(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2011-24581
(P2011-24581A)
(43)公開日　平成23年2月10日(2011.2.10)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	2G045
C07K 16/24	(2006.01)	C07K	16/24		4B024
A61K 47/48	(2006.01)	A61K	47/48		4C076
A61K 38/00	(2006.01)	A61K	37/02		4C084
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	D	4C085

審査請求 有　請求項の数 41　ＯＬ　（全 63 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2010-175199 (P2010-175199)
(22)出願日　平成22年8月4日 (2010.8.4)
(62)分割の表示　特願2005-502085 (P2005-502085)の分割
原出願日　平成15年11月7日 (2003.11.7)
(31)優先権主張番号　60/425,073
(32)優先日　平成14年11月8日 (2002.11.8)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　60/425,063
(32)優先日　平成14年11月8日 (2002.11.8)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　03447005.4
(32)優先日　平成15年1月10日 (2003.1.10)
(33)優先権主張国　欧州特許庁 (EP)

(71)出願人　505166225
アブリンクス　エン．ヴェー．
ベルギー，ベー－９０５２　ツヴィナールデ，テヒノロギーパルク　２１
(74)代理人　100088904
弁理士　庄司　隆
(72)発明者　シレンス，カレン
ベルギー，ベー－３０９０　オヴェリセ，ジーン　トンベウーストラート　２１
(72)発明者　ロウェレイス，マルク
ベルギー，ベー－９４５０　ハールテルト，ウィルゲンストラート　２
(72)発明者　デ　ハールド，ハンス
オランダ，エンエル－４４３６　エンアーオウデランデ，’テー　ツヴィント　１
最終頁に続く

(54)【発明の名称】腫瘍壊死因子αを標的とする単一ドメイン抗体およびその使用

(57)【要約】　（修正有）
【課題】ＴＮＦ‐αに結合する１種または複数の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド、前記ポリペプチドの相同物、前記ポリペプチドの相同物の機能部分の提供。
【解決手段】腫瘍壊死因子αを標的とする単一ドメイン重鎖抗体に由来するポリペプチド、ラクダ科ＶＨＨである単一ドメイン抗体、前記ポリペプチドの投与方法、ＴＮＦ‐α受容体を調節する作用薬のスクリーニング用プロトコル、および前記スクリーニングの結果として生じた作用薬。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
（ａ）配列番号１～１６および７９～８４のいずれかの配列を含む抗ＴＮＦ－α単一ドメイン抗体；
（ｂ）１×１０$^{-6}$Ｍ以上の親和性でＴＮＦ－αと結合することができ、配列番号１～１６および７９～８４のいずれかの配列と７０％以上の配列相同性を示す配列を含む、抗ＴＮＦ－α単一ドメイン抗体；
（ｃ）１×１０$^{-6}$Ｍ以上の親和性でＴＮＦ－αと結合することができる（ａ）または（ｂ）の機能的部分を含む抗ＴＮＦ－α単一ドメイン抗体
から選択される、少なくとも１個の抗ＴＮＦ－α単一ドメイン抗体を含む抗ＴＮＦ－αポリペプチド。
【請求項２】
（ａ）配列番号１～５および１４のいずれかの配列によって表される配列；
（ｂ）配列番号１～５および１４のいずれかの配列と７０％以上の配列相同性を示す相同配列；
（ｃ）１×１０$^{-6}$Ｍ以上の親和性でＴＮＦ－αと結合することができる（ａ）または（ｂ）の機能的部分
を含む少なくとも１個の抗ＴＮＦ－α単一ドメイン抗体を含むポリペプチドである、請求項１に記載の抗ＴＮＦ－αポリペプチド。
【請求項３】
さらに、血清蛋白質を標的とする少なくとも１種の単一ドメイン抗体を含む、請求項１または２に記載の抗ＴＮＦ－αポリペプチド。
【請求項４】
前記血清蛋白質が、血清アルブミン、血清免疫グロブリン、サイロキシン結合蛋白質、トランスフェリン、またはフィブリノーゲンのいずれかである、請求項３に記載の抗ＴＮＦ－αポリペプチド。
【請求項５】
配列番号２６～２９および８５～９７のいずれかの配列を含む血清蛋白質を標的とする少なくとも１種の単一ドメイン抗体である、請求項３または４に記載の抗ＴＮＦ－αポリペプチド。
【請求項６】
配列番号３０～４３のいずれかの配列を含む、請求項３～５のいずれかに記載の抗ＴＮＦ－αポリペプチド。
【請求項７】
さらに、抗ＩＦＮ－γ単一ドメイン抗体、抗ＴＮＦ－α受容体単一ドメイン抗体、および抗ＩＦＮ－γ受容体単一ドメイン抗体からなる群から選択した少なくとも１種の単一ドメイン抗体を含む、請求項１～６のいずれかに記載の抗ＴＮＦ－αポリペプチド。
【請求項８】
ＴＮＦ－αを標的とする単一ドメイン抗体数が、少なくとも２個である、請求項１または７に記載の抗ＴＮＦ－αポリペプチド。
【請求項９】
配列番号７３～７６のいずれかの配列によって表される配列に相当する、請求項８に記載の抗ＴＮＦ－αポリペプチド。
【請求項１０】
少なくとも１種の単一ドメイン抗体が、ヒト化ラクダ科ＶＨＨである、請求項１～９のいずれかに記載の抗ＴＮＦ－αポリペプチド。
【請求項１１】
配列番号１７～１９および２１～２４のいずれかの配列を含む少なくとも１種のヒト化ラクダ科ＶＨＨである、請求項１０に記載の抗ＴＮＦ－αポリペプチド。
【請求項１２】

請求項１～１１のいずれかに記載の抗ＴＮＦ－αポリペプチド、ならびに抗ＩＦＮ－γ単一ドメイン抗体、抗ＴＮＦ－α受容体単一ドメイン抗体、抗ＩＦＮ－γ受容体単一ドメイン抗体、および薬剤として許容される担体からなる群から選択した少なくとも１種の単一ドメイン抗体を含み、対象に同時投与、分別投与、または逐次投与するための組成物。

【請求項１３】

配列番号４４～７２のいずれかの配列を含む少なくとも１個の抗ＩＦＮ－γ単一ドメイン抗体である、請求項７～１１のいずれかに記載の抗ＴＮＦ－αポリペプチド、または請求項１２に記載の組成物。

【請求項１４】

少なくとも１種の単一ドメイン抗体が、ラクダ科ＶＨＨである、請求項１～１１、および１３のいずれかに記載の抗ＴＮＦ－αポリペプチド、または請求項１２に記載の組成物。

【請求項１５】

請求項１～１１、１３または１４のいずれかに記載の抗ＴＮＦ－αポリペプチドをコードする核酸。

【請求項１６】

請求項１～１１、１３または１４のいずれかに記載の抗ＴＮＦ－αポリペプチドと、腫瘍壊死因子αの結合を調節する作用薬を同定する、以下のステップを含む方法：

（ａ）候補調節物質の存在下および非存在下において、前記ポリペプチドと標的間の結合を可能にする条件下で、請求項１～１１、１３または１４のいずれかに記載の抗ＴＮＦ－αポリペプチドを、腫瘍壊死因子αである標的に接触させる、ならびに

（ｂ）前記ポリペプチドとステップ（ａ）の標的との間の結合を測定し、前記候補調節物質の非存在下での結合に比べて、前記候補調節物質の存在下で結合が減少することによって、前記候補調節物質を、請求項１～１１、１３または１４のいずれかに記載の抗ＴＮＦ－αポリペプチドと、腫瘍壊死因子αの結合を調節する作用薬として同定する。

【請求項１７】

請求項１～１１、１３または１４のいずれかに記載の抗ＴＮＦ－αポリペプチドと、腫瘍壊死因子αの結合を通して、腫瘍壊死因子αが介在する疾患を調節する作用薬を同定する、以下を含む方法：

（ａ）候補調節物質の存在下および非存在下において、前記ポリペプチドと標的間の結合を可能にする条件下で、請求項１～１１、１３または１４のいずれかに記載の抗ＴＮＦ－αポリペプチドを、腫瘍壊死因子αである標的に接触させる、ならびに

（ｂ）前記ポリペプチドとステップ（ａ）の標的との間の結合を測定し、前記候補調節物質の非存在下での結合に比べて、前記候補調節物質の存在下で結合が減少することによって、前記候補調節物質を腫瘍壊死因子αが介在する疾患を調節する作用薬として同定する。

【請求項１８】

請求項１～１１、１３または１４のいずれかに記載の抗ＴＮＦ－αポリペプチドと、腫瘍壊死因子αの結合を通して、腫瘍壊死因子αと該受容体の結合を調節する作用薬を同定する、以下を含む方法：

（ａ）候補調節物質の存在下および非存在下において、前記ポリペプチドと標的間の結合を可能にする条件下で、請求項１～１１、１３または１４のいずれかに記載の抗ＴＮＦ－αポリペプチドを、腫瘍壊死因子αである標的に接触させる、ならびに

（ｂ）前記ポリペプチドとステップ（ａ）の標的との間の結合を測定し、前記候補調節物質の非存在下での結合に比べて、前記候補調節物質の存在下で結合が減少することによって、前記候補調節物質を腫瘍壊死因子αとその受容体の結合を調節する作用薬として同定する。

【請求項１９】

請求項１～１１、１３または１４のいずれかに記載の抗ＴＮＦ－αポリペプチド、ならびに腫瘍壊死因子α、それらのためのパッケージング材、および使用説明書を含む、腫瘍

壊死因子αが介在する疾患を調節する作用薬をスクリーニングするためのキット。
【請求項２０】
炎症過程に関連付けられる疾患を治療し、かつ／または予防し、かつ／または緩和するための、請求項１～１１、１３または１４のいずれかに記載の抗ＴＮＦ－αポリペプチド、請求項１５に記載の核酸、請求項１２または１３に記載の組成物。
【請求項２１】
不活化されることなく、胃環境を通過することができるＴＮＦ－α調節物質により調節が可能な疾患を治療し、かつ／または予防し、かつ／または緩和するための、請求項１～１１、１３または１４のいずれかに記載の抗ＴＮＦ－αポリペプチド、あるいは請求項１２に記載の組成物。
【請求項２２】
膣腔および／または直腸腔に送達したＴＮＦ－α調節物質により調節が可能な疾患を治療し、かつ／または予防し、かつ／または緩和するための、請求項１～１１、１３または１４のいずれかに記載の抗ＴＮＦ－αポリペプチド、あるいは請求項１２に記載の組成物。
【請求項２３】
鼻、上気道、および／または肺に送達したＴＮＦ－α調節物質により調節が可能な疾患を治療し、かつ／または予防し、かつ／または緩和するための、請求項１～１１、１３または１４のいずれかに記載の抗ＴＮＦ－αポリペプチド、あるいは請求項１２に記載の組成物。
【請求項２４】
腸粘膜に送達したＴＮＦ－α調節物質により調節が可能な疾患であって、腸粘膜透過性を上昇させる前記疾患を治療し、かつ／または予防し、かつ／または緩和するための、請求項１～１１、１３または１４のいずれかに記載の抗ＴＮＦ－αポリペプチド、あるいは請求項１２に記載の組成物。
【請求項２５】
舌下組織を効果的に通過することができるＴＮＦ－α調節物質により調節が可能な疾患を治療し、かつ／または予防し、かつ／または緩和するための、請求項１～１１、１３または１４のいずれかに記載の抗ＴＮＦ－αポリペプチド、あるいは請求項１２に記載の組成物。
【請求項２６】
皮膚を効果的に通過することができるＴＮＦ－α調節物質により調節が可能な疾患を治療し、かつ／または予防し、かつ／または緩和するための、請求項１～１１、１３または１４のいずれかに記載の抗ＴＮＦ－αポリペプチド、あるいは請求項１２に記載の組成物。
【請求項２７】
前記疾患が、炎症、リューマチ性関節炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸症候群、多発性硬化症、アジソン病、自己免疫性肝炎、自己免疫性耳下腺炎、Ｉ型糖尿病、精巣上体炎、糸球体腎炎、グレーブス病、ギランバレー症候群、橋本病、溶血性貧血、全身性エリテマトーデス、男性不妊症、多発性硬化症、重症筋無力症、天疱瘡、乾癬、リューマチ熱、リューマチ性関節炎、類肉腫症、強皮症、シェーグレン症候群、脊椎関節症、甲状腺炎、および血管炎のいずれかである、請求項１７に記載の方法、請求項１９に記載のキット、請求項２０～２６に記載の抗ＴＮＦ－αポリペプチド、核酸または組成物。
【請求項２８】
請求項２７に記載の疾患が潰瘍性大腸炎であることを特徴とする、請求項１７に記載の方法、請求項１９に記載のキット、請求項２０～２６に記載の抗ＴＮＦ－αポリペプチド、核酸または組成物。
【請求項２９】
請求項１５に記載の核酸を含む組成物、請求項１～１１、１３または１４のいずれかに記載の抗ＴＮＦ－αポリペプチド、あるいは請求項１２に記載の組成物、ならびに適当な

薬剤ビヒクルを含む組成物。
【請求項３０】
以下を含む腫瘍壊死因子αの機能障害によって特徴付けられる疾患の検査方法：
（ａ）試料を請求項１～１１、１３または１４のいずれかに記載の抗ＴＮＦ－αポリペプチドに接触させる、
（ｂ）前記ポリペプチドと前記試料の結合を検出する、ならびに
（ｃ）ステップ（ｂ）で検出した結合と基準を比較し、前記試料に関連する結合の差から、腫瘍壊死因子αの機能障害によって特徴付けられる疾患であると検査される。
【請求項３１】
前記疾患が、炎症、リューマチ性関節炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸症候群、多発性硬化症、アジソン病、自己免疫性肝炎、自己免疫性耳下腺炎、Ｉ型糖尿病、精巣上体炎、糸球体腎炎、グレーブス病、ギランバレー症候群、橋本病、溶血性貧血、全身性エリテマトーデス、男性不妊症、多発性硬化症、重症筋無力症、天疱瘡、乾癬、リューマチ熱、リューマチ性関節炎、類肉腫症、強皮症、シェーグレン症候群、脊椎関節症、甲状腺炎、および血管炎のいずれかである、請求項１～１１、１３または１４のいずれかに記載の単離された抗ＴＮＦ－αポリペプチド、それらのためのパッケージング材、および使用説明書を含む、疾患のスクリーニングに使用するためのキット。
【請求項３２】
請求項１～１１、１３または１４のいずれかに記載の抗ＴＮＦ－αポリペプチドの、以下を含む産生方法：
（ａ）腫瘍壊死因子αを対象とするラクダ科ＶＨＨをコードするＤＮＡを得る工程、および
（ｂ）ステップ（ａ）で選択したＤＮＡをクローニングし、発現させる工程。
【請求項３３】
請求項１～１１、１３または１４のいずれかに記載の抗ＴＮＦ－αポリペプチドの、以下を含む産生方法：
（ａ）前記ポリペプチドの発現を可能にする条件下で、請求項１～１１、１３または１４のいずれかに記載の抗ＴＮＦ－αポリペプチドをコードすることが可能な核酸を含む宿主細胞を培養する工程、ならびに
（ｂ）前記培養物から生成したポリペプチドを回収する工程。
【請求項３４】
前記宿主細胞が、細菌または酵母である、請求項３３に記載の方法。
【請求項３５】
炎症反応に関連付けられる疾患を治療し、および／または予防し、および／または緩和するための薬剤を調製するための、請求項１～１１、１３または１４のいずれかに記載の抗ＴＮＦ－αポリペプチド、請求項１５に記載の核酸、請求項１２に記載の組成物の使用。
【請求項３６】
不活化されることなく、胃環境を通過することができるＴＮＦ－α調節物質により調節が可能な疾患の症状を治療し、予防し、および／または緩和するための薬剤を調製するための、請求項１～１１、１３または１４のいずれかに記載の抗ＴＮＦ－αポリペプチド、または請求項１２に記載の組成物の使用。
【請求項３７】
膣腔および／または直腸腔に送達したＴＮＦ－α調節物質により調節が可能な疾患の症状を治療し、予防し、および／または緩和するための薬剤を調製するための、請求項１～１１、１３または１４のいずれかに記載の抗ＴＮＦ－αポリペプチド、または請求項１２に記載の組成物の使用。
【請求項３８】
鼻、上気道、および／または肺に送達したＴＮＦ－α調節物質により調節が可能な疾患の症状を治療し、予防し、および／または緩和するための薬剤を調製するための、請求項

１～１１、１３または１４のいずれかに記載の抗ＴＮＦ－αポリペプチド、または請求項１２に記載の組成物の使用。
【請求項３９】
腸粘膜に送達したＴＮＦ－α調節物質により調節が可能な疾患であって、腸粘膜透過性を上昇させる前記疾患の症状を治療し、予防し、および／または緩和するための薬剤を調製するための、請求項１～１１、１３または１４のいずれかに記載の抗ＴＮＦ－αポリペプチド、または請求項１２に記載の組成物の使用。
【請求項４０】
舌下組織を効果的に通過することができるＴＮＦ－α調節物質により調節が可能な疾患の症状を治療し、予防し、および／または緩和するための薬剤を調製するための、請求項１～１１、１３または１４のいずれかに記載の抗ＴＮＦ－αポリペプチド、または請求項１２に記載の組成物の使用。
【請求項４１】
皮膚を効果的に通過することができるＴＮＦ－α調節物質により調節が可能な疾患の症状を治療し、予防し、および／または緩和するための薬剤を調製するための、請求項１～１１、１３または１４のいずれかに記載の抗ＴＮＦ－αポリペプチド、または請求項１２に記載の組成物の使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、腫瘍壊死因子α（ＴＮＦ－α）を対象とする１種または複数の単一ドメイン抗体を含むポリペプチドを提供する。さらに、本発明は、診断および治療でのその使用に関する。そのような抗体は、ヒトフレームワーク配列に高い相同性を有するフレームワーク配列を含み得る。腫瘍壊死因子α（ＴＮＦ－α）に対する抗体を、単独でまたは他の薬物と組み合わせて含む組成物について説明する。
【背景技術】
【０００２】
腫瘍壊死因子α（ＴＮＦ－α）は、様々な疾患、たとえば、リューマチ性関節炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、多発性硬化症などの炎症性疾患で重要な役割を果たすと考えられている。ＴＮＦ－αおよびその受容体（ＣＤ１２０ａ、ＣＤ１２０ｂ）は、かなり詳細に研究されてきた。生理活性形態のＴＮＦ－αは、三量体であり、近傍サブユニットによって形成された溝は、サイトカイン受容体の相互作用に重要である。このサイトカインの作用を相殺するためのいくつかの戦略が開発されており、現在、様々な病態の治療に使用されている。
【０００３】
ＴＮＦ－αに対して満足のいく特異性および選択性を有するＴＮＦ－α阻害剤は、ＴＮＦ－αが原因物質として関わってきた疾患を予防し、または治療するための効果的な予防剤または治療剤化合物であり得る。ＴＮＦ－αの抗体による、毒素ショック（ＥＰ４８６５２６号（特許文献１））、腫瘍退縮、細胞毒性の阻害（ＵＳ６４４８３８０号（特許文献２）、ＵＳ６４５１９８３号（特許文献３）、ＵＳ６４９８２３７号（特許文献４））、ＲＡやクローン病（ＥＰ６６３８３６号（特許文献５）、ＵＳ５６７２３４７号（特許文献６）、ＵＳ５６５６２７２号（特許文献７））などの自己免疫疾患、移植片対宿主反応（ＵＳ５６７２３４７号（特許文献８））、細菌性髄膜炎（ＥＰ５８５７０５号（特許文献９））の治療法が記載されてきた。
【０００４】
現在利用可能な薬物のどれも自己免疫疾患の治療には完全に有効ではなく、ほとんどは深刻な毒性によって制限されている。さらに、そのような標的配列に対して十分な作用強度および選択性を備えた新規化学物質（ＮＣＥ）を開発することは、極めて困難であり手順も冗長である。他方で、抗体を基にした薬物は、薬物として顕著な可能性を有している。というのは、こうした薬物は、その標的に対する特異性が極めて優れており、固有の毒

性も低いからである。さらに、新規化学物質（ＮＣＥ's）の開発と比較して、開発時間をかなり縮小させることができる。しかし、ＴＮＦ‐αでの事例のように、リガンドの受容体結合ドメインが溝の中に包埋されている多量体蛋白質に対して、従来の抗体を生じさせることは困難である。本発明に記載したラクダ科に由来する重鎖抗体は、陥凹部に結合する傾向があることが知られている（ＷＯ９７／４９８０５号（特許文献１０）、Ｌａｕｗｅｒｅｙｓら、ＥＭＢＯ Ｊ．１７、５３１２、１９９８（非特許文献１））。したがって、本来、そのような重鎖抗体が、ＴＮＦなどのリガンド受容体結合ドメインへの結合には適している。さらに、そのような抗体は、長期間に渡って安定していることが知られており、したがってその貯蔵寿命は増大する（Ｐｅｒｅｚら、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、４０、７４、２００１（非特許文献２））。さらに、そのような重鎖抗体断片は、酵母や他の微生物などの哺乳動物細胞培養発酵と比較して、安価な発現系を使用し、発酵槽で一括して生成することができる（ＥＰ０６９８０９７号（特許文献１１））。

【０００５】

炎症の調節が必要な状態の治療として、マウス、ヒツジ、ヤギ、ウサギなどの供給源に由来する抗体、およびそのヒト化誘導体を使用することは、いくつかの理由で問題である。従来の抗体は、室温で安定しておらず、調製、保存には冷凍しなければならず、冷凍研究装置、冷凍庫、および冷凍輸送が不可欠であり、これらは時間も費用もかかる。冷凍は、開発途上国では実施不可能な場合もある。さらに、前記抗体の製造または小規模生成は経費がかかる。というのは、無傷で活性な抗体の発現に必要な哺乳動物細胞系は、時間および装置の点から高度な支援が必要であるが、収量は極めて少ないからである。さらに大きい寸法の従来の抗体は、たとえば、炎症組織部位で組織透過性が制限されているはずである。さらに、従来の抗体の結合活性はｐＨ依存性があり、したがって、たとえば、胃出血の治療や胃手術など、通常の生理ｐＨ範囲外の環境における使用は不適当である。さらに、従来の抗体は、低ｐＨまたは高ｐＨで不安定であり、したがって経口投与には適当でない。しかし、ラクダ科抗体は、極端なｐＨ、変性試薬、高温などの過酷な条件に耐えることが実証されている（Ｄｕｍｏｕｌｉｎら、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｃｉｅｎｃｅ １１、５００、２００２（非特許文献３））ので、それらの抗体が経口投与による送達に相応しいものにしている。さらに、従来の抗体の結合活性は、温度依存的であり、したがって生体活性温度範囲外（たとえば、３７±２０℃）の温度で実施するアッセイやキットで使用するのには不適当である。

【０００６】

ポリペプチド薬物、特に抗体を基にした薬物は、薬物として顕著な可能性を有している。というのは、こうした薬物は、その標的に対する特異性が極めて優れており、固有の毒性も低いからである。しかし、治療上有用な標的に対して得られている抗体は、それをヒト治療に向けて調製するためには、ヒト個体で投与後、それに対する望ましくない免疫反応を回避するように、さらに改変する必要があることは当業者によって知られている。この改変工程は、一般に「ヒト化」と称される。ヒト以外の種の中で生じた抗体は、その抗体をヒトで治療上使用可能にするためにはヒト化する必要があることは当業者によって知られている（（１）ＣＤＲ ｇｒａｆｔｉｎｇ：Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｄｅｓｉｇｎ Ｌａｂｓ：ＵＳ６１８０３７０号（特許文献１２）、ＵＳ５６９３７６１号（特許文献１３）、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ：ＵＳ６０５４２９７号（特許文献１４）、Ｃｅｌｌｔｅｃｈ：４６０１６７号（特許文献１５）、ＥＰ６２６３９０号（特許文献１６）、ＵＳ５８５９２０５号（特許文献１７）、（２）Ｖｅｎｅｅｒｉｎｇ：Ｘｏｍａ：ＵＳ５８６９６１９号（特許文献１８）、ＵＳ５７６６８８６号（特許文献１９）、ＵＳ５８２１１２３号（特許文献２０））。実質的にヒト化要件を回避し、またはヒト化の必要性を完全に不要にする抗体の産生方法が必要とされている。所定のフレームワーク領域またはアミノ酸残基を有し、実質的にヒト化要件またはヒト化の必要性が一切なくヒト対象に投与できる新規なクラスの抗体が必要とされている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００７】
【特許文献１】ＥＰ４８６５２６号
【特許文献２】ＵＳ６４４８３８０号
【特許文献３】ＵＳ６４５１９８３号
【特許文献４】ＵＳ６４９８２３７号
【特許文献５】ＥＰ６６３８３６号
【特許文献６】ＵＳ５６７２３４７号、
【特許文献７】ＵＳ５６５６２７２号
【特許文献８】ＵＳ５６７２３４７号
【特許文献９】ＥＰ５８５７０５号
【特許文献１０】ＷＯ９７／４９８０５号
【特許文献１１】ＥＰ０６９８０９７号
【特許文献１２】ＵＳ６１８０３７０号
【特許文献１３】ＵＳ５６９３７６１号
【特許文献１４】ＵＳ６０５４２９７号
【特許文献１５】４６０１６７号
【特許文献１６】ＥＰ６２６３９０号
【特許文献１７】ＵＳ５８５９２０５号
【特許文献１８】ＵＳ５８６９６１９号
【特許文献１９】ＵＳ５７６６８８６号
【特許文献２０】ＵＳ５８２１１２３号
【非特許文献】
【０００８】
【非特許文献１】Ｌａｕｗｅｒｅｙｓら、ＥＭＢＯ Ｊ．１７、５３１２、１９９８
【非特許文献２】Ｐｅｒｅｚら、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、４０、７４、２００１
【非特許文献３】Ｄｕｍｏｕｌｉｎら、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｃｉｅｎｃｅ １１、５００、２００２
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００９】
従来の抗体の別の重要な欠点は、これらが複雑な大きい分子であるが故に、比較的不安定であり、プロテアーゼによる分解に敏感であるということである。これは、従来の抗体薬物が、経口、舌下、局所、経鼻、経膣、経直腸で、または吸入によって投与できないこと意味する。というのは、こうした薬物は、これらの部位の低ｐＨ、およびこれらの部位や血液中のプロテアーゼの作用には耐えられず、かつ／またはその寸法が大きいためによる。こうした問題のいくつかを克服するためには、こうした薬物を注射（静脈内、皮下など）によって投与しなければならない。注射による投与は、皮下用注射器または針を正確および安全に使用するために専門家の訓練を必要とする。これには、さらに、滅菌器具、治療用ポリペプチド液体製剤、滅菌安定形態での前記ポリペプチドのバイアル包装、および対象においては針の侵入に適当な部位が必要とされる。さらに、一般に、対象は、注射を受ける前後に身体的および心理的ストレスを経験する。したがって、注射の必要性を回避する治療用ポリペプチドの送達方法が必要とされ、この方法はコスト／時間の節約になるだけでなく、対象にとってもより好都合、より快適であるはずである。
【００１０】
単一ドメイン抗体を基にした薬物は、薬物として顕著な可能性を有している。というのは、こうした薬物は、その標的に対する特異性が極めて優れており、固有の毒性も低いからである。しかし、その固有の機能的親和性をさらに改善することによって、薬物用量の削減、治療の短縮、副作用の低減など、患者に多くの利益をもたらすことができる。
【００１１】
（本発明目的）

ＴＮＦ‐αに結合する１種または複数の単一ドメイン抗体を含むポリペプチド、前記ポリペプチドの相同物、前記ポリペプチドの相同物の機能部分を提供することが本発明の目的である。前記ポリペプチドは、結合と同時にＴＮＦ‐αの生体活性を改変する。そのようなポリペプチドは、ＴＮＦ‐αの受容体結合溝に結合するかもしれず、またはその受容体結合溝に結合しないかもしれない。そのようなポリペプチドは、単一ドメイン抗体である。

【００１２】

現在の技術のいずれか、または将来得られる単一ドメイン抗体のいずれであってもよい単一ドメイン抗体を提供することもさらに本発明の目的である。例には、それだけには限らないが、重鎖抗体、本質的に軽鎖を欠く抗体、従来の４鎖抗体に由来する単一ドメイン抗体、設計された抗体、および抗体に由来するもの以外の単一ドメイン骨格が含まれる。本発明の一態様によれば、本明細書で使用される単一ドメイン抗体は、軽鎖を欠く重鎖抗体（ＷＯ９４０４６７８号）として知られる、自然に存在する単一ドメイン抗体である。明瞭にするために、軽鎖を欠く重鎖抗体に由来するこの可変ドメインをＶＨＨまたはナノ体と称し、従来の４鎖免疫グロブリンＶＨと区別する。そのようなＶＨＨ分子は、ラクダ科種、たとえば、ラクダ、ラマ、ヒトコブラクダ、アルパカ、グアナコで生じた抗体から得ることができる。

【００１３】

抗ＴＮＦ‐αポリペプチドを静脈内、皮下、経口、舌下、局所、経鼻、経膣、経直腸で、または吸入によって投与する方法を提供することもさらに本発明の目的である。

【００１４】

一価の単一ドメイン抗体の結合親和性を強化することもさらに本発明の目的である。

【課題を解決するための手段】

【００１５】

（本発明の概要）

本発明の一実施形態は、少なくとも１個の抗ＴＮＦ‐α単一ドメイン抗体を含む抗ＴＮＦ‐αポリペプチドである。

【００１６】

本発明の別の実施形態は、単一ドメイン抗体が、配列番号１～１６および７９～８４のいずれかの配列によって表される配列に相当する上記抗ＴＮＦ‐αポリペプチドである。

【００１７】

本発明の別の実施形態は、さらに、血清蛋白質を標的とする少なくとも１種の単一ドメイン抗体を含む上記抗ＴＮＦ‐αポリペプチドである。

【００１８】

本発明の別の実施形態は、前記血清蛋白質が、血清アルブミン、血清免疫グロブリン、サイロキシン結合蛋白質、トランスフェリン、またはフィブリノーゲンのいずれかである上記抗ＴＮＦ‐αポリペプチドである。

【００１９】

本発明の別の実施形態は、単一ドメイン抗血清蛋白質単一ドメイン抗体が、配列番号２６～２９および８５～９７のいずれかの配列によって表される配列に相当する上記抗ＴＮＦ‐αポリペプチドである。

【００２０】

本発明の別の実施形態は、配列番号３０～４３のいずれかの配列によって表される配列に相当する上記抗ＴＮＦ‐αポリペプチドである。

【００２１】

本発明の別の実施形態は、さらに、抗ＩＦＮ‐γ単一ドメイン抗体、抗ＴＮＦ‐α受容体単一ドメイン抗体、および抗ＩＦＮ‐γ受容体単一ドメイン抗体からなる群から選択した少なくとも１種の単一ドメイン抗体を含む上記抗ＴＮＦ‐αポリペプチドである。

【００２２】

本発明の別の実施形態は、ＴＮＦ‐αを標的とする単一ドメイン抗体数が、少なくとも

２個である上記抗ＴＮＦ‐αポリペプチドである。
【００２３】
本発明の別の実施形態は、配列番号７３～７６のいずれかの配列によって表される配列に相当する上記抗ＴＮＦ‐αポリペプチドである。
【００２４】
本発明の別の実施形態は、少なくとも１種の単一ドメイン抗体が、ヒト化ラクダ科ＶＨＨである上記抗ＴＮＦ‐αポリペプチドである。
【００２５】
本発明の別の実施形態は、ヒト化ラクダ科ＶＨＨが、配列番号１７～１９および２１～２４のいずれかの配列によって表される配列に相当する上記抗ＴＮＦ‐αポリペプチドである。
【００２６】
本発明の別の実施形態は、上記抗ＴＮＦ‐αポリペプチド、ならびに抗ＩＦＮ‐γ単一ドメイン抗体、抗ＴＮＦ‐α受容体単一ドメイン抗体、および抗ＩＦＮ‐γ受容体単一ドメイン抗体からなる群から選択した少なくとも１種の単一ドメイン抗体を含み、対象に同時投与、分別投与、または逐次投与するための組成物である。
【００２７】
本発明の別の実施形態は、少なくとも１個の抗ＩＦＮ‐γ単一ドメイン抗体が、配列番号４４～７２のいずれかの配列によって表される配列に相当する、上記抗ＴＮＦ‐αポリペプチドまたは上記組成物である。
【００２８】
本発明の別の実施形態は、前記単一ドメイン抗体が、完全長単一ドメイン抗体の機能部分、または相同配列機能部分と相同配列である、上記抗ＴＮＦ‐αポリペプチドまたは上記組成物である。
【００２９】
本発明の別の実施形態は、抗ＴＮＦ‐αポリペプチドが、完全長抗ＴＮＦ‐αポリペプチドの機能部分、または相同配列機能部分と相同配列である、上記抗ＴＮＦ‐αポリペプチドまたは上記組成物である。
【００３０】
本発明の別の実施形態は、少なくとも１種の単一ドメイン抗体が、ラクダ科ＶＨＨである上記抗ＴＮＦ‐αポリペプチドまたは上記組成物である。
【００３１】
本発明の別の実施形態は、上記抗ＴＮＦ‐αポリペプチドをコードする核酸である。
【００３２】
本発明の別の実施形態は、上記抗ＴＮＦ‐αポリペプチドと腫瘍壊死因子αの結合を調節する作用薬を同定する、以下のステップを含む方法である：
（ａ）候補調節物質の存在下および非存在下において、前記ポリペプチドと標的間の結合を可能にする条件下で、上記抗ＴＮＦ‐αポリペプチドを、腫瘍壊死因子αである標的に接触させる、ならびに
（ｂ）ポリペプチドとステップ（ａ）の標的との間の結合を測定し、前記候補調節物質の非存在下での結合に比べて、前記候補調節物質の存在下で結合が減少することによって、前記候補調節物質を上記抗ＴＮＦ‐αポリペプチドと腫瘍壊死因子αの結合を調節する作用薬として同定する。
【００３３】
本発明の別の実施形態は、上記抗ＴＮＦ‐αポリペプチドと腫瘍壊死因子αの結合を通して、腫瘍壊死因子αが介在する疾患を調節する作用薬を同定する、以下を含む方法である：
（ａ）候補調節物質の存在下および非存在下において、前記ポリペプチドと標的間の結合を可能にする条件下で、上記抗ＴＮＦ‐αポリペプチドを、腫瘍壊死因子αである標的に接触させる、ならびに

（ｂ）ポリペプチドとステップ（ａ）の標的との間の結合を測定し、前記候補調節物質の非存在下での結合に比べて、前記候補調節物質の存在下で結合が減少することによって、前記候補調節物質を腫瘍壊死因子αが介在する疾患を調節する作用薬として同定する。

【００３４】

本発明の別の実施形態は、上記抗ＴＮＦ‐αポリペプチドと腫瘍壊死因子αの結合を通して、腫瘍壊死因子αとその受容体の結合を調節する作用薬を同定する、以下を含む方法である：

（ａ）候補調節物質の存在下および非存在下において、前記ポリペプチドと標的間の結合を可能にする条件下で、上記抗ＴＮＦ‐αポリペプチドを、腫瘍壊死因子αである標的に接触させる、ならびに

（ｂ）ポリペプチドとステップ（ａ）の標的との間の結合を測定し、前記候補調節物質の非存在下での結合に比べて、前記候補調節物質の存在下で結合が減少することによって、前記候補調節物質を腫瘍壊死因子αとその受容体の結合を調節する作用薬として同定する。

【００３５】

本発明の別の実施形態は、上記抗ＴＮＦ‐αポリペプチドおよび腫瘍壊死因子αを含む、腫瘍壊死因子αが介在する疾患を調節する作用薬をスクリーニングするためのキットである。

【００３６】

本発明の別の実施形態は、上記の方法によって同定した、上記抗ＴＮＦ‐αポリペプチドと腫瘍壊死因子αの結合を調節する未知の作用薬である。

【００３７】

本発明の別の実施形態は、上記の方法によって同定した、腫瘍壊死因子αが介在する疾患を調節する未知の作用薬である。

【００３８】

本発明の別の実施形態は、前記疾患が、炎症、リューマチ性関節炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸症候群、および多発性硬化症の１種または複数である上記の未知の作用薬である。

【００３９】

本発明の別の実施形態は、炎症過程に関連付けられる疾患を治療し、かつ／または予防し、かつ／または緩和するための、上記抗ＴＮＦ‐αポリペプチド、上記核酸、上記組成物、または上記作用薬である。

【００４０】

本発明の別の実施形態は、炎症反応に関連付けられる疾患を治療し、かつ／または予防し、かつ／または緩和するための薬剤を調製するための、上記抗ＴＮＦ‐αポリペプチド、上記核酸、上記組成物、または上記作用薬の使用である。

【００４１】

本発明の別の実施形態は、その物質が不活化されることなく、胃環境を通過することができるＴＮＦ‐α調節物質により調節が可能な疾患を治療し、かつ／または予防し、かつ／または緩和するための、上記抗ＴＮＦ‐αポリペプチドまたは上記組成物である。

【００４２】

本発明の別の実施形態は、その物質が不活化されることなく、胃環境を通過することができるＴＮＦ‐α調節物質により調節が可能な疾患の症状を治療し、予防し、かつ／または緩和するための薬剤を調製するための、上記抗ＴＮＦ‐αポリペプチドまたは上記組成物の使用である。

【００４３】

本発明の別の実施形態は、膣腔および／または直腸腔に送達したＴＮＦ‐α調節物質により調節が可能な疾患を治療し、かつ／または予防し、かつ／または緩和するための、上記抗ＴＮＦ‐αポリペプチドまたは上記組成物である。

【００４４】

本発明の別の実施形態は、膣腔および／または直腸腔に送達したＴＮＦ－α調節物質により調節が可能な疾患の症状を治療し、予防し、かつ／または緩和するための薬剤を調製するための、上記抗ＴＮＦ－αポリペプチドまたは上記組成物の使用である。

【００４５】

本発明の別の実施形態は、鼻、上気道、および／または肺に送達したＴＮＦ－α調節物質により調節が可能な疾患を治療し、かつ／または予防し、かつ／または緩和するための、上記抗ＴＮＦ－αポリペプチドまたは上記組成物である。

【００４６】

本発明の別の実施形態は、鼻、上気道、および／または肺に送達したＴＮＦ－α調節物質により調節が可能な疾患の症状を治療し、予防し、かつ／または緩和するための薬剤を調製するための、上記抗ＴＮＦ－αポリペプチドまたは上記組成物の使用である。

【００４７】

本発明の別の実施形態は、腸粘膜に送達したＴＮＦ－α調節物質により調節が可能な疾患であって、腸粘膜透過性を上昇させる前記疾患を治療し、かつ／または予防し、かつ／または緩和するための、上記抗ＴＮＦ－αポリペプチドまたは上記組成物である。

【００４８】

本発明の別の実施形態は、腸粘膜に送達したＴＮＦ－α調節物質により調節が可能な疾患であって、腸粘膜透過性を上昇させる前記疾患の症状を治療し、予防し、かつ／または緩和するための薬剤を調製するための、上記抗ＴＮＦ－αポリペプチドまたは上記組成物の使用である。

【００４９】

本発明の別の実施形態は、舌下組織を効果的に通過することができるＴＮＦ－α調節物質により調節が可能な疾患を治療し、かつ／または予防し、かつ／または緩和するための、上記抗ＴＮＦ－αポリペプチドまたは上記組成物である。

【００５０】

本発明の別の実施形態は、舌下組織を効果的に通過することができるＴＮＦ－α調節物質により調節が可能な疾患の症状を治療し、予防し、かつ／または緩和するための薬剤を調製するための、上記抗ＴＮＦ－αポリペプチドまたは上記組成物の使用である。

【００５１】

本発明の別の実施形態は、皮膚を効果的に通過することができるＴＮＦ－α調節物質により調節が可能な疾患を治療し、かつ／または予防し、かつ／または緩和するための、上記抗ＴＮＦ－αポリペプチドまたは上記組成物である。

【００５２】

本発明の別の実施形態は、皮膚を効果的に通過することができるＴＮＦ－α調節物質により調節が可能な疾患の症状を治療し、予防し、かつ／または緩和するための薬剤を調製するための、上記抗ＴＮＦ－αポリペプチドまたは上記組成物の使用である。

【００５３】

本発明の別の実施形態は、前記疾患が、炎症、リューマチ性関節炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸症候群、多発性硬化症、アジソン病、自己免疫性肝炎、自己免疫性耳下腺炎、Ｉ型糖尿病、精巣上体炎、糸球体腎炎、グレーブス病、ギランバレー症候群、橋本病、溶血性貧血、全身性エリテマトーデス、男性不妊症、多発性硬化症、重症筋無力症、天疱瘡、乾癬、リューマチ熱、リューマチ性関節炎、類肉腫症、強皮症、シェーグレン症候群、脊椎関節症、甲状腺炎、および血管炎のいずれかである、上記方法、上記キット、上記核酸または作用薬、上記核酸または作用薬の使用、上記組成物、上記組成物の使用、上記抗ＴＮＦ－αポリペプチド、上記抗ＴＮＦ－αポリペプチドの使用である。

【００５４】

本発明の別の実施形態は、上記核酸または作用薬、上記抗ＴＮＦ－αポリペプチドまたは上記組成物、および適当な薬剤ビヒクルを含む組成物である。

【００５５】

本発明の別の実施形態は、腫瘍壊死因子αの機能障害によって特徴付けられる疾患の、

以下を含む診断方法である：
（ａ）試料を上記抗ＴＮＦ‐αポリペプチドに接触させる、
（ｂ）前記ポリペプチドと前記試料の結合を検出する、および
（ｃ）ステップ（ｂ）で検出した結合と基準を比較し、前記試料に関連する結合の差から、腫瘍壊死因子αの機能障害によって特徴付けられる疾患の症状を診断する。
【００５６】
本発明の別の実施形態は、上記方法を使用し、上記した疾患をスクリーニングするためのキットである。
【００５７】
本発明の別の実施形態は、単離した上記抗ＴＮＦ‐αポリペプチドを含む、上記した疾患をスクリーニングするためのキットである。
【００５８】
本発明の別の実施形態は、前記腫瘍壊死因子αを精製するための上記抗ＴＮＦ‐αポリペプチドの使用である。
【００５９】
本発明の別の実施形態は、腫瘍壊死因子αと１種または複数の腫瘍壊死因子α受容体との間の相互作用を阻害するための上記抗ＴＮＦ‐αポリペプチドの使用である。
【００６０】
本発明の別の実施形態は、以下のステップを含む、上記抗ＴＮＦ‐αポリペプチドの産生方法である：
（ａ）腫瘍壊死因子αを対象とするラクダ科ＶＨＨをコードする２本鎖ＤＮＡを得る、
（ｂ）ステップ（ｂ）で選択したＤＮＡをクローニングし、発現させる。
【００６１】
本発明の別の実施形態は、以下のステップを含む、上記抗ＴＮＦ‐αポリペプチドの産生方法である：
（ａ）ポリペプチドの発現を可能にする条件下で、上記抗ＴＮＦ‐αポリペプチドをコードすることが可能な核酸を含む宿主細胞を培養する、ならびに
（ｂ）培養物から生成したポリペプチドを回収する。
【００６２】
本発明の別の実施形態は、前記宿主細胞が、細菌または酵母である上記方法である。
【００６３】
本発明の別の実施形態は、上記抗ＴＮＦ‐αポリペプチドを含む、炎症、リューマチ性関節炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸症候群、または多発性硬化症のいずれかをスクリーニングするためのキットである。
【図面の簡単な説明】
【００６４】
【図１】実施例１に記載した抗ヒトＴＮＦのＶＨＨ類の配列。
【図２】実施例１によるＥＬＩＳＡで試験した抗ヒトＴＮＦ‐αのＶＨＨの希釈系列。
【図３】実施例１によるヒト細胞系ＫＹＭを使用し、細胞毒性アッセイで定量したＶＨＨの拮抗作用。
【図４】野生型ＶＨＨ＃１２Ｂと突然変異体Ａ７４Ｓ＋Ｙ７６Ｎ＋Ｋ８３Ｒ＋Ｐ８４ＡのＩｎ　ｖｉｔｒｏ受容体結合アッセイ。
【図５】野生型ＶＨＨ＃１２Ｂと突然変異体１Ｅ＋Ｑ５ＬＡ７４Ｓ＋Ｙ７６Ｎ＋Ｋ８３Ｒ＋Ｐ８４ＡのＩｎ　ｖｉｔｒｏ受容体結合アッセイ。
【図６】野生型ＶＨＨ＃３Ｅと突然変異ＶＨＨ類のＥＬＩＳＡでの結合。
【図７】野生型ＶＨＨ＃３Ｅと突然変異ＶＨＨ類のＩｎ　ｖｉｔｒｏ受容体結合アッセイ。
【図８】実施例３に記載した拮抗性抗マウスＴＮＦ類の配列。
【図９】実施例３によるマウス細胞系Ｌ９２９を使用し細胞毒性アッセイで定量した抗マウスＴＮＦのＶＨＨの拮抗作用。

【図１０】二価または二重特異的ＶＨＨの生成のためのベクターｐＡＸ１１（ｐＵＣ１１９主鎖）のＥｃｏＲＩ-ＨｉｎｄＩＩＩ挿入物。
【図１１】ＩＭＡＣ精製した、一価（レーン８）、二価（レーン１）、三価（レーン２、３、および５）および四価（レーン４、６、および７）の抗ＴＮＦａＶＨＨのクーマシー染色ＰＡＧＥ（１５％）。
【図１２】一価、二価、三価、および四価のＶＨＨのＳｕｐｅｒｄｅｘ　７５ＨＲでのゲルろ過による分析のクロマトグラム。
【図１３】臨床的に使用されている製品レミケードおよびエンブレルを用いた抗ヒトＴＮＦのＶＨＨの一価、二価、三価、および四価形態の拮抗特性の比較。
【図１４】マウスＴＮＦ‐αを標的とする一価および二価のＶＨＨ類の拮抗動作。
【図１５】実施例４に記載したヒトＩｇＧ１に由来するＶＨＨ‐Ｆｃ融合のクーマシー染色ＰＡＧＥ。
【図１６】バイオアッセイで定量した、ＶＨＨ＃３Ｅの二価形式と比較したＶＨＨ＃３Ｅに由来するＶＨＨ‐Ｆｃ融合の拮抗効力。
【図１７】ｐＨ２．２、ｐＨ３．２、およびｐＨ４．２における、参照とペプシン処理したＴＮＦ３ＥのＥＬＩＳＡ（１００％は、１／１００希釈で測定したシグナルである）。
【図１８】実験設定。
【発明を実施するための形態】
【００６５】
表１　ＴＮＦ‐αを標的とする本発明の態様のペプチドのアミノ酸配列表
表２　ＶＨＨ＃１２Ｂの突然変異誘発に使用した突然変異誘発反応、変異原性プライマー、および鋳型の一覧
表３　ＶＨＨ＃３Ｅの突然変異誘発に使用した突然変異誘発反応、変異原性プライマー、および鋳型の一覧
表４　ヒト化型および野生型ＶＨＨの概要
表５　抗マウス血清アルブミン／抗ＴＮＦ‐α
表６　ヒトＩＦＮ‐γを標的とするＶＨＨ類のアミノ酸配列表
表７　ＴＮＦ‐αを標的とする、二価（ＢＩＶ　３Ｅ、ＢＩＶ＃ｍ３Ｆ）、三価（ＴＲＩ　３Ｅ）、または四価（ＴＥＴＲＡ　３Ｅ）ＶＨＨの配列
表８　本発明の抗マウス血清アルブミンＶＨＨのアミノ酸配列間の部分的相同性
表９　本発明の抗ＴＮＦ‐αのＶＨＨ間の部分的相同性
表１０　本発明の抗ＩＦＮ‐γのＶＨＨ間の百分比相同性
表１１　治療スケジュール
【００６６】
（詳細な説明）
本発明は、ＴＮＦ‐αを標的とする１種または複数の単一ドメイン抗体を含む抗腫瘍壊死因子α（ＴＮＦ‐α）ポリペプチドに関する。本発明は、前記ポリペプチドをコードし得る核酸にも関する。
【００６７】
単一ドメイン抗体は、その相補性決定領域が、単一ドメインポリペプチドの一部である抗体である。例には、それだけには限らないが、重鎖抗体、本質的に軽鎖を欠く抗体、従来の４鎖抗体に由来する単一ドメイン抗体、設計された抗体、および抗体に由来するもの以外の単一ドメイン骨格が含まれる。単一ドメイン抗体は、現在の技術のいずれか、または将来得られる単一ドメイン抗体のいずれであってもよい。単一ドメイン抗体は、それだけには限らないが、マウス、ヒト、ラクダ、ラマ、ヤギ、ウサギ、ウシを含むいずれの種からも得ることができる。本発明の一態様によれば、本明細書で使用される単一ドメイン抗体は、軽鎖を欠く重鎖抗体として知られている自然に存在する単一ドメイン抗体である。そのような単一ドメイン抗体は、たとえば、ＷＯ９４／０４６７８号に開示されている。明瞭にするために、本質的に軽鎖を欠く重鎖抗体に由来するこの可変ドメインを、本明細書ではＶＨＨまたはナノ体として示し、従来の４鎖免疫グロブリンＶＨと区別する。そ

のようなＶＨＨ分子は、ラクダ科種、たとえば、ラクダ、ヒトコブラクダ、ラマ、アルパカ、グアナコから生じた抗体から得ることができる。ラクダ科に加え、他の種も本質的に軽鎖を欠く重鎖抗体を産生することができ、そのようなＶＨＨを本発明の範囲に含める。

【００６８】

本発明の、かつ当業者に知られているＶＨＨは、ＷＯ９４／０４６７８号に記載されている通り、ラクダ科に由来するものなど、本質的に軽鎖を欠く免疫グロブリンに由来する重鎖可変ドメインである（以後、ＶＨＨドメインまたはナノ体と称する）。ＶＨＨ分子は、ＩｇＧ分子の約１０分の１である。これらは、単一ポリペプチドであり、極端なｐＨおよび温度条件に耐えて非常に安定している。さらに、これらは、プロテアーゼ作用に耐性であり、このことは従来の抗体にはない事例である。さらに、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで発現したＶＨＨは、収量が高く、適切に折りたたまれた機能的なＶＨＨである。さらに、ラクダ科類で生じた抗体は、抗体ライブラリを用いて、またはラクダ科類以外の哺乳動物の免疫化（ＷＯ９７４９８０５号）によって、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで生じた抗体により認識されるエピトープ以外のエピトープを認識する。そのようにして、抗ＴＮＦ‐αのＶＨＨ類は、従来の抗体よりも効率よくＴＮＦ‐αと相互作用し、それによってＴＮＦ‐α受容体との相互作用をより効果的にブロックすることができる。

【００６９】

本発明の、ＴＮＦ‐αはあらゆる種から得られる。本発明に関連する種の例には、ウサギ、ヤギ、マウス、ラット、ウシ、子ウシ、ラクダ、ラマ、サル、ロバ、モルモット、ニワトリ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマが含まれ、ヒトが好ましい。

【００７０】

ＴＮＦ‐αは、免疫応答を引き出すことが可能なＴＮＦ‐α断片でもある。ＴＮＦ‐αは、完全長ＴＮＦ‐αに対して生じた単一ドメイン抗体に結合し得るＴＮＦ‐α断片でもある。

【００７１】

ＴＮＦ‐αを標的とする単一ドメイン抗体は、10^{-6}Ｍを超える親和性でＴＮＦ‐αに結合することができる単一ドメイン抗体を意味する。

【００７２】

本発明の一実施形態は、単一ドメイン抗体が、ＴＮＦ‐αを標的とするラクダ科ＶＨＨを含む抗ＴＮＦポリペプチドである。

【００７３】

ＴＮＦ‐αを標的とする抗ＴＮＦポリペプチドの１種または複数の単一ドメイン抗体は、同じ配列であってよい。あるいは、それらの全てが、同じ配列を持たなくてもよい。全てが同じ配列を持つわけではないが、同じ標的、その１種または複数の抗原を標的とする抗ＴＮＦ‐α単一ドメイン抗体を含む抗ＴＮＦポリペプチドは本発明の範囲に属する。

【００７４】

本発明の別の実施形態は、単一ドメイン抗体が、表１に示す配列番号１～１６および７９～８４のいずれかの配列によって表される配列に相当する抗ＴＮＦ‐αポリペプチドである。前記配列は、ＴＮＦ‐αを標的とするラクダ科重鎖抗体（ＶＨＨ）に由来する。

【００７５】

さらに、本発明は、前記単一ドメイン抗体がＴＮＦ‐αを標的とするＶＨＨであり、ＶＨＨがヒト様配列を有するクラスに属する、抗ＴＮＦ‐αポリペプチドに関する。このクラスは、ＶＨＨが、カバット（Ｋａｂａｔ）の番号付けにしたがって、たとえばＬ４５など、位置４５にグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、メチオニン、セリン、トレオニン、アスパラギン、またはグルタミンからなる群のアミノ酸を含み、位置１０３にトリプトファンを含むことなどを特徴とする。本発明に記載した、ラクダ科単一ドメイン抗体の新規なクラス（表１、実施例１）は、位置１０３の疎水性残基トリプトファンと合わせて、ＦＲ２に疎水性残基を含む、ＶＨＨ＃２Ｂ（配列番号３）およびＶＨＨ＃１２Ｂ（配列番号１４）によって表される。

【００７６】
配列ＶＨＨ＃１Ａ（配列番号１）、ＶＨＨ＃４Ｂ（配列番号１２）、ＶＨＨ＃８‐２９（配列番号８１）、ＶＨＨ＃８‐４１（配列番号８２）、ＶＨＨ＃８‐４２（配列番号８３）、およびＶＨＨ＃８‐４４（配列番号８４）（表１、実施例１）によって表されるラクダ科単一ドメイン抗体の別のヒト様クラスは、ＷＯ０３０３５６９４号に記載されており、典型的には、ヒト起源のまたは他の種に由来する従来の抗体に見出された疎水性ＦＲ２残基を含むが、親水性におけるこの損失は位置１０３上の帯電したアルギニン残基によって補われ、この残基は二重鎖抗体のＶＨ中に存在する保存トリプトファン残基に取って代わる。そのようにして、この２個のクラスに属するペプチドは、ヒトＶＨフレームワーク領域に対して高いアミノ酸配列相同性を示し、前記ペプチドは、それによる望ましくない免疫応答の懸念なしに、さらにヒト化を行う負担もなくヒトに直接投与されるであろう。本発明は、前記ポリペプチドをコードし得る核酸にも関する。
【００７７】
したがって、本発明の一態様は、それを必要とする患者に、抗ＴＮＦ‐αポリペプチドを直接投与することを可能にし、その場合、単一ドメイン抗体は、ＶＨＨのヒト化クラスに属し、配列番号１、３、１２、１４、８１、８２、８３、および８４のいずれかによって表される配列を含む。
【００７８】
本発明によって使用されるＶＨＨのいずれも、従来のクラスまたはヒト様ラクダ科抗体クラスのものでよい。前記抗体は、ＴＮＦ‐α全体、その断片、またはその相同配列の断片を標的とすることができる。これらのポリペプチドには、完全長ラクダ科抗体、すなわちＦｃおよびＶＨＨドメイン、ヒトＦｃドメイン、またはＶＨＨ類それ自体、もしくは由来する断片を備えた重鎖ラクダ科抗体のキメラ異形抗体が含まれる。
【００７９】
抗血清アルブミンＶＨＨ類は、担体蛋白質であると知られている従来の抗体よりも効果的な方式で血清アルブミンと相互に作用し得る。担体蛋白質として、血清アルブミンエピトープのいくつかは、結合した蛋白質、ペプチド、および小化合物が認識し難いかもしれない。ＶＨＨ類は、陥凹部などの「異例な」または従来とは異なるエピトープに結合することが知られている（ＷＯ９７／４９８０５号）ので、そのようなＶＨＨ類の循環アルブミンに対する親和性は増大し得る。
【００８０】
さらに、対象の１種または複数の血清蛋白質を標的とする１種または複数の単一ドメイン抗体を含む、本明細書に記載した抗ＴＮＦポリペプチドが、前記構築体の一部でない場合は、驚くべきことに、前記対象の循環中の半減期が、抗ＴＮＦ‐α単一ドメイン抗体の半減期と比較して著しく長いという知見にも本発明は関する。そのようなポリペプチドの例を配列番号３０～４３によって表５に表す。さらに、前記ポリペプチドは、マウス中で無傷のままでいられる高い安定性、極端なｐＨに対する耐性、高温安定性、高い標的親和性などと同じく、単一ドメイン抗体の好ましい特性を示すことが判明した。
【００８１】
本発明の別の実施形態は、さらに、１種または複数の血清蛋白質を標的とする１種または複数の単一ドメイン抗体を含む抗ＴＮＦ‐αポリペプチドであり、前記抗ＴＮＦ‐αポリペプチドは配列番号３０～４３（表５）によって表されるいずれかの配列に相当する配列を含む。
【００８２】
本発明の別の実施形態は、抗血清蛋白質単一ドメイン抗体が、表５に示す配列番号２６～２９および８５～９７のいずれかの配列によって表される配列に相当する抗ＴＮＦ‐αポリペプチドである。
【００８３】
血清蛋白質は、対象の血清中に見られるどんな適当な蛋白質でもよい。本発明の一態様では、血清蛋白質は、血清アルブミン、血清免疫グロブリン、サイロキシン結合蛋白質、

トランスフェリン、またはフィブリノーゲンである。有効な治療に必要な半減期、および／または標的抗原の区画分けなど、所期の使用に依存してＶＨＨのパートナーは、上記の血清蛋白質の１種を対象とすることができる。

【００８４】

本明細書で開示した抗ＴＮＦ－αポリペプチドの別の態様として、本発明はさらに、抗ＩＦＮ－γポリペプチド、抗ＴＮＦ－α受容体ポリペプチド、および抗ＩＦＮ－γ受容体ポリペプチドからなる群から選択した少なくとも１種のポリペプチドを含む。

【００８５】

本発明の実施形態であるＩＦＮ－γを標的とする単一ドメイン抗体は、表６に示す配列番号４４～７２のいずれかの配列によって表される配列に相当する。

【００８６】

本発明の一態様によれば、単一ドメイン抗体は、ＴＮＦ－α受容体を標的とする。前記単一ドメイン抗体は、ラクダ科ＶＨＨであってよい。

【００８７】

本発明の一態様によれば、単一ドメイン抗体は、ＩＦＮ－γ受容体を標的とする。前記単一ドメイン抗体は、ラクダ科ＶＨＨであってよい。

【００８８】

本発明の別の態様は、患者に、抗ＩＦＮ－γポリペプチド、抗ＴＮＦ－α受容体ポリペプチド、および抗ＩＦＮ－γ受容体ポリペプチドからなる群から選択した少なくとも１種のポリペプチドをさらに含む抗ＴＮＦ－αポリペプチドの有効量を投与することを含む、自己免疫疾患または本明細書に述べた状態の治療方法であり、そのようなポリペプチドは以下に記述するように互いに接合されている。

【００８９】

そのような多種特異的構築体は、炎症治療化合物として一種特異的構築体よりも作用強度が改善されているであろう。

【００９０】

本発明の一態様は、本明細書で開示した抗ＴＮＦ－αポリペプチド、ならびに抗ＩＦＮ－γポリペプチド、抗ＴＮＦ－α受容体ポリペプチド、および抗ＩＦＮ－γ受容体ポリペプチドからなる群から選択した少なくとも１種のポリペプチドを含み、対象に同時投与、分別投与、または逐次投与するための組成物である。

【００９１】

本発明の一態様は、有効量の抗ＴＮＦ－αポリペプチド、ならびに抗ＩＦＮ－γポリペプチド、抗ＴＮＦ－α受容体ポリペプチド、および抗ＩＦＮ－γ受容体ポリペプチドからなる群から選択した少なくとも１種のポリペプチドを個体に同時投与、分別投与、または逐次投与することを含む、自己免疫疾患の治療方法である。

【００９２】

本発明の別の態様は、抗ＴＮＦ－αポリペプチド、ならびに抗ＩＦＮ－γポリペプチド、抗ＴＮＦ－α受容体ポリペプチド、および抗ＩＦＮ－γ受容体ポリペプチドからなる群から選択した少なくとも１種のポリペプチドを含み、対象に同時投与、分別投与、または逐次投与するためのキットである。本発明にしたがってキットを使用できることは本発明の態様である。本明細書で述べた疾患の治療にキットを使用することができることは本発明の態様である。

【００９３】

同時投与は、たとえば、ポリペプチド類、または前記ポリペプチド類を含む組成物の混合物として、ポリペプチド類を対象に同時に投与することを意味する。例には、それだけには限らないが、静脈内投与液、錠剤、液体、局所クリームなどが含まれ、各調製物には当該ポリペプチド類が含まれる。

【００９４】

分別投与は、ポリペプチド類を対象に同時にまたは実質上同時に投与することを意味する。ポリペプチド類は、分離した非混合型調製物としてキットに含まれる。たとえば、異

なるポリペプチド類が、個々の錠剤としてキットに含まれていてよい。錠剤類は、両錠剤を同時に、または一方の錠剤の直後に他方の錠剤を嚥下することによって対象に投与されてよい。

【００９５】

逐次投与は、ポリペプチド類を対象に逐次投与することを意味する。ポリペプチド類は、分離した非混合型調製物としてキットに含まれる。投与間相互に時差がある。たとえば、一方の成分を投与してから、最長３３６、３１２、２８８、２６４、２４０、２１６、１９２、１６８、１４４、１２０、９６、７２、４８、２４、２０、１６、１２、８、４、２、１、または０．５時間後に他方のポリペプチドが投与されるであろう。

【００９６】

逐次投与では、１種のポリペプチドは、別のポリペプチドの投与前かつ／または後に１回で、または様々な用量で任意の回数で投与することができる。逐次投与は、同時投与または逐次投与と組み合わせることができる。

【００９７】

以下に記載した抗ＴＮＦ‐αポリペプチドの医療用途は、本明細書で開示した抗ＴＮＦ‐αポリペプチド、ならびに抗ＩＦＮ‐γポリペプチド、抗ＴＮＦ‐α受容体ポリペプチド、および抗ＩＦＮ‐γ受容体ポリペプチドからなる群から選択した少なくとも１種のポリペプチドを含み、対象に同時投与、分別投与、または逐次投与するための組成物にも適応され、この組成物は先に本明細書に開示されている。

【００９８】

本発明の一態様によれば、抗ＩＦＮ‐γポリペプチド、抗ＴＮＦ‐α、ＩＦＮ‐γを標的とする単一ドメイン抗体が挙げられる。前記単一ドメイン抗体は、ラクダ科ＶＨＨであってよい。

【００９９】

ＩＦＮ‐γを標的とする単一ドメイン抗体が、表６に示す配列番号４４～７２のいずれかの配列によって表される配列に相当することは本発明の実施形態である。

【０１００】

本発明の一態様によれば、抗ＴＮＦ‐α、ＴＮＦ‐α受容体を標的とする単一ドメイン抗体が挙げられる。前記単一ドメイン抗体は、ラクダ科ＶＨＨであってよい。

【０１０１】

本発明の一態様によれば、抗ＩＦＮ‐γ受容体ポリペプチド、抗ＴＮＦ‐α、ＩＦＮ‐γ受容体を標的とする単一ドメイン抗体が挙げられる。前記単一ドメイン抗体は、ラクダ科ＶＨＨであってよい。

【０１０２】

本発明の別の実施形態は、ＴＮＦ‐αを標的とする単一ドメイン抗体数が２個以上である、本明細書で開示した抗ＴＮＦ‐αポリペプチドである。そのような多価抗ＴＮＦ‐αポリペプチドは、その一価の対照物と比較して予想よりもはるかに高い阻害特性を示しつつも、標的に対する機能的親和性が異例に高いという利点を持つ。

【０１０３】

多価抗ＴＮＦ‐αポリペプチドの機能的親和性は、一価の親抗ＴＮＦ‐αポリペプチドよりも桁違いに高い。本発明者らは、これらの多価ポリペプチドの機能的親和性が、二価抗体および多価抗体に関して従来技術で報告されている機能的親和性よりもはるかに高いことを見出している。驚くべきことに、互いに直接結合し（配列番号７７および７８）、または短いリンカー配列を介して結合する本発明の抗ＴＮＦ‐αポリペプチド類は、従来の多価４鎖抗体で理論上予想される高さの機能的親和性を示す。

【０１０４】

本発明者らは、そのように大きく増大した機能活性が、直接結合アッセイまたは機能アッセイ、たとえば、細胞毒性アッセイにおいて、多ドメインおよび多量体蛋白質から構成した抗原を用いて好ましく検出できることを見出している。

【０１０５】

本発明の別の実施形態は、ＴＮＦ‐αを標的とする単一ドメイン抗体数が２個以上であり、前記抗ＴＮＦ‐αポリペプチドが配列番号７３～７６によって表されるいずれかに相当する配列も含む、本明細書で開示した抗ＴＮＦ‐αポリペプチドである。

【０１０６】

本明細書で開示する単一ドメイン抗体は、当技術分野で公知の方法、または将来のいかなる方法を用いて、１以上の単一ドメイン抗体を結合させることにより形成することができる。たとえば、Ｂｌａｔｔｌｅｒら、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ２４、１５１７‐１５２４、ＥＰ２９４７０３号に記載されたものなど、有機誘導体化剤を用いてアミノ酸残基類を反応させることにより、単一ドメイン抗体を化学架橋的に融合することができる。あるいは、単一ドメイン抗体は、ＤＮＡレベルで遺伝子的に融合させることができ、すなわち、１種または複数の抗標的単一ドメイン抗体、ならびに１種または複数の抗血清蛋白質単一ドメイン抗体を含む完全ポリペプチド構築体をコードするポリヌクレオチド構築体が形成される。二価または多価ＶＨＨポリペプチド構築体を産生する方法は、ＰＣＴ特許出願ＷＯ９６／３４１０３号に開示されている。多数の単一ドメイン抗体類を接合する一方式は、単一のドメイン抗体コード配列を直接またはペプチドリンカーを介して結合することによる遺伝子的手順である。たとえば、第１の単一ドメイン抗体のＣ末端を次の単一ドメイン抗体Ｎ末端と結合することができる。この結合方式は、トリ、テトラなどの機能構築体の構築・産生に向けて追加の単一ドメイン抗体を結合するために伸展することができる。

【０１０７】

本発明の一態様によれば、単一ドメイン抗体類は、リンカーを使用せずに互いに直接結合される。２個のサブユニットの結合活性を保持するためにリンカー配列が必要とされる嵩高な従来の抗体類の接合に反して、本発明のポリペプチド類は、直接結合（配列番号７７および７８）し、それによってヒト対象に投与したとき、リンカー配列が不安定なことによってサブユニットが解離される抗原性など、リンカー配列の潜在的な問題を回避することができる。

【０１０８】

本発明の別の態様によれば、単一ドメイン抗体類は、ペプチドリンカー配列を介して互いに結合される。そのようなリンカー配列は、自然に存在する配列でも、自然に存在しない配列でもよい。リンカー配列は、抗ＴＮＦ‐αポリペプチドを投与する対象で免疫原性ではないと予想される。リンカー配列は、多価抗ＴＮＦ‐αポリペプチドに十分な融通性を提供すると同時に、蛋白質分解には耐性であり得る。リンカー配列の非限定的な例は、ＷＯ９６／３４１０３号に記載されるＶＨＨヒンジ領域から得ることができるものである。

【０１０９】

本発明の別の態様によれば、２種を超える単一ドメイン抗体を含む多価単一ドメイン抗体類を互いに直接またはリンカー配列を介して結合することができる。そのような構築体は、従来の抗体では産生が困難であり、かつ大きいサブユニットに立体的に妨害されるために一価の構築体と比較して本発明のＶＨＨ類で見られるように機能性が著しく増大するのではなく、消失しまたは著しく低減される（そのような多価ＶＨＨ構築体のゲルろ過分析を示す図１２を参照）。

【０１１０】

本明細書で開示したポリペプチド構築体は、当業者が当技術分野で公知の方法、または将来のいかなる方法にしたがって製造することができる。たとえば、ラクダを免疫化し、それからハイブリドーマを得ることによって、または当技術分野で公知の分子生物技術を使用し単一ドメイン抗体ライブラリをクローニングし、続いてファージ提示法を使用して選択することによるなど、当技術分野で公知の方法を使用してＶＨＨを得ることができる。

【０１１１】

本発明の態様によれば、抗ＴＮＦ‐αポリペプチドは、完全長抗ＴＮＦ‐αポリペプチ

ドの相同配列でよい。本発明の別の態様によれば、抗ＴＮＦ‐αポリペプチドは、完全長抗ＴＮＦ‐αポリペプチドの機能部分でよい。本発明の別の態様によれば、抗ＴＮＦ‐αポリペプチドは、完全長抗ＴＮＦ‐αポリペプチドの相同配列でよい。本発明の別の態様によれば、抗ＴＮＦ‐αポリペプチドは、完全長抗ＴＮＦ‐αポリペプチドの相同配列機能部分でよい。本発明の態様によれば、抗ＴＮＦ‐αポリペプチドには、抗ＴＮＦ‐αポリペプチド配列を含めてよい。

【０１１２】

本発明の態様によれば、抗ＴＮＦ‐αポリペプチドを形成するために使用する単一ドメイン抗体は、完全単一ドメイン抗体（たとえばＶＨＨ）またはその相同配列でよい。本発明の別の態様によれば、ポリペプチド構築体を形成するために使用する単一ドメイン抗体は、完全単一ドメイン抗体の機能部分でよい。本発明の別の態様によれば、ポリペプチド構築体を形成するために使用する単一ドメイン抗体は、完全単一ドメイン抗体の相同配列でよい。本発明の別の態様によれば、ポリペプチド構築体を形成するために使用する単一ドメイン抗体は、完全単一ドメイン抗体の相同配列機能部分でよい。

【０１１３】

本明細書では、本発明の相同配列には、１種または複数のアミノ酸の添加、欠失、または置換を含めてよく、それは本発明のポリペプチドの機能特性を実質上変更しない。アミノ酸の欠失または置換数は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、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、または７０アミノ酸までであることが好ましい。

【０１１４】

本発明による相同配列は、アミノ酸の付加、欠失、または置換によって変更されたポリペプチドでよく、未変更ポリペプチドと比較して前記変更によって機能特性は実質上変化しない。

【０１１５】

本発明による相同配列は、アミノ酸の付加、欠失、または置換によって変更されたポリペプチドでよく、未変更ポリペプチドと比較して前記変更によって機能特性は実質上変化しない。

【０１１６】

本発明による相同配列は、他のラクダ科種、たとえば、ラクダ、ヒトコブラクダ、ラマ、アルパカ、グアナコなどに存在する配列でよい。

【０１１７】

相同配列が、配列相同性を示す場合、それは、親配列と高い配列相同性（７０％を超え、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、または９８％の配列相同性）を示す配列を意味し、親配列に類似する特性、すなわち親和性を特徴とすることが好ましく、前記相同性は公知の方法を使用して算出する。

【０１１８】

あるいは、相同配列は、下式：

ＳｅｒをＳｅｒ、Ｔｈｒ、Ｇｌｙ、およびＡｓｎによって置換、

ＡｒｇをＡｒｇ、Ｈｉｓ、Ｇｌｎ、Ｌｙｓ、およびＧｌｕの１個によって置換、

ＬｅｕをＬｅｕ、Ｉｌｅ、Ｐｈｅ、Ｔｙｒ、Ｍｅｔ、およびＶａｌの１個によって置換、

ＰｒｏをＰｒｏ、Ｇｌｙ、Ａｌａ、およびＴｈｒの１個によって置換、

ＴｈｒをＴｈｒ、Ｐｒｏ、Ｓｅｒ、Ａｌａ、Ｇｌｙ、Ｈｉｓ、およびＧｌｎの１個によって置換、

ＡｌａをＡｌａ、Ｇｌｙ、Ｔｈｒ、およびＰｒｏの１個によって置換、

ＶａｌをＶａｌ、Ｍｅｔ、Ｔｙｒ、Ｐｈｅ、Ｉｌｅ、およびＬｅｕの１個によって置

換、
ＧｌｙをＧｌｙ、Ａｌａ、Ｔｈｒ、Ｐｒｏ、およびＳｅｒの１個によって置換、
ＩｌｅをＩｌｅ、Ｍｅｔ、Ｔｙｒ、Ｐｈｅ、Ｖａｌ、およびＬｅｕの１個によって置換、
ＰｈｅをＰｈｅ、Ｔｒｐ、Ｍｅｔ、Ｔｙｒ、Ｉｌｅ、Ｖａｌ、およびＬｅｕの１個によって置換、
ＴｙｒをＴｙｒ、Ｔｒｐ、Ｍｅｔ、Ｐｈｅ、Ｉｌｅ、Ｖａｌ、およびＬｅｕの１個によって置換、
ＨｉｓをＨｉｓ、Ｇｌｕ、Ｌｙｓ、Ｇｌｎ、Ｔｈｒ、およびＡｒｇの１個によって置換、
ＧｌｎをＧｌｎ、Ｇｌｕ、Ｌｙｓ、Ａｓｎ、Ｈｉｓ、Ｔｈｒ、およびＡｒｇの１個によって置換、
ＡｓｎをＡｓｎ、Ｇｌｕ、Ａｓｐ、Ｇｌｎ、およびＳｅｒの１個によって置換、
ＬｙｓをＬｙｓ、Ｇｌｕ、Ｇｌｎ、Ｈｉｓ、およびＡｒｇの１個によって置換、
ＡｓｐをＡｓｐ、Ｇｌｕ、およびＡｓｎの１個によって置換、
ＧｌｕをＧｌｕ、Ａｓｐ、Ｌｙｓ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、Ｈｉｓ、およびＡｒｇの１個によって置換、
ＭｅｔをＭｅｔ、Ｐｈｅ、Ｉｌｅ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、およびＴｙｒの１個によって置換
にしたがって親配列の多数の位置での置換が可能になったことから生じたどんなアミノ酸配列であってもよい。

【０１１９】
本発明による相同ヌクレオチド配列は、ストリンジェントなハイブリッド形成条件下で（Ｓａｍｂｒｏｏｋら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ、実験マニュアル、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ ｐｒｅｓｓ、米国ニューヨーク州によって記載される条件など）、特許配列（ｐａｔｅｎｔ ｓｅｑｕｅｎｃｅ）をコードすることができるヌクレオチド配列の逆相補鎖とハイブリッド形成することが可能な、５０を超え、１００、２００、３００、４００、５００、６００、８００、または１０００ヌクレオチドのヌクレオチド配列をさしていてよい。

【０１２０】
本明細書では、機能部分は、当該物との相互作用を１×１０$^{-6}$Ｍ以上の親和性で維持するのに十分な径の単一ドメイン抗体の配列をさす。

【０１２１】
あるいは、機能部分は、完全なアミノ酸配列に部分的な欠失を含むが、依然として標的との結合および相互作用に必要な１個または複数の結合部位、および１個または複数の蛋白質ドメインを保持する。

【０１２２】
本明細書では、機能部分は、完全配列の１００％未満（たとえば、９９％、９０％、８０％、７０％、６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、１０％、５％、１％など）をさすが、５個以上のアミノ酸または１５個以上のヌクレオチドを含む。

【０１２３】
ＴＮＦ‐α、ＴＮＦ‐α受容体、血清蛋白質（たとえば、血清アルブミン、血清免疫グロブリン、サイロキシン結合蛋白質、トランスフェリン、フィブリノーゲン）およびＩＦＮ‐γ、ＩＦＮ‐γ受容体などの本明細書に記載した標的は前記標的断片であってよい。したがって、標的は、免疫応答を引き出すことができる前記標的の断片であってもよい。標的は、完全長標的に対して生じた単一ドメイン抗体に結合できる前記標的断片であってもよい。

【０１２４】
本明細書で使用される断片は、１００％未満の配列（たとえば、９９％、９０％、８０％、７０％、６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、１０％など）をさすが、５、６

、７、８、９、１０、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５個、またはそれ以上のアミノ酸を含む。断片は、当該物との相互作用を1×10^{-6}Ｍ以上の親和性で維持するのに十分な長さである。

【０１２５】

本明細書で使用される断片は、野生型標的に対して生じた単一ドメイン抗体に結合するための標的の能力を実質上変更しない１個または複数のアミノ酸の任意選択による挿入、欠失、および置換もさす。アミノ酸の挿入、欠失、または置換数は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、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、または７０個までのアミノ酸であることが好ましい。

【０１２６】

本発明の相同配列には、ヒト化されている抗ＴＮＦ‐αポリペプチドを含めてよい。ＶＨＨの新規なクラスの抗体をヒト化することは、投与に際してヒト個体における望ましくない免疫反応の可能性をさらに低減するはずである。

【０１２７】

本発明の一実施形態は、抗体可変ドメイン（ＶＨＨ）のアミノ酸残基を定量することによって、ラマ抗体を基礎とする改変ポリペプチドを調製する方法であって、抗原に対するドメインの本来の親和性を低減させることなく、他方で非相同種に関するその免疫原性を低減して改変できる方法、同定した残基に変更を加えた、非相同種への投与に有用であるＶＨＨの使用、およびそのように改変したＶＨＨに関する。

【０１２８】

より詳しくは、本発明は、ヒトに投与するために改変した改変ＶＨＨの調製、得られたＶＨＨ自体、およびヒト疾患の治療におけるそのような「ヒト化」ＶＨＨの使用に関する。ヒト化は、ヒト患者での投与に際して免疫原性が軽微または存在しないような変異を意味する。本発明にしたがってポリペプチドをヒト化することは、１個または複数のラクダ科アミノ酸を、ヒトコンセンサス配列中に見られるそのヒト対照物によって置換するステップを含むが、ポリペプチドがその通常の特性を失うことなしに、すなわち、ヒト化が得られたポリペプチドの抗原結合能力が重大な影響を受けることはない。そのような方法は、当業者によって知られている。

【０１２９】

ラクダ科単一ドメイン抗体のヒト化には、単一ポリペプチド鎖中に一定量のアミノ酸の導入と突然変異誘発が必要である。これはｓｃＦｖ、Ｆａｂ、（Ｆａｂ）２、およびＩｇＧのヒト化とは対照的であり、それには２本の鎖の軽鎖および重鎖にアミノ酸変化を導入し、両鎖の組立て体を保存する必要がある。

【０１３０】

非制限的な実施例として、ＦＲ２にヒト様残基を含むＶＨＨ＃１２Ｂポリペプチドをヒト化した。ヒト化には、ＦＲ１内の位置１および５で残基の突然変異誘発が必要であり、その突然変異はレパートリークローニングに使用されラマ配列では自然には生じないプライマーによって導入された。そうした残基の突然変異誘発によって結合活性および／または阻害活性の喪失がもたらされることはなかった。ヒト化には、ＦＲ３内の位置７４、７６、８３、８４、９３の残基の突然変異誘発も必要であった。そうした残基の突然変異誘発が、結合活性および／または阻害活性の劇的な喪失をもたらすことはなかった（図４参照）。したがって、ＦＲ１およびＦＲ３の突然変異の組合せによって結合活性および／または阻害活性に影響が及ぼされることはなかった（図５）。

【０１３１】

ヒト化には、ＦＲ４内の位置１０８の残基の突然変異誘発も必要であった。Ｑ１０８Ｌの突然変異誘発は、大腸菌での産生レベルを低下させた。位置１０８は、ラクダ類ＶＨＨ

中で溶媒に曝露されているが、ヒト抗体ではこの位置はＶＨ‐ＶＬ界面で覆い隠されている（Ｓｐｉｎｅｌｌｉ、１９９６、Ｎｉｅｂａ、１９９７）。単離したＶＨでは、位置１０８は溶媒に曝露されている。極性非帯電Ｇｌｎに代えて非極性疎水性Ｌｅｕを導入することは、分子本来の折りたたみ／安定性に対して劇的な影響を及ぼしかねない。

【０１３２】

非制限的な実施例として、位置３７、４４、４５、および４７に親水特性を備えた正真正銘のラクダ類残基を含むＶＨＨ＃３Ｅを代表するポリペプチドをヒト化した。位置４４および４５（Ｅ４４ＧおよびＲ４５Ｌ）でヒト疎水性残基によって親水性残基を交換しても、結合および／または阻害が影響を受けることはなかった。しかし、Ｆ３７ＶおよびＦ４７Ｗを導入した場合、結合活性および／または阻害活性の喪失が観察された。モデルデータによってＣＤＲ３ループ高次構造の統合性を保存するための必須残基３７を確認し、それによって活性を確認した（図６参照）（番号付けは全てＫａｂａｔによる）。

【０１３３】

配列番号３および１４は、ヒトＶＨフレームワーク領域に対して９０％を超えるアミノ酸配列相同性を示し、したがって前記ＶＨＨは、そこからの免疫応答を懸念することなく、追加のヒト化の負担もなく患者に直接投与されるであろう。したがって、本発明の一態様によって、それを必要とする患者に配列番号３および１４、その相同配列、またはその相同配列の機能部分を含むポリペプチドを直接投与することが可能になる。

【０１３４】

本発明の一実施形態は、以下の残基：

ＦＲ１の位置１、５、２８、および３０、
ＦＲ２内の位置４４および４５にある正真正銘のアミノ酸、
ＦＲ３の残基７４、７５、７６、８３、８４、９３、および９４、および
ＦＲ４内の位置１０３、１０４、１０８および１１１

のどれかを単独でまたは組み合わせて置換するステップを含むＶＨＨのヒト化の方法であり、番号付けはカバットの番号付けによる。

【０１３５】

本発明の一実施形態は、炎症過程に関連付けられる疾患の症状の治療、予防、および／または緩和に使用される抗ＴＮＦ‐αポリペプチド、または前記ポリペプチドをコードし得る核酸である。ＴＮＦ‐αは、炎症過程に関与し、ＴＮＦ‐α作用をブロックすることによって抗炎症作用を得ることができ、これはある種の病態、たとえば、クローン病などにおいて非常に望ましい。本発明者らの実施例によって、ＴＮＦ‐αに結合し、さらにそのＴＮＦ‐α受容体への結合をブロックする本発明によるＶＨＨを実証する。

【０１３６】

本発明の抗ＴＮＦ‐αポリペプチドは、アジソン病（副腎）、耳自己免疫疾患（耳）、眼自己免疫疾患（眼）、自己免疫性肝炎（肝臓）、自己免疫性耳下腺炎（耳下腺）、クローン病（腸）、Ｉ型糖尿病（膵臓）、精巣上体炎（精巣上体）、糸球体腎炎（腎臓）、グレーブス病（甲状腺）、ギランバレー症候群（神経細胞）、橋本病（甲状腺）、溶血性貧血（赤血球）、全身性エリテマトーデス（多数組織）、男性不妊症（精子）、多発性硬化症（神経細胞）、重症筋無力症（神経筋接合部）、天疱瘡（主として皮膚）、乾癬（皮膚）、リューマチ熱（心臓および関節）、リューマチ性関節炎（関節ライニング）、類肉腫症（多数組織および臓器）、強皮症（皮膚および結合組織）、シェーグレン症候群（外分泌腺、および他の組織）、脊椎関節症（軸骨格および他の組織）、甲状腺炎（甲状腺）、血管炎（血管）などの自己免疫疾患に適用できる。括弧内は、その疾患によって作用を受ける組織である。自己免疫疾患のこの一覧は、包括ではなく例示を目的とする。

【０１３７】

本発明の抗ＴＮＦ‐αポリペプチドが適用可能な自己免疫状態には、たとえば、エイズ、アトピー性アレルギー、気管支喘息、湿疹、ハンセン病、統合失調症、遺伝性機能低下、組織および臓器移植、慢性疲労症候群、アルツハイマー病、パーキンソン病、心筋梗塞、脳梗塞、自閉症、てんかん、アルサス症候群、アナフィラキシ、アルコールおよび薬物

中毒が含まれる。上記の確認した自己免疫状態では、罹患組織は主要標的であり、別の場合には、これは二次的標的である。これらの状態は、部分的に、またはほとんど自己免疫症候群である。したがって、それらの治療には、本明細書に開示したのと同じ方法または同方法の態様を、ときには他の方法と組み合わせてを使用することができる。

【０１３８】

本発明の別の実施形態は、炎症過程に関連付けられる疾患治療用薬剤を調製するための本発明による抗ＴＮＦ‐αポリペプチド、または前記ポリペプチドをコードし得る核酸の使用である。疾患の例には、リューマチ性関節炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸症候群、および多発性硬化症が含まれる。

【０１３９】

本発明によるポリペプチドおよび核酸は、静脈内など、従来の経路によって対象に投与することができる。しかし、本発明の抗ＴＮＦ‐αポリペプチドの特殊な特性は、これらが組織膜および／または腫瘍などの障壁を通り抜けること、そこで局所的に作用すること、およびこれらが胃内などの極端な環境に耐えるのに十分安定していることである。したがって、本発明の別の態様は、抗ＴＮＦ‐αポリペプチドの送達に関する。

【０１４０】

本発明による対象は、治療用ポリペプチドによって治療することができるいかなる哺乳動物でもよい。

【０１４１】

本発明の抗ＴＮＦ‐αポリペプチドの経口送達によって、そのような分子が活性形で疾患に罹患している大腸の局所部位に提供される。これらの部位は、重度の炎症状態であり、ＴＮＦ‐α産生細胞が含まれ得る。ＴＮＦ‐αに結合する本発明の抗ＴＮＦ‐αポリペプチドは、ＴＮＦ‐αを局所的に無力化することができ、身体全体にわたって分配されるのを回避し、それによって負の副作用を制限する。遺伝的に改変した、ミクロコックスラクチス（Ｍｉｃｒｏｃｏｃｃｕｓ　ｌａｃｔｉｓ）などの微生物が、抗体またはその機能部分を分泌することができる。抗体またはその機能部分を腸において局所的に産生し、送達するためのビヒクルとしてそのような改変した微生物を使用することができる。抗ＴＮＦ‐αポリペプチドを産生する株を使用することによって、炎症性腸症候群を治療することができるはずである。

【０１４２】

本発明の別の態様は、ＷＯ００／２３４７１号に記載されているものなどのベクターを使用し、ラクトコックス類のようなグラム陽性宿主生物など、非侵襲性細菌上での表面発現またはこの細菌から分泌を利用することによって抗ＴＮＦポリペプチドを送達することを含む。

【０１４３】

本発明の一実施形態は、不活化されることなく、胃環境を通過することができるＴＮＦ‐α調節物質により調節が可能な疾患の症状を治療し、予防し、かつ／または緩和する際に使用するための本明細書で開示した抗ＴＮＦ‐αポリペプチドである。

【０１４４】

疾患の例は、それだけには限らないが、リューマチ性関節炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸症候群、および多発性硬化症を含む炎症を引き起こすもの全てである。当業者によって知られているように、ひとたび前記ポリペプチド構築体を所有したならば、製剤技術を正しい部位で最高量のポリペプチドを放出するために適用することができる（胃、大腸など）。この送達方法は、その標的が消化器系内に位置する疾患症状の治療、予防、および／または緩和に重要である。

【０１４５】

本発明の態様は、対象に本明細書で開示した抗ＴＮＦ‐αポリペプチドを経口投与することによって、不活化されることなく、胃環境を通過することができるＴＮＦ‐α調節物質により調節が可能な疾患の症状を治療し、予防し、かつ／または緩和する方法である。

【０１４６】

本発明の別の実施形態は、不活化されることなく、胃環境を通過することができるＴＮＦ‐α調節物質により調節が可能な疾患の症状を治療し、予防し、かつ／または緩和するための薬剤を調製するための本明細書で開示した抗ＴＮＦ‐αポリペプチドの使用である。

【０１４７】

本発明の態様は、対象に本明細書で開示した抗ＴＮＦ‐αポリペプチドを経口投与することによって、前記物質が不活化されることなく、消化器系にＴＮＦ‐α調節物質を送達する方法である。

【０１４８】

本発明の態様は、対象に本明細書で開示した抗ＴＮＦ‐αポリペプチドを経口投与することによって、その物質が不活化されることなく、対象の血流にＴＮＦ‐α調節物質を送達する方法である。

【０１４９】

本発明の別の実施形態は、膣腔および／または直腸腔に送達したＴＮＦ‐α調節物質によって調節が可能な症状または疾患を治療し、予防し、かつ／または緩和する際に使用するための本明細書で開示した抗ＴＮＦ‐αポリペプチドである。

【０１５０】

疾患の例は、それだけには限らないが、リューマチ性関節炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸症候群、および多発性硬化症を含む炎症を引き起こすもの全てである。非制限的な例では、本発明による製剤は、本明細書で開示した抗ＴＮＦ‐αポリペプチドをゲル、クリーム、座薬、フィルムの形で、またはスポンジの形で、または時間の経過につれて活性成分を静かに放出する膣リングとして含む（そのような製剤は、ＥＰ７０７４７３号、ＥＰ６８４８１４号、ＵＳ５６２９００１号に記載されている）。

【０１５１】

本発明の態様は、対象に本明細書で開示した抗ＴＮＦ‐αポリペプチドを経膣および／または経直腸投与することによって、膣腔および／または直腸腔に送達したＴＮＦ‐α調節物質により調節が可能な疾患の症状を治療し、予防し、かつ／または緩和する方法である。

【０１５２】

本発明の別の実施形態は、膣腔および／または直腸腔に送達したＴＮＦ‐α調節物質により調節が可能な疾患の症状を治療し、予防し、かつ／または緩和するための薬剤を調製するための本明細書で開示した抗ＴＮＦ‐αポリペプチドの使用である。

【０１５３】

本発明の態様は、対象の膣腔および／または直腸腔に本明細書で開示した抗ＴＮＦ‐αポリペプチドを投与することによって、前記物質が不活化されることなく、膣腔および／または直腸腔にＴＮＦ‐α調節物質を送達する方法である。

【０１５４】

本発明の態様は、対象の膣腔および／または直腸腔に本明細書で開示した抗ＴＮＦ‐αポリペプチドを投与することによって、前記物質が不活化されることなく、対象の血流にＴＮＦ‐α調節物質を送達する方法である。

【０１５５】

本発明の別の実施形態は、鼻、上気道、および／または肺に送達したＴＮＦ‐α調節物質により調節が可能な疾患の症状を治療し、予防し、かつ／または緩和するために使用される本明細書で開示した抗ＴＮＦ‐αポリペプチドである。

【０１５６】

疾患の例は、それだけには限らないが、リューマチ性関節炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸症候群、および多発性硬化症を含む炎症を引き起こすもの全てである。非制限的な例では、本発明による製剤は、鼻内スプレー（たとえばエアロゾル）または吸入剤の形をした本明細書で開示した抗ＴＮＦ‐αポリペプチドを含む。ポリペプチド構築体は小さいので、治療用ＩｇＧ分子よりもはるかに効果的にその標的に到達することができる

。

【０１５７】

本発明の態様は、対象に本明細書で開示した抗ＴＮＦ‐αポリペプチドを口または鼻を通して吸入投与することよって、上気道および肺に送達したＴＮＦ‐α調節物質により調節が可能な疾患の症状を治療し、予防し、かつ／または緩和する方法である。

【０１５８】

本発明の別の実施形態は、鼻、上気道、および／または肺に送達したＴＮＦ‐α調節物質により調節が可能な疾患の症状を治療し、予防し、かつ／または緩和するための薬剤を調製するための、本明細書で開示した抗ＴＮＦ‐αポリペプチドの使用であり、前記ポリペプチドは不活化されることがない。

【０１５９】

本発明の態様は、対象の鼻、上気道、および／または肺に本明細書で開示した抗ＴＮＦ‐αポリペプチドを投与することによって不活性化されることなく、鼻、上気道、および肺にＴＮＦ‐α調節物質を送達する方法である。

【０１６０】

本発明の態様は、対象の鼻、上気道、および／または肺に本明細書で開示した抗ＴＮＦ‐αポリペプチドを投与することによって不活性化されることなく、対象の血流にＴＮＦ‐α調節物質を送達する方法である。

【０１６１】

本発明の一実施形態は、腸粘膜に送達したＴＮＦ‐α調節物質により調節が可能な疾患であって、腸粘膜透過性を上昇させる前記疾患の症状を治療し、予防し、かつ／または緩和するために使用される本明細書で開示した抗ＴＮＦ‐αポリペプチドである。その小さい径のために、本明細書で開示した抗ＴＮＦ‐αポリペプチドは、腸粘膜透過性の上昇を引き起こす疾患、たとえば、クローン病を患う対象で腸粘膜を通過し、より効果的に血流に到達することができる。

【０１６２】

本発明の態様は、対象に本明細書で開示した抗ＴＮＦ‐αポリペプチドを経口投与することによって、腸粘膜に送達したＴＮＦ‐α調節物質により調節が可能な疾患であって、腸粘膜透過性を上昇させる前記疾患の症状を治療し、予防し、かつ／または緩和する方法である。

【０１６３】

この工程は、本発明の追加の態様‐能動輸送担体の使用によってよりさらに強化することができる。本発明のこの態様では、腸壁を通って血流への輸送を強化する担体にＶＨＨを融合する。非制限的な例では、この「担体」は、治療ＶＨＨに融合される第２ＶＨＨである。そのような融合構築体を当技術分野で公知の方法を使用して作製する。「担体」ＶＨＨは、壁を通る能動輸送を誘発する腸壁上の受容体に特異的に結合する。

【０１６４】

本発明の別の実施形態は、腸粘膜に送達したＴＮＦ‐α調節物質により調節が可能な疾患であって、腸粘膜透過性を上昇させる前記疾患の症状を治療し、予防し、かつ／または緩和するための薬剤を調製するための本明細書で開示した抗ＴＮＦ‐αポリペプチドの使用である。

【０１６５】

本発明の態様は、対象に本発明の抗ＴＮＦ‐αポリペプチドを経口投与することによって、不活化されることなく、腸粘膜にＴＮＦ‐α調節物質を送達する方法である。

【０１６６】

本発明の態様は、対象に本発明の抗ＴＮＦ‐αポリペプチドを経口投与することによって、不活化されることなく、対象の血流にＴＮＦ‐α調節物質を送達する方法である。

【０１６７】

この工程は、本発明の追加の態様‐能動輸送担体の使用によって、よりさらに強化することができる。本発明のこの態様では、本明細書に記載した抗ＴＮＦ‐αポリペプチドを

、腸壁を通って血流への輸送を強化する担体に融合する。非制限的な例では、この「担体」は前記ポリペプチドに融合されるＶＨＨである。そのような融合構築体を当技術分野で公知の方法を使用して作製する。「担体」ＶＨＨは、壁を通る能動輸送を誘発する腸壁上の受容体に特異的に結合する。

【０１６８】

本発明の一実施形態は、舌下組織を効果的に通過することができるＴＮＦ‐α調節物質により調節が可能な疾患の症状を治療し、予防し、かつ／または緩和するために使用される本明細書で開示した抗ＴＮＦ‐αポリペプチドである。

【０１６９】

疾患の例は、それだけには限らないが、リューマチ性関節炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸症候群、および多発性硬化症を含む炎症を引き起こすもの全てである。本明細書で開示した前記ポリペプチド構築体製剤、たとえば、錠剤、スプレー、滴剤は舌下に置かれ、粘膜を通って舌下の毛細管網に吸収される。

【０１７０】

本発明の態様は、対象に本明細書で開示した抗ＴＮＦ‐αポリペプチドを舌下投与することによって、舌下組織を効果的に通過することができるＴＮＦ‐α調節物質により調節が可能な疾患の症状を治療し、予防し、かつ／または緩和する方法である。

【０１７１】

本発明の別の実施形態は、舌下組織を通過することができるＴＮＦ‐α調節物質により調節が可能な疾患の症状を治療し、予防し、かつ／または緩和するための薬剤を調製するための、本明細書で開示した抗ＴＮＦ‐αポリペプチドの使用である。

【０１７２】

本発明の態様は、対象に本明細書で開示した抗ＴＮＦ‐αポリペプチドを舌下投与することによって、不活化されることなく、舌下組織にＴＮＦ‐α調節物質を送達する方法である。

【０１７３】

本発明の態様は、対象に本明細書で開示した抗ＴＮＦ‐αポリペプチドを経口投与することによって、不活化されることなく、対象の血流にＴＮＦ‐α調節物質を送達する方法である。

【０１７４】

本発明の一実施形態は、皮膚を効果的に通過することができるＴＮＦ‐α調節物質により調節が可能な疾患の症状を治療し、予防し、かつ／または緩和するために使用される本明細書で開示した抗ＴＮＦ‐αポリペプチドである。

【０１７５】

疾患の例は、それだけには限らないが、リューマチ性関節炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸症候群、および多発性硬化症を含む炎症を引き起こすもの全てである。前記ポリペプチド構築体製剤、たとえば、クリーム、フィルム、スプレー、滴剤、パッチは、皮膚上に置かれ、浸透する。

【０１７６】

本発明の態様は、対象に本明細書で開示した抗ＴＮＦ‐αポリペプチドを局所投与することによって、皮膚を効果的に通過することができるＴＮＦ‐α調節物質により調節が可能な疾患の症状を治療し、予防し、かつ／または緩和する方法である。

【０１７７】

本発明の別の実施形態は、皮膚を効果的に通過することができるＴＮＦ‐α調節物質により調節が可能な疾患の症状を治療し、予防し、かつ／または緩和するための薬剤を調製するための本明細書で開示した抗ＴＮＦ‐αポリペプチドの使用である。

【０１７８】

本発明の態様は、対象に本明細書で開示した抗ＴＮＦ‐αポリペプチドを局所投与することによって、不活化されることなく、皮膚にＴＮＦ‐α調節物質を送達する方法である。

【０１７９】
本発明の態様は、対象に本明細書で開示した抗ＴＮＦ‐αポリペプチドを局所投与することによって、対象の血流にＴＮＦ‐α調節物質を送達する方法である。
【０１８０】
本発明の別の実施形態では、抗ＴＮＦ‐αポリペプチドは、さらに前記抗ＴＮＦ‐αポリペプチドを肺胞腔から血液に輸送するための能動輸送担体として作用する担体単一ドメイン抗体（たとえばＶＨＨ）を含む。
【０１８１】
さらに担体を含む抗ＴＮＦ‐αポリペプチドは、粘膜表面（気管支上皮細胞）に存在する受容体に特異的に結合し、肺胞腔から血液にポリペプチドを能動輸送する。担体単一ドメイン抗体は、ポリペプチド構築体に融合させることができる。そのような融合構築体は、当技術分野で公知の方法を使用して製造することができ、本明細書に記載されている。「担体」単一ドメイン抗体は、表面を通り抜ける能動輸送を誘発する粘膜表面上の受容体に特異的に結合する。
【０１８２】
本発明の別の態様は、どの単一ドメイン抗体（たとえばＶＨＨ）が経鼻投与直後に血流中に能動輸送されるかを判定する方法である。同様に、未処置のまたは免疫ＶＨＨファージライブラリを経鼻投与することができ、投与後の様々な時点後に、血液または臓器を単離して血流に能動輸送されているファージをレスキューすることができる。肺胞腔から血流に能動輸送するための受容体の非限定的な例は、Ｆｃ受容体Ｎ（ＦｃＲｎ）である。本発明の一態様には、本方法によって同定されたＶＨＨ分子が含まれる。次いで、経鼻投与直後に、血流中の対応する標的に治療ＶＨＨを送達するための担体ＶＨＨとして、そのようなＶＨＨを使用することができる。
【０１８３】
本発明の一態様では、ポリペプチドとＴＮＦ‐αの結合を調節する作用薬をスクリーニングするために、本明細書で開示した抗ＴＮＦ‐αポリペプチドを使用することができる。結合または前記ポリペプチドの置換のみを測定するアッセイで作用薬を同定した場合、作用薬を機能試験にかけて、それらがｉｎ　ｖｉｖｏで抗原の作用を調節したかどうかを判定しなければならない。主として配列番号３に関するスクリーニングアッセイの例を以下に示すが、本明細書で開示したどんな抗ＴＮＦ‐αポリペプチドも適切であろう。
【０１８４】
置換実験の一例では、増加性濃度の候補調節物質の存在または非存在下において、たとえば、標識されている配列番号３によって表されるポリペプチドを含む結合緩衝液中で、ＴＮＦ‐αまたはその断片を発現しているファージまたは細胞を培養する。アッセイを確証し、較正するために、増加性濃度の未標識の前記ポリペプチドを使用して対照競合反応を実施することができる。培養後、細胞を十分に洗浄し、所与の標識に適切なように結合した標識ポリペプチドを測定する（たとえば、シンチレーションカウンティング、蛍光など）。候補調節物質の存在下で結合した標識ポリペプチドの量が少なくとも１０％減少することは、候補調節物質による結合の置換を示す。１μＭ以下の濃度（未飽和ポリペプチド用量）で候補調節物質が標識ポリペプチドの５０％を置換した場合は、このアッセイまたは本明細書に記載の他のアッセイで候補調節物質は特異的に結合すると見なされる。
【０１８５】
あるいは、結合または結合の置換は、表面プラスモン共鳴（ＳＰＲ）によってモニタすることができる。表面プラスモン共鳴アッセイは、固定センサ付近の質量の変化によって２個の分子間結合を測定するための定量法として使用することができ、この変化は、たとえば、水相からセンサ上の膜に固定されたＴＮＦ‐αへの配列番号３によって表されるポリペプチドの結合または結合の喪失によって生じる。この質量の変化は、前記ポリペプチドまたは候補調節物質の注射後または除去後に共鳴単位対時間として測定し、Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｂｉｏｓｅｎｓｏｒ（Ｂｉａｃｏｒｅ　ＡＢ）を使用し測定する。ＴＮＦ‐αは、たとえば、Ｓａｌａｍｏｎらが記載した方法にしたがって、薄層脂質膜中のセンサチップ

（たとえば、研究等級ＣＭ５チップ、Ｂｉａｃｏｒｅ　ＡＢ）上に固定することができる（Ｓａｌａｍｏｎら、１９９６、Ｂｉｏｐｈｙｓ　Ｊ．７１：２８３‐２９４、Ｓａｌａｍｏｎら、２００１、Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｊ．８０：１５５７‐１５６７、Ｓａｌａｍｏｎら、１９９９、Ｔｒｅｎｄｓ　Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｓｃｉ．２４：２１３‐２１９、その各々の全体を参照により本明細書に組み込む）。Ｓａｒｒｉｏらは、チップ上の脂質層に固定したＧＰＣＲＡ（１）アデノシン受容体に結合するリガンドを検出するためにＳＰＲが使用できることを実証した（Ｓａｒｒｉｏら、２０００、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．２０：５１６４‐５１７４、参照により本明細書に組み込む）。ＳＰＲアッセイでの配列番号３のＴＮＦ‐αへの結合条件は、Ｓａｒｒｉｏらが報告した条件を出発点として使用し、当業者が微調整することができる。

【０１８６】

ＳＰＲは、少なくとも２つの方式で結合調節物質をアッセイすることができる。最初に、たとえば、固定ＴＮＦ‐αに配列番号３によって表されるポリペプチドを予備結合させ、続いて候補調節物質を０．１ｎＭ～１μＭの範囲濃度で注射する。置換された結合ポリペプチドを定量でき、調節物質の結合を検出できるようになる。あるいは、膜結合型ＴＮＦ‐αを候補調節物質で予備培養し、たとえば、配列番号３によって表されるポリペプチドで検証することができる。調節物質非存在下での前記ポリペプチドとＴＮＦ‐αの間の結合親和性と比較した、前記ポリペプチドと調節物質で予備培養したＴＮＦ‐αの間の結合親和性の差によって、調節物質の存在下での前記ポリペプチドの結合または置換を実証する。どちらのアッセイでも、候補調節物質の非存在下で結合している前記ポリペプチドの量に比べて、候補調節物質の存在下で結合している前記ポリペプチドの量が１０％以上減少することは、候補調節物質がＴＮＦ‐αと前記ポリペプチドの相互作用を阻害することを示す。

【０１８７】

たとえば、配列番号３によって表されるポリペプチドとＴＮＦ‐αの結合の阻害を検出する別の方法は、蛍光共鳴エネルギー転移（ＦＲＥＴ）を使用する。蛍光ドナー（Ｄ）の放出スペクトルが蛍光アクセプター（Ａ）の励起スペクトルと重複する場合は、ＦＲＥＴは互いに近接（通常<１００Aの間隔）する蛍光ドナー（Ｄ）と蛍光アクセプター（Ａ）の間で生じる量子力学現象である。試験対象となる分子、たとえば、配列番号３によって表されるポリペプチドとＴＮＦ‐αは、ドナーおよびアクセプター蛍光体の相補対で標識する。ドナー蛍光体の励起と同時に発せられる蛍光は、ＴＮＦ‐α：ポリペプチド相互作用によって密接に関連しているが、前記ポリペプチドとＴＮＦ‐αが結合していないときの励起波長に呼応して発せられる蛍光とは波長が異なり、各波長での発光強度を測定することによって結合分子対非結合分子を定量する。ＴＮＦ‐αを標識するためのドナー蛍光体は当技術分野で周知である。特に重要なものは、青色ＦＰ（ＣＦＰ、ドナー（Ｄ））および黄色ＦＰ（ＹＦＰ、アクセプター（Ａ））として知られているＡ．ビクトリアＧＦＰの変異体である。一例として、ＹＦＰ変異体は、ＴＮＦ‐αとの融合蛋白質として製造することができる。融合体としてＧＦＰ変異体発現用ベクター（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）および蛍光体標識試薬（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ）が、当技術分野で公知である。蛍光標識ポリペプチドおよびＹＦＰ‐ＴＮＦ‐αの混合物へ候補調節物質を添加することによってエネルギー転移が阻害される。この阻害は、たとえば、候補調節物質を含まない試料に比べてＹＦＰ蛍光が減少することにより実証されている。ＦＲＥＴを使用する、ＴＮＦ‐α：ポリペプチド相互作用を検出するためのアッセイでは、候補調節物質を含む試料中で、アクセプターの波長で、候補調節物質を含まない試料に比べて蛍光発光強度が１０％以上減少することは、候補調節物質がＴＮＦ‐α：ポリペプチド相互作用を阻害することを示す。

【０１８８】

本明細書で使用する試料は、臨床用、農業用、法医学用、研究用、または他の可能な試料に由来する臨床試料（たとえば、細胞部分、全血、血漿、血清、組織、細胞など）など、ＴＮＦ‐αを含むどんな生体試料でもよい。臨床試料は、ヒト起源または動物起源でよ

い。分析した試料は、事実上固体でも液体でもよい。固体物質を使用する場合、まずこれらを適当な溶液に溶解することは明らかである。

【０１８９】

ＦＲＥＴの変異形態は、分子の相互作用をモニタするために蛍光消光法を使用する。相互作用対の１分子を蛍光体で標識し、その分子にぴったり寄せる場合は、他方の分子を蛍光体の蛍光を消光する分子で標識してよい。励起と直後の蛍光の変化は、蛍光体：クエンチャ対のタグ分子の会合の変化を示す。一般に、標識ＴＮＦ‐αの蛍光の増加は、クエンチャを有する抗ＴＮＦ‐αポリペプチドが転置されていることを示す。消光アッセイでは、候補調節物質を含まない試料に比べて、候補調節物質を含む試料での蛍光発光強度が１０％以上上昇することは、候補調節物質がＴＮＦ‐α：抗ＴＮＦ‐αポリペプチド相互作用を阻害することを示している。

【０１９０】

結合の定量には、表面プラスモン共鳴法およびＦＲＥＴ法の他に蛍光偏光測定法が有用である。蛍光タグ分子の蛍光偏光測定値は、回転相関時間または反転割合に依存する。ＴＮＦ‐αが蛍光標識抗ＴＮＦ‐αポリペプチドと会合することによって形成されたものなどの複合体は、未複合の標識ポリペプチドよりも偏光値が高い。候補阻害剤が、ＴＮＦ‐αと前記ポリペプチドの相互作用を撹乱し、または阻害する場合、ＴＮＦ‐α：抗ＴＮＦ‐αポリペプチド相互作用候補阻害剤を包含させることによって、候補阻害剤を含まない混合物に比べて蛍光偏光が減少する。蛍光偏光法は、ＴＮＦ‐α：抗ＴＮＦ‐αポリペプチド複合体の形成を撹乱する小分子の同定に大変適している。候補調節物質を欠く試料での蛍光偏光に比べて、候補調節物質を含む試料で蛍光偏光が１０％以上減少することは、候補調節物質がＴＮＦ‐α：抗ＴＮＦ‐αポリペプチド相互作用を阻害することを示す。

【０１９１】

ＴＮＦ‐α：抗ＴＮＦ‐αポリペプチド相互作用をモニタリングするための別の代替法は、バイオセンサアッセイを使用する。当技術分野ではＩＣＳバイオセンサが記載されている（Ａｕｓｔｒａｌｉａｎ Ｍｅｍｂｒａｎｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ、Ｃｏｒｎｅｌｌ Ｂ、Ｂｒａａｃｈ‐Ｍａｋｓｖｙｔｉｓ Ｖ、Ｋｉｎｇ Ｌ、Ｏｓｍａｎ Ｐ、Ｒａｇｕｓｅ Ｂ、Ｗｉｅｃｚｏｒｅｋ Ｌ、およびＰａｃｅ Ｒ.「イオンチャンネルスイッチを使用するバイオセンサ（Ａ ｂｉｏｓｅｎｓｏｒ ｔｈａｔ ｕｓｅｓ ｉｏｎ‐ｃｈａｎｎｅｌ ｓｗｉｔｃｈｅｓ）」Ｎａｔｕｒｅ １９９７、３８７、５８０）。この技術では、ＴＮＦ‐αと抗ＴＮＦ‐αポリペプチドの会合は、懸濁させた二分子膜中のグラマシジン（ｇｒａｍａｃｉｄｉｎ）促進イオンチャンネルの閉鎖と関連し、それによってバイオセンサのアドミタンス（インピーダンスに類似）の測定可能な変化に関連する。この手法は、６桁のアドミタンス変化に対して直線的であり、小分子コンビナトリアルライブラリの大規模、高処理スクリーニング法に理想的に適合する。候補調節物質を欠く試料のアドミタンスに比べて、候補調節物質を含む試料中でのアドミタンスが１０％以上変化（上昇または減少）することは、候補調節物質がＴＮＦ‐αと前記ポリペプチドの相互作用を阻害することを示す。ＴＮＦ‐αと抗ＴＮＦ‐αポリペプチドの相互作用を試験するアッセイでは、相互作用調節物質は、前記ポリペプチドと物理的に相互作用する蛋白質ドメインと、必ずしも直接相互作用しなくてもよい可能性があるということに留意することも重要である。調節物質は、相互作用部位から除去された部位で相互作用し、たとえば、ＴＮＦ‐αで高次構造の変化を引き起こす可能性もある。それにもかかわらず、この方式で作用する調節物質（阻害物質または作用物質）は、ＴＮＦ‐αとその受容体の結合を調節する作用薬として重要である。

【０１９２】

試料、たとえば、組織試料中の作用薬の存在を定量するために、記載した結合アッセイのどれかを使用することができ、その作用薬はＴＮＦ‐αに結合し、または、たとえば配列番号３によって表されるポリペプチドとＴＮＦ‐αの結合に作用する。そのようにするためには、試料の存在または非存在下でＴＮＦ‐αを前記ポリペプチドと反応させ、使用する結合アッセイに適切にポリペプチド結合を測定する。前記ポリペプチドの結合が１０

％以上減少することは、試料が前記ポリペプチドとＴＮＦ‐αの結合を調節する作用薬を含むことを示す。もちろん、上記の一般化した方法は、どんな本発明の抗ＴＮＦ‐αポリペプチド、その相同配列、その機能部分、またはその相同配列機能部分と、ＴＮＦ‐αまたはその断片との間の結合を変更する候補調節物質をスクリーニングするために容易に適用することができる。

【０１９３】

本発明の一実施形態は、本明細書で開示した方法によって同定した未知の作用薬である。

【０１９４】

本発明の一実施形態は、炎症過程に関連付けられる疾患の症状の治療、予防、および／または緩和に使用される、本明細書で開示した方法によって同定した未知の作用薬である。

【０１９５】

本発明の別の実施形態は、炎症過程に関連付けられる疾患の症状の治療、予防、および／または緩和に使用される、本明細書で開示した方法によって同定した未知の作用薬の使用である。

【０１９６】

疾患の例には、リューマチ性関節炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸症候群、および多発性硬化症が含まれる。

【０１９７】

本発明にしたがって有用な細胞は、細菌細胞たとえば大腸菌など、酵母細胞たとえばＳ．セレビシエやＰ．パストリスなど、昆虫細胞、または哺乳動物細胞からなる群から選択されることが好ましい。

【０１９８】

本発明による有用な細胞は、その中に本発明の抗ＴＮＦ‐α、その相同配列、その機能部分、または本発明によるその相同配列機能部分を含むポリペプチドをコードする核酸配列を導入することができ、その結果ポリペプチドが本明細書で定義した自然レベルまたは自然レベルを超えて発現するようなどんな細胞でもよい。細胞中で発現する本発明のポリペプチドは、本明細書で定義した正常なまたはほぼ正常な薬理を示すことが好ましい。細胞中で発現する本発明のポリペプチドは、表１に示したアミノ酸配列のどれか１つをコードできるヌクレオチド配列、または表１に示したアミノ酸配列に少なくとも７０％相同するアミノ酸配列をコードできるヌクレオチド配列を含むことが最も好ましい。

【０１９９】

本発明の好ましい実施形態によれば、細胞は、ＣＯＳ７‐細胞、ＣＨＯ細胞、ＬＭ（ＴＫ‐）細胞、ＮＩＨ‐３Ｔ３細胞、ＨＥＫ‐２９３細胞、Ｋ‐５６２細胞または１３２１Ｎ１星状細胞腫細胞からなる群から選択され、他の形質移入可能細胞系でもよい。

【０２００】

一般に、「治療有効量」、「治療上有効用量」および「有効量」は、所望の結果、または結果を実現するのに必要な量を意味する（ＴＮＦ‐α結合の調節、炎症の治療または予防）。当業者であれば、作用強度、したがって「有効量」は、本発明で使用されるＴＮＦ‐α結合を調節する様々な化合物に対して変化してよいことを理解するであろう。当業者ならば、容易に化合物の作用強度を評価できよう。

【０２０１】

本明細書では、用語「化合物」は、本発明の抗ＴＮＦ‐αポリペプチド、組成物、前記ポリペプチドをコードし得る核酸、本明細書に記載のスクリーニング法によって同定した作用薬、または１種もしくは複数の誘導体化アミノ酸を含む前記ポリペプチドをさす。

【０２０２】

「薬剤として許容される」は、生物学的にせよ、そうでないにせよ、望ましくないことはない物質を意味し、すなわち、化合物に加えて、その物質を個体に投与することができ、どんな望ましくない生物学的作用を引き起こすことも、またはそれが含まれている薬剤

組成物の他の成分のいずれかと有害な方式で相互作用することもないことを意味する。
【０２０３】
本明細書で開示した抗ＴＮＦ‐αポリペプチドは、対象の状態の治療または予防に有用であり、薬剤有効量の化合物または組成物を投与することを含む。
【０２０４】
本発明の抗ＴＮＦポリペプチドは、対象でのリューマチ性関節炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸症候群、および多発性硬化症に関連付けられる状態の治療または予防に有用であり、ＴＮＦ‐αに結合する化合物または組成物の薬剤有効量を投与することを含む。
【０２０５】
本明細書に開示した抗ＴＮＦ‐αポリペプチドは、対象の状態の治療または予防に有用であり、別のたとえばアスピリンなどとの配合化合物の薬剤有効量を投与することを含む。
【０２０６】
本明細書に開示した抗ＴＮＦ‐αポリペプチドは、対象でのリューマチ性関節炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸症候群、および多発性硬化症に関連付けられる状態の治療または予防に有用であり、別のたとえばアスピリンなどとの配合化合物の薬剤有効量を投与することを含む。
【０２０７】
本発明は、本発明の単一化合物を含む製剤の投与だけには限らない。１種を超える本発明の化合物を含む製剤をそれを必要とする患者に投与する併用治療を提供することは本発明の範囲に属する。
【０２０８】
ＴＮＦ‐αが介在する状態には、それだけには限らないが、リューマチ性関節炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸症候群、および多発性硬化症が含まれる。
【０２０９】
本発明で有用な化合物は、薬剤組成物として製剤し、選択した投与経路、すなわち、経口もしくは非経口、吸入による鼻腔内、静脈内、筋肉内、局所、または皮下経路に適合する様々な形態でヒト患者や家畜などの哺乳動物宿主に投与することができる。
【０２１０】
本発明の化合物は、遺伝子治療送達法を使用し投与することもできる。たとえば、米国特許第５，３９９，３４６号を参照されたい。その全体を参照により本明細書に組み込む。遺伝子治療送達法を使用し、本発明の化合物のための遺伝子を形質移入した主要な細胞に、さらに特定の臓器、組織、移植片、腫瘍、または細胞を標的とする組織特異的プロモータを形質移入することができる。
【０２１１】
したがって、本発明の化合物は、全身的に、たとえば、不活性希釈剤や吸収性食用可能な担体などの薬剤として許容されるビヒクルと組み合わせて経口的に投与することができる。これらの化合物は、ハードシェルまたはソフトシェルゼラチンカプセルに封入し、打錠し、または患者食の食物に直接組み込むことができる。経口治療投与には、活性化合物を１種または複数の賦形剤と組み合わせ、摂取可能な錠剤、頬腔錠剤、トローチ、カプセル、エリキシル、懸濁液、シロップ、ウェーハなどの形で使用することができる。そのような組成物や調製物には、活性化合物を少なくとも０．１％含めるべきである。もちろん、組成物および調製物の割合は、変化してよく、好都合に所与の単位投与形重量の約２～約６０％にすることができる。そのような治療上使用可能な組成物の活性化合物量は、有効な用量レベルが得られるような量である。
【０２１２】
錠剤、トローチ、丸剤、カプセル剤などには以下：トラガカントガム、アカシア、コーンスターチ、ゼラチンなどの結合剤；リン酸二カルシウムなどの賦形剤；コーンスターチ、ジャガイモ澱粉、アルギン酸などの崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤；

およびショ糖、果糖、乳糖、またはアスパルテームなどの甘味剤；ペパーミント、冬緑樹油、サクランボ香味料などの矯味剤を加えることができる。単位投与形をカプセル剤にする場合は、上の種類の物質の他に、これに植物油やポリエチレングリコールなどの液体担体を含めてもよい。コーティングとして、またそうでない場合は、固体単位投与形の物理的形状を改変するために様々な他の物質を含めてよい。たとえば、錠剤、丸剤、カプセル剤は、ゼラチン、ワックス、セラック、糖などによってコートすることができる。シロップまたはエリキシルには、活性化合物、甘味剤としてショ糖や果糖、保存料としてメチルやプロピルパラベン、着色料、およびサクランボ味やオレンジ味などの香味料を含めてもよい。もちろん、どんな単位投与形の調製に使用されるどんな物質も薬剤として許容され、使用量において実質上無毒であるべきである。さらに、活性化合物は、持続放出調製物やデバイスに組み込むこともできる。

【０２１３】

活性化合物は、注入または注射によって静脈内または腹腔内に投与することもできる。活性化合物またはその塩の溶液は、水で、場合によっては無害の界面活性剤と混合した水で調製することができる。分散剤もグリセロール、液体ポリエチレングリコール、トリアセチン、それらの混合物、および油類で調製することができる。通常の保存および使用条件下では、これらの調製物には、微生物の繁殖を防止するための保存料が含まれる。

【０２１４】

注射または注入に適当な薬剤投与形には、滅菌注射溶液、もしくは注入溶液、または分散剤の適宜の調合に適合している活性成分を含む滅菌水溶液、分散剤、あるいは滅菌粉を含めてもよい。場合によってはリポソームに封入された活性成分を含む分散剤を含めてよい。すべての場合に、最良の剤形は、滅菌液体であり、製造および保存条件下で安定していなければならない。

【０２１５】

液体担体またはビヒクルは、たとえば、水、エタノール、ポリオール（ｐｏｌｙｏｌ）（たとえば、グリセロール（ｇｌｙｃｅｒｏｌ）、プロピレングリコール（ｐｒｏｐｙｌｅｎｅ ｇｌｙｃｏｌ）、液体ポリエチレングリコール（ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｅ ｇｌｙｃｏｌｓ）など）、植物油、無毒グリセリルエステル（ｇｌｙｃｅｒｙｌ ｅｓｔｅｒｓ）、それらの適当な混合物を含む溶媒または液体分散媒体であってよい。適切な流動性は、たとえば、リポソームの形成よって、分散剤の場合には必要な粒径を維持することによって、または界面活性剤の使用によって維持することができる。微生物の作用は、様々な抗菌剤および抗真菌剤、たとえば、パラベン（ｐａｒａｂｅｎｓ）、クロロブタノール（ｃｈｌｏｒｏｂｕｔａｎｏｌ）、フェノール（ｐｈｅｎｏｌ）、ソルビン酸（ｓｏｒｂｉｃ ａｃｉｄ）、チメロサール（ｔｈｉｍｅｒｏｓａｌ）などによって防止することができる。多くの場合、等張化剤、たとえば、糖類、緩衝液、または塩化ナトリウムを含めるのが好ましい。組成物に吸収遅延剤、たとえば、モノステアリン酸アルミニウム（ａｌｕｍｉｎｕｍ ｍｏｎｏｓｔｅａｒａｔｅ）やゼラチンを使用することによって注射組成物を長時間にわたって吸収させることができる。

【０２１６】

滅菌注射溶液は、必要とされる先に列挙した他の成分のいくつかを含む適切な溶媒に必要量の活性化合物を組み込み、続いてろ過滅菌することによって調製する。滅菌注射溶液調製用の滅菌粉の場合には、好ましい調製方法は真空乾燥技術および凍結乾燥技術であり、これらの技術によって活性成分に予め滅菌ろ過した溶液中に存在する任意の追加の所望成分を加えた粉がもたらされる。

【０２１７】

局所投与には、すなわち、化合物が液体のときは、本化合物を純粋形で適用することができる。しかし、一般に、化合物は、皮膚に許容される担体と組み合わせて、皮膚に組成物または製剤として投与されることが望ましく、この化合物は固体または液体であってよい。

【０２１８】

使用可能な固体担体には、タルク、クレイ、微結晶セルロース、シリカ、アルミナなどの微粉化固体が含まれる。使用可能な液体担体には、水、ヒドロキシアルキル、グリコール、または水‐アルコール／グリコールブレンドが含まれ、その場合、本化合物は有効濃度で、場合によっては無毒の界面活性剤を用いて、溶解し、または分散させることができる。香料や追加の抗菌剤などのアジュバントを加えて、所与の使用に向けた特性を最適化することができる。得られた液体組成物は、吸着パッドから塗布し、絆創膏および他の包帯剤に含浸するために使用し、またはポンプ型もしくはエアロゾルスプレーを使用し患部上に噴霧することができる。

【０２１９】

合成ポリマー、脂肪酸、脂肪酸塩およびエステル、脂肪族アルコール、改変セルロース、改変ミネラル物質など、増粘剤を液体担体と共に使用して、使用者の皮膚に直接塗布するための塗布用ペースト、ゲル、軟膏、石鹸などを形成することもできる。

【０２２０】

皮膚に化合物を送達するために使用できる使用可能な外用組成物の例は、当技術分野で公知であり、たとえば、Ｊａｃｑｕｅｔら（米国特許第４，６０８，３９２号）、Ｇｅｒｉａ（米国特許第４，９９２，４７８号）、Ｓｍｉｔｈら（米国特許第４，５５９，１５７号）、およびＷｏｒｔｚｍａｎ（米国特許第４，８２０，５０８号）を参照されたい。

【０２２１】

使用可能な化合物の用量は、そのｉｎ　ｖｉｔｒｏ活性と動物モデルでのｉｎ　ｖｉｖｏ活性を比較することによって定量することができる。マウス、およびヒトまでの他の動物の有効な用量の推定方法は当技術分野で公知であり、たとえば、米国特許第４，９３８，９４９号を参照されたい。

【０２２２】

一般に、ローションなどの液体組成物中の化合物の濃度は、約０．１～２５ｗｔ％であり、約０．５～１０ｗｔ％が好ましい。ゲルなどの半固体もしくは固体組成物または粉での濃度は約０．１～５ｗｔ％であり、約０．５～２．５ｗｔ％が好ましい。

【０２２３】

治療での使用に必要な本化合物、活性塩、またはその誘導体の量は、選択した特定の塩のみならず、投与経路、治療対象の状態の性質、年齢、および患者の状態によっても変化し、最終的に担当する内科医または臨床医の裁量に任せられる。化合物の用量も標的とする細胞、腫瘍、組織、移植片、または臓器に応じて変わる。

【０２２４】

所望用量は、単一用量で、あるいは適切な間隔、たとえば、１日当たり２回、３回、４回以上の副用量で投与する分割用量として好都合に提供することができる。副用量自体、たとえば、散布器からの多数の吸入または複数の点眼の適用など、さらに大まかに間隔を空けて分けた数回の投与に分割することができる。

【０２２５】

治療計画には、長期の毎日治療を含めてもよい。「長期」は、少なくとも２週間、好ましくは数週間、数ヵ月、または数年の持続時間を意味する。この用量範囲で必要な変更は、本明細書に教示した定型の実験のみを使用して当業者が決定することができる。Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ'ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｍａｒｔｉｎ，Ｅ．Ｗ．編第４版）、Ｍａｃｋ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ　Ｃｏ．、米国ペンシルバニア州Ｅａｓｔｏｎを参照されたい。どんな合併症の場合にも、内科医個人も用量を調整することができる。

【０２２６】

本発明は、ＴＮＦ‐α／ＴＮＦ‐α受容体相互作用調節物質である作用薬を提供する。

【０２２７】

候補作用薬は、合成作用薬または作用薬混合物でよく、あるいは天然産物（たとえば植物抽出物や培養上清）でよい。本発明による候補作用薬には合成可能な小分子、天然抽出物、ペプチド、蛋白質、炭水化物、脂質などが含まれる。

【０２２８】
合成作用薬または天然作用薬の大きいライブラリから得た候補調節薬はスクリーニングすることができる。現在、糖類、ペプチド、および核酸ベース作用薬の、無作為ならびに目標を定めた合成に向けて多数の手段が使用されている。合成作用薬ライブラリは、Ｍａｙｂｒｉｄｇｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏ．（英国コーンウォール州Ｔｒｅｖｉｌｌｅｔ）、Ｃｏｍｇｅｎｅｘ（米国ニュージャージー州プリンストン）、Ｂｒａｎｄｏｎ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ（米国ニューハンプシャー州Ｍｅｒｒｉｍａｃｋ）、Ｍｉｃｒｏｓｏｕｒｃｅ（米国コネティカット州Ｎｅｗ Ｍｉｌｆｏｒｄ）を含め、いくつかの企業から市販されている。希少な化学ライブラリは、Ａｌｄｒｉｃｈ（米国ウィスコンシン州ミルウォーキー）から得ることができる。コンビナトリアルライブラリを利用、調製することもできる。あるいは、細菌、真菌、植物、および動物抽出物の形をした天然作用薬のライブラリを、たとえば、Ｐａｎ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（米国ワシントン州Ｂｏｔｈｅｌｌ）やＭｙｃｏＳｅａｒｃｈ（米国ノースカロライナ州）から得ることができ、または当技術分野で周知の方法によって容易に作製することができる。加えて、天然および合成のライブラリおよび作用薬は、従来の化学的、物理的、および生化学的手段によって容易に改変される。

【０２２９】
有用な作用薬は、多数の化学クラス内に見出すことができる。有用な作用薬は、有機作用薬または小型有機作用薬であり得る。小型有機作用薬の分子量は、５０を超え約２，５００ダルトン未満までであり、約７５０未満が好ましく、約３５０ダルトン未満がより好ましい。クラスの例には、複素環、ペプチド、糖類、ステロイドなどが含まれる。作用薬は、効力、安定性、薬剤適合性などを強化するために改変することができる。作用薬の構造の同定を利用して、追加の作用薬を同定し、生成し、またはスクリーニングすることができる。たとえば、ペプチド作用薬を同定した場合、それらを様々な方式で改変して、その安定性を強化することができる。たとえば、Ｄ‐アミノ酸、詳細にはＤ‐アラニンなどの非天然アミノ酸を使用して、アミノ末端またはカルボキシル末端に機能付与、たとえば、アミノ基、アシル化、またはアルキル化、ならびにカルボキシル基、エステル化、またはアミド化などによって改変する。

【０２３０】
１次スクリーニングには、本発明による候補作用薬の使用可能な濃度は、約１０ｍＭ～約１００μＭ以上（すなわち、１ｍＭ、１０ｍＭ、１００ｍＭ、１Ｍなど）である。１次スクリーニング濃度を上限として９種の濃度を追加して使用し、その場合、２次スクリーニング用にまたは濃度曲線を作成するために、１次スクリーニング濃度を半対数間隔（たとえば、さらに９つの濃度）で減少させることによって追加の濃度を決定する。

【０２３１】
（高処理スクリーニングキット）
本発明による高処理スクリーニングキットは、作用薬の検出を実施するための全ての必要な手段および培地を含み、この作用薬は好ましくは１μＭ～１ｍＭの濃度範囲のポリペプチドの存在下でＴＮＦ‐αとの相互作用によって、ＴＮＦ‐α／ＴＮＦ‐α受容体相互作用を調節する。

【０２３２】
キットには、以下のものが含まれる。ＴＮＦ‐αをコードするヌクレオチド配列を含み、発現する本発明の組換え細胞。当業者に周知の方法、特にＷＯ００／０２０４５号に記載されている方法によって、この細胞はキットにしたがってマイクロタイタープレート、より好ましくは９６穴マイクロタイタープレートなどの固体支持体上で増殖する。あるいは、たとえば、当業者によって９６穴マイクロタイタープレートに固定するためのＴＮＦ‐αが精製形で提供される。あるいは、キットには、たとえば、９６穴マイクロタイタープレートに事前固定したＴＮＦ‐αが提供される。ＴＮＦ‐αは、ＴＮＦ‐α全体またはその断片でよい。

【０２３３】

約１μＭ～１ｍＭ以上の濃度の本発明による調節薬を、適切な濃度の抗ＴＮＦ‐αポリペプチド、その相同配列、その機能部分、またはその相同配列機能部分が存在する所定のウェルに加える。前記ポリペプチドの前記濃度は、１μＭ～１ｍＭの範囲が好ましい。キットには、１種または複数の抗ＴＮＦ‐αポリペプチド（たとえば、配列番号１～１５のいずれかによって表される１種または複数のポリペプチド、あるいは他の抗ＴＮＦ‐αポリペプチド、その相同配列、その機能部分またはその相同配列機能部分）を含めてもよい。

【０２３４】

既に本明細書で開示した方法にしたがって結合アッセイを実施し、添加した調節薬の非存在下での、たとえば、抗ＴＮＦ‐αポリペプチド、その相同配列、その機能部分、またはその相同配列機能部分に結合するＴＮＦ‐αの基準レベルとその結果を比較する。調節物質が存在しない活性レベルと比較して少なくとも２倍、好ましくは５倍、より好ましくは１０倍、最も好ましくは１００倍以上のＴＮＦ‐α‐ポリペプチド結合（たとえば）の上昇または減少を示すウェルをさらに分析するために選択する。

【０２３５】

（本発明にしたがう有用な他のキット）

本発明は、ＴＮＦ‐α／ＴＮＦ‐α受容体の結合の調節物質のスクリーニングに有用なキット、およびＴＮＦ‐αの機能障害を特徴とする疾患の診断に有用なキットを提供する。本発明は、疾患調節物質のスクリーニングに有用なキットおよびそれらの診断キットも提供し、前記疾患は１種または複数のＴＮＦ‐αが関与する過程を特徴とする。本発明にしたがって有用なキットには、単離したＴＮＦ‐αを含めてもよい。あるいは、またはさらにキットにはＴＮＦ‐αを発現させるために形質転換した細胞を含めてもよい。別の実施形態では、本発明によるキットには、ＴＮＦ‐αをコードするポリヌクレオチドを含めてよい。さらに別の実施形態では、本発明によるキットには、ＴＮＦ‐αの増幅に有用な特異的プライマーを含めてよい。本発明にしたがって有用なキットには、単離したＴＮＦ‐αポリペプチド、その相同物、またはその機能性部分を含めてよい。本発明によるキットには、前記ポリペプチドを発現するための形質転換細胞を含めてよい。キットには、１種を超えるポリペプチドを含めてもよい。別の実施形態では、本発明によるキットには、ＴＮＦ‐αをコードするポリヌクレオチドを含めてよい。さらに別の実施形態では、本発明によるキットには、巨大分子、たとえば、ＴＮＦ‐αなどの増幅に有用な特異的プライマーを含めてよい。本発明によるキットには全て、記載した項目または項目の組合せ、ならびにそれらのためのパッケージング材が含まれる。キットには、使用説明書も含まれる。

【０２３６】

（実施例）

本発明を以下の非制限的な実施例によって説明する。

【実施例１】

【０２３７】

ヒト腫瘍壊死因子αに対するラクダ科抗体の実施例

【０２３８】

１）免疫化およびライブラリの構築

ラマグラマ（Ｌｌａｍａ　ｇｌａｍａ）をヒトＴＮＦ‐αで免疫化した。免疫化には、適切であり動物に好都合なアジュバント（Ｓｐｅｃｏｌｌ、ＣＥＤＩ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ　Ｂ．Ｖ．）によって乳濁液としてこのサイトカインを処方した。抗原カクテルは、首に２点筋肉内注射することによって投与した。動物には、ＴＮＦ‐α１００μｇを含む乳濁液の注射を１週間毎に６回施した。免疫化中の異なる時点で、動物から血液試料１０ｍｌを採取し、血清を調製した。抗原特異的体液性免疫応答の誘導をＴＮＦを用いたＥＬＩＳＡ実験で血清試料を使用し、確認した（データを図示せず）。最後の免疫化から５日後、血液試料１５０ｍｌを採取した。この試料から、従来の抗体および重鎖抗体（ＨｃＡｂ）を分画し（Ｌａｕｗｅｒｅｙｓら１９９８）、ＥＬＩＳＡで使用した。このＥＬＩ

ＳＡによって抗原特異的体液性免疫応答の原因がＨｃＡｂであることが判明した（データを図示せず）。１５０ｍｌの血液試料からＦｉｃｏｌｌ‐Ｐａｑｕｅ勾配（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用し、ラマ重鎖免疫グロブリン（ＨｃＡｂ）の遺伝子源として末梢血リンパ球（ＰＢＬｓ）を単離し、5×10^{8}個のＰＢＬがもたらされた。抗体の最大の多様性は、試料採取したＢリンパ球数に等しいと推定され、それはＰＢＬ数の約１０％（5×10^{7}）である。ラマの重鎖抗体の画分は、Ｂリンパ球数の２０％までである。したがって、１５０ｍｌの血液試料中のＨｃＡｂの最大の多様性は、10^{7}個の異なる分子として算出される。これらの細胞から全ＲＮＡ（およそ４００μｇ）を酸グアニジニウムチオシアナート（ａｃｉｄ　ｇｕａｎｉｄｉｎｉｕｍ　ｔｈｉｏｃｙａｎａｔｅ）抽出（ＣｈｏｍｃｚｙｎｓｋｉおよびＳａｃｃｈｉ、１９８７）により単離した。

【０２３９】

先に記載した通り、Ｍ‐ＭＬＶ逆転写酵素（Ｇｉｂｃｏ　ＢＲＬ）およびオリゴ‐ｄＴ‐プライマーもしくはヘキサヌクレオチドランダムプライマー（Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いて１００μｇの全ＲＮＡでｃＤＮＡを調製した（ｄｅ　Ｈａａｒｄら、１９９９）。エタノール沈殿と組合わせたフェノール／クロロホルム抽出によりｃＤＮＡを精製し、続いて鋳型として使用してＶＨＨレパートリーを特異的に増幅した。

【０２４０】

単一変性フレームワーク１（ＦＲ１）プライマーＡＢＬ０１３（５'‐ＧＡＧＧＴＢＣＡＲＣＴＧＣＡＧＧＡＳＴＣＹＧＧ‐３'）（配列番号：９８）を含むオリゴ‐ｄＴプライマー付きｃＤＮＡを鋳型として使用し、ＶＨＨレパートリーを増幅し、オリゴ‐ｄＴプライマーと組み合わせてＰｓｔＩ制限部位（太字）に導入した。これはＥＰ０１２０５１００．９号の記載に準ずる。この増幅によって、２個の断片、１６５０ｂｐおよび１３００ｂｐがもたらされ、後者はＣＨ１欠失ＨｃＡｂ遺伝子に由来する産生物である。小型のＰＣＲ産生物をゲルで精製し、続いてＰｓｔＩおよびＢｓｔＥＩＩで消化した。しばしば、ＢｓｔＥＩＩ部位は、ＤＮＡ断片をコードするＶＨＨ由来の重鎖のＦＲ４内に生じる。

【０２４１】

あるいは、ＶＨＨレパートリーは、ヒンジに依存する手法で２個のＩｇＧ特異的オリゴヌクレオチドプライマーを使用し増幅した。単一のＰＣＲ反応で、ＨｃＡｂｓに特異的であることが知られている短い（５'‐ＡＡＣＡＧＴＴＡＡＧＣＴＴＣＣＧＣＴＴＧＣＧＧＣＣＧＣＧＧＡＧＣＴＧＧＧＧＴＣＴＴＣＧＣＴＧＴＧＧＴＧＣＧ‐３'）（配列番号：９９）または長い（５'‐ＡＡＣＡＧＴＴＡＡＧＣＴＴＣＣＧＣＴＴＧＣＧＧＣＣＧＣＧＧＴＴＧＴＧＧＴＴＴＴＧＧＴＧＴＣＴＴＧＧＧＴＴ‐３'）（配列番号：１００）ヒンジプライマーをＦＲ１‐プライマーＡＢＬ０１３と組み合わせた（上記参照）。ＦＲ１およびヒンジプライマーそれぞれの中にＰｓｔＩおよびＮｏｔＩ（太字下線）制限部位を導入し、クローニングを可能にした。続いて、ＰｓｔＩ‐ＢｓｔＥＩＩまたはＰｓｔＩ‐ＮｏｔＩで消化したファージミドベクターｐＡＸ００４中にＤＮＡ断片を連結した。このベクターは、ｐＨＥＮ１（Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍら、１９９１）と同一であるが、それぞれ、精製および検出のためのカルボキシ末端$(His)_{6}$‐およびｃ‐ｍｙｃ‐ｔａｇをコードする。Ｍｉｃｒｏｃｏｎフィルタ（ＹＭ‐５０、Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）で連結混合物を脱塩し、大腸菌ＴＧ１細胞中に電気穿孔して1.8×10^{7}個のクローンを含むライブラリを得た。形質転換細胞を単一の２０×２０ｃｍプレート上でアンピシリン１００μｇ／ｍｌおよび２％のブドウ糖を含むＬＢ培地にて３７℃で終夜増殖させた。２×ＴＹ培地を使用し、コロニーをプレートから掻き取り、２０％グリセロール中－８０℃で貯蔵した。

【０２４２】

品質管理として、クローンを含む挿入物の割合を、ベクターを基にしたプライマーと組み合わせて使用するＰＣＲによってライブラリごとに２４個のクローンで確認した。この分析によって、クローンの９５％がＶＨＨをコードする挿入物を含むことが判明した。これらの２４個のクローンの増幅したＶＨＨ断片をＨｉｎｆＩフィンガープリント分析する

ことによって変異性を検査し、それによってクローンは全て、実際に異なることが示された（データを図示せず）。

【０２４３】

２）拮抗性抗ＴＮＦのＶＨＨ類の選択

両ライブラリからファージを調製した。ポリクローナルファージレパートリーを採取するために、ライブラリをアンピシリン１００μｇ／ｍｌおよび２％ブドウ糖を含む２×ＴＹ培地中３７℃で対数期（ＯＤ６００＝０．５）まで増殖させ、続いてＭ１３Ｋ０７ヘルパーファージに３７℃で３０分間重感染させた。感染細胞を４０００ｒｐｍで５分間ペレット化し、アンピシリン１００μｇ／ｍｌおよびカナマイシン２５μｇ／ｍｌを含む２×ＴＹ培地に再懸濁した。バクテリオファージは、３７℃でおよび２５０ｒｐｍで終夜増殖することによって繁殖させた。一晩経った培地を４５００ｒｐｍで１５分間遠心分離し、ファージを５分の１容量の［２０％ポリエチレングリコール６０００、１．５ＭのＮａＣｌ］溶液で３０分間の氷冷培養によって沈殿させた。ファージを４℃、４０００×ｇで１５分間遠心分離することによってペレット化した。ファージをＰＢＳ中に再懸濁後、細胞残屑をマイクロ遠心チューブに入れ最大速度（１５０００×ｇ）で１分間遠心分離することによってペレット化した。ファージ粒子を含む上清を新しいチューブに移し、再度上記したようにファージを沈澱させた。ファージをＰＢＳに溶解し、上記したように残留する細胞残屑から分離した。ファージの力価を対数的ＴＧ１細胞の感染によって定量し、続いて選択培地にプレーティングした。

【０２４４】

ｉｎ ｖｉｔｒｏビオチン化ＴＮＦ‐αを使用しライブラリを選択した。Ｍａｇｎｉら（Ａｎａｌ Ｂｉｏｃｈｅｍ ２００１、２９８、１８１‐１８８）によって記載されたようにビオチン標識を実施した。ビオチンのＴＮＦへの組込みは、ＳＤＳ‐ＰＡＧＥ分析によって評価し、エクストラアビジン‐アルカリフォスファターゼ（Ｅｘｔｒａｖｉｄｉｎ－ａｌｋａｌｉｎｅ ｐｈｏｓｐｈａｔａｓｅ）共役体（Ｓｉｇｍａ）によって検出した。改変蛋白質の機能性を、固相にコートした組換えｐ７５受容体へのその結合能力に関して評価した。

【０２４５】

ストレプトアビジン被膜マイクロタイタープレート（＋４℃で１６時間、１００μｌのストレプトアビジン１０μｇ／ｍｌでコートした）上でビオチン化ＴＮＦ‐α（室温で２時間１０～４００ｎｇ／ウェル）を捕獲することによってＶＨＨを選択した。細胞外リガンド結合ドメインまたは受容体を発現している細胞を含む過剰な受容体で溶離することによって拮抗性ＶＨＨを得た。捕獲したサイトカインを有するファージを２時間培養した後、非特異的ファージを洗い流す一方で、拮抗性ＶＨＨを提示する特異的ファージを受容体（ＣＤ１２０ｂまたはｐ７５の細胞外ドメイン；１０μＭ）で、または受容体を提示する細胞（＞10^5ＫＹＭ細胞／ウェル）で３０分間溶離した。高濃縮、すなわち、受容体で溶離されたファージ数と、血清アルブミン（５０μｇウェル当たり）によって溶離されたファージ数の割合が２０倍を超える場合は、ＴＮＦ‐α特異的クローンが首尾よく選択されたことを示唆する。あるいは、受容体での溶離に代えて、低ｐＨによってＶＨＨおよび／または抗原が変性する標準的な手順を適用した（０．１Ｍグリシン緩衝液、ｐＨ２．５）。対数期増殖の大腸菌細胞に、溶離し中和したファージを感染させ、選択培地にプレートした。

【０２４６】

個々のクローンを採取し、培養上清中でＶＨＨを産生させるためにマイクロタイタープレート中で増殖した。エクストラアビジン被膜プレート上にＴＮＦ‐αを捕獲するＥＬＩＳＡスクリーニングによってクローンの約５０％が陽性であることが判明した。ＨｉｎｆＩ‐フィンガープリント分析によって１３個の異なるクローンの選択が示され、これらのクローンを増殖し５０ｍｌスケールで誘発した。前記クローンの配列を表１に示す。

【０２４７】

異なる配列を有する５個のクローン、ＶＨＨ＃１Ａ、＃２Ｂ、＃３Ｅ、＃３Ｇ、＃７Ｂ

、および＃１２Ｂ（図１）をさらに詳細に特徴付けた。ＶＨＨ＃３Ｅ、＃３Ｇ、および＃７Ｂは、ＦＲ２の位置４５（アルギニン）に通常の親水性残基を有し、位置４７のフェニルアラニンをトリプトファン置換した単一ドメイン抗体断片であり、それによって溶解性の点で有利な特徴がもたらされている。ＶＨＨ＃１Ａは、ヒト起源または他の種から得た二重鎖抗体中に通常存在する疎水性ＦＲ２残基を含むが、親水性におけるこの喪失を位置１０３の帯電したアルギニン残基によって補っており、このアルギニン残基は二重鎖抗体から得たＶＨ中に存在する保存性トリプトファン残基の置換物である（ＰＣＴ／ＥＰ０２／０７８０４号）。本発明に記載したヒト化ラクダ科単一ドメイン抗体の新規なクラスは、ＶＨＨ＃２ＢおよびＶＨＨ＃１２Ｂによって表され、このクラスは位置１０３の疎水性残基トリプトファンと組み合わせてＦＲ２に疎水性残基を含む。５０ｍｌスケールでの培養によって大量の抗体断片が発現され、ＴＡＬＯＮ樹脂（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を使用するＩＭＡＣによって精製した。溶離剤イミダゾールを除去するためにＰＢＳに対して透析した後、ＶＨＨ量をＯＤ２８０によって定量した。各クローンから約３００μｇのＶＨＨが得られた。

【０２４８】

この物質をＥＬＩＳＡで（ビオチン化）ＴＮＦの検出感受性を定量するために使用した。この目的のために、ビオチン化ＴＮＦ（１μｇ／ｍｌ）の捕獲にストレプトアビジン（１０μｇ／ｍｌ）被膜マイクロタイタープレートを使用し、ＶＨＨを０．２％カゼイン／ＰＢＳで希釈し、室温で２時間培養した。抗ＭＹＣ　ｍＡＢ　９Ｅ１０（０．５μｇ／ｍｌ）および抗マウスＡＰ共役体（１０００倍希釈、Ｓｉｇｍａ）で結合したＶＨＨを検出した。結果を図２に示す。

【０２４９】

３）ＫＹＭ細胞系による細胞毒性アッセイでの拮抗作用の定量

Ｖａｎｄｅｎａｂｅｅｌｅおよび同僚（Ｖａｎｄｅｎａｂｅｅｌｅ、Ｐ．、Ｄｅｃｌｅｒｃｑ、Ｗ．、Ｖｅｒｃａｍｍｅｎ、Ｄ．、ＶａｎｄｅＣｒａｅｎ、Ｍ．、Ｇｒｏｏｔｅｎ、Ｊ．、Ｌｏｅｔｓｃｈｅｒ、Ｈ．、Ｂｒｏｃｋｈａｕｓ、Ｍ．、Ｌｅｓｓｌａｕｅｒ、Ｗ．、Ｆｉｅｒｓ、Ｗ．（１９９２）形質移入ラット／マウスＴ細胞ハイブリドーマにおけるヒト腫瘍壊死因子受容体ｐ７５の機能特徴付け（Ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ　ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ　ｏｆ　ｔｈｅ　ｈｕｍａｎ　ｔｕｍｏｒ　ｎｅｃｒｏｓｉｓ　ｆａｃｔｏｒ　ｒｅｃｅｐｔｏｒ　ｐ７５　ｉｎ　ａ　ｔｒａｎｓｆｅｃｔｅｄ　ｒａｔ／ｍｏｕｓｅ　Ｔ　ｃｅｌｌ　ｈｙｂｒｉｄｏｍａ）．Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７６、１０１５－１０２４．）に記載されている比色ＭＴＴアッセイによってＴＮＦ－αが誘発する細胞分裂停止／細胞毒性を定量した。ＭＴＴ（３－（４，５－シメチルチアゾール－２－イル）－２，５－ジフェニルテトラゾリウムブロミド）（３－(４，５－ｃｉｍｅｔｈｙｌｔｈｉａｚｏｌ－２－ｙｌ)－２，５－ｄｉｐｈｅｎｙｌ　ｔｅｔｒａｚｏｌｉｕｍ　ｂｒｏｍｉｄｅ）は、生細胞によって切断されて紺色のホルマザン生成物をもたらす淡黄色基質である。この工程には、活性ミトコンドリアが必要とされ、死亡直後の細胞でさえ顕著な量のＭＴＴを切断することはない。ＫＹＭ細胞［Ｓｅｋｉｇｕｃｈｉ　Ｍ、Ｓｈｉｒｏｋｏ　Ｙ、Ｓｕｚｕｋｉ　Ｔ、Ｉｍａｄａ　Ｍ、Ｍｉｙａｈａｒａ　Ｍ、Ｆｕｊｉｉ　Ｇ．（１９８５）組織培養でのヒト横紋筋肉腫細胞株特徴付け（Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ　ｏｆ　ａ　ｈｕｍａｎ　ｒｈａｂｄｏｍｙｏｓａｒｃｏｍａ　ｃｅｌｌ　ｓｔｒａｉｎ　ｉｎ　ｔｉｓｓｕｅ　ｃｕｌｔｕｒｅ）．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｐｈａｒｍａｃｏｔｈｅｒ．３９、３７２－３８０．］を９６穴マイクロタイタープレートに播種し、ＴＮＦ－α（三量体を０．２１６ｎｇ／ｍｌすなわち約５ｐＭ）の存在または非存在下で培養した。ＴＮＦの他に、培養中に様々な量の抗体（ＶＨＨまたはレミケード（薬剤名））を含めた。アッセイには、ＭＴＴを最終濃度５００μｇ／ｍｌで培地に加え、プレートを３７℃で培養してミトコンドリア酵素によるＭＴＴの切断を実現した。ウェルの底に黒色の不鮮明な結晶として現れる、形成されたホルマゾン（ｆｏｒｍａｚｏｎ）生成物を酸イソプロパノール（イソプロパノール中４０ｎＭのＨＣｌ）またはＤＭＳＯを加えることによって溶解した。吸光度を５７０ｎｍで測定する。

【０２５０】
ＭＴＴアッセイ（図３）は、ＦＲ２にヒト様疎水性残基と組み合わせて、位置１０３にアルギニンを有するＶＨＨ＃１Ａが穏やかな拮抗作用（ＩＣ５０,～１００ｎＭ）を有することを示す。ＦＲ２に特有の親水性残基を有するＶＨＨ＃７Ｂは、ＥＬＩＳＡで敏感にサイトカインが検出されるにもかかわらず、ＴＮＦ‐αとそのリガンドの結合を阻止しない（曲線図示せず）。それに反して、親水性の正真正銘ＦＲ２残基を有するＶＨＨ＃３Ｅおよび＃３Ｇは、非常に強力な拮抗性ＶＨＨ類（ＩＣ５０,２０ｎＭ）である。ＶＨＨ＃３Ｅおよび＃３Ｇは、高度に相同しクローン的関係（Ｈａｒｍｓｅｎら、Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．３７、５７９‐５９０）にあるが、ＶＨＨ＃３Ｅはさらに強力であり、それはおそらくＶＨＨ＃３ＥがＶＨＨ＃３Ｇよりも高い親和性を有するためである（図２）。（キメラ）モノクローナル抗体であるレミケードは、非常に強力（ＩＣ５０,８０ｐＭ）であるが、それに由来するＦａｂ断片はこの効力の大部分を消失している（ＩＣ５０は３ｎＭ、無傷ｍＡＢの３０分の１）。これは、抗体とサイトカイン間の相互作用の結合力の作用：２個の結合部位を有するｍＡＢは、協力的結合によって三量体ＴＮＦ分子とより効率よく相互作用することを明瞭に示している。ＶＨＨ断片は、あくまでも一価であり、したがって、ＶＨＨ遺伝子の遺伝子融合によって結合力を増大させることが、それらの拮抗効力を増大し得ると推測された（実施例４を参照）。

【０２５１】
これらの実験は、ヒト様ＶＨＨの新規なクラスが正規の結合および機能特性を有し、したがってそれらを治療目的に適用できることを示している。

【実施例２】

【０２５２】
部位標的突然変異誘発によるＶＨＨ＃１２ＢおよびＶＨＨ＃３Ｅのヒト化

【０２５３】
１）ＶＨＨ＃３Ｅ／ＶＨＨ＃１２Ｂ間の相同性およびヒト生殖細胞重鎖Ｖ領域ＤＰ‐４７
ＶＨＨ＃１２ＢおよびヒトＶＨ３生殖細胞配列（ＤＰ‐４７）の配列比較によって以下の高度の相同性が判明した。
ＦＲ１の位置１、５、２８、および３０で４個のＡＡの変化
ＦＲ３の位置７４、７６、８３、８４、および９３で５個のＡＡの変化
ＦＲ４の位置１０８で１個のＡＡの変化
これらは、以下の配列比較に示される。

```
DP-47   EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYAMS----- WVRQAPGKGLEWVS AISGSGGSTYY
VHH#3E  QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFS DHSGYTYTIG WFRQAPGKEREFVA RIYWSSGNTYY

DP-47   ADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK ------------- -----------(配列番号:101)
VHH#3E  ADSVKG RFAISRDIAKNTVDLTMNNLEPEDTAVYYCAA RDGIPTSRSVESYNY WGQGTQVTVSS(配列番号:25)
```

【０２５４】
したがって、ヒト生殖細胞遺伝子ＤＰ‐４７に相同性が高く、ＴＮＦ‐αサイトカインに特異的な阻害物質は、さらにヒト化して、突然変異誘発が阻害能力に与える作用をＥＬＩＳＡで評価するための理想的な候補であった。

【０２５５】
ＶＨＨ＃３ＥおよびヒトＶＨ３生殖細胞（ＤＰ‐４７）の配列比較により、ＤＰ‐４７中の疎水性残基と比較して、ＶＨＨ＃３ＥのＦＲ２中の親水性アミノ酸残基の存在が判明した。

```
DP-47   EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYAMS WVRQAPGKGLEWVS AISGSGGSTYY
VHH#12B QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFEFE NHWMY WVRQAPGKGLEWVS TVNTNGLITRY

DP-47   ADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK------------- -----------(配列番号:101)
VHH#12B ADSVKG RFTISRDNAKYTLYLQMNSLKSEDTAVYYCTK VLPPYSDDSRTNAD WGQGTQVTVSS(配列番号:102)
```

【０２５６】
親水基をヒトＶＨ中に存在する疎水性残基に置換する効果を評価することは重要である。ラクダ類ＶＨＨ配列の大部分は親水性残基を含むからである。

【０２５７】
２）ＶＨＨ＃１２Ｂの突然変異誘発
ＣｈｅｎおよびＲｕｆｆｎｅｒによって記載され、Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅによって商品化（Ｑｕｉｃｋｃｈａｎｇｅ部位特異的変異導入法）された、非ＰＣＲベース部位特異的変異導入法を使用することによってＶＨＨ＃１２Ｂを変異させた。所望の突然変異を導入している２個の変異原性プライマーと組み合わせてプラスミドＤＮＡを鋳型として使用した。２個のプライマーは、鋳型プラスミドＤＮＡの対向する鎖に互いに相補的である。ＰｆｕＤＮＡポリメラーゼを使用するポリメラーゼ反応では、限られた数のサイクルを使用するサイクリングプログラム中に各鎖はプライマー配列から伸展する。これにより野生型鎖と変異鎖の混合物がもたらされる。ＤｐｎＩによる消化によって変異したｉｎ　ｖｉｔｒｏ合成ＤＮＡ鎖を選択する。消化に対して鋳型鎖のみが感受性を有するからである。ＤＮＡを沈澱させ、大腸菌に形質転換し、配列分析によって必要な突然変異を分析した。産生した突然変異ＶＨＨ類および変異原性プライマーを表２に示す。
【０２５８】
プラスミドを突然変異クローンから調製し、ＷＫ６電気コンピテト細胞に形質転換した。単一コロニーを使用し、２％のブドウ糖およびアンピシリン１００μｇ／ｍｌを含むＬＢ培地で終夜培養を開始した。この終夜培養物をアンピシリン１００μｇ／ｍｌを含む３００ｍｌのＴＢ培地で１００倍希釈し、３７℃でＯＤ６００ｎｍ＝２になるまで培養し、その時に１ｍＭのＩＰＴＧおよび５ｍＭのＭｇＳＯ$_4$（最終濃度）を加え、培養物をさらに３時間３７℃で培養した。
【０２５９】
培養物を４℃、４，５００ｒｐｍで２０分間遠心分離した。ペレットは、終夜、または－２０℃で１時間凍結した。次いで、ペレットを室温で４０分間解凍し、２０ｍｌのＰＢＳ／１ｍＭのＥＤＴＡ／１ＭのＮａＣｌに再懸濁させ、１時間氷冷して振盪した。４℃、４，５００ｒｐｍで２０分間遠心分離することによって原形質画分を単離した。ＶＨＨを含む上清をＴＡＬＯＮ（ＣｌｏｎＴｅｃｈ）に供給し精製して均質にした。算出した吸光係数を使用しＶＨＨ収量を決定した。
【０２６０】
突然変異ＶＨＨ類は全て、野生型に匹敵して発現した。Ｉｎ　ｖｉｔｒｏ受容体結合アッセイにおいて突然変異体のその阻害能力を分析した。
【０２６１】
マイクロタイタープレートをＰＢＳ中２μｇ／ｍｌのエンブレル（Ｗｙｅｔｈ、薬剤名）により終夜４℃でコートした。プレートをＰＢＳ‐Ｔｗｅｅｎにより５回洗浄し、１％カゼインを含むＰＢＳにより室温で１時間ブロックした。プレートをＰＢＳ‐Ｔｗｅｅｎにより５回洗浄した。ビオチン化ヒトＴＮＦ‐α（８０μｇ／ｍｌ）を突然変異体または野生型ＶＨＨ＃１２Ｂの希釈系列により室温で１時間予備培養し、混合物をマイクロタイタープレートのウェルにて室温で１時間培養した。プレートをＰＢＳ‐Ｔｗｅｅｎにより５回洗浄した。結合したヒトＴＮＦ‐αをエクストラアビジン‐ＡＰ（１／１，０００希釈）およびパラニトロフェニルリン酸（ｐａｒａｎｉｔｒｏｐｈｅｎｙｌｐｈｏｓｐｈａｔｅ）（ｐＮＰＰ）を使用し検出した。３０分後に４０５ｎｍでシグナルを測定した。結果を図４および５に示す。ＩＣ５０は、６６ｎＭ（野生型）から２００ｎＭ（突然変異体Ｑ１Ｅ＋Ｑ５Ｌ＋Ａ７４Ｓ＋Ｙ７６Ｎ＋Ｋ８３Ｒ＋Ｐ８４Ａ）へ３倍増加した。位置Ｔ９３Ａの突然変異によって阻害が失われた（データを図示せず）。依然としてヒト化が必要とされる位置はＥ２８、Ｅ３０、およびＱ１０８である。しかし、Ｅ２８およびＥ３０は、Ｈ１標準構造の一部であり、したがってＣｈｏｔｈｉａの番号付け方式によるＣＤＲ１の一部である。
【０２６２】
突然変異ＶＨＨのアミノ酸配列を表４配列番号１７～１９に示す。
【０２６３】
３）ＶＨＨ＃３Ｅの突然変異誘発

上記の非ＰＣＲベース部位特異的変異導入法を使用することによってＶＨＨ＃３Ｅを変異させた。得られた突然変異ＶＨＨ類および変異原性プライマーを表３に示す。

【０２６４】

突然変異ＶＨＨ類は全て、野生型に匹敵して発現した。精製した突然変異ＶＨＨ類は、ＥＬＩＳＡで結合を、および上記の方法と同一の受容体結合アッセイで阻害能力を分析した。

【０２６５】

ＥＬＩＳＡの結果を図６に示し、受容体結合アッセイの結果を図７に示す。

【０２６６】

突然変異ＶＨＨのアミノ酸配列を表４配列番号２１～２４示す。

【実施例３】

【０２６７】

マウスＴＮＦ‐αに対する拮抗性ＶＨＨの単離

【０２６８】

１）抗マウスＴＮＦ‐αのＶＨＨの選択

マウスモデルにおいてＩＢＤまたはクローン病に対する効力の研究を実施するために、マウスＴＮＦ特異的ＶＨＨを選択した。したがって、実施例１に記載したようにラマをマウスＴＮＦ‐αで免疫化した。最後の免疫化から４日後および１０日後に試料採取したＰＢＬ類から、かつ４日後のリンパ節から採取した生検からＲＮＡを抽出した。Ｉｇ由来プライマー、またはオリゴ‐ｄＴプライマーと単一Ｉｇプライマーの組合せを使用し、ＶＨＨコード遺伝子セグメントを増幅するために、ランダムプライマー付きｃＤＮＡまたはオリゴ‐ｄＴプライマー付きｃＤＮＡで全ＲＮＡを転換し、鋳型として使用した（実施例１を参照）。Ｉｇプライマーによって、第１のＰＢＬ類から８．５×10^7個のクローンを含むライブラリ、第２ＰＢＬ試料から７×10^6個のクローンを含むライブラリ、およびリンパ節から５．８×10^8個のクローンを含むライブラリが生じた。オリゴ‐ｄＴプライマーとＩｇプライマーの組合せを使用し、第１のＰＢＬ試料から得た１．２×10^8個のクローンを含むライブラリ、ＰＢＬ類の第２試料から５．７×10^7個のクローンのライブラリを製造し、リンパ節由来のライブラリには２×10^8個のクローンが含まれていた。先に記載したように、使用したプライマーの組合せに依存するライブラリをプールし、その結果２個のライブラリがファージに伝達し、増殖した。被膜ストレプトアビジンに捕獲したビオチン化マウスＴＮＦ‐αで選択を実施し、結合したファージをヒト受容体ｐ７５と競合させることによって溶離させた。この受容体は、マウスＴＮＦ‐αと交差反応することが知られている。Ｉｇ由来プライマーを用いた増幅によって得られたライブラリから、２個の異なるマウスＴＮＦ‐α特異的ＶＨＨ（ＶＨＨ＃ｍ３ＦおよびＶＨＨ＃ｍ９Ｅ）を選択する一方で、オリゴ‐ｄＴプライマーおよびＩｇ‐プライマーを用いてＰＣＲによって構築したライブラリから２個の密接に関連するＶＨＨ類を回収した（図８）。

【０２６９】

２）Ｌ９２９細胞系による細胞毒性アッセイでの拮抗効力の定量（図９）

実施例１に記載したものと同じ種類のアッセイを適用したが、マウス細胞系Ｌ９２９で行った。ＶＨＨ＃ｍ３ＦおよびＶＨＨ＃ｍ４Ｂ（図９）は、他の２個のＶＨＨ類よりも１０倍強力であることが判明した。

【実施例４】

【０２７０】

多価ラクダ科抗体を使用しての結合力の増大による拮抗効力の強化

【０２７１】

１）ヒトおよびマウスＴＮＦ‐αに対する二価、三価、および四価ＶＨＨの拮抗効力

二価または二重特異性ＶＨＨの２段階クローニングを可能にする大腸菌産生ベクターｐＡＸ１１（図１０）を設計した。最初に、ＰｓｔＩおよびＢｓｔＥＩＩによりカルボキシ末端ＶＨＨをクローン化しつつ、第２段階で他方のＶＨＨをＳｆｉＩおよびＮｏｔＩによって挿入するが、挿入によって第１の遺伝子断片内で切断されない。この手順によって増

幅による新規な部位の実施が回避され、したがってＰＣＲによる間違いが導入される危険性が回避される。

【０２７２】

このベクターによって、拮抗性抗ヒトＴＮＦ‐αのＶＨＨ＃３Ｅの二価誘導体を産生した。二価ＶＨＨをコードするプラスミドベクターを使用して三量体および四量体誘導体を産生したが、これはＢｓｔＥＩＩによるプラスミドの部分消化によって実現した。この部分消化は、両ＶＨＨ遺伝子セグメントで生じる。直線化したベクターをゲルから精製し、続いて脱リン酸化し、アクセプターとして使用して、同じプラスミドの完全消化によって得られた約３５０ｂｐのＢｓｔＥＩＩ断片をクローニングした。ベクターを付加する前にＢｓｔＥＩＩ断片のみを連結することによって、遺伝子セグメントをコードする多量体ＶＨＨの挿入が強化される。大腸菌での形質転換後、得られたクローンＴＧ１をＭ１３ＲｅｖおよびＭ１３Ｆｗｄプライマーを用いてＰＣＲによってスクリーニングした。ＢｓｔＥＩＩは、対称性カッター（５ｎｔオーバーハング）なので、正確に方向付けられた挿入物のみが得られたが、これはＰｓｔＩ単独（３５０ｂｐ）でプラスミドを消化し、あるいはＥｃｏＲＩおよびＨｉｎｄＩＩＩで二重消化することによって裏付けられた通りであった［二価用に１０００ｂｐ（ＢＩＶ　３Ｅ、配列番号７３）、三価用に１３５０ｂｐ（ＴＲＩ　３Ｅ、配列番号７４）、および四価用に１７００ｂｐ（ＴＥＴＲＡ　３Ｅ、配列番号７５）、データを図示せず］。配列を表７に示す。

【０２７３】

クローンを増殖し、５０ｍｌスケールで誘発し、原形質画分を調製し、ＴＡＬＯＮ樹脂でのＩＭＡＣ精製に使用した。クーマシー染色ＰＡＧＥで精製した産生物の分析によって、良好な無傷多価ＶＨＨの産生レベル（細胞培養物１リットル当たり２～１０ｍｇ）であることが判明した（図１１を参照）。ＩＭＡＣで精製したＶＨＨの分子外観は、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ７５ＨＲカラムでのゲルろ過によって決定し、予想通りより結合力が高い分子ほどカラムから早く出てきた（図１２を参照）。

【０２７４】

拮抗効力を、ＫＹＭ細胞を使用して細胞を基にしたアッセイで分析した。マイクロタイタープレートに細胞を播種し、ＴＮＦ‐αの存在または非存在下で培養した（三量体１．２９ｎｇ／ｍｌ、すなわち約２５ｐＭ）。アッセイ（図１３）によって、この研究に使用した一価の分子が最低の拮抗特性を有することが判明し、そのＩＣ５０値は以下を反映する：キメラ抗体レミケードに由来するＦａｂはＩＣ５０が２ｎＭであり、ＶＨＨ＃３ＥではＩＣ５０は１２ｎＭである（同様に図３を参照）。使用した分子の結合力は、拮抗効力において二価ＩｇＧ分子レミケードで観察したのと同じく、劇的な作用を有することが判明した。その結合活性は、Ｆａｂよりも４０倍有効（ＩＣ５０,５０ｐＭ）である。ＴＮＦ‐αは、三量体分子であり、この分子は二量体受容体に相互作用し、したがって以前に記載（Ｓａｎｔｏｒａら、Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２９９、１１９‐１２９）されているように、ＩｇＧの結合力によってサイトカイン上の２個のエピトープに相互に結合し、大きい複合体の形成に役立つようになると推定することができる。二量体のＩＣ５０（３０ｐＭ）が一量体の４００分の１なので、驚くべきことに、一量体から二量体へＶＨＨの結合力の増大は、レミケードで観察されたことよりも極めて驚くべき効果がある。結合力の増大は、すでに良好な拮抗動作にさらに多くをもたらす：三量体ＶＨＨのＩＣ５０は２０ｐＭであり、四価形式のものは６ｐＭである。ＶＨＨの高次結合力形式全てがレミケードより有効でありながら、エンブレルよりも四価形式はさらに良好である。このエンブレルは、細胞外ドメイン受容体ｐ７５からなり、ＩｇＧのＦｃに融合するために二価結合方式を有する。

【０２７５】

結合力が拮抗動作に及ぼす同様の予想外の効果が、マウスＴＮＦに対して生じたＶＨＨで観察された（図１４）。基質としてＭＴＴおよびマウスＴＮＦ‐α（６５ｐｇ／ｍｌすなわち１．３ｐＭ）を使用し、同じ型の細胞毒性アッセイを実施したが、マウス特異的受容体を発現するマウス細胞系Ｌ９２９を使用した。異なる３個の拮抗性（一価）ＶＨＨを

同定し、９Ｅおよび３Ｆとコード化した。そのうち最初の２個のＩＣ５０は２５ｎＭであり、最後のＩＣ５０は２ｎＭである（同様に実施例３を参照）。３Ｆの二価形式（ＢＩＶ＃ｍ３Ｆ、配列番号７６）への変換によって、ＩＣ５０は１０００倍（２ｐＭ）に増大し、それによって抗体の結合力の増大が予想外の拮抗特性の改善をもたらすことが再び証明された。

【０２７６】

２）ＶＨＨ‐Ｆｃ融合体との比較

適合されたｐＣＤＮＡ３由来ベクター中に、ヒトＴＮＦを標的とするＶＨＨ＃３ＥをＰｓｔＩおよびＢｓｔＥＩＩによってクローン化し、それをヒトＩｇＧ１のＣＨ１欠失Ｆｃ部分に遺伝子融合させた。配列決定によって確認した後、ミエローマ細胞系ＮＳ０にプラスミド構築体を形質移入した。得られた細胞系を増殖し、ＶＨＨ‐Ｆｃ融合体が培養上清中に分泌された。産生物を抗ヒトＦｃＶＨＨ樹脂で精製し、クーマシー染色ゲルで分析した（図１５）。ＤＴＴの存在下では、融合体は４５ｋＤａの蛋白質として視認することができ、ＤＴＴの非存在下では、分子量９０ｋＤａの二量体分子を観察することができた。この二量体産生物は、２個のジスルフィド架橋による２本の鎖の連結から生じ、このジスルフィド架橋はヒンジ領域中に位置するシステイン残基に由来する。

【０２７７】

ヒト細胞系ＫＹＭによりＶＨＨ融合体をバイオアッセイで試験し、両分子は同じ結合力を有し、どちらもＶＨＨ＃３Ｅに由来するにもかかわらず、有効性は二価ＶＨＨの５分の１であることが判明した（図１６）。おそらく嵩高なＦｃテールによる立体障害がこの相違を引き起こしているのであろう。

【実施例５】

【０２７８】

本発明の抗標的単一ドメイン抗体間の相同性の計算

【０２７９】

本発明の抗標的単一ドメイン抗体間のアミノ酸配列相同性の程度は、ＢｉｏｅｄｉｔＳｅｑｕｅｎｃｅ Ａｌｉｇｎｍｅｎｔ Ｅｄｉｔｏｒを使用し、算出した。ＣｌｕｓｔａｌＷにより整列化された通り、計算によって配列全ての相互間の同一残基の比率が示される［Ｔｈｏｍｐｓｏｎ、Ｊ．Ｄ．、Ｈｉｇｇｉｎｓ、Ｄ．Ｇ．およびＧｉｂｓｏｎ、Ｔ．Ｊ．（１９９４）ＣＬＵＳＴＡＬ Ｗ：配列重み付け、位置特異的空隙ペナルティ、および重量マトリックスの選択による、進化性多重配列整列の感受性の改善（ｉｍｐｒｏｖｉｎｇ ｔｈｅ ｓｅｎｓｉｔｉｖｉｔｙ ｏｆ ｐｒｏｇｒｅｓｓｉｖｅ ｍｕｌｔｉｐｌｅ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ａｌｉｇｎｍｅｎｔ ｔｈｒｏｕｇｈ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｗｅｉｇｈｔｉｎｇ, ｐｏｓｉｔｉｏｎ ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｇａｐ ｐｅｎａｌｔｉｅｓ ａｎｄ ｗｅｉｇｈｔ ｍａｔｒｉｘ ｃｈｏｉｃｅ）．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ、１９９４年６月提出］。表８は、本発明の抗血清アルブミンＶＨＨ間相互の部分相同性を示す。表９は、本発明の抗ＴＮＦ‐αのＶＨＨ間相互の部分相同性を示す。表１０は、本発明の抗ＩＦＮ‐γのＶＨＨ間相互の百分比相同性を示す。

【実施例６】

【０２８０】

ＶＨＨ＃３ＥのＶＨＨ‐ＣＤＲ３断片の発現

【０２８１】

フレームワーク４領域中に位置するセンスプライマー（前進：ＣＣＣＣＴＧＧＣＣＣＣＡＧＴＡＧＴＴＡＴＡＣＧ）（配列番号：１０３）、およびフレームワーク３領域中に位置するアンチセンスプライマー（逆進：ＴＧＴＧＣＡＧＣＡＡＧＡＧＡＣＧＧ）（配列番号：１０４）を使用することによって、ＶＨＨ＃３ＥのＣＤＲ３領域を増幅した。

【０２８２】

ｐＡＸ１０でＣＤＲ‐３断片をクローニングするために、必要な制限部位を導入している以下のプライマーによって２巡目のＰＣＲ増幅を実施した。

逆進プライマーＳｆｉ１：

ＧＴＣＣＴＣＧＣＡＡＣＴＧＣＧＧＣＣＣＡＧＣＣＧＧＣＣＴＧＴＧＣＡＧＣＡＡＧＡＧＡＣＧＧ（配列番号：１０５）
前進プライマーＮｏｔ１：
ＧＴＣＣＴＣＧＣＡＡＣＴＧＣＧＣＧＧＣＣＧＣＣＣＣＴＧＧＣＣＣＣＡＧＴＡＧＴＴＡＴＡＣＧ（配列番号：１０６）
【０２８３】
５０ｍｌの反応容量で各プライマー５０ｐｍｏｌを使用しＰＣＲ反応を実施した。１次ＰＣＲの反応条件は９４℃で１１分、続いて９４／５５／７２℃で３０／６０／１２０秒を３０サイクル、さらに７２℃で５分であった。２．５ｍＭのＭｇＣｌ２、２００ｍＭのｄＮＴＰ、および１．２５ＵのＡｍｐｌｉＴａｑ　Ｇｏｄ　ＤＮＡポリメラーゼ（Ｒｏｃｈｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ、ベルギー国ブリュッセル）によって全ての反応を実施した。
【０２８４】
Ｓｆｉ１およびＮｏｔ１で切断した後、ＰＣＲ産生物をｐＡＸ１０中でクローニングした。
【実施例７】
【０２８５】
ヒトＴＮＦαに特異的な抗体断片の安定性試験
【０２８６】
経口投与した蛋白質は、胃の酸性ｐＨで変性され、ペプシンによって分解される。本発明者らは、ＶＨＨ＃３Ｅのペプシンに対する耐性を研究するための条件を選択しており、この条件は胃環境に類似すると推定される。ヒトＴＮＦαに特異的なＶＨＨであるＶＨＨ＃３Ｅを大腸菌中で組換え蛋白質として産生し、ＩＭＡＣおよびゲルろ過クロマトグラフィーによって精製して均質化した。算出した２８０ｎｍでのモル吸光係数の使用によって精製後の蛋白質濃度を分光光度計で定量した。それぞれ、ｐＨ２、ｐＨ３、およびｐＨ４のＭｃＩｌｖａｉｎｅ緩衝液（Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．４９、１９２１、１８３）で１００μｇ／ｍｌ希釈液を調製した。続いて、これらの溶液を３７℃で１５分間培養した後、ブタ胃粘膜ペプシンを１／３０ｗ／ｗの割合で添加した。プロテアーゼの添加から６０分後、試料を採取し、ペプシンを不活化させるために０．１％カゼインを含むｐＨ７．４のＰＢＳで直ちに１００倍に希釈した。機能性抗体断片の存在をＥＬＩＳＡによってを評価するために、この試料から７個の追加の３倍希釈液を調製した。プロテアーゼの添加前に採取したアリコットから調製した同一の希釈液を参照として利用した。ＥＬＩＳＡアッセイでは、ＮｅｕｔｒＡｖｉｄｉｎ（商標）でコートしたマイクロタイタープレートのウェルにビオチン化ＴＮＦαを捕獲した。ペプシン処理および対照の両試料に、試料の同じ段階希釈液を調製し、これらの希釈液の１００μｌをウェルに加えた。培養１時間後に、プレートを洗浄した。捕獲されたＴＮＦαに結合したＶＨＨの検出には、ポリクローナルウサギ抗ＶＨＨ抗血清（Ｒ４２）および抗ウサギＩｇＧアルカリフォスファターゼ（ａｌｋａｌｉｎｅ　ｐｈｏｓｐｈａｔａｓｅ）共役体を使用した。洗浄後、プレートをパラニトロフェニルリン酸（ｐａｒａｎｉｔｒｏｐｈｅｎｙｌ　ｐｈｏｓｐｈａｔｅ）で発色させた。消化条件に曝露した試料および対照試料のすべてに関して、図１７にプロットしたデータは同様の曲線を示す。これは、選択した条件のすべてにおいてＶＨＨ＃３Ｅが本質的にその機能上の活性を保持していることを示している。
【実施例８】
【０２８７】
マウスでの抗ヒトＴＮＦα特異的ＶＨＨの経口投与
【０２８８】
抗ヒトＴＮＦα特異的ＶＨＨ＃３Ｅを含む抗体溶液（１００倍希釈ＰＢＳ１ｍｌ当たり１００μｇ）を調製した。３匹のマウスを最初に１２時間絶飲した後、続いて２時間自由に抗体溶液を飲めるようにした。その後、マウスを屠殺し、その胃を精査した。直ちに１％ＢＳＡを含むＰＢＳ５００μｌで胃を洗い流すことによって胃内容物を回収した。続い

て、この洗浄物質を使用して未希釈物質の１／５希釈から出発して段階的３倍希釈液を調製した。これらの試料の１００μｌをヒトＴＮＦαでコートしたマイクロタイタープレートの個々のウェルに移した。１時間の培養と、続く十分な洗浄後、免疫反応物質の存在をポリクローナルウサギ抗ＶＨＨ抗血清（Ｒ４２）で評価し、続いて抗ウサギアルカリフォスファターゼ共役体で培養した。ＥＬＩＳＡをパラニトロフェニル酢酸（ｐａｒａｎｉｔｒｏｐｈｅｎｙｌ　ａｃｅｔａｔｅ）で発色させた。１０分後に得られたＥＬＩＳＡのシグナルは、これらのマウスの胃洗浄物中に機能性ＶＨＨ＃３Ｅが存在していることを明瞭に実証した。検量線と比較することによって、本発明者らは、試験した３匹のマウスに関して胃洗浄液中の機能性抗体断片の濃度が１．５、１２．６、および８．６μｇ／ｍｌであると決定した。

【実施例９】

【０２８９】

ＩＢＤに関して動物モデルでの効力

【０２９０】

１）慢性大腸炎の動物モデル

様々な投与経路によって適用した二価ＶＨＨ構築体の効力を、ＢＡＬＢ／ｃマウスにおいてＤＳＳ（デキストラン硫酸ナトリウム）で誘発した慢性大腸炎モデルで評価した。このモデルは、当初Ｏｋａｙａｓｕらによって記載［ＯｋａｙａｓｕらＧａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌｏｇｙ１９９０、９８：６９４‐７０２］され、Ｋｏｊｏｕｈａｒｏｆｆらによって改変［Ｇ．Ｋｏｊｏｕｈａｒｏｆｆら、Ｃｌｉｎ．Ｅｘｐ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１９９７、１０７：３５３‐８］されている。Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、ドイツ国から１１週齢の動物を入手し、体重が２１～２２ｇに達するまで動物施設で飼育した。この動物で４巡のＤＳＳ処理サイクルによって慢性大腸炎を誘発した。各サイクルは、ＤＳＳを濃度５％（ｗ／ｖ）で飲料水と共に与えたＤＳＳ処理期間（７日）、および飲料水にＤＳＳを含めない回復期間（１２日）から構成された。最後の回復期間は、処理時の急性炎症ではなく慢性を示す炎症状態を提供するために、１２～２１日に延長された。最後の回復期間に続いて、８匹のマウス群に無作為にマウスを割り当て、ＶＨＨ構築体での治療を開始した。治療期間は２週間であった。治療期間の最後から１週間目に、動物を屠殺し、腸を解剖し組織学的に検査した。実験設定を図１８に概略的に示す。

【０２９１】

２）ＶＨＨ治療スケジュール

ＶＨＨ治療期間中、マウス（１群につき各８匹）は、１００μｇの二価ＶＨＨ３Ｆを胃内または静脈内適用することによって、二価ＶＨＨ＃３Ｆ（ＶＨＨ＃ｍ３Ｆ‐ＶＨＨ＃ｍ３Ｆ、配列番号７６）により毎日連続１４日間治療した。別の群の動物を１日おきに１４日間二価ＶＨＨ＃３Ｆで経直腸的に治療した。投与群全てにおいて、１００μｇ用量の二価ＶＨＨ＃３Ｆを緩衝化溶液１ｍｌにつき１ｍｇの濃度で適用した。負の対照群には、他の条件を同一条件にして１００μｌのＰＢＳを施した。治療スケジュール表１１に示す。

【０２９２】

３）結果

マウスを屠殺後、体重を測定し、大腸を精査した。精査した大腸の長さを測定し、大腸の組織像をヘマトキシリン‐エオシン（ＨＥ）染色によって評価した（標準条件）。負の対照（ＰＢＳ治療）と比較して、二価ナノ体３Ｆで処理した群では、大腸の長さの伸長と組織学的評価（ｈｉｓｔｏｌｏｇｉｃａｌ　ｓｃｏｒｅ）の改善が示され［Ｇ．Ｋｏｊｏｕｈａｒｏｆｆら、Ｃｌｉｎ．Ｅｘｐ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１９９７、１０７：３５３‐８］、それによって治療効力が証明された。

【０２９３】

【表１】

名称	配列番号	配列
VHH#1A	1	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFDFSVSWMYWVRQAPGKGLEWVS EINTNGLITKYVDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMDSLIPEDTALYYCARSPSGS FRGQGTQVTVSS
VHH#7B	2	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFRVNAMGWYRQVPGNQREFVAII TSGDNLNYADAVKGRFTISTDNVKKTVYLQMNVLKPEDTAVYYCNAILQTSR WSIPSNYWGQGTQVTVSS
VHH#2B	3	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDYWMYWVRQAPGKGLEWVST VNTNGLITRYADSVKGRFTISRDNAKYTLYLQMNSLKSEDTAVYYCTKVVPPY SDDSRTNADWGQGTQVTVSS
VHH#3E	4	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDHSGYTYTIGWFRQAPGKERE FVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDIAKNTVDLTMNNLEPEDTAVYYCAAR DGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSS
VHH#3G	5	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAVSGRTFSAHSVYTMGWFRQAPGKEREF VARIYWSSANTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLLMNSLKPEDTAVYYCAAR DGIPTSRTVGSYNYWGQGTQVTVSS
VHH#10A	6	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFRVNAMGWYRQVPGNQREFVAII TSSDTNDTTNYADAVKGRFTISTDNVKKTVYLQMNVLKPEDTAVYYCNAVLQT SRWSIPSNYWGQGTQVTVSS
VHH#2G	7	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCTTSGRTISVYAMGWFRQAPGKEREFVASI SGSGAITPYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLNPEDTAVYYCAASRYAR YRDVHAYDYWGQGTQVTVSS
VHH#1F	8	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAASTRTFSRYVVGWFRQAPGKEREFVATI SWNGEHTYYADSVKGRYTISRDNAKNTVYLQMGSLKPEDTAVYYCAARSFW GYNVEQRDFGSWGQGTPVTVSS
VHH#9C	9	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFRVNAMGWYRQVPGNQREFVAII TNDTTNYADAVKGRFTISTDNVKKTVYLQMNVLKPEDTAVYYCNTVLQTSRW NIPTNYWGQGTQVTVSS
VHH#11E	10	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFRVNAMGWYRQVPGNQREFVAII SGDTTNYADAVKGRFTISTDNVKKTVYLQMNVLESEDTAVYYCNAVLQTSRW SIPSNYWGQGTQVTVSS
VHH#10C	11	QVQLQDSGGGLVQPGGSLRLACVASGSIFSIDVMGWYRQAPGQQRELVATIT NSWTTNYADSVKGRFTISRDNAKNVVYLQMNSLKLEDTAVYYCNARRWYQP EAWGQGTQVTVSS
VHH#4B	12	QVQLQDSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTHWMYWVRQAPGKGLEWVST INTNGLITDYIHSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCALNQAGLS RGQGTQVTVSS
VHH#10D	13	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASRRTFSGYAMGWFRQAPGKEREFVAV VSGTGTIAYYADSVKGRFTISRDNAENTVYLQMNSLKPEDTGLYYCAVGPSSS RWYYRGASLVDYWGKGTLVTVSS
VHH#12B	14	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFEFENHWMYWVRQAPGKGLEWVS TVNTNGLITRYADSVKGRFTISRDNAKYTLYLQMNSLKSEDTAVYYCTKVLPP YSDDSRTNADWGQGTQVTVSS
VHH#m9A	79	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTLSSYITGWFRQAPGKEREFVGAV SWSSSTIVYADSVEGRFTISRDNHQNTVYLQMDSLKPEDTAVYYCAARPYQK YNWASASYNVWGQGTQVTVSS
VHH#m9E	15	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTLSSYITGWFRQAPGKEREFVGAV SWSSSTIVYADSVEGRFTISRDNHQNTVYLQMDSLKPEDTAVYYCAARPYQK YNWASASYNVWGQGTQVTVSS
VHH#m3F	16	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSSIIMAWFRQAPGKEREFVGAV SWSGGTTVYADSVLGRFEISRDSARKSVYLQMNSLKPEDTAVYYCAARPYQ KYNWASASYNVWGQGTQVTVSS
VHH#m4B	80	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCGVSGLSFSGYTMGWFRQAPGKEREFAAAI GWNSGTTEYRNSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAASPKY MTAYERSYDFWGQGTQVTVSS
VHH#8-29	81	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFGDSWMYWVRQAPGKGLEWVS EINTNGLITKYKDSVTGRFTISRDNAKNTLHLEMNRLKPEDTALYYCARDPSGK LRGPGTQVTVSS
VHH#8-41	82	QVQLVESGGGLVQPGGPLRLSCAASGFAFGDSWMYWVRQAPGKGLEWVS EINTNGLITKYKDSVTGRFTISRDNAKNTLHLEMNRLKPEDTALYYCARDPSGK LRGPGTQVTVSS
VHH#8-42	83	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFGDSWMYWVRQAPGKGLEWVS EINTNGLITKYKDSVTGRFTISRDNAKNTLHLEMNRLKPEDTALYYCARDPSGK LRGPGTQVTVSS
VHH#8-44	84	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDHWMYWVRQAPGKGLEWVST INTNGLITNYIHSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCALNQAGLS RGQGTQVTVSS

表1：TNF－αを標的とする本発明の態様のペプチドのアミノ酸配列表

【表２】

突然変異	鋳型	プライマー配列
A74S+Y76N+K83R+P84A	野生型	5′-AGA GAC AAC TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC ACG-3′(配列番号:107) Arg Asp Asn **Ser** Lys **Asn** Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu **Arg Ala** Glu Asp Thr(配列番号:108)
Q1E+Q5L+A74S+Y76N+K83R+P84A	A74S+Y76N+K83R+P84A	5′-C ATG GCT GAG GTG CAG CTG CTC GAG TCT GG-3′(配列番号:109) Met Ala **Glu** Val Gln Leu **Leu** Glu Ser(配列番号:110)
Q1E+Q5L+A74S+Y76N+K83R+P84A+T93A	Q1E+Q5L+A74S+Y76N+K83R+P84A	5′-G GAC ACG GCC GTC TAT TAC TGT GCA AAA GTA CTT C-3′(配列番号:111) Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys **Ala** Lys Val Leu(配列番号:112)

表2:VHH#12Bの突然変異誘発に使用した突然変異誘発反応、変異原性プライマー、および鋳型の一覧

【表３】

突然変異	鋳型	プライマー配列
F37V	**野生型**	5′-ACC TAT ACC ATT GGC TGG GTC CGC CAG GCT-3′(配列番号:113) Thr Tyr Thr Ile Gly Trp **Val** Arg Gln Ala(配列番号:114)
E44G	**野生型**	5′-CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CGT GAG TTT-3′(配列番号:115) Arg Gln Ala Pro Gly Lys **Gly** Arg Glu Phe(配列番号:116)
R45L	**野生型**	5′-A GGG AAG GAG CTT GAG TTT GTA GCG CGT AT-3′(配列番号:117) Gly Lys Glu **Leu** Glu Phe Val Ala Arg (配列番号:118)
F47W	**野生型**	5′-A GGG AAG GAG CGT GAG TGG GTA GCG CGT AT-3′(配列番号:119) Gly Lys Glu Arg Glu **Trp** Val Ala Arg(配列番号:120)

表3:VHH#3Eの突然変異誘発に使用した突然変異誘発反応、変異原性プライマー、および鋳型の一覧

【表４】

配列番号	名称	配列
17	VHH#12B A74S+Y76N+K83R+P84A	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFEFENHWMYWVRQAPGKGLEWVST VNTNGLITRYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTKVLPPY SDDSRTNADWGQGTQVTVSS
18	VHH#12B Q1E+Q5L+A74S+Y76N+K83R+P84A	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFEFENHWMYWVRQAPGKGLEWVST VNTNGLITRYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTKVLPPY SDDSRTNADWGQGTQVTVSS
19	VHH#12B Q1E+Q5L+A74S+Y76N+K83R+P84A+T93A	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFEFENHWMYWVRQAPGKGLEWVST VNTNGLITRYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLPPY SDDSRTNADWGQGTQVTVSS
20	VHH#12B **野生型**	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFEFENHWMYWVRQAPGKGLEWVST VNTNGLITRYADSVKGRFTISRDNAKYTLYLQMNSLKSEDTAVYYCTKVLPPY SDDSRTNADWGQGTQVTVSS
21	VHH#3E F37V	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDHSGYTYTIGWVRQAPGKERE FVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDIAKNTVDLTMNNLEPEDTAVYYCAAR DGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSS
22	VHH#3E E44G	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDHSGYTYTIGWFRQAPGKGRE FVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDIAKNTVDLTMNNLEPEDTAVYYCAAR DGIPTSRSVESYNYWG QGTQVTVSS
23	VHH#3E R45L	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDHSGYTYTIGWFRQAPGKELE FVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDIAKNTVDLTMNNLEPEDTAVYYCAAR DGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSS
24	VHH#3E F47W	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDHSGYTYTIGWFRQAPGKERE WVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDIAKNTVDLTMNNLEPEDTAVYYCAA RDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSS
25	VHH#3E **野生型**	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDHSGYTYTIGWFRQAPGKERE FVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDIAKNTVDLTMNNLEPEDTAVYYCAAR DGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSS

表4:ヒト化型および野生型VHHの概要

【表５】

名称	配列番号	配列
		抗マウス血清アルブミン
MSA21	26	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGVEWVSG ISSLGDSTLYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTIGGSLNP GGQGTQVTVSS
MSA24	27	QVQLQESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRNFGMSWVRQAPGKEPEWVSSI SGSGSNTIYADSVKDRFTISRDNAKSTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTIGGSLSR SSQGTQVTVSS
MSA210	28	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSAI SSDSGTKNYADSVKGRFTISRDNAKKMLFLQMNSLRPEDTAVYYCVIGRGSP SSQGTQVTVSS
MSA212	29	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGLEWVSAI SADGSDKRYADSVKGRFTISRDNGKKMLTLDMNSLKPEDTAVYYCVIGRGSP ASQGTQVTVSS
MSAcl6	85	AVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCVVSGTTFSSAAMGWFRQAPGKEREFVGAI KWSGTSTYYTDSVKGRFTISRDNVKNTVYLQMNNLKPEDTGVYTCAADRDRY RDRMGPMTTTDFRFWGQGTQVTVSS
MSAcl12	86	QVKLEESGGGLVQTGGSLRLSCAASGRTFSSFAMGWFRQAPGREREFVASI GSSGITTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGLCYCAVNRYGIP YRSGTQYQNWGQGTQVTVSS
MSAcl10	87	EVQLEESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFNDYAMGWYRQAPGKERDMVATI SIGGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAIYYCVAHRQTVVR GPYLLWGQGTQVTVSS
MSAcl14	88	QVQLVESGGKLVQAGGSLRLSCAASGRTFSNYAMGWFRQAPGKEREFVAG SGRSNSYNYYSDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAASTNL WPRDRNLYAYWGQGTQVTVSS
MSAcl16	89	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRSLGIYRMGWFRQVPGKEREFVAAIS WSGGTTRYLDSVKGRFTISRDSTKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYCAVDSSGRL YWTLSTSYDYWGQGTQVTVSS
MSAcl19	90	QVQLVEFGGGLVQAGDSLRLSCAASGRSLGIYKMAWFRQVPGKEREFVAAIS WSGGTTRYIDSVKGRFTLSRDNTKNMVYLQMNSLKPDDTAVYYCAVDSSGR LYWTLSTSYDYWGQGTQVTVSS
MSAcl5	91	EVQLVESGGGLVQAGGSLSLSCAASGRTFSPYTMGWFRQAPGKEREFLAGV TWSGSSTFYGDSVKGRFTASRDSAKNTVTLEMNSLNPEDTAVYYCAAAYGG GLYRDPRSYDYWGRGTQVTVSS
MScl11	92	AVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTLDAWPIAWFRQAPGKEREGVSCIR DGTTYYADSVKGRFTISSDNANNTVYLQTNSLKPEDTAVYYCAAPSGPATGS SHTFGIYWNLRDDYDNWGQGTQVTVSS
MSAcl15	93	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDHYTIGWFRQVPGKEREGVSCIS SSDGSTYYADSVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNTLEPDDTAVYYCAAGGLLLR VEELQASDYDYWGQGIQVTVSS
MSAcl8	94	AVQLVDSGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTLDYYAIGWFRQAPGKEREGVACIS NSDGSTYYGDSVKGRFTISRDNAKTTVYLQMNSLKPEDTAVYYCATADRHYS ASHHPFADFAFNSWGQGTQVTVSS
MSAcl7	95	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAYGLTFWRAAMAWFRRAPGKERELVVAR NWGDGSTRYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVRTY GSATYDIWGQGTQVTVSS
MSAcl20	96	EVQLVESGGGLVQDGGSLRLSCIFSGRTFANYAMGWFRQAPGKEREFVAAIN RNGGTTNYADALKGRFTISRDNTKNTAFLQMNSLKPDDTAVYYCAAREWPFS TIPSGWRYWGQGTQVTVSS
MSAcl4	97	DVQLVESGGGWVQPGGSLRLSCAASGPTASSHAIGWFRQAPGKEREFVVGI NRGGVTRDYADSVKGRFAVSRDNVKNTVYLQMNRLKPEDSAIYICAARPEYS FTAMSKGDMDYWGKGTLVTVSS

		抗マウス血清アルブミン/抗TNF−α
MSA21/VHH#3E	30	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGVEWVSG ISSLGDSTLYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTIGGSLNP GGQGTQVTVSSEPKTPKPQPAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRT FSDHSGYTYTIGWFRQAPGKEREFVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDIAK NTVDLTMNNLEPEDTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSS
MSA24/VHH#3E	31	QVQLQESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRNFGMSWVRQAPGKEPEWVSSI SGSGSNTIYADSVKDRFTISRDNAKSTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTIGGSLSR SSQGTQVTVSSEPKTPKPQPAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRT FSDHSGYTYTIGWFRQAPGKEREFVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDIAK NTVDLTMNNLEPEDTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSS
MSA210/VHH#3E	32	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSAI SSDSGTKNYADSVKGRFTISRDNAKKMLFLQMNSLRPEDTAVYYCVIGRGSP SSQGTQVTVSSEPKTPKPQPAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRT FSDHSGYTYTIGWFRQAPGKEREFVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDIAK NTVDLTMNNLEPEDTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSS
MSA212/VHH#3E	33	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGLEWVSAI SADGSDKRYADSVKGRFTISRDNGKKMLTLDMNSLKPEDTAVYYCVIGRGSP ASQGTQVTVSSEPKTPKPQPAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRT FSDHSGYTYTIGWFRQAPGKEREFVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDIAK NTVDLTMNNLEPEDTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSS
MSA21/MSA21/VHH#3E	34	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGVEWVSG ISSLGDSTLYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTIGGSLNP GGQGTQVTVSSEPKTPKPQPAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFT FSRFGMTWVRQAPGKGVEWVSGISSLGDSTLYADSVKGRFTISRDNAKNTLY LQMNSLKPEDTAVYYCTIGGSLNPGGQGTQVTVSSEPKTPKPQPAAAQVQLQ ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDHSGYTYTIGWFRQAPGKEREFVARIY WSSGNTYYADSVKGRFAISRDIAKNTVDLTMNNLEPEDTAVYYCAARDGIPTS RSVESYNYWGQGTQVTVSS
MSA210/VHH#1A	35	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSAI SSDSGTKNYADSVKGRFTISRDNAKKMLFLQMNSLRPEDTAVYYCVIGRGSP SSQGTQVTVSSEPKTPKPQPAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFD FSVSWMYWVRQAPGKGLEWVSEINTNGLITKYVDSVKGRFTISRDNAKNTLY LQMDSLIPEDTALYYCARSPSGSFRGQGTQVTVSS
MSA210/VHH#7B	36	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSAI SSDSGTKNYADSVKGRFTISRDNAKKMLFLQMNSLRPEDTAVYYCVIGRGSP SSQGTQVTVSSEPKTPKPQPAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIF RVNAMGWYRQVPGNQREFVAIITSGDNLNYADAVKGRFTISTDNVKKTVYLQ MNVLKPEDTAVYYCNAILQTSRWSIPSNYWGQGTQVTVSS
MSA210/VHH#2B	37	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSAI SSDSGTKNYADSVKGRFTISRDNAKKMLFLQMNSLRPEDTAVYYCVIGRGSP SSQGTQVTVSSEPKTPKPQPAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFT FSDYWMYWVRQAPGKGLEWVSTVNTNGLITRYADSVKGRFTISRDNAKYTLY LQMNSLKSEDTAVYYCTKVVPPYSDDSRTNADWGQGTQVTVSS
MSA210/VHH#3E	38	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSAI SSDSGTKNYADSVKGRFTISRDNAKKMLFLQMNSLRPEDTAVYYCVIGRGSP SSQGTQVTVSSEPKTPKPQPAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRT FSDHSGYTYTIGWFRQAPGKEREFVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDIAK NTVDLTMNNLEPEDTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSS
MSA210/VHH#3G	39	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSAI SSDSGTKNYADSVKGRFTISRDNAKKMLFLQMNSLRPEDTAVYYCVIGRGSP SSQGTQVTVSSEPKTPKPQPAAAQVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAVSGRT FSAHSVYTMGWFRQAPGKEREFVARIYWSSANTYYADSVKGRFTISRDNAKN TVDLLMNSLKPEDTAVYYCAARDGIPTSRTVGSYNYWGQGTQVTVSS
MSA21/VHH#12B	40	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGVEWVSG ISSLGDSTLYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTIGGSLNP GGQGTQVTVSSEPKTPKPQPAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFE FENHWMYWVRQAPGKGLEWVSTVNTNGLITRYADSVKGRFTISRDNAKYTLY LQMNSLKSEDTAVYYCTKVLPPYSDDSRTNADWGQGTQVTVSS
MSA24/VHH#12B	41	QVQLQESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRNFGMSWVRQAPGKEPEWVSSI SGSGSNTIYADSVKDRFTISRDNAKSTLYLQMNSLKPEDTAVYYCTIGGSLSR SSQGTQVTVSSEPKTPKPQPAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFE FENHWMYWVRQAPGKGLEWVSTVNTNGLITRYADSVKGRFTISRDNAKYTLY LQMNSLKSEDTAVYYCTKVLPPYSDDSRTNADWGQGTQVTVSS
MSA210/VHH#12B	42	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSAI SSDSGTKNYADSVKGRFTISRDNAKKMLFLQMNSLRPEDTAVYYCVIGRGSP SSQGTQVTVSSEPKTPKPQPAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFE FENHWMYWVRQAPGKGLEWVSTVNTNGLITRYADSVKGRFTISRDNAKYTLY LQMNSLKSEDTAVYYCTKVLPPYSDDSRTNADWGQGTQVTVSS
MSA212/VHH#12B	43	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGLEWVSAI SADGSDKRYADSVKGRFTISRDNGKKMLTLDMNSLKPEDTAVYYCVIGRGSP ASQGTQVTVSSEPKTPKPQPAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFE FENHWMYWVRQAPGKGLEWVSTVNTNGLITRYADSVKGRFTISRDNAKYTLY LQMNSLKSEDTAVYYCTKVLPPYSDDSRTNADWGQGTQVTVSS

表5：抗マウス血清アルブミンおよび抗マウス血清アルブミン＋抗TNF−αのVHH

【表６】

配列ファミリ	名称	配列番号	配列
1	MP3D2SRA	44	QVQLQDSGGGTVQAGGSLRLSCAASGRTFSDYAVGWFRQAPGKEREFVARILWTG ASRSYANSVDGRFTVSTDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAIYYCAALPSNIITTDYLRVYY WGQGTQVTVSS
1	MP3A3SR	45	QVQLQDSGGGTVQAGGSLRLSCAASGRTFSNYAVGWFRQAPGKEREFVARIKWSG GSRSYANSVDGRFTVSTDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAIYYCA?LPSNIITTDYLRVYY WGQGTQVTVSS
2	MP3C5SR	46	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAAGISGSVFSRTPMGWYRQAPGKQRELVAGILT SGATSYAESVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLSPEDTAEYYCNTYPTWVLSWGQGT QVTVSS
2	MP3C1SR	47	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAAAGISGSVFSRTPMGWYRQAPGKQRELVAGILS SGATVYAESVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLSPEDTAEYYCNTYPTWVLSWGQGT QVTVSS
2	MP3G8SR	48	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAAAGISGSVFSRTPMGWYRQAPGKQRELVAGILS SGATAYAESVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLSPEDTAEYYCNTYPTWVLSWGQGT QVTVSS
3	MP3D2BR	49	QVQLQESGGGLVQPGESLRLSCAASRGIFRFNAGGWYRQAPGKQRELVAFIGVDNT TRYIDSVKGRFTISRDNAKTTVYLQMNSLQPEDTAVYYCNKVPYIDWGQGTQVTVSS
4	MP3H6SRA	50	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSTYNMGWFRQAPGKEREFVAGISWNG GSIYYTSSVEGRFTISRDNAENTVYLQMNSLKPEDTGVYYCASKGRPYGVPSPRQGD YDYWGQGTQVTVSS
4	MP3B4SRA	51	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSTYNMGWFRQAPGKEREFVAGISWNG GSIYYTSSVEGRFTISRDNAENTVYLQMNSLKPEDTGVYYCASKGRPYGVPSPRQGD YDYWGQGTQVTVSS
4	MP4E4BR	52	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSIYNMGWFRQAPGKEREFVAAISWNG GSIYYTSSVEGRFTISRDNAINTVYLQMNSLKPEDTGVYYCASKGRPYGVPSPRQGE YDYWGQGTQVTVSS
4	MP4H8SR	53	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFNIYNMGWFRQAPGKERDFVAAISWNG GSIYYTSSVEGRFTISRDNAENTVYLQMNSLKPEDTGVYYCASKGRPYGVPSPRQGD YDYWGQGTQVTVSS
5	MP2F6SR	54	QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFNNYNMGWFRQAPGKEREFVAAISWNG GSTYYDDSVKGRFTISRDNANNLVYLQMNSLNFEDTAVYYCACAANPYGIPQYRENR YDFWGQGTQVTVSS
5	MP3D1BR	55	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFDNYNMGWFRQAPGKEREFVAAISWNG GSTYYDDSVKGRFTISRDNFQKLVYLQMNSLKLEDTAVYYCACAANPYGIPQYRENR YDFWGQGTQVTVSS
6	MP2B5BR	56	QVQLVESGGRLVQAGGSLRLSCIASGRTISDYAAGWFRQAPGKEREFLASVTWGFG STSYADSVKGRFTISRDKAKDTVYLQMNTLEPDDTSVYYCASSPRYCAGYRCYVTAS EFDSWGQGTQVTVSS
6	MP2C1BR	57	QVKLEESGGRLVQAGGSLRLSCIASGRTISDYAAGWFRQAPGKEREFLASVSWGFG STYYADSVKGRFTISRDTAKDTVYLQMNTLEPDDTSVYYCASSPRYCAGYRCYATAS EFDSWGQGTQVTVSS
6	MP4A12SR	58	QVQLQESGGRLVQAGGSLRLSCIASGRTISDYAAGWFRQAPGKEREFLASVTWGFG STYYADSVKGRFTISRDKAKDTVYLQMNTLEPDDTSAYYCASSPRYCAGYRCYVTAS EFDSWGPGTQVTVSS
7	MP3F4SRA	59	QVQLQDSGGGLVQAGDSLRLSCAASGRSFSSYGMGWFRQAPGKEHEFVAGIWRSG VSLYYTDSVKGRFTISRDDAKMTVSLQMNSLKPEDTAVYYCAAEATFPTWSRGRFAD YDYRGQGTQVTVSS
7	MP3D3BR	60	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCTASGRSFSSYGMGWFRQAPGKDHEFVAGIWRSG VSLYYADSVKGRFTISRDDAKMTVSLQMNGLKPEDTAVYYCAAEATFPTWNRGTFAD YDYRGQGTQVTVSS
7	MP3E5BR	61	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRSFSSYGMGWFRQAPGKEHEFVAGIWRSG VSLYYADSVKGRFTISRDDAKMTVSLQMNGLKPEDTAVYYCAAEATFPTWNRGSFA DYDYRGQGTQVTVSS
7	MP3C7SRA	62	QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRSFSSYGMGWFRQAPGKEHEFVAGIWRSG VSLYYADSVKGRFTISRDDAKMTVSLQMNSLKPEDTAVYYCAAEATFPTWNRGRFAD YDYSGQGTQVTVSS
8	MP2F1BR	63	AVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCVASGGTFSRYAMGWFRQAPGKEREFVARIGYSG RSISYATSVEGRFAISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCASLVSGTLYQADYWGQ GTQVTVSS
8	MP2C5BR	64	QVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCVASGGTFSRYAMGWFRQPPGKERDFVARIGYSG QSISYATSVEGRFAISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCASLVSGTLYKPNYWGQ GTQVTVSS
9	MP2C10BR	65	QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGLTYTVGWFRQAPGKEREFVAAISWSGGSAL YADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMGSLEPEDTAYYSCAAPGTRYYGSNQVNYNYWG QGTQVTVSS
9	MP2G5SR	66	QVKLEESGGGLVQAGDSLRLSCAASGLTYTVGWFRQAPGKEREFVAAIDWSGGSAL YADSVKGRFTISRDNTKNTVYLQMGSLEPEDTAVYWCAAPGTRYHGRNQVNYNYW GQGTQVTVSS
10	MP3B1SRA	67	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSSINSRT GSITYADSVKGRFTITLDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCASRVDDRVSRGQGTQV TVSS
11	MP2F10SR	68	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTISSFRMGWFRRAPGEEREFVAFVRSNGT STYYADSVEGRFTITRDNAKNTVYLRMDSLKPEDTAVYYCAAATRDYGGSFDYWGQ GTQVTVSS
11	MP3A7SRA	69	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSFRMGWFRRAPGEEREFVAFVRSNG TSTYYADSVEGRFTITRDNAKNTVYLRMDSLKPEDTAVYYCAAATRDYGGSFDYWG QGTQVIVSS
12	MP4C10SR	70	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNYAMSWVRQPPGKGIEWVSSINNRN DHITYADSVKGRFTIARDNANNILYLQMNSLKPEDTAVYYCASRVDDRVSRGQGTQV TVSS
13	MP4D5BR	71	QVQLQDSGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYGMAWFRQAPGKERELVVAINRSG GATSYATSVRGRFTISRDNAKNTMYLQMNSLNPEDTAVYYCAARDPTRTYSSYFEYT YWGQGTQVTVSS
14	MP3F1SRA	72	QVQLQESGGGLVQAGGSLTLSCVASGRTISDYAVGWFRQAPGKEREFVASISWGGG FTAFADSMKGRFTISRDNAKNTVYLQTHTLEPDDTSVYYCASSRRYCTGYRCYATAS EFDSWGQGTQVTVSS

表6： ヒトIFN-γを標的とするVHH類のアミノ酸配列表

【表７】

名称	配列番号	配列
		リンカー配列を有するもの（下線で）
BIV 3E	73	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSSIIMAWFRQAPGKEREFVGAVSWSGG TTVYADSVLGRFEISRDSARKSVYLQMNSLKPEDTAVYYCAARPYQKYNWASASYNV WGQGTQVTVSS<u>EPKTPKPQPAAA</u>QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSSII MAWFRQAPGKEREFVGAVSWSGGTTVYADSVLGRFEISRDSARKSVYLQMNSLKPE DTAVYYCAARPYQKYNWASASYNVWGQGTQVTVSS
TRI 3E	74	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDHSGYTYTIGWFRQAPGKEREFVARIY WSSGNTYYADSVKGRFAISRDIAKNTVDLTMNNLEPEDTAVYYCAARDGIPTSRSVES YNYWGQGTQVTVSS<u>EPKTPKPQPAAA</u>QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTF SDHSGYTYTIGWFRQAPGKEREFVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDIAKNTVDLT MNNLEPEDTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSS<u>EPKTPKPQPAAA</u>QV QLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDHSGYTYTIGWFRQAPGKEREFVARIYW SSGNTYYADSVKGRFAISRDIAKNTVDLTMNNLEPEDTAVYYCAARDGIPTSRSVES YNYWGQGTQVTVSS
TETR A 3E	75	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDHSGYTYTIGWFRQAPGKEREFVARIY WSSGNTYYADSVKGRFAISRDIAKNTVDLTMNNLEPEDTAVYYCAARDGIPTSRSVES YNYWGQGTQVTVSS<u>EPKTPKPQPAAA</u>QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTF SDHSGYTYTIGWFRQAPGKEREFVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDIAKNTVDLT MNNLEPEDTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSS<u>EPKTPKPQPAAA</u>QV QLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDHSGYTYTIGWFRQAPGKEREFVARIYW SSGNTYYADSVKGRFAISRDIAKNTVDLTMNNLEPEDTAVYYCAARDGIPTSRSVESY NYWGQGTQVTVSS<u>EPKTPKPQPAAA</u>QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFS DHSGYTYTIGWFRQAPGKEREFVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDIAKNTVDLTM NNLEPEDTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSS
BIV#m 3F	76	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSSIIMAWFRQAPGKEREFVGAVSWSGG TTVYADSVLGRFEISRDSARKSVYLQMNSLKPEDTAVYYCAARPYQKYNWASASYNV WGQGTQVTVSS<u>EPKTPKPQPAAA</u>QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSSII MAWFRQAPGKEREFVGAVSWSGGTTVYADSVLGRFEISRDSARKSVYLQMNSLKPE DTAVYYCAARPYQKYNWASASYNVWGQGTQVTVSS
		リンカー配列を持たないもの
BIV#3 Edir	77	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSSIIMAWFRQAPGKEREFVGAVSWSGG TTVYADSVLGRFEISRDSARKSVYLQMNSLKPEDTAVYYCAARPYQKYNWASASYNV WGQGTQVTVSSQVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSSIIMAWFRQAPGKER EFVGAVSWSGGTTVYADSVLGRFEISRDSARKSVYLQMNSLKPEDTAVYYCAARPYQ KYNWASASYNVWGQGTQVTVSS
BIV#1 2Bdir	78	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFEFENHWMYWVRQAPGKGLEWVSTVNTN GLITRYADSVKGRFTISRDNAKYTLYLQMNSLKSEDTAVYYCTKVLPPYSDDSRTNAD WGQGTQVTVSSQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFEFENHWMYWVRQAPGK GLEWVSTVNTNGLITRYADSVKGRFTISRDNAKYTLYLQMNSLKSEDTAVYYCTKVLP PYSDDSRTNADWGQGTQVTVSS

表7：TNF－αを標的とする、二価(BIV 3E, BIV#m3F)、三価(TRI 3E)、または四価(TETRA 3E)VHHの配列

【表８】

SEQ	MSA21	MSA24	MSA210	MSA212
MSA21	1.000	0.834	0.800	0.782
MSA24	---	1.000	0.782	0.791
MSA210	---	---	1.000	0.903
MSA212	---	---	---	1.000

表8：本発明の抗マウス血清アルブミンVHHのアミノ酸配列間の部分的相同性

【表９】

SEQ	VHH#1A	VHH#7B	VHH#2B	VHH#3E	VHH#3G	VHH#10A	VHH#2G	VHH#1F	VHH#9C	VHH#11E	VHH#10C	VHH#4B	VHH#10D	VHH#12B	VHH#9E	VHH#3F
VHH#1A	1.000	0.601	0.764	0.596	0.622	0.600	0.682	0.629	0.609	0.601	0.614	0.818	0.642	0.747	0.596	0.604
VHH#7B	---	1.000	0.604	0.635	0.645	0.943	0.653	0.616	0.933	0.933	0.719	0.593	0.614	0.620	0.616	0.624
VHH#2B	---	---	1.000	0.620	0.645	0.611	0.682	0.661	0.629	0.620	0.637	0.796	0.634	0.951	0.620	0.645
VHH#3E	---	---	---	1.000	0.875	0.641	0.713	0.689	0.620	0.643	0.612	0.604	0.648	0.596	0.674	0.682
VHH#3G	---	---	---	---	1.000	0.651	0.779	0.740	0.637	0.637	0.653	0.645	0.689	0.622	0.708	0.716
VHH#10A	---	---	---	---	---	1.000	0.658	0.614	0.935	0.935	0.725	0.592	0.612	0.626	0.622	0.637
VHH#2G	---	---	---	---	---	---	1.000	0.741	0.653	0.669	0.685	0.666	0.746	0.650	0.701	0.717
VHH#1F	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.616	0.616	0.664	0.661	0.714	0.645	0.709	0.717
VHH#9C	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.941	0.743	0.601	0.622	0.645	0.600	0.616
VHH#11E	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.719	0.601	0.622	0.637	0.608	0.624
VHH#10C	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.650	0.606	0.637	0.600	0.632
VHH#4B	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.611	0.796	0.588	0.629
VHH#10D	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.619	0.674	0.674
VHH#12B	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.604	0.637
VHH#9E	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1.000	0.854
VHH#3F																1.000

表９：本発明の抗TNF−αのVHH間の部分的相同性

【表１０】

	% 相同性																																		
	MP3D2SRA	MP3A3SR	MP3C5SR	MP3C1SR	MP3G8SR	P3D2BR	MP3H6SRA	MP3B4SRA	MP4E4BR	MP4H8SR	MP2F6SR	MP3D1BR	MP2B5BR	MP2C1BR	MP4A12SR	MP3F4SRA	MP3D3BR	MP3E5BR	MP3C7SRA	MP2F1BR	MP2C5BR	MP2C10BR	MP2G5SR	MP3B1SRA	MP2F10SR	MP3A7SRA	MP4C10SR	MP4D5BR	MP3F1SRA	MP6D6BR	MP6B1BR	MP6A8BR	MP6B12BR	MP6C11BR	MP6B10BR
MP3D2SRA	X	96	66	66	66	62	71	71	71	70	68	69	65	63	64	68	66	67	68	71	70	68	67	63	67	68	60	72	65	68	67	66	67	76	70
MP3A3SR	—	X	66	66	66	62	72	72	72	71	70	71	65	63	64	68	66	67	68	72	72	69	67	64	66	67	60	73	65	67	67	65	66	77	71
MP3C5SR	—	—	X	97	98	73	65	65	64	63	63	63	60	58	59	64	64	65	66	65	65	65	63	63	64	64	61	67	60	74	63	60	63	70	64
MP3C1SR	—	—	—	X	98	72	64	64	64	62	62	62	58	57	58	65	64	64	65	64	63	64	62	63	64	65	60	67	59	73	63	60	62	70	65
MP3G8SR	—	—	—	—	X	73	65	65	64	63	63	63	59	58	59	64	64	65	66	65	64	65	63	63	65	65	61	66	60	73	63	61	63	71	64
MP3D2BR	—	—	—	—	—	X	63	63	63	62	63	64	59	58	58	62	61	62	63	64	63	63	63	64	63	63	63	65	58	73	64	60	63	68	67
MP3H6SRA	—	—	—	—	—	—	X	100	97	97	80	81	67	68	67	75	71	73	75	73	71	73	71	66	75	75	63	71	69	71	71	68	70	82	70
MP3B4SRA	—	—	—	—	—	—	—	X	97	97	80	81	67	68	67	75	71	73	75	73	71	73	71	66	75	75	63	71	69	71	71	68	70	82	70
MP4E4BR	—	—	—	—	—	—	—	—	X	97	81	82	68	69	68	73	70	71	73	73	71	73	71	66	75	75	63	72	70	71	71	68	70	80	71
MP4H8SR	—	—	—	—	—	—	—	—	—	X	81	81	66	66	66	72	69	71	72	71	71	72	71	64	73	73	62	70	67	69	70	67	70	79	71
MP2F6SR	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	X	94	65	68	64	70	67	69	71	67	65	73	71	63	71	70	62	69	66	67	69	68	67	78	69
MP3D1BR	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	X	65	66	65	71	69	71	72	67	65	70	69	63	71	71	62	68	66	67	71	69	69	79	70
MP2B5BR	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	X	95	97	63	64	64	64	65	63	64	63	60	66	63	57	63	84	65	63	63	62	70	65
MP2C1BR	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	X	95	63	64	64	64	63	61	66	65	59	66	63	56	61	85	65	64	63	62	70	65
MP4A12SR	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	X	63	64	64	64	62	60	63	62	59	65	63	56	61	84	64	63	63	62	70	65
MP3F4SRA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	X	94	96	97	69	67	68	68	62	67	69	60	72	63	67	68	65	65	76	71
MP3D3BR	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	X	98	96	70	68	67	67	62	67	67	60	70	64	66	66	64	64	75	69
MP3E5BR	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	X	98	70	68	68	69	63	68	68	60	72	64	67	68	65	66	77	71
MP3C7SRA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	X	71	69	69	70	63	69	69	61	72	64	68	68	66	66	78	71
MP2F1BR	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	X	94	66	67	63	68	67	61	70	64	68	65	64	64	74	67
MP2C5BR	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	X	66	67	62	67	65	62	69	63	67	64	62	63	73	67
MP2C10BR	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	X	94	62	68	66	59	67	66	69	68	64	68	74	73
MP2G5SR	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	X	62	67	65	59	67	65	67	66	64	66	73	73
MP3B1SRA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	X	66	65	91	67	60	67	69	68	69	69	65
MP2F10SR	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	X	97	61	67	65	71	66	65	67	77	68
MP3A7SRA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	X	61	68	63	71	65	65	67	77	69
MP4C10SR	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	X	64	58	65	64	63	66	66	63
MP4D5BR	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	X	64	69	68	65	67	76	73
MP3F1SRA	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	X	65	64	64	63	71	68
MP6D6BR	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	X	70	65	70	77	73
MP6B1BR	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	X	78	81	76	71
MP6A8BR	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	X	75	74	66
MP6B12BR	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	X	73	68
MP6C11BR																																		X	77
MP6B10BR																																			X

表10:本発明の抗IFN-γのVHH間の百分比相同性

【表１１】

群	動物	説明	スケジュール
1	8	負の対照1 腹腔内投与	毎日100μlのPBSを腹腔内投与 +
2	8	負の対照2 直腸投与	2週間1日おきに100μlのPBSを直腸投与
3	8	負の対照3 胃内投与	14日間連続で毎日100μl のPBSを胃内投与
4	8	正の対照1 デキサメタゾン	7日間連続で5μgを腹腔内投与
5	8	正の対照2 IL10発現ｌラクティス	14日間連続で1日1回経口的に適用
6	8	二価VHH 3Fを胃内投与	14日間連続で毎日100μgの二価VHH 3F$_2$を胃内投与
7	8	二価VHH 3Fを腹腔内投与	14日間連続で毎日100μgの二価VHH 3Fを腹腔内投与
8	8	二価VHH 3Fを経直腸投与	2週間1日おきに100μgの二価VHH3F を含む 100μlのPBSを経直腸的投与

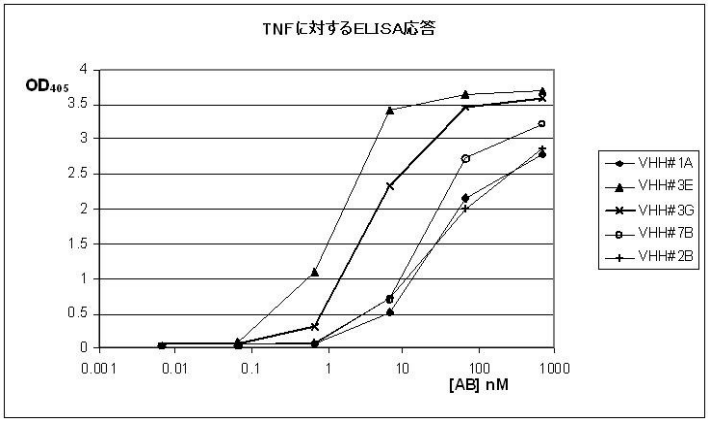
表11. 治療スケジュール

10

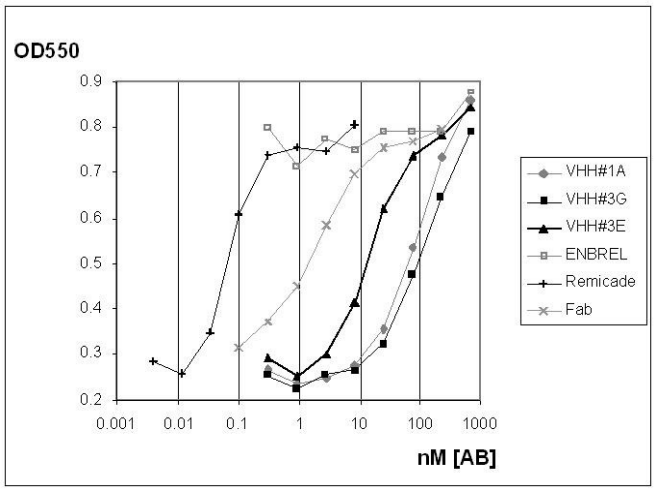
【図１】

```
                    FR1                     CDR1            FR2
VHH#3G      QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAVSGR TFSAHS--VYTMG WFRQAPGKEREFVA
VHH#3E      QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR TFSDHSGYTYTIG WFRQAPGKEREFVA
VHH#1A      QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCATSGF DFS--VSWMY--- WVRQAPGKGLEWVS
VHH#2B      QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCATSGF TFS--DYWMY--- WVRQAPGKGLEWVS
VHH#12B     QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF EFE--NHWMY--- WVRQAPGKGLEWVS
VHH#7B      QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGS IFRVNA-----MG WYRQVPGNQREFVA
            ***** ******* ********* **   *            * ** **   * *

                  CDR2                        FR2
VHH#3G      RIYWSSANTYYADSVKG RFTISRDNAKNTVDLLMNSLKPEDTAVYYCAA
VHH#3E      RIYWSSGNTYYADSVKG RFAISRDIAKNTVDLTMNNLEPEDTAVYYCAA
VHH#1A      EINTNGLITKYVDSVKG RFTISRDNAKNTLYLQMDSLIPEDTALYYCAR
VHH#2B      TVNTNGLITRYADSVKG RFTISRDNAKYTLYLQMNSLKSEDTAVYYCTK
VHH#12B     TVNTNGLITRYADSVKG RFTISRDNAKYTLYLQMNSLKSEDTAVYYCTK
VHH#7B      -IITSGDNLNYADAVKG RFTISTDNVKKTVYLQMNVLKPEDTAVYYCNA
                     * * *** ** ** *  * *  * *  *  **** ***

                  CDR3          FR4       Hinge
VHH#3G      RDGIPTSRTVGSYNY WGQGTQVTVSS EPKTPKPQP (配列番号:121)
VHH#3E      RDGIPTSRSVESYNY WGQGTQVTVSS EPKTPKPQP (配列番号:122)
VHH#1A      ---------SPSGSF RGQGTQVTVSS EPKTPKPQP (配列番号:123)
VHH#2B      -VVPPYSDDSRTNAD WGQGTQVTVSS EPKTPKPQP (配列番号:124)
VHH#12B     -VLPPYSDDSRTNAD WGQGTQVTVSS EPKTPKPQP (配列番号:125)
VHH#7B      --ILQTSRWSIPSNY WGQGTQVTVSS EPKTPKPQP (配列番号:126)
                             ********** *********
```

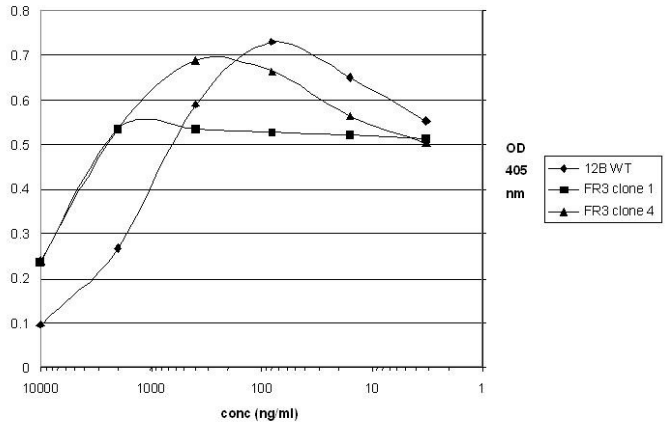
【図２】


TNFに対するELISA応答
OD405
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
[AB] nM
VHH#1A
VHH#3E
VHH#3G
VHH#7B
VHH#2B

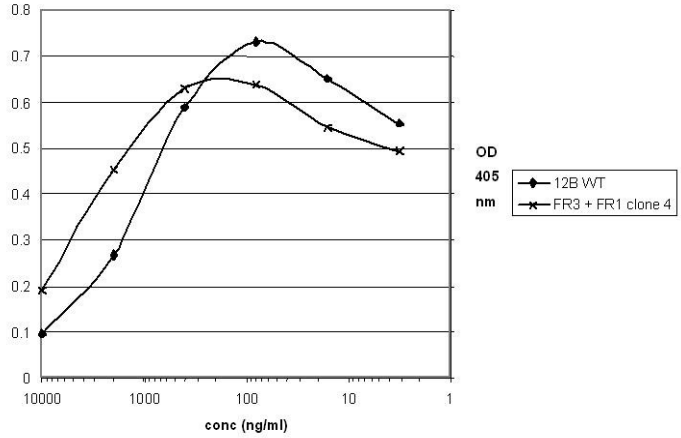
【図３】


OD550
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
nM [AB]
VHH#1A
VHH#3G
VHH#3E
ENBREL
Remicade
Fab

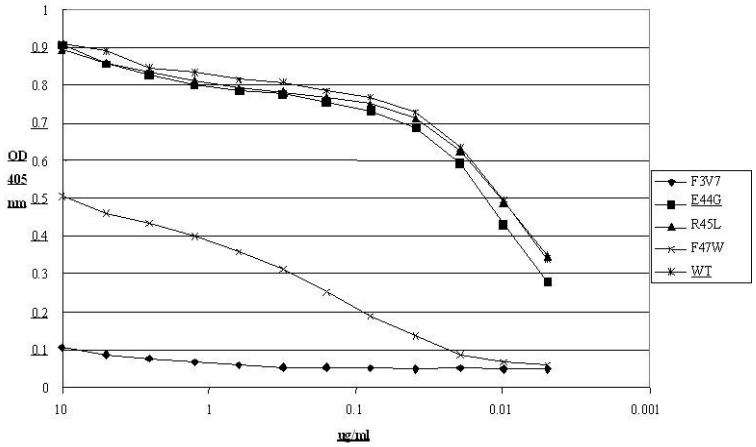
【図４】


0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
10000
1000
100
10
1
conc (ng/ml)
OD
405
nm
12B WT
FR3 clone 1
FR3 clone 4

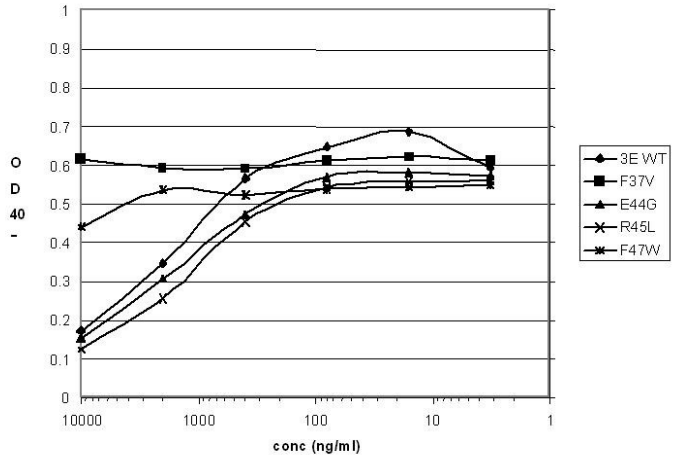
【図５】


0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
10000
1000
100
10
1
conc (ng/ml)
OD
405
nm
12B WT
FR3 + FR1 clone 4

【図６】


1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
10
1
0.1
0.01
0.001
ng/ml
OD
405
nm
F3V7
E44G
R45L
F47W
WT

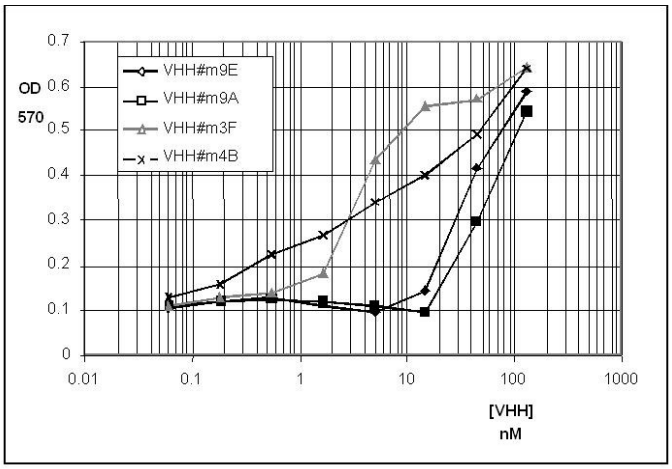
【図７】


1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
10000
1000
100
10
1
conc (ng/ml)
O
D
40
-
3E WT
F37V
E44G
R45L
F47W

【図８】

```
                          FR1                          CDR1    FR2
VHH#m3F       QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAASGG TFSSIIMA WFRQAPGKEREFVGA
VHH#m4B       QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCGVSGL SFSGYTMG WFRQAPGKEREFAAA
VHH#m9A       EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGG TLSSYITG WFRQAPGKEREFVGA
VHH#m9E       QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASEG TLSGYILG WFRQAPGKEREFVGA
               ***  ****************  *     *      ************  *

                    CDR2                        FR2
VHH#m3F       VSWSGGTTVYADSVLG RFEISRDSARKSVYLQMNSLKPEDTAVYYCAA
VHH#m4B       IGWNSGTTEYRNSVKG RFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAA
VHH#m9A       VSWSSSTIVYADSVEG RFTISRDNHQNTVYLQMDSLKPEDTAVYYCAA
VHH#m9E       VSWSGGTIVYADSVKG RFEISRDNARNTVYLQMDSLKSEDTAVYYCAA
                *   *  *  ** * ** ****     ***** *** **********

                    CDR3            FR4      Hinge
VHH#m3F       RPYQKYNWA-SASYNV WGQGTQVTVSS EPKTPKPQP (配列番号:127)
VHH#m4B       SP--KYMTAYERSYDF WGQGTQVTVSS EPKTPKPQP (配列番号:128)
VHH#m9A       RPYQKYNWA-SASYNV WGQGTQVTVSS --------- (配列番号:129)
VHH#m9E       RPYQRFNWA-SASYNV WGRGTQVTVSS --------- (配列番号:130)
               *    * *   **   ** ********
```

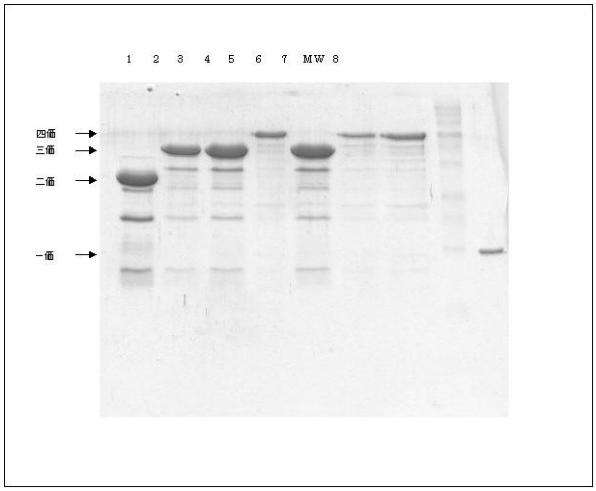
【図９】



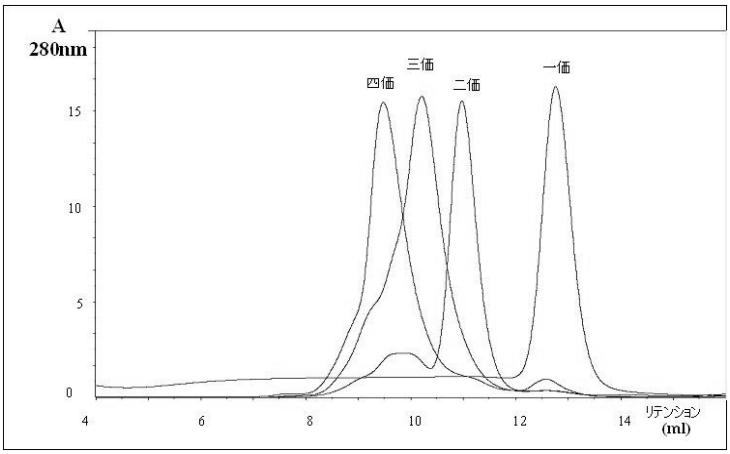
【図１０】

```
HindIII
1 aagcttgcat gcaaattcta tttcaaggag acagtcataa tgaaatacct attgcctacg gcagccgctg gattgttatt
                                                M K Y   L L P T   A A A   G L L L
                                                  <                 pelB-leader

                SfiI      NcoI              NotI                PstI
81 actcgcggcc cagccggcca tggggcctaa taggcggccg cacaggtgca gctgcaggag tcataatgag ggacccaggt
     L A A   Q P A   M G P -   - A A   A Q V   Q L Q E   S - -   G T Q V
        Leader              ><   VHH#1 >        <                  VHH#2

BstEII
161 caccgtctcc tcagaacaaa aactcatctc agaagaggat ctgaatgggg ccgcacatca tcatcatcat cattaatgag
     T V S   S E Q   K L I   S E E D   L N G   A A H   H H H H   H - - (配列番号:132)
              ><      C-MYC                >          <     His6     >

EcoRI
241 aattcactgg ccg (配列番号:131)
```

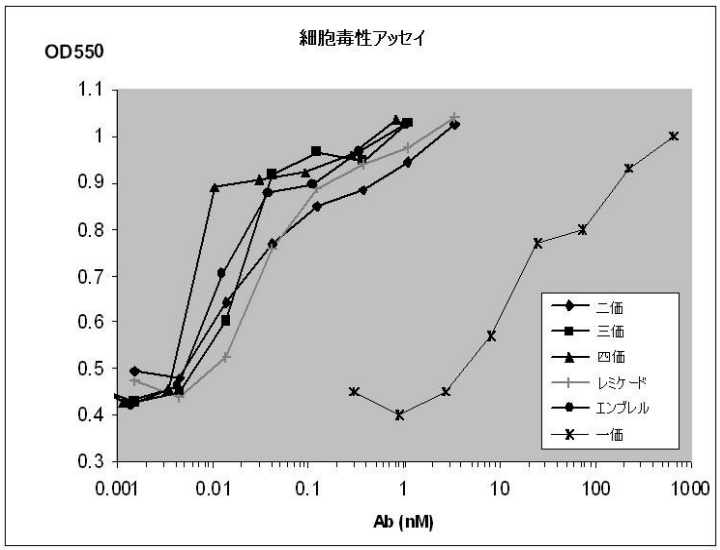
【図１１】


1 2 3 4 5 6 7 MW 8
四価
三価
二価
一価

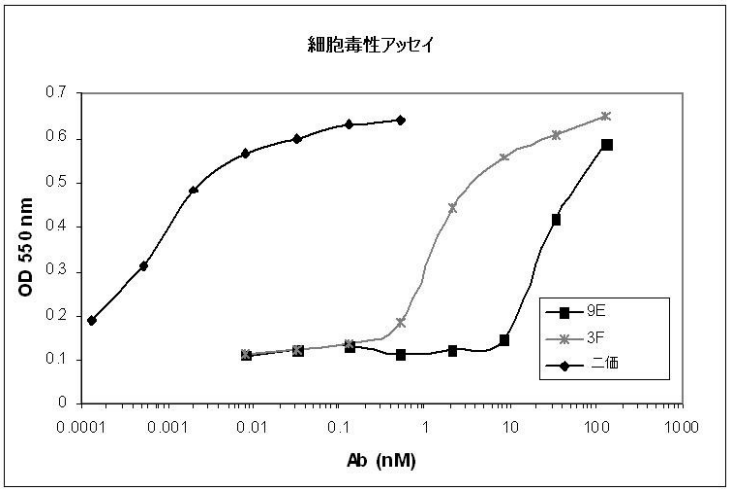
【図１２】


A
280nm
四価
三価
二価
一価
15
10
5
0
4
6
8
10
12
14
リテンション
(ml)

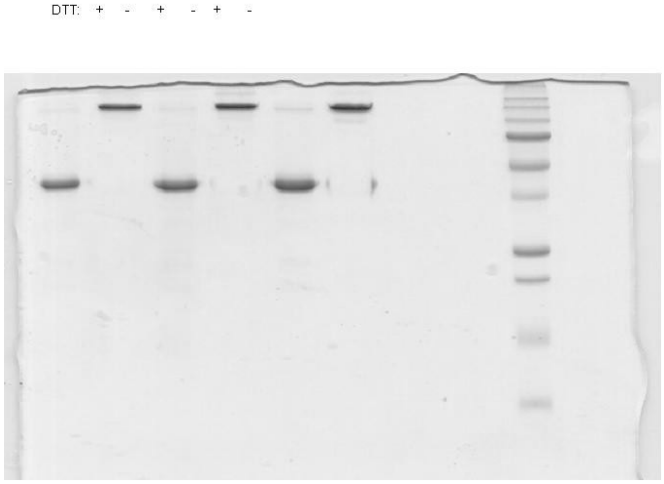
【図１３】


細胞毒性アッセイ
OD550
1.1
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
Ab (nM)
二価
三価
四価
レミケード
エンブレル
一価

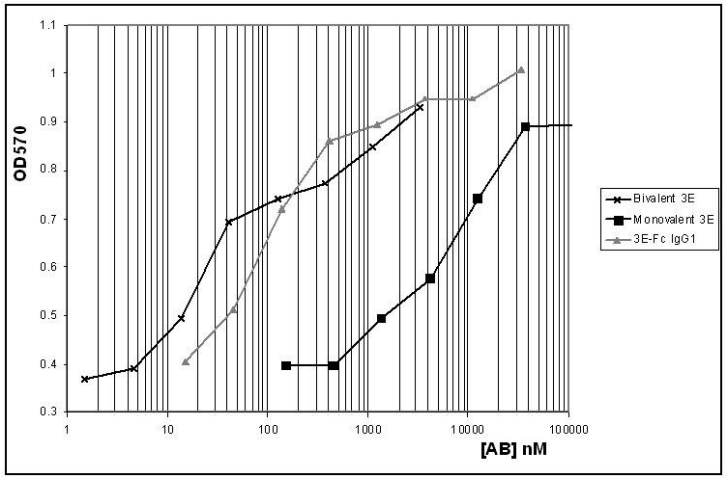
【図１４】


細胞毒性アッセイ
OD 550 nm
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
Ab (nM)
9E
3F
二価

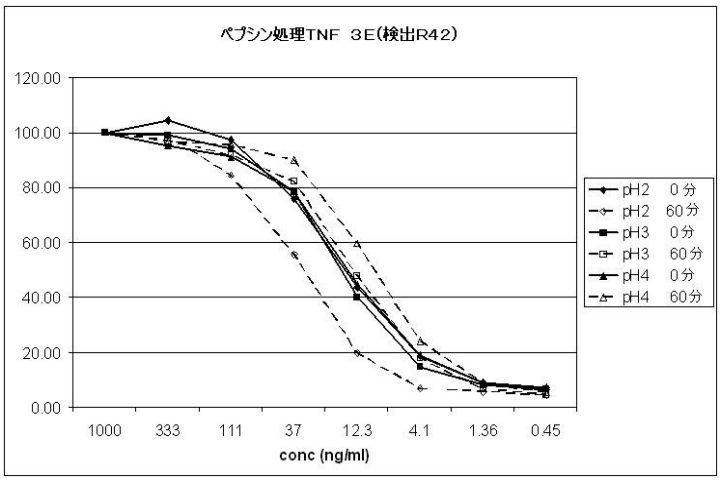
【図１５】


DTT: + - + - + -

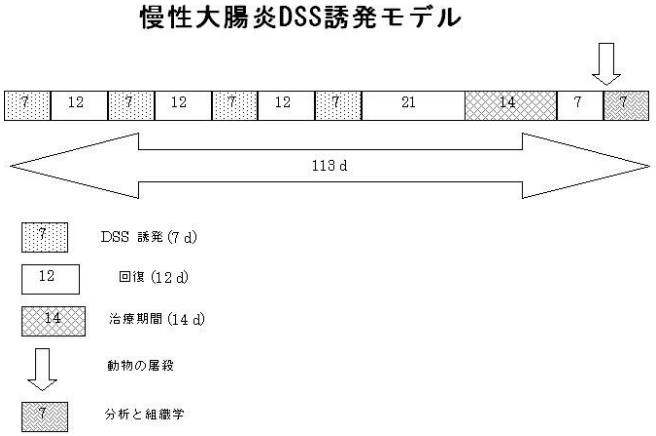
【図１６】


OD570
1.1
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
1
10
100
1000
10000
100000
[AB] nM
Bivalent 3E
Monovalent 3E
3E-Fc IgG1

【図１７】



【図１８】



【配列表】

2011024581000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ 29/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｎ	４Ｃ０８６
Ａ６１Ｐ 1/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00		４Ｈ０４５
Ａ６１Ｐ 25/02	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00	１０１	
Ａ６１Ｐ 1/16	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/00		
Ａ６１Ｐ 37/02	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/02		
Ａ６１Ｐ 3/10	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/16		
Ａ６１Ｐ 15/08	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/02		
Ａ６１Ｐ 13/12	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/10		
Ａ６１Ｐ 21/04	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	15/08		
Ａ６１Ｐ 17/06	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	13/12		
Ａ６１Ｋ 31/7088	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	21/04		
Ｇ０１Ｎ 33/15	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	17/06		
Ｇ０１Ｎ 33/50	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7088		
Ｇ０１Ｎ 33/53	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/15	Ｚ	
Ｇ０１Ｎ 33/531	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/50	Ｚ	
Ｃ０７Ｋ 16/18	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/53	Ｐ	
Ｃ０７Ｋ 16/36	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/531	Ａ	
Ｃ０７Ｋ 16/42	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/18		
		Ｃ０７Ｋ	16/36		
		Ｃ０７Ｋ	16/42		

(31)優先権主張番号 PCT/EP03/06581
(32)優先日 平成15年6月23日(2003.6.23)
(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)
(31)優先権主張番号 PCT/EP03/07313
(32)優先日 平成15年7月8日(2003.7.8)
(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)

Ｆターム(参考) 2G045 AA25 DA36 DA77 FB03
4B024 AA01 BA44 CA01 GA11 HA01
4C076 AA95 BB01 BB02 BB25 BB27 BB29 BB30 BB31 CC03 CC29
EE41 EE59
4C084 AA02 AA07 BA02 BA21 BA23 DA25 MA52 MA56 MA59 MA60
MA63 MA65 NA14 ZA02 ZA022 ZA55 ZA552 ZA66 ZA662 ZA75
ZA752 ZA81 ZA812 ZA89 ZA892 ZA94 ZA942 ZA96 ZA962 ZB05
ZB052 ZB07 ZB072 ZB08 ZB082 ZB11 ZB112 ZB15 ZB152 ZC35
ZC352
4C085 AA13 AA14 BB11 BB17 CC21 CC23 EE01
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 MA52 MA55 MA56 MA57
MA59 MA60 MA63 MA65 NA14 ZA02 ZA66 ZA81 ZA89 ZA94
ZB05 ZB07 ZB08 ZB11 ZB15 ZC06 ZC35
4H045 AA11 BA10 CA40 DA76 EA20 FA74

专利名称(译)	靶向肿瘤坏死因子α的单结构域抗体及其用途		
公开(公告)号	JP2011024581A	公开(公告)日	2011-02-10
申请号	JP2010175199	申请日	2010-08-04
[标]申请(专利权)人(译)	埃博灵克斯股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	阿布链接日元.Weserblick.		
[标]发明人	シレンスカレン ロウェレイスマルク デハールドハンス		
发明人	シレンス,カレン ロウェレイス,マルク デ ハールド,ハンス		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/24 A61K47/48 A61K38/00 A61K39/395 A61P29/00 A61P1/00 A61P25/02 A61P1/16 A61P37/02 A61P3/10 A61P15/08 A61P13/12 A61P21/04 A61P17/06 A61K31/7088 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/531 C07K16/18 C07K16/36 C07K16/42 A61P11/06 A61P19/02 A61P31/06 A61P31/16 A61P35/00 A61P37/06 C07K16/10 C07K16/12 C07K16/28 C07K16/30 C07K16/40 C07K16/46 C12N15/13 G01N33/577		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/14 A61P1/16 A61P3/10 A61P5/00 A61P7/00 A61P7/02 A61P7/06 A61P9/08 A61P9/10 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/00 A61P13/12 A61P15/08 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/02 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/02 A61P27/02 A61P27/16 A61P29/00 A61P31/06 A61P31/16 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00 C07K16/18 C07K16/241 C07K16/249 C07K16/2863 C07K16/2875 C07K16/36 C07K16/40 C07K16/4291 C07K2317/22 C07K2317/24 C07K2317/31 C07K2317/565 C07K2317/569 C07K2317/62 C07K2317/626 C07K2317/76 C07K2317/77 C07K2319/00 C07K2319/31 C07K16/468		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/24 A61K47/48 A61K37/02 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P29/00 A61P29/00.101 A61P1/00 A61P25/02 A61P1/16 A61P37/02 A61P3/10 A61P15/08 A61P13/12 A61P21/04 A61P17/06 A61K31/7088 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.P G01N33/531.A C07K16/18 C07K16/36 C07K16/42 A61K38/00 A61K38/02 A61K38/16 A61K47/50 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/13 C12N15/62.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/BA44 4B024/CA01 4B024/GA11 4B024/HA01 4C076/AA95 4C076/BB01 4C076/BB02 4C076/BB25 4C076/BB27 4C076/BB29 4C076/BB30 4C076/BB31 4C076/CC03 4C076/CC29 4C076/EE41 4C076/EE59 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA02 4C084/BA21 4C084/BA23 4C084/DA25 4C084/MA52 4C084/MA56 4C084/MA59 4C084/MA60 4C084/MA63 4C084/MA65 4C084/NA14 4C084/ZA02 4C084/ZA022 4C084/ZA55 4C084/ZA552 4C084/ZA66 4C084/ZA662 4C084/ZA75 4C084/ZA752 4C084/ZA81 4C084/ZA812 4C084/ZA89 4C084/ZA892 4C084/ZA94 4C084/ZA942 4C084/ZA96 4C084/ZA962 4C084/ZB05 4C084/ZB052 4C084/ZB07 4C084/ZB072 4C084/ZB08 4C084/ZB082 4C084/ZB11 4C084/ZB112 4C084/ZB15 4C084/ZB152 4C084/ZC35 4C084/ZC352 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/BB17 4C085/CC21 4C085/CC23 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/MA52 4C086/MA55 4C086/MA56 4C086/MA57 4C086/MA59 4C086/MA60 4C086/MA63 4C086/MA65 4C086/NA14 4C086/ZA02 4C086/ZA66 4C086/ZA81 4C086/ZA89 4C086/ZA94 4C086/ZB05 4C086/ZB07 4C086/ZB08 4C086/ZB11 4C086/ZB15 4C086/ZC06 4C086/ZC35 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/FA74		
代理人(译)	庄司隆		
优先权	60/425073 2002-11-08 US 60/425063 2002-11-08 US		

	2003447005 2003-01-10 EP PCT/EP2003/006581 2003-06-23 WO PCT/EP2003/007313 2003-07-08 WO
外部链接	Espacenet

摘要(译)

解决的问题：提供一种多肽，其包含与TNF-α结合的一种或多种单结构域抗体，所述多肽的同源物和所述多肽的同源物的功能部分。 解决方案：源自靶向肿瘤坏死因子α的单域重链抗体的多肽，骆驼科动物VHH的单域抗体，该多肽的给药方法以及调节TNF-α受体的作用 用于药物筛选的方案，以及由所述筛选产生的激动剤。 [选择图]无

(P2011-2438)
(43)公開日 平成23年2月10日(2011.2.

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	2G045
C07K 16/24	(2006.01)	C07K	16/24		4B024
A61K 47/48	(2006.01)	A61K	47/48		4C076
A61K 38/00	(2006.01)	A61K	37/02		4C084
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	D	4C085

審査請求 有 請求項の数 41 OL （全 63 頁） 最終頁に

(21)出願番号 特願2010-175199 (P2010-175199)
(22)出願日 平成22年8月4日 (2010.8.4)
(62)分割の表示 特願2005-502085 (P2005-502085)の分割
原出願日 平成15年11月7日 (2003.11.7)
(31)優先権主張番号 60/425,073
(32)優先日 平成14年11月8日 (2002.11.8)
(33)優先権主張国 米国 (US)
(31)優先権主張番号 60/425,063
(32)優先日 平成14年11月8日 (2002.11.8)
(33)優先権主張国 米国 (US)
(31)優先権主張番号 03447005.4
(32)優先日 平成15年1月10日 (2003.1.10)
(33)優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71)出願人 505166225
アブリンクス エン．ヴェー．
ベルギー，ベー－９０５２ ツヴィナールデ，テヒノロギーパルク ２１
(74)代理人 100088904
弁理士 庄司 隆
(72)発明者 シレンス，カレン
ベルギー，ベー－３０９０ オヴェリセジーン トンベウーストラート ２１
(72)発明者 ロウェレイス，マルク
ベルギー，ベー－９４５０ ハールテル，ウィルゲンストラート ２
(72)発明者 デ ハールド，ハンス
オランダ，エンエル－４４３６ エンアオウデランデ，’テー ツヴィント

最終頁に続く