

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5364870号  
(P5364870)

(45) 発行日 平成25年12月11日(2013.12.11)

(24) 登録日 平成25年9月20日(2013.9.20)

(51) Int.Cl.	F 1	
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00	Z N A A
<b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395	Y
<b>A 6 1 K 51/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 49/02	A
<b>A 6 1 K 49/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 49/00	A
<b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 45/00	

請求項の数 48 (全 148 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2008-527180 (P2008-527180)	(73) 特許権者	512212195 アッヴィ・インコーポレイテッド アメリカ合衆国、イリノイ・60064、 ノース・シカゴ、ノース・ワウキガン・ロ ード・1
(86) (22) 出願日	平成18年8月18日(2006.8.18)	(74) 代理人	110001173 特許業務法人川口国際特許事務所
(65) 公表番号	特表2009-504191 (P2009-504191A)	(72) 発明者	ウー, チヨンビン アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01 546、シユールズベリー、プロスペクト ・ストリート・386
(43) 公表日	平成21年2月5日(2009.2.5)	(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・ストリ ート・1014
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/032398		
(87) 国際公開番号	W02007/024715		
(87) 国際公開日	平成19年3月1日(2007.3.1)		
審査請求日	平成21年4月14日(2009.4.14)		
(31) 優先権主張番号	60/709,911		
(32) 優先日	平成17年8月19日(2005.8.19)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

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及びその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

第一及び第二のポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であり、前記第一のポリペプチド鎖はVD1 - (X1)<sub>n</sub> - VD2 - C - (X2)<sub>n</sub> (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は定常ドメインであり、X1はリンカーであり(但し、X1は、定常ドメインではない。)、及びX2はFc領域またはバリエーションFc領域である。)を含み;並びに前記第二のポリペプチド鎖はVD1 - (X1)<sub>n</sub> - VD2 - C - (X2)<sub>n</sub> (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は定常ドメインであり、X1はリンカーであり(但し、X1は、定常ドメインではない。)、及びX2はFc領域を含まない。nは0又は1であり、前記結合タンパク質の前記第一及び第二のポリペプチド鎖は、2つの機能的な抗原結合部位を形成する。)を含む、前記結合タンパク質。

【請求項2】

4つのポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であり、2つのポリペプチド鎖はVD1 - (X1)<sub>n</sub> - VD2 - C - (X2)<sub>n</sub> (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は定常ドメインであり、X1はリンカーであり(但し、X1は、定常ドメインではない。)、及びX2はFc領域又はバリエーションFc領域である。)を含み;並びに2つのポリペプチド鎖はVD1 - (X1)<sub>n</sub> - VD2 - C - (X2)<sub>n</sub> (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は定常ドメインであり、X1はリンカーであり(但し、X1は、定常ドメインでは

ない。)及びX2はFc領域を含まない。nは0又は1であり、前記結合タンパク質の前記4つのポリペプチド鎖は、4つの機能的な抗原結合部位を形成する。)を含む、前記結合タンパク質。

【請求項3】

前記可変ドメインは、ネズミ可変ドメイン、ヒト可変ドメイン、CDR移植された可変ドメイン及びヒト化可変ドメインからなる群から選択される請求項1又は2に記載の結合タンパク質。

【請求項4】

前記ポリペプチドの前記VD1及びVD2は、同じ又は異なる標的抗原に結合することができる請求項1又は2に記載の結合タンパク質。

10

【請求項5】

前記VD1及びVD2は、同じ標的抗原の異なるエピトープに結合することができる請求項4に記載の結合タンパク質。

【請求項6】

X1は、AKTTPKLEEGEFSEAR; AKTTPKLEEGEFSEARV; AKTTPKLG G; RADAAP; RADAAPT V S; RADA A A A G G P G S; RADA A A A ( G 4 S ) 4; SAKTTP; SAKTTPKLG G; SAKTTPKLEEGEFSEARV; ADAAP; ADAAPT V S I F P P; TVAAP; TVAAPSVFI F P P; QPKAAP; QPKAAPSV T L F P P; AKTTPP; AKTTPPSV T P L A P; AKTTAP; AKTTAPSV Y P L A P; A S T K G P; A S T K G P S V F P L A P; G G G G S G G G G S G G G G S; GENKVEYAPALMALS; GPAKEL T P L K E A K V S; 及びGHEAAAVMQVQYPASからなる群から選択されるリンカーである請求項1又は2に記載の結合タンパク質。

20

【請求項7】

結合タンパク質が、X2を含まない請求項1又は2に記載の結合タンパク質。

【請求項8】

前記結合タンパク質が、1つ又はそれ以上の標的抗原に結合し、又は1つ又はそれ以上の標的抗原を中和することができる、請求項1又は2に記載の結合タンパク質。

【請求項9】

該1つ又はそれ以上の標的抗原が、ABC F 1; A C V R 1; A C V R 1 B; A C V R 2; A C V R 2 B; A C V R L 1; A D O R A 2 A; アグレカン; A G R 2; A I C D A; A I F 1; A I G 1; A K A P 1; A K A P 2; A M H; A M H R 2; A N G P T 1; A N G P T 2; A N G P T L 3; A N G P T L 4; A N P E P; A P C; A P O C 1; A R; A Z G P 1 ( 亜鉛 - a - 糖タンパク質 ); B 7 . 1; B 7 . 2; B A D; B A F F; B A G 1; B A I 1; B C L 2; B C L 6; B D N F; B L N K; B L R 1 ( M D R 1 5 ); B l y S; B M P 1; B M P 2; B M P 3 B ( G D F 1 0 ); B M P 4; B M P 6; B M P 8; B M P R 1 A; B M P R 1 B; B M P R 2; B P A G 1 ( プレクチン ); B R C A 1; C 1 9 o r f 1 0 ( I L 2 7 w ); C 3; C 4 A; C 5; C 5 R 1; C A N T 1; C A S P 1; C A S P 4; C A V 1; C C B P 2 ( D 6 / J A B 6 1 ); C C L 1 ( I - 3 0 9 ); C C L 1 1 ( エオタキシン ); C C L 1 3 ( M C P - 4 ); C C L 1 5 ( M I P - 1 d ); C C L 1 6 ( H C C - 4 ); C C L 1 7 ( T A R C ); C C L 1 8 ( P A R C ); C C L 1 9 ( M I P - 3 b ); C C L 2 ( M C P - 1 ); M C A F; C C L 2 0 ( M I P - 3 a ); C C L 2 1 ( M I P - 2 ); S L C; エクソダス - 2; C C L 2 2 ( M D C / S T C - 1 ); C C L 2 3 ( M P I F - 1 ); C C L 2 4 ( M P I F - 2 / エオタキシン - 2 ); C C L 2 5 ( T E C K ); C C L 2 6 ( エオタキシン - 3 ); C C L 2 7 ( C T A C K / I L C ); C C L 2 8; C C L 3 ( M I P - 1 a ); C C L 4 ( M I P - 1 b ); C C L 5 ( R A N T E S ); C C L 7 ( M C P - 3 ); C C L 8 ( m c p - 2 ); C C N A 1; C C N A 2; C C N D 1; C C N E 1; C C N E 2; C C R 1 ( C K R 1 / H M 1 4 5 ); C C R 2 ( m c p - 1 R B / R A ); C C R 3 ( C K R 3 / C M K B R 3 ); C C R 4; C C R 5 ( C M K B R 5 / C h e m R 1 3 ); C C R 6 ( C M K B R

30

40

50

6 / CKR - L3 / STRL22 / DRY6 ) ; CCR7 ( CKR7 / EBI1 ) ; CCR8 ( CMKBR8 / TER1 / CKR - L1 ) ; CCR9 ( GPR - 9 - 6 ) ; CCR11 ( VSHK1 ) ; CCRL2 ( L - CCR ) ; CD164 ; CD19 ; CD1C ; CD20 ; CD200 ; CD - 22 ; CD24 ; CD28 ; CD3 ; CD37 ; CD38 ; CD3E ; CD3G ; CD3Z ; CD4 ; CD40 ; CD40L ; CD44 ; CD45RB ; CD52 ; CD69 ; CD72 ; CD74 ; CD79A ; CD79B ; CD8 ; CD80 ; CD81 ; CD83 ; CD86 ; CDH1 ( E - カドヘリン ) ; CDH10 ; CDH12 ; CDH13 ; CDH18 ; CDH19 ; CDH20 ; CDH5 ; CDH7 ; CDH8 ; CDH9 ; CDK2 ; CDK3 ; CDK4 ; CDK5 ; CDK6 ; CDK7 ; CDK9 ; CDKN1A ( p21Wap1 / Cip1 ) ; CDKN1B ( p27Kip1 ) ; CDKN1C ; CDKN2A ( p16INK4a ) ; CDKN2B ; CDKN2C ; CDKN3 ; CEBPB ; CER1 ; CHGA ; CHGB ; キチナーゼ ; CHST10 ; CKLFSF2 ; CKLFSF3 ; CKLFSF4 ; CKLFSF5 ; CKLFSF6 ; CKLFSF7 ; CKLFSF8 ; CLDN3 ; CLDN7 ( クラウジン - 7 ) ; CLN3 ; CLU ( クラスチリン ) ; CMKLR1 ; CMKOR1 ( RDC1 ) ; CNR1 ; COL18A1 ; COL1A1 ; COL4A3 ; COL6A1 ; CR2 ; CRP ; CSF1 ( M - CSF ) ; CSF2 ( GM - CSF ) ; CSF3 ( GCSF ) ; CTLA4 ; CTNNB1 ( b - カドヘリン ) ; CTSB ( カテプシンB ) ; CX3CL1 ( SCYD1 ) ; CX3CR1 ( V28 ) ; CXCL1 ( GRO1 ) ; CXCL10 ( IP - 10 ) ; CXCL11 ( I - TAC / IP - 9 ) ; CXCL12 ( SDF1 ) ; CXCL13 ; CXCL14 ; CXCL16 ; CXCL2 ( GRO2 ) ; CXCL3 ( GRO3 ) ; CXCL5 ( ENA - 78 / LIX ) ; CXCL6 ( GCP - 2 ) ; CXCL9 ( MIG ) ; CXCR3 ( GPR9 / CKR - L2 ) ; CXCR4 ; CXCR6 ( TYMSTR / STRL33 / Bonzo ) ; CYB5 ; CYC1 ; CYSLTR1 ; DAB2IP ; DES ; DKFZp451J0118 ; DNCL1 ; DPP4 ; E2F1 ; ECGF1 ; EDG1 ; EFNA1 ; EFNA3 ; EFNB2 ; EGF ; EGFR ; ELAC2 ; ENG ; ENO1 ; ENO2 ; ENO3 ; EPHB4 ; EPO ; ERBB2 ( Her - 2 ) ; EREG ; ERK8 ; ESR1 ; ESR2 ; F3 ( TF ) ; FADD ; FasL ; FASN ; FCER1A ; FCER2 ; FCGR3A ; FGF ; FGF1 ( aFGF ) ; FGF10 ; FGF11 ; FGF12 ; FGF12B ; FGF13 ; FGF14 ; FGF16 ; FGF17 ; FGF18 ; FGF19 ; FGF2 ( bFGF ) ; FGF20 ; FGF21 ; FGF22 ; FGF23 ; FGF3 ( int - 2 ) ; FGF4 ( HST ) ; FGF5 ; FGF6 ( HST - 2 ) ; FGF7 ( KGF ) ; FGF8 ; FGF9 ; FGF9R3 ; FIGF ( VEGFD ) ; FDL1 ( EPSILON ) ; FIL1 ( ZETA ) ; FLJ12584 ; FLJ25530 ; FLRT1 ( フィブロネクチン ) ; FLT1 ; FOS ; FOSL1 ( FRA - 1 ) ; FY ( DARIC ) ; GABRP ( GABAa ) ; GAGEB1 ; GAGEC1 ; GALNAC4S - 6ST ; GATA3 ; GDF5 ; GFI1 ; GGT1 ; GM - CSF ; GNAS1 ; GNRH1 ; GPR2 ( CCR10 ) ; GPR31 ; GPR44 ; GPR81 ( FKS80 ) ; GRCC10 ( C10 ) ; GRP ; GSN ( ゲルソリン ) ; GSTP1 ; HAVCR2 ; HDAC4 ; HDAC5 ; HDAC7A ; HDAC9 ; HGF ; HIF1A ; HEP1 ; ヒスタミン及びヒスタミン受容体 ; HLA - A ; HLA - DRA ; HM74 ; HMOX1 ; HUMCYT2A ; ICEBERG ; ICOSL ; ID2 ; IFN - a ; IFNA1 ; IFNA2 ; IFNA4 ; IFNA5 ; IFNA6 ; IFNA7 ; IFNB1 ; IFN ; IFNW1 ; IGBP1 ; IGF1 ; IGF1R ; IGF2 ; IGFBP2 ; IGFBP3 ; IGFBP6 ; IL - 1 ; IL10 ; IL10RA ; IL10RB ; IL11 ; IL11RA ; IL - 12 ; IL12A ; IL12B ; IL12RB1 ; IL12RB2 ; IL13 ; IL13RA1 ; IL13RA2 ; IL14 ; IL15 ; IL15RA ; IL16 ; IL17 ; IL17B ; IL17C ; IL17R ; IL18 ; IL18BP ; IL18R1 ; IL18RAP ; IL19 ; IL1A ; IL1B ; IL1F10 ; IL1F5 ; IL1F6 ; IL1F7 ; IL1F8 ; IL1F9 ; IL1H

10

20

30

40

50

Y1; IL1R1; IL1R2; IL1RAP; IL1RAPL1; IL1RAPL2;  
 IL1RL1; IL1RL2; IL1RN; IL2; IL20; IL20RA; IL21R  
 ; IL22; IL22R; IL22RA2; IL23; IL24; IL25; IL26;  
 IL27; IL28A; IL28B; IL29; IL2RA; IL2RB; IL2RG;  
 IL3; IL30; IL3RA; IL4; IL4R; IL5; IL5RA; IL6; IL  
 6R; IL6ST(糖タンパク質130); IL7; IL7R; IL8; IL8RA; I  
 L8RB; IL8RB; IL9; IL9R; ILK; INHA; INHBA; INSL3  
 ; INSL4; IRAK1; IRAK2; ITGA1; ITGA2; ITGA3; ITG  
 A6(a6インテグリン); ITGAV; HGB3; ITGB4(b4インテグリン);  
 JAG1; JAK1; JAK3; JUN; K6HF; KAI1; KDR; KITLG; K  
 L F5(GCBoxBP); KLF6; KLK10; KLK12; KLK13; KLK1  
 4; KLK15; KLK3; KLK4; KLK5; KLK6; KLK9; KRT1; KR  
 T19(ケラチン19); KRT2A; KRTHB6(毛髪特異的II型ケラチン); L  
 AMA5; LEP(レプチン); Lingo-p75; Lingo-Troy; LPS;  
 LTA(TNF-b); LTB; LTB4R(GPR16); LTB4R2; LTBR;  
 MACMARCHS; MAG又はOmgp; MAP2K7(c-Jun); MDK; MI  
 B1; ミドカイン; MIF; MIP-2; MKI67(Ki-67); MMP2; MMP  
 9; MS4A1; MSMB; MT3(メタロチオネクチン-III); MTSS1; MU  
 C1(ムチン); MYC; MYD88; NCK2; ニューロカン; NFKB1; NFKB  
 2; NGFB(NGF); NGFR; NgR-Lingo; NgR-Nogo66(No  
 go); NgR-p75; NgR-Troy; NME1(NM23A); NOX5; NP  
 PB; NROB1; NROB2; NR1D1; NR1D2; NR1H2; NR1H3; N  
 R1H4; NR1I2; NR1I3; NR2C1; NR2C2; NR2E1; NR2E3  
 ; NR2F1; NR2F2; NR2F6; NR3C1; NR3C2; NR4A1; NR4  
 A2; NR4A3; NR5A1; NR5A2; NR6A1; NRP1; NRP2; NT5  
 E; NTN4; ODZ1; OPRD1; P2RX7; PAP; PART1; PATE; P  
 AWR; PCA3; PCNA; PDGFA; PDGFB; PECAM1; PF4(CXC  
 L4); PGF; PGR; フォスファカン; PIAS2; PIK3CG; PLAU(uP  
 A); PLG; PLXDC1; PPBP(CXCL7); PPID; PR1; PRKCQ  
 ; PRKD1; PRL; PROC; PROK2; PSAP; PSCA; PTAFR; PT  
 EN; PTGS2(COX-2); PTN; RAC2(p21Rac2); RARB; R  
 GS1; RGS13; RGS3; RNF110(ZNF144); ROBO2; S100  
 A2; SCGB1D2(リポフィリンB); SCGB2A1(マンマグロピン2); SC  
 GB2A2(マンマグロピン1); SCYE1(内皮単球活性化サイトカイン); SDF  
 2; SERPINA1; SERPINA3; SERPINB5(マスピン); SERPI  
 NE1(PAI-1); SERPINF1; SHBG; SLA2; SLC2A2; SLC  
 33A1; SLC43A1; SLIT2; SPP1; SPRR1B(Spr1); ST6  
 GAL1; STAB1; STAT6; STEAP; STEAP2; TB4R2; TBX2  
 1; TCP10; TDGF1; TEK; TGFA; TGFB1; TGFB1I1; TGF  
 B2; TGFB3; TGFB1; TGFB1I1; TGFB1I2; TGFB1I3; TH1L  
 ; THBS1(トロンボスポンディン-1); THBS2; THBS4; THPO; TI  
 E(Tie-1); TIMP3; 組織因子; TLR10; TLR2; TLR3; TLR4  
 ; TLR5; TLR6; TLR7; TLR8; TLR9; TNF; TNF-a; TNFA  
 IP2(B94); TNFAIP3; TNFRSF11A; TNFRSF1A; TNFR  
 SF1B; TNFRSF21; TNFRSF5; TNFRSF6(Fas); TNFRS  
 F7; TNFRSF8; TNFRSF9; TNFSF10(TRAIL); TNFSF1  
 1(TRANCE); TNFSF12(APO3L); TNFSF13(April);  
 TNFSF13B; TNFSF14(HVEM-L); TNFSF15(VEGI); T  
 NFSF18; TNFSF4(OX40リガンド); TNFSF5(CD40リガンド)  
 ; TNFSF6(FasL); TNFSF7(CD27リガンド); TNFSF8(CD

10

20

30

40

50

30リガンド) ; TNFSF9 (4-1BBリガンド) ; TOLLIP ; トール様受容体 ; TOP2A (トポイソメラーゼIIa) ; TP53 ; TPM1 ; TPM2 ; TRADD ; TRAF1 ; TRAF2 ; TRAF3 ; TRAF4 ; TRAF5 ; TRAF6 ; TREM1 ; TREM2 ; TRPC6 ; TSLP ; TWEAK ; VEGF ; VEGFB ; VEGFC ; ベルシカン ; VHLC5 ; VLA-4 ; XCL1 (リンホタクチン) ; XCL2 (SCM-1b) ; XCR1 (GPR5/CCXCR1) ; YY1及びZFPM2からなる群から選択される、請求項8に記載の結合タンパク質。

【請求項10】

前記結合タンパク質が2つの異なる標的抗原に結合することができ、前記2つの標的抗原がCD138及びCD20 ; CD138及びCD40 ; CD20及びCD3 ; CD38及びCD138 ; CD38及びCD20 ; CD38及びCD40 ; CD40及びCD20 ; CD19及びCD20 ; CD-8及びIL-6 ; PDL-1及びCTLA-4 ; CTLA-4及びBTN2 ; CSPGs及びRGMA ; IGF1及びIGF2 ; IGF1/2及びErb2B ; IL-12及びIL-18 ; IL-12及びTWEAK ; IL-13及びADAM8 ; IL-13及びCL25 ; IL-13及びIL-1 ; IL-13及びIL-25 ; IL-13及びIL-4 ; IL-13及びIL-5 ; IL-13及びIL-9 ; IL-13及びLHRアゴニスト ; IL-13及びMDC ; IL-13及びMIF ; IL-13及びPED2 ; IL-13及びSPRR2a ; IL-13及びSPRR2b ; IL-13及びTARC ; IL-13及びTGF- ; IL-1及びIL-1 ; MAG及びRGMA ; NgR及びRGMA ; NogOA及びRGMA ; OMgp及びRGMA ; RGMA及びRGMb ; Te38及びTNF ; TNF及びIL-12 ; TNF及びIL-12p40 ; TNF及びIL-13 ; TNF及びIL-15 ; TNF及びIL-17 ; TNF及びIL-18 ; TNF及びIL-1 ; TNF及びIL-23 ; TNF及びMIF ; TNF及びPEG2 ; TNF及びPGE4 ; TNF及びVEGF ; 並びにVEGFR及びEGFR ; TNF及びRANKリガンド ; TNF及びBlyS ; TNF及びGP130 ; TNF及びCD-22 ; 並びにTNF及びCTLA-4からなる群から選択される、請求項8に記載の結合タンパク質。

【請求項11】

前記1つ又はそれ以上の標的抗原が、サイトカイン、ケモカイン、細胞表面タンパク質、酵素及び受容体からなる群から選択される、請求項8に記載の結合タンパク質。

【請求項12】

前記1つ又はそれ以上の標的抗原が、リンホカイン、モノカイン、ポリペプチドホルモン、CCR2、CCR5、CXCL-13、インテグリン、CD-20、CD3、キナーゼ、プロテアーゼ、リンホカイン受容体、モノカイン受容体及びポリペプチドホルモン受容体からなる群から選択される、請求項11に記載の結合タンパク質。

【請求項13】

前記標的サイトカイン抗原が、IL-1及びIL-1、TNF及びIL-13、並びにIL-12及びIL-18からなる群から選択される1組のサイトカインである、請求項12に記載の結合タンパク質。

【請求項14】

結合タンパク質が、IL-1及びIL-1に結合し、又はIL-1及びIL-1を中和し、かつ、配列番号33、配列番号37、配列番号41、配列番号45、配列番号47、配列番号51、配列番号53、配列番号55、配列番号57及び配列番号59からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列 ; 並びに、配列番号35、配列番号39、配列番号43、配列番号46、配列番号49、配列番号52、配列番号54、配列番号56、配列番号58及び配列番号60からなる群から選択されるDVD軽鎖アミノ酸配列を含む、請求項13に記載の結合タンパク質。

【請求項15】

結合タンパク質が、IL-12及びIL-18に結合し、又はIL-12及びIL-18を中和し、かつ、配列番号83、配列番号90、配列番号93、配列番号95及び配列

10

20

30

40

50

番号 114 からなる群から選択される DVD 重鎖アミノ酸配列；並びに配列番号 86、配列番号 91、配列番号 94、配列番号 96 及び配列番号 116 からなる群から選択される DVD 軽鎖アミノ酸配列からなる群から選択される DVD 軽鎖アミノ酸配列を含む、請求項 13 に記載の結合タンパク質。

【請求項 16】

細胞表面タンパク質が CD-20 及び CD3 である、請求項 11 に記載の結合タンパク質。

【請求項 17】

結合タンパク質が、配列番号 97 のアミノ酸配列を含む DVD 重鎖及び配列番号 101 のアミノ酸配列を含む DVD 軽鎖を含む、請求項 16 に記載の結合タンパク質。

10

【請求項 18】

前記結合タンパク質が、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  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ；及び少なくとも約  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  からなる群から選択される、前記 1 つ又はそれ以上の標的への結合速度定数 ( $K_{on}$ ) を有する、請求項 1 又は 2 に記載の結合タンパク質。

【請求項 19】

前記結合タンパク質が、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約  $10^{-3} \text{ s}^{-1}$  及び最大約  $10^{-4} \text{ s}^{-1}$  からなる群から選択される、前記 1 つ又はそれ以上の標的への解離速度定数 ( $K_{off}$ ) を有する、請求項 1 又は 2 に記載の結合タンパク質。

20

【請求項 20】

前記結合タンパク質が、最大約  $10^{-7} \text{ M}$ ；最大約  $10^{-8} \text{ M}$ ；最大約  $10^{-9} \text{ M}$ ；及び最大約  $10^{-10} \text{ M}$  からなる群から選択される、前記 1 つ又はそれ以上の標的への解離定数 ( $K_D$ ) を有する、請求項 1 又は 2 に記載の結合タンパク質。

【請求項 21】

請求項 1 ~ 20 の何れか 1 項に記載された結合タンパク質を含み、免疫接着分子、造影剤、治療剤及び細胞毒性剤からなる群から選択される因子をさらに含む、結合タンパク質連結体。

【請求項 22】

前記因子が、放射性標識、酵素、蛍光標識、発光標識、生物発光標識、磁気標識及びピオチンからなる群から選択される造影剤である、請求項 21 に記載の結合タンパク質連結体。

30

【請求項 23】

前記造影剤が、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{166}\text{Ho}$  及び  $^{153}\text{Sm}$  からなる群から選択される放射性標識である、請求項 22 に記載の結合タンパク質連結体。

【請求項 24】

前記因子が、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、トキシン及びアポトーシス剤からなる群から選択される治療剤又は細胞毒性剤である、請求項 21 に記載の結合タンパク質連結体。

40

【請求項 25】

前記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 又は 2 に記載の結合タンパク質。

【請求項 26】

前記結合タンパク質が、インピボにおいて、前記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 25 に記載の結晶化された結合タンパク質。

【請求項 27】

前記結合タンパク質が生物学的活性を保持している、請求項 25 に記載の結晶化された結合タンパク質。

【請求項 28】

50

請求項 1 又は 2 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 2 9】

請求項 2 8 に記載の単離された核酸を含むベクター。

【請求項 3 0】

前記ベクターが、p c D N A (商標)、p T T、p T T 3、p E F B O S、p B V、p J V、p c D N A (商標) 3 . 1 T O P O (登録商標)、p E F 6 T O P O (登録商標) 及び p B J からなる群から選択される、請求項 2 9 に記載のベクター。

【請求項 3 1】

請求項 2 9 又は 3 0 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 3 2】

前記宿主細胞が原核細胞又は真核細胞である、請求項 3 1 に記載の宿主細胞。

【請求項 3 3】

前記原核細胞が E . コリ ( E . c o l i ) である、請求項 3 2 に記載の宿主細胞。

【請求項 3 4】

前記真核細胞が、原生生物細胞、動物細胞、植物細胞及び真菌細胞からなる群から選択される、請求項 3 2 に記載の宿主細胞。

【請求項 3 5】

前記動物細胞が、哺乳動物細胞、鳥類細胞及び昆虫細胞からなる群から選択される、請求項 3 4 に記載の宿主細胞。

【請求項 3 6】

C H O 細胞、C O S 細胞及び S f 9 細胞からなる群から選択される、請求項 3 5 に記載の宿主細胞。

【請求項 3 7】

前記真菌細胞が酵母細胞である、請求項 3 4 に記載の宿主細胞。

【請求項 3 8】

請求項 2 に記載の結合タンパク質を産生するのに十分な条件下で、請求項 3 1 ~ 3 7 の何れか 1 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 3 9】

生産された結合タンパク質の 5 0 % から 7 5 % が、請求項 2 に記載の二重特異的四価結合タンパク質である、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

生産された結合タンパク質の 7 5 % から 9 0 % が、請求項 2 に記載の二重特異的四価結合タンパク質である、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 1】

生産された結合タンパク質の 9 0 % から 9 5 % が、請求項 2 に記載の二重特異的四価結合タンパク質である、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 2】

請求項 3 8 に記載の方法に従って生産されたタンパク質。

【請求項 4 3】

請求項 1 ~ 2 7 及び 4 2 の何れか 1 項に記載の結合タンパク質及び医薬として許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項 4 4】

少なくとも 1 つの追加の治療剤をさらに含む、請求項 4 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 4 5】

前記追加の薬剤が、治療剤、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又はその機能的断片；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；検出可能な標識又はレポーター；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

10

20

30

40

50

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、エピネフリン又は類縁体、サイトカイン及びサイトカインアンタゴニストからなる群から選択される、請求項4に記載の医薬組成物。

【請求項46】

対象の疾病又は疾患を治療するための、請求項1～27及び42のいずれか一項に記載の結合タンパク質を含む医薬組成物。

【請求項47】

(a) 前記疾患が、自己免疫又は炎症性応答であり、前記結合タンパク質が、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(MIP-3a)、CCL21(MIP-2)、CCL23(MPIF-1)、CCL24(MPIF-2/eotaxin-2)、CCL25(TECK)、CCL26、CCL3(MIP-1a)、CCL4(MIP-1b)、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、BMPR1A、BMPR1B、BMPR2、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、IL13RA1、IL13RA2、IL15、IL15RA、IL16、IL17、IL17R、IL18、IL18R1、IL19、IL20、KITLG、LEP

10

20

30

40

50



、LTA、LTB、LTB4R、LTB4R2、LTBR、MIF、NPPB、PDGF  
B、TBX21、TDGF1、TGFA、TGFB1、TGFB1I1、TGFB2、T  
GFB3、TGFB1、TGFB1R1、TGFB1R2、TGFB1R3、TH1L、TNF  
、TNFRSF1A、TNFRSF1B、TNFRSF7、TNFRSF8、TNFRS  
F9、TNFRSF11A、TNFRSF21、TNFSF4、TNFSF5、TNFS  
F6、TNFSF11、VEGF、ZFPM2及びRNF110(ZNF144)から選  
択される一以上のタンパク質に結合する、

(b)前記疾患は喘息であり、前記結合タンパク質がIL-13と、TNF、IL-1  
、IL-9、IL-4、IL-5、IL-25、TARC、MDC、MIF、及びTG  
F-、LHRアゴニスト、CL25、SPRR2a、SPRR2b及びADAM8から 10  
選択される他の標的とに結合する、

(c)前記疾患が関節リウマチであり、前記結合タンパク質がTNF及びVEGF、TN  
F及びIL-18、TNF及びIL-12、TNF及びIL-23、TNF及びIL-1  
beta、TNF及びMIF、TNF及びIL-17、並びにTNF及びIL-15から  
選択される二つの標的に結合する、

(d)前記疾患が全身性エリテマトーデス(SLE)であり、前記結合タンパク質がCD  
-20、CD-22、CD-19、CD28、CD4、CD80、HLA-DRA、IL  
10、IL2、IL4、IL6、IL11、TNFRSF5、TNFRSF6、TNFR  
SF7、TNFRSF8、TNFSF5、TNFSF6、TNFSF7、BLR1、HD  
AC4、HDAC5、HDAC7A、HDAC9、ICOSL、IGBP1、MS4A1 20  
、RGS1、SLA2、CD81、IFNB1、IFN-a、TNF-a、TNFRSF  
5、TNFRSF7、TNFSF5、AICDA、BLNK、GALNAC4S-6ST  
、INHA、INHBA、KLF6、CD28、CD38、CD69、CD80、CD8  
3、CD86、DPP4、FCER2、IL2RA、CD24、CD37、CD40、C  
D72、CD74、CD79A、CD79B、CR2、IL1R2、ITGA2、ITG  
A3、MS4A1、ST6GAL1、CD1C、CHST10、HLA-A、HLA-D  
RA、NT5E、CTLA4、B7.1/B7.2、BlyS、BAFF及びC5から選  
択される一以上の標的に結合する、

(e)前記疾患が多発性硬化症(MS)であり、前記結合タンパク質がIL-12、TW  
EAK、IL-23、CXCL13、CD40、CD40L、IL-18、VEGF、V 30  
LA-4、TNF、CD45RB、CD200、IFNgamma、GM-CSF、FG  
F、C5、CD52及びCCR2から選択される一以上の標的に結合する、

(f)前記疾患が敗血症であり、前記結合タンパク質がTNF、IL-1、MIF、IL  
-6、IL-8、IL-18、IL-12、IL-23、FasL、LPS、Toll様  
受容体、TLR-4、組織因子、MIP-2、ADORA2A、CASP1、CASP4  
、IL10、IL1B、NFKB1、PROC、TNFRSF1A、CSF3、IL10  
、IL1B、IL6、ADORA2A、CCR3、IL10、IL1B、IL1RN、M  
IF、NFKB1、PTAFR、TLR2、TLR4、GPR44、HMOX1、mid  
kine、IRAK1、NFKB2、SERPINA1、SERPINE1及びTREM 40  
1から選択される一以上の標的に結合する、

(g)前記疾患がパーキンソン病であり、前記結合タンパク質が -シニユクレインと、  
TNF、IL-1及びMCP-1から選択される他の標的とに結合する、又は、

(h)疾患が腫瘍疾患であり、前記結合タンパク質がIGF1及びIGF2、IGF1  
/2及びErbb2B、VEGFR及びEGFR、CD20及びCD3、CD138及びC  
D20、CD38及びCD20、CD38及びCD138、CD40及びCD20、CD  
138及びCD40、並びにCD38及びCD40から選択される二つの標的に結合する

請求項46に記載の医薬組成物。

【請求項48】

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

10

20

30

40

50

ntracavity)、腔内(intracelial)、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、膈、直腸、口内、舌下、鼻内及び経皮から選択される少なくとも1つの様式による対象への投与に適した、請求項43～47のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、多価及び多重特異的な結合タンパク質、それらの製造方法に関し、特に、急性及び慢性炎症、癌並びにその他の疾病の予防及び/又は治療におけるそれらの使用に関する。

10

【背景技術】

【0002】

2つ又はそれ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加工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、化学的連結又は組み換え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を発現する2つの異なるハイブリドーマ細胞株の体細胞融合に基づき、クアドローマ技術(Milstein, C. and A. C. Cuello, Nature, 1983 . 305 (5934) : p. 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-ハイブリドーマ(又はクアドローマ)細胞株内で2つの異なるIg重鎖と軽鎖がランダムに対合するために、最大10個の異なる免疫グロブリン種が生成され、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及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生産することが可能である(Staerz, U. D., et al., Nature, 1985 . 314 (6012) : p. 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つの異なるモノクローナル抗体又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., Science, 1985 . 229 (4708) : p. 81 - 3 参照)。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の調製物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., J Immunol, 1987 . 139 (7) : p. 2367 - 75 参照)。しかし、この方法は、Fab'2断片をもたらす、完全なIgG分子をもたらさない。

30

【0005】

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、最近、開発されている(Kriangkum, J., et al., Biomol Eng, 2001 . 18 (2) : p. 31 - 40 参照)。それらのうち、直列型一本鎖Fv分子及びダイアボディ並びにこれらの様々な誘導体が、組み換え二特異的抗体の構築のために、最も広く使用されているフォーマットである。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., Nat Med, 2003 . 9 (1) : p. 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断片は、別個の折り畳み実体を形成する。2つのscFv断片及び最大63個の残基の長さを有する

40

50

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 (Nakaniishi, K., et al., *Annu Rev Immunol*, 2001, 19: p. 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。従って、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又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及びウシによる、CD28 及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, I. A., et al., *J Clin Invest*, 1999, 104 (10): p. 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。細菌中での可溶性発現を可能とするために、ドメイン順序の変動、又は変動する長さ若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、幾つかの研究が、極めて短い Ala3 リンカー又はグリシン/セリンが豊富な長いリンカーを用いた、細菌中での可溶性直列型 s c F v 分子の発現が報告されている (Leung, B. P., et al., *J Immunol*, 2000, 164 (12): p. 6495 - 502; Ito, A., et al., *J Immunol*, 2003, 170 (9): p. 4802 - 9; Karni, A., et al., *J Neuroimmunol*, 2002, 125 (1 - 2): p. 134 - 40 参照)。最近の研究では、細菌中で、可溶性及び活性形態で産生された分子を濃縮するために、3又は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好ましい直列型 s c F v 分子の単離をもたらした (Arndt, M. and J. Krauss, *Methods Mol Biol*, 2003, 207: p. 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。

#### 【0006】

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 及び 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, *Biochem Soc Trans*, 2002, 30 (4): p. 507 - 11 参照)。リンカーサイズのこの減少は、VH 及び 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 VH A - VL B 及び VH B - VL A (VH - VL 配置) 又は VL A - VH B 及び VL B - VH A (VL - VH 配置) の何れかとともに、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得る。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及び形成に影響を与え得ることを示している (Mack, M., G. Riethmuller, and P. Kufner, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92 (15): p. 7021 - 5 参照)。それにもかかわらず、細菌中での可溶性発現は、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, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90 (14): p. 6444 - 8, 18 参照)。これは、H

10

20

30

40

50

ER2及び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又は抗CD3可変ドメインの何れかにおいて、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、分析された幾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。従って、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、抗体配列の非原型及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及び望ましくない薬物動態をもたらし得る。

10

#### 【0007】

一本鎖ダイアボディ(scDb)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, Cancer Immunol Immunother, 1997, 45(3-4): p. 128-30; Wu, A.M., et al, Immunotechnology, 1996, 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。従って、単量体的一本鎖ダイアボディ(50-60kDa)に対応する分子量を有する全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、可溶性且つ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、幾つかの研究によって示されている(Holliger, P. and G. Winter, Cancer Immunol Immunother, 1997, 45(3-4): p. 128-30; Wu, A.M., et al., Immunotechnology, 1996, 2(1): p. 21-36; Pluckthun, A. and P. Pack, Immunotechnology, 1997, 3(2): p. 83-105; Ridgway, J.B., et al., Protein Eng, 1996, 9(7): p. 617-21参照)。従って、一本鎖ダイアボディは、直列型scFv(全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。

20

30

#### 【0008】

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., J Biol Chem, 2004, 279(4): p. 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, and Miller, K., et al., J Immunol, 2003, 170(9): p. 4854-61参照)。

40

#### 【発明の開示】

##### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0009】

本分野において、2つ又はそれ以上の抗原に結合することが可能な改良された多価結合タンパク質に対する要求が存在する。本発明は、高い親和性で、2つ又はそれ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。

##### 【課題を解決するための手段】

#### 【0010】

##### 発明の要旨

本発明は2つ又はそれ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に関する。本発明は、高い親和性で、2つ又はそれ以上の抗原に結合することが可能な結合タンバ

50

ク質の新規ファミリーを提供する。

【0011】

一態様において、本発明は、ポリペプチド鎖を含み、前記ポリペプチド鎖はVD1 - (X1)<sub>n</sub> - VD2 - C - (X2)<sub>n</sub> (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はアミノ酸又はポリペプチドを表し、X2はFc領域を表し、及びnは0又は1である。)を含む、結合タンパク質を提供する。好ましい実施形態において、結合タンパク質中のVD1及びVD2は、重鎖可変ドメインである。より好ましくは、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及びヒト化重鎖可変ドメインからなる群から選択される。好ましい実施形態において、VD1及び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及びVD2は、異なる抗原に結合することができる。好ましくは、Cは、重鎖定常ドメインである。より好ましくは、X1はリンカーである(但し、X1はCH1ではない。)。最も好ましくは、X1は、AKTTPKLEEGEFSEAR; AKTTPKLEEGEFSEARV; AKTTPKLG G; SAKTTPKLG G; AKTTPKLEEGEFSEARV; SAKTTP; SAKTTPKLG G; RADAAP; RADAAPT V S; RADA A A A G G P G S; RADA A A A (G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>; SAKTTP; SAKTTPKLG G; SAKTTPKLEEGEFSEARV; ADAAP; ADAAPT V S I F P P; TVAAP; TVAAPS V F I F P P; QPKAAP; QPKAAPSVTLFPP; AKTTPP; AKTTPPSV T P L A P; AKTTAP; AKTTAPSVYPLAP; ASTKGP; ASTKGPSV F P L A P; GGGGSGGGGSGGGGS; GENKVEYAPALMALS; GPAKELTPLKEAKVS; 及びGHEAAAVMQVQYPASからなる群から選択されるリンカーである。好ましくは、X2は、Fc領域である。より好ましくは、X2は、バリエーションFc領域である。

10

20

【0012】

好ましい実施形態において、上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、前記ポリペプチド鎖はVD1 - (X1)<sub>n</sub> - VD2 - C - (X2)<sub>n</sub> (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。)、及びX2はFc領域である。)を含む。

30

【0013】

別の実施形態において、結合タンパク質中のVD1及びVD2は、軽鎖可変ドメインである。好ましくは、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及びヒト化軽鎖可変ドメインからなる群から選択される。一実施形態において、VD1及び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及びVD2は、異なる抗原に結合することができる。好ましくは、Cは、軽鎖定常ドメインである。より好ましくは、X1はリンカーである(但し、X1はCL1ではない。)。好ましくは、X1は、AKTTPKLEEGEFSEAR; AKTTPKLEEGEFSEARV; AKTTPKLG G; SAKTTPKLG G; AKTTPKLEEGEFSEARV; SAKTTP; SAKTTPKLG G; RADAAP; RADAAPT V S; RADA A A A G G P G S; RADA A A A (G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>; SAKTTP; SAKTTPKLG G; SAKTTPKLEEGEFSEARV; ADAAP; ADAAPT V S I F P P; TVAAP; TVAAPS V F I F P P; QPKAAP; QPKAAPSVTLFPP; AKTTPP; AKTTPPSV T P L A P; AKTTAP; AKTTAPSVYPLAP; ASTKGP及びASTKGPSV F P L A Pからなる群から選択されるリンカーである。好ましくは、結合タンパク質は、X2を含まない。

40

【0014】

好ましい実施形態において、上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、前記ポリペプチド鎖はVD1 - (X1)<sub>n</sub> - VD2 - C - (X2)<sub>n</sub> (VD1は第一

50

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。）、及びX2はFc領域を含まない。）を含む。

【0015】

別の好ましい実施形態において、本発明は、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)<sub>n</sub>-VD2-C-(X2)<sub>n</sub>（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。）、及びX2はFc領域である。）を含み；並びに前記第二のポリペプチド鎖はVD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-C-(X2)<sub>n</sub>（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。）、及びX2はFc領域を含まない。）を含む。最も好ましくは、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)<sub>n</sub>-VD2-C-(X2)<sub>n</sub>（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。）、及びX2はFc領域である。）を含み；並びに第二の2つのポリペプチド鎖は、それぞれ、VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-C-(X2)<sub>n</sub>（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。）、及び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。

【0016】

別の好ましい実施形態において、上に開示されている結合タンパク質は、1つ又はそれ以上の標的に結合することが可能である。好ましくは、標的は、サイトカイン、細胞表面タンパク質、酵素及び受容体からなる群から選択される。好ましくは、結合タンパク質は、1つ又はそれ以上の標的の生物学的機能を調節することが可能である。より好ましくは、結合タンパク質は、1つ又はそれ以上の標的を中和することが可能である。本発明の結合タンパク質は、リンホカイン、モノカイン及びポリペプチドホルモンからなる群から選択されるサイトカインに結合することができる。特定の実施形態において、結合タンパク質は、IL-1及びIL-1；IL-12及びIL-18；TNF及びIL-23、TNF及びIL-13；TNF及びIL-18；TNF及びIL-12；TNF及びIL-1；TNF及びMIF；TNF及びIL-17；並びにTNF及びIL-15；TNF及びVEGF；VEGFR及びEGFR；IL-13及びIL-9；IL-13及びIL-4；IL-13及びIL-5；IL-13及びIL-25；IL-13及びTARC；IL-13及びMDC；IL-13及びMEF；IL-13及びTGF-；IL-13及びLHRアゴニスト；IL-13及びCL25；IL-13及びSPRR2a；DL-13及びSPRR2b；IL-13及びADAM8；及びTNF及びPGE4、IL-13及びPED2、TNF及びPEG2からなる群から選択されるサイトカインの対に結合することができる。別の実施形態において、本発明の結合タンパク質は、CD138及びCD20；CD138及びCD40；CD19及びCD20；CD20及びCD3；CD38及びCD138；CD38及びCD20；CD38及びCD40；CD40及びCD20；CD-8及びIL-6；CSPGs及びRGM A；CTLA-4及びBTNO2；IGF1及びIGF2；IGF1/2及びEr b 2 B；IL-12及びTWEAK；IL-13及びIL-1；MAG及びRGMA；NgR及びRGMA；Nogo A及びRGMA；OMGp及びRGMA；PDL-1及びCTLA-4；RGMA及びRGM B；Te 3 8及びTNF；TNF及びBl y s；TNF及びCD-22；TNF及びCTLA-4；TNF及びGP130；TNF及びIL-12 p 4 0；並びにTNF及びRANKリガンドからなる群から選択される標的の対に結合することが可能である。

【0017】

10

20

30

40

50

一実施形態において、ヒトIL-1及びヒトIL-1に結合することができる結合タンパク質は、配列番号33、配列番号37、配列番号41、配列番号45、配列番号47、配列番号51、配列番号53、配列番号55、配列番号57及び配列番号59からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列を含み；並びに、配列番号35、配列番号39、配列番号43、配列番号46、配列番号49、配列番号52、配列番号54、配列番号56、配列番号58及び配列番号60からなる群から選択されるDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、マウスIL-1及びマウスIL-1に結合することができる結合タンパク質は、配列番号105のDVD重鎖アミノ酸配列及び配列番号109のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0018】

一実施形態において、IL-12及びIL-18に結合することができる結合タンパク質は、配列番号83、配列番号90、配列番号93、配列番号95及び配列番号114からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列；並びに配列番号86、配列番号91、配列番号94、配列番号46、配列番号96及び配列番号116からなる群から選択されるDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0019】

一実施形態において、CD20及びCD3に結合することができる結合タンパク質は、配列番号97であるDVD重鎖アミノ酸配列及び配列番号101のDVD軽鎖を含む。

【0020】

別の実施形態において、本発明の結合タンパク質は、BMP1、BMP2、BMP3B (GDF10)、BMP4、BMP6、BMP8、CSF1(M-CSF)、CSF2(GM-CSF)、CSF3(G-CSF)、EPO、FGF1(aFGF)、FGF2(bFGF)、FGF3(int-2)、FGF4(HST)、FGF5、FGF6(HST-2)、FGF7(KGF)、FGF9、FGF10、FGF11、FGF12、FGF12B、FGF14、FGF16、FGF17、FGF19、FGF20、FGF21、FGF23、IGF1、IGF2、IFNA1、IFNA2、IFNA4、IFNA5、IFNA6、IFNA7、EFNB1、IFNG、IFNW1、FIL1、FIL1( )、FLL1( )、IL1A、IL1B、IL2、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL8、IL9、IL10、IL11、IL12A、IL12B、IL13、IL14、IL15、IL16、IL17、IL17B、IL18、IL19、IL20、IL22、IL23、IL24、IL25、IL26、IL27、IL28A、IL28B、IL29、IL30、PDGFA、PDGFB、TGFA、TGFB1、TGFB2、TGFB3、LTA(TNF-b)、LTB、TNF(TNF-a)、TNFSF4(OX40リガンド)、TNFSF5(CD40リガンド)、TNFSF6(FasL)、TNFSF7(CD27リガンド)、TNFSF8(CD30リガンド)、TNFSF9(4-1BBリガンド)、TNFSF10(TRAIL)、TNFSF11(TRANCE)、TNFSF12(APO3L)、TNFSF13(April)、TNFSF13B、TNFSF14(HVEM-L)、TNFSF15(VEG1)、TNFSF18、FIGF(VEGFD)、VEGF、VEGFB、VEGFC、IL1R1、IL1R2、IL1RL1、IL1RL2、IL2RA、IL2RB、IL2RG、IL3RA、IL4R、IL5RA、IL6R、IL7R、IL8RA、IL8RB、IL9R、IL10RA、IL10RB、IL11RA、IL12RB1、IL12RB2、IL13RA1、IL13RA2、IL15RA、IL17R、IL18R1、IL20RA、IL21R、IL22R、IL1HY1、IL1RAP、IL1RAPL1、IL1RAPL2、IL1RN、IL6ST、IL18BP、IL18RAP、IL22RA2、AEF1、HGF、LEP(レプチン)、PTN及びTHPOからなる群から選択される1つ、2つ又はそれ以上のサイトカイン、サイトカイン関連タンパク質及びサイトカイン受容体に結合することができる。

【0021】

本発明の結合タンパク質は、CCL1(I-309)、CCL2(MCP-1/MCA

10

20

30

40

50

F)、CCL3(MIP-1a)、CCL4(MIP-1b)、CCL5(RANTES)、CCL7(MCP-3)、CCL8(mcp-2)、CC11(エオタキシン)、CCL13(MCP-4)、CCL15(MIP-1d)、CCL16(HCC-4)、CCL17(TARC)、CCL18(PARC)、CCL19(MDP-3b)、CCL20(MIP-3a)、CCL21(SLC/エキソダス-2)、CCL22(MDC/STC-1)、CCL23(MPIF-1)、CCL24(MPIF-2/エオタキシン-2)、CCL25(TECK)、CCL26(エオタキシン-3)、CCL27(CTACK/ILC)、CCL28、CXCL1(GRO1)、CXCL2(GRO2)、CXCL3(GRO3)、CXCL5(ENA-78)、CXCL6(GCP-2)、CXCL9(MIG)、CXCL10(IP10)、CXCL11(I-TAC)、CXCL12(SDF1)、CXCL13、CXCL14、CXCL16、PF4(CXCL4)、PPBP(CXCL7)、CX3CL1(SCYD1)、SCYE1、XCL1(リンホタクチン)、XCL2(SCM-1b)、BLR1(MDR15)、CCBP2(D6/JAB61)、CCR1(CKR1/HM145)、CCR2(mcp-1RB/RA)、CCR3(CKR3/CMKBR3)、CCR4、CCR5(CMKBR5/ChemR13)、CCR6(CMKBR6/CKR-L3/STRL22/DRY6)、CCR7(CKR7/EBI1)、CCR8(CMKBR8/TER1/CKR-L1)、CCR9(GPR-9-6)、CCRL1(VSHK1)、CCRL2(L-CCR)、XCR1(GPR5/CCXCR1)、CMKLR1、CMKOR1(RDC1)、CX3CR1(V28)、CXCR4、GPR2(CCR10)、GPR31、GPR81(FKSG80)、CXCR3(GPR9/CKR-L2)、CXCR6(TYMSTR/STRL33/Bonzo)、HM74、IL8RA(IL8Ra)、IL8RB(IL8Rb)、LTB4R(GPR16)、TCP10、CKLFSF2、CKLFSF3、CKLFSF4、CKLFSF5、CKLFSF6、CKLFSF7、CKLFSF8、BDNF、C5R1、CSF3、GRCC10(C10)、EPO、FY(DARC)、GDF5、HDF1A、IL8、PRL、RGS3、RGS13、SDF2、SLIT2、TLR2、TLR4、TREM1、TREM2及びVHLからなる群から選択される1つ又はそれ以上のケモカイン、ケモカイン受容体及びケモカイン関連タンパク質に結合することができる。本発明の結合タンパク質は、インテグリンからなる群から選択される細胞表面タンパク質に結合することができる。本発明の結合タンパク質は、キナーゼ及びプロテアーゼからなる群から選択される酵素に結合することができる。本発明の結合タンパク質は、リンホカイン受容体、モノカイン受容体及びポリペプチドホルモン受容体からなる群から選択される受容体に結合することができる。

#### 【0022】

好ましい実施形態において、結合タンパク質は多価である。より好ましくは、結合タンパク質は多重特異的である。上記多価及び/又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、多価及び/又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(及び/又は異化され);(2)アゴニスト抗体であり;及び/又は(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及び/又はアポトーシスを誘導し得る。多価及び/又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(及び/又は異化される)抗体であり得、及び/又はアゴニスト、細胞死誘導及び/又はアポトーシス誘導抗体であり得、並びに本明細書に記載されている多価及び/又は多重特異的結合タンパク質は、これらの特性の1つ又はそれ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、これらの特性の何れか1つ又はそれ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。

#### 【0023】

別の実施形態において、本発明の結合タンパク質は、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  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ; 及び少なくとも  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  からなる群から選択される、1つ又はそれ以上の標的への結合速度定数 ( $K_{on}$ ) を有する。好ましくは、本発明の結合タンパク質は、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、又は  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  と  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  の間の、1つ又はそれ以上の標的に対する結合速度定数 ( $K_{on}$ ) を有する。

#### 【0024】

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  $10^{-3} \text{ s}^{-1}$  ; 最大約  $10^{-4} \text{ s}^{-1}$  ; 最大約  $10^{-5} \text{ s}^{-1}$  ; 及び最大約  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$  からなる群から選択されるからなる群から選択される、1つ又はそれ以上の標的への解離速度定数 ( $K_{off}$ ) を有する。好ましくは、本発明の結合タンパク質は、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、 $10^{-3} \text{ s}^{-1}$  から  $10^{-4} \text{ s}^{-1}$  の、 $10^{-4} \text{ s}^{-1}$  から  $10^{-5} \text{ s}^{-1}$  の、又は  $10^{-5} \text{ s}^{-1}$  から  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$  の間の、1つ又はそれ以上の標的に対する解離速度定数 ( $K_{off}$ ) を有する。

#### 【0025】

別の実施形態において、結合タンパク質は、最大約  $10^{-7} \text{ M}$  ; 最大約  $10^{-8} \text{ M}$  ; 最大約  $10^{-9} \text{ M}$  ; 最大約  $10^{-10} \text{ M}$  ; 最大約  $10^{-11} \text{ M}$  ; 最大約  $10^{-12} \text{ M}$  及び最大  $10^{-13} \text{ M}$  からなる群から選択される、1つ又はそれ以上の標的への解離定数 ( $K_D$ ) を有する。好ましくは、本発明の結合タンパク質は、 $10^{-7} \text{ M}$  から  $10^{-8} \text{ M}$  の;  $10^{-8} \text{ M}$  から  $10^{-9} \text{ M}$  の;  $10^{-9} \text{ M}$  から  $10^{-10} \text{ M}$  の;  $10^{-10} \text{ M}$  から  $10^{-11} \text{ M}$  の;  $10^{-11} \text{ M}$  から  $10^{-12} \text{ M}$  の; 又は  $10^{-12} \text{ M}$  から  $10^{-13} \text{ M}$  の IL-12 又は IL-23 に対する解離定数 ( $K_D$ ) を有する。

#### 【0026】

別の実施形態において、上記結合タンパク質は、免疫接着分子、造影剤、治療剤及び細胞毒性剤からなる群から選択される因子をさらに含む連結体である。好ましくは、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、磁気標識及びピオチンからなる群から選択される。より好ましくは、造影剤は、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{166}\text{Ho}$  及び  $^{153}\text{Sm}$  からなる群から選択される放射性標識である。好ましくは、治療剤又は細胞毒性剤は、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、トキシン及びアポトーシス剤からなる群から選択される。

#### 【0027】

別の実施形態において、上記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。好ましくは、この結晶は、無担体医薬徐放結晶である。より好ましくは、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。最も好ましくは、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。

#### 【0028】

別の実施形態において、上記結合タンパク質はグリコシル化される。好ましくは、グリコシル化は、ヒトグリコシル化パターンである。本発明の一態様は、上に開示されている結合タンパク質の何れか1つをコードする単離された核酸に関する。さらなる実施形態は、上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 c D NA (商標); 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 c D N A (商標) 3.1 T O P O (登録商標)、p E F 6 T O P O (登録商標) 及び p B J からなる群から選択される。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 2 9 】

別の態様において、宿主細胞は、上に開示されたベクターで形質転換される。好ましくは、宿主細胞は原核細胞である。より好ましくは、宿主細胞はイー・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。好ましくは、真核細胞は、原生動物細胞、動物細胞、植物細胞及び真菌細胞からなる群から選択される。より好ましくは、宿主細胞は、CHO及びCOSを含む(但し、これらに限定されない。)哺乳動物細胞;又はサッカロミセス・セレビスシアエ (*Saccharomyces cerevisiae*) などの真菌細胞;又はSf9などの昆虫細胞である。

## 【 0 0 3 0 】

本発明の別の態様は、結合タンパク質を産生するのに十分な条件下で、同じく上に開示されている宿主細胞の何れか1つを培地中において培養することを含む、上に開示されている結合タンパク質を生産する方法を提供する。好ましくは、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。より好ましくは、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。最も好ましくは、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 3 1 】

別の実施形態は、上に開示されている方法に従って産生された結合タンパク質を提供する。

## 【 0 0 3 2 】

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、上に開示されている結晶化された結合タンパク質及び成分並びに少なくとも1つのポリマー性担体を含む。好ましくは、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)又は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、ブルロニックポリオール、アルブミン、アルギナート、セルロース及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、これらの混合物及び共重合体からなる群の1つ又はそれ以上から選択されるポリマーである。好ましくは、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及びポリエチレングリコールからなる群から選択される。別の実施形態は、上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 3 3 】

本発明は、上に開示された結合タンパク質と、及び医薬として許容される担体とを含む医薬組成物も提供する。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。好ましくは、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抗体又は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及び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-1Ab、抗E/LセレクチンAb、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又はその機能的断片(抗IL-18、抗TNF、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;検出可能な標識又はレポーター;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(NS

10

20

30

40

50

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、エピネフリン又は類縁体、サイトカイン及びサイトカインアンタゴニストからなる群から選択される。

【 0 0 3 4 】

別の実施形態において、本発明は、上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る標的又は複数の標的が有害である疾患にしているヒトを治療する方法であり、ヒト対象中の標的又は複数の標的が阻害され、及び治療が達成されるように、上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、前記方法を提供する。 10

好ましくは、疾患は、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又は慢性免疫疾患、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、 20

アジソン病、孤発性の、多内分泌腺機能低下症候群Ⅰ型及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、エルシニア及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、卵巢機能不全、早期卵巢機能不全、繊維性肺疾患、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、繊維症、放射性繊維症、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、1 型自己免疫性肝炎（古典的自己免疫性又はルポイド肝炎）、2 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、1 型乾癬、2 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、男性不妊症特発性又は N O S、精子自己免疫、多発性硬化症（全てのサブタイプ）、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 30

40

50

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、アレルギー及び喘息、B群連鎖球菌 (GBS) 感染、精神障害 (例えば、うつ病及び統合失調症)、Th2型及びTh1型によって媒介される疾病、急性及び慢性疼痛 (疼痛の様々な形態)、並びに、肺癌、乳癌、胃癌、膀胱癌、大腸癌、膵臓癌、卵巣癌、前立腺癌及び腎臓癌及び造血性悪性病変 (白血病及びリンパ腫) などの癌、無リポタンパク質血症、先端チアノーゼ、急性及び慢性寄生性又は感染性プロセス、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)、急性又は慢性細菌感染、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) 及び動脈瘤、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 (持続的又は発作性)、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、無秩序な又は多巣性心房頻脈、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、嚢胞性繊維症、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、垂体外路及び小脳疾患、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、糸球体腎炎、何れかの臓器又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、特発性肺繊維症、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 (lipidema)、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・ドレーガー及びマシャド・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、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、腹部大動脈及びその分枝の閉塞、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

10

20

30

40

50

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、P O E M S 症候群（多発神経炎、臓器肥大、内分泌疾患、単クローン性 グロブリン血症及び皮膚変化症候群（*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、レイノー現象及び病、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細胞又は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、ウイルス及び真菌感染、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、何れかの臓器又は組織の異種移植拒絶を含む群から選択される。

10

20

#### 【0035】

別の態様において、本発明は、上に論述されているような第二の因子の投与前、投与と同時に又は投与後に、上に開示されている結合タンパク質の何れか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を提供する。好ましい実施形態において、第二の因子は、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モノクローナル抗体、抗IL-6モノクローナル抗体、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-E、GM-CSF、FGF及びPDGF、CD2、CD3、CD4、CD8、CD-19、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD90又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及びTGFからなる群から選択される。

30

40

#### 【0036】

好ましい実施形態において、上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（*intracelial*）、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、ボータス、膣、直腸、口内、舌下、鼻内及び経皮から選択される少なくとも1つの様式によって、対象に投与される。

50

## 【 0 0 3 7 】

本発明の一態様は、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を提供する。抗イディオタイプ抗体には、本発明の結合タンパク質中に取り込まれることができる、重鎖若しくは軽鎖又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）、重鎖又は軽鎖可変領域、重鎖又は軽鎖定常領域、フレームワーク領域又はその何れかの一部など（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何れかのタンパク質又はペプチド含有分子が含まれる。

## 【 0 0 3 8 】

別の実施形態において、本発明の結合タンパク質は、A B C F 1 ; A C V R 1 ; A C V R 1 B ; A C V R 2 ; A C V R 2 B ; A C V R L 1 ; A D O R A 2 A ; アグレカン ; A G R 2 ; A I C D A ; A I F 1 ; A I G 1 ; A K A P 1 ; A K A P 2 ; A M H ; A M H R 2 ; A N G P T 1 ; A N G P T 2 ; A N G P T L 3 ; A N G P T L 4 ; A N P E P ; A P C ; A P O C 1 ; A R ; A Z G P 1 ( 亜鉛 - a - 糖タンパク質 ) ; B 7 . 1 ; B 7 . 2 ; B A D ; B A F F ; B A G 1 ; B A I 1 ; B C L 2 ; B C L 6 ; B D N F ; B L N K ; B L R 1 ( M D R 1 5 ) ; B l y S ; B M P 1 ; B M P 2 ; B M P 3 B ( G D F 1 0 ) ; B M P 4 ; B M P 6 ; B M P 8 ; B M P R 1 A ; B M P R 1 B ; B M P R 2 ; B P A G 1 ( プレクチン ) ; B R C A 1 ; C 1 9 o r f 1 0 ( I L 2 7 w ) ; C 3 ; C 4 A ; C 5 ; C 5 R 1 ; C A N T 1 ; C A S P 1 ; C A S P 4 ; C A V 1 ; C C B P 2 ( D 6 / J A B 6 1 ) ; C C L 1 ( I - 3 0 9 ) ; C C L 1 1 ( エオタキシン ) ; C C L 1 3 ( M C P - 4 ) ; C C L 1 5 ( M I P - 1 d ) ; C C L 1 6 ( H C C - 4 ) ; C C L 1 7 ( T A R C ) ; C C L 1 8 ( P A R C ) ; C C L 1 9 ( M I P - 3 b ) ; C C L 2 ( M C P - 1 ) ; M C A F ; C C L 2 0 ( M I P - 3 a ) ; C C L 2 1 ( M I P - 2 ) ; S L C ; エキソダス - 2 ; C C L 2 2 ( M D C / S T C - 1 ) ; C C L 2 3 ( M P I F - 1 ) ; C C L 2 4 ( M P I F - 2 / エオタキシン - 2 ) ; C C L 2 5 ( T E C K ) ; C C L 2 6 ( エオタキシン - 3 ) ; C C L 2 7 ( C T A C K / I L C ) ; C C L 2 8 ; C C L 3 ( M I P - 1 a ) ; C C L 4 ( M I P - 1 b ) ; C C L 5 ( R A N T E S ) ; C C L 7 ( M C P - 3 ) ; C C L 8 ( m c p - 2 ) ; C C N A 1 ; C C N A 2 ; C C N D 1 ; C C N E 1 ; C C N E 2 ; C C R 1 ( C K R 1 / H M 1 4 5 ) ; C C R 2 ( m c p - 1 R B / R A ) ; C C R 3 ( C K R 3 / C M K B R 3 ) ; C C R 4 ; C C R 5 ( C M K B R 5 / C h e m R 1 3 ) ; C C R 6 ( C M K B R 6 / C K R - L 3 / S T R L 2 2 / D R Y 6 ) ; C C R 7 ( C K R 7 / E B I 1 ) ; C C R 8 ( C M K B R 8 / T E R 1 / C K R - L 1 ) ; C C R 9 ( G P R - 9 - 6 ) ; C C R L 1 ( V S H K 1 ) ; C C R L 2 ( L - C C R ) ; C D 1 6 4 ; C D 1 9 ; C D 1 C ; C D 2 0 ; C D 2 0 0 ; C D - 2 2 ; C D 2 4 ; C D 2 8 ; C D 3 ; C D 3 7 ; C D 3 8 ; C D 3 E ; C D 3 G ; C D 3 Z ; C D 4 ; C D 4 0 ; C D 4 0 L ; C D 4 4 ; C D 4 5 R B ; C D 5 2 ; C D 6 9 ; C D 7 2 ; C D 7 4 ; C D 7 9 A ; C D 7 9 B ; C D 8 ; C D 8 0 ; C D 8 1 ; C D 8 3 ; C D 8 6 ; C D H 1 ( E - カドヘリン ) ; C D H 1 0 ; C D H 1 2 ; C D H 1 3 ; C D H 1 8 ; C D H 1 9 ; C D H 2 0 ; C D H 5 ; C D H 7 ; C D H 8 ; C D H 9 ; C D K 2 ; C D K 3 ; C D K 4 ; C D K 5 ; C D K 6 ; C D K 7 ; C D K 9 ; C D K N 1 A ( p 2 1 W a p 1 / C i p 1 ) ; C D K N 1 B ( p 2 7 K i p 1 ) ; C D K N 1 C ; C D K N 2 A ( p 1 6 I N K 4 a ) ; C D K N 2 B ; C D K N 2 C ; C D K N 3 ; C E B P B ; C E R 1 ; C H G A ; C H G B ; キチナーゼ ; C H S T 1 0 ; C K L F S F 2 ; C K L F S F 3 ; C K L F S F 4 ; C K L F S F 5 ; C K L F S F 6 ; C K L F S F 7 ; C K L F S F 8 ; C L D N 3 ; C L D N 7 ( クラウジン - 7 ) ; C L N 3 ; C L U ( クラステリン ) ; C M K L R 1 ; C M K O R 1 ( R D C 1 ) ; C N R 1 ; C O L 1 8 A 1 ; C O L 1 A 1 ; C O L 4 A 3 ; C O L 6 A 1 ; C R 2 ; C R P ; C S F 1 ( M - C S F ) ; C S F 2 ( G M - C S F ) ; C S F 3 ( G C S F ) ; C T L A 4 ; C T N N B 1 ( b - カドヘリン ) ; C T S B ( カテプシン B ) ; C X 3 C L 1 ( S C Y D 1 ) ; C X 3 C R 1 ( V 2 8 ) ; C X C L 1 ( G R O 1 ) ; C X C L 1 0 ( I P - 1 0 ) ; C X C L 1 1 ( I - T A C / I P - 9 ) ; C X C L 1 2 ( S D F 1 ) ; C X C L 1 3 ; C X C L 1 4 ; C X C L 1 6 ; C X C L 2 ( G R O 2 ) ; C X C L 3 ( G R O 3

) ; CXCL5 ( ENA - 78 / LIX ) ; CXCL6 ( GCP - 2 ) ; CXCL9 ( M  
 IG ) ; CXCR3 ( GPR9 / CKR - L2 ) ; CXCR4 ; CXCR6 ( TYMST  
 R / STRL33 / Bonzo ) ; CYB5 ; CYC1 ; CYSLTR1 ; DAB2IP  
 ; DES ; DKFZp451J0118 ; DNCL1 ; DPP4 ; E2F1 ; ECGF1  
 ; EDG1 ; EFNA1 ; EFNA3 ; EFNB2 ; EGF ; EGFR ; ELAC2 ; E  
 NG ; ENO1 ; ENO2 ; ENO3 ; EPHB4 ; EPO ; ERBB2 ( Her - 2 )  
 ; EREG ; ERK8 ; ESR1 ; ESR2 ; F3 ( TF ) ; FADD ; FasL ; FA  
 SN ; FCER1A ; FCER2 ; FCGR3A ; FGF ; FGF1 ( aFGF ) ; FG  
 F10 ; FGF11 ; FGF12 ; FGF12B ; FGF13 ; FGF14 ; FGF16  
 ; FGF17 ; FGF18 ; FGF19 ; FGF2 ( bFGF ) ; FGF20 ; FGF2  
 1 ; FGF22 ; FGF23 ; FGF3 ( int - 2 ) ; FGF4 ( HST ) ; FGF5  
 ; FGF6 ( HST - 2 ) ; FGF7 ( KGF ) ; FGF8 ; FGF9 ; FGFR3 ; F  
 IGF ( VEGFD ) ; FDL1 ( ) ; FIL1 ( ) ; FLJ12584 ; FLJ2  
 5530 ; FLRT1 ( フィブロネクチン ) ; FLT1 ; FOS ; FOSL1 ( FRA -  
 1 ) ; FY ( DARCS ) ; GABRP ( GABAa ) ; GAGEB1 ; GAGEC1 ; G  
 ALNAC4S - 6ST ; GATA3 ; GDF5 ; GFI1 ; GGT1 ; GM - CSF ;  
 GNAS1 ; GNRH1 ; GPR2 ( CCR10 ) ; GPR31 ; GPR44 ; GPR8  
 1 ( FKSG80 ) ; GRCC10 ( C10 ) ; GRP ; GSN ( ゲルソリン ) ; GST  
 P1 ; HAVCR2 ; HDAC4 ; HDAC5 ; HDAC7A ; HDAC9 ; HGF ; H  
 IF1A ; HEP1 ; ヒスタミン及びヒスタミン受容体 ; HLA - A ; HLA - DRA ;  
 HM74 ; HMOX1 ; HUMCYT2A ; ICEBERG ; ICOSL ; ID2 ; IF  
 N - a ; IFNA1 ; IFNA2 ; IFNA4 ; IFNA5 ; IFNA6 ; IFNA7 ;  
 IFNB1 ; IFN ; IFNW1 ; IGBP1 ; IGF1 ; IGF1R ; IGF2 ; I  
 GFBP2 ; IGFBP3 ; IGFBP6 ; IL - 1 ; IL10 ; IL10RA ; IL1  
 0RB ; IL11 ; IL11RA ; IL - 12 ; IL12A ; IL12B ; IL12RB  
 1 ; IL12RB2 ; IL13 ; IL13RA1 ; IL13RA2 ; IL14 ; IL15  
 ; IL15RA ; IL16 ; IL17 ; IL17B ; IL17C ; IL17R ; IL18  
 ; IL18BP ; IL18R1 ; IL18RAP ; IL19 ; IL1A ; IL1B ; IL  
 1F10 ; IL1F5 ; IL1F6 ; IL1F7 ; IL1F8 ; IL1F9 ; IL1HY  
 1 ; IL1R1 ; IL1R2 ; IL1RAP ; IL1RAPL1 ; IL1RAPL2 ; I  
 L1RL1 ; IL1RL2IL1RN ; IL2 ; IL20 ; IL20RA ; IL21R ;  
 IL22 ; IL22R ; IL22RA2 ; IL23 ; IL24 ; IL25 ; IL26 ; I  
 L27 ; IL28A ; IL28B ; IL29 ; IL2RA ; IL2RB ; IL2RG ; I  
 L3 ; IL30 ; IL3RA ; IL4 ; IL4R ; IL5 ; IL5RA ; IL6 ; IL6  
 R ; IL6ST ( 糖タンパク質130 ) ; IL7 ; IL7R ; IL8 ; IL8RA ; IL  
 8RB ; IL8RB ; IL9 ; IL9R ; ILK ; INHA ; INHBA ; INSL3 ;  
 INSL4 ; IRAK1 ; IRAK2 ; ITGA1 ; ITGA2 ; ITGA3 ; ITGA  
 6 ( a6インテグリン ) ; ITGAV ; HGB3 ; ITGB4 ( b4インテグリン ) ; J  
 AG1 ; JAK1 ; JAK3 ; JUN ; K6HF ; KAI1 ; KDR ; KITLG ; KL  
 F5 ( GCBoxBP ) ; KLF6 ; KLK10 ; KLK12 ; KLK13 ; KLK14  
 ; KLK15 ; KLK3 ; KLK4 ; KLK5 ; KLK6 ; KLK9 ; KRT1 ; KRT  
 19 ( ケラチン19 ) ; KRT2A ; KRTHB6 ( 毛髪特異的II型ケラチン ) ; LA  
 MA5 ; LEP ( レプチン ) ; Lingo - p75 ; Lingo - Troy ; LPS ; L  
 TA ( TNF - b ) ; LTB ; LTB4R ( GPR16 ) ; LTB4R2 ; LTBR ; M  
 ACMARCKS ; MAG又はOmgp ; MAP2K7 ( c - Jun ) ; MDK ; MIB  
 1 ; ミドカイン ; MIF ; MIP - 2 ; MKI67 ( Ki - 67 ) ; MMP2 ; MMP9  
 ; MS4A1 ; MSMB ; MT3 ( メタロチオネクチン - III ) ; MTSS1 ; MUC  
 1 ( ムチン ) ; MYC ; MYD88 ; NCK2 ; ニューロカン ; NFKB1 ; NFKB2  
 ; NGFB ( NGF ) ; NGFR ; NgR - Lingo ; NgR - Nogo66 ( Nogo  
 o ) ; NgR - p75 ; NgR - Troy ; NME1 ( NM23A ) ; NOX5 ; NPP

10

20

30

40

50

B ; NROB1 ; NR0B2 ; NR1D1 ; NR1D2 ; NR1H2 ; NR1H3 ; NR1H4 ; NR1I2 ; NR1I3 ; NR2C1 ; NR2C2 ; NR2E1 ; NR2E3 ; NR2F1 ; NR2F2 ; NR2F6 ; NR3C1 ; NR3C2 ; NR4A1 ; NR4A2 ; NR4A3 ; NR5A1 ; NR5A2 ; NR6A1 ; NRP1 ; NRP2 ; NT5E ; NTN4 ; ODZ1 ; OPRD1 ; P2RX7 ; PAP ; PART1 ; PATE ; PAWR ; PCA3 ; PCNA ; PDGFA ; PDGFB ; PECAM1 ; PF4 (CXCL4) ; PGF ; PGR ; フォスファカン ; PIAS2 ; PIK3CG ; PLAU (uPA) ; PLG ; PLXDC1 ; PPBP (CXCL7) ; PPID ; PR1 ; PRKCQ ; PRKD1 ; PRL ; PROC ; PROK2 ; PSAP ; PSCA ; PTAFR ; PTE ; N ; PTGS2 (COX-2) ; PTN ; RAC2 (p21Rac2) ; RARB ; RGS1 ; RGS13 ; RGS3 ; RNF110 (ZNF144) ; ROBO2 ; S100A2 ; SCGB1D2 (リポフィリンB) ; SCGB2A1 (マンマグロビン2) ; SCGB2A2 (マンマグロビン1) ; SCYE1 (内皮単球活性化サイトカイン) ; SDF2 ; SERPINA1 ; SERPINA3 ; SERPINB5 (マズピン) ; SERPINE1 (PAI-1) ; SERPINF1 ; SHBG ; SLA2 ; SLC2A2 ; SLC3A1 ; SLC4A3A1 ; SLIT2 ; SPP1 ; SPRR1B (Spr1) ; ST6GAL1 ; STAB1 ; STAT6 ; STEAP ; STEAP2 ; TB4R2 ; TBX21 ; TCP10 ; TDGF1 ; TEK ; TGFA ; TGFB1 ; TGFB1I1 ; TGFB2 ; TGFB3 ; TGFB I ; TGFB R1 ; TGFB R2 ; TGFB R3 ; TH1L ; THBS1 (トロンボスポンディン-1) ; THBS2 ; THBS4 ; THPO ; TIE (Tie-1) ; TIMP3 ; 組織因子 ; TLR10 ; TLR2 ; TLR3 ; TLR4 ; TLR5 ; TLR6 ; TLR7 ; TLR8 ; TLR9 ; TNF ; TNF-a ; TNFAIP2 (B94) ; TNFAIP3 ; TNFRSF11A ; TNFRSF1A ; TNFRSF1B ; TNFRSF21 ; TNFRSF5 ; TNFRSF6 (Fas) ; TNFRSF7 ; TNFRSF8 ; TNFRSF9 ; TNFSF10 (TRAIL) ; TNFSF11 (TRANCE) ; TNFSF12 (APO3L) ; TNFSF13 (April) ; TNFSF13B ; TNFSF14 (HVEM-L) ; TNFSF15 (VEGI) ; TNFSF18 ; TNFSF4 (OX40リガンド) ; TNFSF5 (CD40リガンド) ; TNFSF6 (FasL) ; TNFSF7 (CD27リガンド) ; TNFSF8 (CD30リガンド) ; TNFSF9 (4-1BBリガンド) ; TOLLIP ; トール様受容体 ; TOP2A (トポイソメラーゼIIa) ; TP53 ; TPM1 ; TPM2 ; TRADD ; TRAF1 ; TRAF2 ; TRAF3 ; TRAF4 ; TRAF5 ; TRAF6 ; TREM1 ; TREM2 ; TRPC6 ; TSLP ; TWEAK ; VEGF ; VEGFB ; VEGFC ; ベルシカン ; VHLC5 ; VLA-4 ; XCL1 (リンホタクチン) ; XCL2 (SCM-1b) ; XCR1 (GPR5/CCXCR1) ; YY1及びZFPM2からなる群から選択される1つ又はそれ以上の標的に結合することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0039】

発明の詳細な説明

本発明は、2つ又はそれ以上の抗原に結合することが可能な多価及び/又は多重特異的結合タンパク質に関する。具体的には、本発明は、二重可変ドメイン免疫グロブリン(DVD-Ig)及びその医薬組成物並びにこのようなDVD-Igを作製するための核酸、組み換え発現ベクター及び宿主細胞に関する。インビトロ又はインビボの何れかで、特異的抗原を検出するために本発明のDVD-Igを使用する方法も、本発明によって包含される。

【0040】

本明細書に別段の定義がなければ、本発明に関連して使用される科学及び技術用語は、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、用語の意味及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、全ての辞書又は本明細書外の定義に優越する。さらに、文脈上

10

20

30

40

50



別段の必要がなければ、単数形の用語は複数形を含むものとし、複数形の用語は単数を含むものとする。本願において、「又は」の使用は、別段の記載がなければ、「及び/又は」を意味する。さらに、「含んでいる」という用語並びに「含む」及び「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」又は「成分」などの用語は、別段の記載がなければ、一つのユニットを含む要素及び成分並びに1より多いサブユニットを含む要素及び成分を包含する。

【0041】

一般的に、本明細書に記載されている細胞及び組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学並びにタンパク質及び核酸化学及びハイブリッド形成に関連して使用される命名法及びこれらの技術は、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、本発明の方法及び技術は、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、並びに本明細書を通じて引用及び論述されている様々な一般的参考文献及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。酵素反応及び精製技術は、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、又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、合成有機化学及び医薬品化学及び薬化学に関して使用される命名法、並びに本明細書に記載されている分析化学、合成有機化学及び医薬品化学及び薬化学の実験室操作及び技術は、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、及び送達、及び患者の治療に対しては、標準的な技術を使用し得る。

【0042】

本発明をさらに容易に理解し得るように、幾つかの用語を以下に定義する。

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」及び「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、固有又は人工のタンパク質、タンパク質断片及びタンパク質配列のポリペプチド類縁体を包含する。ポリペプチドは、単量体又は多量体であり得る。

【0043】

「単離されたタンパク質」又は「単離されたポリペプチド」という用語は、その由来起源又は由来源のために、その固有の状態において当該タンパク質又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又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、又は天然には存在しない。従って、化学的に合成されたポリペプチド、又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。

【0044】

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。

【0045】

本明細書において使用される「生物学的活性」とは、抗原の全ての固有の生物学的特性を表す。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及び酵素活性が含まれるが、これらに限定されない。

【0046】

第二の化学種との抗体、タンパク質又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」又は「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、抗原決定基又はエピトープ）の存在に依存し、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

10

20

30

40

50

。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」及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。

【0047】

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）鎖及び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）分子又はIg分子の本質的なエピトープ結合特性を保持した全ての機能的分子、変異体、バリエーション又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、バリエーション又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。

10

【0048】

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又はVHと略称される。）及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及び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又はVLと略称される。）及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及び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及び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及び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及びIgY）、クラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2）又はサブクラスであり得る。

20

【0049】

「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領域又はバリエーション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ドメイン及び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 US PAT NOS 5,648,260; 5624821）。抗体のFc部分は、幾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）及び抗体の半減期/排除速度及び抗原-抗体複合体を媒介する。幾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、又は有害である場合さえあり得る。ある種のヒトIgGイソタイプ、特に、IgG1及びIgG3は、それぞれ、FcR及び補体C1qへの結合を介して、ADCC及び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.）。従って、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及び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 E

30

40

50

x p 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かもしれない。しかしながら、半Ig分子は、通常の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、本発明の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。

#### 【0050】

本明細書において使用される抗体の「抗原結合部分」(又は単に「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つ又はそれ以上の断片を表す。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、二重特異的又は多重特異的フォーマットでもあり得、2つ又はそれ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」という用語に包含される結合断片の例には、(i) Fab断片(VL、VH、CL及びCH1ドメインからなる一価断片)、(ii) F(ab')<sub>2</sub>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及びCH1ドメインからなるFd断片、(iv) 抗体の単一アームのVL及び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 publication WO 90/05144 A1(参照により本明細書に組み込まれる。))及び(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及び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及び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; and Huston 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及び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 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); and US Patent NO. 5,641,870)。

【0051】

本明細書を通じて、「多価結合タンパク質」という用語は、2つ又はそれ以上の抗原結

10

20

30

40

50

合部位を含む結合タンパク質を表すために使用される。多価結合タンパク質は、好ましくは、3つ又はそれ以上の抗原結合部位を有するように加工され、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つ又はそれ以上の関連する標的又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。本発明の二重可変ドメイン(DVD)結合タンパク質は、2つ又はそれ以上の抗原結合部位を含み、四価又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。)、又は多重特異的(すなわち、2つ又はそれ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ポリペプチド及び2つの軽鎖DVDポリペプチドを含むDVD結合タンパク質は、DVDIgと表される。DVDIgの各半分は、重鎖DVDポリペプチド及び軽鎖DVDポリペプチド及び2つの抗原結合部位を含む。各結合部位は、重鎖可変ドメイン及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關与する。

10

#### 【0052】

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mAの化学的連結によって(Staerz, U. D., et al., Nature, 1985. 314(6012): p. 628-31参照)、又はノブ・イントウ・ホール若しくは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 U S A, 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(又はエピトープ)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(又はエピトープ)に結合する。この定義によって、二特異的抗体は、(特異性及び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。

20

#### 【0053】

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(又はエピトープ)に結合することが可能な完全長抗体を表す(PCT publication WO 02/02773参照)。従って、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。

30

#### 【0054】

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何れか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。

40

#### 【0055】

「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语である。このようなサイトカインの例は、リンホカイン、モノカイン及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及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)及び黄体形成ホルモンなどの糖タンパク質ホルモン；肝細胞増殖因子；繊維芽細胞増殖因子；プロラクチン；胎盤性ラクトゲン；腫瘍壊死因子 - 及び -

50

；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；インヒピン；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；TGF - 及び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及び - 11；エリスロポエチン(EPO)；骨誘導因子；インターフェロン - 、 - 及び - 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)；及び顆粒球 - 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 - 23などのインターロイキン(IL)；TNF - 又はTNF - などの腫瘍壊死因子；並びにLIF及びキットリガンド(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、天然源から又は組み換え細胞培養から得られるタンパク質及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。

10

#### 【0056】

「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つ又はそれ以上のアミノ酸残基を含むポリペプチドを表し、1つ又はそれ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) Structure 2:1121-1123参照)。好ましいリンカーには、AKTTPKLEEGEFSEAR; AKTTPKLEEGEFSEARV; AKTTPKLG; SAKTTPKLG; AKTTPKLEEGEFSEARV; SAKTTP; SAKTTPKLG; RADAAP; RADAAPTVS; RADA AAAGPGS; RADA AAA(G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>; SAKTTP; SAKTTPKLG; SAKTTPKLEEGEFSEARV; ADAAP; ADAAPTVSIFPP; TVAAP; TVAAPSVFIFPP; QPKAAP; QPKAAPSVTLFPP; AKTTPP; AKTTPPSVTLAP; AKTTAP; AKTTAPSVYPLAP; ASTKGP; ASTKGPSVFPLAPが含まれるが、これらに限定されない。

20

#### 【0057】

免疫グロブリン定常ドメインは、重鎖又は軽鎖定常ドメインを表す。ヒトIgG重鎖及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。

30

#### 【0058】

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、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、各モノクローナル抗体は、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、何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。

40

#### 【0059】

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及び定常領域を有する抗体を含むものとする。本発明のヒト抗体は、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若しくは部位特異的突然変異導入によって、又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。

50

## 【0060】

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I I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（例えば、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; Little M. et al (2000) *Immunology Today* 21: 364 - 370参照）又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何れかの手段によって調製され、発現され、作製され、若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、若しくは単離された全てのヒト抗体を含むものとする。このような組換えヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域及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、このような組換えヒト抗体は、インビトロ突然変異導入（又は、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、インビボ体細胞突然変異導入）に供され、従って、組換え抗体のVH及びVL領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列VH及び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

20

## 【0061】

「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つ又はそれ以上のCDR中に、抗原に対する抗体の親和性の改善をもたらす1つ又はそれ以上の変化を有する抗体である。好ましい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、又は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及び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及び/又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); 及びHawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226: 889 - 896 (1992)によって記載されている。

30

40

## 【0062】

「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及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及び軽鎖可変領域配列並びに別の種に由来する定常領域配列を含む抗体を表す。

## 【0063】

「CDR移植された抗体」という用語は、マウスCDRの1つ又はそれ以上（例えば、CDR3）がヒトCDR配列で置換されているマウス重鎖及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及び軽鎖可変領域配列を含むが、VH及び/又はVLのCDR領域の1つ又はそれ以上の配列が、別の種のCDR配列と置換されている抗体を表す。

## 【0064】

50

「ヒト化抗体」という用語は、ヒト以外の種（例えば、マウス）由来の重鎖及び軽鎖可変領域配列を含むが、VH及び/又は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及び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。

【0065】

「Kabata番号」、「Kabata定義」及び「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、抗体又はその抗原結合部分の重鎖及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 and, 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及び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及びCDR3に対するアミノ酸位置89から97にわたる。

【0066】

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。重鎖及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及び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、抗体の何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、Kabata CDRと称され得る。Chothia及び共同研究者（Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) and Chothia et al., Nature 342:877-883 (1989))は、Kabata CDR内のある種の亜部分が、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。これらの亜部分は、L1、L2及びL3又はH1、H2及びH3（「L」及び「H」は、それぞれ、軽鎖及び重鎖領域を表記する。）と表記される。これらの領域は、Chothia CDRと称される場合があり、これは、Kabata CDRと重複する境界を有する。Kabata CDRと重複するCDRを定義する他の境界が、Padlan (FASEB J. 9:133-139 (1995))及び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、Kabata CDRと重複するが、これらは、残基又は場合によってCDR全体の特定の残基又は基が、抗原結合に著しい影響を与えないという予測又は実験的な発見に照らして、短縮又は延長され得る。本明細書に使用されている方法は、これらの系の何れかに従って定義されたCDRを使用し得るが、好ましい実施形態は、Kabata又はChothiaによって定義されたCDRを使用する。

【0067】

本明細書で使用される「フレームワーク」又は「フレームワーク配列」という用語は、

10

20

30

40

50

C D Rを差し引いた可変領域の残りの配列を表す。C D R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C D R（軽鎖のC D R - L 1、 - L 2及び - L 3並びに重鎖のC D R - H 1、 - H 2及び - H 3）は、軽鎖及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（F R 1、F R 2、F R 3及びF R 4）に分割し、C D R 1はF R 1とF R 2の間に位置し、C D R 2はF R 2とF R 3の間に、C D R 3はF R 3とF R 4の間に位置する。他者によって表記されるように、F R 1、F R 2、F R 3又はF R 4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F Rを表す。本明細書において使用される、1つのF Rは、4つの亜領域の1つを表し、複数のF Rは、フレームワーク領域を構成する4つの亜領域の2つ又はそれ以上を表す。

10

## 【0068】

本明細書において使用される「生殖系列抗体遺伝子」又は「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及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）。本発明の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

## 【0069】

本明細書において使用される「ヒト化抗体」という用語は、目的の抗原に免疫特異的に結合し、並びに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（F R）領域及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（C D R）を含む抗体又はそのバリエーション、誘導体、類縁体若しくは断片である。C D R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C D Rのアミノ酸配列に対して、少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を有するC D Rを表す。ヒト化抗体は、少なくとも1つの、典型的には2つの可変ドメイン（F a b、F a b'、F（a b'）<sub>2</sub>、F a b C、F v）の全てを実質的に含み、C D R領域の全て又は実質的に全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、及びフレームワーク領域の全て又は実質的に全てが、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである。好ましくは、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（F c）の少なくとも一部を含む。幾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C H 1、ヒンジ、C H 2、C H 3及びC H 4領域も含み得る。幾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。幾つかの実施形態において、ヒト化抗体は、ヒト化重鎖のみを含有する。特定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及び/

30

40

## 【0070】

本明細書において使用される「中和」という用語は、結合タンパク質がサイトカインに特異的に結合して、サイトカインの生物学的活性を中和することを表す。好ましくは、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%又はそれ以上、その生物学的活性を低下させる。

## 【0071】

「活性」という用語は、2つ又はそれ以上の抗原に対するD V D - I gの結合特異性/親和性などの活性を含む。

## 【0072】

50



「エピトープ」という用語には、免疫グロブリン又は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、ホスホリル又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及び/又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、タンパク質及び/又は高分子の複雑な混合物中で、その標的抗原を優先的に認識する場合に、抗体は抗原を特異的に結合すると称される。

【0073】

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、BIAcore システム (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and 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; Johnson, B., et al. (1995) *J. Mol. Recognit.* 8:125-131; and Johnson, B., et al. (1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277 を参照されたい。

10

20

【0074】

本明細書において使用される「 $K_{on}$ 」という用語は、本分野において公知であるように、抗体/抗原複合体を形成するための抗原への抗体の会合に対する結合速度定数を表すものとする。

【0075】

本明細書において使用される「 $K_{off}$ 」という用語は、本分野において公知であるように、抗体/抗原複合体からの抗体の解離に対する解離速度定数を表すものとする。

【0076】

本明細書において使用される「 $K_d$ 」という用語は、本分野において公知であるように、特定の抗体抗原相互作用の解離定数を表すものとする。

30

【0077】

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。好ましくは、標識は、検出可能なマーカーであり、例えば、放射性標識されたアミノ酸の取り込み、又は印を付けたアビジン (例えば、光学的方法又は比色分析法によって検出することができる、蛍光マーカー又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又は放射性核種 (例えば、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{166}\text{Ho}$  又は  $^{153}\text{Sm}$ ) ; 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) ; 及びガドリニウムキレートなどの磁気因子が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0078】

「連結体」という用語は、第二の化学部分 (治療剤又は細胞毒性剤など) 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、「因子」という用語は、化学的化合物、化学的化合物の混合物、生物学的高分子又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。好ましくは、治療剤又は細胞毒性因子には、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

50

イトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビクリスチン、ピンラスチン、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、プロプラノロール及びピューロマイシン並びにこれらの類縁体又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。

【0079】

本明細書において使用される「結晶」及び「結晶化された」という用語は、結晶の形態で存在する抗体又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、非晶質の固体状態又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）又は分子集合体（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関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又は構築ブロックは、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。全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。Gieger, R. and Ducruix, A. Barrett, *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach, 2nd ed., pp. 201-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999)* を参照されたい。

10

20

【0080】

本明細書において使用される「ポリヌクレオチド」という用語は、2つ又はそれ以上のヌクレオチド（リボヌクレオチド若しくはデオキシヌクレオチドの何れかまたはヌクレオチドの何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の一本鎖及び二本鎖形態を含むが、好ましくは、二本鎖DNAである。

【0081】

本明細書において使用される「単離されたポリペプチド」という用語は、（例えば、ゲノム、cDNA若しくは合成起源又はこれらの幾つかの組み合わせの）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又は一部と会合していない、本来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、又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。

30

【0082】

本明細書において使用される「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及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、宿主細胞中への導入されて、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、「組換え発現ベクター」（又は単に、「発現ベクター」と称される。一般に、組換え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」及び「ベクター」は互換的に使用され得る。しかしながら、本発明は、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、アデノウイルス及びアデノ随伴ウイルス）発現ベクターのような他の形態を含むものとする。

40

50

## 【 0 0 8 3 】

「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及び目的の遺伝子を調節するように、トランスにて又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及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、プロモーター及びエンハンサー配列；スプライシング及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；及び所望であれば、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及び転写終結配列を含む。真核生物では、一般に、このような調節配列には、プロモーター及び転写終結配列が含まれ得る。「調節配列」という用語は、その存在が発現及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、リーダー配列及び融合対配列も含むことが可能である。

10

## 【 0 0 8 4 】

本明細書において記載される「形質転換」とは、外来DNAが宿主細胞に入る全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、自然の条件又は人工の条件下で起こり得る。形質転換は、原核又は真核宿主細胞中へ外来核酸配列を挿入するための何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、リポフェクション及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、又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又は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。

20

## 【 0 0 8 5 】

本明細書において使用される「組換え宿主細胞」（又は単に、「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。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。突然変異又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。好ましくは、宿主細胞には、生物の何れかの界から選択される原核及び真核細胞が含まれる。好ましい真核細胞には、原生動物、真菌、植物及び動物細胞が含まれる。最も好ましくは、宿主細胞には、原核細胞株イー・コリ；哺乳動物細胞株CHO、HEK293及びCOS；昆虫細胞株Sf9及び真菌細胞サッカロミセス・セレビシアエが含まれるが、これらに限定されるものではない。

30

## 【 0 0 8 6 】

組換えDNA、オリゴヌクレオチド合成及び組織培養及び形質転換（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。酵素反応及び精製技術は、製造業者の説明書に従って、又は本分野で一般的に遂行されているように、又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、先述の技術及び手順は、本分野で周知の慣用的な方法に従い、並びに本明細書を通じて引用及び論述されている様々な一般的参考文献及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))」（参照により、あらゆる目的のために、本明細書に組み込まれる。）を

40

50

参照されたい。

【0087】

本分野において公知であり、及び本明細書において使用されている「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（又は生物の子孫）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及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つ又はそれ以上の細胞種又は組織中で、コードされた遺伝子産物の発現を誘導する。

【0088】

「制御する」又は「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）の変化又は変更を表す。調節は、目的の分子の一定の活性又は機能の規模の増加又は減少であり得る。分子の典型的な活性及び機能には、結合特性、酵素活性、細胞受容体活性化及びシグナル伝達が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0089】

これに対応して、本明細書において使用される「調節物質」という用語は、目的の分子の活性又は機能（例えば、サイトカインの生物学的活性）を変化又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又は機能の規模と比べて、分子のある種の活性又は機能の規模の増加又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つの活性又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、炭水化物又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、WO 01/83525に記載されている。

20

【0090】

本明細書において使用される「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又は機能の規模と比べて、分子のある種の活性又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、炭水化物又は抗原に結合する他の全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。

【0091】

本明細書において使用される「アンタゴニスト」又は「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又は機能の規模と比べて、分子のある種の活性又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、抗原の生物学的又は免疫学的活性を遮断又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及び阻害剤には、タンパク質、核酸、炭水化物又は抗原に結合する他の全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。

30

【0092】

本明細書において使用される「有効量」という用語は、疾患若しくはその1つ若しくはそれ以上の症候の重度及び/又は持続時間を低下若しくは軽減し、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つ若しくはそれ以上の症候の再発、発達、発症若しくは進行を予防し、疾患を検出し、又は別の療法（例えば、予防的又は治療的剤）の予防的又は治療的効果を増強若しくは改善するのに十分である療法の量を表す。

40

【0093】

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、生物又は生物であったものから得られた物質の何れかの量を含むが、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、ウサギ及びその他の動物が含まれるが、これらに限定されない。このような物質には、血液、血清、尿、滑液、細胞、臓器、組織、骨髄、リンパ節及び脾臓が含まれるが、これらに限定されない。

50

## 【 0 0 9 4 】

## I . D V D 結合タンパク質の作製

本発明は、1つ又はそれ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及びこれを作製する方法に関する。好ましくは、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  $V D 1 - ( X 1 ) _ n - V D 2 - C - ( X 2 ) _ n$  ( $V D 1$  は第一の可変ドメインであり、 $V D 2$  は第二の可変ドメインであり、 $C$  は定常ドメインであり、 $X 1$  はアミノ酸又はポリペプチドを表し、 $X 2$  は  $F c$  領域を表し、及び  $n$  は 0 又は 1 である。) を含む。本発明の結合タンパク質は、様々な技術を用いて作製することが可能である。本発明は、発現ベクター、宿主細胞及び結合タンパク質を作製する方法を提供する。

10

## 【 0 0 9 5 】

## A . 親モノクローナル抗体の作製

D V D 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及びモノクローナル抗体など、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、又は組み換え技術によって作製され得る。

## 【 0 0 9 6 】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ、組み換え及びファージディスプレイ技術又はこれらの組み合わせの使用など、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、モノクローナル抗体は、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、参照により全体が組み込まれる。)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、原核又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、高い抗体産生及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、又は細胞培養中で、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。好ましい実施形態において、ハイブリドーマはマウスハイブリドーマである。別の好ましい実施形態において、ハイブリドーマは、ラット、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウシ又はウマなど、非ヒト非マウス種の中で産生され得る。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。

20

30

## 【 0 0 9 7 】

また、組み換えモノクローナル抗体は、U.S. Patent No. 5,627,052, PCT Publication WO92/02551 及び 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、重鎖及び軽鎖可変領域 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 又は 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

40

50

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、さらに分析及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 Publication WO97/29131及びPCT Publication 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。

【0098】

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幾つか又は全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。好ましい実施形態において、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)並びにUnited States Patents 5,916,771, 5,939,598, 5,985,615, 5,998,209, 6,075,181, 6,091,001, 6,114,598及び6,130,364を参照されたい。1991年7月25日に公開されたWO91/1074、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及びWO96/33735、1998年4月23日に公開されたWO98/16654、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 0009560及び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Mabを生成する。XENOMOUSEトランスジェニックマウスは、ヒト重鎖遺伝子座及び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) (これらの開示内容は、参照により、本明細書に組み込まれる。)を参照されたい。

【0099】

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. U.S. Patent No. 5,223,409; Kang et al. PCT Publication No. WO 92/18619; Dower et al. PCT Publication No. WO 91/17271; Winter et al. PCT Publication No. WO 92/20791; Markland et al. PCT Publication No. WO 92/15679; Breitling et al. PCT Publication No. WO 93/01288; McCafferty et al. PCT Publication No. WO 92/01047; Garrard et al. PCT Publication No. WO 92/09690; Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9:1370-1372; Hay et al. (1992) Hum Antibod Hybriomas 3:81-85; Huse et al. (1989) Science 246:1275-1281; McCafferty et al., Nature (1990) 348:552-554; Griffiths et al. (1993) EMBO J 12:725-734; Hawkins et al. (1992) J

10

20

30

40

50

Mol Biol 226:889-896; Clackson et al. (1991) Nature 352:624-628; Gram et al. (1992) PNAS 89:3576-3580; Garrad et al. (1991) Bio/Technology 9:1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) Nuc Acid Res 19:4133-4137; and Barbas et al (1991) PNAS 88:7978-7982, US patent application publication 20030186374, and PCT Publication No. WO 97/29131 (これらの各々の内容は、参照により本明細書に組み込まれる。)に記載されている方法が含まれる。

10

## 【0100】

本発明の親抗体は、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、レパートリー又はコンビナトリアル抗体ライブラリー(例えば、ヒト又はマウス)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、標識された抗原又は固体表面若しくはビーズに結合若しくは捕捉された抗原を用いて、選択又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又は遺伝子VIIタンパク質の何れかに組み換え的に融合されたFab、Fv又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及びM13結合ドメインを含む糸状ファージである。本発明の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. Methods 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 application No. PCT/GB91/01134; PCT publications WO90/02809; WO91/10737; WO92/01047; WO92/18619; WO93/11236; WO95/15982; WO95/20401; 並びにU.S. Pat. Nos. 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743及び5,969,108」(これらの各々は、その全体が、参照により、本明細書に組み込まれる。)に開示されているものが含まれる。

20

30

## 【0101】

上記参考文献に記載されているように、ファージ選択後、ヒト抗体又は他の所望される全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及び使用し、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、酵母及び細菌など、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 publication WO92/22324; Mullinax et al., BioTechniques 12(6):864-869 (1992); 及びSawai et al., AJRI 34:26-34 (1995); 及びBetter et al., Science 240:1041-1043 (1988)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'及びF(ab')<sub>2</sub>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(前記参考文献は、参照により、それらの全体が組み込まれる。)。一本鎖Fv及び抗体を作製するため

40

50

に使用することが可能な技術の例には、U.S. Pat. 4,946,778及び5,258,498; Huston et al., *Methods in Enzymology* 203:46-88(1991); Shu et al., *PNAS* 90:7995-7999(1993);並びにSkerra et al., *Science* 240:1038-1040(1988)に記載されているものが含まれる。

#### 【0102】

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及びRobertsによるPCT Publication NO. WO 98/31700並びに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及びこれがコードするペプチド又はタンパク質の間に共有結合的融合物が作製される。従って、特異的なmRNAは、コードされているペプチド又はタンパク質、例えば抗体又はその一部の特性(抗体又はその一部の、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、抗体又はその一部をコードする核酸配列は、上述の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、又は上述のように、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。

#### 【0103】

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、レポトリー又はコンビナトリアル抗体ライブラリー(例えば、ヒト又はマウス)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Witttrup, et al. U.S. Patent NO. 6,699,658に開示されているものが含まれる。

#### 【0104】

上記抗体は、CDR移植された及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及び軽鎖可変領域配列を含み、 $V_H$ 及び/又は $V_L$ のCDR領域の1つ又はそれ以上が、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の組み合わせは、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。従って、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ことが好ましい。CDRを除くヒト及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ことがより好ましい。CDRを除くヒト及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ことがさらに好ましい。CDRを除くヒト及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とが最も好ましい。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(E

10

20

30

40

50



P 2 3 9 , 4 0 0 ; P C T p u b l i c a t i o n W O 9 1 / 0 9 9 6 7 ; U . S .  
 P a t . N o s . 5 , 2 2 5 , 5 3 9 ; 5 , 5 3 0 , 1 0 1 ; 及 び 5 , 5 8 5 , 0 8  
 9 参 照 ) 、 ベ ニ ア リ ン グ ( v e n e e r i n g ) 又 は リ サ ー フ ェ シ ン グ ( r e s u r f a  
 c i n g ) ( E P 5 9 2 , 1 0 6 ; E P 5 1 9 , 5 9 6 ; P a d l a n , M o l e c  
 u l a r I m m u n o l o g y 2 8 ( 4 / 5 ) : 4 8 9 - 4 9 8 ( 1 9 9 1 ) ; S t  
 u d n i c k a e t a l . , P r o t e i n E n g i n e e r i n g 7 ( 6 ) : 8  
 0 5 - 8 1 4 ( 1 9 9 4 ) ; R o g u s k a e t a l . , P N A S 9 1 : 9 6 9 -  
 9 7 3 ( 1 9 9 4 ) ) , 及 び チ ェ ー ン シ ャ ッ プ リ ン グ ( U . S . P a t . N O . 5 ,  
 5 6 5 , 3 5 2 ) 。

【 0 1 0 5 】

ヒト化抗体は、非ヒト種に由来する1つ又はそれ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](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi)  
 ; [www.atcc.org/phage/hdb.html](http://www.atcc.org/phage/hdb.html); [www.sciquest.com/](http://www.sciquest.com/);  
[www.abcam.com/](http://www.abcam.com/); [www.antibodyresource.com/onlinecomp.html](http://www.antibodyresource.com/onlinecomp.html); [www.public.iastate.edu/.about.pedro/research\\_tools.html](http://www.public.iastate.edu/.about.pedro/research_tools.html); [www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html](http://www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html);  
[www.whfreeman.com/immunology/CH-05/kuby05.htm](http://www.whfreeman.com/immunology/CH-05/kuby05.htm); [www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html](http://www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html); [www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/](http://www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/);  
[www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/m.-ikeimages.html](http://www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/m.-ikeimages.html); [www.antibodyresource.com/](http://www.antibodyresource.com/);  
[mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html](http://mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html). [www.immunologylink.com/](http://www.immunologylink.com/);  
[pathbox.wustl.edu/.about.hcenter/index.html](http://pathbox.wustl.edu/.about.hcenter/index.html);  
[www.biotech.ufl.edu/.about.hcl/](http://www.biotech.ufl.edu/.about.hcl/);  
[www.pebio.com/pa/340913/340913.html](http://www.pebio.com/pa/340913/340913.html) - ; [www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/](http://www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/);  
[www.m.ehime-u.ac.jp/.about.yasuhito-/Elisa.html](http://www.m.ehime-u.ac.jp/.about.yasuhito-/Elisa.html); [www.biodesign.com/table.asp](http://www.biodesign.com/table.asp); [www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html](http://www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html);  
[www.biotech.ufl.edu/.about.fccl/protocol.html](http://www.biotech.ufl.edu/.about.fccl/protocol.html);  
[www.isac-net.org/sites\\_geo.html](http://www.isac-net.org/sites_geo.html);  
[aximtl.imt.uni-marburg.de/.about.rek/AEP-Start.html](http://aximtl.imt.uni-marburg.de/.about.rek/AEP-Start.html);  
[baserv.uci.kun.nl/.about.jraats/links1.html](http://baserv.uci.kun.nl/.about.jraats/links1.html);  
[www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/](http://www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/);  
[www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html](http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html);  
[www.ibt.unam.mx/vir/V\\_mice.html](http://www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html);  
[imgt.cnusc.fr:8104/](http://imgt.cnusc.fr:8104/);  
[www.biochem.ucl.ac.uk/.about.martin/abs/index.html](http://www.biochem.ucl.ac.uk/.about.martin/abs/index.html);  
[antibody.bath.ac.uk/](http://antibody.bath.ac.uk/);  
[abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html](http://abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html);  
[www.unizh.ch/.about.honegger/AHOseminar/Slide01.html](http://www.unizh.ch/.about.honegger/AHOseminar/Slide01.html);  
[www.cryst.bbk.ac.uk/.about.ubcg07s/](http://www.cryst.bbk.ac.uk/.about.ubcg07s/);  
[www.nimr.mrc.ac.uk/CC/caewg/caewg.htm](http://www.nimr.mrc.ac.uk/CC/caewg/caewg.htm);  
[www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/humanisation/TAHHP.html](http://www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/humanisation/TAHHP.html);  
[www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat\\_aim.html](http://www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html);  
[www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html](http://www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html)

10

20

30

40

50

; www.crysbio.cam.ac.uk/abo-ut.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) (各々、参照により、全体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、又は結合、親和性、結合速度、解離速度、結合力、特異性、半減期若しくは本分野で公知の他の何れかの適切な特性を減少、増強若しくは修飾するために使用することが可能である。

【0106】

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、好ましくは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、及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、Queen et al., U.S. Pat. NO. 5,585,089; Riechmann et al., Nature 332:323 (1988) (これらは、その全体が、本明細書中に参照により組み込まれる。)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及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、コンセンサス及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、及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 publication WO 91/09967, 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, U.S. Pat. Nos. 5,565,332,5,723.323,5,976,862,5,824,514,5,817,483,5814476,5763192,5723323,5,766886,5,714,352,6,204,023,6,180,370,5,693,762,5,530,101,5,585,089,5,225,539; 4,816,567 (各々(これらの中に引用されている参考文献を含む。)、参照により、全体が本明細書中に組み込まれる。)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。

【0107】

親モノクローナル抗体は、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モノクローナル抗体から選択され得る。これらには、抗TNF抗体(US Patent NO. 6, 258, 562)、抗IL-12及び/又は抗IL-12p40抗体(US Patent No. 6, 914, 128);抗IL-18抗体(US 2005/0147610A1)、抗C5、抗CBL、抗CD147、抗gp120、抗VLA-4、抗CD11a、抗CD18、抗VEGF、抗CD40L、抗Id、抗ICAM-1、抗CXCL13、抗CD2、抗EGFR、抗TGF-2、抗E-セレクトリン、抗第VII因子、抗Her2/neu、抗Fgp、抗CD11/18、抗CD14、抗ICAM-3、抗CD80、抗CD4、抗CD3、抗CD23、抗2-インテグリン、抗47、抗CD52、抗HLADR、抗CD22、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-8、抗IL-9、抗IL-13、抗IL-13受容体、抗IL-17及び抗IL-23(Presta LG. 2005 Selection, design, and engineering of therapeutic antibodies J Allergy Clin Immunol. 116:731-6及び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

【0108】

親モノクローナル抗体は、使用が認可された、臨床試験中の又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<sup>(R)</sup>, IDEC/Genentech/Roche)(例えば、U.S. Pat. NO. 5, 736, 137参照)、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、U.S. Pat. NO. 5, 500, 362に記載されている抗CD20抗体、AME-133(Applied Molecular Evolution)、hA20(Immunomedics, Inc.)、HumaLYM(Intracel)及びPRO70769(「Immunoglobulin Variants and Uses Thereof」と題されたPCT/US2003/040426)、トラスツズマブ(Herceptin<sup>(R)</sup>, Genentech)(例えば、U.S. Pat. NO. 5, 677, 171参照)、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<sup>(R)</sup>)、Genentechによって現在開発中;U.S. Pat. No. 4, 753, 894に記載されている抗Her2抗体;セツキシマブ(Erbix<sup>(R)</sup>, Imclone)(U.S. Pat. NO. 4, 943, 533;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(U.S. Pat. NO. 6, 235, 883)、Abgenix-ImmuneX-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及びEMD72000(Merck KGaA)(U.S. Pat. NO. 5, 558, 864;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;Modjta

30

40

50

h e d i e t a l , 1 9 9 6 , B r J C a n c e r . 7 3 ( 2 ) : 2 2 8 - 3 5  
 ; M o d j t a h e d i e t a l , 2 0 0 3 , I n t J C a n c e r , 1 0 5 ( 2 ) : 2 7 3 - 8 0 ) ; T h e r a C I M h R 3 ( Y M B i o s c i e n c e s , C a n a d a a n d C e n t r o d e I m m u n o l o g i a M o l e c u l a r , C u b a ( U . S . P a t . N O . 5 , 8 9 1 , 9 9 6 ; U . S . P a t . N O . 6 , 5 0 6 , 8 8 3 ; M a t e o e t a l , 1 9 9 7 , I m m u n o t e c h n o l o g y , 3 ( 1 ) : 7 1 - 8 1 ) ; m A b - 8 0 6 ( L u d w i g I n s t i t u e f o r C a n c e r R e s e a r c h , M e m o r i a l S l o a n - K e t t e r i n g ) ( J u n g b l u t h e t a l . 2 0 0 3 , P r o c N a t l A c a d S c i U S A . 1 0 0 ( 2 ) : 6 3 9 - 4 4 ) ; K S B - 1 0 2 ( K S B 1 0  
 i o m e d i x ) ; M R 1 - 1 ( I V A X , N a t i o n a l C a n c e r I n s t i t u t e ) ( P C T W O 0 1 6 2 9 3 1 A 2 ) ; 及 び S C 1 0 0 ( S c a n c e l l ) ( P C T W O 0 1 / 8 8 1 3 8 ) ; ア レ ム ツ ズ マ ブ ( C a m p a t h <sup>(R)</sup> , M i l l e n i u m ) 、 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 モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体 ; ム コ モ ナ ブ - C D 3 ( O r t h o c l o n e O K T 3 <sup>(R)</sup> ) 、 O r t h o B i o t e c h / J o h n s o n & J o h n s o n に よ っ て 開 発 さ れ た 抗 C D 3 抗 体 、 イ ブ リ ツ モ マ ブ ・ チ ウ キ セ タ ン ( Z e v a l i n <sup>(R)</sup> ) 、 I D E C / S c h e r i n g A G に よ っ て 開 発 さ れ た 抗 C D 2 0 抗 体 、 ゲ ム ツ ズ マ ブ ・ オ ソ ガ マ イ シ ン ( M y l o t a r g <sup>(R)</sup> ) 、 C e l l t e c h / W y e t h に よ っ て 開 発 さ れ た 抗 C D 3 3 ( p 6 7 タ ン パ ク 質 ) 抗 体 、 ア レ フ ア セ プ ト ( A m e v i v e <sup>(R)</sup> ) 、 B i o g e n ) に よ っ 20  
 て 開 発 さ れ た 抗 L F A - 3 F c 融 合 、 C e n t o c o r / L i l l y に よ っ て 開 発 さ れ た ア ブ シ キ シ マ ブ ( R e o P r o <sup>(R)</sup> ) 、 N o v a r t i s に よ っ て 開 発 さ れ た バ シ リ キ シ マ ブ ( S i m u l e c t <sup>(R)</sup> ) 、 M e d i m m u n e に よ っ て 開 発 さ れ た パ リ ズ マ ブ ( S y n a g i s <sup>(R)</sup> ) 、 イ ン フ リ キ シ マ ブ ( R e m i c a d e <sup>(R)</sup> ) 、 C e n t o c o r に よ っ て 開 発 さ れ た 抗 T N F 抗 体 、 ア ダ リ ム マ ブ ( H u m i r a <sup>(R)</sup> ) 、 A b b o t t に よ っ て 開 発 さ れ た 抗 T N F 抗 体 、 H u m i c a d e <sup>(R)</sup> 、 C e l l t e c h に よ っ て 開 発 さ れ た 抗 T N F 抗 体 、 エ タ ネ ル セ プ ト ( E n b r e l <sup>(R)</sup> ) 、 I m m u n e x / A m g e n に よ っ て 開 発 さ れ た 抗 T N F F c 融 合 、 A B X - C B L 、 A b g e n i x に よ っ て 開 発 さ れ て い る 抗 体 C D 1 4 7 抗 体 、 A B X - I L 8 、 A b g e n i x に よ っ て 開 発 さ れ て い る 抗 I L 8 抗 体 、 A B X - M a 1 、 A b g e n i x に よ っ て 開 発 30  
 さ れ て い る 抗 M U C 1 8 抗 体 、 ペ ム ツ モ マ ブ ( R 1 5 4 9 , 9 0 Y - m u H M F G 1 ) 、 A n t i s o m a に よ っ て 開 発 中 の 抗 M U C 1 、 T h e r e x ( R 1 5 5 0 ) 、 A n t i s o m a に よ っ て 開 発 さ れ て い る 抗 M U C 1 抗 体 、 A n t i s o m a に よ っ て 開 発 さ れ て い る A n g i o M a b ( A S 1 4 0 5 ) 、 A n t i s o m a に よ っ て 開 発 さ れ て い る H u B C - 1 、 A n t i s o m a に よ っ て 開 発 さ れ て い る T h i o p l a t i n ( A S 1 4 0 7 ) 、 A n t e g r e n <sup>(R)</sup> ( ナ タ リ ズ マ ブ ) 、 B i o g e n に よ っ て 開 発 さ れ て い る 抗 - 4 - - 1 ( V L A - 4 ) 及 び - 4 - - 7 - 抗 体 、 V L A - 1 m A b 、 B i o g e n に よ っ て 開 発 さ れ て い る 抗 V L A - 1 イ ン テ グ リ ン 抗 体 、 L T B R m A b 、 B i o g e n に よ っ て 開 発 さ れ て い る 抗 リ ン ホ ト キ シ ン 受 容 体 ( L T B R ) 抗 体 、 C A T - 1 5 2 、 C a m b r i d g e A n t i b o d y T e c h n o l o g y に よ っ て 開 発 さ れ 40  
 て い る 抗 T G F - 2 抗 体 、 J 6 9 5 、 C a m b r i d g e A n t i b o d y T e c h n o l o g y 及 び A b b o t t に よ っ て 開 発 さ れ て い る 抗 I L - 1 2 抗 体 、 C A T - 1 9 2 、 C a m b r i d g e A n t i b o d y T e c h n o l o g y 及 び G e n z y m e に よ っ て 開 発 さ れ て い る 抗 T G F 1 抗 体 、 C A T - 2 1 3 、 C a m b r i d g e A n t i b o d y T e c h n o l o g y に よ っ て 開 発 さ れ て い る 抗 エ オ タ キ シ ン 1 抗 体 、 C a m b r i d g e A n t i b o d y T e c h n o l o g y 及 び H u m a n G e n o m e S c i e n c e s I n c . に よ っ て 開 発 さ れ て い る L y m p h o S t a t - B <sup>(R)</sup> 抗 B l y s 抗 体 、 T R A I L - R 1 m A b 、 C a m b r i d g e A n t i b o d y T e c h n o l o g y 及 び H u m a n G e n o m e S c i e n c e s I n c . に よ っ て 開 発 さ れ て い る 抗 T R A I L - R 1 抗 体 、 A v a s t i n <sup>(R)</sup> ベ バ シ ズ マ ブ 、 50

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<sup>(R)</sup>(オマリズマブ)、Genentechによって開発されている抗IgE抗体、Raptiva<sup>(R)</sup>(エフェリズマブ)、Genentech及びXomaによって開発されている抗CD11a抗体、MLN-02抗体(旧LDP-02)、Genentech及び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及びAmgenによって開発されている抗IL15抗体、Genmab及びMedarexによって開発されているHuMax-Inflam、HuMax-Cancer、Genmab及びMdarex及びOxford GcoSciencesによって開発されている抗ヘパラーゼI抗体、Genmab及び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及び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ィオタイプ抗体、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<sup>(R)</sup>(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<sup>(R)</sup>(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<sup>(R)</sup>(IDM-I)並びにMedarex及びImmuno-Designed Moleculesによって開発されている抗Her2抗体、HuMax<sup>(R)</sup>-CD4、Medarex及びGenmabによって開発されている抗CD4抗体、HuMax-IL15、Medarex及びGenmabによって開発されている抗IL15抗体、CNT0148、Medarex及びCentocor/J&Jによって開発されている抗TNF抗体、CNT01275、Centocor/J&Jによって開発されている抗サイトカイン抗体、MOR101及びMOR102、MorphoSysによって開発されている抗細胞間接着分子-1(ICAM-1)(CD54)抗体、MOR201、MorphoSysによって開発されている抗繊維芽細胞増殖因子受容体受容体3(FGFR-3)抗体、Nuvion<sup>(R)</sup>(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<sup>(R)</sup>、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及びNovartisによって開発されたXolair<sup>(R)</sup>(オマリズマブ)ヒト化抗IgE抗体並びにMLN01、Xomaによって開発されている抗2インテグリン抗体(本パラグラフにおいて上で引用されて

10

20

30

40

50

いる参考文献の全ては、参照により、本明細書中に明示的に組み込まれる。)が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0109】

B. 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mAb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、直接又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及びFc領域(図1A)を含む。

【0110】

可変ドメインは、上記方法の何れか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。好ましい実施形態において、可変ドメインは、マウス重鎖又は軽鎖可変ドメインである。より好ましくは、可変ドメインは、CDR移植された又はヒト化された可変重鎖又は軽鎖ドメインである。最も好ましくは、可変ドメインは、ヒト重鎖又は軽鎖可変ドメインである。

【0111】

一実施形態において、第一及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。好ましくは、2つの可変ドメインが連結されている。3つ又はそれ以上の可変ドメインも、直接又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、又は異なる抗原に結合し得る。本発明のDVD分子は、1つの免疫グロブリン可変ドメイン及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つ又はそれ以上の非Igドメインも含み得る。

【0112】

リンカー配列は、単一のアミノ酸又はポリペプチド配列であり得る。好ましくは、リンカー配列は、AKTTPKLEEGEFSEAR; AKTTPKLEEGEFSEARV; AKTTPKLG G; SAKTTPKLG G; AKTTPKLEEGEFSEARV; SAKTTP; SAKTTPKLG G; RADAAP; RADAAPT V S; RADA A A G G P G S; RADA A A A (G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>; SAKTTP; SAKTTPKLG G; SAKTTPKLEEGEFSEARV; ADAAP; ADAAPT V S I F P P; T V A A P; T V A A P S V F I F P P; Q P K A A P; Q P K A A P S V T L F P P; A K T T P P; A K T T P P S V T P L A P; A K T T A P; A K T T A P S V Y P L A P; A S T K G P; A S T K G P S V F P L A P; G G G G S G G G S G G G G S; G E N K V E Y A P A L M A L S; G P A K E L T P L K E A K V S; 及びGHEAAAVMQVQYPASからなる群から選択される。リンカー配列の選択は、幾つかのFab分子の結晶構造分析に基づいている。Fab又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残基及び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。本発明のDVD Igは、それぞれ、DVD-Igの軽鎖及び重鎖中のリンカーとしてCL又はCH1のN末端の5から6アミノ酸残基、又は11から12アミノ酸残基を用いて作製された。CL又は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、従って、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又は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、従って、リンカー及び連結から生じ得る何れの免疫原性を、大きな程度まで最小限に抑える。

【0113】

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ドメインの全ての残基は含まない。例えば、CL/CH1ドメインの最

10

20

30

40

50

初の5から12個のアミノ酸残基；軽鎖リンカーは、C<sub>1</sub>又はC<sub>2</sub>に由来することが可能であり；並びに重鎖リンカーは、C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>、C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub>、C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>、C<sub>3</sub>及びC<sub>μ</sub>を含む、何れかのイソタイプのCH<sub>1</sub>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）；ヒンジ領域に由来する配列及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。

#### 【0114】

好ましい実施形態において、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。好ましくは、連結された重鎖可変ドメインを含む配列は、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。好ましくは、定常ドメインは、それぞれ、ヒト重鎖定常ドメイン及びヒト軽鎖定常ドメインである。最も好ましくは、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領域又はバリエーションFc領域であり得る。最も好ましくは、Fc領域は、ヒトFc領域である。好ましい実施形態において、Fc領域には、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE又はIgDから得られるFc領域が含まれる。

10

#### 【0115】

最も好ましい実施形態において、2つの重鎖DVDポリペプチド及び2つの軽鎖DVDポリペプチドは組み合わせられて、DVD-Ig分子を形成する。特異的な標的に結合することができる特異的なDVD-Ig分子の詳細な説明及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。

20

#### 【0116】

##### C. DVDタンパク質の作製

本発明の結合タンパク質は、本分野で公知の多数の何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重鎖及び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、原核又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。原核又は真核宿主細胞の何れの中でも、本発明の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、適切に折りたたまれ、免疫学的に活性なDVDタンパク質を集合及び分泌する傾向がより大きいので、真核細胞中でのDVDタンパク質の発現が好ましく、哺乳動物宿主細胞中での発現が最も好ましい。

30

#### 【0117】

本発明の組換え抗体を発現するための好ましい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<sup>-</sup>CHO細胞を含む。）、NS0骨髓腫細胞、COS細胞及びSP2細胞が含まれる。DVDタンパク質をコードする組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又はより好ましくは、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。

40

#### 【0118】

本発明のDVDタンパク質の組換え発現用の好ましいシステムにおいて、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重鎖及びDVD軽鎖の両方をコードする組換え発現ベクターが、dhfr<sup>-</sup>CHO細胞中に導入される。組換え発現ベクター内

50

で、DVD重鎖及び軽鎖遺伝子は、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/A d M P Lプロモーター制御要素へ作用可能に連結されている。組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重鎖及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。さらに、本発明は、本発明のDVDタンパク質が合成されるまで、適切な培地中で、本発明の宿主細胞を培養することによって、本発明のDVDタンパク質を合成する方法を提供する。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。

10

## 【0119】

DVD-Igの重要な特徴は、DVD-Igが、慣用の抗体として、類似の様式で産生及び精製され得ることである。DVD-Igの産生は、定常領域の何れの配列修飾もなく、又は何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主要産物をもたらす。「二特異的」、「多重特異的」及び「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み合わ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又は分泌された産生をもたらす。例として、Miller and Presta (PCT publication WO2001/077342 (A1)) に記載されている設計に基づいて、重鎖及び軽鎖の16の可能な組み合わせが存在する。その結果、タンパク質の僅か6.25%が、所望の活性形態であると思われる。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、タンパク質の完全に活性な形態を、タンパク質の不活性な及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。

20

## 【0120】

驚くべきことに、本発明の「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及び二重可変ドメイン重鎖をもたらす。

30

## 【0121】

集合され、及び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%、好ましくは75%及びより好ましくは90%が、所望される二重特異的四価タンパク質である。本発明の本態様は、特に、本発明の市販の利用を強化する。従って、本発明は、単一の細胞中で二重可変ドメイン軽鎖及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を含む。

## 【0122】

本発明は、単一の細胞中で二重可変ドメイン軽鎖及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」をもたらす好ましい方法を提供し、ここで、「主要産物」は、二重可変ドメイン軽鎖及び二重可変ドメイン重鎖を含む全ての集合されたタンパク質の50%を上回る。

40

## 【0123】

本発明は、単一の細胞中で二重可変ドメイン軽鎖及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」をもたらすより好ましい方法を提供し、ここで、「主要産物」は、二重可変ドメイン軽鎖及び二重可変ドメイン重鎖を含む全ての集合されたタンパク質の75%を上回る。

## 【0124】

本発明は、単一の細胞中で二重可変ドメイン軽鎖及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」をもたらす最も好ましい方法を提供し、ここで、「主要産物」は、二重可変ドメイン軽鎖及び二重可変ドメイン重

50



鎖を含む全ての集合されたタンパク質の90%を上回る。

【0125】

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、本発明の結合タンパク質は、別の機能的分子（例えば、ペプチド又はタンパク質）へ誘導体化され、又は連結される。例えば、本発明の標識された結合タンパク質は、別の抗体（例えば、二特異的抗体又はダイアボティ）、検出可能な因子、細胞毒性剤、薬剤及び/又は別の分子（ストレプトアビジンコア領域又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若しくはペプチドなどの1つ又はそれ以上の他の分子実体へ、（化学的カップリング、遺伝的融合、非共有会合又はその他によって）本発明の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。

10

【0126】

本発明の結合タンパク質を誘導体化し得る有用な検出可能因子には、蛍光化合物が含まれる。典型的な蛍光検出可能因子には、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-ナフタレンスルホニルクロリド、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、検出可能因子西洋ワサビペルオキシダーゼが存在する場合には、過酸化水素及び

20

【0127】

本発明の別の実施形態は、結晶化された結合タンパク質並びにこのような結晶を含む製剤及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ビボ半減期を有する。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。

【0128】

本発明の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、及びWO02072636（参照により、本明細書に組み込まれる。）に開示されているように產生され得る。

30

【0129】

本発明の別の実施形態は、抗体又はその抗原結合部分が1つ又はそれ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又は糖タンパク質として知られる。抗体は、Fcドメイン中、及び可変ドメイン中に1つ又はそれ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、抗体の抗原結合又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（Co, M. S., et al., *Mol. Immunol.* (1993) 30: 1361-1367）又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）。

40

50

## 【0130】

本発明の一態様は、結合タンパク質のO結合型又は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、増加又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、本発明の別の目的である。

## 【0131】

さらに別の実施形態において、本発明の抗体又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つ又はそれ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つ又はそれ以上の可変領域グリコシル化部位の除去をもたらす1つ又はそれ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 Publication WO2003016466A2並びにU.S. Pat. Nos. 5,714,350及び6,350,861（これらの各々は、参照により、その全体が本明細書に組み込まれる。）に、さらに詳しく記載されている。

## 【0132】

これに加えて又はこれに代えて、フコシル残基の減少した量を有する低フコシル化抗体又は増加した二分岐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本発明の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、本発明の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、Shields, R. L. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277: 26733-26740; Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17: 176-1及びEuropean Patent No: EP 1,176,195; PCT Publications WO03/035835; WO99/54342 80（これらの各々の全体が、参照により本明細書中に組み込まれる。）を参照されたい。

## 【0133】

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及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及びグリコシダーゼ）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及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。本発明において有用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及びシアル酸が含まれ得るが、これらに限定されない。好ましくは、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。

## 【0134】

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すことが、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。ヒト及び

10

20

30

40

50

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、他のタンパク質又は因子による認識、抗原性又はアレルギー性の変化が含まれ得る。従って、当業者は、グリコシル化の特異的な組成及びパターン、例えば、ヒト細胞中又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じ又は少なくとも類似のグリコシル化組成及びパターンを有する治療タンパク質を好み得る。

【0135】

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又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（U.S. patent applications 20040018590及び20020137134並びにPCT publication 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。

【0136】

結合タンパク質に加えて、本発明は、本発明のこのような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）抗体にも関する。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、結合タンパク質又はその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、及び抗Id抗体を産生する。抗Id抗体は、いわゆる抗抗Id抗体を産生するさらに別の動物中に免疫応答を誘導するための「免疫原」としても使用し得る。

【0137】

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及び単離し得る。好ましくは、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、改善又は改変された生物学的特性を示す。

【0138】

III. DVD-Igの使用

本発明の結合タンパク質は2つ又はそれ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）又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、血清又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、結合した又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又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、発光物質及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、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ又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/ビオチン及びアビジン/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、ダンシルクロリド又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；及び適切な放射性材料の例には、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 又は $^{153}\text{Sm}$ が含まれる。

【0139】

本発明の結合タンパク質は、好ましくは、インビトロ及びインビボの両者で、抗原の活性を中和することが可能である。従って、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、本発明の結合タンパク質が交叉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、本発明は、抗原活性が有害である疾病又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を提供する。本発明の結合タンパク質は、治療目的のために、ヒト対象に投与することができる。

【0140】

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又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、又は疑われている疾病及びその他の疾患を含むものとする。従って、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及び/又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。本発明の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、及び本発明の抗体の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。

【0141】

本発明のDVD-Igは、1つの抗原又は複数の抗原に結合し得る。このような抗原には、以下のデータベース（データベースは、参照により、本明細書に組み込まれる。）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。

【0142】

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

サイトカイン及びサイトカイン受容体 (<http://www.cytokinewebfacts.com/>、<http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi>及び[http://cmbi.bjmu.edu.cn/cmldata/cgi/CGF\\_Database/cytokine.medic.kumamoto-u.ac.jp/CFC/indexR.html](http://cmbi.bjmu.edu.cn/cmldata/cgi/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>);

ケモカイン受容体及び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/>) 並びに

ヒトCDマーカー ([http://content.labvelocity.com/tools/6/1226/CD\\_table\\_final\\_locked.pdf](http://content.labvelocity.com/tools/6/1226/CD_table_final_locked.pdf)) 及び (Zola H, 2005 CD molecules 2005: human cell differentiation molecules Blood, 106: 3123-6)。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 4 3 】

D V D - I g は、効力 / 安全を増強し、及び / 又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 ( I L - 1 3 及び T N F ) 及び細胞表面受容体標的 ( V E G F R 及び E G F R ) 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 ( H e r 2 と C D 3 ) との間に、又は自己免疫 / 移植のために自己反応性細胞及びエフェクター細胞の間に、又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何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。

## 【 0 1 4 4 】

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、D V D - I g は、受容体のクラスタリング及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、アゴニスト及びアンタゴニスト作用を有する抗 G P C R 治療剤を作製する上で有用性を有し得る。この場合には、D V D - I g は、クラスタリング / シグナル伝達 ( 2 つの細胞表面分子 ) 又はシグナル伝達 ( 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を標的とするために使用することが可能である。同様に、D V D - I g 分子は、C T L A - 4 連結、及び C T L A - 4 細胞外ドメインの2つの異なるエピトープ ( 又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。C T L A - 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。C T L A - 4 / B 7 相互作用は、細胞周期の進行、I L - 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、C T L A - 4 ( C D 1 5 2 ) 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、C T L A - 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 C T L A - 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。C T L A - 4 / B 7 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 ( S t a m p e r 2 0 0 1 N a t u r e 4 1 0 : 6 0 8 ) 、 「歪んだジッパー」配列である。しかしながら、抗 C T L A - 4 モノクローナル抗体を含む、現在利用可能な C T L A - 4 結合試薬は何れも、連結特性を有しない。この問題に対処するために、幾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 ( H w a n g 2 0 0 2 J I 1 6 9 : 6 3 3 ) 。別の事例では、人工の A P C 表面に連結された、C T L A - 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 ( G r i f f i n 2 0 0 0 J I 1 6 4 : 4 4 3 3 ) 。何れの事例でも、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、C T L A - 4 連結が達成された。これらの実験は、C T L A - 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、C T L A - 4 細胞外ドメインの2つの異なるエピトープ ( 又は同一エピトープの2コピー ) を標的とする D V D - I g 分子を使用することによって、C T L A - 4 連結が達成され得る。論拠は、I g G の2つの結合部位を貫く距離 ( 約 1 5 0 から 1 7 0 ) が、C T L A - 4 の活性化連結 ( 2 個の C T L A - 4 ホモ二量体間で 3 0 から 5 0 ) には大きすぎることである。しかしながら、D V D - I g ( 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、3 0 から 5 0 の範囲にあるので、C T L A - 4 の適切な連結を可能とする。

## 【 0 1 4 5 】

同様に、D V D - I g 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、I L - 1 2 R 及び ) 。さらに、D V D - I g 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、C R 1 及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。

## 【 0 1 4 6 】

10

20

30

40

50

さらに、本発明のDVD-Igは、細胞内送達（内部移行受容体及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及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、より高い効力及び/又はより低い毒性を得るために、組織マーカー及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たんぱく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、又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., Zotarolimus (ABT-578) 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 combinations 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及び回復を促進し得る。あるいは、用具に連結されたDVD、又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及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、患者の足又は腕からの動脈を使用する必要性をなくする。これは、手術及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）及びタンパク質（又は、脂質及び多糖を含む（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、（又はすでに充填されたDVD-Igの老朽化及び変性など、

10

20

30

40

50

さらなる新鮮なDVD-Igを必要とし得る全ての他の要請に応じて)用具から全ての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セットを有する目的標的(サイトカイン、細胞表面マーカー(CD34など)など)に結合し、及び結合部位の他のセットを有する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、多糖及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。

#### 【0147】

##### A. 様々な疾病におけるDVD-Igの使用

本発明の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つ又はそれ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。

#### 【0148】

##### 1. ヒト自己免疫及び炎症性応答

C5、CCL1(1-309)、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(MIP-3a)、CCL21(MIP-2)、CCL23(MPIF-1)、CCL24(MPIF-2/エオタキシン-2)、CCL25(TECK)、CCL26、CCL3(MIP-1a)、CCL4(MIP-1b)、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、I

10

20

30

40

50

L3、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、TGFB1I、TGFB1I2、TGFB1I3、TH1L、TNF、TNFRSF1A、TNFRSF1B、TNFRSF7、TNFRSF8、TNFRSF9、TNFRSF11A、TNFRSF21、TNFSF4、TNFSF5、TNFSF6、TNFSF11、VEGF、ZFPM2及びRNF110(ZNF144)など、多くのタンパク質が、一般的な自己免疫及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、上に列記されている標的の1つ又はそれ以上に結合することが可能なDVD-Igが提供される。

10

## 【0149】

## 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)並びにTh2及びTh1サイトカイン発現並びに上昇した血清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、肥満細胞及びマクロファージなどの炎症性細胞と、サイトカイン及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。従って、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、粘膜の過剰分泌及び気道繊維症など、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)。

20

30

## 【0150】

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-13モノクローナル抗体療法の開発は、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及び腫瘍壊死因子-(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及び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。好ましい実施形態において、本発明のDVD-Igは、標的であるIL-13及びTNF-に結合し、喘息を治療するために使用される。

40

## 【0151】

炎症及び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 Medi

50



cine (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; and 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)。

#### 【0152】

上で開示されている論拠に基づいて、並びに効力及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。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、好ましくは、このような標的には、IL-13及びIL-1が含まれ；IL-13及びIL-9など、炎症に関与しているIL-13及びサイトカイン及びケモカイン；IL-13及びIL-4；IL-13及びIL-5；IL-13及びIL-25；IL-13及びTARC；IL-13及びMDC；IL-13及びMIF；IL-13及びTGF-；IL-13及びLHRアゴニスト；IL-13及びCL25；IL-13及びSPRR2a；IL-13及びSPRR2b；並びにIL-13及びADAM8が含まれるが、これらに限定されるものではない。本発明は、CSF1(MCSF)、CSF2(GM-CSF)、CSF3(GCSF)、FGF2、IFNA1、IFNB1、IFNG、ヒスタミン及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、KTLG、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、TNFSF6、YY1、CYSLTR1、FCER1A、FCER2、LTB4R、TB4R2、LTBR及びキチナーゼからなる群から選択される、喘息に関与している1つ又はそれ以上の標的に結合することが可能なDVD-Igも提供する。

#### 【0153】

##### 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、ケモカイン及び成長因子など、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抗体又はsTNFR融合タンパク質の、RAのマウスモデルへの全身投与は、抗炎症性及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TNFモノクローナル抗体(mAb))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-TNF al p

ha treatment. Ann Rheum Dis 58 Suppl 1:16  
 1-4)は、TNFがIL-6、IL-8、MCP-1及びVEGF産生、免疫及び炎症  
 性細胞の関節中への動員、血管新生並びにマトリックスメタロプロテナーゼ-1及び-  
 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、関節リウマチに關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(MRA)、CTLA4Ig(アダ  
 タセプト、Genovese Mc et al 2005 Abatacept for  
 rheumatoid arthritis refractory to tum  
 or necrosis factor alpha inhibition. N Engl  
 J Med. 353:1114-23.)、及び抗B細胞療法(リツキシマブ、O  
 kamoto H, Kamatani N. 2004 Rituximab for  
 rheumatoid arthritis. N Engl J Med. 351:19  
 09)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既に検査されてきた。  
 インターロイキン-15、インターロイキン-17及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  
 の因子の臨床試験が現在進行中である。抗TNF及び別の媒介物質を組み合わせた二重特  
 異的抗体療法は、臨床的効力及び/又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(何れも、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、炎症及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及びIL-18、TNF及びIL-12; TNF及びIL-23; TNF及びIL-1  
 ; TNF及びMDDF; TNF及びIL-17; 並びにTNF及び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D  
 VDIg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 b  
 iological standardization (1992), 77 99-10  
 2; Hart et al., Journal of Allergy and Cli  
 nical 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., Co  
 mp Med. (2005) 55(2):114-22参照)。

#### 【0154】

#### 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、自己抗体産生及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及びT細胞の相互作用は、第二のシグナルを開始する、IL  
 -10並びにCD40とCD40L及びB7及びCD28とCTLA-4などの同時刺  
 激分子などの幾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  
 体及びアポト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-I  
 g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-DRA、IL10、IL  
 2、IL4、TNFRSF5、TNFRSF6、TNFSF5、TNFSF6、BLR  
 1、HDAC4、HDAC5、HDAC7A、HDAC9、ICOSL、IGBP1、M  
 S4A1、RGS1、SLA2、CD81、IFNB1、IL10、TNFRSF5、T  
 NFRSF7、TNFSF5、AICDA、BLNK、GALNAC4S-6ST、HD  
 AC4、HDAC5、HDAC7A、HDAC9、IL10、IL11、IL4、INH

10

20

30

40

50

A、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-DRA及びNT5E；同時刺激シグナル：CTLA4又はB7.1/B7.2；B細胞生存の阻害「BlyS、BAFF；補体不活化：C5；サイトカイン調節。中心的な原理は、何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又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(Sfikakis P Pet et al 2005 Curr Opin Rheumatol 17:550-7参照)。SLEは、血清IL-4、IL-6、IL-10の文献に報告された上昇を伴う、Th2によって誘導される疾病であると考えられる。IL-4、IL-6、IL-10、INF-a及びTNF-aからなる群から選択される1つ又はそれ以上の標的に結合することが可能なDVDIgも想定される。上で論述されている標的の組み合わせは、多数の狼瘡前臨床モデル中で検査することが可能なSLEに対して治療的な効力を増強する(Peng SL(2004) Methods Mol Med.; 102:227-72参照)。

10

## 【0155】

## 5. 多発性硬化症

多発性硬化症(MS)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(MBP)の免疫学的破壊が、多発性硬化症の主要な病因である。MSは、CD4<sup>+</sup>及びCD8<sup>+</sup>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、反応性窒素種及び同時刺激分子の中枢神経系中での発現は全て、MS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、Th1及びTh2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、サイトカイン及び白血病相互作用並びに調節性T細胞は、治療標的の同定のための重要な領域である。

20

## 【0156】

IL-12は、APCによって産生される炎症促進性サイトカインであり、Th1エフェクター細胞の分化を促進する。IL-12は、MS患者及びEAE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、IL-12経路中の妨害がげっ歯類中のEAEを効果的に抑制すること、及びコモンマモセット中のミエリン誘発性EAEモデル中で、抗IL-12mAbを用いたIL-12p40のインビボ中和が有益な効果を有することが示された。

30

## 【0157】

TWEAKは、中枢神経系(CNS)中で恒常的に発現されるTNF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、増殖性又はアポトーシス効果を有する。その受容体Fn14は、内皮細胞、反応性星状膠細胞及び神経細胞によって、中枢神経系中で発現されている。TWEAK及びFN14mRNA発現は、実験的自己免疫脳脊髄炎(EAE)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(MOG)によってC57BL/6マウス中に誘導されたEAEにおける抗TWEAK抗体治療は、マウスが初回刺激相後に治療された場合に、疾病の重度及び白血球の浸潤の低下をもたらした。

40

## 【0158】

本発明の一態様は、IL-12、TWEAK、IL-23、CXCL13、CD40、CD40L、IL-18、VEGF、VLA-4、TNF、CD45RB、CD200、IFN、GM-CSF、FGF、C5、CD52及びCCR2からなる群から選択される1つ又はそれ以上、好ましくは2つの標的に結合することができるDVDIg分子に関する。好ましい実施形態には、MSの治療に対して有益な治療剤としての二重特異的抗IL-12/TWEAKDVDIgが含まれる。MSを治療するためのDVD分子の有効性を評価するための幾つかの動物モデルが、本分野において公知である(Steinman

50

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; 及び Hart BA, et al., (2005) J Immunol 175(7): 4761-8 参照)。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 Rovelizumab (ICOS Corp)] Drugs. 3(4): 442-6) 参照)。

【0159】

#### 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]、リピドA、エンドトキシン) 及びグラム陽性生物 (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-) 及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及び免疫応答は、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、多臓器不全及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) 及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。これらの効果及び他の効果は、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及び好中球活性の促進の増加した濃度をもたらす。

【0160】

敗血症及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。実験動物及び重病の患者における研究は、リンパ系臓器及び幾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、アレルギー及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 の不存在によって又はグルココルチコイド、グランザイム若しくはいわゆる「死亡 (death)」サイトカイン: 腫瘍壊死因子 又は 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及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、細胞質及び/又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。抗アポトーシス因子を用いた臨床試験は、主にそれらの投与及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、炎症性媒介物質及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因子は、さらなる有益性を有し得る。本発明の一態様は、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、IL10、IL1B、NFKB1、PROC、TNFRSF1A、CSF3、IL10、IL1B、IL6

10

20

30

40

50

、ADORA2A、CCR3、IL10、IL1B、IL1RN、MIF、NFKB1、PTAFR、TLR2、TLR4、GPR44、HMOX1、ミッドカイン、IRAK1、NFKB2、SERPINA1、SERPINE1及びTREM1からなる群から選択される、敗血症に關与する1つ又はそれ以上の標的、好ましい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及びCalandra T, et al., (2000) Nat Med. 6(2): 164-70)参照)。

#### 【0161】

##### 7. 神経疾患

##### 7.1 神経変性疾患

慢性神経変性疾患は、通常、神経細胞機能の進行性の喪失(神経細胞死、脱ミエリン化)、運動性の喪失及び記憶の喪失によって特徴付けられる年齢依存性疾患である。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、それらの発達及び進行に、様々な要因、例えば、年齢、血糖状態、アミロイド産生及び多量体化、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及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及びミク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。従って、これらの慢性神経変性疾患は、複数の細胞種及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)又は神経細胞の喪失及び/又はシナプス機能を抑制するための因子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及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)(CE. Shepherd, et al., Neurobiol Aging. 2005 Oct 24; Nelson RB., Curr Pharm Des. 2005; 11: 3335; William L. Klein.; Neurochem Int. 2002; 41: 345; Michelle C Janelsins, et al., J Neuroinflammation. 2005; 2: 23; Soloman B., Curr Alzheimer Res. 2004; 1: 149; Igor Klyubin, et al., Nat Med. 2005; 11: 556-61; Arancio O, et al., EMBO Journal (2004) 1-10; Bornemann KD, et al., Am J Pathol. 2001; 158: 63; Deane R, et al., Nat Med. 2003; 9: 907-13; 及びEliezer Masliah, et al., Neuron. 2005; 46: 857参照)。

#### 【0162】

本発明のDVD-Ig分子は、アルツハイマー病などの慢性神経変性疾患に關与する1つ又はそれ以上の標的に結合することが可能である。このような標的には、ADの発病に關与すると推定されている全ての媒介物質(可溶性又は細胞表面)、例えば、AGE(S100A、アムホテリン)、炎症促進性サイトカイン(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、Nogo、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)が含まれるが、これらに限定されない。DVD-Ig分子の効力は、アミロイド前駆体タンパク質又はRAGEを過剰発現し

10

20

30

40

50

、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。 - シニクレインが、パーキンソン病に關与している。 - シニクレイン及び炎症性媒介物質(TNP、IL-1、MCP-1など)を標的とすることができるDVD-Ig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、本発明において想定される。

### 【0163】

#### 7.2 神経細胞の再生及び脊髄損傷

病的機序の知見の増大に関わらず、脊髄損傷(SCI)は、なお、多大な損害を与える症状であり、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、挫傷又は圧迫傷害であり、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、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、サイトカイン及びケモカイン)が起こる。SCIにおけるこれらの原発及び続発性の機序は、他の手段、例えば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。明瞭な効果の欠如並びにその後の感染症を伴う免疫抑制及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、生物学又は小分子は認可されていないが、有望な治療原理及び薬物候補が、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、ミエリン中及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NogoA、OMgp及びMAG、RGMA、瘢痕随伴CSPG(コンドロイチン硫酸プロテオグリカン)及び反応性星状膠細胞に対する阻害因子(一部のセマホリン及びエフリン)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及びそ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及び神経突起成長促進分子のこの協調は、NogoA又は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、Nogo及びRGMA)を遮断するか、又は神経突起成長阻害分子を遮断し、及び神経突起成長増強分子の機能を増強するか(例えば、Nogo及びニューロトロフィン)、又は神経突起成長阻害分子(例えば、Nogo)及び炎症促進性分子(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)。

### 【0164】

一態様において、NgR及びRGMA; NogoA及びRGMA; MAG及びRGMA; OMgp及びRGMA; RGMA及びRGMB; CSPG及びRGMA; アグレカン、

10

20

30

40

50

ミッドカイン、ニューロカン、ベルシカン、ホスファカン、T e 3 8 及び T N F - a ; 樹状突起及び軸索の出芽を促進する抗体と組み合わせられた A 球状体 ( g l o b u l o m e r ) 特異的抗体などの標的対に結合することが可能な D V D - I g が提供される。樹状突起の病変は、A D の極めて早期の兆候であり、N O G O A が樹状突起の成長を制限することが知られている。a b のこのような種類を、S C I 候補 ( ミエリンタンパク質 ) A b の何れかと組み合わせることが可能である。他の D V D - I g 標的は、N g R - p 7 5、N g R - T r o y、N g R - N o g o 6 6 ( N o g o )、N g R - L i n g o、L i n g o - T r o y、L i n g o - p 7 5、M A G 又は O m g p のあらゆる組み合わせを含み得る。さらに、標的には、神経突起の阻害に關与すると推定されている全ての媒介物質 ( 可溶性又は細胞表面 )、例えば、N o g o、O m p g、M A G、R G M A、セマフォリン、エフリン、可溶性 A - b、炎症促進性サイトカイン ( 例えば、I L - 1 )、ケモカイン ( 例えば、M I P I a )、神経再生を阻害する分子も含まれ得る。抗 n o g o / 抗 R G M A 又は類似の D V D - I g 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 D V D - I g 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 D V D - I g 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 N o g o、O m p g 及び M A G に結合する N o g o 受容体並びに A - b 及び S 1 0 0 A に結合する R A G E 上の2つの異なるリガンド結合部位を標的とする D V D - I g 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、n o g o 及び n o g o 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。n o g o - n o g o 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。従って、1つの免疫媒介物質、例えば、I L - 1 2 のようなサイトカイン、及び神経突起成長阻害分子、例えば、n o g o 又は R G M の機能を遮断することができる D V D - I g 分子は、免疫又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。

#### 【 0 1 6 5 】

##### 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 ( v o n M e h r e n M , e t a l 2 0 0 3 M o n o c l o n a l a n t i b o d y t h e r a p y f o r c a n c e r . A n n u R e v M e d . ; 5 4 : 3 4 3 - 6 9 ) 。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、又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。従って、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、抗イデオタイプネットワーク、補体媒介性細胞傷害又は抗体依存性細胞傷害 ( A D C C ) 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。腫瘍疾患を治療するために、標的の以下の対に結合することができる D V D I g も想定される。I G F 1 及び I G F 2 ; I G F 1 / 2 及び E r b 2 B ; V E G F R 及び E G F R ; C D 2 0 及び C D 3、C D 1 3 8 及び C D 2 0、C D 3 8 及び C D 2 0、C D 3 8 及び C D 1 3 8、C D 4 0 及び C D 2 0、C D 1 3 8 及び C D 4 0、C D 3 8 及び C D 4 0。他の標的の組み合わせには、E G F / e r b - 2 / e r b - 3 ファミリーの1つ又はそれ以上のメンバーが含まれる。D V D I g が結合し得る、腫瘍疾患に關与する他の標的 ( 1つ又はそれ以上 ) には、C D 5 2、C D 2 0、C D 1 9、C D 3、C D 4、C D 8、B M P 6、I L 1 2 A、I L 1 A、I L 1 B、I L 2、I L 2 4、I N H A、T N F、T N F S F 1 0、B M P 6、E G F、F G F 1、F G F 1 0、F G F 1 1、F G F 1 2、F G F 1 3、F G F 1 4、F G F 1 6、F G F 1 7、F G F 1 8、F G F 1 9、F G F 2、F G F 2 0、F G F 2 1、F G F 2 2、F G F 2 3、F G F 3、F G F 4、F

10

20

30

40

50

GF5、FGF6、FGF7、FGF8、FGF9、GRP、IGF1、IGF2、IL  
 12A、IL1A、IL1B、IL2、INHA、TGFA、TGFB1、TGFB2、  
 TGFB3、VEGF、CDK2、EGF、FGF10、FGF18、FGF2、FGF  
 4、FGF7、IGF1、IGF1R、IL2、VEGF、BCL2、CD164、CD  
 KN1A、CDKN1B、CDKN1C、CDKN2A、CDKN2B、CDKN2C、  
 CDKN3、GNRH1、IGFBP6、IL1A、IL1B、ODZ1、PAWR、P  
 LG、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、FGF2 10  
 3、FGF9、IGFBP3、IL2、INHA、KLK6、TP53、CHGB、GN  
 RH1、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、NR3  
 C1、NR3C2、NR4A1、NR4A2、NR5A1、NR5A2、NR6A1、P  
 GR、RARβ、FGF1、FGF2、FGF6、KLK3、KRT1、APOC1、B  
 RCA1、CHGA、CHGB、CLU、COL1A1、COL6A1、EGF、ERB  
 B2、ERK8、FGF1、FGF10、FGF11、FGF13、FGF14、FGF  
 16、FGF17、FGF18、FGF2、FGF20、FGF21、FGF22、FG 20  
 F23、FGF3、FGF4、FGF5、FGF6、FGF7、FGF8、FGF9、G  
 NRH1、IGF1、IGF2、IGFBP3、IGFBP6、IL12A、IL1A、  
 IL1B、IL2、IL24、INHA、INSL3、INSL4、KLK10、KLK  
 12、KLK13、KLK14、KLK15、KLK3、KLK4、KLK5、KLK6  
 、KLK9、MMP2、MMP9、MSMB、NTN4、ODZ1、PAP、PLAU、  
 PRL、PSAP、SERPINA3、SHBG、TGFA、TIMP3、CD44、C  
 DH1、CDH10、CDH19、CDH20、CDH7、CDH9、CDH1、CDH  
 10、CDH13、CDH18、CDH19、CDH20、CDH7、CDH8、CDH  
 9、ROBO2、CD44、ILK、ITGA1、APC、CD164、COL6A1、  
 MTSS1、PAP、TGFB1I1、AGR2、AIG1、AKAP1、AKAP2、 30  
 CANT1、CAV1、CDH12、CLDN3、CLN3、CYB5、CYC1、DA  
 B2IP、DES、DNCL1、ELAC2、ENO2、ENO3、FASN、FLJ1  
 2584、FLJ25530、GAGEB1、GAGEC1、GGT1、GSTP1、H  
 IP1、HUMCYT2A、IL29、K6HF、KAI1、KRT2A、MIB1、P  
 ART1、PATE、PCA3、PIAS2、PIK3CG、PPIID、PR1、PSC  
 A、SLC2A2、SLC33A1、SLC43A1、STEAP、STEAP2、TP  
 M1、TPM2、TRPC6、ANGPT1、ANGPT2、ANPEP、ECGF1、  
 EREG、FGF1、FGF2、FIGF、FLT1、JAG1、KDR、LAMA5、  
 NRP1、NRP2、PGF、PLXDC1、STAB1、VEGF、VEGFC、AN  
 GPTL3、BAI1、COL4A3、IL8、LAMA5、NRP1、NRP2、ST 40  
 AB1、ANGPTL4、PECAM1、PF4、PROK2、SERPINF1、TN  
 FAIP2、CCL11、CCL2、CXCL1、CXCL10、CXCL3、CXCL  
 5、CXCL6、CXCL9、IFNA1、IFNB1、IFNG、IL1B、IL6、  
 MDK、EDG1、EFNA1、EFNA3、EFNB2、EGF、EPHB4、FGF  
 R3、HGF、IGF1、ITGB3、PDGFA、TEK、TGFA、TGFB1、T  
 GFB2、TGFB1R1、CCL2、CDH5、COL18A1、EDG1、ENG、I  
 TGAV、ITGB3、THBS1、THBS2、BAD、BAG1、BCL2、CCN  
 A1、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 50



)、ESR1、ESR2、F3(TF)、FOSL1(FRA-I)、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(亜鉛-a-糖タンパク質)、BPAG1(プレクチン)、CDKN1A(p21Wap1/Cip1)、CLDN7(クラウジン-7)、CLU(クラスレリン)、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(GC Box BP)、KRT19(ケラチン19)、KRTHB6(毛髪特異的タイプII型ケラチン)、MACMARKKS、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(マンマグロビン2)、SCGB2A2(マンマグロビン1)、SPRR1B(Spr1)、THBS1、THBS2、THBS4及びTNFAIP2(B94)からなる群から選択されるものが含まれるが、これらに限定されるものではない。

10

## 【0166】

20

## IV. 医薬組成物

本発明は、本発明の結合タンパク質と、及び医薬として許容される担体とを含む医薬組成物も提供する。本発明の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、若しくはモニタリングし、疾患又は1つ若しくはそれ以上のその症候を予防し、治療し、管理し、若しくは軽減する上で、及び/又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つ又はそれ以上の本発明のタンパク質を含む。別の実施形態において、医薬組成物は、1つ又はそれ以上の本発明の結合タンパク質と、及び疾患を治療するための、本発明の結合タンパク質以外の1つ又はそれ以上の予防又は治療剤とを含む。好ましくは、予防剤又は治療剤は、疾患又は1つ若しくはそれ以上のその症候の予防、治療、管理又は軽減に有用であることが知られており、又は疾患又は1つ若しくはそれ以上のその症候の予防、治療、管理又は軽減においてこれまで使用されており、若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、希釈剤又は賦形剤をさらに含み得る。

30

## 【0167】

本発明の結合タンパク質は、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、本発明の結合タンパク質と、及び医薬として許容される担体とを含む医薬組成物も提供する。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、全ての溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤及び抗真菌剤、等張剤及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つ又はそれ以上及びこれらの組み合わせが含まれる。多くの場合、組成物中に等張剤、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又は塩化ナトリウムを含むことが好ましい。医薬として許容される担体は、抗体又は抗体部分の保存期間又は有効性を増強する、湿潤剤又は乳化剤、防腐剤又は緩衝剤などの補助物質の微量をさらに含み得る。

40

## 【0168】

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、抗体又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)、レトロウイルス又は他のベクターの一部としての核酸

50

の構築物などに封入して、本発明の1つ若しくはそれ以上の抗体又は本発明の1つ若しくはそれ以上の抗体及び疾患又は1つ若しくはそれ以上のその症候を予防し、管理し、治療し、若しくは軽減するのに有用な予防剤又は治療剤の組み合わせを投与するために使用することが可能である。本発明の予防剤又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、静脈内及び皮下）、硬膜外投与、腫瘍内投与及び粘膜投与（例えば、鼻内及び経口経路）が含まれるが、これらに限定されない。さらに、例えば、吸入装置又は噴霧器及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、U . S . Pat . Nos . 6 , 0 1 9 , 9 6 8 , 5 , 9 8 5 , 3 2 0 , 5 , 9 8 5 , 3 0 9 , 5 , 9 3 4 , 2 7 2 , 5 , 8 7 4 , 0 6 4 , 5 , 8 5 5 , 9 1 3 , 5 , 2 9 0 , 5 4 0 及び 4 , 8 8 0 , 0 7 8 ; 並びに P C T P u b l i c a t i o n N o s . W O 9 2 / 1 9 2 4 4 , W O 9 7 / 3 2 5 7 2 , W O 9 7 / 4 4 0 1 3 , W O 9 8 / 3 1 3 4 6 及び W O 9 9 / 6 6 9 0 3 ( これらの各々は、参照により、それらの全体が本明細書に組み込まれる。 ) を参照されたい。一実施形態において、本発明の結合タンパク質、組み合わせ療法又は本発明の組成物は、A l k e r m e s A I R <sup>( R )</sup> 経肺薬物送達技術 ( A l k e r m e s , I n c . , C a m b r i d g e , M a s s . ) を用いて投与される。特定の実施形態において、本発明の予防剤又は治療剤は、筋肉内、静脈内、腫瘍内、経口、鼻内、経肺又は皮下投与される。予防剤又は治療剤は、あらゆる都合のよい経路によって、例えば、注入若しくはボーラス注射によって、上皮又は粘膜皮下の裏打ち（例えば、口粘膜、直腸及び腸粘膜など）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因子と一緒に投与され得る。投与は、全身又は局所であり得る。

10

20

## 【0169】

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、本発明の予防剤又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、又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 ( s i a l a s t i c ) 膜、ポリマー、繊維性マトリックス（例えば、T i s s u e l <sup>( R )</sup>）又はコラーゲンマトリックスなどの、膜及びマトリックスを含む多孔性又は非多孔性材料である。一実施形態において、本発明の1つ又はそれ以上の抗体アンタゴニストの有効量は、疾患又はその症候を予防し、治療し、管理し、及び/又は軽減するために、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、本発明の1つ又はそれ以上の抗体の有効量は、疾患又は1つ若しくはそれ以上のその症候を予防し、治療し、管理し、及び/又は軽減するために、本発明の結合タンパク質以外の1つ又はそれ以上の治療薬（例えば、1つ又はそれ以上の予防剤又は治療剤）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。

30

## 【0170】

別の実施形態において、予防剤又は治療剤は、調節された放出系又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、調節された放出又は徐放を達成するためにポンプを使用し得る ( L a n g e r , 上記 ; S e f t o n , 1 9 8 7 , C R C C r i t . R e f . B i o m e d . E n g . 1 4 : 2 0 ; B u c h w a l d e t a l , 1 9 8 0 , S u r g e r y 8 8 : 5 0 7 ; S a u d e k e t a l . , 1 9 8 9 , N . E n g l . J . M e d . 3 2 1 : 5 7 4 参照 ) 。別の実施形態において、本発明の治療薬の調節された放出又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 Press, 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;

40

50

During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71:105); U.S. Pat. NO. 5,679,377; U.S. Pat. No. 5,916,597; U.S. Pat. NO. 5,912,015; U.S. Pat. NO. 5,989,463; U.S. Pat. NO. 5,128,326; PCT Publication No. WO99/15154; 及びPCT Publication No. WO 99/20253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-コビニルアセタート)、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-コ-グリコリド)(PLGA)及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。好ましい実施形態において、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、及び生物分解性である。さらに別の実施形態において、調節された放出系又は徐放系は、予防剤又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)。

10

## 【0171】

20

徐放系は、Langer(1990, Science 249:1527-1533)による概説中に論述されている。本発明の1つ又はそれ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、U.S. Pat. No. 4,526,938、PCT publication WO 91/05548、PCT publication WO96/20698、Ning et al., 1996, "Intratatumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel," Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song et al., 1995, "Antibody 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," Proc. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854, and Lam et al., 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery," Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760(これらの各々は、参照により、それらの全体が本明細書中に組み込まれる。)を参照されたい。

30

40

## 【0172】

本発明の組成物が予防剤又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(U.S. Pat. No. 4,980,286)の使用によって、又は直接の注射によって、又は微粒子照射(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、又は脂質若しくは細胞表面受容体若しくは形質移入剤でコーティングし、又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.,

50

1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868参照)、核酸がコードしている予防剤又は治療剤の発現を促進するために、核酸をインビ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。

【0173】

本発明の医薬組成物は、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）、経粘膜及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、鼻内又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、可溶化剤及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）も含み得る。

【0174】

本発明の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又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。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又は1つ若しくはそれ以上の賦形剤を含み、及び好ましくは水より大きな動粘性係数を有する粘性ないし半固体又は固体の形態が通例使用される。適切な製剤は、所望であれば、滅菌され、又は、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、緩衝剤又は塩）と混合された、溶液、懸濁液、エマルジョン、クリーム、軟膏（*ointment*）、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、好ましくは、固体又は液体不活性担体と組み合わされた活性成分が、加圧された揮発性物質（例えば、フロンなどの気体状噴射剤）との混合物中又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、医薬組成物及び剤形に、加湿剤又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。

【0175】

本発明の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、又は点鼻薬の形態で製剤化することが可能である。特に、本発明に従って使用するための予防剤又は治療剤は、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、二酸化炭素又はその他の適切な気体）を用いて、加圧されたパック又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又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、吸入装置又はガス注入装置で使用するためのカプセル及びカートリッジ（例えば、ゼラチンから構成される。）を製剤化し得る。本発明の方法が経口投与を含む場合、錠剤、カプセル、カシエ剤、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。錠剤又はカプセルは、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又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、微結晶セルロース又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、タルク又はシリカ）；崩壊剤（例えば、イモデンプン又はグリコール酸デンプンナトリウム）；又は湿潤剤（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、シロップ若しくは懸濁液の形態（これらに限定されない。）を採り得、又は、使用前に、水若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、セルロース誘導体又は硬化食用脂肪）；乳化剤（例えば、レシチン又はアカシア）；非水性ビヒクル（例えば、アーモンド油、油状エステル、エチルアルコール又は分画された植物油）；及び防腐剤（例えば、p - ヒドロキシ安息香酸メチル若しくはプロピル又はソルビン酸）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、着色剤及び甘味剤も含有し得る。経口投与用調製物は、予防剤又は治療剤の遅い放出、調節された放出又は徐放のために、適切に製剤化され得る。

【0176】

本発明の方法は、例えば、吸入装置又は噴霧器の使用、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、U . S . Pat . Nos . 6 , 0 1 9 , 9 6 8 , 5 , 9 8 5 , 3 2 0 , 5 , 9 8 5 , 3 0 9 , 5 , 9 3 4 , 2 7 2 , 5 , 8 7 4 , 0 6 4 , 5 , 8 5 5 , 9 1 3 , 5 , 2 9 0 , 5 4 0 及び 4 , 8 8 0 , 0 7 8 ; 並びに PCT Publication Nos . WO 9 2 / 1 9 2 4 4 , WO 9 7 / 3 2 5 7 2 , WO 9 7 / 4 4 0 1 3 , WO 9 8 / 3 1 3 4 6 及び WO 9 9 / 6 6 9 0 3 ( これらの各々は、参照により、それらの全体が本明細書に組み込まれる。 ) を参照されたい。特定の実施形態において、本発明の結合タンパク質、組み合わせ療法及び / 又は本発明の組成物は、Alkermes AIR<sup>(R)</sup> 経肺薬物送達技術 ( Alkermes , Inc . Cambridge , Mas . ) を用いて投与される。

【0177】

本発明の方法は、注射による（例えば、ボラス注射又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、アンプル又は複数投薬容器に入れて）与え得る。組成物は、油性又は水性ビヒクル中の懸濁液、溶液又はエマルジョンなどの形態を採り得、懸濁剤、安定化剤及び / 又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。

【0178】

本発明の方法は、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、皮下又は筋肉内への）植え込みによって、又は筋肉内注射によって投与され得る。従って、例えば、組成物は、適切なポリマー材料若しくは疎水性材料（例えば、許容される油中のエマルジョンとして）又はイオン交換樹脂とともに、又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。

【0179】

本発明の方法は、中性又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。

【0180】

一般的には、組成物の成分は、別個に、又は単位剤形中に（例えば、活性剤の量を示した注射器又はにおい袋など、密閉された容器中の凍結乾燥された乾燥粉末又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、医薬等級の無菌水又は生理的食塩水を含有する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、注射用の無菌水又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。

【0181】

特に、本発明は、本発明の予防剤若しくは治療剤の1つ若しくはそれ以上又は本発明の

10

20

30

40

50

医薬組成物が、薬剤の量を示した注射器又はにおい袋など、密閉された容器中に梱包されることも提供する。一実施形態において、本発明の予防剤若しくは治療剤の1つ若しくはそれ以上又は医薬組成物は、密閉された容器中の凍結乾燥された乾燥無菌粉末又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、水又は生理的食塩水で）再構成することができる。好ましくは、本発明の予防剤若しくは治療剤の1つ若しくはそれ以上又は医薬組成物は、少なくとも5mg、より好ましくは、少なくとも10mg、少なくとも15mg、少なくとも25mg、少なくとも35mg、少なくとも45mg、少なくとも50mg、少なくとも75mg又は少なくとも100mg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。本発明の凍結乾燥された予防剤若しくは治療剤又は医薬組成物は、その元の容器中で、2と8の間で保存されるべきであり、本発明の予防剤若しくは治療剤又は医薬組成物は、再構成後、1週以内、好ましくは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、又は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、本発明の予防剤若しくは治療剤の1つ若しくはそれ以上又は本発明の医薬組成物は、薬剤の量及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。好ましくは、投与された組成物の液体形態は、少なくとも0.25mg/ml、より好ましくは、少なくとも0.5mg/ml、少なくとも1mg/ml、少なくとも2.5mg/ml、少なくとも5mg/ml、少なくとも8mg/ml、少なくとも10mg/ml、少なくとも15mg/kg、少なくとも25mg/ml、少なくとも50mg/ml、少なくとも75mg/ml又は少なくとも100mg/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。

#### 【0182】

本発明の結合タンパク質は、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。好ましくは、抗体又は抗体部分は、0.1から250mg/mLの結合タンパク質を含有する注射可能溶液として調製される。注射可能溶液は、フリント容器又は琥珀色の容器、注射器又は予め充填されたシリンジ中の液体又は凍結乾燥された剤形から構成され得る。緩衝液は、pH5.0から7.0（最適にはpH6.0）のL-ヒスチジン（1から50mM）、最適には5から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、リン酸ナトリウム又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から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から10%のスクロース（最適には、0.5から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、トレハロース及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から10%のマニトール（最適には、2から4%）を含めることが可能である。液体及び凍結乾燥された両剤形において、安定化剤、主に1から50mMのL-メチオニン（最適には、5から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から0.05%のポリソルベート-80（最適には、0.005から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及び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発明の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）の吸収又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因子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<sup>®</sup>（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。痛み及び不快感がより小さく、及び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及びUS2006104968を参照）。

10

20

30

40

50

## 【0183】

本発明の組成物は、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、注射可能な溶液及び注入可能な溶液）など、分散液又は懸濁液、錠剤、丸薬、粉末、リポソーム及び坐薬）などの、液体、半固体及び固体剤形が含まれる。好ましい形態は、予定される投与の様式及び治療用途に依存する。典型的な好ましい組成物は、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、注射可能溶液又は注入可能溶液の形態である。投与の好ましい様式は、非経口（例えば、静脈内、皮下、腹腔内、筋肉内）である。好ましい実施形態において、抗体は、静脈内注入又は注射によって投与される。別の好ましい実施形態において、抗体は、筋肉内注入又は皮下注射によって投与される。

10

## 【0184】

治療組成物は、典型的には、製造及び保存の条件下で、無菌及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、リポソーム又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。無菌注射可能溶液は、上に列記されている成分の1つ又は組み合わせを加えた適切な溶媒中に、必要な量で活性化化合物（すなわち、抗体、抗体部分）を取り込ませ、必要に応じて、ろ過された滅菌によって調製することが可能である。一般的に、分散液は、塩基性分散溶媒及び上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、調製の好ましい方法は、予め滅菌ろ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及び粉末乾燥である。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、及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及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。

20

## 【0185】

本発明の結合タンパク質は、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、好ましい投与経路/様式は皮下注射、静脈内注射又は注入である。当業者によって理解されるように、投与の経路及び/又は様式は、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、経皮パッチ及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及びポリ乳酸など、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か、又は、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。

30

## 【0186】

ある種の実施形態において、本発明の結合タンパク質は、例えば、不活性希釈剤又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（及び、所望であれば、その他の成分）は、硬い若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、又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発明の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、又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。

40

## 【0187】

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

50

において、本発明の結合タンパク質は、IL-12活性が有害である疾患を治療するのに有用である、1つ又はそれ以上のさらなる治療剤とともに共製剤化され、及び/又は同時投与される。例えば、本発明の結合タンパク質は、他の錠剤に結合する1つ又はそれ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又は細胞表面分子に結合する抗体）とともに共製剤化され、及び/又は同時投与され得る。さらに、本発明の1つ又はそれ以上の抗体は、先述の治療剤の2つ又はそれ以上と組み合わせて使用され得る。このような組み合わせ療法は、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又は合併症が回避される。

#### 【0188】

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及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、U.S. Application Serial NO. 09/428,082及び公開されたPCT Application No. WO99/25044（参照により、あらゆる目的のために、本明細書に取り込まれる。）に記載されている。

#### 【0189】

特定の実施形態において、本発明の結合タンパク質又は本発明の別の予防剤若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、疾患又は1つ若しくはそれ以上のその症候を治療し、予防し、管理し、又は軽減するために投与される。遺伝子治療は、発現された核酸又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。本発明の本実施形態において、核酸は、予防的効果又は治療的効果を媒介する、本発明のコードされたそれらの抗体又は予防剤若しくは治療剤を産生する。

#### 【0190】

本発明に従って、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 3:87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan, Science 260:926-932 (1993); and 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); and 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、US20050004266A1（参照により、本明細書に組み込まれる。）に開示されている。

#### 【0191】

本発明の結合タンパク質は、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又は慢性免疫疾患、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

10

20

30

40

50



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 型及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、エルシニア及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、繊維性肺疾患、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、血管炎及びまん性肺疾患（*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、繊維症、放射性繊維症、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、1 型自己免疫性肝炎（古典的自己免疫性又はルポイド肝炎）、2 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、1 型乾癬、2 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、男性不妊症特発性又は N O S、精子自己免疫、多発性硬化症（全てのサブタイプ）、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、アレルギー及び喘息、B 群連鎖球菌（G B S）感染、精神障害（例えば、うつ病及び統合失調症）、T h 2 型及び T h 1 型によって媒介される疾病、急性及び慢性疼痛（疼痛の様々な形態）、並びに、肺癌、乳癌、胃癌、膀胱癌、大腸癌、膵臓癌、卵巣癌、前立腺癌及び腎臓癌及び造血性悪性病変（白血病及びリンパ腫）などの癌、無 リポタンパク質血症、先端チアノーゼ、急性及び慢性寄生性又は感染性プロセス、急性白血病、急性リンパ芽球性白血病（A L L）、急性骨髄性白血病（A M L）、急性又は慢性細菌感染、急性膵炎、急性腎不全、腺癌、心房（*aerial*）異所性拍動、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-receptor hypersensitivity reactions*）、大動脈（*aortic*）及び動脈瘤、大動脈解離、動脈性高血圧、動脈硬化症、動静脈瘤、運動失調、心房細動（持続的又は発作性）、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（B M T）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、無秩序な又は多巣性心房頻脈、化学療法関連疾患、慢性骨髄性白血病（C M L）、慢性アルコール症、慢性炎症性病変、慢性リンパ性白血

10

20

30

40

50

病 ( C L L )、慢性閉塞性肺疾患 ( C O P D )、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、嚢胞性繊維症、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、垂体外路及び小脳疾患、家族性血球貪食性リンパ組織球症 ( f a m i l i a l h e m a t o p h a g o c y t i c l y m p h o h i s t i o c y t o s i s )、致死の胸腺移植組織拒絶、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、何れかの臓器又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、H I V 感染 / H I V 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、特発性肺繊維症、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 ( l i p e d e m a )、肝臓移植拒絶、リンパ浮腫 ( l y m p h e d e r m a )、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 ( m e n i n g o c o c c e m i a )、代謝性 / 特発性、偏頭痛、ミトコンドリア多系疾患 ( m i t o c h o n d r i a l m u l t i - s y s t e m d i s o r d e r )、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 - ドレーガー及びマシャド - ジョセフ)、重症筋無力症、マイコバクテリウム・アピウム・イントラセルラーレ、マイコバクテリウム・チュバキユロシス、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、腹部大動脈及びその分枝の閉塞、閉塞性動脈疾患、o k t 3 療法、精巣炎 / 精巣上体炎、精巣炎 / 精管還元術処置、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、P O E M S 症候群 (多発神経炎、臓器肥大、内分泌疾患、単クローン性 グロブリン血症及び皮膚変化症候群 ( s k i n c h a n g e s s y n d r o m e ) )、灌流後症候群 ( p o s t p e r f u s i o n s y n d r o m e )、ポンプ後症候群 ( p o s t p u m p s y n d r o m e )、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、レイノー現象及び病、レイノー病、レフサム病、規則的な Q R S 幅の狭い頻脈症 ( r e g u l a r n a r r o w Q R S t a c h y c a r d i a )、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 ( s p e c i f i c a r r y t h m i a s )、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 細胞又は 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、ウイルス及び真菌感染、ウイルス性脳炎 ( v i t a l e n c e p h a l i t i s ) / 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、何れかの臓器又は組織の異

10

20

30

40

50

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 publication No. WO2002097048A2, Leonard et al., PCT publication NO. WO9524918A1, and Salfeld et al., PCT publication NO. WO00/56772A1参照)。

【0192】

本発明の結合タンパク質は、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。

【0193】

好ましくは、本発明の結合タンパク質又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及び乾癬を治療するために使用される。

【0194】

本発明の結合タンパク質は、様々な疾病の治療において有用な1つ又はそれ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。

【0195】

本発明の結合タンパク質は、このような疾病を治療するために、単独で、又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、又は追加の因子、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、前記追加の因子は、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、追加の因子は、本発明の抗体によって治療されている疾病又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。追加の因子は、治療組成物に有益な属性を付与する因子、例えば、組成物の粘性に影響を与える因子とすることも可能である。

【0196】

本発明に含まれるべき組み合わせは、それらの意図される目的に対して有用な組み合わ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因子は、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。本発明の一部である組み合わせは、本発明の抗体及び以下のリストから選択される少なくとも1つの追加の因子であり得る。当該組み合わせにおいて、形成された組成物はその意図される機能を実行することが可能であれば、組み合わせは、2以上の追加の因子、例えば、2又は3個の追加の因子を含むこともできる。

【0197】

自己免疫疾患及び炎症性疾患を治療するための好ましい組み合わせは、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。他の好ましい組み合わせは、プレドニゾロ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、本発明のDVIDigと組み合わせて患者を治療するときに必要な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、又は除去することさえ可能である。本発明の抗体又は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又は成長因子(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及びPDGF)に対する抗体又はこれらのアンタゴニストが含まれる。本発明の結合タンパク質又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又はCD154を含むこれらのリガンド(gp39又は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。

【0198】

治療剤の好ましい組み合わせは、異なる点で、自己免疫及びこれに続く炎症カスケード

10

20

30

40

50

を干渉し得る。好ましい例には、キメラ、ヒト化又はヒトTNF抗体、D2E7、(PCT公開WO97/29131)、CA2(Remicade<sup>TM</sup>)、CDP571、及び可溶性p55又はp75TNF受容体、これらの誘導体、(p75TNFR IgG(Enbre1<sup>TM</sup>)又はp55TNFR1gG(Lenercept)及び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。他の好ましい組み合わせには、インターロイキン11が含まれる。さらに別の好ましい組み合わせには、IL-12機能と平行して、IL-12機能に依存して、又は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。特に好ましいのは、IL-18抗体又は可溶性IL-18受容体又は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及び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み合わせは、最も有効であり得ることが示されている。さらに別の好ましい組み合わせは、非枯渴性抗CD4阻害剤である。さらに別の好ましい組み合わせには、抗体、可溶性受容体又は拮抗性リガンドを含む、共同刺激経路CD80(B7.1)又はCD86(B7.2)のアンタゴニストが含まれる。

10

## 【0199】

本発明の結合タンパク質は、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ニン、ペニシラミン、金チオリンゴ酸塩(筋肉内及び経口)、アザチオプリン、コルヒチン、コルチコステロイド(経口、吸入及び局所注射)、 $\beta$ -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、イプラトロピウム及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又は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因子(例えば、IRA、NIK、IKK、p38又は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及びそれらの誘導体(例えば、可溶性p55又はp75TNF受容体及び誘導体p75TNFR IgG(Enbre1<sup>TM</sup>)及びp55TNFR IgG(Lenercept))、sIL-IR1、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及びTGF)、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、プロボ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/fam/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及びメソプラムなど

20

30

40

50

の因子とも組み合わせられ得る。好ましい組み合わせには、メトトレキサート又はレフルノミドが含まれ、中度又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。

【0200】

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使用することも可能な非限定的な追加の因子には、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) ; 75kd TNFR-IgG/エタネルセプト (75kd TNF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; 55kd TNF-IgG (55kd TNF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及び/又はDAB389-IL-2 (IL-2融合タンパク質; Seragen; 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; 組換えIL-10、抗炎症性サイトカイン; DNAX/Schering) ; IL-4; IL-10及び/又は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<sup>(R)</sup>/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) 及び サリドマイド関連薬 (例えば、Celgen) ; レフノミド (抗炎症性及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) ; イブプロフェン (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 & Rheumati

10

20

30

40

50

sm ( 1996 ) Vol . 39 , No . 9 ( 補遺 ) , S 281 参照 ) ; アザチオプリン ( 例えば、Arthritis & Rheumatism ( 1996 ) Vol . 39 , No . 9 ( 補遺 ) , S 281 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 及び / 又は lck 阻害剤 ( チロシンキナーゼ zap - 70 又は lck の阻害剤 ) ; VEGF 阻害剤及び / 又は VEGF - R 阻害剤 ( 血管内皮細胞増殖因子又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 ) , S 296 参照 ) ; インターロイキン - 13 ( 例えば、Arthritis & Rheumatism ( 1996 ) Vol . 39 , No . 9 ( 補遺 ) , S 308 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 ) , S 120 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 CD 4 抗体 ; CD 5 トキシン ; 経口投与されたペプチド及びコラーゲン ; ロベンザリト二ナトリウム ; サイトカイン制御因子 ( CRAs ) HP 228 及び HP 466 ( Houghten Pharmaceuticals , Inc . ) ; ICAM - I 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 ( ISIS 2302 ; Isis Pharmaceuticals , Inc . ) ; 可溶性補体受容体 1 ( TP 10 ; T Cell Sciences , Inc . ) ; 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 IL 2 R 抗体 ; マウス及び植物脂質 ( 魚及び植物種子脂肪酸 ; 例えば、DeLuca et al . ( 1995 ) Rheum . Dis . Clin . North Am . J . : 759 - 777 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 ; アザリピジン ; ミコフェノール酸 ( RS - 61443 ) ; タクロリムス ( FK - 506 ) ; シロリムス ( ラパマイシン ) ; アミプリロース ( テラフェクテン ) ; 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 ; 抗ウイルス剤 ; 及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。

#### 【 0201 】

一実施形態において、結合タンパク質又はその抗原結合部分は、関節リウマチの治療用の以下の因子の1つと組み合わせて投与される。KDRの小分子阻害剤 ( ABT - 123 ) 、 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 ; メチルプレドニゾン ; イブプロフェン ; メロキシカム ; 酢酸メチルプレドニゾン、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・ナプシラート / 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 ; オメブラゾール ; 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 TRAP ; MRA ; CTLA 4 - IG ; IL - 18 BP ; ABT - 874 ; ABT - 325 ( 抗 IL - 18 ) ; 抗 IL - 15 ; BIRB - 796 ; SCIO - 469 ; VX - 702 ; AMG - 548 ; VX 740 ; ロフルミラスト ; IC - 485 ; CDC - 801 及びメソプラム。

#### 【 0202 】

本発明の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：ブデノシド；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モノクローナル抗体；抗IL-6モノクローナル抗体；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又は成長因子（例えば、TNF、LT、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、EMAP-II、GM-CSF、FGF及びPDGF）に対する抗体又はこれらのアンタゴニストが含まれる。本発明の抗体又はその抗原結合部分

10

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。本発明の抗体又はその抗原結合部分

20

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又は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因子（例えば、IRAK、NIK、IKK、p38又は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及びそれらの誘導体（例えば、可溶性p55又はp75TNF受容体、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R）及び炎症抑制性サイトカイン（例えば、IL-4、IL-10、IL-11、IL-13及びTGF $\beta$ ）などの因子とも組み合わせられ得る。

### 【0203】

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好ましい例には、以下のもの：TNFアンタゴニスト、例えば、抗TNF抗体、D2E7（PCT Publication No. 97/29131；HUMIRA）、CA2（REMICADE）、CDP571、TNFR-Ig構築物、（p75TNFR IgG（ENBRIL）及びp55TNFR IgG（LENERCEPT））阻害剤及びPDE4阻害剤

30

が含まれる。本発明の抗体又はその抗原結合部分

40

は、コルチコステロイド、例えば、ブデノシド及びデキサメタゾンと組み合わせることが可能である。本発明の結合タンパク質又はこれらの抗原結合部分

50

は、スルファサラジン、5-アミノサリチル酸及びオルサラジンなどの因子と、並びにIL-1などの炎症促進性サイトカインの合成又は作用を妨害する因子（例えば、IL-1変換酵素阻害剤及びIL-1ra）とも組み合わせられ得る。本発明の抗体又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。本発明の結合タンパク質又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。本発明の結合タンパク質又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、コレステラミン/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、ナプシル酸プロポキシフェン、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、メチルプレドニゾン、ナタリズマブ及びインターフェロンと組み合わせることが可能である。

## 【0204】

本発明の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；プレドニゾロン；メチルプレドニゾロン；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又は成長因子（例えば、TNF、LT、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-23、IL-15、IL-16、IL-18、EMAP-II、GM-CSF、FGF及びPDGF）及びそれらの受容体に対する抗体又はこれらのアンタゴニストが含まれる。本発明の結合タンパク質は、CD2、CD3、CD4、CD8、CD19、CD20、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD80、CD86、CD90又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。本発明の結合タンパク質は、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又は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因子（例えば、IRAK、NIK、DCK、p38又は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及びそれらの誘導體（例えば、可溶性p55又はp75TNF受容体、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R）及び炎症抑制性サイトカイン（例えば、IL-4、IL-10、IL-13及びTGF $\beta$ ）などの因子とも組み合わせられ得る。

10

20

30

## 【0205】

本発明の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好ましい例には、インターフェロン-、例えば、IFN-1a及び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阻害剤並びにCD40リガンド及びCD80に対する抗体が含まれる。

## 【0206】

本発明の結合タンパク質は、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、ファムプリジン、酢酸グラチラマー、ナタリズマブ、シンナビドール、 $\alpha$ -イムノカインNNSO<sub>3</sub>、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 (リボ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 $\beta$ -2、チプリモチド、VLA-4アンタゴニスト（例えば、TR-14035、VLA4 UltraHaler、Antegran-ELAN/Biogen）、インターフェロンアンタゴニスト、IL-4アゴニストなどの因子とも組み合わせられ得る。

40

## 【0207】

本発明の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

50



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・モノニトレート、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、重硫酸クロピドグレル、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、塩酸ペラミル、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、スピロノラクトン、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、ブメタニド、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、フマル酸ピソプロロールが含まれる。

## 【0208】

本発明の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、ジクロフェナク及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。

## 【0209】

本発明の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、リン酸プレドニゾロンナトリウム、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、酢酸ピルブテロール、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ロンナトリウム、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。

## 【0210】

本発明の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、イプラトロピウムブロミド、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ロンナトリウム、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、酢酸ピルブテロール、p-エフェドリン/ロラタジン、硫酸テルブタリン、チオトロピウムブロミド、(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。

## 【0211】

10

20

30

40

50

本発明の結合タンパク質と組み合わせることができる、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 - 2 a、インターフェロン - 2 b、インターフェロン - con 1、インターフェロン - n 1、PEG化されたインターフェロン - 2 a、PEG化されたインターフェロン - 2 b、リバビリン、PEGインターフェロン - 2 b + 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及び以下の標的：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。

【0212】

本発明の結合タンパク質と組み合わせることができる、特発性肺繊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、ジゴキシン、インターフェロン、コハク酸メチルプレドニゾロンナトリウム、ロラゼパム、フロセמיד、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、イプラトロピウムプロミド、アクチノマイシン d、アルテブラーゼ、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。

【0213】

本発明の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、ジゴキシン、フロセמיד、シンバスタチン、ラミプリル、テネクテブラーゼ、マレイン酸エナラプリル、トルセמיד、レタバーゼ、ロサルタンカリウム、塩酸キナプリル / mag carb、ブメタニド、アルテブラーゼ、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、ピパリルジン、ロスバスタチン、エゼチミブ / シンバスタチン、アバシミブ、カリボリドが含まれる。

【0214】

本発明の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（ABT - 123）、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（emollient）、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ロン、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、鉍物油 / ひまし油 / nalac

10

20

30

40

50

t、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、石鹼/トリブロムサラン、チメロサル/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、P U V A、U V B、スルファサラジンが含まれる。

【0215】

本発明の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ロン、インドメタシン、硫酸ヒドロキシクロロキン、プレドニゾン、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、カルシポトリエン、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、エファリズマブが含まれる。

10

【0216】

本発明の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、A B T - 5 7 8、アセトアミノフェンが含まれる。

20

【0217】

本発明の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、ナプ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。

30

【0218】

本発明の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)のための治療剤の好ましい例には、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、プデノシド、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 の阻害剤又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。本発明の結合タンパク質は、スルファサラジン、5 - アミノサリチル酸、オルサラジン、イムランなどの因子と、並びにI L - 1 などの炎症促進性サイトカインの合成、産生又は作用を妨害する因子、例えば、I L - 1 変換酵素阻害剤及び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。本発明の結合タンパク質は、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；又は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 又は抗B7抗体ファミリー抗体、抗P

40

50

D - 1ファミリー抗体とともに使用され得る。本発明の結合タンパク質は、IL - 11又は抗サイトカイン抗体、例えば、ホノトリスマブ（抗IFN $\gamma$ 抗体）、又は抗受容体受容体抗体、例えば、抗IL - 6受容体抗体及び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。本発明の抗体又はその抗原結合部分は、また、LJP394（アベチムス（abetimus））（B細胞を枯渇させ、又は不活化する因子）、例えば、リツキシマブ（抗CD20抗体）、リンホスタット-B（抗BlyS抗体）、TNFアンタゴニスト、例えば、抗TNF抗体、D2E7（PCT Publication NO. WO97/29131；HUMIRA）、CA2（REMICADE）、CDP571、TNFR - Ig構築物（p75TNFRIGG（ENBREL及びp55TNFRIGG（LENERCEPT）））とともに使用され得る。

10

**【0219】**

本発明の医薬組成物は、本発明の結合タンパク質の「治療的有効量」又は「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、及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、性別及び個体の体重並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、抗体又は抗体部分のあらゆる毒性効果又は有害効果が、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、及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又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。

20

**【0220】**

投薬計画は、最適な所望の応答（例えば、治療的応答又は予防的応答）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、又は、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若しくは増加させ得る。投与の容易さ及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。本発明の投薬単位形態

30

**【0221】**

本発明の結合タンパク質の治療的又は予防的有効量に対する典型的な非限定的範囲は、0.1から20mg/kg、より好ましくは1から10mg/kgである。緩和されるべき症状の種類及び重度に応じて、投薬量の値が変化し得ることに注意すべきである。何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又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、及び、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又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

**【0222】**

本明細書に記載されている本発明の方法の他の適切な改変及び適合が明白であり、本発明の範囲又は本明細書に開示されている実施形態から逸脱することなく、適切な均等物を用いてこれらを行ない得ることが当業者に自明である。ここに、本発明を詳しく記載してきたが、例示のみを目的とし、本発明を限定することを意図したものではない以下の実施例を参照することによって、本発明がより明確に理解される。

**【実施例】****【0223】**

50

## 実施例

## (実施例1)

## 二重可変ドメイン免疫グロブリン(DVD-Ig)の作製

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mAb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、直接又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及びFc領域(図1A)を含む。

## 【0224】

## (実施例1.1)

## IL-1及びIL-1に対するマウスモノクローナル抗体の作製

本分野で周知のハイブリドーマ技術を用いて、以下のように、IL-1及びIL-1に対するモノクローナル抗体を作製した。

## (実施例1.1.A)

## マウスの免疫化

精製された組み換えヒトIL-1及びマウスIL-1(R&D Systems)を、免疫原並びに力価アッセイ及びELISAスクリーニングでのコーティング抗原として使用した。初回及び強化免疫の両者に対する全ての抗原について、免疫化の用量は、5.0から20.0µg/マウス/注射の範囲であった。ImmuneEasyアジュバントをQiagen(Waltham, MA)から購入し、10.0µg抗原当り20mLのImmuneEasyアジュバントのアジュバント/抗原比で使用した。免疫化すべき動物の各群は、Dr. Yoichiro Iwakura(University of Tokyo, Minato-ku, Tokyo, Japan)から入手した5匹のIL-1 KOマウスを含んだ。以下に記載されている投薬スケジュールに従って、マウスを免疫化した。MRC-5細胞はATCC(Manassas, VA)から購入し、IL-1バイオアッセイのために使用した。ヒトIL-8 ELISAキット並びに対照マウス抗IL-1及び抗体(MAB200及びMAB201)は、R&D Systems(Minneapolis, MN)から購入した。

## 【0225】

要約すると、まず、渦巻き攪拌を用いて、バイアル中のアジュバントを穏やかに混合することによって、アジュバント-抗原混合物を調製した。アジュバントの所望の量をバイアルから取り出し、加熱滅菌された1.5mL微小遠心管に入れた。0.5から1.0mg/mLの範囲にわたる濃度で、PBS又は生理的食塩水中に抗原を調製した。次いで、抗原の計算された量を、アジュバントとともに微小遠心管に添加し、5回、ピペット操作で穏やかに上下させることによって溶液を混合した。アジュバント-抗原混合物を、室温で15分間温置した後、ピペット操作で穏やかに5回上下させることによって、再度混合した。動物に注射するために、アジュバント-抗原溶液を適切な注射器中に吸引した。抗原の計5から20µgを、50から100µLの容量で注射した。各動物を免疫化し、次いで、力価に応じて、2から3回強化免疫した。優れた力価を有する動物には、融合及びハイブリドーマの生成の前に、最終の静脈内強化免疫を施した。

## 【0226】

## (実施例1.1.B)

## ハイブリドーマのスクリーニング

上記のようにして作製されたハイブリドーマをスクリーニングし、ELISAを用いて抗体力価を測定した。標準的なELISA手法を用いて、特異的抗体を誘導するために、ELISAプレート上に、タンパク質抗原を直接被覆した。要約すれば、ELISAプレートを、rhIL-1又はrhIL-1(PBS中、1.0µg/mL)の何れか100µLで、一晚4でコートした。250µLのPBS/0.5%Tween 20で、プレートを3回洗浄し、200µLのブロッキング緩衝液(0.5%Tween 20を加えたPBS中の2%BSA)でブロックした。各ウェルに、希釈された血清又はハイブリ

10

20

30

40

50

ドーマ上清 (100  $\mu$ L) を添加し、室温で2時間温置した。次いで、PBS / 0.5% Tween 20 で、プレート を3回洗浄し、検出のためにHRPヤギ抗マウスIgGを用い、450 nmで結合ODを観察した。ELISA中で高い特異的結合活性を示した抗体を産生するハイブリドーマクローンをサブクローニングし、精製し、抗体の親和性 (Biacore) 及び効力 (MRC-5 バイオアッセイ) を、以下のように性質決定した。

【0227】

(実施例1.1.C)

IL-1 及びIL-1 に対するマウスモノクローナル抗体の性質決定

実施例1.1.Bに記載されているハイブリドーマによって産生された抗体を性質決定するために、以下のアッセイを使用した。

【0228】

(実施例1.1.C.1)

表面プラズモン共鳴:

製造業者の指示書及び標準的な操作に従い、Biacoreシステム (Biacore AB, Uppsala, Sweden) を用いて、表面プラズモン共鳴 (SPR) によって、捕捉された抗体 (ヤギ抗マウスIgGを介して、バイオセンサーマトリックス上に捕捉されたマウス抗rmIL1抗体) とrmIL-1との間のリアルタイム結合相互作用を測定した。要約すると、HBS走行緩衝液 (Biacore AB) 中にrmIL-1を希釈し、5 mL / 分の流速で、固定化されたタンパク質マトリックスを通じて、50  $\mu$ Lの分取試料を注射した。使用したrhIL1の濃度は、62.5、125、187.5、250、375、500、750、1000、1500及び2000 nMであった。解離定数 (解離速度)、会合定数 (結合速度) を測定するために、Biacore速度論評価ソフトウェア (バージョン3.1) を使用した。

【0229】

(実施例1.1.C.2)

抗IL-1バイオアッセイ:

MRC-5細胞株は、用量依存的様式で、ヒトIL-1 及びIL-1 に応答してIL-8を産生するヒト肺繊維芽細胞株である (Dinarelli, C. A., K. Muegge, and S. K. Durum. 2000. Current Protocols in Immunology 6:1参照)。10% FBS完全MEM中でMRC-5細胞を培養し、5% CO<sub>2</sub> インキュベータ中、37 で増殖させた。組み換えヒトIL-1 及びIL-1 に対するmAbの中和効力を測定するために、mAb (50  $\mu$ L) の異なる濃度 (0から10  $\mu$ g / mL) を96ウェルプレートに添加し、37 で1時間、rhIL-1 a又はrhIL-1 bの50  $\mu$ L (10から50 pg / mL) とともに予め温置した。上清を採集し、希釈し、標準的なIL-8 ELISAキット (R&D Systems) を用いて、ELISAによってIL-8濃度を測定した。抗体の効力は、抗体がMRC-5細胞によるIL-8産生を阻害する能力によって測定した。

【0230】

Biacore及びMRC-5バイオアッセイに基づいて、下表1に示されているように、高い親和性及び効力を有する多数のマウス抗hIL-1 a及び抗hIL-1 b抗体を同定した。

【0231】

10

20

30

40

## 【表 1】

表 1. マウス抗 hIL-1a/b mAb の作製及び性質決定

mAb 加-ン番号	特異性	K <sub>D</sub> (M)	IC <sub>50</sub> (M)
3D12.E3	hIL-1α	1.11E-09	6.70E-10
18F4.2C8	hIL-1α	5.78E-10	8.90E-11
6H3.1A4.3E11	hIL-1α	3.54E-10	2.40E-10
13F5.G5	hIL-1β	2.91E-10	6.00E-10
1B12.4H4	hIL-1β	2.13E-10	5.30E-10
6B12.4F6	hIL-1β	5.54E-10	3.20E-10

10

## 【0232】

(実施例 1.1.D)

IL-1 及び IL-1 に対するマウスモノクローナル抗体のクローニング及び配列決定

製造業者の指示書に従い、Trizol 試薬 (Invitrogen) を用いて、各ハイブリドーマ細胞株から全 RNA の単離及び精製後に、表 1 に記載されている全ての抗 IL-1a/b mAb 及びさらなる抗体の可変重 (VH) 及び軽 (VL) 遺伝子のクローニング及び配列決定を実施した。製造業者による指示どおりに、One-tube RT-PCR キット (Qiagen) を使用し、Mouse Ig-Primer Set (Novagen, Madison, WI) から得た IgGVH 及び IgVL オリゴヌクレオチドを用いて、VH 及び VL 両遺伝子の増幅を行った。製造業者の指示書に従って、pCR-TOPO (登録商標) ベクター (Invitrogen) 中に、生産的増幅から得られた DNA 断片をクローニングした。次いで、ABI3000 シークエンサ (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いたジデオキシ鎖終結法によって、複数の VH 及び VL クローンの配列を決定した。全ての mAb VL 及び VH 遺伝子の配列が、以下の表 2 に示されている。

20

## 【0233】

【表 2】

表 2. ヒト IL-1 $\alpha$  及び IL-1 ベータを結合することができるマウスモノクローナル抗体

タンパク質	配列識別子	配列 12345678901234567890	
VH 3D12.E3	配列番号 :1	QIQLVQSGPELKKPGETVKI SCKASGYTFRNYGMNWVKQA PGKDLKRMWINTYTGESTY ADDFKGRFAFSLSTSASTAY LQINNLNKNETATYFCARGI YYYGSSYAMDYWGQGTSTVTV SS	10
VL 3D12.E3	配列番号 :2	NIQMTQTTSLSASLGDVRT ISCRASQDISNCLNWXQKP DGTVKLLIYYTSRLHSGVPS RFSGSGSGTDYSLTISNLEQ EDIATYFCQQKTLTPYAFGG GTKLEINR	
VH 18F4.2C8	配列番号 :3	EVQLQQSGAELVKPGASVKL SCTASGLNIKDTYMHWLKQR PEQGLEWIGRIDPANGNAKY DPRFLGKATITADTSSNTAY LQLS SLTSEDTAVYYCARGD GNFHFYWGQGTTLTVSS	20
VL 18F4.2C8	配列番号 :4	DIVMTQSQRFMSTSVGDRVS VTCKASQNVGTNIAWYQOKP GQSPRALIYSASYRYSVGPDP RFTGSGSGTDFTLTISNVQS VDLAEYFCQQYTRYPLTFGG GTKLEIKR	
VH 6H3.1A4.3E11	配列番号 :5	QVQLQQPGAELVLRPGASVKL SCKASGYTFTTYWMNWVKQR PEQGLEWIGRIDPYDSETLY SQKFKDTAILTVDKSSSTAY MQLS SLTSEDSAVYYCARYG FDYWGQGTTLTVSS	30
VL 6H3.1A4.3E11	配列番号 :6	QIVLTQSPALMSASPGEKVT MTCASASSVNYMYWYQOKPR SSPKPWYIYLTSLASGVPAR FSGSGSGTSYSLTISSEAE DAATYYCQQWNSNPYTFGGG TKLEMKR	



タンパク質	配列識別子	配列 12345678901234567890
VH 13F5.G5	配列番号 :7	QVQLQQSGAELVRFSSVKI SCKASGYAFSSYWMNWVKQR PGQGLEWIGQIYPGDGTNY NGKFKGKATLTADKSSSTSY MQLSGLTSEDSAMYFCVRF TGNDYYAMDYWGQGTSTVTS S
VL 13F5.G5	配列番号 :8	NIVLTQSPASLAVSLGQRAT ISCRASESVDYGN SYMHWY QQKPGQPPKLLIYLASNLES GVPARFSGSGSRTDFTLTID PVEADDAATYYCQNNEDPF TFGSGTKLEIKR
VH 1B12.4H4	配列番号 :9	QVHLKESGPGLVAPSQSLSI TCTVSGFSLTDYGVSWIRQP PGKGLEWLGLIWGGDTYYN SPLKSRLSIRKDNSKSQVFL KMNSLQTDDTAVYYCAKQRT LWGYDLYGMDYWGQGTSTV SS
VL 1B12.4H4	配列番号 :10	ETTVTQSPASLSMAIGKVT IRCITSTDIDVDMNWYQQKP GEPKLLISQGNLTPGVPS RFSSSGSGTDFVFIENMLS EDVADYYCLQSDNPLPTFGA GTKLELKR
VH 6B12.4F6	配列番号 :11	EVQLQQSGPELVKTGTSVKI SCKASGYSFTGYMHWRQS HGKSLEWIGYISCYNGFTSY NPKFKGKATFTVDTSSSTAY IQFSRLTSEDSAVYYCARSD YYGTNDYWGQGTTLTVSS
VL 6B12.4F6	配列番号 :12	QIVLTQSPA IMSASPGEKVT ITCSASSSVSYMHWFQQKPG ASPKLWIYSTSNLASGVPAR FSGSGSGTSYSLTVSRMEAE DAATYYCQQRSTYPYTFGGG TKLEIKR

10

20

30

## 【 0 2 3 4 】

( 実施例 1 . 2 )

マウス - ヒトキメラ抗体の作製及び性質決定

上記全てのmAbを、(ヒト定常領域との)キメラに変換し、発現させ、精製し、活性を確認するために性質決定し、その後のDVD-Ig分析のための対照として使用する。3D12.E3をキメラ形態に変換するために、プライマーP1及びP2を用いて、3D12.E3-VLをPCR増幅し、プライマーP3及びP4を用いて、(ABCで社内作製されたpBOSベクター中の)ヒトCk遺伝子を増幅した。両PCR反応は、標準的なPCR技術及び操作に従って行った。2つのPCR産物をゲル精製し、標準的なPCR条件を使用し、プライマーP1及びP4を用いて、その後の重複PCR反応のための重複テンプレートとして一緒に使用した。製造業者の指示書に従い、TOPOクローニングによって、最終PCR産物キメラ軽鎖3D12.E3-VL-hCkを、pEF6TOPO(

40

50

登録商標) 哺乳動物発現ベクター (Invitrogen) 中にサブクローニングした。表 3 は、PCR プライマーの配列を示している。

【0235】

【表 3】

表 3 :

P1: 5' ATG GTG TCC ACA GCT CAG TTC C 3'	配列番号 13
P2: 5' GC AGC CAC CGT ACG CCG GTT TAT TTC CAG 3'	配列番号 14
P3: 5' CGT ACG GTG GCT GCA CCA TCT GTC 3'	配列番号 15
P4: 5' TCA ACA CTC TCC CCT GTT GAA GC 3'	配列番号 6

10

【0236】

3D12.E3 重鎖をキメラ形態に変換するために、プライマー P5 及び P6 を用いて、3D12.E3-VH を PCR 増幅し、プライマー P7 及び P8 を用いて、(ABC で社内作製された pBOS ベクター中の) ヒト C<sub>1</sub> 遺伝子を増幅した。両 PCR 反応は、標準的な PCR 技術及び操作に従って行った。2つの PCR 産物をゲル精製し、標準的な PCR 条件を使用し、プライマー P5 及び P8 を用いて、その後の重複 PCR 反応のための重複テンプレートとして一緒に使用した。製造業者の指示書に従い、最終 PCR 産物キメラ軽鎖 3D12.E3-VH-hC<sub>1</sub> を、pcDNA (商標) 3.1 TOPO (登録商標) 哺乳動物発現ベクター (Invitrogen) 中にサブクローニングした。表 4

20

【0237】

【表 4】

表 4 :

P5: 5' ATG GCT TGG GTG TGG ACC TTG C 3'	配列番号 17
P6: 5' GGG CCC TTG GTC GAC GCT GAG GAG ACG GTG ACT GAG G 3'	配列番号 18
P7: 5' GCG TCG ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC C 3'	配列番号 19
P8: 5' TC ATT TAC CCG GAG ACA GGG AGA GGC 3'	配列番号 20

30

【0238】

同様に、プライマー P21 / P22 (VH に対して) 及び P7 / P8 (hC<sub>1</sub> に対して) を用いてキメラ 13F5.G5-VH-C<sub>1</sub> を作製し、pcDNA (商標) 3.1 TOPO (登録商標) ベクター中にクローニングし、プライマー P23 / P24 (VL に対して) 及び P3 / P4 (hC<sub>k</sub> に対して) を用いてキメラ 13F5.G5-VL-C<sub>k</sub> を作製し、pEF6 TOPO (登録商標) ベクター中にクローニングした。表 5 は、PCR プライマーの配列を示している。

【0239】

【表 5】

表 5 :

P21: 5' ATA GAA TGG AGC TGG GTT TTC CTC 3'	配列番号 21
P22: 5' GGG CCC TTG GTC GAC GC TGA GGA GAC GGT GAC TGA 3'	配列番号 22
P23: 5' ATG GTC CTC ATG TCC TTG CTG TTC 3'	配列番号 23
P24: 5' GC AGC CAC CGT ACG CCG TTT TAT TTC CAG CTT TG 3'	配列番号 24

40

【0240】

キメラ Ab を発現させるために、72 時間、Lipofectamin (Invitrogen) を用いて、13F5.G5-VL-C<sub>k</sub> 及び 13F5.G5-VH-C<sub>1</sub> を COS 中に同時発現させ、培地を集め、プロテイン A クロマトグラフィーによって IgG 精製した。同様に、72 時間、Lipofectamin (Invitrogen) を用

50

いて、13F5.G5-VL-C及び13F5.G5-VH-C 1をCOS中に同時発現させ、培地を集め、プロテインAクロマトグラフィーによってIgGを精製した。活性を確認するために、Biacore及びMRC-5バイオアッセイによって、精製された両キメラAbを性質決定した。結果は、これらのキメラAbが元のマウスmAbの親和性及び効力と類似の親和性及び効力を示すことを示した。

【0241】

(実施例1.3)

IL-1 / 二重可変ドメイン免疫グロブリン(DVD-Ig)の構築、発現及び精製

hIL-1及びhIL-1に結合することが可能なDVD-Igを作製するために使用された構築物が、図1Bに示されている。要約すれば、それぞれ、組み換えIL-1タンパク質(rhIL-1)及び組み換えIL-1タンパク質(rhIL-1)でBalb/cマウスを免疫化することによって、2つの高親和性マウスAb、抗hIL-1(クローン3D12.E3)及び抗bIL-1(クローン13F5.G5)を含む親mAbを取得した。マウスIgPrimerKit(Novagen, Madison, WI)を用いて、RT-PCRによって、これら2つのハイブリドーマクローンのVL/VH遺伝子を単離した。活性及び効力を確認するために、まず、VL/VH遺伝子を(ヒト定常領域との)キメラ抗体に変換した。DVD1-Igを作製するために、13F5.G5のVH及びVLを、それぞれ、3D12.E3のVH及びVLのN末端に直接融合した(図1Bに示されているとおり)。軽鎖(リンカー配列はADAAP)及び重鎖(リンカー配列はAKTTPP)の両方に、2つの可変ドメイン間のリンカーを有することを除き、DVD2-Igを同様に構築した。これらの配列は、マウスCk及びCH1配列のN末端から選択された。マウスCk及びCH1のN末端から選択されたこれらのリンカー配列は、可変ドメインの天然の伸長であり、幾つかのFab結晶構造の解析に基づけば、顕著な二次構造なしに柔軟な立体構造を示す。PCRクローニングの詳細な手順は、以下に記載されている。

【0242】

(実施例1.3.A)

hIL-1a/bDVD1-Igの分子クローニング:

プライマーP21及びP25を用いて、13F5.G5-VHをPCR増幅し、プライマーP14及びP8を用いて、3D12.E3-VH-hC1を増幅した。両PCR反応は、標準的なPCR技術及び操作に従って行った。2つのPCR産物をゲル精製し、標準的なPCR条件を使用し、プライマーP21及びP8を用いて、その後の重複PCR反応のための重複テンプレートとして一緒に使用した。製造業者の指示書に従い、最終PCR産物DVDIg重鎖hIL-1a/bDVD1-VH-hC1を、pcDNA(商標)3.1TOPO(登録商標)哺乳動物発現ベクター(Invitrogen)中にサブクローニングした。表6は、PCRプライマーの配列を示している。

【0243】

【表6】

表6

P14: 5' CAG ATC CAG TTG GTG CAG TCT GG3'	配列番号 25
P25: 5' CAC CAA CTG GAT CTG TGA GGA GAC GGT GAC TGA GG3'	配列番号 26

【0244】

hIL-1a/bDVD1-Ig軽鎖を作製するために、プライマーP23及びP26を用いて、13F5.G5-VLをPCR増幅し、プライマーP16及びP4を用いて、3D12.E3-VL-hC1を増幅した。両PCR反応は、標準的なPCR技術及び操作に従って行った。2つのPCR産物をゲル精製し、標準的なPCR条件を使用し、プライマーP23及びP4を用いて、その後の重複PCR反応のための重複テンプレートとし

10

20

30

40

50

と一緒に使用した。製造業者の指示書に従い、最終PCR産物 h I L - 1 a / b D V D 1 - I g 軽鎖 h I L - 1 a / b D V D 1 - V L - h C を、p E F 6 T O P O 哺乳動物発現ベクター ( I n v i t r o g e n ) 中にサブクローニングした。表 7 は、P C R プライマーの配列を示している。

【 0 2 4 5 】

【表 7】

表 7

P16: 5' AAT ATC CAG ATG ACA CAG ACT ACA TCC 3'	配列番号 27
P26: 5' GTGT CAT CTG GAT ATT CCG TTT TAT TTC CAG CTT TG 3'	配列番号 28

10

【 0 2 4 6 】

(実施例 1 . 3 . B )

h I L - 1 a / b D V D 2 - I g の分子クローニング :

プライマー P 2 1 及び P 1 7 を用いて、1 3 F 5 . G 5 - V H を P C R 増幅し、プライマー P 1 8 及び P 8 を用いて、3 D 1 2 . E 3 - V H - h C 1 を増幅した。両 P C R 反応は、標準的な P C R 技術及び操作に従って行った。2 つの P C R 産物をゲル精製し、標準的な P C R 条件を使用し、プライマー P 2 1 及び P 8 を用いて、その後の重複 P C R 反応のための重複テンプレートと一緒に使用した。製造業者の指示書に従い、最終 P C R 産物 D V D 2 - I g 重鎖 h I L - 1 a / b D V D 2 - V H - h C 1 を、p c D N A ( 商標 ) 3 . 1 T O P O ( 登録商標 ) 哺乳動物発現ベクター ( I n v i t r o g e n ) 中にサブクローニングした。表 8 は、P C R プライマーの配列を示している。

20

【 0 2 4 7 】

【表 8】

表 8

P17: 5' TGG GGG TGT CGT TTT GGC TGA GG 3'	配列番号 29
P18: 5' GCC AAA ACG ACA CCC CCA CAG ATC CAG TTG GTG CAG 3'	配列番号 30

【 0 2 4 8 】

h I L - 1 a / b D V D 2 - I g 軽鎖を作製するために、プライマー P 2 3 及び P 1 9 を用いて、1 3 F 5 . G 5 - V L を P C R 増幅し、プライマー P 2 0 及び P 4 を用いて、3 D 1 2 . E 3 - V L - h C を増幅した。両 P C R 反応は、標準的な P C R 技術及び操作に従って行った。2 つの P C R 産物をゲル精製し、標準的な P C R 条件を使用し、プライマー P 2 3 及び P 4 を用いて、その後の重複 P C R 反応のための重複テンプレートと一緒に使用した。製造業者の指示書に従い、最終 P C R 産物 h I L - 1 a / b D V D 2 - I g 軽鎖 h I L - 1 a / b D V D 2 - V L - h C を、p E F 6 T O P O ( 登録商標 ) 哺乳動物発現ベクター ( I n v i t r o g e n ) 中にサブクローニングした。表 9 は、P C R プライマーの配列を示している。

30

【 0 2 4 9 】

【表 9】

表 9

P19: 5' TGG TGC AGC ATC AGC CCG TTT TAT TTC 3'	配列番号 31
P20: 5' GCT GAT GCT GCA CCA AAT ATC CAG ATG ACA CAG 3'	配列番号 32

40

【 0 2 5 0 】

h I L - 1 a / b D V D 1 - I g 及び h I L - 1 a / b D V D 2 - I g の最終配列が表 1 0 に記載されている。

【 0 2 5 1 】

【表10】

表10: h I L-1 $\alpha$ / $\beta$  DVD1-I g 及び h I L-1 $\alpha$ / $\beta$  DVD2-I g の  
アミノ酸配列

タンパク質 タンパク質領域	配列識別子	配列	
		1234567890	01234567890
DVD軽可変h I L -1 a/b DVD1 - I g	配列番号:33	QVQLQQSGAELVLRPGSSVKI SCKASGYAFSSYWMMNWVKQR PGQGLEWIGQIYPGDGDTNY NGKFKGKATLTADKSSSTSY MQLSGLTSEDSAMYFCVRF TGNDYYAMDYWGQGTSTVTS SQIQLVQSGPELKKPGETVK ISCKASGYTFRNYGMNWVKQ APGKDLKRMWINTYTGEST YADDFKGRFAFSLETSASTA YLQINNLKNEDTATYFCARG IYYYGSSYAMDYWGQGTSTV VSS	10
VH 13F5.G5	配列番号:7	QVQLQQSGAELVLRPGSSVKI SCKASGYAFSSYWMMN VKQRPGQGLEWIGQIYPGDG DTNYNGKFKGKATLTADKSS STSYMQLSGLTSEDSA MYFCVRFPTGNDYYAMDYWG QGTSTVTVSS	20
リンカー		なし	

タンパク質	配列識別子	配列
タンパク質領域		12345678901234567890
3D12.E3 VH	配列番号:1	QIQLVQSGPELKKPGETVKI SCKASGYTFRNYGMNWVKQA PGKDLKRMWINTYTGESTY ADDFKGRFAFSLETSASTAY LQINNLIKNETATYFCARGI YYYGSSYAMDYWGQGTSVTV SS
CH	配列番号:34	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPE EVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
DVD軽可変h I L - 1 a / b DVD 1 - I g	配列番号:35	NIVLTQSPASLAIVSLGQRAT ISCRASEVDSYGN SYMHY QQKPGQPPKLLIYLASNLES GVPARFSGSGSRDTFTLTID PVEADDAATYYCQQNNEDPF TFGSGTKLEIKRNIQMTQTT SSLSASLGDRVTISCRASQD ISNCLNHYQQKPDGTVKLLI YYTSRHLHSGVPSRFSGSGG TDYSLTISNLEQEDIATYFC QQGKTLPYAFGGGTKLEINR R
13F5.G5 VL	配列番号:8	NIVLTQSPASLAIVSLGQRAT ISCRASEVDSYGN SYMHY QQKPGQPPKLLIYLASNLES GVPARFSGSGSRDTFTLTID PVEADDAATYYCQQNNEDPF TFGSGTKLEIKR
リンカー		None
3D12.E3 VL	配列番号:2	NIQMTQTTSSLSASLGDRVT ISCRASQDISNCLNHYQQK DGTVKLLIYYTSRHLHSGVPS RFSGSGSGTDYSLTISNLEQ EDIATYFCQQGKTLPYAFGG GTKLEINR
CL	配列番号:36	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG

10

20

30

40

タンパク質 タンパク質領域	配列識別子	配列 12345678901234567890
		TASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSTLTLKADYK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
DVD軽可変h I L - 2 a / b DVD 1 - I g	配列番号:37	QVQLQQSGAELVLRPGSSVKI SCKASGYAFSSYWMNWVKQR PGQGLEWIGQIYPGDGDTNY NGKFKGKATLTADKSSSTSY MQLSGLTSEDSAMYFCVRF TGNDYYAMDYWGQGTSTVTS SAKTTPPQIQLVQSGPELKK PGETVKISCKASGYTFRNYG MNWVKQAPGKDLKRMWINT YTGESTYADDFKGRFAFSLE TSASTAYLQINNPKNEDTAT YFCARGIYYYGSSYAMDYWG QGTSVTVSS
13F5.G5 VH	配列番号:7	QVQLQQSGAELVLRPGSSVKI SCKASGYAFSSYWMNWVKQR PGQGLEWIGQIYPGDGDTNY NGKFKGKATLTADKSSSTSY MQLSGLTSEDSAMYFCVRF TGNDYYAMDYWGQGTSTVTS S
リンカー	配列番号:38	AKTTPP
3D12.E3 VH	配列番号:1	QIQLVQSGPELKKPGETVKI SCKASGYTFRNYGMNWVKQA PGKDLKRMWINTYTGESTY ADDFKGRFAFSLETSASTAY LQINNPKNEDTATYFCARGI YYYGSSYAMDYWGQGTSTV SS
CH	配列番号:34	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKEP KSCDKHTCPCPELGG PSVFLFPPKPKDTLMISRT EVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPV LDSGDGFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKLSLSLSPGK

10

20

30

40

タンパク質	配列識別子	配列
タンパク質領域		12345678901234567890
DVD軽可変hIL -2a/bDVD1 -Ig	配列番号:39	NIVLTQSPASLAVSLGQRAT ISCRASESVDSYGNSYMHWY QQKPGQPPKLLIYLASNLES GVPARFSGSGSRTDFTLTID PVEADDAATYYCQQNEDPF TFGSGTKLEIKRADAAPNIQ MTQTTSSLSASLGDRVTISC RASQDISNCLNWWYQQKPDGT VKLLIYYTSRLHSGVPSRFS GSGSGTDYSLTISNLEQEDI ATYFCQQGKTLPYAFGGGK LEINR
13F5.G5 VL	配列番号:8	NIVLTQSPASLAVSLGQRAT ISCRASESVDSYGNSYMHWY QQKPGQPPKLLIYLASNLES GVPARFSGSGSRTDFTLTID PVEADDAATYYCQQNEDPF TFGSGTKLEIKR
リンカー	配列番号:40	ADAAP
3D12.E3 VL	配列番号:2	NIQMTQTTSSLSASLGDRVT ISCRASQDISNCLNWWYQQK DGTVKLLIYYTSRLHSGVPS RFSGSGSGTDYSLTISNLEQ EDIATYFCQQGKTLPYAFGG GTKLEINR
CL	配列番号:36	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC

10

20

## 【0252】

(実施例1.3.C)

hIL-1a/bDVD1-Igの発現及び精製

各構築物の重鎖及び軽鎖を、それぞれ、pcDNA(商標)3.1TOPO(登録商標)及びpEF6TOPO(登録商標)ベクター(Invitrogen Inc.)中にサブクローニングし、正確さを確かめるために配列を決定した。Lipofectamine 2000及び293fectin試薬を用いて、それぞれ、COS細胞及びヒト胎児由来腎臓293細胞(American Type Culture Collection, Manassas, VA)中に、各構築物の重鎖及び軽鎖をコードするプラスミドを一過性に発現させた。一過性形質移入の72時間後に、細胞培地を採集し、製造業者の指示書に従って、プロテインAクロマトグラフィー(Pierce, Rockford, IL)を用いて抗体を精製した。SDS-PAGEによって、Abを分析し、A280及びBCA(Pierce, Rockford, IL)によって定量した。表11は、hIL-1a/bDVD1-Ig及びhIL-1a/bDVD2-Igの発現レベルが、キメラAbのものと同様であることを示しており、哺乳動物細胞中でDVD-Igが効率的に発現され得ることを示唆している。

30

40

## 【0253】



## 【表 1 1】

表 1 1. h I L - 1 a / b D V D - I g の発現及び分子量分析

	発現レベル (ng/ml)		分子量 (ダルトン)		
	COS	Freestyle 293	軽鎖	重鎖	完全長
偽	0	0			
3D12.E3-Ch	2788	3886	23,696	49,914	147,220
13F5.G5-Ch	3260	3562	24,084	49,518	147,204
DVD1-Ig	2988	3300	35,797 (35,790)	64,380 (64,371)	200,346 (200,521)
DVD2-Ig	2433	3486	36,222 (36,220)	64,976 (64,973)	202,354 (202,573)

質量分析によって実験的に決定されたDVD1-Ig及びDVD2-Igの軽鎖、重鎖及び完全長の分子量は、括弧内に示されている。

10

## 【 0 2 5 4 】

( 実施例 1 . 4 )

h I L - 1 a / b D V D - I g の質量分析及びSEC分析

DVD-Igの軽鎖及び重鎖の分子量(MW)を測定するために、1.0MDTT溶液(5 $\mu$ L)によって、DVD-Igの10 $\mu$ L(0.8 $\mu$ g/ $\mu$ L)を還元した。DVD-Igの重鎖及び軽鎖を分離するために、PLRP-S、8 $\mu$ 、4000オングストローム及び1 $\times$ 150mmタンパク質カラム(Michrom BioResource, Auburn, MA)を使用した。質量分析計QSTAR(Applied Biosystems, Foster City, CA)とともに、Agilent HPI100 Capillary HPLC(Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA)を使用した。試料を脱塩するため、流れを廃棄からMSに切り替えるために、バルコバルブを10分に設定した。緩衝液Aは、0.02%TFA、0.08%FA、0.1%ACN及び99.8%HPLC-H<sub>2</sub>Oであった。緩衝液Bは、0.02%TFA、0.08%FA、0.1%CAN、0.1%HPLC-H<sub>2</sub>O及び99.8%ACNを含有した。HPLC流速は50 $\mu$ L/分であり、試料注入容量は8.0mLであった。カラムオープンの温度は60 に設定し、分離グラジエントは、5分間5%B、35分間で5%Bから65%B、さらに5分間で65%Bから95%B、5分間で95%Bから5%Bであった。TOFMSスキャンは800から2500amuであり、サイクルは3600であった。完全長DVD-IgのMWを測定するために、試料を脱塩するため、Protein MicroTrap cartridge(Michrom BioResource, Auburn, MA)を使用した。HPLCグラジエントは、5分間5%B、1分で5%Bから95%B、さらに4分で95%Bから5%Bであった。QSTARTOFMSスキャンは2000から3500amuであり、サイクルは899であった。全てのMS生データは、Analyst QS software(Applied Biosystems)を用いて分析した。DVD-IgのSEC分析の場合、PBS中の精製されたDVD-Ig及びキメラAbを、Superose 6 10/300 G2, 300 $\times$ 10mmカラム(Amersham Bioscience, Piscataway, NJ)にかけた。SECのために、HPLC装置モデル10A(Shimadzu, Columbia, MD)を使用した。全てのタンパク質は、280nm及び214nmでのUV検出を用いて測定した。溶出は、0.5mL/分の流速で、均一濃度であった。安定性研究については、PBS中の0.2から0.4mg/mLの濃度範囲の試料に、-80 及び25 の間での3回の凍結融解サイクルを行うか、又は4週間及び8週間、4 、25 若しくは40 で温置した後、SEC分析を行った。

20

30

40

## 【 0 2 5 5 】

プロテインAクロマトグラフィーによって、DVD-Ig及びキメラAbを精製した。精製収率(3から5mg/L)は、各タンパク質に対する発現溶媒のhIgG定量と合致

50

していた。精製されたDVD-Ig及びキメラAbの組成及び純度は、還元及び非還元両条件でのSDS-PAGEによって分析した。非還元条件では、4つのタンパク質の各々が、単一の結合として移動した。DVD-Igタンパク質は、予想通り、キメラAbより大きな分子量を示した。非還元条件では、4つのタンパク質の各々が、2つのバンド（1つは重鎖及び1つは軽鎖）を与えた。同じく、DVD-Igの重鎖及び軽鎖は、キメラAbのものよりサイズが大きかったSDS-PAGEは、各DVD-Igが単一種として発現され、重鎖及び軽鎖が効率的に対合されて、IgG様分子を形成することを示した。2つのDVD-Ig分子の重鎖及び軽鎖並びに完全長タンパク質のサイズは、アミノ酸配列に基づいて計算されたそれらの分子量と合致している（表11参照）。

【0256】

DVD-Igの正確な分子量を測定するために、質量分析法を使用した。表1に示されているように、実験的に測定された各DVD-Ig（軽鎖、重鎖及び完全長タンパク質を含む。）の分子量は、予想される値と、よく一致している。溶液中でのDVD-Igの物理的特性をさらに研究するために、各タンパク質を分析するためにサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）を使用した。キメラAb及びDVD2-Igの両方が単一のピークを示し、単量体タンパク質として物理的均一性を示した。3D12.E3キメラAbは、13F5.G5キメラAbより小さな物理的サイズを示し、3D12.E3キメラAbがよりコンパクトな球状の形状を採ることを示唆している。DVD1-Igは、主ピーク及び右側の肩ピークを示し、DVD1-Igの一部が、おそらく、現行の緩衝液条件では、凝集した形態であることを示唆している。

【0257】

（実施例1.5）

hIL-1a/bDVD-Igのインビトロ安定性の分析

DVD-Igの物理的安定性を、以下のように調べた。PBS中の0.2から0.4mg/mLの濃度範囲の精製された抗体に、-80及び25の間での3回の凍結融解サイクルを行うか、又は4週間及び8週間、4、25若しくは40で温置した後、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）分析を用いた分析を行った（表12参照）。

【0258】

【表12】

表12. SECによるhIL-1a/bDVD-Igのインビトロ安定性分析

	3D12.E3-Ch			13F5.G5-Ch			DVD1-Ig			DVD2-Ig		
	Agg	Ab	Frgm	Agg	Ab	Frgm	Agg	Ab	Frgm	Agg	Ab	Frgm
3x 凍結融解	1.72	98.28	0.00	13.0	87.0	0.0	46.50	53.50	0.00	0.0	100.0	0.0
4°C @ 4 週	0.85	99.15	0.00	4.2	95.8	0.0	42.43	56.63	0.94	0.0	100.0	0.0
25°C @ 4 週	1.29	98.71	0.00	0.0	100.0	0.0	45.66	54.34	0.00	0.0	100.0	0.0
40°C @ 4 週	1.65	98.35	0.00	20.3	78.1	1.6	36.70	59.42	3.88	0.0	100.0	0.0
4°C @ 8 週	5.35	90.33	4.32	2.2	97.8	0.0	38.18	56.91	4.91	0.0	100.0	0.0
25°C @ 8 週	1.11	60.55	38.34	1.4	97.5	1.0	24.42	67.39	8.19	0.0	100.0	0.0
40°C @ 8 週	4.74	81.47	13.79	34.6	65.4	0.0	20.55	67.16	12.29	0.0	100.0	0.0

凝集及び断片化の程度は、パーセントで示されているのに対して、Abのパーセントは、完全な状態の分子を表す。  
 Agg：凝集物  
 Ab：完全な状態の抗体  
 Frgm：断片

【0259】

両キメラAbは、通常のIgG分子にとって正常な、凝集及び断片化の僅かな程度を示

した。DVD1-Igは、精製後、SCE上で幾らかの凝集を示した。安定性分析では、DVD1-Igも、異なる条件下におけるPBS中での凝集を示したが、DVD1-Igの凝集された形態のパーセントは、延長された保存中又はより高い温度でも増加しなかった。DVD1-Igの断片化された形態のパーセントは、正常な範囲にあり、キメラ3D12.E3.Abのものと類似であった。これに対して、DVD2-Igは、著しい安定性を示した。検査した全ての条件において、DVD2-Igについては、凝集及び断片化は検出されず、DVD2-Igの100%が、完全な状態の単量体分子を維持した。

【0260】

(実施例1.6)

hIL-1a/bPVD-Igの抗原結合親和性の測定

rhIL1- 及びrhIL1- へのDVD-Ig結合の速度論は、25のHBS-EP(10mMHEPES, pH7.4, 150mMNaCl, 3mMEDTA及び0.005%界面活性剤P20)を使用して、Biacore 3000 instrument(Biacore AB, Uppsala, Sweden)を用いた表面プラズモン共鳴を基礎とする測定によって測定した。全ての化学物質は、Biacore AB(Uppsala, Sweden)から、あるいは本明細書に記載されている別の入手先から取得した。製造業者の指示書に従う標準的なアミンカップリングキット及び25mg/mLでの操作を用いて、概ね、10mM酢酸ナトリウム(pH4.5)中に希釈されたヤギ抗ヒトIgG Fc断片特異的ポリクローナル抗体(Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL)の5000RUを、CM5研究等級バイオセンサーチップ全体に直接固定した。バイオセンサー表面上の反応しなかった部分は、エタノールアミンでブロックした。フローセル2及び4中の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した。フローセル1及び3中のヤギ抗ヒトIgGなしの修飾されていないカルボキシメチルデキストランは、基準表面として使用した。速度論分析のために、Bioevaluation 4.0.1ソフトウェアを用いて、全ての10の注射の会合及び解離相に対して、1:1Langmuir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解析を使用)。ヤギ抗ヒトIgG Fc特異的反応表面にわたって捕捉するために、HEPES緩衝化された生理的食塩水中に、精製されたDVD-Ig試料を希釈し、5mL/分の流速で、反応マトリックス上に注入した。25mL/分の連続的流速下で、会合及び解離速度定数 $k_{on}$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )及び $k_{off}$ ( $s^{-1}$ )を測定した。1.25から1000nMの範囲にわたる10個の異なる抗原濃度で速度論結合測定を行うことによって、速度定数を導いた。次いで、以下の式： $K_D = k_{off} / k_{on}$ によって、速度論的速度定数から、DVD-IgとrhIL1 / 間の反応の平衡解離定数(M)を計算した。全ての非特異的結合バックグラウンドを記録し、差し引いて、屈折率の変化及び注入のノイズの大半を除去するために、rhIL1 / 試料の分取試料も、ブランク参照及び反応CM表面上に同時に注入した。その後、5mL/分の流速で、10mMグリシン(pH1.5)の25mLを2回注入して、表面を再生した。抗Fc抗体が固定化された表面が完全に再生され、12サイクルにわたって、完全な捕捉能を維持した。以下の式：

【0261】

【数1】

$$\text{化学量論} = \frac{\text{rhIL1}\alpha/\beta \text{ 応答 (RU)}}{\text{DVD 応答 (RU)}} \times \frac{\text{DVD-Ig MW}}{\text{rhIL1}\alpha/\beta \text{ MW}}$$

を用いて、飽和結合条件(定常状態平衡)下で、捕捉されたDVD-Ig-rhIL1複合体の見かけの化学量論を計算した。

【0262】

10

20

30

40

50

Biacore分析は、キメラAbが、元のハイブリドーマAbと同様の類似の結合速度論及びIL-1への親和性を有することを示し、正しいVL/VH配列が単離されたことを示唆している(表III)。hIL-1への2つのDVD-Igの全体的な結合パラメータは類似しており、DVD-Igの親和性は、キメラ3D12.E3Abの親和性より、2から3倍低いに過ぎなかった。DVD2-IgのhIL-1への結合親和性は、キメラAb13F5.G5より若干低かったが、DVD1-Igの親和性より3倍高かった。IL-1に対する化学量論の評価によって示されたところによれば、hIL-1に対するキメラAbの親和性と比較した、hIL-1に対する2つのDVD-Igの親和性は同様であった。二価の単一特異的である両キメラAbは、それぞれ、1.6及び1.7の化学量論で、Biacore上のIL-1及びhIL-1に結合された。これは、抗体がBiacoreセンサーチップ上に密に固定化された場合の分子間妨害のために、IgGに対して共通しており、化学量論は1.5から2.0の範囲である。hIL-1及びhIL-1に対する両DVD-Igの化学量論は、2つのキメラAbの化学量論と類似しており、両DVD-Igは各抗原に対して二価の結合能を有することを示唆している。

10

【0263】

【表13】

表13. 抗HI-1DVD-Ig分子の機能的性質決定

	抗原	$k_{on}$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$k_{off}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_d$ (M)	化学量論	効力 IC <sub>50</sub> (M)
3D13.E3	hIL-1 $\alpha$	6.43E+05	7.13E-04	1.11E-09	2.0	6.70E-10
3D12.E3-Ch	hIL-1 $\alpha$	4.12E+05	5.52E-04	1.34E-09	1.6	7.00E-10
DVD1-Ig	hIL-1 $\alpha$	3.70E+04	1.05E-04	2.83E-09	1.8	2.30E-09
DVD2-Ig	hIL-1 $\alpha$	7.35E+04	2.52E-04	3.42E-09	2.0	2.90E-09
13F5.G5	hIL-1 $\beta$	2.13E+06	6.21E-04	2.91E-10	1.8	6.00E-10
13F5.G5-Ch	hIL-1 $\beta$	1.41E+06	6.54E-04	4.62E-10	1.7	5.30E-10
DVD1-Ig	hIL-1 $\beta$	6.09E+05	1.59E-03	2.60E-09	1.5	3.10E-09
DVD2-Ig	hIL-1 $\beta$	1.19E+06	9.50E-04	7.98E-10	1.8	1.60E-09

20

親和性及び化学量論は、Biacoreによって測定した。効力(IC50)は、MRC-5バイオアッセイによって測定した。

30

【0264】

さらに、DVD-Igの四価二重特異的抗原結合も、Biacoreによって分析した(表14)。Biacoreセンサーチップ上のヤギ抗ヒトFc抗体を介して、まず、DVD-Igが捕捉され、第一の抗原を注入し、結合シグナルを観察した。第一の抗原によってDVD-Igが飽和されるにつれて、次いで、第二の抗原を注入し、第二のシグナルを観察した。DVD2-Igについては、まず、IL-1を注入した後IL-1を注入し、又はまずIL-1を注入した後、IL-1を注入することによって、これを行った。何れの配列においても、二重結合活性が検出された。DVD1-Igについても、同様の結果が得られた。このように、各DVD-Igは、二重特異的四価分子として、両抗原を同時に結合することができた。表IVに示されているように、第一の抗原(hIL-1又はhIL-1の何れか)に対する両DVD-Igの化学量論は1.5より大きく、単一特異的二価結合の化学量論と同様であった。第二の抗原を注入すると、DVD-Igは第一の抗原によって既に占領されていたが、第二の抗原(すなわち、hIL-1又はhIL-1の何れか)に対する両DVD-Igの化学量論は、1.0と1.3の間であった。このように、DVD-Igは、2つのIL-1及び2つのIL-1分子に結合することができる。Biacoreセンサーチップ上のヤギ抗ヒトFc抗体を介して、まず、DVD-Igを捕捉し、第一の抗原を注入し、結合シグナルを観察した後、第二の抗原を注入した。

40

【0265】

## 【表 1 4】

表 1 4. IL-1 $\alpha$ / $\beta$  への四価二重特異的結合における hIL-1 $\alpha$ /bDVD-Ig の化学量論分析

捕捉されたAb	反応単位		化学量論	
	第一の抗原	第二の抗原	hIL-1 $\alpha$ :DVD-Ig	hIL-1 $\beta$ :DVD-Ig
DVD1-Ig: 932	hIL-1 $\alpha$ : 190	hIL-1 $\beta$ : 75	2.3	1.0
DVD1-Ig: 1092	hIL-1 $\beta$ : 141	hIL-1 $\alpha$ : 107	1.1	1.5
DVD2-Ig: 1324	hIL-1 $\alpha$ : 209	hIL-1 $\beta$ : 137	1.8	1.3
DVD2-Ig: 1184	hIL-1 $\beta$ : 159	hIL-1 $\alpha$ : 131	1.2	1.6

10

## 【0 2 6 6】

(実施例 1 . 7)

DVD-Ig の機能的均一性の測定

DVD2-Ig は、標的特異的アフィニティークロマトグラフィーに代えて、プロテインAクロマトグラフィーによって精製されたので、誤って折り畳まれた及び/又は誤った対を為した何れかのVL/VHドメインが存在する場合には、2つの異なる抗原に対する結合研究によって評価することが可能である。このような結合分析は、サイズ排除液体クロマトグラフィー(SEC)によって実施された。DVD2-Ig は、単独で、又はIL-1、IL-1若しくは等モル比のIL-1及びIL-1の両方との、37で120分の温置期間後に、カラムにかけた。抗原の各々は、対照として、単独でも走行させた。SECの結果は、DVD2-Igが溶液中のIL-1及びIL-1を結合可能であり、このような結合は、SECシグナルに対するシフト(何れかの抗原と複合体を形成した場合に、DVD2-Igの動的サイズの増加を示す。)をもたらすことを示した。DVD2-Igシグナルのシフトは、部分的でなく、100%であったので、すべてのDVD2-Ig分子が抗原を結合できることを示唆する。IL-1及びIL-1の両者の存在下では、DVD2-Igシグナルのさらなる、完全なシフトが存在し、すべてのDVD2-Ig分子が、両抗原を均一な様式で結合できることを示している。本実験は、DVD-Igが、機能的に均一なタンパク質として発現されることを示した。これは、DVD-Igが、以前に記載された全ての二特異的、多重特異的及び多価イムノグロブリン様及びイムノグロブリン由来分子とは異なる均一な単一の機能的種として産生できることを示しているので、重要な示唆を有する。

20

30

## 【0 2 6 7】

(実施例 1 . 8)

DVD-Ig の生物学的活性の測定

MRC-5バイオアッセイを用いてDVD-Igの生物学的活性を測定した。MRC-5細胞株は、用量依存的様式で、ヒトIL-1及びIL-1に反応してIL-8を産生するヒト肺繊維芽細胞株である。MRC-5細胞は、ATCCから取得し、10%FBS完全MEM中、5%CO<sub>2</sub>インキュベータ中で、37で培養した。ヒトIL-1及びIL-1に対するDVD-Igの中和活性を測定するために、MEM/10%FBS中のAbの50 $\mu$ L(1E-7から11E-12M)を96ウェルプレートに添加し、37、5%CO<sub>2</sub>で1時間、hIL-1又はhIL-1の50 $\mu$ L(200pg/mL)とともに予め温置した。次いで、1E5/mLの濃度のMRC-5細胞を全てのウェルに添加し(100 $\mu$ L)、5%CO<sub>2</sub>のインキュベータ中、37で、プレートを一晚温置した。上清を採集し、標準的なELISA(R&D Systems, Minneapolis, MN)によって、ヒトIL-8産生を測定した。DVD-Igの中和活性は、DVD-IgがIL-8産生を阻害する能力によって測定した。

40

## 【0 2 6 8】

表13に示されているように、両DVD-Igは、hIL-1及びhIL-1を中和することができた。hIL-1への結合親和性に合致して、hIL-1に対するD

50

V D 1 - I g 及び D V D 2 - I g の中和活性も同様であった（すなわち、キメラ A b の中和活性の 1 / 3（表 I I I 参照））。h I L - 1 に対するその結合親和性と合致して、h I L - 1 に対する D V D 2 - I g の中和活性は、キメラ A b 1 3 F 5 . G 5 の中和活性より若干低いが、D V D 1 - I g の親和性より 3 倍高かった。総じて、元の m A b と比較して、D V D - I g 分子の生物学的活性には、著しい減少は存在しなかった。

#### 【 0 2 6 9 】

D V D - I g が、I L - 1 及び I L - 1 の両方の存在下で、I L - 8 産生を阻害できるかどうかを決定するために、M R C - 5 アッセイの同じ培養系中に h I L - 1 と h I L - 1 の等量を添加した。D V D 1 - I g 及び D V D 2 - I g は何れも、1 つのサイトカインのみが存在するモノアッセイの活性と同様の活性で、I L - 1 及び I L - 1 の両方の存在下において、M R C - 5 細胞による I L - 8 合成を阻害することができた（表 1 3）。I L - 1 と I L - 1 がともに存在する本アッセイにおいて、D V D 2 - I g の二重阻害活性（1 . 2 n M）は、D V D 1 - I G の二重阻害活性（2 . 2 n M）より高かった。

#### 【 0 2 7 0 】

（実施例 2）

D V D - I g 分子中のリンカーサイズ及び可変ドメインの配向の分析

表 1 5 に示されているように、異なる親 m A b 対を有するさらなる D V D - I g 分子を構築した。m A b の各対に対して、それぞれ 2 つの異なるドメイン配向 a - b - C（ - 定常ドメイン）及び b - a - C（ - 定常ドメイン）で、4 つの異なる D V D - I g 構築物（短いリンカーを有する 2 つ及び長いリンカーを有する 2 つ）を作製した。リンカー配列は、以下に示されているように、ヒト C k 又は C H 1 ドメインの N 末端配列に由来した。

#### 【 0 2 7 1 】

短いリンカー：軽鎖：T V A A P；重鎖：A S T K G P

長いリンカー：軽鎖：T V A A P S V F I F P P；重鎖 A S T K G P S V F P L A P

全ての重鎖及び軽鎖構築物を、p B O S 発現ベクター中にサブクローニングし、C O S 細胞又はフリースタイル 2 9 3 細胞中で発現させた。

#### 【 0 2 7 2 】

新しい D V D クローンを構築するために、h I L - 1 a b D V D 1 - I g 及び h I L - 1 a b D V D 2 - I g に対して記載されているように、重複 P C R を用いて、2 つの m A b の可変ドメイン（軽鎖及び重鎖の両方）を、まず、直列に連結した。次いで、相同的組み換えを用いて、前記連結された片を p B O S ベクター中にサブクローニングした。要約すれば、制限消化によって、ベクターを直鎖化した（p B O S - h C k ベクター 2 μ g を、O + 緩衝液中の F a p A I 及び B s i W I で消化し、並びに p B S O - h C z、n o n a、ベクター 2 μ g を、O + 緩衝液中の F s p A I 及び S a I I で消化した。）。1 % アガロースゲル上で、消化された試料を走行させ、骨格断片を 5 0 μ L の水中に精製した。相同的組み換え及び形質転換のために、D H 5 形質転換受容性細胞を氷上で融解し、2 0 から 5 0 n g の連結された P C R 産物及び直鎖化されたベクター 2 0 から 5 0 n g と混合した（全ての 5 0 μ L D H 5 細胞中）。混合物を穏やかに混合し、4 5 分間、氷上で温置した後、4 2 で 1 分間、熱ショックを与えた。次いで、1 0 0 μ L の S O C 培地を添加し、3 7 で 1 時間温置した。アンピシリンを含有する L B / 寒天プレート上で、形質転換培養物を播種し、3 7 で 1 8 から 2 0 時間温置した。細菌クローンを単離し、そこから D N A を精製し、配列決定分析に供した。以前に記載したように、A b 発現及び精製のために、C O S 又は 2 9 3 細胞中に、最終配列が確認されたクローンを同時形質移入した（同じ A b 対の H V 及び L C をマッキングさせる。）。

#### 【 0 2 7 3 】

精製された D V D - I g タンパク質の特性は、表 1 6 に要約されている。表 1 6 の左側部分は、新しい h I L - 1 a / b D V D - 1 g 分子の構築のために使用された m A b の 2 つの対の特異性、結合親和性及び中和能を示している。h I L - 1 a / b D V D 3 a - I

g、h I L - 1 a / b D V D 4 a - I g , h I L - 1 a / b D V D 3 b - I g 及び h I L - 1 a / b D V D 4 b - I g を構築するために、抗体 1 8 F 4 . 2 C 8 及び 1 B 1 2 . 4 H 4 ( 実施例 1 . 1 . D 参照 ) を使用した。h I L - 1 a / b D V D 3 a - I g 及び h I L - 1 a / b D V D 4 a - I g は、a - b - C の配向であり、それぞれ、短いリンカー及び長いリンカーを有する。h I L - 1 a / b D V D 3 b - I g 及び h I L - 1 a / b D V D 4 b - I g は、b - a - C の配向であり、それぞれ、短いリンカー及び長いリンカーを有する。h I L - 1 a / b D V D 5 a - I g 、 h I L - 1 a / b D V D 6 a - I g , h I L - 1 a / b D V D 5 b - I g 及び h I L - 1 a / b D V D 6 b - I g を構築するために、抗体 6 H 3 . 1 A 4 及び 6 B 1 2 . 4 F 6 を使用した。h I L - 1 a / b D V D 5 a - I g 及び h I L - 1 a / b D V D 6 a - I g は、a - b - C の配向であり、それぞれ、短いリンカー及び長いリンカーを有する。h I L - 1 a / b D V D 5 b - I g 及び h I L - 1 a / b D V D 6 b - I g は、b - a - C の配向であり、それぞれ、短いリンカー及び長いリンカーを有する。h I L - 1 a / b D V D 1 - I g に対して先述した操作を使用し ( 実施例 1 . 3 参照 ) 、重複 P C R 操作を用いて、これらの追加の h I L - 1 a / b D V D - I g の分子クローニングを行った。これらの追加の h I L - 1 a / b D V D - I g のアミノ酸配列は、表 1 5 に開示されている。

【 0 2 7 4 】

【表 15】

表 15 : I L - 1  $\alpha$  及び I L - 1  $\beta$  を結合することができる 6 つの D V D I g の重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列

タンパク質 タンパク質領域	配列識別子	配列 12345678901234567890	
DVD 重可変 hIL-1a/b DVD3a-Ig	配列番号:41	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGLNIKDTYMHWLKQRPEQGLEWIGRIDPANGNAKYDPRFLGKATITADTSSNTAYLQLS SLTSEDTAVYYCARGDGNFHFDYWGQGTTLTVSSASTKGPQVHLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTDYGVSWIRQPPGKLEWLGLIWGGGDYYNSPLKSRLSIRKDNSKSKQVFLKMNSLQTDITAVYYCAKQRTLWGYDLYGMDYWGQGTSTVTVSS	10
18F4.2C8 VH	配列番号:3	EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGLNIKDTYMHWLKQRPEQGLEWIGRIDPANGNAKYDPRFLGKATITADTSSNTAYLQLS SLTSEDTAVYYCARGDGNFHFDYWGQGTTLTVSS	20
リンカー	配列番号:42	ASTKGP	
1B12.4H4 VH	配列番号:9	QVHLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTDYGVSWIRQPPGKLEWLGLIWGGGDYYNSPLKSRLSIRKDNSKSKQVFLKMNSLQTDITAVYYCAKQRTLWGYDLYGMDYWGQGTSTVTVSS	
CH	配列番号:34	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKEP KSCDKHTCPCPEPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPV LQSDGTSFYSKLTVDKSRWQQGNVSCFVYHNDLTHYDTMQSLSLSPGK	30 40



タンパク質 タンパク質領域	配列識別子	配列 12345678901234567890	
<b>DVD 軽可変 HIL- 1a/b DVD3a-Ig</b>	配列番号:43	DIVMTQSQRFMSTSVGDRVS VTCKASQNVGTNIAWYQQKP GQSPRALIYSASYRYSQVDP RFTGSGSGTDFTLTISNVQS VDLAEYFCQQYTRYPLTFGG GTKLEIKRTVAAPETTVTQS PASLSMAIGEKTIRCITST DIDVDMNWXQQKPGEPKLL ISQGNLRLPGVPSRFSSSGS GTFVFIENMLSEVDVYY CLQSDNLPLTFGAGTKLELKR	10
<b>18F4.2C8 VL</b>	配列番号:4	DIVMTQSQRFMSTSVGDRVS VTCKASQNVGTNIAWYQQKP GQSPRALIYSASYRYSQVDP RFTGSGSGTDFTLTISNVQS VDLAEYFCQQYTRYPLTFGG GTKLEIKR	
<b>LINKER</b>	配列番号:44	TVAAP	
<b>1B12.4H4 VL</b>	配列番号:10	ETTQSPASLSMAIGEKT IRCITSTDIDVDMNWXQQK GEPKLLISQGNLRLPGVPS RFSSSGSGTDFVFIENMLS EDVADYYCLQSDNLPLTFGA GTKLELKR	20
<b>CL</b>	配列番号:36	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVCLLNRFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC	
<b>DVD 重可変 hIL-1a/b DVD3b- Ig</b>	配列番号:45	QVHLKESGPGLVAPSQSLSI TCTVSGFSLTDYGVSWIRQP PGKGLEWLGLIWGGGDTYYN SPLKSRLSIRKDNSKSQVFL KMNSLQTDDTAVYYCAKQRT LWGYDLYGMDYWGQTSVTV SSASTKGPEVQLQQSGAELV KPGASVKLSCTASGLNIKDT YMHWLKQRPEQGLEWIGRID PANGNAKYDPRFLGKATITA DTSSNTAYLQLSSLTSEDTA VYYCARGDGNFHFYWGQGT TLTVSS	30
<b>1B12.4H4 VH</b>	配列番号:9	QVHLKESGPGLVAPSQSLSI TCTVSGFSLTDYGVSWIRQP PGKGLEWLGLIWGGGDTYYN SPLKSRLSIRKDNSKSQVFL KMNSLQTDDTAVYYCAKQRT LWGYDLYGMDYWGQTSVTV	40

タンパク質		配列
タンパク質領域	配列識別子	12345678901234567890
		SS
リンカー	配列番号:42	ASTKGP
18F4.2C8 VH	配列番号:3	EVQLQQSGAELVKPGASVKL SCTASGLNIKDTYMHWLKQR PEQGLEWIGRIDPANGNAKY DPRFLGKATITADTSSNTAY LQLSSLTSEDYAVYYCARGD GNFHFQYWGQGTTTLTVSS
CH	配列番号:34	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVTPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKEVEP KSCDKHTCPCPEPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPE EVTQVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPV LDSGGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSQSVMEALHNHYT QKSLSLSPGK
DVD 軽可変 HIL- 1a/b DVD3b-Ig	配列番号:46	ETTVTQSPASLSMAIGEKVT IRCITSTDIDVDMNHYQQKP GEPPKLLISQGNLTPGVPS RFSSSGSGTDFVFIENMLS EDVADYYCLQSDNLPVTFGA GTKLELKRVAAPDIVMTQS QRFMSTSVGDRVSVTCKASQ NVGTNIAWYQQKPGQSPRAL IYSASYRYSQVDRFTGSGS GTDFTLTISNVQSDLAEYF CQQYTRYPLTFGGGTKLEIK R
1B12.4H4 VL	配列番号:10	ETTVTQSPASLSMAIGEKVT IRCITSTDIDVDMNHYQQKP GEPPKLLISQGNLTPGVPS RFSSSGSGTDFVFIENMLS EDVADYYCLQSDNLPVTFGA GTKLELKR
リンカー	配列番号:44	TVAAP
18F4.2C8 VL	配列番号:4	DIVMTQSQRFMSTSVGDRVS VTCKASQNVGTNIAWYQQKP GQSPRALIYSASYRYSQVDR RFTGSGSGTDFLTISNVQS VDLAEYFCQQYTRYPLTFGG GTKLEIKR

10

20

30

40

タンパク質		配列
タンパク質領域	配列識別子	12345678901234567890
CL	配列番号 :36	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
DVD 重可変 hIL- 1a/b DVD4a-Ig	配列番号 :47	EVQLQQSGAELVKPGASVKL SCTASGLNIKDTYMHWLKQR PEQGLEWIGRIDPANGNAKY DPRFLGKATITADTSSNTAY LQLSSLTSEDVAVYYCARGD GNFHFDYWGQGTTLTVSSAS TKGPSVFPLAPQVHLKESGP GLVAPSQSLSI TCTVSGFSL TDYGVSWIRQPPGKGLEWL LIWGGGDTYYNSPLKSRLSI RKDNSKQVFLKMNSLQTD TAVYYCAKQRTLWGVDLYGM DYWGQGTSTVTVSS
18F4.2C8 VH	配列番号 :3	EVQLQQSGAELVKPGASVKL SCTASGLNIKDTYMHWLKQR PEQGLEWIGRIDPANGNAKY DPRFLGKATITADTSSNTAY LQLSSLTSEDVAVYYCARGD GNFHFDYWGQGTTLTVSS
リンカー	配列番号 :48	ASTKGPSVFPLAP
1B12.4H4 VH	配列番号 :9	QVHLKESGPGLVAPSQSLSI TCTVSGFSLTDYGVSWIRQP PGKGLEWLG LIWGGGDTYYN SPLKSRLSIRKDNSKQVFL KMNSLQTD TAVYYCAKQRT LWGYDLYGMDYWGQGTSTV SS
CH	配列番号 :34	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHNKPSNTKVDKKEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRT EVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK

10

20

30

40

タンパク質 タンパク質領域	配列識別子	配列 12345678901234567890	
DVD 軽可変 HIL- 1a/bDVD4a-Ig	配列番号 :49	DIVMTQSQRFMSTSVGDRVS VTCKASQNVGTNIAWYQQKP GQSPRALIYSASYRYSGVPD RFTGSGSGTDFTLTISNVQS VDLAEYFCQQYTRYPLTFGG GTKLEIKRTVAAPSVFIFPP ETTVTQSPASLSMAIGEKVT IRCITSTDIDVDMNWWYQQKP GEPPKLLISQGNLTPGVPS RFSSSGSGTDFVFIENMLS EDVADYYCLQSDNLPLTFGA GTKLELKR	10
18F4.2C8 VL	配列番号 :4	DIVMTQSQRFMSTSVGDRVS VTCKASQNVGTNIAWYQQKP GQSPRALIYSASYRYSGVPD RFTGSGSGTDFTLTISNVQS VDLAEYFCQQYTRYPLTFGG GTKLEIKR	
リンカー	配列番号 :50	TVAAPSVFIFPP	
1B12.4H4 VL	配列番号 :10	ETTVTQSPASLSMAIGEKVT IRCITSTDIDVDMNWWYQQKP GEPPKLLISQGNLTPGVPS RFSSSGSGTDFVFIENMLS EDVADYYCLQSDNLPLTFGA GTKLELKR	20
CL	配列番号 :36	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNIFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC	
DVD 重可変 hIL- 1a/b DVD4b-Ig	配列番号 :51	QVHLKESGPGLVAPSQSLSI TCTVSGFSLTDYGVSWIRQP PGKGLEWLGLIWGGGDTYYN SPLKSRLSIRKDNSKSQVFL KMNSLQTDDEAVYYCAKQRT LWGYDLYGMDYWGQTSVTV SSASTKGPSVFPLAPEVQLQ QSGAELVKPGASVKLSCTAS GLNIKDTYMHWLKQRPQGL EWIGRIDPANGNAKYDPRFL GKATITADTSSNTAYLQLSS LTSEDTAVYYCARGDGNFHF DYWGQGTTLTVSS	30
1B12.4H4 VH	配列番号 :9	QVHLKESGPGLVAPSQSLSI TCTVSGFSLTDYGVSWIRQP PGKGLEWLGLIWGGGDTYYN SPLKSRLSIRKDNSKSQVFL KMNSLQTDDEAVYYCAKQRT LWGYDLYGMDYWGQTSVTV	40

タンパク質		配列	
タンパク質領域	配列識別子	12345678901234567890	
		SS	
リンカー	配列番号:48	ASTKGPSVFPLAP	
18F4.2C8 VH	配列番号:3	EVQLQQSGAELVKPGASVKL SCTASGLNIKDTYMHWLKQR PEQGLEWIGRIDPANGNAKY DPRFLGKATITADTSSNTAY LQLSSLTSEDYAVYYCARGD GNFHFVDYWGQGTTLTVSS	10
CH	配列番号:34	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSQVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPE EVTQVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVVFSCSVMHEALHNHYT QKLSLSLSPGK	20
DVD 軽可変 HIL- 1a/b DVD4b-Ig	配列番号:52	ETTQVTSQSPASLSMAIGEKVT IRCITSTDDIDVDMNWFYQQK GEPKLLISQGNLTPGVPVPS RFSSSGSGTDFVFIENMLLS EDVADYYCLQSDNLPLTFGA GTKLELKRVAAPSVFIFPP DIVMTQSQRFMSTSVGDRVS VTCKASQNVGTNIAWYQQK GQSPRALIYSASYRYSYGVDP RFTGSGSGTDFTLTISNVQS VDLAEYFCQYTRYPLTFGG GTKLEIKR	30
1B12.4H4 VL	配列番号:10	ETTQVTSQSPASLSMAIGEKVT IRCITSTDDIDVDMNWFYQQK GEPKLLISQGNLTPGVPVPS RFSSSGSGTDFVFIENMLLS EDVADYYCLQSDNLPLTFGA GTKLELKR	
リンカー	配列番号:50	TVAAPSVFIFPP	
18F4.2C8 VL	配列番号:4	DIVMTQSQRFMSTSVGDRVS VTCKASQNVGTNIAWYQQK GQSPRALIYSASYRYSYGVDP RFTGSGSGTDFTLTISNVQS VDLAEYFCQYTRYPLTFGG GTKLEIKR	40

タンパク質 タンパク質領域	配列識別子	配列 12345678901234567890	
CL	配列番号 :36	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDYSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC	
DVD 重可変 hIL- 1a/b DVD5a-Ig	配列番号 :53	QVQLQQPGAELVRPGASVKL SCKASGYTFTTYWMNWVKQR PEQGLEWIGRIDPYDSETLY SQKFKDTAILTVDKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYCARYG FDYWGQGTTLTVSSASTKGP EVQLQQSGPELVKTGTSVKI SCKASGYSFTGYMHWRQS HGKSLEWIGYISCYNGFTSY NPKFKGKATFTVDTSSSTAY IQFSRLTSEDSAVYYCARSD YYGTNDYWGQGTTLTVSS	10
6H3.1A4.3E11 VH	配列番号 :5	QVQLQQPGAELVRPGASVKL SCKASGYTFTTYWMNWVKQR PEQGLEWIGRIDPYDSETLY SQKFKDTAILTVDKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYCARYG FDYWGQGTTLTVSS	20
リンカー	配列番号 :42	ASTKGP	
6B12.4F6 VH	配列番号 :11	EVQLQQSGPELVKTGTSVKI SCKASGYSFTGYMHWRQS HGKSLEWIGYISCYNGFTSY NPKFKGKATFTVDTSSSTAY IQFSRLTSEDSAVYYCARSD YYGTNDYWGQGTTLTVSS	
CH	配列番号 :34	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPTVVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKHTCPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSQSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK	30
		QIVLTQSPALMSASPGEKVT MTCASASSVNYMYWYQQKPR	40

タンパク質 タンパク質領域	配列識別子	配列 12345678901234567890
DVD 軽可変 HIL- 1a/b DVD5a-Ig	配列番号:54	SSPKPWIYLTSNLASGVPAR FSGSGSGTSSYSLTISSMEAE DAATYYCQQWNSNPYTFGGG TKLEMKRTVAAPQIVLTQSP AIMSASPGEKVTITCSASSS VSYMHWFQQKPGASPKLWIY STSNLASGVPARFSGSGSGT SYSLTVSRMEAEDAATYYCQ QRSTYPYTFGGGTKLEIKR
6H3.1A4.3E11 VL	配列番号:6	QIVLTQSPALMSASPGEKVT MTCSASSSVNYMYWYQKPR SSPKPWIYLTSNLASGVPAR FSGSGSGTSSYSLTISSMEAE DAATYYCQQWNSNPYTFGGG TKLEMKR
リンカー	配列番号:44	TVAAP
6B12.4F6 VL	配列番号:12	QIVLTQSPA IMSASPGEKVT ITCSASSSVSYMHWFQKPG ASPKLWIYSTSNLASGVPAR FSGSGSGTSSYSLTVSRMEAE DAATYYCQQRSTYPYTFGGG TKLEIKR
CL	配列番号:36	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
DVD 重可変 hIL- 1a/b DVD5b-Ig	配列番号:55	EVQLQQSGPELVKGTGTSVKI SCKASGYSFTGYMHWRQS HGKSLEWIGYISCYNGFTSY NPKFKGKATFTVDTSSSTAY IQFSRLTSEDSAVYYCARSD YYGTNDYWGGTTTLTVSSAS TKGPQVQLQPGAELVRPGA SVKLSCKASGYTFTTYWMNW VKQRPEQGLEWIGRIDPYDS ETLYSQFKDTAILTVDKSS STAYMQLSSLTSEDSAVYYC ARYGFDYWGGTTTLTVSS
6B12.4F6 VH	配列番号:11	EVQLQQSGPELVKGTGTSVKI SCKASGYSFTGYMHWRQS HGKSLEWIGYISCYNGFTSY NPKFKGKATFTVDTSSSTAY IQFSRLTSEDSAVYYCARSD YYGTNDYWGGTTTLTVSS
リンカー	配列番号:42	ASTKGP
6H3.1A4.3E11 VH	配列番号:5	QVQLQQPGAELVRPGASVKL SCKASGYTFTTYWMNWVKQR PEQGLEWIGRIDPYDSETLY

10

20

30

40

タンパク質 タンパク質領域	配列識別子	配列 12345678901234567890	
<b>CH</b>	配列番号 :34	SQKFKDTAILTVDKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYCARYG FDYWGQGTTLTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKEVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTTP EVTCCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK	10
<b>DVD 軽可変 HIL- 1a/b DVD5b-Ig</b>	配列番号 :56	QIVLTQSPA <del>IM</del> SASPGEKVT ITCSASSSVSYMHW <del>FQ</del> QKPG ASP <del>KL</del> WIYSTSNLASGV <del>PAR</del> FSGSGSGTSYSLTVSRMEAE DAATYYCQQRSTYPYTFGGG TKLEIKR <del>TVAAP</del> QIVLTQSP ALMSASPGEKVTMTCSASS VNMYWYQ <del>Q</del> KPRSSPKPW <del>IY</del> LTSN <del>LA</del> SGV <del>PAR</del> FSGSGSGT SYSLT <del>IS</del> SMEAE <del>DAATYYCQ</del> QWNSNPYTFGGG <del>TKLEMKR</del>	20
<b>6B12.4F6 VL</b>	配列番号 :12	QIVLTQSPA <del>IM</del> SASPGEKVT ITCSASSSVSYMHW <del>FQ</del> QKPG ASP <del>KL</del> WIYSTSNLASGV <del>PAR</del> FSGSGSGTSYSLTVSRMEAE DAATYYCQQRSTYPYTFGGG TKLEIKR	30
リンカー	配列番号 :44	<u>TVAAP</u>	
<b>6H3.1A4.3E11 VL</b>	配列番号 :6	QIVLTQSPALMSASPGEKVT MTC <del>SASSSVNMYWYQ</del> KPR SSPK <del>PWIY</del> LTSN <del>LA</del> SGV <del>PAR</del> FSGSGSGTSYSLT <del>IS</del> SMEAE DAATYYCQ <del>QWNSNPYTFGGG</del> TKLEMKR	
<b>CL</b>	配列番号 :36	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC	40



タンパク質		配列	
タンパク質領域	配列識別子	12345678901234567890	
DVD 重可変 hIL- 1a/b DVD6a-Ig	配列番号 :57	QVQLQQPGAELVRPGASVKL SCKASGYTFTTYWMNWVKQR PEQGLEWIGRIDPYDSETLY SQKFKDTAILTVDKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYCARYG FDYWGQGTTLTVSSASTKGP SVFPLAPEVQLQQSGPELVK TGTSVKISCKASGYSFTGY MHWVRQSHGKSLEWIGYISC YNGFTSYNPKFKGKATFTVD TSSSTAYIQFSRLTSEDSAV YYCARSDYGTNDYWGQGTTL TVSS	10
6H3.1A4.3E11 VH	配列番号 :5	QVQLQQPGAELVRPGASVKL SCKASGYTFTTYWMNWVKQR PEQGLEWIGRIDPYDSETLY SQKFKDTAILTVDKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYCARYG FDYWGQGTTLTVSS	
リンカー	配列番号 :48	ASTKGPSVFPLAP	
6B12.4F6 VH	配列番号 :11	EVQLQQSGPELVKTGTSVKI SCKASGYSFTGYMHWVRQS HGKSLEWIGYISCYNGFTSY NPKFKGKATFTVDTSSSTAY IQFSRLTSEDSAVYYCARSD YYGTNDYWGQGTTLTVSS	20
CH	配列番号 :34	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTRKVDKKEP KSCDKHTCPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTQVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSQSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK	30
DVD 軽可変 HIL-	配列番号 :58	QIVLTQSPALMSASPGEKVT MTCASASSVNYMYWYQQKPR SSPKPWIYLTSLASGVPAR FSGSGSTSYSLTISSEAE DAATYYCQQWNSNPYTFGGG TKLEMKRTVAAPSVFIFPPQ IVLTQSPAISASPGEKVTI	40

タンパク質		配列
タンパク質領域	配列識別子	12345678901234567890
<b>1a/b DVD 6a-Ig</b>		TCSASSSVSYMHWFOQKPGA SPKLWIYSTSNLASGVPARF SGSGSGTYSYSLTVSRMEAE AATYYCQQRSTYPYTFGGGT KLEIKRR
<b>6H3.1A4.3E11 VL</b>	配列番号:6	QIVLTQSPALMSASPGEKVT MTCSASSSVNYMYWYQKPR SSPKWIYLTSNLASGVPAR FSGSGSGTYSYSLTISSEAE DAATYYCQQWNSNPYTFGGG TKLEMKR
リンカー	配列番号:50	TVAAPSVFIFPP
<b>6B12.4F6 VL</b>	配列番号:12	QIVLTQSPA <del>IMS</del> ASPGEKVT ITCSASSSVSYMHWFOQKPG ASPKLWIYSTSNLASGVPAR FSGSGSGTYSYSLTVSRMEAE DAATYYCQQRSTYPYTFGGG TKLEIKR
<b>CL</b>	配列番号:36	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
<b>DVD 重可変 hIL- 1a/b DVD6b-Ig</b>	配列番号:59	EVQLQQSGPELVKGTGTSVKI SCKASGYSFTGYMHWRQS HGKSLEWIGYISCYNGFTSY NPKFKGKATFTVDTSSSTAY IQFSRLTSEDSAVYYCARSD YYGTNDYWGQGTTLTVSSAS TKGPSVFPLAPQVQLQQPGA ELVRPGASVKLSCKASGYTF TTYWMNWVKQRPEQGLEWIG RIDPYDSETLYSQFKDTAI LTVDKSSSTAYMQLSSLTSE DSAVYYCARYGFYWGQGTTL TVSS
<b>6B12.4F6 VH</b>	配列番号:11	EVQLQQSGPELVKGTGTSVKI SCKASGYSFTGYMHWRQS HGKSLEWIGYISCYNGFTSY NPKFKGKATFTVDTSSSTAY IQFSRLTSEDSAVYYCARSD YYGTNDYWGQGTTLTVSS
リンカー	配列番号:48	ASTKGPSVFPLAP
<b>6H3.1A4.3E11 VH</b>	配列番号:5	QVQLQQPGAELVRPGASVKL SCKASGYTFTTYWMNWVKQR PEQGLEWIGRIDPYDSETLY SQFKDTAILTVDKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYCARYG FDYWGQGTTLTVSS

10

20

30

40

タンパク質 タンパク質領域	配列識別子	配列 12345678901234567890	
<b>CH</b>	配列番号 :34	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSQVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPE EVTQCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVVFSCSVMHEALHNHYT QKLSLSLSPGK	10
<b>DVD 軽可変 HIL- 1a/b DVD6b-Ig</b>	配列番号 :60	QIVLTQSPA <del>IMS</del> SASPGKEKVT ITCSASSSVSYMHW <del>F</del> QQKPG ASP <del>KL</del> WIYSTSN <del>LA</del> SGV <del>PAR</del> FSGSGSGTSYSLT <del>VS</del> RMEAE DAATYYCQQRSTYPYTFGGG TKLEIKRTVAAPSVFIFPPQ IVLTQSPALMSASPGKEKVTM TCSASSSVNYMYWYQQK <del>PRS</del> SPKPWIYLT <del>SN</del> LA <del>SG</del> V <del>PAR</del> SGSGSGTSYSLT <del>ISS</del> MEAE AATYYCQQWNSNPYTFGGGT KLEMKRR	20
<b>6B12.4F6 VL</b>	配列番号 :12	QIVLTQSPA <del>IMS</del> SASPGKEKVT ITCSASSSVSYMHW <del>F</del> QQKPG ASP <del>KL</del> WIYSTSN <del>LA</del> SGV <del>PAR</del> FSGSGSGTSYSLT <del>VS</del> RMEAE DAATYYCQQRSTYPYTFGGG TKLEIKR	30
リンカー	配列番号 :50	<u>TVAAPSVFIFPP</u>	
<b>6H3.1A4.3E11 VL</b>	配列番号 :6	QIVLTQSPALMSASPGKEKVT MTCSASSSVNYMYWYQQK <del>PR</del> SSPKWIYLT <del>SN</del> LA <del>SG</del> V <del>PAR</del> FSGSGSGTSYSLT <del>ISS</del> MEAE DAATYYCQQWNSNPYTFGGG TKLEMKR	
<b>CL</b>	配列番号 :36	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASV <del>V</del> CLLMN <del>F</del> YPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC	40

## 【 0 2 7 5 】

新規DVD構築物の特徴は、表16に要約されている。親和性 ( $K_d$ ) 及び生物学的活性 ( $IC_{50}$ ) は、それぞれ、Biacore及びMRC-5パイオアッセイによって測定した。全ての新規DVDタンパク質のSDS-PAGE分析は、還元条件及び非還元条件の両方で、通常の抗体及びDVD1/2-Igと同様の正常な移動パターンを示した。

## 【 0 2 7 6 】

【表 16】

表 16. 新しい mAb 由来の新しい DVD-I g 分子の性質決定

mAb	特異性	K <sub>d</sub> (M)	IC <sub>50</sub> (M)	DVD	配向	リンカー	親和性 (K <sub>d</sub> ) M		効力 (IC <sub>50</sub> ) M		
							IL-1α	IL-1β	IL-1α	IL-1β	
18F4.208 1B12.4H4	rhIL-1α	5.95E-10	3.30E-10	DVD3a	a-b-c	短	8.37E-10	6.37E-08	7.50E-10	IL-1β	
	rhIL-1β			DVD4a	a-b-c	長	7.01E-10	9.30E-10	3.50E-10	1.00E-08	NA
6H3.1A4 6B12.4F6		2.61E-10	6.00E-10	DVD3b	b-a-c	短	1.24E-09	1.90E-10	7.00E-09	4.00E-10	
				DVD4b	b-a-c	長	5.60E-10	1.28E-10	3.50E-10	5.00E-10	
		3.54E-10	2.40E-10	DVD5a	a-b-c	短	5.08E-10	1.25E-08	2.60E-09	1.90E-08	
				DVD6a	a-b-c	長	1.06E-09	2.09E-09	2.30E-09	7.00E-08	
5.54E-10	4.00E-10	DVD5b	b-a-c	短	1.32E-08	6.71E-10	3.30E-09	2.50E-10			
		DVD6b	b-a-c	長	8.20E-10	6.79E-10	1.00E-09	7.50E-10			

NA : 中和活性検出されず。

【0277】

新しい DVD 分子の機能的な性質決定は、何れの配向においても、両抗原の結合及び中和の点で、長いリンカーを有する DVD は、短いリンカーを有する DVD に比べて成績が

10

20

30

40

50

優れていた。長いリンカーを有するDVDに関して、b-a-Cの配向を有するDVDは、両抗原への優れた結合及び両抗原の優れた中和を示したが、a-b-C配向を有するDVDは、IL-1への優れた結合及びIL-1の優れた中和を示したが、IL-1への結合及びIL-1の中和は低下していた（例えば、DVD4b対DVD4a）。DVD-Ig分子、DVD4bは、IL-1及びIL-1の両方を、nM未満で結合及び中和し、親mAbの結合及び中和特性を完全に保持していた。

## 【0278】

（実施例3）

IL-12及びIL-18を結合できるDVD-Igの作製

IL-12及びEL-18を結合できるDVD-Ig分子を、上述のとおり、1つがヒトIL-12p40に対するもの（ABT874）、もう1つがヒトEL-18に対するもの（ABT325）である2つの親モノクローナル抗体を使用して構築した。4つの異なる抗IL-12/18DVD-Ig構築物を作製し、2つは短いリンカーを、2つは長いリンカーを有し、各々2つの異なるドメイン配向：12-18-C及び18-12-Cであった（表VI）。ヒトC<sub>L</sub>/C<sub>K</sub>又はCH1ドメインのN末端配列由来のリンカー配列は、次のとおりであった。

## 【0279】

DVD1218構築物（ABT874はV<sub>L</sub>を有する。）に関して：

軽鎖（<sub>L</sub>）：短いリンカー：QPKAAP、長いリンカー：QPKAAPSVTLFPP、

重鎖（<sub>H</sub>）：短いリンカー：ASTKGP、長いリンカー：ASTKGPSVFPLAP、

DVD1812構築物（ABT325は、V<sub>K</sub>を有する。）に関して：

軽鎖（<sub>L</sub>）：短いリンカー：TVAAP、長いリンカー：TVAAPSVFIFPP、

重鎖（<sub>H</sub>）：短いリンカー：ASTKGP、長いリンカー：ASTKGPSVFPLAP。

## 【0280】

全ての重鎖及び軽鎖作製をpBOS発現ベクター中にサブクローニングし、COS細胞又はフリースタイル293細胞中で発現させた後、タンパク質Aクロマトグラフィーにより精製した。精製した材料をSDS-PAGE及びSECへ供し、それらの特性は、DVD2-Igのものと同様であった。

## 【0281】

以下の表17は、各抗IL12/L18 DVD-Igタンパク質を発現させるために使用した重鎖及び軽鎖の作製を記載する。

## 【0282】

## 【表17】

表17. 抗IL12/IL18DVD-Igタンパク質を発現するための構築物

DVD-Ig タンパク質	重鎖構築物	軽鎖構築物
DVD1218SL	DVD1218HC-SL	DVD1218LC-SL
DVD1218LL	DVD1218HC-LL	DVD1218LC-LL
DVD1812SL	DVD1812HC-SL	DVD1812LC-SL
DVD1812LL	DVD1812HC-LL	DVD1812LC-LL

## 【0283】

実施例3.1.1：DVD1218SL及びDVD1218LLのためのDNA作製の分子クローニング

重鎖構築物DVD1218HC-LL及びDVD1218HC-SLを作製するために、それぞれプライマー1及びプライマー2L又はプライマー2Sを使用して、ABT-874のVHドメインをPCR増幅したのに対して、それぞれプライマー3L若しくはプラ

イマー 3 S 及びプライマー 4 を使用して、A B T - 3 2 5 の V H ドメインを増幅した。標準的な P C R 技術及び手法に従って、両 P C R 反応を実施した。2 つの P C R 産物をゲル精製し、標準的な P C R 条件を使用して、プライマー 1 及びプライマー 4 を使用するその後の重複 P C R 反応のための重複テンプレートとして一緒に使用した。哺乳動物以外の発現ベクターである p B O S - h C v l ( A b b o t t ) を、S r f 1 及び S a l I で二重消化したものに対して、標準的な相同性組換えアプローチを使用することによって、重複している P C R 産物をサブクローニングした。

## 【 0 2 8 4 】

軽鎖構築物 D V D 1 2 1 8 L C - L L 及び D V D 1 2 1 8 L C - S L を作製するために、それぞれ、プライマー 5 及びプライマー 6 L 又はプライマー 6 S を使用して、A B T - 8 7 4 の V L ドメインを P C R 増幅したのに対して、それぞれ、プライマー 7 L 若しくはプライマー 7 S 及びプライマー 8 を使用して、A B T - 3 2 5 の V L ドメインを増幅した。標準的な P C R 技術及び手法に従って、両 P C R 反応を実施した。2 つの P C R 産物をゲル精製し、標準的な P C R 条件を使用して、プライマー 5 及びプライマー 8 を使用するその後の重複 P C R 反応のための重複テンプレートとして一緒に使用した。p B O S - h C k l 哺乳動物発現ベクターである ( A b b o t t ) を S r f 1 及び N o t I で二重消化したものに対して、標準的な相同性組換えアプローチを使用することによって、重複している P C R 産物をサブクローニングした。これらの構築のために使用したプライマーを以下の表 1 8 に列挙する。

## 【 0 2 8 5 】

## 【 表 1 8 】

表 1 8 :

プライマー-1:TAGAGATCCCTCGACCTCGAGATCCATTGTGCCCGGGCGCCA CCATGGAGTTTGGGCTGAGC	配列番号 :61
プライマー-2- S:CACCTCTGGGCCCTTGGTCGACGCTGAAGAGACGGTGACCATTGT	配列番号 :62
プライマー-2- L:GGGTGCCAGGGGGAAGACCGATGGGCCCTTGGTCGACGCTGAAGA GACGGTGACCATTGT	配列番号 :63
プライマー-3- S:TCTTCAGCGTCGACCAAGGGCCCAGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCT	配列番号 :64
プライマー-3- L:GCGTCGACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCGAGGTG CAGCTGGTGCAGTCT	配列番号 :65
プライマー-4:GTAGTCCTTGACCAGGCAGCC	配列番号 :66
Primer5:TAGAGATCCCTCGACCTCGAGATCCATTGTGCCCGGGCGCCA CCATGACTTGGACCCCACTC	配列番号 :67
プライマー-6- S:TATTTTCGGGGGCAGCCTTGGGCTGACCTAGTACTGTGACCTTGGT	配列番号 :68
プライマー-6- L:GGGCGGGAACAGAGTGACCGAGGGGGCAGCCTTGGGCTGACCTA GTACTGTGACCTTGGT	配列番号 :69
プライマー-7- S:CTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCGAAATAGTGATGACGCAGTCT	配列番号 :70
プライマー-7- L:CAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCGAAATAG TGATGACGCAGTCT	配列番号 :71
プライマー-GTCCCAGGTGGGGACCCTCACTCTAGAGTCGCGGCCGCCTA ACACTCTCCCCTGTTGAA	配列番号 :72

## 【 0 2 8 6 】

以下に記載されているように、D V D 1 8 1 2 S L 及び D V D 1 8 1 2 L L を作製するために、類似のアプローチが使用された。

## 【 0 2 8 7 】

実施例 3 . 1 . 2 : DVD 1 8 1 2 S L 及び DVD 1 8 1 2 L L のための DNA 作製の分子クローニング

重鎖構築物 DVD 1 8 1 2 H C - L L 及び DVD 1 8 1 2 H C - S L を作製するために、それぞれ、プライマー 1 及びプライマー 9 L 又はプライマー 9 S を使用して、A B T - 3 2 5 の V H ドメインを P C R 精製した。それぞれ、プライマー 1 0 L 又はプライマー 1 0 S 及びプライマー 4 を使用して、A B T - 8 7 4 の V H ドメインを増幅した。標準的な P C R 技術及び手法に従って、両 P C R 反応を実施した。2 つの P C R 産物をゲル精製し、標準的な P C R 条件を使用して、プライマー 1 及びプライマー 4 を使用するその後の重複 P C R 反応のための重複テンプレートとして一緒に使用した。哺乳動物以外の発現ベクターである p B O S - h C v l ( A b b o t t ) を、S r f 1 及び S a l I で二重消化したものに対して、標準的な相同性組換えアプローチを使用することによって、重複している P C R 産物をサブクローニングした。以下は、プライマーの配列である。

【 0 2 8 8 】

軽鎖構築物 DVD 1 8 1 2 L C - L L 及び DVD 1 8 1 2 L C - S L を作製するために、それぞれ、プライマー 1 1 及びプライマー 1 2 L 又はプライマー 1 2 S を使用して、A B T - 3 2 5 の V L ドメインを P C R 増幅したのに対して、それぞれ、プライマー 1 3 L 又はプライマー 1 3 S 及びプライマー 1 4 を使用して、A B T - 8 7 4 の V L ドメインを増幅した。標準的な P C R 技術及び手法に従って、両 P C R 反応を実施した。2 つの P C R 産物をゲル精製し、標準的な P C R 条件を使用して、プライマー 1 1 及びプライマー 1 4 を使用するその後の重複 P C R 反応のための重複テンプレートとして一緒に使用した。p B O S - h C k l 哺乳動物発現ベクターである ( A b b o t t ) を S r f 1 及び N o t I で二重消化したものに対して、標準的な相同性組換えアプローチを使用することによって、重複している P C R 産物をサブクローニングした。これらの構築のために使用されるプライマーを以下の表 1 9 に列挙する。

【 0 2 8 9 】

【表 1 9】

表 1 9 :

プライマー-9-S: CACCTGTGGGCCCTTGGTCGACGCTGAAGAGACGGTGACCATTGT	配列番号 :73
プライマー-9-L: GGGTGCCAGGGGAAGACCGATGGGCCCTTGGTCGACGCTGAAGAG ACGGTGACCATTGT	配列番号 :74
プライマー-10-S: TCTTCAGCGTCGACCAAGGGCCACAGGTGCAGCTGGTGGAGTCT	配列番号 :75
プライマー-10-L: GCGTCGACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCAGGTG CAGCTGGTGGAGTCT	配列番号 :76
プライマー-11: TAGAGATCCCTCGACCTCGAGATCCATTGTGCCCCGGGCGCCACCATG GAAGCCCCAGCGCAGCTT	配列番号 :77
プライマー-12-S: AGACTGTGGTGCAGCCACAGTTCGTTTAATCTCCAGTCGTGT	配列番号 :78
プライマー-12-L: TGCGGGAAGATGAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTAAT CTCCAGTCGTGT	配列番号 :79
プライマー-13-S: AAACGAACTGTGGCTGCACCACAGTCTGTGCTGACTCAGCCC	配列番号 :80

プライマ-13- L:ACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCACAGTCTGTGC TGACTCAGCCC	配列番号:81
プライマ-14: GTCCCAGGTGGGGACCCTCACTCTAGAGTCGCGGCCGCTCATGAAC ATTCTGTAGGGGC	配列番号:82

## 【0290】

抗IL12/L-18 DVD-Igの8個の重鎖及び軽鎖作製のための最終的なDNA配列は、表20に示されているとおりである。

## 【0291】

## 【表20】

タンパク質	配列識別子	配列	
タンパク質領域		12345678901234567890	
DVD 重可変 DVD1218HC-SL	配列番号:83	QVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCAASGFTFSSYGMHWVRQA PGKGLEWVAFIRYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCKTHG SHDNWGQGMVTVSSASTKG PEVQLVQSGTEVKKPGESLK ISCKGSGYTVTSYWIGWVRQ MPGKGLEWMGFYIPGDSETR YSPTFQGQVTISADKSFNTA FLQWSSLKASDTAMYICARV GSGWYPYTFDIWGQGMVTV SS	20
ABT-874 VH	配列番号:84	QVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCAASGFTFSSYGMHWVRQA PGKGLEWVAFIRYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCKTHG SHDNWGQGMVTVSS	30
リンカー	配列番号:42	ASTKGP	
ABT-325 VH	配列番号:85	EVQLVQSGTEVKKPGESLKI SCKGSGYTVTSYWIGWVRQM PGKGLEWMGFYIPGDSETRY SPTFQGQVTISADKSFNTAF LQWSSLKASDTAMYICARV SGWYPYTFDIWGQGMVTVS S	
CH	配列番号:34	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKEP KSCDKHTCPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN	40

10

20

30

40



タンパク質		配列	
タンパク質領域	配列識別子	12345678901234567890	
		STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSQSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK	10
DVD 軽可変  DVD1218LC-SL	配列番号 :86	MTWTPLLFLTLLLHCTGSL QSVLTQPPSVSGAPGQRVTI SCSGSRSNIGSNTVKWYQQL PGTAPKLLIYYNDQRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAITGLQ AEDEADYYCQSYDRYTHPAL LFGTGTKVTVLGQPKAAPEI VMTQSPATLSVSPGERATLS CRASESISNLAWYQQKPGQ APRLFIIYTASTRATDIPARF SGSGSGTEFTLTISLQSED FAVYYCQQYNNWPSITFGQG TRLEIKR	20
ABT-874 VL	配列番号 :87	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTI SCSGSRSNIGSNTVKWYQQL PGTAPKLLIYYNDQRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAITGLQ AEDEADYYCQSYDRYTHPAL LFGTGTKVTVLG	
リンカー	配列番号 :88	QPKAAP	
ABT-325 VL	配列番号 :89	EIVMTQSPATLSVSPGERAT LSCRASESISNLAWYQQK GQAPRLFIIYTASTRATDIPA RFSGSGSGTEFTLTISLQS EDFAVYYCQQYNNWPSITFG QGTRLEIKR	30
CL	配列番号 :36	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC	
DVD 重可変  DVD1218HC-LL	配列番号 :90	QVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCAASGFTFSSYGMHWVRQA PGKGLEWVAFIRYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCKTHG SHDNWGQGTMTVSSASTKG PSVFLAPEVQLVQSGTEVK KPGESLKISCKGSGYTVTSY WIGWVRQMPGKGLEWMGFIY PGDSETRYSPFTFGQVTISA	40

タンパク質		配列
タンパク質領域	配列識別子	12345678901234567890
		DKSFNTAFLQWSSLKASDTA MYICARVGSWYPTFDIWG QGTMTVSS
ABT-874 VH	配列番号:84	QVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCAASGFTFSSYGMHWVRQA PGKGLEWVAFIRYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCKTHG SHDNWGQGTMTVSS
リンカー	配列番号:48	ASTKGPSVFPLAP
ABT-325 VH	配列番号:85	EVQLVQSGTEVKKPGESLKI SCKGSGYTVTSYIWGVRQM PGKGLEWGMFIYPGDSETRY SPTFQQQVTISADKSFNTAF LQWSSLKASDTAMYICARVG SGWYPTFDIWGQGTMTVSS S
CH	配列番号:34	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPE EVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
DVD 軽可変 DVD1218LC-LL	配列番号:91	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTI SCSGSRSNIGSNTVKWYQQL PGTAPKLLIYNDQRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAITGLQ AEDEADYQCQSYDRYTHPAL LFGTGTKVTVLQPKAAPSV TLFPPPEIVMTQSPATLSVSP GERATLSCRASESISNLAW YQQKPGQAPRLFIYTA STRA TDIPARFSGSGSTEFTLTI SSLQSEDFAVYYCQQYNWP SITFGQGRLEIKR
ABT-874 VL	配列番号:87	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTI SCSGSRSNIGSNTVKWYQQL PGTAPKLLIYNDQRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAITGLQ

10

20

30

40

タンパク質		配列
タンパク質領域	配列識別子	12345678901234567890
		AEDEADYYCQSYDRYTHPAL LFGTGTKVTVLG
リンカー	配列番号 :92	QPKAAPSVTLFPP
ABT-325 VL	配列番号 :89	EIVMTQSPATLSVSPGERAT LSCRASESISSNLAWYQQK GQAPRLFITYASTRATDIPA RFSGSGSGTEFTLTISLQS EDFAVYYCQYNNWPSITFG QGTRLEIKR
CL	配列番号 :36	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
DVD 重可変 DVD1812HC-SL	配列番号 :93	EVQLVQSGTEVKKPGESLKI SCKGSGYTVTSYWIWVRQM PGKGLEWMGFYIPGDSETRY SPTFQGQVTISADKSFNTAF LQWSLKAASDTAMYICARVG SGWYPYTFDIWGQGMVTVS SASTKGPQVQLVESGGGVVQ PGRSLRLSCAASGFTFSSYG MHWVRQAPGKLEWVAFIRY DGSNKYYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNLSRAEDTAV YYCKTHGSHDNWGQGMVTV SS
ABT-325 VH	配列番号 :85	EVQLVQSGTEVKKPGESLKI SCKGSGYTVTSYWIWVRQM PGKGLEWMGFYIPGDSETRY SPTFQGQVTISADKSFNTAF LQWSLKAASDTAMYICARVG SGWYPYTFDIWGQGMVTVS S
リンカー	配列番号 :42	ASTKGP
ABT-874 VH	配列番号 :84	QVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCAASGFTFSSYGMHWVRQA PGKLEWVAFIRYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMNLSRAEDTAVYYCKTHG SHDNWGQGMVTVSS
CH	配列番号 :34	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMI SRT EVTCVVVDVSHEDPEVKFNW

10

20

30

40

タンパク質		配列
タンパク質領域	配列識別子	12345678901234567890
		YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
DVD 軽可変  DVD1812LC-SL	配列番号 :94	EIVMTQSPATLSVSPGERAT LSCRASESISSNLAWYQQKP GQAPRLFIIYTASTRATDIPA RFSGSGSGTEFTLTISLQS EDFAVYYCQQYNNWPSITFG QGTRLEIKRTVAAPQSVLTQ PPSVSGAPGQRVTISCSGR SNIGSNTVKWYQQLPGTAPK LLIYYNDQRPSGVPDRFSGS KSGTSASLAITGLQAEDEAD YYCQSYDRYTHPALLFGTGT KVTVLG
ABT-325 VL	配列番号 :89	EIVMTQSPATLSVSPGERAT LSCRASESISSNLAWYQQKP GQAPRLFIIYTASTRATDIPA RFSGSGSGTEFTLTISLQS EDFAVYYCQQYNNWPSITFG QGTRLEIKR
リンカー	配列番号 :44	TVAAP
ABT-874 VL	配列番号 :87	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTI SCSGRSRNSNIGSNTVKWYQQL PGTAPKLLIYYNDQRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAITGLQ AEDEADYYCQSYDRYTHPAL LFGTGTKVTVLG
CL	配列番号 :36	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
DVD 重可変  DVD1812HC-LL	配列番号 :95	EVQLVQSGTEVKKPGESLKI SCKGSGYTVTSYWIGWVRQM PGKGLEWMMGF IYPGDSETRY SPTFQGGQVTISADKSFNTAF LQWSSLKASDTAMYYCARVG SGWYPYTFDIWGQGTMTVTS SASTKGPSVFPLAPQVQLVE SGGGVVQPGRSLRLSCAASG FTFSSYGMHWVRQAPGKGLE WVAFIRYDGSNKYYADSVKG

10

20

30

40

タンパク質		配列
タンパク質領域	配列識別子	12345678901234567890
		RFTISRDN SKNTLYLQMN SL RAEDTAVYYCKTHGSHDNWG QGTMTVTVSS
ABT-325 VH	配列番号 :85	EVQLVQSGTEVKKPGESLKI SCKGSGYTVTSYWIGWVRQM PGKGLEWGMFIYPGDSETRY SPTFQGQVTISADKSFNTAF LQWSSLKASDTAMYYCARVG SGWYPYTFDIWGQGTMTVTVS S
リンカー	配列番号 :48	ASTKGPSVFPLAP
ABT-875 VH	配列番号 :84	QVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCAASGFTFSSYGMHWVRQA PGKGLEWVAFIRYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMN SLRAEDTAVYYCKTHG SHDNWGQGTMTVTVSS
CH	配列番号 :34	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
DVD 軽可変 DVD1812LC-LL	配列番号 :96	EIVMTQSPATLSVSPGERAT LSCRASESISNLAWYQQK GQAPRLFIYTA STRATDIPA RFSGSGSGTEFTLTISLQS EDFAVYYCQQYNNWPSITFG QGTRLEIKRTVAAPSVFIFP PQSVLTQPPSVSGAPGQRT ISCSGSRSNIGSNTVKWYQQ LPGTAPKLLIYNDQRPSGV PDRFSGSKSGTSASLAITGL QAED EADYYCQSYDRYTHPA LLFGTGTKVTVLG
ABT-325 VL	配列番号 :89	EIVMTQSPATLSVSPGERAT LSCRASESISNLAWYQQK GQAPRLFIYTA STRATDIPA RFSGSGSGTEFTLTISLQS

10

20

30

40

タンパク質	配列識別子	配列
タンパク質領域		12345678901234567890
リンカー	配列番号:50	EDFAVYYCQQYNNWPSITFG QGTRLEIKR
ABT-874 VL	配列番号:87	TVAAPSVFIFPP QSVLTQPPSVSGAPGQRVTI SCSGSRSNIGSNTVKWYQQL PGTAPKLLIYYNDQRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAITGLQ AEDEADYYCQSYDRYTHPAL LFGTGTKVTVLG
CL	配列番号:36	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC

10

## 【0292】

(実施例3.2)

IL-12/L-18 DVD Igの抗原結合親和性の測定

hIL-12及びhIL-18に対する抗IL-12/18 DVD-Igの結合親和性は、Biacoreによって測定した(表21)。EL-18に対する中和活性は、KG-1アッセイによって測定した(Konishi, K, et al.)。簡潔に述べると、(2 ng/mLの最終濃度の)IL-18試料を、(0 mg/mLと10 mg/mLの間の最終濃度の)DVD-Igとともに37 で1時間、予め温置した後、10 ng/mLのhTNFを含有するRPMI培地中のKG-1細胞(3 × 10<sup>6</sup> 個/mL)へ添加した後、37 で16ないし20時間温置した。培養上清を回収し、各試料中のヒトIFN- $\gamma$ 生成をELISA(R&D Systems)によって測定した。IC50値として表されるIL-18に対するDVD分子の阻害活性を表6に示す。IL-12に対する抗IL-12/18 DVD分子の阻害活性を測定するために、活性化されたPHA芽細胞からIL-12によって誘導されるIFN- $\gamma$ 生成アッセイを利用した(D'Andrea, A, et al.)。ヒトIFN- $\gamma$ を産生するために、PHA芽細胞を、ヒトIL-12とともに18時間温置した。200 pg/mLのヒトIL-12濃度で、最大を下回る刺激(最大の55ないし75%)を得た。特異的ヒトIFN- $\gamma$  ELISA(Endogen, Cambridge, MA)を使用して、IFN- $\gamma$ に関して上清をアッセイした。IL-12 DVDを中和することによって、IL-12によって誘導されるIFN- $\gamma$ 産生が妨害される。表21に示されているように、ヒトPHA芽細胞によるIFN- $\gamma$ 産生の50%を阻害するために必要なDVD濃度を測定することによって、DVDの中和活性を測定した。

20

30

## 【0293】

Biacoreによって親和性(K<sub>d</sub>)を測定し、KG-1バイオアッセイ(IL-18)及びPBMCアッセイ(IL-12)により作用強度を測定した。

40

## 【0294】

【表 2 1】

mAb	特異性		K <sub>d</sub> (M)	IC <sub>50</sub> (M)	DVD	配向	リンカー	親和性 (K <sub>d</sub> , M)		効力 (IC <sub>50</sub> , M)
	rIL-12	rIL-18						IL-12	IL-18	
ABT874	rIL-12		6.47E-11	5.0E-12	DVD1218-SL	12-18-C	短	3.81E-11	6.22E-10	6.93E-12
ABT325	rIL-18		1.37E-10	3.0E-10	DVD1812-SL	18-12-C	短	1.82E-09	1.91E-10	3.66E-10
					DVD1812-LL	18-12-C	長	1.13E-10	1.62E-10	1.18E-10

親和性 (K<sub>d</sub>) は、Biacoreによって測定され、効力 (IC<sub>50</sub>) は、KG-1 バイオアッセイ (IL-18) 及びPBMCアッセイ (IL-12) によって測定された。

【 0 2 9 5 】

表 2 1 は、抗 DL-12 / IL-18 DVD 分子の構築に使用された 2 つの完全なヒトモノクローナル抗体の特異性、結合親和性及び中和活性を示す。表 V I に示されているよ

10

20

30

40

50

うに、これらのモノクローナル抗体は、高い親和性及び中和活性を有する。抗IL-18 / IL-12 DVD作製の特徴の要約が表VIに示されている。全ての新たなDVDタンパク質のSDS-PAGE分析は、通常の抗体及びDVD1/2-Igと同様に、還元条件及び非還元条件の両方で正常な移動パターンを示した。SEC分析は、全ての分子が正常であることを示し、200kD領域においてピークを呈した。Biacore結合データは、生物学的アッセイにおいて中和活性と一致する。

#### 【0296】

(実施例3.3)

インビボでの抗IL-12 / IL-18 DVD-Igの生物活性

huPBMC-SCIDマウスモデルを使用して、インビボでの抗DL-12 / IL-18 DVD-Igの生物活性を測定した。本モデルにおいて、抗IL-12抗体(ABT-874)、抗EL-18抗体(ABT-325)又は抗IL-12 / 抗IL-18 DVD-Igを腹腔内又は静脈内注射した(250mg / 各マウス)後、新たに精製したヒトPBMC(huPBMC)を、SCIDマウスへ腹腔内注射した。15分後、乾燥黄色ブドウ球菌細胞(SAC)をマウスに投与し、ヒトIFN 産生を誘導した。動物(n=7ないし8匹 / 群)を18ないし20時間後に屠殺し、血清huIFN レベルをELISAにより測定した。ABT874及びABT-325は、SACにより誘導されるIFN を70%阻害し、本モデルにおける各化合物での最大IFN 阻害に相当する。しかしながら、ABT-874 + ABT-325及び抗IL-12 / 抗IL-18 DVD-Igでマウスを処理すると、IFN 生成をほぼ100%阻害した。これらの結果は、抗IL-12 / 抗IL-18 DVD-Ig分子が、インビボで機能的に活性があることを示唆する。

10

20

#### 【0297】

(実施例3.4)

抗IL-12 / IL-18 DVD-Igの薬物動態学的及び薬力学的研究

抗EL-12 / IL-18 DVD-Igの全般的な薬物動態学的及び薬力学的特性は、マウスにおいて親モノクローナル抗体と同様である。すなわち、73%の生物学的利用率であり、通常のIgGに匹敵した。おそらくは、抗ヒトIgG反応のために、類似の薬物動態学的特徴、すなわち第6ないし8日の後の迅速なクリアランスも、他のモノクローナル抗体(例、ヒト、ラット等)について観察された。

30

#### 【0298】

雄のSDラットに、4mg / kgで、抗IL-12 / IL-18 DVD-Igを静脈内注射又は皮下注射の何れかで投与した。PK曲線の初期の部分は正常に見え、他のヒト抗体のものと極めて類似していた。第6日目に始まるDVD-Igの迅速なクリアランスのために、両群における正確な半減期は得られなかった。第6日目後のDVD-Ig濃度の急激な低下は、RAHA反応によるものであり得る。しかしながら、既に研究されている他の単一特異的ヒト抗体のみならず、本実験において、このDVD-Igの構築のために使用された親抗体(ABT-874)の1つについても、同様の特性が観察された。皮下注射及び静脈内注射の両方で、第6日までのDVD-Ig濃度に基づいて、DVD-Igの生物学的利用率を概算した。3匹のうちの2匹のラットで、80ないし95%の生物学的利用率が示され、3匹の間数の平均生物学的利用率は73%であった。

40

#### 【0299】

(実施例3.5)

抗IL-12 / 抗IL-18 DVD-Igの物理的 / 化学的特徴

293細胞由来の、プロテインAによって精製された抗IL-12 / 抗IL-18 DVD-Igの物理的及び化学的特徴の結果が、表22に要約されている。

#### 【0300】



## 【表 2 2】

表 2 2. 抗 IL-12/抗 IL-18 DVD-Ig の物理的/化学的性質決定

検査されたパラメータ	アッセイ/方法		
親和性 (Kd) ・ IL-12 ・ IL-18	Biacore Biacore	・ 38pM (ABT-874 に対して 65pM) ・ 622pM (ABT-325 に対して 137pM)	
効力 (IC50) ・ IL-12 ・ IL-18	・ PHA-BLAST アッセイ ・ KG-1 アッセイ	・ 7pM (ABT-874 に対して 5pM) ・ 180pM (ABT-325 に対して 300pM)	10
M. W.	MS	・ HC:64130 (理論 64127) ・ LC:36072 (理論 36072)	
アミノ酸配列 ジスルフィド結合 グリコシル化特性	配列決定-MS ペプチドマッピング	全て合致 20 のジスルフィド結合が全て合致 他の社内完全ヒト抗体と類似-NGA2F 及び NGA1F が、主要な形態として観察された	20
電荷 均一性 PI 動的サイズ 純度/凝集物	陽イオン交換 (WCX-10) cIEF DSL SDS-PGE  SEC AUC	均一性  9.42 (ABT-874:9.46) 7.69nM (ABT-325 に対して 5.34nM) ・ 還元 (約 64KdHC 及び約 36Kd LC バンド) 及び非還元 (1 つのバンド) ゲルの両方で均一 ・ SEC によるプロテイン A 精製の直後に、1 つのピーク (約 100%) が観察された ・ AUC による凍結融解の 2 サイクル後に約 16-17% の凝集物が観察された	30
安定性 (凍結/融解)	SEC	凍結融解 2 サイクル後における約 5% 凝集物が、さらなる凍結融解 10 サイクル後に、約 13% まで増加した。この結果は、解明されていない (プロセスに関連する、配列特異的又は LCλ/κ ハイブリッド)	
PK 特性	ラット腹腔内及び皮下	親 mAb に類似 (又は親 mAb によって制限される)	40
生物学的利用性	ラット腹腔内及び皮下	平均 73%; 全体的に、親 mAb に類似	

## 【 0 3 0 1】

(実施例 3.6)

更なる抗 12/抗 18 DVD-Ig (1D4.1-ABT325) の作製

表 2 3 に示されているように、異なる親抗 IL-12 モノクローナル抗体 (クローン番号 1D4.1) の更なる抗 EL-12/IL-18 DVD-Ig 分子を構築した。以下のような、ヒト Ck 及び CH1 ドメインの N 末端配列由来の短いリンカーを用いて、1D4

. 1 - A B T 3 2 5 D V D - I g 構築物を作製した。

【 0 3 0 2 】

短いリンカー：軽鎖：T V A A P、重鎖：A S T K G P

全ての重鎖及び軽鎖作製を、p B O S 発現ベクター中にサブクローニングし、C O S 細胞又はフリースタイル 2 9 3 細胞中で発現させた後、上述のとおり性質決定した。1 D 4 . 1 - A B T 3 2 5 D V D - O g は、2 つのものとモノクローナル抗体の活性を完全に保持する（表 2 4 ）。

【 0 3 0 3 】

【表 2 3 】

表 2 3 : 1 D 4 . 1 - A B T 3 2 5 D V D - I g のアミノ酸配列

タンパク質	配列識別子	配列
タンパク質領域		12345678901234567890
1D4.1-ABT325 DVD-Ig 重可変	配列番号:114	EVTLRESGPALVKPTQTLTL TCTFSGFSLSKSVMGVSWIR QPPGKALEWLAHIYWDDDKY YNPSLKSRLTISKDTSKNQV VLTMTNMDPVDATATYYCARR GIRSAMDYWGQGT <sup>1</sup> TVTVSSA STKGPEVQLVQSGTEVKKPG ESLKISCKGSGYTVTSYWIG WVRQMPGKGLEWMGF <sup>2</sup> IYPGD SETRYSPTFQGGQVTISADKS FN <sup>3</sup> TAF <sup>4</sup> LQWSSLKASDTAMYY CARVGS <sup>5</sup> GWYPYTFDIWGQGT M <sup>6</sup> TVSS
1D4.1 VH	配列番号:115	EVTLRESGPALVKPTQTLTL TCTFSGFSLSKSVMGVSWIR QPPGKALEWLAHIYWDDDKY YNPSLKSRLTISKDTSKNQV VLTMTNMDPVDATATYYCARR GIRSAMDYWGQGT <sup>1</sup> TVTVSS
リンカー	配列番号:99	ASTKGP
ABT-325 VH	配列番号:85	EVQLVQSGTEVKKPGESLKI SCKGSGYTVTSYWIGWVRQM PGKGLEWMGF <sup>2</sup> IYPGDSETRY SPTFQGGQVTISADKSFNTAF LQWSSLKASDTAMYYCARVGS GWYPYTFDIWGQGT <sup>3</sup> M <sup>4</sup> TVSS
CH	配列番号:34	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVN <sup>1</sup> NHKPSNTKVDK <sup>2</sup> KVEP KSCDK <sup>3</sup> HTC <sup>4</sup> PPCPAPEAAGG PSVFL <sup>5</sup> FPPKPKDTLMI <sup>6</sup> SRTP EVT <sup>7</sup> CVVVDVSHEDPEVK <sup>8</sup> FNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYR <sup>9</sup> VVSVLTVLHQD <sup>10</sup> WLNGK EYKCKVSNKALPAPIEK <sup>11</sup> TIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKG <sup>12</sup> FYPSDI AVEWESNGQPENNYKT <sup>13</sup> TPPV LDS <sup>14</sup> DGSFFLYSKLTVDKSRW

10

20

30

40

タンパク質		配列
タンパク質領域	配列識別子	12345678901234567890
		QQGNVFSVMSVHEALHNHYT QKSLSLSPGK
<b>1D4.1-ABT325</b> DVD-Ig 軽可変	配列番号:116	DIVMTQSPDSLAVSLGERAT INCKASQSVSNDVAWYQQKP GQPPKLLIYYASNRYTGVDP RFSGSGSGTDFTLTISLQA EDVAVYYCQQDYNSPWTFGG GTKVEIKRTVAAPDIVMTQS PATLSVSPGERATLSCRASE SISNLAWYQQKPGQAPRLF IYTASTRATDIPARFSGSGS GTEFTLTISLQSEDFAVYY CQQYNNWPSITFGQGRLEI KR
<b>1D4.1 VL</b>	配列番号:117	DIVMTQSPDSLAVSLGERAT INCKASQSVSNDVAWYQQKP GQPPKLLIYYASNRYTGVDP RFSGSGSGTDFTLTISLQA EDVAVYYCQQDYNSPWTFGG GTKVEIKR
リンカー	配列番号:44	TVAAP
<b>ABT-325 VL</b>	配列番号:89	EIVMTQSPATLSVSPGERAT LSCRASESISNLAWYQQKP GQAPRLFYTASTRATDIPA RFSGSGSGTDFTLTISLQS EDFAVYYCQQYNNWPSITFG QGRLEIKR
<b>CL</b>	配列番号:36	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC

10

20

30

【 0 3 0 4 】

【 表 2 4 】

表 2 4. 1 D 4. 1 - A B T 3 2 5 D V D - I g 分子の性質決定

mAb	親和性 (K <sub>d</sub> , M)		効力 (IC <sub>50</sub> , M)	
	IL-12	IL-18	IL-12	IL-18
1D4.1	1.20E-10	N/A	4.18E-10	N/A
ABT325	N/A	1.91E-10	N/A	6.87E-11
1D4.1-ABT325 DVD-Ig	1.33E-10	1.59E-10	2.17E-10	1.20E-10

親和性 (K<sub>d</sub>) は、Biacoreによって測定され、効力 (IC<sub>50</sub>) は、KG-1パイオアッセイ (IL-18) 及びPBMCアッセイ (IL-12) によって測定された。

40

【 0 3 0 5 】

( 実施例 4 )

抗 CD 2 0 / 抗 CD 3 D V D - I g の作製

マウス抗ヒトCD20 (クローン5F1) 及び抗ヒトCD3 (クローンOKT3) 親抗体を使用して、抗CD20 / 抗CD3 DVD-Igを生成した。最初の構築物は、異なるドメイン配向を有する2つのDVD-Igを含んだ。V<sub>CD3</sub>-リンカー-V<sub>CD20</sub>-定常の順序で、抗CD3 / 抗CD20 DVD-Igを構築し、V<sub>CD20</sub>-リンカー-V<sub>CD3</sub>-定常の順序で、抗CD20 / 抗CD3 DVD-Igを構築した。しかしながら

50

、予備的な細胞表面結合研究において、抗CD20結合活性は、抗CD3/抗CD20 DVD-Ig分子中で低下したが、抗CD3活性は、本デザインにおいて保存された。これに対して、抗CD3結合活性及び抗CD20結合活性は何れも、抗CD20/抗CD3 DVD-Ig中で完全に保存され、これは、DVD-Igフォーマットにおけるこれら2つのモノクローナル抗体/標的の組み合わせに関して、最適なドメイン配向であることを示した。従って、その後の研究のために、抗CD20/抗CD3 DVD-Ig構築物を選択した。

## 【0306】

抗CD20/抗CD3 DVD-IgをキメラIgとして作製した。すなわち、定常領域は、ヒト定常領域であった。結合分析のため、ヒトT細胞株ジャーカット及びB細胞株ラジ(Raji)をヒトIgGでブロックした後、マウス抗hCD3モノクローナル抗体OKT3、マウス抗hCD20モノクローナル抗体1F5、及び抗CD20/抗CD3 DVD-Igで染色した。次に、細胞を洗浄し、FITC標識したヤギ抗マウスIgG(抗hIgGとの交差反応性は存在しない。)で染色した。抗CD20/CD3 DVD-Igは、T細胞及びB細胞の両者に結合したのに対し、CD3及びCD20モノクローナル抗体は、それぞれ、T細胞のみ又はB細胞のみに結合した。CD20/CD3 DVD-Igのアミノ酸配列は、表25に開示されている。

## 【0307】

## 【表25】

表25: CD20CD3DVD-Igのアミノ酸配列

タンパク質	配列	
タンパク質領域	配列識別子	12345678901234567890
DVD 重可変 CD20CD3DVD-Ig	配列番号:97	QVQLRQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQFKFGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSHYGSNYVDYFDYWGQGTTLTVSSAKTTAPSVYPLAPQVQLQ QSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWKQRPQGL EWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSS
	5F1 VH	配列番号:98

10

20

30

タンパク質		配列	
タンパク質領域	配列識別子	12345678901234567890	
		NQKFKGKATLTADKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYCARSH YGSNYVDYFDYWGQGTTLTV SS	
リンカー	配列番号:99	AKTTAPSVYPLAP	
<b>OKT3 VH</b>	配列番号:100	QVQLQQSGAELARPGASVKM SCKASGYTFTRYTMHWVKQR PGQGLEWIGYINPSRGYTNY NQKFKDKATLTTDKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYCARYY DDHYCLDYWGQGTTLTVSS	10
<b>CH</b>	配列番号:34	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVTPSSSLGTQT YICNVNHHKPSNTKVDKKEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMI S RTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSGGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNV FSCSVMHEALHNYHT QKSLSLSPGK	20
<b>CD20CD3DVD-Ig 軽可変</b>	配列番号:101	QIVLSQSPAILSASPGEKVT MTCRASSSLSFMHWYQQKPG SSPKPWIYATSNLASGVPAR FSGSGSGTSYSLTISRVEAE DAATYFCHQWSSNPLTFGAG TKLELKRADAAPT VSI FPPQ IVLTQSPA IMSASPGEKVTM TCSASSSVSYMNWYQQKSGT SPKRWIYDTSK LASGVP AHF RSGSGTSYSLTISGMEAE AATYYCQWSSNPFTFGSGT KLEINR	30
<b>5F1 VL</b>	SEQ ID NO.:102	QIVLSQSPAILSASPGEKVT MTCRASSSLSFMHWYQQKPG SSPKPWIYATSNLASGVPAR FSGSGSGTSYSLTISRVEAE DAATYFCHQWSSNPLTFGAG TKLELKR	
リンカー	配列番号:103	ADAAPT VSI FPP	
<b>OKT3 VL</b>	配列番号:104	QIVLTQSPA IMSASPGEKVT MTCSASSSVSYMNWYQQKSG TSPKRWIYDTSK LASGVP AH	40

タンパク質		配列
タンパク質領域	配列識別子	12345678901234567890
		FRGSGSGTTSYSLTISGMEAE DAATYYCQQWSSNPFTFGSG TKLEINR
CL	配列番号:36	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC

10

## 【0308】

(実施例5)

mIL-1 / DVD-Igの作製

薬物動態、インビボでの有効性、組織浸透及びDVD-Ig分子の免疫原性に関する重要な問題を研究するために、以下に記載されているように、マウス抗マウスEL1 / DVD-Ig分子を構築した。

## 【0309】

(実施例5.1)

mIL-1 / DVD-Igの構築

DL1 二重ノックアウトマウスから作製された2つのマウス抗マウスIL-1 / モノクローナル抗体(9H10及び10G11)を使用して、抗マウスIL-1 / DVD-Ig分子を構築した。それぞれ、マウスIL-1 又はマウスIL-1 でIL-1 / 二重ノックアウトマウスを免疫化することによって、マウス抗マウスDL-1 a及びマウス抗マウスIL-1 のモノクローナル抗体を生成した。1つのマウス抗マウスIL-1 (クローン9H10)及び1つのマウス抗マウスIL-1 モノクローナル抗体(クローン10G11)を選択し、mIL-1 / DVD-Ig分子を作製するために使用した。多様なリンカーサイズ及び異なるドメイン配向を検査した。V(抗mIL-1) - リンカー - V(抗mIL-1) - マウス定常部(C2a及びCK)の向きで、最終的な機能的mIL-1 / DVD-Ig分子を構築した。クローニング、発現及び精製手法は、hIL-1 / DVD-Igのものと同様であった。hIL-1 / DVD3-Igに関して記載されているものと同様の重複PCR及び相同的組換えを使用して、mIL-1 / DVD-Igのクローニングを実施した。mIL-1 / DVD-Igの配列を以下の表26に示す。

## 【0310】

20

30

【表 26】

表 26 : m I L - 1  $\alpha$  /  $\beta$  D V D - I g のアミノ酸配列

タンパク質	配列識別子	配列	
タンパク質領域		12345678901234567890	
mIL-1 $\alpha$ / $\beta$ DVD-Ig 重可変	配列番号 :105	EVQLQQSGPELVKPGTSVKM SCKTSGYTFTSYVMHWVKQK PGQGLEWIGYIIPYNDNTKY NEKFKGKATLTSKSSSTAY MELSSLTSEDSAVYYCARRN EYYGSSFFDYWGQGTTLTVS SAKTTAPSVYPLAPQVILKE SGPGILQPSQTLSTLCSFSG FSLSTYGTAVNWIRQPSGKG LEWLAQIGSDDRKLYNPFK SRITLSEDTSNSQVFLKITS VDTEDSATYYCANGVMEYWG LGTSVTVSS	10
10G11 VH	配列番号 :106	EVQLQQSGPELVKPGTSVKM SCKTSGYTFTSYVMHWVKQK PGQGLEWIGYIIPYNDNTKY NEKFKGKATLTSKSSSTAY MELSSLTSEDSAVYYCARRN EYYGSSFFDYWGQGTTLTVS S	20
リンカー	配列番号 :99	AKTTAPSVYPLAP	
9H10 VH	配列番号 :107	QVILKESGPGILQPSQTLSTL TCSFSGFSLSTYGTAVNWIR QPSGKGLEWLAQIGSDDRKL YNPFKSRITLSEDTSNSQV FLKITSVDTEDSATYYCANG VMEYWGLGTSVTVSS	
CH	配列番号 :108	AKTTAPSVYPLAPVCGDITG SSVTLGCLVKGYFPEPVTLT WNSGSLSSGVHTFPAVLQSD LYTLSSSVTVTSSTWPSQSI TCNVAHPASSTKVDKKEPR GPTIKPCPPCKCPAPNLLGG PSVFIKPKIKDVLMIKSLSP IVTCVVVDVSEDDPDVQISW FVNNVEVHTAQTQTHREDYN STLRVVSALPIQHQQDWMGK EFKCKVNNKDLPAPIERTIS KPKGSRAPQVYVLPPEEE MTKKQVTLTCMVTDMPEDI YVEWTNNGKTELNYKNTEPV LDSGYSYFMYSKLRVEKKNW VERNSYSCSVVHEGLHNHHT TKSFSRTPGK	30 40
	配列番号 :109	DIQMTQSPASLSASVGETVT ITCRGSGILHNYLVWYQQKQ GKSPQLLVYSAKILADGVPS RFSGSGGTQYSLKINSIQP	

タンパク質		配列
タンパク質領域	配列識別子	12345678901234567890
mIL-1 $\alpha$ / $\beta$ DVD-Ig 軽可変		EDFGSYCQHFWSPTPFTFGS GTKLEIKRADAAPTIVSIFPP SIVMTQTPKFLLVSAGDRVT ITCKASQSVNHDVAWYQQMP GQSPKLLIYFASNRYTGVPD RFTGSGYGTDFTFTISTVQA EDLAVYFCQQDYSSPYTFGG GTKLEIKR
10G11 VL	配列番号 :110	DIQMTQSPASLSASVGETVT ITCRGSGILHNYLVWYQQKQ GKSPQLLVYSAKILADGVPS RFSGSGSGTQYSLKINSLQP EDFGSYCQHFWSPTPFTFGS GTKLEIKR
リンカー	配列番号 :111	ADAAPTIVSIFPP
9H10 VL	配列番号 :112	SIVMTQTPKFLLVSAGDRVT ITCKASQSVNHDVAWYQQMP GQSPKLLIYFASNRYTGVPD RFTGSGYGTDFTFTISTVQA EDLAVYFCQQDYSSPYTFGG GTKLEIKR
CL	配列番号 :113	ADAAPTIVSIFPPSSEQLTSG GASVVCFLNNFYPKDINVKW KIDGSERQNGVLNSWTDQDS KDSTYSMSSTLTLTKDEYER HNSYTCEATHKTSTSPIVKS FNRNEC

10

20

## 【0311】

マウスmIL-1 / DVD-Igは、IL-1 及びIL-1 の両者に対して親和性/インビトロでの有効性を保持した。表27は、モノクローナル抗体9H10(抗mIL-1)、10G11(抗mIL-1)及びmIL-1 / DVD-Igの性質決定を示す。

30

## 【0312】

## 【表27】

表27. mDVD4-Igの性質決定

	抗原	K <sub>D</sub> (M)	IC <sub>50</sub> (M)
9H10	mIL-1 $\alpha$	1.73E-10	2.00E-10
10G11	mIL-1 $\beta$	2.30E-10	3.70E-10
mIL-1 $\alpha$ / $\beta$ DVD-Ig	mIL-1 $\alpha$	7.66E-10	2.00E-09
	mIL-1 $\beta$	6.94E-10	8.00E-10

40

## 【0313】

(実施例5.2)

関節炎モデルにおけるmIL-ロット / DVD-Igのインビボでの活性

抗EL-1、抗IL-1、組み合わされた抗IL-1 / 抗IL-1、及びマウス抗IL-1 / DVD4-Igの治療効果を、本分野で周知のコラーゲン誘発性関節炎マウスモデルにおいて評価した。簡潔に述べると、CFA中のウシII型コラーゲンを使用して、雄DBA-1マウスを尾部の根元で免疫化した。第21日目にマウスを、ザイモサンで腹腔内(腹腔内)追加免疫した。第24ないし27日目で疾病が発症した後、マ

50



ウスを選択し、マウスを各群 10 匹の個別の群に分割した。対照群及び抗サイトカイン群の平均関節炎スコアは、治療の開始時と同等であった。IL-1 を中和するために、抗 IL-1 モノクローナル抗体、抗 IL-1 モノクローナル抗体、抗 IL-1 / 抗 IL-1 モノクローナル抗体の組み合わせ、又はマウス抗 IL-1 / DVD4-Ig の 1 ないし 3 mg / kg を、マウスに 1 日おきに腹腔内注射した。末梢関節における関節炎の視覚的様相に関して、マウスを 1 週間に 3 回注意深く検査し、疾病活性に関するスコアを決定した。

【0314】

治療モードにおける IL-1 の遮断は、関節炎の重度を効果的に緩和し、抗 IL-1 は、抗 IL-1 (対象群と比較して、平均関節炎スコアにおいて 10% 低下) よりも大きな有効性を示した (24% 低下)。抗 IL-1 と抗 IL-1 との間にさらなる効果が観察され、抗 IL-1 及び抗 IL-1 の両モノクローナル抗体で処理したマウスにおいて平均関節炎スコアは 40% 低下した。驚くべきことに、同一用量レベルにおいて、mDVD-Ig の処理は、平均関節炎スコアの 47% の低下を示し、mDVD-Ig のインビボでの治療上の有効性を示した。同様の有効性は、本動物モデルにおける関節腫脹の測定結果においても観察された。

10

【0315】

本発明は、分子生物学及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。

20

【0316】

【表 28】

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);

30

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; 10
- 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 Pres., Boca Raton, Fla. (1974); 20
- 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
- Winnacker, E.L. From Genes To Clones: Introduction To Gene Technology (1987) VCH Publishers, 30  
NY (translated by Horst Ibelgauf). 634 pp. (ISBN 0-89573-614-4).

## 文献

U S 特許 :

4,526,938; 4,753,894; 4,816,567; 4,880,078; 4,943,533; 4,946,778; 4,980,286; 5,500,362;  
 5,916,597; 5,985,309; 5,128,326; 5,223,409; 5,225,539; 5,258,498; 5,290,540; 5,403,484;  
 5,427,908; 5,516,637; 5,530,101; 5,558,864; 5,565,332; 5,571,698; 5,580,717; 5,585,089;  
 5,624,821; 5,627,052; 5,641,870; 5,648,260; 5,658,727; 5,677,171; 5,679,377; 5,693,762;  
 5,698,426; 5,714,350; 5,714,352; 5,723,323; 5,733,743; 5,736,137; 5,750,753; 5,763,192;  
 5,766,886; 5,780,225; 5,814,476; 5,817,483; 5,821,047; 5,824,514; 5,855,913; 5,874,064;  
 5,891,996; 5,912,015; 5,916,771; 5,934,272; 5,939,598; 5,969,108; 5,976,862; 5,985,320;  
 5,985,309; 5,985,615; 5,989,463; 5,998,209; 6,019,968; 6,075,181; 6,091,001; 6,114,598;  
 6,130,364; 6,180,370; 6,204,023; 6,235,883; 6,258,562; 6,350,861; 6,506,883; 6,699,658; 6,914,128

10

U S 特許出願 :

10/172,317  
 09/428,082

20

U S 特許出願公開

20020137134; 20030186374; 20040018590; 20050147610 A1; 20050042664 A1; 2006104968;

海外特許書面

PCT/GB91/01134; PCT/US2003/040426 PCT/US91/05939; PCT/US91/09630; PCT/US94/01234;  
 PCT/US96/18978; PCT/US98/16280; WO 00 09560; WO 00/037504; WO 00/56772; WO 01/58956;  
 WO 01/77342 WO 01/83525; WO 01/88138; WO 0162931A2; WO 0177342A1;  
 WO 02/02773; WO 02072636; WO 03/035835; WO 90/02809; WO 90/05144 A1; WO 91/05548;  
 WO 91/09967; WO 91/10737; WO 91/10741; WO 91/17271; WO 92/01047; WO 92/02551 WO  
 92/09690; WO 92/15679; WO 92/18619; WO 92/19244; WO 92/20791; WO 92/22324 WO  
 93/01288; WO 93/11236; WO 94/02602; WO 95/15982; WO 95/20045 WO 95/20401; WO  
 96/20698; WO 96/33735; WO 96/34096; WO 96/40210; WO 97/29131; WO 97/32572; WO  
 97/44013; WO 98/16654; WO 98/24893; WO 98/31346; WO 98/31700; WO 98/50433; WO  
 99/15154; WO 99/20253; WO 99/25044; WO 99/45031; WO 99/53049; WO 99/54342; WO  
 99/66903; WO00/56772A1; WO2001/077342(A1); WO2002097048A2; WO2003016466A2;  
 WO2004078140; WO2005100584 A2 WO90/14424; WO90/14430; WO90/14443; WO9524918 A1;  
 EP 1,176,195; EP 229,246; EP 239,400; EP 519,596; EP 519,596; EP 592,106; GB89/01334;;  
 GB91/01134;; GB92/01755.

30

40

他の文献

- Ames et al., *J. Immunol. Methods* 184:177-186 (1995);
- Aoji et al., 2005 *J Am Coll Cardiol.* 45(10):1574-9;
- Arancio O, et al., *EMBO Journal* (2004) 1-10;
- Arndt, M. and J. Krauss, *Methods Mol Biol*, 2003. **207**: p. 305-21;
- Azzazy H., and Highsmith W.E., (2002) *Clin. Biochem.* 35:425-445;
- Babcock, J.S. et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7843-7848; 10
- Barbas et al. (1991) *PNAS* 88:7978-7982;
- Barbas et al. *Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813 (1994);
- Barry J. Dickson, *Science.* (2002) 298:1959;
- Better et al., *Science* 240:1041-1043 (1988);
- Biewenga et al 1983 *Clin Exp Immunol* 51: 395-400;
- Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426;
- Bornemann KD, et al., *Am J Pathol.* 2001;158:63;
- Boyce et al., *Journal of Experimental Medicine* (2005), 201(12), 1869-1873; 20
- Brand DD. (2005) *Comp Med.* 55(2):114-22;
- Brennan, M., et al., *Science*, (1985). 229(4708): p. 81-3);
- Brinkman et al., *J. Immunol. Methods* 182:41-50 (1995);
- Buchwald et al., 1980, *Surgery* 88:507;
- Buras JA, et al.,(2005) *Nat Rev Drug Discov.* 4(10):854-65;
- Burke, Sandra E., et al., *Advanced Drug Delivery Reviews* (2006), 58(3), 437-446;
- Burton et al., *Advances in Immunology* 57:191-280 (1994);
- C.E. Shepherd, et al., *Neurobiol Aging.* 2005 Oct 24; 30
- Calandra T, et al., (2000) *Nat Med.* 6(2):164-70;
- Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:4285 (1992);
- Chothia &Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987);
- Chothia et al., *Nature* 342:877-883 (1989);
- Clackson et al. (1991) *Nature* 352:624-628;
- Cleek et al., 1997, *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854;
- Co, M.S., et al., *Mol. Immunol.* (1993) 30:1361- 1367;
- Coffman, et al., *Journal of Experimental Medicine* (2005), 201(12), 1875-1879; 40
- Dall'Acqua 1998 *Biochemistry* 37: 9266-73;
- D'Andrea, A., et al., *J Exp Med*, 1992. **176**(5): p. 1387-98;

- Deane R, et al., *Nat Med.* 2003;9:907-13;
- Descotes J, et al., *Developments in biological standardization* (1992), 77 99-102;
- Dinarello, C. A., K. Muegge, and S. K. Durum. 2000. *Current Protocols in Immunology* 6:1
- During et al., 1989, *Ann. Neurol.* 25:351;
- Durocher et al., *Nucleic Acids Research* 2002, Vol 30, No.2;
- Economides, A.N., et al., *Nat Med*, 2003. 9(1): p. 47-52;
- Eliezer Masliah, et al., *Neuron.* 2005;46:857;
- Felicia Yu Hsuan Teng, et al., *J Neurosci Res.* (2005) 79:273; 10
- Finotto et al., *International Immunology* (2005), 17(8), 993-1007;
- Fuchs et al. (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372;
- Gang Xu, et al., *J. Neurochem.*2004; 91; 1018;.
- Garrad et al. (1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377;
- Gavilondo J.V., and Larrick J.W. (2002) *BioTechniques* 29:128-145;
- Genain CP, et al., (1997) *J Mol Med.* 75(3):187-97;
- Genovese Mc et al 2005 *N Engl J Med.* 353:1114-23; 20
- Glennie, M.J., et al., *J Immunol*, 1987. 139(7): p. 2367-75;
- Goldspiel et al., 1993, *Clinical Pharmacy* 12:488-505;
- Gracie, J.A., et al., *J Clin Invest*, 1999. 104(10): p. 1393-401;
- Gram et al. (1992) *PNAS* 89:3576-3580;
- Green and Jakobovits J. *Exp. Med.* 188:483-495 (1998);
- Green et al. *Nature Genetics* 7:13-21 (1994);
- Griffin (2000) *Jl* 164:4433;
- Griffiths et al. (1993) *EMBO J* 12:725-734; 30
- Harriman G, Harper LK, Schaible TF. 1999 *Ann Rheum Dis* 58 Suppl 1:I 61-4;
- Hart et al., *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (2001), 108(2), 250-257);
- Hawkins et al. (1992) *J Mol Biol* 226:889-896;
- Hay et al. (1992) *Hum Antibod Hybridomas* 3:81-85;
- Hildebrand, H. F., et al., *Surface and Coatings Technology* (2006), 200(22-23), 6318-6324;
- Holliger, P. and G. Winter, *Cancer Immunol Immunother*, 1997. 45(3-4): p. 128-30;
- Holliger, P., et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448;
- Holliger, P., T. Prospero, and G. Winter, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(14): p. 6444-8; 40
- Hoogenboom et al. (1991) *Nuc Acid Res* 19:4133-4137;
- Hoogenboom H., and Chames P. (2000) *Immunology Today* 21:371-378;

- Hoogenboom H.R., (1997) TIB Tech. 15:62-70;
- Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 7 1:105);
- Huber et al. Nature; 264: 415-20; Thies et al 1999 J Mol Biol; 293: 67-79;
- Huse et al. (1989) Science 246:1275-1281;
- Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883;
- Huston et al., Methods in Enzymology 203:46-88 (1991);
- Hwang 2002 JI 169:633;
- Igor Klyubin, et al., Nat Med. 2005, 11:556-61; 10
- Ito, A., et al., J Immunol, 2003. **170**(9): p. 4802-9;
- Jackson et al., J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995);
- Johnsson, B., et al. (1991) Anal. Biochem. 198:268-277;
- Johnsson, B., et al. (1995) J. Mol. Recognit. 8:125-131;
- Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868;
- Jones et al., Nature 321:522 (1986);
- Jones R. 2000 IDrugs. 3(4):442-6; 20
- Jönsson, U., et al. (1991) Biotechniques 11:620-627; 20
- Jönsson, U., et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51:19-26;
- Joosten, L.A., et al., Arthritis Rheum, 1996. **39**(5): p. 797-809;
- Jungbluth et al. 2003, Proc Natl Acad Sci USA. 100(2):639-44);
- Kabat et al. (1971) Ann. NY Acad, Sci. 190:382-391;
- Karni, A., et al., J Neuroimmunol, 2002. **125**(1-2): p. 134-40;
- Kellermann S-A., and Green L.L. (2002) Current Opinion in Biotechnology 13:593-597;
- Kettleborough et al., 1991, Protein Eng. 4(7):773-83); 30
- Kettleborough et al., Eur. J. Immunol. 24:952-958 (1994); 30
- Kim et al 1994 Eur J Immunol; 24: 542-548;
- Kipriyanov, S.M., et al., Int J Cancer, 1998. **77**(5): p. 763-72;
- Konishi, K., et al., J Immunol Methods, 1997. **209**(2): p. 187-91;
- Kostelny, S.A., M.S. Cole, and J.Y. Tso, J Immunol, 1992. **148**(5): p. 1547-53;
- Kriangkum, J., et al., Biomol Eng, 2001. 18(2): p. 31-40;
- Lam et al., 1997, Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759- 760;
- Langer (1990), Science 249:1527-1533; 40
- Le Gall, F., et al., FEBS Lett, 1999. **453**(1-2): p. 164-8; 40
- Le Gall, F., et al., J Immunol Methods, 2004. **285**(1): p. 111-27;

- Leung, B.P., et al., *J Immunol*, 2000. **164**(12): p. 6495-502;
- Levy et al., 1985, *Science* 228:190;
- Little M. et al (2000) *Immunology Today* 21:364-370;
- Lloyd, Clare M., et al., *Advances in Immunology* (2001), 77 263-295;
- Lu, D., et al., *J Biol Chem*, 2004. **279**(4): p. 2856-65;
- Lublin FD., et al., (1985) *Springer Semin Immunopathol.*8(3):197-208;
- Luster et al., *Toxicology* (1994), 92(1-3), 229-43;
- MacCallum, *J Mol Biol* 262(5):732-45 (1996); 10
- Mack, M., et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(15): p. 7021-5;
- Marchalonis et al., *Adv Exp Med Biol.* 484:13-30 (2001);
- Marco Domeniconi, et al., *J Neurol Sci.* 2005, 233:43;
- Marks et al. *BioTechnology* 10:779-783 (1992);
- Marques, A. P., et al., *Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine* (2005), 377-397;
- Mateo et al, 1997, *Immunotechnology*, 3(1):71-81); 20
- May, 1993, *TIBTECH* 11(5):155-215;
- McCafferty et al., *Nature* (1990) 348:552-554;
- McDonnell, et al., *Progress in Respiratory Research* (2001), 31(New Drugs for Asthma, Allergy and COPD), 247-250;
- McGee AW, et al., *Trends Neurosci.* 2003, 26:193;
- McIntosh, J.K., et al., *J Immunol*, 1989. **143**(1): p. 162-7;
- Mendez et al., *Nature Genetics* 15:146-156 (1997);
- Merchant, A.M., et al., *Nat Biotechnol*, 1998. **16**(7): p. 677-81; 30
- Michelle C Janelins, et al., *J Neuroinflammation.* 2005 ;2:23;
- Milan Makwanal, et al., *FEBS J.* 2005, 272:2628;
- Miller, K., et al., *J Immunol*, 2003. **170**(9): p. 4854-61;
- Milstein, C. and A.C. Cuello, *Nature*, 1983. 305(5934): p. 537-40;
- Mizushima, S. and Nagata, S., (1990) *Nucleic acids Research* Vol 18, No. 17;
- Modjtahedi et al, 1996, *Br J Cancer*, 73(2):228-35;
- Modjtahedi et al, 2003, *Int J Cancer*, 105(2):273-80;
- Modjtahedi et al., 1993, *Br J Cancer.* 1993, 67(2):247-53; 40
- Modjtahedi et al., 1993, *J. Cell Biophys.* 1993, 22(1-3):129-46;
- Morgan and Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217;

- Mulligan, *Science* 260:926- 932 (1993);
- Mullinax et al., *BioTechniques* 12(6):864-869 (1992);
- Murthy et al. 1987, *Arch Biochem Biophys.* 252(2):549-60;
- Nakanishi, K., et al.,. *Annu Rev Immunol*, 2001. 19: p. 423-74;
- Nelson RB, *Curr Pharm Des.* 2005;11:3335;
- Ning et al. , 1996, *Radiotherapy &Oncology* 39:179-189;
- Okamoto H, Kamatani N. 2004. *N Engl J Med.* 351:1909;
- Owens T, et al., (1995) *Neurol Clin.*13(1):51-73; 10
- Padilla et al., *Journal of Immunology* (2005), 174(12), 8097-8105;
- Padlan, *FASEB J.* 9:133-139 (1995);
- Padlan, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498 (1991);
- Peipp, M. and T. Valerius, *Biochem Soc Trans*, 2002. 30(4): p. 507-11;
- Peng SL (2004) *Methods Mol Med.*;102: 227-72;
- Persic et al., *Gene* 187 9-18 (1997);
- Pluckthun, A. and P. Pack, *Immunotechnology*, 1997. 3(2): p. 83-105; 20
- Poljak, R.J., et al. (1994) *Structure* 2:1121-1123;
- Presta et al., *J. Immunol.* 151:2623 (1993),
- Presta LG. 2005 *J Allergy Clin Immunol.* 116:731-6;
- R. Jefferis, *Biotechnol. Prog.* 21 (2005), pp. 11–16;
- R.J. Kaufman and P.A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621;
- Ranger and Peppas, 1983, J., *Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61;
- Ridgway, J.B., et al., *Protein Eng*, 1996. 9(7): p. 617-21;
- Riechmann et al., *Nature* 332:323 (1988); 30
- Roberts, R.W. and Szostak, J.W. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12297-12302;
- Rodeck et al., 1987, *J Cell Biochem.* 35(4):315-20;
- Roguska et al., *PNAS* 91:969-973 (1994);
- Saudek et al., 1989, *N. Engl. J. Med.* 321:574;
- Sawai et al., *AJRI* 34:26-34 (1995);
- Schier et al. *Gene* 169:147- 155 (1995);
- Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:20;
- Seligman 1978 *Ann Immunol* 129: 855-70.; 40
- Sfikakis PP et al (2005) *Curr Opin Rheumatol* 17:550-7;
- Shapiro et al., *Crit. Rev. Immunol.* 22(3): 183-200 (2002);



- Shields, R. L. et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740;
- Shu et al., *PNAS* 90:7995-7999 (1993);
- Sims et al., *J. Immunol.* 151: 2296 (1993);
- Skerra et al., *Science* 240:1038-1040 (1988);
- Snibson K J; et al., *Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* (2005), 35(2), 146-52;
- Soloman B, *Curr Alzheimer Res.* 2004;1:149;
- Song et al., 1995, *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397; 10
- Staerz, U.D., et al., *Nature*, 1985. 314(6012): p. 628-31;
- Steinman L, et al., (2005) *Trends Immunol.* 26(11):565-71;
- Studnicka et al., *Protein Engineering* 7(6):805-814 (1994);
- 't Hart BA, et al., (2005) *J Immunol* 175(7):4761-8;
- Tara Karnezis, et al., *Nature Neuroscience* (2004) 7, 736;
- Taylor, L. D., et al. (1992) *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295;
- Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596;
- Tuohy VK, et al., (1999) *J Exp Med.* 189(7):1033-42; 20
- Umana et al. (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-1;
- Urlaub and Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220;
- Verhoeyen et al., *Science* 239:1534 (1988)),
- von Mehren M, et al (2003) *Annu Rev Med.*;54:343-69;
- Wallick, S.C., et al., *Exp. Med.* (1988) 168:1099-1109;
- Ward et al., (1989) *Nature* 341:544-546;
- West et al. 2000 *Biochemistry* 39: 9698-708; 30
- William L. Klein, *Neurochem Int.* 2002 ;41:345;
- Wright, A., et al., *EMBO J.* (1991) 10:2717 2723;
- Wu and Wu, 1991, *Biotherapy* 3:87-95;
- Wu and Wu, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432 (1987);
- Wu, A.M., et al., *Immunotechnology*, 1996. 2(1): p. 21-36;
- Wu, A.M., et al., *Immunotechnology*, 1996. 2(1): p. 21-36;
- Wu, Peng; Grainger, David W., *Biomaterials* (2006), 27(11), 2450-2467;
- Yelton et al. *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); 40
- Zapata et al. *Protein Eng.* 8(10):1057-1062 (1995);

【 0 3 1 7 】

実施形態及び特徴が多数、上述されているが、本明細書の開示又は添付されている特許請求の範囲に定義されている本発明から逸脱せずに、記載されている実施形態及び特徴の改変及び変形を為し得ることが、当業者によって理解される。本明細書に挙げられている公報の各々は、参照により組み込まれる。

【 図面の簡単な説明 】

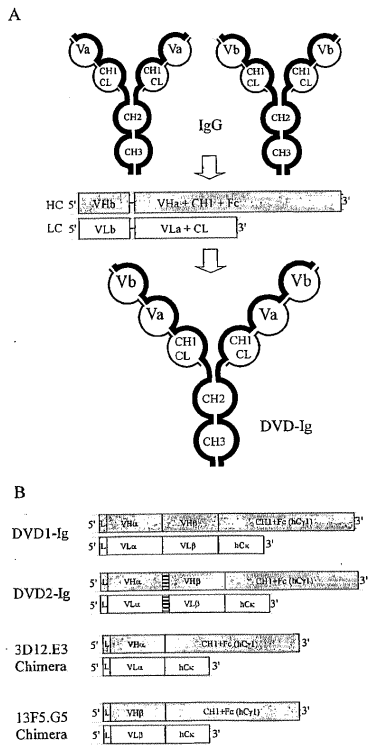
【 0 3 1 8 】

【 図 1 】 図 1 A は、二重可変ドメイン ( D V D ) = I g 構築物の模式図であり、2つの親抗体から D V D - I g を作製するための戦略を示している。図 1 B は、ハイブリドーマク 50

ローン2D13.E3(抗IL-1)及び13F5.G5(抗IL-1)からの構築物DVD1-Ig、DVD2-Ig及び2つのキメラ単一特異的抗体の模式図である。

【図1】

Figure 1



**【配列表】**

0005364870000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 11/06	(2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 19/02	(2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 21/04	(2006.01)	A 6 1 P 21/04	
A 6 1 P 25/16	(2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 27/02	(2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 31/04	(2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 33/00	(2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 33/00	
A 6 1 P 37/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
C 0 7 K 16/18	(2006.01)	A 6 1 P 37/00	
C 0 7 K 16/46	(2006.01)	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 16/24	(2006.01)	C 0 7 K 16/46	
C 0 7 K 16/28	(2006.01)	C 0 7 K 16/24	
C 0 7 K 16/40	(2006.01)	C 0 7 K 16/28	
C 0 7 K 16/26	(2006.01)	C 0 7 K 16/40	
C 1 2 P 21/02	(2006.01)	C 0 7 K 16/26	
C 1 2 N 1/15	(2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 N 1/19	(2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 5/10	(2006.01)	C 1 2 N 1/21	
		C 1 2 N 5/00	1 0 2
		C 1 2 N 5/00	1 0 3

(72)発明者 デイクソン, リチャード・ダブリュ  
 アメリカ合衆国、マサチューセッツ・0 1 5 2 2、ジエフアーソン、ノッティンガム・ドライブ・  
 1 9

(72)発明者 ザルフエルト, ヨツヘン・ゲー  
 アメリカ合衆国、マサチューセッツ・0 1 5 3 6、ノース・グラフトン、オールド・ウエストボロ  
 ・ロード・1 7 7

審査官 木原 啓一郎

(56)参考文献 特表2003-531588(JP,A)  
 特表2005-502589(JP,A)  
 特表平01-502875(JP,A)  
 国際公開第97/014719(WO,A1)  
 国際公開第02/002781(WO,A1)  
 特表2004-511430(JP,A)  
 FEBS Lett., 1999 Jul 2, Vol.454, No.1-2, p.90-94  
 J Biol Chem., 2005 May 20, Vol.280, No.20, p.19665-19672  
 Mol Immunol., 2000 Dec, Vol.37, No.18, p.1123-1130

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0

C 0 7 K 1 6 / 0 0

C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S / W P I D S ( S T N )