

(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2013-535187

(P2013-535187A)

(43) 公表日 平成25年9月12日(2013.9.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4B024
C07K 19/00 (2006.01)	C07K 19/00 ZNA	4B064
C07K 16/00 (2006.01)	C07K 16/00	4B065
C07K 14/48 (2006.01)	C07K 14/48	4C084
C07K 14/705 (2006.01)	C07K 14/705	4C085

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 292 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-518851 (P2013-518851)
 (86) (22) 出願日 平成23年7月8日(2011.7.8)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年3月5日(2013.3.5)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/043297
 (87) 国際公開番号 W02012/006490
 (87) 国際公開日 平成24年1月12日(2012.1.12)
 (31) 優先権主張番号 61/363,120
 (32) 優先日 平成22年7月9日(2010.7.9)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

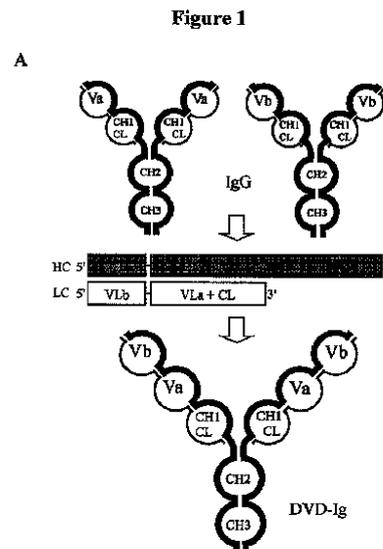
(71) 出願人 391008788
 アボット・ラボラトリーズ
 ABBOTT LABORATORIES
 アメリカ合衆国 イリノイ州 アボット
 パーク アボット パーク ロード 100
 (74) 代理人 110001173
 特許業務法人川口国際特許事務所
 (72) 発明者 ガユール, タリク
 アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01
 746、ホリストン、ワシントン・スト
 ート・1014

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 二重可変ドメイン免疫グロブリンおよびその使用

(57) 【要約】

工学的に作製された多価および多重特異的結合タンパク質を製造する方法、ならびに疾患の予防、診断および/または治療における該結合タンパク質を用いる方法が提供される。多価結合タンパク質は、定常領域によってFc領域と接合された、1を超える連結された重鎖および/または軽鎖可変領域を含有し得る。多価結合タンパク質は、(NGFを含む)多数のサイトカイン、ホルモン、増殖因子、小分子または細胞表面受容体、および多数の小分子、増殖因子、サイトカイン、ホルモンまたは細胞表面受容体のいずれかに結合し得る。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ポリペプチド鎖を含む抗原の対に結合することが可能であり、前記ポリペプチド鎖は $VD1 - (X1)_n - VD2 - C - (X2)_n$
 (VD1 は第一の重鎖可変ドメインであり、
 VD2 は第二の重鎖可変ドメインであり、
 C は重鎖定常ドメインであり、
 X1 はリンカーであり(但し、CH1 ではない。)、
 X2 はFc 領域であり、および
 n は 0 または 1 である。)を含む、
 (前記抗原の対は、NGF および M TX ; NGF および N KG 2 D ; NGF および I GF
 1、2 ; NGF および R ON ; NGF および E r b B 3 ; NGF および C D - 3 ; NGF
 および I G F R ; NGF および H G F ; NGF および V E G F ; NGF および D L L 4 ;
 NGF および P 1 G F ; NGF および C D - 2 0 ; NGF および E G F R ; NGF および
 H E R - 2 ; NGF および C D - 1 9 ; NGF および C D - 8 0 ; NGF および C D - 2
 2 ; NGF および C D - 4 0 ; NGF および c - M E T または NGF および N R P 1 であ
 る) 結合タンパク質。

10

【請求項 2】

VD1 および VD2 が、配列番号 28、30、32、34、36、38、40、42、
 44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、7
 0、72、74、76、78、80、82、84、86、88 または 90 を独立して含む
 、請求項 1 に記載の結合タンパク質。

20

【請求項 3】

ポリペプチド鎖を含む抗原の対に結合することが可能であり、前記ポリペプチド鎖は $VD1 - (X1)_n - VD2 - C - (X2)_n$
 (VD1 は第一の軽重鎖可変ドメインであり、
 VD2 は第二の軽重鎖可変ドメインであり、
 C は軽鎖定常ドメインであり、
 X1 はリンカーであり(但し、CH1 ではない。)、
 X2 はFc 領域を含まず、および
 n は 0 または 1 である。)を含む、
 (前記抗原の対は、NGF および M TX ; NGF および N KG 2 D ; NGF および I GF
 1、2 ; NGF および R ON ; NGF および E r b B 3 ; NGF および C D - 3 ; NGF
 および I G F R ; NGF および H G F ; NGF および V E G F ; NGF および D L L 4 ;
 NGF および P 1 G F ; NGF および C D - 2 0 ; NGF および E G F R ; NGF および
 H E R - 2 ; NGF および C D - 1 9 ; NGF および C D - 8 0 ; NGF および C D - 2
 2 ; NGF および C D - 4 0 ; NGF および c - M E T または NGF および N R P 1 であ
 る) 結合タンパク質。

30

【請求項 4】

VD1 および VD2 軽鎖可変ドメインが、配列番号 29、31、33、35、37、3
 9、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65
 、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89 または 9
 1 を独立して含む、請求項 3 に記載の結合タンパク質。

40

【請求項 5】

n が 0 である、請求項 1 または 3 に記載の結合タンパク質。

【請求項 6】

第一および第二のポリペプチド鎖を含む抗原の対に結合することが可能であり、前記第
 一のポリペプチド鎖は第一の $VD1 - (X1)_n - VD2 - C - (X2)_n$
 (VD1 は第一の重鎖可変ドメインであり、
 VD2 は第二の重鎖可変ドメインであり、

50

Cは重鎖定常ドメインであり、
 X1はリンカーであり(但し、CH1ではない。)、
 X2はFc領域である。)を含み、および
 前記第二のポリペプチド鎖は第二のVD1 - (X1)n - VD2 - C - (X2)n
 (VD1は第一の軽鎖可変ドメインであり、

VD2は第二の軽鎖可変ドメインであり、

Cは軽鎖定常ドメインであり、

X1はリンカーであり(但し、CH1ではない。)、

X2はFc領域を含まず、

nは0または1である。)を含む、(前記抗原の対は、NGFおよびMTX; NGFおよびNKG2D; NGFおよびIGF1、2; NGFおよびRON; NGFおよびErBB3; NGFおよびCD-3; NGFおよびIGFR; NGFおよびHGF; NGFおよびVEGF; NGFおよびDLL4; NGFおよびPIGF; NGFおよびCD-20; NGFおよびEGFR; NGFおよびHER-2; NGFおよびCD-19; NGFおよびCD-80; NGFおよびCD-22; NGFおよびCD-40; NGFおよびc-METまたはNGFおよびNRP1である)結合タンパク質。

【請求項7】

VD1およびVD2重鎖可変ドメインが、配列番号28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88または90を独立して含み、VD1およびVD2軽鎖可変ドメインが、配列番号29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89または91を独立して含む、請求項6に記載の結合タンパク質。

【請求項8】

X1が、配列番号1-26の少なくとも1つである、請求項1、3または6に記載の結合タンパク質。

【請求項9】

結合タンパク質が、2つの第一のポリペプチド鎖および2つの第二のポリペプチド鎖を含む、請求項6に記載の結合タンパク質。

【請求項10】

Fc領域が、バリエーション配列のFc領域である、請求項1、3または6に記載の結合タンパク質。

【請求項11】

Fc領域が、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgEまたはIgDから得られるFc領域である、請求項1、3または6に記載の結合タンパク質。

【請求項12】

第一のポリペプチド鎖のVD1および第二のポリペプチド鎖のVD1が、それぞれ同じ第一および第二の親抗体またはその抗原結合部分から得られる、請求項6に記載の結合タンパク質。

【請求項13】

第一のポリペプチド鎖のVD1および第二のポリペプチド鎖のVD1が、それぞれ異なる第一および第二の親抗体またはその抗原結合部分から得られる、請求項6に記載の結合タンパク質。

【請求項14】

第一のポリペプチド鎖のVD2および第二のポリペプチド鎖のVD2が、それぞれ同じ第一および第二の親抗体またはその抗原結合部分から得られる、請求項6に記載の結合タンパク質。

【請求項15】

第一のポリペプチド鎖のVD2および第二のポリペプチド鎖のVD2が、それぞれ異なる

10

20

30

40

50

る第一および第二の親抗体またはその抗原結合部分から得られる、請求項 6 に記載の結合タンパク質。

【請求項 16】

第一および第二の親抗体が、抗原上の異なるエピトープに結合する、請求項 13 から 15 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項 17】

第一の親抗体またはその抗原結合部分が、第二の親抗体またはその抗原結合部分が第二の抗原に結合する効力と異なる効力で第一の抗原に結合する、請求項 13 から 15 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項 18】

第一の親抗体またはその抗原結合部分が、第二の親抗体またはその抗原結合部分が第二の抗原に結合する親和性と異なる親和性で第一の抗原に結合する、請求項 13 から 15 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項 19】

第一の親抗体またはその抗原結合部分および第二の親抗体またはその抗原結合部分が、ヒト抗体、CDR 移植された抗体またはヒト化抗体である、請求項 13 から 15 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項 20】

第一の親抗体またはその抗原結合部分および第二の親抗体またはその抗原結合部分が、F a b 断片、F (a b ')₂ 断片、ヒンジ領域においてジスルフィド架橋によって連結された 2 つの F a b 断片を含む二価断片、V H および C H 1 ドメインからなる F d 断片、抗体の単一アームの V L および V H ドメインからなる F v 断片、d A b 断片、単離された相補性決定領域 (C D R)、一本鎖抗体またはダイアボディである、請求項 13 から 15 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項 21】

結合タンパク質が、第一の親抗体もしくはその抗原結合部分または第二の親抗体もしくはその抗原結合部分によって示される少なくとも 1 つの所望の特性を有する、請求項 13 から 15 のいずれか一項に記載の前記結合タンパク質。

【請求項 22】

所望の特性が、1 つ以上の抗体パラメーターである、請求項 21 に記載の結合タンパク質。

【請求項 23】

抗体パラメーターが、抗原特異性、抗原に対する親和性、効力、生物学的機能、エピトープ認識、安定性、可溶性、生産効率、免疫原性、薬物動態、生物学的利用率、組織交差反応性またはオルソロガス抗原結合性である、請求項 22 に記載の結合タンパク質。

【請求項 24】

4 つのポリペプチド鎖を含み、2 つのポリペプチド鎖は V D 1 - (X 1)_n - V D 2 - C - (X 2)_n

(V D 1 は第一の重鎖可変ドメインであり、

V D 2 は第二の重鎖可変ドメインであり、

C は重鎖定常ドメインであり、

X 1 はリンカーであり (但し、C H 1 ではない。)、

X 2 は F c 領域である。) を含み、および

2 つのポリペプチド鎖は V D 1 - (X 1)_n - V D 2 - C - (X 2)_n

(V D 1 は第一の軽鎖可変ドメインであり、

V D 2 は第二の軽鎖可変ドメインであり、

C は軽鎖定常ドメインであり、

X 1 はリンカーであり (但し、C H 1 ではない。)、

X 2 は F c 領域を含まず、

n は 0 または 1 である。) を含み、V D 1 および V D 2 重鎖可変ドメインは、配列番号 2

10

20

30

40

50

8、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88または90を独立して含み、VD1およびVD2軽鎖可変ドメインは、配列番号29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89または91を独立して含む、2つの抗原に結合することが可能な結合タンパク質。

【請求項25】

4つのポリペプチド鎖を含み、2つのポリペプチド鎖はVD1 - (X1)_n - VD2 - C - (X2)_n

(VD1は第一の重鎖可変ドメインであり、
VD2は第二の重鎖可変ドメインであり、
Cは重鎖定常ドメインであり、
X1はリンカーであり(但し、CH1ではない。)、
X2はFc領域であり、
nは0または1である。)を含み、および

2つのポリペプチド鎖はVD1 - (X1)_n - VD2 - C - (X2)_n

(VD1は第一の軽鎖可変ドメインであり、
VD2は第二の軽鎖可変ドメインであり、
Cは軽鎖定常ドメインであり、
X1はリンカーであり(但し、CH1ではない。)、
X2はFc領域を含まず、
nは0または1である。)を含み、

抗原の少なくとも1つが、NGF; MTX; NKG2D; IGF1、2; RON; ErbB3; CD-3; IGFR; HGF; VEGF; DLL4; P1GF; CD-20; EGFR; HER-2; CD-19; CD-80; CD-22; CD-40; c-METまたはNRP1である、2つの抗原に結合することが可能な結合タンパク質。

【請求項26】

結合タンパク質が、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、少なくとも約 $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; 少なくとも約 $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; 少なくとも約 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; 少なくとも約 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; または少なくとも約 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の、1つ以上の標的への結合速度定数(K_{on})を有する、請求項1、3、6、24または25に記載の結合タンパク質。

【請求項27】

結合タンパク質が、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 10^{-3} s^{-1} ; 最大約 10^{-4} s^{-1} ; 最大約 10^{-5} s^{-1} ; または最大約 10^{-6} s^{-1} の、1つ以上の標的への解離速度定数(K_{off})を有する、請求項1、3、6、24または25に記載の結合タンパク質。

【請求項28】

結合タンパク質が、最大約 10^{-7} M ; 最大約 10^{-8} M ; 最大約 10^{-9} M ; 最大約 10^{-10} M ; 最大約 10^{-11} M ; 最大約 10^{-12} M または最大 10^{-13} M の、1つ以上の標的への解離定数(K_D)を有する、請求項1、3、6、24または25に記載の結合タンパク質。

【請求項29】

請求項1、3、6、24または25のいずれか一項に記載の結合タンパク質を含み、免疫接着分子、造影剤、治療剤または細胞毒性剤をさらに含む、結合タンパク質連結体。

【請求項30】

造影剤が、放射性標識、酵素、蛍光標識、発光標識、生物発光標識、磁気標識またはビオチンである、請求項29に記載の結合タンパク質連結体。

【請求項31】

放射性標識が、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{31}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho または ^{153}Sm である、請求項30に記載の結合タンパク質連結体。

【請求項32】

治療剤または細胞毒性剤が、代謝抑制剤、アルキル化剤、抗生物質、増殖因子、サイトカイン、抗血管新生剤、抗有糸分裂剤、アントラサイクリン、トキシンまたはアポトーシス剤である、請求項29に記載の結合タンパク質連結体。

【請求項33】

結合タンパク質が、結晶化された結合タンパク質である、請求項1、3、6、24または25に記載の結合タンパク質。

10

【請求項34】

結晶が、担体を含まない医薬徐放結晶である、請求項33に記載の結合タンパク質。

【請求項35】

結合タンパク質が、インビボにおいて、結合タンパク質の可溶性対応物より長い半減期を有する、請求項33に記載の結合タンパク質。

【請求項36】

結合タンパク質が、生物学的活性を保持している、請求項33に記載の結合タンパク質

【請求項37】

請求項1、3、6、24または25のいずれか一項に記載の結合タンパク質アミノ酸配列をコードする単離された核酸。

20

【請求項38】

請求項37に記載の単離された核酸を含むベクター。

【請求項39】

ベクターが、pcDNA、pTT、pTT3、pEFBOS、pBV、pJV、pcDNA3.1TOPO、pEF6TOPOまたはpBJである、請求項38に記載のベクター。

【請求項40】

請求項38に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項41】

宿主細胞が原核細胞である、請求項40に記載の宿主細胞。

30

【請求項42】

宿主細胞がE.コリ(E.coli)である、請求項41に記載の宿主細胞。

【請求項43】

宿主細胞が真核細胞である、請求項40に記載の宿主細胞。

【請求項44】

真核細胞が、原生動物細胞、動物細胞、植物細胞または真菌細胞である、請求項43に記載の宿主細胞。

【請求項45】

動物細胞が、哺乳動物細胞、鳥類細胞または昆虫細胞である、請求項44に記載の宿主細胞。

40

【請求項46】

宿主細胞がCHO細胞である、請求項45に記載の宿主細胞。

【請求項47】

宿主細胞がCOSである、請求項45に記載の宿主細胞。

【請求項48】

宿主細胞が酵母細胞である、請求項44に記載の宿主細胞。

【請求項49】

酵母細胞がサッカロミセス・セレビスシアエ(Saccharomyces cerevisiae)である、請求項48に記載の宿主細胞。

50

- 【請求項 50】
宿主細胞が昆虫 Sf9 細胞である、請求項 45 に記載の宿主細胞。
- 【請求項 51】
結合タンパク質を産生するのに十分な条件下で、請求項 40 から 50 のいずれか一項に記載の宿主細胞を培地中において培養することを含む、結合タンパク質を生産する方法。
- 【請求項 52】
生産された結合タンパク質の 50% - 75% が、二重特異的四価結合タンパク質である、請求項 51 に記載の方法。
- 【請求項 53】
生産された結合タンパク質の 75% - 90% が、二重特異的四価結合タンパク質である、請求項 51 に記載の方法。 10
- 【請求項 54】
生産された結合タンパク質の 90% - 95% が、二重特異的四価結合タンパク質である、請求項 51 に記載の方法。
- 【請求項 55】
請求項 51 に記載の方法に従って生産されたタンパク質。
- 【請求項 56】
請求項 1 から 36 および 55 のいずれか一項に記載の結合タンパク質および医薬として許容される担体を含む医薬組成物。
- 【請求項 57】 20
少なくとも 1 つの追加の治療剤をさらに含む、請求項 56 に記載の医薬組成物。
- 【請求項 58】
追加の治療剤が、造影剤、細胞毒性剤、血管新生阻害剤；キナーゼ阻害剤；共刺激分子遮断剤；接着分子遮断剤；抗サイトカイン抗体またはその機能的断片；メトトレキサート；シクロスポリン；ラパマイシン；FK506；検出可能な標識またはレポーター；TNF アンタゴニスト；抗リウマチ薬；筋肉弛緩剤、麻酔薬、非ステロイド系抗炎症薬（NSAID）、鎮痛剤、麻酔、鎮静剤、局所麻酔、神経筋肉遮断剤、抗微生物剤、抗乾癬剤、コルチコステロイド、アナボリックステロイド、エリスロポエチン、免疫化、イムノグロブリン、免疫抑制剤、成長ホルモン、ホルモン置換薬、放射性医薬、抗うつ剤、抗精神病薬、刺激物質、喘息薬、アゴニスト、吸入用ステロイド、エピネフリンまたは類似体、サイトカインまたはサイトカインアンタゴニストである、請求項 57 に記載の医薬組成物。 30
- 【請求項 59】
治療が達成されるように、請求項 1 から 36 および 55 のいずれか一項に記載の結合タンパク質を対象に投与することによって、対象の疾病または疾患を治療する方法。
- 【請求項 60】
疾患が、関節リウマチ、骨関節炎、若年性慢性関節炎、化膿性関節炎、ライム関節炎、乾癬性関節炎、反応性関節炎、脊椎関節症、全身性紅斑性狼瘡、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、インシュリン依存性糖尿病、甲状腺炎、喘息、アレルギー性疾患、乾癬、皮膚炎、強皮症、移植片対宿主病、臓器移植拒絶、臓器移植に関連する急性または慢性免疫疾患、サルコイドーシス、アテローム性動脈硬化症、播種性血管内凝固、川崎病、パセドウ病、ネフローゼ症候群、慢性疲労症候群、ウェゲナー肉芽腫症、ヘノッホ・シェーライン紫斑症、腎臓の顕微鏡的血管炎、慢性活動性肝炎、ブドウ膜炎、敗血症性ショック、毒素性ショック症候群、敗血症症候群、悪液質、感染性疾患、寄生性疾患、急性横断性脊髄炎、ハンチントン舞蹈病、パーキンソン病、アルツハイマー病、発作、原発性胆汁性肝硬変、溶血性貧血、悪性腫瘍、心不全、心筋梗塞、アジソン病、孤発性の、多内分泌腺機能低下症候群 I 型および多内分泌腺機能低下症候群 II 型、シュミット症候群、成人（急性）呼吸促迫症候群、脱毛症、円形脱毛症、血清反応陰性関節炎、関節炎、ライター病、乾癬性関節炎、潰瘍性大腸性関節炎、腸疾患性滑膜炎、クラミジア、エルシニアおよびサルモネラ関連関節炎、脊椎関節症、アテローム性疾患 / アテローム性動脈硬化症、ア 40 50

トピー性アレルギー、自己免疫性水疱性疾患、尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、類天疱瘡、線状IgA病、自己免疫性溶血性貧血、クームス陽性溶血性貧血、後天性悪性貧血、若年性悪性貧血、筋痛性脳脊髄炎/ロイヤルフリー病、慢性粘膜皮膚カンジダ症、巨細胞性動脈炎、原発性硬化性肝炎、突発性自己免疫性肝炎、後天性免疫不全症候群、後天性免疫不全関連疾患、B型肝炎、C型肝炎、分類不能型免疫不全症(分類不能型原発性低グロブリン血症)、拡張型心筋症、女性不妊症、卵巣機能不全、早期卵巣機能不全、線維性肺疾患、突発性間質性肺炎、炎症後間質性肺疾患、間質性肺炎、結合組織疾患関連間質性肺疾患、混合性結合組織疾患関連肺疾患、全身性硬化症関連間質性肺疾患、関節リウマチ関連間質性肺疾患、全身性紅斑性狼瘡関連肺疾患、皮膚筋炎/多発性筋炎関連肺疾患、シェーグレン病関連肺疾患、強直性脊椎炎関連肺疾患、血管炎性びまん性肺疾患(vasculitic diffuse lung disease)、ヘモシデローシス関連肺疾患、薬物によって誘導された間質性肺疾患、線維症、放射性線維症、閉塞性細気管支炎、慢性好酸球性肺炎、リンパ球浸潤性肺疾患、感染後間質性肺疾患、通風関節炎、自己免疫性肝炎、I型自己免疫性肝炎(古典的自己免疫性またはルポイド肝炎)、II型自己免疫性肝炎(抗LKM抗体肝炎)、自己免疫媒介性低血糖症、黒色表皮腫を伴うB型インシュリン抵抗性、副甲状腺機能低下症、臓器移植に関連する急性免疫疾患、臓器移植に関連する慢性免疫疾患、変形性関節症、原発性硬化性胆管炎、I型乾癬、II型乾癬、特発性白血球減少症、自己免疫性好中球減少症、腎臓病NOS、糸球体腎炎、腎臓の顕微鏡的血管炎、ライム病、円板状紅斑性狼瘡、男性不妊症特発性またはNOS、精子自己免疫、多発性硬化症(すべてのサブタイプ)、交感性眼炎、結合組織疾患に続発する肺高血圧症、グッドパスチャー症候群、結節性多発動脈炎の肺症状、急性リウマチ熱、リウマチ性脊椎炎、スチル病、全身性硬化症、シェーグレン症候群、高安病/動脈炎、自己免疫性血小板減少症、特発性血小板減少症、自己免疫性甲状腺疾患、甲状腺機能亢進症、甲状腺腫自己免疫性甲状腺機能低下症(橋本病)、萎縮性自己免疫性甲状腺機能低下症、原発性粘液水腫(primary myxoedema)、水晶体起因性ブドウ膜炎、原発性血管炎、白斑急性肝疾患、慢性肝疾患、アルコール性肝硬変、アルコール誘発性肝障害、胆汁うっ滞(choleostasis)、特異体質性肝疾患、薬物誘発性肝炎、非アルコール性脂肪性肝炎、アレルギーおよび喘息、B群連鎖球菌(GBS)感染、精神障害(例えば、うつ病および統合失調症)、Th2型およびTh1型によって媒介される疾病、急性および慢性疼痛(疼痛の様々な形態)、ならびに、肺癌、乳癌、胃癌、膀胱癌、大腸癌、膵臓癌、卵巣癌、前立腺癌および腎臓癌および造血性悪性病変(白血病およびリンパ腫)などの癌、無リポタンパク質血症、先端チアノーゼ、急性および慢性寄生性または感染性プロセス、急性白血病、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、急性骨髄性白血病(AML)、急性または慢性細菌感染、急性膵炎、急性腎不全、腺癌、心房(aerial)異所性拍動、AIDS認知症複合、アルコール誘発性肝炎、アレルギー性結膜炎、アレルギー性接触性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、同種移植拒絶、-1-アンチトリプシン欠乏症、筋萎縮性側索硬化症、貧血、狭心症、前角細胞変性、抗cd3治療、抗リン脂質症候群、抗受容体過敏症反応(anti-receptor hypersensitivity reactions)、大動脈(aortic)および動脈瘤、大動脈解離、動脈性高血圧、動脈硬化症、動静脈瘻、運動失調、心房細動(持続的または発作性)、心房粗動、房室ブロック、B細胞リンパ腫、骨移植拒絶、骨髄移植(BMT)拒絶、脚ブロック、パーキンソン病、火傷、心不整脈、心機能不全症候群(cardiac stun syndrome)、心臓腫瘍、心筋症、心肺バイパス炎症反応、軟骨移植拒絶、小脳皮質変性、小脳疾患、無秩序なまたは多巣性心房頻脈、化学療法関連疾患、慢性骨髄性白血病(CML)、慢性アルコール症、慢性炎症性病変、慢性リンパ性白血病(PLL)、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、慢性サリチル酸中毒、結腸直腸癌、うっ血性心不全、結膜炎、接触性皮膚炎、肺性心、冠動脈疾患、クロイツフェルト-ヤコブ病、培養陰性敗血症、嚢胞性線維症、サイトカイン療法関連疾患、ボクサー脳、脱髄性疾患、 Dengue出血熱、皮膚炎、皮膚科学的症状、糖尿病、真性糖尿病、糖尿病性動脈硬化疾患、瀰漫性レビー小体病、拡張型うっ血性心筋症、大脳基底核の疾患、中年のダウン症候群、中枢神経ドーパミン受

10

20

30

40

50

容体を遮断する薬物によって誘発された薬物誘発性運動疾患、薬物感受性、湿疹、脳脊髄炎、心内膜炎、内分泌疾患、喉頭蓋炎、エプスタイン-バーウイルス感染、紅痛症、垂体外路および小脳疾患、家族性血球貪食性リンパ組織球症 (familial hemato phagocytic lymphohistiocytosis)、致命的胸腺移植組織拒絶、フリードライヒ失調症、機能的末梢動脈疾患、真菌性敗血症、ガス壊疽、胃潰瘍、いずれかの臓器または組織の移植片拒絶、グラム陰性敗血症、グラム陽性敗血症、細胞内生物に起因する肉芽腫、有毛細胞白血病、ハラールホルデン・スパッツ病、橋本甲状腺炎、枯草熱、心臓移植拒絶、血色素症、血液透析、溶血性尿毒症症候群/血栓溶解血小板減少紫斑病、出血、A型肝炎、ヒス束不整脈、HIV感染/HIV神経障害、ホジキン病、運動過剰疾患、過敏症反応、過敏性肺炎、高血圧、運動低下疾患、視床下部-下垂体-副腎皮質系評価、特発性アジソン病、特発性肺線維症、抗体媒介性細胞毒性、無力症、乳児脊髄性筋萎縮症、大動脈の炎症、A型インフルエンザ、電離放射線曝露、虹彩毛様体炎/ブドウ膜炎/視神経炎、虚血再灌流障害、虚血性発作、若年性関節リウマチ、若年性脊髄性筋萎縮症、カポジ肉腫、腎移植拒絶、レジオネラ、リーシュマニア症、ハンセン病、皮質脊髄系の病変、脂肪血症 (lip edema)、肝臓移植拒絶、リンパ浮腫 (lymph edema)、マラリア、悪性リンパ腫、悪性組織球増殖症、悪性黒色腫、髄膜炎、髄膜炎菌血症 (meningococ cemia)、代謝性/特発性、偏頭痛、ミトコンドリア多系疾患 (mitochondrial multi. system disorder)、混合性結合組織病、モノクローナル高ガンマグロブリン血症、多発性骨髄腫、多系統変性 (メンセル・デジェリーヌ-トーマス・シャイ-ドレーガーおよびマシャド-ジョセフ)、重症筋無力症、マイコバクテリウム・アビウム・イントラセルラーレ、マイコバクテリウム・チューバキュロシス、骨髄形成異常、真菌虚血疾患、上咽頭癌、新生児慢性肺疾患、腎炎、ネフロゼ、神経変性疾患、神経原性I筋萎縮、好中球減少性発熱、非ホジキンリンパ腫、腹部大動脈およびその分枝の閉塞、閉塞性動脈疾患、okt3療法、精巣炎/精巣上体炎、精巣炎/精管復元術処置、臓器肥大、骨粗鬆症、膵臓移植拒絶、膵癌、腫瘍随伴性症候群/悪性腫瘍の高カルシウム血症、副甲状腺移植拒絶、骨盤内炎症性疾患、通年性鼻炎、心膜疾患、末梢アテローム硬化性疾患、末梢血管疾患、腹膜炎、悪性貧血、ニューモシスチス・カリニ肺炎、肺炎、POEMS症候群 (多発神経炎、臓器肥大、内分泌疾患、単クローン性 グロブリン血症および皮膚変化症候群 (skin changes syndrome))、灌流後症候群 (post perfusion syndrome)、ポンプ後症候群 (post pump syndrome)、心筋梗塞後開心術症候群、子癇前症、進行性核上性麻痺、原発性肺高血圧、放射線療法、レイノー現象および病、レイノー病、レフサム病、規則的なQRS幅の狭い頻脈症 (regular narrow QRS tachycardia)、腎血管性高血圧、再灌流障害、拘束型心筋症、肉腫、強皮症、老年性舞踏病、レビー小体型の老年性認知症、血清反応陰性関節炎、ショック、鎌形赤血球貧血症、皮膚同種異系移植拒絶、皮膚変化症候群、小腸移植拒絶、固形腫瘍、固有不整脈 (specific arrhythmias)、脊髄性運動失調、脊髄小脳変性、連鎖球菌性筋炎、小脳の構造的病変、亜急性硬化性全脳炎、湿疹、心血管系の梅毒、全身性アナフィラキシー、全身性炎症反応症候群、全身性発症若年性関節リウマチ、T細胞またはFABALL、毛細血管拡張症、閉塞性血栓血管炎、血小板減少症、毒性、移植、外傷/出血、III型過敏症反応、IV型過敏症、不安定狭心症、尿毒症、尿路性敗血症、じんましん、心臓弁膜症、静脈瘤、血管炎、静脈疾患、静脈血栓症、心室細動、ウイルスおよび真菌感染、ウイルス性脳炎 (vital encephalitis)/無菌性髄膜炎、ウイルス関連血球貪食症候群、ウェルニッケ-コルサコフ症候群、ウィルソン病、いずれかの臓器または組織の異種移植拒絶、急性冠症候群、急性特発性多発性神経炎、急性炎症性脱髄性多発神経根神経障害、急性虚血、成人スチル病、アナフィラキシー、抗リン脂質抗体症候群、再生不良性貧血、アトピー性湿疹、アトピー性皮膚炎、自己免疫性皮膚炎、連鎖球菌感染に伴う自己免疫異常、自己免疫性腸症、自己免疫性難聴、自己免疫性リンパ増殖症候群 (ALPS)、自己免疫性心筋炎、自己免疫性早期卵巣不全、眼瞼炎、気管支拡張症、水疱性類天疱瘡、心血管疾患、劇症型抗リン

10

20

30

40

50

脂質症候群、セリアック病、頸部脊椎症、慢性虚血、癍痕性類天疱瘡、多発性硬化症のリスクを有する臨床的孤発症候群（C I S）、小児発症精神障害、涙嚢炎、皮膚筋炎、糖尿病性網膜症、椎間板ヘルニア、椎間板脱出、薬物誘発免疫性溶血性貧血、子宮内膜症、眼内炎、上強膜炎、多形性紅斑、重症型多形性紅斑、妊娠性類天疱瘡、ギラン・バレー症候群（G B S）、枯草熱、ヒューズ症候群、特発性パーキンソン病、特発性間質性肺炎、I g E 媒介性アレルギー、免疫性溶血性貧血、封入体筋炎、感染性眼炎症疾患、炎症性脱髄疾患、炎症性心疾患、炎症性腎疾患、I P F / U I P、虹彩炎、角膜炎、乾性角結膜炎、クスマウル病またはクスマウル - マイヤー病、ランドリー麻痺、ランゲルハンス細胞性組織球症、網状皮斑、黄斑変性、顕微鏡的多発性血管炎、モルブス・ベヒテレフ（m o r b u s b e c h t e r e v）、運動ニューロン疾患、粘膜性類天疱瘡、多臓器不全、骨髄異形成症候群、心筋炎、神経根障害、神経障害、非 A 非 B 型肝炎、視神経炎、骨溶解、卵巣癌、小関節性 J R A、末梢動脈閉塞疾患（P A O D）、末梢血管疾患（P V D）、末梢動脈疾患（P A D）、静脈炎、結節性多発性動脈炎（または結節性動脈周囲炎）、多発性軟骨炎、リウマチ性多発性筋痛、白毛症、多関節性 J R A、多内分泌欠損症候群、多発性筋

10

炎、ポンプ後症候群、原発性パーキンソニズム、前立腺癌および直腸癌および造血性悪性病変（白血病およびリンパ腫）、前立腺炎、赤芽球癆、原発性副腎不全、再発性視神経脊髄炎、再狭窄、リウマチ性心疾患、S A P H O（滑膜炎、アクネ、膿疱症、骨過形成および骨髄炎）、強皮症、続発性アミロイドーシス、ショック肺、強膜炎、坐骨神経痛、二次性副腎不全、シリコーン関連結合組織病、スネドン - ウィルキンソン皮膚症、強直性脊椎炎、スティーブンス・ジョンソン症候群（S J S）、全身性炎症反応症候群、側頭動脈炎、トキソプラズマ性網膜炎、中毒性表皮剥離症、横断性脊髄炎、T R A P S（腫瘍壊死因子受容体）、I 型アレルギー反応、I I 型糖尿病、通常型間質性肺炎（U I P）、春季結膜炎、ウイルス性網膜炎、フォークト・小柳・原田症候群（V K H 症候群）、滲出型黄斑変性または創傷治癒である、請求項 5 9 に記載の方法。

20

【請求項 6 1】

対象への投与が、非経口、皮下、筋肉内、静脈内、関節内、気管支内、腹腔内、嚢内、軟骨内、腔内（i n t r a c a v i t y）、腔内（i n t r a c e l l i a l）、小脳内、脳室内、結腸内、頸管内、胃内、肝臓内、心筋内、骨内、骨盤内、心臓周囲内、腹腔内、胸膜内、前立腺内、肺内、結腸内、腎臓内、網膜内、脊髄内、滑膜内、胸腔内、子宮内、膀胱内、ポラス、膻、直腸、口内、舌下、鼻内または経皮である、請求項 6 0 に記載の方法。

30

【請求項 6 2】

a) 第一の抗原に結合することが可能な第一の親抗体またはその抗原結合部分を得る工程、

b) 第二の抗原に結合することが可能な第二の親抗体またはその抗原結合部分を得る工程、

c)

(i) V D 1 - (X 1) n - V D 2 - C - (X 2) n

(V D 1 は前記第一の親抗体またはその抗原結合断片から得られた第一の重鎖可変ドメインであり、

V D 2 は前記第二の親抗体またはその抗原結合断片から得られた第二の重鎖可変ドメインであり、

C は重鎖定常ドメインであり、

X 1 はリンカーであり（但し、C H 1 ではない。）

X 2 は F c 領域であり、および

n は 0 または 1 である。）を含むポリペプチド鎖

(i i) V D 1 - (X 1) n - V D 2 - C - (X 2) n

(V D 1 は前記第一の親抗体またはその抗原結合断片から得られた第一の軽鎖可変ドメインであり、

40

50

V D 2 は前記第二の親抗体またはその抗原結合断片から得られた第二の軽鎖可変ドメインであり、

C は軽鎖定常ドメインであり、

X 1 はリンカーであり（但し、C H 1 ではない。））、

X 2 は F c 領域を含まず、および

n は 0 または 1 である。）を含むポリペプチド鎖

(i i i) 第一の V D 1 - (X 1) n - V D 2 - C - (X 2) n

(V D 1 は前記第一の親抗体またはその抗原結合断片から得られた第一の重鎖可変ドメインであり、

V D 2 は前記第二の親抗体またはその抗原結合断片から得られた第二の重鎖可変ドメインであり、

C は重鎖定常ドメインであり、

X 1 はリンカーであり（但し、C H 1 ではない。））、および

X 2 は F c 領域である。）を含む第一のポリペプチド鎖および

第二の V D 1 - (X 1) n - V D 2 - C - (X 2) n

(V D 1 は前記第一の親抗体またはその抗原結合断片から得られた第一の軽鎖可変ドメインであり、

V D 2 は前記第二の親抗体またはその抗原結合断片から得られた第二の軽鎖可変ドメインであり、

C は軽鎖定常ドメインであり、

X 1 はリンカーであり（但し、C H 1 ではない。））、

X 2 は F c 領域を含まず、

n は 0 または 1 である。）を含む第二のポリペプチド鎖または

(i v) 2 つのポリペプチド鎖が V D 1 - (X 1) n - V D 2 - C - (X 2) n

(V D 1 は前記第一の親抗体またはその抗原結合断片から得られた第一の重鎖可変ドメインであり、

V D 2 は前記第二の親抗体またはその抗原結合断片から得られた第二の重鎖可変ドメインであり、

C は重鎖定常ドメインであり、

X 1 はリンカーであり（但し、C H 1 ではない。））、

X 2 は F c 領域である。）を含み、および

2 つのポリペプチド鎖が V D 1 - (X 1) n - V D 2 - C - (X 2) n

(V D 1 は前記第一の親抗体またはその抗原結合断片から得られた第一の軽鎖可変ドメインであり、

V D 2 は前記第二の親抗体またはその抗原結合断片から得られた第二の軽鎖可変ドメインであり、

C は軽鎖定常ドメインであり、

X 1 はリンカーであり（但し、C H 1 ではない。））、

X 2 は F c 領域を含まず、

n は 0 または 1 である。）を含む第四のポリペプチド鎖

を構築する工程、および

d) 抗原の対に結合することが可能な結合タンパク質が生成されるように、前記第一、第二、第三および第四のポリペプチド鎖を発現させる工程

(抗原の対は、N G F および M T X、N G F および N K G 2 D、N G F および I G F 1、

2、N G F および R O N、N G F および E r b B 3、N G F および C D - 3、N G F およ

び I G F R、N G F および H G F、N G F および V E G F、N G F および D L L 4、N G

F および P 1 G F、N G F および C D - 2 0、N G F および E G F R、N G F および H E

R - 2、N G F および C D - 1 9、N G F および C D - 8 0、N G F および C D - 2 2、

N G F および C D - 4 0、N G F および c - M E T、または N G F および N R P 1 である

)

10

20

30

40

50

を含む、2つの抗原に結合することが可能な結合タンパク質を生成する方法。

【請求項63】

V D 1 および V D 2 重鎖可変ドメインが、配列番号 2 8、3 0、3 2、3 4、3 6、3 8、4 0、4 2、4 4、4 6、4 8、5 0、5 2、5 4、5 6、5 8、6 0、6 2、6 4、6 6、6 8、7 0、7 2、7 4、7 6、7 8、8 0、8 2、8 4、8 6、8 8 または 9 0 を独立して含み、V D 1 および V D 2 軽鎖可変ドメインが、配列番号 2 9、3 1、3 3、3 5、3 7、3 9、4 1、4 3、4 5、4 7、4 9、5 1、5 3、5 5、5 7、5 9、6 1、6 3、6 5、6 7、6 9、7 1、7 3、7 5、7 7、7 9、8 1、8 3、8 5、8 7、8 9 または 9 1 を独立して含む、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項64】

第一の親抗体またはその抗原結合部分および第二の親抗体またはその抗原結合部分が、ヒト抗体、C D R 移植された抗体またはヒト化抗体である、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項65】

第一の親抗体またはその抗原結合部分および第二の親抗体またはその抗原結合部分が、F a b 断片、F (a b ') ₂ 断片、ヒンジ領域においてジスルフィド架橋によって連結された2つのF a b 断片を含む二価断片、V H および C H 1 ドメインからなるF d 断片、抗体の単一アームのV L およびV H ドメインからなるF v 断片、d A b 断片、単離された相補性決定領域(C D R)、一本鎖抗体ならびにダイアボディである、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項66】

第一の親抗体またはその抗原結合部分が、結合タンパク質によって示される少なくとも1つの所望の特性を有する、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項67】

第二の親抗体またはその抗原結合部分が、結合タンパク質によって示される少なくとも1つの所望の特性を有する、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項68】

F c 領域が、バリエーション配列のF c 領域である、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項69】

F c 領域が、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A、I g M、I g E または I g D から得られるF c 領域である、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項70】

所望の特性が、1つ以上の抗体パラメーターである、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項71】

所望の特性が、1つ以上の抗体パラメーターである、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項72】

抗体パラメーターが、抗原特異性、抗原に対する親和性、効力、生物学的機能、エピトープ認識、安定性、可溶性、生産効率、免疫原性、薬物動態、生物学的利用率、組織交差反応性またはオルソロガス抗原結合性である、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項73】

抗体パラメーターが、抗原特異性、抗原に対する親和性、効力、生物学的機能、エピトープ認識、安定性、可溶性、生産効率、免疫原性、薬物動態、生物学的利用率、組織交差反応性またはオルソロガス抗原結合性である、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項74】

第一の親抗体またはその抗原結合部分、第二の親抗体またはその抗原結合部分が、第二の抗原に結合する親和性と異なる親和性で第一の抗原に結合する、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項75】

第一の親抗体またはその抗原結合部分、第二の親抗体またはその抗原結合部分が、第二の抗原に結合する効力と異なる効力で第一の抗原に結合する、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項76】

10

20

30

40

50

イムノアッセイは、試験試料を少なくとも1つの結合タンパク質および少なくとも1つの検出可能な標識と接触させることを含み、

少なくとも1つの結合タンパク質は、請求項1、3、6、24、25または55に記載の結合タンパク質を含む、

イムノアッセイによって試験試料中の少なくとも1つの抗原またはその断片の存在を決定する方法。

【請求項77】

(i) 第一の複合体を形成するために、試験試料を、抗原またはその断片上のエピトープに結合する少なくとも1つの結合タンパク質と接触させること、

(ii) 第二の複合体を形成するために、前記複合体を、前記結合タンパク質に結合したまたは前記結合タンパク質に結合しない抗原もしくはその断片上のエピトープに結合する少なくとも1つの検出可能な標識と接触させることおよび

(iii) 第二の複合体における検出可能な標識によって発生したシグナルに基づいて、試験試料中の抗原またはその断片の存在を検出することをさらに含み、抗原またはその断片の存在が、検出可能な標識によって発生したシグナルに直接的に相関する、請求項76に記載の方法。

【請求項78】

(i) 第一の複合体を形成するために、試験試料を、抗原またはその断片上のエピトープに結合する少なくとも1つの結合タンパク質と接触させること、

(ii) 第二の複合体を形成するために、前記複合体を、前記結合タンパク質への結合について抗原またはその断片と競合する少なくとも1つの検出可能な標識と接触させることおよび

(iii) 第二の複合体における検出可能な標識によって発生したシグナルに基づいて、試験試料中の抗原またはその断片の存在を検出することをさらに含み、抗原またはその断片の存在が、検出可能な標識によって発生したシグナルに間接的に相関する、請求項76に記載の方法。

【請求項79】

試験試料が患者由来であり、方法が、患者の治療的/予防的処置の効力を診断、予後診断、または評価することをさらに含み、

前記方法が、患者の治療的/予防的処置の効力を評価することをさらに含む場合、該方法が、効力を改善するために必要な、患者の治療的/予防的処置を改変することを場合によってさらに含む、請求項76から78のいずれか一項に記載の方法。

【請求項80】

方法が、自動化システムまたは半自動化システムにおける使用に適合される、請求項76から79のいずれか一項に記載の方法。

【請求項81】

方法が、試料中の1を超える抗原の存在を決定する、請求項76から80のいずれか一項に記載の方法。

【請求項82】

イムノアッセイは、(a) 少なくとも1つの結合タンパク質および少なくとも1つの検出可能な標識を用い、(b) 検出可能な標識によって発生したシグナルを対照または前記抗原またはその断片を含む較正物質と比較することを含み、

較正物質は、場合によって一連の較正物質の一部であり、較正物質の各々は、抗原またはその断片の濃度によって順に他の較正物質と異なり、

少なくとも1つの結合タンパク質は、請求項1、3、6、24、25、または55に記載の結合タンパク質を含む、

イムノアッセイによって試験試料中の抗原またはその断片の量または濃度を決定する方法。

【請求項83】

(i) 第一の複合体を形成するために、試験試料を、抗原またはその断片上のエピトープ

ブに結合する少なくとも1つの結合タンパク質と接触させること、

(i i) 第二の複合体を形成するために、前記複合体を、前記結合タンパク質に結合しない抗原またはその断片上のエピトープに結合する少なくとも1つの検出可能な標識と接触させることおよび

(i i i) 第二の複合体における検出可能な標識によって発生したシグナルに基づいて、試験試料中の抗原またはその断片の量または濃度を決定すること

をさらに含み、抗原またはその断片の量または濃度が、検出可能な標識によって発生したシグナルに直接的に比例する、請求項 8 2 に記載の方法。

【請求項 8 4】

(i) 第一の複合体を形成するために、試験試料を、抗原またはその断片上のエピトープに結合する少なくとも1つの結合タンパク質と接触させること、

(i i) 第二の複合体を形成するために、前記複合体を、前記結合タンパク質への結合について抗原またはその断片と競合する少なくとも1つの検出可能な標識と接触させることおよび

(i i i) 第二の複合体における検出可能な標識によって発生したシグナルに基づいて、試験試料中の抗原またはその断片の量または濃度を決定すること

をさらに含み、抗原またはその断片の存在が、検出可能な標識によって発生したシグナルに間接的に比例する、請求項 8 2 に記載の方法。

【請求項 8 5】

試験試料が患者由来であり、方法が、患者の治療的 / 予防的処置の効力を診断、予後診断、または評価することをさらに含み、

前記方法が、患者の治療的 / 予防的処置の効力を評価することをさらに含む場合、該方法が、効力を改善するために必要な、患者の治療的 / 予防的処置を改変することを場合によってさらに含む、請求項 8 2 から 8 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 6】

方法が、自動化システムまたは半自動化システムにおける使用に適合される、請求項 8 2 から 8 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 7】

方法が、試料中の 1 を超える抗原の量または濃度を決定する、請求項 8 2 から 8 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 8】

(a) 抗原またはその断片について試験試料をアッセイするための説明書および (b) 請求項 1、3、6、24、25 または 55 に記載の結合タンパク質を含む少なくとも1つの結合タンパク質を含む、

抗原またはその断片の存在、量、または濃度について試験試料をアッセイするためのキット。

【請求項 8 9】

V D 1 および V D 2 重鎖可変ドメインが、存在する場合、配列番号 28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88 または 90 からの 3 つの C D R を独立して含み、V D 1 および V D 2 軽鎖可変ドメインが、存在する場合、配列番号 29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89 または 91 からの 3 つの C D R を独立して含む、請求項 1、3、6 または 25 に記載の結合タンパク質。

【請求項 9 0】

V D 1 および V D 2 重鎖可変ドメインが、存在する場合、配列番号 28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88 または 90 からの 4 つのフレームワークを独立して含み、V D 1 および V D 2 軽鎖

10

20

30

40

50

可変ドメインが、存在する場合、配列番号 29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89 または 91 からの 4 つのフレームワークを独立して含む、請求項 1、3、6 または 25 に記載の結合タンパク質。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

多価結合タンパク質および多重特異的結合タンパク質、それらを製造する方法、ならびに特に急性および慢性炎症疾患、癌、および他の疾患の診断、予防および/または治療におけるそれらの使用が提供される。

10

【背景技術】

【0002】

2 つ以上の抗原に結合することが可能な多重特異的抗体などの工学的に作製されたタンパク質が、本分野において公知である。このような多重特異的結合タンパク質は、細胞融合、化学的連結または組み換え DNA 技術を用いて作製することが可能である。

【0003】

二特異的抗体は、二特異的抗体の所望される特異性を有するマウスモノクローナル抗体 (mAb) を発現する 2 つの異なるハイブリッド-マ細胞株の体細胞融合に基づき、クアドロ-マ技術 (Milstein, C. and A. C. Cuello (1983) Nature 305 (5934): 537-40 参照) を用いて作製されてきた。得られたハイブリッド-ハイブリッド-マ (またはクアドロ-マ) 細胞株内で 2 つの異なる免疫グロブリン (Ig) 重鎖と軽鎖がランダムに対合するために、最大 10 個の異なる Ig 種が生成され、そのうち 1 つだけが機能的な二特異的抗体である。誤対合された副産物の存在および大幅に減少した産生率は、複雑な精製操作が必要とされることを意味している。

20

【0004】

二特異的抗体は、2 つの異なる mAb の化学的連結によっても生産することが可能である (Staerz, U. D., et al. (1985) Nature 314 (6012): 628-31 参照)。このアプローチは、均一な調製を与えない。他のアプローチは、2 つの異なる mAb またはより小さな抗体断片の化学的連結を使用してきた (Brennan, M., et al. (1985) Science 229 (4708): 81-3 参照)。

30

【0005】

二特異的抗体を作製するための別の方法は、2 つの親抗体をヘテロ二重機能的クロスリンカーと対結合させることであるが、クロスリンカーの親抗体との反応が部位指定的でないので、得られた二特異的抗体には著しい分子不均一性があるという問題がある。二特異的抗体のより均一な調製物を得るために、2 つの異なる Fab 断片が、部位指定された様式で、それらのヒンジシステイン残基において化学的に架橋されてきた (Glennie, M. J., et al. (1987) J. Immunol. 139 (7): 2367-75 参照)。しかし、この方法は、Fab'2 断片をもたらし、完全な IgG 分子をもたらさない。

40

【0006】

多岐にわたる他の組み換え二特異的抗体フォーマットが開発されている (Kriangkum, J., et al. (2001) Biopol. Eng. 18 (2): 31-40 参照)。それらのうち、直列型一本鎖 Fv 分子およびダイアボディならびにこれらの様々な誘導体が、最も広く使用されている。一般に、これらの分子の構築は、異なる抗原を認識する 2 つの一本鎖 Fv (scFv) 断片から始まる (Economides, A. N., et al. (2003) Nat. Med. 9 (1): 47-52 参照)。直列型 scFv 分子 (taFv) は、2 つの scFv 分子を付加的ペプチドリンカーと単に接続する単純なフォーマットである。これらの直列型 scFv 分子中に存在する 2 つの scFv

50

断片は、別個の折り畳み実体を形成する。2つのs c F v断片および最大63個の残基の長さを有するリンカーを接続するために、様々なリンカーを使用することが可能である (Nakanishi, K., et al. (2001) *Ann. Rev. Immunol.* 19: 423 - 74 参照)。親s c F v断片は、通常、細菌内で、可溶性形態で発現されることができ、直列型s c F v分子は、細菌中で不溶性凝集物を形成することがしばしば観察される。したがって、可溶性直列型s c F v分子を作製するために、一般に、再折り畳みプロトコルまたは哺乳動物発現系の使用が適用される。最近の研究において、トランスジェニックウサギおよびウシによる、CD28および抗悪性黒色腫関連プロテオグリカンに対して誘導された直列型s c F vのインビボ発現が報告された (Gracie, J. A., et al. (1999) *J. Clin. Invest.* 104 (10) : 1393 - 401 参照)。この構築物では、2つのs c F v分子は、CH1リンカーによって接続され、二特異的抗体の最大100 mg / Lの血清濃度が見出された。細菌中の可溶性発現を可能とするために、ドメイン順序の変動、または変動する長さもしくは柔軟性を有する中央リンカーを使用することを含む様々な戦略が使用された。現在、いくつかの研究が、極めて短いAla3リンカーまたはグリシン/セリンが豊富な長いリンカーを用いた、細菌中の可溶性直列型s c F v分子の発現が報告されている (Leung, B. P., et al. (2000) *J. Immunol.* 164 (12) : 6495 - 502 ; Ito, A., et al. (2003) *J. Immunol.* 170 (9) : 4802 - 9 ; Karni, A., et al. (2002) *J. Neuroimmunol.* 125 (1 - 2) : 134 - 40 参照)。別の最近の研究では、細菌中で、可溶性および活性形態で産生された分子を濃縮するために、3または6個の残基の長さを有する無作為化された中央リンカーを含有する直列型s c F vレパートリーのファージディスプレイが使用された。このアプローチは、6アミノ酸残基のリンカーを有する直列型s c F v分子の単離をもたらした (Arndt, M. and J. Krauss (2003) *Methods Mol Biol.* 207 : 305 - 21 参照)。このリンカー配列が、直列型s c F v分子の可溶性発現に対する一般的な解決策であるかどうかは不明である。それにも関わらず、この研究は、部位指定突然変異導入と組み合わせた直列型s c F v分子のファージディスプレイが、これらの分子 (これらの分子は、細菌内で、活性形態で発現され得る。) を濃縮するための強力なツールであることを示した。

【0007】

二特異的ダイアボディ (Db) は、発現のためにダイアボディフォーマットを使用する。ダイアボディは、VHおよびVLドメインを接続するリンカーの長さを、約5残基まで減少させることによってs c F v断片から作製される (Peipp, M. and T. Valerius (2002) *Biochem. Soc. Trans.* 30 (4) : 507 - 11 参照)。)。リンカーサイズのこの減少は、VHおよびVLドメインの交差対合による2つのポリペプチド鎖の二量体化を促進する。二特異的ダイアボディは、構造VHA - VLBおよびVHB - VLA (VH - VL配置) またはVLA - VHBおよびVLB - VHA (VL - VH配置) のいずれかとともに、2つのポリペプチド鎖を同一細胞内で発現させることによって作製される。異なる様々な二特異的ダイアボディが過去に作製されており、それらの多くは、細菌中で、可溶性形態で発現される。しかしながら、最近の比較研究は、可変ドメインの方向性が、活性な結合部位の発現および形成に影響を与え得ることを示している (Mack, M. et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (15) : 7021 - 5 参照)。それにもかかわらず、細菌中の可溶性発現は、直列型s c F v分子に比べて重要な利点を示す。しかしながら、2つの異なるポリペプチド鎖が単一の細胞内で発現されるので、活性なヘテロ二量体とともに、不活性なホモ二量体が産生され得る。これにより、二特異的ダイアボディの均一な調製物を得るために、さらなる精製工程の実施が必要となる。二特異的ダイアボディの生成を強制する1つのアプローチは、ノブ・イントゥ・ホールダイアボディの作製である (Holliger, P., T. Prospero, and G. Winter (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (14) : 6444 - 8 . 18 参照

10

20

30

40

50

)。このアプローチは、HER2およびCD3に対して誘導された二特異的ダイアボディに対して示された。Val37をPheと交換し、Leu45をTrpと交換することによって、VHドメイン中に大きなノブが導入され、抗HER2または抗CD3可変ドメインのいずれかにおいて、Phe98をMetに変異させ、Try87をAlaに変異させることによって、VLドメイン中に相補的な穴が作製された。このアプローチを使用することによって、二特異的ダイアボディの産生は、親ダイアボディによる72%からノブ・イントゥ・ホールダイアボディによる90%超まで増加し得る。重要なことに、産生率は、これらの変異の結果として、僅かに減少したに過ぎなかった。しかしながら、いくつかの構築物に対して抗原結合活性の低下が観察された。したがって、このかなり精巧なアプローチは、変化されていない結合活性を有するヘテロ二量体分子を産生する変異を同定するために、様々な構築物の分析を必要とする。さらに、このようなアプローチは、定常領域に免疫グロブリン配列の変異的修飾を必要とし、このため、抗体配列の非原型および非天然形態を作製し、これは、増加した免疫原性、乏しいインビボ安定性および望ましくない薬物動態をもたらし得る。

【0008】

一本鎖ダイアボディ(s c D b)は、二特異的ダイアボディ様分子の形成を改善するための別の戦略である(Holliger, P. and G. Winter (1997) Cancer Immunol. Immunother. 45 (3-4): 128-30; Wu, A. M., et al (1996) Immunotechnology. 2 (1): p. 21-36参照)。二特異的一本鎖ダイアボディは、2つのダイボディ形成ポリペプチド鎖を、約15アミノ酸残基の長さを有する追加の中央リンカーと接続することによって作製される。したがって、単量体の一本鎖ダイアボディ(50-60kDa)に対応する分子量を有するすべての分子が二特異的である。二特異的一本鎖ダイアボディは、細菌中において、可溶性および活性な形態で発現され、精製された分子の大半が単量体として存在することが、いくつかの研究によって示されている(Holliger, P. and G. Winter (1997) Cancer Immunol. Immunother. 45 (3-4): 128-30; Wu, A. M., et al. (1996) Immunotechnol. 2 (1): 21-36; Pluckthun, A. and P. Pack (1997) Immunotechnol. 3 (2): 83-105; Ridgway, J. B., et al. (1996) Protein Engin. 9 (7): 617-21参照)。したがって、一本鎖ダイアボディは、直列型s c F v(すべての単量体は二特異的である。)とダイアボディ(細菌中での可溶性発現)の利点を併有している。

【0009】

より最近に、ダイアボディは、ジ-ダイアボディと名づけられた、よりIg様の分子を作製するためにFcに融合されている(Lu, D., et al. (2004) J. Biol. Chem. 279 (4): 2856-65)。さらに、IgGの重鎖中に2つのFabリピートを含み、4つの抗原分子に結合することが可能な多価の抗体構築物が記載されている(WO0177342A1およびMiller, K., et al. (2003) J. Immunol. 170 (9): 4854-61参照)。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】国際公開第2001/77342号

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】Milstein, C. and A. C. Cuello (1983) Nature 305 (5934): 537-40

【非特許文献2】Staerz, U. D., et al. (1985) Nature 314 (6012): 628-31

10

20

30

40

50

【非特許文献3】Brennan, M., et al. (1985) Science 29 (4708): 81 - 3

【非特許文献4】Glennie, M. J., et al. (1987) J. Immunol. 139 (7): 2367 - 75

【非特許文献5】Kriangkum, J., et al. (2001) Biomol. Eng. 18 (2): 31 - 40

【非特許文献6】Economides, A. N., et al. (2003) Nat. Med. 9 (1): 47 - 52

【非特許文献7】Nakanishi, K., et al. (2001) Ann. Rev. Immunol. 19: 423 - 74

10

【非特許文献8】Gracie, J. A., et al. (1999) J. Clin. Invest. 104 (10): 1393 - 401

【非特許文献9】Leung, B. P., et al. (2000) J. Immunol. 164 (12): 6495 - 502

【非特許文献10】Ito, A., et al. (2003) J. Immunol. 170 (9): 4802 - 9

【非特許文献11】Karni, A., et al. (2002) J. Neuroimmunol. 125 (1-2): 134 - 40

【非特許文献12】Arndt, M. and J. Krauss (2003) Methods Mol Biol. 207: 305 - 21

20

【非特許文献13】Peipp, M. and T. Valerius (2002) Biochem. Soc. Trans. 30 (4): 507 - 11

【非特許文献14】Mack, M. et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (15): 7021 - 5

【非特許文献15】Holliger, P., T. Prospero, and G. Winter (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (14): 6444 - 8. 18

【非特許文献16】Holliger, P. and G. Winter (1997) Cancer Immunol. Immunother. 45 (3-4): 128 - 30

【非特許文献17】Wu, A. M., et al (1996) Immunotechnology. 2 (1): p. 21 - 36

30

【非特許文献18】Pluckthun, A. and P. Pack (1997) Immunotechnol. 3 (2): 83 - 105

【非特許文献19】Ridgway, J. B., et al. (1996) Protein Engin. 9 (7): 617 - 21

【非特許文献20】Lu, D., et al. (2004) J. Biol. Chem. 279 (4): 2856 - 65

【非特許文献21】Miller, K., et al. (2003) J. Immunol. 170 (9): 4854 - 61

【発明の概要】

40

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本分野において、2つ以上の抗原に結合することが可能な改善された多価結合タンパク質に対する要求が存在する。米国特許出願第11/507,050号は、二重可変ドメイン免疫グロブリン(DVD-Ig(商標))と呼ばれる、高い親和性で2つ以上の抗原に結合することが可能な結合タンパク質の新規ファミリーを提供する。さらに、2つ以上の抗原に結合することが可能な新規結合タンパク質が提供される。

【課題を解決するための手段】

【0013】

2つ以上の抗原に結合することが可能な多価結合タンパク質が提供される。高い親和性

50

で2つ以上の抗原に結合することが可能な結合タンパク質の新規ファミリーが提供される。

【0014】

一実施形態において、ポリペプチド鎖を含み、ポリペプチド鎖はVD1 - (X1)_n - VD2 - C - (X2)_n (VD1は第一の可変ドメインであり、VD2は第二の可変ドメインであり、Cは定常ドメインであり、X1はアミノ酸またはポリペプチドを表し、X2はFc領域を表し、nは0または1である。)を含む、結合タンパク質が提供される。一実施形態において、結合タンパク質中のVD1およびVD2は、重鎖可変ドメインである。別の実施形態において、重鎖可変ドメインは、マウス重鎖可変ドメイン、ヒト重鎖可変ドメイン、CDR移植された重鎖可変ドメインまたはヒト化重鎖可変ドメインである。さらに別の実施形態において、VD1およびVD2は、同一の抗原に結合することができる。別の実施形態において、VD1およびVD2は、異なる抗原に結合することができる。さらに別の実施形態において、Cは、重鎖定常ドメインである。例えば、X1はリンカーである(但し、X1はCH1ではない。)。例えば、X1は、AKTTPKLEEGEFSEAR(配列番号1); AKTTPKLEEGEFSEARV(配列番号2); AKTTPKLG(配列番号3); SAKTTPKLG(配列番号4); SAKTTP(配列番号5); RADAAP(配列番号6); RADAAPT(配列番号7); RADAAGGPGS(配列番号8); RADAAGA(G₄S)₄(配列番号9); SAKTTPKLEEGEFSEARV(配列番号10); ADAAP(配列番号11); ADAAPT(配列番号12); TVAAP(配列番号13); TVAAPSVFIFPP(配列番号14); QPKAAP(配列番号15); QPKAAPSVTLFPP(配列番号16); AKTTP(配列番号17); AKTTPPSVTPLAP(配列番号18); AKTTP(配列番号19); AKTTPSVYPLAP(配列番号20); ASTKGP(配列番号21); ASTKGPSVFPLAP(配列番号22); GGGGSGGGGSGGGGS(配列番号23); GENKVEYAPALMALS(配列番号24); GPAKELTPLKEAKVS(配列番号25); またはGHEAAAVMQVQYPAS(配列番号26)を含むリンカーである。一実施形態において、X2は、Fc領域である。別の実施形態において、X2は、バリエーションFc領域である。

10

20

30

【0015】

一実施形態において、本明細書に開示されている結合タンパク質はポリペプチド鎖を含み、ポリペプチド鎖はVD1 - (X1)_n - VD2 - C - (X2)_n (VD1は第一の重鎖可変ドメインであり、VD2は第二の重鎖可変ドメインであり、Cは重鎖定常ドメインであり、X1はリンカーであり(但し、CH1ではない。)、X2はFc領域である。)を含む。

【0016】

一実施形態において、結合タンパク質中のVD1およびVD2は、軽鎖可変ドメインである。一実施形態において、軽鎖可変ドメインは、マウス軽鎖可変ドメイン、ヒト軽鎖可変ドメイン、CDR移植された軽鎖可変ドメインまたはヒト化軽鎖可変ドメインである。一実施形態において、VD1およびVD2は、同一の抗原に結合することができる。別の実施形態において、VD1およびVD2は、異なる抗原に結合することができる。一実施形態において、Cは、軽鎖定常ドメインである。別の実施形態において、X1はリンカーである(但し、X1はCL1ではない。)。一実施形態において、X1は、AKTTPKLEEGEFSEAR(配列番号1); AKTTPKLEEGEFSEARV(配列番号2); AKTTPKLG(配列番号3); SAKTTPKLG(配列番号4); SAKTTP(配列番号5); RADAAP(配列番号6); RADAAPT(配列番号7); RADAAGGPGS(配列番号8); RADAAGA(G₄S)₄(配列番号9); SAKTTPKLEEGEFSEARV(配列番号10); ADAAP(配列番号11); ADAAPT(配列番号12); TVAAP(配列番号13); TVAAPSVFIFPP(配列番号14); QPKAAP(配列番号15); QPKA

40

50

A P S V T L F P P (配列番号16); A K T T P P (配列番号17); A K T T P P S V T P L A P (配列番号18); A K T T A P (配列番号19); A K T T A P S V Y P L A P (配列番号20); A S T K G P (配列番号21); A S T K G P S V F P L A P (配列番号22); G G G G S G G G G S G G G G S (配列番号23); G E N K V E Y A P A L M A L S (配列番号24); G P A K E L T P L K E A K V S (配列番号25); または G H E A A A V M Q V Q Y P A S (配列番号26)を含む。一実施形態において、結合タンパク質は、X2を含まない。

【0017】

一実施形態において、可変重鎖および可変軽鎖はどちらも同じリンカーを含む。別の実施形態において、可変重鎖および可変軽鎖は異なるリンカーを含む。別の実施形態において、可変重鎖および可変軽鎖はどちらも短い(約6アミノ酸の)リンカーを含む。別の実施形態において、可変重鎖および可変軽鎖はどちらも長い(6アミノ酸を超える)リンカーを含む。別の実施形態において、可変重鎖は短いリンカーを含み、可変軽鎖は長いリンカーを含む。別の実施形態において、可変重鎖は長いリンカーを含み、可変軽鎖は短いリンカーを含む。

10

【0018】

一実施形態において、本明細書において開示されている結合タンパク質はポリペプチド鎖を含み、前記ポリペプチド鎖はVD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n(VD1は第一の軽鎖可変ドメインであり、VD2は第二の軽鎖可変ドメインであり、Cは軽鎖定常ドメインであり、X1はリンカーであり(但し、CH1ではない。)、X2はFc領域を含まない。)を含む。

20

【0019】

別の実施形態において、2つのポリペプチド鎖を含み、前記第一のポリペプチド鎖はVD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n(VD1は第一の重鎖可変ドメインであり、VD2は第二の重鎖可変ドメインであり、Cは重鎖定常ドメインであり、X1はリンカーであり(但し、CH1ではない。)、X2はFc領域である。)を含み、前記第二のポリペプチド鎖はVD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n(VD1は第一の軽鎖可変ドメインであり、VD2は第二の軽鎖可変ドメインであり、Cは軽鎖定常ドメインであり、X1はリンカーであり(但し、CH1ではない。)、X2はFc領域を含まない。)を含む、結合タンパク質が提供される。特定の実施形態において、二重可変ドメイン(DVD)結合タンパク質は4つのポリペプチド鎖を含み、第一の2つのポリペプチド鎖は、それぞれ、VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n(VD1は第一の重鎖可変ドメインであり、VD2は第二の重鎖可変ドメインであり、Cは重鎖定常ドメインであり、X1はリンカーであり(但し、CH1ではない。)、X2はFc領域である。)を含み; ならびに第二の2つのポリペプチド鎖は、それぞれ、VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n(VD1は第一の軽鎖可変ドメインであり、VD2は第二の軽鎖可変ドメインであり、Cは軽鎖定常ドメインであり、X1はリンカーであり(但し、CH1ではない。)、X2はFc領域を含まない。)を含む。このような二重可変ドメイン(DVD)タンパク質は、4つの抗原結合部位を有する。

30

【0020】

別の実施形態において、本明細書に開示されている結合タンパク質は、1つ以上の標的に結合することができる。したがって、いくつかの実施形態において、結合タンパク質は、少なくとも2つの異なる標的に結合することができる少なくとも2つの可変ドメイン配列(例えば、VD1およびVD2)を含む。いくつかの実施形態において、VD1およびVD2は、独立して選択される。したがって、いくつかの実施形態において、VD1およびVD2は同じ配列番号を含み、他の実施形態において、VD1およびVD2は異なる配列番号を含む。

40

【0021】

一実施形態において、標的は、サイトカイン、細胞表面タンパク質、酵素、または受容体である。別の実施形態において、結合タンパク質は、1つ以上の標的の生物学的機能を

50

調節することができる。別の実施形態において、結合タンパク質は、1つ以上の標的を中和することができる。別の実施形態において、結合タンパク質は、以下の例示的なサイトカイン：リンホカイン、モノカイン、ポリペプチドホルモン、受容体または腫瘍マーカーに結合することができる。例えば、いくつかの実施形態において、DVD-Igは、神経増殖因子(NGF)、メトトレキサート(MTX)；NKG2D；IGF1, 2；RON；Erbb3；CD-3；IGFR；HGF；VEGF；DLL4；PIGF；CD-20；EGFR；HER-2；CD-19；CD-80；CD-22；CD-40；c-MET；およびNRP1の2つ以上に結合することができる(表2も参照)。特定の実施形態において、結合タンパク質は、以下の例示的な標的の対：NGFおよびMTX；NGFおよびNKG2D；NGFおよびIGF1, 2；NGFおよびRON；NGFおよびErbb3；NGFおよびCD-3；NGFおよびIGFR；NGFおよびHGF；NGFおよびVEGF；NGFおよびDLL4；NGFおよびPIGF；NGFおよびCD-20；NGFおよびEGFR；NGFおよびHER-2；NGFおよびCD-19；NGFおよびCD-80；NGFおよびCD-22；NGFおよびCD-40；NGFおよびc-MET；またはNGFおよびNRP1に結合することができる(実施例2.1から2.60を参照)。

10

【0022】

一実施形態において、結合タンパク質は、配列番号28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、または90を含むVD1およびVD2重鎖可変ドメイン；ならびに配列番号29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、または91を含むVD1およびVD2軽鎖可変ドメインを含む。

20

【0023】

別の実施形態において、結合タンパク質は、表12から71に示される重鎖および軽鎖配列を含む。

【0024】

一実施形態において、NGF(配列2)とMTXに結合することができる結合タンパク質は、配列番号96または配列番号98を含む重鎖；および配列番号97または配列番号99を含む軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、NGF(配列2)とMTXに結合することができる結合タンパク質は、配列番号96の重鎖アミノ酸配列および配列番号97の軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、NGF(配列1)とIL-6Rに結合することができる結合タンパク質は、逆の配向を有し、配列番号98の重鎖アミノ酸配列および配列番号99の軽鎖アミノ酸配列を含む。

30

【0025】

別の実施形態において、ポリペプチド鎖を含み、前記ポリペプチド鎖はVD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n(VD1は第一の親抗体またはその抗原結合部分から得られた第一の重鎖可変ドメインであり、VD2は第二の親抗体またはその抗原結合部分から得られた第二の重鎖可変ドメインであり、Cは重鎖定常ドメインであり、(X1)nはリンカーであり(但し、CH1ではない。)、前記(X1)nは存在しまたは存在せず、(X2)nはFc領域であり、前記(X2)nは存在するまたは存在しない。)を含む、結合タンパク質が提供される。一実施形態において、Fc領域は結合タンパク質に存在しない。

40

【0026】

別の実施形態において、ポリペプチド鎖を含み、前記ポリペプチド鎖はVD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n(VD1は第一の親抗体またはその抗原結合部分から得られた第一の軽鎖可変ドメインであり、VD2は第二の親抗体またはその抗原結合部分から得られた第二の軽鎖可変ドメインであり、Cは軽鎖定常ドメインであり、(X1)nはリンカーであり(但し、CH1ではない。)、前記(X1)nは存在しまたは存在せず、(

50

X 2) n は F c 領域を含まず、前記 (X 2) n は存在するまたは存在しない。) を含む、結合タンパク質が提供される。一実施形態において、(X 2) n は結合タンパク質に存在しない。

【 0 0 2 7 】

別の実施形態において、結合タンパク質は第一および第二のポリペプチド鎖を含み、前記第一のポリペプチド鎖は第一の V D 1 - (X 1) n - V D 2 - C - (X 2) n (V D 1 は第一の親抗体またはその抗原結合部分から得られた第一の重鎖可変ドメインであり、V D 2 は第二の親抗体またはその抗原結合部分から得られた第二の重鎖可変ドメインであり、C は重鎖定常ドメインであり、(X 1) n はリンカーであり(但し、C H 1 ではない。)、前記 (X 1) n は存在しまたは存在せず、(X 2) n は F c 領域であり、前記 (X 2) n は存在するまたは存在しない。) を含む、前記第二のポリペプチド鎖は第二の V D 1 - (X 1) n - V D 2 - C - (X 2) n (V D 1 は第一の親抗体またはその抗原結合部分から得られた第一の軽鎖可変ドメインであり、V D 2 は第二の親抗体またはその抗原結合部分から得られた第二の軽鎖可変ドメインであり、C は軽鎖定常ドメインであり、(X 1) n はリンカーであり(但し、C H 1 ではない。)、前記 (X 1) n は存在しまたは存在せず、(X 2) n は F c 領域を含まず、前記 (X 2) n は存在するまたは存在しない。) を含む。別の実施形態において、結合タンパク質は 2 つの第一のポリペプチド鎖および 2 つの第二のポリペプチド鎖を含む。さらに別の実施形態において、(X 2) n は第二のポリペプチド鎖に存在しない。さらに別の実施形態において、F c 領域は、第一のポリペプチドに存在する場合、固有配列の F c 領域またはバリエーション配列の F c 領域である。さらに別の実施形態において、F c 領域は、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A、I g M、I g E または I g D から得られる F c 領域である。

10

20

【 0 0 2 8 】

別の実施形態において、結合タンパク質は、4 つのポリペプチド鎖を含み、第一および第三のポリペプチド鎖は V D 1 - (X 1) n - V D 2 - C - (X 2) n (V D 1 は第一の親抗体またはその抗原結合部分から得られた第一の重鎖可変ドメインであり、V D 2 は第二の親抗体またはその抗原結合部分から得られた第二の重鎖可変ドメインであり、C は重鎖定常ドメインであり、(X 1) n はリンカーであり(但し、C H 1 ではない。)、前記 (X 1) n は存在しまたは存在せず、(X 2) n は F c 領域であり、前記 (X 2) n は存在するまたは存在しない。) を含む、第二および第四のポリペプチド鎖は V D 1 - (X 1) n - V D 2 - C - (X 2) n (V D 1 は第一の親抗体またはその抗原結合部分から得られた第一の軽鎖可変ドメインであり、V D 2 は第二の親抗体またはその抗原結合部分から得られた第二の軽鎖可変ドメインであり、C は軽鎖定常ドメインであり、(X 1) n はリンカーであり(但し、C H 1 ではない。)、前記 (X 1) n は存在しまたは存在せず、(X 2) n は F c 領域を含まず、前記 (X 2) n は存在するまたは存在しない。) を含む、2 つの抗原に結合することが可能である。

30

【 0 0 2 9 】

親抗体を予め選択することによって結合タンパク質を作製する方法が提供される。一実施形態において、2 つの抗原に結合することが可能な二重可変ドメイン免疫グロブリンを作製する方法は、前記第一および前記第二の抗原に結合することが可能な二重可変ドメイン免疫グロブリンが生成されるように、a) 第一の抗原に結合することが可能な第一の親抗体またはその抗原結合部分を得る工程、b) 第二の抗原に結合することが可能な第二の親抗体またはその抗原結合部分を得る工程、c) V D 1 - (X 1) n - V D 2 - C - (X 2) n (V D 1 は前記第一の親抗体またはその抗原結合部分から得られた第一の重鎖可変ドメインであり、V D 2 は前記第二の親抗体またはその抗原結合部分から得られた第二の重鎖可変ドメインであり、C は重鎖定常ドメインであり、(X 1) n はリンカーであり(但し、C H 1 ではない。)、前記 (X 1) n は存在しまたは存在せず、(X 2) n は F c 領域であり、前記 (X 2) n は存在するまたは存在しない。) を含む第一および第三のポリペプチド鎖を構築する工程、d) V D 1 - (X 1) n - V D 2 - C - (X 2) n (V D 1 は前記第一の親抗体またはその抗原結合部分から得られた第一の軽鎖可変ドメインであ

40

50

り、VD2は前記第二の親抗体またはその抗原結合部分から得られた第二の軽鎖可変ドメインであり、Cは軽鎖定常ドメインであり、(X1)nはリンカーであり(但し、CH1ではない。)、前記(X1)nは存在しまたは存在せず、(X2)nはFc領域を含まず、前記(X2)nは存在するまたは存在しない。)を含む第二および第四のポリペプチド鎖を構築する工程ならびにe)前記第一、第二、第三および第四のポリペプチド鎖を発現させる工程を含む。

【0030】

さらに別の実施形態において、前記第一および前記第二の抗原に結合することが可能であり所望の特性を有する二重可変ドメイン免疫グロブリンが生成されるように、a)第一の抗原に結合することが可能であり二重可変ドメイン免疫グロブリンによって示される少なくとも1つの所望の特性を有する第一の親抗体またはその抗原結合部分を得る工程、b)第二の抗原に結合することが可能であり二重可変ドメイン免疫グロブリンによって示される少なくとも1つの所望の特性を有する第二の親抗体またはその抗原結合部分を得る工程、c)VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n(VD1は前記第一の親抗体またはその抗原結合部分から得られた第一の重鎖可変ドメインであり、VD2は前記第二の親抗体またはその抗原結合部分から得られた第二の重鎖可変ドメインであり、Cは重鎖定常ドメインであり、(X1)nはリンカーであり(但し、CH1ではない。)、前記(X1)nは存在しまたは存在せず、(X2)nはFc領域であり、前記(X2)nは存在するまたは存在しない。)を含む第一および第三のポリペプチド鎖を構築する工程、d)VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n(VD1は前記第一の親抗体またはその抗原結合部分から得られた第一の軽鎖可変ドメインであり、VD2は前記第二の親抗体またはその抗原結合部分から得られた第二の軽鎖可変ドメインであり、Cは軽鎖定常ドメインであり、(X1)nはリンカーであり(但し、CH1ではない。)、前記(X1)nは存在しまたは存在せず、(X2)nはFc領域を含まず、前記(X2)nは存在するまたは存在しない。)を含む第二および第四のポリペプチド鎖を構築する工程ならびにe)前記第一、第二、第三および第四のポリペプチド鎖を発現させる工程を含む、2つの抗原に結合することが可能であり所望の特性を有する二重可変ドメイン免疫グロブリンを作製する方法が提供される。

【0031】

一実施形態において、本明細書において開示されている第一および第二のポリペプチド鎖のVDIは、同じ親抗体またはその抗原結合部分から得られる。別の実施形態において、本明細書において開示されている第一および第二のポリペプチド鎖のVDIは、異なる親抗体またはその抗原結合部分から得られる。別の実施形態において、本明細書において開示されている第一および第二のポリペプチド鎖のVD2は、同じ親抗体またはその抗原結合部分から得られる。別の実施形態において、本明細書において開示されている第一および第二のポリペプチド鎖のVD2は、異なる親抗体またはその抗原結合部分から得られる。

【0032】

一実施形態において、第一の親抗体またはその抗原結合部分および第二の親抗体またはその抗原結合部分は同じ抗体である。別の実施形態において、第一の親抗体またはその抗原結合部分および第二の親抗体またはその抗原結合部分は異なる抗体である。

【0033】

一実施形態において、第一の親抗体またはその抗原結合部分は第一の抗原に結合し、第二の親抗体またはその抗原結合部分は第二の抗原に結合する。特定の実施形態において、第一および第二の抗原は同じ抗原である。別の実施形態において、親抗体は同じ抗原上の異なるエピトープに結合する。別の実施形態において、第一および第二の抗原は異なる抗原である。別の実施形態において、第一の親抗体またはその抗原結合部分は、第二の親抗体またはその抗原結合部分が第二の抗原に結合する効力と異なる効力で第一の抗原に結合する。さらに別の実施形態において、第一の親抗体またはその抗原結合部分は、第二の親抗体またはその抗原結合部分が第二の抗原に結合する親和性と異なる親和性で第一の抗原

10

20

30

40

50

に結合する。

【0034】

別の実施形態において、第一の親抗体またはその抗原結合部分および第二の親抗体またはその抗原結合部分は、ヒト抗体、CDR移植された抗体またはヒト化抗体である。一実施形態において、抗原結合部分は、Fab断片、F(ab')₂断片、ヒンジ領域においてジスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片を含む二価断片、VHおよびCH1ドメインからなるFd断片、抗体の単一アームのVLおよびVHドメインからなるFv断片、dAb断片、単離された相補性決定領域(CDR)、一本鎖抗体またはダイアボディである。

【0035】

別の実施形態において、結合タンパク質は、第一の親抗体もしくはその抗原結合部分または第二の親抗体もしくはその抗原結合部分によって示される少なくとも1つの所望の特性を有する。あるいは、第一の親抗体もしくはその抗原結合部分または第二の親抗体もしくはその抗原結合部分は、二重可変ドメイン免疫グロブリンによって示される少なくとも1つの所望の特性を有する。一実施形態において、所望の特性は、1つ以上の抗体パラメーターである。別の実施形態において、抗体パラメーターは、抗原特異性、抗原に対する親和性、効力、生物学的機能、エピトープ認識、安定性、可溶性、生産効率、免疫原性、薬物動態、生物学的利用率、組織交差反応性またはオルソロガス抗原結合性である。一実施形態において、結合タンパク質は多価である。別の実施形態において、結合タンパク質は多重特異的である。本明細書に記載されている多価および/または多重特異的結合タンパク質は、特に治療的見地から望ましい特性を有する。例えば、多価および/または多重特異的結合タンパク質は、(1)抗体が結合する抗原を発現している細胞によって、二価抗体より速く内部に取り込まれる(および/または異化される);(2)アゴニスト抗体であり;および/または(3)多価抗体が結合することができる抗原を発現している細胞の細胞死および/またはアポトーシスを誘導し得る。多価および/または多重特異的結合タンパク質の少なくとも1つの抗原結合特異性を提供する「親抗体」は、抗体が結合する抗原を発現している細胞によって内部に取り込まれ(および/または異化される)抗体であり得、および/またはアゴニスト、細胞死誘導および/またはアポトーシス誘導抗体であり得、本明細書に記載されている多価および/または多重特異的結合タンパク質は、これらの特性の1つ以上の改善を示し得る。さらに、本明細書に記載されているように、多価結合タンパク質として構築された場合、親抗体は、これらの特性のいずれか1つ以上を欠如し得るが、ここに述べられているようにして構築されたとき、これらの特性は付与され得る。

【0036】

別の実施形態において、結合タンパク質は、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、少なくとも $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; 少なくとも $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; 少なくとも $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; 少なくとも $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; または少なくとも $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の、1つ以上の標的への結合速度定数(K_{on})を有する。一実施形態において、結合タンパク質は、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、 $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ と $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の間、 $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ と $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の間、 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ と $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の間、または $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ と $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の間の、1つ以上の標的に対する結合速度定数(K_{on})を有する。

【0037】

別の実施形態において、結合タンパク質は、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 10^{-3} s^{-1} ; 最大約 10^{-4} s^{-1} ; 最大約 10^{-5} s^{-1} ; または最大約 10^{-6} s^{-1} の、1つ以上の標的への解離速度定数(K_{off})を有する。一実施形態において、結合タンパク質は、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、 10^{-3} s^{-1} から 10^{-4} s^{-1} の、 10^{-4} s^{-1} から 10^{-5} s^{-1} の、または 10^{-5} s^{-1} から 10^{-6} s^{-1} の間の、1つ以上の標的に対する解離速度定数(K_{off})を有する。

10

20

30

40

50

【0038】

別の実施形態において、結合タンパク質は、最大約 10^{-7} M；最大約 10^{-8} M；最大約 10^{-9} M；最大約 10^{-10} M；最大約 10^{-11} M；最大約 10^{-12} M または最大 10^{-13} M の、1つ以上の標的への解離定数 (K_D) を有する。一実施形態において、結合タンパク質は、 10^{-7} M から 10^{-8} M の； 10^{-8} M から 10^{-9} M の； 10^{-9} M から 10^{-10} M の； 10^{-10} M から 10^{-11} M の； 10^{-11} M から 10^{-12} M の；または 10^{-12} M から 10^{-13} M のその標的に対する解離定数 (K_D) を有する。

【0039】

別の実施形態において、上記結合タンパク質は、作用物質をさらに含む連結体である。別の実施形態において、作用物質は、免疫接着分子、造影剤、治療剤または細胞毒性剤である。一実施形態において、造影剤は、放射性標識、酵素、蛍光標識、発光標識、生物発光標識、磁気標識またはビオチンである。別の実施形態において、放射性標識は、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho または ^{153}Sm である。さらに別の実施形態において、治療剤または細胞毒性剤は、代謝抑制剤、アルキル化剤、抗生物質、成長因子、サイトカイン、抗血管新生剤、抗有糸分裂剤、アントラサイクリン、トキシンまたはアポトーシス剤である。

10

【0040】

別の実施形態において、本明細書に記載されている結合タンパク質は結晶化された結合タンパク質であり、結晶として存在する。一実施形態において、この結晶は、無担体医薬徐放結晶である。さらに別の実施形態において、結晶化された結合タンパク質は、前記結合タンパク質の可溶性対応物より大きなインビボ半減期を有する。さらに別の実施形態において、結晶化された結合タンパク質は生物学的活性を保持する。

20

【0041】

別の実施形態において、本明細書に記載されている結合タンパク質はグリコシル化される。例えば、グリコシル化は、ヒトグリコシル化パターンである。

【0042】

本明細書に開示されている結合タンパク質のいずれか1つをコードする単離された核酸も提供される。さらなる実施形態は、本明細書に開示されている単離された核酸を含むベクターを提供し、前記ベクターは、p cDNA；p T T (Durocher et al., Nucleic Acids Research 2002, Vol 30, No. 2)；p T T 3 (さらなる多重クローニング部位を有する p T T；p E F B O S (Mizushima, S. and Nagata, S., (1990) Nucleic acids Research Vol 18, NO. 17)；p B V；p J V；p cDNA 3.1 T O P O、p E F 6 T O P O または p B J である。一実施形態において、ベクターは、米国特許出願第 61/021,282 号に開示されているベクターである。

30

【0043】

別の態様において、宿主細胞は、本明細書に開示されたベクターで形質転換される。一実施形態において、宿主細胞は原核細胞である。別の実施形態において、宿主細胞は E. コリ (E. coli) である。関連する実施形態において、宿主細胞は真核細胞である。別の実施形態において、真核細胞は、原生生物細胞、動物細胞、植物細胞または真菌細胞である。さらに別の実施形態において、宿主細胞は、これらに限定されないが、CHO、COS；NS0、SP2、PER.C6 を含む哺乳動物細胞；またはサッカロミセス・セレビシアエ (Saccharomyces cerevisiae) などの真菌細胞；または Sf9 などの昆虫細胞である。

40

【0044】

一実施形態において、異なる特異性を有する2つ以上のは、単一の組み換え宿主細胞中で生産される。例えば、抗体の混合物の発現は、Oligoclomics (商標) (Merus B.V., The Netherlands) 米国特許第 7,262,028 号；米国特許第 7,429,486 号と呼ばれている。

50

【 0 0 4 5 】

結合タンパク質を産生するのに十分な条件下で、同じく本明細書に開示されている宿主細胞のいずれか1つを培地中において培養することを含む、本明細書に開示されている結合タンパク質を生産する方法が提供される。一実施形態において、この方法によって生産された結合タンパク質の50%から75%が、二重特異的四価結合タンパク質である。特定の実施形態において、この方法によって生産された結合タンパク質の75%から90%が、二重特異的四価結合タンパク質である。特定の実施形態において、生産された結合タンパク質の90%から95%が、二重特異的四価結合タンパク質である。

【 0 0 4 6 】

一実施形態は、結合タンパク質の放出のための組成物を提供し、この組成物は製剤を含み、該製剤は、本明細書に開示されている結晶化された結合タンパク質および成分ならびに少なくとも1つのポリマー担体を含む。例えば、ポリマー担体は、：ポリ(アクリル酸)、ポリ(シアノアクリレート)、ポリ(アミノ酸)、ポリ(無水物)、ポリ(デブシペプチド)、ポリ(エステル)、ポリ(乳酸)、ポリ(乳酸グリコール酸共重合体)またはPLGA、ポリ(b-ヒドロキシブチレート)、ポリ(カプロラクトン)、ポリ(ジオキサノン)；ポリ(エチレングリコール)、ポリ((ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド、ポリ[(オルガノ)ホスファゼン]、ポリ(オルトエステル)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリ(ビニルピロリドン)、無水マレイン酸-アルキルビニルエーテル共重合体、ブルニックポリオール、アルブミン、アルギナート、セルロースおよびセルロース誘導体、コラーゲン、フィブリン、ゼラチン、ヒアルロン酸、オリゴ糖、グリカミノグリカン、硫酸化された多糖、またはこれらの混合物および共重合体である。例えば、成分は、アルブミン、ショ糖、トレハロース、ラクチトール、ゼラチン、ヒドロキシプロピル-シクロデキストリン、メトキシポリエチレングリコールまたはポリエチレングリコールでよい。別の実施形態は、本明細書に開示された組成物の有効量を哺乳動物に投与する工程を含む哺乳動物を治療する方法を提供する。

【 0 0 4 7 】

本明細書に開示された結合タンパク質および医薬として許容される担体を含む医薬組成物が提供される。さらなる実施形態において、この医薬組成物は、疾患を治療するための少なくとも1つの追加の治療剤を含む。例えば、追加の薬剤は、治療剤、造影剤、細胞毒性剤、血管新生阻害剤(抗VEGF抗体またはVEGF-トラップが含まれるが、これらに限定されない。)、キナーゼ阻害剤(KDRおよびTIE-2阻害剤が含まれるが、これらに限定されない。)、共刺激分子遮断剤(抗B7.1、抗B7.2、CTLA4-Ig、抗CD20が含まれるが、これらに限定されない。)、接着分子遮断剤(抗LFA-1抗体、抗E/Lセレクチン抗体、小分子阻害剤が含まれるが、これらに限定されない。)、抗サイトカイン抗体またはその機能的断片(抗IL-18、抗TNFおよび抗IL-6/サイトカイン受容体抗体が含まれるが、これらに限定されない。)、メトトレキサート、シクロスポリン、ラパマイシン、FK506；検出可能な標識またはレポーター、TNFアンタゴニスト、抗リウマチ薬、筋肉弛緩剤、麻酔薬、非ステロイド系抗炎症薬(NSAID)、鎮痛剤、麻酔、鎮静剤、局所麻酔、神経筋肉遮断剤、抗微生物剤、抗乾癬剤、コルチコステロイド、アナボリックステロイド、エリスロポエチン、免疫化、イムノグロブリン、免疫抑制剤、成長ホルモン、ホルモン置換薬、放射性薬剤、抗うつ剤、抗精神病薬、刺激物質、喘息薬、アゴニスト、吸引用ステロイド、エピネフリンまたは類似体、サイトカインまたはサイトカインアンタゴニストでよい。

【 0 0 4 8 】

本明細書に開示されている結合タンパク質によって結合されることができ、標的または複数の標的が有害である疾患に罹患しているヒト対象を治療する方法であり、ヒト対象中の標的または複数の標的の活性が阻害され、1つ以上の症状が緩和され、または治療が達成されるように、本明細書に開示されている結合タンパク質をヒト対象に投与することを含む、前記方法が提供される。例えば、疾患は、関節炎、骨関節炎、若年性慢性関節炎、化膿性関節炎、ライム関節炎、乾癬性関節炎、反応性関節炎、脊椎関節症、全身性紅斑性

10

20

30

40

50

狼瘡、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、インシュリン依存性糖尿病、甲状腺炎、喘息、アレルギー性疾患、乾癬、皮膚炎、強皮症、移植片対宿主病、臓器移植拒絶、臓器移植に関連する急性または慢性免疫疾患、サルコイドーシス、アテローム性動脈硬化症、播種性血管内凝固、川崎病、パセドウ病、ネフロゼ症候群、慢性疲労症候群、ウェゲナー肉芽腫症、ヘノッホ・シェーライン紫斑症、腎臓の顕微鏡的血管炎、慢性活動性肝炎、ブドウ膜炎、敗血症性ショック、毒素性ショック症候群、敗血症症候群、悪液質、感染性疾患、寄生性疾患、後天性免疫不全症候群、急性横断性脊髄炎、ハンチントン舞踏病、パーキンソン病、アルツハイマー病、発作、原発性胆汁性肝硬変、溶血性貧血、悪性腫瘍、心不全、心筋梗塞、アジソン病、孤発性の、多内分泌腺機能低下症候群 I 型および多内分泌腺機能低下症候群 II 型、シュミット症候群、成人（急性）呼吸促迫症候群、脱毛症、円形脱毛症、血清反応陰性関節炎、関節炎、ライター病、乾癬性関節炎、潰瘍性大腸性関節炎、腸疾患性滑膜炎、クラミジア、エルシニアおよびサルモネラ関連関節炎、脊椎関節症、アテローム性疾患 / アテローム性動脈硬化症、アトピー性アレルギー、自己免疫性水疱性疾患、尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、類天疱瘡、線状 I g A 病、自己免疫性溶血性貧血、クームス陽性溶血性貧血、後天性悪性貧血、若年性悪性貧血、筋痛性脳脊髄炎 / ロイヤルフリー病、慢性粘膜皮膚カンジダ症、巨細胞性動脈炎、原発性硬化性肝炎、突発性自己免疫性肝炎、後天性免疫不全症候群、後天性免疫不全関連疾患、B 型肝炎、C 型肝炎、分類不能型免疫不全症（分類不能型原発性低グロブリン血症）、拡張型心筋症、女性不妊症、卵巣機能不全、早期卵巣機能不全、線維性肺疾患、突発性間質性肺炎、炎症後間質性肺疾患、間質性肺炎、結合組織疾患関連間質性肺疾患、混合性結合組織疾患関連肺疾患、全身性硬化症関連間質性肺疾患、関節リウマチ関連間質性肺疾患、全身性紅斑性狼瘡関連肺疾患、皮膚筋炎 / 多発性筋炎関連肺疾患、シェーグレン病関連肺疾患、強直性脊椎炎関連肺疾患、血管炎性びまん性肺疾患（*vasculitic diffuse lung disease*）、ヘモシデロシス関連肺疾患、薬物によって誘導された間質性肺疾患、線維症、放射性線維症、閉塞性細気管支炎、慢性好酸球性肺炎、リンパ球浸潤性肺疾患、感染後間質性肺疾患、通風関節炎、自己免疫性肝炎、I 型自己免疫性肝炎（古典的自己免疫性またはルポイド肝炎）、II 型自己免疫性肝炎（抗 L K M 抗体肝炎）、自己免疫媒介性低血糖症、黒色表皮腫を伴う B 型インシュリン抵抗性、副甲状腺機能低下症、臓器移植に関連する急性免疫疾患、臓器移植に関連する慢性免疫疾患、変形性関節症、原発性硬化性胆管炎、I 型乾癬、II 型乾癬、特発性白血球減少症、自己免疫性好中球減少症、腎臓病 N O S、糸球体腎炎、腎臓の顕微鏡的血管炎、ライム病、円板状紅斑性狼瘡、男性不妊症特発性または N O S、精子自己免疫、多発性硬化症（すべてのサブタイプ）、交感性眼炎、結合組織疾患に続発する肺高血圧症、グッドパスチャー症候群、結節性多発動脈炎の肺症状、急性リウマチ熱、リウマチ性脊椎炎、スチル病、全身性硬化症、シェーグレン症候群、高安病 / 動脈炎、自己免疫性血小板減少症、特発性血小板減少症、自己免疫性甲状腺疾患、甲状腺機能亢進症、甲状腺腫自己免疫性甲状腺機能低下症（橋本病）、萎縮性自己免疫性甲状腺機能低下症、原発性粘液水腫（*primary myxoedema*）、水晶体起因性ブドウ膜炎、原発性血管炎、白斑急性肝疾患、慢性肝疾患、アルコール性肝硬変、アルコール誘発性肝障害、胆汁うっ滞（*choleostasis*）、特異体質性肝疾患、薬物誘発性肝炎、非アルコール性脂肪性肝炎、アレルギーおよび喘息、B 群連鎖球菌（*GBS*）感染、精神障害（例えば、うつ病および統合失調症）、Th 2 型および Th 1 型によって媒介される疾病、急性および慢性疼痛（疼痛の様々な形態）、ならびに、肺癌、乳癌、胃癌、膀胱癌、大腸癌、膵臓癌、卵巣癌、前立腺癌および腎臓癌および造血性悪性病変（白血病およびリンパ腫）などの癌、無リポタンパク質血症、先端チアノーゼ、急性および慢性寄生性または感染性プロセス、急性白血病、急性リンパ芽球性白血病（*ALL*）、急性骨髄性白血病（*AML*）、急性または慢性細菌感染、急性肺炎、急性腎不全、腺癌、心房（*aerial*）異所性拍動、A I D S 認知症複合、アルコール誘発性肝炎、アレルギー性結膜炎、アレルギー性接触性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、同種移植拒絶、- 1 - アンチトリプシン欠乏症、筋萎縮性側索硬化症、貧血、狭心症、前角細胞変性、抗 c d 3 治療、抗リン脂質症候群、抗受容体過敏症反応（*anti-re*

10

20

30

40

50

ceptor hypersensitivity reactions)、大動脈(aortic)および動脈瘤、大動脈解離、動脈性高血圧、動脈硬化症、動静脈瘻、運動失調、心房細動(持続的または発作性)、心房粗動、房室ブロック、B細胞リンパ腫、骨移植拒絶、骨髄移植(BMT)拒絶、脚ブロック、パーキットリンパ腫、火傷、心不整脈、心機能不全症候群(cardiac stun syndrome)、心臓腫瘍、心筋症、心肺バイパス炎症反応、軟骨移植拒絶、小脳皮質変性、小脳疾患、無秩序なまたは多巣性心房頻脈、化学療法関連疾患、慢性骨髄性白血病(CML)、慢性アルコール症、慢性炎症性病変、慢性リンパ性白血病(PLL)、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、慢性サリチル酸中毒、結腸直腸癌、うっ血性心不全、結膜炎、接触性皮膚炎、肺性心、冠動脈疾患、クロイツフェルト-ヤコブ病、培養陰性敗血症、嚢胞性線維症、サイトカイン療法関連疾患、ボクサー脳、脱髄性疾患、デング出血熱、皮膚炎、皮膚科学的症状、糖尿病、真性糖尿病、糖尿病性動脈硬化疾患、瀰漫性レビー小体病、拡張型うっ血性心筋症、大脳基底核の疾患、中年のダウン症候群、中枢神経ドーパミン受容体を遮断する薬物によって誘発された薬物誘発性運動疾患、薬物感受性、湿疹、脳脊髄炎、心内膜炎、内分泌疾患、喉頭蓋炎、エプスタイン-バーウイルス感染、紅痛症、垂体外路および小脳疾患、家族性血球貪食性リンパ組織球症(familial hematophagocytic lymphohistiocytosis)、致命的胸腺移植組織拒絶、フリードライヒ失調症、機能的末梢動脈疾患、真菌性敗血症、ガス壊疽、胃潰瘍、糸球体腎炎、いずれかの臓器または組織の移植片拒絶、グラム陰性敗血症、グラム陽性敗血症、細胞内生物に起因する肉芽腫、有毛細胞白血病、ハラールホルデン・スパッツ病、橋本甲状腺炎、枯草熱、心臓移植拒絶、血色素症、血液透析、溶血性尿毒症症候群/血栓溶解血小板減少紫斑病、出血、肝炎(A型)、ヒス束不整脈、HIV感染/HIV神経障害、ホジキン病、運動過剰疾患、過敏症反応、過敏性肺炎、高血圧、運動低下疾患、視床下部-下垂体-副腎皮質系評価、特発性アジソン病、特発性肺線維症、抗体媒介性細胞毒性、無力症、乳児脊髄性筋萎縮症、大動脈の炎症、A型インフルエンザ、電離放射線曝露、虹彩毛様体炎/ブドウ膜炎/視神経炎、虚血再灌流障害、虚血性発作、若年性関節リウマチ、若年性脊髄性筋萎縮症、カポジ肉腫、腎移植拒絶、レジオネラ、リーシュマニア症、ハンセン病、皮質脊髄系の病変、脂肪血症(lipedema)、肝臓移植拒絶、リンパ浮腫(lymphedema)、マラリア、悪性リンパ腫、悪性組織球増殖症、悪性黒色腫、髄膜炎、髄膜炎菌血症(meningococciemia)、代謝性/特発性疾患、偏頭痛、ミトコンドリア多系疾患(mitochondrial multi-system disorder)、混合性結合組織病、モノクローナル高ガンマグロブリン血症、多発性骨髄腫、多系統変性(メンセル・デジェリーヌ-トーマス・シャイ-ドレーガーおよびマシャド-ジョセフ)、重症筋無力症、マイコバクテリウム・アビウム・イントラセルラーレ、マイコバクテリウム・チュバキュロシス、骨髄形成異常、心筋梗塞、真菌虚血疾患、上咽頭癌、新生児慢性肺疾患、腎炎、ネフローゼ、神経変性疾患、神経原性I筋萎縮、好中球減少性発熱、非ホジキンリンパ腫、腹部大動脈およびその分枝の閉塞、閉塞性動脈疾患、okt3療法、精巣炎/精巣上体炎、精巣炎/精管復元術処置、臓器肥大、骨粗鬆症、膵臓移植拒絶、膵癌、腫瘍随伴性症候群/悪性腫瘍の高カルシウム血症、副甲状腺移植拒絶、骨盤内炎症性疾患、通年性鼻炎、心膜疾患、末梢アテローム硬化性疾患、末梢血管疾患、腹膜炎、悪性貧血、ニューモシスチス・カリニ肺炎、肺炎、POEMS症候群(多発神経炎、臓器肥大、内分泌疾患、単クローン性グロブリン血症および皮膚変化症候群(skin changes syndrome))、灌流後症候群(post perfusion syndrome)、ポンプ後症候群(post pump syndrome)、心筋梗塞後開心術症候群、子癇前症、進行性核上性麻痺、原発性肺高血圧、放射線療法、レイノー現象および病、レイノー病、レフサム病、規則的なQRS幅の狭い頻脈症(regular narrow QRS tachycardia)、腎血管性高血圧、再灌流障害、拘束型心筋症、肉腫、強皮症、老年性舞蹈病、レビー小体型の老年性認知症、血清反応陰性関節炎、ショック、鎌形赤血球貧血症、皮膚同種異系移植拒絶、皮膚変化症候群、小腸移植拒絶、固形腫瘍、固有不整脈(specific arrhythmias)、脊髄

10

20

30

40

50

性運動失調、脊髄小脳変性、連鎖球菌性筋炎、小脳の構造的病変、亜急性硬化性全脳炎、湿疹、心血管系の梅毒、全身性アナフィラキシー、全身性炎症反応症候群、全身性発症若年性関節リウマチ、T細胞またはF A B A L L、毛細血管拡張症、閉塞性血栓血管炎、血小板減少症、毒性、移植、外傷/出血、I I I型過敏症反応、I V型過敏症、不安定狭心症、尿毒症、尿路性敗血症、じんましん、心臓弁膜症、静脈瘤、血管炎、静脈疾患、静脈血栓症、心室細動、ウイルスおよび真菌感染、ウイルス性脳炎(vitalencephalitis)/無菌性髄膜炎、ウイルス関連血球貪食症候群、ウェルニッケ-コルサコフ症候群、ウィルソン病、またはいずれかの臓器または組織の異種移植拒絶でよい。

【0049】

一実施形態において、前記組成物および方法で治療または診断され得る疾患には、乳房、結腸、直腸、肺、中咽頭、下咽頭、食道、胃、膵臓、肝臓、胆嚢および胆管、小腸、尿路(腎臓、膀胱および尿路上皮を含む)、女性生殖路(子宮頸部、子宮および卵巣ならびに絨毛癌および妊娠性絨毛性疾患を含む)、男性生殖路(前立腺、精嚢、精巣および生殖細胞腫瘍を含む)、内分泌腺(甲状腺、副腎および下垂体を含む)および皮膚の癌腫ならびに血管腫、悪性黒色腫、肉腫(骨および軟部組織から生じるものならびにカボジ肉腫を含む)、脳、神経、眼および髄膜の腫瘍(星状膠細胞腫、神経膠腫、神経膠芽細胞腫、網膜芽細胞腫、神経腫、神経芽細胞腫、シュワン細胞腫および髄膜腫を含む)、白血病などの造血性悪性病変から生じる固形腫瘍およびリンパ腫(ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫の両方)を含む原発性および転移性の癌が含まれるが、これらに限定されない。

10

20

【0050】

D V D - I g は、以下の疾患：急性冠症候群、急性特発性多発性神経炎、急性炎症性脱髄性多発神経根神経障害、急性虚血、成人スチル病、円形脱毛症、アナフィラキシー、抗リン脂質抗体症候群、再生不良性貧血、アテローム性動脈硬化症、アトピー性湿疹、アトピー性皮膚炎、自己免疫性皮膚炎、連鎖球菌感染に伴う自己免疫異常、自己免疫性腸症、自己免疫性難聴、自己免疫性リンパ増殖症候群(A L P S)、自己免疫性心筋炎、自己免疫性血小板減少(A I T P)、自己免疫性早期卵巣不全、眼瞼炎、気管支拡張症、水疱性類天疱瘡、心血管疾患、劇症型抗リン脂質症候群、セリアック病、頸部脊椎症、慢性虚血、癬痕性類天疱瘡、多発性硬化症のリスクを有する臨床的孤発症候群(C I S)、結膜炎、小児発症精神障害、慢性閉塞性肺疾患(C O P D)、涙嚢炎、皮膚筋炎、糖尿病性網膜症、真性糖尿病、椎間板ヘルニア、椎間板脱出、薬物誘発免疫性溶血性貧血、心内膜炎、子宮内膜症、眼内炎、上強膜炎、多形性紅斑、重症型多形性紅斑、妊娠性類天疱瘡、ギラン・バレー症候群(G B S)、枯草熱、ヒューズ症候群、特発性パーキンソン病、特発性間質性肺炎、I g E 媒介性アレルギー、免疫性溶血性貧血、封入体筋炎、感染性眼炎症疾患、炎症性脱髄疾患、炎症性心疾患、炎症性腎疾患、I P F / U I P、虹彩炎、角膜炎、乾性角結膜炎(keratoconjunctivitis sicca)、クスマウル病またはクスマウル-マイヤー病、ランドリー麻痺、ランゲルハンス細胞性組織球症、網状皮斑、黄斑変性、悪性病変、顕微鏡的多発性血管炎、モルブス・ベヒテレフ(morbus bechtere v)、運動ニューロン疾患、粘膜性類天疱瘡、多臓器不全、重症筋無力症、骨髄異形成症候群、心筋炎、神経根障害、神経障害、非A非B型肝炎、視神経炎、骨溶解、卵巣癌、小関節性J R A、末梢動脈閉塞疾患(P A O D)、末梢血管疾患(P V D)、末梢動脈疾患(P A D)、静脈炎、結節性多発性動脈炎(または結節性動脈周囲炎)、多発性軟骨炎、リウマチ性多発性筋痛、白毛症、多関節性J R A、多内分泌欠損症候群、多発性筋炎、リウマチ性多発性筋痛(P M R)、ポンプ後症候群、原発性パーキンソニズム、前立腺癌および直腸癌および造血性悪性病変(白血病およびリンパ腫)、前立腺炎、赤芽球癆、原発性副腎不全、再発性視神経脊髄炎、再狭窄、リウマチ性心疾患、S A P H O(滑膜炎、アクネ、膿疱症、骨過形成および骨髄炎)、強皮症、続発性アミロイドーシス、ショック肺、強膜炎、坐骨神経痛、二次性副腎不全、シリコーン関連結合組織病、スネドン-ウィルキンソン皮膚症、強直性脊椎炎、ステーブンス・ジョンソン症候群(S J S)、全身性炎症反応症候群、側頭動脈炎、トキシプラズマ性網膜炎、中毒性表皮剥離

30

40

50

症、横断性脊髄炎、TRAPS（腫瘍壊死因子受容体）、I型アレルギー反応、II型糖尿病、じんましん、通常型間質性肺炎（UIP）、血管炎、春季結膜炎、ウイルス性網膜炎、フォクト・小柳・原田症候群（VKH症候群）、滲出型黄斑変性、創傷治癒、エルシニアならびにサルモネラ関連関節症の1つ以上を治療することもできる。

【0051】

一実施形態において、抗体またはその抗原結合部分は、単独でまたは放射線療法および/もしくは他の化学療法剤と組み合わせて使用される場合、癌を治療するためにまたは本明細書に記載されている腫瘍からの転移の予防において使用される。

【0052】

別の態様において、本明細書に論述されているような第二の作用物質の投与前、投与と同時にまたは投与後に、本明細書に開示されている結合タンパク質のいずれか1つを投与する工程を含む、疾患に罹患している患者を治療する方法が提供される。特定の実施形態において、第二の作用物質は、ブデノシド、上皮増殖因子、コルチコステロイド、シクロスポリン、スルファサラジン、アミノサリチラート、6-メルカプトプリン、アザチオプリン、メトロニダゾール、リポキシゲナーゼ阻害剤、メサラミン、オルサラジン、バルサラジド、抗酸化剤、トロンボキサン阻害剤、IL-1受容体アンタゴニスト、抗IL-1 mAb、抗IL-6またはIL-6受容体mAb、増殖因子、エラスターゼ阻害剤、ピリジニル-イミダゾール化合物、TNF、LT、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-18、IL-23、EMAP-II、GM-CSF、FGFおよびPDGFの抗体またはアゴニスト、CD2、CD3、CD4、CD8、CD-19、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD90またはこれらのリガンドの抗体、メトトレキサート、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノラート・モフェチル、レフルノミド、NSAID、イブプロフェン、コルチコステロイド、プレドニゾロン、ホスホジエステラーゼ阻害剤、アデノシンアゴニスト、抗血栓剤、補体阻害剤、アドレナリン作動薬、IRAK、NIK、IKK、p38、MAPキナーゼ阻害剤、IL-1変換酵素阻害剤、TNF変換酵素阻害剤、T細胞シグナル伝達阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、スルファサラジン、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、可溶性サイトカイン受容体、可溶性p55TNF受容体、可溶性p75TNF受容体、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R、抗炎症性サイトカイン、IL-4、IL-10、IL-11、IL-13またはTGFである。特定の実施形態において、本明細書に開示されている医薬組成物は、非経口、皮下、筋肉内、静脈内、関節内、気管支内、腹腔内、嚢内、軟骨内、腔内（intracavity）、腔内（intracellular）、小脳内、脳室内、結腸内、頸管内、胃内、肝臓内、心筋内、骨内、骨盤内、心臓周囲内、腹腔内、胸膜内、前立腺内、肺内、結腸内、腎臓内、網膜内、脊髄内、滑膜内、胸腔内、子宮内、膀胱内、ポラス、膺、直腸、口内、舌下、鼻内または経皮投与によって、患者に投与される。

【0053】

本発明の少なくとも1つの結合タンパク質に対する少なくとも1つの抗イディオタイプ抗体も提供される。抗イディオタイプ抗体には、本明細書で提供される結合タンパク質中に取り込むことができる、重鎖もしくは軽鎖またはそのリガンド結合部分の少なくとも1つの相補性決定領域（CDR）、重鎖または軽鎖可変領域、重鎖または軽鎖定常領域、フレームワーク領域またはそのいずれかの一部など（これらに限定されない。）、免疫グロブリン分子の少なくとも一部を含むいずれかのタンパク質またはペプチド含有分子が含まれる。

【図面の簡単な説明】

【0054】

【図1】Aは二重可変ドメイン（DVD）= Ig構築物の模式図であり、2つの親抗体からDVD-Igを作製するための戦略を示す図であり、Bは構築物のDVD1-Ig、DVD2-Ig、ならびにハイブリドマクローンの2D13.E3（抗IL-1）およ

10

20

30

40

50

び13F5・G5(抗IL-1)由来の2つのキメラ単一特異的抗体の模式図である。

【発明を実施するための形態】

【0055】

2つ以上の抗原に結合することが可能な多価および/または多重特異的結合タンパク質が提供される。二重可変ドメイン免疫グロブリン(DVD-Ig)およびその医薬組成物ならびにこのようなDVD-Igを作製するための核酸、組み換え発現ベクターおよび宿主細胞。インビトロまたはインビボのいずれかで、特異的抗原を検出するためにDVD-Igを使用する方法も提供される。

【0056】

本明細書に別段の定義がなければ、本明細書で使用される科学および技術用語は、当業者によって一般的に理解される意味を有するものとする。しかしながら、何らかの曖昧さが伏在している場合には、用語の意味および範囲は明確であるべきであり、本明細書中に付与されている定義は、すべての辞書または本明細書外の定義に優越する。さらに、文脈上別段の必要がなければ、単数形用語は複数形を含むものとし、複数形用語は単数を含むものとする。本願において、「または」の使用は、別段の記載がなければ、「および/または」を意味する。さらに、「含んでいる」という用語ならびに「含む」および「含まれた」などのその他の形式の使用は、限定的なものではない。また、「要素」または「成分」などの用語は、別段の記載がなければ、1つのユニットを含む要素および成分ならびに1より多いサブユニットを含む要素および成分をとともに包含する。

10

【0057】

一般的に、本明細書に記載されている細胞および組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学ならびにタンパク質および核酸化学およびハイブリッド形成に関連して使用される命名法およびこれらの技術は、周知のものであり、本分野において一般的に使用されている。一般に、本明細書で提供される方法および技術は、別段の記載がなければ、本分野において周知の慣用方法に従い、ならびに本明細書を通じて引用および論述されている様々な一般的参考文献およびより具体的な参考文献中に記載されているように、実施することができる。酵素反応および精製技術は、製造業者の説明書に従って、本分野で一般的に遂行されているように、または本明細書に記載されているように、実施される。本明細書に記載されている分析化学、合成有機化学および医薬品化学および薬化学に関して使用される命名法、ならびに本明細書に記載されている分析化学、合成有機化学および医薬品化学および薬化学の実験室操作および技術は、周知のものであり、本分野で一般的に使用されているものである。化学合成、化学分析、医薬の調製、調合、および送達、および患者の治療に対しては、標準的な技術を使用し得る。

20

30

【0058】

本発明をさらに容易に理解し得るように、いくつかの用語を以下に定義する。

【0059】

本明細書において使用される「ポリペプチド」という用語は、アミノ酸のあらゆるポリマー鎖を表す。「ペプチド」および「タンパク質」という用語は、ポリペプチドという用語と互換的に使用され、同じく、アミノ酸のポリマー鎖を表す。「ポリペプチド」という用語は、固有または人工のタンパク質、タンパク質断片およびタンパク質配列のポリペプチド類似体を包含する。ポリペプチドは、単量体または多量体であり得る。本明細書における「ポリペプチド」の使用は、別段文脈上矛盾しない限り、ポリペプチドならびにその断片およびバリエーション(バリエーションの断片を含む)を包含するものとする。抗原性ポリペプチドでは、ポリペプチドの断片は、ポリペプチドの少なくとも1つの連続したまたは非線形エピトープを場合によって含有する。少なくとも1つのエピトープ断片の正確な境界は、本分野における通常の技術を使用して確認され得る。断片は、少なくとも約5個の連続したアミノ酸(少なくとも約10個の連続したアミノ酸、少なくとも約15個の連続したアミノ酸または少なくとも約20個の連続したアミノ酸など)を含む。ポリペプチドのバリエーションは、本明細書に記載されている通りである。

40

【0060】

50

「単離されたタンパク質」または「単離されたポリペプチド」という用語は、その由来起源または由来源のために、その固有の状態において当該タンパク質またはポリペプチドとともに存在する天然に随伴される成分を伴わないタンパク質またはポリペプチドであり、同じ種に由来する他のタンパク質を実質的に含まず、異なる種から得られた細胞によって発現され、または天然には存在しない。したがって、化学的に合成されたポリペプチド、またはポリペプチドが本来由来する細胞とは異なる細胞系の中で合成されたポリペプチドは、それに本来付随している成分から「単離」されている。タンパク質は、本分野で周知のタンパク質精製技術を使用し、単離によって、本来付随している成分が実質的に存在しないようにすることもできる。

【0061】

本明細書において使用される「回収する」という用語は、例えば、本分野で周知のタンパク質精製技術を使用して、単離によって、ポリペプチドなどの化学種を、本来付随する成分を実質的に含まないようにする方法を表す。

【0062】

本明細書において使用される「生物学的活性」とは、分子の1つ以上の固有の生物学的特性（インビボで見られるように天然に存在するものであっても、組み換え手段によって提供される、または可能にされるものであっても）を表す。生物学的特性には、受容体に結合すること；細胞増殖の誘導、細胞増殖を阻害すること、他のサイトカインの誘導、アポトーシスの誘導および酵素活性が含まれるが、これらに限定されない。生物学的活性は、Ig分子の活性も含む。

【0063】

第二の化学種との抗体、タンパク質またはペプチドの相互作用に関して、本明細書において使用される「特異的結合」または「特異的に結合する」という用語は、相互作用が、化学種、例えば、抗体上の特定の構造（例えば、抗原決定基またはエピトープ）の存在に依存し、例えば、抗体がタンパク質一般ではなく、特異的なタンパク質構造を認識し、結合することを意味する。抗体がエピトープ「A」に対して特異的であれば、標識された「A」および抗体を含有する反応中での、エピトープAを含有する分子（すなわち、標識されていない遊離のA）の存在は、抗体に結合した、標識されたAの量を減少させる。

【0064】

本明細書において使用される「抗体」という用語は、4つのポリペプチド鎖（2つの重（H）鎖および2つの軽（L）鎖）から構成されるあらゆる免疫グロブリン（Ig）分子またはIg分子の本質的なエピトープ結合特性を保持したすべての機能的断片、変異体、バリエーションまたはこれらの誘導体を広く表すものとする。このような変異体、バリエーションまたは誘導体抗体のフォーマットは、本分野において公知である。これらの非限定的な実施形態は、以下に論述されている。

【0065】

完全長の抗体において、各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書において、HCVRまたはVHと略称される。）および重鎖定常領域から構成される。重鎖定常領域は、3つのドメインCH1、CH2およびCH3から構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書において、LCVRまたはVLと略称される。）および軽鎖定常領域から構成される。軽鎖定常領域は、1つのドメインCLから構成される。VHおよびVL領域は、より保存された領域（フレームワーク領域（FR）と称される。）が散在された超可変領域（相補性決定領域（CDR）と称される。）へ、さらに細分割することが可能である。各VHおよびVLは、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順で、アミノ末端からカルボキシ末端に配置された3つのCDRおよび4つのFRから構成される。免疫グロブリン分子は、あらゆる種類（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgAおよびIgY）、クラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2）またはサブクラスであり得る。

【0066】

「Fc領域」という用語は、無傷の抗体のパパイン消化によって生成され得る、免疫グ

10

20

30

40

50

ロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用される。Fc領域は、固有配列のFc領域またはバリエーションFc領域であり得る。免疫グロブリンのFc領域は、一般に、2つの定常ドメイン(CH2ドメインおよびCH3ドメイン)を含み、場合によって、CH4ドメインを含む。抗体エフェクター機能を変化させるために、Fc部分中のアミノ酸残基を置換することが、本分野において周知である(Winter, et al. 米国特許第5,648,260号および米国特許第5,624,821号)。抗体のFc部分は、いくつかの重要なエフェクター機能、例えば、サイトカイン誘導、ADCC、食作用、補体依存性細胞傷害(CDC)および抗体の半減期/排除速度および抗原-抗体複合体を媒介する。いくつかの事例において、これらのエフェクター機能は、治療用抗体のために望ましいが、別の事例では、治療目的に応じて、必要でない場合があり得、または有害である場合さえあり得る。ある種のヒトIgGアイソタイプ、特に、IgG1およびIgG3は、それぞれ、FcRおよび補体C1qへの結合を介して、ADCCおよびCDCを媒介する。新生児Fc受容体(FcRn)は、抗体の循環半減期を決定する重要な成分である。さらに別の実施形態において、少なくとも1つのアミノ酸残基は、抗体のエフェクター機能が変化されるように、抗体の定常領域、例えば、抗体のFc領域において置換されている。免疫グロブリンの2つの同一の重鎖の二量体化は、CH3ドメインの二量体化によって媒介され、ヒンジ領域内のジスルフィド結合によって安定化される(Huber et al. Nature; 264: 415-20; Thies et al. 1999 J Mol Biol; 293: 67-79.)。重鎖-重鎖ジスルフィド結合を防止するための、ヒンジ領域内のシステイン残基の変異は、CH3ドメインの二量体化を不安定化させる。CH3二量体化にとって必要とされる残基が同定されている(Dall'Acqua 1998 Biochemistry 37: 9266-73.)。したがって、一価の半Igを生成することが可能である。興味深いことに、これらの一価の半Ig分子は、IgGおよびIgA両サブクラスに対して、天然に見出されている(Seligman 1978 Ann Immunol 129: 855-70; Biewenga et al. 1983 Clin Exp Immunol 51: 395-400)。FcRn:IgFc領域の化学量論は、2:1であることが決定されており(West et al. 2000 Biochemistry 39: 9698-708)、半Fcは、FcRn結合を媒介するのに十分である(Kim et al. 1994 Eur J Immunol; 24: 542-548.)。CH3二量体化にとって重要な残基がCH3bシート構造の内部界面上に位置しているのに対して、FcRn結合に必要とされる領域は、CH2-CH3ドメインの外側界面に位置しているため、CH3ドメインの二量体化を崩壊させるための変異は、そのFcRn結合に対して、より大きな悪影響を有さない可能性がある。しかしながら、半Ig分子は、通常抗体よりサイズが小さいので、組織透過においてある種の利点を有し得る。一実施形態において、少なくとも1つのアミノ酸残基は、重鎖の二量体化が破壊されて、半DVDIg分子をもたらすように、本明細書で提供される結合タンパク質の定常領域、例えば、Fc領域において置換されている。IgGの抗炎症活性は、IgG Fc断片のN結合グリカンのシアリル化に依存する。抗炎症活性での正確なグリカンの必要性が決定されており、その結果適当なIgG1 Fc断片が作製され得、それによって効力が大いに増強された完全な組み換えシアリル化IgG1 Fcが得られる(Anthony, R.M., et al. (2008) Science 320: 373-376)。

【0067】

本明細書において使用される抗体の「抗原結合部分」(または単に「抗体部分」という用語は、抗原に特異的に結合する能力を保持する、抗体の1つ以上の断片を表す。抗体の抗原結合機能は、完全長抗体の断片によって実行可能であることは示されている。このような抗体の実施形態は、二特異的、二重特異的または多重特異的フォーマットでもあり得、2つ以上の異なる抗原に特異的に結合する。抗体の「抗原結合部分」という用語に含まれる結合断片の例には、(i) Fab断片(VL、VH、CLおよびCH1ドメインからなる一価断片)、(ii) F(ab')₂断片(ヒンジ領域において、ジスルフィド

架橋によって連結された2つのFab断片を含む二価断片)、(iii) VHおよびCH1ドメインからなるFd断片、(iv)抗体の単一アームのVLおよびVHドメインからなるFv断片、(v)単一の可変ドメインを含むdAb断片(Ward et al. (1989) Nature 341:544-546、Winter et al., PCT公開WO90/05144A1(参照により本明細書に組み込まれる))および(vi)単離された相補性決定領域(CDR)が含まれる。さらに、Fv断片の2つのドメインであるVLおよびVHは別個の遺伝子によってコードされているが、これらは、VLおよびVH領域が対合して一価分子を形成している単一のタンパク質鎖として、これらの作製を可能とする合成リンカーによって、組み換え法を用いて連結することが可能である(一本鎖Fv(scFv)として知られている。例えば、Bird et al. (1988) Science 242:423-426;およびHouston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883を参照)。このような一本鎖抗体も、抗体の「抗原結合部分」という用語に包含されるものとする。ダイアボディなどの一本鎖抗体の他の形態も包含される。ダイアボディは、VHおよびVLドメインが一本鎖ポリペプチド鎖上に発現されているが、同一鎖上にある2つのドメイン間での対合を可能とするには短すぎるリンカーを使用することにより、両ドメインを別の鎖の相補的ドメインと対合するように強制し、2つの抗原結合部位を作出する二価の二特異的抗体である(例えば、Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448;Poljak, R. J., et al. (1994) Structure 2:1121-1123を参照)。このような抗体結合部分は、本分野において公知である(Kontermann and Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag, New York, 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5)。さらに、一本鎖抗体も、相補的軽鎖ポリペプチドと一緒に、抗原結合領域の対を形成する直列Fvセグメントの対を含む「直鎖抗体」(VH-CH1-VH-CH1)に含まれる(Zapata et al. Protein Eng. 8(10):1057-1062(1995);および米国特許第5,641,870号)。

【0068】

本明細書を通じて、「多価結合タンパク質」という用語は、2つ以上の抗原結合部位を含む結合タンパク質を表すために使用される。一実施形態において、多価結合タンパク質は、3つ以上の抗原結合部位を有するように工学的に作製され、一般に、天然に存在しない抗体である。「多重特異的結合タンパク質」という用語は、2つ以上の関連する標的または無関係な標的に結合することが可能な結合タンパク質を表す。本明細書で提供される二重可変ドメイン(DVD)結合タンパク質は、2つ以上の抗原結合部位を含み、四価または多価結合タンパク質である。DVDは、単一特異的であり得(すなわち、1つの抗原に結合することができる。)、または多重特異的(すなわち、2つ以上の抗原に結合することができる。)であり得る。2つの重鎖DVDポリペプチドおよび2つの軽鎖DVDポリペプチドを含むDVD結合タンパク質は、DVD-Igと表される。DVD-Igの各半分は、重鎖DVDポリペプチドおよび軽鎖DVDポリペプチドおよび2つの抗原結合部位を含む。各結合部位は、重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを含み、計6CDRが抗原結合部位当たりの抗原結合に参与する。

【0069】

本明細書に使用される「二特異的抗体」という用語は、クアドローマ技術(Milstein, C. and A. C. Cuelllo, Nature, 1983. 305(5934):p. 537-40参照)によって、2つの異なるモノクローナル抗体の化学的連結によって(Staerz, U. D., et al., Nature, 1985. 314(6012):p. 628-31参照)、またはノブ・イントゥ・ホールもしくはFc領域中に変異を導入する類似のアプローチによって(Holliger, P., T. Prospero, and G. Winter, Proc Natl Acad Sci USA

10

20

30

40

50

、1993.90(14):p.6444-8.18参照)作製され、そのうち1つのみが機能的な二特異的抗体である複数の異なる免疫グロブリン種をもたらす、完全長抗体を表す。分子機能によって、二特異的抗体は、その2つの結合アーム(HC/LCの1つの対)の1つの上に存在する1つの抗原(またはエピトープ)に結合し、その第二のアーム(HC/LCの異なる対)の上に存在する異なる抗原(またはエピトープ)に結合する。この定義によって、二特異的抗体は、(特異性およびCDR配列の両者において)2つの異なる抗原結合アームを有し、それが結合する各抗原に対して一価である。

【0070】

本明細書において使用される「二重特異的抗体」という用語は、その2つの結合アーム(HC/LCの対)の各々の中に存在する2つの異なる抗原(またはエピトープ)に結合することが可能な完全長抗体を表す(PCT公開WO02/02773参照)。したがって、二重特異的結合タンパク質は、同一の特異性と同一のCDR配列を有する2つの同一の抗原結合アームを有し、これが結合する各抗原に対して二価である。

10

【0071】

結合タンパク質の「機能的抗原結合部位」とは、標的抗原に結合することが可能な部位である。抗原結合部位の抗原結合親和性は、必ずしも、当該抗原結合部位が由来する親抗体と同程度に強力であるとは限らないが、抗原に結合する能力は、抗原への抗体結合を評価するための公知の様々な方法のいずれか1つを用いて測定可能でなければならない。さらに、本明細書において、多価抗体の抗原結合部位の各々の抗原結合親和性は、定量的に同一である必要はない。

20

【0072】

「サイトカイン」という用語は、1つの細胞集団によって放出され、細胞間媒介物質として別の細胞集団に対して作用するタンパク質に対する包括的用語である。このようなサイトカインの例は、リンホカイン、モノカインおよび伝統的なポリペプチドホルモンである。サイトカインに含まれるのは、ヒト成長ホルモン、Nメチオニルヒト成長ホルモンおよびウシ成長ホルモンなどの成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インシュリン；プロインシュリン；リラキシン；プロリラキシン；卵胞刺激ホルモン(FSH)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)および黄体形成ホルモン(LH)などの糖タンパク質ホルモン；肝細胞増殖因子；線維芽細胞増殖因子；プロラクチン；胎盤性ラクトゲン；腫瘍壊死因子- および - ；ミューラー管抑制物質；マウス性腺刺激ホルモン関連ペプチド；インヒビン；アクチビン；血管内皮細胞増殖因子；インテグリン；トロンボポエチン(TPO)；NGF- などの神経細胞増殖因子；血小板増殖因子；胎盤増殖因子、TGF- およびTGF- などのトランスフォーミング増殖因子(TGF)；インシュリン様増殖因子- 1および- 11；エリスロポエチン(EPO)；骨誘導因子；インターフェロン- 、 - および - などのインターフェロン；マクロファージ-CSF(M-CSF)などのコロニー刺激因子(CSF)；顆粒球マクロファージ-CSF(GM-CSF)；および顆粒球-CSF(G-CSF)；IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-21、IL-22、IL-23、IL-33などのインターロイキン(IL)；TNF- またはTNF- などの腫瘍壊死因子；ならびにLIFおよびキットリガンド(KL)を含む他のポリペプチド因子である。本明細書において使用される、サイトカインという用語には、天然源からまたは組み換え細胞培養から得られるタンパク質および固有配列のサイトカインの生物学的に活性な均等物が含まれる。

30

40

【0073】

「リンカー」という用語は、ペプチド結合によって連結された2つ以上のアミノ酸残基を含むポリペプチドを表し、1つ以上の抗原結合部分を連結するために使用される。このようなリンカーポリペプチドは、本分野において周知である(例えば、Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R.J., et al. (1994) Struc

50

ture 2 : 1 1 2 1 - 1 1 2 3 参照)。典型的なリンカーには、AKTTPKLEEGEFSEAR (配列番号1) ; AKTTPKLEEGEFSEARV (配列番号2) ; AKTTPKLG (配列番号3) ; SAKTTPKLG (配列番号4) ; SAKTTP (配列番号5) ; RADAAP (配列番号6) ; RADAAPT V S (配列番号7) ; RADA A A A G G P G S (配列番号8) ; RADA A A A (G₄ S)₄ (配列番号9) ; SAKTTPKLEEGEFSEARV (配列番号10) ; ADAAP (配列番号11) ; ADAAPT V S I F P P (配列番号12) ; TVAAP (配列番号13) ; TVAAP S V F I F P P (配列番号14) ; QPKAAP (配列番号15) ; QPKAAP S V T L F P P (配列番号16) ; AKTTPP (配列番号17) ; AKTTPP S V T P L A P (配列番号18) ; AKTTAP (配列番号19) ; AKTTAP S V Y P L A P (配列番号20) ; ASTKGP (配列番号21) ; ASTKGP S V F P L A P (配列番号22) ; GGGGSGGGGSGGGGS (配列番号23) ; GENKVEYAPALMALS (配列番号24) ; GPAKELTPLKEAKVS (配列番号25) ; およびGHEAAAVMQVQYPAS (配列番号26) が含まれるが、これらに限定されない。

【0074】

「免疫グロブリン定常ドメイン」は、重鎖または軽鎖定常ドメインを表す。ヒトIgG重鎖および軽鎖定常ドメインアミノ酸配列は、本分野において公知である。

【0075】

本明細書において使用される「モノクローナル抗体」または「mAb」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られた抗体を表す。すなわち、該集団を構成する各抗体は、僅かな量で存在する可能性がある天然に存在する変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一の抗原に対して誘導される。さらに、異なる決定基(エピトープ)に対して誘導された異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体調製物と異なり、各mAb抗体は、抗原上の単一の決定基に対して誘導される。「モノクローナル」という修飾語は、いずれかの特定の方法によって、抗体を産生することを要求するものと解釈すべきではない。

【0076】

本明細書において使用される「ヒト抗体」という用語は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する抗体を含むものとする。本明細書で提供されるヒト抗体は、例えば、CDR、特にCDE3中に、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基(例えば、インビトロでのランダムな突然変異導入もしくは部位特異的突然変異導入によって、またはインビボでの体細胞変異によって導入された変異)を含み得る。しかしながら、本明細書において使用される「ヒト抗体」という用語は、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖系列に由来するCDR配列がヒトフレームワーク配列上に移植された抗体を含まないものとする。

【0077】

本明細書において使用される「組み換えヒト抗体」という用語は、宿主細胞中に形質移入された組み換え発現ベクターを用いて発現された抗体(以下のII節Cでさらに記載されている)、組み換えコンビナトリアルヒト抗体ライブラリーから単離された抗体(Hoogenboom H. R., (1997) *TIB Tech.* 15: 62-70; Azzazy H., and Highsmith W. E., (2002) *Clin. Biochem.* 35: 425-445; Gavilondo J. V., and Larrick J. W. (2002) *BioTechniques* 29: 128-145; Hoogenboom H., and Chames P. (2000) *Immunology Today* 21: 371-378)、ヒト免疫グロブリン遺伝子に対して遺伝子導入されている動物(例えば、マウス)から単離された抗体(Taylor, L. D., et al. (1992) *Nucl. Acids Res.* 20: 6287-6295; Kellermann S. A., and Green L. L. (2002) *Current Opinion in Biotechnology* 13: 593-597

10

20

30

40

50

; Little M. et al (2000) Immunology Today 21 : 364 - 370 参照) またはヒト免疫グロブリン遺伝子配列の、他のDNA配列へのスプライシングを含む他のいずれかの手段によって調製され、発現され、作製され、もしくは単離された抗体など、組み換え手段によって調製され、発現され、作製され、もしくは単離されたすべてのヒト抗体を含むものとする。このような組み換えヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する。しかしながら、ある種の実施形態において、このような組み換えヒト抗体は、インビトロ突然変異導入(または、ヒトIg配列に対して遺伝子導入された動物が使用される場合には、インビボ細胞突然変異導入)に供され、したがって、組み換え抗体のVHおよびVL領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列VHおよびVL配列に由来し、これらの配列に関連しつつも、インビボで、ヒト抗体生殖系列レパートリー内には、天然に存在しない場合があり得る配列である。

10

【0078】

「親和性成熟された」抗体とは、変化を有しない親抗体と比べて、抗体の1つ以上のCDR中に、抗原に対する抗体の親和性の改善をもたらす1つ以上の変化を有する抗体である。典型的な親和性成熟された抗体は、標的抗原に対してnMの親和性を有し、またはpMの親和性さえ有する。親和性成熟された抗体は、本分野において公知の操作によって産生される。「Marks et al. Bidl Technology 10 : 779 - 783 (1992)」は、VHおよびVLドメインシャッフリングによる親和性成熟を記載している。CDRおよび/またはフレームワーク残基の無作為な突然変異導入は、Barbas et al. Proc Nat. Acad. Sci, USA 91 : 3809 - 3813 (1994); Schier et al. Gene 169 : 147 - 155 (1995); Yelton et al. J. Immunol. 155 : 1994 - 2004 (1995); Jackson et al., J. Immunol. 154 (7) : 3310 - 9 (1995); および Hawkins et al, J. Mol. Biol. 226 : 889 - 896 (1992) によって記載されており、活性増強アミノ酸残基による選択的突然変異導入位置、接触または過剰変異位置での選択的突然変異は、米国特許第6914128B1号に記載されている。

20

【0079】

「キメラ抗体」という用語は、ヒト定常領域に連結されたマウス重鎖および軽鎖可変領域を有する抗体など、ある種に由来する重鎖および軽鎖可変領域配列ならびに別の種に由来する定常領域配列を含む抗体を表す。

30

【0080】

「CDR移植された抗体」という用語は、マウスCDRの1つ以上(例えば、CDR3)がヒトCDR配列で置換されているマウス重鎖および軽鎖可変領域を有する抗体など、ある種に由来する重鎖および軽鎖可変領域配列を含むが、VHおよび/またはVLのCDR領域の1つ以上の配列が、別の種のCDR配列と置換されている抗体を表す。

【0081】

「ヒト化抗体」という用語は、ヒト以外の種(例えば、マウス)由来の重鎖および軽鎖可変領域配列を含むが、VHおよび/またはVL配列の少なくとも一部が、より「ヒト類似に」、すなわち、ヒト生殖系列可変配列により類似するように改変された抗体を表す。ヒト化抗体の1つの種類は、ヒトCDR配列がヒト以外のVHおよびVL配列中に導入されて、対応する非ヒトCDR配列が置換されているCDR移植された抗体である。「ヒト化抗体」も、目的の抗原に免疫特異的に結合し、ヒト抗体のアミノ酸配列を実質的に有するフレームワーク(FR)領域および非ヒト抗体のアミノ酸配列を実質的に有する相補的決定領域(CDR)を含む抗体またはそのバリエーション、誘導体、類似体もしくは断片である。CDRに関して、本明細書において使用される「実質的に」という用語は、非ヒト抗体CDRのアミノ酸配列に対して、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%同一のアミノ酸配列を有するCDRを表す。ヒト化抗体は、少なくとも1つの、典型的には2つの可変ドメイ

40

50

ン (Fab、Fab'、F(ab')₂、FabC、Fv) のすべてを実質的に含み、CDR領域のすべてまたは実質的にすべては非ヒト免疫グロブリン (すなわち、ドナー抗体) のものに対応し、フレームワーク領域のすべてまたは実質的にすべてが、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである。一実施形態において、ヒト化抗体は、免疫グロブリン、典型的にはヒト免疫グロブリンの定常領域 (Fc) の少なくとも一部を含む。いくつかの実施形態において、ヒト化抗体は、軽鎖と、重鎖の少なくとも可変ドメインの両方を含有する。この抗体は、重鎖のCH1、ヒンジ、CH2、CH3およびCH4領域も含み得る。いくつかの実施形態において、ヒト化抗体は、ヒト化軽鎖のみを含有する。いくつかの実施形態において、ヒト化抗体は、軽鎖のヒト化可変ドメインおよび/またはヒト化重鎖のみを含有する。

10

【0082】

「Kabata番号」、「Kabata定義」および「Kabata標識」という用語は、本明細書において、互換的に使用される。本分野において認められているこれらの用語は、抗体またはその抗原結合部分の重鎖および軽鎖可変領域中の他のアミノ酸残基に比べて、より可変的な (すなわち、超可変的な) アミノ酸残基に付番するシステムを表す (Kabata et al. (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190: 382-391 および Kabata, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication NO. 91-3242)。重鎖可変領域の場合、超可変領域は、CDR1に対するアミノ酸位置31から35、CDR2に対するアミノ酸位置50から65およびCDR3に対するアミノ酸位置95から102にわたる。軽鎖可変領域の場合、超可変領域は、CDR1に対するアミノ酸位置24から34、CDR2に対するアミノ酸位置50から56およびCDR3に対するアミノ酸位置89から97にわたる。

20

【0083】

本明細書で使用される「CDR」という用語は、抗体可変配列内の相補性決定領域を表す。重鎖および軽鎖の各可変領域中には3つのCDRが存在し、これらは、各可変領域に対して、CDR1、CDR2およびCDR3と表記される。本明細書において使用される「CDRセット」という用語は、抗原に結合することが可能な単一の可変領域中に存在する3つのCDRの群を表す。これらのCDRの正確な境界は、異なる系に従って、異なって定義されてきた。Kabataによって記載された系 (Kabata et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) and (1991)) は、抗体のいずれの可変領域に対しても適用可能な明瞭な残基付番系を提供するのみならず、3つのCDRを定義する正確な残基境界を提供する。これらのCDRは、KabataCDRと称され得る。Chothiaおよび共同研究者 (Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987) および Chothia et al., Nature 342: 877-883 (1989)) は、KabataCDR内のある種の垂部分が、アミノ酸配列のレベルで大きな多様性を有するにも関わらず、ほぼ同一のペプチド骨格立体構造を採ることを見出した。これらの垂部分は、L1、L2およびL3またはH1、H2およびH3 (「L」および「H」は、それぞれ、軽鎖および重鎖領域を表記する。) と表記される。これらの領域は、ChothiaCDRと称される場合があり、これは、KabataCDRと重複する境界を有する。KabataCDRと重複するCDRを定義する他の境界が、Padlan (FASEB J. 9: 133-139 (1995)) および MacCallum (J. Mol. Biol. 262 (5): 732-45 (1996)) によって記載されている。さらに別のCDR境界定義が、上記系の1つに厳格に従わない場合があり得るが、それにも関わらず、KabataCDRと重複するが、これらは、特定の残基ま

30

40

50

たは残基の群またはさらにはCDR全体が、抗原結合に著しい影響を与えないという予測または実験的な発見に照らして、短縮または延長され得る。本明細書に使用されている方法は、これらの系のいずれかに従って定義されたCDRを使用し得るが、ある種の実施形態は、KabataまたはChothiaによって定義されたCDRを使用する。

【0084】

本明細書で使用される「フレームワーク」または「フレームワーク配列」という用語は、CDRを差し引いた可変領域の残りの配列を表す。CDR配列の正確な定義は、異なる系によって決定され得るので、フレームワーク配列の意義は、これに対応して、異なる解釈に供せられる。6つのCDR（軽鎖のCDR-L1、-L2および-L3ならびに重鎖のCDR-H1、-H2および-H3）は、軽鎖および重鎖上のフレームワーク領域も、各鎖上の4つの亜領域（FR1、FR2、FR3およびFR4）に分割し、CDR1はFR1とFR2の間に位置し、CDR2はFR2とFR3の間に、CDR3はFR3とFR4の間に位置する。他者によって表記されるように、FR1、FR2、FR3またはFR4として特定の亜領域を特定せずに、フレームワーク領域は、天然に存在する単一の免疫グロブリン鎖の可変領域内の組み合わせられたFRを表す。本明細書において使用される、1つのFRは、4つの亜領域の1つを表し、複数のFRは、フレームワーク領域を構成する4つの亜領域の2つ以上を表す。

10

【0085】

本明細書において使用される「生殖系列抗体遺伝子」または「遺伝子断片」という用語は、特定の免疫グロブリンの発現のために遺伝的再編成および変異をもたらす成熟プロセスを経ていない非リンパ系細胞によってコードされる免疫グロブリン配列を表す。（例えば、Shapiro et al., Crit. Rev. Immunol. 22(3): 183-200 (2002); Marchalonis et al., Adv Exp Med Biol. 484: 13-30 (2001) 参照）。様々な実施形態によって提供される利点の1つは、生殖系列抗体遺伝子は、成熟した抗体遺伝子より、種内の個体に特徴的な必須のアミノ酸配列構造を保存する傾向がより大きく、このため、その種において治療的に使用された場合に、外来源に由来するものと認識される可能性がより低いという認識から生じる。

20

【0086】

本明細書において使用される「中和」という用語は、結合タンパク質が抗原に特異的に結合すると、抗原の生物学的活性を相殺することを表す。一実施形態において、中和結合タンパク質はサイトカインに結合し、少なくとも約20%、40%、60%、80%、85%またはそれ以上、その生物学的活性を低下させる。

30

【0087】

「活性」という用語は、2つ以上の抗原に対するDVD-Igの結合特異性および親和性などの活性を含む。

【0088】

「エピトープ」という用語には、免疫グロブリンまたはT細胞受容体に特異的に結合することができる、あらゆるポリペプチド決定基が含まれる。ある種の実施形態において、エピトープ決定基は、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリルまたはスルホリルなどの分子の化学的に活性な表面基を含み、ある種の実施形態において、特異的な三次元構造的特徴および/または特異的な電荷特徴を有し得る。エピトープとは、抗体によって結合される抗原の領域である。ある種の実施形態において、抗体が、タンパク質および/または高分子の複雑な混合物中で、その標的抗原を認識する場合に、抗体は抗原を特異的に結合すると言われている。抗体が交差競合する（一方が他方の結合または調節作用を妨げる）場合、抗体は「同じエピトープに結合する」と言われている。さらに、エピトープの構造上の定義（重複、類似、同一）は有益であるが、機能上の定義は、構造上（結合）および機能上（調節、競合）のパラメーターを包含するので、しばしばより重要である。

40

【0089】

本明細書において使用される「表面プラズモン共鳴」という用語は、例えば、BIAC

50

ore (登録商標) システム (BIAcore International AB (GE Healthcare の会社)、Uppsala、Sweden および Piscataway、NJ) を用いて、バイオセンサーマトリックス内のタンパク質濃度の変化を検出することによって、リアルタイムな生物特異的相互作用の分析を可能とする光学現象を表す。さらなる記載については、Jonsson, U., et al. (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51: 19 - 26; Jonsson, U., et al. (1991) *Biotechniques* 11: 620 - 627; Johnsson, B., et al. (1995) *J. Mol. Recognit.* 8: 125 - 131; および Johnsson, B., et al. (1991) *Anal. Biochem.* 198: 268 - 277 を参照されたい。

10

【0090】

本明細書において使用される「 K_{on} 」という用語は、例えば、本分野で知られている抗体 / 抗原複合体を形成する、結合タンパク質 (例えば、抗体) と抗原の結合についての結合速度 (on rate) 定数を表すものとする。「 K_{on} 」は、「結合速度 (association rate) 定数」または「 k_a 」という用語によっても知られ、これらは本明細書において互換的に使用される。抗体とその標的抗原の結合速度または抗体と抗原間での複合体形成の速度を示しているこの値は、以下の方程式によっても示される：
抗体 (「Ab」) + 抗原 (「Ag」) \rightleftharpoons Ab - Ag

【0091】

本明細書において使用される「 K_{off} 」という用語は、結合タンパク質 (例えば、抗体) の、例えば、本分野で知られている抗体 / 抗原複合体からの解離についての解離速度 (off rate) 定数または「解離速度 (dissociation rate) 定数」を表すものとする。この値は、抗体のその標的抗原からの解離速度または Ab - Ag 複合体の遊離抗体および抗原への経時的な分離を示し、以下の方程式によって示される：
Ab + Ag \rightleftharpoons Ab - Ag

20

【0092】

本明細書において使用される「 K_D 」という用語は、「平衡解離定数」を表すものとし、平衡状態での滴定測定においてまたは解離速度定数 (k_{off}) を結合速度定数 (k_{on}) で割ることによって得られた値を表す。結合速度定数、解離速度定数および平衡解離定数は、抗体と抗原の結合親和性を表すために使用される。結合および解離速度定数を決定する方法は本分野において周知である。蛍光を基礎とする技術の使用は、高い感度を提供し、平衡状態で生理的緩衝液中の試料を調べることができる。BIAcore (登録商標) (生体分子相互作用分析) アッセイなどの他の実験的アプローチおよび機器を使用することが可能である (例えば、BIAcore International AB, GE Healthcare 社, Uppsala, Sweden から入手可能な機器)。さらに、Sapidyne Instruments (Boise, Idaho) から入手可能な KinExA (登録商標) (動態排除アッセイ) アッセイも使用することが可能である。

30

【0093】

「標識」および「検出可能な標識」は、例えば、抗体および分析物などの特異的結合対のメンバー間での反応を検出可能にするために、抗体または分析物などの特異的結合パートナーに結合した部分を意味し、そのように標識された特異的結合パートナー、例えば抗体および分析物は「検出可能に標識された」と呼ばれる。したがって、本明細書において使用される「標識された結合タンパク質」という用語は、結合タンパク質の同定を与える標識が取り込まれたタンパク質を表す。一実施形態において、標識は、視覚または計測手段によって検出可能な信号を生成することができる、検出可能なマーカであり、例えば、放射性標識されたアミノ酸の取り込み、または印を付けたアビジン (例えば、光学的方法または比色分析法によって検出することができる、蛍光マーカまたは酵素活性を含有するストレプトアビジン) によって検出することができるビオチン部分のポリペプチドへの付着である。ポリペプチド用の標識の例には、以下の放射性同位体または放射性核種 (

40

50

例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho または ^{153}Sm)；色原体、蛍光標識(例えば、FITC、ローダミン、ランタニドリン光体)；酵素的標識(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ)；化学発光マーカー；ビオチニル基、二次レポーターによって認識される所定のポリペプチドエピトープ(例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体に対する結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ)；およびガドリニウムキレートなどの磁気作用物質が含まれるが、これらに限定されない。イムノアッセイに一般に使用される標識の代表例には、光を生じる部分、例えばアクリジニウム化合物および蛍光を生じる部分、例えばフルオレセインが含まれる。他の標識は本明細書に記載されている。この関連で、部分自体が検出可能に標識され得るが、さらに別の部分との反応後に検出可能にされ得る。「検出可能に標識された」の使用は、後者のタイプの検出可能な標識化を包含するものとする。

10

【0094】

「連結体」という用語は、第二の化学部分(治療剤または細胞毒性剤など)に化学的に連結された抗体などの結合タンパク質を表す。本明細書において、「作用物質」という用語は、化学的化合物、化学的化合物の混合物、生物学的高分子または生物由来物質から作製された抽出物を表記するために使用される。一実施形態において、治療剤または細胞毒性剤には、百日咳毒素、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ピンクリスチン、ピンプラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロールおよびピューロマイシンならびにこれらの類似体または相同体が含まれるが、これらに限定されるものではない。イムノアッセイとの関連において使用される場合、連結抗体は、検出抗体として使用される検出可能に標識された抗体であってよい。

20

【0095】

本明細書において使用される「結晶」および「結晶化された」という用語は、結晶の形態で存在する結合タンパク質(例えば、抗体)またはその抗原結合部分を表す。結晶は、物質の固体状態の一形態であり、これは、非晶質の固体状態または液体の結晶状態などの他の形態とは異なる。結晶は、原子、イオン、分子(例えば、抗体などのタンパク質)または分子集合体(例えば、抗原/抗体複合体)の規則的な反復する三次元配列から構成される。これらの三次元配列は、本分野においてよく理解されている特異的な数学的關係に従って整列されている。結晶中で反復されている基礎的単位または構築ブロックは、非対称単位と呼ばれる。所定の十分に整えられた結晶的対称性に合致する配置での非対称単位の反復は、結晶の「単位格子」を与える。すべての三次元中での規則的な転換による単位格子の反復は、結晶を与える。Giege, R. and Ducruix, A. Barret, CRYSTALLIZATION OF NUCLEIC ACIDS AND PROTEINS, A PRACTICAL APPROACH, 2nd ea., p. 201-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999)を参照されたい。

30

40

【0096】

「ポリヌクレオチド」という用語は、2つ以上のヌクレオチド(リボヌクレオチドもしくはデオキシヌクレオチドのいずれかまたはヌクレオチドのいずれかのタイプの修飾された形態)のポリマー形態を意味する。本用語は、DNAの一本鎖および二本鎖形態を含む。

【0097】

「単離されたポリペプチド」という用語は、(例えば、ゲノム、cDNAもしくは合成起源またはこれらのいくつかの組合せの)ポリヌクレオチドを意味するものとし、その起源のために、「単離されたポリヌクレオチド」は、「単離されたポリヌクレオチド」が本来その中でともに見出されるポリヌクレオチドの全部または一部と会合していない、本来

50

連結されていないポリヌクレオチドに作用可能に連結されている、またはより大きな配列の一部として本来存在しない、ことを意味する。

【0098】

「ベクター」という用語は、核酸分子に連結されている別の核酸を輸送することができる該核酸分子を表すものとする。ベクターの1つの種類は「プラスミド」であり、これは、その中にさらなるDNAセグメントを連結し得る環状二本鎖DNAループを表す。ベクターの別の種類はウイルスベクターであり、ここで、追加のDNAセグメントはウイルスゲノム中に連結され得る。ある種のベクターは、当該ベクターがその中に導入された宿主細胞中で自律的複製を行うことができる（例えば、細菌の複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソーム哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター）は、宿主細胞中へ導入されて、宿主細胞のゲノム中に組み込まれることが可能であり、これにより、宿主ゲノムとともに複製される。さらに、ある種のベクターは、それらが作用可能に連結されている遺伝子の発現を誘導することが可能である。このようなベクターは、本明細書において、「組み換え発現ベクター」（または単に、「発現ベクター」と称される。一般に、組み換えDNA技術において有用な発現ベクターは、しばしば、プラスミドの形態である。プラスミドは、最も一般的に使用されるベクターの形態であるので、本明細書において、「プラスミド」および「ベクター」は互換的に使用され得る。しかしながら、均等な機能を果たす、ウイルスベクターなどの（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス）発現ベクターの他の形態も含む。

10

20

【0099】

「作用可能に連結された」という用語は、記載された成分をそれらを所期の様式で機能させることができる関係にある併置状態を表す。コード配列に対して「作用可能に連結された」制御配列は、制御配列と適合的な条件下で、コード配列の発現が達成されるように連結されている。「作用可能に連結された」配列は、目的の遺伝子と連続する発現調節配列および目的の遺伝子を調節するように、トランスにてまたは離れて作用する発現調節配列の両方を含む。本明細書において使用される「発現調節配列」という用語は、連結されているコード配列の発現およびプロセッシングに影響を与えるために必要であるポリヌクレオチド配列を表す。発現調節配列には、適切な転写開始、終結、プロモーターおよびエンハンサー配列；スプライシングおよびポリアデニル化シグナルなどの効率的なRNAプロセッシングシグナル；細胞質mRNAを安定化させる配列；翻訳効率を増強する配列（すなわち、Kozakコンセンサス配列）；タンパク質の安定性を増強する配列；および所望であれば、タンパク質分泌を増強させる配列が含まれる。このような調節配列の性質は、宿主生物に応じて異なる。原核生物では、このような調節配列は、一般に、プロモーター、リボソーム結合部位および転写終結配列を含む。真核生物では、一般的な調節配列には、プロモーターおよび転写終結配列が含まれ得る。「調節配列」という用語は、その存在が発現およびプロセッシングに不可欠である成分を含むものとし、その存在が有利である追加の成分、例えば、リーダー配列および融合対配列も含むことができる。

30

40

【0100】

「形質転換」とは、外来DNAが宿主細胞に入るすべてのプロセスを表す。形質転換は、本分野で周知の様々な方法を用いて、自然の条件または人工の条件下で起こり得る。形質転換は、原核または真核宿主細胞中へ外来核酸配列を挿入するためのいずれかの公知の方法に依拠し得る。本方法は、形質転換されている宿主細胞に基づいて選択され、ウイルス感染、電気穿孔、リポフェクションおよび粒子照射を含み得るが、これらに限定されない。このような「形質転換された」細胞には、挿入されたDNAが、自律的に複製するプラスミドとして、または宿主染色体の一部として、その中で複製することできる安定に形質転換された細胞が含まれる。これらには、挿入されたDNAまたはRNAを、限られた時間にわたって一過性に発現する細胞も含まれる。

【0101】

50

「組み換え宿主細胞」（または単に、「宿主細胞」という用語は、外来DNAがその中に導入されている細胞を表すものとする。一実施形態において、宿主細胞は、例えば米国特許第7,262,028号に記載されている宿主細胞のように、2つ以上の（例えば、複数の）、抗体をコードする核酸を含む。このような用語は、当該細胞を表すのみならず、このような細胞の子孫も表すことを理解すべきである。突然変異または環境的な影響のために、後続の世代中にある種の修飾が生じ得るので、このような子孫は、実際には親細胞と同一でないことがあり得るが、本明細書において使用される「宿主細胞」という用語の範囲になお含まれる。一実施形態において、宿主細胞には、生物のいずれかの界から選択される原核および真核細胞が含まれる。別の実施形態において、真核細胞には、原生生物、真菌、植物および動物細胞が含まれる。別の実施形態において、宿主細胞には、原核細胞株E.コリ；哺乳動物細胞株CHO、HEK293、COS、NS0、SP2およびPER.C6；昆虫細胞株Sf9および真菌細胞サッカロミセス・セレピシアエが含まれるが、これらに限定されるものではない。

10

20

30

40

50

【0102】

組み換えDNA、オリゴヌクレオチド合成および組織培養および形質転換（例えば、電気穿孔、リポフェクション）に対しては標準的な技術が使用され得る。酵素反応および精製技術は、製造業者の説明書に従って、または本分野で一般的に遂行されているように、または本明細書に記載されているように、実施され得る。一般に、先述の技術および手順は、本分野で周知の慣用的な方法に従い、ならびに本明細書を通じて引用および論述されている様々な一般的参考文献およびより具体的な参考文献中に記載されているように、実施し得る。例えば、Sambrook et al. MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989))（いずれかの目的で参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

【0103】

本分野において公知である「トランスジェニック生物」とは、導入遺伝子を含有する細胞を有する生物を表し、生物中に導入された導入遺伝子（または生物の子孫）は、生物中に自然に発現されていないポリペプチドを発現する。「導入遺伝子」とは、細胞のゲノム中に安定におよび作用可能に組み込まれているDNA構築物であり、この細胞からトランスジェニック生物が発達し、トランスジェニック生物の1つ以上の細胞種または組織中で、コードされた遺伝子産物の発現を誘導する。

【0104】

「制御する」または「調節する」という用語は互換的に使用され、本明細書において使用される場合、目的の分子の活性（例えば、サイトカインの生物学的活性）の変化または変更を表す。調節は、目的の分子の一定の活性または機能の規模の増加または減少であり得る。分子の典型的な活性および機能には、結合特性、酵素活性、細胞受容体活性化およびシグナル伝達が含まれるが、これらに限定されない。

【0105】

これに対応して、「調節物質」という用語は、目的の分子の活性または機能（例えば、サイトカインの生物学的活性）を変化または変更させることが可能な化合物である。例えば、調節物質は、調節物質の不存在下で観察される活性または機能の規模と比べて、分子のある種の活性または機能の規模の増加または減少を引き起こし得る。ある種の実施形態において、調節物質は、分子の少なくとも1つの活性または機能の規模を減少させる阻害剤である。典型的な阻害剤には、タンパク質、ペプチド、抗体、ペプチパディ、炭水化物または小有機分子が含まれるが、これらに限定されるものではない。ペプチパディは、例えば、WO01/83525に記載されている。

【0106】

「アゴニスト」という用語は、目的分子と接触したときに、アゴニストの不存在下で観察される活性または機能の規模と比べて、分子のある種の活性または機能の規模の増加を

引き起こす調節物質を表す。興味深い特定のアゴニストには、ポリペプチド、核酸、炭水化物または抗原に結合する他のすべての分子が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0107】

「アンタゴニスト」または「阻害剤」という用語は、目的分子と接触したときに、アンタゴニストの不存在下で観察される活性または機能の規模と比べて、分子のある種の活性または機能の規模の減少を引き起こす調節物質を表す。興味深い具体的なアンタゴニストには、抗原の生物学的または免疫学的活性を遮断または調節するアンタゴニストが含まれる。抗原のアンタゴニストおよび阻害剤には、タンパク質、核酸、炭水化物または抗原に結合する他のすべての分子が含まれ得るが、これらに限定されるものではない。

10

【0108】

本明細書において使用される「有効量」という用語は、疾患もしくはその1つ以上の症候の重度および/または持続時間を低下もしくは軽減し、疾患の進行を抑制し、疾患の退行を引き起こし、疾患に伴う1つ以上の症候の再発、発達、発症もしくは進行を予防し、疾患を検出し、または別の療法（例えば、予防的または治療的剤）の予防的または治療的効果を増強もしくは改善するのに十分である療法の量を表す。

【0109】

「患者」および「対象」は、霊長類（例えば、ヒト、サルおよびチンパンジー）、非霊長類（例えば、ウシ、ブタ、ラクダ、ラマ、ウマ、ヤギ、ウサギ、ヒツジ、ハムスター、モルモット、ネコ、イヌ、ラット、マウス、クジラ）を含む哺乳動物、鳥（例えば、アヒルまたはガチョウ）およびサメなどの動物を表すために本明細書において互換的に使用され得る。好ましくは、患者または対象は、疾患、障害もしくは状態について治療もしくは評価されているヒト、疾患、障害もしくは状態のリスクがあるヒト、疾患、障害もしくは状態を有するヒトおよび/または疾患、障害もしくは状態について治療されているヒトなどのヒトである。

20

【0110】

本明細書で使用される「試料」という用語は、最も広義で使用される。本明細書において使用される「生物学的試料」は、生物または生物であったものから得られた物質のいずれかの量を含むが、これらに限定されない。このような生物には、ヒト、マウス、ラット、サル、イヌ、ウサギおよびその他の動物が含まれるが、これらに限定されない。このよ

30

【0111】

「成分（component）」、「複数の成分（components）」および「少なくとも1つの成分」は、本明細書に記載されている方法または本分野において知られている他の方法による、患者の尿、血清または血漿試料などの試験試料のアッセイ用のキット中に含めることが可能である捕捉抗体、検出または連結抗体、対照、較正物質、一連の較正物質、感受性パネル、容器、緩衝液、希釈液、塩、酵素、酵素の補因子、検出試薬、前処理試薬/溶液、基質（例えば、溶液として）、停止溶液などを一般に表す。したがって、本開示との関連で、「少なくとも1つの成分」、「成分（component）」および「複数の成分（components）」は、抗分析物（例えば、抗ポリペプチド）抗体との結合などにより固体支持体上の場合によって固定化されたポリペプチドなどの分析物を含む組成物などの上記のポリペプチドまたは他の分析物を含み得る。いくつかの成分は、溶液中に存在するまたはアッセイで使用するための再構成用に凍結乾燥させることが可能である。

40

【0112】

「対照」は、分析物でない（「陰性対照」）または分析物を含む（「陽性対照」）ことが知られている組成物を表す。陽性対照は、既知の濃度の分析物を含み得る。「対照」、「陽性対照」および「較正物質」は、既知の濃度の分析物を含む組成物を表すために本明

50

細書において互換的に使用され得る。「陽性対照」は、アッセイ性能特性を確立するために使用することが可能であり、試薬（例えば、分析物）の完全性の有用な指標である。

【0113】

「所定のカットオフ」および「所定のレベル」は、所定のカットオフ/レベルに対してアッセイの結果を比較することにより診断/予後診断/治療的効力の結果を評価するために使用されるアッセイのカットオフ値を一般に表し、所定のカットオフ/レベルは様々な臨床的パラメーター（例えば、疾患の重症度、進行/非進行/改善など）にすでにつながっておりまたは関連している。本開示は例示的な所定のレベルを提供し得るが、カットオフ値はイムノアッセイの性質（例えば、使用される抗体など）に応じて様々となり得ることが周知である。さらに、本明細書における開示を他のイムノアッセイに適合させて、本開示を基礎とする他のイムノアッセイについてのイムノアッセイ特異的なカットオフ値を得ることは、当業者の通常の技術の範囲内に十分にある。所定のカットオフ/レベルの正確な値はアッセイ間で様々となり得るが、（もしあれば）本明細書に記載されている相関は一般に適用可能であるはずである。

10

【0114】

本明細書に記載されている診断アッセイにおいて使用される「前処理試薬」、例えば、溶解、沈殿および/または可溶化試薬は、あらゆる細胞を溶解するものおよび/または試験試料中に存在するあらゆる分析物を可溶化するものである。前処理は、本明細書でさらに記載されるように、すべての試料に必要というわけでない。とりわけ、分析物（例えば、目的のポリペプチド）の可溶化は、試料中に存在するあらゆる内在性結合タンパク質からの分析物の放出を伴い得る。前処理試薬は均一（分離工程を必要としない）または不均一（分離工程を必要とする）であり得る。不均一前処理試薬を使用すると、アッセイの次の工程に進行する前に任意の沈殿した分析物結合タンパク質は試験試料から除去される。

20

【0115】

本明細書に記載されているイムノアッセイおよびキットとの関連で「品質管理試薬」には、較正物質、対照および感受性パネルが含まれるが、これらに限定されない。「較正物質」または「標準物質」は、抗体または分析物などの分析物の濃度を内挿するための較正（標準）曲線を確立するために典型的に（例えば複数など、1つ以上）使用される。あるいは、所定の陽性/陰性カットオフ近くにある単一の較正物質を使用することが可能である。「感受性パネル」を含むように、複数の較正物質（すなわち、2つ以上の較正物質または様々な量の（複数の）較正物質）を組み合わせ使用することが可能である。

30

【0116】

「リスク」は、現在または将来のある時点で特定の事象が起こる可能性または確率を表す。「リスク層別」は、医師が、特定の疾患、障害または状態を発症する低度、中程度、高度または最も高度のリスクに患者を分類することを可能にする一連の既知の臨床的リスク因子を表す。

【0117】

特異的結合対（例えば、抗原（またはその断片）および抗体（またはその抗原反応性断片））のメンバー間の相互作用との関連で「特異的な」および「特異性」は、相互作用の選択的な反応性を表す。「に特異的に結合する」という語句および類縁の語句は、分析物（またはその断片）に特異的に結合し、他の実体に特異的に結合しない抗体（またはその抗原反応性断片）の能力を表す。

40

【0118】

「特異的結合パートナー」は、特異的結合対のメンバーである。特異的結合対は、化学的または物理的な手段を介して互いに特異的に結合する2つの異なる分子を含む。したがって、一般的なイムノアッセイの抗原および抗体の特異的結合対に加えて、他の特異的結合対は、ピオチンおよびアビジン（またはストレプトアビジン）、炭水化物およびレクチン、相補的なヌクレオチド配列、エフェクターおよび受容体分子、補因子および酵素、酵素阻害剤および酵素などを含み得る。さらに、特異的結合対は、元の特異的結合メンバーの類似体、例えば、分析物類似体であるメンバーを含み得る。免疫反応性特異的結合メン

50

パーには、単離または組み換えで産生された抗原、抗原断片およびモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を含む抗体ならびにその複合体、断片およびバリエーションの断片を含む)が含まれる。

【0119】

本明細書において使用される「バリエーション」は、アミノ酸の付加(例えば、挿入)、欠失または同類置換によってアミノ酸配列が所与のポリペプチド(例えば、IL-18、BNP、NGALもしくはHIVポリペプチドまたは抗ポリペプチド抗体)と異なるが、所与のポリペプチドの生物活性を保持するポリペプチドを意味する(例えば、バリエーションIL-18はIL-18との結合について抗IL-18抗体と競合することができる)。アミノ酸の同類置換、すなわち特性が類似する(例えば、親水性ならびに荷電領域の程度および分布)異なるアミノ酸とのアミノ酸の置き換えは、微小変化が典型的に關与すると本分野で認識されている。これらの微小変化は、本分野で理解されているように、アミノ酸のヒドロパシーインデックスを考慮することにより部分的に特定することが可能である(例えば、Kyte et al., J. Mol. Biol. 157: 105-132 (1982)参照)。アミノ酸のヒドロパシーインデックスは、この疎水性および荷電の考慮を基礎とする。ヒドロパシーインデックスの類似したアミノ酸を置換することが可能であり、これらのアミノ酸はタンパク質の機能を依然として保持することが本分野において知られている。一態様において、±2のヒドロパシーインデックスを有するアミノ酸が置換される。アミノ酸の親水性は、生物学的機能を保持するタンパク質となる置換を明らかにするために使用することも可能である。ペプチドとの関連でアミノ酸の親水性を考慮すると、抗原性および免疫原性とよく相関することが報告されている有用な尺度である、そのペプチドの最大の局所平均親水性の計算が可能となる(例えば、参照により本明細書に組み込む米国特許第4,554,101号参照)。本分野で理解されているように、類似した親水性値を有するアミノ酸の置換は、生物活性、例えば免疫原性を保持するペプチドをもたらす得る。一態様において、互いに±2以内の親水性値を有するアミノ酸を用いて置換が行われる。アミノ酸のヒドロパシーインデックスと疎水性値はどちらもそのアミノ酸の特定の側鎖によって影響を受ける。この観察に一致して、生物学的機能と適合するアミノ酸置換は、アミノ酸、特に、疎水性、親水性、荷電、サイズおよび他の特性によって明らかにされるこれらのアミノ酸の側鎖の相対的類似性に依存することが理解されている。「バリエーション」は、タンパク質分解、リン酸化または他の翻訳後修飾などによって異なる形でプロセッシングされているが、その生物活性または抗原反応性、例えばIL-18に結合する能力を保持するポリペプチドまたはその断片を示すために使用することも可能である。本明細書における「バリエーション」の使用は、別段文脈上矛盾しない限り、バリエーションの断片を包含するものとする。

【0120】

I. DVD結合タンパク質の作製

1つ以上の標的に結合することが可能な二重可変ドメイン結合タンパク質およびこれを作製する方法。一実施形態において、結合タンパク質はポリペプチド鎖を含み、前記ポリペプチド鎖はVD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n(VD1は第一の可変ドメインであり、VD2は第二の可変ドメインであり、Cは定常ドメインであり、X1はアミノ酸またはポリペプチドを表し、X2はFc領域を表し、nは0または1である。)を含む。結合タンパク質は、様々な技術を用いて作製することが可能である。発現ベクター、宿主細胞および結合タンパク質を作製する方法が提供される。

【0121】

A: 親モノクローナル抗体の作製

DVD結合タンパク質の可変ドメインは、目的の抗原に結合することができるポリクローナルおよびmAbなど、親抗体から取得することが可能である。これらの抗体は、天然に存在し得、または組み換え技術によって作製され得る。

【0122】

mAbは、ハイブリドーマ、組み換えおよびファージディスプレイ技術またはこれら

の組合せの使用など、本分野で公知の多様な技術を用いて調製することが可能である。例えば、mAbは、本分野において公知であり、例えば、Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling, et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981) (前記参考文献はその全体が参照により組み込まれる)に教示されているものなど、ハイブリドーマ技術を用いて作製することが可能である。本明細書において使用される「モノクローナル抗体」という用語は、ハイブリドーマ技術を通じて産生された抗体に限定されない。「モノクローナル抗体」という用語は、あらゆる真核、原核またはファージクローンなど、単一のクローンに由来する抗体を表し、それが産生される方法によらない。ハイブリドーマは、実施例1において、以下に記載されているように、選択され、クローニングされ、頑強なハイブリドーマ増殖、高い抗体産生および所望の抗体特性など、所望の特性についてさらにスクリーニングされる。ハイブリドーマは、培養され、同系の動物中で、免疫系を欠く動物(例えば、ヌードマウス)中で、インビボで、または細胞培養中で、インビトロで増殖され得る。ハイブリドーマを選択し、クローニングし、増殖させる方法は、当業者に周知である。特定の実施形態において、ハイブリドーマはマウスハイブリドーマである。別の実施形態において、ハイブリドーマは、ラット、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウシまたはウマなど、非ヒト非マウス種の中で産生される。別の実施形態において、ハイブリドーマは、ヒト非分泌性骨髄腫が、特異的抗原に結合することが可能な抗体を発現するヒト細胞と融合されているヒトハイブリドーマである。

10

20

30

40

50

【0123】

また、組み換えmAbは、米国特許第5,627,052号、PCT公開WO92/02551およびBabcock, J.S. et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7843-7848に記載されているように、選択リンパ球抗体法(SLAM; selected lymphocyte antibody method)として本分野で呼ばれている手法を用いて、単一の単離されたリンパ球から作製される。この方法では、目的の抗体を分泌する単一細胞、例えば、免疫された動物に由来するリンパ球が同定され、重鎖および軽鎖可変領域cDNAが、逆転写酵素-PCRによって細胞から救出され、これらの可変領域は、次いで、COSまたはCHO細胞などの哺乳動物宿主細胞中で、適切な免疫グロブリン定常領域(例えば、ヒト定常領域)に関連して発現することが可能である。増幅された免疫グロブリン配列で形質移入され、インビボで選択されたリンパ球に由来する宿主細胞は、次いで、例えば、目的の抗原に対する抗体を発現する細胞を単離するために、形質移入された細胞をパニングすることによって、インビトロで、さらに分析および選択を行うことが可能である。増幅された免疫グロブリン配列は、さらに、PCT公開WO97/29131およびPCT公開WO00/56772に記載されているものなど、インビトロでのアフィニティー成熟方法によるなど、インビトロで操作することが可能である。

【0124】

モノクローナル抗体は、目的の抗原を有するヒト免疫グロブリン遺伝子座のいくつかまたはすべてを含む非ヒト動物を免疫することによっても産生される。一実施形態において、非ヒト動物は、XENOMOUSEトランスジェニックマウス(ヒト免疫グロブリン遺伝子座の巨大断片を含み、マウス抗体産生を欠失している改変されたマウス系統)である。例えば、Green et al. *Nature Genetics* 7:13-21 (1994)ならびに米国特許第5,916,771号、第5,939,598号、第5,985,615号、第5,998,209号、第6,075,181号、第6,091,001号、第6,114,598号および第6,130,364号を参照されたい。1991年7月25日に公開されたWO91/10741、1994年2月3日に公開されたWO94/02602、ともに1996年10月31日に公開されたWO96/34096およびWO96/33735、1998年4月23日に公開されたWO98/166

54、1998年6月11日に公開されたWO98/24893、1998年11月12日に公開されたWO98/50433、1999年9月10日に公開されたWO99/45031、1999年10月21日に公開されたWO99/53049、2000年2月24日に公開されたWO 00 09560および2000年6月29日に公開されたWO00/037504も参照されたい。XENOMOUSEトランスジェニックマウスは、完全なヒト抗体の成人様ヒトレパートリーを産生し、抗原特異的ヒトモノクローナル抗体を生成する。XENOMOUSEトランスジェニックマウスは、ヒト重鎖遺伝子座およびx軽鎖遺伝子座のメガ塩基サイズの生殖系列配置YAC断片の導入を通じて、ヒト抗体レパートリーの約80%を含有する。Mendez et al., Nature Genetics 15:146-156(1997)、Green and Jakobovits J. Exp. Med. 188:483-495(1998)(その開示内容は参照により本明細書に組み込まれる)を参照されたい。

10

【0125】

親抗体を作製するために、インビトロ法も使用することが可能であり、抗体ライブラリーは、所望の結合特異性を有する抗体を同定するためにスクリーニングされる。組み換え抗体ライブラリーのこのようなスクリーニングの方法は、本分野において周知であり、例えば、Ladner et al. 米国特許第5,223,409号; Kang et al. PCT公開WO92/18619; Dower et al. PCT公開WO91/17271; Winter et al. PCT公開WO92/20791; Markland et al. PCT公開WO92/15679; Breitling et al. PCT公開WO93/01288; McCafferty et al. PCT公開WO92/01047; Garrard et al. PCT公開WO92/09690; Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9:1370-1372; Hay et al. (1992) Hum Antibod Hybridomas 3:81-85; Huse et al. (1989) Science 246:1275-1281; McCafferty et al., Nature (1990) 348:552-554; Griffiths et al. (1993) EMB O J 12:725-734; Hawkins et al. (1992) J Mol Biol 226:889-896; Clackson et al. (1991) Nature 352:624-628; Gram et al. (1992) PNAS 89:3576-3580; Garrard et al. (1991) Bio/Technology 9:1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) Nuc Acid Res 19:4133-4137; および Barbás et al (1991) PNAS 88:7978-7982、米国特許出願公開第20030186374号およびPCT公開WO97/29131に記載されている方法が含まれ、それぞれの内容は参照により本明細書に組み込まれる。

20

30

【0126】

親抗体は、本分野で公知の様々なファージディスプレイ法を用いて作製することも可能である。ファージディスプレイ法では、機能的抗体ドメインは、これらをコードしているポリヌクレオチド配列を担持するファージ粒子の表面上にディスプレイされる。特に、このようなファージは、レパートリーまたはコンビナトリアル抗体ライブラリー(例えば、ヒトまたはマウス)から発現される抗原結合ドメインをディスプレイするために使用することが可能である。目的の抗原に結合する抗原結合ドメインを発現するファージは、抗原を用いて、例えば、標識された抗原または固体表面もしくはビーズに結合もしくは捕捉された抗原を用いて、選択または同定することが可能である。これらの方法で使用されるファージは、典型的には、ファージ遺伝子IIIまたは遺伝子VIIITANパク質のいずれかに組み換え的に融合されたFab、Fvまたはジスルフィドで安定化されたFv抗体ドメインとともにファージから発現されたfdおよびM13結合ドメインを含む系状ファージである。本明細書で提供される抗体を作製するために使用することが可能なファージディスプレイ法の例には、Brinkman et al., J. Immunol. Met

40

50

hods 182:41-50 (1995); Ames et al., J. Immunol. Methods 184:177-186 (1995); Kettleborough et al., Eur. J. Immunol. 24:952-958 (1994); Persic et al., Gene 187:9-18 (1997); Burton et al., Advances in Immunology 57:191-280 (1994); PCT出願PCT/GB91/01134; PCT公開WO90/02809; WO91/10737; WO92/01047; WO92/18619; WO93/11236; WO95/15982; WO95/20401; ならびに米国特許第5,698,426号;第5,223,409号;第5,403,484号;第5,580,717号;第5,427,908号;第5,750,753号;第5,821,047号;第5,571,698号;第5,427,908号;第5,516,637号;第5,780,225号;第5,658,727号;第5,733,743号および第5,969,108号に開示されているものが含まれ、それぞれその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0127】

本明細書において参考文献に記載されているように、ファージ選択後、ヒト抗体または他の所望されるすべての抗原結合断片を含む完全な抗体を作製するために、ファージから得た抗体コード領域を単離および使用し、例えば、以下に詳述されているように、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母および細菌など、あらゆる所望の宿主中で発現させることが可能である。例えば、PCT公開WO92/22324; Mullinax et al., BioTechniques 12(6):864-869 (1992); および Sawai et al., AJRI 34:26-34 (1995); および Better et al., Science 240:1041-1043 (1988) (前記参考文献はその全体が参照により組み込まれる)に開示されている方法などの本分野で公知の方法を用いて、Fab、Fab'およびF(ab')₂断片を組み換え的に産生するための技術も使用することが可能である。一本鎖Fvおよび抗体を作製するために使用することが可能な技術の例には、米国特許第4,946,778号および第5,258,498号; Huston et al., Methods in Enzymology 203:46-88 (1991); Shu et al., PNAS 90:7995-7999 (1993); ならびに Skerra et al., Science 240:1038-1040 (1988)に記載されているものが含まれる。

【0128】

ファージディスプレイによる組み換え抗体ライブラリーのスクリーニングに代えて、巨大なコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングするための本分野で公知の他の方法を、親抗体の同定のために適用することが可能である。代替的発現系の1つの種類は、SzostakおよびRobertsによるPCT公開WO98/31700ならびにRoberts, R.W. and Szostak, J.W. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 12297-12302に記載されているような、組み換え抗体ライブラリーがRNA-タンパク質融合物として発現されるものである。この系において、ピューロマイシン、ペプチジルアクセプター抗生物質をそれらの3'末端に担持する合成mRNAのインビトロ翻訳によって、mRNAおよびこれがコードするペプチドまたはタンパク質の間に共有結合的融合物が作製される。したがって、特異的なmRNAは、コードされているペプチドまたはタンパク質、例えば抗体またはその一部の特異性(抗体またはその一部、二重特異性抗原への結合など)に基づいて、mRNAの複雑な混合物(例えば、コンビナトリアルライブラリー)から濃縮することが可能である。このようなライブラリーのスクリーニングから回収された、抗体またはその一部をコードする核酸配列は、本明細書に記載されているような組み換え手段によって(例えば、哺乳動物宿主細胞中で)発現されることが可能であり、さらに、最初に選択された配列中に変異が導入されているmRNA-ペプチド融合物のスクリーニングのさらなるラウンドによって、または本明細書に記載されているように、組み換え抗体のインビトロでの親和性成

熟のためのその他の方法によって、さらなる親和性成熟に供することが可能である。

【0129】

別のアプローチにおいて、親抗体は、本分野で公知の酵母ディスプレイ法を用いて作製することも可能である。酵母ディスプレイ法では、抗体ドメインを酵母細胞壁に繫留し、これらを酵母の表面上にディスプレイするために、遺伝学的方法が使用される。特に、このような酵母は、レポトリまたはコンビナトリアル抗体ライブラリー（例えば、ヒトまたはマウス）から発現される抗原結合ドメインをディスプレイするために使用することが可能である。親抗体を作製するために使用することが可能な酵母ディスプレイ法の例には、参照により本明細書に組み込まれる、Wittrop, et al. 米国特許第6,699,658号に開示されているものが含まれる。

10

【0130】

本明細書に記載されている抗体は、CDR移植されたおよびヒト化された親抗体を作製するために、さらに修飾を施すことが可能である。CDR移植された親抗体は、ヒト抗体由来の重鎖および軽鎖可変領域配列を含み、 V_H および / または V_L の CDR 領域の1つ以上が、目的の抗原に結合することが可能なマウス抗体の CDR 配列と置換される。あらゆるヒト抗体から得られるフレームワーク配列が、CDR移植のためのテンプレートとしての役割を果たし得る。しかしながら、このようなフレームワーク上への直鎖の置換は、しばしば、抗原への結合親和性を若干喪失させる。元のマウス抗体に対して、ヒト抗体がより相同であるほど、ヒトフレームワークとマウス CDR の組合せは、親和性を低下させ得る CDR 中の歪みを導入する可能性がより低くなる。したがって、一実施形態において、CDR 以外のマウス可変フレームワークを置換するために選択されたヒト可変フレームワークは、マウス抗体可変領域フレームワークと少なくとも65%の配列同一性を有する。一実施形態において、CDRを除くヒトおよびマウス可変領域は、少なくとも70%の配列同一性を有する。特定の実施形態において、CDRを除くヒトおよびマウス可変領域は、少なくとも75%の配列同一性を有する。別の実施形態において、CDRを除くヒトおよびマウス可変領域は、少なくとも80%の配列同一性を有する。このような抗体を作製する方法は、本分野において公知である (EP 239,400; PCT 公開 WO 91/09967; 米国特許第5,225,539号; 米国特許第5,530,101号; および第5,585,089号参照)、ベニアリング (veneering) またはリサーフェシング (resurfacing) (EP 592,106; EP 519,596; Padlan, Molecular Immunology 28(4/5): 489-498 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7(6): 805-814 (1994); Roguska et al., PNAS 91: 969-973 (1994)), およびチェーンシャッフリング (米国特許第5,565,352号); および抗イディオタイプ抗体。

20

30

【0131】

ヒト化抗体は、非ヒト種に由来する1つ以上の相補性決定領域 (CDR) と、ヒト免疫グロブリン分子由来のフレームワーク領域とを有する所望の抗原に結合する非ヒト種抗体から得られる抗体分子である。公知のヒト Ig 配列は、開示されている。例えば、www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html; www.sciquest.com/; www.abcam.com/; www.antibodyresource.com/onlinecomp.html; www.public.iastate.edu/about/pedro/research_tools.html; www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html; www.whfreeman.com/immunology/CH-05/kuby05.htm; www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html; www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/; www.path.cam.ac.uk/about.mrc7/m-ikeimages.html; www.antibodyreso

40

50

urce.com/; mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html. www.immunologylink.com/; pathbox.wustl.edu/.about.hcenter/index.-html; www.biotech.ufl.edu/.about.hcl/; www.pebio.com/pa/340913/340913.html -; www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/; www.mehime-u.ac.jp/.about.yasuhito-/Elisa.html; www.biodesign.com/table.asp; www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html; www.biotech.ufl.edu/.about.fccl/protocol.html; www.isac-net.org/sites__geo.html; aximtl.imt.uni-marburg.de/.about.rek/AEP-Start.html; baserv.uci.kun.nl/.about.jraats/links1.html; www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/; www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html; www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html; imgt.cnusc.fr:8104/; www.biochem.ucl.ac.uk/.about.martin/abs/index.html; antibody.bath.ac.uk/; abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html; www.unizh.ch/.about.honegger/AHOseminar/Slide01.html; www.cryst.bbk.ac.uk/.about.ubcg07s/; www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm; www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/humanisation/TAHHP.html; www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat__aim.html; www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html; www.cryst.bioc.cam.ac.uk/.about.fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html; www.jerini.de/fr/products.htm; www.patents.ibm.com/ibna.html。Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983) (それぞれ全体が参照により本明細書に組み込まれる)。このような導入された配列は、免疫原性を低下させるために、または結合、親和性、結合速度、解離速度、結合力、特異性、半減期もしくは本分野で公知の他のいずれかの適切な特性を減少、増強もしくは修飾するために使用することが可能である。

【0132】

ヒトフレームワーク領域中のフレームワーク残基は、抗原結合を変化させるために、例えば抗原結合を改善させるために、CDRドナー抗体由来の対応する残基で置換され得る。これらのフレームワーク置換は、本分野で周知の方法によって、例えば、抗原結合にとって重要なフレームワーク残基を同定するために、CDRとフレームワーク残基の相互作用をモデリングすることによって、および特定の位置における異常なフレームワーク残基を同定するための配列比較によって同定される。(例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、Queen et al., 米国特許第5,585,089号; Reichmann et al., Nature 332:323 (1988)を参照されたい)。三次元免疫グロブリンモデルが一般的に利用可能であり、当業者によく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列が採り得る三次元立体構造を図式および表示するコンピュータプログラムを利用可能である。これらのディスプレイの検査は、候補免疫グロブリン配列の機能における残基の推定される役割の分析、すなわち、候補免疫グロブリンがその抗原に結合する能力に影響を与える残基の分析を可能とする。このようにして、FR残基は、所望される抗体特性(標的抗原に対して増加された親和性など)が達成

されるように、コンセンサスおよび輸入配列から選択され、組み合わせることが可能である。一般に、CDR残基は、抗原結合に影響を与えることに直接、および最も実質的に関与する。抗体は、Jones et al., Nature 321:522 (1986); Verhoeyen et al., Science 239:1534 (1988); Sims et al., J. Immunol. 151:2296 (1993); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987); Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993); Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7(6):805-814 (1994); Roguska et al., PNAS 91:969-973 (1994); PCT公開WO91/09967, PCT/:US98/16280、US96/18978、US91/09630、US91/05939、US94/01234、GB89/01334、GB91/01134、GB92/01755; WO90/14443、WO90/14424、WO90/14430、EP229246、EP592, 106; EP519, 596、EP239, 400、米国特許第5,565,332号、第5,723,323号、第5,976,862号、第5,824,514号、第5,817,483号、第5814476号、第5763192号、第5723323号、第5,766886号、第5,714,352号、第6,204,023号、第6,180,370号、第5,693,762号、第5,530,101号、第5,585,089号、第5,225,539号;第4,816,567号(ここで引用されている参考文献を含めて、それぞれ全体が参照により本明細書に組み込まれる)に記載されているものなどの(但し、これらに限定されない。)、本分野で公知の様々な技術を用いてヒト化することが可能である。

10

20

30

40

50

【0133】

B:親モノクローナル抗体を選択するための基準

DVD-Ig分子において所望される少なくとも1つ以上の特性を有する親抗体を選択することを含む実施形態が提供される。一実施形態において、所望の特性は、1つ以上の抗体パラメーターである。別の実施形態において、抗体パラメーターは、抗原特異性、抗原に対する親和性、効力、生物学的機能、エピトープ認識、安定性、可溶性、生産効率、免疫原性、薬物動態、生物学的利用率、組織交差反応性またはオルソロガス抗原結合性である。

【0134】

B1:抗原に対する親和性

治療用mAbの所望の親和性は、抗原の性質および所望の治療的エンドポイントに依存し得る。一実施形態において、サイトカイン-サイトカイン受容体相互作用を遮断するとモノクローナル抗体は高い親和性を有し($K_d = 0.01 - 0.50 \text{ pM}$)、したがって相互作用は通常高い親和性の相互作用である(例えば、 $< \text{pM} - < \text{nM}$ の範囲)。このような場合、その標的に対するmAbの親和性は、その受容体に対するサイトカイン(リガンド)の親和性と等しくまたはこれより良好であるはずである。その一方で、親和性が低い($> \text{nM}$ の範囲)mAbは、例えば、循環中の潜在的に病原性のあるタンパク質を排除する際に治療的に有効であり得、例えば、A-アミロイドの循環中の種に結合し、これを隔離し排除するモノクローナル抗体である。他の場合において、部位特異的突然変異導入によって既存の高親和性mAbの親和性を低減することまたはその標的に対する親和性が低いmAbを使用することは、潜在的な副作用、例えば高親和性mAbがその意図する標的をすべて隔離/中和する可能性があることを回避するために使用することが可能であり、それによって、標的とされたタンパク質の(複数の)機能を完全に除去/排除する。この筋書において、低親和性mAbは、疾患の症状(病的または過剰産生レベル)に関与する可能性がある標的の一部を隔離/中和し得、それによって、標的の一部がその正常な

(複数の)生理的機能を果たし続けることを可能にする。したがって、 K_d を低減して用量を調整することおよび/または副作用を低減することが可能であり得る。親mAbの親和性は、細胞表面分子を適切に標的として所望の治療結果を達成することに役割を果たし得る。例えば、標的が、高密度で癌細胞上に、低密度で正常細胞上に発現している場合、低親和性mAbは、正常細胞より腫瘍細胞上で多数の標的に結合し、この結果ADCCまたはCDCを介して腫瘍細胞が排除され、したがって低親和性mAbは治療的に望ましい効果を有し得る。したがって、所望の親和性を有するmAbを選択することは、可溶性標的と表面標的の両方で重要であり得る。

【0135】

そのリガンドとの相互作用後の受容体を通じたシグナル伝達は、受容体-リガンド相互作用の親和性に依存し得る。同様に、表面受容体に対するmAbの親和性は、細胞内シグナル伝達の性質およびmAbがアゴニストまたはアンタゴニストシグナルを送達し得るかどうかを決定できることが考えられる。mAbによって媒介されるシグナル伝達の、親和性を基礎とする性質は、その副作用プロファイルの影響を有し得る。したがって、治療用モノクローナル抗体の所望の親和性および所望の機能は、インビトロおよびインビボ実験によって注意深く決定される必要がある。

【0136】

結合タンパク質(例えば、抗体)の所望の K_d は、所望の治療結果に応じて実験的に決定され得る。一実施形態において、(特定の抗原に対する親和性(K_d)が、同じ抗原に対するDVD-Igの所望の親和性と等しくまたはこれより良好である)親抗体が選択される。抗原結合親和性および動態は、BIACoreまたは別の類似の技術によって評価される。一実施形態において、各親抗体は、最大約 10^{-7} M;最大約 10^{-8} M;最大約 10^{-9} M;最大約 10^{-10} M;最大約 10^{-11} M;最大約 10^{-12} M;または最大 10^{-13} Mの、その抗原に対する解離定数(K_d)を有する。VD1が得られる第一の親抗体およびVD2が得られる第二の親抗体は、それぞれの抗原に対する類似したまたは異なる親和性(K_D)を有し得る。各親抗体は、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、少なくとも約 10^2 M $^{-1}$ s $^{-1}$;少なくとも約 10^3 M $^{-1}$ s $^{-1}$;少なくとも約 10^4 M $^{-1}$ s $^{-1}$;少なくとも約 10^5 M $^{-1}$ s $^{-1}$;または少なくとも約 10^6 M $^{-1}$ s $^{-1}$ の、その抗原に対する結合速度定数(K_{on})を有する。VD1が得られる第一の親抗体およびVD2が得られる第二の親抗体は、それぞれの抗原に対する類似したまたは異なる結合速度定数(K_{on})を有し得る。一実施形態において、各親抗体は、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 10^{-3} s $^{-1}$;最大約 10^{-4} s $^{-1}$;最大約 10^{-5} s $^{-1}$;または最大約 10^{-6} s $^{-1}$ の、その抗原に対する解離速度定数(K_{off})を有する。VD1が得られる第一の親抗体およびVD2が得られる第二の親抗体は、それぞれの抗原に対する類似したまたは異なる解離速度定数(K_{off})を有し得る。

【0137】

B2:効力

親モノクローナル抗体の所望の親和性/効力は、所望の治療結果に依存する。例えば、受容体-リガンド(R-L)相互作用では、親和性(k_d)は、R-L k_d と等しくまたはこれより良好である(pMの範囲)。循環中の病的なタンパク質の単純な排除では、 k_d は低いnMの範囲であり得、例えば、循環中のA-ペプチドの様々な種の排除である。さらに、 k_d は、標的が同じエピトープを複数コピー発現するかどうかにも依存し、例えば、Aオリゴマー中の立体構造エピトープを標的とするmAbである。

【0138】

VD1およびVD2が同じ抗原であるが別個のエピトープに結合する場合、DVD-Igは、同じ抗原について4つの結合部位を含有し、したがって、DVD-Igの結合力が増加し、それにより見かけの k_d が増加している。一実施形態において、DVD-Igにおいて所望されるものと等しくまたはこれより低い K_d を有する親抗体が選択される。親mAbの親和性の考慮は、DVD-Igが4つまたはそれ以上の同一の抗原結合部位を含有

10

20

30

40

50

有するかどうかにも依存し得る（すなわち、単一の m A b 由来の D V D - I g）。この場合、見かけの k d は、結合力により、m A b より大きくなる。このような D V D - I g は、表面受容体の架橋に使用され、中和効力を増加させ、病的なタンパク質の排除を増強することなどが可能である。

【 0 1 3 9 】

一実施形態において、（特定の抗原に対する中和効力が、同じ抗原に対する D V D - I g の所望の中和潜在力と等しくまたはこれより良好である）親抗体が選択される。中和効力は、標的依存的バイオアッセイによって評価することが可能であり、このバイオアッセイにおいて、適当なタイプの細胞が標的刺激に反応して測定可能なシグナル（すなわち、増殖またはサイトカイン産生）を生じさせ、m A b による標的中和が用量依存的な形でシグナルを低減し得る。

10

【 0 1 4 0 】

B 3 : 生物学的機能

モノクローナル抗体は、潜在的にいくつかの機能を果たすことができる。これらの機能のいくつかは表 1 に列挙されている。これらの機能は、インビトロアッセイ（例えば、細胞を基礎とするアッセイおよび生化学的アッセイ）とインビボ動物モデルの両方によって評価することが可能である。

【 0 1 4 1 】

【表 1】

表 1:治療用抗体のいくつかの潜在的な適用例

20

標的(クラス)	作用機序(標的)
可溶性(サイトカイン、他)	活性の中和(例えば、サイトカイン) 排除の増強(例えば、A β オリゴマー) 半減期の増加(例えば、GLP1)
細胞表面(受容体、他)	アゴニスト(例えば、GLP1R;EPOR など) アンタゴニスト(例えば、インテグリンなど) 細胞毒性(CD20 など)
タンパク質沈着物	排除/分解の増強(例えば、アミロイド沈着物である A β プラーク)

30

【 0 1 4 2 】

表 1 中で本明細書の実施例において記載されている別個の機能を有する m A b は、所望の治療結果を達成するように選択することが可能である。2 つ以上の選択された親モノクローナル抗体は、次いで、単一の D V D - I g 分子中で 2 つの別個の機能を果たすために D V D - I g フォーマットにおいて使用することが可能である。例えば、D V D - I g は、特定のサイトカインの機能を中和する親 m A b を選択し、病的なタンパク質の排除を増強する親 m A b を選択することによって生成され得る。同様に、2 つの異なる細胞表面受容体を認識する 2 つの親モノクローナル抗体（一方の m A b は 1 つの受容体に対してアゴニスト機能を有し、他方の m A b は異なる受容体に対してアンタゴニスト機能を有する）を選択することができる。各々別個の機能を有するこれら 2 つの選択されたモノクローナル抗体は、（単一分子中で、選択されたモノクローナル抗体の 2 つの別個の機能（アゴニストおよびアンタゴニスト）を有する）単一の D V D - I g 分子を構築するために使用することが可能である。同様に、（それぞれの受容体リガンド（例えば、E G F および I G F）の結合を各々遮断する）細胞表面受容体に対する 2 つのアンタゴニストモノクローナル抗体は、D V D - I g フォーマットにおいて使用することが可能である。逆に言うと、

40

50

アンタゴニスト抗受容体 m A b (例えば、抗 E G F R) および中和性抗可溶性媒介物質 (例えば、抗 I G F 1 / 2) m A b は、D V D - I g を作製するために選択することが可能である。

【0143】

B 4 : エピトープ認識

タンパク質の異なる領域は、異なる機能を果たし得る。例えば、サイトカインの特定の領域は、サイトカイン受容体と相互作用して受容体活性化を引き起こすが、タンパク質の他の領域は、サイトカインの安定化に必要であり得る。この場合において、サイトカイン上の(複数の)受容体相互作用領域に特異的に結合する m A b を選択し、それによってサイトカイン - 受容体相互作用を遮断することができる。いくつかの場合、例えば複数のリガンドに結合する特定のケモカイン受容体において、1つのリガンドのみと相互作用するエピトープ(ケモカイン受容体上の領域)に結合する m A b が選択され得る。他の場合において、モノクローナル抗体は、タンパク質の生理機能に直接関与しない標的上のエピトープに結合し得るが、m A b とこれらの領域の結合は、生理機能に干渉し(立体障害)またはタンパク質が機能できないようにタンパク質の立体構造を変化させ得る(リガンドが結合しないように受容体の立体構造を変化させる)複数のリガンドを有する受容体に対する m A b)。サイトカインとその受容体の結合を遮断しないがシグナル伝達を遮断する抗サイトカインモノクローナル抗体も同定されている(例えば、抗 I L - 1 8 m A b である 1 2 5 - 2 H)。

10

【0144】

エピトープおよび m A b 機能の例には、受容体 - リガンド (R - L) 相互作用の遮断 (R - 相互作用部位に結合する中和性 m A b)、R - 結合が減少しまたはなくなる立体障害が含まれるが、これらに限定されない。A b は、受容体結合部位以外の部位で標的に結合することができるが、立体構造変化を誘導し機能を消失させ(例えば、X o l a i r)、R に結合するがシグナル伝達 (1 2 5 - 2 H) を遮断することにより、依然として受容体結合および標的の機能に干渉する。

20

【0145】

一実施形態において、親 m A b は、最大限の効力で適当なエピトープを標的とすることが必要である。このようなエピトープは D V D - I g 中に保存されているべきである。m A b の結合エピトープは、共結晶構造分析、m A b - 抗原複合体の限定的タンパク質溶解プラス質量分析ペプチドマッピング (L e g r o s V . e t a l 2 0 0 0 P r o t e i n S c i . 9 : 1 0 0 2 - 1 0)、ファージディスプレイペプチドライブラリー (O ' C o n n o r K H e t a l 2 0 0 5 J I m m u n o l M e t h o d s . 2 9 9 : 2 1 - 3 5) ならびに突然変異導入 (W u C . e t a l . 2 0 0 3 J I m m u n o l 1 7 0 : 5 5 7 1 - 7) を含むいくつかのアプローチによって決定することが可能である。

30

【0146】

B 5 : 物理化学的特性および医薬的特性

抗体を用いた治療的処置は、(典型的に大きい分子量の結果として質量ベースの効力が低いことにより)しばしば数 m g / k g の高用量の投与をしばしば必要とする。患者遵守に適応させ、慢性疾患療法および外来患者治療に十分に向けさせるため、治療用 m A b の皮下 (s . c .) または筋内 (i . m .) 投与が望ましい。例えば、s . c . 投与に最大限望ましい容量は約 1 . 0 m L であり、したがって、> 1 0 0 m g / m L の濃度が、用量当たりの注射の数を制限するために望ましい。一実施形態において、治療用抗体は一用量で投与される。しかし、このような製剤の開発は、タンパク質間相互作用(例えば、免疫原性リスクを潜在的に増加させる凝集)ならびにプロセッシングおよび送達間の制限(例えば、粘性)によって拘束される。結果として、臨床効力に必要な大きな量および関連する開発の拘束が、抗体製剤の潜在性の完全な利用および高用量の投与計画における s . c . 投与を制限している。タンパク質分子およびタンパク質溶液の物理化学的特性および医薬的特性、例えば、安定性、可溶性および粘性の特徴が最も重要であることが明らか

40

50

である。

【0147】

B5.1: 安定性

「安定な」抗体製剤は、この中の抗体が、保存時にこの物理的安定性および/または化学的安定性および/または生物活性を本質的に保持しているものである。安定性は、選択された期間で、選択された温度において測定することが可能である。一実施形態において、製剤中の抗体は、室温（約30）もしくは40で少なくとも1カ月間、および/または約2 - 8で少なくとも1年間、少なくとも2年間安定である。さらに、一実施形態において、製剤は、製剤の凍結（例えば、-70に）および融解後に安定であり、これは以下で「凍結/融解サイクル」と呼ばれる。別の例において、「安定な」製剤は、タンパク質の約10%未満および約5%未満が製剤中の凝集物として存在するものであり得る。

10

【0148】

インビトロで様々な温度において長い期間安定なDVD-Igが望ましい。インビトロで高い温度、例えば40において2 - 4週間安定な親mAbを迅速にスクリーニングし、次いで安定性を評価することによって、これを達成することができる。2 - 8で保存する間、タンパク質は、少なくとも12カ月間、例えば少なくとも24カ月間の安定性を示す。安定性（単量体完全分子の%）は、陽イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、SDS-PAGE、ならびに生物活性試験などの様々な技術を使用して評価することが可能である。共有結合および立体構造的修飾を分析するために使用され得る分析技術のより包括的なリストについて、Jones, A. J. S. (1993) Analytical methods for the assessment of protein formulations and delivery systems. In: Cleland, J. L.; Langer, R., editors. Formulation and delivery of peptides and proteins, 1st edition, Washington, ACS, pg. 22 - 45; および Pearlman, R.; Nguyen, T. H. (1990) Analysis of protein drugs. In: Lee, V. H., editor. Peptide and protein drug delivery, 1st edition, New York, Marcel Dekker, Inc., pg. 247 - 301を参照されたい。

20

30

【0149】

不均一性および凝集形成：抗体の安定性は、製剤が、凝集物として存在するGMP抗体材料において約10%未満、一実施形態において約5%未満、別の実施形態において約2%未満または一実施形態において0.5%から1.5%以下の範囲内を示し得るようなものであり得る。サイズ排除クロマトグラフィーは、タンパク質凝集物の検出において感度がよく、再現性があり非常に頑強な方法である。

【0150】

低い凝集レベルに加えて、抗体は、一実施形態において、化学的に安定でなければならない。化学的安定性は、イオン交換クロマトグラフィー（例えば、陽イオンまたは陰イオン交換クロマトグラフィー）、疎水性相互作用クロマトグラフィーまたは等電点電気泳動もしくはキャピラリー電気泳動などの他の方法によって決定され得る。例えば、抗体の化学的安定性は、2 - 8で少なくとも12カ月の保存後に、保存試験前の抗体溶液と比較した場合に、陽イオン交換クロマトグラフィーにおいて非修飾抗体を表しているピークが、20%以下、一実施形態において10%以下または別の実施形態において5%以下増加し得るようなものであり得る。

40

【0151】

一実施形態において、親抗体は、構造的な完全性；正確なジスルフィド結合形成および正確なフォールディングを示す；抗体の二次または三次構造の変化による化学的不安定性は、抗体活性に影響し得る。例えば、抗体の活性によって示される安定性は、2 - 8で

50

少なくとも12カ月の保存後に、保存試験前の抗体溶液と比較した場合に、抗体の活性が、50%以下、一実施形態において30%以下もしくは10%以下または一実施形態において5%もしくは1%以下低下し得るようなものであり得る。適切な抗原結合アッセイは、抗体活性を決定するために使用することが可能である。

【0152】

B5.2: 可溶性

mAbの「可溶性」は、正確にフォールディングされた単量体IgGの生産に相関する。したがって、IgGの可溶性は、HPLCによって評価され得る。例えば、可溶性(単量体)IgGは、HPLCクロマトグラフで単一ピークを生じるが、不溶性のもの(例えば、多量体および凝集したものは、複数のピークを生じる。当業者は、したがって、通常のHPLC技術を使用してIgGの可溶性の増大または低下を検出することができる。可溶性を分析するために使用され得る分析技術のより包括的なリストについて、(Jones, A. G. Dep. Chem. Biochem. Eng., Univ. Coll. London, London, UK. Editor(s): Shamlou, P. Ayazi. Process. Solid-Liq. Suspensions (1993), 93-117. Publisher: Butterworth-Heinemann, Oxford, UK and Pearlman, Rodney; Nguyen, Tue H, Advances in Parenteral Sciences (1990), 4 (Pept. Protein Drug Delivery), 247-301を参照されたい)。治療用mAbの可溶性は、十分な投与にしばしば必要とされる高濃度への製剤化にとって重要である。本明細書において概略を述べるように、 $> 100 \text{ mg/mL}$ の可溶性が、効率的な抗体投与に適応させるために必要とされ得る。例えば、抗体の可溶性は、初期の研究相において 5 mg/mL 以上、一実施形態において進行したプロセス科学段階で 25 mg/mL 以上または一実施形態において 100 mg/mL 以上または一実施形態において 150 mg/mL 以上であり得る。タンパク質分子の固有の特性がタンパク質溶液の物理化学的特性、例えば安定性、可溶性、粘性に重要であることは、当業者に明らかである。しかし、当業者は、幅広い様々な賦形剤が、最終的なタンパク質製剤の特徴に有益な影響を及ぼす添加剤として使用され得ることを理解する。これらの賦形剤は、(i)液体溶媒、共溶媒(例えば、エタノールなどのアルコール); (ii)緩衝剤(例えば、リン酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、アミノ酸緩衝液); (iii)糖および糖アルコール(例えば、スクロース、トレハロース、フルクトース、ラフィノース、マンニトール、ソルビトール、デキストラン); (iv)界面活性剤(例えば、ポリソルベート20、40、60、80、ポロキサマー); (v)等張性修飾物質(例えば、NaClなどの塩、糖、糖アルコール); ならびに(vi)他(例えば、保存剤、キレート化剤、抗酸化剤、キレート化合物(例えば、EDTA)、生分解性ポリマー、担体分子(例えば、HSA、PEG)を含み得る。

【0153】

粘性は、抗体製造および抗体プロセッシング(例えば、ダイアフィルトレーション/限外濾過)、充填-仕上げプロセス(ポンピング局面、濾過局面)ならびに送達局面(注入可能性、洗練された装置送達)に関して非常に重要なパラメーターである。低粘性は、高濃度を有する抗体の液体溶液を可能とする。このことは、同じ用量が小容量で投与され得ることを可能とする。小注射容量は、注射の感覚において痛みが少ない利点を備え、溶液は、患者における注射時に痛みを減らすために必ずしも等張性である必要はない。抗体溶液の粘性は、 $100 (1/s)$ 抗体溶液の剪断速度において粘性が、 $200 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ 未満であり、一実施形態において $125 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ 未満であり、別の実施形態において $70 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ 未満であり、さらに別の実施形態において $25 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ 未満でありまたはさらに $10 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ 未満であるようなものであり得る。

【0154】

B5.3: 生産効率

チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)などの哺乳動物細胞中で効率的に発現され

10

20

30

40

50

るDVD-Igの生成は、一実施形態において、哺乳動物細胞中でそれ自体効率的に発現される2つの親モノクローナル抗体を必要とする。安定哺乳動物系統(すなわち、CHO)からの生産収率は、約0.5g/Lを上回り、一実施形態において約1g/Lを上回り、別の実施形態において約2-5g/Lまたはそれ以上の範囲であるべきである(Kipriyanov SM, Little M. 1999 Mol Biotechnol. 12:173-201; Carroll S, Al-Rubeai M. 2004 Expert Opin Biol Ther. 4:1821-9)。

【0155】

哺乳動物細胞中における抗体およびIg融合タンパク質の生産は、いくつかの因子によって影響を受ける。強力なプロモーター、エンハンサーおよび選択マーカの取り込みによる発現ベクターの工学的作製は、組み込まれたベクターコピーからの目的の遺伝子の転写を最大にすることができる。高レベルの遺伝子転写を許容するベクター組み込み部位の同定は、ベクターからのタンパク質発現を増大させることができる(Wurm et al, 2004, Nature Biotechnology, 2004, Vol/Iss/Pg. 22/11(1393-1398))。さらに、生産のレベルは、抗体の重鎖および軽鎖の比率ならびにタンパク質集合および分泌のプロセスにおける様々な工程によって影響される(Jiang et al. 2006, Biotechnology Progress, Jan-Feb 2006, vol. 22, no. 1, p. 313-8)。

10

【0156】

20

B6: 免疫原性

治療用mAbの投与は、免疫応答の特定の発生(すなわち、治療用mAbに対する内在性抗体の形成)をもたらし得る。免疫原性を誘発する可能性がある潜在的な要素は、親モノクローナル抗体の選択の間に分析すべきであり、DVD-Ig構築前に親モノクローナル抗体を最適化するために、このようなリスクを低減するステップをとることが可能である。マウス由来の抗体は、患者において高度に免疫原性であることが分かっている。マウス可変領域およびヒト定常領域からなるキメラ抗体の生成は、治療用抗体の免疫原性を低減する論理的な次の工程を提示する(Morrison and Schlom, 1990)。あるいは、免疫原性は、Riechmann et al., 1988により治療用抗体について記載されているように、マウスCDR配列をヒト抗体フレームワークに移すこと(再成形/CDR移植/ヒト化)によって低減することが可能である。別の方法は、「再表面化」または「ベニヤ化」と呼ばれ、げっ歯類可変軽および重ドメインから開始し、表面到達可能なフレームワークアミノ酸のみがヒトのものに変化しているが、CDRおよび埋まっているアミノ酸は親げっ歯類抗体由来のままである(Roguska et al., 1996)。別のタイプのヒト化において、CDR全体を移植する代わりに、1つの技術は、抗体とその標的の結合に関与するCDR残基のサブセットとして定義される「特異性決定領域」(SDR)のみを移植する(Kashmiri et al., 2005)。これは、抗体-標的複合体の入手可能な三次元構造の分析または(どれが標的と相互作用するかを決定するための)抗体CDR残基の突然変異分析によるSDRの同定を必要とする。あるいは、完全なヒト抗体は、マウス、キメラまたはヒト化抗体と比較して低減された免疫原性を有し得る。

30

40

【0157】

治療用抗体の免疫原性を低減する別のアプローチは、免疫原性であることが予測されているある特定の配列の除去である。1つのアプローチにおいて、最初の生成物をヒトにおいて生物学的に試験し、受け入れられないほど免疫原性であることが分かった後に、B細胞エピトープがマッピングされ、次いで免疫検出を回避するために変化され得る。別のアプローチは、潜在的なT細胞エピトープを予測し除去する方法を使用する。MHCタンパク質に結合する潜在性を有する生物学的治療薬のペプチド配列をスキャンおよび同定する計算方法が開発されている(Desmet et al., 2005)。あるいは、ヒト樹状細胞を基礎とする方法は、潜在的なタンパク質アレルゲン中のCD4⁺T細胞エピト

50

ープを同定するために使用することが可能である (Stickler et al., 2005; S. L. Morrison and J. Schlom, *Important Adv. Oncol.* (1990), pp. 3 - 18; Riechmann, L., Clark, M., Waldmann, H. and Winter, G. 「Reshaping human antibodies for therapy.」 *Nature* (1988) 332: 323 - 327; Roguska - M - A, Pedersen - J - T, Henry - A - H, Searle - S - M, Roja - C - M, Avery - B, Hoffee - M, Cook - S, Lambert - J - M, Blattler - W - A, Rees - A - R, Guild - B - C. A comparison of two murine mAbs humanized by CDR-grafting and variable domain resurfacing. *Protein engineering*, {Protein - Eng}, 1996, vol. 9, p. 895 - 904; Kashmiri - Syed - V - S, De - Pascalis - Roberto, Gonzales - Noreen - R, Schlom - Jeffrey. SDR grafting - a new approach to antibody humanization. *Methods* (San Diego Calif.), {Methods}, May 2005, vol. 36, no. 1, p. 25 - 34; Desmet - Johan, Meersseman - Geert, Boutonnet - Nathalie, Pletinckx - Jurgen, De - Clercq - Krista, Debulpaep - Maja, Braeckman - Tessa, Lasters - Ignace. Anchor profiles of HLA-specific peptides: analysis by a novel affinity scoring method and experimental validation. *Proteins*, 2005, vol. 58, p. 53 - 69; Stickler - M - M, Estell - D - A, Harding - F - A. CD4+ T-cell epitope determination using unexposed human donor peripheral blood mononuclear cells. *Journal of immunotherapy* 2000, vol. 23, p. 654 - 60)。

【0158】

B7: インビボ効力

所望のインビボ効力を有するDVD-Ig分子を生成するために、組み合わせ得られた場合に同様に所望のインビボ効力を有するmAbを生成および選択することが重要である。しかし、いくつかの場合において、DVD-Igは、2つの別々のmAbを組み合わせ達成することができないインビボ効力を示し得る。例えば、DVD-Igは、2つの標的を近接させることができ、このことは、2つの別々のmAbを組み合わせ達成することができない活性につながる。さらなる望ましい生物学的機能は、B3節において本明細書に記載されている。DVD-Ig分子において望ましい特徴を有する親抗体は、薬物動態 $t^{1/2}$; 組織分布; 可溶性対細胞表面標的; および標的濃度 - 可溶性 / 密度 - 表面などの因子に基づいて選択することが可能である。

【0159】

B8: インビボ組織分布

所望のインビボ組織分布を有するDVD-Ig分子を生成するために、一実施形態において、類似の所望のインビボ組織分布プロファイルを有する親mAbが選択されなければならない。あるいは、二重特異的標的化戦略の機構に基づいて、ある時には、組み合わせ得られた場合に同様に所望されるインビボ組織分布を有する親mAbを選択することが必要とされないことがある。例えば、DVD-Igの場合において、1つの結合成分は、特定の部位へとDVD-Igを標的化し、それによって第二の結合成分が同じ標的部位へと移動する。例えば、DVD-Igの一方の結合特異性は膵臓(島細胞)を標的とすることができ、他方の特異性は、GLP1を膵臓へと移動させてインシュリンを誘導すること

ができる。

【0160】

B9：アイソタイプ

アイソタイプ、エフェクター機能および循環半減期を含むがこれらに限定されない所望の特性を有するD V D - I g分子を生成するために、一実施形態において、治療有用性および所望の治療的エンドポイントに応じて適当なF cエフェクター機能を有する親m A bが選択される。5つの主要な重鎖のクラスまたはアイソタイプが存在し、これらのいくつかは複数のサブタイプを有し、これらは抗体分子のエフェクター機能を決定する。これらのエフェクター機能は抗体分子のヒンジ領域、C H 2およびC H 3ドメインにある。しかし、抗体分子の他の部分中の残基も同様にエフェクター機能に対する作用を有し得る。ヒンジ領域F cエフェクター機能には、(i)抗体依存性細胞傷害、(i i)補体(C l q)結合、活性化および補体依存性細胞傷害(C D C)、(i i i)食作用/抗原-抗体複合体の排除ならびに(i v)いくつかの場合におけるサイトカイン放出が含まれる。抗体分子のこれらのF cエフェクター機能は、F c領域と1組のクラス特異的細胞表面受容体との相互作用を通じて媒介される。I g G 1アイソタイプの抗体は最も活性であるが、I g G 2およびI g G 4は、最小限のエフェクター機能を有するまたはエフェクター機能を有さない。I g G抗体のエフェクター機能は、構造的に相同な細胞F c受容体のタイプ(およびサブタイプ)(F c g R 1、F c g R I IおよびF c g R I I I)との相互作用を通じて媒介される。I g G 1のこれらのエフェクター機能は、(F c g RおよびC l q結合に必要とされる)下方のヒンジ領域(例えば、L 2 3 4 A、L 2 3 5 A)中の特定の

10

20

【0161】

m A bが活性または不活性アイソタイプを有するべきかどうかは、抗体について所望される治療的エンドポイントに依存する。アイソタイプの用法および所望の治療結果のいくつかの例が以下に列挙されている：

- a) 所望のエンドポイントが可溶性サイトカインの機能的中和である場合、不活性アイソタイプが使用され得る；
- b) 所望の結果が病的なタンパク質の排除である場合、活性アイソタイプが使用され得る；
- c) 所望の結果がタンパク質凝集物の排除である場合、活性アイソタイプが使用され得る；
- d) 所望の結果が表面受容体をアンタゴナイズすることである場合、不活性アイソタイプが使用される(T y s a b r i、I g G 4；O K T 3、変異I g G 1)；
- e) 所望の結果が標的細胞を除去することである場合、活性アイソタイプが使用される(H e r c e p t i n, I g G 1 (および増強されたエフェクター機能を有する)；および
- f) 所望の結果が、C N Sに入ることなく循環からタンパク質を排除することである場合、I g Mアイソタイプが使用され得る(例えば、循環中のA bペプチド種の排除)。

30

40

親m A bのF cエフェクター機能は、本分野において周知である様々なインビトロ方法によって決定することが可能である。

【0162】

論じられているように、アイソタイプの選択およびそれによるエフェクター機能は、所望の治療的エンドポイントに依存する。循環中の標的の単純な中和、例えば受容体-リガンド相互作用の遮断が所望される場合において、エフェクター機能は必要とされないことがある。このような場合において、(エフェクター機能を消失させる)抗体のF c領域におけるアイソタイプまたは変異が望ましい。標的細胞の消失、例えば腫瘍細胞の消失が治療的エンドポイントである他の場合において、(エフェクター機能を増強する)F c領域におけるアイソタイプまたは変異または脱フコシル化が望ましい(P r e s t a G L,

50

Adv. Drug Delivery Rev. 58: 640 - 656, 2006; Satoh M., Iida S., Shitara K. Expert Opinion Biol. Ther. 6: 1161 - 1173, 2006)。同様に、治療有用性に応じて、抗体分子の循環半減期は、Fc領域中に特定の変異を導入することにより抗体-FcRn相互作用を調節することによって短縮/延長することが可能である(Dall'Acqua WF, Kiener PA, Wu H. J. Biol. Chem. 281: 23514 - 23524, 2006; Petkova SB., Akillesh S., Sproule T.J. et al. Internat. Immunol. 18: 1759 - 1769, 2006; Vaccaro C., Bawdon R., Wanjie S et al. PNAS 103: 18709 - 18714, 2007)。

10

【0163】

正常な治療用mAbの異なるエフェクター機能に影響する様々な残基について公開されている情報は、DVD-Igについて確認する必要があると得る。DVD-Igフォーマットにおいて、モノクローナル抗体エフェクター機能の調節について同定されているもの以外の追加の(異なる)Fc領域残基が重要である可能性があり得る。

【0164】

全体的に、どのFcエフェクター機能(アイソタイプ)が最終的なDVD-Igフォーマットにおいて重要となるかに関する決定は、疾患兆候、治療標的、所望の治療的エンドポイントおよび安全性の考慮に依存する。以下のものを含むが、これらに限定されない例示の適当な重鎖および軽鎖定常領域が以下に列挙されている：

20

IgG1 - アロタイプ: G1mz
 IgG1 変異体 - A234、A235
 IgG2 - アロタイプ: G2m(n-)
 - Km3

【0165】

Fc受容体およびC1q研究：細胞膜上にある任意の過剰産生された標的との抗体の複合体化による望ましくない抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)および補体依存性細胞傷害(CDC)の可能性は、(例えば、L234A、L235A)ヒンジ領域変異によって阻止することが可能である。FcγR結合が、IgG1ヒンジ領域上の重複部位内で起こると考えられるので、mAbのIgG1ヒンジ領域に存在するこれらの置換されたアミノ酸は、mAbとヒトFc受容体(FcRnではない)の結合の減弱をもたらすことが予想される。mAbのこの特徴は、野生型IgGを含有する抗体より改善された安全性プロファイルにつながり得る。mAbとヒトFc受容体の結合は、細胞株(例えば、THP-1、K562)およびFcγRIIb(または他のFcγR)を発現する工学的に作製されたCHO細胞株を使用したフローサイトメトリー実験によって決定することが可能である。IgG1対照モノクローナル抗体と比較して、mAbはFcγRIおよびFcγRIIaへの結合の低下を示すが、FcγRIIbへの結合は影響を受けない。抗原/IgG免疫複合体によるC1qの結合および活性化は、続いての炎症および/または免疫制御応答を伴う古典的補体カスケードを誘発する。IgG上のC1q結合部位は、IgGヒンジ領域内の残基に局在している。増加している濃度のmAbとC1qの結合は、C1qELISAによって評価された。この結果は、野生型対照IgG1の結合と比較して予想されるように、mAbがC1qに結合できないことを示している。全体的に、L234A、L235Aヒンジ領域変異は、mAbとFcγRI、FcγRIIaおよびC1qの結合を阻止するが、mAbとFcγRIIbの相互作用に影響しない。このデータは、インビボにおいて、変異体Fcを有するmAbが、阻害型のFcγRIIbと正常に相互作用するが、活性化型のFcγRIおよびFcγRIIa受容体またはC1qと相互作用しないことを示唆している。

30

40

【0166】

ヒトFcRn結合：新生児受容体(FcRn)は、胎盤を横切るIgGの輸送に関与し

50

、I g G分子の異化半減期を調節する。効力を改善するため、投与量もしくは頻度を低減するためまたは標的への局在化を改善するために抗体の最終的な半減期を増加させることが望ましい可能性がある。あるいは、この逆を行う、すなわち、全身曝露を低減するためまたは標的対非標的結合率を改善するために抗体の最終的な半減期を低下させることが有利である可能性がある。I g Gとこのサルベージ受容体であるF c R nとの相互作用を調整することは、I g Gの最終的な半減期を増加または低下させる方法を提供する。I g Gを含む循環中のタンパク質は、流体相においてマイクロピノサイトーシス(micropinocytosis)を通じて血管内皮の細胞などの特定の細胞により採取される。I g Gは、エンドソームにおいて僅かに酸性の条件下(pH 6.0 - 6.5)でF c R nに結合することができ、細胞表面へと再循環することができ、この細胞表面においてほぼ中性の条件下(pH 7.0 - 7.4)で放出される。F c R n 80、16、17上のF c領域結合部位のマッピングは、種にわたって保存されている2つのヒスチジン残基His 310およびHis 435が、この相互作用のpH依存性に関与することを示した。ファージディスプレイ技術を使用して、F c R nへの結合を増加させ、マウスI g Gの半減期を延長するマウスF c領域変異が同定された(Victor, G. et al.; Nature Biotechnology (1997), 15(7), 637-640を参照)。pH 7.4ではなくpH 6.0においてF c R nに対するヒトI g Gの結合親和性を増加させるF c領域変異も同定されている(Dall'Acqua William F, et al., Journal of Immunology (2002), 169(9), 5171-80を参照)。さらに、1つの場合において、類似した結合のpH依存的増加(最大で27倍)もアカゲザルF c R nで観察され、これは、親I g Gと比較してアカゲザルにおける血清半減期の2倍の増加をもたらした(Hinton, Paul R. et al., Journal of Biological Chemistry (2004), 279(8), 6213-6216を参照)。これらの知見は、F c領域とF c R nの相互作用を調整することによって、抗体治療薬の血漿半減期の延長が実現可能であることを示す。逆に言うと、F c R nとの相互作用を弱めるF c領域変異は、抗体半減期を低減することができる。

【0167】

B10: 薬物動態(PK)

所望の薬物動態プロファイルを有するDVD-I g分子を生成するために、一実施形態において、同様に所望の薬物動態プロファイルを有する親mAbが選択される。1つの考慮事項は、モノクローナル抗体に対する免疫原性応答(すなわち、H A H A、ヒト抗ヒト抗体応答; H A C A、ヒト抗キメラ抗体応答)がこれらの治療剤の薬物動態をさらに複雑にしていることである。一実施形態において、最小限の免疫原性を有するまたは免疫原性を有さないモノクローナル抗体がDVD-I g分子の構築に使用され、この結果得られたDVD-I gも最小限の免疫原性を有するまたは免疫原性を有さない。mAbのPKを決定するいくつかの因子には、mAbの固有の特性(VHアミノ酸配列); 免疫原性; F c R n結合およびF c機能が含まれるがこれらに限定されない。

【0168】

げっ歯類におけるPKプロファイルは、カニクイザルおよびヒトにおけるモノクローナル抗体のPKプロファイルとよく相関する(またはこれを近似的に予測する)ので、選択された親モノクローナル抗体のPKプロファイルは、げっ歯類において容易に決定することが可能である。PKプロファイルは、実施例1.2.2.3A節に記載されているように決定される。

【0169】

所望のPK特徴(および本明細書において論じられている他の所望の機能特性)を有する親モノクローナル抗体が選択された後、DVD-I gが構築される。DVD-I g分子は2つの親モノクローナル抗体由来の2つの抗原結合ドメインを含有するので、DVD-I gのPK特性は同様に評価される。したがって、DVD-I gのPK特性を決定しつつ、2つの親モノクローナル抗体に由来する両方の抗原結合ドメインの機能性を基礎として

P Kプロファイルを決定するP Kアッセイを使用することが可能である。D V D - I gのP Kプロファイルは、実施例1 . 2 . 2 . 3 A節に記載されているように決定することが可能である。D V D - I gのP Kプロファイルに影響し得る追加の因子には、抗原結合ドメイン(C D R)配向；リンカーのサイズ；およびF c / F c R n相互作用が含まれる。親抗体のP K特徴は、以下のパラメーター：吸収、分布、代謝および排泄の評価によって評価することが可能である。

【0170】

吸収：今日まで、治療用モノクローナル抗体の投与は、非経口経路を介するものである（例えば、静脈内[I V]、皮下[S C]または筋内[I M]）。間質腔からのS CまたはI M投与後の全身循環へのm A bの吸収は主としてリンパ経路を介している。飽和可能な前全身的タンパク質分解は、血管外投与後の変化しやすい絶対的生物学的利用率をもたらし得る。通常、モノクローナル抗体の用量の増加に伴う絶対的生物学的利用率の増加が、高い用量での飽和したタンパク質分解能力に起因して観察され得る。リンパ液が血管系にゆっくりと排出されるためm A bの吸収プロセスは通常非常に遅く、吸収の持続時間は数時間から数日にかけて行われ得る。S C投与後のモノクローナル抗体の絶対的生物学的利用率は一般に50%から100%の範囲である。D V D - I g構築物によって標的化される血液脳関門での輸送を媒介とした構造の場合において、血漿における循環時間は、C N Sコンパートメントへの血液脳関門(B B B)での細胞間輸送の増大により減少され得る、この場合、D V D - I gは、その第二の抗原認識部位を介した相互作用を可能にするように遊離される。

10

20

【0171】

分布：I V投与後、モノクローナル抗体は（急速な分布相から開始し、この後遅い排除相となる）二相の血清（または血漿）濃度 - 時間プロファイルに通常従う。一般に、二重指数関数的薬物動態モデルは、この種の薬物動態プロファイルを最もよく表す。m A bについての中心区画(V c)における分布の容量は、血漿容量(2 - 3リットル)と通常等しくまたはこれより僅かに大きい。血清(血漿)濃度 - 時間曲線の分布相は長い吸収部分によってマスクされるので、血清(血漿)濃度対時間プロファイルにおける明確な二相パターンは、I MまたはS Cなどの他の非経口投与経路で明らかでない可能性がある。物理化学的特性、部位特異的および標的配向性受容体によって媒介される取り込み、組織の結合能力およびm A b用量を含む多数の因子がm A bの生体分布に影響を及ぼす可能性がある。これらの因子のいくつかは、m A bの生体分布における非線形性に寄与し得る。

30

【0172】

代謝および排泄：分子サイズのために、完全なモノクローナル抗体は、腎臓を介して尿中に排泄されない。これらは代謝（例えば、異化）によって主として不活性化される。I g Gを基礎とする治療用モノクローナル抗体の場合、半減期は通常数時間または1 - 2日から20日を超える範囲である。m A bの排除は、F c R n受容体に対する親和性、m A bの免疫原性、m A bのグリコシル化の程度、タンパク質分解に対するm A bの感受性および受容体によって媒介される排除を含むがこれらに限定されない多数の因子によって影響され得る。

40

【0173】

B 1 1：ヒトおよびt o x種に対する組織交差反応性パターン

同一の染色パターンは、潜在的なヒト毒性をt o x種において評価することが可能であることを示唆している。t o x種は、非関連毒性が研究される動物である。

【0174】

個々の抗体は、2つの基準を満たすように選択される。(1)抗体標的の知られている発現に適した組織染色。(2)同じ臓器由来のヒトとt o x種の組織間での類似した染色パターン。

【0175】

基準1：免疫化および/または抗体選択は、組み換えまたは合成された抗原(タンパク質、炭水化物または他の分子)を典型的に使用する。非関連抗原に対する天然の対応物お

50

よびカウンタースクリーンへの結合はしばしば治療用抗体のスクリーニング漏斗の一部である。しかし、数多くの抗原に対するスクリーニングはしばしば実際的でない。したがって、すべての主要臓器由来のヒト組織を用いた組織交差反応性研究は、あらゆる非関連抗原に対する抗体の望ましくない結合を除外するのに役立つ。

【0176】

基準2：ヒトおよびtox種の組織を用いた比較組織交差反応性研究（カニクイザル、イヌ、場合によるとげっ歯類など、同じ36または37種の組織がヒト研究と同様に試験される）は、tox種の選択を検証する助けとなる。凍結組織切片における典型的な組織交差反応性研究において、治療用抗体は、低レベルの相互作用（非特異的結合、類似した抗原への低レベルの結合、低レベルの電荷を基礎とする相互作用など）のいずれかを基礎とする、公知の抗原への予測された結合および/またはより低度の組織への結合を示し得る。いずれの場合においても、最適な毒性学的動物種は、ヒトおよび動物組織に対する最も高度の同時の結合を示すものである。

10

【0177】

組織交差反応性研究は、EC CPMP Guideline III/5271/94「Production and quality control of mAbs」および1997 US FDA/CBER「Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use」を含む適切な規制ガイドラインに従っている。剖検または生検において得られたヒト組織の凍結切片（5 μ m）はオブジェクトガラス上で固定し乾燥させた。アビジン-ビオチン系を使用して組織切片のペルオキシダーゼ染色が行われた。FDA's Guidance「Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use」。関連する参考文献には、Clarke J 2004, Boon L. 2002a, Boon L 2002b, Ryan A 1999が含まれる。

20

【0178】

組織交差反応性研究は2つの段階でしばしば行われ、第一段階は、1名のヒトドナーから得られた32種の組織（典型的に、副腎、胃腸管、前立腺、膀胱、心臓、骨格筋、血液細胞、腎臓、皮膚、骨髄、肝臓、脊髄、乳房、肺、脾臓、小脳、リンパ節、精巣、大脳皮質、卵巣、胸腺、結腸、膵臓、甲状腺、内皮、副甲状腺、尿管、眼、下垂体、子宮、ファロピウス管および胎盤）の凍結切片を含む。第二段階において、完全な交差反応性研究が、3名の無関係な成人から得られた（副腎、血液、血管、骨髄、小脳、大脳、子宮頸部、食道、眼、心臓、腎臓、大腸、肝臓、肺、リンパ節、乳房乳腺、卵巣、卵管、膵臓、副甲状腺、末梢神経、下垂体、胎盤、前立腺、唾液腺、皮膚、小腸、脊髄、脾臓、胃、横紋筋、精巣、胸腺、甲状腺、扁桃、尿管、膀胱および子宮を含む）最大38種の組織を用いて行われる。研究は、典型的に最小限で2つの用量レベルにおいて行われる。

30

【0179】

治療用抗体（すなわち、試験品）およびアイソタイプ適合対照抗体は、アビジン-ビオチン複合体（ABC）検出のためにビオチン化することが可能である；他の検出方法は、FITCで（または別の方法で）標識された試験品の三次抗体検出または未標識の試験品を標識された抗ヒトIgGで予め複合体化することを含み得る。

40

【0180】

簡潔に述べると、剖検または生検において得られたヒト組織の凍結切片（約5 μ m）はオブジェクトガラス上で固定し乾燥させる。アビジン-ビオチン系を使用して組織切片のペルオキシダーゼ染色が行われる。最初に（予め複合体化する検出系の場合において）、試験品は、二次ビオチン化抗ヒトIgGとともにインキュベートされ、免疫複合体となる。試験品の最終濃度が2および10 μ g/mLの免疫複合体はオブジェクトガラス上の組織切片に添加され、次いで組織切片はアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼキットを用

50

いて30分間反応させた。その後、ペルオキシダーゼ反応の基質であるDAB(3,3'-ジアミノベンジジン)が組織染色のために4分間適用された。抗原-セファロースビーズは、陽性対照組織切片として使用される。

【0181】

あらゆる特異的染色が、問題の標的抗原の公知の発現を基礎として、予想される(例えば、抗原発現と一致する)または予想されない反応性であると判定される。特異的と判定されたあらゆる染色が、強度および頻度についてスコア化される。抗原または血清競合または遮断研究は、観察された染色が特異的であるか非特異的であるかを決定することにおいてさらに補助することができる。

【0182】

2つの選択された抗体が選択基準-適当な組織染色、ヒトと毒性学的動物の特定の組織間での染色の適合を満たすことが分かった場合、これらをDVD-Ig生成に選択することが可能である。

【0183】

組織交差反応性研究は最終的なDVD-Ig構築物を用いて繰り返さなければならない、しかしこれらの研究は本明細書において概略を述べる同じプロトコルに従うが、あらゆる結合が2つの親抗体のいずれにも由来し得、あらゆる説明されない結合が複雑な抗原競合研究を用いて確認される必要があるため、これらは評価がより複雑である。

【0184】

2つの親抗体が(1)予想されない組織交差反応性の知見の欠如および(2)対応するヒトと毒性学的動物の組織間の組織交差反応性の知見の適当な類似性について選択される場合、DVD-Igのような多重特異的分子を用いた組織交差反応性研究の複雑な企てが大いに単純化されることは容易に明らかである。

【0185】

B12: 特異性および選択性

所望の特異性および選択性を有するDVD-Ig分子を生成するために、同様に所望の特異性および選択性プロファイルを有する親mAbを生成および選択する必要がある。

【0186】

(各抗原について各々2つの)4つまたはそれ以上の結合部位のため、DVD-Igを用いた特異性および選択性についての結合研究は複雑であり得る。簡潔に述べると、DVD-Igを用いたELISA、BIAcore、KinExAまたは他の相互作用研究を使用する結合研究は、1つ、2つまたはそれ以上の抗原とDVD-Ig分子の結合をモニタリングする必要がある。BIAcore技術は、複数の抗原の順次的な独立した結合を分解することが可能であるが、ELISAを含むより伝統的な方法またはKinExAのようなより現代的な技術は可能でない。したがって、各親抗体の注意深い特徴付けは重要である。個々の各抗体が特異性について特徴付けられた後、DVD-Ig分子における個々の結合部位の特異性保持の確認は大いに単純化される。

【0187】

組み合わせてDVD-Igにする前に2つの親抗体が特異性について選択された場合、DVD-Igの特異性の決定の複雑な企てが大いに単純化されることは容易に明らかである。

【0188】

抗原-抗体相互作用研究は、ELISA(酵素結合免疫吸着検定法)、質量分析、化学的架橋、光散乱を用いたSEC、平衡透析、ゲル浸透、限外濾過、ゲルクロマトグラフィ、大帯域分析的SEC、微小分離超遠心(沈降平衡)、分光法、滴定微小熱量測定、(分析的超遠心機における)沈降平衡、(分析的超遠心機における)沈降速度、(BIAcoreを含む)表面プラズモン共鳴を含む多数の古典的なタンパク質間相互作用研究を含めて、多数の形態をとり得る。関連する参考文献には、John Wiley & Sons Inc.によって出版された「Current Protocols in Protein Science」, John E. Coligan, Ben M. Dunn

10

20

30

40

50

, David W. Speicher, Paul T. Wingfield (eds.) Volume 3, chapters 19 and 20 およびこれらの中に含まれる参考文献ならびに John Wiley & Sons Inc. によって出版された「Current Protocols in Immunology」, John E. Coligan, Barbara E. Bierer, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober (eds.) およびこの中に含まれる参考文献が含まれる。

【0189】

全血におけるサイトカイン放出：mAbとヒト血液細胞の相互作用は、サイトカイン放出アッセイによって調べることが可能である (Wing, M. G. Therapeutic Immunology (1995), 2 (4), 183 - 190; John Wiley & Sons Inc. によって出版された「Current Protocols in Pharmacology」, S. J. Enna, Michael Williams, John W. Ferkanay, Terry Kenakin, Paul Moser, (eds.); Madhusudan, S. Clinical Cancer Research (2004), 10 (19), 6528 - 6534; Cox, J. Methods (2006), 38 (4), 274 - 282; Choi, I. European Journal of Immunology (2001), 31 (1), 94 - 106)。簡潔に述べると、様々な濃度のmAbが、ヒト全血とともに24時間インキュベートされる。試験される濃度は、患者における典型的な血液レベル (100 ng/ml - 100 µg/ml を含むがこれらに限定されない) を模倣している最終濃度を含む広い範囲をカバーしているべきである。インキュベーション後、上清および細胞溶解物がIL-1R、TNF-、IL-1b、IL-6およびIL-8の存在について分析された。mAbについて生成されたサイトカイン濃度プロファイルは、陰性ヒトIgG対照および陽性LPSまたはPHA対照によって産生されたプロファイルと比較された。細胞上清と細胞溶解物の両方から得られたmAbによって示されるサイトカインプロファイルは、対照ヒトIgGと同等であった。一実施形態において、モノクローナル抗体は、ヒト血液細胞と相互作用して炎症性サイトカインを自発的に放出しない。

【0190】

(各抗原について各々2つの) 4つまたはそれ以上の結合部位のため、DVD-Igについてのサイトカイン放出研究は複雑である。簡潔に述べると、本明細書に記載されているサイトカイン放出研究は、全血または他の細胞系に対するDVD-Ig分子全体の効果を測定するが、分子のどの部分がサイトカイン放出を引き起こすかを分解することができる。いくつかの共精製細胞成分がそれ自体サイトカイン放出を引き起こす可能性があるため、サイトカイン放出が検出された後、DVD-Ig調製物の純度が確認されなければならない。純度が問題点とならない場合、(Fc部分の除去、結合部位の分離などを含むがこれらに限定されない) DVD-Igの断片化、結合部位突然変異導入または他の方法が、あらゆる観察結果を逆重畳積分するために使用される必要があり得る。組み合わせでDVD-Igにする前に2つの親抗体がサイトカイン放出の欠如について選択された場合、この複雑な企てが大いに単純化されることは容易に明らかである。

【0191】

B13：毒性学的研究のための他の種との交差反応性

一実施形態において、適当なtox種、例えばカニクイザルに対する十分な交差反応性を有する個々の抗体が選択される。親抗体は、オルソロガス種標的 (すなわち、カニクイザル) に結合し、適当な応答 (調節、中和、活性化) を惹起することが必要である。一実施形態において、オルソロガス種標的に対する交差反応性 (親和性/効力) は、ヒト標的の10倍以内であるべきである。実際に、親抗体は、マウス、ラット、イヌ、サル (および他の非ヒト霊長類) ならびに疾患モデル種 (すなわち、喘息モデルのヒツジ) を含む複数の種について評価される。親モノクローナル抗体のtox種に対する許容可能な交差反応性は、同じ種におけるDVD-Ig-Igの将来の毒性学的研究を可能にする。この理

10

20

30

40

50

由で、2つの親モノクローナル抗体は、通常のto x種について許容可能な交差反応性を有するべきであり、それによって同じ種におけるDVD-Igの毒性学的研究が可能になる。

【0192】

親mAbは、特異的な標的に結合することができる、本分野において周知の様々なmAbから選択され得る。これらには、抗TNF抗体(米国特許第6,258,562号)、抗IL-12および/または抗IL-12p40抗体(米国特許第6,914,128号);抗IL-18抗体(US2005/0147610A1)、抗C5、抗CBL、抗CD147、抗gp120、抗VLA-4、抗CD11a、抗CD18、抗VEGF、抗CD40L、抗CD40(例えば、WO2007124299参照)、抗Id、抗ICAM-1、抗CXCL13、抗CD2、抗EGFR、抗TGF-2、抗HGF、抗cMet、抗DLL-4、抗NPR1、抗PLGF、抗ErbB3、抗E-セクチン、抗第VII因子、抗Her2/neu、抗Fgp、抗CD11/18、抗CD14、抗ICAM-3、抗RON、抗CD-19、抗CD80(例えば、WO2003039486参照)、抗CD4、抗CD3、抗CD23、抗2-インテグリン、抗47、抗CD52、抗HLADR、抗CD22(例えば、米国特許第5,789,554参照)、抗CD20、抗MIF、抗CD64(FcR)、抗TCR、抗CD2、抗HepB、抗CA125、抗EpCAM、抗gp120、抗CMV、抗gpIIbIIIa、抗IgE、抗CD25、抗CD33、抗HLA、抗IGF-1,2、抗IGFR、抗VNRインテグリン、抗IL-1、抗IL-1、抗IL-1受容体、抗IL-2受容体、抗IL-4、抗IL-4受容体、抗IL-5、抗IL-5受容体、抗IL-6、抗IL-6R、RANKL、NGF、DKK、V3、抗IL-17A、抗IL-8、抗IL-9、抗IL-13、抗IL-13受容体、抗IL-17および抗IL-23;IL-23p19;抗MTX;抗NKG2D(Presta LG.2005 Selection, design, and engineering of therapeutic antibodies J Allergy Clin Immunol.116:731-6およびhttp://www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/antibodies.html参照)が含まれるが、これらに限定されるものではない。

10

20

30

【0193】

親mAbは、使用が認可された、臨床試験中のまたは臨床的用途のために開発中の様々な治療用抗体からも選択され得る。このような治療用抗体には、リツキシマブ(Rituxan(登録商標), IDEC/Genentech/Roche)(例えば、米国特許第5,736,137号参照)、非ホジキンリンパ腫を治療するために認可されたキメラ抗CD20抗体;HuMax-CD20、Genmabによって現在開発中の抗CD20、米国特許第5,500,362号に記載されている抗CD20抗体、AME-133(Applied Molecular Evolution)、hA20(Immunoedics, Inc.)、HumALYM(Intracel)およびPRO70769(「Immunoglobulin Variants and Uses Thereof」と題されたPCT/US2003/040426)、トラスツズマブ(Herceptin(登録商標)、Genentech)(例えば、米国特許第5,677,171号参照)、乳癌を治療するために認可されたヒト化抗Her2/neu抗体;ペルツズマブ(rhuMab-2C4、Omnitarg(登録商標))、Genentechによって現在開発中;米国特許第4,753,894号に記載されている抗Her2抗体;セツキシマブ(Erbibitux(登録商標)、Imclone)(米国特許第4,943,533号;PCT WO96/40210)、様々な癌に対する臨床試験中のキメラ抗EGFR抗体;ABX-EGF(米国特許第6,235,883号)、Abgenix-Immunes-Amgenによって現在開発中;HuMax-EGFr(U.S.Ser.NO.10/172,317)、Genmabによって現在開発中;425、EMD55900、EMD62000およびEMD72000(Merck KGaA)(米国

40

50

特許第5,558,864号; Murthy et al. 1987, Arch Biochem Biophys. 252(2): 549-60; Rodeck et al., 1987, J Cell Biochem. 35(4): 315-20; Kettleborough et al., 1991, Protein Eng. 4(7): 773-83); ICR62 (Institute of Cancer Research) (PCT WO95/20045; Modjtahedi et al., 1993, J. Cell Biophys. 1993, 22(1-3): 129-46; Modjtahedi et al., 1993, Br J Cancer. 1993, 67(2): 247-53; Modjtahedi et al., 1996, Br J Cancer. 73(2): 228-35; Modjtahedi et al., 2003, Int J Cancer, 105(2): 273-80); TheraCIM hR3 (YM Biosciences, Canada and Centro de Immunologia Molecular, Cuba (米国特許第5,891,996号; 米国特許第6,506,883号; Mateo et al., 1997, Immunotechnology, 3(1): 71-81); mAb-806 (Ludwig Institute for Cancer Research, Memorial Sloan-Kettering) (Jungbluth et al. 2003, Proc Natl Acad Sci USA. 100(2): 639-44); KSB-102 (KS Biomedix); MR1-1 (IVAX, National Cancer Institute) (PCT WO0162931A2); および SC100 (Scancell) (PCT WO01/88138); アレムツズマブ (Campath (登録商標)、Millenium)、B細胞慢性リンパ性白血病の治療に対して現在認可されているヒト化mAb; ム口モナブ-CD3 (Orthoclone OKT3 (登録商標))、Ortho Biotech/Johnson & Johnsonによって開発された抗CD3抗体、イブリツモマブ・チウキセタン (Zevalin (登録商標))、IDEC/Schering AGによって開発された抗CD20抗体、ゲムツズマブ・オゾガマイシン (Mylotarg (登録商標))、Celltech/Wyethによって開発された抗CD33 (p67タンパク質) 抗体、アレファセプト (Amevive (登録商標))、Biogenによって開発された抗LFA-3Fc融合、Centocor/Lillyによって開発されたアプシキシマブ (Reopro (登録商標))、Novartisによって開発されたパシリキシマブ (Simulect (登録商標))、Medimmuneによって開発されたパリジズマブ (Synagis (登録商標))、インフリキシマブ (Remicade (登録商標))、Centocorによって開発された抗TNF抗体、アダリムマブ (Humira (登録商標))、Abbottによって開発された抗TNF抗体、Humicade (登録商標)、Celltechによって開発された抗TNF抗体、ゴリムマブ (CNTO-148)、Centocorによって開発された完全ヒトTNF抗体、エタネルセプト (Enbrel (登録商標))、ImmuneX/Amgenによって開発されたp75TNF受容体Fc融合、レネルセプト、Rocheによって以前に開発されたp55TNF受容体Fc融合、ABX-CBL、Abgenixによって開発されている抗体CD147抗体、ABX-IL8、Abgenixによって開発されている抗IL8抗体、ABX-Mal、Abgenixによって開発されている抗MUC18抗体、ペムツモマブ (R1549, 90Y-muHMFGL)、Antisomaによって開発中の抗MUC1、Therex (R1550)、Antisomaによって開発されている抗MUC1抗体、Antisomaによって開発されているAngioMab (AS1405)、Antisomaによって開発されているHuBC-1、Antisomaによって開発されているThioplatin (AS1407)、Antegren (登録商標) (ナタリズマブ)、Biogenによって開発されている抗-4- -1 (VLA-4) および -4- -7-抗体、VLA-1mAb、Biogenによって開発されている抗VLA-1インテグリン抗体、LTBRmAb、Biogenによって開発されている抗リンホトキシン受容体 (LTBR) 抗体、CAT-15

2、Cambridge Antibody Technologyによって開発されている抗TGF- β 2抗体、ABT874(J695)、Abbottによって開発されている抗IL-12p40抗体、CAT-192、Cambridge Antibody TechnologyおよびGenzymeによって開発されている抗TGF- β 1抗体、CAT-213、Cambridge Antibody Technologyによって開発されている抗エオタキシン1抗体、Cambridge Antibody TechnologyおよびHuman Genome Sciences Inc.によって開発されているLymphostat-B(登録商標)抗BlyS抗体、TRAIL-R1mAb、Cambridge Antibody TechnologyおよびHuman Genome Sciences Inc.によって開発されている抗TRAIL-R1抗体、Avastin(登録商標)ベパシズマブ、rhUMAb-VEGF)、Genentechによって開発されている抗VEGF抗体、Genentechによって開発されている抗HER受容体ファミリー抗体、抗組織因子(ATF)、Genentechによって開発されている抗組織因子抗体、Xolair(登録商標)(オマリズマブ)、Genentechによって開発されている抗IgE抗体、Raptiva(登録商標)(エフェリズマブ)、GenentechおよびXomaによって開発されている抗CD11a抗体、MLN-02抗体(旧LDP-02)、GenentechおよびMillenium Pharmaceuticalsによって開発されている、HuMax CD4、Genmabによって開発されている抗CD4抗体、HuMax-IL15、GenmabおよびAmgenによって開発されている抗IL15抗体、GenmabおよびMedarexによって開発されているHuMax-Inflam、HuMax-Cancer、GenmabおよびMdarexおよびOxford GcoSciencesによって開発されている抗ヘパラナーゼI抗体、GenmabおよびAmgenによって開発されているHuMax-Lymphoma、Genmabによって開発されているHuMax-TAC、IDEC-131およびIDEC Pharmaceuticalsによって開発されている抗CD40L抗体、IDEC-151(クレノリキシマブ)、IDEC Pharmaceuticalsによって開発されている抗CD4抗体、IDEC-114、IDEC Pharmaceuticalsによって開発されている抗CD80抗体、IDEC-152、IDEC Pharmaceuticalsによって開発されている抗CD23、IDEC Pharmaceuticalsによって開発されている抗マクロファージ遊走因子(MIF)抗体、BEC2、Imcloneによって開発されている抗イデオタイプ抗体、IMC-1C11、Imcloneによって開発されている抗KDR抗体、DC101、Imcloneによって開発されている抗flk-1抗体、Imcloneによって開発されている抗VEカドヘリン抗体、CEA-Cide(登録商標)(ラベツズマブ)、Immunomedicsによって開発されている抗癌胎児抗原(CEA)抗体、LymphoCide(登録商標)(エブラツズマブ)、Immunomedicsによって開発されている抗CD22抗体、Immunomedicsによって開発されているAFP-Cide、Immunomedicsによって開発されているMyelomaCide、Immunomedicsによって開発されているLkoCide、Immunomedicsによって開発されているProstaCide、MDX-010、Medarexによって開発されている抗CTLA4抗体、MDX-060、Medarexによって開発されている抗CD30抗体、Medarexによって開発されているMDX-070、Medarexによって開発されているMDX-018、Osidem(登録商標)(IDM-I)ならびにMedarexおよびImmuno-Designed Moleculesによって開発されている抗Her2抗体、HuMax(登録商標)-CD4、MedarexおよびGenmabによって開発されている抗CD4抗体、HuMax-IL15、MedarexおよびGenmabによって開発されている抗IL15抗体、CNTO148、MedarexおよびCentocor/J&Jによって開発されている抗TNF抗体、CNTO1275、Centocor/J&Jによって開発されている抗サイトカイン抗体、MOR101およびMO

R102、MorphoSysによって開発されている抗細胞間接着分子-1 (ICAM-I) (CD54) 抗体、MOR201、MorphoSysによって開発されている抗線維芽細胞増殖因子受容体受容体3 (FGFR-3) 抗体、Nuvion (登録商標) (ピシリズマブ)、Protein Design Labsによって開発されている抗CD3抗体、HuZAF (登録商標)、Protein Design Labsによって開発されている抗インターフェロン抗体、Protein Design Labsによって開発されている抗51インテグリン、Protein Design Labsによって開発されている抗IL-12、ING-1、Xomaによって開発されている抗

Ep-CAM抗体、GenentechおよびNovartisによって開発されたXolair (登録商標) (オマリズマブ) ヒト化抗IgE抗体ならびにMLN01、Xomaによって開発されている抗2インテグリン抗体が含まれ、この段落において本明細書で引用される参考文献はすべて、参照により本明細書に明確に組み込まれるが、これらに限定されるものではない。別の実施形態において、治療薬には、KRN330 (Kirin); huA33抗体 (A33、Ludwig Institute for Cancer Research); CNTO 95 (V3インテグリン、Centocor); MEDI-522 (V3インテグリン、Medimmune); ボロシキシマブ (V1インテグリン、Biogen/PDL); ヒトmAb216 (B細胞グリコシル化エピトープ、NCI); BiTE MT103 (二重特異的CD19xCD3、Medimmune); 4G7xH22 (二重特異的B細胞xFcR1、Medarex/Merck KGa); rM28 (二重特異的CD28xMAPG、米国特許第EP1444268号); MDX447 (EMD 82633) (二重特異的CD64xEGFR、Medarex); カツマキシマブ (リムバブ) (二重特異的EpCAMx抗CD3、Trion/Fres); エルツマキシマブ (二重特異的HER2/CD3、Fresenius Biotech); オレゴボマブ (OvaRex) (CA-125、ViRex); Rencarex (登録商標) (WX G250) (炭酸脱水酵素IX、Wilex); CNTO 888 (CCL2、Centocor); TRC105 (CD105 (エンドグリン)、Tracon); BMS-663513 (CD137アゴニスト、Bristol Myers Squibb); MDX-1342 (CD19、Medarex); シプリズマブ (MEDI-507) (CD2、Medimmune); オファツムマブ (Humax-CD20) (CD20、Genmab); リツキシマブ (Rituxan) (CD20、Genentech); ベルツズマブ (hA20) (CD20、Immunomedics); エブラツズマブ (CD22、Amgen); ルミリキシマブ (IDEC 152) (CD23、Biogen); ム口モナブ-CD3 (CD3、Ortho); HuM291 (CD3fc受容体、PDL Biopharma); HeFi-1, CD30, NCI); MDX-060 (CD30、Medarex); MDX-1401 (CD30、Medarex); SGN-30 (CD30、Seattle Genentics); SGN-33 (リンツズマブ) (CD33、Seattle Genentics); ザノリムマブ (HuMax-CD4) (CD4、Genmab); HCD122 (CD40、Novartis); SGN-40 (CD40、Seattle Genentics); Campath1h (アレムツズマブ) (CD52、Genzyme); MDX-1411 (CD70、Medarex); hLL1 (EPB-1) (CD74.38、Immunomedics); ガリキシマブ (IDEC-144) (CD80、Biogen); MT293 (TRC093/D93) (切断されたコラーゲン、Tracon); HuLuc63 (CS1、PDL Pharma); イビリムマブ (MDX-010) (CTLA4、Bristol Myers Squibb); トレメリムマブ (チシリムマブ、CP-675, 2) (CTLA4、Pfizer); HGS-ETR1 (マパツムマブ) (DR4 TRAIL-R1アゴニスト、Human Genome Science / Glaxo Smith Kline); AMG-655 (DR5、Amgen); アボマブ (DR5、Genentech); CS-1008 (DR

10

20

30

40

50

5、Daiichi Sankyo); HGS-ETR2 (レクサツムマブ) (DR5 TRAIL-R2アゴニスト、HGS); セツキシマブ (Erbibix) (EGFR、Imclone); IMC-11F8 (EGFR、Imclone); ニモツズマブ (EGFR、YM Bio); パニツムマブ (Vectabix) (EGFR、Amgen); ザルツムマブ (HuMaxEGFR) (EGFR、Genmab); CDX-110 (EGFRvIII、AVANT Immunotherapeutics); アデカツムマブ (MT201) (Epcam、Merck); エドレコロマブ (Panorex、17-1A) (Epcam、Glaxo/Centocor); MORAb-003 (葉酸受容体a、Morphotech); KW-2871 (ガングリオシドGD3、Kyowa); MORAb-009 (GP-9、Morphotech); CDX-1307 (MDX-1307) (hCGb、Celldex); トラストズマブ (Herceptin) (HER2、Celldex); ペルツズマブ (rhumaB2C4) (HER2 (DI)、Genentech); アポリズマブ (HLA-DR 鎖、PDL Pharma); AMG-479 (IGF-1R、Amgen); 抗IGF-1R R1507 (IGF1-R、Roche); CP 751871 (IGF1-R、Pfizer); IMC-A12 (IGF1-R、Imclone); BIIB022 (IGF-1R、Biogen); MiK-1 (IL-2Rb (CD122)、Hoffman La Roche); CNT0328 (IL6、Centocor); 抗KIR (1-7F9) (キラー細胞Ig様受容体 (KIR)、Novo); Hu3S193 (Lewis(y)、Wyeth, Ludwig Institute of Cancer Research); hCBE-11 (LTR、Biogen); HuHMFG1 (MUC1、Antisoma/NCI); RAV12 (N結合炭水化物エピトープ、Raven); CAL (副甲状腺ホルモン関連タンパク質 (PTH-rP)、University of California); CT-011 (PD1、CureTech); MDX-1106 (ono-4538) (PD1、Medarex/Ono); MAb CT-011 (PD1、Curetech); IMC-3G3 (PDGFRA、Imclone); バビツキシマブ (ホスファチジルセリン、Peregrine); huJ591 (PSMA、Cornell Research Foundation); muJ591 (PSMA、Cornell Research Foundation); GC1008 (TGFb (汎性) 阻害剤 (IgG4)、Genzyme); インフリキシマブ (Remicade) (TNFa、Centocor); A27.15 (トランスフェリン受容体、Salk Institute, INSERN WO 2005/111082); E2.3 (トランスフェリン受容体、Salk Institute); ベバシズマブ (Avastin) (VEGF、Genentech); HuMV833 (VEGF、Tsukuba Research Lab-WO/2000/034337, University of Texas); IMC-18F1 (VEGFR1、Imclone); IMC-1121 (VEGFR2、Imclone) が含まれる。

【0194】

C. DVD分子の構築

二重可変ドメイン免疫グロブリン (DVD-Ig) 分子は、2つの異なる親モノクローナル抗体由来の2つの異なる軽鎖可変ドメイン (VL) が、組み換えDNA技術によって、直接または短いリンカーを介して直列に連結され、その後に軽鎖定常ドメインが続くように設計される。同様に、重鎖は、直列に連結された2つの異なる重鎖可変ドメイン (VH) の後に、定常ドメインCH1およびFc領域 (図1A) を含む。

【0195】

可変ドメインは、本明細書に記載されている方法のいずれか1つによって作製された親抗体から得られた組み換えDNA技術を用いて取得することが可能である。一実施形態において、可変ドメインは、マウス重鎖または軽鎖可変ドメインである。別の実施形態において、可変ドメインは、CDR移植されたまたはヒト化された可変重鎖または軽鎖ドメインである。一実施形態において、可変ドメインは、ヒト重鎖または軽鎖可変ドメインであ

る。

【0196】

一実施形態において、第一および第二の可変ドメインは、組み換えDNA技術を用いて、互いに直接連結されている。別の実施形態において、可変ドメインは、リンカー配列を介して連結されている。一実施形態において、2つの可変ドメインが連結されている。3つ以上の可変ドメインも、直接またはリンカー配列を介して連結され得る。可変ドメインは、同じ抗原に結合し得、または異なる抗原に結合し得る。いくつかの実施形態において、DVD分子は、1つの免疫グロブリン可変ドメインおよび受容体のリガンド結合ドメイン、酵素の活性ドメインなどの1つの非免疫グロブリン可変ドメインを含み得る。DVD分子は、2つ以上の非Igドメインも含み得る。

10

【0197】

リンカー配列は、単一のアミノ酸またはポリペプチド配列であり得る。一実施形態において、リンカー配列は、AKTTPKLEEGEFSEAR (配列番号1); AKTTPKLEEGEFSEARV (配列番号2); AKTTPKLG (配列番号3); SAKTTPKLG (配列番号4); SAKTTP (配列番号5); RADAAP (配列番号6); RADAAPT V S (配列番号7); RADAAGA G P G S (配列番号8); RADAAGA (G₄S)₄ (配列番号9); SAKTTPKLEEGEFSEARV (配列番号10); ADAAP (配列番号11); ADAAPT V S I F P P (配列番号12); TVAAP (配列番号13); TVAAP S V F I F P P (配列番号14); QPKAAP (配列番号15); QPKAAP S V T L F P P (配列番号16); AKTTPP (配列番号17); AKTTP P S V T P L A P (配列番号18); AKTTAP (配列番号19); AKTTAP S V Y P L A P (配列番号20); ASTKGP (配列番号21); ASTKGP S V F P L A P (配列番号22); GGGGSGGGGSGGGGS (配列番号23); GENKVEYAPALMALS (配列番号24); GPAKELTPLKEAKVS (配列番号25); またはGHEAAAVMQVQYPAS (配列番号26)である。リンカー配列の選択は、いくつかのFab分子の結晶構造分析に基づいている。Fabまたは抗体分子構造中の可変ドメインとCH1/CL定常ドメインの間には、天然の柔軟な連結が存在する。この天然の連結は、VドメインのC末端由来の4-6残基およびCL/CH1ドメインのN末端由来の4-6残基によって構成される約10から12個のアミノ酸残基を含む。DVDIgは、それぞれ、DVD-Igの軽鎖および重鎖中のリンカーとしてCLまたはCH1のN末端の5から6アミノ酸残基、または11から12アミノ酸残基を用いて作製された。CLまたはCH1ドメインのN末端残基、特に最初の5から6個のアミノ酸残基は、強い二次構造なしにループ立体構造を採り、したがって、2つの可変ドメイン間の柔軟なリンカーとして作用することが可能である。CLまたはCH1ドメインのN末端残基は、Ig配列の一部であるので、可変ドメインの天然の伸長であり、したがって、リンカーおよび連結から生じ得るいずれの免疫原性を、大きな程度まで最小限に抑える。

20

30

【0198】

他のリンカー配列は、CL/CH1ドメインのあらゆる長さのあらゆる配列を含み得るが、CL/CH1ドメインのすべての残基は含まない。例えば、CL/CH1ドメインの最初の5から12個のアミノ酸残基; 軽鎖リンカーは、C₁ またはC₂ に由来することが可能であり; ならびに重鎖リンカーは、C₁、C₂、C₃、C₄、C₁、C₂、C₃、C₄ およびC_μを含む、いずれかのアイソタイプのCH1に由来することが可能である。リンカー配列は、Ig様タンパク質 (例えば、TCR、FcR、KIR)、G/Sを基礎とする配列 (例えば、G₄Sリピート; 配列番号27); ヒンジ領域に由来する配列および他のタンパク質から得られる他の天然配列などの他のタンパク質からも由来し得る。

40

【0199】

一実施形態において、定常ドメインは、組み換えDNA技術を用いて、2つの連結された可変ドメインに連結されている。一実施形態において、連結された重鎖可変ドメインを

50

含む配列は、重鎖定常ドメインに連結され、連結された軽鎖可変ドメインを含む配列は、軽鎖定常ドメインに連結される。一実施形態において、定常ドメインは、それぞれ、ヒト重鎖定常ドメインおよびヒト軽鎖定常ドメインである。一実施形態において、DVD重鎖は、Fc領域にさらに連結されている。Fc領域は、固有配列のFc領域またはバリエーションFc領域であり得る。別の実施形態において、Fc領域は、ヒトFc領域である。別の実施形態において、Fc領域には、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgEまたはIgDから得られるFc領域が含まれる。

【0200】

別の実施形態において、2つの重鎖DVDポリペプチドおよび2つの軽鎖DVDポリペプチドは組み合わされて、DVD-Ig分子を形成する。表2は、疾患の治療、例えば癌の治療に有用な標的の例示的な抗体のVHおよびVL領域のアミノ酸配列を列挙している。一実施形態において、あらゆる配向における、表2に列挙されたVHおよび/またはVL領域の少なくとも2つを含むDVDが提供される。いくつかの実施形態において、VD1およびVD2は、独立して選択される。したがって、いくつかの実施形態において、VD1およびVD2は同じ配列番号を含み、他の実施形態において、VD1およびVD2は異なる配列番号を含む。以下に提供されるVHおよびVLドメイン配列は、当該技術分野において知られているまたは当該技術分野において知られている方法を用いて容易に識別できる、相補性決定領域(CDR)およびフレームワーク配列を含む。いくつかの実施形態において、1つ以上のこれらのCDRおよび/またはフレームワーク配列は、機能を損なうことなしに、当該技術分野において同抗原に結合することが知られている結合タンパク質由来の他のCDRおよび/またはフレームワーク配列によって置換される。

【0201】

10

20

【表 2】

表 2: DVD-Ig を作製するための抗体の VH および VL 領域のアミノ酸配列のリスト

配列番号	ABT 固有 ID	タンパク質領域	配列
			1234567890123456789012345678901234567890
28	AB001VH	VH-CD20	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTF TSYNMHWVKQT PGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSA
29	AB001VL	VL-CD20	QIVLSQSPAILSPSPGKVTMTCRASSSVSYIHWFOQKPG SSPKPWIYATSNLASGVVRFSGSGSGTSSYSLTISRVEAE DAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKR
30	AB002VH	VH-CD3 (配列 1)	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQR PGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYCARYDDHYCLDYWGQGTTLTVSS
31	AB002VL	VL-CD3 (配列 1)	QIVLTQSPAIMASAPGKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSG TSPKRWIYDTSKVASGVVRFSGSGSGTSSYSLTISSEAE DAATYYCQQWSSNPLTFGSGTKLEINR
32	AB003VH	VH-EGFR (配列 1)	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSVSSGDYWTWIR QSPGKLEWIGHIYYSNTNPNLSKSRLLTISIDTSKTQF SLKLSVTAADTAIYYCVRDRVTGAFDIWGQGTMTVTVSS
33	AB003VL	VL-EGFR (配列 1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCQASQDISNYLNWYQQKP GKAPKLLIYDASNLETGVPSPRFSGSGSGTDFTFITISLQP EDIATYFCQHFHDLPLAFGGGKVEIKR
34	AB004VH	VH-HER2	EVQLVDSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA PGKLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTTLTVTVSS
35	AB004VL	VL-HER2	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDVNTAVAWYQQKP GKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQP EDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTVEIKR
36	AB005VH	VH - RON (配列 1)	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQA PGKLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCARFSGWPNNYYYYGMDVWGQGTTV TVSS
37	AB005VL	VL - RON (配列 1)	DVVMTQSPPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLLSHNGFNVDW YLQKPGQSPHLLIYFGSYRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQALQTPPWTFGQGTVEIRR
38	AB006VH	VH-CD19	QVQLQQSGAELVLRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNHWVKQR PGQGLEWIGQIWPGDGDTNYNGKFKGKATLTADESSSTAY MQLSSLASEDSAVYYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQGTSTV TVSS
39	AB006VL	VL-CD19	DILLTQTPASLAVSLGQRATISCKASQSDYDGDYSYLNWY QQIPGQPPKLLIYDASNLVSGIIPRFSGSGSGTDFTLNIH PVEKVDAAATYHCQQSTEDPWTFGGGTKLEIKR
40	AB007VH	VH-CD80	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGGSISGGYGWGWIRO PPGKLEWIGSFYSSSGNTYYNPSLKSQVTISTDTSKNQF SLKLNMTAADTAVYYCVRDRLFSVVMVYNNWFDVWGP VLVTVSS
41	AB007VL	VL-CD80	ESALTQPPSVSGAPGQKVTISCTGSTSNIGGYDLHWYQQ PGTAPKLLIYDINKRPSGISDRFSGSKSGTAASLAITGLQ TEDEADYYCQSYDSSLNAQVFGGGTRTLTVLG
42	AB008VH	VH-CD22	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFYSYWLHWVRQA PGQGLEWIGYINPRNDYTEYNQNFKDKATITADESTNTAY MELSSLRSEDTAFYFCARRDITTFYWGQGTTLTVTVSS

10

20

30

40

配列番号	ABT 固有 ID	タンパク質領域	配列
			1234567890123456789012345678901234567890
43	AB008VL	VL-CD22	DIQLTQSPSSLSASVGDVRTMSCKSSQSVLYSANHKNYLA WYQQKPKGKAPKLLIYWASTRESGVPSRFRSGSGSGTDFTF ISSLQPEDIATYYCHQYLSSWTFGGGTKLEIKR
44	AB009VH	VH-CD40	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQA PGKGLEWVAVISYEESNRYHADSVKGRFTISRDNKITLY LQMNSLRTEDTAVYYCARDGGIAAPGPDYWGQGLTVTVSS
45	AB009VL	VL-CD40	DIVMTQSPPLSLTVPPEPASISCRSSQSLLYSNGYNYLDW YLQKPGQSPQVLIISLGSNRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQARQTFPTFGPGTKVDIRR
46	AB010VH	VH - IGF1,2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYDINWVRQA TGQGLEWMGMNPNPNSGNTGYAQKFGQGRVTMTRNTSISTAY MELSSLRSEDTAVYYCARDPYYYYGMDVWGQGLTVTVSS
47	AB010VL	VL - IGF1,2	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIENNHVSWYQQQL PGTAPKLLIYDNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQ TGDEADYYCETWDTLSAGRVFEGGTKLTVLG
48	AB011VH	VH-IGF1R	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSSYAMNWVRQA PGKGLEWVSAISGSGGTFYADSVKGRFTISRDNRTTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKDLGWSDSYYYYYGMVWGQGLT VTVSS
49	AB011VL	VL-IGF1R	DIQMTQFPSSLSASVGDVRTITCRASQGI RNDLGWYQQKP GKAPKRLIYAASRLHRGVPSRFRSGSGSGTEFTLT ISSLQ EDFATYYCLOHNSYPCSFQGGTKLEIKR
50	AB012VH	VH-HGF	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSDYYMSWIRQA PGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARDEYNSGWYVLFYWGQGLTVTV SS
51	AB012VL	VL-HGF	DIQMTQSPSSVSVASVGDVRTITCRASQGISSWLAWYQQKP GKAPNLLIYEASSLQSGVPSRFRGGSGSGTDFTLT ISSLQ EDFATYYCQQANGFPWTFGQGTKVEIKR
52	AB013VH	VH-cMET	QVQLQQSGPELVVRPGASVKWSCPASGYTFTSYWLHWVKKQ RPGQGLEWIGMIDPNSDTRFNPPNFKDKATLNVDRSNT AYNLLSSLTSAADSAVYYCATYGSYVSPLDYWGQGTSVYVS S
53	AB013VL	VL-cMET	DIMMSQSPSSLTVSVGKVTVSCSSQSLLVTSQKNYLA WYQQKPKQQSPKLLIYWASTRESGVDPDRFTGSGSGTDFTLT ITSVKADDLAVYYCQQYYAYPWTFGDGKLEIKR
54	AB014VH	VH-VEGF (配列 1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFTNYGMNWVRQA PGKGLEWVGWINTYTGEPYAADFKRRFTFSLDTSKSTAY LQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYGSSHWYFDVWGQGLTVT VSS
55	AB014VL	VL-VEGF (配列 1)	DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCSASQDISNYLNWYQQKP GKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFRSGSGSGTDFTLT ISSLQ EDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKR
56	AB015VH	VH-DLL4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFTDNWISWVRQA PGKGLEWVGYSNPNSGFTYYADSVKGRFTISADTSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYFDYWGQGLTVTVSS
57	AB015VL	VL-DLL4	DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQDVSTAVAWYQQKP GKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFRSGSGSGTDFTLT ISSLQ EDFATYYCQQSYTGTVTFGQGTKVEIKR
58	AB016VH	VH-NRP1 (配列 1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSSSEPI SWVRQA PGKGLEWVSSITGKNGYTYADSVKGRFTISADTSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYCARWGKVKVYGMVWGQGLTVTVSS
59	AB016VL	VL-NRP1 (配列 1)	DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQSISSYLAWYQQKP GKAPKLLIYGASSRASGVPSRFRSGSGSGTDFTLT ISSLQ EDFATYYCQQYMSVPIITFGQGTKVEIKR
60	AB020VH	VH-NGF (配列 1)	QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWRQP PGKGLEWIGI IWDGTTDYNSAVKSRVTISKDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYYFDYWGQGLTVTVS S

10

20

30

40

配列番号	ABT 固有 ID	タンパク質領域	配列			
			1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
61	AB020VL	VL-NGF (配列 1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQSI SNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTTRFHSVPSRFRSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQEHTLPYTFGQGTKLEIKR			
62	AB033VH	VH-EGFR (配列 2)	QVQLKQSGPGLVQPSSQLSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWISGGNTDYNTPEFTSRLSINKDNSKQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSA			
63	AB033VL	VL-EGFR (配列 2)	DILLTQSPVILSVSPGERVFSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFRSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNWPTTFGAGTKLEIKR			
64	AB034VH	VH-RON (配列 2)	QVQLQESGPGLVKPSEILSLTCTVSGGSSISHYWSWVRQPPGKGLEWIGYIYSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLNLSVTAADTAVYYCARI PNYDRSGYYPGYWYFDLWGRGTLVTVSS			
65	AB034VL	VL-RON (配列 2)	QAVLTQSPSSLSAPPASASLTCTLRSGFNVDYSRISWYQQKPGSPPQYLLRYKSDSDKQQGSGVPSRFRSGSKDASANAGILLISGLQSEDEADYYCMIWHSSAWVFGGKTLTVLR			
66	AB035VH	VH-NRP1 (配列 2)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVWQISPAAGYTNADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARELPYYRMSKVMQVQGGTLVTVSS			
67	AB035VL	VL-NRP1 (配列 2)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQYFSSYLAWYQQKPGKAPKLLIYGASSRASGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLGSPPTFGQGTKVEIKR			
68	AB039VH	VH-CD3 (配列 2)	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSS			
69	AB039VL	VL-CD3 (配列 2)	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAAHFRGSGSGTYSYSLTISGMEEADAATYYCQQWSSNPPTFGSGTKLEINR			
70	AB047VH	VH-P1GF	QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFDYYINWVKLAPGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATLTTIDTSSSTAYMQLSSLTSEDVAVYYFCVRDSPFFDYWGQGTLLTVSS			
71	AB047VL	VL-P1GF	DIVLTQSPDSLAVSLGERVTMNCSSQSLNLSGMRKSFLLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDVAVYYCQSYHLFTFGSGTKLEIKR			
72	AB062VH	VH-ERBB3 (配列 1)	QVQLQQWGAGLLKPSSETLSLTCVAVYGGFSFGYYSWIRQPPGKGLEWIGVINHSNSTNYNPSLKSRTISVETSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFDLWGRGTLVTVSS			
73	AB062VL	VL-ERBB3 (配列 1)	DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSNRNYLAWYQQNPGQP KLLIYWASTRESGVPDRFRSGSGSGTDFTLTISSLQAEADVAVYYCQQYYSTPRTFGQGTKVEIKR			
74	AB063VH	VH-ERBB3 (配列 2)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARDRGDFDAFDIWGQGTMTVTVSS			
75	AB063VL	VL-ERBB3 (配列 2)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCQASQDITNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFRSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYNCQQCENFPITFGQGRLEIKR			
76	AB064VH	VH-EGFR (配列 3)	QVQLQESGPGLVKPSQTLTSLTCTVSGYSISSDFAWNWIROPGKGLEWIMGYISYSGNTRYQPSLKSRTISRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGPYWGQGLVTVSS			
77	AB064VL	VL-EGFR (配列 3)	DIQMTQSPSSMSVSVGDRTTITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLDGVP SRFRSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGKLEIKR			
78	AB070VH	VH-VEGF (配列 2)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQGLVTVSS			
79	AB070VL	VL-VEGF (配列 2)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVEIKR			

10

20

30

40

配列番号	ABT固有ID	タンパク質領域	配列
			1234567890123456789012345678901234567890
80	AB103VH	VH-VEGF (配列 3)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQA PGKGLEWVGVWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAY LQMNLSRAEDTAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLT VSS
81	AB103VL	VL-VEGF (配列 3)	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQQK GKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ EDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKR
82	AB116VH	VH-ERBB3 (配列 3)	EVQLLESAGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYVMAWVRQA PGKGLEWVSSISSGGWTLYADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMNLSRAEDTAVYYCTRGLKMATIFDYWGQGLT VSS
83	AB116VL	VL-ERBB3 (配列 3)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNVVSWYQQ HPGKAPKLIIEVSRPQSGVSNRFSKSGNTASLTISGL QTEDEADYCCSYAGSSI FVI FGGGKVTVLG
84	AB117VH	VH-VEGF (配列 4)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIHWVRQA PGKGLEWVGAIYPYSGYTNADSVKGRFTISADTSKNTAY LQMNLSRAEDTAVYYCARWGHSTSPWAMDYWGQGLT VSS
85	AB117VL	VL-VEGF (配列 4)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQVIRRLAWYQQK GKAPKLLIYAASNLAGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ EDFATYYCQQSNTSPLTFGQGTKVEIKR
86	AB118VH	VH - NGF (配列 2)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNVNWVRQA PGKGLEWVGGVWAGGATDYNALKSRFTISRDNKNTAYL QMNLSRAEDTAVYYCARDGGYSSSTLYAMDAGWQGLT VSS
87	AB118VL	VL - NGF (配列 2)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEDIYNALAWYQQK GKAPKLLIYNTDTLHTGVPSRFSGSGSGTDTYTLTISSLQ EDFATYFCQHYFHYPRTFGQGTKVEIKR
88	AB119VH	VH - MTX	DVQLQESGPGLVKPSQSLTCTVTGFSITSPYAWNWI RQFPGNTLEWVGYSYRGSTTHHPSLKSRISITRDT SKNQFFLQLNSVTEDTATYFCSSYGNYGAYSGQGLT VSA
89	AB119VL	VL - MTX	DVLLTQIPLSLPVSLGDQASISCRSSQSI VHSNGNTYLEW YLQKPGQSPKLLIYKVSTRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDLGVYCFQGSHPVPLTFGAGTQLELKR
90	AB121VH	VH - NKG2D	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQA PGKGLEWVAFIRYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMNLSRAEDTAVYYCAKDRGLDGTDFDYWGQGLT VSS
91	AB121VL	VL - NKG2D	QSALTQPASVSGSPGQSITISCSGSSSNIGNNAVNWYQQ LPGKAPKLLIYYDDLPSGVSDRFSGSKSGTSAFLAISGLQ SEDEADYCAAWDDSLNGPVFGGKLTVLG

10

20

30

40

50

【0202】

特異的な標的に結合することができる特異的DVD-Ig分子の詳細な説明およびこれを作製する方法は、以下の実施例の部に記載されている。

【0203】

D. DVDタンパク質の作製

本明細書で提供される結合タンパク質は、本分野で公知の多数のいずれかによって作製され得る。例えば、宿主細胞からの発現において、DVD重鎖およびDVD軽鎖をコードする発現ベクターは、標準的な技術によって、宿主細胞中に形質移入される。「形質移入」という用語の様々な形態は、原核または真核宿主細胞中への外来DNAの導入のために一般に使用される多様な技術、例えば、電気穿孔、リン酸カルシウム沈殿、DEAE-デキストラン形質移入などを包含するものとする。原核または真核宿主細胞のいずれの中でも、本明細書で提供されるDVDタンパク質を発現することは可能であるが、真核細胞（特に、哺乳動物細胞）は、原核細胞に比べて、適切に折り畳まれ、免疫学的に活性なDVDタンパク質を集合および分泌する傾向がより大きいので、DVDタンパク質は真核細胞、例えば哺乳動物宿主細胞中で発現される。

【0204】

本明細書で提供される組み換え抗体を発現するための典型的な哺乳動物宿主細胞には、チャイニーズハムスター卵巣（CHO細胞）（Urlaub and Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220に記載されており、例えばR. A. Kaufman and P. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621に記載されているようにDHFR選択可能マーカーとともに使用されるdhfr-CHO細胞を含む。）、NS0骨髄腫細胞、COS細胞、SP2細胞およびPER.C6細胞が含まれる。DVDタンパク質をコードする組み換え発現ベクターが哺乳動物宿主細胞中に導入されると、宿主細胞中でDVDタンパク質の発現を可能とするのに十分な期間にわたってまたは、宿主細胞がその中で増殖されている培地中へのDVDタンパク質の分泌を可能とするのに十分な期間にわたって宿主細胞を培養することによって、DVDタンパク質が産生される。DVDタンパク質は、標準的なタンパク質精製方法を用いて、培地から回収することが可能である。

10

【0205】

本明細書で提供されるDVDタンパク質の組み換え発現用の典型的なシステムにおいて、リン酸カルシウムによって媒介された形質移入によって、DVD重鎖およびDVD軽鎖の両方をコードする組み換え発現ベクターが、dhfr-CHO細胞中に導入される。組み換え発現ベクター内で、DVD重鎖および軽鎖遺伝子は、遺伝子の転写の高いレベルを誘導するために、各々、CMVエンハンサー/AdMPLプロモーター制御要素へ作用可能に連結されている。組み換え発現ベクターは、メトトレキサート選択/増幅を用いて、ベクターで形質移入されたCHO細胞の選択を可能とするDHFR遺伝子も担持する。選択された形質転換体宿主細胞は、DVD重鎖および軽鎖の発現を可能とするために培養され、完全な状態のDVDタンパク質が培地から回収される。組み換え発現ベクターを調製し、宿主細胞を形質移入し、形質転換体を選択し、宿主細胞を培養し、培地からDVDタンパク質を回収するために、標準的な分子生物学的技術が使用される。DVDタンパク質が合成されるまで、適切な培地中で、本明細書で提供される宿主細胞を培養することによって、本明細書で提供されるDVDタンパク質を合成する方法も提供される。本方法は、培地からDVDタンパク質を単離することをさらに含むことが可能である。

20

【0206】

DVD-Igの重要な特徴は、DVD-Igが、慣用の抗体として、類似の様式で産生および精製され得ることである。DVD-Igの産生は、定常領域のいずれの配列修飾もなく、またはいずれの種類の化学的修飾もなく、所望される二重特異的活性を有する均一な単一の主産物をもたらす。「二特異的」、「多重特異的」および「多重特異的多価」完全長結合タンパク質を作製するための他の以前に記載された方法は、単一の主要産物をもたらさず、代わりに、集合した不活性な単一特異的、多重特異的、多価の完全長結合タンパク質と、異なる結合部位の組合せを有する多価完全長結合タンパク質との混合物の細胞内産生または分泌された産生をもたらす。例として、Miller and Presta (PCT公開WO2001/077342(A1))に記載されている設計に基づいて、重鎖および軽鎖の16の可能な組合せが存在する。その結果、タンパク質の僅か6.25%が、所望の活性形態であり、他の15の可能な組合せと比較して単一の主産物または単一の主要産物としてではないと思われる。典型的には、大規模な製造において使用される標準的クロマトグラフィー技術を用いて、タンパク質の所望の完全に活性な形態を、タンパク質の不活性なおよび部分的に活性な形態から分離することは、未だ実証されていない。

30

40

【0207】

驚くべきことに、本明細書で提供される「二重特異的多価完全長結合タンパク質」の設計は、主として、所望される「二重特異的多価完全長結合タンパク質」へ集合する二重可変ドメイン軽鎖および二重可変ドメイン重鎖をもたらす。

【0208】

集合され、発現された二重可変ドメイン免疫グロブリン分子の少なくとも50%、少な

50

くとも75%および少なくとも90%が、所望される二重特異的四価タンパク質である。本実施形態は、特に、市販の利用を強化する。したがって、単一の細胞中で二重可変ドメイン軽鎖および二重可変ドメイン重鎖を発現し、「二重特異的四価完全長結合タンパク質」の単一の主要産物をもたらす方法が提供される。

【0209】

単一の細胞中で二重可変ドメイン軽鎖および二重可変ドメイン重鎖を発現し、「二重特異的四価完全長結合タンパク質」の「主要産物」をもたらす方法が提供され、ここで、「主要産物」は、二重可変ドメイン軽鎖および二重可変ドメイン重鎖を含むすべての集合されたタンパク質の50%を上回る。

【0210】

単一の細胞中で二重可変ドメイン軽鎖および二重可変ドメイン重鎖を発現し、「二重特異的四価完全長結合タンパク質」の単一の「主要産物」をもたらす方法が提供され、ここで、「主要産物」は、二重可変ドメイン軽鎖および二重可変ドメイン重鎖を含むすべての集合されたタンパク質の75%を上回る。

【0211】

単一の細胞中で二重可変ドメイン軽鎖および二重可変ドメイン重鎖を発現し、「二重特異的四価完全長結合タンパク質」の単一の「主要産物」をもたらす方法が提供され、ここで、「主要産物」は、二重可変ドメイン軽鎖および二重可変ドメイン重鎖を含むすべての集合されたタンパク質の90%を上回る。

【0212】

II. 誘導体化されたDVD結合タンパク質

一実施形態は、標識された結合タンパク質を提供し、ここで、結合タンパク質は、別の機能的分子（例えば、別のペプチドまたはタンパク質）へ誘導体化され、または連結される。例えば、標識された結合タンパク質は、別の抗体（例えば、二特異的抗体またはダイアポティ）、検出可能作用物質、細胞毒性剤、薬剤および/または別の分子（ストレプトアビジンコア領域またはポリヒスチジンタグなど）との、結合タンパク質の会合を媒介可能なタンパク質もしくはペプチドなどの1つ以上の他の分子実体へ、（化学的カップリング、遺伝的融合、非共有会合またはその他によって）本明細書で提供される結合タンパク質を機能的に連結することによって誘導することが可能である。

【0213】

本明細書で提供される結合タンパク質を誘導体化し得る有用な検出可能作用物質には、蛍光化合物が含まれる。典型的な蛍光検出可能作用物質には、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアナート、ローダミン、5-ジメチルアミン-1-ナフタレンスルホンクロリド、フィコエリトリンなどが含まれる。結合タンパク質は、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼなどの検出可能な酵素でも誘導体化され得る。結合タンパク質が検出可能な酵素で誘導体化される場合には、検出可能な反応産物を生成させるために、本酵素が使用するさらなる試薬を添加することによって抗体が検出される。例えば、検出可能作用物質西洋ワサビペルオキシダーゼが存在する場合には、過酸化水素およびジアミノベンジジンの添加は、検出可能な発色した反応産物をもたらす。結合タンパク質は、ビオチンを用いて誘導体化し、アビジンまたはストレプトアビジン結合の間接的な測定を通じても検出され得る。

【0214】

別の実施形態は、結晶化された結合タンパク質ならびにこのような結晶を含む製剤および組成物を提供する。一実施形態において、結晶化された結合タンパク質は、結合タンパク質の可溶性対応物より大きなインピボ半減期を有する。別の実施形態において、結合タンパク質は、結晶化後の生物活性を保持する。

【0215】

結晶化された結合タンパク質は、本分野で公知の方法に従って、および参照により本明細書に組み込むWO02072636に開示されているように産生され得る。

【0216】

10

20

30

40

50

別の実施形態は、抗体またはその抗原結合部分が1つ以上の炭水化物残基を含む、グリコシル化された結合タンパク質を提供する。新生インビボタンパク質産生は、翻訳後修飾として知られるさらなるプロセッシングを経ることがあり得る。特に、糖（グリコシル）残基は、酵素的に付加され得る（グリコシル化として知られる方法）。共有結合されたオリゴ糖側鎖を有する得られたタンパク質は、グリコシル化されたタンパク質または糖タンパク質として知られる。抗体は、Fcドメイン中、および可変ドメイン中に1つ以上の炭水化物残基を有する糖タンパク質である。Fcドメイン中の炭水化物残基は、抗体の抗原結合または半減期に対する効果を最小限に抑えながら、Fcドメインのエフェクター機能に対して重要な効果を有する（R. Jefferys, *Biotechnol. Prog.* 21 (2005), pp. 11 - 16）。これに対して、可変ドメインのグリコシル化は、抗体の抗原結合活性に対して影響を及ぼし得る。可変ドメイン中のグリコシル化は、おそらくは、立体的な妨害のために、抗体結合親和性に対して負の影響を有し得（C. M. S., et al., *Mol. Immunol.* (1993) 30: 1361 - 1367）または抗原に対する増加した親和性をもたらし得る（Wallick, S. C., et al., *Exp. Med.* (1988) 168: 1099 - 1109; Wright, A., et al., *EMBO J.* (1991) 10: 2717 - 2723）。

10

【0217】

一実施形態は、結合タンパク質のO結合型またはN結合型グリコシル化部位が変異されているグリコシル化部位変異体を作製することに関する。当業者は、標準的な周知の技術を用いて、このような変異体を作製することが可能である。生物学的活性を保持するが、増加または減少した結合活性を有するグリコシル化部位変異体が、別の実施形態である。

20

【0218】

さらに別の実施形態において、本明細書で提供される抗体または抗原結合部分のグリコシル化は修飾される。例えば、無グリコシル化抗体を作製することが可能である（すなわち、抗体は、グリコシル化を欠如する。）。グリコシル化は、例えば、抗原に対する抗体の親和性を増加させるために改変することが可能である。このような炭水化物修飾は、例えば、抗体配列内のグリコシル化の1つ以上の部位を変化させることによって達成することが可能である。例えば、それによって、当該部位のグリコシル化を除去するために、1つ以上の可変領域グリコシル化部位の除去をもたらす1つ以上のアミノ酸置換を施すことが可能である。このような無グリコシル化は、抗原に対する抗体の親和性を増加させ得る。このようなアプローチは、PCT公開WO2003016466A2ならびに米国特許第5,714,350号および第6,350,861号に、さらに詳しく記載されており、それぞれその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0219】

これに加えてまたはこれに代えて、フコシル残基の減少した量を有する低フコシル化抗体（Kanda, Yutaka et al., *Journal of Biotechnology* (2007), 130(3), 300 - 310参照。）または増加した二分岐GlcNAc構造を有する抗体など、グリコシル化の変化した種類を有する修飾された結合タンパク質を作製することが可能である。このような変化されたグリコシル化パターンは、抗体のADCC能力を増加させることが示されている。このような炭水化物修飾は、例えば、変化したグリコシル化機構を有する宿主細胞中で抗体を発現させることによって達成することが可能である。変化したグリコシル化機構を有する細胞は本分野において記載されており、その中で、組み換え抗体を発現させることによって、変化したグリコシル化を有する抗体を産生するための宿主細胞として使用することができる。例えば、それぞれその全体が参照により本明細書に組み込まれる、Shields, R. L. et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277: 26733 - 26740; Umana et al. (1999) *Nat. Biotech.* 17: 176 - 1および欧州特許EP1,176,195; PCT公開WO03/035835; WO99/5434280を参照されたい。

40

【0220】

50

タンパク質グリコシル化は、対象のタンパク質のアミノ酸配列およびその中でタンパク質が発現される宿主細胞に依存する。異なる生物は、異なるグリコシル化酵素（例えば、グリコシル転移酵素およびグリコシダーゼ）を産生し得、利用可能な異なる基質（ヌクレオチド糖）を有し得る。このような要因のために、タンパク質グリコシル化パターンおよびグリコシル残基の組成は、タンパク質がその中で発現されている宿主系に応じて異なり得る。適切なグリコシル残基には、グルコース、ガラクトース、マンノース、フコース、*n*-アセチルグルコサミンおよびシアル酸が含まれ得るが、これらに限定されない。一実施形態において、グリコシル化された結合タンパク質は、グリコシル化パターンがヒトであるように、グリコシル残基を含む。

【0221】

異なるタンパク質グリコシル化は異なるタンパク質特性をもたらし得ることが、当業者に公知である。例えば、酵母などの微生物宿主中で産生され、酵母内在経路を用いてグリコシル化された治療用タンパク質の効力は、CHO細胞株などの哺乳動物細胞中で発現された同じタンパク質の効力と比べて低下され得る。また、このような糖タンパク質は、ヒトにおいて免疫原性であり得、投与後に、減少したインビボ半減期を示し得る。ヒトおよび他の動物中の特異的な受容体は、特異的なグリコシル残基を認識し得、血流からのタンパク質の迅速な除去を促進し得る。他の有害な効果は、タンパク質の折り畳み、溶解度、プロテアーゼに対する感受性、運搬、輸送、区画化、分泌、他のタンパク質または因子による認識、抗原性またはアレルゲン性の変化が含まれ得る。したがって、当業者は、グリコシル化の特異的な組成およびパターン、例えば、ヒト細胞中または意図される対象動物の種特異的細胞中で産生されるものと同一または少なくとも類似のグリコシル化組成およびパターンを有する治療タンパク質を選択し得る。

【0222】

宿主細胞のものとは異なるグリコシル化されたタンパク質を発現することは、異種グリコシル化酵素を発現するために宿主細胞を遺伝的に修飾することによって達成され得る。本分野で公知の技術を使用して、当業者は、ヒトタンパク質グリコシル化を呈する抗体またはその抗原結合部分を作製し得る。例えば、酵母株中で産生されたグリコシル化されたタンパク質（糖タンパク質）が、動物細胞、特にヒト細胞のものと同じのタンパク質グリコシル化を呈するように（米国特許出願第20040018590号および第20020137134号ならびにPCT公開WO2005100584A2）、酵母株は、天然に存在しないグリコシル化酵素を発現するように遺伝的に修飾されている。

【0223】

本明細書で提供される結合タンパク質に加えて、結合タンパク質に対して特異的な抗イディオタイプ（抗Id）抗体が提供される。抗Id抗体は、別の抗体の抗原結合領域と一般的に付随する固有の決定基を認識する抗体である。抗Idは、結合タンパク質またはそのCDR含有領域で動物を免疫化することによって調製することが可能である。免疫された動物は、免疫抗体のイディオタイプ決定基を認識し、これに応答し、抗Id抗体を産生する。DVD-Ig分子に取り込まれる2つ以上の親抗体に対する抗イディオタイプ抗体を生成し、各親抗体のイディオタイプに特異的な抗イディオタイプ抗体がDVD-Igの状況でイディオタイプ（例えば、抗原結合部位）をやはり認識することを実証するために、本分野で十分認識されている方法（例えば、BIAcore、ELISA）によって結合研究を確認することが易しい可能性があることは容易に明らかである。DVD-Igの2つ以上の抗原結合部位の各々に特異的な抗イディオタイプ抗体は、患者血清中のヒトDVD-IgのDVD-Ig濃度を測定するための理想的な試薬を提供する；DVD-Ig濃度アッセイは、固相（例えば、BIAcoreチップ、ELISAプレートなど）に被覆された第一の抗原結合領域に対する抗体を用いる（濯ぎ用緩衝液で濯ぎ、血清試料とともにインキュベートし、もう一度すすぎ工程を行い、最終的に（結合反応の定量化のための酵素でこれ自体標識されている）別の抗原結合部位に対する別の抗イディオタイプ抗体とともにインキュベートする）「サンドイッチアッセイELISAフォーマット」を使用して確立することが可能である。一実施形態において、2つを超える異なる結合部位を有

10

20

30

40

50

するDVD-Igの場合、2つの最も外側の結合部位（定常領域から最も遠位および近位）に対する抗イディオタイプ抗体は、ヒト血清中のDVD-Ig濃度を決定する助けとなるだけでなく、インビボでの分子の完全性も示す。各抗Id抗体は、さらに別の動物における免疫応答を誘導して、いわゆる抗抗Id抗体を産生する「免疫原」として使用することも可能である。

【0224】

さらに、ライブラリーのメンバー宿主細胞がバリエーショングリコシル化パターンを有する目的のタンパク質を産生するように、様々なグリコシル化酵素を発現するように遺伝学的に改変された宿主細胞のライブラリーを用いて、目的のタンパク質を発現させ得ることが、当業者によって理解されている。次いで、当業者は、特定の新規グリコシル化パターンを有する目的のタンパク質を選択および単離し得る。一実施形態において、特に選択された新規グリコシル化パターンを有するタンパク質は、改善または改変された生物学的特性を示す。

10

【0225】

III. DVD-Igの使用

本明細書で提供される結合タンパク質は2つ以上の抗原に結合することができるので、本発明の結合タンパク質は、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）または組織免疫組織化学など慣用のイムノアッセイを用いて、（例えば、血清または血漿などの生物学的試料中で）抗原を検出するために使用することが可能である。DVD-Igは、結合したまたは結合していない抗体の検出を促進するために、検出可能な物質で直接または間接的に標識される。適切な検出可能な物質には、様々な酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質および放射性物質が含まれる。適切な酵素の例には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼが含まれる。適切な補欠分子族複合体の例には、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが含まれる。適切な蛍光物質の例には、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアナート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリンが含まれる。発光物質の例には、ルミノールが含まれる；および適切な放射性材料の例には、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho または ^{153}Sm が含まれる。

20

30

【0226】

一実施形態において、本明細書で提供される結合タンパク質は、インビトロおよびインビボの両方で、抗原の活性を中和することが可能である。したがって、このようなDVD-Igは、例えば、抗原を含有する細胞培地中で、ヒト対象中で、本明細書で提供される結合タンパク質が交差反応する抗原を有するその他の哺乳動物対象中で、抗原活性を阻害するために使用することが可能である。別の実施形態において、抗原活性が有害である疾病または疾患に罹患している対象中の抗原活性を低下させる方法が提供される。本明細書で提供される結合タンパク質は、治療目的のために、ヒト対象に投与することができる。

【0227】

本明細書において使用される「抗原活性が有害である疾患」という用語は、本疾患に罹患している対象中での抗原の存在が、疾患の病態生理の原因であることがまたは疾患の悪化に寄与している因子であることが示されており、または疑われている疾病およびその他の疾患を含むものとする。したがって、抗原活性が有害である疾患は、抗原活性の低下が疾患の症候および/または進行を緩和することが予測される疾患である。このような疾患は、例えば、本疾患に罹患している患者の生物学的液体中の抗原濃度の増加（例えば、対象の血清、血漿、滑液中などの抗原の濃度の増加）によって明らかとされ得る。本明細書で提供される結合タンパク質で治療することが可能な疾患の非限定的な例には、以下に、および結合タンパク質を含む医薬組成物に関するセクションに論述されている疾患が含まれる。

40

【0228】

50

本明細書で提供されるDVD-Igは、1つの抗原または複数の抗原に結合し得る。このような抗原には、以下の、参照により本明細書に組み込まれるデータベースに列記されている標的が含まれるが、これらに限定されるものではない。これらの標的データベースには、以下のものが含まれる。

治療の標的 (<http://xin.cz3.nus.edu.sg/group/cjttd/ttd.asp>);

サイトカインおよびサイトカイン受容体 (<http://www.cytokinewebfacts.com/>、<http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi>および

http://cmbi.bjmu.edu.cn/cmbidata/cgf/CGF_Database/cytokine.medic.kumamoto-u.ac.jp/CFC/indexR.html);

ケモカイン (<http://cytokine.medic.kumamoto-u.ac.jp/CFC/CK/Chemokine.html>);

ケモカイン受容体およびGPCR (<http://csp.medic.kumamoto-u.ac.jp/CSP/Receptor.html>、<http://www.gpcr.org/7tm/>);

嗅覚受容体 (<http://senselab.med.yale.edu/senselab/ORDB/default.asp>);

受容体 (<http://www.iuphar-db.org/iuphar-rd/list/index.htm>);

癌標的 (<http://cged.hgc.jp/cgi-bin/input.cgi>);

潜在的な抗体標的として分泌されるタンパク質 (<http://spd.cbi.pku.edu.cn/>);

タンパク質キナーゼ (<http://spd.cbi.pku.edu.cn/>)ならびに

ヒトCDマーカー (http://content.labvelocity.com/tools/6/1226/CD_table_final_locked.pdf)および (Zola H, 2005 CD molecules 2005: human cell differentiation molecules Blood, 106: 3123-6)。

【0229】

DVD-Igは、効力/安全を増強し、および/または患者の対象範囲を増加させるために、2つの異なる標的を同時に遮断するための治療剤として有用である。このような標的は、可溶性標的(TNF)および細胞表面受容体標的(VEGFRおよびEGFR)が含まれ得る。このような標的は、癌療法のために腫瘍細胞とT細胞(Her2とCD3)との間に、または自己免疫疾患または移植のために自己反応性細胞およびエフェクター細胞の間に、またはある所定の疾病において疾病を引き起こす細胞を除去するためにいずれかの標的細胞とエフェクター細胞の間に、再誘導された細胞障害を誘導するために使用することも可能である。

【0230】

さらに、同一受容体上の2つの異なるエピトープを標的とするように設計されている場合には、DVD-Igは、受容体のクラスタリングおよび活性化を惹起するために使用することが可能である。これは、アゴニストおよびアンタゴニスト作用を有する抗GPCR治療剤を作製する上で有用性を有し得る。この場合には、DVD-Igは、クラスタリング/シグナル伝達(2つの細胞表面分子)またはシグナル伝達(1つの分子上)のために、1つの細胞上に存在する2つの異なるエピトープ(ループ領域および細胞外ドメイン上のエピトープの両方を含む)を標的とするために使用することが可能である。同様に、DVD-Ig分子は、CTLA-4連結、およびCTLA-4細胞外ドメインの2つの異な

るエピトープ（または同一エピトープの2コピー）を標的として免疫応答の下方制御をもたらすことによる負のシグナルを惹起するように設計することが可能である。CTLA-4は、多数の免疫学的疾患の治療的処置に対して、臨床的に妥当性が確認された標的である。CTLA-4/B7相互作用は、細胞周期の進行、IL-2産生および活性化に続くT細胞の増殖を弱化することによって、T細胞活性化を負に制御し、CTLA-4（CD152）の拘束は、T細胞の活性化を下方制御し、免疫寛容の誘導を促進する。しかしながら、CTLA-4の活性化は連結を必要とするので、アゴニスト性抗体によるCTLA-4の拘束によって、T細胞の活性化を弱化するという戦略は成功を収めていない。CTLA-4/B7の分子相互作用は、結晶構造分析によって示されたように（Stampert 2001 Nature 410:608）、「歪んだジッパー」配列である。しかしながら、抗CTLA-4 mAbを含む、現在利用可能なCTLA-4結合試薬はいずれも、連結特性を有しない。この問題に対処するために、いくつかの試みが行われてきた。1つの事例では、細胞要素が結合された一本鎖抗体が作製され、マウス中での同種異系拒絶を著しく阻害した（Hwang 2002 JI 169:633）。別の事例では、人工のAPC表面に連結された、CTLA-4に対する一本鎖抗体が作製され、T細胞応答を弱化させることが示された（Griffin 2000 JI 164:4433）。いずれの事例でも、人工の系内に近接して配置された膜結合型抗体によって、CTLA-4連結が達成された。これらの実験は、CTLA-4の負のシグナル伝達を引き起こすことによる免疫の下方制御という概念に対する証明を与えるが、これらの報告で使用された試薬は、治療的用途には適していない。この目的のために、CTLA-4細胞外ドメインの2つの異なるエピトープ（または同一エピトープの2コピー）を標的とするDVD-Ig分子を使用することによって、CTLA-4連結が達成され得る。論拠は、IgGの2つの結合部位を貫く距離（約150から170）が、CTLA-4の活性化連結（2個のCTLA-4ホモ二量体間で30から50）には大きすぎるということである。しかしながら、DVD-Ig（1つのアーム）上の2つの結合部位間の距離はずっと短く、30から50の範囲にあるので、CTLA-4の適切な連結を可能とする。

10

20

30

40

50

【0231】

同様に、DVD-Igは、細胞表面受容体複合体の2つの異なる要素を標的とすることが可能である（例えば、IL-12R および）。さらに、DVD-Igは、標的可溶性タンパク質/病原体の迅速な排除を誘導するために、CR1および可溶性タンパク質/病原体を標的とすることが可能である。

【0232】

さらに、本明細書で提供されるDVD-Igは、細胞内送達（内部移行受容体および細胞内分子を標的化すること）、脳内への送達（血液脳関門を横切るために、トランスフェリン受容体および中枢神経系疾患媒介物質を標的化すること）など、組織特異的な送達（増強された局所PKにより、より高い効力および/またはより低い毒性を得るために、組織マーカーおよび疾病媒介物質を標的とすること）のために使用することが可能である。DVD-Igは、その抗原の非中和エピトープへの結合を介して特異的な位置へ抗原を送達するための担体タンパク質としての役割も果たすことができ、抗原の半減期を増加させることが可能である。さらに、DVD-Igは、患者中に植え込まれた医療用具に物理的に連結され、またはこれらの医療用具を標的とするように設計することが可能である（Burke, Sandra E.; Kuntz, Richard E.; Schwartz, Lewis B., Zotarolimolimus eluting stents. Advanced Drug Delivery Reviews (2006), 58(3), 437-446; Surface coatings for biological activation and functionalization of medical devices, Hildebrand, H.F.; Blanchemain, N.; Mayer, G.; Chai, F.; Lefebvre, M.; Boschini, F., Surface and Coatings Technology (2006), 200(22-23), 6318-6324; Drug/device combin

ations for local drug therapies and infection prophylaxis, Wu, Peng; Grainger, David W., *Biomaterials* (2006), 27(11), 2450-2467; Mediation of the cytokine network in the implantation of orthopedic devices., Marques, A.P.; Hunt, J.A.; Reis, Rui L., *Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine* (2005), 377-397 参照)。要約すれば、医療用インプラントの部位へ、細胞の適切な種類を誘導することは、正常な組織機能の治癒および回復を促進し得る。あるいは、用具に連結されたDVD、または用具を標的とするDVDによって、装置の植え込み時に放出される媒介物質(サイトカインが含まれるが、これに限定されない。)の阻害も提供される。例えば、封鎖された動脈をきれいにし、心筋への血流を改善するために、介入的心臓病学において、長年にわたってステントが使用されている。しかしながら、伝統的な地金ステントは、一部の患者に、再狭窄(治療された領域中の動脈が再び狭くなること)を引き起こすことが知られており、血液凝固を引き起こし得る。最近、抗CD34抗体によって被覆されたステントが記載されており、これは、再狭窄を軽減し、血液全体を循環している内皮前駆細胞(EPC)を捕捉することによって、血液凝固の発生を予防する。内皮細胞は、血管に整列している細胞であり、血液が滑らかに流れるようにしている。EPCは、ステントの硬い表面に付着して滑らかな層を形成し、この層は、治癒を促進するのみならず、従来ステントの使用に付随してきた合併症である再狭窄および血液凝固を予防する(Aoji et al. 2005 *J Am Coll Cardiol*. 45(10): 1574-9)。ステントを必要としている患者に対する結果を改善させることに加えて、心血管バイパス手術を必要としている患者に対しても改善が示唆されている。例えば、抗EPC抗体で被覆された人工血管導管(人工動脈)は、バイパス手術移植のために、患者の足または腕からの動脈を使用する必要性をなくする。これは、手術および麻酔時間を短縮し、それにより、冠動脈手術死を低下させる。DVD-Igは、細胞動員を促進するために、植え込まれた装置上に被覆された、細胞表面マーカー(CD34など)およびタンパク質(または、タンパク質、脂質および多糖を含む(但し、これらに限定されない。))あらゆる種類のエピトープ)に結合するように設計されている。このようなアプローチは、一般的に、他の医療用インプラントに対しても適用することが可能である。あるいは、DVD-Igは、医療用具上に被覆することも可能であり、植え込まれた時に、(またはすでに充填されたDVD-Igの老朽化および変性など、さらなる新鮮なDVD-Igを必要とし得るすべての他の要請に応じて)用具からすべてのDVDを放出し、装置は、新鮮なDVD-Igを患者に全身投与することによって、最充填することが可能であり、この場合、DVD-Igは、結合部位の1セットで目的標的(サイトカイン、細胞表面マーカー(CD34など)など)に結合し、結合部位の他のセットで装置上に被覆された標的(タンパク質、あらゆる種類のエピトープ(脂質、多糖およびポリマーを含むが、これらに限定されない。))に結合するように設計されている。この技術は、被覆されたインプラントの有用性を拡張するという利点を有している。

【0233】

A. 様々な疾病におけるDVD-Igの使用

本明細書で提供されるDVD-Ig分子は、様々な疾病を治療するための治療分子としても有用である。このようなDVD分子は、特定の疾病に關与する1つ以上の標的に結合し得る。様々な疾病におけるこのような標的の例が、以下に記載されている。

【0234】

1. ヒト自己免疫および炎症性応答

C5、CCL1(I-309)、CCL11(エオタキシン)、CCL13(mcp-4)、CCL15(MIP-1d)、CCL16(HCC-4)、CCL17(TARC)、CCL18(PARC)、CCL19、CCL2(mcp-1)、CCL20(MI

10

20

30

40

50

P - 3 a)、CCL21 (MIP - 2)、CCL23 (MPIF - 1)、CCL24 (MPIF - 2 / エオタキシン - 2)、CCL25 (TECK)、CCL26、CCL3 (MIP - 1 a)、CCL4 (MIP - 1 b)、CCL5 (RANTES)、CCL7 (mcp - 3)、CCL8 (mcp - 2)、CXCL1、CXCL10 (IP - 10)、CXCL11 (I - TAC / IP - 9)、CXCL12 (SDF1)、CXCL13、CXCL14、CXCL2、CXCL3、CXCL5 (ENA - 78 / LIX)、CXCL6 (GCP - 2)、CXCL9、IL13、IL8、CCL13 (mcp - 4)、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CX3CR1、IL8RA、XCR1 (CCXCR1)、IFNA2、IL10、IL13、IL17C、IL1A、IL1B、IL1F10、IL1F5、IL1F6、IL1F7、IL1F8、IL1F9、IL22、IL5、IL8、IL9、LTA、LTB、MIF、SCYE1 (内皮単球活性化サイトカイン)、SPP1、TNF、TNFSF5、IFNA2、IL10RA、IL10RB、IL13、IL13RA1、IL5RA、IL9、IL9R、ABCF1、BCL6、C3、C4A、CEBPB、CRP、ICEBERG、IL1R1、IL1RN、IL8RB、LTB4R、TOLLIP、FADD、IRAK1、IRAK2、MYD88、NCK2、TNFAIP3、TRADD、TRAF1、TRAF2、TRAF3、TRAF4、TRAF5、TRAF6、ACVR1、ACVR1B、ACVR2、ACVR2B、ACVRL1、CD28、CD3E、CD3G、CD3Z、CD69、CD80、CD86、CNR1、CTLA4、CYSLTR1、FCER1A、FCER2、FCGR3A、GPR44、HAVCR2、OPRD1、P2RX7、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、BLR1、CCL1、CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CCL7、CCL8、CCL11、CCL13、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL24、CCL25、CCR1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CX3CL1、CX3CR1、CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL5、CXCL6、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCR4、GPR2、SCYE1、SDF2、XCL1、XCL2、XCR1、AMH、AMHR2、BMPRI1A、BMPRI1B、BMPRI2、C19orf10 (IL27w)、CER1、CSF1、CSF2、CSF3、DKFZp451J0118、FGF2、GFI1、IFNA1、IFNB1、IFNG、IGF1、IL1A、IL1B、IL1R1、IL1R2、IL2、IL2RA、IL2RB、IL2RG、IL3、IL4、IL4R、IL5、IL5RA、IL6、IL6R、IL6ST、IL7、IL8、IL8RA、IL8RB、IL9、IL9R、IL10、IL10RA、IL10RB、IL11、IL11RA、IL12A、IL12B、IL12RB1、IL12RB2、IL13、EL13RA1、IL13RA2、IL15、IL15RA、IL16、IL17、IL17R、IL18、IL18R1、IL19、IL20、KITLG、LEP、LTA、LTB、LTB4R、LTB4R2、LTBR、MIF、NPPB、PDGFB、TBX21、TDGF1、TGFA、TGFB1、TGFB1I1、TGFB2、TGFB3、TGFB I、TGFB R1、TGFB R2、TGFB R3、TH1L、TNF、TNFRSF1A、TNFRSF1B、TNFRSF7、TNFRSF8、TNFRSF9、TNFRSF11A、TNFRSF21、TNFSF4、TNFSF5、TNFSF6、TNFSF11、VEGF、ZFPM2およびRNF110 (ZNF144) など、多くのタンパク質が、一般的な自己免疫および炎症性応答に参与していると推定されている。一態様において、本明細書に列記されている標的の1つ以上に結合することが可能なDVD - Igが提供される。

【0235】

2. 喘息

アレルギー性喘息は、好酸球増加症、杯細胞異形成、上皮細胞の変化、気道過敏症 (AHR) ならびにTh2およびTh1サイトカイン発現ならびに上昇した血清IgEレベル

の存在によって特徴付けられる。気道炎症が、喘息の発病の基礎を成す中心的な因子であることは、現在では広く受け入れられており、T細胞、B細胞、好酸球、肥満細胞およびマクロファージなどの炎症性細胞と、サイトカインおよびケモカインなどの分泌されるこれらの媒介物質の複雑な相互作用が関与している。コルチコステロイドは、今日、喘息に対する最も重要な抗炎症性治療であるが、それらの作用機序は非特異的であり、特に、若い患者集団では、安全性についての懸念が存在する。したがって、より特異的で、標的化された治療の開発が必要とされる。マウス中のIL-13が、好酸球性炎症とは独立に、AHR、粘膜の過剰分泌および気道線維症など、喘息の特徴の多くを模倣するという、証拠が増加している。(Finotto et al., International Immunology (2005), 17(8), 993-1007; Padilla et al., Journal of Immunology (2005), 174(12), 8097-8105)。

【0236】

IL-13は、喘息を伴う病的応答を引き起こす上で中心的な役割を有すると推定されている。肺でのIL-13の効果を抑制するための抗IL-13mAb療法の開発は、喘息のための新規治療としてかなりの有望性を与える、刺激的な新しいアプローチである。しかしながら、異なる免疫学的経路の他の媒介物質も喘息の発病に関与しており、IL-13に加えて、これらの媒介物質を遮断することは、さらなる治療的利点を与え得る。このような標的対には、IL-13および腫瘍壊死因子-(TNF-)などの炎症促進性サイトカインが含まれるが、これに限定されるものではない。TNF-は、喘息における炎症性応答を増幅し得、疾病の重度と関連し得る(McDonnell, et al., Progress in Respiratory Research (2001), 31(New Drugs for Asthma, Allergy and COPD), 247-250)。これは、IL-13およびTNF-の両方を遮断し、特に、重い気道疾病において、有益な効果を有し得ることを示唆する。別の実施形態において、本明細書で提供されるDVD-Igは、標的であるIL-13およびTNF-に結合し、喘息を治療するために使用される。

【0237】

炎症およびAHRをとともに評価することができる、OVAによって誘導された喘息マウスモデルなどの動物モデルが本分野において公知であり、様々なDVD-Ig分子が喘息を治療する能力を測定するために使用し得る。喘息を研究するための動物モデルは、Coffman, et al., Journal of Experimental Medicine (2005), 201(12), 1875-1879; Lloyd, et al., Advances in Immunology (2001), 77, 263-295; Boyce et al., Journal of Experimental Medicine (2005), 201(12), 1869-1873; および Snibson, et al., Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology (2005), 35(2), 146-52に開示されている。これらの標的対の定型的な安全性評価に加えて、免疫抑制の程度に対する特異的検査が保証され、最高の標的対を選択する上で役立つ(Luster et al., Toxicology (1994), 92(1-3), 229-43; Descotes, et al., Developments in biological standardization (1992), 7799-102; Hart et al., Journal of Allergy and Clinical Immunology (2001), 108(2), 250-257参照)。

【0238】

本明細書で開示されている論拠に基づいて、ならびに効力および安全性のための同じ評価モデルを使用して、DVD-Ig分子が結合することができ、喘息を治療するために有用であり得る他の標的対を決定し得る。一実施形態において、IL-1は、喘息におけ

る炎症応答にも関与が推定されているので、このような標的には、IL - 13 および IL - 1 が含まれ；IL - 13 および IL - 9 など、炎症に関与している IL - 13 および サイトカインおよびケモカイン；IL - 13 および IL - 4；IL - 13 および IL - 5；IL - 13 および IL - 25；IL - 13 および TARC；IL - 13 および MDC；IL - 13 および MIF；IL - 13 および TGF - ；IL - 13 および LHR アゴニスト；IL - 13 および CL25；IL - 13 および SPRR2a；IL - 13 および SPRR2b；ならびに IL - 13 および ADAM8 が含まれるが、これらに限定されるものではない。例えば、CSF1 (M-CSF)、CSF2 (GM-CSF)、CSF3 (G-CSF)、FGF2、IFNA1、IFNB1、IFNG、ヒスタミンおよびヒスタミン受容体、IL1A、IL1B、IL2、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL8、IL9、IL10、IL11、IL12A、IL12B、IL13、IL14、IL15、IL16、IL17、IL18、IL19、KTILG、PDGFB、IL2RA、IL4R、IL5RA、IL8RA、IL8RB、IL12RB1、IL12RB2、IL13RA1、IL13RA2、IL18R1、TSLP、CCL1、CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CCL7、CCL8、CCL13、CCL17、CCL18、CCL19、CCL20、CCL22、CCL24、CX3CL1、CXCL1、CXCL2、CXCL3、XCL1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CX3CR1、GPR2、XCR1、FOS、GATA3、JAK1、JAK3、STAT6、TBX21、TGFB1、TNF、TNFSF6、YY1、CYSLTR1、FCER1A、FCER2、LTB4R、TB4R2、LTBR または キチナーゼなどの、喘息に関与している1つ以上の標的に結合することが可能なDVD-Igも提供される。

10

20

30

40

50

【0239】

3. 関節リウマチ

全身性疾患である関節リウマチ (RA) は、関節の滑液中の慢性的炎症反応によって特徴付けられ、軟骨の変性と隣接する関節骨を伴う。TNF、ケモカインおよび成長因子など、多くの炎症促進性サイトカインが、罹患した関節中に発現されている。抗TNF抗体またはsTNFR融合タンパク質の、RAのマウスモデルへの全身投与は、抗炎症性および関節保護的であることが示された。RA患者中のTNFの活性が、静脈内に投与されたインフリキシマブ (キメラ抗TNFmAb) で遮断された臨床的調査 (Harriman G, Harper LK, Schaible TF. 1999 Summary of clinical trials in rheumatoid arthritis using infliximab, an anti-TNFalpha treatment. Ann Rheum Dis 58 Suppl 1:161-4) は、TNFがIL-6、IL-8、MCP-1およびVEGF産生、免疫および炎症性細胞の関節中への動員、血管新生ならびにマトリックスメタロプロテイナーゼ-1および-3の血液レベルの低下を制御するという証拠を提供した。関節リウマチにおける炎症性経路をより深く理解することによって、関節リウマチに関与する他の治療標的の同定に結びついた。過去、インターロイキン-6アンタゴニスト (Chugai, Rocheによって開発されたIL-6受容体抗体MRA、Nishimoto, Norihiro et al., Arthritis & Rheumatism (2004), 50(6), 1761-1769参照)、CTLA4Ig (アダタセプト、Genovese Mc et al 2005 Abatacept for rheumatoid arthritis refractory to tumor necrosis factor alpha inhibition. N Engl J Med. 353:1114-23.)、および抗B細胞療法 (リツキシマブ、Okamoto H, Kamatani N. 2004 Rituximab for rheumatoid arthritis. N Engl J Med. 351:1909) などの有望な治療が、無作為化された対照臨床試験においてすでに検査されてきた。インターロイキン-15 (治療用抗体HuMax-IL-15、AMG714、Baslund, Bo et al., Arthriti

s & Rheumatism (2005), 52(9), 2686-2692)、インターロイキン-17およびインターロイキン-18など、他のサイトカインが同定され、動物モデルにおいて有益であることが示されており、これらの作用物質の臨床試験が現在進行中である。抗TNFおよび別の媒介物質を組み合わせた二重特異的抗体療法は、臨床的効力および/または患者の対象範囲を増大させる上で大きな可能性を秘めている。例えば、TNFとVEGF(いずれも、RAの病態生理学に關与している。)の両方を遮断することは、炎症および血管新生を根絶することができる可能性を秘めている。TNFおよびIL-18; TNFおよびIL-12; TNFおよびIL-23; TNFおよびIL-1; TNFおよびMIF; TNFおよびIL-17; TNFおよびIL-15を含む(但し、これらに限定されない。)、RAに關与している標的の他の対を、特異的DVDIgで遮断することも想定される。これらの標的対の定型的な安全性評価に加えて、免疫抑制の程度に対する特異的検査が保証され、最高の標的対を選択する上で役立ち得る(Luster et al., Toxicology (1994), 92(1-3), 229-43; Descotes, et al., Developments in biological standardization (1992), 77 99-102; Hart et al., Journal of Allergy and Clinical Immunology (2001), 108(2), 250-257参照)。DVDIg分子が関節リウマチの治療に対して有用であるかどうかは、コラーゲンによって誘導された関節炎マウスモデルなど、前臨床動物RAモデルを用いて評価することが可能である。他の有用なモデルも本分野において周知である(Brand DD., Comp Med (2005) 55(2): 114-22参照)。ヒトおよびマウスオルソログに対する親抗体の交差反応性(例えば、ヒトおよびマウスTNF、ヒトおよびマウスIL-15などに対する反応性)を基礎として、「適合代理抗体」由来DVD-Ig分子を用いてマウスCIAモデルにおける妥当性確認研究を行うことが可能である; 簡潔に述べると、2つ(またはそれ以上)のマウス標的特異的抗体を基礎とするDVD-Igは、ヒトDVD-Ig構築に使用される親ヒトまたはヒト化抗体の特徴に可能な限り適合し得る(類似した親和性、類似した中和効力、類似した半減期など)。

【0240】

4. SLE

SLEの免疫病原性の特徴は、ポリクローナルB細胞活性化であり、これは、高グロブリン血症、自己抗体産生および免疫複合体形成をもたらす。基本的な異常は、全般的なT細胞の調節不全のために、T細胞が禁じられたB細胞クローンを抑制できないことであるように見受けられる。さらに、BおよびT細胞の相互作用は、第二のシグナルを開始する、IL-10ならびにCD40とCD40LおよびB7およびCD28とCTLA-4などの同時刺激分子などのいくつかのサイトカインによって促進される。これらの相互作用は、免疫複合体およびアポトーシス材料の損傷された食細胞の排除とともに、生じた組織傷害によって免疫応答を永続化させる。以下の標的がSLEに關与し得、治療的介入のためのDVD-Igアプローチのために使用できる可能性を秘めている。B細胞標的化療法: CD-20、CD-22、CD-19、CD28、CD4、CD80、HLA-DR A、IL10、IL2、IL4、TNFRSF5、TNFRSF6、TNFSF5、TNFSF6、BLR1、HDAC4、HDAC5、HDAC7A、HDAC9、ICOSL、IGBP1、MS4A1、RGS1、SLA2、CD81、IFNB1、IL10、TNFRSF5、TNFRSF7、TNFSF5、AICDA、BLNK、GALNAC4S-6ST、HDAC4、HDAC5、HDAC7A、HDAC9、IL10、IL11、IL4、INHA、INHBA、KLF6、TNFRSF7、CD28、CD38、CD69、CD80、CD83、CD86、DPP4、FCER2、IL2RA、TNFRSF8、TNFSF7、CD24、CD37、CD40、CD72、CD74、CD79A、CD79B、CR2、IL1R2、ITGA2、ITGA3、MS4A1、ST6GAL1、CD1C、CHST10、HLA-A、HLA-DR AおよびNT5E; 同時刺激シグナル: CTLA4またはB7.1/B7.2; B細胞生存の障害: BlyS、BAF

10

20

30

40

50

F ; 補体不活化 : C 5 ; サイトカイン調節。中心的な原理は、いずれかの組織中の総合的な生物応答は、炎症促進性サイトカインまたは抗炎症性サイトカインの局所レベル間のバランスの結果であるということである (S f i k a k i s P P e t a l 2 0 0 5 C u r r O p i n R h e u m a t o l 1 7 : 5 5 0 - 7 参照)。S L E は、血清 I L - 4、I L - 6、I L - 1 0 の文献に報告された上昇を伴う、T h 2 によって誘導される疾病であると考えられる。例えば、I L - 4、I L - 6、I L - 1 0、I N F - または T N F - など、1 つ以上の標的に結合することが可能な D V D I g も想定される。本明細書で論述されている標的の組合せは、多数の狼瘡前臨床モデル中で検査することが可能な S L E に対して治療的な効力を増強する (P e n g S L (2 0 0 4) M e t h o d s M o l M e d . ; 1 0 2 : 2 2 7 - 7 2 参照)。ヒトおよびマウスオルソログに対する親抗体の交差反応性 (例えば、ヒトおよびマウス C D 2 0、ヒトおよびマウスインターフェロン などに対する反応性) を基礎として、「適合代理抗体」由来 D V D - I g 分子を用いてマウスループモデルにおける妥当性確認研究を行うことが可能である ; 簡潔に述べると、2 つ (またはそれ以上) のマウス標的特異的抗体を基礎とする D V D - I g は、ヒト D V D - I g 構築に使用される親ヒトまたはヒト化抗体の特徴に可能な限り適合し得る (類似した親和性、類似した中和効力、類似した半減期など)。

【 0 2 4 1 】

5 . 多発性硬化症

多発性硬化症 (M S) は、主に病因が不明である複雑なヒト自己免疫型疾病である。神経系を通じたミエリン塩基性タンパク質 (M B P) の免疫学的破壊が、多発性硬化症の主要な病因である。M S は、C D 4 + および C D 8 + T 細胞による浸潤を伴う複雑な病変の疾病であり、中枢神経系内の応答の疾病である。サイトカイン、反応性窒素種および同時刺激分子の中枢神経系中での発現はすべて、M S において記載されている。主に検討すべきであるのは、自己免疫の発達に寄与する免疫学的機序である。特に、T h 1 および T h 2 細胞などの他の T 細胞のバランス / 調節を補助する、抗原発現、サイトカインおよび白血球相互作用ならびに調節性 T 細胞は、治療標的の同定のための重要な領域である。

【 0 2 4 2 】

I L - 1 2 は、A P C によって産生される炎症促進性サイトカインであり、T h 1 エフェクター細胞の分化を促進する。I L - 1 2 は、M S 患者および E A E に罹患した動物中の発達している病変中で産生される。以前、I L - 1 2 経路中の妨害がげっ歯類中の E A E を効果的に抑制すること、およびコモンマモセット中のミエリン誘発性 E A E モデル中で、抗 I L - 1 2 m A b を用いた I L - 1 2 p 4 0 のインビボ中和が有益な効果を有することが示された。

【 0 2 4 3 】

T W E A K は、中枢神経系 (C N S) 中で恒常的に発現される T N F ファミリーのメンバーであり、細胞の種類に応じて炎症促進性、増殖性またはアポトーシス効果を有する。その受容体 F n 1 4 は、内皮細胞、反応性星状膠細胞および神経細胞によって、中枢神経系中で発現されている。T W E A K および F N 1 4 m R N A 発現は、実験的自己免疫脳脊髄炎 (E A E) の間に、脊髄中で増加した。ミエリン乏突起膠細胞糖タンパク質 (M O G) によって C 5 7 B L / 6 マウス中に誘導された E A E における抗 T W E A K 抗体治療は、マウスが初回刺激相後に治療された場合に、疾病の重度および白血球の浸潤の低下をもたらした。

【 0 2 4 4 】

一実施形態において、例えば、I L - 1 2、T W E A K、I L - 2 3、C X C L 1 3、C D 4 0、C D 4 0 L、I L - 1 8、V E G F、V L A - 4、T N F、C D 4 5 R B、C D 2 0 0、I F N、G M - C S F、F G F、C 5、C D 5 2 または C C R 2 などの 1 つ以上、例えば 2 つの標的に結合することができる D V D I g 分子が提供される。一実施形態には、M S の治療に対して有益な治療剤としての二重特異的抗 I L - 1 2 / T W E A K D V D I g が含まれる。

【 0 2 4 5 】

10

20

30

40

50

MSを治療するためのDVD分子の有用性を評価するためのいくつかの動物モデルが、本分野において公知である(Steinman L, et al., (2005) Trends Immunol. 26(11):565-71; Lublin FD., et al., (1985) Springer Semin Immunopathol. 8(3):197-208; Genain CP, et al., (1997) J Mol Med. 75(3):187-97; Tuohy VK, et al., (1999) J Exp Med. 189(7):1033-42; Owens T, et al., (1995) Neurol Clin. 13(1):51-73; および 't Hart BA, et al., (2005) J Immunol 175(7):4761-8 参照)。ヒトおよび動物種オルソログに対する親抗体の交差反応性(例えば、ヒトおよびマウスIL-12、ヒトおよびマウスTWEAKなどに対する反応性)を基礎として、「適合代理抗体」由来DVD-Ig分子を用いてマウスEAEモデルにおける妥当性確認研究を行うことが可能である; 簡潔に述べると、2つ(またはそれ以上)のマウス標的的特異的抗体を基礎とするDVD-Igは、ヒトDVD-Ig構築に使用される親ヒトまたはヒト化抗体の特徴に可能な限り適合し得る(類似した親和性、類似した中和効力、類似した半減期など)。同じ概念は他の非げっ歯類種の動物モデルに当てはまり、「適合代理抗体」由来DVD-Igは予期される薬理学および場合によると安全性研究のために選択される。これらの標的対の定型的な安全性評価に加えて、免疫抑制の程度に対する特異的検査が保証され、最高の標的対を選択する上で役立つ(Luster et al., Toxicology (1994), 92(1-3), 229-43; Descotes, et al., Developments in biological standardization (1992), 77 99-102; Jones R. 2000 Ro velizumab (ICOS Corp). IDrugs. 3(4):442-6) 参照)。

10

20

30

40

50

【0246】

しかしながら、MSは、免疫疾患だけでなく、非常に重要な神経変性コンポーネントを有する。MSにおける疾患進行は、軸索の累積損失および損傷に起因し、患者の最終疾患スコアは、これらの神経変性プロセスによって決定される(Compston A. & Coles A. (2008) Lancet 372:1502-1517; Trapp BD. & Nave KA. (2008) Annu. Rev. Neuroscienc 31:247-269)。いくつかの機構は、MSにおける軸索損傷を説明するものであり得る。関連したカルシウム媒介性神経属性を伴う神経伝達物質であるグルタミン酸塩の過剰放出、酸化窒素放出および続く軸索損傷、神経栄養因子支持体の喪失、RGM A、NOGO A、セマホリン、エフリンのような反発性または軸索増殖阻害分子の大量蓄積は、軸索に指向される神経変性および成功した軸索再生の喪失の一因となる場合がある。IL-12、TWEAK、IL-23、CXCL13、CD40、CD40L、IL-18、VEGF、VLA-4、TNF、CD45RB、CD200、IFNガンマ、GM-CSF、FGF、C5、CD52、およびCCR2のような炎症性サイトカインに対して指向される活性の中和を伴う、RGM A、NOGO A、セマホリン、エフリンのようなコンポーネントに対して指向される活性を中和する単一のDVD-Ig分子における標的化は、炎症および神経変性を同時に重視することができるが、現在の治療的MS原理のいずれによっても目的はなおも達成されていない。神経再生を刺激することは、MSにおいて観察される大量の軸索神経変性によって引き起こされる機能障害を補うことができ、それは失われた大脳機能の回復を可能にする。

【0247】

6. 敗血症

敗血症の病態生理は、グラム陰性生物(リポ多糖[LPS]、リポドA、エンドトキシン)およびグラム陽性生物(リポテイコ酸、ペプチドグリカン)の両方の外膜成分によって開始される。これらの外膜成分は、単球の表面上のCD14受容体に結合することが可能である。最近記載されたトール様受容体によって、シグナルは、その後、細胞へと伝達

され、炎症促進性サイトカインである腫瘍壊死因子 (TNF-) およびインターロイキン-1 (IL-1) の最終的な産生をもたらす。圧倒的な炎症性応答および免疫応答は、敗血症性ショックの本質的な特徴であり、敗血症によって誘導される組織損傷、多臓器不全および死亡の病因において中心的な役割を果たす。サイトカイン、特に、腫瘍壊死因子 (TNF) およびインターロイキン (IL-1) は、敗血症性ショックの極めて重要な媒介物質であることが示されている。これらのサイトカインは、組織に対して直接的な毒性効果を有しており、ホスホリパーゼ A2 も活性化させる。これらの効果および他の効果は、血小板活性化因子、酸化窒素合成酵素活性の促進、好中球による組織浸潤の促進および好中球活性の促進の増加した濃度をもたらす。

【0248】

敗血症および敗血症性ショックの治療は、なお臨床的な難問であり、炎症性応答を標的とした生物学的応答修飾物質 (すなわち、抗TNF、抗MIF) を用いた最近の前向き臨床試験は、若干の臨床的有益性を示したに過ぎなかった。最近、免疫抑制の付随期間を逆転させることを目指した治療法に関心が移っている。実験動物および重病の患者における研究は、リンパ系臓器およびいくつかの実質組織の増加したアポトーシスが、この免疫抑制、アネルギーおよび臓器系機能不全に寄与することを示している。敗血症症候群の間、リンパ球アポトーシスは、IL-2 の不存在によってまたはグルココルチコイド、グランザイムもしくはいわゆる「死亡 (death)」サイトカイン：腫瘍壊死因子 または Fas リガンドの放出によって引き金を引かれ得る。アポトーシスは、Bcl-2 ファミリーのアポトーシス促進性のメンバーおよびアポトーシス抑制性のメンバーによって影響を受け得る、細胞質および/またはミトコンドリアのカスパーゼの自己活性化を介して進行する。実験動物では、アポトーシスの阻害剤を用いた治療はリンパ系細胞のアポトーシスを抑制することができるのみならず、予後も改善し得る。抗アポトーシス作用物質を用いた臨床試験は、主にそれらの投与および組織標的化に伴う技術的困難さが原因で、実現性が低いままであるが、リンパ球アポトーシスの阻害は、敗血症患者に対する魅力的な治療の標的である。同様に、炎症性媒介物質およびアポトーシス媒介物質の両方を標的とする二重特異的作用物質は、さらなる有益性を有し得る。一実施形態は、例えば、TNF、IL-1、MIF、IL-6、IL-8、IL-18、IL-12、IL-23、FasL、LPS、トール様受容体、TLR-4、組織因子、MIP-2、ADORA2A、CASP1、CASP4、IL-10、IL-1B、NFKB1、PROC、TNFRSF1A、CSF3、CCR3、IL1RN、MIF、NFKB1、PTAFR、TLR2、TLR4、GPR44、HMOX1、ミッドカイン、IRAK1、NFKB2、SERPINA1、SERPINE1 または TREM1 などの、敗血症に関与する1つ以上の標的、一実施形態では2つの標的に結合することが可能なDVDIgに関する。敗血症に対するこのようなDVDIgの効力は、本分野において公知の前臨床動物モデルにおいて評価することが可能である (Buras JA, et al., (2005) Nat Rev Drug Discov. 4 (10): 854-65 および Calandra T, et al., (2000) Nat Med. 6 (2): 164-70 参照)。

【0249】

7. 神経疾患

7.1 神経変性疾患

神経変性疾患は、それらが、通常、年齢に依存している場合には慢性であり、または急性 (例えば、脳卒中、外傷性脳損傷、脊髄損傷など) のいずれかである。神経変性疾患は、神経細胞機能の進行性の喪失 (神経細胞死、軸索喪失、神経炎ジストロフィー、脱ミエリン化)、運動性の喪失および記憶の喪失によって特徴付けられる。慢性神経変性疾患 (例えば、アルツハイマー病) の基礎を成す機序として明らかになりつつある知見は、複雑な病因を示しており、それらの発達および進行に、様々な要因、例えば、年齢、血糖状態、アミロイド産生および多量体化、RAGE (AGE に対する受容体) に結合する後天的糖化終末産物 (AGE) の蓄積、増加した脳の酸化的ストレス、減少した脳の血流、炎症性サイトカインおよびケモカインの放出を含む神経炎症、神経細胞の機能不全およびミク

10

20

30

40

50

ログリアの活性化が寄与していることが認められている。したがって、これらの慢性神経変性疾患は、複数の細胞種および媒介物質の間で複雑な相互作用を示す。このような疾病に対する治療戦略は限られており、非特異的な抗炎症剤（例えば、コルチコステロイド、COX阻害剤）または神経細胞の喪失および/またはシナプス機能を抑制するための作用物質で炎症プロセスを遮断することが大部分を占める。これらの治療は、疾病の進行を停止させることができない。最近の研究は、可溶性A - bペプチド（A - bオリゴマー形態）に対する抗体などのより標的化された療法が、疾病の進行を停止させるのに役立つことができるのみならず、記憶および他の認知機能を維持するのにも役立つことを示唆している。これらの予備的な観察は、2以上の疾病媒介物質を標的とする特異的な療法（例えば、A - bおよび炎症促進性サイトカイン（TNFなど））が、単一の疾病機序を標的化する場合に観察されたものより、慢性神経変性疾患に対して、ずっと優れた治療的効果を提供し得ることを示唆している（例えば、可溶性A - バロン）（C E . S h e p h e r d , e t a l , N e u r o b i o l A g i n g . 2 0 0 5 O c t 2 4 ; N e l s o n R B . , C u r r P h a r m D e s . 2 0 0 5 ; 1 1 : 3 3 3 5 ; W i l l i a m L . K l e i n . ; N e u r o c h e m I n t . 2 0 0 2 ; 4 1 : 3 4 5 ; M i c h e l l e C J a n e l s i n s , e t a l . , J N e u r o i n f l a m m a t i o n . 2 0 0 5 ; 2 : 2 3 ; S o l o m a n B . , C u r r A l z h e i m e r R e s . 2 0 0 4 ; 1 : 1 4 9 ; I g o r K l y u b i n , e t a l . , N a t M e d . 2 0 0 5 ; 1 1 : 5 5 6 - 6 1 ; A r a n c i o O , e t a l . , E M B O J o u r n a l (2 0 0 4) 1 - 1 0 ; B o r n e m a n n K D , e t a l . , A m J P a t h o l . 2 0 0 1 ; 1 5 8 : 6 3 ; D e a n e R , e t a l . , N a t M e d . 2 0 0 3 ; 9 : 9 0 7 - 1 3 ; および E l i e z e r M a s l i a h , e t a l . , N e u r o n . 2 0 0 5 ; 4 6 : 8 5 7 参 照) 。

【0250】

本明細書において提供されるDVD - Ig分子は、アルツハイマーなどの慢性神経変性疾患に関与する1つ以上の標的に結合することができる。このような標的には、限定されないが、AD発症に関わる任意の媒介物質（可溶性または細胞表面）、例えば、AGE（S100A、アムホテリン）、炎症反応を促進するサイトカイン（例えば、IL - 1）、ケモカイン（例えば、MCP1）、神経再生を阻害する分子（例えば、Noggo、RGM A）、神経突起の成長を増強する分子（ニューロトロフィン）、および血液脳関門での輸送を媒介することができる分子（例えば、トランスフェリン受容体、インスリン受容体またはRAGE）が挙げられる。DVD - Ig分子の効力は、アミロイド前駆体タンパク質またはRAGEを過剰発現し、アルツハイマー病様の症候を発症するトランスジェニックマウスなどの前臨床動物モデルで妥当性を確認することが可能である。さらに、DVD - Ig分子を構築し、動物モデルで効力について検査することが可能であり、ヒト患者での検査のために、最良の治療的DVD - Igを選択することができる。DVD - Ig分子は、パーキンソン病などの他の神経変性疾患の治療のためにも使用することが可能である。 - シヌクレインが、パーキンソン病に関与している。 - シヌクレインおよび炎症性媒介物質（TNF、IL - 1、MCP - 1など）を標的とすることができるDVD - Ig分子は、パーキンソン病に対する有効な治療であることを証明することが可能であり、実施形態でもある。

【0251】

あるいは、 - シヌクレインおよびRGM Aを標的化することができるDVD - Igは、パーキンソン病患者の黒質において病気の進行を中断できるだけでなく、損傷された神経突起の再生成長をもたらすことができ、これは、RGM Aが、近年、PD患者におけるこの領域で強力に上方制御されることが示されてきたためである（Bosser's K . e t a l . (2 0 0 9) B r a i n P a t h o l . 1 9 : 9 1 - 1 0 7) 。

【0252】

7.2 神経細胞の再生および脊髄損傷

病的機序の知見の増大にかかわらず、脊髄損傷（SCI）は、なお、多大な損害を与え

10

20

30

40

50

る症状であり、高い医学的な要求を特徴とする医学的な適応症である。多くの脊髄損傷は、挫傷または圧迫傷害であり、通常、一次損傷に続いて、最初の損傷を悪化させ、病変部位の著しい拡大（特には、10倍超）をもたらす二次的な損傷機序（炎症媒介物質、例えば、サイトカインおよびケモカイン）が起こる。SCIにおけるこれらの原発および続発性の機序は、他の手段、例えば外傷および発作によって引き起こされた脳損傷における機序と極めて類似している。満足する治療は存在せず、メチルプレドニゾロン（MP）の高用量ボラス注射は、損傷から8時間後という狭い時間枠内で使用される唯一の療法である。しかしながら、この治療は、顕著な機能的回復が全くなしに、続発性損傷を予防することのみを目的としている。明瞭な効果の欠如ならびにその後の感染症を伴う免疫抑制および重い組織病理学的な筋肉の変化などの重い副作用に対して大きな批判が為されている。内在性の再生能を刺激する他の薬物、生物学または小分子は認可されていないが、有望な治療原理および薬物候補が、近年、SCIの動物モデルにおいて有効性を示し、最初の有望な臨床データが提示されている。多くの場合、ヒトSCIにおける機能的回復の欠如は、病変部位における、瘢痕組織中、ミエリン中および損傷を伴う細胞上における神経突起の増殖を阻害する因子によって引き起こされる。このような因子は、ミエリン随伴タンパク質Noggin、OMgpおよびMAG、RGMA、瘢痕随伴CSPG（コンドロイチン硫酸プロテオグリカン）および反応性星状膠細胞に対する阻害因子（一部のセマホリンおよびエフリン）である。しかしながら、病変部位では、増殖阻害分子が見出されるのみならず、ニューロトロフィン、ラミニン、L1および他のような神経突起成長刺激因子も見出される。阻害的な影響の低下が、バランスを、増殖阻害から増殖促進へとシフトさせ得るので、神経突起成長阻害分子および神経突起成長促進分子のこの協調は、NogginまたはRGMAのような単一の因子を遮断することが、げっ歯類SCIモデルにおいて著しい機能回復をもたらしたことを説明し得る。しかしながら、単一の神経突起成長阻害分子を遮断することによって観察された回復は完全ではなかった。より速く、より顕著な回復を達成するためには、2つの神経突起成長阻害分子（例えば、NogginおよびRGMA）を遮断するまたは神経突起成長阻害分子を遮断し、神経突起成長増強分子の機能を増強するか（例えば、Nogginおよびニューロトロフィン）、または神経突起成長阻害分子（例えば、Noggin）および炎症促進性分子（例えば、TNF）を遮断することが、望ましい場合があり得る（McGee AW, et al., Trends Neurosci. 2003; 26:193; Marco Domeniconi, et al., J Neurol Sci. 2005; 233:43; Milan Makwanal, et al., FEBS J. 2005; 272:2628; Barry J. Dickson, Science. 2002; 298:1959; Felicia Yu Hsuan Teng, et al., J Neurosci Res. 2005; 79:273; Tara Karnezis, et al., Nature Neuroscience 2004; 7, 736; Gang Xu, et al., J. Neurochem. 2004; 91:1018 参照）。

【0253】

一態様において、NgRおよびRGMA; NogginおよびRGMA; MAGおよびRGMA; OMgpおよびRGMA; RGMAおよびRGM B; RGMAおよびセマホリン3A; RGMAおよびセマホリン4; CSPGおよびRGMA; アグレカン、ミッドカイン、ニューロカン、ベルシカン、ホスファカン、Te38およびTNF- α ; 樹状突起および軸索の出芽を促進する抗体と組み合わせられたA β 球状体（globulomer）特異的抗体などの標的対に結合することが可能なDVD-Igが提供される。樹状突起病変および軸索損傷、または神経炎ジストロフィーは、ADの極めて早期の兆候であり、NOGO Aは樹状突起の成長を制限し、ミエリンに関連した他の分子および上述される分子、例えば、RGMA、MAG、OMgpは、軸索再成長を損なうことが知られている。樹状突起の病変は、ADの極めて早期の兆候であり、NOGO Aが樹状突起の成長を制限することが知られている。abのこのような種類を、SCI候補（ミエリンタンパク質）Abのいずれかと組み合わせることが可能である。他のDVD-Ig標的は、NgR-p

75、NgR - Troy、NgR - Nogo66 (Nogo)、NgR - Lingo、Lingo - Troy、Lingo - p75、MAGまたはOmgpのあらゆる組合せを含み得る。さらに、標的には、神経突起の阻害に関与すると推定されているすべての媒介物質(可溶性または細胞表面)、例えば、Nogo、Omgp、MAG、RGMA、セマホリン、エフリン、可溶性A - b、炎症促進性サイトカイン(例えば、IL - 1)、ケモカイン(例えば、MIP1a)、神経再生を阻害する分子も含まれ得る。抗nogo / 抗RGMAまたは類似のDVD - Ig分子の効力は、脊髄損傷の前臨床動物モデルにおいて、妥当性を確認することが可能である。さらに、これらのDVD - Ig分子を構築し、動物モデルで効力について検査することが可能であり、ヒト患者での検査のために、最良の治療的DVD - Igを選択することができる。さらに、単一の受容体、例えば3つのリガンドNogo、OMGPおよびMAGに結合するNogo受容体ならびにA - bおよびS100Aに結合するRAGE上の2つの異なるリガンド結合部位を標的とするDVD - Ig分子を構築することが可能である。さらに、神経突起成長阻害剤、例えば、nogoおよびnogo受容体は、多発性硬化症のような免疫学的疾患において神経再生を抑制する上でも役割を果たす。nogo - nogo受容体の相互作用の阻害は、多発性硬化症の動物モデルの回復を増強させることが示されている。したがって、1つの免疫媒介物質、例えば、IL - 12のようなサイトカイン、および神経突起成長阻害分子、例えば、nogoまたはRGMの機能を遮断することができるDVD - Ig分子は、免疫または神経突起成長阻害剤分子のみを遮断するより、より速く、より大きな効力を与え得る。

10

20

30

40

50

【0254】

一般に、抗体は、効果的に関連した方法で血液脳関門(BBB)を通過しない。しかしながら、ある種の神経学的疾患、例えば、脳卒中、外傷性脳損傷、多発性硬化症などにおいて、BBBは危険に晒され、DVD - Igおよび抗体の脳への浸透の増加を許容することがあり得る。他の神経学的状態において、BBB漏出が起こっていない場合、内因性輸送システムの標的化を用いてもよく、これには、担体を媒介とした輸送、例えば、グルコースおよびアミノ酸担体、ならびにBBBの血管内皮での受容体を媒介としたトランスサイトーシスを介する細胞構造/受容体が含まれ、このようにしてDVD - IgのトランスBBB輸送を可能にする。このような輸送を可能にするBBBでの構造には、限定されないが、インスリン受容体、トランスフェリン受容体、LRPおよびRAGEが挙げられる。さらに、戦略は、低分子量薬物、ナノ粒子および核酸を含むCNSへの潜在的な薬物を輸送するためのシャトルとしてのDVD - Igの使用も可能にする(Coloma, M J, et al. (2000) Pharm Res. 17(3): 266 - 74; Boado, R J, et al. (2007) Bioconj. Chem. 18(2): 447 - 55)。

【0255】

神経学的疾患を治療するために以下の標的の対に結合することができるDVD - Igが意図される: NGFおよびMTX; NGFおよびNKG2D; NGFおよびIGF1、2; NGFおよびRON; NGFおよびErbb3; NGFおよびCD - 3; NGFおよびIGFR; NGFおよびHGF; NGFおよびVEGF; NGFおよびDLL4; NGFおよびP1GF; NGFおよびCD - 20; NGFおよびEGFR; NGFおよびHER - 2; NGFおよびCD - 19; NGFおよびCD - 80; NGFおよびCD - 22; NGFおよびCD - 40; NGFおよびc - MET; ならびにNGFおよびNRP1(実施例2.1から2.60を参照)。

【0256】

8. 腫瘍疾患

モノクローナル抗体療法が、癌に対する重要な治療法として登場している(von Mehren, M., et al. (2003) Annu. Rev. Med. 54: 343 - 69)。抗体は、アポトーシス、再誘導された細胞毒性、リガンド - 受容体相互作用の妨害を誘導し、または新生物表現型にとって重大なタンパク質の発現を抑制することによって、抗腫瘍効果を発揮し得る。さらに、抗体は、腫瘍微小環境の成分を標的とすること

が可能であり、腫瘍に付随する脈管構造の形成など不可欠な構造を擾乱する。抗体は、そのリガンドが増殖因子である受容体（上皮増殖因子受容体など）を標的とすることも可能である。したがって、抗体は、細胞増殖を刺激する天然のリガンドが標的とされる腫瘍細胞へ結合することを阻害する。あるいは、抗体は、抗イディオタイプネットワーク、補体媒介性細胞傷害または抗体依存性細胞傷害（ADCC）を誘導し得る。2つの別個の腫瘍媒介物質を標的とする二重特異的抗体の使用は、単一特異的療法に比べて、さらなる有利さを与えるものと思われる。

【0257】

別の実施形態において、本明細書で提供されるDVDは、VEGFおよびホスファチジルセリン；VEGFおよびErbb3；VEGFおよびPLGF；VEGFおよびROBO4；VEGFおよびBSG2；VEGFおよびCDCP1；VEGFおよびANPEP；VEGFおよびc-MET；HER-2およびERBB3；HER-2およびBSG2；HER-2およびCDCP1；HER-2およびANPEP；EGFRおよびCD64；EGFRおよびBSG2；EGFRおよびCDCP1；EGFRおよびANPEP；IGF1RおよびPDGFR；IGF1RおよびVEGF；IGF1RおよびCD20；CD20およびCD74；CD20およびCD30；CD20およびDR4；CD20およびVEGFR2；CD20およびCD52；CD20およびCD4；HGFおよびc-MET；HGFおよびNRP1；HGFおよびホスファチジルセリン；Erbb3およびIGF1R；Erbb3およびIGF1、2；c-MetおよびHer-2；c-MetおよびNRP1；c-MetおよびIGF1R；IGF1、2およびPDGFR；IGF1、2およびCD20；IGF1、2およびIGF1R；IGF2およびEGFR；IGF2およびHER2；IGF2およびCD20；IGF2およびVEGF；IGF2およびIGF1R；IGF1およびIGF2；PDGFRaおよびVEGFR2；PDGFRaおよびPLGF；PDGFRaおよびVEGF；PDGFRaおよびc-Met；PDGFRaおよびEGFR；PDGFRbおよびVEGFR2；PDGFRbおよびc-Met；PDGFRbおよびEGFR；RONおよびc-Met；RONおよびMTSP1；RONおよびMSP；RONおよびCDCP1；VGFR1およびPLGF；VGFR1およびRON；VGFR1およびEGFR；VGFR2およびPLGF；VGFR2およびNRP1；VGFR2およびRON；VGFR2およびDLL4；VGFR2およびEGFR；VGFR2およびROBO4；VGFR2およびCD55；LPAおよびS1P；EPHB2およびRON；CTLA4およびVEGF；CD3およびEPCAM；CD40およびIL6；CD40およびIGF；CD40およびCD56；CD40およびCD70；CD40およびVEGFR1；CD40およびDR5；CD40およびDR4；CD40およびAPRIL；CD40およびBCMA；CD40およびRANKL；CD28およびMAG；CD80およびCD40；CD80およびCD30；CD80およびCD33；CD80およびCD74；CD80およびCD2；CD80およびCD3；CD80およびCD19；CD80およびCD4；CD80およびCD52；CD80およびVEGF；CD80およびDR5；CD80およびVEGFR2；CD22およびCD20；CD22およびCD80；CD22およびCD40；CD22およびCD23；CD22およびCD33；CD22およびCD74；CD22およびCD19；CD22およびDR5；CD22およびDR4；CD22およびVEGF；CD22およびCD52；CD30およびCD20；CD30およびCD22；CD30およびCD23；CD30およびCD40；CD30およびVEGF；CD30およびCD74；CD30およびCD19；CD30およびDR5；CD30およびDR4；CD30およびVEGFR2；CD30およびCD52；CD30およびCD4；CD138およびRANKL；CD33およびFTL3；CD33およびVEGF；CD33およびVEGFR2；CD33およびCD44；CD33およびDR4；CD33およびDR5；DR4およびCD137；DR4およびIGF1、2；DR4およびIGF1R；DR4およびDR5；DR5およびCD40；DR5およびCD137；DR5およびCD20；DR5およびEGFR；DR5およびIGF1、2；DR5およびIGFR、DR5およびHER-2ならば

にEGFRおよびDLL4に結合することができる。他の標的の組合せには、EGF/erb-2/erb-3ファミリーの1つ以上のメンバーが含まれる。DVDIgが結合し得る、腫瘍疾患に關与する他の標的(1つ以上)には、CD52、CD20、CD19、CD3、CD4、CD8、BMP6、IL12A、IL1A、IL1B、IL2、IL24、INHA、TNF、TNFSF10、BMP6、EGF、FGF1、FGF10、FGF11、FGF12、FGF13、FGF14、FGF16、FGF17、FGF18、FGF19、FGF2、FGF20、FGF21、FGF22、FGF23、FGF3、FGF4、FGF5、FGF6、FGF7、FGF8、FGF9、GRP、IGF1、IGF2、IL12A、IL1A、IL1B、IL2、INHA、TGFA、TGFB1、TGFB2、TGFB3、VEGF、CDK2、FGF10、FGF18、FGF2、FGF4、FGF7、IGF1R、IL2、BCL2、CD164、CDKN1A、CDKN1B、CDKN1C、CDKN2A、CDKN2B、CDKN2C、CDKN3、GNRH1、IGFBP6、IL1A、IL1B、ODZ1、PAWR、PLG、TGFB1I1、AR、BRCA1、CDK3、CDK4、CDK5、CDK6、CDK7、CDK9、E2F1、EGFR、ENO1、ERBB2、ESR1、ESR2、IGFBP3、IGFBP6、IL2、INSL4、MYC、NOX5、NR6A1、PAP、PCNA、PRKCQ、PRKD1、PRL、TP53、FGF22、FGF23、FGF9、IGFBP3、IL2、INHA、KLK6、TP53、CHGB、GNRH1、IGF1、IGF2、INHA、INSL3、INSL4、PRL、KLK6、SHBG、NR1D1、NR1H3、NR1I3、NR2F6、NR4A3、ESR1、ESR2、NR0B1、NR0B2、NR1D2、NR1H2、NR1H4、NR1I2、NR2C1、NR2C2、NR2E1、NR2E3、NR2F1、NR2F2、NR3C1、NR3C2、NR4A1、NR4A2、NR5A1、NR5A2、NR6A1、PGR、RARβ、FGF1、FGF2、FGF6、KLK3、KRT1、APOC1、BRCA1、CHGA、CHGB、CLU、COL1A1、COL6A1、EGF、ERBB2、ERK8、FGF1、FGF10、FGF11、FGF13、FGF14、FGF16、FGF17、FGF18、FGF2、FGF20、FGF21、FGF22、FGF23、FGF3、FGF4、FGF5、FGF6、FGF7、FGF8、FGF9、GNRH1、IGF1、IGF2、IGFBP3、IGFBP6、IL12A、IL1A、IL1B、IL2、IL24、INHA、INSL3、INSL4、KLK10、KLK12、KLK13、KLK14、KLK15、KLK3、KLK4、KLK5、KLK6、KLK9、MMP2、MMP9、MSMB、NTN4、ODZ1、PAP、PLAU、PRL、PSAP、SERPINA3、SHBG、TGFA、TIMP3、CD44、CDH1、CDH10、CDH19、CDH20、CDH7、CDH9、CDH1、CDH10、CDH13、CDH18、CDH19、CDH20、CDH7、CDH8、CDH9、ROBO2、CD44、ILK、ITGA1、APC、CD164、COL6A1、MTSS1、PAP、TGFB1I1、AGR2、AIG1、AKAP1、AKAP2、CANT1、CAV1、CDH12、CLDN3、CLN3、CYB5、CYC1、DAB2IP、DES、DNCL1、ELAC2、ENO2、ENO3、FASN、FLJ12584、FLJ25530、GAGEB1、GAGEC1、GGT1、GSTP1、HIP1、HUMCYT2A、IL29、K6HF、KAI1、KRT2A、MIB1、PART1、PATE、PCA3、PIAS2、PIK3CG、PPID、PR1、PSCA、SLC2A2、SLC33A1、SLC43A1、STEAP、STEAP2、TPM1、TPM2、TRPC6、ANGPT1、ANGPT2、ANPEP、ECGF1、EREG、FGF1、FGF2、FIGF、FLT1、JAG1、KDR、LAMA5、NRP1、NRP2、PGF、PLXDC1、STAB1、VEGF、VEGFC、ANGPTL3、BAI1、COL4A3、IL8、LAMA5、NRP1、NRP2、STAB1、ANGPTL4、PECAM1、PF4、PROK2、SERPINF1、TNFAIP2、CCL11、CCL2、CXCL1、CXCL10、CXCL3、CXCL5、CXCL6、CXCL9、IFNA1、IFNB1、IFNG、IL1B、IL6、MDK、EDG

1、EFNA1、EFNA3、EFNB2、EGF、EPHB4、FGFR3、HGF、IGF1、ITGB3、PDGFA、TEK、TGFA、TGFB1、TGFB2、TGFB1、CCL2、CDH5、COL18A1、EDG1、ENG、ITGAV、ITGB3、THBS1、THBS2、BAD、BAG1、BCL2、CCNA1、CCNA2、CCND1、CCNE1、CCNE2、CDH1(E-カドヘリン)、CDKN1B(p27Kip1)、CDKN2A(p16INK4a)、COL6A1、CTNNB1(b-カテニン)、CTSB(カテプシンB)、ERBB2(Her-2)、ESR1、ESR2、F3(TF)、FOSL1(FRA-1)、GATA3、GSN(ゲルソリン)、IGFBP2、IL2RA、IL6、IL6R、IL6ST(糖タンパク質130)、ITGA6(a6インテグリン)、JUN、KLK5、KRT19、MAP2K7(c-Jun)、MKI67(Ki-67)、NGFB(NGF)、NGFR、NME1(NM23A)、PGR、PLAU(uPA)、PTEN、SERPINB5(マスピン)、SERPINE1(PAI-1)、TGFA、THBS1(トロンボスポンジン-1)、TIE(Tie-1)、TNFRSF6(Fas)、TNFSF6(FasL)、TOP2A(トポイソメラーゼIIa)、TP53、AZGP1(垂鉛-a-糖タンパク質)、BPAG1(プレクチン)、CDKN1A(p21Wap1/Cip1)、CLDN7(クラウジン-7)、CLU(クラステリン)、ERBB2(Her-2)、FGF1、FLRT1(フィブロネクチン)、GABRP(GABAa)、GNAS1、ID2、ITGA6(a6インテグリン)、ITGB4(b4インテグリン)、KLF5(GCBoxBP)、KRT19(ケラチン19)、KRTHB6(毛髪特異的タイプII型ケラチン)、MACMARKS、MT3(メタロチオネクチン-II)、MUC1(ムチン)、PTGS2(COX-2)、RAC2(p21Rac2)、S100A2、SCGB1D2(リポフィリンB)、SCGB2A1(マンマグロピン2)、SCGB2A2(マンマグロピン1)、SPRR1B(Spr1)、THBS1、THBS2、THBS4およびTNFAIP2(B94)、RON、c-Met、CD64、DLL4、PLGF、CTLA4、ホスファチジルセリン、ROBO4、CD80、CD22、CD40、CD23、CD28、CD80、CD55、CD38、CD70、CD74、CD30、CD138、CD56、CD33、CD2、CD137、DR4、DR5、RANKL、VEGFR2、PDGFR、VEGFR1、MTSP1、MSP、EPHB2、EPHA1、EPHA2、EPCAM、PGE2、NKG2D、LPA、SIP、APRIL、BCMA、MAPG、FLT3、PDGFR、PDGFR、ROP1、PSMA、PSCA、SCD1またはCD59が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0258】

IV. 医薬組成物

本発明の結合タンパク質および医薬として許容される担体を含む医薬組成物が提供される。本明細書で提供される結合タンパク質を含む医薬組成物は、疾患を診断し、検出し、もしくはモニタリングし、疾患または1つ以上のその症候を予防し、治療し、管理し、もしくは軽減する上で、および/または研究において使用されるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、組成物は、1つ以上の本明細書で提供されるタンパク質を含む。別の実施形態において、医薬組成物は、1つ以上の本明細書で提供される結合タンパク質、および疾患を治療するための、本明細書で提供される結合タンパク質以外の1つ以上の予防または治療剤を含む。一実施形態において、予防剤または治療剤は、疾患または1つ以上のその症候の予防、治療、管理または軽減に有用であることが知られており、または疾患または1つ以上のその症候の予防、治療、管理または軽減においてこれまで使用されており、もしくは現在使用されている。これらの実施形態に従えば、組成物は、担体、希釈剤または賦形剤をさらに含み得る。

【0259】

本明細書で提供される結合タンパク質は、対象に投与するのに適した医薬組成物中に取り込ませることが可能である。典型的には、医薬組成物は、本明細書で提供される結合タンパク質および医薬として許容される担体を含む。本明細書において使用される「医薬と

して許容される担体」には、生理的に適合性がある、あらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などが含まれる。医薬として許容される担体の例には、水、生理的食塩水、リン酸緩衝化された生理的食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなどの1つ以上およびこれらの組合せが含まれる。いくつかの実施形態において、等張剤、例えば、糖、マニトール、ソルビトールなどの多価アルコールまたは塩化ナトリウムが組成物中に含まれる。医薬として許容される担体は、抗体または抗体部分の保存期間または有効性を増強する、湿潤剤または乳化剤、防腐剤または緩衝剤などの補助物質の微量をさらに含み得る。

【0260】

様々な送達系が公知であり、例えば、リポソーム、微粒子、マイクロカプセル、抗体または抗体断片を発現することができる組み換え細胞、受容体によって媒介されるエンドサイトーシス（例えば、Wu and Wu, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432 (1987) 参照）、レトロウイルスまたは他のベクターの一部としての核酸の構築物などに封入して、本明細書で提供される1つ以上の抗体または本明細書で提供される1つ以上の抗体および疾患または1つ以上のその症候を予防し、管理し、治療し、もしくは軽減するのに有用な予防剤または治療剤の組合せを投与するために使用することが可能である。本明細書で提供される予防剤または治療剤を投与する方法には、非経口投与（例えば、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内および皮下）、硬膜外投与、腫瘍内投与および粘膜投与（例えば、鼻内および経口経路）が含まれるが、これらに限定されない。さらに、例えば、吸入装置または噴霧器およびエアロゾル化剤を加えた製剤の使用によって、経肺投与を使用することが可能である。例えば、それぞれその全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第6,019,968号；第5,985,320号；第5,985,309号；第5,934,272号；第5,874,064号；第5,855,913号；第5,290,540号；および第4,880,078号；ならびにPCT公開WO92/19244；WO97/32572；WO97/44013；WO98/31346；およびWO99/66903を参照されたい。一実施形態において、本明細書で提供される結合タンパク質、組合せ療法または本明細書で提供される組成物は、Alkermes AIR（登録商標）経肺薬物送達技術（Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.）を用いて投与される。特定の実施形態において、本明細書で提供される予防剤または治療剤は、筋肉内、静脈内、腫瘍内、経口、鼻内、経肺または皮下投与される。予防剤または治療剤は、あらゆる都合のよい経路によって、例えば、注入もしくはポラス注射によって、上皮または粘膜皮下の裏打ち（例えば、口粘膜、直腸および腸粘膜など）を通じた吸収によって投与され得、生物学的に活性な他の作用物質と一緒に投与され得る。投与は、全身または局所であり得る。

【0261】

一実施形態において、インビトロにおける抗体と連結したカーボンナノチューブ（CNT）と腫瘍細胞の特異的結合、その後の近赤外（NIR）光を用いたこれらの高度に特異的な除去は、腫瘍細胞を標的にするために使用することが可能である。例えば、ビオチン化極性脂質は、安定した生体適合性非細胞毒性CNT分散物を調製するために使用することが可能であり、次いでこの分散物は、1つ以上の腫瘍抗原（例えば、CD22）に対する1つまたは2つの異なるneutraliteアビジン誘導体化DVD-Igに付着される（Chakravarty, P. et al. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105: 8697-8702）。

【0262】

特定の実施形態において、治療を必要としている部位へ局所的に、本明細書で提供される予防剤または治療剤を投与することが望ましい場合があり得る。これは、例えば、局所的注入によって、注射によって、またはインプラントの手段によって達成され得るが、これらに限定されるものではなく、前記インプラントは、シアラスチック（sialastic）膜、ポリマー、繊維性マトリックス（例えば、Tissue1（登録商標））またはコラーゲンマトリックスなどの、膜およびマトリックスを含む多孔性または非多孔性材

10

20

30

40

50

料である。一実施形態において、本明細書で提供される1つ以上の抗体アンタゴニストの有効量は、疾患またはその症候を予防し、治療し、管理し、および/または軽減するために、対象の罹患した部位へ局所的に投与される。別の実施形態において、本明細書で提供される1つ以上の抗体の有効量は、疾患または1つ以上のその症候を予防し、治療し、管理し、および/または軽減するために、本明細書で提供される結合タンパク質以外の1つ以上の治療薬（例えば、1つ以上の予防剤または治療剤）の有効量と組み合わせて、対象の罹患した部位へ局所的に投与される。

【0263】

別の実施形態において、予防剤または治療剤は、調節された放出系または徐放系に入れて送達することが可能である。一実施形態において、調節された放出または徐放を達成するためにポンプを使用し得る（Langer, 上記; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:20; Buchwald et al., 1980, Surgery 88:507; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574 参照）。別の実施形態において、治療薬の調節された放出または徐放を達成するために、ポリマー材料を使用することが可能である。（例えば、Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, 1983, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61 を参照されたい。Levy et al., 1985, Science 228:190; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71:105); 米国特許第5,679,377号; 米国特許第5,916,597号; 米国特許第5,912,015号; 米国特許第5,989,463号; 米国特許第5,128,326号; PCT公開WO99/15154; およびPCT公開WO99/20253も参照されたい。徐放製剤中で使用されるポリマーの例には、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、ポリ(メチルメタクリレート)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(エチレン-ビニルアセタート共重合体)、ポリ(メタクリル酸)、ポリグリコリド(PLG)、ポリ無水物、ポリ(N-ビニルピロリドン)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリアクリルアミド、ポリ(エチレングリコール)、ポリラクチド(PLA)、ポリ(ラクチド-グリコリド共重合体)(PLGA) およびポリオルトエステルが含まれるが、これらに限定されるものではない。一実施形態において、徐放製剤中で使用されるポリマーは、不活性であり、溶脱可能な不純物を含まず、保存時に安定であり、無菌であり、生物分解性である。さらに別の実施形態において、調節された放出系または徐放系は、予防剤または治療剤の近くに配置されて、全身投薬量の一部のみを必要とするようにすることができる（例えば、Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984) 参照）。

【0264】

徐放系は、Langer (1990, Science 249:1527-1533) による概説中に論述されている。本明細書で提供される1つ以上の治療剤を含む徐放製剤を作製するために、当業者に公知のあらゆる技術を使用することが可能である。例えば、それぞれ全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第4,526,938号、PCT公開WO91/05548、PCT公開WO96/20698、Ning et al., 1996, "Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel," Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song et al., 1995, "A

10

20

30

40

50

ntibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions," PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397, Cleek et al., 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application," Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854 および Lam et al., 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery," Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760 を参照されたい。
【0265】

組成物が予防剤または治療剤をコードする核酸である特定の実施形態において、適切な核酸発現ベクターの一部として、核酸を構築し、例えば、レトロウイルスベクター（米国特許第4,980,286号）の使用によって、または直接の注射によって、または微粒子照射（例えば、遺伝子銃；Biolistic, Dupon）の使用によって、核酸が細胞内となるように核酸を投与し、または脂質もしくは細胞表面受容体もしくは形質移入剤でコーティングし、または核内に入ることが知られているホメオボックス様ペプチドに連結して核酸を投与することによって（例えば、Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868 参照）、核酸がコードしている予防剤または治療剤の発現を促進するために、核酸をインピボで投与することが可能である。あるいは、相同的組み換えによる発現のために、核酸を細胞内に導入し、宿主細胞DNA内に取り込むことが可能である。

【0266】

本明細書で提供される医薬組成物は、その予定された投与経路と適合的であるように製剤化される。投与の経路の例には、非経口、例えば、静脈内、皮内、皮下、経口、鼻内（例えば、吸入）、経皮（例えば、局所）、経粘膜および直腸投与が含まれるが、これらに限定されない。特異的な実施形態において、組成物は、ヒトへの静脈内、皮下、筋肉内、経口、鼻内または局所投与に適合された医薬組成物として、定型的な手法に従って製剤化される。典型的には、静脈内投与のための組成物は、無菌の等張水性緩衝液中の溶液である。必要な場合には、組成物は、可溶化剤および注射の部位における痛みを和らげるための局所麻酔剤（リグノカム lignocaine）なども含む得る。

【0267】

組成物が局所的に投与されるべき場合には、組成物は、軟膏、クリーム、経皮パッチ、ローション、ゲル、シャンプー、スプレー、エアロゾル、溶液、エマルジョンの形態でまたは当業者に周知の他の形態で製剤化することが可能である。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19th ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995) を参照されたい。一実施形態において、噴霧不能な局所剤形の場合には、局所適用に適合性のある担体または1つ以上の賦形剤を含み、水より大きな動粘性係数を有する粘性ないし半固体または固体の形態が使用される。適切な製剤は、所望であれば、滅菌され、または、例えば、浸透圧などの様々な特性に影響を及ぼすための補助剤（例えば、防腐剤、安定化剤、湿潤剤、緩衝剤または塩）と混合された、溶液、懸濁液、エマルジョン、クリーム、軟膏、粉末、リニメント剤、軟膏（salve）など（これらに限定されない）を含む。他の適切な局所剤形には、一実施形態において、固体または液体不活性担体と組み合わせられた活性成分が、加圧された揮発性物質（例えば、フレオンなどの気体状噴射剤）との混合物中または搾り出し瓶中に梱包されている噴霧可能なエアロゾル調製物が含まれる。所望であれば、医薬組成物および剤形に、加湿剤または湿潤剤も添加することが可能である。このような追加の成分の例は、本分野において周知である。

【0268】

本方法が組成物の鼻内投与を含む場合には、組成物は、エアロゾル形態、スプレー、ミスト中に、または点鼻薬の形態で製剤化することが可能である。特に、予防剤または治療剤は、適切な噴射剤（例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素またはその他の適切な気体）を用いて、加圧されたパックまたは噴霧器からエアロゾルスプレー提示の形態で都合よく送達することが可能である。加圧されたエアロゾルの場合には、投薬単位は、定量された量を送達するためのバルブを付与することによって決定され得る。化合物とラクトースまたはデンプンなどの適切な粉末基剤との粉末混合物を含有する、吸入装置またはガス注入装置で使用するためのカプセルおよびカートリッジ（例えば、ゼラチンから構成される。）を製剤化し得る。

10

【0269】

本方法が経口投与を含む場合、錠剤、カプセル、カシェ剤、ゲルキャップ、溶液、懸濁液などの形態で、組成物を経口的に製剤化することが可能である。錠剤またはカプセルは、従来手段によって、結合剤（例えば、予めゼラチン化されたトウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロース）；充填剤（例えば、ラクトース、微結晶セルロースまたはリン酸水素カルシウム）；潤滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルクまたはシリカ）；崩壊剤（例えば、イモデンプンまたはグリコール酸デンプンナトリウム）；または湿潤剤（例えば、ラウリル硫酸ナトリウム）などの、医薬として許容される賦形剤とともに調製することが可能である。錠剤は、本分野において周知な方法によって被覆され得る。経口投与用の液体調製物は、溶液、シロップもしくは懸濁液の形態（これらに限定されない。）を採り得、または、使用前に、水もしくは他の適切なビヒクルを用いて構成するための乾燥製品として与えられ得る。このような液体調製物は、慣用の手段によって、懸濁剤（例えば、ソルビトールシロップ、セルロース誘導體または硬化食用脂肪）；乳化剤（例えば、レシチンまたはアカシア）；非水性ビヒクル（例えば、アーモンド油、油状エステル、エチルアルコールまたは分画された植物油）；および防腐剤（例えば、p-ヒドロキシ安息香酸メチルもしくはプロピルまたはソルビン酸）などの医薬として許容される添加物とともに調製され得る。調製物は、適宜、緩衝液塩、着香剤、着色剤および甘味剤も含有し得る。経口投与用調製物は、予防剤または治療剤の遅い放出、調節された放出または徐放のために、適切に製剤化され得る。

20

30

【0270】

本明細書で提供される方法は、例えば、吸入装置または噴霧器の使用、エアロゾル化剤とともに製剤化された組成物の使用によって、経肺投与を含み得る。例えば、それぞれその全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第6,019,968号；第5,985,320号；第5,985,309号；第5,934,272号；第5,874,064号；第5,855,913号；第5,290,540号；および第4,880,078号；ならびにPCT公開WO92/19244；WO97/32572；WO97/44013；WO98/31346；およびWO99/66903を参照されたい。特定の実施形態において、本明細書で提供される結合タンパク質、組合せ療法および/または本明細書で提供される組成物は、Alkermes AIR（登録商標）経肺薬物送達技術（Alkermes, Inc., Cambridge, Mas.）を用いて投与される。

40

【0271】

本方法は、注射による（例えば、ボラス注射または連続的注入による）非経口投与のために製剤化された組成物の投与を含み得る。注射用製剤は、添加された防腐剤とともに、単位剤形で（例えば、アンプルまたは複数投薬容器に入れて）与え得る。組成物は、油性または水性ビヒクル中の懸濁液、溶液またはエマルジョンなどの形態を採り得、懸濁剤、安定化剤および/または分散剤などの処方剤を含有し得る。あるいは、活性成分は、使用前に適切なビヒクル（例えば、発熱物質を含まない無菌水）で構成するための粉末形態であり得る。

【0272】

50

本明細書で提供される方法は、さらに、デポ調製物として製剤化された組成物の投与を含み得る。このような長期作用製剤は、（例えば、皮下または筋肉内への）植え込みによって、または筋肉内注射によって投与され得る。したがって、例えば、組成物は、適切なポリマー材料もしくは疎水性材料（例えば、許容される油中のエマルジョンとして）またはイオン交換樹脂とともに、または難溶性誘導体として（例えば、難溶性塩として）調合され得る。

【0273】

本明細書で提供される方法は、中性または塩形態として製剤化された組成物の投与を包含する。医薬として許容される塩には、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などに由来するものなどの陰イオンとともに形成された塩、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどに由来するものなど、陽イオンとともに形成された塩が含まれる。

10

【0274】

一般的には、組成物の成分は、別個に、または単位剤形中に（例えば、活性剤の量を示した注射器またはにおい袋など、密閉された容器中の凍結乾燥された乾燥粉末または無水濃縮物として）一緒に混合されて供給される。投与の様式が注入である場合には、組成物は、医薬等級の無菌水または生理的食塩水を含む注入瓶を用いて分配することが可能である。投与の様式が注射による場合には、注射用の無菌水または生理的食塩水の注射器は、投与前に成分が混合され得るように提供することが可能である。

20

【0275】

一実施形態において、本明細書で提供される予防剤もしくは治療剤の1つ以上または本発明の医薬組成物が、薬剤の量を示した注射器またはにおい袋など、密閉された容器中に梱包されることも提供される。一実施形態において、本明細書で提供される予防剤もしくは治療剤の1つ以上または医薬組成物は、密閉された容器中の凍結乾燥された乾燥無菌粉末または無水濃縮物として供給され、対象に投与するための適切な濃度になるように（例えば、水または生理的食塩水で）再構成することができる。一実施形態において、本明細書で提供される予防剤もしくは治療剤の1つ以上または医薬組成物は、少なくとも5 mg、少なくとも10 mg、少なくとも15 mg、少なくとも25 mg、少なくとも35 mg、少なくとも45 mg、少なくとも50 mg、少なくとも75 mgまたは少なくとも100 mgの単位投薬量で、密封された容器中の凍結乾燥された乾燥無菌粉末として供給される。本明細書で提供される凍結乾燥された予防もしくは治療剤または医薬組成物は、その元の容器中で、2 と 8 の間で保存されるべきであり、本明細書で提供される予防剤もしくは治療剤または医薬組成物は、再構成後、1週以内、例えば5日以内、72時間以内、48時間以内に、24時間以内に、12時間以内に、6時間以内に、5時間以内に、3時間以内に、または1時間以内に投与されるべきである。別の実施形態において、本明細書で提供される予防剤もしくは治療剤の1つ以上または本発明の医薬組成物は、薬剤の量および濃度を示す密閉された容器中に、液体形態で供給される。一実施形態において、投与された組成物の液体形態は、少なくとも0.25 mg/ml、少なくとも0.5 mg/ml、少なくとも1 mg/ml、少なくとも2.5 mg/ml、少なくとも5 mg/ml、少なくとも8 mg/ml、少なくとも10 mg/ml、少なくとも15 mg/kg、少なくとも25 mg/ml、少なくとも50 mg/ml、少なくとも75 mg/mlまたは少なくとも100 mg/mlで、密封された容器中に供給される。液体形態は、その元の容器中で、2 と 8 の間で保存されるべきである。

30

40

【0276】

本明細書で提供される結合タンパク質は、非経口投与に適した医薬組成物中に取り込ませることが可能である。一実施形態において、抗体または抗体部分は、0.1 - 250 mg/mlの結合タンパク質を含む注射可能溶液として調製される。注射可能溶液は、フリント容器または琥珀色の容器、注射器または予め充填されたシリンジ中の液体または凍結乾燥された剤形から構成され得る。緩衝液は、pH 5.0 から 7.0（最適には pH

50

6.0)のL-ヒスチジン(1-50mM)、最適には5-10mMであり得る。他の適切な緩衝液には、コハク酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、リン酸ナトリウムまたはリン酸カリウムが含まれるが、これらに限定されない。0-300mMの濃度に(最適には、液体剤形に対して150mM)の溶液の毒性を修飾するために、塩化ナトリウムを使用することが可能である。凍結乾燥された剤形に対して、凍結保護剤、主に、0-10%のスクロース(最適には、0.5-1.0%)を含めることが可能である。他の適切な凍結保護剤には、トレハロースおよびラクトースが含まれる。凍結乾燥された剤形に対して、充填剤、主に、1-10%のマニトール(最適には、2-4%)を含めることが可能である。液体および凍結乾燥された両剤形において、安定化剤、主に1-50mMのL-メチオニン(最適には、5-10mM)を使用することが可能である。他の適切な充填剤には、グリシン、アルギニンが含まれ、0-0.05%のポリソルベート-80(最適には、0.005-0.01%)として含めることが可能である。さらなる界面活性剤には、ポリソルベート20およびBRIJ界面活性剤が含まれるが、これらに限定されない。非経口投与用の注射可能な溶液として調製された本明細書で提供される結合タンパク質を含む医薬組成物は、治療用タンパク質(例えば、抗体)の吸収または分散を増加させるために使用されるものなど、アジュバントとして有用な作用物質をさらに含むことが可能である。特に有用なアジュバントは、Hylenex(登録商標)(組み換えヒトヒアルロニダーゼ)などのヒアルロニダーゼである。注射可能な溶液中へのヒアルロニダーゼの添加は、非経口投与、特に皮下投与後に、ヒト生物学的利用可能性を改善する。痛みおよび不快感がより小さく、注射部位反応の発生を最小限に抑えながら、より大きな注射部位容量(すなわち、1mLより大きい)も可能である(参照により本明細書に組み込まれるWO2004078140およびUS2006104968を参照)。

【0277】

本明細書で提供される組成物は、様々な形態であり得る。これらには、例えば、液体溶液(例えば、注射可能な溶液および注入可能な溶液)など、分散液または懸濁液、錠剤、丸薬、粉末、リポソームおよび坐薬などの、液体、半固体および固体剤形が含まれる。選択された形態は、予定される投与の様式および治療用途に依存する。典型的な組成物は、他の抗体を用いたヒトの受動免疫に対して使用される組成物と同様の組成物など、注射可能な溶液または注入可能な溶液の形態である。投与の選択された様式は、非経口(例えば、静脈内、皮下、腹腔内、筋肉内)である。一実施形態において、抗体は、静脈内注入または注射によって投与される。別の実施形態において、抗体は、筋肉内注入または皮下注射によって投与される。

【0278】

治療組成物は、典型的には、製造および保存の条件下で、無菌および安定でなければならない。組成物は、溶液、ミクロエマルジョン、分散液、リポソームまたは高薬物濃度に適したその他の秩序化された構造として製剤化することが可能である。無菌注射可能な溶液は、本明細書に列記されている成分の1つまたは組合せを加えた適切な溶媒中に、必要な量で活性な化合物(すなわち、抗体、抗体部分)を取り込ませた後、必要に応じて、濾過滅菌を行うことによって調製することが可能である。一般的に、分散液は、塩基性分散溶媒および本明細書に列記されたものから得られる必要なその他の成分を含有する無菌ビヒクル中に活性化化合物を取り込ませることによって調製される。無菌注射可能な溶液の調製のための凍結乾燥された無菌粉末の場合には、調製の方法は、予め滅菌濾過されたその溶液から、あらゆる追加の所望される成分を加えた活性成分の粉末を与える真空乾燥および粉末乾燥である。溶液の適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング材料を使用することによって、分散液の場合に必要な粒径を維持することによって、および界面活性剤を使用することによって維持することができる。注射可能な組成物の延長された吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸塩およびゼラチンを組成物中に含めることによって実現することができる。

【0279】

本明細書で提供される結合タンパク質は、本分野で公知の様々な方法によって投与する

ことが可能であるが、多くの治療用途において、一実施形態では、投与経路/様式は皮下注射、静脈内注射または注入である。当業者によって理解されるように、投与の経路および/または様式は、所望される結果に応じて変動する。ある種の実施形態において、活性化化合物は、インプラント、経皮パッチおよび微小封入された送達系を含む徐放製剤など、迅速な放出に対して化合物を保護する担体とともに調製され得る。エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステルおよびポリ乳酸など、生物分解可能な生物適合性ポリマーを使用することが可能である。このような製剤の多くの調製方法は、特許が付与されているまたは一般的に当業者に公知である。例えば、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978を参照されたい。

10

【0280】

ある種の実施形態において、本明細書で提供される結合タンパク質は、例えば、不活性希釈剤または同化可能な食用担体とともに経口投与され得る。また、化合物（および、所望であれば、その他の成分）は、硬いもしくは軟い殻のゼラチンカプセル中に封入され、錠剤へと圧縮され、または患者の食事中に直接取り込ませ得る。経口治療投与の場合、化合物は、賦形剤とともに取り込まれ、摂取可能な錠剤、口腔錠、トローチ、カプセル、エリキシル、懸濁液、シロップ、ウェハースなどの形態で使用され得る。非経口投与以外によって本明細書で提供される化合物を投与するために、その不活化を妨げるための物質で化合物を被覆し、またはその不活化を妨げるための物質とともに化合物を同時投与することが必要であり得る。

20

【0281】

補助的活性化化合物も、組成物中に取り込ませることが可能である。ある種の実施形態において、本明細書で提供される結合タンパク質は、本発明の結合タンパク質とともに疾患を治療するのに有用である、1つ以上のさらなる治療剤とともに共製剤化され、および/または同時投与される。例えば、本明細書で提供される結合タンパク質は、他の錠剤に結合する1つ以上のさらなる抗体（例えば、他のサイトカインに結合する抗体または細胞表面分子に結合する抗体）とともに共製剤化され、および/または同時投与され得る。さらに、本明細書で提供される1つ以上の抗体は、先述の治療剤の2つ以上と組み合わせて使用され得る。このような組合せ療法は、投与される治療剤のより低い投薬量を有利に使用し得るので、様々な単独療法に伴って生じ得る毒性または合併症が回避される。

30

【0282】

ある種の実施形態において、結合タンパク質は、本分野で公知の半減期延長ビヒクルに連結される。このようなビヒクルには、Fcドメイン、ポリエチレングリコールおよびデキストランが含まれるが、これらに限定されない。このようなビヒクルは、例えば、米国出願第09/428,082号および公開されたPCT出願WO99/25044に記載され、いずれかの目的で参照により本明細書に組み込まれている。

【0283】

特定の実施形態において、本明細書で提供される結合タンパク質または本明細書で提供される別の予防剤もしくは治療剤をコードする核酸配列は、遺伝子治療によって、疾患または1つ以上のその症候を治療し、予防し、管理し、または軽減するために投与される。遺伝子治療は、発現された核酸または発現可能な核酸の、対象への投与によって実行される治療を表す。本実施形態において、核酸は、予防的効果または治療的効果を媒介する、本明細書で提供されるコードされたそれらの抗体または予防剤もしくは治療剤を産生する。

40

【0284】

本明細書で提供される方法において、本分野で利用可能な遺伝子治療のためのあらゆる方法を使用することが可能である。遺伝子治療の方法の一般的な概説については、Goldspiel et al., 1993, Clinical Pharmacy 12: 488-505; Wu and Wu, 1991, Biotherapy 3: 87-9

50

5 ; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32: 573 - 596 ; Mulligan, Science 260: 926 - 932 (1993) ; および Morgan and Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62: 191 - 217 ; May, 1993, TIBTECH 11 (5) : 155 - 215 を参照されたい。使用可能な組み換えDNA技術の分野で一般的に知られた方法は、Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993) ; および Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990) に記載されている。遺伝子治療の様々な方法の詳細な記述は、参照により本明細書に組み込まれるUS 20050042664 A 1 に開示されている。

【0285】

本明細書で提供される結合タンパク質は、結合タンパク質によって認識される標的が有害である様々な疾病を治療する上で有用である。このような疾病には、関節リウマチ、骨関節炎、若年性慢性関節炎、化膿性関節炎、ライム関節炎、乾癬性関節炎、反応性関節炎、脊椎関節症、全身性紅斑性狼瘡、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、インシュリン依存性糖尿病、甲状腺炎、喘息、アレルギー性疾患、乾癬、皮膚炎、強皮症、移植片対宿主病、臓器移植拒絶、臓器移植に関連する急性または慢性免疫疾患、サルコイドーシス、アテローム性動脈硬化症、播種性血管内凝固、川崎病、パセドウ病、ネフローゼ症候群、慢性疲労症候群、ウェゲナー肉芽腫症、ヘノッホ・シェーライン紫斑症、腎臓の顕微鏡的血管炎、慢性活動性肝炎、ブドウ膜炎、敗血症性ショック、毒素性ショック症候群、敗血症症候群、悪液質、感染性疾患、寄生性疾患、後天性免疫不全症候群、急性横断性脊髄炎、ハンチントン舞蹈病、パーキンソン病、アルツハイマー病、発作、原発性胆汁性肝硬変、溶血性貧血、悪性腫瘍、心不全、心筋梗塞、アジソン病、孤発性の、多内分泌腺機能低下症候群 I 型および多内分泌腺機能低下症候群 II 型、シュミット症候群、成人（急性）呼吸促進症候群、脱毛症、円形脱毛症、血清反応陰性関節炎、関節炎、ライター病、乾癬性関節炎、潰瘍性大腸性関節炎、腸疾患性滑膜炎、クラミジア、エルシニアおよびサルモネラ関連関節炎、脊椎関節症、アテローム性疾患 / アテローム性動脈硬化症、アトピー性アレルギー、自己免疫性水疱性疾患、尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、類天疱瘡、線状 Ig A 病、自己免疫性溶血性貧血、クームス陽性溶血性貧血、後天性悪性貧血、若年性悪性貧血、筋痛性脳脊髄炎 / ロイヤルフリー病、慢性粘膜皮膚カンジダ症、巨細胞性動脈炎、原発性硬化性肝炎、突発性自己免疫性肝炎、後天性免疫不全症候群、後天性免疫不全関連疾患、B 型肝炎、C 型肝炎、分類不能型免疫不全症（分類不能型原発性低グロブリン血症）、拡張型心筋症、女性不妊症、卵巣機能不全、早期卵巣機能不全、線維性肺疾患、突発性間質性肺炎、炎症後間質性肺疾患、間質性肺炎、結合組織疾患関連間質性肺疾患、混合性結合組織疾患関連肺疾患、全身性硬化症関連間質性肺疾患、関節リウマチ関連間質性肺疾患、全身性紅斑性狼瘡関連肺疾患、皮膚筋炎 / 多発性筋炎関連肺疾患、シェーグレン病関連肺疾患、強直性脊椎炎関連肺疾患、血管炎性びまん性肺疾患（vasculitic diffuse lung disease）、ヘモシデローシス関連肺疾患、薬物によって誘導された間質性肺疾患、線維症、放射性線維症、閉塞性細気管支炎、慢性好酸球性肺炎、リンパ球浸潤性肺疾患、感染後間質性肺疾患、通風関節炎、自己免疫性肝炎、I 型自己免疫性肝炎（古典的自己免疫性またはルポイド肝炎）、II 型自己免疫性肝炎（抗 LKM 抗体肝炎）、自己免疫媒介性低血糖症、黒色表皮腫を伴う B 型インシュリン抵抗性、副甲状腺機能低下症、臓器移植に関連する急性免疫疾患、臓器移植に関連する慢性免疫疾患、変形性関節症、原発性硬化性胆管炎、I 型乾癬、II 型乾癬、特発性白血球減少症、自己免疫性好中球減少症、腎臓病 NOS、糸球体腎炎、腎臓の顕微鏡的血管炎、ライム病、円板状紅斑性狼瘡、男性不妊症特発性または NOS、精子自己免疫、多発性硬化症（すべてのサブタイプ）、交感性眼炎、結合組織疾患に続発する肺高血圧症、グッドパスチャー症候群、結節性多発動脈炎の肺症状、急性リウマチ熱、リウマチ性脊椎炎、スチ

10

20

30

40

50

ル病、全身性硬化症、シェーグレン症候群、高安病/動脈炎、自己免疫性血小板減少症、特発性血小板減少症、自己免疫性甲状腺疾患、甲状腺機能亢進症、甲状腺腫自己免疫性甲状腺機能低下症(橋本病)、萎縮性自己免疫性甲状腺機能低下症、原発性粘液水腫(primary myxoedema)、水晶体起因性ブドウ膜炎、原発性血管炎、白斑急性肝疾患、慢性肝疾患、アルコール性肝硬変、アルコール誘発性肝障害、胆汁うっ滞(choleostasis)、特異体質性肝疾患、薬物誘発性肝炎、非アルコール性脂肪性肝炎、アレルギーおよび喘息、B群連鎖球菌(GBS)感染、精神障害(例えば、うつ病および統合失調症)、Th2型およびTh1型によって媒介される疾病、急性および慢性疼痛(疼痛の様々な形態)、ならびに、肺癌、乳癌、胃癌、膀胱癌、大腸癌、膵臓癌、卵巣癌、前立腺癌および腎臓癌および造血性悪性病変(白血病およびリンパ腫)などの癌、無リポタンパク質血症、先端チアノーゼ、急性および慢性寄生性または感染性プロセス、急性白血病、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、急性骨髄性白血病(AML)、急性または慢性細菌感染、急性膵炎、急性腎不全、腺癌、心房(aerial)異所性拍動、AIDS認知症複合、アルコール誘発性肝炎、アレルギー性結膜炎、アレルギー性接触性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、同種移植拒絶、-1-アンチトリプシン欠乏症、筋萎縮性側索硬化症、貧血、狭心症、前角細胞変性、抗cd3治療、抗リン脂質症候群、抗受容体過敏症反応(anti-receptor hypersensitivity reactions)、大動脈(aortic)および動脈瘤、大動脈解離、動脈性高血圧、動脈硬化症、動静脈瘻、運動失調、心房細動(持続的または発作性)、心房粗動、房室ブロック、B細胞リンパ腫、骨移植拒絶、骨髄移植(BMT)拒絶、脚ブロック、パーキットリンパ腫、火傷、心不整脈、心機能不全症候群(cardiac stun syndrome)、心臓腫瘍、心筋症、心肺バイパス炎症反応、軟骨移植拒絶、小脳皮質変性、小脳疾患、無秩序なまたは多巣性心房頻脈、化学療法関連疾患、慢性骨髄性白血病(CML)、慢性アルコール症、慢性炎症性病変、慢性リンパ性白血病(CLL)、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、慢性サリチル酸中毒、結腸直腸癌、うっ血性心不全、結膜炎、接触性皮膚炎、肺性心、冠動脈疾患、クロイツフェルト-ヤコブ病、培養陰性敗血症、嚢胞性線維症、サイトカイン療法関連疾患、ボクサー脳、脱髄性疾患、 Dengue 出血熱、皮膚炎、皮膚科学的症状、糖尿病、真性糖尿病、糖尿病性動脈硬化疾患、瀰漫性レビー小体病、拡張型うっ血性心筋症、大脳基底核の疾患、中年のダウン症候群、中枢神経ドーパミン受容体を遮断する薬物によって誘発された薬物誘発性運動疾患、薬物感受性、湿疹、脳脊髄炎、心内膜炎、内分泌疾患、喉頭蓋炎、エプスタイン-バーウイルス感染、紅痛症、垂体外路および小脳疾患、家族性血球貪食性リンパ組織球症(familial hemophagocytic lymphohistiocytosis)、致命的胸腺移植組織拒絶、フリードライヒ失調症、機能的末梢動脈疾患、真菌性敗血症、ガス壊疽、胃潰瘍、糸球体腎炎、いずれかの臓器または組織の移植片拒絶、グラム陰性敗血症、グラム陽性敗血症、細胞内生物に起因する肉芽腫、有毛細胞白血病、ハラールホルデン・スパッツ病、橋本甲状腺炎、枯草熱、心臓移植拒絶、血色素症、血液透析、溶血性尿毒症症候群/血栓溶解血小板減少紫斑病、出血、肝炎(A型)、ヒス束不整脈、HIV感染/HIV神経障害、ホジキン病、運動過剰疾患、過敏症反応、過敏性肺炎、高血圧、運動低下疾患、視床下部-下垂体-副腎皮質系評価、特発性アジソン病、特発性肺線維症、抗体媒介性細胞毒性、無力症、乳児脊髄性筋萎縮症、大動脈の炎症、A型インフルエンザ、電離放射線曝露、虹彩毛様体炎/ブドウ膜炎/視神経炎、虚血再灌流障害、虚血性発作、若年性関節リウマチ、若年性脊髄性筋萎縮症、カボジ肉腫、腎移植拒絶、レジオネラ、リーシュマニア症、ハンセン病、皮質脊髄系の病変、脂肪血症(lipedema)、肝臓移植拒絶、リンパ浮腫(lymphedema)、マラリア、悪性リンパ腫、悪性組織球増殖症、悪性黒色腫、髄膜炎、髄膜炎菌血症(meningococemia)、代謝性/特発性、偏頭痛、ミトコンドリア多系疾患(mitochondrial multisystem disorder)、混合性結合組織病、モノクローナル高ガンマグロブリン血症、多発性骨髄腫、多系統変性(メンセル・デジェリーヌ-トーマス・シャイ-ドレーガーおよびマシャド-ジョセフ)、重症筋無力症、マイコバクテリウム・アビウム・イントラセ

10

20

30

40

50

ルラーレ、マイコバクテリウム・チューバキュロシス、骨髄形成異常、心筋梗塞、真菌虚血疾患、上咽頭癌、新生児慢性肺疾患、腎炎、ネフローゼ、神経変性疾患、神経原性I筋萎縮、好中球減少性発熱、非ホジキンリンパ腫、腹部大動脈およびその分枝の閉塞、閉塞性動脈疾患、okt3療法、精巣炎/精巣上体炎、精巣炎/精管復元術処置、臓器肥大、骨粗鬆症、膵臓移植拒絶、膵癌、腫瘍随伴性症候群/悪性腫瘍の高カルシウム血症、副甲状腺移植拒絶、骨盤内炎症性疾患、通年性鼻炎、心膜疾患、末梢アテローム硬化性疾患、末梢血管疾患、腹膜炎、悪性貧血、ニューモシスチス・カリニ肺炎、肺炎、POEMS症候群(多発神経炎、臓器肥大、内分泌疾患、単クローン性グロブリン血症および皮膚変化症候群(skin changes syndrome))、灌流後症候群(post perfusion syndrome)、ポンプ後症候群(post pump syndrome)、心筋梗塞後開心術症候群、子癇前症、進行性核上性麻痺、原発性肺高血圧、放射線療法、レイノー現象および病、レイノー病、レフサム病、規則的なQRS幅の狭い頻脈症(regular narrow QRS tachycardia)、腎血管性高血圧、再灌流障害、拘束型心筋症、肉腫、強皮症、老年性舞蹈病、レビー小体型の老年性認知症、血清反応陰性関節炎、ショック、鎌形赤血球貧血症、皮膚同種異系移植拒絶、皮膚変化症候群、小腸移植拒絶、固形腫瘍、固有不整脈(specific arrhythmias)、脊髄性運動失調、脊髄小脳変性、連鎖球菌性筋炎、小脳の構造的病変、亜急性硬化性全脳炎、湿疹、心血管系の梅毒、全身性アナフィラキシー、全身性炎症反応症候群、全身性発症若年性関節リウマチ、T細胞またはFABALL、毛細血管拡張症、閉塞性血栓血管炎、血小板減少症、毒性、移植、外傷/出血、III型過敏症反応、IV型過敏症、不安定狭心症、尿毒症、尿路性敗血症、じんましん、心臓弁膜症、静脈瘤、血管炎、静脈疾患、静脈血栓症、心室細動、ウイルスおよび真菌感染、ウイルス性脳炎(vital encephalitis)/無菌性髄膜炎、ウイルス関連血球貪食症候群、ウェルニッケ-コルサコフ症候群、ウィルソン病、いずれかの臓器または組織の異種移植拒絶が含まれるが、これらに限定されない(Peritt et al. PCT公開WO2002097048A2, Leonard et al., PCT公開WO9524918A1およびSalfeld et al., PCT公開WO00/56772A1参照)。

【0286】

本明細書で提供されるDVD-Igは、以下の疾患：急性冠症候群、急性特発性多発性神経炎、急性炎症性脱髄性多発神経根神経障害、急性虚血、成人スチル病、円形脱毛症、アナフィラキシー、抗リン脂質抗体症候群、再生不良性貧血、アテローム性動脈硬化症、アトピー性湿疹、アトピー性皮膚炎、自己免疫性皮膚炎、連鎖球菌感染に伴う自己免疫異常、自己免疫性難聴、自己免疫性リンパ増殖症候群(ALPS)、自己免疫性心筋炎、自己免疫性血小板減少(AITP)、眼瞼炎、気管支拡張症、水疱性類天疱瘡、心血管疾患、劇症型抗リン脂質症候群、セリアック病、頸部脊椎症、慢性虚血、瘢痕性類天疱瘡、多発性硬化症のリスクを有する臨床的孤発症候群(CIS)、結膜炎、小児発症精神障害、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、涙嚢炎、皮膚筋炎、糖尿病性網膜症、真性糖尿病、椎間板ヘルニア、椎間板脱出、薬物誘発免疫性溶血性貧血、心内膜炎、子宮内膜症、眼内炎、上強膜炎、多形性紅斑、重症型多形性紅斑、妊娠性類天疱瘡、ギラン・バレー症候群(GBS)、枯草熱、ヒューズ症候群、特発性パーキンソン病、特発性間質性肺炎、IgE媒介性アレルギー、免疫性溶血性貧血、封入体筋炎、感染性眼炎症疾患、炎症性脱髄疾患、炎症性心疾患、炎症性腎疾患、IPF/UIP、虹彩炎、角膜炎、乾性角結膜炎(keratoconjunctivitis sicca)、クスマウル病またはクスマウル-マイヤー病、ランドリー麻痺、ランゲルハンス細胞性組織球症、網状皮斑、黄斑変性、悪性病変、顕微鏡的多発性血管炎、モルブス・ベヒテレフ(morbus bechterev)、運動ニューロン疾患、粘膜性類天疱瘡、多臓器不全、重症筋無力症、骨髄異形成症候群、心筋炎、神経根障害、神経障害、非A非B型肝炎、視神経炎、骨溶解、卵巣癌、小関節性JRA、末梢動脈閉塞疾患(PAOD)、末梢血管疾患(PVD)、末梢動脈疾患(PAD)、静脈炎、結節性多発性動脈炎(または結節性動脈周囲炎)、多発性軟骨炎、リウマ

子性多発性筋痛、白毛症、多関節性JRA、多内分泌欠損症候群、多発性筋炎、リウマチ性多発性筋痛(PMR)、ポンプ後症候群、原発性パーキンソニズム、前立腺癌および直腸癌および造血性悪性病変(白血病およびリンパ腫)、前立腺炎、赤芽球癆、原発性副腎不全、再発性視神経脊髄炎、再狭窄、リウマチ性心疾患、SAPHO(滑膜炎、アクネ、膿疱症、骨過形成および骨髄炎)、強皮症、続発性アミロイドーシス、ショック肺、強膜炎、坐骨神経痛、二次性副腎不全、シリコン関連結合組織病、スネドン-ウィルキンソン皮膚症、強直性脊椎炎、ステーブンス・ジョンソン症候群(SJS)、全身性炎症反応症候群、側頭動脈炎、トキソプラズマ性網膜炎、中毒性表皮剥離症、横断性脊髄炎、TRAPS(腫瘍壊死因子受容体)、I型アレルギー反応、II型糖尿病、じんましん、通常型間質性肺炎(UIP)、血管炎、春季結膜炎、ウイルス性網膜炎、フォクト・小柳・原田症候群(VKH症候群)、滲出型黄斑変性、ならびに創傷治癒の1つ以上を治療することもできる。

10

【0287】

本明細書で提供される結合タンパク質は、自己免疫疾患、特に、関節リウマチ、脊椎炎、アレルギー、自己免疫性糖尿病、自己免疫性ブドウ膜炎など、炎症を伴う自己免疫疾患に罹患しているヒトを治療するために使用することが可能である。一実施形態において、本明細書で提供される結合タンパク質またはその抗原結合部分は、関節リウマチ、クローン病、多発性硬化症、インシュリン依存性糖尿病および乾癬を治療するために使用される。

20

【0288】

一実施形態において、本明細書で提供される組成物および方法で治療または診断される疾患には、乳房、結腸、直腸、肺、中咽頭、下咽頭、食道、胃、膵臓、肝臓、胆嚢および胆管、小腸、尿路(腎臓、膀胱および尿路上皮を含む)、女性生殖路(子宮頸部、子宮および卵巣ならびに絨毛癌および妊娠性絨毛性疾患を含む)、男性生殖路(前立腺、精嚢、精巣および生殖細胞腫瘍を含む)、内分泌腺(甲状腺、副腎および下垂体を含む)および皮膚の癌腫ならびに血管腫、悪性黒色腫、肉腫(骨および軟部組織から生じるものならびにカポジ肉腫を含む)、脳、神経、眼および髄膜の腫瘍(星状膠細胞腫、神経膠腫、神経膠芽細胞腫、網膜芽細胞腫、神経腫、神経芽細胞腫、シュワン細胞腫および髄膜腫を含む)、白血病などの造血性悪性病変から生じる固形腫瘍およびリンパ腫(ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫の両方)を含む原発性および転移性の癌が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0289】

一実施形態において、本明細書で提供される抗体またはその抗原結合部分は、単独または放射線療法および/もしくは他の化学療法剤と組み合わせて使用される場合、癌を治療するためにまたは本明細書に記載されている腫瘍からの転移の予防において使用される。

【0290】

本明細書で提供される抗体またはその抗原結合部分は、抗腫瘍剤、放射線療法、化学療法(DNAアルキル化剤、シスプラチン、カルボプラチン、抗チューブリン剤、パクリタキセル、ドセタキセル、タキソール、ドキシソルピシン、ゲムシタピン、ジェムザール、アントラサイクリン、アドリアマイシン、トポイソメラーゼI阻害剤、トポイソメラーゼII阻害剤、5-フルオロウラシル(5-FU)、ロイコボリン、イリノテカン、受容体チロシンキナーゼ阻害剤(例えば、エルロチニブ、ゲフィチニブ)、COX-2阻害剤(例えば、セレコキシブ)、キナーゼ阻害剤およびsiRNAなど)を含むがこれらに限定されない作用因子と組み合わせることが可能である。

40

【0291】

本明細書で提供される結合タンパク質は、様々な疾病の治療において有用な1つ以上の追加の治療剤とともに投与することも可能である。

【0292】

本明細書で提供される結合タンパク質は、このような疾病を治療するために、単独で、

50

または組み合わせて使用することが可能である。結合タンパク質は、単独で、または追加の作用物質、例えば治療剤と組み合わせて使用することが可能であり、前記追加の作用物質は、その意図される目的に対して、当業者によって選択されることを理解すべきである。例えば、追加の作用物質は、本明細書で提供される抗体によって治療されている疾病または症状を治療するのに有用であると本分野で認識されている治療剤とすることが可能である。追加の作用物質は、治療組成物に有益な属性を付与する作用物質、例えば、組成物の粘性に影響を与える作用物質とすることも可能である。

【0293】

本明細書で提供される組合せは、それらの意図される目的に対して有用な組合せであることをさらに理解すべきである。以下に記されている作用物質は、例示を目的とするものであって、限定を意図するものではない。いくつかの実施形態において、組合せは、本明細書に提供される抗体および以下のリストから選択される少なくとも1つの追加の作用物質を含む。また、形成された組成物がその意図される機能を実行することが可能であれば、該組合せは、1を超える追加の作用物質、例えば、2つまたは3つの追加の作用物質を含むこともできる。

10

【0294】

自己免疫疾患および炎症性疾患を治療するための組合せは、NSAIDとも称される非ステロイド性抗炎症薬（イブプロフェンのような薬物が含まれる。）である。他の組合せは、プレドニゾンなどのコルチコステロイドである。ステロイド使用の周知の副作用は、本明細書で提供されるDVDIgと組み合わせて患者を治療するときに必要なとされるステロイド用量を徐々に減らすことによって、低減することが可能であり、または除去することさえ可能である。本明細書で提供される抗体またはその抗体部分とともに組み合わせることが可能な関節リウマチに対する治療剤の非限定的な例には、以下のもの：サイトカイン抑制性抗炎症薬（CSAID）；その他のヒトサイトカインまたは成長因子（例えば、TNF、LT、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-15、IL-16、IL-18、IL-21、IL-23、インターフェロン、EMAP-II、GM-CSF、FGFおよびPDGF）に対する抗体またはこれらのアンタゴニストが含まれる。本明細書で提供される結合タンパク質またはその抗原結合部分は、CD2、CD3、CD4、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD80（B7.1）、CD86（B7.2）、CD90、CTLAまたはCD154を含むこれらのリガンド（gp39またはCD40L）などの細胞表面分子に対する抗体と組み合わせることが可能である。

20

30

【0295】

治療剤の組合せは、異なる点で、自己免疫およびこれに続く炎症カスケードを干渉し得る。例には、キメラ、ヒト化またはヒトTNF抗体、アダリムマブ（PCT公開WO97/29131）、CA2（Remicade（商標））、CDP571、および可溶性p55またはp75TNF受容体、これらの誘導體、（p75TNFR1gG（Enbrel（商標））またはp55TNFR1gG（Lenercept）およびTNF変換酵素（TACE）阻害剤などのようなTNFアンタゴニストが含まれる。同様にIL-1阻害剤（インターロイキン-1変換酵素阻害剤、IL-1RAなど）は、同じ理由のために有効であり得る。他の組合せには、インターロイキン11が含まれる。さらに別の組合せには、IL-12機能と平行して、IL-12機能に依存して、またはIL-12と協調して作用し得る自己免疫応答の中心的プレーヤーが含まれる。特に、IL-18抗体または可溶性IL-18受容体またはIL-18結合タンパク質などのIL-18アンタゴニストである。IL-12およびIL-18は、重複しているが、異なる機能を有しており、両者に対するアンタゴニストの組合せは、最も有効であり得ることが示されている。さらに別の組合せは、非枯渇性抗CD4阻害剤である。さらに別の組合せには、抗体、可溶性受容体または拮抗性リガンドを含む、共同刺激経路CD80（B7.1）またはCD86（B7.2）のアンタゴニストが含まれる。

40

【0296】

50

本明細書で提供される結合タンパク質は、メトトレキサート、6-MP、アザチオプリン、スルファサラジン、メサラジン、オルサラジン、クロロキニン/ヒドロキシクロロキン、ペニシラミン、金チオリンゴ酸塩（筋肉内および経口）、アザチオプリン、コルヒチン、コルチコステロイド（経口、吸入および局所注射）、 β -2アドレナリン作動性受容体アゴニスト（サルブタモール、テルブタリン、サルメテロール）、キサンチン（テオフィリン、アミノフィリン）、クロモグリカート、ネドクロミル、ケトチフェン、イプラトロピウムおよびオキシトロピウム、シクロスポリン、FK506、ラバマイシン、ミコフェノラート・モフェチル、レフルノミド、NSAID、例えば、イブプロフェン、プレドニゾロンなどのコルチコステロイド、ホスホジエステラーゼ阻害剤、アデノシンアゴニスト、抗血栓剤、補体阻害剤、アドレナリン作用薬、TNF またはIL-1などの炎症促進性サイトカインによるシグナル伝達を妨害する作用物質（例えば、IRAK、NIK、IKK、p38またはMAPキナーゼ阻害剤）、IL-1変換酵素阻害剤、TNF変換酵素（TACE）阻害剤、キナーゼ阻害剤などのT細胞シグナル伝達阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、スルファサラジン、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、可溶性サイトカイン受容体およびそれらの誘導体（例えば、可溶性p55またはp75TNF受容体および誘導体p75TNFRIGG（Enbrel（商標）およびp55TNFRIGG（Lenercept））、sIL-1R1、sIL-1RII、sIL-6R）、炎症抑制性サイトカイン（例えば、IL-4、IL-10、IL-11、IL-13およびTGF β ）、セレコキシブ、葉酸、硫酸ヒドロキシクロロキニン、ロフェコキシブ、エタネルセプト、インフリキシマブ、ナプロキセン、バルデコキシブ、スルファサラジン、メチルプレドニゾロン、メロキシカム、酢酸メチルプレドニゾロン、金チオリンゴ酸ナトリウム、アスピリン、トリムシノロン・アセトニド、プロポキシフェンナプシラート/apap、フォラート、ナブメトン、ジクロフェナク、ピロキシカム、エトドラク、ジクロフェナクナトリウム、オキサプロジン、塩酸オキシコドン、ヒドロコドン二酒石酸塩/apap、ジクロフェナクナトリウム/ミソプロストール、フェンタニル、アナキンラ、ヒト組み換え、塩酸トラマドール、サルサラート、スリンダク、シアノコバラミン/fap/ピリドキシン、アセトアミノフェン、アレンドロナートナトリウム、プレドニゾロン、硫酸モルヒネ、塩酸リドカイン、インドメタシン、硫酸グルコサミン/コンドロイチン、塩酸アミトリプチリン、スルファジアジン、塩酸オキシコドン/アセトアミノフェン、塩酸オロパタジン、ミソプロストール、ナプロキセンナトリウム、オメプラゾール、シクロホスファミド、リツキシマブ、IL-1TRAP、MRA、CTLA4-IG、IL-18BP、抗IL-18、抗IL15、BIRB-796、SCIO-469、VX-702、AMG-548、VX740、ロフルミラスト、IC-485、CDC-801およびメソプラムなどの作用物質とも組み合わせられ得る。組合せには、メトトレキサートまたはレフルノミドが含まれ、中度または重度の関節リウマチの症例では、シクロスポリンが含まれる。

【0297】

関節リウマチを治療するために、結合タンパク質と組み合わせて使用することも可能な非限定的な追加の作用物質には、以下の非ステロイド性抗炎症薬（NSAIDs）；サイトカイン抑制性抗炎症薬（CSAIDs）；CDP-571/BAY-10-3356（ヒト化された抗TNF抗体；Celltech/Bayer）；cA2/インフリキシマブ（キメラ抗TNF抗体；Centocor）；75kdTNFR-IGG/エタネルセプト（75kdTNF受容体-IGG融合タンパク質；イムネックス；例えば、Arthritis & Rheumatism（1994）Vol. 37, S295；J. Invest. Med.（1996）Vol. 44, 235Aを参照；55kdTNF-IGG（55kdTNF受容体-IGG融合タンパク質；Hoffmann-La Roche）；IDEC-CE9.1/SB210396（抗原刺激された（primatized）非枯渴性抗CD4抗体；IDEC/SmithKline；例えば、Arthritis & Rheumatism（1995）Vol. 38, S185を参照；DAB486-IL-2および/またはDAB389-IL-2（IL-2融合タンパク質；Serag

10

20

30

40

50

en; 例えば、Arthritis & Rheumatism (1993) Vol. 36, 1223) 参照; 抗Tac (ヒト化抗IL-2R; Protein Design Labs/Roche); IL-4 (抗炎症性サイトカイン; DNAX/Schering); IL-10 (SCH52000; 組み換えIL-10、抗炎症性サイトカイン; DNAX/Schering); IL-4; IL-10 および/またはIL-4 アゴニスト (例えば、アゴニスト抗体); IL-1RA (IL-1受容体アンタゴニスト; Synergen/Amgen); アナキンラ (Kineret (登録商標)/Amgen); TNF-bp/s-TNF (可溶性TNF結合タンパク質; 例えば、Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (補遺), S284 参照; Amer. J. Physiol. - Heart and Circulatory Physiology (1995) Vol. 268, pp. 37-42); R973401 (ホスホジエステラーゼIV型阻害剤; 例えば、Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (補遺), S282 参照; MK-966 (COX-2 阻害剤; 例えば、Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (補遺), S81 参照); Iloprost (例えば、Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (補遺), S82 参照); メトトレキサート; サリドマイド (例えば、Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (補遺), S282 参照) およびサリドマイド関連薬 (例えば、Celgen); レフノミド (抗炎症性およびサイトカイン阻害剤; 例えば、Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (補遺), S131; Inflammation Research (1996) Vol. 45, pp. 103-107 参照); トラネキサム酸 (プラスミノゲン活性化の阻害剤; 例えば、Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (補遺), S284 参照); T-614 (サイトカイン阻害剤; 例えば、Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (補遺), S282 参照); プロスタグランジンE1 (例えば、Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (補遺), S282 参照); Tenidap (非ステロイド性抗炎症薬; 例えば、Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (補遺), S280 参照); ナプロキセン (非ステロイド性抗炎症薬; 例えば、Neuro Report (1996) Vol. 7, pp. 1209-1213 参照); メロキシカム (非ステロイド性抗炎症薬); イブuproフェン (非ステロイド性抗炎症薬); ピロキシカム (非ステロイド性抗炎症薬); ジクロフェナク (非ステロイド性抗炎症薬); インドメタシン (非ステロイド性抗炎症薬); スルファサラジン (例えば、Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (補遺), S281 参照); アザチオプリン (例えば、Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (補遺), S281 参照); ICE 阻害剤 (酵素インターロイキン1 変換酵素の阻害剤); zap-70 および/またはlck 阻害剤 (チロシンキナーゼzap-70 またはlckの阻害剤); VEGF 阻害剤 および/または VEGF-R 阻害剤 (血管内皮細胞増殖因子または血管内皮細胞増殖因子受容体の阻害剤; 血管新生の阻害剤); コルチコステロイド抗炎症薬 (例えば、SB203580); TNF-コンベルターゼ阻害剤; 抗IL-12 抗体; 抗IL-18 抗体; インターロイキン-11 (例えば、Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (補遺), S296 参照); インターロイキン-13 (例えば、Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (補遺), S308 参照); インターロイキン-17 阻害剤 (例えば、Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (補遺), S120 参照); 金; ペニシラミン; クロロキン; クロラムブシル; ヒドロキシクロロキン; シクロスポリン; シクロホスファミド; 全リンパ系照射; 抗胸腺細胞グロブリン; 抗体CD4 抗体; CD5 トキシン; 経口投与されたペプチドおよびコラーゲン; ロベンザリトニナトリウム; サイトカイン制御作用物質 (CRA) HP228 およびHP466 (Houghten Phar

10

20

30

40

50

m a c e u t i c a l s , I n c .) ; I C A M - 1 ア ン チ セ ン ス ホ ス ホ ロ チ オ ア ー ト オ
 リ ゴ デ オ キ シ ヌ ク レ オ チ ド (I S I S 2 3 0 2 ; I s i s P h a r m a c e u t i c a l s , I n c .) ; 可 溶 性 補 体 受 容 体 1 (T P 1 0 ; T C e l l S c i e n c e s ,
 I n c .) ; プ レ ド ニ ゾ ン ; オ ル ゴ テ イ ン ; グ リ コ サ ミ ノ グ リ カ ン ポ リ サ ル フ ァ ー ト ; ミ
 ノ サ イ ク リ ン ; 抗 I L 2 R 抗 体 ; マ ウ ス お よ び 植 物 脂 質 (魚 お よ び 植 物 種 子 脂 肪 酸 ; 例 え
 ば、 D e L u c a e t a l . (1 9 9 5) R h e u m . D i s . C l i n . N o r t h
 A m . 2 1 , : 7 5 9 - 7 7 7 参 照) ; ア ウ ラ ノ フ ィ ン ; フェニルブタゾン ; メクロ
 フェナミン酸 ; フルフェナミン酸 ; 静脈内免疫グロブリン ; ジレウトン ; アザリビジン ;
 ミコフェノール酸 (R S - 6 1 4 4 3) ; タ ク ロ リ ム ス (F K - 5 0 6) ; シ ロ リ ム ス (ラ
 パマイシン) ; アミプリロース (テラフェクチン) ; クラドリピン (2 - クロロデオキ
 シアデノシン) ; メトトレキサート ; b c l - 2 阻 害 剤 (B r u n c k o , M i l a n
 e t a l . , J o u r n a l o f M e d i c i n a l C h e m i s t r y (2 0
 0 7) , 5 0 (4) , 6 4 1 - 6 6 2) ; 抗 ウ イ ル ス 剤 お よ び 免 疫 調 節 剤 が 含 ま れ る が、
 これらに限定されるものではない。

【 0 2 9 8 】

一実施形態において、結合タンパク質またはその抗原結合部分は、関節リウマチの治療
 用の以下の作用物質の1つと組み合わせて投与される。KDRの小分子阻害剤、Tie -
 2の小分子阻害剤 ; メトトレキサート ; プレドニゾン ; セレコキシブ ; 葉酸 ; 硫酸ヒドロ
 キシクロロキン ; ロフェコキシブ ; エタネルセプト ; インフリキシマブ ; レフルノミド ;
 ナプロキセン ; バルデコキシブ ; スルファサラジン ; メチルプレドニゾロン ; イブプロフ
 ェン ; メロキシカム ; 酢酸メチルプレドニゾロン、金チオリンゴ酸ナトリウム ; アスピリ
 ン ; アザチオプリン ; トリアムシノロン・アセトニド ; プロブキシフェン・ナブシラート
 / a p a p ; フォラート ; ナブメトン ; ジクロフェナク ; ピロキシカム ; エトドラク ; ジ
 クロフェナクナトリウム ; オキサプロジン、塩酸オキシコドン、重酒石酸ヒドロコドン /
 a p a p ; ジクロフェナクナトリウム / ミソプロストール ; フェンタニル ; アナキンラ、
 ヒト組み換え ; 塩酸トラマドール ; サルサラート ; スリンダク ; シアノコバラミン / f a
 / ピリドキシン ; アセトアミノエン ; アレンドロナートナトリウム ; プレドニゾロン ; 硫
 酸モルヒネ ; 塩酸リドカイン ; インドメタシン ; 硫酸グルコサミン / コンドロイチン ; シ
 クロスポリン ; 塩酸アミトリプチリン ; スルファジアジン ; 塩酸オキシコドン / アセトア
 ミノフェン ; 塩酸オロパタジン ; ミソプロストール ; ナプロキセンナトリウム ; オメブラ
 ザール ; ミコフェノラート・モフェチル ; シクロホスファミド ; リツキシマブ、IL - 1
 T R A P ; M R A ; C T L A 4 - I G ; I L - 1 8 B P ; I L - 1 2 / 2 3 ; 抗 I L - 1
 8 ; 抗 I L - 1 5 ; B I R B - 7 9 6 ; S C I O - 4 6 9 ; V X - 7 0 2 ; A M G - 5 4
 8 ; V X 7 4 0 ; ロフルミラスト ; I C - 4 8 5 ; C D C - 8 0 1 およびメソプラム。

【 0 2 9 9 】

本明細書で提供される結合タンパク質とともに組み合わせることが可能な炎症性腸疾患
 に対する治療剤の非限定的な例には、以下のもの : プデノシド ; 上皮成長因子 ; コルチコ
 ステロイド ; シクロスポリン ; スルファサラジン ; アミノサリチラート ; 6 - メルカプト
 プリン ; アザチオプリン ; メトロニダゾール ; リボキシゲナーゼ阻害剤 ; メサラミン ; オ
 ルサラジン ; バルサラジド ; 抗酸化剤 ; トロンボキサン阻害剤 ; IL - 1 受容体アンタゴ
 ニスト ; 抗 IL - 1 m A b ; 抗 IL - 6 m A b ; 成長因子 ; エラスターゼ阻害剤 ; ピリ
 ジニル - イミダゾール化合物 ; 他のヒトサイトカインまたは成長因子 (例えば、TNF、
 LT、IL - 1、IL - 2、IL - 6、IL - 7、IL - 8、IL - 15、IL - 16、
 IL - 17、IL - 18、EMAP - I I、GM - C S F、FGFおよびPDGF) に対
 する抗体またはこれらのアンタゴニストが含まれる。本明細書で提供される抗体またはそ
 の抗原結合部分は、CD2、CD3、CD4、CD8、CD25、CD28、CD30、
 CD40、CD45、CD69、CD90これらのリガンドなどの細胞表面分子に対する
 抗体と組み合わせることが可能である。本明細書で提供される抗体またはその抗原結合部
 分は、メトトレキサート、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノラート
 ・モフェチル、レフルノミド、NSAID、例えば、イブプロフェン、プレドニゾロン

10

20

30

40

50

などのコルチコステロイド、ホスホジエステラーゼ阻害剤、アデノシンアゴニスト、抗血栓剤、補体阻害剤、アドレナリン作用薬、TNF またはIL-1などの炎症促進性サイトカインによるシグナル伝達を妨害する作用物質（例えば、IRAK、NIK、IKK、p38またはMAPキナーゼ阻害剤）、IL-1変換酵素阻害剤、TNF変換酵素阻害剤、キナーゼ阻害剤などのT細胞シグナル伝達阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、スルファサラジン、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、可溶性サイトカイン受容体およびそれらの誘導體（例えば、可溶性p55またはp75TNF受容体、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R）および炎症抑制性サイトカイン（例えば、IL-4、IL-10、IL-11、IL-13およびTGF β ）およびbc1-2阻害剤などの作用物質とも組み合わせられ得る。

10

【0300】

結合タンパク質を組み合わせることが可能な、クローン病に対する治療剤の例には、以下のもの：TNFアンタゴニスト、例えば、抗TNF抗体、アダリムマブ（PCT公開第97/29131号；HUMIRA）、CA2（REMICADE）、CDP571、TNFR-Ig構築物、（p75TNFRIGG（ENBREL）およびp55TNFRIGG（LENERCEPT））阻害剤およびPDE4阻害剤が含まれる。本明細書で提供される抗体またはその抗原結合部分は、コルチコステロイド、例えば、ブデノシドおよびデキサメタゾンと組み合わせることが可能である。本明細書で提供される結合タンパク質またはこれらの抗原結合部分は、スルファサラジン、5-アミノサリチル酸およびオルサラジンなどの作用物質、ならびにIL-1などの炎症促進性サイトカインの合成または作用を妨害する作用物質（例えば、IL-1変換酵素阻害剤およびIL-1ra）とも組み合わせられ得る。本明細書で提供される抗体またはその抗原結合部分は、T細胞シグナル伝達阻害剤、例えば、チロシンキナーゼ阻害剤6-メルカプトプリンとともに使用され得る。本明細書で提供される結合タンパク質またはその抗原結合部分は、IL-11と組み合わせることが可能である。本明細書で提供される結合タンパク質またはその抗原結合部分は、メサラミン、プレドニゾン、アザチオプリン、メルカプトプリン、インフリキシマブ、コハク酸メチルプレドニゾロンナトリウム、ジフェノキシラート/硫酸アトロピン、塩酸ロペラミド、メトトレキサート、オメプラゾール、フォラート、シプロフロキサシン/デキストロース-水、重酒石酸ヒドロコドン/apap、テトラサイクリン塩酸塩、フルオシノニド、メトロニダゾール、チメロサル/ホウ酸、コレスチラミン/スクロース、塩酸シプロフロキサシン、硫酸ヒヨスチアミン、塩酸メペリジン、塩酸ミダゾラム、塩酸オキシコドン/アセトアミノフェン、塩酸プロメタジン、リン酸ナトリウム、スルファメトキサゾール/トリメトプリム、セレコキシブ、ポリカルボフィル、ナブシル酸プロボキシフェン、ヒドロコルチゾン、マルチビタミン、バルサラジドナトリウム、リン酸コデイン/アセトアミノフェン（apap）、塩酸コレセベラム、シアノコバラミン、葉酸、レボフロキサシン、メチルプレドニソロン、ナタリズマブおよびインターフェロンと組み合わせることが可能である。

20

30

【0301】

本明細書で提供される結合タンパク質と組み合わせることが可能な、多発性硬化症のための治療剤の非限定的な例には、以下のもの：コルチコステロイド；プレドニゾン；メチルプレドニゾン；アザチオプリン；シクロホスファミド；シクロスポリン；メトトレキサート；4-アミノピリジン；チザニジン；インターフェロン-1a（AVONEX；Biogen）；インターフェロン-1b（BETASERON；Chiron/Berlex）；インターフェロン-n3（Interferon Sciences/Fujimoto）、インターフェロン-（Alfa Wassermann/J&J）、インターフェロン-1A-IF（Serono/Inhale Therapeutics）、PEGインターフェロン2b（Enzon/Schering-Plough）、コポリマー1（Cop-1；COPAXONE；Teva Pharmaceutical Industries, Inc.）；高圧酸素；静脈内免疫グロブリン；クラブリピン；他のヒトサイトカインまたは成長因子（例えば、TNF、LT、IL-1

40

50

、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-23、IL-15、IL-16、IL-18、EMAP-II、GM-CSF、FGFおよびPDGF)およびそれらの受容体に対する抗体またはこれらのアンタゴニストが含まれる。本明細書で提供される結合タンパク質は、CD2、CD3、CD4、CD8、CD19、CD20、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD80、CD86、CD90またはこれらのリガンドなどの細胞表面分子に対する抗体と組み合わせることが可能である。本明細書で提供される結合タンパク質は、メトトレキサート、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノラート・モフェチル、レフルノミド、NSAID、例えば、イブuproフェン、プレドニゾロンなどのコルチコステロイド、ホスホジエステラーゼ阻害剤、アデノシンアゴニスト、抗血栓剤、補体阻害剤、アドレナリン作用薬、TNF または IL-1などの炎症促進性サイトカインによるシグナル伝達を妨害する作用物質(例えば、IRAK、NIK、IKK、p38またはMAPキナーゼ阻害剤)、IL-1変換酵素阻害剤、TACE阻害剤、キナーゼ阻害剤などのT細胞シグナル伝達阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、スルファサラジン、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、可溶性サイトカイン受容体およびそれらの誘導體(例えば、可溶性p55またはp75TNF受容体、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R)、炎症抑制性サイトカイン(例えば、IL-4、IL-10、IL-13およびTGF)およびbc1-2阻害剤などの作用物質とも組み合わせられ得る。

10

【0302】

本明細書で提供される結合タンパク質を組み合わせることが可能な、多発性硬化症のための治療剤の例には、インターフェロン-、例えば、IFN 1aおよびIFN 1b;コパキソン(copaxone)、コルチコステロイド、カスパーゼ阻害剤、例えばカスパーゼ-1の阻害剤、IL-1阻害剤、TNF阻害剤ならびにCD40リガンドおよびCD80に対する抗体が含まれる。

20

【0303】

本明細書で提供される結合タンパク質は、アテムツズマブ、ドロナビノール、ユニメド、ダクリズマブ、ミトキサントロン、塩酸キサリプロデン、ファミプリジン、酢酸グラチラマー、ナタリズマブ、シンナビドール、 α -イムノカインNNSO3、ABR-215062、Anergix.MS、ケモカイン受容体アンタゴニスト、BBR-2778、カラグアリン、CPI-1189、LEM(リポソーム封入されたミトキサントロン)、THC.CBD(カンナビノイドアゴニスト)MBP-8298、メソプラム(PDE4阻害剤)、MNA-715、抗IL-6受容体抗体、ニューロバックス、ピルフェニドンアロトラップ1258(RDP-1258)、sTNF-R1、タラムパネル、テリフルノミド、TGF-2、チプリモチド、VLA-4アンタゴニスト(例えば、TR-14035、VLA4UltraHaler、Antegran-ELAN/Biogen)、インターフェロンアンタゴニスト、IL-4アゴニストなどの作用物質とも組み合わせられ得る。

30

【0304】

本明細書で提供される結合タンパク質と組み合わせることが可能な、狭心症のための治療剤の非限定的な例には、以下のもの:アスピリン、ニトログリセリン、イソソルバイド・モノニトラート、コハク酸メトプロロール、アテノロール、酒石酸メトプロロール、ベシル酸アムロジピン、塩酸ジルチアゼム、硝酸イソソルビド、重硫酸クロピドゲレル、ニフェジピン、アトロバスタチンカルシウム、塩化カリウム、フロセミド、シンバスタチン、塩酸ベラパミル、ジゴキシン、塩酸プロプラノロール、カルベジロール、リシノプリル、スピロラクトン、ヒドロクロロチアジド、マレイン酸エナラプリル、ナドロール、ラミプリル、エノキサパリンナトリウム、ヘパリンナトリウム、バルサルタン、塩酸ソタロール、フェノフィブラート、エゼチミブ、プメタニド、ロサルタンカリウム、リシノプリル/ヒドロクロロチアジド、フェロジピン、カプトプリル、フマル酸ビソプロロールが含まれる。

40

【0305】

50

本明細書で提供される結合タンパク質と組み合わせることが可能な、強直性脊椎炎のための治療剤の非限定的な例には、以下のもの：イブプロフェン、ジクロフェナクおよびミソプロストール、ナプロキセン、メロキシカム、インドメタシン、ジクロフェナク、セレコキシブ、ロフェコキシブ、スルファサラジン、メトトレキサート、アザチオプリン、ミノサイクリン、プレドニゾン、エタネルセプト、インフリキシマブが含まれる。

【0306】

本明細書で提供される結合タンパク質と組み合わせることが可能な、喘息のための治療剤の非限定的な例には、以下のもの：アルブテロール、サルメテロール/フルチカゾン、モンテルカストナトリウム、プロピオン酸フルチカゾン、ブデソニド、プレドニゾン、キシナホ酸サルメテロール、塩酸レバルブテロール、硫酸アルブテロール/イプラトロピウム、リン酸プレドニゾンナトリウム、トリアムシノロン・アセトニド、ニプロピオン酸ベクロメタゾン、イプラトロピウム臭化物、アジスロマイシン、酢酸ビルブテロール、プレドニゾン、テオフィリン無水物、コハク酸メチルプレドニゾンナトリウム、クラリスロマイシン、ザフィルルカスト、フマル酸フォルモテロール、インフルエンザウイルスワクチン、メチルプレドニゾン、アミノキシシリン三水和物、フルニソリド、アレルギー注射、クロモリンナトリウム、塩酸フェキソフェナジン、フルニソリド/メントール、アモキシシリン/クラブラナート、レボフロキサシン、吸入補助装置、グアイフェネシン、リン酸デキサメタゾンナトリウム、塩酸マキシフロキサシン、ドキシサイクリン水和物 (hydrate)、グアイフェネシン/d-メトルファン、p-エフェドリン/cod/クロルフェニル、ガチフロキサシン、塩酸セチリジン、フロ酸モメタゾン、キシナホ酸サルメテロール、ベンゾナタート、セファレキシン、pe/ヒドロコドン/クロルフェニル、塩酸セチリジン/シュードエフェドリン、フェニレフリン/cod/プロメタジン、コデイン/プロメタジン、セフプロジル、デキサメタゾン、グアイフェネシン/シュードエフェドリン、クロルフェニラミン/ヒドロコドン、ネドクロミルナトリウム、硫酸テルブタリン、エピネフリン、メチルプレドニゾン、硫酸メタプロテレノールが含まれる。

【0307】

本明細書で提供される結合タンパク質と組み合わせることができ、COPDに対する治療剤の非限定的な例には、以下のもの：硫酸アルブテロール/イプラトロピウム、イプラトロピウムプロミド、サルメテロール/フルチカゾン、アルブテロール、キシナホ酸サルメテロール、プロピオン酸フルチカゾン、プレドニゾン、テオフィリン無水物、コハク酸メチルプレドニゾンナトリウム、モンテルカストナトリウム、ブデソニド、フマル酸フォルモテロール、トリアムシノロン・アセトニド、レボフロキサシン、グアイフェネシン、アジスロマイシン、ジプロピオン酸ベクロメタゾン、塩酸レバルブテロール、フルニソリド、セフトリアキソンナトリウム、アミノキシシリン三水和物、ガチフロキサシン、ザフィルルカスト、アモキシシリン/クラブラナート、フルニソリド/メントール、クロルフェニラミン/ヒドロコドン、硫酸メタプロテレノール、メチルプレドニゾン、フロ酸モメタゾン、p-エフェドリン/cod/クロルフェニル、酢酸ビルブテロール、p-エフェドリン/ロラタジン、硫酸テルブタリン、チオトロピウムプロミド、(R,R)-フォルモテロール、TgAAT、シロミラスト、ロフルミラストが含まれる。

【0308】

本明細書で提供される結合タンパク質と組み合わせることができ、HCVに対する治療剤の非限定的な例には、以下のもの：インターフェロン - 2a、インターフェロン - 2b、インターフェロン - con1、インターフェロン - n1、PEG化されたインターフェロン - 2a、PEG化されたインターフェロン - 2b、リバビリン、Pegインターフェロン - 2b+リバビリン、ウルソデオキシコール酸、グリシルリジン酸、チマルファシン、マキサミン、VX-497および以下の標的：HCVポリメラーゼ、HCVプロテアーゼ、HCVヘリカーゼ、HCVIRES (配列内リボソーム進入部位)への介入を通じて、HCVを治療するために使用されるあらゆる化合物が含まれる。

【0309】

10

20

30

40

50

本明細書で提供される結合タンパク質と組み合わせることができる、特発性肺線維症のための治療剤の非限定的な例には、以下のもの：プレドニゾン、アザチオプリン、アルブテロール、コルヒチン、硫酸アルブテロール、ジゴキシシン、インターフェロン、コハク酸メチルプレドニゾンナトリウム、ロラゼパム、フロセミド、リシノプリル、ニトログリセリン、スピロラクトン、シクロホスファミド、イブラトロピウムプロミド、アクチノマイシンd、アルテプラゼ、プロピオン酸フルチカゾン、レボフロキサシン、硫酸メタプロテレノール、硫酸モルヒネ、塩酸オキシコドン、塩化カリウム、トリアムシノロン・アセトニド、タクロリムス無水物、カルシウム、インターフェロン - 、メトトレキサート、ミコフェノラート・モフェチル、インターフェロン - - 1 が含まれる。

【0310】

本明細書で提供される結合タンパク質と組み合わせることができる、心筋梗塞のための治療剤の非限定的な例には、以下のもの：アスピリン、ニトログリセリン、酒石酸メトプロロール、エノキサパリンナトリウム、ヘパリンナトリウム、重硫酸クロピドグレル、カルベジロール、アテノロール、硫酸モルヒネ、コハク酸メトプロロール、ワルファリンナトリウム、リシノプリル、一硝酸イソソルビド、ジゴキシシン、フロセミド、シンバスタチン、ラミプリル、テネクテプラゼ、マレイン酸エナラプリル、トルセミド、レタパーゼ、ロサルタンカリウム、塩酸キナプリル/mag carb、ブメタニド、アルテプラゼ、エナラプリラート、塩酸アミオダロン、塩酸チロフィバンm-水和物、塩酸ジルチアゼム、カプトプリル、イルベサルタン、バルサルタン、塩酸プロプラノロール、フォシノプリルナトリウム、塩酸リドカイン、エプチフィバチド、セファゾリンナトリウム、硫酸アトロピン、アミノカブロン酸、スピロラクトン、インターフェロン、塩酸ソタロール、塩化カリウム、ドキュセートナトリウム、塩酸ドブタミン、アルブラゾラム、プラバスタチンナトリウム、アトロバスタチンカルシウム、塩酸ミダゾラム、塩酸メペリジン、二硝酸イソソルビド、エピネフリン、塩酸ドーパミン、ピバリルジン、ロスバスタチン、エゼチミブ/シンバスタチン、アバシミブ、カリポリドが含まれる。

【0311】

本明細書で提供される結合タンパク質と組み合わせることが可能な、乾癬のための治療剤の非限定的な例には、以下のもの：KDRの小分子阻害剤、Tie-2の小分子阻害剤、カルシポトリエン、プロピオン酸クロベタゾール、トリアムシノロン・アセトニド、プロピオン酸ハロベタゾール、タザロテン、メトトレキサート、フルオシノニド、増強された(augmented)ニプロピオン酸ベタメタゾン、フルオシノロン・アセトニド、アシトレチン、タールシャンプー、吉草酸ベタメタゾン、フロ酸モメタゾン、ケトコナゾール、パラモキシシン/フルオシノロン、吉草酸ヒドロコルチゾン、フルランドレノリド、尿素、ベタメタゾン、プロピオン酸クロベタゾール/皮膚軟化剤(emo11)、プロピオン酸フルチカゾン、アジスロマイシン、ヒドロコルチゾン、保湿処方、葉酸、デソニド、ピメクロリムス、コールタール、二酢酸ジフロラゾン、葉酸エタネルセプト、乳酸、メトキサレン、hc/次没食子酸ビスマス(bismuth subgal)/酸化亜鉛(znox)/resor、酢酸メチルプレドニゾン、プレドニゾン、日焼け止め、ハルシノニド、サリチル酸、アンスラリン、ピバル酸クロコルトロン、石炭抽出物、コールタール/サリチル酸、コールタール/サリチル酸/硫黄、デスオキシメタゾン、ジアゼパム、皮膚軟化剤、フルオシノニド/皮膚軟化剤、鉱物油/ひまし油/nalact、鉱物油/落花生油、石油/ミリスチン酸イソプロピル、ソラーレン、サリチル酸、石炭/トリプロムサラン、チメロサール/ホウ酸、セレコキシブ、インフリキシマブ、シクロスポリン、アレファセプト、エファリズマブ、タクロリムス、ピメクロリムス、PUVA、UVB、スルファサラジンが含まれる。

【0312】

本明細書で提供される結合タンパク質と組み合わせることができる、乾癬性関節炎のための治療剤の非限定的な例には、以下のもの：メトトレキサート、エタネルセプト、ロフェコキシブ、セレコキシブ、葉酸、スルファサラジン、ナプロキセン、レフルノミド、酢酸メチルプレドニゾン、インドメタシン、硫酸ヒロドキシクロロキン、プレドニゾン、

10

20

30

40

50

スリンダク、増強されたニプロピオン酸ベタメタゾン、インフリキシマブ、メトトレキサート、フォラート、トリアムシノロン・アセトニド、ジクロフェナク、ジメチルスルホキシド、ピロキシカム、ジクロフェナクナトリウム、ケトプロフェン、メロキシカム、メチルプレドニゾロン、ナブメトン、トルメチンナトリウム、カルシボトリエン、シクロスポリン、ジクロフェナクナトリウム/ミソプロストール、フルオシノニド、硫酸グルコサミン、金チオリンゴ酸ナトリウム、二酒石酸ヒドロコドン/アセトアミノフェン、イブプロフェン、リセドロン酸ナトリウム、スルファジアジン、チオグアニン、バルデコキシブ、アレファセプト、エファリズマブおよび b c 1 - 2 阻害剤が含まれる。

【0313】

本明細書で提供される結合タンパク質と組み合わせることが可能な、再狭窄のための治療剤の非限定的な例には、以下のもの：シロリムス、パクリタキセル、エベロリムス、タクロリムス、ゾタロリムス、アセトアミノフェンが含まれる。

【0314】

本明細書で提供される結合タンパク質と組み合わせることが可能な、坐骨神経痛のための治療剤の非限定的な例には、以下のもの：二酒石酸ヒドロコドン/アセトアミノフェン、ロフェコキシブ、塩酸シクロベンザプリン、メチルプレドニゾロン、ナプロキセン、イブプロフェン、塩酸オキシコドン/アセトアミノフェン、セレコキシブ、バルデコキシブ、酢酸メチルプレドニゾロン、プレドニゾロン、リン酸コデイン/アセトアミノフェン、塩酸トラマドール/アセトアミノフェン、メタキサロン、メロキシカム、メトカルバモール、塩酸リドカイン、ジクロフェナクナトリウム、ギャバペンチン、デキサメタゾン、カリソプロドール、ケトロラク・トロメタミン、インドメタシン、アセトアミノフェン、ジアゼパム、ナブメタオン、塩酸オキシコドン、塩酸チザニジン、ジクロフェナクナトリウム/ミソプロストール、ナブシル酸プロポキシフェン/アセトアミノフェン、a s a / o x y c o d / コキシコドン t e r、イブプロフェン/重酒石酸ヒドロコドン、塩酸トラマドール、エトドラク、塩酸プロポキシフェン、塩酸アミトリプチリン、カリソプロドール/リン酸コデイン/a s a、硫酸モルヒネ、マルチビタミン、ナプロキセンナトリウム、クエン酸オルフェナドリン、テマゼパムが含まれる。

【0315】

本明細書で提供される結合タンパク質と組み合わせることが可能な、S L E (狼瘡) のための治療剤の例には、以下のもの：N S A I D、例えば、ジクロフェナク、ナプロキセン、イブプロフェン、ピロキシカム、インドメタシン；C O X 2 阻害剤、例えば、セレコキシブ、ロフェコキシブ、バルデコキシブ；抗マラリア剤、例えば、ヒドロキシクロロキン；ステロイド、例えば、プレドニゾン、プレドニゾロン、ブデノシド、デキサメタゾン；細胞障害剤、例えば、アザチオプリン、シクロホスファミド、ミコフェノラート・モフェチル、メトトレキサート；P D E 4 の阻害剤またはプリン合成阻害剤、例えば、C e l l c e p t が含まれる。本明細書で提供される結合タンパク質は、スルファサラジン、5 - アミノサリチル酸、オルサラジン、イムランなどの作用物質、ならびに I L - 1 などの炎症促進性サイトカインの合成、産生または作用を妨害する作用物質、例えば、I L - 1

変換酵素阻害剤および I L - 1 r a のようなカスパーゼ阻害剤とも組み合わせられ得る。

本明細書で提供される結合タンパク質は、また、T 細胞シグナル伝達阻害剤、例えば、チロシンキナーゼ阻害剤；または T 細胞活性化分子を標的とする分子、例えば、C T L A - 4 - I g G または抗 B 7 抗体ファミリー抗体、抗 P D - 1 ファミリー抗体とともに使用され得る。本明細書で提供される結合タンパク質は、I L - 1 1 または抗サイトカイン抗体、例えば、ホノトリズマブ (抗 I F N g 抗体)、または抗受容体受容体抗体、例えば、抗 I L - 6 受容体抗体および B 細胞表面分子に対する抗体と組み合わせることが可能である。本明細書で提供される抗体またはその抗原結合部分は、また、L J P 3 9 4 (アベチムス (a b e t i m u s)) (B 細胞を枯渇させ、または不活化する作用物質)、例えば、リツキシマブ (抗 C D 2 0 抗体)、リンホスタット - B (抗 B l y S 抗体)、T N F アンタゴニスト、例えば、抗 T N F 抗体、アダリムマブ (P C T 公開 W O 9 7 / 2 9 1 3 1 ; H U M I R A)、C A 2 (R E M I C A D E)、C D P 5 7 1、T N F R - I g 構築物 (

10

20

30

40

50

p 7 5 T N F R I g G (E N B R E L) および p 5 5 T N F R I g G (L E N E R C E P T)) および b c l - 2 阻害剤 (トランスジェニックマウスにおける b c l - 2 過剰発現が狼瘡様表現型をもたらすことが実証されており (Marquina, Regina et al., Journal of Immunology (2004), 172 (11), 7177 - 7185 参照)、したがって阻害が治療効果を有すると予想されるので) とともに使用され得る。

【 0 3 1 6 】

本明細書で提供される医薬組成物は、本明細書で提供される結合タンパク質の「治療的有効量」または「予防的有効量」を含み得る。「治療的有効量」は、所望の治療的結果を達成するための投薬量で、および所望の治療的結果を達成するために必要な期間にわたって有効な量を表す。結合タンパク質の治療的有効量は、当業者によって決定され得、病状、年齢、性別および個体の体重ならびに結合タンパク質が個体内で所望の応答を惹起する能力などの因子に従って変動し得る。治療的有効量は、抗体または抗体部分のあらゆる毒性効果または有害効果が、治療的に有益な効果によって凌駕される量でもある。「予防的有効量」は、所望の予防的結果を達成するために必要な投薬量で、および所望の予防的結果を達成するために必要な期間にわたって有効な量を表す。典型的には、疾病のより初期段階の前にまたは疾病のより初期段階において、予防的投薬が患者に使用されるので、予防的有効量は、治療的有効量より少ない。

10

【 0 3 1 7 】

投薬計画は、最適な所望の応答 (例えば、治療的応答または予防的応答) を与えるように調整され得る。例えば、単一のボラスを投与することができ、複数の分割された用量を経時的に投与することができ、または、治療状況の緊急性によって示されるように、用量を比例的に減少もしくは増加させ得る。投与の容易さおよび投薬量の均一性のために、投薬単位形態で非経口組成物を製剤化することが特に有利である。本明細書において使用される投薬単位形態は、治療されるべき哺乳動物患者に対する統一された投薬として適した、物理的に分離された単位を表し、各単位は、必要とされる医薬担体とともに、所望される治療効果を生じるように計算された活性化化合物の所定量を含有する。本明細書で提供される投薬単位形態に対する規格は、(a) 活性化化合物の特有の特徴および達成されるべき具体的な治療効果または予防効果ならびに (b) 個体における過敏症の治療用のこのような活性化化合物を配合する分野に固有の制約によって規定され、これらに直接依存する。

20

30

【 0 3 1 8 】

本明細書で提供される結合タンパク質の治療的または予防的有効量に対する典型的な非限定的範囲は、0 . 1 - 2 0 m g / k g、例えば 1 - 1 0 m g / k g である。緩和されるべき症状の種類および重度に応じて、投薬量の値が変化し得ることに注意すべきである。いずれかの具体的な患者に対して、個体の要求に従って、組成物の投与を行いまたは監督している者の専門的判断に従って、特異的投薬計画を経時的に調整すべきこと、および、本明細書に記載されている投薬量の範囲は典型的なものに過ぎず、特許請求の範囲に記載されている組成物の範囲または実施に限定することを意図したものではないことをさらに理解すべきである。

40

【 0 3 1 9 】

V . 診断

本明細書における開示は、診断の適用例も提供する。これは、以下でさらに明らかにされる。

【 0 3 2 0 】

A . アッセイの方法

本開示は、本明細書に記載されている少なくとも 1 つの D V D - I g を使用して試験試料中の分析物 (またはその断片) の存在、量または濃度を決定する方法も提供する。本分野において知られているあらゆる適切なアッセイは、この方法において使用することが可能である。例として、サンドイッチイムノアッセイ (例えば、放射性同位体検出 (ラジオイムノアッセイ (R I A)) および酵素検出 (エンザイムイムノアッセイ (E I A)) また

50

は酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA) (例えば、Quantikine ELISA アッセイ、R & D Systems, Minneapolis, MN) を含むモノクローナル、ポリクローナルおよび/もしくはDVD-Ig サンドイッチイムノアッセイまたはそのあらゆるバリエーション (例えば、モノクローナル/DVD-Ig、DVD-Ig/ポリクローナルなど)、競合阻害イムノアッセイ (例えば、順向および逆向)、蛍光偏光イムノアッセイ (FPIA)、酵素増幅イムノアッセイ技術 (EMIT)、生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET) および均一系化学発光アッセイなどのイムノアッセイが含まれるが、これらに限定されない。予め活性化されたプロテインチップアレイなど、SELDIを基礎とするイムノアッセイにおいて、目的の分析物 (またはその断片) に特異的に結合する捕捉試薬は、質量分析プローブの表面に付着している。分析物 (またはその断片) は、次いで、バイオチップ上で特異的に捕捉され、捕捉された分析物 (またはその断片) は、質量分析によって検出される。あるいは、分析物 (またはその断片) は、捕捉試薬から溶出させ、伝統的なMALDI (マトリックス支援レーザー脱離/イオン化) またはSELDIによって検出することが可能である。化学発光微粒子イムノアッセイ、特にARCHITECT (登録商標) 自動分析器 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) を使用するものは、好ましいイムノアッセイの例である。

10

【0321】

(尿、血液、血清および血漿および他の体液を収集し、取り扱い、処理する) 本分野において周知である方法は、例えば、本明細書に記載されているDVD-Igが免疫診断試薬としておよび/または分析物イムノアッセイキットにおいて使用される場合、本開示の実施において使用される。試験試料は、抗体、抗原、ハプテン、ホルモン、薬物、酵素、受容体、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、オリゴヌクレオチドおよび/またはポリヌクレオチドなど、目的の分析物に加えてさらなる部分を含み得る。例えば、試料は、対象から得られた全血試料であり得る。試験試料、特に全血は、本明細書に記載されているイムノアッセイの前に、例えば前処理試薬を用いて処理されることが必要でありまたは所望され得る。前処理が必要でない場合 (例えば、ほとんどの尿試料) においても、前処理は場合によって (例えば、商業的プラットホームでのレジメンの一部として) 行うことが可能である。

20

【0322】

前処理試薬は、本明細書で提供されるイムノアッセイおよびキットとの使用に適したあらゆる試薬であり得る。前処理は、(a) 1つ以上の溶媒 (例えば、メタノールおよびエチレングリコール) および場合によって塩、(b) 1つ以上の溶媒および塩および場合によって洗浄剤、(c) 洗浄剤または(d) 洗浄剤および塩を場合によって含む。前処理試薬は本分野において公知であり、このような前処理は、例えば、Abbott TDX、AxSYM (登録商標) およびARCHITECT (登録商標) 分析器 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) でのアッセイに使用されるように、文献中に記載されているように (例えば、Yatscoff et al., Abbott TDX Monoclonal Antibody Assay Evaluated for Measuring Cyclosporine in Whole Blood, Clin. Chem. 36: 1969-1973 (1990) およびWallemacq et al., Evaluation of the New AxSYM Cyclosporine Assay: Comparison with TDX Monoclonal Whole Blood and EMIT Cyclosporine Assays, Clin. Chem. 45: 432-435 (1999) を参照) および/または市販されているものを使用することが可能である。さらに、前処理は、(前処理に関する教示についてその全体が参照により組み込まれる。) Abbottの米国特許第5,135,875号、欧州特許公開第0471293号、2006年12月29日に出願された米国仮特許出願第60/878,017号および米国特許出願公開第2008/0020401号に記載されているように行うことが可能である。

30

40

50

前処理試薬は、不均一剤または均一剤であり得る。

【0323】

不均一前処理試薬を使用する場合、前処理試薬は、試料中に存在する分析物結合タンパク質（例えば、分析物またはその断片に結合することができるタンパク質）を沈殿させる。このような前処理工程は、沈殿した分析物結合タンパク質から、前処理剤を試料に添加することによって形成された混合物の上清を分離することによって、あらゆる分析物結合タンパク質を除去することを含む。このようなアッセイにおいて、あらゆる結合タンパク質が存在しない混合物の上清はアッセイにおいて使用され、抗体捕捉工程へと直接進行する。

【0324】

均一前処理試薬を使用する場合、このような分離工程は存在しない。試験試料の混合物および前処理試薬全体は、分析物（またはその断片）の標識された特異的結合パートナー（標識された抗分析物抗体（またはその抗原反応性断片）など）と接触させる。このようなアッセイに使用される前処理試薬は、第一の特異的結合パートナーによる捕捉前または捕捉の間に、前処理された試験試料混合物中で典型的に希釈される。このような希釈にも関わらず、特定の量の前処理試薬は、捕捉の間、試験試料混合物中に依然として存在する（または残存する）。一実施形態において、標識された特異的結合パートナーは、DVD-Ig（またはその断片、バリエーションもしくはバリエーションの断片）であり得る。

【0325】

不均一フォーマットにおいて、試験試料が対象から得られた後、第一の混合物が調製される。混合物は、分析物（またはその断片）および第一の特異的結合パートナーについて評価されている試験試料を含有し、第一の特異的結合パートナーおよび試験試料中に含有されているあらゆる分析物は、第一特異的結合パートナー - 分析物複合体を形成する。好ましくは、第一の特異的結合パートナーは、抗分析物抗体またはその断片である。第一の特異的結合パートナーは、本明細書に記載されているDVD-Ig（またはその断片、バリエーションもしくはバリエーションの断片）であり得る。混合物を形成するために試験試料および第一の特異的結合パートナーが添加される順序は重要でない。好ましくは、第一の特異的結合パートナーは、固相上に固定化されている。（第一の特異的結合パートナー、場合によって第二の特異的結合パートナーについて）イムノアッセイにおいて使用される固相は、磁気粒子、ビーズ、試験管、マイクロタイタープレート、キュベット、膜、足場分子、フィルム、濾紙、ディスクおよびチップなど（但し、これらに限定されない）、本分野において知られているあらゆる固相であり得る。

【0326】

第一特異的結合パートナー - 分析物複合体を含有する混合物が形成された後、本分野において知られているあらゆる技術を使用して、あらゆる非結合分析物が複合体から除去される。例えば、非結合分析物は、洗浄によって除去することが可能である。しかし、望ましくは、第一の特異的結合パートナーは、試験試料中に存在するすべての分析物が第一の特異的結合パートナーによって結合されるように、試験試料中に存在するあらゆる分析物より過度に存在する。

【0327】

あらゆる非結合分析物が除去された後、第二の特異的結合パートナーが混合物に添加されて、第一特異的結合パートナー - 分析物 - 第二特異的結合パートナー複合体を形成する。第二の特異的結合パートナーは、好ましくは、（第一の特異的結合パートナーによって結合される分析物上のエピトープと異なる）分析物上のエピトープに結合する抗分析物抗体である。さらに、また好ましくは、第二の特異的結合パートナーは、上記に記載されている検出可能な標識で標識されまたはこの標識を含有する。第二の特異的結合パートナーは、本明細書に記載されているDVD-Ig（またはその断片、バリエーションもしくはバリエーションの断片）であり得る。

【0328】

本分野において公知であるあらゆる適切な検出可能な標識が使用され得る。例えば、検

10

20

30

40

50

出可能な標識は、放射性標識（ ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、 ^{32}P および ^{33}P など）、酵素標識（西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリ性ペルオキシダーゼ、グルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼなど）、化学発光標識（アクリジニウムエステル、チオエステルまたはスルホンアミド；ルミノール、イソルミノール、フェナンスリジニウムエステルなど）、蛍光標識（フルオレセインなど（例えば、5-フルオレセイン、6-カルボキシフルオレセイン、3'-6-カルボキシフルオレセイン、5(6)-カルボキシフルオレセイン、6-ヘキサクロロ-フルオレセイン、6-テトラクロロフルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネートなど）、ローダミン、フィコピリンタンパク質、R-フィコエリトリン、量子ドット（例えば、硫化亜鉛キャップ付加セレン化カドミウム）、温度測定標識または免疫ポリマーゼ連鎖反応標識であり得る。標識の導入、標識化手順および標識の検出は、Polak and Van Noorden, *Introduction to Immunocytochemistry*, 2nd ed., Springer Verlag, N.Y. (1997) および *Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon* によって出版されたハンドブックとカタログの組合せであるHaugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals* (1996)に見出される。蛍光標識は、FPIAにおいて使用することが可能である（例えば、これらの全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第5,593,896号、第5,573,904号、第5,496,925号、第5,359,093号および第5,352,803号を参照）。アクリジニウム化合物は、均一系または不均一系化学発光アッセイにおいて

10

20

【0329】

好ましいアクリジニウム化合物は、アクリジニウム-9-カルボキサミドである。アクリジニウム9-カルボキサミドを調製する方法は、Mattingly, *J. Biolumin. Chemilumin.* 6:107-114 (1991); Adamczyk et al., *J. Org. Chem.* 63:5636-5639 (1998); Adamczyk et al., *Tetrahedron* 55:10899-10914 (1999); Adamczyk et al., *Org. Lett.* 1:779-781 (1999); Adamczyk et al., *Bioconjugate Chem.* 11:714-724 (2000); Mattingly et al., *In Luminescence Biotechnology: Instruments and Applications*; Dyke, K.V. Ed.; CRC Press: Boca Raton, pp. 77-105 (2002); Adamczyk et al., *Org. Lett.* 5:3779-3782 (2003); ならびに米国特許第5,468,646号、第5,543,524号および第5,783,699号（これらは各々、それに関する教示についてその全体が参照により本明細書に組み込まれる。）に記載されている。別の好ましいアクリジニウム化合物は、アクリジニウム-9-カルボキシレートアリアルエステルである。アクリジニウム-9-カルボキシレートアリアルエステルの例は、10-メチル-9-(フェノキシカルボニル)アクリジニウムフルオロスルホネート(Cayman Chemical, Ann Arbor, MIから入手可能)である。アクリジニウム-9-カルボキシレートアリアルエステルを調製する方法は、McCapra et al., *Photochem. Photobiol.* 4:1111-21 (1965); Razavi et al., *Luminescence* 15:245-249 (2000); Razavi et al., *Luminescence* 15:

30

40

50

239-244(2000); および米国特許第5,241,070号(これらは各々、それに関する教示についてその全体が参照により本明細書に組み込まれる。)に記載されている。アクリジニウム-9-カルボキシレートアリアルエステルおよびその使用に関するさらなる詳細は、US2008-0248493に示されている。

【0330】

(例えば、上記に記載されているアクリジニウムまたは他の化学発光剤を使用する)化学発光アッセイは、Adamczyk et al., Anal. Chim. Acta 579(1):61-67(2006)に記載されている方法に従って行うことが可能である。あらゆる適切なアッセイフォーマットが使用され得るが、マイクロプレートケミルミノメーター(Mithras LB-940, Berthold Technologies U.S.A., LLC, Oak Ridge, TN)は、小容量の複数試料のアッセイを迅速に行うことを可能とする。

10

【0331】

化学発光アッセイ用の混合物を形成するために試験試料および(複数の)特異的結合パートナーが添加される順序は重要でない。第一の特異的結合パートナーがアクリジニウム化合物などの化学発光剤で検出可能に標識される場合、検出可能に標識された第一の特異的結合パートナー-分析物複合体が形成する。あるいは、第二の特異的結合パートナーが使用され、第二の特異的結合パートナーがアクリジニウム化合物などの化学発光剤で検出可能に標識される場合、検出可能に標識された第一の特異的結合パートナー-分析物-第二の特異的結合パートナー複合体が形成する。標識されていても標識されていなくても、あらゆる非結合の特異的結合パートナーは、洗浄などの本分野において知られているあらゆる技術を使用して、混合物から除去することが可能である。

20

【0332】

過酸化水素は、上記に記載されているアクリジニウム化合物の添加前、添加と同時または添加後に、混合物中においてその場で生成され、または混合物に提供もしくは供給され得る(例えば、過酸化水素を含有することが知られている1つ以上の緩衝液または他の溶液である過酸化水素の供給源)。過酸化水素は、当業者に明らかであるようないくつかの方法においてその場で生成され得る。

【0333】

少なくとも1つの塩基溶液を試料に同時にまたはその後添加すると、分析物の存在の指標となる検出可能なシグナル、すなわち、化学発光シグナルが発生する。塩基溶液は、少なくとも1つの塩基を含有し、10以上、好ましくは12以上のpHを有する。塩基溶液の例には、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム、水酸化アンモニウム、水酸化マグネシウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、水酸化カルシウム、炭酸カルシウムおよび炭酸水素カルシウムが含まれるが、これらに限定されない。試料に添加される塩基溶液の量は、塩基溶液の濃度に依存する。使用される塩基溶液の濃度を基礎として、当業者は、試料に添加する塩基溶液の量を容易に決定することができる。

30

【0334】

発生した化学発光シグナルは、当業者に知られている通常の技術を使用して検出することが可能である。発生したシグナルの強度を基礎として、試料中の分析物の量を定量することが可能である。具体的には、試料中の分析物の量は、発生したシグナルの強度に比例する。存在する分析物の量は、発生した光の量を分析物の標準曲線と比較するまたは基準標準物質と比較することによって定量することが可能である。標準曲線は、既知の濃度の分析物の段階希釈物または溶液を使用して、質量分析、重量測定法および本分野において公知である他の技術によって生成することが可能である。化学発光剤としてのアクリジニウム化合物の使用を強調して上記に記載したが、当業者は、この記載を他の化学発光剤の使用に容易に適合させることができる。

40

【0335】

分析物イムノアッセイは、サンドイッチフォーマットなど(但し、これらに限定されない。)、本分野において知られているあらゆるフォーマットを使用して一般に行うことが

50

可能である。具体的には、1つのイムノアッセイフォーマットにおいて、少なくとも2つの抗体が、試料中のヒト分析物などの分析物またはその断片を分離および定量するために使用される。より具体的には、少なくとも2つの抗体は、分析物（またはその断片）上の異なるエピトープに結合して、「サンドイッチ」と呼ばれる免疫複合体を形成する。一般に、イムノアッセイにおいて、1つ以上の抗体は、試験試料中の分析物（またはその断片）を捕捉するために使用することが可能であり（これらの抗体は1つ以上の「捕捉」抗体と頻繁に呼ばれる。）、1つ以上の抗体は、検出可能な（すなわち、定量可能な）標識をサンドイッチに結合させるために使用することが可能である（これらの抗体は、1つ以上の「検出抗体」、1つ以上の「連結体」と頻繁に呼ばれる。）。したがって、サンドイッチイムノアッセイフォーマットの状況において、本明細書に記載されているDVD-Ig（またはその断片、バリエーションもしくはバリエーションの断片）は、捕捉抗体、検出抗体または両方として使用することが可能である。例えば、分析物（またはその断片）上の第一のエピトープに結合することができるドメインを有する1つのDVD-Igは、捕捉抗体として使用することが可能であり、および/または分析物（またはその断片）上の第二のエピトープに結合することができるドメインを有する別のDVD-Igは、検出抗体として使用することが可能である。この関連で、分析物（またはその断片）上の第一のエピトープに結合することができる第一のドメインおよび分析物（またはその断片）上の第二のエピトープに結合することができる第二のドメインを有するDVD-Igは、検出抗体および/または捕捉抗体として使用することが可能である。あるいは、第一の分析物（またはその断片）上のエピトープに結合することができる第一のドメインおよび第二の分析物（またはその断片）上のエピトープに結合することができる第二のドメインを有する1つのDVD-Igは、捕捉抗体および/または（2つ以上の分析物を検出し、場合によって定量する）検出抗体として使用することが可能である。単量体の形態および（ホモマーまたはヘテロマーであり得る）二量体/多量体の形態など、分析物が2つ以上の形態で試料中に存在する可能性がある場合、単量体の形態でのみ曝露されるエピトープに結合することができるドメインを有する1つのDVD-Igおよび二量体/多量体の形態の異なる部分でエピトープに結合することができるドメインを有する別のDVD-Igは、捕捉抗体および/または検出抗体として使用することが可能であり、それによって、異なる形態の所与の分析物の検出および場合による定量化を可能にする。さらに、単一のDVD-Ig内でおよび/またはDVD-Ig間で親和性に相違があるDVD-Igを使用することは、結合力の利点をもたらし得る。本明細書に記載されているイムノアッセイの状況において、DVD-Igの構造内に1つ以上のリンカーを組み込むことが一般に助けになりまたは所望され得る。存在する場合、最適には、リンカーは、内部ドメインによるエピトープの結合ならびに外部ドメインによる別のエピトープの結合を可能にするために十分な長さおよび構造的柔軟性を有するべきである。この関連で、DVD-Igが2つの異なる分析物と結合することができ、一方の分析物が他方より大きい場合、大きい方の分析物が外部ドメインによって結合されることが望ましい。

10

20

30

【0336】

一般的に言うと、分析物（またはその断片）について試験される（例えば、含有することが疑われる）試料は、少なくとも1つの捕捉抗体（または複数の抗体）および少なくとも1つの検出抗体（例えば、捕捉および/または検出抗体が複数の抗体を含む場合のように、第二の検出抗体または第三の検出抗体またはさらに連続した番号の抗体であり得る）と、同時にまたは順次あらゆる順序で接触させることが可能である。例えば、試験試料は、第一に少なくとも1つの捕捉抗体と接触させ、次いで（順次）少なくとも1つの検出抗体と接触させることが可能である。あるいは、試験試料は、第一に少なくとも1つの検出抗体と接触させ、次いで（順次）少なくとも1つの捕捉抗体と接触させることが可能である。さらに別の代替法において、試験試料は、捕捉抗体および検出抗体と同時に接触させることが可能である。

40

【0337】

サンドイッチアッセイフォーマットにおいて、分析物（またはその断片）を含有するこ

50

とが疑われる試料は、第一の抗体 / 分析物複合体の形成を可能にする条件下で、少なくとも1つの第一の捕捉抗体と第一に接触させる。2つ以上の捕捉抗体が使用される場合、2つ以上の捕捉抗体を含む第一の捕捉抗体 / 分析物複合体が形成される。サンドイッチアッセイにおいて、抗体、すなわち、好ましくは、少なくとも1つの捕捉抗体は、試験試料中で予想される分析物（またはその断片）の最大量より過剰なモル量で使用される。例えば、緩衝液（例えば微粒子コーティング緩衝液）mL当たり約5 μ gから約1mgの抗体が使用され得る。

【0338】

1つだけの抗体による結合が必要とされるため、小さな分析物を測定するためにしばしば使用される競合阻害イムノアッセイは、順次的小および古典的フォーマットを含む。順次的競合阻害イムノアッセイにおいて、目的の分析物に対する捕捉抗体は、マイクロタイタープレートのウェルまたは他の固体支持体上に被覆される。目的の分析物を含有する試料がウェルに添加される場合、目的の分析物は捕捉抗体に結合する。洗浄後、既知の量の標識された（例えば、ビオチンまたは西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP））分析物がウェルに添加される。酵素標識の基質は、シグナルを発生させることが必要である。HRPに適した基質の例は、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン（TMB）である。洗浄後、標識された分析物によって発生したシグナルは測定され、試料中の分析物の量に逆比例する。古典的競合阻害イムノアッセイにおいて、目的の分析物に対する抗体は、固体支持体（例えば、マイクロタイタープレートのウェル）上に被覆される。しかし、順次的競合阻害イムノアッセイと異なり、試料および標識された分析物はウェルに同時に添加される。試料中のあらゆる分析物が、捕捉抗体への結合について、標識された分析物と競合する。洗浄後、標識された分析物によって発生したシグナルは測定され、試料中の分析物の量に逆比例する。

【0339】

場合によって、試験試料を少なくとも1つの捕捉抗体（例えば、第一の捕捉抗体）と接触させる前に、少なくとも1つの捕捉抗体は、試験試料からの第一の抗体 / 分析物（またはその断片）複合体の分離を促進する固体支持体に結合することが可能である。捕捉抗体が結合する基質は、試料からの捕捉抗体 - 分析物複合体の分離を促進するあらゆる適切な固体支持体または固相であり得る。

【0340】

例として、マイクロタイタープレートなどのプレートのウェル、試験管、多孔性ゲル（例えば、シリカゲル、アガロース、デキストランまたはゼラチン）、ポリマーフィルム（例えば、ポリアクリルアミド）、ビーズ（例えば、ポリスチレンビーズまたは磁気ビーズ）、フィルター / 膜のストリップ（例えば、ニトロセルロースまたはナイロン）、微粒子（例えば、ラテックス粒子、磁化可能な微粒子（例えば、酸化第二鉄または酸化クロムコアおよびホモまたはヘテロポリマーコートおよび約1 - 10ミクロンの半径を有する微粒子）が含まれる。基質は、抗原に結合するための適切な表面親和性および検出抗体による到達を可能にするために十分な多孔性を有する適切な多孔性材料を含み得る。水和状態のゼラチン性材料が使用され得るが、微小多孔性材料が一般的に好ましい。好ましくは、このような多孔性基質は、厚さが約0.01から約0.5mm、好ましくは約0.1mmのシートの形態である。孔サイズはかなり様々であり得るが、好ましくは孔サイズは約0.025から約15ミクロン、より好ましくは約0.15から約15ミクロンである。このような基質の表面は、抗体と基質の共有結合を引き起こす化学的プロセスによって活性化することが可能である。一般に疎水性の力を介する吸着による、抗原または抗体と基質の不可逆的結合が生じ、あるいは、抗体を基質に共有結合させるために、このような結合が分析物に結合する抗体の能力を干渉しないという条件で、化学的カップリング剤または他の手段を使用することが可能である。あるいは、抗体は、ストレプトアビジン（例えば、DYNAL（登録商標）Magnetic Beads, Invitrogen, Carlsbad, CA）またはビオチン（例えば、Power-Bind（商標）-SAMPストレプトアビジンコーティング微粒子（Seradyn, Indianapolis

10

20

30

40

50

、I N)を使用する)または抗種特異的モノクローナル抗体で予めコーティングされている微粒子と結合することが可能である。必要な場合、基質は、抗体上の様々な官能基との反応性を可能にするために誘導体化し得る。このような誘導体化は特定のカップリング剤の使用を必要とし、このカップリング剤の例には、無水マレイン酸、N-ヒドロキシスクシンイミドおよび1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドが含まれるが、これらに限定されない。所望される場合、各々が(複数の)分析物に特異的である抗体(またはその断片)などの1つ以上の捕捉試薬は、様々な物理的またはアドレス可能な場所において(例えば、バイオチップの配置などにおいて)固相に付着させることが可能である(例えば、米国特許第6,225,047号;国際特許出願公開WO99/51773;米国特許第6,329,209号;国際特許出願公開WO00/56934および米国特許第5,242,828号を参照)。捕捉試薬が固体支持体としての質量分析プローブに付着している場合、プローブに結合した分析物の量は、レーザー脱離イオン化質量分析によって検出することが可能である。あるいは、単一のカラムは、1つ以上の捕捉試薬で誘導体化された様々なビーズで充填することが可能であり、それによって単一の場所において分析物を捕捉する(抗体誘導体化、ビーズベースの技術、例えばLuminox(Austin, TX)のxMAP技術を参照)。

【0341】

分析物(またはその断片)についてアッセイされている試験試料が少なくとも1つの捕捉抗体(例えば、第一の捕捉抗体)と接触した後、第一の抗体(または複数の抗体)-分析物(またはその断片)複合体の形成を可能にするために、混合物はインキュベートされる。インキュベーションは、約4.5から約10.0のpH、約2から約45の温度で、少なくとも約1分から約18時間、好ましくは約1から約24分、最も好ましくは約4から約18分間実施することが可能である。本明細書に記載されているイムノアッセイは、1つの工程(試験試料、少なくとも1つの捕捉抗体および少なくとも1つの検出抗体がすべて、反応容器に順次または同時に添加されることを意味する。)または2つの工程、3つの工程など2つ以上の工程で行うことが可能である。

【0342】

(第一のまたは複数の)捕捉抗体/分析物(またはその断片)複合体の形成後、次いで、この複合体は、(第一のまたは複数の)捕捉抗体/分析物(またはその断片)/第二の検出抗体複合体の形成を可能にする条件下で、少なくとも1つの検出抗体と接触させる。明瞭にするために「第二の」抗体(例えば、第二の検出抗体)と見出しをつけているが、実際、複数の抗体が捕捉および/または検出に使用される場合、少なくとも1つの検出抗体は、イムノアッセイにおいて使用される第二、第三、第四などの抗体であり得る。捕捉抗体/分析物(またはその断片)複合体が2つ以上の検出抗体と接触する場合、(第一のまたは複数の)捕捉抗体/分析物(またはその断片)/(複数の)検出抗体複合体が形成される。捕捉抗体(例えば、第一の捕捉抗体)と同様に、少なくとも1つの(例えば第二およびあらゆるその後の)検出抗体が捕捉抗体/分析物(またはその断片)複合体と接触する場合、上記に記載されているものと同様の条件下でのインキュベーションの時間が、(第一のまたは複数の)捕捉抗体/分析物(またはその断片)/(第二のまたは複数の)検出抗体複合体の形成に必要である。好ましくは、少なくとも1つの検出抗体は、検出可能な標識を含有する。検出可能な標識は、(第一のまたは複数の)捕捉抗体/分析物(またはその断片)/(第二のまたは複数の)検出抗体複合体の形成前に、形成と同時にまたは形成後に、少なくとも1つの検出抗体(例えば、第二の検出抗体)に結合することが可能である。本分野において知られているあらゆる検出可能な標識が使用され得る(Polak and Van Noorden(1997)およびHaugland(1996)の参考文献の論述を含めて上記の論述を参照)。

【0343】

検出可能な標識は、直接またはカップリング剤を介して抗体に結合することが可能である。使用することが可能であるカップリング剤の例は、Sigma-Aldrich, St. Louis, MOから市販されているEDAC(1-エチル-3-(3-ジメチルア

10

20

30

40

50

ミノプロピル)カルボジイミド、塩酸塩)である。使用することが可能である他のカップリング剤は、本分野において公知である。検出可能な標識を抗体に結合させる方法は、本分野において公知である。さらに、C P S P - アクリジニウムエステル(すなわち、9 - [N - トシル - N - (3 - カルボキシプロピル)] - 1 0 - (3 - スルホプロピル) アクリジニウムカルボキサミド)またはS P S P - アクリジニウムエステル(すなわち、N 1 0 - (3 - スルホプロピル) - N - (3 - スルホプロピル) - アクリジニウム - 9 - カルボキサミド)など、抗体への検出可能な標識のカップリングを促進する末端基をすでに含有する多数の検出可能な標識を購入または合成することが可能である。

【0344】

(第一のまたは複数の)捕捉抗体/分析物/(第二のまたは複数の)検出抗体複合体は、標識の定量前に試験試料の残りから分離することが可能であるが、分離する必要はない。例えば、少なくとも1つの捕捉抗体(例えば、第一の捕捉抗体)は、ウェルまたはビーズなどの固体支持体に結合しており、分離は、固体支持体との接触から(試験試料の)流体を除去することによって達成することが可能である。あるいは、少なくとも第一の捕捉抗体が固体支持体に結合している場合、これは、第一の(複数の)抗体/分析物/第二の(複数の)抗体複合体を形成するために、分析物含有試料および少なくとも1つの第二の検出抗体と同時に接触させることが可能であり、その後、固体支持体との接触から流体(試験試料)を除去する。少なくとも1つの第一の捕捉抗体が固体支持体に結合していない場合、(第一のまたは複数の)捕捉抗体/分析物/(第二のまたは複数の)検出抗体複合体は、標識の量の定量のために試験試料から取り出す必要はない。

10

20

【0345】

標識された捕捉抗体/分析物/検出抗体複合体(例えば、第一の捕捉抗体/分析物/第二の検出抗体複合体)の形成後、本分野において知られている技術を使用して複合体中の標識の量が定量される。例えば、酵素標識が使用される場合、標識された複合体は、色の発生などの定量可能な反応を与える標識の基質と反応する。標識が放射性標識である場合、標識は、シンチレーションカウンターなどの適当な手段を使用して定量される。標識が蛍光標識である場合、標識は、「励起波長」として知られている)1つの色の光で標識を刺激し、刺激に反応して標識によって放出される(「放出波長」として知られている)別の光を検出することによって定量される。標識が化学発光標識である場合、標識は、放出された光を視覚的にまたはルミノメーター、X線フィルム、高速写真フィルム、CCDカメラなどを使用することにより検出することによって定量される。複合体中の標識の量が定量化された後、試験試料中の分析物またはその断片の濃度が、既知の濃度の分析物またはその断片の段階希釈物を使用して生成された標準曲線の使用などの適当な手段によって決定される。分析物またはその断片の段階希釈物を使用する以外に、標準曲線は、重量測定法、質量分析および本分野において公知である他の技術によって生成することが可能である。

30

【0346】

A R C H I T E C T (登録商標)分析器を使用する化学発光微粒子アッセイにおいて、連結体希釈物のpHは約6.0 + / - 0.2であるべきであり、微粒子コーティング緩衝液はおよそ室温で(すなわち、約17から約27 で)維持されるべきであり、微粒子コーティング緩衝液のpHは約6.5 + / - 0.2であるべきであり、微粒子希釈物のpHは約7.8 + / - 0.2であるべきである。固体は、好ましくは、約0.15%未満、約0.14%未満、約0.13%未満、約0.12%未満または(約0.10%未満などの)約0.11%未満などの約0.2%未満である。

40

【0347】

F P I A は、競合的結合イムノアッセイの原理を基礎としている。蛍光標識された化合物は、直線偏光によって励起されると、回転速度と逆比例する偏向の程度を有する蛍光を放出する。蛍光標識されたトレーサー-抗体複合体が直線偏光によって励起されると、蛍光体は光が吸収される時間と光が放出される時間との間の回転が制約されるので、放出された光は高度に偏向したままとなる。「遊離」トレーサー化合物(すなわち、抗体に結合

50

していない化合物)が直線偏光によって励起されると、その回転は、競合的結合イムノアッセイにおいて産生される対応するトレーサー - 抗体連結体よりはるかに速い。FPIAは、特別な取り扱いおよび廃棄を必要とする放射性物質が存在しないため、RIAより有利である。さらに、FPIAは、容易および迅速に行うことが可能である均一系アッセイである。

【0348】

上記を考慮して、試験試料における分析物(またはその断片)の存在、量または濃度を決定する方法が提供される。この方法は、(i)(i')抗体、分析物に結合することができる抗体の断片、分析物に結合することができる抗体のパリアント、分析物に結合することができる抗体のパリアントの断片および分析物に結合することができるDVD-Ig (またはその断片、パリアントもしくはパリアントの断片)の少なくとも1つならびに(i i')少なくとも1つの検出可能な標識を使用し、(i i)試験試料において分析物(またはその断片)の存在、量または濃度の直接的または間接的な指標として検出可能な標識によって発生したシグナルを、対照または較正物質において分析物(またはその断片)の存在、量または濃度の直接的または間接的な指標として発生したシグナルと比較することを含むアッセイによって、分析物(またはその断片)について試験試料をアッセイする工程を含む。較正物質は、場合によって一連の較正物質の一部であり、較正物質の各々は、分析物の濃度によって他の較正物質と異なる。

【0349】

この方法は、(i)第一の特異的結合パートナー/分析物(またはその断片)複合体を形成するように、抗体、分析物に結合することができる抗体の断片、分析物に結合することができる抗体のパリアント、分析物に結合することができる抗体のパリアントの断片または分析物に結合することができるDVD-Ig(またはその断片、パリアントもしくはパリアントの断片)を含む分析物(またはその断片)の少なくとも1つの第一の特異的結合パートナーと試験試料を接触させる工程、(i i)第一の特異的結合パートナー/分析物(またはその断片)/第二の特異的結合パートナー複合体を形成するように、検出可能に標識された抗分析物抗体、分析物に結合することができる抗分析物抗体の検出可能に標識された断片、分析物に結合することができる抗分析物抗体の検出可能に標識されたパリアント、分析物に結合することができる抗分析物抗体のパリアントの検出可能に標識された断片または検出可能に標識されたDVD-Ig(またはその断片、パリアントもしくはパリアントの断片)を含む分析物(またはその断片)の少なくとも1つの第二の特異的結合パートナーと第一の特異的結合パートナー/分析物(またはその断片)複合体を接触させる工程ならびに(i i i)(i i)において形成された第一の特異的結合パートナー/分析物(またはその断片)/第二の特異的結合パートナー複合体において、検出可能な標識によって発生したシグナルを検出または測定することにより、試験試料における分析物の存在、量または濃度を決定する工程を含み得る。分析物(またはその断片)の少なくとも1つの第一の特異的結合パートナーおよび/または分析物(またはその断片)の少なくとも1つの第二の特異的結合パートナーが、本明細書に記載されているDVD-Ig(またはその断片、パリアントもしくはパリアントの断片)である方法が好まれ得る。

【0350】

あるいは、この方法は、抗体、分析物に結合することができる抗体の断片、分析物に結合することができる抗体のパリアント、分析物に結合することができる抗体のパリアントの断片またはDVD-Ig(またはその断片、パリアントもしくはパリアントの断片)を含む分析物(またはその断片)の少なくとも1つの第一の特異的結合パートナーと試験試料を接触させる工程ならびに少なくとも1つの第一の特異的結合パートナーへの結合について分析物(またはその断片)と競合することができ、検出可能に標識された分析物、第一の特異的結合パートナーに結合することができる分析物の検出可能に標識された断片、第一の特異的結合パートナーに結合することができる分析物の検出可能に標識されたパリアントまたは第一の特異的結合パートナーに結合することができる分析物のパリアントの検出可能に標識された断片を含む少なくとも1つの第二の特異的結合パートナーと試験試

10

20

30

40

50

料を同時にまたは順次どちらかの順序で接触させる工程を含み得る。試験試料中に存在するあらゆる分析物（またはその断片）および少なくとも1つの第二の特異的結合パートナーは、第一の特異的結合パートナー/分析物（またはその断片）複合体および第一の特異的結合パートナー/第二の特異的結合パートナー複合体をそれぞれ形成するために互いに競合する。この方法は、(ii)において形成された第一の特異的結合パートナー/第二の特異的結合パートナー複合体において、検出可能な標識によって発生したシグナルを検出または測定することにより、試験試料における分析物の存在、量または濃度を決定する工程をさらに含み、第一の特異的結合パートナー/第二の特異的結合パートナー複合体において、検出可能な標識によって発生したシグナルは、試験試料における分析物の量または濃度に逆比例する。

10

【0351】

上記の方法は、試験試料が得られた患者の治療的/予防的処置の効力を診断、予後診断または評価する工程をさらに含み得る。この方法が、試験試料が得られた患者の治療的/予防的処置の効力を評価する工程をさらに含む場合、この方法は、効力を改善するために必要な、患者の治療的/予防的処置の改変を加える工程を場合によってさらに含む。この方法は、自動化システムまたは半自動化システムにおける使用に適合させることが可能である。

【0352】

アッセイの方法（およびそのためのキット）に関して、市販されている抗分析物抗体または文献に記載されている抗分析物を産生する方法を使用することが可能であり得る。様々な抗体の商業的供給者には、Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA)、GenWay Biotech, Inc. (San Diego, CA) および R&D Systems (RDS; Minneapolis, MN) が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0353】

一般に、例えば、疾患または疾患のリスクを検出するために、分析物またはその断片について試験試料をアッセイした後得られた結果をどちらに評価するかに対するベンチマークとして、所定のレベルが使用され得る。一般に、このような比較を行う際に、分析物の存在、量または濃度が疾患、障害もしくは状態の特定の段階もしくはエンドポイントまたは特定の臨床徴候とつながり得るまたは関連し得るように、適当な条件下で十分な回数特定のアッセイを実行することによって、所定のレベルが得られる。典型的に、所定のレベルは、基準対象（または対象の集団）のアッセイを用いて得られる。測定された分析物は、その断片、その分解産物および/またはその酵素的切断産物を含み得る。

30

【0354】

特に、疾患の進行および/または治療をモニタリングするために使用される所定のレベルに対して、分析物またはその断片の量または濃度は、「変化していない」、「好ましい」（または「好ましいように変化している」）または「好ましくない」（または「好ましくないように変化している」）可能性がある。「上昇している」または「増加している」は、典型的なもしくは正常なレベルもしくは範囲（例えば、所定のレベル）より高いまたは別の基準レベルもしくは範囲（例えば、初期のまたはベースライン試料）より高い、試験試料における量または濃度を表す。「低下している」または「低減している」という用語は、典型的なもしくは正常なレベルもしくは範囲（例えば、所定のレベル）より低いまたは別の基準レベルもしくは範囲（例えば、初期のまたはベースライン試料）より低い、試験試料における量または濃度を表す。「変化している」という用語は、典型的なもしくは正常なレベルもしくは範囲（例えば、所定のレベル）を超えてまたは別の基準レベルもしくは範囲（例えば、初期のまたはベースライン試料）を超えて変化している（増加しているまたは減少している）、試料における量または濃度を表す。

40

【0355】

分析物の典型的なまたは正常なレベルまたは範囲は、標準的な慣習に従って定義される。分析物のレベルはある場合において非常に低いので、いわゆる変化したレベルまたは変

50

化は、典型的なもしくは正常なレベルもしくは範囲または基準レベルもしくは範囲と比較して（実験エラーまたは試料の変動によって説明することが不可能である）任意の正味の変化が存在する場合に起こったと見なされ得る。したがって、特定の試料において測定されるレベルは、いわゆる正常な対象から得られた類似の試料において決定されたレベルまたはレベルの範囲と比較される。この文脈において、「正常な対象」は、例えば検出可能な疾患を有さない個体であり、「正常な」（「対照」と称されることもある）患者または集団は、例えばそれぞれ検出可能な疾患を示さないものである。さらに、分析物がヒト集団の大部分において通常高レベルで見出されない場合を考慮すると、「正常な対象」は、実質的に検出可能な分析物の量または濃度の増加または上昇を有さない個体と見なすことが可能であり、「正常な」（「対照」と称されることもある）患者または集団は、実質的に検出可能な分析物の量または濃度の増加または上昇を示さないものである。「見かけ上正常な対象」は、分析物が未だ評価されておらずまたは現在のところ評価中であるものである。分析物のレベルは、分析物が正常で検出不能である（例えば、正常レベルが0または正常集団の約25から約75パーセントの範囲内である）が、試験試料において検出されるときならびに分析物が試験試料中に正常レベルより高く存在するときに「上昇している」と言われる。したがって、とりわけ、本開示は、特定の疾患、障害または状態を有するまたは有するリスクがある対象をスクリーニングする方法を提供する。アッセイの方法は、他のマーカーのアッセイなどをも含み得る。

10

【0356】

従って、本明細書に記載されている方法は、対象が所与の疾患、障害または状態を有するまたはこれらを発症するリスクがあるか否かを決定するために使用することも可能である。具体的には、このような方法は、

20

（a）対象から得られた試験試料における分析物（またはその断片）の濃度または量を（例えば、本明細書に記載されている方法または本分野において知られている方法を使用して）決定する工程および

（b）工程（a）において決定された分析物（またはその断片）の濃度または量を所定のレベルと比較する工程を含み得、工程（a）において決定された分析物の濃度または量が所定のレベルに対して好ましい場合、対象は、所与の疾患、障害または状態を有さずまたはこれらのリスクがないと決定される。しかし、工程（a）において決定された分析物の濃度または量が所定のレベルに対して好ましくない場合、対象は、所与の疾患、障害または状態を有するまたはこれらのリスクがあると決定される。

30

【0357】

さらに、対象における疾患の進行をモニタリングする方法が本明細書において提供される。最適には、この方法は、

（a）対象から得られた試験試料における分析物の濃度または量を決定する工程、
（b）対象から得られた後の試験試料における分析物の濃度または量を決定する工程および

（c）工程（b）において決定された分析物の濃度または量を工程（a）において決定された分析物の濃度または量と比較する工程を含み、工程（b）において決定された濃度または量が、工程（a）において決定された分析物の濃度または量と比較して変化していないまたは好ましくない場合、対象における疾患は継続、進行または悪化していると決定される。比較すると、工程（b）において決定された分析物の濃度または量が、工程（a）において決定された分析物の濃度または量と比較して好ましい場合、対象における疾患は消失、退行または改善していると決定される。

40

【0358】

場合によって、この方法は、工程（b）において決定された分析物の濃度または量を、例えば、所定のレベルと比較する工程をさらに含む。さらに、場合によって、この方法は、比較が、工程（b）において決定された分析物の濃度または量が、例えば、所定のレベルに対して好ましくないように変化していることを示す場合、1つ以上の医薬組成物で対象をしばらくの間治療する工程を含む。

50

【0359】

またさらに、この方法は、1つ以上の医薬組成物で治療を受けている対象において治療をモニタリングするために使用することが可能である。具体的には、このような方法は、対象が1つ以上の医薬組成物を投与される前に対象から得られた第一の試験試料を提供することを含む。次に、対象から得られた第一の試験試料における分析物の濃度または量が（例えば、本明細書に記載されている方法または本分野において知られている方法を使用して）決定される。分析物の濃度または量が決定された後、場合によって、分析物の濃度または量は、次いで所定のレベルと比較される。第一の試験試料において決定された分析物の濃度または量が所定のレベルより低い場合、対象は1つ以上の医薬組成物で治療されない。しかし、第一の試験試料において決定された分析物の濃度または量が所定のレベルより高い場合、対象は1つ以上の医薬組成物でしばらくの間治療される。対象が1つ以上の医薬組成物で治療される期間は、当業者によって決定され得る（例えば、期間は約7日から約2年、好ましくは約14日から約1年であり得る。）。

10

【0360】

1つ以上の医薬組成物での治療の経過の間、次いで第二およびその後の試験試料が対象から得られる。試験試料の番号および前記試験試料が対象から得られる時期は重要でない。例えば、第二の試験試料は、対象が1つ以上の医薬組成物を最初に投与された7日後に得ることが可能であり、第三の試験試料は、対象が1つ以上の医薬組成物を最初に投与された2週間後に得ることが可能であり、第四の試験試料は、対象が1つ以上の医薬組成物を最初に投与された3週間後に得ることが可能であり、第五の試験試料は、対象が1つ以上の医薬組成物を最初に投与された4週間後に得ることが可能である、などとなる。

20

【0361】

第二またはその後の試験試料の各々が対象から得られた後、第二およびその後の試験試料において決定される分析物の濃度または量が（例えば、本明細書に記載されている方法または本分野において知られている方法を使用して）決定される。第二およびその後の試験試料の各々において決定される分析物の濃度または量は、次いで第一の試験試料（例えば、所定のレベルと元々場合によって比較された試験試料）において決定される分析物の濃度または量と比較される。工程（c）において決定された分析物の濃度または量が、工程（a）において決定された分析物の濃度または量と比較して好ましい場合、対象における疾患は消失、退行または改善していると決定され、対象は工程（b）の1つ以上の医薬組成物を投与され続けるべきである。しかし、工程（c）において決定された濃度または量が、工程（a）において決定された分析物の濃度または量と比較して変化していないまたは好ましくない場合、対象における疾患は継続、進行または悪化していると決定され、対象は工程（b）において対象に投与されたより高い濃度の1つ以上の医薬組成物で治療されるべきでありまたは対象は工程（b）において対象に投与された1つ以上の医薬組成物と異なる1つ以上の医薬組成物で治療されるべきである。具体的には、対象は、対象が前記対象の分析物レベルを減少または低下させるために以前に受けていた1つ以上の医薬組成物と異なる1つ以上の医薬組成物で治療することが可能である。

30

【0362】

一般に、反復試験が行われ得るアッセイ（例えば、疾患進行および/または治療に対する応答のモニタリング）の場合、第二およびその後の試験試料は、第一の試験試料が対象から得られた後のある時期に得られる。具体的には、対象の第二の試験試料は、第一の試験試料が対象から得られた数分、数時間、数日、数週間または数年後に得ることが可能である。例えば、第二の試験試料は、対象から第一の試験試料が得られた約1分、約5分、約10分、約15分、約30分、約45分、約60分、約2時間、約3時間、約4時間、約5時間、約6時間、約7時間、約8時間、約9時間、約10時間、約11時間、約12時間、約13時間、約14時間、約15時間、約16時間、約17時間、約18時間、約19時間、約20時間、約21時間、約22時間、約23時間、約24時間、約2日、約3日、約4日、約5日、約6日、約7日、約2週間、約3週間、約4週間、約5週間、約6週間、約7週間、約8週間、約9週間、約10週間、約11週間、約12週間、約13

40

50

週間、約 1 4 週間、約 1 5 週間、約 1 6 週間、約 1 7 週間、約 1 8 週間、約 1 9 週間、約 2 0 週間、約 2 1 週間、約 2 2 週間、約 2 3 週間、約 2 4 週間、約 2 5 週間、約 2 6 週間、約 2 7 週間、約 2 8 週間、約 2 9 週間、約 3 0 週間、約 3 1 週間、約 3 2 週間、約 3 3 週間、約 3 4 週間、約 3 5 週間、約 3 6 週間、約 3 7 週間、約 3 8 週間、約 3 9 週間、約 4 0 週間、約 4 1 週間、約 4 2 週間、約 4 3 週間、約 4 4 週間、約 4 5 週間、約 4 6 週間、約 4 7 週間、約 4 8 週間、約 4 9 週間、約 5 0 週間、約 5 1 週間、約 5 2 週間、約 1 . 5 年、約 2 年、約 2 . 5 年、約 3 . 0 年、約 3 . 5 年、約 4 . 0 年、約 4 . 5 年、約 5 . 0 年、約 5 . 5 年、約 6 . 0 年、約 6 . 5 年、約 7 . 0 年、約 7 . 5 年、約 8 . 0 年、約 8 . 5 年、約 9 . 0 年、約 9 . 5 年または約 1 0 . 0 年後の時期に対象から得ることが可能である。

10

【 0 3 6 3 】

疾患の進行をモニタリングするために使用するとき、上記のアッセイは、急性状態に罹患している対象における疾患の進行をモニタリングするために使用することが可能である。救急状態としても知られている急性状態は、例えば心血管系または排泄系が関与する、生命を脅かす急性の疾患または他の救急医学状態を表す。典型的に、救急状態は、病院を基礎とする設備（救急処置室、集中治療室、外傷センターまたは他の緊急医療設備が含まれるが、これらに限定されない。）における急性の医学的介入または医療補助者もしくは他の分野を基礎とする医療関係者による管理を必要とする状態を表す。救急状態の場合、反復モニタリングが、短い時間枠内で、すなわち、数分、数時間または数日（例えば、約 1 分、約 5 分、約 1 0 分、約 1 5 分、約 3 0 分、約 4 5 分、約 6 0 分、約 2 時間、約 3 時間、約 4 時間、約 5 時間、約 6 時間、約 7 時間、約 8 時間、約 9 時間、約 1 0 時間、約 1 1 時間、約 1 2 時間、約 1 3 時間、約 1 4 時間、約 1 5 時間、約 1 6 時間、約 1 7 時間、約 1 8 時間、約 1 9 時間、約 2 0 時間、約 2 1 時間、約 2 2 時間、約 2 3 時間、約 2 4 時間、約 2 日、約 3 日、約 4 日、約 5 日、約 6 日または約 7 日）で一般に行われ、同様に最初のアッセイは、短い時間枠内に、例えば、疾患または状態の発症の約数分、数時間または数日以内に一般に行われる。

20

【 0 3 6 4 】

アッセイは、慢性または非急性状態に罹患している対象における疾患の進行をモニタリングするために使用することも可能である。非救急または非急性状態は、例えば心血管系および/または排泄系が関与する、生命を脅かす急性の疾患または他の救急医学状態以外の状態を表す。典型的に、非急性状態は、長期または慢性の持続期間の状態を含む。非救急状態の場合、反復モニタリングが、長い時間枠内で、例えば、数時間、数日、数週間、数カ月または数年（例えば、約 1 時間、約 2 時間、約 3 時間、約 4 時間、約 5 時間、約 6 時間、約 7 時間、約 8 時間、約 9 時間、約 1 0 時間、約 1 1 時間、約 1 2 時間、約 1 3 時間、約 1 4 時間、約 1 5 時間、約 1 6 時間、約 1 7 時間、約 1 8 時間、約 1 9 時間、約 2 0 時間、約 2 1 時間、約 2 2 時間、約 2 3 時間、約 2 4 時間、約 2 日、約 3 日、約 4 日、約 5 日、約 6 日、約 7 日、約 2 週間、約 3 週間、約 4 週間、約 5 週間、約 6 週間、約 7 週間、約 8 週間、約 9 週間、約 1 0 週間、約 1 1 週間、約 1 2 週間、約 1 3 週間、約 1 4 週間、約 1 5 週間、約 1 6 週間、約 1 7 週間、約 1 8 週間、約 1 9 週間、約 2 0 週間、約 2 1 週間、約 2 2 週間、約 2 3 週間、約 2 4 週間、約 2 5 週間、約 2 6 週間、約 2 7 週間、約 2 8 週間、約 2 9 週間、約 3 0 週間、約 3 1 週間、約 3 2 週間、約 3 3 週間、約 3 4 週間、約 3 5 週間、約 3 6 週間、約 3 7 週間、約 3 8 週間、約 3 9 週間、約 4 0 週間、約 4 1 週間、約 4 2 週間、約 4 3 週間、約 4 4 週間、約 4 5 週間、約 4 6 週間、約 4 7 週間、約 4 8 週間、約 4 9 週間、約 5 0 週間、約 5 1 週間、約 5 2 週間、約 1 . 5 年、約 2 年、約 2 . 5 年、約 3 . 0 年、約 3 . 5 年、約 4 . 0 年、約 4 . 5 年、約 5 . 0 年、約 5 . 5 年、約 6 . 0 年、約 6 . 5 年、約 7 . 0 年、約 7 . 5 年、約 8 . 0 年、約 8 . 5 年、約 9 . 0 年、約 9 . 5 年または約 1 0 . 0 年）で一般に行われ、同様に最初のアッセイは、長い時間枠内に、例えば、疾患または状態の発症の約数時間、数日、数週間、数カ月または数年以内に一般に行われる。

30

40

【 0 3 6 5 】

50

さらに、上記のアッセイは、対象から得られた第一の試験試料を使用して行うことが可能であり、第一の試験試料は、尿、血清または血漿などの1つの供給源から得られる。場合によって、上記アッセイは、次いで、対象から得られた第二の試験試料を使用して反復することが可能であり、第二の試験試料は、別の供給源から得られる。例えば、第一の試験試料が尿から得られた場合、第二の試験試料は、血清または血漿から得ることが可能である。第一の試験試料および第二の試験試料を使用してアッセイから得られた結果は、比較することが可能である。この比較は、対象における疾患または状態の状況を評価するために使用することが可能である。

【0366】

さらに、本開示は、所与の疾患、障害または状態に罹患しやすいまたは罹患している対象が治療から利益を得るかどうかを決定する方法にも関する。特に、本開示は、分析物に伴う診断方法および製品に関する。したがって、本明細書に記載されている「対象における疾患の治療のモニタリング」の方法は、さらに最適には治療の候補を選択または同定することも包含し得る。

【0367】

従って、特定の実施形態において、本開示は、所与の疾患、障害または状態を有するまたはこれらのリスクがある対象が治療の候補であるかどうかを決定する方法も提供する。一般に、対象は、所与の疾患、障害もしくは状態のいくつかの症状を経験している者または所与の疾患、障害もしくは状態を有するもしくはこれらのリスクがあると現実に診断されている者および/または本明細書に記載されている分析物もしくはその断片の好ましくない濃度もしくは量を示す者である。

【0368】

この方法は、本明細書に記載されているアッセイを場合によって含み、このアッセイにおいて、分析物は、1つ以上の医薬組成物での（例えば、特に分析物が関与する作用機序に関連する医薬品での）、免疫抑制療法でのもしくは免疫吸収療法による対象の治療の前後で評価され、または分析物はこのような治療後に評価され、分析物の濃度もしくは量が所定のレベルに対して比較される。治療後に観察される分析物の好ましくない濃度または量は、対象が、さらにまたは続けて治療を受けることから利益を得ないことを確認するが、治療後に観察される分析物の好ましい濃度または量は、対象が、さらにまたは続けて治療を受けることから利益を得ることを確認する。この確認は、臨床研究の管理および改善された患者ケアの提供を補助する。

【0369】

本明細書において論じられている所与の疾患、障害または状態を評価するために使用されるときに本明細書における特定の実施形態は有利であるが、このアッセイおよびキットは、他の疾患、障害または状態において分析物を評価するために使用することが可能であることは言うまでもない。アッセイの方法は、他のマーカーのアッセイなどをも含み得る。

【0370】

アッセイの方法は、所与の疾患、障害または状態を軽減する化合物を同定するために使用することも可能である。例えば、分析物を発現する細胞は、候補化合物と接触させることが可能である。化合物と接触した細胞における分析物の発現のレベルは、本明細書に記載されているアッセイの方法を使用して、対照細胞におけるレベルと比較することが可能である。

【0371】

B. キット

試験試料における分析物（またはその断片）の存在、量または濃度について試験試料をアッセイするためのキットも提供される。キットは、分析物（またはその断片）について試験試料をアッセイするための少なくとも1つの成分および分析物（またはその断片）について試験試料をアッセイするための説明書を含む。分析物（またはその断片）について試験試料をアッセイするための少なくとも1つの成分は、場合によって固相に固定化され

10

20

30

40

50

ている抗分析物DVD-Ig（またはその断片、バリエーションもしくはバリエーションの断片）を含む組成物を含み得る。

【0372】

キットは、免疫アッセイ、例えば化学発光微粒子免疫アッセイにより分析物について試験試料をアッセイするための少なくとも1つの成分および免疫アッセイ、例えば化学発光微粒子免疫アッセイにより分析物について試験試料をアッセイするための説明書を含み得る。例えば、キットは、抗分析物モノクローナル/ポリクローナル抗体（または分析物に結合することができるその断片、分析物に結合することができるそのバリエーションもしくは分析物に結合することができるバリエーションの断片）または抗分析物DVD-Ig（またはその断片、バリエーションもしくはバリエーションの断片）（これらのどちらかが検出可能に標識され得る。）など、分析物の少なくとも1つの特異的結合パートナーを含み得る。この代わりにまたはこれに加えて、キットは、抗分析物モノクローナル/ポリクローナル抗体（または分析物に結合することができるその断片、分析物に結合することができるそのバリエーションもしくは分析物に結合することができるバリエーションの断片）または抗分析物DVD-Ig（またはその断片、バリエーションもしくはバリエーションの断片）（これらのどちらかが固体支持体上に固定化され得る。）への結合について試験試料中のあらゆる分析物と競合することができる、検出可能に標識された分析物（または抗分析物モノクローナル/ポリクローナル抗体もしくは抗分析物DVD-Ig（またはその断片、バリエーションもしくはバリエーションの断片）に結合することができるその断片）を含み得る。キットは、較正物質または対照、例えば単離または精製された分析物を含み得る。キットは、アッセイを行うための少なくとも1つの容器（例えば、管、マイクロタイタープレートまたはストリップ（これらは、例えば、第一の特異的結合パートナーですでに被覆され得る。））および/またはアッセイ緩衝液もしくは洗浄緩衝液などの緩衝液（これらのどちらかが1つは濃縮溶液として提供することが可能である。）、検出可能な標識（例えば、酵素標識）用の基質溶液または停止溶液を含み得る。好ましくは、キットは、アッセイを行うために必要なすべての成分、すなわち、試薬、標準物質、緩衝液、希釈液などを含む。説明書は、紙の形態またはディスク、CD、DVDなどのコンピュータ可読形態であり得る。

10

20

【0373】

抗分析物抗体もしくは抗分析物DVD-Igなどのあらゆる抗体またはトレーサーは、蛍光体、放射性部分、酵素、ビオチン/アビジン標識、発色団、化学発光標識など、本明細書に記載されている検出可能な標識を取り込むことができ、またはキットは検出可能な標識化を実施するための試薬を含み得る。抗体、較正物質および/または対照は、別々の容器に入れて提供することまたは適当なアッセイフォーマットに、例えば、マイクロタイタープレートに予め分注することが可能である。

30

【0374】

場合によって、キットは品質管理成分（例えば、感受性パネル、較正物質および陽性対照）を含む。品質管理試薬の調製は本分野において周知であり、様々な免疫診断製品のインサートシートに記載されている。感受性パネルのメンバーは、場合によって、アッセイの性能特性を確立するために使用され、さらに場合によって、免疫アッセイキットの試薬の完全性およびアッセイの標準化の有用な指標となる。

40

【0375】

キットは、緩衝液、塩、酵素、酵素の補因子、酵素の基質、検出試薬など、診断アッセイを行うまたは品質管理の評価を促進するために必要な他の試薬も場合によって含み得る。試験試料の単離および/または処理用の緩衝液および溶液（例えば、前処理試薬）などの他の成分もキットに含まれ得る。キットは1つ以上の他の対照をさらに含み得る。キットの1つ以上の成分は凍結乾燥させることが可能であり、この場合キットは凍結乾燥された成分の再構成に適した試薬をさらに含み得る。

【0376】

場合によって、キットの様々な成分は必要に応じて適切な容器、例えばマイクロタイタープレートに入れて提供される。キットは試料を保持または保存するための容器（例えば

50

、尿試料用の容器またはカートリッジ)をさらに含み得る。適当である場合、キットは、場合によって、反応ベッセル、混合ベッセルおよび試薬または試験試料の調製を促進する他の成分も含有し得る。キットは、シリンジ、ピペット、鉗子、計量スプーンなど、試験試料を得ることを補助するための1つ以上の器具も含み得る。

【0377】

検出可能な標識が少なくとも1つのアクリジニウム化合物である場合、キットは、少なくとも1つのアクリジニウム-9-カルボキサミド、少なくとも1つのアクリジニウム-9-カルボキシレートアリアルエステルまたはこれらのあらゆる組合せを含み得る。検出可能な標識が少なくとも1つのアクリジニウム化合物である場合、キットは、過酸化水素の供給源、例えば緩衝液、溶液および/または少なくとも1つの塩基溶液も含み得る。所望される場合、キットは、磁気粒子、ビーズ、試験管、マイクロタイタープレート、キュベット、膜、足場分子、フィルム、濾紙、ディスクまたはチップなどの固相を含有し得る。

10

【0378】

C. キットおよび方法の適合

本明細書に記載されているイムノアッセイなどのアッセイによって試験試料における分析物の存在、量または濃度を決定するキット(またはその成分)ならびに方法は、例えば、米国特許第5,089,424号および第5,006,309号に記載され、例えば、Abbott Laboratories (Abbott Park, IL)によってARCHITECT(登録商標)として商業的に販売されている(固相が微粒子を含むものを含めて)様々な自動化システムおよび半自動化システムにおける使用に適合させることが可能である。

20

【0379】

非自動化システム(例えば、ELISA)と比較した自動化または半自動化システム間のいくつかの相違には、第一の特異的結合パートナー(例えば、抗分析物モノクローナル/ポリクローナル抗体(またはその断片、そのバリエーションもしくはそのバリエーションの断片)または抗分析物DVD-Ig(またはその断片、そのバリエーションもしくはそのバリエーションの断片))が付着している(どちらにしても、サンドイッチ形成および分析物の反応性が影響され得る)基質ならびに捕捉、検出および/または場合によるあらゆる洗浄工程の長さおよびタイミングが含まれる。ELISAなどの非自動化フォーマットは、試料および捕捉試薬との比較的長いインキュベーション時間(例えば、約2時間)を必要とし得るが、自動化または半自動化フォーマット(例えば、ARCHITECT(登録商標)、Abbott Laboratories)は、比較的短いインキュベーション時間(例えば、ARCHITECT(登録商標)で約18分)を有し得る。同様に、ELISAなどの非自動化フォーマットは、比較的長いインキュベーション時間(例えば、約2時間)、連結試薬などの検出抗体をインキュベートし得るが、自動化または半自動化フォーマット(例えば、ARCHITECT(登録商標))は、比較的短いインキュベーション時間(例えば、ARCHITECT(登録商標)で約4分)を有し得る。

30

【0380】

Abbott Laboratoriesから入手可能な他のプラットフォームには、ASYM(登録商標)、IMx(登録商標)(例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5,294,404号を参照)、PRISM(登録商標)、EIA(ビーズ)およびQuantum(商標)IIならびに他のプラットフォームが含まれるが、これらに限定されない。さらに、アッセイ、キットおよびキットの成分は、他のフォーマットにおいて、例えば、電気化学的または他の携帯もしくはポイントオブケアアッセイシステムで使用することが可能である。本開示は、例えば、サンドイッチイムノアッセイを行う商業的Abbott Point of Care(i-STAT(登録商標)、Abbott Laboratories)電気化学的イムノアッセイシステムに適用可能である。免疫センサーならびに単回使用試験装置におけるこれらの製造および操作方法は、例えば、米国特許第5,063,081号、米国特許出願公開第2003/017

40

50

0881号、米国特許出願公開第2004/0018577号、米国特許出願公開第2005/0054078号および米国特許出願公開第2006/0160164号(これらは、それに関する教示についてその全体が参照により本明細書に組み込まれる。)に記載されている。

【0381】

特に、I - S T A T (登録商標)システムへの分析物アッセイの適合に関して、以下の構成が好ましい。金の電流測定用作用電極の対および銀 - 塩化銀基準電極を有する微細加工シリコンチップが製造される。作用電極の1つで、抗分析物モノクローナル/ポリクローナル抗体(またはその断片、そのバリエーションもしくはそのバリエーションの断片)または抗分析物D V D - I g (またはその断片、そのバリエーションもしくはそのバリエーションの断片)が固定化されたポリスチレンビーズ(直径0.2mm)が、電極上のパターン化されたポリビニルアルコールのポリマーコーティングに付着している。このチップは集まって、イムノアッセイに適した流体力学フォーマットを有するI - S T A T (登録商標)カートリッジになる。カートリッジの試料保持チャンバーの壁の一部に、抗分析物モノクローナル/ポリクローナル抗体(または分析物に結合することができるその断片、そのバリエーションもしくはそのバリエーションの断片)または抗分析物D V D - I g (または分析物に結合することができるその断片、そのバリエーションもしくはそのバリエーションの断片)(これらのどちらかが検出可能に標識され得る。)など、分析物の特異的結合パートナーを含む層が存在する。p - アミノフェノールリン酸を含む水性試薬がカートリッジの流体ポーチ内にある。

10

20

【0382】

操作の際に、分析物を含有することが疑われる試料が試験カートリッジの保持チャンバーに添加され、カートリッジはI - S T A T (登録商標)リーダーに挿入される。分析物の特異的結合パートナーが試料中に溶解した後、カートリッジ内のポンプエレメントが、チップを含有する導管に試料を押し入れる。ここで、これは振動してサンドイッチの形成を促進する。アッセイの最後から2番目の工程において、流体がポーチから押し出され、導管に入ってチップの試料を洗浄し、廃棄チャンバーに入る。アッセイの最後の工程において、アルカリホスファターゼ標識は、p - アミノフェノールリン酸と反応してリン酸基を切断し、遊離したp - アミノフェノールを作用電極において電気化学的に酸化させる。測定された電流を基礎として、リーダーは、埋め込まれたアルゴリズムおよび工場で決定された較正曲線によって、試料における分析物の量を計算することができる。

30

【0383】

本明細書に記載されている方法およびキットは、イムノアッセイを実施するための他の試薬および方法を必然的に包含することはさらに言うまでもない。例えば、本分野において知られているような様々な緩衝液ならびに/または例えば洗浄に、連結体希釈液、微粒子希釈液および/もしくは較正物質希釈液として使用されるように容易に調製されもしくは最適化され得るような様々な緩衝液が包含される。例示的な連結体希釈液は、特定のキット(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)において使用され、2 - (N - モルホリノ)エタンスルホン酸(MES)、塩、タンパク質遮断剤、抗微生物剤および洗浄剤を含有するARCHITECT(登録商標)連結体希釈液である。例示的な較正物質希釈液は、特定のキット(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)において使用され、MES、他の塩、タンパク質遮断剤および抗微生物剤を含有する緩衝液を含むARCHITECT(登録商標)ヒト較正物質希釈液である。さらに、2008年12月31日に出願された米国特許出願第61/142,048号に記載されているように、改善されたシグナルの発生は、例えばI - S t a tカートリッジフォーマットにおいて、シグナル増幅物質としてシグナル抗体に連結された核酸配列を使用して得ることが可能である。

40

【0384】

当業者であれば、本明細書に記載されている方法の他の適切な修正および適合が明らかであり、本発明または本明細書に開示されている実施形態の範囲を逸脱することなく、適

50

切な均等物を用いて行われてよいことを容易に理解できる。本発明のある種の実施形態を詳細に説明しているが、本発明は、以下の実施例を参照することによって、より明解に理解されるが、実施例は、説明目的のためだけに含まれており、本発明を限定することを意図しない。

【実施例】

【0385】

[実施例1]

DVD-Igの設計、構築および分析

実施例1.1: 親抗体およびDVD-Igを特定し、特徴付けるために使用されるアッセイ

別段の記載がない限り、親抗体およびDVD-Igを特定し、特徴付けるために、実施例全体で以下のアッセイを使用した。

【0386】

実施例1.1.1: (複数の) 標的抗原に対する親抗体およびDVD-Igの結合および親和性を決定するために使用されるアッセイ

実施例1.1.1A: 直接結合ELISA

所望の標的抗原に結合する抗体をスクリーニングするための酵素免疫吸着法を以下のように行った。リン酸緩衝生理的食塩水(10xPBS、Abbott Bioresearch Center, Media Prep# MPS-073, Worcester, MA)中の所望の標的抗原(R&D Systems, Minneapolis, MN)または所望の標的抗原細胞外ドメイン/FC融合タンパク質(R&D Systems, Minneapolis, MN)またはモノクローナルマウス抗ポリヒスチジン抗体(R&D Systems # MAB050, Minneapolis, MN)の10μg/mlの100μL/ウェルで、4に於て一晩、High bind ELISAプレート(Corning Costar # 3369, Acton, MA)を被覆した。0.02% Tween 20を含むPBSでプレートを4回洗浄した。室温にて0.5時間、300μL/ウェルのブロッキング溶液(脱脂粉乳粉末、様々な小売業者、PBS中に2%になるように希釈)の添加によってプレートをブロッキングした。ブロッキングの後、0.02% Tween 20を含むPBSでプレートを4回洗浄した。

【0387】

あるいは、上記されたモノクローナルマウス抗ポリヒスチジン抗体で被覆されたELISAプレートに、10μg/mlのヒスチジン(His)タグ化された所望の標的抗原(R&D Systems, Minneapolis, MN)の100μL/ウェルを添加し、室温にて1時間インキュベートした。0.02% Tween 20を含むPBSでウェルを4回洗浄した。

【0388】

上記されたブロッキング溶液に希釈された抗体またはDVD-Ig調製物の100μLを、上述のように調製された所望の標的抗原プレートまたは所望の標的抗原/FC融合プレートまたは抗ポリヒスチジン抗体/Hisタグ化された所望の標的抗原プレートに添加し、室温にて1時間インキュベートした。0.02% Tween 20を含むPBSでウェルを4回洗浄した。

【0389】

所望の標的抗原プレートまたは抗ポリヒスチジン抗体/ヒスチジンタグ化された所望の標的抗原プレートの各ウェルに、10ng/mLのヤギ抗ヒトIgG-FC特異的HRPコンジュゲートされた抗体(Southern Biotech # 2040-05, Birmingham, AL)を100μL添加した。あるいは、所望の標的抗原/FC融合プレートの各ウェルに、10ng/mLのヤギ抗ヒトIgG 軽鎖特異的HRPコンジュゲートされた抗体(Southern Biotech # 2060-05 Birmingham, AL)を100μL添加し、室温にて1時間インキュベートした。0.02% Tween 20を含むPBSでプレートを4回洗浄した。

【0390】

100 μ Lの改良されたTMB溶液 (Neogen Corp. #308177, K Blue, Lexington, KY)を各ウェルに添加し、室温にて10分間インキュベートした。50 μ Lの1N硫酸の添加によって、反応を停止させた。450 nmの波長でプレートを分光学的に読み取った。

【0391】

直接結合ELISAでは、プラスチック表面に被膜されたときにおそらく標的抗原上の抗体結合部位が「マスク」され、または抗原が「崩壊」したために、結合が観察されない場合もあった。DVD-Igがその標的に結合することができないのは、直接結合ELISAフォーマットによるDVD-Igに負わされた立体的制限に起因する場合もある。直接結合ELISAフォーマットにおいて結合しなかった親抗体およびDVD-Igは、FACS、Biacoreまたはバイオアッセイなどの他のELISAフォーマットにおいては標的抗原に結合した。また、DVD-Igの非結合も、前に示されたように、DVD-Igの2つの可変ドメイン間のリンカー長を調整することにより回復された。

10

【0392】

実施例1.1.1.B: 捕捉ELISA

抗ヒトFc抗体 (PBS中5 μ g/ml、Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)とともに、ELISAプレート (Nunc, MaxiSorp, Rochester, NY)を4 にて一晚インキュベートする。洗浄緩衝液 (0.05% Tween 20を含むPBS) 中でプレートを3回洗浄し、ブロッキング緩衝液 (1% BSAを含むPBS) 中において25 にて1時間ブロッキングする。ウェルを3回洗浄し、連続希釈した、0.1% BSAを含むPBS中の各抗体またはDVD-Igをウェルに添加し、25 にて1時間インキュベートする。ウェルを3回洗浄し、ピオチン化抗原 (2 nM) をプレートに添加し、25 にて1時間インキュベートする。ウェルを3回洗浄し、ストレプトアビジン-HRP (KPL #474-3000, GaitHERSBURG, MD)とともに、25 にて1時間インキュベートする。ウェルを3回洗浄し、ウェルあたり100 μ LのULTRA-TMB ELISA (Pierce, Rockford, IL)を添加する。発色後、1NのHClを用いて反応を停止させ、450 nmでの吸光度を測定する。結果を表3に示す。

20

【0393】

実施例1.1.1.C: BIACORE技術を用いた親和性決定

30

【0394】

【表3】

表3: Biacore分析において使用される試薬

アッセイ	抗原	製造元命名	製造元	カタログ#
	NGF	組換えヒト β -NGF	R&D systems	256-GF
	EGFR	組換えヒトEGFR/ErbB1	R&D systems	1095-ER
	VEGF	組換えヒトVEGF 165	R&D systems	293-VE/CF
	DLL4	組換えヒトDLL4	R&D systems	1506-D4/CF
	PIGF	組換えヒトPIGF	R&D systems	264-PG/CF
	RON	組換えヒトMSP R/Ron	R&D systems	1947-MS
	ErbB3	組換えヒトErbB3/HER3 Fc キメラ	R&D systems	348-RB

40

ECD=細胞外ドメイン

/FC=抗原/IgG FCドメイン融合タンパク質

【0395】

BIACORE法

BIACOREアッセイ (Biacore, Inc, Piscataway, NJ)は

50

、結合 (on-rate) 定数および解離 (off-rate) 定数の反応速度測定を用いて抗体またはDVD-Igの親和性を測定する。標的抗原(例えば、精製された組み換え標的抗原)への抗体またはDVD-Igの結合は、Biacore(登録商標)1000または3000装置(Biacore(登録商標)AB, Uppsala, Sweden)により、25℃で稼働しているHBS-EP(10mMのHEPES[pH7.4]、150mMのNaCl、3mMのEDTA、および0.005%サーファクタントP20)を用いて表面プラズモン共鳴に基づく測定によって決定された。すべての化学物質は、Biacore(登録商標)AB(Uppsala, Sweden)から入手し、または他には本明細書に記載される別の供給元から入手した。例えば、10mM酢酸ナトリウム(pH4.5)中に希釈された、約5000RUのヤギ抗マウスIgG、(Fc)、断片特異的なポリクローナル抗体(Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL)は、製造業者の使用説明書に従って標準的なアミンカップリングキットおよび25μg/mlでの操作を用いてCM5研究等級のバイオセンサーチップ全体に直接固定化された。バイオセンサー表面上の未反応部分をエタノールアミンを用いてブロックする。フローセル2および4において修飾されたカルボキシメチルデキストラン表面を反応表面として使用する。フローセル1および3におけるヤギ抗マウスIgGなしの未修飾のカルボキシメチルデキストランを基準表面として使用する。反応速度分析のために、Biaevaluation 4.0.1ソフトウェアを用いて、8個すべての注入物の結合および解離相に対して、1:1ラングミュア(Langmuir)結合モデルから誘導された速度方程式を同時にフィッティングさせた(グローバルフィット分析を使用)。ヤギ抗マウスIgG特異的反応表面の全体で捕捉するために、HEPES緩衝生理食塩水中に、精製された抗体またはDVD-Ig試料を希釈した。リガンドとして捕捉されるべき抗体またはDVD-Ig(25μg/ml)を5μl/分の流速で反応マトリックス全体に注入した。結合速度定数および解離結合定数の k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)および k_{off} (s^{-1})は、25μl/分の連続的流速下で決定された。10-200nMの範囲の異なる抗原濃度にて速度論結合測定を行うことによって速度定数を導いた。次に、以下の式: $K_D = k_{off} / k_{on}$ によって、速度論的速度定数から抗体またはDVD-Igおよび標的抗原間の反応の平衡解離定数(M)を計算した。結合を時間の関数として記録し、速度論的速度定数を計算した。このアッセイでは、 $10^6 M^{-1}s^{-1}$ 程度に速い速度定数、および $10^{-6} s^{-1}$ 程度に遅い解離定数を測定することができる。結果を表4に示す。

【0396】

10

20

30

【表 4】

表 4:親抗体および DVD 構築物の BIACORE 分析

親抗体または DVD-Ig ID	N 末端可変 ドメイン (VD)	C 末端可変ド メイン(VD)	k_{on} (M-1s-1)	k_{off} (s-1)	K_D (M)
AB118	NGF (配列 2)		5.40E+06	5.40E-05	1.00E-11
AB033	EGFR (配列 2)		7.93+04	1.39E-03	1.75E-08
DVD1312	EGFR (配列 2)		1.40E+06	1.60E-03	1.10E-09
DVD1312		NGF (配列 2)	1.50E+05	<1E-06	<6.7E-12
AB118	NGF (配列 2)		5.40E+06	5.40E-05	1.00E-11
AB063	ErbB3 (配列 2)		8.66E+04	1.17E-04	1.36E-09
DVD1320	ErbB3 (配列 2)		2.40E+05	<1E-06	<4.2E-12
DVD1320		NGF (配列 2)	2.00E+05	2.80E-04	1.40E-09
AB118	NGF (配列 2)		5.40E+06	5.40E-05	1.00E-11
DVD1323	NGF (配列 2)	IGF1R	5.00E+06	2.40E-05	4.83E-12
DVD1324	IGF1R	NGF (配列 2)	7.40E+05	4.20E-06	5.60E-12
AB118	NGF (配列 2)		5.40E+06	5.40E-05	1.00E-11
DVD1326	HGF	NGF (配列 2)	5.40E+05	1.00E-06	1.90E-12
AB118	NGF (配列 2)		5.40E+06	5.40E-05	1.00E-11
AB014	VEGF (配列 1)		1.47E+05	3.03E-05	2.07E-10
DVD1327	NGF (配列 2)		6.10E+04	1.10E-04	1.80E-09
DVD1327		VEGF (配列 1)	5.20E+06	1.70E-05	3.20E-12
DVD1328	VEGF (配列 1)		9.60E+05	7.70E-05	8.00E-11
DVD1328		NGF (配列 2)	1.80E+05	<1E-06	<5.4E-12
AB118	NGF (配列 2)		5.40E+06	5.40E-05	1.00E-11
AB015	DLL4		4.00E+05	1.66E-04	4.14E-10
DVD1330	DLL4		5.20E+05	2.00E-04	3.80E-10
DVD1330		NGF (配列 2)	6.60E+05	1.20E-06	1.80E-12
AB118	NGF (配列 2)		5.40E+06	5.40E-05	1.00E-11
AB047	PIGF		3.80E+06	1.08E-04	2.82E-11
DVD1331	NGF (配列 2)		3.80E+05	1.10E-04	3.00E-10
DVD1331		PIGF	2.00E+05	2.80E-04	1.40E-09
DVD1332	PIGF		3.00E+06	1.70E-04	5.50E-11
DVD1332		NGF (配列 2)	1.49E+05	<1E-06	<6.7E-12
AB118	NGF (配列 2)		5.40E+06	5.40E-05	1.00E-11
AB005	RON		3.66E+04	7.39E-04	2.02E-08
DVD1334	RON		1.20E+06	6.70E-03	5.70E-09
DVD1334		NGF (配列 2)	1.90E+05	1.20E-06	6.20E-12
AB118	NGF (配列 2)		5.40E+06	5.40E-05	1.00E-11
DVD1336	CD-20	NGF (配列 2)	6.30E+04	<1E-06	<1.6E-11
AB118	NGF (配列 2)		5.40E+06	5.40E-05	1.00E-11
DVD1349	NGF (配列 2)	C-Met	1.80E+06	<1E-06	<5.3E-13

10

20

30

40

親抗体または DVD-Ig ID	N末端可変 ドメイン (VD)	C末端可変ド メイン(VD)	k_{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_{off} (s ⁻¹)	K_D (M)
AB118	NGF (配列 2)		5.40E+06	5.40E-05	1.00E-11
DVD1369	NGF (配列 2)		-	-	-
DVD1369		EGFR (配列 3)	4.10E+05	<1E-6	<2.4E-12
DVD1370	EGFR (配列 3)		1.10E+05	<1E-6	<9.1E-12
DVD1370		NGF (配列 2)	-	-	-

10

Biacore 技術によって特徴付けられたすべての DVD-Ig 構築物の結合は維持され、親抗体の結合に匹敵していた。

【0397】

実施例 1.1.2: 親抗体および DVD-Ig の機能的活性を決定するために使用されるアッセイ

実施例 1.1.2.A: サイトカインバイオアッセイ

標的サイトカインまたは成長因子生物活性を阻害または中和する抗サイトカインまたは抗成長因子親抗体もしくは抗サイトカインまたは抗成長因子配列を含む DVD-Ig の能力は、抗体または DVD-Ig の阻害可能性を決定することにより分析される。例えば、IL-4 を媒介した IgE 産生を阻害する抗 IL-4 抗体の能力を用いることができる。例えば、ヒト未感作 B 細胞をそれぞれ末梢血から単離し、フィコール-パック密度遠心分離によって軟膜を単離し、その後、ヒト sIgD FITC 標識されたヤギ F(ab)₂ 抗体に特異的な MACS ビーズ (Miltenyi Biotec、Bergisch Gladbach、Germany)、続く抗 FITC MACS ビーズを用いた磁気分離により単離した。磁気的に分類された未感作 B 細胞は、XV15 中に 3×10^5 個の細胞/ml に調整され、プレートの中心に 6×6 アレイの 96 ウェルプレートのウェルあたり $100 \mu\text{l}$ を播種し、 37°C にて 10 日間の培養中、 $5\% \text{CO}_2$ の存在下、ウェルを満たした PBS によって取り囲まれた。試験されるべき抗体ごとに 1 プレートを各々調製し、誘導していない対照および誘導される対照、ならびに $7 \mu\text{g}/\text{ml}$ から開始し、 $50 \mu\text{l}$ の 4 倍濃縮の前希釈に添加された $29 \text{ng}/\text{ml}$ の最終濃度まで 3 倍希釈して行う抗体力価の 5 点測定の繰り返しの各 3 ウェルからなっている。IgE 産生を誘導するために、各 $50 \mu\text{l}$ の $20 \text{ng}/\text{ml}$ の rhIL-4 + 最終濃度 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の抗 CD40 モノクローナル抗体 (Novartis、Basel、Switzerland) を各ウェルに添加し、標準のサンドイッチ ELISA 法によって培養期間の終わりに IgE 濃度を決定した。

20

30

【0398】

実施例 1.1.2.B: サイトカイン放出アッセイ

サイトカイン放出を引き起こす親抗体または DVD-Ig の能力を分析する。3 人の健康ドナーから静脈穿刺によってパキュテナー管に末梢血を採取する。全血を RPMI-1640 培地を用いて 1:5 に希釈し、24 ウェル組織培養プレートに $0.5 \text{mL}/\text{ウェル}$ で播種する。抗サイトカイン抗体 (例えば、抗 IL-4) を RPMI-1640 中に希釈し、 $0.5 \text{mL}/\text{ウェル}$ でプレートに入れ、最終濃度を 200、100、50、10、および $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ にする。培養プレート中の全血の最終希釈は 1:10 である。LPS および PHA を添加し、サイトカイン放出の正の対照として、 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ および $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の最終濃度にてウェルを分ける。ポリクローナルヒト IgG を負の対照抗体として用いる。実験は 2 点測定で行う。 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ にてプレートをインキュベートする。24 時間後、ウェルの内容物を試験管に移し、5 分間、 1200rpm にて遠心する。細胞不含の上清を回収し、サイトカインアッセイ用に凍結する。プレートおよびこれらの管に残った細胞を 0.5mL の溶解液で溶解し、 -20°C に置き、融解する。 0.5mL の培地を加え (体積を細胞不含の上清試料と同じレベルにするため)、細胞調製物を回収し

40

50

、サイトカインアッセイ用に凍結する。細胞不含の上清および細胞溶解物は、ELISAによって、サイトカインレベルについて、例えば、IL-8、IL-6、IL-1、IL-1RA、またはTNF- α のレベルについてアッセイされる。

【0399】

実施例1.1.2.C: サイトカイン交差反応性研究

他のサイトカインと交差反応する、目的(複数の)サイトカインに対する抗サイトカイン親抗体またはDVD-Igの能力を分析する。親抗体またはDVD-IgをBIAcoreバイオセンサーマトリックスに固定化する。抗ヒトFc mAbは、最初に、デキストランマトリックス上のカルボキシル基を100mMのN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)および400mMのN-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(EDC)を用いて活性化することによって、デキストランマトリックスに遊離アミン基を介して共有結合される。酢酸ナトリウム(pH4.5)に希釈された、25 μ g/mLの濃度の各抗体またはDVD-Ig調製物の約50 μ Lを、活性化されたバイオセンサーの全体に注入し、タンパク質の遊離アミンを、活性化されたカルボキシル基に直接結合させる。典型的には、5000共鳴単位(RU)を固定化する。未反応のマトリックスEDC-エステルは、1Mエタノールアミンの注入により不活性化される。第二のフローセルは、標準のアミンカップリングキットを用いて、ヒトIgG1/Kを固定化することによって、基準標準物質として調製される。SPR測定はCMバイオセンサーチップを用いて行われる。バイオセンサー表面上で分析されるべきすべての抗原は、0.01%のP20を含むHBS-EP泳動緩衝液中に希釈される。

10

20

【0400】

サイトカイン結合特異性を調べるために、目的の過剰のサイトカイン(100nM、例えば、可溶性組み換えヒト)は、抗サイトカイン親抗体またはDVD-Igを固定化したバイオセンサー表面の全体に注入される(5分の接触時間)。目的のサイトカインの注入前および直後に、HBS-EP緩衝液を単独で各フローセルに流す。基準と、サイトカイン注入の完了後の約30秒に対応する時点との間のシグナルの正味の差異は、最終の結合値を表すために採用される。再度、共鳴を共鳴単位で測定する。結合事象が観察される場合には、次の試料の注入前に10mMのHClを用いてバイオセンサーマトリックスを再生し、それ以外は、泳動緩衝液をマトリックスの全体に注入した。また、ヒトサイトカイン(例えば、IL-1、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20、IL-22、IL-23、IL-27、TNF- α 、TNF- β およびIFN- γ)は、任意の非特異的な結合バックグラウンドを記録するために、固定化されたマウスIgG1/K基準表面の全体に同時に注入される。基準および反応表面を調製することによって、BIAcoreは、屈折率変化および注入ノイズの大部分を取り除くために、反応表面データから基準表面データを自動的に差し引くことができる。このようにして、抗サイトカイン抗体またはDVD-Igの結合反応に起因する真の結合応答を解明することができる。

30

【0401】

固定化された抗サイトカイン抗体の全体に目的のサイトカインを注入した場合、有意な結合が観察される。10mMのHClによる再生は、すべての非共有的に結合したタンパク質を完全に除去する。センサーグラムの試験は、可溶性サイトカインに結合する、固定化された抗サイトカイン抗体またはDVD-Igが強力であり、強固であることを示す。目的のサイトカインを用いた場合に予想される結果を確認した後、残りの組み換えヒトサイトカイン集団は、各抗体またはDVD-Igについて別々に試験される。各注入サイクルについてサイトカインに結合または未結合の抗サイトカイン抗体またはDVD-Igの量を記録する。3つの独立した実験からの結果を用いて、各抗体またはDVD-Igの特異性プロファイルを決定する。目的のサイトカインに結合することが予想される抗体またはDVD-Ig、および任意の他のサイトカインに結合しない抗体またはDVD-Igを選択する。

40

50

【0402】

実施例 1 . 1 . 2 . D : 組織交差反応性

組織交差反応性研究は3段階で行い、第一段階においては32組織の連結切片が含まれ、第二段階においては最大38組織が含まれ、第三段階においては以下に記載される3名の無関係な成人由来の追加組織が含まれる。研究は、典型的には、2つの投薬レベルにて行われる。

【0403】

段階1: ヒト組織(剖検または生検で得られた1名のヒトドナー由来の32組織(典型的には: 副腎、消化管、前立腺、膀胱、心臓、骨格筋、血球、腎臓、皮膚、骨髄、肝臓、脊髄、乳房、肺、脾臓、小脳、リンパ節、睾丸、大脳皮質、卵巣、胸腺、結腸、膵臓、甲状腺、内皮、副甲状腺、尿管、眼、下垂体、子宮、卵管および胎盤))の連結切片(約5 μm)を固定し、オブジェクトグラス上で乾燥させる。組織切片のペルオキシダーゼ染色は、アビジンビオチン系を用いて行われる。

10

【0404】

段階2: ヒト組織(剖検または生検で得られた3名の無関係な成人由来38組織(副腎、血液、血管、骨髄、小脳、大脳、頸部、食道、眼、心臓、腎臓、大腸、肝臓、肺、リンパ節、乳房乳腺、卵巣、卵管、膵臓、副甲状腺、末梢神経、下垂体、胎盤、前立腺、唾液腺、皮膚、小腸、脊髄、脾臓、胃、横紋筋、睾丸、胸腺、甲状腺、扁桃腺、尿管、膀胱、および子宮を含む))の連結切片(約5 μm)を固定し、オブジェクトグラス上で乾燥させる。組織切片のペルオキシダーゼ染色は、アビジン - ビオチン系を用いて行われる。

20

【0405】

段階3: カニクイザル組織(剖検または生検で得られた3匹の無関係な成熟サル由来の38組織(副腎、血液、血管、骨髄、小脳、大脳、頸部、食道、眼、心臓、腎臓、大腸、肝臓、肺、リンパ節、乳房乳腺、卵巣、卵管、膵臓、副甲状腺、末梢神経、下垂体、胎盤、前立腺、唾液腺、皮膚、小腸、脊髄、脾臓、胃、横紋筋、睾丸、胸腺、甲状腺、扁桃腺、尿管、膀胱、および子宮を含む))の連結切片(約5 μm)を固定し、オブジェクトグラス上で乾燥させる。組織切片のペルオキシダーゼ染色は、アビジン - ビオチン系を用いて行われる。

【0406】

抗体またはDVD-Igを二次ビオチン化抗ヒトIgGとともにインキュベートし、免疫複合体となる。最終濃度が2および10 μg/mLの抗体またはDVD-Igである免疫複合体は、オブジェクトグラス上の組織切片に添加され、次に、組織切片を30分間、アビジン - ビオチンペルオキシダーゼキットを用いて反応させる。その後、ペルオキシダーゼ反応の基質であるDAB(3,3'-ジアミノベンジジン)を4分間、組織染色に適用する。抗原 - セファロースビーズを正の対照組織切片として使用する。標的抗原およびヒト血清ブロッキング研究は追加対照としての役割を果たす。最終濃度が2および10 μg/mLの抗体またはDVD-Igである免疫複合体は、標的抗原(最終濃度100 μg/mL)またはヒト血清(最終濃度10%)とともに30分間プレインキュベートされ、次に、オブジェクトグラス上の組織切片に添加され、その後、組織切片は、30分間、アビジン - ビオチン - ペルオキシダーゼキットを用いて反応させる。その後、ペルオキシダーゼ反応の基質であるDAB(3,3'-ジアミノベンジジン)を4分間、組織染色に適用する。

30

40

【0407】

任意の特異的染色は、問題となっている標的抗原の既知の発現に基づいて、予想される反応性(例えば、抗原発現と一致する)または予想されない反応性のいずれかであると判断される。特異的であると判断された任意の染色は、強度および頻度について記録される。段階2(ヒト組織)と段階3(カニクイザル組織)との間の組織染色は、類似であるまたは異なっていると判断される。

【0408】

実施例 1 . 1 . 2 . E : IL - 1 / バイオアッセイおよび中和アッセイ

50

100 μ L 体積において、1.5 から 2×10^4 細胞/ウェルで MRC5 細胞を播種し、37 $^{\circ}$ C にて 5% CO₂ で一晩インキュベートした。完全な MEM 培地中に抗体の 20 μ g/mL 作業原液 (4 倍濃縮) を調製した。Marsh 希釈プレート中の完全な MEM 中で、8 点の連続希釈を行った (5 μ g/mL から 0.0003 μ g/mL)。96 ウェルの v 底 (Costar # 3894) プレートに、各抗体希釈の 65 μ L/ウェルを 4 点測定で添加し、IL-1 もしくは IL-1 の 200 pg/mL 溶液の 65 μ L または IL-1 および IL-1 の両方の 50 pg/mL 溶液を含む混合溶液の 65 μ L も添加した。対照ウェルには、65 μ L の 200 pg/mL の IL-1 もしくは IL-1 または混合された 50 pg/mL IL-1 / (4 倍濃縮) + 65 μ L の MEM 培地を与え、培地対照ウェルには、130 μ L の培地を与えた。1 時間のインキュベーション後、MRC5 細胞に Ab/Ag 混合物を 100 μ L 添加した。すべてのウェル体積は、200 μ L に等しかった。次いで、すべてのプレート試薬は 1 倍濃縮した。16 から 20 時間のインキュベーション後、96 ウェルの丸底プレート (Costar # 3799) にウェル内容物 (150 μ L) を移し、-20 $^{\circ}$ C のフリーザー中に配置した。ヒト IL-8 の ELISA キット (R&D Systems, Minneapolis, MN) または hIL-8 ケミルミネッセンスキット (MDS) を使用することによって、hIL-8 レベルに関して上清を試験した。IL-1、IL-1 または IL-1 / 単独の対照値に対する % 阻害を計算することによって、中和能力を測定した。

10

【0409】

実施例 1.1.2.F: huTNF の中和

20

半コンフルエントな密度になるまで L929 細胞を増殖させ、0.05% トリプシン (trypsin) (Gibco # 25300) を用いて回収した。PBS で細胞を洗浄し、計数し、4 μ g/mL のアクチノマイシン D を含むアッセイ培地中に 1E6 細胞/mL で再懸濁した。50 μ L の体積および 5E4 細胞/ウェルで 96 ウェルプレート (Costar # 3599) に細胞を播種した。アッセイ培地中に 4 倍濃度になるように DVD-Ig (商標) および対照 IgG を希釈し、1:3 連続希釈を行った。アッセイ培地中に 400 pg/mL になるように huTNF を希釈した。1:2 の希釈スキームで、抗体試料 (200 μ L) を huTNF (200 μ L) に添加し、室温で 0.5 時間インキュベートした。

【0410】

30

100 pg/mL の huTNF および 25 nM から 0.00014 nM の DVD-Ig (商標) の最終濃度に対して、DVD-Ig (商標) / huTNF 溶液を 100 μ L で播種された細胞に添加した。37 $^{\circ}$ C にて 5% CO₂ で 20 時間、プレートをインキュベートした。生存率を定量するために、ウェルから 100 μ L を取り除き、10 μ L の WST-1 試薬 (Roche カタログ # 11644807001) を添加した。プレートをアッセイ条件下で 3.5 時間インキュベートし、500 \times g で遠心し、ELISA プレート (Costar カタログ # 3369) に 75 μ L の上清を移した。Spectromax 190 ELISA プレートリーダー上で OD 420 から 600 nm でプレートを読み取った。

【0411】

40

実施例 1.1.2.G: IL-6 によって誘導される pSTAT3 アッセイ

2 mM の 1-グルタミン、10 mM の HEPES、100 U/mL ペニシリン/ストレプトマイシン、1.5 g/L 炭酸水素ナトリウム、4.5 g/L グルコース、1 mM ビルビン酸ナトリウム、10% FBS および 2 ng/mL の GM-CSF を含む DMEM 中で TF-1 細胞を培養する。10 μ L 体積で、1.5 から 2×10^5 細胞/ウェルにて TF-1 細胞を播種し、アッセイ培地 (GM-CSF を除いた完全な DMEM) 中で 37 $^{\circ}$ C にて 5% CO₂ で一晩インキュベートする。96 1/2 ウェル白色アッセイプレート中に細胞を播種する。PBS 中に 500 μ g/mL の抗体の作業原液 (4 倍濃縮) を調製する。Marsh 希釈プレートのアッセイ培地中に抗体および DVD-Ig を 1:5 連続希釈する。細胞を含む 96 1/2 ウェル白色アッセイプレートに各抗体希釈の 5 μ L/ウェ

50

ルを3点測定で添加する。氷上で、30分間、細胞および抗体またはDVD-Igをプレインキュベートする。内毒素を含まないD-PBS(0.1%BSA)中に10μg/mL原液でIL-6を調製し、アッセイ培地を用いて100ng/mL(4倍濃縮)の作業原液を調製する。100ng/mLのIL-6の5μL/ウェルを各ウェルに添加する。プレートを37で30分間にてインキュベートする。5倍の細胞溶解緩衝液5μLをすべてのウェルに添加することによって、細胞を溶解し、室温にて10分間プレートを振とうする。-20にてプレートを凍結し、pSTAT3 SureFire Assayを実施した(PerkinElmer)。

【0412】

室温にてプレートを融解し、Alpha Screen Acceptor Beadsを含む反応緩衝液+活性化緩衝液ミックス(反応緩衝液40部、活性化緩衝液10部およびアクセプタービーズ1部)の30μL/ウェルを各ウェルに添加する。光から保護するためにプレートをホイルで密封し、37にて2時間穏やかに攪拌する。Alpha Screen Donorビーズを含む希釈緩衝液(12.5μL/ウェル)(ドナービーズ1部に対して希釈緩衝液20部)を各ウェルに添加する。プレートをホイルで密封し、37にて2時間穏やかに攪拌する。プレートを室温にし、Alpha Screenプレートリーダーで読み取る。

10

【0413】

実施例1.1.2.H:インビトロでの腫瘍受容体モノクローナル抗体またはDVD-Igの増殖阻害効果

20

D-PBS-BSA(0.1%BSAを含むダルベッコのリン酸緩衝生理的食塩水)の20μL中に希釈された腫瘍受容体モノクローナル抗体またはDVD-Igを180μL中の0.01μg/mLから100μg/mLの最終濃度のヒト腫瘍細胞に添加する。37にて、加湿された5%CO₂雰囲気中において、3日間、プレートをインキュベートする。腫瘍増殖阻害の割合を決定するために、製造業者の使用説明書(Promega, Madison, WI)に従って、MTS試薬を用いて各ウェル中の生細胞数を定量する。抗体処理なしのウェルは0%阻害の対照として使用されるのに対して、細胞なしのウェルは100%阻害を示すと考えられる。

【0414】

実施例1.1.2.I:TF-1細胞増殖バイオアッセイにおけるNGFの阻害

30

RPMI 1640(Invitrogen)+10%ウシ胎仔血清(Hyclone)+L-グルタミン(Invitrogen)+rhGM-CSF(R&D Systems)中でTF-1細胞を培養した。TF-1細胞を1×10⁵細胞/mLでRPMI 1640+L-グルタミン中で血清を24時間枯渇させ、一晚37にて5%CO₂でインキュベートした。実験の当日、100μL体積+アッセイ培地(RPMI-1640+L-グルタミン+4%FBS)中の2.5×10⁴細胞/ウェルにて、不透明な壁の96ウェルプレートにTF-1細胞を播種した。DVD-Igまたは抗体を細胞に添加することによって細胞を刺激した。DVD-Ig(商標)および対照IgGをアッセイ培地に4倍濃度に希釈し、連続した1:5希釈を行った。huNGFをアッセイ培地において8ng/mLに希釈した。DVD-Ig(商標)(50μl)およびhuNGF(50μL)溶液をプレートに添加して、2ng/mL huNGFおよび25nM-0.000003nM、DVD-Ig(商標)の最終濃度にした。72時間、37にて5%CO₂でプレートをインキュベートした。生存率を定量するために、Cell Titer Gloキット(Promegaカタログ#TB288)を用いた(製造業者の使用説明書に従って100μlの溶液を各ウェルに添加した)。Spectromax 190 ELISAプレートリーダー上で発光を用いてプレートを読み込んだ。

40

【0415】

【表 5】

表 5: NGF 親抗体および DVD-Ig 構築物を用いた NGF 阻害アッセイ

親抗体または DVD-Ig ID	N 末端可変 ドメイン (VD)	C 末端可変ド メイン(VD)	N 末端 VD NGF 阻害アッセイ EC50nM	C 末端 VD NGF 阻害アッセイ EC50nM
AB118	NGF(配列 2)		0.0060	
DVD1311	NGF (配列 2)	EGFR (配列 2)	0.0009	---
DVD1312	EGFR (配列 2)	NGF (配列 2)	---	0.0060
DVD1313	NGF (配列 2)	IGF1,2	0.0009	---
DVD1314	IGF1,2	NGF (配列 2)	---	0.0003
DVD1315	NGF (配列 2)	RON (配列 1)	0.0022	---
DVD1316	RON (配列 1)	NGF (配列 2)	--	0.8735
DVD1317	NGF (配列 2)	ErbB3 (配列 1)	0.0011	---
DVD1318	ErbB3 (配列 1)	NGF (配列 2)	---	0.0534
DVD1319	NGF (配列 2)	ErbB3 (配列 2)	0.0141	---
DVD1320	ErbB3 (配列 2)	NGF (配列 2)	---	0.0294
DVD1324	IGF1R	NGF (配列 2)	---	0.0019
DVD1326	HGF	NGF (配列 2)	---	1.3610
DVD1327	NGF (配列 2)	VEGF (配列 1)	0.0191	---
DVD1328	VEGF (配列 1)	NGF (配列 2)	---	0.4311
DVD1330	DLL4	NGF (配列 2)	---	0.1362
DVD1331	NGF (配列 2)	PIGF	0.0065	---
DVD1332	PIGF	NGF (配列 2)	---	1.3530
DVD1333	NGF (配列 2)	RON (配列 2)	0.0006	---
DVD1334	RON (配列 2)	NGF (配列 2)	---	0.1746
DVD1335	NGF (配列 2)	CD-20	0.0003	---
DVD1336	CD-20	NGF (配列 2)	---	0.1475
DVD1337	NGF (配列 2)	EGFR (配列 1)	0.0170	---
DVD1338	EGFR (配列 1)	NGF (配列 2)	---	1.2730
DVD1339	NGF (配列 2)	HER2	0.0006	---
DVD1340	HER2	NGF (配列 2)	---	0.0103
DVD1351	NGF (配列 2)	NRP1 (配列 1)	0.0051	---
DVD1352	NRP1 (配列 1)	NGF (配列 2)	---	0.2259
DVD1362	ErbB3 (配列 1)	NGF (配列 2)	---	0.0025

10

20

30

40

親抗体または DVD-Ig ID	N末端可変 ドメイン (VD)	C末端可変ド メイン(VD)	N末端VD NGF 阻害アッセイ EC50nM	C末端VD NGF 阻害アッセイ EC50nM
	3)			
DVD1369	NGF (配列 2)	EGFR (配列 3)	0.0056	---
DVD1370	EGFR (配列 3)	NGF (配列 2)	---	5.9570

10

N末端またはC末端位置のいずれかにおけるA B 1 1 8からのVDを含むすべてのDVD-IgはNGF阻害アッセイにおいて中和を示した。

【0416】

実施例1.1.2.J:インビトロにおける親またはDVD-Ig抗体の殺腫瘍効果
殺腫瘍活性について、腫瘍細胞上の標的抗原に結合する親抗体またはDVD-Igを分析することができる。要約すると、親抗体またはDVD-IgをD-PBS-BSA(0.1%BSAを含むダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水)に希釈し、最終濃度を0.01μg/mL-100μg/mLの200μLにしてヒト腫瘍細胞に添加する。37にて、加湿された5%CO₂雰囲気において3日間、プレートをインキュベートする。各ウェル中の生細胞数は、製造業者の使用説明書(Promega, Madison, WI)に従って、MTS試薬を用いて定量され、腫瘍増殖阻害の割合を決定する。抗体処理していないウェルは0%阻害の対照として用いられ、細胞を含まないウェルは100%阻害を示すものと考えられた。

20

【0417】

アポトーシスの評価について、カスパーゼ-3の活性化が以下のプロトコールによって決定される:96ウェルプレート中の抗体処理された細胞を20分間攪拌しながら室温にて、120μlの1×溶解緩衝液(1.67mMのHepes、pH7.4、7mMのKCl、0.83mMのMgCl₂、0.11mMのEDTA、0.11mMのEGTA、0.57%のCHAPS、1mMのDTT、1×プロテアーゼインヒビターカクテルタブレット;EDTA不含;Roche Pharmaceuticals, Nutley, NJ)に溶解させる。細胞溶解後、80μlのカスパーゼ-3の反応緩衝液(48mMのHepes、pH7.5、252mMスクロース、0.1%CHAPS、4mMのDTT、および20μMのAc-DEVD-AMC基質;Biomol Research Labs, Inc., Plymouth Meeting, PA)を添加し、プレートを2時間37でインキュベートする。以下の設定:励起=360/40、発光=460/40を用いて、1420VICTOR Multilabel Counter(Perkin Elmer Life Sciences, Downers Grove, IL)上でプレートを読む。アイソタイプ抗体の対照を用いて処理された細胞と比較した、抗体を用いて処理された細胞の蛍光ユニットの増加はアポトーシスを示す。

30

40

【0418】

実施例1.1.2.K:親抗体およびDVD-Ig構築物による細胞増殖の阻害
5%ウシ胎仔血清が補足されたRPMI培地中、96ウェルディッシュに100μl中の2,000細胞/ウェルでU87-MGヒト神経膠腫瘍細胞を播種し、37にて5%CO₂で一晩インキュベートする。翌日、抗体またはDVD-Ig(0.013nMから133nMの投薬量範囲)の連続希釈で細胞を処理し、37にて加湿された5%CO₂雰囲気中で5日間インキュベートする。製造業者の使用説明書に従って、ATP Lite キット(Perkin Elmer, Waltham, MA)を用いてATPレベルを評価することによって、細胞の生存/増殖を間接的に測定する。

【0419】

50

実施例 1.1.2.L: インビトロでの親抗体またはDVD-Ig構築物による受容体リン酸化の阻害

180 μ lの無血清培地(DMEM+0.1%BSA)中に40,000細胞/ウェルで96ウェルプレートにヒト腫瘍細胞を播種し、37 $^{\circ}$ Cにて5%CO₂で一晩インキュベートする。100 μ l/ウェルの受容体捕捉Ab(4 μ g/mlの最終濃度)でCostar EIAプレート(Lowell, MA)を被覆し、振とうしながら室温にて一晩インキュベートする。翌日、受容体抗体で被覆されたELISAプレートを洗浄し(PBST=PBS、pH7.2から7.4中の0.05%Tween20で3回)、振とう装置上で室温にて2時間ブロッキングするために、200 μ lのブロッキング溶液(PBS、pH7.2から7.4中の1%BSA、0.05%NaN₃)を添加する。ヒト腫瘍細胞を抗体またはDVD-Igおよびリガンドと同時にインキュベートした。D-PBS-BSA(0.1%BSAを含むダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水)中に希釈されたモノクローナル抗体またはDVD-Igを0.01 μ g/mlから100 μ g/mlの最終濃度のヒト腫瘍細胞に添加する。1から100 ng/mlの濃度で(200 μ l)、増殖因子を細胞に同時に添加し、37 $^{\circ}$ Cにて加湿された5%CO₂雰囲気において細胞を1時間インキュベートする。120 μ l/ウェルの冷細胞抽出緩衝液(10 mMのTris、pH7.4、100 mMのNaCl、1 mMのEDTA、1 mMのEGTA、1 mMのNaF、1 mMオルトパナジン酸ナトリウム、1%Triton X-100、10%グリセロール、0.1%SDSおよびプロテアーゼ阻害剤カクテル)に細胞を溶解し、振とうしながら4 $^{\circ}$ Cにて20分間インキュベートする。ELISAプレートに細胞可溶化液(100 μ l)を添加し、穏やかに振盪しながら4 $^{\circ}$ Cにて一晩インキュベートする。翌日、ELISAプレートを洗浄し、100 μ l/ウェルのpTyr-HRP検出Abを添加し(p-IGF1R ELISAキット、R&D System # DYC1770, Minneapolis, MN)、暗所において25 $^{\circ}$ Cにて2時間、プレートをインキュベートする。製造業者の使用説明書に従って、リン酸化を決定するためにプレートを発色させる。

10

20

【0420】

実施例 1.1.2.M: ヒト腫瘍皮下脇腹異種移植片の増殖におけるDVD-Igの有効性

A-431ヒト類表皮癌細胞は、インビトロにおいて、組織培養フラスコ中で99%の生存性であって、85%コンフルエントになるまで増殖させる。研究0日に、19-25グラムのSCID雌性マウス(Charles Rivers Labs, Wilmington, MA)は、 1×10^6 個のヒト腫瘍細胞(1:1マトリゲル)を右脇腹に皮下注射される。マウスが約200-320 mm³の平均腫瘍体積を有するマウス群にサイズ適合された後、ヒトIgG対照またはDVD-Igの投与(IP、QD、3x/週)が開始された。腫瘍細胞の注射の約10日後から、週に2回、腫瘍を測定する。

30

【0421】

実施例 1.1.2.N: フローサイトメトリーによって評価されるヒト腫瘍細胞株の表面へのモノクローナル抗体の結合

目的の細胞表面抗原を過剰発現している安定な細胞株またはヒト腫瘍細胞株を組織培養フラスコから回収し、5%ウシ胎児血清を含むリン酸緩衝生理食塩水CPBS(PBS/FBS)に再懸濁させた。染色前に、ヒト腫瘍細胞は、PBS/FCS中の5 μ g/mlの(100 μ l)ヒトIgGとともに氷上でインキュベートされた。1-5 $\times 10^5$ 個の細胞は、PBS/FBS中の抗体またはDVD-Ig(2 μ g/ml)とともに30-60分間、氷上でインキュベートされた。細胞を2回洗浄し、100 μ lのF(ab')₂ヤギ抗ヒトIgG-Fc-フィコエリトリン(PBS中に1:200に希釈)(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, Cat.# 109-116-170)を添加した。氷上で30分のインキュベーション後、細胞を2回洗浄し、PBS/FBSに再懸濁した。Becton Dickinson FACSCalibur(Becton Dickinson, San Jose, CA)を用いて

40

50

蛍光を測定した。

【0422】

表6は、DVD-Ig構築物に対するFACSデータを示す。幾何平均は、 n 個の蛍光シグナルの積($a_1 \times a_2 \times a_3 \dots a_n$)の n 乗根である。対数変換されたデータとともに、幾何平均は、データ分布の重み付けを標準化するために使用される。以下の表は、親抗体およびDVD-Ig構築物のFACS幾何平均を含む。

【0423】

【表6】

表6: DVD-Ig構築物の蛍光活性化細胞分別

親抗体または DVD-Ig ID	N末端可変ドメイン(VD)	C末端可変ドメイン(VD)	FACS 幾何平均 N末端	FACS 幾何平均 C末端
AB011	IGFR		535	
DVD1323	NGF (配列 2)	IGFR		244
DVD1324	IGFR	NGF (配列 2)	825	
AB015	DLL4		308	
DVD1330	DLL4	NGF (配列 2)		
AB001	CD-20		1405	
DVD1336	CD-20	NGF (配列 2)	754	
AB016	NRP1		338	
DVD1351	NGF (配列 2)	NRP1		26
DVD1352	NRP1	NGF (配列 2)	42	

すべてのDVD-Igが、それらの細胞表面標的への結合を示した。DVD-IgのN末端ドメインは、細胞表面上のそれらの標的を親抗体と同様にまたはより良好に結合した。結合は、リンカーの長さを調整することによって回復または改善させ得る。

【0424】

実施例1.1.2.0: フローサイトメトリーによって評価されるヒト腫瘍細胞株の表面への親受容体抗体およびDVD-Ig構築物の結合

細胞表面受容体を過剰発現する安定な細胞株またはヒト腫瘍細胞株を組織培養フラスコから回収し、1%ウシ胎仔血清を含むダルベッコのリン酸緩衝生理的食塩水(DPBS)(DPBS/FCS)中に再懸濁する。氷上で30から60分間、DPBS/FCSにおいて、抗体またはDVD-Ig(10 μ g/mL)の100 μ Lとともに、1から5 \times 10⁵細胞をインキュベートする。細胞を2回洗浄し、50 μ Lのヤギ抗ヒトIgG-フィコエリトリン(DPBS/BSA中で1:50希釈)(Southern Biotech Associates, Birmingham, ALカタログ#2040-09)を添加する。氷上での30から45分のインキュベート後、細胞を2回洗浄し、DPBS/FCS中の125 μ L/ウェルの1%ホルムアルデヒド中に再懸濁する。Becton Dickinson LSRII(Becton Dickinson, San Jose, CA)を用いて、蛍光を測定した。

【0425】

実施例1.2: 目的のヒト抗原に対する親モノクローナル抗体の生成

目的のヒト抗原およびそのパリアントに結合し、中和することができる親マウスmAbを次のように得る。

【0426】

実施例1.2.A: 目的のヒト抗原を用いたマウスの免疫化

完全フロイントアジュバントまたはImmuno easyアジュバント(Qiagen, Valencia, CA)と混合された組み換え精製ヒト抗原(例えば、IGF1、2)の20 μ gを5匹の6-8週齢のBalb/C、5匹のC57B/6マウス、および5匹のAJマウスに1日目に皮下注射する。24日目、38日目、および49日目に、不完全フロイントアジュバントまたはImmuno easyアジュバントと混合された組み換え精製ヒト抗原バリエーションの20 μ gを同じマウスに皮下注射する。84日目または112日目または144日目に、目的の組み換え精製ヒト抗原の1 μ gをマウスに静脈内注射する。

【0427】

実施例1.2.B:ハイブリドーマの生成

実施例1.2.Aに記載された免疫されたマウスから得た脾細胞は、ハイブリドーマを生成するために、Kohler, G. and Milstein (1975) Nature, 256:495に記載の確立された方法に従って、SP2/O-Ag-14細胞と5:1の比で融合される。融合生成物は、ウェルあたり2.5 \times 10⁶個の脾細胞の密度で96ウェルプレート内のアザセリンおよびヒポキサンチンを含む選択培地に置かれる。融合の7-10日後、肉眼で見られるハイブリドーマのコロニーを観察する。ハイブリドーマのコロニーを含む各ウェルからの上清は、目的の抗原に対する抗体(実施例1.1.1.Aに記載される)の存在について、ELISAによって試験される。次に、抗原特異的活性を示す上清は、活性(実施例1.1.2のアッセイに記載される)、例えば、実施例1.1.2.Iに記載されるバイオアッセイなどのバイオアッセイにおいて目的の抗原を中和する能力について試験される。

10

20

【0428】

実施例1.2.C:目的のヒト標的抗原に対する親モノクローナル抗体の同定および特徴付け

実施例1.2.C.1:活性を中和する親モノクローナル抗体の分析

ハイブリドーマ上清は、実施例1.2.Aおよび1.2.Bに従って作製された目的の抗原に結合し、さらに、目的の抗原のバリエーション(「抗原バリエーション」)に結合することができる親抗体の存在についてアッセイされる。次に、両方のアッセイに陽性である抗体を含む上清は、それらの抗原中和効力について、例えば、実施例1.1.2.Iのサイトカインバイオアッセイにおいて試験される。1000pM未満、ある実施形態では100pM未満のバイオアッセイにおけるIC₅₀値を有する抗体を生成するハイブリドーマをスケールアップし、限界希釈によってクロニングする。ハイブリドーマ細胞は、10%の低IgGウシ胎児血清(Hyclone #SH30151, Logan, UT)を含む培地に増殖させる。平均して250mLの各ハイブリドーマ上清(クローン集団由来)を回収し、Harlow, E. and Lane, D. 1988 "Antibodies: A Laboratory Manual"に記載されるようにプロテインAアフィニティークロマトグラフィーによって濃縮および精製する。mAbの標的抗原の活性を阻害する、精製されたmAbの能力は、例えば、実施例1.1.2.Iに記載されるサイトカインバイオアッセイを用いて決定される。

30

40

【0429】

実施例1.2.C.2:目的のカニクイザル標的抗原に対する親モノクローナル抗体交差反応性の分析

本明細書に記載されている選択されたmAbが目的のカニクイザル抗原を認識するかどうかを決定するために、組み換えカニクイザル標的抗原を用いて、BIACORE分析を本明細書に記載される(実施例1.1.1.G)ように実施する。さらにまた、サイトカインバイオアッセイ(実施例1.1.2.I)において、目的の組み換えカニクイザル抗原に対するmAbの中和効力を測定することができる。良好なサル交差反応性を有するmAb(ある実施形態では、ヒト抗原に対する5倍以内の反応性)が将来の特徴付けのために選択される。

【0430】

50

実施例 1 . 2 . D : 各マウス抗ヒトモノクローナル抗体についての可変領域のアミノ酸配列の決定

組み換え抗ヒトマウス mAb の cDNA の単離、発現および特徴付けは以下のように行われる。各アミノ酸配列の決定について、約 1×10^6 個のハイブリドーマ細胞を遠心分離によって単離し、製造業者の使用説明書に従って処理し、トリゾール (Trizol) (Gibco BRL / Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて総 RNA を単離する。総 RNA は、製造業者の使用説明書を通じて、SuperScript First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて第一鎖 DNA 合成に供される。オリゴ (dT) を用いて、ポリ (A) + RNA について選択するために第一鎖合成をプライムする。次に、第一鎖 cDNA 産物は、マウスの免疫グロブリン可変領域の増幅用に設計されたプライマー (Ig-プライマーセット、Novagen, Madison, WI) を用いた PCR によって増幅される。PCR 産物をアガロースゲル上で分離し、切り出し、精製し、次に、TOPO クローニングキットを用いて pCR2.1-TOPO ベクター (インビトロゲン (Invitrogen)、カリフォルニア州カールスバッド) にサブクローニングし、および TOP10 の化学的にコンピテントな大腸菌 (E. coli) (Invitrogen, Carlsbad, CA) に形質転換される。コロニー PCR は、挿入物を含むクローンを特定するために形質転換体に対して実施される。プラスミド DNA は、QIAGEN ミニプレップキット (Qiagen, Valencia, CA) を用いて挿入物を含むクローンから単離される。プラスミド中の挿入物は、両鎖について配列決定され、M13 フォワードおよび M13 リバースプライマー (Fermentas Life Sciences, Hanover MD) を用いて、可変重鎖または可変軽鎖の DNA 配列を決定する。mAb の可変重鎖および可変軽鎖の配列を特定する。ある実施形態では、次の工程の進行 (ヒト化) のためのリード mAb 集団についての選択基準は以下を含む :

抗体は、いずれの N 結合のグリコシル化部位 (NXS) も含有しないが、CH2 における標準のものを除く。

抗体は、すべての抗体における通常のシステインに加えて、いずれの追加のシステインを含有しない。

抗体配列は、VH および VL について最も近いヒト生殖細胞系配列と整列され、いずれの通常でないアミノ酸は、他の天然のヒト抗体における出現について照合される。

N 末端のグルタミン (Q) は、抗体の活性に影響を及ぼさなければ、グルタミン酸 (E) に変更される。これは、Q の環化による異質性 (heterogeneity) を減少させることになる。

効果的なシグナル配列の切断は質量分析によって確認される。これは、COS 細胞または 293 細胞材料とともに行うことができる。

タンパク質配列は、活性の喪失を導き得る Asn の脱アミド化の危険性について確認される。

抗体は低レベルの凝集を有する。

抗体の可溶性は、 $> 5 - 10 \text{ mg/ml}$ (研究相における) ; $> 25 \text{ mg/ml}$ 。

抗体は、動的光散乱 (DLS) による通常サイズ ($5 - 6 \text{ nm}$) を有する。

抗体は、低電荷異質性を有する。

抗体は、サイトカイン放出を欠如する (実施例 1 . 1 . 2 . B 参照)。

抗体は、意図されるサイトカインに対する特異性を有する (実施例 1 . 1 . 2 . C 参照)。

抗体は、予期せぬ組織交差反応性を欠如する (実施例 1 . 1 . 2 . D 参照)。

抗体は、ヒトとカニクイザルの組織交差反応性との間に類似性を有する (実施例 1 . 1 . 2 . D 参照)。

【0431】

実施例 1 . 2 . 2 : 組み換えヒト化親抗体

実施例 1.2.2.1: 組み換えキメラ抗ヒト親抗体の構築および発現

マウス抗ヒト親 mAb の重鎖定常領域をコードする DNA は、細菌における相同組み換えによる 2 つのヒンジ領域のアミノ酸変異を含むヒト IgG1 定常領域をコードする cDNA 断片によって置換される。これらの変異は、234 位 (EU 番号付け) のロイシンからアラニンの変更であり、235 位のロイシンからアラニンの変更である (Lund et al., 1991, J. Immunol., 147: 2657)。これらの抗体の各々の軽鎖定常領域は、ヒト定常領域によって置換される。全長のキメラ抗体は、pBOS 発現プラスミドにキメラ重鎖および軽鎖の cDNA リガンドの同時の形質移入によって COS 細胞において一時的に発現される (Mizushima and Nagata, Nucleic Acids Research 1990, Vol 18, pg 5322)。組み換えキメラ抗体を含む細胞上清は、プロテイン A セファロースクロマトグラフィーによって精製され、結合した抗体は酸性緩衝液の添加によって溶出される。抗体は中和され、PBS 中で透析される。

10

【0432】

キメラ mAb をコードする重鎖 cDNA は、そのキメラ軽鎖 cDNA とともに (両者は pBOS ベクターにおいて連結されている) COS 細胞内に同時に形質移入される。組み換えキメラ抗体を含む細胞上清は、プロテイン A セファロースクロマトグラフィーによって精製され、結合した抗体は酸性緩衝液の添加によって溶出される。抗体は中和され、PBS 中で透析される。

【0433】

次に、精製されたキメラ抗ヒト親 mAb は、例えば、実施例 1.1.1.G および 1.1.2.B に記載される IgE のサイトカイン誘導による IgE の生成を阻害するために、それらの結合する能力 (Biacore による) および機能的活性について試験される。親ハイブリドーマ mAb の活性を維持するキメラ mAb は、将来の進行のために選択される。

20

【0434】**実施例 1.2.2.2: ヒト化抗ヒト親抗体の構築および発現****実施例 1.2.2.2.A: ヒト抗体フレームワークの選択**

各マウスの可変重鎖および可変軽鎖の遺伝子配列は、ベクター NTI ソフトウェアを用いて、44 個のヒト免疫グロブリン生殖細胞系列の可変重鎖または 46 個の生殖細胞系列の可変軽鎖配列 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/retrieveig.html> にて NCBI Ig Blast ウェブサイトから導かれる) に対して別々に整列される。

30

【0435】

ヒト化は、アミノ酸配列ホモロジー、CDR クラスター分析、発現されたヒト抗体のうちの使用頻度、およびヒト抗体の結晶構造に関する入手可能な情報に基づいている。抗体結合、VH-VL 対、および他の因子に対する可能な効果を考慮すると、マウス残基はヒト残基に変異され、この場合、若干の例外はあるが、マウスおよびヒトのフレームワーク残基は異なっている。さらなるヒト化戦略は、ヒト生殖細胞系列の抗体配列またはそれらのサブグループの分析に基づいて設計され、それは、マウス抗体の可変領域の実際のアミノ酸配列に対して高い程度のホモロジー、すなわち、配列類似性を有していた。

40

【0436】

ホモロジーモデリングは、抗体結合部位の構造、CDR に不可欠であることが予測されるマウス抗体の配列に特有の残基を特定するために用いられる。ホモロジーモデリングは計算法であり、それにより、近似の三次元座標がタンパク質のために作製される。初期座標およびそれらのさらなる修正のための誘導の情報源は、三次元座標が知られている第二のタンパク質、基準タンパク質、第一のタンパク質の配列に関連している配列である。2 つのタンパク質の配列間の関係は、基準タンパク質と座標が所望されているタンパク質、標的タンパク質の間の対応を生じさせるために使用される。基準タンパク質および標的タンパク質の一次配列は、基準タンパク質から標的タンパク質に直接移される 2 つのタンバ

50

ク質の初期部分の座標とともに整列される。例えば、残基変異、挿入または欠失に基づく、2つのタンパク質のミスマッチ部分についての座標は、すでに移動されたモデル座標との一貫性を確かめるために精緻化された包括的構造の鋳型およびエネルギーから構築される。この計算されたタンパク質構造は、さらに精緻化されてもよくまたはモデリング研究に直接使用されてもよい。モデル構造の質は、基準および標的タンパク質が関連するコンテンションの精度、および配列アラインメントが構築される正確さによって決定される。

【0437】

マウス mAb について、BLAST 検索および目視検査の組合せを用いて、適切な基準構造を特定する。基準と標的アミノ酸配列との間の 25% の配列同一性は、ホモロジーモデリング実行を試みるために必要最小限であると考えられる。配列アラインメントは手動で構築され、モデル座標はジャッカル (Jackal) プログラムを用いて作り出される (Petrey, D. et al. (2003) Proteins 53 (Suppl. 6) : 430 - 435 参照)。

10

【0438】

選択された抗体のマウスおよびヒトフレームワーク領域の一次配列は、有意な同一性を有する。異なっている残基位置は、マウス抗体の観察された結合有効性を保持するために、ヒト化配列におけるマウス残基を包含する候補対象である。ヒト配列とマウス配列との間で異なるフレームワーク残基のリストを手動で構築する。表7は本研究で選択されたフレームワーク配列を示す。

20

【0439】

【表7】

表7: ヒト IgG 重鎖定常ドメインおよび軽鎖定常ドメインの配列

タンパク質	配列番号	配列
		12345678901234567890123456789012345678901
野生型 hIgG1 定常領域	92	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTQSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSV FLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGIFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
突然変異 hIgG1 定常領域	93	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTQSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGIFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
Igカッパ定常領域	94	TVAAPSVEFI FPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYFVPEAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Igラムダ定常領域	95	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAW KADSSPVKAGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKS SYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

30

40

【0440】

所定のフレームワーク残基が抗体の結合特性に影響を及ぼす可能性は、CDR 残基へのその残基の近接に依存する。したがって、モデル構造を用いると、マウス配列とヒト配列との間で異なる残基は、CDR 中の任意の原子からのそれらの残基の距離に従って位置付けられる。任意の CDR 原子の 4.5 の範囲に入るそれらの残基が最も重要なものとして特定され、ヒト化抗体へのマウス残基の保持 (すなわち、復帰突然変異) についての候補

50

対象に推奨される。

【0441】

インシリコで構築されたヒト化抗体は、オリゴヌクレオチドを用いて構築される。各可変領域のcDNAについて、各々60-80ヌクレオチドのうち6オリゴヌクレオチドは、各オリゴヌクレオチドの5'末端および/または3'末端で20ヌクレオチドまで互いに重複するように設計される。アニーリング反応では、すべての6オリゴヌクレオチドを組合せ、ポイルし、dNTPの存在下でアニーリングする。DNAポリメラーゼI、ラージ(クレノウ)断片(New England Biolabs #M0210, Beverly, MA)を添加して、重複しているオリゴヌクレオチド間の約40bpギャップを埋める。修飾されたpBOSベクター(Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) *Nucleic Acids Res.* 18:17)のマルチクローニングサイトに相補的な突出している配列を含む2つの最外部プライマーを用いて、完全な可変領域遺伝子を増幅するためにPCRを行う。各cDNAアセンブリ由来のPCR産物をアガロースゲル上で分離し、予測される可変領域cDNAサイズに対応するバンドを切り出し、精製する。可変重鎖領域は、細菌において相同組み換えによって、2つのヒンジ領域のアミノ酸変異を含むヒトIgG1定常領域をコードするcDNA断片にフレームを合わせて挿入される。これらの変異は、234位(EU番号付け)のロイシンからアラニンへの変更、235位のロイシンからアラニンへの変更である(Lund et al. (1991) *J. Immunol.* 147:2657)。可変軽鎖領域は、相同組み換えによってヒト定常領域とともにフレームを合わせて挿入される。細菌コロニーを単離し、プラスミドDNAを抽出する。cDNA挿入物を全体として配列決定する。各抗体に対応する正しいヒト化重鎖および軽鎖をCOS細胞に同時に形質移入し、全長ヒト化抗ヒト抗体を一時的に生成する。組み換えキメラ抗体を含む細胞上清をプロテインAセファロースクロマトグラフィーによって精製し、結合した抗体を酸性緩衝液の添加によって溶出する。抗体を中和し、PBS中で透析する。

10

20

【0442】

実施例1.2.2.3:ヒト化抗体の特徴付け

機能的活性を阻害するための精製されたヒト化抗体の能力は、例えば、実施例1.1.2.Aに記載されるようにサイトカインバイオアッセイを用いて決定される。組み換えヒト抗原に対するヒト化抗体の結合親和性は、実施例1.1.1.Bに記載されるように表面プラズモン共鳴(Biacore(登録商標))測定を用いて決定される。ヒト化抗体のバイオアッセイからのIC₅₀値および親和性を位置付ける。親ハイブリドーマmAbの活性を完全に維持するヒト化mAbは、将来の進行のための候補対象として選択される。上位2-3の最も有益なヒト化mAbをさらに特徴付ける。

30

【0443】

実施例1.2.2.3.A:ヒト化抗体の薬物動態分析

薬物動態研究は、Sprague-Dawleyラットおよびカニクイザルにおいて行われる。雄性および雌性のラットならびにカニクイザルは、4mg/kgのmAbの単回投薬で静脈内または皮下に投薬され、抗原捕捉ELISAを用いて試料を分析し、薬物動態パラメーターを非コンパートメント分析によって決定する。要約すると、ヤギ抗ピオチン抗体(5mg/ml、4、一晚)を用いてELISAプレートを被覆し、Superblock(Pierce)を用いてブロックし、10%SuperblockのTTBS中の50ng/mlのピオチン化ヒト抗原とともに室温で2時間インキュベートする。血清試料を連続的に希釈し(TTBS中の0.5%血清、10%Superblock)およびプレート上で30分間、室温にてインキュベートする。HRP標識されたヤギ抗ヒト抗体を用いて検出を行い、4パラメーターのロジスティックフィットを用いて、標準曲線の助けにより濃度を決定する。薬物動態パラメーターに関する値は、WinNonlinソフトウェア(Pharsight Corporation, Mountain View, CA)を用いて、非コンパートメントモデルによって決定される。良好な薬物動態プロファイルを有するヒト化mAb(T1/2は8-13日またはそれより良好であり

40

50

、低クリアランスおよび優れた生物学的利用率は50 - 100%である)を選択する。

【0444】

実施例1.2.2.3.B: ヒト化モノクローナル抗体の物理化学的およびインビトロでの安定性分析

サイズ排除クロマトグラフィー

水を用いて抗体を2.5 mg/mLに希釈し、20 mLをTSKゲルG3000SWXLカラム(Tosoh Bioscience、カタログ#k5539-05k)を用いてShimadzu HPLCシステム上で分析する。211 mM硫酸ナトリウム、92 mMリン酸ナトリウム、pH 7.0を用いて、流速0.3 mL/分にて試料をカラムから溶出する。HPLCシステムの操作条件は以下の通りである：

移動相：211 mMの Na_2SO_4 、92 mMの $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、pH 7.0

勾配：アイソクラチック

流速：0.3 mL/分

検出波長：280 nm

オートサンプラー冷却装置温度：4

カラムオープン温度：周囲

実行時間：50分

表8は、上記プロトコールによって決定された単量体% (予想される分子量の非凝集タンパク質)として発現された親抗体およびDVD-Ig構築物の純度データを含む。

【0445】

10

20

【表 8】

表 8: サイズ排除クロマトグラフィーによって決定された親抗体および DVD-Ig 構築物の純度

親抗体または DVD-Ig ID	N 末端可変 ドメイン (VD)	C 末端可変 ドメイン (VD)	単量体%(純度)
DVD1311	NGF (配列 2)	EGFR (配列 2)	66.4
DVD1312	EGFR (配列 2)	NGF (配列 2)	95.3
DVD1313	NGF (配列 2)	IGF1,2	75.1
DVD1314	IGF1,2	NGF (配列 2)	76.8
DVD1315	NGF (配列 2)	RON (配列 1)	72.5
DVD1316	RON (配列 1)	NGF (配列 2)	-
DVD1317	NGF (配列 2)	ErbB3 (配列 1)	81.3
DVD1318	ErbB3 (配列 1)	NGF (配列 2)	73.1
DVD1319	NGF (配列 2)	ErbB3 (配列 2)	51
DVD1320	ErbB3 (配列 2)	NGF (配列 2)	86.9
DVD1323	NGF (配列 2)	IGF1R	84.3
DVD1324	IGF1R	NGF (配列 2)	94.4
DVD1325	NGF (配列 2)	HGF	76.9
DVD1326	HGF	NGF (配列 2)	92.3
DVD1327	NGF (配列 2)	VEGF (配列 1)	87.2
DVD1328	VEGF (配列 1)	NGF (配列 2)	92.3
DVD1329	NGF (配列 2)	DLL4	62.6
DVD1330	DLL4	NGF (配列 2)	80.2
DVD1331	NGF (配列 2)	PIGF	83
DVD1332	PIGF	NGF (配列 2)	95.8
DVD1333	NGF (配列 2)	RON (配列 2)	61.9
DVD1334	RON (配列 2)	NGF (配列 2)	100
DVD1335	NGF (配列 2)	CD-20	70
DVD1336	CD-20	NGF (配列 2)	81.1
DVD1337	NGF (配列 2)	EGFR (配列 1)	89.8
DVD1338	EGFR (配列 1)	NGF (配列 2)	92.5
DVD1339	NGF (配列 2)	HER2	72.6
DVD1340	HER2	NGF (配列 2)	66.4
DVD1349	NGF (配列 2)	c-MET	-
DVD1350	c-MET	NGF (配列 2)	-
DVD1351	NGF (配列 2)	NRP1 (配列 1)	75.5
DVD1352	NRP1 (配列 1)	NGF (配列 2)	75.3

10

20

30

40

親抗体または DVD-Ig ID	N末端可変 ドメイン (VD)	C末端可変 ドメイン (VD)	単量体%(純度)
	1)		
DVD1361	NGF (配列 2)	ErbB3 (配列 3)	-
DVD1362	ErbB3 (配列 3)	NGF (配列 2)	67
DVD1369	NGF (配列 2)	EGFR (配列 3)	86.6
DVD1370	EGFR (配列 3)	NGF (配列 2)	93.5

10

DVD-Igは、大部分のDVD-Igが90%を超える単量体を示す優れたSECプロフィールを示した。このDVD-Igプロフィールは、親抗体に対して観察されたものと類似している。

【0446】

SDS-PAGE

還元条件下および非還元条件下でドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)によって抗体を分析する。Adalimumab(ロットAFP04C)を対照として用いる。還元条件について、100mMのDTTを含む2×トリスグリシンSDS-PAGE試料緩衝液(Invitrogen、カタログ#LC2676、ロット#1323208)と1:1で試料を混合し、60で30分間加熱する。非還元条件について、試料緩衝液と1:1で試料を混合し、100で5分間加熱する。還元試料(10mg/レーン)を12%プレキャストのトリス-グリシゲル(Invitrogen、カタログ#EC6005box、ロット#6111021)上に装填し、非還元試料(10mg/レーン)を8%-16%プレキャストのトリス-グリシゲル(Invitrogen、カタログ#EC6045box、ロット#6111021)上に装填する。SeeBlue Plus 2(Invitrogen、カタログ#LC5925、ロット#1351542)を分子量マーカーとして用いる。ゲルをXCell SureLockミニセルゲルボックス(Invitrogen、カタログ#EI0001)に入れ、最初に、ゲル内の試料を積層するために電圧75を加え、次にダイフロント(dye front)がゲルの底に到達するまで定電圧125にしてタンパク質を分離する。使用される泳動緩衝液は1×トリスグリシンSDS緩衝液であり、10×トリスグリシンSDS緩衝液(ABC、MPS-79-080106)から調製される。コロイド状青色染色(Invitrogen、カタログ#46-7015、46-7016)を用いてゲルを一晩染色し、バックグラウンドを除くためにMilli-Q水で脱染する。次に、Epson Expressionスキャナー(モデル1680、S/N DASX003641)を用いて、染色されたゲルをスキャンする。

20

30

【0447】

沈降速度分析

3つの標準的な2セクターのカーボン・エボンセンターピースの各々の試料チャンバー内に抗体を装填する。これらのセンターピースは1.2cmの光路長を有し、サファイアウィンドウで構築される。基準緩衝液に関してはPBSを使用し、各チャンバーは140μLを含む。Beckman Proteome Lab XL-I分析用超遠心分離機(シリアル#PL106C01)の4ホール(AN-60Ti)ローターを用いて、すべての試料を同時に試験する。

40

【0448】

実行条件をプログラムし、Proteome Lab(v5.6)を用いて遠心分離制御を行う。試料およびローターは、分析前の1時間(20.0±0.1)熱平衡化させる。適切なセル装填の確認を3000rpmで行い、1回のスキャンを各ウェルについて記

50

録する。沈降速度条件は以下の通りである：

試料細胞体積：420 mL

基準細胞体積：420 mL

温度：20

ローター速度：35,000 rpm

時間：8:00時間

UV波長：280 nm

半径刻み幅：0.003 cm

データ回収：信号加算平均なしの1工程あたり1データポイント

スキャン総数：100

10

【0449】

完全な抗体のLC-MS分子量測定

完全な抗体の分子量をLC-MSによって分析する。水を用いて各抗体を約1 mg/mLに希釈する。タンパク質マイクロトラップ(Michrom Bioresources, Inc、カタログ#004/25109/03)を備えた1100 HPLC(Agilent)システムを用いて、脱塩し、試料の5 mgをAPI Qstarパルサーi質量分析計(Applied Biosystems)に導入する。短い勾配を用いて試料を溶出する。勾配は、移動相A(HPLC水中の0.08% TFA、0.02% TFA)および移動相B(アセトニトリル中の0.08% FAおよび0.02% TFA)を用いて、50 mL/分の流速にて勾配を実行する。質量分析計は、4.5キロボルトの噴霧電圧で操作され、スキャン範囲は2000から3500の質量対電荷比である。

20

【0450】

抗体軽鎖および重鎖のLC-MS分子量測定

抗体軽鎖(LC)、重鎖(HC)および脱グリコシル化されたHCの分子量測定をLC-MSによって分析する。水を用いて抗体を1 mg/mLに希釈し、試料は、最終濃度が10 mMのDTTを用いて、30分間、37℃でLCおよびHCに還元される。抗体を脱グリコシル化するために、100 mgの抗体は、100 mLの全体積中の2 mLのPNGase F、5 mLの10% N-オクチルグルコシドとともに、一晚37℃にてインキュベートされる。脱グリコシル化後、最終濃度が10 mMのDTTを用いて、試料を30分間、37℃にて還元する。C4カラム(Vydac、カタログ#214TP5115、S/N060206537204069)を備えたAgilent 1100 HPLCシステムを用いて脱塩し、試料(5 mg)をAPI Qstarパルサーi質量分析計(Applied Biosystems)に導入する。短い勾配を用いて試料を溶出する。勾配は、移動相A(HPLC水中の0.08% FA、0.02% TFA)および移動相B(アセトニトリル中の0.08% FAおよび0.02% TFA)を用いて、50 mL/分の流速にて勾配を実行する。質量分析計は、4.5キロボルトの噴霧電圧で操作され、スキャン範囲は800から3500の質量対電荷比である。

30

【0451】

ペプチドマッピング

75 mM重炭酸アンモニウム中の最終濃度が6 Mの塩酸グアニジンを用いて抗体を15分間、室温にて変性させる。変性試料は、最終濃度が10 mMのDTTを用いて、37℃、60分間還元させ、次に、暗所にて37℃、30分間、50 mMヨード酢酸(IAA)を用いてアルキル化される。アルキル化後、4リットルの10 mM重炭酸アンモニウムに対して、一晚4℃で試料を透析する。透析された試料は、10 mM重炭酸アンモニウム、pH 7.8を用いて1 mg/mLに希釈され、100 mgの抗体は、1:20(w/w)トリプシン/Lys-C:抗体の比でトリプシン(Promega、カタログ#V5111)またはLys-C(Roche、カタログ#11047825001)を用いて37℃で4時間消化される。消化物は、1 NのHClを1 mL用いてクエンチされる。質量分析計検出を用いたペプチドマッピングについて、40 mLの消化物は、Agilent 1100 HPLCシステムを備えた、C18カラム(Vydac、カタログ#21

40

50

8TP51、S/N NE9606 10.3.5) 上で逆相高速液体クロマトグラフィー (RPHPLC) によって分離される。ペプチドの分離は、移動相 A (HPLC 等級の水中の 0.02% TFA および 0.08% FA) および移動相 B (アセトニトリル中の 0.02% TFA および 0.08% FA) を使用する勾配を用いて、50 mL / 分の流速にて実行する。API QSTAR Pulsar i 質量分析計は、4.5 キロボルトの噴霧電圧のポジティブモードで操作され、スキャン範囲は 800 から 2500 の質量対電荷比である。

【0452】

ジスルフィド結合マッピング

抗体を変性するために、100 mL の抗体は、100 mM 重炭酸アンモニウム中の 8 M グアニジン HCl の 300 mL と混合される。pH をチェックして、pH が 7 から 8 の間であることを確認し、最終濃度が 6 M のグアニジン HCl 中で 15 分間、室温にて試料を変性させる。一部の变性試料 (100 mL) を Milli-Q 水で 600 mL に希釈し、最終のグアニジン - HCl 濃度を 1 M とする。試料 (220 mg) は、1 : 50 のトリプシン : 抗体または 1 : 50 の Lys - C : 抗体 (w/w) の比 (4.4 mg 酵素 : 220 mg 試料) でトリプシン (Promega、カタログ # V5111、ロット # 22265901) または Lys - C (Roche、カタログ # 11047825001、ロット # 12808000) を用いて 37 °C で約 16 時間消化される。さらに 5 mg のトリプシンまたは Lys - C を試料に添加し、消化をさらに 2 時間、37 °C で進行させる。各試料に 1 mL の TFA を添加することによって消化を停止させる。消化された試料は、Agilent HPLC システム上の C18 カラム (Vydac、カタログ # 218TP51、S/N NE020630-4-1A) を用いて RPHPLC によって分離される。分離は、移動相 A (HPLC 等級の水中の 0.02% TFA および 0.08% FA) および移動相 B (アセトニトリル中の 0.02% TFA および 0.08% FA) を用いて、ペプチドマッピングについて使用されたものと同じ勾配で 50 mL / 分の流速にて実行する。HPLC の操作条件は、ペプチドマッピングについて使用された条件と同じである。API QSTAR Pulsar i 質量分析計は、4.5 キロボルトの噴霧電圧のポジティブモードで操作され、スキャン範囲は 800 から 2500 の質量対電荷比である。ジスルフィド結合は、ペプチドの実測された MW と、ジスルフィド結合によって連結されたトリプシンまたは Lys - C ペプチドの予測された MW とを合致させることによって割り当てられる。

【0453】

遊離スルフヒドリル決定

抗体中の遊離システインを定量するために使用される方法は、特徴的な発色生成物である 5 - チオ - (2 - ニトロ安息香酸) (TNB) を生じさせる、エルマン試薬である 5, 5'-ジチオ - ビス(2 - ニトロ安息香酸) (DTNB) とスルフヒドリル基 (SH) の反応に基づいている。反応は、式：



において説明される。

【0454】

TNB⁻ の吸光度は、Cary 50 分光光度計を用いて、412 nm で測定される。吸光度曲線は、遊離 SH 標準として 2メルカプトエタノール (b-ME) の希釈を用いてプロットし、タンパク質中の遊離スルフヒドリル基の濃度は、試料の 412 nm での吸光度から決定される。

【0455】

b-ME 標準ストックは、最終濃度が 0.142 mM になるように、HPLC 等級の水を用いて 14.2 M の b-ME を連続希釈することによって調製される。次に、各濃度について 3 点測定 of 標準を調製する。アミコンウルトラ 10,000 MWCO 遠心フィルター (Millipore、カタログ # UFC801096、ロット # L3KN5251) を用いて抗体を 10 mg / mL に濃縮し、緩衝液をアダリムマブについて使用した処方緩

衝液 (5 . 5 7 m M リン酸一水素ナトリウム、 8 . 6 9 m M リン酸二水素ナトリウム、 1 0 6 . 6 9 m M の NaCl、 1 . 0 7 m M クエン酸ナトリウム、 6 . 4 5 m M クエン酸、 6 6 . 6 8 m M マンニトール、 pH 5 . 2、 0 . 1 % (w / v) Tween) に交換する。試料をシェーカー上で室温にて 2 0 分間混合する。次に、 1 8 0 m L の 1 0 0 m M の Tris 緩衝液、 pH 8 . 1 を各試料に添加し、標準は、 1 0 m M リン酸緩衝液、 pH 8 . 1 中の 2 m M の DTNB を 3 0 0 m L 添加する。完全に混合した後、 Cary 5 0 分光光度計上で 4 1 2 n m の吸光度について試料および標準を測定する。遊離 SH の量と b - ME 標準の OD_{412nm} をプロットすることによって、標準曲線を得る。試料の遊離 SH 含有量は、ブランクを差し引いた後、この曲線に基づいて計算される。

【 0 4 5 6 】

弱い陽イオン交換クロマトグラフィー

1 0 m M リン酸ナトリウム、 pH 6 . 0 を用いて抗体を 1 m g / m L に希釈する。電荷異質性は、WCX - 1 0 ProPac 分析用カラム (Dionex、カタログ # 0 5 4 9 9 3、S / N 0 2 7 2 2) を備えた Shimadzu HPLC システムを用いて分析される。試料を 8 0 % 移動相 A (1 0 m M リン酸ナトリウム、 pH 6 . 0) および 2 0 % 移動相 B (1 0 m M リン酸ナトリウム、 5 0 0 m M の NaCl、 pH 6 . 0) においてカラムに充填し、 1 . 0 m L / 分の流速で溶出する。

【 0 4 5 7 】

オリゴ糖プロファイリング

抗体の PNGase F 処理後に放出されるオリゴ糖は、 2 - アミノベンズアミド (2 - AB) 標識試薬を用いて誘導される。蛍光標識されたオリゴ糖は、順相の高速液体クロマトグラフィー (NPHPLC) によって分離され、異なる形態のオリゴ糖は、保持時間に基づいて、既知の標準と比較して特徴付けられる。

【 0 4 5 8 】

抗体を最初に PNGase F を用いて消化し、重鎖の Fc 部分から N 結合のオリゴ糖を切断する。 2 m L の PNGase F および 3 m L の 1 0 % N - オクチルグルコシドとともに 5 0 0 m L エッペンドルフチューブに抗体 (2 0 0 m g) を入れる。リン酸緩衝生理食塩水を添加し、最終体積を 6 0 m L にする。 7 0 0 R P M に設定したエッペンドルフのサーモミキサー中で一晚 3 7 °C にて試料をインキュベートする。また、 Adalimumab (ロット A F P 0 4 C) を対照として PNGase F を用いて消化する。

【 0 4 5 9 】

PNGase F 処理後、 7 5 0 R P M に設定されたエッペンドルフのサーモミキサー中で 9 5 °C、 5 分間、試料をインキュベートしてタンパク質を沈殿させ、次に、 2 分間、 1 0 , 0 0 0 R P M でエッペンドルフの遠心分離機に試料を置き、沈殿したタンパク質を沈降させる。オリゴ糖を含む上清を 5 0 0 m L のエッペンドルフチューブに移し、スピード - vac 中、 6 5 °C で乾燥させる。

【 0 4 6 0 】

Prozyme から購入される 2 AB 標識キット (カタログ # G K K - 4 0 4、ロット # 1 3 2 0 2 6) を用いて、オリゴ糖を 2 AB で標識する。製造業者の使用説明書に従って標識試薬を調製する。酢酸 (1 5 0 m L、キットにおいて提供される) を DMSO バイアル (キットにおいて提供される) に添加し、溶液を数回、上下にピペティングすることによって混合する。酢酸 / DMSO 混合物 (1 0 0 m L) を 2 - AB 色素のバイアル (使用直前) に移し、色素が完全に溶解するまで混合する。次に、色素溶液を還元剤 (キットにおいて提供される) のバイアルに添加し、十分に混合に混合する (標識試薬)。標識試薬 (5 m L) を各々乾燥させたオリゴ糖試料バイアルに添加し、完全に混合する。 6 5 °C で 7 0 0 - 8 0 0 R P M に設定されたエッペンドルフのサーモミキサーに反応バイアルを置き、 2 時間反応させる。

【 0 4 6 1 】

標識反応後、Prozyme から入手される GlycoClean カートリッジ (カタログ # G K I - 4 7 2 6) を用いて過剰の蛍光色素を取り除く。試料を添加前、カート

10

20

30

40

50

リッジを1 mLのmilli-Q水で洗浄し、その後、1 mLの30%酢酸溶液で5回洗浄する。試料を添加直前に、1 mLのアセトニトリル(Burdick and Jackson、カタログ# AH015-4)をカートリッジに添加する。

【0462】

すべてのアセトニトリルがカートリッジを通過した後、新たに洗浄したディスクの中心に試料をスポット状に置き、ディスク上に10分間吸着させる。1 mLのアセトニトリルを用いてディスクを洗浄し、続いて、1 mLの96%アセトニトリルで5回洗浄する。カートリッジを1.5 mLのエッペンドルフチューブ上に置き、2-AB標識されたオリゴ糖をmilli-Q水の3回の洗浄(各洗浄あたり400 mL)により溶出させる。

【0463】

Shimadzu HPLCシステムに連結させたGlycosep N HPLC(カタログ# GKI-4728)カラムを用いてオリゴ糖を分離する。Shimadzu HPLCシステムは、システムコントローラー、脱気装置、二重ポンプ、試料冷却器を備えたオートサンプラーおよび蛍光検出器からなっていた。

【0464】

高温での安定性

抗体の緩衝液は、5.57 mMリン酸一水素ナトリウム、8.69 mMリン酸二水素ナトリウム、106.69 mMのNaCl、1.07 mMクエン酸ナトリウム、6.45 mMクエン酸、66.68 mMマンニトール、0.1% (w/v) Tween、pH 5.2; または10 mMヒスチジン、10 mMメチオニン、4%マンニトール、pH 5.9のいずれかであり、Amicon超遠心フィルターを用いる。適切な緩衝液を用いて、抗体の最終濃度を2 mg/mLに調整する。次に、抗体溶液を濾過滅菌し、0.25 mLのアリコートは無菌条件下で調製する。アリコートを-80、5、25 または40 で1、2 または3週間放置する。インキュベーション期間の終わりに、サイズ排除クロマトグラフィーおよびSDS-PAGEによって試料を分析する。

【0465】

安定性試料は、還元条件下および非還元条件下でSDS-PAGEによって分析される。使用される手法は、本明細書に記載されたものと同じである。コロイド状青色染色(Invitrogen、カタログ# 46-7015、46-7016)を用いてゲルを一晩染色させ、バックグラウンドが透明になるまでMilli-Q水で脱染される。次に、Epson Expressionスキャナー(モデル1680、S/N DAX003641)を用いて、染色されたゲルをスキャンする。高い感度を得るために、銀染色キット(Owl Scientific)を用いて同じゲルを銀染色し、製造業者によって提供される推奨の手順を用いる。

【0466】

実施例1.2.2.3.C: ヒト癌腫異種移植片の増殖に対するヒト化モノクローナル抗体単独または化学療法との組合せの有効性

99%生存率、組織培養フラスコ中で85%のコンフルエントになるようにヒト癌細胞をインビトロで増殖させる。19から25グラムの雌性または雄性SCIDマウス(Charles Rivers Labs)に耳標を付け、毛を剃った。次いで、研究の0日目に、0.2 mLの 2×10^6 個のヒト腫瘍細胞(1:1マトリゲル)をマウスの右脇腹に皮下接種する。約150から200 mm³の平均腫瘍体積を有するマウスの別々のケージにマウスの大きさを合わせた後に、ピヒクル(PBS)、ヒト化抗体および/または化学療法の投与(IP、Q3D/週)を開始する。接種から約10日後に開始して、週に2回、キャリパーの対によって腫瘍を測定し、式 $V = L \times W^2 / 2$ (V: 体積、mm³; L: 長さ、mm; W: 幅、mm)に従って腫瘍体積を計算する。mAb単独、または化学療法と組み合わせて処理された動物において、ピヒクル単独またはアイソタイプ対照mAbを受けた動物における腫瘍と比べて、腫瘍体積の減少が観察される。

【0467】

実施例1.2.2.3.D: FACSに基づく再指向された細胞傷害(rCTL)アッ

10

20

30

40

50

セイ

負の選択濃縮カラム (R&D Systems, Minneapolis, MN; カタログ # HTCC-525) によって、予め凍結させた単離された末梢血単核細胞 (PBMC) からヒト CD3+T 細胞を単離した。フラスコ (vent cap, Corning, Acton, MA) 中で T 細胞を 4 日間刺激し、D-PBS (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中の 10 µg/mL の抗 CD3 (OKT-3, eBioscience, Inc., San Diego, CA) および 2 µg/mL 抗 CD28 (CD28.2, eBioscience, Inc., San Diego, CA) で被覆し、L-グルタミン、55 mM の β-ME、ペニシリン/ストربتマイシン、10% FBS を含む完全 RPMI 1640 培地 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中の 30 U/mL の IL-2 (Roche) 中で培養する。次いで、アッセイに使用する前に、30 U/mL の IL-2 中で T 細胞を一晩休息させた。製造業者の使用説明書に従って、DoHH2 または Raji 標的細胞を PKH26 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) で標識した。rCTL アッセイを通じて、L-グルタミンおよび 10% FBS (Hyclone, Logan, UT) を含む RPMI 1640 培地 (フェノールなし、Invitrogen, Carlsbad, CA) を使用した。(Dreier et al. (2002) Int J Cancer 100:690 を参照)。

【0468】

10:1 の E:T 比を与えるために、それぞれ 96 ウェルプレート (Costar # 3799, Acton, MA) 中の 10⁵ および 10⁴ 細胞/ウェルの最終細胞濃度で、エフェクター T 細胞 (E) および標的 (T) を播種した。濃度依存的な滴定曲線を得るために、DVD-Ig 分子を希釈した。一晩インキュベーション後、細胞をペレットにし、D-PBS 中に 0.1% BSA (Invitrogen, Carlsbad, CA)、0.1% アジ化ナトリウムおよび 0.5 µg/mL ヨウ化プロピジウム (BD) を含む FACS 緩衝液中に再懸濁する前に、D-PBS で 1 回洗浄する。FACS Canto II 装置 (Becton Dickinson, San Jose, CA) に FACS データを回収し、Flowjo (TreeStar) において分析した。特異的溶解率を測定するために、総標的率 (対照、無処置) によって除した、DVD-Ig 処理された試料における生きた標的率を計算した。Prism (Graphpad) において IC50 を計算した。

【0469】

実施例 1.4: DVD-Ig の生成

2 つの抗原に結合することができる DVD-Ig 分子は、2 つの親モノクローナル抗体を用いて構築され、1 つはヒト抗原 A に対し、他方はヒト抗原 B に対し、本明細書に記載されるように選択される。

【0470】

実施例 1.4.1: 2 つのリンカー長を有する DVD-Ig の生成

ADCC / CDC エフェクター機能を排除するために、234 および 235 に変異を有する 1 Fc を含む定常領域を用いる。4 種の抗 A / B DVD-Ig 構築物を生成する: 2 つは短いリンカーを有し、2 つは長いリンカーを有し、各々は 2 つの異なるドメイン配向にある: V_A-V_B-C および V_B-V_A-C (表 9 を参照)。リンカー配列は、ヒト C1 / Ck または CH1 ドメインの N 末端配列から誘導され、以下の通りである:

DVDAB 構築物について:

軽鎖 (抗 A が 有する場合): 短いリンカー: QPKAAP (配列番号 15); 長いリンカー: QPKAAPSVTLFPP (配列番号 16)。

軽鎖 (抗 A が 有する場合): 短いリンカー: TVAAP (配列番号 13); 長いリンカー: TVAAPSVFIFPP (配列番号 14)。

重鎖 (1): 短いリンカー: ASTKGP (配列番号 21); 長いリンカー: ASTKGPSVFLAP (配列番号 22)。

10

20

30

40

50

【0471】

DVD B A 構築物について：

軽鎖（抗 B が κ である場合）：短いリンカー：Q P K A A P（配列番号 15）；長いリンカー：Q P K A A P S V T L F P P（配列番号 16）。

軽鎖（抗 B が λ である場合）：短いリンカー：T V A A P（配列番号 13）；長いリンカー：T V A A P S V F I F P P（配列番号 14）。

重鎖（ μ ）：短いリンカー：A S T K G P（配列番号 21）；長いリンカー：A S T K G P S V F P L A P（配列番号 22）。

【0472】

重鎖および軽鎖構築物を p B O S 発現ベクターにサブクローニングし、C O S 細胞において発現させ、その後、プロテイン A クロマトグラフィーによって精製する。精製された物質は、S D S - P A G E および S E C 分析に供される。

【0473】

以下の表 9 は、各抗 A / B DVD - I g タンパク質を発現するために使用された重鎖および軽鎖の構築物を記載する。

【0474】

【表 9】

表 9: 抗 A/B DVD-Ig 構築物

DVD-Ig タンパク質	重鎖構築物	軽鎖構築物
DVDABSL	DVDABHC-SL	DVDABLC-SL
DVDABLL	DVDABHC-LL	DVDABLC-LL
DVDBASL	DVDBAHC-SL	DVDBALC-SL
DVDBALL	DVDBAHC-LL	DVDBALC-LL

【0475】

実施例 1 . 4 . 2 : DVD A B S L および DVD A B L L のための DNA 構築物の分子クローニング

重鎖構築物 DVD A B H C - L L および DVD A B H C - S L を生成するために、A 抗体の V H ドメインは、特異的プライマー（3'プライマーはそれぞれ S L / L L 構築物に対する短い/長い線状配列を含む）を用いて P C R 増幅される；一方、B 抗体の V H ドメインは、特異的プライマー（5'プライマーはそれぞれ S L / L L 構築物に対する短い/長い線状配列を含む）を用いて増幅される。両方の P C R 反応は、標準的な P C R 技術および手法に従って行われる。2つの P C R 産物をゲルで精製し、その後の重複 P C R 反応のための重複鋳型としてともに使用する。重複 P C R 産物は、標準的な相同組み換えアプローチを用いることによって、S r f I および S a l I によって二重消化された p B O S - h C 1 , z 非 a - 哺乳類用発現ベクター（A b b o t t）にサブクローニングされる。

【0476】

軽鎖構築物 DVD A B L C - L L および DVD A B L C - S L を生成するために、A 抗体の V L ドメインは、特異的プライマー（3'プライマーはそれぞれ S L / L L 構築物に対する短い/長い線状配列を含む）を用いて P C R 増幅される；一方、B 抗体の V L ドメインは、特異的プライマー（5'プライマーはそれぞれ S L / L L 構築物に対する短い/長い線状配列を含む）を用いて増幅される。両方の P C R 反応は、標準的な P C R 技術および手法に従って行われる。2つの P C R 産物をゲルで精製し、標準的な P C R 条件を用いて、その後の重複 P C R 反応のための重複鋳型としてともに使用する。重複 P C R 産物は、標準的な相同組み換えアプローチを用いることによって、S r f I および N o t I に

よって二重消化された pBOS - hCk 哺乳類用発現ベクター (Abbott) にサブクロニングされる。類似のアプローチを用いて、以下に説明される DVDBASL および DVDBALL を生成させた。

【0477】

実施例 1.4.3 : DVDBASL および DVDBALL のための DNA 構築物の分子クローニング

重鎖構築物 DVDBAHC - LL および DVDBAHC - SL を生成するために、抗体 B の VH ドメインは、特異的プライマー (3' プライマーはそれぞれ SL / LL 構築物に対する短い / 長い線状配列を含む) を用いて PCR 増幅される ; 一方、抗体 A の VH ドメインは、特異的プライマー (5' プライマーはそれぞれ SL / LL 構築物に対する短い / 長い線状配列を含む) を用いて増幅される。両方の PCR 反応は、標準的な PCR 技術および手法に従って行われる。2つの PCR 産物をゲルで精製し、標準的な PCR 条件を用いて、その後の重複 PCR 反応のために重複鋳型としてともに使用する。重複 PCR 産物は、標準的な相同組み換えアプローチを用いることによって、SrfI および SalI によって二重消化された pBOS - hC 1, z 非 a - 哺乳類用発現ベクター (Abbott) にサブクロニングされる。

10

【0478】

軽鎖構築物 DVDBALC - LL および DVDBALC - SL を生成するために、抗体 B の VL ドメインは、特異的プライマー (3' プライマーはそれぞれ SL / LL 構築物に対する短い / 長い線状配列を含む) を用いて PCR 増幅される ; 一方、抗体 A の VL ドメインは、特異的プライマー (5' プライマーはそれぞれ SL / LL 構築物に対する短い / 長い線状配列を含む) を用いて増幅される。両方の PCR 反応は、標準的な PCR 技術および手法に従って行われる。2つの PCR 産物をゲルで精製し、標準的な PCR 条件を用いて、その後の重複 PCR 反応のために重複鋳型としてともに使用する。重複 PCR 産物は、標準的な相同組み換えアプローチを用いることによって、SrfI および NotI によって二重消化された pBOS - hCk 哺乳類用発現ベクター (Abbott) にサブクロニングされる。

20

【0479】

実施例 1.4.4 : 追加の DVD - Ig の構築および発現

実施例 1.4.4.1 : DVD - Ig ベクター構築物の調製

DVD - Ig に取り込むために、特異的な抗原またはそれらのエピトープを認識する特異的抗体についての親抗体アミノ酸配列が、上述したハイブリドーマの調製によって得ることができ、または既知の抗体タンパク質もしくは核酸を配列決定することによって得ることができる。さらに、既知の配列は文献から得ることができる。これらの配列は、標準的な DNA 合成または増幅技術を用いて核酸を合成するために使用することができ、標準的な組み換え DNA 技術を用いて、細胞において発現させるために、発現ベクターに所望の抗体断片を組み入れることができる。

30

【0480】

例えば、核酸コドンは、アミノ酸配列から決定され、オリゴヌクレオチド DNA は、Blue Heron Biotechnology, Inc. (www.blueheronbio.com) Bothell, WA USA で合成された。オリゴヌクレオチドは、300 - 2,000 塩基対の二本鎖 DNA 断片に組み入れられ、プラスミドベクターにクローニングされ、配列が確認された。クローニングされた断片は、酵素処理を用いて組み入れられ、完全な遺伝子を得て、発現ベクターにサブクロニングされた。(7, 306, 914; 7, 297, 541; 7, 279, 159; 7, 150, 969; 20080115243; 20080102475; 20080081379; 20080075690; 20080063780; 20080050506; 20080038777; 20080022422; 20070289033; 20070287170; 20070254338; 20070243194; 20070225227; 20070207171; 20070150976; 20070135620; 20070128190

40

50

; 20070104722; 20070092484; 20070037196; 20070028321; 20060172404; 20060162026; 20060153791; 20030215458; 20030157643を参照)。

【0481】

親抗体およびDVD-Igクローニングのために一群のpHybEベクター(米国特許出願第61/021,282号)を用いた。pJP183由来のV1;pHybE-hCg1,z,非a V2は、野生型の定常領域を有する抗体およびDVD重鎖をクローニングするために使用された。pJP191由来のV2;pHybE-hCk V2は、定常領域を有する抗体およびDVD軽鎖をクローニングするために使用された。pJP192由来のV3;pHybE-hC1 V2は、定常領域を有する抗体およびDVD軽鎖をクローニングするために使用された。シグナルペプチドおよび定常領域とともに構築されたV4は、-ハイブリッドVドメインを有するDVD軽鎖をクローニングするために使用された。シグナルペプチドおよび定常領域とともに構築されたV5は、-ハイブリッドVドメインを有するDVD軽鎖をクローニングするために使用された。pJP183由来のV7;pHybE-hCg1,z,非a V2は、(234、235AA)変異定常領域を有する抗体およびDVD重鎖をクローニングするために使用された。

10

【0482】

表10に関して、親抗体ならびにDVD-Ig VHおよびVL鎖のクローニングに多数のベクターを用いた。

20

【0483】

【表 10】

表 10:親抗体および DVD-Ig をクローニングするために使用されるベクター

ID	重鎖ベクター	軽鎖ベクター
DVD1307	V1	V2
DVD1308	V1	V2
DVD1309	V1	V5
DVD1310	V1	V4
DVD1311	V1	V2
DVD1312	V1	V2
DVD1313	V1	V5
DVD1314	V1	V4
DVD1315	V1	V2
DVD1316	V1	V2
DVD1317	V1	V2
DVD1318	V1	V2
DVD1319	V1	V2
DVD1320	V1	V2
DVD1321	V1	V2
DVD1322	V1	V2
DVD1323	V1	V2
DVD1324	V1	V2
DVD1325	V1	V2
DVD1326	V1	V2
DVD1327	V1	V2
DVD1328	V1	V2
DVD1329	V1	V2
DVD1330	V1	V2
DVD1331	V1	V2
DVD1332	V1	V2
DVD1333	V1	V2
DVD1334	V1	V2
DVD1335	V1	V2
DVD1336	V1	V2
DVD1337	V1	V2
DVD1338	V1	V2
DVD1339	V1	V2
DVD1340	V1	V2
DVD1341	V1	V2
DVD1342	V1	V2
DVD1343	V1	V5
DVD1344	V1	V4
DVD1345	V1	V2
DVD1346	V1	V2
DVD1347	V1	V2
DVD1348	V1	V2

10

20

30

40

ID	重鎖ベクター	軽鎖ベクター
DVD1349	V1	V2
DVD1350	V1	V2
DVD1351	V1	V2
DVD1352	V1	V2
DVD1353	V1	V2
DVD1354	V1	V2
DVD1357	V1	V2
DVD1358	V1	V2
DVD1361	V1	V5
DVD1362	V1	V4
DVD1363	V1	V2
DVD1364	V1	V2
DVD1365	V1	V2
DVD1366	V1	V2
DVD1367	V1	V2
DVD1368	V1	V2
DVD1369	V1	V2
DVD1370	V1	V2

10

20

【0484】

実施例 1.4.4.2: 293細胞における形質移入および発現

DVD-Igタンパク質を生成するために、DVD-Igベクター構築物を293細胞に形質移入する。使用された293の一時的な形質移入の手法は、Durocher et al. (2002) *Nucleic Acids Res.* 30(2): E9およびPhamら(2005) *Biotech. Bioengineering* 90(3): 332-44において公開された方法の変法である。形質移入において使用された試薬には以下のものが含まれる:

- ・130rpm、37°Cおよび5%CO₂に設定された加湿インキュベーター内で使い捨ての三角フラスコにおいて培養されるHEK293-6E細胞(National Research Council Canadaから入手されるEBNA1を安定に発現するヒト胎児腎臓細胞株)。

30

- ・培養液: FreeStyle 293発現培地(Invitrogen 12338-018)+25μg/mLジェネティシン(Geneticin)(G418)(Invitrogen 10131-027)および0.1%Pluronic F-68(Invitrogen 24040-032)。

- ・形質移入培地: FreeStyle 293発現培地+10mMのHEPES(Invitrogen 15630-080)。

- ・ポリエチレンイミン(PEI)保存液: 25kDaの直鎖状PEI(PolyScience)を用いて調製され、-15°C未満で保存される1mg/mL無菌保存溶液、pH 7.0。

40

- ・トリプトン供給培地: FreeStyle 293発現培地中のトリプトンN1(Organotechnie, 19554)の5%w/v無菌保存液。

【0485】

形質移入のための細胞調製: 形質移入の約2-4時間前に、遠心分離によってHEK293-6E細胞を回収し、約100万個の生細胞/mLの細胞密度で培養液中に再懸濁させる。各形質移入について、40mLの細胞懸濁液を使い捨ての250mL三角フラスコに移し、2-4時間インキュベートする。

【0486】

形質移入: 形質移入培地およびPEI保存液を予め室温(RT)に温める。各形質移入

50

について、25 μ g のプラスミドDNAおよび50 μ g のポリエチレンジミン (PEI) を5 mLの形質移入培地と合わせて、15 - 20分間RTにてインキュベートし、DNA : PEI複合体を形成させるようにする。BR3 - Ig形質移入について、25 μ g のBR3 - Igプラスミドを形質移入ごとに用いる。各5 mLのDNA : PEI複合混合物は、予め調製した40 mLの培養物に添加し、130 rpm、37 °Cおよび5% CO₂ に設定した加湿インキュベーターに戻される。20 - 28時間後、5 mLのトリプトン供給培地を各形質移入に添加され、培養を6日間継続する。

【0487】

表11は、293細胞における、mg/Lとして表される親抗体またはDVD - Ig構築物についての収量データを含む。

【0488】

【表 1 1】

表 11:293 細胞における親抗体および DVD-Ig 構築物の収量の一過性発現

親抗体または DVD-Ig ID	N 末端可変ド メイン(VD)	C 末端可変ドメ イン(VD)	発現収量(mg/L)
DVD1311	NGF (配列 2)	EGFR (配列 2)	58.8
DVD1312	EGFR (配列 2)	NGF (配列 2)	17
DVD1313	NGF (配列 2)	IGF1,2	74.6
DVD1314	IGF1,2	NGF (配列 2)	22.2
DVD1315	NGF (配列 2)	RON (配列 1)	92.6
DVD1316	RON (配列 1)	NGF (配列 2)	60.4
DVD1317	NGF (配列 2)	ErbB3 (配列 1)	4
DVD1318	ErbB3 (配列 1)	NGF (配列 2)	10.4
DVD1319	NGF (配列 2)	ErbB3 (配列 2)	0.38
DVD1320	ErbB3 (配列 2)	NGF (配列 2)	39.2
DVD1323	NGF (配列 2)	IGF1R	18.8
DVD1324	IGF1R	NGF (配列 2)	12.8
DVD1325	NGF (配列 2)	HGF	42.2
DVD1326	HGF	NGF (配列 2)	32.4
DVD1327	NGF (配列 2)	VEGF (配列 1)	26
DVD1328	VEGF (配列 1)	NGF (配列 2)	5.8
DVD1329	NGF (配列 2)	DLL4	87.8
DVD1330	DLL4	NGF (配列 2)	110.8
DVD1331	NGF (配列 2)	PIGF	100.4
DVD1332	PIGF	NGF (配列 2)	19.2
DVD1333	NGF (配列 2)	RON (配列 2)	34.6
DVD1334	RON (配列 2)	NGF (配列 2)	50.2
DVD1335	NGF (配列 2)	CD-20	103.4
DVD1336	CD-20	NGF (配列 2)	43.28
DVD1337	NGF (配列 2)	EGFR (配列 1)	101.48
DVD1338	EGFR (配列 1)	NGF (配列 2)	94.52
DVD1339	NGF (配列 2)	HER2	109.4
DVD1340	HER2	NGF (配列 2)	123.6
DVD1349	NGF (配列 2)	c-MET	0.11
DVD1350	c-MET	NGF (配列 2)	0
DVD1351	NGF (配列 2)	NRP1 (配列 1)	115.2
DVD1352	NRP1 (配列 1)	NGF (配列 2)	8.8
DVD1361	NGF (配列 2)	ErbB3 (配列 3)	28.8
DVD1362	ErbB3 (配列 3)	NGF (配列 2)	73.8
DVD1369	NGF (配列 2)	EGFR (配列 3)	38.6
DVD1370	EGFR (配列 3)	NGF (配列 2)	41.6

10

20

30

40

【0489】

すべての DVD は、293 細胞中で良好に発現された。DVD は、プロテイン A カラム上で容易に精製することができた。多くの場合において、293 細胞の上清から 5 mg / L 超の精製された DVD - Ig を容易に得ることができた。

【0490】

実施例 1.4.5 : A / B DVD Ig の特徴付けおよび誘導選択

抗 A / B DVD - Ig の結合親和性は、タンパク質 A およびタンパク質 B に対して、Biacore で分析される。Biacore による多重結合研究によって DVD - Ig の四価特性を調べる。一方、タンパク質 A およびタンパク質 B に対する DVD - Ig の中

50

和効力は、それぞれ、本明細書中に記載されるバイオアッセイによって評価される。元の親 m A b の親和性および可能性を最も保持している D V D - I g 分子は、各 m A b について、本願明細書に記載された詳細な物理化学的および生物分析的（ラット P K）特徴付けに関して選択される。分析の収集に基づいて、最終の誘導 D V D - I g は、安定な C H O 細胞株の開発に進められ、C H O 誘導材料は、安定性、カニクイザルにける薬物動態および有効性研究、ならびにプレフォーミュレーション活性において採用される。

【 0 4 9 1 】

[実施例 2]

二重可変ドメイン免疫グロブリン（ D V D - I g ）の生成および特徴付け

既知のアミノ酸配列を有する親抗体を用いた二重可変ドメイン免疫グロブリン（ D V D - I g ）は、 D V D - I g 可変重鎖および D V D - I g 可変軽鎖配列をコードするポリヌクレオチド断片を合成し、実施例 1 . 4 . 4 . 1 に従って p H y b C - D 2 ベクターにその断片をクローニングすることによって生成された。 D V D - I g 構築体は、実施例 1 . 4 . 4 . 2 に記載される 2 9 3 細胞にクローニングされ、発現された。標準的な方法に従って D V D - I g タンパク質を精製した。機能的特徴付けは、示された実施例 1 . 1 . 1 および 1 . 1 . 2 に記載された方法に従って決定された。 D V D - I g の D V D - I g V H および V L 鎖は以下に示される。

10

【 0 4 9 2 】

実施例 2 . 1 : N G F （配列 2）および M T X D V D - I g の作製

【 0 4 9 3 】

20

【表 1 2】

表 12

配列番号	DVD 可変 ドメイン 名	外側可変 ドメイン 名	内側可変ド メイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
96	DVD1307H	AB118VH	AB119VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNV NWVRQAPGKGLEWVGGVWAGGATDYNALKSRFT ISRDNKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGYS SSTLYAMDAWGQGTLVTVSS ASTKGP DVQLQESG PGLVKPSQSLSLTCTVTGFSITSPYAWNWRQFP GNTLEWMGYISYRGSTTHHPSLKSRLSITRDTSK NQFFLQLNSVTTEDTATYFCSSYGNYGAYSGQGT LVTVSA
97	DVD1307L	AB118VL	AB119VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASEDIYNALA WYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTGVPSRFGSGSG TDYTLTISSSLQPEDFATYFCQHYFHYPRTEGQGT KVEIKR TVAAP DVLLTQIPLSLPVSLGDQASIS RSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVS TRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDLGVY YCFQGSHPVPLTFGAGTQLELKR
98	DVD1308H	AB119VH	AB118VH	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGFSITSPYA WNWIRQFPNGTLEWMGYISYRGSTTHHPSLKSRI SITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYFCSSYGN YAYSGQGTLVTVSA ASTKGP EVQLVESGGGLVQ PGLVKPSQSLSLTCTVTGFSITSPYAWNWRQFP GGSLRLSCAASGFSLTNNNVNWVRQAPGKGLEWV GGVWAGGATDYNALKSRFTISRDNKNTAYLQM NSLRAEDTAVYYCARDGGYSSTLYAMDAWGQGT LVTVSS
99	DVD1308L	AB119VL	AB118VL	DVLLTQIPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNG NTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSTRFSGVPDRFS GSGSGTDFTLTKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPVPLT FGAGTQLELKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGR VTITCRASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNTD TLHTGVPSRFGSGSGSGTDYTLTISSSLQPEDFATY FCQHYFHYPRTEGQGTKVEIKR

10

20

30

【 0 4 9 4 】

実施例 2 . 2 : N G F (配列 2) および N K G 2 D DVD - I g の作製

【 0 4 9 5 】

【表 13】

表 13

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
100	DVD1309H	AB118VH	AB121VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNV NWVRQAPGKGLEWVGGVWAGGATDYN SALKSRFT ISRDN SKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARDGGYS SSTLYAMD AWGQGT LVTVSS ASTKGP QVQLVESG GGLVKPGGSLRLS CAASGF TFSYGMHWVRQAPG KGLEWVAFIRYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SK NTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKDRGLGDGT YFDY WGQGT TTVTVSS
101	DVD1309L	AB118VL	AB121VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASEDIYNALA WYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTGVPSRFGSGSG TDYTLTISSLPEDFATYFCQHYFHYPRTFGQGT KVEIKR TVAAP QSALTQPASVSGSPGQSITISCS GSSSNIGNAVNWYQQLPKAPKLLIYD DLLPS GVSDRFGSGSKSGTSAFLAISGLQSEDEADYYCAA WDDSLNGP VFGGGTKLTVLG
102	DVD1310H	AB121VH	AB118VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGF TFSYGM HWVRQAPGKGLEWVAFIRYDGSNKYYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKDRGL GDGT YFDYWGQGT TTVTVSS ASTKGPE VQLVESGG GLVQPGGSLRLS CAASGF SLTNNNVNWVRQAPGK GLEWVGGVWAGGATDYN SALKSRFTISRDN SKNT AYLQMN SLRAEDTAVYYCARDGGYSSTLYAMD A WGQGT LVTVSS
103	DVD1310L	AB121VL	AB118VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCSGSSSNIGNAV NWYQQLPKAPKLLIYD DLLPSGVSDRFGSGSKS GTS AFLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGP VF GGTKLTVLG QPKAAP DIQMTQSPSSLSASVGRV TITCRASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNTDT LHTGVPSRFGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYF CQHYFHYPRTFGQGT KVEIKR

10

20

30

【0496】

実施例 2.3 : NGF (配列 2) および EGF R (配列 2) DVD - Ig の作製

【0497】

【表 14】
表 14

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
104	DVD1311H	AB118VH	AB033VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFSLTNNNV NWVRQAPGKGLEWVGGVWAGGATDYN SALKSRFT ISRDN SKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARDGGYS SSTLYAMD AWGQGT LVTVSS ASTKGP QVQLKQSG PGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPG KGLEWLGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKS QVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWG QGT LVTVSA
105	DVD1311L	AB118VL	AB033VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEDIYNALA WYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTGVPSRFSGSGSG TDYTLTISSSLQPEDFATYFCQHYFHYPRTFGQGT KVEIKR TVAAP DILLTQSPVILSVSPGERVSEFSC RASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISG IPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQN NNWPTTFGAGTKLELKR
106	DVD1312H	AB033VH	AB118VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTNYGV HWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPFTSRLS INKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTY DYEFAYWGQGT LVTVSA ASTKGP EVQLVESGGGL VQPGGSLRRLSCAASGFSLTNNNVNWVRQAPGKGL EWVGGVWAGGATDYN SALKSRFTISRDN SKNTAY LQMN SLRAEDTAVYYCARDGGYSSSTLYAMD AWG QGT LVTVSS
107	DVD1312L	AB033VL	AB118VL	DILLTQSPVILSVSPGERVSEFSCRASQSIGTNIH WYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSG TDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNWPTTFGAGT KLELKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC RASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTG VPSRFSGSGSGTDYTLTISSSLQPEDFATYFCQHY FHYPRTFGQGTKVEIKR

10

20

30

【 0 4 9 8 】

実施例 2 . 4 : N G F (配列 2) および I G F 1、2 DVD - I g の作製

【 0 4 9 9 】

【表 15】
表 15

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
108	DVD1313H	AB118VH	AB010VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNV NWVRQAPGKGLEWVGGVWAGGATDYNALKSRFT ISRDNKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGYS SSTLYAMDAWGQGTTLVTVSS ASTKGP QVQLVQSG AEVKKPGASVKVSKKASGYTFSTYDINWVRQATG QGLEWMGWMNPNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRNTSI STAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPYYYYYGMVDVW GQGTTLVTVSS
109	DVD1313L	AB118VL	AB010VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASEDIYNALA WYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTGVPSRFGSGSG TDYTLTISSLQPEDFATYFCQHYFHYPRTEFGQGT KVEIKR TVAAP QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCS GSSSNIENNHVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPS GIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCET WDTLSAGRVPFGGKTLTVLG
110	DVD1314H	AB010VH	AB118VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASGYTFSTYDI NWVRQATGQGLEWMGWMNPNPNSGNTGYAQKFQGRV TMTRNTSI STAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPYY YYYYGMVDVWQGTTLVTVSS ASTKGPE VQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNVNWVRQAPGK LEWVGGVWAGGATDYNALKSRFTISRDNKNTA YLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGYSSSTLYAMDAW GQGTTLVTVSS
111	DVD1314L	AB010VL	AB118VL	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIENNHV SWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKS GTSATLGITGLQTGDEADYYCETWDTLSAGRVP GGGKTLTVLG QPKAAP DIQMTQSPSSLSASVGR VTITCRASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNTD TLHTGVPSRFGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATY FCQHYFHYPRTEFGQGTKVEIKR

10

20

30

【0500】

実施例 2.5 : NGF (配列 2) および RON (配列 1) DVD-I g の作製

【0501】

【表 16】

表 16

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
112	DVD1315H	AB118VH	AB005VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNV NWVRQAPGKGLEWVGGVWAGGATDYN SALKSRFT ISRDN SKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARDGGYS SSTLYAMDAWGQGLTVTVSS ASTKGPEVQLVQSG GGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SK NTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARFSGWPNNYYYYG MDVWGQGLTVTVSS
113	DVD1315L	AB118VL	AB005VL	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASEDIYNALA WYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTGVPSRFSGSGSG TDYTLTISSSLQPEDFATYFCQHYFHYPRTFGQGT KVEIKR TVAAP DVVM TQSPLSLPVTGPGE PASISC RSSQSL LHSNGFN YVDWYLQKPGQSPHLLIYFGS YRASGVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDVGVY YCMQALQTPPWTFGQGTKVEIRR
114	DVD1316H	AB005VH	AB118VH	EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM HWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARFSGW PNNYYYYGMDVWGQGLTVTVSS ASTKGPEVQLVE SGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNVNWVRQA PGKGLEWVGGVWAGGATDYN SALKSRFTISRDN S KNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARDGGYSSTLYA MDAWGQGLTVTVSS
115	DVD1316L	AB005VL	AB118VL	DVVM TQSPLSLPVTGPGE PASISCRSSQSL LHSNG FN YVDWYLQKPGQSPHLLIYFGSYRASGVPDRFS GSGSGTDFTLTKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPPW TFGQGTKVEIRR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNT DTLHTGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSSLQPEDFAT YFCQHYFHYPRTFGQGTKVEIKR

10

20

30

【0502】

実施例 2.6 : NGF (配列 2) および ErbB3 (配列 1) DVD-Ig の作製

【0503】

【表 17】

表 17

配列番号	DVD 可変 ドメイン 名	外側可変 ドメイン 名	内側可変ド メイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
116	DVD1317H	AB118VH	AB062VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNV NWVRQAPGKGLEWVGGVWAGGATDYN SALKSRFT ISRDN SKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARDGGYS SSTLYAMD AWGQGLVTVSS ASTKGP QVQLQQWG AGLLK PSETLSLTC AVYGGSFSGYYWSWIRQPPG KGLEWIGEIN HSGSTNYNPSL KSRVTISVETSKN QFSLKLS SVTAADTAVYYCARDKWTWYFDLWGRG TLVTVSS
117	DVD1317L	AB118VL	AB062VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASEDIYNALA WYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTGVPSRFSGSGSG TDYTLTISSLPEDFATYFCQHYFHYPRTFGQGT KVEIKR TVAAP DIEMTQSPDSLAVSLGERATINC RSSQSVLYSSSNRNYLAWYQQNPGQPPKLLIYWA STRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAV YYCQQYYSTPRTFGQGTKVEIKR
118	DVD1318H	AB062VH	AB118VH	QVQLQQWGAGLLK PSETLSLTC AVYGGSFSGYYW SWIRQPPGKGLEWIGEIN HSGSTNYNPSL KSRVT ISVETSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCARDKWTW YFDLWGRGTLVTVSS ASTKGPE VQLVESGGGLVQ PGGSLRLS CAASGFSLTNNNVNWVRQAPGKGLEW VGGVWAGGATDYN SALKSRFTISRDN SKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDGGYSSSTLYAMD AWGQGL TLVTVSS
119	DVD1318L	AB062VL	AB118VL	DIEMTQSPDSLAVSLGERATINC RSSQSVLYSSS NRNYLAWYQQNPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRF SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPR TFGQGTKVEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNT DTLHTGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFAT YFCQHYFHYPRTFGQGTKVEIKR

10

20

30

【0504】

実施例 2.7 : NGF (配列 2) および ErbB3 (配列 2) DVD-Ig の作製

【0505】

【表 18】

表 18

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
120	DVD1319H	AB118VH	AB063VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNV NWVRQAPGKGLEWVGGVWAGGATDYNALKSRFT ISRDN SKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARDGGYS SSTLYAMD AWGQGT LVTVSS ASTKGPEVQLVESG GGLVQPGGSLRLSCAASGF TFSIYSMNWVRQAPG KGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDN AK NSLYLQMN SLRDEDTAVYYCARDRGDFDAFDIWG QGTMVTVSS
121	DVD1319L	AB118VL	AB063VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYNALA WYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTGVPSRFSGSGS TDYTLTISSLPEDFATYFCQHYFHYPRTFGQGT KVEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC QASQDITNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETG VPSRFSGSGSDTFTFTISSLPEDIATYNCQQC ENFPITFGQGRLEIKR
122	DVD1320H	AB063VH	AB118VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFSIYSM NWVRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRF TISRDN AKNSLYLQMN SLRDEDTAVYYCARDRGD FDAFDIWGQGTMTVSS ASTKGPEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNVNWVRQAPGKGL EWVGGVWAGGATDYNALKSRFTISRDN SKNTAY LQMN SLRAEDTAVYYCARDGGYSSTLYAMD AWG QGT LVTVSS
123	DVD1320L	AB063VL	AB118VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS TDFTFTISSLPEDIATYNCQQCENFPITFGQGT RLEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTG VPSRFSGSGSDYTLTISSLPEDFATYFCQHY FHYPRTFGQGT KVEIKR

10

20

30

【0506】

実施例 2.8 : NGF (配列 2) および CD - 3 (配列) DVD - Ig の作製

【0507】

【表 19】
表 19

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列
				1234567890123456789012345678901234
124	DVD1321H	AB118VH	AB002VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNV NWVRQAPGKGLEWVGGVWAGGATDYN SALKSRFT ISRDN SKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARDGGYS SSTLYAMD AWGQGT LVTVSS ASTKGP QVQLQQSG AELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRP GQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLT TDKSS STAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWG QGTTLTVSS
125	DVD1321L	AB118VL	AB002VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASEDIYNALA WYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTGVP SRFSGSGS G TDYTLTISLQPEDFATYFCQHYFHYPRTEFGQGT KVEIKR TVAAP QIVLTQSPA IMSASPG EKVTMT CRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASG V PYRFSGSGSGT SYSLTIS SMEAEDAATYYCQQWS SNPLTFGSGTKLEINR
126	DVD1322H	AB002VH	AB118VH	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTM HWVKQRP GQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKA TLTDKSS STAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDD HYCLDYWGQGTTLTVSS ASTKGP EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFSLTNNVNWVRQAPGKGL EWVGGVWAGGATDYN SALKSRFTISRDN SKNTAY LQMN SLRAEDTAVYYCARDGGYSSTLYAMD AWG QGT LVTVSS
127	DVD1322L	AB002VL	AB118VL	QIVLTQSPA IMSASPG EKVTMTCRASSSVSYMNW YQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGT SYSLTIS SMEAEDAATYYCQQWSNPLTFGSGTK LEINR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCR ASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTG V PSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYFCQHYF HYPRTEFGQGT KVEIKR

10

20

30

【 0 5 0 8 】

実施例 2 . 9 : N G F (配列 2) および I G F R DVD - I g の作製

【 0 5 0 9 】

【表 2 0】

表 20

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列
				1234567890123456789012345678901234
128	DVD1323H	AB118VH	AB011VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFSLTNNNV NWVRQAPGKGLEWVGGVWAGGATDYN SALKSRFT ISRDN SKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARDGGYS SSTLYAMD AWGQGLVTVSS ASTKGPEVQL ESG GGLVQP GGSLRRLSCTASGFTFSSYAMNWVRQAPG KGLEWVSAISGSGGTTFYADSVKGRFTISRDN SR TTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKDLGWSDSYYYYY GMDVWGQGLVTVSS
129	DVD1323L	AB118VL	AB011VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEDIYNALA WYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTGVPSRFSGSGSG TDYTLTISSLPEDFATYFCQHYFHYPRTFGQGT KVEIKR TVAAP DIQMTQFPSSLSASVGDRTITC RASQGI RNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASRLHRG VPSRFSGSGSGTEFTLTISSLPEDFATYYCLQH NSYPCSFQGT KLEIKR
130	DVD1324H	AB011VH	AB118VH	EVQLLES GGGLVQP GGSLRRLSCTASGFTFSSYAM NWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGTTFYADSVKGRF TISRDN SR TTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKDLGW SDSYYYYYGMDVWGQGLVTVSS ASTKGPEVQLV ESGGGLVQP GGSLRRLSCAASGFSLTNNNVNWVRQ APGKGLEWVGGVWAGGATDYN SALKSRFTISRDN SKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARDGGYSSSTLY AMD AWGQGLVTVSS
131	DVD1324L	AB011VL	AB118VL	DIQMTQFPSSLSASVGDRTITCRASQGI RNDLG WYQQKPGKAPKRLIYAASRLHRGVPSRFSGSGSG TEFTLTISSLPEDFATYYCLQHNSYPCSFQGT KLEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC RASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTG VPSRFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYFCQHY FHYPRTFGQGT KVEIKR

10

20

30

【0510】

実施例 2 . 1 0 : N G F (配列 2) および H G F DVD - I g の作製

【0511】

【表 2 1】

表 21

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
132	DVD1325H	AB118VH	AB012VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNV NWVRQAPGKGLEWVGGVWAGGATDYN SALKSRFT ISRDN SKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARDGGYS SSTLYAMD AWGQGLTVTVSS ASTKGP QVQLVESG GGLVKP GGS LRLS CAASGFTFSDYYMSWIRQAPG KGLEWVSYI SSSGSTIYYADSVKGRFTISRDN AK NSLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDEYNSGWYVLF D YWGQGLTVTVSS
133	DVD1325L	AB118VL	AB012VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEDIYNALA WYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTGVPSRFGSGSG TDYTLTISLQPEDFATYFCQHYFHYPRFTFGQGT KVEIKR TVAAP DIQMTQSPSSVSASVGDRTITC RASQGISSWLA WYQQKPGKAPNLLIYEASSLQSG VPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQA NGFPWTFGQGTKVEIKR
134	DVD1326H	AB012VH	AB118VH	QVQLVESGGGLVKP GGS LRLS CAASGFTFSDYYM SWIRQAPGKGLEWVSYI SSSGSTIYYADSVKGRF TISRDN AKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDEYN SGWYVLF DYWGQGLTVTVSS ASTKGPE VQLVESG GGLVQPGGSLRLS CAASGFSLTNNNVNWVRQAPG KGLEWVGGVWAGGATDYN SALKSRFTISRDN SKN TAYLQMN SLRAEDTAVYYCARDGGYSSSTLYAMD AWGQGLTVTVSS
135	DVD1326L	AB012VL	AB118VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISSWLA WYQQKPGKAPNLLIYEASSLQSGVPSRFGSGSG TDFTLTISLQPEDFATYYCQQA NGFPWTFGQGT KVEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC RASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTG VPSRFGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYFCQHY FHYPRFTFGQGTKVEIKR

10

20

30

【 0 5 1 2 】

実施例 2 . 1 1 : N G F (配列 2) および V E G F (配列 1) DVD - I g の作製

【 0 5 1 3 】

【表 2 2】

表 22

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
136	DVD1327H	AB118VH	AB014VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNV NWVRQAPGKGLEWVGGVWAGGATDYNALKSRFT ISRDNKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGYS SSTLYAMDAGWQGTTLVTVSS ASTKGPEVQLVESG GGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPG KGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSK STAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYGGSSHWYF DVWGQGTTLVTVSS
137	DVD1327L	AB118VL	AB014VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYNALA WYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTGVPSRFSGSGSG TDYTLTISSLPEDFATYFCQHYFHYPRFTFGQGT KVEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC SASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQY STVPWTFGQGTKVEIKR
138	DVD1328H	AB014VH	AB118VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGM NWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRF TFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHY YGGSSHWYFDVWGQGTTLVTVSS ASTKGPEVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNVNWVRQAP GKGLEWVGGVWAGGATDYNALKSRFTISRDNK NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGYSSTLYAM DAWGQGTTLVTVSS
139	DVD1328L	AB014VL	AB118VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLN WYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLPEDFATYYCQYSTVPWTFGQGT KVEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTG VPSRFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYFCQHY FHYPRFTFGQGTKVEIKR

10

20

30

【 0 5 1 4 】

実施例 2 . 1 2 : N G F (配列 2) および D L L 4 DVD - I g の作製

【 0 5 1 5 】

【表 2 3】

表 23

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
140	DVD1329H	AB118VH	AB015VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNV NWVRQAPGKGLEWVGGVWAGGATDYN SALKSRFT ISRDN SKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARDGGYS SSTLYAMD AWGQGLTVTVSS ASTKGPEVQLVESG GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWISWVRQAPG KGLEWVGYISPNSGFTYYADSVKGRFTISADTSK NTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARDNFGGYFDYWGQ GTLTVTVSS
141	DVD1329L	AB118VL	AB015VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEDIYNALA WYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTGVPSRFSGSGSG TDYTLTISSLQPEDFATYFCQHYFHYPRTEFGQGT KVEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC RASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ SYTGTVTFGQGTKVEIKR
142	DVD1330H	AB015VH	AB118VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWI SWVRQAPGKGLEWVGYISPNSGFTYYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARDNFG GYFDYWGQGLTVTVSS ASTKGPEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFSLTNNNVNWVRQAPGKGLE WVGGVWAGGATDYN SALKSRFTISRDN SKNTAYL QMN SLRAEDTAVYYCARDGGYSSSTLYAMD AWGQ GTLTVTVSS
143	DVD1330L	AB015VL	AB118VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVSTAVA WYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTGTVTFGQG TKVEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRTIT CRASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHT GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQ YFHYPRTEFGQGTKVEIKR

10

20

30

【0516】

実施例 2.13 : N G F (配列 2) および P 1 G F DVD - I g の作製

【0517】

【表 2 4】

表 24

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
144	DVD1331H	AB118VH	AB047VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFSLTNNNV NWVRQAPGKGLEWVGGVWAGGATDYN SALKSRFT ISRDN SKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARDGGYS SSTLYAMD AWGQGT LVTVSS ASTKGP QVQLQSG AELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKLAPG QGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATLTIDTSS STAYMQLSSLTSEDTAVYFCVRDSPFFDYWGQGT LLTVSS
145	DVD1331L	AB118VL	AB047VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASEDIYNALA WYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTGVPSRFSGSGSG TDYTLTISSLPEDFATYFCQHYFHYPRTFGQGT KVEIKR TVAAP DIVLTQSPDSLAVSLGERVTMNC KSSQSL LNSGMRK SFLAWYQQKPGQSPKLLIYWA STRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDVAV YYCKQSYHLFTFGSGTKLEIKR
146	DVD1332H	AB047VH	AB118VH	QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYI NWKVLAPGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKA TLTIDTSSSTAYMQLSSLTSEDTAVYFCVRDSPF FDYWGQGTLLTVSS ASTKGP EVQLVESGGGLVQP GGSLRRLSCAASGFSLTNNNVNWVRQAPGKGLEWV GGVWAGGATDYN SALKSRFTISRDN SKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARDGGYSSTLYAMD AWGQGT LVTVSS
147	DVD1332L	AB047VL	AB118VL	DIVLTQSPDSLAVSLGERVTMNC KSSQSL LNSGM RKSFLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRF TSGSGTDFTLTISVQAEDVAVYYCKQSYHLFT FGSGTKLEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGR VTITCRASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNTD TLHTGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFATY FCQHYFHYPRTFGQGTKVEIKR

10

20

30

【0518】

実施例 2 . 1 4 : N G F (配列 2) および R O N (配列 2) DVD - I g の作製

【0519】

【表 2 5】
表 25

配列番号	DVD 可変 ドメイン 名	外側可変 ドメイン 名	内側可変ド メイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
148	DVD1333H	AB118VH	AB034VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFSLTNNNV NWVRQAPGKGLEWVGGVWAGGATDYN SALKSRFT ISRDN SKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARDGGYS SSTLYAMDAWGQGLVTVSS ASTKGP QVQLQESG PGLVKPSEILSLTCTVSGGSIS SHYWSWVRQPPG KGLEWIGYIYSGSTNYNPSLKS RVTISVDTSKN QFSLNLSSVTAADTAVYYCARI PNYYDRSGYYPG YWFYFDLWGRGTLVTVSS
149	DVD1333L	AB118VL	AB034VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASEDIYNALA WYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTGVPSRFSGSGSG TDYTLTISSSLQPEDFATYFCQHYFHYPRTEFGQGT KVEIKR TVAAP QAVLTQPSSLSAPP GASASLTCT LRSGFNVD SYRISWYQQKPGSPPQYLLRYKSDSD KQQSGVPSRFSGSKDASANAGILLISGLQSEDE ADYYCMIWHSSAWVFGGGTKLTVLR
150	DVD1334H	AB034VH	AB118VH	QVQLQESGPGPLVKPSEILSLTCTVSGGSIS SHYV SWVRQPPGKGLEWIGYIYSGSTNYNPSLKS RVT ISVDTSKNQFSLNLSSVTAADTAVYYCARI PNYY DRSGYYPGYWFYFDLWGRGTLVTVSS ASTKGPEVQ LVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFSLTNNNVNWV RQAPGKGLEWVGGVWAGGATDYN SALKSRFTISR DNSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARDGGYSST LYAMDAWGQGLVTVSS
151	DVD1334L	AB034VL	AB118VL	QAVLTQPSSLSAPP GASASLTCTLRSGFNVD SYR ISWYQQKPGSPPQYLLRYKSDSDKQQSGVPSRF SGSKDASANAGILLISGLQSEDEADYYCMIWHSS AWVFGGGTKLTVLR TVAAP DIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIY NTDTLHTGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSSLQPEDF ATYFCQHYFHYPRTEFGQGTKVEIKR

10

20

30

【 0 5 2 0 】

実施例 2 . 1 5 : N G F (配列 2) および C D - 2 0 D V D - I g の作製

【 0 5 2 1 】

【表 26】

表 26

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列
				1234567890123456789012345678901234
152	DVD1335H	AB118VH	AB001VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNV NWVRQAPGKGLEWVGGVWAGGATDYNALKSRFT ISRDNKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGYS SSTLYAMDAWGQGLVTVSS ASTKGP QVQLQPG AELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPG RGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSS STAYMQLSSTLSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNV WGAGTTVTVSA
153	DVD1335L	AB118VL	AB001VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASEDIYNALA WYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTGVPSRFSGSGS TDYTLTISSLQPEDFATYFCQHYFHYPRTFGQGT KVEIKR TVAAP QIVLSQSPAILSPSPGKVTMT RASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPIYATSNLASGV PVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWT SNPPTFGGGTKLEIKR
154	DVD1336H	AB001VH	AB118VH	QVQLQPGAEELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNM HWVKQTPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKA TLTADKSSSTAYMQLSSTLSEDSAVYYCARSTYY GGDWYFNVWGAGTTVTVSA ASTKGP EVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNVNWVRQAPGK GLEWVGGVWAGGATDYNALKSRFTISRDNKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGYSSTLYAMDA WGQGLVTVSS
155	DVD1336L	AB001VL	AB118VL	QIVLSQSPAILSPSPGKVTMTCRASSSVSYIHW FQQKPGSSPKPIYATSNLASGVPVRFSGSGSGT SYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTK LEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCR ASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTGV PSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQHYF HYPRTFGQGTKVEIKR

10

20

30

【0522】

実施例 2 . 16 : NGF (配列 2) および EGF R (配列 1) DVD - I g の作製

【0523】

【表 27】

表 27

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
156	DVD1337H	AB118VH	AB003VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFSLTNNNV NWVRQAPGKGLEWVGGVWAGGATDYN SALKSRFT ISRDN SKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARDGGYS SSTLYAMD AWGQGLTVTVSS ASTKGP QVQLQESG PGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGDYYWTWIRQS PGKLEWIGHIYYSGNTNYP SLKSR LTI SIDTS KTQFSLKLSSVTAADTAIYYCVRDRVTGAFDIWG QGTMTVTVSS
157	DVD1337L	AB118VL	AB003VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEDIYNALA WYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTGVPSRFSGSGSG TDYTLTISSLPEDFATYFCQHYFHYPRTFGQGT KVEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC QASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETG VPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYFCQHF DHLPLAFGGGTKVEIKR
158	DVD1338H	AB003VH	AB118VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSVSSGDY YWTWIRQSPGKLEWIGHIYYSGNTNYP SLKSR LTI SIDTSKTQFSLKLSSVTAADTAIYYCVRDRV TGAFDIWGQGTMTVTVSS ASTKGPE VQLVESGGGL VQPGGSLRRLSCAASGFSLTNNNVNWVRQAPGKGL EWWGGVWAGGATDYN SALKSRFTISRDN SKNTAY LQMN SLRAEDTAVYYCARDGGYSSTLYAMD AWG QGTMTVTVSS
159	DVD1338L	AB003VL	AB118VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQDISNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSG TDFTFTISSLPEDIATYFCQHF DHLPLAFGGGT KVEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC RASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTG VPSRFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYFCQHY FHYPRTFGQGTVEIKR

10

20

30

【0524】

実施例 2.17 : NGF (配列 2) および HER-2 DVD-I g の作製

【0525】

【表 28】

表 28

配列番号	DVD 可変 ドメイン 名	外側可変 ドメイン 名	内側可変ド メイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
160	DVD1339H	AB118VH	AB004VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFSLTNNNV NWVRQAPGKGLEWVGGVWAGGATD YNSALKSRFT ISRDN SKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARDGGYS SSTLYAMDAWGQGLVTVSS ASTKGPE EVQLVESG GGLVQPGGSLRLS CAASGFNIKDTYIHWVRQAPG KGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTI SADTSK NTAYLQMN SLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDY WGQGLVTVSS
161	DVD1339L	AB118VL	AB004VL	DIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRASEDIY NALAWYQOKPGKAPKLLIYNTDTLHTG VPSRFSGSGS GTDYTLTIS SLQPEDFATYFCQHYFHYPRTEFGQGT KVEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASV GDRVTITC RASQDVNTAVAWYQOKPGKAPKLLIY SASFLYSG VPSRFSGSRSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQH YTPPTFGQGTKVEIKR
162	DVD1340H	AB004VH	AB118VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFNIKDTYI HWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYAD SVKGRFTI SADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCSRWGGD GFYAMDYWGQGLVTVSS ASTKGPE EVQLVESGGG LVQPGGSLRLS CAASGFSLTNNNVNWVRQAPGK GLEWVGGVWAGGATDYN SALKSRFTISRDN SKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARDGGYSSTLYAMDAW GQGLVTVSS
163	DVD1340L	AB004VL	AB118VL	DIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRASQDVNTA VAWYQOKPGKAPKLLIY SASFLYSGVPSRFSGSRSG TDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQHYTPPTFGQGT KVEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASV GDRVTITC RASEDIYNALAWYQOKPGKAPKLLIY NTDTLHTG VPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYFCQHY FHYPRTEFGQGTKVEIKR

10

20

30

【0526】

実施例 2.18 : NGF (配列 2) および CD - 19 DVD - Ig の作製

【0527】

【表 29】
表 29

配列番号	DVD 可変 ドメイン 名	外側可変 ドメイン 名	内側可変ド メイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
164	DVD1341H	AB118VH	AB006VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFSLTNNNV NWVRQAPGKGLEWVGGVWAGGATD YNSALKSRFT ISRDN SKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARDGGYS SSTLYAMD AWGQGLVTVSS ASTKGP QVQLQ QSG AELVRPGSSVKI SCKASGYAFSSYWMNWVQRPG QGLEWIGQIWP GDGDTNYNGKFKGKATLT ADESS STAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETT TVGRYYA MDYWGQGSVTVSS
165	DVD1341L	AB118VL	AB006VL	DIQMTQSPSSLSASV GDRVITITCRASEDIYN ALAWYQKPGKAPKLLIYNTDTLHTG VPSRFRSGSGS GTDYTLTISS LQPEDFATYFCQHYFHYPRTFGQGT KVEIKR TVAAP DILLTQTPASLAVSLG QRATISCKASQ SVDYDGD SYLNWYQQIPGQPPKLLIY DASN LVSGIPPRFSGSGSGTDFTLN IHPVEKVDAA TYHCQQSTEDPWT FGGKLEIKR
166	DVD1342H	AB006VH	AB118VH	QVQLQQSGAELV RPGSSVKI SCKASGYAFSSYWM NWVQRPGQGLEWIGQIWP GDGDTNYNGKFKGKA TLT ADESSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETT TVGRYYAM DYWGQGSVTVSS ASTKGP EVQLVE SGGGLVQP GGSLRLS CAASGFSLTNNNVNWVRQA PGKGLEWVGGVWAGGATD YNSALKSRFTISRDN SKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARDGGYS SSTLYAMD AWGQGLVTVSS
167	DVD1342L	AB006VL	AB118VL	DILLTQTPASLAVSLG QRATISCKASQ SVDYDGD SYLNWYQQIPGQPPKLLIY DASN LVSGIPPRFSGSGSGTDFTLN IHPVEKVDAA TYHCQQSTEDPWT FGGKLEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASV GDRV TITCRASEDIYNALAWYQKPGKAPKLLIYNTDT LHTGVPSRFRSGSGSGTDYTLTISS LQPEDFATYFCQHYFHYPRTFGQGT KVEIKR

10

20

30

【 0 5 2 8 】

実施例 2 . 1 9 : N G F (配列 2) および C D - 8 0 D V D - I g の作製

【 0 5 2 9 】

【表 30】

表 30

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
168	DVD1343H	AB118VH	AB007VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNV NWVRQAPGKGLEWVGGVWAGGATDYN SALKSRFT ISRDN SKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARDGGYS SSTLYAMD AWGQGT LVTVSS ASTKGP QVQLQESG PGLVKPSETLSLTCAVSGGSI SGGYGGWIRQPP GKGLEWIGSFYSSSGNTYYNPSLKSQVTISTDTS KNQFSLKLN SMTAADTAVYYCVRDR LFSVVG MVY NNWFDVWGPGVLTVSS
169	DVD1343L	AB118VL	AB007VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASEDIYNALA WYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTGVPSRFSGSGSG TDYTLTISSLPEDFATYFCQHYFHYPRTFGQGT KVEIKR TVAAP ESALTQPPSVSGAPGQVTISCT GTSNIGGYDLHWYQQLPGTAPKLLIYDINKRPS GISDRFSGSKSGTAASLAITGLQTEDEADYYCQS YDSSLNAQVFGGGTRTLTVLG
170	DVD1344H	AB007VH	AB118VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGGSI SGGYG WGWIRQPPGKGLEWIGSFYSSSGNTYYNPSLKSQ VTISTDTSKNQFSLKLN SMTAADTAVYYCVRDR L FSVVG MVYNNWFDVWGPGVLTVSS ASTKGP EVQ LVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNVNWV RQAPGKGLEWVGGVWAGGATDYN SALKSRFTISR DNSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARDGGYSST LYAMD AWGQGT LVTVSS
171	DVD1344L	AB007VL	AB118VL	ESALTQPPSVSGAPGQVTISCTGTSNIGGYDL HWYQQLPGTAPKLLIYDINKRPSGISDRFSGSKS GTAASLAITGLQTEDEADYYCQSYDSSLNAQVFG GGTRTLTVLG QPKAAP DIQMTQSPSSLSASVGRV TITCRASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNTDT LHTGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYF CQHYFHYPRTFGQGTKVEIKR

10

20

30

【0530】

実施例 2.20 : NGF (配列 2) および CD - 22 DVD - Ig の作製

【0531】

【表 3 1】
表 31

配列番号	DVD 可変 ドメイン 名	外側可変 ドメイン 名	内側可変ド メイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
172	DVD1345H	AB118VH	AB008VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNV NWVRQAPGKGLEWVGGVWAGGATDYN SALKSRFT ISRDN SKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARDGGYS SSTLYAMDAWGQGLTVTVSS ASTKGP QVQLVQSG AEVKKPGSSVKV SCKASGYTF TSYWLHWVRQAPG QGLEWIGYINPRNDYTEYNQNFKDKATITADEST NTAYMELSSLRSEDTAFYFCARRDITTFYWGQGT TVTVSS
173	DVD1345L	AB118VL	AB008VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEDIYNALA WYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTGVPSRFGSGSG TDYTLTISLQPEDFATYFCQHYFHYPRTFGQGT KVEIKR TVAAP DIQLTQSPSSLSASVGDRTMSC KSSQSVLYSANHKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYWA STRESGVPSRFGSGSGTDFTFTISSLQPEDIAT YYCHQYLSWTFGGGTKLEIKR
174	DVD1346H	AB008VH	AB118VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTF TSYWL HWVRQAPGQGLEWIGYINPRNDYTEYNQNFKDKA TITADESTNTAYMELSSLRSEDTAFYFCARRDIT TFYWGQGT TVTVSS ASTKGPE VQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFSLTNNNVNWVRQAPGKGLEWV GGVWAGGATDYN SALKSRFTISRDN SKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDGGYSSTLYAMDAWGQGT LTVVSS
175	DVD1346L	AB008VL	AB118VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRTM SCKSSQSVLYSAN HKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRF SGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCHQYLSWT FGGGTKLEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGD RTITCRASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNTD TLHTGVPSRFGSGSGTDYTLTISLQPEDFATY FCQHYFHYPRTFGQGTKVEIKR

10

20

30

【 0 5 3 2 】

実施例 2 . 2 1 : N G F (配列 2) および C D - 4 0 D V D - I g の作製

【 0 5 3 3 】

【表 3 2】
表 32

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
176	DVD1347H	AB118VH	AB009VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNV NWVVRQAPGKGLEWVGGVWAGGATDYN SALKSRFT ISRDN SKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARDGGYS SSTLYAMDAWGQGLVTVSS ASTKGP QVQLVESG GGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPG KGLEWVAVISYEESNRYHADSVKGRFTISRDN SK ITLYLQMN SLRTEDTAVYYCARDGGIAAPGPDYW GQGLVTVSS
177	DVD1347L	AB118VL	AB009VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASEDIYNALA WYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTGVPSRFSGSGSG TDYTLTISSLPEDFATYFCQHYFHYPRTFGQGT KVEIKR TVAAP DIQMTQSPSLSLTVTPGEPASISC RSSQSLLYSNGYNYLDWYLQKPGQSPQVLI SLGS NRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCMQARQTPFTFGPGTKVDIRR
178	DVD1348H	AB009VH	AB118VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGM HWVRQAPGKGLEWVAVISYEESNRYHADSVKGRF TISRDN SKITLYLQMN SLRTEDTAVYYCARDGGI AAPGPDYWGQGLVTVSS ASTKGPE VQLVESGGG LVQP GGSLRLSCAASGFSLTNNNVNWVVRQAPGK LEWVGGVWAGGATDYN SALKSRFTISRDN SKNTA YLQMN SLRAEDTAVYYCARDGGYSSSTLYAMDAW GQGLVTVSS
179	DVD1348L	AB009VL	AB118VL	DIQMTQSPSLSLTVTPGEPASISCRSSQSLLYSNG YNYLDWYLQKPGQSPQVLI SLGSNRASGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYCMQARQTPFT FGPGTKVDIRR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGR VTITCRASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNTD TLHTGVPSRFSGSGSGTDTYTLTISSLPEDFATY FCQHYFHYPRTFGQGTKVEIKR

10

20

30

【 0 5 3 4 】

実施例 2 . 2 2 : N G F (配列 2) および c - M E T D V D - I g の作製

【 0 5 3 5 】

【表 3 3】

表 33

配列番号	DVD 可変 ドメイン 名	外側可変 ドメイン 名	内側可変ド メイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
180	DVD1349H	AB118VH	AB013VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNV NWVRQAPGKGLEWVGGVWAGGATDYN SALKSRFT ISRDN SKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARDGGYS SSTLYAMDAWGQGLVTVSS ASTKGP QVQLQSG PELVRP GASVKWSCPASGYTFTSYWLHWKQRP QGGLWIGMIDPNSDTRfnPPNFKDKATLNVD SSNTAYNLLSLSADS AVYYCATYGSYVSPLDY WGQTSVYVSS
181	DVD1349L	AB118VL	AB013VL	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASEDIYNALA WYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTGVP SRFGSGSG TDYTLTISSLQPEDFATYFCQHYFHYPRTFGQGT KVEIKR TVAAP DIMMSQSPSSLT VSVGEKVTVSC KSSQSLLV TSSQKNYLAWYQQKPKQSPKLLIYWA STRESGVPDRFTGSGSGTDFTLITSVKADDLAV YYCQYYAYPWTFGDG TKLEIKR
182	DVD1350H	AB013VH	AB118VH	QVQLQSGPELV RP GASVKWSCPASGYTFTSYWL HWKQRPQGGLWIGMIDPNSDTRfnPPNFK KATLNVD RSSNTAYNLLSLSADS AVYYCATY SYVSPLDYWGQTSVYVSS ASTKGP EVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNVNWVRQAPGK GLEWVGGVWAGGATDYN SALKSRFTISRDN SKNT AYLQMN SLRAEDTAVYYCARDGGYSSTLYAMDA WGQGLVTVSS
183	DVD1350L	AB013VL	AB118VL	DIMMSQSPSSLT VSVGEKVTVSC KSSQSLLV TSS QKNYLAWYQQKPKQSPKLLIYWA STRESGVPDRF TSGSGTDFTLITSVKADDLAVYYCQYYAYPW TFGDG TKLEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNT DTLHTGVP SRFGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAT YFCQHYFHYPRTFGQGT KVEIKR

10

20

30

【 0 5 3 6】

実施例 2 . 2 3 : N G F (配列 2) および N R P 1 (配列 1) DVD - I g の作製

【 0 5 3 7】

【表 3 4】

表 34

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
184	DVD1351H	AB118VH	AB016VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNV NWVRQAPGKGLEWVGGVWAGGATDYNALKSRFT ISRDN SKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARDGGYS SSTLYAMD AWGQGLTVTVSS ASTKGPEVQLVESG GGLVQP GGSLRLS CAASGF SFSSEPI SWVRQAPG KGLEWVSSITGKNGYTYADSVKGRFTISADTSK NTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARW GKKVY GMDVWG QGLTVTVSS
185	DVD1351L	AB118VL	AB016VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDIYNALA WYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTGVPSRFGSGSG TDYTLTISSLPEDFATYFCQHYFHYPRTFGQGT KVEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQSISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYGASSRASG VPSRFGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYFCQY MSVPITFGQGTKVEIKR
186	DVD1352H	AB016VH	AB118VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF SFSSEPI SWVRQAPGKGLEWVSSITGKNGYTYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARWGKK VY GMDVWGQGLTVTVSS ASTKGPEVQLVESGGGL VQP GGSLRLS CAASGF SLSLTNNNVNWVRQAPGKGL EWVGGVWAGGATDYNALKSRFTISRDN SKNTAY LQMN SLRAEDTAVYYCARDGGYSSTLYAMD AWG QGLTVTVSS
187	DVD1352L	AB016VL	AB118VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLA WYQQKPGKAPKLLIYGASSRASGVPSRFGSGSG TDFTLTISSLPEDFATYFCQYMSVPITFGQGT KVEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTG VPSRFGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYFCQHY FHYPRTFGQGTKVEIKR

10

20

30

【 0 5 3 8 】

実施例 2 . 2 4 : N G F (配列 2) および N R P 1 (配列 2) DVD - I g の作製

【 0 5 3 9 】

【表 3 5】

表 35

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
188	DVD1353H	AB118VH	AB035VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFSLTNNNV NWVRQAPGKGLEWVGGVWAGGATDYN SALKSRFT ISRDN SKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARDGGYS SSTLYAMD AWGQGT LVTVSS ASTKGPEVQLVESG GGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSQISPAGGYTNYADSVKGRFTISADTSK NTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARELPYRMSKVM D VQGQGT LVTVSS
189	DVD1353L	AB118VL	AB035VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASEDIYNALA WYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTGVPSRFSGSGSG TDYTLTISLQPEDFATYFCQHYFHYPRTEFGQGT KVEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC RASQYFSSYLAWYQQKPGKAPKLLIYGASSRASG VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQY LGSPTTEFGQGTKVEIKR
190	DVD1354H	AB035VH	AB118VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVSQISPAGGYTNYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARELPY YRMSKVM DVQGQGT LVTVSS ASTKGPEVQLVESG GGLVQPGGSLRRLSCAASGFSLTNNNVNWVRQAPG KGLEWVGGVWAGGATDYN SALKSRFTISRDN SKN TAYLQMN SLRAEDTAVYYCARDGGYSSSTLYAMD AWGQGT LVTVSS
191	DVD1354L	AB035VL	AB118VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQYFSSYLA WYQQKPGKAPKLLIYGASSRASGVPSRFSGSGSG TDFTLTISLQPEDFATYYCQQYLGSPTTEFGQGT KVEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC RASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTG VPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYFCQHY FHYPRTEFGQGTKVEIKR

10

20

30

【 0 5 4 0】

実施例 2 . 2 5 : N G F (配列 2) および C D - 3 (配列 2) DVD - I g の作製

【 0 5 4 1】

【表 3 6】

表 36

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列
				1234567890123456789012345678901234
192	DVD1357H	AB118VH	AB039VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNV NWVRQAPGKGLEWVGGVWAGGATDYN SALKSRFT ISRDN SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGYS SSTLYAMD AWGQGLVTVSS ASTKGP QVQLQSG AELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPG QGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSS STAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWG QGTTLTVSS
193	DVD1357L	AB118VL	AB039VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASEDIYNALA WYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTGVPSRFSGSGSG TDYTLTISSLQPEDFATYFCQHYFHYPRTFGQGT KVEIKR TVAAP QIVLTQSPAIMASASPGEKVTMTCS SASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGV PAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWS SNPFTFGSGTKLEINR
194	DVD1358H	AB039VH	AB118VH	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTM HWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKA TLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDD HYCLDYWGQGTTLTVSS ASTKGP EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNVNWVRQAPGKGL EWVGGVWAGGATDYN SALKSRFTISRDN SKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYCARDGGYSSSTLYAMD AWG QGTTLTVSS
195	DVD1358L	AB039VL	AB118VL	QIVLTQSPAIMASASPGEKVTMTCSASSSVSYMNW YQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGT SYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSNPFTFGSGTK LEINR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCR ASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTGV PSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQHYF HYPRTFGQGTKVEIKR

10

20

30

【 0 5 4 2 】

実施例 2 . 2 6 : N G F (配列 2) および E r b B 3 (配列 3) DVD - I g の作製

【 0 5 4 3 】

【表 37】

表 37

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
196	DVD1361H	AB118VH	AB116VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFSLTNNNV NWVRQAPGKGLEWVGGVWAGGATDYN SALKSRFT ISRDN SKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARDGGYS SSTLYAMD AWGQGT LVTVSS ASTKGPEVQLLES G GGLVQP GGSLRRLSCAASGFTF SHYVMAWVRQAPG KGLEWVSSISSGGWTLYADSVKGRFTISRDN SK NTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGLKMATIFDYWG QGT LVTVSS
197	DVD1361L	AB118VL	AB116VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASEDIYNALA WYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTGVPSRFSGSGSG TDYTLTISSLPEDFATYFCQHYFHYPRTFGQGT KVEIKR IVAAP QSALTQPASVSGSPGQSITISCT GTSSDVGSYNVSWYQQHPGKAPKLLIYEVSQR SGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQTEDEADYYCC SYAGSSIFVIFGGGTKVTVLG
198	DVD1362H	AB116VH	AB118VH	EVQLLES GGGLVQP GGSLRRLSCAASGFTF SHYV MAWVRQAPGKGLEWVSSISSGGWTLYADSVKGR FTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGLK MATIFDYWGQGT LVTVSS ASTKGPEVQLLES GGGL VQP GGSLRRLSCAASGFSLTNNNVNWVRQAPGKGL EWVGGVWAGGATDYN SALKSRFTISRDN SKNTAY LQMN SLRAEDTAVYYCARDGGYSSSTLYAMD AWG QGT LVTVSS
199	DVD1362L	AB116VL	AB118VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNV VSWYQQHPGKAPKLLIYEVSQRPSGVSNRFSGSK SGNTASLTISGLQTEDEADYYCCSYAGSSIFVIF GGGTKVTVLG QPKAAP DIQMTQSPSSLSASVGR VTITCRASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNTD TLHTGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFATY FCQHYFHYPRTFGQGTKVEIKR

10

20

30

【0544】

実施例 2.27 : NGF (配列 2) および VEGF (配列 2) DVD-I g の作製

【0545】

【表 38】

表 38

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
200	DVD1363H	AB118VH	AB070VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNV NWVRQAPGKGLEWVGGVWAGGATDYNALKSRFT ISRDNKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGYS SSTLYAMDAGQGTLVTVSS ASTKGPEVQLVESG GGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPG KGLEWVAGITPAGGYTYADSVKGRFTISADTSK NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPYAMDYW GQGTTLTVSS
201	DVD1363L	AB118VL	AB070VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASEDIYNALA WYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTGVPSRFSGSGSG TDYTLTISLQPEDFATYFCQHYFHYPRTEFGQGT KVEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC RASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQS YTPPTFGQGTKVEIKR
202	DVD1364H	AB070VH	AB118VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWI HWVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFF LPYAMDYWGQGTTLVTVSS ASTKGPEVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNVNWVRQAPGK LEWVGGVWAGGATDYNALKSRFTISRDNKNTA YLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGYSSSTLYAMDAG GQGTTLTVSS
203	DVD1364L	AB070VL	AB118VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDVSTAVA WYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYTPPTFGQGT KVEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC RASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTG VPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYFCQHY FHYPRTEFGQGTKVEIKR

10

20

30

【0546】

実施例 2.28 : NGF (配列 2) および VEGF (配列 4) DVD-I g の作製

【0547】

【表 39】

表 39

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列
				1234567890123456789012345678901234
204	DVD1365H	AB118VH	AB117VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNV NWVRQAPGKGLEWVGGVWAGGATDYNALKSRFT ISRDNKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGYS SSTLYAMDAWQGQTLVTVSS ASTKGPEVQLVESG GGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIHWVRQAPG KLEWVGAIYPYSGYTNADSVKGRFTISADTSK NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSPWAMDY WGQTLVTVSS
205	DVD1365L	AB118VL	AB117VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASEDIYNALA WYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTGVPSRFGSGSG TDYTLTISSLQPEDFATYFCQHYFHPRTFGQGT KVEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC RASQVIRRSALAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLAG VPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQS NTSPLTFGQGTKVEIKR
206	DVD1366H	AB117VH	AB118VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWI HWVRQAPGKGLEWVGAIYPYSGYTNADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGH TSPWAMDYWGQTLVTVSS ASTKGPEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNVNWVRQAPGK GLEWVGGVWAGGATDYNALKSRFTISRDNKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGYSSSTLYAMDA WGQTLVTVSS
207	DVD1366L	AB117VL	AB118VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQVIRRSAL WYQQKPGKAPKLLIYAASNLAGVPSRFGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLTFGQGT KVEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC RASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTG VPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYFCQHY FHPRTFGQGTKVEIKR

10

20

30

【0548】

実施例 2.29 : NGF (配列 2) および VEGF (配列 3) DVD-Ig の作製

【0549】

【表 40】

表 40

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
208	DVD1367H	AB118VH	AB103VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTNNNV NWVRQAPGKGLEWVGGVWAGGATDYNALKSRFT ISRDN SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGYS SSTLYAMD AWGQGT LVTVSS ASTKGPEVQLVESG GGLVQP GGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPG KGLEWV GWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSK STAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYGTSHWYF DVWGQGT LVTVSS
209	DVD1367L	AB118VL	AB103VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASEDIYNALA WYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTGVPSRFGSGSG TDYTLTISSLPEDFATYFCQHYFHPRTFGQGT KVEIKR TVAAP DIQLTQSPSSLSASVGRVTITC SASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSG VPSRFGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQY STVPWTFGQGT KVEIKR
210	DVD1368H	AB103VH	AB118VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGM NWVRQAPGKGLEWV GWINTYTGEPTYAADFKRRF TFLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYY YGTSHWYFDVWGQGT LVTVSS ASTKGPEVQLVES GGLVQP GGSLRLSCAASGFSLTNNNVNWVRQAP GKLEWV GG V WAGGATDYNALKSRFTISRDN SK NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGGYSSSTLYAM DAWGQGT LVTVSS
211	DVD1368L	AB103VL	AB118VL	DIQLTQSPSSLSASVGRVTITCSASQDISNYLN WYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFGSGSG TDFTLTISSLPEDFATYYCQYSTVPWTFGQGT KVEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC RASEDIYNALAWYQQKPGKAPKLLIYNTDTLHTG VPSRFGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYFCQHY FHPRTFGQGT KVEIKR

10

20

30

【0550】

実施例 2.30 : NGF (配列 2) および EGF R (配列 3) DVD - Ig の作製

【0551】

【表 4 1】

表 41

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列
				1234567890123456789012345678901234
212	DVD1369H	AB118VH	AB064VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFSLTNNNV NWVRQAPGKGLEWVGGVWAGGATD YNSALKSRFT ISRDN SKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYCARDGGYS SSTLYAMD AWGQGLVTVSS ASTKGP QVQLQESG PGLVKPSQTL SLTCTVSGYSISSDF AWNWIRQPP GKGLEWMGYISYSGN TRYQPSLKSRTISRDT SKNQFFLKLNSVTAAD TATYYCVTAGR GFPYWGQGLVTVSS
213	DVD1369L	AB118VL	AB064VL	DIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRASEDIY NALAWYQQKPGKAPK LLIYNTDTLHTGVPS RFRSGSGSDYTLTI SSLPEDFATYFCQHY FHPRTFGQGT KVEIKR TVAAP DIQMTQSPSSMSV SVGDRVTITC HSSQDINSNIGWLQ QKPGKSFKGLIYHGT NLDDGVPSRFRSGS GSDYTLTISSLPED FATYYCVQYAQFPW TFGGGT KLEIKR
214	DVD1370H	AB064VH	AB118VH	QVQLQESGPGPLVKP SQTL SLTCTVSGYSISSDF AWNWIRQPPGKGLEW MGYISYSGNTRYQPS LKSRTISRDT SKNQFFLKLNSVTAAD TATYYCVTAGR GFPYWGQGLVTVSS ASTKGP EVQLV ESGGGLVQP GGSLRLS CAASGFSLTNNNV NWVRQAPGKGLEWV GGVWAGGATDYN SALKSRFTISRDN SKNTAYLQMN SLRAEDTAVYYC ARDGGYSSTLYAMD AWGQGLVTVSS
215	DVD1370L	AB064VL	AB118VL	DIQMTQSPSSMSV SVGDRVTITC HSSQDINSNIG WLQKPGKSFKGLI YHGTNLDDGVPS RFRSGSGSDYTL TISSLPEDFATY CVQYAQFPWTF GGGT KLEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLS ASV GDRVTITC RASEDIYNALAWY QQKPGKAPKLLI YNTDTLHTG VPSRFRSGSGSDY TLTISSLPEDFAT YFCQHYFHPRT FGQGT KVEIKR

10

20

30

【 0 5 5 2 】

実施例 2 . 3 1 : N G F (配列 1) および M T X DVD - I g の作製

【 0 5 5 3 】

【表 4 2】
表 42

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
216	DVD1371H	AB020VH	AB119VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLIGYDL NWIRQPPGKGLEWIGIIWGDGTTDYN SAVKSRVT ISKDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGGYWY ATSYFFDYWGQGTTLVTVSS ASTKGP DVQLQESGP GLVKPSQSLSLTCTVTGFSITSPYAWN WIRQFPG NTLEWMGYISYRGSTTHHPSLKSRI SITRDTSKN QFFLQLNSVTTEDTATYFCSSYGNYGAYSGQGT LTVSA
217	DVD1371L	AB020VL	AB119VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSI SNNLN WYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSG TDFFTISSLQPEDATYYCQEQHTLPYTFGQGT KLEIKR TVAAP DVLLTQIPLSLPVS LGDQASISC RSSQSI VHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVS TRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLG VYCFQGS HVPLTFGAGTQLELKR
218	DVD1372H	AB119VH	AB020VH	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGFSITSPYA WNWIRQFPNGTLEWMGYISYRGSTTHHPSLKSRI SITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYFCSSYGN YAYSGQGT LTVSA ASTKGP QVQLQESGPGLVK SETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKLEW IGIIWGDGTTDYN SAVKSRVTISKDTSKNQFSLK LSSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYFFDYWGQGT LTVSS
219	DVD1372L	AB119VL	AB020VL	DVLLTQIPLSLPVS LGDQASISCRSSQSI VHSNG NTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSTRFSGV PDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDLGYYCFQGS HVPLT FGAGTQLELKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGD RTITCRASQSI SNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTS RFHSGVPSRFSGSGSGTDFFTISSLQPEDATY YCQEQHTLPYTFGQGT KLEIKR

10

20

30

【 0 5 5 4 】

実施例 2 . 3 2 : N G F (配列 1) および N K G 2 D DVD - I g の作製

【 0 5 5 5 】

【表 4 3】

表 43

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
220	DVD1373H	AB020VH	AB121VH	QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDL NWIRQPPGKGLEWIGIIWGDGTTDYN SAVKSRVT ISKDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGGYWY ATSYYFDYWGQGLVTVSS ASTKGP QVQLVESGG GLVKPGGSLRLS CAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVAFIRYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRGLGDGTYFDYW GQGT TVTVSS
221	DVD1373L	AB020VL	AB121VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSI SNLN WYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGSG TDFTFTISSLQPEDIA TYYCQQEHTLPYTFGQGT KLEIKR TVAAP QSALTQPASVSGSPGQSITISCS GSSSNIGNNAVNWYQQLP GKAPKLLIYYDDLPS GVSDRFSGSKSGTSAFLAISGLQSEDEADYYCAA WDDSLNGP VFVGGGTKLTVLG
222	DVD1374H	AB121VH	AB020VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGFTFSSYGM HWVRQAPGKGLEWVAFIRYDGSNKYYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRGL GDGTYFDYWGQGT TVTVSS ASTKGP QVQLQESGP GLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGK GLEWIGIIWGDGTTDYN SAVKSRVTISKDTSKNQ FSLKLSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYYFDYW GQGT LVTVSS
223	DVD1374L	AB121VL	AB020VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCSGSSSNIGNNAV NWYQQLP GKAPKLLIYYDDLPSGVSDRFSGSKS GTS AFLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGP VFG GGTKLTVLG QPKAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRT TITCRASQSI SNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSR FHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIA TYY CQQEHTLPYTFGQGT KLEIKR

10

20

30

【 0 5 5 6 】

実施例 2 . 3 3 : N G F (配列 1) および E G F R (配列 2) DVD - I g の作製

【 0 5 5 7 】

【表 4 4】

表 44

配列番号	DVD 可変 ドメイン 名	外側可変 ドメイン 名	内側可変ド メイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
224	DVD1375H	AB020VH	AB033VH	QVQLQESGPGPLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDL NWIRQPPGKGLEWIGLIWGDGTTDYN SAVKSRVT ISKDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGGYWY ATSYYFDYWGQGTLVTVSS ASTKGP QVQLKQSGP GLVQPSQSL SITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGK GLEWLGVIWGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQ VFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGO GTLVTVSA
225	DVD1375L	AB020VL	AB033VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSI SNNLN WYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGSG TDFTFTISSLQPEDIAATYYCQEQHTLPTFGQGT KLEIKR TVAAP DILLTQSPVILSVSPGERVSFSC RASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISG IPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQON NNWPTTFGAGTKLELKR
226	DVD1376H	AB033VH	AB020VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTNYGV HWVRQSPGKGLEWLGVIWGGNTDYNTPFTSRLS INKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTY DYEFAYWGOGTLVTVSA ASTKGP QVQLQESGPG LVPKSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGL EWIGLIWGDGTTDYN SAVKSRVTISKDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYYFDYWGQ GTLVTVSS
227	DVD1376L	AB033VL	AB020VL	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIH WYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSG TDFTLSINSVESEDIADYYCQONNNWPTTFGAGT KLELKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC RASQSI SNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSG VPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIAATYYCQEQ HTLPTFGQGT KLEIKR

10

20

30

【 0 5 5 8】

実施例 2 . 3 4 : N G F (配列 1) および I G F 1、2 DVD - I g の作製

【 0 5 5 9】

【表 4 5】

表 45

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
228	DVD1377H	AB020VH	AB010VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLIGYDL NWIRQPPGKGLEWIGIIWGDGTTDYN SAVKSRVT ISKDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGGYWY ATSYFFDYWGQGTTLVTVSS ASTKGP QVQLVQSGA EVKPPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQATGQ GLEWMGWMNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRNTSIS TAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPYYYYYGM DVWG QGTTLVTVSS
229	DVD1377L	AB020VL	AB010VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSI SNNLN WYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGS TDFFTTISLQPEDIAITYCQQEHTLPYTFGQGT KLEIKR TVAAP QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCS GSSSNIENNHVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPS GIPDRFSGSKSGT SATLGITGLQTGDEADYYCET WDTLSAGR VFGGKLTVLG
230	DVD1378H	AB010VH	AB020VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDI NWVRQATGQGLEWMGWMNPNSGNTGYAQKFQGRV TMTTRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPYY YYYGM DVWGQGTTLVTVSS ASTKGP QVQLQESGPG LVKPSSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGK LEWIGIIWGDGTTDYN SAVKSRVTISKDTSKNQF SLKLSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYFFDYWG QGTTLVTVSS
231	DVD1378L	AB010VL	AB020VL	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIENNHV SWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKS GTSATLGITGLQTGDEADYYCETWDTLSAGR V GGGKLTVLG QPKAAP DIQMTQSPSSLSASVGR VTITCRASQSI SNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTS RFHSGVPSRFSGSGSGTDFFTTISLQPEDIAITY YCQQEHTLPYTFGQGTKLEIKR

10

20

30

【0560】

実施例 2.35 : NGF (配列 1) および短いリンカーおよび長いリンカーを有する RON (配列 1) DVD-Ig の作製

【0561】

【表 4 6】

表 46

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
232	DVD1379H	AB020VH	AB005VH	QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDL NWIRQPPGKGLEWIGI IWGDGTTDYN SAVKSRVT ISKDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGGYWY ATSYYFDYWGQGLTVTVSS ASTKGPEVQLVQSGG GLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGK GLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFSGWPNNYYYYGM DVWGQGLTVTVSS
233	DVD1379L	AB020VL	AB005VL	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSI SNNLN WYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGSG TDFTFTISSLQPEDIA TYYCQQEHTLPYTFGQGT KLEIKR TVAAP DVVM TQSPLSLPVT PGEPA SISC RSSQSL LHSNGFN YVDWYLQKPGQSPHLLIYFGS YRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVY YCMQALQTPPWTFGQGTKVEIRR
234	DVD1380H	AB005VH	AB020VH	EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM HWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARFSGW PNNYYYYGMDVWGQGLTVTVSS ASTKGPQVQLQE SGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQP PGKGLEWIGI IWGDGTTDYN SAVKSRVTISKDTS KNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYYF DYWGQGLTVTVSS
235	DVD1380L	AB005VL	AB020VL	DVVM TQSPLSLPVT PGEPA SISC RSSQSL LHSNG FN YVDWYLQKPGQSPHLLIYFGSYRASGVPDRFS GSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVY YCMQALQTPPW TFGQGTKVEIRR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSI SNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYT SRFHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIA T YYCQQEHTLPYTFGQGTKLEIKR

10

20

30

【 0 5 6 2】

実施例 2 . 3 6 : N G F (配列 1) および E r b B 3 (配列 1) DVD - I g の作製

【 0 5 6 3】

【表 47】

表 47

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
236	DVD1381H	AB020VH	AB062VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLIGYDL NWIRQPPGKGLEWIGI IWGDGTTDYN SAVKSRVT ISKDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGGYWY ATSYFFDYWGQGT LVTVSS ASTKGP QVQLQQWGA GLLKPSSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGK GLEWIGEINHSGSTNYPNPSLKSRVTISVETSKNQ FSLKLSVTAADTAVYYCARDKWTWYFDLWGRGT LVTVSS
237	DVD1381L	AB020VL	AB062VL	DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSI SNNLN WYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGS TDFFTTISLQPEDIA TYYCQQEHTLPYTFGQGT KLEIKR TVAAP DIEMTQSPDSLAVSLGERATINC RSSQSVLYSSNRNYLAWYQQNPGQPPKLLIYWA STRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTITISLQAEDVAV YYCQQYYSTPRTFGQGTKVEIKR
238	DVD1382H	AB062VH	AB020VH	QVQLQQWAGLLKPSSETLSLTCAVYGGSFSGYYW SWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYPNPSLKSRVT ISVETSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARDKWTW YFDLWGRGTLVTVSS ASTKGP QVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLEW IGI IWGDGTTDYN SAVKSRVTISKDTSKNQFSLK LSSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYFFDYWGQGT LVTVSS
239	DVD1382L	AB062VL	AB020VL	DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSS NRNYLAWYQQNPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRF SGSGSGTDFTLTITISLQAEDVAVYYCQQYYSTPR TFGQGTKVEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSI SNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYT SRFHSGVPSRFSGSGSGTDFTTISLQPEDIA T YYCQQEHTLPYTFGQGTKLEIKR

10

20

30

【0564】

実施例 2.37 : NGF (配列 1) および ErbB3 (配列 2) DVD-Ig の作製

【0565】

【表 48】

表 48

配列番号	DVD 可変 ドメイン 名	外側可変 ドメイン 名	内側可変ド メイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
240	DVD1383H	AB020VH	AB063VH	QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDL NWIRQPPGKGLEWIGIIWGDGTTDYNSAVKSRVT ISKDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGGYWY ATSYYFDYWGOGLVTVSS ASTKGPE VQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMNWVRQAPGK GLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNLSLRDEDTAVYYCARDRGDFDAFDIWGQ GTMVTVSS
241	DVD1383L	AB020VL	AB063VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQISINNLN WYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGSG TDFTFTISSLQPEDATYYCQQEHTLPYTFGQGT KLEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC QASQDITNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETG VPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYNCQQC ENFPITFGQGTREIKR
242	DVD1384H	AB063VH	AB020VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSM NWRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNLSLRDEDTAVYYCARDRGD FDAFDIWGQGTMTVTVSS ASTKGP QVQLQESGPG LVPSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGL EWIGIIWGDGTTDYNSAVKSRVTISKDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYYFDYWGO GLVTVSS
243	DVD1384L	AB063VL	AB020VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCQASQDITNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSG TDFTFTISSLQPEDATYNCQQCENFPITFGQGT RLEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC RASQISINNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSG VPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYYCQQE HTLPYTFGQGTREIKR

10

20

30

【0566】

実施例 2.38 : N G F (配列 1) および C D - 3 (配列 1) DVD - I g の作製

【0567】

【表 49】

表 49

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
244	DVD1385H	AB020VH	AB002VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLIGYDL NWIRQPPGKGLEWIGI IWGDGTTDYN SAVKSRVT ISKDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGGYWY ATSYFDYWGQGTTLTVSS ASTKGPQVQLQQSGA ELARPGASVKMCKASGYTFTRYTMHWVKQRPQG GLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSS TAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQ GTTTLTVSS
245	DVD1385L	AB020VL	AB002VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQISNNLN WYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGS TDFFTISSLQPEDIAATYYCQEH TLPYTFGGGT KLEIKR TVAAPQ IVLTQSPAISASPGKVTMT RASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGV PYRFSGSGSGT SYSLTIS SMEAEDAATYYCQQWS SNPLTFGSGTKLEINR
246	DVD1386H	AB002VH	AB020VH	QVQLQQSGAELARPGASVKMCKASGYTFTRYTM HWVKQRPQG GLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKA TLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDD HYCLDYWGQGTTLTVSS ASTKGPQVQLQESGPG LVKPSSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGL EWIGI IWGDGTTDYN SAVKSRVTISKDTSKNQF LKLSSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYFDYWGQ GTLTVSS
247	DVD1386L	AB002VL	AB020VL	QIVLTQSPAISASPGKVTMTCRASSSVSYMNW YQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGV PYRFSGSGSGT SYSLTIS SMEAEDAATYYCQQWSNPLTFGSGTK LEINR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCR ASQISNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGV PSRFSGSGSGTDFFTISSLQPEDIAATYYCQEH TLPYTFGGGTLEIKR

10

20

30

【0568】

実施例 2.39 : NGF (配列 1) および IGF1R DVD - Ig の作製

【0569】

【表 5 0】

表 50

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列
				1234567890123456789012345678901234
248	DVD1387H	AB020VH	AB011VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLIGYDL NWIRQPPGKGLEWIGIIWGDGTTDYN SAVKSRVT ISKDT SKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCARGGYWY ATSYFFDYWGQGT LVTVSS ASTKGPEVQLLES GG GLVQPGGSLRLSCTASGFTFSSYAMNWVRQAPGK GLEWVSAISGSGGTTFYADSVKGRFTISRDN SRT TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDLGWSDSYYYYYG MDVWGQGT TTVTVSS
249	DVD1387L	AB020VL	AB011VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI SNNLN WYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGSG TDFTFTISSLQPEDATYYCQEQHTLPYTFGQGT KLEIKR TVAAP DIQMTQFPSSLSASVGDRVTITC RASQGI RNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASRLHRG VPSRFSGSGSGTEFTLT ISSLQPEDFATYYCLQH NSYPCSFQGT KLEIKR
250	DVD1388H	AB011VH	AB020VH	EVQLLES GGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSSYAM NWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGTTFYADSVKGRF TISRDN SRTTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDLGW SDSYYYYYGMDVWGQGT TTVTVSS ASTKGPQVQLQ ESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQ PPGKGLEWIGIIWGDGTTDYN SAVKSRVTISKDT SKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCARGGYWYATSY FDYWGQGT LVTVSS
251	DVD1388L	AB011VL	AB020VL	DIQMTQFPSSLSASVGDRVTITCRASQGI RNDLG WYQQKPGKAPKRLIYAASRLHRGVPSRFSGSGSG TEFTLT ISSLQPEDFATYYCLQHNSYPCSFQGT KLEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQSI SNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSG VPSRFSGSGSGTDFTFT ISSLQPEDATYYCQEQE HTLPYTFGQGT KLEIKR

10

20

30

【 0 5 7 0】

実施例 2 . 4 0 : N G F (配列 1) および H G F DVD - I g の作製

【 0 5 7 1】

【表 5 1】

表 51

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
252	DVD1389H	AB020VH	AB012VH	QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDL NWIRQPPGKGLEWIGIIWGDGTTDYN SAVKSRVT ISKDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGGYWY ATSYYFDYWGGQTLVTVSS ASTKGP QVQLVESGG GLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGK GLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEYNSGWYVLFDY WGQGTTLTVSS
253	DVD1389L	AB020VL	AB012VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI SNNLN WYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGSG TDFFTTISLQPEDATYYCQQEHTLPYTFGQGT KLEIKR TVAAP DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITC RASQGISWLA WYQQKPGKAPNLLIYEASSLQSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQA NGFPWTFGQGTKVEIKR
254	DVD1390H	AB012VH	AB020VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYM SWIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEYN SGWYVLFDYWGQGTTLVTVSS ASTKGP QVQLQESG PGLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPG KGLEWIGIIWGDGTTDYN SAVKSRVTISKDTSKN QFSLKLSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYYFDY WGQGTTLTVSS
255	DVD1390L	AB012VL	AB020VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISWLA WYQQKPGKAPNLLIYEASSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISLQPEDFATYYCQQANGFPWTFGQGT KVEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQSI SNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSG VPSRFSGSGSGTDFFTTISLQPEDATYYCQQE HTLPYTFGQGTKLEIKR

10

20

30

【 0 5 7 2 】

実施例 2 . 4 1 : N G F (配列 1) および V E G F (配列 1) DVD - I g の作製

【 0 5 7 3 】

【表 5 2】

表 52

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
256	DVD1391H	AB020VH	AB014VH	QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDL NWIRQPPGKGLEWIGI IWGDGTTDYN SAVKSRVT ISKDTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCARGGYWY ATSYFFDYWGQGLVTVSS ASTKGPEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGK GLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKS TAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYGSSHWYFD VWGQGLVTVSS
257	DVD1391L	AB020VL	AB014VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI SNNLN WYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGS TDFFTISSLQPEDATYYCQQEHTLPYTFGQGT KLEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC SASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSG VPSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQY STVPEWTFGQGTKVEIKR
258	DVD1392H	AB014VH	AB020VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGM NWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRF TFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHY YGSSHWYFDVWGQGLVTVSS ASTKGPQVQLQES GPGGLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPP GKGLEWIGI IWGDGTTDYN SAVKSRVTISKDTSK NQFSLKLS SVTAADTAVYYCARGGYWYATSYFFD YWGQGLVTVSS
259	DVD1392L	AB014VL	AB020VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLN WYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGS TDFLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPEWTFGQGT KVEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQSI SNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSG VPSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDATYYCQQE HTLPYTFGQGTKLEIKR

10

20

30

【0574】

実施例 2.42 : NGF (配列 1) および D L L 4 DVD - I g の作製

【0575】

【表 5 3】

表 53

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
260	DVD1393H	AB020VH	AB015VH	QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDL NWIRQPPGKGLEWIGI IWGDGTTDYN SAVKSRVT ISKDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGGYWY ATSYYFDYWGQGLVTVSS ASTKGPEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWISWVRQAPGK GLEWVGYISPN SGFTYYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYFDYWGQG TLVTVSS
261	DVD1393L	AB020VL	AB015VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQISINNLN WYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGSG TDFFTTISLQPEDATYYCQQEHTLPYTFGQGT KLEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC RASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ SYTGTVTFGQGTKVEIKR
262	DVD1394H	AB015VH	AB020VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWI SWVRQAPGKGLEWVGYISPN SGFTYYADSVKGRF TISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFG GYFDYWGQGLVTVSS ASTKGPQVQLQESGPGLV KPSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLE WIGI IWGDGTTDYN SAVKSRVTISKDTSKNQFSL KLSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYYFDYWGQG TLVTVSS
263	DVD1394L	AB015VL	AB020VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDVSTAVA WYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYTGTVTFGQG TKVEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIT CRASQISINNLN WYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHS GVPSRFSGSGSGTDFFTTISLQPEDATYYCQQ EHTLPYTFGQGTKLEIKR

10

20

30

【 0 5 7 6 】

実施例 2 . 4 3 : N G F (配列 1) および P 1 G F DVD - I g の作製

【 0 5 7 7 】

【表 5 4】

表 54

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列
				1234567890123456789012345678901234
264	DVD1395H	AB020VH	AB047VH	QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDL NWIRQPPGKGLEWIGIIWGDGTTDYN SAVKSRVT ISKDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGGYWY ATSYYFDYWGGQGLVTVSS ASTKGP QVQLQSSGA ELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKLAPGQ GLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATLTIDTSSS TAYMQLSSLTSED TAVYFCVRDSPFFDYWGQGL LTVSS
265	DVD1395L	AB020VL	AB047VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI SNLN WYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGS TDFTFTISSLQPEDIA TYYCQQEHTLPYTFGGQ KLEIKR TVAAP DIVLTQSPDSLAVSLGERVTMNC KSSQSLNLSGMRKSF LAWYQQKPGQSPKLLIYWA STRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTIS SVQAEDVAV YYCKQSYHLFTFGSGTKLEIKR
266	DVD1396H	AB047VH	AB020VH	QVQLQSSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYI NWKLAPGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKA TLTIDTSSSTAYMQLSSLTSED TAVYFCVRDSPF FDYWGGQGLLTVSS ASTKGP QVQLQESGPGGLVKP SETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWI GIIWGDGTTDYN SAVKSRVTISKDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYYFDYWGGQGL LTVSS
267	DVD1396L	AB047VL	AB020VL	DIVLTQSPDSLAVSLGERVTMNC KSSQSLNLSGM RKSF LAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRF TSGSGTDFTLTIS SVQAEDVAVYYCKQSYHLFT FGSGTKLEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVDR VTITCRASQSI SNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTS RFHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIA T YCCQEHTLPYTFGGTKLEIKR

10

20

30

【0578】

実施例 2.44 : NGF (配列 1) および RON (配列 2) DVD-I g の作製

【0579】

【表 5 5】

表 55

配列番号	DVD 可変 ドメイン 名	外側可変 ドメイン 名	内側可変ド メイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
268	DVD1397H	AB020VH	AB034VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLIGYDL NWIRQPPGKGLEWIGI IWGDGTTDYN SAVKSRVT ISKDT SKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCARGGYWY ATSYFFDYWGQGLVTVSS ASTKGP QVQLQESGP GLVKPSEILSLTCTVSGGSISSHYWSWVRQPPGK GLEWIGYIYYS GSTNYPNPSLKSRTISVDT SKNQ FSLNLS SVTAADTAVYYCARI PNY YDRSGYYPGY WYFDLWGRGTLVTVSS
269	DVD1397L	AB020VL	AB034VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSI SNLN WYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGSG TDFTFTISSLQPED IATYYCQQEHTLPYTFGQGT KLEIKR TVAAP QAVLTQPSLSAPP GASASLTCT LRSGFNVD SYRISWYQQKPGSPPQYLLRYKSDSD KQQGSGVPSRFSGSKDASANAGILLISGLQSEDE ADYYCMIWHSSAWVFGGGTKLTVLR
270	DVD1398H	AB034VH	AB020VH	QVQLQESGPGLVKPSSEILSLTCTVSGGSISSHYW SWVRQPPGKGLEWIGYIYYS GSTNYPNPSLKSRT ISVDT SKNQFSLNLS SVTAADTAVYYCARI PNY DRSGYYPGYWYFDLWGRGTLVTVSS ASTKGP QVQ LQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWI RQPPGKGLEWIGI IWGDGTTDYN SAVKSRVTISK DTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCARGGYWYAT SYFFDYWGQGLVTVSS
271	DVD1398L	AB034VL	AB020VL	QAVLTQPSLSAPP GASASLTCTLRSGFNVD SYR ISWYQQKPGSPPQYLLRYKSDSDKQQGSGVPSR SGSKDASANAGILLISGLQSEDEADYYCMIWHSS AWVFGGGTKLTVLR QPKAAP DIQMTQSPSSLSAS VGDRTITCRASQSI SNLNWYQQKPGKAPKLLI YYTSRFHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPED IATYYCQQEHTLPYTFGQGT KLEIKR

10

20

30

【 0 5 8 0 】

実施例 2 . 4 5 : N G F (配列 1) および C D - 2 0 D V D - I g の作製

【 0 5 8 1 】

【表 5 6】

表 56

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
272	DVD1399H	AB020VH	AB001VH	QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDL NWIRQPPGKGLEWIGIIWGDGTTDYN SAVKSRVT ISKDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGGYWY ATSYFFDYWGQGLVTVSS ASTKGP QVQLQPGA ELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGR GLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSS TAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVW GAGTTVTVSA
273	DVD1399L	AB020VL	AB001VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCRASQSI SNNLN WYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGSG TDFTFTISSLQPEDIAATYYCQEQHTLPHYTFGGGT KLEIKR IVAAP QIVLSQSPAILSPSPGKVTMTTC RASSSVSYIHWFFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGV PVRFSGSGSGTYSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWT SNPPTFGGGTKLEIKR
274	DVD1400H	AB001VH	AB020VH	QVQLQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNM HWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKA TLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYY GGDWYFNVWGAGTTVTVSA ASTKGP QVQLQESGP GLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGK GLEWIGIIWGDGTTDYN SAVKSRVTISKDTSKNQ FSLKLSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYFFDYW GQGLVTVSS
275	DVD1400L	AB001VL	AB020VL	QIVLSQSPAILSPSPGKVTMTTCRASSSVSYIHW FQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGT YSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTK LEIKR IVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCR ASQSI SNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGV PSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIAATYYCQEQH TLPYTFGGTKLEIKR

10

20

30

【 0 5 8 2】

実施例 2 . 4 6 : N G F (配列 1) および E G F R DVD - I g の作製

【 0 5 8 3】

【表 57】

表 57

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列
				1234567890123456789012345678901234
276	DVD1401H	AB020VH	AB003VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLIGYDL NWIRQPPGKGLEWIGIIWGDGTTDYN SAVKSRVT ISKDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGGYWY ATSYFFDYWGQGT LVTVSS ASTKGP QVQLQESGP GLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGDYYWTWIRQSP GKGLEWIGHIYYSGNTNYPNPSLKSRLTISIDTSK TQFSLKLSVTAADTAIYYCVRDRVTGAFDIWGQ GTMVTVSS
277	DVD1401L	AB020VL	AB003VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQISNNLN WYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGS TDFTFTISSLQPEDIAITYCQQEHTLPYTFGQGT KLEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC QASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETG VPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIAITYFCQHF DHLPLAFGGGKVEIKR
278	DVD1402H	AB003VH	AB020VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSVSSGDY YWTWIRQSPGKGLEWIGHIYYSGNTNYPNPSLKS RLTISIDTSKTQFSLKLSVTAADTAIYYCVRDRV TGAFDIWGQGT MVTVSS ASTKGP QVQLQESGPG LVKPSSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGL EWIGIIWGDGTTDYN SAVKSRVTISKDTSKNQFS LKLSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYFFDYWGQ GTLVTVSS
279	DVD1402L	AB003VL	AB020VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQDISNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGS TDFTFTISSLQPEDIAITYFCQHF DHLPLAFGGG KVEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC RASQISNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSG VPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIAITYCQQE HTLPYTFGQGT KLEIKR

10

20

30

【0584】

実施例 2.47 : NGF (配列 1) および HER2 DVD - Ig の作製

【0585】

【表 5 8】

表 58

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
280	DVD1403H	AB020VH	AB004VH	QVQLQESGPGLVKVPSETLSLTCTVSGFSLIGYDL NWIRQPPGKGLEWIGI IWGDGTTDYN SAVKSRVT ISKDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGGYWY ATSYYFDYWGQGTTLVTVSS ASTKGPEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGK GLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWG QGTTLVTVSS
281	DVD1403L	AB020VL	AB004VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI SNNLN WYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGSG TDFFTTISLQPEDATYYCQQEHTLPYTFGQGT KLEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSG VPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQH YTPPTFGQGTKVEIKR
282	DVD1404H	AB004VH	AB020VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYI HWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGD GFYAMDYWGQGTTLVTVSS ASTKGPQVQLQESGPG LVKVPSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGK LEWIGI IWGDGTTDYN SAVKSRVTISKDTSKNQF SLKLSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYYFDYWG QGTTLVTVSS
283	DVD1404L	AB004VL	AB020VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVA WYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSG TDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTPPTFGQGT KVEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQSI SNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSG VPSRFSGSGSGTDFFTTISLQPEDATYYCQQE HTLPYTFGQGTKLEIKR

10

20

30

【 0 5 8 6】

実施例 2 . 4 8 : N G F (配列 1) および C D - 1 9 D V D - I g の作製

【 0 5 8 7】

【表 59】

表 59

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
284	DVD1405H	AB020VH	AB006VH	QVQLQESGPGLVKPKSETLSLTCTVSGFSLIGYDL NWIRQPPGKGLEWIGI IWGDGTTDYN SAVKSRVT ISKDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGGYWY ATSYYFDYWGQGT LVTVSS ASTKGPQVQLQ SGA ELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPQG GLEWIGQIWPGDGDTNYNGKFKGKATLTADESSS TAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYAM DYWGQGT SVTVSS
285	DVD1405L	AB020VL	AB006VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSI SNNLN WYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGSG TDFFTTISLQPEDIAATYYCQEQHTLPYTFGGGT KLEIKR TVAAPD ILLTQTPASLAVSLGQRATISC KASQSVDDYDGD SYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASN LVSGIPPRFSGSGSGTDFTLNIHPVEKVDAATYH CQOSTEDPWTFGGGTKLEIKR
286	DVD1406H	AB006VH	AB020VH	QVQLQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWM NWKQRPQGQGLEWIGQIWPGDGDTNYNGKFKGKA TLTADESSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETT TVGRYYYAMDYWGQGT SVTVSS ASTKGPQVQLQ E SGPGLVKPKSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQP PGKGLEWIGI IWGDGTTDYN SAVKSRVTISKDTS KNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYYF DYWGQGT LVTVSS
287	DVD1406L	AB006VL	AB020VL	DILLTQTPASLAVSLGQRATISCKASQSVDDYDGD SYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASN LVSGIPPRFSG SGSGTDFTLNIHPVEKVDAATYHCQOSTEDPWT FGGGTKLEIKR TVAAPD IQMTQSPSSLSASVGDRT ITCRASQSI SNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSR FHSVPSRFSGSGSGTDFFTTISLQPEDIAATYY CQEQHTLPYTFGGGT KLEIKR

10

20

30

【0588】

実施例 2.49 : N G F (配列 1) および C D - 8 0 DVD - I g の作製

【0589】

【表 60】

表 60

配列番号	DVD 可変 ドメイン 名	外側可変 ドメイン 名	内側可変ド メイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
288	DVD1407H	AB020VH	AB007VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLIGYDL NWIRQPPGKGLEWIGI IWGDGTTDYN SAVKSRVT ISKDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGGYWY ATSYFFDYWGQGLVTVSS ASTKGP QVQLQESGP GLVKPSETLSLTCAVSGGSI SGGYGWGWIRQPPG KGLEWIGSFYSSSGNTYYNPSLKSQVTI STDTSK NQFSLKLSMTAADTAVYYCVRDRLFSVVMVYN NWFDVWGPGLVTVSS
289	DVD1407L	AB020VL	AB007VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSI SNLN WYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGS TDFTFTISSLQPEDIAATYYCQEH TLPYTFGQGT KLEIKR TVAAP ESALTQPPSVSGAPGQKVTISCT GTSNIGGYDLHWYQQLPGTAPKLLIYDINKRPS GISDRFSGSKSGTAASLAITGLQTEDEADYYCQS YDSSLNAQVFGGGTRLTVLG
290	DVD1408H	AB007VH	AB020VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGGSI SGGYG WGWIRQPPGKGLEWIGSFYSSSGNTYYNPSLKSQ VTI STDTSKNQFSLKLSMTAADTAVYYCVRDRL FSVVMVYNNWFDVWGPGLVTVSS ASTKGP QVQ LQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWI RQPPGKGLEWIGI IWGDGTTDYN SAVKSRVTISK DTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGGYWYATS YFFDYWGQGLVTVSS
291	DVD1408L	AB007VL	AB020VL	ESALTQPPSVSGAPGQKVTISCTGTSNIGGYDL HWYQQLPGTAPKLLIYDINKRPSGISDRFSGSKS GTAASLAITGLQTEDEADYYCQSYDSSLNAQVFG GGTRLTVLG QPKAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRT TITCRASQSI SNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSR FHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIAATYY CQEH TLPYTFGQGT KLEIKR

10

20

30

【 0 5 9 0 】

実施例 2 . 5 0 : N G F (配列 1) および C D - 2 2 D V D - I g の作製

【 0 5 9 1 】

【表 6 1】
表 61

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
292	DVD1409H	AB020VH	AB008VH	QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDL NWIRQPPGKGLEWIGIIWGDGTTDYN SAVKSRVT ISKDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGGYWA ATSYYFDYWGQGLVTVSS ASTKGP QVQLVQSGA EVKKGSSVKVSKASGYTFTSYWLHWVRQAPGQ GLEWIGYINPRNDYTEYNQNFKDKATITADESTN TAYMELSSLRSEDTAFYFCARRDITTFYWGQGT TVTVSS
293	DVD1409L	AB020VL	AB008VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSI SNNLN WYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGSG TDFTFITISLQPEDIAATYYCQQEHTLPYTFGQGT KLEIKR TVAAP DIQLTQSPSSLSASVGDRTMSC KSSQSVLYSANHKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYWA STRESGVPSRFSGSGSGTDFTFITISLQPEDIAAT YYCHQYLSSWTFGGGTKLEIKR
294	DVD1410H	AB008VH	AB020VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTSYWL HWVRQAPGQGLEWIGYINPRNDYTEYNQNFKDKA TITADESTNTAYMELSSLRSEDTAFYFCARRDIT TFYWGQGTTVTVSS ASTKGP QVQLQESGPGGLVKP SETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLEWI GIIWGDGTTDYN SAVKSRVTISKDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYYFDYWGQGL TVTVSS
295	DVD1410L	AB008VL	AB020VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRTMSCKSSQSVLYSAN HKNYLAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRESGVPSRF SGSGSGTDFTFITISLQPEDIAATYYCHQYLSSWT FGGGTKLEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGD RTITCRASQSI SNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTS RFHSGVPSRFSGSGSGTDFTFITISLQPEDIAAT Y CQQEHTLPYTFGQGT KLEIKR

10

20

30

【 0 5 9 2 】

実施例 2 . 5 1 : N G F (配列 1) および C D - 4 0 D V D - I g の作製

【 0 5 9 3 】

【表 6 2】

表 62

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
296	DVD1411H	AB020VH	AB009VH	QVQLQESGPGGLVVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDL NWIRQPPGKLEWIGI IWGDGTTDYN SAVKSRVT ISKDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGGYWY ATSYYFDYWGGQTLVTVSS ASTKGP QVQLVESGG GVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVAVISYEESNRYHADSVKGRFTISRDN SKI TLYLQMNSLRTEDTAVYYCARDGGIAAPGPDYWG QGT LVTVSS
297	DVD1411L	AB020VL	AB009VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSI SNNLN WYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGSG TDFFTISSLQPEDIA TYYCQQEHTLPYTFGQGT KLEIKR TVAAP DI VMTQSP LSLTVTPGEPASISC RSSQSLLYSNGYNYLDWYLQKPGQSPQVLI SLGS NRASGV PDRFSGSGSGTDFFTLKI SRVEAEDVGVY YCMQARQTPFTFGPGTKVDIRR
298	DVD1412H	AB009VH	AB020VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGM HWVRQAPGKLEWVAVISYEESNRYHADSVKGRF TISRDN SKITLYLQMN SLRTEDTAVYYCARDGGI AAPGPDYWGQGT LVTVSS ASTKGP QVQLQESGPG LVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGK LEWIGI IWGDGTTDYN SAVKSRVTISKDTSKNQF SLKLSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYYFDYW GGT LVTVSS
299	DVD1412L	AB009VL	AB020VL	DI VMTQSP LSLTVTPGEPASISCRSSQSLLYSNG YNYLDWYLQKPGQSPQVLI SLGSNRASGV PDRFS GSGSGTDFFTLKI SRVEAEDVGVY YCMQARQTPFT FGPGTKVDIRR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGR VTITCRASQSI SNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTS RFHSGVPSRFSGSGSGTDFFTISSLQPEDIA T Y CQQEHTLPYTFGQGT KLEIKR

10

20

30

【0594】

実施例 2.52 : NGF (配列 1) および cMET DVD-I g の作製

【0595】

【表 6 3】
表 63

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
300	DVD1413H	AB020VH	AB013VH	QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDL NWIRQPPGKGLEWIGI IWGDGTTDYN SAVKSRVT ISKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYWY ATSYYFDYWGGQTLVTVSS ASTKGP QVQLQESGP ELVRPGASVKWSCPASGYTFTSYWLHWKKQRP GQGLEWIGMIDPSNSDTRfnPPNFKDKATLNVD RS SNTAYNLLSSLTSADSAVYYCATYGSYVSP LDYW GQGT SVYVSS
301	DVD1413L	AB020VL	AB013VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSI SNNLN WYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSG GTDFTFTISSLQPEDIAATYCCQEHTLPYTFGQGT KLEIKR TVAAP DIMMSQSPSSSLTVSVGEKVT VSC KSSQSLVTSSQKNYLAWYQQKPKQSPKLLI YWA STRESGVDPDRFTGSGSGTDFTLITIT SVKADDLAV YCQQYYAYPWTFGDGTKLEIKR
302	DVD1414H	AB013VH	AB020VH	QVQLQESGPELVRPGASVKWSCPASGYTFTSYWL HWKKQRPQGQGLEWIGMIDPSNSDTRfnPPNF KDKATLNVD RS SNTAYNLLSSLTSADSAVYY CATYGSYVSPLDYWGGQGT SVYVSS ASTKGP QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGY DLNWIRQPPGK GLEWIGI IWGDGTTDYN SAV KSRVTISKDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYY CARGGYWYATSYYFDYW GQGT LVTVSS
303	DVD1414L	AB013VL	AB020VL	DIMMSQSPSSSLTVSVGEKVTVSC KSSQSL VTSS QKNYLAWYQQKPKQSPKLLIYWAST RESGVDPDRFTGSGSGTDFTLITITSVKADD LAVYYCQQYYAYPWTFGDGTKLEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQSI SNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYT SRFHSGV PSRFSGSGTDFTFTISSLQPEDIAAT YC QQEHTLPYTFGQGT KLEIKR

10

20

30

【 0 5 9 6 】

実施例 2 . 5 3 : N G F (配列 1) および N R P 1 (配列 1) DVD - I g の作製

【 0 5 9 7 】

【表 6 4】
表 64

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
304	DVD1415H	AB020VH	AB016VH	QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDL NWIRQPPGKLEWIGIIWGDGTTDYN SAVKSRVT ISKDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGGYWY ATSYYFDYWGGTTLVTVSS ASTKGP EVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSEPI SWVRQAPGK GLEWVSSITGKNGYTYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGKKVYGMDVWGQ GTLVTVSS
305	DVD1415L	AB020VL	AB016VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSI SNNLN WYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLQPEDATYYCQQEHTLPYTFGQGT KLEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC RASQSISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYGASSRASG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQY MSVPITFGQGTKVEIKR
306	DVD1416H	AB016VH	AB020VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSEPI SWVRQAPGKLEWVSSITGKNGYTYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGK VYGMDVWGQGTTLVTVSS ASTKGP QVQLQESGPG L VKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGL EWIGIIWGDGTTDYN SAVKSRVTISKDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYYFDYWGG GTLVTVSS
307	DVD1416L	AB016VL	AB020VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSISSYLA WYQQKPGKAPKLLIYGASSRASGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYMSVPITFGQGT KVEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC RASQSI SNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSG VPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYYCQQE HTLPYTFGQGTKLEIKR

10

20

30

【 0 5 9 8 】

実施例 2 . 5 4 : N G F (配列 1) および N R P 1 (配列 2) DVD - I g の作製

【 0 5 9 9 】

【表 6 5】

表 65

配列番号	DVD 可変 ドメイン 名	外側可変 ドメイン 名	内側可変ド メイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
308	DVD1417H	AB020VH	AB035VH	QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDL NWIRQPPGKGLEWIGIIWGDGTTDYN SAVKSRVT ISKDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGGYWY ATSYFFDYWGQGT LVTVSS ASTKGPEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVSQISPAGGYTNYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCARELPYYRMSKVM DV QGQGT LVTVSS
309	DVD1417L	AB020VL	AB035VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQISINNLN WYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGSG TDFTFTISSLQPEDATYYCQQEHTLPYTFGQGT KLEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQYFSSYLAWYQQKPGKAPKLLIYGASSRASG VPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQY LGSPTTFGQGTKVEIKR
310	DVD1418H	AB035VH	AB020VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVSQISPAGGYTNYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARELPY YRMSKVM DVQGQGT LVTVSS ASTKGPQVQLQESG PGLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPG KGLEWIGIIWGDGTTDYN SAVKSRVTISKDTSKN QFSLKLSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYFFDY WGQGT LVTVSS
311	DVD1418L	AB035VL	AB020VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQYFSSYLA WYQQKPGKAPKLLIYGASSRASGVPSRFSGSGSG TDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQYLGSPTTFGQGT KVEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQISINNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSG VPSRFSGSGSGTDFTFT ISSLQPEDATYYCQQE HTLPYTFGQGTKLEIKR

10

20

30

【 0 6 0 0】

実施例 2 . 5 5 : N G F (配列 1) および C D - 3 (配列 2) DVD - I g の作製

【 0 6 0 1】

【表 6 6】

表 66

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
312	DVD1421H	AB020VH	AB039VH	QVQLQESGPGGLVVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDL NWIRQPPGKGLEWIGIIWGDGTTDYN SAVKSRVT ISKDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGGYWY ATSYYFDYWGGTTLVTVSS ASTKGPQVQLQQSGA ELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPQG GLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSS TAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQ GTTTLTVSS
313	DVD1421L	AB020VL	AB039VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSI SNNLN WYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGS TDFTFITISLQPEDIAATYYCQEQHTLPYTFGQGT KLEIKR TVAAPQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCS SASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLAGSV PAHFRGSGSGTYSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWS SNPFTFGSGTKLEINR
314	DVD1422H	AB039VH	AB020VH	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTM HWVKQRPQGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKA TLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDD HYCLDYWGQGTTLVTVSS ASTKGPQVQLQESGPGGL VKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGL EWIGIIWGDGTTDYN SAVKSRVTISKDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYYFDYWQ GTLVTVSS
315	DVD1422L	AB039VL	AB020VL	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNW YQQKSGTSPKRWIYDTSKLAGSVPAHFRGSGSGT YSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTK LEINR TVAAPDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCR ASQSI SNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGV PSRFSGSGSGTDFTFITISLQPEDIAATYYCQEQH TLPYTFGQGTLEIKR

10

20

30

【 0 6 0 2 】

実施例 2 . 5 6 : N G F (配列 1) および E r b B 3 (配列 3) DVD - I g の作製

【 0 6 0 3 】

【表 67】

表 67

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
316	DVD1425H	AB020VH	AB016VH	QVQLQESGPGGLVVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDL NWIRQPPGKLEWIGIIWGDGTTDYN SAVKSRVT ISKDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGGYWY ATSYYFDYWGGTTLVTVSS ASTKGPEVQLLES GG GLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYVMAWRQAPGK GLEWVSSISSGGWTLYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGLKMATIFDYWGQ GTLVTVSS
317	DVD1425L	AB020VL	AB016VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSI SNNLN WYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLQPEDIAITYCQQEHTLPYTFGQGT KLEIKR TVAAP QSALTQPASVSGSPGQSITISCT GTSSDVGSYNVSWYQQHPGKAPKLIIEVSRP SGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQTEDEADYYCC SYAGSSI FVIFGGGTKVTVLG
318	DVD1426H	AB016VH	AB020VH	EVQLLES GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYVM AWVRQAPGKLEWVSSISSGGWTLYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGLKM ATIFDYWGQTLVTVSS ASTKGPQVQLQESG PGL VKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGL EWIGIIWGDGTTDYN SAVKSRVTISKDTSKNQF SLKLSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYYFDYWGQ GTLVTVSS
319	DVD1426L	AB016VL	AB020VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNV VSWYQQHPGKAPKLIIEVSRP SGVSNRFSGSK SGNTASLTISGLQTEDEADYYCCSYAGSSI FVIF GGGTKVTVLG QPKAAP DIQMTQSPSSLSASVGR VTITCRASQSI SNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTS RFHSGVPSRFSGSGSDFTFTISSLQPEDIAITY CQQEHTLPYTFGQGTKLEIKR

10

20

30

【0604】

実施例 2.57 : NGF (配列 1) および VEGF (配列 2) DVD-I g の作製

【0605】

【表 6 8】
表 68

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
320	DVD1427H	AB020VH	AB070VH	QVQLQESGPGGLVVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDL NWIRQPPGKGLEWIGIIWGDGTTDYN SAVKSRVT ISKDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGGYWY ATSYYFDYWGGQGLVTVSS ASTKGP EVQLVESGG GLVQPGGSLRLS CAASGFTISDYWIHWVRQAPGK GLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFL PYAMDYWG QGLVTVSS
321	DVD1427L	AB020VL	AB070VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSI SNNLN WYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQEHTLPYTFGQGT KLEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC RASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYS GVPSPRFSGSGSDFTFTISSLQPEDFATYYCQQS YTPPTFGQGTKVEIKR
322	DVD1428H	AB070VH	AB020VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTISDYWI HWVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRF TISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFF LPYAMDYWGQGLVTVSS ASTKGP QVQLQESGPG LVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGK LEWIGIIWGDGTTDYN SAVKSRVTISKDTSKNQF SLKLSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYYFDYW GQGLVTVSS
323	DVD1428L	AB070VL	AB020VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVSTAVA WYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSVPSRFSGSGS GTDFTFTISSLQPEDFATYYCQQSYTPPTFGQGT KVEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC RASQSI SNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSG VPSRFSGSGSDFTFTISSLQPEDIATYYCQQE HTLPYTFGQGTKLEIKR

10

20

30

【 0 6 0 6 】

実施例 2 . 5 8 : N G F (配列 1) および V E G F (配列 4) DVD - I g の作製

【 0 6 0 7 】

【表 69】

表 69

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 1234567890123456789012345678901234
324	DVD1429H	AB020VH	AB117VH	QVQLQESGPGGLVVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDL NWIRQPPGKGLEWIGI IWGDGTTDYN SAVKSRVT ISKDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGGYWY ATSYFFDYWGQGLVTVSS ASTKGPEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIHWVRQAPGK GLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSPWAMDYW GQGLVTVSS
325	DVD1429L	AB020VL	AB117VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI SNNLN WYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGS TDFFTISSLQPEDATYYCQQEHTLPYTFGQGT KLEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQVIRRLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLAG VPSRFSGSGS GTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQS NTSPLTFGQGT KVEIKR
326	DVD1430H	AB117VH	AB020VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWI HWVRQAPGKGLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGH STSPWAMDYWGQGLVTVSS ASTKGPQVQLQESGP GLVVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGK GLEWIGI IWGDGTTDYN SAVKSRVTISKDTSKNQ FSLKLSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYFFDYW GQGLVTVSS
327	DVD1430L	AB117VL	AB020VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVIRRLA WYQQKPGKAPKLLIYAASNLAGVPSRFSGSGS TDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLTFGQGT KVEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQSI SNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSG VPSRFSGSGS GTDFFTISSLQPEDATYYCQQE HTLPYTFGQGT KLEIKR

10

20

30

【0608】

実施例 2.59 : NGF (配列 1) および VEGF (配列 3) DVD-I g の作製

【0609】

【表 70】

表 70

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列
				1234567890123456789012345678901234
328	DVD1431H	AB020VH	AB103VH	QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDL NWIRQPPGKGLEWIGIIWGDGTTDYN SAVKSRVT ISKDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGGYWY ATSYFFDYWGQGLVTVSS ASTKGPEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGK GLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKS TAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYGTSHWYFD VWGQGLVTVSS
329	DVD1431L	AB020VL	AB103VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQISNNLN WYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGG TDFFTTISLQPEDATYYCQQEHTLPYTFGQGT KLEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC SASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSG VPSRFSGSGGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQY STVPWTFGQGTKVEIKR
330	DVD1432H	AB103VH	AB020VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGM NWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRF TFLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYY YGTSHWYFDVWGQGLVTVSS ASTKGPQVQLQES GPGGLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPP GKGLEWIGIIWGDGTTDYN SAVKSRVTISKDTSK NQFSLKLSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYFFD YWGQGLVTVSS
331	DVD1432L	AB103VL	AB020VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLN WYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGG TDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGT KVEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQISNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSG VPSRFSGSGGTDFTFTISLQPEDATYYCQQE HTLPYTFGQGTKLEIKR

10

20

30

【0610】

実施例 2.60 : NGF (配列 1) および EGF R (配列 3) DVD - Ig の作製

【0611】

【表 7 1】
表 71

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列
				1234567890123456789012345678901234
332	DVD1433H	AB020VH	AB064VH	QVQLQESGPGPLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDL NWIRQPPGKGLEWIGI IWGDGTTDYN SAVKSRVT ISKDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGGYWY ATSYFFDYWGQGT LVTVSS ASTKGP QVQLQESGP GLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAWNIRQPPG KGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTISRDTSKN QFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGT LVTVSS
333	DVD1433L	AB020VL	AB064VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSI SNNLN WYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGS TDFFTISSLQPEDATYYCQEQHTLPYTFGQGT KLEIKR TVAAP DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITC HSSQDINSNIGWLQKPGKSFKGLIYHGTNLDDG VPSRFSGSGSDYTLTISLQPEDFATYYCVQY AQFPWTFGGGTKLEIKR
334	DVD1434H	AB064VH	AB020VH	QVQLQESGPGPLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFA WNIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRI TISRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRG FPYWGQGT LVTVSS ASTKGP QVQLQESGPGLVK SETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKLEWI GI IWGDGTTDYN SAVKSRVTISKDTSKNQFSLKL SSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYFFDYWGQGT LVTVSS
335	DVD1434L	AB064VL	AB020VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIG WLQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGS TDYTLTISLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGT KLEIKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQSI SNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSG VPSRFSGSGSDTDFFTISSLQPEDATYYCQEQ HTLPYTFGQGTKLEIKR

10

20

30

【 0 6 1 2 】

実施例 2 . 6 1 : 親抗体および DVD - I g 配列をクローニングするために使用される
クローニングベクター配列

【 0 6 1 3 】

【表 7 2】

表 72

配列番号	バクテ名	ヌクレオチド配列 123456789012345678901234567890123456789012345678901
336	V1	GCGTCGACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGC ACCTCTGGGGGACAGCGGCCCTGGGCTGCCCTGGTCAAGGACTACTTCCCC GAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCAC ACCTTCCCAGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG AATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCT TGTGACAAAACCTCACACATGCCACCCGTGCCAGCACCTGAACCTCTGGGG GGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCCTCATGATC TCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGCTACCCTGTGGTCAAG GTCTTCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCTTCCCGG GAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACGCTGACCTGCCCTGGTCAAAGGCTTC TATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC AACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTC TACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCCTACACGCAGAAGAGC CTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGCGGCCGCTCGAGGCCGGCAAGGCCGG ATCCCCCGACCTCGACCTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTTCATTGCAA TAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGG CAAATCATTTGGTCGAGATCCCTCGGAGATCTCTAGCTAGAGGATCGATCC CCGCCCCGGACGAACCTAAACCTGACTACGACATCTCTGCCCTTCTTCGCG GGGCAGTGCATGTAATCCCTTCAGTTGGTTGGTACAACCTTGCCAACCTGGGC CCTGTTCCACATGTGACACGGGGGGGACCAAACACAAGGGGTTCTCTGA CTGTAGTTGACATCCTTATAAATGGATGTGCACATTTGCCAACACTGAGTG GCTTTTATGTGTAACCTTTGGCTGAAGCTCTTACACCAATGCTGGGGGACAT GTACCTCCCAGGGGCCAGGAAGACTACGGGAGGCTACACCAACGTCAATC AGAGGGGCTGTGTAGCTACCGATAAGCGGACCCTCAAGAGGGCATTAGCA ATAGTGTTTATAAGGCCCTTGTAAACCCTAAACGGGTAGCATATGCTTC CCGGGTAGTAGTATATACTATCCAGACTAACCCTAATTTCAATAGCATATGT TACCCAACGGGAAGCATATGCTATCGAATTAGGGTTAGTAAAAGGGTCCCTA AGGAACAGCGATATCTCCACCCCATGAGCTGTACGGTTTTTATTTACATG GGGTCAGGATTCCACGAGGGTAGTGAACCATTTTAGTACAAAGGGCAGTGG CTGAAGATCAAGGAGCGGGCAGTGAACCTCTCCTGAATCTTCGCCCTGCTTCT TCATTCTCCTTCGTTTAGCTAATAGAATAACTGCTGAGTTGTGAACAGTAA GGTGTATGTGAGGTGCTCGAAAACAAGGTTTCAGGTGACGCCCCAGAATA AAATTTGGACGGGGGGTTTCAAGTGGTGGCATTGTGCTATGACACCAATATAA CCCTCACAAACCCCTTGGGCAATAAATACTAGTGTAGGAATGAAACATTTCT GAATATCTTTAACAATAGAAAATCCATGGGGTGGGGACAAGCCGTAAGACT GGATGTCCATCTCACACGAATTTATGGCTATGGCAACACATAATCCTAGT GCAATATGATACTGGGGTTATTAAGATGTGTCCAGGCAGGGACCAAGACA GGTGAACCATGTTGTTACACTCTATTTGTAACAAGGGGAAAGAGAGTGGAC GCCGACAGCAGCGGACTCCACTGGTTGTCTTAACACCCCCGAAAATTA CGGGGCTCCACGCCAATGGGGCCATAAACAAGACAAGTGGCCACTCTTT TTTTTGAAATTTGTGGAGTGGGGGCACGCTCAGCCCCACACGCCGCCCTG CGGTTTTGGACTGTAAAATAAGGGTGTAAATAACTTGGCTGATTGTAACCC GCTAACCACTGCGGTCAAACCACTTGCCCAAAAACCACTAATGGCACCCC GGGGAATACCTGCATAAGTAGGTGGGCGGGCAAGATAGGGGCGCGATTGC TCGCATCTGGAGGACAAATTACACACACTTGCCTGAGCGCCAAGCACAG GGTGTTGGTCTCATATTCACGAGGTGCTGAGAGCAGGTGGGCTTAATG TTGCCATGGGTAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCC TAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCAT ATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCT

10

20

30

40

配列番号	ベクター名	ヌクレオチド配列
		<p>123456789012345678901234567890123456789012345678901</p> <p>GGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAA TCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATG CTATCCTAATAGAGATTAGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGG TAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATAT CTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCT AATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATA TGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTG GGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAAT CTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCTCATGATAAGCTGTCAAACATGAGA ATTTTCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTATAGGTTAA TGTCATGATAATAATGGTTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAA TGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTA TCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAG GAAGAGTATGAGTATCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTTTCG GGCATTTTTGCCTTCTGTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAA AGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCT CAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTTCCAAT GATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTGGA CGCCGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTT GGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGT AAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAA CTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTTCGA CAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAA TGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGC ACAACGTTGCGCAAACCTAATACTGGCGAACTACTTACTTAGCTTCCCG GCAACAATTAATAGACTGGATGGAGCGGATAAAAGTTGCAGGACCCTTCT GCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGG TGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCC CTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGA ACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTTGGTA ACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCA TTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGAC CAAATCCCTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGA AAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTG CTTGCAAACAAAAAACCCCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCA AGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCCAGCAGCGCAT ACCAAATACTGTTCTTCTAGTGAGCCGTAGTTAGGCCACCCTTCAAGAA CTCTGTAGCACCCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGC TGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATA GTTACCAGGATAAGGCGCAGCGGTGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACA GCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACTACAGCGTGA GCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCC GGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGG AAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGA GCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGC CAGCAACGCGGCCCTTTTTACGGTTCTTGCCTTTTTGCTGCCCTTTGCTCA CATGTTCTTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGC CTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCGAACGACCGAGCGCAGCGA GTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCC CGCGCTTGGCCGATTCAATTAATGCAGCTGGCAGCACAGGTTTCCCGACTG GAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTA GGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAAT TGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGC CAAGCTCTAGCTAGAGGTCGAGTCCCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAA GCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCCA TCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCCACTTCCGCCCACTGGCTGAC TAATTTTTTTTTATTTATGCAGAGCCGAGGCCGCCTCGGCTCTGAGCTAT TCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTTGCAAAAAGC TTTGCAAAGATGGATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTGCAGCTAATG GACCTTCTAGGCTTTGAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGGCCGTCAGTG GGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGAGGGGTCCG CAATTGAACCGGTGCTTAGAGAAGGTGGCGCGGGTAAACTGGGAAAGTGA</p>

10

20

30

40

配列番号	ベクター名	ヌクレオチド配列
		<p>123456789012345678901234567890123456789012345678901</p> <p>GAGGACAAATTACACACACTTGCGCCTGAGCGCCAAGCACAGGGTTGTTGG TCCTCATATTCACGAGGTCGCTGAGAGCACGGTGGGCTAATGTTGCCATGG GTAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATA TCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCC TAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCAT AGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCT GGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCTAA TAGAGATTAGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATATA CTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGC ATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATAT CTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCT AATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATA TGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCG GGTAGCATATGCTATCCTCATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTTTCTTG AAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGAT AATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGG AACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCAT GAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAGGAAGAGTAT GAGTATTCACATTTCCGTGTGCGCCCTTATTCCTTTTTTTCGGGCATTTTG CCTTCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTAAAAGTAAAAGATGCTGA AGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAATCTCAACAGCGG TAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCAC TTTTAAAGTTCGCTATGTGGCGCGTATTATCCCGTGTGACGCCGGCA AGAGCAACTCGGTGCGCGCATACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTA CTCACAGTACACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATT ATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCT GACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCCTTTTTTGCACAACATGGG GGATCATGTAACCTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCAT ACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTT GCGCAAACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATT AATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGC CCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGGCCTGG GTCTCGCGGTATCATTCAGCACCTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTAT CGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAG ACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGA CCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCAATTTTAATT TAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCC TTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAA AGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAC AAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTCGCCGATCAAGAGCTACC AACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCCAGCAGAGCGCAGATACCAATA TGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGC ACCGCTACATACTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAG TGGCGATAAGTCTGTCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCAGG TAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTT GGAGCGAACGACCTACACCGAAGTACGATACCTACAGCGTGGCTATGAGA AAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGG CAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTG GTATCTTTATAGTCCCTGTCGGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATT TTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACGC GGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTTGCTGGCCTTTTTGCTCACATGTTCTT TCCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTG AGCTGATACCGCTCGCCGACGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAG CGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCTTG GCCGATTCAATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTTCCCGACTGGAAAGCGGG CAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCA GGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTTGTGAGCGG ATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTA GCTAGAGGTCGAGTCCCTCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATC TCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCC TAACTCCGCCAGTTCCGCCATTTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTT TTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGT</p>

10

20

30

40

配列番号	ベクター名	ヌクレオチド配列
		<p>123456789012345678901234567890123456789012345678901</p> <p>AGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTTTGCAAAG ATGGATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTGCAGCTAATGGACCTTCTA GGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCG CACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTGCGCAATTGAAC CGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTGCTGTA CTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGT AGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGC CGCCAGAACACAGGT AAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCC TTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCC CGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGGCCTTAAGG AGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGGTGGAGTTGAGGCTGGCCTGGCGCTGGGCGG CCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTTCGATAA GTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTG GCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGT TTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTTC GGCGAGGCGGGCCCTGCGAGCGCGCCACCAGAAATCGGACGGGGGTAGTC TCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGC CCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTGGGCACCAGTTGCGTGAGCGGA AAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAATGGAGGACGCG GCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGGTGCAGTCAACACAAAGGAAAAGGGCCTT TCCGTCTCAGCCGTGCTTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGCGCCGCTC CAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTGCTCTTTAGGTTG GGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGAC TGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGTGTAATTCTCCTTGAATTTGCCCT TTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTCAAAG TTTTTTTCTTCCATTTAGGTGTGCTGAGGAATTCTCTAGAGATCCCTCGA CCTCGAGATCCATTGTGCCCGGGCGCACCATGGACATGCGCGTGCCCGCC AGCTGCTGGGCCTGCTGCTGCTGTGGTTCCCCGGCTCGCGATGC</p>
338	V3	<p>CAACCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAG CTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCG GGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAACCCGTC AAGGCGGGA GTGGAGACCACACACCTCCAAACAAGCAACAACAGTACCGGCCAGC AGCTACCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGAAGTCCCACAGAAGCTACAGC TGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACA GAATGTTTCATGAGCGGCCGCTCGAGGCCGGCAAGGCCGATCCCCGACCT CGACCTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGA ATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTGG TCGAGATCCCTCGGAGATCTCTAGCTAGAGGATCGATCCCCGCCCGGACG AACTAAACCTGACTACGACATCTCTGCCCTTCTTTCGCGGGGCGAGTGCATG TAATCCCTTCAAGTTGGTGGTACAACCTTGCCAAGTGGGCCCTGTTCCACAT GTGACACGGGGGGGACCAACACAAAGGGGTTCTCTGACTGTAGTTGACA TCCTTATAAATGGATGTGCACATTTGCCAACACTGAGTGGCTTTTCATCTG GAGCAGACTTTGAGTCTGTGGACTGCAACACAACATTGCCTTTATGTGTA ACTCTTGGCTGAAGCTCTTACACCAATGCTGGGGGACATGTACCTCCCAGG GGCCCAGGAAGACTACGGGAGGCTACACCAACGTC AATCAGAGGGGCTGT GTAGCTACCGATAAGCGGACCCTCAAGAGGGCATTAGCAATAGTGTTTATA AGGCCCCCTTGTAAACCCTAAACGGGTAGCATATGCTTCCCGGGTAGTAGT ATATACTATCCAGACTAACCTAATTCAATAGCATATGTTACCCAACGGGA AGCATATGCTATCGAATTAGGGTTAGTAAAAGGGTCTTAAGGAACAGCGAT ATCTCCCACCCCATGAGCTGTCACGGTTTTATTTACATGGGGT CAGGATTC CACGAGGTAGTGAACATTTTAGTCACAAGGGCAGTGGCTGAAGATCAAG GAGCGGGCAGTGAACCTCCTGAATCTTCGCTTCTTCAATCTCCTTC GTTTAGCTAATAAGAATAACTGCTGAGTTGTGAACAGTAAGGTGTATGTGAG GTGCTCGAAAACAAGGTTTCAGGTGACGCCCCCAGAATAAAAATTTGGACGG GGGGTTCAGTGGTGGCATTGTGCTATGACACCAATATAACCTCACAAACC CCTTGGGCAATAAATACTAGTGTAGGAATGAAACATTCTGAATATCTTTAA CAATAGAAATCCATGGGGTGGGGACAAGCCGTAAAGACTGGATGTCCATCT CACACGAATTTATGGCTATGGGCAACACATAATCCTAGTGCAATATGATAC TGGGGTTATTAAGATGTGTCCAGGCAGGGACCAAGACAGGTGAACCATGT TGTTACTCTATTTGTAACAAGGGGAAAGAGAGTGGACGCCGACAGCAGC GGACTCCACTGGTTGTCTCTAACACCCCCGAAAATTAACGGGGCTCCACG</p>

10

20

30

40

配列番号	ベクター名	ヌクレオチド配列 123456789012345678901234567890123456789012345678901
		CCAATGGGGCCCAATAACAAAGACAAGTGGCCACTCTTTTTTTTGAATTG TGGAGTGGGGGCACGCGTCAGCCCCACACGCCCTGCGGTTTTGGACT GTAAAATAAGGGTGTAAATAACTTGGCTGATTGTAACCCCGTAACCACTGC GGTCAAACCACTTGCCCAAAAACCACCTAATGGCACCCCGGGGAATACCTG CATAAGTAGGTGGGCGGGCCAAGATAGGGGCGCGATTGCTGCGATCTGGAG GACAAATTACACACACTTGCGCCTGAGCGCCAAGCACAGGGTTGTTGGTCC TCATATTCACGAGGTGCTGAGAGCACGGTGGGCTAATGTTGCCATGGGTA GCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCT GGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAA TCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATAGG CTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGG TAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCTAATAG AGATTAGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATATACTA CCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATA TGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTG GGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAAT TTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGC TATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGT AGCATATGCTATCCTCATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTTTTCTGAAG ACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAAT AATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAAC CCCTATTTGTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAG ACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAG TATTCACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTTCGCGCATTTTGCCCT TCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGA TCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAA GATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTT TAAAGTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTGACGCCGGGCAAGA GCAACTCGGTGCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTC ACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATG CAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGAC AACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCCTTTTTTGCACAACATGGGGGA TCATGTAACCTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACC AAACGACGAGCGTGACACCAGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCG CAAACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCAGCAACAATTAAT AGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCT TCCGGCTGGCTGGTTTATGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGGAGCGTGGGTC TCGCGGTATCATGTCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCCTATCGT AGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACA GATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTGAGACCA AGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTAATTTAA AAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTA ACGTGAGTTTTCGTTCCTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGG ATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGGTAATCTGCTGTTGCAAACAAA AAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAAC TCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGT TCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACC GCCTACATACTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGG CGATAAGTCGTGCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCAGGATAA GGCGCAGCGGTGCGGGCTGAACGGGGGGTTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGGA GCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAG CGCCACGCTTCCCAGGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGCGCAG GGTGCGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTA TCTTTATAGTCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGGCGTCAATTTTTT GTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGC CTTTTTACGGTTCTTGGCCTTTTGTGCTGGCCTTTTGTGCTCACATGTTCTTCC TGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGC TGATAACGCTCGCCGACGCCAAGCAGCGAGCGCAGCGAGTCAAGTGGCGA GGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGGTTGGCC GATTCAATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCAGCTGGAAGCGGGCAG TGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGC TTTACACTTTATGCTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATA

10

20

30

40

配列番号	ベクター名	ヌクレオチド配列
		<p>123456789012345678901234567890123456789012345678901</p> <p>ACAATTTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTAGCT AGAGGTCGAGTCCCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCA ATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCTAA CTCCGCCCAGTTCGCCCATTTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTA TTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGT GAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTTTGCAAAGATG GATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTGCAGCTAATGGACCTTCTAGGT CTTAAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCAC ATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGAGGGGTCCGCAATTGAACCGG TGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGTAAACTGGGAAATGATGTCTGTACTG GCTCCGCCTTTTTCCCAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTAGT CGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCCGAGAACACAGGTAAG TGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTG CGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGA GCTTCGGGTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCCTTAAGGAGC CCCTTCGCCTCGTGTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCG CGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTTCGATAAGTC TCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCA AGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTT TGGGGCCGCGGGCGGCACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTTCGGC GAGCGGGGCCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCA AGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCCGCTGTATCGCCCC GCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCCGCACAGTTCGCTGAGCGGAAAG ATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAATGGAGGACGCGGCG CTCGGGAGAGCGGGCGGGTGGTGCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCC GTCCTCAGCCGTCGTTTCTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCAG GCACCTCGATTAGTTCGAGCTTTTGGAGTACGTCTTTAGGTTGGGG GGAGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGA AGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGTGTAATTTCTCTTGGAAATTTGCCCTTTT TGAGTTTGGATCTTGGTTCATTTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTT TTTTCTCCATTTAGGTGTCTGAGGAATTTCTCTAGAGTCCCTCGACCT CGAGATCCATTGTGCCGGGCGCCACCATGACTTGGACCCACTCCTCTTC CTCACCTCCTCCTCCACTGCACAGGAAGCTTATCG</p>
339	V4	<p>ACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTG AAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGA GAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC AGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCC TGCGAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAAC AGGGGAGAGTGTGAGCGGCCGCTCGAGGCCGGAAGGCCGGATCCCCCGA CCTCGACCTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTTCATTTGCAATAGTGTGT GGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGCAAAATCATT TGGTTCGAGATCCCTCGGAGATCTCTAGCTAGAGGATCGATCCCCGCCCCGG ACGAACTAAACCTGACTACGACATCTCTGCCCTTCTTCGCGGGGACAGTGC ATGTAATCCCTTCAGTTGGTTGGTACAACCTTGCCAACTGGGCCCTGTTCCA CATGTGACACGGGGGGGACCAACACAAAGGGGTTCTCTGACTGTAGTTG ACATCCTTATAAATGGATGTGCACATTTGCCAACACTGAGTGGCTTTCATC CTGGAGCAGACTTTGCAGTCTGTGGACTGCAACACAACATTGCCTTTATGT GTAACCTTGGCTGAAGCTTTACACCAATGCTGGGGGACATGTACCTCCC AGGGGCCCAGGAAGACTACGGGAGGCTACACCAACGTCAATCAGAGGGGCC TGTGTAGCTACCGATAAGCGGACCCTCAAGAGGGCATTAGCAATAGTGTTT ATAAGGCCCCCTTGTAAACCTAAACGGGTAGCATATGCTTCCCGGGTAGT AGTATATACTATCCAGACTAACCCTAATTCAATAGCATATGTTACCCAACG GGAAGCATATGCTATCGAATTAGGGTTAGTAAAAGGGTCTAAGGAACAGC GATATCTCCACCCCATGAGCTGTCACGGTTTTATTTACATGGGGTCAGGA TTCCACGAGGGTAGTGAACATTTTGTGACAAAGGGCAGTGGCTGAAGATC AAGGAGCGGGCAGTGAACCTCTCCTGAATCTTCGCCTGCTTCTTCAATCTCC TTCGTTTAGCTAATAGAATAACTGCTGAGTTGTGAACAGTAAGGTGTATGT GAGGTGCTCGAAAACAAGTTTCAGGTGACGCCCCAGAATAAAATTTGGA CGGGGGTTTCAGTGGTGGCATTGTGCTATGACACCAATATAACCCTCACAA ACCCCTTGGCAATAAATACTAGTGTAGGAATGAAACATTCTGAATATCTT</p>

10

20

30

40

配列番号	ベクター名	ヌクレオチド配列
		<p>123456789012345678901234567890123456789012345678901</p> <p>TAACAATAGAAATCCATGGGGTGGGGACAAGCCGTAAAGACTGGATGTCCA TCTCACACGAATTTATGGCTATGGGCAACACATAATCCTAGTGCAATATGA TACTGGGGTTATTAAGATGTGTCCCAGGCAGGGACCAAGACAGGTGAACCA TGTTGTTACACTCTATTTGTAACAAGGGGAAAGAGAGTGGACGCCGACAGC AGCGGACTCCACTGGTTGTCTCTAACACCCCCGAAAATTAACGGGGCTCC ACGCCAATGGGGCCATAAACAAGACAAGTGGCCACTCTTTTTTTTTGAAA TTGTGGAGTGGGGGCACGCGTCAGCCCCACACGCCGCCCTGCGGTTTTGG ACTGTAAAATAAGGGTGTAAATACTTGGCTGATTGTAACCCCGCTAACCAC TGCGGTCAAACACTTGCCCAAAAACCACTAATGGCACCCCGGGGAATAC CTGCATAAGTAGGTGGCGGGCCAAAGATAGGGGCGCGATTGCTGCGATCTG GAGGACAAATTACACACACTTGCGCCTGAGCGCCAAGCACAGGGTTGTTGG TCCTCATATTCACGAGGTCGCTGAGAGCACGGTGGGCTAATGTTGCCATGG GTAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATA TCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCC TAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCAT AGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCT GGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCTAA TAGAGATTAGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATATA CTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGC ATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATAT CTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCT AATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATA TGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCG GGTAGCATATGCTATCCTCATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTTTCTTG AAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGAT AATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGG AACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCAT GAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTAT GAGTATTCACATTTCCGTGTGCGCCCTTATTCCTTTTTTGGCGCATTTTG CCTTCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAGAGTAAAAGATGCTGA AGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAATGGATCTCAACAGCGG TAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCAC TTTTAAAGTTCCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTGACGCCGGCA AGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTA CTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATT ATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCT GACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCCTTTTTTGCACAACATGGG GGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCAT ACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTT GCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCAGCAACAATT AATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGC CCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGTTGAGCGTGG GTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTAT CGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAG ACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACCTGTCAGA CCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTAATT TAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCC TTAACGTGAGTTTTCGTTCCTACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAA AGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAC AAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTGGCCGATCAAGAGCTACC AACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAAGAGCGCAGATACCAATAAC TGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGC ACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAG TGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGA TAAGGCGCAGCGGTGGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTT GGAGCGAACGACCTACACCGAAGTGAATACCTACAGCGTGAGCTATGAGA AAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGG CAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTG GTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTTGCCACCTCTGACTTGGAGCGTGGATT TTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGC GGCCTTTTTACGGTTCTGGCCTTTTTGCTGCCCTTTTGTCTCACATGTTCTT TCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTG</p>

10

20

30

40

配列番号	ベクター名	ヌクレオチド配列
		<p>123456789012345678901234567890123456789012345678901</p> <p>AGCTGATACCGCTCGCCGACGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAG CGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCTCTCCCCGCGCCTTG GCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGG CAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCA GGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGG ATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTA GCTAGAGGTGCGAGTCCCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATC TCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCCTAACTCCGCCCATCCCCGCC TAACTCCGCCAGTTCCGCCATTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTT TTATTTATGCAGAGGCGGAGCCGCGCTCGGCTCTGAGCTATCCAGAAGT AGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCTTAGGCTTTTGCAAAAAGCTTTGCAAAG ATGGATAAAGTTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTGCAGCTAATGGACCTTCTA GGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCG CACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCCGCAATTGAAC CGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGTGTCGTGTA CTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGT AGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGT AAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTACGGGTATGGCCC TTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCC CGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTCGCCTTAAGG AGCCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCTTGGGCTGGGCGTGGGGCCG CCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAA GTCTCTAGCCATTTAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTG GCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCAAGATCTGCACACTGGTATTTCCGGT TTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTT GGCGAGGCGGGGCTGCGAGCGCGCCACCAGAAATCGGACGGGGTAGTC TCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGC CCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGA AAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCG GCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAAGTCAACACAAAGGAAAGGGCCCTT TCCGTCTCAGCCGTGCTTTCATGTGACTCCAGGATACCGGGCCGCTC CAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTGCTCTTTAGGTTG GGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCACACTGAGTGGGTGGAGAC TGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGTGTAATTTCTCTTGGAAATTTGCCCT TTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAG TTTTTTTCTTCCATTTAGGTTGCTGAGGAATTTCTTAGAGATCCCTCGA CCTCGAGATCCATTTGTGCCCCGGGCGCACCATGACTTGGACCCCACTCCTCT TCCTCACCCCTCCTCCTCACTGCACAGGAAGCTTATCG</p>
340	V5	<p>CAACCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAG CTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCG GGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCTCAAGGCCGGA GTGGAGACCACACACCCTCCAAACAAGCAACAAAGTACGCGGCCAGC AGCTACCTGAGCCTGACGCTGAGCAGTGGAAATCCACAGAAGCTACAGC TGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACA GAATGTTTCATGAGCGGCCGCTCGAGGCCGGCAAGGCCGATCCCCGACCT CGACCTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGA ATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTGG TCGAGATCCCTCGGAGATCTCTAGCTAGAGGATCGATCCCCGCCCGGACG AACTAAACCTGACTACGACATCTCTGCCCTTCTTCGCGGGGACAGTGCATG TAATCCCTTCAGTTGGTTGGTACAACCTTGCCAAGTGGGCCCTGTTCCACAT GTGACACGGGGGGGACCAACACAAAGGGTTCTCTGACTGTAGTTGACA TCCTTATAAATGGATGTGCACATTTGCCAACACTGAGTGGCTTTCATCCTG GAGCAGACTTTGAGTCTGTGGACTGCAACACAACATTGCCCTTTATGTGTA ACTCTTGGCTGAAGCTCTTACACCAATGCTGGGGGACATGTACCTCCCAGG GGCCCAGGAAGACTACGGGAGGCTACACCAACGTCAATCAGAGGGCCTGT GTAGCTACCGATAAGCGGACCCTCAAGAGGGCATTAGCAATAGTGTTTATA AGGCCCCCTTGTAAACCTAAACGGGTAGCATATGCTTCCCGGGTAGTAGT ATATACTATCCAGACTAACCCATAATCAATAGCATATGTTACCCAACGGGA AGCATATGCTATCGAATTAGGGTAGTAAAAGGGTCTAAGGAACAGCGAT ATCTCCCACCCCATGAGCTGTCACGGTTTTATTTACATGGGGTCAGGATTC CACGAGGGTAGTGAACATTTTAGTCACAAGGGCAGTGGCTGAAGATCAAG</p>

10

20

30

40

配列番号	ベクター名	ヌクレオチド配列
		<p>123456789012345678901234567890123456789012345678901</p> <p>GAGCGGGCAGTGAACCTCCTGAATCTTCGCCTGCTTCTTCATTCTCCTTC GTTTAGCTAATAAGAAATAACTGCTGAGTTGTGAACAGTAAGGTGTATGTGAG GTGCTCGAAAACAAGGTTTCAGGTGACGCCCCAGAAATAAAATTTGGACGG GGGGTTCAGTGGTGGCATTGTGCTATGACACCAATATAACCCTCACAAACC CCTTGGGCAATAAAATACTAGTGTAGGAATGAAACATTTCTGAATATCTTTAA CAATAGAAATCCATGGGGTGGGACAAGCCGTAAAGACTGGATGTCCATCT CACACGAATTTATGGCTATGGGCAACACATAATCCTAGTGAATATGATAC TGGGGTTATTAAGATGTGTCCAGGCAGGGACCAAGACAGGTGAACCATGT TGTTACACTCTATTTGTAACAAGGGGAAAAGAGAGTGGACGCCGACAGCAGC GGACTCCACTGGTTGTCTTAACACCCCCGAAAATTAACGGGGCTCCACG CCAATGGGGCCATAAACAAAGACAAGTGGCCACTCTTTTTTTTTGAAATTTG TGGAGTGGGGGCACGCGTCAGCCCCACACGCCCTCGGTTTTTGGACT GTAAAATAAAGGGTGTAAATAACTTGGCTGATTTGTAACCCCGTAACCCTGC GGTCAAACCACTTGCCACAAAACCACTAATGGCACCCCGGGGAATACCTG CATAAGTAGGTGGGCGGGCCAAGATAGGGGCGGATTTGCTGCGATCTGGAG GACAAATTACACACACTTGCCTGAGCGCCAAGCACAGGGTTGTTGGTCC TCATATTCACGAGGTGCTGAGAGCACGGTGGGCTAATGTTGCCATGGGTA GCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCT GGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAA TCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATAGG CTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGG TAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCTAATAG AGATTAGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATATACTA CCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATA TGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTG GGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAAT TTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGC TATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGT AGCATATGCTATCCTCATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTTTCTTGAAG ACGAAAGGGCTCGTGATACGCCATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAAT AATGGTTTCTTAGACGTGAGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTCGCGCGGAAC CCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTATGAG ACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAG TATTAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTTGCGGCATTTTTGCCT TCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTAAAAGTAAAAGATGCTGAAGA TCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAA GATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAGAAGCTTTTCCAATGATGAGCACTTT TAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTTATCCCGTGTGACGCCGGGCAAGA GCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTC ACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTTATG CAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAATCTACTTCTGAC AACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCCTTTTTTGCACAACATGGGGGA TCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGAGCTGAATGAAGCCATACC AAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCG CAAATATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAAT AGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCT TCCGGCTGGCTGGTTTATGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGGAGGTTGGGTC TCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGT AGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACA GATCGCTGAGATAGGTGCCCTCACTGATTAAGCATTTGGTAACCTGTCAGACCA AGTTTACTCATATATACTTTAGATTTGATTTAAAACCTCATTTTTTAATTTAA AAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTA ACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGG ATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAA AAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAAC TCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGT TCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCCTTCAAGAATCTGTAGCACC GCCTACATACTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGG CGATAAGTGTGCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCAGGATAA GGCGCAGCGGTGGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGGA CGAACGACCTACCCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAG CGCCACGCTTCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAG</p>

10

20

30

40

配列番号	ベクター名	ヌクレオチド配列
		<p>123456789012345678901234567890123456789012345678901</p> <p>GGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTA TCTTTATAGTCCTGTCTGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTT GTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGC CTTTTTACGGTTCTTGGCCTTTTGCTGGCCTTTGCTCACATGTTCTTTCC TGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGC TGATAACCGCTCGCCGACGCCAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGA GGAAGCGGAAGAGCGCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCCTTGGCC GATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCCGACTGGAAAGCGGGCAG TGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGC TTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATA ACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTAGCT AGAGGTCGAGTCCCTCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCA ATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCATCCCGCCCTAA CTCCGCCAGTTCCGCCCATTTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTTTA TTTTATGCAGAGGCCGAGGCCCTCGGCCCTGAGCTATTCCAGAAGTAGT GAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAGCTTTGCAAAGATG GATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTTGCAGCTAATGGACCTTCTAGGT CTTGAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCAC ATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGAGGGGTCCGGCAATTGAACCGG TGCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAACCTGGGAAAGTGTGTCGTGTACTG GCTCCGCCTTTTTCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTAGT CGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTCCGCCAGAACACAGGTAAG TGCCGTGTGTGGTCCCAGCGGCCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTG CGTGCCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGA GCTTCCGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCCTTGCCTTAAGGAGC CCCTTCGCCTCGTGCTTGAAGTTGAGGCCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCG CGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTGATAAGTC TCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCA AGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTT TGGGGCCCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTCCGGC GAGGCGGGGCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCA AGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCTGTATCGCCCC GCCCTGGGCGGCAAGCTGGCCCGGTGGCACCCAGTTGCGTGAGCGGAAAG ATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAATGGAGGACGCGGCG CTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAAGTCAACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCC GTCTCAGCCGTGCTTCAATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAG GCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTGCTTTTAGGTTGGGG GGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGA AGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGTGTAATTTCTCTTGGAAATTTGCCCTTTT TGAGTTTGGATCTTGGTTCATTTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTT TTTTCTTCCATTTAGGTTGCTGAGGAAATTTCTTAGAGATCCCTCGACCT CGAGATCCATTTGTCGGGCGGCCACCATGGACATGCGCGTGCCTCCCGCCAG CTGCTGGCCCTGCTGCTGTGTTTCCCGGCTCGCGATGC</p>
341	V7	<p>GCGTCGACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGC ACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCCTGGTCAAGGACTACTTCCCC GAACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCAC ACCTTCCCGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG GTGACCGTGCCCTCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG AATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAATCT TGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCCGCGGGG GGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATC TCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGTATGGTGCAGC GTCTTCAACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCATCCCGC GAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC TATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC AACTACAAGACCACGCTCCCCTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCCTC TACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC</p>

10

20

30

40

配列番号	ベクター名	ヌクレオチド配列
		<p>123456789012345678901234567890123456789012345678901</p> <p>TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCCTACACGCAGAAGAGC CTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGAGCGGCCGCTCGAGGCCGGCAAGGCCGG ATCCCCCGACCTCGACCTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAA TAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGG CAAATCATTTGGTTCGAGATCCCTCGGAGATCTCTAGCTAGAGGATCGATCC CCGCCCCGGACGAACTAAACCTGACTACGACATCTCTGCCCTTCTTCGCG GGGCAGTGCATGTAATCCCTTCAGTTGGTTGGTACAACCTTGCCAACCTGGGC CCTGTTCCACATGTGACACGGGGGGGGACCAAACACAAAGGGGTTCTCTGA CTGTAGTTGACATCCTTATAAATGGATGTGCACATTTGCCAACACTGAGTG GCTTTTCATCCTGGAGCAGACTTTGCAGTCTGTGGACTGCAACACAACATTG CCTTTATGTGTAACCTCTTGGCTGAAGCTCTTACACCAATGCTGGGGGACAT GTACCTCCCAGGGGCCAGGAAGACTACGGGAGGCTACACCAACGTCATC AGAGGGGCTGTGTAGCTACCGATAAGCGGACCCTCAAGAGGGCATTAGCA ATAGTGTTTATAAGGCCCTTGTAAACCCTAAACGGGTAGCATATGCTTC CCGGGTAGTAGTATATACTATCCAGACTAACCCTAATTCATAGCATATGT TACCCAACGGGAAGCATATGCTATCGAATTAGGGTTAGTAAAAGGGTCCTA AGGAACAGCGATATCTCCACCCCATGAGCTGTCACGGTTTTATTTACATG GGGTGAGGATTCCACGAGGGTAGTGAACCATTTTAGTCACAAGGGCAGTGG CTGAAGATCAAGGAGCGGGCAGTGAACCTCTCCTGAATCTTCGCTGCTTCT TCATTCTCCTTCGTTTAGCTAATAGAATAACTGCTGAGTTGTGAACAGTAA GGTGTATGTGAGGTGCTCGAAAACAAGGTTTCAGGTGACGCCCCCAAGAATA AAATTTGGACGGGGGTTTCAGTGGTGGCATTGTGCTATGACACCAATATAA CCCTCACAAACCCCTTGGGCAATAAATACTAGTGTAGGAATGAAACATTCT GAATATCTTTAACAATAGAAATCCATGGGGTGGGGACAAGCCGTAAGACT GGATGTCCATCTCACACGAATTTATGGCTATGGGCAACACATAATCCTAGT GCAATATGATACTGGGGTTATTAAGATGTGTCCCAGGCAGGGACCAAGACA GGTGAACCATGTTGTTACACTCTATTTGTAACAAGGGGAAAGAGAGTGGAC GCCGACAGCAGCGGACTCCACTGGTTGTCTCTAACACCCCCGAAAATTA CGGGGCTCCACGCCAATGGGGCCATAAACAAAGACAAGTGGCCACTCTTT TTTTTGAAATTTGTGGAGTGGGGGCACGCGTCAGCCCCCACAGCCGCCCTG CGGTTTTGGACTGTAAAATAAGGGTGTAAATAACTTGGCTGATTGTAACCC GCTAACCACTCGGGTCAAACCACTTGCCACAAAACCACTAATGGCACC GGGAATACCTGCATAAGTAGGTGGGCGGGCCAAGATAGGGGGCAGCATTC TGCGATCTGGAGGACAAATTACACACACTTGCCTGAGCGCCAAGCACAG GGTTGTTGGTCTCATATTCACGAGGTCGCTGAGAGCACGGTGGGCTAATG TTGCCATGGGTAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCC TAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCAT ATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCT GGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAA TCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATG CTATCCTAATAGAGATTAGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGG TAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATAT CTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCT AATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATA TGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTG GGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAAT CTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCTCATGATAAGCTGTCAAACATGAGA ATTTTCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAA TGTGATGATAAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGAAA TGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTA TCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAG GAAGAGTATGAGTATTCACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTGCG GGCATTTTGCCTTCTGTTTTTGTCTCACCAGAAACGCTGGTGAAGTAAA AGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCT CAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAAGCTTTTCCAAT GATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGGGTATTATCCCGTGTGA CGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGACATACTATTCTCAGAATGACTT GGTTGAGTACTCACCAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGT AAGAGAATTATGAGTGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAA CTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGC CAACATGGGGGATCATGTAACCTGCTTGTGTTGGGAACCGGAGCTGAA TGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGC</p>

10

20

30

40

配列番号	ベクター名	ヌクレオチド配列	
		123456789012345678901234567890123456789012345678901 AACAACTGTTGCGCAAACCTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCG GCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAAGTTGCAGGACCACTTCT GCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGG TGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCC CTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGA ACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTA ACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCA TTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGAC CAAAATCCCTAACGTGAGTTTTCTGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGA AAAGATCAAAGGATCTTCTGAGATCCTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTG CTTGCAAACAACAAAAACCCGCTAACAGCGGTGGTTTGGTTGCCGGATCA AGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGAT ACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAA CTCTGTAGCACCCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGC TGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATA GTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGGGGCTGAACGGGGGGTTTCGTGCACACA GCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGA GCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCC GGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGG AACGCCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTTCGCGACCTCTGAACTTGA GCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGGCGGAGCCTATGAAAACCGC CAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCA CATGTTCTTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGC CTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGA GTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCC CGCGCTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTG GAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTA GGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAAT TGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGC CAAGCTTAGCTAGAGGTGAGTCCCTCCCGAGCGGAGAGATGCAAA CATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTTAACCTCCGCCA TCCCGCCCTTAACCTCCGCCAGTTCCGCCATTCTCCGCCCATGGCTGAC TAATTTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTAT TCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAGC TTTGCAAAGATGGATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTGCAGCTAATG GACCTTCTAGGTCTTGAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGGCCGTCAGTG GGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCGGAGAAGTTGGGGGGAGGGTCCGG CAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAACCTGGGAAAGTGA TGTGCTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATAT AAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTCCGCCAG AACACAGGTAAGTCCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTTTTACGGG TTATGGCCCTTGCCTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGAT TCTTGATCCCGAGCTTCGGGTGGAAAGTGGGTGGGAGAGTTCCAGGCCCTG CGCTTAAGGAGCCCTTCGCCTCGTGCTTGAAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCG CTGGGGCCGCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGC TTTGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCT TTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGG TATTTCCGTTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGGCTCCAGCG CACATGTTCCGGCAGGCGGGGCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACG GGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCC GTGTATCGCCCGCCCTGGCGGCAAGGCTGGCCCGTGGCACCAGTTGC GTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATG GAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGGTACCCACACAAAGGAA AAGGGCCTTTCCGTCTCAGCCGTGCTTTCATGTGACTCCACGGAGTACCG GCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTGCTC TTTAGGTTGGGGGGAGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCGACACTGAGTG GGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGTGTAATTTCTCCTTGG ATTTGCCCTTTTTGAGTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGT GGTCAAAGTTTTTTCTTCCATTTAGGTGTGCTGAGGAATTTCTAGAG ATCCCTCGACCTCGAGATCCATTGTGCCCGGGCGCCACCATGGAGTTTGG CTGAGCTGGCTTTTTCTTGTGCGGATTTAAAAGGTGTCCAGTGC	
			10
			20
			30
			40

【 0 6 1 4 】

本開示は、分子生物学および薬物送達分野で周知の技術全体を、参照により組み込む

。これらの技術には、以下の公報に記載されている技術が含まれるが、これに限定されるものではない。

- Ausubel et al. (eds.), CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, NY (1993);
- Ausubel, F.M. et al. eds., SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (4th Ed. 1999) John Wiley & Sons, NY. (ISBN 0-471-32938-X).
- CONTROLLED DRUG BIOAVAILABILITY, DRUG PRODUCT DESIGN AND PERFORMANCE, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984);
- Giege, R. and Ducruix, A. Barrett, CRYSTALLIZATION OF NUCLEIC ACIDS AND PROTEINS, a Practical Approach, 2nd ea., pp. 20 1-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999); 10
- Goodson, in MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE, vol. 2, pp. 115-138 (1984);
- Hammerling, et al., in: MONOCLONAL ANTIBODIES AND T-CELL HYBRIDOMAS 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981);
- Harlow et al. , ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988);
- Kabat et al., SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) and (1991);
- Kabat, E.A., et al. (1991) SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; 20
- Kontermann and Dubel eds., ANTIBODY ENGINEERING (2001) Springer-Verlag. New York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5).
- Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990);
- Lu and Weiner eds., CLONING AND EXPRESSION VECTORS FOR GENE FUNCTION ANALYSIS (2001) BioTechniques Press. Westborough, MA. 298 pp. (ISBN 1-881299-21-X).
- MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE, Langer and Wise (eds.), CRC Press., Boca Raton, Fla. (1974); 30
- Old, R.W. & S.B. Primrose, PRINCIPLES OF GENE MANIPULATION: AN INTRODUCTION TO GENETIC ENGINEERING (3d Ed. 1985) Blackwell Scientific Publications, Boston. Studies in Microbiology; V.2:409 pp. (ISBN 0-632-01318-4)
- Sambrook, J. et al. eds., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (2d Ed. 1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. Vols. 1-3. (ISBN 0-87969-309-6).
- SUSTAINED AND CONTROLLED RELEASE DRUG DELIVERY SYSTEMS, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978 40
- Winnacker, E.L. FROM GENES TO CLONES: INTRODUCTION TO GENE TECHNOLOGY (1987) VCH Publishers, NY (translated by Horst Ibelgauf). 634 pp. (ISBN 0-89573-614-4).

【 0 6 1 5 】

参照による援用

本出願を通して引用されてもよい、すべての引用される参考資料（参考文献、特許、特許出願、およびウェブサイトを含む）の内容は、これによって、これらの参考資料がそこに記載されているかのように、参考資料の全体を参照することにより明確に援用される。本発明の実施は、別段の記載がない限り、当該技術分野において周知である免疫学、分子生物学および細胞生物学の従来技術を使用する。

【 0 6 1 6 】
均等

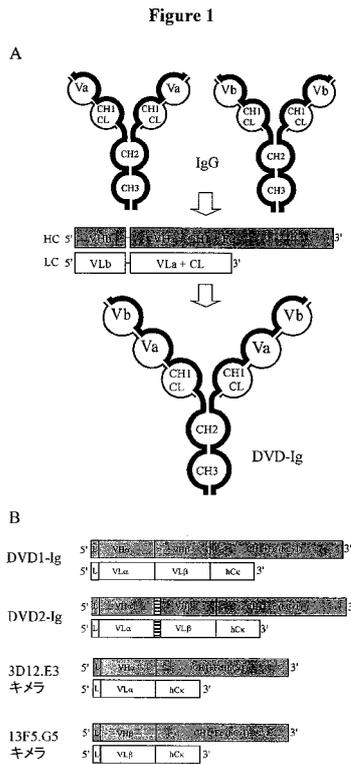
本発明は、その精神または本質的な特徴から逸脱せずに他の具体的な形態において体現されもよい。したがって、前述の実施形態は、本明細書に記載されている本発明を限定するというよりはむしろ、すべての点において例示していると考えべきである。よって、本発明の範囲は、前述の記載によるというよりはむしろ、添付される特許請求の範囲によって示され、したがって、特許請求の範囲の意味および均等の範囲内にあるすべての変更は本明細書に含まれることが意図される。

【 0 6 1 7 】

本出願は、2010年7月9日に出願した米国仮出願第61/363,120号の優先権を主張する通常出願であって、その内容が参照により本明細書に組み込まれている。

10

【 図 1 】



【配列表】

2013535187000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成24年4月27日(2012.4.27)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ポリペプチド鎖を含み、前記ポリペプチド鎖はVD1 - (X1)_n - VD2 - C - (X2)_n

(VD1は第一の重鎖可変ドメインであり、

VD2は第二の重鎖可変ドメインであり、

Cは重鎖定常ドメインであり、

X1はリンカーであり(但し、CH1ではない。)、

X2はFc領域であり、

nは0または1である。)を含む、および

(結合タンパク質は

NGFおよびMTX、

NGFおよびNKGD、

NGFおよびIGF1(NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの少なくとも1つのCDRを含む;および/またはIGF1を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号46からの少なくとも1つのCDRを含む。)、

NGFおよびIGF2(NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの少なくとも1つのCDRを含む;および/またはIGF2を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号46からの少なくとも1つのCDRを含む。)、

NGFおよびRON、

NGFおよびErbb3、

NGFおよびCD-3(NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの少なくとも1つのCDRを含む;および/またはCD-3を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号30または68からの少なくとも1つのCDRを含む。)、

NGFおよびIGFR(NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの少なくとも1つのCDRを含む;および/またはIGFRを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号48からの少なくとも1つのCDRを含む。)、

NGFおよびHGF(NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの少なくとも1つのCDRを含む;および/またはHGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号50からの少なくとも1つのCDRを含む。)、

NGFおよびVEGF(NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの少なくとも1つのCDRを含む;および/またはVEGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号54、78、80または84からの少なくとも1つのCDRを含む。)、

NGFおよびDLL4、

NGFおよびP1GF、

NGFおよびCD-20(NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの少なくとも1つのCDRを含む;および/またはCD-20を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号28からの少なくとも1つのCDRを含む。)、

NGFおよびEGFR(NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの少なくとも1つのCDRを含む;および/またはEGFRを標的化する重鎖可変

ドメインは、配列番号 32、62 または 76 からの少なくとも 1 つの CDR を含む。)、
 NGF および HER-2 (NGF を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 60 または
 86 からの少なくとも 1 つの CDR を含む; および / または HER-2 を標的化する重鎖
 可変ドメインは、配列番号 34 からの少なくとも 1 つの CDR を含む。)、
 NGF および CD-19 (NGF を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 60 または
 86 からの少なくとも 1 つの CDR を含む; および / または CD-19 を標的化する重鎖
 可変ドメインは、配列番号 38 からの少なくとも 1 つの CDR を含む。)、
 NGF および CD-80 (NGF を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 60 または
 86 からの少なくとも 1 つの CDR を含む; および / または CD-80 を標的化する重鎖
 可変ドメインは、配列番号 40 からの少なくとも 1 つの CDR を含む。)、
 NGF および CD-22 (NGF を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 60 または
 86 からの少なくとも 1 つの CDR を含む; および / または CD-22 を標的化する重鎖
 可変ドメインは、配列番号 42 からの少なくとも 1 つの CDR を含む。)、
 NGF および CD-40 (NGF を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 60 または
 86 からの少なくとも 1 つの CDR を含む; および / または CD-40 を標的化する重鎖
 可変ドメインは、配列番号 44 からの少なくとも 1 つの CDR を含む。)、
 NGF および、c-MET、または
 NGF および NRP1 (NGF を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 60 または 8
 6 からの少なくとも 1 つの CDR を含む; および / または NRP1 を標的化する重鎖可変
 ドメインは、配列番号 58 または 66 からの少なくとも 1 つの CDR を含む。)
 に結合する) 少なくとも 1 つの標的に結合することが可能な結合タンパク質。

【請求項 2】

VD1 および / または VD2 重鎖可変ドメインが、配列番号 28、30、32、34、
 36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、6
 2、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88
 または 90 からの 3 つの CDR をそれぞれ含む、請求項 1 に記載の結合タンパク質。

【請求項 3】

ポリペプチド鎖を含み、前記ポリペプチド鎖は VD1 - (X1)_n - VD2 - C - (X
 2)_n
 (VD1 は第一の軽鎖可変ドメインであり、
 VD2 は第二の軽鎖可変ドメインであり、
 C は軽鎖定常ドメインであり、
 X1 はリンカーであり (但し、CH1 ではない。)、
 X2 は Fc 領域を含まず、
 n は 0 または 1 である。) を含む、
 (結合タンパク質は
 NGF および MTX、
 NGF および NKG2D、
 NGF および IGF1 (NGF を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 61 または 8
 7 からの少なくとも 1 つの CDR を含む; および / または IGF1 を標的化する重鎖可変
 ドメインは、配列番号 47 からの少なくとも 1 つの CDR を含む。)、
 NGF および IGF2 (NGF を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 61 または 8
 7 からの少なくとも 1 つの CDR を含む; および / または IGF2 を標的化する重鎖可変
 ドメインは、配列番号 47 からの少なくとも 1 つの CDR を含む。)、
 NGF および RON、
 NGF および ErbB3、
 NGF および CD-3 (NGF を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 61 または 8
 7 からの少なくとも 1 つの CDR を含む; および / または CD-3 を標的化する重鎖可変
 ドメインは、配列番号 30 または 68 からの少なくとも 1 つの CDR を含む。)、
 NGF および IGFIR (NGF を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 61 または 8

7からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはIGFRを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号48からの少なくとも1つのCDRを含む。)、
 NGFおよびHGF (NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはHGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号50からの少なくとも1つのCDRを含む。)、
 NGFおよびVEGF (NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはVEGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号54、78、80または84からの少なくとも1つのCDRを含む。)、
 NGFおよびDLL4、
 NGFおよびP1GF、
 NGFおよびCD-20 (NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはCD-20を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号28からの少なくとも1つのCDRを含む。)、
 NGFおよびEGFR (NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはEGFRを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号32、62または76からの少なくとも1つのCDRを含む。)、
 NGFおよびHER-2 (NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはHER-2を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号34からの少なくとも1つのCDRを含む。)、
 NGFおよびCD-19 (NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはCD-19を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号38からの少なくとも1つのCDRを含む。)、
 NGFおよびCD-80 (NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはCD-80を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号40からの少なくとも1つのCDRを含む。)、
 NGFおよびCD-22 (NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはCD-22を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号42からの少なくとも1つのCDRを含む。)、
 NGFおよびCD-40 (NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはCD-40を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号44からの少なくとも1つのCDRを含む。)、
 NGFおよびc-MET、または
 NGFおよびNRP1 (NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはNRP1を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号58または66からの少なくとも1つのCDRを含む。)
 に結合する)少なくとも1つの標的に結合することが可能な結合タンパク質。

【請求項4】

VD1および/またはVD2軽鎖可変ドメインが、配列番号29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89または91からの3つのCDRをそれぞれ含む、請求項3に記載の結合タンパク質。

【請求項5】

重鎖および/または軽鎖上の(X1)nが0であり、重鎖および/または軽鎖上の(X2)nが(X2)0である、請求項1または3に記載の結合タンパク質。

【請求項6】

第一および第二のポリペプチド鎖を含み、前記第一のポリペプチド鎖は第一のVD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n
 (VD1は第一の重鎖可変ドメインであり、
 VD2は第二の重鎖可変ドメインであり、

C は重鎖定常ドメインであり、
 X 1 はリンカーであり（但し、C H 1 ではない。）、
 X 2 は F c 領域であり、
 n は 0 または 1 である。）を含み、および
 第二のポリペプチド鎖は第二の V D 1 - (X 1) n - V D 2 - C - (X 2) n
 (V D 1 は第一の軽鎖可変ドメインであり、
 V D 2 は第二の軽鎖可変ドメインであり、
 C は軽鎖定常ドメインであり、
 X 1 はリンカーであり（但し、C H 1 ではない。）、
 X 2 は F c 領域を含まず、
 n は 0 または 1 である。）を含む、
 (結合タンパク質は
 N G F および M T X、
 N G F および N K G 2 D
 N G F および I G F 1 (N G F を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 6 0 または 8
 6 からの少なくとも 1 つの C D R を含む；および / または N G F を標的化する軽鎖可変ド
 メインは、配列番号 6 1 または 8 7 からの少なくとも 1 つの C D R を含む；および / また
 は I G F 1 を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 4 6 からの少なくとも 1 つの C D
 R を含む；および / または I G F 1 を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号 4 7 から
 の少なくとも 1 つの C D R を含む。)、
 N G F および I G F 2 (N G F を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 6 0 または 8
 6 からの少なくとも 1 つの C D R を含む；および / または N G F を標的化する軽鎖可変ド
 メインは、配列番号 6 1 または 8 7 からの少なくとも 1 つの C D R を含む；および / また
 は I G F 2 を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 4 6 からの少なくとも 1 つの C D
 R を含む；および / または I G F 2 を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号 4 7 から
 の少なくとも 1 つの C D R を含む。)、
 N G F および R O N、
 N G F および E r b B 3、
 N G F および C D - 3 (N G F を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 6 0 または 8
 6 からの少なくとも 1 つの C D R を含む；および / または N G F を標的化する軽鎖可変ド
 メインは、配列番号 6 1 または 8 7 からの少なくとも 1 つの C D R を含む；および / また
 は C D - 3 を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 3 0 または 6 8 からの少なくとも
 1 つの C D R を含む；および / または C D - 3 を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番
 号 3 1 または 6 9 からの少なくとも 1 つの C D R を含む。)、
 N G F および I G F R (N G F を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 6 0 または 8
 6 からの少なくとも 1 つの C D R を含む；および / または N G F を標的化する軽鎖可変ド
 メインは、配列番号 6 1 または 8 7 からの少なくとも 1 つの C D R を含む；および / また
 は I G F R を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 4 8 からの少なくとも 1 つの C D
 R を含む；および / または I G F R を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号 4 9 から
 の少なくとも 1 つの C D R を含む。)、
 N G F および H G F (N G F を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 6 0 または 8 6
 からの少なくとも 1 つの C D R を含む；および / または N G F を標的化する軽鎖可変ドメ
 インは、配列番号 6 1 または 8 7 からの少なくとも 1 つの C D R を含む；および / または
 H G F を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 5 0 からの少なくとも 1 つの C D R を
 含む；および / または H G F を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号 5 1 からの少な
 くとも 1 つの C D R を含む。)、
 N G F および V E G F (N G F を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 6 0 または 8
 6 からの少なくとも 1 つの C D R を含む；および / または N G F を標的化する軽鎖可変ド
 メインは、配列番号 6 1 または 8 7 からの少なくとも 1 つの C D R を含む；および / また
 は V E G F を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 5 4、7 8、8 0 または 8 4 から

の少なくとも1つのCDRを含む；および/またはVEGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号55、79、81または85からの少なくとも1つのCDRを含む。)、
NGFおよびDLL4、
NGFおよびP1GF、
NGFおよびCD-20 (NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはNGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはCD-20を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号28からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはCD-20を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号29からの少なくとも1つのCDRを含む。)、
NGFおよびEGFR (NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはNGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはEGFRを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号32、62または76からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはEGFRを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号33、63または77からの少なくとも1つのCDRを含む。)、
NGFおよびHER-2 (NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはNGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはHER-2を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号34からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはHER-2を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号35からの少なくとも1つのCDRを含む。)、
NGFおよびCD-19 (NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはNGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはCD-19を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号38からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはCD-19を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号39からの少なくとも1つのCDRを含む。)、
NGFおよびCD-80 (NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはNGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはCD-80を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号40からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはCD-80を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号41からの少なくとも1つのCDRを含む。)、
NGFおよびCD-22 (NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはNGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはCD-22を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号42からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはCD-22を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号43からの少なくとも1つのCDRを含む。)、
NGFおよびCD-40 (NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはNGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはCD-40を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号44からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはCD-40を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号45からの少なくとも1つのCDRを含む。)、
NGFおよびc-METまたは
NGFおよびNRP1 (NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはNGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの少なくとも1つのCDRを含む；および/また

は N R P 1 を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 5 8 または 6 6 からの少なくとも 1 つの C D R を含む；および / または N R P 1 を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 5 9 または 6 7 からの少なくとも 1 つの C D R を含む。)

に結合する) 少なくとも 1 つの標的に結合することが可能な結合タンパク質。

【請求項 7】

V D 1 および / または V D 2 重鎖可変ドメインが、配列番号 2 8、3 0、3 2、3 4、3 6、3 8、4 0、4 2、4 4、4 6、4 8、5 0、5 2、5 4、5 6、5 8、6 0、6 2、6 4、6 6、6 8、7 0、7 2、7 4、7 6、7 8、8 0、8 2、8 4、8 6、8 8 または 9 0 からの 3 つの C D R をそれぞれ含み、V D 1 および / または V D 2 軽鎖可変ドメインが、配列番号 2 9、3 1、3 3、3 5、3 7、3 9、4 1、4 3、4 5、4 7、4 9、5 1、5 3、5 5、5 7、5 9、6 1、6 3、6 5、6 7、6 9、7 1、7 3、7 5、7 7、7 9、8 1、8 3、8 5、8 7、8 9 または 9 1 からの 3 つの C D R をそれぞれ含む、請求項 6 に記載の結合タンパク質。

【請求項 8】

X 1 が、配列番号 1 - 2 7、または G / S を基礎とする配列の少なくとも 1 つである、請求項 1、3、6、2 4 または 9 1 から 9 4 に記載の結合タンパク質。

【請求項 9】

結合タンパク質が、2 つの第一のポリペプチド鎖および 2 つの第二のポリペプチド鎖を含む、請求項 6 に記載の結合タンパク質。

【請求項 10】

F c 領域が、バリエーション配列の F c 領域である、請求項 1、6、2 4、9 1、9 3 または 9 4 に記載の結合タンパク質。

【請求項 11】

F c 領域が、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A、I g M、I g E または I g D 由来である、請求項 1、6、2 4、9 1、9 3 または 9 4 に記載の結合タンパク質。

【請求項 12】

第一のポリペプチド鎖の V D 1 および前記第二のポリペプチド鎖の V D 1 が、それぞれ同じ第一および第二の親抗体またはその結合部分由来である、請求項 6 に記載の結合タンパク質。

【請求項 13】

第一のポリペプチド鎖の V D 1 および前記第二のポリペプチド鎖の V D 1 が、それぞれ異なる第一および第二の親抗体またはその結合部分由来である、請求項 6 に記載の結合タンパク質。

【請求項 14】

第一のポリペプチド鎖の V D 2 および前記第二のポリペプチド鎖の V D 2 が、それぞれ同じ第一および第二の親抗体またはその結合部分由来である、請求項 6 に記載の結合タンパク質。

【請求項 15】

第一のポリペプチド鎖の V D 2 および第二のポリペプチド鎖の V D 2 が、それぞれ異なる第一および第二の親抗体またはその結合部分由来である、請求項 6 に記載の結合タンパク質。

【請求項 16】

第一および第二の親抗体が標的上の異なるエピトープに結合する、請求項 1 3 から 1 5 に記載の結合タンパク質。

【請求項 17】

第一の親抗体またはその結合部分が、第二の親抗体またはその結合部分が第二の標的に結合する効力と異なる効力で第一の標的に結合する、請求項 1 3 から 1 5 に記載の結合タンパク質。

【請求項 18】

第一の親抗体またはその結合部分が、第二の親抗体またはその結合部分が第二の標的に結合する親和性と異なる親和性で第一の標的に結合する、請求項 13 から 15 に記載の結合タンパク質。

【請求項 19】

第一の親抗体またはその結合部分および第二の親抗体またはその結合部分が、ヒト抗体、CDR 移植された抗体またはヒト化抗体である、請求項 13 から 15 に記載の結合タンパク質。

【請求項 24】

4つのポリペプチド鎖を含み、2つのポリペプチド鎖は $VD1 - (X1)_n - VD2 - C - (X2)_n$

(VD1は第一の重鎖可変ドメインであり、
VD2は第二の重鎖可変ドメインであり、
Cは重鎖定常ドメインであり、
X1はリンカーであり(但し、CH1ではない。)、
X2はFc領域であり、
nは0または1である。)を含み、

2つのポリペプチド鎖は $VD1 - (X1)_n - VD2 - C - (X2)_n$

(VD1は第一の軽鎖可変ドメインであり、
VD2は第二の軽鎖可変ドメインであり、
Cは軽鎖定常ドメインであり、
X1はリンカーであり(但し、CH1ではない。)、
X2はFc領域を含まず、
nは0または1である。)を含み、および

(結合タンパク質は

NGFおよびMTX、

NGFおよびNKG2D、

NGFおよびIGF1(NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの少なくとも1つのCDRを含む;および/またはNGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの少なくとも1つのCDRを含む;および/またはIGF1を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号46からの少なくとも1つのCDRを含む;および/またはIGF1を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号47からの少なくとも1つのCDRを含む。)、

NGFおよびIGF2(NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの少なくとも1つのCDRを含む;および/またはNGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの少なくとも1つのCDRを含む;および/またはIGF2を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号46からの少なくとも1つのCDRを含む;および/またはIGF2を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号47からの少なくとも1つのCDRを含む。)、

NGFおよびRON、

NGFおよびErbb3、

NGFおよびCD-3(NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの少なくとも1つのCDRを含む;および/またはNGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの少なくとも1つのCDRを含む;および/またはCD-3を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号30または68からの少なくとも1つのCDRを含む;および/またはCD-3を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号31または69からの少なくとも1つのCDRを含む。)、

NGFおよびIGFR(NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの少なくとも1つのCDRを含む;および/またはNGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの少なくとも1つのCDRを含む;および/またはIGFRを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号48からの少なくとも1つのCD

Rを含む；および/またはIGFRを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号49からの少なくとも1つのCDRを含む。)、

NGFおよびHGF(NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはNGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはHGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号50からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはHGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号51からの少なくとも1つのCDRを含む。)、

NGFおよびVEGF(NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはNGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはVEGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号54、78、80または84からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはVEGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号55、79、81または85からの少なくとも1つのCDRを含む。)、

NGFおよびDLL4、

NGFおよびP1GF、

NGFおよびCD-20(NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはNGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはCD-20を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号28からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはCD-20を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号29からの少なくとも1つのCDRを含む。)、

NGFおよびEGFR(NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはNGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはEGFRを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号32、62または76からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはEGFRを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号33、63または77からの少なくとも1つのCDRを含む。)、

NGFおよびHER-2(NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはNGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはHER-2を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号34からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはHER-2を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号35からの少なくとも1つのCDRを含む。)、

NGFおよびCD-19(NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはNGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはCD-19を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号38からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはCD-19を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号39からの少なくとも1つのCDRを含む。)、

NGFおよびCD-80(NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはNGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはCD-80を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号40からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはCD-80を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号41からの少なくとも1つのCDRを含む。)、

NGFおよびCD-22(NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはNGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの少なくとも1つのCDRを含む；および/またはCD-22を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号42からの少なくとも1つの

C D Rを含む；および/またはC D - 2 2を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号4 3からの少なくとも1つのC D Rを含む。）、

N G FおよびC D - 4 0（N G Fを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号6 0または8 6からの少なくとも1つのC D Rを含む；および/またはN G Fを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号6 1または8 7からの少なくとも1つのC D Rを含む；および/またはC D - 4 0を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号4 4からの少なくとも1つのC D Rを含む；および/またはC D - 4 0を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号4 5からの少なくとも1つのC D Rを含む。）、

N G Fおよびc - M E Tまたは

N G FおよびN R P 1（N G Fを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号6 0または8 6からの少なくとも1つのC D Rを含む；および/またはN G Fを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号6 1または8 7からの少なくとも1つのC D Rを含む；および/またはN R P 1を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号5 8または6 6からの少なくとも1つのC D Rを含む；および/またはN R P 1を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号5 9または6 7からの少なくとも1つのC D Rを含む。）

に結合する）少なくとも1つの標的に結合することが可能な結合タンパク質。

【請求項25】

V D 1および/またはV D 2重鎖可変ドメインが、配列番号2 8、3 0、3 2、3 4、3 6、3 8、4 0、4 2、4 4、4 6、4 8、5 0、5 2、5 4、5 6、5 8、6 0、6 2、6 4、6 6、6 8、7 0、7 2、7 4、7 6、7 8、8 0、8 2、8 4、8 6、8 8または9 0からの3つのC D Rをそれぞれ含み、および/またはV D 1および/またはV D 2軽鎖可変ドメインが、配列番号2 9、3 1、3 3、3 5、3 7、3 9、4 1、4 3、4 5、4 7、4 9、5 1、5 3、5 5、5 7、5 9、6 1、6 3、6 5、6 7、6 9、7 1、7 3、7 5、7 7、7 9、8 1、8 3、8 5、8 7、8 9または9 1からの3つのC D Rをそれぞれ含む、請求項24に記載の結合タンパク質。

【請求項26】

結合タンパク質が、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、少なくとも約 $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ；少なくとも約 $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ；少なくとも約 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ；少なくとも約 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ；または少なくとも約 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の、前記少なくとも1つの標的への結合速度定数（ K_{on} ）を有する、請求項1、3、6、24または91から94に記載の結合タンパク質。

【請求項27】

結合タンパク質が、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 10^{-3} s^{-1} ；最大約 10^{-4} s^{-1} ；最大約 10^{-5} s^{-1} ；または最大約 10^{-6} s^{-1} の、前記少なくとも1つの標的への解離速度定数（ K_{off} ）を有する、請求項1、3、6、24または91から94に記載の結合タンパク質。

【請求項28】

結合タンパク質が、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 10^{-7} M ；最大約 10^{-8} M ；最大約 10^{-9} M ；最大約 10^{-10} M ；最大約 10^{-11} M ；最大約 10^{-12} M ；または最大 10^{-13} M の、前記少なくとも1つの標的への解離定数（ K_D ）を有する、請求項1、3、6、24または91から94に記載の結合タンパク質。

【請求項29】

請求項1、3、6、24または91から94に記載の結合タンパク質を含み、免疫接着分子、造影剤、治療剤または細胞毒性剤をさらに含む、結合タンパク質連結体。

【請求項30】

前記造影剤が、放射性標識、酵素、蛍光標識、発光標識、生物発光標識、磁気標識またはビオチンである、請求項29に記載の結合タンパク質連結体。

【請求項32】

治療剤または細胞毒性剤が、代謝抑制剤、アルキル化剤、抗生物質、増殖因子、サイト

カイン、抗血管新生剤、抗有糸分裂剤、アントラサイクリン、トキシシンまたはアポトーシス剤である、請求項 29 に記載の結合タンパク質連結体。

【請求項 33】

結合タンパク質が、結晶化された結合タンパク質である、請求項 1、3、6、24 または 91 から 94 に記載の結合タンパク質。

【請求項 37】

請求項 1、3、6、24 または 91 から 94 に記載の結合タンパク質アミノ酸配列をコードする単離された核酸。

【請求項 38】

請求項 37 に記載の単離された核酸を含むベクター。

【請求項 39】

ベクターが、p c D N A、p T T、p T T 3、p E F B O S、p B V、p J V、p c D N A 3 . 1 T O P O、p E F 6 T O P O、p H y b E または p B J である、請求項 38 に記載のベクター。

【請求項 40】

請求項 38 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 41】

宿主細胞が原核細胞である、請求項 40 に記載の宿主細胞。

【請求項 42】

原核細胞がエシェリキア・コリ (*Escherichia coli*) である、請求項 41 に記載の宿主細胞。

【請求項 43】

宿主細胞が真核細胞である、請求項 40 に記載の宿主細胞。

【請求項 44】

真核細胞が、原生生物細胞、動物細胞、植物細胞または真菌細胞である、請求項 43 に記載の宿主細胞。

【請求項 45】

動物細胞が、哺乳動物細胞、鳥類細胞または昆虫細胞である、請求項 44 に記載の宿主細胞。

【請求項 46】

哺乳動物細胞が C H O 細胞である、請求項 45 に記載の宿主細胞。

【請求項 47】

哺乳動物細胞が C O S 細胞である、請求項 45 に記載の宿主細胞。

【請求項 48】

真菌細胞が酵母細胞である、請求項 44 に記載の宿主細胞。

【請求項 49】

酵母細胞がサッカロミセス・セレビスシアエ (*Saccharomyces cerevisiae*) である、請求項 48 に記載の宿主細胞。

【請求項 50】

昆虫細胞が S f 9 細胞である、請求項 45 に記載の宿主細胞。

【請求項 51】

結合タンパク質を産生するのに十分な条件下で、請求項 40 から 50 に記載の宿主細胞を培地中において培養することを含む、結合タンパク質を生産する方法。

【請求項 55】

請求項 51 に記載の方法に従って生産されたタンパク質。

【請求項 56】

請求項 1、3、6、24 または 91 から 94 に記載の結合タンパク質および医薬として許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項 57】

少なくとも 1 つの追加の治療剤をさらに含む、請求項 56 に記載の医薬組成物。

【請求項 58】

追加の治療剤が、造影剤、細胞毒性剤、血管新生阻害剤；キナーゼ阻害剤；共刺激分子遮断剤；接着分子遮断剤；抗サイトカイン抗体またはその機能的断片；メトトレキサート；シクロスポリン；ラパマイシン；FK506；検出可能な標識またはレポーター；TNFアンタゴニスト；抗リウマチ薬；筋肉弛緩剤、麻酔薬、非ステロイド系抗炎症薬（NSAID）、鎮痛剤、麻酔、鎮静剤、局所麻酔、神経筋肉遮断剤、抗微生物剤、抗乾癬剤、コルチコステロイド、アナボリックステロイド、エリスロポエチン、免疫化、イムノグロブリン、免疫抑制剤、成長ホルモン、ホルモン置換薬、放射性医薬、抗うつ剤、抗精神病薬、刺激物質、喘息薬、アゴニスト、吸入用ステロイド、エピネフリンまたは類似体、サイトカインまたはサイトカインアンタゴニストである、請求項57に記載の医薬組成物。

【請求項 59】

治療が達成されるように結合タンパク質を対象に投与することによって、疾病または疾患について対象を治療するための、請求項1、3、6、24または91から94に記載の結合タンパク質の使用。

【請求項 60】

疾患が、関節リウマチ、骨関節炎、若年性慢性関節炎、化膿性関節炎、ライム関節炎、乾癬性関節炎、反応性関節炎、脊椎関節症、全身性紅斑性狼瘡、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、インシュリン依存性糖尿病、甲状腺炎、喘息、アレルギー性疾患、乾癬、皮膚炎、強皮症、移植片対宿主病、臓器移植拒絶、臓器移植に関連する急性または慢性免疫疾患、サルコイドーシス、アテローム性動脈硬化症、播種性血管内凝固、川崎病、バセドウ病、ネフローゼ症候群、慢性疲労症候群、ウェゲナー肉芽腫症、ヘノッホ・シェーライン紫斑症、腎臓の顕微鏡的血管炎、慢性活動性肝炎、ブドウ膜炎、敗血症性ショック、毒素性ショック症候群、敗血症症候群、悪液質、感染性疾患、寄生性疾患、急性横断性脊髄炎、ハンチントン舞蹈病、パーキンソン病、アルツハイマー病、発作、原発性胆汁性肝硬変、溶血性貧血、悪性腫瘍、心不全、心筋梗塞、アジソン病、孤発性の、多内分泌腺機能低下症候群I型および多内分泌腺機能低下症候群II型、シュミット症候群、成人（急性）呼吸促迫症候群、脱毛症、円形脱毛症、血清反応陰性関節炎、関節炎、ライター病、乾癬性関節炎、潰瘍性大腸性関節炎、腸疾患性滑膜炎、クラミジア、エルシニアおよびサルモネラ関連関節炎、脊椎関節症、アテローム性疾患/アテローム性動脈硬化症、アトピー性アレルギー、自己免疫性水疱性疾患、尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、類天疱瘡、線状IgA病、自己免疫性溶血性貧血、クームス陽性溶血性貧血、後天性悪性貧血、若年性悪性貧血、筋痛性脳脊髄炎/ロイヤルフリー病、慢性粘膜皮膚カンジダ症、巨細胞性動脈炎、原発性硬化性肝炎、突発性自己免疫性肝炎、後天性免疫不全症候群、後天性免疫不全関連疾患、B型肝炎、C型肝炎、分類不能型免疫不全症（分類不能型原発性低グロブリン血症）、拡張型心筋症、女性不妊症、卵巣機能不全、早期卵巣機能不全、線維性肺疾患、突発性間質性肺炎、炎症後間質性肺疾患、間質性肺炎、結合組織疾患関連間質性肺疾患、混合性結合組織疾患関連肺疾患、全身性硬化症関連間質性肺疾患、関節リウマチ関連間質性肺疾患、全身性紅斑性狼瘡関連肺疾患、皮膚筋炎/多発性筋炎関連肺疾患、シェーグレン病関連肺疾患、強直性脊椎炎関連肺疾患、血管炎性びまん性肺疾患（vasculitic diffuse lung disease）、ヘモシデローシス関連肺疾患、薬物によって誘導された間質性肺疾患、線維症、放射性線維症、閉塞性細気管支炎、慢性好酸球性肺炎、リンパ球浸潤性肺疾患、感染後間質性肺疾患、通風関節炎、自己免疫性肝炎、I型自己免疫性肝炎（古典的自己免疫性またはルポイド肝炎）、II型自己免疫性肝炎（抗LKM抗体肝炎）、自己免疫媒介性低血糖症、黒色表皮腫を伴うB型インシュリン抵抗性、副甲状腺機能低下症、臓器移植に関連する急性免疫疾患、臓器移植に関連する慢性免疫疾患、変形性関節症、原発性硬化性胆管炎、I型乾癬、II型乾癬、特発性白血球減少症、自己免疫性好中球減少症、腎臓病NOS、糸球体腎炎、腎臓の顕微鏡的血管炎、ライム病、円板状紅斑性狼瘡、男性不妊症特発性またはNOS、精子自己免疫、多発性硬化症（すべてのサブタイプ）、交感性眼炎、結合組織疾患に続発する肺高血圧症、グッ

トパスター症候群、結節性多発動脈炎の肺症状、急性リウマチ熱、リウマチ性脊椎炎、スチル病、全身性硬化症、シェーグレン症候群、高安病/動脈炎、自己免疫性血小板減少症、特発性血小板減少症、自己免疫性甲状腺疾患、甲状腺機能亢進症、甲状腺腫自己免疫性甲状腺機能低下症(橋本病)、萎縮性自己免疫性甲状腺機能低下症、原発性粘液水腫(primary myxoedema)、水晶体起因性ブドウ膜炎、原発性血管炎、白斑急性肝疾患、慢性肝疾患、アルコール性肝硬変、アルコール誘発性肝障害、胆汁うっ滞(choleosatis)、特異体質性肝疾患、薬物誘発性肝炎、非アルコール性脂肪性肝炎、アレルギーおよび喘息、B群連鎖球菌(GBS)感染、精神障害、うつ病、統合失調症、Th2型およびTh1型によって媒介される疾病、急性および慢性疼痛、癌、肺癌、乳癌、胃癌、膀胱癌、大腸癌、膵臓癌、卵巣癌、前立腺癌、腎臓癌、造血性悪性病変、白血病、リンパ腫、無リポタンパク質血症、先端チアノーゼ、急性および慢性寄生性または感染性プロセス、急性白血病、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、急性骨髄性白血病(AML)、急性または慢性細菌感染、急性膵炎、急性腎不全、腺癌、心房(aerial)異所性拍動、AIDS認知症複合、アルコール誘発性肝炎、アレルギー性結膜炎、アレルギー性接触性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、同種移植拒絶、-1-アンチトリプシン欠乏症、筋萎縮性側索硬化症、貧血、狭心症、前角細胞変性、抗cd3治療、抗リン脂質症候群、抗受容体過敏症反応(anti-receptor hypersensitivity reactions)、大動脈(aortic)および動脈瘤、大動脈解離、動脈性高血圧、動脈硬化症、動静脈瘻、運動失調、心房細動(持続的または発作性)、心房粗動、房室ブロック、B細胞リンパ腫、骨移植拒絶、骨髄移植(BMT)拒絶、脚ブロック、パーキットリンパ腫、火傷、心不整脈、心機能不全症候群(cardiac stun syndrome)、心臓腫瘍、心筋症、心肺バイパス炎症反応、軟骨移植拒絶、小脳皮質変性、小脳疾患、無秩序なまたは多巣性心房頻脈、化学療法関連疾患、慢性骨髄性白血病(CML)、慢性アルコール症、慢性炎症性病変、慢性リンパ性白血病(CLL)、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、慢性サリチル酸中毒、結腸直腸癌、うっ血性心不全、結膜炎、接触性皮膚炎、肺性心、冠動脈疾患、クロイツフェルト-ヤコブ病、培養陰性敗血症、嚢胞性線維症、サイトカイン療法関連疾患、ボクサー脳、脱髄性疾患、デング出血熱、皮膚炎、皮膚科学的症状、糖尿病、真性糖尿病、糖尿病性動脈硬化疾患、瀰漫性レビー小体病、拡張型うっ血性心筋症、大脳基底核の疾患、中年のダウン症候群、中枢神経ドーパミン受容体を遮断する薬物によって誘発された薬物誘発性運動疾患、薬物感受性、湿疹、脳脊髄炎、心内膜炎、内分泌疾患、喉頭蓋炎、エプスタイン-バーウイルス感染、紅痛症、垂体外路および小脳疾患、家族性血球貪食性リンパ組織球症(familial hematophagocytic lymphohistiocytosis)、致死的胸腺移植組織拒絶、フリードライヒ失調症、機能的末梢動脈疾患、真菌性敗血症、ガス壊疽、胃潰瘍、いずれかの臓器または組織の移植片拒絶、グラム陰性敗血症、グラム陽性敗血症、細胞内生物に起因する肉芽腫、有毛細胞白血病、ハラールホルデン・スパッツ病、橋本甲状腺炎、枯草熱、心臓移植拒絶、血色素症、血液透析、溶血性尿毒症症候群/血栓溶解血小板減少紫斑病、出血、A型肝炎、ヒス束不整脈、HIV感染/HIV神経障害、ホジキン病、運動過剰疾患、過敏症反応、過敏性肺炎、高血圧、運動低下疾患、視床下部-下垂体-副腎皮質系評価、特発性アジソン病、特発性肺線維症、抗体媒介性細胞毒性、無力症、乳児脊髄性筋萎縮症、大動脈の炎症、A型インフルエンザ、電離放射線曝露、虹彩毛様体炎/ブドウ膜炎/視神経炎、虚血再灌流障害、虚血性発作、若年性関節リウマチ、若年性脊髄性筋萎縮症、カボジ肉腫、腎移植拒絶、レジオネラ、リーシュマニア症、ハンセン病、皮質脊髄系の病変、脂肪血症(lipedema)、肝臓移植拒絶、リンパ浮腫(lymphedema)、マラリア、悪性リンパ腫、悪性組織球増殖症、悪性黒色腫、髄膜炎、髄膜炎菌血症(meningococemia)、代謝性/特発性、偏頭痛、ミトコンドリア多系疾患(mitochondrial multi-system disorder)、混合性結合組織病、モノクローナル高ガンマグロブリン血症、多発性骨髄腫、多系統変性(メンセル・デジェリーヌ-トーマス・シャイ-ドレーガーおよびマシャド-ジョセフ)、重症筋無力症、マイコバクテリウム・アビウム・イン

トラセルラーレ、マイコバクテリウム・チューバキュロシス、骨髄形成異常、真菌虚血疾患、上咽頭癌、新生児慢性肺疾患、腎炎、ネフローゼ、神経変性疾患、神経原性I筋萎縮、好中球減少性発熱、非ホジキンリンパ腫、腹部大動脈およびその分枝の閉塞、閉塞性動脈疾患、okt3療法、精巣炎/精巣上体炎、精巣炎/精管復元術処置、臓器肥大、骨粗鬆症、膵臓移植拒絶、膵癌、腫瘍随伴性症候群/悪性腫瘍の高カルシウム血症、副甲状腺移植拒絶、骨盤内炎症性疾患、通年性鼻炎、心膜疾患、末梢アテローム硬化性疾患、末梢血管疾患、腹膜炎、悪性貧血、ニューモシスチス・カリニ肺炎、肺炎、POEMS症候群(多発神経炎、臓器肥大、内分泌疾患、単クローン性グロブリン血症および皮膚変化症候群(skin changes syndrome))、灌流後症候群(post perfusion syndrome)、ポンプ後症候群(post pump syndrome)、心筋梗塞後開心術症候群、子癇前症、進行性核上性麻痺、原発性肺高血圧、放射線療法、レイノー現象および病、レイノー病、レフサム病、規則的なQRS幅の狭い頻脈症(regular narrow QRS tachycardia)、腎血管性高血圧、再灌流障害、拘束型心筋症、肉腫、強皮症、老年性舞蹈病、レビー小体型の老年性認知症、血清反応陰性関節炎、ショック、鎌形赤血球貧血症、皮膚同種異系移植拒絶、皮膚変化症候群、小腸移植拒絶、固形腫瘍、固有不整脈(specific arrhythmias)、脊髄性運動失調、脊髄小脳変性、連鎖球菌性筋炎、小脳の構造的病変、亜急性硬化性全脳炎、湿疹、心血管系の梅毒、全身性アナフィラキシー、全身性炎症反応症候群、全身性発症若年性関節リウマチ、T細胞またはFABALL、毛細血管拡張症、閉塞性血栓血管炎、血小板減少症、毒性、移植、外傷/出血、III型過敏症反応、IV型過敏症、不安定狭心症、尿毒症、尿路性敗血症、じんましん、心臓弁膜症、静脈瘤、血管炎、静脈疾患、静脈血栓症、心室細動、ウイルスおよび真菌感染、ウイルス性脳炎(vital encephalitis)/無菌性髄膜炎、ウイルス関連血球貪食症候群、ウェルニッケ-コルサコフ症候群、ウィルソン病、いずれかの臓器または組織の異種移植拒絶、急性冠症候群、急性特発性多発性神経炎、急性炎症性脱髄性多発神経根神経障害、急性虚血、成人スチル病、アナフィラキシー、抗リン脂質抗体症候群、再生不良性貧血、アトピー性湿疹、アトピー性皮膚炎、自己免疫性皮膚炎、連鎖球菌感染に伴う自己免疫異常、自己免疫性腸症、自己免疫性難聴、自己免疫性リンパ増殖症候群(ALPS)、自己免疫性心筋炎、自己免疫性早期卵巣不全、眼瞼炎、気管支拡張症、水疱性類天疱瘡、心血管疾患、劇症型抗リン脂質症候群、セリアック病、頸部脊椎症、慢性虚血、瘢痕性類天疱瘡、多発性硬化症のリスクを有する臨床的孤発症候群(CIS)、小児発症精神障害、涙嚢炎、皮膚筋炎、糖尿病性網膜症、椎間板ヘルニア、椎間板脱出、薬物誘発免疫性溶血性貧血、子宮内膜症、眼内炎、上強膜炎、多形性紅斑、重症型多形性紅斑、妊娠性類天疱瘡、ギラン・バレー症候群(GBS)、枯草熱、ヒューズ症候群、特発性パーキンソン病、特発性間質性肺炎、IgE媒介性アレルギー、免疫性溶血性貧血、封入体筋炎、感染性眼炎症疾患、炎症性脱髄疾患、炎症性心疾患、炎症性腎疾患、IPF/UIP、虹彩炎、角膜炎、乾性角結膜炎、クスマウル病またはクスマウル-マイヤー病、ランドリー麻痺、ランゲルハンス細胞性組織球症、網状皮斑、黄斑変性、顕微鏡的多発性血管炎、モルブス・ベヒテレフ(morbus bechterev)、運動ニューロン疾患、粘膜性類天疱瘡、多臓器不全、骨髄異形成症候群、心筋炎、神経根障害、神経障害、非A非B型肝炎、視神経炎、骨溶解、卵巣癌、小関節性JRA、末梢動脈閉塞疾患(PAOD)、末梢血管疾患(PVD)、末梢動脈疾患(PAD)、静脈炎、結節性多発性動脈炎(または結節性動脈周囲炎)、多発性軟骨炎、リウマチ性多発性筋痛、白毛症、多関節性JRA、多内分泌欠損症候群、多発性筋炎、ポンプ後症候群、原発性パーキンソニズム、前立腺炎、赤芽球癆、

原発性副腎不全、再発性視神経脊髄炎、再狭窄、リウマチ性心疾患、SAPHO(滑膜炎、アクネ、膿疱症、骨過形成および骨髄炎)、強皮症、続発性アミロイドーシス、ショック肺、強膜炎、坐骨神経痛、二次性副腎不全、シリコン関連結合組織病、スネドン-ウィルキンソン皮膚症、強直性脊椎炎、ステーブンス・ジョンソン症候群(SJS)、全身性炎症反応症候群、側頭動脈炎、トキシプラズマ性網膜炎、中毒性表皮剥離症、横断

性脊髄炎、TRAPS（腫瘍壊死因子受容体）、I型アレルギー反応、II型糖尿病、通常型間質性肺炎（UIP）、春季結膜炎、ウイルス性網膜炎、フォクト・小柳・原田症候群（VKH症候群）、滲出型黄斑変性または創傷治癒である、請求項59に記載の使用。

【請求項61】

対象への投与が、非経口、皮下、筋肉内、静脈内、関節内、気管支内、腹腔内、嚢内、軟骨内、腔内（intracavity）、腔内（intracellular）、小脳内、脳室内、結腸内、頸管内、胃内、肝臓内、心筋内、骨内、骨盤内、心臓周囲内、腹腔内、胸膜内、前立腺内、肺内、結腸内、腎臓内、網膜内、脊髄内、滑膜内、胸腔内、子宮内、膀胱内、ポラス、膻、直腸、口内、舌下、鼻内または経皮である、請求項60に記載の使用。

【請求項62】

a) 第一の親抗体またはその結合部分を得る工程、
b) 第二の親抗体またはその結合部分を得る工程、
c) 請求項1、3、6、24または91から94に記載のポリペプチド鎖を構築する工程、および
d) 少なくとも1つの標的に結合することが可能な結合タンパク質が生成されるように、ポリペプチド鎖を発現させる工程
を含む、少なくとも1つの標的に結合することが可能な結合タンパク質を生成する方法。

【請求項63】

VD1および/またはVD2重鎖可変ドメインが、存在する場合、配列番号28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88または90からの3つのCDRをそれぞれ含み、VD1および/またはVD2軽鎖可変ドメインが、存在する場合、配列番号29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89または91からのCDRをそれぞれ含む、請求項62に記載の方法。

【請求項64】

第一の親抗体またはその結合部分および前記第二の親抗体またはその結合部分が、ヒト抗体、CDR移植された抗体またはヒト化抗体である、請求項62に記載の方法。

【請求項68】

Fc領域が、存在する場合、バリエーション配列のFc領域である、請求項62に記載の方法。

【請求項69】

Fc領域が、存在する場合、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgEまたはIgDから得られるFc領域である、請求項62に記載の方法。

【請求項74】

第一の親抗体またはその結合部分、第二の親抗体またはその結合部分が、第二の標的に結合する親和性と異なる親和性で第一の標的に結合する、請求項62に記載の方法。

【請求項75】

第一の親抗体またはその結合部分、第二の親抗体またはその結合部分が、第二の標的に結合する効力と異なる効力で第一の標的に結合する、請求項62に記載の方法。

【請求項76】

イムノアッセイは、試験試料を少なくとも1つの結合タンパク質および少なくとも1つの検出可能な標識と接触させることを含み、

少なくとも1つの結合タンパク質は、請求項1、3、6、24または91から94に記載の結合タンパク質を含む、
イムノアッセイによって試験試料中の少なくとも1つの標的またはその断片の存在を決定する方法。

【請求項 77】

(i) 第一の複合体を形成するために、試験試料を、標的またはその断片上のエピトープに結合する少なくとも1つの結合タンパク質と接触させること、

(ii) 第二の複合体を形成するために、前記複合体を、前記結合タンパク質に結合しまたは前記結合タンパク質に結合しない標的もしくはその断片上のエピトープに結合する少なくとも1つの検出可能な標識と接触させることおよび

(iii) 第二の複合体における検出可能な標識によって発生したシグナルに基づいて、試験試料中の標的またはその断片の存在を検出することをさらに含み、標的またはその断片の存在が、検出可能な標識によって発生したシグナルに直接的に相関する、請求項76に記載の方法。

【請求項 78】

(i) 第一の複合体を形成するために、試験試料を、標的またはその断片上のエピトープに結合する少なくとも1つの結合タンパク質と接触させること、

(ii) 第二の複合体を形成するために、前記複合体を、前記結合タンパク質への結合について標的またはその断片と競合する少なくとも1つの検出可能な標識と接触させることおよび

(iii) 第二の複合体における検出可能な標識によって発生したシグナルに基づいて、試験試料中の標的またはその断片の存在を検出することをさらに含み、標的またはその断片の存在が、検出可能な標識によって発生したシグナルに間接的に相関する、請求項76に記載の方法。

【請求項 79】

試験試料が患者由来であり、方法が、患者の治療的/予防的処置の効力を診断、予後診断、または評価することをさらに含み、

前記方法が、患者の治療的/予防的処置の効力を評価することをさらに含む場合、該方法が、効力を改善するために必要な、患者の治療的/予防的処置を改変することを場合によってさらに含む、請求項77または78に記載の方法。

【請求項 80】

方法が、自動化システムまたは半自動化システムにおける使用に適合される、請求項77または78に記載の方法。

【請求項 81】

方法が、試料中の1を超える抗原の存在を決定する、請求項77または78に記載の方法。

【請求項 82】

イムノアッセイは、(a) 少なくとも1つの結合タンパク質および少なくとも1つの検出可能な標識を用い、(b) 検出可能な標識によって発生したシグナルを対照または標的またはその断片を含む較正物質と比較することを含み、

較正物質は、場合によって一連の較正物質の一部であり、較正物質の各々は、前記標的またはその断片の濃度によって順に他の較正物質と異なり、

少なくとも1つの結合タンパク質は、請求項1、3、6、24または91から94に記載の結合タンパク質を含む、

イムノアッセイによって試験試料中の標的またはその断片の量または濃度を決定する方法。

【請求項 83】

(i) 第一の複合体を形成するために、試験試料を、標的またはその断片上のエピトープに結合する少なくとも1つの結合タンパク質と接触させること、

(ii) 第二の複合体を形成するために、前記複合体を、前記結合タンパク質に結合しない標的またはその断片上のエピトープに結合する少なくとも1つの検出可能な標識と接触させることおよび

(iii) 第二の複合体における検出可能な標識によって発生したシグナルに基づいて、試験試料中の標的またはその断片の量または濃度を決定すること

をさらに含み、標的またはその断片の量または濃度が、検出可能な標識によって発生したシグナルに直接的に比例する、請求項 8 2 に記載の方法。

【請求項 8 4】

(i) 第一の複合体を形成するために、試験試料を、標的またはその断片上のエピトープに結合する少なくとも 1 つの結合タンパク質と接触させること、

(i i) 第二の複合体を形成するために、前記複合体を、前記結合タンパク質への結合について標的またはその断片と競合する少なくとも 1 つの検出可能な標識と接触させることおよび

(i i i) 第二の複合体における検出可能な標識によって発生したシグナルに基づいて、試験試料中の標的またはその断片の量または濃度を決定すること

をさらに含み、標的またはその断片の存在が、検出可能な標識によって発生したシグナルに間接的に比例する、請求項 8 2 に記載の方法。

【請求項 8 5】

試験試料が患者由来であり、方法が、患者の治療的 / 予防的処置の効力を診断、予後診断、または評価することをさらに含み、および

前記方法が、患者の治療的 / 予防的処置の効力を評価することをさらに含む場合、該方法が、効力を改善するために必要な、患者の治療的 / 予防的処置を改変することを場合によってさらに含む、請求項 8 3 または 8 4 に記載の方法。

【請求項 8 6】

方法が、自動化システムまたは半自動化システムにおける使用に適合される、請求項 8 3 または 8 4 に記載の方法。

【請求項 8 7】

方法が、試料中の 1 を超える抗原の量または濃度を決定する、請求項 8 3 または 8 4 に記載の方法。

【請求項 8 8】

(a) 標的またはその断片について試験試料をアッセイするための説明書および (b) 請求項 1、3、6、24 または 91 から 94 に記載の結合タンパク質を含む少なくとも 1 つの結合タンパク質を含む、標的またはその断片の存在、量、または濃度について試験試料をアッセイするためのキット。

【請求項 8 9】

V D 1 および / または V D 2 重鎖可変ドメインが、存在する場合、配列番号 28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88 または 90 をそれぞれ含み、および / または V D 1 および / または V D 2 軽鎖可変ドメインが、存在する場合、配列番号 29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89 または 91 をそれぞれ含む、請求項 1、3、6 または 24 に記載の結合タンパク質。

【請求項 9 0】

V D 1 および / または V D 2 重鎖可変ドメインが、存在する場合、配列番号 28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88 または 90 をそれぞれ含み、および / または V D 1 および / または V D 2 軽鎖可変ドメインが、存在する場合、配列番号 29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89 または 91 をそれぞれ含む、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 9 1】

ポリペプチド鎖を含み、前記ポリペプチド鎖は V D 1 - (X 1) n - V D 2 - C - (X 2) n

(VD1は第一の重鎖可変ドメインであり、
VD2は第二の重鎖可変ドメインであり、
Cは重鎖定常ドメインであり、
X1はリンカーであり(但し、CH1ではない。)、
X2はFc領域であり、
nは0または1である。)を含む、および

(結合タンパク質は

NGFおよびMTX、NGFおよびNKG2D、NGFおよびIGF1、2、NGFおよびRON、NGFおよびErbb3、NGFおよびCD-3、NGFおよびIGFR、NGFおよびHGF、NGFおよびVEGF、NGFおよびDLL4、NGFおよびPIGF、NGFおよびCD-20、NGFおよびEGFR、NGFおよびHER-2、NGFおよびCD-19、NGFおよびCD-80、NGFおよびCD-22、NGFおよびCD-40、NGFおよびc-METまたはNGFおよびNRP1に結合し、およびさらに、

(結合タンパク質は

(a) NGFに結合し、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 $2.80 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ の解離速度定数(K_{off})を有し、および/または最大約 $1.80 \times 10^{-9} \text{ M}$ の解離定数(K_D)を有し、
(b) EGFRに結合し、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 $1.60 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ の解離速度定数(K_{off})を有し、および/または最大約 $1.10 \times 10^{-9} \text{ M}$ の解離定数(K_D)を有し、
(c) Erbb3に結合し、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、 $1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 未満の解離速度定数(K_{off})を有し、および/または $4.2 \times 10^{-12} \text{ M}$ 未満の解離定数(K_D)を有し、
(d) VEGFに結合し、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 $7.70 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ の解離速度定数(K_{off})を有し、および/または最大約 $8.00 \times 10^{-11} \text{ M}$ の解離定数(K_D)を有し、
(e) DLL4に結合し、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 $2.00 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ の解離速度定数(K_{off})を有し、および/または最大約 $4.14 \times 10^{-10} \text{ M}$ の解離定数(K_D)を有し、
(f) RONに結合し、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 $6.70 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ の解離速度定数(K_{off})を有し、および/または最大約 $5.70 \times 10^{-9} \text{ M}$ の解離定数(K_D)を有するおよび/または
(g) PIGFに結合し、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 $2.80 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ の解離速度定数(K_{off})を有し、および/または最大約 $1.40 \times 10^{-9} \text{ M}$ の解離定数(K_D)を有する)少なくとも1つの標的に結合することが可能な結合タンパク質。

【請求項92】

ポリペプチド鎖を含み、前記ポリペプチド鎖はVD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n

(VD1は第一の軽鎖可変ドメインであり、
VD2は第二の軽鎖可変ドメインであり、
Cは軽鎖定常ドメインであり、
X1はリンカーであり(但し、CH1ではない。)、
X2はFc領域を含まず、
nは0または1である。)を含む、

(結合タンパク質は

NGFおよびMTX、NGFおよびNKG2D、NGFおよびIGF1、2、NGFおよびRON、NGFおよびErbb3、NGFおよびCD-3、NGFおよびIGFR、NGFおよびHGF、NGFおよびVEGF、NGFおよびDLL4、NGFおよびPIGF

F、NGFおよびCD-20、NGFおよびEGFR、NGFおよびHER-2、NGFおよびCD-19、NGFおよびCD-80、NGFおよびCD-22、NGFおよびCD-40、NGFおよびc-METまたはNGFおよびNRP1に結合し、および

さらに、

(結合タンパク質は

(a) NGFに結合し、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 $2.80 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ の解離速度定数(K_{off})を有し、および/または最大約 $1.80 \times 10^{-9} \text{ M}$ の解離定数(K_D)を有し、

(b) EGFRに結合し、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 $1.60 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ の解離速度定数(K_{off})を有し、および/または最大約 $1.10 \times 10^{-9} \text{ M}$ の解離定数(K_D)を有し、

(c) ErbB3に結合し、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、 $1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 未満の解離速度定数(K_{off})を有し、および/または $4.2 \times 10^{-12} \text{ M}$ 未満の解離定数(K_D)を有し、

(d) VEGFに結合し、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 $7.70 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ の解離速度定数(K_{off})を有し、および/または最大約 $8.00 \times 10^{-11} \text{ M}$ の解離定数(K_D)を有し、

(e) DLL4に結合し、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 $2.00 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ の解離速度定数(K_{off})を有し、および/または最大約 $4.14 \times 10^{-10} \text{ M}$ の解離定数(K_D)を有し、

(f) RONに結合し、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 $6.70 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ の解離速度定数(K_{off})を有し、および/または最大約 $5.70 \times 10^{-9} \text{ M}$ の解離定数(K_D)を有し、および/または

(g) P1GFに結合し、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 $2.80 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ の解離速度定数(K_{off})を有し、および/または最大約 $1.40 \times 10^{-9} \text{ M}$ の解離定数(K_D)を有する)少なくとも1つの標的に結合することが可能な結合タンパク質。

【請求項93】

第一および第二のポリペプチド鎖を含み、前記第一のポリペプチド鎖は、第一のVD1 - (X1)n - VD2 - C - (X2)n

(VD1は第一の重鎖可変ドメインであり、

VD2は第二の重鎖可変ドメインであり、

Cは重鎖定常ドメインであり、

X1はリンカーであり(但し、CH1ではない。)、

X2はFc領域であり、

nは0または1である。)を含み、および

前記第二のポリペプチド鎖は第二のVD1 - (X1)n - VD2 - C - (X2)n

(VD1は第一の軽鎖可変ドメインであり、

VD2は第二の軽鎖可変ドメインであり、

Cは軽鎖定常ドメインであり、

X1はリンカーであり(但し、CH1ではない。)、

X2はFc領域を含まず、

nは0または1である。)を含む、および

(結合タンパク質は

NGFおよびMTX、NGFおよびNKG2D、NGFおよびIGF1、2、NGFおよびRON、NGFおよびErbB3、NGFおよびCD-3、NGFおよびIGFR、NGFおよびHGF、NGFおよびVEGF、NGFおよびDLL4、NGFおよびP1GF、NGFおよびCD-20、NGFおよびEGFR、NGFおよびHER-2、NGFおよびCD-19、NGFおよびCD-80、NGFおよびCD-22、NGFおよびCD-40、NGFおよびc-METまたはNGFおよびNRP1に結合し、

さらに、

(結合タンパク質は

(a) NGFに結合し、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 $2.80 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ の解離速度定数 (K_{off}) を有し、および/または最大約 $1.80 \times 10^{-9} \text{ M}$ の解離定数 (K_D) を有し、

(b) EGF Rに結合し、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 $1.60 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ の解離速度定数 (K_{off}) を有し、および/または最大約 $1.10 \times 10^{-9} \text{ M}$ の解離定数 (K_D) を有し、

(c) ErbB3に結合し、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、 $1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 未満の解離速度定数 (K_{off}) を有し、および/または $4.2 \times 10^{-12} \text{ M}$ 未満の解離定数 (K_D) を有し、

(d) VEGFに結合し、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 $7.70 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ の解離速度定数 (K_{off}) を有し、および/または最大約 $8.00 \times 10^{-11} \text{ M}$ の解離定数 (K_D) を有し、

(e) DLL4に結合し、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 $2.00 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ の解離速度定数 (K_{off}) を有し、および/または最大約 $4.14 \times 10^{-10} \text{ M}$ の解離定数 (K_D) を有し、

(f) RONに結合し、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 $6.70 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ の解離速度定数 (K_{off}) を有し、および/または最大約 $5.70 \times 10^{-9} \text{ M}$ の解離定数 (K_D) を有するおよび/または

(g) P1GFに結合し、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 $2.80 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ の解離速度定数 (K_{off}) を有し、および/または最大約 $1.40 \times 10^{-9} \text{ M}$ の解離定数 (K_D) を有する) 少なくとも1つの標的に結合することが可能な結合タンパク質。

【請求項94】

4つのポリペプチド鎖を含み、2つのポリペプチド鎖は、VD1 - (X1)_n - VD2 - C - (X2)_n

(VD1は第一の重鎖可変ドメインであり、

VD2は第二の重鎖可変ドメインであり、

Cは重鎖定常ドメインであり、

X1はリンカーであり(但し、CH1ではない。)、

X2はFc領域であり、

nは0または1である。)を含み、および

2つのポリペプチド鎖はVD1 - (X1)_n - VD2 - C - (X2)_n

(VD1は第一の軽鎖可変ドメインであり、

VD2は第二の軽鎖可変ドメインであり、

Cは軽鎖定常ドメインであり、

X1はリンカーであり(但し、CH1ではない。)、

X2はFc領域を含まず、

nは0または1である。)を含む、および

(結合タンパク質は

NGFおよびMTX、NGFおよびNKG2D、NGFおよびIGF1, 2、NGFおよびRON、NGFおよびErbB3、NGFおよびCD-3、NGFおよびIGFR、NGFおよびHGF、NGFおよびVEGF、NGFおよびDLL4、NGFおよびP1GF、NGFおよびCD-20、NGFおよびEGFR、NGFおよびHER-2、NGFおよびCD-19、NGFおよびCD-80、NGFおよびCD-22、CD-40、NGFおよびc-METまたはNGFおよびNRP1に結合し、および

さらに、

(結合タンパク質は

(a) NGFに結合し、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 2.80

$\times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ の解離速度定数 (K_{off}) を有し、および / または最大約 $1.80 \times 10^{-9} \text{ M}$ の解離定数 (K_D) を有し、
 (b) EGF R に結合し、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 $1.60 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ の解離速度定数 (K_{off}) を有し、および / または最大約 $1.10 \times 10^{-9} \text{ M}$ の解離定数 (K_D) を有し、
 (c) ErbB 3 に結合し、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、 $1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 未満の解離速度定数 (K_{off}) を有し、および / または $4.2 \times 10^{-12} \text{ M}$ 未満の解離定数 (K_D) を有し、
 (d) VEGF に結合し、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 $7.70 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ の解離速度定数 (K_{off}) を有し、および / または最大約 $8.00 \times 10^{-11} \text{ M}$ の解離定数 (K_D) を有し、
 (e) DLL 4 に結合し、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 $2.00 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ の解離速度定数 (K_{off}) を有し、および / または最大約 $4.14 \times 10^{-10} \text{ M}$ の解離定数 (K_D) を有し、
 (f) RON に結合し、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 $6.70 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ の解離速度定数 (K_{off}) を有し、および / または最大約 $5.70 \times 10^{-9} \text{ M}$ の解離定数 (K_D) を有するおよび / または
 (g) P1GF に結合し、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 $2.80 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ の解離速度定数 (K_{off}) を有し、および / または最大約 $1.40 \times 10^{-9} \text{ M}$ の解離定数 (K_D) を有する) 少なくとも 1 つの標的に結合することが可能な結合タンパク質。

【請求項 95】

結合タンパク質は、

NGF および M T X (NGF を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 60 または 86 からの 3 つの C D R をそれぞれ含む ; および / または M T X を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 88 からの 3 つの C D R を含む。)、
 NGF および N K G 2 D (NGF を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 60 または 86 からの 3 つの C D R をそれぞれ含む ; および / または N K G 2 D を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 90 からの 3 つの C D R を含む。)、
 NGF および I G F 1 (NGF を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 60 または 86 からの 3 つの C D R をそれぞれ含む ; および / または I G F 1 , 2 を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 46 からの 3 つの C D R を含む。)、
 NGF および I G F 2 (NGF を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 60 または 86 からの 3 つの C D R をそれぞれ含む ; および / または I G F 1 , 2 を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 46 からの 3 つの C D R を含む。)、
 NGF および R O N (NGF を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 60 または 86 からの 3 つの C D R をそれぞれ含む ; および / または R O N を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 36 または 64 からの 3 つの C D R をそれぞれ含む。)、
 NGF および E r b B 3 (NGF を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 60 または 86 からの 3 つの C D R をそれぞれ含む ; および / または E r b B 3 を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 72、74 または 82 からの 3 つの C D R をそれぞれ含む。)、
 NGF および C D - 3 (NGF を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 60 または 86 からの 3 つの C D R をそれぞれ含む ; および / または C D - 3 を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 30 または 68 からの 3 つの C D R をそれぞれ含む。)、
 NGF および I G F R (NGF を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 60 または 86 からの 3 つの C D R をそれぞれ含む ; および / または I G F R を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 48 からの 3 つの C D R を含む。)、
 NGF および H G F (NGF を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 60 または 86 からの 3 つの C D R をそれぞれ含む ; および / または H G F を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 50 からの 3 つの C D R を含む。)、

NGFおよびVEGF(NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの3つのCDRをそれぞれ含む;および/またはVEGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号54、78、80または84からの3つのCDRをそれぞれ含む。)

、
NGFおよびDLL4(NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの3つのCDRをそれぞれ含む;および/またはDLL4を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号56からの3つのCDRを含む。)、

NGFおよびP1GF(NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの3つのCDRをそれぞれ含む;および/またはP1GFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号70からの3つのCDRを含む。)、

NGFおよびCD-20(NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの3つのCDRをそれぞれ含む;および/またはCD-20を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号28からの3つのCDRを含む。)、

NGFおよびEGFR(NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの3つのCDRをそれぞれ含む;および/またはEGFRを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号32、62または76からの3つのCDRをそれぞれ含む。)、

NGFおよびHER-2(NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの3つのCDRをそれぞれ含む;および/またはHER-2を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号34からの3つのCDRを含む。)、

NGFおよびCD-19(NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの3つのCDRをそれぞれ含む;および/またはCD-19を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号38からの3つのCDRを含む。)、

NGFおよびCD-80(NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの3つのCDRをそれぞれ含む;および/またはCD-80を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号40からの3つのCDRを含む。)、

NGFおよびCD-22(NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの3つのCDRをそれぞれ含む;および/またはCD-22を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号42からの3つのCDRを含む。)、

NGFおよびCD-40(NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの3つのCDRをそれぞれ含む;および/またはCD-40を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号44からの3つのCDRを含む。)、

NGFおよびc-MET(NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの3つのCDRをそれぞれ含む;および/またはc-METを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号52からの3つのCDRを含む。)、または

NGFおよびNRP1(NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの3つのCDRをそれぞれ含む;および/またはNRP1を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号58または66からの3つのCDRをそれぞれ含む。)

に結合する、請求項1または91に記載の結合タンパク質。

【請求項96】

結合タンパク質は、

NGFおよびMTX(NGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの3つのCDRをそれぞれ含む;および/またはMTXを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号89からの3つのCDRを含む。)、

NGFおよびNKG2D(NGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの3つのCDRをそれぞれ含む;および/またはNKG2Dを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号91からの3つのCDRを含む。)、

NGFおよびIGF1(NGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの3つのCDRをそれぞれ含む;および/またはIGF1,2を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号47からの3つのCDRを含む。)、

NGFおよびIGF2(NGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または8

7からの3つのCDRをそれぞれ含む；および/またはIGF1, 2を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号47からの3つのCDRを含む。)、

NGFおよびRON (NGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの3つのCDRをそれぞれ含む；および/またはRONを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号37または65からの3つのCDRをそれぞれ含む。)、

NGFおよびErBB3 (NGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの3つのCDRをそれぞれ含む；および/またはErBB3を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号73、75または83からの3つのCDRをそれぞれ含む。)、

NGFおよびCD-3 (NGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの3つのCDRをそれぞれ含む；および/またはCD-3を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号31または69からの3つのCDRをそれぞれ含む。)、

NGFおよびIGFR (NGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの3つのCDRをそれぞれ含む；および/またはIGFRを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号49からの3つのCDRを含む。)、

NGFおよびHGF (NGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの3つのCDRをそれぞれ含む；および/またはHGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号51からの3つのCDRを含む。)、

NGFおよびVEGF (NGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの3つのCDRをそれぞれ含む；および/またはVEGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号55、79、81または85からの3つのCDRをそれぞれ含む。)、

、

NGFおよびDLL4 (NGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの3つのCDRをそれぞれ含む；および/またはDLL4を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号57からの3つのCDRを含む。)、

NGFおよびP1GF (NGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの3つのCDRをそれぞれ含む；および/またはP1GFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号71からの3つのCDRを含む。)、

NGFおよびCD-20 (NGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの3つのCDRをそれぞれ含む；および/またはCD-20を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号29からの3つのCDRを含む。)、

NGFおよびEGFR (NGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの3つのCDRをそれぞれ含む；および/またはEGFRを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号33、63または77からの3つのCDRをそれぞれ含む。)、

NGFおよびHER-2 (NGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの3つのCDRをそれぞれ含む；および/またはHER-2を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号35からの3つのCDRを含む。)、

NGFおよびCD-19 (NGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの3つのCDRをそれぞれ含む；および/またはCD-19を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号39からの3つのCDRを含む。)、

NGFおよびCD-80 (NGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの3つのCDRをそれぞれ含む；および/またはCD-80を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号41からの3つのCDRを含む。)、

NGFおよびCD-22 (NGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの3つのCDRをそれぞれ含む；および/またはCD-22を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号43からの3つのCDRを含む。)、

NGFおよびCD-40 (NGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの3つのCDRをそれぞれ含む；および/またはCD-40を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号45からの3つのCDRを含む。)、

NGFおよびc-MET (NGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの3つのCDRをそれぞれ含む；および/またはc-METを標的化する軽鎖可

変ドメインは、配列番号 53 からの 3 つの CDR を含む。)、または NGF および NRP1 (NGF を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号 61 または 87 からの 3 つの CDR をそれぞれ含む; および/または NRP1 を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号 59 または 67 からの 3 つの CDR をそれぞれ含む。) に結合する、請求項 3 から 92 に記載の結合タンパク質。

【請求項 97】

結合タンパク質は、

NGF および MTX (NGF を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 60 または 86 からの 3 つの CDR をそれぞれ含み、NGF を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号 61 または 87 からの 3 つの CDR をそれぞれ含む; および/または MTX を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 88 からの 3 つの CDR を含み、MTX を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号 89 からの 3 つの CDR を含む。)、

NGF および NKG2D (NGF を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 60 または 86 からの 3 つの CDR をそれぞれ含み、NGF を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号 61 または 87 からの 3 つの CDR をそれぞれ含む; および/または NKG2D を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 90 からの 3 つの CDR を含み、NKG2D を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号 91 からの 3 つの CDR を含む。)、

NGF および IGF1 (NGF を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 60 または 86 からの 3 つの CDR をそれぞれ含み、NGF を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号 61 または 87 からの 3 つの CDR をそれぞれ含む; および/または IGF1 を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 46 からの 3 つの CDR を含み、IGF1 を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号 47 からの 3 つの CDR を含む。)、

NGF および IGF2 (NGF を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 60 または 86 からの 3 つの CDR をそれぞれ含み、NGF を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号 61 または 87 からの 3 つの CDR をそれぞれ含む; および/または IGF2 を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 46 からの 3 つの CDR を含み、IGF2 を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号 47 からの 3 つの CDR を含む。)、

NGF および RON (NGF を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 60 または 86 からの 3 つの CDR をそれぞれ含み、NGF を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号 61 または 87 からの 3 つの CDR をそれぞれ含む; および/または RON を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 36 または 64 からの 3 つの CDR をそれぞれ含み、RON を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号 37 または 65 からの 3 つの CDR をそれぞれ含む。)、

NGF および ErbB3 (NGF を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 60 または 86 からの 3 つの CDR をそれぞれ含み、NGF を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号 61 または 87 からの 3 つの CDR をそれぞれ含む; および/または ErbB3 を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 72、74 または 82 からの 3 つの CDR をそれぞれ含み、ErbB3 を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号 73、75 または 83 からの 3 つの CDR をそれぞれ含む。)、

NGF および CD-3 (NGF を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 60 または 86 からの 3 つの CDR をそれぞれ含み、NGF を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号 61 または 87 からの 3 つの CDR をそれぞれ含む; および/または CD-3 を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 30 または 68 からの 3 つの CDR をそれぞれ含み、CD-3 を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号 31 または 69 からの 3 つの CDR をそれぞれ含む。)、

NGF および IGFIR (NGF を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 60 または 86 からの 3 つの CDR をそれぞれ含み、NGF を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号 61 または 87 からの 3 つの CDR をそれぞれ含む; および/または IGFIR を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号 48 からの 3 つの CDR を含み、IGFIR を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号 49 からの 3 つの CDR を含む。)、

NGFおよびHGF（NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの3つのCDRをそれぞれ含み、NGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの3つのCDRをそれぞれ含む；および/またはHGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号50からの3つのCDRを含み、HGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号51からの3つのCDRを含む。）、

NGFおよびVEGF（NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの3つのCDRをそれぞれ含み、NGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの3つのCDRをそれぞれ含む；および/またはVEGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号54、78、80または84からの3つのCDRをそれぞれ含み、VEGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号55、79、81または85からの3つのCDRをそれぞれ含む。）、

NGFおよびDLL4（NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの3つのCDRをそれぞれ含み、NGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの3つのCDRをそれぞれ含む；および/またはDLL4を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号56からの3つのCDRを含み、DLL4を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号57からの3つのCDRを含む。）、

NGFおよびP1GF（NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの3つのCDRをそれぞれ含み、NGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの3つのCDRをそれぞれ含む；および/またはP1GFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号70からの3つのCDRを含み、P1GFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号71からの3つのCDRを含む。）、

NGFおよびCD-20（NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの3つのCDRをそれぞれ含み、NGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの3つのCDRをそれぞれ含む；および/またはCD-20を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号28からの3つのCDRを含み、CD-20を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号29からの3つのCDRを含む。）、

NGFおよびEGFR（NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの3つのCDRをそれぞれ含み、NGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの3つのCDRをそれぞれ含む；および/またはEGFRを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号32、62または76からの3つのCDRをそれぞれ含み、EGFRを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号33、63または77からの3つのCDRをそれぞれ含む。）、

NGFおよびHER-2（NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの3つのCDRをそれぞれ含み、NGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの3つのCDRをそれぞれ含む；および/またはHER-2を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号34からの3つのCDRを含み、HER-2を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号35からの3つのCDRを含む。）、

NGFおよびCD-19（NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの3つのCDRをそれぞれ含み、NGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの3つのCDRをそれぞれ含む；および/またはCD-19を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号38からの3つのCDRを含み、CD-19を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号39からの3つのCDRを含む。）、

NGFおよびCD-80（NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの3つのCDRをそれぞれ含み、NGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの3つのCDRをそれぞれ含む；および/またはCD-80を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号40からの3つのCDRを含み、CD-80を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号41からの3つのCDRを含む。）、

NGFおよびCD-22（NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの3つのCDRをそれぞれ含み、NGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの3つのCDRをそれぞれ含む；および/またはCD-22を標

的化する重鎖可変ドメインは、配列番号42からの3つのCDRを含み、CD-22を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号43からの3つのCDRを含む。)、
NGFおよびCD-40(NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの3つのCDRをそれぞれ含み、NGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの3つのCDRをそれぞれ含む;および/またはCD-40を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号44からの3つのCDRを含み、CD-40を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号45からの3つのCDRを含む。)、
NGFおよびc-MET(NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの3つのCDRをそれぞれ含み、NGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの3つのCDRをそれぞれ含む;および/またはc-METを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号52からの3つのCDRを含み、c-METを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号53からの3つのCDRを含む。)、または
NGFおよびNRP1(NGFを標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号60または86からの3つのCDRをそれぞれ含み、NGFを標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号61または87からの3つのCDRをそれぞれ含む;および/またはNRP1を標的化する重鎖可変ドメインは、配列番号58または66からの3つのCDRをそれぞれ含み、NRP1を標的化する軽鎖可変ドメインは、配列番号59または67からの3つのCDRをそれぞれ含む。)

に結合する、請求項6、24、25、93または94に記載の結合タンパク質。

【請求項98】

結合タンパク質は、

DVD1307(配列番号96および97を含む);DVD1308(配列番号98および99を含む);
DVD1309(配列番号100および101を含む);DVD1310(配列番号102および103を含む);
DVD1311(配列番号104および105を含む);DVD1312(配列番号106および107を含む);
DVD1313(配列番号108および109を含む);DVD1314(配列番号110および111を含む);
DVD1315(配列番号112および113を含む);DVD1316(配列番号114および115を含む);
DVD1317(配列番号116および117を含む);DVD1318(配列番号118および119を含む);
DVD1319(配列番号120および121を含む);DVD1320(配列番号122および123を含む);
DVD1321(配列番号124および125を含む);DVD1322(配列番号126および127を含む);
DVD1323(配列番号128および129を含む);DVD1324(配列番号130および131を含む);
DVD1325(配列番号132および133を含む);DVD1326(配列番号134および135を含む);
DVD1327(配列番号136および137を含む);DVD1328(配列番号138および139を含む);
DVD1329(配列番号140および141を含む);DVD1330(配列番号142および143を含む);
DVD1331(配列番号144および145を含む);DVD1332(配列番号146および147を含む);
DVD1333(配列番号148および149を含む);DVD1334(配列番号150および151を含む);
DVD1335(配列番号152および153を含む);DVD1336(配列番号15

4 および 155 を含む) ;
DVD 1337 (配列番号 156 および 157 を含む) ; DVD 1338 (配列番号 158 および 159 を含む) ;
DVD 1339 (配列番号 160 および 161 を含む) ; DVD 1340 (配列番号 162 および 163 を含む) ;
DVD 1341 (配列番号 164 および 165 を含む) ; DVD 1342 (配列番号 166 および 167 を含む) ;
DVD 1343 (配列番号 168 および 169 を含む) ; DVD 1344 (配列番号 170 および 171 を含む) ;
DVD 1345 (配列番号 172 および 173 を含む) ; DVD 1346 (配列番号 174 および 175 を含む) ;
DVD 1347 (配列番号 176 および 177 を含む) ; DVD 1348 (配列番号 178 および 179 を含む) ;
DVD 1349 (配列番号 180 および 181 を含む) ; DVD 1350 (配列番号 182 および 183 を含む) ;
DVD 1351 (配列番号 184 および 185 を含む) ; DVD 1352 (配列番号 186 および 187 を含む) ;
DVD 1353 (配列番号 188 および 189 を含む) ; DVD 1354 (配列番号 190 および 191 を含む) ;
DVD 1357 (配列番号 192 および 193 を含む) ; DVD 1358 (配列番号 194 および 195 を含む) ;
DVD 1361 (配列番号 196 および 197 を含む) ; DVD 1362 (配列番号 198 および 199 を含む) ;
DVD 1363 (配列番号 200 および 201 を含む) ; DVD 1364 (配列番号 202 および 203 を含む) ;
DVD 1365 (配列番号 204 および 205 を含む) ; DVD 1366 (配列番号 206 および 207 を含む) ;
DVD 1367 (配列番号 208 および 209 を含む) ; DVD 1368 (配列番号 210 および 211 を含む) ;
DVD 1369 (配列番号 212 および 213 を含む) ; DVD 1370 (配列番号 214 および 215 を含む) ;
DVD 1371 (配列番号 216 および 217 を含む) ; DVD 1372 (配列番号 218 および 219 を含む) ;
DVD 1373 (配列番号 220 および 221 を含む) ; DVD 1374 (配列番号 222 および 223 を含む) ;
DVD 1375 (配列番号 224 および 225 を含む) ; DVD 1376 (配列番号 226 および 227 を含む) ;
DVD 1377 (配列番号 228 および 229 を含む) ; DVD 1378 (配列番号 230 および 231 を含む) ;
DVD 1379 (配列番号 232 および 233 を含む) ; DVD 1380 (配列番号 234 および 235 を含む) ;
DVD 1381 (配列番号 236 および 237 を含む) ; DVD 1382 (配列番号 238 および 239 を含む) ;
DVD 1383 (配列番号 240 および 241 を含む) ; DVD 1384 (配列番号 242 および 243 を含む) ;
DVD 1385 (配列番号 244 および 245 を含む) ; DVD 1386 (配列番号 246 および 247 を含む) ;
DVD 1387 (配列番号 248 および 249 を含む) ; DVD 1388 (配列番号 250 および 251 を含む) ;
DVD 1389 (配列番号 252 および 253 を含む) ; DVD 1390 (配列番号 25

4 および 2 5 5 を含む) ;
DVD 1 3 9 1 (配列番号 2 5 6 および 2 5 7 を含む) ; DVD 1 3 9 2 (配列番号 2 5
8 および 2 5 9 を含む) ;
DVD 1 3 9 3 (配列番号 2 6 0 および 2 6 1 を含む) ; DVD 1 3 9 4 (配列番号 2 6
2 および 2 6 3 を含む) ;
DVD 1 3 9 5 (配列番号 2 6 4 および 2 6 5 を含む) ; DVD 1 3 9 6 (配列番号 2 6
6 および 2 6 7 を含む) ;
DVD 1 3 9 7 (配列番号 2 6 8 および 2 6 9 を含む) ; DVD 1 3 9 8 (配列番号 2 7
0 および 2 7 1 を含む) ;
DVD 1 3 9 9 (配列番号 2 7 2 および 2 7 3 を含む) ; DVD 1 4 0 0 (配列番号 2 7
4 および 2 7 5 を含む) ;
DVD 1 4 0 1 (配列番号 2 7 6 および 2 7 7 を含む) ; DVD 1 4 0 2 (配列番号 2 7
8 および 2 7 9 を含む) ;
DVD 1 4 0 3 (配列番号 2 8 0 および 2 8 1 を含む) ; DVD 1 4 0 4 (配列番号 2 8
2 および 2 8 3 を含む) ;
DVD 1 4 0 5 (配列番号 2 8 4 および 2 8 5 を含む) ; DVD 1 4 0 6 (配列番号 2 8
6 および 2 8 7 を含む) ;
DVD 1 4 0 7 (配列番号 2 8 8 および 2 8 9 を含む) ; DVD 1 4 0 8 (配列番号 2 9
0 および 2 9 1 を含む) ;
DVD 1 4 0 9 (配列番号 2 9 2 および 2 9 3 を含む) ; DVD 1 4 1 0 (配列番号 2 9
4 および 2 9 5 を含む) ;
DVD 1 4 1 1 (配列番号 2 9 6 および 2 9 7 を含む) ; DVD 1 4 1 2 (配列番号 2 9
8 および 2 9 9 を含む) ;
DVD 1 4 1 3 (配列番号 3 0 0 および 3 0 1 を含む) ; DVD 1 4 1 4 (配列番号 3 0
2 および 3 0 3 を含む) ;
DVD 1 4 1 5 (配列番号 3 0 4 および 3 0 5 を含む) ; DVD 1 4 1 6 (配列番号 3 0
6 および 3 0 7 を含む) ;
DVD 1 4 1 7 (配列番号 3 0 8 および 3 0 9 を含む) ; DVD 1 4 1 8 (配列番号 3 1
0 および 3 1 1 を含む) ;
DVD 1 4 2 1 (配列番号 3 1 2 および 3 1 3 を含む) ; DVD 1 4 2 2 (配列番号 3 1
4 および 3 1 5 を含む) ;
DVD 1 4 2 5 (配列番号 3 1 6 および 3 1 7 を含む) ; DVD 1 4 2 6 (配列番号 3 1
8 および 3 1 9 を含む) ;
DVD 1 4 2 7 (配列番号 3 2 0 および 3 2 1 を含む) ; DVD 1 4 2 8 (配列番号 3 2
2 および 3 2 3 を含む) ;
DVD 1 4 2 9 (配列番号 3 2 4 および 3 2 5 を含む) ; DVD 1 4 3 0 (配列番号 3 2
6 および 3 2 7 を含む) ;
DVD 1 4 3 1 (配列番号 3 2 8 および 3 2 9 を含む) ; DVD 1 4 3 2 (配列番号 3 3
0 および 3 3 1 を含む) ;
DVD 1 4 3 3 (配列番号 3 3 2 および 3 3 3 を含む) ; DVD 1 4 3 4 (配列番号 3 3
4 および 3 3 5 を含む)

である、請求項 2 4、2 5、9 3 または 9 4 に記載の結合タンパク質。

【請求項 9 9】

VD 1 および / または VD 2 重鎖可変ドメインが、存在する場合、配列番号 2 8、3 0、3 2、3 4、3 6、3 8、4 0、4 2、4 4、4 6、4 8、5 0、5 2、5 4、5 6、5 8、6 0、6 2、6 4、6 6、6 8、7 0、7 2、7 4、7 6、7 8、8 0、8 2、8 4、8 6、8 8 または 9 0 からの 3 つの CDR をそれぞれ含み、および / または VD 1 および / または VD 2 軽鎖可変ドメインが、存在する場合、配列番号 2 9、3 1、3 3、3 5、3 7、3 9、4 1、4 3、4 5、4 7、4 9、5 1、5 3、5 5、5 7、5 9、6 1、6 3、6 5、6 7、6 9、7 1、7 3、7 5、7 7、7 9、8 1、8 3、8 5、8 7、

89または91からの3つのCDRをそれぞれ含む、請求項91から94に記載の結合タンパク質。

【請求項100】

VD1および/またはVD2重鎖可変ドメインが、存在する場合、配列番号28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88または90をそれぞれ含み、および/またはVD1および/またはVD2軽鎖可変ドメインが、存在する場合、配列番号29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89または91をそれぞれ含む、請求項91から94に記載の結合タンパク質。

【請求項101】

VD1およびVD2重鎖可変ドメインが、存在する場合、配列番号28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88または90からの3つのCDRをそれぞれ含み、VD1およびVD2軽鎖可変ドメインが、存在する場合、配列番号29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89または91からの3つのCDRをそれぞれ含む、請求項1、3、9、24または91から94に記載の結合タンパク質。

【請求項102】

VD1およびVD2重鎖可変ドメインが、存在する場合、配列番号28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88または90をそれぞれ含み、VD1およびVD2軽鎖可変ドメインが、存在する場合、配列番号29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89または91をそれぞれ含む、請求項1、3、9、24または91から94に記載の結合タンパク質。

【請求項103】

VD1およびVD2重鎖可変ドメインが、存在する場合、配列番号28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88または90をそれぞれ含み、VD1およびVD2軽鎖可変ドメインが、存在する場合、配列番号29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89または91をそれぞれ含む、請求項26に記載の方法。

【請求項104】

第一および第二の軽鎖可変ドメイン間の(X1)_nがCLでない、請求項1、3、9、24または91から94に記載の結合タンパク質。

【請求項105】

第一および第二の軽鎖可変ドメイン間の(X1)_nがCLでない、請求項62に記載の方法。

【請求項106】

TF-1細胞増殖バイオアッセイによって測定された場合に、最大約5.9570nMのEC50でNGFを阻害する、請求項1、3、9、24、または91から94に記載の結合タンパク質。

【手続補正書】

【提出日】平成25年3月13日(2013.3.13)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

第一および第二のポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であって、各々のポリペプチド鎖が、独立して、 $VD1 - (X1)_n - VD2 - C - (X2)_n$ 〔式中、

VD1は第一の可変ドメインであり、

VD2は第二の可変ドメインであり、

Cは定常ドメインであり、

X1はリンカーであり(但し、CH1ではない)、

X2はFc領域であり、および

nは0または1である)を含み;

第一および第二のポリペプチド鎖上のVD1ドメインは、第一の機能的標的結合部位を形成し、第一および第二のポリペプチド鎖上のVD2ドメインは、第二の機能的標的結合部位を形成する;並びに

(a)結合タンパク質は、NGFおよびIFG1、2に結合することが可能であり、ここで、

NGFの機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは、

配列番号60からの3つのCDRおよび配列番号61からの3つのCDR、もしくは配列番号86からの3つのCDRおよび配列番号87からの3つのCDR

を含み、および

IFG1、2の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは、

配列番号46からの3つのCDRおよび配列番号47からの3つのCDR

を含む;

(b)結合タンパク質は、NGFおよびRONに結合することが可能であり、ここで、

NGFの機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは、

配列番号60からの3つのCDRおよび配列番号61からの3つのCDR、もしくは配列番号86からの3つのCDRおよび配列番号87からの3つのCDR

を含み、および

RONの機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは、

配列番号36からの3つのCDRおよび配列番号37からの3つのCDR、もしくは配列番号64からの3つのCDRおよび配列番号65からの3つのCDR

を含む;

(c)結合タンパク質は、NGFおよびErBB3に結合することが可能であり、ここで、

NGFの機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは、

配列番号60からの3つのCDRおよび配列番号61からの3つのCDR、もしくは配列番号86からの3つのCDRおよび配列番号87からの3つのCDR

を含み、および

ErBB3の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは、

配列番号72からの3つのCDRおよび配列番号73からの3つのCDR、

配列番号74からの3つのCDRおよび配列番号75からの3つのCDR、もしくは配列番号82からの3つのCDRおよび配列番号83からの3つのCDR、

を含む;

(d)結合タンパク質は、NGFおよびIGFRに結合することが可能であり、ここで、

NGFの機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは、

配列番号 60 からの 3 つの CDR および配列番号 61 からの 3 つの CDR、もしくは配列番号 86 からの 3 つの CDR および配列番号 87 からの 3 つの CDR

を含み、および

IGFR の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは、

配列番号 48 からの 3 つの CDR および配列番号 49 からの 3 つの CDR

を含む；

(e) 結合タンパク質は、NGF および HGF に結合することが可能であり、ここで、

NGF の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは、

配列番号 60 からの 3 つの CDR および配列番号 61 からの 3 つの CDR、もしくは

配列番号 86 からの 3 つの CDR および配列番号 87 からの 3 つの CDR

を含み、および

HGF の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは、

配列番号 50 からの 3 つの CDR および配列番号 51 からの 3 つの CDR

を含む；

(f) 結合タンパク質は、NGF および VEGF に結合することが可能であり、ここで、

NGF の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは、

配列番号 60 からの 3 つの CDR および配列番号 61 からの 3 つの CDR、または

配列番号 86 からの 3 つの CDR および配列番号 87 からの 3 つの CDR

を含み、および

VEGF の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは、

配列番号 54 からの 3 つの CDR および配列番号 55 からの 3 つの CDR、

配列番号 78 からの 3 つの CDR および配列番号 79 からの 3 つの CDR、もしくは

配列番号 80 からの 3 つの CDR および配列番号 81 からの 3 つの CDR

を含む；

(g) 結合タンパク質は、NGF および DLL4 に結合することが可能であり、ここで、

NGF の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは、

配列番号 60 からの 3 つの CDR および配列番号 61 からの 3 つの CDR、もしくは

配列番号 86 からの 3 つの CDR および配列番号 87 からの 3 つの CDR

を含み、および

DLL4 の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは、

配列番号 56 からの 3 つの CDR および配列番号 57 からの 3 つの CDR

を含む；

(h) 結合タンパク質は、NGF および P1GF に結合することが可能であり、ここで、

NGF の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは、

配列番号 60 からの 3 つの CDR および配列番号 61 からの 3 つの CDR、もしくは

配列番号 86 からの 3 つの CDR および配列番号 87 からの 3 つの CDR

を含み、および

P1GF の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは、

配列番号 70 からの 3 つの CDR および配列番号 71 からの 3 つの CDR

を含む；

(i) 結合タンパク質は、NGF および CD-20 に結合することが可能であり、ここで、

、

NGF の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは、

配列番号 60 からの 3 つの CDR および配列番号 61 からの 3 つの CDR、もしくは

配列番号 86 からの 3 つの CDR および配列番号 87 からの 3 つの CDR

を含み、および

CD-20 の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは、

配列番号 28 からの 3 つの CDR および配列番号 29 からの 3 つの CDR

を含む；

(j) 結合タンパク質は、NGF および EGF R に結合することが可能であり、ここで、

NGFの機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは、
配列番号60からの3つのCDRおよび配列番号61からの3つのCDR、もしくは
配列番号86からの3つのCDRおよび配列番号87からの3つのCDR
を含み、および

EGFRの機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは、
配列番号32からの3つのCDRおよび配列番号33からの3つのCDR、
配列番号62からの3つのCDRおよび配列番号63からの3つのCDR、もしくは
配列番号76からの3つのCDRおよび配列番号77からの3つのCDR
を含む；

(k) 結合タンパク質は、NGFおよびHER-2に結合することが可能であり、ここで、

NGFの機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは、
配列番号60からの3つのCDRおよび配列番号61からの3つのCDR、もしくは
配列番号86からの3つのCDRおよび配列番号87からの3つのCDR
を含み、および

HER-2の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは、
配列番号34からの3つのCDRおよび配列番号35からの3つのCDR
を含む；

(l) 結合タンパク質は、NGFおよびc-METに結合することが可能であり、ここで、

NGFの機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは、
配列番号60からの3つのCDRおよび配列番号61からの3つのCDR、もしくは
配列番号86からの3つのCDRおよび配列番号87からの3つのCDR
を含み、および

c-METの機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは、
配列番号52からの3つのCDRおよび配列番号53からの3つのCDR
を含む；

或いは

(m) 結合タンパク質は、NGFおよびNRP1に結合することが可能であり、ここで、

NGFの機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは、
配列番号60からの3つのCDRおよび配列番号61からの3つのCDR、もしくは
配列番号86からの3つのCDRおよび配列番号87からの3つのCDR
を含み、および

NRP1の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは、
配列番号58からの3つのCDRおよび配列番号59からの3つのCDR、もしくは
配列番号66からの3つのCDRおよび配列番号67からの3つのCDR
を含む、

結合タンパク質。

【請求項2】

2つの第一のポリペプチド鎖および2つの第二のポリペプチド鎖を含む、請求項1に記載の結合タンパク質であって、

各々のポリペプチド鎖が、独立して、VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n〔
式中、

VD1は第一の可変ドメインであり、

VD2は第二の可変ドメインであり、

Cは定常ドメインであり、

X1はリンカーであり(但し、CH1ではない)、

X2はFc領域であり、および

nは0または1である〕を含み；

第一および第二のポリペプチド鎖の各対上のVD1ドメインは、第一の機能的標的結合

部位を形成し、第一および第二のポリペプチド鎖の各対上のVD2ドメインは、第二の機能的標的結合部位を形成する、
結合タンパク質。

【請求項3】

第一のポリペプチド鎖が、第一のVD1 - (X1)_n - VD2 - C - (X2)_n〔式中、
VD1は第一の重鎖可変ドメインであり、
VD2は第二の重鎖可変ドメインであり、
Cは重鎖定常ドメインであり、
X1は第一のリンカーであり（但し、CH1ではない）、
X2はFc領域であり、および
nは0または1である〕を含み；

第二のポリペプチド鎖が、第二のVD1 - (X1)_n - VD2 - C - (X2)_n〔式中、
VD1は第一の軽鎖可変ドメインであり、
VD2は第二の軽鎖可変ドメインであり、
Cは軽鎖定常ドメインであり、
X1は第二のリンカーであり（但し、CH1ではない）、
X2はFc領域を含まず、および
nは0または1である〕を含み；

第一および第二のポリペプチド鎖上のVD1ドメインは、第一の機能的標的結合部位を形成し、第一および第二のポリペプチド鎖上のVD2ドメインは、第二の機能的標的結合部位を形成する、

請求項1または2に記載の結合タンパク質。

【請求項4】

(a) 結合タンパク質が、NGFおよびIFG1、2に結合することが可能であり、ここで前記結合タンパク質は、NGF阻害アッセイによって測定された場合に、最大約0.0009nMのEC50でNGFを阻害することが可能である；

(b) 結合タンパク質が、NGFおよびRONに結合することが可能であり、ここで前記結合タンパク質は、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約6.2 × 10⁻¹² MのK_DでNGFに結合することが可能であり、および/または表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約5.70 × 10⁻⁹ MのK_DでRONに結合することが可能である；

(c) 結合タンパク質が、NGFおよびErBB3に結合することが可能であり、ここで前記結合タンパク質は、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約1.40 × 10⁻⁹ MのK_DでNGFに結合することが可能であり、および/または表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約4.2 × 10⁻¹² MのK_DでErBB3に結合することが可能である；

(d) 結合タンパク質が、NGFおよびIGFRに結合することが可能であり、ここで前記結合タンパク質は、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約4.83 × 10⁻¹² MのK_DでNGFに結合することが可能である；

(e) 結合タンパク質が、NGFおよびHGFに結合することが可能であり、ここで前記結合タンパク質は、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約1.90 × 10⁻¹² MのK_DでNGFに結合することが可能である；

(f) 結合タンパク質が、NGFおよびVEGFに結合することが可能であり、ここで前記結合タンパク質は、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約5.4 × 10⁻¹² MのK_DでNGFに結合することが可能であり、および/または表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約8.00 × 10⁻¹¹ MのK_DでVEGFに結合することが可能である；

(g) 結合タンパク質が、NGFおよびDLL4に結合することが可能であり、ここで

前記結合タンパク質は、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 1.80×10^{-12} M の K_D で NGF に結合することが可能であり、および / または表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 3.80×10^{-10} M の K_D で DLL4 に結合することが可能である；

(h) 結合タンパク質が、NGF および P1GF に結合することが可能であり、ここで前記結合タンパク質は、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 3.00×10^{-10} M の K_D で NGF に結合することが可能であり、および / または表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 1.40×10^{-09} M の K_D で PIGF に結合することが可能である；

(i) 結合タンパク質が、NGF および CD-20 に結合することが可能であり、ここで前記結合タンパク質は、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 1.6×10^{-11} M の K_D で NGF に結合することが可能である；

(j) 結合タンパク質が、NGF および EGFR に結合することが可能であり、ここで前記結合タンパク質は、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 1.00×10^{-11} M の K_D で NGF に結合することが可能であり、および / または表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 1.75×10^{-08} M の K_D で EGFR に結合することが可能である；

(k) 結合タンパク質が、NGF および HER-2 に結合することが可能であり、ここで前記結合タンパク質は、NGF 阻害アッセイによって測定された場合に、最大約 0.0006 nM の EC50 で NGF を阻害することが可能である；

(l) 結合タンパク質が、NGF および c-MET に結合することが可能であり、ここで前記結合タンパク質は、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 5.3×10^{-13} M の K_D で NGF に結合することが可能である；

或いは

(m) 結合タンパク質が、NGF および NRP1 に結合することが可能であり、ここで前記結合タンパク質は、NGF 阻害アッセイによって測定された場合に、最大約 0.2259 nM の EC50 で NGF を阻害することが可能である、

請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項 5】

(a) X1 が配列番号 1 から 27 のいずれか 1 つであり、

(b) X1 が CL ではなく、

(c) (X1)_n が (X1)₀ であり、および / または (X2)_n が (X2)₀ であり、

(d) 結合タンパク質が、2 つの第一のポリペプチド鎖および 2 つの第二のポリペプチド鎖を含み、

(e) Fc 領域が可変配列 Fc 領域であり、

(f) Fc 領域が IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE および IgD 由来の Fc 領域であり、並びに / 或いは

(g) 結合タンパク質が、結晶化された結合タンパク質である、

請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項 6】

請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の結合タンパク質を含み、さらに免疫接着分子、造影剤、治療剤、または細胞毒性剤を含む結合タンパク質連結体であって、

場合によって前記造影剤は、放射性標識、酵素、蛍光標識、発光標識、生物発光標識、磁気標識もしくはビオチンであり、場合によって前記放射性標識は ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho もしくは ^{153}Sm であり、または

場合によって前記治療剤もしくは細胞毒性剤は、代謝抑制剤、アルキル化剤、抗生物質、増殖因子、サイトカイン、抗血管新生剤、抗有糸分裂剤、アントラサイクリン、トキシンまたはアポトーシス剤である、

結合タンパク質連結体。

【請求項 7】

請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の結合タンパク質のアミノ酸配列をコードする単離された核酸。

【請求項 8】

場合によってベクターが、p c D N A、p T T、p T T 3、p E F B O S、p B V、p J V、p c D N A 3 . 1 T O P O、p E F 6、p H y b E、T O P Oまたはp B Jである、請求項 7 に記載の単離された核酸を含むベクター。

【請求項 9】

請求項 8 に記載のベクターを含む宿主細胞であって、場合によって、原核細胞、エシェリキア・コリ (*Escherichia coli*)、真核細胞、原生生物細胞、動物細胞、植物細胞、真菌細胞、酵母細胞、S f 9 細胞、哺乳動物細胞、鳥類細胞、昆虫細胞、C H O 細胞またはC O S 細胞である、宿主細胞。

【請求項 10】

結合タンパク質を産生するのに十分な条件下で、請求項 9 に記載の宿主細胞を培地中で培養することを含む、結合タンパク質を生産する方法。

【請求項 11】

請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の結合タンパク質と、医薬として許容される担体と、を含む医薬組成物。

【請求項 12】

少なくとも 1 つの追加の治療剤をさらに含み、

前記追加の治療剤が、場合によって、造影剤、細胞毒性剤、血管新生阻害剤；キナーゼ阻害剤；共刺激分子遮断剤；接着分子遮断剤；抗サイトカイン抗体またはその機能的断片；メトトレキサート；シクロスポリン；ラパマイシン；F K 5 0 6；検出可能な標識またはレポーター；T N F アンタゴニスト；抗リウマチ薬；筋肉弛緩剤、麻酔薬、非ステロイド系抗炎症薬 (N S A I D)、鎮痛剤、麻酔、鎮静剤、局所麻酔、神経筋肉遮断剤、抗微生物剤、抗乾癬剤、コルチコステロイド、アナボリックステロイド、エリスロポエチン、免疫化、イムノグロブリン、免疫抑制剤、成長ホルモン、ホルモン置換薬、放射性医薬、抗うつ剤、抗精神病薬、刺激物質、喘息薬、アゴニスト、吸入用ステロイド、エピネフリンまたは類似体、サイトカインまたはサイトカインアンタゴニストである、

請求項 11 に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

治療が達成されるように、対象に結合タンパク質を投与することによって対象の疾病または疾患を治療するための薬剤の製造における、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の結合タンパク質の使用であって、

前記疾患が、場合によって、関節リウマチ、骨関節炎、若年性慢性関節炎、化膿性関節炎、ライム関節炎、乾癬性関節炎、反応性関節炎、脊椎関節症、全身性紅斑性狼瘡、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、インシュリン依存性糖尿病、甲状腺炎、喘息、アレルギー性疾患、乾癬、皮膚炎、強皮症、移植片対宿主病、臓器移植拒絶、臓器移植に関連する急性または慢性免疫疾患、サルコイドーシス、アテローム性動脈硬化症、播種性血管内凝固、川崎病、パセドウ病、ネフローゼ症候群、慢性疲労症候群、ウェゲナー肉芽腫症、ヘノッホ・シェーライン紫斑症、腎臓の顕微鏡的血管炎、慢性活動性肝炎、ブドウ膜炎、敗血症性ショック、毒素性ショック症候群、敗血症症候群、悪液質、感染性疾患、寄生性疾患、急性横断性脊髄炎、ハンチントン舞蹈病、パーキンソン病、アルツハイマー病、発作、原発性胆汁性肝硬変、溶血性貧血、悪性腫瘍、心不全、心筋梗塞、アジソン病、孤発性の、多内分泌腺機能低下症候群 I 型および多内分泌腺機能低下症候群 II 型、シュミット症候群、成人 (急性) 呼吸促迫症候群、脱毛症、円形脱毛症、血清反応陰性関節炎、関節炎、ライター病、乾癬性関節炎、潰瘍性大腸性関節炎、腸疾患性滑膜炎、クラミジア、エルシニアおよびサルモネラ関連関節炎、脊椎関節症、アテローム性疾患 / アテローム性動脈硬化症、アトピー性アレルギー、自己免疫性水疱性疾患、尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、類天疱瘡、線状 I g A 病、自己免疫性溶血性貧血、クームス陽性溶血性貧血、後

天性悪性貧血、若年性悪性貧血、筋痛性脳脊髄炎/ロイアルフリー病、慢性粘膜皮膚カンジダ症、巨細胞性動脈炎、原発性硬化性肝炎、突発性自己免疫性肝炎、後天性免疫不全症候群、後天性免疫不全関連疾患、B型肝炎、C型肝炎、分類不能型免疫不全症(分類不能型原発性低グロブリン血症)、拡張型心筋症、女性不妊症、卵巣機能不全、早期卵巣機能不全、線維性肺疾患、突発性間質性肺炎、炎症後間質性肺疾患、間質性肺炎、結合組織疾患関連間質性肺疾患、混合性結合組織疾患関連肺疾患、全身性硬化症関連間質性肺疾患、関節リウマチ関連間質性肺疾患、全身性紅斑性狼瘡関連肺疾患、皮膚筋炎/多発性筋炎関連肺疾患、シェーグレン病関連肺疾患、強直性脊椎炎関連肺疾患、血管炎性びまん性肺疾患(vasculitic diffuse lung disease)、ヘモシデロース関連肺疾患、薬物によって誘導された間質性肺疾患、線維症、放射性線維症、閉塞性細気管支炎、慢性好酸球性肺炎、リンパ球浸潤性肺疾患、感染後間質性肺疾患、通風関節炎、自己免疫性肝炎、I型自己免疫性肝炎(古典的自己免疫性またはルポイド肝炎)、II型自己免疫性肝炎(抗LKM抗体肝炎)、自己免疫媒介性低血糖症、黒色表皮腫を伴うB型インシュリン抵抗性、副甲状腺機能低下症、臓器移植に関連する急性免疫疾患、臓器移植に関連する慢性免疫疾患、変形性関節症、原発性硬化性胆管炎、I型乾癬、II型乾癬、特発性白血球減少症、自己免疫性好中球減少症、腎臓病NOS、糸球体腎炎、腎臓の顕微鏡的血管炎、ライム病、円板状紅斑性狼瘡、男性不妊症特発性またはNOS、精子自己免疫、多発性硬化症(すべてのサブタイプ)、交感性眼炎、結合組織疾患に続発する肺高血圧症、グッドパスチャー症候群、結節性多発動脈炎の肺症状、急性リウマチ熱、リウマチ性脊椎炎、スチル病、全身性硬化症、シェーグレン症候群、高安病/動脈炎、自己免疫性血小板減少症、特発性血小板減少症、自己免疫性甲状腺疾患、甲状腺機能亢進症、甲状腺腫自己免疫性甲状腺機能低下症(橋本病)、萎縮性自己免疫性甲状腺機能低下症、原発性粘液水腫(primary myxoedema)、水晶体起因性ブドウ膜炎、原発性血管炎、白斑急性肝疾患、慢性肝疾患、アルコール性肝硬変、アルコール誘発性肝障害、胆汁うっ滞(choleosatis)、特異体質性肝疾患、薬物誘発性肝炎、非アルコール性脂肪性肝炎、アレルギーおよび喘息、B群連鎖球菌(GBS)感染、精神障害(例えば、うつ病および統合失調症)、Th2型およびTh1型によって媒介される疾病、急性および慢性疼痛(疼痛の様々な形態)、ならびに、肺癌、乳癌、胃癌、膀胱癌、大腸癌、膵臓癌、卵巣癌、前立腺癌および腎臓癌および造血性悪性病変(白血病およびリンパ腫)などの癌、無リポタンパク質血症、先端チアノーゼ、急性および慢性寄生性または感染性プロセス、急性白血病、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、急性骨髄性白血病(AML)、急性または慢性細菌感染、急性膵炎、急性腎不全、腺癌、心房(atrial)異所性拍動、AIDS認知症複合、アルコール誘発性肝炎、アレルギー性結膜炎、アレルギー性接触性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、同種移植拒絶、-1-アンチトリプシン欠乏症、筋萎縮性側索硬化症、貧血、狭心症、前角細胞変性、抗cd3治療、抗リン脂質症候群、抗受容体過敏症反応(anti-receptor hypersensitivity reactions)、大動脈(aortic)および動脈瘤、大動脈解離、動脈性高血圧、動脈硬化症、動静脈瘻、運動失調、心房細動(持続的または発作性)、心房粗動、房室ブロック、B細胞リンパ腫、骨移植拒絶、骨髄移植(BMT)拒絶、脚ブロック、パーキットリンパ腫、火傷、心不整脈、心機能不全症候群(cardiac stun syndrome)、心臓腫瘍、心筋症、心肺バイパス炎症反応、軟骨移植拒絶、小脳皮質変性、小脳疾患、無秩序なまたは多巣性心房頻脈、化学療法関連疾患、慢性骨髄性白血病(CML)、慢性アルコール症、慢性炎症性病変、慢性リンパ性白血病(CLL)、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、慢性サリチル酸中毒、結腸直腸癌、うっ血性心不全、結膜炎、接触性皮膚炎、肺性心、冠動脈疾患、クロイツフェルト-ヤコブ病、培養陰性敗血症、嚢胞性線維症、サイトカイン療法関連疾患、ボクサー脳、脱髄性疾患、デング出血熱、皮膚炎、皮膚科学的症状、糖尿病、真性糖尿病、糖尿病性動脈硬化疾患、瀰漫性レビー小体病、拡張型うっ血性心筋症、大脳基底核の疾患、中年のダウン症候群、中枢神経ドーパミン受容体を遮断する薬物によって誘発された薬物誘発性運動疾患、薬物感受性、湿疹、脳脊髄炎、心内膜炎、内分泌疾患、喉頭蓋炎、エプスタイン-バーウイルス

感染、紅痛症、垂体外路および小脳疾患、家族性血球貪食性リンパ組織球症 (familial hematomphagocytic lymphohistiocytosis)、致死的胸腺移植組織拒絶、フリードライヒ失調症、機能的末梢動脈疾患、真菌性敗血症、ガス壊疽、胃潰瘍、いずれかの臓器または組織の移植片拒絶、グラム陰性敗血症、グラム陽性敗血症、細胞内生物に起因する肉芽腫、有毛細胞白血病、ハラールホルデン・スパッツ病、橋本甲状腺炎、枯草熱、心臓移植拒絶、血色素症、血液透析、溶血性尿毒症症候群 / 血栓溶解血小板減少紫斑病、出血、A型肝炎、ヒス束不整脈、HIV感染 / HIV神経障害、ホジキン病、運動過剰疾患、過敏症反応、過敏性肺炎、高血圧、運動低下疾患、視床下部 - 下垂体 - 副腎皮質系評価、特発性アジソン病、特発性肺線維症、抗体媒介性細胞毒性、無力症、乳児脊髄性筋萎縮症、大動脈の炎症、A型インフルエンザ、電離放射線曝露、虹彩毛様体炎 / ブドウ膜炎 / 視神経炎、虚血再灌流障害、虚血性発作、若年性関節リウマチ、若年性脊髄性筋萎縮症、カボジ肉腫、腎移植拒絶、レジオネラ、リーシュマニア症、ハンセン病、皮質脊髄系の病変、脂肪血症 (lipedema)、肝臓移植拒絶、リンパ浮腫 (lymphedema)、マラリア、悪性リンパ腫、悪性組織球増殖症、悪性黒色腫、髄膜炎、髄膜炎菌血症 (meningococccemia)、代謝性 / 特発性、偏頭痛、ミトコンドリア多系疾患 (mitochondrial multi-system disorder)、混合性結合組織病、モノクローナル高ガンマグロブリン血症、多発性骨髄腫、多系統変性 (メンセル・デジェリーヌ・トーマス・シャイ・ドレーガーおよびマシャド・ジョセフ)、重症筋無力症、マイコバクテリウム・アビウム・イントラセルラーレ、マイコバクテリウム・チューバキュロシス、骨髄形成異常、真菌虚血疾患、上咽頭癌、新生児慢性肺疾患、腎炎、ネフローゼ、神経変性疾患、神経原性I筋萎縮、好中球減少性発熱、非ホジキンリンパ腫、腹部大動脈およびその分枝の閉塞、閉塞性動脈疾患、okt3療法、精巣炎 / 精巣上体炎、精巣炎 / 精管復元術処置、臓器肥大、骨粗鬆症、脾臓移植拒絶、脾癌、腫瘍随伴性症候群 / 悪性腫瘍の高カルシウム血症、副甲状腺移植拒絶、骨盤内炎症性疾患、通年性鼻炎、心膜疾患、末梢アテローム硬化性疾患、末梢血管疾患、腹膜炎、悪性貧血、ニューモシスチス・カリニ肺炎、肺炎、POEMS症候群 (多発神経炎、臓器肥大、内分泌疾患、単クローン性 グロブリン血症および皮膚変化症候群 (skin changes syndrome))、灌流後症候群 (post perfusion syndrome)、ポンプ後症候群 (post pump syndrome)、心筋梗塞後開心術症候群、子癇前症、進行性核上性麻痺、原発性肺高血圧、放射線療法、レイノー現象および病、レイノー病、レフサム病、規則的なQRS幅の狭い頻脈症 (regular narrow QRS tachycardia)、腎血管性高血圧、再灌流障害、拘束型心筋症、肉腫、強皮症、老年性舞踏病、レビー小体型の老年性認知症、血清反応陰性関節炎、ショック、鎌形赤血球貧血症、皮膚同種異系移植拒絶、皮膚変化症候群、小腸移植拒絶、固形腫瘍、固有不整脈 (specific arrhythmias)、脊髄性運動失調、脊髄小脳変性、連鎖球菌性筋炎、小脳の構造的病変、亜急性硬化性全脳炎、湿疹、心血管系の梅毒、全身性アナフィラキシー、全身性炎症反応症候群、全身性発症若年性関節リウマチ、T細胞またはFABALL、毛細血管拡張症、閉塞性血栓血管炎、血小板減少症、毒性、移植、外傷 / 出血、III型過敏症反応、IV型過敏症、不安定狭心症、尿毒症、尿路性敗血症、じんましん、心臓弁膜症、静脈瘤、血管炎、静脈疾患、静脈血栓症、心室細動、ウイルスおよび真菌感染、ウイルス性脳炎 (vital encephalitis) / 無菌性髄膜炎、ウイルス関連血球貪食症候群、ウェルニッケ - コルサコフ症候群、ウィルソン病、いずれかの臓器または組織の異種移植拒絶、急性冠症候群、急性特発性多発性神経炎、急性炎症性脱髄性多発神経根神経障害、急性虚血、成人スチル病、アナフィラキシー、抗リン脂質抗体症候群、再生不良性貧血、アトピー性湿疹、アトピー性皮膚炎、自己免疫性皮膚炎、連鎖球菌感染に伴う自己免疫異常、自己免疫性腸症、自己免疫性難聴、自己免疫性リンパ増殖症候群 (ALPS)、自己免疫性心筋炎、自己免疫性早期卵巣不全、眼瞼炎、気管支拡張症、水疱性類天疱瘡、心血管疾患、劇症型抗リン脂質症候群、セリアック病、頸部脊椎症、慢性虚血、瘢痕性類天疱瘡、多発性硬化症のリスクを有する臨床的孤発症候群 (CIS)、小児発症精神障害、涙嚢

炎、皮膚筋炎、糖尿病性網膜症、椎間板ヘルニア、椎間板脱出、薬物誘発免疫性溶血性貧血、子宮内膜症、眼内炎、上強膜炎、多形性紅斑、重症型多形性紅斑、妊娠性類天疱瘡、ギラン・バレー症候群（GBS）、枯草熱、ヒューズ症候群、特発性パーキンソン病、特発性間質性肺炎、I g E 媒介性アレルギー、免疫性溶血性貧血、封入体筋炎、感染性眼炎症疾患、炎症性脱髄疾患、炎症性心疾患、炎症性腎疾患、I P F / U I P、虹彩炎、角膜炎、乾性角結膜炎、クスマウル病またはクスマウル・マイヤー病、ランドリー麻痺、ランゲルハンス細胞性組織球症、網状皮斑、黄斑変性、顕微鏡的多発性血管炎、モルブス・ベヒテレフ（*morbus bechterev*）、運動ニューロン疾患、粘膜性類天疱瘡、多臓器不全、骨髄異形成症候群、心筋炎、神経根障害、神経障害、非 A 非 B 型肝炎、視神経炎、骨溶解、卵巣癌、小関節性 J R A、末梢動脈閉塞疾患（P A O D）、末梢血管疾患（P V D）、末梢動脈疾患（P A D）、静脈炎、結節性多発性動脈炎（または結節性動脈周囲炎）、多発性軟骨炎、リウマチ性多発性筋痛、白毛症、多関節性 J R A、多内分泌

損症候群、多発性筋炎、ポンプ後症候群、原発性パーキンソニズム、前立腺癌および直腸癌および造血性悪性病変（白血病およびリンパ腫）、前立腺炎、赤芽球癆、原発性副腎不全、再発性視神経脊髄炎、再狭窄、リウマチ性心疾患、S A P H O（滑膜炎、アクネ、膿疱症、骨過形成および骨髄炎）、強皮症、続発性アミロイドーシス、ショック肺、強膜炎、坐骨神経痛、二次性副腎不全、シリコン関連結合組織病、スネドン・ウィルキンソン皮膚症、強直性脊椎炎、スティーブンス・ジョンソン症候群（S J S）、全身性炎症反応症候群、側頭動脈炎、トキソプラズマ性網膜炎、中毒性表皮剥離症、横断性脊髄炎、T R A P S（腫瘍壊死因子受容体）、I 型アレルギー反応、I I 型糖尿病、通常型間質性肺炎（U I P）、春季結膜炎、ウイルス性網膜炎、フォクト・小柳・原田症候群（V K H 症候群）、滲出型黄斑変性または創傷治癒である、使用。

【請求項 1 4】

薬剤が、非経口、皮下、筋肉内、静脈内、関節内、気管支内、腹腔内、嚢内、軟骨内、腔内（*intracavity*）、腔内（*intracellular*）、小脳内、脳室内、結腸内、頸管内、胃内、肝臓内、心筋内、骨内、骨盤内、心臓周囲内、腹腔内、胸膜内、前立腺内、肺内、結腸内、腎臓内、網膜内、脊髄内、滑膜内、胸腔内、子宮内、膀胱内、ポラス、腔、直腸、口内、舌下、鼻内または経皮投与用に製剤化される、請求項 1 3 に記載の使用。

【請求項 1 5】

イムノアッセイによって、試験試料中の少なくとも 1 つの標的またはその断片の存在、量または濃度を決定するインビトロ方法であって、

イムノアッセイは、試験試料を少なくとも 1 つの結合タンパク質および少なくとも 1 つの検出可能な標識と接触させることを含み、

少なくとも 1 つの結合タンパク質は、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の結合タンパク質を含む、方法。

【請求項 1 6】

さらに、

(i) 試験試料を、標的またはその断片上のエピトープに結合する少なくとも 1 つの結合タンパク質と接触させて、第一の複合体を形成すること、

(i i) 前記複合体を、結合タンパク質に結合するか或いは結合タンパク質によっては結合されない標的またはその断片上のエピトープに結合する少なくとも 1 つの検出可能な標識と接触させて、第二の複合体を形成すること、および

(i i i) 第二の複合体における検出可能な標識によって発生したシグナルに基づいて、試験試料中の標的またはその断片の存在、量または濃度を検出すること

を含み、

標的またはその断片の存在、量または濃度が、検出可能な標識によって発生したシグナルに直接的に相関する、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

さらに、

(i) 試験試料を、標的またはその断片上のエピトープに結合する少なくとも1つの結合タンパク質と接触させて、第一の複合体を形成すること、

(i i) 前記複合体を、前記結合タンパク質への結合について標的またはその断片と競合する少なくとも1つの検出可能な標識と接触させて、第二の複合体を形成すること、および

(i i i) 第二の複合体における検出可能な標識によって発生したシグナルに基づいて、試験試料中の標的またはその断片の存在、量または濃度を検出すること

を含み、

標的またはその断片の存在、量または濃度が、検出可能な標識によって発生したシグナルに間接的に相関する、請求項15に記載の方法。

【請求項18】

試験試料が患者由来であり、方法が、

さらに、

(a) 患者の治療的 / 予防的処置の効力を診断、予後診断、または評価すること、

ここで、患者の治療的 / 予防的処置の効力を評価することをさらに含む場合、該方法は、効力を改善するために必要な、患者の治療的 / 予防的処置を改変することを場合によってさらに含む、

(b) 前記方法が、自動化システムまたは半自動化システムにおける使用に適合されること、および / または

(c) 前記方法が、試料中の1を超える標的の存在、量または濃度を決定すること、を含む、請求項15から17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項19】

標的またはその断片の存在、量、または濃度についてインビトロで試験試料をアッセイするためのキットであって、

(a) 標的またはその断片について試験試料をアッセイするための説明書、および

(b) 請求項1から5のいずれか一項に記載の結合タンパク質を含む少なくとも1つの結合タンパク質を含む、キット。

【請求項20】

請求項1から5のいずれか一項に記載の結合タンパク質であって、

(a) 結合タンパク質は、NGFおよびIFG1、2に結合することが可能であり、ここで、

NGFの機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが

配列番号60および配列番号61、もしくは

配列番号86および配列番号87

を含み、および

IFG1、2の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが

配列番号46および配列番号47

を含む；

(b) 結合タンパク質は、NGFおよびRONに結合することが可能であり、ここで、

NGFの機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが

配列番号60および配列番号61、もしくは

配列番号86および配列番号87

を含み、および

RONの機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが

配列番号36および配列番号37、もしくは

配列番号64および配列番号65

を含む；

(c) 結合タンパク質は、NGFおよびErbb3に結合することが可能であり、ここで、

NGFの機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが
配列番号60および配列番号61、もしくは
配列番号86および配列番号87
を含み、および

ErB3の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが
配列番号72および配列番号73、
配列番号74および配列番号75、もしくは
配列番号82および配列番号83、
を含む；

(d) 結合タンパク質は、NGFおよびIGFRに結合することが可能であり、ここで、
NGFの機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが
配列番号60および配列番号61、もしくは
配列番号86および配列番号87
を含み、および

IGFRの機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが
配列番号48および配列番号49
を含む；

(e) 結合タンパク質は、NGFおよびHGFに結合することが可能であり、ここで、
NGFの機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが
配列番号60および配列番号61、もしくは
配列番号86および配列番号87
を含み、および

HGFの機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが
配列番号50および配列番号51
を含む；

(f) 結合タンパク質は、NGFおよびVEGFに結合することが可能であり、ここで、
NGFの機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが
配列番号60および配列番号61、もしくは
配列番号86および配列番号87
を含み、および

VEGFの機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが
配列番号54および配列番号55、
配列番号78および配列番号79、もしくは
配列番号80および配列番号81
を含む；

(g) 結合タンパク質は、NGFおよびDLL4に結合することが可能であり、ここで、
NGFの機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが
配列番号60および配列番号61、もしくは
配列番号86および配列番号87
を含み、および

DLL4の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが
配列番号56および配列番号57
を含む；

(h) 結合タンパク質は、NGFおよびP1GFに結合することが可能であり、ここで
NGFの機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが
配列番号60および配列番号61、もしくは
配列番号86および配列番号87
を含み、および

P1GFの機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが
配列番号70および配列番号71

を含む；

(i) 結合タンパク質は、NGFおよびCD - 20に結合することが可能であり、ここで

、
NGFの機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが
配列番号60および配列番号61、もしくは
配列番号86および配列番号87

を含み、および

CD - 20の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが
配列番号28および配列番号29

を含む；

(j) 結合タンパク質は、NGFおよびEGFRに結合することが可能であり、ここで、

NGFの機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが
配列番号60および配列番号61、もしくは
配列番号86および配列番号87

を含み、および

EGFRの機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが
配列番号32および配列番号33、
配列番号62および配列番号63、もしくは
配列番号76および配列番号77

を含む；

(k) 結合タンパク質は、NGFおよびHER - 2に結合することが可能であり、ここで

、
NGFの機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが
配列番号60および配列番号61、もしくは
配列番号86および配列番号87

を含み、および

HER - 2の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが
配列番号34および配列番号35

を含む；

(l) 結合タンパク質は、NGFおよびc - METに結合することが可能であり、ここで

、
NGFの機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが
配列番号60および配列番号61、もしくは
配列番号86および配列番号87

を含み、および

c - METの機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが
配列番号52および配列番号53

を含む；

或いは

(m) 結合タンパク質は、NGFおよびNRP 1に結合することが可能であり、ここで、

NGFの機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが
配列番号60および配列番号61、もしくは
配列番号86および配列番号87

を含み、および

NRP 1の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが
配列番号58および配列番号59、もしくは
配列番号66および配列番号67

を含む、

結合タンパク質。

【請求項21】

結合タンパク質が、DVD 1311 - 1320、1323、1324、1326 - 1328、1330 - 1340、1349、1351、1352、1362、1369、1370のいずれか1つを含む、
請求項1から5のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. *

PCT/US 11/43297

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 39/00; C12N 5/07, 5/16; C12P 21/08 (2012.01) USPC - 424/136.1; 435/328; 530/387.3 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) IPC(8) - A61K 39/00; C12N 5/07, 5/16; C12P 21/08 (2012.01) USPC - 424/136.1; 435/328; 530/387.3 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 424/130.1, 424/133.1, 424/138.1, 424/141.1, 424/145.1, 424/158.1, 530/387.7, 530/388.1, 530/388.23, 530/388.24, 530/389.2; 435/7.1, 326, 330, 335, 336 (Text Search) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) USPTO PubWest (databases: PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB), Google Scholar - Search Terms: bispecific, multivalent, multispecific, multivalent, NGF, methotrexate, mtx, immunoglobulin, binding protein, nerve growth factor, Ghayur		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y — A	US 2009/0304693 A1 (GHAYUR et al.) 10 December 2009 (10.12.2009) para [0012]; [0013]; [0019]; [0069]; [0328]; [0049]; [0058]; [0059]; [0060]; [0061]; [0062]; [0064]; [0065]; [0088]; claim 5	1, 5, 8, 10, 11, 26-50, 89, 90 ----- 2
Y — A	US 2007/0092507 A1 (BALTHASAR et al.) 26 April 2007 (26.04.2007) para [0049], [0073], [0075]	1, 5, 8, 10, 11, 26-50, 89, 90 ----- 2
Y — A	US 2009/0208490 A1 (PAVONE et al.) 20 August 2009 (20.08.2009) abstract; SEQ ID NO: 4; para [0011], [0029]	89, 90 ----- 2
A	US 2009/0028851 A1 (STUHMER et al.) 29 January 2009 (29.01.2009) abstract; SEQ ID NO: 16.	2
Y,P	US 2011/0091372 A1 (GHAYUR et al.) 21 April 2011 (21.04.2011) para [0012]; [0013]; [0019]; [0051]; [0052]; [0053]; [0054]; [0058]; [0059]; [0293]; SEQ ID NO: 104;	1, 2, 5, 8, 10, 11, 26-50, 89, 90
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "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) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "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 "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 "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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 February 2012 (20.02.2012)		Date of mailing of the international search report 28 FEB 2012
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/43297

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.: 51-61 and 76-88
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+: claims 1, 2, 5, 8, 10, 11, 26-50, 89 and 90, directed to a binding protein comprising a polypeptide chain, wherein the polypeptide chain comprises VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n, wherein VD1 is a first heavy chain variable domain, VD2 is a second heavy chain variable domain, C is a constant domain, X1 represents an amino acid or polypeptide, X2 represents an Fc region and n is 0 or 1; wherein the binding protein is capable of binding a pair of antigens, wherein the pair of antigens comprise NGF and any one of MTX, NKG2D, IGF1, IGF2, RON, ErbB3, CD-3, IGFR, HGF, VEGF, DLL4, P1GF, CD-20, EGFR, HER-2, CD-19, CD-80, CD-22, CD-40, c-MET OR NRP1; further wherein VD1 and VD2 independently comprise SEQ ID NOs: 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88 or 90; and still further wherein X1 is selected from SEQ ID NOs: 1-26; wherein the first invention is limited to the pair of antigens comprising NGF and MTX, and sequences SEQ ID NOs: 86, 88; and SEQ ID NO: 1 (Applicants may opt to have additional sequences searched by specifying the SEQ ID NO: and paying an additional invention search fee for each sequence). — Continued on Extra Sheet —

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1, 2, 5, 8, 10, 11, 26-50, 89 and 90, limited to SEQ ID NOs: 86, 88 and 1.

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 11/43297

Continuation of Box No. III, Observations where Unity of Invention is lacking:

Groups II+: claims 3-5, 8, 10, 11, 26-50, 69 and 90, directed to a binding protein comprising a polypeptide chain, wherein the polypeptide chain comprises $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$, wherein $VD1$ is a first light chain variable domain, $VD2$ is a second light chain variable domain, C is a constant domain, $X1$ represents an amino acid or polypeptide, $X2$ represents an Fc region and n is 0 or 1; wherein the binding protein is capable of binding a pair of antigens, wherein the pair of antigens comprise NGF and any one of MTX, NKG2D, IGF1, IGF2, RON, ErbB3, CD-3, IGFR, HGF, VEGF, DLL4, P1GF, CD-20, EGFR, HER-2, CD-19, CD-80, CD-22, CD-40, c-MET OR NRP1; further wherein $VD1$ and $VD2$ independently comprise SEQ ID NOs: 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89 or 91; and still further wherein $X1$ is selected from SEQ ID NOs: 1-26; wherein the first invention is limited to wherein the antigens comprise NGF and MTX, and the sequences comprise SEQ ID NOs: 29, 31 and SEQ ID NO: 1 (Applicants may opt to have additional sequences searched by specifying the SEQ ID NO: and paying an additional invention search fee for each sequence).

Groups III+: claims 6-50, directed to a binding protein comprising at least first and second polypeptide chains, wherein at least one said first polypeptide chain comprises a first $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$, wherein: $VD1$ is a first heavy chain variable domain; $VD2$ is a second heavy chain variable domain; C is a heavy chain constant domain; $X1$ is a linker with the proviso that it is not CH1; and $X2$ is an Fc region; and wherein said at least one second polypeptide chain comprises a second $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$, wherein: $VD1$ is a first light chain variable domain; $VD2$ is a second light chain variable domain; C is a light chain constant domain; $X1$ is a linker with the proviso that it is not CH1; $X2$ does not comprise an Fc region; wherein n is 0 or 1, wherein the binding protein is capable of binding a pair of antigens, wherein the pair of antigens comprise NGF and any one of MTX, NKG2D, IGF1, IGF2, RON, ErbB3, CD-3, IGFR, HGF, VEGF, DLL4, P1GF, CD-20, EGFR, HER-2, CD-19, CD-80, CD-22, CD-40, c-MET OR NRP1; further wherein the heavy and light chain $VD1$ and $VD2$ independently comprise the even numbered SEQ ID NOs: between 28 and 91 and the odd numbered SEQ ID NOs between 28 and 91, respectively; still further wherein $X1$ is selected from SEQ ID NOs: 1-26; wherein the first invention is limited to binding NGF and MTX, and SEQ ID NOs: 28 and 29, and SEQ ID NO: 1 (Applicants may opt to have additional sequences searched by specifying the SEQ ID NO: and paying an additional invention search fee for each sequence).

Groups IV+ claims 62-75, directed to a method for generating a binding protein capable of binding two antigens comprising the steps of: a) obtaining a first parent antibody or antigen binding portion thereof, capable of binding a first antigen; b) obtaining a second parent antibody or antigen binding portion thereof, capable of binding a second antigen; c) constructing: (i) a polypeptide chain, wherein said polypeptide chain comprises $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$, wherein: $VD1$ is a first heavy chain variable domain obtained from said first parent antibody or antigen binding fragment thereof; $VD2$ is a second heavy chain variable domain obtained from said second parent antibody or antigen binding fragment thereof; C is a heavy chain constant domain; $X1$ is a linker with the proviso that it is not CH1; $X2$ is an Fc region; and n is 0 or 1; (ii) a polypeptide chain, wherein said polypeptide chain comprises $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$, wherein: $VD1$ is a first light chain variable domain obtained from said first parent antibody or antigen binding fragment thereof; $VD2$ is a second light chain variable domain obtained from said second parent antibody or antigen binding fragment thereof; C is a light chain constant domain; $X1$ is a linker with the proviso that it is not CH1; $X2$ does not comprise an Fc region; and n is 0 or 1; (iii) first and second polypeptide chains, wherein said first polypeptide chain comprises a first $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$, wherein $VD1$ is a first heavy chain variable domain obtained from said first parent antibody or antigen binding fragment thereof; $VD2$ is a second heavy chain variable domain obtained from said second parent antibody or antigen binding fragment thereof; C is a heavy chain constant domain; $X1$ is a linker with the proviso that it is not CH1; and $X2$ is an Fc region; and wherein said second polypeptide chain comprises a second $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$, wherein $VD1$ is a first light chain variable domain obtained from said first parent antibody or antigen binding fragment thereof; $VD2$ is a second light chain variable domain obtained from said second parent antibody or antigen binding fragment thereof; C is a light chain constant domain; $X1$ is a linker with the proviso that it is not CH1; $X2$ does not comprise an Fc region; and wherein n is 0 or 1; or (iv) four polypeptide chains, wherein two polypeptide chains comprise $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$, wherein $VD1$ is a first heavy chain variable domain obtained from said first parent antibody or antigen binding fragment thereof; $VD2$ is a second heavy chain variable domain obtained from said second parent antibody or antigen binding fragment thereof; C is a heavy chain constant domain; $X1$ is a linker with the proviso that it is not CH1; and $X2$ is an Fc region; and wherein two polypeptide chains comprise $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$, wherein $VD1$ is a first light chain variable domain obtained from said first parent antibody or antigen binding fragment thereof; $VD2$ is a second light chain variable domain obtained from said second parent antibody or antigen binding fragment thereof; C is a light chain constant domain; $X1$ is a linker with the proviso that it is not CH1; $X2$ does not comprise an Fc region; wherein n is 0 or 1; and d) expressing said polypeptide chains; such that a binding protein capable of binding a pair of antigens, wherein the pair of antigens comprise NGF and any one of MTX, NKG2D, IGF1, IGF2, RON, ErbB3, CD-3, IGFR, HGF, VEGF, DLL4, P1GF, CD-20, EGFR, HER-2, CD-19, CD-80, CD-22, CD-40, c-MET OR NRP1 further wherein the heavy and light chain $VD1$ and $VD2$ sequences independently comprise the even numbered SEQ ID NOs: between 28 and 91, and the odd numbered SEQ ID NOs: between 28 and 91, respectively; wherein the first invention is limited to wherein the target antigens comprise NGF and MTX and the sequences comprise SEQ ID NOs: 28 and 29; and SEQ ID NO: 1 (Applicants may opt to have additional sequences searched by specifying the SEQ ID NO: and paying an additional invention search fee for each sequence).

The inventions listed as Groups I+ - IV+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical features of the claims of Groups I+ through IV+ are listed above. The common technical elements of the Groups is that they are related to binding proteins comprising a polypeptide chain, wherein the polypeptide chain comprises $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$, wherein $VD1$ is a first variable domain, $VD2$ is a second variable domain, C is a constant domain, $X1$ represents an amino acid or polypeptide, $X2$ represents an Fc region and n is 0 or 1; wherein $VD1$ and $VD2$ may comprise light or heavy chain variable domains.

— Continued on next extra sheet —

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/43297

Continuation of Box No. III, Observations where Unity of Invention is lacking:

The common technical elements of the above Groups do not represent an improvement over the prior art of US 2009/0304693 A1 to Ghayur et al., which discloses "a binding protein comprising a polypeptide chain, wherein the polypeptide chain comprises VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, wherein VD1 is a first variable domain, VD2 is a second variable domain, C is a constant domain, X1 represents an amino acid or polypeptide, X2 represents an Fc region and n is 0 or 1. In an embodiment the VD1 and VD2 in the binding protein are heavy chain variable domains...C is a heavy chain constant domain" (para [0013]), wherein the polypeptide is capable of binding NGF (para [0019]), and any one of a number of alternative targets (claim 1); further wherein at least one of VD1 or VD2 comprises SEQ ID NO: 28 (claim 2)(SEQ ID NO: 28; Table 2), and wherein X1 may comprise SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 1; para [0013]). Further, Ghayur teaches wherein "In an embodiment, VD1 and VD2 in the binding protein are light chain variable domains...C is a light chain constant domain...X1 is a linker with the proviso that X1 is not CH1; (para [0020]) further wherein at least one of VD1 and VD2 comprises SEQ ID NO: 29 (claim 4)(SEQ ID NO: 29; Table 2). Additionally, Ghayur teaches wherein "In another embodiment the binding protein of the invention is a DVD-Ig capable of binding two antigens comprising four polypeptide chains, wherein, first and third polypeptide chains comprise VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, wherein, VD1 is a first heavy chain variable domain obtained from a first parent antibody or antigen binding portion thereof; VD2 is a second heavy chain variable domain obtained from a second parent antibody or antigen binding portion thereof; C is a heavy chain constant domain; (X1)n is a linker with the proviso that it is not CH1, wherein the (X1)n is either present or absent; and (X2)n is an Fc region, wherein the (X2)n is either present or absent; and wherein second and fourth polypeptide chains comprise VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, wherein VD1 is a first light chain variable domain obtained from a first parent antibody or antigen binding portion thereof; VD2 is a second light chain variable domain obtained from a second parent antibody or antigen binding portion thereof; C is a light chain constant domain; (X1)n is a linker with the proviso that it is not CH1, wherein the (X1)n is either present or absent; and (X2)n does not comprise an Fc region, wherein the (X2)n is either present or absent" (para [0050]), further wherein, as above, the VD1 and VD2 heavy chain variable domains may independently comprise SEQ ID NO: 28, and the VD1 and VD2 light chain variable domains may comprise SEQ ID NO: 29 (claim 24), and wherein the binding protein may bind NGF in combination with at least one other target molecule (para [0019]).

Finally, Ghayur teaches a method for generating a binding protein capable of binding two antigens comprising the steps of: a) obtaining a first parent antibody or antigen binding portion thereof, capable of binding a first antigen; b) obtaining a second parent antibody or antigen binding portion thereof, capable of binding a second antigen; c) constructing: (i) a polypeptide chain, wherein said polypeptide chain comprises VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, wherein; VD1 is a first heavy chain variable domain obtained from said first parent antibody or antigen binding fragment thereof; VD2 is a second heavy chain variable domain obtained from said second parent antibody or antigen binding fragment thereof; C is a heavy chain constant domain; X1 is a linker with the proviso that it is not CH1; X2 is an Fc region; and n is 0 or 1; (ii) a polypeptide chain, wherein said polypeptide chain comprises VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, wherein; VD1 is a first light chain variable domain obtained from said first parent antibody or antigen binding fragment thereof; VD2 is a second light chain variable domain obtained from said second parent antibody or antigen binding fragment thereof; C is a light chain constant domain; X1 is a linker with the proviso that it is not CH1; X2 does not comprise an Fc region; and n is 0 or 1; (iii) first and second polypeptide chains, wherein said first polypeptide chain comprises a first VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, wherein VD1 is a first heavy chain variable domain obtained from said first parent antibody or antigen binding fragment thereof; C is a heavy chain constant domain; X1 is a linker with the proviso that it is not CH1; and X2 is an Fc region; and wherein said second polypeptide chain comprises a second VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, wherein VD1 is a first light chain variable domain obtained from said first parent antibody or antigen binding fragment thereof; VD2 is a second light chain variable domain obtained from said second parent antibody or antigen binding fragment thereof; C is a light chain constant domain; X1 is a linker with the proviso that it is not CH1; X2 does not comprise an Fc region; and wherein n is 0 or 1; or (iv) four polypeptide chains, wherein two polypeptide chains comprise VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, wherein VD1 is a first heavy chain variable domain obtained from said first parent antibody or antigen binding fragment thereof; VD2 is a second heavy chain variable domain obtained from said second parent antibody or antigen binding fragment thereof; C is a heavy chain constant domain; X1 is a linker with the proviso that it is not CH1; and X2 is an Fc region; and wherein two polypeptide chains comprise VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n, wherein VD1 is a first light chain variable domain obtained from said first parent antibody or antigen binding fragment thereof; VD2 is a second light chain variable domain obtained from said second parent antibody or antigen binding fragment thereof; C is a light chain constant domain; X1 is a linker with the proviso that it is not CH1; X2 does not comprise an Fc region; wherein n is 0 or 1; and d) expressing said polypeptide chains; such that a binding protein capable of binding a pair of antigens is generated wherein said first and second antigens comprise NGF and another target molecule (claim 76).

Therefore, the inventions of Groups I+ - IV+ lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15		4 H 0 4 5
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19		
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21		
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 1	
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02		C
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395		V
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02		
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00		
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1	
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	1/04		
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10		
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06		
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	11/06		
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P	37/08		
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	17/06		
A 6 1 P	17/02	(2006.01)	A 6 1 P	17/02		
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10		
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00		
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	13/12		
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/04		
A 6 1 P	33/00	(2006.01)	A 6 1 P	33/00		
A 6 1 P	25/14	(2006.01)	A 6 1 P	25/14		
A 6 1 P	25/16	(2006.01)	A 6 1 P	25/16		
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28		
A 6 1 P	25/08	(2006.01)	A 6 1 P	25/08		
A 6 1 P	7/06	(2006.01)	A 6 1 P	7/06		
A 6 1 P	9/04	(2006.01)	A 6 1 P	9/04		
A 6 1 P	5/14	(2006.01)	A 6 1 P	5/14		
A 6 1 P	17/14	(2006.01)	A 6 1 P	17/14		
A 6 1 P	17/04	(2006.01)	A 6 1 P	17/04		
A 6 1 P	17/10	(2006.01)	A 6 1 P	17/10		
A 6 1 P	31/10	(2006.01)	A 6 1 P	31/10		
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	1/16		
A 6 1 P	31/14	(2006.01)	A 6 1 P	31/14		
A 6 1 P	31/18	(2006.01)	A 6 1 P	31/18		
A 6 1 P	15/04	(2006.01)	A 6 1 P	15/04		
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00		
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	27/02		
A 6 1 P	19/06	(2006.01)	A 6 1 P	19/06		
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/02		
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00		
A 6 1 P	25/18	(2006.01)	A 6 1 P	25/18		
A 6 1 P	25/24	(2006.01)	A 6 1 P	25/24		
A 6 1 P	25/04	(2006.01)	A 6 1 P	25/04		
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/02		
A 6 1 P	27/14	(2006.01)	A 6 1 P	27/14		
A 6 1 P	21/02	(2006.01)	A 6 1 P	21/02		

A 6 1 P	9/14	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	1 0 1
A 6 1 P	25/32	(2006.01)	A 6 1 P	9/14	
A 6 1 P	11/02	(2006.01)	A 6 1 P	25/32	
A 6 1 P	9/12	(2006.01)	A 6 1 P	11/02	
A 6 1 P	31/16	(2006.01)	A 6 1 P	9/12	
A 6 1 P	3/06	(2006.01)	A 6 1 P	31/16	
A 6 1 P	25/06	(2006.01)	A 6 1 P	3/06	
A 6 1 P	21/04	(2006.01)	A 6 1 P	25/06	
A 6 1 P	33/06	(2006.01)	A 6 1 P	21/04	
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	A 6 1 P	33/06	
G 0 1 N	33/543	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
			G 0 1 N	33/543	5 9 5

(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

(72)発明者 リウ, ジュインジエン

アメリカ合衆国、マサチューセッツ・0 1 5 4 5、シユルーズベリー、クリムゾン・ドライブ・1
4

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA01 BA21 BA63 CA04 CA07 DA01 DA02 DA05
DA11 EA02 EA04 FA02 GA11 HA03
4B064 AG02 AG20 AG27 CA02 CA05 CA06 CA10 CA11 CA19 CC24
DA01 DA13
4B065 AA01X AA57X AA87X AB01 BA02 CA24 CA44 CA46
4C084 AA19 NA05 ZA021 ZA061 ZA081 ZA121 ZA151 ZA161 ZA181 ZA331
ZA341 ZA361 ZA421 ZA441 ZA451 ZA551 ZA591 ZA611 ZA661 ZA681
ZA701 ZA751 ZA811 ZA891 ZA941 ZA961 ZB071 ZB081 ZB111 ZB131
ZB151 ZB261 ZB331 ZB351 ZB371 ZC061 ZC211 ZC311 ZC331 ZC351
ZC391 ZC551 ZC751
4C085 AA34 BB31 CC02 CC22 CC23 DD62 DD63 DD88 EE01 GG01
4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA01 DA30 DA50 DA76 EA20
EA50 FA74