

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-536175

(P2013-536175A)

(43) 公表日 平成25年9月19日(2013.9.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 16/24 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/24 Z N A	4 B O 2 4
<b>A61P 29/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 29/00	4 B O 6 4
<b>A61P 37/06 (2006.01)</b>	A 6 1 P 37/06	4 C O 8 4
<b>A61P 43/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00 1 2 1	4 C O 8 5
<b>A61K 45/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 45/00	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 76 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-520249 (P2013-520249)  
 (86) (22) 出願日 平成23年7月6日 (2011.7.6)  
 (85) 翻訳文提出日 平成25年2月18日 (2013.2.18)  
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2011/053007  
 (87) 国際公開番号 WO2012/007880  
 (87) 国際公開日 平成24年1月19日 (2012.1.19)  
 (31) 優先権主張番号 61/365,307  
 (32) 優先日 平成22年7月16日 (2010.7.16)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 505166225  
 アプリンクス エン. ヴェー.  
 ベルギー, ベー-9052 ヘントーツヴ  
 イナールデ, テヒノロジーパルク 21  
 (74) 代理人 110001508  
 特許業務法人 津国  
 (74) 代理人 100078662  
 弁理士 津国 肇  
 (74) 代理人 100131808  
 弁理士 柳橋 泰雄  
 (74) 代理人 100119079  
 弁理士 伊藤 佐保子  
 (74) 代理人 100135873  
 弁理士 小澤 圭子

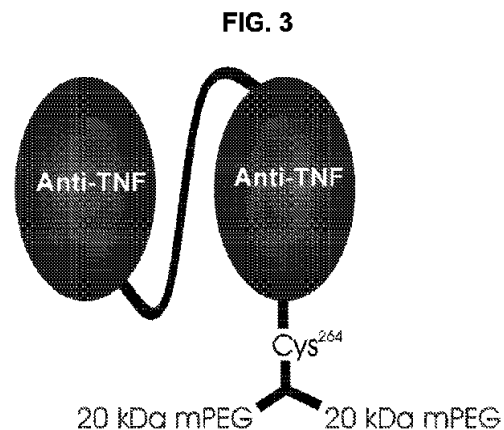
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 修飾された単ドメイン抗原結合分子及びその使用

(57) 【要約】

本発明は、修飾された単ドメイン抗原結合分子、例えばSDAB分子、特にTNFα結合型のSDAB分子に関する。例えばTNFα関連障害を治療するために、本明細書に記載の修飾された単ドメイン抗原結合分子を調製する及び使用する方法も開示する。

【選択図】 なし



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

修飾された単ドメイン抗原結合分子であって、

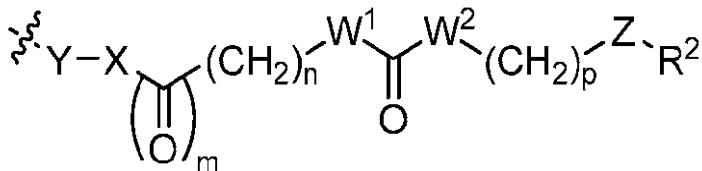
( i ) 1つ又は複数の標的に結合する、1つ又は複数の単一抗原結合ドメインと、

( i i ) 非ペプチドリinkerと、

( i i i ) 1つ又は複数のポリマー分子と、

を含み、該非ペプチドリinkerが式 ( I ) の部分である、修飾された単ドメイン抗原結合分子：

## 【化 1】



10

( 式中、

$W^1$  及び  $W^2$  はそれぞれ独立して、結合又は  $\text{NR}^1$  から選択され、

$Y$  は結合、0 ~ 2 個の  $\text{R}^a$  で置換された  $\text{C}_{1-4}$  アルキレン、又はピロリジン - 2, 5 - ジオンであり、

$X$  は  $\text{O}$ 、結合であるか、又は存在せず、

$Z$  は  $\text{O}$ 、 $\text{NR}^3$ 、 $\text{S}$ 、又は結合であり、

$\text{R}^1$  及び  $\text{R}^3$  はそれぞれ独立して、水素又は  $\text{C}_{1-6}$  アルキルであり、

$\text{R}^2$  は存在していないか、又は1つ若しくは複数のポリマー部分であり、

$\text{R}^a$  はヒドロキシル、 $\text{C}_{1-4}$  アルキル又は  $\text{C}_{1-4}$  アルコキシから選択され、

$m$  は 0 又は 1 であり、

$n$  は 0、1、2 又は 3 であり、

$p$  は 0、1、2、3 又は 4 である ) 。

20

## 【請求項 2】

1つ又は複数のポリマー分子がポリ ( エチレングリコール ) ( PEG ) モノマー又はその誘導体を含む、請求項 1 に記載の修飾された単ドメイン抗原結合分子。

30

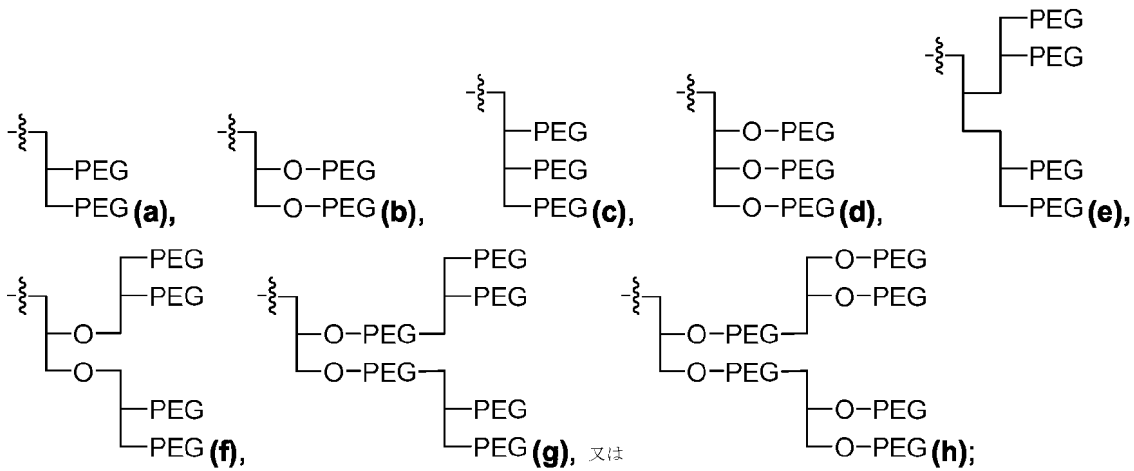
## 【請求項 3】

PEG ポリマー分子が分岐しており、該 PEG モノマーがメトキシポリ ( エチレングリコール ) ( mPEG ) 又はその誘導体である、請求項 2 に記載の修飾された単ドメイン抗原結合分子。

## 【請求項 4】

PEG ポリマー分子が式 ( a ) ~ 式 ( h ) からなる群から選択される分岐 PEG ポリマー分子である、請求項 3 に記載の修飾された単ドメイン抗原結合分子：

## 【化 2】



10

## 【請求項 5】

各 PEG ポリマー部分が独立して、1 KDa ~ 100 KDa の分子量を有する、請求項 2 ~ 4 のいずれか一項に記載の修飾された単一ドメイン抗原結合分子。

## 【請求項 6】

各 PEG ポリマー部分が独立して、10 KDa ~ 50 KDa の分子量を有する、請求項 5 に記載の修飾された単一ドメイン抗原結合分子。

20

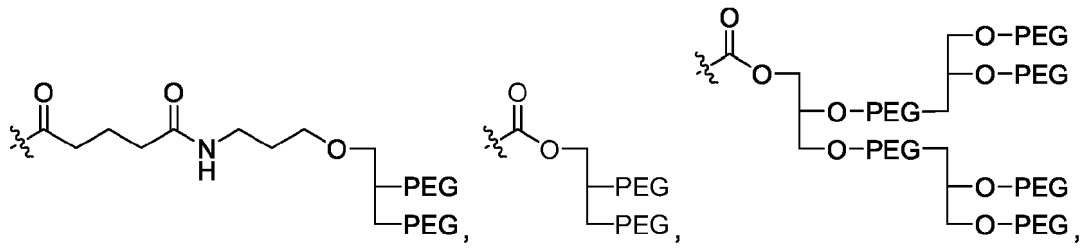
## 【請求項 7】

各 PEG ポリマー部分が独立して、10 KDa、20 KDa、30 KDa、40 KDa 及び 50 KDa からなる群から選択される分子量を有する、請求項 5 に記載の修飾された単一ドメイン抗原結合分子。

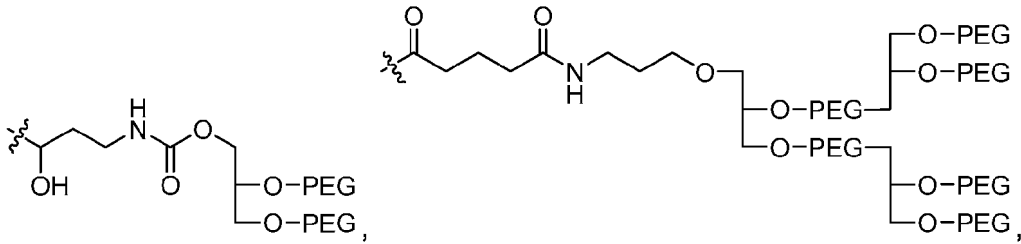
## 【請求項 8】

リンカー及び PEG ポリマー分子が以下からなる群から選択される構造を有する、請求項 5 に記載の修飾された単一ドメイン抗原結合分子：

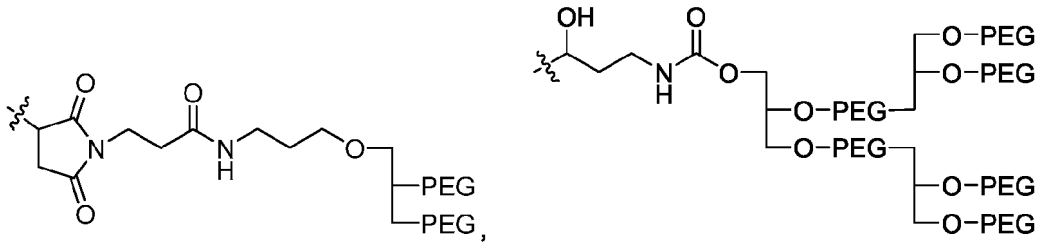
【化 3】



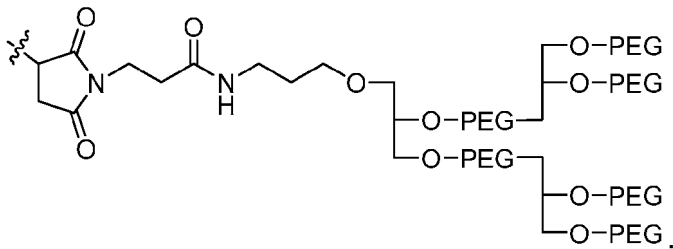
10



20



及び

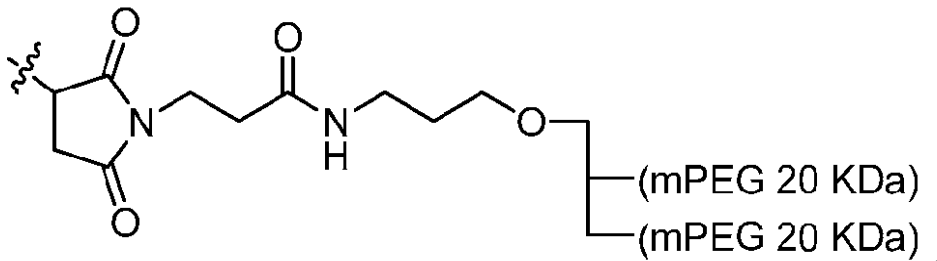


30

【請求項 9】

リンカー及び PEG ポリマー分子が以下の式で表される、請求項 8 に記載の修飾された単一ドメイン抗原結合分子：

【化 4】



40

【請求項 10】

前記単一抗原結合ドメインの少なくとも 1 つがヒト TNF に結合する、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の修飾された単一ドメイン抗原結合分子。

【請求項 11】

一価、二価又は三価である、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の修飾された単一ドメイン抗原結合分子。

【請求項 12】

50

単一特異性、二重特異性又は三重特異性である、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の修飾された単一ドメイン抗原結合分子。

【請求項 13】

前記単一抗原結合ドメインの 1 つ又は複数が、CDR グラフト化、ヒト化、ラクダ化、脱免疫化、又はファージディスプレイによって選択されている、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の修飾された単一ドメイン抗原結合分子。

【請求項 14】

N 末端から C 末端へと以下の順序で：抗 TNF 単一抗原結合ドメイン - (任意でペプチドリンカー) - 抗 TNF 単一抗原結合ドメイン - 非ペプチドリンカー - 1 つ又は複数のポリマー分子を含む一本鎖融合ポリペプチドである、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の修飾された単一ドメイン抗原結合分子。

10

【請求項 15】

前記単一抗原結合ドメインの 1 つ又は複数が、図 2 に示されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列に対して少なくとも 85% 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の修飾された単一ドメイン抗原結合分子。

【請求項 16】

前記単一抗原結合ドメインの 1 つ又は複数が、以下のアミノ酸配列：DYWMY (CDR 1)、EINTNGLITKYPDSVKG (CDR 2) 及び SPSGFN (CDR 3) を有する 3 つの CDR を含むか、又は 1 つのアミノ酸置換が存在するという点で前記 CDR の 1 つとは異なる CDR を有する、請求項 14 又は 15 に記載の修飾された単一ドメイン抗原結合分子。

20

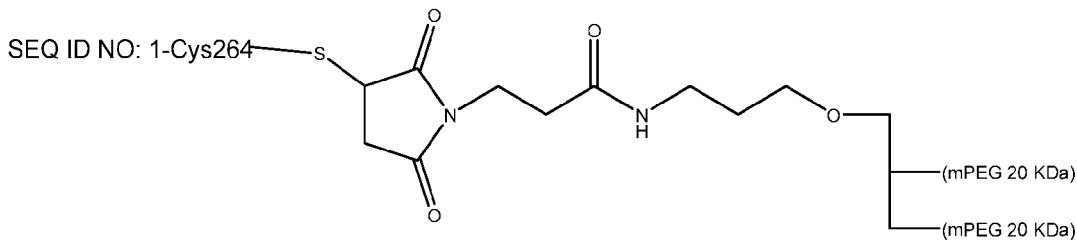
【請求項 17】

前記ペプチドリンカーが、(Gly)<sub>3</sub>-Ser 又は (Gly)<sub>4</sub>-Ser (配列番号 8) の少なくとも 1 回、2 回、3 回、4 回、5 回、6 回、7 回又はそれ以上の反復を含む、請求項 14 ~ 16 のいずれか一項に記載の修飾された単一ドメイン抗原結合分子。

【請求項 18】

以下の構造で表される、請求項 17 に記載の修飾された単一ドメイン抗原結合分子：

【化 5】



30

【請求項 19】

請求項 1 ~ 18 のいずれか一項に記載の修飾された単一ドメイン抗原結合分子と、薬学的に許容可能な担体とを含む医薬組成物。

【請求項 20】

サイトカイン阻害剤、成長因子阻害剤、免疫抑制剤、抗炎症剤、代謝阻害剤、酵素阻害剤、細胞毒性剤、又は細胞増殖抑制剤の 1 つ又は複数から選ばれる第 2 の作用物質を更に含む、請求項 19 に記載の医薬組成物。

40

【請求項 21】

被験体において炎症状態又は自己免疫状態を改善する方法であって、該被験体に、該 TNF 関連障害の症状の 1 つ又は複数が軽減するような量で請求項 1 ~ 18 のいずれか一項に記載の修飾された単一ドメイン抗原結合分子を投与することを含む、被験体において炎症状態又は自己免疫状態を改善する方法。

【請求項 22】

第 2 の作用物質を該修飾された単一ドメイン抗原結合分子と併せて投与することを更に含み、前記第 2 の作用物質がサイトカイン阻害剤、成長因子阻害剤、免疫抑制剤、抗炎症

50

剤、代謝阻害剤、酵素阻害剤、細胞毒性剤、又は細胞増殖抑制剤の1つ又は複数から選ばれる、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

TNF 関連障害が、関節リウマチ (RA)、関節炎状態、乾癬性関節炎、多関節型若年性特発性関節炎 (JIA)、強直性脊椎炎 (AS)、乾癬、潰瘍性大腸炎、クローン病、炎症性腸疾患、又は多発性硬化症の1つ又は複数から選ばれる、請求項21又は22に記載の方法。

【請求項24】

修飾された単ドメイン抗原結合分子又は第2の作用物質を皮下注射、血管注射、筋肉注射又は腹腔内注射により又は吸入により該被験体に投与する、請求項23に記載の方法。

10

【請求項25】

修飾された単ドメイン抗原結合分子を評価する方法であって、

請求項1～18のいずれか一項に記載の修飾されたSDAB分子を被験体に投与することと、

該修飾されたSDAB分子の1つ又は複数の薬物動態/薬力学 (PK/PD) パラメータを評価することと、

を含む、修飾された単ドメイン抗原結合分子を評価する方法。

【請求項26】

修飾された単ドメイン抗原結合分子を評価する又は選択する方法であって、

被験体において請求項1～18のいずれか一項に記載の修飾されたSDAB分子の少なくとも1つのPK/PDパラメータに関する試験値を被験体に提示することと、

提示された該試験値を少なくとも1つの参照値と比較し、それにより該修飾されたSDAB分子を評価する又は選択する、比較することと、

を含む、修飾された単ドメイン抗原結合分子を評価する又は選択する方法。

20

【請求項27】

修飾されたSDAB分子を含有するサンプルを準備することと、

捕捉検出アッセイで該サンプルを試験することと、

を更に含む、請求項25又は26に記載の方法。

【請求項28】

評価されるPK/PDパラメータが、該修飾されたSDAB分子の *in vivo* 濃度 (例えば血液、血清、血漿及び/又は組織中の濃度); 該修飾されたSDAB分子のクリアランス (CL); 該修飾されたSDAB分子の定常状態の体積分布 ( $V_{dss}$ ); 該修飾されたSDAB分子の半減期 ( $t_{1/2}$ ); 該修飾されたSDAB分子のバイオアベイラビリティ; 該修飾されたSDAB分子の用量で正規化した最大血中濃度、最大血清濃度若しくは最大血漿濃度; 該修飾されたSDAB分子の用量で正規化した曝露量; 又は該修飾されたSDAB分子の組織対血清比の1つ又は複数から選ばれる、請求項25～27のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項29】

修飾された単ドメイン結合分子を評価する捕捉検出アッセイであって、固体支持体に固定化された標的と、結合した修飾された単ドメイン抗原結合分子-標的複合体を検出するための該修飾された単ドメイン抗原結合分子のタンパク質部分又はポリマー部分に結合する試薬とを準備することを含む、修飾された単ドメイン結合分子を評価する捕捉検出アッセイ。

40

【請求項30】

請求項1～17のいずれか一項に記載の修飾された単ドメイン結合分子を含有するデバイス、シリンジ又はバイアルを含み、任意で使用説明書を含む、キット又は製造物。

【請求項31】

修飾された単ドメイン結合分子を製造する方法であって、

単ドメイン結合分子を準備することと、

50



例えばポリ(エチレングリコール)(PEG)又はその誘導体が含まれる。修飾されたSDAB分子は、例えば被験体、例えばヒトへの投与に有用である。例えばTNF 関連障害を治療する又は予防するための修飾されたSDAB分子を調製する及び使用方法も開示されている。

**【0005】**

したがって一態様では、本発明は、(i)1つ又は複数の標的(例えばTNF)と相互作用する、例えば1つ又は複数の標的に結合する1つ又は複数の単一抗原結合ドメインと、(ii)リンカー(例えば非ペプチドリinker及び/又はペプチドリinker)と、(iii)1つ又は複数のポリマー分子、例えばポリ(エチレングリコール)(PEG)又はその誘導体とを含む修飾されたSDAB分子を特徴とする。1つの実施の形態では、SDAB分子のリンカーは非ペプチドリinkerである。或る特定の実施の形態では、SDAB分子は、第2の部分、例えばポリマー分子と例えば共有結合的に又は非共有結合的に会合させることによって修飾することができる。例えば、SDAB分子を好適な薬理的に許容可能なポリマー、例えばポリ(エチレングリコール)(PEG)又はその誘導体(例えばメトキシポリ(エチレングリコール)すなわちmPEG)に共有結合的に付着させることができる。

10

**【0006】**

1つの実施の形態では、修飾されたSDAB分子は1つ又は複数の単一結合ドメインを含む。例えば、SDAB分子は、少なくとも1つの免疫グロブリン可変ドメイン(1つ、2つ、又は3つの相補性決定領域(CDR)が含まれる)を含むポリペプチド、例えば一本鎖ポリペプチドを含み得るか、又はそれからなり得る。SDAB分子の例としては、自然状態で軽鎖を欠いた分子(例えばVHH、ナノボディ、又はラクダ科動物由来の抗体)が挙げられる。かかるSDAB分子は、ラクダ、ラマ、ヒトコブラクダ、アルパカ及びゲアナコ等のラクダ科動物から誘導する又は得ることができる。他の実施の形態では、SDAB分子は、他の自然発生的な単一ドメイン分子(例えばサメ単一ドメインポリペプチド(IgNAR))及び単一ドメインスカフォールド(例えばフィブロネクチンスカフォールド)を含むが、それらに限定されない1つ又は複数の単一ドメイン分子を含み得る。

20

**【0007】**

別の実施の形態では、修飾されたSDAB分子は、1つ又は複数の単一抗原結合ドメインからなる一本鎖ポリペプチドである。SDAB分子は同じ標的と、例えば同じ若しくは異なるエピトープで、又は異なる標的と結合することができる。SDAB分子の単一抗原結合ドメインは同じ又は異なるアミノ酸配列を有し得る。幾つかの実施の形態では、SDAB分子は、一価又は多価(例えば二価、三価又は四価)である。他の実施の形態では、SDAB分子は、単一特異性又は多重特異性(例えば二重特異性、三重特異性又は四重特異性)である。SDAB分子は、組換え型、CDRグラフト化、ヒト化、ラクダ化、脱免疫化、及び/又は*in vitro*で生成した(例えばファージディスプレイによって選択された)1つ又は複数の単一抗原結合ドメインを含み得る。例えば、SDAB分子は、1つ又は複数の標的抗原に結合する1つ、2つ、3つ、4つ又はそれ以上の単一抗原結合ドメインを含む一本鎖融合ポリペプチドであり得る。典型的には、標的抗原は哺乳動物、例えばヒトのタンパク質である。1つの実施の形態では、標的抗原はTNF、例えばヒトTNFである。

30

40

**【0008】**

1つの例示的な実施の形態では、修飾されたSDAB分子は、標的抗原、例えばTNFに結合する2つの単一抗原結合ドメイン(例えば2つのラクダ科動物可変領域)の一本鎖ポリペプチド融合体からなる二価分子である。修飾されたSDAB分子の単一抗原結合ドメインは、N末端からC末端へと以下の順序で配置され得る：TNF結合型の単一抗原結合ドメイン - (任意で連結基、例えばペプチドリinker) - TNF結合型の単一抗原結合ドメイン - 1つ又は複数のポリマー分子。1つの実施の形態では、単一抗原結合ドメインは標的抗原上の同じエピトープに結合する(例えば、同じ又は異なる単一抗原結合ドメインを使用する)。他の実施の形態では、SDAB分子の単一抗原結合ドメインは同

50

じ又は異なる標的上の異なるエピトープに結合する。1つ又は複数の標的に対する2つ、3つ、4つ又はそれ以上の単一抗原結合ドメインの任意の順序又は組合せが本発明に包含されることが理解される。

【0009】

他の実施の形態では、修飾されたSDAB分子の単一ドメイン分子の2つ、3つ、4つ又はそれ以上が、連結基を用いて又は連結基を用いずに、遺伝子融合体又はポリペプチド融合体として会合する（例えば融合する）。連結基は当業者にとって明らかな任意の連結基であり得る。例えば、連結基は1個～100個の原子の長さの生体適合性ポリマーであり得る。連結基はペプチドリンカー又は非ペプチドリンカーであり得る。1つの実施の形態では、連結基はペプチドリンカーであり、例えば連結基は、ポリグリシン残基、ポリセリン残基、ポリリシン残基、ポリグルタミン酸残基、ポリイソロイシン残基若しくはポリアルギニン残基、又はそれらの組合せを含むか、又はそれらからなる。例えば、ポリグリシン連結基又はポリセリン連結基には、少なくとも5個、7個、8個、9個、10個、12個、15個、20個、30個、35個及び40個のグリシン残基及びセリン残基が含まれ得る。使用することができる連結基の例としては、少なくとも1回、2回、3回、4回、5回、6回、7回又はそれ以上の反復を有するGly-Ser反復、例えば(Gly)<sub>3</sub>-Ser(配列番号7)又は(Gly)<sub>4</sub>-Ser(配列番号8)反復が挙げられる。幾つかの実施の形態では、連結基は以下の配列を有する：(Gly)<sub>4</sub>-Ser-(Gly)<sub>3</sub>-Ser(配列番号9)又は((Gly)<sub>4</sub>-Ser)<sub>n</sub>(配列番号10)(ここでnは4、5又は6である)。1つの実施の形態では、連結基は以下の配列を含む：((Gly)<sub>4</sub>-Ser)<sub>n</sub>(配列番号10)(ここでn=6)。修飾されたSDAB分子は単一抗原結合ドメインのC末端に連結基(例えば本明細書で「C末端連結基」と称される)を更に含み、別の部分(例えば担体分子、非ペプチドリンカー又は非ペプチド部分)へのSDABの付着を容易にすることができる。本明細書に記載の連結基はいずれもC末端連結基として使用することができる。1つの実施の形態では、1つ又は複数のGly-Ser反復を使用し、例えば(Gly)<sub>3</sub>-Ser又は(Gly)<sub>4</sub>-Ser(配列番号8)の1つ又は複数の反復を使用する。

10

20

【0010】

1つの実施の形態では、修飾されたSDAB分子(本明細書で「SDAB-01」と称される)は、図1に示されるアミノ酸配列(配列番号1)、又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列(例えば図1に示されるアミノ酸配列と比べて、少なくとも85%、90%、95%若しくはそれ以上の同一性を有するか、又は最大で20個、15個、10個、5個、4個、3個、2個、1個のアミノ酸変化(例えば欠失、挿入又は置換(例えば保存的置換))を有するアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる。配列番号1の2つの単一抗原結合ドメインをコードするヌクレオチド配列が配列番号6として与えられる(表12を参照されたい)。他の実施の形態では、修飾されたSDABは、配列番号6、又はそれと実質的に同一のヌクレオチド配列(例えば配列番号6のアミノ酸配列と比べて、少なくとも85%、90%、95%若しくはそれ以上の同一性を有するか、又は最大で60個、45個、30個、15個、12個、9個、6個、3個のヌクレオチド変化を有するヌクレオチド配列)でコードされるアミノ酸配列を含むか、又はそれからなる。

30

40

【0011】

更なる単一ドメイン分子の例としては、国際公開第2006/122786号(引用することにより本明細書の一部をなす)の表19、及び以下の表11に開示されるアミノ酸配列が挙げられるが、それらに限定されない。

【0012】

或る特定の実施の形態では、TNFに結合する修飾されたSDAB分子の単一抗原結合ドメインの少なくとも1つは、以下のアミノ酸配列：DYWMY(配列番号2)(CDR1)、EINTNGLITKYPDSVKG(配列番号3)(CDR2)及び/又はSPSGFN(配列番号4)(CDR3)を有する1つ、2つ若しくは3つのCDRを含むか、又は3つ、2つ若しくは1つ未満のアミノ酸置換(例えば保存的置換)が存在するという点で上記CDRの1つと

50

は異なる C D R を有する。他の実施の形態では、単一抗原結合ドメインは、図 1 のおよそアミノ酸 1 ~ 1 1 5 のアミノ酸配列、又はそれと実質的に同一のアミノ酸配列（例えば図 1 に示されるアミノ酸配列と比べて、少なくとも 8 5 %、9 0 %、9 5 % 若しくはそれ以上の同一性を有するか、又は最大で 2 0 個、1 5 個、1 0 個、5 個、4 個、3 個、2 個、1 個のアミノ酸変化（例えば欠失、挿入又は置換（例えば保存的置換））を有するアミノ酸配列）を有する可変領域を含む。幾つかの実施の形態では、T N F 結合型の S D A B 分子は図 1 に示される T N F 結合型の単ドメイン抗体分子の 1 つ又は複数の生物学的活性を有する。例えば、T N F 結合型の S D A B 分子は、図 1 に示される T N F 結合型の単ドメイン分子によって認識されるエピトープと同じ又は類似のエピトープと結合する（例えばその三量体形態で T N F と結合する；T N F 受容体に接する T N F 部位と結合する；第 1 の T N F モノマー（モノマー A）上の 8 8 位に G l n 及び 9 0 位に L y s と、第 2 の T N F モノマー（モノマー B）上の 1 4 6 位に G l u とを含む T N F 三量体中のエピトープ、又は国際公開第 2 0 0 6 / 1 2 2 7 8 6 号に開示されたエピトープに結合する）。他の実施の形態では、T N F 結合型の S D A B 分子が T N F の N 末端と結合する。他の実施の形態では、T N F 結合型の S D A B 分子は、国際公開第 2 0 0 6 / 1 2 2 7 8 6 号に開示された T N F 結合型の単ドメイン分子のいずれかと類似の活性（例えば結合親和性、解離定数、結合特異性、T N F 阻害活性）を有する。

10

## 【 0 0 1 3 】

他の実施の形態では、T N F 結合型の S D A B 分子は、表 1 1 に開示され、国際公開第 2 0 0 6 / 1 2 2 7 8 6 号（参照することにより本明細書の一部をなす）にも開示された S D A B 分子を 1 つ又は複数含む。例えば、T N F 結合型の S D A B 分子は、国際公開第 2 0 0 6 / 1 2 2 7 8 6 号の表 9 に開示された一価、二価、又は三価の T N F 結合型の S D A B 分子であり得る。T N F 結合型の S D A B 分子の例としては、T N F 1、T N F 2、T N F 3、及びそれらのヒト化型（例えば T N F 2 9、T N F 3 0、T N F 3 1、T N F 3 2、T N F 3 3）が挙げられるが、それらに限定されない。一価の T N F 結合型の S D A B 分子の更なる例は国際公開第 2 0 0 6 / 1 2 2 7 8 6 号の表 8 に開示されている。二価の T N F 結合型の S D A B 分子の例としては、ペプチドリッカーを介して連結した 2 つの T N F 3 0 S D A B 分子を含み、単一の融合ポリペプチド（国際公開第 2 0 0 6 / 1 2 2 7 8 6 号に開示される）を形成する、T N F 5 5 及び T N F 5 6 が挙げられるが、それらに限定されない。二価の T N F 結合型の S D A B 分子の更なる例は本明細書の表 1 1、又は国際公開第 2 0 0 6 / 1 2 2 7 8 6 号の表 1 9 に、T N F 4、T N F 5、T N F 6、T N F 7、T N F 8）として開示されている。

20

30

## 【 0 0 1 4 】

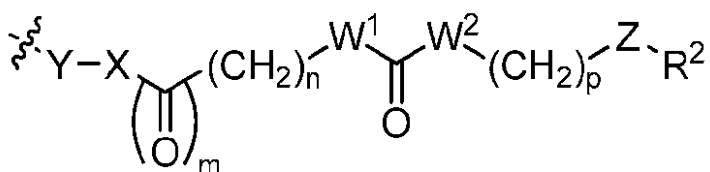
或る特定の実施の形態では、S D A B 分子は、1 つ又は複数のポリマー分子、例えばポリ（エチレングリコール）（P E G）又はその誘導体を含むように修飾される。P E G 分子（例えば P E G モノマー、ポリマー、又はその誘導体）は直鎖状又は分岐状であり得る。1 つの実施の形態では、S D A B はリンカー部分（例えば非ペプチドリッカー）を介して 1 つ又は複数の P E G 分子に付着する。

## 【 0 0 1 5 】

幾つかの実施の形態では、リンカーは非ペプチドリッカーである。1 つの実施の形態では、リンカーは式（I）で表される：

40

## 【 化 1 】



（式中、  
W<sup>1</sup> 及び W<sup>2</sup> はそれぞれ独立して、結合又は N R<sup>1</sup> から選択され、

50

Yは結合、0～2個のR<sup>a</sup>で置換されたC<sub>1</sub>～<sub>4</sub>アルキレン、又はピロリジン-2,5-ジオンであり、

XはO、結合であるか、又は存在せず、

Zは存在していないか、O、NR<sup>3</sup>、S、又は結合であり、

R<sup>1</sup>及びR<sup>3</sup>はそれぞれ独立して、水素又はC<sub>1</sub>～<sub>6</sub>アルキルであり、

R<sup>2</sup>は存在していないか、又は1つ若しくは複数のポリマー部分であり、

R<sup>a</sup>はヒドロキシル、C<sub>1</sub>～<sub>4</sub>アルキル又はC<sub>1</sub>～<sub>4</sub>アルコキシから選択され、

mは0又は1であり、

nは0、1、2又は3であり、

pは0、1、2、3又は4である)。

10

【0016】

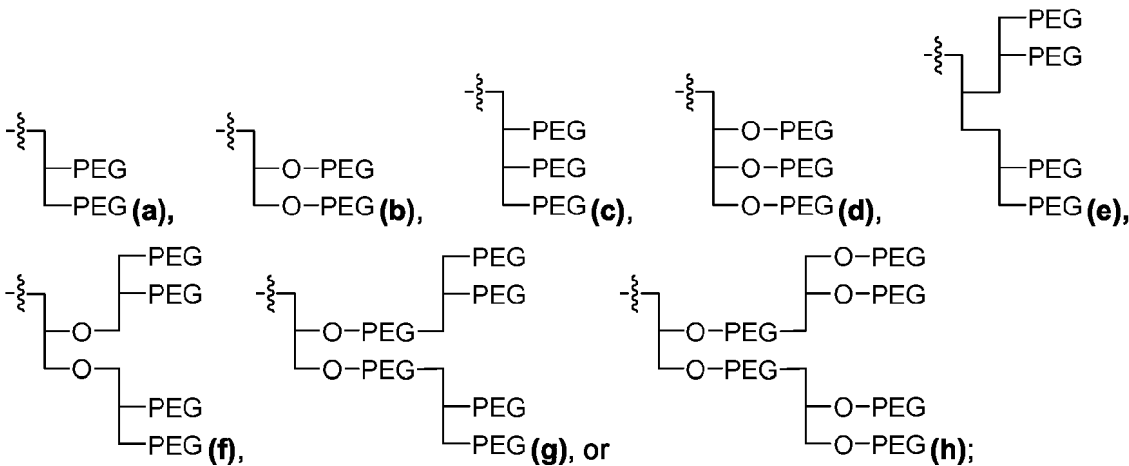
幾つかの実施の形態では、SDAB分子の1つ又は複数のポリマー部分(例えば式(I)のR<sup>2</sup>)は、ポリ(エチレングリコール)(PEG)分子(例えばPEGモノマー、ポリマー、又はその誘導体)を含む。幾つかの実施の形態では、PEG分子はメトキシポリ(エチレングリコール)(mPEG)モノマー、ポリマー、又はその誘導体である。

【0017】

幾つかの実施の形態では、PEG分子は分岐している。幾つかの実施の形態では、PEG分子は式(a)～式(h)の部分から選択される：

【化2】

20



30

(ここで各PEG分子は独立して、PEGモノマー、ポリマー、又はその誘導体である)。幾つかの実施の形態では、各PEG分子はmPEGモノマー、ポリマー、又はその誘導体である。

【0018】

幾つかの実施の形態では、Yは結合である。幾つかの実施の形態では、Yはピロリジン-2,5-ジオンである。幾つかの実施の形態では、Yは0～2個のR<sup>a</sup>で置換されたC<sub>1</sub>～<sub>4</sub>アルキレンである。幾つかの実施の形態では、Yは1個のR<sup>a</sup>で置換されたC<sub>1</sub>～<sub>4</sub>アルキレンである。幾つかの実施の形態では、Yは1個のR<sup>a</sup>で置換されたメチレンである。幾つかの実施の形態では、R<sup>a</sup>はヒドロキシルである。

40

【0019】

幾つかの実施の形態では、Xは結合である。幾つかの実施の形態では、Xは酸素(O)である。幾つかの実施の形態では、Xは存在しない。

【0020】

幾つかの実施の形態では、R<sup>2</sup>は(a)である。

【0021】

幾つかの実施の形態では、R<sup>2</sup>は(g)である。

【0022】

幾つかの実施の形態では、W<sup>1</sup>は結合である。幾つかの実施の形態では、W<sup>1</sup>はNR<sup>1</sup>

50

である。

【 0 0 2 3 】

幾つかの実施の形態では、 $W^2$  は結合である。幾つかの実施の形態では、 $W^2$  は  $NR^1$  である。

【 0 0 2 4 】

幾つかの実施の形態では、 $R^1$  は水素である。

【 0 0 2 5 】

幾つかの実施の形態では、 $Z$  は  $O$ 、 $S$  又は結合である。

【 0 0 2 6 】

幾つかの実施の形態では、 $Z$  は  $O$  である。

10

【 0 0 2 7 】

幾つかの実施の形態では、 $R^3$  は水素である。

【 0 0 2 8 】

幾つかの実施の形態では、 $m$  は  $0$  である。幾つかの実施の形態では、 $m$  は  $1$  である。

【 0 0 2 9 】

幾つかの実施の形態では、 $n$  は  $0$  である。幾つかの実施の形態では、 $n$  は  $2$  である。幾つかの実施の形態では、 $n$  は  $3$  である。

【 0 0 3 0 】

幾つかの実施の形態では、 $p$  は  $0$  である。幾つかの実施の形態では、 $p$  は  $3$  である。

【 0 0 3 1 】

20

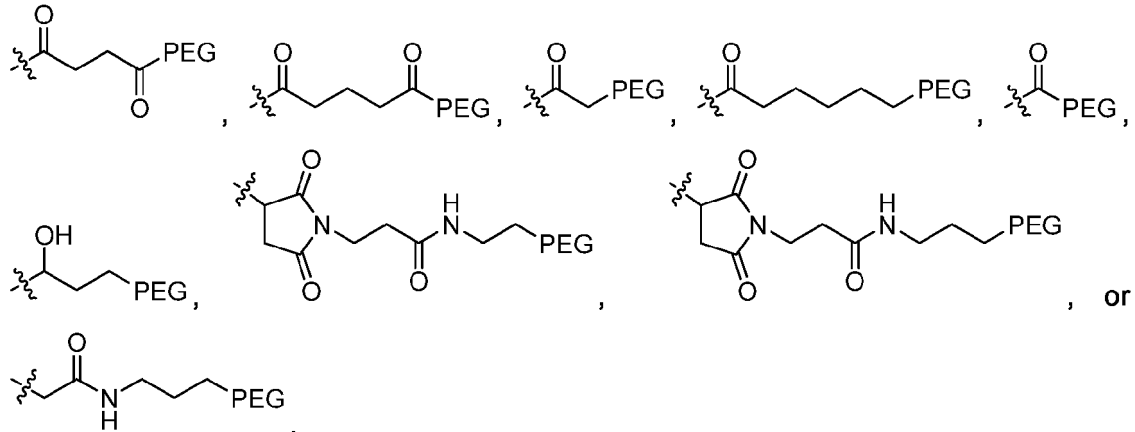
幾つかの実施の形態では、各 PEG 分子は独立して、PEG モノマー、ポリマー、又はその誘導体である。幾つかの実施の形態では、各 PEG 分子は、メトキシ PEG 誘導体 (mPEG) モノマー、ポリマー、又はその誘導体である。幾つかの実施の形態では、各 PEG 分子は独立して、 $1\text{ KDa} \sim 100\text{ KDa}$  の分子量を有する。幾つかの実施の形態では、各 PEG 分子は独立して、 $10\text{ KDa} \sim 50\text{ KDa}$  の分子量を有する。幾つかの実施の形態では、各 PEG 分子は独立して、 $40\text{ KDa}$  の分子量を有する。幾つかの実施の形態では、各 PEG 分子は独立して、 $15\text{ KDa} \sim 35\text{ KDa}$  の分子量を有する。幾つかの実施の形態では、各 PEG 分子は独立して、 $30\text{ KDa}$  の分子量を有する。幾つかの実施の形態では、各 PEG 分子は独立して、 $20\text{ KDa}$  の分子量を有する。幾つかの実施の形態では、各 PEG 分子は独立して、 $17.5\text{ KDa}$  の分子量を有する。幾つかの実施の形態では、各 PEG 分子は独立して、 $12.5\text{ KDa}$  の分子量を有する。幾つかの実施の形態では、各 PEG 分子は独立して、 $10\text{ KDa}$  の分子量を有する。幾つかの実施の形態では、各 PEG 分子は独立して、 $7.5\text{ KDa}$  の分子量を有する。幾つかの実施の形態では、各 PEG 分子は独立して、 $5\text{ KDa}$  の分子量を有する。

30

【 0 0 3 2 】

幾つかの実施の形態では、修飾された S D A B 分子は、PEG 分子に連結した式 (I) のリンカーを含み、以下から選択される構造を有する：

【化3】

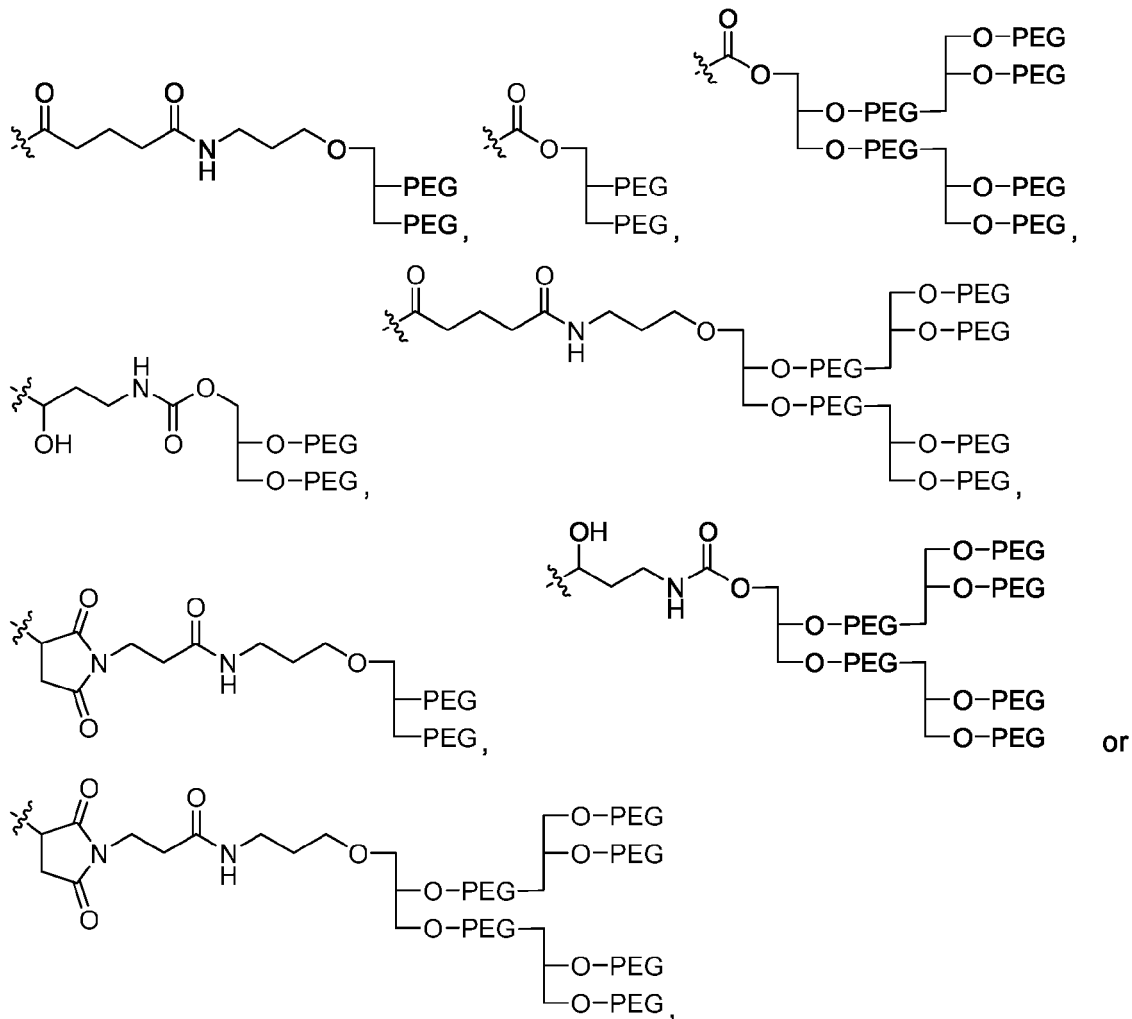


10

【0033】

幾つかの実施の形態では、修飾されたSDAB分子は、PEG分子に連結した式(I)のリンカーを含み、以下から選択される構造を有する：

【化4】



20

30

40

(ここで、各PEG分子は独立して、PEGモノマー、ポリマー、又はその誘導体である)。幾つかの実施の形態では、各PEG分子はmPEGモノマー、ポリマー、又はその誘導体である。

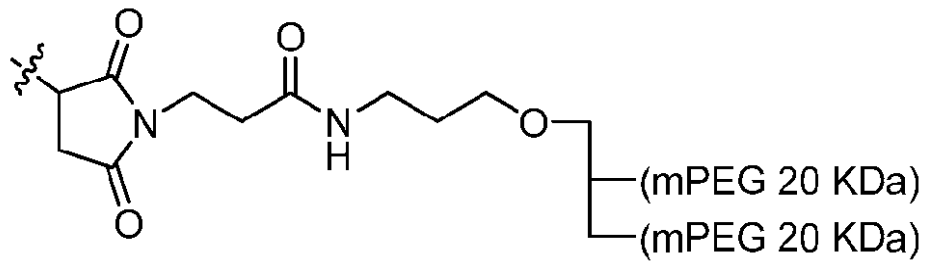
【0034】

幾つかの実施の形態では、式(I)のリンカーは以下の式で表されるPEG分子に連結

50

する：

【化5】

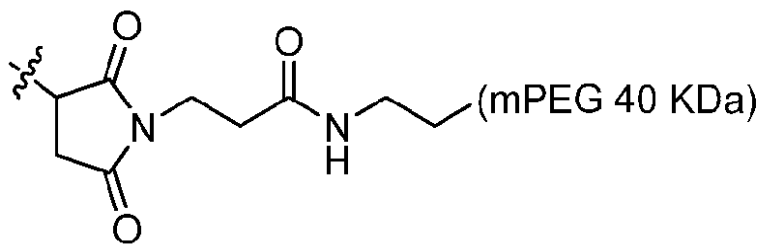


10

【0035】

幾つかの実施の形態では、式(I)のリンカーは以下の式で表されるPEG分子に連結する：

【化6】

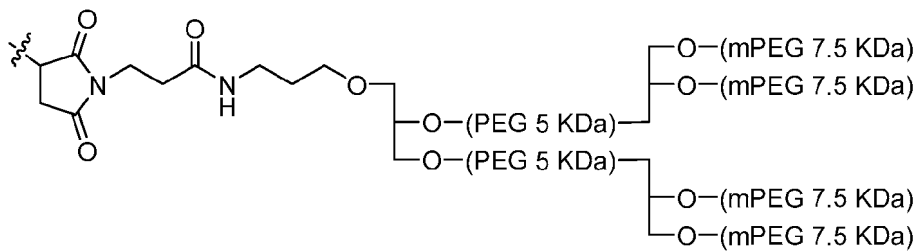


20

【0036】

幾つかの実施の形態では、式(I)のリンカーは以下の式で表されるPEG分子に連結する：

【化7】



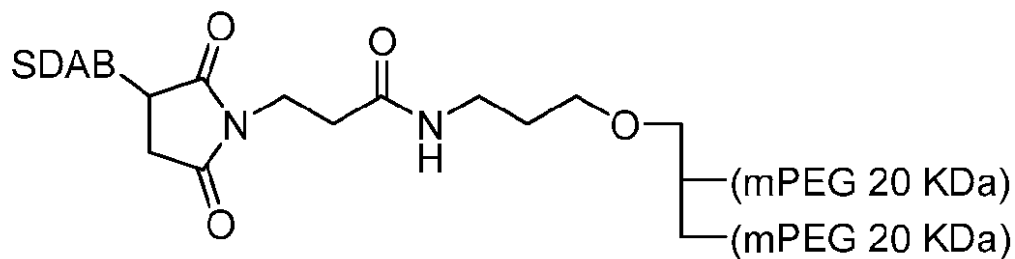
30

【0037】

リンカー-PEG分子はSDAB分子と会合する(例えば結び付く)ことができ、それにより修飾されたSDAB分子が形成する。SDAB分子の単ドメイン分子は、N末端からC末端へと以下の順序で配置され得る：TNF結合型の単ドメイン分子-TNF結合型の単ドメイン分子-PEG分子(例えば分岐したPEG分子)。1つの実施の形態では、修飾されたSDAB分子は以下の式で表される：

40

【化8】

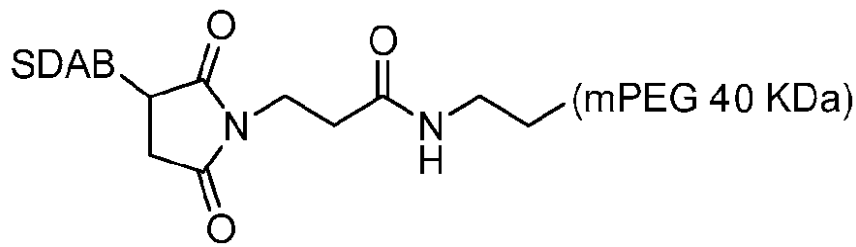


【0038】

50

1つの実施の形態では、修飾されたSDAB分子は以下の式で表される：

【化9】

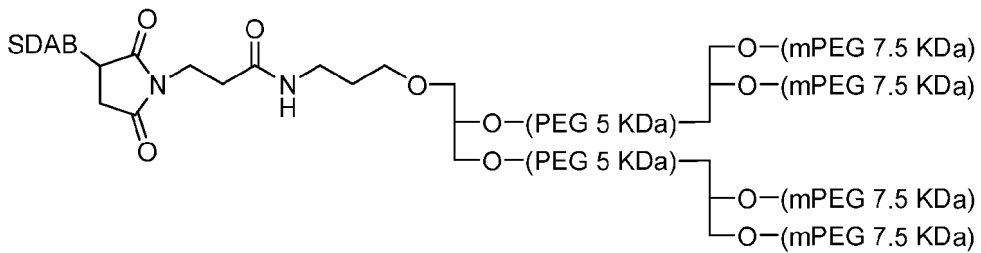


【0039】

10

1つの実施の形態では、修飾されたSDAB分子は以下の式で表される：

【化10】

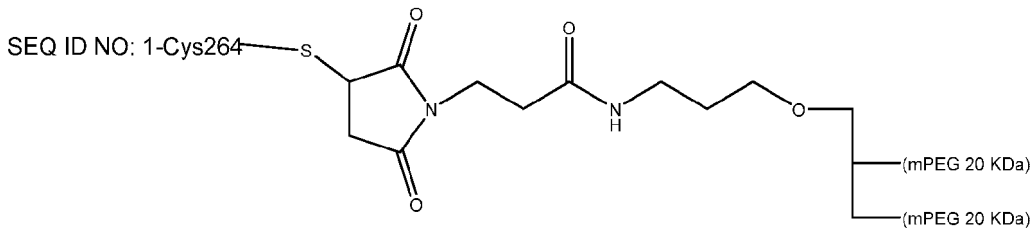


20

【0040】

修飾されたSDAB分子の1つの例示的な実施の形態は以下の式で表される：

【化11】



30

【0041】

SDAB分子の反応基は一般的に、SDAB分子に付着した求核部分を介して付着する。幾つかの実施の形態では、求核部分は硫黄（例えばシステイン残基の硫黄）である。他の実施の形態では、求核部分は窒素（例えば末端の - アミノ基又は窒素含有アミノ酸側鎖（例えばリシン鎖の - アミノ基）の窒素）である。他の実施の形態では、求核部分はC末端基である。SDAB分子の反応基は一般的に、リンカーに付着した求電子部分を介して付着する。幾つかの実施の形態では、求電子部分はカルボニル基（例えば活性化エステル又はアルデヒド）である。幾つかの実施の形態では、求電子部分はマレイミド基である。

【0042】

40

別の態様では、本発明は、本明細書に記載の修飾されたSDAB分子を作製する方法を特徴とする。本方法は、SDAB分子を準備すること（例えばSDAB分子を細胞培養物（例えば組換え細胞培養物）から得ること）と、SDAB分子（例えば単一抗原結合ドメイン）又はリンカー（例えばSDAB分子に付着したペプチドリンカー）を式（I）（式中、Y、X、W<sup>1</sup>、W<sup>2</sup>、Z、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、m、n及びpは上記のとおりである）のリンカー部分に、少なくとも1つの化学結合が形成される条件下で接触させることを含む。

【0043】

幾つかの実施の形態では、Yは結合である。幾つかの実施の形態では、Yはピロリジン - 2, 5 - ジオンである。幾つかの実施の形態では、Yは0 ~ 2個のR<sup>a</sup>で置換されたC

50

1 ~ 4 アルキレンである。幾つかの実施の形態では、Yは1個のR<sup>a</sup>で置換されたC<sub>1</sub> - 4 アルキレンである。幾つかの実施の形態では、Yは1個のR<sup>a</sup>で置換されたメチレンである。幾つかの実施の形態では、R<sup>a</sup>はヒドロキシルである。

【0044】

幾つかの実施の形態では、Xは結合である。幾つかの実施の形態では、Xは酸素(O)である。幾つかの実施の形態では、Xは存在しない。

【0045】

幾つかの実施の形態では、R<sup>2</sup>は(a)である。

【0046】

幾つかの実施の形態では、R<sup>2</sup>は(g)である。

10

【0047】

幾つかの実施の形態では、W<sup>1</sup>は結合である。幾つかの実施の形態では、W<sup>1</sup>はNR<sup>1</sup>である。

【0048】

幾つかの実施の形態では、W<sup>2</sup>は結合である。幾つかの実施の形態では、W<sup>2</sup>はNR<sup>1</sup>である。

【0049】

幾つかの実施の形態では、R<sup>1</sup>は水素である。

【0050】

幾つかの実施の形態では、ZはO、S又は結合である。

20

【0051】

幾つかの実施の形態では、ZはOである。

【0052】

幾つかの実施の形態では、R<sup>3</sup>は水素である。

【0053】

幾つかの実施の形態では、mは0である。幾つかの実施の形態では、mは1である。

【0054】

幾つかの実施の形態では、nは0である。幾つかの実施の形態では、nは2である。幾つかの実施の形態では、nは3である。

【0055】

幾つかの実施の形態では、pは0である。幾つかの実施の形態では、pは3である。

30

【0056】

幾つかの実施の形態では、SDAB分子はシステイン残基を介して連結する。

【0057】

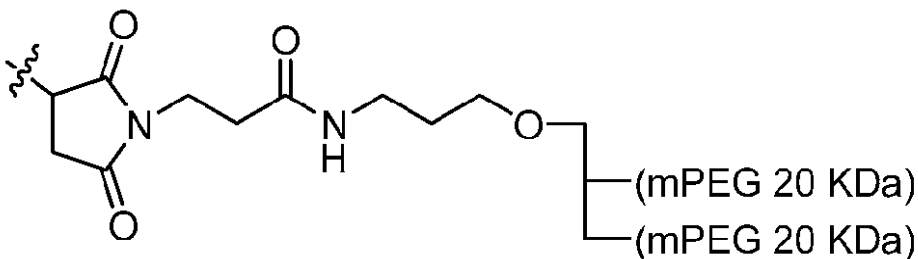
幾つかの実施の形態では、SDAB分子を還元した後に、式(I)のリンカー部分による処理を行う。幾つかの実施の形態では、SDAB分子を還元して、システイン残基の間に形成されるジスルフィド架橋を取り除く。

【0058】

幾つかの実施の形態では、式(I)のリンカーは以下の式で表されるPEG分子に連結する：

40

【化12】

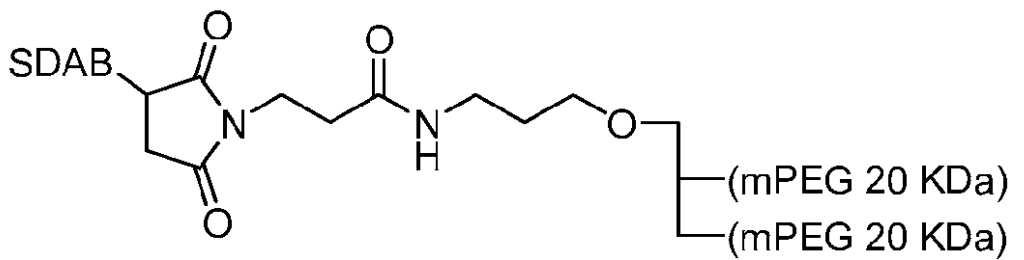


【0059】

50

1つの実施の形態では、修飾されたSDAB分子は以下の式で表される：

【化13】



10

【0060】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載の修飾されたSDAB分子と、薬学的に許容可能な担体とを含む組成物、例えば医薬組成物を特徴とする。本組成物は第2の作用物質、例えばTNF関連障害、例えば関節リウマチ(RA)(例えば中度から重度の関節リウマチ)、関節炎状態(例えば乾癬性関節炎、多関節型若年性特発性関節炎(JIA))、強直性脊椎炎(AS)、乾癬、潰瘍性大腸炎、クローン病、炎症性腸疾患、及び/又は多発性硬化症を含むが、それらに限定されない炎症性障害又は自己免疫障害を治療するのに有用な治療的に又は薬理的に活性のある第2の作用物質も含むことができる。

【0061】

更に別の態様では、本発明は、被験体において炎症状態又は自己免疫状態を改善する方法、例えば、被験体(例えばヒト被験体)においてTNF関連障害、例えば炎症性障害又は自己免疫障害を治療する又は予防する方法を特徴とする。TNF関連障害の例としては、関節リウマチ(RA)(例えば中度から重度の関節リウマチ)、関節炎状態(例えば乾癬性関節炎、多関節型若年性特発性関節炎(JIA))、強直性脊椎炎(AS)、乾癬、潰瘍性大腸炎、クローン病、炎症性腸疾患、及び/又は多発性硬化症が挙げられるが、それらに限定されない。本方法は、被験体、例えばヒト患者に、TNF関連障害の症状の1つ又は複数が軽減するような量で本明細書に記載のTNF結合型の修飾されたSDAB分子を単独で又はTNF関連障害を治療するのに有用な治療的に若しくは薬理的に活性のある第2の作用物質と併せて投与することを含む。

20

【0062】

1つの実施の形態では、本明細書に記載の修飾されたSDAB分子(例えば修飾されたSDAB分子を含有する組成物)は、被験体、例えばヒト被験体(例えばTNF関連障害を有する患者)に投与するのに適している。SDAB分子を注射(例えば皮下注射、血管注射、筋肉注射又は腹腔内注射)により又は吸入により被験体に投与することができる。

30

【0063】

或る特定の実施の形態では、修飾されたSDAB分子と第2の作用物質とを併せて、例えば同時に又は連続して投与する。1つの実施の形態では、修飾されたSDAB分子と第2の作用物質とを同じ組成物、例えば本明細書に記載の医薬組成物中で投与する。1つの実施の形態では、第2の作用物質は抗TNF抗体分子又はそのTNF結合断片であり、第2のTNF抗体は本明細書に記載のTNF結合型の修飾されたSDAB分子とは異なるエピトープと結合する。TNF結合型の修飾されたSDAB分子と同時に投与する又は同時に配合することができる第2の作用物質の他の非限定的な例としては、サイトカイン阻害剤、成長因子阻害剤、免疫抑制剤、抗炎症剤、代謝阻害剤、酵素阻害剤、細胞毒性薬、及び細胞増殖抑制薬が挙げられるが、それらに限定されない。一実施形態では、更なる作用物質は関節炎に標準的な治療薬(treatment)であり、これには非ステロイド系抗炎症剤(NSAID)；コルチコステロイド(プレドニゾロン、プレドニゾン、コルチゾン及びトリアムシノロンを含む)；及び疾患修飾性抗リウマチ剤(DMARD)、例えばメトトレキサート、ヒドロキシクロロキン(Plaquenil)及びスルファサラジン、レフルノミド(Arava(商標))、腫瘍壊死因子阻害剤(エタネルセプト(E

40

50

n b r e l ( 商 標 ) )、インフリキシマブ ( R e m i c a d e ( 商 標 ) ) (メトトレキサートを伴う又は伴わない)及びアダリムマブ ( H u m i r a ( 商 標 ) ) を含む)、抗 C D 20 抗体 ( 例 えば R i t u x a n ( 商 標 ) )、可溶性インターロイキン - 1 受容体、例 えば アナキンラ ( K i n e r e t ( 商 標 ) )、金、ミノサイクリン ( M i n o c i n ( 商 標 ) )、ペニシラミン、並びに細胞毒性薬 ( アザチオプリン、シクロホスファミド及びシクロスポリンを含む) が含まれるが、それらに限定されない。有益には、かかる併用療法では、投与する治療薬をより低い投与量で用いることができ、そのため様々な単剤療法に関連して起こり得る毒性又は合併症が避けられる。賦形剤及び / 又は第 2 の治療薬の代替的な組合せを本明細書で与えられる指示に従って特定し、試験することができる。

【 0 0 6 4 】

別の態様では、本発明は、修飾された S D A B 分子、例 えば本明細書に記載の修飾された S D A B 分子を評価する方法を特徴とする。本方法は、本明細書に記載の修飾された S D A B 分子を被験体、例 えばヒト被験体 ( 例 えば T N F 関連障害を有する患者) に投与することと、修飾された S D A B 分子の 1 つ又は複数の薬物動態 / 薬力学 ( P K / P D ) パラメータを評価することを含む。S D A B 分子を注射 ( 例 えば皮下注射、血管注射、筋肉注射又は腹腔内注射) により又は吸入により被験体に投与することができる。

【 0 0 6 5 】

関連の態様では、本発明は、修飾された S D A B 分子 ( 例 えば本明細書に記載の修飾された T N F 結合型の S D A B 分子) を評価する又は選択する方法を特徴とする。本方法は、

被験体、例 えばヒト被験体又は動物被験体において S D A B 分子の少なくとも 1 つの P K / P D パラメータに関する試験値、例 えば平均試験値を提示することと、提示されたその試験値、例 えば平均試験値を少なくとも 1 つの参照値と比較し、それにより S D A B 分子を評価する又は選択する、比較することと、を含む。

【 0 0 6 6 】

幾つかの実施の形態では、試験値を提示する工程は、S D A B 分子のサンプル、例 えば抗体細胞培養物のサンプルパッチを得ること、及び / 又は S D A B 分子の修飾後、本明細書に記載の薬物動態パラメータの少なくとも 1 つに関して試験することを含む。本明細書に開示される方法はプロセスの観点から、例 えばパッチ間の一貫性又は質をモニタリングする又は確保するのに有用であり得る。

【 0 0 6 7 】

或る特定の実施の形態では、修飾された S D A B 分子を評価する方法は、サンプル、例 えば修飾された S D A B 分子を含有するサンプルを準備することと、捕捉検出アッセイ、例 えばタンパク質検出アッセイ又は本明細書の実施例 1 1 b に記載の全分子検出アッセイでサンプルを試験することとを更に含む。1 つの実施の形態では、サンプルを固体支持体に固定化された標的 ( 例 えば結合型ストレプトアビジンと会合したビオチン化標的分子) に接触させ、結合した S D A B - 標的分子複合体を、修飾された S D A B 分子のタンパク質部分と結合する試薬、例 えば抗体を使用して検出する。かかるアッセイフォーマットでは、修飾された S D A B 分子のタンパク質部分が検出される。他の実施の形態では、サンプルを固体支持体に固定化された標的 ( 例 えば結合型ストレプトアビジンと会合したビオチン化標的分子) に接触させ、結合した S D A B - 標的分子複合体を、修飾された S D A B 分子のポリマー ( 例 えば P E G ) 部分と結合する試薬、例 えば抗体を使用して検出する。かかる実施の形態では、S D A B 分子のポリマー ( 例 えば P E G 化) 部分が検出される。ポリマー ( 例 えば P E G ) 部分の検出によって、修飾された S D A B - ポリマーコンジュゲート全体が捕捉されるのが好ましいが、これはコンジュゲートを形成していない ( u n c o n j u g a t e d ) S D A B 分子が検出されないためである。

【 0 0 6 8 】

本方法により評価される P K / P D パラメータは、修飾された S D A B 分子の i n v i v o 濃度 ( 例 えば血液、血清、血漿及び / 又は組織中の濃度) ; 修飾された S D A B 分

10

20

30

40

50

子のクリアランス (CL) ; 修飾されたSDAB分子の体積分布 ( $V_{dss}$  又は  $V_c$ ) ; 修飾されたSDAB分子の半減期 ( $t_{1/2}$ ) ; 修飾されたSDAB分子のバイオアベイラビリティ ; 修飾されたSDAB分子の最大血中濃度、最大血清濃度、最大血漿濃度、若しくは最大組織濃度 ; 修飾されたSDAB分子の曝露量 (exposure) ( $AUC =$  濃度時間曲線下面積) ; 修飾されたSDAB分子の組織対血清、組織対血漿、若しくは組織対血液のAUC比若しくは濃度比 ; 修飾されたSDAB分子の無処理 (intact) 生成物若しくは分解生成物の尿中濃度 ; 又は血清、血漿若しくは組織中の遊離型、結合型及び全体の標的濃度の1つ又は複数から選ぶことができる。

#### 【0069】

1つの実施の形態では、1つ又は複数のPK/PDパラメータを、修飾されたSDAB分子を被験体に投与した後に1つ、2つ、又はそれ以上の所定の時間間隔で評価する。1つの実施の形態では、修飾されたSDAB分子の少なくとも1つのPK/PDパラメータが、参照基準、例えば修飾されていないSDAB分子と比較して変化する、例えば改善する。例えば、修飾されたSDAB分子は、修飾されていないSDAB分子と比較して半減期及び/又はバイオアベイラビリティの増大 ; 異なる組織分布 (例えば異なる組織又は器官 (例えば小腸又は大腸) への局在) の1つ又は複数を有する。或る特定の実施の形態では、PK/PDパラメータは、治療に対する有効値又は適合性の評価基準を与えるのに用いられる。1つ又は複数の症状の改善、生活の質の改善、炎症性マーカーの低減を含むが、それらに限定されない有効性の他の測定を更に有効性の評価の一部として行うことができる。

10

20

#### 【0070】

幾つかの実施の形態では、1つ又は複数のPK/PDパラメータ、有効値、又は事前に選択された有効性基準を満たすかどうかの指標が、例えばコンピュータ可読媒体に記録される又は記憶される。かかる値又は事前に選択された有効性基準を満たす指標は、例えば商業的利用のために又は米国若しくは外国の規制当局に提出するために、製品説明書、公定書 (例えば米国薬局方)、又は流通させることができる任意の他の文書 (materials) 、例えばラベルに記載することができる。

#### 【0071】

別の態様では、本発明は、検出方法、又は捕捉検出アッセイ、例えば本明細書の実施例11bに記載のタンパク質検出アッセイ若しくは全分子検出アッセイを特徴とする。本方法又は本アッセイは、修飾されたSDAB分子を含有するサンプルを準備すること (例えばSDAB分子の投与後に被験体から得られるサンプルを得ること) と、サンプルを固体支持体に固定化された標的 (例えばTNF) (例えば結合型ストレプトアビジンと会合したビオチン化標的分子) に接触させることと、結合したSDAB-標的複合体を、修飾されたSDAB分子のタンパク質部分又はポリマー (例えばPEG) 部分と結合する試薬、例えば抗体を使用して検出することを含む。その試薬がSDAB分子のタンパク質部分と結合するアッセイフォーマットでは、修飾されたSDAB分子のタンパク質部分が検出される。その試薬が修飾されたSDAB分子のPEG部分と結合するアッセイフォーマットでは、SDAB分子のポリマー (例えばPEG化) 部分が検出される。PEG部分の検出によって、修飾されたSDAB-ポリマーコンジュゲート全体が捕捉されるのが好ましいが、これはコンジュゲートを形成していないSDAB分子が検出されないためである。

30

40

#### 【0072】

別の態様では、本発明は、SDAB分子又は本明細書に記載の組成物の入ったデバイス、シリンジ又はバイアルを含むキット又は製造物を特徴とする。キット又は製造物は任意で使用説明書を含んでもよい。或る特定の実施の形態では、シリンジ又はバイアルは、ガラス、プラスチック又はポリマー材料、例えば環状オレフィンポリマー又はコポリマーで構成される。他の実施の形態では、その配合物が注射用デバイス (例えば注射用シリンジ、例えば充填済み注射用シリンジ) 内に存在し得る。シリンジは個人による投与に、例えば自己注射器 (例えばペン型注射器デバイス) 及び/又は使用説明書を含む単回バイ

50

アルシステムとして適合し得る。1つの実施の形態では、注射用デバイスは、任意で使用及び投与の説明書を備える、充填済みペン型自己注射用デバイス又は他の好適な自己注射用デバイスである。

【0073】

或る特定の実施の形態では、注射（例えば皮下注射、血管注射、筋肉注射、関節内注射又は腹腔内注射）による投与（例えば自己投与）の説明書が事前にパッケージングされたキット又は製造物（例えば単回又は複数回の用量単位の充填済みペン型注射器又はシリンジ）を被験体、例えば患者又はヘルスケア提供者に与える。

【0074】

他の実施の形態では、本発明は本明細書に記載の配合物の鼻腔投与、経皮投与、静脈内投与用のデバイスを特徴とする。例えば、本明細書に記載の配合物の投与用の経皮パッチが提供される。更に他の場合では、本明細書に記載の配合物の投与用の静脈注射バッグが提供される。幾つかの実施の形態では、生理食塩水又は5%デキストロースの入った静脈注射バッグが提供される。

【0075】

別の態様では、本発明は、修飾されたSDAB分子、例えばTNF SDAB分子を必要とする患者（例えばヒト患者）に、本明細書に記載の修飾されたSDAB分子又は組成物をどのように投与するかを指示する方法を特徴とする。本方法は、(i)患者に本明細書に記載のSDAB分子の少なくとも1つの単位用量を与えることと、(ii)患者に例えば注射（例えば皮下注射、血管注射、筋肉注射又は腹腔内注射）によって少なくとも1つの単位用量を自己投与するように指示することを含む。1つの実施の形態では、患者はTNF 関連障害、例えば本明細書に記載の炎症性障害又は自己免疫障害を有する。

【0076】

別の態様では、本発明はレシピエントに本明細書に記載の修飾されたSDAB分子の投与を指示する方法を特徴とする。本方法は、レシピエント（例えばエンドユーザー、患者、医師、開業薬局若しくは薬卸売業者、販売業者、又は病院の院内薬局、養護施設の診療所、又はHMO）に配合物を患者にどのように投与するかを指示することを含む。

【0077】

別の態様では、本明細書に記載の修飾されたSDAB分子を流通させる方法が提供される。本方法は、患者を少なくとも6ヶ月、12ヶ月、24ヶ月又は36ヶ月治療するために、レシピエント（例えばエンドユーザー、患者、医師、開業薬局若しくは薬卸売業者、販売業者、又は病院の院内薬局、養護施設の診療所、又はHMO）に十分な単位投与量のSDAB分子が入ったパッケージを与えることを含む。

【0078】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載の修飾されたSDAB分子を含有する本明細書に記載の配合物のパッケージ又はパッケージのロットの質を（例えばパッケージの使用期限が切れているかどうかを判断するために）評価する方法又はプロセスを特徴とする。本方法はパッケージの使用期限が切れているか否かを評価することを含む。使用期限は、事前に選択された事象、例えば製造、検査又は包装から少なくとも6ヶ月、12ヶ月、24ヶ月、36ヶ月又は48ヶ月であり、例えば24ヶ月又は36ヶ月を超えるものである。幾つかの実施の形態では、分析の結果を受けて、決定を下すか又は手段を講じる、例えば製品の使用期限が切れているか否かに応じて、パッケージ中のSDAB分子を使用するか若しくは廃棄する、分別する(classified)、選別する(selected)、発売するか若しくは発売を控える、出荷する、新たな場所に移す、市場に出す、販売する、又は販売を計画する、市場から回収する、又は販売の計画を中止する。

【0079】

別の態様では、本発明は、規制上の要件、例えば規制当局、例えばFDAの承認後要件に準拠する方法を特徴とする。本方法は、本明細書に記載のように、パラメータに関する抗体配合物の評価を与えることを含む。承認後要件には、上記のパラメータの1つ又は複数の評価基準が含まれ得る。本方法は、任意で観察される溶液パラメータが事前に選択さ

10

20

30

40

50

れた基準を満たすか否か、又はパラメータが事前に選択された範囲内にあるかどうかを判断すること；任意で分析の値若しくは結果を記憶すること、又は例えばその値若しくは結果を規制当局に伝送することにより規制当局と連絡を取り合うことも任意で含む。

【0080】

別の態様では、本発明は、事前に選択された特性、例えば本明細書に記載の特性を有する、例えば販売規格、表示要件、又は公定書要件を満たす、修飾されたSDAB分子、例えばTNF SDAB分子のバッチを作製する方法を特徴とする。本方法は、修飾されたSDAB分子を含有する試験サンプルを準備することと、本明細書に記載の方法に従って試験サンプルを分析することと、試験配合物が、事前に選択された基準を満たす、例えば参照値、例えば本明細書で開示される1つ又は複数の参照値との事前に選択された関係性を有するか否かを決定することと、製品のバッチを作製するために試験サンプル調製物を選択することとを含む。

10

【0081】

別の態様では、本発明は、修飾されたSDAB分子、例えばTNF SDAB分子の配合物の複合バッチであって、各バッチに関する1つ又は複数のパラメータ（例えば、本明細書に記載の方法によって決定された値又は溶液パラメータ）が、事前に選択された所望の参照値又は基準、例えば本明細書に記載の範囲又は基準から、事前に選択された範囲よりも小さく変化する、配合物の複合バッチを特徴とする。幾つかの実施の形態では、配合物の1つ又は複数のバッチに関する1つ又は複数のパラメータを決定し、その決定を受けてバッチ（単数又は複数）を選択する。幾つかの実施の形態は、決定の結果を事前に選択された値又は基準、例えば参照基準と比較することを含む。他の実施の形態は、例えば値又はパラメータの決定の結果に基づき、投与するバッチの用量を調整することを含む。

20

【0082】

本明細書に言及される特許公報、特許出願、特許及び他の参考文献は、引用することによりその全体が本明細書の一部をなす。

【0083】

他に特に規定がなければ、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載の方法及び材料と類似の又は同等の方法及び材料を本発明の実施又は試験において使用することができるが、好適な方法及び材料を以下に記載する。加えて、材料、方法及び実施例は例示的なものにすぎず、限定を意図するものではない。

30

【0084】

本発明の他の特徴及び利点は詳細な説明、図面及び特許請求の範囲から明らかとなる。

【図面の簡単な説明】

【0085】

【図1】SDAB-01のアミノ酸配列（配列番号1）を示す図である。太字のCDRは単一抗原結合ドメイン構成要素に相当し、それぞれが配列番号1のアミノ酸1～115のアミノ酸配列を有する。フレキシブルリンカーは小文字で示されている。部位特定的なPEG化を支持する改変C末端システインも太字で示している。

【図2】SDAB-01分子に用いられるポリエチレングリコール（PEG）（分子量40000、2×20kDa）を示す図である。PEG活性化基はマレイミドである。

40

【図3】SDAB-01の概略図である。

【図4】Aは直鎖mPEG-マレイミド（対照2）及び2つの分岐mPEG-マレイミド（[配列番号1]-PEG40及びSDAB-01）の構造を示している。BはSDAB-01及び[配列番号1]-PEG40のサイズを比較したスキャン図である。

【図5】膜結合型のTNFを発現するCHO-TNF-D13（pW2128）細胞上でのSDAB-01の細胞表面染色のFACS（「蛍光活性化細胞分類」）スキャン図である。細胞をSDAB-01、ビオチン化抗PEG及びストレプトアビジン-PEで順番に染色し（灰色の領域）、又はストレプトアビジン-PEで偽染色した（白色の領域）。

【図6】ヒトTNF又はアカゲザルTNFを用いた細胞毒性アッセイにおける非PE

50

G化SDABポリペプチドの対照3及び対照4と比較したSDAB-01の用量応答曲線を示す図である。

【図7】SDAB-01に対するTNF結合曲線を示す図である。0.195 nM ~ 100 nMの範囲の様々な濃度の(a)ヒト、(b)アカゲザル(rhesus macaque)、(c)ラット及び(d)マウスのTNF、並びに(e)0.195 nM ~ 400 nMの範囲のウサギTNFを固定化したSDAB-01に対して注入した。それぞれのデータ集合は少なくとも2回の独立した実験を代表するものである。

【図8】実験1におけるネズミ気嚢モデルでの総白血球浸潤に対するSDAB-01の効果を示すグラフである。

【図9】実験1におけるネズミ気嚢モデルでの好中球浸潤に対するSDAB-01の効果を示すグラフである。

【図10】実験2におけるネズミ気嚢モデルでの総白血球浸潤に対するSDAB-01の効果を示すグラフである。

【図11】実験2におけるネズミ気嚢モデルでの好中球浸潤に対するSDAB-01の効果を示すグラフである。

【図12】実験3におけるネズミ気嚢モデルでの総白血球浸潤に対するSDAB-01の効果を示すグラフである。

【図13】実験3におけるネズミ気嚢モデルでの好中球浸潤に対するSDAB-01の効果を示すグラフである。

【図14】10 mg/kg、3 mg/kg、1 mg/kg、0.3 mg/kg、0.1 mg/kgのSDAB-01、1 mg/kgの対照SDAB、10 mg/kg及び3 mg/kgのインフリキシマブ、10 mg/kgの対照抗体、又は10 ml/kgのビヒクルによる処理を1週間に2回受けた動物での週ごとの体重を示すグラフである。

【図15】10 mg/kg、3 mg/kg、1 mg/kg、0.3 mg/kg、0.1 mg/kgのSDAB-01、1 mg/kgの対照SDAB、10 mg/kg及び3 mg/kgのインフリキシマブ、10 mg/kgの対照抗体、又は10 ml/kgのビヒクルによる処理を1週間に2回受けた動物での週ごとの平均疾患重症度スコアを示すグラフである。

【図16】10 mg/kg、3 mg/kg、1 mg/kg、0.3 mg/kg、0.1 mg/kgのSDAB-01、1 mg/kgの対照SDAB、10 mg/kg及び3 mg/kgのインフリキシマブ、10 mg/kgの対照抗体、又は10 ml/kgのビヒクルを1週間に2回投与した動物での処理後7週目の疾患重症度を示すグラフである。

【図17】10 mg/kg、3 mg/kg、1 mg/kg、0.3 mg/kg、0.1 mg/kgのSDAB-01、1 mg/kgの対照SDAB、10 mg/kg及び3 mg/kgのインフリキシマブ、10 mg/kgの対照抗体、又は10 ml/kgのビヒクルを1週間に2回投与した動物での処理後7週目の顕微鏡を用いた群平均重症度スコアを示すグラフである。

【図18】10 mg/kg、3 mg/kg、1 mg/kg、0.3 mg/kg、0.1 mg/kgのSDAB-01、1 mg/kgの対照SDAB、10 mg/kg及び3 mg/kgのインフリキシマブ、10 mg/kgの対照抗体、又は10 ml/kgのビヒクルを1週間に2回投与した動物での処理後7週目の顕微鏡を用いた群平均重症度スコアと疾患重症度スコアとの比較を示すグラフである。

【図19】10 mg/kg、3 mg/kg、1 mg/kg、0.3 mg/kg、0.1 mg/kg、0.03 mg/kgのSDAB-01、1 mg/kgの対照SDAB、10 mg/kg及び3 mg/kgのインフリキシマブ、10 mg/kgの対照抗体、又は10 ml/kgのビヒクルによる処理を1週間に2回受けた動物での週ごとの体重を示すグラフである。

【図20】10 mg/kg、3 mg/kg、1 mg/kg、0.3 mg/kg、0.1 mg/kg、0.03 mg/kgのSDAB-01、1 mg/kgの対照SDAB、10 mg/kg及び3 mg/kgのインフリキシマブ、10 mg/kgの対照抗体、又は10 m

10

20

30

40

50

1 / k g のビヒクルによる処理を 1 週間に 2 回受けた動物での週ごとの平均疾患重症度スコアを示すグラフである。

【図 2 1】10 mg / k g、3 mg / k g、1 mg / k g、0.3 mg / k g、0.1 mg / k g、0.03 mg / k g の S D A B - 0 1、1 mg / k g の対照 S D A B、10 mg / k g 及び 3 mg / k g のインフリキシマブ、10 mg / k g の対照抗体、又は 10 ml / k g のビヒクルを 1 週間に 2 回投与した動物での処理後 7 週目の疾患重症度スコアを示すグラフである。

【図 2 2】10 mg / k g、3 mg / k g、1 mg / k g、0.3 mg / k g、0.1 mg / k g、0.03 mg / k g の S D A B - 0 1、1 mg / k g の対照 S D A B、10 mg / k g 及び 3 mg / k g のインフリキシマブ、10 mg / k g の対照抗体、又は 10 ml / k g のビヒクルによる 1 週間に 2 回の処理後の顕微鏡を用いた群平均重症度スコアを示すグラフである。

【図 2 3】10 mg / k g、3 mg / k g、1 mg / k g、0.3 mg / k g、0.1 mg / k g、0.03 mg / k g の S D A B - 0 1、1 mg / k g の対照 S D A B、10 mg / k g 及び 3 mg / k g のインフリキシマブ、10 mg / k g の対照抗体、又は 10 ml / k g のビヒクルを 1 週間に 2 回投与した動物での処理後 7 週目の顕微鏡を用いた群平均重症度スコアと疾患重症度スコアとの比較を示すグラフである。

【図 2 4】雄のカニクイザルにおける 3 mg / k g の単回 I V 投与又は単回 S C 投与後の S D A B - 0 1 の血清濃度 - 時間プロファイルの平均 ( ± S D ) を示すグラフである。

【図 2 5】マウス、ラット又はカニクイザルへの単回 I V 投与後の P E G 化 T N F S D A B ポリペプチドの用量で正規化した血清濃度の平均 ( ± S D ) を示すグラフである。T N F S D A B ポリペプチド 2 × 20 k D a P E G (黒丸)、T N F S D A B ポリペプチド 4 × 10 k D a P E G (白丸)、又は T N F S D A B ポリペプチド 1 × 40 k D a P E G (黒三角) を単回 I V ボーラス投与で B 6 C B A F 1 / J マウス ( A ; 2 × 20 k D a P E G コンジュゲートでは 2 mg / k g 及び他の 2 つのコンジュゲートでは 3 mg / k g )、スプラーグドローラット ( B ; 2 mg / k g )、又はカニクイザル ( C ; 3 mg / k g ) に投与した。マウス及びサルは P K 研究では ( A 及び C )、非標識試験物質を使用し、ラット P K 研究では ( B )、<sup>125</sup>I で標識した試験物質を使用した。単発サンプリングをマウスに用い ( 1 つの時点当たり n = 3 )、逐次サンプリングをラット ( 1 つの化合物当たり n = 5 ~ 7 ) 及びサル ( 1 つの化合物当たり n = 3 ) に用いた。血清濃度を特定の免疫測定法 ( マウス及びサル、ng / mL 単位で ) 又はガンマ線計測 ( ラット、ng × 当量 / mL 単位で ) により決定した。その寿命はマウス、ラット及びサルでそれぞれ、14 日、24 日及び 56 日 ~ 62 日であった。定量限界 ( L O Q ) を下回る個々の動物の濃度の値を平均及び S D の算出のためにゼロとして扱った。データはそれぞれの時点の ( すなわち 1 mg / k g 用量での ) 用量で正規化した濃度の平均 ( ± S D ) を示している。0 ng / mL の ( すなわち全ての動物で L O Q を下回る ) 平均血清濃度のデータ点是对数目盛に示していない。

【図 2 6】マウスへの 0.3 mg / k g の単回 I V 投与後の <sup>125</sup>I で標識した P E G 化 T N F S D A B ポリペプチドの平均組織曝露量及び平均血清曝露量 ( A U C 0 ~ 168 h r ) を示すグラフである。B 6 C B A F 1 / J マウスに、<sup>125</sup>I で標識した T N F S D A B 分子の分岐 2 × 20 k D a P E G ( 黒色のバー ) 又は T N F S D A B 分子の直鎖 40 k D a P E G ( 灰色のバー ) を 0.3 mg / k g の単回 I V ボーラス投与で投与した。血清サンプル及び組織サンプル ( 1 つの時点当たり n = 8 ~ 12 ) を 7 日間 ( 168 時間 ) にわたって回収し、組織及び血清中の放射性当量 ( R E ) 濃度をガンマ線計測により決定した。血清 ( µ g × 当量 / mL 単位で ) 及びそれぞれの組織 ( µ g × 当量 / g 単位で ) 中の A U C 0 ~ 168 h r ( 時間 0 ~ 168 時間の濃度時間曲線下面積 ) を、スパーサンプリング方法を用いた非コンパートメント分析によって決定し、95% 信頼区間 ( 95% C I、グラフ上の誤差バー ) を、平均の標準誤差を用いて算出した。アステリスク ( \* ) は 2 つの構築物間での A U C 0 ~ 168 h r の統計的に有意な差異を示している ( p < 0.05 ) 。

10

20

30

40

50

【図27】PEG化TNF S D A Bポリペプチドのカチオン交換高速液体クロマトグラフィ ( C E X - H P L C ) プロファイルを示すグラフである。それぞれの材料のタンパク質濃度を、配合バッファーを用いて 1.0 mg / mL に調整し、10  $\mu$  L を D i o n e x P r o P a c W C X - 10 カラムに注入した。移動相 A は 10 mM のギ酸アンモニウム ( p H 4.0 ) であった。移動相 B は 10 mM のギ酸アンモニウム、500 mM の塩化ナトリウム ( p H 4.0 ) であった。タンパク質コンジュゲートを 0.75 mL / 分の流速で塩化ナトリウムの線形勾配 ( B を 40 分で 0 % から 40 % ) を用いて溶出した。280 nm での吸光度をモニタリングした。

【図28】PEG化TNF S D A Bポリペプチドのマルチアングル光散乱によるサイズ排除高速液体クロマトグラフィ ( S E C - M A L S ) プロファイルを示すグラフである。TNF S D A Bポリペプチド 2 x 20 k D a P E G ( 破線 )、TNF S D A Bポリペプチド 4 x 10 k D a P E G ( 点線 )、又は TNF S D A Bポリペプチド 1 x 40 k D a P E G ( 実線 ) を 2.0 mg / mL に希釈し、それぞれのサンプルを 100  $\mu$  L、30 に保持した Superose 6 移動相カラムに注入した。保持時間 ( 線図 )、総質量 ( 黒丸 )、PEG 質量 ( 白三角 ) 及びタンパク質量 ( x ) を、Wyatt Technologies の A S T R A V v 5.3.4.14 を用いて決定した。

【図29】流体力学半径 ( R h ) 及び二乗平均平方根半径 ( R M S 又は R g ) の決定を示すグラフである。TNF S D A Bポリペプチド 2 x 20 k D a P E G ( 破線及び白四角 )、TNF S D A Bポリペプチド 4 x 10 k D a P E G ( 緑色の線及び記号 )、又は TNF S D A Bポリペプチド 1 x 40 k D a P E G ( 点線及び白三角 ) を 2.0 mg / mL に希釈し、それぞれのサンプルを 100  $\mu$  L、30 に保持した Superose 6 移動相カラムに注入した。保持時間 ( 実線及び黒丸 )、R h ( A ) 及び R M S ( B ) の分析を、Wyatt Technologies の A S T R A V v 5.3.4.14 を用いて行った。

【図30】標的として C S F E で標識した C H O - T N F D 13 ( p W 2128 ) 細胞、及びエフェクターとしてヒトNK細胞を用いて、S D A B - 01 の A D C C 活性と比較した、対照1、対照2、対照3、及び対照 I g G 1 抗体の A D C C 活性を示すグラフである。A D C C 活性 ( % ) の値は 7 A A D + である標的細胞の % として算出される。プロットした値は、試験薬を用いた 7 A A D + 標的細胞 ( % ) からエフェクター細胞のみの存在下での 7 A A D + 標的細胞 ( % ) を減算したものである。このプロットは実施した4つの個々の A D C C アッセイを代表するものであり、S D A B - 01 には A D C C 活性がないことを実証していた。

【図31】i n v i t r o での仔ウサギ補体の存在下における C H O - T N F - D 13 ( p W 2128 ) 株に対する S D A B - 01 の C D C 活性と比較した、対照1、対照2、対照3、及び対照 I g G 1 抗体の C D C 活性を示すグラフである。細胞毒性を死滅細胞による 7 A A D の取込みにより評価し、プロットした値は、補体のみの存在下での 7 A A D + 細胞の % から試験薬及び対照を用いた 7 A A D + 細胞の % を減算したものである。サンプルをアダリムマブ、インフリキシマブ及び S D A B - 01 に対して二重で作製した。このプロットは、実施した3つの個々のアッセイを代表するものであり、S D A B - 01 には C D C 活性がないことを実証していた。

【発明を実施するための形態】

【0086】

本発明は、修飾された単一ドメイン抗原結合分子 ( 本明細書では「S D A B 分子」とも称される ) に関する。修飾された S D A B 分子は、1つ又は複数の標的と相互作用する、例えば1つ又は複数の標的に結合する1つ又は複数の単一抗原結合ドメインを含み得る。一実施形態では、修飾された S D A B 分子の単一抗原結合ドメインの1つ又は複数が腫瘍壊死因子 - ( T N F ) に結合する。S D A B 分子は、i n v i v o でのその生物学的特性を増大するように修飾することができる。例えば、S D A B 分子は、修飾されていない S D A B 分子と比較して半減期の増大、免疫原性の低減、又は少なくとも1つの薬物動態 / 薬力学 ( P K / P D ) パラメータの改善の1つ又は複数が改善するように修飾する

10

20

30

40

50

ことができる。一実施形態では、修飾されたS D A B分子には、1つ又は複数のポリマー分子、例えばポリ(エチレングリコール)(PEG)又はその誘導体が含まれる。修飾されたS D A B分子は、例えば被験体、例えばヒトへの投与に有用である。TNF 関連障害を治療する又は予防するための修飾されたS D A B分子を調製する及び使用方法も開示されている。

【0087】

本発明をより容易に理解するために、初めに或る特定の用語を定義する。更なる定義は発明を実施するための形態にわたって説明される。

【0088】

本明細書に使用される場合、不定冠詞(the articles "a" and "an")は冠詞の文法上の対象物が1つ又は2つ以上(例えば少なくとも1つ)であることを指す。

【0089】

「又は(若しくは)」という用語は、文脈上、他にはっきりと示されていなければ、本明細書では「及び/又は」という用語を意味するのに用いられ、その用語と区別なく用いられる。

【0090】

「タンパク質」及び「ポリペプチド」という用語は、本明細書では区別なく用いられる。

【0091】

「約」及び「およそ」は一般的に、測定の本質又は正確性を前提として、測定される量に対して許容可能な程度の誤差を意味するものとする。誤差の程度の例は、与えられる値又は値の範囲の20パーセント(%)以内、典型的には10%以内、より典型的には5%以内である。

【0092】

ヌクレオチド配列に関連して、「実質的に同一な」という用語は、第1のヌクレオチド配列と第2のヌクレオチド配列とが共通の機能活性を有するポリペプチドをコードするか、又は共通の構造的ポリペプチドドメイン若しくは共通の機能性ポリペプチド活性をコードするように、第2の核酸配列にアラインしたヌクレオチドと同一のヌクレオチドを十分な又は最低限の数含有する第1の核酸配列、例えば参照配列に対して少なくとも約85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するヌクレオチド配列を表すのに本明細書で用いられる。

【0093】

また本発明のポリペプチドには、上述のポリペプチドの断片、誘導体、類似体又は変異体、及びそれらの任意の組合せも含まれる。本発明のタンパク質に言及する場合、「断片」、「変異体」、「誘導体」及び「類似体」という用語は、対応する天然の抗体又はポリペプチドの機能特性の少なくとも一部を保持する任意のポリペプチドを含む。本発明のポリペプチドの断片には、タンパク質分解断片及び欠失断片に加えて、本明細書の他の箇所でも述べられている特異的な抗体断片も含まれる。本発明のポリペプチドの変異体には、上記の断片の他に、アミノ酸の置換、欠失又は挿入によりアミノ酸配列が変化したポリペプチドも含まれる。変異体は自然発生的であっても、又は自然発生的でなくてもよい。自然発生的ではない変異体は当該技術分野で既知の突然変異誘発技法を用いて生成することができる。変異体ポリペプチドは、保存的な又は非保存的なアミノ酸の置換、欠失又は付加を含み得る。本発明の断片の誘導体は、天然ポリペプチドには見られない更なる特徴を示すように変化しているポリペプチドである。例としては融合タンパク質が挙げられる。変異体ポリペプチドは、本明細書では「ポリペプチド類似体」とも表すことができる。本明細書に使用される場合、ポリペプチドの「誘導体」は機能的側基の反応により化学的に誘導体化された1つ又は複数の残基を有する主題となるポリペプチドを表す。「誘導体」には、20種の標準アミノ酸の1つ又は複数の自然発生的なアミノ酸誘導体を含むそれらのポリペプチドも含まれる。例えば、プロリンを4-ヒドロキシプロリンに置換することができ、リシンを5-ヒドロキシリシンに置換することができ、ヒスチジンを3-メチ

10

20

30

40

50

ルヒスチジンに置換することができ、セリンをホモセリンに置換することができ、リシンをオルニチンに置換することができる。

【0094】

「機能的変異体」という用語は、自然発生的な配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有する、又は実質的に同一のヌクレオチド配列でコードされ、自然発生的な配列の1つ又は複数の活性を有することが可能なポリペプチドを指す。

【0095】

配列間の相同性又は配列同一性（それらの用語は本明細書では区別なく用いられる）の算出は以下のとおりに行われる。

【0096】

2つのアミノ酸配列又は2つの核酸配列の同一性（パーセント）を決定するために、それらの配列を最適比較目的でアライメントする（例えばギャップを最適アラインメントのために第1のアミノ酸配列又は核酸配列及び第2のアミノ酸配列又は核酸配列の片方又は両方に導入することができ、非相同配列は比較目的のために無視することができる）。典型的な実施形態では、比較目的でアラインメントされた参照配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%若しくは60%、又は少なくとも70%、80%、90%、又は100%である。それから、対応するアミノ酸位置又はヌクレオチド位置でのアミノ酸残基又はヌクレオチドを比較する。第1の配列の位置が第2の配列の対応する位置と同じアミノ酸残基又はヌクレオチドに占有される場合、それらの分子はその位置では同一である（本明細書で使用される場合、アミノ酸又は核酸の「同一性」はアミノ酸又は核酸の「相同性」と同等である）。

【0097】

2つの配列間の同一性（パーセント）は、2つの配列の最適なアラインメントのために導入される必要がある、ギャップの数及び各ギャップの長さを考慮して、それらの配列が共有する同一の位置の数に応じたものである。

【0098】

配列の比較及び2つの配列間の同一性（パーセント）の決定を、数学アルゴリズムを用いて達成することができる。一実施形態では、2つのアミノ酸配列間の同一性（パーセント）は、B l o s s u m 62マトリクス又はP A M 2 5 0マトリクスのいずれかと、16、14、12、10、8、6又は4のギャップウェイトと、1、2、3、4、5又は6のレングスウェイトとを用いて、G C Gソフトウェアパッケージ（www.gcg.comで入手可能）においてG A Pプログラムに組み込まれているNeedleman and Wunsch（1970）J. Mol. Biol. 48:444-453）アルゴリズムを使用して決定される。更に別の実施形態では、2つのヌクレオチド配列間の同一性（パーセント）は、N W S g a p d n a . C M Pマトリクスと、40、50、60、70又は80のギャップウェイトと、1、2、3、4、5又は6のレングスウェイトとを用いて、G C Gソフトウェアパッケージ（www.gcg.comで入手可能）においてG A Pプログラムを使用して決定される。典型的なパラメータ集合の1つ（他に特に規定がない場合に使用するもの）は、12のギャップペナルティと、4のギャップ伸長（extend）ペナルティと、5のフレームシフトギャップペナルティとを用いるB l o s s u m 62である。

【0099】

2つのアミノ酸配列又はヌクレオチド配列間の同一性（パーセント）を、P A M 1 2 0 weight residue tableと、12のギャップ長ペナルティと、4のギャップペナルティとを用いてA L I G Nプログラム（バージョン2.0）に組み込まれているE. Meyers and W. Miller（1989）CABIOS, 4: 11-17）のアルゴリズムを使用して決定することができる。

【0100】

本明細書に記載の核酸配列及びタンパク質配列を、公開データベースの検索を行い、例えば他のファミリー成員又は関連配列を同定するための「クエリ配列」として使用することができる。かかる検索を、Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10のN B

10

20

30

40

50

LASTプログラム及びXBLASTプログラム(バージョン2.0)を用いて行うことができる。BLASTヌクレオチド検索を、NBLASTプログラム、スコア=100、ワード長=12で行い、本発明で特徴付けられる核酸分子に相同なヌクレオチド配列を得ることができる。BLASTタンパク質検索を、XBLASTプログラム、スコア=50、ワード長=3で行い、本発明で特徴付けられるタンパク質(配列番号1)分子に相同なアミノ酸配列を得ることができる。比較目的のためのギャップド(gapped)アラインメントを得るために、ギャップドBLASTを、Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402に記載のように利用することができる。BLASTプログラム及びギャップドBLASTプログラムを利用する場合、各プログラム(例えば、XBLAST及びNBLAST)のデフォルトパラメータを使用することができる。

10

#### 【0101】

「保存的アミノ酸置換」はアミノ酸残基を類似の側鎖を有するアミノ酸残基へと置き換えるものである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当該技術分野で規定されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖を有するアミノ酸(例えばリシン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖を有するアミノ酸(例えばアスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電極性側鎖を有するアミノ酸(例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン)、非極性側鎖を有するアミノ酸(例えばアラニン、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、メチオニン、トリプトファン)、分岐側鎖を有するアミノ酸(例えばトレオニン、バリン、イソロイシン)、及び芳香族側鎖を有するアミノ酸(例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)が含まれる。

20

#### 【0102】

本発明の様々な態様を以下で更に詳細に記載する。

#### 【0103】

単一ドメイン抗原結合(SDAB)分子

単一ドメイン抗原結合(SDAB)分子には、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分子が含まれる。例としては、重鎖可変ドメイン、自然状態で軽鎖を欠いた結合分子、ナノボディ(商標)、従来の四鎖抗体から誘導される単一ドメイン、改変ドメイン、及び抗体から誘導されるもの以外の単一ドメインスカフォールドが挙げられるが、それらに限定されない。SDAB分子は当該技術分野のものいづれであっても、又は任意の将来の単一ドメイン分子であってもよい。SDAB分子は、マウス、ヒト、ラクダ、ラマ、魚類、サメ、ヤギ、ウサギ及びウシを含むが、それらに限定されない任意の種から誘導することができる。この用語には、ラクダ科動物及びサメ以外の種由来の自然発生的な単一ドメイン抗体分子も含まれる。

30

#### 【0104】

一態様では、SDAB分子は、例えばサメの血清中で見られる新規抗原受容体(NAR)として知られる免疫グロブリンアイソタイプから誘導されるように、魚類で見られる免疫グロブリンの可変領域から誘導することができる。NARの可変領域から誘導される単一ドメイン分子(「IgNAR」)を作製する方法が、国際公開第03/014161号及びStreltsov (2005) Protein Sci. 14:2901-2909に記載されている。

40

#### 【0105】

別の態様によれば、SDAB分子は、軽鎖を欠いた重鎖として知られる自然発生的な単一ドメイン抗原結合分子である。かかる単一ドメイン分子は、例えば国際公開第9404678号及びHamers-Casterman, C. et al. (1993) Nature 363:446-448に開示されている。明確にするために、軽鎖を自然状態で欠いた、重鎖分子から誘導されるこの可変ドメインは、本明細書ではVHH又はナノボディ(商標)として知られ、四鎖免疫グロブリンの従来のVHとは区別する。かかるVHH分子は、ラクダ科動物種、例えばラクダ、ラマ、ヒトコブラクダ、アルカパ及びグアナコのラクダ科動物種から誘導することができる。ラクダ科動物以外の他の種で、自然状態で軽鎖を欠いた重鎖分子を作製することができ、かかるVHHは本発明の範囲内にある。

50

## 【0106】

S D A B分子は、以下でより詳細に記載されるように、組換え型、C D Rグラフト化、ヒト化、ラクダ化、脱免疫化、及び/又は *in vitro* で生成した(例えばファージディスプレイによって選択された)ものであり得る。

## 【0107】

「抗原結合」という用語は、標的抗原又はそのエピトープに結合する界面を形成する決定基を含むポリペプチドの一部、例えば本明細書に記載の単ドメイン分子を含むことが意図される。タンパク質(又はタンパク質模倣体)に関連して、抗原結合部位は典型的には、標的抗原に結合する界面を形成する1つ又は複数のループ(少なくとも4つのアミノ酸又はアミノ酸模倣体の1つ又は複数のループ)を含む。典型的には、ポリペプチドの抗原結合部位、例えば単ドメイン抗体分子は、少なくとも1つ若しくは2つのC D R、又はより典型的には少なくとも3つ、4つ、5つ若しくは6つのC D Rを含む。

10

## 【0108】

「免疫グロブリン可変ドメイン」という用語は、ヒト又は動物起源のV Lドメイン又はV Hドメインに同一である又は実質的に同一であるとして当該技術分野で理解されることが多い。免疫グロブリン可変ドメインを或る特定の種、例えばサメ及びラマで展開させ、ヒト又は哺乳動物のV L又はV Hとはアミノ酸配列が異なるものにすることができると認識されている。しかしながら、これらのドメインは主に抗原結合にかかわるものである。「免疫グロブリン可変ドメイン」という用語は典型的に、少なくとも1つ若しくは2つのC D R、又はより典型的には少なくとも3つのC D Rを含む。

20

## 【0109】

「定常免疫グロブリンドメイン」又は「定常領域」は、ヒト又は動物起源のドメインであるC L、C H 1、C H 2、C H 3又はC H 4と同一の又は実質的に類似の免疫グロブリンドメインを含むことが意図される。例えば Charles A Hasemann and J. Donald Capra, *Immunoglobulins: Structure and Function*, in William E. Paul, ed., *Fundamental Immunology*, Second Edition, 209, 210-218 (1989)を参照されたい。「Fc領域」という用語は、免疫グロブリンドメインC H 2及びC H 3を含む定常免疫グロブリンドメイン、又はそれらと実質的に類似の免疫グロブリンドメインのFc部分を指す。

## 【0110】

或る特定の実施形態では、S D A B分子は、一価又は多重特異性分子(例えば二価分子、三価分子又は四価分子)である。他の実施形態では、S D A B分子は、単一特異性分子、二重特異性分子、三重特異性分子又は四重特異性分子である。分子が「単一特異性」又は「多重特異性」、例えば「二重特異性」であるかどうかは、結合ポリペプチドが反応する異なるエピトープの数を表す。多重特異性分子は、本明細書に記載の標的ポリペプチドの異なるエピトープに特異的であり得るか、又は標的ポリペプチドに加えて、異種エピトープ、例えば異種ポリペプチド又は固体支持体材料にも特異的であり得る。

30

## 【0111】

本明細書に使用される場合、「価数」という用語は、S D A B分子に存在する可能性のある結合ドメイン、例えば抗原結合ドメインの数を指す。それぞれの結合ドメインが1つのエピトープと特異的に結合する。S D A B分子が2つ以上の結合ドメインを含み、それぞれの結合ドメインが同じエピトープと特異的に結合する場合、2つの結合ドメインを有する抗体に対しては「二価単一特異性」と称し、又はそれぞれの結合ドメインが異なるエピトープと特異的に結合する場合、2つの結合ドメインを有するS D A B分子に対しては「二価二重特異性」と称する。S D A B分子は二重特異性であり、それぞれの特異性に対して二価でもあり得る(「二重特異性四価分子」と称する)。二重特異性二価分子及びそれらを作製する方法は、例えば米国特許第5,731,168号、同第5,807,706号、同第5,821,333号、並びに米国特許出願公開第2003/020734号及び同第2002/0155537号(それら全ての開示は引用することにより本明細書の一部をなす)に記載されている。二重特異性四価分子及びそれらを作製する方法は、例えば国際公開第02/096948号及び国際公開第00/44788号(それらの開示

40

50

は引用することにより本明細書の一部をなす)に記載されている。一般的には、PCT国際公開第93/17715号、国際公開第92/08802号、国際公開第91/00360号、国際公開第92/05793号、Tutt et al., J. Immunol. 147:60-69 (1991)、米国特許第4,474,893号、同第4,714,681号、同第4,925,648号、同第5,573,920号、同第5,601,819号、Kostelny et al., J. Immunol. 148:1547-1553 (1992)を参照されたい。

#### 【0112】

或る特定の実施形態では、SDAB分子は、相補性可変ドメイン、又は1つ若しくは複数の標的抗原に結合する免疫グロブリン定常(例えばFc)領域を欠いた1つ又は複数の単一ドメイン分子を含む一本鎖融合ポリペプチドである。抗原結合ポリペプチドで認識される標的抗原の例としては腫瘍壊死因子(TNF)が挙げられる。或る特定の実施形態では、抗原結合単一ドメイン分子は、そのドメインをPEG、例えば分岐PEG分子と会合させる、例えば共有結合的に付着させることにより修飾される。

10

#### 【0113】

##### TNF

腫瘍壊死因子アルファは、関節リウマチ、クローン病、潰瘍性大腸炎及び多発性硬化症等の炎症性障害に関連することが当該技術分野で知られている。TNF及び受容体(CD120a及びCD120b)の両方が極めて詳細に研究されている。TNFはその生物学的活性形態では三量体である。抗TNF抗体を用いてTNFの作用に拮抗するという戦略が幾つか開発されており、Remicade(商標)及びHumira(商標)等が現在市販されている。TNFに対する抗体分子が知られている。TNF結合型の単一ドメイン抗原結合分子の多くの例が、国際公開第2004/041862号、国際公開第2004/041865号、国際公開第2006/122786号(その内容の全体が引用することにより本明細書の一部をなす)に開示されている。単一ドメイン抗原結合分子の更なる例が、米国特許出願公開第2006/286066号、米国特許出願公開第2008/0260757号、国際公開第06/003388号、米国特許出願公開第05/0271663号、米国特許出願公開第06/0106203号(その内容の全体が引用することにより本明細書の一部をなす)に開示されている。他の実施形態では、TNFに対する単一特異性、二重特異性、三重特異性及び他の多重特異性の単一ドメイン抗体及びPEGである。

20

30

#### 【0114】

本明細書に使用される場合、「TNF」、「TNF」及び「TNF-アルファ」という用語は区別なく用いられ、同じ意味を有する。

#### 【0115】

特定の実施形態では、TNF結合型のSDAB分子は、本明細書の表11及び国際公開第2006/122786号に開示されたSDAB分子を1つ又は複数含む。例えば、TNF結合型のSDAB分子は、国際公開第2006/122786号に開示された一価、二価、又は三価のTNF結合型のSDAB分子であり得る。TNF結合型のSDAB分子の例としては、TNF1、TNF2、TNF3、それらのヒト化型(例えばTNF29、TNF30、TNF31、TNF32、TNF33)が挙げられるが、それらに限定されない。一価のTNF結合型のSDAB分子の更なる例は国際公開第2006/122786号の表8に開示されている。二価のTNF結合型のSDAB分子の例としては、ペプチドリンカーを介して連結し、単一の融合ポリペプチドを形成する2つのTNF30SDAB分子を含み、TNF55及びTNF56が挙げられる(国際公開第2006/122786号に開示される)が、それらに限定されない。二価のTNF結合型のSDAB分子の更なる例は、国際公開第2006/122786号の表19に、TNF4、TNF5、TNF6、TNF7、TNF8)として開示されている。

40

#### 【0116】

他の実施形態では、SDAB分子の単一抗原結合ドメインの2つ以上が、連結基を用いて又は連結基を用いずに、遺伝子融合体又はポリペプチド融合体として融合する。連結基

50

は当業者にとって明らかな任意の連結基であり得る。例えば、連結基は1個～100個の原子の長さの生体適合性ポリマーであり得る。一実施形態では、連結基は、ポリグリシン残基、ポリセリン残基、ポリリシン残基、ポリグルタミン酸残基、ポリイソロイシン残基若しくはポリアルギニン残基、又はそれらの組合せを含むか、又はそれらからなる。例えば、ポリグリシンリンカー又はポリセリンリンカーには、少なくとも5個、7個、8個、9個、10個、12個、15個、20個、30個、35個及び40個のグリシン残基及びセリン残基が含まれ得る。使用することができるリンカーの例としては、1回、2回、3回、4回、5回、6回、7回又はそれ以上の反復を有するGly-Ser反復、例えば(Gly)<sub>4</sub>-Ser(配列番号8)反復が挙げられる。幾つかの実施形態では、リンカーは以下の配列を有する：(Gly)<sub>4</sub>-Ser-(Gly)<sub>3</sub>-Ser(配列番号9)又は((Gly)<sub>4</sub>-Ser)<sub>n</sub>(配列番号10)(ここでnは4、5又は6である)。

10

## 【0117】

1つの例示的な実施形態では、標的抗原、例えば腫瘍壊死因子アルファ(TNF)に結合する2つの単ドメイン抗体分子(例えば2つのラクダ科動物可変領域)の一本鎖ポリペプチド融合体、及び分岐PEG分子から構成される抗原結合ポリペプチドは、トランスジェニックマウスモデルにおいて既に罹患した(established)関節炎に対する用量依存的な治療効果を有することが示された。SDAB-01は、ヒト化した二価二重特異性のTNF阻害性の融合タンパク質である。このタンパク質に対する抗原は腫瘍壊死因子-アルファ(TNF)である。

20

## 【0118】

対応する発現ベクターのDNA配列から予測されるSDAB-01ポリペプチド鎖の完全アミノ酸配列を図1に示す(残基は、配列番号1の残基番号1としてNH<sub>2</sub>末端から数える)。DNA配列でコードされた最後のアミノ酸残基はC<sup>264</sup>であり、タンパク質のCOOH末端を構成する。ジスルフィド結合したSDAB-01(翻訳後修飾は伴わない)予測分子量は約27000Daである。ナノエレクトロスプレーイオン化四重極飛行時間型質量分析により主要なアイソフォームで観察される分子量は67000Daに相当し、それにより翻訳後修飾が存在しないことが確認される。特有の生化学特徴は以下のとおりである：264個のアミノ酸、27365Daの分子量、PI=8.67及びUV=Ec=280nmで1.83。

30

## 【0119】

図1において、相補性決定領域(CDR)は太字で示す。これらの結合ドメインを結ぶアミノ酸リンカーは小文字で示す。

## 【0120】

## SDAB分子の調製

SDAB分子は、組換え型、CDRグラフト化、ヒト化、ラクダ化、脱免疫化、及び/又は*in vitro*で生成した(例えばファージディスプレイによって選択された)1つ又は複数の単ドメイン分子からなり得る。抗体及びSDAB分子を生成し、それらを組換えにより修飾する技法は当該技術分野で既知であり、以下で詳細に記載されている。

## 【0121】

当業者にとって既知の多くの方法が抗体を得るのに利用可能である。例えば、モノクローナル抗体を、既知の方法に従ってハイブリドーマの生成により作製することができる。それから、このようにして形成されたハイブリドーマを、標準的な方法、例えば酵素免疫測定法(ELISA)及び表面プラズモン共鳴(BIACORE(商標))分析を用いてスクリーニングし、特定の抗原に特異的に結合するSDAB分子を産生する1つ又は複数のハイブリドーマを同定する。任意の形態の特定の抗原、例えば組換え抗原、その自然発生型、任意の変異体又は断片、及びその抗原ペプチドを免疫原として使用することができる。

40

## 【0122】

抗体及びSDAB分子を作製する例示的な1つの方法は、タンパク質発現ライブラリ、例えばファージディスプレイライブラリ又はリボソームディスプレイライブラリをスクリ

50

ーニングすることを含む。ファージディスプレイは、例えばLadner et al.の米国特許第5, 223, 409号、Smith (1985) Science 228:1315-1317、国際公開第92/18619号、国際公開第91/17271号、国際公開第92/20791号、国際公開第92/15679号、国際公開第93/01288号、国際公開第92/01047号、国際公開第92/09690号及び国際公開第90/02809号に記載されている。

#### 【0123】

ディスプレイライブラリの使用に加えて、特定の抗原を用いて、非ヒト動物、例えば齧歯動物、例えばマウス、ハムスター又はラットに免疫を付与することができる。一実施形態では、非ヒト動物は、ヒト免疫グロブリン遺伝子の少なくとも一部を含む。例えば、ヒトIg遺伝子座の大きい断片を用いて、マウス抗体産生が欠損しているマウス株を遺伝子操作で作り出す(engineer)ことが可能である。ハイブリドーマ技術を用いて、所望の特異性を有する遺伝子から誘導される抗原特異的なモノクローナル抗体を作製する及び選択することができる。例えば、XENOMOUSE(商標)、Green et al. (1994) Nature Genetics 7:13-21、米国特許出願公開第2003-0070185号、1996年10月31日付けで公開された国際公開第96/34096号及び1996年4月29日付けで出願された国際出願PCT/US96/05928号を参照されたい。

10

#### 【0124】

別の実施形態では、SDAB分子を非ヒト動物から得て、それから当該技術分野で既知の組換えDNA技法を用いて、修飾された、例えばヒト化、脱免疫化、キメラSDAB分子を作製することができる。キメラ抗体及びキメラSDAB分子を作製する多様なアプローチが記載されている。例えば、Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851, 1985、Takeda et al., Nature 314:452, 1985、Cabilly et al.の米国特許第4, 816, 567号、Boss et al.の米国特許第4, 816, 397号、Tanaguchi et al.の欧州特許第171496号、欧州特許第0173494号、英国特許第2177096号を参照されたい。ヒト化抗体及びヒト化SDAB分子は、例えばヒト重鎖及び軽鎖の遺伝子を発現するが、内因性のマウス免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の遺伝子を発現することができないトランスジェニックマウスを用いても作製することができる。Winterは、本明細書に記載のヒト化抗体及びヒト化SDAB分子を調製するのに使用することができる例示的なCDRグラフト化方法を記載している(米国特許第5, 225, 539号)。特定のヒト抗体の全てのCDRを非ヒトCDRの少なくとも一部で置き換えることができ、又はCDRの一部のみを非ヒトCDRで置き換えることができる。ヒト化抗体及びSDAB分子と所定の抗原との結合に要求される数のCDRを置き換えるだけでもよい。

20

30

#### 【0125】

ヒト化抗体は、抗原結合に直接はかかわらないFv可変ドメインの配列をヒトFv可変ドメイン由来の同等の配列に置きかえることにより生成することができる。ヒト化抗体又はその断片を生成する方法の例は、Morrison (1985) Science 229:1202-1207、Oi et al. (1986) BioTechniques 4:214、並びに米国特許第5, 585, 089号、米国特許第5, 693, 761号、米国特許第5, 693, 762号、米国特許第5, 859, 205号及び米国特許第6, 407, 213号で与えられる。それらの方法は、重鎖又は軽鎖の少なくとも1つに由来する免疫グロブリンFv可変ドメインの全て又は一部をコードする核酸配列を単離する、操作する、及び発現することを含む。かかる核酸を、上記のように所定の標的に対するSDAB分子を産生するハイブリドーマから、及び他の供給源から得ることができる。それから、ヒト化SDAB分子をコードする組換えDNAを適当な発現ベクターにクローニングすることができる。

40

#### 【0126】

或る特定の実施形態では、ヒト化SDAB分子を、保存的置換、コンセンサス配列の置換、生殖系列の置換及び/又は復帰突然変異の導入最適化する。かかる変異した免疫グロブリン分子は、当該技術分野で既知の幾つかの技法のいずれかにより作製することができる(例えばTeng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80: 7308-7312, 1983、Kozbor et al., Immunology Today, 4: 7279, 1983、Olsson et al., Meth. Enzymol., 92: 3-16

50

、1982)、PCT国際公開第92/06193号又は欧州特許第0239400号)の教示に従って作製することができる。

【0127】

S D A B分子のヒト化に関する技法は国際公開第06/122786号に開示されている。

【0128】

S D A B分子を、ヒトT細胞エピトープの特異的欠失、又は国際公開第98/52976号及び国際公開第00/34317号に開示の方法による「脱免疫化」により修飾することもできる。要するに、S D A B分子の重鎖及び軽鎖の可変ドメインをM H CクラスI Iに結合するペプチドについて分析することができ、これらのペプチドは潜在的なT細胞エピトープを表す(国際公開第98/52976号及び国際公開第00/34317号に規定されているとおりである)。潜在的なT細胞エピトープの検出のために、「ペプチドスレッディング」と呼ばれるコンピュータモデリングアプローチを適用することができ、加えて国際公開第98/52976号及び国際公開第00/34317号に記載されるように、ヒトM H CクラスI I結合ペプチドのデータベースでV<sub>H</sub>配列及びV<sub>L</sub>配列に存在するモチーフを検索することができる。これらのモチーフは18種の主なM H CクラスI I D Rアロタイプのいずれかに結合し、そのため潜在的なT細胞エピトープを構成する。検出される潜在的なT細胞エピトープを、可変ドメインにおける少数のアミノ酸残基を置換することにより、又は単一アミノ酸置換により排除することができる。典型的には、保存的置換が行われる。排他的なものではないが多くの場合、ヒト生殖系列の抗体配列の位置に共通するアミノ酸を使用することができる。ヒト生殖系列の配列は例えば、Tomlinson, et al. (1992) J. Mol. Biol. 227:776-798、Cook, G. P. et al. (1995) Immunol. Today Vol. 16 (5): 237-242、Chothia, D. et al. (1992) J. Mol. Biol. 227:799-817、及びTomlinson et al. (1995) EMBO J. 14:4628-4638に開示されている。V B A S Eディレクトリがヒト免疫グロブリン可変領域配列の包括的ディレクトリを与える(Tomlinson, I.A. et al. MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UKによってまとめられている)。これらの配列をヒト配列の供給源として、例えばフレームワーク領域及びC D Rに使用することができる。例えば米国特許第6,300,064号に記載のようにヒトのコンセンサスフレームワーク領域も使用することができる。

【0129】

S D A B分子の作製

S D A B分子を、タンパク質を産生するように遺伝子操作した生存宿主細胞によって作製することができる。タンパク質を産生するように細胞を遺伝子操作する方法は当該技術分野で既知である。例えば、Ausabel et al., eds. (1990), Current Protocols in Molecular Biology(Wiley, New York)を参照されたい。かかる方法は、タンパク質をコードし、タンパク質の発現を可能にする核酸を生存宿主細胞に導入することを含む。それらの宿主細胞は培養液中で成長した細菌細胞、真菌細胞又は動物細胞であり得る。細菌宿主細胞としては、大腸菌細胞が挙げられるが、それに限定されない。好適な大腸菌株の例としては、H B 1 0 1、D H 5 a、G M 2 9 2 9、J M 1 0 9、K W 2 5 1、N M 5 3 8、N M 5 3 9、及び外来D N Aを切断しない任意の大腸菌株が挙げられる。使用することができる真菌宿主細胞としては、サッカロミセス・セレビスエ(Saccharomyces cerevisiae)、ピチア・パストリス(Pichiapastoris)及びアスペルギルス細胞が挙げられるが、それに限定されない。使用することができる動物細胞株の幾つかの例は、C H O、V E R O、B H K、H e L a、C o s、M D C K、2 9 3、3 T 3及びW I 3 8である。新たな動物細胞株を、当業者に既知の方法を用いて(例えば形質転換、ウイルス感染、及び/又は選抜によって)樹立することができる。任意で、宿主細胞によってタンパク質を培地へと分泌させることができる。

【0130】

幾つかの実施形態では、S D A B分子を細菌細胞、例えば大腸菌細胞において作製することができる。例えば、ディスプレイエンティティとバクテリオファージタンパク質(又

10

20

30

40

50

はその断片)との間に抑制性終止コドンを含むファージディスプレイベクターにおいてFabが配列によりコードされている場合、ベクターの核酸を、終止コドンを抑止することのできない細菌細胞に導入することができる。この場合、Fabはgene IIIタンパク質に融合せず、ペリプラズム及び/又は培地へと分泌される。

【0131】

S D A B分子は真核細胞でも作製することができる。一実施形態では、抗体(例えばscFv)をピチア属(例えば、Powers et al. (2001) J Immunol Methods. 251: 123-35を参照されたい)、ハンゼヌラ属(正:Hansenula)又はサッカロミセス属等の酵母細胞で発現させる。

【0132】

一実施形態では、S D A B分子を哺乳動物細胞において作製する。クローン抗体又はその抗原結合断片を発現するための典型的な哺乳動物宿主細胞としては、チャイニーズハムスター卵巣細胞(C H O細胞)(例えばKaufman and Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621に記載のD H F R選択マーカーとともに使用される、Urlaub and Chasin (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220に記載のd h f r<sup>-</sup> C H O細胞を含む)、リンパ球細胞株、例えばN S 0骨髄腫細胞及びS P 2細胞、C O S細胞、並びにトランスジェニック動物、例えばトランスジェニック哺乳動物由来の細胞が挙げられる。例えば、細胞は乳房上皮細胞である。

【0133】

S D A B分子をコードする核酸配列に加えて、組換え発現ベクターは、更なる配列、例えば宿主細胞においてベクターの複製を調節する配列(例えば複製起点)及び選択マーカー遺伝子を保有し得る。選択マーカー遺伝子は、ベクターが導入されている宿主細胞の選択を容易にする(例えば、米国特許第4,399,216号、同第4,634,665号及び同第5,179,017号を参照されたい)。例えば典型的に、選択マーカー遺伝子は、ベクターが導入されている宿主細胞に、薬剤、例えばG 4 1 8、ハイグロマイシン又はメトトレキサートに対する耐性を与える。

【0134】

S D A B分子の組換え発現のための例示的なシステムにおいて、抗体重鎖及び抗体軽鎖の両方をコードする組換え発現ベクターを、リン酸カルシウム媒介性のトランスフェクションによってd h f r<sup>-</sup> C H O細胞に導入する。組換え発現ベクター内で、抗体の重鎖遺伝子及び軽鎖遺伝子がそれぞれ、エンハンサー/プロモーター調節因子(例えばS V 4 0、C M V、アデノウイルス等から誘導されるもの、例えばC M Vエンハンサー/A d M L Pプロモーター調節因子又はS V 4 0エンハンサー/A d M L Pプロモーター調節因子)に操作可能に連結し、遺伝子の高い転写レベルを誘導する。組換え発現ベクターもD H F R遺伝子を保有し、それによりメトトレキサート選択/増幅を用いてベクターがトランスフェクトされたC H O細胞の選択が可能になる。選択された形質転換宿主細胞を培養し、抗体の重鎖及び軽鎖を発現させることができ、無傷抗体が培養培地から回収される。標準的な分子生物学的技法を用いて、組換え発現ベクターを調製し、宿主細胞をトランスフェクトして、形質転換体を選択し、宿主細胞を培養して、抗体分子を培養培地から回収することができる。例えば、一部のS D A B分子をアフィニティークロマトグラフィによって単離することができる。

【0135】

S D A B分子はトランスジェニック動物によっても作製することができる。例えば、米国特許第5,849,992号は、トランスジェニック哺乳動物の乳腺において抗体を発現する方法を記載している。乳汁特異的なプロモーターと、抗体分子をコードする核酸と、分泌のためのシグナル配列とを含む導入遺伝子が構築される。かかるトランスジェニック哺乳動物の雌によって産生される乳汁は、その中に対象の抗体が分泌されている。抗体分子を乳汁から精製するか、又は用途によっては直接使用することができる。

【0136】

S D A B分子の結合特性を、任意の方法、例えば以下の方法:B I A C O R E (商標)

10

20

30

40

50

分析、酵素免疫測定法 ( E L I S A )、x 線結晶構造解析、配列分析及びスキャニング突然変異誘発の 1 つによって測定することができる。

【 0 1 3 7 】

S D A B 分子と標的 ( 例えば T N F ) との結合相互作用を、表面プラズモン共鳴 ( S P R ) を用いて分析することができる。S P R 又は生体分子相互作用分析 ( B I A ) は、いかなる相互作用体も標識することなく、リアルタイムで生体特異的な相互作用を検出する。B I A チップの結合表面での質量の変化 ( 結合事象の指標となる ) により、表面付近の光の屈折率の変化が起こる。生体分子間のリアルタイム反応の指標として測定される屈折率の変化によって検出可能なシグナルが発生する。S P R を使用する方法は、例えば米国特許第 5 , 6 4 1 , 6 4 0 号、Raether (1988) Surface Plasmons Springer Verlag、Sjolander and Urbaniczky (1991) Anal. Chem. 63:2338-2345、Szabo et al. (1995) Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705、及び BIAcore International AB (Uppsala, Sweden) によって与えられるオンラインリソースに記載されている。

10

【 0 1 3 8 】

S P R からの情報を用いて、平衡解離定数 (  $K_d$  )、及び分子と標的との結合に関する反応速度パラメータ (  $K_{on}$  及び  $K_{off}$  を含む ) の正確かつ定量的な評価基準を与えることができる。かかるデータを用いて、異なる分子を比較することができる。S P R からの情報を用いて、構造と活性との関係性 ( S A R ) を展開することもできる。例えば、異なる抗体分子の反応速度パラメータ及び平衡結合パラメータを評価することができる。特定の結合パラメータ、例えば高い親和性及び小さい ( slow )  $K_{off}$  と相関する、所定の位置での変異体アミノ酸を同定することができる。この情報を構造モデリングと ( 例えば相同性モデリング、エネルギー最小化、又は x 線結晶構造解析若しくは N M R による構造決定を用いて ) 組み合わせることができる。結果として、タンパク質とその標的との間の物理的相互作用の理解を系統立てて説明し、他の設計プロセスを導くのに使用することができる。

20

【 0 1 3 9 】

修飾された S D A B 分子

S D A B 分子は、フレームワーク領域の 1 つにおいて少なくとも 1 つのアミノ酸位置が、自然発生的なドメイン、例えば V H ドメインのアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を有し得る。

30

【 0 1 4 0 】

一部の S D A B 分子、例えばヒト化 S D A B 分子のアミノ酸配列は、フレームワーク領域の少なくとも 1 つにおいて少なくとも 1 つのアミノ酸位置が、自然発生的なドメイン、例えば自然発生的な V H I - I ドメインのアミノ酸配列とは異なり得ることを理解されたい。

【 0 1 4 1 】

本発明は S D A B 分子の誘導体の配合物も含む。かかる誘導体は一般的に、修飾によって、特に S D A B 分子及び / 又は本発明で開示される S D A B 分子を形成するアミノ酸残基の 1 つ若しくは複数の化学的及び / 又は生物学的 ( 例えば酵素 ) 修飾によって得ることができる。

40

【 0 1 4 2 】

かかる修飾の例、並びにこのようにして修飾することができる S D A B 分子配列内のアミノ酸残基 ( すなわちタンパク質骨格又は側鎖上のアミノ酸残基 )、かかる修飾を導入するのに使用することができる方法及び技法、並びにかかる修飾の潜在的用途及び利点の例が当業者にとって明らかであろう。

【 0 1 4 3 】

例えば、かかる修飾は、1 つ又は複数の官能基、残基又は部分の S D A B 分子への又は S D A B 分子上への ( 例えば共有結合的な連結による又は任意の他の好適な方法での ) 導入、特に 1 つ又は複数の所望の特性又は官能基を与える 1 つ又は複数の官能基、残基又は部分の S D A B 分子への導入を含み得る。かかる官能基の例は当業者にとって明らかであ

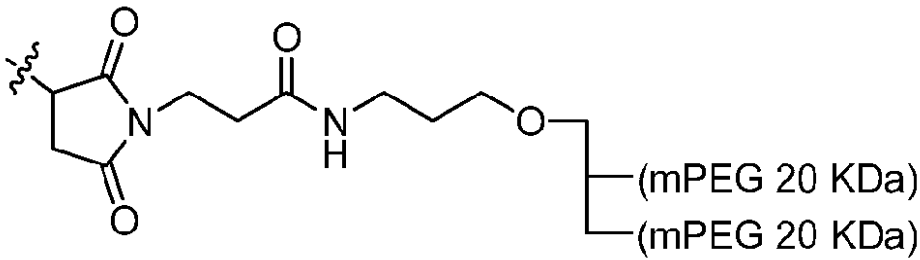
50



## 【 0 1 5 2 】

幾つかの実施形態では、リンカーは以下の式で表される：

## 【 化 1 5 】



10

## 【 0 1 5 3 】

2つ以上のリンカーを本明細書に記載のSDAB分子に使用する場合、これらのリンカーは同じであっても、又は異なってもよい。当業者であれば、本発明のSDAB分子での使用に最適なリンカーを認識するとともに理解するであろう。

## 【 0 1 5 4 】

## PEG化

医薬タンパク質の半減期を増大するのに及び/又は免疫原性を低減するのに広く用いられる技法の1つは、好適な薬理的に許容可能なポリマー、例えばポリ(エチレングリコール)(PEG)又はその誘導体(例えばメトキシポリ(エチレングリコール)すなわちmPEG)の付着を含む。一般的に、任意の好適な形態のPEG化、例えば当該技術分野において抗体及び抗体断片((単一)ドメイン抗体及びScFvを含むが、それらに限定されない)に使用されるPEG化を使用することができる。例えば、Chapman, Nat. Biotechnol., 54, 531-545 (2002)、Veronese and Harris, Adv. Drug Deliv. Rev. 54, 453-456 (2003)、Harris and Chess, Nat Rev. Drug. Discov., 2, (2003)、及び国際公開第04/060965号を参照する。タンパク質のPEG化のための様々な試薬が、例えばNOF America Corporationから市販されてもいる(例えばPEGの式Bに関するもの)。典型的には、部位特異的なPEG化が特にシステイン残基を介して用いられる(例えば、Yang et al., Protein Engineering, 16, 10, 761-770 (2003)を参照されたい)。例えばこのために、PEGをSDAB分子において自然発生するシステイン残基に付着することができ、PEGの付着のために1つ又は複数のシステイン残基が好適に導入されるように、SDAB分子を修飾することができる。さらに、いずれもタンパク質工学の技法を用いて、PEG化のために1つ若しくは複数のシステイン残基が好適に導入されるように、本明細書に記載のSDAB分子を修飾することができるか、又はPEG化のために1つ若しくは複数のシステイン残基を含むアミノ酸配列を本発明のSDAB分子のN末端及び/又はC末端に融合することができる。

20

30

## 【 0 1 5 5 】

PEG化に関連して、本発明は概して、上記PEG化が、(1) *in vivo*での半減期を増大し、(2)免疫原性を低減し、(3)PEG化に関してそれ自体が既知の1つ又は複数の更なる有益な特性を与え、(4)SDAB分子の親和性には本質的に影響を与えず(例えば以下の実施例に記載されるような好適なアッセイにより決定されるように、90%を超えて、50%を超えて、又は10%を超えて、上記親和性を低減しない)、及び/又は(4)SDAB分子の他の所望の特性のいずれにも影響を与えないように、1つ又は複数のアミノ酸位置でPEG化している任意のSDAB分子も包含することに留意されたい。好適なPEG基及び好適なPEG基を特異的に又は非特異的に付着させる方法は当業者にとって明らかであろう。

40

## 【 0 1 5 6 】

SDAB分子及び本明細書に記載のタンパク質に使用されるPEGは、1kDa以上、例えば10kDa以上及び200kDa未満、例えば90kDa未満の分子量を有し得る。幾つかの実施形態では、SDAB分子及び本明細書に記載のタンパク質に使用されるP

50

EGは、1KDa～100KDaの範囲の分子量を有し得る。典型的には、SDAB分子には、5000を超える、例えば10000を超える、及び20000未満、例えば100000未満の、例えば20000～80000の範囲の分子量を有するPEGを使用する。幾つかの実施形態では、SDAB分子及び本明細書に記載のタンパク質に使用されるPEGは10KDa～50KDaの範囲の分子量を有し得る。幾つかの実施形態では、SDAB分子及び本明細書に記載のタンパク質に使用されるPEGは15KDa～45KDaの範囲の分子量を有し得る。幾つかの実施形態では、SDAB分子及び本明細書に記載のタンパク質に使用されるPEGは20KDaの分子量を有し得る。幾つかの実施形態では、SDAB分子及び本明細書に記載のタンパク質に使用されるPEGは40KDaの分子量を有し得る。幾つかの実施形態では、SDAB分子及び本明細書に記載のタンパク質に使用されるPEGは10KDaの分子量を有し得る。

10

【0157】

幾つかの実施形態では、各PEG分子は独立して、PEGモノマー、ポリマー又はその誘導体である。幾つかの実施形態では、各PEGはメトキシPEG誘導体(mPEG)モノマー、ポリマー又はその誘導体である。幾つかの実施形態では、各PEG分子は独立して、1KDa～100KDaの分子量を有する。幾つかの実施形態では、各PEG分子は独立して、10KDa～50KDaの分子量を有する。幾つかの実施形態では、各PEG分子は独立して、40KDaの分子量を有する。幾つかの実施形態では、各PEG分子は独立して、15KDa～35KDaの分子量を有する。幾つかの実施形態では、各PEG分子は独立して、30KDaの分子量を有する。幾つかの実施形態では、各PEG分子は独立して、20KDaの分子量を有する。幾つかの実施形態では、各PEG分子は独立して、17.5KDaの分子量を有する。幾つかの実施形態では、各PEG分子は独立して、12.5KDaの分子量を有する。幾つかの実施形態では、各PEG分子は独立して、10KDaの分子量を有する。幾つかの実施形態では、各PEG分子は7.5KDaの分子量を有する。幾つかの実施形態では、各PEG分子は独立して、5KDaの分子量を有する。

20

【0158】

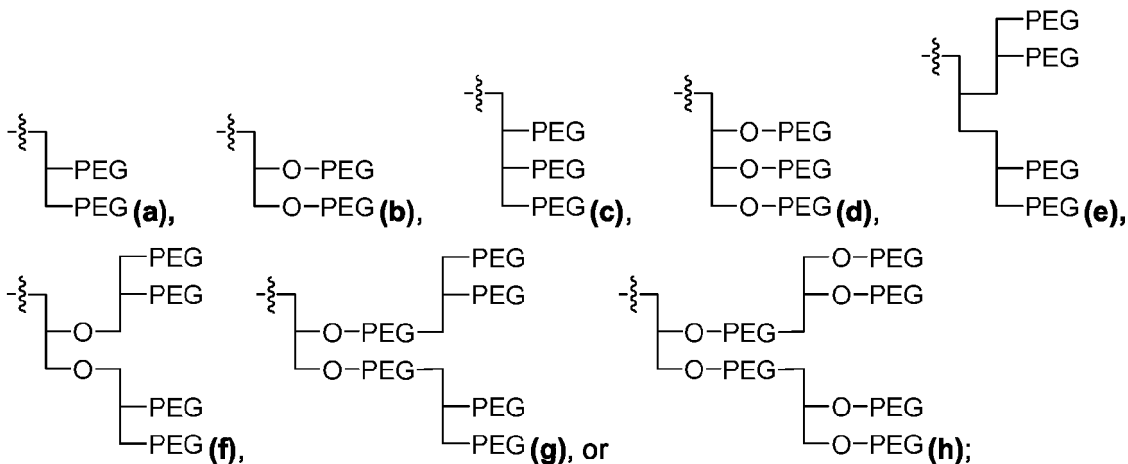
別の通常あまり典型的ではない修飾は、SDAB分子を発現するのに用いられる宿主細胞に応じて、通常翻訳時修飾及び/又は翻訳後修飾の一部としてN連結型グリコシル化又はO連結型グリコシル化を含む。

30

【0159】

幾つかの実施形態では、PEG分子は分岐している。幾つかの実施形態では、PEG分子は式(a)～式(h)の部分から選択される：

【化16】



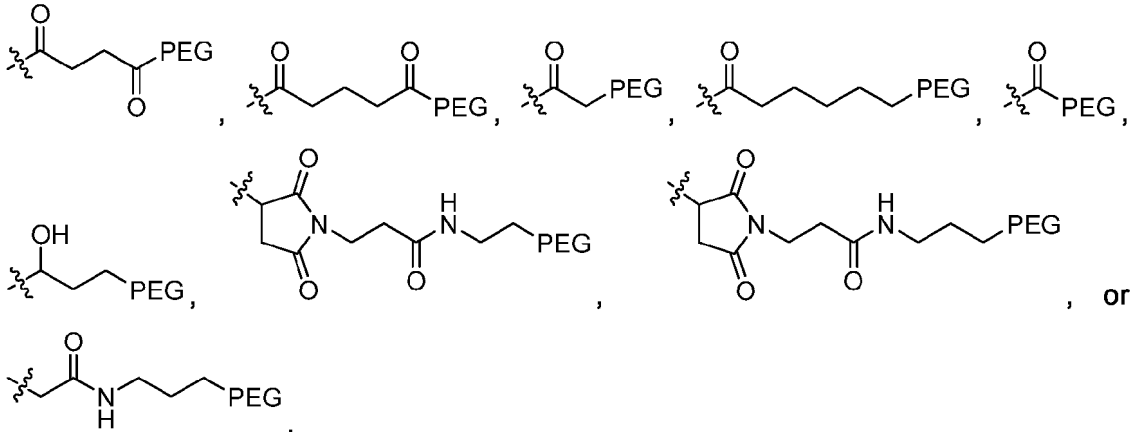
40

(ここで各PEG分子は独立して、PEGモノマー、ポリマー、又はその誘導体である)。幾つかの実施形態では、各PEG分子はmPEGモノマー、ポリマー、又はその誘導体である。幾つかの実施形態では、修飾されたSDAB分子は、PEG分子に連結した式(

50

I) のリンカーを含み、以下から選択される構造を有する：

【化 17】



10

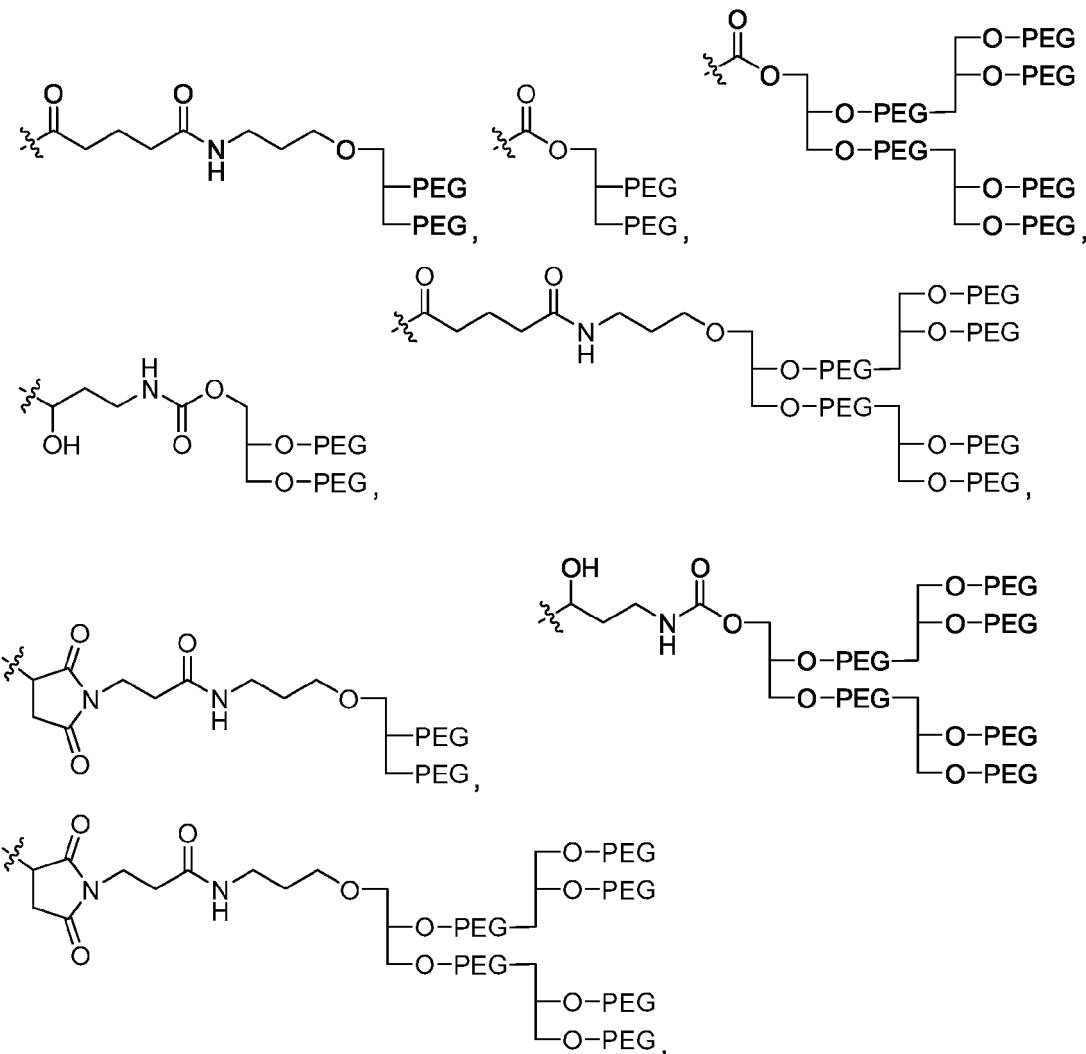
(ここで、各 PEG 分子は独立して、PEG モノマー、ポリマー、又はその誘導体である)。幾つかの実施形態では、各 PEG 分子は mPEG モノマー、ポリマー、又はその誘導体である。

【0160】

幾つかの実施形態では、修飾された SDAB 分子は、PEG 分子に連結した式 (I) のリンカーを含み、以下から選択される構造を有する：

20

【化 18】



30

40

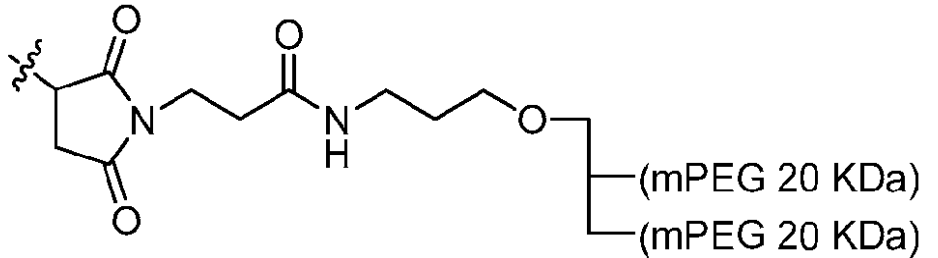
50

(ここで、各 P E G 分子は独立して、P E G モノマー、ポリマー、又はその誘導体である)。幾つかの実施形態では、各 P E G 分子は m P E G モノマー、ポリマー、又はその誘導体である。

【 0 1 6 1 】

幾つかの実施形態では、式 ( I ) のリンカーは以下の式で表される P E G 分子に連結する：

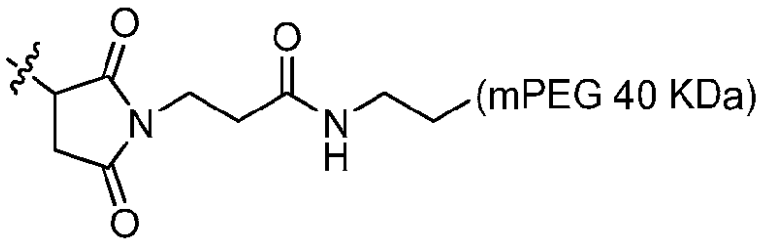
【 化 1 9 】



【 0 1 6 2 】

幾つかの実施形態では、式 ( I ) のリンカーは以下の式で表される P E G 分子に連結する：

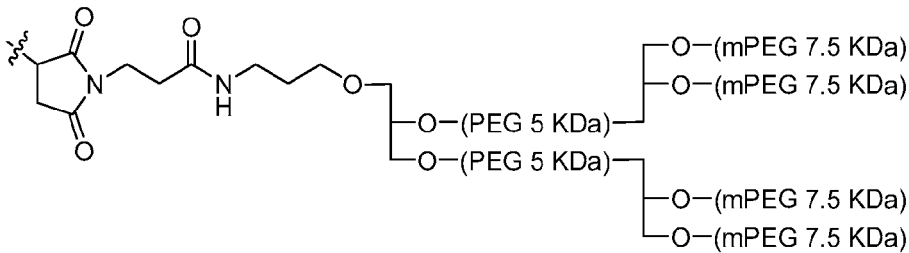
【 化 2 0 】



【 0 1 6 3 】

幾つかの実施形態では、式 ( I ) のリンカーは以下の式で表される P E G 分子に連結する：

【 化 2 1 】

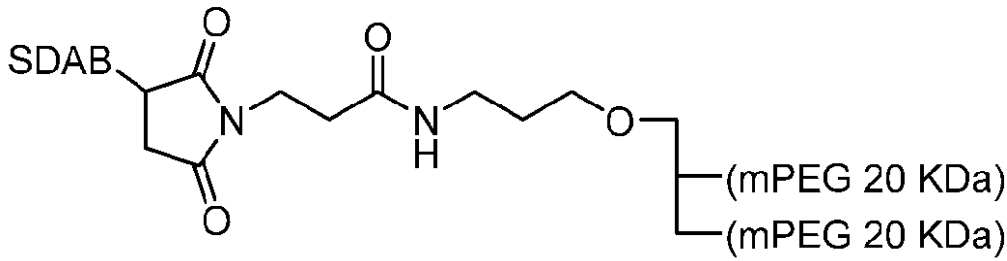


【 0 1 6 4 】

リンカー - P E G 分子は S D A B 分子と会合する (例えば結び付く) ことができ、それにより修飾された S D A B 分子が形成する。S D A B 分子の単一ドメイン分子は、N 末端から C 末端へと以下の順序で配置され得る：T N F 結合型の単一ドメイン分子 - T N F 結合型の単一ドメイン分子 - P E G 分子 (例えば分岐した P E G 分子)。一実施形態では、修飾された S D A B 分子は以下の式で表される：

40

【化22】

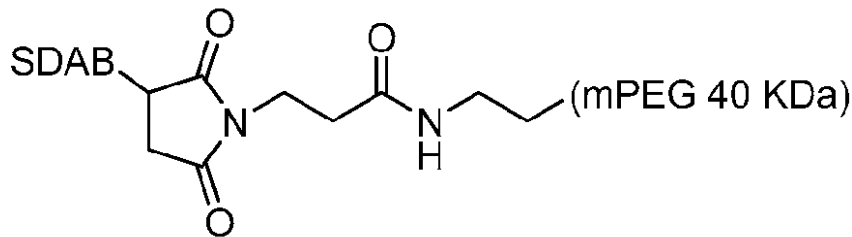


10

【0165】

一実施形態では、修飾されたSDAB分子は以下の式で表される：

【化23】

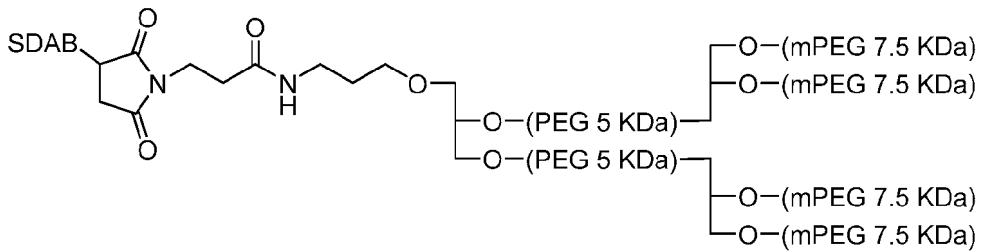


20

【0166】

一実施形態では、修飾されたSDAB分子は以下の式で表される：

【化24】

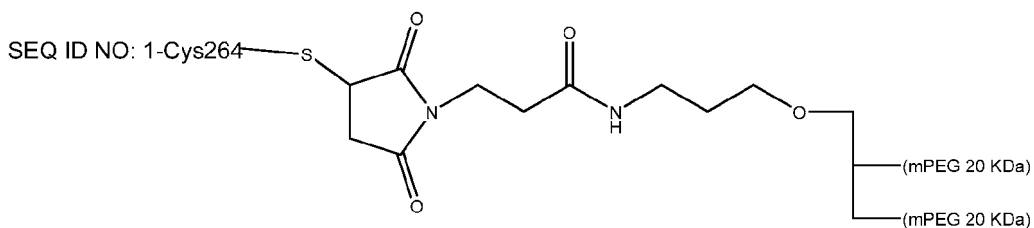


30

【0167】

修飾されたSDAB分子の1つの例示的な実施形態は以下の式で表される：

【化25】



40

【0168】

SDAB分子の反応基は一般的に、SDAB分子に付着した求核部分を介して付着する。幾つかの実施形態では、求核部分は硫黄（例えばシステイン残基の硫黄）である。他の実施形態では、求核部分は窒素（例えば末端の - アミノ基又は窒素含有アミノ酸側鎖（例えばリシン鎖の - アミノ基）の窒素）である。他の実施形態では、求核部分はC末端基である。SDAB分子の反応基は一般的に、リンカーに付着した求電子部分を介して付着する。幾つかの実施形態では、求電子部分はカルボニル基（例えば活性化エステル又はアルデヒド）である。幾つかの実施形態では、求電子部分はマレイミド基である。

【0169】

投与及び治療方法

50

S D A B分子を被験体（例えばヒト被験体）に単独で、又は第2の作用物質、例えば治療的に若しくは薬理的に活性のある第2の作用物質に併せて投与し、T N F 関連障害、例えば炎症性障害又は自己免疫障害を治療する又は予防する（例えばT N F 関連障害に関連する1つ又は複数の症状を低減する又は改善する）ことができる。「治療する」という用語は、障害に関連する状態、症状若しくはパラメータを改善するのに、又は障害の進行を統計学的に有意な程度まで若しくは当業者に検出可能な程度まで抑えるのに効果的な量、方法及び/又は様式で療法剤（therapy）を投与することを指す。治療に使用する場合、治療は被験体の障害若しくは状態を改善する、治癒する、維持する、又は障害若しくは状態の期間を低減することができる。治療上の使用では、被験体には症状の部分的な又は全体的な兆候があり得る。典型的な場合、治療は被験体の障害若しくは状態を医師が検出可能な程度まで改善するか、又は障害若しくは状態の悪化を防ぐ。効果的な量、方法又は様式は被験体に強く依存して変化し得るとともに被験体に合わせられ得る。

10

## 【0170】

本明細書に使用される場合、「被験体」及び「患者」という用語は区別なく用いられる。本明細書に使用される場合、「被験体（"subject" and "subjects"）」という用語は、動物、例えば非霊長類（例えばウシ、ブタ、ウマ、ロバ、ヤギ、ラクダ、ネコ、イヌ、モルモット、ラット、マウス、ヒツジ）及び霊長類（例えばサル、例えばカニクイザル、ゴリラ、チンパンジー及びヒト）を含む哺乳動物を指す。

## 【0171】

治療することができる免疫障害の非限定的な例としては、自己免疫障害、例えば関節炎（関節リウマチ、若年性関節リウマチ、骨関節炎、乾癬性関節炎、ループス関連関節炎又は強直性脊椎炎を含む）、強皮症、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、血管炎、多発性硬化症、自己免疫甲状腺炎、皮膚炎（アトピー性皮膚炎及び湿疹様皮膚炎を含む）、重症筋無力症、炎症性腸疾患（I B D）、クローン病、大腸炎、糖尿病（I型）；炎症状態、例えば皮膚の炎症状態（例えば乾癬）；急性炎症状態（例えば内毒素血症、敗血症（sepsis and septicemia）、毒素性ショック症候群及び感染性疾患）；移植片拒絶反応及びアレルギーが挙げられるが、それらに限定されない。一実施形態では、T N F 関連障害は、関節障害、例えば関節リウマチ、若年性関節リウマチ（R A）（例えば中度から重度の関節リウマチ）、骨関節炎、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、多関節型若年性特発性関節炎（J I A）；若しくは乾癬、潰瘍性大腸炎、クローン病、炎症性腸疾患、及び/又は多発性硬化症の1つ又は複数から選ばれる障害である。

20

30

## 【0172】

或る特定の実施形態では、S D A B分子（又は配合物）を第2の治療薬と併せて投与する。例えば、T N F S D A B分子では、第2の作用物質は抗T N F 抗体又はそのT N F 結合断片であり得る。ここで第2のT N F 抗体は配合物のT N F 結合S D A B分子とは異なるエピトープ特異性を有する。T N F 結合型のS D A Bと同時に配合することができる作用物質の他の非限定的な例としては、例えばサイトカイン阻害剤、成長因子阻害剤、免疫抑制剤、抗炎症剤、代謝阻害剤、酵素阻害剤、細胞毒性薬、及び細胞増殖抑制薬が挙げられる。一実施形態では、更なる作用物質は関節炎に標準的な治療薬であり、これには非ステロイド系抗炎症剤（N S A I D）；コルチコステロイド（プレドニゾン、プレドニゾン、コルチゾン及びトリウムシノロンを含む）；及び疾患修飾性抗リウマチ剤（D M A R D）、例えばメトトレキサート、ヒドロキシクロロキン（P l a q u e n i l）及びスルファサラジン、レフルノミド（A r a v a（商標））、腫瘍壊死因子阻害剤（エタネルセプト（E n b r e l（商標））、インフリキシマブ（R e m i c a d e（商標））（メトトレキサートを伴う又は伴わない）及びアダリムマブ（H u m i r a（商標））を含む）、抗C D 2 0抗体（例えばR i t u x a n（商標））、可溶性インターロイキン-1受容体、例えばアナキンラ（K i n e r e t）、金、ミノサイクリン（M i n o c i n（商標））、ペニシラミン、並びに細胞毒性薬（アザチオプリン、シクロホスファミド及びシクロスポリンを含む）が含まれるが、それらに限定されない。かかる併用療法はより低い投与量の投与治療薬を有益に利用することができ、それにより様々な単剤療

40

50

法に関連する可能性のある毒性又は合併症が回避される。

【0173】

S D A B分子を液体溶液（例えば注射溶液及び注入溶液）の形態で投与することができる。かかる組成物を非経口形式（例えば皮下注射、腹腔内注射又は筋肉注射）によって、又は吸入によって投与することができる。「非経口投与」及び「非経口投与する」という語句は、本明細書で使用される場合、通常注射による腸内投与及び局所投与以外の投与形式を意味し、皮下投与又は筋肉投与、並びに静脈内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、表皮下、嚢下、くも膜下、髄腔内、硬膜外及び胸骨下での注射及び注入を含む。一実施形態では、本明細書に記載の配合物を皮下投与する。

【0174】

医薬組成物又は医薬配合物は滅菌されており、製造及び保存の条件下で安定である。医薬組成物は投与に関する規制基準及び産業基準を満たすように試験することもできる。

【0175】

医薬組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、分散液、リポソーム、又は高いタンパク質濃度に好適な他の規則構造として配合することができる。滅菌済みの注射溶液は、要求に応じて、適切な溶媒中で要求される量の明細書に記載の作用物質を上で挙げられた成分の1つ又は組合せと組み合わせて、その後滅菌することにより調製することができる。概して、分散液は基本となる分散媒と上で列挙されたものの中の要求される他の成分とを含有する滅菌ビヒクルに明細書に記載の作用物質を組み込むことにより調製する。溶液の適切な流動性は、例えばレシチン等のコーティングの使用により、分散液の場合、要求される粒径の維持により、及び界面活性剤の使用により維持することができる。吸収を遅らせる作用物質、例えばモノステアリン酸塩及びゼラチンを組成物に包含させることにより、注射用組成物の持続的吸収をもたらすことができる。

【0176】

組成物 / 配合物

S D A B分子の配合物には、S D A B分子と、抗凍結剤として働くことができる化合物と、バッファーとが含まれる。配合物のpHは概して、pH 5.5 ~ 7.0である。幾つかの実施形態では、配合物を液体として保存する。他の実施形態では、配合物を液体として調製し、それから例えば凍結乾燥又は噴霧乾燥により乾燥させた後、保存する。乾燥した配合物を乾燥化合物として、例えばエアロゾル若しくは粉末として使用するか、又は例えば水、バッファー若しくは他の適切な液体を用いてその元の濃度若しくは別の濃度へと再構成することができる。

【0177】

S D A B分子精製プロセスは、S D A B分子が凍結液体としての長期保存に、及び続くフリーズドライ（例えばヒスチジン/スクロース配合物を用いたフリーズドライ）に好適な配合物に導入されるように設計する。配合物は特定濃度のタンパク質を用いて凍結乾燥する。それから凍結乾燥した配合物を必要に応じて好適な希釈剤（例えば水）で再構成し、元の配合成分を所望の濃度、概して凍結乾燥前の濃度と比較して同じ又は高い濃度まで再溶解させることができる。

【0178】

凍結乾燥した配合物を再構成し、初めにフリーズドライした液体の体積と比べての凍結乾燥物に添加される水又は希釈剤の量に応じて、元の（すなわち凍結乾燥前の）濃度とは異なる濃度を有する配合物を作製することができる。好適な配合物は抗体の完全性の1つ又は複数のパラメータをアッセイすることにより同定することができる。

【0179】

製造品

本願は本明細書に記載の配合物を含み、配合物の使用説明書を備える製造品も提供する。

【0180】

被験体への投与に、例えば医薬品として用いられる配合物は滅菌されていなければなら

10

20

30

40

50

ない。これは当該技術分野で既知の方法を用いて、例えば液体の配合、又は凍結乾燥及び再構成の前又は後の滅菌ろ過膜によるろ過によって達成される。代替的には、構造が損傷を受けない場合、配合物の成分をオートクレーブにより滅菌し、それからろ過滅菌した又は放射線滅菌した成分と組み合わせ、配合物を作製することができる。

#### 【0181】

医薬品配合物を、例えば皮下注射用シリンジ又はマルチチャンバシリンジを含むシリンジ等の経皮送達デバイスを用いて投与することができる。一実施形態では、デバイスは針付きの又は針が内蔵された充填済みシリンジである。他の実施形態では、デバイスは針の付いていない充填済みシリンジである。針は充填済みシリンジとともにパッケージングされていてもよい。一実施形態では、デバイスは自己注射デバイス、例えば自己注射器シリンジである。別の実施形態では、注射デバイスはペン型注射器である。更に別の実施形態では、シリンジは固定(staked)針シリンジ、ルアーロックシリンジ、又はルアースリップシリンジである。他の好適な送達デバイスは、ステント、カテーテル、顕微針及び埋込み型制御放出デバイスを含む。組成物は例えばインラインフィルターを備える又は備えていない、IVチューブ(tubings)を含む標準的なIV機器を用いて静脈投与することができる。

10

#### 【0182】

或る特定の実施形態では、シリンジは自己注射器デバイスとの使用に好適である。例えば、自己注射器デバイスは、単回バイアルシステム、例えば溶液送達用のペン型注射器デバイスを含み得る。かかるデバイスは、例えばBecton Dickensen (Franklin Lakes, N.J.)、Ypsomed (Burgdorf, Switzerland (www.ypsomed.com))、Bioject (Portland, Oreg.)、National Medical Products、Weston Medical (Peterborough, UK)、Medi-Ject Corp (Minneapolis, Minn.)、及びZogenix, Inc (Emeryville, CA)により作製又は開発された、BD Pens、BD Autojector (商標)、Humaject (商標)、NovoPen (商標)、B-D (商標) Pen、AutoPen (商標)、及びOptiPen (商標)、Genotropin Pen (商標)、Genotro Norm Pen (商標)、Humatro Pen (商標)、Reco-Pen (商標)、Roferon Pen (商標)、Biojector (商標)、Inject (商標)、J-tip Needle-Free Injector (商標)、DosePro (商標)、Medi-Ject (商標)のように、製造業者から市販されている。広く認められている二重バイアルシステムを含むデバイスは、再構成溶液の送達のためにカートリッジ中で凍結乾燥した薬剤を再構成するペン型注射器システム、例えばHumatro Pen (商標)を含む。

20

30

#### 【0183】

製造品は配合物を含有するのに好適な容器を含み得る。好適な容器としては、デバイス、ボトル、バイアル、シリンジ、試験管、ネブライザー(例えば超音波ネブライザー又は振動メッシュネブライザー)、静脈注射溶液バッグ、又は吸入具(例えば定量吸入具(MDI)又は乾燥粉末吸入具(DPI))が挙げられるが、それらに限定されない。容器は、ガラス、金属、又はポリカーボネート、ポリスチレン若しくはポリプロピレン等のプラスチックのような任意の好適な材料からなり得る。

40

#### 【0184】

概して容器は、配合物から相当量のタンパク質を吸収せず、配合物の成分との反応性がない材料の容器である。

#### 【0185】

本明細書に記載の製造品はパッケージング材料を更に含み得る。パッケージング材料は、使用又は投与に関する情報に加えて、例えば規制当局が要求している、製品を使用することができる条件に関する情報を備える。例えばパッケージング材料は、本明細書に記載の配合物を含有する充填済みシリンジを注射する方法、又は特定の期間内で、例えば2時間~24時間又はそれ以上の期間で、凍結乾燥した配合物を水性希釈剤で再構成し、溶液を形成する方法について、患者に指示を与えることができる。本発明で請求される配合物

50

はヒト医薬製品用途に有用である。

【0186】

或る特定の実施形態では、配合物をネブライザーとして投与することができる。ネブライザーの例としては、非限定的な例であるが、ジェットネブライザー、超音波ネブライザー及び振動メッシュネブライザーが挙げられる。これらの類は液体からエアロゾルを作製するのに異なる方法を用いる。概して、これらの配合物中でタンパク質の完全性を維持することができる任意のエアロゾル発生デバイスは、本明細書に記載の配合物の送達に好適である。

【0187】

他の実施形態では、医薬組成物は医療用デバイスを用いて投与することができる。例えば、医薬組成物は無針の皮下注射デバイス、例えば米国特許第5,399,163号、同第5,383,851号、同第5,312,335号、同第5,064,413号、同第4,941,880号、同第4,790,824号、又は同第4,596,556号で開示されたデバイスを用いて投与することができる。既知のインプラント及びモジュールの例としては、米国特許第4,487,603号（制御速度で医薬を分配する埋込み型マイクロ注入ポンプを開示している）、米国特許第4,486,194号（皮膚を通して医薬（medicants）を投与する治療用デバイスを開示している）、米国特許第4,447,233号（医薬を正確な注入速度で送達する医薬注入ポンプを開示している）、米国特許第4,447,224号（連続薬剤送達のための可変流量の埋込み型注入装置を開示している）、米国特許第4,439,196号（多重チャンバコンパートメントを備える浸透圧薬剤送達システムを開示している）、及び米国特許第4,475,196号（浸透圧薬剤送達システムを開示している）が挙げられる。治療用組成物は皮下投与又は筋肉投与のための生分解性又は非生分解性の持続放出配合物の形態であってもよい。例えば、米国特許第3,773,919号及び同第4,767,628号、並びにPCT国際公開第94/15587号を参照されたい。連続投与は、埋込み型ポンプ又は外付けポンプを用いても達成することができる。投与は断続的に、例えば1日1回の注射で、又は低用量で連続して、例えば持続放出配合物で実施することもできる。SDAB分子の投与に最適化するように、送達デバイスに改良を加えることができる。例えばシリンジをSDAB分子の保存及び送達に最適な程度までシリコン処理することができる。当然ながら、多くの他のかかるインプラント、送達システム及びモジュールも既知である。

【0188】

本発明は第1の作用物質及び第2の作用物質を投与するデバイスも特徴とする。デバイスは、例えば医薬調製物を保存するための1つ又は複数のハウジングが含むことができ、単位用量の第1の作用物質及び第2の作用物質を送達するように構築することができる。第1の作用物質及び第2の作用物質を同じコンパートメント又は別々のコンパートメントに保存することができる。例えば、本デバイスでは作用物質を組み合わせた後、投与を行うことができる。第1の作用物質及び第2の作用物質を投与するのに異なるデバイスを使用することも可能である。

【0189】

以下の実施例は本発明の理解を助けるために記載されているが、決してその範囲を限定する意図はなく、またそのように解釈されるものではない。

【実施例】

【0190】

実施例1．抗TNF 構成要素の生成及びSDAB-01の遺伝子操作

SDAB-01二価ヒト化SDABポリペプチドを、4つのグリシン及び1つのセリンの6つの反復からなる30個のアミノ酸のフレキシブルリンカーを介した2つの同一のTNF 抗原結合ドメイン（配列番号1のアミノ酸1～115）の遺伝子融合によって構築した。部位特異的なPEG化の準備をするために、遊離システインを3つのグリシンアミノ酸リンカーに続くC末端で遺伝子操作した（図1）。タンパク質をCHO哺乳動物発現系で産生し、プロテインA親和性捕捉により精製した。それからC末端システインをジチ

オスレイトール処理により還元し、活性化  $2 \times 20 \text{ kDa}$  分岐 PEG (図 2) のマレイミド官能基と反応させた。最終生成物を遊離 PEG 及びごく一部の非 PEG 化タンパク質から更に精製するとともに、特性化した。

#### 【0191】

それにより S D A B - 0 1 は、30 個のアミノ酸のフレキシブルリンカーで隔てられた配列番号 1 のアミノ酸 1 ~ 115 のアミノ酸配列を有する 2 つの同一のヒト化抗 TNF 特異的な S D A B 分子と、マレイミドで誘導体化した  $40 \text{ kDa}$  ( $2 \times 20 \text{ kDa}$ ) の分岐ポリエチレングリコールを有する特異的に PEG 化した C 末端システイン部位 ( $2 \times 20 \text{ PEG}$ ) との遺伝子融合体を含む (図 3)。図 4 A は直鎖 mPEG - マレイミドと、S D A B - 0 1 を含む 2 つの分岐 mPEG - マレイミドとを示す。図 4 B は S D A B - 0 1 と [配列番号 1] - PEG 40 とのサイズを比較するスキャン図である。

10

#### 【0192】

解析的な分析によって、直鎖  $40 \text{ K}$  mPEG - マレイミド S D A B と分岐  $40 \text{ K}$  mPEG - マレイミド S D A B との間の PEG 化効率が同程度であることが示された。直鎖  $40 \text{ K}$  mPEG - マレイミド又は分岐  $40 \text{ K}$  mPEG - マレイミドのいずれかで PEG 化した抗 TNF S D A B 分子は同程度の生体活性を示した。見掛けの電荷及び形状は、2 つの分岐  $40 \text{ K}$  mPEG - マレイミド材料 (分岐 PEG の式 A 及び分岐 PEG の式 B) の間でほぼ同程度であるように見える。

#### 【0193】

長さを最適化したフレキシブルリンカーを介した 2 つの同一の TNF 抗原結合ドメイン (配列番号 1 のアミノ酸 1 ~ 115) の二価フォーマットとしての S D A B - 0 1 の構築は、細胞ベースの TNF 中和アッセイにおいてその一価フォーマットと比較してその効力を約 50 倍改善させた。遺伝子操作した C 末端システインの部位特異的な PEG 化は、薬剤候補に、その効力に影響を与えることなく *in vivo* 半減期が延長した所望の薬物動態プロファイルを与えた。

20

#### 【0194】

実施例 2 . フローサイトメトリーによる S D A B - 0 1 と膜結合型の TNF との結合特性化

S D A B - 0 1 は、ヒト TNF を発現する組換えチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞株にその細胞表面上で結合することがフローサイトメトリーによって実証されている。13 アミノ酸の欠失が部位特異的な突然変異誘発によりヒト TNF コード領域に導入され、タンパク質切断が低減し、TNF の培地への放出が起こった。安定した CHO 株をこの構築物を用いて生成した。細胞表面上の TNF の発現は、特異的な抗ヒト TNF 抗体を用いるフローサイトメトリーにより実証された。S D A B - 0 1 を用いて、細胞株 p W 2 1 2 8 CHO - TNF - D 1 3 を染色し、その後ビオチン化抗 PEG 抗体を用いて二次染色を行い、それからストレプトアビジン - PE を用いる三次染色によって検出し、細胞表面結合がもたらされることを実証した (図 5)。

30

#### 【0195】

実施例 3 : ヒト TNF 又はアカゲザル TNF に対する S D A B - 0 1 の親和性

ヒト TNF 及びアカゲザル TNF との抗 TNF S D A B - 0 1 結合の詳細な特性化を、Biacore 機器で表面プラズモン共鳴を用いて実施した。ビオチン化 S D A B - 0 1 をストレプトアビジンセンサーチップ表面上に捕捉し、様々な濃度のヒト TNF 又はアカゲザル TNF をこの実験で試験した。TNF タンパク質を注入し、 $100 \mu\text{L}/\text{分}$  で 1.5 分、会合させ、20 分解離させた。速度定数及び Kd を、Biaevaluation ソフトウェア v 4.1 の 1 : 1 結合モデルを用いて全体的適合により決定した。速度定数で示されるデータは少なくとも 2 つの独立した実験による平均及び標準偏差である。Kd は会合速度及び解離速度 (on and off rates) の平均から算出した。ヒト TNF 又はアカゲザル TNF に対する S D A B - 0 1 の親和性を表 1 に示す。

40

#### 【0196】

表 1 . Biacore により決定されるヒト TNF 又はアカゲザル TNF に対する S

50

## D A B - 0 1 の親和性

【表 1】

	human TNF $\alpha$ ヒト			rhesus macaque TNF $\alpha$ アカゲザル		
	Kon x 10 <sup>6</sup> (1/Ms)	Koff x 10 <sup>-5</sup> (1/s)	Kd (pM)	Kon x 10 <sup>6</sup> (1/Ms)	Koff x 10 <sup>-5</sup> (1/s)	Kd (pM)
<b>SDAB-01</b>	7.76 ± 1.62	14.7 ± 0.45	18.9	4.19 ± 0.413	14.1 ± 2.53	33.7
<b>CONTROL 2</b> 対照	7.36 ± 1.31	14.8 ± 0.961	20.7	4.21 ± 0.056	13.5 ± 2.53	33.7

## 【0197】

10

実施例 4：細胞ベースの細胞毒性アッセイにおける S D A B - 0 1 の特性化

ヒト TNF $\alpha$  又はアカゲザル TNF $\alpha$  を用いた L 9 2 9 細胞ベースの細胞毒性アッセイにおける、S D A B 分子対照 4 及び非 P E G 化 S D A B 分子対照 3 と比較した S D A B - 0 1 の生体活性の評価。S D A B - 0 1 の TNF $\alpha$  ( 0 . 5 n g / m l ) の細胞毒性を中和する能力を細胞ベースの用量応答アッセイで評価した。S D A B - 0 1 及び非 P E G 化 TNF $\alpha$  S D A B 分子である対照 3 を同じ実験でアッセイした。用量応答曲線を図 6 に示し、E C 5 0 の結果を表 2 にまとめる。

## 【0198】

表 2 . S D A B 対照 4、S D A B - 0 1 及び非 P E G 化 S D A B 対照 3 の生体活性

【表 2】

20

EC50, pM	Control 4 対照 EC50, pM (SD)	SDAB-01 EC50, pM (SD)	Control 3 対照 EC50, pM (SD)
Human TNF $\alpha$ ヒト	22.56 (0.08)	35.01 (0.12)	31.75 (0.21)
Rhesus TNF $\alpha$ アカゲザル	11.38 (0.15)	18.09 (0.07)	17.35 (0.18)

## 【0199】

これらの結果は、S D A B - 0 1 が L 9 2 9 細胞ベースのアッセイにおいてヒト TNF $\alpha$  及びアカゲザル TNF $\alpha$  の両方を中和することが可能であることを示している。それらの結果は、P E G 化が S D A B - 0 1 の中和活性に関して顕著な効果を有しないことも示している。

30

## 【0200】

実施例 5 . 様々な種の TNF $\alpha$  との TNF $\alpha$  S D A B - 0 1 結合反応速度の比較

本研究の目的は、S D A B - 0 1 と、ヒト、アカゲザル、ラット、マウス及びウサギを含む様々な種の TNF $\alpha$  との間の結合速度及び平衡解離定数を研究して、有効性モデル、薬物動態モデル及び毒物学モデルに使用することができる、これらの異なる種間で結合親和性を比較する方法を理解することであった。B i a c o r e 機器を用いて、表面プラズモン共鳴によりリアルタイムで結合する反応速度を測定した。速度定数は直接測定し、平衡解離定数は B i a c o r e 評価ソフトウェア v 4 . 1 を用いて結合速度から誘導した。

40

## 【0201】

TNF $\alpha$  結合の評価のために、S D A B - 0 1 を 6 0 R U ~ 7 5 R U の密度でセンサーチップ表面上に固定化した。ヒト TNF $\alpha$  及びアカゲザル TNF $\alpha$  が速い会合速度及び非常に遅い解離速度で S D A B - 0 1 に同じように結合した ( 図 7 a、図 7 b )。S D A B - 0 1 との結合がヒト TNF $\alpha$  及びアカゲザル TNF $\alpha$  の濃度に依存し、飽和に達した。最高濃度では、結合が平衡に達した。S D A B - 0 1 とヒト TNF $\alpha$  及びアカゲザル TNF $\alpha$  との高親和性の結合に対して、ラット TNF $\alpha$  及びマウス TNF $\alpha$  と S D A B - 0 1 との結合はごく僅かなものであった ( 図 7 c、図 7 d )。試験した最高濃度、1 0 0 n M でラット TNF $\alpha$  結合及びマウス TNF $\alpha$  結合では、結合に関して非常に低いシグナルが観察され、5 R U 未満の結合応答にしか達しなかった ( 図 7 )。試験した最高濃度、最大

50

100 nMでの見掛けの速い解離速度及び飽和の欠如が弱い結合の指標である。ラットTNF又はマウスTNFでは、飽和がなく、結合速度が測定するには速すぎたため、平衡解離定数を算出することが不可能であった。このことは、幾らかのごく僅かな結合が存在するが、ラットTNF及びマウスTNFはSDAB-01と極めて弱く結合することを示唆している。ウサギTNFとSDAB-01との結合は、試験した最高濃度の400 nMのウサギTNFであっても観察されなかった(図7)。これらのデータは、SDAB-01は、ヒトTNFと同程度にアカゲザルTNFと結合するが、マウス、ラット又はウサギではTNFリガンドと係合しないことを示している。

#### 【0202】

SDAB-01とのヒトTNF及びアカゲザルTNFの結合の間の会合速度定数及び解離速度定数を1:1の結合モデルを用いて図7に示される結合から算出した(表3)。ヒトTNF及びアカゲザルTNFは非常に類似した会合速度及び解離速度を有し、それぞれ $19.5 + 4.17 \text{ pM}$ 及び $34.1 + 7.23 \text{ pM}$ というほぼ同一のKd値が得られた。

#### 【0203】

表3. SDAB-01とヒトTNF及びアカゲザルTNFとの結合親和性

#### 【表3】

	ka (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	kd (s <sup>-1</sup> )	Kd (pM)
Human TNFα ヒト	7.8 +/- 1.6 E+06	14.7 +/- 0.45E-05	19.5 +/- 4.17
Rhesus macaque TNFα アカゲザル	4.19 +/- 0.41 E+06	14.1 +/- 2.53E-05	34.1 +/- 7.23

アカゲザル

#### 【0204】

実施例6. SDAB-01に対する補体依存性の細胞毒性及び抗体依存性の細胞毒性の欠如

SDAB-01はヒトTNF及びサルTNFに対する高い中和効力を示す。CDC及びADCCの両方が、Fc媒介性のエフェクター機能である。代替的な補体カスケードにおいて第1のタンパク質であるC1qが2つ以上のIgG分子上でFc領域のCH2ドメインと結合する場合、CDCが生じ得る。このことが下流の補体経路成分を誘発し、最終的に細胞の表面上に膜傷害複合体の形成をもたらす、細胞が溶解する。ADCCは、細胞表面上でTNFに結合した抗TNF抗体のFc領域と、NK細胞、単球、マクロファージ及び好中球等の免疫エフェクター細胞上で発現したFcRとの間の相互作用によって標的細胞の死滅を誘発し得る。本研究の目的は、SDAB-01によるCDC活性及びADCC活性に関して試験し、それを抗TNF抗体対照1及び抗TNF抗体対照2、抗TNF抗体対照3と比較することであった。抗体対照1及び抗体対照2はヒトIgG1Fcを有し、そのためエフェクター機能を有し得る。抗体対照3及びSDAB-01はFc領域を欠いている。

#### 【0205】

本分析によって、SDAB-01及び抗体対照3は、抗体対照1及び抗体対照2と比較してCDC活性及びADCC活性を全く有していないことが実証された(図30及び図31)。抗体のFc領域は、分子がCDC活性及びADCC活性を媒介するのに必要とされ、抗体対照3及びSDAB-01はFc領域を欠いている。そのためSDAB-01は、細胞毒性となり得るエフェクター機能活性を引き起こすことなく、細胞表面上でTNFと結合するとともに中和する可能性がある。

#### 【0206】

実施例7: 好中球浸潤に対するSDAB-01の効果

これらのin vivo研究の目的は、ネズミ気嚢モデルにおいて様々な用量のSDAB-01の組換えヒトTNFにより誘導される細胞浸潤を低減する能力を評価することであった。

#### 【0207】

Tessier et al. (Jour of Immunol.159:3595-3602, 1997) によって、TNF のマウス気嚢への注入が気嚢への白血球の集積を誘導することがこれまでに示されている。SDAB-01は、TNF と結合し、TNF の効果を中和するように設計された。SDAB-01が *in vivo* モデルでの細胞集積に対する効果を有するか否かを試験するために、SDAB-01をマウスに投与した後、TNF を気嚢に注入した。細胞を気嚢から回収し、TNF 投与後6時間で差次的にカウントした。

【0208】

囊液を各実験の終了時に(TNF の投与後6時間で)回収し、細胞数をCell D y n eで決定した。実験1の結果を図8及び図9に示す。

【0209】

0.18mg/kgで投与したSDAB-01は、10ngの組換えヒトTNF により誘導される気嚢への細胞浸潤を有意に低減した。0.18mg/kgのSDAB-01によって好中球の集積も有意に阻害された。リンパ球及び単球の浸潤は6時間の時点では微量成分の細胞浸潤であり、この細胞浸潤は本研究ではSDAB-01による影響を受けなかった。

【0210】

実験2は実験1と同じプロトコルを用いて行った。その結果を図10及び図11に示す。その結果は実験1で観察されたものと一致していたが、本実験では好中球の浸潤が0.18mg/kg及び0.09mg/kgの用量のSDAB-01の両方で有意に阻害された。総細胞浸潤は0.09mg/kgのSDAB-01のみで有意に低減し、単球浸潤又はリンパ球浸潤では有意な低減は観察されなかった。

【0211】

実験3では、SDAB-01を先に行ったものと同じ用量で投与した。図12及び図13に示されるように、総白血球浸潤の有意な低減が0.09mg/kg用量で観察され、両方の用量のSDAB-01で好中球浸潤の有意な低減が観察された。リンパ球は0.09mg/kg用量で有意に低減したが、0.18mg/kg群では有意に低減しなかった。試験したいずれの用量でも単球浸潤に対する効果はなかった。

【0212】

要約すると、0.09mg/kg用量で有意ではない正の傾向が与えられた1つの研究を除いて、両方の濃度のSDAB-01で対照群と比較しての好中球浸潤の有意な阻害が観察された(表4)。

【0213】

表4：SDAB-01を用いたネズミ気嚢実験の概要

【表4】

Experiment 実験	総WBC Total WBC		好中球 Neutrophils		リンパ球 Lymphocytes		単球 Monocytes	
	0.18 mg/kg	0.09 mg/kg	0.18 mg/kg	0.09 mg/kg	0.18 mg/kg	0.09 mg/kg	0.18 mg/kg	0.09 mg/kg
1	+	+/-	+	+/-	-	-	-	-
2	+/-	+	+	+	-	-	-	-
3	+/-	+	+	+	-	+	-	-

+ ビヒクル対照と比較した細胞浸潤の有意な低減 (p ≤ 0.05)。  
 +/- より低い浸潤傾向、ただし有意ではない。  
 - ビヒクル対照と比較して有意差なし。

【0214】

0.09mg/kgと低い用量のSDAB-01の投与が、10ngの組換えヒトTNF により誘導される細胞浸潤及び好中球浸潤を有意に低減した。試験したいずれの用量

10

20

30

40

50

でもリンパ球浸潤及び単球浸潤にはほとんど効果がなかった。これらのデータは、S D A B - 0 1 が組換えヒト T N F 刺激により引き起こされる好中球の浸潤を一貫して遮断することができることを示している。

【0215】

実施例 8：関節炎の T g 1 9 7 ヒト T N F トランスジェニックマウスモデルにおける S D A B - 0 1 の有効性

S D A B - 0 1 の治療効果を関節リウマチの T N F トランスジェニックマウスモデルで評価した。このモデルでは、T N F トランスジェニックマウスは、4 週齢～7 週齢で 1 0 0 % の発生率で慢性多発性関節炎を発症する。この疾患はヒト T N F の過剰発現に依拠する。様々な処理用量 ( 1 0 m g / k g 、 3 m g / k g 、 1 m g / k g 、 0 . 3 m g / k g 、 0 . 1 m g / k g 、 0 . 0 3 m g / k g ) の S D A B - 0 1 の効果を治療投与計画で研究した。1 0 0 % のマウスが疾患の徴候を示した場合に、動物を無作為に群に割り当てた。群に割り当てた後、S D A B - 0 1 、抗 T N F 抗体対照 2 、対照抗体又はビヒクルによる処理を開始し、1 週間に 2 回、7 週間継続した。全ての動物に、疾患症状の視覚的兆候に関して盲検で 1 週間ごとスコアリングを行った。研究の終了時に、後肢を摘出し、処理して、疾患の指標に関して顕微鏡によって評価した。

10

【0216】

実験 1 では、1 0 m g / k g 、 3 m g / k g 及び 1 m g / k g の用量での S D A B - 0 1 による処理は、ビヒクル処理群と比較して用量依存的に関節炎の更なる発症を予防することによる顕著な効果を示した。より高い用量の S D A B - 0 1 ( 1 0 m g / k g 、 3 m g / k g 、 1 m g / k g ) による処理は、両方の対照群と比較して組織病理学的スコアの顕著な改善を示した。そのため、臨床的に顕微鏡によって評価した、対照処理群と比較して関節炎の改善を示した最小治療用量は、1 m g / k g の S D A B - 0 1 であった。

20

【0217】

実験 2 では、1 0 m g / k g 、 3 m g / k g 及び 1 m g / k g の用量での S D A B - 0 1 による処理は、臨床スコア及び組織病理スコアの両方で退行を示し、確立された関節炎に対する治療効果を示した。そのため、臨床的に顕微鏡によって評価した、対照処理群と比較して関節炎の改善を示した最小治療用量は 1 m g / k g であった。

【0218】

要約すると、S D A B - 0 1 による抗 T N F 処理は、疾患の増悪の予防、並びに臨床スコア及び組織病理スコアの両方での退行から明らかのように、確立された関節炎に対する用量依存的な治療効果を示した。この処理の結果は、T g 1 9 7 マウス関節炎モデルにおいて、対照抗体処理がビヒクル処理で明らかとなった病変を再現した ( recapitulated ) ことから、ヒト T N F に対する特異的な拮抗作用の直接的な結果であった。

30

【0219】

実験設計

S D A B - 0 1 及び抗破傷風毒素 ( 対照 ) 抗体は、標準的な方法によって Pfizer で調製された。インフリキシマブ ( R e m i c a d e ( c ) 、抗 T N F 抗体、ロット番号 7 H D 9 8 0 1 6 ) を、MedWorld Pharmacy ( カタログ番号 N D C 5 7 8 9 4 - 0 3 0 - 0 1 ) から購入した。

40

【0220】

ヒト T N F - グロビンハイブリッド導入遺伝子 ( C B A × C 5 7 B L / 6 遺伝的バックグラウンドで維持される ) が同型の雄の T g 1 9 7 マウスを ( C B A × C 5 7 B L / 6 ) F 1 雌と交配させた。異型のトランスジェニック子孫を本研究に使用した。1 0 0 % のマウスが関節炎の兆候を示した場合、全てのマウスを処理群に無作為に割り当てた。動物を処理群に割り当てた日から、マウスで腹腔内注射による P F - 0 5 2 3 0 9 0 5 、対照抗体 ( 抗破傷風毒素抗体 ) 、インフリキシマブ、又はビヒクル対照 ( 1 0 m M L - ヒスチジン、5 % スクロースバッファー、ロット番号 C - 5 1 6 8 3 、 D - 2 0 2 1 6 ) の投与を開始した。投与用量及び投与頻度は各実験のサブセクションに記載されている。各マウスの両後肢を規定の間隔で以下のように疾患の進行に関して評価した：

50

- 0 関節炎なし（正常な外観及び屈曲）。
- 0.5 関節炎の発症（軽度の関節腫脹）。
- 1 軽度の関節炎（関節の歪み）。
- 1.5 上記のような指の変形を伴い、屈曲に対する強度が弱い。
- 2 中度の関節炎（重度の腫脹、関節変形、屈曲に対する強度がない）。
- 2.5 上記のような肢の指の変形。
- 3 重度の関節炎（屈曲及び重度の運動障害で検出される関節強直）。

## 【0221】

それから各マウスに0～3の平均スコアを割り当てた。疾患の進行をモニタリングするために、同様に関節炎を患っていたTg197マウスの4匹の同腹子を処理開始点である6週齢で屠殺した。本研究の終了時に、全てのマウスを屠殺し、足関節の組織病理学的分析を行った。実験マウスのスコアを4匹の同腹子のスコアと比較した。組織病理スコアを、以下のように0～4で顕微鏡によって盲検で評価した：

- 0 検出可能な病変なし
- 1 滑膜の過形成及び多形核浸潤の存在
- 2 パンヌス及び線維組織の形成、並びに局所的な軟骨下（正：subchondral）骨侵食
- 3 軟骨破壊及び骨侵食
- 4 広範な軟骨破壊及び骨侵食。

## 【0222】

## 実験1

実験1では、様々な用量のSDAB-01の有効性を関節リウマチの治療的なTNFトランスジェニックネズミモデルで評価した。マウスを関節炎の兆候に関して1週間に2回モニタリングした。100%のマウスが疾患の兆候を示した場合、全ての動物を処理群に無作為に割り当てた。異型のTg197マウスをそれぞれ8匹のマウスの群に分けた。1週間に2回のSDAB-01（10mg/kg、3mg/kg、1mg/kg、0.3mg/kg、0.1mg/kg）、対照抗体（10mg/kg）、インフリキシマブ（10mg/kg、3mg/kg）又はビヒクル（ヒスチジン/スクロースバッファー、10mL/kg）による処理を開始した。処理を7週間継続し、関節の形態の肉眼的変化（関節炎スコア）及び各動物の平均体重を週ごとに記録した。CO<sub>2</sub>を用いて安楽死させた後、血清を回収し、各動物の2つの後肢を組織学的評価のために処理した。

## 【0223】

実験1では、SDAB-01の投与は、ビヒクル処理群と比較して体重減少の改善（図14）及び疾患の進行の抑制（図15）により極めて顕著な効果を示した。インフリキシマブは臨床スコアを安定させる上でSDAB-01（10mg/kg、3mg/kg、1mg/kg）投与と同一であった。

## 【0224】

スコアリングの最終日に評価した疾患の重症度を図16に示す。疾患症状が低減した動物の数は、ビヒクル又は対照抗体と比較してSDAB-01（10mg/kg、3mg/kg、1mg/kg）及びインフリキシマブ（10mg/kg）で処理した群で最大であった。

## 【0225】

各マウスの2つの後肢のそれぞれに由来するヘマトキシリン及びエオシンで染色した一切片を盲検で顕微鏡によって評価した。確立された関節炎に対するSDAB-01（10mg/kg、3mg/kg、1mg/kg）による処理は、疾患の増悪を抑え、組織病理学的スコアの退行を段階的にもたらすことによって有効性を示した。この処理の結果は、対照抗体処理がビヒクル処理で明らかとなった病変を再現したことからヒトTNF に対する特異的な拮抗作用の直接的な結果であった（図17、図18）。

## 【0226】

## 実験2

実験2では、1週間に2回、10mg/kg、3mg/kg、1mg/kg、0.3m

10

20

30

40

50

g / k g 及び 0 . 1 m g / k g の S D A B - 0 1 による処理の効果を反復し、1 週間に 2 回、0 . 0 3 m g / k g の S D A B - 0 1、並びに 1 週間に 2 回、1 0 m g / k g 及び 3 m g / k g のインフリキシマブを含んでいた。S D A B - 0 1 ( 1 0 m g / k g、3 m g / k g、1 m g / k g、0 . 3 m g / k g、0 . 1 m g / k g 及び 0 . 0 3 m g / k g ) の投与は体重減少を改善することにより顕著な効果を示した ( 図 1 9 )。しかしながら、ビヒクル処理群と比較して 1 0 m g / k g、3 m g / k g 及び 1 m g / k g の用量しか疾患の進行を抑えるのに成功しなかった ( 図 2 0 )。S D A B - 0 1 ( 0 . 3 m g / k g ) 又はインフリキシマブ ( 3 m g / k g ) による処理によって、ビヒクル処理群又は対照抗体処理群のいずれかと比較して、臨床評価の中程度であるが有意ではない改善がもたらされた。

10

## 【 0 2 2 7 】

スコアリングの最終日に評価した疾患の重症度を図 2 1 に示す。疾患症状が低減した動物の数は、ビヒクル対照と比較して S D A B - 0 1 ( 1 0 m g / k g、3 m g / k g、1 m g / k g ) 及びインフリキシマブ ( 1 0 m g / k g ) で処理した群で最大であった。

## 【 0 2 2 8 】

各マウスの 2 つの後肢のそれぞれに由来するヘマトキシリン及びエオシンで染色した一切片を盲検で顕微鏡によって評価した。S D A B - 0 1 ( 1 0 m g / k g、3 m g / k g、1 m g / k g ) による処理は、疾患の増悪を抑え、組織病理学的スコアの退行を段階的にもたらずることによって確立された関節炎に対する有効性を示した ( 図 2 2 )。この処理の結果は、ヒト対照抗体処理がビヒクル処理で明らかとなった病変を再現したことからヒト T N F に対する特異的な拮抗作用の直接的な結果であった。ビヒクル処理群のスコアと対照抗体処理群のスコアとに有意な差がなかったことから、3 つのより高い用量の S D A B - 0 1 ( 1 0 m g / k g、3 m g / k g 及び 1 m g / k g ) は、両方の対照群と比較しての組織病理スコアの有意な低減で明らかなるように効果的であった ( 図 2 3 )。したがって臨床的に顕微鏡によって評価された最小有効用量は、1 m g / k g の S D A B - 0 1 であった。

20

## 【 0 2 2 9 】

3 つのより高い用量の S D A B - 0 1 ( 1 0 m g / k g、3 m g / k g 及び 1 m g / k g ) による処理によって、組織病理スコアの改善がもたらされた。これらのスコアは、本研究の開始時に回収した対照同腹子のスコアよりも有意に小さかった。

30

## 【 0 2 3 0 】

1 m g / k g の M E D では、定常状態 ( 出血終了時 ( end-bleed ) ) の血清 S D A B - 0 1 の実測濃度の平均は 4 . 8 1  $\mu$  g / m L であり、これは T g 1 9 7 マウスへの 1 m g / k g の単回 I P 投与後の S D A B - 0 1 の薬物動態プロファイルに基づき予測された 7 . 7 0  $\mu$  g / m L の定常状態 ( 出血終了時 ) の血清濃度と比較して 2 倍差内にあった。定常状態 ( 出血終了時 ) の血清 S D A B - 0 1 濃度の平均は、0 . 3 m g / k g、3 m g / k g 及び 1 0 m g / k g 用量群でそれぞれ 0 . 2 1  $\mu$  g / m L、4 2 . 1  $\mu$  g / m L 及び 1 2 0  $\mu$  g / m L であった。0 . 0 3 m g / k g 及び 0 . 1 m g / k g 用量群では、1 匹を除いて全ての動物が 0 . 0 4 9  $\mu$  g / m L の定量限界未満の血清 S D A B - 0 1 濃度を有していた。

40

## 【 0 2 3 1 】

実施例 9 . ピチア・パストリスで発現した二価 S D A B 分子の P E G 化

ジチオスレート ( D T T ) を中和画分に添加し、S D A B 分子のカルボキシ末端のシステイン間で形成される潜在的なジスルフィド架橋を還元した。1 0 m M の最終濃度の D T T 及び 4 で一晩のインキュベーションが最適であることが見出された。還元を分析用のサイズ排除クロマトグラフィ ( S E C ) により評価した。それから、2 5 m l の還元型の S D A B 分子を 7 5 m l のダルベッコ P B S ( D - P B S ) に添加し、D - P B S で平衡状態にした S u p 7 5 1 0 / 3 0 0 G L カラムに注入した。

## 【 0 2 3 2 】

非還元型の S D A B 分子及び D T T を D - P B S で平衡状態にした H i l o a d 2 6

50

/ 60 Superdex 75 調製グレードのカラムでの分取SECにより取り除いた。

【0233】

還元型のSDAB分子の濃度を、280nmで吸光度を測定することにより決定した。Uvikon 943 Double Beam UV/VIS分光光度計を使用した。吸光度(absorption)を245nm~330nmの波長スキャンで測定した。Quartz Suprasilでできた2つの精密セルを使用した。初めに、ブランクの吸光度を、900 $\mu$ lのD-PBSを充填した2つのセルを配置することにより280nmで測定した。サンプルを100 $\mu$ lのサンプルを第1のセルに添加し、読み取る前にそれを混合することにより希釈した(1/10)。サンプルの吸光度を280nmで測定した。濃度は以下の式で算出した：

10

【0234】

SDAB分子をPEG化するために、5xモル過剰の新たに作製した1mMのPEG40溶液を還元型のSDAB分子溶液に添加した。

【0235】

SDAB分子-PEG混合物を穏やかにかき混ぜながら室温で1時間、インキュベートし、その後4に移行した。PEG化を分析用SECで評価した。その後、25 $\mu$ lのSDAB分子を75 $\mu$ lのD-PBSに添加し、D-PBSで平衡状態にしたSup75HR 10/300カラムに注入した。PEG化SDAB分子をカラムの排除体積範囲(75kDa超)で溶出させた。

20

【0236】

PEG化SDAB分子と非PEG化SDAB分子とをカチオン交換クロマトグラフィ(CEX-バッファーAは25mMのクエン酸であり、バッファーBはPBS中の1MのNaClであった)で分離した。サンプルを希釈し、電気伝導率を5mS/cmとし、pHを4.0に調整した。カラムを平衡状態にし、サンプル適用後、バッファーAで十分に洗浄した。PEG化SDAB分子を3CV勾配で溶出した。

【0237】

回収したSDAB分子では、D-PBSで平衡状態にしたHiLoad 26/60 Superdex 75 prep gradeカラムでのSECによりD-PBSへとバッファーを交換した。続いてアニオン交換カラムを通すことによってSDAB分子をLPSフリーにした。このカラムを1MのNaOHで洗い流し(sanitized)、その後内毒素フリーD-PBSで平衡状態にした。

30

【0238】

ビオチン化

SDAB分子をビオチン化するために、10mMのストック溶液の5xモル過剰のビオチンを還元型のSDAB分子に添加した。ビオチンSDAB分子混合物を穏やかにかき混ぜながら室温で1時間インキュベートし、それから4で保存した。

【0239】

ビオチン化SDAB分子の純度を分析用SECにより制御した。続いて、25 $\mu$ lのビオチン化SDAB分子を75 $\mu$ lのD-PBSに添加し、D-PBSで平衡状態にしたSup75HR 10/300カラムに注入した。得られたクロマトグラムは、SDAB分子ビオチンが更に精製する必要がないことを示しており、遊離スルフヒドリルの酸化によるSDAB分子の二量化は検出することができなかった。脱塩カラムであるSephadex G25微細カラムを通すことによりD-PBSへのバッファーの交換を行った。

40

【0240】

アニオン交換カラムを通すことによって、SDAB分子-ビオチンをLPSフリーにした。カラムを1MのNaOHで一晩洗い流し、それからD-PBSで平衡状態にした。

【0241】

実施例10a. 単回の静脈投与及び皮下投与後の雄のカニクイザルにおけるSDAB-01の薬物動態

50

第1の研究では、SDAB-01は、3 mg/kg (タンパク質含有量ベースで)で単回のIVボラス注射又はSCボラス注射によって、雄のカニクイザル(1群当たりn=3: IVではサルSAN1~3、SCではサルSAN4~6)に投与した。PK分析のために血清サンプルを投与前(0時間)及び投与後0.083時間~1536時間で、それぞれの動物から回収した。更なる血清サンプルを投与前(0時間)及び投与後336時間、672時間、1008時間及び1536時間で採取し、抗SDAB-01抗体の形成を評価した。血清SDAB-01濃度を、限定(qualified)酵素免疫測定法(ELISA)を用いて決定し、結果を用いて、SDAB-01に関する薬物動態パラメータを決定した。抗SDAB-01抗体の存在を、限定ELISAを用いて決定した。

#### 【0242】

IV投与又はSC投与後の雄のカニクイザルにおけるSDAB-01の平均血清濃度-時間プロファイルを図24に示す。サルにおけるIV投与又はSC投与後のSDAB-01の平均薬物動態パラメータを表5にまとめる。

#### 【0243】

表5: 3 mg/kg (タンパク質含有量ベースで)の単回のIV投与又はSC投与後の雄のカニクイザル(1つの処理群当たりn=3)におけるSDAB-01の平均(±SD)薬物動態パラメータ

【表5】

経路 Route	CL (mL/hr/kg)	Vd <sub>ss</sub> (mL/kg)	t <sub>1/2</sub> (hr)	AUC <sub>0-∞</sub> (µg·hr/mL)	C <sub>max</sub> (µg/mL)	T <sub>max</sub> (hr)
IV	0.234 ±0.028	51.5 ±8.15	147 ±78.4	12919 ±1453	85.4 <sup>a</sup> ±2.58	NA
SC	NA	NA	123 ±11.5	8958 ±526	31.7 ±2.72	72 ±0

a. SAN1及びSAN3でのIV投与後5分での濃度; SAN2でのIV投与後0.5時間での濃度。  
NA. 該当なし

#### 【0244】

SDAB-01は3 mg/kgのSC投与後に注射部位から十分に吸収された。3匹の雄のカニクイザルにおける3 mg/kgの単回SC投与後、31.7±2.72 µg/mLの平均最大血清濃度(C<sub>max</sub>)が投与後72時間で観察され、それによりSC注射後のSDAB-01の吸収が緩やかなプロセスであることが示された。3匹のサルでの終末相半減期は110時間~131時間の範囲であり、平均値は123時間(およそ5日間)であった。SC投与後に観察される相対的に短いt<sub>1/2</sub>は、抗SDAB-01抗体の形成によるものであり得る。

#### 【0245】

抗SDAB-01抗体に関して陽性であるSC処理群由来の2匹のサル。3匹のサルの平均AUCは8958 µg·hr/mLであった。サルにおけるSC投与後のバイオアベイラビリティは、IV処理サル及びSC処理サルの両方での抗SDAB-01抗体の形成のために本研究からは正確に決定することができない。しかしながら、SC投与とIV投与との間のAUC<sub>0-∞</sub>比を用いることで推測値を得ることができ、この推測値はおよそ69.3%であることが見出された。この値はサルでのSDAB-01のバイオアベイラビリティを低く推測する又は高く推測する場合があることから、使用には注意が必要である。

#### 【0246】

まとめると、抗SDAB-01抗体の形成は抗SDAB-01を投与した動物の50%(3/6)で検出された。抗SDAB-01抗体の発生率は、3 mg/kgのIV群の動物で33.3%(1/3)であり、3 mg/kgのSC群の動物で66.7%(2/3)

10

20

30

40

50

であった。抗体（2.19～2.52のlog力価）をサルSAN1（IV処理群）及びサル5（SC処理群）での投与後1008時間及び1536時間で検出した。抗体（1.71のlog力価）をサルSAN4（SC処理群）での投与後1536時間で検出した。全ての投与前サンプルが陰性であることから、これらの動物はSDAB-01に対する免疫応答を有していると考えられた。循環レベルのSDAB-01は抗SDAB-01抗体の検出を妨げる可能性があることに留意されたい。

#### 【0247】

SDAB-01の半減期は抗SDAB-01抗体形成に関して陽性であったサルにおいてより短く、それにより抗SDAB-01抗体の形成が、サルにおけるSDAB-01の薬物動態に対して影響を与えることが示唆された。

10

#### 【0248】

第2の研究では、雄及び雌のカニクイザル（1群当たりn=12）に、単回の5mg/kgのIV用量、100mg/kgのIV用量及び100mg/kgのSC用量のSDAB-01を投与し、血清濃度を、限定ELISAを用いて測定した。SDAB-01の5mg/kg又は100mg/kgのIV投与後、平均AUC<sub>0-∞</sub>、CL及びt<sub>1/2</sub>値はそれぞれ、24600µg・h/mL及び395000µg・h/mL、0.210mL/hr/kg及び0.263mL/hr/kg、並びに149時間及び144時間であった。全身曝露（C<sub>max</sub>、AUC<sub>0-∞</sub>、及びAUC<sub>0-168</sub>）は、用量が増大するにつれておよそ用量に比例して増大した。単回の100mg/kgのSC投与後、平均T<sub>max</sub>、AUC<sub>0-∞</sub>及びt<sub>1/2</sub>値はそれぞれ、150時間、352000µg・h/mL及び165時間であった。SC投与後のバイオアベイラビリティ（100mg/kgのIV投与及びSC投与の後の平均AUC<sub>0-∞</sub>値を用いて推測した）は89%であった。抗SDAB-01抗体の発生率は、5mg/kg（IV）用量群、100mg/kg（IV）用量群、及び100mg/kg（SC）用量群それぞれで動物12匹中4匹（33.3%）、動物12匹中1匹（8.3%）、及び動物12匹中1匹（8.3%）であった。

20

#### 【0249】

実施例10b. SDAB-01（TNF SDAB分子2×20PEG）、TNF SDAB分子4×10PEG、及びTNF SDAB分子の直鎖1×40PEGの血清薬物動態の比較

30

TNF SDAB分子の分岐2×20kDa PEG構築物、TNF SDAB分子の分岐4×10kDa PEG構築物、及びTNF SDAB分子の直鎖1×40kDa PEG構築物の血清PKプロファイルを2mg/kg又は3mg/kg（タンパク質含有量ベースで）の単回IV投与後のB6CBAF1/Jマウス、スプラーグドローラット、及びカニクイザルで検査した。血清濃度を特異的ELISA（マウス及びサル）又はガンマ線計測（ラット）のいずれかを用いて決定した。

#### 【0250】

検査した3種全てで、分岐2×20kDa PEG構築物は、直鎖1×40kDa PEG構築物と比較して有意に高い曝露量（AUC）を有していた（p<0.05）（図25及び表6～表8）。特に、直鎖1×40kDa PEG構築物と比べての分岐2×20kDa PEG構築物に関する平均用量で正規化したAUC<sub>0-∞</sub>の相対的増大は、マウス、ラット及びサルでそれぞれ約94%、102%及び136%であった。したがって、分岐2×20kDa PEG構築物の総身体クリアランス（CL）は、直鎖1×40kDa PEG構築物と比較してより低く、分岐2×20kDa PEGの排除半減期（t<sub>1/2</sub>）は、直鎖1×40kDa PEG構築物と比較してより長いと考えられた。特に、分岐2×20kDa PEG構築物に関する平均CL値の相対的低減は、マウス、ラット及びサルでそれぞれ約48%、50%及び66%であり、平均t<sub>1/2</sub>値の相対的増大は、マウス、ラット及びサルでそれぞれ43%、26%、54%であった。

40

#### 【0251】

ラット及びサルにおいて、分岐4×10kDa PEG構築物は、直鎖1×40kDa

50

PEG構築物と比較してより高い平均血清AUC<sub>0~</sub>及びより低いCLも有していたが、マウスではそうではなかった(表6~表8)。ラット及びサルでは、直鎖構築物と比べての分岐4×10kDa PEG構築物に関するPKパラメータの変化の程度は、分岐2×20kDa PEG構築物に関するPKパラメータの変化の程度と比較してあまり顕著なものではなかった(AUC<sub>0~</sub>の43%~51%の増大及びCLの35%~45%の低減)。

## 【0252】

表6. B6CB AF1/Jマウスへの単回IV投与後のPEG化TNF SDA B分子の薬物動態パラメータ。

## 【表6】

構築物	用量 (mg/kg)	C <sub>5min</sub> (µg/mL)	AUC <sub>0-∞</sub> /Dose(µg·hr/mL)/(mg/kg)	AUC <sub>last</sub> /Dose(µg·hr/mL)/(mg/kg)	CL(mL/hr/kg)	Vd <sub>ss</sub> (mL/kg)	t <sub>1/2</sub> (hr)
TNFα SDA B分子の分岐2×20kDa PEG	2	55	2179	2121±61*	0.46	40	66
TNFα SDA B分子の分岐4×10kDa PEG	3	80	1193	1174±23	0.84	58	56
TNFα SDA B分子の直鎖1×40kDa PEG	3	89	1126	1122±22	0.89	46	46

10

20

## 【0253】

雄のB6CB AF1/Jマウスに単回IVボラス用量の指定の試験物質を投与した。血清サンプルを1回の投与後5分~14日目で各マウス(1つの時点当たりn=3)から採取し、血清濃度を特異的ELISAにより決定した。PKパラメータを、スパースサンプリング法を用いた非コンパートメント分析により決定し、AUC<sub>last</sub>/投与の値の統計分析を、ANOVAを用いてダネット事後検定により行った。直鎖1×40 PEG群を対照として用いた。

30

## 【0254】

アスタリスク(\*)は直鎖PEG群と比べての統計的に有意な差異(p<0.05)を示す。

C<sub>5分</sub> = IV投与後、最初のサンプリング時点である5分での濃度。

CL = 血清濃度ベースの総身体クリアランス。

Vd<sub>ss</sub> = 定常状態での分布体積。

t<sub>1/2</sub> = 排除半減期。

AUC<sub>0~</sub> = 時間0~無限大での濃度時間曲線下面積。

AUC<sub>last</sub> = 時間0~定量可能な濃度が見られるサンプリング時間での濃度時間曲線下面積。

40

## 【0255】

表7. スプラーグドローラットへの単回IV投与後の<sup>125</sup>Iで標識したPEG化TNF SDA B分子の薬物動態パラメータ(平均±SD)

【表 7】

化合物	用量 (mg/kg)	C <sub>5min</sub> ( $\mu\text{g}$ eq./mL)	AUC <sub>0-∞</sub> ( $\mu\text{g}$ eq.·hr/mL)	AUC <sub>0-∞</sub> /Dose ( $\mu\text{g}$ eq.·hr/mL/ mg/kg)	CL (mL/hr/kg)	Vd <sub>ss</sub> (mL/kg)	t <sub>1/2</sub> (hr)
TNF $\alpha$ SDA B分子の分岐2× 20kDa PEG	2	46 ± 4.9	2025 ± 214	1013 ± 107	1.0 ± 0.12*	53 ± 5.5*	44 ± 3.5
TNF $\alpha$ SDA B分子の分岐4× 10kDa PEG	2	44 ± 2.2	1514 ± 78	757 ± 39	1.3 ± 0.07*	63 ± 4.1	42 ± 8.2
TNF $\alpha$ SDA B分子の直鎖1× 40kDa PEG	2	39 ± 2.6	1001 ± 62	500 ± 31	2.0 ± 0.13	65 ± 2.2	35 ± 5.7

10

20

## 【0256】

雄のスプライングドローラットに、単回IVボラス用量の指定の125Iで標識した試験物質を与え、血清サンプルを投与後5分～24日目で採取し、血清中の放射性当量(RE)濃度を、ガンマ線計測により決定した。PKパラメータを、非コンパートメント分析によりそれぞれ個々の動物で算出した(2×20kDa PEG構築物及び4×10kDa PEG構築物ではn=7及び1×40kDa PEG構築物ではn=5)。AUC<sub>0-∞</sub>、AUC<sub>0-∞</sub>/投与、CL、Vd<sub>ss</sub>及びt<sub>1/2</sub>の値の統計分析を、ANOVAを用いてダネット事後検定により行った。直鎖1×40kDa PEG群を対照として用いた。アスタリスク(\*)は直鎖PEGと比べての統計的に有意な差異(p<0.05)を示す。

30

## 【0257】

表8. カニクイザルへの単回IV投与後のPEG化TNF SDA B分子の薬物動態パラメータ(平均±SD)

【表 8】

構築物	用量 (mg/kg)	C <sub>5min</sub> (µg/mL)	AUC <sub>0-∞</sub> (µg·hr/mL)	AUC <sub>0-∞</sub> /Dose (µg·hr/mL)/(mg/kg)	CL (mL/hr/kg)	Vd <sub>ss</sub> (mL/kg)	t <sub>1/2</sub> (hr)
TNF $\alpha$ SDA B分子の分岐2× 20kDa PEG	3	82 ± 6.4	13293 ± 820*	4431 ± 273*	0.23 ± 0.01*	57 ± 4.8*	188 ± 19*
TNF $\alpha$ SDA B分子の分岐4× 10kDa PEG	3	76 ± 3.2	8055 ± 736*	2685 ± 245*	0.37 ± 0.03*	79 ± 12	153 ± 30*
TNF $\alpha$ SDA B分子の直鎖1× 40kDa PEG	3	111 ± 26	5637 ± 263	1879 ± 88	0.67 ± 0.10	78 ± 13	122 ± 12

10

20

## 【0258】

雄のカニクイザルに、単回IVボラス用量の指定の試験物質を投与し、血清サンプルを2×20kDa PEG構築物、4×10kDa PEG構築物及び1×40kDa PEG構築物でそれぞれ、5分～62日目、57日目及び56日目で採取し、血清濃度をELISAにより決定した。PKパラメータを非コンパートメント分析によりそれぞれ個々の動物で算出した(1つの構築物当たりn=3)。急激な濃度低下を伴うデータ点をPK算出には使用しなかった(2×20kDa PEG構築物を投与した3匹のサルの中の1匹)。AUC<sub>0-∞</sub>、AUC<sub>0-∞</sub>/投与、CL、Vd<sub>ss</sub>及びt<sub>1/2</sub>の値の統計分析を、ANOVAを用いてダネット事後検定により行った。直鎖1×40kDa PEG群を対照として用いた。アスタリスク(\*)は直鎖PEG群と比べての統計的に有意な差異(p<0.05)を示す。

30

## 【0259】

更なる研究をSDAB-01構築物のみで行った:

## 【0260】

初めに、マウス及びサルの血清サンプルを、2つの異なる免疫測定法フォーマットを用いて分析した:全分子対分子のタンパク質部分を測定する免疫測定法。タンパク質検出アッセイは、ビオチン化標的分子を利用することによりタンパク質部分を介してPEG化薬剤コンジュゲートを捕捉した。ポリクロナル抗薬剤抗体検出器は分子のタンパク質部分とも結合し、そのためアッセイは遊離タンパク質及びPEG化タンパク質を検出した。全分子検出アッセイはProtein Detectionアッセイと同じ捕捉モードを使用した。モノクロナルウサギ抗PEG抗体を介してPEG部分によって検出が起こった。この検出抗体はPEG分子のメトキシ基に特異的である。このアッセイフォーマットはPKプロファイルにはほとんど影響を与えず、マウス及びサルの動物モデルでパラメータを算出した。

40

## 【0261】

第2に、SDAB-01の薬物動態プロファイルを、マウスへの単回SC投与又はIP投与後に検査した。雄のB6CBaF1/Jマウスへの単回の2mg/kgのSC投与又

50

は 3 mg / kg の IP 投与後、Tmax は 24 時間であり、t1/2 値はそれぞれ、52.4 時間（およそ 2.2 日）及び 57.7 時間（およそ 2.4 日）であった。IP 投与又は SC 投与後のバイオアベイラビリティはそれぞれ、68.7% 及び 56.6% であった。雄の Tg197 マウスへの単回の 0.3 mg / kg の IP 投与後、Tmax、t1/2 及び AUC0~ の値はそれぞれ、6 時間、24.6 時間及び 165 µg · h / mL であった。1 mg / kg への IP 用量の増大によって、暴露量がおおよそ用量に比例して増大し（AUC0~ = 528 µg · h / mL）、Tmax（6 時間）及び t1/2（21.4 時間）の値は、0.3 mg / kg で観察されたものと同程度であった。

#### 【0262】

実施例 10c. SDAB-01 (TNF SDAB 分子 2 × 20 PEG) 及び TNF SDAB 分子の直鎖 1 × 40 PEG の生体分布

TNF SDAB 分子の分岐 2 × 20 kDa PEG 構築物及び TNF SDAB 分子の直鎖 1 × 40 kDa PEG 構築物の生体分布を、0.3 mg / kg（タンパク質含有量ベースで）の 125I で標識した試験物質の単回 IV 投与後に B6CBAF1/J マウスにおいて 7 日間（168 時間）にわたって検査した。血清及び組織での放射性当量（RE）濃度を、ガンマ線計測を用いて決定し、血清及び組織での暴露量（AUC0~168 hr）及び組織対血清（T/S）AUC 比を算出した。

#### 【0263】

非放射性標識 PEG コンジュゲートによる B6CBAF1/J マウスでの先の研究の観察結果と同様に、分岐 2 × 20 kDa PEG 構築物は、直鎖 1 × 40 kDa 構築物と比較して約 80% 高い AUC0~168 hr を有していた（p < 0.05）（図 26）。分岐構築物は、試験した全てではないが幾つかの組織で有意に高い暴露量も有していた（図 26）。特に、直鎖 1 × 40 kDa PEG 構築物と比べての分岐 2 × 20 kDa PEG 構築物に関する AUC0~168 hr の増大は、心臓、肺、筋肉、皮膚及び胃でそれぞれ 72%、115%、43%、55% 及び 80% であった。T/S AUC 比（表 9）及び T/S 濃度比（データは示していない）は、これらの組織に関して 2 つの構築物間でおおよそ同様のものであった。

#### 【0264】

血清、心臓、肺、筋肉、皮膚及び胃に対して、脂肪、腎臓、肝臓及び脾臓の AUC0~168 hr は 2 つの構築物で同程度であり、分岐 2 × 20 kDa PEG 構築物でより低い T/S AUC 比（表 9）及び T/S 濃度比（データは示していない）をもたらした。

#### 【0265】

TNF SDAB 分子の直鎖 1 × 40 PEG 及び SDAB-01 の両方で、投与後 1 週間（168 時間）以内に総投与放射能のおおよそ 60% が尿中に排出され、尿中に排出される放射能のほとんど（およそ 70%）が遊離ヨウ素に起因するものであった。

#### 【0266】

表 9. B6CBAF1/J マウスへの単回の 0.3 mg / kg の IV 投与後の 125I で標識した PEG 化 TNF ナノボディの組織対血清（T/S）AUC 比

10

20

30

【表 9】

組織	TNF $\alpha$ ナノボディ (商標) 分岐2 $\times 20\text{ kDa}$ PEG	TNF $\alpha$ ナノボディ (商標) 直鎖1 $\times 40\text{ kDa}$ PEG
fat 脂肪	0.01	0.02
heart 心臓	0.04	0.04
kidney 腎臓	0.03	0.07
liver 肝臓	0.02	0.04
lung 肺	0.10	0.08
muscle 筋肉	0.01	0.01
skin 皮膚	0.06	0.07
spleen 脾臓	0.02	0.04
stomach 胃	0.04	0.05

10

20

## 【0267】

B6CBAF1/Jマウスに、 $^{125}\text{I}$ で標識したTNF S D A B分子の分岐2  $\times$  20 kDa PEG (黒色のバー) 又はTNF S D A B分子の直鎖40 kDa PEG (灰色のバー) の単回の0.3 mg/kgのIVボラス投与を行った。血清サンプル及び組織サンプル(1つの時点当たりn=8~12)を7日間(168時間)にわたり回収し、組織及び血清での放射性当量(RE)濃度を、本明細書に記載のようにガンマ線計測によって決定した。血清のAUC<sub>0~168hr</sub>( $\mu\text{g} \times \text{当量} / \text{mL}$ 単位で)及び各組織のAUC<sub>0~168hr</sub>( $\mu\text{g} \times \text{当量} / \text{g}$ )を、スパスサンプリング法を用いた非コンパートメント分析により決定し、組織対血清(T/S)AUC比(AUC<sub>0~168hr</sub>、組織 / AUC<sub>0~168hr</sub>、血清)を算出した。

30

## 【0268】

実施例11. S D A B分子及び対照分子の生物物理学的分析

3つのTNF S D A B分子40 kDa PEGコンジュゲートの異なるPKプロファイルに対する潜在的原因を調べるために、更なる生物物理学的分析を実施した。

## 【0269】

C E X - H P L Cを行い、3つの構築物の電荷不均一性をモニタリングした。代表的なクロマトグラフィプロファイルを図27に示す。かなりの量の電荷不均一性が全てのPEG化TNF S D A B分子コンジュゲートで観察された。直鎖PEGコンジュゲートの主ピークは、2つの分岐コンジュゲート(2  $\times$  20 kDa及び4  $\times$  10 kDa)と比較した場合により遅い保持時間で溶出し、そのことにより直鎖コンジュゲートは分岐コンジュゲートと比較して表面上により多くの正電荷を有することが示唆された。2つの分岐コンジュゲート(2  $\times$  20 kDa及び4  $\times$  10 kDa)に関する主ピークの保持時間は同様のものであった。比較すると、非コンジュゲートタンパク質は、全ての試験したPEG化コンジュゲートよりもかなり遅く溶出し、そのことにより非コンジュゲートタンパク質が更に大きい正の表面電荷密度を有することが示された。非コンジュゲートタンパク質の理論等電点は9を超え、そのためこのタンパク質はpH4.0であるC E X泳動バッファー中

40

50

で正味の正電荷を有すると予測される。

【0270】

サイズ分布及び質量分布を、UV吸光度によってモニタリングされる多角度光散乱(MALS)、示差屈折率(dRI)、及びオンラインの準弾性光散乱(QELS)によるSE-HPLCを用いて決定した。TNF S D A B分子-PEGコンジュゲートでのPEGが280nmで吸収しないことから、UV検出及びdRI検出によるSEC-MALSを用いて、コンジュゲートにおけるタンパク質及びPEGの分布を決定することが可能である。算出したタンパク質及びPEGの質量分布は3つ全てのコンジュゲートで互いに一致していた(表10及び図28)。

【0271】

分岐4×10kDa PEGコンジュゲートは、SEC-MALSで、分岐2×20kDa PEGコンジュゲート及び直鎖1×40kDa PEGコンジュゲートよりも著しく遅い溶出体積を有しており、そのことにより分岐4×10kDa PEGコンジュゲートが他の2つのコンジュゲートと比較して流体力学的により小さいことが示された(図29)。4×10kDa分岐PEGコンジュゲートのより小さい流体力学半径(Rh、測定されるサンプルと同じ拡散係数を有する球体の半径として定義される)はQELS測定によって確認された(表10)。

【0272】

MALSによって測定される散乱光の角度依存性を用いて、二乗平均平方根(RMS)半径の分布を決定することができる。RMS半径(旋回の半径、Rgとも称される)は、任意の所与の時点での分子の全ての部分のその質量の中心からの二乗平均平方根距離の測定結果であり、分子が専有する平均体積についての情報を与える。分岐2×20kDa PEGコンジュゲート及び分岐4×10kDa PEGコンジュゲートの両方が、直鎖PEGコンジュゲートよりも小さいRg(RMS半径)を有していた(表10及び図29)。

【0273】

最後に、立体配座情報を、RMS/Rh(Rg/Rh)比を算出することにより得ることができる:比の値が大きければ、分子がより伸長する又は拡張する。RMS/Rh比は直鎖1×40kDa PEGコンジュゲート、分岐2×20kDa PEGコンジュゲート及び分岐4×10kDa PEGコンジュゲートでそれぞれ、1.77、1.45及び1.37であり、それにより直鎖1×40kDa PEGを有するコンジュゲートは、分岐PEGを含有するより小型のコンジュゲートよりも拡張した立体配座を有することが示された(表10)。PEG化コンジュゲートを分析するのに用いたSE-HPLC法は、非コンジュゲートタンパク質の比較(side-by-side)分析には好適ではないことに留意されたい。

【0274】

表10. SEC-MALS分析によるPEG化TNF S D A B分子の算出された重量

10

20

30

【表 10】

	総モル質量 (kDa)	PEG モル質量 (kDa)	タンパク質 モル質量 (kDa)	RMS(Rg) 半径 (nm)	Rh 半径 (nm)	RMS/Rh
TNF $\alpha$ SDAB 分子の直鎖1 $\times$ 40 kDa PEG	64.86	39.01	25.85	9.9	5.6	1.77
TNF $\alpha$ SDAB 分子の分岐2 $\times$ 20 kDa PEG	64.54	38.97	25.57	8	5.5	1.45
TNF $\alpha$ SDAB 分子の分岐4 $\times$ 10 kDa PEG	61.78	36.29	25.49	7	5.1	1.37

10

## 【0275】

全てのサンプルを2.0 mg/mLに希釈し、100  $\mu$ Lの各サンプルを30 に保持したSuperose 6カラム(0.5 mL/分で400 mMのNaCl、20 mMのNaPO<sub>4</sub>(pH7.2))に注入した。モル質量、Rh及びRMSを、Wyatt TechnologiesのASTRA V v5.3.4.14を用いて決定した。

20

## 【0276】

3つ全てのSDAB PEGコンジュゲート及び非PEG化タンパク質は、細胞ベースのバイオアッセイ(U937細胞でのTNF 誘導性のアポトーシスをベースとする)においてPEG化参照材料と比べて92%以上の生体活性を有し、それによりPEG化がタンパク質の活性を変えなかったことが示唆された。

## 【0277】

表11. タンパク質配列



【表 1 2】

Name 名称	SEQ ID NO 配列番号	Sequence 配列
TNF30-30GS-TNF30-C (TNF55)	5	AtgagatttccttcaatTTTTactgctgttttattcgcagcatcctccgcattagc tgctccagtcacactacaacagaagatgaaacggcacaaattccggctgaagctg tcatcgggttactcagatttagaaggggatttcgatgttgctgttttgccattttcc aacagcacaaataacgggttattgtttataaataactactattgccagcattgctgc taaagaagaaggggtatctctcgagaaaagagaggtgcagctggaggctggtg gaggcttgggtcaaccgggtggcagcctgcgtttatcctgcgcagcctctggtttc accttagtgattactggatgtattgggttcgtcaggctccagggaaaggcctcga atgggtgtcggaaattaataactaatggctttatcacaaaataccggacagcgtta agggccgtttcaccatctcccgcgataacgctaaaaacacgctgtatctgcaaatg aacagcctgcgtcctgaagacacggccgtatattactgtgcgcgctctccgagcgg ttttaaccgcccaggggacccttgtcaccgtctcctcaggcggaggaggcagcg gtggcggggtagcggcggaggaggcagcgggtggcgggggatccggcggaggaggc agcgggtggcggggtagcggaggtgcagctggaggctggaggctgggttca accgggtggcagcctgcgtttatcctgcgcagcctctggtttcaccttagtgatt actggatgtattgggttcgtcaggctccagggaaaggcctcgaatgggtgtcggaa attaataactaatggctttatcacaaaataccggacagcgttaagggccgtttcac catctcccgcgataacgctaaaaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgcgtc ctgaagacacggcctatattactgtgcgcgctctccgagcgggttttaaccgccc caggggacccttgttaccgtctcctgctaataa
TNF30-30GS-TNF30-gggC (TNF56)	6	atgagatttccttcaatTTTTactgctgttttattcgcagcatcctccgcattagc tgctccagtcacactacaacagaagatgaaacggcacaaattccggctgaagctg tcatcgggttactcagatttagaaggggatttcgatgttgctgttttgccattttcc aacagcacaaataacgggttattgtttataaataactactattgccagcattgctgc taaagaagaaggggtatctctcgagaaaagagaggtgcagctggaggctggtg gaggcttgggtcaaccgggtggcagcctgcgtttatcctgcgcagcctctggtttc accttagtgattactggatgtattgggttcgtcaggctccagggaaaggcctcga atgggtgtcggaaattaataactaatggctttatcacaaaataccggacagcgtta agggccgtttcaccatctcccgcgataacgctaaaaacacgctgtatctgcaaatg aacagcctgcgtcctgaagacacggccgtatattactgtgcgcgctctccgagcgg ttttaaccgcccaggggacccttgtcaccgtctcctcaggcggaggaggcagcg gtggcggggtagcggcggaggaggcagcgggtggcgggggatccggcggaggaggc agcgggtggcggggtagcggaggtgcagctggaggctggaggctgggttca accgggtggcagcctgcgtttatcctgcgcagcctctggtttcaccttagtgatt actggatgtattgggttcgtcaggctccagggaaaggcctcgaatgggtgtcggaa attaataactaatggctttatcacaaaataccggacagcgttaagggccgtttcac catctcccgcgataacgctaaaaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgcgtc ctgaagacacggcctatattactgtgcgcgctctccgagcgggttttaaccgccc caggggacccttgttaccgtctcctcaggaggagggtgctaataa

10

20

30

【0 2 7 9】

均等物

本明細書で引用される参考文献は全て、それぞれ個々の刊行物又は特許又は特許出願が、あらゆる目的で引用することによりその全体が本明細書の一部をなすものとなるように具体的にかつ個々に示されていた場合と同じ程度に、あらゆる目的で引用することによりその全体が本明細書の一部をなす。

【0 2 8 0】

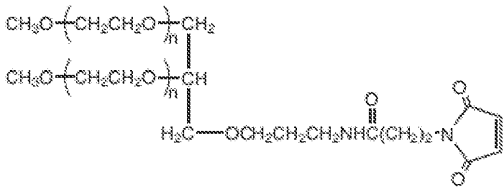
本発明は本明細書に記載の特定の実施形態によっては範囲が限定されないものとする。実際、本明細書に記載のもの以外の本発明で特徴付けられる様々な変更が、上述の記載及び添付の図面から当業者にとって明らかとなるであろう。かかる変更は添付の特許請求の範囲内にあることが意図される。

40

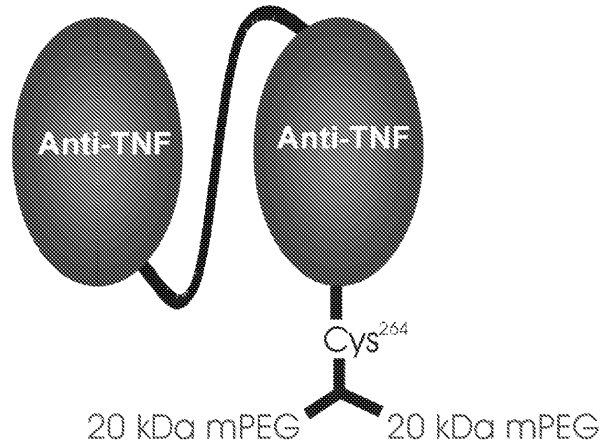
【 図 1 】

CDR1  
 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **DYWMY**WVRQAPGKGLE  
 CDR2  
 WVS**EINTNGLITKYPDSVKG** RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTA  
 CDR3  
 VYYCAR**SPSGFN**RQGGTLVTVSSggggsgggsgggsgggsgggsggg  
 CDR1  
 gsggggsEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **DYWMY**WVRQ  
 CDR2  
 APGKLEWVS **EINTNGLITKYPDSVKG** RFTISRDNAKNTLYLQMNS  
 CDR3  
 LRPEDTAVYYCAR **SPSGFN**RQGGTLVTVSSggg **C**

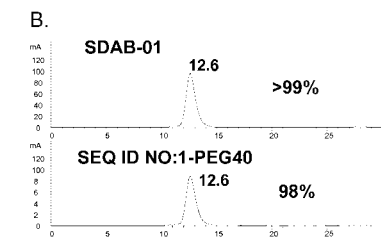
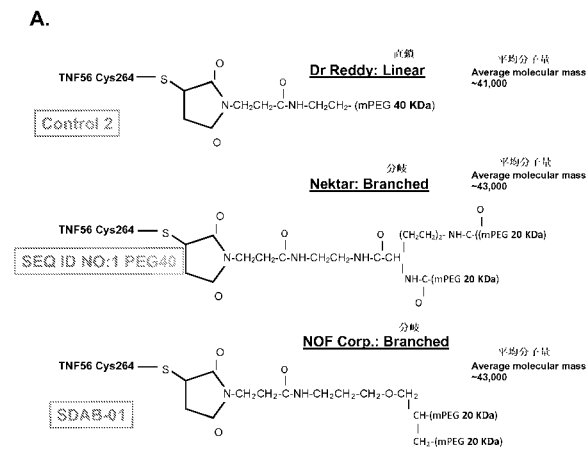
【 図 2 】



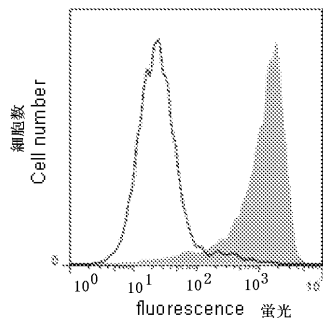
【 図 3 】



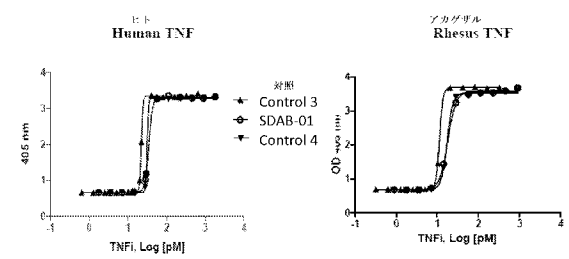
【 図 4 】



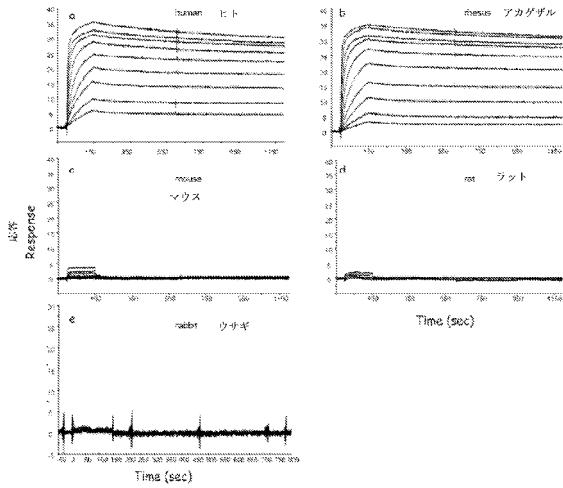
【 図 5 】



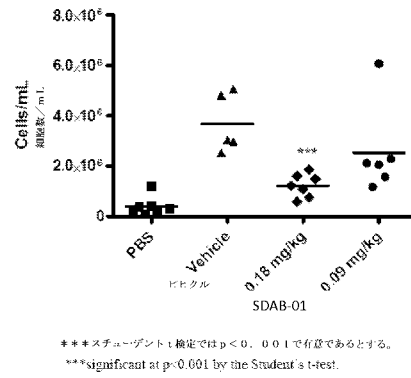
【 図 6 】



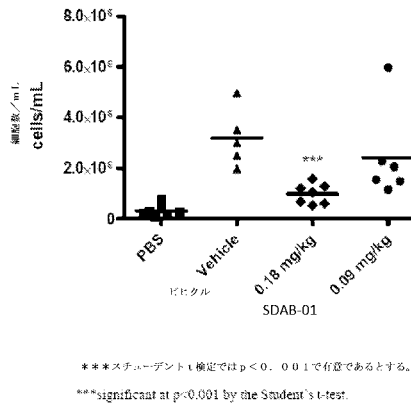
【 図 7 】



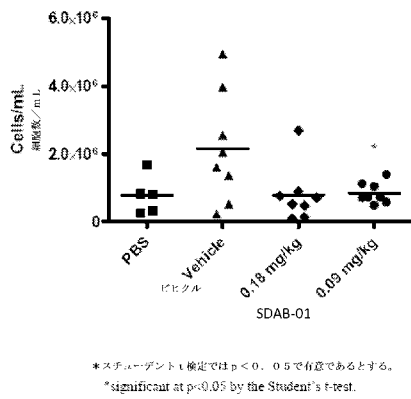
【 図 8 】



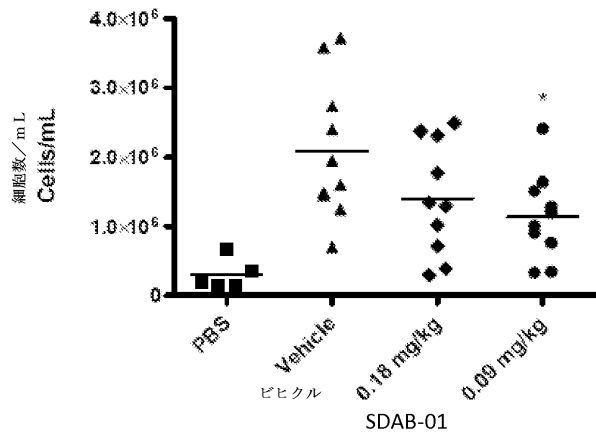
【 図 9 】



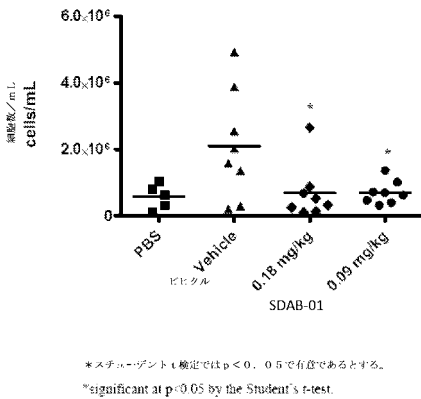
【 図 10 】



【 図 12 】

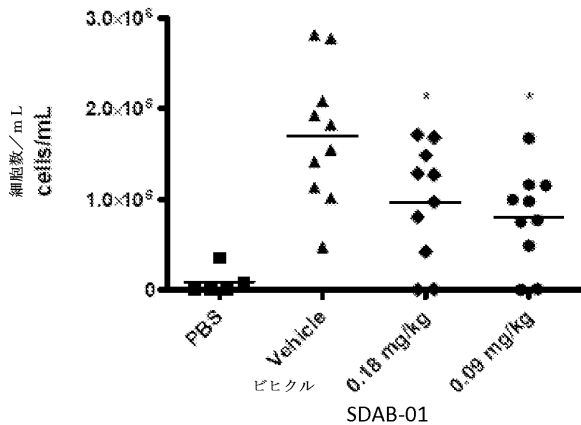


【 図 11 】



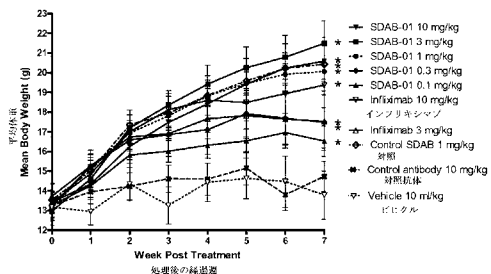
\* スチューデント t 検定では  $p < 0.05$  で有意であるとする。  
 \*significant at  $p < 0.05$  by the Student's t-test.

【 図 1 3 】

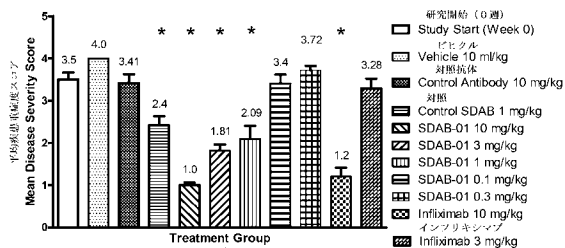


\* スチューデント t 検定では  $p < 0.05$  で有意であるとする。  
 \* significant at  $p < 0.05$  by the Student's t-test.

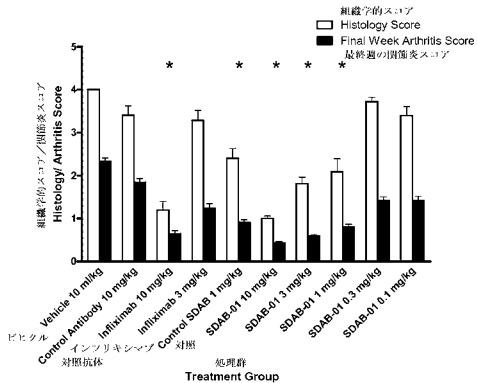
【 図 1 4 】



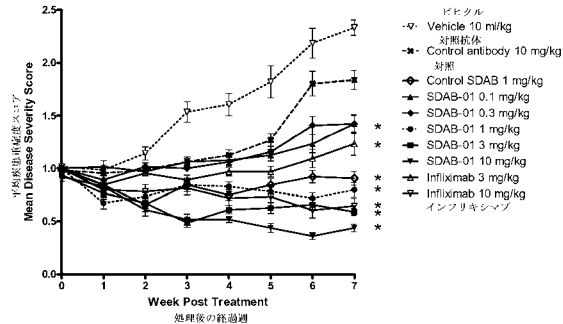
【 図 1 7 】



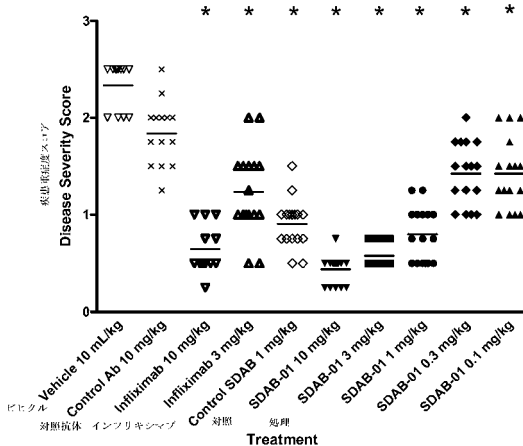
【 図 1 8 】



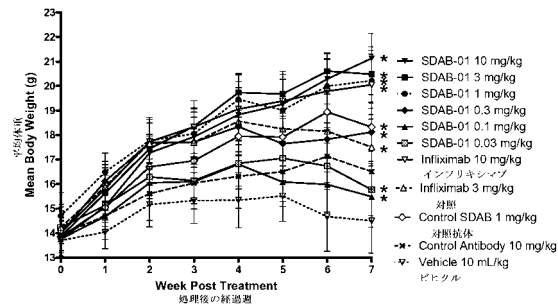
【 図 1 5 】



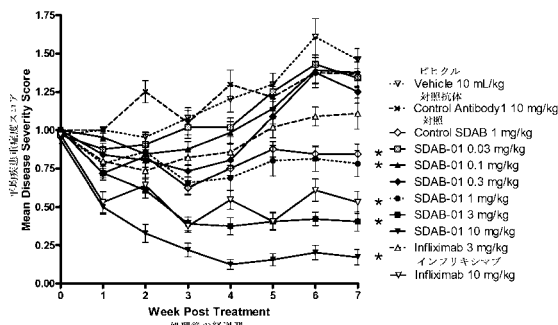
【 図 1 6 】



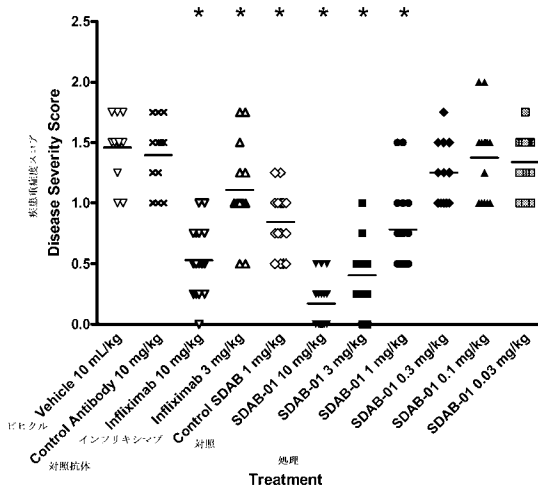
【 図 1 9 】



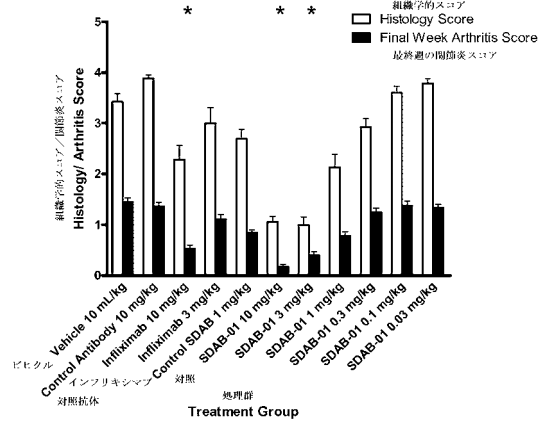
【 図 2 0 】



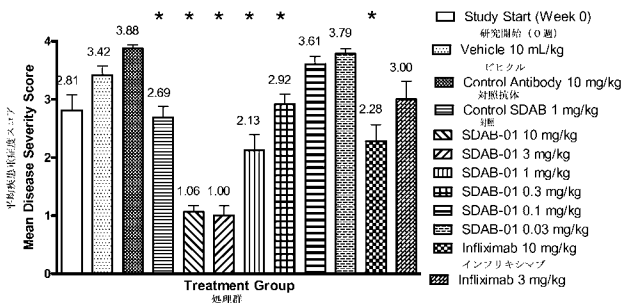
【 図 2 1 】



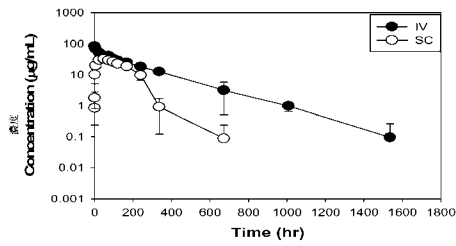
【 図 2 3 】



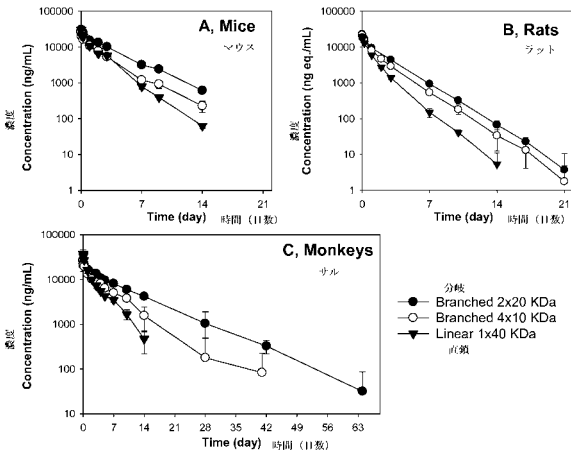
【 図 2 2 】



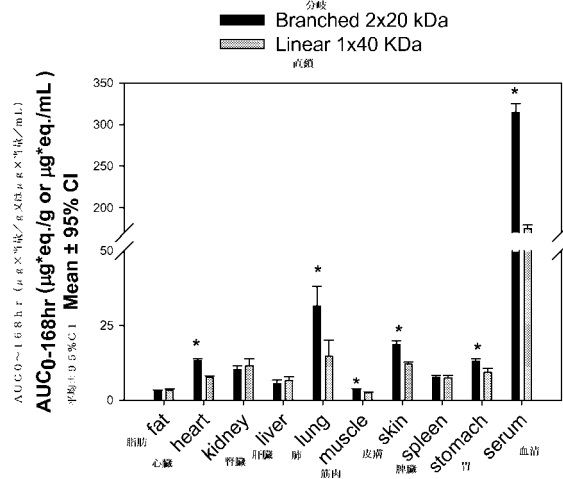
【 図 2 4 】



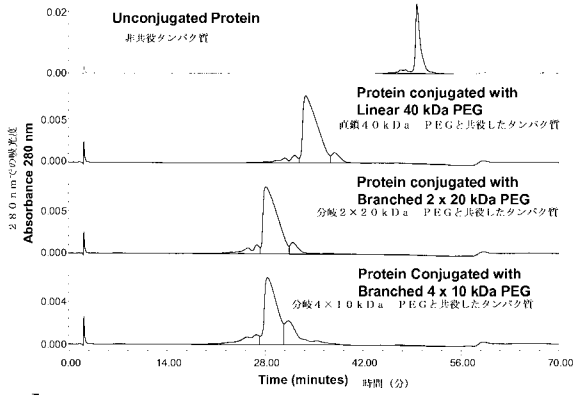
【 図 2 5 】



【 図 2 6 】

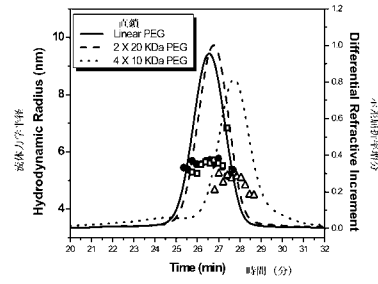


【 図 2 7 】

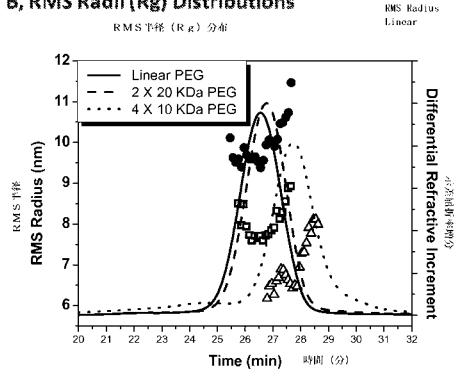


【 図 2 9 】

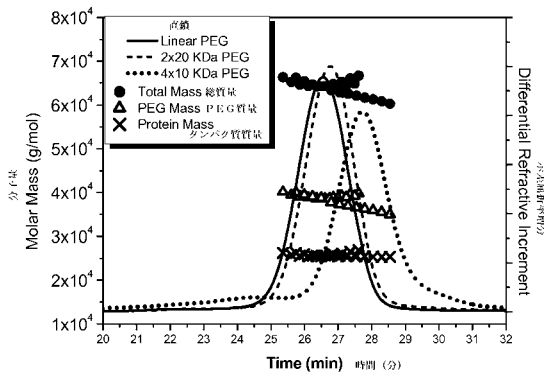
A, Hydrodynamic Radii (Rh) Distributions  
流体力学半径 (Rh) 分布



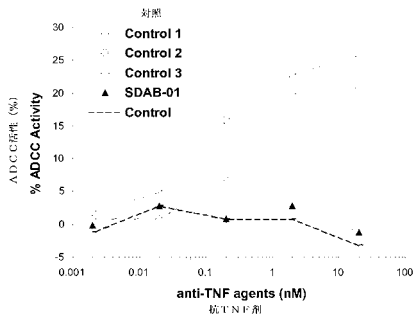
B, RMS Radii (Rg) Distributions  
RMS半径 (Rg) 分布



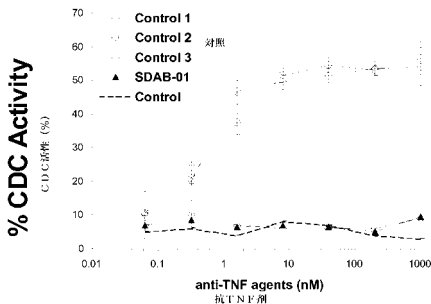
【 図 2 8 】



【 図 3 0 】



【 図 3 1 】



【配列表】

2013536175000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/IB2011/053007

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/24 A61K39/395 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EP0-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/122786 A2 (ABLYNX NV [BE]; BEIRNAERT ELS [BE]) 23 November 2006 (2006-11-23) cited in the application the whole document in particular abstract page 2, line 16 - page 6, line 30 page 20, line 11 - page 21, line 8 page 72, lines 16-18 page 90, line 22 - page 91, line 3 page 147, line 6 - page 162, line 31 claims 1-111; figures 1-62; examples 1-65; tables 1-47; sequence 420 ----- -/--	1-31
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 13 February 2012		Date of mailing of the international search report 23/02/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Ferreira, Roger

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2011/053007
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>YANG K ET AL: "Tailoring structure-function and pharmacokinetic properties of single-chain Fv proteins by site specific PEGylation", PROTEIN ENGINEERING, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 16, no. 10, 1 January 2003 (2003-01-01), pages 761-770, XP003015609, ISSN: 0269-2139 cited in the application the whole document</p>	1-31
X	<p>WO 2010/055950 A1 (JAPAN HEALTH SCIENCE FOUND [JP]; RIKEN [JP]; MATSUMURA YASUHIRO [JP];) 20 May 2010 (2010-05-20)</p> <p>the whole document in particular abstract claims 1-17; figures 1-14; examples 1-8</p>	1-9, 11-13, 19,20, 25-31
X	<p>WO 2010/056550 A1 (WYETH LLC [US]; BROWN PAUL R [US]; TOBLER SCOTT ANDREAS [US]; WOOD AND) 20 May 2010 (2010-05-20)</p> <p>abstract in particular claims 1-56; figures 1-4; examples 1-6</p>	1-31
A	<p>ITAI BENBAR ET AL: "MUTATIONS OF TWO LYSINE RESIDUES IN THE CDR LOOPS OF A RECOMBINANT IMMUNOTOXIN THAT REDUCE ITS SENSITIVITY TO CHEMICAL DERIVARIZATION", BIOCONJUGATE CHEMISTRY, ACS, WASHINGTON, DC, US, vol. 5, no. 4, 1 July 1994 (1994-07-01), pages 321-326, XP000564453, ISSN: 1043-1802, DOI: 10.1021/BC00028A007 the whole document</p>	1-31
A	<p>ROBERTS M J ET AL: "Chemistry for peptide and protein PEGylation", ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS, ELSEVIER BV, AMSTERDAM, NL, vol. 54, no. 4, 17 June 2002 (2002-06-17), pages 459-476, XP002354432, ISSN: 0169-409X, DOI: 10.1016/S0169-409X(02)00022-4 the whole document</p>	1-31
A	<p>WO 2008/077945 A2 (ABLYNX NV [BE]; BLANCHETOT CHRISTOPHE [NL]; SAUNDERS MICHAEL JOHN SCOT) 3 July 2008 (2008-07-03) the whole document</p>	1-31
	-/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2011/053007
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2004/060965 A2 (NEKTAR THERAPEUTICS AL CORP [US]; KOZLOWSKI ANTONI [US]; GROSS REMY F) 22 July 2004 (2004-07-22) cited in the application the whole document -----	1-31
A	WO 2004/081026 A2 (DOMANTIS LTD [GB]; BASRAN AMRIK [GB]) 23 September 2004 (2004-09-23) the whole document -----	1-31
A	WO 2010/060212 A1 (CANADA NAT RES COUNCIL [CA]; ABULROB ABDELNASSER [CA]; VERES TEODAR []) 3 June 2010 (2010-06-03) the whole document -----	1-31
A	WO 2006/003388 A2 (DOMANTIS LTD [GB]; IGNATOVICH OLGA [GB]; DE WILDT RUDOLF [GB]; WOOLVEN) 12 January 2006 (2006-01-12) cited in the application the whole document -----	1-31

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2011/053007

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006122786 A2	23-11-2006	AT 537188 T	15-12-2011
		AU 2006249144 A1	23-11-2006
		BR PI0609224 A2	18-10-2011
		CA 2608770 A1	23-11-2006
		CN 101248087 A	20-08-2008
		CR 9519 A	17-10-2008
		EC SP077910 A	26-03-2008
		EP 1888640 A2	20-02-2008
		EP 1888641 A1	20-02-2008
		EP 2172484 A2	07-04-2010
		EP 2365000 A2	14-09-2011
		JP 2008539772 A	20-11-2008
		KR 20080011395 A	04-02-2008
		NI 200700291 A	12-05-2008
		NZ 562695 A	27-05-2011
		US 2009028880 A1	29-01-2009
		WO 2006122786 A2	23-11-2006
		WO 2006122787 A1	23-11-2006
		ZA 200709867 A	29-10-2008
		ZA 200901011 A	28-04-2010
-----			
WO 2010055950 A1	20-05-2010	EP 2359852 A1	24-08-2011
		US 2011287036 A1	24-11-2011
		WO 2010055950 A1	20-05-2010
-----			
WO 2010056550 A1	20-05-2010	AU 2009314311 A1	20-05-2010
		CA 2739352 A1	20-05-2010
		CN 102272154 A	07-12-2011
		EP 2346900 A1	27-07-2011
		KR 20110079693 A	07-07-2011
		US 2010172894 A1	08-07-2010
		WO 2010056550 A1	20-05-2010
-----			
WO 2008077945 A2	03-07-2008	AU 2007337983 A1	03-07-2008
		CA 2672944 A1	03-07-2008
		EP 2097451 A2	09-09-2009
		US 2010092460 A1	15-04-2010
		WO 2008077945 A2	03-07-2008
-----			
WO 2004060965 A2	22-07-2004	AT 444984 T	15-10-2009
		AU 2003300133 A1	29-07-2004
		CA 2509153 A1	22-07-2004
		CN 1732206 A	08-02-2006
		EP 1578842 A2	28-09-2005
		JP 4490290 B2	23-06-2010
		JP 2006512445 A	13-04-2006
		KR 20050098852 A	12-10-2005
		MX PA05007151 A	21-09-2005
		WO 2004060965 A2	22-07-2004
-----			
WO 2004081026 A2	23-09-2004	CA 2529819 A1	23-09-2004
		CN 1845938 A	11-10-2006
		EP 1639011 A2	29-03-2006
		EP 2267028 A2	29-12-2010
		JP 2007516195 A	21-06-2007
		US 2006286066 A1	21-12-2006
		WO 2004081026 A2	23-09-2004
-----			

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2011/053007

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010060212	A1	03-06-2010	NONE
-----			
WO 2006003388	A2	12-01-2006	AU 2005259006 A1 12-01-2006
			AU 2010201856 A1 27-05-2010
			CA 2571536 A1 12-01-2006
			EA 200700175 A1 31-08-2007
			EA 201070623 A1 30-12-2010
			EP 1761565 A2 14-03-2007
			EP 2322554 A1 18-05-2011
			IL 180187 A 28-02-2011
			KR 20070050912 A 16-05-2007
			KR 20100049700 A 12-05-2010
			WO 2006003388 A2 12-01-2006
-----			

## フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 29/00 1 0 1	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 D	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
	C 1 2 P 21/08	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, T M), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, I D, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO , NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100116528

弁理士 三宅 俊男

(74) 代理人 100122736

弁理士 小國 泰弘

(74) 代理人 100122747

弁理士 田中 洋子

(74) 代理人 100132540

弁理士 生川 芳徳

(74) 代理人 100146031

弁理士 柴田 明夫

(74) 代理人 100088904

弁理士 庄司 隆

(74) 代理人 100124453

弁理士 資延 由利子

(74) 代理人 100135208

弁理士 大杉 卓也

(74) 代理人 100152319

弁理士 曾我 亜紀

(72) 発明者 ヘーゲン, マルティン

アメリカ合衆国, マサチューセッツ 0 2 1 4 0, ケンブリッジ, 8 7 ケンブリッジ パーク  
ドライブ, ファイザー グローバル リサーチ アンド ディベロプメント

(72) 発明者 オランド, ステファン ユーベル

アメリカ合衆国, マサチューセッツ 0 2 1 4 0, ケンブリッジ, 8 7 ケンブリッジ パーク  
ドライブ, ファイザー グローバル リサーチ アンド ディベロプメント

(72) 発明者 ヴァグミスター, ユリア

アメリカ合衆国, マサチューセッツ 0 2 1 4 0, ケンブリッジ, 8 7 ケンブリッジ パーク  
ドライブ, ファイザー グローバル リサーチ アンド ディベロプメント

(72) 発明者 シュ, シン

アメリカ合衆国, エムエー 0 1 8 1 0 , アンドーバー , 3 5 ファーウッド ドライブ

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA44 GA03

4B064 AG27 BJ12 CA10 CA20 CC24 DA01

4C084 AA19 MA02 MA16 MA66 MA70 NA05 ZB081 ZB082 ZB111 ZB112

ZB212 ZC022 ZC202 ZC212 ZC751

4C085 AA14 BB11 CC21 DD62 EE01 EE03 GG02 GG03 GG04 GG06

GG10

4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA42 DA76 EA22 EA24 EA27 FA72

专利名称(译)	修饰的单结构域抗原结合分子及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP2013536175A</a>	公开(公告)日	2013-09-19
申请号	JP2013520249	申请日	2011-07-06
[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	ヘーゲンマルティン オランダステファンユーベル ヴァグミースターユリア シュシン		
发明人	ヘーゲン,マルティン オランダ,ステファン ユーベル ヴァグミースター,ユリア シュ,シン		
IPC分类号	C07K16/24 A61P29/00 A61P37/06 A61P43/00 A61K45/00 A61P19/02 A61P17/06 A61P1/04 A61P25/00 A61K39/395 G01N33/53 C12N15/02 C07K19/00 C12P21/08		
CPC分类号	A61K47/60 A61K2039/505 A61P1/00 A61P1/04 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 C07K16/241 C07K2317/24 C07K2317/33 C07K2317/40 C07K2317/569 C07K2317/76 C07K2317/90 C07K2317/92		
FI分类号	C07K16/24.ZNA A61P29/00 A61P37/06 A61P43/00.121 A61K45/00 A61P29/00.101 A61P19/02 A61P17/06 A61P1/04 A61P25/00 A61K39/395.N G01N33/53.D C12N15/00.C C07K19/00 C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA44 4B024/GA03 4B064/AG27 4B064/BJ12 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4C084/AA19 4C084/MA02 4C084/MA16 4C084/MA66 4C084/MA70 4C084/NA05 4C084/ZB081 4C084/ZB082 4C084/ZB111 4C084/ZB112 4C084/ZB212 4C084/ZC022 4C084/ZC202 4C084/ZC212 4C084/ZC751 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC21 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG06 4C085/GG10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA42 4H045/DA76 4H045/EA22 4H045/EA24 4H045/EA27 4H045/FA72		
代理人(译)	津国 肇 柳桥康夫 三宅 俊男 田中洋子 阿基奥·希巴达 庄司隆 Shinobe百合子		
优先权	61/365307 2010-07-16 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及修饰的单结构域抗原结合分子，例如SDAB分子，特别是结合TNF $\alpha$ 结合的SDAB分子。还公开了制备和使用本文所述的修饰的单结构域抗原结合分子来治疗例如TNF $\alpha$ 相关病症的方法。

FIG. 3

