

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4945557号
(P4945557)

(45) 発行日 平成24年6月6日(2012.6.6)

(24) 登録日 平成24年3月9日(2012.3.9)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A
C 07 K 16/46	(2006.01)	C 07 K 16/46	
C 07 K 16/28	(2006.01)	C 07 K 16/28	
A 61 K 39/395	(2006.01)	A 61 K 39/395	C
A 61 P 35/00	(2006.01)	A 61 K 39/395	D

請求項の数 11 (全 151 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-517139 (P2008-517139)
 (86) (22) 出願日 平成18年6月14日 (2006.6.14)
 (65) 公表番号 特表2009-500005 (P2009-500005A)
 (43) 公表日 平成21年1月8日 (2009.1.8)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2006/023479
 (87) 國際公開番号 WO2007/084181
 (87) 國際公開日 平成19年7月26日 (2007.7.26)
 審査請求日 平成21年6月12日 (2009.6.12)
 (31) 優先権主張番号 11/154,103
 (32) 優先日 平成17年6月15日 (2005.6.15)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 592130699
 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア
 The Regents of The University of California
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94607, オークランド, フランクリン ストリート 1111, 5ティーエイチ フロア

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】二重特異的単鎖 Fv 抗体分子およびその使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

第2の抗体に結合された第1の抗体を含む二重特異的抗体であって、ここで、該第1の抗体と該第2の抗体とは異なるエピトープに対して特異的に結合し、

該第1の抗体は、

C 6 B 1 D 2 V H C D R 1 配列 S Y W I A 、 C 6 B 1 D 2 V H C D R 2 配列
 L I Y P G D S D T K Y S P S F Q G 、 C 6 B 1 D 2 V H C D R 3 配列 H D V G Y C
 T D R T C A K W P E W L G V 、 配列 Q V Q L V Q S G A E V K K P G E S L K I S C K
 G S G Y S F T または Q V Q L L Q S G A E V K K P G E S L K I S C K G S G Y S F T
 を含む C 6 B 1 D 2 フレームワーク 1 領域、 配列 W V R Q M P G K G L E Y M G を含む C
 6 B 1 D 2 フレームワーク 2 領域、 配列 Q V T I S V D K S V S T A Y L Q W S S L K P
 S D S A V Y F C A R を含む C 6 B 1 D 2 フレームワーク 3 領域、 および配列 W G Q G T
 L V T V S S を含む C 6 B 1 D 2 フレームワーク 4 領域を含む V H ドメインと、

C 6 B 1 D 2 V L C D R 1 配列 S G S S S N I G N N Y V S 、 C 6 B 1 D 2 V
 L C D R 2 配列 D H T N R P A 、 C 6 B 1 D 2 V L C D R 3 配列 A S W D Y T L S
 G W V 、 配列 Q S V L T Q P P S V S A A P G Q K V T I S C または E S V L T Q P P S
 V S A A P G Q K V T I S C を含む C 6 B 1 D 2 フレームワーク 1 領域、 配列 W Y Q Q L
 P G T A P K L L I Y を含む C 6 B 1 D 2 フレームワーク 2 領域、 配列 G V P D R F S G
 S K S G T S A S L A I S G F R S E D E A D Y Y C を含む C 6 B 1 D 2 フレームワーク
 3 領域、 および配列 F G G G T K V T V L G または F G G G T K L T V L G を含む C 6 B

10

20

1 D 2 フレームワーク 4 領域を含む V L ドメインと
を含み、

該第 2 の抗体は、抗体 H E R 3 . H 3 (配列番号 4) の全ての相補性決定領域を含む、
抗体。

【請求項 2】

前記第 1 の抗体および前記第 2 の抗体が、それぞれ单鎖 F v である、請求項 1 に記載の二
重特異的抗体。

【請求項 3】

前記第 1 の抗体が、ペプチドリンカーによって第 2 の抗体に結合されている、請求項 1 ま
たは 2 に記載の二重特異的抗体。

10

【請求項 4】

前記ペプチドリンカーは、配列番号 3 7 のアミノ酸配列を有する、請求項 3 に記載の二重
特異的抗体。

【請求項 5】

前記二重特異的抗体は、薬学的に許容される担体中に存在する、請求項 1 ~ 4 のいずれか
1 項に記載の二重特異的抗体。

【請求項 6】

ガンを処置するための、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の二重特異的抗体を含む、組
成物。

20

【請求項 7】

前記ガンが、乳ガン、結腸ガン、卵巣ガン、子宮内膜ガン、胃ガン、膵臓ガン、前立腺ガ
ン、および唾液腺ガンからなる群より選択される、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 8】

H E R 2 / n e u 受容体およびH E R 3 受容体を有するガン細胞の成長および / または増
殖を特異的に阻害するための、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の二重特異的抗体を含
む、組成物。

【請求項 9】

請求項 3 に記載の二重特異的单鎖 F v 抗体をコードする核酸分子を含む、ベクター。

【請求項 10】

プラスミド、コスミド、ファージ、およびウイルスからなる群より選択される、請求項 9
に記載のベクター。

30

【請求項 11】

請求項 9 または 1 0 に記載のベクターで形質転換された、宿主細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願への相互参照

本願は、2005年6月15日に出願されたU S S N 1 1 / 1 5 4 , 1 0 3 号に対する
優先権および利益を主張する。U S S N 1 1 / 1 5 4 , 1 0 3 号は、全ての目的のために
、その全体が本明細書中に参考として援用される。

40

【0 0 0 2】

政府に支援された研究および開発の下でなされた発明に対する権利に関する声明

本研究は、United States Army Medical Research and Material Command Breast Cancer Research Program, Grant NO: DAMD17-01-1-0520、
およびUnited States National Cancer Institute, Institutional Pilot Grant NO: NCI CA 06
927 による補助金によって、部分的に支援された。米国合衆国政府は、本発明に一定の
権利を有する。

【0 0 0 3】

50

発明の分野

本発明は、免疫学および腫瘍学の分野に関し、そしてさらに具体的には、上皮成長因子受容体（EGFR）ファミリーのタンパク質を過剰発現する様々なガンの検出および/または処置において有利に使用することができる、二重特異的抗体分子（例えば、bscFv）に関する。本発明の特定の例示的な二重特異的scFv抗体分子は、EGFRファミリーの1つのメンバーの2つの異なるエピトープに対して結合特異性を有しているか、または、EGFRファミリーの2つの異なるメンバーに対して結合特異性を有しているかのいずれかである。

【背景技術】

【0004】

発明の背景

上皮成長因子受容体（EGFR）シグナル伝達経路は、体の至るところでのガンの発症および拡散において重要な役割を担っている。EGFRは、erb-b-1としても知られており、4つの遺伝子からなる1つのファミリー（これには、HER2/neu2（erb-b-2）、HER3（erb-b-3）、およびHER4（erb-b-4）もまた含まれる）のメンバーである。EGFRは、広い範囲の固形腫瘍（結腸ガン、頭頸部ガン、肺臓ガン、卵巣ガン、および乳ガンが含まれる）において発現される。

【0005】

HER2/neuは、チロシンキナーゼ活性を有している細胞表面受容体タンパク質である。完全なタンパク質は、3つの部分から構成される：細胞内細胞質ドメイン、短い疎水性膜貫通セグメント、およびリガンド結合を担っている細胞外ドメイン（ECD）。この受容体タンパク質は、様々な上皮細胞のタイプの細胞膜上で発現されており、そして特異的な成長因子の結合を通じて、細胞増殖・分裂の様々な態様を調節する。

【0006】

Her2/neuは、HER2/neuタンパク質をコードする遺伝子であり、プロト-オンコジーンとして知られている遺伝子のグループのメンバーである。プロト-オンコジーンは、正常な細胞の増殖および分化に関係している重要なタンパク質（例えば、成長因子、成長因子受容体、およびアポトーシスタンパク質）をコードする。プロト-オンコジーンが点変異、移動、または遺伝子増幅によって変化すると、これらによって、異常な細胞の形質転換、およびガンの発症を導く可能性がある増殖シグナルが生じる。

【0007】

Her2/neuは、多くの正常な細胞の中では低レベルで発現され得るが、様々なガン細胞の中では、通常、過剰発現されている。Her2/neuの過剰発現は、ほとんどの場合は、遺伝子のコピー数の増加（遺伝子増幅）によって、および/または細胞中のHer2/neu遺伝子の発現レベルの増大によって引き起こされる。この成長因子受容体の過剰発現は、細胞増殖および発ガン性形質転換の率を高めることによって、腫瘍の進行において鍵となる役割を担っている。Her2/neu遺伝子の遺伝子増幅は、様々なタイプのガン（乳ガン、卵巣ガン、子宮内膜ガン、胃ガン、肺臓ガン、前立腺ガン、および唾液腺ガンが含まれる）において観察されている（非特許文献1）。乳ガン患者においては、HER2/neuは、乳ガン患者においては、これが予後不良、腫瘍の再発、および生存期間の短縮に関係しているので、臨床的に重要であることも示されている。（非特許文献2；非特許文献3；非特許文献4）。

【0008】

現在は、ガンの処置のための新しい免疫療法のストラテジーの開発に多くの注目が集まっている。1つのこのようなストラテジーは、抗体をベースとするガン治療法である。抗体をベースとするガン治療法の主要な目的は、毒性のあるペイロード（payload）（例えば、放射性同位元素、毒素、または薬物）を腫瘍に対して特異的に送達することである。抗体結合部位をベースとする分子の大きさの範囲としては、以下が挙げられる：IgM（1000kDa）、IgG（150kDa）、Fab（ab=）₂（100kDa）、Fab（50kDa）、（scFv=）₂（55kDa）、およびscFv（25kDa）。

10

20

30

40

50

）。免疫不全マウスにおいては、より大きな分子（例えば、IgGおよびFab₂断片）は、ヒト腫瘍異種移植片の中で高レベルで保持され、低い特異性を有しているが（非特許文献5；非特許文献6）、一方、より小さい分子（例えば、scFv、(scFv)₂およびFab）は、比較的低いレベルで腫瘍の中で保持され、大幅に改善された特異性を有している（非特許文献6；非特許文献7；非特許文献8；非特許文献9）。

【0009】

上記の標的化特性についての最も優勢な決定要因は、初回通過クリアランス（first pass clearance）についての腎臓値と比較した、抗体をベースとする分子の大きさである。抗体をベースとする分子の別の重要な特徴は価数であり、なぜなら、明らかに大きい腫瘍での保持は、標的抗原に対する多価結合と関係しているからである（非特許文献6；非特許文献7；非特許文献10；非特許文献11）。

10

【0010】

ハーセプチン⁷は、乳ガンを標的化する免疫療法の新しい形態であり、これは、Her2/neuを過剰発現するガン細胞を標的化するために最近開発された。この処置方法は、HER2/neuポジティブである転移性乳ガンの患者に有効な処置方法を提供することが、臨床試験において示されている。しかし、この薬物処置方法はコストがかかり、そして、これには有意な発病率および死亡率が伴う。

【0011】

いくつかの他のタイプの治療方法が、その腫瘍が高レベルでHer2/neuを発現する乳ガン患者においてより有効である、またはあまり有効ではないことが示されている。これらには、Her2/neuの発現が増幅されている患者においてより有効であると考えられるアントラサイクリン療法、およびそのHer2/neu発現のレベルが高い患者においてはあまり有効ではないホルモン療法が含まれる。

20

【0012】

初回通過クリアランスについての腎臓値の範囲内にある分子量を有している、2価の単鎖Fvをベースとする抗体分子の作成にもまた注目が集まっている。これらには、50kDaのダイアボディ（非特許文献12）、55kDaの(scFv)₂（非特許文献7）、60～65kDaの両親媒性ヘリックスをベースとするscFv二量体（非特許文献13；非特許文献14）、ならびに、80kDa(scFv-C_H3)₂LDミニボディおよびFab₂ミニボディ（非特許文献15）が含まれる。これらのタンパク質はそれぞれ2つの抗原分子に結合することができるが、これらは、それらの結合部位の方向、柔軟性、および幅が異なる。これらの新しい、そして刷新的な免疫療法は、全体的に手順の多い治療法であるにもかかわらず、さらに頻繁に再発または進行する乳ガンおよび他のガンにおける治療結果の向上を助けるであろうと考えられる。

30

【非特許文献1】Hynes and Stern (1994) *Biochim Biophys Acta.*, 1198: 165-184

【非特許文献2】Seshadri et al. (1993) *J. Clin. Oncol.*, 11: 1936-1942

【非特許文献3】Berger et al. (1988) *Cancer Res.*, 48: 1238-1243

40

【非特許文献4】O'Reilly et al. (1991) *Br. J. Cancer*, 63: 444-446

【非特許文献5】Adams et al. (1992) *Antibody, Immunoclonal Radiopharm.*, 5: 81-95

【非特許文献6】Milenic et al. (1991) *J. Cancer Res.*, 51: 6363-6371

【非特許文献7】Adams et al. (1993) *Cancer Res.*, 53: 4026-4034

【非特許文献8】Beaumier et al. (1985) *J. Nucl. Med.*, 26: 1172-1179

50

【非特許文献 9】 Colcher et al. (1990) J. Natl. Cancer Inst. 82: 1191-1197

【非特許文献 10】 Adams et al. (1996) Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 37: 472

【非特許文献 11】 Wolf et al. (1993) Cancer Res. 53: 2560-2565

【非特許文献 12】 Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448

【非特許文献 13】 Pack et al. (1993) Bio/Technology 11: 1271-1277

10

【非特許文献 14】 Pack (1992) Biochemistry 31: 1579-1584

【非特許文献 15】 Hu et al. (1996) Cancer Res. 56: 3055-3061

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明は、上皮成長因子受容体 (EGFR) ファミリーのタンパク質を過剰発現する様々なガンの検出および/または処置において有利に使用することができる、二重特異的(または多特異的)抗体分子(例えば、bs scFv)の同定に関する。したがって、1つの実施形態においては、本発明により、互いに(直接またはリンカーを介して)結合させられた第1の抗体と第2の抗体が含まれている二重特異的抗体が提供される。この場合、第1の抗体と第2の抗体は異なるエピトープに特異的に結合し、そして第1の抗体は、上皮成長因子受容体タンパク質ファミリーの1つのメンバー(例えば、EGFR、HER2/neu、HER3、HER4)の上にある少なくとも1つのエピトープに対して結合特異性を有しており(特異的に結合し)、そして、第2の抗体は、第1のエピトープとは異なる上皮成長因子受容体タンパク質ファミリーの1つのメンバーの上にある第2のエピトープ(これは、EGFR、HER2/neu、HER3、およびHER4からなる群より選択されるタンパク質の上にあるエピトープである)に対する結合特異性を有している(

20

特異的に結合する)。特定の実施形態においては、抗体はリンカー、より好ましくは、ペプチドリンカーによって、そして最も好ましくは、タンパク質分解的切断部位が含まれていないペプチドリンカー(例えば、配列番号37のアミノ酸配列有しているリンカー)によって結合させられている。特定の実施形態においては、第1の抗体および/または第2の抗体は、以下からなる群より選択される抗体によって特異的に結合させられたエピトープに特異的に結合する: C6.5、C6ML3-9、C6MH3-B1、C6-B1D2、F5、HER3.A5、HER3.F4、HER3.H1、HER3.H3、HER3.E12、HER3.B12、EGFR.E12、EGFR.C10、EGFR.B11、EGFR.E8、HER4.B4、HER4.G4、HER4.F4、HER4.A8、HER4.B6、HER4.D4、HER4.D7、HER4.D11、HER4.D12、HER4.E3、HER4.E7、HER4.F8、およびHER4.C7。特定の実施形態においては、第1の抗体および/または第2の抗体には、以下からなる群より選択される抗体の1つ、2つまたは全ての相補性決定領域(単数または複数)が含まれる:C6.5、C6ML3-9、C6MH3-B1、C6-B1D2、F5、HER3.A5、HER3.F4、HER3.H1、HER3.H3、HER3.E12、HER3.B12、EGFR.E12、EGFR.C10、EGFR.B11、EGFR.E8、HER4.B4、HER4.G4、HER4.F4、HER4.A8、HER4.B6、HER4.D4、HER4.D7、HER4.D11、HER4.D12、HER4.E3、HER4.E7、HER4.F8、およびHER4.C7。特定の実施形態においては、二重特異的抗体または多特異的抗体は、以下からなる群より選択されるポリペプチド配

30

40

50

列をコードする核酸配列が含まれているベクターによってコードされる：配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号14、配列番号20、および配列番号22。特定の実施形態においては、二重特異的抗体または多特異的抗体は、例えば、以下からなる群より別々に選択される、本明細書中に記載される2つの核酸配列によってコードされるポリペプチドをコードする2つの核酸配列が含まれているベクターによってコードされる：配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号20、および配列番号22。特定の例においては、二重特異的抗体は、例えば、以下からなる群より別々に選択される本明細書中に記載される、特定の場合には少なくとも1つ、そして特定の場合には少なくとも2つの核酸配列が含まれているベクターによってコードされる：配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号14、配列番号20、および配列番号22。特定の場合には、ベクターにはさらに、配列番号37の配列を有しているポリペプチドをコードする核酸配列が含まれる。

【0014】

特定の実施形態においては、第1の抗体および/または第2の抗体（例えば、上記の抗体）は単鎖抗体（例えば、scFv抗体）である。第1の抗体と第2の抗体のいずれもが単鎖抗体である場合には、抗体は、好ましくは、直接結合させられる（1つのポリペプチドを形成するように）か、あるいは、リンカーを介して、より好ましくは、ペプチドリンカー（タンパク質分解的切断部位が含まれていないペプチドリンカー）を介して結合させられて、単鎖二重特異的または多特異的抗体（例えば、bscFv）が形成される。二重特異的抗体（または多特異的抗体）が単鎖抗体である場合は、上記第2の抗体は単鎖抗体であり、そして上記第1の抗体はペプチドリンカーによって上記第2の抗体に結合させられる。

【0015】

別の実施形態においては、本発明には、本明細書中に開示され、そして/または請求されるような二重特異的抗体または多特異的抗体と、薬学的に許容される担体が含まれている組成物が含まれる。

【0016】

本発明によってはまた、ガンを処置する（例えば、ガンの1つ以上の兆候を緩和する）ための方法も提供される。この方法には、通常、その必要がある患者（ヒトまたはヒト以外の動物）に、治療有効量の本明細書中に開示されそして/または請求されるような二重特異的抗体または多特異的抗体と、薬学的に許容される担体を投与する工程が含まれる。ガンとしては、乳ガン、結腸ガン、卵巣ガン、子宮内膜ガン、胃ガン、膵臓ガン、前立腺ガン、および唾液腺ガンからなる群より選択されるガンを挙げることができるが、これらに限定はされない。投与は、任意の様々な従来法によって行うことができ、これには、全身的な注射が可能な投与、腫瘍もしくはガン性の組織への注射、経口投与などが含まれる。

【0017】

なお別の実施形態においては、本発明により、ガンを処置する（例えば、ガンの1つ以上の兆候を緩和する）ための方法が提供される。この方法には、通常、その必要がある患者（ヒトまたはヒト以外の動物）に、治療有効量の本明細書中に開示されそして/または請求されるような二重特異的抗体または多特異的抗体と、薬学的に許容される担体を、化学療法薬、外部線照射、標的化させられた放射性同位元素、およびシグナル伝達阻害因子からなる群より選択される他の細胞毒性薬と組み合わせて投与する工程が含まれる。ガンとしては、乳ガン、結腸ガン、卵巣ガン、子宮内膜ガン、胃ガン、膵臓ガン、前立腺ガン、および唾液腺ガンからなる群より選択されるガンを挙げることができるが、これらに限定はされない。投与は、任意の様々な従来法によって行うことができ、これには、全身的な注射が可能な投与、腫瘍もしくはガン性の組織への注射、経口投与などが含まれる。

10

20

30

40

50

【0018】

なお別の実施形態においては、本発明により、エフェクターに結合させられた、本明細書中に開示されそして／または請求されるような二重特異的抗体または多特異的抗体が含まれているキメラ部分が提供される。好ましいエフェクターとしては、細胞毒素、標識、放射性核種、薬物、リポソーム、リガンド、および抗体が挙げられるが、これらに限定はされない。特定の場合には、エフェクターはポリペプチドであり、キメラ部分は融合タンパク質、好ましくは、組み換えによって発現させられた融合タンパク質である。

【0019】

本発明によってはまた、上皮成長因子受容体タンパク質ファミリー（例えば、EGFR、HER2/neu、HER3、HER4）に由来する受容体を保有している細胞に対して、エフェクター分子を特異的に送達するか、または標的化させる方法も提供される。この方法には、本明細書中に記載されそして／または請求されるようなキメラ部分を提供する工程、および細胞をキメラ部分と接触させる工程が含まれる。これによって、キメラ部分は細胞に特異的に結合する。好ましいエフェクターとしては、細胞毒素、標識、放射性核種、薬物、リポソーム、リガンド、抗体などが挙げられるが、これらに限定はされない。特定の実施形態においては、キメラ部分は融合タンパク質である。特定の実施形態においては、細胞はガン細胞であり、好ましくは、EGFRタンパク質ファミリーの1つ以上のメンバーを過剰発現するガン細胞である。特に好ましいガン細胞としては、乳ガン、結腸ガン、卵巣ガン、子宮内膜ガン、胃ガン、膵臓ガン、前立腺ガン、および唾液腺ガン細胞が挙げられるが、これらに限定はされない。

【0020】

上皮成長因子受容体タンパク質ファミリー（例えば、EGFR、HER2/neu、HER3、HER4）に由来する受容体を保有している細胞を特異的に死滅させる、および／またはそのような細胞の成長もしくは増殖を特異的に阻害する方法もまた提供される。この方法には、通常、細胞傷害性もしくは細胞増殖抑制性のエフェクター（例えば、細胞毒素、放射性部分、および細胞毒素もしくは細胞増殖抑制因子が含まれているリポソームなど）に結合させられた、本明細書中に記載されそして／または請求されるようなキメラ部分を提供する工程；ならびに、上記細胞をキメラ部分と接触させる工程が含まれる。これによって、キメラ部分は細胞に特異的に結合して、細胞死、ならびに／あるいは、細胞の成長および／または増殖の阻害を生じる。特定の実施形態においては、キメラ部分融合タンパク質である。特定の実施形態においては、細胞はガン細胞であり、好ましくは、EGFRタンパク質ファミリーの1つ以上のメンバーを過剰発現するガン細胞である。特に好ましいガン細胞としては、乳ガン、結腸ガン、卵巣ガン、子宮内膜ガン、胃ガン、膵臓ガン、前立腺ガン、および唾液腺ガン細胞が挙げられるが、これらに限定はされない。

【0021】

本発明によってはまた、ガン細胞または組織の存在を検出する、および／または視覚化する、および／または診断する方法も提供される。この方法には、通常、細胞または組織を、検出可能な標識に結合させられた本明細書中に記載されるような二重特異的抗体または多特異的抗体が含まれているキメラ部分と接触させる工程；ならびに、標識を検出する工程が含まれる。ここでは、細胞または組織と会合した標識の検出が、上皮成長因子受容体ファミリータンパク質の1つ以上のメンバーを発現する（または過剰発現する）細胞または組織の存在を示す。好ましい検出可能な標識としては、放射体、陽電子放射体、MRI標識、および蛍光標識または比色分析用標識が挙げられるが、これらに限定はされない。特定の例においては、検出可能な標識は放射体であり、検出には、線カメラでの画像化が含まれる。特定の場合には、検出可能な標識は陽電子放射体であり、検出には、陽電子放出型断層撮影法（PET）による画像化が含まれる。特定の場合には、検出可能な標識はMRI標識であり、検出には核磁気共鳴撮影法による検出が含まれる。特定の実施形態においては、上皮成長因子受容体タンパク質ファミリーの1つ以上のメンバーを発現する細胞または組織は、EGFR、HER2/neu、HER3、およびHER4からなる群より選択されるタンパク質を過剰発現する細胞あるいは組織である。上皮成長因子

10

20

30

40

50

受容体タンパク質ファミリーの1つ以上のメンバーを発現する細胞または組織は、ガン細胞または組織（例えば、乳ガン、結腸ガン、卵巣ガン、子宮内膜ガン、胃ガン、膵臓ガン、前立腺ガン、または唾液腺ガン）であり得る。診断アッセイは、ガンの鑑別診断の構成要素であり得、そして／または、EGFRタンパク質ファミリーの1つまたは複数のメンバーを過剰発現するものとしてガンのタイプを決定するために使用することができ、そして／または、アッセイは、既知のガンを視覚化するために使用することもできる。これら（および他の）場合には、アッセイには、ガン細胞の存在の手がかりは必要なく、そのような細胞または組織がおそらく存在するであろうという単なる暗示だけが必要である。特定の実施形態においては、検出には、非侵襲的画像化技術が含まれる。特定の実施形態においては、免疫組織化学が含まれる。特定の実施形態においては、検出には、組織試料または生検の中での検出が含まれる。特定の実施形態においては、検出には、組織切片の中での検出が含まれる。特定の実施形態においては、検出はインビボでの検出である。

10

【0022】

本発明にしたがうと、特定の実施形態においては、EGFRタンパク質ファミリーの複数のメンバーに対して結合親和性を有している新規の二重特異的単鎖Fv抗体分子（bs-scFv）が提供される。

【0023】

本発明の特定の好ましい実施形態においては、bs-scFv抗体は、EGFRタンパク質ファミリーの異なるメンバー（例えば、EGFR、HER2/neu、HER3、およびHER4）の上にある2つの異なるエピトープに対して結合親和性を有しているか、あるいは、EGFRタンパク質ファミリーの1つのメンバーの上にある2つの異なるエピトープに対して結合親和性を有しており、そして、タンパク質分解的切断部位が含まれていない新規のリンカー分子によって作動可能に連結されている、第1のアームと第2のアームを有している。このリンカーは、本発明の1つの態様を構成する。bs-scFv抗体を形成するように互いに対合させられたアームは、以下を含む複数のアームの任意の1つであり得る：C6.5、C6ML3-9、C6MH3-B1、C6-B1D2、F5、HER3.A5、HER3.F4、HER3.H1、HER3.H3、HER3.E12、HER3.B12、EGFR.E12、EGFR.C10、EGFR.B11、EGFR.E8、HER4.B4、HER4.G4、HER4.F4、HER4.A8、HER4.B6、HER4.D4、HER4.D7、HER4.D11、HER4.D12、HER4.E3、HER4.E7、HER4.F8、およびHER4.C7。特に好ましい実施形態においては、アームは、配列番号11のアミノ酸配列を有しているリンカー分子で互いに連結させられる。scFvアームとリンカー分子をコードしている核酸配列が含まれているベクターおよび形質転換体もまた提供される。

20

【0024】

EGFRタンパク質ファミリーの2つのメンバーに対して結合親和性を有している例示的なbs-scFv抗体はALMであり、これには、HER3に対して結合特異性を有している1つのアームと、HER2/neuに対して結合特異性を有している第2のアームが含まれている。EGFRタンパク質ファミリーの1つのメンバーの上にある2つのエピトープに対して結合親和性を有している例示的なbs-scFv抗体はALFであり、これは、HER3の上にあるエピトープに対する結合特異性を有している1つのアームと、HER3の上の別のエピトープに対して結合特異性を有している第2のアームを有している。

30

【0025】

本発明の別の実施形態においては、bs-scFv抗体は、腫瘍細胞によって過剰発現されるEGFRタンパク質ファミリーの複数のメンバーに対して結合親和性を有している。

40

【0026】

本発明のなお別の実施形態においては、ガンを処置するための組成物および方法が提供される。ここでは、患者には、治療有効量の本発明のbs-scFv抗体分子が薬学的に

50

許容される担体の中で、単独で、あるいは、他の細胞傷害性因子（例えば、化学療法薬、外部線照射、標的化させられた放射性同位元素、およびシグナル伝達阻害因子）と一緒にいすれかで投与される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0027】

定義

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」は、アミノ酸残基のポリマーを意味するように本明細書中では同義的に使用される。これらの用語は、その中の1つ以上のアミノ酸残基が、対応する自然界に存在しているアミノ酸残基の人工的な化学的アノログであるアミノ酸のポリマーに対して、ならびに、自然界に存在しているアミノ酸のポリマーに対して適用される。この用語にはまた、ポリペプチドを形成するアミノ酸を連結する従来のペプチド結合に対する変異体も含まれる。好ましい「ペプチド」、「ポリペプチド」、および「タンパク質」は、その炭素がペプチド結合によって連結させられているアミノ酸の鎖である。したがって、鎖の一方の末端（アミノ末端）にある末端アミノ酸は遊離のアミノ基を有しており、一方、鎖の他の末端（カルボキシ末端）にある末端アミノ酸は遊離のカルボキシル基を有している。本明細書中で使用される場合は、用語「アミノ末端」（N末端と省略される）は、ペプチドのアミノ末端にあるアミノ酸上の遊離のアミノ基、または、ペプチドの内部の任意の他の位置にあるアミノ酸のアミノ基（ペプチド結合に関与している場合には、イミノ基）を意味する。同様に、用語「カルボキシ末端」は、ペプチドのカルボキシ末端上にある遊離のカルボキシル基、またはペプチドの内部の任意の他の位置にあるアミノ酸のカルボキシル基を意味する。ペプチドにはまた、原則として、任意のポリアミノ酸も含まれ、これには、アミド結合とは対照的に、エーテルによって結合されたアミノ酸のようなペプチド模倣物が含まれるが、これに限定はされない。

【0028】

本明細書中で使用される場合は、「抗体」は、免疫グロブリン遺伝子または免疫グロブリン遺伝子の断片によって実質的にコードされる1つ以上のポリペプチドからなるタンパク質を意味する。認識されている免疫グロブリン遺伝子としては、 κ 、 λ 、 γ 、 δ 、 ϵ 、 μ 、 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 、 μ 定常領域の遺伝子、さらには、無数の免疫グロブリン可変領域の遺伝子が挙げられる。軽鎖は、またはのいずれかとして分類される。重鎖は、 κ 、 λ 、 μ 、 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 、 μ として分類され、これらは順に、免疫グロブリンのクラスIgG、IgM、IgA、IgD、およびIgEをそれぞれ定義する。

【0029】

典型的な免疫グロブリン（抗体）の構造単位には、四量体が含まれていることが知られている。個々の四量体は、2種類の同じポリペプチド鎖の対から構成され、それぞれの対に、1つの「軽」（約25kD）と1つの「重」鎖（約50~70kD）が含まれている。それぞれの鎖のN末端は、抗原認識を主として担っている約100個から110個またはそれ以上のアミノ酸の可変領域を定義する。用語可変軽鎖（V_L）と可変重鎖（V_H）は、これらの軽鎖および重鎖をそれぞれ意味する。

【0030】

抗体は、完全な免疫グロブリンとして存在するか、または、様々なペプチダーゼでの消化によって生じる多数の十分に特性決定された断片として存在する。したがって、例えば、ペプシンは、ヒンジ領域の中のジスルフィド結合の下で抗体を消化して、それ自体がジスルフィド結合によってV_H-C_H1に連結させられた軽鎖であるFabの二量体F(a_b)₂を生じる。F(a_b)₂は、穏やかな条件下で還元されて、ヒンジ領域の中のジスルフィド結合を切断することができ、それによって、(Fab')₂二量体をFab'単量体に変換する。Fab'単量体は、本質的には、ヒンジ領域の一部を有しているFabである（他の抗体断片のさらに詳細な記載については、Fundamental Immunology, W. E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993)を参照のこと）。様々な抗体断片が、完全な抗体の消化に関して定義されてい

10

20

30

40

50

るが、当業者であれば、そのような F a b ' 断片を、化学的に、または組み換え D N A 方法論を利用してのいずれかによって、新たに合成することができることを理解するであろう。したがって、用語抗体には、本明細書中で使用される場合には、完全な抗体、完全な抗体の修飾によって生産されたか、または、組み換え D N A 方法論を使用して新しく合成されたかのいずれかである抗体もまた含まれる。好ましい抗体としては、単鎖抗体（1つのポリペプチド鎖として存在する抗体）、より好ましくは、連続するポリペプチドが形成されるように可変重鎖と可変軽鎖が互いに（直接、またはペプチドリンカーを介して）連結させられた単鎖 F v 抗体（s c F v ）が挙げられる。単鎖 F v 抗体は、直接連結させられたかまたはペプチドをコードするリンカーによって連結させられたかのいずれかの、V_H コード配列と V_L コード配列が含まれている核酸から発現させることができる、共有結合させられた V_H - V_L ヘテロ二量体である。H u s t o n , e t a l . (1 9 8 8) Proc . Nat . Acad . Sci . U S A , 8 5 : 5 8 7 9 - 5 8 8 3 。 V_H および V_L は、1つのポリペプチド鎖として互いに連結されているが、V_H ドメインと V_L ドメインは、共有結合以外によって会合する。糸状ファージの表面上で発現される第1の機能性抗体分子は単鎖 F v ' (s c F v) であるが、別の発現ストラテジーもまた成功している。例えば、F a b 分子は、鎖の一方（重鎖または軽鎖）が g 3 キャプシドタンパク質に融合させられている場合にはファージ上にディスプレイされ得、そして相補鎖はペリプラズムに、可溶性分子として輸送される。2つの鎖は、同じレプリコン上にコードされる場合も、また、別のレプリコン上にコードされる場合もある。重要なポイントは、個々の F a b 分子の中の2つの抗体鎖が翻訳後にアセンブリし、そして二量体は、例えば、g 3 p に対する鎖の一方の連結によってファージ粒子の中に取り込まれる（例えば、米国特許第 5 , 7 3 3 , 7 4 3 号を参照のこと）。抗原結合部位の構造に実質的に類似している三次元構造になるように折りたたまれる分子になるように、自然に凝集した形態へと変換するが、軽鎖ポリペプチドと重鎖ポリペプチドが抗体の V 領域とは化学的に分かれている s c F v 抗体と多数の他の構造が、当業者に公知である（例えば、米国特許第 5 , 0 9 1 , 5 1 3 号、同第 5 , 1 3 2 , 4 0 5 号、および同第 4 , 9 5 6 , 7 7 8 号を参照のこと）。特に好ましい抗体としては、ファージ上にディスプレイされている全ての抗体（例えば、s c F v 、 F v 、 F a b 、およびジスルフィド結合させられた F v (R e i t e r e t a l . (1 9 9 5) Protein Eng . 8 : 1 3 2 3 - 1 3 3 1) が挙げられるべきであり、そしてまた、二重特異的抗体、三重特異的抗体、四重特異的抗体、および、一般的な多特異的抗体（例えば、b s s c F v ）も挙げられる。

【 0 0 3 1 】

本発明の抗体に関して、用語「免疫学的に特異的」、「特異的に結合する」は、目的のタンパク質（例えば、H E R 2 / n e u ）の1つ以上のエピトープに結合するが、抗原性である生物学的分子の混合集団が含まれている試料中の他の分子は実質的には認識せず、それらには結合しない抗体を意味する。

【 0 0 3 2 】

用語「二重特異的抗体」は、本明細書中で使用される場合は、2つの抗原結合部位（第1の結合部位はエピトープ上の第1の抗原またはエピトープに対して親和性を有しており、そして第2の結合部位は、第1のものとは異なる第2の抗原またはエピトープに対して結合親和性を有している）を含む抗体を意味する。

【 0 0 3 3 】

用語「核酸」または「オリゴヌクレオチド」、あるいは本明細書中に文法上の同等の用語は、互いに共有結合させられた少なくとも2つのヌクレオシドを意味する。本発明の核酸は、好ましくは、一本鎖または二本鎖であり、そして通常は、ホスホジエステル結合が含まれているであろうが、場合によっては、以下に概説されるように、別の骨格を有している場合がある核酸アナログが含まれ、これには例えば、以下が含まれる：ホスホルアミド (B e a u c a g e e t a l . (1 9 9 3) T e t r a h e d r o n 4 9 (1 0) : 1 9 2 5) およびその中で引用されている参考文献； L e t s i n g e r (1 9 7 0) J . O r g . C h e m . 3 5 : 3 8 0 0 ; S p r i n z l e t a l . (1 9 7 7)

10

20

30

40

50

Eur. J. Biochem. 81: 579; Letsinger et al. (1986) Nucl. Acids Res. 14: 3487; Sawai et al. (1984) Chem. Lett. 805, Letsinger et al. (1988) J. Am. Chem. Soc. 110: 4470; および Pauwels et al. (1986) Chemica Scripta 26: 1419)、ホスホロチオエート (Mag et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19: 1437; および米国特許第5,644,048号) ホスホロジチオエート (Briuet al. (1989) J. Am. Chem. Soc. 111: 2321)、O-メチルホスホアミダイト結合 (Eckstein, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Oxford University Pressを参照のこと)、ならびに、ペプチド核酸骨格および結合 (Egholm (1992) J. Am. Chem. Soc. 114: 1895; Meier et al. (1992) Chem. Int. Ed. Engl. 31: 1008; Nielsen (1993) Nature, 365: 566; Carlsson et al. (1996) Nature 380: 207を参照のこと)。他のアナログ核酸としては、ポジティブな骨格を有しているもの (Denpcy et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6097)；非イオン性の骨格を有しているもの (米国特許第号5,386,023号、同第5,637,684号、同第5,602,240号、同第5,216,141号、および同第4,469,863号; Angew. (1991) Chem. Int'l. Ed. English 30: 423; Letsinger et al. (1988) J. Am. Chem. Soc. 110: 4470; Letsinger et al. (1994) Nucleoside & Nucleotide 13: 1597; 第2章および第3章, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y. S. Sanghui and P. Dan Cook; Mesmaeker et al. (1994), Bioorganic & Medicinal Chem. Lett. 4: 395; Jeffs et al. (1994) J. Biomolecular NMR 34: 17; Tetrahedron Lett. 37: 743 (1996))、ならびに、非リボース骨格を有しているもの (これには、米国特許第5,235,033号、同第5,034,506号、ならびに、第6章および第7章, ASC Symposium Series 580, Carbohydrate Modifications in Antisense Research, Ed. Y. S. Sanghui and P. Dan Cookに記載されているものが含まれる)。1つ以上の炭素環式の糖が含まれている核酸もまた、核酸の定義に含まれる (Jenkins et al. (1995), Chem. Soc. Rev. pp 169-176を参照のこと)。いくつかの核酸アナログは、Rawls, C & E News, 1997年6月2日、35頁に記載されている。リボース-リン酸骨格のこれらの修飾は、標識のようなさらなる部分の付加を容易にするために、または、生理学的環境下でのそのような分子の安定性を高める、および半減期を長くするために行われる場合がある。

【0034】

用語「～に特異的にハイブリダイズする」および「特異的ハイブリダイゼーション」および「～に選択的にハイブリダイズする」は、本明細書中で使用される場合は、ストリンジエントな条件下で特定のスクレオチド配列に対して優先的に、核酸分子が結合すること、二重鎖を形成すること、またはハイブリダイズすることを意味する。用語「ストリンジエントな条件」は、プローブが、その標的であるサブ配列に対して優先的にハイブリダイズし、そして他の配列に対しては、弱い程度にハイブリダイズするかまたは全くハイブリダイズしない条件を意味する。核酸のハイブリダイゼーションの状況におけるストリンジエントなハイブリダイゼーションおよびストリンジエントなハイブリダイゼーション洗浄条件は配列に応じて様々であり、様々な環境的パラメーターの下で異なる。核酸のハイブ

10

20

30

40

50

リダイゼーションについての広範囲にわたる指針は、例えば、Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Acid Probes part I*, 第2章, Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays, Elsevier, NY (Tijssen) に見ることができる。一般的には、高いストリンジエンシーのハイブリダイゼーションおよび洗浄条件は、定義されたイオン強度およびpHでの特異的配列についての熱融解温度(T_m)よりも約5度低くなるように選択される。 T_m は、完全に適合しているプローブに対して標的配列の50%がハイブリダイズする温度(定義されたイオン強度およびpHの下で)である。極めてストリンジエントな条件は、特定のプローブについての T_m に等しくなるように選択される。サザンプロットまたはノーザンプロットにおいてアレイ上またはフィルター上に100個を超える相補性残基を有している相補的な核酸のハイブリダイゼーションについてのストリンジエントなハイブリダイゼーション条件の一例は、標準的なハイブリダイゼーション溶液を使用した場合には42度であり(例えば、Sambrook (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (第2版) 1~3巻, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY、および以下の詳細な議論を参照のこと)、ハイブリダイゼーションは一晩行われる。高いストリンジエンシーの洗浄条件の一例は、72度で約15分間の0.15MのNaClである。ストリンジエントな洗浄条件の一例は、65度で15分間の、0.2×SSCでの洗浄である(例えば、SSC緩衝液の記載については、Sambrook(前出)を参照のこと)。多くの場合には、高いストリンジエンシーの洗浄の前には、バックグラウンドのプローブシグナルを除去するための、低いストリンジエンシーでの洗浄が行われる。例えば、100個を超えるヌクレオチドの二本鎖についての例示的な中程度のストリンジエンシーの洗浄は、45度で15分間の1×SSCである。例えば、100個を超えるヌクレオチドの二本鎖についての低いストリンジエンシーの洗浄の一例は、40度で15分間の4×から6×SSCである。

【0035】

RNAに対して適用される場合には、用語「単離された核酸」は、上記で定義されたような単離されたDNA分子によってコードされるRNA分子を主に意味する。あるいは、この用語は、その自然界での状態(すなわち、細胞の中または組織の中)でそれが会合している他の核酸から十分に分離されているRNA分子を意味する場合もある。「単離された核酸」(DNAまたはRNAのいずれか)はさらに、生物学的手段または合成手段によって直接生産され、そしてその生産の際に存在する他の成分から分離された分子を示す場合もある。

【0036】

「レプリコン」は任意の遺伝的エレメントであり、例えば、プラスミド、コスミド、バックミド(bacmid)、プラスチド、ファージ、またはウイルスであり、これらは、主に、その自身の制御下で複製することができる。レプリコンはRNAである場合、またDAである場合のいずれもがあり、これらは一本鎖である場合も、また、二本鎖である場合もある。

【0037】

「ベクター」は、結合させられた配列もしくはエレメントの複製が生じるようにそれに対して別の遺伝的配列またはエレメント(DNAまたはRNAのいずれか)を結合させることができるレプリコン(例えば、プラスミド、コスミド、バックミド、ファージ、またはウイルス)である。

【0038】

「発現オペロン」は、転写制御配列および翻訳制御配列、例えば、プロモーター、エンハンサー、翻訳開始シグナル(例えば、ATGまたはAUGコドン)、ポリアデニル化シ

10

20

30

40

50

グナル、ターミネーターなどを有することができ、そして宿主細胞または生物の中のポリペプチドをコードする配列の発現を促進する核酸セグメントを意味する。

【0039】

用語「プライマー」は、本明細書中で使用される場合は、適切な環境に置かれた場合に、鑄型依存性の核酸合成の開始因子として機能的役割を果たすことができる、オリゴヌクレオチド（RNAまたはDNAのいずれか、一本鎖または二本鎖のいずれか、生物学的システムに由来するか、制限酵素消化によって作成されたか、または合成によって生産されたかのいずれか）を意味する。核酸の適切なヌクレオシド3'リン酸前駆体、ポリメラーゼ酵素、適切な補因子、ならびに、適切な温度およびpHのような条件と共に提示された場合には、プライマーは、プライマー伸張産物を生じるように、ポリメラーゼの作用または同様の活性によるヌクレオチドの付加によって、その3'末端を伸張させることができる。プライマーは、特定の条件および用途の要件に応じて、様々な長さであり得る。多くの場合は、プライマーは約15から約25、またはそれ以上のヌクレオチドの長さの範囲である。プライマーは、通常、所望される伸張産物の合成を感作するために、所望される鑄型に対して十分に相補的である。言い換えると、プライマーは、ポリメラーゼまたは同様の酵素による合成の開始に使用される適切な並置にプライマーの3'ヒドロキシル部位分を提供するために十分な様式で、所望される鑄型鎖とアニーリングすることができる。プライマー配列が所望される鑄型の正確な相補鎖を示すことは必要ではない。例えば、相補的ではないヌクレオチド配列であっても、別の相補的なプライマーの5'末端に結合することができる。あるいは、プライマー配列が伸張産物の合成のための鑄型-プライマー複合体を機能的に提供するために所望される鑄型鎖の配列と十分な相補性を有している限りは、相補的ではない塩基を、オリゴヌクレオチドプライマー配列の中に散りばめて組み入れることができる。

10

【0040】

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）は、米国特許第4,683,195号、同第4,800,195号、および同第4,965,188号に記載されている。それらの開示全体が引用により本明細書中に組み入れられる

20

本明細書中で使用される場合は、用語「レポーター」、「レポーターシステム」、「レポーター遺伝子」、または「レポーター遺伝子産物」は、発現させられると容易に測定することができる（例えば、生物学的アッセイ、免疫アッセイ、放射免疫測定によって、または比色、蛍光、化学発光、あるいは他の方法によって）レポーターシグナルを生じる産物をコードする遺伝子が核酸の中に含まれている、動作可能である遺伝的システムを意味するはずである。核酸は、RNAまたはDNAのいずれか、直鎖状または環状のいずれか、一本鎖または二本鎖のいずれか、アンチセンスまたはセンス極性のいずれでもあり得、そして、レポーター遺伝子産物の発現に不可欠な制御エレメントに対して作動可能に連結させることができる。制御エレメントは、レポーターシステムの性質によって、そしてレポーター遺伝子がDNAの形態であるかまたはRNAの形態であるかによって様々であろう。これには、例えば、プロモーター、エンハンサー、翻訳制御配列、ポリA付加シグナル、転写終結シグナルなどのエレメントが含まれ得るが、これらに限定はされない。

30

【0041】

用語「形質転換」、「トランسفェクト」、「形質導入」は、それによって核酸が細胞または宿主生物に導入される任意の方法あるいは手段を意味するはずであり、これらは、同じ意味に変換するための同義的に使用することができる。このような方法としては、トランسفェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、PEG-融合などが挙げられるが、これらに限定はされない。導入された核酸は、レシピエント細胞または生物の核酸の中に組み込まれる（共有結合させられる）場合があり、またそうでない場合もある。細菌、酵母、植物、および哺乳動物細胞中では、例えば、導入された核酸はエピソームエレメントまたは独立したレプリコン（例えば、プラスミド）として維持される場合がある。あるいは、導入された核酸は、レシピエント細胞または生物の核酸の中に組み込まれるようになる場合があり、そして細胞または生物の中で安定に維持され、そ

40

50

してレシピエント細胞または生物の子孫である細胞または生物にさらに継代されるか、あるいは遺伝する場合もある。最後に、導入された核酸は、レシピエント細胞または宿主生物の中に、一時的にしか存在しない場合もある。

【0042】

用語「選択マーカー遺伝子」は、発現されると選択することができる表現形（例えば、抗生物質耐性）を、形質転換された細胞または植物に付与する遺伝子を意味する。

【0043】

用語「作動可能に連結された」は、コード配列の発現に不可欠な調節配列が、コード配列の発現を行えるようにコード配列に対して適切な位置でDNA分子の中に配置されていることを意味する。この同じ定義は、発現ベクター中の転写単位および他の転写制御エレメント（例えば、エンハンサー）の配置について適用される場合もある。10

【0044】

用語「同一」または「同一性」の割合（%）は、2つ以上の核酸またはポリペプチド配列の状況では、以下の配列比較アルゴリズムの1つを使用して、または目視検査によって測定すると、最大の対応のために比較され、そしてアラインメントされた場合に、同じであるか、または一定の割合の同じであるアミノ酸残基もしくはヌクレオチドを有している、2つ以上の配列あるいはサブ配列を意味する。本発明のペプチドに関しては、配列同一性は、ペプチドの全長にわたって決定される。

【0045】

配列比較のためには、通常、1つの配列が参照配列とされ、それに対して試験配列が比較される。配列比較アルゴリズムが使用される場合は、試験配列と参照配列がコンピュータに入力され、必要に応じて、サブ配列の座標が設定され、そして配列アルゴリズムプログラムのパラメーターが設定される。その後、配列比較アルゴリズムによって、参照配列と比較した試験配列（単数または複数）についての配列同一性の割合（%）が、設定されたプログラムのパラメーターに基づいて計算される。20

【0046】

比較のための配列の最適なアラインメントは、例えば、Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981) の局所相同性アルゴリズムによって、Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970) の相同性アラインメントアルゴリズムによって、Pearson & Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444 の類似性の検索のための方法によって、これらのアルゴリズム (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI のGAP, BESTFIT, FASTA、およびTFASTA) のコンピュータによる実行によって、あるいは、目視検査（一般的には、Ausubel et al., 前出を参照のこと）によって行うことができる。30

【0047】

有用なアルゴリズムの一例はPILEUPである。PILEUPは、進行性の段階的なアルゴリズムを使用して関連する配列の1つのグループから複数の配列アラインメントを作成して、関連性と配列同一性の割合（%）を示す。これによってはまた、アラインメントを作成するために使用されるクラスター化関係を示す樹または系統樹もプロットされる。PILEUPでは、Feng & Doolittle (1987) *J. Mol. Evol.* 35:351-360 の進行性のアラインメント方法の簡易化が使用される。使用される方法は、Higgins & Sharp (1989) CABIOS 5:151-153 によって記載されている方法に類似している。このプログラムでは、300までの配列をアラインメントすることができる。個々の配列は、最大で5,000個のヌクレオチドまたはアミノ酸の長さである。複数のアラインメント手順が、2つの最も類似している配列の対アラインメントを用いて開始され、これによって2つのアラインメントされた配列のクラスターが生じる。このクラスターは、次いで、次に最も関係している配列ま4050

たはアラインメントされた配列のクラスターに対してアラインメントされる。配列の2つのクラスターが、2つの個々の配列の対アラインメントの単純な伸張によってアラインメントされる。最終的なアラインメントは、一連の進行性の対アラインメントによって得られる。このプログラムは、配列比較の領域についての特異的な配列およびそれらのアミノ酸もしくはヌクレオチドの座標を設定すること、およびプログラムのパラメーターを設定することによって行われる。例えば、参照配列を、以下のパラメーターを使用して配列同一性の割合(%)の関係を決定するために、他の試験配列に対して比較することができる：デフォルトギャップ荷重(3.00)、デフォルトギャップ長荷重(0.10)、および加重末端ギャップ。

【0048】

10

配列同一性の割合(%)および配列類似性を決定するために適しているアルゴリズムの別の例はBLASTアルゴリズムであり、これは、Altschul et al.(1990)J. Mol. Biol. 215:403-410に記載されている。BLAST分析を行うためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Information(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)を通じて公に入手することができる。このアルゴリズムには、最初に、検索配列の長さWの短い文字列を同定することによって高スコアの配列対(HSP)を特定する工程が含まれる。検索配列は、データベース配列中の同じ長さの文字列とともにアラインメントされた場合には、適合しているか、またはある程度のポジティブ値閾値スコア(positive-valued threshold score)Tを満たすかのいずれかである。Tは、文字列スコア閾値と呼ばれる(Altschul et al.、前出)。これらの最初の文字列のヒットは、それらが含まれているより長いHSPを見つけるための検索を開始するための種子とされる。この文字列のヒットは、その後、累積アルゴリズムスコアを大きくすることができる限りは、個々の配列に沿って両方向に伸張される。累積スコアは、ヌクレオチド配列については、パラメーターM(適合している残基の対についての褒賞スコア；常に>0)およびN(適合しない残基についてのペナルティースコア；常に<0)を使用して計算される。アミノ酸配列については、スコアリングマトリックスは、累積スコアを計算するために使用される。それぞれの方向への文字列のヒットの伸張は、累積アラインメントスコアがその最大到達値よりも量X小さくなつた時；1つ以上のネガティブにスコアされる残基のアラインメントの累積が原因で、累積スコアがゼロまたはそれ未満になつた時；またはいずれかの配列の末端に到達した時には、停止される。

20

BLASTアルゴリズムのパラメーターW、T、およびXによって、アラインメントの感度および速度が決定される。(ヌクレオチド配列についての)BLASTNプログラムでは、デフォルトとして、11の文字列の長さ(W)、10の期待値(E)、M=5、N=-4、および両方の鎖の比較が使用される。アミノ酸配列については、BLASTPプログラムでは、デフォルトとして、3の文字列の長さ(W)、10の期待値(E)、およびBLOSUM62スコアリングマトリックスが使用される(Henikoff & Henikoff(1989)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915を参照のこと)。

30

【0049】

40

配列同一性の割合(%)を計算することに加えて、BLASTアルゴリズムによってはまた、2つの配列間の類似性の統計分析も行われる(例えば、Karlin & Altschul(1993)Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:5873-5878を参照のこと)。BLASTアルゴリズムによって提供される類似性の1つの測定方法は、最少確率合計(smallest sum probability(P(N)))であり、これによって、2つのヌクレオチド配列またはアミノ酸配列の間での適合が偶然に起こる可能性の指標が提供される。例えば、核酸は、参照核酸に対する試験核酸の比較における最少確率合計が、約0.1未満、より好ましくは、約0.01未満、そして最も好ましくは、約0.001未満である場合に、参照配列に対して類似していると考えられる。

50

【0050】

表現「特異的に標的化する／送達する」は、例えば、本発明のキメラ部分に関して使用される場合には、標的（例えば、標的タンパク質（単数または複数）を過剰発現している細胞に対するその部分の特異的な結合を意味し、これによって、「特異的な」標的化を用いない場合に得られるものと比較して、細胞で、または細胞内でのその部分の局所的な持続期間および／または濃度の増大が生じる。この特異性は必ずしも絶対的なものではないが、正常に標的タンパク質（単数または複数）を発現している細胞（例えば、野生型）について観察されるよりも、または標的タンパク質（単数または複数）を発現していない細胞について観察されるよりも多く標的タンパク質（単数または複数）を発現している細胞について観察されるよりも、検出しやすい／測定しやすいほどに大きい親和力／親和性だけが必要である。 10

【0051】

アミノ酸残基は、本出願の中では、標準的な3文字または1文字の省略形（例えば、W I P O 標準 S T 2 5 に示されているもの）にしたがって、および／あるいは、表1に示されるように識別される。

【0052】

【表1 - 1】

表1 アミノ酸配列の省略形

アミノ酸	3文字の省略形	1文字の省略形
L-アラニン	Ala	A
L-アルギニン	Arg	R
L-アスパラギン	Asn	N
L-アスパラギン酸	Asp	D
L-システイン	Cys	C
L-グルタミン	Gln	Q
L-グルタミン酸	Glu	E
グリシン	Gly	G
L-ヒスチジン	His	H

20

【0053】

【表1 - 2】

L-イソロイシン	Ile	I
L-ロイシン	Leu	L
L-メチオニン	Met	M
L-フェニルアラニン	Phe	F
L-プロリン	Pro	P
L-セリン	Ser	S
L-スレオニン	Thr	T
L-トリプトファン	Trp	W
L-チロシン	Tyr	Y
L-バリン	Val	V
L-リジン	Lys	K

30

40

本明細書中に記載される鏡像異性体アミノ酸は、「L」異性体形態であることが好ましい。しかし、ポリペプチドの所望される特性がたも垂れる限りは、「D」異性体形態の残基で、任意のLアミノ酸残基を置換することができる。本明細書中に示される全てのアミノ酸残基の配列は、従来の左から右に向かってアミノ末端からカルボキシ末端方向であることに合わせられる。

【0054】

用語「単離されたタンパク質」または「単離され、そして精製されたタンパク質」が、時折、本明細書中で使用される。この用語は、主に、本発明の単離された核酸分子の発現

50

によって生産されるタンパク質を意味する。あるいは、この用語は、「実質的に純粋な」形態で存在するように、それが自然界において会合している他のタンパク質とは十分に分離されているタンパク質を意味し得る。「単離された」は、他の化合物もしくは材料との人工的または合成による混合物、あるいは、基本的な活性を妨害することではなく、そして、不完全な精製、安定剤の添加、または、例えば、免疫学的調製物もしくは薬学的に許容される調製物にするための配合が原因で存在する可能性がある、不純物の存在を排除することは意味しない。

【0055】

用語「実質的に純粋」は、所定の材料（例えば、核酸、オリゴヌクレオチド、タンパク質など）が少なくとも50～60重量%を占めている調製物を意味する。より好ましくは、調製物には、任意の化合物が、少なくとも75重量%、そして最も好ましくは、90～95重量%含まれる。純度は、所定の化合物に適している方法（例えば、クロマトグラフィー方法、アガロースまたはポリアクリルアミドゲル電気泳動、HPLC分析など）によって測定される。

10

【0056】

用語「機能的」は、本明細書中で使用される場合は、核酸またはアミノ酸配列が記載されるアッセイまたは目的について機能的であることを暗に意味する。

【0057】

表現「原則として～から構成されている」は、特定のヌクレオチドまたはアミノ酸について言及される場合には、所定の配列番号の特性を有している配列を意味する。例えば、アミノ酸配列に関して使用される場合には、この表現には、配列自体と、配列の基本的な特性と新規の特性に影響を与えることのない分子修飾が含まれる。

20

【0058】

用語「タグ」、「タグ配列」、または「タンパク質タグ」は、化学的部分（ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、またはアミノ酸、ペプチド、もしくはタンパク質、あるいは他の化合物）を意味し、これらは、別の配列に対して付加されると、さらなる有用性を提供するか、またはその配列の有用な特性（具体的には、検出または単離における有用な特性）を付加する。したがって、例えば、ホモポリマー核酸配列または捕捉オリゴヌクレオチドに相補的な核酸配列が、伸張産物またはハイブリダイズした産物のその後の単離を容易にするために、プライマーまたはプローブ配列に付加される場合がある。タンパク質タグの場合には、ヒスチジン残基（例えば、4個から8個の連続しているヒスチジン残基）が、キレート金属クロマトグラフィーによるタンパク質の単離を容易にするために、タンパク質のアミノ末端またはカルボキシ末端のいずれかに付加される場合もある。あるいは、特異的な抗体分子または他の分子（例えば、f1a gエピトープ、c-my cエピトープ、インフルエンザA型ウイルスヘマグルチニンタンパク質の膜貫通エピトープ、プロテインA、セルロース結合ドメイン、カルモジュリン結合タンパク質、マルトース結合タンパク質、キチン結合ドメイン、グルタチオンS-トランスフェラーゼなど）と反応するエピトープまたは結合決定基を提示するアミノ酸配列、ペプチド、タンパク質、または融合パートナーが、複数の手順（例えば、アフィニティーコロマトグラフィーまたは免疫アフィニティーコロマトグラフィー）によるタンパク質の単離を容易するために、タンパク質に付加される場合がある。化学的タグ部分としては、核酸またはタンパク質のいずれかに付加することができ、そしてアビジン試薬との相互作用により単離または検出を容易にするビオチンのような分子などが挙げられる。多数の他のタグ部分が公知であり、これらは、当業者であれば用意に想定することができ、そして、この定義の範囲にあると意図される。

30

【0059】

「クローン」または「クローン細胞の集団」は、例えば、有糸分裂によって、1つの細胞または共通の先祖から導かれた細胞の集団である。

【0060】

「細胞株」は、多くの世代へとインビトロで安定に増殖することができる初代細胞のク

40

50

ローンまたは細胞集団である。

【0061】

詳細な説明

腫瘍は、多くの場合には、様々にリガンドに結合して、際限のない腫瘍の増殖を促進する、複数の成長因子受容体を過剰発現する。このような成長因子受容体の一例は、上皮成長因子受容体 (EGFR) タンパク質ファミリーである。

【0062】

上皮成長因子受容体 (EGFR) タンパク質ファミリーのメンバーを介したシグナル伝達は、リガンドの結合によって誘発されるホモ二量体またはヘテロ二量体の形成に応じて様々である。この受容体ファミリーは、4つの膜結合タンパク質 : EGFR、HER2/neu、HER3、およびHER4から構成されている。これらのタンパク質の過剰発現は、多数のタイプのガン（乳ガン、結腸ガン、卵巣ガン、子宮内膜ガン、胃ガン、膵臓ガン、前立腺ガン、および唾液腺ガンが含まれるが、これらに限定はされない）における予後不良と関係している。多数のグループによって、腫瘍の増殖を阻害するためにEGFRタンパク質ファミリーの個々のメンバー（例えば、HER2/neuまたはEGFR）を標的化するストラテジーが開発されてきたが、いずれの処置も、これらの形態のガンを最終的に治癒できることは証明されていない。

【0063】

本発明にしたがって、EGFRタンパク質ファミリーの複数のメンバー（または所定のメンバー上の複数の部位）を同時に標的化することができる新規の抗体構築物が開発された。この抗体構築物には、通常、互いに結合させられた第1の抗体と第2の抗体が含まれる。ここでは、第1の抗体と第2の抗体は、EGFRタンパク質ファミリーの同じメンバーまたは異なるメンバー上の異なるエピトープに対して特異的に結合する。特定の実施形態においては、二重特異的抗体構築物は、二重特異的単鎖分子（例えば、二重特異的単鎖Fv (bs-scFv)）であるが、構築物は必ずしもそれに限定はされない。したがって、例えば、化学的に結合させられた完全な抗体、または抗体断片もまた、本発明の範囲内であると意図される。一般的には、二重特異的抗体が本明細書中で記載される場合には、三重特異的またはそれ以上の一般的な多特異的抗体もまた意図されることが理解されるであろう。

【0064】

本発明の二重特異的抗体は、EGFRタンパク質ファミリーの選択されたメンバー（例えば、EGFR、HER2/neu、HER3、HER4）に結合して、リガンドによって誘導されるシグナル伝達を妨げる、ならびに/または、細胞増殖抑制効果および/または細胞毒性作用を誘発する。二重特異的抗体はまた、ガン細胞、固形腫瘍などを特異的に標識するために、そしてより一般的には、任意に結合させられたかもしくは別の方法でカップリングさせられたエフェクター（例えば、放射性同位元素、標識、細胞毒素、薬物、リポソーム、抗体、核酸、デンドリマーなど）をガン細胞（単離されたガン細胞、転移性細胞、固形腫瘍の細胞などが含まれるが、これらに限定はされない）に対して特異的に標的化/送達するためにも使用することができる。

【0065】

特定の好ましい実施形態においては、本発明の二重特異的抗体は二重特異的単鎖Fv抗体（bs-scFv）である。単鎖Fv抗体断片には操作された抗体誘導体が含まれ、これには、ペプチドリンカーモーダル分子によって連結させられた重鎖可変領域と軽鎖可変領域の両方が含まれ、そして、それらの大きさが小さくなつたことによってそれらがIgG抗体よりも容易に組織および固形腫瘍に浸潤できるとの理由から、修飾されていないIgG抗体よりもおそらく有効である。

【0066】

1つの実施形態においては、本発明の二重特異的抗体（例えば、bs-scFv抗体分子）には、2つの異なる結合特異性を提供する2つのドメインが含まれる。第1のドメインは、EGFRタンパク質ファミリーの1つのメンバーの上にある1つのエピトープに対

10

20

30

40

50

して結合親和性を有しており、そして第2のドメインは、EGFRタンパク質ファミリーの第2のメンバーの上にあるエピトープに対する結合親和性を有している。本発明の例示的なbs-scFv分子は「ALM」であり、これは、HER2/neuの上にあるエピトープに対して結合特異性を示す第1のアーム(ドメイン)と、HER3の上にあるエピトープに対して結合特異性を示す第2のアーム(ドメイン)を用いて作成された二重特異的抗体である。

【0067】

あるいは、本発明の二重特異的抗体は、1つのドメインがEGFRタンパク質ファミリーの1つのメンバーの上にあるエピトープに対して結合特異性を有しており、そして第2のドメインがEGFRタンパク質ファミリーの同じメンバーの上にある第2の異なるエピトープに対して結合特異性を有するように、作成することができる。このタイプの例示的なbs-scFvは「ALF」であり、これは、2つの異なるscFv分子(いずれも、HER3に対して特異性を有している)から構成されている。

【0068】

I. 本発明の二重特異的抗体または多特異的抗体を形成する抗体。

【0069】

上記に示されるように、本発明の二重特異的抗体または多特異的抗体には、通常、その少なくとも2つがEGFRタンパク質ファミリーの異なるエピトープに特異的である、2つ以上の結合ドメインが含まれる。本発明の好ましい抗体には、EGFR、HER2/neu、HER3、およびHER4のエピトープに特異的なドメインが含まれる。

【0070】

ファージディスプレイアプローチを使用して、EGFRタンパク質ファミリーのこれらのメンバーの上にある様々なエピトープに特異的な多数の単鎖抗体が惹起させられている。これらの単鎖Fv抗体は、本発明の二重特異的抗体または多特異的抗体を構築するためのドメイン/アームとして使用することができる。多数のこれらの抗体は、表2に、そして図13および14において、以下で提供される。個々のアーム(抗体)は、EGFRタンパク質ファミリーの別のメンバーの上にある2つの異なるエピトープに対して結合特異性を有しているbs-scFv抗体、またはEGFRタンパク質ファミリーの同じメンバーの上にある2つの異なるエピトープに対して結合特異性を有しているbs-scFv抗体のいずれかを形成するように、異なるアームと対合させることができる。

【0071】

【表2-1】

表2 EGFRタンパク質ファミリーの複数のエピトープに対する単鎖Fv抗体

抗 HER2/neu*:	抗 HER3**:
C6.5***	HER3.A5
C6ML3-9 (ML3.9またはC6ML3.9)	HER3.F4(配列番号2のタンパク質 ,

【0072】

【表2-2】

C6MH3-B1 (B1またはC6MH3.B1)	配列番号28の DNA)	
C6-B1D2 (B1D2 またはC6MH3-B1D2)	HER3.H1 (配列番号3のタンパク質 , 配列番号29の DNA)	
F5 (配列番号1のタンパク質、配列番号27の DNA)**	HER3.H3 (配列番号4のタンパク質 , 配列番号30の DNA))	
HER3.B12 (配列番号6のタンパク質 , 配列番号32の DNA)	HER3.E12 (配列番号5のタンパク質 , 配列番号31の DNA))	10
Anti-EGFR**:	Anti-HER4:	
EGFR.E12 (配列番号7のタンパク質 , 配列番号33の DNA)	HER4.B4	
EGFR.C10 (配列番号8のタンパク質 , 配列番号34の DNA)	HER4.G4	
EGFR.B11 (配列番号9のタンパク質 , 配列番号35の DNA)	HER4.F4	
EGFR.E8 (配列番号10のタンパク質 , 配列番号36の DNA)	HER4.A8	20
	HER4.B6 (配列番号19のタンパク質 , 配列番号37の DNA)	
	HER4.D4	
	HER4.D7	
	HER4.D11	
	HER4.D12	
	HER4.E3 (配列番号21のタンパク質 , 配列番号38の DNA)	
	HER4.E7	
	HER4.F8	
	HER4.C7	30

* 配列は、 Schier et al. (1996). J. Mol. Biol., 255 (1) : 28 - 43 に開示されている。 Schier et al. (1995) Immunootechnology, 1 : 73 - 81 もまた参考のこと。

** 配列は、本明細書中以下の別表A (Appendix A) に提供される。

*** 配列は、図13および14にも示される。

【0073】

しかし、本発明の二重特異的抗体または多特異的抗体は、表2および/または図13もしくは14に列挙される特定の抗体の使用に必ずしも限定はされない。事実上、表2および/または図13もしくは14に列挙される個々の抗体は、EGFRタンパク質ファミリーの1つのメンバーのエピトープを特定し、これらの抗体は同じエピトープに結合する他の抗体を同定するために容易に使用することができる。したがって、特定の実施形態においては、本発明の二重特異的抗体または多特異的抗体には、表2および/または図13もしくは14の抗体（例えば、C6.5、C6ML3-9、C6MH3-B1、C6-B1D2、F5、HER3.A5、HER3.F4、HER3.H1、HER3.H3、HER3.E12、HER3.B12、EGFR.E12、EGFR.C10、EGFR.B11、EGFR.E8、HER4.B4、HER4.G4、HER4.F4、HER4.A8、HER4.B6、HER4.D4、HER4.D7、HER4.D11、HER4.D12、HER4.E3、HER4.E7、HER4.F8、およびHER4.C7からなる群より選択される抗体）が特異的に結合するエピトープに特異的に結合する1つ以

上のドメインが含まれる。

【0074】

このような抗体は、抗体全体、抗体断片、または単鎖抗体を、標的タグが含まれているタンパク質に結合するそれらの能力について表2に列挙される抗体と競合するそれらの能力についてスクリーニングすることによって容易に同定される。言い換えると、候補の抗体は、EGFRタンパク質ファミリーの中の標的タンパク質に対する表2および/または図13もしくは14に列挙される抗体との交差反応性についてスクリーニングすることができる。

【0075】

好みの実施形態においては、本発明の抗体は、表2および/または図13もしくは14に列挙される抗体によって認識される1つ以上のエピトープに特異的に結合する。言い換えると、特に好みの抗体は、これらの抗体の1つ以上と交差反応する。交差反応性についてのアッセイする手段は当業者に周知である（例えば、Dowbenko et al. (1988) J. Virol. 62: 4703-4711を参照のこと）。

【0076】

例えば、特定の実施形態においては、交差反応性は、固体支持体に結合させられた単離されたEGFRファミリーのメンバー（例えば、EGFR、HER2/neu、HER3、およびHER4、またはそれらの断片）を提供すること、そして、標的タンパク質への結合について表2に列挙される抗体の1つ以上と競合する試験抗体の能力をアッセイすることによって確認することができる。したがって、競合結合形式の免疫アッセイは、交差反応性の決定に使用することができる。例えば、1つの実施形態においては、EGFRファミリーのメンバーのポリペプチドが固体支持体に固定される。試験される抗体（例えば、ファージディスプレイライブラリーからの選択によって作成されたか、または全抗体ライブラリーにおいて作成された）は、固定されたポリペプチドに対する結合について、表2および/または図13もしくは14に列挙される抗体の1つ以上との競合アッセイに加えられる。試験抗体の、表2および/または図13もしくは14の抗体の固定されたタンパク質に対する結合と競合する能力が比較される。次いで、上記タンパク質の交差反応性の割合（%）は、標準的な計算を使用して計算することができる。試験抗体が表2および/または図13もしくは14の抗体の1つ以上と競合し、そして対応する（競合する）抗体（例えば、表2の抗体）と同様またはそれ以上の親和性で、約 1×10^{-8} Mに匹敵するかまたはそれよりも大きい、より好みの、 1×10^{-9} よりも大きい、あるいは、 1×10^{-10} 、またはそれよりも大きい結合親和性を有している場合には、抗体は本発明での使用に十分に適している。

【0077】

特に好みの実施形態においては、交差反応性は、BIAcoreでの表面プラズモン共鳴を使用することによって行われる。BIAcoreフローセルの中で、EGFRタンパク質はセンサーチップに結合させられる。5（1/分の典型的な流速、100nMから1（Mの滴定で、抗体は、表面のほぼ飽和した状態を生じる抗体濃度を決定するために約5分間、フローセル表面上に注入される。エピトープマッピングまたは交差反応性が、その後、ほぼ飽和した状態を生じる濃度の抗体の対を使用して評価され、そして、少なくとも100RUの抗体が結合する。結合した抗体の量が、対のそれぞれのメンバーについて決定され、その後、2つの抗体が一緒に混合されて、個々の抗体の測定に使用される濃度と等しい最終濃度とされる。様々なエピトープを認識する抗体は、一緒に注射された場合には、結合したRUの付加的増加を原則として示すが、同じエピトープを認識する抗体は、RUのわずかな増加しか示さない。特に好みの実施形態においては、抗体は、一緒に「注射」された場合に、それらが、原則的な付加的増加（好みの、少なくとも約1.4倍の増加、より好みの、少なくとも約1.6倍の増加、そして最も好みの、少なくとも約1.8または2倍の増加）を示すならば、交差反応性であると言われる。

【0078】

表2および/または図13もしくは14に列挙された抗体によって認識されるエピト-

10

20

30

40

50

プでの交差反応性は、多数の他の標準的な技術（例えば、Geysen et al (1987) J. Immunol. Meth. 102: 259-274を参照のこと）によって確認することができる。

【0079】

加えて、表2に特定された多数の抗体は配列決定されている（例えば、図13および14を参照のこと）。したがって、相補性決定領域（CDR）が含まれているアミノ酸配列は公知である。この配列情報を使用して、同じであるか、または類似する相補性決定領域を、例えば、種適合性を確実にするために、血清半減期を長くするために、などのために、キメラ全長抗体および/または抗体断片を生じさせるために、他の抗体中に操作することができる。キメラ抗体を作成する多数の方法は当業者に周知である（例えば、米国特許第5,502,167号、同第5,500,362号、同第5,491,088号、同第5,482,856号、同第5,472,693号、同第5,354,847号、同第5,292,867号、同第5,231,026号、同第5,204,244号、同第5,202,238号、同第5,169,939号、同第5,081,235号、同第5,075,431号、および同第4,975,369号を参照のこと）。

10

【0080】

簡単に言うと、日常的に使用されている方法を使用して、表2に列挙された抗体を同じエピトープに結合する他の抗体（全長、抗体断片、単鎖など）を作成または同定するためには、容易に使用することができる。同様に、表2に列挙された抗体は、同じであるかまたは類似する相補性決定領域（CDR）を有している他の抗体を作成するために容易に利用することができる。

20

【0081】

I I . 二重特異的抗体分子の調製

多数のEGFRタンパク質ファミリーのメンバーの上で見られるエピトープに対する抗体（例えば、表2に列挙された抗体）を使用して、本発明の二重特異的抗体または多特異的抗体を調製することができる。2つ（またはそれ以上）の抗体を、様々な方法を使用して調製することができる。例えば、抗体は、（化学的なタンパク質合成方法、組み換え発現方法、ハイブリドーマ技術などを使用して）別々に調製し、その後、直接またはリンカーを介してのいずれかで、互いに化学的に結合させることができる。抗体がいずれも、末端で直接結合させられたか、またはリンカーを介して結合させられた単鎖抗体である場合は、二重特異的分子または多特異的分子を化学的に合成することができ、また、より好ましくは、組み換えによって発現させることができる。

30

【0082】

分子を化学的に結合させる手段は当業者に周知である。2つの抗体を化学的にカップリングさせるための手順は単純である。ポリペプチドには通常、様々な官能基（例えば、カルボン酸（COOH）または遊離のアミン（-NH₂）基）が含まれており、これらは、対応する抗体またはリンカー上の適切な官能基との反応に利用される。

【0083】

あるいは、抗体は、さらなる反応性官能基を露出させるかまたは結合させるように誘導することもできる。誘導には、多数のリンカー分子のうちの任意のもの（例えば、Pierce Chemical Company, Rockford Illinoisから入手することができるもの）の結合が含まれ得る。様々な適切なリンカーが当業者に公知であり（例えば、欧州特許出願番号188,256；米国特許第4,671,958号、同第4,659,839号、同第4,414,148号、同第4,699,784号、同第4,680,338号、同第4,569,789号、および同第4,589,071号；ならびに、Borlinghaus et al. (1987) Cancer Res. 47: 4071-4075を参照のこと）、そして適切なリンカーは、二重特異的抗体に対するエフェクターの結合に関して、以下にも記載される。

40

【0084】

本発明の特に好ましい実施態様においては、bs-scFv抗体分子は、宿主細胞の中

50

で生産された組み換え体である抗体断片の発現によって生産される。EGFRタンパク質ファミリーの複数のメンバーの上にある様々なエピトープを標的化するscFv分子のいくつかの遺伝子がクローニングされており(例えば、別表A(Appendix A)およびSchier et al. (1996) J. Mol. Biol., (1): 28-43を参照のこと)、これらのscFv遺伝子の対(または他の組み合わせ)を、直接またはリンカー分子を介して、作動可能に連結させることができる。得られた、bs-scFv抗体断片をコードする核酸分子は発現ベクターの中に挿入され、そして宿主細胞の中に導入される。その後、得られたbs-scFv抗体分子が単離され、そして発現システムから精製される。

【0085】

10

本発明の特定の好ましい実施形態においては、scFv抗体分子は、bs-scFv抗体分子をタンパク質分解から保護するように設計された新規のリンカー分子と対合させられる。このリンカーには通常、タンパク質分解的切断部位は含まれておらず、これは、通常は、主に中性(電荷を有していない)アミノ酸が含まれることを特徴とする。1つのこのようなリンカー配列iは、以下の配列を有している: Asn Ser Gly Ala Gly Thr Ser Gly Ser Gly Ala Ser Gly Glu Gly Ser Gly Ser Lys Leu(配列番号37)。

【0086】

表2に提供されたscFvは、以下の要因に基づいて新しいbs-scFvの中に取り込まれる:(1)所定の標的にに対する親和性の低下、(2)抗鎖反応性エピトープを含まないこと(BIAcore上でのサンドイッチアッセイおよび結合阻害によって決定される)、(3)まだ結合していないEGFRファミリーのメンバーの対を標的化する組み合わせ、ならびに、(4)他のbs-scFvの組み合わせで使用された場合に、増殖の阻害およびシグナル伝達の変化を導くscFvアームが含まれること。

20

【0087】

本発明のbs-scFv抗体の純度は、当業者に公知の標準的な方法を使用してアッセイすることができ、これには、ELISA、免疫組織化学、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー、固定化金属アフィニティーコロマトグラフィー(IMAC)、サイズ排除クロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)、ウェスタンブロッティング、表面プラズモン共鳴、および質量スペクトル分析が含まれるが、これらに限定はされない。

30

【0088】

本明細書中で提供される抗体、核酸配列、および他の教示を使用して、本発明の二重特異的抗体または多特異的抗体を、日常的に使用される方法(例えば、Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory、またはAusubel et al. (eds) (1997) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons N.Y.に示されている方法)を使用して組み換えによって発現させることができる。加えて、本発明の組み換え体である二重特異的单鎖抗体を生産する例示的な方法は、実施例で示される。特異的な材料が記載される範囲については、これは、単なる説明の目的のためのものにすぎず、本発明を限定するようには意図されない。

40

【0089】

III.二重特異的抗体および/または多特異的抗体が含まれているキメラ部分
多くの実施形態においては、本発明の二重特異的および/または多特異的抗EGFRファミリーメンバー抗体は、いずれのさらなる「エフェクター」を使用することもなく、ガン細胞の成長および/または増殖を阻害することができ、特定の実施形態においては、二重特異的抗体および/または多特異的抗体がエフェクターに対してさらに結合させられ、それによって、EGFRファミリーのメンバー(単数または複数)を過剰発現しているエフェクターを優先的に標的化/送達(deliver)するキメラ部分が形成される。

50

【0090】

EGFRタンパク質は多くの場合は、ガン細胞の中でアップレギュレートされることが明らかにされているので、これらのタンパク質は、様々なガン細胞（例えば、単離された細胞、転移性の細胞、固体腫瘍の細胞など）に対する（特に、上皮ガン細胞（例えば、乳ガン細胞）に対する）エフェクター（例えば、細胞毒素、放射標識などのエフェクター分子）の効率的であり、特異的な送達のための標的（単数または複数）として、有効に使用することができる。標的EGFRタンパク質（単数または複数）は、必ずしも、有効な標的を提供するためだけにガン細胞の上に存在しているのではない。健常な細胞と比較した、ガン細胞上でのEGFRのディファレンシャルな発現は、有意であり、そして有用な標的化の利点を提供するために、すなわち、標的（例えば、ガン）細胞へおよび/または標的細胞の中へのエフェクター部分の優先的な送達を生じるために十分である。

10

【0091】

特定の好ましい実施形態においては、本発明の二重特異的抗体または多特異的抗体は、「プレ標的化」ストラテジー（これによって、エフェクター部分の投与後に標的部位でのキメラ部分の形成が生じる）において、または「標的化」ストラテジー（この場合は、二重特異的抗体および/または多特異的抗体がエフェクター分子に結合させられて、その後、キメラ部分が提供されるように使用される）において利用される。

【0092】

キメラ分子またはキメラ組成物またはキメラ部分は、それらの自然界での状態においては別々に存在している2つ以上の分子または組成物が、その構成成分であるメンバーの所望される機能性を有している1つの分子部分または組成物を形成するように一緒に結合させられている、分子または組成物を意味する。通常は、キメラの構成成分である分子の1つであるp o e t uは「標的化分子」であり、すなわち、本発明の場合には、EGFRファミリーの1つ以上のメンバーに特異的に結合する二重特異的抗体または多特異的抗体である。

20

【0093】

キメラ分子の別の構成成分は「エフェクター」である。エフェクター分子は、標的細胞（例えば、EGFRファミリーのメンバーを過剰発現している細胞）に特異的に輸送される1つの分子または分子のグループを意味する。エフェクター分子は、通常、標的細胞に送達される特徴的な活性を有している。エフェクター分子としては、細胞毒素、標識、放射性核種、リガンド、抗体、薬物、リポソームなどが挙げられるが、これらに限定はされない。

30

【0094】

特定の実施形態においては、エフェクターは検出可能な標識であり、好ましくは、放射性核種が含まれている検出可能な標識である。本発明の放射性核-キレート化剤-（例えば、ビオチン）結合体において有用な放射性核種および標識の中でも、放射体、陽電子放射体、X線放射体、および蛍光放射体は、領域の特定、診断および/もしくは病期診断、ならびに/または治療に適しており、一方、放射体および放射体、ならびに電子捕捉因子および中性子捕捉因子（例えば、ホウ素およびウラン）もまた治療に使用することができる。

40

【0095】

検出可能な標識は、外部検出器および/または内部検出器と組み合わせて使用することができ、例えば、1つ以上のEGFRファミリーのメンバーを過剰発現しているガン細胞を効率よく領域を特定する、および/または視覚化するための手段が提供される。このような検出/視覚化は、手術前および手術中の設定が含まれるが、これらに限定はされない様々な状況において有用であり得る。したがって、特定の実施形態においては、本発明は、哺乳動物の体内のEGFRファミリーのマーカーを有している組織を手術中に検出するおよび領域を特定する方法に関する。これらの方法には、通常、検出器（例えば、線検出プローブ）、による検出のために十分な量の、検出可能な標識で標識された本発明の二重特異的抗体および/または多特異的抗体（例えば、放射性同位元素（例えば、¹⁶¹T）

50

b、^{1 2 3} I、^{1 2 5} Iなど)で標識された本発明の抗MUC-1抗体)が含まれている組成物を哺乳動物に投与する工程、ならびに、標的組織に活性のある物質を取り込ませた後に、そして好ましくは、標識の血液からのクリアランス後に、哺乳動物を、体の関係する部分の放射免疫検出技術に供する(例えば、線検出プローブを使用することによる)工程が含まれる。

【0096】

標識が結合した二重特異的抗体および/または多特異的抗体は、放射線誘導手術の技術において使用することができる。ここでは、被験体の体内の関連する組織を、検出器(例えば、線検出プローブ)によって手術中に検出し、領域を特定することができる。執刀医は、手術中に、このプローブを使用して、放射性同位体で標識された化合物がその中に取り込まれた(すなわち、例えば、低エネルギー光子放射体が取り込まれた)組織を見つけることができる。

10

【0097】

検出可能な標識に加えて、好ましいエフェクターとしては、細胞毒素(例えば、シードモナス(*Pseudomonas*)エクソトキシン、リシン、アブリン、ジフテリア毒素など)、あるいは、細胞傷害性薬物またはプロドラッグ(この場合、キメラ部分は強力な細胞死滅因子として作用することができ、EGFRファミリーのメンバー(単数または複数)を保有している細胞に対して細胞毒素を特異的に標的化させる)が挙げられる。

【0098】

なお他の実施形態においては、エフェクターには、薬剤(例えば、抗ガン剤、例えば、ドキソルビシン、ビンプラスチン、タキソールなど)、免疫システムの成分による結合した細胞の認識を刺激する抗原、免疫システムの成分に特異的に結合して、それらを標的細胞(単数または複数)に対して指向させる抗体などがカプセル化されているリポソームが含まれ得る。

20

【0099】

A)二重特異的または多特異的である、抗EGFRファミリーメンバー標的化分子
本発明の方法および組成物の好ましい実施形態においては、標的化部分は、本明細書中に記載されるEGFRファミリーの1つ以上のメンバーに特異的に結合する二重特異的抗体および/または多特異的抗体である。二重特異的抗体および/または多特異的抗体には、全長の抗体、抗体断片(単数または複数)(例えば、Fv、Fabなど)、ならびに/あるいは、単鎖抗体(scfv)が含まれ得る。

30

【0100】

B)特に好ましいエフェクター

1)画像化組成物

特定の実施形態においては、本発明のキメラ分子は、腫瘍部位に対して検出可能な標識を指向させるために使用することができる。これにより、腫瘍の検出および/または領域の特定を容易にすることができます。特定の特に好ましい実施形態においては、キメラ分子のエフェクター成分は、「放射線不透過性」の標識であり、例えば、X線を使用して容易に視覚化することができる標識である。放射線不透過性の材料は当業者に周知である。最も一般的な放射線不透過性の材料としては、ヨウ化物、臭化物、またはバリウム塩が挙げられる。他の放射線不透過性の材料もまた公知であり、これらには、有機ビスマス誘導体(例えば、米国特許第5,939,045号を参照のこと)、放射線不透過性ポリウレタン(米国特許第5,346,981号を参照のこと)、有機ビスマス複合物(例えば、米国特許第5,256,334号を参照のこと)、放射線不透過性バリウムポリマー複合体(例えば、米国特許第4,866,132号を参照のこと)などが含まれるが、これらに限定はされない。

40

【0101】

本発明の二重特異的抗体および/または多特異的抗体は、放射線不透過性部分に直接結合させることができ、また、以下に記載されるような放射線不透過性材料を保有しているかまたは放射線不透過性材料が含まれている「パッケージ」(例えば、キレート、リポソ

50

ーム、ポリマーマイクロビーズなど)に結合させることもできる。

【0102】

放射線不透過性標識に加えて、他の標識もまた、本発明での使用に適している。本発明のキメラ分子のエフェクター分子成分としての使用に適している検出可能な標識としては、分光高度的手段、光化学的手段、生化学的手段、免疫化学的手段、電気的手段、光学的手段、または化学的手段、によって検出することができる任意の組成物が挙げられる。本発明において有用な標識としては、磁気ビーズ(例えば、Dyna beads(登録商標))、蛍光色素(例えば、フルオレセインイソチオシアネート、テキサスレッド、ローダミン、緑色蛍光タンパク質など)、放射標識(例えば、³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C、または³²P)、酵素(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、およびELISAにおいて一般的に使用される他の酵素)、ならびに比色標識(例えば、コロイド金または着色ガラスもしくはプラスチック(例えば、ポリスチレン、ポリブロピレン、ラテックスなど)ビーズ)が挙げられる。

【0103】

様々な好ましい放射標識としては、以下が挙げられるが、これらに限定はされない:
⁹Tc、²⁰³Pb、⁶⁷Ga、⁶⁸Ga、⁷²As、¹¹¹In、^{113m}In、⁹⁷Ru、⁶²Cu、⁶⁴1Cu、⁵²Fe、^{52m}Mn、⁵¹Cr、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、⁷⁷As、⁹⁰Y、⁶⁷Cu、¹⁶⁹Er、¹²¹Sn、¹²⁷Te、¹⁴²Pr、¹⁴³Pr、¹⁹⁸Au、¹⁹⁹Au、¹⁶¹Tb、¹⁰⁹Pd、¹⁶⁵Dy、¹⁴⁹Pm、¹⁵¹Pm、¹⁵³Sm、¹⁵⁷Gd、¹⁵⁹Gd、¹⁶⁶Ho、¹⁷²Tm、¹⁶
⁹Yb、¹⁷⁵Yb、¹⁷⁷Lu、¹⁰⁵Rh、および¹¹¹Ag。

【0104】

このような標識を検出する手段は当業者に周知である。したがって、例えば、放射標識は、写真用フィルム、シンチレーション検出器などを使用して検出することができる。蛍光マーカーは、放射された発光を検出するための光検出器を使用して検出することができる。酵素標識は、通常、酵素を基質とともに提供すること、および基質に対する酵素の作用によって生産される反応産物を検出することによって検出され、そして比色標識は、着色された標識を単に視覚化することによって検出される。

【0105】

特定の特異的な実施形態においては、本発明により、腫瘍および/または他のガン細胞の検出のための免疫結合体(キメラ部分)の使用が意図される。したがって、例えば、本発明の二重特異的抗体は、線カメラでの検出のためには線を放射する放射性同位元素(例えば、Na-22、Cr-51、Co-60、Tc-99、I-125、I-131、Cs-137、GA-67、Mo-99)に対して、陽電子放出型断層撮影法(PET)装置上での検出のためには陽電子を放射する同位元素(例えば、C-11、N-13、O-15、F-18など)に対して、そして核磁気共鳴検出方法(MRI)のための金属造影剤(例えば、Gdが含まれている試薬、Euが含まれている試薬など)に対して、結合させることができる。加えて、本発明の二重特異的抗体は、従来の免疫組織化学(例えば、蛍光標識、ナノ結晶標識、酵素標識および比色標識など)において使用することもできる。

【0106】

2) 放射線増感剤

別の実施形態においては、エフェクターは、細胞に対する電離放射線(例えば、⁶⁰C⁰またはX線源によって生じる可能性があるもの)の細胞傷害作用を促進する放射線増感剤であり得る。多数の放射線増感剤が公知であり、これには、ベンゾポルフィリン誘導化合物(例えば、米国特許第5,945,439号を参照のこと)、1,2,4-ベンゾトリアジンオキサイド(例えば、米国特許第5,849,738号を参照のこと)、特定のジアミンが含まれている化合物(例えば、米国特許第5,700,825号を参照のこと)、BCNT(例えば、米国特許第5,872,107号を参照のこと)、放射線増感性のニトロ安息香酸アミド誘導体(例えば、米国特許第4,474,814号を参照のこと)

)、様々な複素環誘導体(例えば、米国特許第5,064,849号を参照のこと)、白金錯体(例えば、米国特許第4,921,963号を参照のこと)などが含まれるが、これらに限定はされない。

【0107】

3) リガンド

エフェクター分子はまた、リガンド、エピトープタグ、または抗体である場合もある。特に好ましいリガンドおよび抗体は、免疫細胞上の表面マーカーに結合するものである。このような抗体をエフェクター分子として利用するキメラ分子は、リガンドまたは抗体に対する結合パートナーを保有している免疫細胞と、EGFRファミリーのメンバー(単数または複数)を発現している腫瘍細胞との間での会合を確立する二官能性リンカーとしての役割を果たす。

10

【0108】

3) キレート

本明細書中に記載される医薬品および/または放射標識の多くは、特に、ブレ標的化ストラテジーが利用される場合には、キレートとして提供されることが好ましい。キレート化を行う分子は、通常は、二重特異的抗体および/または多特異的抗体に結合させられたエピトープタグに特異的に結合する分子(例えば、ビオチン、アビシン、ストレプトアビシンなど)に結合させられる。

【0109】

キレート化を行う基は当業者に周知である。特定の実施形態においては、キレート化を行う基は、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)、シクロヘキシル1,2-ジアミン四酢酸(CDTA)、エチレングリコール-O,O'-ビス(2-アミノエチル)-N,N,N',N'-四酢酸(EGTA)、N,N-ビス(ヒドロキシベンジル)-エチレンジアミン-N,N'-二酢酸(HBED)、トリエチレンテトラアミン六酢酸(TTHA)、1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-N,N',N'',N'''-四酢酸(DOTA)、ヒドロキシエチルジアミン三酢酸(HEDTA)、1,4,8,11-テトラ-アザシクロテトラデカン-N,N',N'',N'''-四酢酸(TETA)、置換されたDTPA、置換されたEDTAなどに由来する。

20

【0110】

30

特定の好ましいキレート化剤の例としては、置換された、または未置換の、2-イミノチオランおよび2-イミノチアシクロヘキサン、特に、2-イミノ-4-メルカプトメチルチオラン、およびSAPS(N-4-[211At]アスタトフェネチル)スクシニメート)が挙げられる。

【0111】

1つのキレート化剤である1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-N,N',N'',N'''-四酢酸(DOTA)は、診断上および治療上重要な多数の金属(例えば、放射性各種および放射標識)をキレート化するその能力の理由から、特に目的となるものである。

【0112】

40

DOTAとタンパク質(例えば、抗体)の結合体が記載されている。例えば、米国特許第5,428,156号には、DOTAを抗体および抗体断片に結合させるための方法が教示されている。これらの結合体を作成するためには、DOTAの1つのカルボン酸基が活性のあるエステルへと変換され、これが、抗体または抗体断片上のアミンもしくはスルフヒドリル基と反応することができる。Lewis et al. (1994) *Bioconjugate Chem.* 5: 565-576には同様の方法が記載されており、ここでは、DOTAの1つのカルボキシル基が活性のあるエステルに変換され、活性化させられたDOTAは抗体と混合され、抗体のリジン残基の-N-アミノ基を介してDOTAに対して抗体が連結させられ、それによってDOTAの1つのカルボキシル基がアミド部分に変換される。

50

【0113】

あるいは、キレート化剤を、直接、またはリンカーを介して、エピトープタグに、またはエピトープタグに結合する部分に結合させることができる。DOTAとビオチンの結合体が記載されている（例えば、Su (1995) J. Nuc1. Med., 36 (5 Suppl.) : 154Pを参照のこと、ここには、DOTA-LC-ビオチンまたはDOTA-ベンジル-4-(6-アミノ-カプロアミド)-ビオチンのような利用することができるアミノ側鎖ビオチン誘導体を介するビオチンへのDOTAの結合が開示されている）。Yau et al., WO 95/15335には、ビオチンに結合させることができるニトロ-ベンジル-DOTA化合物を生産する方法が開示されている。この方法には、ヒドロキシル基の一時的な射出；アミンのトシリ化；一時的に保護されたヒドロキシ基の脱保護；脱保護されたヒドロキシ基のトシリ化；および分子内トシリ基の環化による環化反応が含まれる。Wu et al. (1992) Nuc1. Med. Biol., 19 (2) : 239-244には、¹¹¹INおよび⁹⁰Yでのタンパク質の放射標識のためのマイクロ環(microcyclic)キレート化剤の合成が開示されている。Wu et al.によって、実験用のモデルタンパク質である、アビジンとの結合体の安定性および生体分布を研究するための標識されたDOTA-ビオチン結合体が作成された。この結合体は、インサイチュで作成された活性化されたDOTA誘導体と反応させられる遊離のアミノ基が含まれているビオチンヒドラジドを使用して作成された。

【0114】

4) 細胞毒素

20

特に好ましい細胞毒素としては、シュードモナス(*Pseudomonas*)エクソトキシン、ジフテリア(*Diphtheria*)毒素、リシン、およびアブリンが挙げられる。シュードモナス(*Pseudomonas*)エクソトキシンおよびジフテリア(*Diphtheria*)毒素が最も好ましい。

【0115】

シュードモナス(*Pseudomonas*)エクソトキシンA(PE)は極めて活性の高い単量体タンパク質(分子量66kD)であり、シュードモナス・アエルギノーサ(*Pseudomonas aeruginosa*)によって分泌され、これは、そのADP-リボシリ化を触媒する(EF-2上への酸化されたNADのADPリボシリル部分の導入を触媒すること)ことによる伸張因子2(EF-2)の不活化を介して真核生物細胞の中でのタンパク質の合成を阻害する。

30

【0116】

毒素には3つの構造ドメインが含まれ、これは、細胞傷害性を引き起こすように共同して作用する。ドメインIa(アミノ酸1~252)は細胞の結合を媒介する。ドメインII(アミノ酸253~364)は、細胞質ゾルへの移動を担っており、そしてドメインIII(アミノ酸400~613)は、伸張因子2のADPリボシリ化を媒介し、これは、タンパク質を不活化させて、細胞死を引き起こす。ドメインIb(アミノ酸365~399)の機能はまだ同定されていないが、その大部分であるアミノ酸365~380は、細胞傷害性を失うことなく欠失させることができる。Siegal et al. (1989) J. Biol. Chem. 264: 14256-14261を参照のこと。

40

【0117】

標的化分子(例えば、抗MUC-1)がPEに融合させられる場合には、好ましいPE分子は、ドメインIa(アミノ酸1から252)が欠失させられており、そしてアミノ酸365から380がドメインIbから欠失させられているものである。しかし、ドメインIb全体と、ドメインIIの一部(アミノ酸350から394)は、特に、欠失させられた配列がGGGGS(配列番号11)のような連結ペプチドで置き換えられる場合には、欠失させることができる。

【0118】

加えて、PE分子はさらに、特定の所望される用途のために分子を変化させるために、部位特異的突然変異誘発または当該分野で公知の他の技術を使用してさらに修飾すること

50

ができる。本明細書中に記載されるP E分子によって提供される機能的利点に実質的には影響が及ばない様式でP E分子を変化させるための手段もまた使用することができ、このように得られた分子は、本明細書中に含まれるように意図される。

【0119】

好ましいP E分子の最大細胞傷害特性のためには、分子に対するいくつかの修飾が推奨される。組み換え体分子に対する適切なカルボキシル末端配列は、分子を標的細胞の細胞質ゾルへと移動させることができ。有効であることが明らかにされているアミノ酸配列としては、R E D L K (配列番号23) (自然界に存在しているP Eとして)、R E D L (配列番号24)、R D E L (配列番号25)、もしくはK D E L (配列番号26)、それらの繰り返し、または小胞体の中でタンパク質を維持するかもしくはその中へとタンパク質を再利用するように機能する他の配列 (本明細書中では「小胞体保持配列 (endoplasmic retention sequence)」と呼ばれる) が挙げられる。例えば、Chaudhary et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 308-312、およびSeetharam et al. J. Biol. Chem. 266: 17376-17381を参照のこと。P Eの好ましい形態には、P E38QQRと命名されたP E分子 (Debinski et al. Bioconj. Chem., 5: 40 (1994)) およびP E4E (例えば、Chaudhary et al. (1995) J. Biol. Chem., 265: 16306を参照のこと) が含まれる。

【0120】

様々なりガンドに対して融合させられたP Eをコードする遺伝子をクローニングする方法は当業者に周知である (例えば、Siegal et al. (1989) FASEB J., 3: 2647-2652; and Chaudhary et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 4538-4542を参照のこと)。

【0121】

P Eと同様に、ジフテリア毒素 (DT) は、ADP-リボシル化伸張因子2によって細胞を死滅させ、それによってタンパク質の合成を阻害する。しかし、ジフテリア毒素は、ジスルフィド結合によって連結させられた2つの鎖AとBに分けられる。P Eとは対照的に、カルボキシル末端上にあるDTの鎖Bは受容体の結合を担っており、アミノ末端上にある鎖Aには酵素活性が含まれる (Uchida et al. (1972) Science, 175: 901-903; Uchida et al. (1973) J. Biol. Chem., 248: 3838-3844)。

【0122】

好ましい実施形態においては、本発明の標的化分子 - ジフテリア (Diphtheria) 毒素融合タンパク質は、ジフテリア (Diphtheria) 毒素B鎖の短縮によって除去される自然界に存在している受容体結合ドメインを有している。DT388が特に好ましく、この場合、カルボキシル末端配列が残基389で始まるDTが除去される。Chaudhary et al. (1991) Bioch. Biophys. Res. Comm., 180: 545-551。P Eキメラ細胞毒素と同様に、DT分子はMUC-1抗体に化学的に結合させることができるが、特に好ましい実施形態においては、標的化分子は、組み換え手段によってジフテリア (Diphtheria) 毒素に融合させられるであろう (例えば、Williams et al. (1990) J. Biol. Chem. 265: 11885-11889を参照のこと)。

【0123】

5) 他の治療用部分

他の適切なエフェクター分子としては、医薬品、または様々な医薬品が含まれているカプセル化システムが挙げられる。したがって、キメラ分子の標的化分子は薬物に直接結合させることができ、これは、腫瘍に直接送達される。このような薬物は当業者に周知であり、これには、ドキソルビシン、ビンプラスチン、ゲニステイン、アンチセンス分子など

10

20

30

40

50

が含まれるが、これらに限定はされない。

【0124】

あるいは、エフェクター分子は、ウイルスキャプシド、リポソーム、ミセルのような力プセル化システムであり得、これらには、薬物、核酸（例えば、アンチセンス核酸）、または循環システムに直接曝されることによって好ましくはシールドされる別の治療用部分のような、治療用組成物が含まれる。抗体に結合させられたりポソームを調製する手段は当業者に周知である。例えば、米国特許第4,957,735号、Connor et al. (1985) Pharm. Ther., 28: 341-365を参照のこと。

【0125】

C) エフェクター分子への標的化分子の結合

10

当業者は、本発明の二重特異的抗体および/または多特異的抗体とエフェクター部分を、通常は、いずれの順序でも、一緒に連結させることができることを理解するであろう。したがって、例えば、標的化分子は単鎖タンパク質である場合には、エフェクター分子を、標的化分子のアミノ末端またはカルボキシ末端のいずれかに連結させることができる。エフェクターはまた、二重特異的抗体および/または多特異的抗体の内部領域に連結させることができ、またその逆も可能である。同様に、二重特異的抗体および/または多特異的抗体は、エフェクター分子の内部位置にも、また、末端にも連結させることができる。いずれの場合にも、二重特異的および/または多特異的抗体あるいはエフェクターのそれぞれの活性を妨害しない連結点が選択される。

【0126】

20

二重特異的抗体および/または多特異的抗体とエフェクター分子は、当業者に周知の多数の手段のいずれかによって結合させることができる。通常、エフェクター分子は、直接、またはリンカー（スペーサー）を介してのいずれかで、二重特異的抗体に結合させられる。しかし、エフェクター分子と二重特異的抗体の両方がいずれもポリペプチドである場合には、キメラ分子を一本鎖の融合タンパク質として組み換えによって発現させることができ、好ましい。

【0127】

1) 標的化分子へのエフェクター分子の結合

1つの実施形態においては、二重特異的抗体および/または多特異的抗体は、エフェクター分子（例えば、細胞毒素、標識、リガンド、薬物、抗体、リポソームなど）に対して化学的に結合させられる。分子を化学的に結合させる手段は当業者に周知である。

30

【0128】

抗体または他のポリペプチド標的化分子に対して1つの因子を結合させるための手順は、その因子の化学構造にしたがって様々であろう。ポリペプチドには、通常、様々な官能基（例えば、カルボン酸（COOH）または遊離のアミン（-NH₂）基）が含まれ、これらは、それに対してエフェクターを結合させるためのエフェクター分子上の適切な官能基との反応に利用することができる。

【0129】

あるいは、二重特異的抗体および/またはエフェクター分子は、さらに別の反応性官能基を露出させるかまたは結合させるように誘導することができる。誘導には、任意の多数のリンカー分子（例えば、Pierce Chemical Company, Rockford Illinoisから入手できるもの）の結合が含まれる。

40

【0130】

「リンカー」は、本明細書中で使用される場合は、エフェクター分子に対して標的化分子を結合させるために使用される分子である。リンカーは、標的化分子とエフェクター分子の両方に対して共有結合を形成することができる。適切なリンカーは当業者に周知であり、これには、直鎖または分岐鎖の炭素リンカー、複素環炭素リンカー、あるいはペプチドリンカーが含まれるが、これらに限定はされない。二重特異的抗体および/または多特異的抗体とエフェクター分子がポリペプチドである場合には、リンカーを、それらの側基を介して（例えば、システインに対するジスルフィド結合を介して）構成アミノ酸に連結

50

させることができる。しかし、好ましい実施形態においては、リンカーは、末端アミノ酸の - 炭素のアミノ基およびカルボキシル基に対して結合させられるであろう。

【0131】

特定の因子上の基と反応する 1 つの官能基と抗体と反応する別の基を有している二官能性リンカーを、所望される免疫結合体を形成させるために使用することができる。あるいは、誘導には、二重特異的抗体および / または多特異的抗体の化学的処理（例えば、遊離のアルデヒド基を生じさせるための過ヨウ素酸塩での糖タンパク質抗体の糖部分のグリコール切断）が含まれ得る。抗体上の遊離のアルデヒド基を 1 つの因子上の遊離のアミンまたはヒドラジン基と反応させて、それに対してその因子を結合させることができる。（米国特許第 4,671,958 号を参照のこと）。ポリペプチド（例えば、抗体または抗体断片）上に遊離のスルフヒドリル基を生じさせるための手順もまた公知である（米国特許第 4,659,839 号を参照のこと）。

10

【0132】

様々な化合物（放射性核金属キレート、毒素、および薬物が含まれる）のタンパク質（例えば、抗体）への結合のための多くの手順およびリンカーモノマーが公知である（例えば、欧洲特許出願番号；米国特許第 1,882,56 ; 米国特許第 4,671,958 号、同第 4,659,839 号、同第 4,414,148 号、同第 4,699,784 号、同第 4,680,338 号、同第 4,569,789 号、および同第 4,589,071 号、ならびに Borlinghaus et al. (1987) Cancer Res. 47: 4071-4075 を参照のこと）。具体的には、様々な免疫毒素の生産が当該分野で周知であり、例えば、“Monoclonal Antibody - Toxin Conjugates: Aiming the Magic Bullet,” Thorpe et al., Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine, Academic Press, pp. 168-190 (1982), Waldmann (1991) Science, 252: 1657、米国特許第 4,545,985 号および同第 4,894,443 号に見ることができる。

20

【0133】

いくつかの状況では、キメラ部分がその標的部位と反応すると、二重特異的抗体および / または多特異的抗体からエフェクター分離が遊離させられることが所望される。したがって、エフェクターが標的部位で遊離させられる場合には、標的部位の近くで切断することができる連結が含まれているキメラ結合体を使用することができる。抗体から因子を放出させるための連結の切断は、免疫結合体が標的細胞の内部で、または標的部位の近くのいずれかで曝される酵素活性または条件によって促進される場合がある。標的部位が腫瘍である場合には、腫瘍部位に存在している条件下で（例えば、腫瘍関連酵素または酸性 pH に曝された場合に）切断することができるリンカーが使用される場合がある。

30

【0134】

多数の様々な切断することができるリンカーが当業者に公知である。例えば、米国特許第 4,618,492 号；同第 4,542,225 号；および同第 4,625,014 号を参照のこと。これらのリンカー基から因子を解離させるための機構としては、例えば、光解離性の結合の照射および酸で触媒される加水分解が挙げられる。例えば、米国特許第 4,671,958 号には、患者の補体システムのタンパク質分解酵素によってインビボにおいて標的部位で切断されるリンカーが含まれている免疫結合体の記載が含まれる。様々な放射線画像診断用化合物、放射線治療用化合物、薬物、毒素、および他の因子を抗体に結合させるための多数の方法が報告されていることを考慮して、当業者は、抗体または他のポリペプチドに対して任意の因子を結合させるための適切な方法を決定することができるであろう。

40

【0135】

2. キレートの結合

特に好ましい実施形態においては、エフェクターには、抗体に対して、またはエピトープタグに対して結合させられたキレートが含まれる。二重特異的抗体および / または多特

50

異的抗体は、対応するエピトープタグまたは抗体を有しており、その結果、キレートに対して二重特異的抗体および/または多特異的抗体を単に接触させることによって、エフェクターに対する抗体の結合が生じる。混合工程は、この部分が使用された後に行うことができ（プレ標的化ストラテジー）、また、標的組織を、二重特異的抗体および/または多特異的抗体に結合させて、その後にキレートを誘導することもできる。様々な標的化分子に結合させるために適しているキレートを生産する方法は、当業者に周知である（例えば、米国特許第6,190,923号、同第6,187,285号、同第6,183,721号、同第6,177,562号、同第6,159,445号、同第6,153,775号、同第6,149,890号、同第6,143,276号、同第6,143,274号、同第6,139,819号、同第6,132,764号、同第6,123,923号、同第6,123,921号、同第6,120,768号、同第6,120,751号、同第6,117,412号、同第6,106,866号、同第6,096,290号、同第6,093,382号、同第6,090,800号、同第6,090,408号、同第6,088,613号、同第6,077,499号、同第6,075,010号、同第6,071,494号、同第6,071,490号、同第6,060,040号、同第6,056,939号、同第6,051,207号、同第6,048,979号、同第6,045,821号、同第6,045,775号、同第6,030,840号、同第6,028,066号、同第6,022,966号、同第6,022,523号、同第6,022,522号、同第6,017,522号、同第6,015,897号、同第6,010,682号、同第6,010,681号、同第6,004,533号、および同第6,001,329を参照のこと）。 10

【0136】

3) 融合タンパク質の生産

二重特異的抗体および/または多特異的抗体、ならびに/あるいはエフェクター分子がいずれも単鎖タンパク質であり、比較的短い（すなわち、約50アミノ酸未満）である場合には、これらは、標準的な化学的なペプチド合成技術を使用して合成することができる。いずれの成分も比較的短い場合は、キメラ部分は、1つの連続するポリペプチドとして合成することができる。あるいは、二重特異的抗体および/または多特異的抗体とエフェクター分子は、別々に合成し、その後、一方の分子のアミノ末端を他方の分子のカルボキシル末端と縮合させ、それによってペプチド結合を形成させることによって融合させることもできる。あるいは、二重特異的抗体および/または多特異的抗体とエフェクター分子は、それぞれ、ペプチドスペーサー分子の一方の末端で縮合させることができ、それによって連続する融合タンパク質を形成させることができる。 30

【0137】

配列のC末端が不溶性支持体に結合させられ、その後、配列中の残りのアミノ酸が連続的に付加される固相合成は、本発明のポリペプチドの化学合成の好ましい方法である。固相合成のための技術は、Barany and Merrifield, Solid-Phase Peptide Synthesis; 3-284頁、The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. 第2巻: Special Methods in Peptide Synthesis, Part A., Merrifield, et al. J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2156 (1963)、およびStewart et al., Solid Phase Peptide Synthesis、第2版、Pierce Chem. Co., Rockford, Ill. (1984)に記載されている。 40

【0138】

好ましい実施形態においては、二重特異的抗体および/または多特異的抗体が単鎖ポリペプチドであり、そしてエフェクターがポリペプチドである場合には、本発明のキメラ融合タンパク質は、組み換えDNA方法を使用して合成される。一般的には、これには、融合タンパク質をコードするDNA配列を作成する工程、特定のプロモーターの制御下になるように発現カセットの中にDNAを配置する工程、宿主の中でタンパク質を発現させる 50

工程、発現させられたタンパク質を単離する工程、および必要に応じて、タンパク質を再度復元する（renaturing）工程が含まれる。

【0139】

本発明の融合タンパク質（例えば、ALM-P E 3 8 Q Q R）をコードするDNAは、任意の適切な方法によって調製することができ、これには例えば、適切な配列のクローニングおよび制限、またはNarang et al. (1979) Meth. Enzymol. 68: 90-99のホスホトリエステル法；Brown et al. (1979) Meth. Enzymol. 68: 109-151のホスホジエステル法；Beaucage et al. (1981) Tetra. Lett., 22: 1859-1862のジエチルホスホルアミダイト法のような方法による直接的な化学合成；ならびに、米国特許第4,458,066号の固相方法が含まれる。

10

【0140】

化学合成によって一本鎖のオリゴヌクレオチドが得られる。これは、相補的な配列とのハイブリダイゼーションによって、または鑄型としてこの一本鎖を使用するDNAポリメラーゼを用いた重合によって、二本鎖のDNAに変換される場合もある。当業者は、DNAの化学合成は約100塩基の配列に限定されるが、より長い配列を、より短い配列の連結によって得ることを理解している。

【0141】

あるいは、サブ配列をクローニングして、そして、適切なサブ配列を適切な制限酵素を使用して切断することができる。その後、断片を所望されるDNA配列が得られるように連結させることができる。

20

【0142】

好ましい実施形態においては、本発明の融合タンパク質をコードするDNAが、DNA增幅方法（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR））を使用してクローニングされる場合もある。したがって、例えば、二重特異的抗体および/または多特異的抗体をコードする核酸は、Nde Iの制限部位が含まれているセンスプライマーと、Hind IIIの制限部位が含まれているアンチセンスプライマーを使用してPCR增幅される。これにより、二重特異的抗体および/または多特異的抗体配列をコードしており、そして末端に制限部位を有している核酸が得られる。PE38QQR断片は、Debinski et al. (1994) Int. J. Cancer, 58: 744-748に記載されているプラスミドpWDMH4-38QQRまたはプラスミドpSGC242FdN1の切断産物であり得る。二重特異的抗体および/または多特異的抗体とPE38QQR配列の連結、ならびに、ベクターへの挿入によっては、PE38QQRのアミノ末端（PEの253位）に連結させられた二重特異的抗体および/または多特異的抗体をコードするベクターが得られる。2つの分子は、制限部位によって導入されたグルタミン酸、アラニン、およびフェニルアラニンからなる3個のアミノ酸の連結部分によって連結される。

30

【0143】

2つの分子は、互いに直接連結されることが本質的には好ましいが、当業者は、複数の分子が、1つ以上のアミノ酸からなるペプチドスペーサーによって間隔が隔てられる場合があることを理解するであろう。一般的には、スペーサーは、タンパク質を連結させること、またはそれらの間に一定の最小限の距離もしくは他の空間的関係を保つ以外の他の特異的な生物学的活性は有していないであろう。しかし、スペーサーの構成アミノ酸は、折り畳み、正味の電荷、または疎水性のような分子のいくつかの特性に影響を与えるように選択することもできる。

40

【0144】

融合タンパク質をコードする核酸配列は、様々な宿主細胞の中で発現させることができ、これには、大腸菌（E. coli）、他の細菌宿主、酵母、および様々なより高等な真核生物細胞（例えば、COS、CHO、およびHeLa細胞株、ならびに骨髄腫細胞株）が含まれる。組み換え体タンパク質の遺伝子は、個々の宿主について適切な制御配列に対して作動可能に連結させられるであろう。大腸菌（E. coli）については、これには

50

、プロモーター（例えば、T 7、trp、またはプロモーター）、リボソーム結合部位、および好ましくは、転写終結シグナルが含まれる。真核生物細胞については、制御配列には、プロモーター、および、好ましくは、免疫グロブリン遺伝子、SV40サイトメガロウイルスなどに由来するエンハンサーと、ポリアデニル化配列が含まれるであろう。これには、スプライシングドナー配列とアクセプター配列が含まれる場合がある。

【0145】

本発明のプラスミドは、周知の方法（例えば、大腸菌（E. coli）の塩化カルシウム形質転換、およびリン酸カルシウムでの処理、または哺乳動物細胞についてはエレクトロポレーション）によって、選択された宿主細胞に導入することができる。プラスミドで形質転換された細胞は、プラスミドに含められた遺伝子（例えば、amp、gpt、neo、およびhyg遺伝子）によって付与された抗生物質に対する耐性によって選択することができる。

【0146】

一旦発現させられると、組み換え体である融合タンパク質は、当該分野で標準的である手順にしたがって精製することができ、これには、硫酸アンモニウム沈殿、アフィニティカラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動などが含まれる（一般的には、R. Scopes (1982) Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y.; Deutscher (1990) Methods in Enzymology, 第182巻: Guide to Protein Purification., Academic Press, Inc. N.Y. を参照のこと）。少なくとも約90から95%の均質性である実質的に純粋な組成物が好ましく、98から99%、またはそれ以上の均質性が、医薬品への使用には最も好ましい。一旦、部分的に、または所望される均質性になるように精製されると、その後、ポリペプチドは治療的に使用することができる。

【0147】

当業者は、化学合成、生物学的発現、または精製の後に、EGFRポリペプチドを標的化する融合タンパク質が、構成要素であるポリペプチドの自然界での立体構造とは実質的に異なる立体構造を有する可能性があることを理解するであろう。この場合、ポリペプチドを変性させ、そして還元させること、その後、ポリペプチドを好ましい立体構造へと再度折り畳ませることが必要な場合がある。タンパク質を還元させ、そして変性させる方法、および再折り畳みを誘導する方法は当業者に周知である (Debinski et al. (1993) J. Biol. Chem., 268:14065-14070; Kreitman and Pastan (1993) Bioconjug. Chem., 4: 581-585; および、Buchner, et al. (1992) Anal. Biochem., 205:263-270 を参照のこと)。

【0148】

当業者は、それらの生物学的活性を低下させることなく、融合タンパク質に対して修飾を行うことができるこを理解している。いくつかの修飾によって、標的化分子のクローニング、発現、または融合タンパク質への取り込みが容易にすることができる。このような修飾は当業者には周知であり、これには、例えば、開始部位を提供するためのアミノ末端へのメチオニンの付加、または便利であるように配置された制限部位もしくは終結コドンを作成するためのいずれかの末端へのさらなるアミノ酸の配置が含まれる。

【0149】

IV. 二重特異的抗体分子および/またはキメラ部分の使用

2つの異なる抗原に対して親和性を有している二重特異的抗体は、治療および診断において広範な用途を有している。特に、本発明のbs-抗体分子（例えば、bs-scFv）は：(1) EGFRタンパク質ファミリーのメンバーを過剰発現している腫瘍の成長を直接変化させるために；(2)他の細胞傷害性因子（例えば、化学療法薬、外部線照射、標的化させられた放射性同位元素、および他の抗体またはシグナル伝達阻害因子）と一緒に；そして(3) EGFRタンパク質ファミリーのメンバーを発現する標的化された腫瘍

10

20

30

40

50

細胞に対して直接に多種多様の細胞傷害性因子またはエフェクター細胞を動員するために、使用することができる。

【0150】

本発明の b s - s c F v 抗体を利用する特異的な腫瘍細胞に対する細胞傷害性因子またはエフェクター細胞の標的化によっては、正常な組織と比較した腫瘍細胞上のこれらの標的の発現の増大が原因で、付加された腫瘍に対する特異性が提供される。加えて、二重特異的抗体は、複数の受容体または受容体の構成成分に結合することができ、それによって、複数の受容体または受容体の複数の構成成分を架橋して、細胞傷害作用および/または細胞増殖抑制効果を生じる。正常な組織上の 1 つの標的にしか結合しない抗体をベースとする試薬は、通常は、複数の受容体を架橋することではなく、細胞毒性の結果を誘発することもない。

10

【0151】

加えて、単特異的抗体は、通常、標的細胞に対して低い親和力を示す。対照的に、本発明の二重特異的抗体は、標的細胞（単数または複数）に対して高い親和力を示し、これは、抗体/標的複合体を安定化させることを助け、そして抗体の細胞との長期間にわたる会合を提供し、したがって、両方の標的を過剰発現する腫瘍細胞に対するさらなる特異性を試薬に提供する。

【0152】

加えて、E G F R タンパク質ファミリーの複数のメンバーに対する抗体の結合によっては、多くの場合に、これらのタンパク質のインターナライゼーションが誘発され、これによってこれらの抗体は、毒素、薬物、放射性同位体、または他の細胞傷害性因子の送達のための効果的な足場が作成される。A L M は、腫瘍細胞の表面上にあるH E R 2 / n e u およびH E R 3 の量の減少を媒介し、このことは、同様のインターナライゼーション機構を示唆している。したがって、これらの b s - s c F v 分子と細胞傷害性因子または他の因子（エフェクター）との（例えば、キメラ部分の中での）結合によって、両方の標的を過剰発現する細胞に対する効率的な送達が生じ、したがって、治療の特異性および効率が増大するであろう。エフェクター細胞と相互作用するさらなる配列（例えば、F c 受容体標的化アーム）を取り込ませることによって、標的化特異性における同様の増大もまた、エフェクター細胞をベースとする処置ストラテジーに取り込ませることができる。

20

【0153】

本発明の二重特異的抗体分子はまた、治療薬（例えば、シュードモナス（P s e u d o m o n a s ）エクソトキシン、ジフテリア（D i p h t h e r i a ）毒素、様々な腫瘍抑制因子遺伝子、様々な標識など）をコードする核酸の直接的な標的化およびインターナライゼーションのための遺伝子治療に使用することもできる。加えて、二重特異的抗体は、細胞毒性放射性部分（例えば、²₁¹ A t ）に対して、放射線増感剤に対して、および様々な検出可能な標識（例えば、放射線不透過性標識）に対して、例えば、キレートを介して結合させることができる。加えて、二重特異的抗体分子は、脂質、リポソーム、デンドリマーなどに結合させることができる。脂質、リポソーム、およびデンドリマーは、様々な治療用部分（例えば、以下が含まれるが、これらに限定はされない抗ガン剤：アルキル化剤（例えば、ブスルファン、クロラムブシル、シス-プラチン、シアノモルホリノドキソルビシンなど）、抗生物質（例えば、アロコルヒチン、コルヒチン（c o h c h i c i n e ）、タキソール、ピンプラスチン、ピンクリスチンなど）、トポイソメラーゼI阻害剤（例えば、カンプトテシン、アミノカンプトテシンなど）、トポイソメラーゼII阻害剤（例えば、ドキソルビシン、アモナフィド、ダウノルビシン、デオキシドキソルビシン、ミトキサントロンなど）、R N A / D N A 代謝拮抗物質（例えば、アシビシン、フトラフルール、メトトレキセート、トリメトトレキセートなど）；D N A 代謝拮抗物質（例えば、2' デオキシ-5'-フルオソウリジン、シクロシチジン、グアナゾールなど））と複合体を組み合わせ、そして/また、それらをカプセル化することができる。脂質、リポソーム、およびデンドリマーはまた、タンパク質治療薬、例えば、治療用部分をコードする核酸などとも組み合わせることができる。

40

50

【0154】

上記のように、キメラ部分の標的化成分として使用される場合は、本発明の二重特異的抗体および／または多特異的抗体は、標的EGFRタンパク質を発現している標的細胞（単数または複数）に対して会合させられたエフェクターを優先的に標的化／送達する。細胞とのエフェクターの会合（例えば、接触時間または接触量）（接触または非常な接近）を増大させることにより、本発明の抗体の、細胞の中にエフェクターをインターナライズす可能性、および／またはその細胞に対してその特徴的な活性を発揮する可能性が高まる。

【0155】

したがって、例えば、二重特異的抗体または多特異的抗体によって標的化されたリポソームあるいは他の治療用媒体（リポソーム、ウイルスなど）は、標的である腫瘍に対する暴露の増加を示す。例示的な実施形態においては、リポソームは、腫瘍の特異的な標的化を促進させるために、本発明のbs-scFv抗体分子に散りばめることができる。抗ガン剤（例えば、化学療法薬、抗体、アンチセンス分子、および／または放射性同位元素）は、そのように修飾されたリポソームの中にカプセル化することができる。

10

【0156】

別の実施形態においては、二重特異的抗体または多特異的抗体（例えば、bs-scFv抗体）分子を使用して、遺伝子治療ベクター（修飾されたウイルスが含まれるが、これに限定はされない）を標的抗原を両方発現している細胞に対して指向させることができる。ウイルスはまた、それらが生産され得て細胞のマイクロ環境に分泌され得る腫瘍細胞に対して、これらのbs-scFv抗体分子の遺伝子を送達するために利用することができ、あるいは、さらなる細胞内標的化配列の付加によって、これらを、特異的な細胞の構成成分に局在化させてそれらの標的の発現をノックアウトしてしまうイントラボディーへと変化させることもできる。

20

【0157】

加えて、本発明の二重特異的抗体または多特異的抗体（例えば、bs-scFv抗体）分子は、EGFRタンパク質ファミリーの複数のメンバーの異常な発現を検出するためにも有利に使用することができる。このような検出によっては、これらの細胞表面タンパク質によって促進される異常な腫瘍の増殖が関係しているガンの初期診断が導かれ得る。一般的には、免疫複合体の形成の検出は当該分野で周知であり、多数のアプローチの適用によって行うことができる。これらの方法は、一般的には、標識またはマーカー（例えば、当該分野で標準的に使用されている任意の放射性、蛍光、生物学的、もしくは酵素タグまたは標識）の検出に基づく。このような標識の使用に関する米国特許としては、米国特許第3,817,837号；同第3,850,752号；同第3,939,350号；同第3,996,345号；同第4,277,437号；同第4,275,149号；および同第4,366,241号が挙げられる。もちろん、当業者であれば、当該分野で公知であるように、二次抗体のような二次結合リガンドの使用、またはアビジン／ビオチン結合処理の使用によってさらなる利点を見出すことができるであろう。

30

【0158】

V. bs-scFv抗体分子の投与：

40

A) 薬学的処方物

本明細書中に記載されるように、二重特異的抗体またはbs-scFv抗体分子またはキメラ部分には、直接、そして／または単位投与量形態の調製物の中で使用することができる、非薬学的組成物（例えば、純粋ではない組成物または滅菌されていない組成物）、および薬学的組成物（すなわち、被験体もしくは患者（すなわち、ヒト被験体もしくはヒト以外の被験体）への投与に適している組成物）の製造に有用な、バルクの薬物組成物が含まれる。特定の実施形態においては、このような組成物には、治療有効量の1つ以上の治療薬（例えば、二重特異的抗体および／もしくは多特異的抗体、あるいは／またはこのような抗体が含まれているキメラ部分）と、薬学的に許容される担体が含まれる。

【0159】

50

上記のように、本発明の薬剤は、他種多様な状況で使用することができ、これには、腫瘍またはガン細胞の検出および／もしくは画層化、腫瘍の成長および／またはガン細胞の成長および／もしくは増殖の阻害などが含まれるが、これらに限定はされない。本発明の1つ以上の二重特異的抗体、および／または機能化させられた二重特異的抗体、および／またはキメラ部分は、注射によって、すなわち、静脈内に、筋肉内に、皮内に、皮下に、十二指腸内に、または腹腔内に投与することができる。また、特定の実施形態においては、化合物は、吸入によって、例えば、鼻腔内に投与することができる。加えて、特定の化合物は、経口で、または経皮的に投与することができる。

【0160】

特異的な実施形態においては、用語「薬学的に許容される」は、連邦政府もしくは州政府の監督官庁によって承認されたこと、あるいは、米国薬局方または他の一般的に認識されている動物（より具体的には、ヒト）での使用についての薬局方に列挙されていること、あるいは、動物またはヒトへの投与に適していることを意味する。用語「担体」は、治療薬がそれとともに投与される、希釈剤、アジュバント（例えば、フロイト（Freund's）のアジュバント（完全なアジュバントおよび不完全なアジュバント））、賦形剤、または媒体を意味する。このような薬学的担体は、滅菌の液体（例えば、水性または油性）であり得、これには、ワセリン、動物、植物、もしくは合成の起源のもの（例えば、ピーナッツ油、大豆油、鉛油、ゴマ油など）の滅菌の液体が含まれる。薬学的組成物が静脈内に投与される場合には、水が好ましい担体である。生理食塩水および水性デキストロースおよびグリセロール溶液もまた、液体担体として、特に注射用の溶液に使用することができる。適切な薬学的賦形剤としては、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、コメ、コムギ、チヨーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが挙げられる。組成物にはまた、所望される場合には、主要ではない量の、湿潤剤もしくは乳化剤、またはpH緩衝剤も含まれ得る。これらの組成物は、溶液、懸濁液、乳濁液、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、徐放処方物などの形態とすることができます。

【0161】

一般的には、本発明の組成物の成分は、別々に、または単位投与量形態と一緒に混合されてのいずれかで、例えば、凍結乾燥粉末、または水を含まない濃縮物として、特定の量の有効成分を示す密閉されシールされた容器（例えば、アンプルまたは小さい包み（sachette））の中に、供給される。組成物が注入によって投与される場合には、これは、滅菌された薬学的等級の水または生理食塩水が含まれている注入用ボトルを用いて分散させることができる。組成物が注射によって投与される場合は、注射用滅菌水または生理食塩水のアンプルが提供され、成分を投与前に混合することができる。

【0162】

本発明の組成物は、中性の形態または塩の形態として提供することができる。薬学的に許容される塩としては、陰イオンを用いて形成されたもの（例えば、塩酸、リン酸、酢酸、シウ酸、酒石酸などから誘導されたもの）、ならびに、陽イオンを用いて形成されたもの（例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどから誘導されたもの）が挙げられる。

【0163】

本発明の二重特異的抗体および／または機能化させられた二重特異的抗体および／またはキメラ部分が含まれている薬学的組成物は、通常の、混合、溶解、顆粒化、糖衣錠を作成すること、ゲル化（levigating）、乳化、カプセル化、捕捉、または凍結乾燥のプロセスによって製造することができる。薬学的組成物は、薬学的に使用することができる調製物にするための分子の処理を容易にする、生理学的に許容される担体、希釈剤、賦形剤、または助剤の1つ以上を使用して、従来の様式で処方することができる。適切な処方物は、選択される投与経路に応じて様々である。

10

20

30

40

50

【0164】

局所または経皮投与については、本発明の二重特異的抗体および／または機能化させられた二重特異的抗体および／またはキメラ部分は、当該分野で周知であるように、溶液剤、ゲル剤、軟膏、クリーム剤、ローション剤、エマルジョン、懸濁剤などとして処方することができる。全身用の処方物には、注射（例えば、皮下、静脈内、筋肉内、髄腔内、または腹腔内注射）による投与のために設計された処方物、ならびに、経皮、経粘膜、吸入、経口、または肺投与のために設計された処方物が含まれる。

【0165】

注射については、本発明の二重特異的抗体および／または機能化させられた二重特異的抗体および／またはキメラ部分は、水溶液に、好ましくは、生理学的に適合する緩衝液（例えば、ハンクス（Hanks's）溶液、リンガー（Ringer's）溶液、または生理食塩緩衝液）の中に処方することができる。溶液には、懸濁剤、安定剤、および／または分散剤のような処方剤を含めることができる。あるいは、鉄キレート剤（単数または複数）が含まれている組成物は、使用前に、適切な媒体（例えば、滅菌の発熱物質が含まれていない水）で構成するための粉末の形態であり得る。

10

【0166】

経粘膜投与については、透過させられるバリアに適している浸透剤が処方物の中で使用される。このような浸透剤は通常は当該分野で公知である。

【0167】

経口投与については、本発明の二重特異的抗体および／または機能化させられた二重特異的抗体および／またはキメラ部分は、薬剤（単数または複数）を当該分野で周知の薬学的に許容される担体と混合することによって容易に処方することができる。このような担体は、薬剤（単数または複数）を、処置される患者によって経口摂取される、錠剤、丸剤、糖衣錠、カプセル剤、液剤、ゲル剤、シロップ剤、スラリー、懸濁剤などとして処方できるようにする。経口用の固形の処方物（例えば、散剤、カプセル剤、および錠剤）については、適切な賦形剤には、增量剤（例えば、糖（例えば、ラクトース、スクロース、マンニトール、およびソルビトール）；セルロース調製物（例えば、トウモロコシデンプン、コムギデンプン、コメデンプン、ジャガイモデンプン、ゼラチン、トラガカントガム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、および／またはポリビニルピロリドン（PVP））；造粒剤；ならびに結合剤が含まれる。所望される場合には、崩壊剤（例えば、架橋されたポリビニルピロリドン、寒天、またはアルギン酸もしくはその塩（例えば、アルギン酸ナトリウム））が添加される場合がある。

20

【0168】

所望される場合には、固体の投与量形態は、標準的な技術を使用して、糖でコーティングされる場合も、また、腸溶性コーティングされる場合もある。

【0169】

経口用の液体調製物（例えば、懸濁剤、エリキシル剤、および溶液剤）については、適切な担体、賦形剤、または希釈剤には、水、グリコール、油、アルコールなどが含まれる。加えて、香味剤、保存剤、着色剤などを添加することができる。

30

【0170】

舌下投与については、鉄キレート剤（単数または複数）は、通常の様式で処方された、錠剤、トローチ剤などの形態とすることができます。

40

【0171】

吸入による投与については、本発明の二重特異的抗体および／または機能化させられた二重特異的抗体および／またはキメラ部分は、通常は、適切な推進剤（例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素、または他の適切な気体）を使用して、加圧型のパックまたはネブライザーからエアゾールスプレーの形態で送達される。加圧型エアゾールの場合には、投与量単位は、定量を送達するためのバルブを備えることによって決定することができる。吸入器（inha

50

ler) または吸入器 (insufflator) で使用するためのゼラチンのカプセルおよびカートリッジを処方することができ、これには、鉄キレート剤 (単数または複数) と適切な粉末基剤 (例えば、ラクトースまたはデンプン) の混合粉末が含まれる。

【0172】

本発明の二重特異的抗体および / または機能化させられた二重特異的抗体および / またはキメラ部分はまた、(例えば、従来の坐剤基剤 (例えば、ココアバターまたは他のグリセリド) が含まれている) 直腸用組成物または膣用組成物 (例えば、坐剤または停留浣腸) に処方することもできる。

【0173】

上記に記載された処方物に加えて、本発明の二重特異的抗体および / または機能化させられた二重特異的抗体および / またはキメラ部分は、デポー調製物として処方することもできる。このような長期作用型の処方物は、移植 (例えば、皮下または筋肉内) によって、あるいは、筋肉内注射によって投与することができる。したがって、例えば、本発明の薬剤 (単数または複数) は、適切なポリマー材料または疎水性材料とともに (例えば、許容可能な油の中のエマルジョンとして)、あるいは、イオン交換樹脂と共に、あるいは、難溶性誘導体として (例えば、難溶性の塩として) 処方することができる。

【0174】

他の薬学的送達システムもまた使用することができる。リポソームとエマルジョンは、本発明の二重特異的抗体および / または機能化させられた二重特異的抗体および / またはキメラ部分を送達するために使用することができる送達媒体の周知の例である。特定の有機溶媒 (例えば、ジメチルスルフォキシド) もまた使用することができるが、通常は、毒性がより大きくなる。加えて、本発明の二重特異的抗体および / または機能化させられた二重特異的抗体および / またはキメラ部分は、徐放システム (例えば、治療薬が含まれている固体のポリマーの半透過性マトリックス) を使用して送達することができる。様々な徐放性の材料が確立されており、当業者に周知である。徐放カプセルは、それらの化学的性質に応じ様々であり得、数日間、数週間、または 100 日を越えて有効成分 (単数または複数) を放出することができる。薬剤 (単数または複数) の化学的性質および生物学的安定性に応じて、安定化のためのさらなるストラテジーを使用することができる。

【0175】

本発明の二重特異的抗体および / または機能化させられた二重特異的抗体および / またはキメラ部分に、電荷を有している側鎖または末端が含まれる場合には、これらは、遊離の酸もしくは塩基として、または薬学的に許容される塩として、上記の処方物の任意のものに含めることができる。薬学的に許容される塩は、遊離の塩基の生物学的活性を実質的に保持しており、そして無機酸との反応によって調製されるそれらの塩である。水性溶媒および他のプロトン性溶媒の中でより溶解する傾向がある薬学的な塩は、対応する遊離の塩基の形態である。

【0176】

B) 有効投与量

本発明の二重特異的抗体および / または機能化させられた二重特異的抗体および / またはキメラ部分は、一般的には、意図される目的 (例えば、腫瘍もしくはガン細胞を画像化するため、ガン細胞の成長および / もしくは増殖を阻害するためなど) を達成するために有効量で使用されるであろう。特定の好ましい実施形態においては、本発明の方法で利用される二重特異的抗体および / または機能化させられた二重特異的抗体および / またはキメラ部分は、ガン細胞の増殖および / もしくは成長を部分的または完全に阻害するために、あるいは、EGFR ファミリーのタンパク質の過剰発現を特徴とするガン細胞もしくは腫瘍の視覚化を可能にするために有効な用量で投与される。特定の実施形態においては、ガン細胞の成長および / または増殖を 90 %、より好ましくは、95 %、そして最も好ましくは、98 % または 99 % の信頼水準で阻害する投与量が選択される。好ましい有効量は、腫瘍の成長を減少させるかもしくは妨げる、あるいは、ガン細胞の検出および / または視覚化を容易にする量である。細胞の成長および増殖の阻害因子に関しては、化合物は

10

20

30

40

50

同じ用量レベルで予防的に使用することもできる。

【0177】

通常、本発明の二重特異的抗体および/または機能化させられた二重特異的抗体および/またはキメラ部分、あるいはそれらの薬学的組成物は、治療有効量で投与または塗布される。治療有効量は、ガン細胞および/または腫瘍の発症もしくは進行（例えば、成長および/または増殖）を減少させる、あるいは防ぐために有効な量である。治療有効量の決定は、特に、本明細書中に提供される詳細な開示を考慮して、十分に当業者の能力の範囲内である。

【0178】

全身投与については、治療有効用量は、インビトロでのアッセイによって最初に概算することができる。例えば、用量は、動物モデルにおいて処方することができ、細胞培養物中で決定された IC_{50} が含まれる循環濃度の範囲が得られる。このような情報は、ヒトに有用な用量をより正確に決定するために使用することができる。

10

【0179】

初期量もまた、インビオでのデータ（例えば、動物モデル）から、当該分野で周知の技術を使用して概算することができる。当業者は、動物でのデータに基づいてヒトへの投与を容易に最適化することができる。

【0180】

投与量および間隔は、治療効果を維持するために十分な阻害剤の血漿レベルが提供されるように、個別に調整することができる。

20

【0181】

典型的な治療薬についての投与量は当業者に公知である。さらに、このような投与量は、通常、事実上は助言的なものであり、特定の治療状況、患者の耐容性などに応じて調整することができる。組成物の単回投与または複数回投与を、患者が必要としているかまたは寛容化できる投与量および頻度に応じて投与することができる。

【0182】

特定の実施形態においては、約 $1 \mu g$ の初期量、好ましくは、一日に約 $1 mg$ から約 $1000 mg / kg$ が有効であろう。約 5 から $75 mg$ の一日量の範囲が好ましい。しかし投与量は、患者の要望、処置される症状の重篤度、および使用される化合物に応じて変わり得る。特定の状況についての適切な投与量の決定は当業者の能力の範囲内である。一般的には、処置は、化合物の最適用量よりも少ない、少量の投与量を用いて開始される。その後、投与量は、その状況下での最適な効果が得られるまで、少量の増分で増加させられる。便宜上、一日量の合計は、分割することができ、そして所望される場合には、1日の間に複数回投与することができる。典型的な投与量は、約 0.1 から約 $500 mg / kg$ であり、理想的には、約 25 から約 $250 mg / kg$ であろう。

30

【0183】

局所投与または選択的取り込みの場合には、二重特異的抗体および/またはキメラ分子の有効な局所濃度は、血漿濃度にはおそらく関係はない。当業者は過度の実験を行うことなく、治療上有効な局所投与量を最適化することができるであろう。抗体および/またはキメラ部分の量は、もちろん、処置される被験体、被験体の体重、苦痛の重篤度、投与形式、および処方する医師の判断に応じて様々であろう。

40

【0184】

治療は断続的に繰り返すことができる。特定の実施形態においては、二重特異的抗体分子が含まれている薬学的調製物は、適切な間隔で、病理学的兆候が軽減するかまたは緩和されるまで、例えば、1日に少なくとも2回以上、投与することができる。その後、投与量は、維持レベルにまで減少させることができる。特定の場合には、適切な間隔は、通常は患者の症状に応じて様々である。治療は、単独で提供することができ、また、他の薬物、および/または放射線治療、および/または外科手術手順と組み合わせて提供することもできる。

【0185】

50

C) 毒性

好ましくは、本明細書中に記載される本発明の二重特異的抗体および／または機能化させられた二重特異的抗体および／またはキメラ部分の治療有効量によっては、実質的な毒性を引き起こすことなく、治療的利点が提供されるであろう。

【 0 1 8 6 】

本明細書中に記載される薬剤の毒性は、細胞培養物中で、または実験用動物において標準的な薬学的手順によって、例えば、LD₅₀（集団の50%を致死させる用量）またはLD₁₀₀（集団の100%を致死させる用量）を決定することによって決定することができる。毒性作用と治療効果との間での線量率（dose ratio）が治療指數である。高い治療指數を示す試薬が好ましい。細胞培養アッセイおよび動物実験によって得られたデータを、ヒトで使用される毒性のない投与量範囲を定義するために使用することができる。本発明の二重特異的抗体および／または機能化させられた二重特異的抗体および／またはキメラ部分の投与量は、毒性が低いかまたは毒性のない有効量が含まれる循環濃度の範囲にあることが好ましい。投与量は、使用される投与量形態および利用される投与経路に応じて、この範囲内で変えることができる。正確な処方、投与経路、および投与量は、患者の症状を考慮して個々の医師によって選択され得る（例えば、Fingl et al. (1975) In: The Pharmaceutical Basis of Therapeutics, 第1章、1ページを参照のこと）。

【 0 1 8 7 】

V I . キット

本発明にはさらに、インビオで、および／または生物学的試料中でEGFRタンパク質ファミリーの複数のメンバーを発現するあるいは過剰発現する細胞を検出することに使用されるキットが含まれる。上皮成長因子ファミリー（例えば、ガン細胞）の複数のメンバーを発現している、または過剰発現している細胞の成長および／または増殖を阻害するためのキットもまた提供される。

【 0 1 8 8 】

特定の実施形態においては、キットには、EGFRタンパク質ファミリーの複数のメンバーの上にある少なくとも2つのエピトープに特異的な1つ以上の本発明の二重特異的抗体および／または多特異的抗体が含まれる。特に好ましい実施形態においては、抗体は二重特異的scFv抗体である。用途に応じて、抗体は、本明細書中に記載されるようなエフェクター（例えば、放射性部分、リポソーム、細胞毒素、別の抗体など）に結合させるためのリンカーおよび／またはキレート剤で機能化させることができる。

【 0 1 8 9 】

特定の実施形態においては、キットには、例えば、EGFRタンパク質ファミリーの複数のメンバーに特異的な本発明のbs-scFc抗体分子、ならびに、bs-scFv抗体分子の検出に使用される緩衝液および他の成分が含まれ得る。

【 0 1 9 0 】

キットにはまた、例えば、ガン細胞を検出するための抗体の使用を教示している、および／または機能化試薬との抗体の結合を教示している、あるいは、画像化および／または治療的用途のための機能化させられた抗体の使用を教示している説明用の材料も含まれる。特定の実施形態においては、（第2の容器の中の）1つ以上のエフェクター（例えば、細胞毒素、放射標識）を伴う（第1の容器の中の）リンカーおよび／またはキレート剤を用いて機能化させられた抗体が提供される。その結果、2つの成分は、別々に投与することができ（例えば、プレ-標的化アプローチにおいて）、また、2つの成分を使用の直前に投与することもできる。

【 0 1 9 1 】

特定の説明用の材料によっては、推奨される投与レジュメ、カウンターの指示などが提供されるであろう。説明用の材料には通常、記載された材料または印刷された材料が含まれるが、これらはそれらに限定はされない。このような説明を保存し、そして末端の使用者に連絡をとることができる任意の媒体が、本発明によって想定される。このような媒体

10

20

30

40

50

としては、電気的保存媒体（例えば、磁気ディスク、テープ、カートリッジ、チップ）、光学媒体（例えば、CD ROM）などが挙げられるが、これらに限定はされない。このような媒体には、それらが提供されているインターネットサイト上のアドレスが含まれる場合がある。

【実施例】

【0192】

以下の実施例は説明のために提供され、請求される本発明を限定するためのものではない。

【0193】

実施例 1

10

Bs - Scfv 抗体分子の調製

EGFR と HER2/neu の過剰発現は、多くの固形腫瘍において予後不良と関係している。これらの受容体を介するシグナル伝達を混乱させる抗体（例えば、Hercep tin⁷（抗 HER2）および C225（抗 EGFR））は、ガンの処置における有意な有用性が明らかにされている。EGFR ファミリーの複数のメンバー（EGFR、Her-2/neu、Her3、および Her4）を介するシグナル伝達は、リガンドの結合によって誘発されるこれらの受容体のホモ二量体、ヘテロ二量体、またはヘテロ多量体の形成に依存する。これらの受容体タンパク質の複数のエピトープの対が組み合わせられている二重特異的 scfv 抗体分子を、ガン性の腫瘍細胞中でのこれらのシグナル伝達複合体の形成を防ぐことにおける使用のために、本明細書中で以下に記載するように作成した。

20

【0194】

I. 材料および方法：

以下の材料および方法を本発明の実施を容易にするために提供した：

A. クローニング：

EGFR ファミリーの様々なメンバー（EGFR、HER2/neu、HER3、HER4）に特異的な単鎖 Fv (scfv) 抗体分子をコードする遺伝子は全て、Jim Marks 博士（University of California San Francisco）から入手した。scfv 遺伝子は、大きな処理していないヒト scfv ライブラリーから単離した。EGFR タンパク質に特異的な scfv 遺伝子は、これらのタンパク質の細胞外ドメインに対する選択によって単離した。scfv 遺伝子は全て、pUC 119 myc/his ベクターの中の、NcoI 制限部位と NotI 制限部位の間に挿入断片として提供された。これらのアームの配列は別表 A (Appendix A) に示される（配列番号 1 ~ 10、19、および 21）。

30

【0195】

1. 20 アミノ酸のリンカー分子の構築：

循環中の bs - scfv 抗体のタンパク質分解によって、それらの有効性が限られる場合がある。したがって、全ての明らかになっているタンパク質分解部位が含まれていない新しい 20 アミノ酸のリンカーを設計し、そして合成した。リンカーの構築に使用したアミノ酸は、細菌のペリプラズム空間へのタンパク質効率的な輸送を促進するように、主に中性（電荷を有していない、疎水性、または親水性）であるように選択した。新しいリンカー分子をコードする以下の 2 つのプライマーを合成した：LW583 (5' =

40

【0196】

【数 1】

LW583 (5' = -AAT TCA GGT GCT GGT ACT TCA GGT TCA GGT GCT TCA GGT GAA

GGT TCA GGT TCA A-3', 配列番号 12); および LW584 (5' = -AGC TTT GAA CCT

GAA CCT TCA CCT GAA GCA CCT GAA CCT GAA GTA CCA GCA CCT G-3',

配列番号 13).

これらのオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションによって、EcoRI で消化さ

50

れた末端と H i n d I I I で消化された末端を有している「粘着」末端リンカーを形成させた。この産物を、 E c o R I と H i n d I I I で予め消化しておいた p E T 2 0 b (+) ベクターに挿入した。プラスミド D N A を、 D N A プラスミドの単離および精製のための市販されているキット (Q i a g e n または G i b c o B R L C o .) を使用して形質転換された D H 5 大腸菌 (E . c o l i) から作成し、その後、「 p E T 2 0 b (+) / リンカー (p E T 2 0 b (+) / L i n k e r) 」と命名した。リンカー分子は、以下の核酸配列によってコードされ： 5 '

【 0 1 9 7 】

【 数 2 】

5'-AAT TCA GGT GCT GGT ACT TCA GGT TCA GGT GCT TCA GGT GAA

10

【 0 1 9 8 】

【 数 3 】

GGT TCA GGT TCA AAG CTA->3

(配列番号 1 4)、そして得られるリンカー分子は以下のアミノ酸配列を有している：

【 0 1 9 9 】

【 数 4 】

NSG AGT SGS GAS GEG SGS KL

(配列番号 3 7)。

20

【 0 2 0 0 】

2 . p E T 2 0 b (+) / リンカーベクターへの抗 H E R 3 遺伝子のクローニング
抗 H E R 3 s c F v 抗体分子をコードする遺伝子である A 5 を、以下の 2 つのプライマーを用いて、 A 5 - p U C 1 1 9 m y c / h i s プラスミドから増幅させた：

【 0 2 0 1 】

【 数 5 】

LW687

(5=-CGA CCA TGG CCC AGG TGC AGC TGG TGC AG- 3', 配列番号 15); および

LW688 (5=-CGA ATT CAC CTA GGA CGG TCA GCT TGG-3=, 配列番号 16).

30

増幅産物とベクター p E T 2 0 b (+) / リンカーを、いずれも、 N c o I と E c o R I 酵素で消化し、連結させ、そしてプラスミド D N A の生産のためにコンピテント D H 5 大腸菌 (E . c o l i) の中に形質転換した。選択した酵素は、リンカーの上流にある A 5 遺伝子を指向する。次いで、「 p E T 2 0 b (+) A 5 / リンカー」と呼ぶ新しいプラスミドを単離し、そして精製した。

【 0 2 0 2 】

3 . p E T 2 0 b (+) A 5 / リンカーベクターへの抗 H E R 2 / n e u 遺伝子のクローニング：

抗 H E R 2 / n e u s c F v 抗体分子をコードする遺伝子 M L 3 . 9 を、以下の 2 つのプライマーを使用して M L 3 . 9 - p U C 1 1 9 m y c / h i s プラスミドから増幅させた：

40

【 0 2 0 3 】

【 数 6 】

LW697 (5=-GGG AAG CTT CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GG-3=, 配列番号 17);

および LW698 (5=-GGG CTC GAG ACC TAG GAC GGT CAG CTT GGT TCC-3=,

配列番号 18)

P C R 増幅産物とプラスミド D N A (p E T 2 0 b (+) A 5 / リンカー) を、 H i n

50

d I I I および X h o I 制限酵素で消化し、連結させ、そして新しいプラスミドDNAである p E T 2 0 b (+) A 5 / L i n k e r / M L 3 . 9 の生産のためにコンピテント D H 5 大腸菌 (E. c o l i) に形質転換した。選択した酵素は、リンカー配列の下流にある M L 3 . 9 遺伝子を指向する。次いで、「A p E T 2 0 b (+) A 5 / L i n k e r / M L 3 . 9」と呼ぶ新しいプラスミドを単離し、そして精製した。

【0204】

4 . p U C 1 1 9 / m y c / h i s ベクターへの A 5 / リンカー / M L 3 . 9 遺伝子のクローニング：

p E T 2 0 b (+) に由来する b s - s c F v 産物をコードする核酸分子を、 p U C 1 1 9 m y c / h i s ベクターにクローニングした。(ヒスチジン)₆ タグと 1 つの「停止」コドン(これは、 p E T ベクターの一部である)を、 A 5 / リンカー / M L 3 . 9 核酸構築物と一緒に増幅させた。PCR 増幅を、以下の 2 つのプライマーを使用して行った：

L W 6 8 7

【0205】

【数7】

(5'-CGA CCA TGG CCC AGG TGC AGC TGG TGC AG-3', 配列番号15) ; および

LW686 (5'-GAT ATA ATG CGG CCG CTC AGT GGT GGT GGT G-3', 配列

番号 58)

10

20

p U C 1 1 9 m y c / h i s ベクターと増幅産物の、 N c o I と N o t I 酵素での消化を行い、その後、連結工程と、 D H 5 大腸菌 (E. c o l i) への形質転換を行った。その後、「 p U C / A L M 」と呼ぶ得られたプラスミドDNAを精製し、そして単離した(図1)。

【0206】

B . 発現クローランの形質転換、 T G 1 :

p U C / A L M を大腸菌 (E. c o l i) T G 1 株に形質転換し、 A 5 / リンカー / M L 3 . 9 b s - s c F v 抗体分子を生産するクローランを以下のように単離した。 b s - s c F v 分子を一晩透析し、 N i - N T A 樹脂 (Q i a g e n) を使用して固定金属アフィニティーコロマトグラフィーによって精製し、その後、 S u p e r d e x - 7 5 カラム (P h a r m a c i a) を使用して H P L C システム上でのサイズ排除クロマトグラフィーを行った。

30

【0207】

I I . 結果：

概念の実証として、2つの異なる b s - s c F v 抗体分子を作成した。「 A L M 」と命名した第1の抗体分子は、 A 5 s c F v と M L 3 . 9 s c F v から構成されており、これは、 H E R 3 と H E R 2 / n e u の両方に、それぞれが特異的に結合する。「 A L F 」と命名した第2の b s - s c F v 抗体分子は、 A 5 と F 4 の2つの異なる s c F v 分子から構成され、これらはいずれも H E R 3 に対して特異性を有している。両方の b s - s c F v 抗体分子をクローニングし、大腸菌 (E. c o l i) の中で発現させた。

40

【0208】

A L M を、一連のインピトロでのアッセイとインピボでのアッセイにおいて評価した。 H E R 3 と H E R 2 / n e u の両方に同時に、別々に、そして同時に結合するその能力を、 B I A c o r e 装置上での表面プラズモン共鳴によって明らかにした(図2、3、および4)。インピトロでは、 H E R 3 と H E R 2 / n e u の両方を過剰発現しているヒト B T - 4 7 4 乳ガン細胞との A L M のインキュベーションによって、 H E R 2 / n e u および H E R 3 の細胞表面での発現の低下(図5)、 M T T アッセイにおいては増殖の低下(図6)、クローラン形成性のアッセイにおいては生存の減少(図7)、そして A K T 2 (アポトーシス経路における重要なタンパク質)のリン酸化の増加とその後の顕著な脱リン酸化(図8)が導かれた。これらの効果は、 H e r c e p t i n⁷ を使用して観察された効

50

果（データは示さない）に匹敵するものであったか（MTTアッセイ）、またはそれよりも大きかった（AKT2の脱リン酸化）。

【0209】

インビボでは、放射性ヨウ化ALMは、s.c.ヒトBT-474腫瘍異種移植片を有している免疫不全マウスへの投与後、24時間以内に、高い特異的な腫瘍標的化を示した（図9）。

【0210】

これらの結果は、EGFRタンパク質を過剰発現する腫瘍細胞の処置についての本発明のbs-scFv抗体分子の有用性を示している。新しいbs-scFv抗体分子は、様々なガン（乳ガン、結腸ガン、卵巣ガン、子宮内膜ガン、胃ガン、膵臓ガン、前立腺ガン、および唾液腺ガンが含まれるが、これらに限定はされない）を処置するために、単独で使用することも、また、既存の化学療法と組み合わせて使用することもできる。

【0211】

実施例2

併用される化学療法のアプローチ

HER2/neuは、これが様々な腫瘍の中で過剰発現されており、そしてその過剰発現が予後不良と関係しているので、併用する化学療法のアプローチのための有力な標的である。HER2/neuは、そのチロシンキナーゼドメインを介してシグナル伝達を誘発することができるリガンドを欠いているが、高濃度で過剰発現されると、HER2/neuは自発的にホモ二量体を形成することができる（Yarden and Sliwko 2001）Nature Reviews, Molecular Cell Biology 2:127-137）。HER3は、色々な意味で、HER2/neuとは反対である。これは、リガンドに対して活発に結合するが、機能性のチロシンキナーゼドメインは含まれておらず、したがって、シグナル伝達のためには、HER2/neuとのヘテロ二量体の形成が必要である。実際、この組み合わせが、EGFRファミリーの複数のメンバーによって形成されるシグナル伝達複合体の最強のものであると多くの人によって考えられている（Lohrisch and Piccart 2001）Sem. Oncology (28) Suppl 18:3-11）。

【0212】

多くの化学療法薬によって、正常な細胞の中でアポトーシスを引き起こすであろう損傷が導かれる。しかし、いくつかの腫瘍細胞は、正常なアポトーシスのシグナル伝達経路を妨害する異常なシグナル伝達を有している。HER2/neuを過剰発現している腫瘍細胞中のAKT2のリン酸化によっては、化学療法薬または生物学的薬剤の抗腫瘍作用を妨害する可能性がある抗アポトーシス性のカスケードが導かれる（Zhou et al. (2000) J. Biol. Chem., 275:8027-8031）。したがって、既存の化学療法による処置と組み合わせたbs-scFv抗体分子でのHER2/neuの標的化は、化学療法だけよりも、腫瘍細胞を死滅させることにおいて有効であろう。

【0213】

実施例3

²¹¹Atで標識された二重特異的scFvのインビボでの効力

²¹¹Atで標識された二重特異的scFv抗体の腫瘍に対する効力を評価するためのインビボでの実験を行った。二重特異的抗体を、²¹¹At-SAPSキレート（N-(4-[²¹¹At]アストロフェネチル)スクシニメート）を使用して標識した（例えば、図10を参照のこと）。

【0214】

BT474乳ガン細胞の注射前の4日間、マウスには -エストラジオールの錠剤を移植した。0日目に、マウスに 5×10^6 個のBT474乳ガン細胞を注射した。14日目には、²¹¹Atを結合させた二重特異的抗体（ALT）の初回治療量を、80 μgの高用量と、10 μgの低用量で、i.p.で投与した。続く治療用量を、16日目および18日目に投与した。その後、腫瘍の容積を、図11Aから11Cに示すように追跡した。

10

20

30

40

40

50

【 0 2 1 5 】

腫瘍の容積は、全体的には、未処置の対照（図 1 1 A）と比較して、処置した動物（図 1 1 B および 1 1 C）においては少なかった。

【 0 2 1 6 】**実施例 4****ガンの画像化**

図 1 2 は、ヨウ素 - 1 2 4 で標識した A L M 二重特異的单鎖 F v を使用した 2 匹のマウスの P E T - C T 画像を示す。マウスに、5 0 マイクロキュリー（5 0 マイクログラム）の標識した A L M を注射し、4 8 時間後に画像化した。

【 0 2 1 7 】

これは、ガンの検出についての本発明の二重特異的抗体の効力を示しているはずである。

【 0 2 1 8 】

本明細書中に記載される実施例および実施形態は説明の目的のためのものにすぎず、その認識の中での様々な修飾または変更が当業者に示唆され、そして本出願および添付の特許請求の範囲に含まれるであろうことが理解される。本明細書および付随する添付物の中に記載されている全ての刊行物、特許、および特許出願は、全ての目的についてそれらの全体が引用により本明細書中に組み入れられる。

【 0 2 1 9 】

【数8】

付録 A

Complete seq:F5-aHer2-scfV

Sequencher™ "Complete F5-aHer2-contig" (配列番号 1)

F5-aHer2 IWL14. ATG AAA TAC CTA TGT CCT ACG GCA GCC GCT GGA TGT TAA TTA CTC GCG GCC CAG
 #1 (22A4-6At)pe/B 重配列-差異後に切断

ATG AAA TAC CTA TGT CCT ACG GCA GCC GCT GGA TGT TAA TTA CTC GCG GCC CAG
 MET Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Gly Leu Leu Ala Ala Gln

F5-aHer2 IWL14. CCG GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT
 #55 New I
 CCG GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT
 Pro Ala MET Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro

F5-aHer2 IWL14. GGG GGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT CGC AGC TAT
 #109

GGG GGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT CGC AGC TAT
 Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr

F5-aHer2 IWL14. GCC ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC TCA GCT
 #163

GCC ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC TCA GCT
 Ala MET Ser Thr Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Thr Val Ser Ala

【0220】

【数9】

Complete seq:F5@Her2-scFv
Sequencher™ "Complete F5@Her2-contig" (配列番号 1)

F5-aHer2	IM114.	ATT ACT GGT CGT GAT AAC ACA TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGG TTC	
	#217		
		ATT ACT GGT CGT GGT GAT AAC ACA TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGG TTC	
		Ile Ser Gly Arg Gly Asp Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe	
F5-aHer2	IM114.	ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG	
	#271		
		ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG	
		Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln MET Asn Ser Leu	
F5-aHer2	IM114.	AGA GCC GAG GAC ACG GCC GTT TAT TAC TGT GCG AAA ATG ACA AGT AAC GCG TTC	
	#325		
		AGA GCC GAG GAC ACG GCC GTT TAT TAC TGT GCG AAA ATG ACA AGT AAC GCG TTC	
		Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr <u>Cys</u> Ala Lys MET Thr Ser Asn Ala Phe	
F5-aHer2	IM114.	GCA TTT GAC TAC TGG GGC CAG GCA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA	GGT GGA GGC
F5-aHer2	IM19?		
	#379		
		VH	
		GCA TTT GAC TAC TGG GGC CAG GCA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA	GGT GGA GGC
		Ala Phe Asp Tyr Tyr Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	Gly Gly Gly

【0221】

【数10】

Complete seq:F5'Her2-scfV
Sequencer™ "Complete F5'-Her2-contig" (配列番号 1)

F5-aHer2	IM114	GGT TCA GGC CGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC TCG	GGT TCA GGC CGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC TCG	Gly ser Gly Gly Gly ser Gly Gly ser Gly Gly
F5-aHer2	IM1197	GGT TCA GGC CGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC TCG	GGT TCA GGC CGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC TCG	Gly ser Gly Gly Gly ser Gly Gly ser Gly Gly
F5-aHer2	IM1233	GGT TCA GGC CGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC TCG	GGT TCA GGC CGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC TCG	Gly ser Gly Gly Gly ser Gly Gly ser Gly Gly

ES-aHar2 IM197 CCG CCC TCA GTC TCT GGG GCC CCA GGG CAG ACC ATC TCC TCC ACT GGG
 CCG CCC TCA GTC TCT GGG GCC CCA GGG CAG ACC ATC TCC TCC ACT GGG
 Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Glu Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly
 #487

5'-a₁er2 IM197 AGC AGC TCC AAC ATC GGG GCA GGT TAT GGT GTC CAC TGG TAC CAG CAG CTT CCA
#541

5'-aHer2 1M19.7 GGA ACA GCC CCC AAA CTC CTC ATC TAT GGT AAC ACC AAT CGG CCC TCA GGG GTC
 Gly Thr Ala Pro Lys Leu Ile Tyr Gly Asn Thr Asn Arg Pro Ser Gly Val
 #595

【数 1 1】

Complete seq:F5-aHer2-scfv
 Sequencher™ "Complete F5-aHer2-contig" (配列番号 1)

F5-aHer2 IM19.7 CCT GAC CGA TTC TCT GGC TTC AAG TCT GGC ACC TCA GCC TCC TCC CTG GCC ATC ACT
 #649 CCT GAC CGA TTC TCT GGC TTC AAG TCT GGC ACC TCA GCC TCC TCC CTG GCC ATC ACT
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Phe Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr

F5-aHer2 IM19.7 GGG CTC CAG GCT GAG GAT GAG GCT GAT TAT TAC TGC CAG TCC TAT GAC AGC AGC
 #703 GGG CTC CAG GCT GAG GAT GAG GCT GAT TAT TAC TGC CAG TCC TAT GAC AGC AGC
 Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
 VL

F5-aHer2 IM19.7 CTG AGT GGT TGG GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAG CTG ACC GTC CTA GGT GCG GCG
 #757 CTG AGT GGT TGG GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAG CTG ACC GTC CTA GGT GCG GCG
 Leu Ser Gly Trip Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala

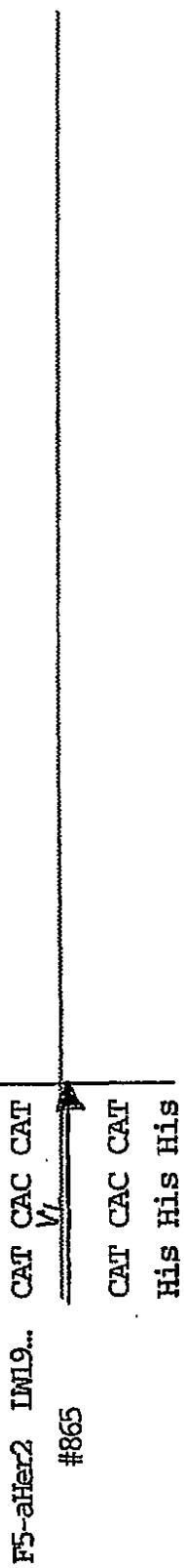
F5-aHer2 IM19.7 GCA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT GGG GCC GCA CAT CAC CAT
 #811 GCA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT GGG GCC GCA CAT CAC CAT
 Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala His His His

【0 2 2 3】

【数 1 2】

Complete seq:F5-aHer2-sCFV
 Sequencher™ "Complete F5-aHer2-contig" (配列番号 1)

F5-aHer2 INI9... CAT CAC CAT
 #865
 V
 CAT CAC CAT
 His His His



10

20

30

40

【 0 2 2 4 】

Compl.scFv-F4aHer3-seq-contig Sequencher™ "Compl.scFv-F4aHer3-seq-contig" (電列番号 2)	
F4-aHer3	IWL1.. ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TTG TTA TTA CTC GCG GCG CAG #1
	ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TTG TTA TTA CTC GCG GCG CAG MET LYS Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Gly Leu Leu Leu Ala Ala Gln
F4-aHer3	IWL1.. CCG GCC ATG GCC CAG CTG CAG CAG TCG GAG TCG GGG GGA GGC CTG GTC AAG CCT #55
	CCG GCC ATG GCC CAG CTG CAG CAG TCG GAG TCG GGG GGA GGC CTG GTC AAG CCT Pro Ala MET Ala Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro
F4-aHer3	IWL1.. GGG GGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT AGC AGC TAT #109
	GGG GGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT AGC AGC TAT Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser <u>Cys</u> Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
F4-aHer3	IWL1.. GCC ATG AGC TGG GTC CGC CAG CCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC TCA ACT #163
	GCC ATG AGC TGG GTC CGC CAG CCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC TCA ACT Ala MET Ser Thr Val Arg Gln Ala Pro GLY Lys GLY Leu Glu Thr Val Ser Thr

Cap1.scFv-F4aHer3-seq contig
Sequencher™ "Cap1.scFv-F4aHer3-seq-contig" (配列番号 2)

F4-aHer3	IWL1...	ATT ACT GGT GGT GGT ACC ACA TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGG TTC	#217
		ATT ACT GGT GGT GGT ACC ACA TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGG TTC	
		Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe	
F4-aHer3	IWL1...	ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG	#271
		ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG	
		Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln MET Asn Ser Leu	
F4-aHer3	IWL1...	AGA GCC GAG GAC ACG GCC GTA TAT TAC TGT GCG AAG GGG TAT AGC AGC AGC TGG	#325
		AGA GCC GAG GAC ACG GCC GTA TAT TAC TGT GCG AAG GGG TAT AGC AGC AGC TGG	
		Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr <u>Cys</u> Ala Lys Gly Tyr Ser Ser Ser TriP	
F4-aHer3	IWL1...	TCC GAA GTA GCG TCC GGC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA	#379
		TCC GAA GTA GCG TCC GGC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA	
		Ser Glu Val Ala Ser Gly Tyr TriP Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	

【数15】

Compl.scFv-F4Her3-seq-contig
Sequencher™ "Compl.scFv-F4Her3-seq-contig" (配列番号 2)

F4-Her3 IM11... GGT GGA GGC GGT TCA AGC GGA GGT GGC TCT GCT GGC GGT GGC GGA TCG
 F4-Her3 IM19... GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG ATC GTG

#433 GGT GGA GGC GGT TCA ^GRGC GGA GGT GGC TCT GCT GGC GGT GGC GGA TCG GAC ARC GTG
 GLY GLY GLY GLY Ser <?> GLY GLY GLY Ser GLY GLY GLY GLY Ser Asp Ile Val
 Gly

F4-Her3 IM19... ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTG GGA GAC AGA GTC ACC ATC
 #487 ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTG GGA GAC AGA GTC ACC ATC
 MET Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val GLY Asp Arg Val Thr Ile

F4-Her3 IM19... ACT TGC CGG GCA ACT CAG GGC ATT AGA AAT GAT TTA GGC TGG TAT CAG CAG AAA
 #541 ACT TGC CGG GCA ACT CAG GGC ATT AGA AAT GAT TTA GGC TGG TAT CAG CAG AAA
 Thr Cys Arg Ala ser Gln GLY Ile Arg Asn Asp Leu GLY Trp Tyr Gln Gln Lys

F4-Her3 IM19... GCA GGG AAA GCC CCT AAG CTC CTG ATC TAT GCT GCA TCC ACT TTA CAA ACT GGG
 #595 GCA GGG AAA GCC CCT AAG CTC CTG ATC TAT GCT GCA TCC ACT TTA CAA ACT GGG
 Ala Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly

【0227】

[数 1 6]

Compl.scFv-F4GHer3-seq-contig

Sequencher™ "Compl.scFv-F4GHer3-seq-contig" (配列番号 2)

F4-aaHer3 LM19... GTC CCA TCA AGG TIC AGC GGC AGT GCA TCT GGC ACA GAT TIC ACT CTC ACC ATC

#649

GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GCA TCT GGC ACA GAT TIC ACT CTC ACC ATC
Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

F4-aaHer3 LM19... AGC AGC CTG CAG CCT GAT GAT TTT GCA ACT TAC TIC TIC TGT CAA CAG GCT CAC AGT

#703

AGC ACC CTG CAG CCT GAT GAT TTT GCA ACT TAC TIC TIC TGT CAA CAG GCT CAC AGT
Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ala His Ser

F4-aaHer3 LM19... TTC CCT CCC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGT GCG GCC GCA

#757

TTC CCT CCC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGT GCG GCC GCA
Phe Pro Pro Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala

F4-aaHer3 LM19... GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT GGG GCC GCA CAT CAC CAT CAT

#811

GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT GGG GCC GCA CAT CAC CAT CAT
; Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala His His His His

【数 1 7】

Compl.scFv-F4aHer3-seq.seq.contig
 Sequencher™ "Compl.scFv-F4aHer3-seq-contig" (配列番号 2)

F4-aHer3	TM19...	CAC	CAT
#865		CAC	CAT
		His	His

【 0 2 2 9 】

10

20

30

40

【数 1 8】

HIGHER3-contig seq.

Sequencher™ "Untitled Project" (配列番号 3)

HIGHER3_IW111.... ATG AAA TAC CTA TIG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TIG TTA TCA CTC GCG GCC CAG

#1

ATG AAA TAC CTA TIG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TIG TTA TCA CTC GCG GCC CAG
MET Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Gly Leu Leu Ala Ala Gln

HIGHER3_IW111.... CCG GCC ATG GCC CAG GTA CAG CTG CAG CAG TCA GGG GGA GGC CTG GTC AAG CCT

#5

CCG GCC ATG GCC CAG GTA CAG CTG CAG CAG TCA GGG GGA GGC CTG GTC AAG CCT
Pro Ala MET Ala Gln Val Gln Leu Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Val Lys Pro

HIGHER3_IW111.... GGG GGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT

#109

GGG GGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT
Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

HIGHER3_IW111.... AGC ATG AAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC TCA TCC

#163

AGC ATG AAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC TCA TCC
Ser MET Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys GLY Leu Glu Trp Val Ser Ser

【 0 2 3 0 】

【数19】

HIGHER3-contig seq.
Sequencher™ "Untitled Project" (配列番号 3)

HIGHER3 LM111... ATT AGT AGT AGT AGT TAC ATA TAC TAC GCA GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC
#217

ATT AGT AGT AGT AGT TAC ATA TAC TAC GCA GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC
Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe.

HIGHER3 LM111... ACC ATC TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC TCA CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG
#271

ACC ATC TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC TCA CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG
Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln MET Asn Ser Leu

HIGHER3 LM111... AGA GAC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT GAC GGT CCC CCC ATC
#325

AGA GAC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT GAC GGT CCC CCC ATC
Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Asp Gly Pro Pro Ile

HIGHER3 LM111... CAG CAC TGG GGC CAG GCA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA CGT GGA GGC GGT TCA
HIGHER3 LM197 ...
#379

CAG CAC TGG GGC CAG GCA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA CGT GGA GGC GGT TCA
Gln His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser <?> Gly Gly Gly Ser

【0231】

【数20】

HIGHER3-contig seq.
Sequencher™ "Untitled Project" (配列番号 3)

HIGHER3 IM111.... GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG
HIGHER3 IM197.... GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGA TCG CAG TCT GTG TTG ACG CAG CAG CCG CCC
#433

GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG CAG TCT GTG TTG ACG CAG CAG CCG CCC
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro

HIGHER3 IM197.... TCG GTA TCT GGG GCC CCC GCA GGG CAG AGG GTC ACC ATC TCC TGC ACT GGG AGC AGC
#487

TCG GTA TCT GGG GCC CCC GCA GGG CAG AGG GTC ACC ATC TCC TGC ACT GGG AGC AGC
Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser

HIGHER3 IM197.... TCC AAC ATC GGG GCA AGT TTT GAT GTC CAG TAC TGG TAC CAG CAA CTT CCA GGA ACA
#541

TCC AAC ATC GGG GCA AGT TTT GAT GTC CAG TAC TGG TAC CAG CAA CTT CCA GGA ACA
Ser Asn Ile Gly Ala Ser Phe Asp Val Gln Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr

HIGHER3 IM197.... GCC CCC AAA CTC CTC ATC TAT GGT AAC AAC AAT CGG CCC TCA GGG GTC CCT GAC
#595

GCC CCC AAA CTC CTC ATC TAT GGT AAC AAC AAT CGG CCC TCA GGG GTC CCT GAC
Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp

【0232】

【数21】

HIGHER3-contig seq.
Sequencher™ "Untitled Project" (配列番号 3)

HIGHER3 LM197 ...	CGA TTC TCT GCC TCC AAG TCT GGC ACC TCA GCC TCC CTG GGC ATC ACC GGA CTC	#649	CGA TTC TCT GCC TCC AAG TCT GGC ACC TCA GCC TCC CTG GGC ATC ACC GGA CTC Arg Phe Ser Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Gly Ile Thr Gly Leu
HIGHER3 LM197 ...	CAG ACT GGG GAC GAG GGC GAT TAT TAC TGC GGC TCA TAT ACA GGC ACC TAC TCT	#703	CAG ACT GGG GAC GAG GGC GAT TAT TAC TGC GGC TCA TAT ACA GGC ACC TAC TCT Gln Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr <u>Tyr</u> <u>Tyr</u> <u>Cys</u> Gly Ser Tyr Thr Gly Thr Tyr Ser
HIGHER3 LM197 ...	TGG GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTC ACC GTC ACC GTC CTA GGT GCG GCC GCA GAA CAA	#757	TGG GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTC ACC GTC ACC GTC CTA GGT GCG GCC GCA GAA CAA Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala Glu Gln
HIGHER3 LM197 ...	AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT GGG GCC GCA CAT CAC CAT CAC CAT	#811	AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT GGG GCC GCA CAT CAC CAT CAC CAT Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala His His His His His

【0233】

【数22】

Contig[0002]

Sequencher™ "H3GHer3-contig seq." (配列番号 4)

H3GHer3	IM11..	ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TTG TTA TTA CTC GCG GCC CAG	#1
		ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TTG TTA TTA CTC GCG GCC CAG	
		MET Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Ala Ala Gln	
H3GHer3	IM11..	CCG GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTG CAG CAG TCG GGG GGA GGC TTG GTC AAG CCT	#55
		CCG GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GGG GGA GGC TTG GTC AAG CCT	
		Pro Ala MET Ala Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro	
H3GHer3	IM11..	GGG GGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT AGT AGC TAT	#109
		GGG GGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT AGT AGC TAT	
		Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser <u>Cys</u> Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	
H3GHer3	IM11..	TGG ATG AGC TGG GTG CGC CAG CCT CCA GGA AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCC AAC	#163
		TGG ATG AGC TGG GTG CGC CAG CCT CCA GGA AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCC AAC	
		Trp MET Ser Trp Val Arg Gin Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Asn	

【0234】

【数23】

Contig[0002]
 Sequencher™ "H3eHer3-contig seq." (配列番号 4).

H3eHer3 IM111.. ATA AAC CGC GAT GCA AGT GCC AGT TAT GTG GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC
 #217

ATA AAC CGC GAT GCA AGT GCC AGT TAT TAT GTG GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC
 Ile Asn Arg Asp Gly Ser Ala Ser Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe

H3eHer3 IM111.. ACC ATC TCC AGA GAC GAC GGC AAG AAC TCA CTC TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG
 #271

ACC ATC TCC AGA GAC GAC GGC AAG AAC TCA CTC TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG
 Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Glu Met Asn Ser Leu

H3eHer3 IM111.. AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT CGG GGC GTG GGG TAC
 #325

AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT CGG GGC GTG GGG TAC
 Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg GLY Val GLY Tyr

H3eHer3 IM111.. TTC GAT CTC TCG GGC CGT GGC ACC CTC GTC ACC GTC TCC TCA GGT GCA GGC GGT
 H3eHer3 IM197.. #379

TTC GAT CTC TGG GGC CGT GGC ACC CTC GTC ACC GTC TCC TCA GGT GCA GGC GGT
 Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly GLY GLY GLY

【0235】

Contig[0002]
Sequencher™ "H3GHer3-contig seq." (配列番号 4)

H3GHer3	IM111...	TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG	
H3GHer3	IM197...	TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG TCT GCC CTG ACT CAG CCT	
	#433		
		TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG CAG TCT GCC CTG ACT CAG CCT	
		Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro	
H3GHer3	IM197...	GCC TCC GTG TCT GGA TCT CCT GGA CAG TCG ATC ACC ATC TCC TGC ACT GGA ACC	
	#487		
		GCC TCC GTG TCT GGA TCT CCT GGA CAG TCG ATC ACC ATC TCC TGC ACT GGA ACC	
		Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser <u>Cys</u> Thr Gly Thr	
H3GHer3	IM197...	AGC AGT GAT GTT GGT TAT AAC TTT GTC TCC TGG TAC CAA CAG CAC CCA GGC	
	#541		
		AGC AGT GAT GTT GGT TAT AAC TTT GTC TCC TGG TAC CAA CAG CAC CCA GGC	
		Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Phe Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly	
H3GHer3	IM197...	AAA GCC CCC AAA CTC ATG ATT TAT GAT GTC AGT GAT CGA CCC TCA GGG GTC TCT	
	#595		
		AAA GCC CCC AAA CTC ATG ATT TAT GAT GTC AGT GAT CGA CCC TCA GGG GTC TCT	
		LYS Ala Pro Lys Leu MET Ile Tyr Asp Val Ser Asp Arg Pro Ser Gly Val Ser	

【数25】

Contig[0002]
Sequencher™ "H3GHer3-contig seq." (配列番号 4)

H3GHer3	IM197...	GAT CGG TTC TCT GGC TCC AAG TCT GGC AAC ACG GCC TCC CTG ATC ATC TCT GGC	
#649		GAT CGG TTC TCT GGC TCC AAG TCT GGC AAC ACG GCC TCC CTG ATC ATC ATC TCT GGC	
		Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Ile Ile Ser Gly	
.....			
H3GHer3	IM197...	CTC CAG GCT GAC GAC GAG GCT GAT TAT TAC TGC AGC TCA TAT GGA AGC AGC AGC	
#703		CTC CAG GCT GAC GAC GAG GCT GAT TAT TAC TGC AGC TCA TAT GGA AGC AGC AGC	
		Leu Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr <u>Cys</u> Ser Ser Tyr Gly Ser Ser Ser	
.....			
H3GHer3	IM197...	ACC CAT GTG ATT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTC ACC GTC CTA GGT GCG GCC GCA	
#757		ACC CAT GTG ATT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTC ACC GTC CTA GGT GCG GCC GCA	
		Thr His Val Ile Phe Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala	
.....			
H3GHer3	IM197...	GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT GGG GCC GCA CAT CAC CAT CAT	
#811		GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT GGG GCC GCA CAT CAC CAT CAT	
		Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn GLY Ala Ala His His His His	

【0237】

【数 2 6】

Contig[0002]
 Sequencher™ "H3@Her3-contig seq." (配列番号 4)

H3@Her3	IM197...	CAC	CAT
#865		CAC	CAT
		His	His

【 0 2 3 8 】

10

20

30

40

【数27】

complete seq. E12-@Her3-scFv Sequencher™ "complete seq. E12-@Her3-scFv" (配列番号 5)	
E12-@Her3 IML..	ATG AAA TAC CTA TIG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TIG TIA TTA CTC GCG GCC CAG
#1	ATG AAA TAC CTA TIG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TIG TIA TTA CTC GCG GCC CAG MET Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Ala Ala Gln
E12-@Her3 IML..	CCG GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT
#55	CCG GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT Pro Ala MET Ala Gln Val Gln Leu Val Gly Ser Gly Gly Val Val Gln Pro
E12-@Her3 IML..	GGG AGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT GAC TAT
#109	GGG AGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT GAC TAT Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
E12-@Her3 IML..	TAT ATA CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG ATG GCA GTT
#163	TAT ATA CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG ATG GCA GTT Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Ala Val

【0239】

【数28】

complete seq. E12-*aaHer3-scfv*Sequencher™ "complete seq. E12-*aaHer3-scfv*" (配列番号 5)

EL2- <i>aaHer3</i> IML...	ATT TCA TAT GAT GGC AAT AAT TAC TAC GCC GCC TCC GTG AAG GAC CGA TTC	
#217	ATT TCA TAT GAT GGC AAT AAT TAC TAC GCC GCC TCC GTG AAG GAC CGA TTC	
	Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Ala Ser Val Lys Asp Arg Phe	
EL2- <i>aaHer3</i> IML...	ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG GTG TCT CTG CAA ATG AAC AGC CTG	
#271	ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG GTG TCT CTG CAA ATG AAC AGC CTG	
	Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Ser Leu Gln MET Asn Ser Leu	
EL2- <i>aaHer3</i> IML...	AGA GCT GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT CTC TAC GGT GAC TAC	
#325	AGA GCT GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT CTC TAC GGT GAC TAC	
	Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Leu Tyr Gly Asp Tyr	
EL2- <i>aaHer3</i> IML...	GCT CTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA GGT GCA GGC	
EL2- <i>aaHer3</i> IML...	GCT CTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA GGT GCA GGC	
#379	GCT CTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA GGT GCA GGC	
	Ala Leu Asp Tyr Tyr Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly	

【0240】

【数29】

complete seq. E12- <u>aHer3</u> -scFv		Sequencher™ "complete seq.E12- <u>aHer3</u> -scFv" (配列番号 5)	
E12-aHer3	IWL...	GGT TCA GGC CGA GGT GGC TCT CGC GGT GGT GGC GGA TCG	
E12-aHer3	IWL...	GGT TCA GGC CGA GGT GGC TCT CGC GGT GGC GGA TCG GAC ATC CAG ATG ACC CAG	
#433		GGT TCA GGC CGA GGT GGC TCT CGC GGT GGC GGA TCG GAC ATC CAG ATG ACC CAG Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln	
E12-aHer3	IWL...	TCT CCT TCC ACC CTG TCT GCA TCT CTG GCA GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG	
#487		TCT CCT TCC ACC CTG TCT GCA TCT CTG GCA GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr <u>Cys</u> Arg	
E12-aHer3	IWL...	GCC AGT CAG AGT ATT GGT AGC TGC TIG GCC TGC TAT CAG CAG AAA CCA GGG AAA	
#541		GCC AGT CAG AGT ATT GGT AGC TGC TIG GCC TGC TAT CAG CAG AAA CCA GGG AAA Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Thr Leu Ala Thr Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys	
E12-aHer3	IWL...	GCC CCT AAA CTC CTG ATC TAT AAG GCG TCT ACT TTA GAA AGT GGG GTC CCA TCA	
#595		GCC CCT AAA CTC CTG ATC TAT AAG GCG TCT ACT TTA GAA AGT GGG GTC CCA TCA Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser	

【0241】

【数30】

complete seq. E12-aHer3-scFv	
Sequencher™ "complete seq. E12-aHer3-scFv" (配列番号. 5)	
E12-aHer3 IML..	AGG TTC ACC GGC ACT GGA TCT GGG ACA GAA TIC ACT CTC ACA ATC AGC GGC. CTC
#649	AGG TTC ACC GGC ACT GGA TCT GGG ACA GAA TIC ACT CTC ACA ATC AGC GGC CTC Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu
E12-aHer3 IML..	CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAG AAG CTT AGT AGT TAC CCG CTC
#703	CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAG AAG CTT AGT AGT TAC CCG CTC Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr <u>Cys</u> Gln Lys Leu Ser Ser Tyr Pro Leu
E12-aHer3 IML..	ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGT GCG GCG GCA GAA CAA AAA
#757	ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGT GCG GCG GCA GAA CAA AAA Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala Glu Gln Lys
E12-aHer3 IML..	CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT GGG GCC GCA CAT CAC CAT CAC CAT CAC CAT
#811	CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT GGG GCC GCA CAT CAC CAT CAC CAT CAC CAT Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala His His His His His His

【0242】

【数31】

Contig[0001]
Sequencer™ "Cont1. scFv-B12αHer3-seq, contig" (配列番号 6)

B12-αHer3 IM11 ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TTG TTA TTA CTC GCG GCC CAG
 #1 2.0A (66 nt) *peb* ←配列一発現後に切断

ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TTG TTA TTA CTC GCG GCC CAG
 MET Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Ala Ala Gln

B12-αHer3 IM11 CCG GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GCT GGG GCA GGC TTG GIA CAG CCT
 #55 CAG CAG GTG CAG CTC TCT GCA GGA GGC TTG GIA CAG CCT
 Pro Ala MET Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro

B12-αHer3 IM11 CCC AGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA ACC TTT GAT GAT TAT
 #109 ←
 CCC AGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA ACC TTT GAT GAT TAT
 GLY Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr

B12-αHer3 IM11 CCC ATG CAC TGG GTC CGG CAA GCT CCA GGG AAG GGC CTG GAG TGG GTC TCA GGT
 #163 CCC ATG CAC TGG GTC CGG CAA GCT CCA GGG AAG GGC CTG GAG TGG GTC TCA GGT
 Ala MET His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser GLY

【0 2 4 3】

【数32】

Contig[0001]
Sequencer™ "Compl. scFv-B12aHer3-seq.contig" (配列番号 6)

B12-aHer3	INN	ATT ACT TCG ATT AGT AGT GGT AGC ATA GGC TAT GCG GAC TCT GTG AAG GGC CGA TIC	
#217			
		ATT ACT TCG ATT ACT GGT AGC ATA GGC TAT GCG GAC TCT GTG AAG GGC CGA TIC	
		Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe	
B12-aHer3	INN	ACC ATC TCC AGA GAC AAC GCC AAG AAC TCA CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG	
#271			
		ACC ATC TCC AGA GAC AAC GCC AAG AAC TCA CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG	
		Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Glu Met Asn Ser Leu	
B12-aHer3	INN	AGA CCT GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT CGG AGA GAT CTT GGT GCC AAG CAG	
#325			
		AGA CCT GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT CGG AGA GAT CTT GGT GCC AAG CAG	
		Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr <u>Cys</u> Ala Arg Asp Leu Gly Ala Lys Gln	
B12-aHer3	INN	TGG CTG GAG GGG TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGC ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA	
#379			
		TGG CTG GAG GGG TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGC ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA	
		Trp Leu Glu Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Glu Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	

【0244】

【数33】

contig[0001] Sequencher™ "Cappl. scFv-B12cHer3-seq. contig" (電列番号 6)	
B12-aher3	IMI4 GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGT GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG
B12-aher3	IMI97 GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGT GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG AAT TTT ATG
#433	
	GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG AAT TTT ATG
	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asn Phe MET
B12-aher3	IMI97 CTG ACT CAG GAC CCT GCT GTG TCT GTG GCC TIG GGA CAG ACA GTC AGG ATC ACA
#487	
	CTG ACT CAG GAC CCT GCT GTG TCT GTG GCC TIG GGA CAG ACA GTC AGG ATC ACA
	Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr
B12-aher3	IMI97 TGC CAA GGA GAC AGC CTC AGA AGC TAT TAT GCA AGC TGG TAC CAG CAG AAG CCA
#541	
	TGC CAA GGA GAC AGC CTC AGA AGC TAT TAT GCA AGC TGG TAC CAG CAG AAG CCA
	<u>Cys</u> Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Ala Ser Thr Tyr Gln Gln Lys Pro
B12-aher3	IMI97 GGA CAG GCC CCT GTA CTT GTC ATC TAT GGT AAA AAC AAC CGG CCC TCA GGG ATC
#595	
	GGA CAG GCC CCT GTA CTT GTC ATC TAT GGT AAA AAC AAC CGG CCC TCA GGG ATC
	Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile

【0245】

【数34】

Contig[0001]
Sequencer™ "Cappl. scFv-B12-afHer3-seq.contig" (配列番号 6)

B12-afHer3	LM197	CCA GAC CGA TTC TCT GGC TCC ACC TCA GGA AAC TCA GCT TCC TIG ACC ATC ACT	#649														
		CCA GAC CGA TTC TCT GGC TCC ACC TCA GGA AAC TCA GCT TCC TIG ACC ATC ACT															
Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Thr	Ser	Gly	Asn	Ser	Ala	Ser	Leu	Thr	Ile	Thr
B12-afHer3	LM197	GGG GCT CAG GCG GAA GAT GAG GCT GAC TAT TAC TGT AAC TCC CGG GAC ACC AGT	#703														
		GGG GCT CAG GCG GAA GAT GAG GCT GAC TAT TAC TGT AAC TCC CGG GAC ACC AGT															
Gly	Ala	Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	<u>Cys</u>	Asn	Ser	Arg	Asp	Ser	Ser
B12-afHer3	LM197	GGT AAC CAT TGG GTG TTC GGC GCA GGG ACC AAG GTC ACC GTC CTA GGT GCG GCC	#757														
		GGT AAC CAT TGG GTG TTC GGC GCA GGG ACC AAG GTC ACC GTC CTA GGT GCG GCC															
GLY	Asn	His	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Thr	Val	Leu	Gly	Ala	Ala
B12-afHer3	LM197	6 GCA NAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT GGG GCC GCA CAT CAC CAT	#811														
		6 GCA NAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT GGG GCC GCA CAT CAC CAT															
Ala	<?>	Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Asp	Leu	Asn	Gly	Ala	Ala	His	His	Gly	

【0246】

【数 3 5】

Contig[0001]
Sequencher™ "Compl. scFv-B12@Her3-seq.seq" (配列番号 6)

B12-aHer3 M197 CAT CAC CAT

#865

CAT CAC CAT
His His His

10

20

30

40

【 0 2 4 7 】

Contig[00001]

Sequencher™ "E12@EGFR-scfFv-contig" (配列番号 7)

E12 @EGFR IM114 ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TTG TTA TTA CTC GCC GCG CAG

#1

ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TTG TTA TTA CTC GCC GCG CAG
MET Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Gly Leu Leu Leu Ala Ala Gln

E12 @EGFR IM114 CCG GCC ATG GCC GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT

#5

CCG GCC ATG GCC GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT
Pro Ala MET Ala Glu Val Gln Leu Val Gln ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro

E12 @EGFR IM114 GGG TCC TCG GTG AAG GTC TCC TGC AAG GCT TCT GGA GGC ACC TTC AGC AGC TAT

#109

GGG TCC TCG GTG AAG GTC TCC TGC AAG GCT TCT GGA GGC ACC TTC AGC AGC TAT
Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr

E12 @EGFR IM114 GCT ATC AGC TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA GGG

#163

GCT ATC AGC TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT GAG TGG ATG GGA GGG
Ala Ile Ser Thr Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly

【数37】

Contig[0001]
Sequencher™ "E12@EGFR-scFv-contig" (配列番号 7)

E12 EGFR IML14	ATC ATC CCT ATC TTT GGT ACA GCA AAC TAC GCA CAG AAG TTC CAG GGC AGA GTC	
#217	ATC ATC CCT ATC TTT GGT ACA GCA AAC TAC GCA CAG AAG TTC CAG GGC AGA GTC	
	Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val	
E12 EGFR IML14	ACG ATT ACC GCG GAC GAA TCC ACG AGC ACA GCA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG	
#271	ACG ATT ACC GCG GAC GAA TCC ACG AGC ACA GCA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG	
	Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu	
E12 EGFR IML14	AGA TCT GAG GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAG GAG CCA TAT TGT	
#325	AGA TCT GAG GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAG GAG CCA TAT TGT	
	Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Glu Gly Pro Tyr Cys	
E12 EGFR IML14	AGT AGT ACC AGC TGC TAT GGG CCT TTT GAT ATC TGG GGC CAA GGC ACC CTG GTC	
#379	AGT AGT ACC AGC TGC TAT GGG CCT TTT GAT ATC TGG GGC CAA GGC ACC CTG GTC	
	Ser Ser Thr Ser Cys Tyr Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val	

【0249】

Contig [0001] Sequencher™ "E12αEGFR-ScFv-contig" (配列番号 7)	
E12 αEGFR IM11.1	ACC GTC TCC TCA GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC CGT GGC GGA
E12αEGFR IM19.7	GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC CGT GGC GGA
#433	
	ACC GTC TCC TCA GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC CGT GGC GGA
	Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
E12 αEGFR IM11.4	TCG
E12αEGFR IM19.7	TCG CAG TCT GTG CTG ACT CAG GAC CCT GCT GTG TCT GTG GCC TIG GGA CAG ACA
#487	
	TCG CAG TCT GTG CTG ACT CAG GAC CCT GCT GTG TCT GTG GCC TIG GGA CAG ACA
	Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln Thr
E12αEGFR IM19.7	GTC AAG ATC ACA TGC CAA GGA GAC CTC AGA AGC TAT TTT GCA AGC TGG TAC
#541	
	GTC AAG ATC ACA TGC CAA GGA GAC CTC AGA AGC TAT TTT GCA AGC TGG TAC
	Val Lys Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Phe Ala Ser Trp Tyr

【数39】

Contig[0001]
 Sequencher™ "EL2@EGER-ScFv-contig" (配列番号 7)

EL2@EGER IM19.7 CAG CAG AAG CCA GGA CAG CCG CCT ACA CTT GTC ATG TAT GCT AGA AAT GAC CGG

#595 CAG CAG AAG CCA GCA CAG GCC CCT ACA CTT GTC ATG TAT GCT AGA AAT GAC CGG
 Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Thr Leu Val MET Tyr Ala Arg Asn Asp Arg

EL2@EGER IM19.7 CCC GCA GGG GTC CCT GAC CGA TTC TCT GGC TCC AAG TCT GGC ACC TCA GCC TCC

#649 CCC GCA GGG GTC CCT GAC CGA TTC TCT GGC TCC AAG TCT GGC ACC TCA GCC TCC
 Pro Ala Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser

EL2@EGER IM19.7 CTG GCC ATC AGT GGG CTC CAG TCT GAG GAT GAG GCT GAT TAT TAT TGT GCA GCA

#703 CTG GCC ATC AGT GGG CTC CAG TCT GAG GAT GAG GCT GAT TAT TAT TGT GCA GCA
 Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala

EL2@EGER IM19.7 TGG CAT GAC AGC CTG AAT GGT TAT CTC TTC GGA GCT GGG ACC AAG CTG ACC GTC

#757 TGG CAT GAC AGC CTG AAT GGT TAT CTC TTC GGA GCT GGG ACC AAG CTG ACC GTC
 Trp Asp Ser Leu Asn Gly Tyr Leu Phe Gly Ala GLY Thr Lys Leu Thr Val

【0251】

【数40】

Contig[0001]
Sequencher™ "E12GEGFR-scfFv-contig". (配列番号 7)

E12GEGFR IM197 CTA CGT GCC GCA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT GGG GCC
#811
CTA CGT GCC GCA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT GGG GCC
Leu · Gly Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala

E12GEGFR IM197 GCA CAT CAC CAT CAT CAC CAT
#865
GCA CAT CAC CAT CAT CAC CAT
Ala His His His His His

【0252】

【数41】

Contig[0001]
Sequencher™ "C10EEFR-scfV-seq" (配列番号 8)

C10EEFR	IW11	ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TIG TTA TTA CTC CTC GCG GCC CAG	#1
		ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TIG TTA TTA CTC CTC GCG GCC CAG	
		MET Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Ala Ala Gln	
C10EEFR	IW114	CCG GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG TCG GGC CCA GCA CTG GTG AAG CCT	#55
		CCG GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG TCG GGC CCA GCA CTG GTG AAG CCT	
		Pro Ala MET Ala Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro	
C10EEFR	IW114	TCG GAG ACC CTG TCC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GGT GGC TCC TTC AGA AGT TAC	#109
		TCG GAG ACC CTG TCC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GGT GGC TCC TTC AGA AGT TAC	
		Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Phe Arg Ser Tyr	
C10EEFR	IW114	TAC TGG AGC TGG ATC CGG TAG CCC CCA GGG AAG GCA CTG GAG TGG ATA GGG TAT	#163
		TAC TGG AGC TGG ATC CGG TAG CCC CCA GGG AAG GCA CTG GAG TGG ATA GGG TAT	
		Tyr Trp Ser Trp Ile Arg STP Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr	

【0253】

【数42】

Contig[0001]

Sequencher™ "C10GEFR-seq" (順列番号 8)

C10GEFR IM114 ATC TTT TAC AGT GGG AGC ACC AAC TAC AAT CCC TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC
#217

ATC TTT TAC AGT GGG AGC ACC AAC TAC AAT CCC TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC
Ile Phe Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr

C10GEFR IM114 ATA TCA GTA GAC ACG TCC AAG AAC CAG TIC TCC CTG AAG CTC AGC TCT GTG ACC
#271

ATA TCA GTA GAC ACG TCC AAG AAC CAG TIC TCC CTG AAG CTC AGC TCT GTG ACC
Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr

C10GEFR IM114 GCT GCG GAC ACG GCC GTG TAT TAT TGT GCG AGA GGA CAT TIC GGG GAG TTA GGA
#325

GCT GCG GAC ACG GCC GTG TAT TAT TGT GCG AGA GGA CAT TIC GGG GAG TTA GGA
Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly His Leu Gly Glu Leu Gly

C10GEFR IM114 TGG TTC GAC CCC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA AGT GGA GGC
C10GEFR IM197...
#379

TGG TTC GAC CCC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA AGT GGA GGC
Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ser Gly Gly

【0254】

【数43】

Contig[0001]
Sequencher™ "C10GECCR-scFv-seq" (配列番号 8)

C10GECCR IM114 GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG
 C10GECCR IM197... GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GCT GGC GGT GGC GGA TCG ATC CAG ATG ACC CAG

#433

GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GCT GGC GGT GGC GGA TCG GAC ATC CAG ATG ACC CAG
 Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ile Gln MET Thr Gln

C10GECCR IM197... TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC CAG

#487

TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC CAG
 Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln

C10GECCR IM197... GCG AGT CAG GAC ATT AGC AAC TAT TTA AAT TGG TAT CAG CAG AAG CCG GGG AAA

#541

GCG AGT CAG GAC ATT AGC AAC TAT TTA AAT TGG TAT CAG CAG AAG CCG GGG AAA
 Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys

C10GECCR IM197... GCC CCT AAA CTC CTC ATT GCT GCA TCC CGT TTA GCG AGC GGG GTC CCC TCA

#595

GCC CCT AAA CTC CTC ATT GCT GCA TCC CGT TTA GCG AGC GGG GTC CCC TCA
 Ala Pro Lys Leu Leu Ile Phe Ala Ala Ser Arg Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser

【0255】

Contig[0001]
Sequencher™ "C10CEGER-ScFv-seq"(配列番号 8)
C10CEGER LM197... AGA TTC AGC GGC ACT GGA TCT GGC ACA GAT TTC AGT CTC ACC ATC AGC AGC CTG
#649
AGA TTC AGC GGC ACT GGA TCT GGC ACA GAT TTC AGT CTC ACC ATC AGC AGC AGC CTG
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu

C10CEGER LM197... CAG CCT GAC GAT TTT GCA ACT TAT TGT CTA CAA GAT TCC GAT TAC CCC CTC
#703
CAG CCT GAC GAT TTT GCA ACT TAT TGT CTA CAA GAT TCC GAT TAC TAC CCC CTC
Gln Pro Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asp Ser Asp Tyr Pro Leu

C10CEGER LM197... ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGT GCG GGC GCA GAA CAA AAA
#757
ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGT GCG GGC GCA GAA CAA AAA
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala Glu Gln Lys

C10CEGER LM197... CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT GGG GCC GCA CAT CAC CAT CAT CAC CAT
#811
CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT GGG GCC GCA CAT CAC CAT CAT CAC CAT CAC CAT
Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala His His His His His His

Contig[0001]

Sequencher™ "B11-@ECEFRSCFvcontig" (配列番号 9)

B11-@ECEFR IM11.. ATG AAA TAC CTA TIG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TIG TIA TIA CTC GCG GCG CAG
#1

ATG AAA TAC CTA TIG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TIG TIA TIA CTC GCG GCG CAG
MET Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Ala Ala Gln

B11-@ECEFR IM11.. CCG GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTC TIG CAG TCT GGG GGA GGC TIG GIA CAG CCT
#55

CCG GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTC TIG CAG TCT GGG GGA GGC TIG GIA CAG CCT
Pro Ala MET Ala Gln Val Gln Leu Leu Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro

B11-@ECEFR IM11.. GGG GGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT AGC AGC TAT
#109

GGG GGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT AGC AGC TAT
Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

B11-@ECEFR IM11.. GCC ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC TCA GCT
#163

GCC ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC TCA GCT
Ala MET Ser TriP Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu TriP Val Ser Ala

【数46】

Contig[0001]
Sequencher™ "B11-GEF1F1cFvcontig" (配列番号 9)

B11-GEF1F1L.. ATT AGT GGT GGT GGT AGT AGC ACA TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGG CCG TTC
#217

ATT AGT GGT GGT GGT AGC ACA TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGG CCG TTC
Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe

B11-GEF1F1L.. ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC TCG TAT CTG CAA ATG AAC AGC AGC CTG
#271

ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC AGC CTG
Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln MET Asn Ser Leu

B11-GEF1F1L.. AGA GCC GAG GAC ACG GCC GTA TAT TAC TGT GCA AGA GAG GGA TAT AGC AGC AAC
#325

AGA GCC GAG GAC ACG GCC GTA TAT TAC TGT GCA AGA GAG GGA TAT AGC AGC AAC
Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Tyr Ser Ser Asn

B11-GEF1F1L.. TGG AAT AAC TGG TAC TTC GAT CTC TGG GGC CGT GGC ACC CTG GTC ACC GTC TCC
#379

TGG AAT AAC TGG TAC TTC GAT CTC TGG GGC CGT GGC ACC CTG GTC ACC GTC TCC
Trp Asn Asn Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

【0258】

Contig[0001]
Sequencher™ "B11eEFrscFvcontig" (配列番号 9)

B11-eEFrsc IM11...	TCA GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GCA TCG	
B11-eEFrsc IM19...	GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC TCG GAT GAT	
#433		
	TCA GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GCA TCG GAT GTC	
	Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Val	
B11-eEFrsc IM19...	GTG ATG ACT CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTC GCA GAC AGA GTC ACC	
#487		
	GTG ATG ACT CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTC GCA GAC AGA GTC ACC	
	Val MET Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr	
B11-eEFrsc IM19...	ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AGC ATT AGC AGC TAT TTA AAT TGG TAT CAG CAG	
#541		
	ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AGC ATT AGC AGC TAT TTA AAT TGG TAT CAG CAG	
	Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln	
B11-eEFrsc IM19...	AAA CCA GGG AAG GCC CCT GAA CCT CTC ATC TAT GCT GCA TCC CGT TTA CAA AGT	
#595		
	AAA CCA GGG AAG GCC CCT GAA CCT CTC ATC TAT GCT GCA TCC CGT TTA CAA AGT	
	Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Arg Leu Gln Ser	

【数48】

Contig[0001]
Sequencher™ "B11@EFERscFvcontig" (配列番号 9)

B11-EFER LM19...	GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACC GAA TTC ACT CTC ACC	
#649		
	GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACC GAA TTC ACT CTC ACC	
	Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr	
B11-EFER LM19...	ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAT GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAA TAT TAT	
#703		
	ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAT GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAA TAT TAT	
	Ile Ser Ser Leu Cln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr	
B11-EFER LM19...	AAT TAT CCG TCG ACG TTC GGC CGA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGT GCG GCC	
#757		
	AAT TAT CCG TCG ACG TTC GGC CGA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGT GCG GCC	
	Asn Tyr Pro Trip Thr Phe GLY Arg GLY Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala	
B11-EFER LM19...	GCA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT GGG GCC GCA CAT CAC CAT	
#811		
	GCA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT GGG GCC GCA CAT CAC CAT	
	Ala Glu Cln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala His His His	

【0260】

【数49】

Contig[0001]
Sequencher™ "B110EEFRscFvcontig" (配列番号 9)

B11-EEFR TIM19.. CAT CAC CAT

#865

CAT CAC CAT
His His His

【0261】

10

20

30

40

【数 5 0】

Contig[0001]
Sequencher™ "E8-CEGFR IM11..Fycontig" (配列番号 10)E8-CEGFR IM11.. ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TGT TAA TTA CTC GCG GCC CAG
#1ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TGT TAA TTA CTC GCG GCC CAG
MET Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Ala Ala GlnE8-CEGFR IM11.. CCG GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG TCG GGG GGA GGC ATG GTC GTC CAG CCT
#55CCG GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG TCG GGG GGA GGC ATG GTC GTC CAG CCT
Pro Ala MET Ala Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly MET Val Gln ProE8-CEGFR IM11.. GGG AGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT AGC AGC TAT
#109GGG AGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT AGC AGC TAT
GLY Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser TyrE8-CEGFR IM11.. GCC ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT CCA CGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC TCA GCT
#163GCC ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT CCA CGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC TCA GCT
Ala MET Ser Thr Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Thr Val Ser Ala

【 0 2 6 2 】

E8-CEGFR LM11...	ATT ACT GCT AGT GGT GGT GGT AGC ACA TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGG CGG TCC	#217
	ATT ACT GGT AGT GGT GGT GGT AGC ACA TAC TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGG CGG TCC	
	Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe	
E8-CEGFR LM11...	ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG	#271
	ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG	
	Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln MET Asn Ser Leu	
E8-CEGFR LM11...	AGA GCC GAG GAC ACG GCC CTG TAT TAC TGT GCA AGA GAG GCA TAT AGC AGC AAC	#325
	AGA GCC GAG GAC ACG GCC CTG TAT TAC TGT GCA AGA GAG GCA TAT AGC AGC AAC	
	Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Gly Tyr Ser Ser Asn	
E8-CEGFR LM11...	TGG AAT AAC TGG TAC TTC GAT CTC TGG GGC CGT GGC ACC CTG GTC ACC GTC TCC	#379
	TGG AAT AAC TGG TAC TTC GAT CTC TGG GGC CGT GGC ACC CTG GTC ACC GTC TCC	
	Trp Asn Asn Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser	

Contig[0001]

Sequencher™ "E8@EEFR5CFvcontig" (配列番号 10)

E8-@EEFR LM111... TCA GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG
 E8-@EEFR LM197... GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAA ATT
 #433 TCA GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAA ATT
 Ser GLY GLY GLY GLY Ser GLY GLY GLY GLY Ser GLY GLY GLY Ser GLU Ile

E8-@EEFR LM197... GTG CTG ACT CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTC TCT GCA GAC AGA GTC ACC
 #487 GTG CTG ACT CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTC TCT GCA GAC AGA GTC ACC
 Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val GLY ASP Arg Val Thr

E8-@EEFR LM197... ATC ACT TGC CCG GCA AGT CAG AGC ATT AGC AGC TAT TTA ATT TGG TAT TCG TAT CAG CAG
 #541 ATC ACT TGC CCG GCA AGT CAG AGC ATT AGC AGC TAT TTA ATT TGG TAT TCG TAT CAG CAG
 Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Thr Tyr Gln Gln

E8-@EEFR LM197... AAA CCA GGG AAA GCC CCT AAG CTC CTC ATC ATT GCT GCA TCC AGT TTG CAA AGT
 #595 AAA CCA GGG AAA GCC CCT AAG CTC CTC ATC ATT GCT GCA TCC AGT TTG CAA AGT
 Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

【数53】

Contig[0001]

Sequencher™ "E8GEEFRSCFVcontig" (配列番号 10)

g-E8GEEFR LM197... GGG GTC CCA TCA AGG TTC ACT GGC AGT GCA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC
#649

GGG GTC CCA TCA AGG TTC ACT GGC AGT GCA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

g-E8GEEFR LM197... ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAC GAT TIT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG TAT AAT
#703

ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAC GAT TIT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG TAT AAT
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn

g-E8GEEFR LM197... AGT TAC CCT TGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA CGT GCG GCG
#757

AGT TAC CCT TGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA CGT GCG GCG
Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Ile Lys Arg Ala Ala

g-E8GEEFR LM197... GCA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT CGG GCC GCA CAT CAC CAT
#811

GCA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT CGG GCC GCA CAT CAC CAT
Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala His His His

【0265】

【数 5 4】

10

20

30

40

Contig[0001]
Sequencher™ "E8@EGFRscFvcontig" (配列番号 10)

E8-EGFR L1M197.. CAT CAC CAT.

#865

CAT CAC CAT
His His His

【図面の簡単な説明】

【0 2 6 6】

【図 1】図 1 は、pUC / ALMベクターの模式図を示す。

【図 2】図 2 は、BIAcoreチップ上のHER3細胞外ドメインに対するALMタンパク質の結合を示しているグラフを示す。

【図 3】図 3 は、BIAcoreチップ上のHER2/neu細胞外ドメインに対するA 50

L Mタンパク質の結合を示しているグラフを示す。

【図4】図4は、B I A c o r eチップ上のH E R 3タンパク質とH E R 2 / n e uに対するA L Mタンパク質の同時の結合を示しているグラフを示す。

【図5】図5Aおよび5Bは、A L MをH E R 2 / n e uとH E R 3の両方を発現しているヒトB T - 4 7 4乳ガン細胞とともにインビトロでインキュベートした後の、細胞表面のH E R 2 / n e uとH E R 3の減少を示している、フローサイトメトリーの結果のグラフを示す。

【図6】図6は、MTTアッセイの結果のグラフを示しており、これは、A L Mが、H E R 2 / n e uとH E R 3の両方を発現しているB T - 4 7 4乳ガン細胞の増殖を減少させることを示している。

【図7】図7は、17日間のコロニー形成アッセイの結果を示すグラフを示しており、これは、細胞表面のH E R 2 / n e uの発現と等しいモル濃度のA L MとのB T - 4 7 4細胞のインキュベーションによって、コロニーの形成（細胞の生存）の50%の減少が導かることを示している。

【図8】図8は、ウェスタンプロット分析を示しており、これは、H E R 2 / n e uとH E R 3の両方を発現しているヒトB T - 4 7 4乳ガン細胞と共に、様々な濃度のA L Mをインビトロでインキュベーションした後、48時間の間のAKTリン酸化の変化を示している。

【図9】図9は、免疫不全マウスにおける、48時間にわたる¹Iで標識されたA L Mの生体分布をマップしているグラフを示す。

【図10】図10は、本発明の二重特異的抗体を標識するために使用したキレート²¹¹A t - S A P Sを示す。

【図11A】図11Aから11Cは、未処理の対照（図11A）と比較した、10μgの低い投与量（図11C）および高用量の80μg（図11B）の²¹¹A tを結合させたA L Mの効果を示している。

【図11B】図11Aから11Cは、未処理の対照（図11A）と比較した、10μgの低い投与量（図11C）および高用量の80μg（図11B）の²¹¹A tを結合させたA L Mの効果を示している。

【図11C】図11Aから11Cは、未処理の対照（図11A）と比較した、10μgの低い投与量（図11C）および高用量の80μg（図11B）の²¹¹A tを結合させたA L Mの効果を示している。

【図12】図12は、¹²⁴Iで標識された二重特異的抗体（A L M）を使用した、マウスでの特異的腫瘍の標識を示している。H E R 2 / n e u抗原とH E R 3抗原を発現しているS K - O V - 3卵巣ガン異種移植片を有しているs c i dマウスのP E T（上段右）およびC T（上段左）の画像、ならびに、F C C CでのG . E . D i s c o v e r y L Sについての注射の48時間後を画像化した。C Tスライドの厚みは0.63mmである。画像融合（下段右）は、M I Mソフトウェアを用いて行った。

【図13】図13は、A d a m s L a bによって決定され、そして特定のb s - s c F v分子の構築に使用したS c F v軽鎖および重鎖の配列を示す。以下についての配列が提供される：C 6 . 5重鎖（配列番号38）、G 9 8 A重鎖（配列番号39）、M L 3 - 9重鎖（配列番号40）、H 3 B 1重鎖（配列番号41）、B 1 D 2重鎖（配列番号42）、C 6 . 5軽鎖（配列番号43）、G 9 8 A軽鎖（配列番号44）、M L 3 - 9軽鎖（配列番号45）、H 3 B 1軽鎖（配列番号46）、およびB 1 D 2軽鎖（配列番号47）。

【図14】図14は、M a r k s l a b .によって提供された、I D E Cベクター中で生産される全てのI g Gの重鎖および軽鎖可変領域の推定されるタンパク質配列を示す。特定の実施形態においては、s c F vの配列はこれとは異なる場合がある。以下について配列が提供される：C 6 . 5重鎖（配列番号48）、G 9 8 A重鎖（配列番号49）、M L 3 - 9重鎖（配列番号50）、H 3 B 1重鎖（配列番号51）、B 1 D 2重鎖（配列番号52）、C 6 . 5軽鎖（配列番号53）、G 9 8 A軽鎖（配列番号54）、M L 3 - 9軽鎖（配列番号55）、H 3 B 1軽鎖（配列番号56）、およびB 1 D 2軽鎖（配列番号57）。

10

20

30

40

50

5 7)。

【 0 2 6 7 】

SEQUENCE LISTING

<110> ADAMS, GREGORY P.

HORAK, EVA M.

WEINER, LOUIS M.

JAMES, MARKS D.

<120> BISPECIFIC SINGLE CHAIN Fv ANTIBODY MOLECULES AND METHODS OF USE
THEREOF

10

<130> 407T-000420US

<150> US 60/370,276

<151> 2002-04-02

<150> US10/406,830

<151> 2003-04-04

20

<160> 57

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 291

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

30

<223> Synthetic antibody.

<400> 1

Met Lys Tyr LeuLeu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Gln Pro AlaMet Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
20 25 30

40

Leu Val Gln ProGly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
35 40 45

Phe Thr Phe ArgSer Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
50 55 60

50

Lys Gly Leu GluTrp Val Ser Ala Ile Ser Gly Arg Gly Asp Asn Thr
 65 70 75 80

Tyr Tyr Ala AspSer Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 85 90 95

Ser Lys Asn ThrLeu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 100 105 110 10

Thr Ala Val TyrTyr Cys Ala Lys Met Thr Ser Asn Ala Phe Ala Phe
 115 120 125

Asp Tyr Trp GlyGln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
 130 135 140

20
 Gly Ser Gly GlyGly Gly Ser Gly Gly Ser Gln Ser Val Leu
 145 150 155 160

Thr Gln Pro ProSer Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile
 165 170 175

Ser Cys Thr GlySer Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Gly Val His
 180 185 190 30

Trp Tyr Gln GlnLeu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly
 195 200 205

Asn Thr Asn ArgPro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Phe Lys
 210 215 220

40
 Ser Gly Thr SerAla Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp
 225 230 235 240

Glu Ala Asp TyrTyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Trp
 245 250 255

Val Phe Gly GlyGly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala Glu
 260 265 270 50

Gln Lys Leu IleSer Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala His His His
 275 280 285

His His His
 290

10
 <210> 2
 <211> 291
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic antibody.

<400> 2

20
 Met Lys Tyr LeuLeu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15

Ala Gln Pro AlaMet Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
 20 25 30

Leu Val Gln ProGly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 35 40 45

30

Phe Thr Phe ArgSer Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 50 55 60

Lys Gly Leu GluTrp Val Ser Ala Ile Ser Gly Arg Gly Asp Asn Thr
 65 70 75 80

40

Tyr Tyr Ala AspSer Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 85 90 95

Ser Lys Asn ThrLeu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 100 105 110

Thr Ala Val TyrTyr Cys Ala Lys Met Thr Ser Asn Ala Phe Ala Phe
 115 120 125

50

Asp Tyr Trp GlyGln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
 130 135 140

Gly Ser Gly GlyGly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Ser Val Leu
 145 150 155 160

10
 Thr Gln Pro ProSer Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile
 165 170 175

Ser Cys Thr GlySer Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Gly Val His
 180 185 190

Trp Tyr Gln GlnLeu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly
 195 200 205

20

Asn Thr Asn ArgPro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Phe Lys
 210 215 220

Ser Gly Thr SerAla Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp
 225 230 235 240

30

Glu Ala Asp TyrTyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Trp
 245 250 255

Val Phe Gly GlyGly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala Glu
 260 265 270

Gln Lys Leu IleSer Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala His His His
 275 280 285

40

His His His
 290

<210> 3
 <211> 288
 <212> PRT
 <213> Artificial

50

<220>

<223> Synthetic antibody.

<400> 3

Met	Lys	Tyr	Leu	Leu	Pro	Thr	Ala	Ala	Ala	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala
1							5				10				15

															10
Ala	Gln	Pro	Ala	Met	Ala	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Gly	Gly
							20					30			

Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly
							35					40			45

Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Ser	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Val	Pro	Gly
							50					55			60
															20

Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Ser	Ile	Ser	Ser	Ser	Ser	Tyr	Ile
							65						80	

Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn
							85					90		95	

															30
Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Asp	Glu	Asp
							100					105		110	

Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Asp	Gly	Pro	Pro	Ile	Gln	His
							115					120		125	

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Arg	Gly	Gly	Ser
							130					135		140
														40

Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ser	Val	Leu	Ser	Gln
							145					150		155
														160

Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Gly	Ala	Pro	Gly	Gln	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys
							165					170		175	

Thr Gly Ser SerSer Asn Ile Gly Ala Ser Phe Asp Val Gln Trp Tyr
 180 185 190

Gln Gln Leu ProGly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asn Asn
 195 200 205

Asn Arg Pro SerGly Val Pro Asp Arg Phe Ser Ala Ser Lys Ser Gly
 210 215 220 10

Thr Ser Ala SerLeu Gly Ile Thr Gly Leu Gln Ile Gly Asp Glu Ala
 225 230 235 240

Asp Tyr Tyr CysGly Ser Tyr Thr Gly Thr Tyr Ser Trp Val Phe Gly
 245 250 255

20
 Gly Gly Thr LysVal Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu
 260 265 270

Ile Ser Glu GluAsp Leu Asn Gly Ala Ala His His His His His
 275 280 285

<210> 4
 <211> 290 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic antibody.

<400> 4

Met Lys Tyr LeuLeu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15 40

Ala Gln Pro AlaMet Ala Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly
 20 25 30

Leu Val Lys ProGly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 35 40 45

Phe Thr Phe SerSer Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 50 55 60

Lys Gly Leu GluTrp Val Ala Asn Ile Asn Arg Asp Gly Ser Ala Ser
 65 70 75 80

Tyr Tyr Val AspSer Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp
 85 90 95 10

Ala Lys Asn SerLeu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 100 105 110

Thr Ala Val TyrTyr Cys Ala Arg Asp Arg Gly Val Gly Tyr Phe Asp
 115 120 125

20
 Leu Trp Gly ArgGly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
 130 135 140

Ser Gly Gly GlyGly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala Leu Thr
 145 150 155 160

Gln Pro Ala SerVal Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser
 165 170 175 30

Cys Thr Gly ThrSer Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Phe Val Ser Trp
 180 185 190

Tyr Gln Gln HisPro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val
 195 200 205

40
 Ser Asp Arg ProSer Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser
 210 215 220

Gly Asn Thr AlaSer Leu Ile Ile Ser Gly Leu Gln Ala Asp Asp Glu
 225 230 235 240

Ala Asp Tyr TyrCys Ser Ser Tyr Gly Ser Ser Ser Thr His Val Ile
 245 250 255 50

Phe Gly Gly GlyThr Lys Val Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala Glu Gln
 260 265 270

Lys Leu Ile SerGlu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala His His His His
 275 280 285

10
 His His
 290

<210> 5
 <211> 287
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220> 20
 <223> Synthetic antibody.

<400> 5

Met Lys Tyr LeuLeu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15

Ala Gln Pro AlaMet Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
 20 25 30 30

Val Val Gln ProGly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 35 40 45

Phe Thr Phe SerAsp Tyr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 50 55 60

40
 Lys Gly Leu GluTrp Met Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Lys
 65 70 75 80

Tyr Tyr Ala AlaSer Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 85 90 95

Ser Lys Asn ThrVal Ser Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 100 105 110 50

Thr Ala Val TyrTyr Cys Ala Arg Asp Leu Tyr Gly Asp Tyr Ala Leu
 115 120 125

Asp Tyr Trp GlyGln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
 130 135 140

10
 Gly Ser Gly GlyGly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met
 145 150 155 160

Thr Gln Ser ProSer Thr Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr
 165 170 175

Ile Thr Cys ArgAla Ser Gln Ser Ile Gly Ser Trp Leu Ala Trp Tyr
 180 185 190 20

Gln Gln Lys ProGly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser
 195 200 205

Thr Leu Glu SerGly Val Pro Ser Arg Phe Thr Gly Ser Gly
 210 215 220

30
 Thr Glu Phe ThrLeu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
 225 230 235 240

Thr Tyr Tyr CysGln Lys Leu Ser Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly
 245 250 255

Gly Thr Lys ValGlu Ile Lys Arg Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile
 260 265 270 40

Ser Glu Glu AspLeu Asn Gly Ala Ala His His His His His
 275 280 285

<210> 6
 <211> 291
 <212> PRT
 <213> Artificial 50

<220>

<223> Synthetic antibody.

<400> 6

Met	Lys	Tyr	Leu	Leu	Pro	Thr	Ala	Ala	Ala	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala
1							5				10				15

															10
Ala	Gln	Pro	Ala	Met	Ala	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Gly	Gly
							20			25				30	

Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly
							35			40				45	

Phe	Thr	Phe	Asp	Asp	Tyr	Ala	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly
							50			55				60	
															20

Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Gly	Ile	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Ile
							65			70				80	

Gly	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn
							85			90				95	

															30
Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp
							100			105				110	

Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Leu	Gly	Ala	Lys	Gln	Trp	Leu
							115			120				125	

Glu	Gly	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
							130			135				140	
															40

Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asn
							145			150				160

Phe	Met	Leu	Thr	Gln	Asp	Pro	Ala	Val	Ser	Val	Ala	Leu	Gly	Gln	Thr
							165			170				175	

Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser
 180 185 190

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Gly
 195 200 205

Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Thr
 210 215 220 10

Ser Gly Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu Asp
 225 230 235 240

Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His Trp
 245 250 255

20
 Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala Glu
 260 265 270

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala His His His
 275 280 285

His His His
 290 30

<210> 7
 <211> 295
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic antibody.

40
 <400> 7

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
 20 25 30

Val Lys Lys ProGly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 35 40 45

Gly Thr Phe SerSer Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 50 55 60

Gln Gly Leu GluTrp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala
 65 70 75 80 10

Asn Tyr Ala GlnLys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu
 85 90 95

Ser Thr Ser ThrAla Tyr Met Glu Val Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
 100 105 110

20
 Thr Ala Val TyrTyr Cys Ala Arg Glu Glu Gly Pro Tyr Cys Ser Ser
 115 120 125

Thr Ser Cys TyrGly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 130 135 140

50
 Thr Val Ser SerGly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 145 150 155 160 160

Gly Gly Ser GlnSer Val Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala
 165 170 175

Leu Gly Gln ThrVal Lys Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser
 180 185 190

40
 Tyr Phe Ala SerTrp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Thr Leu
 195 200 205

Val Met Tyr AlaArg Asn Asp Arg Pro Ala Gly Val Pro Asp Arg Phe
 210 215 220

50
 Ser Gly Ser LysSer Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
 225 230 235 240

Gln Ser Glu AspGlu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser
 245 250 255

Leu Asn Gly TyrLeu Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 260 265 270

10
 Ala Ala Ala GluGln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala
 275 280 285

Ala His His HisHis His His
 290 295

<210> 8

<211> 286

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic antibody.

<400> 8

Met Lys Tyr LeuLeu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15

30

Ala Gln Pro AlaMet Ala Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly
 20 25 30

Leu Val Lys ProSer Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly
 35 40 45

40

Gly Ser Phe ArgSer Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Pro Pro Gly Lys
 50 55 60

Gly Leu Glu TrpIle Gly Tyr Ile Phe Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr
 65 70 75 80

Asn Pro Ser LeuLys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys
 85 90 95

50

Asn Gln Phe SerLeu Lys Leu Ser Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala
 100 105 110

Val Tyr Tyr CysAla Arg Gly His Leu Gly Glu Leu Gly Trp Phe Asp
 115 120 125

10
 Pro Trp Gly GlnGly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ser Gly Gly Gly
 130 135 140

Ser Gly Gly GlyGly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr
 145 150 155 160

20
 Gln Ser Pro SerSer Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile
 165 170 175

Thr Cys Gln AlaSer Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln
 180 185 190

20
 Gln Lys Pro GlyLys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Phe Ala Ala Ser Arg
 195 200 205

30
 Leu Ala Ser GlyVal Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr
 210 215 220

Asp Phe Ser LeuThr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr
 225 230 235 240

40
 Tyr Tyr Cys LeuGln Asp Ser Asp Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly
 245 250 255

Thr Lys Val GluIle Lys Arg Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser
 260 265 270

Glu Glu Asp LeuAsn Gly Ala Ala His His His His His His
 275 280 285

<210> 9
 <211> 291
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic antibody.

<400> 9

10
 Met Lys Tyr LeuLeu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15

Ala Gln Pro AlaMet Ala Gln Val Gln Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gly
 20 25 30

Leu Val Gln ProGly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 35 40 45

20
 Phe Thr Phe SerSer Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 50 55 60

65
 Lys Gly Leu GluTrp Leu Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr
 70 75 80

30
 Tyr Tyr Ala AspSer Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 85 90 95

70
 Ser Lys Asn ThrLeu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 100 105 110

80
 Thr Ala Val TyrTyr Cys Ala Arg Glu Gly Tyr Ser Ser Asn Trp Asn
 115 120 125

90
 Asn Trp Tyr PheAsp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 130 135 140

100
 Ser Gly GlyGly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 145 150 155 160

10

20

30

40

50

Asp Val Val MetThr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 165 170 175

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 180 185 190

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile
 195 200 205 10

Tyr Ala Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 210 215 220

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 225 230 235 240

20
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Trp
 245 250 255

Thr Phe Gly Arg Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala Glu
 260 265 270

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala His His His
 275 280 285 30

His His His
 290

<210> 10
 <211> 291
 <212> PRT
 <213> Artificial 40

<220>
 <223> Synthetic antibody.

<400> 10

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15

Ala Gln Pro AlaMet Ala Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly
 20 25 30

Met Val Gln ProGly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 35 40 45

Phe Thr Phe SerSer Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 50 55 60 10

Lys Gly Leu GluTrp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr
 65 70 75 80

Tyr Tyr Ala AspSer Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 85 90 95

20
 Ser Lys Asn ThrLeu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 100 105 110

Thr Ala Leu TyrTyr Cys Ala Arg Glu Gly Tyr Ser Ser Asn Trp Asn
 115 120 125

Asn Trp Tyr PheAsp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 130 135 140 30

Ser Gly Gly GlyGly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 145 150 155 160

Glu Ile Val LeuThr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 165 170 175

40
 Asp Arg Val ThrIle Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 180 185 190

Leu Asn Trp TyrGln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 195 200 205

Tyr Ala Ala SerSer Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 210 215 220 50

Ser Gly Ser GlyThr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 225 230 235 240

Asp Asp Phe AlaThr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Trp
 245 250 255

10
 Thr Phe Gly GlnGly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala Glu
 260 265 270

Gln Lys Leu IleSer Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala His His His
 275 280 285

His His His
 290 20

<210> 11
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Peptide linker.

30
 <400> 11

Gly Gly Gly GlySer
 1 5

<210> 12
 <211> 55
 <212> DNA
 <213> Artificial 40

<220>
 <223> Oligonucleotide primer.

<400> 12
 aattcaggtgctggtacttc aggttcaggt gcttcaggt aaggttcaggttcaa 55

<210> 13
 <211> 55 50

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleotide primer.

<400> 13

actttgaacctgaaccttc acctgaagca cctgaacctg aagtaccagcacctg

55

10

<210> 14

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleotide primer.

<400> 14

aattcaggtg ctggtaacttcaggttcaggt gcttcaggtg aaggttcagg ttcaaagcta

60

20

<210> 15

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleotide primer.

30

<400> 15

cgaccatggcccaggtgcagctggcag

29

<210> 16

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Oligonucleotide primer.

40

<400> 16

cgaattcaccttaggacggtcagcttgg

27

<210> 17

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

50

<220>

<223> Oligonucleotide primer.

<400> 17

gggaagcttcaggtgcagct ggtgcagtcgtgg

32

<210> 18

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

10

<220>

<223> Oligonucleotide primer.

<400> 18

gggctcgagacacctaggacgg tcagcttggttcc

33

20

<210> 19

<211> 243

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic antibody.

<400> 19

30

Met Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro

1

5

10

15

Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser

20

25

30

Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu

35

40

45

40

Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp

50

55

60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr

65

70

75

80

50

Leu Tyr Leu GlnMet Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Glu Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Ala LysTyr Pro Leu Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser GlyGly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125 10

Gly Ser Gln SerAla Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro
 130 135 140

Gly Gln Ser IleThr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly
 145 150 155 160

20
 Gly Tyr Asn TyrAla Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro
 165 170 175

Lys Leu Met IleTyr Glu Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Phe Asn
 180 185 190

Arg Phe Ser GlyAla Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser
 195 200 205 30

Gly Leu Gln AlaGlu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Tyr Thr
 210 215 220

Ser Ser Ser ThrTrp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 225 230 235 240

40
 Gly Asn Ser

<210> 20

<211> 729

<212> DNA

<213> Artificial

<220> 50

<223> Nucleic acid encoding single chain antibody.

<400> 20

atggcccagggtgcagctgg	60
agactctccgtgcagcc	120
caggctccaggcaaggg	180
tactatgcagactccgtg	240
ctgtatctgcaaatgaac	300
tatccttaaactggggcc	360
ggcggagggtggcttggc	420
tctgggtctccggacag	480
ggttataactatgc	540
tatgaggtcagtaatcg	600
aacacggcccccgtaccat	660
aactcatatacaagcagc	720
ggaaattcc	729

<210> 21

<211> 295

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic antibody.

<400> 21

Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro
1 5 10 15

Gly Arg Ser LeuArg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Lys
20 25 30

Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Val Ser Ala Le Ser Ala Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60

Ser Val Lys GlyArg Phe Thr Ile Phe Arg Asp Asn Ser Glu Asn Ser
 65 70 75 80

Leu Tyr Leu GlnMet Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Ala ArgAsp Ser Ser Gly Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val ThrVal Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125

Ser Gly Gly GlyGly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr
 130 135 140

Leu Ser Ala SerIle Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 145 150 155 160

Glu Gly Ile TyrHis Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 165 170 175

Ala Pro Lys LeuLeu Ile Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Ala Ser Gly Ala
 180 185 190

Pro Ser Arg PheSer Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Thr Ile Thr Cys
 195 200 205

Arg Ala Ser GluGly Ile Tyr His Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
 210 215 220

Pro Gly Lys AlaPro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Ala
 225 230 235 240

10

20

30

40

50

Ser Gly Ala ProSer Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
245 250 255

Thr Leu Thr IleSer Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr
 260 265 270

Cys Gln Gln TyrTyr Arg Ser Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
275 280 285

Leu Glu Asn LysArg Asn Ser
290 295

<210> 22
<211> 885
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Nucleic acid encoding single chain antibody.

<400> 22

atggcccagggtgcagctgca ggagtcgggg ggaggcgtgg tccagcctgg gaggtccctg	60
agactctccctgtgcagcgtc cggattcacc ttcaagagct atggcatgca ctgggtccgc	120
caggctccagggaaagggct ggagtggtc tcagctatta gtgctagtgg tggtagcaca	180
30	
tactacgcagactccgtaa gggccgcttc accatcttca gagacaattc cgagaactca	240
ctgtatcttcaaataacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtctatta ctgtgcgaga	300
gattcaagtggtccttga ctactgggc cagggAACCC tggtcaccgt ctccctcaggt	360
420	
ggaggcggttcaggcggagg tggctctggc ggtggcggat cggacatcgt gatgacccag	
tctccctccaccctgtccgc atctatttga gacagagtca ccatcacctg ccggggccagt	480
40	
gagggtatTTatcactggtt ggcctggtat cagcagaagc cagggaaagc ccctaaactc	540
ctgatctataaggcctctag tttagccagt ggggccccat caaggttcag cggcagtggaa	600
tctggacagataccatcac ctggccggcc agtgagggtat ttatcactg gttggcctgg	660
tatcagcagaagccaggaa agccccctaaa ctccctgatct ataaggcctc tagtttagcc	720
780	
50	
agtggggcccatcaaggtt cagcggcagt ggatctggga cagatttcac tctcaccatc	

agcagccctgcaggctgaaga tgtggcagta tactactgtc agcaatatta tagaagtccg 840

ctcactttcggtggagggac caagctggag aacaaacggaattcc 885

<210> 23

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Translocation signaling sequence.

<400> 23

Arg Glu Asp LeuLys

1 5

20

<210> 24

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Translocation signaling sequence.

<400> 24

30

Arg Glu Asp Leu

1

<210> 25

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Translocation signaling sequence.

<400> 25

40

Arg Asp Glu Leu

1

<210> 26

<211> 4

50

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Translocation signaling sequence.

<400> 26

Lys Asp Glu Leu

1

10

<210> 27

<211> 873

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Nucleic acid encoding single chain antibody.

20

<400> 27

atgaaataccatttgcctac ggcagccgct ggattgttat tactcgcggc ccagccggcc 60

atggcccagg tgcagctggtgaggctggg ggaggcttgg tacagcctgg ggggtccctg 120

agactctcctgtgcagcctc tggattcacc ttgcgcagct atgcctatgag ctgggtccgc 180

caggctccagggaaaggggct ggagtgggtc tcagctatata gtggtcgtgg tgataacaca 240

tactacgcagactccgtgaa gggccgggttc accatctcca gagacaatttca caagaacacg 300

30

ctgtatctgcaaataacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtttatata ctgtgcgaaa 360

atgacaagtaacgcgttcgc atttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 420

tcaggtggaggcggttcagg cggaggtggc tctggcggtg gcggatcgca gtctgtgttg 480

acgcagccgcctcagtgta tggggccca gggcagaggg tcaccatctc ctgcactggg 540

agcagctccaaacatcggggc aggttatggt gtacactggt accagcagct tccaggaaca 600

40

gcccccaaactcctcatcta tggtaacacc aatcgccct caggggtccc tgaccgattc 660

tctggcttca agtctggcacctcagcctcc ctggccatca ctggctcca ggctgaggat 720

gaggctgattattactgcca gtcctatgac agcagcctga gtggttgggt gttcggcgga 780

gggaccaagctgaccgtcct aggtgcggcc gcagaacaaa aactcatctc agaagaggat 840

ctgaatggggccgcacatca ccatcatcac cat 873

50

<210> 28
 <211> 873
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Nucleic acid encoding single chain antibody.

<400> 28	atgaaataccattgcctac ggcagccgct ggattgttat tactcgccgc ccagccggcc	60
	atggcccagg tgcagctggtgaggctggg ggaggcttgg tacagcctgg ggggtccctg	120
	agactctcctgtgcagccctc tggattcacc tttcgcagct atgcccattag ctgggtccgc	180
	caggctccagggaaaggggct ggagtgggtc tcagctatta gtggtcgtgg tgataacaca	240
	tactacgcag actccgtgaaggccgggttcc accatctcca gagacaattc caagaacacg	300
	ctgtatctgcaaataacag cctgagagcc gaggacacgg ccgttattatctgtgcgaaa	360
	atgacaagtaacgcgttcgc atttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc	420
	tcagggtggaggcggttcagg cggaggtggc tctggcggtg gcggatcgca gtctgtgttg	480
	acgcagcccccctcagtc tggggcccca gggcagaggg tcaccatctc ctgcactggg	540
	agcagctccaacatcggggc aggttatggt gtacactggt accagcagct tccaggaaca	600
	gcccccaaactcctcatcta tggtaacacc aatcgccct caggggtccc tgaccgattc	660
	tctggcttcaagtctggcac ctcaagcctcc ctggccatca ctgggtccca ggctgaggat	720
	gaggctgattattactgcca gtcctatgac agcagcctga gtggttgggt gttcggcgga	780
	gggaccaagctgaccgtcct aggtgcggcc gcagaacaaa aactcatctc agaagaggat	840
	ctgaatggggccgcacatca ccatcatcaccat	873

<210> 29
 <211> 864
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Nucleic acid encoding single chain antibody.

10

20

30

40

50

<400> 29
atgaaatacctattgcctac ggcagccgct ggattgttat tactcgccgc ccagccggcc 60
atggcccagg tacagctgcagcagtcaggg ggaggcctgg tcaaacctgg ggggtccctg 120
agactctcctgtcagcctc tggattcacc tttagtagct atagcatgaa ctgggtccgc 180
caggtcccagggaaaggggct ggagtgggtc tcatccatta gtagtagtag tagttacata 240
tactacgcagactctgtgaa gggccgattc accatctcca gagacaatgc caagaactca 300 10
ctgtatctgcaaatgaacag cctgagagac gaggacacgg ctgtgttata ctgtgcgaga 360
gatgacgggtccccccatcca gcactggggc cagggAACCC tggtcaccgt ctccctcacgt 420
ggaggcggttcaggcggagg tggctctggc ggtggcgat cgcatctgt gttgagccag 480
ccgcctcggtatctgggc cccagggcag agggtcacca tctcctgcac tgggagcagc 540
tccaaacatcgggcaagtt tggatgtacag tggtaaccagc aacttccagg aacagcccc 600 20
aaactccatcatctatggtaa caacaatcg ccctcagggg tccctgaccg attctctgcc 660
tccaaatctggcacccatcagc ctccctgggc atcaccggac tccagatcg ggacgaggcc 720
gattattactgcggctata tacaggcacc tactttggg tggtcggcgg agggaccaag 780
gtcaccgtccttaggtgcggc cgccagaacaa aaactcatct cagaagagga tctgaatggg 840
ggccgcacatcaccatcatcaccat 864 30

<210> 30
<211> 870
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Nucleic acid encoding single chain antibody. 40
<400> 30
atgaaatacctattgccgac ggcagccgct ggatgttat tactcgccgc ccagccggcc 60
atggcccaggtgcagctgca ggagtccggg ggaggcttgg tcaagcctgg ggggtccctg 120
agactctcctgtgcagcctc tggattcacc ttttagtagct attggatgag ctgggtccgc 180
caggctccagaaaggggct ggagtgggtc gccaacataa accgcgatgg aagtgcagt 240
tattatgtggactctgtcaa qggccgattc accatctcca gagacqacqc caagaactca 300 50

ctgtatctgcaaataacag cctgagagcc gaggacacgg ctgtgttata ctgtgcgaga	360	
gatcggggcggtgggtactt cgatctctgg ggccgtggca ccctggtcac cgtctccctca	420	
ggtggaggcggttcaggcgg aggtggctct ggccgtggcg gatcgacgtc tgccctgact	480	
cagcctgcct ccgtgtctggatctccctgga cagtcgatca ccatactccctg cactggaaacc	540	
agcagtgtatgttggttta taactttgtc tcctggtacc aacagcaccc aggcaaagcc	600	10
cccaaactcatgatttatga tgtcagtgtat cgaccctcag gggctctga tcggttctct	660	
ggctccaagtcggcaacac ggcccccctg atcatctctg gcctccaggc tgacgacgag	720	
gctgattattactgcagctc atatggaagc agcagcaccc atgtgatttt cggcggaggg	780	
accaaggtcaccgtcctagg tgccggccca gaacaaaaac tcatactcaga agaggatctg	840	
aatggggccgcacatcaccatcatcaccat	870	20

<210> 31

<211> 861

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Nucleic acid encoding single chain antibody.

<220>	30	
<223> Nucleic acid encoding single chain antibody.		
<400> 31		
atgaaataccatattgcctac ggcagccgtt ggattgttat tactcgcggc ccagccggcc	60	
atggcccagg tgcagctggggaggctgggg ggaggcgtgg tccagcctgg gaggtccctg	120	
agactctccgtgcagcctc tggattcacc ttcatgtact attatataca ctgggtccgc	180	
caggctccaggcaagggctt ggagtggatg gcagtttattt catatgtatgg caataataaa	240	
tactacgcccctccgtgaa ggaccgattc accatctcca gagacaattt caagaacacg	300	40
gtgtctctgcaaataacag cctgagagctt gaggacacgg ctgtgttata ctgtgcgaga	360	
gatctctacggtgactacgc tcttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc	420	
tcagggtggaggcggttcagg cggagggtggc tctggcggtg gcggatcgga catccagatg	480	
acccagtcctccctccaccc tctgtcatct ctggggagaca gagtccacat cacttgccgg	540	
gccagtcagagtattggtag ctggttggcc tggtatcagc agaaaccagg gaaagccct	600	50

aaactccgtatctataaggc	gtctacttta	gaaagtgggg	tcccatcaag	gttcaccggc	660
agtggatctg	ggacagaattcacttcaca	atcagcggcc	tccagcctga	agattttgc	720
acttattactgtcagaagct	tagtagttac	ccgctcactt	tcggcggagg	gaccaaggtg	780
gaaatcaaacgtgcggccgc	agaacaaaaa	ctcatctcag	aagaggatct	aatggggcc	840
gcacatcaccatcatcaccat					861
					10

<210> 32
 <211> 873
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>					
<223> Nucleic acid encoding single chain antibody.					20
<400> 32					
atgaaataccatttgcctac	ggcagccgct	ggatttttat	tactcgcggc	ccagccggcc	60
atggcccagg	tgcagctggtgcagtctgg	ggaggcttgg	tacagcctgg	caggccctg	120
agactctcctgtgcagcctc	tggattcacc	ttttagtattt	atgccatgca	ctgggtccgg	180
caagctccagggaaaggccct	ggagtggttc	tcaggtat	tttggaaatag	tggtagcata	240
ggctatgcggactctgtgaa	ggccgattc	accatctcca	gagacaacgc	caagaactca	300
ctgtatctgcaatgaacag	cctgagacct	gaggacacgg	ctgtgtat	ctgtgcgaga	360
gatcttggtgccaagcagt	gctgggggg	ttttagtact	ggggccaggg	caccctggtc	420
accgtctccctcaggtggagg	cggttcaggc	ggaggtggct	ctggcggtgg	cggatcgaat	480
tttatgctgactcaggaccc	tgctgtgtct	gtggccttgg	gacagacagt	caggatcaca	540
tgcccaaggagacagcctcag	aagctattat	gcaagctgg	accagcagaa	gccaggacag	600
gccctgtacttgtcatcta	tggtaaaaac	aaccggccct	cagggatccc	agaccgattc	660
tctggctcca	cctcagaaactcagttcc	ttgaccatca	ctggggctca	ggcggaaagat	720
gaggctgactattactgtaa	ctccgggac	agcagtggt	accattgggt	gttcggcgga	780
gggaccaaggtcaccgtcct	aggtgccgc	gcagaacaaa	aactcatctc	agaagaggat	840
ctgaatggggccgcacatca	ccatcatcac	cat			873
					50

<210> 33
 <211> 885
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Nucleic acid encoding single chain antibody.

<400> 33	10
atgaaataccattgcctac ggcagccgct ggattgttat tactcgccgc ccagccggcc	60
atggccgaggcgagctggt gcagtcgtgg gctgagggtga agaagcctgg gtcctcggtg	120
aaggctcctgcaaggcttc tggaggcacc ttcaagcagct atgcatacg ctgggtgcga	180
caggcccctggacaaggcct tgagtggatg ggagggatca tccctatctt tggtacagca	240
aactacgcac agaagtccagggcagagtc acgattaccg cgacgaaatc cacgagcaca	300
gcctacatggaggtgagcag cctgagatct gaggacacgg ccgtgttata ctgtgcgaga	360
gaggaggggcatattgtat tagtaccagc tgctatgggg ctttgatat ctggggccaa	420
ggcacccctggtcaccgtctc ctcaggtgga ggcggttcag gcggagggtgg ctctggcggt	480
ggcggatcgcaagtgtgct gactcaggac cctgctgtgt ctgtggccctt gggacagaca	540
gtcaagatcacatgccaagg agacagcctc agaagctatt ttgcaagctg gtaccagcag	600
aagccaggacaggcccctac acttgtcatg tatgctagaa atgaccggcc cgcagggttc	660
cctgaccgattctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cagtgggctc	720
cagtctgaggatgaggctga ttattattgt gcagcatggg atgacagcct gaatggttat	780
ctcttcggagctggaccaa gctgaccgtc ctaggtgcgg ccgcagaaca aaaactcatc	840
tcagaagaggatctgaatgg ggccgcacat caccatcatcaccat	885
	40

<210> 34
 <211> 861
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Nucleic acid encoding single chain antibody.

<400> 34

atgaaaatacctattgcctac ggcagccgct ggattgttat tactcgccgc ccagccggcc	60
atggcccagg tgcagctgcaggagtcgggc ccaggactgg tgaagccttc ggagaccctg	120
tccctcacctgcactgtctc tggtggtcc ttcaagaatct actactggag ctggatccgg	180
tagccccagggaaaggact ggagtggata gggtataatct tttagtggag gagcaccaac	240
tacaatccctccctcaagag tcgagtcacc atatcagtag acacgtccaa gaaccagttc	300
tccctgaagctgagctttt gaccgctgctg gacacggccg tgtattattt tgctgagagga	360
catttggggagtttagatg gttcgacccc tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc	420
tcaagtggaggcggttcagg cggaggtggc tctggcggtg gcggtatcgga catccagatg	480
accaggctccatccctccct gtctgcattt gtaggagaca gagtcaccat cacttgccag	540
gcgagtcaggacattagcaa ctatttaaat tggtatcagc agaagccggg gaaagccct	600
aaactcctgatcttgcgc atcccttta gcgagcgggg tccctcaag attcagcggc	660
agtggatctggcacagat t cagtctcacc atcagcagcc tgcagcctga cgattttgc	720
acttattattgtctacaaga ttccgattac cccctcactt tcggcggagg gaccaaggatg	780
gaaatcaaacgtgcggccgc agaacaaaaa ctcatctcag aagaggatct gaatggggcc	840
gcacatcaccatcatcaccat	861
	30

<210> 35

<211> 873

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic antibody.

	40
<400> 35	
atgaaaatacctattgcctac ggcagccgct ggattgttat tactcgccgc ccagccggcc	60
atggcccagg tgcagctgttttgcaggagtcgggg ggaggcttgg tacagcctgg ggggtccctg	120
agactctcctgtgcagcctc tggattcacc tttagcagct atgccatgag ctgggtccgc	180
caggctccagggaaagggtt ggagtggctg tcaatcttta gtggtagtgg tggttagcaca	240
tactacgcagactccgtgaa gggccggttc accatctcca gagacaattc caagaacacg	300
	50

ctgtatctgc aaatgaacagcctgagagcc gaggacacgg ccgtatatta ctgtgcaaga	360	
gagggatatacgcaactg gaataactgg tacttcgatc tctggggccg tggcaccctg	420	
gtcaccgtctccctcagggtgg aggcggttca ggcggagggtg gctctggcgg tggcggatcg	480	
gatgttgtga tgactcagtctccatcctcc ctgtctgcat ctgttaggaga cagagtacc	540	
atcacttgccggcaagtca gagcattagc agctattaa atttgtatca gcagaaacca	600	10
ggaaaggccctgaactcct gatctatgct gcatccgtt tacaaagtgg ggtcccatca	660	
agttcagtggcagtggatc tgggaccgaa ttcaacttca ccatcagcag cctgcagcct	720	
gatgattttgcaacttatta cggccaacaa tattataatt atccgtggac gttcggccga	780	
gggaccaagggtggaaatcaa acgtgcggcc gcagaacaaa aactcatctc agaagaggat	840	
ctgaatggggccgcacatca ccatcatcaccat	873	20

<210> 36
 <211> 873
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>		
<223> Nucleic acid encoding single chain antibody.		30
<400> 36		
atgaaataccattgcctac ggcagccgtt ggattgttat tactcgcggc ccagccggcc	60	
atggcccagggtgcagctgca ggagtgggg ggaggcatgg tccagcctgg gaggtccctg	120	
agactctcctgtgcagcctc tggattcacc tttagcagct atgccatgag ctgggtccgc	180	
caggctccaggaaaggggct ggagtgggtc tcagctatta gtggtagtgg tggtagcaca	240	
tactacgcagactccgtgaa gggccggttc accatcttca gagacaatttca caagaacacg	300	40
ctgtatctgc aaatgaacagcctgagagcc gaggacacgg ccctgttatta ctgtgcaaga	360	
gagggatatacgcaactg gaataactgg tacttcgatc tctggggccg tggcaccctg	420	
gtcaccgtctccctcagggtgg aggcggttca ggcggagggtg gctctggcgg tggcggatcg	480	
gaaatttgtgc tgactcagtctccatcctcc ctgtctgcat ctgttaggaga cagagtacc	540	
atcacttgccggcaagtca gagcattagc agctattaa atttgtatca gcagaaacca	600	50

ggaaagccccctaagtcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 660
agtttcagtgccagtgatc tggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 720
gacgatttgcaacttatta ctgccaacag tataatagtt acccttggac gttcggccaa 780
gggaccaagctggagatcaa acgtgcggcc gcagaacaaa aactcatctc agaagaggat 840
ctgaatggggccgcacatca ccatcatcaccat 873 10

<210> 37
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Peptide linker.
<400> 37

Asn Ser Gly Ala Gly Thr Ser Gly Ser Gly Ala Ser Gly Glu Gly Ser
1 5 10 15

Gly Ser Lys Leu
20

<210> 38
<211> 129
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial antibody VH sequence.

<400> 38

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Ser Leu Lys IleSer Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Ile Ala TrpVal Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met
35 40 45

Gly Leu Ile TyrPro Gly Asp Ser Asp Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60

Gln Gly Gln ValThr Ile Ser Val Asp Lys Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

10
 Leu Gln Trp SerSer Leu Lys Pro Ser Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg His AspVal Gly Tyr Cys Ser Ser Ser Asn Cys Ala Lys Trp
 100 105 110

Pro Glu Tyr PheGln His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115 120 125 20

Ser

<210> 39

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial 30

<220>

<223> Artificial antibody VH sequence.

<400> 39

Gln Val Gln LeuVal Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15

40
 Ser Leu Lys IleSer Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Trp Ile Ala TrpVal Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met
 35 40 45

Gly Leu Ile TyrPro Gly Asp Ser Asp Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60 50

Gln Gly Gln ValThr Ile Ser Val Asp Lys Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Trp SerSer Leu Lys Pro Ser Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

10
 Ala Arg His AspVal Ala Tyr Cys Ser Ser Ser Asn Cys Ala Lys Trp
 100 105 110

Pro Glu Tyr PheGln His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115 120 125

Ser 20

<210> 40
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Artificial antibody VH sequence.

30
 <400> 40

Gln Val Gln LeuVal Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Ser Leu Lys IleSer Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

40
 Trp Ile Ala TrpVal Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met
 35 40 45

Gly Leu Ile TyrPro Gly Asp Ser Asp Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60

Gln Gly Gln ValThr Ile Ser Val Asp Lys Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80 50

Leu Gln Trp SerSer Leu Lys Pro Ser Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg His AspVal Gly Tyr Cys Ser Ser Ser Asn Cys Ala Lys Trp
 100 105 110

10
 Pro Glu Tyr PheGln His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115 120 125

Ser

<210> 41
 <211> 129 20
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Artificial antibody VH sequence.

<400> 41

Gln Val Gln LeuVal Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15 30

Ser Leu Lys IleSer Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Trp Ile Ala TrpVal Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met
 35 40 45

40
 Gly Leu Ile TyrPro Gly Asp Ser Asp Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60

Gln Gln Gln ValThr Ile Ser Val Asp Lys Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Trp SerSer Leu Lys Pro Ser Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95 50

Ala Arg His AspVal Gly Tyr Cys Thr Asp Arg Thr Cys Ala Lys Trp
 100 105 110

Pro Glu Tyr PheGln His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115 120 125

10
 Ser

<210> 42
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220> 20
 <223> Artificial antibody VH sequence.

<400> 42

Gln Val Gln LeuVal Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Ser Leu Lys IleSer Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30 30

Trp Ile Ala TrpVal Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met
 35 40 45

Gly Leu Ile TyrPro Gly Asp Ser Asp Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60

40
 Gln Gly Gln ValThr Ile Ser Val Asp Lys Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Trp SerSer Leu Lys Pro Ser Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg His AspVal Gly Tyr Cys Thr Asp Arg Thr Cys Ala Lys Trp
 100 105 110 50

Pro Glu Trp LeuGly Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115 120 125

Ser

10
 <210> 43
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Artificial antibody VL sequence.

<400> 43

20
 Gln Ser Val LeuThr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Lys Val Thr IleSer Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
 20 25 30

Tyr Val Ser TrpTyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly HisThr Asn Arg Pro Ala Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Lys SerGly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Phe Arg
 65 70 75 80

40
 Ser Glu Asp GluAla Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95

Ser Gly Trp ValPhe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

<210> 44
 <211> 111 50

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial antibody VL sequence.

<400> 44

Gln Ser Val LeuThr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

10

Lys Val Thr IleSer Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser TrpTyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

20

Ile Tyr Gly HisThr Asn Arg Pro Ala Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys SerGly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Phe Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp GluAla Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Trp Asp Tyr Thr Leu
85 90 95

30

Ser Gly Trp ValPhe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 45

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial

40

<220>

<223> Artificial antibody VL sequence.

<400> 45

Gln Ser Val LeuThr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

50

Lys Val Thr IleSer Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
 20 25 30

Tyr Val Ser TrpTyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Asp HisThr Asn Arg Pro Ala Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60 10

Gly Ser Lys SerGly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Phe Arg
 65 70 75 80

Ser Glu Asp GluAla Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Trp Asp Tyr Thr Leu
 85 90 95

20
 Ser Gly Trp ValPhe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

<210> 46

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial

<220> 30

<223> Artificial antibody VL sequence.

<400> 46

Gln Ser Val LeuThr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Lys Val Thr IleSer Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
 20 25 30 40

Tyr Val Ser TrpTyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Asp HisThr Asn Arg Pro Ala Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Lys SerGly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Phe Arg
 65 70 75 80

Ser Glu Asp GluAla Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Trp Asp Tyr Thr Leu
 85 90 95

Ser Gly Trp ValPhe Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
 100 105 110 10

<210> 47

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial antibody VL sequence.

20

<400> 47

Gln Ser Val LeuThr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Lys Val Thr IleSer Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
 20 25 30

30

Tyr Val Ser TrpTyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Asp HisThr Asn Arg Pro Ala Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Lys SerGly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Phe Arg
 65 70 75 80 40

Ser Glu Asp GluAla Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Trp Asp Tyr Thr Leu
 85 90 95

Ser Gly Trp ValPhe Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
 100 105 110

50

<210> 48
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Artificial antibody VH sequence.

<400> 48

10
 Gln Val Gln LeuLeu Gln Ser Gly Ala Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Ser Leu Lys IleSer Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Trp Ile Ala TrpVal Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met
 35 40 45

Gly Leu Ile TyrPro Gly Asp Ser Asp Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60

Gln Gly Gln ValThr Ile Ser Val Asp Lys Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

30
 Leu Gln Trp SerSer Leu Lys Pro Ser Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg His AspVal Gly Tyr Cys Ser Ser Ser Asn Cys Ala Lys Trp
 100 105 110

Pro Glu Tyr PheGln His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115 120 125

Ser

<210> 49
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Artificial

10

20

30

40

50

<220>

<223> Artificial antibody VH sequence.

<400> 49

Gln	Val	Gln	Leu	Leu	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu
1					5			10				15			

Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Ser	Tyr
			20			25				30					10

Trp	Ile	Ala	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Tyr	Met
					35			40			45				

Gly	Leu	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Ser	Asp	Thr	Lys	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe
					50			55		60					20

Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Lys	Ser	Val	Ser	Thr	Ala	Tyr
					65			70		75			80		

Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Pro	Ser	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys
					85			90			95				

															30
Ala	Arg	His	Asp	Val	Ala	Tyr	Cys	Ser	Ser	Ser	Asn	Cys	Ala	Lys	Trp
					100			105			110				

Pro	Glu	Tyr	Phe	Gln	His	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser
						115		120			125				

Ser															40

<210> 50

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial antibody VH sequence.

<400> 50

Gln Val Gln LeuLeu Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Ser Leu Lys IleSer Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

10
 Trp Ile Ala TrpVal Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met
 35 40 45

Gly Leu Ile TyrPro Gly Asp Ser Asp Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60

Gln Gly Gln ValThr Ile Ser Val Asp Lys Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

20
 Leu Gln Trp SerSer Leu Lys Pro Ser Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg His AspVal Gly Tyr Cys Ser Ser Ser Asn Cys Ala Lys Trp
 100 105 110

30
 Pro Glu Tyr PheGln His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115 120 125

Ser

<210> 51

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial

40

<220>

<223> Artificial antibody VH sequence.

<400> 51

Gln Val Gln LeuLeu Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15

50

Ser Leu Lys IleSer Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Trp Ile Ala TrpVal Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met
 35 40 45

10
 Gly Leu Ile TyrPro Gly Asp Ser Asp Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60

Gln Gly Gln ValThr Ile Ser Val Asp Lys Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Trp SerSer Leu Lys Pro Ser Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95 20

Ala Arg His AspVal Gly Tyr Cys Thr Asp Arg Thr Cys Ala Lys Trp
 100 105 110

Pro Glu Tyr PheGln His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115 120 125

30
 Ser

<210> 52
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220> 40
 <223> Artificial antibody VH sequence.

<400> 52

Gln Val Gln LeuLeu Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Ser Leu Lys IleSer Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30 50

Trp Ile Ala TrpVal Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met
 35 40 45

Gly Leu Ile TyrPro Gly Asp Ser Asp Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60

10
 Gln Gly Gln ValThr Ile Ser Val Asp Lys Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Trp SerSer Leu Lys Pro Ser Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg His AspVal Gly Tyr Cys Thr Asp Arg Thr Cys Ala Lys Trp
 100 105 110

20
 Pro Glu Trp LeuGly Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115 120 125

Ser

30
 <210> 53
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Artificial antibody VL sequence.

<400> 53
 40
 Gln Ser Val LeuThr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Lys Val Thr IleSer Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
 20 25 30

Tyr Val Ser TrpTyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

50

Ile Tyr Gly HisThr Asn Arg Pro Ala Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Lys SerGly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Phe Arg
 65 70 75 80

10
 Ser Glu Asp GluAla Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95

Ser Gly Trp ValPhe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

<210> 54

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> Artificial antibody VL sequence.

<400> 54

Glu Ser Val LeuThr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15

30

Lys Val Thr IleSer Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
 20 25 30

Tyr Val Ser TrpTyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

40

Ile Tyr Asp HisThr Asn Arg Pro Ala Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Lys SerGly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Phe Arg
 65 70 75 80

Ser Glu Asp GluAla Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Trp Asp Tyr Thr Leu
 85 90 95

50

Ser Gly Trp ValPhe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

<210> 55
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial 10

<220>
 <223> Artificial antibody VL sequence.

<400> 55

Glu Ser Val LeuThr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15

20
 Lys Val Thr IleSer Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
 20 25 30

Tyr Val Ser TrpTyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Asp HisThr Asn Arg Pro Ala Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60 30

Gly Ser Lys SerGly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Phe Arg
 65 70 75 80

Ser Glu Asp GluAla Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Trp Asp Tyr Thr Leu
 85 90 95

40
 Ser Gly Trp ValPhe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

<210> 56
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220> 50

<223> Artificial antibody VL sequence.

<400> 56

Glu Ser Val LeuThr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Lys Val Thr IleSer Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
 20 25 30 10

Tyr Val Ser TrpTyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Asp HisThr Asn Arg Pro Ala Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

20
 Gly Ser Lys SerGly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Phe Arg
 65 70 75 80

Ser Glu Asp GluAla Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Trp Asp Tyr Thr Leu
 85 90 95

Ser Gly Trp ValPhe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110 30

<210> 57

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial antibody VL sequence.

40

<400> 57

Glu Ser Val LeuThr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Lys Val Thr IleSer Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
 20 25 30

50

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40

45

Ile Tyr Asp His Thr Asn Arg Pro Ala Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Phe Arg

65 70 75 80 10

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Trp Asp Tyr Thr Leu

85 90 95

Ser Gly Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

100 105 110

20

B10, 抗EGFR ECD

ATGGCCCAGCTGCAGCTGAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTCACAGACCCGTCCCTCACCTGCACTGTCTC
TGGTGGCTCCATCAGCAGTGGTATTACTACTGGAGTTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAAGGGCCTGGAGTGGATTGGGT
ACATCTATTACAGTGGAGCACCAACTACAACCCCCCCCCTCAAGAGTCAGTCACCATGTCAGTAGACACGTCCAAGAAC
CAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGACACGGCGTGTATTACTGTGCGAGAGTAAAGATAGTAGTCGG
GGCTTTGATATCTGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGCTCTTCATCGGCCTCGGGGGCCGAATTGGCGGCGGGCGGCT
CCGGAGGAGGAGGATCTGGTGGTGGTTGACTAGTGAATTGTGATGACACAGTCTCCAGCCACCCGTCTTTGTCT
CCAGGGAAAGAGCCACCCCTCCTGCAGGGCAGTCAGAGTGTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGG
CCAGGCTCCAGGCTCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGCT
GGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTCAGTGTATTACTGTCACTGGCAGTGGTAGCTCA
CCCATCACCTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAACGCTCGAGC

30

B2, 抗EGFR ECD

ATGGCCCAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGCCTCAGTGAAGGTTCTGCAAGGCATC
TGGATACACCTTCAACCAGCTACTATGCACTGGTGCAGCAGGCCCTGGACAAGGGCTTGGATGGATAATCA
ACCCCTAGTGGTGGTAGCACAAGCTACGCACAGAAAGTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCAGGGACACGTCCACGAGCACA
GTCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGAGGGACTACGGGGAGAA
CATGGACGCTGGGCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCATCGGCCTCGGGGGCGAATTGGCGGCGGGCTCC
GAGGAGGAGGATCTGGTGGTGGTTGACTAGTGAATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCATCTGTA
GGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCAGGCGAGTCAGGACATTGCAACTATTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAAGGGAA
AGCCCTAAGCTCCTGATCTACGATGCATCCAATTGGAAACAGGGGCTCCATCAAGGTTCACTGGAGTGGATCTGGGA
CAGATTTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCAACATATTACTGTCAACAGGCTAACAGTTCCCG
ATCACCTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAACGCTCGAGC

40

H2, 抗Her2 ECD

50

ATGGCCCAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTN
 TGGTGGGTCTTCAGTGGTTACTACTGGAGTTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAAGTC
 ATCATAGTGAAGGACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCGAGTTC
 TCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCTGTATTACTGTGCGAGAGAGCATAAGCAGCTCCTATGATGC
 TTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTACCGTCTTCATCGGCCTCGGGGGCGAATTGGGCGGCGGCGCTCCG
 GANGAGGAGGATCTGGTGGTGGTGGTCACTAGTCAGACTGTGGTGACCCAGGAGCCCTCAGTGTCTGGGGCCCCAGGG
 CAGAGGGTCAACATCTCTGCACTGGGAGCAGCTCAACATCGGGGCAGGTTATGATGTTACTGGTACCCGGCAGCTCC
 AGGAACAGTCCCCAAACTCCTCATCTATGGTACACCAATCGGCCTCAGGGGTCACTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGT
 CTGGCTCCTCAGCCTCCCTGGCCATCACTGGGCTCCAGGTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGCCAGTCCTATGACAGC 10
 ATCCTGAGTGGTTATGTCCTCGGAACCTGGACCAAGGTACCGTCCTAGGCTCGAG

H3 抗Her2 ECD

ATGGCCCAGGTCCAGTGGTGCAGTCTGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGCCTCAGTGAAGGTTCTGCAAGGCATC
 TGGATACACCTTCACCAAGCTACTATATGCACTGGTGCAGCAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGATAATCA
 ACCCTAGTGGTGGTAGCACAAGCTACGCACAGAAGTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCAGGGACACGTCACGAGCACA 20
 GTCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGGAGCAGTTGATGCTTT
 TGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTACCGTCTTCATCGGCCTCGGGGCGAATTGGGCGGCGGCGCTCCGGAG
 GAGGAGGATCTGGTGGTGGTGGTCACTAGTGTGACTGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCGTACCCCTGG
 CAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTCGTATACTGATGGATACACCTACTTGAGTGGTTTCACCA
 GAGGCCAGGCCAATCTCCAAGGCGCTAATTATAAGGTTCTAACCGGGACTCTGGGTCCCAGACAGATTAGCAGCGCA
 GTGGGTCAAGGCACTGATTCACACTGAAAATCAGCAGGGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGTTTATTACTGCATGCAAGGT
 ACACACTGGCCCCTCACTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGCTCGAGGC

【図1】

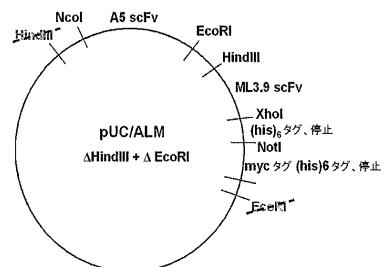


Fig. 1

【図2】

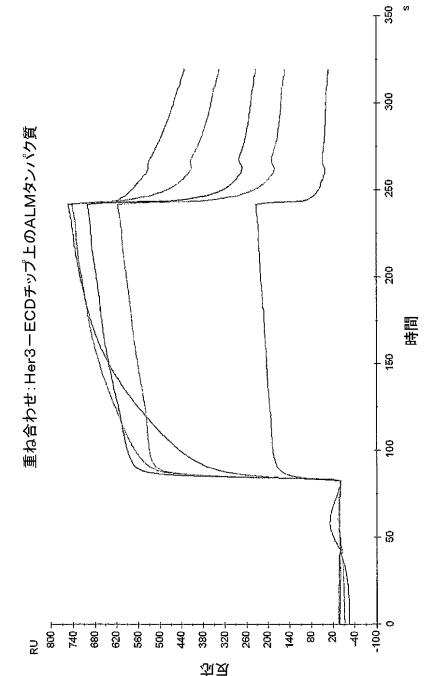


Fig. 2

【図3】

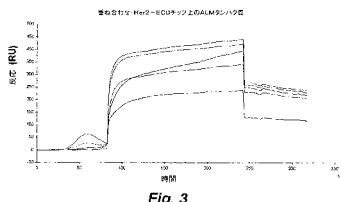


Fig. 3

【図4】

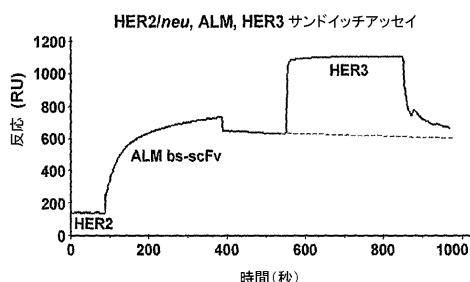


Fig. 4

【図5】

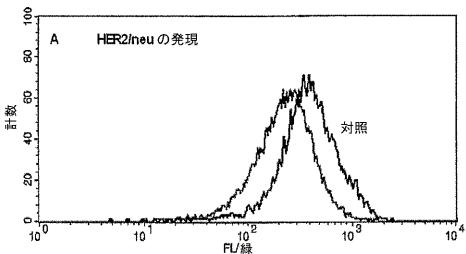


Fig. 5A

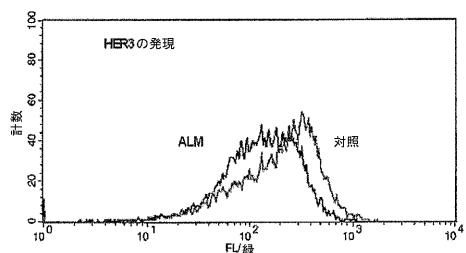


Fig. 5B

【図6】

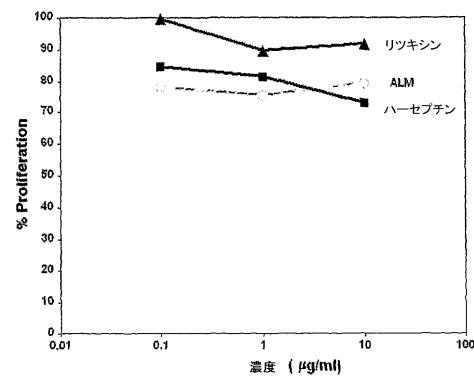


Fig. 6

【図7】

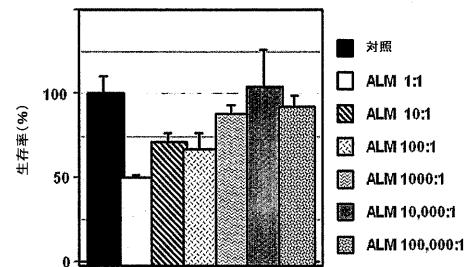


Fig. 7

【図8】

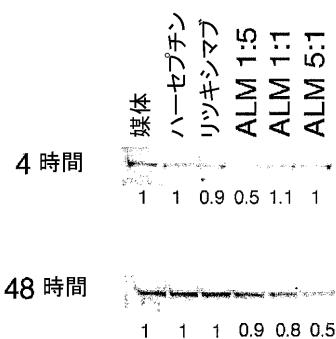


Fig. 8

【図9】

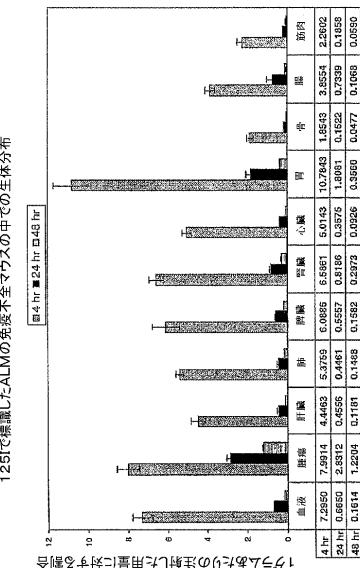


Fig. 9

【図10】

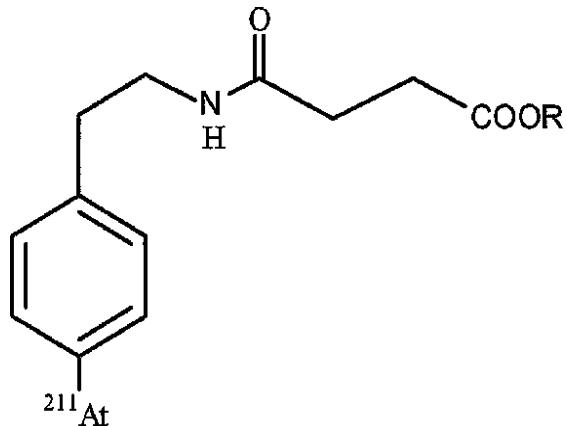


Fig. 10

【図11A】

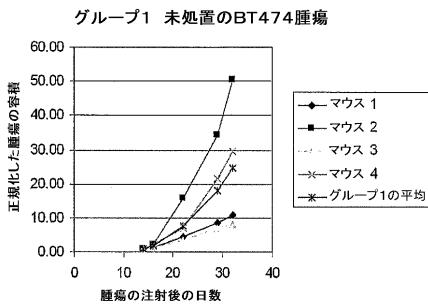


Fig. 11A

【図11B】

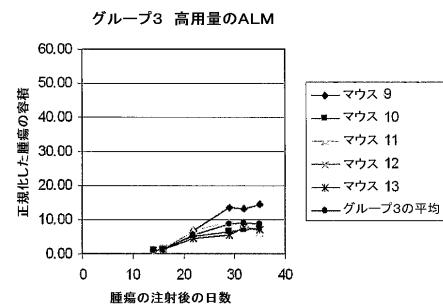


Fig. 11B

【図11C】

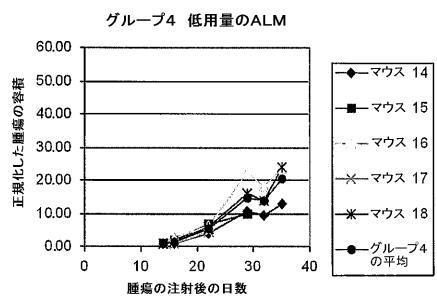


Fig. 11C

【図12】

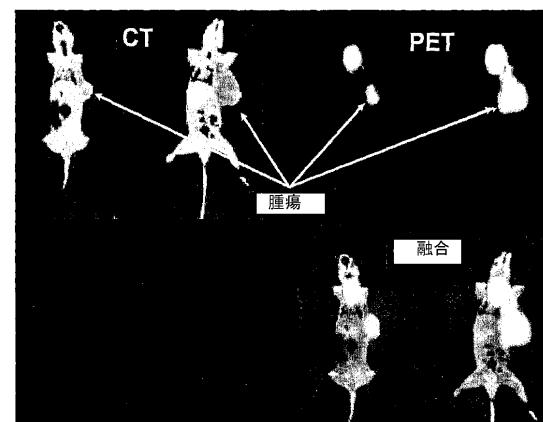


Fig. 12

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 0 7 K	16/30	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 1
			C 0 7 K	16/30	

(73)特許権者 507410010

フォックス チース キャンサー センター
 アメリカ合衆国 ペンシルベニア 19111, フィラデルフィア, コットマン アベニュー
 333

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100062409

弁理士 安村 高明

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 アダムス, グレゴリー ピー.

アメリカ合衆国 ペンシルベニア 19111, フィラデルフィア, コットマン アベニュー
 333, フォックス チース キャンサー センター

(72)発明者 ホラーク, エバ エム.

アメリカ合衆国 ペンシルベニア 19111, フィラデルフィア, コットマン アベニュー
 333, フォックス チース キャンサー センター

(72)発明者 ウィナー, ルイス エム.

アメリカ合衆国 ペンシルベニア 19111, フィラデルフィア, コットマン アベニュー
 333, フォックス チース キャンサー センター

(72)発明者 マークス, ジェームス ディー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94707, ケンジントン, アードモア ロード 107

審査官 石丸 聰

(56)参考文献 米国特許出願公開第2004/0071696(US, A1)
 国際公開第2008/140493(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/09

C07K 16/28

C07K 16/46

C07K 16/30

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)