

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6034435号
(P6034435)

(45) 発行日 平成28年11月30日 (2016.11.30)

(24) 登録日 平成28年11月4日 (2016.11.4)

(51) Int.Cl.		F I			
C O 7 K 16/28	(2006.01)	C O 7 K	16/28	Z N A	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A	
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08		

請求項の数 11 外国語出願 (全 205 頁)

(21) 出願番号	特願2015-76148 (P2015-76148)	(73) 特許権者	505166225
(22) 出願日	平成27年4月2日 (2015.4.2)		アブリンクス エン. ヴェー.
(62) 分割の表示	特願2011-541503 (P2011-541503) の分割		ベルギー, ベー-9052 ヘントーツヴ ィナールデ, テヒノロジーパルク 21
原出願日	平成21年12月21日 (2009.12.21)	(74) 代理人	110001508
(65) 公開番号	特開2015-155429 (P2015-155429A)		特許業務法人 津国
(43) 公開日	平成27年8月27日 (2015.8.27)	(72) 発明者	ラーエマンス, トーン
審査請求日	平成27年4月30日 (2015.4.30)		ベルギー, ベー-1653 ドウォルフ, クラウウェンベルグ 35
(31) 優先権主張番号	61/203, 188	(72) 発明者	ストルテレルス, カテリネ
(32) 優先日	平成20年12月19日 (2008.12.19)		ベルギー, ベー-9000 ガント, クー プレ リンクス 73
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	ノルテ, フリードリッヒ
			ドイツ, 22767 ハンブルク, パウル ゼンブラッツ 11

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫グロブリン配列を生成する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

P2X7と特異的に結合できるナノボディであって、
該ナノボディは、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）とからなり、
該相補性決定領域は、

CDR1が配列番号233、CDR2が配列番号397、CDR3が配列番号561と、
CDR1が配列番号244、CDR2が配列番号408、CDR3が配列番号572と、
CDR1が配列番号245、CDR2が配列番号409、CDR3が配列番号573と、
CDR1が配列番号254、CDR2が配列番号418、CDR3が配列番号582と、
CDR1が配列番号255、CDR2が配列番号419、CDR3が配列番号583と、
CDR1が配列番号263、CDR2が配列番号427、CDR3が配列番号591と、
CDR1が配列番号274、CDR2が配列番号438、CDR3が配列番号602と、
CDR1が配列番号276、CDR2が配列番号440、CDR3が配列番号604と、
CDR1が配列番号279、CDR2が配列番号443、CDR3が配列番号607と、
CDR1が配列番号281、CDR2が配列番号445、CDR3が配列番号609とからなる群から選択される、
ナノボディ。

【請求項2】

請求項1記載のナノボディであって、

該ナノボディは、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）とからなり、

該相補性決定領域は、

CDR1が配列番号279、CDR2が配列番号443、CDR3が配列番号607と、
CDR1が配列番号274、CDR2が配列番号438、CDR3が配列番号602と、
CDR1が配列番号233、CDR2が配列番号397、CDR3が配列番号561と
 かなる群から選択される、

請求項1記載のナノボディ。

【請求項3】

請求項1又は2記載のナノボディであって、

該ナノボディは、P2X7と特異的に結合でき、

該ナノボディは、配列番号732、743、744、753、754、762、773、
775、778及び780の少なくとも1つのナノボディと、少なくとも90%のアミノ酸同一性を有する、

請求項1又は2記載のナノボディ。

【請求項4】

請求項1又は2記載のナノボディであって、

該ナノボディはP2X7と特異的に結合でき、

該ナノボディは、配列番号732、773及び778の少なくとも1つのナノボディと
、少なくとも90%のアミノ酸同一性を有する、

請求項1又は2記載のナノボディ。

【請求項5】

請求項1記載のナノボディであって、

カバットナンバリングによる11位、37位、44位、45位、47位、83位、84位、
 103位、104位及び108位のアミノ酸残基の1つ又は複数が表B-2で言及される特徴的な残基から選択される、

請求項1記載のナノボディ。

【請求項6】

請求項3記載のナノボディであって、

前記ナノボディは、

配列番号732、743、744、753、754、762、773、775、778及
び780からなる群から選択される、

P2X7と特異的に結合できる、請求項4記載のナノボディ。

【請求項7】

配列番号732、773及び778からなる群から選択される、

P2X7と特異的に結合できる請求項4記載のナノボディ。

【請求項8】

請求項1ないし7のいずれか記載のナノボディを含む、ポリペプチド。

【請求項9】

請求項1ないし7のいずれか記載のナノボディの少なくとも2つを含むポリペプチド。

【請求項10】

配列番号789～791の1個以上と少なくとも90%のアミノ酸同一性を有する、請求項9記載のポリペプチド。

【請求項11】

配列番号790、789及び791からなる群から選択される、請求項8ないし10のいずれか記載のポリペプチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞関連抗原、より具体的には膜に固定された抗原に対する免疫グロブリン

10

20

30

40

50

配列を生成する方法に関する。本発明は、本発明の方法により取得可能な免疫グロブリン配列も提供する。具体的には本発明は、DNAワクチン接種の使用による免疫グロブリン配列の生成に関する。より具体的には本発明は、DNAワクチン接種による、好ましくは細胞関連抗原、特にGPCR及びイオンチャネルを含む多重膜貫通ドメインを有する抗原に指向性を有する免疫グロブリン配列のラクダ科動物における生成に関する。さらには本発明は、細胞関連抗原、より具体的には例えばGPCR及びイオンチャネル等の膜に固定された抗原、より好ましくはイオンチャネルに対する上記免疫グロブリン配列に関する。

【0002】

細胞関連抗原、より具体的には単一又は複数の膜貫通ドメインを有する細胞関連抗原は、その未変性の(native)立体構造において精製するのが困難である。in vivoでの標的の機能を変えることができる未変性エピトープに対する抗体(又はナノボディ等の抗体断片)を同定するためには、ラクダ科動物に標的抗原をその未変性の立体構造で投与することが極めて重要である(非特許文献1)。これらの細胞関連抗原の精製された未変性タンパク質がない場合、ほとんどの適用される免疫付与戦略は、選択した抗原を機能的に発現する全細胞の一定間隔での反復注射からなる。かかる免疫付与戦略が首尾よく実行されている(すなわちin vivoで成熟した中和ナノボディの同定をもたらす)標的の例は特許文献1及び特許文献2)に記載されている。しかしながら、標的発現細胞の反復ブースター(boosters)注射では多くの場合、特に標的の発現レベルが低く宿主細胞バックグラウンドが高度に免疫原性である場合には、標的の特異的な免疫応答は弱くなるか又は検出不能となる。ラマに対する免疫原性が低いラクダ科動物起源の細胞株を使用することにより、標的に対する体液性応答にさらに焦点を当てることができる。それにもかかわらず(擬似(quasi))自己表面マーカーの反復注射であっても、ラクダ科動物の細胞株の表面マーカーに対する応答が起こる。

【0003】

GPCR、イオンチャネル又は任意の他のタイプの多重貫通細胞表面マーカーに対する(中和)選択的抗体の同定は、i)ほとんどの場合で、未変性タンパク質は免疫付与又はその後の抗体同定に利用可能ではなく、ii)多重貫通因子(multispanners)が多くの場合、低い免疫原性を示し(細胞外表面に曝されるアミノ酸残基の数がほとんどの単一の膜貫通受容体に比べて限定されるため)、iii)多重貫通表面分子が多くの場合、低い密度で発現するため、困難である(非特許文献2)。

【背景技術】

【0004】

免疫グロブリン配列、例えばそれらに由来する抗体及び抗原結合断片は、調査及び治療用途においてそれぞれの抗原を特異的に標的化するのに広く用いられている。通常、抗体の生成は、実験動物の免疫付与、ハイブリドーマを作出するための抗体産生細胞の融合、及び所望の特異性に関するスクリーニングを含む。代替的に、抗体をナイーブ(naive)ライブラリ又は合成ライブラリのスクリーニングにより、例えばファージディスプレイにより生成することができる。

【0005】

免疫グロブリン配列、例えばナノボディの生成は、様々な刊行物において広範に説明されており、その中でも特許文献3、非特許文献3及び非特許文献4を例として挙げることができる。これらの方法では、上記標的抗原に対する免疫応答を誘導するためにラクダ科動物に標的抗原を免疫付与する。標的抗原と結合するナノボディに関して、上記免疫付与により得られるナノボディのレパートリーをさらにスクリーニングする。

【0006】

これらの例では、抗体の生成には、免疫付与及び/又はスクリーニングのために精製抗原が必要となる。抗原を天然の供給源から、又は組換え体産生の過程で精製することができる。

【0007】

有望な治療標的の重要なクラスは、細胞関連抗原、例えば膜貫通抗原、特に多重膜貫通

10

20

30

40

50

ドメインを有する膜貫通抗原である。しかしながら細胞関連抗原、特に膜結合抗原は、細胞膜内に包埋されているか又は細胞膜に固定されているため、その天然の立体構造において得るのが困難である。しかしながら、*in vivo*で存在する、その天然の立体構造で存在するエピトープ、すなわち立体構造エピトープに対する免疫グロブリン配列を得るためには、正しい立体構造で標的抗原を免疫付与することが極めて重要である。かかる立体構造エピトープは、薬学的に活性のある免疫グロブリン配列を作出するのに最も重要である。例えば、イオンチャネルの孔領域と特異的に相互作用する免疫グロブリン配列はその伝導性に影響を与え、それにより薬理学的効果がもたらされる。

【0008】

免疫付与及び/又は免疫グロブリン配列に関するスクリーニングを、かかる抗原のペプチド断片を用いて行うことができる。しかしながら、かかるアプローチは、短い合成ペプチドでは立体構造依存性エピトープを再産生することができないため、かかるエピトープに対する抗体をもたらしなさい。

10

【0009】

そのため、これらの細胞関連抗原に関して、抗原を保有する全細胞による免疫付与、及びその後の細胞関連抗原と結合するナノボディに関するこのように誘導されたナノボディのレパートリーのスクリーニングは、任意のものである（例えば特許文献1、特許文献2、特許文献4、特許文献5、特許文献6で行われたように）。しかしながら、かかる細胞が多く抗原を発現し、これにより主として対象ではない抗原に対する抗体応答が生じる。したがって、このアプローチにより獲得可能な抗体応答は、低い特異性、特に生成する全ての抗体中における対象となる抗体の発生頻度が非常に低いことを特徴とする。そのためこのアプローチは、対象となる標的抗原に対する抗体の効率的な生成を妨げる。

20

【0010】

したがって従来技術では、立体構造エピトープ、特に膜関連抗原の立体構造エピトープに対する好適な幅の特異的な抗体応答を生じる満足のいく方法は提示されていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

【特許文献1】国際公開第05/044858号

【特許文献2】国際公開第07/042289号

【特許文献3】国際公開第94/04678号

【特許文献4】国際公開第2008/074839号

【特許文献5】国際公開第2009/068625号

【特許文献6】国際公開第2009/138519号

【非特許文献】

【0012】

【非特許文献1】Dormitz et al. (2008). Trends in Biotechnology 26: 659-667

【非特許文献2】Michel et al. (2009). Naunyn-Schmied Archives Pharmacology 379: 385-388

【非特許文献3】Hamers-Casterman et al. 1993

【非特許文献4】Muyldermans et al. 2001

30

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

本発明の目的は、当該技術分野のこれらの欠点を克服することである。特に本発明の目的は、立体構造エピトープを示す細胞関連抗原のような複雑な抗原に対する免疫グロブリン配列を作出する方法を提供することである。

【0014】

上述の課題が本発明により克服される。遺伝子ワクチン接種が、その天然の立体構造の立体構造エピトープに対して、すなわち細胞関連抗原に対して良好な特異性及び許容可能

50

な幅の抗体応答をもたらす得ることが見出されている。

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明は以下のことに関する：

細胞関連抗原と結合することができる及び／又はこれに対する親和性を有する免疫グロブリン配列を生成する方法であって、

a) 非ヒト動物に、上記細胞関連抗原、又は上記細胞関連抗原のドメイン若しくは特定部分をコードする核酸を遺伝子ワクチン接種する工程、並びに

b) 任意で、細胞関連抗原を発現する天然細胞若しくはトランスフェクト細胞を含む細胞、細胞由来の膜抽出物、豊富な抗原を内包する小胞若しくは任意の他の膜誘導体、リポソーム、又は細胞関連抗原を発現するウイルス粒子から選択される天然の立体構造で上記抗原を動物に追加免疫する (boosting: ブーストする) 工程、

c) 上記細胞関連抗原と結合することができる及び／又はこれに対する親和性を有する免疫グロブリン配列に関して、上記非ヒト動物に由来する免疫グロブリン配列のセット、コレクション又はライブラリをスクリーニングする工程、

を含む、方法。本発明の特定の実施の形態では、上記細胞関連抗原は、膜貫通抗原、多重貫通ドメインを有する膜貫通抗原、例えばGPCR又はイオンチャネルから選択される。本発明によれば、上記非ヒト動物は、脊椎動物、サメ、哺乳動物、トカゲ、ラクダ科動物、ラマ、好ましくはラクダ科動物及びラマから選択され得る。

【0016】

本発明の1つの実施の形態において、免疫グロブリン配列は、軽鎖可変ドメイン配列 (例えばV_L配列)、又は重鎖可変ドメイン配列 (例えばV_H配列) であり、より具体的には免疫グロブリン配列は、従来の四本鎖抗体に由来する重鎖可変ドメイン配列、又は重鎖抗体に由来する重鎖可変ドメイン配列であり得る。

【0017】

本発明によれば、免疫グロブリン配列は、ドメイン抗体 (又はドメイン抗体としての使用に好適な免疫グロブリン配列)、単一ドメイン抗体 (又は単一ドメイン抗体としての使用に好適な免疫グロブリン配列)、「dAb」 (又はdAbとしての使用に好適な免疫グロブリン配列)、又はナノボディ (V_HH配列を含むが、これに限定されない) であってもよく、好ましくはナノボディである。

【0018】

本発明によれば、ワクチン接種を、無針ジェット注射により、バリスティック法 (ballistic method) により、タトゥーのような針による注射 (needle-mediated injections) により、パッチによる皮膚上へのDNAの局所適用により、又は任意のこれらの投与方法、その後のin vivoエレクトロポレーションにより行うことができ、さらにDNAの皮内投与、筋肉内投与又は皮下投与により行われるワクチン接種を含む。

【0019】

免疫グロブリン配列のセット、コレクション又はライブラリを、上記非ヒト哺乳動物の血液から得ることができる。

【0020】

本発明では、上記細胞関連抗原を、その未変性の立体構造の抗原の発現を可能にする任意の細胞バックグラウンドで発現させることができる。かかる細胞バックグラウンドの例は、Cho、Cos7、HeK293、又はラクダ科動物起源の細胞である。好ましくは、上記細胞関連抗原は、CXCR7、CXCR4及びP2X7から選択される抗原を含むが、これらに限定されない膜貫通抗原である。

【0021】

免疫グロブリン配列のセット、コレクション又はライブラリを細胞又はウイルスのセット、コレクション又はサンプルで発現させることができ、細胞又はウイルスの上記セット、コレクション又はサンプルを上記細胞関連抗原と結合することができる及び／又はこれに対する親和性を有する免疫グロブリン配列を発現する細胞又はウイルスに関してスクリ

10

20

30

40

50

ーニングし、より具体的には上記細胞関連抗原と結合することができる及び／又はこれに対する親和性を有する免疫グロブリン配列をコードする核酸配列を細胞又はウイルスから精製及び／又は単離した後、上記免疫グロブリン配列を発現させることができる。

【 0 0 2 2 】

本発明によれば、免疫グロブリン配列のセット、コレクション又はライブラリを核酸配列のセット、コレクション又はライブラリによりコードすることができ、核酸配列の上記セット、コレクション又はライブラリを上記細胞関連抗原と結合することができる及び／又はこれに対する親和性を有する免疫グロブリン配列をコードする核酸配列に関してスクリーニングし、より具体的には上記細胞関連抗原と結合することができる及び／又はこれに対する親和性を有する免疫グロブリン配列をコードする核酸配列を精製及び／又は単離

10

【 0 0 2 3 】

本発明によれば、上記細胞関連抗原と結合することができる及び／又はこれに対する親和性を有する免疫グロブリン配列を、精製及び／又は単離することができる。

【 0 0 2 4 】

本発明は、本明細書に記載の方法により取得可能な免疫グロブリン、及び上記免疫グロブリン配列を含む組成物に、より具体的にはイオンチャンネル及びG P C Rに指向性を有する(本明細書で規定のように)免疫グロブリン配列にも関する。

【 0 0 2 5 】

特に本発明は、1つ又は複数のこのような免疫グロブリン配列を含むか又はこれから本質的になる、イオンチャンネルに指向性を有する(本明細書で規定のように)免疫グロブリン配列に、並びに化合物又は構築物、特にタンパク質及びポリペプチド(それぞれ、本明細書で「本発明の免疫グロブリン配列」、「本発明の化合物」及び「本発明のポリペプチド」とも称される)に関する。本発明は、このような免疫グロブリン配列及びポリペプチドをコードする核酸(本明細書で「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；このような免疫グロブリン配列及びポリペプチドを調製する方法に；このような免疫グロブリン配列若しくはポリペプチドを発現する又は発現することが可能である宿主細胞に；このような免疫グロブリン配列、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；並びに特に予防目的、治療目的又は診断目的、例えば本明細書で言及される予防目的、治療目的又は診断目的のための、このような免疫グロブリン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。

20

30

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 6 】

【 図 1 . 1 A 】 P i g J e t (パネル B) 又はタトゥー法 (パネル C) による遺伝子ワクチン接種後のラマにおける体液性免疫応答の動態。血清は 4 0 0 倍希釈で試験した。矢印はジェット免疫付与の瞬間を示し、タトゥー短間隔計画を星印によって示す。

【 図 1 . 1 B 】 P i g J e t (パネル B) 又はタトゥー法 (パネル C) による遺伝子ワクチン接種後のラマにおける体液性免疫応答の動態。血清は 4 0 0 倍希釈で試験した。矢印はジェット免疫付与の瞬間を示し、タトゥー短間隔計画を星印によって示す。

40

【 図 1 . 1 C 】 P i g J e t (パネル B) 又はタトゥー法 (パネル C) による遺伝子ワクチン接種後のラマにおける体液性免疫応答の動態。血清は 4 0 0 倍希釈で試験した。矢印はジェット免疫付与の瞬間を示し、タトゥー短間隔計画を星印によって示す。

【 図 1 . 2 】 単回 H B s A g タンパク質追加免疫後に D N A ワクチン接種したラマにおいて観察された強い二次血清応答。

【 図 1 . 3 】 タンパク質免疫付与 (ラマ 3 2 及びラマ 3 3) に対する、「 D N A 」初回刺激 - 「タンパク質」追加免疫プロトコル (ラマ 1 2 4 、 ラマ 1 6 0 、 ラマ 1 1 7 、 ラマ 2 0 3) によって得られた体液性免疫応答。

【 図 1 . 4 】 H B s A g (ラマ 1 2 4) に対する重鎖抗体 (I g G 2 及び I g G 3) 媒介性抗体応答。

50

【図2.1】pVAX-hCXCR4トランスフェクション後のHEK293細胞、及びpcDNA3.1-hCXCR4トランスフェクション後のラクダ科動物細胞のCXCR4特異的染色。

【図2.2A】遺伝子免疫付与によるラマにおけるCXCR4特異的血清変換。パネルA：「DNA」初回刺激-「細胞」追加免疫プロトコル；パネルB：「細胞」追加免疫プロトコルのみ。

【図2.2B】遺伝子免疫付与によるラマにおけるCXCR4特異的血清変換。パネルA：「DNA」初回刺激-「細胞」追加免疫プロトコル；パネルB：「細胞」追加免疫プロトコルのみ。

【図2.3】「DNA」レパートリー、「PB」レパートリー又は「細胞」レパートリーからのhCXCR4特異的ナノボディ発見効率（ライブラリの数）。

【図2.4】遺伝子免疫付与（DNA）及び単回細胞追加免疫（PB）後に得られた相補的な標的特異的ナノボディレパートリー。レパートリー特異的ナノボディファミリーの数が示される。

【図2.5A】遺伝子免疫付与の後（「DNA」）、続く単回細胞追加免疫の後（「PB」）又は完全細胞免疫付与の後（「細胞」）に同定された、一次スクリーニング後のCXCR4特異的ナノボディレパートリーのFACS（パネルA）又はELISA（パネルB）によって求められた平均結合効力（個々のナノボディの数）。

【図2.5B】遺伝子免疫付与の後（「DNA」）、続く単回細胞追加免疫の後（「PB」）又は完全細胞免疫付与の後（「細胞」）に同定された、一次スクリーニング後のCXCR4特異的ナノボディレパートリーのFACS（パネルA）又はELISA（パネルB）によって求められた平均結合効力（個々のナノボディの数）。

【図3.1】遺伝子免疫付与によるラマにおけるmP2X7特異的血清変換。

【図3.2】ヒトmP2X7及びマウスmP2X7の配列アライメント。

【図3.3】遺伝子カクテル免疫付与によるラマにおけるmP2X7特異的血清変換。

【図3.4A】予め吸着させた免疫血清は遺伝子免疫付与後にmP2X7特異的重鎖抗体を含有する。パネルA：抗ラマIgG-1；パネルB：抗ラマIgG-2/3。

【図3.4B】予め吸着させた免疫血清は遺伝子免疫付与後にmP2X7特異的重鎖抗体を含有する。パネルA：抗ラマIgG-1；パネルB：抗ラマIgG-2/3。

【図3.5】「DNA」レパートリー、「PB」レパートリー又は「細胞」レパートリーからのmP2X7特異的ナノボディ発見効率（ライブラリの数）。

【図3.6】mP2X7に対する一次スクリーニング後に同定されたナノボディの配列多様性。DNA：DNA免疫付与；PB：DNA免疫付与、その後ポスト追加免疫（post boost：ポストブースト）。

【図3.7】mP2X7発現HeK293細胞及び対照のWT HeK293細胞との結合について抗Myc抗体とのブレインキューベーションを行った、及び行っていないクローン2C4及びクローン5A1のペリプラズム抽出物の代表例。

【図3.8】mP2X7-Cho細胞との結合についての、24個の異なるファミリーに由来するナノボディの滴定曲線。

【図3.9】mP2X7を発現するYac-1細胞に対するナノボディによるリガンド誘導性CD62Lシェディング（shedding）の用量依存的阻害。

【図3.10A】固定濃度のナノボディ（2µM）でのmP2X7媒介性CD62L細胞外ドメインシェディングにおけるヌクレオチドの滴定。パネルA/パネルB：ナノボディ14D5、13G9、7H6、13B5、ナノボディなし（no nb）、Art2.2ナノボディ；パネルC/パネルD：4B4、7D6、13A7、8G11、8F5、8G12、ナノボディなし、無関連ナノボディ、Art2.2ナノボディ。

【図3.10C】固定濃度のナノボディ（2µM）でのmP2X7媒介性CD62L細胞外ドメインシェディングにおけるヌクレオチドの滴定。パネルA/パネルB：ナノボディ14D5、13G9、7H6、13B5、ナノボディなし（no nb）、Art2.2ナノボディ；パネルC/パネルD：4B4、7D6、13A7、8G11、8F5、8G12

10

20

30

40

50

、ナノボディなし、無関連ナノボディ、Art 2.2 ナノボディ。

【図3.11A】13A7(細胞)、8G11(PB)及び14D5(DNA)の二価ナノボディは、mP2X7機能の遮断又は増強において効力の増強を示す。パネルA/パネルB:ナノボディ又はナノボディ構築物:8G11、13A7-35GS-13A7、13A7、8G11-35GS-8G11、無関連ナノボディ;パネルC/パネルD:ナノボディ又はナノボディ構築物:14D5、14D5-35GS-14D5、無関連ナノボディ。

【図3.11C】13A7(細胞)、8G11(PB)及び14D5(DNA)の二価ナノボディは、mP2X7機能の遮断又は増強において効力の増強を示す。パネルA/パネルB:ナノボディ又はナノボディ構築物:8G11、13A7-35GS-13A7、13A7、8G11-35GS-8G11、無関連ナノボディ;パネルC/パネルD:ナノボディ又はナノボディ構築物:14D5、14D5-35GS-14D5、無関連ナノボディ。

10

【図3.12】遺伝子免疫付与の後(「DNA」)、続く単回細胞追加免疫の後(「PB」)又は完全細胞免疫付与の後(「細胞」)に同定された、mP2X7特異的ナノボディレパートリーのELISAにより求められた平均結合効力(特有のナノボディの数)。

【図3.13A】ヒト生殖細胞系列配列VH3-23/JH5に対する、84個の非冗長mP2X7選択性ナノボディの配列アライメント。

【図3.13B】ヒト生殖細胞系列配列VH3-23/JH5に対する、84個の非冗長mP2X7選択性ナノボディの配列アライメント。

20

【図4.1】遺伝子銃遺伝子免疫付与によるラマにおけるCXCR7特異的血清変換。白色又は黒色のバーは、CXCR7トランスフェクト又は非トランスフェクトHEK293WT細胞に対して得られたMCF値を表す。

【図4.2】「DNA」レパートリー、「PB」レパートリー又は「細胞」レパートリーからのCXCR7特異的ナノボディ発見効率(ライブラリの数)。

【図4.3】遺伝子免疫付与(DNA)及び単回細胞追加免疫(PB)後に得られた相補的な標的特異的ナノボディレパートリー。レパートリー特異的ナノボディファミリーの数が示される。

【発明を実施するための形態】

【0027】

本発明は、添付の特許請求の範囲の主題を包含するが、これに限定されない。

30

【0028】

A) 定義

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" (2nd.Ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、F.Ausubel et al, eds., "Current protocols in molecular biology", Green Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)、Lewin, "Genes II", John Wiley & Sons, New York, N.Y., (1985)、Old et al., "Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering", 2nd edition, University of California Press, Berkeley, CA (1981)、Roitt et al., "Immunology" (6th. Ed.), Mosby/Elsevier, Edinburgh (2001)、Roitt et al., Roitt's Essential Immunology, 10th Ed. Blackwell Publishing, UK (2001)、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包括的な背景技術を参照する。

40

【0029】

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を表すのに使用されるのか又は通常の本鎖抗体を表すのに使用されるかに関係なく、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_HHドメイン又はV_H/V_Lドメイン等の抗原結合ドメイン又は断片を含

50

む)の両方を含む一般的な用語として使用される。「抗原結合分子」又は「抗原結合タンパク質」という用語は、免疫グロブリン配列と区別なく使用され、ナノボディを含む。

【0030】

本発明の一実施形態では、免疫グロブリン配列は、軽鎖可変ドメイン配列(例えば V_L 配列)、又は重鎖可変ドメイン配列(例えば V_H 配列)であり、より具体的には免疫グロブリン配列は、通常の四本鎖抗体に由来する重鎖可変ドメイン配列、又は重鎖抗体に由来する重鎖可変ドメイン配列であり得る。

【0031】

本発明によれば、免疫グロブリン配列は、ドメイン抗体(又はドメイン抗体としての使用に好適な免疫グロブリン配列)、単一ドメイン抗体(又は単一ドメイン抗体としての使用に好適な免疫グロブリン配列)、「dAb」(又はdAbとしての使用に好適な免疫グロブリン配列)、又はナノボディ(V_{HH} 配列を含むが、これに限定されない)であってもよく、好ましくはナノボディである。

10

【0032】

本発明で与えられる免疫グロブリン配列は、(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(本明細書で規定のように)本発明のタンパク質若しくはポリペプチド(1つ又は複数の本発明の免疫グロブリン配列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免疫グロブリン配列(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。例えば、これに限定されないが、1つ又は複数の本発明の免疫グロブリン配列は、全て本明細書に記載される一価、多価、又は多重特異性の本発明のポリペプチドをそれぞれ提供するように、このようなタンパク質又はポリペプチド(任意で(すなわち細胞関連抗原以外の1つ又は複数の他の標的に対する)結合単位としての役割を果たし得る1つ又は複数のさらなる免疫グロブリン配列を含有し得る)における結合単位として使用してもよい。このようなタンパク質又はポリペプチドは、(本明細書に規定のように)本質的に単離形態でもあり得る。

20

【0033】

本発明は、マウス、ラット、ウサギ、ロバ、ヒト及びラクダ科動物の免疫グロブリン配列を含む異なる起源の免疫グロブリン配列を含む。本発明は、完全にヒトの、ヒト化した、又はキメラの免疫グロブリン配列も含む。例えば本発明は、ラクダ科動物の免疫グロブリン配列、及びヒト化したラクダ科動物の免疫グロブリン配列、又はラクダ化ドメイン抗体、例えばWard et al(例えば特許文献3及びDavies and Riechmann(1994 and 1996)を参照されたい)により記載されたようなラクダ化dAbを含む。さらに本発明は、例えば多価及び/又は多重特異性の構築物を形成する融合免疫グロブリン配列(1つ又は複数の V_{HH} ドメインを含有する多価及び多重特異性のポリペプチド、並びにそれらの調製物に関しては、Conrath et al., J. Biol. Chem., Vol. 276, 10, 7346-7350, 2001、並びに例えば国際公開第96/34103号及び国際公開第99/23221号も参照する)、及び本発明の免疫グロブリン配列から誘導される、タグ又は他の機能的部分、例えばトキシン、標識、放射性化学物質等を含む免疫グロブリン配列を含む。

30

【0034】

免疫グロブリン配列及び免疫グロブリン配列、特にナノボディの構造は、これらに限定されないが、4つのフレームワーク領域すなわち「FR」(当該技術分野及び本明細書中でそれぞれ、「フレームワーク領域1」すなわち「FR1」、「フレームワーク領域2」すなわち「FR2」、「フレームワーク領域3」すなわち「FR3」及び「フレームワーク領域4」すなわち「FR4」と称される)から構成されることができ、このフレームワーク領域の間には、3つの相補性決定領域すなわち「CDR」(当該技術分野でそれぞれ、「相補性決定領域1」すなわち「CDR1」、「相補性決定領域2」すなわち「CDR2」及び「相補性決定領域3」すなわち「CDR3」と称される)が挿入される。

40

【0035】

50

ナノボディにおけるアミノ酸残基の総数は、110～120の範囲内であってもよく、好ましくは112～115であり、及び最も好ましくは113である。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たように）は、このような部分、断片、類似体又は誘導体が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/又はサイズに関して特に限定されないことに留意すべきである。

【0036】

本明細書で使用される場合、「免疫グロブリン配列」という用語は、免疫グロブリン分子をコードする核酸配列及び免疫グロブリンポリペプチド自体の両方を表す。任意のより限定的な意味は特定の文脈から明らかになる。

10

【0037】

これらの分子は全て、「本発明のポリペプチド」とも称され、これは本発明の「免疫グロブリン配列」と同義である。

【0038】

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_{HH} 配列」又は「タンパク質配列」のような用語における）「配列」という用語は本明細書で使用される場合、文脈からより限定的な解釈が要求されない限り、関連の免疫グロブリン配列及びこれをコードする核酸配列又はヌクレオチド配列の両方を含むことが一般的に理解されるものとする。

【0039】

以下において、本発明の「核酸分子」に対する言及は、特定の文脈から明らかなように、遺伝子ワクチン接種のための核酸、又は本発明の免疫グロブリン配列をコードする核酸、又はその両方のいずれかに関し得る。

20

【0040】

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、技法及び操作を実施することができ、当業者にとって明らかなそれ自体が既知の方法で実施している。同様に例えば、標準的なハンドブック、及び本明細書で言及される包括的な背景技術、並びに本明細書で引用されるさらなる参考文献、並びに例えば以下のレビュー、Pres ta, Adv. Drug Deliv. Rev. 2006, 58 (5-6): 640-56、Levin and Weiss, Mol. Biosyst. 2006, 2 (1): 49-57、Irving et al., J. Immunol. Methods, 2001, 248 (1-2), 31-45、Schmitzet al., Placenta, 2000, 21 Suppl. A, S106-12、Gonzaleset al., Tumour Biol., 2005, 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。

30

【0041】

本発明は、本明細書で規定のように抗原と結合することができる及び/又はこれに対する親和性を有する免疫グロブリン配列に関する。本発明との関連では、或る特定の抗原「と結合する及び/又はこれに対する親和性を有する」とは例えば抗体及びそれらのそれぞれの抗原との関連で理解されるような当該技術分野での通常の意味を有する。

【0042】

本発明の特定の実施形態では、「と結合する及び/又はこれに対する親和性を有する」という用語は、免疫グロブリン配列が抗原と特異的に相互作用することを意味し、該用語は上記抗原「に対する」免疫グロブリン配列と区別なく使用される。

40

【0043】

「特異性」という用語は、特定の免疫グロブリン配列、抗原結合分子又は抗原結合タンパク質（例えば本発明のナノボディ又はポリペプチド）が結合することができる、様々なタイプ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、抗原決定基と抗原結合タンパク質上の抗原結合部位との間の結合力の評価基準であり、 K_D 値が小さくなれば、抗原決定基と

50

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評価基準である。結合活性は、抗原決定基と抗原結合分子上の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。

【0044】

典型的に、本発明の免疫グロブリン配列（例えば本発明の免疫グロブリン配列、ナノボディ及び/又はポリペプチド）が、 10^{-5} モル/L～ 10^{-12} モル/L以下、及び好ましくは 10^{-7} モル/L～ 10^{-12} モル/L以下、及びより好ましくは 10^{-8} モル/L～ 10^{-12} モル/Lの解離定数（ K_D ）で（すなわち 10^5 L/モル～ 10^{12} L/モル以上、及び好ましくは 10^7 L/モル～ 10^{12} L/モル以上、及びより好ましくは 10^8 L/モル～ 10^{12} L/モルの結合定数（ K_A ）で）それらの抗原と結合する、並びに/又は

10^2 M⁻¹ s⁻¹～約 10^7 M⁻¹ s⁻¹、好ましくは 10^3 M⁻¹ s⁻¹～ 10^7 M⁻¹ s⁻¹、より好ましくは 10^4 M⁻¹ s⁻¹～ 10^7 M⁻¹ s⁻¹（ 10^5 M⁻¹ s⁻¹～ 10^7 M⁻¹ s⁻¹等）の k_{on} 速度で本明細書に規定の細胞関連抗原と結合する、並びに/又は

1 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^{-2} s⁻¹～ 10^{-6} s⁻¹、より好ましくは 10^{-3} s⁻¹～ 10^{-6} s⁻¹（ 10^{-4} s⁻¹～ 10^{-6} s⁻¹等）の k_{off} 速度で本明細書に規定の細胞関連抗原と結合する。

【0045】

10^{-4} モル/Lより大きい任意の K_D 値（すなわち 10^4 M⁻¹（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。

【0046】

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（500 pM未満等）の親和性で所望の抗原と結合する。

【0047】

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（例えばスキ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。

【0048】

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^{-4} モル/L又は 10^{-3} モル/Lより大きい（例えば 10^{-2} 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。

【0049】

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）⁻¹（又はM⁻¹）である。本明細書では、2つの分子（例えば本発明の免疫グロブリン配列、免疫グロブリン配列、ナノボディ又はポリペプチドと、その目的とする標的との）間の相互作用の安定性は主

10

20

30

40

50

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 値による分子相互作用の強さの特定を、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、 $DG = RT \cdot \ln(K_D)$ (等しくは $DG = -RT \cdot \ln(K_A)$) (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(DG)に関連するので、熱力学的意味でも分子相互作用の強さを特徴付ける。

【0050】

有意(例えば特異的)と見なされる、生物学的相互作用、例えば本発明の免疫グロブリン配列と本明細書に規定の細胞関連抗原との結合に関する K_D は典型的に、 $10^{-10} M$ ($0.1 nM$) $\sim 10^{-5} M$ ($10000 nM$)の範囲内である。相互作用が強くなれば、その K_D は低くなる。

10

【0051】

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^{-1} (s は秒のSI単位表記である)である。結合速度(on-rate) k_{on} の単位は、 $M^{-1} s^{-1}$ である。

【0052】

本発明の免疫グロブリン配列に関して、結合速度は、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ながら $10^2 M^{-1} s^{-1} \sim 約 10^7 M^{-1} s^{-1}$ の間で変化し得る。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。本発明の免疫グロブリン配列の解離速度は、 $10^{-6} s^{-1}$ ($t_{1/2}$ が数日である略不可逆的な複合体) $\sim 1 s^{-1}$ ($t_{1/2} = 0.69 s$)の間で変化し得る。

20

【0053】

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化され、もう1つの分子が、 k_{on} 、 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化分子上を通る)で測定することができる。例えば、既知のピアコアの機器を使用してこれを実施することができる。

30

【0054】

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(artefacts: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ろう。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 を測定することができる。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。

【0055】

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. (J. Immunol. Methods, 77, 305-19, 1985)の2段階ELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)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分子の1つ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。

40

【0056】

しかし、 K_D の正確な測定はかなりの労力を要する可能性があり、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た方法で(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処理されるべきであることに留意すべきである。

【0057】

50

最後に、多くの状況下で経験豊かな科学者は、幾つかの参照分子と比較して結合親和性を決定することが都合がよいと判断することができ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ELISA若しくはFACS（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基若しくはクロモフォア基、若しくは他の化学部分（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ELISA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は固定濃度に維持し、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させる。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、 IC_{50} 値が得られる。参照分子の K_D である K_{Dref} 及び参照分子の総濃度 c_{ref} が既知であれば、以下の式： $K_D = IC_{50} / (1 + c_{ref} / K_{Dref})$ 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。 $c_{ref} \ll K_{Dref}$ の場合、 $K_D = IC_{50}$ であることに留意されたい。 IC_{50} の測定が、比較される結合因子に関して一貫した方法で（例えば c_{ref} を固定して）実施されれば、 IC_{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。

10

【0058】

本発明との関連では、「立体構造依存性エピトープ」又は「立体構造エピトープ」は、抗原の一次配列の単一の連続ストレッチ内にはないアミノ酸を含むエピトープを示す。言い換えると、タンパク質標的の二次構造及び/又は三次構造のために、一次配列において離れた位置にあり得るアミノ酸が互いに近づくことにより、エピトープの形成に参与する。例えば抗原が3つのアミノ酸ループを含む場合、これらのループのそれぞれ1つにおける残基が単一のエピトープの形成に参与し得る。同じことが2つ以上のドメイン又はサブユニットを含む抗原にも当てはまる。この場合、エピトープは異なるドメイン又はサブユニット上のアミノ酸により形成され得る。また適切な条件によるタンパク質の完全な又は部分的な変性、すなわち二次構造及び/又は三次構造の部分的な又は完全な破壊が立体構造エピトープを部分的に又は完全に破壊する。当業者は、立体構造エピトープがタンパク質を変性させることにより破壊される正確な条件はタンパク質の性質及び特定の状況に応じて変わることを理解するだろう。

20

30

【0059】

好ましい実施形態では、本発明は立体構造エピトープに対する免疫グロブリン配列に関する。特に本発明は、好ましくはラクダ科動物の免疫グロブリン配列（ナノボディを含む）であり得る、本明細書で規定のような細胞関連抗原上の立体構造エピトープに対する免疫グロブリン配列に関する。

【0060】

本発明との関連では、「細胞関連抗原」は、細胞の膜（細胞内コンパートメント及びオルガネラの膜を含む）にしっかりと固定される、又は細胞の膜内に位置する抗原を意味し、単一又は複数の膜貫通領域を有する抗原を含む。言い換えると、この用語は、膜依存性の立体構造エピトープを示す抗原を表す。特にこの用語は、本明細書で規定のような立体構造エピトープを有する抗原を表す。この用語は、膜貫通抗原、GPCR又はイオンチャネル等の多重膜貫通ドメインを有する膜貫通抗原を包含する。これらの全ての抗原の中で、当業者には、本発明の好ましい細胞関連抗原を表す、広範な新薬開発のための（druggable）標的抗原が知られている。本発明は特に、立体構造依存性のエピトープが膜での正しい固定及び/又は位置に依存する細胞関連抗原に関する。このため本発明は、このような立体構造依存性のエピトープに対する免疫グロブリン配列を提供する。

40

【0061】

好ましい実施形態では本発明は、1つ又はより好ましくは複数の膜貫通ドメインを有する内在性膜タンパク質である抗原に関する。これらの抗原は細胞の原形質膜、並びに/又は細胞内コンパートメント及びオルガネラの膜に存在するか、又はこれらの膜内で機能す

50

る。多くの膜貫通タンパク質、例えば膜貫通受容体は、互いに機能的に相互作用する、2つ以上のサブユニット又はドメインを含む。

【0062】

内在性膜タンパク質は、3つの異なる部分又はドメイン、すなわち細胞外（又はコンパートメント外）ドメイン、膜貫通ドメイン及び細胞内（又はコンパートメント内）ドメインを含む。複数の膜貫通ドメインを有するタンパク質は典型的に、複数の細胞/コンパートメント外及び細胞/コンパートメント内のドメインも有する。例えば、7回膜貫通受容体は7つの膜貫通ドメインを含む。

【0063】

このため、細胞関連抗原という用語は本明細書で理解される場合、緩くしか結び付かない、すなわち膜にしっかりと固定されない又は膜内に位置しない抗原を排除することが意図される。抗原は膜の中と延びる少なくとも1つのドメイン又は部分を含む場合にしっかりと固定される。

10

【0064】

一実施形態では本発明は、脂質尾部（lipid tail）を介する膜挿入部を有するが、膜貫通ドメインを有しない抗原を排除する。この場合、タンパク質の親水性部分又は親水性ドメインの立体構造は膜環境に依存しない。例えば、適切な立体構造にある、すなわち抗原が脂質尾部を介して膜と結び付く場合にも存在する立体構造エピトープを発現する、脂質尾部を欠いた組換えタンパク質を発現することが考え得る。同様に、緩くしか結び付かない任意の他のタンパク質が特定の実施形態で本発明から排除される。これに関連して「緩く結び付いた」タンパク質は、膜が存在しない場合であっても天然立体構造を示す、すなわち天然立体構造が膜との固定又は膜内での包埋（embedding）に依存しないタンパク質を意味する。さらに特定の実施形態では、本発明はART 2.2を排除する。

20

【0065】

本発明による細胞関連抗原の典型例は、7回膜貫通ドメイン受容体、例えばGタンパク質共役受容体、例えばさらに本明細書に記載されるもの、アドレナリン受容体、嗅覚受容体、受容体チロシンキナーゼ、例えば上皮成長因子受容体、インスリン受容体、線維芽細胞成長因子受容体、高親和性のニューロトロフィン受容体、及びEph受容体、インテグリン、低親和性の神経成長因子受容体、NMDA受容体、幾つかの免疫受容体、例えばT細胞受容体、T細胞受容体及びCD28を含む。さらには、本発明による細胞関連抗原は、イオンチャネル、例えば本明細書にさらに記載されるもの、カルシウムチャネル、ナトリウムチャネル、カリウムチャネル、2Pイオンチャネル、6-TMイオンチャネル、電圧依存性イオンチャネル及び/又はカルシウム活性化カリウムチャネルも含む。

30

【0066】

本明細書で使用される場合、「細胞関連抗原」という用語は、上記細胞関連抗原の任意の部分、断片、サブユニット、又はドメインを含み、またこれを表すことが意図される。細胞関連抗原の任意のサブセクションは、対象となる立体構造エピトープを表す場合、本発明の範囲内にある。例えば対象となるエピトープが受容体の結合部位、又はイオンチャネルの孔に位置する場合、上記エピトープを形成することが可能な細胞関連抗原の任意の断片（複数可）が本発明に含まれる。好ましくは、これらの部分、ドメイン、断片又はサブユニットは、膜依存性の立体構造に関与する細胞関連抗原の部分である。例えばタンパク質が伸長（extended）細胞内ループにより連結した幾つかの膜貫通ドメインを含む場合、細胞外立体構造エピトープに影響することなく、かかるループが一部又は完全に省略されることが想定される。

40

【0067】

特に本発明は、天然立体構造で細胞関連抗原に指向性を有する免疫グロブリン配列に関する。本発明との関連では、「天然立体構造」は、タンパク質がその二次構造及び/又は三次構造、特にその膜依存性の二次構造及び/又は三次構造を示すことを意味する。言い換えると、天然立体構造は、非変性形態のタンパク質を説明し、立体構造エピトープ、特に膜依存性の立体構造エピトープが存在する立体構造を説明する。具体的にタンパク質は

50

、タンパク質が膜に組み込まれ、又は膜にしっかりと結合する場合に存在する立体構造を有する。抗原は、細胞関連抗原を発現する天然細胞若しくはトランスフェクト細胞を含む細胞、細胞由来の膜抽出物、抗原を内包する小胞若しくは任意の他の膜誘導体、リポソーム、又は細胞関連抗原を発現するウイルス粒子に存在する場合、天然立体構造で得ることができる。これらの実施形態のいずれかでは、抗原は好適な手段で濃縮することができる。上記細胞関連抗原を、C h o、C o s 7、H e k 2 9 3、又はラクダ科動物起源の細胞を包含するがこれらに限定されない、未変性又は天然の (native or natural) 立体構造での抗原の発現を可能にする任意の好適な細胞で発現させることができる。

【 0 0 6 8 】

本発明の細胞関連抗原は、好ましくは新薬開発のための膜タンパク質、特に複数の膜貫通ドメインを有する新薬開発のための膜タンパク質である。本発明の一実施形態では、標的はG P C R又はイオンチャネルである。

【 0 0 6 9 】

本発明による細胞関連抗原を表すイオンチャネルの具体的であるが非限定的な例が以下に与えられる。このようなイオンチャネルを特異的に認識する免疫グロブリン配列の治療効果も挙げている。

【 0 0 7 0 】

1 . T w o - P カリウムチャネル (Goldstein et al., Pharmacological Reviews, 57, 4, 527 (2005) を参照されたい)、例えば K_{2 P 1 . 1}、K_{2 P 2 . 1}、K_{2 P 3 . 1}、K_{2 P 3 . 1}、K_{2 P 4 . 1}、K_{2 P 5 . 1}、K_{2 P 6 . 1}、K_{2 P 7 . 1}、K_{2 P 9 . 1}、K_{2 P 1 0 . 1}、K_{2 P 1 2 . 1}、K_{2 P 1 3 . 1}、K_{2 P 1 5 . 1}、K_{2 P 1 6 . 1}、K_{2 P 1 7 . 1} 及び K_{2 P 1 8 . 1} (これらは全て、F L I P R 又はパッチ - クランプ等の電気生理学的アッセイを用いてスクリーニングすることができる)。

2 . C a t S p e r チャネル (Clapham and Garbers, Pharmacological Reviews, 57, 4, 451 (2005) を参照されたい)、例えば C a t S p e r - 1 及び C a t S p e r - 2 (両方とも受精能及び精子の運動性にかかわる)、C a t S p e r - 3 及び C a t S p e r - 4 (これらは全て、F L I P R、パッチ - クランプ、又はカルシウム画像化技法等の電気生理学的アッセイを用いてスクリーニングすることができる)。

3 . 二孔チャネル (Clapham and Garbers, Pharmacological Reviews, 57, 4, 451 (2005) を参照されたい)、例えば T P C 1 及び T P C 2。

4 . 環状ヌクレオチド依存性チャネル (Hofman et al., Pharmacological Reviews, 57, 4, 455 (2005) を参照されたい)、例えば C N G A - 1、C N G A - 2、C N G A - 3、C N G A - 4 A、C N G B 1 及び C N G B 3 (これらはパッチ - クランプ及びカルシウム画像化等の技法を用いてスクリーニングすることができる)。

5 . 過分極活性化環状ヌクレオチド依存性チャネル (Hofman et al., Pharmacological Reviews, 57, 4, 455 (2005) を参照されたい)、例えば H C N 1、H C N 2、H C N 3、H C N 4 (全て心不整脈及び虚血性心疾患のための薬剤開発のための有力な薬理学標的と考えられる) (これらは電圧固定等の技法を用いてスクリーニングすることができる)。

6 . 内向き整流型のカリウムチャネル (Kubo et al., Pharmacological Reviews, 57, 4, 509 (2005) を参照されたい)、例えば K_{i r 1 . 1}、K_{i r 2 . 1}、K_{i r 2 . 2}、K_{i r 2 . 3}、K_{i r 2 . 4}、K_{i r 3 . 1}、K_{i r 3 . 2}、K_{i r 3 . 3}、K_{i r 3 . 4}、K_{i r 3 . 4}、K_{i r 4 . 2}、K_{i r 5 . 1}、K_{i r 6 . 1} (降圧薬及び冠拡張薬に関する標的)、K_{i r 6 . 2} (ペントラミンに関する標的 ; そのサブユニット S U R 1 は糖尿病及び P H H I の治療に関する標的である) 及び K_{i r 7 . 1} (カルシウムチャネルブロッカーの副作用に関する可能性がある部位である) (これらは電圧固定等の技法を用いてスクリーニングすることができる)。

7 . カルシウム活性化カリウムチャネル (Wei et al., Pharmacological Reviews, 57, 4, 463 (2005) を参照されたい)、例えば

K_{C a 1 . 1} - 脳卒中、癲癇、膀胱過反応性 (bladder over-reactivity)、喘息、高血圧、胃の過剰運動性 (gastric hypermotility) 及び精神病の治療に有用であり得るオーブ

10

20

30

40

50

ナー；

K_{Ca}2.1 - 筋緊張性筋ジストロフィー、消化管運動障害、記憶障害、癲癇、ナルコレプシー及びアルコール依存症等の様々な疾患の治療に有用であり得るモジュレータ。K_{Ca}2.2のオープナーは小脳性運動失調症のために提唱されている；

K_{Ca}2.2 - 筋緊張性筋ジストロフィー、消化管運動障害、記憶障害、癲癇、ナルコレプシー及びアルコール依存症等の様々な疾患の治療に有用であり得るモジュレータ。K_{Ca}2.2のオープナーは小脳性運動失調症のために提唱されている；

K_{Ca}2.2 - 筋緊張性筋ジストロフィー、消化管運動障害、記憶障害、癲癇、ナルコレプシー、高血圧及び尿失禁等の様々な疾患の治療に有用であり得るモジュレータ；

K_{Ca}3.1 - 鎌状赤血球貧血、糖尿病の治療に、免疫抑制剤として、EAEに、再狭窄及び血管形成の予防に、脳損傷の治療に、並びに脳浮腫の低減に有用であり得るブロッカー。K_{Ca}3.1のオープナーは嚢胞性線維症及びCOPDの治療のために提唱されている；

並びにK_{Ca}4.1、K_{Ca}4.2及びK_{Ca}5.1（それらは全て、電気生理学的技法又はパッチ-クランプ若しくは電圧固定等の技法を用いてスクリーニングすることができる）。

8. カリウムチャネル (Shieh et al., Pharmacological Reviews, 57, 4, 557 (2005)

及びGutman et al., Pharmacological Reviews, 57, 4, 473 (2005)を参照されたい)

、例えば

電圧依存性カルシウムチャネル、例えばKv1.1、Kv1.2、Kv1.3、Kv1.4、Kv1.5、Kv1.6及びKv1.7；

電圧依存性及びcGMP依存性のカルシウムチャネル、例えばKv1.10；

Kvチャネルの - サブユニット、例えばKv - 1、Kv - 2及びKv - 3；

Shab様チャネル、例えばKv2.1及びKv2.2；

Shaw様チャネル、例えばKv3.1、Kv3.2、Kv3.3及びKv3.4；

Shal様チャネル、例えばKv4.1、Kv4.2、Kv4.3、Kv5.1、Kv6.1、Kv6.2、Kv8.1、Kv9.1、Kv9.2、Kv9.3、KH1及びKH2；

ether-a-go-goチャネル、例えばEAG、HERG、BEC1及びBEC2；

MinK型チャネル、例えばMinK、MiRP1及びMiRP2；

KvLQT型チャネル、例えばKvLQT1、KvLQT2、KvLQT3、KvLQT4、KvLQT5；

内向き整流型カリウムチャネル、例えば上述のもの；

スルホニル尿素受容体、例えばスルホニル尿素受容体1及び2；

大コンダクタンスカルシウム活性化チャネル、例えばS/o及びBK_{Ca}の - サブユニット；

小コンダクタンスカルシウム活性化チャネル、例えばSK1、SK2及びSK3；

中間コンダクタンスカルシウム活性化チャネル、例えばIK_{Ca}1；

二孔カリウムチャネル、例えばTWIK1、TREK、TASK、TASK2、TWIK2、TOSS、TRAAK及びCTBAK1；

（それらは全て、電気生理学的技法又はパッチ-クランプ若しくは電圧固定等の技法を用いてスクリーニングすることができる）。カリウムチャネルは、心疾患（例えば不整脈）、神経疾患、神経筋障害、聴覚及び前庭疾患、腎疾患、アルツハイマー病及び代謝性疾患等の多種多様な疾患及び障害にかかわり、これらの疾患における活性化化合物の標的である。これらについても、Shieh et al.及びGutman et al.（及びそれらで言及されるさらなる従来技術）によるレビュー、並びに本明細書で言及されるさらなる引例を参照する。Shiehのレビューの表3及び表4は、様々なカリウムチャネルの多くの既知のオープナー及びブロッカーのそれぞれ、及びそれらが使用/提唱されている疾患適応症にも言及している。

10

20

30

40

50

9. 電圧依存性カルシウムチャネル (Catterall et al., Pharmacological Reviews, 57, 4, 411 (2005) を参照されたい)、例えば

Ca_v1.2 - Ca²⁺ アнтаゴニストとして有用であるモジュレータ;

Ca_v1.3 - 心拍数を調節するために、抗うつ剤として、及び聴覚障害用の薬剤として提唱されているモジュレータ;

Ca_v2.1 - 炎症性疼痛用の鎮痛剤として提唱されているモジュレータ;

Ca_v2.2 - 炎症性疼痛、術後疼痛、温熱性痛覚過敏、慢性疼痛及び機械的異痛等の疼痛用の鎮痛剤として提唱されているモジュレータ;

Ca_v3.2 - 癲癇、高血圧及び狭心症のための標的として提唱されている;

Ca_v3.3 - 視床振動 (thalamicoscillations) の治療のための標的として提唱されている;

及び Ca_v1.1、Ca_v1.4、Ca_v2.3、Ca_v3.1 (それらは全て、パッチ-クランプ、電圧固定及びカルシウム画像化等の技法を用いてスクリーニングすることができる)。

10. 一過性受容体電位 (TRP) チャネル (Clapham et al., Pharmacological Reviews, 57, 4, 427 (2005) を参照されたい)、例えば

TRPCチャネル、例えば TRPC1、TRPC2、TRPC3、TRPC4、TRPC5、TRPC6 及び TRPC7;

TRPVチャネル、例えば TRPV1、TRPV2、TRPV3、TRPV4、TRPV5 及び TRPV6;

TRPMチャネル、例えば TRPM1、TRPM2、TRPM3、TRPM4、TRPM5、TRPM6、TRPM7 及び TRPM8;

TRPA1;

TRPPチャネル、例えば PKD1、PKD2L1 及び PKD2L2 (これらは多発性嚢胞腎にかかわる);

TRPMLチャネル、例えば ムコリピン1、ムコリピン2 及び ムコリピン3;

(それらは、パッチ-クランプ又はカルシウム画像化等の技法を用いてスクリーニングすることができる)。

11. 電圧依存性ナトリウムチャネル (Catterall et al., Pharmacological Reviews, 57, 4, 397 (2005) を参照されたい)、例えば

Na_v1.1、Na_v1.2 及び Na_v1.3 - 癲癇及び発作の予防及び治療用の薬剤のための標的である;

Na_v1.4 - ミオトニーの治療用の局所麻酔のための標的である;

Na_v1.5 - 抗不整脈薬のための標的である;

Na_v1.6 - 抗癲癇薬及び鎮痛剤のための標的である;

Na_v1.7、Na_v1.8 及び Na_v1.9 - 局所麻酔のための潜在的な標的である;(それらは全て電圧固定又は電圧感受性色素を伴う技法を用いてスクリーニングすることができる)。

【0071】

イオンチャネル、並びにそれらが関連する疾患及び障害が当該技術分野で既知である。例えば以下のレビュー: Goldstein et al., Pharmacological Reviews, 57, 4, 527 (2005); Yu et al., Pharmacological Reviews, 57, 4, 387 (2005); Clapham and Garbers, Pharmacological Reviews, 57, 4, 451 (2005); Hoffmann et al., Pharmacological Reviews, 57, 4, 455 (2005); Kubo et al., Pharmacological Reviews, 57, 4, 509 (2005); Wei et al., Pharmacological Reviews, 57, 4, 463 (2005); Shieh et al., Pharmacological Reviews, 57, 4, 557 (2005); Catterall et al., Pharmacological Reviews, 57, 4, 411 (2005); Gutman et al., Pharmacological Reviews, 57, 4, 473 (2005); Clapham et al., Pharmacological Reviews, 57, 4, 427 (2005); 及び Catterall et al., Pharmacological Reviews, 57, 4, 397 (2005); 並びにこれらのレビュー並びに以下の論文及びレビュー: Chandy et al., Trends in Pharmacological Sciences,

10

20

30

40

50

May 2004, 280-289 ; Takana and Shigenobu, J. Pharmacol. Sci., 99, 214-200 (2005) ; Padinjat and Andrews, Journal of Cell Science, 117, 5707-5709 (2004) ; Amiret al., The Journal of Pain, Vol. 7, No. 5, S1-S29 (2006) ; Devor, The Journal of Pain, Vol. 7, No. 15, S3-S12 (2006) ; Xie et al., Current Drug Discovery, April 2004, 31-33 ; Vianna-Jorge and Suarez-Kurtz, BioDrugs 2004, 18 (5), 329-41 ; Garcia and Kaczorowski, Sci STKE, 2005, 302 ; Gopalakrishnan and Shieh, Expert Opin. Ther. Targets, 2005, 8 (5), 437-58 ; Mannhold, Med. Res. Rev., 2004, 24 (2), 213-66 ; Sabido-David et al., Expert Opin. Investig. Drugs, 2004, 13 (1) 1249-61 ; 及び Christ, Journal of Andrology, Vol. 23, No. 5, S10-S19 (2002) で言及されるさらなる引例を、並びにこれらで言及されたさらなる従来技術 (全て参照により本明細書で引用される) を、並びに本願で言及される以下の表及びさらなる従来技術を参照する。

10

【0072】

これらのレビュー及びこの従来技術から分かるように、イオンチャネルは一般的に、それらを通ずることができるイオンに応じて (すなわちカルシウムチャネル、ナトリウムチャネル又はカリウムチャネル)、それらの組成及び構造に応じて (例えばサブユニット、孔及び膜貫通ドメインの数及び種類に応じて、例えば2Pイオンチャネル、6-TMイオンチャネル等)、及び/又はそれらが活性化される様式に応じて (例えば電圧依存性イオンチャネル又はカルシウム活性化カリウムチャネル) 分類される。

【0073】

イオンチャネルは一般的に、細胞内ループと細胞外ループとの組合せにより連結された、多くの膜貫通ドメインサブユニットを含む。これらについても上記で言及された引例及び従来技術、並びに Benham, Nature Biotechnology, October 2005, 1234-1235、並びに本明細書で言及されるさらなる従来技術を参照する。

20

【0074】

イオンチャネルが膜タンパク質であり、様々な疾患状態と既知の関連があるということにより、イオンチャネルが薬学的化合物及び獣医学的化合物のための (すなわち予防、治療又は診断のための) 魅力的な分子標的となる。また、活性 (アゴニスト、アンタゴニスト、ブロッカー及び/又はオープナーのいずれかとして) 及び/又はイオンチャネル及びそれらの生物学的活性又は生理学的活性に関する選択性に関して潜在的な薬学的化合物又は獣医学的化合物をスクリーニングする方法が従来技術分野で既知である。関与するイオンチャネルに応じた好適な技法の幾つかの非限定的な例としては、パッチ-クランプ、電圧固定、イオン束の測定、FLIPR、カルシウム画像化及び電気生理学的技法等の技法が挙げられる。

30

【0075】

本発明による細胞関連抗原を表すGPCRの具体的であるが、非限定的な例が以下に与えられる。これらのGPCRに指向性を有する本発明の免疫グロブリン配列の幾つかの例示的な治療効果も挙げられている。

【0076】

A群GPCR

- アセチルコリン受容体 (アゴニスト)、
- ムスカリン受容体 (アゴニスト)、
- ムスカリンM1受容体 (アゴニスト)、
- ムスカリンM2受容体 (アゴニスト)、
- ムスカリンM3受容体 (アゴニスト)、
- ムスカリンM4受容体 (アゴニスト)、
- ムスカリンM5受容体 (アゴニスト)、
- ムスカリン受容体 (部分アゴニスト)、
- アドレナリン受容体 (アゴニスト)、
- アドレナリン受容体 (アゴニスト)、
- 1アドレナリン受容体 (アゴニスト)、

40

50

1 A アドレナリン受容体 (アゴニスト)、	
1 B アドレナリン受容体 (アゴニスト)、	
1 D アドレナリン受容体 (アゴニスト)、	
2 アドレナリン受容体 (アゴニスト)、	
2 A アドレナリン受容体 (アゴニスト)、	
2 B アドレナリン受容体 (アゴニスト)、	
2 C アドレナリン受容体 (アゴニスト)、	
2 アドレナリン受容体 (部分アゴニスト)、	
3 アドレナリン受容体 (アゴニスト)、	
アドレナリン受容体 (アゴニスト)、	10
1 アドレナリン受容体 (アゴニスト)、	
2 アドレナリン受容体 (アゴニスト)、	
3 アドレナリン受容体 (アゴニスト)、	
ドーパミン受容体 (アゴニスト)、	
ドーパミン D 5 受容体 (アゴニスト)、	
ドーパミン D 1 受容体 (アゴニスト)、	
ドーパミン D 2 受容体 (アゴニスト)、	
ドーパミン D 3 受容体 (アゴニスト)、	
ドーパミン D 4 受容体 (アゴニスト)、	
ヒスタミン受容体 (アゴニスト)、	20
ヒスタミン H 1 受容体 (アゴニスト)、	
ヒスタミン H 2 受容体 (アゴニスト)、	
ヒスタミン H 3 受容体 (アゴニスト)、	
ヒスタミン H 4 受容体 (アゴニスト)、	
5 - H T G P C R (アゴニスト)、	
5 - H T 1 (アゴニスト)、	
5 - H T 2 (アゴニスト)、	
5 - H T 4 (アゴニスト)、	
5 - H T 5 a (アゴニスト)、	
5 - H T 5 b (アゴニスト)、	30
5 - H T 6 (アゴニスト)、	
5 - H T 7 (アゴニスト)、	
微量アミン関連受容体 (アゴニスト)、	
微量アミン関連受容体 - 1 (アゴニスト)、	
微量アミン関連受容体 - 2 (アゴニスト)、	
微量アミン関連受容体 - 3 (アゴニスト)、	
微量アミン関連受容体 - 4 (アゴニスト)、	
微量アミン関連受容体 - 5 (アゴニスト)、	
微量アミン関連受容体 - 6 (アゴニスト)、	
微量アミン関連受容体 - 7 (アゴニスト)、	40
微量アミン関連受容体 - 8 (アゴニスト)、	
微量アミン関連受容体 - 9 (アゴニスト)、	
アベリン受容体 (アゴニスト)、	
カンナビノイド受容体 (アゴニスト)、	
カンナビノイド C B 1 受容体 (アゴニスト)、	
カンナビノイド C B 2 受容体 (アゴニスト)、	
リゾスフィンゴ脂質受容体 (アゴニスト)、	
スフィンゴシン - 1 - リン酸受容体 - 1 (アゴニスト)、	
リゾホスファチジン酸 - 1 受容体 (アゴニスト)、	
スフィンゴシン - 1 - リン酸受容体 - 3 (アゴニスト)、	50

リゾホスファチジン酸 - 2 受容体 (アゴニスト)、	
スフィンゴシン - 1 - リン酸受容体 - 2 (アゴニスト)、	
スフィンゴシン - 1 - リン酸受容体 - 4 (アゴニスト)、	
リゾホスファチジン酸 - 3 受容体 (アゴニスト)、	
スフィンゴシン - 1 - リン酸受容体 - 5 (アゴニスト)、	
A 群ホルモンタンパク質 G P C R (アゴニスト)、	
F S H (アゴニスト)、	
黄体形成ホルモン受容体 (アゴニスト)、	
T S H (アゴニスト)、	
ロイコトリエン (アゴニスト)、	10
ロイコトリエン B L T 受容体 (アゴニスト)、	
システニルロイコトリエン受容体 (アゴニスト)、	
メラトニン (アゴニスト)、	
メラトニン M T 1 (アゴニスト)、	
メラトニン M T 2 (アゴニスト)、	
メラトニン M T 3 (アゴニスト)、	
A 群ヌクレオチド様 G P C R (アゴニスト)、	
アデノシン受容体 (アゴニスト)、	
P 2 Y 受容体 (アゴニスト)、	
A 群オーファン G P C R (アゴニスト)、	20
グレリン (アゴニスト)、	
A 群ペプチド G P C R (アゴニスト)、	
アンジオテンシン受容体 (アゴニスト)、	
アンジオテンシン I 受容体 (アゴニスト)、	
アンジオテンシン I I 受容体 (アゴニスト)、	
ボンベシン受容体 (アゴニスト)、	
ボンベシン B B 1 受容体 (アゴニスト)、	
ボンベシン B B 2 受容体 (アゴニスト)、	
ボンベシン b b 3 受容体 (アゴニスト)、	
ガストリン放出ペプチドリガンド、	30
ニューロメディン B リガンド、	
ニューロメディン C リガンド、	
ブラジキニン受容体 (アゴニスト)、	
ブラジキニン B 1 受容体 (アゴニスト)、	
ブラジキニン B 2 受容体 (アゴニスト)、	
C 3 a 受容体 (アゴニスト)、	
C 5 a (アゴニスト)、	
C C K 受容体 (アゴニスト)、	
C C K 1 受容体 (アゴニスト)、	
C C K 2 受容体 (アゴニスト)、	40
ガストリン (アゴニスト)、	
ケモカイン (アゴニスト)、	
C C ケモカイン受容体 (アゴニスト)、	
C C R 1 ケモカイン (アゴニスト)、	
C C R 2 ケモカイン (アゴニスト)、	
C C R 3 ケモカイン (アゴニスト)、	
C C R 4 ケモカイン (アゴニスト)、	
C C R 5 ケモカイン (アゴニスト)、	
C C R 6 ケモカイン (アゴニスト)、	
C C R 7 ケモカイン (アゴニスト)、	50

CCR8ケモカイン(アゴニスト)、	
CCR9ケモカイン(アゴニスト)、	
CCR10ケモカイン(アゴニスト)、	
CCR11ケモカイン(アゴニスト)、	
CX3Cケモカイン受容体(アゴニスト)、	
CX3CR1ケモカイン(アゴニスト)、	
XCR1ケモカイン(アゴニスト)、	
CXCケモカイン受容体(アゴニスト)、	
CXCR1ケモカイン(アゴニスト)、	
CXCR3ケモカイン(アゴニスト)、	10
CXCR4ケモカイン(アゴニスト)、	
CXCR5ケモカイン(アゴニスト)、	
アドレノメジュリン受容体(アゴニスト)、	
エンドセリン(アゴニスト)、	
エンドセリンET-A(アゴニスト)、	
エンドセリンET-B(アゴニスト)、	
ガラニン(アゴニスト)、	
ガラニンGAL1(アゴニスト)、	
ガラニンGAL2(アゴニスト)、	
ガラニンGAL3(アゴニスト)、	20
IL-9(アゴニスト)、	
KISS-1受容体(アゴニスト)、	
メラニン凝集ホルモン(アゴニスト)、	
MCH受容体-1(アゴニスト)、	
MCH受容体-2(アゴニスト)、	
メラノコルチン(アゴニスト)、	
メラノコルチンMC1(アゴニスト)、	
ACTH受容体(アゴニスト)、	
メラノコルチンMC3(アゴニスト)、	
メラノコルチンMC4(アゴニスト)、	30
メラノコルチンMC5(アゴニスト)、	
NK(アゴニスト)、	
NK1(アゴニスト)、	
NK2(アゴニスト)、	
NK3(アゴニスト)、薬剤:1	
神経ペプチドY受容体(アゴニスト)、	
神経ペプチドY1受容体(アゴニスト)、	
神経ペプチドY2受容体(アゴニスト)、	
神経ペプチドY4受容体(アゴニスト)、	
神経ペプチドY5受容体(アゴニスト)、	40
神経ペプチドY6受容体(アゴニスト)、	
ニューロテンシン受容体(アゴニスト)、	
ニューロテンシンNTS1(アゴニスト)、	
ニューロテンシンNTS2(アゴニスト)、	
オレキシン及び神経ペプチドFF受容体(アゴニスト)、	
オレキシン(アゴニスト)、	
オピオイド(アゴニスト)、	
オピオイド(アゴニスト)、	
オピオイド(アゴニスト)、	
μオピオイド(アゴニスト)、	50

O R L 1 受容体 (アゴニスト)、
 オピオイド (部分アゴニスト)、
 オピオイド (アゴニスト)、
 オレキシン及び神経ペプチド F F 受容体 (アゴニスト)、
 神経ペプチド F F 受容体 (アゴニスト)、
 神経ペプチド F F 1 受容体 (アゴニスト)、
 神経ペプチド F F 2 受容体 (アゴニスト)、
 オレキシン (アゴニスト)、
 オレキシン - 1 (アゴニスト)、
 オレキシン - 2 (アゴニスト)、
 プロテアーゼ活性化受容体 (アゴニスト)、
 プロテアーゼ活性化受容体 - 1 (アゴニスト)、
 プロテアーゼ活性化受容体 - 2 (アゴニスト)、
 プロテアーゼ活性化受容体 - 3 (アゴニスト)、
 プロテアーゼ活性化受容体 - 4 (アゴニスト)、
 プロキネチシン受容体 (アゴニスト)、
 プロキネチシン受容体 - 1 (アゴニスト)、
 プロキネチシン受容体 - 2 (アゴニスト)、
 ソマトスタチン (アゴニスト)、
 ソマトスタチン 1 (アゴニスト)、
 ソマトスタチン 2 (アゴニスト)、
 ソマトスタチン 3 (アゴニスト)、
 ソマトスタチン 4 (アゴニスト)、
 ソマトスタチン 5 (アゴニスト)、
 ウロテンシン I I (アゴニスト)、
 バソプレシン様受容体 (アゴニスト)、
 オキシトシン (アゴニスト)、
 バソプレシン (アゴニスト)、
 バソプレシン V 1 (アゴニスト)、
 バソプレシン V 2 (アゴニスト)、
 プロスタノイド受容体 (アゴニスト)、
 D P プロスタノイド (アゴニスト)、
 P G D 2 (アゴニスト)、
 E P 1 プロスタノイド (アゴニスト)、
 P G E 2 (アゴニスト)、
 E P 2 プロスタノイド (アゴニスト)、
 P G E 2 (アゴニスト)、
 E P 3 プロスタノイド (アゴニスト)、
 P G E 2 (アゴニスト)、
 E P 4 プロスタノイド (アゴニスト)、
 P G E 2 (アゴニスト)、
 F P プロスタノイド (アゴニスト)、
 P G F 2 (アゴニスト)、
 I P プロスタノイド (アゴニスト)、
 プロスタサイクリン (アゴニスト)、
 プロスタノイド受容体 (部分アゴニスト)、
 T P プロスタノイド (アゴニスト)、
 トロンボキサン A 2 (アゴニスト)、
 コハク酸受容体 1 (アゴニスト)、
 T R H (アゴニスト)、

10

20

30

40

50

TRH1 (アゴニスト)、	
TRH2 (アゴニスト)、	
1型鋤鼻受容体 (アゴニスト)、	
1型鋤鼻受容体 - 1 (アゴニスト)、	
1型鋤鼻受容体 - 2 (アゴニスト)、	
1型鋤鼻受容体 - 3 (アゴニスト)、	
1型鋤鼻受容体 - 4 (アゴニスト)、	
1型鋤鼻受容体 - 5 (アゴニスト)、	
アペリン受容体 (モジュレータ)、	
カンナビノイド受容体 (モジュレータ)、	10
ケモカイン受容体様1 (モジュレータ)、	
リゾスフィンゴ脂質受容体 (モジュレータ)、	
A群ホルモンタンパク質GPCR (モジュレータ)、	
ロイコトリエン受容体 (モジュレータ)、	
メラトニン受容体 (モジュレータ)、	
A群ヌクレオチド様GPCR (モジュレータ)、	
A群オーファンGPCR (モジュレータ)、	
PAF受容体 (モジュレータ)、	
A群ペプチドGPCR (モジュレータ)、	
プロスタノイド受容体 (モジュレータ)、	20
コハク酸受容体1 (モジュレータ)、	
TRH受容体 (モジュレータ)、	
1型鋤鼻受容体 (モジュレータ)	
【0077】	
B群GPCR	
Gタンパク質共役受容体 - 3 (モジュレータ)、	
Gタンパク質共役受容体 - 3 (アゴニスト)、	
Gタンパク質共役受容体 - 3 (アンタゴニスト)、	
Gタンパク質共役受容体 - 6 (モジュレータ)、	
Gタンパク質共役受容体 - 6 (アゴニスト)、	30
Gタンパク質共役受容体 - 6 (アンタゴニスト)、	
Gタンパク質共役受容体 - 12 (モジュレータ)、	
Gタンパク質共役受容体 - 12 (アゴニスト)、	
Gタンパク質共役受容体 - 12 (アンタゴニスト)、	
Gタンパク質共役受容体 - 14 (モジュレータ)、	
Gタンパク質共役受容体 - 14 (アゴニスト)、	
Gタンパク質共役受容体 - 14 (アンタゴニスト)、	
B群GPCR (アゴニスト)、	
CRF - 1受容体 (アゴニスト)、	
CRF - 2受容体 (アゴニスト)、	40
カルシトニン受容体 (モジュレータ)、	
カルシトニン (アゴニスト)、	
カルシトニン (アンタゴニスト)、	
ACTH放出因子受容体 (モジュレータ)、	
CRF - 1受容体 (モジュレータ)、	
CRF - 1受容体 (アゴニスト)、	
CRF - 1受容体 (アンタゴニスト)、	
CRF - 2受容体 (モジュレータ)、	
CRF - 2受容体 (アゴニスト)、	
CRF - 2受容体 (アンタゴニスト)、	50

A C T H 放出因子 (アゴニスト)、
 C R F - 1 受容体 (アゴニスト)、
 C R F - 2 受容体 (アゴニスト)、
 A C T H 放出因子 (アンタゴニスト)、
 C R F - 1 受容体 (アンタゴニスト)、
 C R F - 2 受容体 (アンタゴニスト)、
 グルカゴン様ペプチド受容体 (モジュレータ)、
 グルカゴン様ペプチド 1 受容体 (モジュレータ)、
 グルカゴン様ペプチド 2 受容体 (モジュレータ)、
 グルカゴン様ペプチド (アゴニスト)、
 グルカゴン様ペプチド (アンタゴニスト)、
 グルカゴン受容体 (モジュレータ)、
 グルカゴン (アゴニスト)、
 グルカゴン (アンタゴニスト)、
 G H R H 受容体 (モジュレータ)、
 G H R H (アゴニスト)、
 成長ホルモン放出因子 (アンタゴニスト)、
 I 型 P A C A P 受容体 (モジュレータ)、
 I 型 P A C A P 受容体 (アゴニスト)、
 I 型 P A C A P 受容体 (アンタゴニスト)、
 P T H 受容体 (モジュレータ)、
 P T H - 1 受容体 (モジュレータ)、
 P T H - 2 受容体 (モジュレータ)、
 P T H (アゴニスト)、
 P T H (アンタゴニスト)、
 セクレチン受容体 (モジュレータ)、
 セクレチン (アゴニスト)、
 セクレチン (アンタゴニスト)、
 V I P 受容体 (モジュレータ)、
 V I P - 1 受容体 (モジュレータ)、
 V I P - 2 受容体 (モジュレータ)、
 V I P (アゴニスト)、
 V I P (アンタゴニスト)

【 0 0 7 8 】

C 群 G P C R

C 群 G P C R (モジュレータ)、
 C 群 G P C R (アゴニスト)、
 G A B A B 受容体 (アゴニスト)、
 代謝型グルタミン酸受容体 (アゴニスト)、
 代謝型グルタミン酸受容体 1 (アゴニスト)、
 代謝型グルタミン酸受容体 2 (アゴニスト)、
 代謝型グルタミン酸受容体 3 (アゴニスト)、
 代謝型グルタミン酸受容体 4 (アゴニスト)、
 代謝型グルタミン酸受容体 5 (アゴニスト)、
 代謝型グルタミン酸受容体 6 (アゴニスト)、
 代謝型グルタミン酸受容体 7 (アゴニスト)、
 代謝型グルタミン酸受容体 8 (アゴニスト)

【 0 0 7 9 】

好ましくは上記細胞関連抗原は、例えば P 2 X 7 等のイオンチャネルから選択される抗原を含むが、これに限定されない膜貫通抗原である。

【0080】

当業者には、「天然立体構造」という用語により包含される異なる特定の三次元立体構造が存在し得ることが理解される。例えばタンパク質が膜環境にありながら、2つ以上の異なる立体構造を有する場合、これらの立体構造全てが「天然立体構造」と考えられる。このことは活性化により立体構造が変化する受容体、例えば光により誘導されるロドプシンの様々な活性化状態、又は「閉塞(closed)」若しくは「開放(open)」立体構造を示すイオンチャネルで例示される。本発明はこれらの異なる天然立体構造のいずれか1つに対する、すなわち存在し得る異なる種類の立体構造エピトープに対する免疫グロブリン配列を包含する。

【0081】

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(目的とする宿主細胞又は宿主生物内の発現に特異的に適合しているコドンの使用を伴うDNA等)であってもよい。

【0082】

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。

【0083】

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(また本質的に単離形態であってもよい)の形態をとり、ベクター中に存在し、及び/又はベクターの一部であってもよい。

【0084】

本発明の核酸は、本発明の細胞関連抗原若しくは免疫グロブリン配列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若しくは得ることができ、及び/又は好適な天然資源から単離することができる。類似体を得るためには、天然V_HHドメインをコードするヌクレオチド配列に、例えば、部位特異的な突然変異誘発を起こして、上記類似体をコードする本発明の核酸を得ることができる。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、ナノボディを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、好適な方法で連結することもできる。

【0085】

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、部位特異的な突然変異誘発、2つ以上の天然配列及び/又は合成型配列(又はこれらの2つ以上の部分)の組合せ(combining)、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/又は領域を作製するための)1つ又は複数の制限部位の導入、及び/又は例えば、天然GPCRの配列を鋳型として使用した1つ又は複数の「ミスマッチ」プライマーを使用するPCR反応による突然変異の導入が挙げられ得るが、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.等の標準的なハンドブック、並びに以下の実施例を参照する。

【0086】

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、遺伝子構築物中に存在し、及び/又は遺伝子構築物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、1つ又は複数のそれ自体が既知の遺伝子構築物の要素に、任意で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」とも呼ばれる。

10

20

30

40

50

【0087】

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、目的とする宿主細胞又は宿主生物の形質転換に好適な形態、目的とす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/又は継代(inheritance)に好適な形態、又は遺伝子免疫付与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)での発現をもたらし得るベクターであってもよい。

10

【0088】

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)と作用可能に連結した少なくとも1つの本発明の核酸と、

b) プロモーター、及び任意で好適なターミネーター等の、1つ又は複数の調節要素と、任意でさらに

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、「調節要素」、「プロモーター」、「ターミネーター」、及び「作用可能に連結した」という用語は、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、免疫付与の対象となる宿主細胞、宿主生物又は動物、対象となる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/ワクチン接種技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。

20

【0089】

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、及び任意で上記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、これによりこれらは互いに機能的な関係にあることが通常意図されている。例えば、プロモーターが、コード配列の転写及び/又は発現を、開始又は別の形で制御/調節することができる場合(上記コード配列は、上記プロモーター「の制御下に」あるものとして理解されたい)、コード配列に「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(orientation)を有し、また通常同一リーディングフレーム内にある。また、必ずしも必要ではないこともあるが、これらは通常本質的に隣接している。

30

【0090】

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、目的とする宿主細胞又は宿主生物において意図される生物学的機能を付与することができるようなものである。

40

【0091】

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、目的とする宿主細胞又は宿主生物において「作用可能」であるとされ、このため(例えば)、上記プロモーターは、(本明細書で規定したように)作用可能に連結したヌクレオチド配列(例えばコード配列)の転写及び/又は発現を、開始又は別の形で制御/調節することができるものであると意図される。

【0092】

50

ターミネーター、転写及び/又は翻訳エンハンサー、及び/又は組込み因子等の、本発明の遺伝子構築物に存在し/使用され得る、プロモーター、選択マーカ、リーダー配列、発現マーカ及びさらなる要素についての(さらなる)非限定的な幾つかの例については、上記のSambrook et al.及びAusubel et al.等の包括的なハンドブック、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6,207,410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。上記の包括的な背景技術及び本明細書中にさらに引用した参考文献も参照する。

10

【0093】

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.等の包括的な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。

【0094】

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好ましいが非限定的な幾つかの例は、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したものである。

【0095】

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するため、すなわち本発明のナノボディ若しくはポリペプチドを発現及び/又は産生させるため、又は遺伝子ワクチン接種の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、原核若しくは真核の細胞若しくは細胞株、又は任意の好適な真菌、原核若しくは真核の生物であり得る。

20

【0096】

本発明の非限定的な一実施形態によれば、本発明の免疫グロブリン配列、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、本発明の免疫グロブリン配列、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。

30

【0097】

本発明との関連で、「遺伝子ワクチン接種」は、核酸配列、例えばDNA配列を、上記核酸配列によりコードされたタンパク質に対する免疫応答を誘導するのに好適な標的動物に移入させる任意の既知の方法又は手段を含む。当業者にとって遺伝子ワクチン接種の標準方法は既知である。本発明によれば、遺伝子ワクチン接種を、無針ジェット注射により、パリスティック法により、タトゥーのような針による注射により、パッチによる皮膚上へのDNAの局所適用により、又はこれらの投与方法のいずれかの後のin vivoエレクトロポレーションにより行うことができ、さらにDNAの皮内投与、筋肉内投与又は皮下投与により行われるワクチン接種を含む。

【0098】

遺伝子ワクチン接種に関して、「遺伝的」という用語は、例えば本明細書で規定のような任意の好適なタイプ又は種類の核酸分子、例えばDNA、RNA、cDNA、二本鎖DNA、例えば修飾ヌクレオチド(例えばPNA)を含む核酸分子を表し、ここで上記核酸分子は本明細書で規定のように細胞関連抗原をコードし、免疫応答を生じることができるように非ヒト動物において発現を引き起こすのに好適である。

40

【0099】

核酸分子の例には、DNA、RNA、PNA、cDNA、二本鎖DNA、及びin vivo又はin vitroで例えば安定性を増大させる化学修飾を含む他の形態の核酸分子が含まれる。

【0100】

50

核酸分子は発現ベクター、プラスミド、又は動物において抗原を発現するのに好適な任意の他の核酸分子若しくは遺伝的構築物の形態であり得る。好適な核酸分子が当業者にとって既知であり、市販の発現ベクター及びプラスミドを含む。具体的であるが、非限定的な例としては、市販の p V A X 1 構築物、又は Aldevron から取得可能な B 型肝炎小型表面抗原 (H B S A g) をコードする真核生物発現ベクター p R c / C M V - H b s (複数可) (これらは対象となる抗原を発現するルーチン手段により改変することができる) が挙げられる。

【 0 1 0 1 】

哺乳動物細胞における使用のためのベクターの幾つかの非限定的な例としては、 p M A M n e o (Clontech)、 p c D N A 3 (Invitrogen)、 p M C 1 n e o (Stratagene)、 p S G 5 (Stratagene)、 E B O - p S V 2 - n e o (A T C C 3 7 5 9 3)、 p B P V - 1 (8 - 2) (A T C C 3 7 1 1 0)、 p d B P V - M M T n e o (3 4 2 - 1 2) (A T C C 3 7 2 2 4)、 p R 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発現系等のウイルスに基づく発現系が挙げられる。

【 0 1 0 2 】

遺伝子ワクチン接種は非ヒト動物において標的抗原を発現するのに好適な要素を含む、好適な核酸又は遺伝的構築物により行われる。このような要素は、対象となる立体構造エピトープが抗原の構造情報により表される場合、この構造情報をコードする要素、又はその一部を含む。遺伝的構築物は、発現の制御に関連する要素、例えば好適なプロモーター、エンハンサー、ターミネータ及び当業者にとって既知の他の制御配列も含み得る。具体的には本発明は、 i n v i v o トランスフェクション後の構成的発現を可能にするプロモーターの使用も包含する。好適なプロモーターの具体的であるが、非限定的な例は構成的なサイトメガロウイルス (C M V) プロモーターである。

【 0 1 0 3 】

当業者には、哺乳動物細胞における発現のためのプロモーターを含むが、これらに限定されない多くのさらなる好適なプロモーターが既知である：ヒトサイトメガロウイルス (h C M V) 前初期エンハンサー/プロモーター；プロモーターが T e t 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 (h C M V) 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 (T K) プロモーター；ラウス肉腫ウイルスの長末端反復配列 (R S V L T R) 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 (h E F - 1) プロモーター； S V 4 0 初期プロモーター； H I V - 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。

【 0 1 0 4 】

本発明は当該技術分野で既知の方法による好適な量の遺伝子ワクチン接種に必要とされる核酸分子の産生を包含する。例えば、エンドトキシン - 低プラスミド D N A を製造業者の取扱説明書に従ってエンドトキシンプリー G i g a p r e p キット (Qiagen) を用いて産生することができる。

【 0 1 0 5 】

遺伝子ワクチン接種のために、本明細書に記載の核酸分子を好適なやり方で配合することができる。例えば核酸分子、例えばベクター又はプラスミドをエンドトキシンプリー H₂O、好ましくは L A L (カプトガニ血球抽出成分 (limulus amaebocyte lysate)) H₂O (すなわち L A L によりエンドトキシンに関して試験した水) 中で若しくは L A L H₂O 中のエンドトキシンプリーの 0 . 9 % N a C l 中で、又は当業者にとって既知の別の好適なバッファー若しくは溶液中で最終的に再構成する。再構成された核酸分子を - 2 0 の一定分量の溶液中に保管することができる、又は代替的に使用前の再構築のために凍結乾燥形態で保管することができる。

【 0 1 0 6 】

核酸分子は、遺伝子ワクチン接種における使用に好適な希釈率に、例えば0.1 mg/ml ~ 10 mg/ml、具体的には1 mg/ml ~ 5 mg/ml、より具体的には1 mg/mlの濃度で希釈する。

【0107】

遺伝子ワクチン接種のために、核酸分子を本明細書で概説されるように好適なやり方で動物に投与する。DNAの好適な皮内適用方法の具体例には、無針ジェット注射 (Pig-jet)、タトゥー法 (Bins, et al., Nature Medicine 11:899-904)、Vaccijetを用いた無針ジェット注射 (Robbins Instruments, USA)、DNAを投与するためのパステック法としてのパッチ又はヘリオス遺伝子銃 (Biorad) による皮膚上へのDNAの局所投与が含まれる。全てのDNA投与方法の後に、細胞トランスフェクション効率を高めるためにin vivoエレクトロポレーションを行うことができる。

10

【0108】

上記の方法のいずれかに関して、核酸は好適な担体と結び付けることができる。例えば、核酸は粒子 (金粒子を含むが、これに限定されない) と結び付けることができる。当業者には核酸を好適な担体と結び付けるルーチン技法が既知である。

【0109】

本発明との関連で、「非ヒト動物」は、脊椎動物、サメ、哺乳動物、トカゲ、ラクダ科動物、ラマ、好ましくはラクダ科動物、最も好ましくはラマ又はアルパカを含むが、これらに限定されない。

【0110】

B) 本発明の方法

本発明は本明細書で規定のように細胞関連抗原と結合することができる及び/又はこれに対する親和性を有する免疫グロブリン配列を生成する方法に関する。該方法は以下の工程を含むが、これらに限定されない：

20

a) 非ヒト動物に、上記細胞関連抗原、又は上記細胞関連抗原のドメイン若しくは特定部分をコードする核酸、又は例えば免疫調節遺伝要素との遺伝子融合体としての上記細胞関連抗原のドメイン若しくは特定部分、又はラクダ科動物オースログ配列上でグラフト化した上記細胞関連抗原のドメイン若しくは特定部分を遺伝子ワクチン接種する工程；並びに

b) 任意で、細胞関連抗原 (又は上記抗原の抗原ドメイン若しくは特定部分) を発現する天然細胞又はトランスフェクト細胞を含む細胞、細胞由来の膜抽出物、豊富な抗原を内包する小胞若しくは任意の他の膜誘導体、リポソーム、又は細胞関連抗原を発現するウイルス粒子から選択される天然立体構造で上記抗原を動物に追加免疫する工程；

30

c) 上記細胞関連抗原と結合することができる及び/又はこれに対する親和性を有する免疫グロブリン配列に関して、上記非ヒト動物に由来する免疫グロブリン配列のセット、コレクション又はライブラリをスクリーニングする工程。

【0111】

そのため包括的には、本発明の方法は、本明細書で規定のような非ヒト動物の遺伝子ワクチン接種を含む。1つの特定の実施形態では、非ヒト動物はラクダ科動物である。

【0112】

本発明の特定の利点は、広範な抗原に広く適用可能である、免疫グロブリン配列を生成する口バスタな方法が提供されることにある。本発明の方法はタンパク質抗原の接近可能性 (accessibility) に限定されない。特に、精製された抗原を必要としない。有利なことに該方法は、遺伝子ワクチン接種を単に使用することにより該方法を行うことができることから、抗原が細胞で発現される又は膜環境に存在する必要がない。したがって、本発明の方法は上記で例示されるような抗原のいずれにも広く適用可能であるが、それに限定されない。特に本方法は、対応する核酸配列が既知である、又はルーチン手段により同定することができる抗原に適用可能である。

40

【0113】

そのため、本発明はこのような口バスタで広範な適用性を欠いた従来技術の方法と比べ

50

て有利である。特にラクダ科動物、特にラマ等の動物において免疫グロブリン配列を生成するこのような口バストな方法に関して当該技術分野では教示がない。

【0114】

具体的には、本発明は細胞関連抗原に対する免疫グロブリン配列を生成する改善された方法を提供するが、該方法は、1つの特定の実施形態によればDNAワクチン接種により免疫応答を誘導し、その後細胞関連抗原と結合することができる免疫グロブリン配列に関してスクリーニングすることにより精製タンパク質による追加免疫の必要がなくなる。さらに具体的には本発明は、細胞関連抗原に対する免疫グロブリン配列（ナノボディを含む）を生成する方法であって、

a) ラクダ科動物に上記細胞関連抗原（又は上記抗原の抗原ドメイン若しくは特定部分）をコードする核酸をワクチン接種する工程；並びに

b) 上記細胞関連抗原と結合することができる及び/又はこれに対する親和性を有する免疫グロブリン配列に関して、上記ラクダ科動物に由来する免疫グロブリン配列のセット、コレクション又はライブラリをスクリーニングする工程、を含む、方法を提供する。

【0115】

驚くべきことに、血清抗体力価がタンパク質又は細胞に基づいた免疫付与と比較して、DNAワクチン接種後でより低くなった場合であっても、特異的な免疫グロブリン配列に関するスクリーニングにより、同程度のヒット率が与えられた、すなわち同程度の頻度の特異的な免疫グロブリン配列を得ることができることも見出されている。さらに、同定された結合因子の親和性は（本明細書で規定のように）高かった。このことは、より特異的な高親和性の免疫グロブリン応答をもたらし、特異的な免疫グロブリン配列のより効率的なスクリーニング及び単離を可能にするという本発明の特定の利点を明確に示している。特に免疫付与された動物が血清抗体力価に関してより低い免疫応答を示す場合、このような利点をDNAワクチン接種により得ることができることは従来技術からは予測不可能であった。

【0116】

代替的な実施形態において、本発明は、細胞関連抗原に対する免疫グロブリン配列（ナノボディを含む）を生成する方法であって、

a) ラクダ科動物に上記細胞関連抗原（又は上記抗原の抗原ドメイン若しくは特定部分）をコードする核酸をワクチン接種する工程；

b) 例えば細胞関連抗原（又は上記抗原の抗原ドメイン若しくは特定部分）を発現するトランスフェクト細胞の使用により、細胞膜抽出物を用いて、又は細胞関連抗原を発現するウイルス粒子を用いて、天然立体構造で細胞関連抗原をラクダ科動物に追加免疫する工程；並びに

c) 上記細胞関連抗原と結合することができる及び/又はこれに対する親和性を有する免疫グロブリン配列に関して、上記ラクダ科動物に由来する免疫グロブリン配列のセット、コレクション又はライブラリをスクリーニングする工程、を含む、方法を提供する。

【0117】

ワクチン接種

本発明の方法では、動物において免疫応答を誘導するのに好適な遺伝子ワクチン接種を行う。より具体的には、遺伝子ワクチン接種は動物における免疫グロブリン配列の生成に反映されるように免疫応答を誘導するのに好適でなければいけない。動物の血清中での抗体応答の検出は「血清変換（serum conversion）」とも称される。当業者はルーチン手段により抗体応答を決定することにより遺伝子ワクチン接種をモニタリングすることができる。このため当業者は、適切な抗体応答を誘導するのに必要となる適正な投与量及び頻度を容易に決定することができる。

【0118】

好ましくは、遺伝子ワクチン接種は適正な抗体力価を誘導する。抗体力価は、単離及び

10

20

30

40

50

ノ又はスクリーニングによる免疫グロブリン配列の生成を可能にする特定の抗体産生細胞の数に相当する。しかしながら上記で指摘されるように、本発明の方法は、従来の方法と比較して低い血清抗体力価しかない場合であっても、高い親和性の免疫グロブリン配列の単離を成功させる。例えば、遺伝子ワクチン接種は、タンパク質の追加免疫後に得られる血清力価（従来のタンパク質免疫付与技法により取得可能な抗体力価と同程度である）と比較して、例えば3分の1の血清抗体力価で高親和性の免疫グロブリン配列の単離を成功させる。1つの特定の実施形態では、該血清抗体力価は5分の1、好ましくは10分の1であり得る。血清力価を例えばELISA又はFACSを含む従来方法により決定することができる。

【0119】

本発明に関する重要なさらなる態様は遺伝子ワクチン接種により得られる抗体レパートリーの幅である。特に抗体応答が直鎖エピトープ及び立体構造エピトープの両方に指向性を有し、重要なことに膜依存性の立体構造エピトープに指向性を有することが本発明の一態様である。

【0120】

このため本発明は、非ヒト動物において適正な力価及び幅の抗体応答を得るのに好適な遺伝子ワクチン接種に関する。

【0121】

一実施形態では本発明は、動物の1箇所又は複数箇所の部位での単回遺伝子ワクチン接種を伴い得る。例えば、ラクダ科動物は1箇所、2箇所、3箇所、4箇所、5箇所又は複数箇所の部位（互いに隣接してもよく又は動物の全身の好適な位置に分散していてもよい）で注射することができる。具体例では、ラクダ科動物、例えばラマは頸部の最大5箇所の隣接部位で遺伝子ワクチン接種を受ける。遺伝子ワクチン接種の領域は清浄であり、毛がない方がよいことは自明である。そのため本発明は、好適な除毛手段、例えば剪毛、及び化学的手段、例えば脱毛クリーム、又はテープによる物理的除毛を包含する。

【0122】

本発明の一態様では、驚くべきことにDNAワクチンを投与する位置が取得可能な免疫グロブリン配列に、特に多様性およびエピトープ選好に関して影響を与えることが見出されている。

【0123】

本発明は、反復遺伝子ワクチン接種、例えば好適な間隔で2連続、3連続、4連続又は5連続の遺伝子ワクチン接種を包含する。このような間隔は好ましくは数日～数週間、例えば3日～4週間、より好ましくは5日～2週間である。好適な間隔は、0日目、3日目、7日目、21日目、24日目、28日目、56日目、59日目及び63日目、代替的には0日目、14日目、28日目及び57日目、代替的には0日目、3日目、7日目、21日目、24日目、28日目、56日目、59日目及び63日目、代替的には0日目、14日目、28日目及び42日目での遺伝子ワクチン接種を含む。

【0124】

1つの具体的な実施形態では、遺伝子ワクチン接種は適正な抗体応答が動物で誘起されるまで、毎週又は隔週で行われる。

【0125】

さらなる具体的な実施形態では、例えば無針注射による皮内投与は0日目、14日目、28日目及び57日目に行われる。別の具体的な実施形態では、短間隔のタトゥー法、タトゥーイング（tattooing）は0日目、3日目、7日目、21日目、24日目、28日目、56日目、59日目及び63日目に行われる。さらなる具体例は、0日目、14日目、28日目及び42日目での無針注射による免疫付与を含む。遺伝子ワクチン接種のバリスティック法では、用量は0日、14日、28日及び42日の間隔で投与した、最大500psi～600psiの圧力設定での金1mg当たり1μgのDNA 12ショット（shots）であり得る。

【0126】

10

20

30

40

50

1つの特定の実施形態では、本発明は、好適なDNA投与技法、その後の*in vivo*エレクトロポレーションを用いた遺伝子ワクチン接種に関する。驚くべきことに遺伝子ワクチン接種の従来方法と比較してこの投与形式が有益であることが見出されている。例えば、*in vivo*エレクトロポレーションはワクチン接種の有効性に関して有益である、すなわちより顕著で、及び/又はより信頼性のある免疫応答をもたらす。これに関して「より信頼性がある」とは、個々の動物間で観察される免疫応答、特にスクリーニングにより取得可能な「ヒット」の数の変動がより低いことを意味する。さらに、エレクトロポレーションの使用は、システムの設定を変えることにより、ワクチン接種プロトコルを要求される侵入深さに容易に適合させる、例えば皮内、皮下又は筋肉内のワクチン接種間で選択するのを可能にする。さらに、幾つかの動物、例えばラクダ科動物の比較的厚く頑丈な皮膚を考えると、エレクトロポレーションは良好なワクチン接種有効性、及び異なる皮膚特性を特徴とする、免疫付与の様々な異なる位置に対する即時の適合も可能にする。

10

【0127】

当業者は遺伝子ワクチン接種に好適な用量の核酸分子を選択することができる。例えば、0.1mg~10mgの核酸、具体的には1mg~5mg、より具体的には1mg~2mg、又は1mgの核酸を遺伝子ワクチン接種の1回の(例えば0日目での)適用に使用することができ、これにより反復遺伝子ワクチン接種の回数に応じた累積用量が得られる。

【0128】

好適な抗体応答が動物で確認される場合、本発明の一実施形態では免疫グロブリン配列は、本明細書に記載の方法により上記動物から直接、すなわちタンパク質の追加免疫を行わずに単離することができる。抗体応答の検出を、ルーチン手段、例えばELISA、RIA、FACS、又は抗体を検出する任意の他の方法により行うことができる。

20

【0129】

タンパク質の追加免疫

代替的には該方法は、動物にタンパク質の好適な供給源を追加免疫することも含む。特に動物に本明細書で規定のような細胞関連抗原、特に膜貫通抗原を天然立体構造で含む組成物を追加免疫することが想定される。このような組成物は抗原を発現する細胞、又は細胞の断片若しくは誘導體、例えば膜画分、単離オルガネラ、又は他の好適な調製物を含み得る。ウイルス、リポソーム、ミセル、又は天然立体構造で細胞関連抗原を含有するのに好適な他のシステムも想定される。

30

【0130】

本発明の一態様では、抗原を同種細胞で発現させることができる。例えばラクダ科動物の免疫付与のために、抗原をラクダ科動物細胞で発現させることができる。ラクダ科動物の免疫系はラクダ科動物細胞に寛容である、すなわちこの細胞に含まれる抗原のほとんどに対して免疫応答を開始しない(mount)。しかしながら、異種抗原(本明細書で規定のような細胞関連抗原を含むが、これに限定されない)が上記細胞に人工的に導入される場合、動物の免疫系は上記抗原に特異的に指向性を有する免疫応答を開始する。これは免疫応答が主に対象となる抗原に指向性を有する、すなわちこの抗原に対する特異性の向上を特徴とするという利点を有する。当業者には、このアプローチを関連の種に使用することができることを理解されたい。例えば、密接な関連性を考慮してラクダ由来細胞をラマの免疫付与に使用することも、またその逆も可能である。

40

【0131】

免疫付与する動物と同種の任意の好適な細胞を使用することができる。例えば、ラクダ科動物細胞をラクダ科動物の免疫付与に使用することができる、例えばラマ細胞をラマの免疫付与に使用することができる。好適な細胞は自発的に不死化した細胞、例えば癌細胞、又は未分化細胞、例えば胚由来細胞を含むが、これらに限定されない。好適な細胞は既知の手段により人工的に不死化した細胞も包含する。

【0132】

細胞を*in vivo*での増殖が低減又は排除されるように動物への投与前に有利に処

50

理することができる。好適な処理は化学的処理及び物理的処理を含むが、これらに限定されない。好適な物理的処理の具体的な一例は細胞が増殖することのないようにするX線による照射である。

【0133】

上記の細胞のいずれかを本明細書で規定のような非ヒト動物を免疫付与するためにのみ、すなわちDNAワクチン接種とは独立して使用することもできる。

【0134】

好ましくはタンパク質を、免疫応答を増強させるために上記の調製物のいずれかにおいて濃縮する。例えば、高効率プロモーターを用いた細胞における組換え発現を、細胞1個当たりの抗原の量を増大させるのに使用することができる。一実施形態では、非ヒト動物としてラクダ科動物を用いる場合、対象となる抗原を発現する細胞はラクダ科動物由来細胞、好ましくは不死化したラクダ科動物由来細胞であり得る。該細胞は上記抗原を発現するように遺伝子修飾する。

10

【0135】

さらに当業者には、本発明がワクチン接種に関して免疫応答を高めるために一般的に使用されるアジュバントの使用も包含することを理解されたい。タンパク質調製物は例えばゲル又はエマルジョン等の免疫応答を高める物理的形態でもあり得る。アジュバントの具体的であるが、非限定的な例としては、Stimune又はSpecol (CEDI Diagnostics, Lelystad, The Netherlands)、完全フロインドアジュバント、フロインド不完全アジュバント、TiterMax (金)、モノホスホリルリピドA (MPL)、Alum、QuilA、CpG DNAが挙げられる。

20

【0136】

本発明は、天然立体構造でのタンパク質の上記供給源による単回又は複数回の追加免疫(任意でアジュバントを用いる)を含む。タンパク質の追加免疫を好適な間隔で行い、この間隔はルーチン手段により、例えば動物において免疫グロブリン応答をモニタリングすることにより決定することができる。

【0137】

追加免疫を皮内、皮下又は筋肉内の投与を含むが、これらに限定されない異なる投与経路により行うことができる。

【0138】

1つの特定の実施形態では、本発明は、好適な免疫応答を誘発するために動物において要求されるタンパク質の投与回数を低減することに関する。このため、遺伝子ワクチン接種 - タンパク質追加免疫(「初回刺激 - 追加免疫(prime-boost)」とも称される)戦略が動物の反復タンパク質追加免疫の必要性を排除する。一例としてはこの戦略が動物に対する負担を軽減し、手順を容易にすると共に加速させ、免疫グロブリン配列を産生するのに必要となる抗原の量を減らす。このため、本発明の遺伝子ワクチン接種 - タンパク質追加免疫戦略により、遺伝子ワクチン接種後にタンパク質の追加免疫を行わない又は1回だけ行う場合であっても、驚くべきことに動物の血液中で複数回のタンパク質の追加免疫を含む従来の方法と同じ抗体力価を得ることができる。

30

【0139】

追加免疫のための抗原源として細胞を用いた初回刺激 - 追加免疫戦略のさらなる特定の利点は、抗体応答が既知のアプローチと比べて特に高い特異性を特徴とすることにある。言い換えれば、DNA初回刺激のために、細胞追加免疫(cell boost)により誘起されるリコール(recall)免疫応答が主に対象となる抗原に指向性を有し、細胞上の任意の他の抗原決定基は免疫応答全体に有意な影響を与えない。このため、本発明によるDNA初回刺激 - 細胞追加免疫は特異性に関して特に有益であり、これによりスクリーニングの際の有益な「ヒット率」、すなわち多数の特異的免疫グロブリン配列が生じる。

40

【0140】

このためタンパク質の追加免疫を含む実施形態では、特定の技術的効果が免疫応答の向上を含む。さらに、同じB細胞系列に属する異なる機能的ナノボディの配列多様性が高ま

50

る。本発明による追加免疫が遺伝子免疫付与のみの後で同定された配列と比べてこれまでに同定されていないアミノ酸置換の導入を引き起こし、これは追加免疫媒介性の *in vivo* 成熟の指標である。

【0141】

免疫グロブリン配列のスクリーニング/単離

本明細書に記載の遺伝子ワクチン接種は動物において免疫応答を誘導する。それから、免疫グロブリン配列のセット、コレクション又はライブラリを動物から単離する。「単離」は、a) 例えば好適な組織をサンプリングすることによる動物からの配列の分離、及び b) 例えばスクリーニング、すなわち特異的バインダーの「ヒット数」の単離による特異的配列からの選出を含む。

10

【0142】

当業者は免疫グロブリン配列の好適なセット、コレクション又はライブラリを確立する技法、及び対象となる配列に関してそれらをスクリーニングする技法に精通している。糖業者は例えば国際公開第02/085945号及び国際公開第04/049794号に記載の技法を一般的に参照することができる。国際公開第99/37681号、国際公開第01/90190号、国際公開第03/025020号及び国際公開第03/035694号に記載の技法及び方法も参照することができる。代替的に、本発明に従って免疫付与した動物から得られる、例えば $V_{H H}$ ライブラリに由来する改良型の合成ライブラリ又は半合成ライブラリ（例えばランダム突然変異誘発及び/又はCDRシャッフリング（例えば国際公開第00/43507号に記載されているようなもの）等の技法によって、 $V_{H H}$

20

【0143】

本発明は免疫グロブリン配列を含む動物からの物質（例えば、これに限定されないが抗体産生細胞）の単離を含む。例えば、末梢血単球（PBMC）を従来的手段により単離することができる。他の物質は末梢血リンパ球（PBL）、末梢リンパ節、特に免疫付与部位、脾臓、骨髄のリンパを集めるリンパ節、又は他の免疫学的に関連がある物質を含む。

【0144】

具体的であるが、非限定的な一例では、B細胞含有血液試料を回収することができ、末梢血リンパ球（PBL）を標準方法により精製することができる。例えば、Ficoll-Paque（Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden）での濃度勾配遠心分離を製造業者の取扱説明書に従って用いることができる。

30

【0145】

例えば動物から単離されたPBLを含む上記の物質のいずれかは多くの免疫グロブリン配列、すなわち免疫グロブリン配列のセット、コレクション又はライブラリを含む。

【0146】

例えばPBMCで発現したこの多くの免疫グロブリン配列の中でも、所望の免疫グロブリンの特異性で、例えば細胞のイムノパニング（immunopanning）により直接単離することができる。

【0147】

代替的に、免疫グロブリン配列のセット、コレクション又はライブラリをコードする核酸配列を細胞又はウイルスのセット、コレクション又はサンプルで単離、移入及び発現させることができる。

40

【0148】

遺伝物質を所望の特異性を有する免疫グロブリン配列をコードするこのような配列を単離するのに好適な手段によりさらに単離及びプロセッシングすることができる。このために、例えば上記の多くの免疫グロブリン配列をコードする核酸配列を好適な手段により該物質から抽出することができ、発現のためにレシピエント細胞又はウイルスに移入することができる。当業者は免疫グロブリン配列の抽出に好適な技法、及び発現のための、例えば細胞又はウイルスにおける発現ライブラリでのこれらの配列の操作に精通している。幾つかの非限定的な例は例えば大腸菌（*E. coli*）又はバクテリオファージにおける発現ライ

50

ブラリの生成を含む。

【0149】

具体的であるが、非限定的な一例では、全RNAを上記物質から抽出することができる。全RNAを既知の手段によりcDNAに変換することができる。このcDNAを用いて、例えばナノボディレパートリー等の免疫グロブリン配列を例えばPCR又は当該技術分野で既知のネステッドPCR法(上記の参考特許文献を参照されたい)を含むルーチン手段により増幅することができる。

【0150】

免疫グロブリン配列を含む核酸分子を好適な制限酵素の使用により消化することができ、その後任意で例えばゲル電気泳動により精製する。消化した配列を好適な遺伝子構築物、例えばベクター又はプラスミドにおける対応する制限部位にライゲートすることができる。好適なベクターの非限定的な例としては、ファージディスプレイベクター、例えばpAX50が挙げられる。pAX50はLacZプロモーター、大腸菌ファージpIII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抵抗性遺伝子、マルチクローニング部位(SfiI制限部位及びBstEII制限部位を内包する)、並びにgene3及びエルウィニア・カロトボラ(Erwinia carotovora) pε1Bモチーフからなるキメラリーダー配列を含有する。このディスプレイベクターは、geneIII産物との融合タンパク質として個々のナノボディを発現する、ファージ粒子の産生を可能にする。

10

【0151】

ライゲートした核酸分子を大腸菌のような好適な宿主生物の形質転換によりライブラリを得るのに使用することができる。当業者には、好適な形質転換技法、例えば化学的方法、エレクトロポレーション等が既知である。このようにして、好適なサイズ、例えば1E7~1E8個のライブラリを得ることができる。

20

【0152】

一実施形態では、ライブラリを、細菌を対数期(例えばOD600=0.5)まで成長させることによりレスキューする(rescued)ことができ、その後ヘルパーファージを感染させ、pIII融合タンパク質としてファージの先端上でクローニング免疫グロブリン配列のレパートリーを発現する組換えファージを得て、得られたファージを例えば4でさらなる使用のために例えば濾過滅菌後に保管することができる。

30

【0153】

細胞又はウイルスのセット、コレクション又はライブラリを、上記細胞関連抗原と結合することができる及び/又はこれに対する親和性を有する免疫グロブリン配列を発現する細胞又はウイルスに関してスクリーニングする、より具体的には上記細胞関連抗原と結合することができる及び/又はこれに対する親和性を有する免疫グロブリン配列をコードする核酸配列を細胞又はウイルスから精製及び/又は単離した後に、上記免疫グロブリン配列を発現させることができる。

【0154】

このため本発明は、非ヒト動物に存在する多くの配列から対象となる抗原に指向性を有する免疫グロブリン配列(又はこれをコードする核酸配列)を選択及び単離するのに好適なスクリーニング工程(複数可)も包含する。このようなスクリーニング方法は、対象となる免疫グロブリン配列に関連する、細胞、ウイルス、発現構築物、又は配列を選び出すのに好適な方法を全て包含する。当業者はファージディスプレイ、イムノパニング等を含む多くの好適な技法に精通している。当然のことながら本発明は、既知の方法の組合せにも関する。好適な組合せは当業者にとって明らかであろう。

40

【0155】

1つの特定の実施形態では、免疫グロブリン配列を発現するファージのライブラリを好適な細胞関連抗原源(対象となる抗原を含む(固定化)細胞又はリボソームを含むが、これらに限定されない)での1回又は複数回のパニングにより選択することができる。

【0156】

50

例えばイムノパニングによる1回の選択の後、アウトプット(output)をさらなる選択及び/又はプロセッシングに好適な発現ベクターヘプールとして再クローニングすることができる。

【0157】

本発明によれば、上記細胞関連抗原と結合することができる及び/又はこれに対する親和性を有する免疫グロブリン配列を精製及び/又は単離することができる。

【0158】

当業者は免疫グロブリンの産生に標準技法を使用することができる。このため対象となる免疫グロブリン配列をコードする細胞、ウイルス又は核酸配列をスクリーニング法により同定した後、上記免疫グロブリン配列を例えば組換え発現により産生することができる。この目的で、細胞若しくはウイルスを直接使用することができる、又は免疫グロブリン配列をコードする核酸を好適な宿主細胞を含む好適な発現系に移入することができる。宿主細胞としては、哺乳動物系、例えばCHO細胞、真核生物系、例えば昆虫細胞、又は例えばピキア・パストリス(Pichia pastoris)を含む真菌、及び原核生物系、例えば大腸菌が挙げられる。当業者には、これらの宿主系で免疫グロブリン配列を発現する際に使用するのに好適な発現ベクター及びツールが既知である。

【0159】

本発明の免疫グロブリン配列、ナノボディ及び核酸を、本明細書の記載から当業者にとって明らかのようにそれ自体既知のやり方で調製することができる。当業者には、どの具体例が遺伝子ワクチン接種に、免疫グロブリン配列のセット、コレクション若しくはライブラリの生成及び/又はスクリーニングに、又は抗原特異的配列の選択後の免疫グロブリン配列の産生に好適であるかを理解されたい。

【0160】

例えば、本発明のポリペプチドを、抗体の調製のために、特に抗体断片((単一)ドメイン抗体及びScFv断片を含むが、これらに限定されない)の調製のためにそれ自体が既知の任意のやり方で調製することができる。

【0161】

当業者にとって明らかであるように、本発明のポリペプチドを調製する特に有用な方法は概して、

好適な宿主細胞又は宿主生物(本明細書で「本発明の宿主」とも称される)において、又は本発明の上記ナノボディ又はポリペプチドをコードする核酸(本明細書で「本発明の核酸」とも称される。この用語は特定の文脈から明らかのように、ワクチン接種のための遺伝子構築物にも使用される)の別の好適な発現系において発現を行う工程、

任意でその後、このようにして得られた本発明の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、を含む。

【0162】

さらに、産生された免疫グロブリンを、沈殿(precipitation)、アフィニティクロマトグラフィ、サイズ排除クロマトグラフィ、イオン交換クロマトグラフィ、HPLC、濾過及び他の既知の精製法を含む標準技法により精製することができる。さらに、免疫グロブリン配列は、例えばエピトープ特異性、結合反応速度等を決定するために、既知の方法によりさらに特徴付けることができる。

【0163】

免疫グロブリン配列

本発明は、本明細書に記載の方法により取得可能な免疫グロブリン配列、すなわちポリペプチド分子、上記免疫グロブリン配列を含む組成物にも関する。このような組成物は研究目的のための組成物、及び治療用の薬学的組成物を含む。当業者は、免疫グロブリン配列の治療適用のための標準技法及び配合物に精通している。このため一態様では、本発明の方法は薬学的組成物としての特定の免疫グロブリン配列及びそれらの配合物の精製を包含する。

10

20

30

40

50

【 0 1 6 4 】

本発明は、本質的に単離した形態で、例えば少なくとも90%純粋な、少なくとも95%純度な、少なくとも98%、少なくとも99%、又は少なくとも99.99%純粋な形態で免疫グロブリン配列を提供する。非限定的な一実施形態では、純粋であるとは調製物中に他の免疫グロブリンの配列が存在しないことを意味する。さらなる非限定的な実施形態では、純粋は産生物由来の混入物 (contaminants) が組成物中に存在しないことを意味する。

【 0 1 6 5 】

本発明は、本明細書で開示の方法により取得可能な免疫グロブリン配列の誘導體である免疫グロブリン配列も包含する。例えば本発明は、当該技術分野で既知の方法により取得可能なヒト化免疫グロブリン配列を包含する。さらに本発明は、当該技術分野で既知の方法によっても取得可能なラクダ化免疫グロブリン配列を包含する。本発明は、免疫グロブリン配列の既知の構造変異体も包含する。

10

【 0 1 6 6 】

B型肝炎小型表面抗原に指向性を有する免疫グロブリン配列

本発明は、(本明細書で規定のように) B型肝炎小型表面抗原に指向性を有する免疫グロブリン配列、並びに1つ又は複数のこのような免疫グロブリン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(それぞれ本明細書で「本発明の免疫グロブリン配列」、「本発明の化合物」及び「本発明のポリペプチド」とも称される)に関する。本発明は、このような免疫グロブリン配列及びポリペプチドをコードする核酸(本明細書で「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;このような免疫グロブリン配列及びポリペプチドを調製する方法に;このような免疫グロブリン配列若しく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;このような免疫グロブリン配列、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;並びに特に予防目的、治療目的若しくは診断目的、例えば本明細書で言及される予防目的、治療目的若しくは診断目的のためのこのような免疫グロブリン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。

20

【 0 1 6 7 】

イオンチャンネルに指向性を有する免疫グロブリン配列

本発明は、(本明細書で規定のように) イオンチャンネルに指向性を有する免疫グロブリン配列に、並びに1つ又は複数のこのような免疫グロブリン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(本明細書ではそれぞれ、「本発明の免疫グロブリン配列」、「本発明の化合物」、及び「本発明のポリペプチド」とも称される)に関する。本発明は、このような免疫グロブリン配列及びポリペプチドをコードする核酸(本明細書では「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;このような免疫グロブリン配列及びポリペプチドを調製する方法に;このような免疫グロブリン配列又はポリペプチドを発現する又は発現することが可能な宿主細胞に;このような免疫グロブリン配列、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;並びに特に予防目的、治療目的若しくは診断目的、例えば本明細書で言及される予防目的、治療目的若しくは診断目的のためのこのような免疫グロブリン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。

30

40

【 0 1 6 8 】

Xu et al., Nature Biotechnology, October 2005, 1289-1293 and Benham, Nature Biotechnology, October 2005, 1234-1235は、6回膜貫通ドメイン構造を有するイオンチャンネルを遮断するアプローチを記載しており、ここでは特定の細胞外ループ、すなわち第3の細胞外領域(E3)に指向性を有する、ウサギで産生されるポリクローナル抗体が使用される。しかしながら、ウサギポリクローナル抗体はヒトにおける治療的使用に適さない。このため本発明の目的はイオンチャンネルに、及び/又はイオンチャンネルの生物学的及び/

50

又は生理学的活性に関連する疾患及び障害の予防、治療又は診断に使用することができる治療的化合物を提供することである。本明細書で使用される場合、疾患又は障害の「予防」及び「治療」は一般的に、疾患又は障害を患う又はその危険性がある被験体に有益な任意の予防効果又は治療効果を含み、例えば疾患の1つ又は複数の症状を緩和又は予防すること、及び疾患の発症及び/又は(さらなる)進行を予防する又は遅らせることも含む。

【0169】

特に本発明の目的は、イオンチャネルを調節することが可能であるこのような治療的化合物を提供することである。「イオンチャネルの調節」とは概して本明細書では、イオンチャネルと接触する際、又はそうでなければ好適にはイオンチャネルと相互作用する際(すなわち好適な *in vitro*、細胞又は *in vivo* アッセイの条件下で及び/又は好適な動物モデルで; 特に生理学的条件下で、すなわち被験体への好適な投与の際)、化合物がイオンチャネルに関して及び/又は上記イオンチャネルに関連する生物学的及び/又は生理学的機能に関して、アゴニスト効果又はアンタゴニスト効果を与えることを意味する。

10

【0170】

本発明の別の目的は、予防若しくは治療における(すなわち本明細書にさらに記載のようにこのような治療を必要とする被験体に1つ又は複数の化合物を投与することによる)、又は診断目的のための(これも本明細書にさらに記載のように)本明細書に記載の治療的化合物の使用によりそれぞれ治療、予防及び/又は診断することができる疾患及び障害の予防、治療及び/又は診断に使用することができる治療的化合物を提供することである。特に本発明の目的は、少なくとも1つのイオンチャネルを(本明細書で規定のように)調節することにより、それぞれ治療、予防及び/又は診断することができる疾患及び障害の予防、治療及び/又は診断に使用することができる治療的化合物を提供することである。さらなる目的は、ポリクローナル抗体の使用に、ウサギで産生された抗体の使用に、及び通常の四本鎖抗体の使用に関連する欠点を有しないこのような化合物を提供することである。本発明の目的は、このような化合物を容易に生成するのに使用することができる方法を提供することでもある。

20

【0171】

本発明の具体的であるが、非限定的な一目的は、イオンチャネルに指向性を有するタンパク質及び/又はポリペプチドを提供すること、及びXu et alにより記載された通常のパリクローナルウサギ抗体又はその断片と比較して改善した治療特性及び/又は薬理学特性及び/又は他の有益な特性(例えば調製しやすさの改善及び/又は製品コストの低減等)を有する、このようなタンパク質又はポリペプチド用の免疫グロブリン配列を提供することである。これらの改善した有益な特性は本明細書のさらなる記載から明らかになるであろう。上記の目的は概して、本明細書に記載の免疫グロブリン配列及び組成物(の使用)により達成される。

30

【0172】

本発明の免疫グロブリン配列、ポリペプチド及び組成物は概して、イオンチャネルの開放及び/又は閉塞(開放及び/又は閉塞の増進)を調節するのに、及び/又はイオンチャネルを介したイオンの流れを調節するのに(すなわち不可逆的であってもよいが、好ましくは可逆的に、このような流れを増大若しくは低減するのに、又はこのような流れを部分的に若しくは完全に遮断するのに)使用することができる。このため、本発明のポリペプチド及び組成物を、イオンチャネル及び/又はイオンチャネルを介したイオンの流れがかわる生物学的な機能、経路、応答、効果、機構及び作用を調節するのに使用することができる。特に本発明のポリペプチド及び組成物を、イオンチャネルを介したイオンの流れを(すなわち完全に若しくは部分的に、不可逆的であってもよいが、好ましくは可逆的に)低減又は阻害するのに使用することができる。このため、本発明の免疫グロブリン配列、ポリペプチド及び組成物は概して、イオンチャネルの(完全又は部分)ブロッカーとして及び/又は(完全及び部分)オープナーとして(これも不可逆的であってもよいが、好ましくは可逆的に)、及び/又はイオンチャネルの、及び/又はイオンチャネル及び/又

40

50

はイオンチャネルを介したイオンの流れがかかわる生物学的な機能、経路、応答、効果、機構及び作用のアゴニストとして又はアンタゴニストとして作用することができる。このため、本発明のポリペプチド及び組成物を、イオンチャネルに関連する疾患及び障害の予防及び治療（本明細書で規定のように）に使用することができる。一般的に、「イオンチャネルに関連する疾患及び障害」は、本発明の（特にその薬学的に活性のある量の）ポリペプチド又は組成物のいずれかを、及び／又はイオンチャネルに対して活性のある既知の活性成分を、それを必要とする（すなわち疾患若しくは障害若しくは少なくとも1つのこれらの症状を有する、及び／又は疾患若しくは障害を誘発若しくは発症する危険性がある）被験体に好適に投与することにより、それぞれ予防及び／又は治療することができる疾患及び障害として定義することができる。イオンチャネルに関連するこのような疾患及び障害の例は、本明細書の開示に基づき当業者にとって明らかであり、例えば本発明の免疫グロブリン配列又は化合物／ポリペプチドが指向性を有するイオンチャネル（複数可）に応じて、本明細書で挙げられる従来技術で言及された疾患及び障害を含む。したがってこれらに限定されないが、本発明の免疫グロブリン配列及びポリペプチドを、例えば現在イオンチャネルを調節することができる活性成分により予防又は治療されている全ての疾患及び障害、例えば上記の従来技術で言及されるものを予防及び／又は治療するのに使用することができる。また本発明のポリペプチドを、このような活性成分による治療が現在開発されている、提案されている、又は将来提案若しくは開発され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想定される。さらに、本明細書中にさらに記載のそれらの有利な特性のために、本発明のポリペプチドを、これらの既知の活性成分が使用されているか、又は提案若しくは開発される疾患及び障害以外の他の疾患及び障害の予防及び治療にも使用してもよいこと、及び／又は本発明のポリペプチドが本明細書に記載の疾患及び障害を治療するのに新規の方法及びレジメンを提供ことが想定される。

【0173】

本発明の免疫グロブリン配列及びポリペプチドの他の用途及び使用は、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。概して本発明は、（本明細書に規定のように）イオンチャネルに指向性を有する、及び／又は（本明細書に規定のように）これと特異的に結合することができる免疫グロブリン配列、並びにこのような免疫グロブリン配列を少なくとも1つ含む化合物及び構築物、特にタンパク質及びポリペプチドを提供する。より具体的には本発明は、本明細書に規定の（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）親和性でイオンチャネルと結合することができる免疫グロブリン配列、並びにこのような免疫グロブリン配列を少なくとも1つ含む化合物及び構築物、特にタンパク質及びポリペプチドを提供する。

【0174】

特に、本発明の免疫グロブリン配列及びポリペプチドが、

10^{-5} モル/L ~ 10^{-12} モル/L 以下、及び好ましくは 10^{-7} モル/L ~ 10^{-12} モル/L 以下、及びより好ましくは 10^{-8} モル/L ~ 10^{-12} モル/L の解離定数 (K_D) で（すなわち 10^5 L/モル ~ 10^{12} L/モル以上、及び好ましくは 10^7 L/モル ~ 10^{12} L/モル以上、及びより好ましくは 10^8 L/モル ~ 10^{12} L/モルの結合定数 (K_A) で）イオンチャネルと結合するようなもの、及び／又は 10^2 $M^{-1} s^{-1}$ ~ 約 10^7 $M^{-1} s^{-1}$ 、好ましくは 10^3 $M^{-1} s^{-1}$ ~ 10^7 $M^{-1} s^{-1}$ 、より好ましくは 10^4 $M^{-1} s^{-1}$ ~ 10^7 $M^{-1} s^{-1}$ (10^5 $M^{-1} s^{-1}$ ~ 10^7 $M^{-1} s^{-1}$ 等) の k_{on} 速度でイオンチャネルと結合するようなもの、及び／又は

$1 s^{-1}$ ($t_{1/2} = 0.69 s$) ~ $10^{-6} s^{-1}$ ($t_{1/2}$ が数日である略不可逆的な複合体の場合)、好ましくは $10^{-2} s^{-1}$ ~ $10^{-6} s^{-1}$ 、より好ましくは $10^{-3} s^{-1}$ ~ $10^{-6} s^{-1}$ ($10^{-4} s^{-1}$ ~ $10^{-6} s^{-1}$ 等) の k_{off} 速度でイ

10

20

30

40

50

オンチャネルと結合するようなものであるのが好ましい。

【0175】

好ましくは、本発明の一価の免疫グロブリン配列（又は本発明の免疫グロブリン配列を1つだけ含有するポリペプチド）が、500 nM未満、好ましくは200 nM未満、より好ましくは10 nM未満（500 pM未満等）の親和性でイオンチャネルと結合するようなものであるのが好ましい。本発明の免疫グロブリン配列又はポリペプチドとイオンチャネルとの結合に関する幾つかの好ましいIC₅₀値は、本明細書のさらなる記載及び実施例から明らかになる。イオンチャネルとの結合のために、本発明の免疫グロブリン配列は通常、その免疫グロブリン配列内に1つ又は複数のアミノ酸残基若しくは1つ又は複数のアミノ酸残基のストレッチ（すなわちそれぞれの「ストレッチ」が、（すなわち免疫グロブリン配列の一次構造又は三次構造で）互いに隣接しているか、又は互いに近接している2つ以上のアミノ酸残基を含む）を含有し、これを介して本発明の免疫グロブリン配列はイオンチャネルと結合することができ、このようにしてアミノ酸残基又はアミノ酸残基のストレッチは、イオンチャネルと結合する「部位」（本明細書で「抗原結合部位」とも称される）を形成する。

10

【0176】

本発明で与えられる免疫グロブリン配列は、（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（本明細書で規定のように）本発明のタンパク質若しくはポリペプチド（1つ又は複数の本発明の免疫グロブリン配列を含むか、又は本質的にこれからなってもよく、任意でさらに1つ又は複数のさらなる免疫グロブリン配列（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。例えば、これに限定されないが、1つ又は複数の本発明の免疫グロブリン配列は、全て本明細書に記載される一価、多価又は多重特異性の本発明のポリペプチドをそれぞれ提供するように、このようなタンパク質又はポリペプチド（任意で（すなわちイオンチャネル以外の1つ又は複数の他の標的に対する）結合単位としての役割を果たし得る1つ又は複数のさらなる免疫グロブリン配列を含有してもよい）における結合単位として使用してもよい。このようなタンパク質又はポリペプチドは、（本明細書に規定のように）本質的に単離形態でもあり得る。

20

【0177】

本発明の免疫グロブリン配列及びポリペプチド自体が、ジスルフィド架橋を介して任意の他の免疫グロブリン配列又は免疫グロブリン鎖と連結しない（が、1つ又は複数の分子内ジスルフィド架橋を含有しても又は含有しなくてもよい（例えば本明細書中に記載のナノボディは、CDR3とCDR1又はFR2との間にジスルフィド架橋を含有し得ることもあることが知られている））単一のアミノ酸鎖から本質的になるのが好ましい。しかしながら、1つ又は複数の本発明の免疫グロブリン配列は、互いに及び/又は他の免疫グロブリン配列と（例えばジスルフィド架橋を介して）連結し、本発明に有用でもあり得るペプチド構築物（例えばFab'断片、F(ab')₂断片、ScFv構築物、「ダイアボディ」及び他の多重特異性の構築物）を提供し得ることに留意されたい。例えばHolliger and Hudson, Nat Biotechnol. 2005 Sep; 23(9): 1126-36によるレビューを参照する。概して、本発明の免疫グロブリン配列（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治療目的及び/又は診断目的のための）被験体への投与を目的とする場合、上記被験体において自然発生しない免疫グロブリン配列であるか、又は上記被験体において自然発生する場合は、（本明細書に規定のように）本質的に単離形態であるのが好ましい。

30

40

【0178】

薬学的用途の場合、本発明の免疫グロブリン配列（並びにこれを含む化合物、構築物及びポリペプチド）はヒトイオンチャネルに指向性を有するのが好ましく、一方で獣医学目的の場合は、本発明の免疫グロブリン配列及びポリペプチドは治療する種由来のイオンチャネルに指向性を有するか、又は治療する種由来のイオンチャネルと少なくとも交差反応性を有するのが好ましいことも、当業者にとって明らかである。

50

【0179】

さらに、本発明の免疫グロブリン配列は、任意でかつイオンチャネルとの結合のための少なくとも1つの結合部位の他に、他の抗原、タンパク質又は標的との結合のための1つ又は複数のさらなる結合部位を含有し得る。

【0180】

関与する特定の疾患又は障害に応じて、それ自体が既知の任意の好適な *in vitro* アッセイ、細胞ベースのアッセイ、*in vivo* アッセイ及び/又は動物モデル、又はこれらの任意の組合せを使用して、本発明の免疫グロブリン配列及びポリペプチド、並びにこれを含む組成物の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明らかであり、例えば本明細書に記載のレビュー及び従来技術で言及されるアッセイ及び動物モデルを含む。

10

【0181】

また本発明によれば、第1の種の温血動物由来のイオンチャネルに指向性を有する免疫グロブリン配列及びポリペプチドは、1つ又は複数の他の種の温血動物由来のイオンチャネルと交差反応性を示しても又は示さなくてもよい。例えば、ヒトイオンチャネルに指向性を有する免疫グロブリン配列及びポリペプチドは、1つ又は複数の他の種の霊長類（例えば、これらに限定されないが、マウス、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（*Macaca fascicularis*））及び/又はアカゲザル（マカク・ムラット（*Macacamulatta*）））及びヒヒ（パピオ・ウルジヌス（*Papio ursinus*））由来のイオンチャネル、及び/又は疾患のための動物モデル（例えばマウス、ラット、ウサギ、ブタ又はイヌ）、特にイオンチャネルに関連がある疾患及び障害のための動物モデルで使用されることが多い、1種又は複数種の動物（例えば本明細書で言及される種及び動物モデル）由来のイオンチャネルと交差反応性を示しても又は示さなくてもよい。この観点では、このような疾患モデルでヒトイオンチャネルに対して免疫グロブリン配列及びポリペプチドを試験することが可能となるので、このような交差反応性が存在する場合、該反応性は薬剤開発の観点から都合がよいことがあることが当業者にとって明らかである。

20

【0182】

より一般的には、複数種の哺乳動物由来のイオンチャネルと交差反応性を有する本発明の免疫グロブリン配列及びポリペプチドは、同じ免疫グロブリン配列又はポリペプチドを複数種にわたって使用することが可能であるので、通常、獣医学用途に使用するのに有利である。したがって、或る種の動物由来のイオンチャネルに指向性を有する免疫グロブリン配列及びポリペプチド（例えばヒトイオンチャネルに対する免疫グロブリン配列及びポリペプチド）は、免疫グロブリン配列及び/又はポリペプチドの使用によって治療する種において所望の効果がもたらされる限り、別の種の動物の治療に使用することができることも本発明の範囲内に包含される。

30

【0183】

本発明の免疫グロブリン配列（及びこれを含むポリペプチド）はイオンチャネルを（本明細書で規定のように）調節することが可能であるようなものが好ましい。特に本発明の免疫グロブリン配列（及びこれを含むポリペプチド）はイオンチャネルを（完全に又は部分的に）遮断することが可能であるようなものが好ましい。化合物によるイオンチャネルのそれぞれの「部分的な又は完全な遮断」とは、免疫グロブリン配列又はポリペプチドによるイオンチャネルの調節が、イオンチャネルが免疫グロブリン配列又はポリペプチドにより遮断される特定の機構にかかわらずそれぞれ、（すなわち本明細書に記載のような好適なアッセイにより決定されるように免疫グロブリン配列/ポリペプチドとイオンチャネルとの間に相互作用がない場合のイオンチャネルを介したイオンの流れと比較して）チャネルを介したイオンの流れの低減をもたらす、又はチャネルを介したイオンの流れが本質的になくなることを意味する。例えばこれに限定されないが、免疫グロブリン配列又はポリペプチドは、チャネルを介したイオンの流れが（例えば立体障害又は立体相互作用により）完全若しくは部分的に遮断されるようにイオンチャネル（又はその少なくとも1つのサブユニット）のエピトープに結合することにより直接的に、又はイオンチャネルの1つ

40

50

若しくは複数の細胞外の部分、領域、ドメイン若しくはループとの相互作用により、又はイオンチャネルの（可能性のある）立体構造（複数可）に影響を与えることにより、又はイオンチャネルが立体構造変化を受けられることができる程度及び／又は速度を限定することにより間接的に、イオンチャネルを部分的に若しくは完全に遮断することができる。

【0184】

イオンチャネルのブロッカーである本発明の免疫グロブリン配列又はポリペプチドは、本明細書に記載されるもののような、好適なアッセイにより決定されるように、免疫グロブリン配列／ポリペプチドとイオンチャネルとの間の相互作用がない場合のイオンチャネルを介したイオンの流れと比較して、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%、例えば25%以上、又はさらに50%以上、及び最大で75%、又はさらに90%超、又はそれ以上チャネルを介したイオンの流れを低減するようなものが好ましい。

10

【0185】

イオンチャネルのオープナーである本発明の免疫グロブリン配列又はポリペプチドは、本明細書に記載されるもののような、好適なアッセイにより決定されるように、免疫グロブリン配列／ポリペプチドとイオンチャネルとの間の相互作用がない場合のイオンチャネルを介したイオンの流れと比較して、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%、例えば25%以上、又はさらに50%以上、及び最大で75%、又はさらに90%超、又はそれ以上チャネルを介したイオンの流れを増大するようなものが好ましい。

20

【0186】

イオンチャネル及び／又はそれらに関連する生物学的機能（複数可）又は応答（複数可）のアゴニストである本発明の免疫グロブリン配列又はポリペプチドは、本明細書に記載されるもののような、好適なアッセイにより決定されるように、免疫グロブリン配列／ポリペプチドとイオンチャネルとの間の相互作用がない場合の生物学的機能又は応答と比較して、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%、例えば25%以上、又はさらに50%以上、及び最大で75%、又はさらに90%超、又はそれ以上所望の生物学的機能又は応答を増大するようなものが好ましい。

【0187】

イオンチャネル及び／又はそれらに関連する生物学的機能（複数可）又は応答（複数可）のアンタゴニストである本発明の免疫グロブリン配列又はポリペプチドは、本明細書に記載されるもののような、好適なアッセイにより決定されるように、免疫グロブリン配列／ポリペプチドとイオンチャネルとの間の相互作用がない場合の生物学的機能又は応答と比較して、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%、例えば25%以上、又はさらに50%以上、及び最大で75%、又はさらに90%超、又はそれ以上所望の生物学的機能又は応答を低減するようなものが好ましい。

30

【0188】

イオンチャネルのブロッカー又はオープナーである（又はブロッカー若しくはオープナーを増進する）及び／又はイオンチャネル、又はそれらに関連する生物学的機能（複数可）若しくは応答（複数可）のアゴニスト又はアンタゴニストである本発明の免疫グロブリン配列又はポリペプチドは、不可逆的に所望の活性を提供することができるが、可逆的に活性を提供することができるのが好ましい。

40

【0189】

本発明はまたその最も広範な意味で、本発明の免疫グロブリン配列及びポリペプチドが指向性を有するイオンチャネルの、特異的な抗原決定基、エピトープ、部分、ドメイン、サブユニット又は立体構造（適用可能な場合）によっては特に限定又は規定されない。

【0190】

本発明の免疫グロブリン配列及びポリペプチドは、任意の所望のイオンチャネルに指向性を有してもよく、特に少なくとも1つの細胞外ドメインを有するイオンチャネルに指向性を有してもよい。これらに限定されないが、より具体的には、本発明の免疫グロブリン

50

配列及びポリペプチドは、少なくとも1つの膜貫通ドメイン、より具体的には少なくとも2つの膜貫通ドメイン、例えば少なくとも4つの膜貫通ドメイン（例えば4 - T M イオンチャンネル）又は6つ以上の膜貫通ドメイン（例えば6 - T M イオンチャンネル）を有する任意の所望のイオンチャンネルに指向性を有してもよい。このようなイオンチャンネルの例は、本明細書に挙げられた従来技術に基づき当業者にとって明らかであろう。例えば上記で挙げられたGoldstein et al.、Yu et al.、Clapham and Garbers、Hoffmann et al.、Kubo et al.、Wei et al.、Shieh et al.（例えば559頁の図2を参照されたい）、Catterall et al.、Gutman et al.、Clapham et al.、Catterall et al.のレビューを参照する。本明細書にさらに記載のように、本発明の免疫グロブリン配列及びポリペプチドは例えば、このような膜貫通ドメインの細胞外部分に、特にこのような膜貫通ドメインと連結する細胞外ループ/リピートに指向性を有し得る（例えばこれについてもShieh et al.の559頁の図2、及び2 - T M、4 - T M及び6 - T M イオンチャンネルのこのような細胞外ループを概略的に示すXu et al（上掲）の1290頁の図1を参照する）。

10

【0191】

好ましいが、非限定的な一態様では、本発明の免疫グロブリン配列及びポリペプチドが、6 - T M イオンチャンネル（例えばこれらに限定されないが、上述のKv - イオンチャンネル（例えばKv1.1 ~ Kv9.3、KvLQTイオンチャンネル、Slc及びIKCa10））に、特にこのような6 - T M イオンチャンネルの膜貫通ドメインと連結する細胞外ループ/リピートのうちの1つ、例えばE1、E2、特にE3ループ、又はリピート2、3及び4のS5とS6との間の領域に指向性を有する。

20

【0192】

しかしながら本発明の特定の一態様によれば、本発明の免疫グロブリン配列又はポリペプチドは細胞の表面上で発現するイオンチャンネルに、及び/又はイオンチャンネルの少なくとも1つの細胞外の領域、ドメイン、ループ又は他の細胞外エピトープに（本明細書で規定のように）指向性を有し得る。

【0193】

特にこの態様によれば、本発明の免疫グロブリン配列又はポリペプチドは、イオンチャンネルの少なくとも1つの細胞外の領域、ドメイン、ループ又は他の細胞外エピトープに（本明細書で規定のように）指向性を有し、さらに本発明の上記免疫グロブリン配列又はポリペプチドが（本明細書で規定のように）上記イオンチャンネルを調節することが可能であるようなものが好ましい。より具体的にはこの態様によれば、本発明の免疫グロブリン配列又はポリペプチドが、イオンチャンネルの少なくとも1つの細胞外の領域、ドメイン、ループ又は他の細胞外エピトープに（本明細書で規定のように）指向性を有し、さらに本発明の上記免疫グロブリン配列又はポリペプチドが（完全に又は部分的に）上記イオンチャンネルを遮断することが可能であるようなものが好ましい。

30

【0194】

本発明のこの態様によれば、本発明の免疫グロブリン配列又はポリペプチドは、任意の好適な細胞外の部分、領域、ドメイン、ループ又は他の細胞外エピトープに指向性を有し得るが、好ましくは膜貫通ドメインの細胞外部分の1つに又はより好ましくは膜貫通ドメインと連結する細胞外ループの1つに指向性を有する。より具体的には、イオンチャンネルが6 - T M チャンネルである場合、タンパク質又はポリペプチド（特にそこに存在する免疫グロブリン配列のうちの少なくとも1つ）は、膜貫通ドメインと連結する細胞外E3ループに指向性を有し得る（及び/又は細胞外E3ループに及び/又は細胞外E3ループの配列に由来する、又はこれに基づく合成又は半合成のペプチドに対して産生することができる）。

40

【0195】

他の好適な細胞外の部分、領域、ドメイン、ループ又はエピトープは、関連（pertinent）イオンチャンネルの免疫グロブリン配列のKyte - Doolittle解析により、同じ（サブ）ファミリーに属するイオンチャンネルをアライメントすると共に、様々な膜貫通ドメイン及び細胞外の部分、領域、ドメイン若しくはループ（E3ループを含む）を同

50

定することにより、TMAP解析により、又はそれらの任意の好適な組合せにより得ることができる。本発明は、(本明細書でさらに規定されるような)このような細胞外の部分、領域、ドメイン、ループ又はエピトープに指向性を有する(及び/又はこのような細胞外の部分、領域、ドメイン、ループ若しくはエピトープを含む免疫グロブリン配列の部分若しくは断片に対して、及び/又はこのような細胞外の部分、領域、ドメイン、ループ若しくはエピトープに由来する若しくはこれらに基づく合成若しくは半合成のペプチドに対して産生された)免疫グロブリン配列にも関する。

【0196】

特に、本発明の免疫グロブリン配列及びポリペプチドが、
 10^{-5} モル/L ~ 10^{-12} モル/L 以下、及び好ましくは 10^{-7} モル/L ~ 10^{-12} モル/L 以下、及びより好ましくは 10^{-8} モル/L ~ 10^{-12} モル/L の解離定数 (K_D) で (すなわち 10^5 L/モル ~ 10^{12} L/モル以上、及び好ましくは 10^7 L/モル ~ 10^{12} L/モル以上、及びより好ましくは 10^8 L/モル ~ 10^{12} L/モルの結合定数 (K_A) で) (本明細書に記載のように) イオンチャネルの細胞外の部分、領域、ドメイン、ループ又は他の細胞外エピトープと結合するようなもの、及び/又は 10^2 M $^{-1}$ s $^{-1}$ ~ 約 10^7 M $^{-1}$ s $^{-1}$ 、好ましくは 10^3 M $^{-1}$ s $^{-1}$ ~ 10^7 M $^{-1}$ s $^{-1}$ 、より好ましくは 10^4 M $^{-1}$ s $^{-1}$ ~ 10^7 M $^{-1}$ s $^{-1}$ (10^5 M $^{-1}$ s $^{-1}$ ~ 10^7 M $^{-1}$ s $^{-1}$ 等) の k_{on} 速度で (本明細書に記載のように) イオンチャネルの細胞外の部分、領域、ドメイン、ループ又は他の細胞外エピトープと結合するようなもの、及び/又は 1 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^{-2} s $^{-1}$ ~ 10^{-6} s $^{-1}$ 、より好ましくは 10^{-3} s $^{-1}$ ~ 10^{-6} s $^{-1}$ (10^{-4} s $^{-1}$ ~ 10^{-6} s $^{-1}$ 等) の k_{off} 速度で (本明細書に記載のように) イオンチャネルの細胞外の部分、領域、ドメイン、ループ又は他の細胞外エピトープと結合するようなものであるのが好ましい。

【0197】

好ましくは、本発明の一価の免疫グロブリン配列(又は本発明の免疫グロブリン配列を1つだけ含有するポリペプチド)が、500 nM未滿、好ましくは200 nM未滿、より好ましくは10 nM未滿(500 pM未滿等)の親和性で(本明細書に記載のように)イオンチャネルの細胞外の部分、領域、ドメイン、ループ又は他の細胞外エピトープと結合するようなものであるのが好ましい。

【0198】

本発明の免疫グロブリン配列又はポリペプチドと、イオンチャネルの細胞外の部分、領域、ドメイン、ループ又は他の細胞外エピトープ(本明細書に記載のような)との結合に関する幾つかの好ましいIC50は、本明細書でのさらなる記載及び実施例から明らかであろう。

【0199】

またこの態様によれば、本発明の任意の(本明細書で規定されるような)多価又は多重特異性のポリペプチドは好適には、同一の抗原上の2つ以上の異なる細胞外の部分、領域、ドメイン、ループ若しくは他の細胞外エピトープに、例えば2つの異なる細胞外ループに、膜貫通ドメインの2つの異なる細胞外部分に、又は1つの細胞外ループ(one extracellular loops)及び1つの細胞外ループにも指向性を有し得る。本発明のこのような多価又は多重特異性のポリペプチドは、所望のイオンチャネル、及び/又はこのような多価又は多重特異性のポリペプチドの使用により得ることができる任意の他の所望の特性又は所望の特性の組合せに対する増大した結合活性又は改善した選択性を有していてもよい(又はこれらに関して遺伝子操作されていても(engineered)及び/又は選択されていてもよい)。

【0200】

本発明の免疫グロブリン配列又はポリペプチドは、本発明のペプチド抗原自体(代わりに例えばより大きいタンパク質又はポリペプチドの一部である、例えば細胞表面上に存在

10

20

30

40

50

するイオンチャンネルの一部であるペプチド抗原)を用いて、ペプチド抗原に対する本発明の免疫グロブリン配列又はポリペプチドの結合(すなわち全て本明細書に記載のようなこのような結合の特異性、親和性、 K_D 、 K_A 、 k_{on} 又は k_{off})を決定するのに標準的なアッセイにおいて上記ペプチド抗原自体に指向性を有する場合、(本明細書でさらに規定のように)ペプチド抗原「に指向性を有する」と言うこともできる。免疫グロブリン配列又はポリペプチドと小ペプチドとの結合を決定する技法は当業者にとって明らかであり、例えば本明細書に記載の技法を含む。

【0201】

本発明の免疫グロブリン配列又はポリペプチドは、上記ペプチド抗原に関してスクリーニングする、これを用いて選択する及び/又は(すなわち本明細書でさらに記載のように好適には哺乳動物に免疫付与することにより)これに対して産生される場合、(本明細書でさらに規定のように)ペプチド抗原「に指向性を有する」と言うこともできる。本発明のペプチド抗原に対して本発明の免疫グロブリン配列及びポリペプチドを産生する技法、並びに本発明のペプチド抗原に結合する本発明の免疫グロブリン配列及びポリペプチドをスクリーニング又は選択する技法は、例えば本明細書でのさらなる開示に基づき当業者にとって明らかであろう。

【0202】

概して、本発明のペプチド抗原自体に指向性を有する及び/又は本発明のペプチド抗原に対してスクリーニングした、これを用いて選択した及び/又はこれに対して産生された、本発明の免疫グロブリン配列及びポリペプチドは、細胞の表面上に存在するイオンチャンネル(又は少なくとも1つのそのサブユニット)の一部を形成する本発明のペプチド抗原と結合する(特に本明細書で規定のように特異的に結合する)ことも可能であることが期待される。このため、本発明のペプチド抗原は(本明細書で規定のように)本発明の免疫グロブリン配列及びポリペプチドを生成する方法に特定に使用することができ、このような方法及び使用は本発明のさらなる態様を形成する。

【0203】

例えば、このような方法が以下の工程の1つ又は以下の工程の両方の好適な組合せを含み得る:

a) 所望の細胞外の部分、領域、ドメイン、ループ又は他の細胞外エピトープ(複数可)に対する免疫応答が惹起されるように、ラクダ科動物に所望の細胞外の部分、領域、ドメイン、ループ若しくは他の細胞外エピトープ(複数可)を含む好適な抗原を好適に免疫付与する工程。抗原は、所望の細胞外の部分、領域、ドメイン、ループ又は他の細胞外エピトープ(複数可)に対する免疫応答を惹起することが可能な任意の好適な抗原;例えばこれに限定されないが、その表面上に所望の細胞外の部分、領域、ドメイン、ループ又は他の細胞外エピトープ(複数可)を有する全細胞;この細胞壁断片若しくはこのような細胞に由来する任意の他の好適な調製物;その表面上に所望の細胞外の部分、領域、ドメイン、ループ又は他の細胞外エピトープ(複数可)を有する小胞;所望の細胞外の部分、領域、ドメイン、ループ若しくは他の細胞外エピトープ(複数可)を含む、イオンチャンネルのサブユニット若しくはサブユニットの断片;又は所望の細胞外の部分、領域、ドメイン、ループ若しくは他の細胞外エピトープ(複数可)(の免疫グロブリン配列)を含む及び/又はこれに基づく合成若しくは半合成のペプチドであってもよく、及び/又は

b) 所望の細胞外の部分、領域、ドメイン、ループ又は他の細胞外エピトープ(複数可)との親和性及び/又は結合に関してスクリーニングする工程。これは例えば、表面上で重鎖抗体を発現する細胞(例えば好適に免疫付与したラクダ科動物から得られたB細胞)のセット、コレクション若しくはライブラリをスクリーニングすることにより、VHH配列若しくはナノボディ配列の(ナイーブ又は免疫)ライブラリのスクリーニングにより、又はVHH配列若しくはナノボディ配列をコードする核酸配列の(ナイーブ又は免疫)ライブラリのスクリーニングにより実施することができ、これらは全て本明細書で言及されるさらなる開示及び従来技術を参照して、それ自体が既知の方法で実施してもよく、

この方法はさらに任意でそれ自体が既知の1つ又は複数の他の好適な工程、例えばこれ

10

20

30

40

50

に限定されないが、親和性成熟工程、所望の免疫グロブリン配列を発現する工程、所望の抗原（この場合、イオンチャネル）との結合及び／又はこれに対する活性に関してスクリーニングする工程、所望の免疫グロブリン配列又はヌクレオチド配列を決定する工程、（例えば本明細書でさらに記載のように）1つ又は複数のヒト置換を導入する工程、好適な多価及び／又は多重特異性フォーマットでフォーマットする工程、所望の生物学的及び／又は生理学的特性に関してスクリーニングする（すなわち本明細書に記載されるような好適なアッセイを使用する）工程、及び／又は1つ又は複数のこのような工程の任意の好適な組合せを1つ又は複数任意の好適な順番で含んでいてもよい。

【0204】

このような方法及びこのような方法で得られた免疫グロブリン配列、並びにこれらを含むか又はこれらから本質的になるタンパク質及びポリペプチドは、本発明のさらなる態様を形成する。

【0205】

好ましい一実施形態において、本発明の免疫グロブリン配列又はポリペプチドは「モノクローナル」免疫グロブリン配列又はポリペプチドであり、これは上記タンパク質又はポリペプチドに存在するイオンチャネルに指向性を有する1つ又は複数の免疫グロブリン配列の少なくともそれぞれ（好ましくは上記タンパク質又はポリペプチドに存在する免疫グロブリン配列の全て）が当業者に一般的に理解されるような「モノクローナル」であることを意味する。しかしながらこの点において、本明細書でさらに記載のように、本発明は、同一のイオンチャネルの異なる部分、領域、ドメイン、ループ又はエピトープに、特に同一のイオンチャネルの異なる細胞外の部分、領域、ドメイン、ループ又はエピトープに指向性を有する免疫グロブリン配列（特にモノクローナル免疫グロブリン配列）を2つ以上含む、多価又は多重特異性のタンパク質を明確に包含することに留意すべきである。

【0206】

別の態様では本発明は、（本明細書で規定のように）イオンチャネルを調節することが可能な、少なくとも1つの本発明の免疫グロブリン配列、又は本発明の免疫グロブリン配列の少なくとも1つの部分、断片、類似体、変異体若しくは誘導体を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に関する。好ましくは、上記タンパク質又はポリペプチドは（本明細書で規定のように）イオンチャネルを完全に又は部分的に遮断することが可能である。

【0207】

本明細書に記載のタンパク質又はポリペプチドは、好ましくは細胞の表面上で発現されるイオンチャネルに、及び／又はイオンチャネルの少なくとも1つの細胞外の領域、ドメイン、ループ又は他の細胞外エピトープに、より好ましくはイオンチャネルの少なくとも1つの細胞外ループに指向性を有する。具体的な一態様では、イオンチャネルが6つの膜貫通ドメイン（6-TM）を有するイオンチャネルである場合、タンパク質又はポリペプチドは細胞外E3ループに指向性を有するのが好ましい。本明細書に記載のタンパク質又はポリペプチドは本発明のペプチド抗原にも指向性を有し得る。

【0208】

具体的な一態様では、本発明は本発明の少なくとも1つの免疫グロブリン配列、又は本発明の免疫グロブリン配列の少なくとも1つの部分、断片、類似体、変異体若しくは誘導体を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であって、タンパク質又はポリペプチドに存在する本発明の免疫グロブリン配列のうちの少なくとも1つ（又は本発明の免疫グロブリン配列の部分、断片、類似体、変異体若しくは誘導体のうちの少なくとも1つ）がイオンチャネルに指向性を有する、タンパク質又はポリペプチドに関する。好ましくはタンパク質又はポリペプチドに存在する本発明の免疫グロブリン配列のうちの少なくとも1つ（又は本発明の免疫グロブリン配列の部分、断片、類似体、変異体若しくは誘導体のうちの少なくとも1つ）がイオンチャネルを調節する、より好ましくはイオンチャネルを完全に又は部分的に遮断することが可能である。また好ましくは、タンパク質又はポリペプチドに存在する本発明の免疫グロブリン配列のうちの少なくとも1つ（又

10

20

30

40

50

は本発明の免疫グロブリン配列の部分、断片、類似体、変異体若しくは誘導体のうちの少なくとも1つ)が、イオンチャネルの少なくとも1つの細胞外の領域、ドメイン、ループ又は他の細胞外エピトープに、具体的にはイオンチャネルの1つの細胞外ループに指向性を有する。具体的な一態様では、イオンチャネルが6つの膜貫通ドメイン(6-TM)を有するイオンチャネルである場合、タンパク質又はポリペプチドに存在する本発明の免疫グロブリン配列のうちの少なくとも1つが細胞外E3ループに指向性を有するのが好ましい。

【0209】

本明細書に記載のタンパク質又はポリペプチドは、本発明の単一の免疫グロブリン配列(又は本発明の免疫グロブリン配列の部分、断片、類似体、変異体若しくは誘導体)、又は任意で好適には(本明細書に記載のような)1つ若しくは複数の好適なリンカーを介して連結される、本発明の免疫グロブリン配列(又は本発明の免疫グロブリン配列の部分、断片、類似体、変異体若しくは誘導体)のうちの少なくとも2つ(例えば2つ、3つ、4つ又はそれ以上)を含み得るか又はこれから本質的になり得る。このようなリンカーの好適な例は、例えば本明細書のさらなる開示に基づき当業者にとって明らかであろう。

10

【0210】

本発明の一態様では、タンパク質又はポリペプチドが少なくとも2つの本発明の免疫グロブリン配列を含む場合、タンパク質又はポリペプチドに存在する本発明の免疫グロブリン配列(又は本発明の免疫グロブリン配列の部分、断片、類似体、変異体若しくは誘導体)のうちの少なくとも2つが同じイオンチャネルに指向性を有する。例えば、タンパク質又はポリペプチドに存在する本発明の免疫グロブリン配列(又は本発明の免疫グロブリン配列の部分、断片、類似体、変異体若しくは誘導体)のうちの少なくとも2つが同じイオンチャネルの異なる細胞外の領域、ドメイン、ループ又は他の細胞外エピトープに指向性を有し得る。しかしながら好ましくは、タンパク質又はポリペプチドに存在する本発明の免疫グロブリン配列(又は本発明の免疫グロブリン配列の部分、断片、類似体、変異体若しくは誘導体)のうちの少なくとも1つ(又は少なくとも2つ)がイオンチャネルの少なくとも1つの細胞外ループに指向性を有する。

20

【0211】

本発明のタンパク質又はポリペプチドが、少なくとも2つの本発明の免疫グロブリン配列(又は本発明の免疫グロブリン配列の部分、断片、類似体、変異体若しくは誘導体)を含むか又はこれから本質的になる場合、本発明のタンパク質又はポリペプチドは、少なくとも2つの異なる本発明の免疫グロブリン配列(又は本発明の免疫グロブリン配列の部分、断片、類似体、変異体若しくは誘導体)を含み得るか、及び/又は少なくとも2つの同一の本発明の免疫グロブリン配列(又は本発明の免疫グロブリン配列の部分、断片、類似体、変異体若しくは誘導体)を含み得る。

30

【0212】

具体的な一態様では、本発明のタンパク質又はポリペプチドが、少なくとも2つの本発明の免疫グロブリン配列(又は本発明の免疫グロブリン配列の部分、断片、類似体、変異体若しくは誘導体)を含むか又はこれから本質的になる場合、本発明のタンパク質又はポリペプチドは、イオンチャネルとは異なるタンパク質、ポリペプチド又は他の抗原に指向性を有する、少なくとも1つの本発明の免疫グロブリン配列(又は本発明の免疫グロブリン配列の部分、断片、類似体、変異体若しくは誘導体)を含み得る。

40

【0213】

別の態様では本発明は、イオンチャネルを調節することが可能な本発明の免疫グロブリン配列、又は本発明の免疫グロブリン配列の部分、断片、類似体、変異体若しくは誘導体に関する。好ましくは、上記本発明の免疫グロブリンは、(本明細書に規定のように)イオンチャネルを完全に又は部分的に遮断することが可能である。

【0214】

本明細書に記載の本発明の免疫グロブリン配列は、好ましくはイオンチャネルの少なくとも1つの細胞外の領域、ドメイン、ループ又は他の細胞外エピトープに、より好ましく

50

はイオンチャネルの少なくとも1つの細胞外ループに指向性を有する。具体的な一態様では、イオンチャネルが6つの膜貫通ドメイン(6-TM)を有するイオンチャネルである場合、本発明の免疫グロブリン配列は細胞外E3ループに指向性を有するのが好ましい。

【0215】

適用可能な場合、本発明の免疫グロブリン配列が、イオンチャネルの2つ以上の抗原決定基、エピトープ、部分、ドメイン、サブユニット又は立体構造と結合することができることも、本発明の範囲内である。このような場合、本発明の免疫グロブリン配列及び/又はポリペプチドが結合する、イオンチャネルの抗原決定基、エピトープ、部分、ドメイン又はサブユニットは、本質的に同じであり得るか(例えば、イオンチャネルが反復構造モチーフを含有するか、又は多量体形態で生じる場合)、又は異なり得る(後者の場合、本発明の免疫グロブリン配列及びポリペプチドが、同じであり得るか、若しくは異なり得る親和性及び/又は特異性で、イオンチャネルのこのような異なる抗原決定基、エピトープ、部分、ドメイン、サブユニットと結合し得る)。また、例えば、イオンチャネルが活性な立体構造及び不活性な立体構造で存在する場合、本発明の免疫グロブリン配列及びポリペプチドは、これらの立体構造のいずれか一方に結合してもよく、又はこれらの立体構造の両方に(すなわち、同じであり得る又は異なり得る親和性及び/又は特異性で)結合してもよい。また、例えば、本発明の免疫グロブリン配列及びポリペプチドは、関連リガンドと結合するイオンチャネルの立体構造と結合してもよく、関連リガンドと結合していないイオンチャネルの立体構造と結合してもよく、又はこのような立体構造の両方と(また同じであり得る又は異なり得る親和性及び/又は特異性で)結合してもよい。

10

20

【0216】

また、本発明の免疫グロブリン配列及びポリペプチドは概して、イオンチャネルの天然又は合成の類似体、変異体、突然変異体、対立遺伝子、部分及び断片全て;又は少なくとも、本発明の免疫グロブリン配列及びポリペプチドがイオンチャネル(例えば野生型のイオンチャネル)で結合する抗原決定基(複数可)又はエピトープ(複数可)と本質的に同じである抗原決定基又はエピトープを1つ又は複数含有する、イオンチャネルのこれらの類似体、変異体、突然変異体、対立遺伝子、部分及び断片と少なくとも結合することが期待される。また、このような場合、本発明の免疫グロブリン配列及びポリペプチドは、本発明の免疫グロブリン配列が(野生型)イオンチャネルと結合する親和性及び特異性と同じか、又は異なる(すなわちこれより高いか、又は低い)親和性及び/又は特異性で、このような類似体、変異体、突然変異体、対立遺伝子、部分及び断片と結合し得る。本発明の免疫グロブリン配列及びポリペプチドが、イオンチャネルの類似体、変異体、突然変異体、対立遺伝子、部分及び断片によっては結合するものもあれば、結合しないものもあることも、本発明の範囲内に含まれる。

30

【0217】

イオンチャネルが単量体形態及び1つ又は複数の多量体形態で存在する場合、本発明の免疫グロブリン配列及びポリペプチドが、単量体形態のイオンチャネルのみと結合するか、多量体形態のイオンチャネルのみと結合するか、又は単量体及び多量体形態の両方のイオンチャネルと結合することは、本発明の範囲内である。同様に、このような場合、本発明の免疫グロブリン配列及びポリペプチドは、本発明の免疫グロブリン配列が多量体形態と結合する親和性及び特異性と同じか、又は異なる(すなわちこれより高いか、又は低い)親和性及び/又は特異性で単量体形態のイオンチャネルと結合し得る。

40

【0218】

また、イオンチャネルが、タンパク質複合体を形成するように他のタンパク質又はポリペプチドと(例えば複数のサブユニットと)会合することができる場合、本発明の免疫グロブリン配列及びポリペプチドが、会合していない状態でイオンチャネルと結合するか、会合した状態でイオンチャネルと結合するか、又はその両方でイオンチャネルと結合することは、本発明の範囲内である。これら全ての場合で、本発明の免疫グロブリン配列及びポリペプチドは、本発明の免疫グロブリン配列及びポリペプチドが単量体状態及び非会合状態でイオンチャネルと結合する親和性及び/又は特異性と同じか、又は異なり得る(す

50

なわちこれより高いか、又は低い)親和性及び/又は特異性でこのような多量体又は会合したタンパク質複合体と結合し得る。

【0219】

また、当業者にとって明らかなように、イオンチャンネルに指向性を有する免疫グロブリン配列を2つ以上含有するタンパク質又はポリペプチドは、対応する単量体免疫グロブリン配列(複数可)よりも高い結合活性でイオンチャンネルと結合し得る。例えば、これらに限定されないが、イオンチャンネルの異なるエピトープに指向性を有する免疫グロブリン配列を2つ以上含有するタンパク質又はポリペプチドは、異なる単量体それぞれよりも高い結合活性で結合することができ(通常結合し)、イオンチャンネルに指向性を有する免疫グロブリン配列を2つ以上含有するタンパク質又はポリペプチドも、より高い結合活性でイ

10

【0220】

概して、本発明の免疫グロブリン配列及びポリペプチドは、当業者にとって明らかなように、生物学的及び/又は治療的観点から最も関連がある形態のイオンチャンネル(単量体、多量体及び会合している形態を含む)と少なくとも結合する。本明細書で想定される使用に好適である限り、本発明の免疫グロブリン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、イオンチャンネルとの結合に関して機能的な抗原結合部位(の少なくとも一部)を含有し、より好ましくはイオンチャンネル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)親和性でイオンチャンネル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、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

【0221】

本明細書でさらに記載される、本発明の具体的であるが非限定的な一態様において、このような類似体、突然変異体、変異体、対立遺伝子、誘導体は、その元となる免疫グロブリン配列に比べて(本明細書にさらに記載されるように)増大した血清半減期を有する。例えば、本発明の免疫グロブリン配列は、本発明の免疫グロブリン配列の誘導体の半減期が増大するように、半減期を延長する1つ又は複数の基又は部分(例えばPEG)と(化学的に又は別の方法で)連結され得る。

【0222】

具体的ではあるが非限定的な一態様では、本発明の免疫グロブリン配列は、免疫グロブリンフォールドを含む免疫グロブリン配列であり得るか、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免疫グロブリン配列であり得る。特にHalaby et al., J. (1999) Protein Eng. 12, 563-71によるレビューを参照する。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、このような免疫グロブリン配列は、イオンチャンネルと(本明細書に規定のように)特異的に結合することができ、より好ましくは本明細書に規定のように(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)親和性でイオンチャンネルと結合することができる。また、このような免疫グロブリン配列の部分、断片、類似体、突然変異体、変異体、対立遺伝子及び/又は誘導体は、免疫グロブリンフォールドを含むか、

40

50

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できるようなものであるのが好ましい。

【0223】

具体的であるが、非限定的に、本発明の免疫グロブリン配列は、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免疫グロブリン配列、又はこのような免疫グロブリン配列の任意の好適な断片（したがって通常、本明細書でさらに記載されるように、CDRの少なくとも1つを形成するアミノ酸残基の少なくとも幾つかを含有する）であり得る。

【0224】

本発明のこのような免疫グロブリン配列において、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。

【0225】

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。特に好ましい一態様では、フレームワーク配列は、V_{H 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）ラクダ化した通常のV_H配列であるいずれかのフレームワーク配列である。

【0226】

フレームワーク配列は、本発明の免疫グロブリン配列が、ドメイン抗体（又はドメイン抗体としての使用に好適な免疫グロブリン配列）、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免疫グロブリン配列）、「dAb」（又はdAbとしての使用に好適な免疫グロブリン配列）、又はナノボディ（商標）（V_{H H}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。同様に、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。

【0227】

特に、本発明の免疫グロブリン配列に存在するフレームワーク配列は、本発明の免疫グロブリン配列がナノボディ（商標）であるように、（本明細書に規定の）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。

【0228】

同様に概して、本発明の免疫グロブリン配列に関して本明細書に記載のように、上記のいずれかの好適な断片（又は断片の組合せ）（例えば1つ又は複数のフレームワーク配列に好適に隣接した、及び/又はこれを介して連結した、1つ又は複数のCDR配列を（例えば、これらのCDR配列及びフレームワーク配列が、断片が誘導された完全長の（full-sized：フルサイズの）免疫グロブリン配列で発生し得るのと同じ順序（order）で）含有する断片）を使用することも可能である。このような断片は同様に、免疫グロブリンフォールドを含むか、若しくは形成することができるようなもの、又は代替的に免疫グロブリンフォールドを含まないか、若しくは形成することができないようなものであってもよい。

【0229】

特定の一態様において、このような断片は、本明細書に記載の単一CDR配列（特にCDR3配列）を含み、フレームワーク配列（の一部）（特に断片が誘導される免疫グロブリン配列において上記CDR配列に隣接するフレームワーク配列（複数可）の一部）が両側に隣接する。例えば、CDR3配列は、FR3配列（の一部）の後にあり、FR4配列

10

20

30

40

50

(の一部)の前にあり得る。このような断片はまた、ジスルフィド架橋、特にCDR配列の前後それぞれにある2つのフレームワーク領域を連結するジスルフィド架橋を含有してもよい(このようなジスルフィド架橋を形成するために、上記フレームワーク領域で自然発生するシステイン残基を使用するか、又は代替的にシステイン残基を上記フレームワーク領域に合成的に付加若しくは導入してもよい)。これらの「促進断片」のさらなる説明に関しては、同様に国際公開第03/050531号、並びに国際公開第2009/127691号を参照する。

【0230】

本発明の免疫グロブリン配列は、具体的に免疫グロブリン配列又はその好適な断片、より具体的には免疫グロブリン可変ドメイン配列又はその好適な断片(例えば軽鎖可変ドメイン配列(例えばV_L配列)若しくはその好適な断片、又は重鎖可変ドメイン配列(例えばV_H配列)若しくはその好適な断片)であり得る。本発明の免疫グロブリン配列は、重鎖可変ドメイン配列である場合、通常の本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。

10

【0231】

しかし本発明が、本発明の免疫グロブリン配列(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、また本発明の免疫グロブリン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免疫グロブリン配列は、(任意の好適な種由来の)天然免疫グロブリン配列、又は合成若しくは半合成の免疫グロブリン配列であり得る。本発明の具体的ではあるが非限定的な態様では、免疫グロブリン配列は(任意の好適な種由来の)天然免疫グロブリン配列、又は合成若しくは半合成の免疫グロブリン配列であり、これにはこれらに限定されないが、(本明細書に規定の)「ヒト化」免疫グロブリン配列(例えば部分又は完全ヒト化マウス又はウサギ免疫グロブリン配列、特に部分又は完全ヒト化V_HH配列又はナノボディ)、(本明細書に規定の)「ラクダ化」免疫グロブリン配列、並びに親和性成熟(例えば、合成、ランダム又は天然免疫グロブリン配列から開始する)、CDRグラフト化、ベニヤリング(veneering)、異なる免疫グロブリン配列由来の断片の組合せ、重複プライマーを使用したPCRアセンブリ、及び当業者に既知の免疫グロブリン配列を遺伝子操作する同様の技法、又は上記のいずれかの任意の好適な組合せ等の技法によって得られる免疫グロブリン配列が含まれる。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記載及び従来技術を参照する。

20

30

【0232】

同様に、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(例えば細胞から単離されるDNA又はRNA)から単離される配列、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

【0233】

特に本発明の免疫グロブリン配列は、(本明細書で規定の)ナノボディ(商標)又はその好適な断片(備考:ナノボディ(商標)(NanobodyTM, NanobodiesTM)及びナノクローン(商標)は、Ablynx N. V.の商標である)であり得る。イオンチャンネル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。ナノボディの概説に関しては、以下のさらなる記載、及び本明細書で引用される従来技術を参照する。しかしこれに関して、本明細書及び従来技術は主に、いわゆる「V_H3群」のナノボディ(すなわちDP-47、DP-51又はDP-29等のV_H3群のヒト生殖細胞系列の配列との高度な配列相同性を有するナノボディ)を説明し、このナノボディは本発明

50

の好ましい態様を形成することに留意すべきである。しかし概して、本発明は最も広範な意味で、イオンチャンネルに指向性を有する任意のタイプのナノボディを包含し、例えば2006年4月14日付けでAblynx N. V.により出願された"DP-78-like Nanobodies"と題する米国仮特許出願第60/792,279号に記載されるように、例えばいわゆる「V_H4群」に属するナノボディ(すなわちDP-78等のV_H4群のヒト生殖細胞系列の配列との高度な配列相同性を有するナノボディ)も包含することに留意すべきである。

【0234】

概して、ナノボディ(特にV_HH配列及び部分ヒト化ナノボディ)は特に、(同様に本明細書にさらに記載される)1つ又は複数のフレームワーク配列における(本明細書に記載される)1つ又は複数の「特徴的な(Hallmark:ホールマーク)残基」の存在を特徴とし得る。したがって概して、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を指し、CDR1~CDR3はそれぞれ相補性決定領域1~相補性決定領域3を指し、1つ又は複数の特徴的な残基は本明細書にさらに規定されるようなものである)を有する免疫グロブリン配列として定義することができる。

【0235】

具体的にナノボディは、(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を指し、CDR1~CDR3はそれぞれ相補性決定領域1~相補性決定領域3を指し、フレームワーク配列は本明細書にさらに規定されるようなものである)を有する免疫グロブリン配列であり得る。

【0236】

具体的にナノボディは、(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を指し、CDR1~CDR3はそれぞれ相補性決定領域1~相補性決定領域3を指し、フレームワーク配列は本明細書にさらに規定されるようなものである)を有する免疫グロブリン配列であり得る。

【0237】

より具体的に、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を指し、CDR1~CDR3はそれぞれ相補性決定領域1~相補性決定領域3を指す)を有する免疫グロブリン配列であり得る;ここで

i)好ましくは、カバットナンバリング(Kabat numbering)による11位、37位、44位、45位、47位、83位、84位、103位、104位及び108位のアミノ酸残基の1つ又は複数は、以下の表B-2で言及する特徴的な残基から選択され、

ii)上記免疫グロブリン配列は、配列番号1~配列番号22の免疫グロブリン配列の少なくとも1つとの少なくとも80%のアミノ酸同一性を有する(ここでアミノ酸同一性の程度を決定するためにCDR配列を形成するアミノ酸残基(配列番号1~配列番号22の配列においてXで示す)は無視する)。

【0238】

これらのナノボディにおいて、CDR配列は概して、本明細書中にさらに規定されるようなものである。

【0239】

したがって、本発明は、イオンチャンネルと(本明細書に規定のように)結合することができる及び/又はこれに指向性を有するこのようなナノボディ、その好適な断片、並びにこのようなナノボディ及び/又は好適な断片を1つ又は複数含むか、又はこれらから本質

10

20

30

40

50

的になるポリペプチドにも関する。

【0240】

配列番号705～配列番号788、より好ましくは配列番号726～配列番号750、配列番号753～配列番号758、配列番号762～配列番号764、配列番号772～配列番号773、配列番号775、又は配列番号778～配列番号780（表A-1を参照されたい）はイオンチャネルに対して惹起されている多くのV_{H H}配列の免疫グロブリン配列を与える。

【0241】

表A-1：好ましいV_{H H}配列又はナノボディ配列（本明細書で特定の名称を有する配列又は配列番号X（ここでXは関連の免疫グロブリン配列を表す番号である）としても表される）：

【表 1】

名称	配列番号 X: ここで X=	P2X7 機能	ファミ リー	免疫グロブリン配列
P2X7PMP2 C4	705	binder 結合因子	1	EVQLVESGGDVVQAGGSLRLSCLASGFT FDDYAIGWFRQAPGKEREGISCSSTGNV FYADSVKGRFTISSDKEKNTLYLQMNSLK PEDTAVYHCAAGHFTVDSGKVLLRTDISS WGQGTQVTVSS
P2X7PMP2A 6	706	Binder	1	EVQLVESGGDVVQAGGSLRLSCLASGFT FDDYAIGWFRQAPGKEREGISCSSTGNV FYADSVKGRFTISSDKEKNTLYLQMNSLE PEDTAVYHCAAGHFTVDSGKVLLRTDISS WGQGTQVTVSS
P2X7PMP4 D5	707	Binder	1	EMQLVESGGDVVQAGGSLRLSCLASGFT FDDYAIGWFRQAPGKEREGISCSSTGNV FYADSVKGRFTISSDKEKNTLYLQMNSLK PEDTAVYHCAAGHFTVDSGKVLLRTDISS WGQGTQVTVSS
P2X7PMP20 E8	708	Binder	1	EVQLVESGGDVVQAGGSLRLSCLASGFT FDDYAIGWFRQAPGKEREGISCSSTGNV FYADSVKGRFTISSDKEKNTLYLQMNSLK PGDTAVYHCAAGHFTVDSGKVLLRTDISS WGQGTQVTVSS
P2X7PMP16 H8	709	Binder	1	EVQLVESGGDVVQAGGSLRLSCLASGFT FDDYAIGWFRQAPGKEREGISCSSTGNV FYADSVKGRLTISSDKEKNTLYLQMNSLK PEDTAVYHCAAGHFTVDSGKVLLRTDISS WGQGTQVTVSS
P2X7PMP16 B10	710	Binder	1	EVQLVESGGDVVQAGGSLRLSCLASGFT FDDYAIGWFRQAPGKEREGISCSSTGNV FYADSVKGRFTISSDKEKNTLYLQMNSLK PEDTAVYHCAAGHFTVDSGKVLLRTDISS WGQGTQVTVSS

10

20

30

40

P2X7PMP4 G6	711	binder	1	EVQLVESGGDVVQAGGSLRLSCLASGFT FDDYAIGWFRQAPGKEREKREGISCISSSTGNV FYADSVKGRFTISSDKEKNTLYLQMNSLK PEDTAVYHCAAGHFTVDSGKVLRTDVS SWGQGTQVTVSS
P2X7PMP1A 8	712	Binder	2	EVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGFT LDDYAIWFRQAPGKEREKREGVSILSSIGKT FYADSVKDRFSITADGAKTTVFLQMNSLK PGDTAIYYCVAGHFVYNDGAISLNTARGS GFWGQGAQVTVSS
P2X7PMP1 C9	713	Binder	2	EVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGFT LDDYAIWFRQAPGKEREKREGVSILSSIGKT FYADSVKDRFSITADGAKTTVFLQMNSLK PEDTAIYYCVAGHFVYNDGAISLNTARGS GFWGQGAQVTVSS
P2X7PMP20 B10	714	Binder	2	EVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGFT LDDYAIWFRQAPGKEREKREGVSILSSIGKT FYADSVKDRFSITADGAKTTVFLQMNSLK PEDTAIYYCVAGHFVYNDGAISLNTARGS GFWGQGTQVTVSS
P2X7PMP20 C9	715	Binder	2	EVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGFT LDDYAIWFRQAPGKEREKREGVSILSSIGKT FYADSAKDRFSITADGAKTTVFLQMNSLK PEDTAIYYCVAGHFVYNDGAISLNTARGS GFWGQGTQVTVSS
P2X7PMP5A 1	716	Binder	3	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASERT YSMGWFRQAPGKEREFVAGSGWDGIPT RYADSVKGRILTISRDNKNTVSLQMSGL KPEDTAIYYCATGTSVYHYQYWGQGTQV TVSS

10

20

30

P2X7PMP5B 1	717	binder	3	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASERT YSMGWFRQAPGKEREFVAGSGWDGIPT RYADSVKGRFTISRDNKNTVSLQMSGL KPEDTAIYYCATGTSVYHYQYRGQGTQV TVSS
P2X7PMP11 G1	718	Binder	3	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASERT YSMGWFRRAPGKEREFVAGSGWDGIPT RYADSVKGRFTISRDNKNTVSLQMSGL KPEDTAIYYCATGTSVYHYQYWGGGTQV TVSS
P2X7PMP11 A1	719	Binder	3	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASERT YSVGWFRQAPGKEREFVAGSGWDGTP RYADSVKGRFTISRDNKNTVSLQMSGL KPEDTAIYYCATGTSVYHYQYWGGGTQV TVSS
P2X7PMP7E 2	720	Binder	3	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAPERT YSMGWFRQAPGKEREFVAGSGWDGIPT RYADSVKGRFTISRDNKNTVSLQMSGL KPEDTAIYYCATGTSVYHYQYWGGGTQV TVSS
P2X7PMP5F 1	721	Binder	3	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASERT YSMGWFRQAPGKEREFVAGSGWDGIPT RYADSVKGRFTISRDNKNTVSLQMSGL KPEDTAIYYCATGTSVYHYQYWGGGTQV TVSS
P2X7PMP7F 3	722	Binder	3	EVQLVESRGGLVQAGGSLRLSCAASERT YSMGWFRQAPGKEREFVAGSGWDGIPT RYADSVKSRFTISRDNKNTVSLQMSGLK PEDTAIYYCATGTSVYHYQYWGGGTQVT VSS

10

20

30

P2X7PMP13 B2	723	binder	3	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASERT YSMGWFRQAPGKEREVAGSGWDGIPT RYADSVKGRFTISRDNNAKNAVSLQMSGL KPEDTAIYYCATGTSVYHYQYWGGGTQV TVSS
P2X7PMP11 D3	724	Binder	3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASERT YSMGWFRQAPGKEREVAGSGWDGIPT RYADSVKGRFTISRDNNAKNTVSLQMSGL KPEDTAIYYCATGTSVYHYQYWGGGTQV TVSS
P2X7PMP7F 1	725	Binder	3	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASERT YSMGWFRQAPGKEREVAGSGWDGIPT RYADSVKGRFTISRDNNAKSTVSLQMSGL KPEDTAIYYCATGTSVYHYQYWGGGTQV TVSS
P2X7PMP4B 4	726	Enhancer	4	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRT VSDYGMGWFRQAPGKLREFVASINWSGI YTRYIDSVEGRFTISRDNKNTLYLQMNN LKAEDTAVYYCAYFLGPNWYSNYGRPSS YDFYGGGTQVTVSS
P2X7PMP19 A7	727	Enhancer	4	KVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRT VSDYGMGWFRQAPGKLREFVASINWSGI YTRYIDSVEGRFTISRDNKNTLYLQMNN LRAEDTAVYYCAYFLGPNWYSNYGRPSS YDFYGGGTQVTVSS
P2X7PMP19 A8	728	Enhancer	4	EVQLMESGGGLVQAGGSLRLSCAASGR TVSDYGMGWFRQAPGKLREFVASINWS GIYTRYIDSVEGRFTISRDNKNTLYLQMN NLKAEDTAVYYCAYFLGPNWYSNYGRPS SYDFYGGGTQVTVSS

10

20

30

P2X7PMP19 D12	729	Enhancer	4	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRT VSDYGMGWFRQAPGKREFVASINWSGI YTRYIDSVEGRFTISRDNKNTLYLQMNN LKAEDTAVYYCAYFLGPNWYSNYGRPSS YGFYQGQTQVTVSS	
P2X7PMP20 B8	730	Enhancer	4	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRT VSDYGMGWFRQAPGKECFVASINWSG TYTRYIDSVEGRFTISRDNTEENTLYLQMN NLKAEDTAVYYCAYFLGPNWYSYGRPS SYDFYQGQTQVTVSS	10
P2X7PMP4 G4	731	Enhancer	4	EVQLMESGGGLVQAGGPLRLSCAASGR TVSDYGMGWFRQAPGKEREFVASINWS GTYTRYIDSVEGRFTISRDNTEENTLYLQM NNLKAEDTAVYYCAYFLGPNWYSYGRP SSYDFYQGQTQVTVSS	20
P2X7PMP8 G11	732	Blocker	5,1	AVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGNF FRVNTMAWYRQAPGKQRELVADITRGDR TNYADTVNGRFTISRDNVRNTVYLQMNG LRPEDTAAYYCYAVIELGVLEPRDYWGQ GTQVTVSS	30
P2X7PMP6A 11	733	Blocker	5,2	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGNF FRVNTMAWYRQAPGKQRELVADITRGDR TNYADTVNGRFTISRDNVRNTVYLQMNG LKPEDTAAYYCYARIELGVLEPRDYWGQ GTQVTVSS	40
P2X7PMP8E 6	734	Blocker	5,2	EVQLVESGGGLVQAGGPLRLSCAASGNF FRVNTMAWYRQAPGKQRELVADITRGDR TNYADTVNGRFTISRDNVRNTVYLQMNG LKPEDTAAYYCYARIELGVLEPRDYWGQ GTQVTVSS	
P2X7PMP12 A11	735	Blocker	5,2	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSF FRVNNMAWYRQAPGKQRELVADITRGD RTNYADSVNGRFTISRDNVRNTVYLQMN GLKPEDTAVYYCYARIELGVLEPRDYWG QGTQVTVSS	

P2X7PMP14 F6	736	Blocker	5,2	EVQLVESGGGLVQAGGPLRLSCAASGSF FRVNNMAWYRQAPGKQRELVADITRGD RTNYADSVNGRFTISRDNVRNTVYLQMN GLKPEDTAVYYCYARIELGVLEPRDYWG QGTQVTVSS
P2X7PMP8B 4	737	Blocker	5,2	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGNF FRVNTMAWYRQAPGKQRELVADITRGDR TNYADTVNGRFTISRDNVRNTVYLQMNS LKPEDTAAYYCYARIELGVLEPRDYWGQ GTQVTVSS
P2X7PMP14 G4	738	Blocker	5,2	EVQLVESGGGLVQAGGSLGLSCAASGNF FRVNTMAWYRQAPGKQRELVADITRGDR TNYADTVNGRFTISRDNVRNTVYLQMNG LKPEDTAAYYCYARIELGVLEPRDYWGQ GTQVTVSS
P2X7PMP8 H5	739	Blocker	5,2	EMQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGN FFRVNTMAWYRQAPGKQRELVADITRGD RTNYADTVNGRFTISRDNVRNTVYLQMN GLKPEDTAAYYCYARIELGVLEPRDYWG QGTQVTVSS
P2X7PMP14 F10	740	Blocker	5,2	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLLCAASGSF FRVNNMAWYRQAPGKQRELVADITRGD RTNYADSVNGRFTISRDNVRNTVYLQMN GLKPEDTAVYSCYARIELGILEPRDYWGQ GTQVTVSS
P2X7PMP8A 11	741	Blocker	5,2	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSF FRVNNMAWYRQAPGKQRELVADITRGD RTNYADSVNGRFTISRDNVRNTVYLQMD GLKPEDTAVYYCYARIELGVLVPRDYWG QGTQVTVSS

10

20

30

P2X7PMP8 H6	742	Blocker	5,2	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSF FRVNNMAWYRQAPGKQRELVADITRGD RTNYADSVNGRFTISRDNVRNTVYLQMN GLKPEDTAVYYCYARIELGPLVPRDYWG QGTQVTSS
P2X7PMP8F 5	743	Blocker	5,2	EVQLVKSGGGLVQAGGSLRLSCAASGSF FRVNNMAWYRQAPGKQRELVADITRGD RTNYADSVNGRFTISRDNVRNTVYLQMN GLKPEDTAVYYCYARIELGPLVPRDYWG QGTQVTSS
P2X7PMP8 G12	744	Blocker	5,3	KVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSF FRVNNMAWYRQGGPKQRELVADITRGD RTNYADSVNGRFTISRDNVRNTVYLQMN GLKPEDTAVYYCYATIELGVLEPRDYWG QGTQVTSS
P2X7PMP8B 12	745	Blocker	5,3	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSF FRVNNMAWYRQGGPKQRELVADITRGD RTNYADSVNGRFTISRDNVRNTVYLQMN GLKPEDTAVYYCYATIELGVLEPRDYWG QGTQVTSS
P2X7PMP14 G11	746	Blocker	5,3	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGSF FRVNNMAWYRQGGPKQRELVADITRGD RTNYADSVNGRFTISRDNVRNTVYLQMN GLKPEDTAVYYCYATIELGVLEPRDYWG QGTQVTSS
P2X7PMP8 C12	747	Blocker	5,3	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSF FRVNNMAWYRQAPGKQRELVADITRGD RTNYADSVNGRFTISRDNVRNTVYLQMN GLKPEDTAVYYCYATIELGVLEPRDYWG QGTQVTSS

10

20

30

P2X7PMP8 H10	748	Blocker	5,3	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSF FRVNNMAWYRQGPQKQRELVADITRGD RTNYADSVNGRFTISRDNVRNTVYLQMN GLKPEDTAVYYCYATIELGVLEPRDYWG QGTQVTVSS
P2X7PMP8 D10	749	Blocker	5,3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSF FRVNNMAWYRQAPGKQRELVADITRGD RTNYADSVNGRFTISRDNVRNTVYLQMN GLKPEDTAVYYCYATIELGVLEPRDYWG QGTQVTVSS
P2X7PMP8 H4	750	Blocker	5,3	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSF FRVNNMAWYRQGPQKQRELVADITRGD RTNYADSVNGRFTISRDNVRNTVYLQMD GLKPEDTAVYYCYATIELGVLVPRDYWG QGTQVTVSS
P2X7PMP18 D12	751	Binder	6	EVQLVESGGDLVQAGGSLKLSCVSGVT FDDGTIGWFRQAPGKEREGACISRDGT TYRDSVKGRFTVSSDSAKTTVNLQMNS LKPEDTAVYYCAADYASLCTIETGYGSLY DYWGRGTQVTVSS
P2X7PMP4B 3	752	Binder	6	EVQLVESGGDLVQAGGSLKLSCVSGVT FDDGTIGWFRQAPGKEREGACISRDGT TYRDSVKGRFTVSSDSAKTTVNLQMNS LKPEDTAVYYCAADYASLCTIETGYGSLY DYWGKGTQVTVSS
P2X7PMP8 C7	753	Partial Blocker	7	EMQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGR TFSSLAMGWLQRQAPGKEREFVSGISRGG TSTYYADSVKGRFTISRDNKNTMYLQM NSLKPEDTAVYYCAGSPVLSIVLDTRGLE YWGQGTQVTVSS

10

20

30

40

P2X7PMP8E 7	754	Partial Blocker	7	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRT FSSLAMGWLRQAPGKEREFVSGISRGGT STYYADSVKGRFTISRDNKNTMYLQMN SLKPEDTAVYYCAGSPVLSIVLDTRGLEY WGQGTQVTVSS
P2X7PMP6 D7	755	Partial Blocker	7	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRT FSSLAMGWLRQAPGKEREFVSGISRGGT STYYADSVKGRFTISRDNKNTMYLQMN SLKPEDTAVYYCAGSPVLSIVLDTRGLEY WGQGTQVTVSS
P2X7PMP7 D6	756	Enhancer	8	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRT FGSSPVGWFRQAPGKERDFVATISWNG VDTHYLDSVKGRFTISRDNKNTVHLQM HILKPEDTALYYCAASTSGSVYLPYRVYQ YDSWGQGTQVTVSS
P2X7PMP7E 8	757	Enhancer	8	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRT FSSSPVWFRQAPGKERDFVATISWNGV DTHYLDSVKGRFTISRDNALNTVHLQMHI LKPEDTALYYCAASTSGSAYLPYRVYQYD SWGQGTQVTVSS
P2X7PMP7F 5	758	Enhancer	8	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRT FSSSPVWFRQAPGKERDFVATISWNGV DTHYLDSVKGRFTISRDNALNTVHLQMHI LKPEDTALYYCAASTSGSAYLPYRVHQY DSWGQGTQVTVSS
P2X7PMP7F 9	759	Binder	9	EVQLVESGGGLVQAGASLRVSCAASART GSYTMGWFRQAPGKEREFVSTISWNGA STVYADSVKGRFTISRDNKNTVSLQMN SLKPEDTAVYYCAGSISSYSSRWQDDYE YWGQGTQVTVSS

10

20

30

P2X7PMP7A 4	760	Binder	9	EVQLVESGGGLVQAGGSLRVSCAASART GSYSMGWFRQAPGKEREVSTISWNGA DTVYADSVKGRFTISRDNADKDTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAGSITSYVSTWQHHDYE YWGQGTQVTVSS	
P2X7PMP7B 4	761	Binder	10	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRN FGSYTMAWFRQAPGKGREFVSTINWSG GDTDYADSVKGRFTISRDNADKNTVYLQM DSLKPEDTAVYYCAAGLEYMSTIRYTYEY WGQGTQVTVSS	10
P2X7PMP7 H6	762	Blocker	11	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVWSGS MYRIDNMGWYRQAPGKQRELVATVTRG DITNYADSVKGRFTIGRDNADKNTVYLQMN SLKPADTAVYYCNIDSYIIGAGVRDYWGR GTQVTVSS	
P2X7PMP7 G5	763	Enhancer	12	EVQLVESGGGLVQSGGSLRLSCAGSGFS YYIIGWFRQAPGKEREEVSCIRVTDGSTY YTNSVKGRFTMSRDNAENTVYLQMNSLK PEDTAVYSCATECQRWAYPNRIGARGQ GTQVTVSS	20
P2X7PMP13 F4	764	Enhancer	12	EVQLVESGGGLVQSGGSLRLSCAGSGFS YYIIGWFRQAPGKEREEVSCIRVTDGSTY HTNSVKGRFTMSRDNAENTVYLQMNSLK PEDTAVYSCATECQRWAYPNRIGARGQ GTQVTVSS	30
P2X7PMP7 D8	765	Binder	13	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLT LEYYNIGWFRQAPGKEREGVACIDWTEG STFYVDSVKGRFTISTDNAKNTVYLLHMNS LEPEDTAVYYCAAGWGRVITVQHMCADR SLFTSWGQGTQVTVSS	
P2X7PMP13 B8	766	Binder	13	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLT LTYYNIGWFRQAPGKEREGVSCIDWTDG TTFYADSVKGRFTISTDNAKNTVYLLHNS LEPEDTAVYYCAAGWGRVMTVQHMCAD RSLFTSWGQGTQVTVSS	40

P2X7PMP7 D5	767	Binder	14	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRT FSSVAVGWFRQAPGKERDFVAWISWSG DSTYYADSVKGRFTASRDNVNNTVYLQM NSLKPEDTADYYCAAWKYDRASYDFPE AYDYWGQGTQVTVSS
P2X7PMP16 D9	768	Binder	15	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASPGT FSSFNMGWFRQTPGKEREFVAATSWSDI STYYADSVKGRFTISRDNKNTVTLEMNS LKPEDTAVYYCAAGYYRGGYLG YRLTLE GSYDWWGQGTQVTVSS
P2X7PMP1 G6	769	Binder	15	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASPGA FSSFNMGWFRQTPGKEREFVAATSWSDI STYYADSVKGRFTISRDNKNTVTLEMNS LKPEDTAVYYCAAGYYRGGYLG YRLTLE GSYDWWGQGTQVTVSS
P2X7PMP19 E3	770	Binder	15	EMQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASPGT FSSFNMGWFRQTPGKEREFVAATSWSDI STYYADSVKGRFTISRDNKNTVTLEMNS LKPEDTAVYYCAAGYYRGGYLG YRLTLE GSYDWWGQGTQVTVSS
P2X7PMP19 C2	771	Binder	15	EVQLVKSGGGLVQAGGSLRLSCAASPGT FSSFNMGWFRQTPGKEREFVAATSWSDI STYYADSVKGRFTISRDNKNTVTLEMNS LKPEDTAVYYCAAGYYRGGYLG YRLTLE GSYDWWGQGTQVTVSS
P2X7PMP6B 7	772	Partial Blocker	16	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVSGRT FSAMGWFRQAPGKEREFVATVGWNPMN SYYGDSVKGRFTIFRDNAKNTVYLQMNS LKPEDTAVYYCAGSGSLLDVTSEAVYTD WGQGTQVTVSS

10

20

30

40

P2X7PMP14 D5	773	Enhancer	17	KVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSP ISSYAMGWYRQAPGKPRELVARIYTG AWYEDSVKGRFTISRDNAQNTVYLQ MNSLKSEDTAVYYCHGRVRYDYWGQ GTQVT VSS
P2X7PMP13 G5	774	Binder	18	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASDRT FGSSAMGWFRQAPGKDRDFVAAISW SGSSTHYADSVKGRFTISRDNANTMY LQMNLSLKPADTAVYTCAASRRAYLP AKVGEYDFWGQGTQVT VSS
P2X7PMP13 B5	775	Partial Blocker	19	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRT FSSYAMGWFRQAPGKEREVAAISLSGS MTYYADSMKGRFTISRDNANTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCAAEEELGDGLGY LAYRYDYWGQGTQVT VSS
P2X7PMP13 F6	776	Binder	20	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSTNIMTWVRQAPGKGLEWISTINSGG TTTYADSVRGRFTISRDNANMLYLQ MSSLKPEDTALYYCITPRGVKGRGTQ VT VSS
P2X7PMP13 G4	777	Binder	21	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASDRT FGSSTMGWFRQPPGKNREFVATIAW SATTTHYADAVKGRFTVSRDNALNT VYLQMNLSLKPEDTAVYYCAATLTW LGIHEYEYNTWGQGTQVT VSS
P2X7PMP13 A7	778	Blocker	22	EVQLVESGGGLVQPGESLRLSCTASRFM LDYYDIGWFRQAPGKEREGVSCRFTNDG STAYADSVKGRFTISRDIVKHTVYLQ MNSLQPEDTAVYYCAAGPLTKRRQC VPGDFSMDFWGEGTLVT VSS

10

20

30

P2X7PMP13 E9	779	Blocker	22	EVQLVESGGGLVQPGE SLRLSCTASRFD LDYYDIAWFRQAPGKER EGVSCSFTNDG STYYADSVKGRFTMSR NNDHRTVYLQMT SLQPEDTAVYTCAVGPL TRRRQCVPGDF SMDFWGEGTLTVSS
P2X7PMP13 G9	780	Blocker	23	EVQLVESGGGLVQAGGS LRLSCVASGRT FSILTMGWFRQAPGKER EFVAAISGIGAIH YADSVKGRFTLSRDNA RNTVSLHMNSLK PEDTAVYYCAAKANYES PSRETSYAYWG QGTQTVSS
P2X7PMP20 H9	781	Binder	24	EVQLVESGGRVMQTGG SLRLSCAASGH TFNDYSMGWFRQAPGKE LEFLAGINWSG MSTWYADSVKDRFTISR DNNKNTVFLQM NSLEPGDTAVYYCAARQ WISTIILTAPSQY DYWGQGTQTVSS
P2X7PMP20 A11	782	Binder	24	EVQLVESGGRVMQTGG SLRLSCAASGH TFNDYNMGWFRQAPGKE LEFLAGINWS GMSTWYADSVKDRFTISR DNNKNTVFLQ MNSLEPGDTAVYYCAAR QWISTIILTAPS QYDYWGQGTQTVSS
P2X7PMP18 C1	783	Binder	25	EVQLVESGGDLVQPGGS LRLSCVASGFA LEEHAIGWFRQAPGKER EGVSLSSYLGA AYYATSVKGRFTISRDN AKNTVTLQMNSL KPEDTAVYYCARGHFTY DDGRITIRSVDY WGKGTTLTVSS
P2X7PMP18 A7	784	Binder	25	EVQLVESGGDLVQPGGS LRLSCVASGFA LEEHAIGWFRQAPGKER EGVSLSSYVGA VYYATSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSL KPEDTAVYYCARGHFTY DDGRISIRSVDH WGKGTTLTVSS

10

20

30

40

P2X7PMP19 H4	785	Binder	26	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRT LSTAVMGWFRQAPGKERGLVAMISWSG SMTYYAKSVKGRFTISRDNANTMYLQM NSLKPEDTAVYYCAADMGGGPPDGDAM PRLSSGMDYWGKGLTVTVSS
P2X7PMP16 G3	786	Binder	27	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGND FARFSIDAMGWYRQAPGKQRELVAIVTE DGTKNYADSVKGRATISRDDANNSMYLE MNTLKPEDTAVYYCKMGGGLIDGAAPYEF WGRGTQVTVSS
P2X7PMP15 C7	787	Binder	28	EMQLVESGGGWVQAGGSLRLSCASSGS IFSAGAMGWYRQPAGKQRELVAIDITLGG STNYADSVKGRFTISRDNNAKNAVFLQMN SLKPEDTAVYYCNGLINTFARKIPRYAWG QGTQVTVSS
P2X7PMP16 F5	788	Binder	29	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGPT TFGRYTMGWFRQAPGREREFVAAISWIG GRYYVDVVKGRFTISRDNAAKMMVYLQM NSLKPDDTAVYHCAAFFQALGSPREYDY WGQGTQVTVSS

10

20

【 0 2 4 2 】

特に本発明は幾つかの特定の態様で以下のものを提供する：

(本明細書で規定のように) イオンチャンネルに指向性を有し、配列番号 705 ~ 配列番号 788、より好ましくは配列番号 726 ~ 配列番号 750、配列番号 753 ~ 配列番号 758、配列番号 762 ~ 配列番号 764、配列番号 772 ~ 配列番号 773、配列番号 775、又は配列番号 778 ~ 配列番号 780、より好ましくは配列番号 726 ~ 配列番号 750、配列番号 753 ~ 配列番号 758、配列番号 762 ~ 配列番号 764、配列番号 772 ~ 配列番号 773、配列番号 775、又は配列番号 778 ~ 配列番号 780 (表 A-1 を参照されたい) の免疫グロブリン配列の少なくとも 1 つと少なくとも 80%、好ましくは少なくとも 85%、例えば 90% 若しくは 95%、又はそれ以上の配列同一性を有する、免疫グロブリン配列。これらの免疫グロブリン配列はさらに同種リガンドとイオンチャンネルとの結合を中和するようなもの；及び/又はイオンチャンネルとの結合に関して同種リガンドと競合するもの；及び/又はイオンチャンネル上の(本明細書で規定のような) 相互作用部位(例えばリガンド結合部位)に指向性を有するものであり得る；

30

40

(本明細書で規定のように) 配列番号 705 ~ 配列番号 788、より好ましくは配列番号 726 ~ 配列番号 750、配列番号 753 ~ 配列番号 758、配列番号 762 ~ 配列番号 764、配列番号 772 ~ 配列番号 773、配列番号 775、又は配列番号 778 ~ 配列番号 780、より好ましくは配列番号 726 ~ 配列番号 750、配列番号 753 ~ 配列番号 758、配列番号 762 ~ 配列番号 764、配列番号 772 ~ 配列番号 773、配列番号 775、又は配列番号 778 ~ 配列番号 780 (表 A-1 を参照されたい) の免疫グロブリン配列の少なくとも 1 つとイオンチャンネルとの結合を交差遮断する、及び/又はイオンチャンネルとの結合に関して配列番号 705 ~ 配列番号 788、より好ましくは配列番号 726 ~ 配列番号 750、配列番号 753 ~ 配列番号 758、配列番号 762 ~ 配列番号 764、配列番号 772 ~ 配列番号 773、配列番号 775、又は配列番号 778 ~ 配

50

列番号 780、より好ましくは配列番号 726 ~ 配列番号 750、配列番号 753 ~ 配列番号 758、配列番号 762 ~ 配列番号 764、配列番号 772 ~ 配列番号 773、配列番号 775、又は配列番号 778 ~ 配列番号 780 (表 A - 1 を参照されたい) の免疫グロブリン配列の少なくとも 1 つと競合する、免疫グロブリン配列。この場合も、これらの免疫グロブリン配列はさらに同種リガンドとイオンチャネルとの結合を中和するようなもの；及び/又はイオンチャネルとの結合に関して同種リガンドと競合するようなもの；及び/又はイオンチャネル上での (本明細書で規定のような) 相互作用部位 (例えばリガンド結合部位) に指向性を有するようなものであり得る；この免疫グロブリン配列は、本明細書でさらに記載のようなもの (例えばナノボディであり得る)；並びにこのような免疫グロブリン配列を 1 つ又は複数含む本発明のポリペプチド (本明細書にさらに記載のようなものであってもよく、例えば本明細書に記載のような二重特異性及び/又は二重パラトピックポリペプチドであってもよい)、及びこのような免疫グロブリン配列及びポリペプチドをコードする核酸配列であり得る。このような免疫グロブリン配列及びポリペプチドは任意の天然リガンドを含まない。

【0243】

したがって本発明の特に好ましいナノボディの幾つかが、イオンチャネルと (本明細書でさらに規定されるように) 結合することができ、及び/又はそれらに指向性を有し、

i) 配列番号 705 ~ 配列番号 788、より好ましくは配列番号 726 ~ 配列番号 750、配列番号 753 ~ 配列番号 758、配列番号 762 ~ 配列番号 764、配列番号 772 ~ 配列番号 773、配列番号 775、又は配列番号 778 ~ 配列番号 780、より好ましくは配列番号 726 ~ 配列番号 750、配列番号 753 ~ 配列番号 758、配列番号 762 ~ 配列番号 764、配列番号 772 ~ 配列番号 773、配列番号 775、又は配列番号 778 ~ 配列番号 780 (表 A - 1 を参照されたい) の少なくとも 1 つとの少なくとも 80% のアミノ酸同一性を有し (ここでアミノ酸同一性の程度を決定するために CDR 配列を形成するアミノ酸残基は無視する) (またこれに関しては、表 B - 1 を参照するが、この図は配列番号 705 ~ 配列番号 788、より好ましくは配列番号 726 ~ 配列番号 750、配列番号 753 ~ 配列番号 758、配列番号 762 ~ 配列番号 764、配列番号 772 ~ 配列番号 773、配列番号 775、又は配列番号 778 ~ 配列番号 780、より好ましくは配列番号 726 ~ 配列番号 750、配列番号 753 ~ 配列番号 758、配列番号 762 ~ 配列番号 764、配列番号 772 ~ 配列番号 773、配列番号 775、又は配列番号 778 ~ 配列番号 780 (表 A - 1 を参照されたい) のナノボディのフレームワーク 1 配列 (配列番号 126 ~ 配列番号 207)、フレームワーク 2 配列 (配列番号 290 ~ 配列番号 371)、フレームワーク 3 配列 (配列番号 454 ~ 配列番号 535) 及びフレームワーク 4 配列 (配列番号 618 ~ 配列番号 699) を列挙する) (フレームワーク 1 配列の 1 位 ~ 4 位及び 27 位 ~ 30 位のアミノ酸残基に関しては、以下で為されるコメントも参照する。したがって、アミノ酸同一性の程度を決定するためにこれらのアミノ酸残基は無視するのが好ましい)、

ii) 好ましくはカバットナンバリングによる 11 位、37 位、44 位、45 位、47 位、83 位、84 位、103 位、104 位及び 108 位のアミノ酸残基の 1 つ又は複数が、以下の表 B - 2 で言及される特徴的な残基から選択される、ナノボディである。

【0244】

これらのナノボディにおいて、概して CDR 配列は本明細書にさらに規定されるようなものである。

【0245】

この場合も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得られてもよく、例えば (すなわち好適な種のラクダ科動物由来の) 天然 V_{HH} 配列、又は合成若しくは半合成の免疫グロブリン配列であってもよく、これにはこれらに限定されないが、(本明細書に規定の) 「ヒト化」ナノボディ、(本明細書に規定の) 「ラクダ化」免疫グロブリン配列 (特にラクダ化重鎖可変ドメイン配列)、並びに本明細書にさらに記載されるように、親和性成熟 (例えば、合成、ランダム又は天然免疫グロブリン配列から開

10

20

30

40

50

始する)、CDRグラフト化、ベニヤリング、異なる免疫グロブリン配列由来の断片の結合、重複プライマーを使用したPCRアセンブリ、及び当業者に既知の免疫グロブリン配列を遺伝子操作する同様の技法、又は上記のいずれかの任意の好適な組合せ等の技法によって得られたナノボディが含まれる。また、ナノボディがV_{H H}配列を含む場合、上記ナノボディは、1つ又は複数の本発明のさらなる(部分又は完全)ヒト化ナノボディを提供するように、本明細書でさらに記載されるように好適にヒト化され得る。同様に、ナノボディが合成又は半合成の配列(例えば部分ヒト化配列)を含む場合、上記ナノボディは、同様に1つ又は複数の本発明のさらなる(部分又は完全)ヒト化ナノボディを提供するように、同様に本明細書で記載されるように任意でさらに好適にヒト化され得る。

【0246】

特にヒト化ナノボディは、概してこれまでの段落でナノボディに関して規定されたような免疫グロブリン配列であり得るが、この中に(本明細書に規定の)ヒト化置換である、及び/又はヒト化置換に対応する少なくとも1つのアミノ酸残基が(特にフレームワーク残基の少なくとも1つに)存在する。本明細書中の開示に基づいて、当業者にとって、幾つかの好ましいが非限定的なヒト化置換(及びその好適な組合せ)は明らかになる。付加的に又は代替的に、天然V_{H H}配列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って、他の潜在的に有用なヒト化置換を確認することができ、その後このようにして決定した潜在的に有用なヒト化置換(又はその組合せ)の1つ又は複数を上記V_{H H}配列に(それ自体が既知の任意の方法で、本明細書にさらに記載のように)導入することができ、得られたヒト化V_{H H}配列を、標的に対する親和性、安定性、発現の容易さ及びレベル、及び/又は他の所望の特性に関して試験することができる。このように、限定的な試行錯誤によって、本明細書中の開示に基づき、当業者は、他の好適なヒト化置換(又はその好適な組合せ)を決定することができる。また上記に基づいて、ナノボディ(のフレームワーク領域)を部分ヒト化又は完全ヒト化してもよい。

【0247】

好ましいが非限定的な一態様において、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)とからなる、例えばP2X7等のイオンチャネルに対する(本明細書中に規定の)ナノボディであって、

CDR1が、

- a) 配列番号208~配列番号289の免疫グロブリン配列；
- b) 配列番号208~配列番号289の免疫グロブリン配列の少なくとも1つとの少なくとも80%のアミノ酸同一性を有する免疫グロブリン配列；
- c) 配列番号208~配列番号289の免疫グロブリン配列の少なくとも1つとの、3つ、2つ若しくは1つのアミノ酸差異を有する免疫グロブリン配列からなる群から選択され、及び/又は

CDR2が、

- d) 配列番号372~配列番号453の免疫グロブリン配列；
- e) 配列番号372~配列番号453の免疫グロブリン配列の少なくとも1つとの少なくとも80%のアミノ酸同一性を有する免疫グロブリン配列；
- f) 配列番号372~配列番号453の免疫グロブリン配列の少なくとも1つとの、3つ、2つ若しくは1つのアミノ酸差異を有する免疫グロブリン配列からなる群から選択され、及び/又は

CDR3が、

- g) 配列番号536~配列番号617の免疫グロブリン配列；
- h) 配列番号536~配列番号617の免疫グロブリン配列の少なくとも1つとの少なくとも80%のアミノ酸同一性を有する免疫グロブリン配列；
- i) 配列番号536~配列番号617の免疫グロブリン配列の少なくとも1つとの、3つ、2つ若しくは1つのアミノ酸差異を有する免疫グロブリン配列からなる群から選択さ

10

20

30

40

50

れるか、又はこのような免疫グロブリン配列の任意の好適な断片である、ナノボディに関する。

【0248】

特に、好ましいが非限定的なこの態様によれば、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）とからなる、例えばP2X7等のイオンチャネルに対する（本明細書中に規定の）ナノボディであって、

CDR1が、

- a) 配列番号208～配列番号289の免疫グロブリン配列；
- b) 配列番号208～配列番号289の免疫グロブリン配列の少なくとも1つとの少なくとも80%のアミノ酸同一性を有する免疫グロブリン配列；
- c) 配列番号208～配列番号289の免疫グロブリン配列の少なくとも1つとの、3つ、2つ若しくは1つのアミノ酸差異を有する免疫グロブリン配列からなる群から選択され、

10

CDR2が、

- d) 配列番号372～配列番号453の免疫グロブリン配列；
- e) 配列番号372～配列番号453の免疫グロブリン配列の少なくとも1つとの少なくとも80%のアミノ酸同一性を有する免疫グロブリン配列；
- f) 配列番号372～配列番号453の免疫グロブリン配列の少なくとも1つとの、3つ、2つ若しくは1つのアミノ酸差異を有する免疫グロブリン配列からなる群から選択され、

20

CDR3が、

- g) 配列番号536～配列番号617の免疫グロブリン配列；
- h) 配列番号536～配列番号617の免疫グロブリン配列の少なくとも1つとの少なくとも80%のアミノ酸同一性を有する免疫グロブリン配列；
- i) 配列番号536～配列番号617の免疫グロブリン配列の少なくとも1つとの、3つ、2つ若しくは1つのアミノ酸差異を有する免疫グロブリン配列からなる群から選択されるか、又はこのような免疫グロブリン配列の任意の好適な断片である、ナノボディに関する。

30

【0249】

本発明の免疫グロブリン配列に関して本明細書で包括的に言及するように、本発明のナノボディがb)及び/又はc)によるCDR1配列を1つ又は複数含有する場合、

i) b)及び/又はc)によるこのようなCDRにおいて任意のアミノ酸置換は、（本明細書で規定されるように）対応するa)によるCDRと比較して、保存的なアミノ酸置換であるのが好ましく；及び/又は

ii) b)及び/又はc)によるCDRは、対応するa)によるCDRと比較して、アミノ酸置換だけを含有し、アミノ酸欠失又は挿入は含有しないのが好ましく；及び/又は

iii) b)及び/又はc)によるCDRは、それ自体が既知の1つ又は複数の親和性成熟技法を用いる親和性成熟によってa)によるCDRから誘導されるCDRであり得る。

40

【0250】

同様に、本発明のナノボディがe)及び/又はf)によるCDR2配列を1つ又は複数含有する場合、

i) e)及び/又はf)によるこのようなCDRにおいて任意のアミノ酸置換は、（本明細書で規定されるように）対応するd)によるCDRと比較して、保存的なアミノ酸置換であるのが好ましく；及び/又は

ii) e)及び/又はf)によるCDRは、対応するd)によるCDRと比較して、アミノ酸置換だけを含有し、アミノ酸欠失又は挿入は含有しないのが好ましく；及び/又は

iii) e)及び/又はf)によるCDRは、それ自体が既知の1つ又は複数の親和性成熟技法を用いる親和性成熟によってd)によるCDRから誘導されるCDRであり得る

50

【0251】

また同様に、本発明のナノボディが h) 及び / 又は i) による C D R 3 配列を 1 つ又は複数含有する場合、

i) h) 及び / 又は i) によるこのような C D R において任意のアミノ酸置換は、(本明細書で規定されるように) 対応する g) による C D R と比較して、保存的なアミノ酸置換であるのが好ましく ; 及び / 又は

i i) h) 及び / 又は i) による C D R は、対応する g) による C D R と比較して、アミノ酸置換だけを含有し、アミノ酸欠失又は挿入は含有しないのが好ましく ; 及び / 又は

i i i) h) 及び / 又は i) による C D R は、それ自体が既知の 1 つ又は複数の親和性成熟技法を用いる親和性成熟によって g) による C D R から誘導される C D R であり得る

10

【0252】

直前の 3 段落は概して、それぞれ b)、c)、e)、f)、h) 又は i) による C D R 1 配列、C D R 2 配列及び / 又は C D R 3 配列を 1 つ又は複数含む、任意の本発明のナノボディに適用されると理解すべきである。

【0253】

本発明のナノボディのうち、具体的には上記で明示的に挙げられる C D R を 1 つ又は複数含むナノボディが好ましい。より具体的には上記で明示的に挙げられる C D R を 2 つ以上含むナノボディが好ましい。最も具体的には上記で明示的に挙げられる C D R を 3 つ含むナノボディが好ましい。

20

【0254】

幾つかの特に好ましいが非限定的な C D R 配列の組合せ、及び C D R 配列とフレームワーク配列との好ましい組合せが以下の表 B - 1 で言及され、これは多くの好ましい (が非限定的な) 本発明のナノボディに存在する C D R 配列及びフレームワーク配列を挙げている。当業者にとって明らかなように、同じクローンで現れる C D R 1 配列、C D R 2 配列及び C D R 3 配列の組合せ (すなわち表 B - 1 の同じ行で言及される C D R 1 配列、C D R 2 配列及び C D R 3 配列) が通常好ましい (が、本発明はその最も広範な意味ではこれに限定されず、表 B - 1 で言及される C D R 配列の他の好適な組合せも含む)。また、同じクローンで現れる C D R 配列とフレームワーク配列との組合せ (すなわち表 B - 1 の同じ行で言及される C D R 配列及びフレームワーク配列) が通常好ましい (が、本発明はその最も広範な意味ではこれに限定されず、表 B - 1 で言及される C D R 配列とフレームワーク配列との他の好適な組合せ、並びに例えば本明細書でさらに記載されるようなこのような C D R 配列と他の好適なフレームワーク配列との組合せも含む)。

30

【0255】

また、表 B - 1 で言及される C D R の組合せを含む本発明のナノボディにおいて、それぞれの C D R を、言及される C D R との、少なくとも 8 0 %、好ましくは少なくとも 9 0 %、より好ましくは少なくとも 9 5 %、さらにより好ましくは少なくとも 9 9 % の配列同一性 (本明細書中で規定) を有する免疫グロブリン配列からなる群から選択される C D R に置き換えることができ、ここで

40

i) このような C D R において任意のアミノ酸置換は、(本明細書で規定されるように) 対応する表 B - 1 で言及される C D R 配列と比較して、保存的なアミノ酸置換であるのが好ましく ; 及び / 又は

i i) 任意のこのような C D R 配列は、対応する表 B - 1 で言及される C D R 配列と比較して、アミノ酸置換だけを含有し、アミノ酸欠失又は挿入は含有しないのが好ましく ; 及び / 又は

i i i) 任意のこのような C D R 配列は、特に対応する表 B - 1 で言及される C D R 配列から、それ自体が既知の親和性成熟技法によって誘導される C D R である。

【0256】

しかし、当業者にとって明らかなように、表 B - 1 で言及される、C D R 配列 (の組合

50

せ)、並びに C D R 配列及びフレームワーク配列(の組合せ)が一般的に好ましい。

【 0 2 5 7 】

表 B - 1 : C D R 配列の好ましい組合せ、フレームワーク配列の好ましい組合せ、及びフレームワーク配列と C D R 配列との好ましい組合せ。

(「番号」は本明細書で使用される配列番号を表す)

【表 2】

FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
EVQLVESG						
1 GDVWQAGG	2	2	3	4 RFTISSDKEKNTLYLQ	5	6
2 SRLSCLAS	0	9 WFRQAPGKE	7	5 MNSLKPEDTAVYHCA	3	1 WGQGT
6 GFTFD	8 DYAIG	0 REGIS	2	4 A	6 LLRTDISS	8 QVTVSS
EVQLVESG						
1 GDVWQAGG	2	2	3	4 RFTISSDKEKNTLYLQ	5	6
2 SRLSCLAS	0	9 WFRQAPGKE	7	5 MNSLEPEDTAVYHCA	3	1 WGQGT
7 GFTFD	9 DYAIG	1 REGIS	3	5 A	7 LLRTDISS	9 QVTVSS
EMQLVESG						
1 GDVWQAGG	2	2	3	4 RFTISSDKEKNTLYLQ	5	6
2 SRLSCLAS	1	9 WFRQAPGKE	7	5 MNSLKPEDTAVYHCA	3	2 WGQGT
8 GFTFD	0 DYAIG	2 REGIS	4	6 A	8 LLRTDISS	0 QVTVSS
EVQLVESG						
1 GDVWQAGG	2	2	3	4 RFTISSDKEKNTLYLQ	5	6
2 SRLSCLAS	1	9 WFRQAPGKE	7	5 MNSLKPEDTAVYHCA	3	2 WGQGT
9 GFTFD	1 DYAIG	3 REGIS	5	7 AA	9 LLRTDISS	1 QVTVSS

10

20

30

40

1	EVQLVESG	2		2		3		4	4	5		6
3	GDVWQAGG	1		9	WFRQAPGKE	7		5	5	4	RLTISSDKEKNTLYLQ	6
0	SLRSLCLAS	2	DYAIG	4	REGIS	6	CISSTGNVIFYADSVKG	8	0	0	LLRTDISS	2
	GFTFD											2
1	EVQLVESG	2		2		3		4	4	5		6
3	GDVWQAGG	1		9	WFRQAPGKE	7		5	5	4	RFTISSDKEKNTLYLQ	6
1	SLRSLCLAS	3	DYAIG	5	REGIS	7	CISSTGNVIFYADSVKG	9	1	4	GHFTVDGKGV	2
	GFTFD											3
1	EVQLVESG	2		2		3		4	4	5		6
3	GDVWQAGG	1		9	WFRQAPGKE	7		6	6	4	RFTISSDKEKNTLYLQ	2
2	SLRSLCLAS	4	DYAIG	6	REGIS	8	CISSTGNVIFYADSVKG	0	2	4	GHFTVDGKGV	4
	GFTFD											4
1	EVQLVESG	2		2		3		4	4	5		6
3	GGLVQTGG	1		9	WFRQAPGKE	7		6	6	4	RFSITADGAKTTVFLQ	2
3	SLRSLCAAS	5	DYAIA	7	REGVS	9	ILSSIGKTFYADSVKD	1	3	4	GHFYNDGAI	5
	GFTLD											5
1	EVQLVESG	2		2		3		4	4	5		6
3	GGLVQTGG	1		9	WFRQAPGKE	8		6	6	4	RFSITADGAKTTVFLQ	2
4	SLRSLCAAS	6	DYAIA	8	REGVS	0	ILSSIGKTFYADSVKD	2	4	4	GHFYNDGAI	6
	GFTLD											6

10

20

30

40

1	EVQLVESG				3				4	4				6	
3	GGLVQTGG	2		2	WFRQAPGKE				6	6				2	WGQGT
5	SLRLSCAAS	1		9	REGVS				3	3				7	QVTVSS
	GFTLD	7	DYAIA	9					1	1	ILSSIGKTFYADSVKD				
	EVQLVESG														
1	GGLVQTGG	2		3					3	3				6	
3	SLRLSCAAS	1		0	WFRQAPGKE				8	8				2	WGQGT
6	GFTLD	8	DYAIA	0	REGVS				2	2	ILSSIGKTFYADSAKD			8	QVTVSS
	EVQLVESG														
1	GGLVQAGG	2		3					3	3				6	
3	SLRLSCAAS	1		0	WFRQAPGKE				8	8				2	WGQGT
7	ERTYS	9	MG	1	REFVA				3	3				9	QVTVSS
	EVQLVESG														
1	GGLVQAGG	2		3					3	3				6	
3	SLRLSCAAS	2		0	WFRQAPGKE				8	8				3	WGQGT
8	ERTYS	0	MG	2	REFVA				4	4				0	QVTVSS
	EVQLVESG														
1	GGLVQAGG	2		3					3	3				6	
3	SLRLSCAAS	2		0	WFRQAPGKE				8	8				3	WGQGT
9	ERTYS	1	VG	3	REFVA				5	5				1	QVTVSS

10

20

30

40

1	EVQLVESG		3						4	4	5		6
4	GGLVQAGG	2	3	WFRQAPGKE	9	GSGWDGIPTRYADSVK	3	9	7	RFTISRDNKSTVSL	5	3	WGQGT
5	SLRLSCAAS	2	0	REFVA	1	G			3	AT	5	7	QVTVSS
	ERTYS	7	9										
	KVQLVESG												
1	GGLVQAGG	2	3		3				4	RFTISRDNKNTLYLQ	5	6	
4	SLRLSCAAS	2	1	WFRQAPGKL	9				7	MNHLRAEDTAVYCA	5	3	YGQGTQ
6	GRTVS	8	0	REFVA	2	SINWSGIYTRYIDSVEG	2	2	4	AY	6	8	VTVSS
	DYGMG												
	EVQLMESG												
1	GGLVQAGG	2	3		3				4	RFTISRDNKNTLYLQ	5	6	
4	SLRLSCAAS	2	1	WFRQAPGKL	9				7	MNHLKAEDTAVYCA	5	3	YGQGTQ
7	GRTVS	9	1	REFVA	3	SINWSGIYTRYIDSVEG	3	3	5	Y	7	9	VTVSS
	DYGMG												
	EVQLVESG												
1	GGLVQAGG	2	3		3				4	RFTISRDNKNTLYLQ	5	6	
4	SLRLSCAAS	3	1	WFRQAPGKL	9				7	MNHLKAEDTAVYCA	5	4	YGQGTQ
8	GRTVS	0	2	REFVA	4	SINWSGIYTRYIDSVEG	4	4	6	Y	8	0	VTVSS
	DYGMG												
	EVQLVESG												
1	GGLVQAGG	2	3		3				4	RFTISRDNKNTLYLQ	5	6	
4	SLRLSCAAS	3	1	WFRQAPGKE	9				7	MNHLKAEDTAVYCA	5	4	YGQGTQ
9	GRTVS	1	3	CEFVA	5	SINWSGIYTRYIDSVEG	5	5	7	Y	9	1	VTVSS
	DYGMG												

10

20

30

40

1	EVQLMESG	2	3	3	3	4	4	4	4	6	6	6	6
5	GGLVQAGG	3	1	1	1	3	3	3	3	3	3	3	3
0	PLRLSCAAS	2	4	4	4	6	6	6	6	6	6	6	6
	GRTVS	2	DYGMG										
	AVQLVESG												
1	GGLVQAGG	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
5	SLRLSCAAS	3	1	1	1	3	3	3	3	3	3	3	3
1	GNFFR	3	VNTMA	5	5	7	7	7	7	7	7	7	7
	EVQLVESG												
1	GGLVQAGG	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
5	SLRLSCAAS	3	1	1	1	3	3	3	3	3	3	3	3
2	GNFFR	4	VNTMA	6	6	8	8	8	8	8	8	8	8
	EVQLVESG												
1	GGLVQAGG	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
5	PLRLSCAAS	3	1	1	1	3	3	3	3	3	3	3	3
3	GNFFR	5	VNTMA	7	7	9	9	9	9	9	9	9	9
	EVQLVESG												
1	GGLVQAGG	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
5	SLRLSCAAS	3	1	1	1	3	3	3	3	3	3	3	3
4	GSFFR	6	VNNMA	8	8	10	10	10	10	10	10	10	10

10

20

30

40

1	EVQLVESG	2		3	4		4	4	4	5	6	6	
5	GGLVQAGG	3	1	WYRQAPGKQ	0		8	8	8	6	RIELGVLEPR	4	WGQGT
5	PLRLSCAAS	7	9	RELVA	1	DITRGRDRTNYADSVNG	3	CYA	5	5	DY	7	QVTVSS
	GSFFR												
	EVQLVESG												
1	GGLVQAGG	2	3		4		4	4	4	5		6	
5	SLRLSCAAS	3	2	WYRQAPGKQ	0		8	8	8	6	RIELGVLEPR	4	WGQGT
6	GNFFR	8	0	RELVA	2	DITRGRDRTNYADTVNG	4	CYA	6	6	DY	8	QVTVSS
	EVQLVESG												
1	GGLVQAGG	2	3		4		4	4	4	5		6	
5	SLGLSCAAS	3	2	WYRQAPGKQ	0		8	8	8	6	RIELGVLEPR	4	WGQGT
7	GNFFR	9	1	RELVA	3	DITRGRDRTNYADTVNG	5	CYA	7	7	DY	9	QVTVSS
	EMQLVESG												
1	GGLVQAGG	2	3		4		4	4	4	5		6	
5	SLRLSCAAS	4	2	WYRQAPGKQ	0		8	8	8	6	RIELGVLEPR	5	WGQGT
8	GNFFR	0	2	RELVA	4	DITRGRDRTNYADTVNG	6	CYA	8	8	DY	0	QVTVSS
	EVQLVESG												
1	GGLVQAGG	2	3		4		4	4	4	5		6	
5	SLRLLCAAS	4	2	WYRQAPGKQ	0		8	8	8	6	RIELGILEPRD	5	WGQGT
9	GSFFR	1	3	RELVA	5	DITRGRDRTNYADSVNG	7	CYA	9	9	Y	1	QVTVSS

10

20

30

40

1	EVQVESG		3	4		4	4	4	5	6	
6	GGLVQAGG	2	3	4		4	4	4	5	6	
0	SLRLSCAAS	4	2	0		0	0	0	7	5	
	GSFFR	2	4	6	VNNMA	6	6	6	0	2	QVTSS
1	EVQVESG		3	4		4	4	4	5	6	
6	GGLVQAGG	2	3	4		4	4	4	5	6	
1	SLRLSCAAS	4	2	0		0	0	0	7	5	
	GSFFR	3	5	7	VNNMA	7	7	7	1	3	QVTSS
1	EVQVESG		3	4		4	4	4	5	6	
6	GGLVQAGG	2	3	4		4	4	4	5	6	
2	SLRLSCAAS	4	2	0		0	0	0	7	5	
	GSFFR	4	6	8	VNNMA	8	8	8	2	4	QVTSS
1	KVQVESG		3	4		4	4	4	5	6	
6	GGLVQAGG	2	3	4		4	4	4	5	6	
3	SLRLSCAAS	4	2	0		0	0	0	7	5	
	GSFFR	5	7	9	VNNMA	9	9	9	3	5	QVTSS
1	EVQVESG		3	4		4	4	4	5	6	
6	GGLVQAGG	2	3	4		4	4	4	5	6	
4	SLRLSCAAS	4	2	1		1	1	1	7	5	
	GSFFR	6	8	0	VNNMA	8	8	8	4	6	QVTSS

10

20

30

40

1	EVQLVESG			3		4		4	4	5	6	6	6
7	GDLVQAGG	2		3	WFRQAPGKE	1		1	9	8	6	6	WGRGT
0	SLKLSCVVS	5	DGTIG	4	REGIA	6	CISRVDGTTYRDSVKG	8	CAA	0	2	2	QVTYSS
	GVTFD	2											
1	EVQLVESG			3		4		4	4	5	6	6	
7	GDLVQAGG	2		3	WFRQAPGKE	1		1	9	8	6	6	WGKGT
1	SLKLSCVVS	5	DGTIG	5	REGIA	7	CISRVDGTTYRDSVKG	9	CAA	1	3	3	QVTYSS
	GVTFD	3											
1	EMQLVESG			3		4		4	5	5	6	6	
7	GGLVQAGG	2		3	WLRQAPGKE	1		1	0	8	6	6	WGQGT
2	SLRLSCAAS	5	SLAMG	6	REFVS	8	GISRGGTSTYYADSVKG	0	CAG	2	4	4	QVTYSS
	GRTFS	4											
1	EVQLVESG			3		4		4	5	5	6	6	
7	GGLVQAGG	2		3	WLRQAPGKE	1		1	0	8	6	6	WGQGT
3	SLRLSCAAS	5	SLAMG	7	REFVS	9	GISRGGTSTYYADSVKG	1	CAG	3	5	5	QVTYSS
	GRTFS	5											
1	EVQLVESG			3		4		4	5	5	6	6	
7	GGLVQAGG	2		3	WLRQAPGKE	2		2	0	8	6	6	WGQGT
4	SLRLSCAAS	5	SLAMG	8	REFVS	0	GISRGGTSTYYADSVKG	2	CAG	4	6	6	QVTYSS
	GRTFS	6											

10

20

30

40

1	EVQLVESG			3	4		5	5	6	6	
8	GGLVQPGG	2	3	4	5	RFTISRDNAKNTVYLH	5	GWGRVMTVQ	6		
5	SLRLSCAAS	6	4	3	3	LNSLEPEDTAVYYCA	1	HMCADRSFLT	7	WGQGT	
	GLTLT	7	9	1	1	CIDWTDGTTFYADSVK	3	A	7	QVTSS	
	EVQLVESG										
1	GGLVQAGD	2	3	4	5	RFTASRDNNVNTVYL	5		6		
8	SLRLSCAAS	6	5	3	3	WISWSDSTYYADSVK	1	AWKYDRASY	7	WGQGT	
6	GRTFS	8	0	2	2	G	4	DFPEAYDY	8	QVTSS	
	EVQLVESG										
1	GGLVQAGG	2	3	4	5	RFTISRDNAKNTVTL	5	GYRGGYLG	6		
8	SLRLSCAAS	6	5	3	3	MNSLKPEDTAVYYCA	1	YRLTLEGSYD	7	WGQGT	
7	PGTFS	9	1	3	3	ATSWSDISTYYADSVK	5	V	9	QVTSS	
	EVQLVESG										
1	GGLVQAGG	2	3	4	5	RFTISRDNAKNTVTL	5	GYRGGYLG	6		
8	SLRLSCAAS	7	5	3	3	MNSLKPEDTAVYYCA	1	YRLTLEGSYD	8	WGQGT	
8	PGAFS	0	2	4	4	ATSWSDISTYYADSVK	6	V	0	QVTSS	
	EMQLVESG										
1	GGLVQAGG	2	3	4	5	RFTISRDNAKNTVTL	5	GYRGGYLG	6		
8	SLRLSCAAS	7	5	3	3	MNSLKPEDTAVYYCA	1	YRLTLEGSYD	8	WGQGT	
9	PGTFS	1	3	5	5	ATSWSDISTYYADSVK	7	V	1	QVTSS	

10

20

30

40

1	EVQLVKGSG	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630	631	632	633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810	811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822	823	824	825	826	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836	837	838	839	840	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850	851	852	853	854	855	856	857	858	859	860	861	862	863	864	865	866	867	868	869	870	871	872	873	874	875	876	877	878	879	880	881	882	883	884	885	886	887	888	889	890	891	892	893	894	895	896	897	898	899	900	901	902	903	904	905	906	907	908	909	910	911	912	913	914	915	916	917	918	919	920	921	922	923	924	925	926	927	928	929	930	931	932	933	934	935	936	937	938	939	940	941	942	943	944	945	946	947	948	949	950	951	952	953	954	955	956	957	958	959	960	961	962	963	964	965	966	967	968	969	970	971	972	973	974	975	976	977	978	979	980	981	982	983	984	985	986	987	988	989	990	991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000	1001	1002	1003	1004	1005	1006	1007	1008	1009	1010	1011	1012	1013	1014	1015	1016	1017	1018	1019	1020	1021	1022	1023	1024	1025	1026	1027	1028	1029	1030	1031	1032	1033	1034	1035	1036	1037	1038	1039	1040	1041	1042	1043	1044	1045	1046	1047	1048	1049	1050	1051	1052	1053	1054	1055	1056	1057	1058	1059	1060	1061	1062	1063	1064	1065	1066	1067	1068	1069	1070	1071	1072	1073	1074	1075	1076	1077	1078	1079	1080	1081	1082	1083	1084	1085	1086	1087	1088	1089	1090	1091	1092	1093	1094	1095	1096	1097	1098	1099	1100	1101	1102	1103	1104	1105	1106	1107	1108	1109	1110	1111	1112	1113	1114	1115	1116	1117	1118	1119	1120	1121	1122	1123	1124	1125	1126	1127	1128	1129	1130	1131	1132	1133	1134	1135	1136	1137	1138	1139	1140	1141	1142	1143	1144	1145	1146	1147	1148	1149	1150	1151	1152	1153	1154	1155	1156	1157	1158	1159	1160	1161	1162	1163	1164	1165	1166	1167	1168	1169	1170	1171	1172	1173	1174	1175	1176	1177	1178	1179	1180	1181	1182	1183	1184	1185	1186	1187	1188	1189	1190	1191	1192	1193	1194	1195	1196	1197	1198	1199	1200	1201	1202	1203	1204	1205	1206	1207	1208	1209	1210	1211	1212	1213	1214	1215	1216	1217	1218	1219	1220	1221	1222	1223	1224	1225	1226	1227	1228	1229	1230	1231	1232	1233	1234	1235	1236	1237	1238	1239	1240	1241	1242	1243	1244	1245	1246	1247	1248	1249	1250	1251	1252	1253	1254	1255	1256	1257	1258	1259	1260	1261	1262	1263	1264	1265	1266	1267	1268	1269	1270	1271	1272	1273	1274	1275	1276	1277	1278	1279	1280	1281	1282	1283	1284	1285	1286	1287	1288	1289	1290	1291	1292	1293	1294	1295	1296	1297	1298	1299	1300	1301	1302	1303	1304	1305	1306	1307	1308	1309	1310	1311	1312	1313	1314	1315	1316	1317	1318	1319	1320	1321	1322	1323	1324	1325	1326	1327	1328	1329	1330	1331	1332	1333	1334	1335	13
---	-----------	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	----

みの「アミノ酸差異」（本明細書で規定）を有するCDR1配列、CDR2配列及びCDR3配列それぞれからなる群から好適に選択される。

【0259】

これに関して、「好適に選択される」とは、規定通りに、それぞれCDR1配列が好適なCDR1配列から（すなわち本明細書で規定のように）選択され、CDR2配列が好適なCDR2配列から（すなわち本明細書で規定のように）選択され、CDR3配列が好適なCDR3配列から（すなわち本明細書で規定のように）選択されることを意味する。より具体的には、CDR配列は、本発明のナノボディが本明細書に規定のような（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）親和性で例えばP2X7等のイオンチャネルと結合するように選択されるのが好ましい。

10

【0260】

特に、本発明のナノボディにおいて、存在するCDR3配列が少なくとも、表B-1で挙げられるCDR3配列からなる群から；又は表B-1で挙げられるCDR3配列の少なくとも1つとの、少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらにより好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するCDR3配列からなる群から；及び/又は表B-1で挙げられるCDR3配列の少なくとも1つとの、3つ、2つ若しくは1つのみのアミノ酸差異を有するCDR3配列からなる群から好適に選択される。

20

【0261】

好ましくは、本発明のナノボディにおいて、存在するCDR1配列、CDR2配列及びCDR3配列の少なくとも2つが、それぞれ表B-1で挙げられるCDR1配列、CDR2配列及びCDR3配列からなる群から；又は表B-1でそれぞれ挙げられるCDR1配列、CDR2配列及びCDR3配列の少なくとも1つとの、少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらにより好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するCDR1配列、CDR2配列及びCDR3配列それぞれからなる群から；及び/又は表B-1でそれぞれ挙げられるCDR1配列、CDR2配列及びCDR3配列の少なくとも1つとの、3つ、2つ若しくは1つのみの「アミノ酸差異」を有するCDR1配列、CDR2配列及びCDR3配列それぞれからなる群から好適に選択される。

30

【0262】

特に、本発明のナノボディにおいて、存在するCDR3配列が少なくとも、表B-1で挙げられるCDR3配列からなる群から；又はそれぞれ表B-1で挙げられるCDR3配列の少なくとも1つとの、少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらにより好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するCDR3配列からなる群から好適に選択され；存在するCDR1配列及びCDR2配列の少なくとも1つが、それぞれ表B-1で挙げられるCDR1配列及びCDR2配列からなる群から；又は表B-1でそれぞれ挙げられるCDR1配列及びCDR2配列の少なくとも1つとの、少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらにより好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するCDR1配列及びCDR2配列それぞれからなる群から；及び/又は表B-1でそれぞれ挙げられるCDR1配列及びCDR2配列の少なくとも1つとの、3つ、2つ若しくは1つのみのアミノ酸差異を有するCDR1配列及びCDR2配列それぞれからなる群から好適に選択される。

40

【0263】

最も好ましくは、本発明のナノボディにおいて、存在するCDR1配列、CDR2配列及びCDR3配列の3つ全てが、それぞれ表B-1で挙げられるCDR1配列、CDR2配列及びCDR3配列からなる群から；又は表B-1でそれぞれ挙げられるCDR1配列、CDR2配列及びCDR3配列の少なくとも1つとの、少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらにより好ましくは少なくとも

50

99%の配列同一性を有するCDR1配列、CDR2配列及びCDR3配列それぞれからなる群から；及び/又は表B-1でそれぞれ挙げられるCDR1配列、CDR2配列及びCDR3配列の少なくとも1つとの、3つ、2つ若しくは1つのみのアミノ酸差異を有するCDR1配列、CDR2配列及びCDR3配列それぞれからなる群から好適に選択される。

【0264】

さらにより好ましくは、本発明のナノボディにおいて、存在するCDR1配列、CDR2配列及びCDR3配列の少なくとも1つが、それぞれ表B-1で挙げられるCDR1配列、CDR2配列及びCDR3配列からなる群から好適に選択される。好ましくはこの態様では、存在する他の2つのCDR配列の少なくとも1つ、又は好ましくは両方が、表B-1でそれぞれ挙げられる対応するCDR配列の少なくとも1つとの、少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらにより好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するCDR配列から；及び/又は表B-1でそれぞれ挙げられる対応する配列の少なくとも1つとの、3つ、2つ若しくは1つのみのアミノ酸差異を有するCDR配列からなる群から好適に選択される。

10

【0265】

特に、本発明のナノボディにおいて、存在するCDR3配列が少なくとも、表B-1で挙げられるCDR3からなる群から好適に選択される。好ましくはこの態様では、存在するCDR1配列及びCDR2配列の少なくとも1つ、及び好ましくは両方が、表B-1でそれぞれ挙げられるCDR1配列及びCDR2配列との、少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらにより好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するCDR1配列及びCDR2配列それぞれからなる群から；及び/又は表B-1でそれぞれ挙げられるCDR1配列及びCDR2配列の少なくとも1つとの、3つ、2つ若しくは1つのみのアミノ酸差異を有するCDR1配列及びCDR2配列それぞれからなる群から好適に選択される。

20

【0266】

さらにより好ましくは、本発明のナノボディにおいて、存在するCDR1配列、CDR2配列及びCDR3配列の少なくとも2つが、それぞれ表B-1で挙げられるCDR1配列、CDR2配列及びCDR3配列からなる群から好適に選択される。好ましくはこの態様では、存在する残りのCDR配列が、表B-1で挙げられる対応するCDR配列の少なくとも1つとの、少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらにより好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するCDR配列からなる群から；及び/又は表B-1で挙げられる対応する配列の少なくとも1つとの、3つ、2つ若しくは1つのみのアミノ酸差異を有するCDR配列からなる群から好適に選択される。

30

【0267】

特に、本発明のナノボディにおいて、CDR3配列が少なくとも、表B-1で挙げられるCDR3配列からなる群から好適に選択され、CDR1配列又はCDR2配列のいずれかが、それぞれ表B-1で挙げられるCDR1配列及びCDR2配列からなる群から好適に選択される。好ましくは、この態様において、存在する残りのCDR配列が、表B-1で挙げられる対応するCDR配列の少なくとも1つとの、少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらにより好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するCDR配列からなる群から；及び/又は表B-1で挙げられる対応するCDR配列との、3つ、2つ若しくは1つのみのアミノ酸差異を有するCDR配列からなる群から好適に選択される。

40

【0268】

さらにより好ましくは、本発明のナノボディにおいて、存在するCDR1配列、CDR2配列及びCDR3配列の3つ全てが、それぞれ表B-1で挙げられるCDR1配列、CDR2配列及びCDR3配列からなる群から好適に選択される。また概して、表B-1で挙げられるCDRの組合せ(すなわち表B-1の同じ行で言及されるもの)が好ましい。

50

このため概して、本発明のナノボディにおけるCDRが、表B-1で言及されるCDR配列であるか、又は表B-1で挙げられるCDR配列との、少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらにより好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するCDR配列からなる群から；及び/又は表B-1で挙げられるCDR配列との、3つ、2つ若しくは1つのみのアミノ酸差異を有するCDR配列からなる群から好適に選択される場合、他のCDRの少なくとも1つ、好ましくは両方が、表B-1における同じ組合せ（すなわち表B-1の同じ行で言及されるもの）に属するCDR配列から好適に選択されるか、又は同じ組合せに属するCDR配列（複数可）との、少なくとも80%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらにより好ましくは少なくとも99%の配列同一性を有するCDR配列からなる群から；及び/又は同じ組合せに属するCDR配列（複数可）との、3つ、2つ若しくは1つのみのアミノ酸差異を有するCDR配列からなる群から好適に選択されることが好ましい。上記の段落で示される他の好ましい実施形態（preferences）は、表B-1で言及されるCDRの組合せにも適用される。

10

【0269】

このため、非限定的な例により、本発明のナノボディは例えば、表B-1で言及されるCDR1配列の1つとの80%を超える配列同一性を有するCDR1配列と、表B-1で言及される（が、異なる組合せに属する）CDR2配列の1つとの、3つ、2つ若しくは1つのアミノ酸差異を有するCDR2配列と、CDR3配列とを含むことができる。

【0270】

20

幾つかの好ましい本発明のナノボディは例えば以下のものを含み得る：（1）表B-1で言及されるCDR1配列の1つとの80%を超える配列同一性を有するCDR1配列；表B-1で言及される（が、異なる組合せに属する）CDR2配列の1つとの、3つ、2つ若しくは1つのアミノ酸差異を有するCDR2配列；及び表B-1で言及される（が、異なる組合せに属する）CDR3配列の1つとの80%を超える配列同一性を有するCDR3配列；又は（2）表B-1で言及されるCDR1配列の1つとの80%を超える配列同一性を有するCDR1配列；CDR2配列；及び表B-1で挙げられるCDR3配列の1つ；又は（3）CDR1配列；表B-1で挙げられるCDR2配列の1つとの80%を超える配列同一性を有するCDR2配列；及びCDR2配列と同じ組合せに属する、表B-1で言及されるCDR3配列との、3つ、2つ若しくは1つのアミノ酸差異を有するCDR3配列。

30

【0271】

幾つかの特に好ましい本発明のナノボディは例えば以下のものを含み得る：（1）表B-1で言及されるCDR1配列の1つとの80%を超える配列同一性を有するCDR1配列；同じ組合せに属する、表B-1で言及されるCDR2配列との、3つ、2つ若しくは1つのアミノ酸差異を有するCDR2配列；及び同じ組合せに属する、表B-1で言及されるCDR3配列との80%を超える配列同一性を有するCDR3配列；又は（2）CDR1配列；表B-1で挙げられるCDR2；及び表B-1で挙げられるCDR3配列（ここでCDR2配列とCDR3配列とは異なる組合せに属し得る）。

【0272】

40

幾つかのさらにより好ましい本発明のナノボディは例えば以下のものを含み得る：（1）表B-1で言及されるCDR1配列の1つとの80%を超える配列同一性を有するCDR1配列；同じ組合せに属する、表B-1で挙げられるCDR2配列；及び異なる組合せに属する、表B-1で言及されるCDR3配列；又は（2）表B-1で言及されるCDR1配列；同じ組合せに属する、表B-1で言及されるCDR2配列との、3つ、2つ若しくは1つのアミノ酸差異を有するCDR2配列；及び同じ若しくは異なる組合せに属する、表B-1で挙げられるCDR3配列との80%を超える配列同一性を有するCDR3配列。

【0273】

特に好ましい本発明のナノボディは例えば、表B-1で言及されるCDR1配列と、同

50

じ組合せに属する、表B - 1で言及されるCDR2配列との80%を超える配列同一性を有するCDR2配列と、同じ組合せに属する、表B - 1で言及されるCDR3配列とを含み得る。最も好ましい本発明のナノボディにおいて、存在するCDR1配列、CDR2配列及びCDR3配列が、それぞれ表B - 1で挙げられるCDR1配列、CDR2配列及びCDR3配列の組合せの1つから好適に選択される。

【0274】

別の好ましいが非限定的な本発明の態様によれば、(a) CDR1は1個～12個のアミノ酸残基、通常2個～9個のアミノ酸残基、例えば5個、6個又は7個のアミノ酸残基の長さを有し、及び/又は(b) CDR2は13個～24個のアミノ酸残基、通常15個～21個のアミノ酸残基、例えば16個又は17個のアミノ酸残基の長さを有し、及び/又は(c) CDR3は2個～35個のアミノ酸残基、通常3個～30個のアミノ酸残基、例えば6個～23個のアミノ酸残基の長さを有する。

10

【0275】

別の好ましいが非限定的な態様では、本発明は、CDR配列(本明細書で規定)が、配列番号705～配列番号788、より好ましくは配列番号726～配列番号750、配列番号753～配列番号758、配列番号762～配列番号764、配列番号772～配列番号773、配列番号775、又は配列番号778～配列番号780、より好ましくは配列番号726～配列番号750、配列番号753～配列番号758、配列番号762～配列番号764、配列番号772～配列番号773、配列番号775、又は配列番号778～配列番号780、より好ましくは配列番号732、配列番号773、又は配列番号778(表A - 1を参照されたい)の免疫グロブリン配列の少なくとも1つのCDR配列との、80%超、好ましくは90%超、より好ましくは95%超、例えば99%以上の配列同一性(本明細書で規定)を有するナノボディに関する。

20

【0276】

概して、上記のCDR配列を有するナノボディが、本明細書でさらに記載されるようなものであり、好ましくは同様に本明細書でさらに記載されるようなものであるフレームワーク配列を有し得る。このため、例えば本明細書で言及されるようにこのようなナノボディは、(任意の好適な種由来の)天然のナノボディ、天然の(すなわち好適なラクダ科動物種由来の) V_{HH} 配列、又は合成若しくは半合成の免疫グロブリン配列若しくはナノボディ(部分ヒト化ナノボディ又は V_{HH} 配列、完全ヒト化ナノボディ又は V_{HH} 配列、ラクダ化重鎖可変ドメイン配列が挙げられるが、これらに限定されない)、及び本明細書で言及される技法により得られたナノボディであり得る。

30

【0277】

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)とからなるヒト化ナノボディであって、CDR1～CDR3は本明細書で規定されるようなものであり、上記ヒト化ナノボディが少なくとも1つのヒト化置換(本明細書で規定)、具体的にはそのフレームワーク配列(本明細書で規定)の少なくとも1つに少なくとも1つのヒト化置換を含む、ヒト化ナノボディに関する。

【0278】

別の好ましいが非限定的な態様において、本発明は、CDR配列が、配列番号705～配列番号788、より好ましくは配列番号726～配列番号750、配列番号753～配列番号758、配列番号762～配列番号764、配列番号772～配列番号773、配列番号775、又は配列番号778～配列番号780、より好ましくは配列番号726～配列番号750、配列番号753～配列番号758、配列番号762～配列番号764、配列番号772～配列番号773、配列番号775、又は配列番号778～配列番号780、より好ましくは配列番号732、配列番号773、又は配列番号778(表A - 1を参照されたい)の免疫グロブリン配列のうちの少なくとも1つのCDR配列との、少なくとも70%のアミノ酸同一性、好ましくは少なくとも80%のアミノ酸同一性、より好ましくは少なくとも90%のアミノ酸同一性、例えば95%若しくはそれ以上のアミノ酸同

40

50

一性、又はさらに本質的に100%のアミノ酸同一性を有するナノボディに関する。このアミノ酸同一性の程度は例えば、上記のナノボディと配列番号705～配列番号788、より好ましくは配列番号726～配列番号750、配列番号753～配列番号758、配列番号762～配列番号764、配列番号772～配列番号773、配列番号775、又は配列番号778～配列番号780、より好ましくは配列番号732、配列番号773、又は配列番号778(表A-1を参照されたい)の配列の1つ又は複数との間のアミノ酸同一性の程度を(本明細書に記載のように)求めることにより決定することができる(ここでフレームワーク領域を形成するアミノ酸残基は無視する)。このようなナノボディは本明細書でさらに説明されるようなものであり得る。

【0279】

別の好ましいが非限定的な態様において、本発明は、配列番号705～配列番号788、より好ましくは配列番号726～配列番号750、配列番号753～配列番号758、配列番号762～配列番号764、配列番号772～配列番号773、配列番号775、又は配列番号778～配列番号780、より好ましくは配列番号732、配列番号773、又は配列番号778(表A-1を参照されたい)からなる群から、又は配列番号705～配列番号788、より好ましくは配列番号726～配列番号750、配列番号753～配列番号758、配列番号762～配列番号764、配列番号772～配列番号773、配列番号775、又は配列番号778～配列番号780、より好ましくは配列番号732、配列番号773、又は配列番号778(表A-1を参照されたい)の免疫グロブリン配列の少なくとも1つとの、80%超、好ましくは90%超、より好ましくは95%超、例えば99%以上の配列同一性(本明細書で規定)を有する免疫グロブリン配列からなる群から選択される免疫グロブリン配列を有するナノボディに関する。

【0280】

別の好ましいが非限定的な本発明の態様は、対応する天然 V_{HH} 配列と比較して、少なくとも1つのヒト化置換(本明細書で規定)、具体的にはそのフレームワーク配列(本明細書で規定)の少なくとも1つに少なくとも1つのヒト化置換を含む、配列番号705～配列番号788、より好ましくは配列番号726～配列番号750、配列番号753～配列番号758、配列番号762～配列番号764、配列番号772～配列番号773、配列番号775、又は配列番号778～配列番号780、より好ましくは配列番号732、配列番号773、又は配列番号778(表A-1を参照されたい)のナノボディのヒト化変異体に関する。

【0281】

本発明のポリペプチドは少なくとも1つの本発明のナノボディを含むか又はこれから本質的になる。本発明のポリペプチドの幾つかの好ましいが、非限定的な例は配列番号789～配列番号791(表A-3を参照されたい)で与えられる。

【0282】

表A-3(適用される場合):好ましいポリペプチド又は化合物の配列(本明細書で特定の名称を有する配列又は配列番号X(ここでXは関連の免疫グロブリン配列を表す番号である)としても表される):

10

20

30

【表 3】

名称	P2X7 機能	配列番号：X ここで X=	免疫グロブリン配列
14D5- 35GS- 14D5	エンハンサー (実施例 3. 1 1 及び実施例 3. 1 2 を参 照されたい)	789	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSPISY AMGWYRQAPGKPRELVARIYTGATWYEDSV KGRFTISRDNQNTVYLQMNSLKSEDTAVYYC HGRVRYDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQL VESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSPISYAMG WYRQAPGKPRELVARIYTGATWYEDSVKGR FTISRDNQNTVYLQMNSLKSEDTAVYYCHGR VRYDYWGQGTQVTVSS
13A7- 35GS- 13A7	ブロッカー (実施例 3. 1 1 及び実施例 3. 1 2 を参 照されたい)	790	EVQLVESGGGLVQPGESLRLSCTASRFMLDYY DIGWFRQAPGKEREGVSCRFTNDGSTAYADS VKGRFTISRDNVHTVYLQMNSLQPEDTAVYYC AAGPLTKRRQCVPGDFSMDFWGEGLTVTVSS GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG GSGGGSEVQLVESGGGLVQPGESLRLSCTA SRFMLDYYDIGWFRQAPGKEREGVSCRFTND GSTAYADSVKGRFTISRDNVHTVYLQMNSLQ EDTAVYYCAAGPLTKRRQCVPGDFSMDFWGE GTLTVTVSS
8G11- 35GS- 8G11	ブロッカー (実施例 3. 1 1 及び実施例 3. 1 2 を参 照されたい)	791	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGNFFRV NTMAWYRQAPGKQRELVDITRGDRNTYADT VNGRFTISRDNVNTVYLQMNGLRPEDTAAAY CYAVIELGVLEPRDYWGQGTQVTVSSGGGG GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGG GSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGNFF RVNTMAWYRQAPGKQRELVDITRGDRNTYA DTVNGRFTISRDNVNTVYLQMNGLRPEDTAA YYCYAVIELGVLEPRDYWGQGTQVTVSS

10

20

30

【 0 2 8 3 】

「好ましい」(又は「より好ましい」、「さらにより好ましい」等)と本明細書中で言及されるナノボディが、本明細書中に記載のポリペプチドで使用するのにも好ましい(又はより好ましい、又はさらにより好ましい等)ことは、当業者にとって明らかである。このように概して、1つ又は複数の「好ましい」本発明のナノボディを含むか又はこれから本質的になるポリペプチドが好ましく、概して1つ又は複数の「より好ましい」本発明のナノボディを含むか又はこれから本質的になるポリペプチドがより好ましい。

40

【 0 2 8 4 】

概して、単一のナノボディ(本発明の単一のナノボディ等)を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は、本明細書で「一価」タンパク質若しくはポリペプチド、又は「一価構築物」と呼ばれる。2つ以上のナノボディ(少なくとも2つの本発明のナノボディ、又は少なくとも1つの本発明のナノボディ及び少なくとも1つの他のナノボディ等)を含むか又はこれから本質的になるタンパク質及びポリペプチドは、本明細書で「多価」タンパク質若しくはポリペプチド、又は「多価構築物」と呼ばれ、これらは、対応する本発明の一価のナノボディに比べて或る特定の利点を与え得る。このような多価構築物の幾つかの非限定的な例は、本明細書中のさらなる記載から明らかになる。

【 0 2 8 5 】

50

具体的であるが、非限定的な一態様によれば、本発明のポリペプチドは、少なくとも2つの本発明のナノボディ、例えば2つ又は3つの本発明のナノボディを含むか又はこれから本質的になる。本明細書中にさらに記載のように、このような多価構築物は、本発明の単一ナノボディを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に比べて、例えばP2X7等のイオンチャネルに対する結合活性が大きく改善するというような、或る特定の利点を与えることができる。このような多価構築物は、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、このような多価ナノボディ構築物の幾つかの好ましいが、非限定的な例は、配列番号789～配列番号791の構築物である。

【0286】

具体的であるが、非限定的な別の態様によれば、本発明のポリペプチドは、少なくとも1つの本発明のナノボディと、好ましくはナノボディでもある少なくとも1つの他の結合単位（すなわち別のエピトープ、抗原、標的、タンパク質又はポリペプチドに指向性を有する）とを含むか又は本質的にこれからなる。このようなタンパク質又はポリペプチドは、本明細書中で「多重特異性」タンパク質若しくはポリペプチド、又は「多重特異性構築物」とも称され、これらは、（好ましいが非限定的な幾つかの多重特異性構築物の本明細書中のさらなる考察から明らかになるように）対応する本発明の一価ナノボディに比べて或る特定の利点を与え得る。このような多重特異性構築物は、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、このような多重特異性ナノボディ構築物の幾つかの好ましいが、非限定的な例は、配列番号789～配列番号791の構築物である。

【0287】

具体的であるが、非限定的なさらに別の態様によれば、本発明のポリペプチドは、少なくとも1つの本発明のナノボディと、任意で1つ又は複数のさらなるナノボディと、本発明のナノボディに及び/又は得られた融合タンパク質に少なくとも1つの所望の特性を与える少なくとも1つの他の免疫グロブリン配列（タンパク質又はポリペプチド等）とを含むか又はこれから本質的になる。ここでも同様に、このような融合タンパク質は、対応する本発明の一価ナノボディに比べて或る特定の利点を与え得る。このような免疫グロブリン配列及びこのような融合構築物の幾つかの非限定的な例は、本明細書中のさらなる記載から明らかになる。

【0288】

例えば2つ以上の上記の態様を組合せて、2つの本発明のナノボディと、1つの他のナノボディと、任意で1つ又は複数の他の免疫グロブリン配列とを含む三価の二重特異性構築物を提供することも可能である。このような構築物、及び本発明の関連内で特に好ましい幾つかの構築物のさらなる非限定的な例は、本明細書中のさらなる記載から明らかになる。

【0289】

上記の構築物において、1つ又は複数のナノボディ及び/又は他の免疫グロブリン配列は、互いに直接連結しても、及び/又は1つ又は複数のリンカー配列を介して互いに好適に連結してもよい。このようなリンカー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。

【0290】

具体的な本発明の一態様において、本発明のナノボディ、又は本発明のナノボディを少なくとも1つ含む、本発明の化合物、構築物若しくはポリペプチドの半減期は、対応する本発明の免疫グロブリン配列に比べて増大し得る。このようなナノボディ、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き、当業者にとって明らかになり、例えば（例えばペグ化によって）半減期が増大するように化学修飾した本発明のナノボディ配列又はポリペプチド；血清タンパク質（血清アルブミン等、例えば欧州特許第0368684号、4頁を参照されたい）との結合に関するさらなる結合部位を少なくとも1つ含む本発明の免疫グロブリン配列；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つの免疫グロブリン配列）と連結する本発明のナノボディを少なくとも1つ含む本発明のポリペプチドを含む

10

20

30

40

50

。このような半減期を延ばす部分又は免疫グロブリン配列を含む本発明のポリペプチドの例は、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になり、例えば1つ又は複数の本発明のナノボディが、1つ又は複数の血清タンパク質若しくはその断片（血清アルブミン又はその好適な断片等）と、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）ドメイン抗体等）と好適に連結するポリペプチド；本発明のナノボディがFc部分（ヒトFc等）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つ若しくは複数の本発明のナノボディが、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ペプチド（例えば国際公開第91/01743号、国際公開第01/45746号、国際公開第02/076489号、及び2006年12月5日付で出願したAblynx N.V.の"Peptides capable of binding to serum proteins"と題したAblynx N.V.の米国仮特許出願（国際出願PCT/EP/2007/063348号も参照されたい）に記載のタンパク質及びペプチドであるが、これに限定されない）と好適に連結するポリペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0291】

さらに、当業者にとって明らかなように、このようなナノボディ、化合物、構築物又はポリペプチドは、三重特異性又は多重特異性ナノボディ構築物を提供するように、1つ又は複数のさらなる基、残基、部位、又は結合単位（例えば1つ又は複数のさらなる免疫グロブリン配列、特に1つ又は複数のさらなる（すなわち例えばP2X7等のイオンチャネルに指向性を有しない）ナノボディ）を含有し得る。

20

【0292】

概して、半減期が増大した本発明のナノボディ（又はこれを含む化合物、構築物若しくはポリペプチド）は、対応する本発明の免疫グロブリン配列自体の半減期の少なくとも1.5倍、好ましくは少なくとも2倍（少なくとも5倍等）、例えば少なくとも10倍又は20倍を超える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、対応する本発明の免疫グロブリン配列自体に比べて、半減期が1時間を超えて、好ましくは2時間を超えて、より好ましくは6時間を超えて（12時間等を超えて）、又はさらに24時間、48時間若しくは72時間を超えて増大し得る。

30

【0293】

好ましいが非限定的な本発明の一態様において、このような本発明のナノボディ、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時間又はそれ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（約5日～10日等）、好ましくは少なくとも9日（約9日～14日等）、より好ましくは少なくとも約10日（約10日～15日等）、若しくは少なくとも約11日（約11日～16日等）、より好ましくは少なくとも約12日（約12日～18日以上等）、又は14日超（約14日～19日等）の半減期を有し得る。

【0294】

本発明の別の態様では、本発明のポリペプチドは、得られる本発明のポリペプチドが血液脳関門を横断するのを可能にする1つ又は複数（例えば2つ及び好ましくは1つ）の免疫グロブリン配列に連結する（任意で1つ又は複数の好適なリンカー配列を介して）、1つ又は複数（例えば2つ又は好ましくは1つ）の本発明のナノボディを含む。特に、得られる本発明のポリペプチドが血液脳関門を横断するのを可能にする上記1つ又は複数の免疫グロブリン配列は、1つ又は複数の（例えば2つ及び好ましくは1つ）ナノボディ、例えば、国際公開第02/057445号に記載のナノボディ（好ましい例は、FC44（国際公開第06/040153号の配列番号189）及びFC5（国際公開第06/040154号の配列番号190）である）であり得る。

40

【0295】

50

特に、本発明のナノボディを1つ又は複数含むポリペプチドは、

10^{-5} モル/L ~ 10^{-12} モル/L 以下、及び好ましくは 10^{-7} モル/L ~ 10^{-12} モル/L 以下、及びより好ましくは 10^{-8} モル/L ~ 10^{-12} モル/L の解離定数 (K_D) で (すなわち 10^5 L/モル ~ 10^{12} L/モル以上、及び好ましくは 10^7 L/モル ~ 10^{12} L/モル以上、及びより好ましくは 10^8 L/モル ~ 10^{12} L/モルの結合定数 (K_A) で) 例えば P2X7 等のイオンチャネルと結合するようなもの、及び/又は

$10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ~ 約 $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、好ましくは $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ~ $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、より好ましくは $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ~ $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ($10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ~ $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 等) の k_{on} 速度で例えば P2X7 等のイオンチャネルと結合するようなもの、及び/又は

1 s^{-1} ($t_{1/2} = 0.69 \text{ s}$) ~ 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^{-2} s^{-1} ~ 10^{-6} s^{-1} 、より好ましくは 10^{-3} s^{-1} ~ 10^{-6} s^{-1} (10^{-4} s^{-1} ~ 10^{-6} s^{-1} 等) の k_{off} 速度で例えば P2X7 等のイオンチャネルと結合するようなものであるのが好ましい。

【0296】

好ましくは、本発明の免疫グロブリン配列を1つだけ含有するポリペプチドが、500 nM未満、好ましくは200 nM未満、より好ましくは10 nM未満(500 pM未満等)の親和性で例えば P2X7 等のイオンチャネルと結合するようなものであるのが好ましい。これに対して、本発明のナノボディを2つ以上含有するポリペプチドは、本発明の免疫グロブリン配列を1つだけ含有するポリペプチドに比べて、増大した結合活性で例えば P2X7 等のイオンチャネルと結合することができることが当業者には明らかである。

【0297】

本発明の免疫グロブリン配列又はポリペプチドと例えば P2X7 等のイオンチャネルとの結合に関する幾つかの好ましい IC_{50} 値は、本明細書のさらなる記載及び実施例から明らかになる。

【0298】

本発明のこの好ましい態様による他のポリペプチドは例えば、配列番号789~配列番号791(表A-3を参照されたい)の免疫グロブリン配列のうちの1つ又は複数と80%超、好ましくは90%超、より好ましくは95%超、例えば99%又はそれ以上の「配列同一性」(本明細書で規定のような)を有する免疫グロブリン配列からなる群から選択されてもよく、ここで上記免疫グロブリン配列内に含まれるナノボディは本明細書にさらに規定のようなものが好ましい。

【0299】

本発明の別の態様は、本発明の免疫グロブリン配列(例えば本発明のナノボディ)又はこれを含む本発明のポリペプチドをコードする核酸に関する。さらに、本発明の核酸に関して本明細書中に概して記載するように、このような核酸は、本明細書中に規定のように遺伝子構築物の形態であり得る。

【0300】

別の態様では本発明は、本発明の免疫グロブリン配列(例えばナノボディ)及び/又はこれを含む本発明のポリペプチドを発現するか、又は発現することができる、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。

【0301】

本発明の別の態様は、少なくとも1つの本発明の免疫グロブリン配列と、少なくとも1つの本発明のポリペプチド及び/又は少なくとも1つの本発明の核酸と、任意で(すなわち組成物の使用目的に応じて)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構成要素と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(同様に本明細書に記載の)診断用途のための生成物若しくは組成物であり得る。このような生成物又

10

20

30

40

50

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。

【0302】

本発明はさらに、本明細書中に記載の免疫グロブリン配列、化合物、構築物、ポリペプチド、核酸、宿主細胞、生成物及び組成物を調製又は生成する方法に関する。このような方法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。

【0303】

本発明はさらに、本明細書中に記載の免疫グロブリン配列、化合物、構築物、ポリペプチド、核酸、宿主細胞、生成物及び組成物の適用及び使用、並びに例えばP2X7等のイオンチャンネル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。

【0304】

また本発明の他の態様、実施形態、利点及び用途は、本明細書の以下のさらなる記載から明らかになる。概して、最も広範な意味で本明細書で使用されるナノボディという用語は、特定の生物学的供給源又は特定の調製方法に限定されないことに留意すべきである。例えば、以下でより詳細に考察されるように、本発明のナノボディは概して、国際公開第08/020079号の61頁及び62頁で言及された技法(1)~(8)又はそれ自体が既知の任意の他の好適な技法のいずれかによって得ることができる。1つの好ましい群のナノボディは、例えばP2X7等のイオンチャンネルに指向性を有する天然重鎖抗体のV_{H H}ドメインに対応する。本明細書にさらに記載されるように、このようなV_{H H}配列は概して、例えばP2X7等のイオンチャンネルをラクダ科動物種に好適に(すなわち免疫応答及び/又は例えばP2X7等のイオンチャンネルに指向性を有する重鎖抗体を誘起するように)免疫付与することによって、上記ラクダ科動物由来の好適な生体試料(例えば血液試料、血清試料又はB細胞の試料)を得ることによって、及びそれ自体が既知の任意の好適な技法を使用して、上記試料から例えばP2X7等のイオンチャンネルに指向性を有するV_{H H}配列を生成することによって、生成又は入手することができる。このような技法は、当業者にとって明らかであり、及び/又は本明細書でさらに記載される。

【0305】

代替的に、例えばP2X7等のイオンチャンネルに対するこのような天然V_{H H}ドメインは、ラクダ科動物のV_{H H}配列のナイーブラリから、例えばそれ自体が既知の1つ又は複数のスクリーニング技法を用いて、例えばP2X7等のイオンチャンネル、又は少なくともその一部分、断片、抗原決定基若しくはエピトープを使用して、このようなライブラリをスクリーニングすることによって得ることができる。このようなライブラリ及び技法は例えば、国際公開第99/37681号、国際公開第01/90190号、国際公開第03/025020号及び国際公開第03/035694号に記載されている。代替的に、ナイーブV_{H H}ライブラリ由来の改良型の合成ライブラリ又は半合成ライブラリ(例えばランダム突然変異誘発及び/又はCDRシャッフリング(例えば国際公開第00/43507号に記載されているようなもの)等の技法によって、ナイーブV_{H H}ライブラリから得られるV_{H H}ライブラリ)を使用してよい。

【0306】

このように、別の態様において、本発明は、例えばP2X7等のイオンチャンネルに指向性を有するナノボディを生成する方法に関する。一態様では、上記方法は少なくとも、

a) ナノボディ配列のセット、コレクション又はライブラリを準備する工程と、

b) 例えばP2X7等のイオンチャンネルと結合することができる、及び/又はこれに対する親和性を有するナノボディ配列に関して、上記のナノボディ配列のセット、コレクション又はライブラリをスクリーニングする工程と、

c) 例えばP2X7等のイオンチャンネルと結合することができる、及び/又はこれに対する親和性を有するナノボディ(単数又は複数)を単離する工程とを含む。

【0307】

10

20

30

40

50

このような方法では、ナノボディ配列のセット、コレクション又はライブラリは、ナノボディ配列のナイーブセット、ナイーブコレクション又はナイーブライブラリ、ナノボディ配列の合成又は半合成のセット、コレクション又はライブラリ、及び/又は親和性成熟を受けているナノボディ配列のセット、コレクション又はライブラリであり得る。

【0308】

この方法の好ましい一態様では、ナノボディ配列のセット、コレクション又はライブラリは、例えばP2X7等のイオンチャネル、又はこれに基づく若しくはこれに由来する好適な抗原決定基(例えばその抗原の部分、断片、領域、ドメイン、ループ又は他のエピトープ)を好適に免疫付与したラクダ科動物種に由来している、ナノボディ配列の免疫セット、免疫コレクション又は免疫ライブラリ、特にV_HH配列の免疫セット、免疫コレクション又は免疫ライブラリであり得る。特定の一態様では、上記抗原決定基は、細胞外の部分、領域、ドメイン、ループ又は他の細胞外エピトープ(複数可)であり得る。

10

【0309】

上記の方法において、ナノボディ配列又はV_HH配列のセット、コレクション又はライブラリは、スクリーニングを容易にするように、ファージ、ファージミド、リボソーム又は好適な微生物(酵母等)上に提示してもよい。ナノボディ配列(のセット、コレクション又はライブラリ)を提示及びスクリーニングするのに好適な方法、技法及び宿主生物は、例えば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である。国際公開第03/054016号及びNature Biotechnology, 23, 9, 1105-1116(2005)におけるHogenboomによる総説も参照する。

20

【0310】

別の態様において、ナノボディ配列を生成する方法は、

a) 免疫グロブリン配列を発現するラクダ科動物種由来の細胞のコレクション又は試料を準備する工程と、

b) (i) 例えばP2X7等のイオンチャネルと結合することができる、及び/又はこれに対する親和性を有する免疫グロブリン配列を発現する細胞、(ii) 重鎖抗体を発現する細胞に関して上記細胞のコレクション又は試料をスクリーニングする工程であって、例えばP2X7等のイオンチャネルと結合することができる及び/又はこれに対して親和性を有する重鎖抗体を発現する細胞を少なくとも1つ提供するように、本質的に単一のスクリーニング工程として、又は2つの別々のスクリーニング工程として任意の好適な順番で下位工程(i)及び(ii)を実施することができる、スクリーニングする工程と、

30

c) (i) 上記重鎖抗体に存在するV_HH配列を上記細胞から単離する工程、又は(ii) 上記重鎖抗体に存在するV_HH配列をコードする核酸配列を上記細胞から単離した後、上記V_HHドメインを発現する工程のいずれかをと少なくとも含む。

【0311】

この態様による方法において、細胞のコレクション又は試料は例えば、B細胞のコレクション又は試料であり得る。また、この方法では、細胞の試料は、例えばP2X7等のイオンチャネル、又はこれに基づく若しくはこれに由来する好適な抗原決定基(例えばその抗原の部分、断片、領域、ドメイン、ループ又は他のエピトープ)を好適に免疫付与したラクダ科動物に由来し得る。特定の一態様では、上記抗原決定基は、細胞外の部分、領域、ドメイン、ループ又は他の細胞外エピトープ(複数可)であり得る。

40

【0312】

上記の方法は、当業者にとって明らかなように、任意の好適な方法で行われ得る。例えば欧州特許第0542810号、国際公開第05/19824号、国際公開第04/051268号及び国際公開第04/106377号を参照されたい。工程b)のスクリーニングは、FACS等のフローサイトメトリ法を使用して行うのが好ましい。これに関しては、例えばLieby et al., Blood, Vol. 97, No. 12, 3820を参照する。特に、Ablynx N.V.による国際出願である国際公開第06/079372号で記載のいわゆる「ナノクローン(商標)」法を参照する。

【0313】

50

別の態様において、例えば P 2 X 7 等のイオンチャンネルに指向性を有する免疫グロブリン配列を生成する方法は、

a) 重鎖抗体又はナノボディ配列をコードする核酸配列のセット、コレクション又はライブラリを準備する工程と、

b) 例えば P 2 X 7 等のイオンチャンネルと結合することができる及び/又はこれに対する親和性を有する重鎖抗体又はナノボディ配列をコードする核酸配列に関して、上記核酸配列のセット、コレクション又はライブラリをスクリーニングする工程と、

c) 上記核酸配列を単離し、その後それぞれ上記重鎖抗体に存在する V_HH 配列を発現するか、又は上記ナノボディ配列を発現する、単離する工程とを少なくとも含み得る。

【0314】

このような方法では、重鎖抗体又はナノボディ配列をコードする核酸配列のセット、コレクション又はライブラリは例えば、重鎖抗体又は V_HH 配列のナイーブセット、ナイーブコレクション又はナイーブラブラリをコードする核酸配列のセット、コレクション又はライブラリ；ナノボディ配列の合成又は半合成のセット、コレクション又はライブラリをコードする核酸配列のセット、コレクション又はライブラリ；及び/又は親和性成熟を受けているナノボディ配列のセット、コレクション又はライブラリをコードする核酸配列のセット、コレクション又はライブラリであり得る。

【0315】

この方法の好ましい態様では、免疫グロブリン配列のセット、コレクション又はライブラリは、例えば P 2 X 7 等のイオンチャンネル、又はこれに基づく若しくはこれに由来する好適な抗原決定基（例えばその抗原の部分、断片、領域、ドメイン、ループ又は他のエピトープ）を好適に免疫付与したラクダ科動物由来の重鎖抗体又は V_HH 配列をコードする核酸配列の免疫セット、免疫コレクション又は免疫ライブラリであり得る。特定の態様では、上記抗原決定基は、細胞外の部分、領域、ドメイン、ループ又は他の細胞外エピトープ（複数可）であり得る。

【0316】

上記の方法において、ヌクレオチド配列のセット、コレクション又はライブラリは、スクリーニングを容易にするように、ファージ、ファージミド、リボソーム又は好適な微生物（例えば酵母）上に提示してもよい。免疫グロブリン配列をコードするヌクレオチド配列（のセット、コレクション又はライブラリ）を提示及びスクリーニングするのに好適な方法、技法及び宿主生物は、例えば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である。国際公開第 03 / 054016 号及び Nature Biotechnology, 23, 9, 1105-1116 (2005) における Hoogenboom によるレビューも参照する。

【0317】

当業者にとって明らかなように、本明細書中に記載の方法のスクリーニング工程を選択工程として実施することもできる。したがって、本明細書で使用する「スクリーニング」という用語は、選択、スクリーニング、又は選択法及び/又はスクリーニング法の任意の好適な組合せを含むことができる。また、配列のセット、コレクション又はライブラリを使用する場合、これは、1 個、2 個、3 個又は約 5 個、10 個、50 個、100 個、500 個、1000 個、5000 個、10⁴ 個、10⁵ 個、10⁶ 個、10⁷ 個、10⁸ 個以上の配列等の任意の好適な数の配列を含有し得る。

【0318】

また、上記の免疫グロブリン配列のセット、コレクション又はライブラリにおける配列の 1 つ又は複数又は全ては、コンピュータモデリング法又は生物静力学法又はデータマイニング法等の合理的又は半経験的なアプローチで入手又は規定され得る。

【0319】

さらに、このようなセット、コレクション又はライブラリは、自然に多様化した配列（例えば免疫ライブラリ）の多様なセットに由来する複数の配列を含む（compromise）、（例えば、指定の点突然変異又はランダム化した位置を有する）互いの変異体である 1 つ、2 つ以上の配列、又は任意の他の多様な配列源（例えば Hoogenboom et al, Nat Biotec

10

20

30

40

50

hno1 23: 1105, 2005及びBinz et al, Nat Biotechnol 2005, 23: 1247に記載)を含み得る。配列のこのようなセット、コレクション又はライブラリは、ファージ粒子、リボソーム、細菌、酵母細胞、哺乳動物細胞の表面上に提示され、これらの担体内で免疫グロブリン配列をコードするヌクレオチド配列に連結することができる。このことが、このようなセット、コレクション又はライブラリを、所望の本発明の免疫グロブリン配列を単離する選択法に従わせる。より一般的には、配列が好適な宿主又は宿主細胞上に提示される場合、初めに上記宿主又は宿主細胞から所望の配列をコードするヌクレオチド配列を単離した後、好適な宿主生物で上記ヌクレオチド配列を好適に発現することによって所望の配列を得ることも可能である(慣習になっている)。さらに、当業者にとって明らかなように、それ自体が既知の任意の好適な方法でこれを実施することができる。

10

【0320】

例えばP2X7等のイオンチャンネルに指向性を有するV_HH配列又はナノボディ配列を得るためのさらに別の技法は、(すなわち免疫応答及び/又は例えばP2X7等のイオンチャンネルに指向性を有する重鎖抗体を生じるように)重鎖抗体を発現することができるトランスジェニック哺乳動物に好適に免疫付与すること、上記V_HH配列又はナノボディ配列(をコードする核酸配列)を含有する上記トランスジェニック哺乳動物由来の好適な生体試料(例えば血液試料、血清試料又はB細胞の試料)を得ること、及びこれからそれ自体が既知の任意の好適な技法(本明細書に記載の方法又はハイブリドーマ法のいずれか等)を使用して、上記試料から例えばP2X7等のイオンチャンネルに指向性を有するV_HH配列を生成することを伴う。例えばこのために、国際公開第02/085945号、国際公開第04/049794号、国際公開第06/008548号及びJanssens et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006 Oct 10;103(41):15130-5に記載されている重鎖抗体発現マウス、並びにさらなる方法及び技法を使用することができる。例えば、このような重鎖抗体発現マウスは、天然源由来の(単一)可変ドメイン(例えばヒト(単一)可変ドメイン、ラクダ科動物(単一)可変ドメイン又はサメ(単一)可変ドメイン)及び例えば合成又は半合成の(単一)可変ドメイン等の任意の好適な(単一)可変ドメインを有する重鎖抗体を発現することができる。

20

【0321】

本発明は、上記方法、又は代替的に上記の方法の1つと、さらに上記V_HH配列又はナノボディ配列のヌクレオチド配列又は免疫グロブリン配列を決定する工程と、好適な宿主細胞若しくは宿主生物における発現又は化学合成のようなそれ自体が既知の方法で上記V_HH配列又はナノボディ配列を発現又は合成する工程とを少なくとも含む方法によって得られるV_HH配列又はナノボディ配列にも関する。

30

【0322】

本明細書で言及されるように、特に好ましい群の本発明のナノボディは、国際公開第08/020079号の63頁にさらに記載されるように、及び国際公開第08/020079号の63頁で言及される技法を用いて、天然V_HHドメインの免疫グロブリン配列に対応するが、すなわち上記天然V_HH配列(特にフレームワーク配列)の免疫グロブリン配列における1つ又は複数のアミノ酸残基を、(例えば上記の)ヒト由来の通常の本鎖抗体由来のV_Hドメインの対応する位置(複数可)で発生する1つ又は複数のアミノ酸残基に置き換えることによって「ヒト化」した免疫グロブリン配列を有するナノボディを含む。別の特に好ましい群の本発明のナノボディは、国際公開第08/020079号の63頁にさらに記載されるように、及び国際公開第08/020079号の63頁で言及される技法を用いて、天然V_Hドメインの免疫グロブリン配列に対応するが、すなわち通常の本鎖抗体由来の天然V_Hドメインの免疫グロブリン配列における1つ又は複数のアミノ酸残基を、重鎖抗体のV_HHドメインの対応する位置(複数可)で発生する1つ又は複数のアミノ酸残基に置き換えることによって「ラクダ化」した免疫グロブリン配列を有するナノボディを含む。

40

【0323】

天然V_H配列又は好ましくはV_HH配列を発端として本発明のナノボディ及び/又はこ

50

れをコードする核酸を得るのに好適な他の方法及び技法は当業者から明らかであり、例えば国際公開第08/00279号の64頁で言及された技法を含み得る。そこで言及されるように、ナノボディは特に、フレームワーク配列のうちの1つ又は複数における1つ又は複数の「特徴的な残基(Hallmark residues)」(本明細書に記載)の存在を特徴とし得る。

【0324】

したがって、好ましいが、本発明の非限定的な一態様によれば、ナノボディは概して、最も広範な意味で

a) 3つの相補性決定領域/配列が間に挿入された4つのフレームワーク領域/配列から構成される免疫グロブリン配列(カバットナンバリングによる108位のアミノ酸残基はQである)、及び/又は

b) 3つの相補性決定領域/配列が間に挿入された4つのフレームワーク領域/配列から構成される免疫グロブリン配列(カバットナンバリングによる45位のアミノ酸残基は、(本明細書に規定の)荷電アミノ酸又はシステイン残基であり、44位のアミノ酸残基はEであるのが好ましい)、及び/又は

c) 3つの相補性決定領域/配列が間に挿入された4つのフレームワーク領域/配列から構成される免疫グロブリン配列(カバットナンバリングによる103位のアミノ酸残基はP、R及びSからなる群から選択され、特にR及びSからなる群から選択される)を含む、ポリペプチドと定義することができる。

【0325】

したがって好ましいが非限定的な第1の態様において、本発明のナノボディは、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を指し、CDR1~CDR3はそれぞれ相補性決定領域1~相補性決定領域3を指す)を有し得る；ここで

a) カバットナンバリングによる108位のアミノ酸残基はQであり、及び/又は

b) カバットナンバリングによる45位のアミノ酸残基は、荷電アミノ酸又はシステインであり、カバットナンバリングによる44位のアミノ酸残基はEであるのが好ましく、及び/又は

c) カバットナンバリングによる103位のアミノ酸残基はP、R及びSからなる群から選択され、特にR及びSからなる群から選択され、

d) CDR1、CDR2及びCDR3は本明細書で規定されるようなものであり、好ましくは本明細書中の好ましい態様の1つに従って規定されるようなものであり、より好ましくは本明細書中のより好ましい態様の1つに従って規定されるようなものである。

【0326】

特に、ナノボディは概して、最も広範な意味で

a) 3つの相補性決定領域/配列が間に挿入された4つのフレームワーク領域/配列から構成される免疫グロブリン配列(カバットナンバリングによる108位のアミノ酸残基はQである)、及び/又は

b) 3つの相補性決定領域/配列が間に挿入された4つのフレームワーク領域/配列から構成される免疫グロブリン配列(カバットナンバリングによる44位のアミノ酸残基はEであり、カバットナンバリングによる45位のアミノ酸残基はRである)、及び/又は

c) 3つの相補性決定領域/配列が間に挿入された4つのフレームワーク領域/配列から構成される免疫グロブリン配列(カバットナンバリングによる103位のアミノ酸残基はP、R及びSからなる群から選択され、特にR及びSからなる群から選択される)を含む、ポリペプチドと定義することができる。

【0327】

したがって好ましいが非限定的な一態様によれば、本発明のナノボディは、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を指

10

20

30

40

50

し、CDR1～CDR3はそれぞれ相補性決定領域1～相補性決定領域3を指す)を有し得る；ここで

- a) カバットナンバリングによる108位のアミノ酸残基はQであり、及び/又は
- b) カバットナンバリングによる44位のアミノ酸残基はEであり、カバットナンバリングによる45位のアミノ酸残基はRであり、及び/又は
- c) カバットナンバリングによる103位のアミノ酸残基はP、R及びSからなる群から選択され、特にR及びSからなる群から選択され、
- d) CDR1、CDR2及びCDR3は本明細書で規定されるようなものであり、好ましくは本明細書中の好ましい態様の1つに従って規定されるようなものであり、より好ましくは本明細書中のより好ましい態様の1つに従って規定されるようなものである。

10

【0328】

特に本発明による例えばP2X7等のイオンチャネルに対するナノボディは、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を指し、CDR1～CDR3はそれぞれ相補性決定領域1～相補性決定領域3を指す)を有し得る；ここで

- a) カバットナンバリングによる108位のアミノ酸残基はQであり、及び/又は
- b) カバットナンバリングによる44位のアミノ酸残基はEであり、カバットナンバリングによる45位のアミノ酸残基はRであり、及び/又は
- c) カバットナンバリングによる103位のアミノ酸残基はP、R及びSからなる群から選択され、特にR及びSからなる群から選択され、
- d) CDR1、CDR2及びCDR3は本明細書で規定されるようなものであり、好ましくは本明細書中の好ましい態様の1つに従って規定されるようなものであり、より好ましくは本明細書中のより好ましい態様の1つに従って規定されるようなものである。

20

【0329】

特に、好ましいが、本発明の非限定的な一態様によれば、ナノボディは概して、3つの相補性決定領域/配列が間に挿入された4つのフレームワーク領域/配列から構成される免疫グロブリン配列を含むポリペプチドと定義することができ、

- a-1) カバットナンバリングによる44位のアミノ酸残基は、A、G、E、D、G、Q、R、S、Lからなる群から選択され、好ましくはG、E若しくはQからなる群から選択され、
- a-2) カバットナンバリングによる45位のアミノ酸残基は、L、R若しくはCからなる群から選択され、好ましくはL若しくはRからなる群から選択され、
- a-3) カバットナンバリングによる103位のアミノ酸残基は、W、R若しくはSからなる群から選択され、好ましくはW若しくはRであり、最も好ましくはWであり、
- a-4) カバットナンバリングによる108位のアミノ酸残基はQであるか、又は
- b-1) カバットナンバリングによる44位のアミノ酸残基は、E及びQからなる群から選択され、
- b-2) カバットナンバリングによる45位のアミノ酸残基はRであり、
- b-3) カバットナンバリングによる103位のアミノ酸残基は、W、R及びSからなる群から選択され、好ましくはWであり、
- b-4) カバットナンバリングによる108位のアミノ酸残基はQ及びLからなる群から選択され、好ましくはQであるか、又は
- c-1) カバットナンバリングによる44位のアミノ酸残基は、A、G、E、D、Q、R、S及びLからなる群から選択され、好ましくはG、E及びQからなる群から選択され、
- c-2) カバットナンバリングによる45位のアミノ酸残基は、L、R及びCからなる群から選択され、好ましくはL及びRからなる群から選択され、
- c-3) カバットナンバリングによる103位のアミノ酸残基は、P、R及びSからなる群から選択され、特にR及びSからなる群から選択され、

30

40

50

c - 4) カバットナンバリングによる 108 位のアミノ酸残基は Q 及び L からなる群から選択され、好ましくは Q であり、かつ

d) CDR 1、CDR 2 及び CDR 3 は本明細書で規定されるようなものであり、好ましくは本明細書中の好ましい態様の 1 つに従って規定されるようなものであり、より好ましくは本明細書中のより好ましい態様の 1 つに従って規定されるようなものである。

【0330】

したがって、好ましいが非限定的な別の態様において、本発明のナノボディは、構造：
FR 1 - CDR 1 - FR 2 - CDR 2 - FR 3 - CDR 3 - FR 4
(ここで、FR 1 ~ FR 4 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 を指し、CDR 1 ~ CDR 3 はそれぞれ相補性決定領域 1 ~ 相補性決定領域 3 を指す) を有し得る；ここで

a - 1) カバットナンバリングによる 44 位のアミノ酸残基は、A、G、E、D、G、Q、R、S、L からなる群から選択され、好ましくは G、E 若しくは Q からなる群から選択され、

a - 2) カバットナンバリングによる 45 位のアミノ酸残基は、L、R 若しくは C からなる群から選択され、好ましくは L 若しくは R からなる群から選択され、

a - 3) カバットナンバリングによる 103 位のアミノ酸残基は、W、R 若しくは S からなる群から選択され、好ましくは W 若しくは R であり、最も好ましくは W であり、

a - 4) カバットナンバリングによる 108 位のアミノ酸残基は Q であり、かつ

d) CDR 1、CDR 2 及び CDR 3 は本明細書で規定されるようなものであり、好ましくは本明細書中の好ましい態様の 1 つに従って規定されるようなものであり、より好ましくは本明細書中のより好ましい態様の 1 つに従って規定されるようなものである。

【0331】

好ましいが非限定的な別の態様において、本発明のナノボディは、構造：
FR 1 - CDR 1 - FR 2 - CDR 2 - FR 3 - CDR 3 - FR 4
(ここで、FR 1 ~ FR 4 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 を指し、CDR 1 ~ CDR 3 はそれぞれ相補性決定領域 1 ~ 相補性決定領域 3 を指す) を有し得る；ここで

b - 1) カバットナンバリングによる 44 位のアミノ酸残基は、E 及び Q からなる群から選択され、

b - 2) カバットナンバリングによる 45 位のアミノ酸残基は R であり、

b - 3) カバットナンバリングによる 103 位のアミノ酸残基は、W、R 及び S からなる群から選択され、好ましくは W であり、

b - 4) カバットナンバリングによる 108 位のアミノ酸残基は Q 及び L からなる群から選択され、好ましくは Q であり、かつ

d) CDR 1、CDR 2 及び CDR 3 は本明細書で規定されるようなものであり、好ましくは本明細書中の好ましい態様の 1 つに従って規定されるようなものであり、より好ましくは本明細書中のより好ましい態様の 1 つに従って規定されるようなものである。

【0332】

好ましいが非限定的な別の態様において、本発明のナノボディは、構造：
FR 1 - CDR 1 - FR 2 - CDR 2 - FR 3 - CDR 3 - FR 4
(ここで、FR 1 ~ FR 4 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 を指し、CDR 1 ~ CDR 3 はそれぞれ相補性決定領域 1 ~ 相補性決定領域 3 を指す) を有し得る；ここで

c - 1) カバットナンバリングによる 44 位のアミノ酸残基は、A、G、E、D、Q、R、S 及び L からなる群から選択され、好ましくは G、E 及び Q からなる群から選択され、

c - 2) カバットナンバリングによる 45 位のアミノ酸残基は、L、R 及び C からなる群から選択され、好ましくは L 及び R からなる群から選択され、

c - 3) カバットナンバリングによる 103 位のアミノ酸残基は、P、R 及び S からな

10

20

30

40

50

る群から選択され、特に R 及び S からなる群から選択され、

c - 4) カバットナンバリングによる 108 位のアミノ酸残基は Q 及び L からなる群から選択され、好ましくは Q であり、かつ

d) CDR 1、CDR 2 及び CDR 3 は本明細書で規定されるようなものであり、好ましくは本明細書中の好ましい態様の 1 つに従って規定されるようなものであり、より好ましくは本明細書中のより好ましい態様の 1 つに従って規定されるようなものである。

【0333】

2 つの特に好ましいが非限定的な本発明のナノボディ群は、上記の a)、上記の (a - 1) ~ (a - 4)、上記の b)、上記の (b - 1) ~ (b - 4)、上記の (c)、及び / 又は上記の (c - 1) ~ (c - 4) によるものであり、

i) カバットナンバリングによる 44 位 ~ 47 位のアミノ酸残基は、配列 G L E W (又は本明細書に記載の G L E W 様配列) を形成し、108 位のアミノ酸残基は Q であるか、又は

ii) カバットナンバリングによる 43 位 ~ 46 位のアミノ酸残基は、配列 K E R E 又は配列 K Q R E (又は記載されるような K E R E 様配列) を形成し、108 位のアミノ酸残基は Q 又は L であり、好ましくは Q である。

【0334】

したがって、好ましいが非限定的な別の態様において、本発明のナノボディは、構造：
FR 1 - CDR 1 - FR 2 - CDR 2 - FR 3 - CDR 3 - FR 4

(ここで、FR 1 ~ FR 4 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 を指し、CDR 1 ~ CDR 3 はそれぞれ相補性決定領域 1 ~ 相補性決定領域 3 を指す) を有し得る；ここで

i) カバットナンバリングによる 44 位 ~ 47 位のアミノ酸残基は、配列 G L E W (又は本明細書に記載の G L E W 様配列) を形成し、108 位のアミノ酸残基は Q であり、かつ

ii) CDR 1、CDR 2 及び CDR 3 は本明細書で規定されるようなものであり、好ましくは本明細書中の好ましい態様の 1 つに従って規定されるようなものであり、より好ましくは本明細書中のより好ましい態様の 1 つに従って規定されるようなものである。

【0335】

好ましいが非限定的な別の態様において、本発明のナノボディは、構造：

FR 1 - CDR 1 - FR 2 - CDR 2 - FR 3 - CDR 3 - FR 4

(ここで、FR 1 ~ FR 4 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 を指し、CDR 1 ~ CDR 3 はそれぞれ相補性決定領域 1 ~ 相補性決定領域 3 を指す) を有し得る；ここで

i) カバットナンバリングによる 43 位 ~ 46 位のアミノ酸残基は、配列 K E R E 又は配列 K Q R E (又は K E R E 様配列) を形成し、108 位のアミノ酸残基は Q 又は L であり、好ましくは Q であり、かつ

ii) CDR 1、CDR 2 及び CDR 3 は本明細書で規定されるようなものであり、好ましくは本明細書中の好ましい態様の 1 つに従って規定されるようなものであり、より好ましくは本明細書中のより好ましい態様の 1 つに従って規定されるようなものである。

【0336】

カバットナンバリングによる 43 位 ~ 46 位のアミノ酸残基が、配列 K E R E 又は配列 K Q R E を形成する、本発明のナノボディにおいて、37 位のアミノ酸残基が F であるのが最も好ましい。カバットナンバリングによる 44 位 ~ 47 位のアミノ酸残基が、配列 G L E W を形成する、本発明のナノボディにおいて、37 位のアミノ酸残基は、Y、H、I、L、V 又は F からなる群から選択され、V であるのが最も好ましい。

【0337】

したがって、決してこれらには限定されないが、上記で言及された位置に存在するアミノ酸残基に基づき、概して本発明のナノボディを以下の 3 つの群に基づいて分類することができる：

10

20

30

40

50

i) 「GLEW群」：カバットナンバリングによる44位～47位に免疫グロブリン配列GLEW、及びカバットナンバリングによる108位にQを有するナノボディ。本明細書でさらに記載されるように、この群内のナノボディは通常、37位にVを有し、103位にW、P、R又はSを有することができ、好ましくは103位にWを有する。GLEW群は、以下の表B-2で言及されるもののような幾つかのGLEW様配列も含む。より包括的にはこれらに限定されないが、GLEW群に属するナノボディは44位がG及び/又は47位がWであり、46位が通常Eであり、好ましくは45位が荷電アミノ酸残基及びシステインではないナノボディとして定義することができる。

ii) 「KERE群」：カバットナンバリングによる43位～46位に免疫グロブリン配列KERE又はKQRE（又は別のKERE様配列）、及びカバットナンバリングによる108位にQ又はLを有するナノボディ。本明細書でさらに記載されるように、この群内のナノボディは通常、37位にF、及び47位にL又はFを有し、103位にW、P、R又はSを有することができ、好ましくは103位にWを有する。より包括的にはこれらに限定されないが、KERE群に属するナノボディは44位がK、Q又はR（通常K）であり、45位が荷電アミノ酸残基又はシステインであり、47位が本明細書でさらに規定のようなものであるナノボディとして定義することができる。

iii) 「103P、R、S群」：103位にP、R又はSを有するナノボディ。これらのナノボディは、カバットナンバリングによる44位～47位に免疫グロブリン配列GLEW、又はカバットナンバリングによる43位～46位に免疫グロブリン配列KERE又はKQREのいずれかを有することができ（後者は、（KERE群に関して規定のように）37位のF、及び47位のL又はFと組合せるのが最も好ましい）、カバットナンバリングによる108位にQ又はLを有することができ、Qを有するのが好ましい。

【0338】

また必要に応じて、ナノボディは、2つ以上のこれらの群に属し得る（すなわちこれらの特徴を有し得る）。例えば、1つの特に好ましいナノボディ群は、44位～47位にGLEW又はGLEW様配列、103位にP、R又はS（特にR）、及び108位にQ（Lへとヒト化してもよい）を有する。

【0339】

より一般的には、上記に言及される定義が、未変性（すなわち非ヒト化） V_{HH} 配列の形態のナノボディを説明し、またこれに当てはまること、及びこれらのナノボディのヒト化変異体は、上記のもの以外のアミノ酸残基（すなわち本明細書中に規定の1つ又は複数のヒト化置換）を含有し得ることに留意されたい。例えばこれに限定されないが、GLEW群又は103P、R、S群の幾つかのヒト化ナノボディにおいて、108位のQは、108Lにヒト化し得る。本明細書中に既に言及されたように、他のヒト化置換（及びその好適な組合せ）は、本明細書中の開示に基づき当業者にとって明らかであろう。付加的に又は代替的に、天然の V_{HH} 配列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するヒト V_H 配列の対応するフレームワーク配列と比較することによって、他の潜在的に有用なヒト化置換を確認することができ、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、潜在的に有用なヒト化置換（又はその組合せ）の1つ又は複数を上記 V_{HH} 配列に導入することができ、標的に対する親和性、安定性、発現の容易さ及びレベル、及び/又は他の所望の特性に関して、得られたヒト化 V_{HH} 配列を試験することができる。このようにして、当業者は、限定的な試行錯誤によって、本明細書中の開示に基づき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。また、上記に基づき、ナノボディ（のフレームワーク領域）を部分ヒト化又は完全ヒト化してもよい。

【0340】

したがって、好ましいが非限定的な別の態様において、本発明のナノボディは、（本明細書に規定のように）GLEW群に属するナノボディであってもよく、その中のCDR1、CDR2及びCDR3は本明細書で規定されるようなものであり、好ましくは本明細書中の好ましい態様の1つに従って規定されるようなものであり、より好ましくは本明細書

10

20

30

40

50

中のより好ましい態様の1つに従って規定されるようなものである。

【0341】

好ましいが非限定的な別の態様において、本発明のナノボディは、(本明細書に規定のように)KERE群に属するナノボディであってもよく、CDR1、CDR2及びCDR3は本明細書で規定されるようなものであり、好ましくは本明細書中の好ましい態様の1つに従って規定されるようなものであり、より好ましくは本明細書中のより好ましい態様の1つに従って規定されるようなものである。

【0342】

したがって、好ましいが非限定的な別の態様において、本発明のナノボディは、(本明細書に規定のように)103P、R、S群に属するナノボディであってもよく、その中のCDR1、CDR2及びCDR3は本明細書で規定されるようなものであり、好ましくは本明細書中の好ましい態様の1つに従って規定されるようなものであり、より好ましくは本明細書中のより好ましい態様の1つに従って規定されるようなものである。

【0343】

また、より一般的には、上記で言及された108Q、43E/44R及び103P、R、S残基の他に、本発明のナノボディは、通常の本ドメインでV_H/V_L界面(の一部)が形成される1つ又は複数の位置で、対応する天然V_H配列における同じ位置(複数可)で自然発生するアミノ酸残基よりも強く荷電する、1つ又は複数のアミノ酸残基、特に(国際出願の国際公開第08/020079号の48頁の表A-2で言及される)1つ又は複数の荷電アミノ酸残基を含有することができる。このような置換としては、これらに限定されないが、以下の表B-2で言及されるGLEW様配列、及び例えば44位~47位のKLEWと共に108位にQを有するナノボディを得るために、いわゆる「マイクロボディ」に関して国際出願の国際公開第00/29004号で説明される置換が挙げられる。これらの位置での他の可能性のある置換は、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る。本発明のナノボディの一態様において、83位のアミノ酸残基は、L、M、S、V及びWからなる群から選択され、Lであるのが好ましい。また、本発明のナノボディの一態様において、83位のアミノ酸残基は、R、K、N、E、G、I、T及びQからなる群から選択され、(天然V_Hドメインに対応するナノボディに関しては)K若しくはE、又は(本明細書に記載の「ヒト化」ナノボディに関しては)Rのいずれかであるのが最も好ましい。一態様では、84位のアミノ酸残基は、P、A、R、S、D、T及びVからなる群から選択され、(天然V_Hドメインに対応するナノボディに関しては)P、又は(本明細書に記載の「ヒト化」ナノボディに関しては)Rであるのが最も好ましい。さらに本発明のナノボディの一態様において、104位のアミノ酸残基は、G及びDからなる群から選択され、Gであるのが最も好ましい。

【0344】

まとめると、ナノボディにおいて上記で言及される、11位、37位、44位、45位、47位、83位、84位、103位、104位及び108位のアミノ酸残基は、本明細書で「特徴的な残基」とも称される。特徴的な残基及び最も密接に関連したヒトV_Hドメイン(V_H3)の対応する位置のアミノ酸残基を表B-2に要約する。

【0345】

天然V_Hドメインで生じるこれらの特徴的な残基の幾つかの特に好ましいが非限定的な組合せを表B-3で言及する。比較のために、DP-47と呼ばれるヒトV_H3の対応するアミノ酸残基をイタリック体で示している。

【0346】

表B-2: ナノボディにおける特徴的な残基

10

20

30

40

【表 4】

位置	ヒト V _H 3	特徴的な残基
11	L, V; 主に L	L, S, V, M, W, F, T, Q, E, A, R, G, K, Y, N, P, I; 好ましくは L
37	V, I, F; 通常 V	F ⁽¹⁾ , Y, V, L, A, H, S, I, W, C, N, G, D, T, P, 好ましくは F ⁽¹⁾ 又は Y
44 ⁽⁸⁾	G	E ⁽³⁾ , Q ⁽³⁾ , G ⁽²⁾ , D, A, K, R, L, P, S, V, H, T, N, W, M, I; 好ましくは G ⁽²⁾ , E ⁽³⁾ 又は Q ⁽³⁾ ; 最も好ましくは G ⁽²⁾ 又は Q ⁽³⁾
45 ⁽⁸⁾	L	L ⁽²⁾ , R ⁽³⁾ , P, H, F, G, Q, S, E, T, Y, C, I, D, V; 好ましくは L ⁽²⁾ 又は R ⁽³⁾
47 ⁽⁸⁾	W, Y	F ⁽¹⁾ , L ⁽¹⁾ 又は W ⁽²⁾ G, I, S, A, V, M, R, Y, E, P, T, C, H, K, Q, N, D; 好ましくは W ⁽²⁾ , L ⁽¹⁾ 又は F ⁽¹⁾
83	R or K; 通常 R	R, K ⁽⁵⁾ , T, E ⁽⁵⁾ , Q, N, S, I, V, G, M, L, A, D, Y, H; 好ましくは K 又は R; 最も好ましくは K
84	A, T, D; 主に A	P ⁽⁵⁾ , S, H, L, A, V, I, T, F, D, R, Y, N, Q, G, E; 好ましくは P
103	W	W ⁽⁴⁾ , R ⁽⁶⁾ , G, S, K, A, M, Y, L, F, T, N, V, Q, P ⁽⁶⁾ , E, C; 好ましくは W
104	G	G, A, S, T, D, P, N, E, C, L; 好ましくは G
108	L, M 又は T; 主に L	Q, L ⁽⁷⁾ , R, P, E, K, S, T, M, A, H; 好ましくは Q 又は L ⁽⁷⁾

脚注：

(1) 排他的ではないが、具体的には、43位～46位の KERE 又は KQRE との組合せで。

(2) 通常 44位～47位の GLEW として。

(3) 通常 43位～46位の KERE 又は KQRE として、例えば 43位～47位の KERE L、KERE F、KQRE L、KQRE F、KERE G、KQREW 又は KQREG として。代替的に、TERE (例えば TERE L)、TQRE (例えば TQRE L)、KECE (例えば KECE L 又は KECE R)、KQCE (例えば KQCE L)、RERE (例えば RERE G)、RQRE (例えば RQRE L、RQRE F 又は RQREW)、Q

10

20

30

40

50

ERE (例えばQEREG)、QQRE (例えばQQREW、QQREL又はQQREF)、KGRE (例えばKREG)、KDRE (例えばKDREV)等の配列も可能である。幾つかの他の可能であるがあまり好ましくない配列としては例えば、DECKL及びNVCELが挙げられる。

(4) 44位～47位にGLEW、及び43位～46位にKERE又はKQREの両方を有する。

(5) 多くの場合、天然V_{HH}ドメインの83位、84位のKP又はEPとして。

(6) 排他的ではないが、具体的には44位～47位のGLEWとの組合せで。

(7) 44位～47位がGLEWである場合、また103位にWを含有する(非ヒト化)V_{HH}配列における108位は常にQであることが条件である。

(8) GLEW群は、44位～47位にGLEW様配列(例えばGVEW、EPEW、GLER、DQEW、DLEW、GIEW、ELEW、GPEW、EWLP、GPER、GLER及びELEW)も含有する。

【0347】

表B-3:天然ナノボディにおける特徴的な残基の幾つかの好ましいが非限定的な組合せこれらの組合せのヒト化に関しては、明細書を参照する。

【表5】

	11	37	44	45	47	83	84	103	104	108
DP-47 (ヒト)	M	V	G	L	W	R	A	W	G	L
「KERE」群	L	F	E	R	L	K	P	W	G	Q
	L	F	E	R	F	E	P	W	G	Q
	L	F	E	R	F	K	P	W	G	Q
	L	Y	Q	R	L	K	P	W	G	Q
	L	F	L	R	V	K	P	Q	G	Q
	L	F	Q	R	L	K	P	W	G	Q
	L	F	E	R	F	K	P	W	G	Q
「GLEW」群	L	V	G	L	W	K	S	W	G	Q
	M	V	G	L	W	K	P	R	G	Q

【0348】

ナノボディにおいて、特徴的な残基以外の任意の位置の各アミノ酸残基は、天然V_{HH}ドメインの(カバットナンバリングによる)対応する位置で自然発生する任意のアミノ酸残基であり得る。

【0349】

このようなアミノ酸残基は当業者にとって明らかである。表B-4～表B-7は、天然V_{HH}ドメインのFR1、FR2、FR3及びFR4の(カバットナンバリングによる)それぞれの位置に存在し得る幾つかの非限定的な残基を表す。それぞれの位置に関しては、天然V_{HH}ドメインのそれぞれの位置で最も頻繁に発生する(ナノボディにおける上記位置に最も好ましいアミノ酸残基である)アミノ酸残基を太字で示し、それぞれの位置で好ましい他のアミノ酸残基を下線処理する(備考:天然V_{HH}ドメインの26位～30位で見られるアミノ酸残基の数字は、これらの位置の残基が既にCDR1部分を形成しているというChothia(同上)によるナンバリングの基礎をなす仮説を支持する)。

【0350】

表B-4～表B-7では、ヒトV_H3ドメインのそれぞれの位置に存在し得る非限定的な残基の幾つかも表している。また、それぞれの位置に関しては、天然ヒトV_H3ドメインのそれぞれの位置で最も頻繁に発生するアミノ酸残基を太字で示し、他の好ましいアミノ酸残基を下線処理する。

【0351】

参考のみのために、表B-4～表B-7は、7732個のV_{HH}配列の代表的な試料におけるそれぞれのアミノ酸位置でのV_{HH}エントロピー(「V_{HH} Ent.」)及びV

V_{HH} 変動性 (「 $V_{HH} Var.$ 」) に関するデータ (Utrecht UniversityのDavid Lutje Hulzing及びProf. Theo Verripsによって無償 (kindly) 提供された a . o . データを含む) も含有する。 V_{HH} エントロピー及び V_{HH} 変動性の値は、解析する7732個の V_{HH} 配列間のアミノ酸残基の変動性及び保存度に対する評価基準を与え、低い値 (すなわち1未満、例えば0.5未満) は、アミノ酸残基が、 V_{HH} 配列間で強く保存される (すなわちほとんど変動性がない) ことを示す。例えば、9位のG及び36位のWがそれぞれ、0.01及び0の V_{HH} エントロピー値を有し、これは (解析する7732個の配列全てにおいて36位がWである場合) これらの残基が強く保存され、ほとんど変動しないことを示す一方で、CDR部分を形成する残基に関しては概して、1.5以上の値が見られる (データ図示せず)。以下で表すデータは、27位~30位のアミノ酸残基、並びに

10

おそらく93位及び94位のアミノ酸残基でさえも既にCDR部分を形成しているという仮説を支持することに留意されたい (しかしながら、本発明は任意の特定の仮説又は説明に限定されず、上記のように、本明細書ではカバットによるナンバリングを使用する)。配列エントロピー、配列変動性及びこれを決定する方法の一般的説明に関しては、Oliveira et al., PROTEINS: Structure, Function and Genetics, 52:544-552 (2003) を参照されたい。

【0352】

表B-4:FR1におけるアミノ酸残基の非限定的な例 (脚注に関しては、表B-2の脚注を参照する)

【表 6】

位置	アミノ酸残基		V _{HH}	V _{HH}
	ヒト V _{H3}	ラクダ科動物 V _{HH}	Ent.	Var.
1	E, Q	E, Q, K, D, A, G, R	0,47	5
2	V	V, M, A, E, L	0,04	1
3	Q	Q, K, P, H, F, R	0,04	1
4	L	L, M, Q, P, R, F, V	0,02	1
5	V, L	V, Q, M, E, A, L, P, K, R	0,35	3
6	E	E, A, Q, D, K, H	0,21	5
7	S, T	S, F, L, W, T	0,05	2
8	G, R	G, R, E, V	0,04	1
9	G	G, R, V, A	0,01	1
10	G, V	G, D, R, S, K, E, A, Q, N, T, V	0,22	4
11	特徴的な残基: L, S, V, M, W, F, T, Q, E, A, R, G, K, Y, N, P, I; 好ましくは L		0,35	4
12	V, I	V, A, L, M, E, G, T	0,11	2
13	Q, K, R	Q, L, R, H, P, E, K, T, S, V, D, G, A, N, M	0,46	3
14	P	A, P, T, V, S, D, F, N, I, E, L, R, G, Y, Q, H	0,92	5
15	G	G, E	0	1
16	G, R	G, D, E, A, S, N, V, R, K, T, P, C, L	0,47	4
17	S	S, F, P, Y, T, A, C, R, N	0,14	2
18	L	L, V, R, M, P, Q, S, A, T, K, H	0,06	1
19	R, K	R, T, K, S, N, G, A, I, L, Q, F, E, V, M	0,36	4
20	L	L, F, V, I, P, H, S	0,18	3
21	S	S, A, T, P, F, V, H, D, R, L, I, G	0,13	3
22	C	C, W	0	1
23	A, T	A, V, I, E, S, L, G, I, K, Q, R, D, F, N, P, M	0,88	5
24	A	A, D, V, T, H, Y, P, G, S, F, L, I, N, Q, E, R	0,78	9

10

20

30

位置	アミノ酸残基		V _{HH}	V _{HH}
	ヒト V _{H3}	ラクダ科動物 V _{HH}	Ent.	Var.
25	S	S, P, T, A, F, L, N, Y, R, H, D, V, I, W, G, K, Q, C	0,2	2
26	G	G, E, R, V, T, A, S, K, D, L, I, Q, N, F, Y, M, W, P, H	0,45	6
27	F	R, E, S, P, L, G, I, N, T, D, H, V, E, A, Y, K, M, Q, W, C	1,89	12
28	T	T, L, S, A, P, F, D, N, V, R, M, L, G, Y, K, E, H, W, Q	1,29	12
29	F, V	F, L, S, V, I, A, W, Y, G, D, R, T, P, N, E, M, H, Q, K, C	1,23	11
30	S, D, G	S, D, N, G, R, T, A, E, I, Y, K, V, H, L, F, W, M, P, C, Q	1,55	12

10

【 0 3 5 3 】

表 B - 5 : F R 2 におけるアミノ酸残基の非限定的な例 (脚注に関しては、表 B - 2 の脚注を参照する)

20

【 表 7 】

位置	アミノ酸残基		V _{HH}	V _{HH}
	ヒト V _{H3}	ラクダ科動物 V _{HH}	Ent.	Var.
36	W	W	0	1
37	特徴的な残基: F ⁽¹⁾ , Y, V, L, A, H, S, I, W, C, N, G, D, T, P, 好ましくは F ⁽¹⁾ 又は Y		1,1	7
38	R	R, H, C, P, Y, L, V	0,01	1
39	Q	Q, E, R, H, L, A, S, K, P, V, T, D	0,22	3
40	A	A, V, T, P, G, S, D, I, L, R, N, F, Y, C, E, H	0,55	6
41	P, S, T	P, S, A, L, T, Q, R, V, D, G, I, H	0,18	3
42	G	G, E, A, R, D, V, W, T, Q, K, L, N, H, M	0,1	2
43	K	K, N, Q, E, R, T, L, S, M, D, G, A, V, H, I, F, P	0,45	7
44	特徴的な残基: E ⁽³⁾ , Q ⁽³⁾ , G ⁽²⁾ , D, A, K, R, L, P, S, V, H, T, N, W, M, I; 好ましくは G ⁽²⁾ , E ⁽³⁾ 又は Q ⁽³⁾ ; 最も好ましくは G ⁽²⁾ 又は Q ⁽³⁾ .		1,11	4
45	特徴的な残基: L ⁽²⁾ , R ⁽³⁾ , P, H, F, G, Q, S, E, T, Y, C, I, D, V; 好ましくは L ⁽²⁾ 又は R ⁽³⁾		0,56	3
46	E, V	E, D, A, Q, V, M, K, T, G, R, S, N, I, L, F	0,42	4
47	特徴的な残基: F ⁽¹⁾ , L ⁽¹⁾ or W ⁽²⁾ , G, I, S, A, V, M, R, Y, E, P, T, C, H, K, Q, N, D; 好ましくは W ⁽²⁾ , L ⁽¹⁾ 又は F ⁽¹⁾		1,64	11
48	V	V, I, L, A, T, Q, F, M, G, E, R	0,35	5
49	S, A, G	A, S, G, T, V, L, C, I, F, P, E, Y, M, D, R	0,89	5

30

40

【 0 3 5 4 】

表 B - 6 : F R 3 におけるアミノ酸残基の非限定的な例 (脚注に関しては、表 B - 2 の脚注を参照する)

50

注を参照する)

【表 8】

位置	アミノ酸残基		V _{HH}	V _{HH}
	ヒト V _{H3}	ラクダ科動物 V _{HH}	Ent.	Var.
66	R	R	0	1
67	F	F, S, L, V, I, C, A, Y, M, G	0,1	1
68	T	T, A, S, I, F, V, P, N, G, R, K, M, D, L, W, Q	0,34	4
69	I	I, <u>V</u> , M, T, L, A, F, P, S, G, N	0,5	5
70	S	S, T, A, F, P, V, Y, L, D, G, N, H, W, E, C	0,22	4
71	R	R, <u>S</u> , K, G, T, I, W, A, N, V, E, L, M, F, D, Q, C	0,61	7
72	D, E	D, N, E, G, V, A, H, L, S, T, I, Q, F, P, Y, R	0,34	4
73	N, <u>D</u> , G	N, D, S, K, I, Y, G, T, H, R, A, V, F, L, E, M, P, C	0,65	9
74	A, S	A, <u>I</u> , V, S, F, G, D, P, N, I, R, L, Y, H, E, Q, K, W, M	0,8	8
75	K	K, N, E, R, Q, A, G, T, M, S, L, D, V, W, Y, I	0,71	6

76	N, S	N, K, S, R, D, T, H, G, E, A, Y, I, M, Q, L, W, P, F, V	0,66	7
77	<u>S</u> , <u>I</u> , I	T, <u>A</u> , M, S, R, I, V, L, P, E, N, K, G, W, Q	0,72	7
78	L, A	V, <u>L</u> , <u>A</u> , M, I, G, T, F, W, Q, S, E, N, H	1,11	6
79	Y, H	Y, F, D, S, H, N, T, A, L, W, V, C, G, E, I, P, R	0,68	8
80	L	L, M, V, P, F	0,05	2
81	Q	Q, E, R, H, L, D, T, G, K, P, A, I, S, N, Y, V, M	0,38	4
82	M	M, I, L, V, A, T, S, K	0,12	3
82a	N, G	N, <u>S</u> , <u>D</u> , T, E, H, K, I, A, G, R, Y, L, V, F, Q	0,77	5
82b	S	S, <u>N</u> , T, G, H, D, R, A, K, I, M, V, F, E, P, Y, C, L	0,72	8
82c	L	L, V, M, P, A, T, G	0,08	2
83	特徴的な残基:	R, K ⁽⁵⁾ , T, E ⁽⁵⁾ , Q, N, S, I, V, G, M, L, A, D, Y, H; 好ましくは K 又は R; 最も好ましくは K	0,66	6
84	特徴的な残基:	P ⁽⁶⁾ , S, H, L, A, V, I, T, F, D, R, Y, N, Q, G, E; 好ましくは P	0,85	7
85	E, G	E, D, G, A, Q, V, S, N, K, T, R, L	0,27	3
86	D	D, E, G, N	0,02	1
87	T, M	T, S, A, M, R, P, K, E	0,15	3

10

20

30

40

50

位置	アミノ酸残基		V _{HH} Ent.	V _{HH} Var.
	ヒト V _{H3}	ラクダ科動物 V _{HH}		
88	A	A, G, S, D, N, T, P, V	0,23	2
89	V, L	V, I, L, E, A, R, T, D, F, M, N, S, K, G, Q, H	0,71	7
90	Y	Y, H, F, N	0	1
91	Y, H	Y, F, R, S, H, T, I, V, L, N, D, C, Q, W, A, E, M	0,6	7
92	C	C, R, P	0	1
93	A, K, T	A, N, I, K, G, V, R, Y, S, H, W, L, F, Q, M, I, E, C, D	1,33	10
94	K, R, T	A, K, V, I, R, L, G, S, D, Q, I, M, F, Y, N, E, H, P, C, W	1,55	12

10

【 0 3 5 5 】

表 B - 7 : F R 4 におけるアミノ酸残基の非限定的な例 (脚注に関しては、表 B - 2 の脚注を参照する)

20

【 表 9 】

位置	アミノ酸残基		V _{HH} Ent.	V _{HH} Var.
	ヒト V _{H3}	ラクダ科動物 V _{HH}		
103	特徴的な残基 : W⁽⁴⁾, R⁽⁶⁾, G, S, K, A, M, Y, L, F, T, N, V, Q, P⁽⁶⁾, E, C ; 好ましくは W		0,54	6
104	特徴的な残基 : G, A, S, T, D, P, N, E, C, L ; 好ましくは G		0,13	3
105	Q, R	Q, K, H, R, P, E, L, T, N, S, V, A, M, G	0,52	5
106	G	G, R, E	0	1
107	T	T, Q, I, A, S, N, R, V, D	0,24	3
108	特徴的な残基 : Q, L⁽⁷⁾, R, P, E, K, S, T, M, A, H ; 好ましくは Q 又は L ⁽⁷⁾		0,3	4
109	V	V, I, L	0	1
110	T	T, S, N, A, I, F	0,01	1
111	V	V, I, A	0,01	1
112	S	S, T, P, F, A	0,01	1
113	S	S, T, A, L, P, F, E, V	0,04	1

30

40

【 0 3 5 6 】

このように、好ましいが非限定的な別の態様において、本発明のナノボディは、(一般)構造:

F R 1 - C D R 1 - F R 2 - C D R 2 - F R 3 - C D R 3 - F R 4

(ここで、F R 1 ~ F R 4 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 を指し、C D R 1 ~ C D R 3 はそれぞれ相補性決定領域 1 ~ 相補性決定領域 3 を指す) を有する免疫グロブリン配列として規定することができ、ここで

i) カバットナンバリングによる 1 1 位、3 7 位、4 4 位、4 5 位、4 7 位、8 3 位、8 4 位、1 0 3 位、1 0 4 位及び 1 0 8 位のアミノ酸残基の 1 つ又は複数、表 B - 2 で言及される特徴的な残基から選択され、

50

i i) C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 が、本明細書中で規定されるようなものであり、本明細書中の好ましい態様の 1 つに従って規定されるようなものであるものが好ましく、本明細書中のより好ましい態様の 1 つに従って規定されるようなものであるのがより好ましい。

【 0 3 5 7 】

上記ナノボディは例えば、 $V_{H H}$ 配列であっても、又はヒト化ナノボディであってもよい。上記ナノボディ配列が $V_{H H}$ 配列である場合、これらは、本明細書中にさらに記載のように、好適にヒト化されていてもよい。ナノボディが部分ヒト化ナノボディである場合、これらは任意で、さらに本明細書中に記載のようにさらに好適にヒト化してもよい。

【 0 3 5 8 】

特に、本発明のナノボディは、(一般)構造:

FR 1 - C D R 1 - FR 2 - C D R 2 - FR 3 - C D R 3 - FR 4

(ここで、FR 1 ~ FR 4 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 を指し、C D R 1 ~ C D R 3 はそれぞれ相補性決定領域 1 ~ 相補性決定領域 3 を指す) を有する免疫グロブリン配列である可能性があり、ここで

i) カバットナンバリングによる 1 1 位、3 7 位、4 4 位、4 5 位、4 7 位、8 3 位、8 4 位、1 0 3 位、1 0 4 位及び 1 0 8 位の(好ましくは)アミノ酸残基の 1 つ又は複数、表 B - 2 で言及される特徴的な残基から選択され($V_{H H}$ 配列が特徴的な残基を 1 つ又は複数含有すること、並びに部分ヒト化ナノボディが通常及び好ましくは[依然として]特徴的な残基を 1 つ又は複数含有すること[しかしながら、本発明に応じて好適であれば、1 つ又は複数の他のアミノ酸残基ではなく、全ての特徴的な残基がヒト化した部分ヒト化ナノボディを提供することも本発明の範囲内である]、並びに本発明に応じて好適であれば、完全ヒト化ナノボディにおいて特徴的な残基の位置の全てのアミノ酸残基がヒト $V_{H 3}$ 配列で発生するアミノ酸残基であることが理解される。本明細書中の開示に基づき当業者にとって明らかなように、このような $V_{H H}$ 配列、少なくとも 1 つの特徴的な残基を有するこのような部分ヒト化ナノボディ、特徴的な残基を有しないこのような部分ヒト化ナノボディ及びこのような完全ヒト化ナノボディは全て、本発明の態様を形成する)、

i i) 上記免疫グロブリン配列が、配列番号 1 ~ 配列番号 2 2 の免疫グロブリン配列の少なくとも 1 つとの少なくとも 8 0 % のアミノ酸同一性を有し(アミノ酸同一性の程度を求めるために、C D R 配列を形成するアミノ酸残基(配列番号 1 ~ 配列番号 2 2 の配列において X で示す)は無視する)、

i i i) C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 が、本明細書中で規定されるようなものであり、本明細書中の好ましい態様の 1 つに従って規定されるようなものであるものが好ましく、本明細書中のより好ましい態様の 1 つに従って規定されるようなものであるのがより好ましい。

【 0 3 5 9 】

上記ナノボディは例えば、 $V_{H H}$ 配列であっても、又はヒト化ナノボディであってもよい。上記ナノボディ配列が $V_{H H}$ 配列である場合、これらは、本明細書中にさらに記載のように、好適にヒト化されていてもよい。ナノボディが部分ヒト化ナノボディである場合、これらは任意で、さらに本明細書中に記載のようにさらに好適にヒト化してもよい。

【 0 3 6 0 】

表 B - 8 : K E R E、G L E W 及び P、R、S 1 0 3 群のナノボディの代表的な免疫グロブリン配列

C D R は X X X X で示す

10

20

30

40

【 表 1 0 】

KERE sequence no. 1	SEQ ID NO:1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIPFSXXXXXWFRQAPGK QRDSVAXXXRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVRYCYFX XXXXWGQGTQVTVSS
KERE sequence no. 2	SEQ ID NO:2	QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCVSGSRTFSXXXXXWFR LAPG KEREFVAXXXRFTISRDTASNRYLHMNLTPEdTAVYYCAA XXXXWGQGTQVTVSS
KERE sequence no. 3	SEQ ID NO:3	AVQLVDSGGGLVQAGDSLKLSALTGGAFXXXXXWFRQTPG REREFVAXXXRFTISRDNAKNMVYLRMNSLIPEDAAVYSCAA XXXXWGQGTQVTVSS
KERE sequence no. 4	SEQ ID NO:4	QVQLVESGGGLVEAGGSLRLSCTASESPFRXXXXXWFRQTS G QEREFVAXXXRFTISRDDAKNTVWLHGSTLKPEDTAVYYCAA XXXXWGQGTQVTVSS
KERE sequence no. 5	SEQ ID NO:5	AVQLVESGGGLVQGGGSLRLACAASERIFXXXXXWYRQGP G NERELVAXXXRFTISMDYTKQTVYLMNSLRP EDTGLYYCKI XXXXWGQGTQVTVSS
KERE sequence no. 6	SEQ ID NO:6	DVKFVESGGGLVQAGGSLRLSCVASFNFDFXXXXXWFRQAP G KEREVAXXXRFTISSEKDKNSVYLMNSLKPEDTALYICAG XXXXWGGRGTQVTVSS

10

20

30

40

50

KERE sequence no. 7	SEQ ID NO:7	QVRLAESGGGLVQSGGSLRLSCVASGSTYTXSXXWYRQYPG KQRALVAXXXRFTIARDSTKDTFCLQMNNLKPEDTAVYYCYA XXXXXWGQGTQTVSS
KERE sequence no. 8	SEQ ID NO:8	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTSDXXXWFRQAPG KREGVSTXXXRFTISTDNAKNTVHLLMNRVNAEDTALYYCAV XXXXXWGRGTRVTVSS
KERE sequence no. 9	SEQ ID NO:9	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCQASGDISTXXXWYRQVPG KLREFVAXXXRFTISGDNAKRAIYLMNNLKPDDTAVYYCNR XXXXXWGQGTQTVSP
KERE sequence no. 10	SEQ ID NO:10	QVPLVESGGGLVQAGDSLRLFCVPSFTSTXXXWFRQAPGK EREFVAXXXRFTISRNATKNTLTLRMDSLKPEDTAVYYCAAX XXXXXWGQGTQTVSS
KERE sequence no. 11	SEQ ID NO:11	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLFCVSGGTASXXXWFRQAPG EKREFVAXXXRFTIARENAGNMVYLMNNLKPDDTALYTCAA XXXXXWGRGTRVTVSS

10

20

30

40

KERE sequence no. 12	SEQ ID NO:12	AVQLVESGGDSVQPGDSQTLSCAASGRRTNSXXXXXWFRQAPG KERVFLAXXXXRFTISRDSAKNMMYLQMNNLKPQDTAVYYCA AXXXXWGQGTQTVSS
KERE sequence no. 13	SEQ ID NO:13	AVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCLVSGLTSSXXXXXWFRQTPW QERDFVAXXXXRFTISRDNKYKDTVLLEMNFKPEDTAIYYCAAX XXXXWGQGTQTVSS
KERE sequence no. 14	SEQ ID NO:14	AVQLVESGGGLVQAGASLRLSCATSTRITLDXXXXXWFRQAPGR DREFVAXXXXRFTVSRDSAENTVALQMNSLKPEDTAVYYCAA XXXXWGQGTQTVSS
KERE sequence no. 15	SEQ ID NO:15	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSRHTAHXXXXXWFRQAPG KEREAVSXXXRFTISRDIYAGNTAFLQMDSLKPEDTGVYYCAT XXXXWGQGTQTVSS
KERE sequence no. 16	SEQ ID NO:16	EVQLVESGGELVQAGGSLKLSCTASGRNFVXXXXXWFRRAPG KEREFVAXXXXRFTVSRDNGKNTAYLRMNSLKPEDTADYYCA VXXXXLGSQTQTVSS
GLEW sequence no. 1	SEQ ID NO:17	AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLVSGTFSXXXXXWFRQAPG KVLEWVXXXXRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCVK XXXXXGSGGTQTVSS

GLEW sequence no. 2	SEQ ID NO:18	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVCSVSSGCTXXXWVRQAPG KAEWVXXXXRFFKISRDNAKKTLYLQMNSLGPEDTAMYYCQ RXXXXRGQGTQTVSS
GLEW sequence no. 3	SEQ ID NO:19	EVQLVESGGGLALPGGSLTSCVFSFGSTFSXXXXWVRHTPGK AEEWVXXXXRFTISRDNAKNTLYLEMNSLSPEDTAMYYCGR XXXXRSKGIQTVSS
P,R,S 103 sequence no. 1	SEQ ID NO:20	AVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSXXXXWFRQAPG KEREFVXXXXRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAA XXXXRGQGTQTVSS
P,R,S 103 sequence no. 2	SEQ ID NO:21	DVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFSFDXXXXWLRQTPG KGLEWVGXXXXRFTISRDNAKNMLYLHLNLLKSEDTAVYYCR RXXXXLGGQGTQTVSS
P,R,S 103 sequence no. 3	SEQ ID NO:22	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVCSVSSGCTXXXWVRQAPG KAEWVXXXXRFFKISRDNAKKTLYLQMNSLGPEDTAMYYCQ RXXXXRGQGTQTVSS

【 0 3 6 1 】

特に、KERE群の本発明のナノボディは、(一般)構造:

10

20

30

40

50

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

を有する免疫グロブリン配列である可能性があり、ここで

i) カバットナンバリングによる45位のアミノ酸残基は、荷電アミノ酸(本明細書中に規定)又はシステイン残基であり、44位のアミノ酸残基は好ましくはEであり、

ii) FR1は、以下の免疫グロブリン配列の少なくとも1つとの少なくとも80%のアミノ酸同一性を有する免疫グロブリン配列であり、

【0362】

表B-9: KERE群のナノボディの代表的なFW1配列

【表11】

KERE FW1 sequence no. 1	SEQ ID NO:23	QVQRVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTSS	10
KERE FW1 sequence no. 2	SEQ ID NO:24	QVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCSASGRTFS	
KERE FW1 sequence no. 3	SEQ ID NO:25	QVKLEESGGGLVQAGDSLRLSCAATGRAFG	
KERE FW1 sequence no. 4	SEQ ID NO:26	AVQLVESGGGLVQPGESLGLSCVASGRDFV	
KERE FW1 sequence no. 5	SEQ ID NO:27	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCEVLGRTAG	20
KERE FW1 sequence no. 6	SEQ ID NO:28	QVQLVESGGGWVQPGGSLRLSCAASETILS	
KERE FW1 sequence no. 7	SEQ ID NO:29	QVQLVESGGGTVPGGSLNLSCVASGNTFN	
KERE FW1 sequence no. 8	SEQ ID NO:30	EVQLVESGGGLAQPGGSLQLSCSAPGFTLD	
KERE FW1 sequence no. 9	SEQ ID NO:31	AQELEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFN	30

【0363】

iii) FR2は、以下の免疫グロブリン配列の少なくとも1つとの少なくとも80%のアミノ酸同一性を有する免疫グロブリン配列であり、

【0364】

表B-10: KERE群のナノボディの代表的なFW2配列

【表 1 2】

KERE FW2 sequence no. 1	SEQ ID NO:41	WFRQAPGKREFVA
KERE FW2 sequence no. 2	SEQ ID NO:42	WFRQTPGREREFVA
KERE FW2 sequence no. 3	SEQ ID NO:43	WYRQAPGKQREMVA
KERE FW2 sequence no. 4	SEQ ID NO:44	WYRQGPGKQRELVA
KERE FW2 sequence no. 5	SEQ ID NO:45	WIRQAPGKEREGVS
KERE FW2 sequence no. 6	SEQ ID NO:46	WFREAPGKEREGIS
KERE FW2 sequence no. 7	SEQ ID NO:47	WYRQAPGKERDLVA
KERE FW2 sequence no. 8	SEQ ID NO:48	WFRQAPGKQREEVS
KERE FW2 sequence no. 9	SEQ ID NO:49	WFRQPPGKVREFVG

10

20

【0365】

i v) FR3は、以下の免疫グロブリン配列の少なくとも1つとの少なくとも80%のアミノ酸同一性を有する免疫グロブリン配列であり、

【0366】

表B-11: KERE群のナノボディの代表的なFW3配列

【表 1 3】

KERE FW3 sequence no. 1	SEQ ID NO:50	RFTISRDNKNTVYLLQMNSLKPEDTAVYRCYF	
KERE FW3 sequence no. 2	SEQ ID NO:51	RFAISRDNKNTGYLQMNSLEPEDTAVYYCAA	
KERE FW3 sequence no. 3	SEQ ID NO:52	RFTVARNNKNTVNLEMNSLKPEDTAVYYCAA	
KERE FW3 sequence no. 4	SEQ ID NO:53	RFTISRDIKNTVDLLMNNLEPEDTAVYYCAA	10
KERE FW3 sequence no. 5	SEQ ID NO:54	RLTISRDNVDTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAA	
KERE FW3 sequence no. 6	SEQ ID NO:55	RFTISRDNKNTVYLLQMDNVKPEDTAIYYCAA	
KERE FW3 sequence no. 7	SEQ ID NO:56	RFTISKDSGKNTVYLLQMTSLKPEDTAVYYCAT	
KERE FW3 sequence no. 8	SEQ ID NO:57	RFTISRDSAKNMMYLLQMNNLKPQDTAVYYCAA	20
KERE FW3 sequence no. 9	SEQ ID NO:58	RFTISRENDKSTVYLLQLNSLKPEDTAVYYCAA	
KERE FW3 sequence no. 10	SEQ ID NO:59	RFTISRDIYAGNTAYLLQMNSLKPEDTGVYYCAT	

【 0 3 6 7 】

v) FR4 は、以下の免疫グロブリン配列の少なくとも1つとの少なくとも80%のアミノ酸同一性を有する免疫グロブリン配列であり、

【 0 3 6 8 】

表 B - 1 2 : K E R E 群のナノボディの代表的な F W 4 配列

【表 1 4】

KERE FW4 sequence no. 1	SEQ ID NO:60	WGQGTQVTVSS	
KERE FW4 sequence no. 2	SEQ ID NO:61	WGKGLVTVSS	
KERE FW4 sequence no. 3	SEQ ID NO:62	RGQGTRVTVSS	
KERE FW4 sequence no. 4	SEQ ID NO:63	WGLGTQVTISS	40

【 0 3 6 9 】

vi) CDR1、CDR2及びCDR3が、本明細書中で規定されるようなものであり、本明細書中の好ましい態様の1つに従って規定されるようなものであるものが好ましく、本明細書中のより好ましい態様の1つに従って規定されるようなものであるのがより好ましい。

【 0 3 7 0 】

上記ナノボディにおいて、1つ又は複数のさらなる特徴的な残基は、(例えばこれらが

10

20

30

40

50

V_HH 配列又は部分ヒト化ナノボディである場合)本明細書中に記載のようなものが好ましい。

【0371】

また、上記ナノボディは例えば、V_HH 配列であっても、又はヒト化ナノボディであってもよい。上記ナノボディ配列がV_HH 配列である場合、これらは、本明細書中にさらに記載のように、好適にヒト化されていてもよい。ナノボディが部分ヒト化ナノボディである場合、これらは任意で、さらに本明細書中に記載のようにさらに好適にヒト化してもよい。

【0372】

フレームワーク1に関して、上記で概説の免疫グロブリン配列がヌクレオチド配列の発現によって生成する場合、上記核酸を生成するのに使用されているプライマー(複数可)によって、始めの4つの免疫グロブリン配列(すなわちカバットナンバリングによる1位~4位のアミノ酸残基)が決まり得ることが多いことは、当業者にとって明らかである。このように、アミノ酸同一性の程度を求めるために、始めの4つのアミノ酸残基を無視するのが好ましい。

10

【0373】

また、フレームワーク1に関して、カバットナンバリングによる27位~30位のアミノ酸位置は(CDRではなく)フレームワーク領域の一部であると考えられるが、1000個を超えるV_HH 配列のデータベースの解析によって、27位~30位のアミノ酸が、1位~26位のアミノ酸に対する変動性よりも非常に大きい変動性(V_HH エントロピー及びV_HH 変動性に関して表される、表B-4~表B-7を参照されたい)を有することが見出されている。このため、アミノ酸同一性の程度を求めるために、27位~30位のアミノ酸残基も無視するのが好ましい。

20

【0374】

これを考慮して、KERE群のナノボディは、3つの相補性決定領域/配列が間に挿入された4つのフレームワーク領域/配列から構成される免疫グロブリン配列であり得る；ここで

i)カバットナンバリングによる45位のアミノ酸残基は、荷電アミノ酸(本明細書中に規定)又はシステイン残基であり、44位のアミノ酸残基は好ましくはEであり、

ii)FR1は、カバットナンバリングによる5位~26位で、以下の免疫グロブリン配列の少なくとも1つとの少なくとも80%のアミノ酸同一性を有する免疫グロブリン配列であり、

30

【0375】

表B-13:KERE群のナノボディの代表的なFW1配列(5位~26位のアミノ酸残基)

【表 15】

KERE FW1 sequence no. 10	SEQ ID NO:32	VESGGGLVQPGGSLRLSCAASG
KERE FW1 sequence no. 11	SEQ ID NO:33	VDSGGGLVQAGDSLKLSCALTG
KERE FW1 sequence no. 12	SEQ ID NO:34	VDSGGGLVQAGDSLRLSCAASG
KERE FW1 sequence no. 13	SEQ ID NO:35	VDSGGGLVEAGGSLRLSCQVSE
KERE FW1 sequence no. 14	SEQ ID NO:36	QDSGGGSVQAGGSLKLSCAASG
KERE FW1 sequence no. 15	SEQ ID NO:37	VQSGGRLVQAGDSLRLSCAASE
KERE FW1 sequence no. 16	SEQ ID NO:38	VESGGTLVQSGDSLKLSCASST
KERE FW1 sequence no. 17	SEQ ID NO:39	MESGGDSVQSGGSLTLSCVASG
KERE FW1 sequence no. 18	SEQ ID NO:40	QASGGGLVQAGGSLRLSCSASV

10

20

【0376】

i i i) FR 2、FR 3 及び FR 4 は、KERE 群のナノボディの FR 2、FR 3 及び FR 4 に関して本明細書中に言及されるようなものであり、

i v) CDR 1、CDR 2 及び CDR 3 が、本明細書中で規定されるようなものであり、本明細書中の好ましい態様の 1 つに従って規定されるようなものであるものが好ましく、本明細書中のより好ましい態様の 1 つに従って規定されるようなものであるのがより好ましい。

30

【0377】

上記ナノボディは例えば、V_HH 配列であっても、又はヒト化ナノボディであってもよい。上記ナノボディ配列が V_HH 配列である場合、これらは、本明細書中にさらに記載のように、好適にヒト化されていてもよい。ナノボディが部分ヒト化ナノボディである場合、これらは任意で、この場合も本明細書中に記載のようにさらに好適にヒト化してもよい。

【0378】

GLEW 群のナノボディは、3 つの相補性決定領域 / 配列が間に挿入された 4 つのフレームワーク領域 / 配列から構成される免疫グロブリン配列であり得る；ここで

i) 好ましくは、GLEW 群のナノボディが非ヒト化ナノボディである場合、108 位のアミノ酸残基は Q であり、

40

i i) FR 1 は、以下の免疫グロブリン配列の少なくとも 1 つとの少なくとも 80% のアミノ酸同一性を有する免疫グロブリン配列であり、

【0379】

表 B - 14 : GLEW 群のナノボディの代表的な FW 1 配列

【表 1 6】

GLEW FW1 sequence no. 1	SEQ ID NO:64	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
GLEW FW1 sequence no. 2	SEQ ID NO:65	EVHLVESGGGLVLRPGGSLRLSCAAFGFIFK
GLEW FW1 sequence no. 3	SEQ ID NO:66	QVKLEESGGGLAQPGGSLRLSCVASGFTFS
GLEW FW1 sequence no. 4	SEQ ID NO:67	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVCSGCT
GLEW FW1 sequence no. 5	SEQ ID NO:68	EVQLVESGGGLALPGGSLTLCVFSGSTFS

10

【 0 3 8 0 】

i i i) F R 2 は、以下の免疫グロブリン配列の少なくとも1つとの少なくとも80%のアミノ酸同一性を有する免疫グロブリン配列であり、

【 0 3 8 1 】

表 B - 1 5 : G L E W 群のナノボディの代表的な F W 2 配列

【表 1 7】

GLEW FW2 sequence no. 1	SEQ ID NO:72	WVRQAPGKVLEWVS
GLEW FW2 sequence no. 2	SEQ ID NO:73	WVRRPPGKGLEWVS
GLEW FW2 sequence no. 3	SEQ ID NO:74	WVRQAPGMGLEWVS
GLEW FW2 sequence no. 4	SEQ ID NO:75	WVRQAPGKEPEWVS
GLEW FW2 sequence no. 5	SEQ ID NO:76	WVRQAPGKDQEWVS
GLEW FW2 sequence no. 6	SEQ ID NO:77	WVRQAPGKAEWVS
GLEW FW2 sequence no. 7	SEQ ID NO:78	WVRQAPGKGLEWVA
GLEW FW2 sequence no. 8	SEQ ID NO:79	WVRQAPGRATEWVS

20

30

40

【 0 3 8 2 】

i v) F R 3 は、以下の免疫グロブリン配列の少なくとも1つとの少なくとも80%のアミノ酸同一性を有する免疫グロブリン配列であり、

【 0 3 8 3 】

表 B - 1 6 : G L E W 群のナノボディの代表的な F W 3 配列

【表 1 8】

GLEW FW3 sequence no. 1	SEQ ID NO:80	RFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCVK
GLEW FW3 sequence no. 2	SEQ ID NO:81	RFTISRDNARNTLYLQMDSLIPEDTALYYCAR
GLEW FW3 sequence no. 3	SEQ ID NO:82	RFTSSRDNAKSTLYLQMNDLKPEDTALYYCAR
GLEW FW3 sequence no. 4	SEQ ID NO:83	RFIISRDNAKNTLYLQMNSLGPEDTAMYYCQR
GLEW FW3 sequence no. 5	SEQ ID NO:84	RFTASRDNAKNTLYLQMNSLKSEDTARYYCAR
GLEW FW3 sequence no. 6	SEQ ID NO:85	RFTISRDNAKNTLYLQMDDLQSEDTAMYYCGR

10

【 0 3 8 4】

v) FR 4 は、以下の免疫グロブリン配列の少なくとも 1 つとの少なくとも 80% のアミノ酸同一性を有する免疫グロブリン配列であり、

【 0 3 8 5】

20

表 B - 1 7 : G L E W 群のナノボディの代表的な F W 4 配列

【表 1 9】

GLEW FW4 sequence no. 1	SEQ ID NO:86	GSQGTQVTSS
GLEW FW4 sequence no. 2	SEQ ID NO:87	LRGGTQVTSS
GLEW FW4 sequence no. 3	SEQ ID NO:88	RGQGTLVTSS
GLEW FW4 sequence no. 4	SEQ ID NO:89	RSRGIQVTSS
GLEW FW4 sequence no. 5	SEQ ID NO:90	WGKGTQVTSS
GLEW FW4 sequence no. 6	SEQ ID NO:91	WGQGTQVTSS

30

【 0 3 8 6】

vi) CDR 1、CDR 2 及び CDR 3 が、本明細書中で規定されるようなものであり、本明細書中の好ましい態様の 1 つに従って規定されるようなものであるものが好ましく、本明細書中のより好ましい態様の 1 つに従って規定されるようなものであるのがより好ましい。

40

【 0 3 8 7】

上記ナノボディにおいて、1 つ又は複数のさらなる特徴的な残基は、(例えばこれらが V_HH 配列又は部分ヒト化ナノボディである場合)本明細書中に記載のようなものが好ましい。

【 0 3 8 8】

この場合もフレームワーク 1 に関して、アミノ酸同一性の程度を求めるために、1 位 ~ 4 位及び 27 位 ~ 30 位のアミノ酸残基を無視するのが好ましいことは当業者にとって明

50

らかである。

【0389】

これを考慮して、GLEW群のナノボディは、3つの相補性決定領域/配列が間に挿入された4つのフレームワーク領域/配列から構成される免疫グロブリン配列であり得る；ここで

i) 好ましくは、GLEW群のナノボディが非ヒト化ナノボディである場合、108位のアミノ酸残基はQであり、

ii) FR1は、カバットナンバリングによる5位～26位で、以下の免疫グロブリン配列の少なくとも1つとの少なくとも80%のアミノ酸同一性を有する免疫グロブリン配列であり、

【0390】

表B-18：KERE群のナノボディの代表的なFW1配列（5位～26位のアミノ酸残基）

【表20】

GLEW FW1 sequence no. 6	SEQ ID NO:69	VESGGGLVQPGGSLRLSCAASG
GLEW FW1 sequence no. 7	SEQ ID NO:70	EESGGGLAQPGGSLRLSCVASG
GLEW FW1 sequence no. 8	SEQ ID NO:71	VESGGGLALPGGSLTLSCVFSG

【0391】

iii) FR2、FR3及びFR4は、GLEW群のナノボディのFR2、FR3及びFR4に関して本明細書中に言及されるようなものであり、

iv) CDR1、CDR2及びCDR3が、本明細書中で規定されるようなものであり、本明細書中の好ましい態様の1つに従って規定されるようなものであるものが好ましく、本明細書中のより好ましい態様の1つに従って規定されるようなものであるのがより好ましい。

【0392】

上記ナノボディは例えば、V_{H H}配列であっても、又はヒト化ナノボディであってもよい。上記ナノボディ配列がV_{H H}配列である場合、これらは、本明細書中にさらに記載のように、好適にヒト化されていてもよい。ナノボディが部分ヒト化ナノボディである場合、これらは任意で、この場合も本明細書中に記載のようにさらに好適にヒト化してもよい。上記ナノボディにおいて、1つ又は複数のさらなる特徴的な残基は、（例えばこれらがV_{H H}配列又は部分ヒト化ナノボディである場合）本明細書中に記載のようなものが好ましい。

【0393】

P、R、S 103群のナノボディは、3つの相補性決定領域/配列が間に挿入された4つのフレームワーク領域/配列から構成される免疫グロブリン配列であり得る；ここで

i) カバットナンバリングによる103位のアミノ酸残基はWではなく、

ii) 好ましくは、カバットナンバリングによる103位のアミノ酸残基は、P、R又はSであり、より好ましくはRであり、

iii) FR1は、以下の免疫グロブリン配列の少なくとも1つとの少なくとも80%のアミノ酸同一性を有する免疫グロブリン配列であり、

【0394】

表B-19：P、R、S 103群のナノボディの代表的なFW1配列

10

20

30

40

【表 2 1】

P,R,S 103 FW1 sequence no. 1	SEQ ID NO:92	AVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFS	
P,R,S 103 FW1 sequence no. 2	SEQ ID NO:93	QVQLQESGGGMVQPGGSLRLSCAASGFDFG	
P,R,S 103 FW1 sequence no. 3	SEQ ID NO:94	EVHLVESGGGLVLRPGGSLRLSCAAFQFIFK	
P,R,S 103 FW1 sequence no. 4	SEQ ID NO:95	QVQLAESGGGLVQPGGSLKLSCAASRTIVS	10
P,R,S 103 FW1 sequence no. 5	SEQ ID NO:96	QEHLVESGGGLVDIGGSLRLSCAASERIFS	
P,R,S 103 FW1 sequence no. 6	SEQ ID NO:97	QVKLEESGGGLAQPGGSLRLSCVASGFTFS	
P,R,S 103 FW1 sequence no. 7	SEQ ID NO:98	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVCVSSGCT	
P,R,S 103 FW1 sequence no. 8	SEQ ID NO:99	EVQLVESGGGLALPGGSLTLSCVFSGSTFS	20

【 0 3 9 5 】

i v) F R 2 は、以下の免疫グロブリン配列の少なくとも1つとの少なくとも80%のアミノ酸同一性を有する免疫グロブリン配列であり、

【 0 3 9 6 】

表 B - 2 0 : P、R、S 1 0 3 群のナノボディの代表的な F W 2 配列

【表 2 2】

P,R,S 103 FW2 sequence no. 1	SEQ ID NO:102	WFRQAPGKEREVFA
P,R,S 103 FW2 sequence no. 2	SEQ ID NO:103	WVRQAPGKVLEWVS
P,R,S 103 FW2 sequence no. 3	SEQ ID NO:104	WVRRPPGKGLEWVS
P,R,S 103 FW2 sequence no. 4	SEQ ID NO:105	WIRQAPGKEREGVS
P,R,S 103 FW2 sequence no. 5	SEQ ID NO:106	WVRQYPGKEPEWVS
P,R,S 103 FW2 sequence no. 6	SEQ ID NO:107	WFRQPPGKEHEFVA
P,R,S 103 FW2 sequence no. 7	SEQ ID NO:108	WYRQAPGKRTELVA
P,R,S 103 FW2 sequence no. 8	SEQ ID NO:109	WLRQAPGQGLEWVS
P,R,S 103 FW2 sequence no. 9	SEQ ID NO:110	WLRQTPGKGLEWVG
P,R,S 103 FW2 sequence no. 10	SEQ ID NO:111	WVRQAPGKAEEFVS

10

20

【 0 3 9 7 】

v) FR3は、以下の免疫グロブリン配列の少なくとも1つとの少なくとも80%のアミノ酸同一性を有する免疫グロブリン配列であり、

【 0 3 9 8 】

表B-21: P、R、S 103群のナノボディの代表的なFW3配列

30

【表 2 3】

P,R,S 103 FW3 sequence no. 1	SEQ ID NO:112	RFTISRDNANTVYLMNSLKPEDTAVYYCAA	
P,R,S 103 FW3 sequence no. 2	SEQ ID NO:113	RFTISRDNARNTLYLQMDSLIPEDTALYYCAR	
P,R,S 103 FW3 sequence no. 3	SEQ ID NO:114	RFTISRDNAKNEMYLMNMLKTEDTGVYWCGA	
P,R,S 103 FW3 sequence no. 4	SEQ ID NO:115	RFTISSDSNRNMIYLMNMLKPEDTAVYYCAA	10
P,R,S 103 FW3 sequence no. 5	SEQ ID NO:116	RFTISRDNAKNMLYLHLNMLKSEDTAVYYCRR	
P,R,S 103 FW3 sequence no. 6	SEQ ID NO:117	RFTISRDNAKKTVYLRNLNLPEDTAVYSCNL	
P,R,S 103 FW3 sequence no. 7	SEQ ID NO:118	RFKISRDNAKKTLYLMNSLGPEDTAMYQCQR	
P,R,S 103 FW3 sequence no. 8	SEQ ID NO:119	RFTVSRDNGKNTAYLRMNSLKPEDTADYYCAV	20

【 0 3 9 9 】

v i) F R 4 は、以下の免疫グロブリン配列の少なくとも1つとの少なくとも80%のアミノ酸同一性を有する免疫グロブリン配列であり、

【 0 4 0 0 】

表 B - 2 2 : P、R、S 1 0 3 群のナノボディの代表的な F W 4 配列

【表 2 4】

P,R,S 103 FW4 sequence no. 1	SEQ ID NO:120	RGQGTQVTVSS	
P,R,S 103 FW4 sequence no. 2	SEQ ID NO:121	LRGGTQVTVSS	30
P,R,S 103 FW4 sequence no. 3	SEQ ID NO:122	GNKGTLVTVSS	
P,R,S 103 FW4 sequence no. 4	SEQ ID NO:123	SSPGTQVTVSS	
P,R,S 103 FW4 sequence no. 5	SEQ ID NO:124	SSQGTLVTVSS	
P,R,S 103 FW4 sequence no. 6	SEQ ID NO:125	RSRGIQVTVSS	40

【 0 4 0 1 】

v i i) C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 が、本明細書中で規定されるようなものであり、本明細書中の好ましい態様の1つに従って規定されるようなものであるものが好ましく、本明細書中のより好ましい態様の1つに従って規定されるようなものであるのがより好ましい。

【 0 4 0 2 】

上記ナノボディにおいて、1つ又は複数のさらなる特徴的な残基は、(例えばこれらが V_HH 配列又は部分ヒト化ナノボディである場合)本明細書中に記載のようなものが好ま

しい。

【0403】

フレームワーク1に関して、アミノ酸同一性の程度を求めるために、1位～4位及び27位～30位のアミノ酸残基を無視するのが好ましいことはここでもまた当業者にとって明らかである。

【0404】

これを考慮して、P、R、S 103群のナノボディは、3つの相補性決定領域/配列が間に挿入された4つのフレームワーク領域/配列から構成される免疫グロブリン配列であり得る；ここで

i) カバットナンバリングによる103位のアミノ酸残基はWではなく、

ii) 好ましくは、カバットナンバリングによる103位のアミノ酸残基は、P、R又はSであり、より好ましくはRであり、

iii) FR1は、カバットナンバリングによる5位～26位で、以下の免疫グロブリン配列の少なくとも1つとの少なくとも80%のアミノ酸同一性を有する免疫グロブリン配列であり、

【0405】

表B-23：P、R、S 103群のナノボディの代表的なFW1配列（5位～26位のアミノ酸残基）

【表25】

P,R,S 103 FW1 sequence no. 9	SEQ ID NO:100	VESGGGLVQAGGSLRLSCAASG
P,R,S 103 FW1 sequence no. 10	SEQ ID NO:101	AESGGGLVQPGGSLKLSCAASR

【0406】

iv) FR2、FR3及びFR4は、P、R、S 103群のナノボディのFR2、FR3及びFR4に関して本明細書中に言及されるようなものであり、

v) CDR1、CDR2及びCDR3が、本明細書中で規定されるようなものであり、本明細書中の好ましい態様の1つに従って規定されるようなものであるものが好ましく、本明細書中のより好ましい態様の1つに従って規定されるようなものであるのがより好ましい。

【0407】

上記ナノボディは例えば、V_HH配列であっても、又はヒト化ナノボディであってもよい。上記ナノボディ配列がV_HH配列である場合、これらは、本明細書中にさらに記載のように、好適にヒト化されていてもよい。ナノボディが部分ヒト化ナノボディである場合、これらは任意で、この場合も本明細書中に記載のようにさらに好適にヒト化してもよい。

【0408】

上記ナノボディにおいて、1つ又は複数のさらなる特徴的な残基は、（例えばこれらがV_HH配列又は部分ヒト化ナノボディである場合）本明細書中に記載のようなものが好ましい。

【0409】

別の好ましいが非限定的な態様において本発明は、上記のようなナノボディであって、CDR配列が、配列番号705～配列番号788、より好ましくは配列番号726～配列番号750、配列番号753～配列番号758、配列番号762～配列番号764、配列番号772～配列番号773、配列番号775、又は配列番号778～配列番号780、より好ましくは配列番号732、配列番号773、又は配列番号778（表A-1を参照されたい）の免疫グロブリン配列のうち少なくとも1つのCDR配列との少なくとも70%のアミノ酸同一性、好ましくは少なくとも80%のアミノ酸同一性、より好ましくは

10

20

30

40

50

少なくとも90%のアミノ酸同一性(95%以上のアミノ酸同一性等)、又はさらに本質的に100%のアミノ酸同一性を有する、ナノボディに関する。このアミノ酸同一性の程度は例えば、上記ナノボディと、配列番号705~配列番号788、より好ましくは配列番号726~配列番号750、配列番号753~配列番号758、配列番号762~配列番号764、配列番号772~配列番号773、配列番号775、又は配列番号778~配列番号780、より好ましくは配列番号732、配列番号773、又は配列番号778(表A-1を参照されたい)の配列の1つ又は複数との間のアミノ酸同一性の程度を(本明細書に記載の方法で)求めることによって決定することができる(フレームワーク領域を形成するアミノ酸残基は無視する)。このようなナノボディは、本明細書にさらに記載されるようなものであり得る。

10

【0410】

本明細書で既に言及されているように、別の好ましいが非限定的な本発明の態様は、配列番号705~配列番号788、より好ましくは配列番号726~配列番号750、配列番号753~配列番号758、配列番号762~配列番号764、配列番号772~配列番号773、配列番号775、又は配列番号778~配列番号780、より好ましくは配列番号732、配列番号773、又は配列番号778(表A-1を参照されたい)からなる群から、又は配列番号705~配列番号788、より好ましくは配列番号726~配列番号750、配列番号753~配列番号758、配列番号762~配列番号764、配列番号772~配列番号773、配列番号775、又は配列番号778~配列番号780、より好ましくは配列番号732、配列番号773、又は配列番号778(表A-1を参照されたい)の免疫グロブリン配列の少なくとも1つとの、80%超、好ましくは90%超、より好ましくは95%超、例えば99%以上の配列同一性(本明細書で規定)を有する免疫グロブリン配列からなる群から選択される免疫グロブリン配列を有するナノボディに関する。

20

【0411】

また上記のナノボディにおいて、

i) 任意のアミノ酸置換(本明細書で規定のようにヒト化置換でない場合)は、(本明細書で規定されるように)対応する配列番号705~配列番号788、より好ましくは配列番号726~配列番号750、配列番号753~配列番号758、配列番号762~配列番号764、配列番号772~配列番号773、配列番号775、又は配列番号778~配列番号780、より好ましくは配列番号732、配列番号773、又は配列番号778(表A-1を参照されたい)の免疫グロブリン配列と比較して、保存的なアミノ酸置換であるのが好ましく;及び/又は

30

ii) その免疫グロブリン配列は、対応する配列番号705~配列番号788、より好ましくは配列番号726~配列番号750、配列番号753~配列番号758、配列番号762~配列番号764、配列番号772~配列番号773、配列番号775、又は配列番号778~配列番号780、より好ましくは配列番号732、配列番号773、又は配列番号778(表A-1を参照されたい)の免疫グロブリン配列と比較して、アミノ酸置換だけ、又はそうでなければ好ましくはわずか5つ、好ましくはわずか3つ、より好ましくは1つ若しくは2つだけのアミノ酸欠失若しくは挿入を含有するのが好ましく;及び/又は

40

iii) CDRは、親和性成熟によって、例えば対応する配列番号705~配列番号788、より好ましくは配列番号726~配列番号750、配列番号753~配列番号758、配列番号762~配列番号764、配列番号772~配列番号773、配列番号775、又は配列番号778~配列番号780、より好ましくは配列番号732、配列番号773、又は配列番号778(表A-1を参照されたい)の免疫グロブリン配列のCDRから誘導されるCDRであり得る。

【0412】

好ましくは、本発明のナノボディにおけるCDR配列及びFR配列は、本発明のナノボディ(及びこれを含む本発明のポリペプチド)が、

50

10^{-5} モル/L ~ 10^{-12} モル/L 以下、好ましくは 10^{-7} モル/L ~ 10^{-12} モル/L 以下、より好ましくは 10^{-8} モル/L ~ 10^{-12} モル/L の解離定数 (K_D) で (すなわち、 10^5 L/モル ~ 10^{12} L/モル以上、好ましくは 10^7 L/モル ~ 10^{12} L/モル以上、より好ましくは 10^8 L/モル ~ 10^{12} L/モルの結合定数 (K_A) で) 例えば P2X7 等のイオンチャンネルに結合するようなものであり、及び/又は

$10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ~ 約 $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、好ましくは $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ~ $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、より好ましくは $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ~ $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ($10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ~ $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 等) の k_{on} 速度で例えば P2X7 等のイオンチャンネルに結合するようなものであり、及び/又は

1 s^{-1} ($t_{1/2} = 0.69 \text{ s}$) ~ 10^{-6} s^{-1} ($t_{1/2}$ が数日のほぼ非可逆的な複合体を与える)、好ましくは 10^{-2} s^{-1} ~ 10^{-6} s^{-1} 、より好ましくは 10^{-3} s^{-1} ~ 10^{-6} s^{-1} (10^{-4} s^{-1} ~ 10^{-6} s^{-1} 等) の k_{off} 速度で例えば P2X7 等のイオンチャンネルに結合するようなものである。

【0413】

好ましくは、本発明のナノボディに存在する CDR 配列及び FR 配列は、本発明のナノボディが、500 nM 未満、好ましくは 200 nM 未満、より好ましくは 10 nM 未満 (500 pM 未満等) の親和性で例えば P2X7 等のイオンチャンネルと結合するようなものである。

【0414】

本発明の非限定的な一態様によれば、ナノボディは本明細書で規定されるようなものであり得るが、天然のヒト V_H ドメインの対応するフレームワーク領域と比較して、特に DP-47 の対応するフレームワーク領域と比較して、フレームワーク領域の少なくとも 1 つに少なくとも「1つのアミノ酸差異」(本明細書で規定される)を有することが条件である。より具体的には、本発明の非限定的な一態様によれば、ナノボディは本明細書で規定されるようなものであり得るが、天然のヒト V_H ドメインの対応するフレームワーク領域と比較して、特に DP-47 の対応するフレームワーク領域と比較して、特徴的な残基 (例えば 108 位、103 位及び/又は 45 位のもの) の少なくとも 1 つに少なくとも「1つのアミノ酸差異」(本明細書で規定される)を有することが条件である。通常、ナノボディは、FR2 及び/又は FR4 の少なくとも 1 つにおいて、特に FR2 及び/又は FR4 の特徴的な残基の少なくとも 1 つ (同様に、例えば 108 位、103 位及び/又は 45 位のもの) において、天然の V_H ドメインとの少なくとも 1 つのこのようなアミノ酸差異を有する。

【0415】

また、本発明のヒト化ナノボディは本明細書で規定されるようなものであり得るが、天然の V_{HH} ドメインの対応するフレームワーク領域と比較して、フレームワーク領域の少なくとも 1 つに少なくとも「1つのアミノ酸差異」(本明細書で規定される)を有することが条件である。より具体的には、本発明の非限定的な一態様によれば、ヒト化ナノボディは本明細書で規定されるようなものであり得るが、天然の V_{HH} ドメインの対応するフレームワーク領域と比較して、特徴的な残基 (例えば 108 位、103 位及び/又は 45 位のもの) の少なくとも 1 つに少なくとも「1つのアミノ酸差異」(本明細書で規定される)を有することが条件である。通常、ヒト化ナノボディは、FR2 及び/又は FR4 の少なくとも 1 つにおいて、特に FR2 及び/又は FR4 の特徴的な残基の少なくとも 1 つ (同様に、例えば 108 位、103 位及び/又は 45 位のもの) において、天然の V_{HH} ドメインとの少なくとも 1 つのこのようなアミノ酸差異を有する。

【0416】

本明細書における開示より明らかなように、本明細書で規定されるような本発明のナノボディの天然又は合成の類似体、突然変異体、変異体、対立遺伝子、ホモログ及びオソログ (本明細書中でまとめて「類似体」と称される)、特に配列番号 705 ~ 配列番号 788、より好ましくは配列番号 726 ~ 配列番号 750、配列番号 753 ~ 配列番号 75

10

20

30

40

50

8、配列番号762～配列番号764、配列番号772～配列番号773、配列番号775、又は配列番号778～配列番号780、より好ましくは配列番号732、配列番号773、又は配列番号778（表A-1を参照されたい）のナノボディの類似体の使用も本発明の範囲内である。したがって、本発明の一態様によれば、「本発明のナノボディ」という用語は最も広範な意味ではこのような類似体も包含する。

【0417】

概して、このような類似体では、本明細書で規定されるような本発明のナノボディと比較して、1つ又は複数のアミノ酸残基が置換、欠失及び/又は付加されていてもよい。このような置換、挿入又は欠失はフレームワーク領域の1つ又は複数、及び/又はCDRの1つ又は複数において起こってもよい。このような置換、挿入又は欠失がフレームワーク領域の1つ又は複数において起こる場合、特徴的な残基の1つ又は複数、及び/又はフレームワーク残基中の他の位置の1つ又は複数において起こってもよいが、特徴的な残基での置換、挿入又は欠失は（これらが本明細書中で説明されるような適切なヒト置換でない限り）一般にあまり好適ではない。

10

【0418】

非限定的な例によると、置換は例えば保存的置換（本明細書中で説明される）であってもよく、及び/又はアミノ酸残基は、別の V_{HH} ドメインの同じ位置で自然発生する別のアミノ酸残基で置き換えられていてもよいが（このような置換の幾つかの非限定的な例については表B-4～表B-7を参照されたい）、本発明は概してこれに限定されない。したがって、本発明のナノボディの特性を改善するか、又は少なくとも本発明のナノボディ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過度に（すなわち、ナノボディがもはやその使用目的に適さなくなる程度まで）損なわない任意の1つ又は複数の置換、欠失若しくは挿入、又はその任意の組合せが本発明の範囲内に含まれる。当業者は一般に、本明細書における開示に基づいて、また任意に、例えば限られた数の可能な置換を導入すること、及びそのようにして得られるナノボディの特性に対するその影響を求めるとを含み得る限られた日常実験の後、適切な置換、欠失若しくは挿入、又はその適切な組合せを決定及び選択することが可能である。

20

【0419】

例えば当業者の能力の範囲内で、本発明のナノボディ又はポリペプチド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、翻訳後修飾される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して、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。

30

【0420】

上記の表B-4～表B-7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、本発明は最も広範な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。

40

【0421】

類似体は好ましくは、本発明のナノボディに関して本明細書で規定されるようなものである親和性（本明細書中でさらに説明されるように、（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 IC_{50} 値として適切に測定されるか、及び/又は表される）で例えばP2X7等のイオンチャンネルと結合することができるようなものである。

【0422】

類似体は好ましくは、本明細書中で説明されるようなナノボディの有利な特性を保持するものでもある。

【0423】

50

また、好適な一態様によれば、類似体は、配列番号705～配列番号788、より好ましくは配列番号726～配列番号750、配列番号753～配列番号758、配列番号762～配列番号764、配列番号772～配列番号773、配列番号775、又は配列番号778～配列番号780、より好ましくは配列番号732、配列番号773、又は配列番号778（表A-1を参照されたい）のナノボディの1つとの少なくとも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%（少なくとも95%等）又は99%以上の程度の配列同一性を有し、及び/又は好ましくは多くとも20個、好ましくは多くとも10個、さらにより好ましくは多くとも5個、例えば4個、3個、2個又はただ1個のアミノ酸差異（本明細書で規定される）を有する。

【0424】

また、類似体のフレームワーク配列及びCDRは好ましくは、本明細書で規定される好適な態様に従うものである。より一般には、本明細書中で説明されるように、類似体は（a）108位にQ、及び/又は（b）45位に荷電アミノ酸又はシステイン残基、好ましくは44位にE、より好ましくは44位にE及び45位にR、及び/又は（c）103位にP、R又はSを有する。

【0425】

本発明のナノボディの1つの好適な群の類似体は、ヒト化された（すなわち、本発明の天然のナノボディの配列と比較して）ナノボディを含む。本明細書中で引用される背景技術で述べられたように、このようなヒト化は一般に、ヒトV_Hドメイン、例えばヒトV_H3ドメインでの同じ位置に起こるアミノ酸残基での、天然のV_HHの配列における1つ又は複数のアミノ酸残基の置き換えを含む。可能なヒト化置換又はヒト化置換の組合せの例は、例えば本明細書中の表から、本明細書中で引用される背景技術で述べられた可能なヒト化置換から、及び/又はナノボディの配列と天然のヒトV_Hドメインの配列との比較から当業者に明らかである。

【0426】

ヒト化置換は、得られるヒト化ナノボディが、本明細書で規定されるようなナノボディの有利な特性を依然として保持するように、より好ましくは類似体に関して前述の段落に説明されるようなものであるように選択されるべきである。当業者は一般に、本明細書における開示に基づいて、また任意に、例えば限られた数の可能なヒト化置換を導入すること、及びそのようにして得られるナノボディの特性に対するその影響を求めるとを含み得る限られた日常実験の後、適切なヒト化置換又は適切なヒト化置換の組合せを決定及び選択することが可能である。

【0427】

概して、ヒト化の結果として、本発明のナノボディは、本明細書中で説明されるような本発明のナノボディの有利な特性を依然として保持しながら、より「ヒト様」となり得る。結果として、このようなヒト化ナノボディは幾つかの利点、例えば対応する天然のV_HHドメインと比較して低減された免疫原性を有し得る。同様に、当業者は、本明細書における開示に基づいて、また任意に限られた日常実験の後、一方ではヒト化置換によりもたらされる有利な特性と、他方では天然のV_HHドメインの有利な特性との間の所望の又は適切なバランスを最適化又は達成するヒト化置換又は適切なヒト化置換の組合せを選択することが可能である。

【0428】

本発明のナノボディは任意のフレームワーク残基（複数可）で、例えば1つ又は複数の特徴的な残基（本明細書で規定される）で又は1つ又は複数の他のフレームワーク残基（すなわち、非特徴的な残基）で又はこれらの任意の適切な組合せで適切にヒト化され得る。「P、R、S-103群」又は「KERE群」のナノボディに関する1つの好適なヒト化置換は、Q108からL108への置換である。「GLEW群」のナノボディもまた、他の特徴的な残基の少なくとも1つがラクダ化（camelid（camelizing））置換（本明細書で規定される）を含有するという条件で、Q108からL108への置換によりヒト化され得る。例えば、上述したように、1つの特に好適な群のヒト化ナノボディは、GLE

10

20

30

40

50

W又はGLEW様配列を44位～47位に、P、R又はS(特にR)を103位に、Lを108位に有する。

【0429】

ヒト化及び他の類似体、並びにこれをコードする核酸配列は、例えば国際公開第08/020079号の103頁及び104頁で言及される技法のうちの1つ又は複数を用いて、それ自体が既知の任意の方法で準備することができる。

【0430】

ここで言及されるように、本発明のナノボディ(その類似体を含む)を、例えばヒトV_H3配列、例えばD_P-47、D_P-51又はD_P-29等のヒトV_H配列(すなわち、免疫グロブリン配列又は対応するヌクレオチド配列)から、すなわち、本発明のナノボディの配列を提供するために及び/又はこのようにして得られる配列にナノボディの有利な特性を付与するために、1つ又は複数のラクダ化置換を導入する(すなわち、上記ヒトV_Hドメインの免疫グロブリン配列中の1つ又は複数のアミノ酸残基を、V_HHドメインの対応する位置で生じるアミノ酸残基に変化させる)ことにより、設計及び/又は準備することが可能であることも、当業者には明らかである。同様に、これは一般に、開始点としてヒトV_Hドメインに対する免疫グロブリン配列及び/又はヌクレオチド配列を使用し、前の段落で言及される多様な方法及び技法を用いて実行することができる。

【0431】

幾つかの好ましいが非限定的なラクダ化置換は、表B-4～表B-7から導くことができる。特徴的な残基の1つ又は複数でのラクダ化置換は一般に、所望の特性に他のアミノ酸位置の1つ又は複数での置換よりも大きな影響を与えるが、その両方及び任意の適切な組合せが本発明の範囲内に含まれることも明らかである。例えば、既に少なくとも幾つかの所望の特性を付与している1つ又は複数のラクダ化置換を導入すること、及び次に上記特性をさらに改善するか、及び/又はさらなる有利な特性を付与するさらなるラクダ化置換を導入することが可能である。また、当業者は一般に、本明細書における開示に基づいて、また任意に、例えば限られた数の可能なラクダ化置換を導入すること、及びナノボディの有利な特性が得られたか又は改善された(すなわち、元のV_Hドメインと比較して)か否かを求めることを含み得る限られた日常実験の後、適切なラクダ化置換又は適切なラクダ化置換の組合せを決定及び選択することが可能である。

【0432】

しかしながら、一般にこのようなラクダ化置換は好ましくは、得られる免疫グロブリン配列が少なくとも(a)108位にQ、及び/又は(b)45位に荷電アミノ酸又はシステイン残基及びまた好ましくは44位にE、より好ましくは44位にE及び45位にR、及び/又は(c)103位にP、R又はS、並びに任意に1つ又は複数のさらなるラクダ化置換を含有するようなものである。より好ましくは、ラクダ化置換は、本発明のナノボディ及び/又はその類似体(本明細書で規定される)、例えばヒト化類似体及び/又は好ましくは前述の段落に規定されるようなものである類似体をもたらすようなものである。

【0433】

ナノボディは自然状態で稀であるが、V_Hドメインフォールドに構造的に適合する置換の組込みによりV_Hドメインから得ることもできる。例えばこれらに限定されないが、これらの置換は以下のうちの1つ又は複数を含み得る:35位のGly、37位のSer、Val又はThr、39位のSer、Thr、Arg、Lys、His、Asp又はGlu、45位のGlu又はHis、47位のTrp、Leu、Val、Ala、Thr又はGlu、50位のS又はR(Barthelemy et al. J Biol Chem. 2008 Feb 8;283(6):3639-54. Epub 2007 Nov 28)。

【0434】

本明細書における開示から同様に明らかのように、本明細書で規定されるような本発明のナノボディの部分若しくは断片、又は2つ以上の部分若しくは断片の組合せ、特に配列番号705～配列番号788、より好ましくは配列番号726～配列番号750、配列番号753～配列番号758、配列番号762～配列番号764、配列番号772～配列番

10

20

30

40

50

号 773、配列番号 775、又は配列番号 778 ~ 配列番号 780、より好ましくは配列番号 732、配列番号 773、又は配列番号 778 (表 A-1 を参照されたい) のナノボディ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、本発明の一態様によれば、「本発明のナノボディ」という用語は最も広範な意味ではこのような部分又は断片も包含する。

【0435】

概して、本発明のナノボディ (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ナノボディ (又はその類似体) の免疫グロブリン配列と比較して、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か、及び / 又は除去された免疫グロブリン配列を有する。

10

【0436】

部分又は断片は好ましくは、本発明のナノボディに対して、本明細書で規定されるようなものである親和性 (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 IC_{50} 値として適切に測定されるか、及び / 又は表される) で例えば P2X7 等のイオンチャネルと結合することができるようなものである。

【0437】

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ナノボディの免疫グロブリン配列の少なくとも 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、例えば少なくとも 40 個の連続アミノ酸残基を含むようなものである。

20

【0438】

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) を含むようなものである。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ようなものである。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ようなものである。

30

【0439】

別の特に好ましいが非限定的な態様によれば、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.) に説明される)。

【0440】

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、同一の又は異なる本発明のナノボディに由来する) を組み合わせる、すなわち、本発明のナノボディの類似体 (本明細書で規定される) を提供する及び / 又は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、本発明のナノボディの 1 つ又は複数の部分又は断片を、ヒト V_H 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。

40

【0441】

好適な一態様によれば、部分又は断片は、配列番号 705 ~ 配列番号 788、より好ましくは配列番号 726 ~ 配列番号 750、配列番号 753 ~ 配列番号 758、配列番号 762 ~ 配列番号 764、配列番号 772 ~ 配列番号 773、配列番号 775、又は配列番号 778 ~ 配列番号 780、より好ましくは配列番号 732、配列番号 773、又は配列

50

番号778(表A-1を参照されたい)のナノボディの1つとの少なくとも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%(少なくとも90%等)、95%又は99%以上の程度の配列同一性を有する。

【0442】

部分及び断片、並びにこ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、完全長の本発明のナノボディをコードする核酸中に終止コドン挿入すること、及び次にこのようにして得られる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。

10

【0443】

本発明は最も広範な意味では本発明のナノボディの誘導体も含む。このような誘導体は概して、本発明のナノボディ及び/又は本発明のナノボディを形成するアミノ酸残基の1つ又は複数の修飾、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。

【0444】

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、又は好ましくは側鎖のいずれか)で修飾することができるナノボディ配列内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。

20

【0445】

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ナノボディに付与する1つ又は複数の官能基、残基又は部分を本発明のナノボディ中に又はナノボディ上に(例えば共有結合によるか、又は他の適切な形で)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。

【0446】

例えば、このような修飾は、本発明のナノボディの半減期、溶解性及び/又は吸収性を増大する、本発明のナノボディの免疫原性及び/又は毒性を低減する、本発明のナノボディ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/又は本発明のナノボディ及び/又はポリペプチドに他の有益な特性を付与するか、及び/又は本発明のナノボディ及び/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、又は任意の他の適切な形で)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、一般に、上記で引用される包括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(例えばScFv及び単一ドメイン抗体)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, 16th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1980)を参照する。同様に当業者に明らかのように、このような官能基は、例えば本発明のナノボディに直接(例えば共有結合的に)、又は任意に適切なリンカー若しくはスパーサーを介して結合し得る。

30

40

【0447】

半減期を増大するか、及び/又は医薬用タンパク質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(例えば、限定されるものではないが、(単一)ドメイン抗体及び

50

S c F v) 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, Nat. Biotechnol., 54, 531-545 (2002)、Veronese and Harris, Adv. Drug Deliv. Rev. 54, 453-456 (2003)、Harris and Chess, Nat. Rev. Drug. Discov., 2, (2003) 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。

【0448】

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., Protein Engineering, 16, 10, 761-770 (2003)を参照されたい)。例えば、そのために、本発明のナノボディ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、本発明のナノボディを、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免疫グロブリン配列を、本発明のナノボディの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)。

10

【0449】

好ましくは、PEGは、本発明のナノボディ及びタンパク質に対して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。

【0450】

さらに、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、本発明のナノボディ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。

20

【0451】

さらに別の修飾は、標識したナノボディの用途に応じて、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もよい。これらを結合、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、リン光標識、化学発光標識、生物発光標識、放射性同位体、金属、金属キレート、金属カチオン、発色団及び酵素、例えば国際公開第08 / 020079号の109頁で言及されるものが挙げられるが、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。

30

【0452】

本発明のこのような標識したナノボディ及びポリペプチドは、例えば、特定の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* 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。

【0453】

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)の導入を含んでもよい。例えば好適なキレート基としては、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。

40

【0454】

さらに別の修飾は、ビオチン-(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もよい。このような官能基は、本発明のナノボディを別のタンパク質、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、本発明のナノボディは、ビオチンと結合し、アビジン又はストレプトアビジンと結合した別のタンパク質、ポリペプチド、化合物又は担体に連結し得る。例えば、このような結合ナノボディは、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、本発明のナノボディを、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、

50

Cao and Suresh, Journal of Drug Targetting, 8, 4, 257 (2000) 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、本発明のナノボディと治療に有効な作用物質とを連結させるのに使用することができる。

【0455】

用途によっては、特に、(例えば、癌の治療において)本発明のナノボディが指向性を有する標的を発現する細胞を死滅させること、又はこのような細胞の成長及び/又は増殖を低減するか若しくは遅延させることを意図する用途では、本発明のナノボディは、毒素又は毒素残基若しくは毒素部分にも連結し得る。本発明のナノボディに連結して、例えば細胞毒性化合物をもたらし得る毒素部分、化合物又は残基の例は当業者にとって明らかであり、例えば、上記の従来技術に及び/又は本明細書中のさらなる説明に見ることができる。一例はいわゆるADEPT(商標)技術である(国際公開第03/055527号に記載)。

10

【0456】

他の可能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, Biotechnol. Appl. Biochem., 26, 143-151 (1997)を参照する。

【0457】

好ましくは、この誘導体は、本発明のナノボディに関して本明細書で規定されるようなものである親和性(本明細書中でさらに説明されるように、(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 IC_{50} 値として適切に測定されるか、及び/又は表される)で例えばP2X7等のイオンチャネルと結合することができるようなものである。

20

【0458】

上述のように、本発明はまた、少なくとも1つの本発明のナノボディ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、本発明のポリペプチドの免疫グロブリン配列が、本発明のナノボディの免疫グロブリン配列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)等の限定数のアミノ酸残基をナノボディの免疫グロブリン配列のアミノ末端、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ナノボディの免疫グロブリン配列に対応するかどちらかであることを意味する。

30

【0459】

上記のアミノ酸残基は、ナノボディの(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場合もあり又は与えない場合もあり、ナノボディにさらなる官能性を付加する場合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、

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。

40

合成の際に宿主細胞からのナノボディの分泌を導く、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、ナノボディのN末端に連結されるが、本発明は最も広範な意味では、これに限定されるものではない。

ナノボディを、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指向性を有し、及び/又はこれらに侵入させるか若しくは入り込ませ、及び/又はナノボディを、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侵入させるか若しくはこ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。このような免疫グロブリン配列の例は当業者にとって明らかであり、国際公開第08/020079号の112頁のc)段落で言及されるものを含む。

50

「標識」、例えば、免疫グロブリン配列又は残基を対象とする親和性技法等を用いてナノボディの精製を可能にするか又は容易にする、上記の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、ナノボディ配列をもたらし得る(この目的のために、標識は任意で、切断可能なリンカー配列を介してナノボディ配列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m y c標識(例えば国際公開第06/12282号の配列番号31を参照)である。

官能化し及び/又は官能基の結合のための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、本発明のナノボディ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。

【0460】

ラクダ科動物におけるDNAワクチン接種

DNAワクチン接種は実験動物、例えばラット、マウス及びウサギにおいて免疫応答を誘導するのに広く使用されている(例えばTang et al., Nature, 1992; Nagata et al., J. Immunol. Methods, 2003; Bins et al., Nature Med. 2005; Bins et al., J. Immunol., 2007; Kilpatrick et al., Hybridoma, 1998を参照されたい)。しかしながら、より大型の動物のDNAワクチン接種は不可能ではないにしても困難であると考えられている。特にラクダ科動物のDNAワクチン接種に関するレポートは数少ない。Koch Nolte et al., 2007によるレポートは、さらに2回のタンパク質追加免疫と組合せた、6週~12週間隔での8回ものDNAワクチン接種が要求される長期にわたる面倒な手順を説明している。本発明の目的の1つは、大型動物、特にラクダ科動物をDNAワクチン接種する改善された方法を提供することである。

【0461】

a) タンパク質追加免疫を伴わない免疫グロブリン配列の生成

特定の実施形態では本発明は、非ヒト動物、具体的にはラクダ科動物、より具体的にはラマにおいてタンパク質追加免疫を伴わない遺伝子ワクチン接種により免疫グロブリン配列を生成する方法に関する。

【0462】

非ラクダ科動物において、例えばマウスにおいて、タンパク質抗原による追加免疫を伴わないDNAワクチン接種後にポリクローナル血清抗体応答を得ることができることがこれまでに実証されている(例えばBins et al., Nature Medicine, 2005; Bins et al., J. Immunol. 2007)。しかしながら、このようなポリクローナル抗体応答は、抗原特異的モノクローナル抗体を効果的に生成するのに十分ではないことが知られている(Nagata et al., 2003)。著者らは、タンパク質追加免疫を行わないマウスにおける「ごくわずかな(almost negligible)」特異的なハイブリドーマ収率($10E8$ 個の脾臓細胞当たり $0.0 \sim 1.3$)を報告している。

【0463】

より大型の動物、特にラクダ科動物の遺伝子ワクチン接種がマウスと比較して免疫応答を誘起する効率が極めて乏しいことが一般的に知られている。そのためラクダ科動物における遺伝子ワクチン接種の使用では免疫グロブリン配列の産生が不可能であると考えられる。

【0464】

Koch-Nolte et al. 2007は、ecto-ADP-リボシルトランスフェラーゼART2.2に対する単一のドメイン抗体を得るDNA初回刺激-タンパク質追加免疫戦略によるラマの免疫付与を説明している。しかしながらこの手順は、低効率であり、広範な追加免疫が要求されることを特徴としていた。より具体的には、ラマは6週~12週の間隔でART2.2をコードする発現ベクターを用いた4回の皮内遺伝子銃による4回の免疫付与を受けた(300 psi の圧力設定での金 1 mg 当たり $1\text{ }\mu\text{ g}$ のDNA 12ショット)

10

20

30

40

50

。4回のその後の追加免疫DNA免疫付与及びさらなる2回のタンパク質追加免疫には、満足のいく免疫応答を得るために組換えART2.2を用いることが要求された。全体としては、この手順は動物で好適な免疫応答を達成するまで7ヶ月におよび、複数回のタンパク質追加免疫が必要となる。

【0465】

この従来技術の教示を鑑みて、本明細書に記載の方法を使用することにより、タンパク質追加免疫を伴わず好適な免疫応答をラクダ科動物、特にラマで達成することができることは、本発明の驚くべき発見である。言い換えると、遺伝子ワクチン接種単独でも、その後のスクリーニングによる免疫グロブリン配列の生成に適正な免疫応答を誘導するのに十分であり得る。特に、血清抗体応答が従来免疫付与戦略と比較して低かったとしても、

10

【0466】

b) 細胞関連抗原に対する抗体応答の生成

導入部で概説されたように、当該技術分野は、本明細書で規定のように細胞結合する抗原に対する、特に膜貫通抗原に対する抗体応答を生成するのに適正な手段を提供してはいない。

【0467】

本発明は、好適な非ヒト動物、特にラクダ科動物、好ましくはラマの遺伝子ワクチン接種により、従来技術の試みと比較してレポーターの幅の改善及び特異性の改善を特徴とする抗体応答を生成することができるという驚くべき発見に基づいている。

20

【0468】

細胞関連抗原、より具体的には単一又は複数の膜貫通ドメインを有する抗原は、それらの天然立体構造で精製するのが困難である。未変性エピトープに対する、ナノボディを含む免疫グロブリン配列を得るために、標的抗原をその未変性の立体構造でラマに投与することが極めて重要である。これらの細胞関連抗原に関して、抗原を機能的に発現する全細胞による免疫付与が好ましい戦略である（例えば特許文献1、特許文献2、米国特許出願第61/004,332号で行われたようなもの）。全細胞の免疫付与の主な欠点は、多くの他の抗原（細胞表面マーカー）も動物の免疫系に対して提示され、これにより高度に希釈された標的の特異的な免疫応答が起こることである。特異性を増大するために、精密かつ技術的に複雑な初回刺激 - 追加免疫戦略を考案する必要がある。これらの工程のいずれかが変性タンパク質又はペプチドの使用を含む範囲では、得られる抗体応答は立体構造エピトープの不利益となる。したがって、免疫グロブリン配列の取得可能なスペクトル幅は限定されるであろう。さらに、単に細胞に基づいたアプローチ、すなわち免疫付与のために標的抗原を発現する細胞を使用するアプローチは、対象となる免疫グロブリン配列の効率的な単離を不可能にする免疫グロブリン配列の低い特異性を特徴とする。

30

【0469】

Koch-Nolte et al. 2007は、ecto-ADP-リボシルトランスフェラーゼART2.2に対する単一のドメイン抗体を得るためにDNA初回刺激 - タンパク質追加免疫戦略を用いた或るラマの免疫付与を説明している。

40

【0470】

ecto-ADP-リボシルトランスフェラーゼART2.2は、脂質尾部を介するが、膜貫通ドメインを伴わない膜挿入を特徴とするGpi固定タンパク質である。このタンパク質に関して、正確に折り畳まれた精製タンパク質を追加免疫のために調製することができる。そのため、精製タンパク質を用いて追加免疫を行うことができる。上記のように、膜内に固定された、又は膜に位置する細胞関連抗原の精製タンパク質はそれらの天然立体構造の精製形態では得ることができない。いかなる精製調製物も膜依存性の立体構造エピトープを欠くこととなる。そのため、これらの細胞関連抗原からの精製タンパク質による追加免疫は不可能である。

50

【0471】

膜貫通タンパク質、特に複数の膜貫通ドメインを有するタンパク質に関して、立体構造エピトープ、特に膜依存性の立体構造エピトープが免疫グロブリン配列に関する標的として特に興味深い。例えば、イオンチャネルの孔は治療的に最も重要な標的を表す。しかしながら、従来のアプローチの使用では、このような標的を認識する免疫グロブリン配列を生成することはほとんど不可能である。例えば、イオンチャネルの孔領域は複数の膜貫通ドメイン、さらに場合によってはチャネルの複数のサブユニットにより形成される。この孔領域と結合する免疫グロブリン配列の生成のためのペプチドを提供することはほぼ不可能である。さらに、該タンパク質が膜環境でしかその天然立体構造を示さないため、精製イオンチャネルタンパク質を免疫付与に使用することはできない。

10

【0472】

本発明は、このような種類の立体構造エピトープに対する免疫グロブリン配列の生成を提供し、精製タンパク質による追加免疫の必要性を排除する。

【0473】

本発明では、遺伝子ワクチン接種（免疫応答の必要となる特異性を提供する）後に、動物に例えば天然立体構造で、すなわち膜に包埋された／固定されたタンパク質を発現する細胞を追加免疫することができることが期待される。これらの細胞が多くの抗原を発現する場合であっても、免疫学的なリコール応答が遺伝子ワクチン接種により送達された抗原に対してのみ起こることとなる。このため遺伝子ワクチン接種による動物の初回刺激により、たとえ例えばタンパク質を発現するが、免疫グロブリン配列の高度に特異的なレパートリーが得られる細胞に関してタンパク質が精製されていないとしても、天然立体構造でのタンパク質による追加免疫が可能になる。

20

【0474】

好ましい実施形態では本発明は、ラクダ科動物、特にラマにおける免疫グロブリン配列の生成に関する。これらの動物の抗体応答は、標的抗原上の溝（grooves）又は隙間（crevices）に広がり、特異的に結合することができる免疫グロブリン配列の存在を特徴とする。これは、細胞関連抗原の立体構造エピトープの場合に特に重要かつ有益である。

【0475】

このため具体的な一実施形態では本発明は、細胞関連抗原、特に1つ又は複数の膜貫通ドメインを示す抗原の立体構造エピトープに対して免疫グロブリン配列を産生するためのラクダ科動物の遺伝子ワクチン接種の使用に関する。

30

【0476】

これより上記に記載のような本発明の一般原理を特定の好ましい態様、実施形態及び特許請求の範囲に関して例示する。しかしながら、本発明はこれらに限定されるものとは理解されない。

【0477】

本願を通して挙げられた全ての引例（参考文献、交付済み特許、公開済み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本明細書に明示的に援用されている。

【0478】

好ましい態様：

40

態様A - 1：例えばP2X7等のイオンチャネルに指向性を有する及び／又はこれと特異的に結合することができる免疫グロブリン配列。

態様A - 2：本質的に単離形態である、態様A - 1に記載の免疫グロブリン配列。

態様A - 3：被験体に投与するためのものであり、上記被験体では自然発生しない、態様A - 1又はA - 2に記載の免疫グロブリン配列。

態様A - 4： 10^{-5} モル/L～ 10^{-12} モル/L以下、及び好ましくは 10^{-7} モル/L～ 10^{-12} モル/L以下、及びより好ましくは 10^{-8} モル/L～ 10^{-12} モル/Lの解離定数（ K_D ）で例えばP2X7等のイオンチャネルと特異的に結合することができる免疫グロブリン配列。このような免疫グロブリン配列は特に、これまでの態様のいずれかに記載の免疫グロブリン配列であり得る。

50

態様 A - 5 : $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \sim 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、好ましくは $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \sim 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、より好ましくは $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \sim 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ($10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \sim 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 等) の結合速度 (k_{on} 速度) で例えば P2X7 等のイオンチャネルと特異的に結合することができる免疫グロブリン配列。このような免疫グロブリン配列は特に、これまでの態様のいずれかに記載の免疫グロブリン配列であり得る。

態様 A - 6 : $1 \text{ s}^{-1} \sim 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、好ましくは $10^{-2} \text{ s}^{-1} \sim 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、より好ましくは $10^{-3} \text{ s}^{-1} \sim 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ ($10^{-4} \text{ s}^{-1} \sim 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 等) の解離速度 (k_{off} 速度) で例えば P2X7 等のイオンチャネルと特異的に結合することができる免疫グロブリン配列。このような免疫グロブリン配列は特に、これまでの態様のいずれかに記載の免疫グロブリン配列であり得る。

10

態様 A - 7 : 500 nM 未満、好ましくは 200 nM 未満、より好ましくは 10 nM 未満 (500 pM 未満等) の親和性で例えば P2X7 等のイオンチャネルと特異的に結合することができる免疫グロブリン配列。このような免疫グロブリン配列は特に、これまでの態様のいずれかに記載の免疫グロブリン配列であり得る。

態様 A - 8 : 天然免疫グロブリン配列 (任意の好適な種由来) 又は合成若しくは半合成の免疫グロブリン配列である、これまでの態様のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

態様 A - 9 : 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、これまでの態様のいずれかに記載の免疫グロブリン。

20

態様 A - 10 : 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、これまでの態様のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

態様 A - 11 : 免疫グロブリン配列である、これまでの態様のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

態様 A - 12 : 天然免疫グロブリン配列 (任意の好適な種由来) 又は合成若しくは半合成の免疫グロブリン配列である、これまでの態様のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

態様 A - 13 : ヒト化免疫グロブリン配列、ラクダ化免疫グロブリン配列、又は親和性成熟等の技法により得られた免疫グロブリン配列である、これまでの態様のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

30

態様 A - 14 : 軽鎖可変ドメイン配列 (例えば VL 配列) 又は重鎖可変ドメイン配列 (例えば VH 配列) から本質的になる、これまでの態様のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

態様 A - 15 : 通常の本鎖抗体に由来する重鎖可変ドメイン配列から本質的になる、又は重鎖抗体に由来する重鎖可変ドメイン配列から本質的になる、これまでの態様のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

態様 A - 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 An 免疫グロブリン配列)、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 An 免疫グロブリン配列)、「dAb」 (又は dAb としての使用に好適な An 免疫グロブリン配列) 又はナノボディ (VHH 配列を含むが、これに限定されない) から本質的になる、これまでの態様のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

40

態様 A - 17 : ナノボディから本質的になる、これまでの態様のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

態様 A - 18 :

i) 配列番号 1 ~ 配列番号 22 の An 免疫グロブリン配列のうち少なくとも 1 つとの少なくとも 80% のアミノ酸同一性を有し (ここでアミノ酸同一性の程度を決定するために CDR 配列を形成するアミノ酸残基は無視する) ;

ii) 好ましくはカバットナンバリングによる 11 位、37 位、44 位、45 位、47 位、83 位、84 位、103 位、104 位及び 108 位のアミノ酸残基のうち 1 つ又は複数、表 B - 2 で言及される特徴的な残基から選択される、

50

ナノボディから本質的になる、これまでの態様のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。
態様 A - 19 :

i) 配列番号 789 ~ 配列番号 791 の免疫グロブリン配列のうちの少なくとも 1 つとの少なくとも 80% のアミノ酸同一性を有し (ここでアミノ酸同一性の程度を決定するために CDR 配列を形成するアミノ酸残基は無視する) ;

ii) 好ましくはカバットナンバリングによる 11 位、37 位、44 位、45 位、47 位、83 位、84 位、103 位、104 位及び 108 位のアミノ酸残基のうちの 1 つ又は複数、表 B - 2 で言及される特徴的な残基から選択される、

ポリペプチドから本質的になる、これまでの態様のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

10

態様 A - 20 :

i) 配列番号 705 ~ 配列番号 788、より好ましくは配列番号 726 ~ 配列番号 750、配列番号 753 ~ 配列番号 758、配列番号 762 ~ 配列番号 764、配列番号 772 ~ 配列番号 773、配列番号 775、又は配列番号 778 ~ 780、より好ましくは配列番号 732、配列番号 773 又は配列番号 778 の免疫グロブリン配列のうちの少なくとも 1 つとの少なくとも 80% のアミノ酸同一性を有し (ここでアミノ酸同一性の程度を決定するために CDR 配列を形成するアミノ酸残基は無視する) ;

ii) 好ましくはカバットナンバリングによる 11 位、37 位、44 位、45 位、47 位、83 位、84 位、103 位、104 位及び 108 位のアミノ酸残基のうちの 1 つ又は複数、表 B - 2 で言及される特徴的な残基から選択される、

20

ナノボディから本質的になる、これまでの態様のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

態様 A - 21 : ヒト化ナノボディから本質的になる、これまでの態様のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

態様 A - 22 : 例えば P2X7 等のイオンチャネルとの結合に関する少なくとも 1 つの結合部位に加えて、他の抗原、タンパク質又は標的との結合に関する 1 つ又は複数のさらなる結合部位を含有する、これまでの態様のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

【0479】

CDR ベースの態様

態様 B - 1 : 例えば P2X7 等のイオンチャネルに指向性を有する及び / 又はこれと特異的に結合することができ、以下のものからなる群から選択されるアミノ酸残基のストレッチを 1 つ又は複数含む、免疫グロブリン配列 :

30

a) 配列番号 208 ~ 配列番号 289 の免疫グロブリン配列 ;

b) 配列番号 208 ~ 配列番号 289 の免疫グロブリン配列のうちの少なくとも 1 つとの少なくとも 80% のアミノ酸同一性を有する免疫グロブリン配列 ;

c) 配列番号 208 ~ 配列番号 289 の免疫グロブリン配列のうちの少なくとも 1 つとの、3 つ、2 つ若しくは 1 つのアミノ酸差異を有する免疫グロブリン配列 ;

d) 配列番号 372 ~ 配列番号 453 の免疫グロブリン配列 ;

e) 配列番号 372 ~ 配列番号 453 の免疫グロブリン配列のうちの少なくとも 1 つとの少なくとも 80% のアミノ酸同一性を有する免疫グロブリン配列 ;

f) 配列番号 372 ~ 配列番号 453 の免疫グロブリン配列のうちの少なくとも 1 つとの、3 つ、2 つ若しくは 1 つのアミノ酸差異を有する免疫グロブリン配列 ;

40

g) 配列番号 536 ~ 配列番号 617 の免疫グロブリン配列 ;

h) 配列番号 536 ~ 配列番号 617 の免疫グロブリン配列のうちの少なくとも 1 つとの少なくとも 80% のアミノ酸同一性を有する免疫グロブリン配列 ;

i) 配列番号 536 ~ 配列番号 617 の免疫グロブリン配列のうちの少なくとも 1 つとの、3 つ、2 つ若しくは 1 つのアミノ酸差異を有する免疫グロブリン配列 ; 又は

それらの任意の好適な組合せ。

このような免疫グロブリン配列は特に態様 A - 1 ~ A - 22 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列であり得る。

態様 B - 2 : アミノ酸残基の上記ストレッチのうちの少なくとも 1 つが例えば P2X7 等

50

のイオンチャネルとの結合に関する抗原結合部位の一部を形成する、態様 B - 1 に記載の免疫グロブリン配列。

態様 B - 3 : 例えば P 2 X 7 等のイオンチャネルに指向性を有する及び / 又はこれと特異的に結合することができ、(i) アミノ酸残基の第 1 のストレッチが a)、b) 若しくは c) による免疫グロブリン配列の 1 つに対応する場合、アミノ酸残基の第 2 のストレッチは d)、e)、f)、g)、h) 若しくは i) による免疫グロブリン配列の 1 つに対応し ; (i i) アミノ酸残基の第 1 のストレッチが d)、e) 若しくは f) による免疫グロブリン配列の 1 つに対応する場合、アミノ酸残基の第 2 のストレッチは a)、b)、c)、g)、h) 若しくは i) による免疫グロブリン配列の 1 つに対応し ; 又は (i i i) アミノ酸残基の第 1 のストレッチが g)、h) 若しくは i) による免疫グロブリン配列の 1 つに対応する場合、アミノ酸残基の第 2 のストレッチは a)、b)、c)、d)、e) 若しくは f) による免疫グロブリン配列の 1 つに対応するように、以下のものからなる群から選択されるアミノ酸残基のストレッチを 2 つ以上含む、免疫グロブリン配列 :

- a) 配列番号 2 0 8 ~ 配列番号 2 8 9 の免疫グロブリン配列 ;
- b) 配列番号 2 0 8 ~ 配列番号 2 8 9 の免疫グロブリン配列のうち少なくとも 1 つとの少なくとも 8 0 % のアミノ酸同一性を有する免疫グロブリン配列 ;
- c) 配列番号 2 0 8 ~ 配列番号 2 8 9 の免疫グロブリン配列のうち少なくとも 1 つとの、3 つ、2 つ若しくは 1 つのアミノ酸差異を有する免疫グロブリン配列 ;
- d) 配列番号 3 7 2 ~ 配列番号 4 5 3 の免疫グロブリン配列 ;
- e) 配列番号 3 7 2 ~ 配列番号 4 5 3 の免疫グロブリン配列のうち少なくとも 1 つとの少なくとも 8 0 % のアミノ酸同一性を有する免疫グロブリン配列 ;
- f) 配列番号 3 7 2 ~ 配列番号 4 5 3 の免疫グロブリン配列のうち少なくとも 1 つとの、3 つ、2 つ若しくは 1 つのアミノ酸差異を有する免疫グロブリン配列 ;
- g) 配列番号 5 3 6 ~ 配列番号 6 1 7 の免疫グロブリン配列 ;
- h) 配列番号 5 3 6 ~ 配列番号 6 1 7 の免疫グロブリン配列のうち少なくとも 1 つとの少なくとも 8 0 % のアミノ酸同一性を有する免疫グロブリン配列 ;
- i) 配列番号 5 3 6 ~ 配列番号 6 1 7 の免疫グロブリン配列のうち少なくとも 1 つとの、3 つ、2 つ若しくは 1 つのアミノ酸差異を有する免疫グロブリン配列。

このような免疫グロブリン配列は特に態様 A - 1 ~ A - 2 2、B - 1 又は B - 2 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列であり得る。

態様 B - 4 : アミノ酸残基の少なくとも 2 つのストレッチが例えば P 2 X 7 等のイオンチャネルとの結合に関する抗原結合部位の一部を形成する、態様 B - 3 に記載の免疫グロブリン配列。

態様 B - 5 : 例えば P 2 X 7 等のイオンチャネルに指向性を有する及び / 又はこれと特異的に結合することができ、アミノ酸残基の第 1 のストレッチが、

- a) 配列番号 2 0 8 ~ 配列番号 2 8 9 の免疫グロブリン配列 ;
 - b) 配列番号 2 0 8 ~ 配列番号 2 8 9 の免疫グロブリン配列のうち少なくとも 1 つとの少なくとも 8 0 % のアミノ酸同一性を有する免疫グロブリン配列 ;
 - c) 配列番号 2 0 8 ~ 配列番号 2 8 9 の免疫グロブリン配列のうち少なくとも 1 つとの、3 つ、2 つ若しくは 1 つのアミノ酸差異を有する免疫グロブリン配列 ;
- からなる群から選択され、アミノ酸残基の第 2 のストレッチが、
- d) 配列番号 3 7 2 ~ 配列番号 4 5 3 の免疫グロブリン配列 ;
 - e) 配列番号 3 7 2 ~ 配列番号 4 5 3 の免疫グロブリン配列のうち少なくとも 1 つとの少なくとも 8 0 % のアミノ酸同一性を有する免疫グロブリン配列 ;
 - f) 配列番号 3 7 2 ~ 配列番号 4 5 3 の免疫グロブリン配列のうち少なくとも 1 つとの、3 つ、2 つ若しくは 1 つのアミノ酸差異を有する免疫グロブリン配列 ;

からなる群から選択され、アミノ酸残基の第 3 のストレッチが、

- g) 配列番号 5 3 6 ~ 配列番号 6 1 7 の免疫グロブリン配列 ;

h) 配列番号536～配列番号617の免疫グロブリン配列のうちの少なくとも1つとの少なくとも80%のアミノ酸同一性を有する免疫グロブリン配列；

i) 配列番号536～配列番号617の免疫グロブリン配列のうちの少なくとも1つとの、3つ、2つ若しくは1つのアミノ酸差異を有する免疫グロブリン配列からなる群から選択される、アミノ酸残基のストレッチを3つ以上含む、免疫グロブリン配列。

このような免疫グロブリン配列は特に態様A-1～A-22及び/又はB-1～B-4のいずれかに記載の免疫グロブリン配列であり得る。

態様B-6：アミノ酸残基の少なくとも3つのストレッチが例えばP2X7等のイオンチャンネルとの結合に関する抗原結合部位の一部を形成する、態様B-5に記載の免疫グロブリン配列。

10

態様B-7：例えばP2X7等のイオンチャンネルに指向性を有する及び/又はこれと特異的に結合することができる免疫グロブリン配列であって、上記免疫グロブリン配列のCDR配列が、配列番号705～配列番号788、より好ましくは配列番号726～配列番号750、配列番号753～配列番号758、配列番号762～配列番号764、配列番号772～配列番号773、配列番号775、又は配列番号778～配列番号780、より好ましくは配列番号732、配列番号773又は配列番号778の免疫グロブリン配列のうちの少なくとも1つのCDR配列との少なくとも70%のアミノ酸同一性、好ましくは少なくとも80%のアミノ酸同一性、より好ましくは少なくとも90%のアミノ酸同一性（95%以上のアミノ酸同一性等）、又はさらに本質的に100%のアミノ酸同一性を有する、免疫グロブリン配列。このような免疫グロブリン配列は特に態様A-1～A-22及び/又はB-1～B-6のいずれかに記載の免疫グロブリン配列であり得る。

20

態様C-1：例えばP2X7等のイオンチャンネルに指向性を有し、配列番号705～配列番号788、より好ましくは配列番号726～配列番号750、配列番号753～配列番号758、配列番号762～配列番号764、配列番号772～配列番号773、配列番号775、又は配列番号778～配列番号780、より好ましくは配列番号732、配列番号773又は配列番号778の免疫グロブリン配列のうちの少なくとも1つと、例えばP2X7等のイオンチャンネルとの結合を交差遮断する免疫グロブリン配列。このような免疫グロブリン配列は特に態様A-1～A-22のいずれかに記載の及び/又はB-1～B-7のいずれかに記載の免疫グロブリン配列であり得る。また好ましくは、このような免疫グロブリン配列は例えばP2X7等のイオンチャンネルと特異的に結合することが可能である。

30

態様C-2：例えばP2X7等のイオンチャンネルに指向性を有し、配列番号705～配列番号788、より好ましくは配列番号726～配列番号750、配列番号753～配列番号758、配列番号762～配列番号764、配列番号772～配列番号773、配列番号775、又は配列番号778～配列番号780、より好ましくは配列番号732、配列番号773又は配列番号778の免疫グロブリン配列のうちの少なくとも1つにより、例えばP2X7等のイオンチャンネルとの結合を交差遮断される免疫グロブリン配列。このような免疫グロブリン配列は特に態様A-1～A-22のいずれかに記載の及び/又はB-1～B-7のいずれかに記載の免疫グロブリン配列であり得る。また好ましくは、このような免疫グロブリン配列は例えばP2X7等のイオンチャンネルと特異的に結合することが可能である。

40

態様C-3：上記免疫グロブリン配列の交差遮断する又は交差遮断される能力をピアコアアッセイで検出する、態様C-1又はC-2に記載の免疫グロブリン配列。

態様C-4：上記免疫グロブリン配列の交差遮断する又は交差遮断される能力をELISAアッセイで検出する、態様C-1～C-3のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

態様D-1：本質的に単離形態である、態様B-1～B-7又はC-1～C-7のいずれか1つに記載の免疫グロブリン配列。

態様D-2：被験体に投与するためのものであり、上記被験体では自然発生しない、態様B-1～B-7、C-1～C-7、及び/又はD-1のいずれかに記載の免疫グロブリン

50

配列。

態様 D - 3 : 10^{-5} モル/L ~ 10^{-12} モル/L 以下、及び好ましくは 10^{-7} モル/L ~ 10^{-12} モル/L 以下、及びより好ましくは 10^{-8} モル/L ~ 10^{-12} モル/L の解離定数 (K_D) で例えば P2X7 等のイオンチャネルと特異的に結合することができる、態様 B - 1 ~ B - 7、C - 1 ~ C - 7、及び/又は D - 1 又は D - 2 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

態様 D - 4 : $10^2 M^{-1} s^{-1}$ ~ 約 $10^7 M^{-1} s^{-1}$ 、好ましくは $10^3 M^{-1} s^{-1}$ ~ $10^7 M^{-1} s^{-1}$ 、より好ましくは $10^4 M^{-1} s^{-1}$ ~ $10^7 M^{-1} s^{-1}$ ($10^5 M^{-1} s^{-1}$ ~ $10^7 M^{-1} s^{-1}$ 等) の結合速度 (k_{on} 速度) で例えば P2X7 等のイオンチャネルと特異的に結合することができる、態様 B - 1 ~ B - 7、C - 1 ~ C - 7、及び/又は D - 1 ~ D - 3 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

態様 D - 5 : $1 s^{-1}$ ~ $10^{-6} s^{-1}$ 、好ましくは $10^{-2} s^{-1}$ ~ $10^{-6} s^{-1}$ 、より好ましくは $10^{-3} s^{-1}$ ~ $10^{-6} s^{-1}$ ($10^{-4} s^{-1}$ ~ $10^{-6} s^{-1}$ 等) の解離速度 (k_{off} 速度) で例えば P2X7 等のイオンチャネルと特異的に結合することができる、態様 B - 1 ~ B - 7、C - 1 ~ C - 7、及び/又は D - 1 ~ D - 4 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

態様 D - 6 : 500 nM 未満、好ましくは 200 nM 未満、より好ましくは 10 nM 未満 (500 pM 未満等) の親和性で例えば P2X7 等のイオンチャネルと特異的に結合することができる、態様 B - 1 ~ B - 7、C - 1 ~ C - 7、及び/又は D - 1 ~ D - 5 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

態様 D - 1 ~ D - 6 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列は特に態様 A - 1 ~ A - 2 2 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列であり得る。

態様 E - 1 : 天然免疫グロブリン配列 (任意の好適な種由来) 又は合成若しくは半合成の免疫グロブリン配列である、態様 B - 1 ~ B - 7、C - 1 ~ C - 7、及び/又は D - 1 ~ D - 6 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

態様 E - 2 : 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 B - 1 ~ B - 7、C - 1 ~ C - 7、D - 1 ~ D - 6、及び/又は E - 1 のいずれかに記載の免疫グロブリン。

態様 E - 3 : 免疫グロブリン配列である、態様 B - 1 ~ B - 7、C - 1 ~ C - 7、D - 1 ~ D - 6、及び/又は D - 1 又は D - 2 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

態様 E - 4 : 天然免疫グロブリン配列 (任意の好適な種由来) 又は合成若しくは半合成の免疫グロブリン配列である、態様 B - 1 ~ B - 7、C - 1 ~ C - 7、D - 1 ~ D - 6、及び/又は E - 1 ~ E - 3 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

態様 E - 5 : ヒト化免疫グロブリン配列、ラクダ化免疫グロブリン配列、又は親和性成熟等の技法により得られた免疫グロブリン配列である、態様 B - 1 ~ B - 7、C - 1 ~ C - 7、D - 1 ~ D - 6、及び/又は E - 1 ~ E - 4 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

態様 E - 6 : 軽鎖可変ドメイン配列 (例えば V_L 配列) 又は重鎖可変ドメイン配列 (例えば V_H 配列) から本質的になる、態様 B - 1 ~ B - 7、C - 1 ~ C - 7、D - 1 ~ D - 6、及び/又は E - 1 ~ E - 5 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

態様 E - 7 : 通常の本鎖抗体に由来する重鎖可変ドメイン配列から本質的になる、又は重鎖抗体に由来する重鎖可変ドメイン配列から本質的になる、態様 B - 1 ~ B - 7、C - 1 ~ C - 7、D - 1 ~ D - 6、及び/又は E - 1 ~ E - 6 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

態様 E - 8 : ドメイン抗体 (又はドメイン抗体としての使用に好適な An 免疫グロブリン配列)、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 An 免疫グロブリン配列)、「dAb」(又は dAb としての使用に好適な An 免疫グロブリン配列)、又はナノボディ (V_{HH} 配列を含むが、これに限定されない) から本質的になる、態様 B - 1 ~ B - 7、C - 1 ~ C - 7、D - 1 ~ D - 6、及び/又は E - 1 ~ E - 7 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

10

20

30

40

50

態様 E - 9 : ナノボディから本質的になる、態様 B - 1 ~ B - 7、C - 1 ~ C - 7、D - 1 ~ D - 6、及び/又は E - 1 ~ E - 8 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

態様 E - 10 :

i) 配列番号 1 ~ 配列番号 22 の免疫グロブリン配列のうちの少なくとも 1 つとの少なくとも 80% のアミノ酸同一性を有し (ここでアミノ酸同一性の程度を決定するために CDR 配列を形成するアミノ酸残基は無視する) ;

ii) 好ましくはカバットナンバリングによる 11 位、37 位、44 位、45 位、47 位、83 位、84 位、103 位、104 位及び 108 位のアミノ酸残基のうちの 1 つ又は複数が、表 B - 2 で言及される特徴的な残基から選択される、

ナノボディから本質的になる、態様 B - 1 ~ B - 7、C - 1 ~ C - 7、D - 1 ~ D - 6、及び/又は E - 1 ~ E - 9 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

10

態様 E - 11 :

i) 配列番号 705 ~ 配列番号 788、より好ましくは配列番号 726 ~ 配列番号 750、配列番号 753 ~ 配列番号 758、配列番号 762 ~ 配列番号 764、配列番号 772 ~ 配列番号 773、配列番号 775、又は配列番号 778 ~ 配列番号 780、より好ましくは配列番号 732、配列番号 773 又は配列番号 778 の An 免疫グロブリン配列のうちの少なくとも 1 つとの少なくとも 80% のアミノ酸同一性を有し (ここでアミノ酸同一性の程度を決定するために CDR 配列を形成するアミノ酸残基は無視する) ;

ii) 好ましくはカバットナンバリングによる 11 位、37 位、44 位、45 位、47 位、83 位、84 位、103 位、104 位及び 108 位のアミノ酸残基のうちの 1 つ又は複数が、表 B - 2 で言及される特徴的な残基から選択される、

20

ナノボディから本質的になる、態様 B - 1 ~ B - 7、C - 1 ~ C - 7、D - 1 ~ D - 6、及び/又は E - 1 ~ E - 10 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

態様 E - 12 : ヒト化ナノボディから本質的になる、態様 B - 1 ~ B - 7、C - 1 ~ C - 7、D - 1 ~ D - 6、及び/又は E - 1 ~ E - 11 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

態様 E - 13 : CDR 配列により形成される、結合に関する少なくとも 1 つの結合部位に加えて、他の抗原、タンパク質又は標的との結合に関する 1 つ又は複数のさらなる結合部位を含有する、態様 B - 1 ~ B - 7、C - 1 ~ C - 7、D - 1 ~ D - 6、及び/又は E - 1 ~ E - 11 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

30

態様 E - 1 ~ E - 13 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列は特に態様 A - 1 ~ A - 22 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列であり得る。

【0480】

フレームワーク + CDR の態様

態様 F - 1 : 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免疫グロブリン配列であって、

CDR1 が、

a) 配列番号 208 ~ 配列番号 289 の免疫グロブリン配列 ;

b) 配列番号 208 ~ 配列番号 289 の免疫グロブリン配列の少なくとも 1 つとの少なくとも 80% のアミノ酸同一性を有する免疫グロブリン配列 ;

40

c) 配列番号 208 ~ 配列番号 289 の免疫グロブリン配列の少なくとも 1 つとの 3 つ、2 つ若しくは 1 つのアミノ酸差異を有する免疫グロブリン配列

からなる群から選択され、及び/又は

CDR2 が、

d) 配列番号 372 ~ 配列番号 453 の免疫グロブリン配列 ;

e) 配列番号 372 ~ 配列番号 453 の免疫グロブリン配列の少なくとも 1 つとの少なくとも 80% のアミノ酸同一性を有する免疫グロブリン配列 ;

f) 配列番号 372 ~ 配列番号 453 の免疫グロブリン配列の少なくとも 1 つとの 3 つ、2 つ若しくは 1 つのアミノ酸差異を有する免疫グロブリン配列

50

からなる群から選択され、及び/又は

C D R 3 が、

g) 配列番号 5 3 6 ~ 配列番号 6 1 7 の免疫グロブリン配列；

h) 配列番号 5 3 6 ~ 配列番号 6 1 7 の免疫グロブリン配列の少なくとも 1 つとの少なくとも 8 0 % のアミノ酸同一性を有する免疫グロブリン配列；

i) 配列番号 5 3 6 ~ 配列番号 6 1 7 の免疫グロブリン配列の少なくとも 1 つとの 3 つ、2 つ若しくは 1 つのアミノ酸差異を有する免疫グロブリン配列

からなる群から選択される、免疫グロブリン配列。

このような免疫グロブリン配列は好ましくは、例えば P 2 X 7 等のイオンチャンネルに指向性を有し、及び/又は例えば P 2 X 7 等のイオンチャンネルと特異的に結合することができる免疫グロブリン配列である。また、このような免疫グロブリン配列は好ましくは、態様 A - 1 ~ 態様 A - 2 2、態様 C - 1 ~ 態様 C - 7、態様 D - 1 ~ 態様 D - 6 及び/又は態様 E - 1 ~ 態様 E - 1 3 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列である。

態様 F - 2 : 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免疫グロブリン配列であって、

C D R 1 が、

a) 配列番号 2 0 8 ~ 配列番号 2 8 9 の免疫グロブリン配列；

b) 配列番号 2 0 8 ~ 配列番号 2 8 9 の免疫グロブリン配列の少なくとも 1 つとの少なくとも 8 0 % のアミノ酸同一性を有する免疫グロブリン配列；

c) 配列番号 2 0 8 ~ 配列番号 2 8 9 の免疫グロブリン配列の少なくとも 1 つとの 3 つ、2 つ又は 1 つのアミノ酸差異を有する免疫グロブリン配列

からなる群から選択され、

C D R 2 が、

d) 配列番号 3 7 2 ~ 配列番号 4 5 3 の免疫グロブリン配列；

e) 配列番号 3 7 2 ~ 配列番号 4 5 3 の免疫グロブリン配列の少なくとも 1 つとの少なくとも 8 0 % のアミノ酸同一性を有する免疫グロブリン配列；

f) 配列番号 3 7 2 ~ 配列番号 4 5 3 の免疫グロブリン配列の少なくとも 1 つとの 3 つ、2 つ又は 1 つのアミノ酸差異を有する免疫グロブリン配列

からなる群から選択され、

C D R 3 が、

g) 配列番号 5 3 6 ~ 配列番号 6 1 7 の免疫グロブリン配列；

h) 配列番号 5 3 6 ~ 配列番号 6 1 7 の免疫グロブリン配列の少なくとも 1 つとの少なくとも 8 0 % のアミノ酸同一性を有する免疫グロブリン配列；

i) 配列番号 5 3 6 ~ 配列番号 6 1 7 の免疫グロブリン配列の少なくとも 1 つとの 3 つ、2 つ又は 1 つのアミノ酸差異を有する免疫グロブリン配列

からなる群から選択される、免疫グロブリン配列。

このような免疫グロブリン配列は好ましくは、例えば P 2 X 7 等のイオンチャンネルに指向性を有し、及び/又は例えば P 2 X 7 等のイオンチャンネルと特異的に結合することができる免疫グロブリン配列である。また、このような免疫グロブリン配列は好ましくは、態様 A - 1 ~ 態様 A - 2 2、態様 C - 1 ~ 態様 C - 7、態様 D - 1 ~ 態様 D - 6 及び/又は態様 E - 1 ~ 態様 E - 1 3 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列である。

態様 F - 3 : 上記免疫グロブリン配列の C D R 配列が、配列番号 7 0 5 ~ 配列番号 7 8 8、より好ましくは配列番号 7 2 6 ~ 配列番号 7 5 0、配列番号 7 5 3 ~ 配列番号 7 5 8、配列番号 7 6 2 ~ 配列番号 7 6 4、配列番号 7 7 2 ~ 配列番号 7 7 3、配列番号 7 7 5 又は配列番号 7 7 8 ~ 配列番号 7 8 0、より好ましくは配列番号 7 3 2、配列番号 7 7 3 又は配列番号 7 7 8 の免疫グロブリン配列のうち少なくとも 1 つの C D R 配列との少なくとも 7 0 % のアミノ酸同一性、好ましくは少なくとも 8 0 % のアミノ酸同一性、より好ましくは少なくとも 9 0 % のアミノ酸同一性、例えば 9 5 % 以上のアミノ酸同一性、又はさらには本質的に 1 0 0 % のアミノ酸同一性を有する、態様 F - 1 及び態様 F - 2 のいずれ

10

20

30

40

50

かに記載の免疫グロブリン配列。

このような免疫グロブリン配列は好ましくは、例えば P 2 X 7 等のイオンチャンネルに指向性を有し、及び/又は例えば P 2 X 7 等のイオンチャンネルと特異的に結合することができる免疫グロブリン配列である。また、このような免疫グロブリン配列は好ましくは、態様 A - 1 ~ 態様 A - 2 2、態様 C - 1 ~ 態様 C - 7、態様 D - 1 ~ 態様 D - 6 及び/又は態様 E - 1 ~ 態様 E - 1 3 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列である。

態様 F - 4 : 例えば P 2 X 7 等のイオンチャンネルに指向性を有し、配列番号 7 0 5 ~ 配列番号 7 8 8、より好ましくは配列番号 7 2 6 ~ 配列番号 7 5 0、配列番号 7 5 3 ~ 配列番号 7 5 8、配列番号 7 6 2 ~ 配列番号 7 6 4、配列番号 7 7 2 ~ 配列番号 7 7 3、配列番号 7 7 5 又は配列番号 7 7 8 ~ 配列番号 7 8 0、より好ましくは配列番号 7 3 2、配列番号 7 7 3 又は配列番号 7 7 8 の免疫グロブリン配列の態様のいずれかに記載の免疫グロブリン配列のうちの少なくとも 1 つの結合を交差遮断する、態様 F - 1 ~ 態様 F - 3 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

10

態様 F - 5 : 例えば P 2 X 7 等のイオンチャンネルに指向性を有し、配列番号 7 0 5 ~ 配列番号 7 8 8、より好ましくは配列番号 7 2 6 ~ 配列番号 7 5 0、配列番号 7 5 3 ~ 配列番号 7 5 8、配列番号 7 6 2 ~ 配列番号 7 6 4、配列番号 7 7 2 ~ 配列番号 7 7 3、配列番号 7 7 5 又は配列番号 7 7 8 ~ 配列番号 7 8 0、より好ましくは配列番号 7 3 2、配列番号 7 7 3 又は配列番号 7 7 8 の免疫グロブリン配列のうちの少なくとも 1 つにより例えば P 2 X 7 等のイオンチャンネルとの結合を交差遮断される、態様 F - 1 ~ 態様 F - 3 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

20

態様 F - 6 : 上記免疫グロブリン配列の交差遮断する又は交差遮断される能力をピアコアッセイで検出する、態様 F - 4 又は態様 F - 5 に記載の免疫グロブリン配列。

態様 F - 7 : 上記免疫グロブリン配列の交差遮断する又は交差遮断される能力を E L I S A アッセイで検出する、態様 F - 4 又は態様 F - 5 に記載の免疫グロブリン配列。

態様 F - 8 : 本質的に単離形態である、態様 F - 1 ~ 態様 F - 7 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

態様 F - 9 : 被験体に投与するためのものであり、上記被験体では自然発生しない、態様 F - 1 ~ 態様 F - 8 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

態様 F - 1 0 : $1 0^{-5}$ モル/L ~ $1 0^{-12}$ モル/L 以下、及び好ましくは $1 0^{-7}$ モル/L ~ $1 0^{-12}$ モル/L 以下、及びより好ましくは $1 0^{-8}$ モル/L ~ $1 0^{-12}$ モル/L の解離定数 (K_D) で例えば P 2 X 7 等のイオンチャンネルと特異的に結合することができる、態様 F - 1 ~ 態様 F - 9 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

30

態様 F - 1 1 : $1 0^2 M^{-1} s^{-1}$ ~ 約 $1 0^7 M^{-1} s^{-1}$ 、好ましくは $1 0^3 M^{-1} s^{-1}$ ~ $1 0^7 M^{-1} s^{-1}$ 、より好ましくは $1 0^4 M^{-1} s^{-1}$ ~ $1 0^7 M^{-1} s^{-1}$ ($1 0^5 M^{-1} s^{-1}$ ~ $1 0^7 M^{-1} s^{-1}$ 等) の結合速度 (k_{on} 速度) で例えば P 2 X 7 等のイオンチャンネルと特異的に結合することができる、態様 F - 1 ~ 態様 F - 1 0 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

態様 F - 1 2 : $1 s^{-1}$ ~ $1 0^{-6} s^{-1}$ 、好ましくは $1 0^{-2} s^{-1}$ ~ $1 0^{-6} s^{-1}$ 、より好ましくは $1 0^{-3} s^{-1}$ ~ $1 0^{-6} s^{-1}$ ($1 0^{-4} s^{-1}$ ~ $1 0^{-6} s^{-1}$ 等) の解離速度 (k_{off} 速度) で例えば P 2 X 7 等のイオンチャンネルと特異的に結合することができる、態様 F - 1 ~ 態様 F - 1 1 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

40

態様 F - 1 3 : 5 0 0 nM 未満、好ましくは 2 0 0 nM 未満、より好ましくは 1 0 nM 未満 (5 0 0 pM 未満等) の親和性で例えば P 2 X 7 等のイオンチャンネルと特異的に結合することができる、態様 F - 1 ~ 態様 F - 1 2 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

態様 F - 1 4 : 天然免疫グロブリン配列 (任意の好適な種由来) 又は合成若しくは半合成の免疫グロブリン配列である、態様 F - 1 ~ 態様 F - 1 3 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

態様 F - 1 5 : 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 F - 1 ~ 態様 F - 1 4 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

50

態様 F - 16 : 免疫グロブリン配列である、態様 F - 1 ~ 態様 F - 15 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

態様 F - 17 : 天然免疫グロブリン配列 (任意の好適な種由来) 又は合成若しくは半合成の免疫グロブリン配列である、態様 F - 1 ~ 態様 F - 16 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

態様 F - 18 : ヒト化免疫グロブリン配列、ラクダ化免疫グロブリン配列、又は親和性成熟等の技法により得られた免疫グロブリン配列である、態様 F - 1 ~ 態様 F - 17 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

態様 F - 19 : 軽鎖可変ドメイン配列 (例えば V_L 配列) 又は重鎖可変ドメイン配列 (例えば V_H 配列) から本質的になる、態様 F - 1 ~ 態様 F - 19 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

10

態様 F - 20 : 従来の四本鎖抗体に由来する重鎖可変ドメイン配列から本質的になる、又は重鎖抗体に由来する重鎖可変ドメイン配列から本質的になる、態様 F - 1 ~ 態様 F - 19 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

態様 F - 21 : ドメイン抗体 (又はドメイン抗体としての使用に好適な免疫グロブリン配列)、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免疫グロブリン配列)、「dAb」(又はdAbとしての使用に好適な免疫グロブリン配列)、又はナノボディ (V_{HH} 配列を含むが、これに限定されない) から本質的になる、態様 F - 1 ~ 態様 F - 20 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

態様 F - 22 : ナノボディから本質的になる、態様 F - 1 ~ 態様 F - 21 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

20

態様 F - 23 :

i) 配列番号 1 ~ 配列番号 22 の免疫グロブリン配列のうちの少なくとも 1 つとの少なくとも 80% のアミノ酸同一性を有し (ここでアミノ酸同一性の程度を決定するために CDR 配列を形成するアミノ酸残基は無視する) ;

ii) 好ましくはカバットナンバリングによる 11 位、37 位、44 位、45 位、47 位、83 位、84 位、103 位、104 位及び 108 位のアミノ酸残基のうちの 1 つ又は複数が、表 B - 2 で言及される特徴的な残基から選択される、

ナノボディから本質的になる、態様 F - 1 ~ 態様 F - 22 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

30

態様 F - 24 :

i) 配列番号 705 ~ 配列番号 788、より好ましくは配列番号 726 ~ 配列番号 750、配列番号 753 ~ 配列番号 758、配列番号 762 ~ 配列番号 764、配列番号 772 ~ 配列番号 773、配列番号 775、又は配列番号 778 ~ 配列番号 780、より好ましくは配列番号 732、配列番号 773 又は配列番号 778 の免疫グロブリン配列のうちの少なくとも 1 つとの少なくとも 80% のアミノ酸同一性を有し (ここでアミノ酸同一性の程度を決定するために CDR 配列を形成するアミノ酸残基は無視する) ;

ii) 好ましくはカバットナンバリングによる 11 位、37 位、44 位、45 位、47 位、83 位、84 位、103 位、104 位及び 108 位のアミノ酸残基のうちの 1 つ又は複数が、表 B - 2 で言及される特徴的な残基から選択される、

ナノボディから本質的になる、態様 F - 1 ~ 態様 F - 23 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

40

態様 F - 25 : ヒト化ナノボディから本質的になる、態様 F - 1 ~ 態様 F - 24 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

態様 G - 1 : CDR 配列により形成される、結合に関する少なくとも 1 つの結合部位に加えて、別の抗原、タンパク質又は標的との結合に関する 1 つ又は複数のさらなる結合部位を含有する、これまでの態様のいずれかに記載の免疫グロブリン配列。

態様 H - 1 : 例えば P2X7 等のイオンチャンネルに指向性を有する及び / 又はこれと特異的に結合することができる、ナノボディ。

態様 H - 2 : 本質的に単離形態である、態様 H - 1 に記載のナノボディ。

50

態様 H - 3 : 10^{-5} モル/L ~ 10^{-12} モル/L 以下、及び好ましくは 10^{-7} モル/L ~ 10^{-12} モル/L 以下、及びより好ましくは 10^{-8} モル/L ~ 10^{-12} モル/L の解離定数 (K_D) で例えば P2X7 等のイオンチャネルと特異的に結合することができる、態様 H - 1 又は態様 H - 2 に記載のナノボディ。

態様 H - 4 : $10^2 M^{-1} s^{-1}$ ~ 約 $10^7 M^{-1} s^{-1}$ 、好ましくは $10^3 M^{-1} s^{-1}$ ~ $10^7 M^{-1} s^{-1}$ 、より好ましくは $10^4 M^{-1} s^{-1}$ ~ $10^7 M^{-1} s^{-1}$ ($10^5 M^{-1} s^{-1}$ ~ $10^7 M^{-1} s^{-1}$ 等) の結合速度 (k_{on} 速度) で例えば P2X7 等のイオンチャネルと特異的に結合することができる、態様 H - 1 ~ 態様 H - 3 のいずれかに記載のナノボディ。

態様 H - 5 : $1 s^{-1}$ ~ $10^{-6} s^{-1}$ 、好ましくは $10^{-2} s^{-1}$ ~ $10^{-6} s^{-1}$ 、より好ましくは $10^{-3} s^{-1}$ ~ $10^{-6} s^{-1}$ ($10^{-4} s^{-1}$ ~ $10^{-6} s^{-1}$ 等) の解離速度 (k_{off} 速度) で例えば P2X7 等のイオンチャネルと特異的に結合することができる、態様 H - 1 ~ 態様 H - 4 のいずれかに記載のナノボディ。

10

態様 H - 6 : 500 nM 未満、好ましくは 200 nM 未満、より好ましくは 10 nM 未満 (500 pM 未満等) の親和性で例えば P2X7 等のイオンチャネルと特異的に結合することができる、態様 H - 1 ~ 態様 H - 5 のいずれかに記載のナノボディ。

態様 H - 7 : 天然ナノボディ (任意の好適な種由来) 又は合成若しくは半合成のナノボディである、態様 H - 1 ~ 態様 H - 6 のいずれかに記載のナノボディ。

態様 H - 8 : V_{HH} 配列、部分ヒト化 V_{HH} 配列、完全ヒト化 V_{HH} 配列、ラクダ化重鎖可変ドメイン、又は親和性成熟等の技法により得られたナノボディである、態様 H - 1 ~ 態様 H - 7 のいずれかに記載のナノボディ。

20

態様 H - 9 :

i) 配列番号 1 ~ 配列番号 22 の An 免疫グロブリン配列のうちの少なくとも 1 つとの少なくとも 80% のアミノ酸同一性を有し (ここでアミノ酸同一性の程度を決定するために CDR 配列を形成するアミノ酸残基は無視する) ;

ii) 好ましくはカバットナンバリングによる 11 位、37 位、44 位、45 位、47 位、83 位、84 位、103 位、104 位及び 108 位のアミノ酸残基のうちの 1 つ又は複数が、表 B - 2 で言及される特徴的な残基から選択される、

態様 H - 1 ~ 態様 H - 8 のいずれかに記載のナノボディ。

態様 H - 10 :

30

i) 配列番号 705 ~ 配列番号 788、より好ましくは配列番号 726 ~ 配列番号 750、配列番号 753 ~ 配列番号 758、配列番号 762 ~ 配列番号 764、配列番号 772 ~ 配列番号 773、配列番号 775、又は配列番号 778 ~ 配列番号 780、より好ましくは配列番号 732、配列番号 773 又は配列番号 778 の An 免疫グロブリン配列のうちの少なくとも 1 つとの少なくとも 80% のアミノ酸同一性を有し (ここでアミノ酸同一性の程度を決定するために CDR 配列を形成するアミノ酸残基は無視する) ;

ii) 好ましくはカバットナンバリングによる 11 位、37 位、44 位、45 位、47 位、83 位、84 位、103 位、104 位及び 108 位のアミノ酸残基のうちの 1 つ又は複数が、表 B - 2 で言及される特徴的な残基から選択される、

態様 H - 1 ~ 態様 H - 9 のいずれかに記載のナノボディ。

40

態様 H - 11 : CDR1 が、

a) 配列番号 208 ~ 配列番号 289 の免疫グロブリン配列 ;

b) 配列番号 208 ~ 配列番号 289 の免疫グロブリン配列の少なくとも 1 つとの少なくとも 80% のアミノ酸同一性を有する免疫グロブリン配列 ;

c) 配列番号 208 ~ 配列番号 289 の免疫グロブリン配列の少なくとも 1 つとの 3 つ、2 つ若しくは 1 つのアミノ酸差異を有する免疫グロブリン配列

からなる群から選択され、及び / 又は

CDR2 が、

d) 配列番号 372 ~ 配列番号 453 の免疫グロブリン配列 ;

e) 配列番号 372 ~ 配列番号 453 の免疫グロブリン配列の少なくとも 1 つとの少な

50

くとも 80% のアミノ酸同一性を有する免疫グロブリン配列；

f) 配列番号 372 ~ 配列番号 453 の免疫グロブリン配列の少なくとも 1 つとの 3 つ、2 つ若しくは 1 つのアミノ酸差異を有する免疫グロブリン配列
からなる群から選択され、及び / 又は

CDR3 が、

g) 配列番号 536 ~ 配列番号 617 の免疫グロブリン配列；

h) 配列番号 536 ~ 配列番号 617 の免疫グロブリン配列の少なくとも 1 つとの少なくとも 80% のアミノ酸同一性を有する免疫グロブリン配列；

i) 配列番号 536 ~ 配列番号 617 の免疫グロブリン配列の少なくとも 1 つとの 3 つ、2 つ若しくは 1 つのアミノ酸差異を有する免疫グロブリン配列

10

からなる群から選択される、態様 H - 1 ~ 態様 H - 10 のいずれかに記載のナノボディ。
態様 H - 12 : CDR1 が、

a) 配列番号 208 ~ 配列番号 289 の免疫グロブリン配列；

b) 配列番号 208 ~ 配列番号 289 の免疫グロブリン配列の少なくとも 1 つとの少なくとも 80% のアミノ酸同一性を有する免疫グロブリン配列；

c) 配列番号 208 ~ 配列番号 289 の免疫グロブリン配列の少なくとも 1 つとの 3 つ、2 つ若しくは 1 つのアミノ酸差異を有する免疫グロブリン配列

からなる群から選択され、

CDR2 が、

d) 配列番号 372 ~ 配列番号 453 の免疫グロブリン配列；

20

e) 配列番号 372 ~ 配列番号 453 の免疫グロブリン配列の少なくとも 1 つとの少なくとも 80% のアミノ酸同一性を有する免疫グロブリン配列；

f) 配列番号 372 ~ 配列番号 453 の免疫グロブリン配列の少なくとも 1 つとの 3 つ、2 つ若しくは 1 つのアミノ酸差異を有する免疫グロブリン配列

からなる群から選択され、

CDR3 が、

g) 配列番号 536 ~ 配列番号 617 の免疫グロブリン配列；

h) 配列番号 536 ~ 配列番号 617 の免疫グロブリン配列の少なくとも 1 つとの少なくとも 80% のアミノ酸同一性を有する免疫グロブリン配列；

i) 配列番号 536 ~ 配列番号 617 の免疫グロブリン配列の少なくとも 1 つとの 3 つ、2 つ若しくは 1 つのアミノ酸差異を有する免疫グロブリン配列

30

からなる群から選択される、態様 H - 1 ~ 態様 H - 11 のいずれかに記載のナノボディ。

態様 H - 13 : CDR 配列が、配列番号 705 ~ 配列番号 788、より好ましくは配列番号 726 ~ 配列番号 750、配列番号 753 ~ 配列番号 758、配列番号 762 ~ 配列番号 764、配列番号 772 ~ 配列番号 773、配列番号 775 又は配列番号 778 ~ 配列番号 780、より好ましくは配列番号 732、配列番号 773 又は配列番号 778 の免疫グロブリン配列のうちの少なくとも 1 つの CDR 配列との少なくとも 70% のアミノ酸同一性、好ましくは少なくとも 80% のアミノ酸同一性、より好ましくは少なくとも 90% のアミノ酸同一性、例えば 95% 以上のアミノ酸同一性、又はさらには本質的に 100% のアミノ酸同一性を有する、態様 H - 1 ~ 態様 H - 12 のいずれかに記載のナノボディ。

40

態様 H - 14 : 部分ヒト化ナノボディである、態様 H - 1 ~ 態様 H - 13 のいずれかに記載のナノボディ。

態様 H - 15 : 完全ヒト化ナノボディである、態様 H - 1 ~ 態様 H - 14 のいずれかに記載のナノボディ。
態様 H - 16 : 配列番号 705 ~ 配列番号 788、より好ましくは配列番号 726 ~ 配列番号 750、配列番号 753 ~ 配列番号 758、配列番号 762 ~ 配列番号 764、配列番号 772 ~ 配列番号 773、配列番号 775 若しくは配列番号 778 ~ 配列番号 780、より好ましくは配列番号 732、配列番号 773 若しくは配列番号 778 からなる群から、又は配列番号 705 ~ 配列番号 788、より好ましくは配列番号 726 ~ 配列番号 750、配列番号 753 ~ 配列番号 758、配列番号 762 ~ 配列番号 764、配列番号 7

50

72 ~ 配列番号 773、配列番号 775 若しくは配列番号 778 ~ 配列番号 780、より好ましくは配列番号 732、配列番号 773 若しくは配列番号 778 の免疫グロブリン配列のうちの少なくとも 1 つとの 80% 超、好ましくは 90% 超、より好ましくは 95% 超、例えば 99% 以上の配列同一性（本明細書中で規定される）を有する免疫グロブリン配列からなる群から選択される、態様 H - 1 ~ 態様 H - 15 のいずれかに記載のナノボディ。

態様 H - 17：ヒト化ナノボディである、態様 H - 1 ~ 態様 H - 16 のいずれかに記載のナノボディ。

態様 H - 18：配列番号 705 ~ 配列番号 788、より好ましくは配列番号 726 ~ 配列番号 750、配列番号 753 ~ 配列番号 758、配列番号 762 ~ 配列番号 764、配列番号 772 ~ 配列番号 773、配列番号 775 又は配列番号 778 ~ 配列番号 780、より好ましくは配列番号 732、配列番号 773 からなる群から選択される、態様 H - 1 ~ 態様 H - 17 のいずれかに記載のナノボディ。

態様 H - 19：例えば P2X7 等のイオンチャンネルに指向性を有し、配列番号 705 ~ 配列番号 788、より好ましくは配列番号 726 ~ 配列番号 750、配列番号 753 ~ 配列番号 758、配列番号 762 ~ 配列番号 764、配列番号 772 ~ 配列番号 773、配列番号 775 又は配列番号 778 ~ 配列番号 780、より好ましくは配列番号 732、配列番号 773 又は配列番号 778 の免疫グロブリン配列のうちの少なくとも 1 つの、例えば P2X7 等のイオンチャンネルとの結合を交差遮断する、ナノボディ。

態様 H - 20：例えば P2X7 等のイオンチャンネルに指向性を有し、配列番号 705 ~ 配列番号 788、より好ましくは配列番号 726 ~ 配列番号 750、配列番号 753 ~ 配列番号 758、配列番号 762 ~ 配列番号 764、配列番号 772 ~ 配列番号 773、配列番号 775 又は配列番号 778 ~ 配列番号 780、より好ましくは配列番号 732、配列番号 773 又は配列番号 778 の免疫グロブリン配列のうちの少なくとも 1 つにより例えば P2X7 等のイオンチャンネルとの結合を交差遮断される、ナノボディ。

態様 H - 21：上記ナノボディの交差遮断する又は交差遮断される能力をピアコアアッセイで検出する、態様 H - 19 又は態様 H - 20 に記載のナノボディ。

態様 H - 22：上記ナノボディの交差遮断する又は交差遮断される能力を ELISA アッセイで検出する、態様 H - 19 ~ 態様 H - 21 のいずれかに記載のナノボディ。

【0481】

ポリペプチド

態様 K - 1：態様 A - 1 ~ 態様 A - 22、態様 B - 1 ~ 態様 B - 7、態様 C - 1 ~ 態様 C - 4、態様 D - 1 ~ 態様 D - 6、態様 E - 1 ~ 態様 E - 13、態様 F - 1 ~ 態様 F - 25 若しくは態様 G - 1 のいずれかに記載の 1 つ又は複数の免疫グロブリン配列、及び / 又は態様 H - 1 ~ 態様 H - 22 のいずれかに記載の 1 つ又は複数のナノボディを含むか又はこれから本質的になり、任意で 1 つ又は複数のペプチドリンカーをさらに含む、ポリペプチド。

態様 K - 2：上記 1 つ又は複数の結合単位が免疫グロブリン配列である、態様 K - 1 に記載のポリペプチド。

態様 K - 3：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免疫グロブリン配列、単ドメイン抗体、単ドメイン抗体としての使用に好適な免疫グロブリン配列、「dAb」、dAb としての使用に好適な免疫グロブリン配列、又はナノボディからなる群から選択される、態様 K - 1 又は態様 K - 2 に記載のポリペプチド。

態様 K - 4：上記 1 つ又は複数の本発明の免疫グロブリン配列が免疫グロブリン配列である、態様 K - 1 ~ 態様 K - 3 のいずれかに記載のポリペプチド。

態様 K - 5：上記 1 つ又は複数の本発明の免疫グロブリン配列が、ドメイン抗体、ドメイン抗体としての使用に好適な免疫グロブリン配列、単ドメイン抗体、単ドメイン抗体としての使用に好適な免疫グロブリン配列、「dAb」、dAb としての使用に好適な免疫グロブリン配列、又はナノボディからなる群から選択される、態様 K - 1 ~ 態様 K - 4

10

20

30

40

50

のいずれかに記載のポリペプチド。

態様 K - 6 : 態様 H - 1 ~ 態様 H - 2 2 のいずれかに記載の 1 つ又は複数のナノボディを含むか又はこれから本質的になり、上記 1 つ又は複数の他の結合単位がナノボディである、態様 K - 1 ~ 態様 K - 5 のいずれかに記載のポリペプチド。

態様 K - 7 : 少なくとも 1 つの結合単位が多価構築物である、態様 K - 1 ~ 態様 K - 6 のいずれかに記載のポリペプチド。

態様 K - 8 : 少なくとも 1 つの結合単位が多重パラトピック構築物である、態様 K - 1 ~ 態様 K - 8 のいずれかに記載のポリペプチド。

態様 K - 9 : 少なくとも 1 つの結合単位が多重特異的構築物である、態様 K - 1 ~ 態様 K - 8 のいずれかに記載のポリペプチド。

10

態様 K - 10 : それぞれ対応する態様 A - 1 ~ 態様 A - 2 2、態様 B - 1 ~ 態様 B - 7、態様 C - 1 ~ 態様 C - 4、態様 D - 1 ~ 態様 D - 6、態様 E - 1 ~ 態様 E - 1 3、態様 F - 1 ~ 態様 F - 2 5 若しくは態様 G - 1 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列それ自体、又は態様 H - 1 ~ 態様 H - 2 2 のいずれかに記載のナノボディそれ自体と比較して増大した半減期を有する、態様 K - 1 ~ 態様 K - 9 のいずれかに記載のポリペプチド。

態様 K - 11 : 上記 1 つ又は複数の他の結合単位が、それぞれ対応する態様 A - 1 ~ 態様 A - 2 2、態様 B - 1 ~ 態様 B - 7、態様 C - 1 ~ 態様 C - 4、態様 D - 1 ~ 態様 D - 6、態様 E - 1 ~ 態様 E - 1 3、態様 F - 1 ~ 態様 F - 2 5 若しくは態様 G - 1 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列それ自体、又は態様 H - 1 ~ 態様 H - 2 2 のいずれかに記載のナノボディそれ自体と比較して増大した半減期を有するポリペプチドをもたらす、態様 K - 10 に記載のポリペプチド。

20

態様 K - 12 : 増大した半減期を有するポリペプチドをもたらす上記 1 つ又は複数の他の結合単位が、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 K - 10 又は態様 K - 11 に記載のポリペプチド。

態様 K - 13 : 増大した半減期を有するポリペプチドをもたらす上記 1 つ又は複数の他の結合単位が、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 K - 10 ~ 態様 K - 12 のいずれかに記載のポリペプチド。

態様 K - 14 : 増大した半減期を有するポリペプチドをもたらす上記 1 つ又は複数の他の結合単位が、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 K - 10 ~ 態様 K - 13 のいずれかに記載のポリペプチド。

30

態様 K - 15 : 増大した半減期を有するポリペプチドをもたらす上記 1 つ又は複数の他の結合単位が、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ドメイン抗体、ドメイン抗体としての使用に好適な免疫グロブリン配列、単ドメイン抗体、単ドメイン抗体としての使用に好適な免疫グロブリン配列、「dAb」、dAb としての使用に好適な免疫グロブリン配列、又はナノボディからなる群から選択される、態様 K - 10 ~ 態様 K - 14 のいずれかに記載のポリペプチド。

態様 K - 16 : 増大した半減期を有するポリペプチドをもたらす上記 1 つ又は複数の他の結合単位が、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ナノボディである、態様 K - 10 ~ 態様 K - 15 に記載のポリペプチド。

40

態様 K - 17 : それぞれ対応する態様 A - 1 ~ 態様 A - 2 2、態様 B - 1 ~ 態様 B - 7、態様 C - 1 ~ 態様 C - 4、態様 D - 1 ~ 態様 D - 6、態様 E - 1 ~ 態様 E - 1 3、態様 F - 1 ~ 態様 F - 2 5 若しくは態様 G - 1 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列それ自体、又は態様 H - 1 ~ 態様 H - 2 2 のいずれかに記載のナノボディそれ自体の半減期より少なくとも 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 K - 10 ~ 態様 K - 16 のいずれかに記載のポリペプチド。

50

態様 K - 18 : それぞれ対応する態様 A - 1 ~ 態様 A - 22、態様 B - 1 ~ 態様 B - 7、態様 C - 1 ~ 態様 C - 4、態様 D - 1 ~ 態様 D - 6、態様 E - 1 ~ 態様 E - 13、態様 F - 1 ~ 態様 F - 25 若しくは態様 G - 1 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列それ自体、又は態様 H - 1 ~ 態様 H - 22 のいずれかに記載のナノボディそれ自体と比較して、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、又はさらには 24 時間超、48 時間超若しくは 72 時間超増大した血清半減期を有する、態様 K - 10 ~ 態様 K - 17 のいずれかに記載のポリペプチド。

態様 K - 19 : 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 ; 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)、又は少なくとも約 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 K - 1 ~ 態様 K - 18 のいずれかに記載のポリペプチド。

【0482】

化合物又は構築物

態様 L - 1 : 態様 A - 1 ~ 態様 A - 22、態様 B - 1 ~ 態様 B - 7、態様 C - 1 ~ 態様 C - 4、態様 D - 1 ~ 態様 D - 6、態様 E - 1 ~ 態様 E - 13、態様 F - 1 ~ 態様 F - 25 若しくは態様 G - 1 のいずれかに記載の 1 つ又は複数の免疫グロブリン配列、及び / 又は態様 H - 1 ~ 態様 H - 22 のいずれかに記載の 1 つ又は複数のナノボディ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された 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。

態様 L - 2 : 上記 1 つ又は複数の他の基、残基、部分又は結合単位が免疫グロブリン配列である、態様 L - 1 に記載の化合物又は構築物。

態様 L - 3 : 上記 1 つ又は複数のリンカーが存在する場合、該リンカーが 1 つ又は複数の免疫グロブリン配列である、態様 L - 1 又は態様 L - 2 に記載の化合物又は構築物。

態様 L - 4 : 上記 1 つ又は複数の他の基、残基、部分又は結合単位が免疫グロブリン配列である、態様 L - 1 ~ 態様 L - 3 のいずれかに記載の化合物又は構築物。

態様 L - 5 : 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免疫グロブリン配列、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免疫グロブリン配列、「dAb」、dAb としての使用に好適な免疫グロブリン配列、又はナノボディからなる群から選択される、態様 L - 1 ~ 態様 L - 4 のいずれかに記載の化合物又は構築物。

態様 L - 6 : 上記 1 つ又は複数の本発明の免疫グロブリン配列が免疫グロブリン配列である、態様 L - 1 ~ 態様 L - 5 のいずれかに記載の化合物又は構築物。

態様 L - 7 : 上記 1 つ又は複数の本発明の免疫グロブリン配列が、ドメイン抗体、ドメイン抗体としての使用に好適な免疫グロブリン配列、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免疫グロブリン配列、「dAb」、dAb としての使用に好適な免疫グロブリン配列、又はナノボディからなる群から選択される、態様 L - 1 ~ 態様 L - 6 のいずれかに記載の化合物又は構築物。

態様 L - 8 : 態様 H - 1 ~ 態様 H - 22 のいずれかに記載の 1 つ又は複数のナノボディを含むか又はこれから本質的になり、上記 1 つ又は複数の他の基、残基、部分又は結合単位がナノボディである、化合物又は構築物。

態様 L - 9 : 多価構築物である、態様 L - 1 ~ 態様 L - 9 のいずれかに記載の化合物又は構築物。

態様 L - 10 : 多重特異的構築物である、態様 L - 1 ~ 態様 L - 10 のいずれかに記載の化合物又は構築物。

態様 L - 11 : それぞれ対応する態様 A - 1 ~ 態様 A - 22、態様 B - 1 ~ 態様 B - 7、態様 C - 1 ~ 態様 C - 4、態様 D - 1 ~ 態様 D - 6、態様 E - 1 ~ 態様 E - 13、態様 F - 1 ~ 態様 F - 25 若しくは態様 G - 1 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列それ自体

10

20

30

40

50

、又は態様 H - 1 ~ 態様 H - 2 2 のいずれかに記載のナノボディそれ自体と比較して増大した半減期を有する、態様 L - 1 ~ 態様 L - 1 0 のいずれかに記載の化合物又は構築物。
態様 L - 1 2 : 上記 1 つ又は複数の他の基、残基、部分又は結合単位が、それぞれ対応する態様 A - 1 ~ 態様 A - 2 2、態様 B - 1 ~ 態様 B - 7、態様 C - 1 ~ 態様 C - 4、態様 D - 1 ~ 態様 D - 6、態様 E - 1 ~ 態様 E - 1 3、態様 F - 1 ~ 態様 F - 2 5 若しくは態様 G - 1 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列それ自体、又は態様 H - 1 ~ 態様 H - 2 2 に記載のナノボディそれ自体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もたらず、態様 L - 1 ~ 態様 L - 1 1 に記載の化合物又は構築物。

態様 L - 1 3 : 増大した半減期を有する化合物又は構築物をもたらず上記 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 L - 1 2 に記載の化合物又は構築物。

10

態様 L - 1 4 : 増大した半減期を有する化合物又は構築物をもたらず上記 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 L - 1 2 又は態様 L - 1 3 に記載の化合物又は構築物。

態様 L - 1 5 : 増大した半減期を有する化合物又は構築物をもたらず上記 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 L - 1 2 ~ 態様 L - 1 4 のいずれかに記載の化合物又は構築物。

20

態様 L - 1 6 : 増大した半減期を有する化合物又は構築物をもたらず上記 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ドメイン抗体、ドメイン抗体としての使用に好適な免疫グロブリン配列、単ドメイン抗体、単ドメイン抗体としての使用に好適な免疫グロブリン配列、「dAb」、dAb としての使用に好適な免疫グロブリン配列、又はナノボディからなる群から選択される、態様 L - 1 2 ~ 態様 L - 1 4 のいずれかに記載の化合物又は構築物。

態様 L - 1 7 : 増大した半減期を有する化合物又は構築物をもたらず上記 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ナノボディである、態様 L - 1 2 ~ 態様 L - 1 4 のいずれかに記載の化合物又は構築物。

30

態様 L - 1 8 : それぞれ対応する態様 A - 1 ~ 態様 A - 2 2、態様 B - 1 ~ 態様 B - 7、態様 C - 1 ~ 態様 C - 4、態様 D - 1 ~ 態様 D - 6、態様 E - 1 ~ 態様 E - 1 3、態様 F - 1 ~ 態様 F - 2 5 若しくは態様 G - 1 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列それ自体、又は態様 H - 1 ~ 態様 H - 2 2 のいずれかに記載のナノボディそれ自体の半減期より少なくとも 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 L - 1 2 ~ 態様 L - 1 7 のいずれかに記載の化合物又は構築物。

態様 L - 1 9 : それぞれ対応する態様 A - 1 ~ 態様 A - 2 2、態様 B - 1 ~ 態様 B - 7、態様 C - 1 ~ 態様 C - 4、態様 D - 1 ~ 態様 D - 6、態様 E - 1 ~ 態様 E - 1 3、態様 F - 1 ~ 態様 F - 2 5 若しくは態様 G - 1 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列それ自体、又は態様 H - 1 ~ 態様 H - 2 2 のいずれかに記載のナノボディそれ自体と比較して、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、又はさらには 24 時間超、48 時間超若しくは 72 時間超増大した血清半減期を有する、態様 L - 1 2 ~ 態様 L - 1 8 のいずれかに記載の化合物又は構築物。

40

態様 L - 2 0 : 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 ; 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)、又は少なくとも約 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

50

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L-12～態様L-19のいずれかに記載の化合物又は構築物。

態様L-21: 態様A-1～態様A-22、態様B-1～態様B-7、態様C-1～態様C-4、態様D-1～態様D-6、態様E-1～態様E-13、態様F-1～態様F-25若しくは態様G-1のいずれかに記載の1つの免疫グロブリン配列、及び/又は態様H-1～態様H-22のいずれかに記載の1つの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。

態様L-22: 上記本発明の免疫グロブリン配列が、ドメイン抗体、ドメイン抗体としての使用に好適な免疫グロブリン配列、単ドメイン抗体、単ドメイン抗体としての使用に好適な免疫グロブリン配列、「dAb」、dAbとしての使用に好適な免疫グロブリン配列、又はナノボディからなる群から選択される、態様L-21に記載の一価構築物。

10

態様L-23: 態様H-1～態様H-22のいずれかに記載の1つの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。

【0483】

核酸

態様M-1: 態様A-1～態様A-22、態様B-1～態様B-7、態様C-1～態様C-4、態様D-1～態様D-6、態様E-1～態様E-13、態様F-1～態様F-25又は態様G-1のいずれかに記載の免疫グロブリン配列、態様H-1～態様H-22のいずれかに記載のナノボディをコードする、核酸配列又はヌクレオチド配列。

態様M-2: 上記の態様のいずれかに記載の化合物又は構築物をコードする、核酸配列又はヌクレオチド配列。

20

【0484】

宿主細胞

態様N-1: 態様A-1～態様A-22、態様B-1～態様B-7、態様C-1～態様C-4、態様D-1～態様D-6、態様E-1～態様E-13、態様F-1～態様F-25若しくは態様G-1のいずれかに記載の免疫グロブリン配列、態様H-1～態様H-22のいずれかに記載のナノボディ、態様K-1～態様K-19のいずれかに記載のポリペプチド、態様L-1～態様L-21のいずれかに記載の化合物若しくは構築物(これをコードする核酸配列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ものである)、若しくは態様L-22若しくは態様L-23のいずれかに記載の一価構築物を発現する若しくはこれを好適な状況下で発現することが可能である;及び/又は態様M-1に記載の核酸配列若しくはヌクレオチド配列、若しくは態様M-2に記載の遺伝子構築物を含む、宿主又は宿主細胞。

30

【0485】

組成物

態様O-1: 態様A-1～態様A-22、態様B-1～態様B-7、態様C-1～態様C-4、態様D-1～態様D-6、態様E-1～態様E-13、態様F-1～態様F-25若しくは態様G-1のいずれかに記載の免疫グロブリン配列、態様H-1～態様H-22のいずれかに記載のナノボディ、態様K-1～態様K-19のいずれかに記載のポリペプチド、態様L-1～態様L-21のいずれかに記載の化合物若しくは構築物、態様L-22若しくは態様L-23のいずれかに記載の一価構築物、又は態様M-1若しくは態様M-2に記載の核酸配列若しくはヌクレオチド配列を少なくとも1つ含む、組成物。

40

態様O-2: 薬学的組成物である、態様O-1に記載の組成物。

態様O-3: 薬学的組成物であり、少なくとも1つの薬学的に許容可能な担体、希釈剤若しくは賦形剤及び/又はアジュバントをさらに含み、1つ又は複数のさらなる薬学的に活性のあるポリペプチド及び/又は化合物を任意で含む、態様O-2に記載の組成物。

【0486】

本発明の作用物質及び組成物の製造

態様P-1: 態様A-1～態様A-22、態様B-1～態様B-7、態様C-1～態様C-4、態様D-1～態様D-6、態様E-1～態様E-13、態様F-1～態様F-25

50

若しくは態様 G - 1 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列、態様 H - 1 ~ 態様 H - 2 2 のいずれかに記載のナノボディ、態様 K - 1 ~ 態様 K - 1 9 のいずれかに記載のポリペプチド、態様 L - 1 ~ 態様 L - 2 1 のいずれかに記載の化合物若しくは構築物（これをコードする核酸配列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ものである）、又は態様 L - 2 2 若しくは態様 L - 2 3 のいずれかに記載の一価構築物を製造する方法であって、

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 M - 1 に記載の核酸配列若しくはヌクレオチド配列、又は態様 M - 2 に記載の遺伝子構築物を発現させる工程、

任意でその後

b) そのようにして得られた態様 A - 1 ~ 態様 A - 2 2、態様 B - 1 ~ 態様 B - 7、態様 C - 1 ~ 態様 C - 4、態様 D - 1 ~ 態様 D - 6、態様 E - 1 ~ 態様 E - 1 3、態様 F - 1 ~ 態様 F - 2 5 若しくは態様 G - 1 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列、態様 H - 1 ~ 態様 H - 2 2 のいずれかに記載のナノボディ、態様 K - 1 ~ 態様 K - 1 9 のいずれかに記載のポリペプチド、態様 L - 1 ~ 態様 L - 2 1 のいずれかに記載の化合物若しくは構築物、又は態様 L - 2 2 若しくは態様 L - 2 3 のいずれか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。

態様 P - 2 : 態様 A - 1 ~ 態様 A - 2 2、態様 B - 1 ~ 態様 B - 7、態様 C - 1 ~ 態様 C - 4、態様 D - 1 ~ 態様 D - 6、態様 E - 1 ~ 態様 E - 1 3、態様 F - 1 ~ 態様 F - 2 5 若しくは態様 G - 1 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列、態様 H - 1 ~ 態様 H - 2 2 のいずれかに記載のナノボディ、態様 K - 1 ~ 態様 K - 1 9 のいずれかに記載のポリペプチド、態様 L - 1 ~ 態様 L - 2 1 のいずれかに記載の化合物若しくは構築物（これをコードする核酸配列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ものである）、又は態様 L - 2 2 若しくは態様 L - 2 3 のいずれかに記載の一価構築物を製造する方法であって、

a) 態様 . . . に記載の宿主又は宿主細胞を培養及び/又は維持する工程であって、上記宿主又は上記宿主細胞が態様 A - 1 ~ 態様 A - 2 2、態様 B - 1 ~ 態様 B - 7、態様 C - 1 ~ 態様 C - 4、態様 D - 1 ~ 態様 D - 6、態様 E - 1 ~ 態様 E - 1 3、態様 F - 1 ~ 態様 F - 2 5 若しくは態様 G - 1 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列、態様 H - 1 ~ 態様 H - 2 2 のいずれかに記載のナノボディ、態様 K - 1 ~ 態様 K - 1 9 のいずれかに記載のポリペプチド、態様 L - 1 ~ 態様 L - 2 1 のいずれかに記載の化合物若しくは構築物、又は態様 L - 2 2 若しくは態様 L - 2 3 のいずれかに記載の一価構築物を少なくとも 1 つ発現及び/又は産生するような条件下で、培養及び/又は維持する工程、

任意でその後

b) そのようにして得られた態様 A - 1 ~ 態様 A - 2 2、態様 B - 1 ~ 態様 B - 7、態様 C - 1 ~ 態様 C - 4、態様 D - 1 ~ 態様 D - 6、態様 E - 1 ~ 態様 E - 1 3、態様 F - 1 ~ 態様 F - 2 5 若しくは態様 G - 1 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列、態様 H - 1 ~ 態様 H - 2 2 のいずれかに記載のナノボディ、態様 K - 1 ~ 態様 K - 1 9 のいずれかに記載のポリペプチド、態様 L - 1 ~ 態様 L - 2 1 のいずれかに記載の化合物若しくは構築物、又は態様 L - 2 2 若しくは態様 L - 2 3 のいずれか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。

【0487】

スクリーニングの方法

態様 Q - 1 : 例えば P 2 X 7 等のイオンチャンネルに指向性を有する免疫グロブリン配列をスクリーニングする方法であって、

a) 免疫グロブリン配列をコードする核酸配列のセット、コレクション又はライブラリを用意する工程、

b) 例えば P 2 X 7 等のイオンチャンネルと結合することができ及び/又はこれに対する

10

20

30

40

50

親和性を有し、本発明のナノボディ、例えば配列番号705～配列番号788、より好ましくは配列番号726～配列番号750、配列番号753～配列番号758、配列番号762～配列番号764、配列番号772～配列番号773、配列番号775若しくは配列番号778～配列番号780、より好ましくは配列番号732、配列番号773若しくは配列番号778(表A-1)、又は本発明のポリペプチド若しくは構築物、例えば配列番号789～配列番号791(表A-3を参照されたい)により交差遮断される又はこれを交差遮断する免疫グロブリン配列をコードする核酸配列に関して、核酸配列の上記セット、コレクション又はライブラリをスクリーニングする工程、並びに

c)上記核酸配列を単離する工程であって、その後上記免疫グロブリン配列を発現させる、単離する工程を少なくとも含む、方法。

【0488】

本発明の結合因子の使用

態様R-1:少なくとも1つの[疾患及び障害を挿入]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、態様A-1～態様A-22、態様B-1～態様B-7、態様C-1～態様C-4、態様D-1～態様D-6、態様E-1～態様E-13、態様F-1～態様F-25若しくは態様G-1のいずれかに記載の免疫グロブリン配列、態様H-1～態様H-22のいずれかに記載のナノボディ、態様K-1～態様K-19のいずれかに記載のポリペプチド、態様L-1～態様L-21のいずれかに記載の化合物若しくは構築物、態様L-22若しくは態様L-23のいずれかに記載の一価構築物;又は態様O-2若しくは態様O-3に記載の組成物を少なくとも1つ、それを必要とする被験体に投与することを含む、方法。

態様R-2:例えばP2X7等のイオンチャンネルと、その生物学的活性若しくは薬理学的活性と、及び/又は例えばP2X7等のイオンチャンネル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、態様A-1～態様A-22、態様B-1～態様B-7、態様C-1～態様C-4、態様D-1～態様D-6、態様E-1～態様E-13、態様F-1～態様F-25若しくは態様G-1のいずれかに記載の免疫グロブリン配列、態様H-1～態様H-22のいずれかに記載のナノボディ、態様K-1～態様K-19のいずれかに記載のポリペプチド、態様L-1～態様L-21のいずれかに記載の化合物若しくは構築物、態様L-22若しくは態様L-23に記載の一価構築物;又は態様O-2若しくは態様O-3に記載の組成物を少なくとも1つ、それを必要とする被験体に投与することを含む、方法。

態様R-3:態様A-1～態様A-22、態様B-1～態様B-7、態様C-1～態様C-4、態様D-1～態様D-6、態様E-1～態様E-13、態様F-1～態様F-25若しくは態様G-1のいずれかに記載の免疫グロブリン配列、態様H-1～態様H-22のいずれかに記載のナノボディ、態様K-1～態様K-19のいずれかに記載のポリペプチド、態様L-1～態様L-21のいずれかに記載の化合物若しくは構築物、態様L-22若しくは態様L-23に記載の一価構築物;又は態様O-2若しくは態様O-3に記載の組成物を少なくとも1つ、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、態様A-1～態様A-22、態様B-1～態様B-7、態様C-1～態様C-4、態様D-1～態様D-6、態様E-1～態様E-13、態様F-1～態様F-25若しくは態様G-1のいずれかに記載の免疫グロブリン配列、態様H-1～態様H-22のいずれかに記載のナノボディ、態様K-1～態様K-19のいずれかに記載のポリペプチド、態様L-1～態様L-21のいずれかに記載の化合物若しくは構築物、態様L-22若しくは態様L-23に記載の一価構築物;又は態様O-2若しくは態様O-3に記載の組成物を少なくとも1つ、それを必要とする被験体に投与することを含む、方法。

態様R-4:免疫療法のための方法であって、薬学的に活性のある量の、態様A-1～態

10

20

30

40

50

様 A - 2 2、態様 B - 1 ~ 態様 B - 7、態様 C - 1 ~ 態様 C - 4、態様 D - 1 ~ 態様 D - 6、態様 E - 1 ~ 態様 E - 1 3、態様 F - 1 ~ 態様 F - 2 5 若しくは態様 G - 1 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列、態様 H - 1 ~ 態様 H - 2 2 のいずれかに記載のナノボディ、態様 K - 1 ~ 態様 K - 1 9 のいずれかに記載のポリペプチド、態様 L - 1 ~ 態様 L - 2 1 のいずれかに記載の化合物若しくは構築物、態様 L - 2 2 若しくは態様 L - 2 3 に記載の一価構築物；又は態様 O - 2 若しくは態様 O - 3 に記載の組成物を少なくとも1つ、それを必要とする被験体に投与することを含む、方法。

態様 R - 5：少なくとも1つの[疾患及び障害を挿入]の予防及び/若しくは治療のための薬学的組成物の調製における、並びに/又は態様 R - 1 ~ 態様 R - 3 に記載の方法の1つ又は複数における使用のための、態様 A - 1 ~ 態様 A - 2 2、態様 B - 1 ~ 態様 B - 7、態様 C - 1 ~ 態様 C - 4、態様 D - 1 ~ 態様 D - 6、態様 E - 1 ~ 態様 E - 1 3、態様 F - 1 ~ 態様 F - 2 5 若しくは態様 G - 1 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列、態様 H - 1 ~ 態様 H - 2 2 のいずれかに記載のナノボディ、態様 K - 1 ~ 態様 K - 1 9 のいずれかに記載のポリペプチド、態様 L - 1 ~ 態様 L - 2 1 のいずれかに記載の化合物若しくは構築物、又は態様 L - 2 2 若しくは態様 L - 2 3 に記載の一価構築物の使用。

態様 R - 6：イオンチャネルが或る役割を果たす又はイオンチャネルが関与する少なくとも1つの疾患又は障害の予防及び/又は治療のための、態様 A - 1 ~ 態様 A - 2 2、態様 B - 1 ~ 態様 B - 7、態様 C - 1 ~ 態様 C - 4、態様 D - 1 ~ 態様 D - 6、態様 E - 1 ~ 態様 E - 1 3、態様 F - 1 ~ 態様 F - 2 5 若しくは態様 G - 1 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列、態様 H - 1 ~ 態様 H - 2 2 のいずれかに記載のナノボディ、態様 K - 1 ~ 態様 K - 1 9 のいずれかに記載のポリペプチド、態様 L - 1 ~ 態様 L - 2 1 のいずれかに記載の化合物若しくは構築物、態様 L - 2 2 若しくは態様 L - 2 3 に記載の一価構築物；又は態様 O - 2 若しくは態様 O - 3 に記載の組成物。

【0489】

断片の態様

態様 S - 1：態様 A - 1 ~ 態様 A - 2 2、態様 B - 1 ~ 態様 B - 7、態様 C - 1 ~ 態様 C - 4、態様 D - 1 ~ 態様 D - 6、態様 E - 1 ~ 態様 E - 1 3、態様 F - 1 ~ 態様 F - 2 5 若しくは態様 G - 1 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列の、又は態様 H - 1 ~ 態様 H - 2 2 のいずれかに記載のナノボディの、部分又は断片。

態様 S - 2：例えば P 2 X 7 等のイオンチャネルと特異的に結合することができる、態様 S - 1 に記載の部分又は断片。

態様 S - 3： 10^{-5} モル/L ~ 10^{-12} モル/L 以下、及び好ましくは 10^{-7} モル/L ~ 10^{-12} モル/L 以下、及びより好ましくは 10^{-8} モル/L ~ 10^{-12} モル/L の解離定数 (K_D) で例えば P 2 X 7 等のイオンチャネルと特異的に結合することができる、態様 S - 1 又は態様 S - 2 に記載の部分又は断片。

態様 S - 4： 10^2 $M^{-1} s^{-1}$ ~ 約 10^7 $M^{-1} s^{-1}$ 、好ましくは 10^3 $M^{-1} s^{-1}$ ~ 10^7 $M^{-1} s^{-1}$ 、より好ましくは 10^4 $M^{-1} s^{-1}$ ~ 10^7 $M^{-1} s^{-1}$ (10^5 $M^{-1} s^{-1}$ ~ 10^7 $M^{-1} s^{-1}$ 等) の結合速度 (k_{on} 速度) で例えば P 2 X 7 等のイオンチャネルと特異的に結合することができる、態様 S - 1 ~ 態様 S - 3 のいずれかに記載の部分又は断片。

態様 S - 5： $1 s^{-1}$ ~ $10^{-6} s^{-1}$ 、好ましくは $10^{-2} s^{-1}$ ~ $10^{-6} s^{-1}$ 、より好ましくは $10^{-3} s^{-1}$ ~ $10^{-6} s^{-1}$ ($10^{-4} s^{-1}$ ~ $10^{-6} s^{-1}$ 等) の解離速度 (k_{off} 速度) で例えば P 2 X 7 等のイオンチャネルと特異的に結合することができる、態様 S - 1 ~ 態様 S - 4 のいずれかに記載の部分又は断片。

態様 S - 6：態様 S - 1 ~ 態様 S - 4 のいずれかに記載の1つ又は複数の部分又は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された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。

態様 S - 7：上記1つ又は複数の他の基、残基、部分又は結合単位が免疫グロブリン配列である、態様 S - 6 に記載の化合物又は構築物。

態様 S - 8：上記1つ又は複数のリンカーが存在する場合、該リンカーが1つ又は複数の

10

20

30

40

50

免疫グロブリン配列である、態様 S - 6 又は態様 S - 7 に記載の化合物又は構築物。

態様 S - 9 : 態様 S - 1 ~ 態様 S - 7 のいずれかに記載の部分若しくは断片、又は態様 S - 8 に記載の化合物若しくは構築物をコードする、核酸配列又はヌクレオチド配列。

態様 S - 10 : 態様 S - 1 ~ 態様 S - 7 のいずれかに記載の部分若しくは断片、態様 S - 6 ~ 態様 S - 8 のいずれかに記載の化合物若しくは構築物、又は態様 S - 9 に記載の核酸配列若しくはヌクレオチド配列を少なくとも1つ含む、組成物。

【0490】

誘導体の態様

態様 T - 1 : 態様 A - 1 ~ 態様 A - 22、態様 B - 1 ~ 態様 B - 7、態様 C - 1 ~ 態様 C - 4、態様 D - 1 ~ 態様 D - 6、態様 E - 1 ~ 態様 E - 13、態様 F - 1 ~ 態様 F - 25 若しくは態様 G - 1 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列の、又は態様 H - 1 ~ 態様 H - 22 のいずれかに記載のナノボディの、誘導体。

10

態様 T - 2 : 例えば P2X7 等のイオンチャネルと特異的に結合することができる、態様 T - 1 に記載の誘導体。

態様 T - 3 : 10^{-5} モル/L ~ 10^{-12} モル/L 以下、及び好ましくは 10^{-7} モル/L ~ 10^{-12} モル/L 以下、及びより好ましくは 10^{-8} モル/L ~ 10^{-12} モル/L の解離定数 (K_D) で例えば P2X7 等のイオンチャネルと特異的に結合することができる、態様 T - 1 又は態様 T - 2 に記載の誘導体。

態様 T - 4 : $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ~ 約 $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、好ましくは $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ~ $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、より好ましくは $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ~ $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ($10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ~ $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 等) の結合速度 (k_{on} 速度) で例えば P2X7 等のイオンチャネルと特異的に結合することができる、態様 T - 1 ~ 態様 T - 3 のいずれかに記載の誘導体。

20

態様 T - 5 : 1 s^{-1} ~ 10^{-6} s^{-1} 、好ましくは 10^{-2} s^{-1} ~ 10^{-6} s^{-1} 、より好ましくは 10^{-3} s^{-1} ~ 10^{-6} s^{-1} (10^{-4} s^{-1} ~ 10^{-6} s^{-1} 等) の解離速度 (k_{off} 速度) で例えば P2X7 等のイオンチャネルと特異的に結合することができる、態様 T - 1 ~ 態様 T - 4 のいずれかに記載の誘導体。

態様 T - 6 : 態様 K - 1 ~ 態様 K - 19 のいずれかに記載のポリペプチド、又は態様 L - 1 ~ 態様 L - 23 のいずれかに記載の化合物若しくは構築物の、誘導体。

態様 T - 7 : 例えば P2X7 等のイオンチャネルと特異的に結合することができる、態様 T - 6 に記載の誘導体。

30

態様 T - 8 : 10^{-5} モル/L ~ 10^{-12} モル/L 以下、及び好ましくは 10^{-7} モル/L ~ 10^{-12} モル/L 以下、及びより好ましくは 10^{-8} モル/L ~ 10^{-12} モル/L の解離定数 (K_D) で例えば P2X7 等のイオンチャネルと特異的に結合することができる、態様 T - 6 又は態様 T - 7 に記載の誘導体。

態様 T - 9 : $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ~ 約 $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、好ましくは $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ~ $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、より好ましくは $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ~ $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ($10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ~ $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 等) の結合速度 (k_{on} 速度) で例えば P2X7 等のイオンチャネルと特異的に結合することができる、態様 T - 6 ~ 態様 T - 8 のいずれかに記載の誘導体。

40

態様 T - 10 : 1 s^{-1} ~ 10^{-6} s^{-1} 、好ましくは 10^{-2} s^{-1} ~ 10^{-6} s^{-1} 、より好ましくは 10^{-3} s^{-1} ~ 10^{-6} s^{-1} (10^{-4} s^{-1} ~ 10^{-6} s^{-1} 等) の解離速度 (k_{off} 速度) で例えば P2X7 等のイオンチャネルと特異的に結合することができる、態様 T - 6 ~ 態様 T - 9 のいずれかに記載の誘導体。

態様 T - 11 : 対応する態様 A - 1 ~ 態様 A - 22、態様 B - 1 ~ 態様 B - 7、態様 C - 1 ~ 態様 C - 4、態様 D - 1 ~ 態様 D - 6、態様 E - 1 ~ 態様 E - 13、態様 F - 1 ~ 態様 F - 25 若しくは態様 G - 1 のいずれかに記載の免疫グロブリン配列それ自体、態様 H - 1 ~ 態様 H - 22 のいずれかに記載のナノボディそれ自体、態様 K - 1 ~ 態様 K - 19 のいずれかに記載のポリペプチド、又は態様 L - 1 ~ 態様 L - 23 のいずれかに記載の化合物若しくは構築物それ自体の半減期より少なくとも1.5倍、好ましくは少なくとも2

50

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T-1～態様T-10のいずれかに記載の誘導体。

態様T-12：それぞれ対応する態様A-1～態様A-22、態様B-1～態様B-7、態様C-1～態様C-4、態様D-1～態様D-6、態様E-1～態様E-13、態様F-1～態様F-25若しくは態様G-1のいずれかに記載の免疫グロブリン配列それ自体、態様H-1～態様H-23のいずれかに記載のナノボディそれ自体、態様K-1～態様K-19のいずれかに記載のポリペプチド、又は態様L-1～態様L-23のいずれかに記載の化合物若しくは構築物それ自体と比較して、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、又はさらには24時間超、48時間超若しくは72時間超増大した血清半減期を有する、態様T-1～態様T-11のいずれかに記載の誘導体。

10

態様T-13：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；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）、又は少なくとも約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T-1～態様T-12のいずれかに記載の誘導体。

態様T-14：ペグ化誘導体である、態様T-1～態様T-13のいずれかに記載の誘導体。

20

態様T-15：態様T-1～態様T-14のいずれかに記載の1つ又は複数の誘導体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された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。

態様T-16：上記1つ又は複数の他の基、残基、部分又は結合単位が免疫グロブリン配列である、態様T-15に記載の化合物又は構築物。

態様T-17：上記1つ又は複数のリンカーが存在する場合、該リンカーが1つ又は複数の免疫グロブリン配列である、態様T-16に記載の化合物又は構築物。

態様T-18：態様T-16又は態様T-17に記載の化合物又は構築物をコードする、核酸。

態様T-19：態様T-1～態様T-14のいずれかに記載の誘導体、態様T-15～態様T-17のいずれかに記載の化合物若しくは構築物、又は態様T-18に記載の核酸配列若しくはヌクレオチド配列を少なくとも1つ含む、組成物。

30

【0491】

特に好ましい態様

1. 細胞関連抗原と結合することができる及び/又はこれに対する親和性を有する免疫グロブリン配列を生成する方法であって、

a) 非ヒト動物に、上記細胞関連抗原又は上記細胞関連抗原のドメイン若しくは特定部分をコードする核酸を遺伝子ワクチン接種する工程、並びに

b) 任意で、該細胞関連抗原を発現する天然細胞若しくはトランスフェクト細胞を含む細胞、細胞由来の膜抽出物、豊富な抗原を内包する小胞若しくは任意の他の膜誘導体、リポソーム、又は該細胞関連抗原を発現するウイルス粒子から選択される、その天然立体構造の上記抗原により該動物を追加免疫する工程、

40

c) 上記細胞関連抗原と結合することができる及び/又はこれに対する親和性を有する免疫グロブリン配列に関して、上記非ヒト動物に由来する免疫グロブリン配列のセット、コレクション又はライブラリをスクリーニングする工程を含む、方法。

2. 上記細胞関連抗原が、膜貫通抗原、例えばGPCR又はイオンチャネルを含むがこれらに限定されない多重貫通ドメインを有する膜貫通抗原から選択される、態様1に記載の方法。

3. 上記非ヒト動物が、脊椎動物、例えばサメ、トカゲ及び哺乳動物、より具体的にはラ

50

クダ科動物、例えばラマ及びアルパカから選択される、態様 1 又は 2 に記載の方法。

4 . 非ヒト動物がラクダ科動物又はラマである、態様 1 ~ 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

5 . 上記免疫グロブリン配列が軽鎖可変ドメイン配列又は重鎖可変ドメイン配列である、態様 1 ~ 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

6 . 免疫グロブリン配列が、従来の四本鎖抗体に由来する重鎖可変ドメイン配列、又は重鎖抗体に由来する重鎖可変ドメイン配列である、態様 5 に記載の方法。

7 . 免疫グロブリン配列が、ドメイン抗体 (又はドメイン抗体としての使用に好適な免疫グロブリン配列)、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免疫グロブリン配列)、*「d A b」* (又は *d A b* としての使用に好適な免疫グロブリン配列)、又はナノボディ ($V_{H H}$ 配列を含むがこれに限定されない) (又はナノボディとしての使用に好適な免疫グロブリン配列) である、態様 1 ~ 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

8 . 免疫グロブリン配列がナノボディである、態様 7 に記載の方法。

9 . ワクチン接種を、無針ジェット注射により、パルスティック法により、タトゥーのような針による注射により、局所適用により、又は任意の DNA 投与方法、その後の *i n v i v o* エレクトロポレーションにより行う、態様 1 ~ 8 のいずれか 1 つに記載の方法。

10 . ワクチン接種を、DNA の皮内投与、筋肉内投与又は皮下投与により行う、態様 1 ~ 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

11 . 免疫グロブリン配列の該セット、コレクション又はライブラリを、上記非ヒト哺乳動物のこれらの免疫グロブリン配列をコードする細胞を内包する血液、リンパ節、脾臓、骨髓、又は任意の組織から得る、態様 1 ~ 10 のいずれか 1 つに記載の方法。

12 . 上記細胞関連抗原を、その未変性の立体構造の標的の発現が可能である任意の細胞、例えばこれらに限定されないが、*C h o*、*C o s 7*、*H e k 2 9 3*、又はラクダ科動物由来細胞、例えばラマ由来細胞若しくはアルパカ由来細胞から選択される細胞で発現させる、態様 1 ~ 11 のいずれか 1 つに記載の方法。

13 . 上記細胞関連抗原が、膜貫通抗原、例えば *G P C R* 及び / 又はイオンチャネル等である、態様 1 ~ 12 のいずれか 1 つに記載の方法。

14 . 上記抗原が、*C X C R 7*、*C X C R 4* 及び / 又は *P 2 X 7* から選択される、態様 1 ~ 13 のいずれか 1 つに記載の方法。

15 . 免疫グロブリン配列の該セット、コレクション又はライブラリを、細胞又はウイルスのセット、コレクション又はサンプルで発現させ、上記細胞関連抗原と結合することができる及び / 又はこれに対する親和性を有する免疫グロブリン配列を発現する細胞に関して、細胞の上記セット、コレクション又はサンプルをスクリーニングする、態様 1 ~ 14 のいずれかに記載の方法。

16 . 上記細胞関連抗原と結合することができる及び / 又はこれに対する親和性を有する免疫グロブリン配列をコードする核酸配列を該細胞又は該ウイルスから精製及び / 又は単離した後、上記免疫グロブリン配列を発現させる、態様 15 に記載の方法。

17 . 免疫グロブリン配列の該セット、コレクション又はライブラリが核酸配列のセット、コレクション又はライブラリによってコードされ、上記細胞関連抗原と結合することができる及び / 又はこれに対する親和性を有する免疫グロブリン配列をコードする核酸配列に関して、核酸配列の上記セット、コレクション又はライブラリをスクリーニングする、態様 1 ~ 16 のいずれかに記載の方法。

18 . 上記細胞関連抗原と結合することができる及び / 又はこれに対する親和性を有する免疫グロブリン配列をコードする該核酸配列を精製及び / 又は単離した後、上記免疫グロブリン配列を発現させる、態様 17 に記載の方法。

19 . 上記細胞関連抗原と結合することができる及び / 又はこれに対する親和性を有する該免疫グロブリン配列を精製及び / 又は単離する、態様 1 ~ 18 のいずれか 1 つに記載の方法。

20 . 態様 1 ~ 19 のいずれか 1 つの方法により取得可能な免疫グロブリン。

21 . 態様 1 ~ 19 のいずれか 1 つの方法により取得可能な、イオンチャネルに指向性を

10

20

30

40

50

有する免疫グロブリン。

22. イオンチャネルのアンタゴニスト（部分又は完全）である、態様21に記載の免疫グロブリン。

23. イオンチャネルのアゴニスト（部分又は完全）である、態様21に記載の免疫グロブリン。

24. 態様1～19のいずれか1つの方法により取得可能な、P2X7に指向性を有する免疫グロブリン。

25. 態様20～24のいずれかに記載の免疫グロブリン配列を含む組成物。

【0492】

図1. Pig-jet（パネルA）又はタトゥー法（パネルB）による遺伝子ワクチン接種後のラマにおける体液性免疫応答の動態を示す図である。

図2. DNAワクチン接種したラマでの単一のHBsAgタンパク質追加免疫の効果を示す図である。グラフの注釈は図1と同じである。

図3. タンパク質免疫付与（ラマ32及びラマ33）に対する「DNA」初回刺激（prime：プライム）-「タンパク質」追加免疫（boost：ブースト）プロトコル（ラマ124、ラマ160、ラマ117、ラマ203）で得られた体液性免疫応答を示す図である。

図4. HBsAgに対する重鎖抗体（IgG2及びIgG3）媒介性の抗体応答を示す図である。

【実施例】

【0493】

実施例1. ラマの遺伝子免疫付与、及びモデル抗原としてB型肝炎小型表面抗原を用いた免疫グロブリン配列の同定

標的特異的ラクダ科動物の免疫グロブリン配列を、DNAワクチン接種に続いて同定した。B型肝炎小型表面抗原をモデル抗原として選択した（このタンパク質は動物において遺伝子免疫付与後に体液性免疫応答を誘導するのに広く使用されているためである）。

【0494】

実施例1.1. 遺伝子免疫付与のためのプラスミドの生成及び調製

B型肝炎小型表面抗原（HBsAg）をコードする真核生物発現ベクターpRc/CMV-Hbs（複数可）は、Aldevronから入手する。発現は構成的サイトメガロウイルス（CMV）プロモーターの制御下である。得られた構築物の配列を配列解析によって検証した。

【0495】

プラスミドDNAを、製造業者の取扱説明書に従ってエンドトキシンフリーGigaprepキット（Qiagen）を用いて作製する。ベクターDNAを最後にエンドトキシンフリーLAL H₂O中、又はエンドトキシンフリー0.9%NaClのLAL H₂O溶液中1mg/mLの濃度で再構築する。プラスミドは-20℃で一定分量で保管する。使用前にプラスミドDNA溶液を遠心分離して、可能な限り凝集物を除去する。

【0496】

実施例1.2. 異なるDNA投与方法に続く遺伝子免疫付与によるラクダ科動物における体液性免疫応答の誘導

獣医学部倫理委員会（ゲント大学、Belgium）の認可の後、4頭のラマ（124、160、117及び203）に2つの遺伝子免疫付与方法を用いて免疫付与し、抗原特異的体液性応答を誘導した。どちらの方法についてもDNAは皮内（ID）適用した。第1のDNA投与方法は無針ジェット注射からなるものであり、第2のDNA投与方法はタトゥー法（Bins et al. 2005. Nature Medicine 11:899-904）に従うものであった。

【0497】

DNA適用の前に、ラマの皮膚の肩甲骨より上のおよそ200cm²～240cm²の領域を剪毛し、皮膚を市販の脱毛クリーム（Veet）で2分間処理して、残った全ての毛及び角質層の一部を化学的に除去し、剪毛した領域を水ですすぐことによって十分に清浄にした。第1の方法については、DNAはPig-jet装置（Endoscopic）を用いて皮膚

10

20

30

40

50

内に投与する（ラム124及びラム160）。マルチノズルヘッドによって5つの隣接するスポットに同時に0.04mlずつDNA溶液を分散させるが、注射による水疱又は丘疹が皮膚に2時間ほど残る。したがって、（0日目、14日目、28日目及び57日目に）ラムに与えられる各用量（1mgのDNA）によって、25個の注射による水疱が生じた。短間隔タトゥー法については、短間隔計画を使用した。ラム117及びラム203に麻酔をかけ、DNA適用領域を0日目、3日目、7日目（間隔1）、21日目、24日目、28日目（間隔2）、56日目、59日目及び63日目（間隔3）にタトゥーイングする3つの部分に分けた。1mg/mlのDNAの液滴を適用し、市販のタトゥー装置（magnum 9 formation needle）を用いて皮膚内に0.5mmの深さで、1期間につき少なくとも10分間、およそ80cm²の表面上にタトゥーを入れた。投与されるDNAの用量は1.33mg（間隔1及び間隔2）及び4mg（間隔3）である。全てのラムについて、免疫付与の間に一定間隔で少量の血液試料を回収し、ELISAにより血清変換をモニタリングする。

10

【0498】

DNAワクチン接種後にラムがHBsAg特異的体液性免疫応答を誘導したか否かを検証するために、400倍希釈の免疫前血清及び免疫血清を用いてELISAを実行した。つまり、1µg/mlの組み換えHBsAg（Aldevron）を96ウェルMaxisorpプレート（Nunc）に4で一晚固定化する。ウェルをカゼイン溶液（PBS中1%）でブロッキングする。血清希釈物を添加した後、特異的に結合した免疫グロブリンを、ヤギ抗ラムIgGセイヨウワサビペルオキシダーゼ複合体（Bethyl Lab. Inc., Montgomery, TX）を用いて検出する。図1.1に示す結果から、両方のラム（124及び160）に対するジェット注射法について、規模は様々であるが明らかな標的特異的血清変換が検出される（0日目対80日目）ことが実証される（図1.1のパネルA、パネルB）。3回目にタトゥーを入れた後、応答の規模はジェット注射と比べると小さいが、同様の傾向がラム117及びラム203について実証される（図1.1のパネルA、パネルC）。

20

【0499】

実施例1.3. HBsAgタンパク質によるDNA初回刺激したラクダ科動物の追加免疫は、重鎖抗体媒介性応答を含む抗原特異的血清変換を増大させた

85日目に、アジュバントとしてStimune（CEDIDiagnostics, Lelystad, The Netherlands）を用いた50µgの精製HBsAgの単回追加免疫を、4頭全てのラムの頸部に筋内（IM）投与し、少量の血清試料を回収した。4頭全ての動物の免疫応答の評価を、先の実施例に記載されるようにELISAによって行ったが、4頭全ての動物について単回HBsAg追加免疫によって強い二次応答が誘導されることが示された（図1.2）。この「DNA」初回刺激 - 「タンパク質」追加免疫アプローチの後、HBsAgタンパク質のみを注射した免疫付与方法（ラム32及びラム33；毎週のIM頸部注射を6回；Stimuneをアジュバントとして用い、1回の注射当たり100µg～50µgのタンパク質という用量）と比べて、同様の抗原特異的血清力価が生じた。結果を図1.3に示す。結合したラム免疫グロブリンが、ラムIgG1通常抗体、又は重鎖のみのラムIgG2抗体及びIgG3抗体を特異的に認識するモノクローナル抗体で検出されたため、抗体応答は通常抗体及び重鎖抗体を発現するB細胞レパートリーのどちらによっても増加した（図1.4）（Daley et al., Clin Diagn Lab Immunol. 2005 Mar; 12(3): 380-6）。

30

40

【0500】

実施例1.4. ラクダ科動物におけるDNAを用いたHBsAgに対する免疫応答の初回刺激は、in vivo成熟抗原特異的ナノボディを同定するのに十分である

B細胞を含有する150mLの血液試料を、ラム124及びラム117（それぞれPig-jet DNA適用及びタトゥーDNA適用の後に最も高い血清変換を示すラム）から、最後のDNA投与とHBsAgタンパク質追加免疫との間に回収した。続いて、末梢血リンパ球（PBL）を、製造業者の取扱説明書に従ったFicoll-Paque（Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden）での密度勾配遠心分離法によって精製した。

50

【0501】

全RNAを抽出し、cDNAを調製して、以前に記載されている（例えば、国際公開第02/085945号及び国際公開第04/049794号）ようにネステッドPCRによってナノボディレパートリーを増幅した。PCR産物をSfiI（ネステッドPCRによってFR1プライマー領域に導入した）及びBstEII（FR4に自然発生する制限部位）で消化し、ゲル電気泳動の後、およそ350bpのDNA断片をゲルから精製した。330ngの増幅したナノボディレパートリーを、SfiI-BstEIIで消化した1µgのファージディスプレイベクター（pAX50）の対応する制限部位とライゲーションして、大腸菌TG1のエレクトロポレーションの後ライブラリを得た。pAX50はLacZプロモーター、大腸菌ファージpIII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抵抗性遺伝子、マルチクロニング部位（SfiI制限部位及びBstEII制限部位を内包する）、並びにgene3及びエルウィニア・カトボラpelBモチーフからなるキメラリーダー配列を含有する。このディスプレイベクターは、個々のナノボディをc-Myc、His6タグ及びgeneIII産物との融合タンパク質として発現するファージ粒子の作製を可能にする。ラマ124及びラマ117の免疫組織に由来するライブラリのサイズは、それぞれ 1×10^8 CFU及び 3×10^7 CFUであった。ライブラリの品質管理のため、各々のライブラリのランダムに選んだ24個のコロニーに対するM13リバースプライマー及びgeneIIIプライマーを用いたコロニーPCRによって、正確なサイズの挿入断片の割合がそれぞれ91%及び100%であると求められた。

10

20

【0502】

ライブラリを、細菌を対数期（ $OD_{600} = 0.5$ ）まで培養することによってレスキューし、その後のヘルパーファージでの感染によって、クローニングナノボディのレパートリーをファージの先端でpIII融合タンパク質として発現する組み換えファージを得た。ファージを濾過滅菌後にさらなる使用のために4で保管した。

【0503】

HBsAg特異的ナノボディを、以下のように単回のパニングの後選択した。組み換えHBsAg（Aldevron）を、Maxisorp96ウェルプレート（Nunc, Wiesbaden, Germany）に1ウェル当たり500ng及び50ngで直接固定化した。ファージライブラリとの2時間のインキュベーション及び十分な洗浄の後、結合したファージをトリプシン（1mg/ml）を用いて室温で15分間溶出させた。プロテアーゼ活性は、100µlのファージ溶出物に5µlの16mM ABSEFプロテアーゼ阻害剤を添加することによって阻害された。全ての選択条件において、非HBsAgコーティングウェルから溶出した溶出ファージの数と比較して、HBsAg固定化ウェルからより多数の溶出ファージが観察され、HBsAg特異的ナノボディの濃縮が示される。各々の選択のアウトプットを、対数的に増殖した大腸菌TG1に37で30分間再感染させ、適切な希釈物を固形培地（2%グルコース及びアンピシリンを含有するLB）上で一晩培養して、単一のコロニーを得た。個々のコロニーをHBsAg濃縮選択アウトプットから取り出し、96ディープウェルプレート（1ml容）で培養して、IPTGを添加することによってナノボディ発現を誘導した。ペリプラズム抽出物（PE）を標準的な方法に従って80µlの容量で調製した。

30

40

【0504】

合計188個の10倍希釈のPE（ラマ124に由来するPEが94個及びラマ117に由来するPEが94個）を、固相にコーティングしたHBsAgとの特異的結合について、マウス抗Mycモノクローナル抗体及び後続工程で抗マウスHRP結合検出抗体を用いて、ELISAによってスクリーニングした。バックグラウンド（非コーティングウェル）の最低2倍のシグナルを示すペリプラズム抽出物を陽性とスコア付けし、対応するナノボディクローンをシークエンシングした。ライブラリ124及びライブラリ117については、クローンのそれぞれ68%及び4%が陽性であるとスコア付けされた。配列解析によって、5個のHBsAg特異的ナノボディファミリーが同定され（ラマ124から3

50

個及びラマ117から2個；配列番号は表1.1)、ファミリーの代表例は、ラマ124からHBSAGPMP2E7(ファミリー1)、HBSAGPMP2E12(ファミリー2)及びHBSAGPMP2A4(ファミリー3)、並びにラマ117からHBSAGPMP1C6(ファミリー4)及びHBSAGPMP1E11(ファミリー5)である。

【0505】

実施例1.5. DNAワクチン接種したラマから単離したナノボディは、タンパク質免疫付与したラマから同定されたものと同様の解離速度を示す

血漿由来HBsAg粒子(Biodesign)を、表面プラズモン共鳴CM5センサーチップ(BIACore)に11000RUの密度で固定化した。チップ表面の再生は、0.1M HClを45 μ l/分の流速で5秒間流すことによって行った。ペリプラズムナノボディ抽出物を注入し、解離速度を評価した(Biacore)。データは参照チャンネル、及びブランクの泳動バッファー注入の曲線を減算することによって二重参照した。処理した曲線を、Biacore T100 Evaluationソフトウェアv1.1.1及びBiacore Evaluationソフトウェアv4.1において1:1解離モデルを結合曲線に適合することによって評価した。HBSAGPMP2E7、HBSAGPMP2E12の解離速度は、それぞれ $8.8 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 及び $1.3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ と算出された。これらの解離速度は、ラマ32及びラマ33から得られたライブラリに対する選択後に同定されたHBsAg特異的ナノボディについて得られたもの(解離速度 $6.0 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1} \sim 1.7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$)と同様であり(Serruys et al. 2009 Hepatology 49(1):39-49)、遺伝子免疫付与によって得られたナノボディの親和性が、タンパク質免疫付与によって同定されたナノボディと異なることが示される。

【0506】

表1.1: 配列:

10

20

【表 2 6】

名称	配列番号	免疫グロブリン配列
PHbsAgPMP2E7	700	EVQLVESGGGLLQAGGSLRRLSCAASERAFIYG KAWFRQAPGKEREFVAGINWNGGDLHYADSVK GRFTISRDNNTNNVYVYLQMNSLKSEDTAVYYCAV RRGTAYETDVSSYEWGTQVTVSS
PHbsAgPMP2E12	701	EVQLVESGGGLVQAGGSLRRLSCAASGRSISEYA MGWFRQAPGQEREFVASISTSGGSTTYADSVK GRFIISRDNKNTVYVYLQMNSLKPEDTAVYYCAR YNGWMYAGTMGVHFGQGTQVTVSS
PHbsAgPMP2A4	702	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGSIDSINR MGWYRQAPGKQRELVASSTSGGSTDYADSVK GRFTISRDNKNTVYVYLQMNSLKPEDTAVYYCNF RGSYYSYGYDYGKGLTVTVSS
PHbsAgPMP1C6	703	KVQLVESGGGWVVRTGGSMRLSCAASGRTSSG SAMGWFRQAPGKERVFVAASWGGAYTDYADS VKGRFTISRDNWRNTVDLQMNMLKPEDTAVYY CADGGSTWYEPTESDFGSWGQGTQVTVSS
PHbsAgPMP1E11	704	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGSRDRLN VMGWYRQAPGKERDLVATMTAGGSTNYADSV KGRFTISRDIANMVYVYLQMNSLKPEDTAVYYCNGI TASWYSGSYNNYWGQGTQVTVSS

10

20

【 0 5 0 7 】

実施例 2 . 遺伝子免疫付与による G タンパク質共役受容体に対するナノボディの同定 30

複数の膜貫通ドメインを内包する膜結合標的に対する遺伝子免疫付与の実行可能性を実証するために、ヒトケモカイン受容体 CXCR4 を第 1 の例として選択した。

【 0 5 0 8 】

実施例 2 . 1 . 遺伝子免疫付与に好適な CXCR4 をコードするベクターの生成

ヒトケモカイン受容体 CXCR4 をコードする cDNA (NM_003467) を Open Biosystems から購入した。制限部位 NheI (5' 末端) 及び XhoI (3' 末端) の PCR 媒介性導入の後、単位複製配列を pVAX-1 (Invitrogen) 及び pCDNA3.1 (Invitrogen) の対応する部位にクローニングした。得られた pVAX1-CXCR4 及び pCDNA3.1-CXCR4 の配列完全性を配列解析によって検証した。ベクター pVAX1 は遺伝子免疫付与に使用するように設計されたものであり、ヒトサイトメガロウイルス (CMV) プロモーターを内包する。pVAX1 は大腸菌における高コピー数の複製、並びに *in vitro* 及び *in vivo* の両方で、大抵の哺乳動物細胞における対象となるタンパク質の一時的な高レベルの発現を可能にする。ミリグラム量のエンドトキシンフリー pVAX1-CXCR4 プラスミドを作製し、LAL H₂O 中 0.9% 生理食塩水に 2 mg/mL の濃度まで溶解し、-20 で保管した。

40

【 0 5 0 9 】

実施例 2 . 2 . pVAX1-CXCR4 トランスフェクト細胞は、機能的 CXCR4 受容体を発現する

ヒト CXCR4 の機能的発現を検証するために、エンドトキシンフリー pVAX1-CXCR4 プラスミドを、HEK293 細胞に Fugene (Roche) を用いて一時的にト

50

ランスフェクトし、*in vitro*で細胞外発現をフローサイトメトリーによってモニタリングした。ヒトCXCR4特異的モノクローナル抗体12G5 (R&D SystemsのMAB170)、その後PE標識ヤギ抗マウスIgG検出抗体 (Jackson ImmunoResearch Inc.、カタログ番号115-115-164) を検出抗体として使用した。この方法によって、非ランスフェクトHEK293細胞に比べて38倍のランスフェクトpVAX1-hCXCR4/HEK293細胞の蛍光強度シフトが示された (図2.1、パネルA)。細胞表面での機能的CXCR4の存在は、親HEK293細胞ではなくCXCR4ランスフェクトHEK293細胞への、そのビオチン化リガンドCXCL12/SDF-1a (R&D Systems、Human CXCL12/SDF-1 Biotinylated Fluorokine Kit NNS00) の結合によって、製造業者の手順に従って確認した (図示せず)。

10

【0510】

実施例2.3. 安定にランスフェクトしたCXCR4ラクダ科動物細胞の生成

安定なCXCR4細胞株の生成のために、pCDNA3.1-hCXCR4プラスミドを、不死化ラクダ腎臓 (CAKI) 細胞にランスフェクトした (Nguyen et al. 2001. Adv. Immunol. 79:261-296)。(実施例2.2に記載されるような)12G5抗体での蛍光染色によって示される高い発現密度を示す個々のランスフェクト細胞を、マイクロタイタープレートウェルにおける単一細胞の沈着によってクローニングした (ACDU付きのFACS Aria I、Becton Dickinson)。クローン細胞株を選択抗生物質を含有する培地中で増殖させ、(実施例2.2のように)フローサイトメトリーによってCXCR4発現を確認した後、複数の均質で安定なCXCR4 CAKIトランスフェクタントが得られた。非ランスフェクトラクダ科動物細胞と比べて114倍の蛍光シフトを示す (高レベルのCXCR4膜発現を示唆する)1つのクローンを、さらなる実験に選択した (図2.1、パネルB)。

20

【0511】

実施例2.4. pVAX1-CXCR4の皮内送達は、ラマにおいて検出可能な標的特異的体液性免疫応答を誘導するのに十分である

獣医学部倫理委員会 (ゲント大学、Belgium) による認可の後、4頭のラマ (ラマ389、ラマ401、ラマ402及びラマ403) を遺伝子免疫付与に割り当てた。CXCR4をコードするDNAの投与の直前に、ラマの肩甲骨を覆う250cm²の皮膚領域を剪毛し、実施例1.2に記載されるように市販の脱毛クリームを塗布することによって残った全ての毛組織を除去する。0.9%生理食塩水に溶解したDNAを毛のない皮膚に、3ノズルヘッドを用いた自動ジェット式注射器 (dermojet) Vacci-jet (Akra Dermojet France) を使用する無針ジェット注射によって投与した。4回のDNA投与 (0日目、14日目、28日目及び42日目) 全てについて、ラマ1頭当たり2mgのDNAを適用し、複数の隣接するスポットに分散させた。DNAを含有する液体の皮内 (ID) 適用の成功は、皮膚上に液体を含有する表在性の水疱又は丘疹が2時間ほど形成されることによって示される。各々のラマから、10mlの免疫前血清試料及び遺伝子ワクチン接種手順中の異なる血清試料を回収し、抗原特異的体液性免疫応答をモニタリングした。250倍~5000倍希釈の免疫前試料 (0日目) 及び免疫血清試料 (53日目; 4回目のDNA適用後11日目に回収した) 中に存在するラマ免疫グロブリンの結合を、非ランスフェクトラクダ科動物細胞に対するCXCR4トランスフェクト (transfected) ラクダ科動物細胞の染色差について、フローサイトメトリーによってスコア付けした。ラマ全IgG (通常抗体+重鎖抗体) に結合した細胞を、ヤギ抗ラマIgG (カタログ番号A160-100; Bethyl)、その後のPE結合ロバ抗ヤギIgG (JacksonImmunoResearch Laboratories、カタログ番号115-115-164) での二次染色によって検出した。ラマ403を除いて、CXCR4トランスフェクトCAKI細胞の53日目の免疫血清全てについて (最低でも試験した3つの希釈率について)、免疫前レベルと比べて明らかに増大した平均細胞蛍光 (MCF) が観察されたが、同様に染色した非ランスフェクトCAKI細胞のMCF値は低いままであった (図2.2)。このことから、ID遺伝子免疫付与の後

30

40

50

、4頭のうち3頭のラマが未変性の標的立体構造に対して特異的体液性応答を示すことが示唆された。

【0512】

実施例2.5. 遺伝子免疫付与に続く単回細胞追加免疫は、CXCR4特異的血清変換を有意に増大させる

ヒト又は齧歯類の宿主細胞バックグラウンドと比べて高い全体的配列類似性による、ラマにおけるラクダ科動物細胞表面マーカーの免疫原性の減少を見込んで、ラクダ科動物細胞を免疫応答をCXCR4に指向付ける免疫原細胞バックグラウンドとして選択した。培養したCXCR4発現ラクダ科動物細胞(実施例2.3)を新たに採取し、D-PBSで2回洗浄して、全ての培養培地混入物を除去した。細胞を2mLのD-PBSに再懸濁し、動物施設への移送の間氷上で保管した。ラマ389、ラマ401、ラマ402及びラマ403に、最後のDNA投与の最低3週間後に2E7個のhCXCR4トランスフェクトラクダ科動物細胞を皮下(SC)注射した。細胞追加免疫後11日目に、免疫血液試料を各々のラマから回収し、CXCR4血清力価を実施例2.4に記載されるように求めた。4頭全てのラマ(250倍~2250倍の血清希釈率)について、DNA投与単独の後(53日目)に得られた血清試料と比べて増大したMCF値がCXCR4トランスフェクトラクダ科動物細胞で検出されたが、未トランスフェクトラクダ科動物細胞に結合した血清は、3頭の動物においてわずかにしか増大しなかった。これらの結果から、単回細胞追加免疫が4頭全てのラマについてCXCR4応答の規模の増大をもたらしたことが示される(図2.2及び表2.1)。4頭の遺伝子免疫付与ラマと並行して、ラマ217及びラマ218から回収した62日目試料について血清力価を求めた(図2.2及び表2.1)。これらのラマを、6回のCXCR4-HEK293細胞注射(1回の用量当たり1E7個~4E7個の細胞)によって一週間の間隔で免疫付与した(特許文献6に記載)。2頭のうち1頭のラマ(218)のみが、未トランスフェクト対照細胞と比べて、CXCR4発現細胞に対して強い血清応答を示した(n=2; 代表的な一例を示す)。検出されたMCF値から、実行した遺伝子免疫付与手順(DNA+細胞追加免疫)によって、完全細胞免疫付与と比べて同様の又はより良好な規模の標的特異的力価が生じることが示唆された。

【0513】

表2.1. CXCR4特異的ナノボディB細胞系列の発見概要

10

20

【表 27】

ラマ番号	免疫原	CXCR4 応答 (FACS)	ライブラリ	選択条件	特異性 スクリーニング ヒット率 (ELISA)	CXCR4 特異的ナノボディ ファミリィ (その一部はリガ ンド置換されている) の数
389	DNA	+	DNA	R1: 10U	18% (8/45)	5
				R2: 10U	9% (4/45)	
				R2: 1U	13% (6/45)	
401	hCXCR4/ラクダ 科動物細胞	++	PB	R1: 10U	4% (2/45)	3
				R2: 10U	76% (34/45)	
				R2: 1U	78% (35/45)	
402	DNA	+	DNA	R1: 10U	0% (0/45)	3
				R2: 10U	2% (1/45)	
				R2: 1U	4% (2/45)	
403	hCXCR4/ラクダ 科動物細胞	++	PB	R1: 10U	22% (10/45)	4
				R2: 10U	89% (40/45)	
				R2: 1U	76% (34/45)	
217	hCXCR4/Hek2 93 細胞	+	細胞	R1: 10U	0% (0/45)	22
				R2: 10U	16% (7/45)	
				R2: 1U	7% (3/45)	
218	hCXCR4/Hek2 93 細胞	+	細胞	R1: 10U	36% (16/45)	6
				R2: 10U	67% (30/45)	
				R2: 1U	67% (30/45)	
217	hCXCR4/ラクダ 科動物細胞	+	PB	R1: 10U	4% (2/45)	4
				R2: 10U	31% (14/45)	
				R2: 1U	27% (12/45)	
217	hCXCR4/Hek2 93 細胞	+	細胞	R1: 10U	7% (3/45)	10
				R2: 10U	51% (23/45)	
				R2: 1U	44% (20/45)	
218	hCXCR4/Hek2 93 細胞	+	細胞	R1: 10U	4% (2/45)	15
				R2: 10U	89% (40/45)	
				R2: 1U	78% (35/45)	
218	hCXCR4/Hek2 93 細胞	+	細胞	R1: 10U	7% (3/45)	15
				R2: 10U	93% (42/45)	
				R2: 1U	96% (43/45)	

【0514】

実施例 2.6. 遺伝子免疫付与は CXCR4 特異的ナノボディを同定するのに十分である
ラマ 389、ラマ 401、ラマ 402、ラマ 403 から、4 つの 150 ml の血液試料
を、最後の DNA 投与後 3 日目及び 9 日目 (それぞれ PBL1 及び PBL2 として記号化
される)、並びに細胞追加免疫後 4 日目及び 8 日目 (それぞれ PBL3 及び PBL4) に
回収した。さらに、細胞追加免疫後 3 日目 ~ 4 日目に、触知可能な弓リンパ節 (bow lym
ph node) (LN) の生検材料を各々のラマから局所外科手術によって回収した。末梢血リ
ンパ球を PBL1 ~ PBL4 試料から、実施例 1.4 に記載されるように Ficoll -
Paque での密度勾配遠心分離法によって精製した。リンパ球を内包する免疫組織全て
から、(実施例 1.4 に記載されるように) 全 RNA を抽出し、cDNA 調製の鋳型とし

10

20

30

40

50

て使用した。遺伝子免疫付与したラマの各々から、2つの別個のライブラリを作成した(表2.2):一方のライブラリはプールしたPBL1+PBL2のcDNAに由来し(「DNA」ライブラリ)、もう一方はプールしたPBL3+PBL4及びLNに由来するものであった(ポスト追加免疫又は「PB」ライブラリ)。

【0515】

表2.2. 親V生殖細胞系列配列に対する5個のin vivo成熟CXCR4ナノボディファミリーの遺伝的距離

【表28】

ナノボディファミリー	ラマに由来するナノボディファミリー	ライブラリ(ナノボディ変異体の数)	平均的相互作用効力(MCF比; FACS)	平均的相互作用効力(吸収比; ELISA)	親V生殖細胞系列に対するヌクレオチド突然変異の平均数 ¹	親V生殖細胞系列に対するアミノ酸突然変異の平均数 ¹
A	389	DNA(1) PB(16)	46 553	14 33	19 26	10 12
B	389	DNA(1) PB(3)	105 261	7 11	17 19	12 13
C	389	DNA(2) PB(6)	505 556	43.5 87.3	5.5 13	5 9
D	402	DNA(1) PB(7)	755 671	56 73	21 22	15 14.6
E	403	DNA(2) PB(2)	381 412	20.5 10.5	17 18	10.5 11.5

¹ 欠失又は付加を含むあらゆる変化が突然変異の数を算出する上で考慮される。

【0516】

10

20

30

40

50

フローサイトメトリーによって検出されたポリクローナル血清応答は、未変性 C X C R 4 に対する標的特異的のラマ抗体の存在を示唆しているが、力価の規模は必ずしも、i) 抗 C X C R 4 重鎖抗体媒介性クローン多様性、ii) 標的に対するモノクローナルナノボディの親和性、及び iii) 応答幅 (例えば個々のナノボディの対象となる C X C R 4 エピトープ) を予測するものではない。これらをモノクローナルレベルで特性化するために、C X C R 4 特異的のナノボディをファージディスプレイによって同定した。並列選択を、8 個の D N A 及び P B ライブラリ、並びに細胞免疫付与したラマから作成した 2 個のさらなるライブラリの各々に対して行った。ライブラリを、最後の細胞注射後 4 日目及び 8 日目に回収した P B L 1 + P B L 2 に由来するプールした c D N A から同様に (similarly in a similar manner) 作成した。

10

【 0 5 1 7 】

C X C R 4 特異的のナノボディを選択するために、実施例 1 . 4 に記載されるように 1 0 個全てのライブラリから組み換えファージをレスキューした。1 回目の選択では、C X C R 4 トランスフェクト H E K 2 9 3 細胞に由来する、9 6 ウェル M a x i s o r p プレート (Nunc) に固定化した膜小胞 1 0 単位を、低脂肪粉乳 (P B S 中 M a r v e l l 4 %) でブロックした。レスキューしたファージとの 2 時間のインキュベーションの後、室温で 1 5 分間トリプシン溶出 (1 m g / m l) を行い、続いて P B S で 1 5 回洗浄した。0 . 8 m M プロテアーゼ阻害剤 A B S F を適用することによってプロテアーゼ活性を即座に中和した。全てのファージアウトプットを、対数的に増殖した大腸菌 T G 1 細胞に感染させ、個々のナノボディクローンの解析のために寒天プレート (L B + A m p + 2 % グルコース) にプレーティングした。1 回目のファージアウトプットをレスキューし、プレートに固定化した C X C R 4 膜小胞 1 0 単位又は 1 単位に対して 2 回目の選択を行った。非トランスフェクト H E K 2 9 3 対照膜小胞から溶出したファージに対する、C X C R 4 膜小胞から溶出したファージの数の比率として濃縮係数を算出した。1 0 個のうち 8 個のライブラリについて、2 回目のアウトプットが 5 を超える濃縮係数を示した (データは図示せず)。プレートに固定化した h C X C R 4 膜小胞 1 0 単位又は 1 単位に対して選択した 2 回目のファージアウトプットを、T G 1 細胞に感染させ、寒天プレート (L B + A m p + 2 % グルコース) にプレーティングした。C X C R 4 膜小胞に対して選択した (1 回目及び 2 回目) 各々のアウトプットの 4 5 個の個々のクローンを、1 m l の 9 6 ディープウェルプレートにおいて培養し、実施例 1 . 4 に記載されるようにペリプラズム抽出物 (P E) を調製した。

20

30

【 0 5 1 8 】

C X C R 4 特異性を 2 つの異なる受容体フォーマットを用いる 2 回のスクリーニングアッセイによって決定した。第 1 の方法では、2 単位の C X C R 4 膜小胞を、4 で一晩のコーティングによって 9 6 ウェル M a x i s o r p プレートに 1 ウェル毎に固定化した。P B S 中 4 % M a r v e l でブロックした後、1 0 倍希釈の P E を添加し、結合したナノボディ (c - M y c タグを内包する) を、マウス抗 M y c 及びウサギ抗マウス H R P での逐次検出によって検出した。h C X C R 4 膜小胞で対照膜小胞と比べて最低で 5 倍の E L I S A シグナルの増大を示す 5 0 1 個のナノボディを、C X C R 4 特異的であると見なした。2 種類の陰性対照 P E (一方は無関連ナノボディを発現する T G - 1 から、もう一方は空の発現ベクターを含有する T G - 1 から生成した) の対応する平均比は、それぞれ 1 . 1 ± 0 . 8 及び 1 . 2 ± 0 . 7 であった。このスクリーニング法から、各々の選択アウトプットのヒット率を算出し、表 2 . 1 にまとめた。異なる免疫付与戦略に従う 2 回の選択アウトプット (1 0 U の膜小胞) の平均ヒット率に基づくと、発見効率が「D N A」レポーター、「P B」レポーター及び「細胞」レポーターについて、それぞれ 1 4 %、7 1 % 及び 9 1 % であると算出された (図 2 . 3)。C X C R 4 に対する検出可能な重鎖抗体 (H c A b) 力価の非存在下であっても (表 2 . 1)、ラマ 4 0 3 D N A ライブラリに対する 1 回目及び 2 回目の選択後のそれぞれ 4 % 及び 3 1 % のヒット率によって示されるように、標的特異的のナノボディが同定された。ヒット率から、単回細胞追加免疫後では、単回の選択が全ての H c A b ラマレポーターから C X C R 4 特異的のナノボデ

40

50

ィを同定するのに十分であることが示唆される(表2.1中のヒット率4%~36%)。

【0519】

501個全てのCXCR4特異的ナノボディをシーケンシングし、重複するナノボディ(同一のアミノ酸配列)を除外した。これにより、70個の異なるナノボディB細胞系列に属する171個の特有の配列が同定された(表2.1)。ナノボディは、そのCDR3領域が高いアミノ酸配列類似性を示し、かつ同じ長さである場合、同じB細胞系列又はファミリーに属する。CDR3は主に抗原相互作用に寄与すると予想され、結果として同じファミリーに属するナノボディは同じエピトープに結合すると推定される。1頭のラマにつき同定されたCXCR4特異的ナノボディファミリーの平均数はそれぞれ、細胞免疫付与後は12.5(217、218)、DNA免疫付与によって11.2(DNA+細胞追加免疫; 389、401、402及び403)である。1つのナノボディファミリーに属するナノボディアミノ酸配列変異体(最低で1つのアミノ酸残基の突然変異)の数は、1個~最大で17個のファミリー変異体の範囲であった。

【0520】

CXCR4特異的結合を、ヒトCXCR4を発現する細胞に結合するナノボディをフローサイトメトリーによって測定する二次スクリーニングアッセイにおいて確認した。ここで、5倍希釈のPEを、親の又はCXCR4をトランスフェクトしたラクダ科動物細胞(2×10^5 個の細胞)と共にインキュベートし、ナノボディ結合をマウス抗Myc(SerotecのMCA2200)、続いて抗マウスIgG-PE(JacksonImmunoResearch Laboratoriesの115-115-164)検出抗体によって測定した。全ての試料について、CXCR4発現細胞に対するMCF値と、未トランスフェクト対照細胞に対するMCFとの比率を算出した。無関連ナノボディが一貫して2.4未満の比率を示した一方で、61個のナノボディファミリー(少なくとも1つのファミリー成員)について10を超える比率が検出され、それにより未変性CXCR4に対するこれらのファミリーの特異性が確認された。残りの9個のナノボディファミリーのうち、単一の成員からなる7個のファミリー(7ファミリー)が、膜小胞でのELISAにおいて測定された5倍~10倍の吸光度比にもかかわらず3未満の比率を示した。残りの2個のナノボディファミリー(2ファミリー; 全ての単一成員のファミリー)については、吸光度比(ELISA)はそれぞれ144及び70であり、MCF比(FACS)はそれぞれ2.2及び2.3であった。

【0521】

実施例2.7.免疫付与方法としての皮内DNA投与は、SDF-1-CXCR4受容体相互作用を調節するナノボディを同定するのに十分である

CXCR4特異性のスクリーニング(ELISA又はFACSによって決定した)に続いて、171個全てのCXCR4特異的ナノボディ変異体を、(特許文献6に記載されるように)リガンドSDF-1とその受容体との相互作用を遮断するそれらの能力について試験し、受容体機能を調節するナノボディを同定した。つまり、40pMの $[^{125}\text{I}]$ SDF-1リガンド(自家(in-house)標識した)を、2 μg のhCXCR4/HEK293膜抽出物と、ナノボディ競合相手の10倍希釈のPE(実施例1.4に記載されるように作製した)の存在下又は非存在下で結合させた。4で1時間のインキュベーションの後、膜抽出物を洗浄し、結合リガンドの1分当たりの放射能カウント(cpm)の全量を求めた。膜抽出物への放射標識したリガンドの非特異的結合(非CXCR4関連)を、CXCR4受容体からの全ての放射性リガンドと競合する過剰の非標識SDF-1(100nM)の添加によって決定した。各々のプレートの非特異的結合値を、全結合(ナノボディの非存在下でのcpm)及び各々のナノボディについて得られたcpm値から減算し、ナノボディの存在下での残留 $[^{125}\text{I}]$ SDF-1結合率(%)(SDF_{res})を算出した。リガンドディスプレイとしてスコア付けされたナノボディファミリーが多数同定され(表2.1)、リガンドと競合するナノボディが各々の免疫付与戦略(DNAレパートリー、PBレパートリー及び細胞レパートリーを表す)から同定されたことが示される。

【0522】

10

20

30

40

50

実施例 2 . 8 . 異なる免疫付与戦略後に同定されたナノボディのエピトープマッピング

各々の免疫付与戦略からの標的特異的ナノボディ（競合相手及び結合因子）の選択アウトプットを、さらなる特性化のために、His 6 及び Myc タグと融合させた溶解性ナノボディの発現及び精製を可能にする発現ベクターに再クローニングした。発現は IPTG 誘導後に 37 °C で大腸菌において行う。細胞培養物を遠心した（spinning）後、ペレットを凍結融解し、dPBS に再懸濁することによってペリプラズム抽出物を調製する。この抽出物を固定化金属アフィニティークロマトグラフィ（IMAC）の出発材料として使用する。ナノボディを 250 mM イミダゾールを用いてカラムから溶出させ、続いて dPBS で脱塩する。全てのナノボディの純度及び完全性をポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）によって検証する一方で、タグの存在をウェスタンブロット法によ

10

【0523】

DNA ワクチン接種戦略（DNA のみ又はその後の細胞追加免疫）によって、細胞免疫付与戦略の後同定されたナノボディと比べて、異なるエピトープに対するナノボディが同定されるかを決定するために、多数のエピトープビニングアッセイを実施する。これらは、アミノ酸残基 1 ~ 14 に相当する CXCR4 の N 末端ペプチドへの結合（ELISA）、N 末端及び細胞外ループ領域内に点突然変異を導入した CXCR4 突然変異体の受容体への結合、又は N 末端若しくは細胞外ループが関連 GPCR の配列によって個々に置き換わった N 末端切断型 hCXCR4 受容体若しくは CXCR4 キメラ等の突然変異 CXCR4 への結合である。代替的には、エピトープマッピングを本発明者らの精製ナノボディパ

20

【0524】

実施例 2 . 9 . 遺伝子免疫付与に続く細胞追加免疫は、異なるナノボディレパートリーを生じる

ラマ 389、ラマ 401、ラマ 402 及びラマ 403 から、（シーケンシングした 225 個のうち）123 個のナノボディ配列変異体からなる 45 個の CXCR4 特異的ナノ

30

【0525】

実施例 2 . 10 . 「DNA」レパートリーの平均効力は、「PB」レパートリー及び「細胞」レパートリーよりも低い

先の実施例によって、「DNA」ライブラリ及び「PB」ライブラリの両方から限られた数のファミリーしか同定されないことが示される。このレパートリーサブセットに対する細胞追加免疫の効果を検証するために、i) 特定のナノボディファミリー内の各々の変異体について、親 V 遺伝子生殖細胞系列配列に対する遺伝的距離を算出すること（アミノ酸又はヌクレオチドの突然変異の数；CDR3 領域及び FR4 領域をコードする D 遺伝子

40

50

セグメント及びJ遺伝子セグメントを除外する)、及びii)ナノボディ変異体の効力を比較することによって、in vivo成熟をスコア付けした。遺伝的距離の算出については、全てのライブラリについて増幅エラーの比例的(proportional)導入を推定した(PCRによる増幅を含むナノボディレパートリークローニング法によって引き起こされる突然変異の数を制限するために、ブルーフリーディングポリメラーゼが使用されている)。これら5個のファミリーのうち3個について、「PB」由来ナノボディは親V遺伝子生殖細胞系列配列に対して平均して12個、13個及び9個のアミノ酸突然変異(又は26個、19個及び13個のヌクレオチド突然変異)を示した一方で、「DNA」ライブラリに由来するナノボディについてはそれぞれ10個、12個及び5個(又はヌクレオチドレベルでは19個、17個及び5.5個)であり、「PB」由来ナノボディが「DNA」由来ナノボディよりも親V遺伝子生殖細胞系列から離れている(したがってより成熟している)ことが示唆された。これら3個のファミリーについて、この「PB」ナノボディのより高い成熟度は、「PB」由来ナノボディ対「DNA」由来ナノボディの平均結合効力(実施例2.6に記載されるようなMCF比)が3個のファミリーそれぞれについて、それぞれ553対46、261対105、556対505であることにも反映されている(FACSの結果であるが傾向はELISAにおいて確認した、表2.2を参照されたい)。

【0526】

ラマ389、ラマ401、ラマ402及びラマ403に由来する122個の特有のナノボディ(「DNA」ライブラリ及び「PB」ライブラリに由来するそれぞれ20個及び102個のナノボディ変異体)の全てについて濃度依存性標的結合を解析する場合、平均MCF比(FACS)は、「PB」ライブラリ及び「DNA」ライブラリに由来するナノボディについて、それぞれ427及び196であった(図2.5)。「細胞」ライブラリ(ラマ217又はラマ218)に由来する49個のナノボディ変異体から算出された、対応する数値は538である。この傾向をELISAアッセイによって得られた数値により確認する:平均吸着比(実施例2.6に記載されるように算出した)は「PB」ライブラリ及び「DNA」ライブラリに由来するナノボディについて、それぞれ36.2及び23であった。「細胞」ライブラリ(ラマ217又はラマ218)に由来する49個のナノボディ変異体から算出された、対応する数値は28である。このことから、「DNA」ライブラリに由来するナノボディ変異体の平均遺伝的距離が、「PB」ライブラリから同定されたナノボディよりも密接に親生殖細胞系列配列に関連することが示唆され、したがってより成熟度が低いと考えられる。さらに、3つのレパートリーの平均結合効力を解析したところ、「DNA」レパートリーは「PB」レパートリーよりも効力が低く、「PB」レパートリーは「細胞」レパートリーと同様の効力を有するようである(図2.5)。

【0527】

しかしながら、第4のファミリーについては驚くべきことに、「DNA」ライブラリから得られた変異体が、「PB」ライブラリから同定されたナノボディと比べて、それ以上のin vivo成熟度を示した(表2.2)。このファミリーからの「DNA」由来クローンは、V生殖系列と比べて15個のアミノ酸(又は21個のヌクレオチド)突然変異を示すが、「PB」由来ナノボディについての対応する平均値は14.6(アミノ酸)又は21.7(ヌクレオチド)である。このことは、「DNA」ナノボディ及び「PB」ナノボディのFACSアッセイにおける平均効力にも反映される(それぞれ755及び671である)。第5のファミリーについては、「DNA」ライブラリ及び「PB」ライブラリの成熟は、4つの解析法(アミノ酸突然変異又はヌクレオチド突然変異、FACS及びELISA)によると「DNA」由来ナノボディと「PB」由来ナノボディとの間に一貫した順位が検出されないため、極めて同様であるとスコア付けされた。

【0528】

3つの異なるレパートリーの平均結合効力の間には統計的に有意な差は見られないが、「PB」レパートリーの平均効力は、「細胞」ライブラリから得られた平均効力と同様であり、これらは「DNA」レパートリーの平均効力よりも高い。しかしながら、モノクローナルレベルでは、同様の結合効力を有するナノボディは、細胞追加免疫又は細胞免疫付

10

20

30

40

50

との後に同定された場合と比べると、遺伝子免疫付与のみの後に同定されている。

【0529】

実施例3．リガンド作動性イオンチャネルに対するナノボディの同定

複数の膜貫通ドメインを内包する膜結合標的に対する遺伝子免疫付与の実行可能性を実証する第2の例として、マウスプリン受容体P2X7を選択した。

【0530】

P2X7は、高濃度の外因性(exogeneous)ATP、又はNAD依存性ADPリボシル化によって活性化される、リガンド依存性イオンチャネルである。この機能的チャネルは、各々が2つの膜貫通領域及び285個のアミノ酸残基の単一の細胞外ループからなる3つのP2X7タンパク質サブユニットによって形成される。プリン受容体の活性化は立体構造変化を誘導し、大きな非選択的な孔の形成をもたらし、最終的に膜のブレブ形成及びアポトーシスを引き起こす。

【0531】

P2X7による遺伝子免疫付与は、ウサギ及びラットにおいてポリクローナル及びモノクローナル抗P2X7抗体を首尾よく産生させることが以前に実証されている(Adriouch et al. 2005, Cell Immun 236, 72-77)。ここで、本発明者らは、遺伝子免疫付与に続いてリガンド誘導性P2X7活性化を調節するP2X7特異的ナノボディの同定を実証した。

【0532】

実施例3．1．バリスティック法を用いた遺伝子免疫付与によるラマにおけるmP2X7に対する体液性応答の誘導

遺伝子銃免疫付与は、マウス、ウシ及びラマを含む様々な動物において体液性応答を誘導する皮内DNA送達の効率的な方法であることが示されている(Koch-Nolte 2007, Fas eb. J. 21, 3490-3499)。このバリスティック投与方法では、高圧下でDNAをコーティングした金微粒子を非常に免疫能力の高い皮膚組織に送達し、ランゲルハンス抗原提示細胞等の真皮中に存在する免疫エフェクター細胞を直接標的化し、トランスフェクトする。これによりin vivoでのトランスフェクション効率の増大がもたらされ、結果として持続的な抗原提示が体液性免疫応答の誘導を刺激すると考えられる。

【0533】

3頭のラマ(407、414及び417)を、マウスP2X7(mP2X7)をコードするDNAによって免疫付与した。DNA送達に使用した装置は、ヘリオス遺伝子銃(Biorad)であった。エンドトキシンフリーmP2X7発現プラスミドpCDNA6.1-mP2X7(Adriouch et al. 2005, Cell Immun 236, 72-77)を、1µmの金粒子(Biorad、カタログ番号1652263)に製造業者の取扱説明書に従ってコーティングした。ラマの頸部領域の皮膚を実施例1.2のように準備した。各々のラマに2週間の投与間隔で4回の抗原投与を行った。12ショットのプラスミド結合金粒子からなる各々の投与(1ショット当たり0.5mgの金粒子に結合したDNA1µg)を、600psiに設定した圧力によって皮膚内に適用した。最後の遺伝子免疫付与の3週間後、全てのラマに 2×10^7 個のmP2X7トランスフェクトHeK293細胞の単回追加免疫を行った。一定間隔で血液試料を回収し、体液性免疫応答の誘導を経時的にモニタリングした。B細胞組織の単離のために、4回目のDNA免疫付与後3日目及び9日目(PBL1及びPBL2)、並びに細胞追加免疫後4日目及び8日目(PBL3及びPBL4)にこれらの動物から血液を回収した。弓領域の触知可能なリンパ節(LN)の生検材料を、細胞追加免疫後4日目に採取した。

【0534】

別の3頭のラマ(413、415及び416)を、 2×10^7 個の安定にトランスフェクトしたmP2X7 HeK293細胞(Adriouch et al. 2005, Cell Immun 236, 72-77)によって2週間の間隔で4回、弓領域の皮下に免疫付与した。4回目の免疫付与後4日目及び8日目にこれらの動物から血液を回収し、4回目の免疫付与後4日目にLN生検材料を採取した。

10

20

30

40

50

【 0 5 3 5 】

実施例 2 . 4 に記載されるのと同様にして、未トランスフェクト CHO 細胞及び m P 2 X 7 トランスフェクト CHO 細胞を用いたフローサイトメトリーによって、血清応答を m P 2 X 7 反応性についてモニタリングした。DNA 免疫付与したラマについては、m P 2 X 7 血清変換を免疫前血清試料 (0 日目)、最後の DNA 免疫付与後に回収した血清試料 (5 1 日目、P B L 2) 及び細胞追加免疫後の血清試料 (7 1 日目、P B L 4) の間で比較した。4 回の細胞注射によって免疫付与したラマについては、m P 2 X 7 特異的力価を免疫前試料と、5 2 日目に回収した免疫試料との間で比較した。図 3 . 1 に、6 頭全ての m P 2 X 7 によって免疫付与したラマの全 I g G (通常抗体及び重鎖抗体) 免疫応答を示す。ラマ 4 0 7 を除いて、免疫前レベル (最低で 3 つの希釈物を試験した) と比べて、細胞追加免疫後に回収した 7 1 日目の免疫血清試料によって、m P 2 X 7 トランスフェクト CHO 細胞の平均細胞蛍光 (M C F) の明らかな増大が観察された。非トランスフェクト CHO 細胞に対する M C F 値は低いままである。遺伝子免疫付与手順 (DNA 初回刺激、その後の単回細胞追加免疫) の後、3 頭のうち 2 頭のラマが未変性標的立体構造に対する特異的体液性応答を示した。複数回の細胞注射を受けた 3 頭の動物は全て、検出可能な m P 2 X 7 特異的血清力価を示す (5 2 日目)。無関連 CHO 細胞表面抗原に対するバックグラウンド応答は、遺伝子免疫付与 (DNA + 細胞追加免疫) によって免疫付与した動物よりも、これらの動物において高い。

10

【 0 5 3 6 】

実施例 3 . 2 : 遺伝子銃を用いたヒト及びマウスの P 2 X 7 の遺伝子カクテル免疫付与
 遺伝子免疫付与の利点の 1 つは、単に異なる標的をコードする遺伝子を同じ動物に投与することによって、複数の標的に対する免疫応答を生じる汎用性である。カクテル免疫付与は、免疫応答を特異的立体構造に偏らせるためにも使用することができる。カクテル免疫付与の例として、本発明者らは、図 3 . 2 に示されるような 8 0 . 5 % の全体的配列同一性を共有するヒト (h) P 2 X 7 及び m P 2 X 7 オーツログを、ラマの遺伝子銃 DNA 免疫付与に選択する。また、P 2 X 7 チャネルに対するそのオープン立体構造での免疫応答の誘導を可能にするために、実施例 3 . 1 に記載される免疫付与戦略に 2 つの変更を加えた。まず、カクテル免疫付与を、m P 2 X 7 及び m A r t 2 . 2 (A D P リボシル化を媒介することによる P 2 X 7 の既知の活性化因子である) をコードするプラスミドの混合物によって適用した。次に、細胞追加免疫の前に P 2 X 7 トランスフェクト H e k 2 9 3 細胞を A T P で処理してチャネルを活性化した後、オープン立体構造を保存するためにパラホルムアルデヒドを用いて細胞を固定した。

20

30

【 0 5 3 7 】

2 頭のラマ (4 0 5 及び 4 1 8) を、遺伝子銃による遺伝子免疫付与を用いて、h P 2 X 7 及び m P 2 X 7 の両方によって同時に免疫付与した。エンドトキシンフリー p C D N A 6 . 1 - m P 2 X 7 及び p C D N A 6 . 1 - m A r t 2 . 2 (1 : 1 0 比) の混合物を、1 μ m の金粒子に結合させた。同様に、h P 2 X 7 をコードする p C D N A 6 . 1 - h P 2 X 7 プラスミドを 1 μ m の金粒子に結合させた。遺伝子免疫付与を実施例 3 . 1 に記載されるように行った (1 μ g / 0 . 5 m g / ショット)。頸部の左側面を m P 2 X 7 / m A r t 2 . 2 複合体での免疫付与に使用し、右側面を h P 2 X 7 複合体での免疫付与に使用した。4 回目の DNA 免疫付与の 3 週間後、両方のラマを 2×10^7 個の A T P 処理した、固定した m P 2 X 7 - H e k 2 9 3 細胞 (左側) 及び h P 2 X 7 - H e k 2 9 3 細胞 (右側) で同時に追加免疫した。3 日後に、2 回目の追加免疫を 2×10^7 個の A T P 処理した、固定した h P 2 X 7 - H e k 2 9 3 細胞を用いて行った。B 細胞組織の単離については、4 回目の DNA 免疫付与後 3 日目及び 9 日目 (P B L 1 及び P B L 2)、並びに 1 回目の細胞追加免疫後 4 日目及び 8 日目 (P B L 3 及び P B L 4) にこれらの動物から血液を回収した。1 回目の細胞追加免疫後 3 日目に、左側の弓領域から L N 生検材料を採取した。

40

【 0 5 3 8 】

両方のラマの m P 2 X 7 に対する全 I g G 血清力価応答を、実施例 3 . 1 に記載される

50

ように、未トランスフェクト細胞及びmP2X7トランスフェクト細胞を用いたフローサイトメトリーによってモニタリングした。ここで、免疫前血清試料(0日目)を、DNA免疫付与後(51日目、PBL2)及びそれぞれの細胞追加免疫後(71日目、PBL4)に採取した試料と比較した。ラマ418は、DNA免疫付与後にmP2X7に対する明らかな全IgG免疫応答を示し、これは細胞追加免疫後にさらに増強されたが、ラマ405のみが細胞追加免疫後にmP2X7反応性を示す(図3.3)。両方のラマについて、未トランスフェクトCHO細胞に対するMCF値は低いままである。ヒトP2X7に対する血清反応性は求めなかった。要するに、遺伝子免疫付与及び続く細胞追加免疫後に、5頭のうち4頭のラマが明らかなmP2X7血清応答を示す。

【0539】

実施例3.3: 遺伝子免疫付与後の重鎖抗体応答の誘導

また、重鎖抗体(HcAb)媒介性mP2X7特異的応答の誘導を、安定なHeK293-mP2X7トランスフェクタントに対するラマIgGアイソタイプ特異的モノクローナル抗体を用いたFACSによってモニタリングした。この設定を試験するために、ラマ血清の希釈物(DNA免疫付与したラマについては200倍、細胞免疫付与したラマについては1000倍)を、 1×10^7 個のWT HeK293細胞に室温で1時間前吸着させて(pre-adsorbed)、細胞バックグラウンド抗体を枯渇させた。次に、 5×10^5 個のHeK293-mP2X7又は未トランスフェクトHeK293細胞を、0.1mLの前吸着させた血清と共に4で0.5時間インキュベートし(内在化を防ぐため)、その後結合したHcAbをマウス抗ラマIgG2及びIgG3抗体の混合物によって検出し(Daley et al. 2005. Clin Diagn Lab Immunol 12: 380-386)、続いて抗マウスIgG-P E (Jackson ImmunoResearch)で染色した。通常ラマ抗体の結合は抗ラマIgG1を用いて検出した。mP2X7染色の対照として、ラットmAb Hano43が挙げられる(Adriouch et al. 2005, Cell Immun 236, 72-77)。HeK293-mP2X7によって免疫付与したラマのmP2X7特異的IgG血清力価は、高レベルのHeK293細胞バックグラウンド結合のために求めることができなかったが、そのような高いバックグラウンドはDNA免疫付与したラマ407については観察されなかった。図3.4に、mP2X7(ラマ414及びラマ417)又はmP2X7及びhP2X7のカクテル(ラマ405及びラマ418)による遺伝子免疫付与後の通常抗体(パネルA)及びHcAb(パネルB)媒介性血清応答を示す。DNAワクチン接種のみの後、ラマ414及びラマ418の血清は、通常Ab媒介性応答について非トランスフェクトWT HeK293細胞に対し、mP2X7トランスフェクトHeK293細胞の明らかなMCFシフトを示し、(実施例3.1及び実施例3.2において)全IgGによって検出された血清変換が確認された。細胞追加免疫によって、非トランスフェクトWT HeK293細胞に対し、mP2X7トランスフェクトHeK293細胞の中程度(ラマ417)から明らかな(ラマ405、ラマ414及びラマ418)通常Ab媒介性MCFシフトが誘導された。中程度のHcAb応答がラマ414及びラマ418について細胞追加免疫前に検出され、これはラマ414については細胞追加免疫によって増強された(71日目及び67日目の血清と比較)。対照的に、ラマ405及びラマ417については検出可能な重鎖血清応答はあったとしてもほとんど見られなかった(図3.4-B)。要するに、5頭のうち2頭のラマにおいて、遺伝子免疫付与によって細胞追加免疫後にmP2X7に対する検出可能なHcAb応答がもたらされた。

【0540】

実施例3.4. ライブラリ構築

末梢血単核細胞を、Ficoll-Hypaqueを用いて、製造業者(Amersham Bioscience)の取扱説明書に従って血液試料から調製した。次に、これらの細胞及びLN生検材料から全RNAを抽出し、ナノボディをコードする遺伝子断片(実施例1.4)を増幅するRT-PCRの出発材料として使用した。5頭のDNA免疫付与したラマ405、407、414、417及び418については、DNA免疫付与後にPBL1及びPBL2から得たcDNAのみを「DNA」ライブラリの生成に使用したが、追加免疫後(PB

10

20

30

40

50

ライブラリの構築には P B L 3、P B L 4 及び L N に由来する c D N A を使用した。H e k 2 9 3 - m P 2 X 7 細胞によって免疫付与したラマについては、P B L 1、P B L 2 及び L N から得た c D N A をライブラリの生成に使用した。H c A b レパートリーの可変ドメインに対応する断片を、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抵抗性遺伝子、マルチクロニング部位及び g e n e 3 リーダー配列を含有する、p U C 1 1 9 に由来するファージミドベクターにクローニングした。このベクターは、ナノボディコード配列とインフレームで、C 末端 c - m y c タグ及び (H i S)₆ タグをコードする。合計 1 3 個のファージライブラリを生成し、4 0 5 - D N A、4 0 5 - P B、4 0 7 - D N A、4 0 7 - P B、4 1 4 - D N A、4 1 4 - P B、4 1 7 - D N A、4 1 7 - P B、4 1 8 - D N A、4 1 8 - P B、4 1 3 - 細胞、4 1 5 - 細胞及び 4 1 6 - 細胞と指定した。得られたファージライブラリのサイズは、 $0.12 \sim 2.5 \times 10^8$ 個のクローンであり、挿入断片は 83% ~ 100% であると推定された。ファージを標準的な方法に従って調製し、さらなる使用のために 4℃ で保管した。

10

【 0 5 4 1 】

実施例 3 . 5 . ファージディスプレイを用いた m P 2 X 7 発現細胞に対するナノボディ選択

m P 2 X 7 プリン受容体とその未変性立体構造で認識するナノボディを同定するために、D N A ワクチン接種後の動物から生成した 1 0 個全てのライブラリ、及び細胞免疫付与したラマから生成した 3 個のライブラリを用いて、m P 2 X 7 を発現する全細胞に対して選択を行った。種々の免疫付与方法によって同定されたモノクローナルナノボディの特性を比較するため、全てのライブラリに対する選択を並行して行った。1 回目の選択においては、m P 2 X 7 をトランスフェクトした C H O 細胞又は未トランスフェクト C H O 細胞 (1 つのライブラリにつき 5×10^6 個) を、ブロッキングバッファー (P B S 中 1 0 % ウシ胎児血清 (F B S) 及び 2 % M a r v e l) で 4℃ で 3 0 分間ブロッキングした。プレブロッキング工程として、全てのファージインプット (inputs) を、ブロッキングバッファー中、4℃ で 3 0 分間インキュベートした。細胞をファージと共に 4℃ で低回転でインキュベートした後、遠沈して、ブロッキングバッファーで 3 回、P B S を用いてさらに 2 回洗浄した。細胞に結合したファージを、実施例 1 . 4 のようにトリプシンを用いて溶出させた。全てのファージアウトプットを対数的に増殖した大腸菌 T G 1 細胞に感染させ、個々のナノボディクロンの解析のために寒天プレート (L B + A m p + 2 % グルコース) にプレーティングした。並行選択において非トランスフェクト C H O 細胞から溶出したファージに対する、m P 2 X 7 - C H O 細胞から溶出したファージの数の比率として濃縮係数を算出した。1 回目の選択における 3 倍超の濃縮係数は 4 1 3 及び 4 1 4 のライブラリについてのみ観察することができ、4 1 4 の P B ライブラリについては 2 0 0 倍超の濃縮係数も示すものであった。1 回目の m P 2 X 7 / C H O に対して選択されたファージアウトプットをレスキューし、m P 2 X 7 を内在的に発現するマウス Y a c - 1 細胞に対する 2 回目の選択に使用した。細胞バックグラウンドの変更を、無関連細胞バックグラウンドマーカに結合するファージの選択を減少させるために行った。1 回目と本質的に同じ手順に従った。この 2 回目の選択に利用可能な対照細胞はなかったため、1 回目のアウトプットに対する 2 回目のアウトプットの比を取ることによって相対濃縮係数を算出した。D N A ライブラリからは、4 0 7 及び 4 1 7 についてのみ濃縮が検出された (比はそれぞれ 6 及び 9 7) 。P B レパートリーについては、5 個のうち 3 個のライブラリが 1 0 を超える濃縮係数を示したが、4 0 7 については中程度の 3 倍の濃縮が観察された。P B ライブラリ 4 1 4 についてはさらなる濃縮は見られなかったが、これは 1 回目の選択中における既に高い抗原特異的ファージ濃縮によるものである可能性がある。細胞免疫付与したライブラリについては、4 1 3 のみが中程度の 3 倍の濃縮を示した。各々の選択アウトプット (1 回目及び 2 回目) の 4 5 個 ~ 4 8 個の個々のクローンを 9 6 ウェルフォーマットで培養し、ファージを続くスクリーニングのために実施例 1 に記載されるように調製した。

20

30

40

【 0 5 4 2 】

50

実施例 3 . 6 . m P 2 X 7 特異的ナノボディに関するスクリーニング

初めに、P 2 X 7 特異性を、未トランスフェクト CHO 細胞及び m P 2 X 7 トランスフェクト CHO 細胞に対するファージ ELISA によって決定した。細胞を 96 ウェル培養プレートに、ペニシリン及びストレプトマイシン（それぞれ 100 U / ml 及び 100 µg / ml）を添加した 10% FBS を含有する DMEM 培地 0.2 ml 中、1 ウェル当たり 4×10^4 個の細胞という密度で播種し、5% CO₂ 雰囲気において 37 °C で 24 時間インキュベートした。サブコンフルエントな細胞を PBS ですすぎ、PBS 中の 4% パラホルムアルデヒドを用いて室温で 10 分間固定した。固定した細胞を PBS で 3 回洗浄し、PBS 中の 2% BSA で 2 時間ブロッキングした。ブロッキングに続いて、ファージを含有する 10 倍希釈の培養上清を添加し、1 時間インキュベートした。細胞に結合したファージをマウス抗 M 13 - HRP 複合体（GE Healthcare、カタログ番号 E 2886）によって検出した。陽性対照としてラット mAb Hano 43 を使用した。全ての回の選択に由来する 1506 個のうち 523 個のスクリーニングした個々のクローンが、対照 CHO 細胞と比べて m P 2 X 7 - CHO 細胞に対し、最低で 2 倍増大した ELISA シグナルを示した。DNA ライブラリ、PB ライブラリ及び細胞ライブラリの一次スクリーニング後のヒット率を表 3 . 1 に示す。

【 0 5 4 3 】

種々の免疫付与戦略（DNA、PB、細胞）後に生成したレポトリリーに対する 1 回目及び 2 回目の選択アウトプットの平均ヒット率に基づく、発見効率は「DNA」レポトリリー、「PB」レポトリリー及び「細胞」レポトリリーについて、それぞれ 4%、40% 及び 11%（1 回目のアウトプット）又は 31%、78% 及び 60%（2 回目のアウトプット）であると算出された（図 3 . 5）。これにより、種々のレポトリリーにおける m P 2 X 7 に結合するナノボディの割合は、「DNA」よりも「PB」及び「細胞」について高いことが示された。cDNA 免疫付与した動物については、2 回目の選択後の血清力価とヒット率との間の良好な相関が、ラマ 405、ラマ 418 及びラマ 414 に由来する PB ライブラリについて観察され、ヒット率は 1 回目の後に 48% 超、2 回目の後に 90% 超という範囲であった。比較のために、細胞免疫付与に由来するライブラリで観察されたヒット率は、2 回目の選択後に 40% ~ 73% の範囲であった。DNA 免疫付与後にラマ 407 及びラマ 417 において検出可能な血清力価が存在しないにもかかわらず（図 3 . 1）、対応する DNA ライブラリのヒット率は、2 回目の選択後にそれぞれ 25% 及び 87% であった。先に CXCR4 について示されたように、このことは、DNA ワクチン接種が、検出可能な標的的特異的血清変換の非存在下であっても、m P 2 X 7 特異的ナノボディをファージディスプレイ技術によって同定するのに十分であることを示す。

【 0 5 4 4 】

実施例 3 . 7 . m P 2 X 7 結合クロンの配列多様性

一次スクリーニングにおける全ての m P 2 X 7 結合因子の配列を解析した。523 個のナノボディクロンのうち、84 個の特有のクローンが同定され、これらは 29 個の異なる配列ファミリーにカテゴリー化することができた（図 3 . 13）。同じファミリーに属するナノボディアミノ酸配列変異体の数を図 3 . 6 にまとめる。DNA ワクチン接種（DNA + PB）及び細胞免疫付与の後、それぞれ 15 個及び 14 個のファミリーが同定され、DNA + 細胞追加免疫免疫付与法後には 3 個、細胞免疫付与戦略後には 4 . 7 個のファミリーという平均多様性が得られた。DNA ライブラリ及び PB ライブラリの両方に由来するファミリー変異体、すなわちファミリー 2、ファミリー 15、ファミリー 25 及びファミリー 5 を含む 4 個の m P 2 X 7 ファミリーが同定された（図 3 . 5）。これらのクロンのうちの 2 個、16D9（ファミリー 15、ラマ 414）及び 6A11（ファミリー 5、ラマ 418）は、DNA レポトリリー及び PB レポトリリーの両方から同定された。しかしながら、CXCR4 について先に示されたように、大半のファミリーはもっぱら「DNA」ライブラリ（15 個のうち 4 個のファミリー）又は「PB」ライブラリ（15 個のうち 7 個のファミリー）において同定された。このことは、遺伝子免疫付与に続く細胞追加免疫により、遺伝子免疫付与のみの後に生成したライブラリにおいては容易に同定さ

10

20

30

40

50

れないナノボディレパートリーの *in vivo* 成熟が引き起こされたことを示している (表 3.1)。

【0545】

表 3.1. mP2X7 遺伝子及び細胞免疫付与の後のスクリーニングヒット率

【表 29】

ラマ 番号	免疫付与戦略	ライブラリ	FACS 血清 力価 (全 Ig G)	一次スクリーニングヒッ ト率 (%)		同定された NBファミ リー
				R1	R2	
407	DNA (4x)	DNA	-	0.0	11.1	25
	mP2X7/HEK (1x)	PB	-	2.2	39.1	6, 25, 28
414	DNA (4x)	DNA	+/-	6.7	11.1	15, 26, 27, 29
	mP2X7/HEK (1x)	PB	++	73.9	93.5	1, 4, 15
417	DNA (4x)	DNA	-	11.1	86.7	2
	mP2X7/HEK (1x)	PB	+/-	2.2	60.9	2, 24
405	カクテル DNA (4x)	DNA	-	0.0	0.0	-
	m+hP2X7/HEK (1x)	PB	+	47.9	97.9	7, 16
418	カクテル DNA (4x)	DNA	+	2.1	50.0	5, 17
	m+hP2X7/HEK (1x)	PB	++	70.8	100.0	5
413	mP2X7/HEK (4x)	細胞	+	27.1	72.9	3
415	mP2X7/HEK (4x)	細胞	+	2.1	68.8	8, 10, 11, 12, 14, 18, 19, 20, 21
416	mP2X7/HEK (4x)	細胞	+	4.2	39.6	9, 13, 22, 23

【0546】

実施例 3.8. 各々のファミリーの代表的なクローンの選択についての mP2X7 結合クローンの特異性及び順位の確認

全ての非冗長 mP2X7 特異的クローンを、1 mL 容 96 ディープウェルプレートでの PE の作製のために、実施例 1 に記載されるように 96 ウェルプレートにおいて再整列した (re-arrayed)。固定した細胞への結合についてのスクリーニングの後同定された mP2X7 特異的ナノボディが、未変性 mP2X7 にも結合することができることを確認するために、全ての非冗長クローンの PE を、mP2X7 - Hek293 細胞への直接結合について、検出に myc タグを用いる FACS において解析した。10 倍希釈の PE を 0.5 μ g の抗 myc FITC 結合抗体 (AbD Serotec、カタログ番号 MCA2200F) (結合強度を増大させるために偽二価ナノボディを作製する) と共に、0.1 mL の PBS / 10% FCS 中、4 で 45 分間プレインキュベートした。PE 希釈物を、Hek293 - mP2X7 と未トランスフェクト細胞との混合物 (各々 5×10^5 個) と共に 4 で 0.5 時間インキュベートした後、細胞をすすぎ、細胞結合蛍光をフローサイトメトリーによって検出した。代替的には、10 倍希釈の PE の抗 myc FITC 結合抗体による逐次染色を細胞とのインキュベーション後に行った。ナノボディファミリー 1、2、4、5、25 (DNA / PB ライブラリに由来) 並びにナノボディファミリー 10 及び 11 (細胞免疫付与ライブラリに由来) の成員については、明らかな結合活性の利点が見られ、これらのナノボディのエピトープが、偽二量体化ナノボディにとって依然として容易に接近可能であることが示された。ナノボディ 2C4 (ファミリー 1) 及びナノボディ 5A1 (ファミリー 3) についてのプレインキュベーションの効果を図 3.7 に示す。各々の

ファミリーのうち、最良の結合因子をさらなる特性化のために選択した。ファミリー 6、ファミリー 26 ~ ファミリー 29 は、抗 Myc 抗体とのプレインキュベーション後であっても、mP2X7 発現細胞への低い結合しか示さず、したがってさらなる特性化から除外された。DNAライブラリ及びPBライブラリの両方に由来する特有のクローンを有するファミリー（ファミリー 2、ファミリー 5、ファミリー 15 及びファミリー 25）から、少なくとも 2 つの代表例を、DNA由来クローンとPB由来クローンとの比較を可能にするために選択した。この結果、それぞれのナノボディの効力及び親和性に対する細胞追加免疫の考え得る寄与の決定が可能となる。さらなる特性化のために選択したナノボディのパネルを図 3.8 及び表 3.2 に示す。

【0547】

表 3.2. mP2X7 特異的ナノボディの特性化

【 例 3 0 】

クローン	ファミリー	ラマ	ライブラリ	P2X7機能	測定NB		測定リガンド	
					Chono-P2X7 / wtの倍率 (フアージELISA)	100uM ATPに対するIC50 (n M) (n=2)	20uM NA Dに対するIC50 (n M) (n=2)	2mM NB によるATP IC50 (n M) (n=1)
2C4	1	414	PB		4			
2A6	1	414	PB		8			
1A8	2	417	DNA		20			
20C9	2	417	PB		11			
7E2	3	413	Cell		25			
4B4	4	414	PB	エンハンサー	19		47	5
8G11	5	418	PB	遮断	26	68	389	>540
8F5	5	418	DNA	遮断	16	579	171	部分的
8G12	5	418	PB	遮断	36	82	290	>540
8C7	7	405	PB	部分的な遮断	21	386*	4000*	
8E7	7	405	PB	部分的な遮断	16	576*	4000*	
7D6	8	415	Cell	エンハンサー	18		47	4
7A4	9	415	Cell		32			
7B4	10	415	Cell		23			
7H6	11	415	Cell	遮断	23	122.6	494	>540
7G5	12	415	Cell	エンハンサー	30			
13B8	13	416	Cell		24			
7D5	14	415	Cell		14			
1G6	15	414	DNA		12			
16D9	15	414	DNA, PB		7			
6B7	16	405	PB	部分的な遮断	24		16	2
14D5	17	418	DNA	エンハンサー	8			
13G5	18	415	Cell		35			
13B5	19	415	Cell	部分的な遮断	28	436	200	部分的
13F6	20	415	Cell		20			
13G4	21	415	Cell		56			
13A7	22	416	Cell	遮断	25	6	565	>540
13G9	23	416	Cell	遮断	17	35	469	>540
20A11	24	417	PB		11			
18C1	25	407	DNA		18			
18A7	25	407	PB		14			

* ナノボディはn=1で試験した

【 0 5 4 8 】

実施例 3 . 9 . m P 2 X 7 特異的ナノボディの作製及び精製

選択したナノボディのコード配列を、(実施例 2 . 8 に記載されるように) L a c Z プロモーター、カナマイシンに対する抵抗性遺伝子、マルチクローニング部位及び O m p A シグナルペプチド配列を含有する p U C 1 1 9 に由来する発現ベクターに再クローニングした。このベクターはナノボディコード配列とインフレームで、C 末端 c - m y c タグ及

10

20

30

40

50

び(His)6タグをコードするものであった。発現は大腸菌TG-1細胞中でc-myc、His₆タグ付きタンパク質として、250mLの培養容量で行った。1mM IPTGを添加することによって発現を誘導し、37℃で3時間継続させた。細胞培養物を遠心した後、ペレットを凍結融解し、dPBSに再懸濁することによってペリプラズム抽出物を調製した。これらの抽出物を、His₆タグ粗カラム(GE Healthcare, Uppsala, Sweden)を用いる固定化金属アフィニティークロマトグラフィ(IMAC)に関する出発材料として使用した。ナノボディ(登録商標)を250mMイミダゾールを用いてカラムから溶出させ、続いてdPBSで脱塩した。全てのナノボディの純度及び完全性をポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)によって検証し、一方でタグの存在を抗His抗体を検出に用いるウェスタンブロット法によって検証した。

10

【0549】

実施例3.10. いずれのマウスP2X7ナノボディもヒトP2X7又はP2X4に対して交差反応性でない

精製ナノボディの濃度依存性mP2X7結合を、FACSにおいて安定なmP2X7発現CHO細胞を用いて解析した。1.2μM~6.7pMの範囲のナノボディの段階希釈物を調製し、10%FBS(FACSバッファー)を添加した0.1mLのdPBS中で 2×10^5 個の細胞と共に、4℃で0.5時間インキュベートした。次に、細胞を3回洗浄し、結合したナノボディをマウス抗Myc(Serotec, MCA2200)を使用し、その後抗マウスIgG-PE(JacksonImmunoResearch Laboratories, 115-115-164)で染色することによって検出した。陽性対照として、ラットHano43抗体のハイブリドーマ上清を使用し、これを抗ラットIgG-PE(Jackson ImmunoResearch Laboratories, 112-116-143)によって可視化した。結果を図3.8に示す。無関連対照ナノボディによって得られる最大MCF値は、314~355(濃度は1.2μM~6.7pM)の範囲であった。ナノボディ7D5(ファミリー14)、ナノボディ13A7(ファミリー22)及びナノボディ7E2(ファミリー3)については、EC₅₀値はそれぞれ3nM、3.4nM及び4.3nMである。試験した他の全てのナノボディについては、S字状曲線は得られず、結果としてEC₅₀値を求めることができなかった(図3.8)。注目すべきことに、最も強く結合するナノボディは全て、HeK293-P2X7細胞によって免疫付与した3頭のラマに由来していた。2C4、20A11及び13F6(600を超えるMCF値が検出されなかった)以外の全てのナノボディについて特異的結合を確認した。

20

30

【0550】

次に、24個全てのファミリーのナノボディの特異性を、P2X7のヒトオーソログを発現するHeK293細胞、及びP2Xプリン受容体ファミリーの別の成員であるhP2X4を発現するCHO細胞に対する交差反応性結合の解析によって決定した(Moeller et al. Purinergic Signal 3: 359-366, 2007)。各々のナノボディのうち、250ng(最終濃度147nM)を抗Myc-FITC結合抗体と共に、未トランスフェクトHeK細胞を含まない以外は実施例3.7に記載されるのと同じ手順に従ってブレインキュベートした。陽性対照として抗体L4(hP2X7に特異的、Buell et al. Blood 15: 3521-3528)及びCR29(hP2X4に特異的、Moeller et al. Purinergic Signal 3: 359-366, 2007)を使用し、一方で無関連ナノボディを陰性対照として加えた。いずれのナノボディも、hP2X7-HeK293又はhP2X4を発現するCHO細胞に結合しないことが見出された。一部のナノボディをhP2X7及びmP2X7の両方によって免疫付与したラマから単離した(ファミリー5、ファミリー7、ファミリー16ファミリー及びファミリー17)という事実にもかかわらず、これらのいずれもhP2X7に対し交差反応性ではなかった。

40

【0551】

実施例3.11. mP2X7受容体機能を増強又は遮断するナノボディの同定

24個の異なるファミリーからの全ての精製ナノボディを、mP2X7プリン受容体の機能的活性を調節するその能力について解析した。P2X7の活性化は、細胞外ATP(

50

直接的活性化)又はNAD依存性ADPリボシル化(間接的活性化)によって起こり、カルシウム放出、ホスファチジルセリンの曝露、及びCD62Lのシェディングをもたらし、最終的にアポトーシスを引き起こす(Scheuplein et al. 2009, J. Immun. 182(5): 2898-908)。リガンド誘導性CD62Lシェディングを用いて、ナノボディがmP2X7機能を妨げることができるか否かを決定した。

【0552】

第1のアプローチにおいては、 5×10^5 個のYac-1細胞(mP2X7を内因的に発現する)を、単一濃度のナノボディ($5 \mu\text{g}$ 、最終濃度 $2 \mu\text{M}$)と共に、10%FBSを添加したRPMI中、室温で15分間インキュベートした。続いて、ATP(最終濃度 $100 \mu\text{M}$)又はNAD(最終濃度 $20 \mu\text{M}$)を添加することによってP2X7イオンチャネルを活性化させ、その後細胞懸濁液を37で20分間さらにインキュベートした。先の滴定実験から、これらのリガンド濃度によって最大のCD62L細胞外ドメイン切断が誘導されることが示された。細胞を洗浄し、細胞表面のCD62Lの存在を抗CD62L-PE結合抗体(BD Pharmingen、カタログ番号553151)を用いるFACSにおいて検出した。CD62L陽性染色細胞の割合を、P2X7機能調節の尺度として採用した。対照として、ナノボディなし又は無関連対照ナノボディを加えたが、これらはリガンド及び個々の実験に応じてCD62Lシェディングを細胞の80%~98%でもたらした(すなわち細胞の2%~20%はCD62L陽性のままである)。CD62L陽性のままである細胞の割合が、無関連ナノボディを用いて得られた値の3倍を超える場合、ナノボディをmP2X7ブロッカーと見なした。7個のファミリー(ファミリー5、ファミリー7、ファミリー11、ファミリー16、ファミリー19、ファミリー22及びファミリー23)を代表する10個のナノボディは、ATP及びNAD誘導性CD62Lシェディングの両方を遮断したが、ファミリー7の2個のナノボディは閾値のすぐ上であった。さらに、ファミリー16及びファミリー19に属する2個のナノボディは、NAD誘導性応答を遮断するが、ATP誘導性応答は遮断しないようであり、これらがmP2X7上のNAD依存性ADPリボシル化部位を選択的に標的とし得ることが示唆される(Adriouch et al. FASEB J 22: 861-869, 2008)。阻害能を確認するため、並びにATP及びNAD媒介性CD62Lシェディングアッセイにおけるナノボディの遮断効力を順位付けするために、これらの10個のナノボディのうち9個を2回の並行実験において段階希釈で試験した。代表例を図3.9に示す。両方のリガンド媒介性アッセイにおいて、全てのブロッカーについてP2X7機能の阻害を確認することができたが、IC50値を表3.2に示す。ファミリー19のナノボディ13B5について示唆されたNAD選択性(-selectively)は確認されなかった。ブロッッキング効力に基づいて、ナノボディを以下の通りに順位付けすることができる: $13A7 > 8G11$ 、 $13G9$ 、 $8G12 > 7H6 > 13B5$ 、 $8F5 > 8C7$ 、 $8E7$ 。

【0553】

ナノボディが単独でmP2X7チャネルを活性化することができるかを検証するために、細胞を同様に $2 \mu\text{M}$ のナノボディと共に、その後のリガンド処理なしにインキュベートした。試験した一価ナノボディのいずれもmP2X7を直接活性化することができなかった。しかしながら、或る特定のナノボディについては、CD62L細胞外ドメインシェディングの増大がヌクレオチド処理後に観察され、これらのクローンがmP2X7のゲーティングを促進し得ることが示唆された。ATP及びNAD誘導性P2X7活性化の増強を、準最適リガンド濃度(ATPについては $100 \mu\text{M}$ 未満、NADについては $20 \mu\text{M}$ 未満)を用いて検証した。Yac-1細胞を固定濃度のナノボディ($2 \mu\text{M}$)で処理し、次いで漸増濃度のATP($1 \mu\text{M} \sim 2700 \mu\text{M}$)又はNAD($1 \mu\text{M} \sim 540 \mu\text{M}$)で刺激した。ATPの場合、3個のナノボディがCD62Lシェディングを以下の効力の順番で明らかに増強することが見出された: $14D5 > 4B4 = 7D6$ (図3.10)。NADについては増強はあまり明白でなかった。

【0554】

遮断ナノボディも同様に同じアッセイにおいて試験した(固定濃度のナノボディ対漸増

10

20

30

40

50

濃度のリガンドで)。試験したNADの最も高い濃度(540 μM)では、停滞状態(60%前後の阻害)に達した13B5及び8F5を除く大半のブロッカーは、依然として最大限に切断を阻害していた(図3.10)。ATPを用いて得られた滴定曲線に基づいて、ブロッカーについて以下の順位を付けることができた; 13A7、13G9、7H6 > 8G11、8G12 > 8F5、13B5(表3.2)。3個のファミリー5のナノボディを比較したところ、PBライブラリに由来するクローン(8G11及び8G12)の両方が、DNAライブラリに由来するクローン(8F5)よりも優れたブロッカーであった。

【0555】

受容体調節ナノボディ(ブロッカー及びエンハンサー)を、3つ全てのレパートリー「DNA」、「PB」又は「細胞」から同定したが、最も効力のあるブロッカーは「細胞」ライブラリから同定された13A7(ATP及びNADアッセイにおけるIC50は、それぞれ6 nM及び11 nM)であった。対照的に、最も効力のあるエンハンサーである14D5は、「DNA」ライブラリから同定された。

【0556】

実施例3.12. 受容体調節効力の改善した多価ナノボディ

35アミノ酸GlySerリンカーによって連結した2つの同一ナノボディ配列の頭-尾遺伝子融合体からなる二価ナノボディ構築物を、機能的遮断ナノボディ13A7(ファミリー22、細胞)及び8G11(ファミリー5、PB)、並びに部分アゴニスト14D5(ファミリー17、DNA)から生成した。構築物を、特異的制限部位を含む種々のプライマーセットを用いた別個のPCR反応(一方はN末端ナノボディサブユニットに対し、一方はC末端ナノボディサブユニットに対する)によって作製した。LacZプロモーター、カナマイシンに対する抵抗性遺伝子及びOmpAシグナルペプチド配列を含有する、pUC119に由来する発現ベクターを使用した。シグナルペプチドのすぐ下流に、ナノボディ挿入のための多重クロニング部位、続いてDNA配列をコードする35Gly-Serリンカー、及び第2のナノボディ配列のクロニングのための第2の多重クロニング部位が存在する。このベクターは、得られるナノボディ-35Gly-Ser-ナノボディコード配列とインフレームで、C末端c-mycタグ及び(His)6タグをコードするものであった。ヌクレオチド配列の検証の後、3つ全ての二価mP2X7ナノボディ構築物を発現させ、精製した。大腸菌TG1細胞中で作製を行い、続いて実施例3.9に本質的に記載されるように、IMAC及び脱塩によってペリプラズム画分からHisタグを用いて精製した。

【0557】

mP2X7活性の増強における一価及び二価14D5の効力を、(実施例3.11に記載されるように)Yac-1細胞では細胞外ドメインシェディングが起こらない準最適ヌクレオチド濃度(ATPは33 μM、NADは1.5 μM)で、CD62L細胞外ドメインシェディングの増強を測定することによって比較した。一価14D5に対する二価14D5の効力の増大は、ATPによって誘導されたシェディングについてはおよそ220倍(IC50は22.6 nMに対して0.1 nM)、NADによって誘導されたシェディングについては40倍(IC50は4.1 nMに対して0.06 nM)であった。リガンドの非存在下では、一価14D5も二価14D5もP2X7のゲーティングを誘導することができなかった。

【0558】

図3.11に示されるように、2つの遮断ナノボディ13A7及び8G11の効力を、100 μM ATP及び20 μM NADのそれぞれで求めた。二価ナノボディ(Bivalents)13A7及び8G11は、ATP及びNADの両方についてナノモル以下の範囲の効力を有していた。一価13A7に対する二価13A7の効力の増大は中程度でしかなく、NAD誘導性シェディングの場合は23倍の増大、ATP誘導性シェディングの場合は9倍の増大であった(二価ナノボディのIC50はATPについては0.1 nM、NADについては0.3 nM)。8G11については、一価から二価への効力の増大ははるかに強く、146倍(NAD)及び84倍(ATP)(二価ナノボディのIC50はATPに

10

20

30

40

50

については 0.2 nM、NAD については 0.52 nM) であった。

【0559】

実施例 3.13. mP2X7 三量体上の異なるエピトープに対するナノボディ地図

近年、ゼブラフィッシュプリリン受容体 P2X4 の結晶構造が公表された (Kawate et al. 2009. Nature 460: 592-598)。利用可能な P2X4 構造 (pdb 3I5D 及び pdb 3H9V、分解能はそれぞれ 3.5 及び 3.1) に基づき、ホモロジーモデリングソフトウェア (Discovery Studio (Accelrys) に内蔵された Modeler) を用いて mP2X7 のモデルを構築した。ゼブラフィッシュ P2X4 と mP2X7 との配列同一性は、細胞外領域では 49% である。まず、マウス P2X7 の配列を既知の P2X4 構造の配列とアライメントした。配列アライメントでは、2つの配列間のギャップ及び保存されたジスルフィド結合の適切な位置決めを行うことに注意する。次に、既知の P2X4 構造の 3D 座標を使用して、未知の mP2X7 の 3D 座標を予測した。確率密度関数 (pdf) は幾何学的特徴の制約を表し、3D モデルを評価するために使用される。mP2X7 WT と同様のレベルの細胞外 mP2X7 発現を示す mP2X7 アルギニン突然変異体の既存のパネルのうち、7個の突然変異体を選択した (Adriouch et al. 2008, FASEB J 22: 861-869, Schwarzet al. Purinergic Signal 5: 151-161, 2009)。生成したモデルによると、これら 7個の突然変異体は、mP2X7 分子上に構造的に分散した 6つの領域を表す；突然変異体 R125A (部位 I；NAD 媒介性リポシル化に重要な R125 残基)、R294A (部位 I；ATP 結合に重要な溝に位置する残基)、R206A (部位 II；2つの mP2X7 相互作用単量体の界面近くに位置する機能獲得型突然変異体)；R151A (部位 III；抗 mP2X7 mAb Hano44 との結合に重要な残基；Adriouch et al. 2008, FASEB J 22: 861-869)；R178A (部位 IV)；R230A (部位 V)；R53K (部位 VI；2つの mP2X7 相互作用単量体の界面の膜貫通ドメイン近くに位置する残基)。ナノボディと mP2X7 との結合がこれらの置換によって影響され得るか否かを決定するために、種々のファミリーを代表する 24 個の精製ナノボディを、非トランスフェクト Hek293 細胞、及び WT 又は突然変異 mP2X7 受容体で一時的にトランスフェクトした Hek293 細胞との結合について評価した。フローサイトメトリーアッセイについては、ナノボディの検出は抗 Myc、その後ヤギ抗マウス-PE 複合体によって行ったが、P2X7 発現密度の推定はラットモノクローナル Hano43、その後二次抗ラット-PE 複合体での染色によって行った。Hek293 細胞へのバックグラウンド結合の減算による、種々の一時的トランスフェクタント (WT mP2X7 及び 7個の突然変異体) に対する発現密度の正規化の後、1 μM での種々のナノボディの残存結合を算出した。

【0560】

90% を超える結合の減少は、以下の 6 個のナノボディのみで検出された (全て突然変異体 R151A に対する結合)：ナノボディ 7H6 (細胞、415、ファミリー 11)、7D5 (細胞、415、ファミリー 14)、6B7 (PB、405、ファミリー 16)、7E2 (細胞、413、ファミリー 3)、8G11 (PB、418、ファミリー 5)、8G12 (PB、418、ファミリー 5)。これによって、他の全てのナノボディが、それらが別個の領域に結合すること、又はこれらのナノボディがそのフットプリント内で Arg 残基に結合しないことから、結合に関して Arg151 に決定的には依存しないことが推論される。予想された通り、mP2X7 特異的ラット抗体 Hano44 は、R151A 突然変異体に対していかなる結合も示さなかった。

【0561】

実施例 3.14. 「DNA」レパートリーの平均効力は、「PB」レパートリーと同程度であるが、「細胞」レパートリーよりも低い

4 個のファミリーのみが「DNA」ライブラリ及び「PB」ライブラリの両方から同定された。実施例 2.10 のように、特定のナノボディファミリー内の各々の変異体について、最も近縁なラマV 生殖細胞系列配列 (FR1 ~ FR3 を含む) に対する in vivo 成熟をスコア付けし、ナノボディ変異体の効力を比較した (表 3.3)。ファミリー 2

10

20

30

40

50

、ファミリー 5、ファミリー 15 及びファミリー 25 について、「PB」由来ナノボディは親 V 遺伝子生殖細胞系列配列に対して、平均して 19.5 個、16.5 個、10 個及び 14 個のアミノ酸突然変異を示したが、「DNA」ライブラリに由来するナノボディはそれぞれ 19.5 個、17 個、10.3 個及び 15 個であり、「DNA」由来ナノボディと「PB」由来ナノボディとの等しい成熟が示される。DNA 及び PB に由来するファミリー成員の CDR3 領域の配列を比較すると、DNA 配列に対する PB における多様性の増大がファミリー 5 及びファミリー 25 のみで観察される。

【0562】

表 3.3. 親 V 生殖細胞系列配列に対する *in vivo* 成熟ナノボディの遺伝的距離

【表 3 1】

ナノボディファミリー (ラマ)	ファミリー内の ナノボディ 変異体	ラマ 生殖細胞 系列	ライブラリ	標的相互作用効力		親V生殖細胞 系列に対するアミノ 酸突然変異 の数 ¹	DNAクロー ンと異なるCDR3 中のアミノ 酸の数
				FACS による MFI (プレ Myco インキュ ベーション)	(吸収比、 ELISA)		
2 (417)	1C9	VHH1e	DNA	19	6	19	0
	1A8		DNA	18	21	20	0
	20C9		PB	97	11	20	0
	20B10		PB	85	8	19	0
5 (418)	14F6	VHH2a/ b	DNA	nd	15	16	0
	8B4		DNA	71	13	17	0
	8H5		DNA	24	12	18	0
	6A11		DNA+PB	53	17	18	0
	8E6		DNA	69	12	19	0
	14G4		DNA	nd	34	19	0
	8F5		DNA	143	16	15	2
	8H6		DNA	43	17	15	2
	8H4		DNA	65	27	17	2
	14F10		PB	nd	19	17	1
	14G11		PB	nd	30	18	2
	8G11		PB	166	26	19	1
	8G12		PB	166	36	16	1
	8D10		PB	94	18	16	1
	8H10		PB	94	19	16	1
	8B12		PB	93	38	16	1
	8C12		PB	89	28	15	1
6H10	PB	44	7	15	0		
8A11	PB	17	11	16	1		
15 (414)	16D9	VHH-3	DNA+PB	53	7	10	0
	19C2		DNA	64	18	10	0
	19E3		DNA	55	8	10	0
	1G6		DNA	11	12	11	0
25 (407)	18C1	VHH- 1e	DNA	63	18	15	0
	18A7		PB	69	14	14	2

10

20

30

40

50

¹ 欠失又は付加を含むいかなる変化も突然変異の数を算出する上で考慮される。

【 0 5 6 3 】

「DNA」レパートリー、「PB」レパートリー及び「細胞」レパートリーにそれぞれ由来する20個、37個及び29個のナノボディ変異体の平均吸着比(ELISA)は、それぞれ13、13及び26であり(図3.12)、この標的に対する「細胞」由来ナノボディの優位性が示される。これらの観察結果は、最も効力のある結合因子(13A7、7D5及び7E2、実施例3.10)及び最も効力のあるブロッカー(13A7)の両方が「細胞」レパートリーから同定されたことから、モノクローナルナノボディレベルでも示される。しかしながら、個々のファミリーを考える場合、ファミリー5については(他ではない)、DNAレパートリーに対するPBの平均効力の明らかな増大が観察される(吸着比は18に対して23、FACSによる平均蛍光強度は66に対して95)。このことから、このファミリーにおいては細胞追加免疫の結果として親和性成熟が起こったことが示唆される。他の3つのファミリーでは、細胞追加免疫によって効力は改善しなかった。しかしながら、機能的ナノボディの効力の順位では、最も効力のあるエンハンサー14D5はDNAレパートリーに由来するが、二番目に良好なブロッカーはPBレパートリーのファミリー5に由来するものであった。どちらのファミリーも、DNA免疫付与後に最も強いHcAb媒介性血清応答を示すラマである(図3.4B)ラマ418から同定された。

10

【 0 5 6 4 】

実施例3.15. 標的カクテルによる遺伝子免疫付与は個々の標的の各々に特異的なナノボディの同定を可能にする

20

ラマ等の非近交系動物の免疫付与によって、個々の動物間で非常に多様な標的特異的体液性応答の規模(magnitudes)が生じた。この効果は、GPCR及びイオンチャネル等といった複数の膜貫通ドメインを含有する低免疫原性の細胞表面発現受容体による遺伝子免疫付与後にさらに顕著である(実施例2.4及び実施例3.1)。検出可能なHcAb媒介性標的特異的応答は発見効率を少なくとも増大させることが予想される。したがって、任意の種類のカクテル(細胞結合分子及び非細胞結合分子)による非近交系動物の遺伝子免疫付与は有利であり得る。動物の数を増加させることによって、可用性に負担をかけることなく、より多くの(大規模(high magnitude)の)標的レスポンド(responders)を同定する可能性が増大する。カクテルDNAワクチン接種の一例として、本発明者らは2頭のラマ(405及び418)を、マウス及びヒト起源の2つのイオンチャネルP2X7によって実施例3.2に記載されるように免疫付与した。マウス及びヒトのP2X7間のアミノ酸同一性は十分に異なり(80.5%の配列同一性)、同定された全てのマウスP2X7ナノボディはヒトP2X7との交差反応性を欠いている(実施例3.10)ため、マウス及びヒトのP2X7を、カクテル遺伝子免疫付与アプローチを実証するための関連標的例として利用することができる。

30

【 0 5 6 5 】

hP2X7特異的ナノボディを同定するために、実施例3に本質的に記載されるように、細胞に基づいた選択を行い、hP2X7特異的ナノボディを濃縮した。選択はラマ405及びラマ418の各々に由来するプールした「DNA」(PBL1+PBL2)及び「PB」(PBL2+PBL3+LN)ライブラリに対し、全ての多様性を維持し、ライブラリを動物毎に分けて行った。安定なhP2X7トランスフェクトYAC-1細胞及びhP2X7-Art2.2トランスフェクトCHO細胞を、それぞれ1回目及び2回目の選択に使用した。2回目の選択の後、濃縮係数を非トランスフェクトCHO細胞に対する、hP2X7トランスフェクト細胞から溶出したファージの数の比として算出した。濃縮係数は、ラマ405及びラマ418に由来するライブラリについては、それぞれ15倍及び7倍であり、hP2X7ナノボディの存在が示され、両方のイオンチャネルに対するナノボディの同定の成功が示唆された。

40

【 0 5 6 6 】

hP2X7選択後のファージアウトプットによる大腸菌TG1の感染の後、個々のクロ

50

ーンを取り出し、ペリプラズム抽出物を実施例 1 . 4 のように調製した。このペリプラズム抽出物を使用して、マウス P 2 X 7 に対して行った場合（実施例 3 . 5 ）と同様に、フローサイトメトリーによってヒト P 2 X 7 に対する特異性を決定する。ペリプラズム抽出物は、h P 2 X 7 トランスフェクト細胞株（C H O 又は H E K 2 9 3 等）では明らかな染色を示すが、マウス P 2 X 7 をトランスフェクトした同一の親細胞株、又は同じ非トランスフェクト W T 細胞株ではバックグラウンドを超えず、h P 2 X 7 に特異的であると考えられる。h P 2 X 7 特異性は、E C 5 0 を決定するのと同じ方法で精製ナノボディを用いて用量依存的に確認される。

【 0 5 6 7 】

実施例 4 . 1 . ヘリオス遺伝子銃を用いたラマの遺伝子免疫付与に続く、体液性 C X C R 7 特異的血清力価の誘導

10

遺伝子免疫付与後に標的特異的ナノボディを同定する第 2 の G P C R 例として、ケモカイン受容体 C X C R 7 を選択した。ヒト C X C R 7 をコードする c D N A を p V A X 1 にクローニングし、プラスミド D N A を実施例 2 . 1 に記載されるように精製した。トランスフェクション後、実施例 2 . 2 に記載されるものと同様の検出法に従って、親 W T 細胞に対する C X C R 7 トランスフェクト W T 細胞の染色差によって確認したところ、p V A X 1 - C X C R 7 構築物は細胞表面で未変性 C X C R 7 の発現を示した（データは図示せず）。

【 0 5 6 8 】

4 頭のラマ（3 9 1、3 9 5、3 9 6 及び 3 9 7）を、実施例 2 . 4 に記載されるように皮内ジェット注射によって免疫付与した。単回の 2×10^7 個の C A K I / h C X C R 7 細胞の注射を 4 回目の D N A 免疫付与後 4 2 日目 ~ 5 6 日目に投与した。3 頭のラマ（3 8 5、3 8 7 及び 4 0 4）を、 2×10^7 個の安定にトランスフェクトした C X C R 7 / H E K 2 9 3 細胞を 1 4 日間隔で 4 回注射することによって免疫付与した。C X C R 7 特異的血清 I g G 力価を、D N A ワクチン接種及び単回細胞追加免疫後の免疫前血清試料及び免疫血清試料を用いて、実施例 2 . 4 と同様に求めた。7 頭のラマのいずれもその 2 つの免疫付与計画の後、C X C R 7 特異的体液性応答を示さなかった。

20

【 0 5 6 9 】

別の免疫付与実験において、4 頭のラマ（4 3 4、4 3 9、4 4 1 及び 4 4 4）を、ヘリオス遺伝子銃を用いて、実施例 3 に記載されるように遺伝子免疫付与した。要するに、4 回の D N A 投与を 2 週間間隔で適用し（1 回の投与当たり 2 4 ショット）、その後 C A K I トランスフェクト C X C R 7 細胞（2 E 7 個の細胞）の単回細胞追加免疫を行った。4 回目の D N A 投与後 8 日目の免疫前血液試料、及び単回細胞追加免疫後 8 日目の最後の血液試料を各々のラマから回収し、標的特異的血清力価を実施例 2 . 4 に記載されるように F A C S によって求めた。免疫付与した 4 頭のラマのうち、1 頭のラマ（4 4 4）のみが、免疫前レベルと比べて C X C R 7 トランスフェクト H E K 2 9 3 細胞で、「D N A」及び細胞追加免疫後血清試料について中程度ではあるが一貫して増大した M C F を試験した全ての希釈率で示した（図 4 . 1）。並行して、4 頭のラマ（4 3 5、4 3 6、4 3 7、4 4 0）を、C X C R 7 トランスフェクト C A K I 細胞を 2 週間間隔で 4 回細胞注射すること（1 回の注射につき 2×10^7 個の細胞）によって免疫付与した。ラマ 4 4 4 とは対照的に、後者の 4 頭のラマのいずれも検出可能な C X C R 7 血清力価を示さなかった。

30

40

【 0 5 7 0 】

実施例 4 . 2 . 検出可能な C X C R 7 特異的血清変換の非存在下での標的特異的ナノボディの同定

ラマ 3 9 1、ラマ 3 9 5、ラマ 3 9 6 及びラマ 3 9 7 の各々について、遺伝子免疫付与及び細胞追加免疫の後に回収した免疫組織からライブラリを構築した（それぞれ D N A レパートリー及び P B レパートリー）。3 個のさらなるライブラリを、細胞免疫付与したラマ 3 8 5、ラマ 3 8 7 及びラマ 4 0 4 から構築した。ライブラリの概要を表 4 . 1 にまとめる。1 1 個全てのライブラリについて、ファージディスプレイ選択を 1 0（1 回目及び 2 回目の選択）及び 1（2 回目の選択）単位の C X C R 7 膜小胞に対し、先に記載される

50

ように（実施例 2.6）行った。2 回目の選択アウトプットの全てから、853 個のクローンがスクリーニングされた（1 個のライブラリにつき 31 個～155 個の個々のクローン）。結果を表 4.1 にまとめる。CXCR7 特異性を、2 単位の CXCR7 膜小胞に対し、1 mL の培養物から調製したファージ上清の 10 倍希釈物を適用して、ファージ ELISA によって求めた。非トランスフェクト対照膜小胞と比べて、hCXCR7 膜小胞について最低で 2 倍増大した ELISA シグナルを示す 234 個のナノボディを、CXCR7 特異的であると見なした。動物及びレポーターについての 2 回目のヒット率を表 4.1 にまとめる（4%～61% の範囲）。種々の免疫付与戦略後の 2 回目の選択アウトプットに対する平均ヒット率に基づく、発見効率は「DNA」レポーター、「PB」レポーター及び「細胞」レポーターについて、それぞれ 29%、28% 及び 26% であると算出された（図 4.2）。CXCR7 に対する検出可能な HcAb 力価の非存在下であっても、標的特異的ナノボディが全ての免疫付与戦略（DNA、PB、細胞）から同定された。234 個全ての CXCR7 特異的ナノボディをシーケンシングし、重複するナノボディ（同一のアミノ酸配列）を除外した。これにより、46 個の異なるナノボディ B 細胞系列に属する 78 個の特有の配列が同定された（表 4.1）。ファミリー内で同定された変異体（最低で 1 アミノ酸残基差）の数は 1～12 の範囲であった。1 頭のラマにつき同定された CXCR7 特異的ナノボディファミリーの平均数はそれぞれ、細胞免疫付与後に 5.3（385、387、404）、DNA 免疫付与によって 7.5（DNA + 細胞追加免疫；391、395、396、397）であり、この標的について、遺伝子免疫付与（DNA + PB）が細胞免疫付与によって得られた多様性と比べて、より高いナノボディファミリー多様性をもたらしたことが示される。

10

20

【0571】

表 4.1. CXCR7 特異的ナノボディファミリーの発見概要

【表 3 2】

ラマ番号	免疫原	CXCR7 応答 (FACS)	ライブラリ	特異性 スクリーニング ヒット率 (ELISA)	異なるCXCR7 特異的ナノボディ ファミリー (その一部はリガン ド置換されている) の数
391	DNA	-	DNA	26% (12/46)	4
	CXCR7/CAKI	-	PB	18% (8/44)	2
395	DNA	-	DNA	45% (62/138)	6
	CXCR7/CAKI	-	PB	29% (9/31)	4
396	DNA	-	DNA	17% (8/46)	3
	CXCR7/CAKI	-	PB	61% (22/36)	2
397	DNA	-	DNA	17% (24/138)	6
	CXCR7/CAKI	-	PB	10% (4/42)	3
385	CXCR7/Hek29 3	-	細胞	46% (71/155)	7
387	CXCR7/Hek29 3	-	細胞	4% (2/45)	2
404	CXCR7/Hek29 3	-	細胞	9% (12/132)	7

【0572】

受容体機能調節ナノボディを同定するために、SDF-1リガンド置換アッセイを、CXCR7/HEK293膜抽出物を用いて、CXCR4について記載される場合(実施例2.7)と同様に行った。CXCR7/HEK293膜抽出物への残存 $[^{125}I]$ -SDF-1結合の明らかな減少を示すナノボディを、リガンド競合相手であると見なした。リガンドディスプレイサであるとスコア付けされたナノボディファミリーの数を表4.1に示すが、リガンド競合ナノボディが免疫付与戦略(レパトリーDNA、レパトリーPB及びレパトリー細胞によって表される)に関係なく同定されることが示される。

【0573】

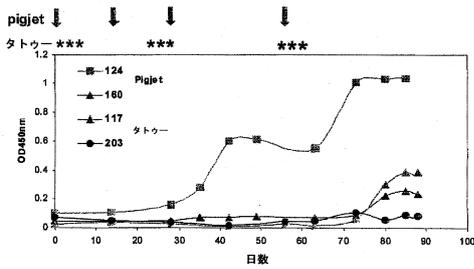
実施例4.3. 遺伝子免疫付与後の細胞追加免疫によって、異なるナノボディレパトリーが生成される

ラマ391、ラマ395、ラマ396及びラマ397から、(シーケンシングした234個のうち)55個のナノボディ配列変異体からなる29個のCXCR7特異的ナノボディファミリーが同定された。実施例2(CXCR4)及び実施例3(P2X7)での所見とは対照的に、最低で1個の同一の変異体を含む2個のファミリーを、ラマ396のDNAレパトリー及びPBレパトリーの両方において同定することができた。これら29個のファミリーのうち2個についてしか(全ファミリー多様性の7%)、同じファミリーに属するナノボディ変異体が「DNA」ライブラリ及び「PB」ライブラリから同定されず(表4.1及び図4.3)、この場合もDNAワクチン接種(DNA)又は細胞追加免疫(PB)後のナノボディレパトリーが異なることが示唆される。遺伝子免疫付与のみによって異なるナノボディレパトリーがもたらされ、レパトリーの一部が細胞

追加免疫後に同定されないか、又は失われることが示される。

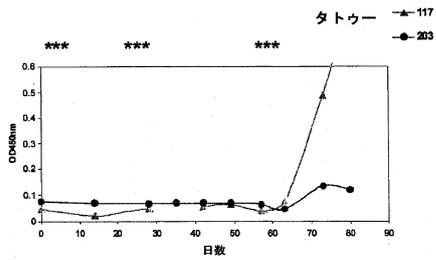
【図 1.1 A】

Figure 1.1. パネルA



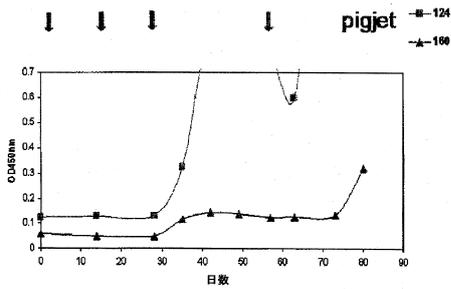
【図 1.1 C】

Figure 1.1 パネルC



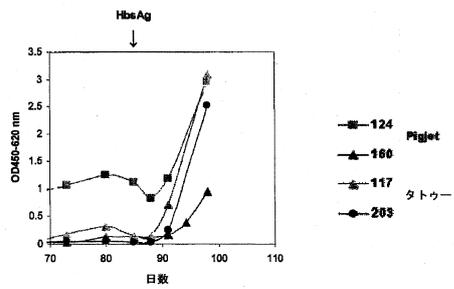
【図 1.1 B】

Figure 1.1. パネルB



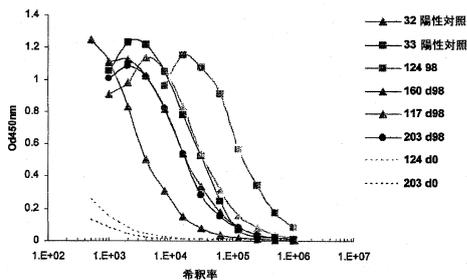
【図 1.2】

Figure 1.2



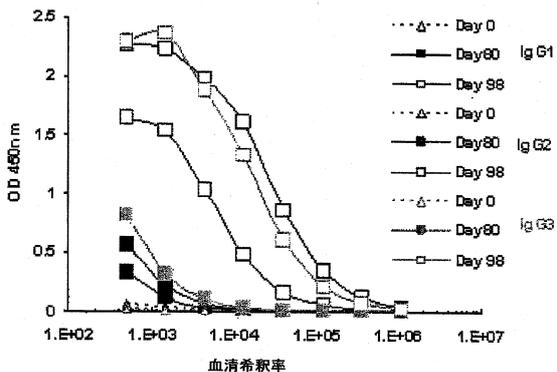
【 図 1 . 3 】

Figure 1.3.



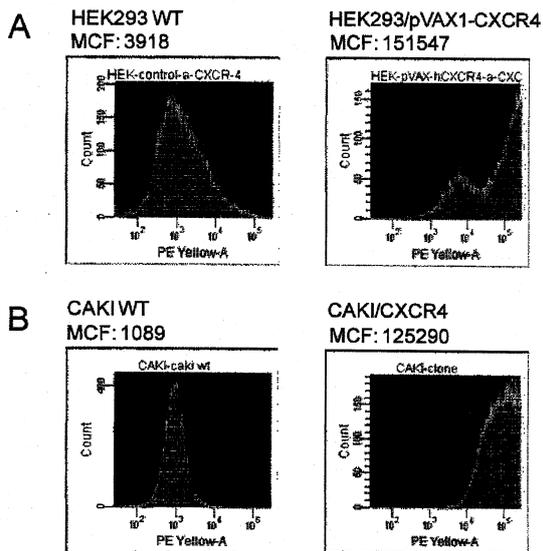
【 図 1 . 4 】

Figure 1.4.



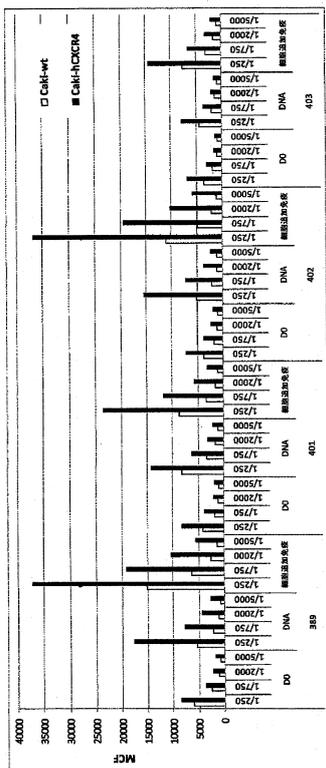
【 図 2 . 1 】

Figure 2.1.



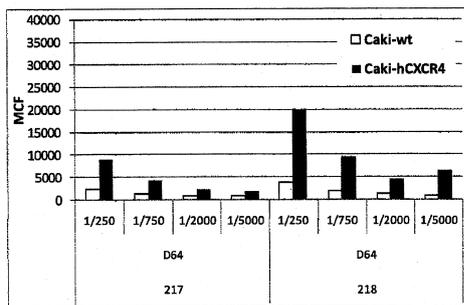
【 図 2 . 2 A 】

Figure 2.2. パネルA



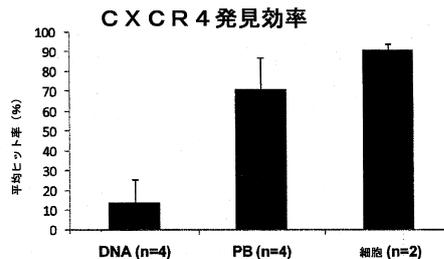
【 図 2 . 2 B 】

Figure 2.2. パネルB



【 図 2 . 3 】

Figure 2.3



【 図 2 . 4 】

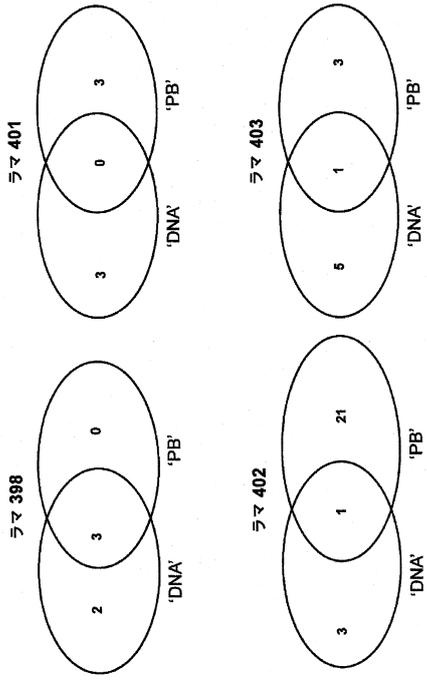


Figure 2.4.

【 図 2 . 5 A 】

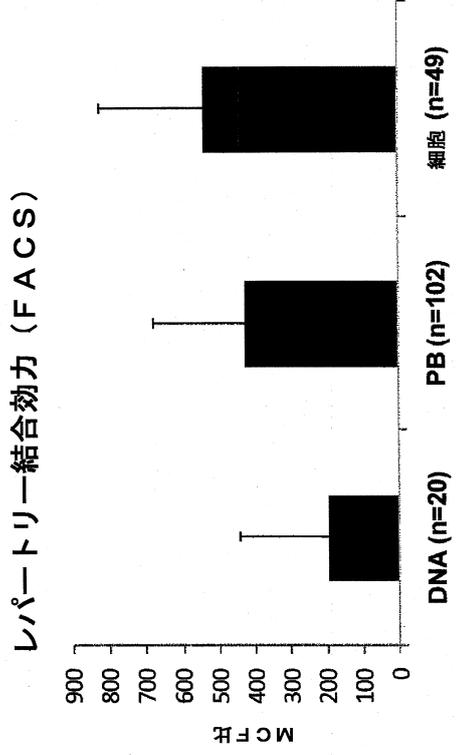


Figure 2.5. パネルA

【 図 2 . 5 B 】

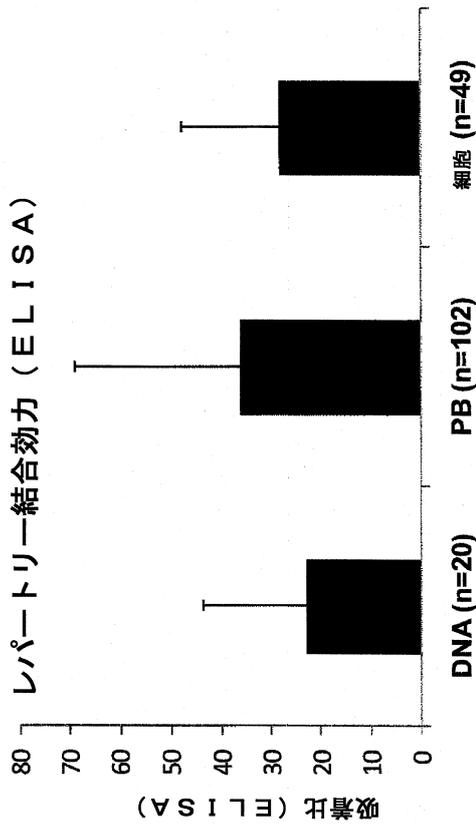


Figure 2.5. パネルB

【 図 3 . 1 】

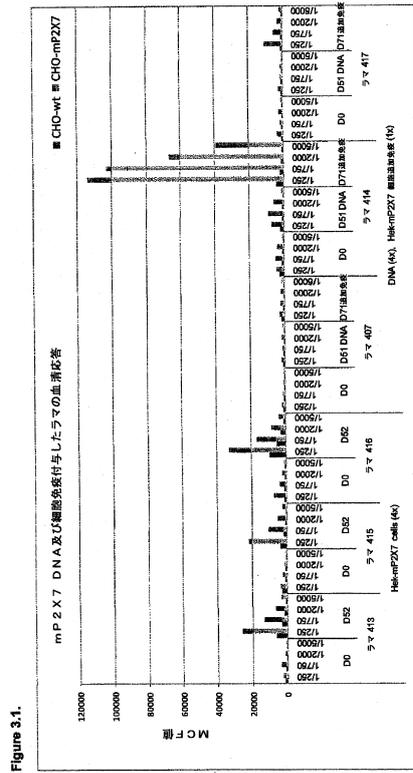
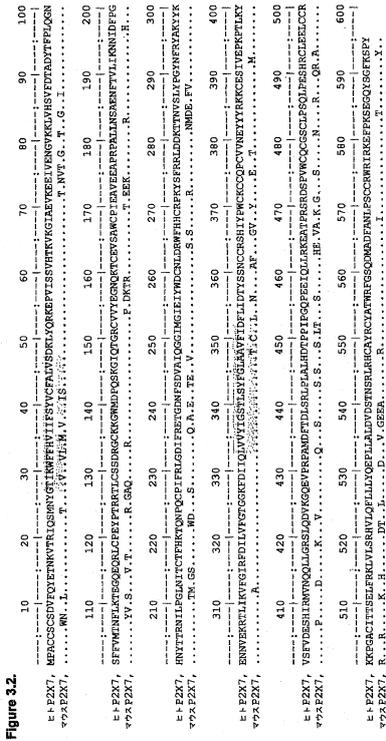


Figure 3.1.

【 図 3 . 2 】



膜貫通ドメイン

【 図 3 . 3 】

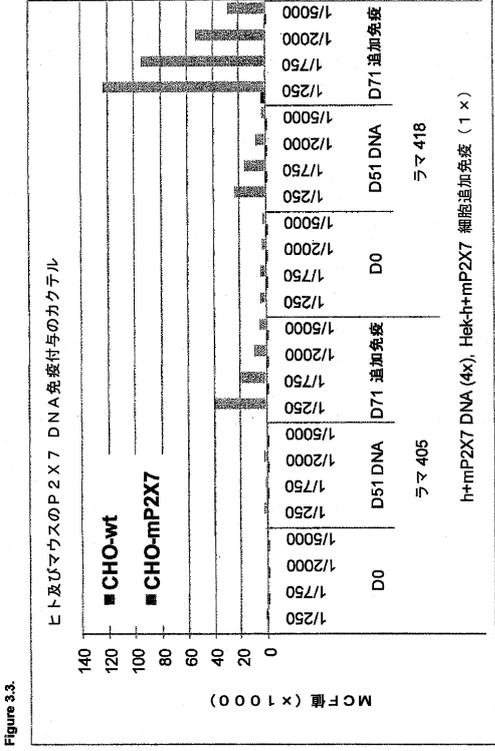
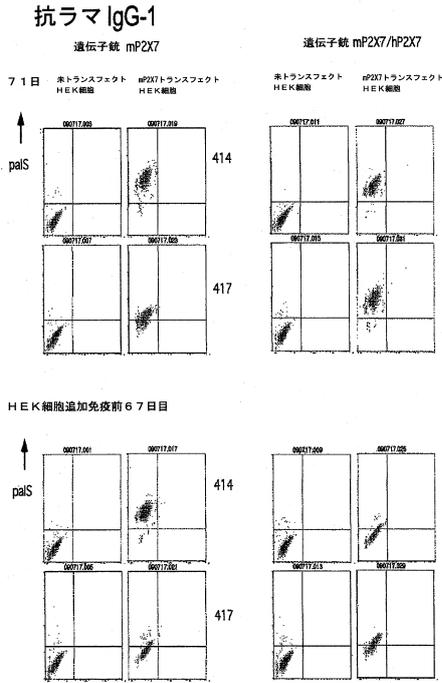


Figure 3.3

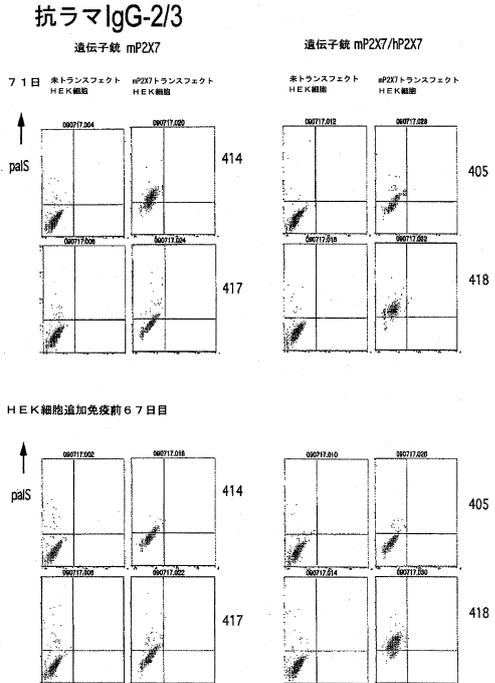
【 図 3 . 4 A 】

Figure 3.4. A



【 図 3 . 4 B 】

Figure 3.4. B



【 図 3 . 5 】

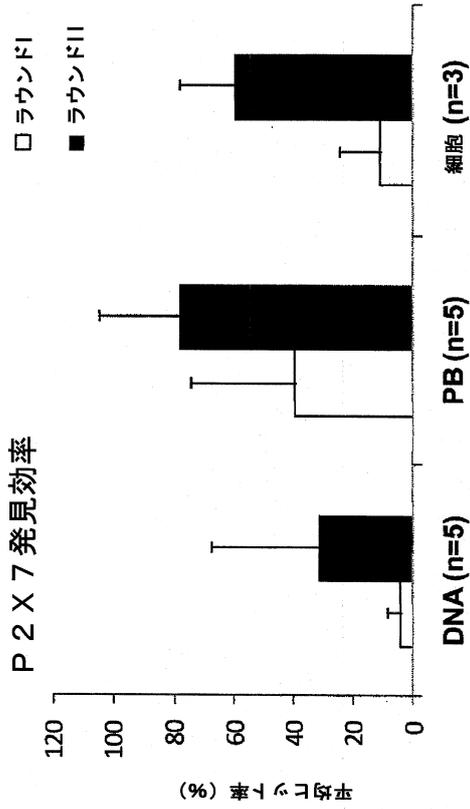


Figure 3.5.

【 図 3 . 6 】

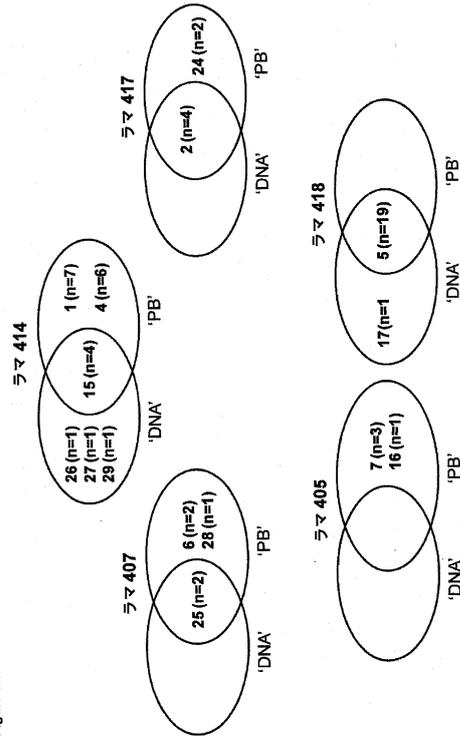


Figure 3.6.

【 図 3 . 7 】

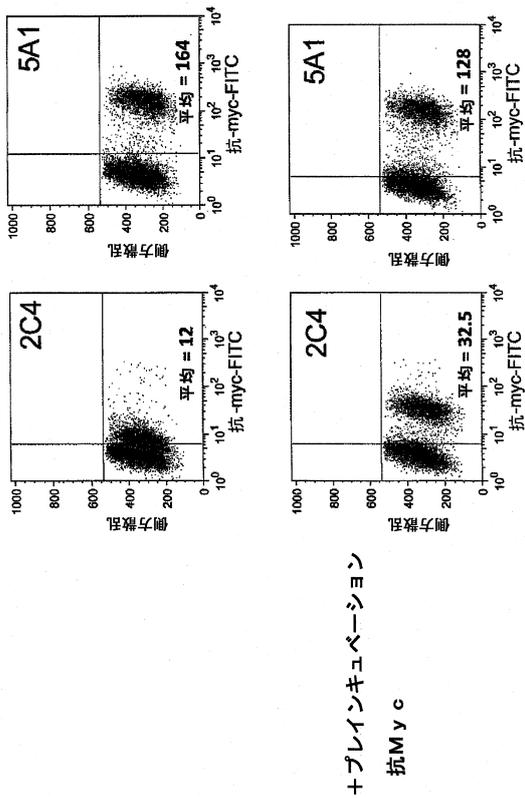
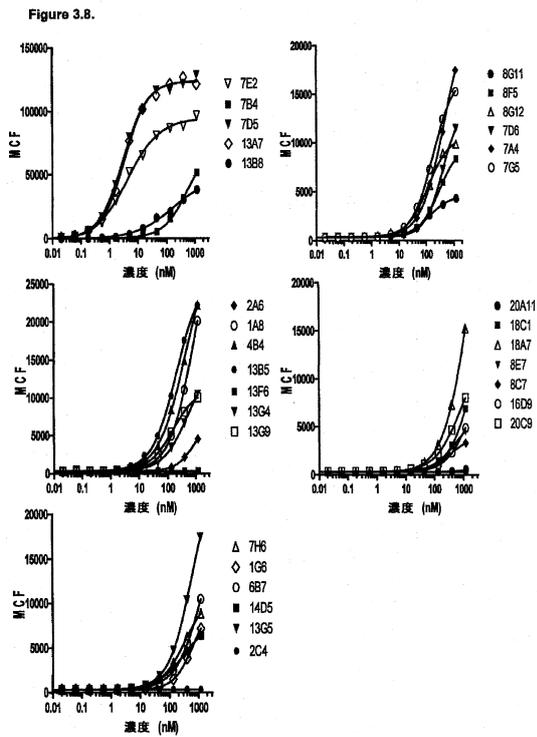


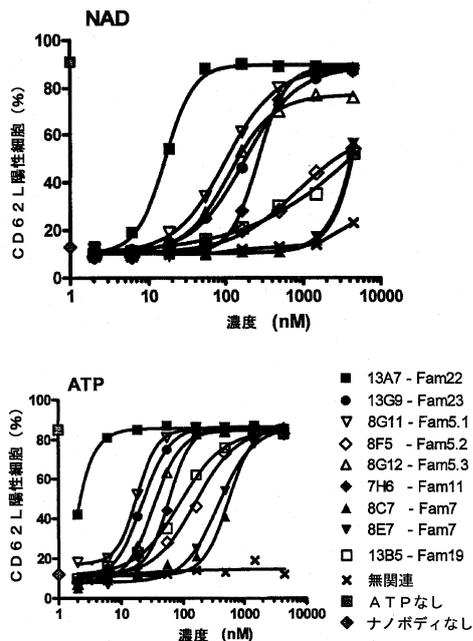
Figure 3.7.

【 図 3 . 8 】



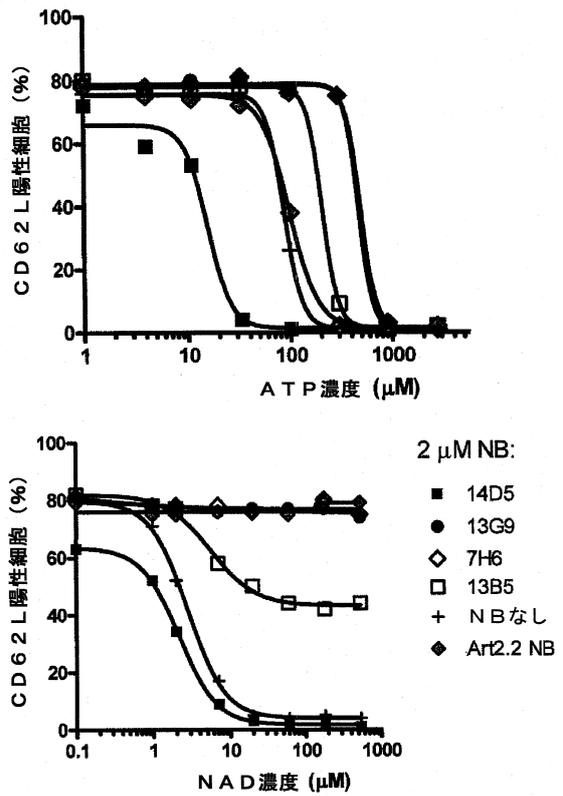
【図 3.9】

Figure 3.9.



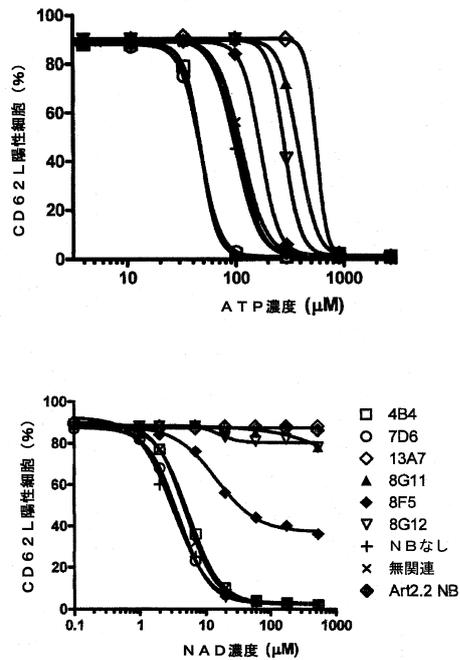
【図 3.10 A】

Figure 3.10. パネルA/B



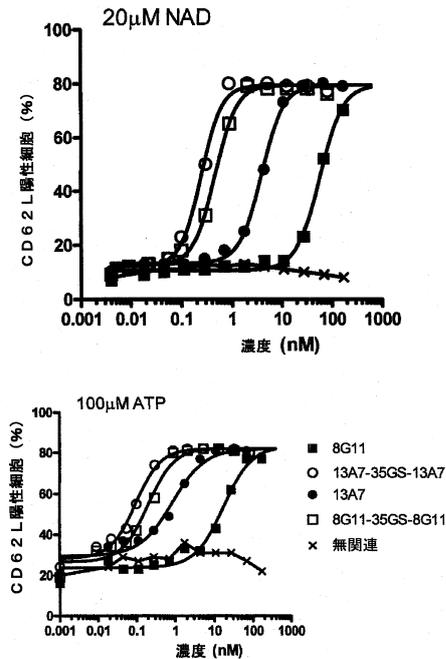
【図 3.10 C】

Figure 3.10. パネルC/D



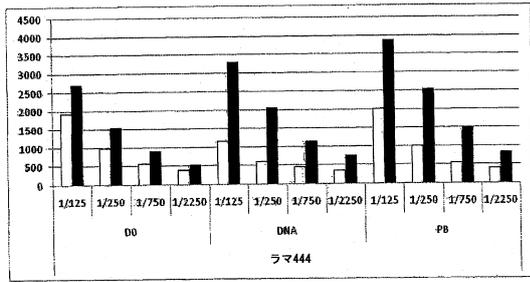
【図 3.11 A】

Figure 3.11. パネルA/B



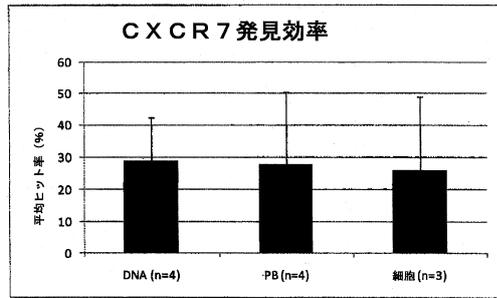
【 図 4 . 1 】

Figure 4.1.



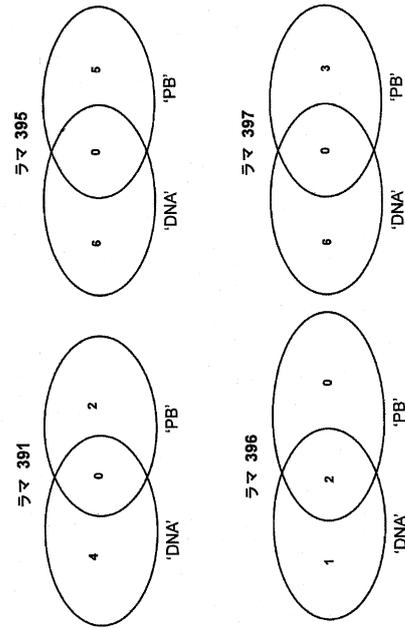
【 図 4 . 2 】

Figure 4.2.



【 図 4 . 3 】

Figure 4.3.



【 配列表 】

0006034435000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 ゴンザレス, マリア
ポルトガル, ペー - 4 2 0 0 - 5 3 4 ポルト, 3 エー エスィー ケー, ナンバー 88, プ
ラカ アルツール サントス シルバ
- (72)発明者 アスカオ, ジョアナ
ポルトガル, ペー - 4 4 6 0 - 4 7 9 セニョーラ ダ オーラ, ナンバー 1 ディレティオ,
エントラダ 2, ルア キンタ ド ヴィーゾ ナンバー 126
- (72)発明者 ファン ロンバエイ, フィリップ
ベルギー, ペー - 9 0 9 0 メッレ, リートフェルトストラート 29

審査官 北村 悠美子

- (56)参考文献 国際公開第2008/043145(WO, A1)
Cellular Immunology, 2005年, Vol.236, p.72-77
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2001年, Vol.276, No.26, p.23262-23267
Blood, 1998年, Vol.92, No.10, p.3521-3528
The FASEB Journal, 2007年, Vol.21, p.3490-3498

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 16/00 - 16/46
C12N 15/00 - 15/90
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)