(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2012-527876
(P2012-527876A)
(43)公表日　平成24年11月12日(2012.11.12)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
C07K 19/00	(2006.01)	C07K	19/00		4B064
C07K 16/24	(2006.01)	C07K	16/24		4B065
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		4C085
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19		4H045

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 76 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2012-512353 (P2012-512353)
(86)(22)出願日　平成22年5月26日 (2010.5.26)
(85)翻訳文提出日　平成24年1月20日 (2012.1.20)
(86)国際出願番号　PCT/EP2010/057229
(87)国際公開番号　WO2010/136482
(87)国際公開日　平成22年12月2日 (2010.12.2)
(31)優先権主張番号　61/181,881
(32)優先日　平成21年5月28日 (2009.5.28)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　397009934
グラクソ　グループ　リミテッド
ＧＬＡＸＯ　ＧＲＯＵＰ　ＬＩＭＩＴＥＤ
イギリス　ミドルセックス　ユービー６　０エヌエヌ　グリーンフォード　バークレー　アベニュー　グラクソ　ウェルカム　ハウス　（番地なし）
Ｇｌａｘｏ　Ｗｅｌｌｃｏｍｅ　Ｈｏｕｓｅ，Ｂｅｒｋｅｌｅｙ　Ａｖｅｎｕｅ　Ｇｒｅｅｎｆｏｒｄ，Ｍｉｄｄｌｅｓｅｘ　ＵＢ６　ＯＮＮ，Ｇｒｅａｔ　Ｂｒｉｔａｉｎ
(74)代理人　100091096
弁理士　平木　祐輔

最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗原結合タンパク質

(57)【要約】
本発明は、ＨＧＦアンタゴニストとＶＥＧＦアンタゴニストとの組み合わせに関し、かつ、１つ以上のエピトープ結合ドメインに連結したタンパク質スキャフォールドを含むＨＧＦに結合する抗原結合タンパク質、それら構築物の製造方法及びその使用を提供する。ここでこの抗原結合タンパク質はそのうちの少なくとも１つがエピトープ結合ドメイン由来であり、そのうちの少なくとも１つがペアード（対になった）ＶＨ／ＶＬドメイン由来である、少なくとも２つの抗原結合部位を有する構築物である。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
１つ以上のエピトープ結合ドメインに連結したタンパク質スキャフォールドを含む抗原結合タンパク質であって、該抗原結合タンパク質は少なくとも２つの抗原結合部位を有し、そのうちの少なくとも１つはエピトープ結合ドメインに由来し、そのうちの少なくとも１つはペアードＶＨ／ＶＬドメインに由来し、かつ該抗原結合部位の少なくとも１つはＨＧＦに結合することが可能である、上記抗原結合タンパク質。
【請求項２】
少なくとも１つのエピトープ結合ドメインが免疫グロブリン単一可変ドメインである、請求項１に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項３】
免疫グロブリン単一可変ドメインがヒトｄＡｂである、請求項２に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項４】
免疫グロブリン単一可変ドメインがラクダ科ｄＡｂ（ＶＨＨ）またはサメｄＡｂ（ＮＡＲＶ）である、請求項２に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項５】
少なくとも１つのエピトープ結合性ドメインが、ＣＴＬＡ－４（Ｅｖｉｂｏｄｙ）；リポカリン；プロテインＡのＺドメイン（Ａｆｆｉｂｏｄｙ、ＳｐＡ）、Ａドメイン（Ａｖｉｍｅｒ／Ｍａｘｉｂｏｄｙ）などのプロテインＡ由来分子；ＧｒｏＥｌ及びＧｒｏＥＳなどの熱ショックタンパク質；トランスフェリン（ｔｒａｎｓ－ｂｏｄｙ）；アンキリンリピートタンパク質（ＤＡＲＰｉｎ）；ペプチドアプタマー；Ｃ型レクチンドメイン（Ｔｅｔｒａｎｅｃｔｉｎ）；ヒトγクリスタリン及びヒトユビキチン（ａｆｆｉｌｉｎｓ）；ＰＤＺドメイン；ヒトプロテアーゼインヒビターのスコーピオントキシンクニッツ（ｓｃｏｒｐｉｏｎｔｏｘｉｎｋｕｎｉｔｚ）型ドメイン；並びにフィブロネクチン（アドネクチン）より選択される非Ｉｇスキャフォールドに由来する、請求項１に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項６】
エピトープ結合ドメインがＡｆｆｉｂｏｄｙ、アンキリンリピートタンパク質（ＤＡＲＰｉｎ）及びアドネクチンより選択されるスキャフォールドに由来する、請求項５に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項７】
結合タンパク質が２以上の抗原に対する特異性を有する、請求項１～６のいずれか1項に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項８】
少なくとも１つのペアードＶＨ／ＶＬドメインがＨＧＦに結合可能な、請求項１～７のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項９】
少なくとも１つのエピトープ結合ドメインがＨＧＦに結合可能な、請求項１～８のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項１０】
抗原結合タンパク質がＨＧＦ及びＶＥＧＦに結合可能な、請求項１～９のいずれか1項に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項１１】
タンパク質スキャフォールドがＩｇスキャフォールドである、請求項１～１０のいずれか1項に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項１２】
ＩｇスキャフォールドがＩｇＧスキャフォールドである、請求項１１に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項１３】

ＩｇＧスキャフォールドがＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３及びＩｇＧ４より選択される、請求項１２に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項１４】

ＩｇＧスキャフォールドが抗体の全てのドメインを含む、請求項１１～１３のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項１５】

配列番号１０の重鎖配列および配列番号１２の軽鎖配列を含む、請求項１～１４のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項１６】

配列番号２２重鎖配列および配列番号１２の軽鎖配列を含む、請求項１５に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項１７】

４つのエピトープ結合ドメインを含む、請求項１～１６のいずれか1項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項１８】

２つのエピトープ結合ドメインが同じ抗原に対する特異性を有する、請求項１７に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項１９】

少なくとも１つのエピトープ結合ドメインが１～１５０のアミノ酸を含むリンカーを介してＩｇスキャフォールドに直接連結されている、請求項１～１８のいずれか1項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項２０】

少なくとも１つのエピトープ結合ドメインが、１～２０のアミノ酸を含むリンカーを介してＩｇスキャフォールドに直接連結されている、請求項１９に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項２１】

少なくとも１つのエピトープ結合ドメインが、配列番号３～８で示されるいずれか１つの配列、又はそれらの任意の複合もしくは組み合わせより選択されたリンカーを介してＩｇスキャフォールドに直接連結されている、請求項２０に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項２２】

少なくとも１つのエピトープ結合ドメインがヒト血清アルブミンに結合する、請求項１～２１のいずれか1項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項２３】

軽鎖のＮ末端でＩｇスキャフォールドと連結したエピトープ結合ドメインを含む、請求項１１～２２のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項２４】

重鎖のＮ末端でＩｇスキャフォールドと連結したエピトープ結合ドメインを含む、請求項１１～２２のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項２５】

軽鎖のＣ末端でＩｇスキャフォールドに連結したエピトープ結合ドメインを含む、請求項１１～２２のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項２６】

重鎖のＣ末端でＩｇスキャフォールドに連結したエピトープ結合ドメインを含む、請求項１１～２２のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項２７】

４つの抗原結合部位を有する、請求項１～２６のいずれか1項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項２８】

医薬で使用するための、請求項１～２７のいずれか1項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項２９】

癌、例えば固形腫瘍（結腸，乳房，卵巣，肺（小細胞または非小細胞），前立腺，膵臓，腎臓，肝臓，胃，頭頸部，メラノーマ，肉腫を含む），原発性および二次性（転移性）脳腫瘍、例えば限定はされないが、グリオーマ（上衣腫を含む），髄膜腫，オリゴデンドローマ，アストロサイトーマ（低悪性度，未分化および多形神経膠芽腫），髄芽腫，神経節腫，シュワン腫および脊索腫，または加齢性黄斑変性病，糖尿病性網膜症，ＲＡもしくは乾癬の治療のための医薬の製造における使用のための、請求項１～２８のいずれか1項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項３０】

治療量の請求項１～２７のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質を投与することを含む、癌、例えば固形腫瘍（結腸，乳房，卵巣，肺（小細胞または非小細胞），前立腺，膵臓，腎臓，肝臓，胃，頭頸部，メラノーマ，肉腫を含む），原発性および二次性（転移性）脳腫瘍、例えば限定はされないが、グリオーマ（上衣腫を含む），髄膜腫，オリゴデンドローマ，アストロサイトーマ（低悪性度，未分化および多形神経膠芽腫），髄芽腫，神経節腫，シュワン腫および脊索腫，または加齢性黄斑変性病，糖尿病性網膜症，ＲＡもしくは乾癬に罹患した患者の治療方法。

【請求項３１】

癌、例えば固形腫瘍（結腸，乳房，卵巣，肺（小細胞または非小細胞），前立腺，膵臓，腎臓，肝臓，胃，頭頸部，メラノーマ，肉腫を含む），原発性および二次性（転移性）脳腫瘍、例えば限定はされないが、グリオーマ（上衣腫を含む），髄膜腫，オリゴデンドローマ，アストロサイトーマ（低悪性度，未分化および多形神経膠芽腫），髄芽腫，神経節腫，シュワン腫および脊索腫，または加齢性黄斑変性病，糖尿病性網膜症，ＲＡもしくは乾癬の治療のための、請求項１～２７のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項３２】

請求項１～２７のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質の重鎖をコードする、ポリヌクレオチド配列。

【請求項３３】

請求項１～２７のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質の軽鎖をコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項３４】

請求項１～２７のいずれかに記載の抗原結合タンパク質の重鎖及び軽鎖をコードする１つ以上のポリヌクレオチド配列を含む、形質転換又はトランスフェクトされた組換え宿主細胞。

【請求項３５】

請求項３４に記載の宿主細胞を培養する工程及び抗原結合タンパク質を単離する工程を含む、請求項１～２７に記載の抗原結合タンパク質の生産方法。

【請求項３６】

請求項１～２７のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質及び製薬上許容可能な担体を含む医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、ＨＧＦアンタゴニストとＶＥＧＦアンタゴニストとの組み合わせに関し、かつ、１つ以上のエピトープ結合ドメインに連結したタンパク質スキャフォールドを含むＨＧＦに結合する抗原結合タンパク質、それら構築物の製造方法及びその使用を提供する。

【背景技術】

【０００２】

抗体を治療用途に用いることは周知である。

【０００３】

抗体は、少なくとも２つの重鎖と２つの軽鎖を含むヘテロ多量体糖タンパク質である。ＩｇＭを除いて、通常、インタクト抗体は約１５０Ｋｄａのヘテロテトラマー糖タンパク

質であり、２つの同じ軽鎖（Ｌ）と２つの同じ重鎖（Ｈ）により構成される。通常、各軽鎖は１つの共有結合性ジスルフィド結合により重鎖に結合するが、別々の免疫グロブリンアイソタイプの重鎖間のジスルフィド結合の数は変化する。それぞれ重鎖と軽鎖は鎖内ジスルフィド架橋も有する。各重鎖には、一端に可変ドメイン（ＶＨ）があり、続いて多くの定常領域がある。各軽鎖は、可変ドメイン（ＶＬ）と、他端に定常領域を有する；軽鎖の定常領域は重鎖の最初の定常領域と並び、また、軽鎖の可変ドメインは重鎖の可変ドメインと並んでいる。ほとんどの脊椎動物種由来の抗体の軽鎖は、定常領域のアミノ酸配列に基づいたカッパおよびラムダと呼ばれる２つのタイプの１つに割り付けられる。ヒト抗体は、重鎖の定常領域のアミノ酸配列によって、５つの異なるクラス、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧおよびＩｇＭに割り付けられる。ＩｇＧとＩｇＡは、さらにサブクラス、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、およびＩｇＧ４、ならびにＩｇＡ１およびＩｇＡ２に細分化することができる。種変異体はマウスとラットで認められ、少なくともＩｇＧ２ａ、ＩｇＧ２ｂがある。抗体の可変ドメインは、相補性決定領域（ＣＤＲ）と呼ばれる特別の変異性を示す特定の領域により、該抗体に結合特異性を付与する。可変領域の中で、より保存される領域はフレームワーク領域（ＦＲ）と呼ばれる。インタクト重鎖と軽鎖の可変ドメインはそれぞれ３つのＣＤＲによって連結されている４つのＦＲを含む。各鎖の中のＣＤＲはＦＲ領域により他方の鎖のＣＤＲとごく接近して置かれ、抗体の抗原結合性部位の形成に寄与する。定常領域は、抗体の抗原への結合に直接関係しないが、抗体依存性細胞媒介性細胞毒性（ＡＤＣＣ）への関与やＦｃγ受容体への結合による食作用、新生児のＦｃ受容体（ＦｃＲｎ）による半減期／クリアランス速度、および補体カスケードのＣ１ｑコンポーネントによる補体依存性細胞毒性、等種々のエフェクター機能を示す。

【０００４】

ＩｇＧ抗体の構造の性質とは、２つの抗原結合性部位があり、その両方が同じエピトープに特異的である、というものである。従って、それらは一重特異性である。

【０００５】

二重特異性抗体は、少なくとも２つの異なるエピトープに対して結合特異性がある抗体である。そのような抗体を作る方法は、当業者には既知である。本来、二重特異性抗体の組み換え産生は、２つのＨ鎖が異なる結合特異性を有する場合の２つの免疫グロブリンＨ鎖Ｌ鎖ペアの同時発現に基づいている。Millstein et al, Nature 305 537-539 (1983), WO93/08829 and Traunecker et al EMBO, 10, 1991, 3655-3659参照。ＨとＬ鎖の任意組み合わせが可能なために、組み合わせ可能な１０種の異なる抗体構造の混合物が産生され、その内の１つだけが所望の結合特異性を有する。別のアプローチでは、少なくともヒンジ部、ＣＨ２およびＣＨ３領域の一部を含む重鎖定常領域に対し所望の結合特異性を備えた可変ドメインを融合させることが含まれる。少なくとも１つの融合体中にある軽鎖結合に必要な部位を含んでいるＣＨ１領域を有することが好ましい。これらの融合体をコードするＤＮＡ、また、所望ならＬ鎖を、別々の発現ベクトルに挿入し、適切な宿主生物へ同時導入する。２つあるいは３つすべての鎖のコード配列を１つの発現ベクトルに挿入するが、それは可能である。１つのアプローチでは、二重特異性抗体は１つのアーム中の一つ目の結合特異性を有するＨ鎖、および、別のアーム中の二つ目の結合特異性を提供するＨ－Ｌ鎖ペアから構成される。WO94/04690参照。また、Suresh et al Methods in Enzymology 121, 210, 1986も参照のこと。別のアプローでチは、単一のドメイン結合部位を含む抗体分子を含んでいる（WO2007/095338に記述）。

【０００６】

ＨＧＦ（肝細胞増殖因子または分散因子，ＳＦ）は、その受容体ＭＥＴ（間葉上皮転換因子、ｃ－ＭＥＴまたは肝細胞増殖因子受容体しても知られている）と共に、細胞内で、前移動性，抗アポトーシス性および前分裂促進的シグナルの独特の組み合わせを伝達することができる多面的サイトカインである。ほとんどの組織原産で、ＨＧＦは間葉系源の細胞により発現され、細胞外マトリクス中に局在化し、そこでは、プロテアーゼにより切断されるまで不活性（前ＨＧＦ）形態のままである。正常な生理的条件下では、これは、組織損傷に応答して、または胚発生中に起こる。ＭＥＴは上皮由来の細胞により発現され、

それらの組織の局在性と一致し、ＨＧＦ／ＭＥＴシグナル伝達の効果は、成体における組織修復および胚における器官形成に対し必要不可欠である上皮間葉相互作用，細胞動員，遊走および迅速な細胞分裂において重要である。ＨＧＦ／ＭＥＴシグナリングの活性化は、増殖，分散／遊走，細胞極性の誘発および血管新生を含む幅広い細胞プロセスを調整し、この場合、効果は細胞の型および環境に依存する。成体動物では、この経路はかなり無活動であるが、肝再生，腎臓損傷の修復，皮膚治癒および腸損傷などのプロセスに不可欠であり、この場合、傷の端での細胞内のＨＧＦ／ＭＥＴシグナリングにより媒介される浸潤性増殖の協調的プロセスは組織完全性の回復に必須である。制御されたＨＧＦ／ＭＥＴは、胚発生および組織形態形成を組織化する協調的な遺伝子プログラムと共に、正常な生理機能の本質的な特徴であり、一方、癌細胞における制御されていないＨＧＦ／ＭＥＴ発現は、腫瘍の新生物播種の重要な特徴である。この制御されていない発現は、変異，ゲノム増幅，転写上方制御およびパラクリンまたはオートクリン活性化を活性化した結果生じ得る。実際、ＨＧＦ／ＭＥＴ依存浸潤性増殖シグナルは、隣接する組織に移動し浸潤し、原発腫瘍から離れた部位で転移巣を確立する細胞が得られる可能性のある高侵襲性腫瘍の一般的な特徴であることが示されている。ＨＧＦは強力な血管新生因子であり、ＭＥＴは内皮細胞により発現されることが知られているという事実に加えて、ＨＧＦ／ＭＥＴの治療標的は、癌発症，腫瘍進行および転移を阻害するかなりの可能性を有する。

【０００７】

血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）ファミリーの増殖因子およびそれらの受容体は血管新生および血管透過性の必要不可欠な制御因子である。ＶＥＧＦファミリーはＶＥＧＦ－Ａ，ＰＩＧＦ（胎盤増殖因子），ＶＥＧＦ－Ｂ，ＶＥＧＦ－Ｃ，ＶＥＧＦ－Ｅおよびヘビ毒ＶＥＧＦを含み、それぞれが、血管パターン形成および血管発生において明確な役割を有すると考えられる。単一の８－エクソン遺伝子から転写されたｍＲＮＡの別のスプライシングのために、ＶＥＧＦ－Ａは、シグナルペプチド切断後に残ったアミノ酸の数により識別される少なくとも９つのサブタイプ（アイソフォーム）を有する。例えば、ヒトでは、最も顕著なアイソフォームは$VEGF_{165}$であり、これは、可溶型と細胞結合型の間の平衡状態で存在する。より長いアイソフォーム（$VEGF_{183}$，$VEGF_{189}$および$VEGF_{206}$）は、極めて正に帯電したＣ末端領域を有し、細胞表面グリカンおよびそれらのバイオアベイラビリティを調節するヘパリンとの結合を媒介する。ＶＥＧＦ－Ａアイソフォームはすべて、受容体結合ＶＥＧＦ断片を構築する約１１０のＮ末端残基のコアを介して生じる会合によりホモ二量体を形成する。正常な状況下では、および、固形腫瘍の中心では、ＶＥＧＦの発現は低酸素条件により主に媒介され、血管供給の不足を表す。低酸素は、低酸素誘導因子ＨＩＦ－１αの、構成的に発現されたＨＩＦ－１αとの二量体化を引き起こし、ＶＥＧＦ遺伝子のプロモータ領域中の低酸素応答要素に結合する転写因子を形成する。正常酸素状態下では、ＨＩＦ－１αタンパク質は、複数のプロリンヒドロキシル化イベントの結果として、ユビキチン依存性分解を受ける。他の腫瘍結合型ＶＥＧＦ上方制御は、癌遺伝子経路（すなわちｒａｓ）を介する、炎症性サイトカインおよび増殖因子を介する活性化によって、ならびに機械力によって生じる。

【０００８】

活性ＶＥＧＦホモ二量体は、細胞表面でＶＥＧＦＲファミリーの受容体により結合される。ＶＥＧＦ－Ａでは、主な血管内皮結合受容体はＶＥＧＦＲ１（Ｆｌｔ１）およびＶＥＧＦＲ２（Ｆｌｋ－２；ＫＤＲ）である。どちらの受容体も、チロシンキナーゼファミリーのメンバーであり、活性化のためにはリガンド媒介二量体化を必要とする。二量体化すると、キナーゼドメインは、自己リン酸化を受けるが、ＶＥＧＦＲ２におけるキナーゼ活性の程度はＶＥＧＦＲ１よりも大きい。ＶＥＧＦの血管新生シグナリングは、主にＶＥＧＦＲ２を介して媒介されるが、ＶＥＧＦの親和性は、ＶＥＧＦＲ１に対して約３倍大きい（ＫＤは、ＶＥＧＦＲ２では１００ｐＭであることに比べ約３０ｐＭ）ことが証明されている。これにより、ＶＥＧＦＲ１は、ＶＥＧＦを捕捉するデコイ受容体として主に作用し、ＶＥＧＦＲ２活性化の程度を調節するということが提案されている。ＶＥＧＦＲ１発現はいくつかの腫瘍と関連するが、その主な役割は、胚発生および器官形成中にあると考え

られる。ＶＥＧＦ－Ａ$_{165}$もまた、ニューロピリン受容体ＮＲＰ１およびＮＲＰ２により結合される。これらの受容体はＴＫドメインが欠如しているが、ＶＥＧＦＲ２に対する共受容体として作用しＶＥＧＦをＶＥＧＦＲ２にトランスファさせることによりシグナリングを増強する。

【０００９】

多くの研究が、ＶＥＧＦ－Ａを腫瘍血管新生における主要な因子として確認することを支援している。例えば、ＶＥＧＦ－Ａはほとんどの腫瘍および腫瘍関連間質において発現される。増殖を支援するための良く発達し、拡大した血管系が存在しないと、腫瘍細胞は壊死性およびアポトーシス性となり、よって、連続細胞増殖の結果となり得る腫瘍容積（約１ｍｍ３）の増加を制限する。ＶＥＧＦ－Ａの発現は壊死領域に隣接する低酸素腫瘍細胞で最も高く、増殖腫瘍における低酸素によるＶＥＧＦ－Ａの誘導が血管新生のアクチベーターとインヒビターの均衡を変化させることができ、腫瘍において新規血管の増殖を引き起こすことを示す。この仮説と一致して、ＶＥＧＦ－Ａを阻害もしくは捕捉し、またはそのシグナリング受容体，ＶＥＧＦＲ－２をブロックする多くのアプローチ、例えば、低分子量チロシンキナーゼ阻害剤，モノクローナル抗体，アンチセンスオリゴヌクレオチドなどが治療薬として開発されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【００１０】

【特許文献１】WO93/08829

【特許文献２】WO94/04690

【特許文献３】WO2007/095338

【非特許文献】

【００１１】

【非特許文献１】Millstein et al, Nature 305 537-539 (1983)

【非特許文献２】Traunecker et al EMBO, 10, 1991, 3655-3659

【非特許文献３】Suresh et al Methods in Enzymology 121, 210, 1986

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【００１２】

本発明は治療に使用されるＨＧＦアンタゴニストとＶＥＧＦアンタゴニストの組み合わせに関する。

【００１３】

本発明は、特に、１つまたは複数のエピトープ結合ドメインにリンクされたタンパク質スキャフォールドを含む抗原結合タンパク質に関し、この抗原結合タンパク質は少なくとも２つの抗原結合性部位を有し、その内の少なくとも１つがエピトープ結合ドメイン由来で、またその内の少なくとも１つがペアード（対になった）ＶＨ／ＶＬドメイン由来であり、また、抗原結合性部位の少なくとも１つがＨＧＦに結合する。

【００１４】

本発明は、特に、１つまたは複数のエピトープ結合ドメインにリンクされたタンパク質スキャフォールドを含む抗原結合タンパク質に関し、この抗原結合タンパク質は少なくとも２つの抗原結合性部位を有し、その内の少なくとも１つがエピトープ結合ドメイン由来で、またその内の少なくとも１つがペアード（対になった）ＶＨ／ＶＬドメイン由来であり、ならびに、抗原結合性部位の少なくとも１つがＨＧＦに結合し、抗原結合性部位の少なくとも１つがＶＥＧＦに結合する。

【００１５】

また、本発明は、本明細書記載のうちのいずれかの抗原結合タンパク質の重鎖をコードしたポリヌクレオチド配列、および本明細書記載のうちのいずれかの抗原結合タンパク質の軽鎖をコードしたポリヌクレオチドを提供する。このポリヌクレオチドは、等価のポリペプチド配列に相当するコード配列を示すが、このポリヌクレオチド配列を、開始コドン

、適切なシグナル配列および停止コドンと共に発現ベクターに挿入することができることは理解されるであろう。本発明はさらに組み換え型の形質転換または形質移入した宿主細胞を提供し、この宿主細胞は本明細書記載のいずれかの抗原結合タンパク質の重鎖、および軽鎖をコードした１つまたは複数のポリヌクレオチドを含む。

【００１６】

さらに、本発明は本明細書記載のいずれかの抗原結合タンパク質の産生方法を提供し、この方法は、第１および第２のベクターを含む宿主細胞を適切な培地、例えば無血清培地中で培養するステップを含み、前記第１のベクターが本明細書記載のいずれかの抗原結合タンパク質の重鎖をコードしたポリヌクレオチドと、前記第２のベクターが本明細書記載のいずれかの抗原結合タンパク質の軽鎖をコードしたポリヌクレオチドを含む。

【００１７】

本発明はさらに本明細書記載の抗原結合タンパク質および製薬上許容可能なキャリアを含む医薬品組成物を提供する。

【図面の簡単な説明】

【００１８】

【図１】ＥＬＩＳＡにより決定された、精製ヒトモノクローナル抗ＨＧＦ抗体（ＢＰＣ２０１３～２０１５）および抗ＨＧＦ－ＶＥＧＦ二重特異性抗体（ＢＰＣ２０２１～ＢＰＣ２０２６）の、ヒト組換えＨＧＦへの結合を示す図である。

【図２】ＥＬＩＳＡにより決定された、精製抗ＨＧＦ－ＶＥＧＦ二重特異性抗体（ＢＰＣ２０２１～２０２６）のＶＥＧＦへの結合を示す図である。

【図３ａ】Ｂｘ－ＰＣ３細胞におけるＨＧＦ－媒介ＭＥＴリン酸化（ｐＭＥＴ）に対する様々なＨＧＦ／ＶＥＧＦ二重標的分子（ｍＡｂ－ｄＡｂ）の効果を示す図である。

【図３ｂ】Ｂｘ－ＰＣ３細胞におけるＨＧＦ－媒介ＭＥＴリン酸化（ｐＭＥＴ）に対する様々なＨＧＦ／ＶＥＧＦ二重標的分子（ｍＡｂ－ｄＡｂ）の効果を示す図である。

【図４ａ】Ｍｖ１Ｌｕ増殖アッセイの結果を示す図である。ｍＡｂと比較したｍＡｂｄＡｂ構築物による処理（図４ａ）および不適切ｍＡｂｄａｂと比較したｍＡｂｄＡｂによる処理（図４ｂ）。

【図４ｂ】Ｍｖ１Ｌｕ増殖アッセイの結果を示す図である。ｍＡｂと比較したｍＡｂｄＡｂ構築物による処理（図４ａ）および不適切ｍＡｂｄａｂと比較したｍＡｂｄＡｂによる処理（図４ｂ）。

【図５】ＢｘＰＣ３浸潤アッセイにおけるウェルの画像の定量的分析を示す図である。

【図６ａ】血管新生アッセイの結果－フィールド面積（図６ａ）および平均細管長（図６ｂ）の結果を示す図である。

【図６ｂ】血管新生アッセイの結果－フィールド面積（図６ａ）および平均細管長（図６ｂ）の結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【００１９】

定義

本明細書で使われる用語「タンパク質スキャフォールド」は、これに制限されるものではないが、免疫グロブリン（Ｉｇ）スキャフォールド，例えば、ＩｇＧスキャフォールドを含み、これは４鎖または２鎖抗体であってもよく、または抗体のＦｃ領域のみを含んでもよく、あるいは１つまたは複数の抗体由来の定常領域を含んでもよい。また、この定常領域は、ヒトまたは霊長類起源であっても、ヒトまたは霊長類定常領域の人工キメラであってもよい。このようなタンパク質スキャフォールドは、１つまたは複数の定常領域の他に抗原結合性部位を含んでもよい。例えば、タンパク質スキャフォールドがＩｇＧ全体を含む場合もある。このようなタンパク質スキャフォールドは、他のタンパク質ドメイン、例えばエピトープ結合ドメインまたはＳｃＦｖドメイン、等の抗原結合性部位を有するタンパク質ドメインに結合可能である。

【００２０】

「ドメイン」は、他のタンパク質とは独立した三次構造を有する折り畳まれたタンパク

質構造である。通常、ドメインは領域タンパク質の多様な機能特性の原因であり、多くの場合、残りのタンパク質および／またはドメインの機能を失うことなく、付加、除去または他のタンパク質に移動可能である。「抗体単一可変領域」は、抗体可変ドメインの配列特性を含む、折り畳まれたポリペプチド領域である。従って、これは完全抗体可変ドメイン、および、例えば、１つまたは複数のループが抗体可変ドメインの特性を有しない配列、または切断されたまたはＮやＣ末端延長部を含む抗体可変ドメイン、並びに少なくとも全長領域の結合活性と特異性を保持している可変ドメインの折り畳まれた断片、により置換された場合、等の修飾可変ドメインを含む。

【００２１】

語句「免疫グロブリン単一可変ドメイン」は、別の可変領域またはドメインに独立に抗原またはエピトープに特異的に結合する抗体可変ドメイン（V_H，V_{HH}，V_L）を指す。免疫グロブリン単一可変ドメインは、他の、別の可変領域または可変ドメインと共にある種のフォーマット（例えば、ホモまたはヘテロ多量体）で存在できる。この場合、他の領域またはドメインは、単一免疫グロブリン可変ドメインによる抗原結合に必要ではない（すなわち、免疫グロブリン単一可変ドメインは新たな可変ドメインとは独立に抗原に結合する）。本明細書で使われる場合、「ドメイン抗体」または「ｄＡｂ」は、抗原に結合が可能な「免疫グロブリン単一可変ドメイン」と同じである。免疫グロブリン単一可変ドメインは、ヒト抗体可変ドメインであってもよいが、他の種、例えばげっ歯類（例はWO00/29004で開示），テンジクザメおよびラクダV_{HH}ｄＡｂ、等由来の単一抗体可変ドメインを含んでもよい。ラクダV_{HH}はラクダ，ラマ，アルパカ，ヒトコブラクダ，およびグアナコ等の種由来の免疫グロブリン単一可変ドメインポリペプチドであり、これは元々軽鎖の欠けた重鎖抗体を産生する。このV_{HH}領域は、当業者に利用可能な標準的な方法によりヒト化されてもよく、このような領域も本発明による「ドメイン抗体」と考えられる。本明細書で使われる「V_H」はラクダV_{HH}ドメインを含む。ＮＡＲＶは、テンジクザメを含む軟骨魚類で特定された別のタイプの免疫グロブリン単一可変ドメインである。また、これらの領域は、新規抗原受容体可変領域（通常、Ｖ（ＮＡＲ）またはＮＡＲＶと省略）としても知られる。詳細は、Mol. Immunol. 44, 656-665 (2006)および US20050043519A参照。

【００２２】

用語「エピトープ結合ドメイン」は、別の可変領域またはドメインとは独立に、抗原またはエピトープに特異的に結合するドメインを指す。これは、免疫グロブリン単一可変ドメイン、例えばヒト、ラクダまたはサメの免疫グロブリン単一可変ドメインであってもよく、または下記を含む群から選択された非免疫グロブリンスキャフォールドの誘導体であってもよい。ＣＴＬＡ－４（Ｅｖｉｂｏｄｙ）；リポカリン；プロテインＡ由来分子、例えばプロテインＡのＺ－領域（アフィボディ，ＳｐＡ），Ａ－領域（アビマー／マキシボディ（Ｍａｘｉｂｏｄｙ））；熱ショックタンパク質、例えばＧｒｏＥＬとＧｒｏＥＳ；トランスフェリン（トランスボディ（Ｔｒａｎｓ－ｂｏｄｙ））；アンキリンリピートタンパク質（ＤＡＲＰｉｎ）；ペプチドアプタマー；Ｃ－タイプレクチン領域（テトラネクチン）；ヒトγクリスタリンおよびヒトユビキチン（ａｆｆｉｌｉｎ）；ＰＤＺドメイン；ヒトプロテアーゼ阻害剤のスコーピオントキシンクニッツタイプドメイン；およびフィブロネクチン（アドネクチン（アドネクチン））；このドメインは、その天然のリガンド以外のリガンドに結合させるためにタンパク質工学による操作が行われたものである。

【００２３】

ＣＴＬＡ－４（細胞毒性Ｔリンパ球関連抗原４）は主にＣＤ４＋Ｔ細胞上に発現するＣＤ２８ファミリー受容体である。その細胞外ドメインは可変ドメイン様Ｉｇフォールドを有する。抗体のＣＤＲに対応するループは、異種の配列と置換して異なる結合特性を出すことができる。異なる結合特異性有するように操作されたＣＴＬＡ－４分子は、Ｅｖｉｂｏｄｙとして知られている。詳細は、Journal of Immunological Methods 248 (1-2), 31-45 (2001)を参照のこと。

【００２４】

リポカリンは細胞外タンパク質ファミリー で、ステロイド，ビリン，レチノイドおよび脂質、等の小さな疎水性の分子を輸送する。これらは、円錐形構造の開口端に多くのループがある強固なβ－シート二次構造を有し、これは別の標的抗原に結合するように操作できる。Ａｎｔｉｃａｌｉｎはサイズが１６０－１８０アミノ酸で、リポカリン由来である。詳細は、Biochim Biophys Acta 1482: 337-350 (2000), US7250297B1 およびUS20070224633を参照のこと。

【００２５】

アフィボディは、黄色ブドウ球菌のプロテインＡ由来のスキャフォールドで、抗原結合するように操作できる。このドメインは約５８アミノ酸のらせん状束からなる。ライブラリは表面残基の無作為化により生成されている。詳細は、Protein Eng.Des.Sel.17, 455-462 (2004) および EP1641818A1を参照のこと。

【００２６】

アビマーは、Ａ－ドメインスキャフォールドファミリー由来の多ドメインタンパク質である。約３５アミノ酸の未変性ドメインは、明確なジスルフィド結合構造をとっている。多様性は、Ａ－ドメインファミリー中の天然変異の混ぜ合わせにより生成されている。詳細は、Nature Biotechnology 23(12), 1556 - 1561 (2005) and Expert Opinion on Investigational Drugs 16(6), 909-917 (June 2007)を参照のこと。

【００２７】

トランスフェリンは、単量体血清輸送糖タンパク質である。トランスフェリンは許容表面ループに挿入する操作により別の標的抗原に結合させることができる。操作したトランスフェリンスキャフォールドの例には、トランスボディがある。詳細は、J. Biol.Chem 274, 24066-24073 (1999)参照。

【００２８】

設計アンキリンリピートタンパク質（ＤＡＲＰｉｎ）は、膜内在性タンパク質の細胞骨格への連結を媒介するタンパク質ファミリーであるアンキリン由来である。アンキリンの一回の繰り返しは３３残基のチーフで、２つのα－ヘリックスとβ－ターンを含む。これらは、各繰り返し中の一つ目のα－ヘリックスとβ－ターンの残基を無秩序化することにより標的抗原に結合するよう操作できる。これらの結合面を、分子の数を増やすことにより増加させることができる（親和性成熟の方法）。詳細は、J. Mol. Biol. 332, 489-503 (2003), PNAS 100(4), 1700-1705 (2003)とJ. Mol. Biol. 369, 1015-1028 (2007) および US20040132028A1参照。

【００２９】

フィブロネクチンは、抗原に結合させるように操作できるスキャフォールドである。アドネクチンは、ヒトＩＩＩ型フィブロネクチン（ＦＮ３）における１５繰り返し単位の内の１０番目のドメインの天然アミノ酸配列骨格からなる。β－サンドイッチの一端の３つのループは操作によりアドネクチンに特異的に目的治療標的を認識させることができる。詳細は、Protein Eng. Des. Sel. 18, 435-444 (2005), US20080139791, WO2005056764 および US6818418B1参照。

【００３０】

ペプチドアプタマーはコンビナトリアル認識分子で、定常性スキャフォールドタンパク質で構成され、このタンパク質の典型的例には、活性部位に挿入された制限付き可変ペプチドループを含むチオレドキシン（ＴｒｘＡ）がある。詳細は、Expert Opin.Biol. Ther. 5, 783-797 (2005)参照。

【００３１】

ミクロボディは、長さ２５－５０アミノ酸の天然のマイクロタンパク質由来で、３－４システインブリッジを含む。マイクロタンパク質の例には、ＫａｌａｔａＢ１、コノトキシンおよびノッティン（ｋｎｏｔｔｉｎ）がある。マイクロタンパク質は、ループを有し、これをマイクロタンパク質全体の折り畳みに影響を与えないで２５アミノ酸まで含有するように操作できる。操作されたノッティンドメインの詳細については、WO2008098796参照。

【００３２】
他のエピトープ結合ドメインには、別の標的抗原の結合特性を操作するためのスキャフォールドとして使われてきたタンパク質、例えばヒトγ－クリスタリンおよびヒトユビキチン（ａｆｆｉｌｉｎ），ヒトプロテアーゼ阻害剤のｋｕｎｉｔｚタイプドメイン，Ｒａｓ－結合タンパク質ＡＦ－６のＰＤＺドメイン、サソリ毒（カリブドトキシン），Ｃ－タイプレクチンドメイン（テトラネクチン）がある（これらは、Handbook of Therapeutic 抗体 (2007, edited by Stefan Dubel) の７章Non-抗体 ScaffoldsおよびProtein Science 15:14-27 (2006)でレビューされている）。本発明のエピトープ結合ドメインは、これらの代替タンパク質ドメイン由来であってもよい。
【００３３】
本明細書で使われる用語「ペアード（対になった）$Ｖ_{H}$ドメイン」，「ペアード$Ｖ_{L}$ドメイン」，および「ペアード$Ｖ_{H}$／$Ｖ_{L}$ドメイン」は、それらのパートナー可変ドメインペアとペアの場合のみ抗原に特異的に結合する抗体可変ドメインを指す。いずれの対形成でも常に１つの$Ｖ_{H}$と１つの$Ｖ_{L}$があり、用語「ペアード$Ｖ_{H}$ドメイン」は$Ｖ_{H}$パートナーを指し、用語「ペアード$Ｖ_{L}$ドメイン」は$Ｖ_{L}$パートナーを指し、用語「ペアード$Ｖ_{H}$／$Ｖ_{L}$ドメイン」は一緒の２つのドメインを指す。
【００３４】
本明細書で使われる用語「抗原結合タンパク質」は、抗体、抗体断片、例えばドメイン抗体（ｄＡｂ），ＳｃＦｖ，ＦＡｂ，$ＦＡｂ_{2}$，およびＨＧＦおよび／またはＶＥＧＦに結合可能な他のタンパク質構築物を指す。抗原結合分子は少なくとも１つのＩｇ可変ドメイン、例えば抗体，ドメイン抗体，Ｆａｂ，Ｆａｂ’，Ｆ（ａｂ’）２，Ｆｖ，ＳｃＦｖ，二特異性抗体，ｍＡｂｄＡｂｓ，アフィボディ，ヘテロコンジュゲート抗体または二重特異性抗体を含み得る。一実施形態では、抗原結合分子は抗体である。別の実施形態では、抗原結合分子はｄＡｂ、すなわち免疫グロブリン単一可変ドメイン、例えば、異なるＶ領域またはドメインとは独立して、特異的に抗原またはエピトープに結合する$Ｖ_{H}$，$Ｖ_{H}$または$Ｖ_{L}$である。抗原結合分子は２つの標的に結合可能であってもよく、すなわち、二重標的タンパク質であってもよい。抗原結合分子は、抗体および抗原結合断片の組み合わせ、例えば、１つまたは複数のドメイン抗体および／またはモノクローナル抗体に連結された１つまたは複数のＳｃＦｖｓであってもよい。抗原結合分子はまた非免疫グロブリンドメイン、例えば下記を含む群から選択されたスキャフォールドの誘導体であるドメインを含み得る。ＣＴＬＡ－４（Ｅｖｉｂｏｄｙ）；リポカリン；プロテインＡ由来分子、例えばプロテインＡのＺ－領域（アフィボディ，ＳｐＡ），Ａ－ドメイン（アビマー／マキシボディ（Ｍａｘｉｂｏｄｙ））；熱ショックタンパク質、例えばＧｒｏＥＬとＧｒｏＥＳ；トランスフェリン（トランスボディ（Ｔｒａｎｓ－ｂｏｄｙ））；アンキリンリピートタンパク質（ＤＡＲＰｉｎ）；ペプチドアプタマー；Ｃ－タイプレクチンドメイン（テトラネクチン）；ヒトγクリスタリンおよびヒトユビキチン（ａｆｆｉｌｉｎ）；ＰＤＺドメイン；ヒトプロテアーゼ阻害剤のスコーピオントキシンクニッツタイプドメイン；およびフィブロネクチン（アドネクチン（アドネクチン））；このドメインは、ＨＧＦまたはＶＥＧＦに結合させるためにタンパク質工学による操作が行われたものである。本明細書では、「抗原結合タンパク質」はヒトＨＧＦおよび／またはＶＥＧＦに拮抗しおよび／または中和することができる。さらに、抗原結合タンパク質は、ＨＧＦおよび／またはＶＥＧＦに結合し、天然リガンドが受容体に結合および／または活性化しないようにすることにより、ＨＧＦおよび／またはＶＥＧＦ活性をブロックしてもよい。
【００３５】
本明細書では、「ＶＥＧＦアンタゴニスト」は、ＶＥＧＦの少なくとも１つの活性を減少または排除することができる任意の化合物を含む。一例として、ＶＥＧＦアンタゴニストは、ＶＥＧＦに結合することができ、その結合は、ＶＥＧＦ活性を直接減少または排除することができ、または少なくとも１つのリガンドが受容体に結合するのをブロックすることにより間接的に作用することができる。
【００３６】

本明細書では、「ＨＧＦアンタゴニスト」は、ＨＧＦの少なくとも１つの活性を減少または排除することができる任意の化合物を含む。一例として、ＨＧＦアンタゴニストは、ＨＧＦに結合することができ、その結合は、ＨＧＦ活性を直接減少または排除することができ、または少なくとも１つのリガンドが受容体に結合するのをブロックすることにより間接的に作用することができる。

【００３７】

本発明の一実施形態では、抗原結合性部位は、Ｂｉａｃｏｒｅ（登録商標）で測定した場合に、少なくともＫｄ値１ｍＭで抗原に結合し、例えばＫｄ値１０ｎＭ，１ｎＭ，５００ｐＭ，２００ｐＭ，１００ｐＭ，で各抗原に結合する。

【００３８】

本明細書で使われる用語「抗原結合性部位」は、抗原に特異的に結合可能な構築物上の部位を指し、単一ドメイン，例えばエピトープ結合ドメインであっても、標準的抗体上に認められるペアードV_H／V_Lドメインであってもよい。本発明の一部の態様では、単一鎖

用語「ｍＡｂ／ｄＡｂ」および「ｄＡｂ／ｍＡｂ」は、本明細書では本発明の抗原結合タンパク質を指す。この２つの用語は、本明細書では相互に置き換え可能な使い方が可能で、同じ意味が意図されている。

【００３９】

用語「定常重鎖１」は本明細書では、免疫グロブリン重鎖のＣＨ１ドメインを指す。

【００４０】

用語「定常軽鎖」は本明細書では、免疫グロブリン軽鎖の定常ドメインを指す。

【００４１】

本発明はＨＧＦアンタゴニストとＶＥＧＦアンタゴニストを含む組成物を提供する。また、本発明は治療に使用するためのＨＧＦアンタゴニストとＶＥＧＦアンタゴニストの組み合わせを提供する。本発明はまたＨＧＦアンタゴニストをＶＥＧＦアンタゴニストと併用して投与することにより疾患を治療する方法を提供する。ＨＧＦアンタゴニストとＶＥＧＦアンタゴニストを別々に投与しても、順次投与しても、同時に投与してもよい。

【００４２】

血管新生の阻害は、増殖する腫瘍への血液の供給を欠乏させる（よって、酸素および栄養分を制限する）目的で確立された治療アプローチである。複数の血管新生阻害剤が、前臨床癌モデルおよびいくつかの臨床試験で治療上確認されている。アバスチン（Ｂｅｖａｃｉｚｕｍａｂ），ＶＥＧＦを標的とするモノクローナル抗体は、化学療法と併用して、転移性結腸直腸癌（ＣＲＣ）および非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）の治療のための一次治療として認可されており、多くの小分子化合物が前臨床および臨床開発中である。ある癌、例えば乳癌および結腸癌では、これらのような薬剤が、化学療法と併用して投与されると、疾患の進行を遅らせ、患者の生存期間を数ヶ月増加させるが、単独で投与した場合はそうではない。実際、いくつかの臨床試験では、Ｂｅｖａｃｉｚｕｍａｂのみの治療は、化学療法（ＣＴ）プラス治療に比べ成績が劣るために早期に打ち切られた。当初、この所見は矛盾していると考えられた。というのも、腫瘍血液供給の減少が、ＣＴを腫瘍に送達させることができる程度を制限することが示されていたからである。この所見を正当化する試みは、Ｂｅｖａｃｉｚｕｍａｂの効果は腫瘍の特徴的に障害された血管系を「正常化」するという提案に基づく。血管正常化の仮定効果は、間質液圧（ＩＦＰ）の減少であり、血流の増加およびＣＴ薬の腫瘍のコアへの浸透が得られる。ＣＴとの併用におけるＢｅｖａｃｉｚｕｍａｂの効果に対する別の理論は、ＶＥＧＦの遮断は、栄養分および酸素供給を減少させ、アポトーシス促進性イベントを誘発し、これはＣＴにより誘導されたものを増強することを示唆する。

【００４３】

インビボモデルでの最近の研究は、診療所で、ＶＥＧＦ経路の阻害を標的とする単独療法において使用される場合の、抗血管新生阻害剤の長期有効性の欠如をより明らかにし始めている。いくつかの報告が、そのようなアプローチの抗腫瘍効果を証明しているが、ま

た、同時の腫瘍順応およびより悪性度の高い段階への進行も示し、侵襲性が高くなり、場合によっては、リンパおよび遠隔転移が増加する。そのため、癌細胞の酸素を欠乏させた（低酸素）結果は、原発腫瘍増殖に対する有益な効果に加えて、それを求めて他の場所へ腫瘍細胞を駆動すると考えられる。言い換えれば、新血管新生を効果的に阻害することにより、抗腫瘍効果および生存利益を生成させる抗血管新生療法は、さらに、浸潤および転移を増加させることにより腫瘍の表現型を変えることができる。他の報告は、低酸素は、癌細胞にＭＥＴを産生させ、ＨＧＦ／ＭＥＴ媒介経路を介するシグナリングを増加させ、これにより、それらの細胞が高い運動性を有するようになり、遠隔部位まで移動するようになる（転移拡散）ことを示している。さらに、ＶＥＧＦ阻害剤単独の延長使用は、別の新血管新生経路の使用を促進する可能性があり、生存率の増加に伴い薬物耐性の可能性が広がる。

【００４４】

よって、二重特異性分子は、単一の薬剤中で、ＨＧＦ抗体の活性（腫瘍増殖、血管新生および転移の抑制）と、ＶＥＧＦ遮断の抗血管新生効果を組み合わせ、各成分を別個に使用した場合に比べいくつかの利点を有する。相乗効果の可能性があり、というのも、ＨＧＦおよびＶＥＧＦの同時中和は、細胞の低酸素への転移性応答を抑制することができ、一方、改善された血管新生制御を送達させる。さらに、これらの２つの活性を組み合わせると、患者の生存率が増加するように、単一薬剤抗血管新生治療に対する薬物耐性の可能性を制限することができる。

【００４５】

このようなアンタゴニストは、抗体であっても、エピトープ結合ドメイン、例えば免疫グロブリン単一可変ドメインであってもよい。アンタゴニストは、別々の分子の組み合わせとして、同時に投与、すなわち同時投与（ｃｏ－ａｄｍｉｎｉｓｔｅｒｅｄ）、あるいは互いを例えば２０時間以内、または１５時間以内、または１２時間以内、または１０時間以内、または８時間以内、または６時間以内、または４時間以内、または２時間以内、または１時間以内、または３０分以内、の投与のように２４時間以内に投与してもよい。

【００４６】

本発明において使用される他のＨＧＦアンタゴニストは、抗ｃ－ＭＥＴ抗体，例えばWO 2009007427に記載される抗体を含む。

【００４７】

さらなる実施形態では、アンタゴニストは２つ以上の抗原に結合できる１つの分子として存在する。例えば、本発明はＨＧＦとＶＥＧＦに結合可能な、またはＨＧＦおよびＶＥＧＦＲ２に結合可能な、またはｃ－ＭＥＴおよびＶＥＧＦに結合可能な二重標的分子を提供する。

【００４８】

本発明はタンパク質スキャフォールドを含む抗原結合タンパク質を提供する。このスキャフォールドは１つまたは複数のエピトープ結合ドメインに結合し、当該抗原結合タンパク質は少なくとも２つの抗原結合性部位を有し、少なくともその内の１つがエピトープ結合ドメイン由来であり、また少なくともその内の１つがペアードV_H／V_Lドメイン由来であり、またこの抗原結合性部位の少なくとも１つがＨＧＦに結合する。

【００４９】

このような抗原結合タンパク質は、タンパク質スキャフォールドを含み，このスキャフォールドは、例えばＩｇＧ等のＩｇスキャフォールド、例えば１つまたは複数のエピトープ結合ドメインに結合するモノクローナル抗体、例えば結合タンパク質は少なくとも２つの抗原結合性部位を有するドメイン抗体で、その内の少なくとも１つがエピトープ結合ドメイン由来であり、また抗原結合性部位の少なくとも１つがＨＧＦに結合している。また、本発明はこれを産生する方法および使用、特に治療で使用する方法に関する。

【００５０】

本発明の抗原結合タンパク質はまたｍＡｂｄＡｂとも呼ばれる。

一実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質のタンパク質スキャフォールドは、Ｉｇ

スキャフォールド、例えばＩｇＧスキャフォールドまたはＩｇＡスキャフォールドである。ＩｇＧスキャフォールドは、抗体の全てのドメイン（すなわち、ＣＨ１，ＣＨ２，ＣＨ３，$Ｖ_{H}$，$Ｖ_{L}$）を含んでもよい。本発明の抗原結合タンパク質はＩｇＧ１，ＩｇＧ２，ＩｇＧ３，ＩｇＧ４またはＩｇＧ４ＰＥから選択されたＩｇＧスキャフォールドを含んでもよい。

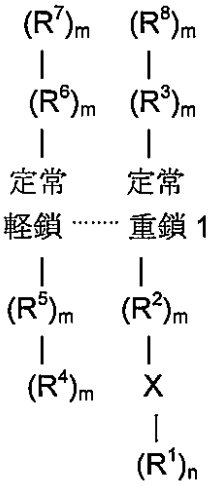
【００５１】

本発明の抗原結合タンパク質は少なくとも２つの抗原結合性部位を有し、例えば２つの結合部位をの内、一つ目の結合部位は抗原上の第１のエピトープに特異性を有し、二つ目の結合部位は同じ抗原上の第２のエピトープに特異性を有する。さらなる実施形態では、４つの抗原結合性部位，または６つの抗原結合性部位，または８つの抗原結合性部位，または１０個以上の抗原結合性部位を有する。一実施形態では、抗原結合タンパク質は１以上の抗原に対して、例えば、２つ以上の抗原，例えば２つの抗原，または３つの抗原，または４つの抗原に対して特異性を有する。

【００５２】

別の態様では、本発明は、２つ以上の式Ｉの構造を含むホモダイマーの少なくとも１つを含むＨＧＦに結合可能な抗原結合タンパク質に関する：

【化１】



(I)

【００５３】

式中、

Ｘは、定常重鎖ドメイン２および定常重鎖ドメイン３を含む定常抗体領域を表し；

$Ｒ^{1}$、$Ｒ^{4}$、$Ｒ^{7}$および$Ｒ^{8}$はエピトープ結合ドメインから独立に選択されたドメインを表し；

$Ｒ^{2}$は、定常重鎖１，およびエピトープ結合ドメインからなる群から選択されたドメインを表し；

$Ｒ^{3}$は、ペアード$Ｖ_{H}$およびエピトープ結合ドメインからなる群から選択されたドメインを表し；

$Ｒ^{5}$は、定常軽鎖、およびエピトープ結合ドメインからなる群より選択されたドメインを表し；

$Ｒ^{6}$は、ペアード$Ｖ_{L}$およびエピトープ結合ドメインからなる群から選択されたドメインを表し；

ｎは、０，１，２，３および４から独立に選択された整数を表し；

ｍは、０および１から独立に選択された整数を表し、

定常重鎖１および定常軽鎖ドメインは会合しており；

少なくとも１つのエピトープ結合ドメインが存在し；

さらに、$Ｒ^{3}$がペアード$Ｖ_{H}$ドメインを表す場合は、$Ｒ^{6}$はペアード$Ｖ_{L}$ドメインを表し、これにより２つのドメインが一緒に抗原に結合可能となる。

【００５４】
一実施形態では、R^6はペアードV_Lを表し、R^3はペアードV_Hを表す。
【００５５】
さらなる実施形態では、R^7とR^8のどちらか、または両方がエピトープ結合ドメインを表す。
【００５６】
またさらなる実施形態では、R^1とR^4のどちらか、または両方がエピトープ結合ドメインを表す。
【００５７】
一実施形態では、R^4が存在する。
【００５８】
一実施形態では、R^1、R^7およびR^8はエピトープ結合ドメインを表す。
【００５９】
一実施形態では、R^1、R^7、R^8およびR^4はエピトープ結合ドメインを表す。
【００６０】
一実施形態では、$(R^1)_n$，$(R^2)_m$，$(R^4)_m$および$(R^5)_m=0$，すなわち存在せず、R^3はペアードV_Hドメインであり，R^6はペアードV_Lドメインであり，R^8はV_HｄＡｂであり，およびR^7はV_LｄＡｂである。
【００６１】
別の実施形態では、$(R^1)_n$，$(R^2)_m$，$(R^4)_m$および$(R^5)_m$は０，すなわち存在せず、R^3はペアードV_Hドメインであり，R^6はペアードV_Lドメインであり，R^8はV_HｄＡｂであり，および$(R^7)_m=0$すなわち存在しない。
【００６２】
別の実施形態では、$(R^2)_m$，および$(R^5)_m$は０，すなわち存在せず、R^1はｄＡｂであり，R^4はｄＡｂであり，R^3はペアードV_Hドメインであり，R^6はペアードV_Lドメインであり，$(R^8)_m$と$(R^7)_m=0$、すなわち存在しない。
【００６３】
本発明の一実施形態では、エピトープ結合ドメインは免疫グロブリン単一可変ドメインである。
【００６４】
いずれかの本明細書記載の抗原結合タンパク質は１つまたは複数の抗原を中和することができ、例えばＨＧＦの中和およびＶＥＧＦの中和も可能であることは、理解されるであろう。
【００６５】
本発明の抗原結合タンパク質に関連して本明細書で使われる用語「中和する」およびその文法的変形体は、本発明の抗原結合タンパク質の存在下、このような抗原結合タンパク質の無い場合の標的の活性に比較して、全体的または部分的に標的の生物活性が低下することを意味する。これに限定されないが、中和が、１つまたは複数のリガンドのブロッキング、受容体を活性化するリガンドの阻害、受容体の発現低下、またはエフェクター機能への作用、によるものであってもよい。
【００６６】
中和のレベルはいくつかの方法、例えば、下記実施例において設定されるアッセイ法のいずれかを使用することにより、例えば、リガンドの受容体への結合の阻止を測定するアッセイ法において測定可能である。この測定法は、例えば実施例６に記載のように実施される。このアッセイでは、ＨＧＦの中和は、中和する抗原結合タンパク質の存在下でＭＥＴのリン酸化（Ｍｅｔリン酸化はＨＧＦにより刺激される）の減少を評価することにより測定される。このアッセイにおいて使用するのに好適なＨＧＦタンパク質としてはＮＣＢＩ参照配列：ＮＭ＿０００６０１．４（ＵｎｉＰｒｏｔ　ＩＤ　Ｐ１４２１０）の配列を含むＨＧＦタンパク質が挙げられる。ＶＥＧＦの中和のレベルは、例えば、実施例１４において記載されるアッセイにより測定することができる。このアッセイにおいて使用する

のに好適なＶＥＧＦタンパク質としては、ＮＣＢＩ参照配列ＮＰ＿００１０２０５３９．２（ＵｎｉＰｒｏｔ　ＩＤ：Ｐ１５６９２）を含むＶＥＧＦ$_{165}$が挙げられる。

【００６７】

中和を評価する他の方法で、例えば中和する抗原結合タンパク質の存在下、リガンドとその受容体間の結合低下を評価することにより測定する方法は、当業者には既知であり、例えばＢｉａｃｏｒｅ（登録商標）アッセイがある。

【００６８】

本発明の別の態様では、少なくとも実質的に本明細書で例示されている抗原結合タンパク質と等価な中和活性を有する抗原結合タンパク質が提供される。

【００６９】

本発明の抗原結合タンパク質はＨＧＦに対して特異性を有し、例えばＨＧＦに結合可能なエピトープ結合ドメイン、および／またはＨＧＦに結合するペアードV_H／V_Lを含む。抗原結合タンパク質はＨＧＦに結合可能な抗体を含んでもよい。抗原結合タンパク質はＨＧＦに結合可能な免疫グロブリン単一可変ドメインを含んでもよい。

【００７０】

一実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質は、例えばＨＧＦおよびＶＥＧＦに結合可能な場合のように１つ以上の抗原に対し特異性を有する。一実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質ＨＧＦおよびＶＥＧＦに同時に結合できる。

【００７１】

本明細書記載のいずれかの抗原結合タンパク質が、例えば実施例７に記載されたような適切なアッセイを使った化学量論的解析により測定して、同時に２つ以上の抗原に結合可能であってもよいことは理解されよう。

【００７２】

このような抗原結合タンパク質の例には、ＨＧＦアンタゴニストであるエピトープ結合ドメインを有するＶＥＧＦ抗体、重鎖のＣ末端やＮ末端または軽鎖のＣ末端やＮ末端に結合した抗ＨＧＦ免疫グロブリン単一可変ドメインがある。実施例には、配列番号３４または３９の重鎖配列および／または配列番号３５の軽鎖配列を含み、重鎖と軽鎖の片方または両方がＨＧＦに結合する１つまたは複数のエピトープ結合ドメインをさらに含む抗原結合タンパク質がある。

【００７３】

このような抗原結合タンパク質の例には、重鎖のＣ末端やＮ末端、またはＣ末端に結合したＶＥＧＦアンタゴニストであるエピトープ結合ドメインを有するＨＧＦ抗体がある。例としては配列番号２，６または１０で設定された重鎖配列および／または配列番号４，８または１２で設定された軽鎖配列を含む抗原結合タンパク質が挙げられ、重鎖と軽鎖の片方または両方が、例えばＶＥＧＦまたはＶＥＧＦ受容体、例えばＶＥＧＦＲ２に結合することにより、ＶＥＧＦに拮抗することができる１つまたは複数のエピトープ結合ドメインをさらに含む。そのようなエピトープ結合ドメインは、配列番号２５，２６，３６，３７および３８で設定されるものから選択することができる。

【００７４】

一実施形態では、抗原結合タンパク質は、配列番号２，６，または１０で設定される重鎖配列，および配列番号４，８または１２で設定される軽鎖配列を含み、さらに、重鎖のＣ末端もしくはＮ末端または軽鎖のＣ末端もしくはＮ末端に結合された、ＶＥＧＦに拮抗することができる少なくとも１つのエピトープ結合ドメイン，例えば抗ｄＡｂ，例えば配列番号２５または２６で設定されるもの，または例えば配列番号２６で設定される抗ＶＥＧＦアンチカリン，または抗ＶＥＧＦＲ２アドネクチンを含む。

【００７５】

このような抗原結合タンパク質の例には、重鎖のＣ末端やＮ末端、または軽鎖のＣ末端やＮ末端に結合したＶＥＧＦ免疫グロブリン単一可変ドメインを含むエピトープ結合ドメインを有するＨＧＦ抗体が挙げられる。例えば、配列番号１４，１８もしくは２２で設定された重鎖配列および配列番号４，８もしくは１２で設定された軽鎖配列を有する抗原結

合タンパク質、配列番号２，６もしくは１０で設定された重鎖配列および配列番号１６，２０もしくは２４で設定された軽鎖配列を有する抗原結合タンパク質，または配列番号１４，１８もしくは２２で設定された重鎖配列および配列番号１６，２０もしくは２４で設定された軽鎖配列を有する抗原結合タンパク質である。

【００７６】

一実施形態では、抗原結合タンパク質は、ＶＥＧＦアンタゴニストであるエピトープ結合ドメインに結合した抗ＨＧＦ抗体を含み、抗ＨＧＦ抗体が、配列番号２の重鎖配列および配列番号４の軽鎖配列を有する抗体、または配列番号６の重鎖配列および配列番号１０の軽鎖配列を有する抗体、または配列番号８の重鎖配列および配列番号１２の軽鎖配列を有する抗体と同じＣＤＳを有する。

【００７７】

一実施形態では、抗原結合タンパク質は、ＶＥＧＦアンタゴニストであるエピトープ結合ドメインに連結された抗ＨＧＦ抗体を含み、ここで、重鎖配列は配列番号１０を含み、軽鎖配列は配列番号１２を含み、例えば、配列番号２２の重鎖配列および配列番号１２の軽鎖配列を含むｍＡｂｄＡｂである。

【００７８】

本発明で使用されるＨＧＦ抗体のさらなる詳細は、WO2005017107，WO2007/143098およびWO2007/115049において示される。

【００７９】

このような抗原結合タンパク質の他の例には、重鎖のＣ末端やＮ末端、または軽鎖のＣ末端やＮ末端に結合した抗ＶＥＧＦエピトープ結合ドメインを有する抗ＨＧＦ抗体がある。このＶＥＧＦエピトープ結合ドメインは、ＶＥＧＦｄＡｂで、WO2007080392（参照により本明細書に組み込まれる）にあるいずれかのＶＥＧＦｄＡｂ配列、特に配列番号１１７，１１９，１２３，１２７－１９８，５３９および５４０で設定されるｄＡｂから選択されるＶＥＧＦ　ｄＡｂ、またはWO2008149146（参照により本明細書に組み込まれる）で設定されるＶＥＧＦ　ｄＡｂ配列のいずれか、特に、ＤＯＭ１５－２６－５０１，ＤＯＭ１５－２６－５５５，ＤＯＭ１５－２６－５５８，ＯＭ１５－２６－５８９，ＤＯＭ１５－２６－５９１，ＤＯＭ１５－２６－５９４およびＤＯＭ１５－２６－５９５と記載されているｄＡｂから選択されるＶＥＧＦ　ｄＡｂ，またはWO 2008149147（参照により本明細書に組み込まれる）で設定されるＶＥＧＦ　ｄＡｂ配列のいずれかから選択されるＶＥＧＦ　ｄＡｂ、または、WO 2008149150（参照により本明細書に組み込まれる）で設定されるＶＥＧＦ　ｄａｂ配列のいずれかから選択されるＶＥＧＦ　ｄａｂである。

【００８０】

本明細書の請求項に組み込むために開示を提供するという明白な意図を持って、本発明の内容に適用するための可変ドメインとアンタゴニストの実施例として、あたかも本明細書に明示的に記載されているかのように、これらの具体的配列およびWO2007080392，WO2008149146，WO2007066106，WO2008149147およびWO 2008149150の開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【００８１】

また、このような抗原結合タンパク質は、同じまたは異なる抗原特異性を有し、重鎖のＣ末端および／またはＮ末端、および／または、軽鎖のＣ末端および／またはＮ末端に結合した１つまたは複数の追加のエピトープ結合ドメインを有してもよい。

【００８２】

本発明の一実施形態では、本明細書記載の発明に従った、ＡＤＣＣおよび／または補体活性化またはエフェクター機能を低減するように定常領域を含む抗原結合タンパク質が提供される。このような一実施形態では、重鎖定常領域は、ＩｇＧ２またはＩｇＧ４アイソタイプの本来の無効化定常領域または変異ＩｇＧ１定常領域を含んでもよい。適切な修飾の例は、EP0307434に記載されている。一例では、位置２３５および２３７（ＥＵインデックスナンバリング）のアラニン残基の置換が含まれる。

【００８３】

一実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質は、Ｆｃ機能、例えばＡＤＣＣおよびＣＤＣ活性の１つまたは両方を有する。このような抗原結合タンパク質は、軽鎖上、例えば、軽鎖のＣ末端上にエピトープ結合ドメインを含んでもよい。

【００８４】

また、本発明は、エピトープ結合ドメインを抗体の軽鎖上に配置することにより、特に、エピトープ結合ドメインを軽鎖のＣ末端上に配置することにより抗原結合タンパク質のＡＤＣＣおよびＣＤＣ機能を維持する方法を提供する。

【００８５】

本発明は、また、エピトープ結合ドメインを抗体の重鎖上に配置することにより、特に、エピトープ結合ドメインを重鎖のＣ末端上に配置することにより抗原結合タンパク質のＣＤＣ機能を低減させる方法を提供する。

【００８６】

一実施形態では、抗原結合タンパク質は、ドメイン抗体（ｄＡｂ）であるエピトープ結合ドメインを含み、例えば、エピトープ結合ドメインがヒトV_HまたはヒトV_Lであっても、ラクダV_{HH}（ナノボディ）またはサメｄＡｂ（ＮＡＲＶ）であってもよい。一実施形態では、抗原結合タンパク質は、下記の群から選択されたスキャフォールド誘導体であるエピトープ結合ドメインを含む。ＣＴＬＡ－４（Ｅｖｉｂｏｄｙ）；リポカリン；プロテインＡ由来分子例えばプロテインＡのＺドメイン（アフィボディ，ＳｐＡ），Ａドメイン（アビマー／マキシボディ）；ＧｒｏＥＬやＧｒｏＥＳ等の熱ショックタンパク質；トランスフェリン（トランスボディ）；アンキリンリピートタンパク質（ＤＡＲＰｉｎ）；ペプチドアプタマー；Ｃ－タイプレクチンドメイン（テトラネクチン）；ヒトγクリスタリンおよびヒトユビキチン（ａｆｆｉｌｉｎ）；ＰＤＺドメイン；ヒトプロテアーゼ阻害剤のスコーピオントキシンクニッツタイプドメイン；およびフィブロネクチン（アドネクチン）；このドメインは、その天然のリガンド以外のリガンドに結合させるためにタンパク質工学による操作が行われたものである。

【００８７】

本発明の抗原結合タンパク質は、アドネクチンであるエピトープ結合ドメインに結合したタンパク質スキャフォールド、例えば、重鎖のＣ末端に結合したアドネクチンを有するＩｇＧスキャフォールドを含んでもよく、またはアドネクチンに結合したタンパク質スキャフォールド、例えば、重鎖のＮ末端に結合したアドネクチンを有するＩｇＧスキャフォールドを含んでもよく、または，アドネクチンに結合したタンパク質スキャフォールド、例えば、軽鎖のＣ末端に結合したアドネクチンを有するＩｇＧスキャフォールドを含んでもよく、または，アドネクチンに結合したタンパク質スキャフォールド、例えば、軽鎖のＮ末端に結合したアドネクチンを有するＩｇＧスキャフォールドを含んでもよい。

【００８８】

他の実施形態では、抗原結合タンパク質は、タンパク質スキャフォールド、例えばＣＴＬＡ－４であるエピトープ結合ドメインに結合したＩｇＧスキャフォールド、例えば、重鎖のＮ末端に結合したＣＴＬＡ－４を有するＩｇＧスキャフォールドを含んでもよく、または、例えば、重鎖のＣ末端に結合したＣＴＬＡ－４を有するＩｇＧスキャフォールドを含んでもよく、または、例えば、軽鎖のＮ末端に結合したＣＴＬＡ－４を有するＩｇＧスキャフォールドを含んでもよく、または、軽鎖のＣ末端に結合したＣＴＬＡ－４を有するＩｇＧスキャフォールドを含んでもよい。

【００８９】

他の実施形態では、抗原結合タンパク質は、タンパク質スキャフォールド、例えばリポカリンであるエピトープ結合ドメインに結合したＩｇＧスキャフォールド、例えば、重鎖のＮ末端に結合したリポカリンを有するＩｇＧスキャフォールドを含んでもよく、または、例えば、重鎖のＣ末端に結合したリポカリンを有するＩｇＧスキャフォールドを含んでもよく、または、例えば、軽鎖のＮ末端に結合したリポカリンを有するＩｇＧスキャフォールドを含んでもよく、または、軽鎖のＣ末端に結合したリポカリンを有するＩｇＧスキャフォールドを含んでもよい。

【００９０】
他の実施形態では、抗原結合タンパク質は、タンパク質スキャフォールド、例えばＳｐＡであるエピトープ結合ドメインに結合したＩｇＧスキャフォールド、例えば、重鎖のＮ末端に結合したＳｐＡを有するＩｇＧスキャフォールドを含んでもよく、または、例えば、重鎖のＣ末端に結合したＳｐＡを有するＩｇＧスキャフォールドを含んでもよく、または、例えば、軽鎖のＮ末端に結合したＳｐＡを有するＩｇＧスキャフォールドを含んでもよく、または、軽鎖のＣ末端に結合したＳｐＡを有するＩｇＧスキャフォールドを含んでもよい。
【００９１】
他の実施形態では、抗原結合タンパク質は、タンパク質スキャフォールド、例えばアフィボディであるエピトープ結合ドメインに結合したＩｇＧスキャフォールド、例えば、重鎖のＮ末端に結合したアフィボディを有するＩｇＧスキャフォールドを含んでもよく、または、例えば、重鎖のＣ末端に結合したアフィボディを有するＩｇＧスキャフォールドを含んでもよく、または、例えば、軽鎖のＮ末端に結合したアフィボディを有するＩｇＧスキャフォールドを含んでもよく、または、軽鎖のＣ末端に結合したアフィボディを有するＩｇＧスキャフォールドを含んでもよい。
【００９２】
他の実施形態では、抗原結合タンパク質は、タンパク質スキャフォールド、例えばａｆｆｉｍｅｒであるエピトープ結合ドメインに結合したＩｇＧスキャフォールド、例えば、重鎖のＮ末端に結合したａｆｆｉｍｅｒを有するＩｇＧスキャフォールドを含んでもよく、または、例えば、重鎖のＣ末端に結合したａｆｆｉｍｅｒを有するＩｇＧスキャフォールドを含んでもよく、または、例えば、軽鎖のＮ末端に結合したａｆｆｉｍｅｒを有するＩｇＧスキャフォールドを含んでもよく、または、軽鎖のＣ末端に結合したａｆｆｉｍｅｒを有するＩｇＧスキャフォールドを含んでもよい。
【００９３】
他の実施形態では、抗原結合タンパク質は、タンパク質スキャフォールド、例えばＧｒｏＥＬであるエピトープ結合ドメインに結合したＩｇＧスキャフォールド、例えば、重鎖のＮ末端に結合したＧｒｏＥＬを有するＩｇＧスキャフォールドを含んでもよく、または、例えば、重鎖のＣ末端に結合したＧｒｏＥＬを有するＩｇＧスキャフォールドを含んでもよく、または、例えば、軽鎖のＮ末端に結合したＧｒｏＥＬを有するＩｇＧスキャフォールドを含んでもよく、または、軽鎖のＣ末端に結合したＧｒｏＥＬを有するＩｇＧスキャフォールドを含んでもよい。
【００９４】
他の実施形態では、抗原結合タンパク質は、タンパク質スキャフォールド、例えばトランスフェリンであるエピトープ結合ドメインに結合したＩｇＧスキャフォールド、例えば、重鎖のＮ末端に結合したトランスフェリンを有するＩｇＧスキャフォールドを含んでもよく、または、例えば、重鎖のＣ末端に結合したトランスフェリンを有するＩｇＧスキャフォールドを含んでもよく、または、例えば、軽鎖のＮ末端に結合したトランスフェリンを有するＩｇＧスキャフォールドを含んでもよく、または、軽鎖のＣ末端に結合したトランスフェリンを有するＩｇＧスキャフォールドを含んでもよい。
【００９５】
他の実施形態では、抗原結合タンパク質は、タンパク質スキャフォールド、例えばＧｒｏＥＳであるエピトープ結合ドメインに結合したＩｇＧスキャフォールド、例えば、重鎖のＮ末端に結合したＧｒｏＥＳを有するＩｇＧスキャフォールドを含んでもよく、または、例えば、重鎖のＣ末端に結合したＧｒｏＥＳを有するＩｇＧスキャフォールドを含んでもよく、または、例えば、軽鎖のＮ末端に結合したＧｒｏＥＳを有するＩｇＧスキャフォールドを含んでもよく、または、軽鎖のＣ末端に結合したＧｒｏＥＳを有するＩｇＧスキャフォールドを含んでもよい。
【００９６】
他の実施形態では、抗原結合タンパク質は、タンパク質スキャフォールド、例えばＤＡ

ＲＰｉｎであるエピトープ結合ドメインに結合したＩｇＧスキャフォールド、例えば、重鎖のＮ末端に結合したＤＡＲＰｉｎを有するＩｇＧスキャフォールドを含んでもよく、または、例えば、重鎖のＣ末端に結合したＤＡＲＰｉｎを有するＩｇＧスキャフォールドを含んでもよく、または、例えば、軽鎖のＮ末端に結合したＤＡＲＰｉｎを有するＩｇＧスキャフォールドを含んでもよく、または、軽鎖のＣ末端に結合したＤＡＲＰｉｎを有するＩｇＧスキャフォールドを含んでもよい。

【００９７】

他の実施形態では、抗原結合タンパク質は、タンパク質スキャフォールド、例えばペプチドアプタマーであるエピトープ結合ドメインに結合したＩｇＧスキャフォールド、例えば、重鎖のＮ末端に結合したペプチドアプタマーを有するＩｇＧスキャフォールドを含んでもよく、または、例えば、重鎖のＣ末端に結合したペプチドアプタマーを有するＩｇＧスキャフォールドを含んでもよく、または、例えば、軽鎖のＮ末端に結合したペプチドアプタマーを有するＩｇＧスキャフォールドを含んでもよく、または、軽鎖のＣ末端に結合したペプチドアプタマーを有するＩｇＧスキャフォールドを含んでもよい。

【００９８】

本発明の一実施形態では、４つのエピトープ結合ドメイン、例えば４つのドメイン抗体があり、２つのエピトープ結合ドメインが同じ抗原に対し特異性を有してもよく、抗原結合タンパク質中に存在する全てのエピトープ結合ドメインが同じ抗原に対し特異性を有してもよい。

【００９９】

本発明のタンパク質スキャフォールドは、リンカーを使ってエピトープ結合ドメインに連結してもよい。適切なリンカーの例は、長さで１アミノ酸～１５０アミノ酸，または１アミノ酸～１４０アミノ酸，例えば、１アミノ酸～１３０アミノ酸，または１～１２０アミノ酸，または１～８０アミノ酸，または１～５０アミノ酸，または１～２０アミノ酸，または１～１０アミノ酸，または５～１８アミノ酸のアミノ酸配列であってもよい。このような配列は、それ自身の三次構造を有してもよく、例えば、本発明のリンカーが単一可変ドメインを含んでもよい。一実施形態では、リンカーのサイズは、単一可変ドメインと同等である。適切なリンカーは、サイズが１～２０オングストロームであってもよく、例えば、１５オングストローム未満，または１０オングストローム未満，または５オングストローム未満であってもよい。

【０１００】

本発明の一実施形態では、少なくとも１つのエピトープ結合ドメインはＩｇスキャフォールドに直接に結合し、このスキャフォールドは、１～１５０アミノ酸、例えば、１～２０アミノ酸、例えば１～１０アミノ酸からなるリンカーを有している。このようなリンカーは、配列番号２７～３２で示されるもののいずれか１つから選択することができ、または、これらリンカーの複合であってもよい。

【０１０１】

本発明の抗原結合タンパク質で使用するリンカーは、単体でも他のリンカー、１つまたは複数のＧＳ残基のセット、例えば、「ＧＳＴＶＡＡＰＳ」または「ＴＶＡＡＰＳＧＳ」または「ＧＳＴＶＡＡＰＳＧＳ」であってもよい。一実施形態ではリンカーは配列番号２８を含む。

【０１０２】

一実施形態では、エピトープ結合ドメインは、リンカー「$(PAS)_n(GS)_m$」によりＩｇスキャフォールドに結合している。別の実施形態では、エピトープ結合ドメインは、リンカー「$(GGGGS)_n(GS)_m$」によりＩｇスキャフォールドに結合している。別の実施形態では、エピトープ結合ドメインは、リンカー「$(TVAAPS)_n(GS)_m$」によりＩｇスキャフォールドに結合している。別の実施形態では、エピトープ結合ドメインは、リンカー「$(GS)_m(TVAAPSGS)_n$」によりＩｇスキャフォールドに結合している。別の実施形態では、エピトープ結合ドメインは、リンカー「$(PAVPPP)_n(GS)_m$」によりＩｇスキャフォールドに結合している。別の実施形態で

は、エピトープ結合ドメインは、リンカー「（ＴＶＳＤＶＰ）$_n$（ＧＳ）$_m$」によりＩｇスキャフォールドに結合している。別の実施形態では、エピトープ結合ドメインは、リンカー「（ＴＧＬＤＳＰ）$_n$（ＧＳ）$_m$」によりＩｇスキャフォールドに結合している。この全ての実施形態で、ｎ＝１～１０，およびｍ＝０～４である。

【０１０３】

このようなリンカーに例には、（ＰＡＳ）$_n$（ＧＳ）$_m$ここでｎ＝１およびｍ＝１（配列番号４６），（ＰＡＳ）$_n$（ＧＳ）$_m$ここでｎ＝２およびｍ＝１（配列番号４７），（ＰＡＳ）$_n$（ＧＳ）$_m$ここでｎ＝３およびｍ＝１（配列番号４８），（ＰＡＳ）$_n$（ＧＳ）$_m$ここでｎ＝４およびｍ＝１，（ＰＡＳ）$_n$（ＧＳ）$_m$ここでｎ＝２およびｍ＝０，（ＰＡＳ）$_n$（ＧＳ）$_m$ここでｎ＝３およびｍ＝０，（ＰＡＳ）$_n$（ＧＳ）$_m$ここでｎ＝４およびｍ＝０がある。

【０１０４】

このようなリンカーに例には、（ＧＧＧＧＳ）$_n$（ＧＳ）$_m$ここでｎ＝１およびｍ＝１，（ＧＧＧＧＳ）$_n$（ＧＳ）$_m$ここでｎ＝２およびｍ＝１，（ＧＧＧＧＳ）$_n$（ＧＳ）$_m$ここでｎ＝３およびｍ＝１、（ＧＧＧＧＳ）$_n$（ＧＳ）$_m$ここでｎ＝４およびｍ＝１，（ＧＧＧＧＳ）$_n$（ＧＳ）$_m$ここでｎ＝２およびｍ＝０（配列番号４９），（ＧＧＧＧＳ）$_n$（ＧＳ）$_m$ここでｎ＝３およびｍ＝０（配列番号５０），（ＧＧＧＧＳ）$_n$（ＧＳ）$_m$ここでｎ＝４およびｍ＝０がある。

【０１０５】

このようなリンカーに例には、（ＴＶＡＡＰＳ）$_n$（ＧＳ）$_m$ここでｎ＝１およびｍ＝１（配列番号：３２），（ＴＶＡＡＰＳ）$_n$（ＧＳ）$_m$ここでｎ＝２およびｍ＝１（配列番号：６４），（ＴＶＡＡＰＳ）$_n$（ＧＳ）$_m$ここでｎ＝３およびｍ＝１（配列番号：６５），（ＴＶＡＡＰＳ）$_n$（ＧＳ）$_m$ここでｎ＝４およびｍ＝１，（ＴＶＡＡＰＳ）ｎ（ＧＳ）ｍここでｎ＝２およびｍ＝０，（ＴＶＡＡＰＳ）$_n$（ＧＳ）$_m$ここでｎ＝３およびｍ＝０，（ＴＶＡＡＰＳ）$_n$（ＧＳ）$_m$ここでｎ＝４およびｍ＝０がある。

【０１０６】

このようなリンカーに例には、（ＧＳ）$_m$（ＴＶＡＡＰＳＧＳ）$_n$ここでｎ＝１およびｍ＝１（配列番号４０），（ＧＳ）$_m$（ＴＶＡＡＰＳＧＳ）$_n$ここでｎ＝２およびｍ＝１（配列番号４１），（ＧＳ）$_m$（ＴＶＡＡＰＳＧＳ）$_n$ここでｎ＝３およびｍ＝１（配列番号４２），または（ＧＳ）$_m$（ＴＶＡＡＰＳＧＳ）$_n$ここでｎ＝４およびｍ＝１（配列番号４３），（ＧＳ）$_m$（ＴＶＡＡＰＳＧＳ）$_n$ここでｎ＝５およびｍ＝１（配列番号４４），（ＧＳ）$_m$（ＴＶＡＡＰＳＧＳ）$_n$ここでｎ＝６およびｍ＝１（配列番号４５），（ＧＳ）$_m$（ＴＶＡＡＰＳＧＳ）$_n$ここでｎ＝１およびｍ＝０（配列番号３２），（ＧＳ）$_m$（ＴＶＡＡＰＳＧＳ）$_n$ここでｎ＝２およびｍ＝１０，（ＧＳ）$_m$（ＴＶＡＡＰＳＧＳ）$_n$ここでｎ＝３およびｍ＝０，または（ＧＳ）$_m$（ＴＶＡＡＰＳＧＳ）$_n$ここでｎ＝０がある。

【０１０７】

このようなリンカーに例には、（ＰＡＶＰＰＰ）$_n$（ＧＳ）$_m$ここでｎ＝１およびｍ＝１（配列番号５１），（ＰＡＶＰＰＰ）$_n$（ＧＳ）$_m$ここでｎ＝２およびｍ＝１（配列番号５２），（ＰＡＶＰＰＰ）$_n$（ＧＳ）$_m$ここでｎ＝３およびｍ＝１（配列番号５３），（ＰＡＶＰＰＰ）$_n$（ＧＳ）$_m$ここでｎ＝４およびｍ＝１，（ＰＡＶＰＰＰ）$_n$（ＧＳ）$_m$ここでｎ＝２およびｍ＝０，（ＰＡＶＰＰＰ）$_n$（ＧＳ）$_m$ここでｎ＝３およびｍ＝０，（ＰＡＶＰＰＰ）$_n$（ＧＳ）$_m$ここでｎ＝４およびｍ＝０がある。

【０１０８】

このようなリンカーに例には、（ＴＶＳＤＶＰ）$_n$（ＧＳ）$_m$ここでｎ＝１およびｍ＝１（配列番号５４），（ＴＶＳＤＶＰ）$_n$（ＧＳ）$_m$ここでｎ＝２およびｍ＝１（配列番号５５），（ＴＶＳＤＶＰ）$_n$（ＧＳ）$_m$ここでｎ＝３およびｍ＝１（配列番号５６），（ＴＶＳＤＶＰ）$_n$（ＧＳ）$_m$ここでｎ＝４およびｍ＝１，（ＴＶＳＤＶＰ）$_n$（ＧＳ）$_m$ここでｎ＝２およびｍ＝０，（ＴＶＳＤＶＰ）$_n$（ＧＳ）$_m$ここでｎ＝３およびｍ＝０，（ＴＶＳＤＶＰ）$_n$（ＧＳ）$_m$ここでｎ＝４およびｍ＝０がある。

【０１０９】
このようなリンカーに例には、（ＴＧＬＤＳＰ）$_n$（ＧＳ）$_m$ここでｎ＝１およびｍ＝１（配列番号５７），（ＴＧＬＤＳＰ）$_n$（ＧＳ）$_m$ここでｎ＝２およびｍ＝１（配列番号５８），（ＴＧＬＤＳＰ）$_n$（ＧＳ）$_m$ここでｎ＝３およびｍ＝１（配列番号５９），（ＴＧＬＤＳＰ）$_n$（ＧＳ）$_m$ここでｎ＝４およびｍ＝１，（ＴＧＬＤＳＰ）$_n$（ＧＳ）$_m$ここでｎ＝２およびｍ＝０，（ＴＧＬＤＳＰ）$_n$（ＧＳ）$_m$ここでｎ＝３およびｍ＝０，（ＴＧＬＤＳＰ）$_n$（ＧＳ）$_m$ここでｎ＝４およびｍ＝０がある。
【０１１０】
別の実施形態では、エピトープ結合ドメインおよびＩｇスキャフォールドの間にはリンカーが存在しない。別の実施形態では、エピトープ結合ドメインはリンカー「ＴＶＡＡＰＳ」によりＩｇスキャフォールドに結合する。別の実施形態では、エピトープ結合ドメインはリンカー「ＴＶＡＡＰＳＧＳ」によりＩｇスキャフォールドに結合する。別の実施形態では、エピトープ結合ドメインはリンカー「ＧＳ」によりＩｇスキャフォールドに結合する。別の実施形態では、エピトープ結合ドメインはリンカー「ＡＳＴＫＧＰＴ」によりＩｇスキャフォールドに結合する。
【０１１１】
一実施形態では、本発明の抗原結合タンパク質は、少なくとも１つの抗原結合性部位、例えばヒト血清アルブミンに結合可能な少なくとも１つのエピトープ結合ドメイン、を含む。
【０１１２】
一実施形態では、少なくとも３つの抗原結合性部位があり、例えば４または５または６または８または１０抗原結合性部位があり、この抗原結合タンパク質は少なくとも３または４または５または６または８または１０抗原に結合可能であり、例えば、３または４または５または６または８または１０抗原に同時に結合可能である。
【０１１３】
また、本発明は医薬に使用するための、例えば、血管新生を必要とする、またはＨＧＦ（ＨＧＦ／Ｍｅｔシグナリング）および／またはＶＥＧＦの上昇したレベルと関連すると考えられる固形腫瘍の治療薬製造に使用するための抗原結合タンパク質を提供する。そのような腫瘍としては、結腸，乳房，卵巣，肺（小細胞または非小細胞），前立腺，膵臓，腎臓，肝臓，胃，頭頸部，メラノーマ，肉腫が挙げられる。原発性および二次性（転移性）脳腫瘍もまた含まれ、グリオーマ（上衣腫を含む），髄膜腫，オリゴデンドローマ，アストロサイトーマ（低悪性度，未分化および多形神経膠芽腫），髄芽腫，神経節腫，シュワン腫および脊索腫が挙げられるが、それらに限定されない。本発明の抗原結合タンパク質を用いた治療に好適な望ましくない血管新生と関連する他の疾患としては、加齢性黄斑変性病，糖尿病性網膜症，ＲＡおよび乾癬が挙げられる。
【０１１４】
本発明は、固形腫瘍（結腸，乳房，卵巣，肺（小細胞または非小細胞），前立腺，膵臓，腎臓，肝臓，胃，頭頸部，メラノーマ，肉腫を含む），原発性および二次性（転移性）脳腫瘍、例えば限定はされないが、グリオーマ（上衣腫を含む），髄膜腫，オリゴデンドローマ，アストロサイトーマ（低悪性度，未分化および多形神経膠芽腫），髄芽腫，神経節腫，シュワン腫および脊索腫，加齢性黄斑変性病，糖尿病性網膜症，ＲＡまたは乾癬の患者を治療する方法を提供し、これは、本発明の治療量の抗原結合タンパク質の投与を含む。
【０１１５】
本発明の抗原結合タンパクは、固形腫瘍（結腸，乳房，卵巣，肺（小細胞または非小細胞），前立腺，膵臓，腎臓，肝臓，胃，頭頸部，メラノーマ，肉腫を含む），原発性および二次性（転移性）脳腫瘍、例えば限定はされないが、グリオーマ（上衣腫を含む），髄膜腫，オリゴデンドローマ，アストロサイトーマ（低悪性度，未分化および多形神経膠芽腫），髄芽腫，神経節腫，シュワン腫および脊索腫，加齢性黄斑変性病，糖尿病性網膜症，ＲＡまたは乾癬あるいはＨＧＦおよび／またはＶＥＧＦの過剰産生に関わる他の任意の

疾患の治療に使うことができる。

【０１１６】

本発明の抗原結合タンパク質は、何らかのエフェクター機能を有しうる。例えば、タンパク質スキャフォールドがエフェクター機能を有する抗体由来のＦｃ領域を含む場合、例えば、タンパク質スキャフォールドがＩｇＧ１由来のＣＨ２およびＣＨ３を含む場合である。エフェクター機能のレベルは、既知の技術、例えば、ＣＨ２ドメインの変異により、例えば、ＩｇＧ１ ＣＨ２ドメインが２３９および３３２および３３０から選択された位置に１つまたは複数の変異を有する場合、例えば、変異がＳ２３９ＤおよびＩ３３２ＥおよびＡ３３０Ｌから選択され、その抗体が強化されたエフェクター機能を有するようにする技術、および／または、例えば、本発明の抗原結合タンパク質のグリコシレーションプロファイルを変えてＦｃ領域のフコシル化を減少させる技術、等の技術により変えることができる。

【０１１７】

本発明に使われるタンパク質スキャフォールドには、抗体の全てのドメインを含む全モノクローナル抗体スキャフォールドを含み、または、本発明のタンパク質スキャフォールドは、一価抗体のような従来にない構造を含んでもよい。このような一価抗体は、重鎖のヒンジ部がホモ二量体化しないように修飾されたペアード重鎖と軽鎖を含んでもよい（このような一価抗体は、WO2007059782に記述されている）。他の一価抗体は、機能的可変領域とＣＨ１領域が欠けた第２の重鎖と二量体化するペアード重鎖と軽鎖を含んでもよい。この場合、ホモ二量体よりもヘテロ二量体を形成するように第１と第２の重鎖を修飾して、２つの重鎖と１つの軽鎖を有する一価抗体ができる（このような一価抗体は、WO2006015371に記載されている）。このような一価抗体は、本発明のエピトープ結合ドメインが結合できるタンパク質スキャフォールドを提供可能である。

【０１１８】

本発明に使われるエピトープ結合ドメインは、別の可変領域またはドメインと独立して、抗原またはエピトープに特異的に結合するドメインであり、これは、ドメイン抗体であっても、または下記の群から選択された非免疫グロブリンスキャフォールドの誘導体であるドメインであってもよい。ＣＴＬＡ－４（Ｅｖｉｂｏｄｙ）；リポカイン；プロテインＡ誘導分子、例えばプロテインＡのＺドメイン（アフィボディ，ＳｐＡ），Ａドメイン（アビマー／マキシボディ）；熱ショックタンパク質、例えばＧｒｏＥＬおよびＧｒｏＥＳ；トランスフェリン（トランスボディ）；アンキリンリピートタンパク質（ＤＡＲＰｉｎ）；ペプチドアプタマー；Ｃタイプレクチンドメイン（テトラネクチン）；ヒトγクリスタリンおよびヒトユビキチン（ａｆｆｉｌｉｎ）；ＰＤＺドメイン；ヒトプロテアーゼ阻害剤のスコーピオントキシンクニッツタイプドメイン；およびフィブロネクチン（アドネクチン）；このドメインは、その天然のリガンド以外のリガンドに結合させるためにタンパク質工学による操作が行われた。一実施形態では、これはドメイン抗体であってもよく、また他の適切なドメイン、例えば、ＣＴＬＡ－４，リポカリン，ＳｐＡ，アフィボディ，アビマー，ＧｒｏＥＬ，トランスフェリン，ＧｒｏＥＳおよびフィブロネクチンからなる群から選択されたドメインであってもよい。一実施形態では、これは免疫グロブリン単一可変ドメイン、アフィボディ，アンキリンリピートタンパク質（ＤＡＲＰｉｎ）およびアドネクチンから選択されてもよい。別の実施形態では、これは、アフィボディ，アンキリンリピートタンパク質（ＤＡＲＰｉｎ）およびアドネクチンから選択されてもよい。別の実施形態では、これは、ドメイン抗体、例えば、ヒト，ラクダまたはサメ（ＮＡＲＶ）ドメイン抗体から選択されたドメイン抗体であってもよい。

【０１１９】

エピトープ結合ドメインは、１つまたは複数の位置でタンパク質スキャフォールドに結合可能である。この位置には、タンパク質スキャフォールドのＣ末端およびＮ末端，例えば、ＩｇＧの重鎖のＣ末端重鎖および／または軽鎖のＣ末端，または例えばＩｇＧの重鎖のＮ末端および／または軽鎖のＮ末端が挙げられる。

【０１２０】

一実施形態では、第１のエピトープ結合ドメインがタンパク質スキャフォールドに結合し、第２のエピトープ結合ドメインが第１のエピトープ結合ドメインに結合し、例えばタンパク質スキャフォールドがＩｇＧスキャフォールドの場合は、第１のエピトープ結合ドメインＩｇＧスキャフォールドの重鎖のＣ末端に結合してもよく、そのエピトープ結合ドメインがそのＣ末端の位置で第２のエピトープ結合ドメインに結合でき、または例えば、第１のエピトープ結合ドメインは、ＩｇＧスキャフォールドの軽鎖のＣ末端に結合してもよく，その第１のエピトープ結合ドメインは、そのＣ末端の位置で第２のエピトープ結合ドメインにさらに結合してもよく，または例えば、第１のエピトープ結合ドメインは、ＩｇＧスキャフォールドの軽鎖のＮ末端に結合してもよく、その第１のエピトープ結合ドメインはそのＮ末端の位置で第２のエピトープ結合ドメインにさらに結合してもよく，または例えば、第１のエピトープ結合ドメインは、ＩｇＧスキャフォールドの重鎖のＮ末端に結合してもよく、その第１のエピトープ結合ドメインは、そのＮ末端の位置で第２のエピトープ結合ドメインにさらに結合してもよい。

【０１２１】

エピトープ結合ドメインがドメイン抗体である場合は、一部のドメイン抗体がスキャフォールド内の特定の位置に適合することがある。

【０１２２】

本発明で使用するドメイン抗体は、通常のＩｇＧの重鎖および／または軽鎖のＣ末端で結合可能である。さらに、一部の免疫グロブリン単一可変ドメインは、通常の抗体の重鎖および軽鎖の両方のＣ末端に結合できる。

【０１２３】

免疫グロブリン単一可変ドメインのＮ末端が抗体定常ドメイン（C_H3またはC_Lのいずれか）に融合している構築物の場合は、ペプチドリンカーは、免疫グロブリン単一可変ドメインが抗原に結合するのを支援することができる。事実、ｄＡｂのＮ末端は、抗原結合活性に関わる相補性決定領域（ＣＤＲＳ）の近傍に配置される。従って、短いペプチドリンカーは、エピトープ結合ドメインおよびタンパク質スキャフォールドに対する定常ドメインの間のスペーサーとして作用し、これによりｄＡｂＣＤＲをより容易に抗原に近づけることができ、従って高い親和性での結合が可能となる。

【０１２４】

免疫グロブリン単一可変ドメインがＩｇＧに結合する環境は、融合しようとする抗体鎖によって異なる：ＩｇＧスキャフォールドの抗体軽鎖のＣ末端で融合する場合は、各免疫グロブリン単一可変ドメインが抗体ヒンジとＦｃ部の近くに配置されることが期待される。このような免疫グロブリン単一可変ドメインは相互に大きく離れていると思われる。通常の抗体では、Ｆａｂ断片間の角度、および各Ｆａｂ断片とＦｃ部間の角度は非常に大きく変動する。ｍＡｂ、ｄＡｂの場合はＦａｂ断片間の角度は多くは異ならないが、一方、各ＦａｂとＦｃ部間の角度には、一部の角度制約が観察されることがある。ＩｇＧスキャフォールドの抗体重鎖のＣ末端で融合した場合、各免疫グロブリン単一可変ドメインはＦｃ部のC_H3ドメインの近くに配置されることが期待される。これはＦｃ受容体（例えば、ＦｃγＲＩ，ＩＩ，ＩＩＩおよびＦｃＲｎ）へのＦｃ結合特性に影響することは期待できない。理由は、これらの受容体が、C_H2ドメイン（ＦｃγＲＩ，ＩＩおよびＩＩＩクラスの受容体の場合）またはC_H2およびC_H3ドメイン間のヒンジ（例えば、ＦｃＲｎ受容体の場合）と結合しているからである。このような抗原結合タンパク質の別の特徴は、両免疫グロブリン単一可変ドメインが相互に空間的に接近していることが期待され、適切なリンカーにより与えられた柔軟性があるという条件下、これらの免疫グロブリン単一可変ドメインはホモ二量体でさえ形成でき、従って、Ｆｃ部の「ジップド（ｚｉｐｐｅｄ）」四次構造化を促進し、この構築物の安定性を高めることができる。

【０１２５】

このような構造の考察は、エピトープ結合ドメインに結合する最も適切な位置、例えば、ｄＡｂのタンパク質スキャフォールド（例えば、抗体）上の位置、の選択の助けとなり得る。

抗原のサイズ、その局在化（血液中または細胞表面上），その四次構造（単量体または多量体）は変動可能である。通常の抗体は、ヒンジ部が存在することによりアダプター構築物として機能するように元々設計されているが、Ｆａｂ断片の先端での２つの抗原結合性部位の方向は大きく変動でき、従って抗原の分子特性とその環境を受け入れることが可能である。対照的に、抗体または他のタンパク質スキャフォールドに結合した免疫グロブリン単一可変ドメインは、直接的あるいは間接的に構造的柔軟性が少ない。

【０１２６】

免疫グロブリン単一可変ドメインの溶液中結合状態と方法の理解も有益である。インビトロでｄＡｂは単量体での存在が多く、溶液中ではホモ二量体か多量体が多いという根拠が蓄積されてきた（Reiter et al. (1999) J Mol Biol 290 p685-698; Ewert et al (2003) J Mol Biol 325, p531-553, Jespers et al (2004) J Mol Biol 337 p893-903; Jespers et al (2004) Nat Biotechnol 22 p1161-1165; Martin et al (1997) Protein Eng. 10 p607-614; Sepulvada et al (2003) J Mol Biol 333 p355-365）。これはＩｇドメインと一緒のインビボで観察された多量体発生、例えば、ベンスジョーンズタンパク質（免疫グロブリン軽鎖の二量体 (Epp et al (1975) Biochemistry 14 p4943-4952; Huan et al (1994) Biochemistry 33 p14848-14857; Huang et al (1997) Mol immunol 34 p1291-1301)およびamyloid fibers (James et al. (2007) J Mol Biol. 367:603-8)、を強く想起させる。

【０１２７】

例えば、溶液中では二量体化する傾向のｄａｂを軽鎖のＣ末端よりもＦｃ部のＣ末端に結合させることが望ましいという可能性もある。理由は、Ｆｃ部のＣ末端への結合により本発明の抗原結合タンパク質との関連で、これらのｄＡｂを二量体化させると思われるためである。

【０１２８】

本発明の抗原結合タンパク質は、単一抗原に特異的な抗原結合性部位を含んでもよく、２つ以上の抗原または単一抗原上の２つ以上のエピトープに対し特異的な抗原結合性部位を有してもよく、また、抗原結合性部位のそれぞれが同じまたは異なる抗原上の別々のエピトープに対し特異的であってもよい。

【０１２９】

特に、本発明の抗原結合タンパク質は、ＨＧＦおよびＶＥＧＦに関連する疾患、例えば、血管新生を必要とする、またはＨＧＦ（ＨＧＦ／Ｍｅｔシグナリング）および／またはＶＥＧＦの上昇したレベルと関連すると考えられる固形腫瘍を治療するのに有用であり得る。そのような腫瘍としては、結腸，乳房，卵巣，肺（小細胞または非小細胞），前立腺，膵臓，腎臓，肝臓，胃，頭頸部，メラノーマ，肉腫が挙げられる。原発性および二次性（転移性）脳腫瘍もまた含まれ、グリオーマ（上衣腫を含む），髄膜腫，オリゴデンドローマ，アストロサイトーマ（低悪性度，未分化および多形神経膠芽腫），髄芽腫，神経節腫，シュワン腫および脊索腫が挙げられるが、それらに限定されない。本発明の抗原結合タンパク質を用いた治療に好適な望ましくない血管新生と関連する他の疾患としては、加齢性黄斑変性病，糖尿病性網膜症，ＲＡおよび乾癬が挙げられる。

【０１３０】

本発明の抗原結合タンパク質は、本発明の抗原結合タンパク質のためのコード配列を含む発現ベクターを有する宿主細胞の形質移入により産生可能である。発現ベクターまたは組換えプラスミドは、宿主細胞に対する複製および発現、および／または分泌を制御できる通常の制御配列の操作環境にこれらのコード配列を置くことにより産生可能である。調節配列には、プロモータ配列，例えば、ＣＭＶプロモータ，および他の既知抗体から得られたシグナル配列が含まれる。同様にして、相補的抗原結合タンパク質の軽鎖または重鎖をコードしたＤＮＡ塩基配列を有する第２の発現ベクターを産生できる。特定の実施形態では、この第２の発現ベクターは、コード配列と選択可能なマーカーに関することを除いて第１の発現ベクターに同じにして、各ポリペプチド鎖が機能的に発現していることを可能な限り確実にする。あるいは、抗原結合タンパク質のための重鎖と軽鎖コード配列を単

一のベクター上に、例えば、同じベクター中に２つの発現カセットに入れて、置いてもよい。

【０１３１】

選択された宿主細胞は、第１と第２のベクターの両方を使って通常の技術により同時形質移入され（または、単純に単一のベクターで形質移入され）、組換えまたは合成軽鎖と重鎖の両方を含む本発明の形質移入した宿主細胞が作られる。この形質移入した細胞は、次に通常の技術により培養され本発明の操作された抗原結合タンパク質が産生される。組換え重鎖および／または軽鎖の会合を含む抗原結合タンパク質はアッセイ、例えば、ＥＬＩＳＡやＲＩＡ、により培養物からスクリーニングされる。同様の通常の技術を採用して、他の抗原結合タンパク質を構築することが可能である。

【０１３２】

本方法で採用されたクローニングおよびサブクローニングステップのための適切なベクター、および、本発明の組成物の作成は当業者により選択されうる。例えば、通常のクローニングベクターのｐＵＣシリーズを使用可能である。１つのベクター、ｐＵＣ１９、は市販品で、Ａｍｅｒｓｈａｍ（バッキンガムシャー州，英国）またはＰｈａｒｍａｃｉａ（ウプサラ、スウェーデン）、等のサプライハウスから入手可能である。さらに、容易に複製可能で、多くのクローニングサイトと選択可能な遺伝子（例えば、抗生物質耐性）を有し、容易に操作できる、いずれのベクターもクローニングの目的に使用可能である。従って、クローニングベクターの選択は本発明における制約因子ではない。

【０１３３】

また、発現ベクターを、異種のＤＮＡ塩基配列の発現、例えば哺乳動物のジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子（ＤＨＦＲ）、を増幅するための適切な遺伝子により特徴づけることができる。他のベクター配列には、ポリＡシグナル配列、例えば、ウシ成長ホルモン（ＢＧＨ）由来の配列、およびβ‐グロビンプロモータ配列（ｂｅｔａｇｌｏｐｒｏ）が含まれる。本明細書で使える発現ベクターは、当業者にはよく知られた技術により合成してもよい。

【０１３４】

このようなベクターの構成要素、例えば、レプリコン，選択遺伝子，エンハンサー，プロモータ，シグナル配列、等、は市販または天然の入手源から入手してもよく、また、選択宿主中の組換えＤＮＡの生成物の発現および／または分泌の誘導に使用される既知手順により合成してもよい。哺乳動物、細菌、昆虫、酵母、および真菌の発現に関する技術分野で既知の多くのタイプがある他の適切な発現ベクターもこの目的に選択してもよい。

【０１３５】

また、本発明は、本発明の抗原結合タンパク質のコード配列を含む組換えプラスミドを形質移入された細胞株を包含する。これらクローニングベクターのクローニングと他の操作に有用な宿主細胞もまた従来からあるものである。しかし、種々の大腸菌株由来の細胞は、本発明の抗原結合タンパク質作成におけるクローニングベクターや他のステップの複製に使うことができる。

【０１３６】

本発明の抗原結合タンパク質の発現のための適切な宿主細胞または細胞株には、哺乳動物細胞、例えば、ＮＳ０，Ｓｐ２／０，ＣＨＯ（例えば、ＤＧ４４），ＣＯＳ，ＨＥＫ，繊維芽細胞（例えば、３Ｔ３），および骨髄細胞、例えば、これはＣＨＯまたは骨髄細胞中で発現してもよい、が含まれる。ヒト細胞を使って、分子をグリコシレーションパターンで修飾させてもよい。あるいは、他の真核細胞株を採用してもよい。哺乳動物宿主細胞の選択および形質転換，培養，増幅，スクリーニングと生成物産生および精製の方法は、当業者には既知である。例えば、前述のSambrook et alを参照。

【０１３７】

細菌細胞は、組換えＦａｂの発現のため、または本発明の他の実施形態のために適切な宿主細胞として有用であり得る（例えば、Pluckthun，A.，Immunol．Rev.，130:151-188(1992)参照）。しかし、細菌細胞で発現したタンパク質は、折り畳まれていないまたは不

適切に折り畳まれた形式または非グリコシル化形式になる傾向があるため，細菌細胞中で産生されたいずれの組換えＦａｂも抗原結合能力の保持の観点でスクリーニングしなければならなくなる。細菌細胞で発現された分子が正しく折り畳まれた形式で産生された場合は、その細菌細胞は望ましい宿主となるだろう。あるいは、別の実施形態で、分子が細菌宿主中で発現され、引き続き再折り畳みされることが可能である。例えば、発現に使われる種々の大腸菌株は、バイオテクノロジーの分野で宿主細胞としてよく知られている。種々の枯草菌、ストレプトマイセス，他の桿菌等の株もまたこの方法に採用できる。

【０１３８】

所望の場合は、当業者に既知の酵母細胞株もまた、昆虫細胞、例えば、ショウジョウバエと鱗翅類、およびウイルス発現システムと同様に、宿主細胞として入手可能である。例えば、Miller et al., Genetic Engineering, 8:277-298, Plenum Press (1986)、および本明細書に引用の文献を参照のこと。

【０１３９】

ベクターが作成される一般的な方法、本発明の宿主細胞を産生するために必要な形質移入方法、およびこのような宿主細胞から本発明の抗原結合タンパク質を産生するために必要な培養方法、は全て従来からの技術であってもよい。典型的には，本発明の培養方法は無血清培養方法で，通常細胞を無血清懸濁液中で培養する。同様に、本発明の抗原結合タンパク質を一度産生した後、細胞培養内容物を当分野の標準的手法、例えば、硫安塩析法，アフィニティーカラム，カラムクロマトグラフイー，ゲル電気泳動法、等、により精製してもよい。このような技術は、当該分野の技術の範囲内にあり本発明を制限するものではない。例えば、改変抗体の調製に関しては、WO 99/58679 および WO 96/16990に記載されている。

【０１４０】

抗原結合タンパク質のさらに別の発現法では、トランスジェニック動物中での発現を使用してもよい。この例は、U.S. Patent No.4,873,316に記載されている。これは、動物カゼインプロモータを使った発現システムであり、このプロモータは、遺伝子導入で哺乳動物に取り込んだ場合、雌のミルク中に所望の組換えタンパク質を産生させる。

【０１４１】

本発明のさらなる態様では、本発明の抗体を産生する方法を提供し、この方法は本発明の抗体の軽鎖および／または重鎖をコードしたベクターで形質転換または形質移入した宿主細胞を培養し、これにより産生された抗体を回収するステップを含む。

【０１４２】

本発明に従って、本発明の抗原結合タンパク質を産生する方法が提供され、この方法は、

（ａ）抗原結合タンパク質の重鎖をコードした第１のベクターを提供するステップと；

（ｂ）抗原結合タンパク質の軽鎖をコードした第２のベクターを提供するステップと；

（ｃ）哺乳動物宿主細胞（例えば、ＣＨＯ）を前記第１と第２のベクターで形質転換するステップと；

（ｄ）抗原結合タンパク質を前記宿主細胞から前記培地へ分泌を促す条件下で、ステップ（ｃ）の宿主細胞を培養するステップと；

（ｅ）分泌されたステップ（ｄ）の抗原結合タンパク質を回収するステップと、

を含む。

【０１４３】

所望の方法で発現された後、抗原結合タンパク質のインビトロ活性を適切なアッセイにより調査する。現在よく使われるＥＬＩＳＡアッセイ方式を採用し、標的に対する抗原結合タンパク質の定性および定量評価を行う。さらに、他のインビトロアッセイを使って、通常のクリアランス機序にも関わらす体の中に残留している抗原結合タンパク質を評価するため実施されるヒトの臨床試験の前に中和性能を確認する。

【０１４４】
治療の用量と持続時間は、ヒトの循環系における本発明の分子の相対的持続時間に関係し、治療条件と患者の全体的健康状態に依存して当業者により調節可能である。最大の治療効果を得るためには、長期間にわたる（例えば、４～６ヶ月間）反復投薬（例えば、週一回または２週間に一回）が、必要となる可能性があることが想定される。
【０１４５】
本発明の治療薬の投与方法は、宿主に薬剤を送達する任意の適切なルートであってよい。本発明の抗原結合タンパク質，および医薬品組成物は、非経口投与、すなわち、皮下（ｓ．ｃ．），髄腔内，腹腔内，筋肉内（ｉ．ｍ．），静脈内（ｉ．ｖ．），または鼻腔内の投与に特に有用である。
【０１４６】
本発明の治療薬は、有効量の本発明の抗原結合タンパク質を製薬上許容可能なキャリア中の有効成分として含む医薬品組成物として調製されてもよい。本発明の予防薬としては、抗原結合タンパク質を含む水性懸濁液または水溶液は、生理的ｐＨに緩衝され注射の準備ができた形としてもよい。非経口投与用組成物は、通常、本発明の抗原結合タンパク質の溶液、または製薬上許容可能なキャリア、例えば水性キャリア、に溶解したそのカクテルを含む。種々の水性キャリアは、例えば、０．９％食塩水，０．３％グリシン，等を用いてもよい。これらの溶液は、無菌状態で、通常、粒子状物質の無い状態にされる。これらの溶液は、通常のよく知られた滅菌技術（例えば、濾過）により無菌にされる。組成物は、適切な生理学的条件に必要とされる、例えば、ｐＨ調節剤および緩衝剤等のような製薬上許容可能な補助物質を含んでもよい。このような製剤処方での本発明の抗原結合タンパク質の濃度は、広く変動可能で、すなわち、重量％で約０．５％未満から，通常、約１％または少なくとも約１％、そして１５～２０％までになり、また、選択された具体的な投与方法に従って流体容量，粘性、等に基づき一次的に選択される。
【０１４７】
従って、本発明の筋肉内注射用医薬品組成物は、１ｍＬの無菌緩衝水、および約１ｎｇ～約２００ｍｇ、例えば、約５０ｎｇ～約３０ｍｇ、または、約５ｍｇ～約２５ｍｇの本発明の抗原結合タンパク質を含むように調製され得る。同様に、本発明の点滴静注用医薬品組成物は、約２５０ｍｌの無菌リンゲル液，および約１～約３０ｍｇ、または約５ｍｇ～約２５ｍｇの１ｍｌ当たりのリンゲル液中の本発明の抗原結合タンパク質を含むように調製され得る。非経口投与組成物を調製する実際の方法は既知で、当業者には明らかであり、さらに詳細は、例えば、Remington's Pharmaceutical Science，15th ed.，Mack Publishing Company，イーストン，ペンシルベニア州、に記載されている。本発明の静脈内投与可能な抗原結合タンパク質製剤の調製については、Lasmar U and Parkins D “The formulation of Biopharmaceutical products”，Pharma. Sci. Tech. today，page 129-137，Vol.3 (3rd April 2000)，Wang，W “Instability，stabilisation and formulation of liquid protein pharmaceuticals”，Int. J. Pharm 185 (1999) 129-188，Stability of Protein Pharmaceuticals Part A and B ed Ahern T.J.，Manning M. C.，New York，NY: Plenum Press (1992)，Akers，M. J.“Excipient-Drug interactions in Parenteral Formulations”，J. Pharm Sci 91 (2002) 2283-2300，Imamura，K et al “Effects of types of sugar on stabilization of Protein in the dried state”，J Pharm Sci 92 (2003) 266-274,Izutsu，Kkojima，S.“Excipient crystalinity and its protein-structure-stabilizing effect during freeze-drying”，J Pharm. Pharmacol，54 (2002) 1033-1039，Johnson，R，“Mannitol-sucrose mixtures-versatile formulations for protein lyophilization”，J. Pharm. Sci，91 (2002) 914-922，Ha，E Wang W，Wang Y. j. “Peroxide formation in polysorbate 80 and protein stability”，J. Pharm Sci，91，2252-2264,(2002)、を参照のこと。この全内容は参照により本明細書に組み込まれ、具体的に参照される。
【０１４８】
一実施形態では、医薬品として用いる場合、本発明の治療薬はユニット剤形として存在

する。適切な治療有効量は当業者には容易に決定可能である。適切な用量は患者の体重により計算され、例えば、０．０１～２０ｍｇ／ｋｇ，例えば０．１～２０ｍｇ／ｋｇ，例えば１～２０ｍｇ／ｋｇ，例えば１０～２０ｍｇ／ｋｇまたは例えば１～１５ｍｇ／ｋｇ，例えば１０～１５ｍｇ／ｋｇの範囲であってもよい。本発明の有効ヒト治療条件の使用に関して、適切な用量は０．０１～１０００ｍｇ，例えば０．１～１０００ｍｇ，例えば０．１～５００ｍｇ，例えば５００ｍｇ，例えば０．１～１００ｍｇ，または０．１～８０ｍｇ，または０．１～６０ｍｇ，または０．１～４０ｍｇ，または例えば１～１００ｍｇ，または１～５０ｍｇ，の範囲内の本発明の抗原結合タンパク質であってもよく、これらは非経口、例えば、皮下、静脈内、または筋肉内投与できる。このような用量は、必要なら、医師により選択された適切な時間間隔で反復してもよい。

【０１４９】

本明細書記載の抗原結合タンパク質は、貯蔵のための冷凍乾燥が可能で、使用に先立ち適切なキャリア中で再構成できる。この技術は、通常の免疫グロブリンで有効であることが示され、既知技術の凍結乾燥と再構成技術を用いることができる。

【０１５０】

当技術分野で既知のいくつかの方法を使って本発明に使われるエピトープ結合ドメインを見つけることが可能である。

【０１５１】

用語「ライブラリ」は、ポリペプチドまたは核酸の不均一混合物を指す。ライブラリは、それぞれ単一ポリペプチドまたは核酸配列を有するメンバーからなる。この点で、「ライブラリ」は「レパートリー」と同義である。ライブラリメンバー間の配列の差異は、ライブラリ中に存在する多様性の原因である。ライブラリはポリペプチドまたは核酸の単純な混合物の形を取ってもよく、また、核酸のライブラリで形質転換された生命体または細胞の形、例えば、細菌、ウイルス、動物、または植物、等の形であってもよい。一実施例では、それぞれの生命体または細胞は１つのみまたは限られた数のライブラリメンバーを含む。都合のいいことに、核酸によってコードされたポリペプチドを発現させるために核酸が発現ベクターの中に組み込まれる。一態様では、従って、ライブラリは宿主生物の集合体の形を取ることができ、各生命体は、発現して対応するポリペプチドメンバーを産生することが可能な核酸型の単一ライブラリメンバーを含んだ１つまたは複数の発現ベクターのコピーを含む。従って、この宿主生物の集合体は多様なポリペプチドの大きなレパートリーをコードする可能性を有している。

【０１５２】

「ユニバーサルフレームワーク」は、Ｋａｂａｔの定義（“Sequences of Proteins of Immunological Interest”，米国保健社会福祉省）の配列中に保存された抗体領域に対応する単一抗体フレームワーク配列、またはＣｈｏｔｈｉａとＬｅｓｋの定義（Chothia and Lesk, (1987) J. Mol. Biol. 196:910-917）によるヒト生殖細胞系列免疫グロブリンレパートリーまたは構造に対応する単一抗体フレームワーク配列である。これは、単一フレームワークでも、これらのフレームワークの集合体であってもよく、たとえ高頻度可変領域にのみある変異だったにしても、実質的にいかなる結合特異性の誘導も許容することが認められてきた。

【０１５３】

本明細書で定義されたアミノ酸およびヌクレオチド配列の整合性と相同性，類似性または同一性は、一実施形態中で調製され、デフォルトのパラメーターを使ってＢＬＡＳＴ２Ｓｅｑｕｅｎｃｅアルゴリズムにより測定されている(Tatusova, T. A. et al., FEMS Microbiol Lett, 174:187-188 (1999))。

【０１５４】

ディスプレイシステム（例えば、核酸のコード化機能、および、核酸によりコードされたペプチドまたはポリペプチドの機能特性とリンクしたディスプレイシステム）が、本明細書記載の方法中で、例えば、ｄＡｂまたは他のエピトープ結合ドメインの選択において、使われた場合、選択されたペプチドまたはポリペプチドをコードした核酸のコピー数を

増幅するまたは増やすことは、好都合なことが多い。これは、本明細書記載の方法や他の適切な方法を使って追加のラウンドのために、あるいは、追加のレパートリー（例えば、親和性成熟レパートリー）を調製するために、十分な量の核酸および／またはペプチドまたはポリペプチドを得る効率的な手段を提供する。従って、一部の実施形態では、エピトープ結合ドメイン選択方法は、ディスプレイシステム（例えば、ファージディスプレイのような、核酸のコーディング機能および核酸によりコードされたペプチドまたはポリペプチドの機能特性とリンクしたディスプレイ）の使用を含み、選択されたペプチドまたはポリペプチドをコードした核酸のコピー数を増幅するまたは増やすことをさらに含む。核酸は、任意の適切な方法、例えば、ファージ増幅，細胞増殖またはポリメラーゼ連鎖反応、を使って増幅可能である。

【０１５５】

一実施例では、この方法は核酸のコーディング機能および核酸によりコードされたポリペプチドの物理的、化学的、および／または機能的特性にリンクしたディスプレイシステムを用いる。このようなディスプレイシステムは、複数の複写可能な遺伝子パッケージ（ｇｅｎｅｔｉｃ　ｐａｃｋａｇｅ）、例えば、バクテリオファージまたは細胞（細菌）、を含むことができる。ディスプレイシステムは、ライブラリ、例えば、バクテリオファージディスプレイライブラリ、を含んでもよい。バクテリオファージディスプレイはディスプレイシステムの一例である。

【０１５６】

多くの適切なバクテリオファージディスプレイシステム（例えば、一価のディスプレイおよび多価のディスプレイシステム）が記載されてきた（例えばGriffiths et al., U.S. Patent No. 6,555,313 B1（参照により本明細書に組み込まれる）；Johnson et al., U.S. Patent No. 5,733,743 （参照により本明細書に組み込まれる）； McCafferty et al., U.S. Patent No. 5,969,108 （参照により本明細書に組み込まれる）； Mulligan-Kehoe, U.S. Patent No. 5,702,892 （参照により本明細書に組み込まれる）； Winter, G. et al., Annu. Rev. Immunol. 12:433-455 (1994); Soumillion, P. et al., Appl. Biochem. Biotechnol. 47(2-3):175-189 (1994); Castagnoli, L. et al., Comb. Chem. High Throughput Screen, 4(2):121-133 (2001)、参照)。バクテリオファージディスプレイシステムで提示されたペプチドまたはポリペプチドは、いずれの適切なバクテリオファージ、例えば、線状ファージ（例えば、ｆｄ，Ｍ１３，Ｆ１），溶菌ファージ（例えば、Ｔ４，Ｔ７，ラムダ），またはＲＮＡファージ（例えば、ＭＳ２）、上にも提示可能である。

【０１５７】

通常、適切なファージコートタンパク質（例えば、ｆｄ　ｐＩＩＩタンパク質）との融合タンパク質としてペプチドまたはファージポリポリペプチドのレパートリーを提示するファージライブラリは、産生されるか提供される。融合タンパク質は、ペプチドまたはポリペプチドファージコートタンパク質の先端、または所望なら内部の位置、にペプチドまたはポリペプチドを提示できる。例えば、提示されたペプチドまたはポリペプチドは、ｐＩＩＩのアミノ末端からドメイン１まで存在可能である（ｐＩＩＩのドメイン１はＮ１とも呼ばれる）。提示されたポリペプチドは、直接ｐＩＩＩに（例えば、ｐＩＩＩのドメイン１のＮ末端）またはリンカーを使ってｐＩＩＩに融合可能である。所望なら，融合体はタグ（例えば、ｍｙｃエピトープ，Ｈｉｓタグ）をさらに含むこともできる。ファージコートタンパク質との融合タンパク質として提示されたペプチドまたはポリペプチドのレパートリーを含むライブラリは、任意の適切な方法を用いて産生可能である。例えば、提示されたペプチドまたはポリペプチドをコードしたファージベクターライブラリやファージミドベクターを、適切な宿主細菌中に導入し、生成した細菌を培養してファージを産生する（例えば、適切なヘルパーファージを使って、または必要ならプラスミドを補完して）。ファージライブラリは、培養物から任意の適切な方法、例えば、沈降法および遠心分離法、により回収可能である。

【０１５８】

ディスプレイシステムは任意の所望量の多様性を含むペプチドまたはポリペプチドのレ

パートリーを含むこともできる。例えば、このレパートリーは生命体、生命体のグループ、所望組織または所望細胞型、により発現された天然のポリペプチドに対応するアミノ酸配列を有するペプチドまたはポリペプチドを含むことも、または、無秩序のまたは無秩序化されたアミノ酸配列を有するペプチドまたはポリペプチドを含むこともできる。希望するなら、このポリペプチドは、共通のコアまたはスキャフォールドを共有することができる。例えば、レパートリーまたはライブラリ中の全ポリペプチドが、プロテインＡ，プロテインＬ，プロテインＧ，フィブロネクチンドメイン，アンチカリン（Ａｎｔｉｃａｌｉｎ），ＣＴＬＡ４，所望の酵素（例えば、ポリメラーゼ，セルラーゼ），または免疫グロブリンスーパーファミリー由来のポリペプチド，例えば、抗体または抗体断片（例えば、抗体可変ドメイン）から選択されたスキャフォールドをベースにすることも可能である。このようなレパートリーやライブラリ中のポリペプチドは、無秩序または無秩序化されたアミノ酸配列の規定領域および共通アミノ酸配列の領域を含むことができる。特定の実施形態では、レパートリー中の全てまたは実質的に全てのポリペプチドが所望のタイプ、例えば、所望の酵素（例えば、ポリメラーゼ）または所望の抗体の抗原結合性断片（例えば、ヒトV_HまたはヒトV_L）、である。一部の実施形態では、ポリペプチドディスプレイシステムはポリペプチドのレパートリーを含み、その中の各ポリペプチドは抗体可変ドメインを含む。例えば、レパートリー中の各ポリペプチドはV_H，V_LまたはＦｖ（例えば、単鎖Ｆｖ）を含んでもよい。

【０１５９】

アミノ酸配列の多様性を、任意の適切な方法を使って、ペプチドまたはポリペプチドまたはスキャフォールドの任意の所望の領域に導入可能である。例えば、アミノ酸配列の多様性を、標的部位、例えば、任意の適切な変異誘発性（例えば、低忠実性ＰＣＲ，オリゴヌクレオチド媒介または部位特異的変異，ＮＮＫコドンを使った多様化）または任意の他の適切な方法を使って、多様化ポリペプチドをコードした核酸ライブラリを調製することにより、抗体可変ドメインの相補性決定領域または疎水性ドメイン、に導入可能である。所望なら、多様化すべきポリペプチドの領域を無秩序化できる。レパートリーを構成するポリペプチドのサイズは、概して選択できる問題であり、均一なポリペプチドサイズは必要ではない。レパートリー中のポリペプチドは、少なくとも三次構造（少なくとも１つのドメインを形成する）を有することができる。

【０１６０】

選択／単離／回収

エピトープ結合ドメインまたはドメインの集合体は、適切な方法を使って、レパートリーまたはライブラリ（例えば、ディスプレイシステム中の）から選択、単離、および／または回収可能である。例えば，ドメインは選択可能な特性（例えば、物理的特性，化学的特性，機能特性）に基づいて選択または単離される。適切な選択可能な特性には、レパートリー中のペプチドまたはポリペプチドの生物活性，例えば，一般的リガンド（例えば、スーパー抗原）に対する結合性，標的リガンド（例えば、抗原，エピトープ，基質）に対する結合性，抗体に対する結合性（例えば、ペプチドまたはポリペプチド上に発現したエピトープ経由），および触媒能力が含まれる（例えば、Tomlinson et al., WO 99/20749; WO 01/57065; WO 99/58655参照）。

【０１６１】

一部の実施形態では、実質的に全てのドメインが共通の選択可能特性を共有するペプチドまたはポリペプチドのライブラリまたはレパートリーからプロテアーゼ耐性ペプチドまたはポリペプチドが選択および／または単離される。例えば、ドメインを、実質的に全てのドメインに共通の一般的リガンドに結合する，共通の標的リガンドに結合する，共通の抗体に結合する（または結合される），または共通の触媒能力を有するライブラリまたはレパートリーから選択することができる。この選択のタイプは、所望の生物活性を有する親のペプチドまたはポリペプチドに基づいたレパートリーまたはドメインを調製する際、例えば、免疫グロブリン単一可変ドメインの親和性成熟を行う場合、に特に有用である。

【０１６２】

共通の一般的リガンドに対する結合性に基づいた選択では、元のライブラリまたはレパートリーの成分である全てまたは実質的に全てのドメイを含むドメインのコレクションまたは集合体が得られる。例えば，標的リガンドまたは一般的リガンドに結合しているドメイン、例えばプロテインＡ，プロテインＬまたは抗体は、パニングまたは適切な親和性マトリックスを使って選択、単離、および／または回収ができる。パニングは、リガンド（例えば、一般的リガンド，標的リガンド）の溶液を適切な容器（例えば、チューブ，ペトリ皿）に加え、リガンドを容器の壁表面上に沈着または被覆させることにより成し遂げられる。過剰リガンドを洗い流し、ドメインを容器に加え、この容器をペプチドまたはポリペプチドが固定化したリガンドと結合するための適切な条件下で維持する。非結合ドメインは、洗い流され、結合ドメインは、任意の適切な方法、例えば、削り取りやｐＨを下げることによって回収できる。

【０１６３】

適切なリガンド親和性マトリックスは、通常、固体担体またはビーズ（例えば、アガロース）を含み、これに対しリガンドが共有結合的または非共有結合的に連結される。

【０１６４】

親和性マトリックスは、ドメインがマトリックス上のリガンドに結合するための適切な条件下、バッチプロセス，カラムプロセスまたは任意の他の適切なプロセスを使って、ペプチドまたはポリペプチド（例えば、プロテアーゼとインキュベートされたレパートリー）と結合させることができる。親和性マトリックスと結合しないドメインを洗い流すことができ、結合したドメインを、低ｐＨバッファー，マイルドな変性剤（例えば、尿素）、またはリガンドとの結合で競合するペプチドまたはドメインで溶出、等の任意の適切な方法で溶出し、回収する。一実施例では、ビオチン化した標的リガンドは、レパートリー中のドメインが標的リガンドに結合するために適切な条件下、レパートリーと結合する。結合ドメインは、固定化したアビジンストレプトアビジン（例えば、ビーズ上の）を使って回収される。

【０１６５】

一部の実施形態では、一般的または標的リガンドは、抗体またはその抗体の抗原結合性断片である。ライブラリまたはレパートリーのペプチドまたはポリペプチド中で実質的に保存されたペプチドまたはポリペプチドの構造的特徴と結合する抗体または抗原結合断片は、特に一般的リガンドとして有用である。プロテアーゼ耐性ペプチドまたはポリペプチドの単離，選択および／または回収のためのリガンドとしての使用に適切な抗体と抗原結合性断片は、モノクローナルまたはポリクローナルであってもよく、任意の適切な方法で調製できる。

【０１６６】

ライブラリ／レパートリー

プロテアーゼエピトープ結合ドメインをコードする、および／または、これを含むライブラリは、任意の適切な方法を使って調製または入手可能である。ライブラリは、目的のドメインまたはスキャフォールド（例えば、ライブラリから選択されたドメイン）に基づくドメインをコードするように設計することも、または、本明細書記載の方法を使って別のライブラリから選択することも可能である。例えば，ドメインが豊富なライブラリは、適切なポリペプチドディスプレイシステムを使って調整可能である。

【０１６７】

所望のタイプのドメインのレパートリーをコードしたライブラリは、任意の適切な方法を使って容易に産生可能である。例えば，所望のタイプのポリペプチド（例えば、免疫グロブリン可変ドメイン）をコードした核酸配列を得ることができ、それぞれが１つまたは複数の変異を含む核酸のコレクションが調製できる。例えば、エラープローンポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）システムを使って核酸を増幅することにより、化学的変異誘発により(Deng et al., J. Biol. Chem., 269:9533 (1994))、または細菌突然変異誘発株を使って(Low et al., J. Mol. Biol., 260:359 (1996)) 調整可能である。

【０１６８】

他の実施形態では、核酸の特定の領域を多様化の標的にすることができる。

【０１６９】

選択位置を変異させる方法も当業者にはよく知られており、これには、例えば、ＰＣＲを使う場合または使わない場合の、不適正なオリゴヌクレオチドまたは変性オリゴヌクレオチドの使用が含まれる。例えば，合成抗体ライブラリは、抗原結合ループに対する変異を標的にして作られてきた。無秩序または半無秩序抗体Ｈ３およびＬ３領域を、生殖細胞系列免疫グロブリンＶ遺伝子セグメントに付加して、変異フレームワーク領域を有する大ライブラリが構築されている(Hoogenboom and Winter (1992) supra; Nissim et al. (1994) supra; Griffiths et al. (1994) supra; DeKruif et al. (1995) supra)。このような多様化は、拡張され、一部または全ての他の抗原結合ループを含むまでになっている(Crameri et al. (1996) Nature Med., 2:100; Riechmann et al. (1995) Bio/Technology, 13:475; Morphosys, WO 97/08320, supra)。他の実施形態では、核酸の特定の領域を多様化の標的にでき、例えば，２段階ＰＣＲ戦略では１回目のＰＣＲ生成物を「メガプライマー（ｍｅｇａ－ｐｒｉｍｅｒ）」として用いる(例えば、Landt, O. et al., Gene 96:125-128 (1990)参照)。標的の多様化は、例えば、ＳＯＥ ＰＣＲを使っても達成できる(例えば、Horton, R.M. et al., Gene 77:61-68 (1989) 参照)。

【０１７０】

選択位置での配列多様性は、ポリペプチドの配列を特定するコード配列を変え、多くのアミノ酸（例えば２０全部またはそのサブセット）をその位置に組み込むことにより得ることができる。ＩＵＰＡＣ命名法を使って説明するが、最も用途の広いコドンは、ＮＮＫであり、これはＴＡＧ停止コドンと同様に全アミノ酸をコードする。ＮＮＫコドンは、必要な多様性を導入するために使用可能である。同じ目的を有する他のコドンＮＮＮも使用でき、これは追加の停止コドンＴＧＡとＴＡＡを作り出す。このような標的化手法は、標的領域中の全配列空間を調査対象にすることができる。

【０１７１】

一部のライブラリは、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーであるドメイン（例えば、抗体またはその一部）を含む。例えば、ライブラリは既知の主鎖構造を有するドメインを含むことができる。（例えば、Tomlinson et al.,WO99/20749参照）。ライブラリは適切なプラスミドまたはベクター中で調製できる。本明細書で使われるベクターは、異種のＤＮＡを細胞の中に導入し、それの発現および／または複製をするために使われる離散した要素を指す。任意の適切なベクターを使うことができ、これにはプラスミド（例えば、細菌性プラスミド），ウイルスまたはバクテリオファージベクター、人工染色体、およびエピソームベクターが含まれる。このようなベクターは、単純クローニングおよび突然変異生成のために使うことができ、または、発現ベクターライブラリの発現を促進するために使うことができる。ベクターおよびプラスミドは、通常１つまたは複数のクローニング部位（例えば、ポリリンカー）、複製開始点、および少なくとも１つの選択可能なマーカー遺伝子を含む。発現ベクターは、ポリペプチドの転写と翻訳促進エレメント、例えば、エンハンサー，プロモータ，転写終結信号，シグナル配列，等をさらに含むことができる。これらのエレメントは、このような発現ベクターが、発現に適切な条件下維持された場合（例えば、適切な宿主細胞中で）、ポリペプチドが発現し、産生されるようにポリペプチドをコードしたクローン化挿入断片に作動可能なようにリンクされた状態に配置することが可能である。

【０１７２】

クローニングおよび発現ベクターは、通常、１つまたは複数の選択宿主細胞中でベクターに複製させる核酸配列を含む。典型的には、クローニングベクター中では，この配列は、ベクターに宿主染色体ＤＮＡとは独立に複製させ、複製開始点または自己複製配列を含む配列である。このような配列は、種々の細菌、酵母およびウイルスでよく知られている。プラスミドｐＢＲ３２２由来の複製開始点は、大抵のグラム陰性細菌に対し適切で、２ミクロンプラスミド開始点は、酵母に適切であり、また種々のウイルス開始点（例えば、ＳＶ４０，アデノウイルス）は、哺乳動物細胞中に入れるクローニングベクターに有用で

ある。これらがコス細胞のような高レベル複製が可能な哺乳動物細胞で使われるのでなければ、通常、複製開始点は哺乳類の発現ベクターには必要でない。

【０１７３】

クローニングまたは発現ベクターは、選択可能マーカーとも呼ばれる選択遺伝子を含むことができる。このようなマーカー遺伝子は、選択培養培地中で成長した形質転換宿主細胞の生存または成長に必要なタンパク質をコードしている。従って、選択遺伝子を含むベクターで形質転換されなかった宿主細胞は、その倍地中で生存しないことになる。典型的な選択遺伝子は、抗生物質と他の毒素、例えば、アンピシリン，ネオマイシン，メトトレキサートまたはテトラサイクリン，に耐性を付与し、栄養要求性欠如を補完し，または成長培地中で得られない重要な栄養素を補給する、タンパク質をコードしている。

【０１７４】

適切な発現ベクターは多くの要素を含むことができる。例えば、複製開始点，選択可能マーカー遺伝子，１つまたは複数の発現調節エレメント，例えば、転写調節エレメント（例えば、プロモータ，エンハンサー，ターミネーター）および／または１つまたは複数の翻訳信号，シグナル配列またはリーダー配列，等を含むことができる。発現調節エレメントおよび信号またはリーダー配列は、もしあれば、ベクターまたは他のソースから供給を受けることができる。例えば，抗体鎖をコードしたクローン化核酸の転写および／または翻訳調節配列は、直接発現に使用可能である。

【０１７５】

プロモータは、所望の宿主細胞中の発現のために組み込んでもよい。プロモータは、構成的であっても誘導可能であってもよい。例えば，プロモータは、核酸の転写を命令するように、抗体、抗体鎖またはその一部をコードした核酸に作動可能なようにリンクされてもよい。種々の適切な原核生物用プロモータ（例えば、β－ラクタマーゼおよびラクトースプロモータシステム，アルカリフォスファターゼ，トリプトファン（ｔｒｐ）プロモータシステム，大腸菌用のｌａｃ，Ｔ３，Ｔ７プロモータ）および真核生物（例えば、シミアンウイルス４０初期または後期プロモータ，ラウス肉腫ウイルス末端反復配列プロモータ，サイトメガロウイルスプロモータ，アデノウイルス後期プロモータ，ＥＧ－１ａプロモータ）宿主が入手可能である。

【０１７６】

さらに、発現ベクターは、通常、ベクターを保持している宿主細胞の選択に用いる選択可能マーカー，および，複製可能な発現ベクターの場合には、複製開始点を含む。抗生物質または薬剤耐性を付与する産物をコードした遺伝子は、共通の選択可能マーカーであり、原核生物（例えば、β－ラクタマーゼ遺伝子（アンピシリン耐性），テトラサイクリン耐性用Ｔｅｔ遺伝子）および真核細胞（例えば、ネオマイシン（Ｇ４１８またはジェネテシン），ｇｐｔ（ミコフェノール酸），アンピシリン，またはヒグロマイシン耐性遺伝子）で使用可能である。ジヒドロ葉還元酵素標識遺伝子は、種々の宿主中でメトトレキサートにより選択を可能にする。宿主の栄養要求性マーカーの遺伝子産物をコードした遺伝子（例えば、ＬＥＵ２，ＵＲＡ３，ＨＩＳ３）は、酵母中の選択マーカーとして使われることが多い。ウイルス（例えば、バキュロウイルス）またはファージベクター，および宿主細胞のゲノムに統合可能なベクター，例えば、レトロウイルスベクター、の使用もまた意図されている。

【０１７７】

原核生物（例えば、大腸菌等の細菌細胞）または哺乳動物細胞中での発現に適切な発現ベクターには、例えば，ｐＥＴベクター（例えば、ｐＥＴ－１２ａ，ｐＥＴ－３６，ｐＥＴ－３７，ｐＥＴ－３９，ｐＥＴ－４０，Ｎｏｖａｇｅｎ他），ファージベクトル（例えば、ｐＣＡＮＴＡＢ５Ｅ，Ｐｈａｒｍａｃｉａ），ｐＲＩＴ２Ｔ（プロテインＡ融合ベクター，Ｐｈａｒｍａｃｉａ），ｐＣＤＭ８，ｐＣＤＮＡ１．１／ａｍｐ，ｐｃＤＮＡ３．１，ｐＲｃ／ＲＳＶ，ｐＥＦ－１（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ），ｐＣＭＶ－ＳＣＲＩＰＴ，ｐＦＢ，ｐＳＧ５，ｐＸＴ１ (Stratagene, La Jolla, CA), pCDEF3 (Goldman, L.A., et al., Biotechniques, 21:1013-1015 (1996)), ｐＳＶＳＰＯ

ＲＴ（Ｇｉｂｃｏ ＢＲＬ，Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤ），ｐＥＦ－Ｂｏｓ(Mizushima, S., et al., Nucleic Acids Res., 18:5322 (1990)) 等、が挙げられる。種々の発現宿主，例えば、原核細胞（大腸菌），昆虫細胞（ショウジョウバエＳｃｈｎｉｅｄｅｒ Ｓ２細胞，Ｓｆ９），酵母（Ｐ．ｍｅｔｈａｎｏｌｉｃａ，Ｐ．ｐａｓｔｏｒｉｓ，Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）および哺乳動物細胞（例えば、コス細胞）での使用に適切な発現ベクターが入手可能である。

【０１７８】

ベクターの一部の実施例は、ポリペプチドライブラリメンバーに相当するヌクレオチド配列の発現を可能とする発現ベクターである。従って、一般的および／または標的リガンドによる選択は、ポリペプチドライブラリメンバーを発現する単一クローンの別々の増殖と発現により行われる。上述のように、具体的な選択ディスプレイシステムは、バクテリオファージディスプレイである。従って、ファージまたはファージミドベクターは使用可能である。例えば、ベクターは大腸菌複製開始点（二本鎖複製用）および、ファージ複製起点（一本鎖ＤＮＡの産生用）を有するファージミドベクターであってもよい。このようなベクターの操作および発現は、当業者にはよく知られている (Hoogenboom and Winter (1992) supra; Nissim et al. (1994) supra)。簡単に述べれば、ベクターは、ファージミドおよび発現カセット上流のラックプロモータに選択性を付与するβ－ラクタマーゼ遺伝子を含むことができる。この遺伝子は、適切なリーダー配列，多重クローニング部位，１つまたは複数のペプチドタグ，１つまたは複数のＴＡＧ停止コドンおよびファージタンパク質ｐＩＩＩを含むことができる。従って、大腸菌の種々の抑制因子および非抑制因子株を使って、また、グルコース，イソ－プロピルチオ－β－Ｄガラクトシド（ｉｓｏ－ｐｒｏｐｙｌｔｈｉｏ－β－Ｄ－ｇａｌａｃｔｏｓｉｄｅ）（ＩＰＴＧ）またはＶＣＳＭ１３等のヘルパーファージを添加して、ベクターは、発現のないプラスミドとして複製することができ、大量のポリペプチドライブラリメンバーのみ、または産物ファージ（この内の一部はポリペプチド－ｐＩＩＩ融合体で、その表面に少なくとも１つのコピーを含む）、を産生することができる。抗体可変ドメインは、標的リガンド結合部位および／または一般的リガンド結合部位を含んでもよい。特定の実施形態では、一般的リガンド結合部位は、プロテインＡ，プロテインＬまたはプロテインＧ等のスーパー抗原のための結合部位である。可変ドメインは、任意の所望の可変ドメイン，例えば、ヒトＶＨ（例えば、V_H１ａ，V_H１ｂ，V_H２，V_H３，V_H４，V_H５，V_H６），ヒトＶλ（例えば、Ｖλｌ，Ｖλｌｌ，Ｖλｌｌｌ，ＶλｌＶ，ＶλＶ，ＶλＶＩまたはＶκ１）またはヒトＶＫ（例えば、Ｖκ２，Ｖκ３，Ｖκ４，Ｖκ５，Ｖκ６，Ｖκ７，Ｖκ８，Ｖκ９またはＶκ１０）に基づくものであってもよい。

【０１７９】

またさらなる技術カテゴリーには、レパートリーの人工区分への選別が含まれ、これは遺伝子とその遺伝子産物との結びつきを利用する。例えば，所望の遺伝子産物をコードした核酸が、油中水乳剤を使って形成されたマイクロカプセル中で選択可能となる選択システムが、WO99/02671, WO00/40712 および Tawfik & Griffiths (1998) Nature Biotechnol 16(7), 652-6に記載されている。所望の活性を有する遺伝子産物をコードした遺伝因子がマイクロカプセル中に区分けされ、次に、転写、および／または翻訳されてそれぞれの遺伝子産物（ＲＮＡまたはタンパク質）をマイクロカプセル内に産生する。引き続き、所望の活性を有する遺伝子産物を産生する遺伝子因子が選別される。この手法によって、種々の方法で所望の活性を検出することにより目的の遺伝子産物を選択できる。

【０１８０】

エピトープ結合ドメインの解析

ＥＬＩＳＡを含む当業者に周知の方法によって、ドメインのその特異的抗原又はエピトープに対する結合を試験することができる。一例として、結合は、モノクローナル抗体を用いたＥＬＩＳＡを用いて試験される。

【０１８１】

ファージＥＬＩＳＡは、任意の適切な手順に従い実施することができ：例示的なプロト

コルを下記に記載する。

【０１８２】

それぞれの回の選別で生産したファージの集団を、「ポリクローナル」ファージ抗体を同定するために、選択した抗原又はエピトープに対する結合によりＥＬＩＳＡによってスクリーニングすることができる。これら集団由来の、単一の感染させたバクテリアのコロニーからのファージをその後、「モノクローナル」ファージ抗体を同定するためにＥＬＩＳＡによってスクリーニングすることができる。抗原又はエピトープに結合する可溶性抗体断片のスクリーニングもまた所望され、これもまた、例えばＣ－又はＮ－末端タグに対する試薬を用いたＥＬＩＳＡによって実施することができる（例えばＷｉｎｔｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ １２，４３３～５５及びそこで引用された文献を参照のこと）。

【０１８３】

ＰＣＲ産物のゲル電気泳動（Ｍａｒｋｓ ｅｔ ａｌ．１９９１，上記；Ｎｉｓｓｉｍ ｅｔ ａｌ．１９９４，上記）、プロービング（Ｔｏｍｌｉｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，１９９２ Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２７，７７６）又はベクターＤＮＡのシークエンスにより、選択したファージモノクローナル抗体の多様性を評価することができる。

【０１８４】

ｄＡｂの構造

ｄＡｂが、本明細書に記載したファージディスプレイ技術に用いるために選択したＶ遺伝子レパートリーから選択される場合には、これらの可変ドメインは普遍的なフレームワーク領域を含み、そのため、本明細書で定義したような特定の一般的リガンドによって認識されるようになる可能性がある。普遍的なフレームワーク、一般的リガンドなどの使用については国際公開第９９／２０７４９に記載されている。

【０１８５】

Ｖ遺伝子レパートリーが使用される場合には、ポリペプチド配列における多様性が可変ドメインの構造的ループ内に局在する場合もある。それぞれの可変ドメインとその相補対との相互作用を高めるために、ＤＮＡシャッフリング又は変異生成によって、いずれの可変ドメインのポリペプチド配列をも変化させてもよい。ＤＮＡシャッフリングは当業者に周知であり、かつ、例えばＳｔｅｍｍｅｒ，１９９４，Ｎａｔｕｒｅ，３７０：３８９～３９１及び米国特許第６，２９７，０５３号に記載され、この両方は引用することにより本明細書に組み入れられる。突然変異生成のその他の方法もまた当業者に周知である。

【０１８６】

ｄＡｂ構築物作成における使用のためのスキャフォールド

ｉ．主鎖構造の選択

免疫グロブリンスーパーファミリーの全てのメンバーは、ポリペプチド鎖については類似した折り畳み部分を共有する。例えば、抗体はそれらの一次配列に関しては高度に多様化しているが、配列の比較及び結晶学的な構造は予想に反して、６つの抗体の抗原結合ループのうちの５つ（Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３）が限られた数の主鎖構造、又は標準的な構造をとることを明らかにした（Ｃｈｏｔｈｉａ ａｎｄ Ｌｅｓｋ（１９８７）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，１９６：９０１；Ｃｈｏｔｈｉａ ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｎａｔｕｒｅ，３４２：８７７）。ループ長及び鍵となる残基の解析はさらに、大部分のヒト抗体に見られるＨ１、Ｈ２、Ｌ１、Ｌ２及びＬ３の主鎖構造の予測を可能にした（Ｃｈｏｔｈｉａ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２２７：７９９；Ｔｏｍｌｉｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９９５）ＥＭＢＯ Ｊ．，１４：４６２８；Ｗｉｌｌｉａｍｓ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２６４：２２０）。Ｈ３領域は、（Ｄセグメントの使用により）配列、長さ及び構造においてはより多様であるが、ループ及び抗体フレームワークの鍵となる位置における特定の残基の長さ及び存在又は残基の型に依存して、短いループ長においてはＨ３領域もまた限られた数の主鎖構造を形成する（Ｍａｒｔｉｎ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２６３：８００；Ｓｈｉｒａｉ ｅｔ ａｌ．（１９９６）ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔｅｒｓ，３９９：１

）。

【０１８７】

ｄＡｂはV_Hドメインライブラリ及び／又はV_Lドメインライブラリなどのドメインライブラリから有利に構築される。１つの態様においては、特定のループ長及び鍵となる残基がメンバーの主鎖構造を保証するように選択されてドメインライブラリが設計されることが知られている。都合の良いことに、これらは天然に見られる、上記で議論されたような機能を果たさない可能性を最小限にするための、免疫グロブリンスーパーファミリーの実際の構造である。生殖細胞系Ｖ遺伝子セグメントは、抗体又はＴ細胞受容体ライブラリを構築するための、１つの好適な基礎となるフレームワークとして機能するが、その他の配列もまた役立つ。変異も低頻度で生じ得るが、機能性メンバーの少数が、その機能に影響を及ぼさない程度に変化した主鎖構造を有する可能性がある程度である。

【０１８８】

標準的な構造の理論もまた、リガンドによってコードされる異なる主鎖構造の数の評価、リガンド配列に基づく主鎖構造の予測、及び標準的な構造に影響を及ぼさない多様化のための残基の選択のために役立つ。ヒトV_κドメインにおいては、Ｌ１ループは４つの標準的な構造のうちの１つをとることができ、Ｌ２ループは単一の標準的な構造を有し、ヒトV_κドメインの９０％がＬ３ループにおける５つの標準的な構造のうちの１つをとることができることが知られている（Ｔｏｍｌｉｎｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９９５）上記）；従って、V_κドメインのみにおいては、異なる種類の主鎖構造を作り出すために、異なる標準的な構造が結合することが可能である。V_λドメインがＬ１、Ｌ２及びＬ３ループの異なる種類の標準的な構造をコードするし、V_κ及びV_λドメインがＨ１及びＨ２ループの複数の標準的な構造をコードする任意のV_Hドメインと対合することが可能な場合には、これら５つのループで見られる標準的な構造な組み合わせの数は非常に多くなる。このことは、様々な種類の結合特異性を生産するためには、主鎖構造の多様性の生成が必須である可能性を意味する。しかしながら、予想に反し、見いだされた単一の既知の主鎖構造に基づいて抗体ライブラリを構築することにより、実質的に全ての抗原を標的とするための十分な多様性の生成のためには主鎖構造における多様性は必要とされない。さらに驚くべきことに、単一の主鎖構造はコンセンサス構造である必要もなく、単一の天然に生じる構造を全ライブラリの基礎として用いることが可能である。従って、一つの特定の態様においては、ｄＡｂは単一の既知の主鎖構造を有する。

【０１８９】

選択された単一の主鎖構造が、問題となる免疫グロブリンスーパーファミリータイプの分子間ではありふれたものになってもよい。その構造をとる十分な数の天然に生じる分子が観察される場合、その構造はありふれたものとなる。従って、１つの態様においては、天然に生じる免疫グロブリンドメインのそれぞれの結合ループの異なる主鎖構造は個別に検討され、その後、異なるループにおける所望の主鎖構造の組み合わせを有する、天然に生じる可変ドメインが選択される。何も得られかった場合には、最も近似した等価物を選択することができる。異なるループにおける所望の主鎖構造の組み合わせは、所望の主鎖構造をコードする生殖細胞系遺伝子セグメントを選択することにより作出することができる。一例として、選択した生殖細胞系遺伝子セグメントは、天然にしばしば発現し、特に、それらは全ての天然の生殖細胞系遺伝子セグメント中で最も頻繁に発現するものであってもよい。

【０１９０】

ライブラリの設計においては、６つの抗原結合ループそれぞれの異なる主鎖構造の頻度を個別に検討してもよい。Ｈ１、Ｈ２、Ｌ１、Ｌ２及びＬ３においては、２０％から１００％の範囲で天然に生じる分子の抗原結合ループを構成する、指定された構造が選択される。典型的には、その観察される頻度は３５％を超え（すなわち３５％から１００％の間）、そして理想的には、５０％を超える、又は６５％を超えさえもする。Ｈ３ループの大部分が標準的な構造を有さないため、標準的な構造を示す、それらのループ間でありふれた主鎖構造を選択することが好ましい。ループのそれぞれにおいては、天然のレパートリ

ーにおいて最も頻繁に観察される構造がされに選択される。ヒト抗体においては、それぞれのループにおける、最も一般的な標準的な構造（ＣＳ）は以下の通りである：Ｈ１－ＣＳ１（発現レパートリーの７９％）、Ｈ２－ＣＳ３（４６％）、Ｌ１－$Ｖ_{κ}$のＣＳ２（３９％）、Ｌ２－ＣＳ１（１００％）、Ｌ３－$Ｖ_{κ}$のＣＳ１（３６％）（計算はκ：λ率が７０：３０であるとみなす。Ｈｏｏｄｅｔ ａｌ．（１９６７）Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｓｙｍｐ．Ｑｕａｎｔ．Ｂｉｏｌ．，４８：１３３）。標準的な構造を有するＨ３ループについては、９４番の残基から１０１番の残基である、塩橋を有する７つの残基のＣＤＲ３の長さ（Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ ｉｎｔｅｒｅｓｔ，Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ及びヒト Ｓｅｒｖｉｃｅｓ）が最も一般的であることが見いだされた。ＥＭＢＬデータライブラリには、この構造を形成するために必要とされる長さのＨ３及び鍵となる残基を有するヒト抗体配列が少なくとも１６あり、及びタンパク質データバンク中には、抗体モデリングの基礎として使用可能な少なくとも２つの結晶学的な構造が存在する（２ｃｇｒ及び１ｔｅｔ）。最も頻繁に発現する生殖細胞系遺伝子セグメントの標準的な構造の組み合わせは、$Ｖ_{Ｈ}$セグメント３－２３（ＤＰ－４７）、$Ｊ_{Ｈ}$セグメントＪＨ４ｂ、$Ｖ_{κ}$セグメントＯ２／Ｏ１２（ＤＰＫ９）及び$Ｊ_{κ}$セグメント$Ｊ_{κ}$１である。$Ｖ_{Ｈ}$セグメントＤＰ４５及びＤＰ３８もまた適している。これらのセグメントをさらに、所望の単一の主鎖構造を有するライブラリを構築するための基礎として、組み合わせることによって使用することができる。

【０１９１】

また別の方法としては、単離において、それぞれの結合ループの天然に生じる異なる主鎖構造に基づいて単一の主鎖構造を選択する代わりに、天然に生じる主鎖構造の組み合わせが単一の主鎖構造を選択するための基礎として使用される。抗体の場合には、例えば、任意の２つ、３つ、４つ、５つ、６つの抗原結合ループの天然に生じる標準的な構造の組み合わせを決定することができる。ここで、選択される構造は天然に生じる抗体においてありふれたものであってもよく、かつ、天然のレパートリーにおいて最も頻繁に見られるものであってもよい。従って、ヒト抗体においては、例えば、５つの抗原結合ループであるＨ１、Ｈ２、Ｌ１、Ｌ２及びＬ３の天然の組み合わせについて検討する場合には、最も頻繁にみられる標準的な構造の組み合わせを決定し、その後、単一の主鎖構造を選択するための基礎として、Ｈ３ループにおける最も一般的な構造と組み合わせる。

【０１９２】

標準的な配列の多様化

選択された複数の既知の主鎖構造又は単一の既知の主鎖構造を有することから、構造的及び／又は機能的多様性を有するレパートリーを生成するために、分子の結合部位を多様にすることにより、ｄＡｂを構築することができる。このことは、それらがそれらの構造及び／又それらの機能において十分な多様性を有するように変異が生成され、幅のある活性を提供することができることを意味する。

【０１９３】

所望の多様性は、典型的には、１つ以上の位置において選択した分子を多様化することにより生成される。変化させる位置は、ランダムに選ぶこともでき、又は選択してもよい。多様化はその後、非常に膨大な数の変異を生成する、在住アミノ酸を任意のアミノ酸又は、天然若しくは合成のそのアナログにより置換すること、又は限定数の変異を生成する、在住のアミノ酸を１つ以上の定義されたアミノ酸サブセットにより置換する、ランダム化によって達成できる。

【０１９４】

それらの変異を導入する様々な方法が報告されている。分子をコードする遺伝子中にランダムな突然変異を導入するためには、変異性ＰＣＲ（Ｈａｗｋｉｎｓ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２２６：８８９）、化学的突然変異生成（Ｄｅｎｇ ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２６９：９５３３）又はバクテリアの突然変異誘発遺伝子株（Ｌｏｗ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ

．，２６０：３５９）を用いることができる。選択した位置に変異を導入するための方法も当該分野においては周知であり、これらにはＰＣＲの使用を介した又は介さない、ミスマッチオリゴヌクレオチド又は変性オリゴヌクレオチドの使用が含まれる。例えば、複数の合成抗体ライブラリが抗原結合ループに対するターゲティング突然変異によって作出された。ヒト破傷風トキソイド結合ＦａｂのＨ３領域が、新しい種類の結合特性を作出するためにランダム化された（Ｂａｒｂａｓ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８９：４４５７）。変異のないフレームワーク領域を有する巨大ライブラリを生産するために、Ｈ３及びＬ３領域のランダム化又はセミランダム化が生殖細胞系Ｖ遺伝子セグメントに付加された（Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍ&Ｗｉｎｔｅｒ（１９９２）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２２７：３８１；Ｂａｒｂａｓ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８９：４４５７；Ｎｉｓｓｉｍ ｅｔ ａｌ．（１９９４）ＥＭＢＯＪ．，１３：６９２；Ｇｒｉｆｆｉｔｈｓ ｅｔ ａｌ．（１９９４）ＥＭＢＯＪ．，１３：３２４５；Ｄｅ Ｋｒｕｉｆ ｅｔ ａｌ．（１９９５）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２４８：９７）。それらの変異は、いくつか又は全てのその他の抗原結合ループを含むように拡大された（Ｃｒａｍｅｒｉ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｄ．，２：１００；Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．（１９９５）Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１３：４７５；Ｍｏｒｐｈｏｓｙｓ，国際公開第９７／０８３２０号，上記）。

【０１９５】

ループランダム化はＨ３のみに対しては約10^{15}を超える構造を作出し、その他の５つのループについても類似した数の変異を生成する可能性があるため、全ての可能な組み合わせを発現するライブラリを構築するために現在の形質転換技術を用いること、又は無細胞系を用いることさえも適してはいない。例えば、これまでに構築された最も巨大なライブラリのうちの１つにおいては、この設計のライブラリにおいて可能な多様性のただ１つの画分である、6×10^{10}の異なる抗体が生成された（Ｇｒｉｆｆｉｔｈｓ ｅｔ ａｌ．（１９９４）上記）。

【０１９６】

１つの実施形態においては、分子の所望の機能を作出する又は変化させることに直接含まれるそれらの残基のみが多様化される。多くの分子においては、その機能は標的に結合することであり、さらに、分子の全体のパッキング又は選択した主鎖構造の維持に重要な残基を変化させることを避けるために、多様性は標的結合部位に集中させる必要がある。

【０１９７】

１つの態様においては、抗原結合部位におけるそれらの残基のみが多様化されたｄＡｂライブラリが使用される。これらの残基は特にヒト抗体レパートリーにおいて多様であり、かつ、高品質な抗体／抗原複合体と結合することが知られている。例えば、Ｌ２においては、天然に生じる抗体の５０及び５３番目の位置が変化すると抗原と結合することが観察されることが知られている。反対に、ライブラリにおいては２つが変化したのに対し、標準的な方法では、Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．（１９９１、上記）によって定義された複数の７残基である、相当する相補性決定領域（ＣＤＲ１）における全ての残基を多様化させただろう。このことは、幅のある抗原結合特性を作出するためには、機能的な多様性に関する十分な改良が必要とされることを示す。

【０１９８】

天然においては、抗体の多様性は、ナイーブ初代レパートリーを作出するための生殖細胞系Ｖ、Ｄ及びＪ遺伝子セグメントの体細胞組換え（いわゆる生殖細胞系及び接合多様性）、並びに生じた再構成Ｖ遺伝子の体細胞超変異の、２つの過程の結果である。ヒト抗体配列の解析により、初代レパートリーにおける多様性が抗原結合部位の中心に集中していること、一方で体細胞超変異は初代レパートリーにおいて高度に保存される抗原結合部位の末端の領域にまで多様性を広げることが示された（Ｔｏｍｌｉｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２５６：８１３を参照のこと）。この相補性はおそらく配列間隔を検索するための効果的な方法として発展し、そして明かに抗体に特有で

はあるが、その他のポリペプチドレパートリーに対しても容易に適用することができる。多様化した残基は、標的への結合部位を形成する残基のサブセットである。標的結合部位における異なる（重複を含む）残基のサブセットは、必要に応じて選択の異なる段階において多様化される。

【０１９９】

抗体レパートリーの例においては、初代「ナイーブ」レパートリーは抗原結合部位のいくつかの、しかし全てではない、残基が多様化された場合に作出される。この文脈で本明細書で使用される場合、「ナイーブ」又は「ダミー」という用語は、予め決められた標的を有しない抗体分子を意味する。これらの分子は、多様な抗原刺激に曝されていない胎児及び新生児患者の場合と同様に、免疫多様化を受けていない患者の免疫グロブリン遺伝子によってコードされる分子に類似する。このレパートリーはその後、抗原又はエピトープの種類によって選択される。必要に応じて、さらなる多様性をその後、最初のレパートリーにおいて多様化された領域の外側に導入することができる。この成熟したレパートリーを改変した機能、特異性又は親和性によって選択することができる。

【０２００】

本明細書において記載された配列は、実質的に同一な配列、例えば少なくとも９０％同一な配列、本明細書で記載された配列と例えば少なくとも９１％、又は少なくとも９２％、又は少なくとも９３％、又は少なくとも９４％、又は少なくとも９５％、又は少なくとも９６％、又は少なくとも９７％、又は少なくとも９８％、又は少なくとも９９％同一な配列を含むことを理解されたい。

【０２０１】

核酸については、「実質的な同一性」という用語は、２つの核酸又はその示された配列を、最適にアライン又は比較した場合に、適切なヌクレオチドの挿入又は欠損を含めて、少なくとも約８０％のヌクレオチドが、通常は少なくとも約９０％から９５％、または少なくとも約９８％から９９．５％のヌクレオチドが同一であることを示す。また、実質的な同一性は、選択的なハイブリダイゼーションの条件下でセグメントが相補鎖にハイブリダイズする場合にも存在する。

【０２０２】

ヌクレオチド及びアミノ酸配列については、「同一」という用語は、適切な挿入又は欠損を含めて最適にアライン及び比較した場合の２つの核酸又はアミノ酸配列の同一性の度合いを意味する。また、実質的な同一性は、選択的なハイブリダイゼーションの条件下でＤＮＡセグメントが相補鎖にハイブリダイズする場合にも存在する。

【０２０３】

２つの配列間の同一性のパーセンテージは、その２つの配列を最適にアライメントするために導入することが必要とされるギャップ及びそれぞれのギャップの長さを考慮した、その配列が共有している同一の位置の数の関数である（すなわち、％同一性＝同一の位置の数／全位置の数ｘ１００）。２つの配列間の配列の比較及び同一性のパーセンテージの決定は、以下の限定しない実施例に記載した数学的アルゴリズムを用いて行うことができる。

【０２０４】

２つのヌクレオチド配列間の同一性のパーセンテージは、ＮＷＳｇａｐｄｎａ．ＣＭＰマトリックス並びに４０、５０、６０、７０、又は８０のギャップウェート及び１、２、３、４、５、又は６の長さウェートを使用してＧＣＧソフトウェア中のＧＡＰプログラムを用いて決定することができる。２つのヌクレオチド又はアミノ酸配列間の同一性のパーセンテージもまたＡＬＩＧＮｐｒｏｇｒａｍ（ｖｅｒｓｉｏｎ　２．０）に組み込まれたＥ．Ｍｅｙｅｒｓ及びＷ．Ｍｉｌｌｅｒ（Ｃｏｍｐｕｔ．Ａｐｐｌ．Ｂｉｏｓｃｉ．、４：１１～１７（１９８８））のアルゴリズムを用い、ＰＡＭ１２０ウェート残基表、１２のギャップ長ペナルティ及び４のギャップペナルティを使用して決定することができる。加えて、２つのアミノ酸配列間の同一性のパーセンテージはＧＣＧソフトウェア中のＧＡＰプログラム中に組み込まれたＮｅｅｄｌｅｍａｎ及びＷｕｎｓｃｈ（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉ

ｏｌ．４８：４４４～４５３（１９７０））のアルゴリズムを用い、Ｂｌｏｓｓｕｍ６２マトリックス又はＰＡＭ２５０マトリックスのいずれか及び１６、１４、１２、１０、８、６、又は４のギャップウェートと１、２、３、４、５、又は６の長さウェートを使用して決定することができる。

【０２０５】

一例として、本発明のポリペプチド配列は、配列番号３８によってコードされる参照配列と１００％同一であってもよく、又は同一性のパーセンテージが１００％未満になるような特定の整数までのアミノ酸変異を、参照配列と比較して、含んでいてもよい。それらの変異は、少なくとも１つのアミノ酸欠損、保存置換及び非保存置換を含む置換、又は挿入からなる群より選択される。ここで前記変異は、参照配列若しくは参照配列中の１つ以上の隣接したグループのアミノ酸中に個別に散在して、参照ポリペプチド配列のアミノ－又はカルボキシ－末端又はそれら末端位置の間の任意の位置に生じてもよい。指定された同一性のパーセンテージにおけるアミノ酸変異の数は、配列番号３８によってコードされるポリペプチド配列中のアミノ酸の総数とそれぞれの同一性のパーセンテージの数字上のパーセンテージ（１００で割る）とを掛け、その後、配列番号３８によってコードされるポリペプチド配列中のアミノ酸の数から得られた数値を引くことによって決定する、又は：

【数１】

$$na \leq xa - (xa \bullet y)$$

【０２０６】

であり、

式中ｎａはアミノ酸変異の数、ｘａは配列番号３８によってコードされるポリペプチド配列中のアミノ酸の総数、及びｙは、例えば７０％の場合には０．７０、８０％の場合には０．８０、８５％の場合には０．８５などであり、並びにここでｘａ及びｙの数値がいずれの整数でもない場合には、ｘａから引く前に、最も近い整数まで切り捨てる。

【実施例】

【０２０７】

実施例１－ＨＧＦ／ＶＥＧＦ抗原結合タンパク質の設計および構築

抗ＨＧＦモノクローナル抗体の可変領域をコードするコドン最適化ＤＮＡ配列を構築し、発現ベクターにクローン化させた。可変領域配列を、新規に、ＰＣＲに基づく戦略および重複オリゴヌクレオチドを用いて構築した。ＰＣＲプライマーを、シグナル配列（配列番号３３）を組み込み、哺乳動物発現ベクターにクローン化するために必要とされる制限部位を含むように設計した。Ｈｉｎｄ　ＩＩＩおよびＳｐｅＩ部位を、V_Hドメインをフレームし、ヒトγ１Ｃ領域を単独で、またはＴＶＡＡＰＳＧＳリンカーを介してＣ末端でＶＥＧＦ　ｄＡｂ（配列番号２５）に融合されたヒトγ１Ｃ領域を含む哺乳動物発現ベクターへのクローン化を可能にするように設計した。ＨｉｎｄＩＩＩおよびＢｓｉＷＩ部位を、V_Lドメインをフレームし、ヒトκＣ領域を単独で、またはＴＶＡＡＰＳＧＳリンカーを介してＣ末端でＶＥＧＦ　ｄＡｂ（配列番号２５）に融合されたヒトκＣ領域を含む哺乳動物発現ベクターへのクローン化を可能にするように設計した。

【０２０８】

下記表１は、構築した抗ＨＧＦ　ｍＡｂｓおよび抗ＨＧＦ－ＶＥＧＦ二重特異性抗原結合タンパク質の概要を示す。

【表１】

抗体 ID	別名	説明	ヌクレオチド配列の配列番号	アミノ酸配列の配列番号
BPC2013	2.12.1	抗 HGF 2.12.1 hIgG1FcWT 重鎖	1	2
		抗 HGF 2.12.1 ヒトκ軽鎖	3	4
BPC2014	HE2B8-4	抗 HGF LRMR2B8 hIgG1FcWT 重鎖	5	6
		抗 HGF LRMR2B8 ヒトκ軽鎖	7	8
BPC2015	HuL2G7	抗 HGF HuL2G7 hIgG1FcWT 重鎖	9	10
		抗 HGF HuL2G7 ヒトκ軽鎖	11	12
BPC2021	抗 HGF-VEGF-2.12.1-H-TVAAPSGS-593	抗 HGF-VEGF-2.12.1-H-TVAAPS-593 重鎖	13	14
		抗 HGF 2.12.1 ヒトκ軽鎖	3	4
BPC2022	抗 HGF-VEGF-2.12.1-L-TVAAPSGS-593	抗 HGF-VEGF-2.12.1-L-TVAAPS-593 軽鎖	15	16
		抗 HGF 2.12.1 hIgG1FcWT 重鎖	1	2
BPC2023	抗 HGF-VEGF-HE2B8-4-H-TVAAPSGS-593	抗 HGF-VEGF-LRMR2B8-H-TVAAPS-593 重鎖	17	18
		抗 HGF LRMR2B8 ヒトκ軽鎖	7	8
BPC2024	抗 HGF-VEGF-HE2B8-4-L-TVAAPSGS-593	抗 HGF-VEGF-LRMR2B8-L-TVAAPS-593 軽鎖	19	20
		抗 HGF LRMR2B8 hIgG1FcWT 重鎖	5	6
BPC2025	抗 HGF-VEGF-HuL2G7-H-TVAAPSGS-593	抗 HGF-VEGF-HuL2G7-H-TVAAPS-593 重鎖	21	22
		抗 HGF HuL2G7 ヒトκ軽鎖	11	12
BPC2026	抗 HGF-VEGF-HuL2G7-L-TVAAPSGS-593	抗 HGF-VEGF-HuL2G7-L-TVAAPS-593 軽	23	24
		抗 HGF HuL2G7 hIgG1FcWT 重鎖	9	10

【０２０９】

ＢＰＣ２０１３，ＢＰＣ２０１４，ＢＰＣ２０１５，ＢＰＣ２０２１，ＢＰＣ２０２２，ＢＰＣ２０２３，ＢＰＣ２０２４，ＢＰＣ２０２５，およびＢＰＣ２０２６に対する重鎖および軽鎖をコードしている発現プラスミドを、２９３ｆｅｃｔｉｎ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１２３４７０１９）を用いてＨＥＫ２９３－６Ｅ細胞中に一過的に同時導入した。２４時間後、細胞培養に栄養としてトリプトンを添加し、さらに７２～１２０時間後に細胞を回収した。ある場合には、上清材料を結合アッセイにおいて被験物質として使用した。他の場合には、二重特異性抗原結合タンパク質をプロテインＡカラムを使用して精製し、その後、結合アッセイで試験した。

【０２１０】

実施例２－ヒトＨＧＦ結合ＥＬＩＳＡ

９６ウェル高結合プレートを、５０μｌ／ウェルの１００ｎｇ／ｍＬ組換えヒトＨＧＦ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）でコーティングし、４℃で一晩インキュベートした。その後の工程をすべて室温で実施した。このプレートを０．０５％のＴｗｅｅｎ２０を含むトリス緩衝食塩水で３回洗った。８０μＬのブロッキング溶液（０．０５％のＴｗｅｅｎ２０を含むトリス緩衝食塩水中に１％ＢＳＡ）をそれぞれのウェルに加え、そしてこのプレートを室温で少なくとも１時間インキュベートした。その後、再び洗いの工程を行った。上清または精製抗体を、プレートにわたり、ブロッキング溶液中で連続して希釈した。１時間インキュベートした後、プレートを洗った。ヤギ抗ヒトκ軽鎖特異ペルオキシダーゼ結合抗体（Ｓｉｇｍａ　Ａ７１６４）をブロッキング溶液中で０．７５μｇ／ｍＬに希釈し、そして５０μＬをそれぞれのウェルに加えた。プレートを１時間インキュベートした。再度洗いの工程を行った後、５０μｌのＯＰＤ（ｏ－フェニレンジアミン二塩酸塩）ＳｉｇｍａＦａｓｔ基質溶液をそれぞれのウェルに加え、２５μＬの３Ｍ硫酸を加えることによって反応を停止させた。ＶｅｒｓａＭａｘ　Ｍｉｃｒｏｐｌａｔｅ　Ｒｅａｄｅｒ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ）を利用し、標準的なエンドポンドプロトコールを用いて４９０ｎｍで吸光度を測定した。

【０２１１】

図１は精製ｍＡｂｄａｂを用いたＥＬＩＳＡの結果を示し、そして抗原結合タンパク質およびポジティブコントロール抗体ＢＰＣ２０１３～２０１５およびＢＰＣ２０２１～２０２６が組換えヒトＨＧＦへの結合を示すことを確認する。ネガティブコントロール抗体はＨＧＦに対する結合を示さない。

【０２１２】

実施例３－ヒトＶＥＧＦ結合ＥＬＩＳＡ

９６ウェル高結合プレートを、５０μｌ／ウェルの０．４μｇ／ｍＬヒトＶＥＧＦでコーティングし、４℃で一晩インキュベートした。その後の工程をすべて室温で実施した。このプレートを０．０５％のＴｗｅｅｎ２０を含むトリス緩衝食塩水で３回洗った。８０μＬのブロッキング溶液（０．０５％のＴｗｅｅｎ２０を含むトリス緩衝食塩水中に１％ＢＳＡ）をそれぞれのウェルに加え、そしてこのプレートを室温で少なくとも１時間インキュベートした。その後、再び洗いの工程を行った。上清または精製抗体を、プレートにわたり、ブロッキング溶液中で連続して希釈した。１時間インキュベートした後、プレートを洗った。ヤギ抗ヒトκ軽鎖特異ペルオキシダーゼ結合抗体をブロッキング溶液中で０．７５μｇ／ｍＬに希釈し、そして５０μＬをそれぞれのウェルに加えた。プレートを１時間インキュベートした。再度洗いの工程を行った後、５０μｌのＯＰＤ（ｏ－フェニレンジアミン二塩酸塩）ＳｉｇｍａＦａｓｔ基質溶液をそれぞれのウェルに加え、２５μＬの３Ｍ硫酸を加えることによって反応を停止させた。ＶｅｒｓａＭａｘ　Ｍｉｃｒｏｐｌａｔｅ　Ｒｅａｄｅｒ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ）を利用し、標準的なエンドポンドプロトコールを用いて４９０ｎｍで吸光度を測定した。

【０２１３】

図２はＥＬＩＳＡの結果を示し、そして抗原結合タンパク質およびポジティブコントロール抗体ＢＰＣ２０２１～２０２６がヒトＶＥＧＦへの結合を示すことを確認する。ネガティブアイソタイプ適合コントロール抗体（ＧＲＩＴＳ２６８１６）はＶＥＧＦに対する

結合を示さない。

【０２１４】

実施例４－ヒトＶＥＧＦへの結合の動力学

Ｃ１チップ上の捕捉表面を用いてＢｉａｃｏｒｅ分析を実施した。プロテインＡを捕捉剤として使用し、最初にアミンカップリングによってＣ１バイオセンサチップに結合させた。抗体を固定化表面上に捕捉させ、明確な濃度のヒトＶＥＧＦ（２５６，６４，１６，４，１，０．２５ｎＭ）を、この捕捉表面上に通過させた。捕捉抗体表面上での緩衝液の注入を、二重規準のために使用した。１００ｍＭ水酸化ナトリウムを用い、各ＶＥＧＦ注入後、捕捉表面を再生させ；再生により捕捉抗体を除去したが、その後のサイクルで抗体を捕捉する表面の能力に有意の影響を与えなかった。すべての実行を、２５℃でＨＢＳ－ＥＰ緩衝液を用いて実施した。データをＢｉａｃｏｒｅ　Ｔ１００（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いて作成し、そのソフトウェアに固有の１：１結合モデルにフィッティングさせた。二重特異性抗原結合タンパク質ＢＰＣ２０２１～２０２６は、ヒトＶＥＧＦに対して高い親和性を示しネガティブコントロールＨＧＦ抗体（ＢＰＣ２０１３～２０１５）はヒトＶＥＧＦに対する結合を示さない。

【表２】

ヒトＶＥＧＦへの結合の動力学

	Ka (M-1.s-1)	Kd (s-1)	KD (pM)
BPC2013	結合見られず		
BPC2014	結合見られず		
BPC2015	結合見られず		
BPC2021	3.74E+5	2.85E-5	76
BPC2022	5.74E+5	1.33E-4	232
BPC2023	4.15E+5	6.43E-5	155
BPC2024	4.88E+5	6.75E-5	138
BPC2025	3.89E+5	5.74E-5	148
BPC2026	4.86E+5	5.44E-5	112

【０２１５】

実施例５－ヒトＨＧＦへの結合の動力学

最初にアミンカップリングによってＣＭ５チップ上に固定化させたヒトＨＧＦ（室内で製造）を用いてＢｉａｃｏｒｅ分析を実施した。抗体を、固定化表面上に、規定された濃度（５００，１２５，３１．３，７．８，１．９５，０．４６ｎＭ）で通過させた。ヒトＨＧＦ固定化表面上での緩衝液の注入を、二重規準のために使用した。１００ｍＭリン酸を用いた各抗体注入後に固定化表面を再生させ；再生により結合抗体を除去したが、その後のサイクルで抗体を結合させる表面の能力に有意の影響を与えなかった。すべての実行を、２５℃でＨＢＳ－ＥＰ緩衝液を用いて実施した。データをＢｉａｃｏｒｅ　Ｔ１００（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いて作成し、そのソフトウェアに固有の１：１結合モデルおよび二価被分析物モデルにフィッティングさせた。二重特異性抗原結合試料ＢＰＣ２０２１～２０２６および親ＨＧＦ抗体ＢＰＣ２０１３～２０１５はすべてヒトＨＧＦに対し高い親和性を示す。

【表３】
ヒトＨＧＦへの結合の動力学

	1:1 結合モデル			二価モデル		
	Ka (M-1.s-1)	Kd (s-1)	KD (nM)	Ka (M-1.s-1)	Kd (s-1)	KD (nM)
BPC2013	1.399E+5	1.225E-4	0.88	2.42E+05	2.02E-04	0.83
BPC2014	7.138E+4	1.100E-4	1.54	1.26E+05	2.04E-04	1.62
BPC2015	1.857E+5	8.194E-5	0.44	2.28E+05	1.32E-04	0.58
BPC2021	2.028E+5	1.569E-4	0.77	4.38E+05	2.73E-04	0.62
BPC2022	1.066E+5	1.496E-4	1.40	1.83E+05	2.64E-04	1.44
BPC2023	1.063E+5	1.645E-4	1.55	7.62E+04	2.40E-04	3.15
BPC2024	8.232E+4	1.455E-4	1.77	9.17E+04	2.37E-04	2.58
BPC2025	3.688E+5	1.258E-4	0.34	7.01E+05	1.98E-04	0.28
BPC2026	2.780E+5	1.035E-4	0.37	3.63E+05	1.58E-04	0.44

【０２１６】
実施例６－Ｂｘ－ＰＣ３腫瘍細胞におけるＭＥＴリン酸化（ｐＭＥＴ）へのＨＧＦ／ＶＥＧＦ抗原結合タンパク質の効果
Ｂｘ－ＰＣ３細胞を、Ｃｏｓｔａｒ９６ウェルプレートに、グルタミンおよび１０％ＦＣＳを補充したＲＰＭＩ中１００，０００細胞／ｍｌ（１００００細胞／１００μｌ／ウェル）で播種し、１６時間３７℃／５％CO_2でインキュベートした。細胞を１００μｌＰＢＳで洗浄し、１００μｌＲＰＭＩ無血清培地を添加し、さらに１６時間３７℃／５％CO_2でさらにインキュベートした。試験試料ＢＰＣ２０１５，ＢＰＣ２０２３～ＢＰＣ２０２６またはコントロール（ＢＰＣ１００７＆ＢＰＣ１０２３）を細胞に２組で、３０μｇ／ｍｌまでの様々な濃度で添加した。１５分後、ＨＧＦ（室内）を２００ｎｇ／ｍｌの最終濃度まで３７℃／５％　CO_2で添加した。最後に、培地を除去し、細胞を１００μｌの氷冷ＰＢＳで洗浄し、冷溶解緩衝液（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｌｉｎｇ　Ｐａｔｈ－Ｓｃａｎ　Ｐｈｏｓｐｈｏ－Ｍｅｔ　Ｓａｎｄｗｉｃｈ　ＥＬＩＳＡキット，７３３３により供給）で溶解させた。ＭＥＴリン酸化をＣｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｌｉｎｇ　ｐＭＥＴ　ＥＬＩＳＡを用い、製造者プロトコルに従い（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｌｉｎｇ　Ｐａｔｈ－Ｓｃａｎ　Ｐｈｏｓｐｈｏ－Ｍｅｔ　Ｓａｎｄｗｉｃｈ　ＥＬＩＳＡキット，７３３３）アッセイした。
【０２１７】
図３Ａおよび３Ｂは様々な抗ＨＧＦ／ＶＥＧＦ　ｍＡｂ－ｄＡｂ（ＢＰＣ２０２３～２０２６）および抗ＨＧＦ　ｍＡｂ（ＢＰＣ２０１５）のＢｘ－ＰＣ３細胞におけるＨＧＦ－刺激ＭＥＴリン酸化（ｐＭＥＴ）に対する効果を示す２つの実験を表す。結果により、抗ＨＧＦ　ｍＡｂ（ＢＰＣ２０１５）は、抗ＨＧＦ／ＶＥＧＦ　ｍＡｂ－ｄＡｂ（ＢＰＣ２０２３～２０２６）のように、ＨＧＦ媒介受容体リン酸化を阻害することが確認される。ネガティブコントロール試料ＢＰＣ１００７およびＢＰＣ１０２３は、ＨＧＦ－媒介受容体リン酸化の阻害を示さなかった。
【０２１８】

このアッセイをその後、同じＨＧＦ　ｍＡｂｓおよび抗ＨＧＦ／ＶＥＧＦ　ｍＡｂ－ｄＡｂｓを用いて実施した。アッセイ条件は前の実施と同一とした。抗ＨＧＦ　ｍＡｂｓおよび抗ＨＧＦ／抗ＶＥＧＦ　ｍＡｂｄＡｂはどちらも、ＨＧＦ－媒介ＭＥＴリン酸化を阻害した。ネガティブコントロールは、ＭＥＴリン酸化の阻害に何の効果も有さなかった。ＩＣ５０は、抗体のＭＥＴリン酸化に対する効果を示す。３つの独立した実験からの平均ＩＣ５０を表４に示す。

【表４】

分子	IC50
BPC2013	3.6
BPC2021	6.3
BPC2022	5.4
BPC2014	4.5
BPC2023	6.9
BPC2024	13.3
BPC2015	4.2
BPC2025	3.9
BPC2026	5.7

【０２１９】

このアッセイをその後、ＨＧＦ　ｍＡｂ（ＢＰＣ２０１５）抗不適切／ＶＥＧＦ　ｍＡｂ－ｄＡｂおよび抗ＨＧＦ／ＶＥＧＦ　ｍＡｂ－ｄＡｂ（ＢＰＣ２０２５）（０．０１ｎＭまでの４倍希釈で用量設定された６６７ｎＭから）を用いて実施した。細胞をこれらの試験ｍＡｂ／ｍＡｂｄＡｂと共に１時間のみインキュベートし、４０ｎｇ／ｍｌのＨＧＦを使用し、細胞シグナリングをＭｅｓｏＳｃａｌｅ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ　ｐｌａｔｆｏｒｍ（ＭＳＤ）により測定したことを除き、アッセイ条件は前の実行と同一とした。

【０２２０】

抗ＨＧＦ　ｍＡｂおよび抗ＨＧＦ／抗ＶＥＧＦ　ｍＡｂｄＡｂはどちらも、ＨＧＦ－媒介ＭＥＴリン酸化を用量依存様式で阻害した。コントロールｍＡｂおよび不適切ｍＡｂ－ＶＥＧＦ　ｄＡｂは、ＭＥＴリン酸化の阻害に何の効果も有さなかった。ＩＣ５０は抗体の％ホスホＭＥＴ－（（ｐＭＥＴ生ＭＳＤユニット／総生ＭＥＴユニット）＊１００）に対する効果を示す。ＨＧＦ　ｍＡｂ（ＢＰＣ２０１５）に対する２つの独立した実験からの平均ＩＣ５０は０．４０ｎＭであり、ｍＡｂｄＡｂ（ＢＰＣ２０２５）では０．３４ｎＭであった。

【０２２１】

実施例７

抗原結合タンパク質の化学量論性評価（Ｂｉａｃｏｒｅ（商標）を用いる）

この実施例は予測上のものである。これは本発明の抗原結合タンパク質を試験することができる追加のアッセイを実施するためのガイダンスを提供する。

【０２２２】

抗ヒトＩｇＧを、最初にアミンカップリングによってＣＭ５バイオセンサーチップ上に固定化する。単一の濃度のＨＧＦまたはＶＥＧＦを通過させた後に、抗原結合タンパク質をこの表面上に捕捉する。この濃度は、結合表面及び観察される結合シグナルを最大のＲ－ｍａｘに達するまで飽和させるのに十分な濃度である。化学量をその後、下記の式を用いて算出する：

化学量＝Ｒｍａｘ＊Ｍｗ（リガンド）／Ｍｗ（被分析物）＊Ｒ（固定化又は補足されたリガンド）。

【０２２３】

同時に１つ以上の被分析物の結合について化学量を算出する場合には、飽和抗原濃度の

異なる抗原を順番に通過させ、その後上述の通りに化学量を算出する。この試験はＢｉａｃｏｒｅ３０００を利用し、ＨＢＳ－ＥＰランニングバッファーを用いて２５℃で行うことができる。

【０２２４】

実施例８

Ｍｖ１Ｌｕ増殖アッセイ

ＴＧＦ－βはＭｖ１Ｌｕ細胞増殖を阻害する。これは、ＨＧＦの添加により克服される。よって、このアッセイＨＧＦ中和抗体のＨＧＦ－媒介細胞増殖を阻害する能力を評価する。ＣｅｌｌＴｉｔｅｒＧｌｏ（商標）アッセイは、ＡＴＰ－依存性であり、よって総細胞数に比例する生物発光シグナルを得る。「＋ＴＧＦ－β＋ＨＧＦ」と「＋ＴＧＦ－β－ＨＧＦ」の間の差は、ＨＧＦ－媒介細胞増殖を反映する(J. Immunol Methods 1996, Jan 16, Vol 189 (1); 59-64)

Ｍｖ１Ｌｕ細胞（ＡＴＣＣ）を、４０ｎｇ／ｍｌヒトＨＧＦおよび１ｎｇ／ｍｌ　ＴＧＦ－β（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）が補充された無血清培地でインキュベートした。ＨＧＦを必要に応じてコントロールウェルから除外した。すべての実行を、ＴＧＦβの存在下で実施した。「ＨＧＦ－」で指定されたネガティブコントロール実行を除き、すべての実行をＨＧＦの存在下で実施した。

【０２２５】

抗体またはｍＡｂｄＡｂ構築物を、２．０，１．０，０．５，０．２５，０．１２５，０．０６または０．０３μｇ／ｍｌの最終濃度で添加した。総細胞数を４８時間後発光ＡＴＰ－依存性アッセイを用いて決定した。このアッセイでは、生物発光シグナルは生存細胞数に比例する（ＣｅｌｌＴｉｔｅｒＧｌｏ，Ｐｒｏｍｅｇａ）。すべての条件を３組で試験した。

【０２２６】

図４に示されるデータは、平均＋／－ＳＤとして示され、２つの独立した実験を表す。

【０２２７】

抗ＨＧＦモノクローナル抗体（ＢＰＣ２０１５）は、ＨＧＦ－媒介Ｍｖ１Ｌｕ細胞増殖を、用量依存様式で抑止した。このＨＧＦ－中和能力が、ｍＡｂｄＡｂフォーマットで保持されたことを確認するために、抗ＨＧＦモノクローナル抗体部分および抗ＶＥＧＦｄＡｂ部分を含むｍＡｂｄＡｂ構築物を用いて直接比較を実施した（ＢＰＣ２０２５）。ｍＡｂｄＡｂ構築物を用いた処理では、ＨＧＦ媒介Ｍｖ１Ｌｕ細胞増殖の用量依存抑止が得られ、これは、ｍＡｂ応答プロファイルと区別できなかった（図４ａ）。

【０２２８】

観察された効果がＨＧＦの特異的中和によるものであったことを確認するために、並列実験を、ＢＰＣ２０２５、およびアッセイ－不適切タンパク質を標的とするモノクローナル抗体部分および抗ＶＥＧＦ　ｄＡｂを含む別のｍＡｂｄＡｂ構築物を同一の用量滴定で比較して実施した。抗不適切／ＶＥＧＦ　ｍＡｂｄＡｂの効果は観察されなかった（図４ｂ）。

【０２２９】

データから、抗ＨＧＦ　ｍＡｂは、ＨＧＦ－依存細胞増殖を用量依存様式で抑止し、この活性はｍＡｂｄＡｂフォーマットにおいて保持されることが示される。

【０２３０】

実施例９

ＢｘＰＣ３浸潤アッセイ

細胞浸潤を、Ｏｒｉｓ　Ｃｅｌｌ　Ｉｎｖａｓｉｏｎシステムを用いて評価し、製造者（Ｐｌａｔｙｐｕｓ）により指示されるように実施した。簡単に言うと、１３０，０００ＢｘＰＣ３細胞（ＡＴＣＣ）／ウェルを、細胞外マトリクスでコーティングした９６ウェルプレートに、ウェルプラグの存在下で播種し、環状無細胞領域を生成させた。細胞接着後、プラグを除去し、ウェルを洗浄し、細胞外マトリクスで覆い、三次元細胞環境を提供した。プレートをインキュベートし、マトリクス重合させ、ウェルを、２０ｎｇ／ｍｌヒ

トＨＧＦを含む成長培地（１０％熱失活ウシ胎仔血清，グルタミンおよびペニシリン／ストレプトマイシンを補充したＲＰＭＩ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ））で覆った。ＨＧＦを必要に応じてコントロールウェルから除外した。抗体またはｍＡｂｄＡｂ構築物を、２０，１０，５または２．５μｇ／ｍｌの濃度範囲で添加した。プレートを７２時間インキュベートし、その後画像解析し、残りの無細胞領域の画素面積を定量化した。すべての条件を少なくとも３組で試験した。

【０２３１】

すべてのウェルの画像を獲得し、画像解析にかけ、浸潤の定性的および定量的評価を可能にした。７２時間のインキュベーション後の残りの無細胞領域の定性的比較により、ＢｘＰＣ３細胞のＨＧＦ－依存性浸潤応答は細胞外マトリクス分解および細胞浸潤に起因する無細胞面積および非均一多細胞突起の見かけの減少として現れたことを確認した。図５で示される定量的分析は、ＨＧＦ－未処理ウェルに比べＨＧＦで処理したウェルでの無細胞面積の減少を確認した。図５は、残りの無細胞面積の平均＋／－ＳＤを示し、２つの独立した実験を表す。抗ＨＧＦ　ｍＡｂ（ＢＰＣ２０１５）およびｍＡｂｄＡｂ（ＢＰＣ２０２５）は、アイソタイプコントロールモノクローナル抗体で処理したウェルと比較して、無細胞領域のサイズが保持されることにより示されるように、このアッセイおいて、試験した各濃度で、ＨＧＦ－媒介ＢｘＰＣ３浸潤を抑止した。

【０２３２】

実施例１０

血管新生アッセイ

Ａｎｇｉｏｋｉｔ（商標）は内皮細胞および線維芽細胞の市販の共培養アッセイであり、推定抗血管新生剤の、インビトロでの内皮ネットワーク形成に関連する１つまたは複数のパラメータを阻害する能力を試験するために使用することができる。これらのパラメータは画像解析を用いて定量化され、例えば、総内皮細胞面積（フィールド面積），血管分岐点の数，平均細管長などが挙げられる。

【０２３３】

血管新生共培養アッセイ（Ａｎｇｉｏｋｉｔ（商標））を、製造者（ＴＣＳ　Ｃｅｌｌｗｏｒｋｓ）により指示されるように実施した。簡単に言うと、培地を２４ウェルフォーマットＡｎｇｉｏｋｉｔ（商標）共培養プレートから吸引し、２０ｎｇ／ｍｌのヒトＨＧＦを補充した、または補充していない完全成長培地と置換した。試験化合物を添加し、０．１７μＭの同程度の最終モル濃度の各構築物を達成した。培地および試験化合物を４，７および９日に置換した。細胞を１１日に固定し、内皮細胞ネットワークを、製造者により指示されるように、抗ＣＤ３１免疫細胞化学により可視化した。画像を光学顕微鏡により記録し、画像解析をＡｎｇｉｏＳｙｓソフトウエア（ＴＣＳ　Ｃｅｌｌｗｏｒｋｓ）を用いて実施した。

【０２３４】

様々な血管新生過程に対するＨＧＦ－拮抗作用の効果（ＢＰＣ２０１５）またはアイソタイプコントロールモノクローナル抗体（ｍＡｂネガティブコントロール）を用いた場合。ＨＧＦ　ｍＡｂ（ＢＰＣ２０１５）をその後、同じアッセイにおいて抗ＨＧＳ／抗ＶＥＧＦ　ｍＡｂｄＡｂ（ＢＰＣ２０２５）と同時に実施した。

【０２３５】

図６ａおよびｂで示されるデータは、４つの同型ウェルの平均＋／－ＳＤとして表され、２つの独立した実験を表し、フィールド面積および平均細管長を示す。定性的分析により、抗ＨＧＦ　ｍＡｂまたは抗ＨＧＦ／抗ＶＥＧＦ　ｍＡｂｄＡｂのいずれかを用いた処理により媒介されるＨＧＦ中和により内皮ネットワーク形成の明確な阻害が得られたことが明らかになった。これは、アイソタイプコントロール処理と比較した総フィールド面積及び総細管長を含む血管新生パラメータに対する抗ＨＧＦ　ｍＡｂまたは抗ＨＧＦ／抗ＶＥＧＦ　ｍＡｂｄＡｂによる阻害効果を確認した定量的分析により確認された。

【０２３６】

実施例１１

Ｂｘ－ＰＣ３細胞におけるＡＫＴリン酸化の阻害に対する抗ＨＧＦ　ｍＡｂおよび抗ＨＧＦ／ＶＥＧＦ　ｍＡｂｄＡｂの効果の比較

ｃ－ＭＥＴ受容体のリン酸化を介するシグナル伝達は、そのリガンドＨＧＦの結合により開始される。ＭＥＴリン酸化が起こると、様々なアダプタータンパク質の動員および活性化により２つの主要な細胞シグナリング経路の活性化が起こる。これにより、細胞増殖（ＭＡＰＫ／ＭＥＫ／ＥＲＫ経路）および生存（ＰＩ３キナーゼ／ＡＫＴ経路）の活性化に至る。

【０２３７】

Ｂｘ－ＰＣ３膵臓細胞を、滅菌９６ウェル細胞培養プレートにＲＰＭＩ完全培地中１０，０００細胞／ウェルで蒔き一晩３７℃／５％CO_2で放置した。その後、細胞を２４時間ＲＰＭＩ無血清培地中でインキュベートし、その後、コントロールｍＡｂ，抗ＨＧＦｍＡｂ，抗不適切／ＶＥＧＦｍＡｂ－ｄＡｂまたは抗ＨＧＦ／ＶＥＧＦ　ｍＡｂ－ｄＡｂ（ＢＰＣ２０２５）（０．０１ｎＭまでの４倍希釈で用量設定された６６７ｎＭから）のいずれかを、４０ｎｇ／ｍｌの「室内」ＨＧＦと共に１時間、添加した。細胞を、製造者の指示におけるように、ＭＳＤ溶解緩衝液中で溶解させた。溶解物を凍結し、リン酸化ＡＫＴレベルを、製造者の指示において記載されるように、ＭＳＤ　ｐＡＫＴ／Ｔｏｔａｌ　ＡＫＴアッセイ（カタログ番号Ｋ１１１００Ｄ－２）を用いて評価した。

【０２３８】

抗ＨＧＦ　ｍＡｂおよび抗ＨＧＦ／抗ＶＥＧＦ　ｍＡｂｄＡｂはどちらもＨＧＦ－媒介ＡＫＴリン酸化を用量依存様式で阻害した。コントロールｍＡｂおよび不適切ｍＡｂ－ＶＥＧＦ　ｄＡｂは、ＡＫＴリン酸化の阻害に影響しなかった。ＩＣ５０は、抗体の％ホスホＡＫＴ－（（ｐＡＫＴ生ＭｅｓｏＳｃａｌｅ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙプラットフォーム（ＭＳＤ）ユニット／総生ＡＫＴユニット）＊１００）に対する効果を示す。

【０２３９】

ＨＧＦ　ｍＡｂ（ＢＰＣ２０１５）に対する２つの独立した実験からの平均ＩＣ５０は０．６３ｎＭであり、ｍＡｂｄＡｂ（ＢＰＣ２０２５）では０．８８ｎＭであった。

【０２４０】

実施例１２

Ｂｘ－ＰＣ３細胞におけるＥＲＫリン酸化の阻害に対する抗ＨＧＦ　ｍＡｂおよび抗ＨＧＦ／ＶＥＧＦ　ｍＡｂｄＡｂの効果の比較

このアッセイは、細胞を、ＨＧＦおよび試験ｍＡｂ／ｍＡｂｄＡｂ構築物と、３時間インキュベートしたことを除き、実施例１１で記載したのと同じ方法を用いて実施した。

【０２４１】

リン酸化ＥＲＫ，ＭＡＰＫ／ＭＥＫ経路の下流メンバーのレベルを、製造者の指示に記載されるように、ＭＳＤ　ｐＥＲＫ／Ｔｏｔａｌ　ＥＲＫアッセイ（カタログ番号Ｋ１１１０７Ｄ－２）を用いて評価した。

【０２４２】

抗ＨＧＦ　ｍＡｂおよび抗ＨＧＦ／抗ＶＥＧＦ　ｍＡｂｄＡｂはどちらもＨＧＦ－媒介ＥＲＫリン酸化を用量依存様式で阻害した。コントロールｍＡｂおよび不適切ｍＡｂ－ＶＥＧＦ　ｄＡｂは、ＥＲＫリン酸化の阻害に影響しなかった。ＩＣ５０は、抗体の％ホスホＥＲＫ－（（ｐＥＲＫ生ＭｅｓｏＳｃａｌｅ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙプラットフォーム（ＭＳＤ）ユニット）＊１００）に対する効果を示す。

【０２４３】

ＨＧＦ　ｍＡｂ（ＢＰＣ２０１５）に対する２つの独立した実験からの平均ＩＣ５０は０．９８ｎＭであり、ｍＡｂｄＡｂ（ＢＰＣ２０２５）では０．９２ｎＭであった。

【０２４４】

実施例１３

Ｂｘ－ＰＣ３細胞における細胞遊走の阻害に対する抗ＨＧＦ　ｍＡｂおよび抗ＨＧＦ／ＶＥＧＦ　ｍＡｂｄＡｂの効果の比較

Ａｍｓｂｉｏ（商標）は、滅菌９６ウェル組織培養プレートから構成され、各ウェルに

予め挿入されたシリコーン播種ストッパを有するＯｒｉｓ細胞遊走アッセイを供給する。細胞を添加し、コンフルエンスまで増殖させる。ストッパを除去し、環状無細胞領域を残す。この領域内への細胞遊走をその後、遊走阻害剤または促進剤を添加した後、時間と共にモニタする。

【０２４５】

Ｂｘ－ＰＣ３膵臓細胞を、Ｏｒｉｓ細胞遊走９６ウェルプレートにＲＰＭＩ完全培地中１０，０００細胞／ウェルで蒔き、７２時間コンフルエントになるまでインキュベートした。細胞ストッパを除去し、無細胞領域を得た。その後、細胞を２４時間ＲＰＭＩ無血清培地中でコントロールｍＡｂ，抗ＨＧＦｍＡｂ，抗不適切／ＶＥＧＦｍＡｂまたは抗ＨＧＦ／ＶＥＧＦ　ｍＡｂ－ｄＡｂ（ＢＰＣ２０２５））（０．０１ｎＭまでの４倍希釈で用量設定された６６７ｎＭから）のいずれかと、２５ｎｇ／ｍｌのＨＧＦと共にインキュベートした。無細胞領域への細胞遊走をその後、Ｅｎｖｉｓｉｏｎプレートリーダー上でＣｅｌｌ　Ｔｒａｃｋｅｒ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃｅｌｌ　Ｔｒａｃｋｅｒ（商標）Ｇｒｅｅｎ　ＣＭＦＤＡ　＃Ｃ２９２５）を用いて定量化した。

【０２４６】

ＨＧＦ　ｍＡｂ（ＢＰＣ２０１５）に対する３つの独立した実験からの平均ＩＣ５０は０．３３ｎＭであり、ｍＡｂｄＡｂ（ＢＰＣ２０２５）では０．３２ｎＭであり、ｍＡｂｄＡｂフォーマットは、ＨＧＦ結合部位の活性に影響しなかったことが示された。

【０２４７】

実施例１４－ＶＥＧＦ受容体結合アッセイ

この実施例は予測上のものである。これは本発明の抗原結合タンパク質を試験することができる追加のアッセイを実施するためのガイダンスを提供する。

【０２４８】

この実施例は予測上のものである。これは本発明の抗原結合タンパク質を試験することができる追加のアッセイを実施するためのガイダンスを提供する。このアッセイは、内皮細胞におけるＶＥＧＦ受容体ＶＥＧＦＲ２のＶＥＧＦ－媒介リン酸化およびＶＥＧＦ結合タンパク質のこの過程を阻害する能力を測定する。初代内皮細胞（例えば、ヒト臍帯内皮細胞，Ｌｏｎｚａ）を、ゼラチンコーティングしたプレート上に単層として播種し、一晩完全成長培地（ＥＧＭ－２　Ｂｕｌｌｅｔｋｉｔ，Ｌｏｎｚａ）中でインキュベートする。細胞は約４時間血清不足とし、その後、$VEGF_{165}$（例えば、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｃａｔ　Ｎｏ：２９３－ＶＥ－０５０）または推定ＶＥＧＦ結合タンパク質と共にプレインキュベートした$VEGF_{165}$で処理する。細胞溶解物を２０分後に生成させ、リン酸化ＶＥＧＦＲ２を、適切な方法（例えば、Ｍｅｓｏｓｃａｌｅ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ　Ｃａｔ　Ｎｏ：Ｋ１１１ＤＪＤ－２）を用い、製造者の指示に従い定量化する。

【０２４９】

配列

【表５】

説明（アミノ酸配列）	配列番号：	
	アミノ酸	ＤＮＡ
抗ＨＧＦｍＡｂ２．１２．１重鎖ｈＩｇＧ１	２	１
抗ＨＧＦｍＡｂ２．１２．１軽鎖κ	４	３
抗ＨＧＦｍＡｂＬＲＭＲ２Ｂ８重鎖ｈＩｇＧ１	６	５
抗ＨＧＦｍＡｂＬＲＭＲ２Ｂ８軽鎖κ	８	７
抗ＨＧＦｍＡｂＨｕＬ２Ｇ７重鎖ｈＩｇＧ１	１０	９
抗ＨＧＦｍＡｂＨｕＬ２Ｇ７軽鎖κ	１２	１１
抗ＨＧＦ－ＶＥＧＦ－２．１２．１－Ｈ－ＴＶＡＡＰＳＧＳ－５９３重鎖	１４	１３
抗ＨＧＦ－ＶＥＧＦ－２．１２．１－Ｌ－ＴＶＡＡＰＳＧＳ－５９３軽鎖	１６	１５
抗ＨＧＦ－ＶＥＧＦ－ＬＲＭＲ２Ｂ８－ＴＶＡＡＰＳＧＳ－５９３重鎖	１８	１７
抗ＨＧＦ－ＶＥＧＦ－ＬＲＭＲ２Ｂ８－ＴＶＡＡＰＳＧＳ－５９３軽鎖	２０	１９
抗ＨＧＦ－ＶＥＧＦ－ＨｕＬ２Ｇ７－Ｈ－ＴＶＡＡＰＳＧＳ－５９３重鎖	２２	２１
抗ＨＧＦ－ＶＥＧＦ－ＨｕＬ２Ｇ７－Ｌ－ＴＶＡＡＰＳＧＳ－５９３軽鎖	２４	２３
抗ＶＥＧＦｄＡｂＤＯＭ１５－２６－５９３	２５	
抗ＶＥＧＦアンチカリン	２６	
リンカー	２７	
リンカー	２８	
リンカー	２９	
リンカー	３０	
リンカー	３１	
リンカー	３２	
シグナルペプチド配列	３３	
抗ＶＥＧＦ抗体重鎖	３４	
抗ＶＥＧＦ抗体軽鎖	３５	
抗ＶＥＧＦＲ２アドネクチン	３６	
ヒト化抗ＨＧＦナノボディＨＧＦ１３	３７	
ヒト化抗ＨＧＦナノボディＨＧＦ１３ｈｕｍ５	３８	
他の抗ＶＥＧＦ抗体重鎖	３９	
ＧＳ（ＴＶＡＡＰＳＧＳ）$_1$	４０	

GS（TVAAPSGS）$_2$	41	
GS（TVAAPSGS）$_3$	42	
GS（TVAAPSGS）$_4$	43	
GS（TVAAPSGS）$_5$	44	
GS（TVAAPSGS）$_6$	45	
（PAS）$_1$GS	46	
（PAS）$_2$GS	47	
（PAS）$_3$GS	48	
（G_4S）$_2$	49	
（G_4S）$_3$	50	
（PAVPPP）$_1$GS	51	
（PAVPPP）$_2$GS	52	
（PAVPPP）$_3$GS	53	
（TVSDVP）$_1$GS	54	
（TVSDVP）$_2$GS	55	
（TVSDVP）$_3$GS	56	
（TGLDSP）$_1$GS	57	
（TGLDSP）$_2$GS	58	
（TGLDSP）$_3$GS	59	
PASリンカー	60	
PAVPPPリンカー	61	
TVSDVPリンカー	62	
TGLDSPリンカー	63	
（TVAAPS）$_2$（GS）$_1$	64	
（TVAAPS）$_3$（GS）$_1$	65	

配列番号 1 (抗 HGF mAb 2.12.1 重鎖 hIgG1)

CAGGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCCCGGCCTGGTGAAACCCTCCGAGACCCTGAGCCTGAC
CTGCACCGTGAGCGGCGGCAGCATCAGCATCTACTACTGGAGCTGGATCAGGCAGCCCCCAG
GAAAGGGCCTCGAGTGGATCGGCTACGTGTACTACAGCGGCAGCACCAACTACAACCCCAGC
CTGAAGAGCAGGGTGACCATCAGCGTGGACACCAGCAAGAACCAGTTCAGCCTGAAGCTGAA
CTCTGTCACCGCCGCCGATACCGCCGTGTATTACTGCGCCAGGGGCGGCTACGACTTTTGGA
GCGGCTACTTCGACTACTGGGGCCAGGGAACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAG
GGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCCCT
GGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCC
TGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGC
AGCGTGGTGACCGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCA
CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACA
CCTGCCCCCCCTGCCCTGCCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCC
AAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGT
GAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATG
CCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACC
GTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGCCCT
GCCTGCCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGT
ACACCCTGCCCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTG
AAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAA
CTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGA
CCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCC
CTGCACAATCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

配列番号 2 (抗 HGF mAb 2.12.1 重鎖 hIgG1)

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISIYYWSWIRQPPGKGLEWIGYVYYSGSTNYNPS
LKSRVTISVDTSKNQFSLKLNSVTAADTAVYYCARGGYDFWSGYFDYWGQGTLVTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK

配列番号 3 (抗 HGF mAb 2.12.1 軽鎖 κ)

GAGATCGTGATGACCCAGAGCCCCGCCACCCTGAGCGTGTCCCCCGGCGAGAGGGCCACCCT
GAGCTGCAGGGCCTCTCAGAGCGTGGACAGCAACCTGGCCTGGTACAGGCAGAAGCCCGGAC
AGGCCCCAAGGCTGCTGATCTACGGCGCCAGCACCAGAGCAACCGGCATTCCCGCCAGGTTT
AGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGAGTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGAGCGAGGACTT
CGCCGTCTACTACTGCCAGCAGTACATCAACTGGCCCCCCATCACCTTCGGCCAGGGCACCA
GGCTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGATGAG
CAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGC
CAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCG
AGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGAC

TACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGAC
CAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC

配列番号 4 (抗 HGF mAb 2.12.1 軽鎖 κ)

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVDSNLAWYRQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARF
SGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYINWPPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD
YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号 5 (抗 HGF mAb LRMR2B8 重鎖 hIgG1)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGCCCGGCGCAGAAGTCAAGAAGCCCGGCACTAGCGTGAAGCTGAG
CTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCACCTACTGGATGCACTGGGTGAGGCAGGCCCCCG
GACAGGGACTGGAGTGGATTGGCGAGATCAACCCCACCAACGGCCACACCAACTACAACCAG
AAGTTCCAGGGCAGGGCCACACTGACCGTGGACAAGAGCACCTCCACCGCCTACATGGAACT
GAGCAGCCTGAGGAGCGAGGACACCGCCGTGTATTACTGCGCCAGGAACTACGTGGGCAGCA
TCTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCC
AGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTG
CCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCA
GCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTG
GTGACCGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCC
CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCC
CCCCCTGCCCTGCCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCT
AAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGTGAGCCA
CGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGA
CCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTG
CACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGC
CCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCC
TGCCCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGC
TTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAA
GACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGG
ACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCAC
AATCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

配列番号 6 (抗 HGF mAb LRMR2B8 重鎖 hIgG1)

QVQLVQPGAEVKKPGTSVKLSCKASGYTFTTYWMHWVRQAPGQGLEWIGEINPTNGHTNYNQ
KFQGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNYVGSIFDYWGQGTLVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK

配列番号 7 (抗 HGF mAb LRMR2B8 軽鎖 κ)

GACATCGTGATGACTCAGAGCCCCGACAGCCTGGCTATGTCACTGGGCGAGAGGGTGACCCT
GAACTGCAAGGCCAGCGAGAACGTGGTGAGCTACGTGAGCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCC
AGAGCCCCAAACTCCTGATCTACGGCGCCTCCAACAGGGAGTCTGGCGTCCCCGACAGGTTC
AGCGGCAGCGGAAGCGCCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCGTGCAGGCCGAAGACGT
GGCCGATTACCACTGCGGCCAGAGCTACAACTACCCCTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGC
TGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCAG
CTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAA
GGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGC
AGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTAC
GAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAA
GAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC

配列番号 8 (抗 HGF mAb LRMR2B8 軽鎖 κ)

DIVMTQSPDSLAMSLGERVTLNCKASENVVSYVSWYQQKPGQSPKLLIYGASNRESGVPDRF
SGSGSATDFTLTISSVQAEDVADYHCGQSYNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号 9 (抗 HGF mAb HuL2G7 重鎖 hIgG1)

GAGGTGCAGCTCGTCCAGAGCGGCGCAGAAGTGAAGAAGCCCGGCGCCAGCGTGAAGGTGAG
CTGCAAGGTGAGCGGCTACACCTTCTCCGGCAACTGGATCGAGTGGGTGAGGCAGGCCCCCG
GGAAAGGCCTGGAGTGGATCGGCGAGATCCTGCCCGGCAGCGGCAACACCAACTACAACGAG
AAGTTCAAGGGCAAGGCCACCATGACCGCCGACACCAGCACCGACACCGCCTACATGGAGCT
GAGCAGCCTGAGGAGCGAGGACACCGCTGTGTACTATTGCGCCAGGGGCGGCCACTACTACG
GCAGCTCTTGGGACTACTGGGGACAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAG
GGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCCCT
GGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCC
TGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGC
AGCGTGGTGACCGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCA
CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACA
CCTGCCCCCCCTGCCCTGCCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCC
AAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGT
GAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATG
CCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACC
GTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGCCCT
GCCTGCCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGT
ACACCCTGCCCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTG
AAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAA
CTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGA
CCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCC
CTGCACAATCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

配列番号 10 (抗 HGF mAb HuL2G7 重鎖 hIgG1)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTFSGNWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGSGNTNYNE
KFKGKATMTADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGHYYGSSWDYWGQGTLVTVSSASTK

GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK

配列番号 11 (抗 HGF mAb HuL2G7 軽鎖 κ)

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGATAGGGTCACCAT
CACCTGCAAGGCCAGCGAGAACGTGGTGACCTACGTGAGCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGGA
AGGCCCCCAAACTGCTGATCTACGGCGCCTCCAACCGATACACCGGCGTGCCCGACAGGTTC
AGCGGAAGCGGCAGCGGCACAGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTT
CGCCACCTACTACTGCGGCCAGGGCTACAGCTACCCCTATACCTTCGGCCAGGGCACCAAGC
TCGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCAG
CTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAA
GGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGC
AGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTAC
GAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAA
GAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC

配列番号 12 (抗 HGF mAb HuL2G7 軽鎖 κ)

DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASENVVTYVSWYQQKPGKAPKLLIYGASNRYTGVPDRF
SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGQGYSYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号 13 (抗 HGF-VEGF-2.12.1-H-TVAAPSGS-593 重鎖)

CAGGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCCCGGCCTGGTGAAACCCTCCGAGACCCTGAGCCTGAC
CTGCACCGTGAGCGGCGGCAGCATCAGCATCTACTACTGGAGCTGGATCAGGCAGCCCCCAG
GAAAGGGCCTCGAGTGGATCGGCTACGTGTACTACAGCGGCAGCACCAACTACAACCCCAGC
CTGAAGAGCAGGGTGACCATCAGCGTGGACACCAGCAAGAACCAGTTCAGCCTGAAGCTGAA
CTCTGTCACCGCCGCCGATACCGCCGTGTATTACTGCGCCAGGGGCGGCTACGACTTTTGGA
GCGGCTACTTCGACTACTGGGGCCAGGGAACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAG
GGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCCCT
GGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCC
TGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGC
AGCGTGGTGACCGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCA
CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACA
CCTGCCCCCCCTGCCCTGCCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCC
AAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGT
GAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATG
CCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACC
GTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGCCCT
GCCTGCCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGT
ACACCCTGCCCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTG

AAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAA
CTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGA
CCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCC
CTGCACAATCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAGACCGTGGCCGCCCC
CTCGGGATCCGAGGTGCAGCTCCTGGTCAGCGGCGGCGGCCTGGTCCAGCCCGGAGGCTCAC
TGAGGCTGAGCTGCGCCGCTAGCGGCTTCACCTTCAAGGCCTACCCCATGATGTGGGTCAGG
CAGGCCCCCGGCAAAGGCCTGGAGTGGGTGTCTGAGATCAGCCCCAGCGGCAGCTACACCTA
CTACGCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTCACCATCAGCAGGGACAACAGCAAGAACACCCTGT
ACCTGCAGATGAACTCTCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGGACCCC
AGGAAGCTGGACTATTGGGGCCAGGGCACTCTGGTGACCGTGAGCAGC

配列番号 14 (抗 HGF-VEGF-2.12.1-H-TVAAPSGS-593 重鎖)

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISIYYWSWIRQPPGKGLEWIGYVYYSGSTNYNPS
LKSRVTISVDTSKNQFSLKLNSVTAADTAVYYCARGGYDFWSGYFDYWGQGTLVTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGKTVAAPSGSEVQLLVSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKAYPMMWVR
QAPGKGLEWVSEISPSGSYTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDP
RKLDYWGQGTLVTVSS

配列番号 15 (抗 HGF-VEGF-2.12.1-L-TVAAPSGS-593 軽鎖)

GAGATCGTGATGACCCAGAGCCCCGCCACCCTGAGCGTGTCCCCCGGCGAGAGGGCCACCCT
GAGCTGCAGGGCCTCTCAGAGCGTGGACAGCAACCTGGCCTGGTACAGGCAGAAGCCCGGAC
AGGCCCCAAGGCTGCTGATCTACGGCGCCAGCACCAGAGCAACCGGCATTCCCGCCAGGTTT
AGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGAGTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGAGCGAGGACTT
CGCCGTCTACTACTGCCAGCAGTACATCAACTGGCCCCCCATCACCTTCGGCCAGGGCACCA
GGCTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGATGAG
CAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGC
CAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCG
AGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGAC
TACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGAC
CAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGCACCGTGGCCGCCCCCTCGGGATCCGAGGTGCAGCTCC
TGGTCAGCGGCGGCGGCCTGGTCCAGCCCGGAGGCTCACTGAGGCTGAGCTGCGCCGCTAGC
GGCTTCACCTTCAAGGCCTACCCCATGATGTGGGTCAGGCAGGCCCCCGGCAAAGGCCTGGA
GTGGGTGTCTGAGATCAGCCCCAGCGGCAGCTACACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCA
GGTTCACCATCAGCAGGGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCTCTGAGG
GCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGGACCCCAGGAAGCTGGACTATTGGGGCCA
GGGCACTCTGGTGACCGTGAGCAGC

配列番号 16 (抗 HGF-VEGF-2.12.1-L-TVAAPSGS-593 軽鎖)

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVDSNLAWYRQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARF
SGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYINWPPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD

YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECTVAAPSGSEVQLLVSGGGLVQPGGSLRLSCAAS
GFTFKAYPMMWVRQAPGKGLEWVSEISPSGSYTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR
AEDTAVYYCAKDPRKLDYWGQGTLVTVSS

配列番号 17 (抗 HGF-VEGF-LRMR2B8-TVAAPSGS-593 重鎖)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGCCCGGCGCAGAAGTCAAGAAGCCCGGCACTAGCGTGAAGCTGAG
CTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCACCTACTGGATGCACTGGGTGAGGCAGGCCCCCG
GACAGGGACTGGAGTGGATTGGCGAGATCAACCCCACCAACGGCCACACCAACTACAACCAG
AAGTTCCAGGGCAGGGCCACACTGACCGTGGACAAGAGCACCTCCACCGCCTACATGGAACT
GAGCAGCCTGAGGAGCGAGGACACCGCCGTGTATTACTGCGCCAGGAACTACGTGGGCAGCA
TCTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCC
AGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTG
CCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCA
GCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTG
GTGACCGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCC
CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCC
CCCCCTGCCCTGCCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCT
AAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGTGAGCCA
CGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGA
CCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTG
CACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGC
CCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCC
TGCCCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGC
TTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAA
GACCACCCCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGG
ACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCAC
AATCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAGACCGTGGCCGCCCCCTCGGG
ATCCGAGGTGCAGCTCCTGGTCAGCGGCGGCGGCCTGGTCCAGCCCGGAGGCTCACTGAGGC
TGAGCTGCGCCGCTAGCGGCTTCACCTTCAAGGCCTACCCCATGATGTGGGTCAGGCAGGCC
CCCGGCAAAGGCCTGGAGTGGGTGTCTGAGATCAGCCCCAGCGGCAGCTACACCTACTACGC
CGACAGCGTGAAGGGCAGGTTCACCATCAGCAGGGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGC
AGATGAACTCTCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGGACCCCAGGAAG
CTGGACTATTGGGGCCAGGGCACTCTGGTGACCGTGAGCAGC

配列番号 18 (抗 HGF-VEGF- LRMR2B8-TVAAPSGS-593 重鎖)

QVQLVQPGAEVKKPGTSVKLSCKASGYTFTTYWMHWVRQAPGQGLEWIGEINPTNGHTNYNQ
KFQGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNYVGSIFDYWGQGTLVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGKTVAAPSGSEVQLLVSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKAYPMMWVRQA
PGKGLEWVSEISPSGSYTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPRK
LDYWGQGTLVTVSS

配列番号 19 (抗 HGF-VEGF LRMR2B8-L-TVAAPSGS-593 ヒト κ 軽鎖)

GACATCGTGATGACTCAGAGCCCCGACAGCCTGGCTATGTCACTGGGCGAGAGGGTGACCCT
GAACTGCAAGGCCAGCGAGAACGTGGTGAGCTACGTGAGCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCC
AGAGCCCCAAACTCCTGATCTACGGCGCCTCCAACAGGGAGTCTGGCGTCCCCGACAGGTTC
AGCGGCAGCGGAAGCGCCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCGTGCAGGCCGAAGACGT
GGCCGATTACCACTGCGGCCAGAGCTACAACTACCCCTACACCTTCGGCCAGGGCACCAAGC
TGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCAG
CTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAA
GGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGC
AGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTAC
GAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAA
GAGCTTCAACCGGGGCGAGTGCACCGTGGCCGCCCCCTCGGGATCCGAGGTGCAGCTCCTGG
TCAGCGGCGGCGGCCTGGTCCAGCCCGGAGGCTCACTGAGGCTGAGCTGCGCCGCTAGCGGC
TTCACCTTCAAGGCCTACCCCATGATGTGGGTCAGGCAGGCCCCCGGCAAAGGCCTGGAGTG
GGTGTCTGAGATCAGCCCCAGCGGCAGCTACACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCAGGT
TCACCATCAGCAGGGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCTCTGAGGGCC
GAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGGACCCCAGGAAGCTGGACTATTGGGGCCAGGG
CACTCTGGTGACCGTGAGCAGC

配列番号 20 (抗 HGF-VEGF LRMR2B8-TVAAPSGS-593 ヒト κ 軽鎖)

DIVMTQSPDSLAMSLGERVTLNCKASENVVSYVSWYQQKPGQSPKLLIYGASNRESGVPDRF
SGSGSATDFTLTISSVQAEDVADYHCGQSYNYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECTVAAPSGSEVQLLVSGGGLVQPGGSLRLSCAASG
FTFKAYPMMWVRQAPGKGLEWVSEISPSGSYTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA
EDTAVYYCAKDPRKLDYWGQGTLVTVSS

配列番号 21 (抗 HGF-VEGF-HuL2G7-H-TVAAPSGS-593 重鎖)

GAGGTGCAGCTCGTCCAGAGCGGCGCAGAAGTGAAGAAGCCCGGCGCCAGCGTGAAGGTGAG
CTGCAAGGTGAGCGGCTACACCTTCTCCGGCAACTGGATCGAGTGGGTGAGGCAGGCCCCCG
GGAAAGGCCTGGAGTGGATCGGCGAGATCCTGCCCGGCAGCGGCAACACCAACTACAACGAG
AAGTTCAAGGGCAAGGCCACCATGACCGCCGACACCAGCACCGACACCGCCTACATGGAGCT
GAGCAGCCTGAGGAGCGAGGACACCGCTGTGTACTATTGCGCCAGGGGCGGCCACTACTACG
GCAGCTCTTGGGACTACTGGGGACAGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAG
GGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCCCT
GGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCC
TGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGC
AGCGTGGTGACCGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCA
CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACA
CCTGCCCCCCCCTGCCCTGCCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCC
AAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGT
GAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATG
CCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACC
GTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGTAAGGTGTCCAACAAGGCCCT
GCCTGCCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGT

ACACCCTGCCCCCTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTG
AAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAA
CTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGA
CCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCC
CTGCACAATCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAGACCGTGGCCGCCCC
CTCGGGATCCGAGGTGCAGCTCCTGGTCAGCGGCGGCGGCCTGGTCCAGCCCGGAGGCTCAC
TGAGGCTGAGCTGCGCCGCTAGCGGCTTCACCTTCAAGGCCTACCCCATGATGTGGGTCAGG
CAGGCCCCCGGCAAAGGCCTGGAGTGGGTGTCTGAGATCAGCCCCAGCGGCAGCTACACCTA
CTACGCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTCACCATCAGCAGGGACAACAGCAAGAACACCCTGT
ACCTGCAGATGAACTCTCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGGACCCC
AGGAAGCTGGACTATTGGGGCCAGGGCACTCTGGTGACCGTGAGCAGC

配列番号 22 (抗 HGF-VEGF-HuL2G7-H-TVAAPSGS-593 重鎖)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTFSGNWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGSGNTNYNE
KFKGKATMTADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGHYYGSSWDYWGQGTLVTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGKTVAAPSGSEVQLLVSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKAYPMMWVR
QAPGKGLEWVSEISPSGSYTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDP
RKLDYWGQGTLVTVSS

配列番号 23 (抗 HGF-VEGF-HuL2G7-L-TVAAPSGS-593 軽鎖)

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGATAGGGTCACCAT
CACCTGCAAGGCCAGCGAGAACGTGGTGACCTACGTGAGCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGGA
AGGCCCCCAAACTGCTGATCTACGGCGCCTCCAACCGATACACCGGCGTGCCCGACAGGTTC
AGCGGAAGCGGCAGCGGCACAGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTT
CGCCACCTACTACTGCGGCCAGGGCTACAGCTACCCCTATACCTTCGGCCAGGGCACCAAGC
TCGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCAG
CTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAA
GGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGC
AGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTAC
GAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAA
GAGCTTCAACCGGGGCGAGTGCACCGTGGCCGCCCCCTCGGGATCCGAGGTGCAGCTCCTGG
TCAGCGGCGGCGGCCTGGTCCAGCCCGGAGGCTCACTGAGGCTGAGCTGCGCCGCTAGCGGC
TTCACCTTCAAGGCCTACCCCATGATGTGGGTCAGGCAGGCCCCCGGCAAAGGCCTGGAGTG
GGTGTCTGAGATCAGCCCCAGCGGCAGCTACACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCAGGT
TCACCATCAGCAGGGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCTCTGAGGGCC
GAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGGACCCCAGGAAGCTGGACTATTGGGGCCAGGG
CACTCTGGTGACCGTGAGCAGC

配列番号 **24** (抗 **HGF-VEGF-HuL2G7-L-TVAAPSGS-593** 軽鎖)

DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASENVVTYVSWYQQKPGKAPKLLIYGASNRYTGVPDRF
SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCGQGYSYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECTVAAPSGSEVQLLVSGGGLVQPGGSLRLSCAASG
FTFKAYPMMWVRQAPGKGLEWVSEISPSGSYTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRA
EDTAVYYCAKDPRKLDYWGQGTLVTVSS

配列番号 **25** (抗 **VEGF dAb DOM15-26-593**)
EVQLLVSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKAYPMMWVRQAPGKGLEWVSEISPSGSYTYYAD
SVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDPRKLDYWGQGTLVTVSS

配列番号 **26** (抗 **VEGF** アンチカリン)
DGGGIRRSMSGTWYLKAMTVDREFPEMNLESVTPMTLTLLKGHNLEAKVTMLISGRCQEVKA
VLGRTKERKKYTADGGKHVAYIIPSAVRDHVIFYSEGQLHGKPVRGVKLVGRDPKNNLEALE
DFEKAAGARGLSTESILIPRQSETCSPG

配列番号 **27** (**G4S** リンカー)
GGGGS

配列番号 **28** (リンカー)
TVAAPS

配列番号 **29** (リンカー)
ASTKGPT

配列番号 **30** (リンカー)
ASTKGPS

配列番号 **31** (リンカー)
GS

配列番号 **32** (リンカー)
TVAAPSGS

配列番号 **33** (シグナルペプチド配列例)
MGWSCIILFLVATATGVHS

配列番号 **34** (抗 **VEGF** 抗体重鎖)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAA
DFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDYWGQGTLVTVSSA
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT

CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

配列番号 **35** (抗 **VEGF** 抗体軽鎖)
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号 **36** (抗 **VEGFR2** アドネクチン)
EVVAATPTSLLISWRHPHFPTRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPLQPPTATISGLKPGVDYTI
TVYAVTDGRNGRLLSIPISINYRT

配列番号 **37** (抗 **HGF** ナノボディ **HGF13**)
EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFRSYPMGWFRQAPGKEREFVASITGSGGSTYYAD
SVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRPEDTAVYSCAAYIRPDTYLSRDYRKYDYWGQGTQVTV
SS

配列番号 **38** (ヒト化 抗 **HGF** ナノボディ **HGF13hum5**)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPMGWFRQAPGKGREFVSSITGSGGSTYYAD
SVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAAYIRPDTYLSRDYRKYDYWGQGTLVTV
SS

配列番号 **39** (別の抗 **VEGF** 抗体重鎖)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAA
DFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTLVTVSSA
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

配列番号 **40**
GSTVAAPSGS

配列番号 **41**
GSTVAAPSGSTVAAPSGS

配列番号 **42**
GSTVAAPSGSTVAAPSGSTVAAPSGS

配列番号 **43**
GSTVAAPSGSTVAAPSGSTVAAPSGSTVAAPSGS

配列番号 **44**
GSTVAAPSGSTVAAPSGSTVAAPSGSTVAAPSGSTVAAPSGS

配列番号 **45**

GSTVAAPSGSTVAAPSGSTVAAPSGSTVAAPSGSTVAAPSGSTVAAPSGS

配列番号 46
PASGS

配列番号 47
PASPASGS

配列番号 48
PASPASPASGS

配列番号 49
GGGGSGGGGS

配列番号 50
GGGGSGGGGSGGGGS

配列番号 51
PAVPPPGS

配列番号 52
PAVPPPPAVPPPGS

配列番号 53
PAVPPPPAVPPPPAVPPPGS

配列番号 54
TVSDVPGS

配列番号 55
TVSDVPTVSDVPGS

配列番号 56
TVSDVPTVSDVPTVSDVPGS

配列番号 57
TGLDSPGS

配列番号 58
TGLDSPTGLDSPGS

配列番号 59
TGLDSPTGLDSPTGLDSPGS

配列番号 60
PAS

配列番号 61
PAVPPP

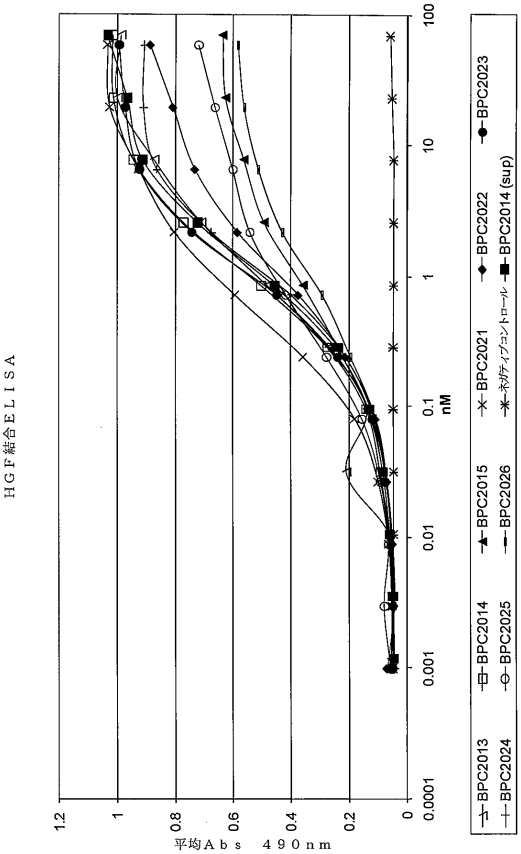
配列番号 62
TVSDVP

配列番号 **63**
TGLDSP

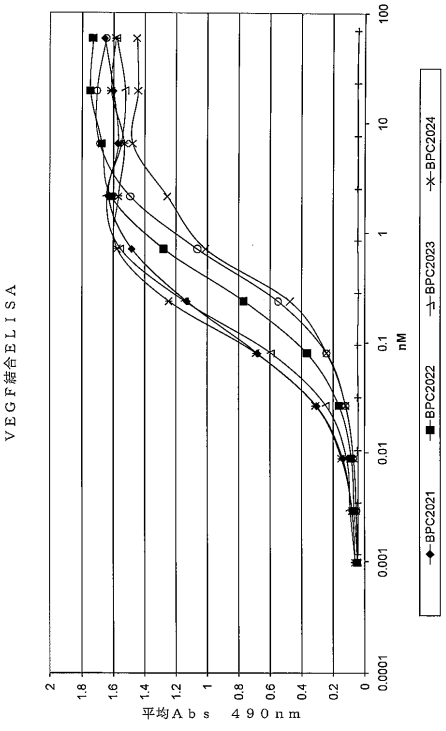
配列番号 **64**
TVAAPSTVAAPSGS

配列番号 **65**
TVAAPSTVAAPSTVAAPSGS

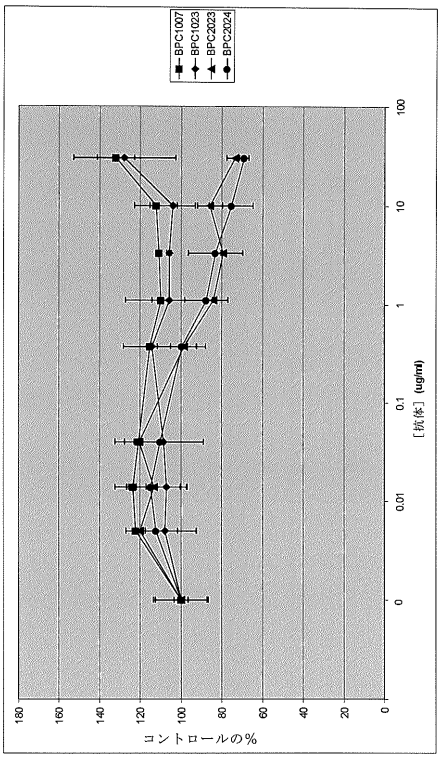
【図１】



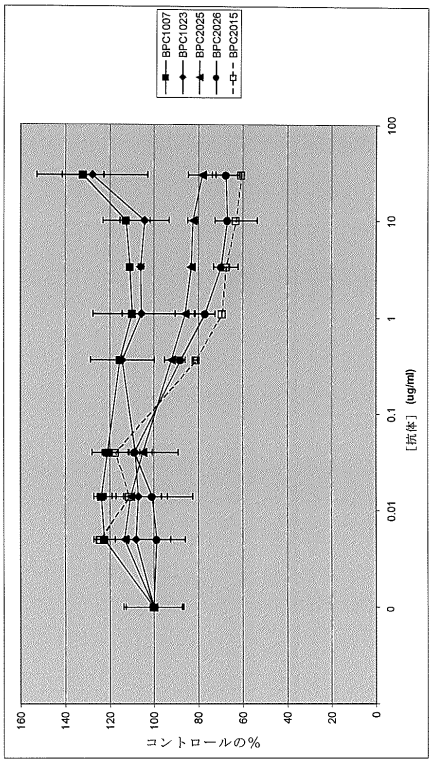
【図２】



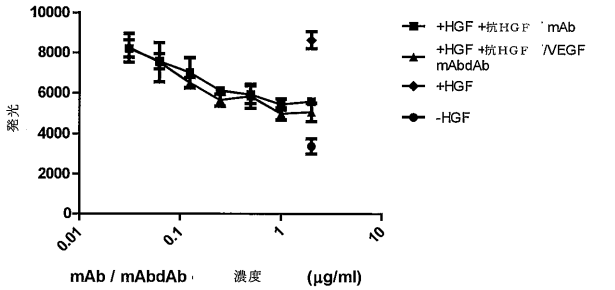
【図３ａ】



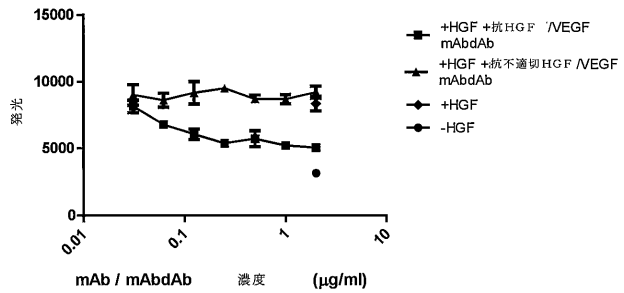
【図３ｂ】



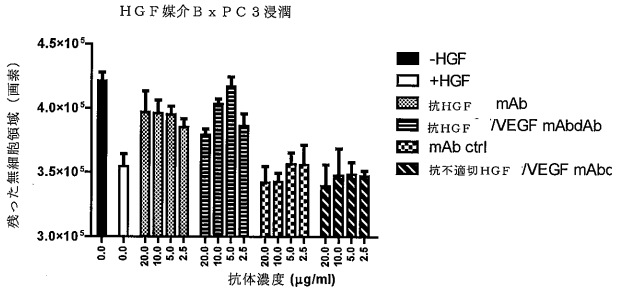
【図４ａ】



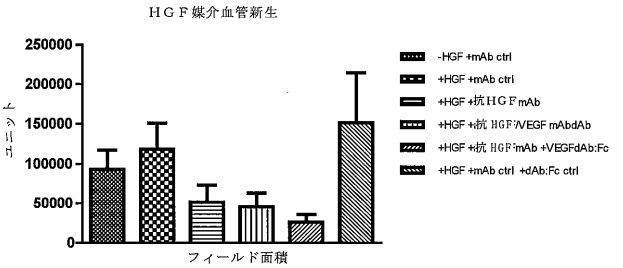
【図４ｂ】



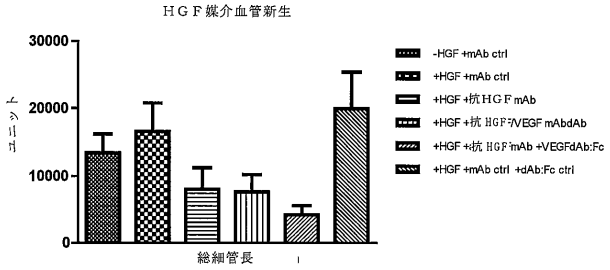
【図５】



【図６ａ】



【図６ｂ】



【配列表】

2012527876000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/057229

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/22 C07K16/46 A61K39/395 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CAO B ET AL: "Neutralizing monoclonal antibodies to hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) display antitumor activity in animal models" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES (PNAS), NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, US LNKD-DOI:10.1073/PNAS.131200498, vol. 98, no. 13, 19 June 2001 (2001-06-19), pages 7443-7448, XP002982804 ISSN: 0027-8424 e.g. abstract the whole document -/--	1,8,9, 11-14, 17-20, 23,24, 28-36

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* 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 document 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	Date of mailing of the international search report
20 July 2010	30/09/2010
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Gruber, Andreas

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/057229

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2006/020258 A2 (IMCLONE SYSTEMS INC [US]; ZHU ZHENPING [US]) 23 February 2006 (2006-02-23) e.g. page 3, paragraph 6 the whole document	2-4,21, 25-27
X	EDER JOSEPH PAUL ET AL: "Novel therapeutic inhibitors of the c-Met signaling pathway in cancer." CLINICAL CANCER RESEARCH : AN OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH 1 APR 2009 LNKD-PUBMED:19318488, vol. 15, no. 7, 1 April 2009 (2009-04-01), pages 2207-2214, XP002592604 ISSN: 1078-0432	1,8,9, 11-14, 17-20, 23,24, 28-36
Y	e.g. page 2210, right-hand column, paragraph 3 and 4 the whole document	2-4,21, 25-27
X	WO 2007/115049 A2 (GALAXY BIOTECH LLC [US]; KIM KYUNG JIN [US]; WANG LIHONG [US]; PARK HA) 11 October 2007 (2007-10-11) e.g Example 1; Fig 3; claims 1-24 the whole document	1,8,9, 11-15, 17-20, 23,24, 28-36
Y	SHEN ET AL: "Single variable domain antibody as a versatile building block for the construction of IgG-like bispecific antibodies" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL LNKD- DOI:10.1016/J.JIM.2006.09.020, vol. 318, no. 1-2, 3 January 2007 (2007-01-03), pages 65-74, XP005820137 ISSN: 0022-1759 e.g. page 67 and Fig. 1 the whole document	2-4,21, 25-27
Y	WO 2009/040562 A1 (UCB PHARMA SA [BE]; HUMPHREYS DAVID PAUL [GB]; DAVE EMMA [GB]) 2 April 2009 (2009-04-02) e.g. claim 1; page 21, lines 25-26 the whole document	2-4,21, 25-27
A	WO 2006/074399 A2 (BIOGEN IDEC INC [US]; GLASER SCOTT [US]; WU XIUFENG [US]) 13 July 2006 (2006-07-13) e.g. page 65, lines 12-17 the whole document	1-4,8,9, 11-15, 17-21, 23-36

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2010/057229

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:

see additional 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 an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-4, 8, 9, 11-15, 17-21, 23-36(all partially)

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 Application No. PCT/EP2010/057229

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

Invention: 1; Claims: 1-4, 8, 9, 11-15, 17-21, 23-36(all partially)

antigen-binding protein capable of binding HGF comprising a protein scaffold which is linked to one or more epitope-binding domains wherein the antigen-binding protein has at least two antigen binding sites at least one of which is from an epitope binding domain and at least one of which is from a paired VH/VL domain and wherein at least one epitope binding domain is an immunoglobulin single variable domain, method, polynucleotide sequence, host cell, composition

---

Inventions: 2-3; Claims: 1, 5, 7-9, 11-15, 17-21, 23-36(all partially)

antigen-binding protein capable of binding HGF comprising a protein scaffold which is linked to one or more epitope-binding domains wherein the antigen-binding protein has at least two antigen binding sites at least one of which is from an epitope binding domain and at least one of which is from a paired VH/VL domain and wherein at least one of the antigen binding domain is derived from (each of the following being one invention):
a) CTLA-4 (Evibody); or
b) lipocalin;
method, polynucleotide sequence, host cell, composition

Invention: 4; Claims: 1, 5-9, 11-15, 17-21, 23-36(all partially)

antigen-binding protein capable of binding HGF comprising a protein scaffold which is linked to one or more epitope-binding domains wherein the antigen-binding protein has at least two antigen binding sites at least one of which is from an epitope binding domain and at least one of which is from a paired VH/VL domain and wherein at least one of the antigen binding domain is derived from Protein A derived molecules such as Z-domain of Protein A (Affibody, SpA), A-domain (Avimer/Maxibody), method, polynucleotide sequence, host cell, composition

---

Invention: 5; Claims: 1, 5, 7-9, 11-15, 17-21, 23-36(all partially)

International Application No. PCT/EP2010/057229

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

antigen-binding protein capable of binding HGF comprising a protein scaffold which is linked to one or more epitope-binding domains wherein the antigen-binding protein has at least two antigen binding sites at least one of which is from an epitope binding domain and at least one of which is from a paired VH/VL domain and wherein at least one of the antigen binding domain is derived from Heat shock proteins such as GroEl and GroES; transferrin (trans-body), method, polynucleotide sequence, host cell, composition

---

Invention: 6; Claims: 1, 5-9, 11-15, 17-21, 23-36(all partially)

antigen-binding protein capable of binding HGF comprising a protein scaffold which is linked to one or more epitope-binding domains wherein the antigen-binding protein has at least two antigen binding sites at least one of which is from an epitope binding domain and at least one of which is from a paired VH/VL domain and wherein at least one of the antigen binding domain is derived from ankyrin repeat protein (DARPin), method, polynucleotide sequence, host cell, composition

---

Inventions: 7-11; Claims: 1, 5, 7-9, 11-15, 17-21, 23-36(all partially)

antigen-binding protein capable of binding HGF comprising a protein scaffold which is linked to one or more epitope-binding domains wherein the antigen-binding protein has at least two antigen binding sites at least one of which is from an epitope binding domain and at least one of which is from a paired VH/VL domain and wherein at least one of the antigen binding domain is derived from (each of the following being one invention):
a) peptide aptamer;
b) C-type lectin domain (Tetranectin);
c) human γ-crystallin and human ubiquitin (affilins);
d) PDZ domains; or
e) scorpion toxinkunitz type domains of human protease inhibitors,
method, polynucleotide sequence, host cell, composition

Invention: 12; Claims: 1, 5-9, 11-15, 17-21, 23-36(all partially)

antigen-binding protein capable of binding HGF comprising a protein scaffold which is linked to one or more epitope-binding domains wherein the antigen-binding protein has at least two antigen binding sites at least one of which is from an epitope binding domain and at least one of which is from a paired VH/VL domain and wherein at least one of the antigen binding domain is derived from fibronectin (adnectin), method, polynucleotide sequence, host cell, composition

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Invention: 13; Claims: 1-4, 7-21, 23-36(all partially)

antigen-binding protein wherein at least one of the antigen binding sites is capable of binding HGF and wherein at least one epitope binding domain is an immunoglobulin single variable domain and which is capable of binding HGF and VEGF, method, polynucleotide sequence, host cell, composition

---

Invention: 14; Claims: 1-4, 7-9, 11-15, 17-36(all partially)

antigen-binding protein wherein at least one of the antigen binding sites is capable of binding HGF and wherein at least one epitope binding domain is an immunoglobulin single variable domain and wherein at least one of the epitope binding domains binds human serum albumin, method, polynucleotide sequence, host cell, composition

---

Inventions: 15-16; Claims: 1, 5, 7-21, 23-36(all partially)

antigen-binding protein wherein at least one of the antigen binding sites is capable of binding HGF and wherein at least one of the antigen binding domain is derived from (each of the following being one invention):
a) CTLA-4 (Evibody); or
b) lipocalin
and which is capable of binding HGF and VEGF, method, polynucleotide sequence, host cell, composition

---

Invention: 17; Claims: 1, 5-21, 23-36(all partially)

antigen-binding protein wherein at least one of the antigen binding sites is capable of binding HGF and wherein at least one of the antigen binding domain is derived from Protein A derived molecules such as Z-domain of Protein A (Affibody, SpA), A-domain (Avimer/Maxibody) and which is capable of binding HGF and VEGF, method, polynucleotide sequence, host cell, composition

---

Invention: 18; Claims: 1, 5, 7-21, 23-36(all partially)

antigen-binding protein wherein at least one of the antigen binding sites is capable of binding HGF and wherein at least one of the antigen binding domain is derived from Heat shock proteins such as GroEl and GroES; transferrin (trans-body) and which is capable of binding HGF and VEGF, method, polynucleotide sequence, host cell, composition

---

International Application No. PCT/EP2010 /057229

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Invention: 19; Claims: 1, 5-21, 23-36(all partially)

antigen-binding protein wherein at least one of the antigen binding sites is capable of binding HGF and wherein at least one of the antigen binding domain is derived from ankyrin repeat protein (DARPin) and which is capable of binding HGF and VEGF, method, polynucleotide sequence, host cell, composition

---

Inventions: 20-24; Claims: 1, 5, 7-21, 23-36(all partially)

antigen-binding protein wherein at least one of the antigen binding sites is capable of binding HGF and wherein at least one of the antigen binding domain is derived from (each of the following being one invention):
a) peptide aptamer;
b) C-type lectin domain (Tetranectin);
c) human γ-crystallin and human ubiquitin (affilins);
d) PDZ domains; or
e) scorpion toxinkunitz type domains of human protease inhibitors
and which is capable of binding HGF and VEGF, method, polynucleotide sequence, host cell, composition

---

Invention: 25; Claims: 1, 5-21, 23-36(all partially)

antigen-binding protein wherein at least one of the antigen binding sites is capable of binding HGF and wherein at least one of the antigen binding domain is derived from fibronectin (adnectin) and which is capable of binding HGF and VEGF, method, polynucleotide sequence, host cell, composition

---

Inventions: 26-27; Claims: 1, 5, 7-9, 11-15, 17-36(all partially)

antigen-binding protein wherein at least one of the antigen binding sites is capable of binding HGF and wherein at least one of the antigen binding domain is derived from (each of the following being one invention):
a) CTLA-4 (Evibody); or
b) lipocalin
and wherein at least one of the epitope binding domains binds human serum albumin, method, polynucleotide sequence, host cell, composition

---

Invention: 28; Claims: 1, 5-9, 11-15, 17-36(all partially)

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

antigen-binding protein wherein at least one of the antigen binding sites is capable of binding HGF and wherein at least one of the antigen binding domain is derived from Protein A derived molecules such as Z-domain of Protein A (Affibody, SpA), A-domain (Avimer/Maxibody) and wherein at least one of the epitope binding domains binds human serum albumin, method, polynucleotide sequence, host cell, composition

---

Invention: 29; Claims: 1, 5, 7-9, 11-15, 17-36(all partially)

antigen-binding protein wherein at least one of the antigen binding sites is capable of binding HGF and wherein at least one of the antigen binding domain is derived from Heat shock proteins such as GroEl and GroES; transferrin (trans-body) and wherein at least one of the epitope binding domains binds human serum albumin, method, polynucleotide sequence, host cell, composition

---

Invention: 30; Claims: 1, 5-9, 11-15, 17-36(all partially)

antigen-binding protein wherein at least one of the antigen binding sites is capable of binding HGF and wherein at least one of the antigen binding domain is derived from ankyrin repeat protein (DARPin) and wherein at least one of the epitope binding domains binds human serum albumin, method, polynucleotide sequence, host cell, composition

---

Inventions: 31-35; Claims: 1, 5, 7-9, 11-15, 17-36(all partially)

antigen-binding protein wherein at least one of the antigen binding sites is capable of binding HGF and wherein at least one of the antigen binding domain is derived from (each of the following being one invention):
a) peptide aptamer;
b) C-type lectin domain (Tetranectin);
c) human y-crystallin and human ubiquitin (affilins);
d) PDZ domains; or
e) scorpion toxinkunitz type domains of human protease inhibitors
and wherein at least one of the epitope binding domains binds human serum albumin, method, polynucleotide sequence, host cell, composition

---

Invention: 36; Claims: 1, 5-9, 11-15, 17-36(all partially)

antigen-binding protein wherein at least one of the antigen binding sites is capable of binding HGF and wherein at least one of the antigen binding domain is derived from fibronectin (adnectin) and wherein at least one of the epitope binding domains binds human serum albumin, method, polynucleotide sequence, host cell, composition

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2010/057229

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006020258 A2	23-02-2006	EP 1786918 A2	23-05-2007
		JP 2008512352 T	24-04-2008
WO 2007115049 A2	11-10-2007	AR 059922 A1	07-05-2008
		AU 2007233242 A1	11-10-2007
		CA 2645358 A1	11-10-2007
		CN 101415811 A	22-04-2009
		EP 2016162 A2	21-01-2009
		JP 2009532378 T	10-09-2009
		KR 20090013777 A	05-02-2009
		RU 2008143318 A	10-05-2010
		US 2008019974 A1	24-01-2008
		ZA 200807903 A	31-03-2010
WO 2009040562 A1	02-04-2009	CA 2700714 A1	02-04-2009
		CN 101842387 A	22-09-2010
		EP 2195341 A1	16-06-2010
		US 2010239582 A1	23-09-2010
WO 2006074399 A2	13-07-2006	US 2009162380 A1	25-06-2009

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*1/21*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/21		
Ｃ１２Ｎ	*5/10*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/00	１０１	
Ｃ１２Ｐ	*21/08*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｐ	21/08		
Ａ６１Ｋ	*39/395*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｄ	
Ａ６１Ｐ	*35/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｎ	
Ａ６１Ｐ	*35/04*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		
Ａ６１Ｐ	*27/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/04		
Ａ６１Ｐ	*9/10*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	27/02		
Ａ６１Ｐ	*17/06*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/10		
Ａ６１Ｐ	*19/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	17/06		
Ａ６１Ｐ	*29/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	19/02		
			Ａ６１Ｐ	29/00	１０１	

(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(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,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

(74)代理人 100118773
弁理士 藤田 節
(74)代理人 100122389
弁理士 新井 栄一
(74)代理人 100111741
弁理士 田中 夏夫
(72)発明者 クラーク，ニール ジェイムズ
イギリス国 エスジー１ ２エヌワイ ハートフォードシャー スティーヴネイジ，ガンネルズ ウッド ロード，グラクソスミスクライン
(72)発明者 フォード，スザンナ カレン
イギリス国 エスジー１ ２エヌワイ ハートフォードシャー スティーヴネイジ，ガンネルズ ウッド ロード，グラクソスミスクライン
(72)発明者 ハンブリン，ポール アンドリュー
イギリス国 エスジー１ ２エヌワイ ハートフォードシャー スティーヴネイジ，ガンネルズ ウッド ロード，グラクソスミスクライン
(72)発明者 マーティン，スティーブン
イギリス国 エスジー１ ２エヌワイ ハートフォードシャー スティーヴネイジ，ガンネルズ ウッド ロード，グラクソスミスクライン

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 BA44 CA02 GA11 HA01
4B064 AG27 CA19 CC24 DA01
4B065 AA90Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44
4C085 AA13 AA14 BB11 BB36 DD62 EE01
4H045 AA11 BA10 CA40 DA76 EA20 FA74