

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-525155

(P2012-525155A)

(43) 公表日 平成24年10月22日 (2012. 10. 22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 2 4
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00 Z N A	4 B 0 6 4
C 0 7 K 16/00 (2006.01)	C 0 7 K 16/00	4 C 0 8 5
C 0 7 K 16/12 (2006.01)	C 0 7 K 16/12	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 233 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2012-508789 (P2012-508789)
 (86) (22) 出願日 平成22年4月30日 (2010. 4. 30)
 (85) 翻訳文提出日 平成23年12月16日 (2011. 12. 16)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2010/033231
 (87) 国際公開番号 W02010/127284
 (87) 国際公開日 平成22年11月4日 (2010. 11. 4)
 (31) 優先権主張番号 61/174, 711
 (32) 優先日 平成21年5月1日 (2009. 5. 1)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

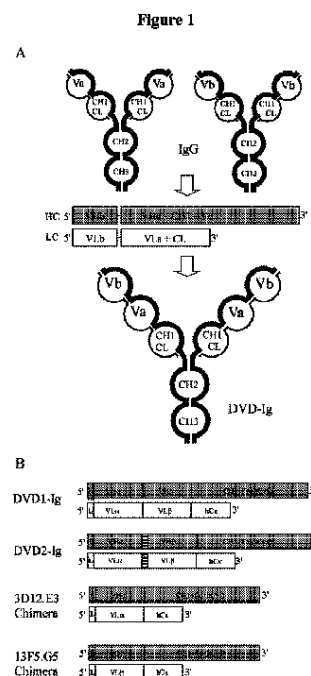
(71) 出願人 391008788
 アボット・ラボラトリーズ
 ABBOTT LABORATORIES
 アメリカ合衆国 イリノイ州 アボット
 パーク アボット パーク ロード 1 0
 0
 (74) 代理人 110001173
 特許業務法人川口国際特許事務所
 (72) 発明者 ガユール, タリク
 アメリカ合衆国、マサチューセッツ・0 1
 7 4 6、ホリストン、ワシントン・ストリ
 ート・1 0 1 4

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 二重可変ドメイン免疫グロブリンおよびこの使用

(57) 【要約】

本発明は、操作された多価および多重特異的な結合タンパク質、これらの製造方法に関し、特に、疾病の予防、診断および／または治療におけるこれらの使用に関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であって、前記ポリペプチド鎖は、 $VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n$ を含み、

VD1は、第一の親抗体またはこの抗原結合部分から得られる第一の重鎖可変ドメインであり；

VD2は、第二の親抗体またはこの抗原結合部分から得られる第二の重鎖可変ドメインであり；

Cは、重鎖定常ドメインであり；

(X1)nは、リンカーであり（ただし、CH1ではない。）、前記(X1)nは、存在しまたは不存在であり；および

(X2)nは、Fc領域であり、前記(X2)nは、存在しまたは不存在であり、VD1およびVD2は、配列番号27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、323、325および327からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、結合タンパク質。

【請求項 2】

EGFRおよびCD-3；EGFRおよびIGF1R；EGFRおよびRON；EGFRおよびHGF；VEGFおよびEGFR；EGFRおよびErbb3、EGFRおよびDLL-4、EGFRおよびPLGF、EGFRおよびEGFR、EGFRおよびRGMa、EGFRおよび破傷風トキソイド；VEGFおよび破傷風トキソイド；ならびに破傷風トキソイドおよび破傷風トキソイドからなる群から選択される対に結合することができる、請求項1に記載の結合タンパク質。

【請求項 3】

(X2)nが不存在である、請求項1の結合タンパク質。

【請求項 4】

ポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であって、前記ポリペプチド鎖は、 $VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n$ を含み、

VD1は、第一の親抗体またはこの抗原結合部分から得られる第一の軽鎖可変ドメインであり；

VD2は、第二の親抗体またはこの抗原結合部分から得られる第二の軽鎖可変ドメインであり；

Cは、軽鎖定常ドメインであり；

(X1)nは、リンカーであり（ただし、CH1ではない。）、前記(X1)nは、存在しまたは不存在であり；および

(X2)nは、Fc領域を含まず、前記(X2)nは、存在しまたは不存在であり、VD1およびVD2は、配列番号28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、324、326および328からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、結合タンパク質。

【請求項 5】

EGFRおよびCD-3；EGFRおよびIGF1R；EGFRおよびRON；EGFRおよびHGF；VEGFおよびEGFR；EGFRおよびErbb3、EGFRおよびDLL-4、EGFRおよびPLGF、EGFRおよびEGFR、EGFRおよびRGMa、EGFRおよび破傷風トキソイド；VEGFおよび破傷風トキソイド；ならびに破傷風トキソイドおよび破傷風トキソイドからなる群から選択される対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】

(X2)nが不存在である、請求項4の結合タンパク質。

【請求項 7】

第一および第二のポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であって、前記第一のポリペプチド鎖は、第一のVD1-(X1)n-VD2-C-(X2)nを含み、

VD1は、第一の親抗体またはこの抗原結合部分から得られる第一の重鎖可変ドメインであり；

VD2は、第二の親抗体またはこの抗原結合部分から得られる第二の重鎖可変ドメインであり；

Cは、重鎖定常ドメインであり；

(X1)nは、リンカーであり（ただし、CH1ではない。）、前記(X1)nは、存在しまたは不存在であり；および

(X2)nは、Fc領域であり、前記(X2)nは、存在しまたは不存在であり；ならびに

前記第二のポリペプチド鎖は、第二のVD1-(X1)n-VD2-C-(X2)nを含み、

VD1は、第一の親抗体またはこの抗原結合部分から得られる第一の軽鎖可変ドメインであり；

VD2は、第一の親抗体またはこの抗原結合部分から得られる第二の軽鎖可変ドメインであり；

Cは、軽鎖定常ドメインであり；

(X1)nは、リンカーであり（ただし、CH1ではない。）、前記(X1)nは、存在しまたは不存在であり；および

(X2)nは、Fc領域を含まず、前記(X2)nは、存在しまたは不存在であり、VD1およびVD2重鎖可変ドメインは、配列番号27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、323、325および327からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、ならびにVD1およびVD2軽鎖可変ドメインは、配列番号28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、324、326、および328からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、結合タンパク質。

【請求項8】

EGFRおよびCD-3；EGFRおよびIGF1R；EGFRおよびRON；EGFRおよびHGF；VEGFおよびEGFR；EGFRおよびErbb3、EGFRおよびDLL-4、EGFRおよびPLGF、EGFRおよびEGFR、EGFRおよびRGMa、EGFRおよび破傷風トキソイド；VEGFおよび破傷風トキソイド；ならびに破傷風トキソイドおよび破傷風トキソイドからなる群から選択される対に結合することができる、請求項7の結合タンパク質。

【請求項9】

2つの第一のポリペプチド鎖および2つの第二のポリペプチド鎖を含む、請求項8の結合タンパク質。

【請求項10】

Fc領域が原型配列Fc領域および変形物配列Fc領域からなる群から選択される、請求項8の結合タンパク質。

【請求項11】

Fc領域が、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgEまたはIgDから得られるFc領域からなる群から選択される、請求項8の結合タンパク質。

【請求項12】

第一のポリペプチド鎖の前記VD1および第二のポリペプチド鎖の前記VD1が同じ親抗体またはこの抗原結合部分から得られる、請求項8の結合タンパク質。

【請求項13】

第一のポリペプチド鎖の前記VD1および第二のポリペプチド鎖の前記VD1が異なる親抗体またはこの抗原結合部分から得られる、請求項8の結合タンパク質。

【請求項 14】

第一のポリペプチド鎖の前記 V D 2 および第二のポリペプチド鎖の前記 V D 2 が同じ親抗体またはこの抗原結合部分から得られる、請求項 8 の結合タンパク質。

【請求項 15】

第一のポリペプチド鎖の前記 V D 2 および第二のポリペプチド鎖の前記 V D 2 が異なる親抗体またはこの抗原結合部分から得られる、請求項 8 の結合タンパク質。

【請求項 16】

前記第一および前記第二の親抗体が前記抗原上の異なるエピトープに結合する、請求項 8 の結合タンパク質。

【請求項 17】

前記第一の親抗体またはこの抗原結合部分が、前記第二の親抗体またはこの抗原結合部分が前記第二の抗原に結合する強度とは異なる強度で前記第一の抗原に結合する、請求項 8 の結合タンパク質。

【請求項 18】

前記第一の親抗体またはこの抗原結合部分が、前記第二の親抗体またはこの抗原結合部分が前記第二の抗原に結合する親和性とは異なる親和性で前記第一の抗原に結合する、請求項 8 の結合タンパク質。

【請求項 19】

前記第一の親抗体またはこの抗原結合部分および前記第二の親抗体またはこの抗原結合部分がヒト抗体、C D R 移植抗体およびヒト化抗体からなる群から選択される、請求項 8 の結合タンパク質。

【請求項 20】

前記第一の親抗体またはこの抗原結合部分および前記第二の親抗体またはこの抗原結合部分が、F a b 断片、F (a b ')₂ 断片；ヒンジ領域において、ジスルフィド架橋によって連結された 2 つの F a b 断片を含む二価断片；V H および C H 1 ドメインからなる F d 断片；抗体の単一アームの V L および V H ドメインからなる F v 断片；d A b 断片；単離された相補性決定領域 (C D R) ；一本鎖抗体およびダイアボディからなる群から選択される、請求項 8 の結合タンパク質。

【請求項 21】

前記第一の親抗体もしくはこの抗原結合部分または前記第二の親抗体もしくはこの抗原結合部分によって示される少なくとも 1 つの所望の特性を有する、請求項 8 の結合タンパク質。

【請求項 22】

前記所望の特性が 1 つ以上の抗体パラメータから選択される、請求項 21 の結合タンパク質。

【請求項 23】

前記抗体パラメータが、抗原特異性、抗原に対する親和性、強度、生物学的機能、エピトープ認識、安定性、溶解度、産生効率、免疫原性、薬物速度論、生物学的利用性、組織交叉反応性およびオーソログ抗原結合からなる群から選択される、請求項 22 の結合タンパク質。

【請求項 24】

4 つのポリペプチド鎖を含む、2 つの抗原に結合することができる D V D - I g であって、第一および第三のポリペプチド鎖が V D 1 - (X 1)_n - V D 2 - C - (X 2)_n を含み、

V D 1 は、第一の親抗体またはこの抗原結合部分から得られる第一の重鎖可変ドメインであり；

V D 2 は、第二の親抗体またはこの抗原結合部分から得られる第二の重鎖可変ドメインであり；

C は、重鎖定常ドメインであり；

(X 1)_n は、リンカーであり (ただし、C H 1 ではなく、前記 (X 1)_n は、存在し

10

20

30

40

50

または不存在である。) ; および

(X 2) n は、F c 領域であり、前記 (X 2) n は、存在しまたは不存在であり、ならびに

第二および第四のポリペプチド鎖が V D 1 - (X 1) n - V D 2 - C - (X 2) n を含み、

V D 1 は、第一の親抗体またはこの抗原結合部分から得られる第一の軽鎖可変ドメインであり；

V D 2 は、第二の親抗体またはこの抗原結合部分から得られる第二の軽鎖可変ドメインであり；

C は、軽鎖定常ドメインであり；

(X 1) n は、リンカーであり（ただし、C H 1 ではなく、前記 (X 1) n は、存在しまたは不存在である。） ; および

(X 2) n は、F c 領域を含まず、前記 (X 2) n は、存在しまたは不存在であり、V D 1 および V D 2 重鎖可変ドメインは、配列番号 2 7、2 9、3 1、3 3、3 5、3 7、3 9、4 1、4 3、4 5、4 7、4 9、5 1、5 3、5 5、5 7、3 2 3、3 2 5 および 3 2 7 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、ならびに V D 1 および V D 2 軽鎖可変ドメインは、配列番号 2 8、3 0、3 2、3 4、3 6、3 8、4 0、4 2、4 4、4 6、4 8、5 0、5 2、5 4、5 6、5 8、3 2 4、3 2 6 および 3 2 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、

2 つの抗原に結合することができる D V D - I g。

【請求項 2 5】

2 つの抗原に結合することができる二重可変ドメイン免疫グロブリンを作製する方法であって、

a) 第一の抗原に結合することができる第一の親抗体またはこの抗原結合部分を取得する工程；

b) 第二の抗原に結合することができる第二の親抗体またはこの抗原結合部分を取得する工程；

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

(V D 1 は、前記第一の親抗体またはこの抗原結合部分から得られる第一の重鎖可変ドメインであり；

V D 2 は、前記第二の親抗体またはこの抗原結合部分から得られる第二の重鎖可変ドメインであり；

C は、重鎖定常ドメインであり；

(X 1) n は、リンカーであり（ただし、C H 1 ではない。） ; 前記 (X 1) n は、存在しまたは不存在であり；ならびに

(X 2) n は、F c 領域であり、前記 (X 2) n は、存在しまたは不存在である。) を含む第一および第三のポリペプチド鎖を構築する工程；

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

(V D 1 は、前記第一の親抗体またはこの抗原結合部分から得られる第一の軽鎖可変ドメインであり；

V D 2 は、前記第二の親抗体またはこの抗原結合部分から得られる第二の軽鎖可変ドメインであり；

C は、軽鎖定常ドメインであり；

(X 1) n は、リンカーであり（ただし、C H 1 ではない。） ; 前記 (X 1) n は、存在しまたは不存在であり；ならびに

(X 2) n は、F c 領域を含まず、前記 (X 2) n は、存在しまたは不存在である。) を含む第二および第四のポリペプチド鎖を構築する工程；

e) 前記第一、第二、第三および第四のポリペプチド鎖を発現させる工程；

を、前記第一および前記第二の抗原に結合することができる二重可変ドメイン免疫グロブリンが作製されるように含み；V D 1 および V D 2 重鎖可変ドメインは、配列番号 2 7、

10

20

30

40

50

29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、323、325および327からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、ならびにVD1およびVD2軽鎖可変ドメインは、配列番号28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、324、326および328からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、方法。

【請求項26】

前記第一の親抗体またはこの抗原結合部分および前記第二の親抗体またはこの抗原結合部分がヒト抗体、CDR移植抗体およびヒト化抗体からなる群から選択される、請求項25の方法。

10

【請求項27】

前記第一の親抗体またはこの抗原結合部分および前記第二の親抗体またはこの抗原結合部分が、Fab断片、F(ab')₂断片；ヒンジ領域において、ジスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片を含む二価断片；VHおよびCH1ドメインからなるFd断片；抗体の単一アームのVLおよびVHドメインからなるFv断片；dAb断片；単離された相補性決定領域（CDR）；一本鎖抗体およびダイアボディからなる群から選択される、請求項25の方法。

【請求項28】

前記第一の親抗体またはこの抗原結合部分が二重可変ドメイン免疫グロブリンによって示される少なくとも1つの所望の特性を有する、請求項25の方法。

20

【請求項29】

前記第二の親抗体またはこの抗原結合部分が二重可変ドメイン免疫グロブリンによって示される少なくとも1つの所望の特性を有する、請求項25の方法。

【請求項30】

Fc領域が原型配列Fc領域および変形物配列Fc領域からなる群から選択される、請求項25の方法。

【請求項31】

Fc領域が、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgEまたはIgDから得られるFc領域からなる群から選択される、請求項25の方法。

【請求項32】

30

前記所望の特性が1つ以上の抗体パラメータから選択される、請求項28の方法。

【請求項33】

前記所望の特性が1つ以上の抗体パラメータから選択される、請求項29の方法。

【請求項34】

前記抗体パラメータが、抗原特異性、抗原に対する親和性、強度、生物学的機能、エпитープ認識、安定性、溶解度、産生効率、免疫原性、薬物速度論、生物学的利用性、組織交叉反応性およびオーソログ抗原結合からなる群から選択される、請求項32の方法。

【請求項35】

前記抗体パラメータが、抗原特異性、抗原に対する親和性、強度、生物学的機能、エпитープ認識、安定性、溶解度、産生効率、免疫原性、薬物速度論、生物学的利用性、組織交叉反応性およびオーソログ抗原結合からなる群から選択される、請求項33の方法。

40

【請求項36】

前記第一の親抗体またはこの抗原結合部分が、前記第二の親抗体またはこの抗原結合部分が前記第二の抗原に結合する親和性とは異なる親和性で前記第一の抗原に結合する、請求項25の方法。

【請求項37】

前記第一の親抗体またはこの抗原結合部分が、前記第二の親抗体またはこの抗原結合部分が前記第二の抗原に結合する強度とは異なる強度で前記第一の抗原に結合する、請求項25の方法。

【請求項38】

50

所望の特性を有し、2つの抗原に結合することができる二重可変ドメイン免疫グロブリンを作製する方法であって、

a) 第一の抗原に結合することができ、および二重可変ドメイン免疫グロブリンによって示される少なくとも1つの所望の特性を有する第一の親抗体またはこの抗原結合部分を取得する工程；

b) 第二の抗原に結合することができ、および二重可変ドメイン免疫グロブリンによって示される少なくとも1つの所望の特性を有する第二の親抗体またはこの抗原結合部分を取得する工程；

c) $VD1 - (X1)_n - VD2 - C - (X2)_n$

(VD1は、前記第一の親抗体またはこの抗原結合部分から得られる第一の重鎖可変ドメインであり； 10

VD2は、前記第二の親抗体またはこの抗原結合部分から得られる第二の重鎖可変ドメインであり；

Cは、重鎖定常ドメインであり；

(X1)_nは、リンカーであり(ただし、CH1ではない。)、前記(X1)_nは、存在しまたは不存在であり；

(X2)_nは、Fc領域であり、前記(X2)_nは、存在しまたは不存在である。)

を含む第一および第三のポリペプチド鎖を構築する工程；

d) $VD1 - (X1)_n - VD2 - C - (X2)_n$

(VD1は、前記第一の親抗体またはこの抗原結合部分から得られる第一の軽鎖可変ドメインであり； 20

VD2は、前記第二の親抗体またはこの抗原結合部分から得られる第二の軽鎖可変ドメインであり；Cは、軽鎖定常ドメインであり；

(X1)_nは、リンカーであり(ただし、CH1ではない。)、前記(X1)_nは、存在しまたは不存在であり；

(X2)_nは、Fc領域を含まず、前記(X2)_nは、存在しまたは不存在である。)

を含む第二および第四のポリペプチド鎖を構築する工程；

e) 前記第一、第二、第三および第四のポリペプチド鎖を発現させる工程；

を、所望の特性を有し、前記第一および前記第二の抗原に結合することができる二重可変ドメイン免疫グロブリンが作製されるように含む、方法。 30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2009年5月1日に提出された米国仮特許出願番号61/174,711(いかなる目的に対しても、参照によりこの全体が明示的に本明細書に組み込まれる。)に対する優先権を主張する。

【0002】

発明の分野

本発明は、多価および多重特異的な結合タンパク質、製造方法に関し、特に、急性および慢性炎症疾患、癌ならびにその他の疾病の診断、予防および/または治療におけるこれらの使用に関する。 40

【背景技術】

【0003】

発明の背景

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

【0004】

二特異的抗体は、二特異的抗体の所望の特異性を有するマウスモノクローナル抗体(m 50

A b) 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 (1983) Nature 305 (5934): 537-40 参照) を用いて作製されてきた。得られたハイブリドーマ細胞株内で 2 つの異なる免疫グロブリン (Ig) 重鎖と軽鎖がランダムに対合するために、最大 10 個の異なる Ig 種が生成され、このうち 1 つだけが機能的な二特異的抗体である。誤対合された副産物の存在および大幅に減少した産生率は、精巧な精製操作が必要とされることを意味している。

【0005】

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

【0006】

二特異的抗体を作製するために使用される別の方法は、2 つの親抗体をヘテロ二機能的クロスリンカーとカップリングさせることであるが、クロスリンカーと親抗体の反応が部位特異的でないので、得られた二特異的抗体は、著しい分子多様性に悩まされる。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、部位特異的な様式で、これらのヒンジシステイン残基において化学的に架橋されてきた (Glennie, M. J., et al. (1987) J. Immunol. 139 (7): 2367-75 参照)。しかし、この方法は、完全な IgG 分子ではなく Fab' 2 断片をもたらす。

【0007】

多岐にわたる他の組み換え二特異的抗体フォーマットが、開発されている (Kriangkum, J., et al. (2001) Biomol. Eng. 18 (2): 31-40 参照)。これらのうち、直列型一本鎖 Fv 分子およびダイアボディならびにこれらの様々な誘導体が、最も広く使用されている。一般に、これらの分子の構築は、異なる抗原を認識する 2 つの一本鎖 Fv (scFv) 断片から始まる (Economides, A. N., et al. (2003) Nat. Med. 9 (1): 47-52 参照)。直列型 scFv 分子 (taFv) は、2 つの scFv 分子を付加的な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 断片および最大 63 個の残基の長さを有するリンカーを接続するために、様々なリンカーを使用することが可能である (Nakanishi, K., et al. (2001) Ann. Rev. Immunol. 19: 423-74 参照)。親 scFv 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 scFv 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 scFv 分子を作製するために、再折り畳みプロトコルまたは哺乳動物発現系の使用が、一般に適用される。最近の研究において、CD28 および悪性黒色腫関連プロテオグリカンに対する直列型 scFv の、トランスジェニックウサギおよびウシによるインビボ発現が報告された (Gracie, J. A., et al. (1999) J. Clin. Invest. 104 (10): 1393-401 参照)。この構築物では、2 つの scFv 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、または変動する長さもしくは柔軟性を有する中央リンカーを使用することを含む様々な戦略が使用された。現在、幾つかの研究が、極めて短い Ala3 リンカーまたはグリシン/セリンが豊富な長いリンカーを用いた、細菌中での可溶性直列型 scFv 分子の発現を報告している (Leung, B. P., et al. (2000) J. Immunol. 164 (12): 6495-502; Ito, A., et al. (2003) J. Immunol. 170 (9): 4802-9; Kami, A., et al. (2002) J. Neuroimmunol. 125 (1-

10

20

30

40

50

2) : 134-40 参照)。最近の研究では、細菌中で、可溶性および活性形態で産生された分子を濃縮するために、3または6個の残基の長さを有する無作為に選ばれた中央リンカーを含有する直列型 scFv レポートリーのファージディスプレイが使用された。この手法は、6アミノ酸残基のリンカーを有する直列型 scFv 分子の単離をもたらした (Arndt, M. and J. Krauss (2003) *Methods Mol. Biol.* 207: 305-21 参照)。このリンカー配列が、直列型 scFv 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。それにもかかわらず、この研究は、定方向突然変異誘発と組み合わせた直列型 scFv 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。

10

【0008】

二特異的ダイアボディ (Db) は、発現のためのダイアボディフォーマットを使用する。ダイアボディは、VH および VL ドメインを接続するリンカーの長さを、約5残基まで減少させることによって scFv 断片から作製される (Peipp, M. and T. Valerius (2002) *Biochem. Soc. Trans.* 30 (4): 507-11 参照)。このリンカーサイズの減少は、VH および VL ドメインの交叉対合による2つのポリペプチド鎖の二量体化を促進する。二特異的ダイアボディは、構造 VHA-VLB および VHB-VLA (VH-VL 配置) または VLA-VHB および VLB-VHA (VL-VH 配置) の何れかとともに、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。多種多様の異なる二特異的ダイアボディが過去に作製されており、これらの多くは、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および形成に影響を与え得ることを示している (Mack, M. et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (15): 7021-5 参照)。それにもかかわらず、細菌中での可溶性発現は、直列型 scFv 分子に優る重要な利点を示す。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つの手法は、ノブ・イントゥ・ホール (knob-into-hole) ダイアボディの作製である (Holliger, P., T. Prospero, and G. Winter (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (14): 6444-8. 18 参照)。これは、HER2 および CD3 に対する二重特異的ダイアボディについて示された。Val37 を Phe と交換し、Leu45 を Trp と交換することによって、VH ドメイン中に大きなノブが導入され、抗HER2 または抗CD3 可変ドメインの何れかにおいて、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。この手法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、幾つかの分析された構築物について、抗原結合活性の低下が観察された。従って、このかなり複雑な手法は、不変の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、このような手法は、定常領域の免疫グロブリン配列の変異的修飾を必要とし、このため、抗体配列の非原型および非天然形態を作製し、これは、増加した免疫原性、乏しいインビボ安定性および望ましくない薬物動態をもたらし得る。

20

30

40

【0009】

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 (1997) *Cancer Immunol. Immunother.* 45 (3-4): 128-30; Wu, A. M., et al. (1996) *Immunotechnology* 2 (1

50

）：p. 21-36 参照）。二特異的一本鎖ダイアボディは、2つのダイア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、単量体の一本鎖ダイアボディ（50から60kDa）に相当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、可溶性か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 (1997) Cancer Immunol. Immunother. 45 (3-4) : 128-30; Wu, A. M., et al. (1996) Immunotechnol. 2 (1) : 21-36; Pluckthun, A. and P. Pack (1997) Immunotechnol. 3 (2) : 83-105; Ridgway, J. B., et al. (1996) Protein Engin. 9 (7) : 617-21 参照）。従って、一本鎖ダイアボディは、直列型 scFv の利点（全ての単量体は二特異的である。）とダイアボディの利点（細菌中での可溶性発現）を兼ね備える。

10

【0010】

より最近になって、ダイアボディは、ジードダイアボディと名づけられた、より Ig 様の分子を作製するために Fc に融合されている（Lu, D., et al. (2004) J. Biol. Chem. 279 (4) : 2856-65 参照）。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. (2003) J. Immunol. 170 (9) : 4854-61 参照）。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

【特許文献1】国際公開第01/77342号

【非特許文献】

【0012】

【非特許文献1】Milstein, C. および A. C. Cuelllo, Nature, 305 (5934), 1983年, pp. 537-40

【非特許文献2】Staerz, U. D. 他、Nature, 314 (6012), 1985年, pp. 628-31

30

【非特許文献3】Brennan, M. 他、Science, 229 (4708), 1985年, pp. 81-3

【非特許文献4】Glennie, M. J. 他、J Immunol, 139 (7), 1987年, pp. 2367-75

【非特許文献5】Kriangkum, J. 他、Biomol Eng, 18 (2), 2001年 pp. 31-40

【非特許文献6】Economides, A. N. 他、Nat Med, 9 (1), 2003年, pp. 47-52

【非特許文献7】Nakanishi, K. 他、Annu Rev Immunol, 19, 2001年, pp. 423-74

40

【非特許文献8】Gracie, I. A. 他、J Clin Invest, 104 (10), 1999年, pp. 1393-401

【非特許文献9】Leung, B. P. 他、J Immunol, 164 (12), 2000年, pp. 6495-502

【非特許文献10】Ito, A. 他、J Immunol, 170 (9), 2003年, pp. 4802-9

【非特許文献11】Karni, A. 他、J Neuroimmunol, 125 (1-2), 2002年, pp. 134-40

【非特許文献12】Arndt, M. および J. Krauss, Methods Mol Biol, 207, 2003年, pp. 305-21

50

【非特許文献13】Peipp, M. および T. Valerius Biochem Soc Trans, 30 (4)、2002年、pp. 507-11

【非特許文献14】Mack, M., G. Riethmüller および P. Kufner, Proc Natl Acad Sci USA, 92 (15)、1995年、pp. 7021-5

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

【非特許文献16】Holliger, P. および G. Winter, Cancer Immunol Immunother, 45 (3-4)、1997年、pp. 128-30

【非特許文献17】Wu, A. M. 他、Immunotechnology, . 2 (1)、1996年、pp. 21-36

【非特許文献18】Holliger, P. および G. Winter, Cancer Immunol Immunother, 45 (3-4)、1997年、pp. 128-30

【非特許文献19】Pluckthun, A. および P. Pack, Immunotechnology, . 3 (2)、1997年、pp. 83-105

【非特許文献20】Ridgway, J. B. 他、Protein Eng, 9 (7)、1996年、pp. 617-21

【非特許文献21】Lu, D. 他、J Biol Chem, 279 (4)、2004年、pp. 2856-65

【非特許文献22】Miller, K. 他、J Immunol, 170 (9)、2003年、pp. 4854-61

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

当分野において、2つ以上の抗原に結合することが可能な改良された多価結合タンパク質に対する要求が存在する。米国特許出願逐次番号11/507,050は、高い親和性で2つ以上の抗原に結合することができる結合タンパク質（これは、二重可変ドメイン免疫グロブリン（DVD-Ig（商標））と称されている。）の新規ファミリーを提供する。本発明は、2つ以上の抗原に結合することが可能なさらなる新規結合タンパク質を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0014】

発明の要旨

本発明は、2つ以上の抗原に結合することが可能な多価結合タンパク質に関する。本発明は、高い親和性で、2つ以上の抗原に結合することが可能な結合タンパク質の新規ファミリーを提供する。

【0015】

一実施形態において、本発明は、VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n（VD1は第一の可変ドメインであり、VD2は第二の可変ドメインであり、Cは定常ドメインであり、X1はアミノ酸またはポリペプチドを表し、X2はFc領域を表し、およびnは0または1である。）を含むポリペプチド鎖を含む結合タンパク質を提供する。一実施形態において、結合タンパク質中のVD1およびVD2は、重鎖可変ドメインである。別の実施形態において、重鎖可変ドメインは、マウス重鎖可変ドメイン、ヒト重鎖可変ドメイン、CDR移植された重鎖可変ドメインおよびヒト化重鎖可変ドメインからなる群から選択される。さらに別の実施形態において、VD1およびVD2は、同一の抗原に結合することができる。別の実施形態において、VD1およびVD2は、異なる抗原に結合することができる。さらに別の実施形態において、Cは重鎖定常ドメインである。例えば、X1

はリンカーである（ただし、X 1はCH 1ではない。）。例えば、X 1は、AKTTPKLEEGEFSEAR（配列番号1）；AKTTPKLEEGEFSEARV（配列番号2）；AKTTPKLGG（配列番号3）；SAKTTPKLGG（配列番号4）；SAKTTP（配列番号5）；RADAAP（配列番号6）；RADAAPTVS（配列番号7）；RADAAAAGGPGS（配列番号8）；RADAAA（G₄S）₄（配列番号9），SAKTTPKLEEGEFSEARV（配列番号10）；ADAAAP（配列番号11）；ADAAPTVSIFPP（配列番号12）；TVAAAP（配列番号13）；TVAAPSVFIFPP（配列番号14）；QPKAAP（配列番号15）；QPKAAPSVTLFPP（配列番号16）；AKTTPP（配列番号17）；AKTTPPSVTPLAP（配列番号18）；AKTTAP（配列番号19）；AKTTAPSVYPLAP（配列番号20）；ASTKGP（配列番号21）；ASTKGPSVFPLAP（配列番号22），GGGGSGGGSGGGGS（配列番号23）；GENKVEYAPALMALS（配列番号24）；GPAKELTPLKEAKVS（配列番号25）；GHEAAAVMQVQYPAS（配列番号26）からなる群から選択されるリンカーである。一実施形態において、X 2はFc領域である。別の実施形態において、X 2は変形物Fc領域である。

10

【0016】

一実施形態において、本明細書に開示されている結合タンパク質は、ポリペプチド鎖を含み、前記ポリペプチド鎖は、VD 1－（X 1）_n－VD 2－C－（X 2）_n（VD 1は第一の重鎖可変ドメインであり、VD 2は第二の重鎖可変ドメインであり、Cは重鎖定常ドメインであり、X 1はリンカーであり（ただし、CH 1ではない。）、およびX 2はFc領域である。）を含む。

20

【0017】

一実施形態において、結合タンパク質中のVD 1およびVD 2は、軽鎖可変ドメインである。一実施形態において、軽鎖可変ドメインは、マウス軽鎖可変ドメイン、ヒト軽鎖可変ドメイン、CDR移植された軽鎖可変ドメインおよ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、VD 1およびVD 2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、VD 1およびVD 2は、異なる抗原に結合することができる。一実施形態において、Cは、軽鎖定常ドメインである。別の実施形態において、X 1はリンカーである（ただし、X 1はCL 1ではない。）。一実施形態において、X 1は、AKTTPKLEEGEFSEAR（配列番号1）；AKTTPKLEEGEFSEARV（配列番号2）；AKTTPKLGG（配列番号3）；SAKTTPKLGG（配列番号4）；SAKTTP（配列番号5）；RADAAP（配列番号6）；RADAAPTVS（配列番号7）；RADAAAAGGPGS（配列番号8）；RADAAA（G₄S）₄（配列番号9），SAKTTPKLEEGEFSEARV（配列番号10）；ADAAAP（配列番号11）；ADAAPTVSIFPP（配列番号12）；TVAAAP（配列番号13）；TVAAPSVFIFPP（配列番号14）；QPKAAP（配列番号15）；QPKAAPSVTLFPP（配列番号16）；AKTTPP（配列番号17）；AKTTPPSVTPLAP（配列番号18）；AKTTAP（配列番号19）；AKTTAPSVYPLAP（配列番号20）；ASTKGP（配列番号21）；ASTKGPSVFPLAP（配列番号22），GGGGSGGGSGGGGS（配列番号23）；GENKVEYAPALMALS（配列番号24）；GPAKELTPLKEAKVS（配列番号25）；GHEAAAVMQVQYPAS（配列番号26）からなる群から選択されるリンカーである。一実施形態において、結合タンパク質は、X 2を含まない。

30

40

【0018】

一実施形態において、可変重鎖および可変軽鎖は何れも、同じリンカーを含む。別の実施形態において、可変重鎖および可変軽鎖は、異なるリンカーを含む。別の実施形態において、可変重鎖および可変軽鎖は何れも、短い（約6アミノ酸）リンカーを含む。別の実施形態において、可変重鎖および可変軽鎖は何れも、長い（6アミノ酸より多い）リンカ

50

ーを含む。別の実施形態において、可変重鎖は短いリンカーを含み、可変軽鎖は長いリンカーを含む。別の実施形態において、可変重鎖は長いリンカーを含み、可変軽鎖は短いリンカーを含む。

【0019】

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

【0020】

別の実施形態において、本発明は、2つのポリペプチド鎖を含む結合タンパク質を提供し、前記第一のポリペプチド鎖は、 $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$ ($VD1$ は第一の重鎖可変ドメインであり、 $VD2$ は第二の重鎖可変ドメインであり、 C は重鎖定常ドメインであり、 $X1$ はリンカーであり（ただし、 $CH1$ ではない。）、および $X2$ はFc領域である。）を含み；ならびに前記第二のポリペプチド鎖は、 $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$ ($VD1$ は第一の軽鎖可変ドメインであり、 $VD2$ は第二の軽鎖可変ドメインであり、 C は軽鎖定常ドメインであり、 $X1$ はリンカーであり（ただし、 $CH1$ ではない。）、および $X2$ はFc領域を含まない。）を含む。特定の実施形態において、二重可変ドメイン(DVD)結合タンパク質は、4つのポリペプチド鎖を含み、第一の2つのポリペプチド鎖は、それぞれ、 $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$ ($VD1$ は第一の重鎖可変ドメインであり、 $VD2$ は第二の重鎖可変ドメインであり、 C は重鎖定常ドメインであり、 $X1$ はリンカーであり（ただし、 $CH1$ ではない。）、および $X2$ はFc領域である。）を含み；ならびに第二の2つのポリペプチド鎖は、それぞれ、 $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$ ($VD1$ は第一の軽鎖可変ドメインであり、 $VD2$ は第二の軽鎖可変ドメインであり、 C は軽鎖定常ドメインであり、 $X1$ はリンカーであり（ただし、 $CH1$ ではない。）、および $X2$ 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。

【0021】

別の実施形態において、本明細書に開示されている結合タンパク質は、1つ以上の標的に結合することが可能である。一実施形態において、標的は、サイトカイン、細胞表面タンパク質、酵素および受容体からなる群から選択される。別の実施形態において、結合タンパク質は、1つ以上の標的の生物学的機能を調節することが可能である。別の実施形態において、結合タンパク質は、1つ以上の標的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、ポリペプチドホルモン、受容体または腫瘍マーカー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。例えば、本発明のDVD-Igは、以下のもの： $CD-3$ 、 RON 、 $IGF1R$ 、 HGF 、 $VEGF$ 、 $DLL-4$ 、 $EGFR$ 、 $PLGF$ 、 $ErbB3$ 、 $RGMa$ および破傷風トキシソイドの2つ以上に結合することができる（表2も参照）。特定の実施形態において、結合タンパク質は、からなる群から選択される標的の結合対に結合することができる。

【0022】

一実施形態において、 $EGFR$ （配列2）および $EGFR$ （配列1）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号59および配列番号61からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号60および配列番号62からなる群から選択されるDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、 $EGFR$ （配列2）および $EGFR$ （配列1）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号59のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号60のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、 $EGFR$ （配列2）および $EGFR$ （配列1）に結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号61のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号62のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。

10

20

30

40

50

【0023】

第二の実施形態において、EGFR（配列2）およびEGFR（配列1）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号63および配列番号65からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号64および配列番号66からなる群から選択されるDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、EGFR（配列2）およびEGFR（配列1）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号63のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号64のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、EGFR（配列2）およびEGFR（配列1）に結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号65のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号66のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。

10

【0024】

第三の実施形態において、EGFR（配列2）およびEGFR（配列1）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号67および配列番号69からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号68および配列番号70からなる群から選択されるDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、EGFR（配列2）およびEGFR（配列1）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号67のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号68のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、EGFR（配列2）およびEGFR（配列1）に結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号69のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号70のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。

20

【0025】

第四の実施形態において、EGFR（配列2）およびEGFR（配列1）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号71および配列番号73からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号72および配列番号74からなる群から選択されるDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、EGFR（配列2）およびEGFR（配列1）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号71のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号72のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、EGFR（配列2）およびEGFR（配列1）に結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号73のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号74のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。

30

【0026】

一実施形態において、EGFR（配列2）およびRONに結合することができる結合タンパク質は、配列番号75および配列番号77からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号76および配列番号78からなる群から選択されるDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、EGFR（配列2）およびRONに結合することができる結合タンパク質は、配列番号75のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号76のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、EGFR（配列2）およびRONに結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号77のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号78のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0027】

第二の実施形態において、EGFR（配列2）およびRONに結合することができる結合タンパク質は、配列番号79および配列番号81からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号80および配列番号82からなる群から選択されるDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、EGFR（配列2）およびRONに結合することができる結合タンパク質は、配列番号79のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号80のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、EGFR（配列2）およびRONに結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号81のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号82のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。

40

【0028】

第三の実施形態において、EGFR（配列2）およびRONに結合することができる結

50

合タンパク質は、配列番号 83 および配列番号 85 からなる群から選択される DVD 重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号 84 および配列番号 86 からなる群から選択される DVD 軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、EGFR（配列 2）および RON に結合することができる結合タンパク質は、配列番号 83 の DVD 重鎖アミノ酸配列および配列番号 84 の DVD 軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、EGFR（配列 2）および RON に結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号 85 の DVD 重鎖アミノ酸配列および配列番号 86 の DVD 軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0029】

第四の実施形態において、EGFR（配列 2）および RON に結合することができる結合タンパク質は、配列番号 87 および配列番号 89 からなる群から選択される DVD 重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号 88 および配列番号 90 からなる群から選択される DVD 軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、EGFR（配列 2）および RON に結合することができる結合タンパク質は、配列番号 87 の DVD 重鎖アミノ酸配列および配列番号 88 の DVD 軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、EGFR（配列 2）および RON に結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号 89 の DVD 重鎖アミノ酸配列および配列番号 90 の DVD 軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0030】

一実施形態において、EGFR（配列 2）および ErbB3（配列 1）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号 91 および配列番号 93 からなる群から選択される DVD 重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号 92 および配列番号 94 からなる群から選択される DVD 軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、EGFR（配列 2）および ErbB3（配列 1）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号 91 の DVD 重鎖アミノ酸配列および配列番号 92 の DVD 軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、EGFR（配列 2）および ErbB3（配列 1）に結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号 93 の DVD 重鎖アミノ酸配列および配列番号 94 の DVD 軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0031】

第二の実施形態において、EGFR（配列 2）および ErbB3（配列 1）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号 95 および配列番号 97 からなる群から選択される DVD 重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号 96 および配列番号 98 からなる群から選択される DVD 軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、EGFR（配列 2）および ErbB3（配列 1）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号 95 の DVD 重鎖アミノ酸配列および配列番号 96 の DVD 軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、EGFR（配列 2）および ErbB3（配列 1）に結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号 97 の DVD 重鎖アミノ酸配列および配列番号 98 の DVD 軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0032】

第三の実施形態において、EGFR（配列 2）および ErbB3（配列 1）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号 99 および配列番号 101 からなる群から選択される DVD 重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号 100 および配列番号 102 からなる群から選択される DVD 軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、EGFR（配列 2）および ErbB3（配列 1）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号 99 の DVD 重鎖アミノ酸配列および配列番号 100 の DVD 軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、EGFR（配列 2）および ErbB3（配列 1）に結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号 101 の DVD 重鎖アミノ酸配列および配列番号 102 の DVD 軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0033】

第四の実施形態において、EGFR（配列 2）および ErbB3（配列 1）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号 103 および配列番号 105 からなる群から選択される DVD 重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号 104 および配列番号 106 からな

10

20

30

40

50

る群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、EGFR（配列2）およびErbb3（配列1）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号103のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号104のDVD重鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、EGFR（配列2）およびErbb3（配列1）に結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号105のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号106のDVD重鎖アミノ酸配列を含む。

【0034】

一実施形態において、EGFR（配列2）およびErbb3（配列2）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号107および配列番号109からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号108および配列番号110からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、EGFR（配列2）およびErbb3（配列2）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号107のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号108のDVD重鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、EGFR（配列2）およびErbb3（配列2）に結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号109のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号110のDVD重鎖アミノ酸配列を含む。

【0035】

第二の実施形態において、EGFR（配列2）およびErbb3（配列2）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号111および配列番号113からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号112および配列番号114からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、EGFR（配列2）およびErbb3（配列2）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号111のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号112のDVD重鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、EGFR（配列2）およびErbb3（配列2）に結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号113のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号114のDVD重鎖アミノ酸配列を含む。

【0036】

第三の実施形態において、EGFR（配列2）およびErbb3（配列2）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号115および配列番号117からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号116および配列番号118からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、EGFR（配列2）およびErbb3（配列2）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号115のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号116のDVD重鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、EGFR（配列2）およびErbb3（配列2）に結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号117のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号118のDVD重鎖アミノ酸配列を含む。

【0037】

第四の実施形態において、EGFR（配列2）およびErbb3（配列2）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号119および配列番号121からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号120および配列番号122からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、EGFR（配列2）およびErbb3（配列2）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号119のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号120のDVD重鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、EGFR（配列2）およびErbb3（配列2）に結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号121のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号122のDVD重鎖アミノ酸配列を含む。

【0038】

一実施形態において、EGFR（配列2）およびCD3に結合することができる結合タンパク質は、配列番号123および配列番号125からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号124および配列番号126からなる群から選択される

D V D 軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、E G F R（配列 2）および C D 3 に結合することができる結合タンパク質は、配列番号 1 2 3 の D V D 重鎖アミノ酸配列および配列番号 1 2 4 の D V D 軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、E G F R（配列 2）および C D 3 に結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号 1 2 5 の D V D 重鎖アミノ酸配列および配列番号 1 2 6 の D V D 軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0039】

第二の実施形態において、E G F R（配列 2）および C D 3 に結合することができる結合タンパク質は、配列番号 1 2 7 および配列番号 1 2 9 からなる群から選択される D V D 重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号 1 2 8 および配列番号 1 3 0 からなる群から選択される D V D 軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、E G F R（配列 2）および C D 3 に結合することができる結合タンパク質は、配列番号 1 2 7 の D V D 重鎖アミノ酸配列および配列番号 1 2 8 の D V D 軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、E G F R（配列 2）および C D 3 に結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号 1 2 9 の D V D 重鎖アミノ酸配列および配列番号 1 3 0 の D V D 軽鎖アミノ酸配列を含む。

10

【0040】

第三の実施形態において、E G F R（配列 2）および C D 3 に結合することができる結合タンパク質は、配列番号 1 3 1 および配列番号 1 3 3 からなる群から選択される D V D 重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号 1 3 2 および配列番号 1 3 4 からなる群から選択される D V D 軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、E G F R（配列 2）および C D 3 に結合することができる結合タンパク質は、配列番号 1 3 1 の D V D 重鎖アミノ酸配列および配列番号 1 3 2 の D V D 軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、E G F R（配列 2）および C D 3 に結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号 1 3 3 の D V D 重鎖アミノ酸配列および配列番号 1 3 4 の D V D 軽鎖アミノ酸配列を含む。

20

【0041】

第四の実施形態において、E G F R（配列 2）および C D 3 に結合することができる結合タンパク質は、配列番号 1 3 5 および配列番号 1 3 7 からなる群から選択される D V D 重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号 1 3 6 および配列番号 1 3 8 からなる群から選択される D V D 軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、E G F R（配列 2）および C D 3 に結合することができる結合タンパク質は、配列番号 1 3 5 の D V D 重鎖アミノ酸配列および配列番号 1 3 6 の D V D 軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、E G F R（配列 2）および C D 3 に結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号 1 3 7 の D V D 重鎖アミノ酸配列および配列番号 1 3 8 の D V D 軽鎖アミノ酸配列を含む。

30

【0042】

一実施形態において、E G F R（配列 2）および I G F 1 R に結合することができる結合タンパク質は、配列番号 1 3 9 および配列番号 1 4 1 からなる群から選択される D V D 重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号 1 4 0 および配列番号 1 4 2 からなる群から選択される D V D 軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、E G F R（配列 2）および I G F 1 R に結合することができる結合タンパク質は、配列番号 1 3 9 の D V D 重鎖アミノ酸配列および配列番号 1 4 0 の D V D 軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、E G F R（配列 2）および I G F 1 R に結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号 1 4 1 の D V D 重鎖アミノ酸配列および配列番号 1 4 2 の D V D 軽鎖アミノ酸配列を含む。

40

【0043】

第二の実施形態において、E G F R（配列 2）および I G F 1 R に結合することができる結合タンパク質は、配列番号 1 4 3 および配列番号 1 4 5 からなる群から選択される D V D 重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号 1 4 4 および配列番号 1 4 6 からなる群から選

50

扱されるDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、EGFR（配列2）およびIGF1Rに結合することができる結合タンパク質は、配列番号143のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号144のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、EGFR（配列2）およびIGF1Rに結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号145のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号146のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0044】

第三の実施形態において、EGFR（配列2）およびIGF1Rに結合することができる結合タンパク質は、配列番号147および配列番号149からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号148および配列番号150からなる群から選択されるDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、EGFR（配列2）およびIGF1Rに結合することができる結合タンパク質は、配列番号147のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号148のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、EGFR（配列2）およびIGF1Rに結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号149のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号150のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0045】

第四の実施形態において、EGFR（配列2）およびIGF1Rに結合することができる結合タンパク質は、配列番号151および配列番号153からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号152および配列番号154からなる群から選択されるDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、EGFR（配列2）およびIGF1Rに結合することができる結合タンパク質は、配列番号151のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号152のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、EGFR（配列2）およびIGF1Rに結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号153のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号154のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0046】

一実施形態において、EGFR（配列2）およびHGFに結合することができる結合タンパク質は、配列番号155および配列番号157からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号156および配列番号158からなる群から選択されるDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、EGFR（配列2）およびHGFに結合することができる結合タンパク質は、配列番号155のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号156のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、EGFR（配列2）およびHGFに結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号157のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号158のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0047】

第二の実施形態において、EGFR（配列2）およびHGFに結合することができる結合タンパク質は、配列番号159および配列番号161からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号160および配列番号162からなる群から選択されるDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、EGFR（配列2）およびHGFに結合することができる結合タンパク質は、配列番号159のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号160のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、EGFR（配列2）およびHGFに結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号161のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号162のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0048】

第三の実施形態において、EGFR（配列2）およびHGFに結合することができる結合タンパク質は、配列番号163および配列番号165からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号164および配列番号166からなる群から選択さ

れるDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、EGFR（配列2）およびHGFに結合することができる結合タンパク質は、配列番号163のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号164のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、EGFR（配列2）およびHGFに結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号165のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号166のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0049】

第四の実施形態において、EGFR（配列2）およびHGFに結合することができる結合タンパク質は、配列番号167および配列番号169からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号168および配列番号170からなる群から選択されるDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、EGFR（配列2）およびHGFに結合することができる結合タンパク質は、配列番号167のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号168のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、EGFR（配列2）およびHGFに結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号169のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号170のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0050】

一実施形態において、EGFR（配列2）およびVEGF（配列1）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号171および配列番号173からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号172および配列番号174からなる群から選択されるDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、EGFR（配列2）およびVEGF（配列1）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号171のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号172のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、EGFR（配列2）およびVEGF（配列1）に結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号173のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号174のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0051】

第二の実施形態において、EGFR（配列2）およびVEGF（配列1）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号175および配列番号177からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号176および配列番号178からなる群から選択されるDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、EGFR（配列2）およびVEGF（配列1）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号175のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号176のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、EGFR（配列2）およびVEGF（配列1）に結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号177のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号178のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0052】

第三の実施形態において、EGFR（配列2）およびVEGF（配列1）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号179および配列番号181からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号180および配列番号182からなる群から選択されるDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、EGFR（配列2）およびVEGF（配列1）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号179のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号180のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、EGFR（配列2）およびVEGF（配列1）に結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号181のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号182のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0053】

第四の実施形態において、EGFR（配列2）およびVEGF（配列1）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号183および配列番号185からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号184および配列番号186からなる

群から選択されるDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、EGFR（配列2）およびVEGF（配列1）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号183のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号184のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、EGFR（配列2）およびVEGF（配列1）に結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号185のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号186のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0054】

一実施形態において、EGFR（配列2）およびDLL-4に結合することができる結合タンパク質は、配列番号187および配列番号189からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号188および配列番号190からなる群から選択されるDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、EGFR（配列2）およびDLL-4に結合することができる結合タンパク質は、配列番号187のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号188のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、EGFR（配列2）およびDLL-4に結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号189のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号190のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0055】

第二の実施形態において、EGFR（配列2）およびDLL-4に結合することができる結合タンパク質は、配列番号191および配列番号193からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号192および配列番号194からなる群から選択されるDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、EGFR（配列2）およびDLL-4に結合することができる結合タンパク質は、配列番号191のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号192のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、EGFR（配列2）およびDLL-4に結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号193のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号194のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0056】

第三の実施形態において、EGFR（配列2）およびDLL-4に結合することができる結合タンパク質は、配列番号195および配列番号197からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号196および配列番号198からなる群から選択されるDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、EGFR（配列2）およびDLL-4に結合することができる結合タンパク質は、配列番号195のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号196のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、EGFR（配列2）およびDLL-4に結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号197のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号198のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0057】

第四の実施形態において、EGFR（配列2）およびDLL-4に結合することができる結合タンパク質は、配列番号199および配列番号201からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号200および配列番号202からなる群から選択されるDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、EGFR（配列2）およびDLL-4に結合することができる結合タンパク質は、配列番号199のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号200のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、EGFR（配列2）およびDLL-4に結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号201のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号202のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0058】

一実施形態において、EGFR（配列2）およびPLGFに結合することができる結合タンパク質は、配列番号203および配列番号205からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号204および配列番号206からなる群から選択され

るDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、EGFR（配列2）およびPLGFに結合することができる結合タンパク質は、配列番号203のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号204のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、EGFR（配列2）およびPLGFに結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号205のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号206のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0059】

第二の実施形態において、EGFR（配列2）およびPLGFに結合することができる結合タンパク質は、配列番号207および配列番号209からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号208および配列番号210からなる群から選択されるDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、EGFR（配列2）およびPLGFに結合することができる結合タンパク質は、配列番号207のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号208のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、EGFR（配列2）およびPLGFに結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号209のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号210のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0060】

第三の実施形態において、EGFR（配列2）およびPLGFに結合することができる結合タンパク質は、配列番号211および配列番号213からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号212および配列番号214からなる群から選択されるDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、EGFR（配列2）およびPLGFに結合することができる結合タンパク質は、配列番号211のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号212のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、EGFR（配列2）およびPLGFに結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号213のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号214のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0061】

第四の実施形態において、EGFR（配列2）およびPLGFに結合することができる結合タンパク質は、配列番号215および配列番号217からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号216および配列番号218からなる群から選択されるDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、EGFR（配列2）およびPLGFに結合することができる結合タンパク質は、配列番号215のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号216のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、EGFR（配列2）およびPLGFに結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号217のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号218のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0062】

一実施形態において、EGFR（配列2）およびErbb3（配列3）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号219および配列番号221からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号220および配列番号222からなる群から選択されるDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、EGFR（配列2）およびErbb3（配列3）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号219のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号220のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、EGFR（配列2）およびErbb3（配列3）に結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号221のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号222のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0063】

第二の実施形態において、EGFR（配列2）およびErbb3（配列3）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号223および配列番号225からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号224および配列番号226からな

る群から選択されるD V D重鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、E G F R（配列2）およびE r b B 3（配列3）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号2 2 3のD V D重鎖アミノ酸配列および配列番号2 2 4のD V D重鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、E G F R（配列2）およびE r b B 3（配列3）に結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号2 2 5のD V D重鎖アミノ酸配列および配列番号2 2 6のD V D重鎖アミノ酸配列を含む。

【0 0 6 4】

第三の実施形態において、E G F R（配列2）およびE r b B 3（配列3）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号2 2 7および配列番号2 2 9からなる群から選択されるD V D重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号2 2 8および配列番号2 3 0からなる群から選択されるD V D重鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、E G F R（配列2）およびE r b B 3（配列3）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号2 2 7のD V D重鎖アミノ酸配列および配列番号2 2 8のD V D重鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、E G F R（配列2）およびE r b B 3（配列3）に結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号2 2 9のD V D重鎖アミノ酸配列および配列番号2 3 0のD V D重鎖アミノ酸配列を含む。

【0 0 6 5】

第四の実施形態において、E G F R（配列2）およびE r b B 3（配列3）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号2 3 1および配列番号2 3 3からなる群から選択されるD V D重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号2 3 2および配列番号2 3 4からなる群から選択されるD V D重鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、E G F R（配列2）およびE r b B 3（配列3）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号2 3 1のD V D重鎖アミノ酸配列および配列番号2 3 2のD V D重鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、E G F R（配列2）およびE r b B 3（配列3）に結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号2 3 3のD V D重鎖アミノ酸配列および配列番号2 3 4のD V D重鎖アミノ酸配列を含む。

【0 0 6 6】

一実施形態において、E G F R（配列2）およびV E G F（配列2）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号2 3 5および配列番号2 3 7からなる群から選択されるD V D重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号2 3 6および配列番号2 3 8からなる群から選択されるD V D重鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、E G F R（配列2）およびV E G F（配列2）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号2 3 5のD V D重鎖アミノ酸配列および配列番号2 3 6のD V D重鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、E G F R（配列2）およびV E G F（配列2）に結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号2 3 7のD V D重鎖アミノ酸配列および配列番号2 3 8のD V D重鎖アミノ酸配列を含む。

【0 0 6 7】

第二の実施形態において、E G F R（配列2）およびV E G F（配列2）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号2 3 9および配列番号2 4 1からなる群から選択されるD V D重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号2 4 0および配列番号2 4 2からなる群から選択されるD V D重鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、E G F R（配列2）およびV E G F（配列2）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号2 3 9のD V D重鎖アミノ酸配列および配列番号2 4 0のD V D重鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、E G F R（配列2）およびV E G F（配列2）に結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号2 4 1のD V D重鎖アミノ酸配列および配列番号2 4 2のD V D重鎖アミノ酸配列を含む。

【0 0 6 8】

第三の実施形態において、E G F R（配列2）およびV E G F（配列2）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号2 4 3および配列番号2 4 5からなる群から選択されるD V D重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号2 4 4および配列番号2 4 6からなる

群から選択されるD V D軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、E G F R（配列2）およびV E G F（配列2）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号2 4 3のD V D重鎖アミノ酸配列および配列番号2 4 4のD V D軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、E G F R（配列2）およびV E G F（配列2）に結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号2 4 5のD V D重鎖アミノ酸配列および配列番号2 4 6のD V D軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0069】

第四の実施形態において、E G F R（配列2）およびV E G F（配列2）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号2 4 7および配列番号2 4 9からなる群から選択されるD V D重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号2 4 8および配列番号2 5 0からなる群から選択されるD V D軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、E G F R（配列2）およびV E G F（配列2）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号2 4 7のD V D重鎖アミノ酸配列および配列番号2 4 8のD V D軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、E G F R（配列2）およびV E G F（配列2）に結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号2 4 9のD V D重鎖アミノ酸配列および配列番号2 5 0のD V D軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0070】

一実施形態において、E G F R（配列2）およびV E G F（配列3）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号2 5 1および配列番号2 5 3からなる群から選択されるD V D重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号2 5 2および配列番号2 5 4からなる群から選択されるD V D軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、E G F R（配列2）およびV E G F（配列3）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号2 5 1のD V D重鎖アミノ酸配列および配列番号2 5 2のD V D軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、E G F R（配列2）およびV E G F（配列3）に結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号2 5 3のD V D重鎖アミノ酸配列および配列番号2 5 4のD V D軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0071】

第二の実施形態において、E G F R（配列2）およびV E G F（配列3）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号2 5 5および配列番号2 5 7からなる群から選択されるD V D重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号2 5 6および配列番号2 5 8からなる群から選択されるD V D軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、E G F R（配列2）およびV E G F（配列3）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号2 5 5のD V D重鎖アミノ酸配列および配列番号2 5 6のD V D軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、E G F R（配列2）およびV E G F（配列3）に結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号2 5 7のD V D重鎖アミノ酸配列および配列番号2 5 8のD V D軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0072】

第三の実施形態において、E G F R（配列2）およびV E G F（配列3）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号2 5 9および配列番号2 6 1からなる群から選択されるD V D重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号2 6 0および配列番号2 6 2からなる群から選択されるD V D軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、E G F R（配列2）およびV E G F（配列3）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号2 5 9のD V D重鎖アミノ酸配列および配列番号2 6 0のD V D軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、E G F R（配列2）およびV E G F（配列3）に結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号2 6 1のD V D重鎖アミノ酸配列および配列番号2 6 2のD V D軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0073】

第四の実施形態において、E G F R（配列2）およびV E G F（配列3）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号2 6 3および配列番号2 6 5からなる群から選択されるD V D重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号2 6 4および配列番号2 6 6からなる

群から選択されるDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、EGFR（配列2）およびVEGF（配列3）に結合することができる結合タンパク質は、配列番号263のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号264のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、EGFR（配列2）およびVEGF（配列3）に結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号265のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号266のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0074】

一実施形態において、EGFR（配列1）およびRGMaに結合することができる結合タンパク質は、配列番号267および配列番号269からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号268および配列番号270からなる群から選択されるDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、EGFR（配列1）およびRGMaに結合することができる結合タンパク質は、配列番号267のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号268のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、EGFR（配列1）およびRGMaに結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号269のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号270のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。

10

【0075】

第二の実施形態において、EGFR（配列1）およびRGMaに結合することができる結合タンパク質は、配列番号271および配列番号273からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号272および配列番号274からなる群から選択されるDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、EGFR（配列1）およびRGMaに結合することができる結合タンパク質は、配列番号271のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号272のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、EGFR（配列1）およびRGMaに結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号273のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号274のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。

20

【0076】

第三の実施形態において、EGFR（配列1）およびRGMaに結合することができる結合タンパク質は、配列番号275および配列番号277からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号276および配列番号278からなる群から選択されるDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、EGFR（配列1）およびRGMaに結合することができる結合タンパク質は、配列番号275のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号276のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、EGFR（配列1）およびRGMaに結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号277のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号278のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。

30

【0077】

第四の実施形態において、EGFR（配列1）およびRGMaに結合することができる結合タンパク質は、配列番号279および配列番号281からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号280および配列番号282からなる群から選択されるDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、EGFR（配列1）およびRGMaに結合することができる結合タンパク質は、配列番号279のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号280のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、EGFR（配列1）およびRGMaに結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号281のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号282のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。

40

【0078】

一実施形態において、EGFR（配列1）および破傷風トキソイドに結合することができる結合タンパク質は、配列番号283および配列番号285からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号284および配列番号286からなる群から

50

選択されるDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、EGFR（配列1）および破傷風トキソイドに結合することができる結合タンパク質は、配列番号283のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号284のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、EGFR（配列1）および破傷風トキソイドに結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号285のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号286のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0079】

第二の実施形態において、EGFR（配列1）および破傷風トキソイドに結合することができる結合タンパク質は、配列番号287および配列番号289からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号288および配列番号290からなる群から選択されるDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、EGFR（配列1）および破傷風トキソイドに結合することができる結合タンパク質は、配列番号287のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号288のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、EGFR（配列1）および破傷風トキソイドに結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号289のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号290のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。

10

【0080】

第三の実施形態において、EGFR（配列1）および破傷風トキソイドに結合することができる結合タンパク質は、配列番号291および配列番号293からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号292および配列番号294からなる群から選択されるDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、EGFR（配列1）および破傷風トキソイドに結合することができる結合タンパク質は、配列番号291のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号292のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、EGFR（配列1）および破傷風トキソイドに結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号293のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号294のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。

20

【0081】

第四の実施形態において、EGFR（配列1）および破傷風トキソイドに結合することができる結合タンパク質は、配列番号295および配列番号297からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号296および配列番号298からなる群から選択されるDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、EGFR（配列1）および破傷風トキソイドに結合することができる結合タンパク質は、配列番号295のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号296のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、EGFR（配列1）および破傷風トキソイドに結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号297のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号298のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。

30

【0082】

一実施形態において、VEGF（配列1）および破傷風トキソイドに結合することができる結合タンパク質は、配列番号299および配列番号301からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号300および配列番号302からなる群から選択されるDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、VEGF（配列1）および破傷風トキソイドに結合することができる結合タンパク質は、配列番号299のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号300のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、VEGF（配列1）および破傷風トキソイドに結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号301のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号302のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。

40

【0083】

第二の実施形態において、VEGF（配列1）および破傷風トキソイドに結合することができる結合タンパク質は、配列番号303および配列番号305からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号304および配列番号306からなる群

50

から選択されるDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、VEGF（配列1）および破傷風トキソイドに結合することができる結合タンパク質は、配列番号303のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号304のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、VEGF（配列1）および破傷風トキソイドに結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号305のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号306のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0084】

第三の実施形態において、VEGF（配列1）および破傷風トキソイドに結合することができる結合タンパク質は、配列番号307および配列番号309からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号308および配列番号310からなる群から選択されるDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、VEGF（配列1）および破傷風トキソイドに結合することができる結合タンパク質は、配列番号307のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号308のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、VEGF（配列1）および破傷風トキソイドに結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号309のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号310のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。

10

【0085】

第四の実施形態において、VEGF（配列1）および破傷風トキソイドに結合することができる結合タンパク質は、配列番号311および配列番号313からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号312および配列番号314からなる群から選択されるDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、VEGF（配列1）および破傷風トキソイドに結合することができる結合タンパク質は、配列番号311のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号312のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、VEGF（配列1）および破傷風トキソイドに結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号313のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号314のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。

20

【0086】

一実施形態において、破傷風トキソイドおよび破傷風トキソイドに結合することができる結合タンパク質は、配列番号315および配列番号317からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号316および配列番号318からなる群から選択されるDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、破傷風トキソイドおよび破傷風トキソイドに結合することができる結合タンパク質は、配列番号315のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号316のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、破傷風トキソイドおよび破傷風トキソイドに結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号317のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号318のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。

30

【0087】

第二の実施形態において、破傷風トキソイドおよび破傷風トキソイドに結合することができる結合タンパク質は、配列番号319および配列番号321からなる群から選択されるDVD重鎖アミノ酸配列；ならびに配列番号320および配列番号322からなる群から選択されるDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、破傷風トキソイドおよび破傷風トキソイドに結合することができる結合タンパク質は、配列番号319のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号320のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、破傷風トキソイドおよび破傷風トキソイドに結合することができる結合タンパク質は、逆の方向性を有し、配列番号321のDVD重鎖アミノ酸配列および配列番号322のDVD軽鎖アミノ酸配列を含む。

40

【0088】

一実施形態において、上記に記載されている何れのDVD-IgのEGFR-VH配列も、配列番号323、325または327の何れか1つのアミノ酸配列を含む。別の実施形態において、上記に記載されている何れのDVD-IgのEGFR-VL配列も、配列

50

番号 3 2 4、3 2 6 または 3 2 8 の何れか 1 つのアミノ酸配列を含む。

【0089】

別の実施形態において、本発明は、ポリペプチド鎖を含む結合タンパク質を提供し、前記ポリペプチド鎖は、 $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$ ($VD1$ は、第一の親抗体またはこの抗原結合部分から得られる第一の重鎖可変ドメインであり、 $VD2$ は、第二の親抗体またはこの抗原結合部分から得られる第二の重鎖可変ドメインであり、 C は、重鎖定常ドメインであり、 $(X1)_n$ は、リンカーであり (ただし、 $CH1$ ではない。)、前記 $(X1)_n$ は、存在しまたは不存在であり、および $(X2)_n$ は、 Fc 領域であり、前記 $(X2)_n$ は、存在しまたは不存在である。) を含む。一実施形態において、 Fc 領域は、結合タンパク質に存在しない。

10

【0090】

別の実施形態において、本発明は、ポリペプチド鎖を含む結合タンパク質を提供し、前記ポリペプチド鎖は、 $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$ ($VD1$ は、第一の親抗体またはこの抗原結合部分から得られる第一の軽鎖可変ドメインであり、 $VD2$ は、第二の親抗体またはこの抗原結合部分から得られる第二の軽鎖可変ドメインであり、 C は、軽鎖定常ドメインであり、 $(X1)_n$ は、リンカーであり (ただし、 $CH1$ ではない。)、前記 $(X1)_n$ は、存在しまたは不存在であり、および $(X2)_n$ は、 Fc 領域を含まず、前記 $(X2)_n$ は、存在しまたは不存在である。) を含む。一実施形態において、 $(X2)_n$ は、結合タンパク質に存在しない。

20

【0091】

別の実施形態において、本発明の結合タンパク質は、第一および第二のポリペプチド鎖を含む (前記第一のポリペプチド鎖は、第一の $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$ ($VD1$ は、第一の親抗体またはこの抗原結合部分から得られる第一の重鎖可変ドメインであり、 $VD2$ は、第二の親抗体またはこの抗原結合部分から得られる第二の重鎖可変ドメインであり、 C は、重鎖定常ドメインであり、 $(X1)_n$ は、リンカーであり (ただし、 $CH1$ ではない。)、前記 $(X1)_n$ は、存在しまたは不存在であり、および $(X2)_n$ は、 Fc 領域であり、前記 $(X2)_n$ は、存在しまたは不存在である。) を含み、ならびに前記第二のポリペプチド鎖は、第二の $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$ ($VD1$ は、第一の親抗体またはこの抗原結合部分から得られる第一の軽鎖可変ドメインであり、 $VD2$ は、第二の親抗体またはこの抗原結合部分から得られる第二の軽鎖可変ドメインであり、 C は、軽鎖定常ドメインであり、 $(X1)_n$ は、リンカーであり (ただし、 $CH1$ ではない。)、前記 $(X1)_n$ は、存在しまたは不存在であり、および $(X2)_n$ は、 Fc 領域を含まず、前記 $(X2)_n$ は、存在しまたは不存在である。) を含む。)。別の実施形態において、結合タンパク質は、2 つの第一のポリペプチド鎖および 2 つの第二のポリペプチド鎖を含む。さらに別の実施形態において、 $(X2)_n$ は、第二のポリペプチドに存在しない。さらに別の実施形態において、 Fc 領域は、第一のポリペプチド中に存在する場合、固有配列 Fc 領域および変形物配列 Fc 領域からなる群から選択される。さらに別の実施形態において、 Fc 領域は、 $IgG1$ 、 $IgG2$ 、 $IgG3$ 、 $IgG4$ 、 IgA 、 IgM 、 IgE および IgD から得られる Fc 領域からなる群から選択される。

30

40

【0092】

別の実施形態において、本発明の結合タンパク質は、4 つのポリペプチド鎖を含む 2 つの抗原に結合することができる $DVD-Ig$ である (第一および第三のポリペプチド鎖は、 $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$ ($VD1$ は、第一の親抗体またはこの抗原結合部分から得られる第一の重鎖可変ドメインであり、 $VD2$ は、第二の親抗体またはこの抗原結合部分から得られる第二の重鎖可変ドメインであり、 C は、重鎖定常ドメインであり、 $(X1)_n$ は、リンカーであり (ただし、 $CH1$ ではない。)、前記 $(X1)_n$ は、存在しまたは不存在であり、および $(X2)_n$ は、 Fc 領域であり、前記 $(X2)_n$ は、存在しまたは不存在である。) を含み、ならびに第二および第四のポリペプチド鎖は、 $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$ ($VD1$ は、第一の親抗体またはこの抗

50

原結合部分から得られる第一の軽鎖可変ドメインであり、VD2は、第二の親抗体またはこの抗原結合部分から得られる第二の軽鎖可変ドメインであり、Cは、軽鎖定常ドメインであり、(X1)nは、リンカーであり（ただし、CH1ではない。）、前記(X1)nは、存在しまたは不存在であり、および(X2)nは、Fc領域を含まず、前記(X2)nは、存在しまたは不存在である。）を含む。）。

【0093】

本発明は、親抗体を予め選択することによって、DVD-Ig結合タンパク質を作製する方法を提供する。一実施形態において、a) 第一の抗原に結合することができる第一の親抗体またはこの抗原結合部分を取得する工程；b) 第二の抗原に結合することができる第二の親抗体またはこの抗原結合部分を取得する工程；c) VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n (VD1は、前記第一の親抗体またはこの抗原結合部分から得られる第一の重鎖可変ドメインであり、VD2は、前記第二の親抗体またはこの抗原結合部分から得られる第二の重鎖可変ドメインであり、Cは、重鎖定常ドメインであり、(X1)nは、リンカーであり（ただし、CH1ではない。）、前記(X1)nは、存在しまたは不存在であり、および(X2)nは、Fc領域であり、前記(X2)nは、存在しまたは不存在である。）を含む第一および第三のポリペプチド鎖を構築する工程；d) VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n (VD1は、前記第一の親抗体またはこの抗原結合部分から得られる第一の軽鎖可変ドメインであり、VD2は、前記第二の親抗体またはこの抗原結合部分から得られる第二の軽鎖可変ドメインであり、Cは、軽鎖定常ドメインであり、(X1)nは、リンカーであり（ただし、CH1ではない。）、前記(X1)nは、存在しまたは不存在であり、および(X2)nはFc領域を含まず、前記(X2)nは、存在しまたは不存在である。）を含む第二および第四のポリペプチド鎖を構築する工程；e) 前記第一および前記第二の抗原に結合することができる二重可変ドメイン免疫グロブリンが作製されるように、前記第一、第二、第三および第四のポリペプチド鎖を発現させる工程；を含む、2つの抗原に結合することができる二重可変ドメイン免疫グロブリンを作製する方法。

【0094】

さらに別の実施形態において、本発明は、a) 第一の抗原に結合することができ、および二重可変ドメイン免疫グロブリンによって呈される少なくとも1つの所望の特性を有する第一の親抗体またはこの抗原結合部分を取得する工程；b) 第二の抗原に結合することができ、および二重可変ドメイン免疫グロブリンによって呈される少なくとも1つの所望の特性を有する第二の親抗体またはこの抗原結合部分を取得する工程；c) VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n (VD1は、前記第一の親抗体またはこの抗原結合部分から得られる第一の重鎖可変ドメインであり、VD2は、前記第二の親抗体またはこの抗原結合部分から得られる第二の重鎖可変ドメインであり、Cは、重鎖定常ドメインであり、(X1)nは、リンカーであり（ただし、CH1ではない。）、前記(X1)nは、存在しまたは不存在であり、および(X2)nは、Fc領域であり、前記(X2)nは、存在しまたは不存在である。）を含む第一および第三のポリペプチド鎖を構築する工程；d) VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n (VD1は、前記第一の親抗体またはこの抗原結合部分から得られる第一の軽鎖可変ドメインであり、VD2は、前記第二の親抗体またはこの抗原結合部分から得られる第二の軽鎖可変ドメインであり、Cは、軽鎖定常ドメインであり、(X1)nは、リンカーであり（ただし、CH1ではない。）、前記(X1)nは、存在しまたは不存在であり、および(X2)nは、Fc領域を含まず、前記(X2)nは、存在しまたは不存在である。）を含む第二および第四のポリペプチド鎖を構築する工程；e) 所望の特性を有し、前記第一および前記第二の抗原に結合することができる二重可変ドメイン免疫グロブリンが作製されるように、前記第一、第二、第三および第四のポリペプチド鎖を発現させる工程；を含む、所望の特性を有し、2つの抗原に結合することができる二重可変ドメイン免疫グロブリンを作製する方法を提供する。

【0095】

一実施形態において、本明細書に開示されている第一および第二のポリペプチド鎖のV

D 1 は、同じ親抗体またはこの抗原結合部分から得られる。別の実施形態において、本明細書に開示されている第一および第二のポリペプチド鎖の V D 1 は、異なる親抗体またはこの抗原結合部分から得られる。別の実施形態において、本明細書に開示されている第一および第二のポリペプチド鎖の V D 2 は、同じ親抗体またはこの抗原結合部分から得られる。別の実施形態において、本明細書に開示されている第一および第二のポリペプチド鎖の V D 2 は、異なる親抗体またはこの抗原結合部分から得られる。

【0096】

一実施形態において、第一の親抗体またはこの抗原結合部分と第二の親抗体またはこの抗原結合部分は、同じ抗体である。別の実施形態において、第一の親抗体またはこの抗原結合部分と第二の親抗体またはこの抗原結合部分は、異なる抗体である。

10

【0097】

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

20

【0098】

別の実施形態において、第一の親抗体またはこの抗原結合部分および第二の親抗体またはこの抗原結合部分は、ヒト抗体、C D R 移植抗体およびヒト化抗体からなる群から選択される。一実施形態において、抗原結合部分は、F a b 断片、F (a b ') 2 断片（ヒンジ領域において、ジスルフィド架橋によって連結された2つの F a b 断片を含む二価断片）、V H および C H 1 ドメインからなる F d 断片、抗体の単一アームの V L および V H ドメインからなる F v 断片、d A b 断片、単離された相補性決定領域（C D R）、一本鎖抗体およびダイアボディからなる群から選択される。

【0099】

別の実施形態において、本発明の結合タンパク質は、第一の親抗体もしくはこの抗原結合部分または第二の親抗体もしくはこの抗原結合部分によって呈される少なくとも1つの所望の特性を有する。または、第一の親抗体またはこの抗原結合部分および第二の親抗体またはこの抗原結合部分は、二重可変ドメイン免疫グロブリンによって呈される少なくとも1つの所望の特性を有する。一実施形態において、所望の特性は、1つ以上の抗体パラメータから選択される。別の実施形態において、抗体パラメータは、抗原特異性、抗原に対する親和性、強度、生物学的機能、エピトープ認識、安定性、溶解度、産生効率、免疫原性、薬物動態学、生物学的利用性、組織交叉反応性およびオーソロガス抗原結合からなる群から選択される。一実施形態において、結合タンパク質は多価である。別の実施形態において、結合タンパク質は多重特異的である。本明細書に記載されている多価および／または多重特異的結合タンパク質は、特に治療的見地から望ましい特性を有する。例えば、多価および／または多重特異的結合タンパク質は、（1）抗体が結合する抗原を発現している細胞によって、二価抗体より速く内部に取り込まれ（および／または異化され）；（2）アゴニスト抗体であり；および／または（3）多価抗体が結合することができる抗原を発現している細胞の細胞死および／またはアポトーシスを誘導し得る。多価および／または多重特異的結合タンパク質の少なくとも1つの抗原結合特異性を提供する「親抗体」は、抗体が結合する抗原を発現している細胞によって内部に取り込まれ（および／または異化される）抗体であり得、および／またはアゴニスト、細胞死誘導および／またはアポトーシス誘導抗体であり得、ならびに本明細書に記載されている多価および／または多重特異的結合タンパク質は、これらの特性の1つ以上の改善を示し得る。さらに、本明細書に記載されているように、多価結合タンパク質として構築された場合、親抗体は、これ

30

40

50

らの特性の何れか1つ以上を欠如し得るが、これらを付与され得る。

【0100】

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 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ；および少なくとも約 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ からなる群から選択される、1つ以上の標的へのオン速度定数（Kon）を有する。一実施形態において、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、 $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ と $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の間、 $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ と $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の間、 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ と $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の間、または $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ と $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の間の、1つ以上の標的に対するオン速度定数（Kon）を有する。

10

【0101】

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 $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ；最大約 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ；最大約 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ；および最大約 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 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つ以上の標的に対するオフ速度定数（Koff）を有する。一実施形態において、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、 $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の、 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の、または $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の、1つ以上の標的へのオフ速度定数（Koff）を有する。

20

【0102】

別の実施形態において、結合タンパク質は、最大約 10^{-7} M ；最大約 10^{-8} M ；最大約 10^{-9} M ；最大約 10^{-10} M ；最大約 10^{-11} M ；最大約 10^{-12} M および最大 10^{-13} M からなる群から選択される、1つ以上の標的への解離定数（KD）を有する。一実施形態において、本発明の結合タンパク質は、 10^{-7} M から 10^{-8} M の； 10^{-8} M から 10^{-9} M の； 10^{-9} M から 10^{-10} M の； 10^{-10} M から 10^{-11} M の； 10^{-11} M から 10^{-12} M の；または 10^{-12} M から 10^{-13} M の、この標的への解離定数（KD）を有する。

【0103】

別の実施形態において、本明細書に記載されている結合タンパク質は、免疫接着分子、画像化剤、治療剤およ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抱合体である。一実施形態において、画像化剤は、放射性標識、酵素、蛍光標識、発光標識、生物発光標識、磁気標識およびビオチンからなる群から選択される。別の実施形態において、画像化剤は、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho および ^{153}Sm からなる群から選択される放射性標識である。さらに別の実施形態において、治療剤または細胞毒性剤は、代謝抑制剤、アルキル化剤、抗生物質、成長因子、サイトカイン、抗血管新生剤、抗有糸分裂剤、アントラサイクリン、トキシシンおよびアポトシス剤からなる群から選択される。

30

【0104】

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

40

【0105】

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

【0106】

本発明の一態様は、本明細書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、本明細書に開示されている単離された

50

核酸を含むベクターを提供し、前記ベクターは、p c D N A ; p T T (D u r o c h e r e t a l . , N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h 2 0 0 2 , V o l 3 0 , N o . 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 (M i z u s h i m a , S . a n d N a g a t a , S . , (1 9 9 0) N u c l e i c a c i d s R e s e a r c h V o l 1 8 , N o . 1 7) ; p B V ; p J V ; p c D N A 3 . 1 T O P O , p E F 6 T O P O および p B J からなる群から選択される。一実施形態において、ベクターは、米国特許出願逐次番号 6 1 / 0 2 1 , 2 8 2 に開示されているベクターである。

【0107】

別の態様において、宿主細胞は、本明細書に開示されたベクターで形質転換される。一実施形態において、宿主細胞は原核細胞である。別の実施形態において、宿主細胞はイー・コリ (E . C o l i) である。関連する実施形態において、宿主細胞は真核細胞である。別の実施形態において、真核細胞は、原生生物細胞、動物細胞、植物細胞および真菌細胞からなる群から選択される。さらに別の実施形態において、宿主細胞は、C H O 、 C O S ; N S 0 、 S P 2 、 P E R . C 6 を含む (ただし、これらに限定されない。) 哺乳動物細胞; またはサッカロミセス・セレビシアエ (S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e) などの真菌細胞; または S f 9 などの昆虫細胞である。

【0108】

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、同じく本明細書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、本明細書に開示されている結合タンパク質を生産する方法を提供する。一実施形態において、この方法によって生産された結合タンパク質の 5 0 % から 7 5 % が、二重特異的四価結合タンパク質である。特定の実施形態において、この方法によって生産された結合タンパク質の 7 5 % から 9 0 % が、二重特異的四価結合タンパク質である。特定の実施形態において、生産された結合タンパク質の 9 0 % から 9 5 % が、二重特異的四価結合タンパク質である。

【0109】

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、組成物は、製剤を含み、該製剤は、本明細書に開示されている結晶化された結合タンパク質および成分ならびに少なくとも 1 つのポリマー性担体を含む。例えば、ポリマー性担体は、: ポリ (アクリル酸)、ポリ (シアノアクリレート)、ポリ (アミノ酸)、ポリ (無水物)、ポリ (デブシペプチド)、ポリ (エステル)、ポリ (乳酸)、ポリ (乳酸グリコール酸共重合体) または P L G A 、ポリ (b-ヒドロキシプロピレート)、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、プルロニックポリオール、アルブミン、アルギナート、セルロースおよびセルロース誘導体、コラーゲン、フィブリン、ゼラチン、ヒアルロン酸、オリゴ糖、グリカミノグリカン、硫酸化された多糖、これらの混合物および共重合体からなる群の 1 つ以上から選択されるポリマーである。例えば、成分は、アルブミン、ショ糖、トレハロース、ラクチオール、ゼラチン、ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン、メトキシポリエチレングリコールおよ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、本明細書に開示された組成物の有効量を哺乳動物に投与する工程を含む哺乳動物を治療する方法を提供する。

【0110】

本発明は、本明細書に開示された結合タンパク質と、および医薬的に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、医薬組成物は、疾患を治療するための少なくとも 1 つの追加の治療剤を含む。例えば、追加の薬剤は、治療剤、画像化剤、細胞毒性剤、血管新生阻害剤 (抗 V E G F 抗体または V E G F-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 (K D R および T I E-2 阻害剤が含ま

10

20

30

40

50

れるが、これらに限定されない。) 、共刺激分子遮断剤 (抗 B 7 . 1、抗 B 7 . 2、C T L A 4 - I g、抗 C D 2 0 が含まれるが、これらに限定されない。) 、接着分子遮断剤 (抗 L F A - 1 抗体、抗 E / L セレクチン抗体、小分子阻害剤が含まれるが、これらに限定されない。) 、抗サイトカイン抗体またはこの機能的断片 (抗 I L - 1 8、抗 T N F および抗 I L - 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、F K 5 0 6、検出可能な標識またはレポーター、T N F アンタゴニスト、抗リウマチ薬、筋肉弛緩剤、催眠薬、非ステロイド系抗炎症薬 (N S A I D) 、鎮痛剤、麻酔、鎮静剤、局所麻酔、神経筋肉遮断剤、抗微生物剤、抗乾癬剤、コルチコステロイド、アナボリックステロイド、エリスロポエチン、免疫化、免疫グロブリン、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、β アゴニスト、吸引用ステロイド、エピネフリンまたは類縁体、サイトカインおよ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。

【0111】

別の実施形態において、本発明は、本明細書に開示されている結合タンパク質によって結合されることが出来る標的または複数の標的が有害である疾患に罹患しているヒト対象を治療する方法であり、ヒト対象中の標的もしくは複数の標的の活性が阻害され、および 1 つ以上の症候が緩和され、または治療が達成されるように、本明細書に開示されている結合タンパク質をヒト対象に投与することを含む、方法を提供する。例えば、疾患は、関節炎、骨関節炎、若年性慢性関節炎、化膿性関節炎、ライム関節炎、乾癬性関節炎、反応性関節炎、脊椎関節症、全身性紅斑性狼瘡、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、インシュリン依存性糖尿病、甲状腺炎、喘息、アレルギー性疾患、乾癬、皮膚炎、強皮症、移植片対宿主病、臓器移植拒絶、臓器移植に関連する急性または慢性免疫疾患、サルコイドーシス、アテローム性動脈硬化症、播種性血管内凝固、川崎病、パセドウ病、ネフローゼ症候群、慢性疲労症候群、ウェゲナー肉芽腫症、ヘノッホ・シェーライン紫斑症、腎臓の顕微鏡的血管炎、慢性活動性肝炎、ブドウ膜炎、敗血症性ショック、毒素性ショック症候群、敗血症症候群、悪液質、感染性疾患、寄生性疾患、後天性免疫不全症候群、急性横断性脊髄炎、ハンチントン舞蹈病、パーキンソン病、アルツハイマー病、発作、原発性胆汁性肝硬変、溶血性貧血、悪性腫瘍、心不全、心筋梗塞、アジソン病、孤発性の、多内分泌腺機能低下症候群 I 型および多内分泌腺機能低下症候群 I I 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、血清反応陰性関節症、関節症、ライター病、乾癬性関節症、潰瘍性大腸性関節症、腸疾患性滑膜炎、クラミジア、エルシニアおよびサルモネラ関連関節症、脊椎関節症、アテローム性疾患 / 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、後天性免疫不全症関連疾患、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 γ 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、突発性繊維化性肺肺炎、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 (v a s c u l i t i c d i f f u s e l u n g d i s e a s e) 、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、痛風関節炎、自己免疫性肝炎、1 型自己免疫性肝炎 (古典的自己免疫性またはルポイド肝炎) 、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、男性不妊症特発性または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、アレルギーおよび喘息、B群連鎖球菌（GBS）感染、精神障害（例えば、うつ病および統合失調症）、Th2型およびTh1型によって媒介される疾病、急性および慢性疼痛（疼痛の様々な形態）、ならびに、肺癌、乳癌、胃癌、膀胱癌、大腸癌、膵臓癌、卵巣癌、前立腺癌および直腸癌および造血性悪性病変（白血病およびリンパ腫）などの癌、無βリポタンパク質血症、先端チアノーゼ、急性および慢性寄生性または感染性工程、急性白血病、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、急性骨髄性白血病（AML）、急性または慢性細菌感染、急性膵炎、急性腎不全、腺癌、心房（aerial）異所性拍動、AIDS認知症複合、アルコール誘発性肝炎、アレルギー性結膜炎、アレルギー性接触性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、同種移植拒絶、α-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）、大動脈および末梢動脈瘤、大動脈解離、動脈性高血圧、動脈硬化症、動静脈瘻、運動失調、心房細動（持続的または発作性）、心房粗動、房室ブロック、B細胞リンパ腫、骨移植拒絶、骨髄移植（BMT）拒絶、脚ブロック、パーキットリンパ腫、火傷、心不整脈、心機能不全症候群（cardiac stun syndrome）、心臓腫瘍、心筋症、心肺バイパス炎症反応、軟骨移植拒絶、小脳皮質変性、小脳疾患、無秩序なまたは多巣性心房頻脈、化学療法関連疾患、慢性骨髄性白血病（CML）、慢性アルコール症、慢性炎症性病変、慢性リンパ性白血病（CLL）、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、慢性サリチル酸中毒、結腸直腸癌、うっ血性心不全、結膜炎、接触性皮膚炎、肺性心、冠動脈疾患、クロイツフェルトーヤコブ病、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、中枢神経系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障害、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、錐体外路および小脳疾患、家族性血球貪食性リンパ組織球症（familial hematomphagocytic lymphohistiocytosis）、致死性胸腺移植拒絶、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、何れかの臓器または組織の移植片拒絶、グラム陰性敗血症、グラム陽性敗血症、細胞内生物に起因する肉芽腫、有毛細胞白血病、ハラーホルデン・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、運動過剰性運動障害、過敏症反応、過敏性肺炎、高血圧、運動低下性運動障害、視床下部一下垂体一副腎皮質系評価、特発性アジソン病、特発性肺繊維症、抗体媒介性細胞傷害、無力症、乳児脊髄性筋萎縮症、大動脈の炎症、A型インフルエンザ、電離放射線曝露、虹彩毛様体炎／ブドウ膜炎／視神経炎、虚血再灌流障害、虚血性発作、若年性関節リウマチ、若年性脊髄性筋萎縮症、カポジ肉腫、腎移植拒絶、レジオネラ、リーシュマニア症、ハンセン病、皮質脊髄系の病変、脂肪血症（lipedema）、肝臓移植拒絶、リンパ浮腫（lymphedema）、マラリア、悪性リンパ腫、悪性組織球増殖症、悪性黒色腫、髄膜炎、髄膜炎菌血症（meningococcemia）、代謝性／特発性疾患、偏頭痛、ミトコンドリア多系疾患（mitochondrial multi-system dis

order)、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 シャイードレーガーおよびマシャ・ドージョセフ)、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、骨髄異形成症候群、心筋梗塞、心筋虚血疾患、上咽頭癌、新生児慢性肺疾患、腎炎、ネフローゼ、神経変性疾患、神経原性I筋萎縮、好中球減少性発熱、非ホジキンリンパ腫、腹部大動脈およびこの分枝の閉塞、閉塞性動脈疾患、okt3療法、精巣炎/精巣上体炎、精巣炎/精管復元術処置、臓器肥大、骨粗鬆症、脾臓移植拒絶、脾癌、腫瘍随伴性症候群/悪性腫瘍の高カルシウム血症、副甲状腺移植拒絶、骨盤内炎症性疾患、通年性鼻炎、心膜疾患、末梢性アテローム性動脈硬化疾患、末梢血管疾患、腹膜炎、悪性貧血、ニューモシスチス・カリニ肺炎、肺炎、POEMS症候群(多発神経炎、臓器肥大、内分泌疾患、単クローン性γグロブリン血症および皮膚変化症候群(skin changes syndrome))、灌流後症候群(post perfusion syndrome)、ポンプ後症候群(post pump syndrome)、心筋梗塞後開心術症候群、子癇前症、進行性核上性麻痺、原発性肺高血圧、放射線療法、レイノー現象および病、レイノー病、レフサム病、規則的なQRS幅の狭い頻脈症(regular narrow QRS tachycardia)、腎血管性高血圧、再灌流障害、拘束型心筋症、肉腫、強皮症、老年性舞蹈病、レビー小体型の老年性認知症、血清反応陰性関節症、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、失神、心血管系の梅毒、全身性アナフィラキシー、全身性炎症反応症候群、全身性発症若年性関節リウマチ、T細胞またはFABALL、毛細血管拡張症、閉塞性血栓血管炎、血小板減少症、毒性、移植、外傷/出血、III型過敏症反応、IV型過敏症、不安定狭心症、尿毒症、尿路性敗血症、じんましん、心臓弁膜症、静脈瘤、血管炎、静脈疾患、静脈血栓症、心室細動、ウイルスおよび真菌感染、ウイルス性脳炎(vital encephalitis)/無菌性髄膜炎、ウイルス(vital)関連血球貪食症候群、ウェルニッケー・コルサコフ症候群、ウィルソン病、何れかの臓器または組織の異種移植拒絶からなる群から選択される。

【0112】

一実施形態において、本発明の組成物および方法を用いて治療または診断することができる疾病には、乳癌、大腸癌、直腸癌、肺癌、口腔咽頭癌、下咽頭癌、食道癌、胃癌、脾臓癌、肝臓癌、胆嚢および胆管癌、小腸癌、尿路癌(腎臓、膀胱および尿路上皮を含む。)、雌性生殖路(子宮頸部、子宮、卵巣ならびに絨毛癌および妊娠性絨毛性疾患を含む。)、雄性生殖路(前立腺、精嚢、精巣および胚細胞腫瘍を含む。)、内分泌腺癌(甲状腺、副腎および下垂体を含む。))および皮膚癌ならびに血管腫、悪性黒色腫、肉腫(骨および軟組織から生じる肉腫ならびにカボジ肉腫を含む。)、脳、神経、眼の腫瘍および髄膜(星状膠細胞腫、神経膠腫、神経膠芽腫、網膜芽細胞腫、神経腫、神経芽細胞腫、シュワン細胞腫および髄膜腫を含む。)、白血病およびリンパ腫(ホジキンおよび非ホジキンリンパ腫の両方)などの造血系悪性腫瘍から生じる固形腫瘍などの、原発性および転移性癌が含まれるが、これらに限定されない。

【0113】

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

【0114】

別の態様において、本発明は、本明細書に考察されているような第二の因子の投与前、投与と同時にまたは投与後に、本明細書に開示されている結合タンパク質の何れか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。特定の実施形態において、第二の因子は、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 β 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、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およびPDGFの抗体またはアゴニスト、CD2、CD3、CD4、CD8、CD-19、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD90またはこれらのリガンドの抗体、メトトレキサート、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノラート・モフェチル、レフルノミド、NSAID、イブプロフェン、コルチコステロイド、プレドニゾロン、ホスホジエステラーゼ阻害剤、アデノシンアゴニスト、抗血栓剤、補体阻害剤、アドレナリン作動薬、IRAK、NIK、IKK、p38、MAPキナーゼ阻害剤、IL-1 β 変換酵素阻害剤、TNF α 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、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およびTGF β からなる群から選択される。

【0115】

特定の実施形態において、本明細書に開示されている医薬組成物は、非経口、皮下、筋肉内、静脈内、関節内、気管支内、腹腔内、嚢内、軟骨内、腔内（intracavity）、腔内（intracellular）、小脳内、脳室内、結腸内、頸管内、胃内、肝臓内、心筋内、骨内、骨盤内、心臓周囲内、腹腔内、胸膜内、前立腺内、肺内、結腸内、腎臓内、網膜内、脊髄内、滑膜内、胸腔内、子宮内、膀胱内、ボラス、膣、直腸、口内、舌下、鼻内および経皮から選択される少なくとも1つの様式によって、患者に投与される。

【0116】

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、重鎖もしくは軽鎖またはこのリガンド結合部分の少なくとも1つの相補性決定領域（CDR）、重鎖または軽鎖可変領域、重鎖または軽鎖定常領域、フレームワーク領域またはこ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またはペプチド含有分子が含まれる。

【図面の簡単な説明】

【0117】

【図1】Aは二重可変ドメイン（DVD）-Ig構築物の模式図であり、2つの親抗体からDVD-Igを作製するための戦略を示している。Bはハイブリドーマクローン2D13、E3（抗IL-1 α ）および13F5、G5（抗IL-1 β ）からの構築物DVD1-Ig、DVD2-Igおよび2つのキメラ単一特異的抗体の模式図である。

【発明を実施するための形態】

【0118】

発明の詳細な記述

本発明は、2つ以上の抗原に結合することが可能な多価および／または多重特異的結合タンパク質に関する。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）およびこの医薬組成物ならびにこのようなDVD-Igを作製するための核酸、組み換え発現ベクターおよび宿主細胞に関する。インビトロまた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。

【0119】

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用語および技術用

語は、当業者によって一般的に理解される意味を有するものとする。しかしながら、何らかの潜在的な曖昧さが生じた場合には、用語の意味および範囲は明瞭でなければならず、本明細書に提供されている定義があらゆる辞書または外部的な定義に優越する。さらに、文脈上別段の要求がなければ、単数の用語は複数を含み、複数の用語は単数を含むものとする。本願において、別段の記載がなければ、「または」の使用は「および／または」を意味する。さらに、「含み」ならびに「含む」および「含んだ」などの他の形態の用語の使用は限定的でない。また、「要素」または「成分」などの用語は、具体的に別段の表記がなければ、1つのユニットを含む要素および成分ならびに2つ以上のサブユニットを含む要素および成分の両方を包含する。

【0120】

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

【0121】

本発明をさらに容易に理解し得るように、特定の用語を以下に定義する。

【0122】

本明細書において使用される「ポリペプチド」という用語は、アミノ酸のあらゆるポリマー鎖を表す。「ペプチド」および「タンパク質」という用語は、ポリペプチドという用語と同じ意味で使用され、同じく、アミノ酸のポリマー鎖を表す。「ポリペプチド」という用語は、固有または人工のタンパク質、タンパク質断片およびタンパク質配列のポリペプチド類縁体を包含する。ポリペプチドは、単量体または多量体であり得る。

【0123】

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

【0124】

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、当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過程を表す。

【0125】

本明細書において使用される「生物学的活性」は、分子のあらゆる1つ以上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および酵素活性が含まれるが、これらに限定されない。

【0126】

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

【0127】

本明細書において使用される「抗体」という用語は、4つのポリペプチド鎖（2つの重（H）鎖および2つの軽（L）鎖）から構成されるあらゆる免疫グロブリン（Ig）分子またはIg分子の本質的なエピトープ結合特性を保持した何れの機能的分子、変異体、変形物またはこれらの誘導体を広く表す。このような変異体、変形物または誘導体抗体のフォーマットは、当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、以下に考察されている。

【0128】

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

【0129】

「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領域または変形物Fc領域であり得る。免疫グロブリンのFc領域は、一般に、2つの定常ドメイン（CH2ドメインおよびCH3ドメイン）を含み、場合により、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、当分野において公知である（Winter, et al. 米国特許5,648,260および米国特許5,624,821）。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）ならびに抗体および抗原-抗体複合体の半減期／排除速度を媒介する。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、また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およびIgG3は、それぞれ、FcγRおよび補体C1qへの結合を介して、ADCCおよびCDCを媒介する。新生児Fc受容体（FcRn）は、抗体の循環半減期を決定する重要な成分である。さらに別の実施形態において、少なくとも1つのアミノ酸残基は、抗体のエフェクター機能が変化されるように、抗体の定常領域、例えば、抗体のFc領域において置換されている。免疫グロブリンの2つの同一の重鎖の二量体化は、CH3ドメインの二量体化によって媒介され、ヒンジ領域内のジスルフィド結合によって安定化される（Huber et al. Nature; 264:415-20; Thies et al. 1999 J Mol Biol; 293:67-79.）。重鎖-重鎖ジスルフィド結合を防止するための、ヒンジ領域内のシステイン残基の変異は、CH3ドメインの二量体化（dimeration）を不

10

20

30

40

50

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およびIgA両サブクラスに対して、天然に見出されている (Seligman 1978 Ann Immunol 129:855-70.; Biewenga et al 1983 Clin Exp Immunol 51:395-400)。FcRn:IgFc領域の化学量論は、2:1であることが決定されており (West et al. 2000 Biochemistry 39:9698-708)、半Fcは、FcRn結合を媒介するのに十分である (Kim et al 1994 Eur J Immunol; 24:542-548.)。CH3二量体化にとって重要な残基がCH3bシート構造の内部界面上に位置しているのに対して、FcRn結合に必要とされる領域は、CH2-CH3ドメインの外側界面に位置しているため、CH3ドメインの二量体化を崩壊させるための変異は、この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。

【0130】

本明細書において使用される抗体の「抗原結合部分」(または単に「抗体部分」という用語は、抗原に特異的に結合する能力を保持する、抗体の1つ以上の断片を表す。抗体の抗原結合機能は、完全長抗体の断片によって実行可能であることは示されている。このような抗体の実施形態は、二特異的、二重特異的または多重特異的フォーマットでもあり得、2つ以上の異なる抗原に特異的に結合する。抗体の「抗原結合部分」という用語に包含される結合断片の例には、(i) Fab断片(VL、VH、CLおよびCH1ドメインからなる一価断片)、(ii) F(ab')₂断片(ヒンジ領域において、ジスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片を含む二価断片)、(iii) VHおよびCH1ドメインからなるFd断片、(iv) 抗体の単一アームのVLおよびVHドメインからなるFv断片、(v) 単一の可変ドメインを含むdAb断片(参照により本明細書に組み込まれるWard et al. (1989) Nature 341:544-546、Winter et al., PCT公開WO90/05144A1)および(vi) 単離された相補性決定領域(CDR)が含まれる。さらに、Fv断片の2つのドメインであるVLおよびVHは別個の遺伝子によってコードされているが、これらは、VLおよびVH領域が対合して一価分子を形成している単一のタンパク質鎖として、これらの作製を可能とする合成リンカーによって、組み換え法を用いて連結することが可能である(一本鎖Fv(scFv)として知られている。例えば、Bird et al. (1988) Science 242:423-426; およびHouston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883を参照)。このような一本鎖抗体も、抗体の「抗原結合部分」という用語に包含されるものとする。ダイアボディなどの一本鎖抗体の他の形態も包含される。ダイアボディは、VHおよびVLドメインが単一のポリペプチド鎖上に発現されているが、同一鎖上にある2つのドメイン間での対合を可能とするには短すぎるリンカーを使用することにより、両ドメインを別の鎖の相補的ドメインと対合するように強制し、2つの抗原結合部位を作出する二価の二特異的抗体である(例えば、Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994) Structure 2:1121-1123を参照)。このような抗体結合部分は、当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-CH

1-VH-CH1)に含まれる(Zapata et al. Protein Eng. 8(10):1057-1062(1995);および米国特許番号5,641,870)。

【0131】

本明細書を通じて、「多価結合タンパク質」という用語は、2つ以上の抗原結合部位を含む結合タンパク質を表すために使用される。一実施形態において、多価結合タンパク質は、3つ以上の抗原結合部位を有するように加工され、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つ以上の関連する標的または無関係な標的に結合することが可能な結合タンパク質を表す。本発明の二重可変ドメイン(DVD)結合タンパク質は、2つ以上の抗原結合部位を含み、四価または多価結合タンパク質である。DVDは、単一特異的であり得(即ち、1つの抗原に結合することができる。)、または多重特異的(即ち、2つ以上の抗原に結合することができる。)であり得る。2つの重鎖DVDポリペプチドおよび2つの軽鎖DVDポリペプチドを含むDVD結合タンパク質は、DVDIgと表される。DVDIgの各半分は、重鎖DVDポリペプチドおよび軽鎖DVDポリペプチドおよび2つの抗原結合部位を含む。DVDIgの各半分は、重鎖DVDポリペプチドおよび軽鎖DVDポリペプチドおよび2つの抗原結合部位を含む。各結合部位は、抗原結合部位毎の抗原結合に関連する全ての6CDRを備える重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを含む。

10

【0132】

本明細書に使用される「二特異的抗体」という用語は、クアドローマ技術(Milstein, C. and A. C. Cuelllo, Nature, 1983. 305(5934):p. 537-40参照)によって、2つの異なるモノクローナル抗体の化学的連結によって(Staerz, U. D., et al., Nature, 1985. 314(6012):p. 628-31参照)、またはノブ・イントゥ・ホールもしくはFc領域中に変異を導入する類似の手法によって(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、このうち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、この2つの結合アーム(HC/LCの1つの対)の1つの上に存在する1つの抗原(またはエピトープ)を結合し、この第二のアーム(HC/LCの異なる対)の上に存在する異なる抗原(またはエピトープ)に結合する。この定義によって、二特異的抗体は、(特異性およびCDR配列の両者において)2つの異なる抗原結合アームを有し、これが結合する各抗原に対して一価である。

20

30

【0133】

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、この2つの結合アーム(HC/LCの対)の各々の中に存在する2つの異なる抗原(またはエピトープ)に結合することが可能な完全長抗体を表す(PCT公開WO02/02773参照)。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。

【0134】

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

【0135】

「サイトカイン」という用語は、1つの細胞集団によって放出され、細胞間媒介物質として別の細胞集団に対して作用するタンパク質に対する包括的用語である。このようなサイトカインの例は、リンホカイン、モノカインおよび伝統的なポリペプチドホルモンであ

50

る。サイトカインに含まれるのは、ヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモンおよびウシ成長ホルモンなどの成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インシュリン；プロインシュリン；リラキシン；プロリラキシン；卵胞刺激ホルモン（FSH）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）および黄体形成ホルモンなどの糖タンパク質ホルモン；肝細胞成長因子；繊維芽細胞成長因子；プロラクチン；胎盤性ラクトゲン；腫瘍壊死因子- α および- β ；ミューラー管抑制物質；マウス性腺刺激ホルモン関連ペプチド；インヒビン；アクチビン；血管内皮細胞成長因子；インテグリン；トロンボポエチン（TPO）；NGF- α などの神経細胞成長因子；血小板成長因子；胎盤成長因子；TGF- α およびTGF- β などのトランスフォーミング成長因子（TGF）；インシュリン様成長因子-1および-11；エリスロポエチン（EPO）；骨誘導因子；インターフェロン- α 、- β および- γ などのインターフェロン；マクロファージ-CSF（M-CSF）などのコロニー刺激因子（CSF）；顆粒球マクロファージ-CSF（GM-CSF）；および顆粒球-CSF（G-CSF）；IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-21、IL-22、IL-23、IL-33などのインターロイキン（IL）；TNF- α またはTNF- β などの腫瘍壊死因子；ならびにLIFおよびキットリガンド（KL）を含む他のポリペプチド因子である。本明細書において使用される、サイトカインという用語には、天然源からまたは組み換え細胞培養から得られるタンパク質および固有配列のサイトカインの生物学的に活性な均等物が含まれる。

【0136】

「リンカー」という用語は、ペプチド結合によって連結された2つ以上のアミノ酸残基を含むポリペプチドを表し、1つ以上の抗原結合部分を連結するために使用される。このようなリンカーポリペプチドは、当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）。典型的なリンカーには、X1は、AKTTTPKLEEGEFSEAR（配列番号1）；AKTTTPKLEEGEFSEARV（配列番号2）；AKTTTPKLG G（配列番号3）；SAKTTTPKLG G（配列番号4）；SAKTTTP（配列番号5）；RADAAP（配列番号6）；RADAAPTVS（配列番号7）；RADAAAAGGPGS（配列番号8）；RADAAAAG₄S₄（配列番号9）；SAKTTTPKLEEGEFSEARV（配列番号10）；ADAAP（配列番号11）；ADAAPTVSIFPP（配列番号12）；TVAAP（配列番号13）；TVAAPSVFIFPP（配列番号14）；QPKAAP（配列番号15）；QPKAAPSVTLFPP（配列番号16）；AKTTTPP（配列番号17）；AKTTTPPSVTPLAP（配列番号18）；AKTTAP（配列番号19）；AKTTAPSVYPLAP（配列番号20）；ASTKGP（配列番号21）；ASTKGPSVFPLAP（配列番号22）、GGGGSGGGGSGGGGS（配列番号23）；GENKVEYAPALMALS（配列番号24）；GPAKELTPLKEAKVS（配列番号25）；GHEAAAVMQVQYPAS（配列番号26）が含まれるが、これらに限定されない。

【0137】

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

【0138】

本明細書において使用される「モノクローナル抗体」または「mAb」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られた抗体を表す。即ち、該集団を構成する各抗体は、僅かな量で存在する可能性がある天然に存在する変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一の抗原に対して誘導される。さらに、異なる決定基（エピトープ）に対して誘導された異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体調製物

と異なり、各mAb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。

【0139】

本明細書において使用される「ヒト抗体」という用語は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する抗体を含むものとする。本発明のヒト抗体は、例えば、CDR、特にCDR3中に、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基（例えば、インビトロでのランダムな突然変異導入もしくは部位特異的突然変異導入によって、またはインビボでの体細胞変異によって導入された変異）を含み得る。しかしながら、本明細書において使用される「ヒト抗体」という用語は、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖系列に由来するCDR配列がヒトフレームワーク配列上に移植された抗体を含まないものとする。

【0140】

本明細書において使用される「組み換えヒト抗体」という用語は、宿主細胞中に形質移入された組み換え発現ベクターを用いて発現された抗体（以下のII節Cでさらに記載されている）、組み換えコンビナトリアルヒト抗体ライブラリーから単離された抗体（Hoogenboom H. R., (1997) *TIB Tech.* 15: 62-70; Azazy H., and Highsmith W. E., (2002) *Clin. Biochem.* 35: 425-445; Gavilondo J. V., and Larrick J. W. (2002) *BioTechniques* 29: 128-145; Hoogenboom H., and Chames P. (2000) *Immunology Today* 21: 371-378）、ヒト免疫グロブリン遺伝子に対して遺伝子導入されている動物（例えば、マウス）から単離された抗体（Taylor, L. D., et al. (1992) *Nucl. Acids Res.* 20: 6287-6295; Kellermann S-A., および Green L. L. (2002) *Current Opinion in Biotechnology* 13: 593-597; Little M. et al (2000) *Immunology Today* 21: 364-370 参照）またはヒト免疫グロブリン遺伝子配列の、他のDNA配列へのスプライシングを含む他の何れかの手段によって調製され、発現され、作製され、もしくは単離された抗体など、組み換え手段によって調製され、発現され、作製され、もしくは単離された全てのヒト抗体を含むものとする。このような組み換えヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する。しかしながら、ある種の実施形態において、このような組み換えヒト抗体は、インビトロ突然変異導入（または、ヒトIg配列に対して遺伝子導入された動物が使用される場合には、インビボ体細胞突然変異導入）に供され、従って、組み換え抗体のVHおよびVL領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列VHおよびVL配列に由来し、これらの配列に関連しつつも、インビボで、ヒト抗体生殖系列レパートリー内には、天然に存在しない場合があり得る配列である。

【0141】

「親和性成熟された」抗体とは、変化を有しない親抗体と比べて、抗体の1つ以上のCDR中に、抗原に対する抗体の親和性の改善をもたらす1つ以上の変化を有する抗体である。典型的な親和性成熟された抗体は、標的抗原に対してnMの親和性を有し、またはpMの親和性さえ有する。親和性成熟された抗体は、当分野において公知の操作によって産生される。「Marks et al. *Bidl Technology* 10: 779-783 (1992)」は、VHおよびVLドメインシャッフリングによる親和性成熟を記載している。CDRおよび／またはフレームワーク残基の無作為な突然変異導入は、Barbas et al. *Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91: 3809-3813 (1994); Schier et al. *Gene* 169: 147-155 (1995); Yelton et al. *J. Immunol.* 155: 1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.* 154 (7): 3310-9 (1995); Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 2

26:889-896 (1992) によって記載されており、選択的な突然変異導入位置、接触または高頻度変異位置での、活性増強アミノ酸残基による選択的変異は、米国特許 US 6, 914, 128 B1 に記載されている。

【0142】

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

【0143】

「CDR移植された抗体」という用語は、マウス CDR の 1 つ以上（例えば、CDR 3）がヒト CDR 配列で置換されているマウス重鎖および軽鎖可変領域を有する抗体など、ある種に由来する重鎖および軽鎖可変領域配列を含むが、VH および／または VL の CDR 領域の 1 つ以上の配列が、別の種の CDR 配列と置換されている抗体を表す。

【0144】

「ヒト化抗体」という用語は、ヒト以外の種（例えば、マウス）由来の重鎖および軽鎖可変領域配列を含むが、VH および／または VL 配列の少なくとも一部が、より「ヒト類似に」、即ち、ヒト生殖系列可変配列により類似するように改変された抗体を表す。ヒト化抗体の 1 つの種類は、ヒト CDR 配列がヒト以外の VH および VL 配列中に導入されて、対応する非ヒト CDR 配列が置換されている CDR 移植された抗体である。また、「ヒト化抗体」は、目的の抗原に免疫特異的に結合し、およびヒト抗体のアミノ酸配列を実質的に有するフレームワーク（FR）領域と非ヒト抗体のアミノ酸配列を実質的に有する相補性決定領域（CDR）を含む抗体またはこの変形物、誘導体、類縁体もしくは断片である。本明細書において使用される CDR の文脈での「実質的に」という用語は、非ヒト抗体 CDR のアミノ酸配列と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 % または少なくとも 99 % 同一のアミノ酸配列を有する CDR を表す。ヒト化抗体は、CDR 領域の全てまたは実質的に全てが非ヒト免疫グロブリン（即ち、ドナー抗体）のものに対応し、およびフレームワーク領域の全てまた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フレームワーク領域である、少なくとも 1 つの、典型的には 2 つの可変ドメイン（Fab、Fab'、F(ab')₂、FabC、Fv）の実質的に全てを含む。一実施形態において、ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域（典型的には、ヒト免疫グロブリンの定常領域）の少なくとも一部（Fc）も含む。幾つかの実施形態において、ヒト化抗体は、軽鎖および重鎖の少なくとも可変ドメインの両方を含有する。抗体は、重鎖の CH1、ヒンジ、CH2、CH3 および CH4 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および／またはヒト化重鎖のみを含有する。

【0145】

「Kabat 番号」、「Kabat 定義」および「Kabat 標識」という用語は、本明細書において、同じ意味で使用される。当分野において認知されているこれらの用語は、抗体またはこの抗原結合部分の重鎖および軽鎖可変領域中の他のアミノ酸残基に比べて、より可変的な（即ち、超可変的な）アミノ酸残基に付番するシステムを表す（Kabat et al. (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382-391 and, 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）。重鎖可変領域の場合、超可変領域は、CDR1 に対するアミノ酸位置 31 から 35、CDR2 に対するアミノ酸位置 50 から 65 および CDR3 に対するアミノ酸位置 95 から 102 にわたる。軽鎖可変領域の場合、超可変領域は、CDR1 に対するアミノ酸位置 24 から 34、CDR2 に対するアミノ酸位置 50 から 56 および CDR3 に対する

アミノ酸位置 89 から 97 にわたる。

【0146】

本明細書で使用される「CDR」という用語は、抗体可変配列内の相補性決定領域を表す。重鎖および軽鎖の各可変領域中には3つのCDRが存在し、これらは、各可変領域に対して、CDR1、CDR2およびCDR3と表記される。本明細書において使用される「CDRセット」という用語は、抗原に結合することが可能な単一の可変領域中に存在する3つのCDRの群を表す。これらのCDRの正確な境界は、異なる系に従って、異なって定義されてきた。Kabatによって記載された系(Kabat 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、Kabat CDRと称され得る。Chothia および共同研究者(Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) および Chothia et al., Nature 342:877-883 (1989))は、Kabat 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およびL3またはH1、H2およびH3(「L」および「H」は、それぞれ、軽鎖および重鎖領域を表記する。)と表記される。

これらの領域は、Chothia CDRと称される場合があり、これは、Kabat CDRと重複する境界を有する。Kabat CDRと重複するCDRを定義する他の境界が、Padlan (FASEB J. 9:133-139 (1995)) および MacCallum (J Mol Biol 262(5):732-45 (1996))によって記載されている。さらに別のCDR境界定義が、本明細書の系の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、Kabat CDRと重複するが、これらは、特定の残基または残基の群またはCDR全体さえ、抗原結合に著しい影響を与えないという予測または実験的な発見に照らして、短縮または延長され得る。本明細書に使用されている方法は、これらの系の何れかに従って定義されたCDRを使用し得るが、ある種の実施形態は、KabatまたはChothiaによって定義されたCDRを使用する。

【0147】

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

【0148】

本明細書において使用される「生殖系列抗体遺伝子」または「遺伝子断片」という用語は、特定の免疫グロブリンの発現のために遺伝的再編成および変異をもたらす成熟工程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、こ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。

【0149】

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

【0150】

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

10

【0151】

「エピトープ」という用語には、免疫グロブリンまたはT細胞受容体に特異的に結合することができる、あらゆるポリペプチド決定基が含まれる。ある種の実施形態において、エピトープ決定基は、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリルまたはスルホニルなどの分子の化学的に活性な表面基を含み、ある種の実施形態において、特異的な三次元構造的特徴および／または特異的な電荷特徴を有し得る。エピトープとは、抗体によって結合される抗原の領域である。ある種の実施形態において、抗体は、タンパク質および／または高分子の複雑な混合におけるこの目的の抗原を認識する場合、抗原を特異的に結合するものと称される。抗体が交叉競合すれば（一方が他方の結合または調節効果を妨げる。）、抗体は、「同じエピトープに結合する」と称される。さらに、エピトープの構造的定義（重複する、類似する、同一）は情報を与えるが、構造（結合）および機能的（調節、競合）パラメータを包含するので、機能定義は、しばしば、より妥当である。

20

【0152】

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; Johnsson, B., et al. (1995) J. Mol. Recognit. 8:125-131; および Johnsson, B., et al. (1991) Anal. Biochem. 198:268-277を参照されたい。

30

【0153】

本明細書において使用される「 K_{on} 」という用語は、当分野において公知であるように、例えば、抗体／抗原複合体を形成するための抗原への結合タンパク質（例えば、抗体）の会合に対するオン速度定数を表すものとする。

【0154】

本明細書において使用される「 K_{off} 」という用語は、当分野において公知であるように、例えば、抗体／抗原複合体からの結合タンパク質（例えば、抗体）の解離に対するオフ速度定数を表すものとする。

40

【0155】

本明細書において使用される「 K_d 」という用語は、当分野において公知であるように、特定の結合タンパク質（例えば、抗体）－抗原相互作用の解離定数を表すものとする。

【0156】

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取り込まれた標識を有するタンパク質を表す。一実施形態において、標識は、検出可能なマーカー、例えば、放射性標識されたアミノ酸の取り込み、または印を付けたアビジン（例えば、光学的方法または比色分析法によって検出することができる

50

、蛍光マーカーまたは酵素活性を含有するストレプトアビジン)によって検出することができるビオチン部分のポリペプチドへの付着である。ポリペプチド用の標識の例には、以下の放射性同位体または放射性核種(例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho または ^{153}Sm)；蛍光標識(例えば、FITC、ローダミン、ランタニドリン光体)；酵素的標識(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ)；化学発光マーカー；ビオチニル基、二次レポーターによって認識される所定のポリペプチドエピトープ(例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体に対する結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ)；およびガドリニウムキレートなどの磁気因子が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0157】

「連結体」という用語は、第二の化学部分(治療剤または細胞毒性剤など)に化学的に連結された抗体などの結合タンパク質を表す。本明細書において、「因子」という用語は、化学的化合物、化学的化合物の混合物、生物学的高分子または生物学的物質から作製された抽出物を表記するために使用される。一実施形態において、治療剤または細胞毒性因子には、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、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロールおよびピューロマイシンならびにこれらの類縁体または相同体が含まれるが、これらに限定されるものではない。

20

【0158】

本明細書において使用される「結晶」および「結晶化された」という用語は、結晶の形態で存在する結合タンパク質(例えば、抗体)またはこの抗原結合部分を表す。結晶は、物質の固体状態の一形態であり、これは、非晶質の固体状態または液体の結晶状態などの他の形態とは異なる。結晶は、原子、イオン、分子(例えば、抗体などのタンパク質)または分子集合体(例えば、抗原/抗体複合体)の規則的な反復する三次元配列から構成される。これらの三次元配列は、当分野においてよく理解されている特異的な数学的關係に従って整列されている。結晶中で反復されている基礎的単位または構築ブロックは、非対称単位と呼ばれる。所定の十分に確定さ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。三つの次元全てでの規則的な転換による単位格子の反復は、結晶を与える。「Giege, R. and Ducruix, A. Barrett, Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach, 2nd ed., p. 201-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999)」を参照されたい。

30

【0159】

「ポリヌクレオチド」という用語は、2つ以上のヌクレオチド(リボヌクレオチドもしくはデオキシヌクレオチドの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の一本鎖および二本鎖形態を含む。

40

【0160】

「単離されたポリペプチド」という用語は、(例えば、ゲノム、cDNAもしくは合成起源またはこれらの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、この起源のために、「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」が本来一緒に見出されるポリヌクレオチドの全部または一部を伴っていない、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、またはより大きな配列の一部として本来存在しない、ことを意味する。

【0161】

「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

50

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、この中にさらなる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、当該ベクターがこの中に導入された宿主細胞中で自律的複製を行うことができる（例えば、細菌の複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソーム哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター）は、宿主細胞中へ導入された際に、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、これらが作用可能に連結されている遺伝子の発現を誘導することが可能である。このようなベクターは、本明細書において、「組み換え発現ベクター」（または単に、「発現ベクター」と称される。一般に、組み換えDNA技術において有用な発現ベクターは、しばしば、プラスミドの形態である。プラスミドは、最も一般的に使用されるベクターの形態であるので、本明細書において、「プラスミド」および「ベクター」は同じ意味で使用され得る。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、アデノウイルスおよ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。

10

【0162】

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

20

30

【0163】

「形質転換」とは、外来DNAが宿主細胞に入る全ての工程を表す。形質転換は、当分野で周知の様々な方法を用いて、自然の条件または人工の条件下で起こり得る。形質転換は、原核または真核宿主細胞中へ外来核酸配列を挿入するための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、リポフェクションおよび粒子照射を含み得るが、これらに限定されない。このような「形質転換された」細胞には、挿入されたDNAが、自律的に複製するプラスミドとして、または宿主染色体の一部として、この中で複製することできる安定に形質転換された細胞が含まれる。これらには、挿入されたDNAまたはRNAを、限られた時間にわたって一過性に発現する細胞も含まれる。

40

【0164】

「組み換え宿主細胞」（または単に、「宿主細胞」という用語は、外来DNAがこ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ものとする。突然変異または環境的な影響のために、後続の世代中にある種の修飾が生じ得るので、このような子孫は、実際には親細胞と同一でないことがあり得るが、本明細書において使用される「宿主細胞」という用語の範囲にな

50

含まれる。一実施形態において、宿主細胞には、生物の何れかの界から選択される原核および真核細胞が含まれる。別の実施形態において、真核細胞には、原生生物、真菌、植物および動物細胞が含まれる。別の実施形態において、宿主細胞には、原核細胞株イー・コリ；哺乳動物細胞株CHO、HEK293、COS、NS0、SP2およびPER.C6；昆虫細胞株Sf9および真菌細胞サッカロミセス・セレ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。

【0165】

組み換えDNA、オリゴヌクレオチド合成および組織培養および形質転換（例えば、電気穿孔、リポフェクション）に対しては標準的な技術が使用され得る。酵素反応および精製技術は、製造業者の仕様に従って、または当分野で一般的に遂行されているように、または本明細書に記載されているように、実施され得る。一般に、先述の技術および操作は、当分野で周知の慣用的な方法に従い、ならびに本明細書を通じて引用および考察されている様々な一般的参考文献およびより具体的な参考文献中に記載されているように、実施し得る。例えば、あらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれる「Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989))」を参照されたい。

【0166】

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

【0167】

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

【0168】

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

【0169】

「アゴニスト」という用語は、目的分子と接触したときに、アゴニストの不存在下で観察される活性または機能の規模と比べて、分子のある種の活性または機能の規模の増加を引き起こす調節物質を表す。興味深い具体的なアゴニストには、ポリペプチド、核酸、炭水化物または抗原に結合する他の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。

【0170】

「アンタゴニスト」または「阻害剤」という用語は、目的分子と接触したときに、アンタゴニストの不存在下で観察される活性または機能の規模と比べて、分子のある種の活性または機能の規模の減少を引き起こす調節物質を表す。興味深い具体的なアンタゴニスト

には、抗原の生物学的または免疫学的活性を遮断または調節するアンタゴニストが含まれる。抗原のアンタゴニストおよび阻害剤には、タンパク質、核酸、炭水化物または抗原に結合する他の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。

【0171】

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

【0172】

本明細書で使用される「試料」という用語は、この最も広義で使用される。本明細書において使用される「生物学的試料」は、生物または生物であったものから得られた物質の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、ウサギおよびその他の動物が含まれるが、これらに限定されない。このような物質には、血液、血清、尿、滑液、細胞、臓器、組織、骨髄、リンパ節および脾臓が含まれるが、これらに限定されない。

【0173】

I. DVD結合タンパク質の作製

本発明は、1つ以上の標的に結合することが可能な二重可変ドメイン結合タンパク質およびこれを作製する方法に関する。一実施形態において、結合タンパク質はポリペプチド鎖を含み、前記ポリペプチド鎖はVD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n (VD1は第一の可変ドメインであり、VD2は第二の可変ドメインであり、Cは定常ドメインであり、X1はアミノ酸またはポリペプチドを表し、X2はFc領域を表し、およびnは0または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、宿主細胞および結合タンパク質を作製する方法を提供する。

【0174】

A. 親モノクローナル抗体の作製

DVD結合タンパク質の可変ドメインは、目的の抗原に結合することができるポリクローナルおよび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、または組み換え技術によって作製され得る。

【0175】

mAbは、ハイブリドーマ、組み換えおよびファージディスプレイ技術またはこれらの組み合わせの使用など、当分野で公知の多様な技術を用いて調製することが可能である。例えば、mAbは、当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)」(前記文献は、参照によりこれらの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、原核またはファージクローンなど、単一のクローンに由来する抗体を表し、これが産生される方法によらない。ハイブリドーマは、以下の実施例1に考察されているように、選択され、クローニングされ、頑強なハイブリドーマ増殖、高い抗体産生および所望の抗体特性など、所望の特性についてさらにスクリーニングされる。ハイブリドーマは、培養され、同系の動物中において、免疫系を欠く動物（例えば、ヌードマウス）中においてインビボで増殖されまたはインビトロでの細胞培養で増殖され得る。ハイブリドーマを選択し、クローニングし、増殖させる方法は、当業者に周知である。特定の実施形態に

10

20

30

40

50

において、ハイブリドーマはマウスハイブリドーマである。別の実施形態において、ハイブリドーマは、ラット、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウシまたはウマなど、非ヒト非マウス種の中で産生され得る。別の実施形態において、ハイブリドーマは、ヒト非分泌性骨髓腫が、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。

【0176】

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

【0177】

モノクローナル抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の幾つかまたは全てを含む非ヒト動物を目的の抗原で免疫することによっても産生される。一実施形態において、非ヒト動物は、XENOMOUSEトランスジェニックマウス（ヒト免疫グロブリン遺伝子座の巨大断片を含み、マウス抗体産生を欠失している改変されたマウス系統）である。例えば、Green et al. Nature Genetics 7:13-21 (1994) ならびに米国特許番号5,916,771、5,939,598、5,985,615、5,998,209、6,075,181、6,091,001、6,114,598 および6,130,364を参照されたい。1991年7月25日に公開されたWO91/10741、1994年2月3日に公開されたWO94/02602、ともに1996年10月31日に公開されたWO96/34096およびWO96/33735、1998年4月23日に公開されたWO98/16654、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WO0009560および2000年6月29日に公開されたWO00/037504も参照されたい。XENOMOUSEトランスジェニックマウスは、完全なヒト抗体の成人様ヒトレパートリーを産生し、抗原特異的ヒトモノクローナル抗体を生成する。XENOMOUSEトランスジェニックマウスは、ヒト重鎖遺伝子座およびx軽鎖遺伝子座のメガ塩基サイズの生殖系列配置YAC断片の導入を通じて、ヒト抗体レパートリーの約80%を含有する。Mendez et al., Nature Genetics 15:146-156 (1997), Green and Jakobovits J. Exp. Med. 188:483-495 (1998)（これらの開示は、参照により本明細書に組み込まれる。）を参照されたい。

【0178】

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、当分野において周知であり、例

えば、Ladner et al. 米国特許番号 5, 223, 409; Kang et al. PCT 公開 WO 92/18619; Dower et al. PCT 公開 WO 91/17271; Winter et al. PCT 公開 WO 92/20791; Markland et al. PCT 公開 WO 92/15679; Breitling et al. PCT 公開 WO 93/01288; McCafferty et al. PCT 公開 WO 92/01047; Garrard et al. PCT 公開 WO 92/09690; Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9:1370-1372; Hay et al. (1992) Hum Antibod Hybridomas 3:81-85; Huse et al. (1989) Science 246:1275-1281; McCafferty et al., Nature (1990) 348:552-554; Griffiths et al (1993) EMBO J 12:725-734; Hawkins et al. (1992) J Mol Biol 226:889-896; Clackson et al. (1991) Nature 352:624-628; Gram et al. (1992) PNAS 89:3576-3580; Garrard et al. (1991) Bio/Technology 9:1373-1377; Hoogenboom et al. (1991) Nuc Acid Res 19:4133-4137; および Barbas et al (1991) PNAS 88:7978-7982, 米国特許出願公開 20030186374 号および PCT 公開 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。

【0179】

本発明の親抗体は、当分野で公知の様々なファージディスプレイ法を用いて作製することも可能である。ファージディスプレイ法では、機能的抗体ドメインは、これらをコードしているポリヌクレオチド配列を担持するファージ粒子の表面上にディスプレイされる。特に、このようなファージは、レパートリーまたはコンビナトリアル抗体ライブラリー (例えば、ヒトまたはマウス) から発現される抗原結合ドメインをディスプレイするために使用することが可能である。目的の抗原に結合する抗原結合ドメインを発現するファージは、抗原を用いて、例えば、標識された抗原または固体表面もしくはビーズに結合もしくは捕捉された抗原を用いて、選択または同定することが可能である。これらの方法で使用されるファージは、典型的には、ファージ遺伝子 III または遺伝子 VII タンパク質の何れかに組み換え的に融合された Fab、Fv またはジスルフィドで安定化された Fv 抗体ドメインとともにファージから発現された fd および M13 結合ドメインを含む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 出願 PCT/GB91/01134; PCT 国際公開 WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; ならびに米国特許番号 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 および 5, 969, 108」(これらの各々は、参照によりこの全体が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。

【0180】

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

【0181】

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当分野で公知の他の方法を、親抗体の同定のために適用することが可能である。代替的発現系の1つの種類は、SzostakおよびRobertsによるPCT公開WO98/31700ならびにRoberts, R. W. and Szostak, J. W. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 12297-12302に記載されているような、組み換え抗体ライブラリーがRNA-タンパク質融合物として発現されるものである。この系では、ピューロマイシン(ペプチジルアクセプター抗生物質)をこの3'末端に担持する合成mRNAのインビトロ翻訳によって、mRNAとmRNAがコードするペプチドまたはタンパク質との間で、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またはタンパク質、例えば抗体またはこの一部の特性(抗体またはこの一部の、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、抗体またはこの一部をコードする核酸配列は、本明細書に記載されている組み換え手段によって(例えば、哺乳動物宿主細胞中で)発現されることが可能であり、さらに、最初に選択された配列中に変異が導入されているmRNA-ペプチド融合物のスクリーニングのさらなるラウンドによって、または本明細書に記載されているような、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。

【0182】

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

【0183】

本明細書に開示されている抗体は、CDR移植されたおよびヒト化された親抗体を作製するために、さらに修飾を施すことが可能である。CDR移植された親抗体は、ヒト抗体由来の重鎖および軽鎖可変領域配列を含み、V_Hおよび/またはV_LのCDR領域の1つ以上が、目的の抗原に結合することが可能なマウス抗体のCDR配列と置換される。あらゆるヒト抗体から得られるフレームワーク配列が、CDR移植のためのテンプレートとしての役割を果たし得る。しかしながら、このようなフレームワーク上への直鎖の置換は、

しばしば、抗原への結合親和性を若干喪失させる。元のマウス抗体に対して、ヒト抗体がより相同であるほど、ヒトフレームワークとマウスCDRの組み合わせは、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。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、一実施形態において、CDRとは別にマウス可変フレームワークを置換するように選択されるヒト多様フレームワークは、マウス抗体可変領域フレームワークを備える少なくとも65%の配列同一性を有する。一実施形態において、CDRを除くヒトおよびマウス可変領域は、少なくとも70%の配列同一性を有する。特定の実施形態において、CDRを除くヒトおよびマウス可変領域は、少なくとも75%の配列同一性を有する。別の実施形態において、CDRを除くヒトおよびマウス可変領域は、少なくとも80%の配列同一性を有する。このような抗体を作製する方法は、当分野において公知である（EP239,400；PCT公開WO91/09967；米国特許番号5,225,539；5,530,101号；および5,585,089号参照）、ベニアリング（veneering）またはリサーフェシング（resurfacing）（EP592,106；EP519,596；Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498(1991)；Studnicka et al., Protein Engineering 7(6):805-814(1994)；Roguska et al., PNAS 91:969-973(1994)）、およびチェーンシャッフリング（米国特許番号5,565,352）および抗イディオタイプ抗体。

10

20

【0184】

ヒト化抗体は、非ヒト種に由来する1つ以上の相補性決定領域（CDR）と、ヒト免疫グロブリン分子由来のフレームワーク領域とを有する所望の抗原に結合する非ヒト種抗体から得られる抗体分子である。公知のヒトIg配列は、開示されている。例えば、www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez-query.fcgi；www.atcc.org/phage/hdb.html；www.sciquest.com/；www.abcam.com/；www.antibodyresource.com/onlinecomp.html；www.public.iastate.edu/about.pedro/researchtools.html；www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html；www.whfreeman.com/immunology/CH-05/kuby05.htm；www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html；www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/；www.path.cam.ac.uk/about.mrc7/m.-likeimages.html；www.antibodyresource.com/；mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html；www.immunologylink.com/；pathbox.wustl.edu/about.hcenter/index.-html；www.biotech.ufl.edu/about.hcl/；www.pebio.com/pa/340913/340913.html；www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/；www.m.ehime-u.ac.jp/about.yasuhito-/Elisa.html；www.biodesign.com/table.asp；www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html；www.biotech.ufl.edu/about.fccl/protocol.html；www.isac-net.org/sites_geo.html；aximtl.imt.uni-marburg.de/about.rek/AEP-Start.html；baserv.uci.kun.nl/about.jraats/links1.html；www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/；www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO。

30

40

50

html;www.ibt.unam.mx/vir/Vmice.html;imgt.cnusc.fr:8104/;www.biochem.ucl.ac.uk/.about.martin/abs/index.html;antibody.bath.ac.uk/;abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html;www.unizh.ch/.about.honegger/AHOseminar/Slide01.html;www.cryst.bbk.ac.uk/.about.ubcg07s/;www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm;www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/humanisation/TAHHP.html;www.ibt.unam.mx/vir/structure/stataim.html;www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html;www.cryst.bioc.cam.ac.uk/.about.fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html;www.jerini.de/fr/products.htm;www.patents.ibm.com/ibm.html. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U. S. Dept. Health (1983) (各々は、参照により本明細書に全体的に組み込まれる。)。このような導入された配列は、免疫原性を低下させるために、または結合、親和性、結合速度、解離速度、結合力、特異性、半減期もしくは当分野で公知の他の何れかの適切な特性を減少、増強もしくは修飾するために使用することが可能である。

10

20

【0185】

ヒトフレームワーク領域中のフレームワーク残基は、抗原結合を変化させるために、例えば、抗原結合を改善させるために、CDRドナー抗体由来の対応する残基で置換され得る。

【0186】

これらのフレームワーク置換は、当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ル化することによって、および特定の位置における異常なフレームワーク残基を同定するための配列比較によって同定される（例えば、Queen et al., 米国特許番号5,585,089; Riechmann et al., Nature 332:323 (1988) (これは、参照により本明細書に組み込まれる。))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および表示するコンピュータプログラムを利用可能である。これらのディスプレイの検査は、候補免疫グロブリン配列の機能における残基の推定される役割の分析、即ち、候補免疫グロブリンがこ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（標的抗原に対する増加された親和性など）が達成されるように、コンセンサスおよび輸入配列から選択され、組み合わせることが可能である。一般に、CDR残基は、抗原結合に影響を与えることに直接、および最も実質的に関与する。抗体は、Jones et al., Nature 321:522 (1986); Verhoeven et al., Science 239:1534 (1988); Sims et al., J. Immunol. 151:2296 (1993); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987); Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993); Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7(6):805-814 (1994); Roguska et al., PNAS 91:969-973 (1994); PCT公開WO 91/09967、PCT/:US98/16280、US96/18978、US91

30

40

50

／09630、US91／05939、US94／01234、GB89／01334、GB91／01134、GB92／01755；WO90／14443、WO90／14424、WO90／14430、EP229246、EP592、106；EP519、596、EP239、400、米国特許番号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（各々は、参照により本明細書に全体的に組み込まれる。）に記載されているものなどの（ただし、これらに限定されない。）、当分野で公知の様々な技術を用いてヒト化することが可能である。

10

【0187】

B．親モノクローナル抗体を選択するための基準

本発明の一実施形態は、DVD-Ig分子中に所望される少なくとも1つ以上の特性を有する親抗体を選択することに関する。一実施形態において、所望の特性は1つ以上の抗体パラメータから選択される。別の実施形態において、抗体パラメータは、抗原特異性、抗原に対する親和性、強度、生物学的機能、エピトープ認識、安定性、溶解度、産生効率、免疫原性、薬物速度論、生物学的利用性、組織交叉反応性およびオーソログ抗原結合から選択される。

【0188】

B1．抗原に対する親和性治療用mAbの所望される親和性は、抗原の性質および所望される治療的評価項目に依存し得る。一実施形態において、サイトカインーサイトカイン受容体相互作用は通常高い親和性の相互作用（例えば、 $< pM$ から $< nM$ の範囲）なので、モノクローナル抗体は、サイトカインーサイトカイン受容体相互作用を遮断する場合に、より高い親和性（ $K_d = 0.01$ から $0.50 pM$ ）を有する。このような事例において、標的に対するmAbの親和性は、サイトカインの受容体に対するサイトカイン（リガンド）の親和性と等しくまたはこれより優れているべきである。他方、より低い親和性を有するmAb（ $> nM$ 範囲）は、例えば、病原性を有する可能性がある循環タンパク質、例えば、 $A-\beta$ アミロイドの循環種に結合し、取り囲み、および排除するモノクローナル抗体を除去する上で、治療的に有効であり得る。他の事例では、起こり得る副作用（例えば、高親和性mAbは、この意図する標的の全てを取り囲み／中和することによって、標的とされるタンパク質の機能を完全に枯渇／除去し得る。）を回避するために、部位指定突然変異導入によって既存の高親和性mAbの親和性を低下させることまたはこの標的に対してより低い親和性を有するmAbを使用することを使用し得る。このシナリオでは、低親和性mAbは、疾病の症候の原因となり得る標的の一部を囲い込み／中和し得るので（病理学的なまたは過剰産生されたレベル）、標的の一部はこの正常な生理的機能を遂行し続けることが可能である。従って、用量を調整し、および／または副作用を低減するために、 K_d を低下させることが可能であり得る。親mAbの親和性は、所望の治療的結果を達成するために、細胞表面分子に適切に標的化する上で役割を果たし得る。例えば、標的が、高い密度で癌細胞上に発現され、低い密度で正常な細胞上に発現されていれば、より低い親和性のmAbは、正常な細胞より腫瘍細胞上の標的のより多数を結合し、ADCまたはCDCを介した腫瘍細胞の除去をもたらす、従って、治療的に望ましい効果を有し得る。従って、所望の親和性を有するmAbを選択することは、可溶性および表面標的の両方に関して妥当であり得る。

20

30

40

【0189】

このリガンドと相互作用した際の受容体を通じたシグナル伝達は、受容体ーリガンド相互作用の親和性に依存し得る。同様に、表面受容体に対するmAbの親和性は、細胞内シグナル伝達の性質およびこのmAbがアゴニストまたはアンタゴニストシグナルを伝達し得るかどうかを決定し得ると考えられる。mAb媒介性シグナル伝達の親和性を基礎とする性質は、この副作用特性に影響を有し得る。従って、治療用モノクローナル抗体の所望される親和性および所望される機能は、インビトロおよびインビボ実験操作によって注意

50

深く決定される必要がある。

【0190】

結合タンパク質（例えば、抗体）の所望される K_d は、所望される治療結果に応じて実験的に決定され得る。一実施形態において、特定の抗原に対してDVD-Igの所望される親和性と等しいまたはこれを上回る同抗原に対する親和性（ K_d ）を有する親抗体が選択される。抗原結合の親和性および速度論は、Biacoreまたは別の類似の技術によって評価される。一実施形態において、各親抗体は、最大約 10^{-7} M；最大約 10^{-8} M；最大約 10^{-9} M；最大約 10^{-10} M；最大約 10^{-11} M；最大約 10^{-12} Mおよび最大 10^{-13} Mからなる群から選択される、この抗原への解離定数（ K_d ）を有する。VD1がそこから得られる第一の親抗体およびVD2がそこから得られる第二の親抗体は、それぞれの抗原に対して、類似のまたは異なる親和性（ K_D ）を有し得る。各親抗体は、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、少なくとも約 $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、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 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ および少なくとも約 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ からなる群から選択される、抗原へのオン速度定数（ K_{on} ）を有する。VD1がそこから得られる第一の親抗体およびVD2がそこから得られる第二の親抗体は、それぞれの抗原に対して、類似のまたは異なるオン速度定数（ K_{on} ）を有し得る。一実施形態において、各親抗体は、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 10^{-3} s^{-1} ；最大約 10^{-4} s^{-1} ；最大約 10^{-5} s^{-1} ；および最大約 10^{-6} s^{-1} からなる群から選択される、抗原へのオフ速度定数（ K_{off} ）を有する。VD1がそこから得られる第一の親抗体およびVD2がそこから得られる第二の親抗体は、それぞれの抗原に対して、類似のまたは異なるオフ速度定数（ K_{off} ）を有し得る。

【0191】

B2. 強度

親モノクローナル抗体の所望される親和性／強度は、所望される治療結果に依存する。

例えば、受容体ーリガンド（R-L）相互作用に関して、親和性（ k_d ）は、R-Lの k_d （pM範囲）と等しくまたはこれを上回る。病的な循環タンパク質の単純な排除のために、 k_d は、低nM範囲であり得る（例えば、循環しているA- β ペプチドの様々な種の排除）。さらに、 k_d は、標的が同じエピトープの複数コピーを発現するかどうかにも依存する（例えば、A β オリゴマー中の立体構造エピトープを標的とするmAb）。

【0192】

VD1とVD2が同じ抗原に結合するが、異なるエピトープに結合する場合には、DVD-Igは、同じ抗原に対する4つの結合部位を含有し、従って、結合力を増加させ、これにより、DVD-Igの見かけの k_d を増加させる。一実施形態において、DVD-Igにおいて所望される k_d と等しくまたはこれより低い k_d を有する親抗体が選択される。親mAbの親和性の検討は、DVD-Igが4つ以上の同じ抗原結合部位を含有するかどうかにも依存し得る（即ち、単一のmAbに由来するDVD-Ig）。この場合には、見かけの k_d は、結合力のために、mAbより大きい。このようなDVD-Igは、表面受容体を架橋し、中和能力を増加させ、病的タンパク質の排除を増大させるなどのために使用することができる。

【0193】

一実施形態において、特異的な抗原に対してDVD-Igの所望される中和能に等しいまたはこれを上回る同じ抗原に対する中和能を有する親抗体が選択される。中和能は、標的刺激に応答して、適切な種類の細胞が測定可能なシグナル（即ち、増殖またはサイトカインの産生）を生成し、mAbによる標的の中和が用量依存的な様式でシグナルを低下させ得る標的依存性バイオアッセイによって評価することができる。

【0194】

B3. 生物学的機能

モノクローナル抗体は、潜在的に幾つかの機能を発揮し得る。これらの機能の幾つかが、表1に列記されている。これらの機能は、インビトロアッセイ（例えば、細胞を基礎と

する生化学的アッセイ) およびインビボ動物モデルの両方によって評価することができる。

【0195】

【表1】

表1：治療抗体に対する幾つかの潜在的な適用

標的(クラス)	動作のメカニズム(標的)
溶液(サイトカイン、その他)	活性の中和(例えば、サイトカイン) クリアランスを強化する(例えば、 $A\beta$ オリゴマー) 半減を増加する(例えば、GLP 1)
細胞表面(受容体、その他)	アゴニスト(例えば、GLP1 R; EP0 R; など) アンタゴニスト(例えば、インテグリンなど) 細胞毒性(CD 20 など)
タンパク質貯蔵	クリアランス/分解を強化する(例えば、 $A\beta$ プラーク、 アミロイド貯蔵)

表1中のこの例に記載されている異なる機能を有するMabが、所望される治療的結果を達成するために選択され得る。次いで、単一のDVD-Ig分子中で2つの異なる機能を達成するために、2つ以上の選択された親モノクローナル抗体は、DVD-Igフォーマットで使用する事ができる。例えば、DVD-Igは、特異的なサイトカインの機能を中和する親mAbを選択し、および病的タンパク質の排除を強化する親mAbを選択することによって作製され得る。同様に、2つの異なる細胞表面受容体を認識する2つの親モノクローナル抗体(一方のmAbはある受容体に対してアゴニスト機能を有し、および他方のmAbは異なる受容体に対してアンタゴニスト機能を有する。)を選択することができる。それぞれが異なる機能を有するこれら2つの選択されたモノクローナル抗体は、単一の分子中に選択されたモノクローナル抗体の2つの異なる機能(アゴニストおよびアンタゴニスト)を有する単一のDVD-Ig分子を構築するために使用することができる。同様に、それぞれの受容体リガンド(例えば、EGFおよびIGF)の結合をそれぞれ遮断する細胞表面受容体に対する2つの拮抗性モノクローナル抗体を、DVD-Igフォーマット中に使用することができる。逆に、DVD-Igを作製するために、拮抗性抗受容体mAb(例えば、抗EGFR)および中和抗可溶性媒介物質(例えば、抗IGF1/2)mAbを選択することができる。

【0196】

B4. エピトープ認識：

タンパク質の異なる領域は、異なる機能を発揮し得る。例えば、サイトカインの特異的な領域は、サイトカイン受容体と相互作用して受容体の活性化をもたらすのに対して、このタンパク質の他の領域はサイトカインを安定化させるために必要とされ得る。この事例では、サイトカイン上の受容体相互作用領域を特異的に結合することにより、サイトカイン-受容体相互作用を遮断するmAbを選択し得る。幾つかの事例では、例えば、複数のリガンドに結合するある種のケモカイン受容体、1つのリガンドのみと相互作用するエピトープ(ケモカイン受容体上の領域)に結合するmAbを選択することができる。他の事例では、モノクローナル抗体は、タンパク質の生理的機能に直接必要とされないが、これらの領域へのmAbの結合が生理機能を妨害し(立体的妨害)またはタンパク質が機能できないようにタンパク質の立体構造を変化させ得る(何れのリガンドも結合できないように、受容体の立体構造を変化させる、複数のリガンドを有する受容体に対するmAb)標的上のエピトープに結合することができる。この受容体へのサイトカインの結合を遮断しないが、シグナル伝達を遮断する抗サイトカインモノクローナル抗体も、同定されている(例えば、125-2H、抗IL-18mAb)。

【0197】

エピトープおよびmAb機能の例には、受容体-リガンド(R-L)相互作用を遮断す

ること（R－相互作用部位に結合する中和mAb）、減少したR－結合をもたらすまたはR－結合をなくす立体的妨害が含まれるが、これらに限定されない。Abは、受容体結合部位以外の部位において標的に結合することができるが、立体構造の変化を誘導することによって、標的の受容体結合および機能をなお妨害し、および機能を喪失させ（例えば、Xolair）、Rに結合するが、シグナル伝達を遮断する（125－2H）。

【0198】

一実施形態において、親mAbは、最大の有効性のために、適切なエピトープを標的とする必要がある。このようなエピトープは、DVD－Ig中で保存されるべきである。mAbの結合エピトープは、共結晶回折学、mAb－抗原複合体の限定的タンパク質分解＋質量分析的ペプチドマッピング（Legros V. et al 2000 Prote in Sci. 9:1002－10）、ファージによってディスプレイされたペプチドライブラリー（O'Connor KH et al 2005 J Immunol Methods. 299:21－35）および突然変異導入（Wu C. et al. 2003 J Immunol 170:5571－7）などの幾つかの手法によって決定することができる。

【0199】

B5. 生理化学および薬学的特性：

抗体を用いた治療的処置には、（典型的に高い分子量の結果、質量当りの能力が低いために）高い用量（しばしば、数mg/kg）の投与をしばしば必要とする。患者に服薬を遵守させ、および慢性疾患の療法および外来患者の治療に十分に対処するために、治療用mAbの皮下（s.c.）または筋肉内（i.m.）投与が望ましい。例えば、皮下投与のための最大の望ましい容量は、約1.0mLであり、従って、>100mg/mLの濃度は、注射回数／投薬を限定することが望ましい。一実施形態において、治療用抗体は1回の投薬で投与される。しかしながら、タンパク質－タンパク質相互作用（例えば、免疫原性リスクを増大させる可能性を有する凝集）によって、ならびに加工および輸送の間の限界によって（例えば、粘度）、このような製剤の開発は制約される。この結果、臨床的な有効性のために必要とされる多量および付随する開発の制約は、抗体製剤の可能性の完全な活用および高用量治療計画での皮下投与を制約する。タンパク質分子およびタンパク質溶液の生理化学的および薬学的特性（例えば、安定性、溶解度および粘度特性）は、最も有用であると思われる。

【0200】

B5. 1. 安定性：

「安定な」抗体製剤は、保存に際して、この中の抗体がこの物理的安定性および／または化学的安定性および／または生物活性を実質的に保持する抗体製剤である。安定性は、選択された期間にわたって、選択された温度で測定することができる。一実施形態において、製剤中の抗体は、室温で（約30℃）でまたは40℃で少なくとも1ヶ月間および／または約2から8℃で、少なくとも1年間、少なくとも2年間安定である。さらに、一実施形態において、製剤は、凍結（例えば、－70℃への）、および製剤の融解（以下、「凍結／融解サイクル」と称される。）後に安定である。別の例では、「安定な」製剤は、製剤中の凝集物として、タンパク質の約10%未満および約5%未満が存在する製剤であり得る。

【0201】

様々な温度で長期間にわたってインビトロで安定なDVD－Igが望ましい。上昇した温度で、例えば、40℃で、2から4週間、インビトロで安定な親mAbの迅速なスクリーニングによってこれを達成し、次いで、安定性を評価することができる。2から8℃での保存の間、タンパク質は、少なくとも12ヶ月間、例えば、少なくとも24ヶ月間、安定性を示す。安定性（単量体、完全な状態の分子の%）は、陽イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、SDS－PAGEおよび生物活性検査などの様々な技術を用いて評価することができる共有的および立体構造的修飾を分析するために使用され得る分析技術のより包括的なリストに関しては、「Jones, A. J. S. (19

93) Analytical methods for the assessment of protein formulations and delivery systems. In: Cleland, J. L.; Langer, R., editors. Formulation and delivery of peptides and proteins, 1st edition, Washington, ACS, pg. 22-45; および Pearlman, R.; Nguyen, T. H. (1990) Analysis of protein drugs. In: Lee, V. H., editor. Peptide and protein drug delivery, 1st edition, New York, Marcel Dekker, Inc., pg. 247-301」を参照されたい。

10

【0202】

不均一性および凝集物の形成：抗体の安定性は、製剤が、凝集物として存在するGMP抗体材料中に、約10%未満、一実施形態において、約5%未満、別の実施形態において、約2%未満、または一実施形態において、0.5%から1.5%またはこれ以下の範囲内を呈し得るような安定性であり得る。サイズ排除クロマトグラフィーは、感受性、生産性があり、タンパク質の凝集の検出において非常に適応している。

【0203】

低い凝集物レベルに加えて、一実施形態において、抗体は化学的に安定でなければならない。化学的な安定性は、イオン交換クロマトグラフィー（例えば、陽イオンまたは陰イオン交換クロマトグラフィー）、疎水性相互作用クロマトグラフィーまたは等電点電気泳動もしくはキャピラリー電気泳動などの他の方法によって測定され得る。例えば、抗体の化学的安定性は、2から8℃での少なくとも12ヶ月の保存後に、保存検査の前の抗体溶液と比べて、陽イオン交換クロマトグラフィー中の修飾されていない抗体に相当するピークが20%以下、一実施形態において、10%以下、または別の実施形態において、5%以下増加し得るような化学的安定性であり得る。

20

【0204】

一実施形態において、親抗体は、構造的な完全性；正しいジスルフィド結合の形成および正しい折り畳みを示し、抗体の二次または三次構造の変化による化学的な不安定性は抗体活性に影響を及ぼし得る。例えば、抗体の活性によって示される安定性は、2から8℃での少なくとも12ヶ月の保存後に、保存検査前の抗体溶液と比べて、抗体の活性が50%以下、一実施形態において、30%以下もしくは10%以下、または一実施形態において、5%もしくは1%以下減少し得るような安定性である。抗体の活性を測定するために、適切な抗原結合アッセイを使用することができる。

30

【0205】

B5. 2. 溶解度：

mAbの「溶解度」は、正確に折り畳まれた単量体IgGの産生と相関する。従って、IgGの溶解度がHPLCによって評価され得る。例えば、可溶性（単量体）IgGはHPLCクロマトグラフィー上に単一のピークを生じるのに対して、不溶性の（例えば、多量体および凝集した。）は複数のピークを生じる。従って、当業者は、定型的なHPLC技術を用いて、IgGの溶解度の増加または減少を検出することができる。溶解度を分析するために使用され得る分析技術のより包括的なリストに関しては、Jones, A. G. Dep. Chem. Biochem. Eng., Univ. Coll. London, London, UK. Editor(s): Shamlou, P. Ayazi. *Process. Solid-Liq. Suspensions* (1993), 93-117. Publisher: Butterworth-Heinemann, Oxford, UK and Pearlman, Rodney; Nguyen, Tue H, *Advances in Parenteral Sciences* (1990), 4 (Pept. Protein Drug Delivery), 247-301)を参照されたい。治療用mAbの溶解度は、十分な投薬のためにしばしば必要とされる高い濃度になるように調合するために不可欠である。本明細書に概説されているように、効率的な抗体投薬量を収

40

50

容するためには、 $>100\text{ mg/mL}$ の溶解度が必要とされ得る。例えば、抗体の溶解度は、初期研究期では約 5 mg/mL 以上であり得、一実施形態において、進んだ工程科学段階では約 25 mg/mL 以上であり得、または一実施形態において、約 100 mg/mL 以上であり得、または一実施形態において、約 150 mg/mL 以上であり得る。タンパク質分子の固有の特性は、タンパク質溶液の重要な物理化学的特性（例えば、安定性、溶解度、粘度）であることが当業者に自明である。しかしながら、当業者は、最終のタンパク質製剤の特性に有益な影響を与えるための添加物として使用され得る幅広い様々な賦形剤が存在することを理解する。これらの賦形剤には、（i）液体溶媒、共溶媒（例えば、エタノールなどのアルコール）、（ii）緩衝剤（例えば、ホスファート、アセタート、シトラート、アミノ酸緩衝液）；（iii）糖または糖アルコール（例えば、ショ糖、トレハロース、フルクトース、ラフィノース、マニトール、ソルビトール、デキストラン）；（iv）界面活性剤（例えば、ポリソルベート20、40、60、80、ポリキサマー）；（v）等張性改変物質（例えば、NaClなどの塩、糖、糖アルコール）および（vi）その他（例えば、防腐剤、キレート剤、抗酸化剤、キレート物質（例えば、EDTA）、生物分解性ポリマー、担体分子（例えば、HSA、PEG）が含まれ得る。

10

【0206】

粘度は、抗体の製造および抗体の加工処理（例えば、透析ろ過／限外ろ過）、充填仕上げ工程（ポンプ送出の側面、ろ過の側面）および送達の側面（注射可能性、精巧な装置の送達）に関して、極めて重要なパラメータである。低い粘度は、より高い濃度を有する抗体の液体溶液を可能にする。これは、同じ用量がより少容量で投与され得ることを可能にする。小さな注射容量には、注射感覚に対するより小さな痛みという利点が備わっており、患者内への注射時に痛みを低減するために、必ずしも溶液を等張にする必要がない。抗体溶液の粘度は、 100 (1/s) の剪断速度で、抗体溶液の粘度が $200\text{ mPa}\cdot\text{s}$ を下回るように、一実施形態において、 $125\text{ mPa}\cdot\text{s}$ を下回るように、別の実施形態において、 $70\text{ mPa}\cdot\text{s}$ を下回るように、さらに別の実施形態において、 25 mPa または $10\text{ mPa}\cdot\text{s}$ さえ下回るような粘度であり得る。

20

【0207】

B5. 3. 産生効率

チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）などの哺乳動物細胞中で効率的に発現されるDVD-Igの作製は、一実施形態において、哺乳動物中でこれ自体効率的に発現される2つの親モノクローナル抗体を必要とする。安定な哺乳動物株（即ち、CHO）からの作製収率は、 0.5 g/L 超、一実施形態において、 1 g/L 超、別の実施形態において、2から 5 g/L 以上の範囲内とすべきである（Kipriyanov SM, Little M. 1999 Mol Biotechnol. 12:173-201; Carroll S, Al-Rubeai M. 2004 Expert Opin Biol Ther. 4:1821-9）。

30

【0208】

哺乳動物細胞中での抗体およびIg融合タンパク質の作製は、幾つかの因子によって影響を受ける。強力なプロモーター、エンハンサーおよび選択マーカーの取り込みを介した発現ベクターの操作は、組み込まれたベクターコピーからの目的の遺伝子の転写を最大化し得る。遺伝子転写の高いレベルを許容するベクター組み込み部位の同定は、ベクターからのタンパク質の発現を増強し得る（Wurm et al, 2004, Nature Biotechnology, 2004, Vol/Iss/Pg. 22/11 (1393-1398)）。さらに、産生のレベルは、抗体重鎖および軽鎖の比ならびにタンパク質の集合および分泌の過程における様々な工程によって影響を受ける（Jiang et al. 2006, Biotechnology Progress, Jan-Feb 2006, vol. 22, no. 1, p. 313-8）。

40

【0209】

B6. 免疫原性

治療用mAbの投与は、免疫応答のある種の発生（即ち、治療用mAbに対して誘導さ

50

れた内在性抗体の形態)をもたらし得る。免疫原性を誘導し得る潜在的な要素は、親モノクローナル抗体の選択の間に分析すべきであり、DVD-Igの構築の前に、親モノクローナル抗体を最適化するために、このようなリスクを低減させるための工程を踏むことができる。マウス由来の抗体は、患者内で高度に免疫原性であることが見出されている。マウスの可変領域とヒトの定常領域から構成されるキメラ抗体の作製が、治療用抗体の免疫原性を低下させるための論理的な次のステップを与える(Morrison and Schlom, 1990)。または、免疫原性は、Riechmann他、1988によって治療用抗体に関して記載されたように、ヒト抗体フレームワーク中にマウスCDR配列を転移させることによって低減させることができる(リシェーピング/CDRグラフィティン/ヒト化)。別の方法は、げっ歯類の可変軽および重ドメインから始まり、表面接近可能なフレームワークアミノ酸のみがヒトのアミノ酸に改変される一方、CDRおよび埋没されたアミノ酸は親げっ歯類抗体のままである、「リサーフェシング」または「ベニアリング」と称される(Roguska et al., 1996)。ヒト化の別の種類では、CDR全体を移植する代わりに、1つの技術は、抗体の標的への抗体の結合に関与するCDR残基の垂群と定義される「特異性決定領域」(SDR)のみを移植する(Kashmiri et al., 2005)。これには、抗体-標的複合体の利用可能な三次元構造の分析または何れが標的と相互作用するかを決定するための抗体CDR残基の変異分析の何れかを通じたSDRの同定が必要とされる。または、完全なヒト抗体は、マウス、キメラまたはヒト化抗体と比べて低下した免疫原性を有し得る。

【0210】

治療用抗体の免疫原性を低下させるための別の手法は、免疫原性であると予想されるある特定の配列を除去することである。1つの手法では、第一世代の生物薬がヒトで検査され、許容できないほどに免疫原性であることが見出された後に、B細胞エピトープをマッピングし、次いで、免疫検出を回避するために変化させることができる。別の手法は、T細胞エピトープの候補を予測し、除去するための方法を使用する。MHCタンパク質に結合する可能性を有する生物学的治療薬のペプチド配列を走査および同定するために、コンピュータ法が開発されている(Desmet et al., 2005)。または、タンパク質アレルゲン候補中のCD4⁺T細胞エピトープを同定するために、ヒトの樹状細胞を基礎とする方法を使用することができる(Stickler et al., 2005; S. L. Morrison and J. Schlom, Important Adv. Oncol. (1990), pp. 3-18; Riechmann, L., Clark, M., Waldmann, H. and Winter, G. 「Reshaping human antibodies for therapy」Nature 1988) 332: 323-327; Roguska-M-A, Pedersen-J-T, Henry-A-H, Searle-S-M, Roja-C-M, Avery-B, Hoffee-M, Cook-S, Lambert-J-M, Blaettler-W-A, Rees-A-R, Guild-B-C. A comparison of two murine mAbs humanized by CDR-grafting and variable domain resurfacing. Protein engineering, {Protein-Eng}, 1996, vol. 9, p. 895-904; Kashmiri-Syed-V-S, De-Pascalis-Roberto, Gonzales-Noreen-R, Schlom-Jeffrey. SDR grafting-a new approach to antibody humanization. Methods San Diego Calif.), {Methods}, May 2005, vol. 36, no. 1, p. 25-34; Desmet-Johan, Meersseman-Geert, Boutonnet-Nathalie, Pletinckx-Jurgen, De-Clercq-Krista, Debulpaep-Maja, Braeckman-Tessa, Lasters-Ignace. Anchor profiles of HLA-specific peptides: analysis by a novel affinity scoring method

and experimental validation. Proteins, 2005, vol. 58, p. 53-69; Stickler-M-M, Estell-D-A, Harding-F-A. CD4+ T-cell epitope determination using unexposed human donor peripheral blood mononuclear cells. Journal of immunotherapy 2000, vol. 23, p. 654-60)。

【0211】

B7. インビボでの有効性

所望のインビボ有効性を有するDVD-Ig分子を作製するために、組み合わせて与えられたときに、同様に所望のインビボ有効性を有するmAbを作製および選択することが重要である。しかしながら、幾つかの事例において、DVD-Igは、2つの別個のmAbの組み合わせを用いて達成することができないインビボ有効性を示し得る。例えば、DVD-Igは2つの標的を近接させて、2つの別個のmAbの組み合わせを用いて達成することができない活性をもたらし得る。さらなる望ましい生物学的機能が、本明細書の節B3に記載されている。DVD-Ig分子において望ましい特徴を有する親抗体は、薬物動態のt_{1/2}；組織分布；可溶性対細胞表面標的および標的濃度－可溶性／密度－表面などの要因に基づいて選択され得る。

【0212】

B8. インビボ組織分布

所望のインビボ組織分布を有するDVD-Ig分子を作製するために、一実施形態において、類似の所望のインビボ組織分布特性を有する親mAbを選択しなければならない。または、二重特異的標的化戦略の機序に基づいて、別の時点では、組み合わせて与えられたときに、同様に所望のインビボ組織分布を有する親mAbを選択することが必要でない場合があり得る。例えば、1つの結合成分がDVD-Igを特異的な部位へ標的化するDVD-Igの場合には、これにより、第二の結合成分を同じ標的部位へもたらし得る。例えば、DVD-Igの一方の結合特異性は脾臓（脾頭細胞）を標的化することができ、他方の特異性はインシュリンを誘導するためにGLP1を脾臓にもたらし得る。

【0213】

B9. イソタイプ：

イソタイプ、エフェクター機能および循環半減期などの（ただし、これらに限定されない。）所望の特性を有するDVD-Ig分子を作製するために、一実施形態において、治療用途および所望の治療的評価項目に応じて適切なFc-エフェクター機能を有する親mAbが選択される。5つの主要な重鎖クラスまたはイソタイプが存在し、このうち幾つかは数個のサブタイプを有し、これらが抗体分子のエフェクター機能を決定する。これらのエフェクター機能は、抗体分子のヒンジ領域、CH2およびCH3ドメイン中に存在する。しかし、抗体分子のその他の部分における残留物は、さらにエフェクター機能への効果を有し得る。ヒンジ領域Fc-エフェクター機能には、(i) 抗体依存性細胞性細胞傷害、(ii) 補体(C1q)結合、活性化および補体依存性細胞傷害(CDC)、(iii) 抗原-抗体複合体の貪食作用／排除ならびに(iv) 幾つかの事例におけるサイトカインの放出が含まれる。抗体分子のこれらのFc-エフェクター機能は、クラス特異的な細胞表面受容体の組みとのFc領域の相互作用を通じて媒介される。IgG1イソタイプの抗体は最も活性が高いのに対して、IgG2およびIgG4は最小限のエフェクター機能を有しまたはエフェクター機能を有さない。IgG抗体のエフェクター機能は、3つの構造的に相同的な細胞性Fc受容体のタイプ（およびサブタイプ）(FcγR1、FcγRIIおよびFcγRIII)との相互作用を通じて媒介される。IgG1のこれらのエフェクター機能は、FcγRおよびC1q結合に必要とされるヒンジ領域下方の特定のアミノ酸残基（例えば、L234A、L235A）を変異させることによって除去することができる。Fc領域中のアミノ酸残基、特に、CH2-CH3ドメインも、抗体分子の循環半減期を決定する。このFc機能は、酸性リソゾームから全身循環へ抗体分子をリサイクルするために必要な新生Fc受容体(FcRn)へのFc領域の結合を通じて媒介される

。

【0214】

mAbが活性なイソタイプまたは不活性なイソタイプを有するべきかどうかは、抗体に対して所望される治療的評価項目に依存する。イソタイプの使用および所望される治療結果の幾つかの例が、以下に列記されている。

【0215】

a) 所望の評価項目が可溶性サイトカインの機能的な中和である場合、不活性なイソタイプを使用し得る。

b) 所望の結果が病的タンパク質の排除である場合、活性なイソタイプを使用し得る。

c) 所望の結果がタンパク質凝集物の排除である場合、活性なイソタイプを使用し得る

10

。

d) 所望の結果が表面受容体を拮抗することである場合、不活性なイソタイプが使用される (Tysabri、IgG4; OKT3、変異されたIgG1) ;

e) 所望の結果が標的細胞を除去することである場合、活性なイソタイプが使用される (Herceptin、IgG1 (および増強されたエフェクター機能を有する。)) ; および

f) 所望の結果が、中枢神経系に入らずに循環からタンパク質を除去することである場合、IgMイソタイプが使用され得る (例えば、循環Abペプチド種の除去) 。

【0216】

親mAbのFcエフェクター機能は、当分野で周知の様々なインビトロ法によって測定され得る。

20

【0217】

考察されているように、イソタイプの選択、従って、エフェクター機能の選択は所望の治療的評価項目に依存する。循環標的の単純な中和 (例えば、受容体ーリガンド相互作用を遮断すること) が望まれる場合には、エフェクター機能は必要とされない場合があり得る。このような事例では、エフェクター機能を除去する抗体のFc領域中のイソタイプまたは変異が望ましい。標的細胞の除去、例えば、腫瘍細胞の除去が治療的評価項目である他の事例では、エフェクター機能を増強するFc領域中のイソタイプまたは変異または脱フコシル化が望ましい (Presta GL, Adv. Drug Delivery Rev. 58:640-656, 2006; Satoh M., Iida S., Shitara K. Expert Opinion Biol. Ther. 6:1161-1173, 2006)。同様に、治療用途に応じて、Fc領域中に特異的な変異を導入することによって抗体ーFcRn相互作用を調節することによって、抗体分子の循環半減期を短縮/延長することができる (Dall'Acqua WF, Kiener PA, Wu H. J. Biol. Chem. 281:23514-23524, 2006; Petkova SB., Akillesh S., Sproule TJ. et al. Internat. Immunol. 18:1759-1769, 2006; Vaccaro C, Bawdon R., Wanjie S et al. PNAS 103:18709-18714, 2007)。

30

【0218】

正常な治療用mAbの異なるエフェクター機能に影響を及ぼす様々な残基に関する公表された情報が、DVD-Igに関して確認される必要があり得る。DVD-Igフォーマットでは、モノクローナル抗体エフェクター機能の調節に関して同定されたもの以外のさらなる (異なる) Fc領域残基が重要であり得ることが可能であり得る。

40

【0219】

総合すると、何れのFcエフェクター機能 (イソタイプ) が最終的なDVD-Igフォーマットにおいて不可欠であるのかについての決定は、疾病の適応症、治療の標的、所望される治療の評価項目および安全性についての考慮に依存する。以下に列記されているのは、

o IgG1ーアロタイプ: G1mz

50

- I g G 1 変異体－A 2 3 4、A 2 3 5
- I g G 2－アロタイプ：G 2 m (n－)
- κ－K m 3
- λ

などの典型的な適切な重鎖および軽鎖定常領域であるが、これらに限定されない。

【0220】

F c 受容体および C 1 q 研究：細胞膜上の何れかの過剰発現された標的への抗体の複合体形成による望ましくない抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (A D C C) および補体依存性細胞傷害 (C D C) の可能性は、ヒンジ領域の変異 (例えば、L 2 3 4 A、L 2 3 5 A) によって除去され得る。F c g R 結合は I g G 1 ヒンジ領域上の重複する部位内で起こると考えられているので、m A b の I g G 1 ヒンジ領域中に存在するこれらの置換されたアミノ酸は、ヒト F c 受容体への m A b の減少した結合をもたらす (が、F c R n への減少した結合はもたらさない。) と予想される。m A b のこの特徴は、野生型 I g G を含有する抗体に比べて改善された安全性特性をもたらし得る。ヒト F c 受容体への m A b の結合は、細胞株 (例えば、T H P－1、K 5 6 2) および F c g R I I b (または他の F c g R) を発現する加工された C H O 細胞株を用いるフローサイトメトリー実験によって測定することができる。I g G 1 対照モノクローナル抗体と比べて、m A b は F c g R I および F c g R I I a への低下した結合を示すのに対して、F c g R I I b への結合は影響を受けない。抗原／I g G 免疫複合体による C 1 q の結合および活性化は、古典的な補体カスケードをもたらし、この結果、炎症性および／または免疫制御応答をもたらす。I g G 上の C 1 q 結合部位は、I g G ヒンジ領域内の残基に局在化されている。m A b の増加する濃度への C 1 q の結合は、C 1 q E L I S A によって評価された。結果は、野生型対照 I g G 1 の結合と比較したときに予想通り、m A b が C 1 q に結合できないことを示す。総合すると、L 2 3 4 A、L 2 3 5 A ヒンジ領域の変異は、F c g R I、F c g R I I a および C 1 q への m A b の結合を失わせるが、F c g R I I b との m A b の相互作用に影響を与えない。このデータは、インビボにおいて、変異体 F c を有する m A b は、阻害的 F c g R I I b と正常に相互作用するが、活性化 F c g R I および F c g R I I a 受容体または C 1 q と相互作用できない可能性が高いことを示唆する。

【0221】

ヒト F c R n 結合：新生受容体 (F c R n) は、胎盤を横切る I g G の輸送および I g G 分子の異化的半減期の調節に必要である。有効性を改善するために、投与の用量もしくは頻度を減らすために、または標的への局在化を改善するために、抗体の最終半減期を増加させることが望ましい場合があり得る。または、これとは逆のを行う、即ち、全身曝露を減らすために、または標的対非標的結合比を改善するために、抗体の最終半減期を減少させることが有利であり得る。I g G とこのサルベージ受容体 F c R n 間の相互作用を改変することは、I g G の最終半減期を増加または減少させるための方法を提供する。I g G などの循環中のタンパク質は、血管内皮の細胞などのある種の細胞による微小飲作用を通じて液体相へ取り込まれる。I g G は、僅かに酸性の条件下で (p H 6. 0 から 6. 5)、エンドソーム中で F c R n に結合することができ、細胞表面へリサイクルされ、そこで、ほぼ中性の条件下で (p H 7. 0 から 7. 4) 放出される。F c R n 8 0、1 6、1 7 上の F c 領域結合部位のマッピングは、種間で保存されている 2 つのヒスチジン残基 H i s 3 1 0 および H i s 4 3 5 が、この相互作用の p H 依存性に必要であることを示した。ファージディスプレイ技術を用いて、F c R n への結合を増加させ、マウス I g G の半減期を延長するマウス F c 領域の変異が同定された (V i c t o r, G. e t a l.; N a t u r e B i o t e c h n o l o g y 1 9 9 7), 1 5 (7), 6 3 7－6 4 0 参照)。p H 6. 0 で F c R n に対するヒト I g G の結合親和性を増加させるが、p H 7. 4 では増加させない F c 領域の変異も同定されている (D a l l ' A c q u a W i l l i a m F, e t a l., J o u r n a l o f I m m u n o l o g y 2 0 0 2), 1 6 9 (9), 5 1 7 1－8 0 参照)。p H 6. 0 で F c R n に対するヒト I g G の結合親和性を増加させるが、p H 7. 4 では増加させない F c 領域の変異も同定されてい

る (Dall'Acqua William F, et al., Journal of Immunology 2002), 169 (9), 5171-80 参照)。さらに、ある事例では、結合における同様の pH 依存性増加 (最大 27 倍) は、アカゲザル FcRn に対しても観察され、これは、親 IgG と比べて、アカゲザル中での血清半減期の 2 倍の増加をもたらした (Hinton, Paul R. et al., Journal of Biological Chemistry (2004), 279 (8), 6213-6216 参照)。これらの知見は、FcRn との Fc 領域の相互作用を改変することによって、抗体治療薬の血漿半減期を延長させることができることを示唆する。逆に、FcRn との相互作用を弱める Fc 領域の変異は抗体半減期を短縮し得る。

【0222】

10

B. 10 薬物速度論 (PK) :

所望の薬物速度論特性を有する DVD-Ig 分子を作製するために、一実施形態において、同様に所望の薬物速度論特性を有する親 mAb が選択される。1つの考慮事項は、モノクローナル抗体に対する免疫原性応答 (即ち、H A H A、ヒト抗ヒト抗体応答; H A C A、ヒト抗キメラ抗体応答) がこれらの治療剤の薬物速度論をさらに複雑にすることである。一実施形態において、得られた DVD-Ig が最小限の免疫原性を有するように、または免疫原性を有さないように、DVD-Ig 分子を構築するために、最小限の免疫原性を有するモノクローナル抗体または免疫原性を有さないモノクローナル抗体が使用される。mAb の PK を決定する要因の幾つかには、mAb の固有の特性 (V H アミノ酸配列) ; 免疫原性; FcRn 結合および Fc 機能が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0223】

げっ歯類での PK 特性はカニクイザルおよびヒトでのモノクローナル抗体の PK 特性と良好に相関する (または密接に予測する。) ので、選択された親モノクローナル抗体の PK 特性は、げっ歯類において容易に測定することができる。PK 特性は、実施例の部 1. 2. 2. 3. A に記載されているように測定される。

【0224】

所望の PK 特徴 (および本明細書に考察されているような他の所望の機能的特性) を有する親モノクローナル抗体を選択した後、DVD-Ig を構築する。DVD-Ig 分子は 2つの親モノクローナル抗体由来の 2つの抗原結合ドメインを含有するので、DVD-Ig の PK 特性も評価される。DVD-Ig 分子は 2つの親モノクローナル抗体由来の 2つの抗原結合ドメインを含有するので、DVD-Ig の PK 特性も評価される。DVD-Ig の PK 特性は、実施例 1. 2. 2. 3. A に記載されているように測定することができる。DVD-Ig の PK 特性に影響を及ぼし得るさらなる要因には、抗原結合ドメイン (CDR) の方向性; リンカーのサイズおよび Fc / FcRn 相互作用が含まれる。親抗体の PK の特徴は、以下のパラメータ: 吸収、分布、代謝および排泄を評価することによって評価することができる。

30

【0225】

吸収: 現在まで、治療用モノクローナル抗体の投与は、非経口経路 (例えば、静脈内 [IV]、皮下 [SC] または筋肉内 [IM]) を介して行われている。皮下または筋肉内投与の何れかの後の細胞間隙から全身循環中への mAb の吸収は、主に、リンパ経路を通じて行われる。飽和性、前全身性、タンパク分解性の分解は、血管外投与後に可変的な絶対的生物学的利用性をもたらし得る。通常、より高い用量での飽和したタンパク分解能のために、モノクローナル抗体の増加する用量に伴う、絶対的生物学的利用性の増加が観察され得る。リンパ液は血管系内にゆっくり排出するので、mAb に対する吸収工程は、通常極めて遅く、吸収の期間は、数時間から数日に起こり得る。皮下投与後のモノクローナル抗体の絶対的生物利用可能性は、一般に、50% から 100% の範囲である。

40

【0226】

分布: 静脈投与後に、モノクローナル抗体は、急速な分布期から開始し、その後に遅い除去期が続く、二相性の血清 (または血漿) 濃度-時間特性に通常従う。一般に、二相性の指数関数的薬物速度論モデルが、この種の薬物速度論特性を最もよく記載する。mAb

50

に対する中枢コンパートメント（V_c）中での分布の容積は、通常、血漿容積（2から3 L）と等しく、またはこれより僅かに大きい。長い吸収部分によって、血清（血漿）濃度－時間曲線の分布相が覆い隠されるので、血清（血漿）濃度対時間特性の明瞭な二相性パターンは、投与の他の非経口経路（筋肉内または皮下など）では明白でない場合があり得る。物理化学的特性、部位特異的および標的に向けられた受容体媒介性取り込み、組織の結合能力およびmAb用量などの多くの要因が、mAbの生物分布に影響を及ぼし得る。これらの要因の幾つかは、mAbに対する生物分布の非線形性に寄与し得る。

【0227】

代謝および排泄：分子サイズのために、完全な状態のモノクローナル抗体は、腎臓を介して尿内に排泄される。完全な状態のモノクローナル抗体は、主に、代謝（例えば、異化）によって不活化される。IgGを基礎とする治療用モノクローナル抗体に関して、半減期は、通例、数時間または1から2日から20日超の範囲である。mAbの除去は、FcRn受容体に対する親和性、mAbの免疫原性、mAbのグリコシル化の程度、タンパク分解に対するmAbの感受性および受容体媒介性の除去などの（ただし、これらに限定されない。）、多くの因子によって影響を受け得る。

【0228】

B. 1.1 ヒトおよびtox種に対する組織交叉反応性パターン：

同じ染色パターンは、tox種における、潜在的なヒト毒性を評価できることを示唆する。Tox種とは、無関係な毒性が研究される動物である。

【0229】

2つの基準を充足する個別の抗体を選択する。（1）抗体標的の既知の発現に関して適切な組織染色。（2）同じ臓器からのヒトおよびtox種の組織間での類似の染色パターン。

【0230】

基準1：免疫化および／または抗体選択は、組み換えまたは合成された抗原（タンパク質、炭水化物または他の分子）を典型的に使用する。天然の対応物への結合および無関係の抗原に対する対比スクリーニングは、しばしば、治療用抗体のためのスクリーニング漏斗の一部である。しかしながら、多数の抗原に対するスクリーニングは、しばしば非現実的である。従って、全ての主要な臓器から得られるヒト組織との組織交叉反応性研究は、何れかの無関係の抗原への抗体の望ましくない結合を除外する役割を果たす。

【0231】

基準2：ヒトおよびtox種の組織（カニクイザル、イヌ、おそらくげっ歯類およびその他、同じ36または37の組織がヒトの研究におけるように検査されている。）を用いた比較組織交叉反応性研究は、tox種の選択の妥当性を確認するのに役立つ。凍結組織切片に関する典型的な組織交叉反応性研究では、治療用抗体は既知の抗原への予想される結合および／または、より低い程度で、低レベルの相互作用に基づく組織への結合（非特異的結合、類似の抗原への低レベルの結合、低レベルの電荷を基礎とする相互作用など）を示し得る。何れの場合でも、最も妥当な毒性学動物種は、ヒトおよび動物組織への結合の一致の最も高い程度を有する動物種である。

【0232】

組織交叉反応性研究は、ECCPMPガイドラインIII/5271/94「Production and quality control of mAbs」および1997USFDA/CBER「Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use」などの適切な規制ガイドラインに従う。剖検または生検で得られたヒト組織の凍結切片（5μm）を対物ガラス上に固定し、乾燥させた。アビジン－ビオチン系を用いて、組織切片のペルオキシダーゼ染色を行った。食品医薬品局の指針「Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use」。適切な参考文献

10

20

30

40

50

には、「Clark e J 2004, Boon L. 2002a, Boon L 2002b, Ryan A 1999」が含まれる。

【0233】

組織交叉反応性研究は、しばしば、2段階で行われ、第一の段階は、1人のヒトドナーから得られる32の組織（典型的には、副腎、胃腸管、前立腺、膀胱、心臓、骨格筋、血液細胞、腎臓、皮膚、骨髄、肝臓、脊髄、乳房、肺、脾臓、小脳、リンパ節、精巣、大脳皮質、卵巣、胸腺、大腸、膵臓、甲状腺、内皮、副甲状腺、尿管、眼、下垂体、子宮、ファロピア管および胎盤）の凍結切片を含む。第二相では、完全な交叉反応性研究は、3人の無関係な成人から得られる最大38の組織（副腎、血液、血管、骨髄、小脳、大脳、頸部、食道、眼、心臓、腎臓、大腸、肝臓、肺、リンパ節、乳房の乳腺、卵巣、卵管、膵臓、副甲状腺、末梢神経、下垂体、胎盤、前立腺、唾液腺、皮膚、小腸、脊髄、脾臓、胃、横紋筋、精巣、胸腺、甲状腺、扁桃腺、尿管、膀胱および子宮を含む。）を用いて行われる。研究は、典型的には、最低2つの投薬レベルで行われる。

10

【0234】

治療用抗体（即ち、検査品）およびイソタイプを合致させた対照抗体は、アビジン-ビオチン複合体（ABC）検出のためにビオチン化され得る。他の検出法には、FITC（またはその他の）標識された検査品のための三次抗体検出または標識されていない検査品のための標識された抗ヒトIgGとの事前の複合体形成が含まれ得る。

【0235】

要約すれば、剖検または生検で得られたヒト組織の凍結切片（約5 μ m）を対物ガラス上に固定し、乾燥させる。アビジン-ビオチン系を用いて、組織切片のペルオキシダーゼ染色を行う。まず（事前に複合体を形成する検出系の場合）、ビオチン化された二次抗ヒトIgGとともに検査品を温置し、免疫複合体を生じさせる。検査品の2および10 μ g/mLの最終濃度の免疫複合体を対物ガラス上の組織切片上に添加し、次いで、アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼキットと組織切片を30分間反応させた。その後、組織染色のために、ペルオキシダーゼ反応に対する基質であるDAB（3,3'-ジアミノベンジン）を4分間適用した。陽性対照組織切片として、抗原-セファロースビーズを使用する。

20

【0236】

何れの特異的染色も、問題となっている標的抗原の既知の発現に基づいて、予想された（例えば、抗原の発現と合致）反応性または予想されない反応性の何れかであると判断される。特異的と判断された全ての染色には、強度と頻度に関してスコアを付与する。抗原または血清競合または遮断研究は、観察された染色が特異的または非特異的であるかどうかの決定をさらに補助し得る。

30

【0237】

2つの選択された抗体が選択基準を充足する（適切な組織染色、ヒトと毒性学動物特異的組織間での合致する染色）ことが見出されたら、DVD-Ig作製のために、これらを選択することができる。

【0238】

組織交叉反応性研究は、最終のDVD-Ig構築物を用いて繰り返さなければならないが、2つの親抗体の何れかから何らかの結合が生じ得、複雑な抗原競合研究を用いて、何らかの説明されない結合を確認する必要があるので、これらの研究は、本明細書に概説されているものと同じプロトコールに従うものの、より評価が複雑である。

40

【0239】

（1）予想されない組織交叉反応性の知見の欠如に関して、ならびに（2）対応するヒトおよび毒性学動物種の組織間での、組織交叉反応性の知見の適切な類似性に関して、2つの親抗体が選択されれば、DVD-Igのような多重特異的分子を用いた組織交叉反応性研究の複雑な作業が大幅に簡略化されることは自明である。

【0240】

B. 12特異性および選択性：

50

所望の特異性と選択性を有するDVD-Ig分子を作製するために、同様に所望の特異性および選択性特性を有する親mAbを作製および選択することが必要である。

【0241】

DVD-Igを用いた特異性および選択性に関する結合研究は、4つ以上の結合部位（それぞれ2つが各抗原に対する。）のために複雑であり得る。簡潔に述べれば、ELISA、BIAcore、KinExAを使用する結合研究またはDVD-Igと他の相互作用研究は、DVD-Ig分子への1つ、2つ以上の抗原の結合をモニターする必要がある。BIAcore技術は、複数の抗原の逐次的な独立した結合を分割することができるが、ELISAなどのより伝統的な方法またはKinExAのようなより近代的な技術は分割できない。従って、各親抗体の注意深い性質決定が不可欠である。それぞれの個別の抗体が特異性に関して性質決定された後、DVD-Ig分子中の個別の結合部位の特異性の保持の確認は大幅に簡略化される。

10

【0242】

DVD-Ig中に組み合わされる前に、特異性に関して2つの親抗体が選択されれば、DVD-Igの特異性を測定するという複雑な作業が大幅に簡略化されることは自明である。

【0243】

抗原-抗体相互作用の研究は、ELISA（酵素結合免疫吸着検定法）、質量分析法、化学的架橋、光散乱を用いたSEC、平衡透析、ゲル浸透、限外ろ過、ゲルクロマトグラフィー、巨大ゾーン分析的SEC、微量調製超遠心（沈降平衡）、分光学的方法、滴定微量熱量測定、（分析的超遠心での）沈降平衡、（分析的遠心での）沈降速度、表面プラズモン共鳴（BIAcoreを含む。）などの多くの古典的なタンパク質-タンパク質相互作用研究など、多くの形態を採り得る。関連する参考文献には、John Wiley & Sons Inc.，によって出版された「Current Protocols in Protein Science」John E. Coligan, Ben M. Dunn, David W. Speicher, Paul T. Wingfield (eds.) Volume 3, chapters 19 and 20」およびこの中に含まれる参考文献ならびにJohn Wiley & Sons Inc.，によって出版された「Current Protocols in Immunology」, John E. Coligan, Barbara E. Bierer, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober (eds.)」およびこの中に含まれる関連する参考文献が含まれる。

20

30

【0244】

全血中のサイトカイン放出：ヒト血液細胞とのmAbの相互作用は、サイトカイン放出アッセイによって調べることができる（John Wiley & Sons Inc.によって出版されたWing, M. G. Therapeutic Immunology (1995), 2 (4), 183-190; 「Current Protocols in Pharmacology」, S. J. Enna, Michael Williams, John W. Ferkany, Terry Kenakin, Paul Moser, (eds.) ; Madhusudan, S. Clinical Cancer Research 2004), 10 (19), 6528-6534; Cox, J. Methods 2006), 38 (4), 274-282; Choi, I. European Journal of Immunology 2001), 31 (1), 94-106)）。簡潔に述べれば、mAbの様々な濃度をヒト全血とともに24時間温置する。検査される濃度は、患者中の典型的な血液レベルを模倣する最終濃度を含む幅広い範囲を包含すべきである（100 ng/mLから100 μg/mLなど、これに限定されない。）。温置後、IL-1Ra、TNF-α、IL-1b、IL-6およびIL-8の存在に関して、上清および細胞可溶化液を分析した。mAbに関して作製されたサイトカイン濃度特性を、陰性ヒトIgG対照および陽性LPSまたはPHA対照によって作製された特性と比較した。細胞上清および細胞可溶化液の両方から得られたmAbによって示されたサイトカイン特性

40

50

は、対照ヒト I g G と同等であった。一実施形態において、モノクローナル抗体は、炎症性サイトカインを自発的に放出するために、ヒト血液細胞と相互作用しない。

【0245】

4つ以上の結合部位（各抗原に対してそれぞれ2つ）のために、DVD-Igに対するサイトカイン放出研究は複雑である。簡潔に述べれば、本明細書に記載されているサイトカイン放出研究は、全血または他の細胞系に対する完全なDVD-Ig分子の効果を測定するが、分子の何れの部分がサイトカインの放出を引き起こすかを解決することはできない。サイトカインの放出が検出されたら、幾つかの同時精製された細胞成分が単独でサイトカインの放出を引き起こし得るので、DVD-Ig調製物の純度が確認されなければならない。純度が問題でなければ、何れかの観察結果を解析するために、DVD-Igの断片化（Fc部分の除去、結合部位の分離などを含むが、これらに限定されない。）、結合部位の突然変異導入または他の方法を使用することが必要であり得る。DVD-Ig中に組み合わされる前に、サイトカインの放出の欠如に関して、2つの親抗体が選択されれば、この複雑な作業が大幅に簡略化されることは自明である。

【0246】

B. 13 毒性学的研究のための他の種への交叉反応性：

一実施形態において、適切なtox種（例えば、カンクイザル）への十分な交叉反応性を有する各抗体が選択される。親抗体は、オーソログな種の標的（即ち、カンクイザル）に結合し、適切な応答（調節、中和、活性化）を惹起することが必要である。一実施形態において、オーソログな種の標的への交叉反応性（親和性／強度）は、ヒト標的の10倍以内とすべきである。実際に、親抗体は、マウス、ラット、イヌ、サル（および他の非ヒト霊長類）および疾病モデル種（即ち、喘息モデル用のヒツジ）などの複数の種に関して評価される。親モノクローナル抗体からのtox種への許容可能な交叉反応性は、同じ種内のDVD-Ig-Igの将来の毒性学的研究を可能にする。この理由のために、2つの親モノクローナル抗体は、共通のtox種に対して許容可能な交叉反応性を有し、従って、同じ種内でのDVD-Igの毒性学的研究を可能にすべきである。

【0247】

親mAbは、特異的な標的に結合することができる様々なmAbから選択され得、当分野において周知である。これらには、抗TNF抗体（米国特許番号6,258,562）、抗IL-12および／または抗IL-12p40抗体（米国特許番号6,914,128）；抗IL-18抗体（US2005/0147610A1）、抗C5、抗CBL、抗CD147、抗gp120、抗VLA-4、抗CD11a、抗CD18、抗VEGF、抗CD40L、抗CD-40（例えば、WO2007124299参照）抗Id、抗ICAM-1、抗CXCL13、抗CD2、抗EGFR、抗TGF-β2、抗HGF、抗cMet、抗DLL-4、抗NPR1、抗PLGF、抗Erbb3、抗E-セレクトリン、抗VILI因子、抗Her2/neu、抗Fgp、抗CD11/18、抗CD14、抗ICAM-3、抗RON、抗CD-19、抗CD80（例えば、WO2003039486参照）、抗CD4、抗CD3、抗CD23、抗β2-インテグリン、抗α4β7、抗CD52、抗HLADR、抗CD22（例えば、米国特許番号5,789,554参照）、抗CD20、抗MIF、抗CD64（FcR）、抗TCRαβ、抗CD2、抗HepB、抗CA125、抗EpCAM、抗gp120、抗CMV、抗gpIIbIIIa、抗IgE、抗CD25、抗CD33、抗HLA、抗IGF1,2、抗IGFR、抗IGF1R、抗RGMa、破傷風トキソイド、抗VNRインテグリン、抗IL-1α、抗IL-1β、抗IL-1受容体、抗IL-2受容体、抗IL-4、抗IL-4受容体、抗IL5、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；抗IL-23（Presta LG. 2005 Selection, design, and engineering of therapeutic antibodies J Allergy Clin Immunol. 116:731-6および<http://www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/antibodies.html>参照）。

【0248】

親mAbは、使用に関して、臨床試験においてまたは臨床的使用のための開発において承認を受けた様々な治療用抗体からも選択され得る。このような治療用抗体には、リツキシマブ（Rituxan（登録商標）、IDEC／Genentech／Roche）（例えば、米国特許番号5,736,137参照）、非ホジキンリンパ腫を治療するために承認を受けたキメラ抗CD20抗体；HuMax-CD20、Genmabによって現在開発されている抗CD20抗体、AME-133（Applied Molecular Evolution）、hA20（Immunomedics, Inc.）、HumaLYM（Intracel）およびPRO70769（PCT／US2003／040426、発明の名称「Immunoglobulin Variants and Uses Thereof」）
10、トラスツズマブ（Herceptin（登録商標）、Genentech）（例えば、米国特許番号5,677,171号照）、乳癌を治療するために承認を受けたヒト化抗Her2/neu抗体；Genentecによって現在開発されているベルツズマブ（rhumaB-2C4, Omnitarg（登録商標））；米国特許番号4,753,894に記載されている抗Her2抗体；セツキシマブ（Erbix（登録商標）、Imclone）（米国特許番号4,943,533；PCTWO96／40210）、様々な癌に対する臨床試験におけるキメラ抗EGFR抗体；Abgenix-Immunex-
20 Amgenによって現在開発されているABX-EGF（米国特許番号6,235,883）；Genmabによって現在開発されているHuMax-EGFr（米国逐次番号10／172,317）；425、EMD55900、EMD62000およびEMD72000（Merck KGaA）（米国特許番号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；Modjtahedi et al
30, 1996, Br J Cancer, 73（2）：228-35；Modjtahedi et al, 2003, Int J Cancer, 105（2）：273-80）；TheraCIMhR3（YM Biosciences, Canada and Centro de Immunologia Molecular, Cuba 米国特許番号5,891,996；米国特許番号6,506,883；Mateo et al, 1997, Immunotechnology, 3（1）：71-81）；mAb-806（Ludwig Institute for Cancer Research, Memorial Sloan-Kettering）（Jungbluth et al. 2003, Proc Natl Acad Sci USA. 100（2）：639-44）；KSB-102（KS Biomedix）；MR1-1（IVAX, National Cancer Institute）（PCT WO0162931A2）；ならびにSC100（Scancell）（PCTWO01／88138）；アレムツズマブ（Campath（登録商標）、Millenium）、B細胞慢性リンパ性白血病の治療に関して現在承認を受けているヒト化mAb；ムロモナブ-CD3（Orthoclone OKT3（登録商標））、Ortho Biotech／Johnson&Johnsonによって開発された抗CD3抗体、イブリツモマブ・チウキセタン（Zevalin（登録商標））、IDEC／Schering AGによって開発された抗CD20抗体、ゲムツズマブ・オゾガマイシン（Mylotarg（登録商標））、Celltech／Wyethによって開発された抗CD33（p67タンパク質）抗体、アレフセプト（Amevive（登録商標））、Biogenによって開発された抗LFA-3
40
50

Fc融合物)、Centocor/Lillyによって開発されたアブシキシマブ(ReoPro(登録商標))、Novartisによって開発されたバシリキシマブ(Simulect(登録商標))、Medimmuneによって開発されたパリビズマブ(Synagis(登録商標))、インフリキシマブ(Remicade(登録商標))、Centocorによって開発された抗TNF α 抗体、アダリムマブ(Humira(登録商標))、Abbottによって開発された抗TNF α 抗体、Humicade(登録商標)、Celltechによって開発された抗TNF α 抗体、ゴリムマブ(CNTO-148)、Centocorによって開発された完全ヒトTNF抗体、エタネルセプト(Enbrel(登録商標))、ImmuneX/Amgenによって開発されたp75TNF受容体Fc融合物、レネルセプト、Rocheによって以前に開発されたp55TNF受容体Fc融合物、ABX-CBL、Abgenixによって開発されている抗CD147抗体、ABX-IL8、Abgenixによって開発されている抗IL-8抗体、ABX-MA1、Abgenixによって開発されている抗MUC18抗体、ペムツモマブ(R1549, 90Y-muHMFGL)、Antisomaによって開発中の抗MUC1、Therex(R1550)、Antisomaによって開発されている抗MUC1抗体、Antisomaによって開発されているAngioMab(AS1405)、Antisomaによって開発されているHuBC-1、Antisomaによって開発されているThioplatin(AS1407)、Antegren(登録商標)(ナタリズマブ)、Biogenによって開発されている抗 α -4- β -1(VLA-4)および α -4- β -7-抗体、VLA-1mAb、Biogenによって開発されている抗VLA-1インテグリン抗体、LTBRmAb、Biogenによって開発されている抗リンホトキシ β 受容体(LTBR)抗体、CAT-152、Cambridge Antibody Technologyによって開発されている抗TGF- β 2抗体、ABT874(J695)、Abbottによって開発されている抗IL-12p40抗体、CAT-192、Cambridge Antibody TechnologyおよびGenzymeによって開発されている抗TGF- β 1抗体、CAT213、Cambridge Antibody Technologyによって開発されている抗エオタキシ β 1抗体、LymphoStat-B(登録商標)、Cambridge Antibody TechnologyおよびHuman Genome Sciences Inc. , によって開発されている抗Blys抗体、TRAIL-R1mAb、Cambridge Antibody TechnologyおよびHuman Genome Sciences Inc. , によって開発されている抗TRAIL-R1抗体、Avastin(登録商標)ベバシズマブ、rhumaB-VEGF、Genentechによって開発されている抗VEGF抗体、Genentechによって開発されている抗HER受容体ファミリー抗体、Anti-Tissue Factor(ATF)、Genentechによって開発されている抗組織因子抗体、Xolair(登録商標)(オマリズマブ)、Genentechによって開発されている抗IgE抗体、Raptiva(登録商標)(エファリズマブ)、GenentechおよびXomaによって開発されている抗CD11a抗体、GenentechおよびMillenium Pharmaceuticalsによって開発されているMLN-02抗体(以前には、LDP-02)、HuMaxCD4、Genmabによって開発されている抗CD4抗体、HuMax-IL15、GenmabおよびAmgenによって開発されている抗IL-15抗体、GenmabおよびMedarexによって開発されているHuMax-Inflam、Humax-Cancer、GenmabおよびMedarexおよびOxford GeoSciencesによって開発されている抗ヘパラーゼI抗体、GenmabおよびAmgenによって開発されているHuMax-Lymphoma、Genmabによって開発されているHuMax-TAC、IDEC-131およびIDEC Pharmaceuticalsによって開発されている抗CD40L抗体、IDEC-151(Clenoliximab)、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-IC11、Imcloneによって開発されている抗KDR抗体、DC101、Imcloneによって開発されている抗flk-1抗体、Imcloneによって開発されている抗VEカドヘリン抗体、CEA-Cide(登録商標)(ラベツズマブ)、Immunomedicsによって開発されている抗癌胎児性抗原(CEA)抗体、LymphoCide(登録商標)(エブラツズマブ)、Immunomedicsによって開発されている抗CD22抗体、Immunomedicsによって開発されているAFP-Cide、Immunomedicsによって開発されているMyelomaCide、Immunomedicsによって開発されているLkoCide、Immunomedicsによって開発されているProstaCide、MDX-010、Medarexによって開発されている抗CTLA4抗体、MDX-060、Medarexによって開発されている抗CD30抗体、Medarexによって開発されているMDX-070、Medarexによって開発されているMDX-018、Osidem(登録商標)(IDM-1)ならびにMedarexおよびImmuno-Designed Moleculesによって開発されている抗Her2抗体、Humax(登録商標)-CD4、MedarexおよびGenmabによって開発されている抗CD4抗体、HuMax-IL15、MedarexおよびGenmabによって開発されている抗IL15抗体、CNTO148、MedarexおよびCentocor/J&Jによって開発されている抗TNF α 抗体、CNTO1275、Centocor/J&Jによって開発されている抗サイトカイン抗体、MOR101および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成長因子受容体3(FGFR-3)抗体、Nuvion(登録商標)(ビシリズマブ)、Protein Design Labsによって開発されている抗CD3抗体、HuZAF(登録商標)、Protein Design Labsによって開発されている抗 γ 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 $\alpha 5 \beta 1$ インテグリン、Protein Design Labsによって開発されている抗IL12、ING-1、Xomaによって開発されている抗Ep-CAM抗体、Xolair(登録商標)(オマリズマブ)、GenentechおよびNovartisによって開発されているヒト化抗IgE抗体ならびにMLN01、Xomaによって開発されている抗 $\beta 2$ インテグリン抗体が含まれるが、これらに限定されない(この段落において本明細書に引用された文献の全ては、参照により本明細書に明示的に組み込まれる。)。別の実施形態において、治療薬には、KRN330(Kirin); huA33抗体(A33, Ludwig Institute for Cancer Research); CNTO95(αV インテグリン, Centocor); MEDI-522($\alpha V \beta 3$ インテグリン, Medimmune); ボロシキシマブ($\alpha V \beta 1$ インテグリン, Biogen/PDL); ヒトmAb216(B細胞グリコシル化されたエピトープ, NCI); BiTEMT103(二特異的CD19 $\times$ CD3, Medimmune); 4G7 $\times$ H22(二特異的Bcell $\times$ Fc γ 1, Medarex/Merck KGa); rM28(二特異的CD28 $\times$ MAPG、米国特許番号EP1444268); MDX447(EMD82633)(二特異的CD64 $\times$ EGFR, Medarex); カツマキシマブ(レモバブ)(二特異的EpCAM $\times$ 抗CD3, Trion/Fres); エルツマキシマブ(二特異的HER2/CD3, Fresenius米国Biotech); オレゴボマブ(OvaRex)(CA-125, ViRex); Rencarex(登録商標)(WX G250)(炭酸脱水酵素IX, Willex); CNTO888(CCL2, Centocor); TRC105(CD105(エンドグリン), Tracoon); BMS-663513(CD137アゴニスト, Bry

stol Myers Squibb) ; MDX-1342 (CD19, Medarex)
) ; シプリズマブ (MED1-507) (CD2, Medimmune) ; オファツムマ
 ブ (Humax-CD20) (CD20, Genmab) ; リツキシマブ (Rituxa
 n) (CD20, Genentech) ; ベルツズマブ (hA20) (CD20, Imm
 unomedics) ; エブラツズマブ (CD22, Amgen) ; ルミリキシマブ (I
 DEC152) (CD23, Biogen) ; ムロモナブ-CD3 (CD3, Ortho
) ; HuM291 (CD3fc受容体, PDL Biopharma) ; HeFi-1,
 CD30, NCI) ; MDX-060 (CD30, Medarex) ; MDX-1401
 (CD30, Medarex) ; SGN-30 (CD30, Seattle Genent
 ics) ; SGN-33 (リンツズマブ) (CD33, Seattle Genent
 ics) ; ザノリムマブ (HuMax-CD4) (CD4, Genmab) ; HCD12
 2 (CD40, Novartis) ; SGN-40 (CD40, Seattle Gen
 entics) ; Campath1h (アレムツズマブ) (CD52, Genzyme)
 ; MDX-1411 (CD70, Medarex) ; hLL1 (EPB-1) (CD74
 . 38, Immunomedics) ; ガリキシマブ (IDEC-144) (CD80,
 Biogen) ; MT293 (TRC093/D93) (切断されたコラーゲン, Tra
 con) ; HuLuc63 (CS1, PDL Pharma) ; イピリムマブ (MDX-
 010) (CTLA4, Bristol Myers Squibb) ; トレメリムマブ
 (チシリムマブ, CP-675, 2) (CTLA4, Pfizer) ; HGS-ETR1
 (マパツムマブ) (DR4 TRAIL-R1アゴニスト, Human Genome
 Science/GlaxoSmithKline) ; AMG-655 (DR5, Amg
 en) ; アポマブ (DR5, Genentech) ; CS-1008 (DR5, Dai
 chi Sankyo) ; HGS-ETR2 (レキサツマブ) (DR5 TRAIL-R
 2 アゴニスト, HGS) ; セツキシマブ (Erbix) (EGFR, Imclone)
 ; IMC-11F8, (EGFR, Imclone) ; ニモツズマブ (EGFR, Y
 M Bio) ; パニツムマブ (Vectabix) (EGFR, Amgen) ; ザルツム
 マブ (HuMaxEGFr) (EGFR, Genmab) ; CDX-110 (EGFRv
 III, AVANT Immunotherapeutics) ; アデカツムマブ (MT
 201) (Epcam, Merck) ; エドレコロマブ (Panorex, 17-1A)
 (Epcam, Glaxo/Centocor) ; MORAb-003 (葉酸受容体a,
 Morphotech) ; KW-2871 (ガングリオシドGD3, Kyowa) ; MO
 RAb-009 (GP-9, Morphotech) ; CDX-1307 (MDX-13
 07) (hCgb, Celldex) ; トラスツズマブ (Herceptin) (HER
 2, Celldex) ; ベルツズマブ (rhUMAb 2C4) (HER2 (DI), G
 enentech) ; アポリズマブ (HLA-DRβ鎖, PDL Pharma) ; AM
 G-479 (IGF-1R, Amgen) ; 抗IGF-1R R1507 (IGF1-R
 , Roche) ; CP 751871 (IGF1-R, Pfizer) ; IMC-A12
 (IGF1-R, Imclone) ; BII B022 (IGF-1R, Biogen) ;
 Mik-β-1 (IL-2Rb (CD122), Hoffman LaRoche) ; C
 NTO 328 (IL6, Centocor) ; 抗KIR (1-7F9) (Killer
 細胞Ig様受容体 (KIR), Novo) ; Hu3S193 (Lewis (y), Wye
 th, Ludwig Institute of Cancer Research) ;
 hCBE-11 (LTBR, Biogen) ; HuHMFGL (MUC1, Antiso
 ma/NCI) ; RAV12 (N結合型炭水化物エピトープ, Raven) ; CAL (副
 甲状腺ホルモン関連タンパク質 (PTH-rP), University of Cal
 ifornia) ; CT-011 (PD1, CureTech) ; MDX-1106 (o
 no-4538) (PD1, Medarex/Ono) ; MAbCT-011 (PD1,
 Curetech) ; IMC-3G3 (PDGFRα, Imclone) ; バビツキシマ
 ブ (ホスファチジルセリン, Peregrine) ; huJ591 (PSMA, Corn
 ell Research Foundation) ; muJ591 (PSMA, Cor

10

20

30

40

50

nell Research Foundation) ; GC1008 (TGFB (pan) 阻害剤 (IgG4), Genzyme) ; インフリキシマブ (レミケイド) (TNF α , Centocor) ; A27.15 (トランスフェリン受容体, Salk Institute, INSERNWO2005/111082) ; E2.3 (トランスフェリン受容体, Salk Institute) ; ベバシズマブ (Avastin) (VEGF, Genentech) ; HuMV833 (VEGF, Tsukuba Research Lab-WO/2000/034337, University of Texas) ; IMC-18F1 (VEGFR1, Imclone) ; IMC-1121 (VEGFR2, Imclone) が含まれる。

【0249】

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

【0250】

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

【0251】

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

【0252】

リンカー配列は、単一のアミノ酸またはポリペプチド配列であり得る。一実施形態において、リンカー配列は、AKTTPKLEEGEFSEAR (配列番号1) ; AKTTPKLEEGEFSEARV (配列番号2) ; AKTTPKLG (配列番号3) ; SAKTTPKLG (配列番号4) ; SAKTTP (配列番号5) ; RADAAP (配列番号6) ; RADAAPTVS (配列番号7) ; RADAAAAGGPGS (配列番号8) ; RADAAA (G₄S)₄ (配列番号9) ; SAKTTPKLEEGEFSEARV (配列番号10) ; ADAAP (配列番号11) ; ADAAPTVSIFPP (配列番号12) ; TVAAP (配列番号13) ; TVAAPSVFIFPP (配列番号14) ; QPKAAP (配列番号15) ; QPKAAPSVTLFPP (配列番号16) ; AKTTPP (配列番号17) ; AKTTPPSVTPLAP (配列番号18) ; AKTTAP (配列番号19) ; AKTTAPSVYPLAP (配列番号20) ; ASTKGP (配列番号21) ; ASTKGPSVFPLAP (配列番号22) ; GGGGSGGGGSGGGGS (配列番号23) ; GENKVEYAPALMALS (配列番号24) ; GPAKELTPLKEAKVS (配列番号25) ; GHEAAAVMQVQYPAS (配列番号26) 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または抗体分子構造中の可変ドメインとCH1/CL定常ドメインの間には、天然の柔軟な連結が存在する。この天然の連結は、VドメインのC末端由来の4から6残基およびCL/CH1ドメインのN末端由来の4から6残基によって寄与される約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、DV

10

20

30

40

50

D-Igの軽鎖および重鎖中のリンカーとしてCLまたはCH1のN末端の5から6アミノ酸残基、または11から12アミノ酸残基を用いて作製された。

【0253】

CLまたはCH1ドメインのN末端残基、特に最初の5から6個のアミノ酸残基は、強い二次構造なしにループ立体構造を採り、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またはCH1ドメインのN末端残基は、Ig配列の一部であるので、可変ドメインの天然の伸長であり、従って、リンカーおよび連結から生じ得るあらゆる免疫原性の大部分を最小限に抑える。

【0254】

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ドメインの最初の5から12個のアミノ酸残基；軽鎖リンカーは、C κ またはC λ に由来することが可能であり；ならびに重鎖リンカーは、C γ 1、C γ 2、C γ 3、C γ 4、C α 1、C α 2、C δ 、C ϵ およびC μ を含む、何れかのイソタイプのCH1に由来することが可能である。リンカー配列は、Ig様タンパク質（例えば、TCR、FcR、KIR）、G/Sを基礎とする配列（例えば、G4Sリピート）；ヒンジ領域に由来する配列および他のタンパク質から得られる他の天然配列などの他のタンパク質からも由来し得る。

【0255】

一実施形態において、定常ドメインは、組み換えDNA技術を用いて、2つの連結された可変ドメインに連結されている。一実施形態において、連結された重鎖可変ドメインを含む配列は、重鎖定常ドメインに連結され、連結された軽鎖可変ドメインを含む配列は、軽鎖定常ドメインに連結される。一実施形態において、定常ドメインは、それぞれ、ヒト重鎖定常ドメインおよびヒト軽鎖定常ドメインである。一実施形態において、DVD重鎖は、Fc領域にさらに連結されている。Fc領域は、固有配列のFc領域または変形物Fc領域であり得る。別の実施形態において、Fc領域は、ヒトFc領域である。別の実施形態において、Fc領域には、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgEまたはIgDから得られるFc領域が含まれる。

【0256】

別の実施形態において、2つの重鎖DVDポリペプチドおよび2つの軽鎖DVDポリペプチドは組み合わされて、DVD-Ig分子を形成する。表2は、疾病治療（例えば、癌治療）に有用な目的のための典型的な抗体のVHおよびVL領域のアミノ酸配列を記載している。一実施形態において、本発明は、何れかの方向性でも、表2に列記されているVHおよび／またはVL領域の少なくとも2つを含むDVDを提供する。

【0257】

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

【0258】

【表2】

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

配列番号	ABT リンク ID	タンパク質 領域	配列
			1234567890123456789012345678901234567890
27	AB002VH	VH CD3	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQR PGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTTLTVSS

10

20

30

40

配列 番号	ABT ユニーク ID	タンパク質 領域	配列 1234567890123456789012345678901234567890
28	AB002VL	VL CD3	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSG TSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAE DAATYYCQQWSSNPLTFGSGTKLEINR
29	AB005VH	VH RON	EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQA PGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCARFSGWPNYYYYGMDVWGQGTTV TVSS
30	AB005VL	VL RON	DVVMTQSPPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLHNSGNFYVDW YLQKPGQSPHLLIYFGSYRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQALQTPPWTFGQGTKVEIRR
31	AB011VH	VH IGF1R	EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSSYAMNWRQA PGKGLEWVSAISGSGGTTFYADSVKGRFTISRDN SRTTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKDLGWSDSYYYYYGMDVWGQGT TVSS
32	AB011VL	VL IGF1R	DIQMTQFPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKP GKAPKRLIYAASRLHRGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQP EDFATYYCLQHNSYPCSFQGTGKLEIKR
33	AB012VH	VH HGF	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQA PGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARDEYNSGWYVLFDYWGQGT LVT VSS
34	AB012VL	VL HGF	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKP GKAPNLLIYEASSLQSGVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQANGFPWTFGQGTKVEIKR
35	AB014VH	VH VEGF (配列 1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTF TNYGMNWRQA PGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAY LQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYGGSSHWFYDVWGQGT LVT VSS
36	AB014VL	VL VEGF (配列 1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKP GKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQYSTVPWTFGQGTKVEIKR

10

20

30

40

配列 番号	ABT リンク ID	タンパク質 領域	配列 1234567890123456789012345678901234567890
37	AB015VH	VH DLL-4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWISWVRQA PGKGLEWVGYYISPNSGFTYYADSVKGRFTISADTSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYFDYWGQGTLLTVSS
38	AB015VL	VL DLL-4	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQDVSTAVAWYQQKP GKAPKLLIYSASFYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQIP EDFATYYCQQSYTGTVTFTGQGTKVEIKR
39	AB033VH	VH EGFR (配列 1)	QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQS PGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFF KMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGTLLTVSA
40	AB033VL	VL EGFR (配列 1)	DILLTQSPVILSVSPGERVVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRT NGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVES EDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLEIKR
41	AB047VL	VH PLGF	QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYINWVKLA PGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATLTIDTSSSTAY MQLSSLTSEDVAVYFCVRDSPFFDYWGQGTLLTVSS
42	AB047VH	VL PLGF	DIVLTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLNLSGMRKSFLA WYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLT ISSVQAEDVAVYYCKQSYHLFTFGSGTKLEIKR
43	AB059VH	VH-RGMa	EVQLVESGGGLVQPGSSSLKSCVASGFTFSNYGMNWIRQA PKKGLEWIGMIYYDSSEKHYADSVKGRFTISRDNSTNTLY LEMNSLRSEDAIYYCAKGTTPDYWGQGVMTVSS
44	AB059VL	VL-RGMa	DVVLTTQTPVSLSVTLGDQASMSRCSQSLYSDGYTFLEW FLQKPGQSPQLLIYEVSNRFSGVDPDRFIGSGSGTDFTLKI SRVEPEDLGYYCFQATHDPLTFTGSGTKLEIKR
45	AB062VH	VH ErbB3 (配列 1)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQP PGKGLEWIGEINHSGSTNYPNPSLKSRTISVETSKNQFSL KLSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFDLWGRGTLLTVSS
46	AB062VL	VL ErbB3 (配列 1)	DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSNRNYLA WYQQNPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLT ISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPRFTFGQGTKVEIKR

10

20

30

40

配列 番号	ABT ユニーク ID	変換質 領域	配列 1234567890123456789012345678901234567890
47	AB063VH	VH ErbB3 (配列 2)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMNWVRQA PGKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLRDEDTAVYYCARDRGDFDAFDIWGQGTMTVTVSS
48	AB063VL	VL ErbB3 (配列 2)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLNWYQQKP GKAPKLLIYDASNLETGVPSRFRSGSGSGTDFTFTISLQPF EDIATYNCQQCENFPITFGQGTRLEIKR
49	AB064VH	VH EGFR (配列 2)	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSISDDFAWNWIRQ PPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTISRDTSKNQFF LKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLLTVTVSS
50	AB064VL	VL EGFR (配列 2)	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGWLQQKP GKSFKGLIYHGTNLDGVPSPRFRSGSGSGTDYTLTISLQPF EDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLEIKR
51	AB067VH	VH ErbB3 (配列 3)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYVMAWVRQA PGKGLEWVSSISSSGWTLYADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCTRGLKMATIFDYWGQGTLLTVTVSS
52	AB067VL	VL ErbB3 (配列 3)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNVWSWYQQ HPGKAPKLLIYEVSQRPSGVSNRFRSGSKSGNTASLTISGL QTEDEADYYCCSYAGSSIFVIFGGGTKVTVLG
53	AB070VH	VH VEGF (配列 2)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIHWVRQA PGKGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQGTLLTVTVSS
54	AB070VL	VL VEGF (配列 2)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKP GKAPKLLIYSASFYSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPF EDFATYYCQSYTTPPTFGQGTKVEIKR
55	AB071VH	VH VEGF (配列 3)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIHWVRQA PGKGLEWVGAIYPYSGYTNADSVKGRFTISADTSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSPWAMDYWGQGTLLTVS S
56	AB071VL	VL VEGF (配列 3)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVIRRLAWYQQKP GKAPKLLIYAASNLASGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPF EDFATYYCQSNSTPLTFGQGTKVEIKR

10

20

30

40

配列 番号	ABT ユニーク ID	タンパク質 領域	配列 1234567890123456789012345678901234567890
57	AB059VH	VH-RGMa	EVQLVESGGGLVQPGSSSLKSCVASGFTFSNYGMNWIRQA PKKGLEWIGMIYYDSSEKHYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LEMNSLRSEDTAIYYCAKGTTPDYWGQGVMTVSS
58	AB059VL	VL-RGMa	DVVLVTQTPVSLSVTLGDQASMSCRSSQSLEYSDGYTFLEW FLQKPGQSPQQLLIYEVS NRFSGV PDRFIGSGSGTDFTLKI SRVEPEDLGVIYYCFQATHDPLTFSGGTKLEIKR
323	AB122VH	VH EGFR (配列 3)	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSDYAWNWI RQ PPKGLEWMGYISYSGNTRYNPSLKS RITISRDTSKNQFF LKLNSVTAADTATYYCATAGRFPYWGQGLVTVSS
324	AB122VL	VL EGFR (配列 3)	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGWLQQKP GKSFKGLIYHGTNLDGVP SRFSGSGSGTDYTLTISSLQP EDFATYYCVQYGQFPWTFGGGTKLEIKR
325	AB123VH	VH EGFR (配列 4)	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSDYAWNWI RQ PPKGLEWMGYISYSANTRYNPSLKS RITISRDTSKNQFF LKLNSVTAADTATYYCATAGRFPYWGQGLVTVSS
326	AB123VL	VL EGFR (配列 4)	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDISSNIGWLQQKP GKSFKGLIYHGTNLEDGVP SRFSGSGSGTDYTLTISSLQP EDFATYYCVQYGQFPWTFGGGTKLEIKR
327	AB124VH	VH EGFR (配列 5)	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSDYAWNWI RQ PPKGLEWMGYISYSGNTRYNPSLRS RITISRDTSKNQFF LKLNSVTAADTATYYCATAGRFPYWGQGLVTVSS
328	AB124VL	VL EGFR (配列 5)	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGWLQQKP GKSFKGLIYHGTNLDGVP SRFSGSGSGTDYTLTISSLQP EDFATYYCVQYGQFPWTFGGGTKLEIKR

10

20

30

【0259】

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

【0260】

C. DVDタンパク質の作製

本発明の結合タンパク質は、当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重鎖およびDVD軽鎖をコードする発現ベクターは、標準的な技術によって、宿主細胞中に形質移入される。「形質移入」という用語の様々な形態は、原核または真核宿主細胞中への外来DNAの導入のために一般に使用される多様な技術、例えば、電気穿孔、リン酸カルシウム沈殿、DEAE-デキストラン形質移入などを包含するものとする。原核または真核宿主細胞の何れの中でも、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、適切に折り畳まれ、免疫学的に活性なDVDタンパク質を組み立ておよび分泌する傾向がより大きいので、DVDタンパク質は、真核細胞中、例えば、哺乳動物宿主細胞中で発現される。

40

50

【0261】

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

10

【0262】

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

20

【0263】

DVD-Igの重要な特徴は、DVD-Igが、旧来の抗体と同様の様式で作製および精製され得ることである。DVD-Igの作製は、定常領域の何れの配列修飾もなしに、または何れの種類の化学的修飾もなしに、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。「二重特異的」、「多重特異的」および「多重特異的多価」完全長結合タンパク質を作製するための他の以前に記載された方法は、単一の主要産物をもたらさず、代わりに、集合した不活性な単一特異的、多重特異的、多価の完全長結合タンパク質と、異なる結合部位の組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または分泌された産生をもたらす。例として、Miller and Prest a (PCT公開WO2001/077342 (A1))によって記載された設計に基づいて、重鎖および軽鎖の16の可能な組み合わせが存在する。この結果、タンパク質の僅か6.25%が、所望の活性形態であり、他の15個の可能な可能性と比べて、単一の主要な産物または単一の主な産物として存在しない可能性がある。典型的には、大規模な製造において使用される標準的クロマトグラフィー技術を用いて、タンパク質の所望される完全に活性な形態を、タンパク質の不活性な形態および部分的に活性な形態から分離することは、未だ示されていない。

30

40

【0264】

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および二重可変ドメイン重鎖をもたらす。

【0265】

集合され、およ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%

50

、好ましくは75%およびより好ましくは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、本発明の商業的な利用を強化する。従って、本発明は、単一の細胞中で二重可変ドメイン軽鎖および二重可変ドメイン重鎖を発現し、「二重特異的四価完全長結合タンパク質」の単一の主要産物をもたらす方法を含む。

【0266】

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

【0267】

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

【0268】

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

【0269】

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、別のペプチドまたはタンパク質）へ誘導体化され、または連結される。例えば、本発明の標識された結合タンパク質は、別の抗体（例えば、二特異的抗体またはダイアボティ）、検出可能な因子、細胞毒性剤、薬剤および／または別の分子（ストレプトアビジンコア領域またはポリヒスチジンタグなど）との、結合タンパク質の会合を媒介可能なタンパク質もしくはペプチドなどの1つ以上の他の分子実体へ、（化学的カップリング、遺伝的融合、非共有会合またはその他によって）本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。

【0270】

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-ナフタレンスルホンクロリド、フィコエリトリンなどが含まれる。結合タンパク質は、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼなどの検出可能な酵素でも誘導体化され得る。結合タンパク質が検出可能な酵素で誘導体化される場合には、検出可能な反応産物を生成させるために、本酵素が使用するさらなる試薬を添加することによって結合タンパク質が検出される。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、過酸化水素およびジアミノベンジジンの添加は、検出可能な発色した反応産物をもたらす。結合タンパク質は、ビオチンを用いて誘導体化し、アビジンまたはストレプトアビジン結合の間接的な測定を通じても検出され得る。

【0271】

本発明の別の実施形態は、結晶化された結合タンパク質ならびにこのような結晶を含む製剤および組成物を提供する。一実施形態において、結晶化された結合タンパク質は、結合タンパク質の可溶性対応物より大きなイン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。

【0272】

本発明の結晶化された結合タンパク質は、当分野で公知の方法に従って、および参照により本明細書に組み込まれるWO 02 07 26 36に開示されているように産生され得る。

10

20

30

40

50

【0273】

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

【0274】

本発明の一態様は、結合タンパク質のO結合型またはN結合型グリコシル化部位が変異されているグリコシル化部位変異体を作製することに関する。当業者は、標準的な周知の技術を用いて、このような変異体を作製することが可能である。生物学的活性を保持するが、増加または減少した結合活性を有するグリコシル化部位変異体が、本発明の別の目的である。

【0275】

さらに別の実施形態において、本発明の抗体または抗原結合部分のグリコシル化を修正する。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（即ち、抗体は、グリコシル化を欠如する。）。グリコシル化は、例えば、抗原に対する抗体の親和性を増加させるために改変することが可能である。このような炭水化物修飾は、例えば、抗体配列内のグリコシル化の1つ以上の部位を変化させることによって達成することが可能である。例えば、これによって、当該部位のグリコシル化を除去するために、1つ以上の可変領域グリコシル化部位の除去をもたらす1つ以上のアミノ酸置換を施すことが可能である。このような無グリコシル化は、抗原に対する抗体の親和性を増加させ得る。このような手法は、PCT公開WO2003016466A2ならびに米国特許番号5,714,350および米国特許番号6,350,861（これらの各々は、参照によりこ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。

【0276】

これに加えてまたはこれに代えて、フコシル残基の減少した量を有する低フコシル化抗体（Kanda, Yutaka et al., Journal of Biotechnology (2007), 130(3), 300-310参照）または増加した二分岐GlcNAc構造を有する抗体など、グリコシル化の変化した種類を有する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当分野において記載されており、この中で、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および欧州特許EP1,176,195; PCT公開W

003/035835; WO99/5434280 (これらの各々は、参照によりこの全体が本明細書に組み込まれる。)を参照されたい。

【0277】

タンパク質グリコシル化は、対象のタンパク質のアミノ酸配列およびこの中でタンパク質が発現される宿主細胞に依存する。異なる生物は、異なるグリコシル化酵素(例えば、グリコシル転移酵素およびグリコシダーゼ)を産生し得、利用可能な異なる基質(ヌクレオチド糖)を有し得る。このような要因のために、タンパク質グリコシル化パターンおよびグリコシル残基の組成は、当該タンパク質がこ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およびシアル酸が含まれ得るが、これらに限定されない。一実施形態において、グリコシル化された結合タンパク質は、グリコシル化パターンがヒトであるように、グリコシル残基を含む。

10

【0278】

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

20

【0279】

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。当分野で公知の技術を使用して、当業者は、ヒトタンパク質グリコシル化を呈する抗体またはこ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一のタンパク質グリコシル化を呈するように(米国特許出願20040018590および20020137134ならびにPCT公開WO2005100584A2)、酵母株は、天然に存在しないグリコシル化酵素を発現するように遺伝的に修飾されている。

30

【0280】

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に一般的に付随する固有の決定基を認識する抗体である。抗Idは、結合タンパク質またはこの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、および抗Id抗体を産生する。DVD-Ig分子中に取り込まれた2つ以上の親抗体に対する抗イディオタイプ抗体を作製し、各親抗体のイディオタイプに対して特異的な抗イディオタイプ抗体がDVD-Igにおけるイディオタイプ(例えば、抗原結合部位)も認識することを確かめるために、当分野で十分に認知されている方法(例えば、BIACore、ELISA)による結合研究を確認することがより容易であることは自明である。DVD-Igの2つ以上の抗原結合部位の各々に対して特異的な抗イディオタイプ抗体は、ヒト患者血清中のヒトDVD-IgのDVD-Ig濃度を測定するための理想的な試薬を提供する。DVD-Ig濃度アッセイは、第一の抗原結合領域に対する抗体が固相(例えば、BIACoreチップ、ELISAプレートなど)上に被覆され、濯ぎ緩衝液で濯ぎ、血清試料との温置、別の濯ぎ工程およびこれ自体結合反応の定量用酵素で標識された別の抗原結合

40

50

部位に対する別の抗イディオタイプ抗体とともに最終的に温置する「サンドイッチアッセイ E L I S A フォーマット」を使用して確立することが可能である。一実施形態において、3つ以上の異なる結合部位を有する D V D - I g に関して、2つの最も外側の結合部位（定常領域から最も遠いおよび近い。）に対する抗イディオタイプ抗体は、ヒト血清中の D V D - I g 濃度を測定するのに役立つのみならず、インビボでの分子の完全性も記述する。各抗 I d 抗体は、いわゆる抗抗 I d 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。

【0281】

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

【0282】

I I I . D V D - I g の使用

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

【0283】

一実施形態において、本発明の結合タンパク質は、インビトロおよびインビボの両方で、抗原の活性を中和することができる。従って、このような D V D - I g 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できる。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または疾患に罹患している対象中の抗原活性を低下させる方法を提供する。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。

【0284】

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示されもしくは疑われまたは疾患の悪化に寄与している因子であることが示されもしくは疑われている疾病およびその他の疾患を含むものとする。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および／または進行を緩和することが予測される疾患である。このような疾患は、例えば、本疾患に罹患している患者の生物学的液体中の抗原濃度の増加（例えば、対象の血清、血漿、滑液中などの抗原の濃度の増加）によって明らかとされ得る。本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、および本発明の抗体の医薬組成物に関するセクションに考察されている疾患が含まれる。

【0285】

本発明のDVD-Igは、1つの抗原または複数の抗原に結合し得る。このような抗原には、以下のデータベース（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、以下のリストが含まれる。

【0286】

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

サイトカインおよびサイトカイン受容体 (<http://www.cytokinefacts.com/>、<http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi>およびhttp://cmbi.bjmu.edu.cn/cmbidata/cgf/CGF_Database/cytokine.medic.kumamoto-u.ac.jp/CFC/indexR.html) ;

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

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

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

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

癌標的 (<http://cged.hgc.jp/cgi-bin/input.cgi>) ; 潜在的な抗体標的としての分泌タンパク質 (<http://spd.cbi.pku.edu.cn/>) ;

タンパク質キナーゼ (<http://spd.cbi.pku.edu.cn/>) ならびにヒトCDマーカー (http://content.labvelocity.com/tools/6/1226/CD_table_final_locked.pdf) および (Zola H, 2005 CD molecules 2005: human cell differentiation molecules Blood, 106:3123-6) 。

【0287】

DVD-Igは、効力/安全を増強し、および/または患者の範囲を増加させるために、2つの異なる標的を同時に遮断するための治療剤として有用である。このような標的は、可溶性標的 (TNF) および細胞表面受容体標的 (VEGFRおよびEGFR) が含まれ得る。このような標的は、癌療法のために腫瘍細胞とT細胞 (Her2とCD3) との間に、または自己免疫疾患もしくは移植のために自己反応性細胞とエフェクター細胞の間に、またはある所定の疾病において疾病を引き起こす細胞を除去するために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。

【0288】

さらに、同一受容体上の2つの異なるエピトープを標的とするように設計されている場合には、DVD-Igは、受容体のクラスターリングおよび活性化を惹起するために使用することが可能である。これは、アゴニストおよびアンタゴニスト作用を有する抗GPCR治療剤を作製する上で有用性を有し得る。この場合には、DVD-Igは、クラスターリング/シグナル伝達 (2つの細胞表面分子) またはシグナル伝達 (1つの分子上) のために、1つの細胞上に存在する2つの異なるエピトープ (ループ領域および細胞外ドメインの両方の上のエピトープを含む。) を標的とするために使用することが可能である。同様に、DVD-Ig分子は、CTLA-4連結、およびCTLA-4細胞外ドメインの2つの異なるエピトープ (または同一エピトープの2コピー) を標的として免疫応答の下方制御

10

20

30

40

50

をもたらすことによって、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ことができる。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」アレイである。しかしながら、抗C T L A - 4 m A b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 L T 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 (また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150から170Å) が、C T L A - 4 の活性な連結 (2個のC T L A - 4 ホモ二量体間で30から50Å) には大きすぎるということである。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、30から50Å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。

【0289】

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 (例えば、I L - 1 2 R α および β) を標的とすることが可能である。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 および可溶性タンパク質／病原体を標的とすることが可能である。

【0290】

さらに、本発明のD V D - I g は、細胞内送達 (内部移行受容体および細胞内分子を標的化すること)、脳内への送達 (脳血液関門を横切るために、トランスフェリン受容体および中枢神経系疾患媒介物質を標的化すること) など、組織特異的な送達 (増強された局所P Kにより、より高い効力および／またはより低い毒性を得るために、組織マーカーおよび疾病媒介物質を標的とすること) のために使用することが可能である。D V D - I g は、この抗原の非中和エピトープへの結合を介して特異的な位置へ抗原を送達するための担体タンパク質としての役割も果たすことができ、抗原の半減期を増加させることも可能である。さらに、D V D - I g は、患者中に植え込まれた医療用具に物理的に連結され、またはこれらの医療用具を標的とするように設計することが可能である (B u r k e , S a n d r a E . ; K u n t z , R i c h a r d E . ; S c h w a r t z , L e w i s B . , Z o t a r o l i m 米 国 e l u t i n g s t e n t s . A d v a n c e d D r u g D e l i v e r y R e v i e w s (2 0 0 6) , 5 8 (3) , 4 3 7 - 4 4 6 ; S u r f a c e c o a t i n g s f o r b i o l o g i c a l a c t i v a t i o n a n d f u n c t i o n a l i z a t i o n o f m e d i c a l d e v i c e s , H i l d e b r a n d , H . F . ; B l a n c h e m a i n , N . ; M a y e r , G . ; C h a i , F . ; L e f e b v r e , M . ; B o s c h i n , F . , S u r f a c e a n d C o a t i n g s T e c h n o l o g y (2 0 0 6) , 2 0 0 (2 2 - 2 3) , 6 3 1 8 - 6 3 2 4 ; D r u g / d e v i c e c o m b i n a t i o n s

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

【0291】

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つ以上の標的を結合し得る。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。

【0292】

1. ヒト自己免疫および炎症性応答

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 (MI

P-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、ICBERG、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、LTA、LTB、LTB4R、LTB4R2、LTBR、MIF、NPPB、PDGFB、TBX21、TDGF1、TGFA、TGFB1、TGFB1I1、TGFB2、TGFB3、TGFB1、TGFB1R1、TGFB1R2、TGFB1R3、TH1L、TNF、TNFRSF1A、TNFRSF1B、TNFRSF7、TNFRSF8、TNFRSF9、TNFRSF11A、TNFRSF21、TNFSF4、TNFSF5、TNFSF6、TNFSF11、VEGF、ZFPM2およびRNF110(ZNF144)など、多くのタンパク質が、一般的な自己免疫および炎症性応答に関与していると推定されている。一態様において、本明細書に列記されている標的の1つ以上に結合することが可能なDVD-Igが提供される。

【0293】

2. 喘息

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

の存在によって特徴付けられる。気道炎症が、喘息の発病の基礎を成す中心的な因子であることは、現在では広く受け入れられており、T細胞、B細胞、好酸球、肥満細胞およびマクロファージなどの炎症性細胞と、サイトカインおよびケモカインなどの分泌されるこれらの媒介物質の複雑な相互作用が関与している。コルチコステロイドは、今日、喘息に対する最も重要な抗炎症性治療であるが、こ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、粘膜の過剰分泌および気道繊維症など、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)。

10

【0294】

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 mAb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、刺激的な新しい手法である。しかしながら、異なる免疫学的経路の他の媒介物質も喘息の発病に関与しており、IL-13に加えて、これらの媒介物質を遮断することは、さらなる治療的利点を与え得る。このような標的対には、IL-13および腫瘍壊死因子- α (TNF- α)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- α は、喘息における炎症性応答を増幅し得、疾病の重度と関連し得る (McDonnell, et al., Progress in Respiratory Research (2001), 31 (New Drugs for Asthma, Allergy and COPD), 247-250)。これは、IL-13およびTNF- α の両方を遮断し、特に、重い気道疾病において、有益な効果を有し得ることを示唆する。別の実施形態において、本発明のDVD-Igは、標的であるIL-13およびTNF α を結合し、喘息を治療するために使用される。

20

【0295】

炎症およびAHRを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当分野において公知であり、様々なDVD-Ig分子が喘息を治療する能力を測定するために使用し得る。喘息を研究するための動物モデルは、Coffman, et al., Journal of Experimental Medicine (2005), 201 (12), 1875-1879; Lloyd, et al., Advances in Immunology (2001), 77, 263-295; Boyce et al., Journal of Experimental Medicine (2005), 201 (12), 1869-1873; および Snibson, et al., Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology (2005), 35 (2), 146-52に開示されている。これらの標的対の定型的な安全性評価に加えて、免疫抑制の程度に対する特異的検査が保証され、最高の標的対を選択する上で役立ち得る (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)。

30

40

【0296】

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

50

推定されているので、一実施形態において、このような標的には、IL-13およびIL-1 β ；IL-13およびIL-9など、炎症に関与しているIL-13およびサイトカインおよびケモカイン；IL-13およびIL-4；IL-13およびIL-5；IL-13およびIL-25；IL-13およびTARC；IL-13およびMDC；IL-13およびMIF；IL-13およびTGF- β ；IL-13およびLHRアゴニスト；IL-13およびCL25；IL-13およびSPRR2a；IL-13およびSPRR2b；ならびにIL-13およびADAM8が含まれるが、これらに限定されるものではない。本発明は、CSF1(MCSF)、CSF2(GM-CSF)、CSF3(GCSF)、FGF2、IFNA1、IFNB1、IFNG、ヒスタミンおよびヒスタミン受容体、IL1A、IL1B、IL2、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL8、IL9、IL10、IL11、IL12A、IL12B、IL13、IL14、IL15、IL16、IL17、IL18、IL19、KTILG、PDGFB、IL2RA、IL4R、IL5RA、IL8RA、IL8RB、IL12RB1、IL12RB2、IL13RA1、IL13RA2、IL18R1、TSLP、CCL1、CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CCL7、CCL8、CCL13、CCL17、CCL18、CCL19、CCL20、CCL22、CCL24、CX3CL1、CXCL1、CXCL2、CXCL3、XCL1、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CX3CR1、GPR2、XCR1、FOS、GATA3、JAK1、JAK3、STAT6、TBX21、TGFB1、TNF、TNFSF6、YY1、CYSLTR1、FCER1A、FCER2、LTB4R、TB4R2、LTBRおよ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つ以上の標的に結合することが可能なDVD-Igも提供する。

【0297】

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の磨耗を伴う。TNF、ケモカインおよび成長因子など、多くの炎症促進性サイトカインが、罹患した関節中に発現されている。抗TNF抗体またはsTNFR融合タンパク質の、RAのマウスモデルへの全身投与は、抗炎症性および関節保護的であることが示された。RA患者中のTNFの活性が、静脈内に投与されたインフリキシマブ(キメラ抗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 α treatment. Ann Rheum Dis 58 Suppl 1:161-4)は、TNFがIL-6、IL-8、MCP-1およびVEGF産生、免疫および炎症性細胞の関節中への動員、血管新生ならびにマトリックスメタロプロテイナーゼ-1および-3の血液レベルの低下を制御するという証拠を提供した。関節リウマチにおける炎症性経路をより深く理解することによって、関節リウマチに関与する他の治療標的の同定に結びついた。過去、インターロイキン-6アンタゴニスト(Chugai, Rocheによって開発されたIL-6受容体抗体MRA(Nishimoto, Orihiro et al., Arthritis & Rheumatism (2004)、50(6)、1761-1769参照)、CTLA4Ig(アバタセプト、Genovese Mc et al 2005 Abatacept for rheumatoid arthritis refractory to tumor necrosis factor α inhibition. N Engl J Med. 353:1114-23.)、および抗B細胞療法(リツキシマブ、Okamoto H, Kamatani N. 2004 Rituximab for rheumatoid arthritis. N Engl J Med. 351:1909)などの有望な治療が、無作為の対照化された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(治療用抗体HuMax-IL 15, AMG714 Baslund, Bo

et al., Arthritis & Rheumatism (2005), 52 (9), 2686-2692)、インターロイキン-17およびインターロイキン-18など、他のサイトカインが同定され、動物モデルにおいて有益であることが示されており、これらの因子の臨床試験が現在進行中である。抗TNFおよび別の媒介物質を組み合わせた二重特異的抗体療法は、臨床的効力および／または患者の対象範囲を増大させる上で大きな可能性を秘めている。例えば、TNFとVEGF（何れも、RAの病態生理学に参与している。）の両方を遮断することは、炎症および血管新生を根絶することができる可能性を秘めている。TNFおよびIL-18；TNFおよびIL-12；TNFおよびIL-23；TNFおよびIL-1 β ；TNFおよびMIF；TNFおよびIL-17；TNFおよびIL-15を含む（ただし、これらに限定されない。）、RAに参与している標的の他の対を、特異的DVD Igで遮断することも想定される。これらの標的対の定型的な安全性評価に加えて、免疫抑制の程度に対する特異的検査が保証され、最高の標的対を選択する上で役立ち得る（Luster et al., Toxicology (1994), 92 (1-3), 229-43；Descotes, et al., Developments in biological standardization (1992), 77 99-102；Hart et al., Journal of Allergy and Clinical Immunology (2001), 108 (2), 250-257 参照）。DVD Ig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当分野において周知である（Brand DD., Comp Med. (2005) 55 (2) : 114-22 参照）。（2005）55 (2) : 114-22）。ヒトおよびマウスのオルソログ（例えば、ヒトおよびマウスTNF、ヒトおよびマウスIL-15に対する反応性など）に対する親抗体の交叉反応性に基づいて、マウスCIAモデルでの検証研究は、「合致されたサロゲート抗体」由来のDVD-Ig分子を用いて実施され得る。要約すると、2つ（以上）のマウス標的特異的抗体を基礎とするDVD-Igを、ヒトDVD-Ig構築のために使用された親ヒトまたはヒト化抗体の特徴に可能な限り合致させ得る（類似の親和性、類似の中和能、類似の半減期など）。

【0298】

4. SLE

SLEの免疫病原性の特徴は、ポリクローナルB細胞活性化であり、これは、高グロブリン血症、自己抗体産生および免疫複合体形成をもたらす。基本的な異常は、全般的なT細胞の調節不全のために、T細胞が禁じられたB細胞クローンを抑制できないことであるように見受けられる。さらに、BおよびT細胞の相互作用は、第二のシグナルを開始する、IL-10ならびにCD40とCD40L、B7およびCD28およびCTLA-4などの共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、免疫複合体およびアポトーシス材料の食細胞性排除の異常とともに、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に参与し得、治療的介入のためのDVD-Ig手法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、IL2、IL4、TNFRSF5、TNFRSF6、TNFSF5、TNFSF6、BLR1、HDAC4、HDAC5、HDAC7A、HDAC9、ICOSL、IGBP1、MS4A1、RGS1、SLA2、CD81、IFNB1、IL10、TNFRSF5、TNFRSF7、TNFSF5、AICDA、BLNK、GALNAC4S-6ST、HDAC4、HDAC5、HDAC7A、HDAC9、IL10、IL11、IL4、INH 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およびNT5E；共刺激シグナル：CTL

A 4 または B 7. 1 / B 7. 2 ; B 細胞生存の阻害 : B l y S、B A F F ; 補体不活化 : C 5 ; サイトカイン調節 : 中心的な原理は、何れかの組織中での正味の生物応答が、炎症促進性サイトカインまたは抗炎症性サイトカインの局所レベル間のバランスの結果であるということである (S f i k a k i s P P e t a l 2 0 0 5 C u r r O p i n R h e u m a t o l 1 7 : 5 5 0 - 7 参照)。S L E は、血清 I L - 4、I L - 6、I L - 1 0 の文献に報告された上昇を伴う、T h 2 によって誘導される疾病であると考えられる。I L - 4、I L - 6、I L - 1 0、I N F - α および T N F - α からなる群から選択される 1 つ以上の標的に結合することが可能な D V D I g も想定される。本明細書において考察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 S L E に対して治療的な効力を増強する (P e n g S L (2 0 0 4) M e t h o d s M o l M e d. ; 1 0 2 : 2 2 7 - 7 2 参照)。ヒトおよびマウスのオルソログ (例えば、ヒトおよびマウス C D 2 0、ヒトおよびマウスインターフェロン α に対する反応性など) に対する親抗体の交叉反応性に基づいて、マウス狼瘡モデルでの検証研究は、「合致されたサロゲート抗体」由来の D V D - I g 分子を用いて実施され得る。要約すると、2 つ (以上) のマウス標的特異的抗体を基礎とする D V D - I g を、ヒト D V D - I g 構築のために使用された親ヒトまたはヒト化抗体の特徴に可能な限り合致させ得る (類似の親和性、類似の中和能、類似の半減期など)。

【0299】

5. 多発性硬化症 (M S)

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

【0300】

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

【0301】

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

【0302】

本発明の一態様は、I L - 1 2、T W E A K、I L - 2 3、C X C L 1 3、C D 4 0、C D 4 0 L、I L - 1 8、V E G F、V L A - 4、T N F、C D 4 5 R B、C D 2 0 0、I F N γ 、G M - C S F、F G F、C 5、C D 5 2 および C C R 2 からなる群から選択される 1 つ以上、例えば 2 つの標的に結合することができる D V D I g 分子に関する。一実施形態には、M S の治療に対して有益な治療剤としての二重特異的抗 I L - 1 2 / T W E A K D V D I g が含まれる。

【0303】

MSを治療するためのDVD分子の有用性を評価するための幾つかの動物モデルが、当分野において公知である (Steinman L, et al., (2005) Trends Immunol. 26 (11): 565-71; Lublin FD., et al., (1985) Springer Semin Immunopathol. 8 (3): 197-208; Genain CP, et al., (1997) J Mol Med. 75 (3): 187-97; Tuohy VK, et al., (1999) J Exp Med. 189 (7): 1033-42; Owens T, et al., (1995) Neurol Clin. 13 (1): 51-73; および Hart B A, et al., (2005) J Immunol 175 (7): 4761-8 参照)。ヒトおよび動物種のオルソログ (例えば、ヒトおよびマウス IL-12、ヒトおよびマウス TWEAK に対する反応性など) に対する親抗体の交叉反応性に基づいて、マウス EAE モデルでの検証研究は、「合致されたサロゲート抗体」由来の DVD-Ig 分子を用いて実施され得る。要約すると、2つ (以上) のマウス標的特異的抗体を基礎とする DVD-Ig を、ヒト DVD-Ig 構築のために使用された親ヒトまたはヒト化抗体の特徴に可能な限り合致させ得る (類似の親和性、類似の中和能、類似の半減期など)。同じ概念が、他の非げっ歯類種の動物モデルにも当てはまる。「合致されたサロゲート抗体」由来の DVD-Ig は、予想される薬理学および可能であれば安全性研究のために選択される。これらの標的対の定型的な安全性評価に加えて、免疫抑制の程度に対する特異的検査が保証され、最高の標的対を選択する上で役立ち得る (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) IDrugs. 3 (4): 442-6) 参照)。

【0304】

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) およびグラム陽性生物 (リポテイコ酸、ペプチドグリカン) の両方の外膜成分によって開始される。これらの外膜成分は、単球の表面上の CD14 受容体に結合することが可能である。最近記載されたツ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 α (TNF- α) およびインターロイキン-1 (IL-1) の最終的な産生をもたらす。圧倒的な炎症性応答および免疫応答は、敗血症性ショックの本質的な特徴であり、敗血症によって誘導される組織損傷、多臓器不全および死亡の発病において中心的な役割を果たす。サイトカイン、特に、腫瘍壊死因子 (TNF) およびインターロイキン (IL) -1 は、敗血症性ショックの極めて重要な媒介物質であることが示されている。これらのサイトカインは、組織に対して直接的な毒性効果を有しており、ホスホリパーゼ A2 も活性化させる。これらの効果および他の効果は、血小板活性化因子の増加した濃度、一酸化窒素合成酵素活性の促進、好中球による組織浸潤の促進および好中球活性の促進をもたらす。

【0305】

敗血症および敗血症性ショックの治療は、なお臨床的な難問であり、炎症性応答を標的とした生物学的応答修飾物質 (即ち、抗 TNF、抗 MIF) を用いた最近の前向き臨床試験は、若干の臨床的有益性を示したに過ぎなかった。最近、免疫抑制の付随期間を逆転させることを目指した治療法に関心が移っている。実験動物および重病の患者における研究は、リンパ系臓器および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、エネルギーおよび臓器系機能不全に寄与することを示している。敗血症症候群の間、リンパ球アポトーシスは、IL-2 の不存在によってまたはグルココルチコイド、グランザイムもしくはいわゆる「死亡 (death)」サイトカイン: 腫瘍壊死因子 α または Fas リガンドの放出によって引き金を引かれ得る。アポトーシスは、Bcl-2 ファミリーのア

ポトーシス促進性のメンバーおよびアポトーシス抑制性のメンバーによって影響を受け得る、細胞質および／またはミトコンドリアのカスパーゼの自己活性化を介して進行する。実験動物では、アポトーシスの阻害剤を用いた治療はリンパ系細胞のアポトーシスを抑制することができるのみならず、予後も改善し得る。抗アポトーシス因子を用いた臨床試験は、主にこれらの投与および組織標的化に伴う技術的困難さが原因で、実現性が低いままであるが、リンパ球アポトーシスの阻害は、敗血症患者に対する魅力的な治療の標的である。同様に、炎症媒介物質およびアポトーシス媒介物質の両方を標的とする二重特異的因子は、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、IL-10、IL-1B、NFKB1、PROC、TNFRSF1A、CSF3、CCR3、IL1RN、MIF、NFKB1、PTAFR、TLR2、TLR4、GPR44、HMOX1、ミッドカイン、IRAK1、NFKB2、SERPINA1、SERPINE1およびTREM1からなる群から選択される、敗血症に関与する1つ以上の標的（一実施形態では、2つの標的）に結合することができるDVD-Igに関する。敗血症に対するこのようなDVD-Igの有効性は、当分野において公知の前臨床動物モデルにおいて評価することが可能である（Buras JA, et al., (2005) Nat Rev Drug Discov. 4 (10): 854-65およびCalandra T, et al., (2000) Nat Med. 6 (2): 164-70) 参照）。

10

【0306】

20

7. 神経疾患

7. 1. 神経変性疾患

慢性の神経変性疾患は、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）、運動の喪失および記憶の喪失によって特徴付けられる年齢依存性の疾患である。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、これらの発達および進行に、様々な要因、例えば、年齢、血糖状態、アミロイド産生および多量体化、RAGE（AGEに対する受容体）に結合する後天的糖化終末産物（AGE; advanced glycation-end product）の蓄積、増加した脳の酸化ストレス、減少した脳の血流、炎症性サイトカインおよびケモカインの放出を含む神経炎症、神経細胞の機能不全およびミク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、複数の細胞種および媒介物質の間で複雑な相互作用を示す。このような疾病に対する治療戦略は限られており、非特異的な抗炎症剤（例えば、コルチコステロイド、COX阻害剤）または神経細胞の喪失および／またはシナプス機能を抑制するための因子で炎症工程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- β ペプチド（A- β オリゴマー形態を含む。）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役立ち得ることを示唆している。これらの予備的な観察は、2つ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- β および炎症促進性サイトカイン（TNFなど））が、単一の疾病機序を標的化する場合に観察されたものより、慢性神経変性疾患に対して、ずっと優れた治療的効果を提供し得ることを示唆している（例えば、可溶性A- β バロン）（C. E. 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. Janelisins, et al., J Neuroinflammation. 2005; 2: 23; Solomon 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 Pa

30

40

50

thol. 2001; 158: 63; Deane R, et al., Nat Med. 2003; 9: 907-13; および Eliezer Masliah, et al., Neuron. 2005; 46: 857 参照)。

【0307】

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 つ以上の標的に結合することができる。このような標的には、AD の発病に關与すると推定されている全ての媒介物質 (可溶性または細胞表面)、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または RAGE を過剰発現し、アルツハイマー病様の症候を発症するトランスジェニックマウスなどの前臨床動物モデルで妥当性を確認することが可能である。さらに、DVD-Ig 分子を構築し、動物モデルで効力について検査することが可能であり、ヒト患者での検査のために、最良の治療的 DVD-Ig を選択することができる。DVD-Ig 分子は、パーキンソン病などの他の神経変性疾患の治療のためにも使用することが可能である。 α -シヌクレインが、パーキンソン病に關与している。 α -シヌクレインおよび炎症性媒介物質 (TNF、IL-1、MCP-1 など) を標的とすることができる DVD-Ig 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。

【0308】

7. 2 神経細胞の再生および脊髄損傷

病的機序の知見の増大に関わらず、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、挫傷または圧迫傷害であり、通常、原発性損傷に続いて、最初の損傷を悪化させ、病変部位の著しい拡大 (特には、10 倍超) をもたらす続発性損傷機序 (炎症媒介物質、例えば、サイトカインおよびケモカイン) が起こる。SCI におけるこれらの原発および続発性の機序は、他の手段、例えば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) の高用量大量瞬時注射は、損傷から 8 時間後という狭い時間枠内で使用される唯一の療法である。しかしながら、この治療は、顕著な機能的回復が全くなしに、続発性損傷を予防することのみを目的としている。明瞭な効果の欠如ならびにその後の感染症を伴う免疫抑制および重い組織病理学的な筋肉の変化などの重い副作用に対して大きな批判が為されている。内在性の再生能を刺激する他の薬物、生物物質または小分子は承認されていないが、有望な治療原理および薬物候補が、近年、SCI の動物モデルにおいて有効性を示している。多くの場合、ヒト SCI における機能的回復の欠如は、病変部位における、瘢痕組織中、ミエリン中および損傷を伴う細胞上における神経突起の増殖を阻害する因子によって引き起こされる。このような因子は、ミエリン随伴タンパク質 NogoA、OMgp および MAG、RGM-A、瘢痕随伴 CSPG (コンドロイチン硫酸プロテオグリカン) および反応性星状膠細胞に対する阻害因子 (一部のセマホリンおよびエフリン) である。しかしながら、病変部位では、増殖阻害分子が見出されるのみならず、ニューロトロフィン、ラミニン、L1 およびその他のような神経突起成長刺激因子も見出される。阻害的な影響の低下が、バランスを、増殖阻害から増殖促進へとシフトさせ得るので、神経突起成長阻害分子と神経突起成長促進分子のこの協調は、NogoA または RGM-A 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 および RGM-A) を遮断し、または神経突起成長阻害分子を遮断し、および神経突起成長増強分子の機能を増強し (例えば、Nogo およびニューロトロフィン)、または神経突起成長阻害分子 (例えば、Nogo) および炎症促進性分子 (例えば、TNF) を遮断することが、望ましい場合があり得る (McGeer 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)。

【0309】

一態様において、NgRおよびRGMA; NogoAおよびRGMA; MAGおよびRGMA; OMgpおよびRGMA; RGMAおよびRGMb; CSPGおよびRGMA; アグレカン、ミッドカイン、ニューロカン、ベルシカン、ホスファカン、Te38およびTNF- α ; 樹状突起および軸索の出芽を促進する抗体と組み合わせられたA β 球状体 (globulomer) 特異的抗体などの標的対に結合することができるDVD-Igが提供される。樹状突起の病変は、ADの極めて早期の兆候であり、NogoAが樹状突起の成長を制限することが知られている。abのこのような種類を、SCI候補 (ミエリンタンパク質) Abの何れかと組み合わせることが可能である。他のDVD-Ig標的は、NgR-p75、NgR-Troy、NgR-Nogo66 (Nogo)、NgR-Lingo、Lingo-Troy、Lingo-p75、MAGまたはOmpgのあらゆる組み合わせを含み得る。さらに、標的には、神経突起の阻害に関与すると推定されている全ての媒介物質 (可溶性または細胞表面)、例えば、Nogo、Ompg、MAG、RGMA、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、IL-1)、ケモカイン (例えば、MIP1a)、神経再生を阻害する分子も含まれ得る。抗nogo/抗RGMAまたは類似のDVD-Ig分子の効力は、脊髄損傷の前臨床動物モデルにおいて、妥当性を確認することが可能である。さらに、これらのDVD-Ig分子を構築し、動物モデルで効力について検査することが可能であり、ヒト患者での検査のために、最良の治療的DVD-Igを選択することができる。さらに、単一の受容体、例えば3つのリガンドNogo、OmpgおよびMAGに結合するNogo受容体ならびにA-bおよびS100Aに結合するRAGE上の2つの異なるリガンド結合部位を標的とするDVD-Ig分子を構築することが可能である。さらに、神経突起成長阻害剤、例えば、nogoおよびnogo受容体は、多発性硬化症のような免疫学的疾患において神経再生を抑制する上でも役割を果たす。nogo-nogo受容体の相互作用の阻害は、多発性硬化症の動物モデルの回復を増強させることが示されている。従って、1つの免疫媒介物質、例えば、IL-12のようなサイトカイン、および神経突起成長阻害分子、例えば、nogoまたはRGMの機能を遮断することができるDVD-Ig分子は、免疫または神経突起成長阻害剤分子のみを遮断するより、より速く、より大きな効力を与え得る。

【0310】

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様式として登場している (von Mehren M, et al 2003 Monoclonal antibody therapy for cancer. Annu Rev Med. ; 54:343-69)。抗体は、アポトーシス、再誘導された細胞毒性、リガンド-受容体相互作用の妨害を誘導し、または新生物表現型にとって不可欠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。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。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。または、抗体は、抗イディオタイプネットワーク、補体媒介性細胞傷害または抗体依存性細胞性細胞傷害 (ADCC) を誘導し得る。2つの別個の腫瘍媒介物質を標的とする二重特異的抗体の使用は、単一特異的療法

に比べて、さらなる有利さを与えるものと思われる。腫瘍疾患を治療するための以下の標的対に結合することができるDVD Igも検討される：IGF1およびIGF2；IGF1／2およびHER-2；VEGFRおよびEGFR；CD20およびCD3；CD138およびCD20；CD38およびCD20；CD38およびCD138；CD40およびCD20；CD138およびCD40；CD38およびCD40；CD-20およびCD-19；CD-20およびEGFR；CD-20およびCD-80；CD-20およびCD-22；CD-3およびHER-2；CD-3およびCD-19；EGFRおよびHER-2；EGFRおよびCD-3；EGFRおよびIGF1, 2；EGFRおよびIGF1R；EGFRおよびRON；EGFRおよびHGF；EGFRおよびc-MET；HER-2およびIGF1, 2；HER-2およびIGF1R；RONおよびHGF；VEGFおよびEGFR；VEGFおよびHER-2；VEGFおよびCD-20；VEGFおよびIGF1, 2；VEGFおよびDLL4；VEGFおよびHGF；VEGFおよびRON；VEGFおよびNRP1；CD20およびCD3；VEGFおよびPLGF；DLL4およびPLGF；Erbb3およびEGFR；HGFおよびErbb3, HER-2およびErbb3；c-MetおよびErbb3；HER-2およびPLGF；HER-2およびHER-2；EGFRおよびEGFR；EGFRおよびDLL-4；EGFRおよびPLGF；EGFRおよびRGMa；EGFRおよび破傷風トキソイド；VEGFおよび破傷風トキソイド；および破傷風トキソイドおよび破傷風トキソイド。

【0311】

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

10

20

30

40

50

CD 2 2 および CD 3 3 ; CD 2 2 および CD 7 4 ; CD 2 2 および CD 1 9 ; CD 2 2
 および DR 5 ; CD 2 2 および DR 4 ; CD 2 2 および VEGF ; CD 2 2 および CD 5
 2 ; CD 3 0 および CD 2 0 ; CD 3 0 および CD 2 2 ; CD 3 0 および CD 2 3 ; CD
 3 0 および CD 4 0 ; CD 3 0 および VEGF ; CD 3 0 および CD 7 4 ; CD 3 0 およ
 び CD 1 9 ; CD 3 0 および DR 5 ; CD 3 0 および DR 4 ; CD 3 0 および VEGFR
 2 ; CD 3 0 および CD 5 2 ; CD 3 0 および CD 4 ; CD 1 3 8 および RANKL ; C
 D 3 3 および FTL 3 ; CD 3 3 および VEGF ; CD 3 3 および VEGFR 2 ; CD 3
 3 および CD 4 4 ; CD 3 3 および DR 4 ; CD 3 3 および DR 5 ; DR 4 および CD 1
 3 7 ; DR 4 および IGF 1, 2 ; DR 4 および IGF 1 R ; DR 4 および DR 5 ; DR
 5 および CD 4 0 ; DR 5 および CD 1 3 7 ; DR 5 および CD 2 0 ; DR 5 および EG
 FR ; DR 5 および IGF 1, 2 ; DR 5 および IGFR, DR 5 および HER-2, E
 GFR および DLL 4 に結合することができる。他の標的の組み合わせには、EGF/e
 rb-2/e rb-3 ファミリーの 1 つ以上のメンバーが含まれる。DVD Ig が結合し
 得る、腫瘍疾患に關与する他の標的 (1 つ以上) には、CD 5 2、CD 2 0、CD 1 9、
 CD 3、CD 4、CD 8、BMP 6、IL 1 2 A、IL 1 A、IL 1 B、IL 2、IL 2
 4、INHA、TNF、TNFSF 1 0、BMP 6、EGF、FGF 1、FGF 1 0、F
 GF 1 1、FGF 1 2、FGF 1 3、FGF 1 4、FGF 1 6、FGF 1 7、FGF 1 8
 、FGF 1 9、FGF 2、FGF 2 0、FGF 2 1、FGF 2 2、FGF 2 3、FGF 3
 、FGF 4、FGF 5、FGF 6、FGF 7、FGF 8、FGF 9、GRP、IGF 1、
 IGF 2、IL 1 2 A、IL 1 A、IL 1 B、IL 2、INHA、TGFA、TGFB 1
 、TGFB 2、TGFB 3、VEGF、CDK 2、FGF 1 0、FGF 1 8、FGF 2、
 FGF 4、FGF 7、IGF 1 R、IL 2、BCL 2、CD 1 6 4、CDKN 1 A、CD
 KN 1 B、CDKN 1 C、CDKN 2 A、CDKN 2 B、CDKN 2 C、CDKN 3、G
 NRH 1、IGFBP 6、IL 1 A、IL 1 B、ODZ 1、PAWR、PLG、TGFB
 1 I 1、AR、BRCA 1、CDK 3、CDK 4、CDK 5、CDK 6、CDK 7、CD
 K 9、E 2 F 1、EGFR、ENO 1、ERBB 2、ESR 1、ESR 2、IGFBP 3
 、IGFBP 6、IL 2、INSL 4、MYC、NOX 5、NR 6 A 1、PAP、PCN
 A、PRKCQ、PRKD 1、PRL、TP 5 3、FGF 2 2、FGF 2 3、FGF 9、
 IGFBP 3、IL 2、INHA、KLK 6、TP 5 3、CHGB、GNRH 1、IGF
 1、IGF 2、INHA、INSL 3、INSL 4、PRL、KLK 6、SHBG、NR
 1 D 1、NR 1 H 3、NR 1 I 3、NR 2 F 6、NR 4 A 3、ESR 1、ESR 2、NR
 0 B 1、NR 0 B 2、NR 1 D 2、NR 1 H 2、NR 1 H 4、NR 1 I 2、NR 2 C 1、
 NR 2 C 2、NR 2 E 1、NR 2 E 3、NR 2 F 1、NR 2 F 2、NR 3 C 1、NR 3 C
 2、NR 4 A 1、NR 4 A 2、NR 5 A 1、NR 5 A 2、NR 6 A 1、PGR、RAR B
 、FGF 1、FGF 2、FGF 6、KLK 3、KRT 1、APOC 1、BRCA 1、CH
 GA、CHGB、CLU、COL 1 A 1、COL 6 A 1、EGF、ERBB 2、ERK 8
 、FGF 1、FGF 1 0、FGF 1 1、FGF 1 3、FGF 1 4、FGF 1 6、FGF 1
 7、FGF 1 8、FGF 2、FGF 2 0、FGF 2 1、FGF 2 2、FGF 2 3、FGF
 3、FGF 4、FGF 5、FGF 6、FGF 7、FGF 8、FGF 9、GNRH 1、IG
 F 1、IGF 2、IGFBP 3、IGFBP 6、IL 1 2 A、IL 1 A、IL 1 B、IL
 2、IL 2 4、INHA、INSL 3、INSL 4、KLK 1 0、KLK 1 2、KLK 1
 3、KLK 1 4、KLK 1 5、KLK 3、KLK 4、KLK 5、KLK 6、KLK 9、M
 MP 2、MMP 9、MSMB、NTN 4、ODZ 1、PAP、PLAU、PRL、PSA
 P、SERPINA 3、SHBG、TGFA、TIMP 3、CD 4 4、CDH 1、CDH
 1 0、CDH 1 9、CDH 2 0、CDH 7、CDH 9、CDH 1、CDH 1 0、CDH 1
 3、CDH 1 8、CDH 1 9、CDH 2 0、CDH 7、CDH 8、CDH 9、ROBO 2
 、CD 4 4、ILK、ITGA 1、APC、CD 1 6 4、COL 6 A 1、MTSS 1、P
 AP、TGFB 1 I 1、AGR 2、AIG 1、AKAP 1、AKAP 2、CANT 1、C
 AV 1、CDH 1 2、CLDN 3、CLN 3、CYB 5、CYC 1、DAB 2 IP、DE
 S、DNCL 1、ELAC 2、ENO 2、ENO 3、FASN、FLJ 1 2 5 8 4、FL

10

20

30

40

50

J25530、GAGEB1、GAGEC1、GGT1、GSTP1、HIP1、HUMCYT2A、IL29、K6HF、KAI1、KRT2A、MIB1、PART1、PATE、PCA3、PIAS2、PIK3CG、PPID、PR1、PSCA、SLC2A2、SLC33A1、SLC43A1、STEAP、STEAP2、TPM1、TPM2、TRPC6、ANGPT1、ANGPT2、ANPEP、ECGF1、EREG、FGF1、FGF2、FIGF、FLT1、JAG1、KDR、LAMA5、NRP1、NRP2、PGF、PLXDC1、STAB1、VEGF、VEGFC、ANGPTL3、BAI1、COL4A3、IL8、LAMA5、NRP1、NRP2、STAB1、ANGPTL4、PECAM1、PF4、PROK2、SERPINF1、TNFAIP2、CCL11、CCL2、CXCL1、CXCL10、CXCL3、CXCL5、CXCL6、CXCL9、IFNA1、IFNB1、IFNG、IL1B、IL6、MDK、EDG1、EFNA1、EFNA3、EFNB2、EGF、EPHB4、FGFR3、HGF、IGF1、ITGB3、PDGFA、TEK、TGFA、TGFB1、TGFB2、TGFB1、CCL2、CDH5、COL18A1、EDG1、ENG、ITGAV、ITGB3、THBS1、THBS2、BAD、BAG1、BCL2、CCNA1、CCNA2、CCND1、CCNE1、CCNE2、CDH1 (E-カドヘリン)、CDKN1B (p27Kip1)、CDKN2A (p16INK4a)、COL6A1、CTNNB1 (b-カテニン)、CTSB (カテプシンB)、ERBB2 (Her-2)、ESR1、ESR2、F3 (TF)、FOSL1 (FRA-1)、GATA3、GSN (ゲルソリン)、IGFBP2、IL2RA、IL6、IL6R、IL6ST (糖タンパク質130)、ITGA6 (a6インテグリン)、JUN、KLK5、KRT19、MAP2K7 (c-Jun)、MKI67 (Ki-67)、NGFB (NGF)、NGFR、NME1 (NM23A)、PGR、PLAU (uPA)、PTEN、SERPINB5 (マスピン)、SERPINE1 (PAI-1)、TGFA、THBS1 (トロンボスポンジン-1)、TIE (Tie-1)、TNFRSF6 (Fas)、TNFSF6 (FasL)、TOP2A (トポイソメラーゼIIa)、TP53、AZGP1 (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II型ケラチン)、MACMARCKS、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およびTNFAIP2 (B94)、RON、c-Met、CD64、DLL4、PLGF、CTLA4、ホスファチジルセリン (phosphatidylserine)、ROBO4、CD80、CD22、CD40、CD23、CD28、CD80、CD55、CD38、CD70、CD74、CD30、CD138、CD56、CD33、CD2、CD137、DR4、DR5、RANKL、VEGFR2、PDGFR、VEGFR1、MTSP1、MSP、EPHB2、EPHA1、EPHA2、EPCAM、PGE2、NKG2D、LPA、SIP、APRIL、BCMA、MAPG、FLT3、PDGFR α 、PDGFR β 、ROR1、PSMA、PSCA、SCD1およびCD59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。

【0312】

IV. 医薬組成物

本発明は、本発明の結合タンパク質と、および医薬的に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、もしくはモニタリングし、疾患または1つ以上のこの症候を予防し、治療し、管理し、もしくは軽減する上で、および／または研究において使用されるが、これらに限定されない

。特定の実施形態において、組成物は、1つ以上の本発明の結合タンパク質を含む。別の実施形態において、医薬組成物は、1つ以上の本発明の結合タンパク質と、およ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つ以上の予防または治療剤とを含む。一実施形態において、予防剤または治療剤は、疾患または1つ以上のこの症候の予防、治療、管理または軽減に有用であることが知られており、または疾患または1つ以上のこの症候の予防、治療、管理または軽減においてこれまで使用されており、もしくは現在使用されている。これらの実施形態に従えば、組成物は、担体、希釈剤または賦形剤をさらに含み得る。

【0313】

本発明の結合タンパク質は、対象への投与に適した医薬組成物中に取り込ませることができる。典型的には、医薬組成物は、本発明の結合タンパク質と医薬的に許容される担体とを含む。本明細書において使用される、「医薬的に許容される担体」には、生理的に適合的であるあらゆる全ての溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張および吸収遅延剤などが含まれる。医薬的に許容される担体の例には、水、生理的食塩水、リン酸緩衝化された生理的食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなどの1つ以上ならびにこれらの組み合わせが含まれる。幾つかの実施形態において、等張剤（例えば、糖、マニトール、ソルビトールなどの多価アルコールまたは塩化ナトリウム）が組成物中に含まれる。医薬的に許容される担体は、抗体または抗体部分の保存寿命または有効性を増強する湿潤または乳化剤、防腐剤または緩衝剤などの補助物質の微量をさらに含み得る。

【0314】

様々な送達系が公知であり、例えば、リボソーム、微粒子、ミクロカプセル、抗体または抗体断片を発現することができる組み換え細胞、受容体によって媒介されるエンドサイトーシス（例えば、Wu and Wu, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432 (1987) 参照）、レトロウイルスまたは他のベクターの一部としての核酸の構築物などの中に封入して、本発明の1つ以上の抗体または本発明の1つ以上の抗体および疾患または1つ以上のこの症候を予防し、管理し、治療し、もしくは軽減するのに有用な予防剤または治療剤の組み合わせを投与するために使用することが可能である。本発明の予防剤または治療剤を投与する方法には、非経口投与（例えば、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内および皮下）、硬膜外投与、腫瘍内投与および粘膜投与（例えば、鼻内および経口経路）が含まれるが、これらに限定されない。さらに、例えば、吸入装置または噴霧器およびエアロゾル化剤を加えた製剤の使用によって、経肺投与を使用することが可能である。例えば、米国特許番号6,019,968、米国特許番号5,985,320、米国特許番号5,985,309、米国特許番号5,934,272、米国特許番号5,874,064、米国特許番号5,855,913；米国特許番号5,290,540および米国特許番号4,880,078；ならびにPCT公開WO92/19244、WO97/32572、WO97/44013、WO98/31346およびWO99/66903（これらの各々は、参照によりこ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、組み合わせ療法または本発明の組成物は、Alkermes AIR（登録商標）経肺薬物送達技術（Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.）を用いて投与される。特定の実施形態において、本発明の予防剤または治療剤は、筋肉内、静脈内、腫瘍内、経口、鼻内、経肺または皮下投与される。予防剤または治療剤は、あらゆる都合のよい経路によって、例えば、注入もしくはボーラス注射によって、上皮または粘膜皮下の裏打ち（例えば、口粘膜、直腸および腸粘膜など）を通じた吸収によって投与され得、および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、全身または局所であり得る。

【0315】

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、本発明の予防剤または治療剤を投与することが望ましい場合があり得る。これは、例えば、局所的注入によって、注射によって、またはインプラントの手段によって達成され得るが、これらに限定さ

10

20

30

40

50

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 1 (登録商標)) またはコラーゲンマトリックスなどの、膜およびマトリックスを含む多孔性または非多孔性材料である。一実施形態において、本発明の1つ以上の抗体アンタゴニストの有効量は、疾患またはこの症候を予防し、治療し、管理し、および／または軽減するために、対象の罹患した部位へ局所的に投与される。別の実施形態において、本発明の1つ以上の抗体の有効量は、疾患または1つ以上のこの症候を予防し、治療し、管理し、および／または軽減するために、本発明の結合タンパク質以外の1つ以上の治療薬 (例えば、1つ以上の予防剤または治療剤) の有効量と組み合わせて、対象の罹患した部位へ局所的に投与される。

【0316】

別の実施形態において、予防剤または治療剤は、調節された放出系または徐放系に入れて送達することが可能である。一実施形態において、調節された放出または徐放を達成するためにポンプを使用し得る (Langer, 上記; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:20; Buchwald et al., 1980, Surgery 88:507; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574 参照)。別の実施形態において、本発明の治療薬の調節された放出または徐放を達成するために、ポリマー材料を使用することが可能である (例えば、Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC 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; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71:105); 米国特許番号5, 679, 377; 米国特許番号5, 916, 597; 米国特許番号5, 912, 015; 米国特許番号5, 989, 463; 米国特許番号5, 128, 326; PCT公開WO99/15154; およびPCT公開WO99/20253も参照されたい。徐放製剤中で使用されるポリマーの例には、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、ポリ(メチルメタクリレート)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(エチレン-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) およびポリオルトエステルが含まれるが、これらに限定されるものではない。一実施形態において、徐放製剤中で使用されるポリマーは、不活性であり、溶脱可能な不純物を含まず、保存時に安定であり、無菌であり、および生物分解性である。さらに別の実施形態において、調節された放出系または徐放系は、予防剤または治療剤の近くに配置されて、全身投薬量の一部のみを必要とするようにすることができる (例えば、Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, 上記, vol. 2, pp. 115-138 (1984) 参照)。

【0317】

徐放系は、Langer (1990, Science 249:1527-1533) による概説中に考察されている。本発明の1つ以上の治療剤を含む徐放製剤を作製するために、当業者に公知のあらゆる技術を使用することが可能である。例えば、米国特許番号4, 526, 938、PCT公開WO91/05548、PCT公開WO96/20698、Ning et al., 1996, 「Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel,」 R

10

20

30

40

50

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、参照によりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。)を参照されたい。

10

20

30

40

50

【0318】

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

【0319】

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

【0320】

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または当業者に周知の他の形態で製剤化することが可能である。例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19th ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995)」を参照されたい。一実施形態において、噴霧不能な局所剤形の場合には、局所適用に適合性のある担体または1つ以上の賦形剤を含み、および水より大きな動粘性係数を有する粘性から半固体または固体の形態が使用される。適切な製剤は、所望であれば、滅菌され、または、例えば、浸透圧などの様々な特性に影響を及ぼすための補助剤（例えば、防腐剤、安定化剤、湿潤剤、緩衝剤または塩）と混合された、溶液、懸濁液、エマルジョン、クリーム、軟膏（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、一実施形態において、固体または液体不活性担体と組み合わせられた活性成分が、加圧された揮発性物質（例えば、フレ

オンなどの気体状噴射剤)との混合物中または搾り出し瓶中に梱包されている噴霧可能なエアロゾル調製物が含まれる。所望であれば、医薬組成物および剤形に、加湿剤または湿潤剤も添加することが可能である。このような追加の成分の例は、当分野において周知である。

【0321】

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

【0322】

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

【0323】

本発明の方法は、例えば、吸入装置または噴霧器の使用、エアロゾル化剤とともに製剤化された組成物の使用による経肺投与を含み得る。例えば、米国特許番号6,019,968、米国特許番号5,985,320、米国特許番号5,985,309、米国特許番号5,934,272、米国特許番号5,874,064、米国特許番号5,855,913、米国特許番号5,290,540および米国特許番号4,880,078；ならびにPCT公開WO92/19244、WO97/32572、WO97/44013、WO98/31346およびWO99/66903（これらの各々は、参照によりこ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、組み合わせ療法および／または本発明の組成物は、Alkermes AIR（登録商標）経肺薬物送達技術（Alkermes, Inc. Cambridge, Mass.）を用いて投与される。

【0324】

本発明の方法は、注射による（例えば、大量瞬時注射または連続的注入による）非経口投与のために製剤化された組成物の投与を含み得る。注射用製剤は、添加された防腐剤とともに、単位剤形で（例えば、アンプルまたは複数投薬容器に入れて）与え得る。組成物

は、油性または水性ビヒクル中の懸濁液、溶液またはエマルジョンなどの形態を採り得、懸濁剤、安定化剤および／または分散剤などの処方剤を含有し得る。または、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。

【0325】

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、皮下または筋肉内への）植え込みによって、または筋肉内注射によって投与され得る。従って、例えば、組成物は、適切なポリマー材料もしくは疎水性材料（例えば、許容される油中のエマルジョンとして）またはイオン交換樹脂とともに、または難溶性誘導体として（例えば、難溶性塩として）調合され得る。

10

【0326】

本発明の方法は、中性または塩形態として製剤化された組成物の投与を包含する。医薬的に許容される塩には、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、および水酸化ナトリウム、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。

【0327】

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

20

【0328】

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

30

40

【0329】

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。一実施形態において、抗体または抗体部分は、0.1から250mg/mLの

50

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、フリントまたはアンバーバイアル、アンプルまたは事前に充たしたシリンジにおける液体または凍結乾燥された剤形から構成することができる。緩衝液は、pH 5.0から7.0（最適にはpH 6.0）のL-ヒスチジン（1から50 mM）、最適には5から10 mMであり得る。他の適切な緩衝液には、コハク酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、リン酸ナトリウムまたはリン酸カリウムが含まれるが、これらに限定されない。0から300 mMの濃度に（最適には、液体剤形に対して150 mM）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、トレハロースおよびラクトースが含まれる。凍結乾燥された剤形に対して、充填剤、主に、1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。液体および凍結乾燥された両剤形において、安定化剤、主に1から50 mMのL-メチオニン（最適には、5から10 mM）を使用することができる。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およびBRIJ界面活性剤が含まれるが、これらに限定されない。非経口投与用の注射可能な溶液として調製された本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）の吸収または分散を増加させるために使用されるものなど、アジュバントとして有用な因子をさらに含むことができる。特に有用なアジュバントは、Hylenex（登録商標）（組み換えヒトヒアルロニダーゼ）などのヒアルロニダーゼである。注射可能な溶液中へのヒアルロニダーゼの添加は、非経口投与、特に皮下投与後に、ヒト生物学的利用可能性を改善する。注射可能な溶液中へのヒアルロニダーゼの添加は、痛みおよび不快感がより小さく、およ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（即ち、1 mLより大きい。）も可能にする（参照により本明細書に組み込まれるWO 2004 078 140およびUS 2006 10 49 68を参照）。

【0330】

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

【0331】

治療組成物は、典型的には、製造および保存の条件下で、無菌および安定でなければならない。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、分散液、リポソームまたは高薬物濃度に適したその他の秩序化された構造として製剤化することができる。無菌注射可能溶液は、本明細書に列記されている成分の1つまたは組み合わせを加えた適切な溶媒中に、必要な量で活性な化合物（即ち、抗体、抗体部分）を取り込ませ、その後、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。一般に、分散液は、塩基性分散溶媒および本明細書に列記されたものから得られる必要なその他の成分を含有する無菌ビヒクル中に活性化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、調製の方法は、予め滅菌ろ過されたこの溶液から、あらゆる追加の所望される成分を加えた活性成分の粉末を与える真空乾燥および粉末乾燥である。溶液の適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングを使用することによって、分散液の場合には、必要とされる粒径を維持することによって、および界面活性剤を使用することによって維持することができる。注射可能組成物の延長された吸収は、

吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸塩およびゼラチンを組成物中に含めることによって実現することができる。

【0332】

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

10

【0333】

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、不活性希釈剤または同化可能な食用担体とともに経口投与され得る。また、化合物（および、所望であれば、その他の成分）は、硬いもしくは軟い殻のゼラチンカプセル中に封入され、錠剤へと圧縮され、または対象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、この不活化を妨げるための物質で化合物を被覆し、またはこの不活化を妨げるための物質とともに化合物を同時投与することが必要であり得る。

20

【0334】

補助的活性化合物も、組成物中に取り込ませることが可能である。ある種の実施形態において、本発明の結合タンパク質は、本発明の結合タンパク質を用いて疾患を治療するのに有用である、1つ以上のさらなる治療剤とともに共製剤化され、および／または同時投与される。例えば、本発明の結合タンパク質は、他の錠剤に結合する1つ以上のさらなる抗体（例えば、他のサイトカインに結合する抗体または細胞表面分子に結合する抗体）とともに共製剤化され、および／または同時投与され得る。さらに、本発明の1つ以上の抗体は、先述の治療剤の2つ以上と組み合わせて使用され得る。このような組み合わせ療法は、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、様々な単独療法に付随する可能性がある毒性または合併症が回避される。

30

【0335】

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

40

【0336】

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

【0337】

本発明に従って、当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

50

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); およびMorgan and Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217; May, 1993, TIBTECH 11(5):155-215を参照されたい。使用可能な組み換えDNA技術の分野で一般的に知られた方法は、Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); およびKriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990)に記載されている。遺伝子治療の様々な方法の詳細な記述は、参照により本明細書に組み込まれるUS20050004266A1に開示されている。

10

【0338】

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、若年性慢性関節炎、敗血症性関節炎、ライム関節炎、乾癬性関節炎、反応性関節炎、脊椎関節症、全身性紅斑性狼瘡、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、インシュリン依存性糖尿病、甲状腺炎、喘息、アレルギー性疾患、乾癬、皮膚炎、強皮症、移植片対宿主病、臓器移植拒絶、臓器移植に関連する急性または慢性免疫疾患、サルコイドーシス、アテローム性動脈硬化症、播種性血管内凝固、川崎病、バセドウ病、ネフローゼ症候群、慢性疲労症候群、ウェゲナー肉芽腫症、ヘノッホ・シェーライン紫斑症、腎臓の顕微鏡的血管炎、慢性活動性肝炎、ブドウ膜炎、敗血症性ショック、毒素性ショック症候群、敗血症症候群、悪液質、感染性疾患、寄生性疾患、後天性免疫不全症候群、急性横断性脊髄炎、ハンチントン舞蹈病、パーキンソン病、アルツハイマー病、発作、原発性胆汁性肝硬変、溶血性貧血、悪性腫瘍、心不全、心筋梗塞、アジソン病、孤発性の、多内分泌腺機能低下症候群Ⅰ型および多内分泌腺機能低下症候群Ⅱ型、シュミット症候群、成人（急性）呼吸促進症候群、脱毛症、円形脱毛症、血清反応陰性関節症、関節症、ライター病、乾癬性関節症、潰瘍性大腸性関節症、腸疾患性滑膜炎、クラミジア、エルシニアおよびサルモネラ関連関節症、脊椎関節症、アテローム性疾患／動脈硬化症、アトピー性アレルギー、自己免疫性水疱性疾患、尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、類天疱瘡、線状IgA病、自己免疫性溶血性貧血、クームス陽性溶血性貧血、後天性悪性貧血、若年性悪性貧血、筋痛性脳炎／ロイアルフリー病、慢性粘膜皮膚カンジダ症、巨細胞性動脈炎、原発性硬化性肝炎、突発性自己免疫性肝炎、後天性免疫不全症候群、後天性免疫不全症関連疾患、B型肝炎、C型肝炎、分類不能型免疫不全症（分類不能型低γ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、突発性繊維化性肺炎、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、痛風関節炎、自己免疫性肝炎、1型自己免疫性肝炎（古典的自己免疫性またはルポイド肝炎）、2型自己免疫性肝炎（抗LKM抗体肝炎）、自己免疫媒介性低血糖症、黒色表皮腫を伴うB型インシュリン抵抗性、副甲状腺機能低下症、臓器移植に関連する急性免疫疾患、臓器移植に関連する慢性免疫疾患、変形性関節症、原発性硬化性胆管炎、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NOS、糸球体腎炎、腎臓の顕微鏡的血管炎、ライム病、円板状紅斑性狼瘡、男性

20

30

40

50

不妊症特発性またはNOS、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、アレルギーおよび喘息、B群
 連鎖球菌（GBS）感染、精神障害（例えば、うつ病および統合失調症）、Th2型およ
 びTh1型によって媒介される疾病、急性および慢性疼痛（疼痛の様々な形態）、ならび
 に、肺癌、乳癌、胃癌、膀胱癌、大腸癌、膵臓癌、卵巣癌、前立腺癌および直腸癌および
 造血性悪性病変（白血病およびリンパ腫）などの癌、無βリポタンパク質血症、先端チア
 ノーゼ、急性および慢性寄生性または感染性工程、急性白血病、急性リンパ芽球性白血病
 （ALL）、急性骨髄性白血病（AML）、急性または慢性細菌感染、急性肺炎、急性腎
 不全、腺癌、心房（aerial）異所性拍動、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、α-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（antireceptor
 hypersensitivity reactions）、大動脈および末梢動
 脈瘤、大動脈解離、動脈性高血圧、動脈硬化症、動静脈瘻、運動失調、心房細動（持続的
 または発作性）、心房粗動、房室ブロック、B細胞リンパ腫、骨移植拒絶、骨髄移植（B
 MT）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（c
 ardiac stunsyndrome）、心臓腫瘍、心筋症、心肺バイパス炎症反
 応、軟骨移植拒絶、小脳皮質変性、小脳疾患、無秩序なまたは多巣性心房頻脈、化学療法
 関連疾患、慢性（chronic）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、
 クロイツフェルトーヤコブ病、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、中枢神経系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障害、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、錐体外路および小脳疾患、家族性血球
 貪食性リンパ組織球症（familial hematomphagocytic lym
 phohistiocytosis）、致死性胸腺移植拒絶、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、何れかの臓器または
 組織の移植片拒絶、グラム陰性敗血症、グラム陽性敗血症、細胞内生物に起因する肉芽腫
 、有毛細胞白血病、ハラールホルデン・スパッツ病、橋本甲状腺炎、枯草熱、心臓移植拒絶
 、血色素症、血液透析、溶血性尿毒症症候群／血栓溶解血小板減少紫斑病、出血、肝炎（
 A型）、ヒス束不整脈、HIV感染／HIV神経障害、ホジキン病、運動過剰性運動障害
 、過敏症反応、過敏性肺炎、高血圧、運動低下性運動障害、視床下部一下垂体一副腎皮質
 系評価、特発性アジソン病、特発性肺繊維症、抗体媒介性細胞傷害、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（lipidema）、肝臓移植拒絶、リンパ浮腫（lymphed
 erma）、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（meningococcemia）、代謝性／特発性疾患、偏頭痛、ミトコンド
 リア多系疾患（mitochondrial multisystem disord

10

20

30

40

50

er)、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 シャイードレーガーおよびマシャド・ジョセフ)、重症筋無力症、マイコバクテリウム・アビウム・イントラセルラーレ、マイコバクテリウム・チューバキュロシス、骨髄異形成症候群、心筋梗塞、心筋虚血疾患、上咽頭癌、新生児慢性肺疾患、腎炎、ネフローゼ、神経変性疾患、神経原性I筋萎縮、好中球減少性発熱、非ホジキンリンパ腫、腹部大動脈およびこの分枝の閉塞、閉塞性動脈疾患、okt3療法、精巣炎/精巣上体炎、精巣炎/精管復元術処置、臓器肥大、骨粗鬆症、脾臓移植拒絶、脾癌、腫瘍随伴性症候群/悪性腫瘍の高カルシウム血症、副甲状腺移植拒絶、骨盤内炎症性疾患、通年性鼻炎、心膜疾患、末梢性アテローム性動脈硬化疾患、末梢血管疾患、腹膜炎、悪性貧血、ニューモシスチス・カリニ肺炎、肺炎、POEMS症候群(多発神経炎、臓器肥大、内分泌疾患、単クローン性γグロブリン血症および皮膚変化症候群(skin changes syndrome))、灌流後症候群(post perfusion syndrome)、ポンプ後症候群(post pump syndrome)、心筋梗塞後開心術症候群、子癇前症、進行性核上性麻痺、原発性肺高血圧、放射線療法、レイノー現象および病、レイノー病、レフサム病、規則的なQRS幅の狭い頻脈症(regular narrow QRS tachycardia)、腎血管性高血圧、再灌流障害、拘束型心筋症、肉腫、強皮症、老年性舞蹈病、レビー小体型の老年性認知症、血清反応陰性関節症、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、失神、心血管系の梅毒、全身性アナフィラキシー、全身性炎症反応症候群、全身性発症若年性関節リウマチ、T細胞またはFAB ALL、毛細血管拡張症、閉塞性血栓血管炎、血小板減少症、毒性、移植、外傷/出血、III型過敏症反応、IV型過敏症、不安定狭心症、尿毒症、尿路性敗血症、じんましん、心臓弁膜症、静脈瘤、血管炎、静脈疾患、静脈血栓症、心室細動、ウイルスおよび真菌感染、ウイルス性脳炎(vital encephalitis)/無菌性髄膜炎、ウイルス関連血球貪食症候群、ウェルニッケー・コルサコフ症候群、ウィルソン病、何れかの臓器または組織の異種移植拒絶が含まれるが、これらに限定されない(Peritt et al., PCT公開WO2002097048A2, Leonard et al., PCT公開WO9524918A1およびSalfeld et al., PCT公開WO00/56772A1参照)。

【0339】

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の、炎症を伴う自己免疫疾患を罹患しているヒトを治療するために使用することができる。一実施形態において、本発明またはこの抗原結合部分の結合タンパク質は、リウマチ性関節炎、クローン病、複数の硬化、インシュリン依存性糖尿病および乾癬に使用される。

【0340】

一実施形態において、本発明の組成物および方法を用いて治療または診断することができる疾病には、乳癌、大腸癌、直腸癌、肺癌、口腔咽頭癌、下咽頭癌、食道癌、胃癌、脾臓癌、肝臓癌、胆嚢および胆管癌、小腸癌、尿路癌(腎臓、膀胱および尿路上皮を含む。)、雌性生殖路(子宮頸部、子宮および卵巣ならびに絨毛癌および妊娠性絨毛性疾患を含む。)、雄性生殖路(前立腺、精嚢、精巣および胚細胞腫瘍を含む。)、内分泌腺癌(甲状腺、副腎および下垂体を含む。)および皮膚癌ならびに血管腫、悪性黒色腫、肉腫(骨および軟組織から生じる肉腫ならびにカボジ肉腫を含む。)、脳、神経、眼の腫瘍および髄膜(星状膠細胞腫、神経膠腫、神経膠芽腫、網膜芽細胞腫、神経腫、神経芽細胞腫、シュワン細胞腫および髄膜腫を含む。)、白血病およびリンパ腫(ホジキンおよび非ホジキンリンパ腫の両方)などの造血系悪性腫瘍から生じる固形腫瘍などの、原発性および転移性癌が含まれるが、これらに限定されない。

【0341】

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

【0342】

本発明の抗体またはこの抗原結合部分は、DNAアルキル化剤、シスプラチン、カルボプラチン、抗チューブリン剤、パクリタキセル、ドセタキセル、タキソール、ドキシソルビン、ゲムシタビン、ゲムザール、アンスラサイクリン、アドリアマイシン、トポイソメラーゼI阻害剤、トポイソメラーゼII阻害剤、5-フルオロウラシル(5-FU)、ロイコボリン、イリノテカン、受容体チロシンキナーゼ阻害剤(例えば、エルロチニブ、ゲフェチニブ)、COX-2阻害剤(例えば、セレコキシブ)、キナーゼ阻害剤およびsiRNAなどの抗新生物剤、放射線療法、化学療法を含む(ただし、これらに限定されない。)因子とともに組み合わせられ得る。

10

【0343】

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。

【0344】

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、または組み合わせて使用することが可能である。結合タンパク質は、単独で、または追加の因子、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、こ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または症状を治療するのに有用であると当分野で認識されている治療剤であり得る。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できる。

20

【0345】

本発明に含まれるべき組み合わせは、こ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、本発明の抗体および以下のリストから選択される少なくとも1つの追加の因子であり得る。当該組み合わせにおいて、形成された組成物がこの意図される機能を発揮することが可能であれば、組み合わせは、2つ以上の追加の因子、例えば、2または3個の追加の因子を含むこともできる。

30

【0346】

自己免疫疾患および炎症性疾患を治療するための組み合わせは、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DVDIgと組み合わせて患者を治療するときに必要とされるステロイド用量を徐々に減らすことによって、低減することが可能であり、または除去することさえ可能である。本発明の抗体また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または成長因子(例えば、TNF、LT、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-15、IL-16、IL-18、IL-21、IL-23、インターフェロン、EMA-P-11、GM-CSF、FGFおよびPDGF)に対する抗体またはこれらのアンタゴニストが含まれる。本発明の結合タンパク質またはこの抗原結合部分は、CD2、CD3、CD4、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD80(B7.1)、CD86(B7.2)、CD90、CTLAまたはCD154を含むこれらのリガンド(gp39またはCD40L)などの細胞表面分子に対する抗体と組み合わせることが可能である。

40

【0347】

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

50

ドを干渉し得る。例には、キメラ、ヒト化またはヒトTNF抗体、ADALIMUMAB、(PCT公開WO97/29131)、CA2(Remicade(商標))、CDP571、および可溶性p55またはp75TNF受容体、これらの誘導体、(p75TNFRlgG(Enbrel(商標))またはp55TNFRlgG(Lenercept))およびTNF α 変換酵素(TACE)阻害剤などのようなTNFアンタゴニストが含まれる。同様にIL-1阻害剤(インターロイキン-1変換酵素阻害剤、IL-1RAなど)は、同じ理由のために有効であり得る。他の組み合わせには、インターロイキン11が含まれる。さらに別組み合わせには、IL-12機能と平行して、IL-12機能に依存して、またはIL-12と協調して作用し得る自己免疫応答の中心的プレーヤーが含まれる。特に、IL-18抗体または可溶性IL-18受容体またはIL-18結合タンパク質などのIL-18アンタゴニストである。IL-12およびIL-18は、重複しているが、異なる機能を有しており、両者に対するアンタゴニストの組み合わせは、最も有効であり得ることが示されている。さらに別の組み合わせは、非枯渇性抗CD4阻害剤である。さらに別の組み合わせには、抗体、可溶性受容体または拮抗性リガンドを含む、共同刺激経路CD80(B7.1)またはCD86(B7.2)のアンタゴニストが含まれる。

10

【0348】

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ン、ペニシラミン、金チオリンゴ酸塩(筋肉内および経口)、アザチオプリン、コルヒチン(cocchine)、コルチコステロイド(経口、吸入および局所注射)、 β -2アドレナリン作動性受容体アゴニスト(サルブタモール、テルブタリン、サルメテラル)、キサンチン(テオフィリン、アミノフィリン)、クロモグリカート、ネドクロミル、ケトチフェン、イプラトロピウムおよびオキシトロピウム、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、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- α またはIL-1などの炎症促進性サイトカインによるシグナル伝達を妨害する因子(例えば、IRAK、NIK、IKK、p38またはMAPキナーゼ阻害剤)、IL-1 β 変換酵素阻害剤、TNF α 変換酵素(TACE)阻害剤、キナーゼ阻害剤などのT細胞シグナル伝達阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、スルファサラジン、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、可溶性サイトカイン受容体およびこれらの誘導体(例えば、可溶性p55またはp75TNF受容体および誘導体p75TNFRlgG(Enbrel(商標))およびp55TNFRlgG(Lenercept))、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R)、炎症抑制性サイトカイン(例えば、IL-4、IL-10、IL-11、IL-13およびTGF β)、セレコキシブ、葉酸、硫酸ヒドロキシクロロキン、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、トリアムシノロン・アセトニド、プロボキシフェンナブシラート/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/fa/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

20

30

40

50

スト、IC-485、CDC-801およびメソプラムなどの因子とも組み合わせられ得る。組み合わせには、メトトレキサートまたはレフルノミドが含まれ、中度または重度の関節リウマチの症例では、シクロスポリンが含まれる。

【0349】

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 α 抗体; Celltech/Bayer) ; cA2/インフリキシマブ (キメラ抗TNF α 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) 非枯渇性抗CD4抗体; IDEC/SmithKline; 例えば、Arthritis & Rheumatism (1995) Vol. 38, S185を参照; DAB486-IL-2および/またはDAB389-IL-2 (IL-2融合タンパク質; Seragen; 例えば、Arthritis & Rheumatism (1993) Vol. 36, 1223) 参照; 抗Tac (ヒト化抗IL-2R α ; Protein Design Labs/Roche) ; IL-4 (抗炎症性サイトカイン; DNAX/Schering) ; IL-10 (SCH52000; 組み換えIL-10、抗炎症性サイトカイン; DNAX/Schering) ; IL-4; IL-10および/またはIL-4アゴニスト (例えば、アゴニスト抗体) ; IL-1RA (IL-1受容体アンタゴニスト; Synergen/Amgen) ; アナキンラ (Kineret (登録商標)/Amgen) ; TNF-bp/s-TNF (可溶性TNF結合タンパク質; 例えば、Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (補遺), S284参照; Amer. J. Physiol. - Heart and Circulatory Physiology (1995) Vol. 268, pp. 37-42) ; R973401 (ホスホジエステラーゼIV型阻害剤; 例えば、Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (補遺), S282参照; MK-966 (COX-2阻害剤; 例えば、Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (補遺), S81参照) ; Iloprost (例えば、Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (補遺), S82参照) ; メトトレキサート; サリドマイド (例えば、Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (補遺), S282参照) およびサリドマイド関連薬 (例えば、Celgen) ; レフルノミド (抗炎症性およびサイトカイン阻害剤; 例えば、Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (補遺), S131; Inflammation Research (1996) Vol. 45, pp. 103-107参照) ; トラネキサム酸 (プラスミノゲン活性化の阻害剤; 例えば、Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (補遺), S284参照) ; T-614 (サイトカイン阻害剤; 例えば、Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (補遺), S282参照) ; プロスタグランジンE1 (例えば、Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (補遺), S282参照) ; Tenidap (非ステロイド性抗炎症薬; 例えば、Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (補遺), S280参照) ; ナプロキセン (非ステロイド性抗炎症薬; 例えば、Neuro Report (1996) Vol. 7, pp. 1209-1213参照) ; メロキシカム (非ステロイド性抗炎症薬) ; イブプロフェン (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 & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (補遺), S281 参照) ; アザチオプリン (例えば、Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (補遺), S281 参照) ; ICE 阻害剤 (酵素インターロイキン 1β 変換酵素の阻害剤) ; zap-70 および / または lck 阻害剤 (チロシンキナーゼ zap-70 または lck の阻害剤) ; VEGF 阻害剤 および / または VEGF-R 阻害剤 (血管内皮細胞増殖因子または血管内皮細胞増殖因子受容体の阻害剤 ; 血管新生の阻害剤) ; コルチコステロイド 抗炎症薬 (例えば、SB203580) ; TNF-コンベルターゼ阻害剤 ; 抗 IL-12 抗体 ; 抗 IL-18 抗体 ; インターロイキン-11 (例えば、Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (補遺), S296 参照) ; インターロイキン-13 (例えば、Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (補遺), S308 参照) ; インターロイキン-17 阻害剤 (例えば、Arthritis & Rheumatism (1996) Vol. 39, No. 9 (補遺), S120 参照) ; 金 ; ペニシラミン ; クロロキン ; クロラムブシル ; ヒドロキシクロロキン ; シクロスポリン ; シクロホスファミド ; 全リンパ系照射 ; 抗胸腺細胞グロブリン ; 抗 CD4 抗体 ; CD5 トキシン ; 経口投与されたペプチド および コラーゲン ; ロベンザリトニナトリウム ; サイトカイン制御因子 (CRAs) HP228 および HP466 (Houghten Pharmaceuticals, Inc.) ; ICAM-1 アンチセンスホスホロチオアートオリゴデオキシヌクレオチド (ISIS2302 ; Isis Pharmaceuticals, Inc.) ; 可溶性補体受容体 1 (TP10 ; 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 IL2R 抗体 ; マウス および 植物脂質 (魚 および 植物種子脂肪酸 ; 例えば、De Luca et al. (1995) Rheum. Dis. Clin. North Am. 21 : 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 ; アザリビン ; 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 (テラフェクチン) ; クラドリビン (2-クロロデオキシアデノシン) ; メトトレキサート ; bcl-2 阻害剤 (Bruncko, Milan et al., Journal of Medicinal Chemistry (2007), 50 (4), 641-662 参照) 抗ウイルス剤 ; および免疫調節剤が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0350】

一実施形態において、結合タンパク質またはこの抗原結合部分は、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、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 ; パルデコキシブ ; スルファサラジン ; メチルプレドニゾロン ; イブプロフェン ; メロキシカム ; 酢酸メチルプレドニゾロン、金チオリング酸ナトリウム ; アスピリン ; アザチオプリン ; トリアムシノロン・アセトニド ; プロブキシフェン・ナブシラート / a p a p ; フォラート ; ナブメトン ; ジクロフェナク ; ピロキシカム ; エトドラク ; ジクロフェナクナトリウム ; オキサプロジン、塩酸オキシコドン、重酒石酸ヒドロコドン / a p a p ; ジクロフェナクナトリウム / ミソプロストール ; フェンタニル ; アナキンラ、ヒト組み換え ; 塩酸トラマドール ; サルサラート ; スリンダク ; シアノコバラミン / f a / ピリドキシン ; アセトアミノエン ; アレンドロナートナトリウム ; プレドニゾロン ; 硫酸モルヒネ ; 塩酸リドカイン ; インドメタシン ; 硫酸グルコサミン / コンドロイチン ; シクロスポリン ; 塩酸アミトリプチリン ; スルファジアジン ; 塩酸オキシコドン / アセトアミノフェン ; 塩酸オロパタジン ; ミソプロストール ; ナプロキセンナトリウム ; オメプラゾール ; 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 ; CTLA4-IG ; IL-18 BP ; IL-12 / 23 ; 抗 IL-18 ; 抗 IL-15 ; BIRB-796 ; SCIO-469 ; VX-702 ; AMG-548 ;

VX740；ロフルミラスト；IC-485；CDC-801およびメソプラム。

【0351】

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-1β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または成長因子（例えば、TNF、LT、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、EMAP-11、GM-CSF、FGFおよびPDGF）に対する抗体またはこれらのアンタゴニストが含まれる。本発明の抗体またはこの抗原結合部分は、CD2、CD3、CD4、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD90またはこれらのリガンドなどの細胞表面分子に対する抗体と組み合わせることが可能である。本発明の抗体またはこの抗原結合部分は、メトトレキサート、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノラート・モフェチル、レフルノミド、NSAID、例えば、イブプロフェン、プレドニゾロン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、TNFαまたはIL-1などの炎症促進性サイトカインによるシグナル伝達を妨害する因子（例えば、IRAK、NIK、IKK、p38またはMAPキナーゼ阻害剤）、IL-1β変換酵素阻害剤、TNFα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、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、可溶性サイトカイン受容体およびこれらの誘導体（例えば、可溶性p55またはp75TNF受容体、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R）および炎症抑制性サイトカイン（例えば、IL-4、IL-10、IL-11、IL-13およびTGFβ）およびbc1-2阻害剤などの因子とも組み合わせられ得る。

【0352】

結合タンパク質を組み合わせることが可能な、クローン病に対する治療剤の例には、以下のもの：TNFアンタゴニスト、例えば、抗TNF抗体、ADALIMUMAB（PCT公開97/29131；HUMIRA）、CA2（REMICADE）、CDP571、TNFR-Ig構築物、（p75TNFR-IgG（ENBRELL）およびp55TNFR-IgG（LENERCEPT））阻害剤およびPDE4阻害剤が含まれる。本発明の抗体またはこの抗原結合部分は、コルチコステロイド、例えば、ブデノシドおよびデキサメタゾンと組み合わせることが可能である。本発明の結合タンパク質またはこの抗原結合部分は、スルファサラジン、5-アミノサリチル酸およびオルサラジンなどの因子と、ならびにIL-1などの炎症促進性サイトカインの合成または作用を妨害する因子（例えば、IL-1β変換酵素阻害剤およびIL-1ra）とも組み合わせられ得る。本発明の抗体またはこの抗原結合部分は、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またはこの抗原結合部分は、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またはこの抗原結合部分は、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、硫酸ヒオスチアミン、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、ナプシル酸プロボキシフェン、ヒドロコルチゾン、マルチビタミン、バルサラジド二ナトリ

ウム、リン酸コデイン／アセトアミノフェン（a p a p）、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、メチルプレドニゾロン、ナタリズマブおよびインターフェロン γ と組み合わせることが可能である。

【0353】

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- β 1 a（AVONEX；Biogen）；インターフェロン- β 1 b（BETASERON；Chiron／Berlex）；インターフェロン α -n 3）（Interferon Sciences／Fujimoto）、インターフェロン- α （Alfa Wassermann／J&J）、インターフェロン- β 1 A-IF（Serono／Inhale Therapeutics）、PEGインターフェロン α 2 b（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；クラブリビン；他のヒトサイトカインまたは成長因子（例えば、TNF、LT、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-23、IL-15、IL-16、IL-18、EMAP-11、GM-CSF、FGFおよびPDGF）およびこれらの受容体に対する抗体またはこれらのアンタゴニストが含まれる。本発明の結合タンパク質は、CD 2、CD 3、CD 4、CD 8、CD 19、CD 20、CD 25、CD 28、CD 30、CD 40、CD 45、CD 69、CD 80、CD 86、CD 90またはこれらのリガンドなどの細胞表面分子に対する抗体と組み合わせることが可能である。本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、FK 506、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 α またはIL-1などの炎症促進性サイトカインによるシグナル伝達を妨害する因子（例えば、IRAK、NIK、IKK、p38またはMAPキナーゼ阻害剤）、IL-1 β 変換酵素阻害剤、TACE阻害剤、キナーゼ阻害剤などのT細胞シグナル伝達阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、スルファサラジン、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、可溶性サイトカイン受容体およびこれらの誘導体（例えば、可溶性p55またはp75 TNF受容体、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R）および炎症抑制性サイトカイン（例えば、IL-4、IL-10、IL-13およびTGF β ）およびbc1-2阻害剤などの因子とも組み合わされ得る。

【0354】

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例には、インターフェロン- β 、例えば、IFN β 1 aおよびIFN 1 b；コパキソン（copaxone）、コルチコステロイド、カスパーゼ阻害剤、例えばカスパーゼ-1の阻害剤、IL-1阻害剤、TNF阻害剤ならびにCD 40リガンドおよびCD 80に対する抗体が含まれる。

【0355】

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、ファミプリジン、酢酸グラチラマー、ナタリズマブ、シンナビドール、 α -イムノカインNNSO₃、ABR-215062、Anergix MS、ケモカイン受容体アンタゴニスト、BBR-2778、カラグアリン、CPI-1189、LEM（リ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（PDE 4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- β 2、チプリモチド、VLA-4アンタゴニスト（例えば、TR-14035、VL

A4 Ultrahaler、Antegran-ELAN/Biogen)、インターフェロン γ 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。

【0356】

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ترات、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、二硝酸イソソルビド、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、塩酸ペラパミル、ジゴキシシン、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、フマル酸ビソプロロールが含まれる。

10

【0357】

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、ジクロフェナクおよびミソプロストール、ナプロキセン、メロキシカム、インドメタシン、ジクロフェナク、セレコキシブ、ロフェコキシブ、スルファサラジン、メトトレキサート、アザチオプリン、ミノサイクリン、プレドニゾン、エタネルセプト、インフリキシマブが含まれる。

20

【0358】

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、二プロピオン酸ベクロメタゾン、イプラトロピウムブロミド、アジスロマイシン、酢酸ビルブテロール、プレドニゾン、テオフィリン無水物、コハク酸メチルプレドニゾロンナトリウム、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、メチルプレドニゾロン、アモ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、塩酸モキシフロキサシン、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、メチルプレドニゾロン、硫酸メタプロテレノールが含まれる。

30

【0359】

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、アモ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、メチルプレドニゾロン、フロ酸モメタゾン、

40

50

p-エフェドリン/cod/クロロフェニル、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。

【0360】

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- α -2a、インターフェロン- α -2b、インターフェロン- α con1、インターフェロン- α -n1、PEG化されたインターフェロン- α -2a、PEG化されたインターフェロン- α -2b、リバビリン、PEGインターフェロン α -2b+リバビリン、ウルソデオキシコール酸、グリシルリジン酸、チマルファシン、マキサミン、VX-497および以下の標的：HCVポリメラーゼ、HCVプロテアーゼ、HCVヘリカーゼ、HCVIRES（配列内リボソーム進入部位）への介入を通じて、HCVを治療するために使用されるあらゆる化合物が含まれる。

10

【0361】

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、 γ インターフェロン、コハク酸メチルプレドニゾンナトリウム、ロラゼパム、フロセミド、リシノプリル、ニトログリセリン、スピロラクトン、シクロホスファミド、イプラトロピウムブロミド、アクチノマイシンd、アルテプララーゼ、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、トリウムシノロン・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- α 、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- γ -1 β が含まれる。

20

【0362】

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、フロセミド、シンバスタチン、ラミプリル、テネクテプララーゼ、マレイン酸エナラプリル、トルセミド、レタバーゼ、ロサルタンカリウム、塩酸キナプリル/magcarb、ブメタニド、アルテプララーゼ、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、エブチフィバチド、セファゾリンナトリウム、硫酸アトロピン、アミノカプロン酸、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、ビパリルジン、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。

30

【0363】

本発明の結合タンパク質と組み合わせることができる、乾癬のための治療剤の非限定的な例には、以下のもの：KDRの小分子阻害剤Tie-2の小分子阻害剤、カルシボトリエン、プロピオン酸クロベタゾール、トリウムシノロン・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)二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)/r

40

50

e s o r、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、鉱物油／ひまし油／n a l a c 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／トリブロムサラシ、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。

【0364】

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、増強された二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、トリウムシノロン・アセトニド、ジクロフェナク、ジメチルスルホキシド、ピロキシカム、ジクロフェナクナトリウム、ケトプロフェン、メロキシカム、メチルプレドニゾロン、ナブメトン、トルメチンナトリウム、カルシボトリエン、シクロスポリン、ジクロフェナクナトリウム／ミソプロストール、フルオシノニド、硫酸グルコサミン、金チオリンゴ酸ナトリウム、二酒石酸ヒドロコドン／アセトアミノフェン、イブプロフェン、リセドロン酸ナトリウム、スルファジアジン、チオグアニン、バルデコキシブ、アレファセプト、エファリズマブおよびb c 1－2 阻害剤が含まれる。

【0365】

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、ゾタロリムス、アセトアミノフェンが含まれる。

【0366】

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ル、メチルプレドニゾロン、ナプロキセン、イブプロフェン、塩酸オキシコドン／アセトアミノフェン、セレコキシブ、バルデコキシブ、酢酸メチルプレドニゾロン、プレドニゾロン、リン酸コデイン／アセトアミノフェン、塩酸トラマドール／アセトアミノフェン、メタキサロン、メロキシカム、メトカルバモール、塩酸リドカイン、ジクロフェナクナトリウム、ギャバペンチン、デキサメタゾン、カリソプロドール、ケトロラク・トロメタミン、インドメタシン、アセトアミノフェン、ジアゼパム、ナブメトン、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、ナプシル酸プロボキシフェン／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、塩酸プロボキシフェン、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。

【0367】

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）のための治療剤の例には、以下のもの：N S A I D、例えば、ジクロフェナク、ナプロキセン、イブプロフェン、ピロキシカム、インドメタシン；C O X 2 阻害剤、例えば、セレコキシブ、ロフェコキシブ、バルデコキシブ；抗マラリア剤、例えば、ヒドロキシクロロキン；ステロイド、例えば、プレドニゾン、プレドニゾロン、ブデノシド、デキサメタゾン；細胞毒性剤、例えば、アザチオプリン、シクロホスファミド、ミコフェノラート・モフェチル、メトトレキサート；P D E 4 の阻害剤またはプリン合成阻害剤、例えば、C e l l c e p t が含まれる。本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、ならびにI L－1などの炎症促進性サイトカインの合

10

20

30

40

50

成、産生または作用を妨害する因子、例えば、IL-1 β 変換酵素阻害剤およびIL-1 α 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；またはT細胞活性化分子を標的とする分子、例えば、CTLA-4-IgGまたは抗B7抗体ファミリー抗体、抗PD-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または抗サイトカイン抗体、例えば、ホノトリズマブ（抗IFN γ 抗体）、または抗受容体受容体抗体、例えば、抗IL-6受容体抗体およびB細胞表面分子に対する抗体と組み合わせることが可能である。本発明の抗体またはこの抗原結合部分は、また、LJP394（アベチムス（abetimus））（B細胞を枯渇させ、または不活化する因子）、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、Adalimumab（PCT公開WO97/29131；HUMIRA）、CA2（REMICADE）、CDP571、TNFR-Ig構築物（p75TNFR-IgG（ENBRELEおよびp55TNFR-IgG（LENERCEPT））およびbcl-2阻害剤（トランスジェニックマウス中でのbcl-2の過剰発現は、狼瘡様の表現型を引き起こすことが示されているので（Marquina, Regina et al., Journal of Immunology（2004）、172（11）、7177-7185）、阻害は治療効果を有すると予想される。）とともに使用され得る。

【0368】

本発明の医薬組成物は、本発明の結合タンパク質の「治療的有效量」または「予防的有效量」を含み得る。「治療的有效量」は、必要な投薬量でおよび必要な期間にわたって、所望の治療的結果を達成するのに有効な量を表す。結合タンパク質の治療的有效量は、当業者によって決定され得、個体の病状、年齢、性別および体重ならびに結合タンパク質が個体内で所望の応答を惹起する能力などの因子に従って変動し得る。治療的有效量は、治療的に有益な効果が抗体または抗体部分のあらゆる毒性効果または有害効果を上回る量でもある。「予防的有效量」は、必要な投薬量でおよび必要な期間にわたって、所望の予防的結果を達成するのに有効な量を表す。典型的には、疾病のより初期段階の前にまたは疾病のより初期段階において、予防的投薬が対象に使用されるので、予防的有效量は、治療的有效量より少ない。

【0369】

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

【0370】

本発明の結合タンパク質の治療的または予防的有效量に対する典型的な非限定的範囲は、0.1から20mg/kg、例えば1から10mg/kgである。緩和されるべき症状の種類および重度に応じて、投薬量の値が変化し得ることに注意すべきである。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または監督している者の専門的判断に従って、具体的な投薬計画を経時的に調整すべきこと、および、本明細書に記載されている投薬量の範囲は典型的なものに過ぎず、特許請求の範囲に記載されている組成物の範囲または実施に限定することを意図したものではないことをさらに理解すべきである。

【0371】

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および適合が明白であり、本発明の範囲また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】

【0372】

(実施例1) : DVD-Igの設計、構築および分析

(実施例1.1) : 親抗体およびDVD-Igを同定および性質決定するために使用されたアッセイ

別段の記載がなければ、実施例を通じて、親抗体およびDVD-Igを同定および性質決定するために、以下のアッセイを使用する。

【0373】

(実施例1.1.1) : これらの標的抗原に対する親抗体およびDVD-Igの結合および親和性を測定するために使用されたアッセイ

(実施例1.1.1A) : ELISA

所望の標的抗原に結合する抗体に関してスクリーニングするための酵素結合免疫吸着検定法を以下のように行う。リン酸緩衝生理食塩水(PBS)中のFc特異的ヤギ抗マウスIgG(Pierce番号31170, Rockford, IL) 5 μg/mLの50 μL/ウェルで、4℃で一晩、ELISAプレート(Corning Costar, Acton, MA)を被覆した。0.05% Tween-20を含有するPBSで、プレートを1回洗浄する。室温で1時間、200 μL/ウェルのブロッキング溶液(PBS(BioRad番号170-6404, Hercules, CA)中に2%になるように希釈)の添加によってプレートをブロッキングする。ブロッキングの後、0.05% Tween-20を含有するPBSで、プレートを1回洗浄する。

【0374】

上述のように準備したELISAプレートに、例えば、0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)(Sigma, St. Louis, MO)を含有するPBS中で希釈されたマウス血清、ハイブリドーマ上清または抗体またはDVD-Ig調製物の50 μL/ウェルを添加し、室温で1時間温置する。0.05% Tween-20を含有するPBSで、ウェルを3回洗浄する。0.1% BSAを含有するPBS中で、ビオチニル化された組み換え精製標的抗原の50 μLを100 ng/mLに希釈し、各ウェルに添加し、室温で1時間温置する。0.05% Tween-20を含有するPBSで、プレートを3回洗浄する。0.1% BSAを含有するPBS中でストレプトアビジンHRP(Pierce番号21126, Rockland, IL)を1:20000に希釈し、50 μL/ウェル添加し、プレートを室温で1時間温置する。0.05% Tween-20を含有するPBSで、プレートを3回洗浄する。50 μLのTMB溶液(Sigma 番号 T0440, St. Louis, MO)を各ウェルに添加し、室温で10分温置する。1N硫酸の添加によって、反応を停止させる。450 nmの波長で、プレートを分光学的に読み取る。結果を表3に示す。

【0375】

【表 3】

表 3: 様々な方向性およびリンカーの長さを有する他の配列と結合した EGFR (配列 2) を有する 104 個の DVD 構築物の直接結合 ELISA

DVD-Ig 番号	N 末端 VD 配列番号	N 末端 VDEC50 (nM)	N 末端参照 抗体番号	N 末端参照 抗体 EC50 (nM)	HC リンカー	LC リンカー	C 末端 VD 配列番号	C 末端 VDEC50 (nM)	C 末端参照 抗体番号	C 末端参照 抗体 EC50 (nM)
DVD321	EGFR (配列 2)	6.83	AB064	3.63	S	S	EGFR (配列 1)	6.83	AB033	1.8
DVD322	EGFR (配列 1)	1.59	AB033	1.67	S	S	EGFR (配列 2)	1.59	AB064	3.63
DVD325	EGFR (配列 2)	5.95	AB064	6.86	S	S	RON	24.99	AB005	0.19
DVD326	RON	0.18	AB005	0.24	S	S	EGFR (配列 2)	29.93	AB064	8.83
DVD327	EGFR (配列 2)	3.98	AB064	3.45	S	S	ErbB3 (配列 1)	485.26	AB062	1.19
DVD328	ErbB3 (配列 1)	1.14	AB062	1.34	S	S	EGFR (配列 2)	94.89	AB064	3.83
DVD329	EGFR (配列 2)	3.82	AB064	4.37	S	S	ErbB3 (配列 2)	481.28	AB063	0.86
DVD330	ErbB3 (配列 2)	1.29	AB063	1.11	S	S	EGFR (配列 2)	224.44	AB064	4.17
DVD331	EGFR (配列 2)	3.68	AB064	3.89	S	S	CD3	N/ A	AB002	N/ A
DVD332	CD3	N/ A	AB002	N/ A	S	S	EGFR (配列 2)	62.09	AB064	3.95
DVD333	EGFR (配列 2)	3.55	AB064	4.46	S	S	IGF1R	78.58	AB011	0.24
DVD334	IGF1R	0.19	AB012	0.26	S	S	EGFR (配列 2)	137.12	AB064	4.28
DVD335	EGFR (配列 2)	3.77	AB064	5.03	S	S	HGF	159.04	AB014	0.15
DVD336	HGF	0.15	AB015	0.19	S	S	EGFR (配列 2)	332.05	AB064	5.40
DVD337	EGFR (配列 2)	6.5	AB064	6.73	S	S	VEGF (配列 1)	0.57	AB014	0.25
DVD338	VEGF (配列 1)	0.24	AB047	0.26	S	S	EGFR (配列 2)	205.54	AB064	7.84
DVD339	EGFR (配列 2)	5.1	AB064	3.66	S	S	DLL-4	4.0	AB015	0.45
DVD340	DLL-4	0.32	AB067	0.40	S	S	EGFR (配列 2)	189.14	AB064	3.8
DVD341	EGFR (配列 2)	3.41	AB064	4.39	S	S	PLGF	0.74	AB047	0.21
DVD342	PLGF	0.2	AB070	0.25	S	S	EGFR (配列 2)	119.88	AB064	3.77
DVD755	EGFR (配列 2)	3.26	AB064	4.78	S	S	ErbB3 (配列 3)	27.68	AB067	1.40
DVD756	ErbB3 (配列 3)	3.94	AB067	2.03	S	S	EGFR (配列 2)	48.87	AB064	3.48

10

20

30

40

DVD-Ig 番号	N 末端 VD 配列番号	N 末端 VDEC50 (nM)	N 末端参照 抗体番号	N 末端参照 抗体 EC50 (nM)	HC リンカー	LC リンカー	C 末端 VD 配列番号	C 末端 VDEC50 (nM)	C 末端参照 抗体番号	C 末端参照 抗体 EC50 (nM)
DVD757	EGFR (配列 2)	14.51	AB064	10.69	S	S	VEGF (配列 2)	528.26	AB070	5.12
DVD758	VEGF (配列 2)	5.37	AB070	5.91	S	S	EGFR (配列 2)	561.59	AB064	9.11
DVD759	EGFR (配列 2)	7.01	AB064	10.25	S	S	VEGF (配列 3)	127.91	AB071	1.68
DVD760	VEGF (配列 3)	0.77	AB071	1.57	S	S	EGFR (配列 2)	328.03	AB064	12.93
DVD765	EGFR (配列 2)	4.48	AB064	3.63	L	L	EGFR (配列 1)	4.48	AB033	1.67
DVD766	EGFR (配列 1)	3.12	AB033	1.8	L	L	EGFR (配列 2)	3.12	AB064	3.63
DVD767	EGFR (配列 2)	5.97	AB064	6.86	L	L	RON	0.64	AB005	0.19
DVD768	RON	0.18	AB005	0.24	L	L	EGFR (配列 2)	20.67	AB064	8.83
DVD769	EGFR (配列 2)	3.59	AB064	3.45	L	L	ErbB3 (配列 1)	8.23	AB062	1.19
DVD770	ErbB3 (配列 1)	1.55	AB062	1.36	L	L	EGFR (配列 2)	15.24	AB064	6.86
DVD771	EGFR (配列 2)	4.43	AB064	4.37	L	L	ErbB3 (配列 2)	1.38	AB063	0.86
DVD772	ErbB3 (配列 2)	31.42	AB063	1.11	L	L	EGFR (配列 2)	77.19	AB064	4.17
DVD773	EGFR (配列 2)	4.96	AB064	3.89	L	L	CD3	N/ A	AB002	N/ A
DVD774	CD3	N/ A	AB002	N/ A	L	L	EGFR (配列 2)	19.29	AB064	3.95
DVD775	EGFR (配列 2)	3.59	AB064	4.46	L	L	IGF1R	2.77	AB011	0.24
DVD776	IGF1R	0.83	AB011	0.26	L	L	EGFR (配列 2)	286.41	AB064	4.28
DVD777	EGFR (配列 2)	5.13	AB064	5.03	L	L	HGF	0.96	AB012	0.15
DVD778	HGF	0.17	AB012	0.19	L	L	EGFR (配列 2)	50.3	AB064	5.40
DVD779	EGFR (配列 2)	10.57	AB064	6.73	L	L	VEGF (配列 19)	0.24	AB014	0.25
DVD780	VEGF (配列 1)	2.19	AB014	0.26	L	L	EGFR (配列 2)	408.7	AB064	7.84
DVD781	EGFR (配列 2)	4.19	AB064	3.66	L	L	DLI-4	0.42	AB015	0.45
DVD782	DLI-4	0.37	AB015	0.40	L	L	EGFR (配列 2)	55.24	AB064	3.8
DVD783	EGFR (配列 2)	3.8	AB064	4.39	L	L	PLGF	0.36	AB047	0.21
DVD784	PLGF	0.26	AB047	0.25	L	L	EGFR (配列 2)	41.36	AB064	3.77

10

20

30

40

DVD-Ig 番号	N 末端 VD 配列番号	N 末端 VDEC50 (nM)	N 末端参照 抗体番号	N 末端参照 抗体 EC50 (nM)	HC リカー	LC リカー	C 末端 VD 配列番号	C 末端 VDEC50 (nM)	C 末端参照 抗体番号	C 末端参照 抗体 EC50 (nM)
DVD787	EGFR (配列 2)	3.78	AB064	4.78	L	L	ErbB3 (配列 3)	14.38	AB067	1.40
DVD788	ErbB (配列 3)	3.14	AB067	2.03	L	L	EGFR (配列 2)	18.04	AB064	3.48
DVD789	EGFR (配列 2)	14.61	AB064	10.69	L	L	VEGF (配列 1)	45.95	AB070	5.12
DVD790	VEGF (配列 1)	15.91	AB071	5.91	L	L	EGFR (配列 2)	76.76	AB064	9.11
DVD791	EGFR (配列 2)	8.24	AB064	10.25	L	L	VEGF (配列 3)	11.62	AB071	1.68
DVD792	VEGF (配列 3)	0.82	AB071	1.57	L	L	EGFR (配列 2)	48.61	AB064	12.93
DVD795	EGFR (配列 2)	6.21	AB064	3.63	L	S	EGFR (配列 1)	6.21	AB033	1.67
DVD796	EGFR (配列 1)	1.94	AB033	1.8	L	S	EGFR (配列 2)	1.94	AB064	3.63
DVD797	EGFR (配列 2)	4.56	AB064	6.86	L	S	RON	1.16	AB005	0.19
DVD798	RON	0.18	AB005	0.24	L	S	EGFR (配列 2)	17.94	AB064	8.83
DVD799	EGFR (配列 2)	5.76	AB064	3.45	L	S	ErbB3 (配列 1)	20.04	AB062	1.19
DVD800	ErbB3 (配列 1)	2.06	AB062	1.34	L	S	EGFR (配列 2)	67.26	AB064	3.83
DVD801	EGFR (配列 2)	3.91	AB064	4.37	L	S	ErbB3 (配列 2)	3.28	AB063	0.86
DVD802	ErbB3 (配列 2)	11.13	AB063	1.11	L	S	EGFR (配列 2)	726.39	AB064	4.17
DVD803	EGFR (配列 2)	0.23	AB064	3.89	L	S	CD3	N/A	AB002	N/ A
DVD804	CD3	N/ A	AB002	N/ A	L	S	EGFR (配列 2)	157.62	AB064	3.95
DVD805	EGFR (配列 2)	0.48	AB064	4.46	L	S	IGF1R	0.99	AB011	0.24
DVD806	IGF1R	0.4	AB011	0.26	L	S	EGFR (配列 2)	53.79	AB064	4.28
DVD807	EGFR (配列 2)	4.85	AB064	5.03	L	S	HGF	9.24	AB012	0.15
DVD808	HGF	0.14	AB012	0.19	L	S	EGFR (配列 2)	96.36	AB064	5.40
DVD809	EGFR (配列 2)	7.34	AB064	6.73	L	S	VEGF (配列 1)	0.23	AB014	0.25
DVD810	VEGF (配列 1)	0.33	AB014	0.26	L	S	EGFR (配列 2)	227.99	AB064	7.84
DVD811	EGFR (配列 2)	3.45	AB064	3.66	L	S	DLL-4	0.99	AB015	0.45
DVD812	DLL-4	0.39	AB015	0.40	L	S	EGFR (配列 2)	77.26	AB064	3.8

10

20

30

40

DVD-Ig 番号	N 末端 VD 配列番号	N 末端 VDEC50 (nM)	N 末端参照 抗体番号	N 末端参照 抗体 EC50 (nM)	HC リンカー	LC リンカー	C 末端 VD 配列番号	C 末端 VDEC50 (nM)	C 末端参照 抗体番号	C 末端参照 抗体 EC50 (nM)
DVD813	EGFR (配列 2)	3.41	AB064	4.39	L	S	PLGF	0.44	AB047	0.21
DVD814	PLGF	0.23	AB047	0.25	L	S	EGFR (配列 2)	50.43	AB064	3.77
DVD817	EGFR (配列 2)	5.33	AB064	4.78	L	S	ErbB3 (配列 3)	18.82	AB067	1.4
DVD818	ErbB3 (配列 3)	3.32	AB067	2.03	L	S	EGFR (配列 2)	19.32	AB064	3.48
DVD819	EGFR (配列 2)	12.2	AB064	10.69	L	S	VEGF (配列 2)	36.35	AB070	5.12
DVD820	VEGF (配列 2)	4.08	AB070	5.91	L	S	EGFR (配列 2)	106.81	AB064	9.1
DVD821	EGFR (配列 2)	6.96	AB064	10.25	L	S	VEGF (配列 3)	11.09	AB071	1.68
DVD822	VEGF (配列 3)	0.72	AB071	1.57	L	S	EGFR (配列 2)	90.03	AB064	12.93
DVD825	EGFR (配列 2)	1.67	AB064	3.63	S	L	EGFR (配列 1)	1.67	AB033	1.67
DVD826	EGFR (配列 1)	2.27	AB033	1.8	S	L	EGFR (配列 2)	2.27	AB064	3.63
DVD827	EGFR (配列 2)	6.28	AB064	6.86	S	L	RON	6.57	AB005	0.19
DVD828	RON	0.2	AB005	0.24	S	L	EGFR (配列 2)	19.83	AB064	8.83
DVD829	EGFR (配列 2)	3.81	AB064	3.45	S	L	ErbB3 (配列 1)	41.4	AB062	1.19
DVD830	ErbB3 (配列 1)	1.43	AB062	1.34	S	L	EGFR (配列 2)	42.71	AB064	3.83
DVD831	EGFR (配列 2)	4.6	AB064	4.37	S	L	ErbB3 (配列 2)	1.42	AB063	0.86
DVD832	ErbB3 (配列 2)	1.19	AB063	1.11	S	L	EGFR (配列 2)	62.39	AB064	4.17
DVD833	EGFR (配列 2)	3.03	AB064	3.89	S	L	CD3	N/ A	AB002	N/ A
DVD834	CD3	N/ A	AB002	N/ A	S	L	EGFR (配列 2)	26.7	AB064	3.95
DVD835	EGFR (配列 2)	2.42	AB064	4.46	S	L	IGF1R	3.47	AB011	0.24
DVD836	IGF1R	0.51	AB011	0.26	S	L	EGFR (配列 2)	56.83	AB064	4.28
DVD837	EGFR (配列 2)	4.51	AB064	5.03	S	L	HGF	1.29	AB012	0.15
DVD838	HGF	0.19	AB012	0.19	S	L	EGFR (配列 2)	57.66	AB064	5.40
DVD839	EGFR (配列 2)	12.53	AB064	6.73	S	L	VEGF (配列 1)	0.26	AB014	0.25
DVD840	VEGF (配列 1)	0.18	AB014	0.26	S	L	EGFR (配列 2)	69.77	AB064	7.84

10

20

30

40

DVD-Ig 番号	N 末端 VD 配列番号	N 末端 VDEC50 (nM)	N 末端参照 抗体番号	N 末端参照 抗体 EC50 (nM)	HC リンカー	LC リンカー	C 末端 VD 配列番号	C 末端 VDEC50 (nM)	C 末端参照 抗体番号	C 末端参照 抗体 EC50 (nM)
DVD841	EGFR (配列 2)	4.06	AB064	3.66	S	L	DLL-4	0.55	AB015	0.45
DVD842	DLL-4	0.36	AB015	0.40	S	L	EGFR (配列 2)	51.68	AB064	3.8
DVD843	EGFR (配列 2)	3.65	AB064	4.39	S	L	PLGF	0.37	AB047	0.21
DVD844	PLGF	0.23	AB047	0.25	S	L	EGFR (配列 2)	45.51	AB064	3.77
DVD847	EGFR (配列 2)	2.92	AB064	4.78	S	L	ErbB (配列 3)	12.93	AB067	1.40
DVD848	ErbB3 (配列 3)	3.23	AB067	2.03	S	L	EGFR (配列 2)	16.74	AB064	3.48
DVD849	EGFR (配列 2)	12.33	AB064	10.69	S	L	VEGF (配列 2)	59.58	AB070	5.12
DVD850	VEGF (配列 2)	10.17	AB070	5.91	S	L	EGFR (配列 2)	71.83	AB064	9.11
DVD851	EGFR (配列 2)	9.36	AB064	10.25	S	L	VEGF (配列 3)	28.44	AB071	1.68
DVD852	VEGF (配 列 3)	0.78	AB071	1.57	S	L	EGFR (配列 2)	68.11	AB064	12.93

全ての DVD-Ig 構築物の結合が維持され、親抗体の結合と同等であった。全ての N 末端可変ドメインは、DVD-Ig 構築物 DVD322、DVD337、DVD341、DVD765、DVD766、DVD767、DVD771、DVD777、DVD779、DVD781、DVD783、DVD796、DVD803、DVD809、DVD811、DVD813、DVD825、DVD826、DVD831、DVD839、DVD841 および DVD843 の C 末端可変ドメインと同様に、親抗体と類似の高い親和性で結合した。

【0376】

(実施例 1. 1. 1B) : BIACORE 技術を用いた親和性の測定

BIACORE アッセイ (Biacore, Inc, Piscataway, NJ) は、on 速度および off 速度定数の速度論的測定を用いて、抗体または DVD-Ig の親和性を測定する。標的抗原 (例えば、精製された組み換え標的抗原) への抗体または DVD-Ig の結合は、25℃で走行 HBS-EP (10mM HEPES [pH7.4]、150mM NaCl、3mM EDTA および 0.005% 界面活性剤 P20) を使用して、Biacore (登録商標) 1000 または 3000 装置 (Biacore (登録商標) AB, Uppsala, Sweden) を用いる表面プラズモン共鳴を基礎とする測定によって測定される。全ての化学物質は、Biacore (登録商標) AB (Uppsala, Sweden) または本文中に記載されている別の入手先から取得する。例えば、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および 25 μg/mL の操作を用いて、CM5 研究等級バイオセンサーチップを横切って、10mM 酢酸ナトリウム (pH4.5) 中に希釈されたヤギ抗マウス IgG、(Fcγ) 断片特異的ポリクローナル抗体 (Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL) の約 5000 RU を直接固定化する。バイオセンサー表面上の未反応部分は、エタノールアミンでブロックする。フローセル 2 および 4 中の修飾されたカルボキシメチルデキストラン表面は、反応表面として使用する。フローセル 1 および 3 中のヤギ抗マウス 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参照表面として使用する。速度論的分析のために、Biaevaluation 4.0.1 ソフトウェアを用いて、8 つの

注射全ての会合および解離相へ、（グローバルフィット解析を用いて）1：1のLangmuir結合モデルから誘導される速度方程式を同時にフィッティングさせる。ヤギ抗マウスIgG特異的な反応表面を横切る捕捉のために、HEPESによって緩衝化された生理的食塩水中に、精製された抗体またはDVD-Igを希釈する。リガンド（25 μg/mL）として捕捉されるべき抗体またはDVD-Igを、5 μL/分の流速で反応マトリックス上に注入する。25 μL/分の継続的な流速下で、会合および解離速度定数 k_{on} （ $M^{-1} S^{-1}$ ）および k_{off} （ s^{-1} ）を測定する。10から200 nMの範囲の異なる抗原濃度で速度論的結合測定を行うことによって、速度定数が導かれる。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抗体またはDVD-Igと標的抗原間での反応の平衡解離定数（M）を計算する。結合は、時間の関数として記録され、速度論的速度定数が計算される。このアッセイでは、最大 $10^6 M^{-1} s^{-1}$ の速さのオン速度および最小 $10^{-6} s^{-1}$ までの遅さのオフ速度を測定することができる。

【0377】

【表 4】

表 4 : 親抗体および DVD 構築物の BIAcore 分析

親抗体 または DVD-Ig ID	N 末端 多様 ドメイン (VD)	C 末端 多様 ドメイン (VD)	HC リンカー	LC リンカー	抗原	k_{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_{off} (s ⁻¹)	k_D (M)
AB033	EGFR (配列 1)				FL-hEGFR	2.47E+05	1.13E-03	4.60E-09
AS064	EGFR (配列 2)				FL-hEGFR	ND	ND	ND
DVD321	EGFR (配列 2)	EGFR (配列 1)	短い	短い	FL-hEGFR	5.46E+04	7.39E-04	1.40E-08
DVD322	EGFR (配列 1)	EGFR (配列 2)	短い	短い	FL-hEGFR	2.52E+05	1.04E-03	4.10E-09
DVD795	EGFR (配列 2)	EGFR (配列 1)	長い	短い	FL-hEGFR	1.29E+04	2.59E-04	2.00E-08
DVD796	EGFR (配列 1)	EGFR (配列 2)	長い	短い	FL-hEGFR	3.31E+05	1.21E-03	3.70E-09
DVD765	EGFR (配列 2)	EGFR (配列 1)	長い	長い	FL-hEGFR	3.07E+04	2.61E-04	8.50E-09
DVD766	EGFR (配列 1)	EGFR (配列 2)	長い	長い	FL-hEGFR	3.06E+05	1.21E-03	3.90E-09
DVD825	EGFR (配列 2)	EGFR (配列 1)	短い	長い	FL-hEGFR	1.16E+04	2.95E-04	2.60E-08
DVD826	EGFR (配列 1)	EGFR (配列 2)	短い	長い	FL-hEGFR	2.65E+05	1.10E-03	4.20E-09
AB033	EGFR (配列 1)				d2-7 trunc	3.85E+05	1.06E-03	2.80E-09
AB064	EGFR (配列 2)				d2-7 trunc	3.70E+04	6.82E-04	1.80E-08
DVD321	EGFR (配列 2)	EGFR (配列 1)	短い	短い	d2-7 trunc	5.32E+04	4.55E-04	8.50E-09
DVD322	EGFR (配列 1)	EGFR (配列 2)	短い	短い	d2-7 trunc	1.69E+05	5.70E-04	3.40E-09
DVD795	EGFR (配列 2)	EGFR (配列 1)	長い	短い	d2-7 trunc	5.65E+04	2.53E-04	4.50E-09
DVD796	EGFR (配列 1)	EGFR (配列 2)	長い	短い	d2-7 trunc	2.60E+05	5.02E-04	1.90E-09
DVD765	EGFR (配列 2)	EGFR (配列 1)	長い	長い	d2-7 trunc	3.99E+04	2.16E-04	5.40E-09
DVD766	EGFR (配列 1)	EGFR (配列 2)	長い	長い	d2-7 trunc	2.06E+05	4.56E-04	2.20E-09
DVD825	EGFR (配列 2)	EGFR (配列 1)	短い	長い	d2-7 trunc	3.31E+04	2.40E-04	7.30E-09
DVD826	EGFR (配列 1)	EGFR (配列 2)	短い	長い	d2-7 trunc	2.05E+05	4.84E-04	2.40E-09
AB033	EGFR (配列 1)				d-2-7 Cet	ND	ND	ND
AB064	EGFR (配列 2)				d-2-7 Cet	2.03E+04	6.60E-04	3.30E-08
DVD321	EGFR (配列 2)	EGFR (配列 1)	短い	短い	d-2-7 Cet	2.49E+04	5.56E-04	2.20E-08
DVD322	EGFR (配列 1)	EGFR (配列 2)	短い	短い	d-2-7 Cet	1.04E+04	4.34E-04	4.20E-08
DVD795	EGFR (配列 2)	EGFR (配列 1)	長い	短い	d-2-7 Cet	2.42E+04	5.52E-04	2.30E-08

10

20

30

40

親抗体 または DVD-Ig ID	N 末端 多様 ドメイン (VD)	C 末端 多様 ドメイン (VD)	HC リンカー	LC リンカー	抗原	kon (M ⁻¹ s ⁻¹)	koff (s ⁻¹)	kD (M)
DVD796	EGFR (配列 1)	EGFR (配列 2)	長い	短い	d-2-7 Cet	1.43E+04	4.48E-04	3.10E-08
DVD765	EGFR (配列 2)	EGFR (配列 1)	長い	長い	d-2-7 Cet	2.65E+04	5.76E-04	2.20E-08
DVD766	EGFR (配列 1)	EGFR (配列 2)	長い	長い	d-2-7 Cet	1.08E+04	4.45E-04	4.10E-08
DVD825	EGFR (配列 2)	EGFR (配列 1)	短い	長い	d-2-7 Cet	2.56E+04	5.50E-04	2.20E-08
DVD826	EGFR (配列 1)	EGFR (配列 2)	短い	長い	d-2-7 Cet	1.18E+04	4.45E-04	3.80E-08

10

B i a c o r e 技術によって性質決定された全ての DVD-Ig 構築物の結合が維持され、親抗体の結合と同等であった。全ての N 末端可変ドメインは、親抗体と類似の高い親和性で結合した。

【0378】

(実施例 1. 1. 2) : 親抗体および DVD-Ig の機能的活性を測定するために使用されたアッセイ

20

(実施例 1. 1. 2. A) : A431 細胞結合

対数期 A431 細胞を標準方法に従って回収した。5 × 10⁴ 細胞 (300 μL) を含む各試料を、DVD-Ig の連続希釈法で冷室で 1 時間培養した。次いで、PE 結合ヤギ抗ヒト抗体 (Jackson ImmunoResearch Cat 番号 109-115-098) (300 μL) で細胞を染色し、冷湿で 30 分間培養した。FACS Calibur HTS (Becton Dickinson, San Jose) で染色した細胞を分析した。Prism (GraphPad Software, La Jolla) でデータを分析した。データを表 5 に示す。

【0379】

(実施例 1. 1. 2. B) : 細胞結合競合アッセイ

30

5 nM FITC 結合 EGFR (配列 2) を、DVD-Ig の連続希釈法で氷上で 15 分間培養し、次いで 5 × 10⁴ の回収した対数期 U87MG-de2-7 細胞 (300 μL) とともに冷室で 1 時間培養した。FACS Calibur HTS (Becton Dickinson, San Jose) で染色した細胞を分析した。Prism (GraphPad Software, La Jolla) でデータを分析した。データを表 5 に示す。

【0380】

(実施例 1. 1. 2. C) : ウェスタンブロット：全 EGFR (Receptor Down-Regulation) および pTyr

対数期 A431 または U87MG-de2-7 細胞を、ウェルあたり 1 × 10⁶ 細胞 (2 mL) で 6 ウェルプレートに置いた。翌日 24 時間、細胞を血清飢餓状態にした。次いで、100 nM の様々な抗体 (30 μl) で細胞を 1 時間処理し、次いで 15 nM EGFR (0.5 μL) で 10 分間刺激した。次いで、細胞を回収し、氷上で RIPA バッファー (150 μl/ウェル) (Sigma) に溶解した。標準方法に従って SDS-PAGE ゲル上で細胞溶解物を分離し、次いで PVDF 膜 (Invitrogen) に転写した。様々な抗体プローブを用いたウェスタンブロットティングでタンパク質を検出した。データを表 5 に示す。

40

【0381】

(実施例 1. 1. 2. D) : 細胞増殖 (コロニー形成) アッセイ

対数期 A431 細胞を、ウェルあたり 300 細胞で 100 μL で 96 ウェルプレートに

50

置いた。翌日、抗体の連続希釈法で細胞を処理し、7から10日間培養した。3. 7%パラホルムアルデヒドで細胞を20分間固定し、次いで0.1%クリスタル・バイオレットで1時間染色した。染色したクリスタル・バイオレットを10%酢酸で1時間抽出し、次いでOD590で定量した。データを表5に示す。

【0382】

【表5】

表5：EGFR DVD-Igのスクリーニング

DVD ID	配列 ID	位置	HC リンカー	LC リンカー	その他の DVD ドメイン	A431 結合	EGFR Comp.	Ptyr Sign. 阻害	EGFR 受容体 下方 制御	細胞 増殖 阻害
DVD322	EGFR (配列 2)	C-	短い	短い	EGFR (配列 1)	+	-	+	-	ND
DVD321	EGFR (配列 2)	N	短い	短い	EGFR (配列 1)	-	+	-	+	ND
DVD766	EGFR (配列 2)	C	長い	長い	EGFR (配列 1)	+	+	+	-	ND
DVD765	EGFR (配列 2)	N	長い	長い	EGFR (配列 1)	+	+	+	+	+
DVD796	EGFR (配列 2)	C	長い	短い	EGFR (配列 1)	+	+	-	-	ND
DVD795	EGFR (配列 2)	N	長い	短い	EGFR (配列 1)	+	+	+	+	+
DVD826	EGFR (配列 2)	C	短い	長い	EGFR (配列 1)	+	+	-	-	ND
DVD825	EGFR (配列 2)	N	短い	長い	EGFR (配列 1)	+	+	-	-	ND

10

20

【0383】

(実施例1. 1. 2. E)：MSDアッセイによる複数のヒト癌細胞株中の全EGFRの下方制御

対数期細胞（A431、A431NS、A549またはHN5）を、 1×10^4 細胞/ウェル（100 μ L）で96ウェルプレートに播種した。翌日、異なる抗体（30 μ L）で100 nMで2時間37℃で、細胞を処理した。次いで、細胞を回収し、Whole Cell Lysate Kit—Total EGFR Assay（Meso Scale Discovery Cat番号K151CKD-2）を用いて、製造業者のプロトコールに従って全EGFRレベルを定量した。データを表6に示す。

30

【0384】

【表 6】

表 6 : MSD アッセイによる複数のヒト癌細胞株中の全 EGFR の下方制御

対照のパーセンテージ (100nM)				
細胞列	EGFR (配列 2)	EGFR (配列 1)	DVD795	EGFR (配列 2) + EGFR (配列 1)
A431	97	30	14	32
A431NS	98	44	24	43
A549	91	29	7	29
HN5	102	53	11	36
NCI-H1975	94	35	15	25
OVCAR5	94	34	12	36
PC3	108	57	20	72
U87MG	96	58	187	59
U87MG-EGFRwt	86	57	13	39
U87MG-de2-7	90	49	21	52

DVD795 は、試験された全てのヒト癌細胞株における全 EGFR の下方制御を示した。

【0385】

(実施例 1. 1. 2. G) : サイトカインバイオアッセイ

抗サイトカイン親抗体または抗サイトカイン配列を含有する DVD-Ig が標的サイトカインの生物活性を阻害または中和する能力は、抗体または DVD-Ig の阻害能力を測定することによって分析される。例えば、抗 IL-4 抗体が IL-4 媒介性 IgE 産生を阻害する能力が使用され得る。例えば、ヒトナイーブ B 細胞は、それぞれ、Ficoll-paque 密度遠心による軟膜、続いて、ヒト sIgDFITC 標識されたヤギ F(ab)2 抗体に対して特異的な MACS ビーズ (Miltenyi Biotec)、続いて、抗 FITCMACS ビーズを用いる磁気分離によって、末梢血から単離される。3 × 10⁵ 細胞/mL になるように、磁氣的に分別されたナイーブ B 細胞を XV15 中に調整し、37℃、5% CO₂ 存在下での培養の 10 日の間に、PBS が充填されたウェルによって取り囲まれたプレートの中心に、6 × 6 アレイで、96 ウェルプレートの 100 μL/ウェル中に播種する。検査されるべき抗体当り、それぞれ非誘導および誘導対照の 3 ウェルからなるそれぞれ 1 つのプレートを調製し、7 μg/mL から始まり、29 ng/mL の最終濃度まで 3 倍希釈で行う抗体滴定の 5 つ組みの反復を、希釈前の 4 倍濃縮された 50 μL 中に添加する。IgE 産生を誘導するために、20 ng/mL の rhIL-4 + 0.5 μg/mL の最終濃度の抗 CD40 モノクローナル抗体 (Novartis) をそれぞれ 50 μL で、各ウェルに添加し、標準的なサンドイッチ ELISA 法によって、培養期間の終了時に IgE 濃度を測定する。

【0386】

(実施例 1. 1. 2. H) : サイトカイン放出アッセイ

親抗体または DVD-Ig がサイトカイン放出を引き起こす能力が分析される。ヘパリン処理された vacutainer 管の中に、静脈穿刺によって、3 人の健康なドナーから末梢血を採取する。RPMI-1640 培地で全血を 1 : 5 希釈し、0.5 mL/ウェルで、24 ウェルの組織培養プレート中に配置する。抗サイトカイン抗体 (例えば、抗 IL-4) を RPMI-1640 中に希釈し、0.5 mL/ウェルでプレート中に配置して、200、100、50、10 および 1 μg/mL の最終濃度を得た。培養プレート中の全血の最終希釈は、1 : 10 である。サイトカイン放出に対する陽性対照として、2 μg/mL および 5 μg/mL の最終濃度で、LPS および PHA を別々のウェルに添加する。陰性対照抗体として、ポリクローナルヒト IgG を使用する。実験は、2 つ組みで行う。37℃、5% CO₂ でプレートを温置する。24 時間後、ウェルの内容物を試験管の中に移し、1200 rpm で 5 分間遠心する。無細胞上清を集め、サイトカインアッセイの

ために凍結した。プレート上および管中に残った細胞を溶解溶液 0.5 mL で溶解し、 -20°C に配置し、融解する。(容量を無細胞上清試料と同じレベルにするために) 培地 0.5 mL を添加し、細胞調製物を集め、サイトカインアッセイのために凍結する。ELISA によって、サイトカインレベルに関して (例えば、IL-8、IL-6、IL-1 β 、IL-1RA または TNF- α のレベルに関して) 無細胞上清および細胞可溶化液をアッセイする。

【0387】

(実施例 1. 1. 2. I) : 再誘導された細胞傷害 (rCTL) アッセイ : FACS ベース

予め凍結させた単離された末梢血単核細胞 (PBMC) から、陰性選択濃縮カラム (R & D Cat. 番号 HTCC-525) によって、FACS ベースのヒト CD3 + T 細胞を単離した。完全 RPMI 培地 (L-グルタミン酸, 55 mM β -ME, Pen/Strep, 10% FCS) に溶かした 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の抗 CD3 (OKT-3, BD) および 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の抗 CD28 (CD28. 2, Abcam) でコートしたフラスコ中で、T 細胞を 4 日間刺激した。分析に用いる前に、30 U/mL IL-2 (Pepro tech) 中に T 細胞を一晩置いた。製造業者の指示書に従って、DoHH2 または Raji 標的細胞を PKH26 (Sigma) で標識した。rCTL アッセイを通して、L-グルタミン酸および 10% FBS (Hy clone) を含有する RPMI 1640 培地 (フェノールなし、Invitrogen) を使用した。

【0388】

10:1 の E:T 比を与えるために、それぞれ、96 ウェルプレート (Costar 番号 3799) 中の 10^5 および 10^4 細胞/ウェルで、エフェクター T 細胞 (E) および標的 (T) を播種した。DVD-Ig 分子を適切に希釈して、濃度依存性の滴定曲線を得た。一晩培養した後、細胞をペレット化し、0.1% BSA (Invitrogen) および 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ヨウ化プロピジウム (BD) を含有する 100 μL PBS 中で再懸濁する前に、PBS で 1 回洗浄した。FACS データを FACS Canto 装置 (Becton Dickinson, San Jose) で収集し、Flowjo (Tree star) で分析した。パーセント総標的 (対照、無処置) によって除した、DVD-Ig 処理された試料中の生きた標的のパーセントを計算して、パーセント特異的溶解を測定した。データをグラフにし、Prism (Graphpad Software, La Jolla) で、IC50 を計算する。

【0389】

(実施例 1. 1.) 再誘導された細胞傷害 (rCTL) アッセイ : インペデンスベース (Impedance based)

T 細胞を上述のように調製した。EGFR を発現している標的細胞を、ACEA R T-CES 96 ウェルプレート (ACEA Bio, San Diego) に一晩付着させた。次いで、10:1 の E:T 比を与えるために、 2×10^5 および 2×10^4 細胞/ウェルで、エフェクター T 細胞 (E) および標的 (T) を播種した DVD-Ig 分子を適切に希釈して、濃度依存性の滴定曲線を得た。DVD-Ig 処理された試料中の標的の細胞指数を、対照標的 (無処置) の細胞指数によって除して、パーセント特異的溶解を計算した。データをグラフにし、Prism (Graphpad Software, La Jolla) で、IC50 を計算した。データを表 7 に示す。

【0390】

10

20

30

40

【表 7】

表 7 : DVD-Ig を含有する EGFR(配列 2) の rCTL 活性

DVD ID	配列 ID	位置	HC リンカー	LC リンカー	その他の DVD ドメイン	rCTL 活性 IC50 (pM)
DVD774	EGFR (配列 2)	C	長い	長い	CD3	0.2
DVD773	EGFR (配列 2)	N	長い	長い	CD3	16
DVD804	EGFR (配列 2)	C	長い	短い	CD3	0.09
DVD803	EGFR (配列 2)	N	長い	短い	CD3	42
DVD332	EGFR (配列 2)	C	短い	短い	CD3	0.03
DVD331	EGFR (配列 2)	N	短い	短い	CD3	>200nM
DVD834	EGFR (配列 2)	C	短い	長い	CD3	0.08
DVD833	EGFR (配列 2)	N	短い	長い	CD3	12

N 末端または C 末端の位置の何れかにおいて A B O O 2 由来の V D を含有する全ての D V D - I g は、r C T L アッセイにおいて傷害を示した。

【0391】

(実施例 1. 1. 2. C) : サイトカイン交叉反応性研究

目的のサイトカインに対して誘導された抗サイトカイン親抗体または D V D - I g が他のサイトカインと交叉反応する能力を分析する。B I A c o r e バイオセンサーマトリックス上に、親抗体または D V D - I g を固定化する。まず、100mM N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) および 400mM N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩 (EDC) でマトリックス上のカルボキシル基を活性化することによって、遊離のアミン基を介して、抗ヒト F c m A b をデキストランマトリックスに共有結合させる。酢酸ナトリウム pH 4.5 中に希釈された 25 μg/mL の濃度の各抗体または D V D - I g 調製物の約 50 μL を、活性化されたバイオセンサーを横切って注入し、タンパク質上の遊離アミンを活性化されたカルボキシル基に直接結合させる。典型的には、5000 共鳴単位 (RU) を固定化する。未反応のマトリックス EDC-エステルは、1M エタノールアミンの注入によって不活化させる。標準的なアミンカップリングキットを用いてヒト I g G 1/K を固定化することによって、参照標準として第二のフローセルを調製する。CM バイオセンサーチップを用いて、SPR 測定を行う。バイオセンサー表面上の分析すべき全ての抗原を、0.01% P20 を含有する HBS-E P 走行緩衝液中に希釈する。

【0392】

サイトカイン結合特異性を調べるために、抗サイトカイン親抗体または D V D - I g が固定化されたバイオセンサー表面を横切って、過剰な目的のサイトカイン (100nM、例えば、可溶性組み換えヒト) を注入する (5 分の接触時間)。目的のサイトカインの注入前および直後に、HBS-E P 緩衝液のみが各フローセルを通過して流れる。最終的な結合値を表すために、ベースラインとサイトカイン注入完了から約 30 秒後に対応する点との間のシグナルの正味の差を取る。再度、共鳴単位で応答を測定する。結合現象を観察する場合には、次の試料の注入前に、10mM HCl を用いてバイオセンサーマトリックスを再生し、そうでなければ、マトリックス上に走行緩衝液を注入した。あらゆる非特異

的結合のバックグラウンドを記録するために、固定化されたマウス I g G 1 / K 参照表面上に、ヒトサイトカイン（例えば、I L - 1 α、I L - 1 β、I L - 2、I L - 3、I L - 4、I L - 5、I L - 6、I L - 7、I L - 8、I L - 9、I L - 10、I L - 11、I L - 12、I L - 13、I L - 15、I L - 16、I L - 17、I L - 18、I L - 19、I L - 20、I L - 22、I L - 23、I L - 27、T N F - α、T N F - βおよび I F N - γ）も同時に注入する。参照および反応表面を調製することによって、B i a c o r e は、屈折率の変化および注入のノイズの大半を除去するために、反応表面のデータから参照表面のデータを自動的に差し引くことができる。従って、抗サイトカイン抗体または D V D - I g 結合反応に起因する真の結合応答を確かめることができる。

【0393】

目的のサイトカインが、固定された抗サイトカイン抗体を横切って注入されると、著しい結合が観察される。10 mM H C l 再生は、全ての非共有的に会合されたタンパク質を完全に除去する。センサーグラムの検査は、可溶性サイトカインへの固定された抗サイトカイン抗体または D V D - I g 結合が強力で、強固であることを示す。目的のサイトカインを用いて予想された結果を確認した後、各抗体または D V D - I g に対して別々に、残りの組み換えヒトサイトカインの群を検査する。各注入サイクルに対して、抗サイトカイン抗体または D V D - I g によって結合されたまたは結合されていないサイトカインの量を記録する。各抗体または D V D - I g の特異性プロファイルを測定するために、3つの独立した実験から得られた結果を使用する。目的のサイトカインに対して予想された結合を有し、他の何れのサイトカインにも結合しない抗体または D V D - I g を選択する。

【0394】

（実施例 1. 1. 2. D）：組織交叉反応性

組織交叉反応性研究は、32の組織の凍結切片を含む第一の段階、最大38の組織を含む第二の段階および以下に記載されているように、3人の無関係な成人から得られたさらなる組織を含む第三の段階という3つの段階で行われる。研究は、典型的には、2つの投薬レベルで行われる。

【0395】

段階1：ヒト組織（剖検または生検で得られた1人のヒトドナーから得られる32の組織（典型的には、副腎、胃腸管、前立腺、膀胱、心臓、骨格筋、血液細胞、腎臓、皮膚、骨髓、肝臓、脊髄、乳房、肺、脾臓、小脳、リンパ節、精巣、大脳皮質、卵巣、胸腺、大腸、膵臓、甲状腺、内皮、副甲状腺、尿管、眼、下垂体、子宮、ファロピア管および胎盤）の凍結切片（約5 μm）を対物ガラス上に固定し、乾燥させる。アビジン-ビオチン系を用いて、組織切片のペルオキシダーゼ染色を行う。

【0396】

段階2：ヒト組織の38の組織（剖検または生検で得られた3人の無関係な成人由来の副腎、血液、血管、骨髓、小脳、大脳、頸部、食道、眼、心臓、腎臓、大腸、肝臓、肺、リンパ節、乳房の乳腺、卵巣、卵管、膵臓、副甲状腺、末梢神経、下垂体、胎盤、前立腺、唾液腺、皮膚、小腸、脊髄、脾臓、胃、横紋筋、精巣、胸腺、甲状腺、扁桃腺、尿管、膀胱および子宮を含む。）の凍結切片（約5 μm）を対物ガラス上に固定し、乾燥させる。アビジン-ビオチン系を用いて、組織切片のペルオキシダーゼ染色を行う。

【0397】

段階3：カンクイザル組織の凍結切片（約5 μm）（38の組織（剖検または生検で得られた3人の無関係な成体サル由来の副腎、血液、血管、骨髓、小脳、大脳、頸部、食道、眼、心臓、腎臓、大腸、肝臓、肺、リンパ節、乳房の乳腺、卵巣、卵管、膵臓、副甲状腺、末梢神経、下垂体、胎盤、前立腺、唾液腺、皮膚、小腸、脊髄、脾臓、胃、横紋筋、精巣、胸腺、甲状腺、扁桃腺、尿管、膀胱および子宮を含む。）を対物ガラス上に固定し、乾燥させる。アビジン-ビオチン系を用いて、組織切片のペルオキシダーゼ染色を行う。

【0398】

ビオチン化された二次抗ヒト I g G とともに抗体または D V D - I g を温置し、免疫複

10

20

30

40

50

合体を生じさせる。抗体またはDVD-Igの2および10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の最終濃度の免疫複合体を対物ガラス上の組織切片上に添加し、次いで、アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼキットと組織切片を30分間反応させる。その後、組織染色のために、ペルオキシダーゼ反応に対する基質であるDAB(3, 3'-ジアミノベンジジン)を4分間適用する。陽性対照組織切片として、抗原-セファロースビーズを使用する。標的抗原およびヒト血清ブロッティング研究は、さらなる対照としての役割を果たす。抗体またはDVD-Igの2および10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の最終濃度の免疫複合体を、標的抗原(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の最終濃度)またはヒト血清(最終濃度10%)とともに、30分間、予め温置し、次いで、対物ガラス上の組織切片上に添加し、次いで、アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼキットと組織切片を30分間反応させる。その後、組織染色のために、ペルオキシダーゼ反応に対する基質であるDAB(3, 3'-ジアミノベンジジン)を4分間適用する。

10

【0399】

何れの特異的染色も、問題となっている標的抗原の既知の発現に基づいて、予想された(例えば、抗原の発現と合致)または予想されない反応性であると判断される。特異的と判断された全ての染色には、強度と頻度のスコアを付与する。段階2(ヒト組織)および段階3(カニクイザル組織)の間の組織染色は、類似であるまたは異なると判断される。

【0400】

(実施例1. 1. 2. E) : インビトロにおける親抗体またはDVD-Ig抗体の殺腫瘍効果

腫瘍細胞上の標的抗原に結合する親抗体またはDVD-Igを、殺腫瘍効果について分析してもよい。簡潔に述べると、D-PBS-BSA(0.1%BSAを加えたダルベッコのリン酸緩衝化された生理的食塩水)で親抗体またはDVD-Igを希釈し、0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の最終濃度のヒト腫瘍細胞に添加する。37°Cで、加湿された5%CO₂雰囲気中において、3日間、プレートを温置する。腫瘍増殖阻害の%を測定するために、製造業者の指示書(Promega, Madison, WI)に従って、MTS試薬を用いて、各ウェル中の生きた細胞の数を定量する。抗体処理なしのウェルは0%阻害の対照として使用されるのに対して、細胞なしのウェルは100%阻害を示すと考えられる。

20

【0401】

アポトーシスを評価するために、以下のプロトコールによって、カスパーゼ-3の活性化を測定する。室温で振盪しながら、20分間、96ウェルプレート中の抗体処理された細胞を1×溶解緩衝液120 μL (1.67mMHepes、pH7.4、7mMKCl、0.83mM MgCl₂、0.11mMEDTA、0.11mMEGTA、0.57%CHAPS、1mMDTT、1×プロテアーゼ阻害剤カクテル錠；無EDTA；Roche Pharmaceuticals, Nutley, NJ)中に溶解する。細胞溶解後、カスパーゼ-3反応緩衝液(48mMHepes、pH7.5、252mMショ糖、0.1%CHAPS、4mMDTTおよび20 μM Ac-DEVD-AMC基質；Bio-mol Research Labs, Inc., Plymouth Meeting, PA)80 μL を添加し、37°Cで2時間、プレートを温置する。以下の設定：励起=360/40、発光=460/40を用いて、1420VICTOR Multilabel Counter(Perkin Elmer Life Sciences, Downers Grove, IL)上でプレートを読み取る。イソタイプ抗体対照処理された細胞と比較した抗体処理細胞からの蛍光単位の増加が見られ、これがアポトーシスの指標である。

30

40

【0402】

(実施例1. 1. 2. F) : インビトロにおける抗体またはDVD-Igによる受容体活性化の阻害

細胞受容体またはこのリガンドに結合する親抗体またはDVD-Igを、受容体活性化の阻害について試験してもよい。D-PBS-BSA(0.1%BSAを加えたダルベッコのリン酸緩衝化された生理的食塩水)で親抗体またはDVD-Igを希釈し、0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の最終濃度のヒト腫瘍細胞に添加する。37°Cで、加湿

50

された5%CO₂雰囲気中において、1時間、プレートを温置する。1から100ng/mLの濃度で、成長因子（例えば、IGF1またはIGF2）を細胞に5から15分間に添加して、受容体（例えば、IGF1R）自己リン酸化を刺激する。抗体処理なしのウェルは0%阻害の対照として使用されるのに対して、成長因子刺激なしのウェルは100%阻害を示すと考えられる。細胞抽出緩衝液（10mMTris、pH7.4、100mMNaCl、1mMEDTA、1mMEGTA、1mMNaF、1mMオルトバナジン酸ナトリウム、1%Triton X-100、10%グリセロール、0.1%SDSおよびプロテアーゼ阻害剤カクテル）で培養することによって、細胞溶解する。R&D System（Minneapolis, MN）から購入した特定のELISAキットを用いて、これらの細胞溶解物中のリン-IGF1Rを測定する。

10

【0403】

（実施例1. 1. 2. G）：ヒト癌異種移植片（皮下側面または自然発生転移）における、抗腫瘍細胞抗原抗体もしくはDVD-Ig自体による効果もしくは化学療法と組み合わせた効果

99%の生存率、組織培養フラスコ中で85%の集密度になるように、ヒト癌細胞を増殖させる。19から25グラムのSCID雌または雄マウス（Charles Rivers Labs）を耳標し、毛を剃る。次いで、右の脇腹に、研究0日目に、 2×10^6 ヒト腫瘍細胞（1:1マトリゲル）の0.2mlをマウスに皮下注射する。約150から200mm³の平均腫瘍容積を有するマウスの別個のかごに、マウスの大きさを合わせた後、ビヒクル（PBS）、抗体もしくはDVD-Igの投与（IP, Q3D/週）の投与および／または化学療法を開始した。予防注射の約10日後に開始して、週に2回、キャリパーの対によって腫瘍を測定し、式 $V = L \times W^2 / 2$ （V:容積、mm³; L:長さ、mm. W:幅、mm）に従って腫瘍容積を計算する。ビヒクルまたはアイソタイプ対照mAbを注射した動物における腫瘍と比較して、抗体もしくはDVD-Igを単独でまたは化学療法と組み合わせて処置した動物において、腫瘍容積の縮小が見られる。

20

【0404】

（実施例1. 1. 2. H）：フローサイトメトリーによって評価された、ヒト腫瘍細胞株の表面へのモノクローナル抗体の結合

目的の細胞表面抗原を過剰発現する安定な細胞株またはヒト腫瘍細胞株を組織培養フラスコから採集し、5%子ウシ胎児血清を含有するリン酸緩衝化された生理的食塩水（PBS）（PBS/FCs）中に再懸濁した。染色の前に、PBS/FCs中の200μg/mLのヒトIgGとともに、氷上で、ヒト腫瘍細胞を温置した。氷上で30から60分間、PBS/FCs中において、抗体またはDVD-Ig（1から2μg/mL）とともに、1から 5×10^5 細胞を温置した。細胞を2回洗浄し、ヤギ抗マウスIgG-フィコエリトリン（PBS/BSA中の1:300希釈）100μL（Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, Cat. 番号15-115-164）を添加した。氷上での30分の温置後、細胞を2回洗浄し、PBS/FCs中に再懸濁した。Becton Dickinson FACSCalibur（Becton Dickinson, San Jose, CA）を用いて、蛍光を測定した。データを表8に示す。

30

40

【0405】

【表 8】

表 8 : DVD-Ig を含有する EGFR (配列 2) の FACS 結合

DVD ID	配列 ID	位置	HC リンカー	LC リンカー	他の DVD ドメイン	JURCAT FACS EC50 (P. M)	親の U287IΔ2-7 FACS %
DVD774	EGFR (配列 2)	C	長い	長い	CD3	890	70
DVD773	EGFR (配列 2)	N	長い	長い	CD3	>10nM	105
DVD804	EGFR (配列 2)	C	長い	短い	CD3	650	70
DVD803	EGFR (配列 2)	N	長い	短い	CD3	>10nM	110
DVD332	EGFR (配列 2)	C	短い	短い	CD3	75	40
DVD331	EGFR (配列 2)	N	短い	短い	CD3	>50nM	115
DVD834	EGFR (配列 2)	C	短い	長い	CD3	700	65
DVD833	EGFR (配列 2)	N	短い	長い	CD3	>10nM	110

全ての DVD-Ig は、これらの細胞表面標的への結合を示した。DVD-Ig の N 末端ドメインは、細胞表面上のこれらの標的を親抗体と同等にまたはより良好に結合した。結合は、リンカーの長さを調整することによって復活または改善させ得る。

【0406】

(実施例 1. 2) : 目的のヒト抗原に対する親モノクローナル抗体の作製

親マウス mAb は、目的のヒト抗原に結合して中和することができ、この変形物は、以下のようにして得られる。

【0407】

(実施例 1. 2. A) : 目的のヒト抗原でのマウスの免疫化

完全フロイントアジュバントまたは Immune easy アジュバント (Qiagen, Valencia, CA) と混合された組み換え精製ヒト抗原 (例えば、IGF1, 2) 20 μg を、第 1 日目に、5 匹の 6 から 8 週齢の Balb/C、5 匹の C57B/6 マウスおよび 5 匹の A/J マウス中に皮下注射する。24 日、38 日および 49 日目に、不完全フロイントアジュバントまたは Immune easy アジュバントと混合された組み換え精製ヒト抗原変形物 20 μg を同じマウス中に皮下注射する。84 日または 112 日または 144 日目に、目的の組み換え精製ヒト抗原 1 μg をマウスの静脈内に注射する。

【0408】

(実施例 1. 2. B) : ハイブリドーマの作製

ハイブリドーマを作製するために、「Kohler, G. and Milstein, C (1975) Nature, 256: 495」に記載されている確立された方法に従って、実施例 1. 2. A に記載されている免疫化されたマウスから得られた脾細胞を、5:1 の比で、SP2/O-Ag-14 細胞と融合する。ウェル当たり 2.5×10^6 個の脾細胞の密度で、96 ウェルプレート中のアザセリンおよびヒポキサンチンを含有する選択培地中に融合産物を播種する。融合から 7 から 10 日後に、肉眼で観察できるハイブリドーマコロニーが観察される。ハイブリドーマコロニーを含有する各ウェルからの上清を、(実施例 1. 2. A に記載されているように) 目的の抗原に対する抗体の存在に関して、ELISA によって検査する。次いで、抗原特異的活性を示す上清を (実施例 1. 1. 2 のアッセイに記載されているように) 活性 (例えば、実施例 1. 1. 2. A に記載されてい

るようなバイオアッセイにおいて、目的の抗原を中和する能力）に関して検査する。

【0409】

（実施例 1. 2. C）：目的のヒト標的抗原に対する親モノクローナル抗体の同定および性質決定

（実施例 1. 2. C. 1）：親モノクローナル抗体の中和活性の分析

実施例 1. 2. A および 1. 2 B に従って作製された、目的の抗原に結合し、目的抗原の変形物（「抗原変形物」）も結合することができる親抗体の存在に関して、ハイブリドーマ上清をアッセイする。次いで、例えば、実施例 1. 1. 2. A のサイトカインバイオアッセイにおいて、抗原中和効力に関して、両アッセイにおいて陽性の抗体を有する上清を検査する。バイオアッセイにおいて 1000 pM 未満の IC_{50} 値、一実施形態では、100 pM 未満の IC_{50} 値を有する抗体を産生するハイブリドーマを増やし、限界希釈によってクローニングした。10% の低 Ig G ウシ胎児血清を含有する培地（Hy clone 番号 SH30151, Logan, UT）中に、ハイブリドーマ細胞を増殖させる。平均して、（クローン集団に由来する）各ハイブリドーマ上清 250 mL を採集し、「Harlow, E. and Lane, D. 1988 「Antibodies: A Laboratory Manual」」に記載されているように、濃縮し、プロテイン A アフィニティークロマトグラフィーによって精製する。例えば、実施例 1. 1. 2. A に記載されているようなサイトカインバイオアッセイを用いて、精製された mAb がこの標的抗原の活性を阻害する能力を測定する。

10

【0410】

（実施例 1. 2. C. 2）：目的のカニクイザル標的抗原に対する親モノクローナル抗体交叉反応性の分析

本明細書に記載されている選択された mAb が目的のカニクイザル抗原を認識するかどうかを測定するために、組み換えカニクイザル標的抗原を用いて、本明細書に記載されているように（実施例 1. 1. 1. B）、B I A C O R E 分析を行う。さらに、目的の組み換えカニクイザル抗原に対する mAb の中和能力は、サイトカインバイオアッセイにおいても測定され得る（実施例 1. 1. 2. A）。良好なカニクイザル交叉反応性（一実施形態において、ヒト抗原に対する反応性の 5 倍以内）を有する mAb を、さらなる性質決定のために選択する。

20

【0411】

（実施例 1. 2. D）：各マウス抗ヒトモノクローナル抗体に対する可変領域のアミノ酸配列の測定

cDNA の単離、組み換え抗ヒトマウス mAb の発現および性質決定は、以下のように行われる。各アミノ酸配列の決定のために、約 1×10^6 個のハイブリドーマ細胞を遠心によって単離し、製造業者の指示書に従って、Trizol (Gibco BRL/Invitrogen, Carlsbad, CA.) を用いて全 RNA を単離するために処理した。製造業者の指示書に従って、Superscript First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて、全 RNA を第一鎖 DNA の合成に供する。ポリ (A) + RNA を選択するための第一鎖合成を開始するために、オリゴ (dT) を使用する。次いで、マウス免疫グロブリン可変領域の増幅のために設計されたプライマーを用いる PCR によって、第一鎖 cDNA 産物を増幅する (Ig-Primer Sets, Novagen, Madison, WI)。アガロースゲル上で PCR 産物を分離し、切り出し、精製し、次いで、PCR 2.1-TOPO ベクター (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中に、TOPO Cloning キットを用いてサブクローニングし、化学的に形質転換受容能力を有する TOP10 イー・コリ (E. coli) (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中に形質転換する。挿入物を含有するクローンを同定するために、形質転換体に対してコロニー PCR を行う。QIAPrep Miniprep キット (Qiagen, Valencia, CA) を用いて、挿入物を含有するクローンからプラスミド DNA を単離する。M13 フォワードおよび M13 リバースプライマー (Fermenta

30

40

50

s Life Sciences, Hanover MD) を用いて、可変重鎖または可変軽鎖 DNA 配列を決定するために、両鎖に対して、プラスミド中の挿入物を配列決定する。mAb の可変重鎖および可変軽鎖配列を同定する。一実施形態において、次工程の開発（ヒト化）のための、リード mAb の群に関する選択基準には、以下のものが含まれる。

【0412】

■抗体は、CH₂ 中の標準的な N 結合型グリコシル化部位（NXS）を除き、N 結合型グリコシル化部位を一切含有しない

■抗体は、全ての抗体中の通常のシステインの他に、余分のシステインを一切含まない

■抗体配列は VH および VL に対して最も近いヒト生殖系列配列と並置され、あらゆる異常なアミノ酸は、他の天然のヒト抗体中での発生に関してチェックされるべきである

■抗体の活性に影響を及ぼさなければ、N 末端のグルタミン（Q）はグルタミン酸（E）に変化させる。これは、Q の環状化による不均一性を低減する。

■効率的なシグナル配列の切断を質量分析法によって確認する。これは、COS 細胞または 293 細胞材料を用いて行うことができる

■活性の喪失をもたらし得る Asn の脱アミド化のリスクに関して、タンパク質配列がチェックされる

■抗体は、凝集の低いレベルを有する

■抗体は、（研究相では）>5 から 10 mg/mL の溶解度を有する；>25 mg/mL

■抗体は、動的光散乱（DLS）によって、正常なサイズ（5 から 6 nm）を有する

■抗体は、低い電荷不均一性を有する

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

■抗体は、目的とするサイトカインに対して特異性を有する（実施例 1. 1. 2. C 参照）

■抗体は、予想外の組織交叉反応性を欠如する（実施例 1. 1. 2. D 参照）

■抗体は、ヒトとカニクイザル組織交叉反応性の間で類似性を有する（実施例 1. 1. 2. D 参照）

【0413】

（実施例 1. 2. 2）：組み換えヒト化親抗体

（実施例 1. 2. 2. 1）：組み換えキメラ抗ヒト親抗体の構築および発現

細菌中での相位的組み換えによって、2 つのヒンジ領域アミノ酸変異を含有するヒト IgG1 定常領域をコードする cDNA 断片によって、マウス抗ヒト親 mAb の重鎖定常領域をコードする DNA を置き換える。これらの変異は、234 位のロイシンからアラニンへの変化（EU 付番）および 235 位のロイシンからアラニンへの変化である（Lund et al. (1991) J. Immunol. 147:2657）。これらの抗体のそれぞれの軽鎖定常領域は、ヒト κ 定常領域によって置き換えられる。pBOS 発現プラスミド中に連結されたキメラ重鎖および軽鎖 cDNA の同時形質移入によって、完全長キメラ抗体を COS 細胞中で一過性に発現させる（Mizushima and Nagata (1990) Nucleic Acids Res. 18:5322）。プロテイン A セファロースクロマトグラフィーによって、組み換えキメラ抗体を含有する細胞上清を精製し、酸緩衝液の添加によって、結合された抗体を溶出する。抗体を中性にし、PBS 中に透析する。

【0414】

キメラ mAb をコードする重鎖 cDNA を、このキメラ軽鎖 cDNA とともに（何れも、pBOS ベクター中に連結されている。）COS 細胞中へ同時形質移入する。プロテイン A セファロースクロマトグラフィーによって、組み換えキメラ抗体を含有する細胞上清を精製し、酸緩衝液の添加によって、結合された抗体を溶出する。抗体を中性にし、PBS 中に透析する。

【0415】

次いで、結合する能力に関して（B i a c o r eによる。）および機能的活性（例えば、実施例 1. 1. 1. Bおよび1. 1. 2. B中に記載されているように、I g Eのサイトカイン誘導性産生を阻害すること）に関して、精製されたキメラ抗ヒト親m A bを検査する。親ハイブリドーマm A bの活性を維持するキメラm A bを、将来の開発のために選択する。

【0416】

（実施例 1. 2. 2. 2）：ヒト化抗ヒト親抗体の構築および発現

（実施例 1. 2. 2. 2. A）：ヒト抗体フレームワークの選択

V e c t o r N T I ソフトウェアを用いて（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/retrieveig.html> で、NCBI I g B l a s t ウェブサイトから得られた。）、44のヒト免疫グロブリン生殖系列可変重鎖または46の生殖系列可変軽鎖配列に対して、それぞれのマウス可変重鎖および可変軽鎖遺伝子配列を別々に並置する。

10

【0417】

ヒト化は、アミノ酸配列の相同性、C D R クラスター分析、発現されたヒト抗体間での使用頻度およびヒト抗体の結晶構造に関して利用可能な情報に基づく。抗体結合、V H - V L 対合およびその他の要因に対して起こり得る効果を考慮に入れて、少数の例外を有しつつ、マウスとヒトのフレームワーク残基が異なる場所で、マウス残基をヒト残基へ変異させる。マウス抗体可変領域の実際のアミノ酸配列に対する相同性の高い程度（即ち、配列類似性）を有するヒト生殖系列抗体配列またはこの亜群の解析に基づいて、さらなるヒト化戦略を設計する。

20

【0418】

抗体の結合部位であるC D Rの構造にとって不可欠であると予想されるマウス抗体配列に特有の残基を同定するために、相同性モデリングを使用する。相同性モデリングは、タンパク質に対して、近似的な三次元座標を作製するコンピュータを利用した方法である。最初の座標の源およびこのさらなる精緻化のための指針は、三次元座標が公知でありおよびこの配列が第一のタンパク質の配列と関連する第二のタンパク質（参照タンパク質）である。参照タンパク質と座標が所望されるタンパク質（標的タンパク質）との間の対応を作製するために、2つのタンパク質の配列間での関連性が使用される。参照および標的タンパク質の一次配列を、参照タンパク質から標的タンパク質へ直接転移された2つのタンパク質の同一部分の座標と並置する。既に転移されたモデル座標との一貫性を確保するために精緻化された包括的構造テンプレートおよびエネルギーから、（例えば、残基の変異、挿入または欠失から得られる）2つのタンパク質の合致しない部分に対する座標を構築する。このコンピュータによるタンパク質構造は、さらに精緻化され、またはモデル化研究で直接使用され得る。モデル構造の品質は、参照および標的タンパク質が関連しているという主張の正確さ、ならびに配列の並置が構築される精度によって決定される。

30

【0419】

マウスm A bに関しては、適切な参照構造を同定するために、B L A S T 検索と視覚的検査の組み合わせが使用される。参照および標的アミノ酸配列間での25%の配列同一性は、相同性モデル化作業を試みるのに必要な最低条件と考えられる。配列の並置は手動で構築され、モデル座標はプログラムJ a c k a lを用いて作製される（P e t r e y, D. e t a l. （2003）P r o t e i n s 53（補遺6）：430-435参照）。

40

【0420】

選択された抗体のマウスおよびヒトフレームワーク領域の一次配列は、著しい同一性を共有する。異なる残基の位置は、マウス抗体の観察された結合力を保持するために、ヒト化された配列中にマウス残基を含めるための候補である。ヒトおよびマウス配列の間で異なるフレームワーク残基のリストは、手作業で構築される。

【0421】

あるフレームワーク残基が抗体の結合特性に影響を及ぼす確率は、C D R 残基へのこの近接性に依存する。従って、モデル構造を使用する場合、マウスとヒト配列間で異なる残

50

基は、C D R中の何れかの原子からのこれらの距離に従って順位付けされる。何れかのC D R原子の4.5オングストローム以内に存在する残基は最も重要であると同定され、ヒト化抗体中にマウス残基を保持する（即ち、逆変異）ための候補とすることが推奨される。

【0422】

コンピュータによって構築されたヒト化抗体は、オリゴヌクレオチドを用いて構築される。それぞれの可変領域cDNAに対して、それぞれ60から80個のヌクレオチドのうち6個のヌクレオチドが、各オリゴヌクレオチドの5'および/または3'末端の20ヌクレオチドだけ互いに重複するように設計される。徐冷反応では、6つのオリゴヌクレオチド全てを合わせ、沸騰させ、dNTPの存在下で、徐冷する。重複するオリゴヌクレオチド間の約40塩基対の間隙を埋めるために、DNAポリメラーゼI、巨大（Klenow）断片（New England Biolabs 番号M0210, Beverly, MA.）を添加する。修飾されたpBOSベクター中の多重クロニング部位に対して相補的な突出配列を含有する2つの最も外側のプライマーを用いて、可変領域遺伝子全体を増幅するために、PCRを実施する（Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) *Nucleic Acids Res.* 18:17）。18:17）。各cDNA集合物から得られたPCR産物をアガロースゲル上で分離し、予想された可変領域cDNAサイズに対応するバンドを切り出し、精製する。細菌中での相同的組み換えによって、2つのヒンジ領域アミノ酸変異を含有するヒトIgG1定常領域をコードするcDNA断片上に、可変重鎖領域をインフレームに挿入する。これらの変異は、234位のロイシンからアラニンへの変化（EU付番）および235位のロイシンからアラニンへの変化である（Lund et al. (1991) *J. Immunol.* 147:2657）。可変軽鎖領域は、相同的組み換えによって、ヒトκ定常領域とインフレームに挿入する。細菌のコロニーを単離し、プラスミドDNAを抽出する。cDNA挿入物の全体を配列決定する。完全長のヒト化抗ヒト抗体を一過性に作製するために、各抗体に対応する正しいヒト化重鎖および軽鎖をCOS細胞中に同時形質移入する。プロテインAセファロースクロマトグラフィーによって、組み換えキメラ抗体を含有する細胞上清を精製し、酸緩衝液の添加によって、結合された抗体を溶出する。抗体を中性にし、PBS中に透析する。

【0423】

（実施例1.2.2.3）：ヒト化抗体の性質決定

例えば、実施例1.1.2.Aに記載されているサイトカインバイオアッセイを用いて、精製されたヒト化抗体が機能的活性を阻害する能力を測定する。実施例1.1.1.Bに記載されている表面プラズモン共鳴（Biacore（登録商標））測定を用いて、組み換えヒト抗原へのヒト化抗体の結合親和性を測定する。バイオアッセイから得られたIC₅₀値およびヒト化抗体の親和性に順位を付ける。親ハイブリドーマmAbの活性を完全に維持するヒト化mAbを、将来の開発のための候補として選択する。最も好ましい上位2から3個のヒト化mAbをさらに性質決定する。

【0424】

（実施例1.2.2.3.A）：ヒト化抗体の薬物速度論的分析

Sprague-Dawleyラットおよびカニクイザルにおいて、薬物速度論的研究を実施する。雄および雌のラットおよびカニクイザルに、4mg/kgのmAbの単回用量を静脈内または皮下に投薬し、抗原捕捉ELISAを用いて試料を分析し、ノンコンパートメント分析によって、薬物速度論的パラメータを測定する。要約すれば、ヤギ抗ビオチン抗体（5mg/mL、4℃、一晚）でELISAプレートを被覆し、Superblock（Pierce）でブロッキングし、室温で2時間、10%SuperblockTTBS中の50ng/mLのビオチン化されたヒト抗原とともに温置する。血清試料を系列希釈し（TTBS中の0.5%血清、10%Superblock）、室温で30分間、プレート上で温置する。HRP標識されたヤギ抗ヒト抗体を用いて検出を行い、4パラメータロジスティックフィッティングを使用する標準曲線の助けを得て濃度を測定する

。薬物速度論的パラメータに対する値は、WinNonlinソフトウェア（Pharsight Corporation, Mountain View, CA）を使用するノンコンパートメントモデルによって測定する。優れた薬物速度論的特性（ $T_{1/2}$ は、8から13日またはこれより良好、低い排除速度および優れた生物学的利用性50から100%を有する。）を有するヒト化mAbを選択する。

【0425】

（実施例1.2.3.B）：ヒト化モノクローナル抗体の物理化学的およびインビトロ安定性分析

サイズ排除クロマトグラフィー

2.5mg/mLになるように、抗体を水で希釈し、TSKゲルG3000SWXLカラム（Tosoh Bioscience, cat 番号 k5539-05k）を使用するShimadzuHPLCシステム上で20mLを分析する。0.3mL/分の流速で、211mM硫酸ナトリウム、92mMリン酸ナトリウム、pH7.0で、試料をカラムから溶出する。HPLCシステムの作動条件は、以下のとおりである。

移動相：211mM Na_2SO_4 、92mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、pH7.0

勾配：等濃度

流速：0.3mL/分

検出波長：280nm

自動試料採取装置冷却温度：4℃

カラムオープン温度：室温

実行時間：50分

【0426】

DVD-Igの純度データを表9に示す。

【0427】

10

20

【表 9】

表 9 : サイズ 排除カマトグラフィーによって測定された親抗体および DVD-Ig 構築物の純度

DVD ID	配列 ID	位置	HC リンカー	LC リンカー	他の DVD ドメイン	%モノマー (純度)
DVD774	EGFR (配列 2)	C	長い	長い	CD3	85
DVD773	EGFR (配列 2)	N	長い	長い	CD3	97
DVD804	EGFR (配列 2)	C	長い	短い	CD3	87
DVD803	EGFR (配列 2)	N	長い	短い	CD3	91
DVD332	EGFR (配列 2)	C	短い	短い	CD3	91
DVD331	EGFR (配列 2)	N	短い	短い	CD3	99
DVD834	EGFR (配列 2)	C	短い	長い	CD3	82
DVD833	EGFR (配列 2)	N	短い	長い	CD3	99
DVD322	EGFR (配列 2)	C	短い	短い	EGFR (配列 1)	97.8
DVD321	EGFR (配列 2)	N	短い	短い	EGFR (配列 1)	94.4
DVD766	EGFR (配列 2)	C	長い	長い	EGFR (配列 1)	95.1
DVD765	EGFR (配列 2)	N	長い	長い	EGFR (配列 1)	92.5
DVD796	EGFR (配列 2)	C	長い	短い	EGFR (配列 1)	97.9
DVD795	EGFR (配列 2)	N	長い	短い	EGFR (配列 1)	96.2
DVD826	EGFR (配列 2)	C	短い	長い	EGFR (配列 1)	95.7
DVD825	EGFR (配列 2)	N	短い	長い	EGFR (配列 1)	95.0

DVD-Ig は、多くの DVD-Ig が 90% を超える単量体を示す優れた SEC 特性を示した。この DVD-Ig の特性は、親抗体に対して観察されたものと似ている。

【0428】

SDS-PAGE

還元および非還元条件下の両方で、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によって抗体を分析する。アダリムマブプロット AFP04C を対照として使用する。還元条件に関しては、100mM DTT を加えた 2×tris グリシン SDS-PAGE 試料緩衝液 (Invitrogen, cat 番号 LC2676, lot 番号 1323208) と試料を 1:1 で混合し、60℃ で 30 分間加熱する。非還元条件に関しては、試料を試料緩衝液と 1:1 で混合し、100℃ で 5 分間加熱する。還元された試料 (10mg/レーン) は 12% プレキャスト tris-グリシンゲル (Invitrogen, cat 番号 EC6005box, lot 番号 6111021) 上に搭載し、還元されていない試料 (10mg/レーン) は、8% から 16% の pr

ecasttris-グリシングル (Invitrogen, cat 番号 EC6045 box, lot 番号 6111021) 上に搭載する。分子量マーカーとして、SeeBlue Plus 2 (Invitrogen, cat 番号 LC5925, lot 番号 1351542) を使用する。XCell SureLock ミニセルゲルボックス (Invitrogen, cat 番号 EI0001) 中でゲルを走行させ、試料をゲル中に積み重ねるために、まず 75 の電圧を印加した後、色素の先頭がゲルの底に到達するまで、125 の定常電圧を印加することによってタンパク質を分離する。使用する走行緩衝液は、10×tris グリシン SDS 緩衝液 (ABC, MPS-79-080106) から調製される 1×tris グリシン SDS 緩衝液である。コロイド状青色染色 (Invitrogen cat 番号 46-7015, 46-7016) を用いて、ゲルを一晩染色し、バックグラウンドが透明になるまで、Milli-Q 水で脱色させる。次いで、Epson Expression スキャナー (モデル 1680、S/NDASX003641) を用いて、染色されたゲルをスキャンした。

10

【0429】

沈降速度分析

3つの標準的な 2 セクターカーボンエポンセンターピースのそれぞれの試料チャンバー中に抗体を搭載する。これらのセンターピースは 1.2 cm の光路長を有しており、サファイアウィンドウを用いて作製されている。参照緩衝液のために PBS を使用し、各チャンバーは 140 μL を含有した。Beckman Proteome Lab XL-I 分析用超遠心装置 (シリアル番号 PL106C01) 中の 4 つ穴 (AN-60Ti) ローターを用いて、全ての試料を同時に調べる。

20

【0430】

走行条件はプログラムされ、遠心の管理は、Proteome Lab (v5.6) を用いて行われる。試料およびローターは、分析の前に 1 時間、熱的に平衡化させる (20.0 ± 0.1 °C)。3000 rpm で適切な細胞の搭載の確認を行い、各細胞に対して単一の走査を記録する。沈降速度条件は、以下のとおりである。

試料セル容積：420 mL

参照セル容積：420 mL

温度：20 °C

ローター速度：35,000 rpm

30

時間：8:00 時間

UV 波長：280 nm

放射状 (radial) ステップのサイズ：0.003 cm

データ収集：シグナル平均化なしに、ステップ毎に 1 つのデータポイント

走査の総数：100

【0431】

完全な状態の抗体の LC-MS 分子量測定

LC-MS によって、完全な状態の抗体の分子量を分析する。約 1 mg/mL になるように、水で各抗体を希釈する。脱塩し、APIQstarpulsari 質量分析装置 (Applied Biosystems) 中に、試料 5 mg を導入するために、タンパク質マイクロトラップ (Michrom Bioresources, Inc, cat 番号 004/25109/03) を備えた 1100 HPLC (Agilent) システムを使用する。試料を溶出するために、短い勾配を使用する。50 mL/分の流速で、移動相 A (HPLC 水中、0.08 % FA、0.02 % TFA) および移動相 B (アセトニトリル中、0.08 % FA および 0.02 % TFA) を用いて勾配を実行する。質量分析装置は、2000 から 3500 質量対電荷比の走査範囲で、4.5 kV のスプレー電圧で操作する。

40

【0432】

抗体軽鎖および重鎖の LC-MS 分子量測定

抗体軽鎖 (LC)、重鎖 (HC) および脱グリコシル化された HC の分子量測定は、L

50

C-M Sによって分析する。1 m g / m Lになるように、水で抗体を希釈し、3 7 ° Cで3 0 分間、1 0 m M D T Tの最終濃度で、試料をL CおよびH Cに還元する。抗体を脱グリコシル化するために、1 0 0 m Lの総容量で、P G NアーゼF 2 m L、1 0 % N-オクチルグルコシド5 m Lとともに、3 7 ° Cで一晩、抗体1 0 0 m Lを温置する。脱グリコシル化後、1 0 m M D T Tの最終濃度を用いて、3 7 ° Cで3 0 分間、試料を還元する。脱塩し、A P I Q s t a r p u l s a r i 質量分析装置 (A p p l i e d B i o s y s t e m s) 中に、試料 (5 m g) を導入するために、C 4 カラム (V y d a c, c a t 番号 2 1 4 T P 5 1 1 5, S / N 0 6 0 2 0 6 5 3 7 2 0 4 0 6 9) を備えたA g i l e n t 1 1 0 0 H P L C システムを使用する。試料を溶出するために、短い勾配を使用する。5 0 m L / 分の流速で、移動相 A (H P L C 水中、0 . 0 8 % F A、0 . 0 2 % T F A) および移動相 B (アセトニトリル中、0 . 0 8 % F A および 0 . 0 2 % T F A) を用いて勾配を実行する。質量分析装置は、8 0 0 から 3 5 0 0 質量対電荷比の走査範囲で、4 . 5 k V のスプレー電圧で操作する。

10

【0 4 3 3】

ペプチドマッピング

7 5 m M 炭酸水素アンモニウム中の 6 M 塩酸グアニジンの最終濃度を用いて、室温で 1 5 分間、抗体を変性させる。変性された試料を、3 7 ° Cで 6 0 分間、1 0 m M D T Tの最終濃度で還元した後、暗所にて、3 7 ° Cで 3 0 分間、5 0 m M ヨード酢酸 (I A A) でアルキル化する。アルキル化に続いて、4 ° Cで、1 0 m M 炭酸水素アンモニウムの 4 リットルに対して、試料を一晩透析する。1 0 m M 炭酸水素アンモニウム、p H 7 . 8 によって、透析された試料を 1 m g / m L になるように希釈し、3 7 ° Cで 4 時間、1 : 2 0 (w / w) のトリプシン / L y s - C : 抗体比で、トリプシン (P r o m e g a, c a t 番号 V 5 1 1 1) または L y s - C (R o c h e, c a t 番号 1 1 0 4 7 8 2 5 0 0 1) を用いて、抗体 1 0 0 m g を消化する。1 N H C l の 1 m L で、消化物を反応停止させる。質量分析検出を用いたペプチドマッピングのために、A g i l e n t 1 1 0 0 H P L C システムを有する C 1 8 カラム (V y d a c, c a t 番号 2 1 8 T P 5 1, S / N N E 9 6 0 6 1 0 . 3 . 5) 上での逆相高性能液体クロマトグラフィー (R P H P L C) によって、消化物 4 0 m L を分離する。5 0 m L / 分の流速で、移動相 A (H P L C 等級の水中の 0 . 0 2 % T F A および 0 . 0 8 % F A) および移動相 B (アセトニトリル中の 0 . 0 2 % T F A および 0 . 0 8 % F A) を使用する勾配を用いて、ペプチドの分離を行う。4 . 5 k V のスプレー電圧での陽性モードおよび 8 0 0 から 2 5 0 0 質量対電荷比のスキニング範囲で、A P I Q S T A R P u l s a r i 質量分析装置を操作する。

20

30

【0 4 3 4】

ジスルフィド結合マッピング

抗体を変性させるために、抗体 1 0 0 m L を 1 0 0 m M 炭酸水素アンモニウム中の 8 M 塩酸グアニジン 3 0 0 m L と混合する。p H が 7 と 8 の間にあることを確かめるために、p H をチェックし、6 M 塩酸グアニジンの最終濃度で、室温で 1 5 分間、試料を変性させる。変性された試料の一部 (1 0 0 m L) を、M i l l i - Q 水で 6 0 0 m L に希釈して、1 M の最終塩酸グアニジン濃度を得る。3 7 ° Cで約 1 6 時間、1 : 5 0 のトリプシンまたは 1 : 5 0 の L y s - C : 抗体 (w / w) 比 (4 . 4 m g 酵素 : 2 2 0 m g 試料) のトリプシン (P r o m e g a, c a t 番号 V 5 1 1 1, l o t 番号 2 2 2 6 5 9 0 1) または L y s - C (R o c h e, c a t 番号 1 1 0 4 7 8 2 5 0 0 1, l o t 番号 1 2 8 0 8 0 0 0) の何れかで、試料 (2 2 0 m g) を消化する。試料に、トリプシンまたは L y s - C をさらに 5 m g 添加し、3 7 ° Cでさらに 2 時間、消化を進行させる。各試料に T F A 1 m L を添加することによって、消化を停止させる。A g i l e n t H P L C システム上の C 1 8 カラム (V y d a c, c a t 番号 2 1 8 T P 5 1 S / N N E 0 2 0 6 3 0 - 4 - 1 A) を用いる R P H P L C によって、消化された試料を分離する。5 0 m L / 分の流速で、移動相 A (H P L C 等級の水中の 0 . 0 2 % T F A および 0 . 0 8 % F A) および移動相 B (アセトニトリル中の 0 . 0 2 % T F A および 0 . 0 8 % F A) を使用するペプチドマッピングに対して使用したのと同じ勾配を用いて、分離を行う。H P L C 操作条

40

50

件は、ペプチドマッピングに対して使用したものと同一である。4. 5 kVのスプレー電圧での陽性モードおよび800から2500質量対電荷比のスキャン範囲で、APIQSTAR Pulsari質量分析装置を操作する。ペプチドの観察された分子量を、ジスルフィド結合によって結合されたトリプシンまたはLys-Cペプチドの予想される分子量とマッチさせることによって、ジスルフィド結合を割り振る。

【0435】

遊離のスルフヒドリルの決定

抗体中の遊離のシステインを定量するために使用した方法は、Ellman試薬、5, 5-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(DTNB)の、スルフヒドリル基(SH)との反応(この反応は、特徴的な発色性産物である5-チオ(2-ニトロ安息香酸)(TNB)を生成する。)を基礎とする。反応は、式：

$DTNB + RSH \rightarrow RS-TNB + TNB^- + H^+$ で図示される。

【0436】

TNB-の吸光度は、Cary 50分光光度計を用いて、412 nmで測定される。遊離のSH標準として、2メルカプトエタノール(b-ME)の希釈物を用いて、吸光度曲線をプロットし、タンパク質中の遊離のスルフヒドリル基の濃度を試料の412 nmの吸光度から求める。

【0437】

0.142 mMの最終濃度まで、HPLC等級の水で14.2 M b-MEを系列希釈することによって、b-ME標準原液を調製する。次いで、各濃度に対する3つ組みの標準を調製する。Amicon ultra 10, 000 MWCO遠心フィルター(Millipore, cat 番号 UFC801096, lot 番号 L3KN5251)を用いて、抗体を10 mg/mLまで濃縮し、アダリムマブに対して使用される製剤緩衝液(5.57 mM一塩基性リン酸ナトリウム、8.69 mM二塩基性リン酸ナトリウム、106.69 mM NaCl、1.07 mM クエン酸ナトリウム、6.45 mM クエン酸、66.68 mM マニトール、pH 5.2、0.1% (w/w) Tween)に緩衝液を交換する。室温で20分間、振盪装置上で試料を混合する。次いで、100 mM Tris緩衝液、pH 8.1の180 mLを各試料および標準に添加した後、10 mM リン酸緩衝液 pH 8.1中の2 mM DTNBの300 mLを添加する。完全な混合後、Cary 50分光光度計上で、412 nmでの吸収に関して、試料および標準を測定する。遊離のSHの量とb-ME標準のOD_{412 nm}をプロットすることによって標準曲線を得る。ブランクを差し引いた後のこの曲線に基づいて、試料の遊離SH含量を計算する。

【0438】

弱陽イオン交換クロマトグラフィー

10 mM リン酸ナトリウム、pH 6.0を用いて、抗体を1 mg/mLまで希釈する。WCX-10 Pro Pac分析用カラム(Dionex, cat 番号 054993, S/N 02722)を備えたShimadzu HPLCシステムを用いて、電荷の不均一性を分析する。80%の移動相A(10 mM リン酸ナトリウム、pH 6.0)および20%の移動相B(10 mM リン酸ナトリウム、500 mM NaCl、pH 6.0)中のカラムに試料を搭載し、1.0 mL/分の流速で溶出する。

【0439】

オリゴ糖の特性決定

抗体のPNGアゼF処理後に放出されるオリゴ糖を、2-アミノベンズアミド(2-AB)標識試薬を用いて誘導化する。順相高性能液体クロマトグラフィー(NPHPLC)によって、蛍光標識されたオリゴ糖を分離し、既知標準と比較した保持時間に基づいて、オリゴ糖の異なる形態を性質決定する。

【0440】

重鎖のFc部分からN結合型オリゴ糖を切断するために、まず、PNGアゼFを用いて抗体を消化する。PNGアゼF 2 mLおよび10% N-オクチルグルコシド 3 mLとともに、抗体(200 mg)を500 mLのEppendorf管に入れる。最終容量を

60 mLにするために、リン酸緩衝化された生理的食塩水を添加する。700 RPMに設定されたEppendorf温熱ミキサー中にて、試料を37℃で一晩温置する。対照として、アダリムマブロットAFP04CもPNGアーゼFで消化する。

【0441】

PNGアーゼF処理の後、タンパク質を沈殿させるために、750 RPMに設定されたEppendorf温熱ミキサー中にて、95℃で5分間、試料を温置し、次いで、沈殿したタンパク質を回転して沈降させるために、10,000 RPMで2分間、Eppendorf遠心管に試料を入れる。オリゴ糖を含有する上清を500 mLのEppendorf管に移し、65℃で、speed-vac中で乾燥させる。

【0442】

Prozymeから購入した2AB標識キット（cat番号GKK-404, lot番号132026）を用いて、オリゴ糖を2ABで標識する。標識試薬は、製造業者の指示書に従って調製する。酢酸（150 mL、キットに付属）をDMSOバイアル（キットに付属）に添加し、ピペット操作で溶液を数回上下させることによって混合する。（使用直前に）酢酸/DMSO混合物（100 mL）を2-AB色素のバイアルに移し、色素が完全に溶解するまで混合する。次いで、還元剤のバイアル（キットに付属）に色素溶液を添加し、よく混合する（標識試薬）。各乾燥されたオリゴ糖試料のバイアルに、標識試薬（5 mL）を添加し、完全に混合する。反応の2時間、65℃および700から800 RPMに設定されたEppendorf温熱ミキサー中に、反応バイアルを入れる。

【0443】

標識反応後、ProzymeのGlycoClean S Cartridges（cat番号GKI-4726）を用いて、過剰な蛍光色素を除去する。試料を添加する前に、milli-Q水1 mLでカートリッジを洗浄した後、30%酢酸溶液1 mLの5 isheで洗浄する。試料を添加する直前に、アセトニトリル（Burdick and Jackson, cat番号AH015-4）1 mLをカートリッジに添加する。

【0444】

アセトニトリルの全てがカートリッジを通過した後、洗浄直後のディスクの中心に試料を点状に配置し、ディスク上に10分間吸着させる。アセトニトリル1 mL、続いて、96%アセトニトリル1 mLの5つのisheで、ディスクを洗浄する。1.5 mLのEppendorf管上にカートリッジを配置し、milli-Q水の3回ishe（各ish 400 mL）を用いて、2-AB標識されたオリゴ糖を溶出する。

【0445】

Shimadzu HPLCシステムに接続されたGlycosepN HPLC（cat番号GKI-4728）カラムを用いて、オリゴ糖を分離する。Shimadzu HPLCシステムは、システム制御装置、脱気装置、2つのポンプ、試料冷却装置が付いた自動試料採取装置および蛍光検出装置からなった。

【0446】

高温での安定性

抗体の緩衝液は、5.57 mM一塩基性リン酸ナトリウム、8.69 mM二塩基性リン酸ナトリウム、106.69 mM NaCl、1.07 mMクエン酸ナトリウム、6.45 mMクエン酸、66.68 mM マニトール、0.1% (w/v) Tween、pH 5.2；または10 mMヒスチジン、10 mMメチオニン、4% マニトール、pH 5.9の何れかであり、Amicon超遠心フィルターを使用する。適切な緩衝液を用いて、抗体の最終濃度を2 mg/mLに調整する。次いで、抗体溶液をフィルター滅菌し、0.25 mLの分取試料を無菌条件下で調製する。1、2または3週間、分取試料を-80℃、5℃、25℃または40℃に放置する。温置期間の終了時に、サイズ排除クロマトグラフィーおよびSDS-PAGEによって試料を分析する。

【0447】

還元条件および非還元条件下の両方でのSDS-PAGEによって、安定性試料を分析する。使用した操作は、本明細書に記載されているものと同じである。コロイド状青色染

10

20

30

40

50

色 (Invitrogen cat 番号 46-7015, 46-7016) を用いて、ゲルを一晩染色し、バックグラウンドが透明になるまで、Milli-Q 水で脱色させる。次いで、Epson Expression スキャナー (モデル 1680、S/N D A S X 003641) を用いて、染色されたゲルをスキャンした。より高い感度を得るために、銀染色キット (Owl Scientific) を用いて、同じゲルを銀染色し、製造業者によって与えられた推奨操作を使用する。

【0448】

(実施例 1. 2. 2. 3. C) : ヒト癌腫異種移植片の増殖に対するヒト化モノクローナル抗体単独または化学療法との組み合わせの有効性

99% の生存率、組織培養フラスコ中で 85% の集密度になるように、ヒト癌細胞を増殖させる。19 から 25 グラムの雌または雄の SCID マウス (Charles Rivers Labs) に耳標を付け、毛を剃った。次いで、研究の 0 日目に、 2×10^6 個のヒト腫瘍細胞 0.2 mL (1:1 マトリゲル) をマウスの右脇腹に皮下接種する。約 150 から 200 mm³ の平均腫瘍容積を有するマウスの別々のかごの中に、マウスの大きさを合わせた後に、ビヒクル (PBS)、ヒト化抗体および/または化学療法の投与 (腹腔内、Q3D/週) を開始する。接種から約 10 日後に開始して、週に 2 回、測径器の対によって腫瘍を測定し、式 $V = L \times W^2 / 2$ (V: 容積、mm³; L: 長さ、mm; W: 幅、mm) に従って腫瘍容積を計算する。mAb のみで、または化学療法と組み合わせて処理された動物中には、ビヒクルのみまたはイソタイプ対照 mAb を与えた動物中の腫瘍と比べて、腫瘍容積の低下が見られる。

【0449】

(実施例 1. 4) : DVD-Ig の作製

本明細書に記載されているように選択された 2 つの親モノクローナル抗体 (一方はヒト抗原 A に対し、他方はヒト抗原 B に対する。) を用いて、2 つの抗原に結合することができる DVD-Ig 分子を構築する。

【0450】

(実施例 1. 4. 1) : 2 つのリンカー長を有する DVD-Ig の作製

ADCC/CDCE 効果機能を除くために、234 および 235 に変異を有する $\mu 1 F c$ を含有する定常領域を使用する。4 つの異なる抗 A/B DVD-Ig 構築物 (2 つは短いリンカーを有し、2 つは長いリンカーを有する (それぞれ、2 つの異なるドメイン方向性: $V_A - V_B - C$ および $V_B - V_A - C$)) を作製する (表 8 参照)。ヒト C1/Ck または CH1 ドメインの N 末端配列に由来するリンカー配列は、以下のとおりである。

【0451】

DVDAB 構築物の場合:

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

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

重鎖 ($\gamma 1$): 短いリンカー: ASTKGP (配列番号 21); 長いリンカー: ASTKGPSVFPLAP (配列番号 22)

DVDBA 構築物の場合: 軽鎖 (抗 B が λ を有する場合): 短いリンカー: QPKAAP (配列番号 15); 長いリンカー: QPKAAPSVTLFPP (配列番号 16)

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

重鎖 ($\gamma 1$): 短いリンカー: ASTKGP (配列番号 21); 長いリンカー: ASTKGPSVFPLAP (配列番号 22)

【0452】

pBOS 発現ベクター中に、重鎖および軽鎖構築物をサブクローニングし、COS 細胞中で発現させた後、プロテイン A クロマトグラフィーによって精製する。精製された物質

を SDS-PAGE および SEC 分析に供する。

【0453】

以下の表10は、各抗A／BDVD-Igタンパク質を発現させるために使用された重鎖および軽鎖構築物を記載する。

【0454】

【表10】

表10：抗A/B DVD-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	軽鎖構築
DVDABSL	DVDABHC-SL	DVDABLC-SL
DVDABLL	DVDABHC-LL	DVDABLC-LL
DVDBASL	DVDBAHC-SL	DVDBALC-SL
DVDBALL	DVDBAHC-LL	DVDBALC-LL

10

【0455】

（実施例1．4．2）：DVDABSLおよびDVDABLLに対するDNA構築物の分子クローニング

重鎖構築物DVDABHC-LLおよびDVDABHC-SLを作製するために、A抗体のVHドメインは特異的なプライマー（3'プライマーは、それぞれ、SL／LL構築物に対する短い／長いライナー配列を含有する。）を用いて、PCR増幅されるのに対して、B抗体のVHドメインは、特異的なプライマー（5'プライマーは、それぞれ、SL／LL構築物に対する短い／長いライナー配列を含有する。）を用いて増幅される。両PCR反応は、標準的なPCR技術と操作に従って行われる。2つのPCR生成物をゲル精製し、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する。標準的な相同的組み換え手法を使用することによって、SrfIおよびSalIによって二重消化されたpBOS-hcy1, z、非a哺乳動物発現ベクター（Abbot）の中に重複するPCR産物をサブクローニングする。

20

【0456】

軽鎖構築物DVDABLC-LLおよびDVDABLC-SLを作製するために、A抗体のVLドメインは特異的なプライマー（3'プライマーは、それぞれ、SL／LL構築物に対する短い／長いライナー配列を含有する。）を用いて、PCR増幅されるのに対して、B抗体のVLドメインは、特異的なプライマー（5'プライマーは、それぞれ、SL／LL構築物に対する短い／長いライナー配列を含有する。）を用いて増幅される。両PCR反応は、標準的なPCR技術と操作に従って行われる。2つのPCR生成物をゲル精製し、標準的なPCR条件を使用するその後の重複PCR反応のための重複テンプレートとして一緒に使用する。標準的な相同的組み換え手法を使用することによって、SrfIおよびNotIによって二重消化されたpBOS-hCk哺乳動物発現ベクター（Abbot）の中に重複するPCR産物をサブクローニングする。以下に記載されているDVDBASLおよびDVDBALLを作製するために、類似の手法が使用される。

30

【0457】

（実施例1．4．3）：DVDBASLおよびDVDBALLに対するDNA構築物の分子クローニング：

重鎖構築物DVDBAHC-LLおよびDVDBAHC-SLを作製するために、抗体BのVHドメインは特異的なプライマー（3'プライマーは、それぞれ、SL／LL構築物に対する短い／長いライナー配列を含有する。）を用いて、PCR増幅されるのに対して、抗体AのVHドメインは、特異的なプライマー（5'プライマーは、それぞれ、SL／LL構築物に対する短い／長いライナー配列を含有する。）を用いて増幅される。両PCR反応は、標準的なPCR技術と操作に従って行われる。2つのPCR生成物をゲル精製し、標準的なPCR条件を使用するその後の重複PCR反応のための重複テンプレートとして一緒に使用する。標準的な相同的組み換え手法を使用することによって、SrfI

40

50

および S a l I によって二重消化された p B O S - h c y 1, z、非 a 哺乳動物発現ベクター (A b b o t t) の中に重複する P C R 産物をサブクロニングする。

【0458】

軽鎖構築物 D V D B A L C - L L および D V D B A L C - S L を作製するために、抗体 B の V L ドメインは特異的なプライマー (3' プライマーは、それぞれ、S L / L L 構築物に対する短い / 長いライナー配列を含有する。) を用いて、P C R 増幅されるのに対して、抗体 A の V L ドメインは、特異的なプライマー (5' プライマーは、それぞれ、S L / L L 構築物に対する短い / 長いライナー配列を含有する。) を用いて増幅される。両 P C R 反応は、標準的な P C R 技術と操作に従って行われる。2つの P C R 生成物をゲル精製し、標準的な P C R 条件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する。標準的な相同的組み換え手法を使用することによって、S r f I および N o t I によって二重消化された p B O S - h C k 哺乳動物発現ベクター (A b b o t t) の中に重複する P C R 産物をサブクロニングする。

10

【0459】

(実施例 1. 4. 4) : さらなる D V D - I g の構築および発現

(実施例 1. 4. 4. 1) : D V D - I g ベクター構築物の調製

D V D - I g の中に取り込ませるために、特異的な抗原またはこのエピトープを認識する特異的抗体に対する親抗体アミノ酸配列は、上記ハイブリドーマの調製によって取得することが可能であり、または公知の抗体タンパク質または核酸を配列決定することによって取得することが可能である。さらに、文献から公知の配列を得ることができる。標準的な D N A 合成または増幅技術を使用し、所望の抗体断片を発現ベクター中に集合させ、標準的な組み換え D N A 技術を使用して、細胞内で発現させるための核酸を合成するために、前記配列を使用することができる。

20

【0460】

標準方法に従って、p H y b - C ベクターまたは p H y b - E ベクターに D V D - I g 配列をクロニングする (米国特許出願逐次番号 6 1 / 0 2 1, 2 8 2 参照)。

【0461】

p H y b - C ベクターは、複製の S V 4 0 真核生物起源、サイトメガロ・ウイルス真核細胞発現ベクター (p C M V)、3つのリーダー配列 (T P L)、スプライスドナー部位 (S D)、アデノウイルス後期エンハンサー因子 (e n h M L P)、スプライス受容部位 (S A)、ポリ A シグナル (P A) に続く興味対象の遺伝子のオープンリーディングフレーム (O R F) 領域、二回転対称因子 (D S)、エプスタイン・バー・ウイルスに由来する複製の真核生物起源 (O r i P)、繰り返し領域 (F R)、アンピリシン抵抗マーカー (A m p R) および複製の細菌起源 (p M B l o r i) を含む。

30

【0462】

p H y b - E ベクターは、複製の S V 4 0 真核生物起源、E F - 1 a 真核生物プロモーター、ポリ A シグナル (P A) に続く興味対象の遺伝子のオープンリーディングフレーム (O R F) 領域、二回転対称因子 (D S)、エプスタイン・バー・ウイルスに由来する複製の真核生物起源 (O r i P)、繰り返し領域 (F R)、アンピリシン抵抗マーカー (A m p R) および複製の細菌起源 (p M B l o r i) を含む。典型的な p H y b - E ベクターとしては、p H y b E - h C k、p H y b E - h C l および p H y b E - h C g l、z、n o n - a が挙げられる (米国特許出願逐次番号 6 1 / 0 2 1, 2 8 2 参照)。

40

【0463】

(実施例 1. 4. 4. 2) : 2 9 3 細胞中での形質移入および発現

D V D - I g タンパク質を作製するために、D V D - I g ベクター構築物を 2 9 3 細胞に形質移入する。D u r o c h e r e t a l. (2002) N u c l. A c i d s R e s. 30 (2) : E 9 and P h a m e t a l. (2005) B i o t e c h. B i o e n g i n e e r i n g 90 (3) : 332-44 において発表された方法の変法を、2 9 3 の一過性の形質移入手順に使用する。形質移入において使用した試薬は以下を含む。

50

【0464】

・加湿インキュベーターセット中の使い捨てのエルレンマイアーフラスコで、130 rpm、37℃および5%CO₂で培養したHEK 293-6E細胞（EBNA1を安定的に発現するヒト胎児腎臓細胞株；National Research Council Canadaから入手）。

・培養培地：FreeStyle 293 Expression Medium（Invitrogen 12338-018）+25μg/mL Geneticin（G418）（Invitrogen 10131-027）および0.1%Pluronic F-68（Invitrogen 24040-032）。

・形質移入培地：FreeStyle 293 Expression Medium +10mM HEPES（Invitrogen 15630-080）。 10

・ポリエチレンイミン（PEI）ストック：リニア25kDa PEI（Polysciences）で調製し、-15℃未満で保存した1 mg/mL無菌ストック溶液、pH 7.0。

・トリプトン供給培地：FreeStyle 293 Expression MediumにおけるトリプトンN1（Organotechnie, 19554）の5%w/v無菌ストック。

【0465】

形質移入のための細胞調製：形質移入の約2から4時間前に、遠心分離によってHEK 293-6E細胞を回収し、約100万生菌細胞/mLの細胞密度で培養培地中で再懸濁する。各形質移入のために、使い捨ての250-mLエルレンマイアーフラスコに、40 mLの細胞懸濁液を移し、2から4時間培養する。 20

【0466】

形質移入：形質移入培地およびPEIストックを予め室温（RT）に温める。各形質移入のために、5 mLの形質移入培地中で、25μgのプラスミドDNAおよび50μgのポリエチレンイミン（PEI）を合わせ、室温で15から20分間培養して、DNA：PEI複合体を形成させる。BR3-Ig形質移入のために、1回の形質移入につき、25μgのBR3-Igプラスミドを使用する。予め調製した40-mLの培養液に各5-mLのDNA：PEI複合体混合物を添加し、130 rpm、37℃および5%CO₂の加湿インキュベーターセットに戻す。20から28時間後、各形質移入に5 mLのトリプトン供給培地を添加し、6日間培養し続ける。 30

【0467】

DVD-Igの発現プロファイルを表11に示す。

【0468】

【表 1 1】

表 11: 抗体および DVD-Ig を含有する EGFR (配列 2) の一過性 HEK293 発現収量

DVD-ID	配列 ID	位置	HC リンカー	LC リンカー	他の DVD ドメイン	発現率 (mg/ L)
AB064	EGFR (配列 2)			—	—	47.2
AB002	CD3			—	—	67.2
AB015	DLL-4			—	—	57.6
AB033	EGFR (配列 1)			—	—	44.4
AB116	ErbB3 (配列 3)			—	—	61.0
AB063	ErbB3 (配列 2)			—	—	37.8
AB062	ErbB3 (配列 1)			—	—	24.6
AB012	HGF			—	—	22.8
AB011	IGF1R			—	—	57.0
AB119	MTX (4-351-178)			—	—	1.6
AB121	NKG2D (KYK-2.0)			—	—	32.8
AB047	P1GF ()			—	—	23.6
AB005	RON			—	—	67.4
AB014	VEGF (配列 1)			—	—	52.4
AB117	VEGF (配列 3)			—	—	70.8
AB070	VEGF (配列 2)			—	—	1.2
DVD774	EGFR (配列 2)	C	長い	長い	CD3	3.8
DVD773	EGFR (配列 2)	N	長い	長い	CD3	0.6
DVD804	EGFR (配列 2)	C	長い	短い	CD3	2.6
DVD803	EGFR (配列 2)	N	長い	短い	CD3	40.6
DVD332	EGFR (配列 2)	C	短い	短い	CD3	1.0
DVD331	EGFR (配列 2)	N	短い	短い	CD3	31.0
DVD834	EGFR (配列 2)	C	短い	長い	CD3	3.0
DVD833	EGFR (配列 2)	N	短い	長い	CD3	1.7
DVD782	EGFR (配列 2)	C	長い	長い	DLL-4	16.6
DVD781	EGFR (配列 2)	N	長い	長い	DLL-4	55.0
DVD812	EGFR (配列 2)	C	長い	短い	DLL-4	44.4
DVD811	EGFR (配列 2)	N	長い	短い	DLL-4	43.8
DVD340	EGFR (配列 2)	C	短い	短い	DLL-4	48.4
DVD339	EGFR (配列 2)	N	短い	短い	DLL-4	23.6
DVD842	EGFR (配列 2)	C	短い	長い	DLL-4	28.6
DVD841	EGFR (配列 2)	N	短い	長い	DLL-4	48.2
DVD766	EGFR (配列 2)	C	長い	長い	EGFR (配列 1)	7.8
DVD765	EGFR (配列 2)	N	長い	長い	EGFR (配列 1)	7.0
DVD796	EGFR (配列 2)	C	長い	短い	EGFR (配列 1)	15.6
DVD795	EGFR (配列 2)	N	長い	短い	EGFR (配列 1)	26.6
DVD322	EGFR (配列 2)	C	短い	短い	EGFR (配列 1)	12.4
DVD321	EGFR (配列 2)	N	短い	短い	EGFR (配列 1)	15.6
DVD826	EGFR (配列 2)	C	短い	長い	EGFR (配列 1)	13.6
DVD825	EGFR (配列 2)	N	短い	長い	EGFR (配列 1)	12.4
DVD788	EGFR (配列 2)	C	長い	長い	ErbB (配列 3)	42.0

10

20

30

40

DVD-ID	配列 ID	位置	HC リンカー	LC リンカー	他の DVDドメイン	発現率 (mg/ L)
DVD787	EGFR (配列 2)	N	長い	長い	ErbB (配列 3)	32.8
DVD818	EGFR (配列 2)	C	長い	短い	ErbB (配列 3)	45.0
DVD817	EGFR (配列 2)	N	長い	短い	ErbB (配列 3)	29.8
DVD756	EGFR (配列 2)	C	短い	短い	ErbB (配列 3)	41.0
DVD755	EGFR (配列 2)	N	短い	短い	ErbB (配列 3)	22.4
DVD848	EGFR (配列 2)	C	短い	長い	ErbB3 (配列 3)	37.6
DVD847	EGFR (配列 2)	N	短い	長い	ErbB3 (配列 3)	34.0
DVD772	EGFR (配列 2)	C	長い	長い	ErbB3 (配列 2)	0.9
DVD771	EGFR (配列 2)	N	長い	長い	ErbB3 (配列 2)	15.2
DVD802	EGFR (配列 2)	C	長い	短い	ErbB3 (配列 3)	0.9
DVD801	EGFR (配列 2)	N	長い	短い	ErbB3 (配列 3)	22.4
DVD330	EGFR (配列 2)	C	短い	短い	ErbB3 (配列 2)	1.2
DVD329	EGFR (配列 2)	N	短い	短い	ErbB3 (配列 2)	16.6
DVD832	EGFR (配列 2)	C	短い	長い	ErbB3 (配列 2)	0.5
DVD831	EGFR (配列 2)	N	短い	長い	ErbB3 (配列 2)	15.0
DVD770	EGFR (配列 2)	C	長い	長い	ErbB3 (配列 1)	17.4
DVD769	EGFR (配列 2)	N	長い	長い	ErbB3 (配列 1)	16.2
DVD800	EGFR (配列 2)	C	長い	短い	ErbB3 (配列 1)	15.6
DVD799	EGFR (配列 2)	N	長い	短い	ErbB3 (配列 1)	26.4
DVD328	EGFR (配列 2)	C	短い	短い	ErbB3 (配列 1)	7.8
DVD327	EGFR (配列 2)	N	短い	短い	ErbB3 (配列 1)	10.2
DVD830	EGFR (配列 2)	C	短い	長い	ErbB3 (配列 1)	17.2
DVD829	EGFR (配列 2)	N	短い	長い	ErbB3 (配列 1)	17.2
DVD778	EGFR (配列 2)	C	長い	長い	HGF	2.0
DVD777	EGFR (配列 2)	N	長い	長い	HGF	24.8
DVD808	EGFR (配列 2)	C	長い	短い	HGF	9.8
DVD807	EGFR (配列 2)	N	長い	短い	HGF	33.6
DVD336	EGFR (配列 2)	C	短い	短い	HGF	7.6
DVD335	EGFR (配列 2)	N	短い	短い	HGF	23.8
DVD838	EGFR (配列 2)	C	短い	長い	HGF	5.8
DVD837	EGFR (配列 2)	N	短い	長い	HGF	23.4
DVD776	EGFR (配列 2)	C	長い	長い	IGF1R	0.3
DVD775	EGFR (配列 2)	N	長い	長い	IGF1R	23.4
DVD806	EGFR (配列 2)	C	長い	短い	IGF1R	4.4
DVD805	EGFR (配列 2)	N	長い	短い	IGF1R	44.8
DVD334	EGFR (配列 2)	C	短い	短い	IGF1R	18.6
DVD333	EGFR (配列 2)	N	短い	短い	IGF1R	48.0
DVD836	EGFR (配列 2)	C	短い	長い	IGF1R	0.4
DVD835	EGFR (配列 2)	N	短い	長い	IGF1R	27.8
DVD1210	EGFR (配列 2)	C	短い	短い	MTX (4-351-178)	0.0
DVD1211	EGFR (配列 2)	N	短い	短い	MTX (4-351-178)	1.9

10

20

30

40

DVD-ID	配列 ID	位置	HC リンカー	LC リンカー	他の DVD ドメイン	発現率 (mg/ L)
DVD1214	EGFR (配列 2)	C	長い	長い	NKG2D (KYK_2.0)	38.4
DVD1215	EGFR (配列 2)	N	長い	長い	NKG2D (KYK_2.0)	19.6
DVD784	EGFR (配列 2)	C	長い	長い	PIGF ()	28.8
DVD783	EGFR (配列 2)	N	長い	長い	PIGF ()	23.2
DVD814	EGFR (配列 2)	C	長い	短い	PIGF ()	21.8
DVD813	EGFR (配列 2)	N	長い	短い	PIGF ()	28.2
DVD342	EGFR (配列 2)	C	短い	短い	PIGF ()	38.2
DVD341	EGFR (配列 2)	N	短い	短い	PIGF ()	32.2
DVD844	EGFR (配列 2)	C	短い	長い	PIGF ()	22.0
DVD843	EGFR (配列 2)	N	短い	長い	PIGF ()	24.2
DVD768	EGFR (配列 2)	C	長い	長い	RON	35.6
DVD767	EGFR (配列 2)	N	長い	長い	RON	44.8
DVD798	EGFR (配列 2)	C	長い	短い	RON	49.0
DVD797	EGFR (配列 2)	N	長い	短い	RON	68.4
DVD326	EGFR (配列 2)	C	短い	短い	RON	55.6
DVD325	EGFR (配列 2)	N	短い	短い	RON	32.4
DVD828	EGFR (配列 2)	C	短い	長い	RON	46.6
DVD827	EGFR (配列 2)	N	短い	長い	RON	52.6
DVD780	EGFR (配列 2)	C	長い	長い	VEGF (配列 1)	0.1
DVD779	EGFR (配列 2)	N	長い	長い	VEGF (配列 1)	13.2
DVD810	EGFR (配列 2)	C	長い	短い	VEGF (配列 1)	1.4
DVD809	EGFR (配列 2)	N	長い	短い	VEGF (配列 1)	17.8
DVD338	EGFR (配列 2)	C	短い	短い	VEGF (配列 1)	2.0
DVD337	EGFR (配列 2)	N	短い	短い	VEGF (配列 1)	22.0
DVD840	EGFR (配列 2)	C	短い	長い	VEGF (配列 1)	1.6
DVD839	EGFR (配列 2)	N	短い	長い	VEGF (配列 1)	17.2
DVD792	EGFR (配列 2)	C	長い	長い	VEGF (配列 3)	56.4
DVD791	EGFR (配列 2)	N	長い	長い	VEGF (配列 3)	2.4
DVD822	EGFR (配列 2)	C	長い	短い	VEGF (配列 3)	83.0
DVD821	EGFR (配列 2)	N	長い	短い	VEGF (配列 3)	34.4
DVD760	EGFR (配列 2)	C	短い	短い	VEGF (配列 3)	74.4
DVD759	EGFR (配列 2)	N	短い	短い	VEGF (配列 3)	50.4
DVD852	EGFR (配列 2)	C	短い	長い	VEGF (配列 3)	71.6
DVD851	EGFR (配列 2)	N	短い	長い	VEGF (配列 3)	50.2
DVD790	EGFR (配列 2)	C	長い	長い	VEGF (配列 2)	1.3
DVD789	EGFR (配列 2)	N	長い	長い	VEGF (配列 2)	46.0
DVD820	EGFR (配列 2)	C	長い	短い	VEGF (配列 2)	1.6
DVD819	EGFR (配列 2)	N	長い	短い	VEGF (配列 2)	57.0
DVD758	EGFR (配列 2)	C	短い	短い	VEGF (配列 2)	1.1
DVD757	EGFR (配列 2)	N	短い	短い	VEGF (配列 2)	52.4
DVD850	EGFR (配列 2)	C	短い	長い	VEGF (配列 2)	2.4
DVD849	EGFR (配列 2)	N	短い	長い	VEGF (配列 2)	49.8

10

20

30

40

全ての DVD-I g は、293 細胞中で良好に発現された。DVD-I g は、プロテイン A カラム上で容易に精製することができる。多くの事例で、293 細胞の上清から、5 mg/L 超の精製された DVD-I g を容易に得ることができた。

50

【0469】

(実施例1.4.5) : A/B DVD-I gの性質決定およびリード選択

タンパク質Aおよびタンパク質Bの両方に対して、抗A/B DVD-I gの結合親和性をBiacore上で分析する。Biacore上での多重結合研究によって、DVD-I gの四価特性を調べる。一方、本明細書に記載されているように、それぞれ、バイオアッセイによって、タンパク質Aおよびタンパク質Bに対するDVD-I gの中和能を評価する。各mAbに対して本明細書に記載されているように、詳しい物理化学的および生物分析的(ラットPK)性質決定のために、元の親mAbの親和性および効力を最もよく保持するDVD-I g分子を選択する。多数の分析に基づいて、最終リードDVD-I gはCHO安定細胞株の開発に進み、カニクイザルでの安定性、薬物速度論および有効性研究ならびに前製剤活性において、CHO由来の物質を使用する。

10

【0470】

(実施例2) : 二重可変ドメイン免疫グロブリン(DVD-I g)の作製および性質決定

DVD-I g可変重およびDVD-I g可変軽鎖配列をコードするポリヌクレオチド断片を合成し、実施例1.4.4.1に従って、pHybC-D2ベクター中に断片をクローニングすることによって、既知のアミノ酸配列を有する親抗体を用いて二重可変ドメイン免疫グロブリン(DVD-I g)を作製した。実施例1.4.4.2に記載されているように、DVD-I g構築物を293細胞中にクローニングし、発現させた。標準的な方法に従って、DVD-I gタンパク質を精製した。表記されているように、実施例1.1.1および1.1.2に記載されている方法に従って、機能的な特徴を決定した。

20

【0471】

以下の例は、DVD-I g VHおよびVL鎖の配列を含む表をそれぞれ含む。

【0472】

(実施例2.1) : リンカーセット1を有するEGFR(配列2)およびEGFR(配列1)DVD-I gの作製

【0473】

【表 1 2】

表 12

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				12345678901234567890123456789012345
59	DVD321H	AB064VH	AB033VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGLVTVSS ASTKGP QVQLKQSGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKLEWLGVWS GGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSN DTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSA
60	DVD321L	AB064VL	AB033VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQKPKGKSFGLIYHGTNLDGVPSPRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR TVAAP DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQ SIGTNIHWYQQRNGSPRLIKYASESISGIPSRF SGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQNNNWPTT FGAGTKLEIKR
61	DVD322H	AB033VH	AB064VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSTCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKLEWLGVWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYDYEF FAYWGQGLVTVSA ASTKGP QVQLQESGPGLVKPS QTLSTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGKLEWMG YISYSGNTRYQPSLKSRTISRDTSKNQFFLKLNS VTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGLVTVSS
62	DVD322L	AB033VL	AB064VL	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRNGSPRLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQNNNWPTTFGAGTKLE IKR TVAAP DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQ DINSNIGWLQKPKGKSFGLIYHGTNLDGVPSPR SGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWT FGGGTKLEIKR

10

20

【0 4 7 4】

(実施例 2. 2) : リンカーセット 2 を有する E G F R (配列 2) および E G F R (配列 1) D V D - I g の作製

【0 4 7 5】

30

【表 1 3】

表 13

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
63	DVD765H	AB064VH	AB033VH	12345678901234567890123456789012345 QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTTLVTVSS ASTKGPSVFPLAP QVQLKQSGPGL VQPSQSLSTCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLE WLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSKQVFFK MNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGTTLVT VSA
64	DVD765L	AB064VL	AB033VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDGVPSPRFGSGSGSTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTGLE IKR TVAAPSVFIFPP DILLTQSPVILSVSPGERVS FSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLIKYASESI SGIPSRFGSGSGSTDFTLSINSVESEDIADYYCQQ NNNWPTTFGAGTKLELKR
65	DVD766H	AB033VH	AB064VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSTCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSKQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEF FAYWGQGTTLVTVSA ASTKGPSVFPLAP QVQLQESG PGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAWNIRQPPG KGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTISRDTSKNQ FFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTTLVT VSS
66	DVD766L	AB033VL	AB064VL	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRNGSPRLLIKYASESISGIPSRFGSGSGSTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR TVAAPSVFIFPP DIQMTQSPSSMSVSVGDRVT ITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLD DGVPSRFGSGSGSTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQ YAQFPWTFGGGTGLEIKR

10

20

【0 4 7 6】

(実施例 2. 3) : リンカーセット 3 を有する E G F R (配列 2) および E G F R (配列 1) D V D - I g の作製

【0 4 7 7】

30

【表 1 4】

表 14

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				12345678901234567890123456789012345
67	DVD795H	AB064VH	AB033VH	QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTIT SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTILVTVSS ASTKGPSVFPLAP QVQLKQSGPGL VQPSQSLSTCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLE WLGIWSSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFK MNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGTILVT VSA
68	DVD795L	AB064VL	AB033VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR TVAAP DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQ SIGTNIHWYQRTNGSPRLIKYASESISGIPSRF SGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQNNNWPTT FGAGTKLELKR
69	DVD796H	AB033VH	AB064VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSTCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGIWSSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEF FAYWGQGTILVTVSA ASTKGPSVFPLAP QVQLQESG PGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAWNIRQPPG KGLEWWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTITSRDTSKNQ FFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTILVT VSS
70	DVD796H	AB033VL	AB064VL	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQRTNGSPRLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQNNNWPTTFGAGTKLE LKR TVAAP DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQ DINSNIGWLQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRF SGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWT FGGGTKLEIKR

10

20

【0 4 7 8】

(実施例 2. 4) : リンカーセット 4 を有する E G F R (配列 2) および E G F R (配列 1) DVD-I g の作製

【0 4 7 9】

30

【表 15】

表 15

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
71	DVD825H	AB064VH	AB033VH	12345678901234567890123456789012345 QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTIT SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTTLVTVSS ASTKGP QVQLKQSGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWS GGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSN DTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGTTLVTVSA
72	DVD825L	AB064VL	AB033VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGKLE IKR TVAAPS VFI FP DILLTQSPVILSVSPGERVS FSCRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLLIKYASESI SGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQ NNNWPTTFGAGTKLELKR
73	DVD826H	AB033VH	AB064VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYDYEF FAYWGQGTTLVTVSA ASTKGP QVQLQESGPGLVKPS QTLSTCTVSGYSISSDFAWNIRQPPGKGLEWMG YISYSGNTRYQPSLKSRTITSRDTSKNQFFLKLNS VTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTTLVTVSS
74	DVD826L	AB033VL	AB064VL	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR TVAAPS VFI FP DIQMTQSPSSMSVSVGDRVT ITCHSSQDINSNIGWLQKPGKSFKGLIYHGTNLDD GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQ YAQFPWTFGGGKLEIKR

10

20

【0480】

(実施例 2. 5) : リンカーセット 1 を有する E G F R (配列 2) および R O N D V D
— I g の作製

【0481】

【表 16】

表 16

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				123456789 0 123456789 0 123456789 0 12345
75	DVD325H	AB064VH	AB005VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTTLVTVSS ASTKGPE VQLVQSGGGLVKPGGSL RLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISY DGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARFSGWPNYYGMDVWGQGTITVTVS S
76	DVD325L	AB064VL	AB005VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR TVAAP DVVMTQSPSLPVTGPGEPAISCRSSQ SLLHSNGFNVDWYLVKPGQSPHLLIYFGSYRASG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQAL QTPPWTFGGGTKVEIRR
77	DVD326H	AB005VH	AB064VH	EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMH WVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFSGWPN YGGMDVWGQGTITVTVSS ASTKGP QVQLQESGPG LVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAWNIRQPPGK GLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTISRDTSKNQFF LKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTITVTVS S
78	DVD326L	AB005VL	AB064VL	DVVMTQSPSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLHSNGF NYVDWYLVKPGQSPHLLIYFGSYRASGVDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPPWTFG QGTKVEIRR TVAAP DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTI TCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLDD GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQY AQFPWTFGGGTKLEIKR

10

20

【0482】

(実施例 2. 6) : リンカーセット 2 を有する E G F R (配列 2) および R O N D V D
— I g の作製

【0483】

30

【表 17】

表 17

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				123456789 0 123456789 0 123456789 0 12345
79	DVD767H	AB064VH	AB005VH	QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPE VQLVQSGGGL VKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLE WVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARFSGWPNYYYYGMDVWGQ GTTVTVSS
80	DVD767L	AB064VL	AB005VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVITITCHSSQDINSNIGW LQKPGKSFKGLIYHGTNLDGVP SRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR TVAAPS VFI FPP DVVM TQSPLSLPVT PGE PAS ISCRSSQSL LHSNGFN YVDWYLQKPGQSPHLLIYF GSYRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQALQTPPWTFGQGTKEIRR
81	DVD768H	AB005VH	AB064VH	EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMH WVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFSGWPN YYYYGMDVWGQGT TTVTVSS ASTKGPSVFPLAP QVQ LQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAWNWI RQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTISR TSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQ GTLVTVSS
82	DVD768L	AB005VL	AB064VL	DVVM TQSPLSLPVT PGE PASISCRSSQSL LHSNGF NYVDWYLQKPGQSPHLLIYF GSYRASGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPPWTFG QGTKEIRR TVAAPS VFI FPP DIQMTQSPSSMSVS VGDRVITITCHSSQDINSNIGWLQKPGKSFKGLIY HGTNLDGVP SRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFA TYYCVQYAQFPWTFGGGTKLEIKR

10

20

【0484】

(実施例2. 7) : リンカーセット3を有するEGFR（配列2）およびRONDVD— Igの作製

【0485】

30

【表 18】

表 18

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				123456789 0 123456789 0 123456789 0 12345
83	DVD797H	AB064VH	AB005VH	QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTIT SRDTSKNQFFLKLNSTAAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPE VQLVQSGGGL VKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLE WVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARFSGWPNYYYYGMDVWGQ GTTVTVSS
84	DVD797L	AB064VL	AB005VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVITITCHSSQDINSNIGW LQKPKGKSFGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGKLE IKR TVAAP DVVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQ SLLHSNGFNVDWYLQKPGQSPHLLIYFGSYRASG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQAL QTPPWTFGQGTKEIRR
85	DVD798H	AB005VH	AB064VH	EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMH WVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFSGWPN YYYYGMDVWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAP QVQ LQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAWNWI RQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTITISRD TSKNQFFLKLNSTAAADTATYYCVTAGRGFPYWGQ GTLVTVSS
86	DVD798L	AB005VL	AB064VL	DVVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLHSNGF NYVDWYLQKPGQSPHLLIYFGSYRASGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPPWTFG QGTKEIRR TVAAP DIQMTQSPSSMSVSVGDRVIT ITCHSSQDINSNIGWLQKPKGKSFGLIYHGTNLDD GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQY AQFPWTFGGGKLEIKR

10

20

【0486】

(実施例 2. 8) : リンカーセット 4 を有する E G F R (配列 2) および R O N D V D

ー I g の作製

【0487】

30

【表 19】

表 19

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				12345678901234567890123456789012345
87	DVD827H	AB064VH	AB005VH	QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTIT SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTTLVTVSS ASTKGP EVQLVQSGGGLVKPGGSL RLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISY DGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARFSGWPNYYYYGMDVWGQGTTVTVS S
88	DVD827L	AB064VL	AB005VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQKPKGKSFGLIYHGTNLDGVP SRFSGSGSGTD YTLTISSSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR TVAAPSVFIFPP DVVM TQSPSLSLPVTTPGEPAS ISCRSSQSL LHSNGFN YVDWYLQKPGQSPHLLIYF GSYRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCMQALQTPPWTFGQGTKEIRR
89	DVD828H	AB005VH	AB064VH	EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMH WVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFSGWPN YYYYGMDVWGQGTTVTVSS ASTKGP QVQLQESGPG LVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGKG LEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTISRDT SKNQFF LKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTTLVTVS S
90	DVD828L	AB005VL	AB064VL	DVVM TQSPSLSLPVTTPGEPASISCRSSQSL LHSNGF NYVDWYLQKPGQSPHLLIYFGSYRASGVPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPPWTFG QGTKEIRR TVAAPSVFIFPP DIQMTQSPSSMSVS VGDRVTITCHSSQDINSNIGWLQKPKGKSFGLIY HGTNLDGVP SRFSGSGSGTDYTLTISSSLQPEDFA TYYCVQYAQFPWTFGGGTKLEIKR

10

20

【0488】

(実施例 2. 9) : リンカーセット 1 を有する E G F R (配列 2) および E r b B 3 (配列 1) D V D - I g の作製

【0489】

30

【表 20】

表 20

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				12345678901234567890123456789012345
91	DVD327H	AB064VH	AB062VH	QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTIT SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLLVTVSS ASTKGP QVQLQQWGAGLLKPSETL SLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINH SGSTNYPNPSLKSRTISVETSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCARDKWTWYFDLWGRGTLVTVSS
92	DVD327L	AB064VL	AB062VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR TVAAP DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQ SVLYSSSNRNYLAWYQQNPGQPPKLLIYWASTRES GVPDFRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQY YSTPRTFGQGTKVEIKR
93	DVD328H	AB062VH	AB064VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWS WIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYPNPSLKSRTIS VETSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFD LWGRGTLVTVSS ASTKGP QVQLQESGPGGLVKPSQT LSLTCTVSGYSISSDFAWNIRQPPGKGLEWMGYI SYSGNTRYQPSLKSRTISRDTSKNQFFLKLNSVT AADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLLVTVSS
94	DVD328L	AB062VL	AB064VL	DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSN RNYLAWYQQNPGQPPKLLIYWASTRESGVPDFRFS GSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQYYSTPRTFG QGTKVEIKR TVAAP DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTI TCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFGLIYHGTNLDD GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQY AQFPWTFGGGTKLEIKR

10

20

【0490】

(実施例 2. 10) : リンカーセット 2 を有する E G F R (配列 2) および E r b B 3
(配列 1) D V D - I g の作製

【0491】

【表 2 1】

表 21

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				12345678901234567890123456789012345
95	DVD769H	AB064VH	AB062VH	QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTIT SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLLVTVSS ASTKGPSVFPLAP QVQLQWAGL LKPSETLSLTCVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGELNHSGSTNYPNPSLKSRTISVETSKNQFSLK LSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFDLWGRGTLVTVS S
96	DVD768L	AB064VL	AB062VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD YTLLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR TVAAPSVFIFPP DIEMTQSPDSLAVSLGERAT INCRSSQSVLYSSSNRNYLAWYQQNPGQPPKLLIY WASTRESGVDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDEVA VYYCQQYYSTPRTFGGGTKVEIKR
97	DVD770H	AB062VH	AB064VH	QVQLQWAGALLKPSETLSLTCVYGGSFSGYYWS WIRQPPGKGLEWIGELNHSGSTNYPNPSLKSRTIS VETSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFD LWGRGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAP QVQLQESGPG LVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGKG LEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTITSRDTSKNQFF LKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLLVTVS S
98	DVD770L	AB062VL	AB064VL	DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSN RNYLAWYQQNPGQPPKLLIYWASTRESGVDRFSG SGSGTDFTLTISSLQAEDEVAVYYCQQYYSTPRTFG GGTKVEIKR TVAAPSVFIFPP DIQMTQSPSSMSV VGDRVTITCHSSQDINSNIGWLQKPGKSFKGLIY HGTNLDDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFA TYYCVQYAQFPWTFGGGTKLEIKR

10

20

【0492】

(実施例 2. 11) : リンカーセット 3 を有する E G F R (配列 2) および E r b B 3
(配列 1) D V D - I g の作製

【0493】

30

【表 2 2】

表 22

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				12345678901234567890123456789012345
99	DVD799H	AB064VH	AB062VH	QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTIT SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLLVTVSS ASTKGPSVFPLAP QVQLQGWAGL LKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE WIGEINHSGSTNYNPSLKSRTTISVETSKNQFSLK LSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFDLWGRGTLTVTS S
100	DVD799L	AB064VL	AB062VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQKPKGKSFGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD YTLLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGKLE IKR TVAAP DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQ SVLYSSSNRNYLAWYQQNPGQPPKLLIYWASTRES GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQY YSTPRTFGQGTKVEIKR
101	DVD800H	AB062VH	AB064VH	QVQLQGWAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWS WIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRTTIS VETSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFD LWGRGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAP QVQLQESGPG LVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAWNWIQPPGKG LEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTTISRDTSKNQFF LKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLLTVS S
102	DVD800L	AB062VL	AB064VL	DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSN RNYLAWYQQNPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSG SGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPRTFG QGTKVEIKR TVAAP DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTI TCHSSQDINSNIGWLQKPKGKSFGLIYHGTNLDD GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQY AQFPWTFGGGKLEIKR

10

20

【0494】

(実施例 2. 12) : リンカーセット 4 を有する E G F R (配列 2) および E r b B 3
(配列 1) D V D - I g の作製

【0495】

30

【表 2 3】

表 23

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				123456789 0 123456789 0 123456789 0 12345
103	DVD829H	AB064VH	AB062VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTIT SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTTLVTVSS ASTKGP QVQLQWAGLLKPSETL SLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINH SGSTNYPNPSLKSRTISVETSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCARDKWTWYFDLWGRGTLVTVSS
104	DVD829L	AB064VL	AB062VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITICHSSQDINSNIGW LQKKPGKSFKGLIYHGTNLDGVPSPRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR TVAAPS VFIFPP DIEMTQSPDSLAVSLGERAT INCRSSQSVLYSSSNRNYLAWYQQNPGQPPKLLIY WASTRESGVDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQQYYSTPRTFGQGTKVEIKR
105	DVD830H	AB062VH	AB064VH	QVQLQWAGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWS WIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYPNPSLKSRTIS VETSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFD LWGRGTLVTVSS ASTKGP QVQLQESGPGLVKPSQT LSLTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGKGLEWMGYI SYSGNTRYQPSLKSRTISRDTSKNQFFLKLNSVT AADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTTLVTVSS
106	DVD830L	AB062VL	AB064VL	DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSN RNYLAWYQQNPGQPPKLLIYWASTRESGVDRFSG SGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPRTFG QGTKVEIKR TVAAPS VFIFPP DIQMTQSPSSMSVS VGDRVTITICHSSQDINSNIGWLQKKPGKSFKGLIY HGTNLDGVPSPRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFA TYYCVQYAQFPWTFGGGTKLEIKR

10

20

【0496】

(実施例 2. 13) : リンカーセット 1 を有する E G F R (配列 2) および E r b B 3
(配列 2) D V D - I g の作製

【0497】

30

【表 2 4】

表 24

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
107	DVD329H	AB064VH	AB063VH	12345678901234567890123456789012345 QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTILVTVSS ASTKGP EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFSIYSMNWVRQAPGKGLEWVSYS SSSTIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRD EDTAVYYCARDRGDFDAFDIWQGQTMVTVSS
108	DVD329L	AB064VL	AB063VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQKPKGKSFKGLIYHGTNLDGVPSPRSGSGSGTD YTLTISLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQ DITNYLNWYQQKPKAPKLLIYDASNLETGVPSRF SGSGSGTDFTTISLQPEDATYNCQQCENFPIT FGQGTREIKR
109	DVD330H	AB063VH	AB064VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMN WVRQAPGKGLEWVSYSISSSTIYYADSVKGRFTI SRDNANKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARDRGDFDA FDIWQGQTMVTVSS ASTKGP QVQLQESGPGLVKPS QTLSTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGKGLEWMG YISYSGNTRYQPSLKSRTISRDTSKNQFFLKLNS VTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTILVTVSS
110	DVD330L	AB063VL	AB064VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQDITNYLNW YQQKPKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTD FTTISLQPEDATYNCQQCENFPITFGQGTRE IKR TVAAP DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQ DINSNIGWLQKPKGKSFKGLIYHGTNLDGVPSPR SGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCVQYAQFPWT FGGGTKLEIKR

10

20

【0498】

(実施例 2. 14) : リンカーセット 2 を有する E G F R (配列 2) および E r b B 3
(配列 2) D V D - I g の作製

【0499】

【表 2 5】

表 25

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				12345678901234567890123456789012345
111	DVD771H	AB064VH	AB063VH	QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAP EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMNWVRQAPGKGLE WVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRDEDTAVYYCARDRGDFDAFDIWGQGTMTV VSS
112	DVD771L	AB064VL	AB063VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTLNDDGVPSRFGSGSGSTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR TVAAPSVFIFPP DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCQASQDITNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLE TGVPSRFGSGSGSTDFTFTISSLQPEDIATYNCQQ CENFPITFGQGTTRLEIKR
113	DVD772H	AB063VH	AB064VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMN WVRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARDRGDFDA FDIWGQGTMTVTVSS ASTKGPSVFPLAP QVQLQESG PGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPG KGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTISRDTSKNQ FFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLV VSS
114	DVD772L	AB063VL	AB064VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLNW YQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFGSGSGSTD FTFTISSLQPEDIATYNCQQCENFPITFGQGTTRLE IKR TVAAPSVFIFPP DIQMTQSPSSMSVSVGDRVT ITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTLNLD DGVPSRFGSGSGSTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQ YAQFPWTFGGGTKLEIKR

10

20

【0500】

(実施例 2. 15) : リンカーセット 3 を有する E G F R (配列 2) および E r b B 3
(配列 2) D V D - I g の作製

【0501】

30

【表 2 6】

表 26

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				12345678901234567890123456789012345
115	DVD801H	AB064VH	AB063VH	QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTIT SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTTLVTVSS ASTKGPSVFPLAP EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMNWVRQAPGKGLE WVSYISSSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRDEDTAVYYCARDRGDFDAFDIWGQGTMTVT VSS
116	DVD801L	AB064VL	AB063VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQKPGKSFKGLIYHGTNLDGVPSTRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQ DITNYLNWYQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRF SGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYNCQQCENFPIT FGQGTTRLEIKR
117	DVD802H	AB063VH	AB064VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMN WVRQAPGKGLEWVSYISSSSSSTIYYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARDRGDFDA FDIWGQGTMTVTVSS ASTKGPSVFPLAP QVQLQESG PGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAWNIRQPPG KGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTITSRDTSKNQ FFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTTLVT VSS
118	DVD802L	AB063VL	AB064VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLNW YQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTD FTFTISSLQPEDIATYNCQQCENFPITFGQGTTRLE IKR TVAAP DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQ DINSNIGWLQKPGKSFKGLIYHGTNLDGVPSTRF SGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWT FGGGTKLEIKR

10

20

【0502】

(実施例 2. 16) : リンカーセット 4 を有する E G F R (配列 2) および E r b B 3
(配列 2) D V D - I g の作製

【0503】

30

【表 27】

表 27

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
119	DVD831H	AB064VH	AB063VH	12345678901234567890123456789012345 QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTTLVTVSS ASTKGP EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFSIYSMNWVRQAPGKGLEWVSYISS SSSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRD EDTAVYYCARDRGDFDAFDIWGQGTMTVTVSS
120	DVD831L	AB064VL	AB063VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDGVPSPRFGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR TVAAPS VFIFPP DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCQASQDITNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLE TGVPSRFGSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYNCQQ CENFPITFGQGTTRLEIKR
121	DVD832H	AB063VH	AB064VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYSMN WVRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARDRGDFDA FDIWGQGTMTVTVSS ASTKGP QVQLQESGPGLVKPS QTLSTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGKGLEWWMG YISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFLKLNS VTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTTLVTVSS
122	DVD832L	AB063VL	AB064VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDITNYLNW YQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFGSGSGTD FTFTISSLPEDIATYNCQQCENFPITFGQGTTRLE IKR TVAAPS VFIFPP DIQMTQSPSSMSVSVGDRVT ITCHSSQDINSNIGWLQKPGKSFKGLIYHGTNLD DGVPSRFGSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQ YAQFPWTFGGGTKLEIKR

10

20

【0504】

(実施例 2. 17) : リンカーセット 1 を有する E G F R (配列 2) および C D 3 D V
D - I g の作製

【0505】

【表 28】

表 28

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				12345678901234567890123456789012345
123	DVD331H	AB064VH	AB002VH	QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTILVTVSS ASTKGP QVQLQSGAELARPGASV KMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINP SRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTS EDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSS
124	DVD331L	AB064VL	AB002VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQKPKGKSFKGLIYHGTNLDGVPSPRFGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR TVAAP QIVLTQSPAISASPGKVTMTCRASS SVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPRYS GSGSGTSYSLTISSMEADAATYYCQQWSSNPLTF GSGTKLEINR
125	DVD332H	AB002VH	AB064VH	QVQLQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMH WVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATL TDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYC LDYWGQGTTLTVSS ASTKGP QVQLQESGPGLVKPS QTLSTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGKGLEWMG YISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFLKLNS VTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTILVTVSS
126	DVD332L	AB002VL	AB064VL	QIVLTQSPAISASPGKVTMTCRASSSVSYMNWY QQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPRYSFGSGSGTSY SLTISSMEADAATYYCQQWSSNPLTFGSGTKLEI NR TVAAP DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQD INSNIGWLQKPKGKSFKGLIYHGTNLDGVPSPRFS GSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTF GGGTKLEIKR

10

20

【0506】

(実施例 2. 18) : リンカーセット 2 を有する E G F R (配列 2) および C D 3 D V
D - I g の作製

【0507】

【表 29】

表 29

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				12345678901234567890123456789012345
127	DVD773H	AB064VH	AB002VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGLVTVSS ASTKGPSVFPLAP QVQLQESGAE LRPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKRPGQGLE WIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYM QLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLT VSS
128	DVD773L	AB064VL	AB002VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFGSGSGSTD YTLTISLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGKLE IKR TVAAPS VFIFPP QIVLTQSPAISASPGKVT MTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVAS GVPYRFGSGSGTSYSLTISSEAEADAATYYCQQW SSNPLTFGSGTKLEINR
129	DVD774H	AB002VH	AB064VH	QVQLQESGAEARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMH WVKRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATL TDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYC LDYWGQGTTLTVSS ASTKGPSVFPLAP QVQLQESG PGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAWNIRQPPG KGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQ FFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGLVTV VSS
130	DVD774L	AB002VL	AB064VL	QIVLTQSPAISASPGKVTMTTCRASSSVSYMNWY QQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFGSGSGTSY SLTISSEAEADAATYYCQQWSSNPLTFGSGTKLEI NR TVAAPS VFIFPP DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTI TCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLDD GVPSRFGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCVQY AQFPWTFGGGKLEIKR

10

20

【0508】

(実施例 2. 19) : リンカーセット 3 を有する E G F R (配列 2) および C D 3 D V
D - I g の作製

【0509】

30

【表 3 0】

表 30

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				12345678901234567890123456789012345
131	DVD803H	AB064VH	AB002VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTTLTVSS ASTKGPSVFPLAP QVQLQSGAEL ARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPQGGL WIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYM QLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLT VSS
132	DVD803L	AB064VL	AB002VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQKPKGKSFGLIYHGTNLDGVPSPRFGSGSGTD YTLTISLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGKLE IKR TVAAP QIVLTQSPAISASPGKVTMTCRASS SVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPRFS GSGSGTSYSLTISSEAEADAATYYCQQWSSNPLTF GSGTKLEINR
133	DVD804H	AB002VH	AB064VH	QVQLQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMH WVKQRPQGGLWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATL TDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYC LDYWGQGTTLTVSS ASTKGPSVFPLAP QVQLQESG PGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAWNWIWIRQPPG KGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTISRDTSKNQ FFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTTLT VSS
134	DVD804L	AB002VL	AB064VL	QIVLTQSPAISASPGKVTMTCRASSSVSYMNWY QQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPRFSGSGSGTSY SLTISSEAEADAATYYCQQWSSNPLTFGSGTKLEI NR TVAAP DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQD INSNIGWLQKPKGKSFGLIYHGTNLDGVPSPRFS GSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCVQYAQFPWTF GGGKLEIKR

10

20

【0 5 1 0】

(実施例 2. 20) : リンカーセット 4 を有する E G F R (配列 2) および C D 3 D V
D - I g の作製

【0 5 1 1】

30

【表 3 1】

表 31

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
135	DVD833H	AB064VH	AB002VH	12345678901234567890123456789012345 QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTTLVTVSS ASTKGP QVQLQSGAELARPGASV KMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPQGQLEWIGYINP SRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTS EDSAVYYCARYDDHYCLDYWGQGTTLTVSS
136	DVD833L	AB064VL	AB002VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITICHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR TVAAPSVEIFPP QIVLTQSPAIMASAPGEKVT MTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVAS GVPIRFGSGSGTSTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQW SSNPLTFGSGTKLEINR
137	DVD834H	AB002VH	AB064VH	QVQLQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMH WVKQRPQGQLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATL TDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYDDHYC LDYWGQGTTLTVSS ASTKGP QVQLQESGPGLVKPS QTLSTCTVSGYSISSDFAWNIRQPPGKGLEWMG YISYSGNTRYQPSLKSRTISRDTSKNQFFLKLNS VTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTTLVTVSS
138	DVD834L	AB002VL	AB064VL	QIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCRASSSVSYMNWY QQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPIRFGSGSGTST SLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGSGTKLEI NR TVAAPSVEIFPP DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTI TICHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLDD GVPSRFGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQY AQFPWTFGGGTKLEIKR

10

20

【0512】

(実施例 2. 21) : リンカーセット 1 を有する E G F R (配列 2) および I G F 1 R
D V D - I g の作製

【0513】

【表 3 2】

表 32

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
139	DVD333H	AB064VH	AB011VH	12345678901234567890123456789012345 QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTIT SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTILVTVSS ASTKGP EVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCTASGFTFSSYAMNWVRQAPGKLEWVSAISG SGGTTFYADSVKGRFTISRDNSTTLTLQMNLSLRA EDTAVYYCAKDLGWSDSYYYYYGMDVWGQGTITVTV SS
140	DVD333L	AB064VL	AB011VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDGVPSPRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR TVAAP DIQMTQFPSSLSASVGDRVTITCRASQ GIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASRLHRGVPSRF SGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHNSYPCS FGQGTKLEIKR
141	DVD334H	AB011VH	AB064VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSSYAMN WVRQAPGKLEWVSAISGSGGTTFYADSVKGRFTI SRDNSTTLTLQMNLSLRAEDTAVYYCAKDLGWSDS YYYYYGMDVWGQGTITVTVSS ASTKGP QVQLQESGP GLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGK GLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTISRDTSKNQF FLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTILVTV SS
142	DVD334L	AB011VL	AB064VL	DIQMTQFPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGW YQQKPGKAPKRLIYAASRLHRGVPSRFSGSGSGTE FTLTISLQPEDFATYYCLQHNSYPCSFQGGTKLE IKR TVAAP DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQ DINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLDGVPSPRF SGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWT FGGGTKLEIKR

10

20

【0 5 1 4】

(実施例 2. 2 2) : リンカーセット 2 を有する E G F R (配列 2) および I G F 1 R
D V D - I g の作製

【0 5 1 5】

30

【表 3 3】

表 33

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
143	DVD775H	AB064VH	AB011VH	12345678901234567890123456789012345 QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTTLVTVSS ASTKGPSVFPLA PEVQLLESGGGL VQPGGSLRLSCTASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGTTFYADSVKGRFTISRDNSTTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKDLGWSDSYYYYYGMDVWG QGTTVTVSS
144	DVD775L	AB064VL	AB011VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDGVPSPRFGSGSGTD YTLTISLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGKLE IKR TVAAPS VFIFPP DIQMTQFPSSLSASVGDRVT ITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASRLH RGVPSRFGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQ HNSYPGSFGQGTKLEIKR
145	DVD776H	AB011VH	AB064VH	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSSYAMN WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGTTFYADSVKGRFTI SRDNSTTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDLGWSDS YYYYYGMDVWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLA PQV QLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAWN IRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTISR DTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWG QGTLVTVSS
146	DVD776L	AB011VL	AB064VL	DIQMTQFPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGW YQQKPGKAPKRLIYAASRLHRGVPSRFGSGSGTE FTLTISLQPEDFATYYCLQHNSYPGSFGQGTKLE IKR TVAAPS VFIFPP DIQMTQSPSSMSVSVGDRVT ITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLD DGVPSRFGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCVQ YAQFPWTFGGGKLEIKR

10

20

【0516】

(実施例 2. 23) : リンカーセット 3 を有する E G F R (配列 2) および I G F 1 R
D V D - I g の作製

【0517】

30

【表 3 4】

表 34

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				12345678901234567890123456789012345
147	DVD805H	AB064VH	AB011VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTILVTVSS ASTKGPSVFPLAP EVQLLESGGGL VQPGGSLRLSCTASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLE WVSAISGSGGTTFYADSVKGRFTISRDNSTTLTYL QMNSLRAEDTAVYYCAKDLGWSDSYYYYYGMVWVG QGTTVTVSS
148	DVD805L	AB064VL	AB011VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVITITCHSSQDINSNIGW LQPKPGKSFGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR TVAAP DIQMTQFPSSLSASVGRVTITCRASQ GIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASRLHRGVPSRF SGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHNSYPSCS FGGTGKLEIKR
149	DVD806H	AB011VH	AB064VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSSYAMN WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGTTFYADSVKGRFTI SRDNSTTLTYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDLGWSDS YYYYYGMVWVGQGTITVTVSS ASTKGPSVFPLAP QV QLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAWN IRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISR DTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWG QGTLVTVSS
150	DVD806L	AB011VL	AB064VL	DIQMTQFPSSLSASVGRVTITCRASQGIRNDLGW YQQKPGKAPKRLIYAASRLHRGVPSRFSGSGSGTE FTLTISLQPEDFATYYCLQHNSYPSCSFGGTGKLE IKR TVAAP DIQMTQSPSSMSVSVGDRVITITCHSSQ DINSNIGWLQKPGKSFGLIYHGTNLDDGVPSRF SGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWT FGGTGKLEIKR

10

20

【0 5 1 8】

(実施例 2. 2 4) : リンカーセット 4 を有する E G F R (配列 2) および I G F 1 R
D V D - I g の作製

【0 5 1 9】

30

【表 3 5】

表 35

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				12345678901234567890123456789012345
151	DVD835H	AB064VH	AB011VH	QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLLTVSS ASTKGPEV QLLES GGGGLVQPGGSL RLSCTASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSAISG SGGTTTFYADSVKGRFTISRDN SRTTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKDLGWSDSY YYYGMDVWGQGT TTVT SS
152	DVD835L	AB064VL	AB011VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGNTLDDGVPSRFRSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGG TKLE IKR TVAAPSVFI FPDIQMTQFPSSLSASV GDRVT ITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASRLH RGVPSRFRSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQ HNSYPCSFQGQTKLEIKR
153	DVD836H	AB011VH	AB064VH	EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSSYAMN WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGTTTFYADSVKGRFTI SRDN SRTTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDLGWSDS Y YYYGMDVWGQGT TTVTSS ASTKG PQVQLQESGP GLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGK GLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDT SKNQF FLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLLTV SS
154	DVD836L	AB011VL	AB064VL	DIQMTQFPSSLSASV GDRVTITCRASQGIRNDLGW YQQKPGKAPKRLIYAASRLHRGVPSRFRSGSGSGTE FTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYPCSFQGQTKLE IKR TVAAPSVFI FPDIQMTQSPSSMSVSVGDRVT ITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGNTLD DGVPSRFRSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQ YAQFPWTFGGG TKLEIKR

10

20

【0520】

(実施例 2. 25) : リンカーセット 1 を有する E G F R (配列 2) および H G F D V
D - I g の作製

【0521】

30

【表 3 6】

表 36

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				12345678901234567890123456789012345
155	DVD335H	AB064VH	AB012VH	QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTIT SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTTLVTVSS ASTKGP QVQLVESGGGLVKPGGSL RLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVSYISS SGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRA EDTAVYYCARDEYNSGWYVLFDYWGQGTTLVTVSS
156	DVD335L	AB064VL	AB012VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDGVPSPRFSGSGSGTD YTLTISSSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR TVAAP DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQ GISSWLAWYQQKPGKAPNLLIYEASSLQSGVPSRF GGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQANGFPWT FGQGTKVEIKR
157	DVD336H	AB012VH	AB064VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMS WIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEYNSGW YVLFDYWGQGTTLVTVSS ASTKGP QVQLQESGPGLV KPSQTLSTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGKGLE WMGYISYSGNTRYQPSLKSRTISRDTSKNQFFLK LNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTTLVTVSS
158	DVD336L	AB012VL	AB064VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAW YQQKPGKAPNLLIYEASSLQSGVPSRFGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQANGFPWTFGQGTKVE IKR TVAAP DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQ DINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLDGVPSPR SGSGSGTDYTLTISSSLQPEDFATYYCVQYAQFPWT FGGGTKLEIKR

10

20

【0 5 2 2】

(実施例 2. 26) : リンカーセット 2 を有する E G F R (配列 2) および H G F D V
D - I g の作製

【0 5 2 3】

30

【表 3 7】

表 37

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				12345678901234567890123456789012345
159	DVD777H	AB064VH	AB012VH	QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTIT SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGT LVT VSS ASTKGPSVFPLAP QVQLVESGGGL VKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLE WVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCARDEYNSGWYVLFDYWGQGT LTVSS
160	DVD777L	AB064VL	AB012VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDGVPSPRFGSGSGSTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR TVAAPSVFIFPP DIQMTQSPSSVSASVGDRVT ITCRASQGISWLAWYQKPGKAPNLLIYEASSLQ SGVPSRFGSGSGSTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ ANGFPWTFGQGTKVEIKR
161	DVD778H	AB012VH	AB064VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMS WIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEYNSGW YVLFDYWGQGT LVT VSS ASTKGPSVFPLAP QVQLQ ESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAWNIRQ PPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTITSRDTS KNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGT LTVSS
162	DVD778L	AB012VL	AB064VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISWLAW YQKPGKAPNLLIYEASSLQSGVPSRFGSGSGSTD FTLTISSLQPEDFATYYCQANGFPWTFGQGTKVE IKR TVAAPSVFIFPP DIQMTQSPSSMSVSVGDRVT ITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLD DGVPSRFGSGSGSTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQ YAQFPWTFGGGTKLEIKR

10

20

【0 5 2 4】

(実施例 2. 27) : リンカーセット 3 を有する E G F R (配列 2) および H G F D V
D - I g の作製

【0 5 2 5】

30

【表 3 8】

表 38

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				12345678901234567890123456789012345
163	DVD807H	AB064VH	AB012VH	QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTTLTVSS ASTKGPSVFPLAP QVQLVESGGGL VKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLE WVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCARDEYNSGWYVLFDYWGQGT LTVSS
164	DVD807L	AB064VL	AB012VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQPKPGKSFKGLIYHGTNLDGVPSPRSGSGSGTD YTLTISSSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGKLE IKR TVAAP DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQ GISSWLAWYQQKPGKAPNLLIYEASSLQSGVPSRF GGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQANGFPWT FGQGTKVEIKR
165	DVD808H	AB012VH	AB064VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMS WIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEYNSGW YVLFDYWGQGTTLTVSS ASTKGPSVFPLAP QVQLQ ESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAWNIRQ PPGKGLEWWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTISRDT KNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGT LTVSS
166	DVD808L	AB012VL	AB064VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAW YQQKPGKAPNLLIYEASSLQSGVPSRFGGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQANGFPWTFGQGTKVE IKR TVAAP DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQ DINSNIGWLQPKPGKSFKGLIYHGTNLDGVPSPR SGSGSGTDYTLTISSSLQPEDFATYYCVQYAQFPWT FGGGTKLEIKR

10

20

【0 5 2 6】

(実施例 2. 28) : リンカーセット 4 を有する E G F R (配列 2) および H G F D V
D - I g の作製

【0 5 2 7】

30

【表 3 9】

表 39

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				12345678901234567890123456789012345
167	DVD837H	AB064VH	AB012VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTIT SRDTSKNQFFLKLSNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLLTVSS ASTKGP QVQLVESGGGLVKPGGSL RLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVSYISS SGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRA EDTAVYYCARDEYNSGWYVLFDYWGQGTLLTVSS
168	DVD837L	AB064VL	AB012VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDGVPSPRFGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR TVAAPSVEIFPP DIQMTQSPSSVSASVGDRVT ITCRASQGISWLAWEYQQKPGKAPNLLIYEASLQ SGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ ANGFPWTFGGGTKVEIKR
169	DVD838H	AB012VH	AB064VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMS WIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTI SRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDEYNSGW YVLFDYWGQGTLLTVSS ASTKGP QVQLQESGPGLV KPSQTLSTCTVSGYSISSDFAWNIRQPPGKGLE WMGYISYSGNTRYQPSLKSRTISRDTSKNQFFLK LSNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLLTVSS
170	DVD838L	AB012VL	AB064VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISWLAWE YQQKPGKAPNLLIYEASLQSGVPSRFGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQANGFPWTFGGGTKVE IKR TVAAPSVEIFPP DIQMTQSPSSMSVSVGDRVT ITCHSSQDINSNIGWYQQKPGKSFKGLIYHGTNLD DGVPSRFGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQ YAQFPWTFGGGTKLEIKR

10

20

【0528】

(実施例 2. 29) : リンカーセット 1 を有する E G F R (配列 2) および V E G F (配列 1) D V D - I g の作製

【0529】

【表 4 0】

表 40

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				12345678901234567890123456789012345
171	DVD337H	AB064VH	AB014VH	QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGYSSISDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTILVTVSS ASTKGP EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINT YTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRA EDTAVYYCAKYPHYGYSSHWFYFDVWGQGTILVTVSS
172	DVD337L	AB064VL	AB014VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQKKPGKSEFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQ DISNYLNWYQQKPKAPKVLITYFTSSLSHSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYSTVPWT FGQGTKVEIKR
173	DVD338H	AB014VH	AB064VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYS SHWFYFDVWGQGTILVTVSS ASTKGP QVQLQESGPG L VKPSQTLSTCTVSGYSSISDFAWNIRQPPGKGL EWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFL KLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTILVTVSS
174	DVD338L	AB014VL	AB064VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPKGAPKVLITYFTSSLSHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQYSTVPWTFGQGTKVE IKR TVAAP DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQ DINSNIGWLQKKPGKSEFKGLIYHGTNLDDGVPSRF SGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWT FGGGTKLEIKR

10

20

【0530】

(実施例 2. 30) : リンカーセット 2 を有する E G F R (配列 2) および V E G F (配列 1) D V D - I g の作製

【0531】

【表 4 1】

表 41

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
175	DVD779H	AB064VH	AB014VH	12345678901234567890123456789012345 QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGYSSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTTLTVSS ASTKGPSVFPLAPE EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLE WVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYL QMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQG TLVTVSS
176	DVD779L	AB064VL	AB014VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDGVPSSRFGSGSGTD YTLTISLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGKLE IKR TVAAPSVFIFPP DIQMTQSPSSLSASVGDRT ITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLITYFTSSLH SGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGGGKVEIKR
177	DVD780H	AB014VH	AB064VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYS SHWYFDVWGQGTTLTVSS ASTKGPSVFPLAP QVQL QESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGYSSDFAWNWIR QPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTISRDT SKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQG TLVTVSS
178	DVD780L	AB014VL	AB064VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLITYFTSSLHSGVPSRFGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGGGKVE IKR TVAAPSVFIFPP DIQMTQSPSSMSVSVGDRVT ITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLD DGVPSRFGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCVQ YAQFPWTFGGGKLEIKR

10

20

【0532】

(実施例 2. 31) : リンカーセット 3 を有する E G F R (配列 2) および V E G F (配列 1) D V D - I g の作製

【0533】

30

【表 4 2】

表 42

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				12345678901234567890123456789012345
179	DVD809H	AB064VH	AB014VH	QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTIT SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLLVTVSS ASTKGPSVFPLAPE VQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLE WVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYL QMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYGSSHWYFDVWGQG TLVTVSS
180	DVD809L	AB064VL	AB014VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDGVPSPRFGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGKLE IKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVSGDRVTITCSASQ DISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYSTVPWT FGQGTKVEIKR
181	DVD810H	AB014VH	AB064VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYGS SHWYFDVWGQGTLLVTVSS ASTKGPSVFPLAPQ VQL QESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAWNWIR QPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTITSRDT SKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQG TLVTVSS
182	DVD810L	AB014VL	AB064VL	DIQMTQSPSSLSASVSGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQYSTVPWTFGQGTKVE IKR TVAAP DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQ DINSNIGWLQKPGKSFKGLIYHGTNLDGVPSPRF SGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWT FGGGTKLEIKR

10

20

【0534】

(実施例 2. 32) : リンカーセット 4 を有する E G F R (配列 2) および V E G F (配列 1) DVD-I g の作製

【0535】

30

【表 4 3】

表 43

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				12345678901234567890123456789012345
183	DVD839H	AB064VH	AB014VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSSSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTTLVTVSS ASTKGPE VQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINT YTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRA EDTAVYYCAKYPHYGSSHWYFDVWGQGTTLVTVSS
184	DVD839L	AB064VL	AB014VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDGVPSPRFGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR TVAAPSVFIFPP DIQMTQSPSSLSASVGDRT ITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLH SGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKVEIKR
185	DVD840H	AB014VH	AB064VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYGS SHWYFDVWGQGTTLVTVSS ASTKGPE VQLQESGPG VKPSQTLSTCTVSGYSSSDFAWNWIRQPPGKGL EWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFL KLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTTLVTVSS
186	DVD840L	AB014VL	AB064VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQYSTVPWTFGQGTKVE IKR TVAAPSVFIFPP DIQMTQSPSSMSVSVGDRVT ITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLD DGVPSRFGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQ YAQFPWTFGGGTKLEIKR

10

20

【0536】

(実施例 2. 33) : リンカーセット 1 を有する E G F R (配列 2) および D L L - 4
D V D - I g の作製

【0537】

【表 4 4】

表 44

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				12345678901234567890123456789012345
187	DVD339H	AB064VH	AB015VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTI SRDTSKNQFFLKLSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTTLVTVSS ASTKGPE VQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFTDNWISWVRQAPGKGLEWVGYS NSGFTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARDNFGGYFDYWGQGTTLVTVSS
188	DVD339L	AB064VL	AB015VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQKPGKSFKGLIYHGTNLDGVPSPRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVSGDRVTITCRASQ DVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFYSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYTGT TFGGGTKVEIKR
189	DVD340H	AB015VH	AB064VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWIS WVRQAPGKGLEWVGYSYNSGFTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYF DYWGQGTTLVTVSS ASTKGPE VQLQESGPGLVKPSQ TLSTCTVSGYSSDFAWNWIRQPPGKGLEWMGY ISYSGNTRYQPSLKSRTISRDTSKNQFFLKLSV TAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTTLVTVSS
190	DVD340L	AB015VL	AB064VL	DIQMTQSPSSLSASVSGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQSYTGTVTTFGGGTKV EIKR TVAAP DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSS QDINSNIGWLQKPGKSFKGLIYHGTNLDGVPSPR FSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPW TFGGGTKLEIKR

10

20

【0538】

(実施例 2. 34) : リンカーセット 2 を有する E G F R (配列 2) および D L L - 4
D V D - I g の作製

【0539】

30

【表 4 5】

表 45

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
191	DVD781H	AB064VH	AB015VH	12345678901234567890123456789012345 QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLLTVSS ASTKGPSVFPLAP EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWISWVRQAPGKGLE WVGYISPNSGFTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYFDYWGQGTLLTV SS
192	DVD781L	AB064VL	AB015VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQKPGKSKFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR TVAAPSVFIFPP DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QSYTGTVTFGQGTKVEIKR
193	DVD782H	AB015VH	AB064VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWIS WVRQAPGKGLEWVGYSISPNSGFTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYF DYWGQGTLLTVSS ASTKGPSVFPLAP QVQLQESGP GLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAWNWIWIRQPPGK GLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQF FLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLLTV SS
194	DVD782L	AB015VL	AB064VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQSYTGTVTFGQGTKV EIKR TVAAPSVFIFPP DIQMTQSPSSMSVSVGDRV TITCHSSQDINSNIGWLQKPGKSKFKGLIYHGTNL DDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCV QYAQFPWTFGGGTKLEIKR

10

20

【0540】

(実施例 2. 35) : リンカーセット 3 を有する E G F R (配列 2) および D L L - 4
D V D - I g の作製

【0541】

30

【表 4 6】

表 46

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				12345678901234567890123456789012345
195	DVD811H	AB064VH	AB015VH	QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGYSSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTTLVTVSS ASTKGPSVFPLAP EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWISWVRQAPGKGLE WVGYISPNSGFTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYFDYWGGTTLTV SS
196	DVD811L	AB064VL	AB015VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDGVPSPRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVSGDRVTITCRASQ DVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFYSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYTGTV TFGGGTKVEIKR
197	DVD812H	AB015VH	AB064VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWIS WVRQAPGKGLEWVGYISPNSGFTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYF DYWGQGTTLVTVSS ASTKGPSVFPLAP QVQLQESGP GLVKPSQTLSTCTVSGYSSDFAWNWIRQPPGK GLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQF FLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTTLTV SS
198	DVD812L	AB015VL	AB064VL	DIQMTQSPSSLSASVSGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQSYTGTVTFGGGTKV EIKR TVAAP DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSS QDINSNIGWLQKPGKSFKGLIYHGTNLDGVPSPR FSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPW TFGGGTKLEIKR

10

20

【0542】

(実施例 2. 36) : リンカーセット 4 を有する E G F R (配列 2) および D L L - 4
D V D - I g の作製

【0543】

30

【表 4 7】

表 47

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				12345678901234567890123456789012345
199	DVD841H	AB064VH	AB015VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTTLVTVSS ASTKGP EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFTDNWISWVRQAPGKGLEWVGYSIP NSGFTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARDNFGGYFDYWQGTTLVTVSS
200	DVD841L	AB064VL	AB015VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVITITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDGVPSPRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGKLE IKR TVAAPSVFIFPP DIQMTQSPSSLSASVGDRT ITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QSYTGTVTFGQGTKVEIKR
201	DVD842H	AB015VH	AB064VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDNWIS WVRQAPGKGLEWVGYSIPNSGFTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDNFGGYF DYWGQGTTLVTVSS ASTKGP QVQLQESGPGLVKPSQ TLSTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGKGLEWMGY ISYSGNTRYQPSLKSRTISRDTSKNQFFLKLNSV TAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTTLVTVSS
202	DVD842L	AB015VL	AB064VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITICRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQSYTGTVTFGQGTKV EIKR TVAAPSVFIFPP DIQMTQSPSSMSVSVGDRV TITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLDG VPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCV QYAQFPWTFGGGKLEIKR

10

20

【0544】

(実施例 2. 37) : リンカーセット 1 を有する E G F R (配列 2) および P L G F D
V D - I g の作製

【0545】

【表 4 8】

表 48

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				123456789 0 123456789 0 123456789 0 12345
203	DVD341H	AB064VH	AB047VH	QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGYSSSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLLTVSS ASTKGP QVQLQQSGAELVKPGASV KISCKASGYTFTDYINWVKLAPGQGLEWIGWIYP GSGNTKYNEKFKGKATLTIDTSSSTAYMQLSSLTS EDTAVYFCVRDSPFFDYWGQGTLLTVSS
204	DVD341L	AB064VL	AB047VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSEFKGLIYHGTNLDDGVPSRFGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR TVAAP DIVLTQSPDLSAVSLGERVTMNCKSSQ SLLNSGMRKSFLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRES GVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDVAVYYCKQS YHLFTFGSGTKLEIKR
205	DVD342H	AB047VH	AB064VH	QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYIN WVKLAPGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATL TIDTSSSTAYMQLSSLTSEDVAVYFCVRDSPFFDY WGQGTLLTVSS ASTKGP QVQLQESGPGGLVKPSQTL SLTCTVSGYSSSDFAWNIRQPPGKGLEWMGYIS YSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFLKLNSVTA ADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLLTVSS
206	DVD342L	AB047VL	AB064VL	DIVLTQSPDLSAVSLGERVTMNCKSSQSLLNSGMR KSFLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTG SGSGTDFTLTISVQAEDVAVYYCKQSYHLFTFGS GTKLEIKR TVAAP DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTIT CHSSQDINSNIGWLQQKPGKSEFKGLIYHGTNLDDG VPSRFGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYA QFPWTFGGGTKLEIKR

10

20

【0546】

(実施例 2. 38) : リンカーセット 2 を有する E G F R (配列 2) および P L G F D
V D - I g の作製

【0547】

【表 4 9】

表 49

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				123456789 0 123456789 0 123456789 0 12345
207	DVD783H	AB064VH	AB047VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTIT SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTTLVTVSS ASTKGPSVFPLAP QVQLQSGAEL VKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKLAPGQGLE WIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATLTIDTSSSTAYM QLSSLTSEDNAVYFCVRDSPFFDYWGQGTLLTVSS
208	DVD783L	AB064VL	AB047VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTTITCHSSQDINSNIGW LQKKPGKSFKGLIYHGTNLDGVPSPRFSGSGSGTD YTLTISLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR TVAAPSVFIFPP DIVLTQSPDSLAVSLGERVT MNCKSSQSLNSGMRKSFRAWYQQKPGQSPKLLIY WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDVA VYYCKQSYHLFTFGSGTKLEIKR
209	DVD784H	AB047VH	AB064Vh	QVQLQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYIN WVKLAPGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATL TIDTSSSTAYMQLSSLTSEDNAVYFCVRDSPFFDY WGQGTLLTVSS ASTKGPSVFPLAP QVQLQESGPG VKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAWNIRQPPGKGL EWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTISRDTSKNQFFL KLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTTLVTVSS
210	DVD784L	AB047VL	AB064VL	DIVLTQSPDSLAVSLGERVTMNCKSSQSLNSGMR KSFRAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTG SGSGTDFTLTISSVQAEDVAVYYCKQSYHLFTFGS GTKLEIKR TVAAPSVFIFPP DIQMTQSPSSMSVSV GDRVTTITCHSSQDINSNIGWLQKKPGKSFKGLIYH GTNLDGVPSPRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFAT YYCVQYAQFPWTFGGGTKLEIKR

10

20

【0548】

(実施例 2. 39) : リンカーセット 3 を有する E G F R (配列 2) および P L G F D
V D - I g の作製

【0549】

【表 50】

表 50

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				12345678901234567890123456789012345
211	DVD813H	AB064VH	AB047VH	QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFFLKLSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLLTVSS ASTKGPSVFPLAP QVQLQESGAE LWVKGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKLAPQGGL EwigWIYPGSGNTKYNEKFKGKATLTIDTSSSTAYM QLSSLTSEDVAVYFCVRDSPFFDYWGQGTLLTVSS
212	DVD813L	AB064VL	AB047VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQKPGKSFKGLIYHGTNLDGVPSPRFGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR TVAAP DIVLTQSPDSLAVSLGERVTMNCSSQ SLNSGMRKSFLLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRES GVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDVAVYYCKQS YHLFTFGSGTKLEIKR
213	DVD814H	AB047VH	AB064VH	QVQLQESGAEWVKGASVKISCKASGYTFTDYYIN WVKLAPQGGLWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATL TIDTSSSTAYMQLSSLTSEDVAVYFCVRDSPFFDY WGQGTLLTVSS ASTKGPSVFPLAP QVQLQESGPG LWVKGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKLAPQGGL EWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITISRDTSKNQFFL KLSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLLTVSS
214	DVD814L	AB047VL	AB064VL	DIVLTQSPDSLAVSLGERVTMNCSSQSLNSGMR KSFLLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTG SGSGTDFTLTISVQAEDVAVYYCKQSYHLFTFGS GTKLEIKR TVAAP DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTIT CHSSQDINSNIGWLQKPGKSFKGLIYHGTNLDG VPSRFGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYA QFPWTFGGGTKLEIKR

10

20

【0550】

(実施例 2. 40) : リンカーセット 4 を有する E G F R (配列 2) および P L G F D
V D - I g の作製

【0551】

【表 5 1】

表 51

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				12345678901234567890123456789012345
215	DVD843H	AB064VH	AB047VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTIT SRDTSKNQFFFLKLSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLLTVTVSS ASTKGP QVQLQSGAELVKPGASV KISCKASGYTFTDYYINWVKLAPQGQLEWIGWIYP GSGNTKYNEKFKGKATLTIDTSSSTAYMQLSSLTS EDTAVYFCVRDSPFFDYWGQGTLLTVSS
216	DVD843L	AB064VL	AB047VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDGVPSPRFSGSGSGTD YTLTISSSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR TVAAPSVFIFPP DIVLTQSPDLSAVSLGERVT MNCKSSQSLNLSGMRKSFLLAWYQQKPGQSPKLLIY WASTRESGVDPDRFTGSGSGTDFTLTITSSVQAEDVA VYYCKQSYHLFTFGSGTKLEIKR
217	DVD844H	AB047VH	AB064VH	QVQLQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYIN WVKLAPQGQLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATL TIDTSSSTAYMQLSSLTSEDTAVYFCVRDSPFFDY WGQGTLLTVTVSS ASTKGP QVQLQESGPGLVKPSQTL SLTCTVSGYSISSDFAWNIRQPPGKGLEWWMGYIS YSGNTRYQPSLKSRTITSRDTSKNQFFFLKLSVTA ADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLLTVTVSS
218	DVD844L	AB047VL	AB064VL	DIVLTQSPDLSAVSLGERVTMNCKSSQSLNLSGMR KSFLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVDPDRFTG SGSGTDFTLTITSSVQAEDVAVYYCKQSYHLFTFGS GTKLEIKR TVAAPSVFIFPP DIQMTQSPSSMSVSV GDRVTITCHSSQDINSNIGWLQKPGKSFKGLIYH GTNLDGVPSPRFSGSGSGTDYTLTISSSLQPEDFAT YYCVQYAQFPWTFGGGTKLEIKR

10

20

【0552】

(実施例 2. 41) : リンカーセット 1 を有する E G F R (配列 2) および E r b B 3
(配列 3) D V D - I g の作製

【0553】

【表 5 2】

表 52

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
219	DVD755H	AB064VH	AB067VH	12345678901234567890123456789012345 QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRITI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTTLVTVSS ASTKGPE VQLLES GGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFSHYVMAWVRQAPGKGLEWVSSISS SGGWTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCTRGLKMATIFDYWGQGTTLVTVSS
220	DVD755L	AB064VL	AB067VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQKPGKSFKGLIYHGTNLDGVP SRFS GSGSGTD YTLTISSLPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR TVAAP QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSS DVGSYNVSWYQQHPGKAPKLIIEVSVQRPSGVSN RFSGSKSGNTASLTISGLQTEDEADYYCCSYAGSS IFVIFGGGTKVTVLG
221	DVD756H	AB067VH	AB064VH	EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYVMA WVRQAPGKGLEWVSSISSSGWTLYADSVKGRFTI SRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGLKMATI FDYWGQGTTLVTVSS ASTKGP QVQLQESGPGGLVKPS QTLSTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGKGLEWMG YISYSGNTRYQPSLKSRITISRDT SKNQFFLKLNS VTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTTLVTVSS
222	DVD756L	AB067VL	AB064VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNV SWYQQHPGKAPKLIIEVSVQRPSGVSNRFSGSKSG NTASLTISGLQTEDEADYYCCSYAGSSIFVIFGGG TKVTVLG QPKAAP DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTIT CHSSQDINSNIGWLQKPGKSFKGLIYHGTNLDG VPSRFS GSGSGTDYTLTISSLPEDFATYYCVQYA QFPWTFGGGTKLEIKR

10

20

【0554】

(実施例 2. 42) : リンカーセット 2 を有する E G F R (配列 2) および E r b B 3
(配列 3) D V D - I g の作製

【0555】

【表 5 3】

表 53

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				123456789 0 123456789 0 123456789 0 12345
223	DVD787H	AB064VH	AB067VH	QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTILVTVSS ASTKGPSVFPLA PEVQLLESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTFSHYVMAWVRQAPGKGLE WVSSISSGGWTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCTRGLKMATIFDYWGQGTILV VSS
224	DVD787L	AB064VL	AB067VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDGVPSPRFGSGSGTD YTLTISSLPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGKLE IKR TVAAPSVFI FPQSAITQPASVSGSPGQSITI SCTGTSSDVGSYNVSWYQQHPGKAPKLIIEVSQ RPSGVSNRFGSGSKGNTASLTISGLQTEDEADYYC CSYAGSSIFVIFGGGTKVTVLG
225	DVD788H	AB067VH	AB064VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYVMA WVRQAPGKGLEWVSSISSGGWTLYADSVKGRFTI SRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGLKMATI FDYWGQGTILVTVSS ASTKGPSVFPLA PQVQLQESG PGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPG KGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTISRDTSKNQ FFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTILV VSS
226	DVD788L	AB067VL	AB064VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNV SWYQQHPGKAPKLIIEVSRPSGVSNRFGSGSKG NTASLTISGLQTEDEADYYCCSYAGSSIFVIFGGG TKVTVLG QPKAAPSVTLFPP DIQMTQSPSSMSVSV GDRVTITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYH GTNLDGVPSPRFGSGSGTDYTLTISSLPEDFAT YYCVQYAQFPWTFGGGKLEIKR

10

20

【0 5 5 6】

(実施例 2. 4 3) : リンカーセット 3 を有する E G F R (配列 2) および E r b B 3
(配列 3) D V D - I g の作製

【0 5 5 7】

30

【表 5 4】

表 54

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				12345678901234567890123456789012345
227	DVD817H	AB064VH	AB067VH	QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTILVTVSS ASTKGPSVFPLAPE VQLLESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTFSHYVMAWVRQAPGKGLE WVSSISSGGWTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCTRGLKMATIFDYWGQGTILV VSS
228	DVD817L	AB064VL	AB067VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVITITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDGVP SRFGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGG TKLE IKR TVAAP QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSS DVGSYNVSWYQQHPGKAPKLIIEVSRPSGVS NRFSGSKSGNTASLTISGLQTEDEADYYCCSYAGSS IFVIFGGG TKVTVLG
229	DVD818H	AB067VH	AB064VH	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYVMA WVRQAPGKGLEWVSSISSGGWTLYADSVKGRFTI SRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGLKMATI FDYWGQGTILVTVSS ASTKGPSVFPLAP QVQLQESG PGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPG KGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTISRDT SKNQ FFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTILV VSS
230	DVD818L	AB067VL	AB064VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNV SWYQQHPGKAPKLIIEVSRPSGVS NRFSGSKSG NTASLTISGLQTEDEADYYCCSYAGSSIFVIFGGG TKVTVLG QPKAAP DIQMTQSPSSMSVSVGDRVITIT CHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLDG VPSRFGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYA QFPWTFGGG TKLEIKR

10

20

【0 5 5 8】

(実施例 2. 4 4) : リンカーセット 4 を有する E G F R (配列 2) および E r b B 3
(配列 3) D V D - I g の作製

【0 5 5 9】

30

【表 5 5】

表 55

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				12345678901234567890123456789012345
231	DVD847H	AB064VH	AB067VH	QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTIT SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTIVTVSS ASTKGP EVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFSHYVMAWVRQAPGKGLEWVSSISS SGGWTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCTRGLKMATIFDYWGQGTIVTVSS
232	DVD847L	AB064VL	AB067VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQKPGKSFGLIYHGTLNDDGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR TVAAPS VFIFPP QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGTSSDVGSYNVSVWYQQHPGKAPKLIIEVSQ RPSGVS NRFSGSKSGNTASLTISGLQTEDEADYYC CSYAGSSI FVIFGGG TKVTLG
233	DVD848H	AB067VH	AB064VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYVMA WVRQAPGKGLEWVSSISSGGWTLYADSVKGRFTI SRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGLKMATI FDYWGQGTIVTVSS ASTKGP QVQLQESGPGGLVKPS QTLSTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGKGLEWMG YISYSGNTRYQPSLKSRTISRDT SKNQFFLKLNS VTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTIVTVSS
234	DVD848L	AB067VL	AB064VL	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNV SWYQQHPGKAPKLIIEVSRPSGVS NRFSGSKSG NTASLTISGLQTEDEADYYCCSYAGSSI FVIFGGG TKVTLG QPKAAPS VTLFPP DIQMTQSPSSMSVSV GDRVTITCHSSQDINSNIGWLQKPGKSFGLIYH GTNDDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAT YYCVQYAQFPWTFGGGTKLEIKR

10

20

【0560】

(実施例 2. 45) : リンカーセット 1 を有する E G F R (配列 2) および V E G F (配列 2) D V D - I g の作製

【0561】

【表 5 6】

表 56

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				12345678901234567890123456789012345
235	DVD757H	AB064VH	AB070VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGLTVTVSS ASTKGPE VQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPGKGLEWVAGITP AGGYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQGLTVTVSS
236	DVD757L	AB064VL	AB070VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDGVPSPRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYTTPPT FGQGTKVEIKR
237	DVD758H	AB070VH	AB064VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIH WVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPY AMDYWGQGLTVTVSS ASTKGPE QVQLQESGPGLVKPS QTLSTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGKGLEWM GYISYSGNTRYQPSLKSRTISRDTSKNQFFLKLNS VTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGLTVTVSS
238	DVD758L	AB070VL	AB064VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVE IKR TVAAP DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQ DINSNIGWLQKPGKSFKGLIYHGTNLDGVPSPRF SGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWT FGGGTKLEIKR

10

20

【0 5 6 2】

(実施例 2. 4 6) : リンカーセット 2 を有する E G F R (配列 2) および V E G F (配列 2) D V D - I g の作製

【0 5 6 3】

30

【表 5 7】

表 57

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				12345678901234567890123456789012345
239	DVD789H	AB064VH	AB070VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLLVTVSS ASTKGPSVFPLAP EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPGKGLE WVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQGTLLV TVSS
240	DVD789L	AB064VL	AB070VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQKPKGKSFKGLIYHGTNLDGVPSPRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGKLE IKR TVAAPS VFIFPP DIQMTQSPSSLSASVGDRT ITCRASQDVSTAVAWYQQKPKAPKLLIYSASFLY SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ SYTTPPTFGQGTKVEIKR
241	DVD790H	AB070VH	AB064VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWIH WVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPY AMDYWGQGTLLVTVSS ASTKGPSVFPLAP QVQLQES GPGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAWNIRQPP GKGLEWWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTISRDTSKN QFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLLV TVSS
242	DVD790L	AB070VL	AB064VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVSTAVAW YQQKPKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVE IKR TVAAPS VFIFPP DIQMTQSPSSMSVSVGDRVT ITCHSSQDINSNIGWLQKPKGKSFKGLIYHGTNLD DGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQ YAQFPWTFGGGKLEIKR

10

20

【0564】

(実施例 2. 47) : リンカーセット 3 を有する E G F R (配列 2) および V E G F (配列 2) D V D - I g の作製

【0565】

30

【表 58】

表 58

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				12345678901234567890123456789012345
243	DVD819H	AB064VH	AB070VH	QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTTI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLLVTVSS ASTKGPSVFPLAP EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTISDYSWVHWVRQAPGKGLE WVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQGTLLV TVSS
244	DVD819L	AB064VL	AB070VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDGVPSPRFGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVSGDRVTITCRASQ DVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPT FGQGTKVEIKR
245	DVD820H	AB070VH	AB064VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYSWV HWVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPY AMDYWGQGTLLVTVSS ASTKGPSVFPLAP QVQLQES GPGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAWNWIWIRQPP GKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTTISRDTSKN QFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLLV TVSS
246	DVD820L	AB070VL	AB064VL	DIQMTQSPSSLSASVSGDRVTITCRASQDVSTAVAW YQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSYTTPPTFGQGTKVE IKR TVAAP DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQ DINSNIGWLQKPGKSFKGLIYHGTNLDGVPSPRF SGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWT FGGGTKLEIKR

10

20

【0566】

(実施例 2. 48) : リンカーセット 4 を有する E G F R (配列 2) および V E G F (配列 2) D V D - I g の作製

【0567】

30

【表 59】

表 59

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
247	DVD849H	AB064VH	AB070VH	123456789 0 123456789 0 123456789 0 12345 QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMMGYISYSGNTRYQPSLKSRTIT SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTTLVTVSS ASTKGP EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTISDYWIHWVRQAPGKGLEWVAGITP AGGYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARFVFFLPYAMDYWGQGTTLVTVSS
248	DVD849L	AB064VL	AB070VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTTITCHSSQDINSNIGW LQKKPGKSFKGLIYHGTNLDGVPSPRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGKLE IKR TVAAPSVFIFPP DIQMTQSPSSLSASVGDRV ITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASF SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ SYTTPPTFGQGTKVEIKR
249	DVD850H	AB070VH	AB064VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISDYWI WVRQAPGKGLEWVAGITPAGGYTYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARFVFFLPY AMDYWGQGTTLVTVSS ASTKGP QVQLQESGPGLVK PSQTLSTCTVSGYSISSDFAWNIRQPPGKLEW MMGYISYSGNTRYQPSLKSRTITSRDTSKNQFFLKL NSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTTLVTVSS
250	DVD850L	AB070VL	AB064VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCRASQDVSTAV AWYQQKPGKAPKLLIYSASFSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQSYTTPPTFGQGTKVE IKR TVAAPSVFIFPP DIQMTQSPSSMSVSVGDRV TITCHSSQDINSNIGWLQKKPGKSFKGLIYHGTNLD GVPSPRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCV QYAQFPWTFGGGKLEIKR

10

20

【0568】

(実施例 2. 49) : リンカーセット 1 を有する E G F R (配列 2) および V E G F (配列 3) D V D - I g の作製

【0569】

30

【表 6 0】

表 60

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				12345678901234567890123456789012345
251	DVD759H	AB064VH	AB071VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLLVTVSS ASTKGP EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTINASWIHWVRQAPGKGLEWVGAIYP YSGYTNADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARWGHSTSPWAMDYWGQGTLLVTVSS
252	DVD759L	AB064VL	AB071VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDGVPSPRFGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGTKLE IKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQ VIRRLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQSNSTPLT FGQGTKVEIKR
253	DVD760H	AB071VH	AB064VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIH WVRQAPGKGLEWVGAIYPYSGYTNADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSP WAMDYWGQGTLLVTVSS ASTKGP QVQLQESGPGLVK PSQTLSTCTVSGYSSDFAWNWIRQPPGKGLEW MGYISYSGNTRYQPSLKSRTISRDTSKNQFFLKL NSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLLVTVSS
254	DVD760L	AB071VL	AB064VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQVIRRLAW YQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRFGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQSNSTPLTFGQGTKVE IKR TVAAP DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQ DINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLDGVPSPR SGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWT FGGGTKLEIKR

10

20

【0570】

(実施例 2. 50) : リンカーセット 2 を有する E G F R (配列 2) および V E G F (配列 3) D V D - I g の作製

【0571】

【表 6 1】

表 61

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				12345678901234567890123456789012345
255	DVD791H	AB064VH	AB071VH	QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGYSSISDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTIT SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTILVTVSS ASTKGPSVFPLAP EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTINASWIHWVRQAPGKGLE WVGAITYPSGYTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSPWAMDYWGQGTIL VTVSS
256	DVD791L	AB064VL	AB071VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVITITCHSSQDINSNIGW LQKPKGKSFKGLIYHGTNLDGVPSPRFGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPWTFGGGKLE IKR TVAAPSVFIFPP DIQMTQSPSSLSASVGDRT ITCRASQVIRRLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLA SGVSPRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ SNTSPLTFGQGTKEIKR
257	DVD792H	AB071VH	AB064VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIH WVRQAPGKGLEWVGAIYPSGYTNYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSP WAMDYWGQGTILVTVSS ASTKGPSVFPLAP QVQLQE SGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSSISDFAWNIRQP PGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTITSRDTSK NQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTIL VTVSS
258	DVD792L	AB071VL	AB064VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQVIRRLAW YQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVSPRFGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLTFGQGTKE IKR TVAAPSVFIFPP DIQMTQSPSSMSVSVGDRV ITCHSSQDINSNIGWLQKPKGKSFKGLIYHGTNLD DGVSPRFGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQ YAQFPWTFGGGKLEIKR

10

20

【0572】

(実施例2. 51) : リンカーセット3を有するEGFR (配列2) およびVEGF (配列3) DVD-Igの作製

【0573】

30

【表 6 2】

表 62

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				12345678901234567890123456789012345
259	DVD821H	AB064VH	AB071VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAP EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTINASWIHWVRQAPGKGLE WVGAIYPYSGYTNADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSPWAMDYWGQGT LTVTVSS
260	DVD821L	AB064VL	AB071VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD YTLTISLQPEDFATYYCVQYQFPWTFGGGTKLE IKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQ VIRRSALAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSNTSPLT FGGGTKVEIKR
261	DVD822H	AB071VH	AB064VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIH WVRQAPGKGLEWVGAIYPYSGYTNADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSP WAMDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAP QVQLQE SGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAWNIRQP PGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTISRDTSK NQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGT LTVTVSS
262	DVD822L	AB071VL	AB064VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQVIRRSALAW YQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQSNTSPLTFGGGTKVE IKR TVAAP DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTTITCHSSQ DINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRF SGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCVQYQFPWT FGGGTKLEIKR

10

20

【0574】

(実施例 2. 52) : リンカーセット 4 を有する E G F R (配列 2) および V E G F (配列 3) D V D - I g の作製

【0575】

30

【表 6 3】

表 63

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				12345678901234567890123456789012345
263	DVD851H	AB064VH	AB071VH	QVQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGYSISSDFAW NWIRQPPGKGLEWMGYISYSGNTRYQPSLKSRTI SRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVTAGRGFPY WGQGTLLVTVSS ASTKGP EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTINASWIHWVRQAPGKGLEWVGAIYP YSGYTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCARWGHSTSPWAMDYWGQGTLLVTVSS
264	DVD851L	AB064VL	AB071VL	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITCHSSQDINSNIGW LQQKPGKSFKGLIYHGTNLDDGVPSRFSGSGSGTD YTLTISSLQPEDFATYYCVQYQFPWTFGGGKLE IKR TVAAPSVFIFPP DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRASQVIRRLAWYQQKPGKAPKLLIYAASNLA SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ SNTSPLTFGQGTKEIKR
265	DVD852H	AB071VH	AB064VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTINASWIH WVRQAPGKGLEWVGAIYPYSGYTNYADSVKGRFTI SADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGHSTSP WAMDYWGQGTLLVTVSS ASTKGP QVQLQESGPGGLVK PSQTLSTCTVSGYSISSDFAWNWIRQPPGKGLEW MGYISYSGNTRYQPSLKSRTISRDTSKNQFFLKL NSVTAADTATYYCVTAGRGFPYWGQGTLLVTVSS
266	DVD852L	AB071VL	AB064VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQVIRRLAW YQQKPGKAPKLLIYAASNLASGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQSNTSPLTFGQGTKE IKR TVAAPSVFIFPP DIQMTQSPSSMSVSVGDRVT ITCHSSQDINSNIGWLQQKPGKSFKGLIYHGTNLDD DGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQ YQFPWTFGGGKLEIKR

10

20

【0576】

(実施例 2. 53) : リンカーセット 1 を有する E G F R (配列 1) および R G M a D
V D - I g の作製

【0577】

【表 6 4】

表 64

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				12345678901234567890123456789012345
267	DVD713H	AB033VH	AB059VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYDYE FAYWGQGTTLVTVSA ASTKGP EVQLVESGGGLVQPG SSLKLSQVSGFTFSNYGMNWIRQAPKKGLEWIGM IYYDSSEKHYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLEMNS LRSEDAIYYCAKGTTPDYWGQGMVTVSS
268	DVD713L	AB033VL	AB059VL	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQRTNGSPRLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNWNWPTTFGAGTKLE LKR TVAAP DVLTQTPVSLSVTLGDQASMSCRSSQ SLEYS DGYTFLEWFLQKPGQSPQLLIYEVS NRFSG VPDRFIGSGSGTDFTLKISRVEPEDLG VYYCFQAT HDPLTFGSGTKLEIKR
269	DVD714H	AB059VH	AB033VH	EVQLVESGGGLVQPGSSSLKLSQVSGFTFSNYGMN WIRQAPKKGLEWIGMIYYDSSEKHYADSVKGRFTI SRDN SKNTLYLEMNSLRSEDAIYYCAKGTTPDYW GQGMVTVSS ASTKGP QVQLKQSGPGLVQPSQSL ITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWGG NTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDA IYYCARALTYDYDYE FAYWGQGTTLVTVSA
270	DVD714L	AB059VL	AB033VL	DVLTQTPVSLSVTLGDQASMSCRSSQSLEYS DGY TFLEWFLQKPGQSPQLLIYEVS NRFSGVPDRFIGS GSGTDFTLKISRVEPEDLG VYYCFQATHDPLTFGS GTKLEIKR TVAAP DILLTQSPVILSVSPGERVSFS CRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLIKYASESISG IPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNN NWPTTFGAGTKLEIKR

10

20

【0578】

(実施例 2. 54) : リンカーセット 2 を有する E G F R (配列 1) および R G M a D
V D - I g の作製

【0579】

【表 6 5】

表 65

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				12345678901234567890123456789012345
271	DVD871H	AB033VH	AB059VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPTTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYDYE FAYWGQGLVTVSA ASTKGPSVFPLAP EVQLVESG GGLVQPGSSSLKSCVASGFTFSNYGMNWIRQAPKK GLEWIGMIYYDSSEKHYADSVKGRFTISRDNKNT LYLEMNSLRSEDAIYYCAKGTTPDYWGQGVMTV SS
272	DVD871L	AB033VL	AB059VL	DILLTQSPVILSVSPGERVVSFSCRASQSIGTNIHW YQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR TVAAPSVFIFPP DVVLTPVSLSVTLGDAQS MSCRSSQSLEYSDGYTFLEWFLQKPGQSPQLLIYE VSNRFGVPDRFIGSGSGTDFTLKISRVEPEDLGV YYCFQATHDPLTFGSGTKLEIKR
273	DVD872H	AB059VH	AB033VH	EVQLVESGGGLVQPGSSSLKSCVASGFTFSNYGMN WIRQAPKKGLEWIGMIYYDSSEKHYADSVKGRFTI SRDNKNTLYLEMNSLRSEDAIYYCAKGTTPDYW GQGVMTVSS ASTKGPSVFPLAP QVQLKQSGPGLV QPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEW LGVIWSSGNTDYNTPTTSRLSINKDNSKSQVFFKM NSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLVTV SA
274	DVD872L	AB059VL	AB033VL	DVVLTPVSLSVTLGDAQSMSCRSSQSLEYSDGY TFLEWFLQKPGQSPQLLIYEVSNRFGVPDRFIGS GSGTDFTLKISRVEPEDLGVYYCFQATHDPLTFGS GTKLEIKR TVAAPSVFIFPP DILLTQSPVILSVSP GERVVSFSCRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLLIKY ASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVESEDIAD YYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKR

10

20

【0580】

(実施例 2. 55) : リンカーセット 3 を有する E G F R (配列 1) および R G M a D V D - I g の作製

【0581】

30

【表 6 6】

表 66

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				12345678901234567890123456789012345
275	DVD877H	AB033VH	AB059VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPTTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYDYE FAYWGQGT LVTVSA ASTKGPSVFPLAP EVQLVESG GGLVQPGSSSLKLSVASGFTFSNYGMNWIRQAPKK GLEWIGMIYYDSSEKHYADSVKGRFTISRDN SKNT LYLEMNSLRSEDAIYYCAKGTTPDYWGQGVMTV SS
276	DVD877L	AV033VL	AB059VL	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR TVAAP DVLTQTPVSLSVTLGDQASMSCRSSQ SLEYSDGYTFLEWFLQKPGQSPQLLIYEVS NRFSG VPDRFIGSGSGTDFTLKISRVEPEDLGVIYCFQAT HDPLTFGSGTKLEIKR
277	DVD878H	AB059VH	AB033VH	EVQLVESGGGLVQPGSSSLKLSVASGFTFSNYGMN WIRQAPKKGLEWIGMIYYDSSEKHYADSVKGRFTI SRDN SKNTLYLEMNSLRSEDAIYYCAKGTTPDYW GQGVMTVSS ASTKGPSVFPLAP QVQLKQSGPGLV QPSQSL SITCTVSGFSLTNYGVHWRQSPGKGLEW LGVIWSSGNTDYNTPTTSRLSINKDNSKSQVFFKM NSLQSNDAIYYCARALTYDYDEFA YWGQGT LVTV SA
278	DVD878L	AB059VL	AV033VL	DVLTQTPVSLSVTLGDQASMSCRSSQSLEYSDGY TFLEWFLQKPGQSPQLLIYEVS NRFSGVPDRFIGS GSGTDFTLKISRVEPEDLGVIYCFQATHDPLTFGS GTKLEIKR TVAAP DILLTQSPVILSVSPGERVSF SCRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLLIKYASESISG IPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNN NWPTTFGAGTKLEIKR

10

20

【0582】

(実施例 2. 56) : リンカーセット 4 を有する E G F R (配列 1) および R G M a D V D - I g の作製

【0583】

30

【表 67】

表 67

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				12345678901234567890123456789012345
279	DVD883H	AB033VH	AB059VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYDE FAYWGQGTTLTVSA ASTKGPEV QLVESGGGLVQPG SSLKLSCVASGFTFSNYGMNWIRQAPKKGLEWIGM IYYDSSEKHYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLEMNS LRSEDAIYYCAKGTTPDYWGQGMVTVSS
280	DVD883L	AB033VL	AB059VL	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQR TNGSPRL LIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQNNNWPTTFGAGTKLE LKR TVAAPSVFIFPP DVLTQTTPVSLSVTLGDQAS MSCRSSQSLEYSDGYTFLEWFLQKPGQSPQLLIYE VSNRFSGVPDRFIGSGSGTDFTLKISRVEPEDLGV YYCFQATHDPLTFSGSGTKLEIKR
281	DVD884H	AB059VH	AB033VH	EVQLVESGGGLVQPGSSSLKLSCVASGFTFSNYGMN WIRQAPKKGLEWIGMIYYDSSEKHYADSVKGRFTI SRDN SKNTLYLEMNSLRSEDAIYYCAKGTTPDYW GQGMVTVSS ASTKGP QVQLKQSGPGLVQPSQSL ITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSG GNTDYNTPFTSRLSINKDNKSQVFFKMNSLQSNDAI YCARALTYDYEFAYWGQGTTLTVSA
282	DVD884L	AB059VL	AB033VL	DVLTQTTPVSLSVTLGDQASMSCRSSQSLEYSDGY TFLEWFLQKPGQSPQLLIYEVSNRFSGVPDRFIGS GSGTDFTLKISRVEPEDLGVYYCFQATHDPLTFGS GTKLEIKR TVAAPSVFIFPP DILLTQSPVILSVSP GERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQR TNGSPRL LIKY ASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIAD YYCQNNNWPTTFGAGTKLELKR

10

20

【0584】

(実施例 2. 57) : リンカーセット 1 を有する E G F R (配列 1) および破傷風トキ
ソイド D V D - I g の作製

【0585】

【表 68】

表 68

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
283	DVD763H	AB033VH	AB095VH	12345678901234567890123456789012345 QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYDYE FAYWGQGTTLVTVSA ASTKGPE VQLLESGGDLVRPG GSLRLSCAASGFSFSRYGMSWVRQAPGKGLDWVAH ISASAGATYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNN LRADDAIYYCAKGGKQWLIPWFDPPWGQGTTLVTVS S
284	DVD763L	AB033VL	AB095VL	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRNGSPRLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQNNNWPTTFGAGTKLE LKR TVAAP DIQMTQSPSSVSASVGDRTIACRASQ DISDRLAWYQQKPGKVPKVLIIYGASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTINS LQPEDFATYYCQANSPFLT FGGGTKVEMKR
285	DVD764H	AB095VH	AB033VH	EVQLLESGGDLVRPGGSLRLSCAASGFSFSRYGMS WVRQAPGKGLDWVAHISASAGATYYADSVKGRFTI SRDN SKNTLFLQMNNLRADDAIYYCAKGGKQWLI PWFDPPWGQGTTLVTVSS ASTKGP QVQLKQSGPGLVQ PSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWL GVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMN SLQSNDAIYYCARALTYDYDEFAYWGQGTTLVTVS A
286	DVD764L	AB095VL	AB033VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRTIACRASQDISDRLAW YQQKPGKVPKVLIIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTINS LQPEDFATYYCQANSPFLTFGGGKVE MKR TVAAP DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQ SIGTNIHWYQQRNGSPRLIKYASESISGIPSRF SGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQNNNWPTT FGAGTKLELKR

10

20

【0586】

(実施例 2. 58) : リンカーセット 2 を有する E G F R (配列 1) および破傷風トキ
ソイド D V D - I g の作製

【0587】

30

【表 69】

表 69

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				12345678901234567890123456789012345
287	DVD873H	AB033VH	AB095VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWISGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSKVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYDYE FAYWGQGTTLVTVSA ASTKGPSVFPLAP EVQLLESG GDLVRPGGSLRLSCAASGFSFSGSRGMSWVRQAPGK GLDWVAHISASAGATYYADSVKGRFTISRDN SKNT LFLQMNNLRADDAIYYCAKGGKQWLIPWFD PWGQ GTLVTVSS
288	DVD873L	AB033VL	AB095VL	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQRTNGSPRLLIKYASEISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLE LKR TVAAPSVFIFPP DIQMTQSPSSVSASVGDRVT IACRASQDISDRLAWYQQKPKVKVPLIYGASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCQQ ANSFPLTFGGGTKEVKR
289	DVD874H	AB095VH	AB033VH	EVQLLESGGDLVRPGGSLRLSCAASGFSFSGSRGMS WVRQAPGKGLDWVAHISASAGATYYADSVKGRFTI SRDN SKNTLFLQMNNLRADDAIYYCAKGGKQWLI PWFD PWGQGTTLVTVSS ASTKGPSVFPLAP QVQLKQ SGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSP GKGLEWLGVIWISGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKS QVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYDYE FAYWGQ GTLVTVSA
290	DVD874L	AB095VL	AB033VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIACRASQDISDRLAW YQQKPKVKVPLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTINSLQPEDFATYYCQQANSFPLTFGGGTKE MKR TVAAPSVFIFPP DILLTQSPVILSVSPGERVS FSCRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLLIKYASEI SGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQ NNNWPTTFGAGTKLELKR

10

20

【0588】

(実施例 2. 59) : リンカーセット 3 を有する E G F R (配列 1) および破傷風トキ
ソイド D V D - I g の作製

【0589】

30

【表 70】

表 70

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
291	DVD879H	AB033VH	AB095VH	12345678901234567890123456789012345 QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPTTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYDYE FAYWGQGTILVTVSA ASTKGPSVFPLAPE VQLLESG GDLVRPGGSLRLSCAASGFSFSSRYGMSWVRQAPGK GLDWVAHISASAGATYYADSVKGRFTISRDNKNT LFLQMNNLRADDTAIYYCAKGGKQWLIPWFDPPWGQ GTLVTVSS
292	DVD879L	AV033VL	AB095VL	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQQRNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVESEDIADYYCQNNNWPTTFGAGTKLE LKR TVAAP DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIACRASQ DISDRLAWYQQKPGKVPKVLIIYGASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCQANSPFLT FGGGTKVEMKR
293	DVD880H	AB095VH	AB033VH	EVQLLESGGDLVRPGGSLRLSCAASGFSFSSRYGMS WVRQAPGKGLDWVAHISASAGATYYADSVKGRFTI SRDNKNTLFLQMNNLRADDTAIYYCAKGGKQWLI PWFDPPWGQGTILVTVSS ASTKGPSVFPLAP QVQLKQ SGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSP GKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPTTSRLSINKDNSKS QVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYDYEFAWGQ GTLVTVSA
294	DVD880L	AB095VL	AV033VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIACRASQDISDRLAW YQQKPGKVPKVLIIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTINSLQPEDFATYYCQANSPFLTFGGGTKVE MKR TVAAP DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQ SIGTNIHWYQQRNGSPRLLIKYASESISGIPSRF SGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQNNNWPTT FGAGTKLELKR

10

20

【0590】

(実施例 2. 60) : リンカーセット 4 を有する E G F R (配列 1) および破傷風トキ
ソイド D V D - I g の作製

【0591】

30

【表 7 1】

表 71

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				12345678901234567890123456789012345
295	DVD885H	AB033VH	AB095VH	QVQLKQSGPGLVQPSSQLSITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYDYE FAYWGQGTLLVTVSA ASTKGP EVQLLESQGGDLVRPG GSLRLSCAASGFSFSRYGMSWVRQAPGKGLDWAH ISASAGATYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNN LRADDAIYYCAKGGKQWLIPWFDPPWGQGTLLVTVS S
296	DVD885L	AB033VL	AB095VL	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHW YQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD FTLSINSVEEDIADYYCQNNNNWPTTFGAGTKLE LKR TVAAPSVFIFPP DIQMTQSPSSVSASVGDRTV IACRASQDISDRLAWYQQKPGKVPKVLIIYGASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCQQ ANSFPLTFGGGTKEVEMKR
297	DVD886H	AB095VH	AB033VH	EVQLLESQGGDLVRPGGSLRLSCAASGFSFSRYGMS WVRQAPGKGLDWAHISASAGATYYADSVKGRFTI SRDN SKNTLFLQMNNLRADDAIYYCAKGGKQWLI PWFDPPWGQGTLLVTVSS ASTKGP QVQLKQSGPGLVQ PSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWRQSPGKGLEWL GVIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMN SLQSNDAIYYCARALTYDYDYE FAYWGQGTLLVTVS A
298	DVD886L	AB095VL	AB033VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRTV IACRASQDISDRLAW YQQKPGKVPKVLIIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTINSLQPEDFATYYCQQANSFPLTFGGGTKE MKR TVAAPSVFIFPP DILLTQSPVILSVSPGERVS FSCRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLLIKYASESI SGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVEEDIADYYCQQ NNNNWPTTFGAGTKLELKR

10

20

【0592】

(実施例 2. 61) : リンカーセット 1 を有する VEGF (配列 1) および破傷風トキ
ソイド DVD-Ig の作製

【0593】

30

【表 7 2】

表 72

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				12345678901234567890123456789012345
299	DVD869H	AB014VH	AB095VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYS SHWYFDVWGQGTLLVTVSS ASTKGPE VQLVESGGDL VRPGGSLRLSCAASGFSFSRYGMSWVRQAPGKGLD WVAHISASAGATYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFL QMNNLRADDTAIYYCAKGGKQWLIPWFDPPWGQGTLL TVSS
300	DVD869L	AB014VL	AB095VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIIYFTSSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQYSTVPWTFGQGTKVE IKR TVAAP DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIACRASQ DISDRLAWYQQKPGKVPKVLIIYGASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCQYQANSFPLT FGGGTKVEMKR
301	DVD870H	AB095VH	AB014VH	EVQLLES GGD LVRPGGSLRLSCAASGFSFSRYGMS WVRQAPGKGLDWVAHISASAGATYYADSVKGRFTI SRDN SKNTLFLQMNNLRADDTAIYYCAKGGKQWLI PWFDPPWGQGTLLVTVSS ASTKGPE VQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWV GWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQM NSLRAEDTAVYYCAKYPHYYS SHWYFDVWGQGTLL TVSS
302	DVD870L	AB095VL	AB014VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIACRASQDISDRLAW YQQKPGKVPKVLIIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTINSLQPEDFATYYCQYQANSFPLTFGGGTKVE MKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQ DISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSSLHSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYSTVPWT FGQGTKVEIKR

10

20

【0594】

(実施例 2. 62) : リンカーセット 2 を有する VEGF (配列 1) および破傷風トキソイド DVD-Ig の作製

【0595】

30

【表 7 3】

表 73

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				12345678901234567890123456789012345
303	DVD875H	AB014VH	AB095VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYS SHWYFDVWGQGTLLVTVSS ASTKGPSVFPLAP EVQL LESGGDLVRPGGSLRLSCAASGFSFSGSRYSWVRQ APGKGLDWVAHISASAGATYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNNLRADDTAIYYCAKGGKQWLIPWFD PWGQGTLLVTVSS
304	DVD875L	AB014VL	AB095VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIIYFTSSSLHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQYSTVPWTFGQGTKVE IKR TVAAPSVFIFPP DIQMTQSPSSVSASVGDRVT IACRASQDISDRLAWYQQKPGKVPKVLIIYGASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCQQ ANSFPLTFGGGTKVEMKR
305	DVD876H	AB095VH	AB014VH	EVQLLESFGGDLVRPGGSLRLSCAASGFSFSGSRYS WVRQAPGKGLDWVAHISASAGATYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLFLQMNNLRADDTAIYYCAKGGKQWLIP WFDLPWGQGTLLVTVSS ASTKGPSVFPLAP EVQLVE SGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWWVRQAP GKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSK STAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYS SHWYFDVWGQGTLLVTVSS
306	DVD876L	AB095VL	AB014VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIACRASQDISDRLAW YQQKPGKVPKVLIIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTINSLQPEDFATYYCQANSFPLTFGGGTKVE MKR TVAAPSVFIFPP DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSSLH SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKVEIKR

10

20

【0596】

(実施例 2. 63) : リンカーセット 3 を有する VEGF (配列 1) および破傷風トキソイド DVD-I g の作製

【0597】

30

【表 7 4】

表 74

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				12345678901234567890123456789012345
307	DVD881H	AB014VH	AB095VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYS SHWYFDVWGQGTTLVTVSS ASTKGPSVFPLAP EVQL LESAGDILVRPGGSLRLSCAASGFSFSRYGMSWVRQ APGKGLDWAHISASAGATYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNNLRADDTAIYYCAKGGKQWLI PWFD PWGQGTTLVTVSS
308	DVD881L	AB014VL	AB095VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIIYFTSSLSHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGGGTKE IKR TVAAP DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIACRASQ DISDRLAWYQQKPGKVPKVLIIYGASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCQQANSFPLT FGGGTKVEMKR
309	DVD882H	AB095VH	AB014VH	EVQLLESAGDILVRPGGSLRLSCAASGFSFSRYGMS WVRQAPGKGLDWAHISASAGATYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLFLQMNNLRADDTAIYYCAKGGKQWLI PWFD PWGQGTTLVTVSS ASTKGPSVFPLAP EVQLVE SGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAP GKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSK STAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYS SHWYFD VWGQGTTLVTVSS
310	DVD882L	AB095VL	AB014VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIACRASQDISDRLAW YQQKPGKVPKVLIIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTINSLQPEDFATYYCQQANSFPLTFGGGTKE MKR TVAAP DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQ DISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLSHSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSTVPWT FGGGTKVEIKR

10

20

【0598】

(実施例 2. 64) : リンカーセット 4 を有する V E G F (配列 1) および破傷風トキ
ソイド D V D - I g の作製

【0599】

30

【表 7 5】

表 75

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				12345678901234567890123456789012345
311	DVD887H	AB014VH	AB095VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMN WVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTF SLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYHYS SHWYFDVWGQGTLLTVSS ASTKGPEVQLLES GGDL VRPGGSLRLSCAASGFSFSRYGMSWVRQAPGKGLD WVAHISASAGATYYADSVKGRFTISRDNKNTLFL QMNNLRADDTAIYYCAKGGKQWLIPWFDPPWQGTLL TVSS
312	DVD887L	AB014VL	AB095VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCSASQDISNYLNW YQQKPGKAPKVLIIYFTSSLSHSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQYSTVPWTFGQGTKVE IKR TVAAPS VFIFPP DIQMTQSPSSVSASVGDRV IACRASQDISDRLAWYQQKPGKVPKVLIIYGASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCQQ ANSFPLTFGGGKTKVEMKR
313	DVD888H	AB095VH	AB014VH	EVQLLESGLDVRPGGSLRLSCAASGFSFSRYGMS WVRQAPGKGLDVAHISASAGATYYADSVKGRFTI SRDNKNTLFLQMNNLRADDTAIYYCAKGGKQWLI PWFDPPWQGTLLTVSS ASTKGPEVQLVES GGGLVQ PGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWV GWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQM NSLRAEDTAVYYCAKYPHYHYS SHWYFDVWGQGTLL TVSS
314	DVD888L	AB095VL	AB014VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITACRASQDISDRLAW YQQKPGKVPKVLIIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTINSLQPEDFATYYCQQANSFPLTFGGGKTKVE MKR TVAAPS VFIFPP DIQMTQSPSSLSASVGDRV ITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLH SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKVEIKR

10

20

【0600】

(実施例 2. 65) : リンカーセット 1 を有する破傷風トキソイドおよび破傷風トキソ
イド DVD-I g の作製

【0601】

30

【表 7 6】

表 76

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				12345678901234567890123456789012345
315	DVD889H	AB095VH	AB095VH	EVQLLSEGGDLVRPGGSLRLSCAASGFSFSRYGMS WVRQAPGKGLDWVAHISASAGATYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLFLQMNNLRADDTAIYYCAKGGKQWLI PWFDPWQGTTLVTVSS ASTKGPEV QLLSEGGDLVR PGGSLRLSCAASGFSFSRYGMSWVRQAPGKGLDWV AHISASAGATYYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQM NNLRADDTAIYYCAKGGKQWLIPWFDPWQGTTLV TVSS
316	DVD889L	AB095VL	AB095VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIACRASQDISDRLAW YQQKPGKVPKVLIIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTINSLQPEDFATYYCQQANSFPLTFGGGTKVE MKR TVAAP DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIACRASQ DISDRLAWYQQKPGKVPKVLIIYGASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCQQANSFPLT FGGGTKVEMKR
317	DVD890H	AB095VH	AB095VH	EVQLLSEGGDLVRPGGSLRLSCAASGFSFSRYGMS WVRQAPGKGLDWVAHISASAGATYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLFLQMNNLRADDTAIYYCAKGGKQWLI PWFDPWQGTTLVTVSS ASTKGPSVFPLA PEVQLL SGGDLVRPGGSLRLSCAASGFSFSRYGMSWVRQAP GKGLDWVAHISASAGATYYADSVKGRFTISRDNSK NTLFLQMNNLRADDTAIYYCAKGGKQWLIPWFDPW GQGTTLVTVSS
318	DVD890L	AB095VL	AB095VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIACRASQDISDRLAW YQQKPGKVPKVLIIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTINSLQPEDFATYYCQQANSFPLTFGGGTKVE MKR TVAAPSVFIFPP DIQMTQSPSSVSASVGDRVT IACRASQDISDRLAWYQQKPGKVPKVLIIYGASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCQQ ANSFPLTFGGGTKVEMKR

10

20

【0602】

(実施例 2. 66) : リンカーセット 2 を有する破傷風トキソイドおよび破傷風トキソ
イド DVD-I g の作製

【0603】

30

【表 77】

表 77

配列 番号	DVD 可変 ドメイン名	外部 可変 ドメイン名	内部 可変 ドメイン名	配列
				12345678901234567890123456789012345
319	DVD891H	AB095VH	AB095VH	EVQLLES ^{GGDLVR} PGGSLRLSCAASGFS ^{FSRYGMS} WVRQAPGKGLDWVAHISASAGATYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLFLQMNNLRADDTAIYYCAKGGKQWLI PWFD ^{PWGQGT} LVTVSS ASTKGPSVFPLA PEVQLLE SGGDLVRPGGSLRLSCAASGFS ^{FSRYGMS} WVRQAP GKGLDWVAHISASAGATYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNNLRADDTAIYYCAKGGKQWLI PWFD ^{PWGQGT} LVTVSS
320	DVD891L	AB095VL	AB095VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIACRASQDISDRLAW YQQKPGKVPKVLIIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTINSLQPEDFATYYCQ ^{QANSFPLT} FGGGTKVE MKR TVAAP DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIACRASQ DISDRLAWYQQKPGKVPKVLIIYGASSLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCQ ^{QANSFPLT} FGGGTKVEMKR
321	DVD892H	AB095VH	AB095VH	EVQLLES ^{GGDLVR} PGGSLRLSCAASGFS ^{FSRYGMS} WVRQAPGKGLDWVAHISASAGATYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLFLQMNNLRADDTAIYYCAKGGKQWLI PWFD ^{PWGQGT} LVTVSS ASTKG PEVQLLES ^{GGDLVR} PGGSLRLSCAASGFS ^{FSRYGMS} WVRQAPGKGLDWV AHISASAGATYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNNLRADDTAIYYCAKGGKQWLI PWFD ^{PWGQGT} LVTVSS
322	DVD892L	AB095VL	AB095VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTIACRASQDISDRLAW YQQKPGKVPKVLIIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTD FTLTINSLQPEDFATYYCQ ^{QANSFPLT} FGGGTKVE MKR TVAAPSVFI FPPDIQMTQSPSSVSASVGDRVT IACRASQDISDRLAWYQQKPGKVPKVLIIYGASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCQ ^Q ANSFPLTFGGGTKVEMKR

10

20

【0604】

本発明は、分子生物学および薬物送達分野で周知の全体技術を、参照により組み込む。これらの技術としては、以下の刊行物に記載されている技術が挙げられるが、これに限定されない：

30

【0605】

【表 7 8】

- Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993);
- Ausubel, F.M. et al. eds., Short Protocols In Molecular Biology (4th Ed. 1999) John Wiley & Sons, NY. (ISBN 0-471-32938-X).
- Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984);
- Giege, R. and Ducruix, A. Barrett, Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach, 2nd ea., pp. 20 1-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999); 10
- Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, vol. 2, pp. 115-138 (1984);
- Hammerling, et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981);
- Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988);
- Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) and (1991);
- Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; 20
- Kontermann and Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. New York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5).
- Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990);
- Lu and Weiner eds., Cloning and Expression Vectors for Gene Function Analysis (2001) BioTechniques Press. Westborough, MA. 298 pp. (ISBN 1-881299-21-X).
- Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); 30
- Old, R.W. & S.B. Primrose, Principles of Gene Manipulation: An Introduction To Genetic Engineering (3d Ed. 1985) Blackwell Scientific Publications, Boston. Studies in Microbiology; V.2:409 pp. (ISBN 0-632-01318-4).
- Sambrook, J. et al. eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d Ed. 1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. Vols. 1-3. (ISBN 0-87969-309-6).
- Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978
- Winnacker, E.L. From Genes To Clones: Introduction To Gene Technology (1987) VCH Publishers, NY (translated by Horst Ibelgaufts). 634 pp. (ISBN 0-89573-614-4). 40

【 0 6 0 6 】

参照による組み込み

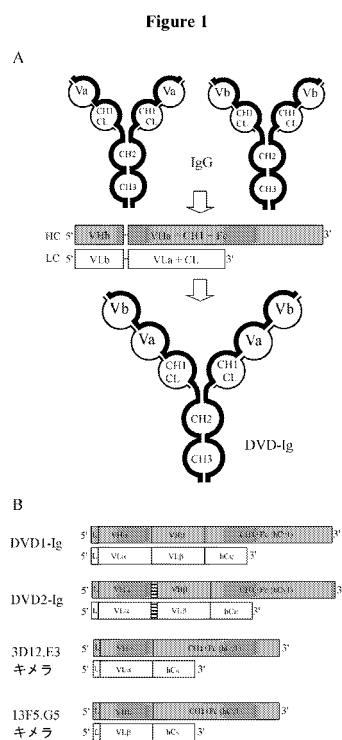
本願を通じて引用され得る全ての引用された参考文献（文献、特許、特許出願およびウェブサイトを含む。）の内容の全体は、本明細書中にこれらの参考文献が引用されるように、参照により、本明細書に明示的に組み込まれる。本発明の実施は、別段の記載がなければ、当分野において周知である免疫学、分子生物学および細胞生物学の慣用技術を使用する。

【 0 6 0 7 】

均等物

本発明は、この精神または不可欠な特徴から逸脱することなく、他の具体的な形態で具現化され得る。従って、前記実施形態は、本明細書に記載されている本発明の限定ではなく、あらゆる点で例示的なものと考えなければならない。従って、本発明の範囲は、前記記載ではなく、添付の特許請求の範囲によって示され、従って、特許請求の範囲の均等の意義および範囲に属する全ての変化は本発明に包含されるものとする。

【図 1】



【配列表】

2012525155000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成24年1月12日(2012.1.12)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であって、前記ポリペプチド鎖は、VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)nを含み、

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)nは、リンカーであり（ただし、CH1ではない。）；

(X2)nは、Fc領域であり；

(X1)nは、(X1)0または(X1)1であり；

(X2)nは、(X2)0または(X2)1であり；および

VD1およびVD2は、配列番号27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、323、325またはおよび327からの3つのCDRを独立して含む、結合タンパク質。

【請求項2】

EGFRおよびCD-3；EGFRおよびIGF1R；EGFRおよびRON；EGFRおよびHGF；VEGFおよびEGFR；EGFRおよびErbb3、EGFRおよびDLL-4、EGFRおよびPLGF、EGFRおよびEGFR、EGFRおよびRGMa、EGFRおよび破傷風トキソイド；VEGFおよび破傷風トキソイド；または破傷風トキソイドおよび破傷風トキソイドに結合することができる、請求項1に記載の結合タンパク質。

【請求項3】

(X2)nが(X2)0である、請求項1の結合タンパク質。

【請求項4】

ポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であって、前記ポリペプチド鎖は、VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)nを含み、

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)nは、リンカーであり（ただし、CLではない。）；

(X2)nは、Fc領域を含まず；

(X1)nは、(X1)0または(X1)1であり；

(X2)nは、(X2)0または(X2)1であり；および

VD1およびVD2は、配列番号28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、324、326または328からの3つのCDRを独立して含む、結合タンパク質。

【請求項5】

EGFRおよびCD-3；EGFRおよびIGF1R；EGFRおよびRON；EGFRおよびHGF；VEGFおよびEGFR；EGFRおよびErbb3、EGFRおよびDLL-4、EGFRおよびPLGF、EGFRおよびEGFR、EGFRおよびRGMa、EGFRおよび破傷風トキソイド；VEGFおよび破傷風トキソイド；または破傷風

トキソイドおよび破傷風トキソイド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】

(X 2) n が (X 2) 0 である、請求項 4 の結合タンパク質。

【請求項 7】

第一および第二のポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であって、

前記第一のポリペプチド鎖は、第一の V D 1 - (X 1) n - V D 2 - C - (X 2) n を含み、

V D 1 は、第一の重鎖可変ドメインであり；

V D 2 は、第二の重鎖可変ドメインであり；

C は、重鎖定常ドメインであり；

(X 1) n は、第一のリンカーであり；

(X 2) n は、F c 領域であり；ならびに

前記第二のポリペプチド鎖は、第二の V D 1 - (X 1) n - V D 2 - C - (X 2) n を含み、

V D 1 は、第一の軽鎖可変ドメインであり；

V D 2 は、第二の軽鎖可変ドメインであり；

C は、軽鎖定常ドメインであり；

(X 1) n は、第二のリンカーであり；

(X 2) n は、F c 領域を含まず；

前記 (X 1) n は、(X 1) 0 または (X 1) 1 であり、および、(X 2) n は、(X 2) 0 または (X 2) 1 であり、

第一および第二の X 1 リンカーは、同じであるかまたは異なり；

第一の X 1 リンカーは、C H 1 ではなく、および／または、第二の X 1 リンカーは、C L ではなく；および

V D 1 および V D 2 重鎖可変ドメインは、配列番号 2 7、2 9、3 1、3 3、3 5、3 7、3 9、4 1、4 3、4 5、4 7、4 9、5 1、5 3、5 5、5 7、3 2 3、3 2 5 または 3 2 7 からの 3 つの C D R を独立して含み、ならびに V D 1 および V D 2 軽鎖可変ドメインは、配列番号 2 8、3 0、3 2、3 4、3 6、3 8、4 0、4 2、4 4、4 6、4 8、5 0、5 2、5 4、5 6、5 8、3 2 4、3 2 6 または 3 2 8 からの 3 つの C D R を独立して含む、結合タンパク質。

【請求項 8】

E G F R および C D - 3；E G F R および I G F 1 R；E G F R および R O N；E G F R および H G F；V E G F および E G F R；E G F R および E r b B 3、E G F R および D L L - 4、E G F R および P L G F、E G F R および E G F R、E G F R および R G M a、E G F R および破傷風トキソイド；V E G F および破傷風トキソイド；または破傷風トキソイドおよび破傷風トキソイドに結合することができる、請求項 7 の結合タンパク質。

【請求項 9】

2 つの第一のポリペプチド鎖および 2 つの第二のポリペプチド鎖を含む、請求項 8 の結合タンパク質。

【請求項 10】

F c 領域が変形物配列 F c 領域である、請求項 8 の結合タンパク質。

【請求項 11】

F c 領域が、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A、I g M、I g E または I g D から得られる F c 領域である、請求項 8 の結合タンパク質。

【請求項 12】

第一のポリペプチド鎖の前記 V D 1 および第二のポリペプチド鎖の前記 V D 1 が同じ親抗体またはこの抗原結合部分から得られる、請求項 8 の結合タンパク質。

【請求項 13】

第一のポリペプチド鎖の前記 V D 1 および第二のポリペプチド鎖の前記 V D 1 が異なる親抗体またはこの抗原結合部分から得られる、請求項 8 の結合タンパク質。

【請求項 14】

第一のポリペプチド鎖の前記 V D 2 および第二のポリペプチド鎖の前記 V D 2 が同じ親抗体またはこの抗原結合部分から得られる、請求項 8 の結合タンパク質。

【請求項 15】

第一のポリペプチド鎖の前記 V D 2 および第二のポリペプチド鎖の前記 V D 2 が異なる親抗体またはこの抗原結合部分から得られる、請求項 8 の結合タンパク質。

【請求項 16】

前記第一および前記第二の親抗体が前記抗原上の異なるエピトープに結合する、請求項 8 の結合タンパク質。

【請求項 17】

前記第一の親抗体またはこの抗原結合部分が、前記第二の親抗体またはこの抗原結合部分が前記第二の抗原に結合する強度とは異なる強度で前記第一の抗原に結合する、請求項 8 の結合タンパク質。

【請求項 18】

前記第一の親抗体またはこの抗原結合部分が、前記第二の親抗体またはこの抗原結合部分が前記第二の抗原に結合する親和性とは異なる親和性で前記第一の抗原に結合する、請求項 8 の結合タンパク質。

【請求項 19】

4 つのポリペプチド鎖を含む、2 つの抗原に結合することができる結合タンパク質であって、

第一および第三のポリペプチド鎖が $V D 1 - (X 1)_n - V D 2 - C - (X 2)_n$ を含み、

V D 1 は、第一の重鎖可変ドメインであり；

V D 2 は、第二の重鎖可変ドメインであり；

C は、重鎖定常ドメインであり；

(X 1)_n は、第一のリンカーであり；

(X 2)_n は、F c 領域であり；ならびに

第二および第四のポリペプチド鎖が $V D 1 - (X 1)_n - V D 2 - C - (X 2)_n$ を含み、

V D 1 は、第一の軽鎖可変ドメインであり；

V D 2 は、第二の軽鎖可変ドメインであり；

C は、軽鎖定常ドメインであり；

(X 1)_n は、第二のリンカーであり；

(X 2)_n は、F c 領域を含まず；

前記 (X 1)_n は、(X 1)₀ または (X 1)₁ であり、および、(X 2)_n は、(X 2)₀ または (X 2)₁ であり、

第一および第二の X 1 リンカーは、同じであるかまたは異なり；

第一の X 1 リンカーは、C H 1 ではなく、および／または、第二の X 1 リンカーは、C L ではなく；および

V D 1 および V D 2 重鎖可変ドメインは、配列番号 27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、323、325 または 327 からの 3 つの C D R を独立して含み、ならびに V D 1 および V D 2 軽鎖可変ドメインは、配列番号 28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、324、326 または 328 からの 3 つの C D R を独立して含む、2 つの抗原に結合することができる結合タンパク質。

【請求項 20】

2 つの抗原に結合することができる結合タンパク質を作製する方法であって、

a) 第一の抗原に結合することができる第一の親抗体またはこの抗原結合部分を取得す

る工程；

b) 第二の抗原に結合することができる第二の親抗体またはこの抗原結合部分を取得する工程；

c) 請求項 1、3、7 または 19 のいずれか一項のポリペプチドを構築する工程；

e) ポリペプチド鎖を発現させる工程

を、前記第一および前記第二の抗原に結合することができる結合タンパク質が作製されるように含み；

V D 1 および V D 2 重鎖可変ドメインは、配列番号 27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、323、325 および 327 からの 3 つの C D R を独立して含み、ならびに V D 1 および V D 2 軽鎖可変ドメインは、配列番号 28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、324、326 および 328 からの 3 つの C D R を独立して含む、方法。

【請求項 21】

F c 領域が変形物配列 F c 領域である、請求項 20 の方法。

【請求項 22】

F c 領域が、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A、I g M、I g E および I g D から得られる F c 領域である、請求項 20 の方法。

【請求項 23】

前記第一の親抗体またはこの抗原結合部分が、前記第二の親抗体またはこの抗原結合部分が前記第二の抗原に結合する親和性とは異なる親和性で前記第一の抗原に結合する、請求項 20 の方法。

【請求項 24】

前記第一の親抗体またはこの抗原結合部分が、前記第二の親抗体またはこの抗原結合部分が前記第二の抗原に結合する強度とは異なる強度で前記第一の抗原に結合する、請求項 20 の方法。

【請求項 25】

V D 1 および V D 2 重鎖可変ドメインが、配列番号 27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、323、325 または 327 を独立して含む、請求項 1 の結合タンパク質。

【請求項 26】

V D 1 および V D 2 軽鎖可変ドメインが、配列番号 28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、324、326 または 328 を独立して含む、請求項 4 の結合タンパク質。

【請求項 27】

V D 1 および V D 2 重鎖可変ドメインが、配列番号 27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、323、325 または 327 を独立して含み、ならびに V D 1 および V D 2 軽鎖可変ドメインが、配列番号 28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、324、326 または 328 を独立して含む、請求項 7 の結合タンパク質。

【請求項 28】

V D 1 および V D 2 重鎖可変ドメインが、配列番号 27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、323、325 または 327 を独立して含み、ならびに V D 1 および V D 2 軽鎖可変ドメインが、配列番号 28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、324、326 または 328 を独立して含む、請求項 19 の結合タンパク質。

【請求項 29】

V D 1 および V D 2 重鎖可変ドメインが、配列番号 27、29、31、33、35、3

7、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、323、325または327を独立して含み、ならびにVD1およびVD2軽鎖可変ドメインが、配列番号28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、324、326または328を独立して含む、請求項20の方法。

【請求項30】

検査試料中の少なくとも1つの抗原またはこの断片の存在をイムノアッセイによって決定する方法であって、

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

少なくとも1つの結合タンパク質は、請求項19の結合タンパク質を含む、方法。

【請求項31】

検査試料中の抗原もしくはこの断片の量または濃度をイムノアッセイによって決定する方法であって、

イムノアッセイは、(a)少なくとも1つの結合タンパク質および少なくとも1つの検出可能な標識を使用し、および(b)検出可能な標識によって生成されたシグナルと、対照または抗原もしくはこの断片を含む検量物質とを比較すること含み、

検量物質は、場合により、検量物質の各々が抗原またはこの断片の濃度において一連の他の検量物質と異なる一連の検量物質の一部であり、

ならびに少なくとも1つの結合タンパク質は、請求項19の結合タンパク質を含む、方法。

【請求項32】

抗原もしくはこの断片の存在、量または濃度に関して検査試料をアッセイするためのキットであって、

(a) 抗原またはこの断片に関して検査試料をアッセイするための指示書および

(b) 請求項19の結合タンパク質を含む少なくとも1つの結合タンパク質を含む、キット。

【請求項33】

請求項19の結合タンパク質および医薬的に許容される担体を含む、医薬組成物。

【請求項34】

前記さらなる治療剤が、画像化剤、細胞毒性剤、血管新生阻害剤、キナーゼ阻害剤、共同刺激分子遮断薬、接着分子遮断薬、抗サイトカイン抗体もしくはその機能的断片、メトトレキサート、シクロスポリン、ラパマイシン、FK506、検出可能な標識もしくはレポーター、TNFアンタゴニスト、抗リウマチ薬、筋弛緩剤、催眠薬、非ステロイド性炎症薬(NSAID)、鎮痛薬、麻酔薬、鎮静薬、局所麻酔薬、神経筋遮断薬、抗微生物薬、抗乾癬薬、コルチコステロイド、タンパク同化ステロイド、エリスロポエチン、免疫化、免疫グロブリン、免疫抑制薬、成長ホルモン、ホルモン補充薬、放射性医薬、抗うつ病、精神治療薬、興奮剤、喘息薬、 β アゴニスト、吸入ステロイド、エピネフリンもしくは類縁体、サイトカインまたはサイトカインアンタゴニストである、請求項33の医薬組成物。

【請求項35】

X1が、配列番号1から28のいずれか1つである、請求項1、3または7に記載の結合タンパク質。

【請求項36】

治療が達成されるように、結合タンパク質を対象に投与することによって、疾病または疾患に関して対象を治療するのに使用するための、請求項1、3または7に記載の結合タンパク質。

【請求項37】

前記疾患が、関節リウマチ、骨関節炎、若年性慢性関節炎、化膿性関節炎、ライム関節炎、乾癬性関節炎、反応性関節炎、脊椎関節症、全身性紅斑性狼瘡、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、インシュリン依存性糖尿病、甲状腺炎、喘息、アレルギー性疾患

、乾癬、皮膚炎、強皮症、移植片対宿主病、臓器移植拒絶、臓器移植に関連する急性または慢性免疫疾患、サルコイドーシス、アテローム性動脈硬化症、播種性血管内凝固、川崎病、バセドウ病、ネフローゼ症候群、慢性疲労症候群、ウェゲナー肉芽腫症、ヘノッホ・シュエライン紫斑症、腎臓の顕微鏡的血管炎、慢性活動性肝炎、ブドウ膜炎、敗血症性ショック、毒素性ショック症候群、敗血症症候群、悪液質、感染性疾患、寄生性疾患、後天性免疫不全症候群、急性横断性脊髄炎、ハンチントン舞蹈病、パーキンソン病、アルツハイマー病、発作、原発性胆汁性肝硬変、溶血性貧血、悪性腫瘍、心不全、心筋梗塞、アジソン病、孤発性の、多内分泌腺機能低下症候群Ⅰ型および多内分泌腺機能低下症候群Ⅱ型、シュミット症候群、成人（急性）呼吸促迫症候群、脱毛症、円形脱毛症、血清反応陰性関節症、関節症、ライター病、乾癬性関節症、潰瘍性大腸性関節症、腸疾患性滑膜炎、クラミジア、エルシニアおよびサルモネラ関連関節症、脊椎関節症、アテローム性疾患／動脈硬化症、アトピー性アレルギー、自己免疫性水疱性疾患、尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、類天疱瘡、線状IgA病、自己免疫性溶血性貧血、クームス陽性溶血性貧血、後天性悪性貧血、若年性悪性貧血、筋痛性脳炎／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、後天性免疫不全症関連疾患、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γ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、突発性繊維化性肺炎、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（古典的自己免疫性またはルポイド肝炎）、2型自己免疫性肝炎（抗LKM抗体肝炎）、自己免疫媒介性低血糖症、黒色表皮腫を伴うB型インシュリン抵抗性、副甲状腺機能低下症、臓器移植に関連する急性免疫疾患、臓器移植に関連する慢性免疫疾患、変形性関節症、原発性硬化性胆管炎、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NOS、糸球体腎炎、腎臓の顕微鏡的血管炎、ライム病、円板状紅斑性狼瘡、男性不妊症特発性またはNOS、精子自己免疫、多発性硬化症（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、アレルギーおよび喘息、B群連鎖球菌（GBS）感染、精神障害（例えば、うつ病および統合失調症など）、Th2型およびTh1型によって媒介される疾病、急性および慢性疼痛、肺癌、乳癌、胃癌、膀胱癌、大腸癌、膵臓癌、卵巣癌、前立腺癌および直腸癌および造血性悪性病変（白血病およびリンパ腫）などの癌、無βリポタンパク質血症、先端チアノーゼ、急性および慢性寄生性または感染性プロセス、急性白血病、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、急性骨髄性白血病（AML）、急性または慢性細菌感染、急性膵炎、急性腎不全、腺癌、心房（*aerial*）異所性拍動、AIDS認知症複合、アルコール誘発性肝炎、アレルギー性結膜炎、アレルギー性接触性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、同種移植拒絶、α-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*）、大動脈および末梢動脈瘤、大動脈解離、動脈性高血圧、動脈硬化症、動静脈瘻、運

動失調、心房細動（持続的または発作性）、心房粗動、房室ブロック、B細胞リンパ腫、骨移植拒絶、骨髄移植（BMT）拒絶、脚ブロック、バーキットリンパ腫、火傷、心不整脈、心機能不全症候群（cardiac stun syndrome）、心臓腫瘍、心筋症、心肺バイパス炎症反応、軟骨移植拒絶、小脳皮質変性、小脳疾患、無秩序なまたは多巣性心房頻脈、化学療法関連疾患、慢性骨髄性白血病（CML）、慢性アルコール症、慢性炎症性病変、慢性リンパ性白血病（CLL）、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、慢性サリチル酸中毒、結腸直腸癌、うっ血性心不全、結膜炎、接触性皮膚炎、肺性心、冠動脈疾患、クロイツフェルトーヤコブ病、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、中枢神経系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障害、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、錐体外路および小脳疾患、家族性血球貪食性リンパ組織球症（familial hematophagocytic lymphohistiocytosis）、致死性胸腺移植拒絶、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、何れかの臓器または組織の移植片拒絶、グラム陰性敗血症、グラム陽性敗血症、細胞内生物に起因する肉芽腫、有毛細胞白血病、ハラールホルデン・スパッツ病、橋本甲状腺炎、枯草熱、心臓移植拒絶、血色素症、血液透析、溶血性尿毒症症候群／血栓溶解血小板減少紫斑病、出血、肝炎（A型）、ヒス束不整脈、HIV感染／HIV神経障害、ホジキン病、運動過剰性運動障害、過敏症反応、過敏性肺炎、高血圧、運動低下性運動障害、視床下部一下垂体一副腎皮質系評価、特発性アジソン病、特発性肺繊維症、抗体媒介性細胞傷害、無力症、乳児脊髄性筋萎縮症、大動脈の炎症、A型インフルエンザ、電離放射線曝露、虹彩毛様体炎／ブドウ膜炎／視神経炎、虚血再灌流障害、虚血性発作、若年性関節リウマチ、若年性脊髄性筋萎縮症、カポジ肉腫、腎移植拒絶、レジオネラ、リーシュマニア症、ハンセン病、皮質脊髄系の病変、脂肪血症（lipedema）、肝臓移植拒絶、リンパ浮腫（lymphedema）、マラリア、悪性リンパ腫、悪性組織球増殖症、悪性黒色腫、髄膜炎、髄膜炎菌血症（meningococcemia）、代謝性／特発性疾患、偏頭痛、ミトコンドリア多系疾患（mitochondrial multi-system disorder）、混合性結合組織病、モノクローナル高ガンマグロブリン血症、多発性骨髄腫、多系統変性（メンセル・デジェリーヌートーマス シャイードレーガーおよびマシャドージョセフ）、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、骨髄異形成症候群、心筋梗塞、心筋虚血疾患、上咽頭癌、新生児慢性肺疾患、腎炎、ネフローゼ、神経変性疾患、神経原性I筋萎縮、好中球減少性発熱、非ホジキンリンパ腫、腹部大動脈およびその分枝の閉塞、閉塞性動脈疾患、okt3療法、精巣炎／精巣上体炎、精巣炎／精管復元術処置、臓器肥大、骨粗鬆症、脾臓移植拒絶、脾癌、腫瘍随伴性症候群／悪性腫瘍の高カルシウム血症、副甲状腺移植拒絶、骨盤内炎症性疾患、通年性鼻炎、心膜疾患、末梢性アテローム性動脈硬化疾患、末梢血管疾患、腹膜炎、悪性貧血、ニューモシスチス・カリニ肺炎、肺炎、POEMS症候群（多発神経炎、臓器肥大、内分泌疾患、単クローン性γグロブリン血症および皮膚変化症候群（skin changes syndrome））、灌流後症候群（post perfusion syndrome）、ポンプ後症候群（post pump syndrome）、心筋梗塞後開心術症候群、子癇前症、進行性核上性麻痺、原発性肺高血圧、放射線療法、レイノー現象および病、レイノー病、レフサム病、規則的なQRS幅の狭い頻脈症（regular narrow QRS tachycardia）、腎血管性高血圧、再灌流障害、拘束型心筋症、肉腫、強皮症、老年性舞蹈病、レビー小体型の老年性認知症、血清反応陰性関節症、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、失神、心血管系の梅毒、全身性アナフィラキシー、全身性炎症反

応症候群、全身性発症若年性関節リウマチ、T細胞またはF a b A L L、毛細血管拡張症、閉塞性血栓血管炎、血小板減少症、毒性、移植、外傷／出血、I I I型過敏症反応、I V型過敏症、不安定狭心症、尿毒症、尿路性敗血症、じんましん、心臓弁膜症、静脈瘤、血管炎、静脈疾患、静脈血栓症、心室細動、ウイルスおよび真菌感染、ウイルス性脳炎（v i r a l e n c e p h a l i t i s）／無菌性髄膜炎、ウイルス（v i r a l）関連血球貪食症候群、ウェルニッケーコルサコフ症候群、ウィルソン病、何れかの臓器または組織の異種移植拒絶、急性冠動脈症候群、急性突発性多発性神経炎、急性炎症性脱髄性多発性神経障害、急性虚血、成体スチル病、円形脱毛症、アナフィラキシー、抗リン脂質抗体症候群、再生不良貧血、動脈硬化症、アトピー性湿疹、アトピー性皮膚炎、自己免疫性皮膚炎、連鎖球菌感染を伴う自己免疫性疾患、自己免疫性腸疾患、自己免疫性難聴、自己免疫性リンパ増殖性症候群（A L P S）、自己免疫性心筋炎、自己免疫性早発閉経、眼瞼炎、気管支拡張症、水疱性類天疱瘡、心血管疾患、劇症型抗リン脂質抗体症候群、セリアック病、頸部脊椎症、慢性虚血、瘢痕性類天疱瘡、多発性硬化症に対するリスクを有する最初のエピソードからなる症候群（c i s ; c l i n i c a l l y i s o l a t e d s y n d r o m e）、結膜炎、小児発症精神疾患、慢性閉塞性肺疾患（C O P D）、涙囊炎、皮膚筋炎、糖尿病性網膜症、真性糖尿病、椎間板ヘルニア、椎間板脱出、薬物によって誘導される免疫溶血性貧血、心内膜炎、子宮内膜炎、眼内炎、上強膜炎、多型性紅斑、重症型多型性紅斑、妊娠性類天疱瘡、ギランバレー症候群（G B S）、枯草熱、ヒューズ症候群、突発性パーキンソン病、突発性間質性肺炎、I g E媒介性アレルギー、免疫溶血性貧血、封入体筋炎、感染性眼性炎症疾患、炎症性脱髄性疾患、炎症性心臓病、炎症性腎臓病、I P F／U I P、虹彩炎、角膜炎、乾性角結膜炎、クスマウル病またはクスマウル・マイヤー病、ランドリー麻痺、ランゲルハンス細胞組織球増殖症、網状皮斑、黄斑変性、顕微鏡的多発性血管炎、ベフテレフ病、運動神経疾患、粘膜類天疱瘡、多発性臓器不全、重症筋無力症、骨髄異形成症候群、心筋炎、神経根疾患、神経障害、非A非B型肝炎、視神経炎、骨溶解、卵巣癌、少関節性J R A、末梢動脈閉塞疾患（P A O D）、末梢血管疾

患（P V D）、末梢動脈疾患（P A D）、静脈炎、結節性多発性動脈炎（または結節性動脈周囲炎）、多発性軟骨炎、リウマチ性多発性筋痛、白毛症、多関節性J R A、多内分泌欠乏症候群、多発性筋炎、リウマチ性多発性筋痛（P M R）、ポンプ後症候群（p o s t - p u m p）症候群、原発性パーキンソン病、前立腺および直腸癌および造血系の悪性腫瘍（白血病およびリンパ腫）、前立腺炎、純赤血球形成不全、原発性副腎不全、再発性視神経脊髄炎、再狭窄、リウマチ性心疾患、s a p h o（滑膜炎、ざ瘡、膿疱、骨肥大症および骨炎）、強皮症、続発性アミロイドーシス、ショック肺、強膜炎、坐骨神経痛、続発性副腎不全、シリコーン関連結合組織疾患、スネドナーウィルキンソン皮膚病、強直性脊椎炎、スティーブンス・ジョンソン症候群（S J S）、全身性炎症性応答症候群、側頭動脈炎、トキソプラズマ網膜炎、毒性表皮剥離症、横断性脊髄炎、T R A P S（腫瘍壊死因子受容体1型アレルギー性反応）、I I型糖尿病、じんましん、通常型間質性肺炎（U I P）、血管炎、春季カタル、ウイルス性網膜炎、フォークト・コヤナギ・ハラダ症候群（V K H症候群）、滲出型黄斑変性または創傷治癒である、請求項36の結合タンパク質。

【請求項38】

対象への前記投与が、非経口、皮下、筋肉内、静脈内、関節内、気管支内、腹部内、嚢内、軟骨内、腔内（i n t r a c a v i t a r y）、腔内（i n t r a c e l l i a l）、小脳内、脳室内、結腸内、頸管内、胃内、肝臓内、心筋内、骨内、骨盤内、心臓周囲内、腹腔内、胸膜内、前立腺内、肺内、結腸内、腎臓内、網膜内、脊髄内、滑膜内、胸腔内、子宮内、膀胱内、ポーラス、腔、直腸、口内、舌下、鼻内または経皮による、請求項36の結合タンパク質。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 10/33231

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - C12P 21/08; A61K 39/00 (2010.01)

USPC - 530/387.3; 424/136.1;

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
USPC- 530/387.3; 424/136.1;

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC- 530/388.1 530/391.3 530/391.7; 530/387.1; 424/178.1; 435/328; 536/23.53

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PubWEST, Google Scholar: dual variable domain, heavy chain, light chain, diabody, bivalent antibody, constant domain, constant region, affinity, potency, second antibody, same, different, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgGA, IgGM, IgGE, IgGD, parent antibody, fc, linker
GenCore 6.3: SEQ ID NOs: 27, 29, 30

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2007/0071675 A1 (Wu et al.), 29 Mar. 2007 (29.03.2007) Claims 11, 14-15, 21-22, Table 1, Fig. 1B, para [0012], [0014]-[0016], [0053], [0067]-[0068], [0073], [0098], [0105], [0113], [0118], [0233], [0239], [0240]-[0245], [0252]	38
Y	WO 2005/120557 A1 (Pereira et al.), 22 Dec. 2005 (22.12.2005) SEQ ID NO 7	1-3, 25-37
Y	US 2003/0039645 A1 (Adair et al.) 27 Feb. 2003 (27.02.2003) SEQ ID NO 30	1-3, 25-37

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 Nov. 2010 (13.11.2010)

Date of mailing of the international search report

22 NOV 2010

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 10/33231

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

Group I-: claims 1-24, drawn to a binding protein comprising a polypeptide chain that comprises VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n. The first invention is restricted to a binding protein comprising a polypeptide chain VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n, wherein VD1 and VD2 comprise an amino acid sequence SEQ ID NOs: 27 and 29, respectively. Should an additional fee(s) be paid, Applicant is invited to elect an additional SEQ ID NO(s) to be searched. The exact claims searched will depend on the specifically elected SEQ ID NO(s).
[NOTE: Claims 4-24 were excluded from the search, because they are drawn to a non-elected subject matter.]

---Continued on Extra Sheet---

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
Claims 1-3, limited to SEQ ID NOs 27 and 29, and claims 25-38
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 10/33231

*****Supplemental Box*****

Continued from Box III

Group II, claims 25-38, drawn to a method for generating a Dual Variable Domain Immunoglobulin that can bind two antigens comprising the steps of:

- (a) obtaining a first parent antibody, or antigen binding portion thereof, that can bind a first antigen;
- (b) obtaining a second parent antibody, or antigen binding portion thereof, that can bind a second antigen;
- (c) constructing first and third polypeptide chains comprising VDI-(X1)n-VD2-C-(X2)n.

The inventions listed as Groups I+ through II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The inventions of Group I+ do not include the inventive concept of a method for generating a Dual Variable Domain Immunoglobulin VDI-(X1)n-VD2-C-(X2)n that can bind two antigens, as required by Group II.

The inventions of Groups I+ and II share the technical feature of a binding protein comprising a polypeptide chain, wherein said polypeptide chain comprises VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art. Specifically, US 2007/0071675 A1 to Wu et al. (hereinafter "Wu"), discloses binding protein comprising a polypeptide chain, wherein said polypeptide chain comprises VD 1-(X 1)n -VD2-C-(X2) n (para [0012], [0098]), wherein; VDI is a first heavy chain variable domain obtained from a first parent antibody or antigen binding portion thereof (claims 11, 21, para [0012], [0016], [0098], Fig. 1);

VD2 is a second heavy chain variable domain obtained from a second parent antibody or antigen binding portion thereof (claims 11, 21, para [0012], [0016], [0098], Fig. 1);

C is a heavy chain constant domain (claims 11, 21, para [0012], [0016], [0098], Fig. 1);

(X 1) n is a linker with the proviso that it is not CH 1, wherein said (X 1) n is either present or absent (para [0012], [0016], [0098], Fig. 1); and

(X2)n is an Fc region, wherein said (X2)n is either present or absent (para [0012], [0016], [0098],

wherein VDI and VD2 comprise an amino acid sequence that is identical to the claimed SEQ ID NO 27 (Example 4; SEQ ID NO 100). As said binding protein comprising VD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n was known at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

Another technical feature of the inventions listed as Group I+ is the specific amino acid sequence recited therein. The inventions do not share a special technical feature, because 1) no significant structural similarities can readily be ascertained among the amino acid sequences, and 2) Wu et al discloses the claimed SEQ ID NO:27 (Example 4; SEQ ID NO 100). Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

Groups I+ and II therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Claims 4-24 were excluded from the search, because they are drawn to a non-elected subject matter.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 0 7 K	16/46	(2006.01)	C 0 7 K	16/46
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/02
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02
A 6 1 P	37/08	(2006.01)	A 6 1 P	37/08
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	1/04
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02
				V
				C

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

(72)発明者 リウ, ジュインジエン
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・0 1 5 4 5、シユルーズベリー、クリムゾン・ドライブ・1 4

(72)発明者 キングスバリー, ジリアン・エイ
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・0 1 7 7 8、ウエイランド、アクエダクト・ロード・4 6

(72)発明者 ライリー, エドワード・ビー
アメリカ合衆国、イリノイ・6 0 0 4 8、リバティビル、ウイナーズ・サークル・1 1 3 6

(72)発明者 モーガンーラツペ, スーザン・イー
アメリカ合衆国、イリノイ・6 0 6 5 6、シカゴ、ノース・キャンフィールド・アベニュー・5 4 1 9

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA41 DA03 EA04 GA11 HA01
4B064 AG27 BJ12 CA10 CA19 CC15 CC24 DA01 DA13
4C085 AA13 BB31 CC22 EE01
4H045 AA11 AA20 BA09 BA41 CA42 DA76 EA20 EA50 FA74