(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2014-533249
(P2014-533249A)
(43)公表日　平成26年12月11日(2014.12.11)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C07K 16/46	(2006.01)	C07K	16/46		4B024
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	4B065
C12N 15/00	(2006.01)	C12N	15/00	ZNA	4C085
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		4H045
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 92 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2014-540192 (P2014-540192)
(86)(22)出願日　平成24年11月6日 (2012.11.6)
(85)翻訳文提出日　平成26年6月23日 (2014.6.23)
(86)国際出願番号　PCT/US2012/063639
(87)国際公開番号　WO2013/070565
(87)国際公開日　平成25年5月16日 (2013.5.16)
(31)優先権主張番号　61/624,651
(32)優先日　平成24年4月16日 (2012.4.16)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　61/625,299
(32)優先日　平成24年4月17日 (2012.4.17)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　61/697,585
(32)優先日　平成24年9月6日 (2012.9.6)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　504333972
メディミューン，エルエルシー
アメリカ合衆国　２０８７８　メリーランド州，ゲイサーズバーグ，ワン　メディミューン　ウェイ
(74)代理人　100091096
弁理士　平木　祐輔
(74)代理人　100118773
弁理士　藤田　節
(74)代理人　100122389
弁理士　新井　栄一
(74)代理人　100111741
弁理士　田中　夏夫
(74)代理人　100169971
弁理士　菊田　尚子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】多重特異性を持つ多価結合タンパク質およびその使用

(57)【要約】
本開示は概して、２つのエピトープ（たとえば、第１および第２のエピトープ）に結合し、かつ第１および第２のエピトープのそれぞれへの結合に対して二価であるタンパク質を提供する。本開示はまた、そうしたタンパク質を含む組成物と、そうしたタンパク質をコードする核酸分子と、そうしたタンパク質を作製および使用する方法とを提供する。
【選択図】図１

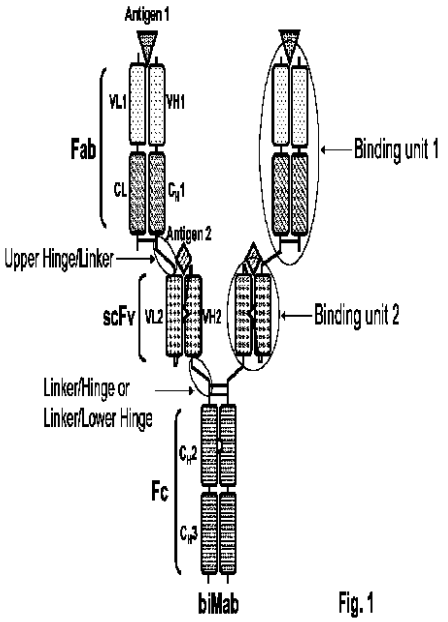


Fig.1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
タンパク質であって、
第１のエピトープに結合するＦａｂアーム、
第２のエピトープに結合する結合ドメイン（ＢＤ）、および
C_H2ドメインおよびC_H3ドメインを含むＦｃ領域；
を含み、
前記ＢＤは第１のポリペプチドリンカー（Ｌ１）を介して前記Ｆａｂアームに、そして第２のポリペプチドリンカー（Ｌ２）を介して前記Ｆｃ領域に相互に連結されており；かつ前記タンパク質は前記第１および第２の各エピトープへの結合に対して二価であるタンパク質。
【請求項２】
前記Ｌ１は１～５０アミノ酸残基を含む、請求項１に記載のタンパク質。
【請求項３】
前記Ｌ２は１～５０アミノ酸残基を含む、請求項１または２に記載のタンパク質。
【請求項４】
前記Ｌ１および前記Ｌ２は各々１～５０アミノ酸残基を含む、請求項１～３のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項５】
前記Ｌ１および前記Ｌ２は各々１５～３０アミノ酸残基を含む、請求項１～４のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項６】
前記Ｌ１はヒンジ部分およびリンカー部分を含む、請求項１～５のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項７】
前記Ｌ２はヒンジ部分およびリンカー部分を含む、請求項１～６のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項８】
前記Ｌ１および前記Ｌ２は各々ヒンジ部分およびリンカー部分を含む、請求項１～７のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項９】
前記Ｌ１は抗体ヒンジ領域の少なくとも５アミノ酸残基を含む、請求項１～８のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項１０】
前記Ｌ２は抗体ヒンジ領域の少なくとも５アミノ酸残基含む、請求項１～９のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項１１】
前記Ｌ１は抗体ヒンジ領域の少なくとも７アミノ酸残基含む、請求項１～１０のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項１２】
前記Ｌ２は抗体ヒンジ領域の少なくとも７アミノ酸残基含む、請求項１～１１のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項１３】
前記Ｌ２は抗体ヒンジ領域の少なくとも１２アミノ酸残基含む、請求項１～１２のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項１４】
前記Ｌ１は抗体ヒンジ領域の８アミノ酸残基含む、請求項１～１３のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項１５】
前記Ｌ２は抗体ヒンジ領域の１５アミノ酸残基含む、請求項１～１４のいずれか一項に

記載のタンパク質。
【請求項１６】
前記Ｌ１および前記Ｌ２は各々抗体ヒンジ領域または修飾抗体ヒンジ領域の全部または一部を含む、請求項１～１５のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項１７】
前記Ｌ１は抗体ヒンジ領域の少なくとも５アミノ酸残基含み、かつ前記ヒンジ領域はＥＵ２２１位にアスパラギン酸からグリシンへの置換を含む、請求項１～１６のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項１８】
前記ヒンジ領域はシステインが別のアミノ酸で置換されている置換を含む、請求項１６または１７に記載のタンパク質。
【請求項１９】
前記Ｌ２は抗体ヒンジ領域の少なくとも５アミノ酸残基含み、かつ前記ヒンジ領域はＥＵ２２０位にシステインからバリンへの置換を含む、請求項１～１８のいずれか一項に記載のタンパク質
【請求項２０】
前記Ｌ１はＧｌｙ－Ｓｅｒペプチドを含むリンカー部分を含む、請求項１～１９のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項２１】
前記Ｌ２はＧｌｙ－Ｓｅｒペプチドを含むリンカー部分を含む、請求項１～２０のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項２２】
前記Ｌ１および前記Ｌ２は各々Ｇｌｙ－Ｓｅｒペプチドを含むリンカー部分を含む、請求項１～２１のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項２３】
前記Ｇｌｙ－Ｓｅｒペプチドは式（$Ｇｌｙ_{4}Ｓｅｒ$）ｎであり、ｎは１、２、３、４、５、６、７、８、９および１０からなる群から選択される正の整数である、請求項２０～２２のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項２４】
前記Ｌ１はヒンジ部分を含まない、請求項１～５のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項２５】
前記Ｌ２はヒンジ部分を含まない、請求項１～５のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項２６】
前記Ｌ１および前記Ｌ２はヒンジ部分を含まない、請求項１～５のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項２７】
前記Ｌ１はアミノ酸配列ＥＰＫＳＣＤＫＴ（配列番号４）を含む、請求項１～２３のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項２８】
前記Ｌ１はアミノ酸配列ＥＰＫＳＣＧＫＴ（配列番号６）を含む、請求項１～２３のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項２９】
前記Ｌ１はアミノ酸配列ＥＰＫＳＣ（配列番号３８）を含む、請求項１～２３のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項３０】
前記Ｌ２はアミノ酸配列ＥＰＫＳＶＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ（配列番号１２）を含む、請求項１～２３、２７～２９のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項３１】
前記Ｌ２はアミノ酸配列ＣＰＰＣＰ（配列番号１４）を含む、請求項１～２３、２７～２９のいずれか一項に記載のタンパク質。

【請求項３２】
前記Ｌ２はアミノ酸配列ＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ（配列番号４０）を含む、請求項１～２３、２７～２９のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項３３】
前記ＢＤはｓｃＦｖ、単一ドメイン抗体、一本鎖ダイアボディ、抗体模倣体、抗体可変ドメインおよび受容体結合ドメインからなる群から選択される、請求項１～３２のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項３４】
前記ＢＤはｓｃＦｖを含む、請求項３３に記載のタンパク質。
【請求項３５】
前記ｓｃＦｖはＶＨドメイン、ポリペプチドリンカーおよびＶＬドメインを含む、請求項３４に記載のタンパク質。
【請求項３６】
前記Ｆａｂドメインは前記Ｌ１を介して前記ｓｃＦｖの前記ＶＨドメインのＮ末端に相互に連結される、請求項３５に記載のタンパク質。
【請求項３７】
前記Ｆａｂドメインは前記Ｌ１を介して前記ｓｃＦｖの前記ＶＬドメインのＮ末端に相互に連結される、請求項３５に記載のタンパク質。
【請求項３８】
前記Ｆｃ領域は前記Ｌ２を介して前記ｓｃＦｖの前記ＶＨドメインのＣ末端に相互に連結される、請求項３５または３７に記載のタンパク質。
【請求項３９】
前記Ｆｃ領域は前記Ｌ２を介して前記ｓｃＦｖの前記ＶＬドメインのＣ末端に相互に連結される、請求項３５または３６に記載のタンパク質。
【請求項４０】
前記ｓｃＦｖの前記ＶＬドメインはＫａｂａｔ位置１００にシステインを有する、請求項３５～３９のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項４１】
前記ｓｃＦｖの前記ＶＨドメインはＫａｂａｔ位置４４にシステインを有する、請求項３５～４０のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項４２】
前記抗体模倣体はミニボディ、マキシボディ、アビマー、Ｆｎ３を用いたタンパク質スキャフォールド、アンキリンリピート、ＶＡＳＰポリペプチド、トリ膵ポリペプチド（ａＰＰ）、テトラネクチン、アフィリリン、ノッチン、ＳＨ３、ＰＤＺドメイン、プロテインＡドメイン、リポカリン、トランスフェリンおよびｋｕｎｉｔｚドメインからなる群から選択される、請求項３３に記載のタンパク質。
【請求項４３】
前記Ｆｃ領域はＩｇＧ１由来のＦｃ領域、ＩｇＧ２由来のＦｃ領域、ＩｇＧ３由来のＦｃ領域、ＩｇＧ４由来のＦｃ領域、ＩｇＡ由来のＦｃ領域、ＩｇＭ由来のＦｃ領域、ＩｇＥ由来のＦｃ領域およびＩｇＤ由来のＦｃ領域からなる群から選択される、請求項１～４２のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項４４】
前記Ｆｃ領域は変異Ｆｃ領域を含む、請求項４３に記載のタンパク質。
【請求項４５】
前記Ｆｃ領域は非グリコシル化される、請求項４３または４４に記載のタンパク質。
【請求項４６】
前記Ｆｃ領域は脱グリコシル化される、請求項４３または４４に記載のタンパク質。
【請求項４７】
前記Ｆｃ領域はフコシル化を低下させてあるか、または非フコシル化されている、請求項４３または４４に記載のタンパク質。

【請求項４８】
前記変異Ｆｃ領域は２９７位に置換を含む、請求項４４～４７のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項４９】
２９７位の前記置換は２９７Ｑである、請求項４８に記載のタンパク質。
【請求項５０】
前記変異Ｆｃ領域はＥＵインデックスにより番号付けされた２３９位、２８２位、２８９位、２９７位、３１２位、３２４位、３３０位、３３５位、３３７位、３３９位、３５６位、３５９位、３６１位、３８３位、３８４位、３９８位、４００位、４４０位、４２２位および４４２位の１つまたは複数に置換を含む、請求項４３～４９のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項５１】
前記Ｆａｂアームの前記ＣＨ１ドメインはＥＵインデックスにより番号付けされた１３１位、１３２位、１３４位、１３５位、１３６位および１３９位の１つまたは複数に置換を含む、請求項１～５０のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項５２】
置換はシステイン、リジン、チロシン、ヒスチジン、セレノシステインおよびセレノメチオニンから選択されるアミノ酸への置換を含む、請求項５０または５１に記載のタンパク質。
【請求項５３】
前記置換はシステインである、請求項５２に記載のタンパク質。
【請求項５４】
前記タンパク質はＮ末端からＣ末端に以下のポリペプチドドメインを含むキメラ重鎖を含み
ＶＨ１－ＣＨ１－Ｌ１－ＢＤ－Ｌ２－Ｆｃ；
ＶＨ１は前記Ｆａｂの前記重鎖可変ドメインを含み、ＣＨ１は前記Ｆａｂの前記重鎖定常ドメイン１を含み、Ｌ１は第１のリンカーポリペプチドを含み、ＢＤは結合ユニット２を含み、Ｌ２は第２のリンカーポリペプチドを含み、ＦｃはＣ$_{H}$２およびＣ$_{H}$３ドメインを含む、請求項１～５３のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項５５】
ＢＤはｓｃＦｖを含む、請求項５４に記載のタンパク質。
【請求項５６】
前記ｓｃＦｖはＮ末端からＣ末端に下記を含み、
ＶＨ２－ポリペプチドリンカー－ＶＬ２またはＶＬ２－ポリペプチドリンカー－ＶＨ２；
ＶＨ２は前記ｓｃＦｖの前記重鎖可変ドメインを含み、ＶＬ２は前記ｓｃＦｖの前記軽鎖可変ドメインを含む、請求項５５に記載のタンパク質。
【請求項５７】
前記Ｌ１はヒンジ部分およびリンカー部分を含む、請求項５４～５６のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項５８】
前記Ｌ２はヒンジ部分およびリンカー部分を含む、請求項５４～５７のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項５９】
前記Ｌ１はＮ末端からＣ末端にヒンジ部分およびリンカー部分を含む、請求項５７または５８に記載のタンパク質。
【請求項６０】
前記Ｌ２はＮ末端からＣ末端にリンカー部分およびヒンジ部分を含む、請求項５７～５９のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項６１】

前記第１および第２のエピトープは異なる、請求項１～６０のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項６２】
前記第１および第２のエピトープは同じである、請求項１～６０のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項６３】
前記Ｆａｂアームおよび／またはＦｃ領域は少なくとも１つの結合ユニットをさらに含む、請求項１～６２のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項６４】
前記少なくとも１つの結合ユニットはポリペプチドリンカーを介して前記Ｆａｂアームおよび／またはＦｃに相互に連結される、請求項６３に記載のタンパク質。
【請求項６５】
前記少なくとも１つの結合ユニットは前記キメラ重鎖のＮ末端および／またはＣ末端で相互に連結される、請求項６３または６４に記載のタンパク質。
【請求項６６】
前記少なくとも１つの結合ユニットは前記軽鎖のＮ末端および／またはＣ末端で相互に連結される、請求項６３～６５のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項６７】
前記少なくとも１つの結合ユニットは前記重鎖のＮ末端および／またはＣ末端で相互に連結され、かつ少なくとも１つの結合ユニットが前記軽鎖のＮ末端および／またはＣ末端に相互に連結される、請求項６５または６６に記載のタンパク質。
【請求項６８】
少なくとも１つの結合ユニットが前記重鎖のＮ末端およびＣ末端で相互に連結され、および／または少なくとも１つの結合ユニットが前記軽鎖のＮ末端およびＣ末端に相互に連結される、請求項６５または８０に記載のタンパク質。
【請求項６９】
少なくとも１つの結合ユニットが前記重鎖のＮ末端およびＣ末端で相互に連結され、かつ少なくとも１つの結合ユニットが前記軽鎖のＮ末端およびＣ末端に相互に連結される、請求項６５または６６に記載のタンパク質。
【請求項７０】
前記タンパク質は前記Ｆａｂアームと前記Ｆｃ領域との間に相互に連結された少なくとも１つの追加の結合ユニットをさらに含む、請求項１～６９のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項７１】
少なくとも１つの追加の結合ユニットがＬ１と前記ＢＤとの間に相互に連結される、請求項７０に記載のタンパク質。
【請求項７２】
少なくとも１つの追加の結合ユニットが前記ＢＤとＬ２との間に相互に連結される、請求項７０に記載のタンパク質。
【請求項７３】
少なくとも１つの追加の結合ユニットがポリペプチドリンカーにより前記ＢＤに相互に連結される、請求項７１または７２に記載のタンパク質。
【請求項７４】
各結合ユニットはＦａｂドメイン、ｓｃＦｖ、単一ドメイン抗体、一本鎖ダイアボディ、抗体模倣体、抗体可変ドメインおよび受容体結合ドメインからなる群から選択される、請求項６３～７３のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項７５】
前記結合ユニットは各々異なるエピトープに結合する、請求項６３～７５のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項７６】

２つ以上の結合ユニットが各々同じエピトープに結合する、請求項６３～７５のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項７７】
前記少なくとも１つの結合ユニットは前記第１のエピトープおよび／または前記第２のエピトープに結合しない、請求項６３～７６のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項７８】
前記少なくとも１つの結合ユニットは前記第１のエピトープに結合せず、かつ前記第２のエピトープにも結合しない、請求項６３～７６のいずれか一項に記載のタンパク質。
【請求項７９】
薬学的に許容されるキャリアを用いて製剤化された、請求項１～７８のいずれか一項に記載のタンパク質を含む組成物。
【請求項８０】
請求項１～７８のいずれか一項に記載のタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子。
【請求項８１】
第１のヌクレオチド配列を含む第１の核酸分子および
第２のヌクレオチド配列を含む第２の核酸分子；
を含み、
請求項１～７８のいずれか一項に記載のタンパク質が前記第１および第２の核酸分子によりコードされる
核酸組成物。
【請求項８２】
請求項８０または８１に記載の核酸を含むベクター。
【請求項８３】
請求項８２に記載のベクターを含む宿主細胞。
【発明の詳細な説明】
【背景技術】
【０００１】
多くの疾患が生体分子により引き起こされるかまたは生体分子に関連しており、生体分子を標的とし、任意にその活性を調節する疾患処置剤、治療薬、診断試薬および研究試薬を開発することは、有用である。２つ以上の部位に結合する、たとえば治療剤、診断剤および研究剤を含む作用物質は、単一の分子が同じ標的生体分子の複数の領域、あるいは複数の異なる標的に結合できるように、望ましい場合がある。本明細書に記載のアプローチは、追加のエピトープに結合する（すなわち、追加の特異性を有する）結合タンパク質、たとえば三重特異性結合タンパク質、四重特異性結合タンパク質、五重特異性結合タンパク質を作製するように適合することができる、独特のコア構造に基づく新規な二重特異性を持つ二価結合タンパク質を提供する。
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００２】
本開示は概して、少なくとも２つのエピトープに結合するタンパク質（たとえば、少なくとも二重特異性であり、かつ第１のエピトープおよび第２のエピトープに結合するタンパク質）を提供する。一方、本開示はまた、単一特異性でありながら、エピトープへの結合に対して四価性を示す（たとえば、第１第２の結合ユニットが各々同じエピトープに結合する）タンパク質も提供する点に留意されたい。
【０００３】
一態様では、本開示は、第１のエピトープに結合するＦａｂアーム（ａｒｍ）と、第２のエピトープに結合する結合ドメイン（ＢＤ）と、C_H2ドメインおよびC_H3ドメインを含むＦｃ領域とを含むタンパク質であって、ＢＤは第１のポリペプチドリンカー（Ｌ１）を介してＦａｂアームに、第２のポリペプチドリンカー（Ｌ２）を介してＦｃ領域に相

互に連結されており、かつタンパク質は第１および第２の各エピトープへの結合に対して二価であるタンパク質を提供する。

【０００４】

ある態様では、Ｌ１および／またはＬ２はヒンジ部分およびリンカー部分を含む。ある態様では、Ｌ１および／またはＬ２のリンカー部分はＧｌｙ－Ｓｅｒペプチドを含む。ある態様では、Ｌ１もＬ２もヒンジ部分を含まない。

【０００５】

ある態様では、ＢＤはｓｃＦｖ、単一ドメイン抗体、一本鎖ダイアボディ、抗体模倣体、抗体可変ドメインおよび受容体結合ドメインからなる群から選択される。

【０００６】

ある態様では、Ｆｃ領域はＩｇＧ１由来、ＩｇＧ２由来、ＩｇＧ３由来、ＩｇＧ４由来、ＩｇＡ由来、ＩｇＭ由来、ＩｇＥ由来およびＩｇＤ由来のＦｃ領域からなる群から選択される。

【０００７】

ある態様では、Ｆｃ領域は変異配列のＦｃ領域である。

【０００８】

ある態様では、タンパク質はＮ末端からＣ末端に以下のポリペプチドドメイン：ＶＨ１－ＣＨ１－Ｌ１－ＢＤ－Ｌ２－Ｆｃを含むキメラ重鎖を含み、ＶＨ１はＦａｂの重鎖可変ドメインを含むアミノ酸配列を含み、ＣＨ１はＦａｂの重鎖定常ドメイン１を含むアミノ酸配列を含み、Ｌ１は第１のポリペプチドリンカーを含むアミノ酸配列を含み、ＢＤは結合ユニット２をコードするアミノ酸配列を含み、Ｌ２は第２のポリペプチドリンカーを含むアミノ酸配列を含み、ＦｃはＣ$_{H}$２ドメインおよびＣ$_{H}$３ドメインを含むアミノ酸配列を含む。

【０００９】

いくつかの態様では、ＢＤはｓｃＦｖを含む。

【００１０】

いくつかの態様では、ｓｃＦｖは、Ｎ末端からＣ末端にＶＨ２－ポリペプチドリンカー－ＶＬ２またはＶＬ２－ポリペプチドリンカー－ＶＨ２を含み、ＶＨ２はｓｃＦｖの重鎖可変ドメインを含むアミノ酸配列を含み、ＶＬ２はｓｃＦｖの軽鎖可変ドメインを含むアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、ＶＨ２とＶＬ２との間のポリペプチドリンカーはプロテアーゼ切断部位を含む。

【００１１】

ある態様では、Ｌ１はＮ末端からＣ末端にヒンジ部分およびリンカー部分を含む。

【００１２】

ある態様では、Ｌ２はＮ末端からＣ末端にリンカー部分およびヒンジ部分を含む。

【００１３】

いくつかの態様では、ＦａｂアームはＥＧＦＲ、ＩＧＦＲ１、ＶＥＧＦ、Ａｎｇ２、ＰｓｌまたはＰｃｒＶから選択される標的上に存在する第１のエピトープに結合する。

【００１４】

いくつかの態様では、ＢＤはＥＧＦＲ、ＩＧＦＲ１、ＶＥＧＦ、Ａｎｇ２、ＰｓｌまたはＰｃｒＶから選択される標的上に存在する第２のエピトープに結合する。

【００１５】

いくつかの態様では、第１および第２のエピトープは異なる。他の態様では、第１および第２のエピトープは同じである。ある態様では、第１および第２のエピトープは同じ標的分子上に位置する。他の態様では、第１および第２のエピトープは異なる標的分子上に位置する。

【００１６】

ある態様では、Ｆａｂアームおよび／またはＦｃ領域は少なくとも１つの結合ユニットをさらに含み、少なくとも１つの結合ユニットはポリペプチドリンカーを介してＦａｂアームおよび／またはＦｃ領域に相互に連結される。

【００１７】
いくつかの態様では、少なくとも１つの結合ユニットはＦａｂアーム、ｓｃＦｖ、単一ドメイン抗体、一本鎖ダイアボディ、抗体模倣体、抗体可変ドメインおよび受容体結合ドメインからなる群から選択される。
【００１８】
いくつかの態様では、タンパク質は３つ以上の結合ユニット、たとえば少なくとも３つまたは少なくとも４つまたは少なくとも５つの結合ユニットを含む。
【００１９】
ある態様では、結合ユニット（少なくとも２つ、３つ、４つ、５つなど）は各々異なるエピトープに結合する。他の態様では、２つ以上の結合ユニット（少なくとも２つ、３つ、４つ、５つなどを有する分子の）は各々同じエピトープに結合する。いくつかの態様では、タンパク質は３つ以上の結合ユニットを含み、結合ユニット３、４、５などは第１および／または第２のエピトープに結合しない。
【００２０】
本開示はまた、第１のヌクレオチド配列を含む第１の核酸分子および第２のヌクレオチド配列を含む第２の核酸分子を含む核酸組成物であって、第１および第２の核酸分子は第１のエピトープに結合するＦａｂアームと、第２のエピトープに結合する結合ドメイン（ＢＤ）と、C_H2ドメインおよびC_H3ドメインを含むＦｃ領域とを含むタンパク質をコードし、ＢＤは第１のポリペプチドリンカー（Ｌ１）を介してＦａｂアームに、第２のポリペプチドリンカー（Ｌ２）を介してＦｃ領域に相互に連結されており、かつタンパク質は第１および第２の各エピトープへの結合に対して二価である核酸組成物を提供する。
【００２１】
本開示は、前述の態様のいずれかのすべての組み合わせのほか、詳細な説明および例に記載された態様のいずれかとの組み合わせを考慮している。
【００２２】
本開示の説明において、本開示の特定の態様が図に示されている。しかしながら、本開示は、図に示した態様の正確な配置および手段に限定されるものではない。
【図面の簡単な説明】
【００２３】
【図１】各エピトープへの結合に対して二重特異性を持つ代表的な二価ポリペプチドの模式図である。各エピトープへの結合に対して二重特異性を持つ二価ポリペプチドというこの表現は、ｂｉＭａｂ（抗体部分を含む二重特異性の二価タンパク質）をいう。図示したように、このｂｉＭａｂは２つの結合ユニットを有し、各々が異なるエピトープに結合する。結合ユニットは図の右側に標記してあるが、結合ユニットは各々図の左側にも存在する（たとえば、この分子は各エピトープへの結合のため二価であり、分子は結合ユニットと上方および下方リンカー／ヒンジ領域とについて左右対称である）。ｂｉＭａｂのエピトープは同じ標的抗原由来でも、あるいは異なる標的抗原由来でもよい。同じ標的に結合する場合は、ｂｉＭａｂの結合ユニットは非重複領域（すなわち、異なる、好ましくは非重複エピトープ）に結合する。
【図２Ａ】代表的なｂｉＭａｂのキメラ重鎖ドメインの代表的なＤＮＡ配列およびタンパク質配列を示す。
【図２Ｂ】代表的なｂｉＭａｂのキメラ重鎖ドメインの代表的なＤＮＡ配列およびタンパク質配列を示す。
【図２Ｃ】代表的なｂｉＭａｂのキメラ重鎖ドメインの代表的なＤＮＡ配列およびタンパク質配列を示す。
【図２Ｄ】野生型ヒンジ領域と、いくつかの代表的なＬ１およびＬ２の変更形態とのタンパク質配列のアライメントを示す。上のパネルは代表的なＬ１配列を示し、C_H1ドメインおよびＢＤドメインを枠で囲み、軽鎖と鎖間ジスルフィド架橋を作るシステイン、および望ましくない切断が起こることがあるアスパルテート残基を矢印で示す。下のパネルは代表的なＬ２配列を示し、ＢＤドメインおよびC_H2ドメインを枠で囲み、任意のセリン

挿入（ディレクショナルクローニング用のＸｈｏＩ制限部位を導入するために行う）、および望ましくない切断が起こることがあるアスパルテート残基を矢印で示す。表記のアスパルト（ａｓｐａｒｔｅ）を除去（たとえば、この残基を欠いているまたはこの位置にアミノ酸置換を有するリンカーの使用）すると、Ｌ１リンカーおよびｌ２リンカー内の望ましくない切断を抑制することができる。

【図３】２つの代表的なｂｉＭａｂのタンパク質配列を示す。実際のアミノ酸配列には本分子の以下の部分：可変重鎖ドメインＩ；ｓｃＦｖ　ＶＨドメインＩＩ；ｓｃＦｖ　ＶＬドメインＩＩがないことに留意されたい。分子のこれらの部分は、使用される個々の結合ユニットのアミノ酸配列を含む。２つのリンカー／ヒンジ領域を下線で示し、ヒンジ部分を太字で示す。

【図４Ａ】代表的なｂｉＭａｂの上方ヒンジ／リンカー（Ｌ１ともいう）のヒンジ部分のＤＮＡ配列およびタンパク質配列と、そのｂｉＭａｂを模式化したものを示す。このヒンジ部分の配列は模式図の右側に示し、ＥＰＫＳＣＤＫＴ（配列番号４）である。上方ヒンジ／リンカー（Ｌ１）のリンカー部分の配列は模式図に示していない。

【図４Ｂ】代表的なｂｉＭａｂの上方ヒンジ／リンカー（Ｌ１ともいう）修飾ヒンジ部分ＤＮＡ配列およびタンパク質配列と、そのｂｉＭａｂを模式化したものとを示す。このヒンジ部分の配列は模式図の右側に示し、ＥＰＫＳＣＧＫＴ（配列番号６）である。通常のＩｇＧ１上方ヒンジ配列（図４Ａの配列も参照）から修飾されたこの修飾上方ヒンジ残基（Ｇ）を下線、太字およびイタリック体で示す。上方ヒンジ／リンカー（Ｌ１）のリンカー部分の配列は模式図に示していない。

【図４Ｃ】代表的なｂｉＭａｂの上方ヒンジ／リンカー（Ｌ１ともいう）の短いヒンジ部分のＤＮＡ配列およびタンパク質配列と、そのｂｉＭａｂを模式化したものとを示す。このヒンジ部分の配列は模式図の右側に示し、ＥＰＫＳＣ（配列番号３８）である。通常のＩｇＧ１上方ヒンジ配列（図４Ａの配列も参照）から修飾されたこの短い上方ヒンジには、ヒトＩｇＧ１上方ヒンジのＣ末端の３アミノ酸残基が存在しない。上方ヒンジ／リンカー（Ｌ１）のリンカー部分の配列は模式図に示していない。

【図５Ａ】代表的なｂｉＭａｂのリンカー／下方ヒンジ（Ｌ２ともいう）のリンカー部分およびヒンジ部分の両方のＤＮＡ配列およびタンパク質配列と、そのｂｉＭａｂを模式化したものとを示す。リンカー部分はポリ－グリシン－セリンリンカーであり、ヒンジ部分は修飾ヒンジである。このリンカー／下方ヒンジの配列は模式図の右側に示す。通常のＩｇＧ１ヒンジ配列（図２Ｄのアライメントも参照）から修飾されたこの修飾ヒンジの残基（Ｖ）を下線、太字およびイタリック体で示す。

【図５Ｂ】代表的なｂｉＭａｂのリンカー／下方ヒンジ（Ｌ２ともいう）のリンカー部分およびヒンジ部分の両方のＤＮＡ配列およびタンパク質配列と、そのｂｉＭａｂを模式化したものとを示す。リンカー部分はポリ－グリシン－セリンリンカーであり、ヒンジ部分は短縮したヒンジである。このリンカー／下方ヒンジの配列は模式図の右側に示す。このヒンジは、通常のＩｇＧ１ヒンジ配列（図２Ｄのアライメントも参照）の一部である。

【図５Ｃ】代表的なｂｉＭａｂのリンカー／下方ヒンジ（Ｌ２ともいう）のリンカー部分およびヒンジ部分の両方のＤＮＡ配列およびタンパク質配列と、そのｂｉＭａｂを模式化したものとを示す。リンカー部分はポリ－グリシン－セリンリンカーであり、ヒンジ部分はやはり短縮した修飾ヒンジである。このリンカー／下方ヒンジの配列は模式図の右側に示す。このヒンジは、通常のＩｇＧ１ヒンジ配列（図２Ｄのアライメントも参照）の一部である。

【図６Ａ】代表的な抗ＥＧＦＲ／ＩＧＦ１Ｒ　ｂｉＭａｂ（ｂｉＭａｂ－ＥＩ）の軽鎖および重鎖のＤＮＡ配列、タンパク質配列と、このｂｉＭａｂを模式化したものとを示す。

【図６Ｂ】代表的な抗ＥＧＦＲ／ＩＧＦ１Ｒ　ｂｉＭａｂ（ｂｉＭａｂ－ＥＩ）の軽鎖および重鎖のＤＮＡ配列、タンパク質配列と、このｂｉＭａｂを模式化したものとを示す。

【図６Ｃ】代表的な抗ＥＧＦＲ／ＩＧＦ１Ｒ　ｂｉＭａｂ（ｂｉＭａｂ－ＥＩ）の軽鎖および重鎖のＤＮＡ配列、タンパク質配列と、このｂｉＭａｂを模式化したものとを示す。

【図６Ｄ】代表的な抗ＥＧＦＲ／ＩＧＦ１Ｒ　ｂｉＭａｂ（ｂｉＭａｂ－ＥＩ）の軽鎖お

よび重鎖のＤＮＡ配列、タンパク質配列と、このｂｉＭａｂを模式化したものとを示す。
【図７Ａ】代表的な抗ＶＥＧＦ／Ａｎｇ２　ｂｉＭａｂ（ｂｉＭａｂ－ＶＡ）の軽鎖および重鎖のＤＮＡ配列およびタンパク質配列と、このｂｉＭａｂを模式化したものとを示す。
【図７Ｂ】代表的な抗ＶＥＧＦ／Ａｎｇ２　ｂｉＭａｂ（ｂｉＭａｂ－ＶＡ）の軽鎖および重鎖のＤＮＡ配列およびタンパク質配列と、このｂｉＭａｂを模式化したものとを示す。
【図７Ｃ】代表的な抗ＶＥＧＦ／Ａｎｇ２　ｂｉＭａｂ（ｂｉＭａｂ－ＶＡ）の軽鎖および重鎖のＤＮＡ配列およびタンパク質配列と、このｂｉＭａｂを模式化したものとを示す。
【図７Ｄ】代表的な抗ＶＥＧＦ／Ａｎｇ２　ｂｉＭａｂ（ｂｉＭａｂ－ＶＡ）の軽鎖および重鎖のＤＮＡ配列およびタンパク質配列と、このｂｉＭａｂを模式化したものとを示す。
【図８Ａ】代表的な抗ＰｃｒＶ／Ｐｓｌ　ｂｉＭａｂ（Ｂｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ）の軽鎖および重鎖のＤＮＡ配列およびタンパク質配列と、このｂｉＭａｂを模式化したものとを示す。
【図８Ｂ】代表的な抗ＰｃｒＶ／Ｐｓｌ　ｂｉＭａｂ（Ｂｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ）の軽鎖および重鎖のＤＮＡ配列およびタンパク質配列と、このｂｉＭａｂを模式化したものとを示す。
【図８Ｃ】代表的な抗ＰｃｒＶ／Ｐｓｌ　ｂｉＭａｂ（Ｂｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ）の軽鎖および重鎖のＤＮＡ配列およびタンパク質配列と、このｂｉＭａｂを模式化したものとを示す。
【図８Ｄ】代表的な抗ＰｃｒＶ／Ｐｓｌ　ｂｉＭａｂ（Ｂｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ）の軽鎖および重鎖のＤＮＡ配列およびタンパク質配列と、このｂｉＭａｂを模式化したものとを示す。
【図９】２９３細胞の一過性発現から１０日後の代表的なｂｉＭａｂ（たとえば、ｂｉＭａｂ－ＥＩおよびｂｉＭａｂ－ＶＡ）の一過性発現レベルをｍｇ／Ｌ単位で示す。
【図１０】プロテインＡによる精製および２５ｍＭのヒスチジン－ＨＣｌ（ｐＨ６）による透析後の代表的なｂｉＭａｂ（たとえば、ｂｉＭａｂ－ＥＩおよびｂｉＭａｂ－ＶＡ）のサイズ排除クロマトグラム（ＳＥＣ－ＨＰＬＣ）を示す。ｂｉＭａｂ－ＥＩのクロマトグラムを左側に示し、ｂｉＭａｂ－ＶＡのクロマトグラムを右側に示す。プロテインＡによる精製後のモノマー含有量（％）および保持時間（分）を概略的に図に示す。
【図１１Ａ】ｂｉＭａｂ－ＥＩの示差走査熱量測定により得られたサーモグラムを示し、親の従来抗体と比較する。ｂｉＭａｂドメインに対応する転移温度を示し、親の従来抗体（抗ＥＧＦＲ抗体（ＰａｎｉＸ）および抗ＩＧＦ１Ｒ抗体（Ｄａｌｏ））の融解転移を重ねて表示してある。ピーク温度および抗体をバターンごとに表示する。
【図１１Ｂ】ｂｉＭａｂ－ＶＡの示差走査熱量測定により得られたサーモグラムを示し、親の従来抗体と比較する。ｂｉＭａｂドメインに対応する転移温度を示し（黒線）、親の従来抗体（抗ＶＥＧＦ抗体（Ａｖａ）および抗Ａｎｇ２抗体（ＬＣ０６））の融解転移を重ねて表示してある。ピーク温度および抗体をバターンごとに表示する。
【図１２Ａ】ｂｉＭａｂ－ＥＩ、親の従来の抗ＥＧＦＲ　ｍＡｂ（ＰａｎｉＸ）または親の従来の抗ＩＧＦ１Ｒ　ｍＡｂ（Ｄａｌｏ）の結合を測定するＥＬＩＳＡの結果を示す。左側のパネルの結果は、固定化したＥＧＦＲに対する結合を示す。右側のパネルの結果は、固定化したＩＧＦ１Ｒに対する結合を示す。
【図１２Ｂ】ｂｉＭａｂ－ＶＡ、親の従来の抗ＶＥＧＦ　ｍＡｂ（Ａｖａ）または親の従来の抗Ａｎｇ２　ｍＡｂ（ＬＣ０６）の結合を測定するＥＬＩＳＡの結果を示す。左側のパネルの結果は、固定化したＶＥＧＦ－１６５に対する結合を示す。右側のパネルの結果は、固定化したＡｎｇ２に対する結合を示す。
【図１３Ａ－Ｂ】ＢＩＡｃｏｒｅを用いて測定した、ｂｉＭａｂ－ＥＩのその標的ＥＧＦＲおよびＩＧＦ１Ｒに対する同時結合を示す。図示した実験では、ｂｉＭａｂ－ＥＩを固

定化し、そのそれぞれのリガンドを流す。同時結合は、結合反応（ＲＵ）の上昇により観察される。同時結合は、標的の注入順序に関係なく観察される。
【図１４Ａ－Ｄ】ＢＩＡｃｏｒｅを用いて測定した、ｂｉＭａｂ－ＶＡのその標的ＶＥＧＦおよびＡｎｇ２に対する同時結合を示す。固定化した分子はｂｉＭａｂ－ＶＡ（パネルＡおよびＢ）、Ａｎｇ２（パネルＣ）およびＶＥＧＦ（パネルＤ）であった。同時結合は、結合反応（ＲＵ）の上昇により観察される。同時結合は、標的の注入順序と、ＢＩＡｃｏｒｅセンサー表面にどの試薬が固定化されたかとに関係なく観察される。
【図１５】ｂｉＭａｂ－ＥＩ、ｂｉＭａｂ－ＶＡおよびｂｉＭａｂ－ＥＩの構築の際に使用した親の従来の抗ＥＧＦＲ　ｍＡｂの、ヒトＦｃＲｎに対する結合のK_D値を示す。ＫＤ値は、ＢＩＡｃｏｒｅの結合平衡の使用により測定した。
【図１６】ｂｉＭａｂ－ＥＩ、ｂｉＭａｂ－ＶＡ、親の従来の抗ＥＧＦＲ　ｍＡｂまたはＢＳＡ各々の、ヒトＣ１ｑに対する結合をアッセイするＥＬＩＳＡ解析の結果を示す。
【図１７】ｂｉＭａｂ－ＥＩ、ｂｉＭａｂ－ＥＩの構築の際に使用した親の従来の抗ＥＧＦＲ　ｍＡｂ、親の従来の抗ＩＧＲ１Ｒ　ｍＡｂ、２つの親の従来の抗ＥＧＦＲ抗体と抗ＩＧＦ１Ｒ抗体との混合物、およびアイソタイプコントロール抗体に反応した細胞生存率を測定する細胞殺傷アッセイの結果を示す。
【図１８Ａ】ｂｉＭａｂ－ＶＡによるｐＴｉｅ２（Ａｎｇ２の天然の受容体）リン酸化の阻害（図１８Ａ）およびｐＶＥＧＦＲ２（ＶＥＧＦの天然の受容体）リン酸化の阻害を示す。これら一連の実験には、親抗体および陰性対照抗体を含めた。
【図１８Ｂ】ｂｉＭａｂ－ＶＡによるｐＴｉｅ２（Ａｎｇ２の天然の受容体）リン酸化の阻害（図１８Ａ）およびｐＶＥＧＦＲ２（ＶＥＧＦの天然の受容体）リン酸化の阻害を示す。これら一連の実験には、親抗体および陰性対照抗体を含めた。
【図１９】あまりモノマーを減少させずにｂｉＭａｂ－ＥＩおよびｂｉＭａｂ－ＶＡを濃縮することができることを示す。
【図２０】リンカー（たとえば、$(G_4S)_2$）を介して可変領域のアミノ末端（Ｂｓ２）に、あるいは重鎖のＣＨ３のカルボキシ末端（Ｂｓ３）にｓｃＦｖを融合したＢｓ２、Ｂｓ３という２つの従来の二重特異性抗体型を模式化したものである。ヒンジ領域にｓｃＦｖを挿入し、ｓｃＦｖのＮ末端およびＣ末端のリンカーにより連結された本発明の例示的ｂｉＭａｂを比較のために示す（図８も参照）。２つの異なるＢｓ２コンストラクトを示す。Ｂｓ２－Ｖ２Ｌ２－２Ｃでは、Ｗ４－ＲＡＤのｓｃＦｖがＶ２Ｌ２のＶＨのアミノ末端に融合され（軽鎖および重鎖のそれぞれのアミノ酸配列に関する配列番号５１および５３と、対応するヌクレオチド配列に関する配列番号５０および５２とを参照）、Ｂｓ２－Ｗ４－ＲＡＤ－２Ｃでは、Ｖ２Ｌ２のｓｃＦｖがＷ４－ＲＡＤのＶＨのアミノ末端に融合されている（軽鎖および重鎖のそれぞれのアミノ酸配列に関する配列番号５５および５７と、対応するヌクレオチド配列に関する配列番号５４および５６とを参照）。Ｂｓ３－Ｖ２Ｌ２－２Ｃでは、Ｗ４－ＲＡＤのｓｃＦｖがＣＨ３のカルボキシ末端に融合されている（軽鎖および重鎖のそれぞれのアミノ酸配列に関する配列番号５９および６１と、対応するヌクレオチド配列に関する配列番号５８および６０とを参照）。ＢｉＭａｂ　Ｂｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃでは、Ｗ４－ＲＡＤのｓｃＦｖがヒンジ領域に挿入されている（図８と、軽鎖および重鎖のそれぞれのアミノ酸配列に関する配列番号４２および４５を参照）。
【図２１】ＢＳ２－Ｖ２Ｌ２、ＢＳ３－Ｖ２Ｌ２およびＢＳ４－Ｖ２Ｌ２がすべて親対照（Ｖ２Ｌ２）と同様にＲＢＣの溶解を防止したことを示す。Ｒ３４７を陰性対照として使用した。
【図２２】精製されたＷ４－ＲＡＤ親抗体；Ｐｓｌ／ＰｃｒＶ二重特異性抗体Ｂｓ２－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ、Ｂｓ３－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ、Ｂｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃの希釈液による、発光性Ｐ．エルジノーサ（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）血清型Ｏ５株（ＰＡＯ１．ｌｕｘ）を用いたオプソニン貪食アッセイを示す。Ｂｓ２－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ抗体およびＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ抗体は、親Ｗ４－ＲＡＤ抗体と比較して同様の殺傷を示し、Ｂｓ３－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ抗体の殺傷は減少した。すべての実験でＲ３４７を陰性対照として使用した。
【図２３Ａ】６２０６急性肺炎モデル系を用いて異なる抗Ｐｓｌ／抗ＰｃｒＶ二重特異性

抗体で処置したマウスのインビボ生存試験を示す。すべての試験において、対照マウスは感染から約３０～４８時間後には感染のため死亡した。試験Ａ～Ｄをそれぞれパネルａ～Ｄに示す。（Ａ）Ｂｓ３－Ｖ２Ｌ２動物はすべて、Ｖ２Ｌ２対照を投与された動物と共に生存した。Ｗ４－ＲＡＤを免疫された動物の約９０％が生存した。一方、Ｂｓ２－Ｖ２Ｌ２動物の約５０％は１２０時間には感染で死亡した。

【図２３Ｂ】６２０６急性肺炎モデル系を用いて異なる抗Ｐｓｌ／抗ＰｃｒＶ二重特異性抗体で処置したマウスのインビボ生存試験を示す。すべての試験において、対照マウスは感染から約３０～４８時間後には感染のため死亡した。試験Ａ～Ｄをそれぞれパネルａ～Ｄに示す。（Ｂ）：Ｂｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃは１．０ｍｇ／ｋｇおよび０．５ｍｇ／ｋｇの両方でＢｓ２－Ｖ２Ｌ２と比較して大きな活性を有した。

【図２３Ｃ】６２０６急性肺炎モデル系を用いて異なる抗Ｐｓｌ／抗ＰｃｒＶ二重特異性抗体で処置したマウスのインビボ生存試験を示す。すべての試験において、対照マウスは感染から約３０～４８時間後には感染のため死亡した。試験Ａ～Ｄをそれぞれパネルａ～Ｄに示す。（Ｃ）：Ｂｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃは１．０ｍｇ／ｋｇでＢｓ２－Ｖ２Ｌ２と比較して大きな活性を有するようであった。

【図２３Ｄ】６２０６急性肺炎モデル系を用いて異なる抗Ｐｓｌ／抗ＰｃｒＶ二重特異性抗体で処置したマウスのインビボ生存試験を示す。すべての試験において、対照マウスは感染から約３０～４８時間後には感染のため死亡した。試験Ａ～Ｄをそれぞれパネルａ～Ｄに示す。（Ｄ）：Ｂｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃは０．５ｍｇ／ｋｇでＢｓ３－Ｖ２Ｌ２と比較して大きな活性を有した。

【図２４】Ｂｓ２、Ｂｓ３、ＢｉＭａｂ、親抗体を単独および組み合わせて処置したマウスの致死的肺炎の予防率を示す。マウスは、０．２ｍｇ／ｋｇ～１５ｍｇ／ｋｇの範囲の様々な用量の抗体で処置した。生存率を表に示し、それぞれ比較のため動物数を括弧内に示した。

【図２５】薬剤またはトキシンの結合点の部位特異的修飾を有するｂｉＭａｂを示す。修飾は、単に例示のためｂｉＭａｂの$C_{H}2$　Ｆｃドメイン上に示す。修飾は、ｂｉＭａｂのどのドメインに導入してもよく、ｂｉＭａｂの複数のドメインに導入してもよい。薬剤またはトキシンは、化学またはタンパク質媒介コンジュゲーション方法を用いてｂｉＭａｂにコンジュゲートすることができる。薬剤またはトキシンの遊離が必要とされる場合、活性薬剤またはトキシンをｂｉＭａｂに連結するリンカー内またはその周囲に部位特異的プロテアーゼ切断部位を設計してもよい。部位特異的薬剤コンジュゲーション用に修飾されたｂｉＭａｂの結合ユニットを文字ＡおよびＢで標記する。部位特異的薬剤コンジュゲーション用に修飾されたこのｂｉＭａｂは、各標的に二重特異性を持つ二価のｂｉＭａｂである。特記される点として、このｂｉＭａｂの標的は、異なっていても、あるいは同じであってもよい。標的が同じである場合、ｂｉＭａｂの結合ユニットは、非重複領域に結合してもよいし（たとえば、二重特異性を持つ二価）、あるいは同じエピトープに結合してもよい（たとえば、単一特異性を持つ四価）。

【図２６】ｂｉＭａｂ「コア」構造を基礎として使用して作製することができる多重特異性結合ユニットを図示する。模式的に示したように、ｂｉＭａｂ「コア」構造は、結合ユニットＡおよびＢで作られる（図１も参照）。Ａ＋Ｂ「コア」構造を使用して、Ａ＋Ｂ「コア」を構成するポリペプチドの各末端に、特にＣ、Ｄ、ＥおよびＦの位置に他の結合ユニットを結合してもよい。したがって、ｂｉＭａｂコアを基礎構造として使用して、三重特異性結合ユニット（Ａ＋Ｂ＋Ｃ；Ａ＋Ｂ＋Ｄ；Ａ＋Ｂ＋Ｅ；Ａ＋Ｂ＋Ｆ）；四重特異性結合ユニット（Ａ＋Ｂ＋Ｃ＋Ｄ；Ａ＋Ｂ＋Ｃ＋Ｅ；Ａ＋Ｂ＋Ｃ＋Ｆ；Ａ＋Ｂ＋Ｄ＋Ｅ；Ａ＋Ｂ＋Ｄ＋Ｆ；Ａ＋Ｂ＋Ｅ＋Ｆ）；五重特異性結合ユニット（Ａ＋Ｂ＋Ｃ＋Ｄ＋Ｅ；Ａ＋Ｂ＋Ｃ＋Ｄ＋Ｆ；Ａ＋Ｂ＋Ｄ＋Ｅ＋Ｆ）；および六重特異性結合ユニット（Ａ＋Ｂ＋Ｃ＋Ｄ＋Ｅ＋Ｆ）を作製することができる。表に示すように、結合タンパク質はすべて各エピトープに対して二価である。結合ユニットＢ、Ｃ、Ｄ、ＥおよびＦは、どのような結合部分、たとえば、抗体フラグメント（任意の可能なドメイン配向で、任意のリンカーの長さおよび組成を有するｓｃＦｖなど）；抗体の単一ドメイン（ＶＨまたはＶＬなど）；抗体

模倣体、たとえば抗体の結合構造を模倣するポリペプチドスキャフォールド；タンパク質ドメイン、たとえば免疫メディエーター（たとえば、サイトカイン）；リガンド結合ドメイン；および高分子トキシンであってもよい。結合ユニットＢ、Ｃ、Ｄ、ＥおよびＦは、遺伝的方法を用いて結合しても、あるいはインビトロでの化学媒介またはタンパク質媒介コンジュゲーション方法により結合してもよい。ユニットＢ、Ｃ、Ｄ、ＥおよびＦを連結するリンカーは、以下に限定されるものではないが、（ＧＧＧＧＳ）リピートであってもよい。ユニットＢ、Ｃ、Ｄ、ＥおよびＦの遊離が必要とされる場合、部位特異的プロテアーゼ切断部位は、リンカー内またはその周囲に設計してもよい（たとえば、図２９を参照）。様々な結合ユニット（Ａ、Ｂ、Ｃ、Ｄ、ＥおよびＦ）は、同一抗原のエピトープに結合しても、あるいは異なる標的抗原のエピトープに結合してもよい。同じ標的に結合する場合、結合ユニットは、非重複領域（すなわち、異なる、好ましくは非重複エピトープ）に結合する。本明細書の教示に基づき、上記の結合タンパク質のいずれの結合価も、同じエピトープに結合する結合ユニットを組み込むことにより増やすことができることが理解されよう。たとえば、以下に限定されるものではないが、ＣおよびＤに同じ結合ユニットを付加すると、ＡおよびＢが結合する異なるエピトープに対して二価であり、ＣおよびＤの結合ユニット（同じエピトープに結合する）が結合するエピトープに対して四価になる結合分子が得られる。

【図２７Ａ】図２６に記載されているようなｂｉＭａｂ「コア」構造（破線の枠で示す）に追加のｓｃＦｖ単位を結合することにより作製することができるいくつかの多重特異性結合ユニットを示す。三重特異性結合ユニットＡ＋Ｂ＋Ｆ（ＴｒｉＭａｂ１）；Ａ＋Ｂ＋Ｃ（ＴｒｉＭａｂ２）；Ａ＋Ｂ＋Ｅ（ＴｒｉＭａｂ３）；およびＡ＋Ｂ＋Ｄ（ＴｒｉＭａｂ４）をそれぞれパネルＡ、Ｂ、ＣおよびＤに図示する。四重特異性結合ユニット（Ａ＋Ｂ＋Ｃ＋Ｄ（ＴｅｔｒａＭａｂ１）およびＡ＋Ｂ＋Ｄ＋Ｅ（ＴｅｔｒａＭａｂ２）をそれぞれパネルＥおよびＦに図示する。五重特異性結合ユニットＡ＋Ｂ＋Ｃ＋Ｄ＋Ｅ（ＰｅｎｔａＭａｂ１）；Ａ＋Ｂ＋Ｃ＋Ｄ＋Ｆ（ＰｅｎｔａＭａｂ２）；およびＡ＋Ｂ＋Ｄ＋Ｅ＋Ｆ　ＰｅｎｔａＭａｂ３）をそれぞれパネルＧ、ＨおよびＩに図示する。六重特異性結合ユニットＡ＋Ｂ＋Ｃ＋Ｄ＋Ｅ＋Ｆをパネルｊに図示する。

【図２７Ｂ】図２７Ａと同じ。

【図２７Ｃ】図２７Ａと同じ。

【図２７Ｄ】図２７Ａと同じ。

【図２７Ｅ】図２７Ａと同じ。

【図２７Ｆ】図２７Ａと同じ。

【図２７Ｇ】図２７Ａと同じ。

【図２７Ｈ】図２７Ａと同じ。

【図２７Ｉ】図２７Ａと同じ。

【図２７Ｋ】図２７Ａと同じ。

【図２８】ヒトＩｇＧヒンジ領域に２つのタンデム結合ユニット２ａおよび２ｂ（この場合ｓｃＦｖとして示す）を挿入させた代表的な伸長型ｂｉＭａｂ「コア」の模式図である。この図は例示のみを目的としており、ヒンジに挿入することができる結合ユニットの数または種類を限定することを意図するものではない。ヒンジに挿入される結合ユニットは、どのような結合部分、たとえば、抗体フラグメント（任意の可能なドメイン配向で、任意のリンカーの長さおよび組成を有するｓｃＦｖなど）；抗体の単一ドメイン（ＶＨまたはＶＬなど）；抗体模倣体、たとえば抗体の結合構造を模倣するポリペプチドスキャフォールド；タンパク質ドメイン、たとえば免疫メディエーター（たとえば、サイトカイン）；リガンド結合ドメイン；および高分子トキシンであってもよい。ヒンジに存在する結合ユニットを連結する分子内および／または分子間のリンカーは、以下に限定されるものではないが、（ＧＧＧＧＳ）リピートであってもよい。ユニットＢ、Ｃ、Ｄ、ＥおよびＦの遊離が必要とされる場合、部位特異的プロテアーゼ切断部位は、リンカー内またはその周囲に設計してもよい（たとえば、図２９を参照）。結合ユニットがｓｃＦｖである場合、結合ユニットは、いかなる配向で存在してもよく、ｓｃＦｖドメインの物理化学的性質を

変化させる突然変異を含んでもよい。様々な結合ユニットは、同一抗原のエピトープに結合しても、あるいは異なる標的抗原のエピトープに結合してもよい。同じ標的に結合する場合、結合ユニットは、非重複領域（すなわち、異なる、好ましくは非重複エピトープ）に結合する。本明細書の教示に基づき、上記の結合タンパク質のいずれの結合価も、同じエピトープに結合する結合ユニットを組み込むことにより増やすことができることが理解されよう。たとえば、以下に限定されるものではないが、２ａおよび２ｂに同じ結合ユニットを付加すると、結合ユニット１および結合ユニット２ａ／２ｂが結合する異なるエピトープに対して二価であり、２ａおよび２ｂの結合ユニット（同じエピトープに結合する）が結合するエピトープに対して四価になる結合分子が得られる。

【図２９】代表的なｂｉＭａｂ「コア」の模式図であり、結合ユニット２は、２つのプロテアーゼ切断部位を含むポリペプチドリンカーを有するｓｃＦｖである。左パネルは、プロテアーゼ切断前の構造を図示する。右パネルは、プロテアーゼ処理の結果、ｓｃＦｖのＶＨ２とＶＬ２との間にあるリンカーが除去された後の構造を図示する。得られたタンパク質は、合計６つの別々のポリペプチド鎖を含むジスルフィド架橋ホモ２量体である。

【発明を実施するための形態】

【００２４】

引き続き本開示をさらに詳細に記載する前に、本開示は、特定の組成物またはプロセスステップに限定されるものではなく、したがって異なってもよいことを理解されたい。本明細書および添付の特許請求の範囲に使用される場合、単数形「１つの（ａ、ａｎ）」および「前記（ｔｈｅ）」は、文脈上明らかに他の意味に解すべき場合を除き、複数の意味を含むことに留意しなければならない。

【００２５】

他に記載がない限り、本明細書で使用する技術用語および科学用語はすべて、本発明が関連する技術分野の当業者が一般に理解しているのと同じ意味を持つ。たとえば、Ｃｏｎｃｉｓｅ Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｂｉｏｍｅｄｉｃｉｎｅ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｕｏ，Ｐｅｉ－Ｓｈｏｗ，２ｎｄ ｅｄ．，２００２，ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ；Ｔｈｅ Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｃｅｌｌ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，３ｒｄ ｅｄ．，１９９９，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ；およびＯｘｆｏｒｄ Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ Ｏｆ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ Ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｒｅｖｉｓｅｄ，２０００，Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓは、当業者にとって本発明に使用される多くの用語の一般的な辞書となる。

【００２６】

本明細書においてアミノ酸は、その一般に知られる３文字記号またはＩＵＰＡＣ－ＩＵＢ生化学命名委員会（Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｎｏｍｅｎｃｌａｔｕｒｅ Ｃｏｍｍｉｓｓｉｏｎ）により推奨される１文字記号で示すことがある。ヌクレオチドも、同様に、その一般的に認められた１文字記号で示すことがある。

【００２７】

抗体の可変ドメイン、相補性決定領域（ＣＤＲ）およびフレームワーク領域（ＦＲ）のアミノ酸の番号付けは、他に記載がない限り、Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ Ｅｄ．Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ．（１９９１）に記載されるＫａｂａｔの定義に従う。この番号付け体系を使用すると、実際の直鎖状アミノ酸配列は、可変ドメインのＦＲもしくはＣＤＲの短縮またはＦＲもしくはＣＤＲへの挿入に対応して、より少ないアミノ酸または追加のアミノ酸を含むことができる。たとえば、重鎖可変ドメインは、Ｈ２の残基５２の後の１個のアミノ酸の挿入（Ｋａｂａｔによれば残基５２ａ）、および重鎖ＦＲ残基８２の後に挿入された残基（たとえば、Ｋａｂａｔによれば残基８２ａ、８２ｂおよび８２ｃなど）を含むことができる。残基のＫａｂａｔの番号付けは個々の抗体に対して、抗体の配列と「標準的な」Ｋａｂａｔ番号が付けられた

配列との相同性領域でアライメントを行うことにより決定することができる。フレームワーク残基の最大のアライメントには、Ｆｖ領域に使用される、この番号付け体系の「スペーサー」残基の挿入が必要とされることが多い。さらに、任意の特定のＫａｂａｔ部位番号における個々の特定の残基の種類は、種間の相違または対立遺伝子の相違のため抗体鎖によって異なることもある。

【００２８】

本明細書で使用する場合、「抗体」という用語は、免疫グロブリンとも呼ばれ、モノクローナル抗体（全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、少なくとも２つの異なるエピトープ結合フラグメントから形成される多重特異性抗体（たとえば、多重特異性抗体、たとえば、その全体を本明細書に援用する国際公開第２００９／０１８３８６号パンフレット、国際出願ＰＣＴ／米国特許出願公開第２０１２／０４５２２９号明細書）、ｂｉＭａｂ、ヒト抗体、ヒト化抗体、ラクダ化抗体、一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）、一本鎖抗体、単一ドメイン抗体、ドメイン抗体、Ｆａｂフラグメント、Ｆ（ａｂ’）２フラグメント、所望の生物活性を示す抗体フラグメント（たとえば抗原結合部分）、ジスルフィド結合Ｆｖ（ｄｓＦｖ）、および抗イディオタイプ（抗Ｉｄ）抗体（たとえば、本発明の抗体に対する抗Ｉｄ抗体など）、イントラボディ、ならびに上記のいずれかのエピトープ結合フラグメントを包含する。特に、抗体は、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性なフラグメント、すなわち、少なくとも１つの抗原結合部位を含む分子を含む。抗体はまた、抗体またはその一部とのペプチド融合体、たとえばＦｃドメインとの融合タンパク質を含む。免疫グロブリン分子は、どのようなアイソタイプ（たとえば、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＡおよびＩｇＹ）、サブアイソタイプ（たとえば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１およびＩｇＡ２）またはアロタイプ（たとえば、Ｇｍ、たとえば、Ｇ１ｍ（ｆ、ｚ、ａまたはｘ）、Ｇ２ｍ（ｎ）、Ｇ３ｍ（ｇ、ｂまたはｃ）、Ａｍ、ＥｍおよびＫｍ（１、２または３））であってもよい。抗体は、任意の哺乳動物、以下に限定されるものではないが、ヒト、サル、ブタ、ウマ、ウサギ、イヌ、ネコ、マウスなど、または他の動物、たとえばトリ（たとえばニワトリ）に由来してもよい。

【００２９】

Ａ．新規な二重特異性結合タンパク質

単一の結合分子に複数の結合部位を付加すると、分子の能力（たとえば治療能、診断能など）を大きく高めることができる。たとえば、二重特異性抗体は、同じ標的生体分子の２つ以上の領域に結合して、標的の１つのエピトープのみに結合する単特異性ポリペプチドより大きな特異性を与えることができる。あるいは、二重特異性抗体は、複数の標的生体分子、たとえば複合体に存在する標的、または封鎖および／またはクラスター形成が望ましい標的に結合することができる。第３のシナリオでは同じ二重特異性抗体が、その標的分子の局在および／または発現に応じて、いつでも異なる機能を発揮することができる。

【００３０】

本明細書に記載されるのは、新規な結合タンパク質である。こうした新規な結合タンパク質の例示的構造を「ｂｉＭａｂ」という。例示的ｂｉＭａｂを模式化したもの、および特定のｂｉＭａｂの具体的な例を本明細書に提供する。より一般的には、ｂｉＭａｂは、各々がエピトープに結合する２つの結合ユニットを含むポリペプチドである（たとえば、結合ユニット１は第１のエピトープに結合し、結合ユニット２は第２のエピトープに結合する）。基本的なｂｉＭａｂは、２つのエピトープの各々の結合に対して二価である（たとえば、ポリペプチドは２つの結合ユニット１および２つの結合ユニット２を含む）。このため、結合ユニット１および２が異なるエピトープに結合する場合、ｂｉＭａｂは、通常の二重特異性抗体の多重特異性と、通常の抗体分子の二価性とを有する。結合ユニット１および２が同じエピトープに結合する場合、ｂｉＭａｂは、通常の抗体の単一特異性を有するが、四価である。ｂｉＭａｂは、結合ユニットに加えて、リンカーポリペプチドおよびＦｃ部分をさらに含む。本開示はまた、「コア」ｂｉＭａｂ構造に追加の結合ユニッ

トを付加して、各エピトープに対して二価である三重特異性、四重特異性、五重特異性および六重特異性の結合タンパク質を得ることにより、３つ以上のエピトープに結合する結合タンパク質も提供する（たとえば図２６、２７および２８を参照）。本開示は、ｂｉＭａｂなどの結合タンパク質、およびｂｉＭａｂコアを構成する結合タンパク質を提供する。本開示の結合タンパク質は、本明細書に記載するような結合ユニット、リンカーポリペプチドおよびＦｃ部分を含む。本開示はまた、こうしたｂｉＭａｂをコードする核酸分子、およびこうしたｂｉＭａｂを作製して使用する方法も提供する。ｂｉＭａｂ、ｂｉＭａｂコアを含む結合タンパク質、およびｂｉＭａｂの様々な部分については、本明細書により詳細に記載する。

【００３１】

本明細書に記載するようなｂｉＭａｂは２つの重鎖－軽鎖対を含み、一緒に第１の結合ユニットを形成する重鎖および軽鎖は各々可変領域（たとえばＶＬおよびＶＨ）を含み、かつ重鎖は第２の結合ユニット（たとえばｓｃＦｖ）をさらに含む。第１および第２の結合ユニットが異なるエピトープに結合する場合、各重鎖－軽鎖対は二重特異性であり、２つの対は共に各エピトープに対して二価である。第１および第２の結合ユニットが同じエピトープに結合する場合、各重鎖－軽鎖対は単一特異性であり、２つの対は共にエピトープに対して四価である。いくつかの態様では、２つの重鎖－軽鎖対は同一である。いくつかの態様では、２つの重鎖－軽鎖対は同一でない。

【００３２】

ｂｉＭａｂのドメインは、免疫グロブリンのドメインに基づいてもよい。モノクローナル抗体（ｍＡｂ）などの免疫グロブリン分子は、診断薬および治療薬として広く使用されており、ｍＡｂの結合フラグメントを設計する方法は、当該技術分野において公知である。モノクローナル抗体は、すべての免疫グロブリン分子と同様に、ペプチドサブユニットで構成される。典型的または通常のｍＡｂは、２つの重鎖サブユニットおよび２つの軽鎖サブユニットを含む。ｍＡｂの重鎖は各々、抗原結合に寄与する１つの可変ドメイン（ＶＨ）、および３または４つのサブ領域（C_H1、C_H2、C_H3、C_H4）で構成される定常ドメイン（ＣＨ）を含む。ｍＡｂの軽鎖は各々、１つの可変ドメイン（ＶＬ）および１つの定常ドメイン（ＣＬ）を含む。軽鎖定常ドメイン鎖には、哺乳動物に見られる２つのアイソタイプ、カッパ（κ）およびラムダ（λ）がある。ジスルフィド結合は、各C_H１ドメインを１つのＣＬドメインに連結し、C_H２ドメインを互いに連結する。異なるクラスの抗体（ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧおよびＩｇＭ）には、５種の重鎖（α、δ、ε、γおよびμ）が認められる。ｍＡｂ重鎖は、構造の柔軟性および可動性を与えるヒンジ領域を有する。本開示のｂｉＭａｂは、従来の抗体に類似した全体構造を有し得るが、第１の抗原結合部分とＦｃ部分との間に位置する追加の結合ユニットの存在によって区別することができる。したがって、１つのエピトープへの結合に対して二価である従来の抗体と異なり、ｂｉＭａｂは、２つのエピトープへの結合に対して二価である。一方で、本明細書に記載するように、ｂｉＭａｂは、ＦｃＲｎへの結合能ならびにＣ１ｑ受容体およびＦｃγ受容体への結合能（たとえば、抗体依存性細胞傷害および補体依存性細胞傷害を媒介する能力を示唆する）など従来の抗体の多くの望ましい特性を依然として維持している。

【００３３】

Ｆａｂフラグメント、Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメント、Ｆａｂ’フラグメント、ｓｃＦｖフラグメント、ジ－ｓｃＦｖフラグメント、ｓｄＡｂフラグメントなどｍＡｂ分子の選択された部分のみを含むｍＡｂフラグメントも、診断薬または治療薬として使用されてきた。さらに、抗体および抗体フラグメントの結合特異性を向上させるため、可変ドメインの特定の残基が変更されてきた。非ヒト抗体の領域「をヒト化して」ｍＡｂの免疫原性を低下させるため、抗原結合に直接関与しない他の残基も置き換えられてきた。

【００３４】

ｂｉＭａｂは従来の抗体と異なり、たとえば、２つの異なるエピトープへの結合に対して二価（または１つのエピトープへの結合に対して四価）であるが、ｂｉＭａｂの多くの

部分は、従来の抗体部分に由来するまたは類似する。本明細書に記載のｂｉＭａｂには、当該技術分野において公知のどのようなｍＡｂドメインおよび／またはフラグメントを使用してもよい。特に、ｂｉＭａｂは、Ｆａｂフラグメントおよび／もしくはｓｃＦｖフラグメントまたはこれらの変異体を含んでもよい。例示的かつ非限定的なｓｃＦｖの変異体として、タンデムジ－ｓｃＦｖ、タンデムトリ－ｓｃＦｖ、ダイアボディおよびトリボディまたはトリアボディがあるが、これに限定されるものではない。このため、ある態様では、本開示は、多重特異性を持つ二価ポリペプチドであって、第１のエピトープに結合するＦａｂ（結合ユニット１）、第２のエピトープに結合するｓｃＦｖまたはｓｃＦｖの変異体（結合ユニット２）、少なくともＣ$_{H}$２およびＣ$_{H}$３ドメインを含むＦｃ、結合ユニット１と結合ユニット２とを相互に連結するポリペプチドリンカー（Ｌ１；上方ヒンジ／リンカー）、および結合ユニット２とＦｃとを相互に連結するポリペプチドリンカー（Ｌ２；リンカー／下方ヒンジ）を含むポリペプチドを提供する。

【００３５】

本開示は全般的に、本開示の新規な結合タンパク質に関し、ｂｉＭａｂが実例である。別の例には、ｂｉＭａｂコアのほか、１つまたは複数の追加の結合ユニットを含む結合タンパク質（たとえば、図２７および２８を参照）および／または伸長型ｂｉＭａｂコアを含む結合タンパク質（たとえば、図２９を参照）がある。ｂｉＭａｂまたはｂｉＭａｂの特徴を本明細書に記載するときは、そうした記載が本開示の新規な結合タンパク質に全般的に当てはまるものであり、そうした結合タンパク質が２つの結合ユニットまたは３つ以上の結合ユニットを含むかどうかに関係ないことを理解すべきである。したがって、ｂｉＭａｂという用語は、本開示の結合タンパク質を例示するものであり、文脈上許容される場合、ｂｉＭａｂに関する任意のそうした言及は、ｂｉＭａｂコアを含む結合タンパク質を説明するために使用されることがある。

【００３６】

図１は、本開示の例示的ｂｉＭａｂの模式図を示す。図１に示すように、本開示のｂｉＭａｂの一態様は、２つの同一の重鎖－軽鎖対を含み、重鎖－軽鎖対は各々二重特異性であり、２つの同一の対が各エピトープに対して共に二価である。各重鎖－軽鎖対は、第１のエピトープに結合するＦａｂドメイン（結合ユニット１）、第２のエピトープに結合する結合ドメイン（ＢＤ）（結合ユニット２；図１にｓｃＦｖとして図示）およびＦｃ領域を含む。さらに詳しくは、ｂｉＭａｂは２つのキメラ重鎖を含み、各々重鎖可変領域（ＶＨ１）と、重鎖定常領域（ＣＨ１）と、第１のポリペプチドリンカー（図１に上方ヒンジ／リンカーと表記；本明細書ではＬ１ともいう）と、結合ドメイン（ＢＤ）と、第２のポリペプチドリンカー（図１にリンカー／下方ヒンジと表記；本明細書ではＬ２ともいう）と、Ｃ$_{H}$２ドメインおよびＣ$_{H}$３ドメインを含むＦｃ領域とを含む。本開示のｂｉＭａｂは、２つの通常の抗体軽鎖をさらに含み、各々軽鎖可変領域（ＶＬ１）および軽鎖定常領域（ＣＬ）を含む。図１に示す特定のｂｉＭａｂの結合ドメイン（結合ユニット２）はｓｃＦｖである。しかしながら、本開示の様々な態様によるｂｉＭａｂの結合ドメインは、当該技術分野において公知のどのような結合ドメインであってもよい。

【００３７】

図１は、本明細書ではｂｉＭａｂ「コア」ともいうｂｉＭａｂの有用な模式化したものを示す。図２および３は、代表的なｂｉＭａｂの重鎖の追加の説明を示す。このポリペプチド鎖は、図１に示すように、ＶＨ１ドメイン、ＣＨ１ドメイン、上方ヒンジ／リンカー（本明細書ではＬ１または第１のポリペプチドリンカーともいう）、結合ユニット２（ｓｃＦｖのＶＬ２およびＶＨ２など）、リンカー／下方ヒンジ（本明細書ではＬ２または第２のポリペプチドリンカーともいう）、およびＦｃ（Ｃ$_{H}$２ドメインおよびＣ$_{H}$３ドメイン）を含む。この重鎖は、従来の軽鎖領域を含んでもよいため、本明細書でキメラ重鎖という。ｂｉＭａｂは２つのこうしたキメラ重鎖を含み、これらは同一でも、あるいは異なってもよい。結合ユニット１の可変重鎖ドメイン（ＶＨ）はＶＨ１という点に留意されたい。ある態様では、これは、第１のエピトープに結合するＦａｂの可変重鎖である。同様に、結合ユニット１の可変軽鎖ドメイン（ＶＬ）はＶＬ１という。ある態様では、これは

、第１のエピトープに結合するＦａｂの可変軽鎖である。一方、結合ユニット２が第２のエピトープに結合するｓｃＦｖである態様では、結合ユニット２のドメインは、ＶＨ２およびＶＬ２など数字「２」で示す。

【００３８】

図２は、例示的ｂｉＭａｂキメラ重鎖に使用されるいくつかのドメインのＤＮＡ配列およびアミノ酸配列の情報を提供する。キメラ重鎖の部分は図２Ａ～２Ｃに示す。図２Ａの最上部に、ＶＨ１領域のＤＮＡ配列およびタンパク質配列を模式的に示す。任意の特定のｂｉＭａｂの場合、この実際の配列は、特定の結合ユニット１のＶＨ１、たとえば特定のＦａｂのＶＨ１に対応すると考えられる。次いで図２Ａは、例示的C_H1ドメインおよびヒトＩｇＧ１全ヒンジ領域のＤＮＡ配列およびタンパク質配列を示す。これに続いて、ｂｉＭａｂのＦａｂとＢＤとを相互に連結するポリペプチドリンカー１（Ｌ１）のいくつかの例示的な選択肢のＤＮＡ配列およびアミノ酸配列を示す。Ｌ１は、ヒンジ部分およびリンカー部分（上方ヒンジ／リンカー）を含んでもよく、これを図２Ａに図示する。図２Ａは、最初にＬ１のヒンジ部分（上方ヒンジ、この場合ヒトＩｇ１上方ヒンジとして示す）の例を示す。図２Ａは、ヒトＩｇＧ１上方ヒンジまたは修飾ヒトＩｇＧ１上方ヒンジとして示す、Ｌ１のヒンジ部分に考えられる３つの態様を図示していることに留意されたい。これらのヒンジ部分は、修飾ヒンジ部分がシステインの直後にＤからＧへの置換を含む、あるいはシステイン後の残基を欠いている点で異なる。次いで図２Ａは、Ｌ１のリンカー部分、この場合G_4Sリンカーを示す。上方ヒンジ部分およびリンカー部分は一緒にＬ１を形成する。しかしながら、ある態様では、Ｌ１はリンカー部分のみ、またはヒンジ部分のみを含む。

【００３９】

図２Ｂは、ＶＨ２－リンカー－ＶＬ２配向でも、あるいはＶＬ２－リンカー－ＶＨ２配向でもよい結合ユニット２の、この場合ｓｃＦｖのＤＮＡ配列およびタンパク質配列を模式的に示す。任意の特定のｂｉＭａｂでは、この配列は、たとえば、特定の結合ユニット２のＶＨ２配列およびＶＬ２配列、ならびにこれらのＶＨ２ドメインおよびＶＬ２ドメインに適切なリンカーに対応すると考えられる。Ｌ１のヒンジ部分およびリンカー部分は、たとえば、Ｌ１が２つのヒンジ部分および２つのリンカー部分を含むように繰り返されてもよいことが理解されよう。

【００４０】

例示的第２のポリペプチドリンカー（Ｌ２；リンカー／下方ヒンジともいう）のＤＮＡ配列およびアミノ酸配列を図２Ａおよび２Ｂに示す。Ｌ２のリンカー部分は図２Ｂの下部に示す。図示したように、このリンカー部分はG_4Sリンカーである。Ｌ２のヒンジ部分は図２Ｂの下部に示す（このヒンジ部分は下方ヒンジまたはヒンジ変異体として示している点に留意されたい）。図２Ｂは、Ｌ２のヒンジ部分、ヒトＩｇＧ１のヒンジ変異体およびヒトＩｇＧ１の下方ヒンジの３つの態様を示す。下方ヒンジ部分およびリンカー部分は一緒にＬ２（リンカー／下方ヒンジともいう）を形成する。しかしながら、ある態様では、Ｌ２はリンカー部分のみ、またはヒンジ部分のみを含む。

【００４１】

図２Ｃは、ＦｃのC_H2ドメインおよびC_H3ドメインのＤＮＡ配列およびアミノ酸配列を示す。図２Ｂに示すC_H2ドメインおよびC_H3ドメインはＩｇＧ１由来であるが、ｂｉＭａｂは、ＩｇＭ、ＩｇＧ、ＩｇＤ、ＩｇＡおよびＩｇＥなど任意のＩｇクラス、ならびにＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３およびＩｇＧ４など任意のアイソタイプ由来のＦｃを使用して容易に作製することができる。Ｌ２のヒンジ部分およびリンカー部分は、たとえば、Ｌ２が２つのヒンジ部分および２つのリンカー部分を含むように繰り返されてもよいことが理解されよう。

【００４２】

最後に、図２Ｄは、野生型ヒンジ領域およびいくつかの代表的なＬ１およびＬ２の変更形態のタンパク質配列のアライメントを示す。望ましくない切断現象が起こる可能性があるアスパルテートを示す。ある態様では、このアスパルテートはＬ１および／またはＬ２

に存在しない。ある態様では、アスパレートを別のアミノ酸残基（たとえば、グリシン）で置換する。他の態様では、アスパルテート残基を欠失させる。また、アミノ酸挿入（たとえば、セリン）を含むＬ２の変更形態も示す。このアミノ酸挿入は、リンカーをコードするＤＮＡ配列に制限部位（たとえば、ＸｈｏＩ）を導入するために行った。特に結合ドメインのクローニングを容易にするには、本発明の結合タンパク質に存在する任意のリンカーに所望の制限部位を組み込んでもよいことを意図している。

【００４３】

図３は、ｂｉＭａｂの例示的模式図でキメラ重鎖のアミノ酸配列をもう１つ表示する。言うまでもなく、ＶＨ１（結合ユニット１の可変重鎖ドメイン１）の具体的な配列および結合ドメイン２（ＶＨ２－リンカー－ＶＬ２配向のｓｖＦｃ）の具体的な配列は示していないことを理解すべきである。これらの配列は、特定のｂｉＭａｂを構成する個々の結合ユニットによって異なる。一方、相互に関連するｂｉＭａｂの各部分の相対位置は、維持されている（たとえば、個々の結合ユニットが異なっても、ｂｉＭａｂ型は同じである）。

【００４４】

図３では、Ｌ１およびＬ２を下線およびイタリック体で示し、Ｌ１およびＬ２のヒンジ部分を太字で示す。上のパネルでは、Ｌ１のヒンジ部分は、ヒトＩｇＧ１上方ヒンジに対応するのに対し、下のパネルではＬ１のヒンジ部分は修飾ヒトＩｇＧ１上方ヒンジに対応する。上のパネルでは、Ｌ２のヒンジ部分はヒトＩｇＧ１の下方ヒンジ変異体に対応するのに対し、下のパネルではＬ２のヒンジ部分はヒトＩｇＧ１の下方ヒンジに対応する。いずれの場合も、Ｌ１は、たとえば、結合ユニット１のＶＨ１と結合ユニット２のＶＨ２とを相互に連結することにより、結合ユニット１と結合ユニット２とを相互に連結する。Ｌ２は、たとえば、結合ユニット２のＶＬ２とＦｃのC_H2ドメインとを相互に連結することにより、結合ユニット２とＦｃと相互に連結する。

【００４５】

代表的なｂｉＭａｂをさらに模式化したものを図４および５に示す。これらの図は、この分子におけるＬ１およびＬ２のヒンジ部分の相対位置を示す。たとえば、図４Ａ～４Ｃでは、Ｌ１のヒンジ部分の相対位置を示す。Ｌ１はリンカー部分をさらに含んでもよいが、その配列は、図４Ａ、４Ｂまたは４Ｃに示していない。リンカー部分をさらに含むＬ１の例は配列番号６２、６３および６４に示す）。一方、存在する場合には、Ｌ１のヒンジ部分は結合ユニット１と直接相互に連結し（たとえば、結合ユニット１の一部と隣接し）、リンカー部分は結合ユニット２と直接相互に連結する（たとえば、結合ユニット２の一部と隣接する）点に留意されたい。この構造のため、Ｌ１は上方ヒンジ／リンカーともいう。さらに例を挙げると、図５Ａ～５ＣはＬ２のヒンジ部分の相対位置を示す。Ｌ２はリンカー部分をさらに含んでもよいが、その配列は図５Ａ、５Ｂまたは５Ｃに示していない。一方、存在する場合には、Ｌ２のヒンジ部分はＦｃドメインと直接相互に連結し（たとえば、Ｆｃドメインの一部と隣接し）、リンカー部分は結合ユニット２と直接相互に連結する（たとえば、結合ユニット２の一部と隣接する）点に留意されたい。この構造のため、Ｌ２はリンカー／下方ヒンジともいう。

【００４６】

本明細書ではｂｉＭａｂ「コア」ともいうｂｉＭａｂ型全体について記載してきた。本開示のｂｉＭａｂの様々な部分および例示的な機能特性について、下記により詳細に記載する。本開示は、分子の各部分または分子の機能的特徴を記載する態様など、上記または下記に開示される態様のいずれかの組み合わせを含むｂｉＭａｂ意図している。

【００４７】

１．　結合ユニット

本開示のｂｉＭａｂは、少なくとも２つの結合ユニット（結合ユニット１および結合ユニット２）を含む。ある態様では各結合ユニットは、同じ標的分子上にある異なるエピトープあるいは異なる標的上のエピトープを問わず、異なるエピトープに結合する。ｂｉＭａｂの結合ユニットは各々対として存在する（２つの結合ユニット１および２つの結合ユ

ニット２が存在する）ため、ｂｉＭａｂは各エピトープに対して二価の結合を示す。本明細書の教示から、各結合ユニットが同じエピトープに結合する場合、ｂｉＭａｂはエピトープに対して四価の結合を示すことが理解されよう。

【００４８】

ある態様では、第１の結合ユニットはＦａｂフラグメント、たとえば、通常のモノクローナル抗体のＦａｂフラグメント、または可変軽鎖（ＶＬ１）、定常軽鎖（ＣＬ１）、可変重鎖（ＶＨ１）および定常重鎖部分（ＣＨ１）を含む組換え技術によって作製された抗原結合フラグメントである。任意に、Ｆａｂの軽鎖および重鎖は、１つまたは複数のジスルフィド結合を介して相互に連結されていてもよい。Ｆａｂは、第１のエピトープに結合する。

【００４９】

ある態様では、Ｆａｂは、通常のモノクローナル抗体、たとえば通常のマウス抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体の配列に由来するまたは基づく。ある態様では、通常のモノクローナル抗体の配列に由来するまたは基づくＦａｂを含むｂｉＭａｂは、通常の抗体の１つまたは複数の機能活性を保持する（たとえば、機能活性の少なくとも８０％以上（８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、９９％または１００％））を保持する。たとえば、ある態様では、こうしたＦａｂを含むｂｉＭａｂは、通常の抗体の抗原に対する親和性、阻害活性または細胞殺傷活性の１つまたは複数を保持する。

【００５０】

ある態様では、Ｆａｂは上皮増殖因子受容体（ＥＧＦＲ）に結合する。ある態様では、ＦａｂはＩＧＦＲ１に結合する。ある態様では、ＦａｂはＶＥＧＦに結合する。ある態様では、ＦａｂはＡｎｇ２に結合する。ある態様では、ＦａｂはＥＧＦＲ、ＩＧＦＲ１、ＶＥＧＦ、Ａｎｇ２、ＰｓｌまたはＰｃｒＶのいずれかに結合する通常のモノクローナル抗体の配列に由来するまたは基づく。例示的な通常のモノクローナル抗体として、パニツムマブ、ダロツズマブ、ベバシズマブ、ＬＣ０６、Ｗ４－ＲＡＤまたはＶ２Ｌ２が挙げられる。たとえば、ある態様では、本開示のｂｉＭａｂは結合ユニット１としてＦａｂを含み、このＦａｂは、パニツムマブ、ダロツズマブ、ベバシズマブまたはＬＣ０６の１つ、２つ、３つ、４つ、５つまたは全６つのＣＤＲを含む。

【００５１】

ある態様では、Ｆａｂは、配列番号２０、２９および４２のいずれかに記載のアミノ酸配列を含む軽鎖部分（ＶＬ１およびＣＬ）を含む。ある態様では、Ｆａｂは、配列番号２３、３２および４５のいずれかに記載の、図６Ｃ、７Ｃまたは８Ｃに下線で示したアミノ酸配列を含む重鎖部分（ＶＨ１およびC_H1）を含む。ある態様では、Ｆａｂは、配列番号２１に記載のアミノ酸配列を含む可変軽鎖部分（ＶＬ１）、および配列番号２４に記載のアミノ酸配列を含む可変重鎖部分（ＶＨ１）を含む。ある態様では、Ｆａｂは、配列番号３０に記載のアミノ酸配列を含む可変軽鎖部分（ＶＬ１）、および配列番号３３に記載のアミノ酸配列を含む可変重鎖部分（ＶＨ１）を含む。ある態様では、Ｆａｂは、配列番号４３に記載のアミノ酸配列を含む可変軽鎖部分（ＶＬ１）、および配列番号４６に記載のアミノ酸配列を含む可変重鎖部分（ＶＨ１）を含む。ある態様では、Ｆａｂは、軽鎖部分（ＶＬ１およびＣＬ）をコードするヌクレオチド配列、および重鎖部分（ＶＨ１およびＣＨ１）をコードするヌクレオチド配列、たとえば、配列番号１９　２８、４１に記載の核酸配列を含むヌクレオチド配列、および配列番号２２、２９または４４に記載の、図６Ａ、７Ａまたは８Ａに下線で示した核酸配列を含むヌクレオチド配列によりコードされる。

【００５２】

ある態様では、本開示のｂｉＭａｂは結合ユニット２を含み、結合ユニット２は第２のエピトープに結合する結合ドメインを含む。本開示による結合ドメイン（「ＢＤ」ともいう）として、たとえば、抗体可変領域、抗体フラグメント、ｓｃＦｖ、一本鎖ダイアボディまたは当該技術分野において公知の他の結合ドメインがある。結合ドメインとしてさらに、二重特異性一本鎖ダイアボディ、または２つの異なるエピトープに結合するように設

計された一本鎖ダイアボディが挙げられる。さらに、抗体様分子または抗体模倣体として、たとえば、以下に限定されるものではないが、エピトープに特異的に結合するミニボディ、マキシボディ（ｍａｘｙｂｏｄｙ）、「Ａ」ドメインオリゴマー（アビマーとも呼ばれる）（たとえば、各々援用する米国特許出願公開第２００５／０１６４３０１号明細書、同第２００５／００４８５１２号明細書および同第２００４／０１７５７６号明細書を参照）、Ｆｎ３を用いたタンパク質スキャフォールド（たとえば、援用する米国特許出願公開第２００３／０１７０７５３号明細書を参照）、アンクリンリピート（ＤＡＲＰｉｎとも呼ばれる）、ＶＡＳＰポリペプチド、トリ膵ポリペプチド（ａＰＰ）、テトラネクチン（ＣＴＬＤ３に基づく）、アフィリリン（γＢ－クリスタリン／ユビキチンに基づく）、ノッチン（Ｋｎｏｔｔｉｎ）、ＳＨ３ドメイン、ＰＤＺドメイン、テンダミスタット、ネオカルチノスタチン、プロテインＡドメイン、リポカリン、トランスフェリンおよびＫｕｎｉｔｚドメインが挙げられる。一態様では、本開示の多重特異性エピトープ結合ドメインの構築に有用なエピトープ結合ドメインは、あらゆる目的において本明細書に援用する国際公開第２００９／０５８３７９号パンフレットおよび国際公開第２０１１／１３０３２４号パンフレットに例示される。

【００５３】

さらにある態様では、ＢＤは、受容体のリガンド結合ドメインまたはリガンドの受容体結合ドメインを含む。たとえば、ＢＤは、ＦＧＦＲに結合するＦＧＦ部分、ＥＧＦＲに結合するＥＧＦ部分、ＰＤＧＦＲに結合するＰＤＧＦおよび同種のものを含む。あるいは、ＢＤは、ＦＧＦに結合するＦＧＦＲ部分、ＥＧＦに結合するＥＧＦＲ部分、ＰＤＧＦに結合するＰＤＧＦＲおよび同種のものを含んでもよい。多くのリガンド／受容体対のそれぞれの結合ドメインは当該技術分野において周知であり、したがって容易に選択してｂｉＭａｂ型の使用に適合させることができる。

【００５４】

ある態様では、結合ドメインはｓｃＦｖである。したがって、ある態様では、結合ユニット２はｓｃＦｖを含む。ｓｃＦｖは、フレキシブルなポリペプチドリンカーを介して可変軽鎖ドメイン（ＶＬ）に結合した可変重鎖ドメイン（ＶＨ）を含むポリペプチド鎖を包含することが理解されよう。図１は、ＢＤ（ここでは結合ユニット２と表示）がｓｃＦｖであり、そのドメインをＶＬ２およびＶＨ２で示す例示的ｂｉＭａｂの模式図を示す。いくつかの態様では、ＶＨ２とＶＬ２との間のポリペプチドリンカーはプロテアーゼ切断部位を含む。図２９は、ｓｃＦｖ結合ドメインのポリペプチドリンカーのプロテアーゼ切断前および後の代表的なｂｉＭａｂ「コア」を含む模式図を示す。

【００５５】

ｓｃＦｖのＶＨドメインおよびＶＬドメインは同じ抗体に由来しても、あるいは異なる抗体に由来してもよい。いくつかの態様では、ｓｃＦｖのＶＨまたはＶＬは目的の標的に結合する１つまたは複数のＣＤＲを含んでもよく、ＶＨドメインまたはＶＬドメインの残りは、異なる抗体に由来するまたは合成ドメインである。いくつかの態様では、ｓｃＦｖは、抗体、たとえば、目的の標的に結合する当該技術分野において公知の抗体の少なくとも１つのＣＤＲを含む。いくつかの態様では、ｓｃＦｖは、ある抗体の少なくとも２つのＣＤＲを含む。いくつかの態様では、ｓｃＦｖは、ある抗体の少なくとも３つのＣＤＲを含む。いくつかの態様では、ｓｃＦｖは、ある抗体の少なくとも４つのＣＤＲを含む。いくつかの態様では、ｓｃＦｖは、ある抗体の少なくとも５つのＣＤＲを含む。いくつかの態様では、ｓｃＦｖは、ある抗体の少なくとも６つのＣＤＲを含む。

【００５６】

いくつかの方法を単独あるいは組み合わせて用いて、ｓｃＦｖ分子を含むｂｉＭａｂの安定性を高めてもよい。単独あるいは本明細書に記載の１つまたは複数の他の方法と組み合わせて使用できると考えられる１つの方法は、ｓｃＦｖ部分を安定化させるようにｓｃＦｖドメインを連結するリンカーの長さおよび／または組成を操作することによる。

【００５７】

単独あるいは本明細書に記載の他の方法１つまたは複数を組み合わせて使用できると考

えられる別の方法は、ジスルフィド結合の形成を促進するようにｓｃＦｖのＶＨドメインおよび／またはＶＬドメインに少なくとも２つのアミノ酸置換（修飾または突然変異ともいう）を導入することによる（たとえばＢｒｉｎｋｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，１９９３，ＰＮＡＳ，９０：７５３８－４２；Ｚｈｕ ｅｔ ａｌ．，１９９７，Ｐｒｏｔ．Ｓｃｉ．６：７８１－８；Ｒｅｉｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９９４，Ｂｉｏｃｈｅｍ．３３：５４５１－９；Ｒｅｉｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９９６，Ｎａｔｕｒｅ １４：１２３９－４５；Ｌｕｏ ｅｔ ａｌ．，１９９５，Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１１８：８２５－３１；Ｙｏｕｎｇ ｅｔ ａｌ．，１９９５，ＦＥＢＳ Ｌｅｔ．３７７：１３５－９；Ｇｌｏｃｋｓｈｕｂｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９９０，Ｂｉｏｃｈｅｍ．２９：１３６２－７を参照）。

【００５８】

ある態様では、ｓｃＦｖのＶＨドメインおよびＶＬドメインに１つの突然変異を導入して、ｓｃＦｖを含むｂｉＭａｂの発現時にＶＨドメインとＶＬドメインとの間の鎖間ジスルフィド結合の形成を促進する。別の態様では、鎖の同じドメインに２つの突然変異を導入する。ある態様では、異なる鎖に２つの突然変異を導入する。ある態様では、２つの突然変異の複数対を導入して、複数のジスルフィド結合の形成を促進する。ある態様では、システインを導入してジスルフィド結合の形成を促進する。システインに変異させてもよい例示的アミノ酸として、ＶＨ２のアミノ酸４３、４４、４５、４６、４７、１０３、１０４、１０５および１０６、ならびにＶＬ２のアミノ酸４２、４３、４４、４５、４６、９８、９９、１００および１０１が挙げられる。前述の番号付けは、ｓｃＦｖのＶＨ２およびＶＬ２のみに対する（ｂｉＭａｂの全長配列または本明細書に提供する配列番号のアミノ酸の位置に対するものではない）位置を特定するＫａｂａｔの番号付けに基づく。システイン残基に変異させてもよいアミノ酸位置の例示的組み合わせとして、ＶＨ４４－ＶＬ１００、ＶＨ１０５－ＶＬ４３、ＶＨ１０５－ＶＬ４２、ＶＨ４４－ＶＬ１０１、ＶＨ１０６－ＶＬ４３、ＶＨ１０４－ＶＬ４３、ＶＨ４４－ＶＬ９９、ＶＨ４５－ＶＬ９８、ＶＨ４６－ＶＬ９８、ＶＨ１０３－ＶＬ４３、ＶＨ１０３－ＶＬ４４およびＶＨ１０３－ＶＬ４５が挙げられる。いくつかの態様では、ＶＨのアミノ酸４４およびＶＬのアミノ酸１００をシステインに変異させる。

【００５９】

単独あるいは本明細書に記載の１つまたは複数の他の方法と組み合わせて使用してもよいとさらに考えられる方法は、ｓｃＦｖの順序を選択することである。ある態様では、ＶＬドメインに対するＶＨドメインの配向を安定性のために最適化する。ある態様では、ｓｃＦｖは、ＶＨ－リンカー－ＶＬの配向である。ある態様では、ｓｃＦｖは、ＶＬ－リンカー－ＶＨの配向である。また、ｓｃＦｖのドメインの配向は、ｓｃＦｖがｂｉＭａｂのＦａｂ部分およびＦｃ部分とどのように相互に結合するかを決定する。これは、ポリペプチドリンカーの文脈で以下により詳細に記載する。ただし、簡単に説明すると、ＢＤ、たとえばｓｃＦＶがポリペプチドリンカー（Ｌ１）によりＦａｂと相互に連結され、Ｆｃとポリペプチドリンカー（Ｌ２）により相互に連結されることから、ドメインの順序は、ｓｃＦｖのどの部分がＬ１と相互に連結され、ｓｃＦｖのどの部分がＬ２と相互に連結されるかを決定する。

【００６０】

単独あるいは１つまたは複数の本明細書に記載の方法と組み合わせて使用してもよい別の方法は、ｓｃＦｖの１つまたは複数の表面残基を変異させて１つまたは複数の安定化突然変異を導入することによる。いくつかの態様では、ｓｃＦｖのＶＨドメインおよび／またはＶＬドメインの一方または両方の１、２、３、４、５、６または６を超える残基を変異させる。ある態様では、ｓｃＦｖのＶＨドメインのみの変更を行う。ある態様では、ｓｃＦｖのＶＬドメインのみの変更を行う。ある態様では、ｓｃＦｖのＶＨドメインおよびＶＬドメインの両方の変更を行う。各ドメインに同じ数の変更を行っても、あるいは各ドメインに異なる数の変更を行ってもよい。ある態様では、１つまたは複数の変更は、未修飾の親ｓｃＦｖに存在する残基の保存的アミノ酸置換である。他の態様では、１つまたは

複数の変更は、未修飾の親ｓｃＦｖに存在する残基の非保存的アミノ酸置換である。ｓｃＦｖのＶＨドメインまたはＶＬドメインの一方あるいは両方に複数の置換を行う場合、置換は各々独立に保存的置換または非保存的置換である。ある態様では、置換はすべて保存的置換である。ある態様では、置換はすべて非保存的である。ある態様では、置換の少なくとも１つは保存的である。ある態様では、少なくとも１つまたは置換は非保存的である。

【００６１】

単独あるいは１つまたは複数の本明細書に記載の他の方法と組み合わせて使用してもよいさらに別の方法は、ｓｃＦｖのＶＨドメインおよび／またはＶＬドメインの１つまたは複数の残基を変異させて１つまたは複数の置換を導入して、既知の抗体のＶＨドメインおよび／またはＶＬドメインのコンセンサス配列の前記特定位置で最も頻度の高い残基にマッチさせることによる。ある態様では、ｓｃＦｖのＶＨドメインおよび／またはＶＬドメインの一方または両方に１、２、３、４、５、６または６を超える位置で置換を導入する。各ドメインに同じ数の変更を行ってもよいし、あるいは各ドメインに異なる数の変更を行ってもよい。ある態様では、あるコンセンサス配列にマッチさせる配列の１つまたは複数の変更は、未修飾のＶＨ配列および／またはＶＬ配列に存在する残基の保存的アミノ酸置換である。他の態様では、１つまたは複数の変更は、未修飾のＶＨ配列および／またはＶＬ配列に存在する残基の非保存的アミノ酸置換である。ｓｃＦｖのＶＨドメインまたはＶＬドメインの一方あるいは両方に複数の置換を行う場合、置換は各々独立に保存的置換または非保存的置換である。ある態様では、置換はすべて保存的置換である。ある態様では、置換はすべて非保存的置換である。ある態様では、置換の少なくとも１つは保存的である。ある態様では、少なくとも１つまたは置換は非保存的である。

【００６２】

ｓｃＦｖ部分の修飾または安定化に有用であると記載された修飾のいずれも、Ｆａｂ部分の修飾に適用できることに留意されたい。たとえば、ｂｉＭａｂのＦａｂ部分の可変ドメインを修飾して、安定性、抗原結合および同種のものを向上させることができる。さらに、Ｆａｂ部分あるいはｓｃＦｖ部分を修飾して免疫原性を低下させることもできる。

【００６３】

ある態様では、結合ユニット２（ＢＤ）は、ｓｃＦｖ、たとえば、グリシン－セリンリンカーなどのフレキシブルリンカーにより相互に連結された可変軽鎖（ＶＬ２）および可変重鎖（ＶＨ２）を含む通常のモノクローナル抗体に由来するｓｃＦｖである。任意に、ｓｃＦｖの可変軽鎖および可変重鎖は、１つもしくは複数のジスルフィド結合を介してさらに相互に連結されていてもよく、上記のように、１つもしくは複数の突然変異または変更を含んでいてもよい。ｓｃＦｖは、第２のエピトープに結合する。ある態様では、第２のエピトープは、結合ユニット１が結合する第１のエピトープと異なる。他の態様では、第２のエピトープは、結合ユニット１が結合する第１のエピトープと同じである。ある態様では、ｓｃＦｖは、通常のマウス抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体など通常のモノクローナル抗体の配列に由来するまたは基づく。ある態様では、通常のモノクローナル抗体の配列に由来するまたは基づくｓｃＦｖを含むｂｉＭａｂは、通常の抗体の１つまたは複数の機能活性を保持する（たとえば、機能活性の少なくとも８０％以上（８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、９９％または１００％）を保持する）。たとえば、ある態様では、こうしたｓｃＦｖを含むｂｉＭａｂは、通常の抗体の抗原に対する親和性、阻害活性または細胞殺傷活性の１つまたは複数を保持する。

【００６４】

ある態様では、ｓｃＦｖは上皮増殖因子受容体（ＥＧＦＲ）に結合する。ある態様では、ｓｃＦｖはＩＧＦＲ１に結合する。ある態様では、ｓｃＦｖはＶＥＧＦに結合する。ある態様では、ｓｃＦｖはＡｎｇ２に結合する。ある態様では、ｓｃＦｖは、ＥＧＦＲ、ＩＧＦＲ１、ＶＥＧＦ、Ａｎｇ２、ＰｓｌまたはＰｃｒＶのいずれかに結合する通常のモノクローナル抗体の配列に由来するまたは基づく。例示的な通常のモノクローナル抗体として、パニツムマブ、ダロツズマブ、ベバシズマブまたはＬＣ０６が挙げられる。たとえば

、ある態様では、本開示のｂｉＭａｂは結合ユニット２としてｓｃＦｖを含み、このｓｃＦｖは、パニツムマブ、ダロツズマブ、ベバシズマブまたはＬＣ０６の１つ、２つ、３つ、４つ、５つまたは全６つのＣＤＲを含む。

【００６５】

ある態様では、ｓｃＦｖは、配列番号２６、３５および４８のいずれかに記載されたアミノ酸配列を含む可変軽鎖部分（ＶＬ２）を含む。ある態様では、ｓｃＦｖは、配列番号２７、３６、４９のいずれかに記載されたアミノ酸配列を含む可変重鎖部分（ＶＨ２）を含む。ある態様では、ｓｃＦｖは、配列番号２５、３４および４７のいずれかに記載されたアミノ酸配列を含む。図６Ｂ、６Ｃ、７Ｂ、７Ｃ、８Ｂおよび８Ｃを参照されたい。

【００６６】

本開示は、ある態様では、本開示のｂｉＭａｂが、本明細書に記載の結合ユニット１および結合ユニット２の任意の組み合わせを含め、本明細書に記載の結合ユニット１および結合ユニット２のいずれかを含むことを意図している。たとえば、ある態様では、本開示は、特定の標的に結合する（たとえば、特定の標的上のエピトープに結合する）Ｆａｂ、たとえば特定のアミノ酸配列を含むまたは特定のヌクレオチド配列によりコードされたＦａｂ、および／または、特定の標的に結合する（たとえば、特定の標的上のエピトープに結合する）ｓｃＦｖ、たとえば特定のアミノ酸配列を含むまたは特定のヌクレオチド配列によりコードされたｓｃＦｖを含むポリペプチドを提供する。

【００６７】

上記に詳述したように、結合ユニット１および結合ユニット２は、リンカーポリペプチド１（Ｌ１；上方ヒンジ／リンカーともいう）を介して相互に連結される。一般に、この結合は、相互の連結が結合ユニット１の重鎖C_H1ドメイン（ＶＨ１、たとえばＦａｂのＶＨ１）および結合ユニット２部分を介する（たとえば、結合ユニット２がｓｃＦｖである場合、相互の連結はｓｃＦｖのＶＨ２またはＶＬ２を介する）ように、ｂｉＭａｂのキメラ重鎖を介するものである。Ｌ１は長さおよび配列が異なってもよく、例示的なＬ１構造を本明細書に記載する。本開示は、所望の標的に結合する特異的結合ユニットと本明細書に記載の特定のＬ１およびＬ２ポリペプチドリンカーとの任意の組み合わせなど結合ユニットとリンカーポリペプチドとの任意の組み合わせを含むｂｉＭａｂを意図している。

【００６８】

２．　Ｆｃ領域

本明細書で使用する場合、「Ｆｃ領域」は定常領域のフラグメント、アナログ、変異体、ミュータントまたは誘導体を含む、免疫グロブリン、好ましくはヒト免疫グロブリンの定常領域に由来するドメインを包含する。好適な免疫グロブリンとして、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４および他のクラス、たとえばＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥおよびＩｇＭが挙げられる。Ｆｃ領域は、天然配列のＦｃ領域でも、あるいは改変したＦｃ領域でもよい。免疫グロブリンのＦｃ領域は一般に２つの定常ドメイン、C_H2ドメインおよびC_H3ドメインを含み、任意にC_H4ドメインを含む。本開示のｂｉＭａｂは、C_H2ドメインおよびC_H3ドメインを含むＦｃ領域を含む。ある態様では、本開示のｂｉＭａｂは、Ｌ１もしくはＬ２の一方または両方のヒンジ部分と同じクラスのＦｃドメインを含む。

【００６９】

ａ．　改変Ｆｃ領域

本開示のｂｉＭａｂのエフェクター機能および／または半減期を変化させるため、改変Ｆｃ領域（本明細書では「変異Ｆｃ領域」ともいう）を使用してもよい。Ｆｃ領域では、分子の機能特性および／または薬物動態特性を変化させるため、１つまたは複数の改変を行ってもよい。こうした改変の結果、ＩｇＧのＣ１ｑ結合および補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）、またはＦｃγＲ結合および抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）、または抗体依存性貪食作用（ＡＤＣＰ）が低下または増強される。本開示は、機能を増強または減弱するあるいは所望のエフェクター機能を与えることによりエフェクター機能を微調整するための変更を行ったｂｉＭａｂを包含する。したがって、本開示の一態様では、ｂｉＭａｂは変

異Ｆｃ領域（すなわち、下記で考察される改変を行ったＦｃ領域）を含む。本明細書では変異Ｆｃ領域を含むｂｉＭａｂを「Ｆｃ変異ｂｉＭａｂ」ともいう。本明細書で使用する場合、「天然の」とは未修飾の親配列をいい、本明細書では天然のＦｃ領域を含むｂｉＭａｂを「天然のＦｃ　ｂｉＭａｂ」という。Ｆｃ変異ｂｉＭａｂは、当業者によく知られている多くの方法により作製することができる。非限定的な例として、抗体コード領域の単離（たとえば、ハイブリドーマから）およびＦｃ領域における１つまたは複数の所望の置換の実施が挙げられる。あるいは、ｂｉＭａｂの抗原結合部分（たとえば、可変領域）を、変異Ｆｃ領域をコードするベクターにサブクローニングしてもよい。一態様では、変異Ｆｃ領域は、天然のＦｃ領域と比較してエフェクター機能を誘導するレベルが同等である。別の態様では、変異Ｆｃ領域は、天然のＦｃと比較してエフェクター機能の誘導が高くなる。別の態様では、変異Ｆｃ領域は、天然のＦｃと比較してエフェクター機能の誘導が低くなる。変異Ｆｃ領域のいくつかの具体的な態様を以下に詳述する。エフェクター機能を測定する方法は、当該技術分野において周知である。

【００７０】

一般に、エフェクター機能は、以下に限定されるものではないが、アミノ酸置換、アミノ酸付加、アミノ酸欠失、およびＦｃアミノ酸の翻訳後修飾（たとえばグリコシル化）における変更などＦｃ領域の変更により修飾する。下記に記載される方法を用いて、本開示のｂｉＭａｂのエフェクター機能、ＦｃＲに対するＦｃ領域の結合性の割合（たとえば、親和性および特異性）を微調整して、所望の特性を持つｂｉＭａｂを得てもよい。

【００７１】

本明細書で使用するＦｃ領域は、第１の定常領域の免疫グロブリンドメインを除く、抗体分子の定常領域を含むポリペプチドを含むことが理解されよう。このためＦｃとは、ＩｇＡ、ＩｇＤおよびＩｇＧの最後の２つの定常領域の免疫グロブリンドメインと、ＩｇＥおよびＩｇＭの最後の３つの定常領域の免疫グロブリンドメインと、任意に、これらのドメインのフレキシブルなヒンジのＮ末端の全部または一部とをいう。ＩｇＡおよびＩｇＭの場合、ＦｃはＪ鎖を含んでいてもよい。ＩｇＧの場合、Ｆｃは免疫グロブリンドメインＣガンマ２およびＣガンマ３（Ｃγ２およびＣγ３）、および任意にＣガンマ１（Ｃγ１）とＣガンマ２（Ｃγ２）との間の下方ヒンジ部分を含む。Ｆｃ領域の境界は異なってもよいが、本明細書で使用する場合、ヒトＩｇＧ重鎖のＦｃ領域は残基Ａ２３１からそのカルボキシル末端までを含み、番号付けはＫａｂａｔに記載されたＥＵインデックスに従う。Ｆｃとは、単離されたこの領域をいっても、あるいは抗体、抗体フラグメントまたはＦｃ融合タンパク質の文脈におけるこの領域をいってもよい。多くの異なるＦｃ位置、以下に限定されるものではないが、ＥＵインデックスにより番号付けされたＩｇＧ１の２７０位、２７２位、３１２位、３１５位、３５６位および３５８位で多型が観察されており、したがって本配列と従来技術の配列との間に若干の相違が存在してもよい。

【００７２】

一態様では、本開示は、天然のＦｃ　ｂｉＭａｂと比較してＦｃリガンド（たとえば、Ｆｃ受容体、Ｃ１ｑ）に対する結合性が改変されたＦｃ変異ｂｉＭａｂを包含する。結合性の例として、結合特異性、平衡解離定数（K_d）、解離速度および結合速度（それぞれk_{off}およびk_{on}）、結合親和性ならびに／またはアビディティーがあるが、これに限定されるものではない。平衡解離定数（K_d）がk_{off}／k_{on}と定義されることは、当該技術分野において公知である。ある態様では、低K_dを有するＦｃ変異領域を含むｂｉＭａｂが、高K_dを有するｂｉＭａｂより望ましいことがある。しかしながら、場合によってはk_{on}またはk_{off}の値の方がK_dの値より重要であることもある。当業者であれば、個々の用途にどの速度論的パラメーターが最も重要であるかを判定することができる。たとえば、１つまたは複数のポジティブレギュレーター（たとえば、ＦｃγＲＩＩＡ）に対する結合を低下させる、および／または、抑制性Ｆｃ受容体（たとえば、ＦｃγＲＩＩＢ）に対する結合を増強する修飾は、ＡＤＣＣ活性を低下させるのに好適であると考えられる。したがって、様々な受容体に対する結合親和性の比率（たとえば、平衡解離定数（K_d）の比率）から、本開示のＦｃ変異ｂｉＭａｂのＡＤＣＣ活性が増強また

は低下されるかどうかが示され得る。加えて、Ｃ１ｑに対する結合を低下させる修飾も、ＣＤＣ活性を低下または除去するに好適であると考えられる。

【００７３】

一態様では、１つまたは複数のＦｃ受容体、以下に限定されるものではないが、ＦｃＲｎ、ＦｃγＲＩ（ＣＤ６４）（アイソフォームＦｃγＲＩＡ、ＦｃγＲＩＢおよびＦｃγＲＩＣを含む）；ＦｃγＲＩＩ（ＣＤ３２、たとえばアイソフォームＦｃγＲＩＩＡ、ＦｃγＲＩＩＢおよびＦｃγＲＩＩＣ）；およびＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６、たとえばアイソフォームＦｃγＲＩＩＩＡおよびＦｃγＲＩＩＩＢ）に対する結合親和性が、Ｆｃ変異ｂｉＭａｂは天然のＦｃ　ｂｉＭａｂと比較して改変される。

【００７４】

ある態様では、Ｆｃ変異ｂｉＭａｂはＦｃリガンドに対する親和性を高めてある。他の態様では、Ｆｃ変異ｂｉＭａｂは、天然のＦｃ　ｂｉＭａｂと比較してＦｃリガンドに対する親和性を低下させてある。

【００７５】

特定の態様では、Ｆｃ変異ｂｉＭａｂはＦｃ受容体ＦｃγＲＩＩＩＡに対する結合を増強させてある。別の特定の態様では、Ｆｃ変異ｂｉＭａｂはＦｃ受容体ＦｃγＲＩＩＢに対する結合を増強させてある。さらなる特定の態様では、Ｆｃ変異ｂｉＭａｂはＦｃ受容体ＦｃγＲＩＩＩＡとＦｃγＲＩＩＢとの両方に対する結合を増強させてある。ある態様では、ＦｃγＲＩＩＩＡに対する結合を増強させたＦｃ変異ｂｉＭａｂは、天然のＦｃ　ｂｉＭａｂと比較してＦｃγＲＩＩＢ受容体に対する結合を同時に高めていない。特定の態様では、Ｆｃ変異ｂｉＭａｂはＦｃ受容体ＦｃγＲＩＩＩＡに対する結合を低下させてある。さらなる特定の態様では、Ｆｃ変異ｂｉＭａｂはＦｃ受容体ＦｃγＲＩＩＢに対する結合を低下させてある。別の特定の態様では、Ｆｃ変異ｂｉＭａｂはＦｃ受容体ＦｃＲｎに対する結合を増強させてある。なお別の特定の態様では、ＦｃγＲＩＩＩＡおよび／またはＦｃγＲＩＩＢに対する親和性が改変されたＦｃ変異ｂｉＭａｂは、Ｆｃ受容体ＦｃＲｎに対する結合を増強させてある。なお別の特定の態様では、ＦｃγＲＩＩＩＡおよび／またはＦｃγＲＩＩＢに対する親和性が改変されたＦｃ変異ｂｉＭａｂは、天然のＦｃ　ｂｉＭａｂと比較してＣ１ｑに対する結合を改変してある。

【００７６】

別の態様では、Ｆｃ変異ｂｉＭａｂは、天然のＦｃ　ｂｉＭａｂと比較してＣ１ｑに対する親和性を増加または低下させる。なお別の特定の態様では、Ｃ１ｑに対する親和性が改変されたＦｃ変異ｂｉＭａｂは、Ｆｃ受容体ＦｃＲｎに対する結合を増強させてある。なお別の特定の態様では、Ｃ１ｑに対する親和性が改変されたＦｃ変異ｂｉＭａｂは、天然のＦｃ　ｂｉＭａｂと比較してＦｃγＲＩＩＩＡおよび／またはＦｃγＲＩＩＢに対する結合を改変させてある。

【００７７】

抗体が当該技術分野において抗体エフェクター機能と総称される複数のプロセスにより標的抗原の攻撃および破壊を誘導することができることは、当該技術分野において周知である。これらのプロセスの１つは、「抗体依存性細胞性細胞傷害」または「ＡＤＣＣ」と呼ばれ、分泌型Ｉｇが特定の細胞傷害性細胞（たとえば、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、好中球およびマクロファージ）上に存在するＦｃγ受容体（ＦｃγＲ）に結合すると、これらの細胞傷害性エフェクター細胞が抗原を持つ標的細胞に特異的に結合し、その後細胞毒で標的細胞を殺傷することができるようになる細胞毒性の形態をいう。標的細胞の表面に対して特異的な高親和性ＩｇＧ抗体は細胞傷害性細胞を「武装」させるものであり、こうした殺傷に必須である。標的細胞の溶解は細胞外で行われ、細胞間の直接的な接触を必要とするが、補体を必要としない。エフェクター機能という用語により包含されるもう１つのプロセスは、補体依存性細胞傷害（以下「ＣＤＣ」という）であり、これは、抗体を介して補体系により標的細胞を破壊する生化学的現象をいう。補体系は、抗体と組み合わさって病原菌および他の外来細胞を破壊する、通常の血漿で見られる複雑なタンパク質の系である。エフェクター機能という用語に包含されるさらに別のプロセスは抗体依存性

貪食作用（ＡＤＣＰ）であり、これは、１つまたは複数のエフェクターリガンドを発現する非特異的な細胞傷害性細胞が、標的細胞上に結合した抗体を認識し、その後標的細胞の貪食作用を引き起こす細胞性反応をいう。

【００７８】

Ｆｃ変異ｂｉＭａｂは、１つまたは複数のＦｃγＲを介したエフェクター細胞の機能に関するインビトロ機能アッセイにより特徴付けられることを意図している。ある態様では、Ｆｃ変異ｂｉＭａｂは、インビボモデルにおいてインビトロ系アッセイと同様の結合性およびエフェクター細胞機能（本明細書に記載および開示されたものなど）を有する。しかしながら、本開示は、インビトロ系アッセイで所望の表現型を示さないが、インビボでは所望の表現型を示すＦｃ変異ｂｉＭａｂを除外するものではない。

【００７９】

Ｆｃ領域を含むタンパク質の血清中半減期は、ＦｃＲｎに対するＦｃ領域の結合親和性を高めることにより延長することができる。「抗体半減期」という用語は、本明細書で使用する場合、投与後の抗体分子の平均生存時間の指標である抗体の薬物動態特性を意味する。抗体半減期は、既知量の免疫グロブリンの５０パーセントを患者の体内（または他の哺乳動物）またはその特定のコンパートメントから除去するのに要する時間を、たとえば血清中で見て（すなわち、血中半減期）または他の組織で見て表すことができる。半減期は、免疫グロブリンまたは免疫グロブリンのクラスによって異なってもよい。一般に、抗体（またはｂｉＭａｂ）半減期を延長すると、投与されたｂｉＭａｂの循環血中の平均滞留時間（ＭＲＴ）が長くなる。

【００８０】

半減期を延長すると、患者に投与される薬剤量が減少するほか、投与頻度も低下し得る。ｂｉＭａｂの血清半減期を延長するには、たとえば米国特許第５，７３９，２７７号明細書に記載されているようなサルベージ受容体結合エピトープをｂｉＭａｂ（特に抗体フラグメント）に組み込んでもよい。本明細書で使用する場合、「サルベージ受容体結合エピトープ」という用語は、ＩｇＧ分子のインビボでの血清中半減期に関わる、ＩｇＧ分子（たとえばＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３またはＩｇＧ４）のＦｃ領域のエピトープをいう。あるいは、半減期の延長された本開示のｂｉＭａｂは、ＦｃとＦｃＲｎ受容体との間の相互作用に関与することが確認されたアミノ酸残基を修飾することにより作製してもよい（たとえば、米国特許第６，８２１，５０５号明細書および同第７，０８３，７８４号明細書；および国際公開第０９／０５８４９２号パンフレットを参照されたい）。さらに、本開示のｂｉＭａｂの半減期は、当該技術分野において広く利用される技術によりＰＥＧまたはアルブミンへのコンジュゲーションによって延長してもよい。

【００８１】

一態様では、本開示は、Ｆｃ領域がＫａｂａｔに記載されたＥＵインデックスにより番号付けされた２２１、２２５、２２８、２３４、２３５、２３６、２３７、２３８、２３９、２４０、２４１、２４３、２４４、２４５、２４７、２５０、２５１、２５２、２５４、２５５、２５６、２５７、２６２、２６３、２６４、２６５、２６６、２６７、２６８、２６９、２７９、２８０、２８４、２９２、２９６、２９７、２９８、２９９、３０５、３０８、３１３、３１６、３１８、３２０、３２２、３２５、３２６、３２７、３２８、３２９、３３０、３３１、３３２、３３３、３３４、３３９、３４１、３４３、３７０、３７３、３７８、３９２、４１６、４１９、４２１、４２８、４３３、４３４、４３５、４３６、４４０および４４３からなる群から選択される１つまたは複数の位置に修飾（たとえば、アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失）を含む、Ｆｃ変異体を提供する。任意に、Ｆｃ領域は、当業者に公知の追加および／または代わりの位置に修飾を含んでよい（たとえば、米国特許第５，６２４，８２１号明細書；同第６，２７７，３７５号明細書；同第６，７３７，０５６号明細書；同第７，０８３，７８４号明細書；同第７，３１７，０９１号明細書；同第７，２１７，７９７号明細書；同第７，２７６，５８５号明細書；同第７，３５５，００８号明細書；米国特許出願公開第２００２／０１４７３１１号明細書；同第２００４／０００２５８７号明細書；同第２００５／０２１５７６８号

明細書；同第２００７／０１３５６２０号明細書；同第２００７／０２２４１８８号明細書；同第２００８／００８９８９２号明細書；国際公開第９４／２９３５１号パンフレット；および国際公開第９９／５８５７２号パンフレットを参照されたい）。さらに、有用なアミノ酸位置および具体的な置換については、米国特許第６，７３７，０５６号明細書の表２および６～１０；米国特許出願公開第２００６／０２４２９８号明細書の図４１に示される表；米国特許出願公開第２００６／２３５２０８号明細書の図５、１２および１５に示される表；米国特許出願公開第２００６／０１７３１７０号明細書の図８、９および１０に示される表および国際公開第０９／０５８４９２号パンフレットの図８～１０、１３および１４に示される表に例示されている。

【００８２】

特定の態様では、本開示は、Ｆｃ領域がＫａｂａｔに記載されたＥＵインデックスにより番号付けされた２２１Ｋ、２２１Ｙ、２２５Ｅ、２２５Ｋ、２２５Ｗ、２２８Ｐ、２３４Ｄ、２３４Ｅ、２３４Ｎ、２３４Ｑ、２３４Ｔ、２３４Ｈ、２３４Ｙ、２３４Ｉ、２３４Ｖ、２３４Ｆ、２３５Ａ、２３５Ｄ、２３５Ｒ、２３５Ｗ、２３５Ｐ、２３５Ｓ、２３５Ｎ、２３５Ｑ、２３５Ｔ、２３５Ｈ、２３５Ｙ、２３５Ｉ、２３５Ｖ、２３５Ｅ、２３５Ｆ、２３６Ｅ、２３７Ｌ、２３７Ｍ、２３７Ｐ、２３９Ｄ、２３９Ｅ、２３９Ｎ、２３９Ｑ、２３９Ｆ、２３９Ｔ、２３９Ｈ、２３９Ｙ、２４０Ｉ、２４０Ａ、２４０Ｔ、２４０Ｍ、２４１Ｗ、２４１Ｌ、２４１Ｙ、２４１Ｅ、２４１Ｒ。２４３Ｗ、２４３Ｌ　２４３Ｙ、２４３Ｒ、２４３Ｑ、２４４Ｈ、２４５Ａ、２４７Ｌ、２４７Ｖ、２４７Ｇ、２５０Ｅ、２５０Ｑ、２５１Ｆ、２５２Ｌ、２５２Ｙ、２５４Ｓ、２５４Ｔ、２５５Ｌ、２５６Ｅ、２５６Ｆ、２５６Ｍ、２５７Ｃ、２５７Ｍ、２５７Ｎ、２６２Ｉ、２６２Ａ、２６２Ｔ、２６２Ｅ、２６３Ｉ、２６３Ａ、２６３Ｔ、２６３Ｍ、２６４Ｌ、２６４Ｉ、２６４Ｗ、２６４Ｔ、２６４Ｒ、２６４Ｆ、２６４Ｍ、２６４Ｙ、２６４Ｅ、２６５Ａ、２６５Ｇ、２６５Ｎ、２６５Ｑ、２６５Ｙ、２６５Ｆ、２６５Ｖ、２６５Ｉ、２６５Ｌ、２６５Ｈ、２６５Ｔ、２６６Ｉ、２６６Ａ、２６６Ｔ、２６６Ｍ、２６７Ｑ、２６７Ｌ、２６８Ｅ、２６９Ｈ、２６９Ｙ、２６９Ｆ、２６９Ｒ、２７０Ｅ、２８０Ａ、２８４Ｍ、２９２Ｐ、２９２Ｌ、２９６Ｅ、２９６Ｑ、２９６Ｄ、２９６Ｎ、２９６Ｓ、２９６Ｔ、２９６Ｌ、２９６Ｉ、２９６Ｈ、２９６Ｇ、２９７Ｓ、２９７Ｄ、２９７Ｅ、２９８Ａ、２９８Ｈ、２９８Ｉ、２９８Ｔ、２９８Ｆ、２９９Ｉ、２９９Ｌ、２９９Ａ、２９９Ｓ、２９９Ｖ、２９９Ｈ、２９９Ｆ、２９９Ｅ、３０５Ｉ、３０８Ｆ３１３Ｆ、３１６Ｄ、３１８Ａ、３１８Ｓ、３２０Ａ、３２０Ｓ、３２２Ａ、３２２Ｓ、３２５Ｑ、３２５Ｌ、３２５Ｉ、３２５Ｄ、３２５Ｅ、３２５Ａ、３２５Ｔ、３２５Ｖ、３２５Ｈ、３２６Ａ、３２６Ｄ、３２６Ｅ、３２６Ｇ、３２６Ｍ、３２６Ｖ、３２７Ｇ、３２７Ｗ、３２７Ｎ、３２７Ｌ、３２８Ｓ、３２８Ｍ、３２８Ｄ、３２８Ｅ、３２８Ｎ、３２８Ｑ、３２８Ｆ、３２８Ｉ、３２８Ｖ、３２８Ｔ、３２８Ｈ、３２８Ａ、３２９Ｆ、３２９Ｈ、３２９Ｑ、３３０Ｋ、３３０Ｇ、３３０Ｔ、３３０Ｃ、３３０Ｌ、３３０Ｙ、３３０Ｖ、３３０Ｉ、３３０Ｆ、３３０Ｒ、３３０Ｈ、３３１Ｇ、３３１Ａ、３３１Ｌ、３３１Ｍ、３３１Ｆ、３３１Ｗ、３３１Ｋ、３３１Ｑ、３３１Ｅ、３３１Ｓ、３３１Ｖ、３３１Ｉ、３３１Ｃ、３３１Ｙ、３３１Ｈ、３３１Ｒ、３３１Ｎ、３３１Ｄ、３３１Ｔ、３３２Ｄ、３３２Ｓ、３３２Ｗ、３３２Ｆ、３３２Ｅ、３３２Ｎ、３３２Ｑ、３３２Ｔ、３３２Ｈ、３３２Ｙ、３３２Ａ、３３３Ａ、３３３Ｄ、３３３Ｇ、３３３Ｑ、３３３Ｓ、３３３Ｖ、３３４Ａ、３３４Ｅ、３３４Ｈ、３３４Ｌ、３３４Ｍ、３３４Ｑ、３３４Ｖ、３３４Ｙ、３３９Ｔ、３７０Ｅ、３７０Ｎ、３７８Ｄ、３９２Ｔ、３９６Ｌ、４１６Ｇ、４１９Ｈ、４２１Ｋ、４２８Ｌ、４２８Ｆ、４３３Ｋ、４３３Ｌ、４３４Ａ、４２４Ｆ、４３４Ｗ、４３４Ｙ、４３６Ｈ、４４０Ｙおよび４４３Ｗからなる群から選択される少なくとも１つの置換を含む、Ｆｃ変異体を提供する。任意に、Ｆｃ領域は、当業者に公知の追加および／または代わりのアミノ酸置換、以下に限定されるものではないが、米国特許第６，７３７，０５６号明細書の表２および６～１０；米国特許出願公開第２００６／０２４２９８号明細書の図４１に示される表；米国特許出願公開第２００６／２３５２０８号明細書の図５、１２および１５に示される表；米国特許出願公開第２００６／０１７３１７０号明細書の図８、９お

よび１０に示される表および国際公開第０９／０５８４９２号パンフレットの図８、９および１０に示される表に例示されているものを含んでもよい。

【００８３】

特定の態様では、本開示は、Ｆｃ領域がＫａｂａｔに記載されたＥＵインデックスにより番号付けされた２２８、２３４、２３５および３３１からなる群から選択される１つまたは複数の位置に少なくとも１つの修飾（たとえば、アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失）を含む、Ｆｃ変異ｂｉＭａｂを提供する。２２８位を図２Ａの配列番号１０に下線で示し、２３４位、２３５位および３３１位を図２Ｃの配列番号１６に下線で示す。一態様では、修飾は、Ｋａｂａｔに記載されたＥＵインデックスにより番号付けされた２２８Ｐ、２３４Ｆ、２３５Ｅ、２３５Ｆ、２３５Ｙおよび３３１Ｓからなる群から選択される少なくとも１つの置換である。

【００８４】

別の特定の態様では、本開示は、Ｆｃ領域がＩｇＧ４のＦｃ領域であり、Ｋａｂａｔに記載されたＥＵインデックスにより番号付けされた２２８および２３５からなる群から選択される１つまたは複数の位置に少なくとも１つの修飾を含む、Ｆｃ変異ｂｉＭａｂを提供する。なお別の特定の態様では、Ｆｃ領域はＩｇＧ４のＦｃ領域であり、非天然のアミノ酸は、Ｋａｂａｔに記載されたＥＵインデックスにより番号付けされた２２８Ｐ、２３５Ｅおよび２３５Ｙからなる群から選択される。

【００８５】

別の特定の態様では、本開示は、Ｆｃ領域がＫａｂａｔに記載されたＥＵインデックスにより番号付けされた２３９、３３０および３３２からなる群から選択される１つまたは複数の位置に少なくとも１つの非天然のアミノ酸を含む、Ｆｃ変異ｂｉＭａｂを提供する。２３９位、３３０位および３３２位を図２Ｃの配列番号１６に太字および二重下線で示す。一態様では、修飾は、Ｋａｂａｔに記載されたＥＵインデックスにより番号付けされた２３９Ｄ、３３０Ｌ、３３０Ｙおよび３３２Ｅからなる群から選択された少なくとも１つの置換である。本明細書にその全体を援用する米国特許第７，３１７，０９１号明細書を参照されたい。

【００８６】

特定の態様では、本開示は、Ｆｃ領域がＫａｂａｔに記載されたＥＵインデックスにより番号付けされた２５２、２５４および２５６からなる群から選択される１つまたは複数の位置に少なくとも１つの非天然のアミノ酸を含む、Ｆｃ変異ｂｉＭａｂを提供する。２５２位、２５４位、２５６位を拡大して波下線で図２Ｃの配列番号１６に示す。一態様では、修飾は、Ｋａｂａｔに記載されたＥＵインデックスにより番号付けされた２５２Ｙ、２５４Ｔおよび２５６Ｅからなる群から選択される少なくとも１つの置換である。その全体を本明細書に援用する米国特許第７，０８３，７８４号明細書を参照されたい。

【００８７】

ある態様では、本開示は、Ｆｃ領域がＫａｂａｔに記載されたＥＵインデックスにより番号付けされた４２８位に非天然のアミノ酸を含む、Ｆｃ変異ｂｉＭａｂを提供する。一態様では、４２８位の修飾は、Ｋａｂａｔに記載されたＥＵインデックスにより番号付けされた４２８Ｔ、４２８Ｌ、４２８Ｆおよび４２８Ｓからなる群から選択される。その全体を本明細書に援用する米国特許第７，６７０，６００号明細書を参照されたい。別の態様では、Ｆｃ変異ｂｉＭａｂは、Ｋａｂａｔに記載されたＥＵインデックスにより番号付けされた４３４位に非天然のアミノ酸をさらに含んでもよい。一態様では、４３４位の修飾は、Ｋａｂａｔに記載されたＥＵインデックスにより番号付けされた４３４Ａ、４３４Ｓおよび４３４Ｆからなる群から選択される。他の態様では、本開示は、Ｆｃ領域がＫａｂａｔに記載されたＥＵインデックスにより番号付けされた４２８位および４３４位に非天然のアミノ酸を含む、Ｆｃ変異ｂｉＭａｂを提供する。特定の態様では、Ｆｃ領域は４２８Ｌ、４３４Ｓを含む。米国特許第８，０８８，３７６号明細書を参照されたい。４２８位および４３４位を図２Ｃの配列番号１８に太字および下線で示す。

【００８８】

ある態様では、ＩｇＧ抗体により誘発されるエフェクター機能は、タンパク質のＦｃ領域に結合した糖部分に強く依存する（Ｃｌａｕｄｉａ Ｆｅｒｒａｒａ ｅｔ ａｌ．，２００６，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｂｉｏｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ９３：８５１－８６１）。したがって、Ｆｃ領域にグリコシル化修飾を行ってエフェクター機能を増強または低下させることができる（たとえば、Ｕｍａｎａ ｅｔ ａｌ，１９９９，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ １７：１７６－１８０；Ｄａｖｉｅｓ ｅｔ ａｌ．，２００１，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ Ｂｉｏｅｎｇ ７４：２８８－２９４；Ｓｈｉｅｌｄｓ ｅｔ ａｌ，２００２，Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２７７：２６７３３－２６７４０；Ｓｈｉｎｋａｗａ ｅｔ ａｌ．，２００３，Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２７８：３４６６－３４７３；米国特許第６，６０２，６８４号明細書；同第６，９４６，２９２号明細書；同第７，０６４，１９１号明細書；同第７，２１４，７７５号明細書；同第７，３９３，６８３号明細書；同第７，４２５，４４６号明細書；同第７，５０４，２５６号明細書；米国特許出願公開第２００３／０１５７１０８号明細書；同第２００３／０００３０９７号明細書；同第２００９／００１０９２１号明細書；ＰＯＴＥＬＬＩＧＥＮＴ（商標）技術（Ｂｉｏｗａ，Ｉｎｃ．Ｐｒｉｎｃｅｔｏｎ，Ｎ．Ｊ．）；ＧＬＹＣＯＭＡＢ（商標）グリコシル化工学技術（ＧＬＹＣＡＲＴ ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ＡＧ，Ｚｕｒｉｃｈ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）を参照）。したがって、一態様では、本開示のｂｉＭａｂのＦｃ領域はアミノ酸残基の変化したグリコシル化を含む。別の態様では、アミノ酸残基のグリコシル化を変化させた結果、エフェクター機能が低下する。別の態様では、アミノ酸残基のグリコシル化を変化させた結果、エフェクター機能が増強される。特定の態様では、Ｆｃ領域はフコシル化を抑制する。別の態様では、Ｆｃ領域を非フコシル化する（たとえば、米国特許出願公開第２００５／０２２６８６７号明細書を参照）。一態様では、エフェクター機能、特にＡＤＣＣを増強したこうしたｂｉＭａｂを、親細胞により産生されるポリペプチドと比較して１００倍を超えるＡＤＣＣを有する、高度にフコースを除去したポリペプチドを産生するように操作された宿主細胞（たとえば、ＣＨＯ細胞、コウキクサ（Ｌｅｍｎａ ｍｉｎｏｒ））に発現させる（Ｍｏｒｉ ｅｔ ａｌ．，２００４，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ Ｂｉｏｅｎｇ ８８：９０１－９０８；Ｃｏｘ ｅｔ ａｌ．，２００６，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，２４：１５９１－７）。

【００８９】

ＩｇＧ分子上のオリゴ糖にシアル酸を付加すると、その抗炎症活性を増強し、その細胞毒性を変化させることができる（Ｋｅｎｅｋｏ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２００６，３１３：６７０－６７３；Ｓｃａｌｌｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏ．２００７ Ｍａｒ；４４（７）：１５２４－３４）。上記の研究から、シアリル化を増加させたＩｇＧ分子は抗炎症性を有する一方、シアリル化を低下させたＩｇＧ分子は免疫賦活性を増強する（たとえば、ＡＤＣＣ活性を増強する）ことが立証される。したがって、ｂｉＭａｂは、特定の用途に適切なシアリル化プロファイルで修飾してもよい（米国特許出願公開第２００９／０００４１７９号明細書および国際公開第２００７／００５７８６号パンフレット）。

【００９０】

一態様では、本開示のｂｉＭａｂのＦｃ領域は、天然のＦｃ領域と比較して改変されたシアリル化プロファイルを含む。一態様では、本開示のｂｉＭａｂのＦｃ領域は、天然のＦｃ領域と比較して増加したシアリル化プロファイルを含む。別の態様では、本開示のｂｉＭａｂのＦｃ領域は、天然のＦｃ領域と比較して減少したシアリル化プロファイルを含む。

【００９１】

一態様では、本開示のＦｃ変異体は、他の既知のＦｃ変異体、たとえばＧｈｅｔｉｅ ｅｔ ａｌ．，１９９７，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈ．１５：６３７－４０；Ｄｕｎｃａｎ ｅｔ ａｌ，１９８８，Ｎａｔｕｒｅ ３３２：５６３－５６４；Ｌｕｎｄ ｅｔ ａｌ．，１９９１，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ １４７：２６５７－２６６２；Ｌｕｎｄ ｅｔ ａｌ，１９９２，Ｍｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２９：５３－５９；Ａｌｅｇｒｅ ｅｔ ａ

l，１９９４，Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ ５７：１５３７－１５４３；Ｈｕｔｃｈｉｎｓ ｅｔ ａｌ．，１９９５，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ ９２：１１９８０－１１９８４；Ｊｅｆｆｅｒｉｓ ｅｔ ａｌ，１９９５，Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｌｅｔｔ．４４：１１１－１１７；Ｌｕｎｄ ｅｔ ａｌ．，１９９５，Ｆａｓｅｂ Ｊ ９：１１５－１１９；Ｊｅｆｆｅｒｉｓ ｅｔ ａｌ，１９９６，Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｌｅｔｔ ５４：１０１－１０４；Ｌｕｎｄ ｅｔ ａｌ，１９９６，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ １５７：４９６３－４９６９；Ａｒｍｏｕｒ ｅｔ ａｌ．，１９９９，Ｅｕｒ Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２９：２６１３－２６２４；Ｉｄｕｓｏｇｉｅ ｅｔ ａｌ，２０００，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ １６４：４１７８－４１８４；Ｒｅｄｄｙ ｅｔ ａｌ，２０００，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ １６４：１９２５－１９３３；Ｘｕ ｅｔ ａｌ．，２０００，Ｃｅｌｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２００：１６－２６；Ｉｄｕｓｏｇｉｅ ｅｔ ａｌ，２００１，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ １６６：２５７１－２５７５；Ｓｈｉｅｌｄｓ ｅｔ ａｌ．，２００１，Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２７６：６５９１－６６０４；Ｊｅｆｆｅｒｉｓ ｅｔ ａｌ，２００２，Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｌｅｔｔ ８２：５７－６５；Ｐｒｅｓｔａ ｅｔ ａｌ．，２００２，Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｓｏｃ Ｔｒａｎｓ ３０：４８７－４９０）；米国特許第５，６２４，８２１号明細書；同第５，８８５，５７３号明細書；同第５，６７７，４２５号明細書；同第６，１６５，７４５号明細書；同第６，２７７，３７５号明細書；同第５，８６９，０４６号明細書；同第６，１２１，０２２号明細書；同第５，６２４，８２１号明細書；同第５，６４８，２６０号明細書；同第６，５２８，６２４号明細書；同第６，１９４，５５１号明細書；同第６，７３７，０５６号明細書；同第７，１２２，６３７号明細書；同第７，１８３，３８７号明細書；同第７，３３２，５８１号明細書；同第７，３３５，７４２号明細書；同第７，３７１，８２６号明細書；同第６，８２１，５０５号明細書；同第６，１８０，３７７号明細書；同第７，３１７，０９１号明細書；同第７，３５５，００８号明細書；米国特許出願公開第２００４／０００２５８７号明細書；および国際公開第９９／５８５７２号パンフレットに開示されたものと組み合わせてもよい。Ｆｃドメインの他の修飾および／または置換および／または付加および／または欠失も当業者に容易に明らかになるであろう。

【００９２】

天然のＦｃを含むｂｉＭａｂ型に示されたポリペプチドは、例に示すように、ＦｃＲｎおよびＣ１ｑに結合してＡＤＣＣを媒介する能力を保持している点に留意されたい。このためある態様では、ｂｉＭａｂは、ＦｃＲｎおよび／またはＣ１ｑおよび／または１つまたは複数のＦｃγ受容体（ＦｃγＲ）に結合する能力を保持している。たとえば、ある態様では、ｂｉＭａｂはｂｉＭａｂが結合するエピトープの１つに結合する通常の抗体と比較して、ＦｃＲｎおよび／またはＣ１ｑおよび／または１つまたは複数のＦｃγＲに結合する能力を少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％または１００％保持する。ある態様では、ｂｉＭａｂは１つまたは２つの通常の抗体の結合ドメインから作製され、これらの通常の抗体の一方または両方と活性の比較が行われる。

【００９３】

また、改変されたＦｃ領域を使用して重鎖ヘテロ２量体を作製し、２つの異なる重鎖－軽鎖対を含むｂｉＭａｂを得てもよい。ヘテロ２量体を形成しやすくするには、一対のＦｃ領域間の境界面を操作して、組換え細胞培養から回収されるヘテロ２量体の割合を最大にする。ある態様では、境界面はＣＨ３ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第１の抗体分子の境界面の１つまたは複数の小さなアミノ酸側鎖を、より大きな側鎖（たとえばチロシンまたはトリプトファン）で置換することにより「突起」が生じる。大きなアミノ酸側鎖をより小さなアミノ酸側鎖（たとえばアラニンまたはトレオニン）で置換することにより、大きな側鎖と同一または類似の大きさの「空洞」が代償として第２の抗体分子の境界面に形成される。これが、ヘテロ２量体の収率をホモ２量体など他の望ましくない最終産物より高めるメカニズムとなる。ＣＨ３の修飾としては、たとえば、一方の重鎖のＹ４０７Ｖ／Ｔ３６６Ｓ／Ｌ３６８Ａおよび他方の重鎖のＴ３６６Ｗ；一方の重鎖

のＳ３５４Ｃ／Ｔ３６６Ｗおよび他方の重鎖のＹ３４９Ｃ／Ｙ４０７Ｖ／Ｔ３６６Ｓ／Ｌ３６８Ａが挙げられる。一方の鎖に突起を、そして他方の鎖に空洞を与える別の修飾については、米国特許第７，１８３，０７６号明細書；およびＭｅｒｃｈａｎｔ ｅｔ ａｌ．，１９９８，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ １６：６７７－６８１に記載されている。ヘテロ２量体を形成するのに使用することができる他の修飾には、静電気的に一致するＦｃ領域が共発現するとヘテロ２量化が起こるように、Ｆｃ２量体の境界面両端の電荷極性を変化させる修飾があるが、これに限定されるものではない。電荷極性を変化させる修飾には、下記表１に示したものがあるが、これに限定されるものではない（さらに国際公開第２００７／１４７９０１号パンフレット；Ｇｕｎａｓｅｋａｒａｎ ｅｔ ａｌ．，２０１０，ＪＢＣ ２８５：１９６３７－４６も参照されたい）。さらに、Ｄａｖｉｓ ｅｔ ａｌ．（２０１０，Ｐｒｏｔ．Ｅｎｇ．Ｄｅｓｉｇｎ ＆ Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ ２３：１９５－２０２）は、ヒトＩｇＧドメインおよびＩｇＡ ＣＨ３ドメインの誘導体である鎖交換操作ドメイン（ＳＥＥＤ：ｓｔｒａｎｄ－ｅｘｃｈａｎｇｅｄ ｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ ｄｏｍａｉｎ）ＣＨ３領域を用いたヘテロ２量体のＦｃプラットフォームについて記載している（さらに、国際公開第２００７／１１０２０５号パンフレットも参照されたい）。

【００９４】

【表１】

表 1.ヘテロ 2 量化のための CH3 修飾	
一方の重鎖の Fc 領域の修飾	他方の重鎖の Fc 領域の修飾
K370E/D399K/K439D	D356K/E357K/K409D
K409D	D399K
K409E	D399K
K409E	D399R
K409D	D399R
D339K	E356K
D399K/E356K	K409D/K392D
D399K/E356K	K409D/K439D
D399K/E357K	K409D/K370D
D399K/E356K/E357K	K409D/K392D/K370D
D399K/E357K	K409D/K392D
K392D/K409D	D399K
K409D/K360D	D399K

【００９５】

３．グリコシル化

グリコシル化によりポリペプチドのエフェクター機能を変化させられるだけでなく、可変領域のグリコシル化修飾により、標的抗原に対する抗体（またはｂｉＭａｂ）の親和性も変化させることができる。一態様では、本ｂｉＭａｂの可変領域のグリコシル化パターンを修飾する。たとえば、非グリコスル化ｂｉＭａｂを作製してもよい（すなわち、ｂｉＭａｂはグリコシル化を欠損している）。グリコシル化は、たとえば、標的抗原に対するｂｉＭａｂの親和性を高めるように改変することができる。こうした糖鎖修飾は、たとえば、ｂｉＭａｂ配列内の１つまたは複数のグリコシル化部位を変化させることにより達成することができる。たとえば、１つまたは複数の可変領域フレームワークのグリコシル化部位を除去し、それによりその部位のグリコシル化を除去する１つまたは複数のアミノ酸置換を行ってもよい。こうした非グリコシル化は、抗原に対するｂｉＭａｂの親和性を高

めることができる。こうしたアプローチについては、米国特許第５，７１４，３５０号明細書および同第６，３５０，８６１号明細書にさらに詳細に記載されている。また、Ｆｃ領域に存在するグリコシル化部位（たとえば、ＩｇＧのアスパラギン２９７）を除去する１つまたは複数のアミノ酸置換を行ってもよい。さらに、非グリコシル化ｂｉＭａｂは、必要なグリコシル化機構を欠損する細菌細胞を用いて作製してもよい。

【００９６】

４．　ポリペプチドリンカー

リンカーは、ｂｉＭａｂキメラ重鎖のドメイン／領域を近接する分子に連結するのに使用することができる。上記のようにｂｉＭａｂは、少なくとも２つのリンカーポリペプチドＬ１およびＬ２を含む。加えてｂｉＭａｂは、別のリンカー、たとえばｓｃＦｖの可変重鎖および軽鎖を相互に連結するフレキシブルリンカーを含んでもよい。さらにｂｉＭａｂは、別のリンカー、たとえばｓｃＦｖの可変重鎖および軽鎖を相互に連結するフレキシブルリンカーと、他の結合ユニットをｂｉＭａｂコア構造に連結する他のリンカーとを含んでもよい。ｂｉＭａｂコア構造に連結される追加の結合ユニットの例を図２６～２８に示す。

【００９７】

リンカーの例示的かつ非限定的な例として、少なくとも４つの残基を含むポリペプチド鎖がある。こうしたリンカーの一部は、フレキシブルであり、親水性であり、さらにそれ自体の二次構造（リンカー部分またはフレキシブルリンカー部分）をほとんどあるいはまったく有さなくてもよい。少なくとも４つのアミノ酸のリンカーは、分子が集合した後、近傍に位置するドメインおよび／または領域を相互に連結するのに使用してもよい。また、より長いリンカーを使用してもよい。このため、リンカーは約１残基、２残基、３残基、４残基、５残基、６残基、７残基、８残基、９残基、１０残基、１１残基、１２残基、１３残基、１４残基、１５残基、１６残基、１７残基、１８残基、１９残基、２０残基、２５残基、３０残基、３５残基、４０残基、４５残基、５０残基でもよい。またリンカーは、たとえば、約１００～１７５残基であってもよい。分子の一部を相互に連結するため複数のリンカーを使用する場合、リンカーは同一でも、あるいは異なっていてもよい（たとえば、長さおよび／またはアミノ酸配列が同一または異なる）。

【００９８】

リンカーは、切断試薬により選択的に切断される少なくとも１つの結合を含む切断可能なリンカーであってもよい。切断可能なリンカーを使用して、リンカー配列の全部または一部を除去しやすくしてもよい。リンカーは、リンカーの内部またはリンカーの少なくとも１つの末端で切断が起こるように、プロテアーゼ切断部位を含むように操作してもよい。たとえば、リンカーの両側の２つの末端各々にトロンビン部位を操作してもよい。また、使用するリンカーの種類に応じて、ＴＣＥＰ、ＴＦＡおよびＤＴＴなど薬により切断を媒介してもよい。リンカーは、切断試薬が切断産物からリンカー由来の残基をすべて除去するように設計してもよい。他の例示的かつ非限定的なリンカーとして、インビボ条件下で、たとえば、内在性酵素もしくは他の内在性因子の存在下で、あるいは、単に体内に存在する水性液体内または体内の細胞内で結合が選択的に切断され得るプロドラッグリンカーが挙げられる。ｂｉＭａｂが２つ以上のポリペプチドリンカーを含む場合、リンカーは各々異なっていてもよいし、あるいは、リンカーの少なくとも１つが他と異なっていてもよい。いくつかの態様では、ｂｉＭａｂは切断可能なリンカーを含む。特定の態様では、ｂｉＭａｂは、ＶＨ２とＶＬ２との間に切断可能なリンカーを含むｓｃＦｖを含む。

【００９９】

リンカーは所望の構造の形成を容易にする。リンカーは（Ｇｌｙ－Ｓｅｒ）$_n$残基を含み、溶解性を高めるため、Ｇｌｕ残基またはＬｙｓ残基がある程度全体に分散していてもよい。その代わりにまたはそれに加えて、リンカーはセリン残基をまったく含んでおらず、こうしたリンカーは、リンカーがＯ－結合型グリコシ化を受ける場合に好ましいことがある。いくつかの態様では、たとえば、リンカーの２量体化を使用してｂｉＭａｂのドメインをドメインが適切に折りたたまれた構造にする場合、リンカーは、システイン残基を

含んでもよい。いくつかの態様では、ｂｉＭａｂは、ポリペプチドのドメインを連結する少なくとも２つのポリペプチドリンカーを含む。他の態様では、ｂｉＭａｂは少なくとも３つのポリペプチドリンカーを含む。他の態様では、ｂｉＭａｂは４つ以上のポリペプチドリンカーを含む。

【０１００】

いくつかの態様では、ポリペプチドリンカーは１～５０残基、１～２５残基、２５～５０残基または３０～５０残基を含む。いくつかの態様では、ポリペプチドリンカーはＦｃ部分の一部を含む。たとえば、いくつかの態様では、ポリペプチドリンカーはＩｇＧ１抗体、ＩｇＧ２抗体、ＩｇＧ３抗体および／またはＩｇＧ４抗体の免疫グロブリンヒンジドメインの一部を含んでもよい。いくつかの態様では、ポリペプチドリンカーはＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３および／またはＩｇＧ４の突然変異免疫グロブリンヒンジドメインの一部を含む。いくつかの態様では、ポリペプチドリンカーは、ＩｇＧ１抗体、ＩｇＧ２抗体、ＩｇＧ３抗体および／またはＩｇＧ４抗体の免疫グロブリンヒンジ領域／ドメインの少なくとも５アミノ酸残基、７アミノ酸残基、８アミノ酸残基または１５アミノ酸残基を含む。いくつかの態様では、ポリペプチドリンカーは、ＩｇＧ１抗体、ＩｇＧ２抗体、ＩｇＧ３抗体および／またはＩｇＧ４抗体の修飾免疫グロブリンヒンジ領域／ドメインの少なくとも５アミノ酸残基、７アミノ酸残基、８アミノ酸残基または１５アミノ酸残基を含む。

【０１０１】

ポリペプチドリンカーは、３つのシステインを天然に含むヒンジ領域の全部または一部を含んでもよい。ある態様では、完全なおよび／または天然のヒンジ領域に対してシステイン残基の１つまたは２つのみが残るように、選択されたヒンジ領域を切断するか、あるいは他の方法で改変または置換する。同様に、ある種の他の態様では、ポリペプチドリンカーは、システイン残基の数がアミノ酸の置換または欠失により減少しているヒンジ領域の突然変異部分または他の方法で改変された部分を含んでもよく、たとえば突然変異ヒンジ領域または他の方法で改変されたヒンジ領域は、本明細書に記載するように０、１つまたは２つのシステイン残基を含む。

【０１０２】

したがって、突然変異ヒンジドメインまたは他の方法で改変されたヒンジドメインは、１つまたは複数のシステイン残基を含む野生型免疫グロブリンヒンジドメインに由来しても、あるいは（それを用いて）構築してもよい。ある態様では、ヒンジ領域の突然変異部分または他の方法で改変された部分はシステイン残基を含まなくても、あるいはシステイン残基を１つのみ含んでもよく、突然変異ヒンジ領域または他の方法で改変されたヒンジ領域は、それぞれ１つ以上のシステイン残基または２つ以上のシステイン残基を含む、野生型免疫グロブリンヒンジ領域であるか、またはそれに由来している。ヒンジ領域の突然変異部分または他の方法で改変された部分では、野生型免疫グロブリンヒンジ領域のシステイン残基は、好ましくは欠失している、またはジスルフィド結合を形成できないアミノ酸で置換されている。いくつかの態様では、ヒンジ領域の突然変異部分または他の方法で改変された部分は、４つのヒトＩｇＧアイソタイプサブクラスＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３またはＩｇＧ４のいずれを含んでもよいヒトＩｇＧ野生型ヒンジ領域であるか、またはそれに由来している。

【０１０３】

いくつかの態様では、ポリペプチドリンカーは、免疫グロブリン軽鎖とジスルフィド結合を形成するシステイン残基（ＥＵ残基２２０）を含むヒンジ領域の一部を含む。いくつかの態様では、ポリペプチドリンカーは、ＥＵ残基Ｃ２２０にアミノ酸置換を含むヒンジ領域の改変された部分を含む。いくつかの態様では、ポリペプチドリンカーは、アミノ酸置換Ｃ２２０Ｖを含む。

【０１０４】

いくつかの態様では、ポリペプチドリンカーは、ヒンジ関連の自発的自己切断を防止するアミノ酸置換を含む。いくつかの態様では、ポリペプチドリンカーは、ＥＵ位置Ｄ２２

１の位置にアミノ酸置換を含む。いくつかの態様では、ポリペプチドリンカーはアミノ酸置換Ｄ２２１Ｇを含む。いくつかの態様では、ポリペプチドリンカーはアミノ酸Ｄ２２１を欠損している。

【０１０５】

いくつかの態様では、ポリペプチドリンカーはｇｌｙ－ｓｅｒリンカーを含むか、またはｇｌｙ－ｓｅｒリンカーからなる。本明細書で使用する場合、「ｇｌｙ－ｓｅｒリンカー」という用語は、グリシン残基およびセリン残基からなるペプチドをいう。例示的ｇｌｙ－ｓｅｒリンカーは、式（Gly_4Ser）ｎのアミノ酸配列を含み、式中、ｎは正の整数（たとえば、１、２、３、４、５、６、７、８、９または１０）である。好ましいｇｌｙ－ｓｅｒリンカーは（Gly_4Ser）$_2$および（Gly_4Ser）$_4$である。別の例示的ｇｌｙ－ｓｅｒリンカーは（Gly_4Ser）$_3$である。なお他の態様では、ポリペプチドリンカーに２つ以上のｇｌｙ－ｓｅｒリンカーを直列に組み込む。いくつかの態様では、ポリペプチドリンカーは、ヒンジ領域（たとえば、ＩｇＧ１分子、ＩｇＧ２分子、ＩｇＧ３分子またはＩｇＧ４分子に由来する）の少なくとも一部、および一連のｇｌｙ－ｓｅｒアミノ酸残基（たとえば、（Gly_4Ser）ｎなどのｇｌｙ－ｓｅｒリンカー）を含む。

【０１０６】

ある態様では、Ｌ１および／またはＬ２はヒンジ部分、およびリンカー部分、たとえばｇｌｙ－ｓｅｒリンカーを含むリンカー部分の両方を含む。他の態様では、Ｌ１および／またはＬ２はヒンジ部分のみ、またはリンカー部分のみ、たとえばｇｌｙ－ｓｅｒリンカーのみを含む。他の態様では、Ｌ１およびＬ２はｇｌｙ－ｓｅｒリンカー部分を含む。ある態様では、Ｌ１およびＬ２のｇｌｙ－ｓｅｒリンカー部分は同じ長さであるのに対し、他の態様では、Ｌ１およびＬ２のｇｌｙ－ｓｅｒリンカー部分は異なる長さである。ｂｉＭａｂがｓｃＦｖを含む場合、ｓｃＦｖの重鎖および軽鎖はフレキシブルリンカーにより連結されていてもよい。このフレキシブルリンカーは一般にヒンジ部分を含まず、むしろｇｌｙ－ｓｅｒリンカーまたは他のフレキシブルリンカーである。ｓｃＦｖのドメインを相互に連結するフレキシブルリンカーの長さおよびアミノ酸配列は、容易に選択して最適化することができる。

【０１０７】

いくつかの態様では、ポリペプチドリンカー（特にＬ１および／またはＬ２）は、ｇｌｙ－ｓｅｒリンカーまたは全ｇｌｙリンカー、およびヒンジドメインの一部または修飾部分を含む。いくつかの態様では、ＦａｂドメインをｂｉＭａｂの結合ドメイン（ＢＤ；結合ユニット２）に連結するポリペプチドリンカー（Ｌ１）は、アミノ酸配列ＥＰＫＳＣＤＫＴＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号６３）またはＥＰＫＳＣＧＫＴＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号６４）またはＥＰＫＳＣＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号６５）を含む。いくつかの態様では、結合ドメインおよび結合ドメインをｂｉＭａｂのＦｃドメインに連結するポリペプチドリンカー（Ｌ２）は、アミノ酸配列ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＥＰＫＳＶＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ（配列番号６７）またはＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＣＰＰＣＰ（配列番号６９）またはＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ（配列番号７１）を含む。

【０１０８】

結合ユニット１を結合ユニット２に、および結合ユニット２をＦｃに相互に連結するのに使用するポリペプチドリンカー（たとえば、Ｌ１およびＬ２）を問わず、ｂｉＭａｂは任意に、追加のポリペプチドリンカーを含んでもよい。そうした追加のポリペプチドリンカーの長さおよび配列は独立に選択される。たとえば、ｂｉＭａｂは、ｓｃＦｖの可変重鎖および軽鎖を相互に連結するフレキシブルなポリペプチドリンカーをさらに含んでもよい。このフレキシブルなポリペプチドリンカーはｇｌｙ－ｓｅｒリンカーを含んでもよい。一般に、このリンカーはヒンジ部分を含まない。

【０１０９】

５．　ｂｉＭａｂの特定の構造

本開示のｂｉＭａｂは２つの重鎖－軽鎖対を含む。ｂｉＭａｂキメラ重鎖のポリペプチ

ド配列は、抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ１）を含むポリペプチド配列、抗体重鎖定常ドメイン１（ＣＨ１）を含むポリペプチド配列、第１のポリペプチドリンカー（Ｌ１）を含むポリペプチド配列、結合ドメイン（ＢＤ１）を含むポリペプチド配列、第２のポリペプチドリンカー（Ｌ２）を含むポリペプチド配列、およびＦｃドメインを含むポリペプチド配列を含んでもよい。いくつかの態様では、Ｆｃドメインは、C_H2ドメインおよびC_H3ドメインを含む。このため、ｂｉＭａｂキメラ重鎖は、Ｎ末端からＣ末端に以下の配向：ＶＨ１－C_H1－Ｌ１－ＢＤ－Ｌ２－C_H2－C_H3でポリペプチド配列を含んでもよい。ｂｉＭａｂ軽鎖のポリペプチド配列は、軽鎖可変ドメイン（ＶＬ１）および軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）を含んでもよい。このため、ｂｉＭａｂ軽鎖は、Ｎ末端からＣ末端に以下の配向：ＶＬ１－ＣＬ１でポリペプチド配列を含んでもよい。ＶＨ１、ＶＬ１およびＣＬ１は、第１のエピトープに結合する結合ユニット１の一部を示すのに使用される点に留意されたい。ＢＤは、第２のエピトープに結合する結合ユニット２の一部を示すのに使用される。ある態様では、１つまたは複数の追加の結合ユニット（たとえば、ｓｃＦｖ）がｂｉＭａｂコアのＮ末端および／またはＣ末端に存在する。たとえば図２６および２７を参照されたい。他の態様では、１つまたは複数の追加の結合ユニット（たとえば、ｓｃＦｖ）がヒンジ内に存在する。このため、ｂｉＭａｂ重鎖は伸長型コアを含み、Ｎ末端からＣ末端に以下の配向：ＶＨ１－C_H1－Ｌ１－（ＢＤ）$_n$－Ｌ２－C_H2－C_H3（ｎ＞１）でポリペプチド配列を有してもよい。伸長型コアを有する例示的ｂｉＭａｂを図２８に示す。

【０１１０】

結合ドメインがｓｃＦｖである態様では、ｂｉＭａｂキメラ重鎖は、抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ１）を含むポリペプチド配列、抗体重鎖定常ドメイン１（ＣＨ１）を含むポリペプチド配列、第１のポリペプチドリンカー（Ｌ１）を含むポリペプチド配列、抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ２）を含むポリペプチド配列、フレキシブルリンカーを含むポリペプチド配列、抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ２）を含むポリペプチド配列、第２のポリペプチドリンカー（Ｌ２）を含むポリペプチド配列、および抗体Ｆｃドメインを含むポリペプチド配列を含んでもよい。このため、ＢＤとしてｓｃＦｖを含むｂｉＭａｂのキメラ重鎖は、Ｎ末端からＣ末端に以下の配向：ＶＨ１－ＣＨ１－Ｌ１－ＶＬ２－Ｌ３－ＶＨ２－Ｌ２－Ｆｃでポリペプチド配列を含んでもよい。キメラ重鎖は、アミノ酸配列（たとえば、各ポリペプチドドメインのアミノ酸配列）を含むポリペプチド鎖である。あるいは、結合ドメインとしてｓｃＦｖを含むｂｉＭａｂのキメラ重鎖は、Ｎ末端からＣ末端に以下の配向：ＶＨ１－ＣＨ１－Ｌ１－ＶＨ２－Ｌ３－ＶＬ２－Ｌ２－Ｆｃでポリペプチド配列を含んでもよい。キメラ重鎖は、アミノ酸配列（たとえば、各ポリペプチドドメインのアミノ酸配列）を含むポリペプチド鎖である。ＶＨ１、ＶＬ１およびＣＬ１は結合ユニット１の一部を示すのに使用され、ＶＨ１およびＶＬ１はその第１のエピトープに結合する部分を示す点に留意されたい。ＶＨ２およびＶＬ２は、第２のエピトープに結合する結合ユニット２の一部を示すのに使用される。ある態様では、追加のｓｃＦｖ結合ドメインが、ｂｉＭａｂコアを構成するポリペプチドのＮ末端および／またはＣ末端に存在する。たとえば図２６～２７（結合ユニット３および／または４および／または５をさらに含むｂｉＭａｂコアを図示する）を参照されたい。ある態様では、２つ以上のｓｃＦｖ結合ドメインがｂｉＭａｂコア内に存在する。たとえば図２８（結合ユニット２ａおよび２ｂを含む伸長型ｂｉＭａｂコアを図示する）を参照されたい。追加のｓｃＦｖは各々、ＶＨ３、ＶＨ４、ＶＨ５で示す抗体重鎖可変領域、およびＶＬ３、ＶＬ４、ＶＬ５で示す対応する抗体軽鎖可変領域を含む。

【０１１１】

６．　標識、コンジュゲートおよび部分

本開示のｂｉＭａｂは、診断および他のアッセイを目的として標識にコンジュゲートしてもよく、ｂｉＭａｂおよび／またはそれが結合する標的を検出することができる。標識には、以下に限定されるものではないが、発色団、フルオロフォア、蛍光タンパク質、リン光色素、タンデム色素、粒子、ハプテン、酵素および放射性同位元素がある。

【０１１２】
ある態様では、ｂｉＭａｂをフルオロフォアにコンジュゲートする。ｂｉＭａｂに結合するフルオロフォアの選択により、コンジュゲートしたｂｉＭａｂの吸収および蛍光発光特性が決定される。ｂｉＭａｂおよびｂｉＭａｂ結合リガンドに使用することができるフルオロフォア標識の物理的性質には、スペクトル特性（吸収、発光およびストークスシフト）、蛍光強度、寿命、偏光および光退色速度またはこれらの組み合わせがあるが、これに限定されるものではない。これらの物理的性質はすべて、あるフルオロフォアを別のフルオロフォアと区別するのに使用することができ、したがって多重解析が可能になる。蛍光標識の他の望ましい特性として、たとえば細胞または生体（たとえば、生きている動物）においてｂｉＭａｂの標識を行った場合の細胞透過性および低毒性を挙げることができる。

【０１１３】
ある態様では、酵素が標識であり、ｂｉＭａｂにコンジュゲートされる。酵素は、検出可能なシグナルの増幅を行い、アッセイ感度を高められるため望ましい標識である。酵素自体は検出可能な反応を起こさないが、適切な基質に接触すると基質を分解する働きをし、変質した基質が蛍光シグナル、比色シグナルまたは発光シグナルを発するようになる。標識試薬上の１つの酵素が複数の基質を検出可能なシグナルに変換できるため、酵素により検出可能なシグナルが増幅される。酵素基質は、測定可能な好ましい結果、たとえば比色、蛍光または化学発光が得られるように選択する。こうした基質は当該技術分野において広く使用され、当業者に公知であり、たとえば、オキシドレダクターゼ、たとえば西洋わさびペルオキシダーゼおよび基質、たとえば３，３’－ジアミノベンジジン（ＤＡＢ）；ホスファターゼ酵素、たとえば酸性ホスファターゼ、アルカリ性および基質、たとえば５－ブロモ－６－クロロ－３－インドリルホスフェート（ＢＣＩＰ）；グリコシダーゼ、たとえばβ－ガラクトシダーゼ、β－グルクロニダーゼまたはβ－グルコシダーゼおよび基質、たとえば５－ブロモ－４－クロロ－３－インドリルβ－Ｄ－ガラクトピラノシド（Ｘ－ｇａｌ）が挙げられ、別の酵素として、加水分解酵素、たとえばコリンエステラーゼおよびペプチダーゼ、オキシダーゼ、たとえばグルコースオキシダーゼおよびシトクロムオキシダーゼ、ならびに好適な基質が公知であるレダクーゼが挙げられる。

【０１１４】
酵素および化学発光を示すその適切な基質は、いくつかのアッセイに好適である。そうしたものとして、天然および組換え形態のルシフェラーゼおよびエクオリンがあるが、これに限定されるものではない。加えて、ホスファターゼ、グリコシダーゼおよびオキシダーゼの化学発光性基質、たとえば安定なジオキセタン、ルミノール、イソルミノールおよびアクリジニウムエステルを含むものも有用である。

【０１１５】
また、別の態様では、ビオチンなどのハプテンを標識として利用してもよい。ビオチンは、酵素系で検出可能なシグナルをさらに増幅する働きをすることができ、さらに単離を目的としてアフィニティークロマトグラフィーに使用されるタグとしても機能できるため有用である。検出には、ビオチンに対して親和性を有する酵素コンジュゲート、たとえばアビジン－ＨＲＰを使用する。その後ペルオキシダーゼ基質を加えて検出可能なシグナルを発生させる。

【０１１６】
ハプテンはさらに、ホルモン、天然および合成薬剤、汚染物質、アレルゲン、アフェクター分子、増殖因子、ケモカイン、サイトカイン、リンホカイン、アミノ酸、ペプチド、化学中間体、ヌクレオチドおよび同種のものも含む。

【０１１７】
ある態様では、標識として蛍光タンパク質をｂｉＭａｂにコンジュゲートしてもよい。蛍光タンパク質の例としては、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）およびフィコビリンタンパク質ならびにこれらの誘導体が挙げられる。蛍光タンパク質、特にフィコビリンタンパク質は、タンデム色素標識した標識試薬を作製するのに特に有用である。こうしたタンデム

色素には、より大きなストークスシフトを得ることを目的とした蛍光タンパク質およびフルオロフォアがあり、発光スペクトルが蛍光タンパク質の吸収スペクトルの波長からさらにシフトする。

【０１１８】

ある態様では、標識は放射性同位元素である。好適な放射性物質として、ヨウ素（^{121}Ｉ、^{123}Ｉ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ）、炭素（^{14}Ｃ）、硫黄（^{35}Ｓ）、トリチウム（^{3}Ｈ）、インジウム（^{111}Ｉｎ、^{112}Ｉｎ、^{113}ｍＩｎ、^{115}ｍＩｎ、）、テクネチウム（^{99}Ｔｃ、^{99}ｍＴｃ）、タリウム（^{201}Ｔｉ）、ガリウム（^{68}Ｇａ、^{67}Ｇａ）、パラジウム（^{103}Ｐｄ）、モリブデン（^{99}Ｍｏ）、キセノン（^{135}Ｘｅ）、フッ素（^{18}Ｆ）、^{153}ＳＭ、^{177}Ｌｕ、^{159}Ｇｄ、^{149}Ｐｍ、^{140}Ｌａ、^{175}Ｙｂ、^{166}Ｈｏ、^{90}Ｙ、^{47}Ｓｃ、^{186}Ｒｅ、^{188}Ｒｅ、^{142}Ｐｒ、^{105}ＲｈおよびＲｕがあるが、これに限定されるものではない。

【０１１９】

いくつかの態様では、薬剤をｂｉＭａｂにコンジュゲートしてもよい。たとえば、ｓｃＦｖを含むｂｉＭａｂは、細胞傷害性薬物にコンジュゲートしてもよい。この例では、ｓｃＦｖが細胞表面上の標的抗原に結合することができ、その後細胞傷害性薬物が細胞に送達される。いくつかの態様では、ｂｉＭａｂコンジュゲートは細胞内移行し、細胞傷害性薬物を細胞に放出する。当該技術分野において公知の任意の細胞傷害性薬物をｂｉＭａｂにコンジュゲートしてもよい。抗体コンジュゲートの中にはＦＤＡにより既に承認されているもの、あるいは現在臨床試験が行われているものもある。

【０１２０】

ある特徴では、薬剤および他の分子は、部位特異的なコンジュゲーションによりｂｉＭａｂを標的としてもよい。たとえば、ｂｉＭａｂは、コンジュゲーション反応のための遊離チオール基が得られるシステイン操作ドメイン（結合ユニットおよび／またはＦｃドメインに導入されたシステインを含む）を含んでもよい。ある態様では、特異的なコンジュゲーション部位を含むようにｂｉＭａｂを操作してもよい。図２２５は、薬剤コンジュゲーション用に修飾したｂｉＭａｂを模式化したものである。いくつかの態様では、本開示は、Ｆｃ領域が、ＥＵインデックスにより番号付けされた２３９位、２８２位、２８９位、２９７位、３１２位、３２４位、３３０位、３３５位，３３７位、３３９位、３５６位、３５９位、３６１位、３８３位、３８４位、３９８位、４００位、４４０位、４２２位および４４２位の１つまたは複数にアミノ酸置換を含むＦｃ変異ｂｉＭａｂを提供する。いくつかの態様では、Ｆｃ領域は、以下の群：ａ）２８９位および４４０位；ｂ）３３０位および４４０位；ｃ）３３９位および４４０位；ｄ）３５９位および４４０位；ｅ）２８９位および３５９位；ｆ）３３０位および３５９位；ｇ）３３９位および３５９位；ｈ）２８９位および３３９位；ｉ）３３０位および３３９位；ｊ）２８９位および３３０位；ｋ）３３９位および４４２位；ｌ）２８９位、３３９位および４４２位；ｍ）２８９位、３３０位および３３９位；ｎ）３３０位、３３９位および４４２位；ならびにｏ）２８９位、３３０位および４４２位の群の１つまたは複数に置換を含む。他の態様では、本開示は、ＦａｂアームのＣＨ１ドメインが、ＥＵインデックスにより番号付けされた１３１位、１３２位、１３４位、１３５位、１３６位および１３９位の１つまたは複数に置換を含むｂｉＭａｂを提供する。一態様では、置換は、システイン、リジン、チロシン、ヒスチジン、セレノシステインおよびセレノメチオニンから選択されるアミノ酸の置換を含む。特定の態様では、置換はシステインである。安定なシステイン操作抗体を作製するための方法は、その内容全体を本明細書に援用する米国特許第７，８５５，２７５号明細書、米国特許出願公開第２０１１００３３３７８号明細書および国際公開第２０１１／００５４８１号パンフレットに記載されている。

【０１２１】

７．　例示的な標的

いくつかの態様では、特定の分子対がｂｉＭａｂの標的となる（たとえば、結合ユニット１は標的の一方に結合し、結合ユニット２は他方の標的に結合する）。本開示のｂｉＭ

ａｂは、たとえば、ＩＬ－１αおよびＩＬ－１β；ＩＬ－１２およびＩＬ－１８；ＴＮＦαおよびＩＬ－２３；ＴＮＦαおよびＩＬ－１３；ＴＮＦおよびＩＬ－１８；ＴＮＦおよびＩＬ－１２；ＴＮＦおよびＩＬ－１β；ＴＮＦおよびＭＩＦ；ＴＮＦおよびＩＬ－１７；ならびにＴＮＦおよびＩＬ－１５；ＴＮＦおよびＶＥＧＦ；ＶＥＧＦＲおよびＥＧＦＲ；ＩＬ－１３およびＩＬ－９；ＩＬ－１３およびＩＬ－４；ＩＬ－１３およびＩＬ－５；ＩＬ－１３およびＩＬ－２５；ＩＬ－１３およびＴＡＲＣ；ＩＬ－１３およびＭＤＣ；ＩＬ－１３およびＭＩＦ；ＩＬ－１３およびＴＧＦ－β；ＩＬ－１３およびＬＨＲアゴニスト；ＩＬ－１３およびＣＬ２５；ＩＬ－１３およびＳＰＲＲ２ａ；ＩＬ－１３およびＳＰＲＲ２ｂ；ＩＬ－１３およびＡＤＡＭ８；ＴＮＦαおよびＰＧＥ４；ＩＬ－１３およびＰＥＤ２；ＴＮＦおよびＰＥＧ２から選択されるサイトカインの対に結合することができる。

【０１２２】

ある態様では、本開示のｂｉＭａｂは、たとえば、ＣＤ１３８およびＣＤ２０；ＣＤ１３８およびＣＤ４０；ＣＤ１９およびＣＤ２０；ＣＤ２０およびＣＤ３；ＣＤ３８およびＣＤ１３８；ＣＤ３８およびＣＤ２０；ＣＤ３８およびＣＤ４０；ＣＤ４０およびＣＤ２０；ＣＤ－８およびＩＬ－６；ＣＳＰＧおよびＲＧＭ　Ａ；ＣＴＬＡ４およびＢＴＮＯ２；ＩＧＦ１およびＩＧＦ２；ＩＧＦ１／２およびＥｒｂＢ２；ＩＧＦＲおよびＥＧＦＲ；ＥｒｂＢ２およびＥｒｂＢ３；ＥｒｂＢ２およびＣＤ６４；ＩＬ－１２およびＴＷＥＡＫ；ＩＬ－１３およびＩＬ－１β；ＭＡＧおよびＲＧＭ　Ａ；ＮｇＲおよびＲＧＭ　Ａ；ＮｏｇｏＡおよびＲＧＭ　Ａ；ＯＭＧｐおよびＲＧＭ　Ａ；ＰＤＬ－１およびＣＴＬＡ４；ＲＧＭ　ＡおよびＲＧＭ　Ｂ；Ｔｅ３８およびＴＮＦα；ＴＮＦαおよびＢｌｙｓ；ＴＮＦαおよびＣＤ－２２；ＴＮＦαおよびＣＴＬＡ－４；ＴＮＦαおよびＧＰ１３０；ＴＮＦαおよびＩＬ－１２ｐ４０；およびＴＮＦαおよびＲＡＮＫリガンドから選択される標的の対に結合することができてもよい。

【０１２３】

いくつかの態様では、本開示のｂｉＭａｂは、たとえばＢＭＰ１、ＢＭＰ２、ＢＭＰ３Ｂ（ＧＤＦ１０）、ＢＭＰ４、ＢＭＰ６、ＢＭＰ８、ＣＳＦ１（Ｍ－ＣＳＦ）、ＣＳＦ２（ＧＭ－ＣＳＦ）、ＣＳＦ３（Ｇ－ＣＳＦ）、ＥＰＯ、ＦＧＦ１（αＦＧＦ）、ＦＧＦ２（βＦＧＦ）、ＦＧＦ３（ｉｎｔ－２）、ＦＧＦ４（ＨＳＴ）、ＦＧＦ５、ＦＧＦ６（ＨＳＴ－２）、ＦＧＦ７（ＫＧＦ）、ＦＧＦ９、ＦＧＦ１０、ＦＧＦ１１、ＦＧＦ１２、ＦＧＦ１２Ｂ、ＦＧＦ１４、ＦＧＦ１６、ＦＧＦ１７、ＦＧＦ１９、ＦＧＦ２０、ＦＧＦ２１、ＦＧＦ２３、ＩＧＦ１、ＩＧＦ２、ＩＮＦα１、ＩＮＦα２、ＩＮＦα４、ＩＮＦα５、ＩＮＦα６、ＩＮＦα７、ＩＮＦβ１、ＩＮＦγ、ＩＮＦω１、ＦＩＬ１、ＦＩＬ１（ＥＰＳＩＲＯＮ）、ＦＩＬ１（ＺＥＴＡ）、ＩＬ１α、ＩＬ１β、ＩＬ２、ＩＬ３、ＩＬ４、ＩＬ５、ＩＬ６、ＩＬ７、ＩＬ８、ＩＬ９、ＩＬ１０、ＩＬ１１、ＩＬ１２Ａ、ＩＬ１２Ｂ、ＩＬ１３、ＩＬ１４、ＩＬ１５、ＩＬ１６、ＩＬ１７、ＩＬ１７Ｂ、ＩＬ１８、ＩＬ１９、ＩＬ２０、ＩＬ２２、ＩＬ２３、ＩＬ２４、ＩＬ２５、ＩＬ２６、ＩＬ２７、ＩＬ２８Ａ、ＩＬ２８Ｂ、ＩＬ２９、ＩＬ３０、ＰＤＧＦＡ、ＰＤＧＦＢ、ＴＧＦＡ、ＴＧＦＢ１、ＴＧＦＢ２、ＴＧＦＢ３、ＬＴＡ（ＴＮＦ－β）、ＬＴＢ、ＴＮＦ（ＴＮＦ－α）、ＴＮＦＳＦ４（ＯＸ４０リガンド）、ＴＮＦＳＦ５（ＣＤ４０リガンド）、ＴＮＦＳＦ６（ＦａｓＬ）、ＴＮＦＳＦ７（ＣＤ２７リガンド）、ＴＮＦＳＦ８（ＣＤ３０リガンド）、ＴＮＦＳＦ９（４－１ＢＢリガンド）、ＴＮＦＳＦ１０（ＴＲＡＩＬ）、ＴＮＦＳＦ１１（ＴＲＡＮＣＥ）、ＴＮＦＳＦ１２（ＡＰＯ３Ｌ）、ＴＮＦＳＦ１３（Ａｐｒｉｌ）、ＴＮＦＳＦ１３Ｂ、ＴＮＦＳＦ１４（ＨＶＥＭ－Ｌ）、ＴＮＦＳＦ１５（ＶＥＧＩ）、ＴＮＦＳＦ１８、ＦＩＧＦ（ＶＥＧＦＤ）、ＶＥＧＦ、ＶＥＧＦＢ、ＶＥＧＦＣ、ＩＬ１Ｒ１、ＩＬ１Ｒ２、ＩＬ１ＲＬ１、ＩＬ１ＲＬ２、ＩＬ２ＲＡ、ＩＬ２ＲＢ、ＩＬ２ＲＧ、ＩＬ３ＲＡ、ＩＬ４Ｒ、ＩＬ５ＲＡ、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ７Ｒ、ＩＬ８ＲＡ、ＩＬ８ＲＢ、ＩＬ９Ｒ、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＩＬ１１ＲＡ、ＩＬ１２ＲＢ１、ＩＬ１２ＲＢ２、ＩＬ１３ＲＡ１、ＩＬ１３ＲＡ２、ＩＬ１５ＲＡ、ＩＬ１７Ｒ、ＩＬ１８Ｒ１、ＩＬ２０ＲＡ、ＩＬ２１Ｒ、ＩＬ２２Ｒ、ＩＬ１ＨＹ１、ＩＬ１ＲＡＰ、ＩＬ１ＲＡＰ

Ｌ１、ＩＬ１ＲＡＰＬ２、ＩＬ１ＲＮ、ＩＬ６ＳＴ、ＩＬ１８ＢＰ、ＩＬ１８ＲＡＰ、ＩＬ２２ＲＡ２、ＡＩＦ１、ＨＧＦ、ＬＥＰ（レプチン）、ＰＴＮ、およびＴＨＰＯの中から選択される１種、２種もしくはそれ以上のサイトカイン、サイトカイン関連タンパク質およびサイトカイン受容体に結合することができてもよい。

【０１２４】

さらなる態様では、本開示のｂｉＭａｂは、たとえば、ＣＣＬ１（Ｉ－３０９）、ＣＣＬ２（ＭＣＰ－１／ＭＣＡＦ）、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１ａ）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１ｂ）、ＣＣＬ５（ＲＡＮＴＥＳ）、ＣＣＬ７（ＭＣＰ－３）、ＣＣＬ８（ｍｃｐ－２）、ＣＣＬ１１（エオタキシン）、ＣＣＬ１３（ＭＣＰ－４）、ＣＣＬ１５（ＭＩＰ－１ｄ）、ＣＣＬ１６（ＨＣＣ－４）、ＣＣＬ１７（ＴＡＲＣ）、ＣＣＬ１８（ＰＡＲＣ）、ＣＣＬ１９（ＭＩＰ－３ｂ）、ＣＣＬ２０（ＭＩＰ－３ａ）、ＣＣＬ２１（ＳＬＣ／ｅｘｏｄｕｓ－２）、ＣＣＬ２２（ＭＤＣ／ＳＴＣ－１）、ＣＣＬ２３（ＭＰＩＦ－１）、ＣＣＬ２４（ＭＰＩＦ－２／エオタキシン－２）、ＣＣＬ２５（ＴＥＣＫ）、ＣＣＬ２６（エオタキシン－３）、ＣＣＬ２７（ＣＴＡＣＫ／ＩＬＣ）、ＣＣＬ２８、ＣＸＣＬ１（ＧＲＯ１）、ＣＸＣＬ２（ＧＲＯ２）、ＣＸＣＬ３（ＧＲＯ３）、ＣＸＣＬ５（ＥＮＡ－７８）、ＣＸＣＬ６（ＧＣＰ－２）、ＣＸＣＬ９（ＭＩＧ）、ＣＸＣＬ１０（ＩＰ　１０）、ＣＸＣＬ１１（Ｉ－ＴＡＣ）、ＣＸＣＬ１２（ＳＤＦ１）、ＣＸＣＬ１３、ＣＸＣＬ１４、ＣＸＣＬ１６、ＰＦ４（ＣＸＣＬ４）、ＰＰＢＰ（ＣＸＣＬ７）、ＣＸ３ＣＬ１（ＳＣＹＤ１）、ＳＣＹＥ１、ＸＣＬ１（リンホタクチン）、ＸＣＬ２（ＳＣＭ－１ｂ）、ＢＬＲ１（ＭＤＲ１５）、ＣＣＢＰ２（Ｄ６／ＪＡＢ６１）、ＣＣＲ１（ＣＫＲ１／ＨＭ１４５）、ＣＣＲ２（ｍｃｐ－１ＲＢ／ＲＡ）、ＣＣＲ３（ＣＫＲ３／ＣＭＫＢＲ３）、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５（ＣＭＫＢＲ５／ＣｈｅｍＲ１３）、ＣＣＲ６（ＣＭＫＢＲ６／ＣＫＲ－Ｌ３／ＳＴＲＬ２２／ＤＲＹ６）、ＣＣＲ７（ＣＫＲ７／ＥＢＩ１）、ＣＣＲ８（ＣＭＫＢＲ８／ＴＥＲ１／ＣＫＲ－Ｌ１）、ＣＣＲ９（ＧＰＲ－９－６）、ＣＣＲＬ１（ＶＳＨＫ１）、ＣＣＲＬ２（Ｌ－ＣＣＲ）、ＸＣＲ１（ＧＰＲ５／ＣＣＸＣＲ１）、ＣＭＫＬＲ１、ＣＭＫＯＲ１（ＲＤＣ１）、ＣＸ３ＣＲ１（Ｖ２８）、ＣＸＣＲ４、ＧＰＲ２（ＣＣＲ１０）、ＧＰＲ３１、ＧＰＲ８１（ＦＫＳＧ８０）、ＣＸＣＲ３（ＧＰＲ９／ＣＫＲ－Ｌ２）、ＣＸＣＲ６（ＴＹＭＳＴＲ／ＳＴＲＬ３３／Ｂｏｎｚｏ）、ＨＭ７４、ＩＬ８ＲＡ（ＩＬ８Ｒａ）、ＩＬ８ＲＢ（ＩＬ８Ｒｂ）、ＬＴＢ４Ｒ（ＧＰＲ１６）、ＴＣＰ１０、ＣＫＬＦＳＦ２、ＣＫＬＦＳＦ３、ＣＫＬＦＳＦ４、ＣＫＬＦＳＦ５、ＣＫＬＦＳＦ６、ＣＫＬＦＳＦ７、ＣＫＬＦＳＦ８、ＢＤＮＦ、Ｃ５Ｒ１、ＣＳＦ３、ＧＲＣＣ１０（Ｃ１０）、ＥＰＯ、ＦＹ（ＤＡＲＣ）、ＧＤＦ５、ＨＩＦ１Ａ、ＩＬ８、ＰＲＬ、ＲＧＳ３、ＲＧＳ１３、ＳＤＦ２、ＳＬＩＴ２、ＴＬＲ２、ＴＬＲ４、ＴＲＥＭ１、ＴＲＥＭ２およびＶＨＬの中から選択される１種または複数種のケモカイン、ケモカイン受容体およびケモカイン関連タンパク質に結合することができてもよい。

【０１２５】

さらなる態様では、本開示のｂｉＭａｂは、たとえば、７０７－ＡＰ、ＡＬＫ、ＡＦＰ、ＡＫＡＰ－４、ＡＮＨＹＤＲＡＳＥ　ＩＸ、ＡＲＴ－４、Ｂ７Ｈ３、ＢＡＧＥ、ｂ－カテニン変異（ｂ－ｃａｔｅｎｉｎ－ｍｕｔａｔｅｄ）、Ｂｃｒ－ａｂｌ、ＢＯＲＩＳ、ＣＡＭＥＬ、ＣＡＰ－１、ＣＡＳＰ－８、ＣＤＣ２７変異（ＣＤＣ２７　ｍｕｔａｔｅｄ）、ＣＤＫ４変異（ＣＤＫ４　ｍｕｔａｔｅｄ）、ＣＥＡ、ＣＴ、サイクリンＢ１（ＣＹＣＬＩＮ　Ｂ１）、Ｃｙｐ－Ｂ、ＣＹＰ１Ｂ１、ＤＡＭ－６／ＭＡＧＥ－Ｂ２、ＤＡＭ－１０／ＭＡＧＥ－Ｂ１、ＥＧＦＲｖＩＩＩ、ＥＬＦ２Ｍ、ＥＰＣＡＭ、ＥＰＨＡ２、ＥＰＨＡ４、ＥＲＧ、ＥＴＶ６－ＡＭＬ１、ＦＡＰ、ＦＬＵＣＯＳＹＬ、Ｇ２５０、ＧＡＧＥ、ＧＤ２、ＧＤ３、ＧＬＯＢＯＨ、ＧＭ１、ＧＭ３、ＧｎＴ－Ｖ、Ｇｐ１００、ＨＡＧＥ、ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ＨＥＲ４、ＨＬＡ－Ａ＊０２０１－Ｒ１７０Ｉ、ＨＰＶ－Ｅ６、ＨＰＶ－Ｅ７、ＨＳＰ７０－２Ｍ、ＨＳＴ－２、ＨＴＥＲＴ、ｉＣＥ、ＫＩＡＡ０２０５、ＬＡＧＥ、ＬＣＫ、ＬＤＬＲ／ＦＵＴ、ＬＭＰ２、ＬＵＧＵＭＡＩＮ、ＭＡＤ－ＣＴ１、ＭＡＤ－ＣＴ２、ＭＡＧＥ、ＭＡＧＥ－Ａ１、ＭＡＧＥ－Ａ３、ＭＡＲＴ１、ＭＣ１Ｒ、ＭＥＳＯＴＨＥＬＩＮ、ＭＬ－ＩＡＰ、ＭＵＣ１、ＭＵＭ－１、－２、－３、ＭＹＣＮ、

ＮＡ１７、ＮＡ８８－Ａ、ＮＹ－ＥＳＯ－１、Ｐ１５、ｐ１９０ ｍｉｎｏｒ ｂｃｒ－ａｂｌ、Ｐ５３、ＰＡＧＥ４、ＰＡＰ、ＰＡＸＳ、ＰＤＧＦＲ Ｂ、ＰＬＡＣ１、Ｐｍｌ／ＲＡＲａ、ポリシアル酸（ＰＯＬＹＳＩＡＬＩＣ ＡＣＩＤ）、ＰＲ１、ＰＲＡＭＥ、ＰＳＡ、ＰＳＣＡ、ＰＳＭＡ、ＲＡＧＥ、ＲＡＳ－ミュータント、ＲＧＳ５、ＲＨＯＣ、ＲＵ１、ＲＵ２、ＳＡＧＥ、ＳＡＲＴ－１、ＳＡＲＴ－３、ＳＳＸ２、ＳＴＮ、ＳＵＲＶＩＶＩＮ、ＴＥＬ／ＡＭＬ１、ＴＩＥ２、ＴＰＩ変異（ＴＰＩ ｍｕｔａｔｅｄ）、ＴＲＰ－１、ＴＲＰ－２、ＴＲＰ－２／ＩＮＴ２、ＶＥＧＦＲ２、ＷＴ１およびＸＡＧＥ１の中から選択される１種または複数種の癌抗原に結合することができてもよい。

【０１２６】

他のｂｉＭａｂは、たとえば、膜内在性タンパク質、たとえばイオンチャネル、イオンポンプ、Ｇタンパク質共役型受容体、構造タンパク質、接着タンパク質、たとえばインテグリン、トランスポーター、膜結合酵素、エネルギーの蓄積および伝達に関わるタンパク質および脂質アンカー型タンパク質、たとえばＧタンパク質、ならびに一部の膜アンカー型キナーゼの中から選択される細胞表面タンパク質に結合することができてもよい。また、ｂｉＭａｂは、酵素、たとえばキナーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、ホスファターゼ、脂肪酸シンテターゼ、消化酵素、たとえばペプシン、トリプシンおよびキモトリプシン、リゾチーム、ならびにポリメラーゼに結合することができてもよい。さらに、ｂｉＭａｂは、受容体、たとえばホルモン受容体、リンホカイン受容体、モノカイン受容体、増殖因子受容体、Ｇタンパク質共役型受容体などに結合することができてもよい。

【０１２７】

さらなる態様では、本開示のｂｉＭａｂは、１つまたは複数の感染性因子（たとえば、細菌、ウイルス）に結合することができる。感染細菌には、グラム陰性菌およびグラム陽性菌があるが、これに限定されるものではない。グラム陽性菌には、パスツレラ属（Ｐａｓｔｅｕｒｅｌｌａ ｓｐｅｃｉｅｓ）、ブドウ球菌属（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｉ ｓｐｅｃｉｅｓ）、およびストレプトコッカス属（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐｅｃｉｅｓ）があるが、これに限定されるものではない。グラム陰性菌には、エシェリキア・コリ（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）、シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ｓｐｅｃｉｅｓ）、およびサルモネラ属（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ ｓｐｅｃｉｅｓ）があるが、これに限定されるものではない。感染細菌の具体的な例としては、ヘリコバクター・ピロリ（Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ ｐｙｌｏｒｉｓ）、ボレリア・ブルグドルフェリ（Ｂｏｒｒｅｌｉａ ｂｕｒｇｄｏｒｆｅｒｉ）、レジオネラ・ニューモフィリア（Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ ｐｎｅｕｍｏｐｈｉｌｉａ）、マイコバクテリア属（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉａ ｓｐｓ）（たとえば、Ｍ．ツベルクローシス（Ｍ．ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）、Ｍ．アビウム（Ｍ．ａｖｉｕｍ）、Ｍ．イントラセルラーレ（Ｍ．ｉｎｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒｅ）、Ｍ．カンサシ（Ｍ．ｋａｎｓａｓｉｉ）、Ｍ．ゴルドナエ（Ｍ．ｇｏｒｄｏｎａｅ））、スタフィロコッカス・アウレウス（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ ａｕｒｅｕｓ）、シュードモナス・エルジノーサ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）、ナイセリア・ゴノレア（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｇｏｎｏｒｒｈｏｅａｅ）、髄膜炎菌（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ）、リステリア・モノサイトゲネス（Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｍｏｎｏｃｙｔｏｇｅｎｅｓ）、ストレプトコッカス・ピオゲネス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｙｏｇｅｎｅｓ）（Ａ群ストレプトコッカス（Ｇｒｏｕｐ Ａ Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ））、ストレプトコッカス・アガラクチア（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ａｇａｌａｃｔｉａｅ）（Ｂ群ストレプトコッカス（Ｇｒｏｕｐ Ｂ Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ））、ストレプトコッカス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）（ビリダンス群）、ストレプトコッカス・フェカリス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｆａｅｃａｌｉｓ）、ストレプトコッカス・ボビス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｂｏｖｉｓ）、ストレプトコッカス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）（嫌気性種）、ストレプトコッカス・ニューモニエ（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、病原性カンピロバクター・エスピー（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ ｓｐ．）、エンテロコッカス・エスピー（Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．）、ヘモフ

ィルス・インフルエンザエ（Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ）、バチルス・アントラシス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ａｎｔｈｒａｃｉｓ）、コリネバクテリウム・ジフセリエ（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｄｉｐｈｔｈｅｒｉａｅ）、コリネバクテリウム・エスピー（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｓｐ．）、エリシペロスリクス・ルシオパシエ（Ｅｒｙｓｉｐｅｌｏｔｈｒｉｘ ｒｈｕｓｉｏｐａｔｈｉａｅ）、クロストリジウム・パーフリンジェンス（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｐｅｒｆｒｉｎｇｅｎｓ）、クロストリジウム・テタニ（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｔｅｔａｎｉ）、エンテロバクター・アエロゲネス（Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒ ａｅｒｏｇｅｎｅｓ）、クレブシエラ・ニューモニエ（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、パスツレラ・ムルトシダ（Ｐａｓｔｕｒｅｌｌａ ｍｕｌｔｏｃｉｄａ）、バクテロイデス・エスピー（Ｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ ｓｐ．）、フソバクテリウム・ヌクレアタム（Ｆｕｓｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ｎｕｃｌｅａｔｕｍ）、ストレプトバチルス・モニリフォルミス（Ｓｔｒｅｐｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｍｏｎｉｌｉｆｏｒｍｉｓ）、トレポネーマ・パリダム（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ ｐａｌｌｉｄｕｍ）、トレポネーマ・ペルテニュ（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ ｐｅｒｔｅｎｕｅ）、レプトスピラ（Ｌｅｐｔｏｓｐｉｒａ）、リケッチア（Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ）およびアクチノマイセス・イスラエリ（Ａｃｔｉｎｏｍｙｃｅｓ ｉｓｒａｅｌｌｉ）があるが、これに限定されるものではない。ウイルスには、エンテロウイルス、ロタウイルス、アデノウイルス、肝炎ウイルスがあるが、これに限定されるものではない。ヒトで見出された具体的なウイルスの例には、レトロウイルス科（Ｒｅｔｒｏｖｉｒｉｄａｅ）（たとえば、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）；ピコルナウイルス科（Ｐｉｃｏｒｎａｖｉｒｉｄａｅ）（たとえば、ポリオウイルス、Ａ型肝炎ウイルス；エンテロウイルス、ヒトコクサッキーウイルス、ライノウイルス、エコーウイルス）；カリシウイルス科（Ｃａｌｃｉｖｉｒｉｄａｅ）（たとえば、胃腸炎を引き起こす菌株）；トガウイルス科（Ｔｏｇａｖｉｒｉｄａｅ）（たとえば、ウマ脳炎ウイルス、風疹ウイルス）；フラビウイルス科（Ｆｌａｖｉｖｉｒｉｄａｅ）（たとえば、デングウイルス、脳炎ウイルス、黄熱病ウイルス）；コロナウイルス科（Ｃｏｒｏｎａｖｉｒｉｄａｅ）（たとえば、コロナウイルス）；ラブドウイルス科（Ｒｈａｂｄｏｖｉｒｉｄａｅ）（たとえば、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス）；フィロウイルス科（Ｆｉｌｏｖｉｒｉｄａｅ）（たとえば、エボラウイルス）；パラミクソウイルス科（Ｐａｒａｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅ）（たとえば、パラインフルエンザウイルス、ムンプスウイルス、麻疹ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス）；オルトミクソウイルス科（Ｏｒｔｈｏｍｙｘｏｖｉｒｉｄａｅ）（たとえば、インフルエンザウイルス）；ブンガウイルス科（Ｂｕｎｇａｖｉｒｉｄａｅ）（たとえば、ハンタンウイルス、ブンガウイルス、フレボウイルスおよびナイロウイルス）；アレナウイルス科（Ａｒｅｎａｖｉｒｉｄａｅ）（出血熱ウイルス）；レオウイルス科（Ｒｅｏｖｉｒｉｄａｅ）（たとえば、レオウイルス、オルビビウルスおよびロタウイルス）；ビルナウイルス科（Ｂｉｒｎａｖｉｒｉｄａｅ）；ヘパドナウイルス科（Ｈｅｐａｄｎａｖｉｒｉｄａｅ）（Ｂ型肝炎ウイルス）；パルボウイルス科（Ｐａｒｖｏｖｉｒｉｄａｅ）（パルボウイルス）；パポバウイルス科（Ｐａｐｏｖａｖｉｒｉｄａｅ）（パピローマウイルス、ポリオーマウイルス）；アデノウイルス科（大部分のアデノウイルス）；ヘルペスウイルス科（Ｈｅｒｐｅｓｖｉｒｉｄａｅ）（単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ）１および２、水痘帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ））；ポックスウイルス科（Ｐｏｘｖｉｒｉｄａｅ）（痘瘡ウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス）；イリドウイルス科（Ｉｒｉｄｏｖｉｒｉｄａｅ）（たとえば、アフリカ豚コレラウイルス）；および未分類ウイルス（たとえば、海綿状脳症の病原因子、デルタ肝炎の病原体、非Ａ非Ｂ型肝炎の病原体；ノーウォークウイルスおよび関連ウイルス、ならびにアストロウイルス）があるが、これに限定されるものではない。

【０１２８】

ある態様では、本開示のｂｉＭａｂは同じ標的上の２つの異なるエピトープに結合する（たとえば、結合ユニット１は標的上の第１のエピトープに結合し、結合ユニット２は同じ標的上の第２のエピトープに結合する）。

【０１２９】
ある態様では、本開示のｂｉＭａｂはＥＧＦＲおよびＩＧＦＲ１に結合する。ある態様では、結合ユニット１はＥＧＦＲに結合し、結合ユニット２はＩＧＦＲ１に結合する。他の態様では、結合ユニット１はＩＧＦＲ１に結合し、結合ユニット２はＥＧＦＲに結合する。他の態様では、本開示のｂｉＭａｂはＶＥＧＦおよびＡｎｇ２に結合する。ある態様では、結合ユニット１はＶＥＧＦに結合し、結合ユニット２はＡｎｇ２に結合する。他の態様では、結合ユニット１はＡｎｇ２に結合し、結合ユニット２はＶＥＧＦに結合する。
【０１３０】
いくつかの態様では、本開示のｂｉＭａｂが多量体であることにより、標識または療法剤が特定の細胞型または分子の標的を標的とすることができる。たとえば、ｂｉＭａｂの１つの機能ドメインが細胞表面の標的に結合し、同時に同じｂｉＭａｂの別の機能ドメインが検出に有用なハプテンまたは標識剤に結合することができる。同様に、１つの機能ドメインが細胞標的に結合し、同時に第２の機能ドメインがトキシンに結合することができる。両方の結合反応が単一の分子により媒介されるため、トキシンが細胞傷害機能に影響を及ぼす細胞標的の近傍にトキシンを配置することができる。
【０１３１】
Ｂ．ｂｉＭａｂをコードする核酸分子
本開示は、ｂｉＭａｂをコードする核酸分子を提供する。本開示の一態様は、本開示のｂｉＭａｂのいずれかをコードする核酸分子を提供する。核酸分子は、ｂｉＭａｂの重鎖および／または軽鎖をコードしてもよい。
【０１３２】
いくつかの態様では、ｂｉＭａｂの重鎖をコードする核酸分子は、ＶＨ１ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む核酸部分；C_H1ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む核酸部分；第２のエピトープに結合する結合ドメイン（ＢＤ）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸部分；Ｆｃドメインをコードするヌクレオチド配列を含む核酸部分を含む連続する核酸分子であり、核酸分子は、ポリペプチドリンカーをコードするヌクレオチド配列を含む少なくとも１つの核酸部分をさらに含む。いくつかの態様では、ＣＨ１ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む核酸部分は、第１のポリペプチドリンカー（Ｌ１）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸部分を介して、結合ドメイン（ＢＤ）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸部分に結合される。いくつかの態様では、結合ドメイン（ＢＤ）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸部分は、第２のポリペプチドリンカー（Ｌ２）をコードするヌクレオチド配列を含む核酸部分を介して、Ｆｃ領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸部分に結合される。
【０１３３】
いくつかの態様では、結合ドメイン（ＢＤ）はｓｃＦｖであり、ｓｃＦｖをコードする核酸部分は、ＶＬ２ドメインをコードするヌクレオチド配列およびＶＨ２をコードするヌクレオチド配列を含み、ＶＬ２ドメインをコードするヌクレオチド配列は、フレキシブルなポリペプチドリンカーをコードするヌクレオチド配列を介して、ＶＨ２ドメインをコードするヌクレオチド配列に結合される。
【０１３４】
いくつかの態様では、ｂｉＭａｂの重鎖をコードする連続する核酸分子は、ＶＨ１ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む核酸部分の５’末端に結合した結合ユニットをコードする核酸部分および／またはＦｃ領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸部分の３’末端に結合した結合ユニットをコードする核酸部分をさらに含む。ある態様では、結合ユニットをコードする核酸部分は、ポリペプチドリンカーをコードするヌクレオチド配列を含む核酸部分を介して、ＶＨ１ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む核酸部分に結合される。他のある種の態様では、Ｆｃ領域をコードするヌクレオチド配列を含む核酸部分は、ポリペプチドリンカーをコードするヌクレオチド配列を含む核酸部分を介して、結合ユニットをコードする核酸部分に結合される。
【０１３５】

いくつかの態様では、核酸分子はｂｉＭａｂの軽鎖をコードする。ｂｉＭａｂの軽鎖をコードする核酸は、ＶＬ１ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む核酸部分、およびＣＬドメインをコードするヌクレオチド配列を含む核酸部分を含んでもよい。

【０１３６】

いくつかの態様では、ｂｉＭａｂの軽鎖をコードする核酸分子は、ＶＬ１ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む核酸部分の５’末端に結合した結合ユニットをコードする核酸部分および／またはＣＬドメインをコードするヌクレオチド配列を含む核酸部分の３’末端に結合した結合ユニットをコードする核酸部分をさらに含む。ある態様では、結合ユニットをコードする核酸部分は、ポリペプチドリンカーをコードするヌクレオチド配列を含む核酸部分を介して、ＶＬ１ドメインをコードするヌクレオチド配列を含む核酸部分に結合される。他のある種の態様では、ＣＬドメインをコードするヌクレオチド配列を含む核酸部分は、ポリペプチドリンカーをコードするヌクレオチド配列を含む核酸部分を介して、結合ユニットをコードする核酸部分に結合される。本開示の別の態様は、本明細書に記載するような核酸分子を含むベクターであって、本明細書に記載するようなｂｉＭａｂをコードするベクターを提供する。

【０１３７】

さらなる態様は、本明細書に記載するような核酸分子のいずれかで形質転換された宿主細胞を提供する。本開示の別の態様では、本明細書に記載するような核酸分子を含むベクターを含む宿主細胞を提供する。一態様では、宿主細胞は２つ以上のベクターを含んでもよい。

【０１３８】

本開示は、本開示の任意のｂｉＭａｂのほか、ｂｉＭａｂの軽鎖あるいはキメラ重鎖をコードする核酸分子を意図している。たとえば、本開示は、ｂｉＭａｂ軽鎖をコードするヌクレオチド配列（たとえば、第１のエピトープに結合する結合ユニット１、たとえばＦａｂのＶＬ１＋ＣＬ）および／またはｂｉＭａｂキメラ重鎖をコードするヌクレオチド配列（たとえば、ＶＨ１＋ＣＨ１＋Ｌ１＋ＢＤ＋Ｌ２＋Ｆｃ）を含む核酸分子を意図している。本開示はさらに、追加の結合ユニットをさらに含む本開示の任意のｂｉＭａｂをコードする核酸分子を意図している。たとえば、追加の結合ユニットをさらに含むｂｉＭａｂ軽鎖をコードするヌクレオチド配列（たとえば、結合ユニット２＋結合ユニット１のＶＬ１＋ＣＬ）および／または追加の結合ユニットをさらに含むｂｉＭａｂキメラ重鎖をコードするヌクレオチド配列（たとえば、結合ユニット４＋ＶＨ１＋ＣＨ１＋Ｌ１＋ＢＤ＋Ｌ２＋Ｆｃ）を含む核酸分子。

【０１３９】

Ｃ．ｂｉＭａｂを作製するための方法

本開示は、ｂｉＭａｂを作製するための方法を提供する。ある態様では、組換え核酸を発現コンストラクトの１つまたは複数の調節ヌクレオチド配列に作動可能に連結してもよい。ｂｉＭａｂの軽鎖およびキメラ重鎖をコードする核酸配列は、任意の配向（たとえば、軽鎖が重鎖の前またはその逆）で同じ発現ベクターにクローニングしてもよいし、あるいは２つの異なるベクターにクローニングしてもよい。１つのベクターを用いて発現を行う場合、２つのコーディング遺伝子は、それ自体の遺伝子エレメント（たとえば、プロモーター、ＲＢＳ、リーダー、停止、ポリＡなど）を有していてもよいし、あるいは１セットの遺伝子エレメントでクローニングしてもよいが、シストロンエレメントに連結する。調節ヌクレオチド配列は一般に、発現に使用される宿主細胞に適切なものとする。種々の宿主細胞に適切な発現ベクターおよび好適な調節配列の多くの種類が当該技術分野において公知である。典型的には、前記１つまたは複数の調節ヌクレオチド配列として、プロモーター配列、リーダー配列またはシグナル配列、リボソーム結合部位、転写開始および終結配列、翻訳開始配列および終結配列、ならびにエンハンサーまたはアクチベーター配列を挙げることができるが、これに限定されるものではない。本開示は、当該技術分野において公知の構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターを意図している。プロモーターは、天然プロモーターでも、あるいは２つ以上のプロモーターのエレメントを組み合わせ

たハイブリッドプロモーターでもよい。発現コンストラクトは細胞のエピソーム、たとえばプラスミド上に存在してもよいし、あるいは発現コンストラクトを染色体に挿入してもよい。

【０１４０】

ある態様では、発現ベクターは、形質転換された宿主細胞の選択を可能にする選択可能なマーカー遺伝子を含む。選択可能なマーカー遺伝子は当該技術分野において周知であり、使用する宿主細胞によって異なる。ある態様では、本開示は、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、かつ少なくとも１つの調節配列に作動可能に連結された発現ベクターに関する。調節配列は当該技術分野で知られており、コードされたポリペプチドの発現を誘導するように選択される。したがって、調節配列という用語は、プロモーター、エンハンサーおよび他の発現制御エレメントを含む。例示的かつ非限定的な調節配列については、Ｇｏｅｄｄｅｌ；Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ（１９９０）に記載される。発現ベクターの設計は、形質転換される宿主細胞の選択および／または発現が望まれるタンパク質の種類のような要因によって異なることがあることを理解すべきである。さらに、ベクターのコピー数、コピー数を制御する能力、およびベクターによりコードされた他の任意のタンパク質、たとえば抗生物質マーカーの発現も考慮すべきである。

【０１４１】

本開示はさらに本開示のｂｉＭａｂを作製する方法に関する。たとえば、ｂｉＭａｂをコードする１つまたは２つ以上の発現ベクター（たとえば、キメラ重鎖および軽鎖をコードする単一のベクター、またはキメラ重鎖をコードするベクターと軽鎖をコードするベクターとの２つのベクター）をトランスフェクトした宿主細胞を適切な条件下で培養してポリペプチドの発現が起こるようにしてもよい。ｂｉＭａｂを分泌させ、ポリペプチドを含む細胞と培地との混合物から単離してもよい。あるいは、ｂｉＭａｂを細胞質または膜画分に保持し、細胞を採取、溶解してタンパク質を単離してもよい。細胞培養物は、宿主細胞、培地および他の副産物を含む。細胞培養に好適な培地は当該技術分野において周知である。タンパク質を精製するには、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、限外濾過、電気泳動およびイムノアフィニティ精製などの当該技術分野において公知の技術を用いてｂｉＭａｂを細胞培養培地、宿主細胞または両方から単離してもよい。ある態様では、ｂｉＭａｂは、その精製を容易にするドメインを含む融合タンパク質として作製する。

【０１４２】

クローン化遺伝子またはその一部を、原核細胞、真核細胞（酵母、トリ、昆虫または哺乳動物）あるいは両方の発現に好適なベクターにライゲートして組換え核酸を作製してもよい。組換えポリペプチドを産生する発現媒体には、プラスミドおよび他のベクターがある。たとえば、好適なベクターとして、原核細胞、たとえばＥ．コリ（Ｅ．ｃｏｌｉ）での発現用の下記の種類のプラスミド：ｐＢＲ３２２由来のプラスミド、ｐＥＭＢＬ由来のプラスミド、ｐＥＸ由来のプラスミド、ｐＢＴａｃ由来のプラスミドおよびｐＵＣ由来のプラスミドが挙げられる。ある態様では、哺乳動物発現ベクターは、細菌においてベクターを伝播しやすくする原核生物配列および真核細胞に発現する１つまたは複数の真核生物転写ユニットの両方を含む。ｐｃＤＮＡＩ／ａｍｐ由来、ｐｃＤＮＡＩ／ｎｅｏ由来、ｐＲｃ／ＣＭＶ由来、ｐＳＶ２ｇｐｔ由来、ｐＳＶ２ｎｅｏ由来、ｐＳＶ２－ｄｈｆｒ由来、ｐＴｋ２由来、ｐＲＳＶｎｅｏ由来、ｐＭＳＧ由来、ｐＳＶＴ７由来、ｐｋｏ－ｎｅｏ由来およびｐＨｙｇ由来のベクターは、真核細胞のトランスフェクションに好適な哺乳動物発現ベクターの例である。これらのベクターの一部は、細菌プラスミド、たとえばｐＢＲ３２２由来の配列で修飾して、原核生物細胞および真核細胞の両方において複製および薬剤耐性選択を行いやすくする。あるいは、真核細胞におけるタンパク質の一過性発現には、ウイルス、たとえばウシパピローマウイルス（ＢＰＶ－１）またはエプスタインバーウイルス（ｐＨＥＢｏ、ｐＲＥＰ由来およびｐ２０５）の誘導体を使用してもよい。プラ

スミドの調製および宿主生物の形質転換に使用される様々な方法は、当該技術分野において周知である。原核細胞および真核細胞の両方に好適な他の発現系のほか、一般的な組換え手順については、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，２ｎｄ Ｅｄ．，ｅｄ．ｂｙ Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｆｒｉｔｓｃｈ ａｎｄ Ｍａｎｉａｔｉｓ（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，１９８９）Ｃｈａｐｔｅｒｓ １６ ａｎｄ １７を参照されたい。場合によっては、組換えポリペプチドを、バキュロウイルス発現系の使用により発現させると望ましい場合がある。そうしたバキュロウイルス発現系の例として、ｐＶＬ由来のベクター（ｐＶＬ１３９２、ｐＶＬ１３９３およびｐＶＬ９４１など）、ｐＡｃＵＷ由来のベクター（ｐＡｃＵＷ１など）、およびｐＢｌｕｅＢａｃ由来のベクター（β－ｇａｌを含むｐＢｌｕｅＢａｃ ＩＩＩ）が挙げられる。

【０１４３】

融合遺伝子を作製するための技術はよく知られている。基本的に、異なるポリペプチド配列をコードする様々な核酸フラグメントの連結は、ライゲーションのための平滑末端または付着末端、適切な末端を与える制限酵素消化、必要に応じて付着末端の平滑化、望ましくない連結を回避するためのアルカリホスファターゼ処理、および酵素的ライゲーションを利用して従来の技術により行われる。別の態様では、融合遺伝子は、自動ＤＮＡ合成装置を含む従来の技術により合成してもよい。あるいは、アンカープライマーを用いて遺伝子フラグメントのＰＣＲ増幅を行ってもよく、２つの連続した核酸フラグメント間に相補的オーバーハングを形成し、その後これをアニールしてキメラ遺伝子配列を得てもよい（たとえば、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，ｅｄｓ．Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ：１９９２を参照されたい）。

【０１４４】

いくつかの態様では、上述の核酸のいずれかを発現する発現ベクターを使用して宿主細胞にｂｉＭａｂ発現させてもよい。たとえば、ｂｉＭａｂは、細菌細胞、たとえばＥ．コリ（Ｅ．ｃｏｌｉ）、昆虫細胞（たとえば、バキュロウイルス発現系を使用）、酵母または哺乳動物細胞に発現させてもよい。他の好適な宿主細胞も当業者に知られている。

【０１４５】

従来の技術により発現ベクターを宿主細胞に導入したら、次いで従来の技術によりトランスフェクト細胞を培養して抗体を産生させる。このため、本開示は、ｂｉＭａｂまたはそのフラグメントをコードし、異種プロモーターに作動可能に連結されたポリヌクレオチドを含む宿主細胞を含む。ある態様では、全ｂｉＭａｂの発現のため、キメラ重鎖および軽鎖の両方を宿主細胞に（同一または異なるベクターから）共発現させてもよい。ある態様では、ｂｉＭａｂの重鎖および軽鎖の両方を単一のプロモーターから発現させる。ある態様では、ｂｉＭａｂの重鎖および軽鎖を複数のプロモーターから発現させる。ある態様では、ｂｉＭａｂの重鎖および軽鎖は単一のベクターにコードされる。ある態様では、ｂｉＭａｂの重鎖および軽鎖は複数のベクターのベクターにコードされる。

【０１４６】

組換え抗体の発現用の宿主として利用可能な哺乳動物細胞株は当該技術分野において周知であり、アメリカンタイプカルチャーコレクション（ＡＴＣＣ）から入手できる多くの不死化細胞株、以下に限定されるものではないが、チャイニーズハムスターの卵巣（ＣＨＯ）細胞、ＨｅＬａ細胞、ベビーハムスター腎臓（ＢＨＫ）細胞、サル腎細胞（ＣＯＳ）、ヒト肝細胞癌細胞（たとえば、Ｈｅｐ Ｇ２）、ヒト腎臓上皮２９３細胞、およびいくつかの他の細胞株がある。各宿主細胞は、タンパク質および遺伝子産物の翻訳後プロセシングおよび修飾に特徴的かつ特異的なメカニズムを有する。適切な細胞株または宿主系を選択すれば、発現される抗体またはその一部の正しい修飾およびプロセシングを確実なものにすることができる。この目的のため、一次転写物の適切なプロセシング、遺伝子産物のグリコシル化およびリン酸化のための細胞機構を有する真核宿主細胞を使用してもよい。こうした哺乳動物宿主細胞としては、ＣＨＯ細胞、ＶＥＲＹ細胞、ＢＨＫ細胞、Ｈｅｌ

ａ細胞、ＣＯＳ細胞、ＭＤＣＫ細胞、２９３細胞、３Ｔ３細胞、Ｗ１３８細胞、ＢＴ４８３細胞、Ｈｓ５７８Ｔ細胞、ＨＴＢ２細胞、ＢＴ２Ｏ細胞およびＴ４７Ｄ細胞、ＮＳ０細胞（機能的免疫グロブリン鎖を内因性にまったく産生しないマウス骨髄腫細胞株）、ＳＰ２０細胞、ＣＲＬ７Ｏ３Ｏ細胞およびＨｓＳ７８Ｂｓｔ細胞があるが、これに限定されるものではない。一態様では、ヒトリンパ球の不死化により開発されたヒト細胞株を使用して組換え技術によりモノクローナル抗体を産生させてもよい。一態様では、ヒト細胞株ＰＥＲ．Ｃ６．（Ｃｒｕｃｅｌｌ，Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ）を使用して組換え技術によりモノクローナル抗体を産生してもよい。

【０１４７】

組換え抗体の発現用の宿主として使用してもよい別の細胞株には、昆虫細胞（たとえばＳｆ２１／Ｓｆ９、トリコプルシア・ニ（Ｔｒｉｃｈｏｐｌｕｓｉａ　ｎｉ）Ｂｔｉ－Ｔｎ５ｂ１－４）または酵母細胞（たとえばＳ．セレビシエ（Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）、ピキア（Ｐｉｃｈｉａ）、米国特許第７，３２６，６８１号明細書；など）、植物細胞（米国特許出願公開第２００８００６６２００号明細書）；およびニワトリ細胞（国際公開第２００８１４２１２４号パンフレット）があるが、これに限定されるものではない。

【０１４８】

ある態様では、本開示のｂｉＭａｂは細胞株に安定発現させる。安定発現は、組換えタンパク質を長期間高い収率で産生するために使用してもよい。たとえば、抗体分子を安定発現する細胞株を作製してもよい。発現制御エレメント（たとえば、プロモーター、エンハンサー、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位など）および選択可能なマーカー遺伝子を含む適切に設計されたベクターで宿主細胞を形質転換してもよい。外来ＤＮＡの導入後、細胞を濃縮培地で１～２日間増殖させてから、選択培地に切り換えてもよい。組換えプラスミドの選択可能なマーカーは、選択に対する耐性を付与し、染色体にプラスミドを安定に組み込んだ細胞を増殖させて細胞増殖巣を形成させ、次にこれをクローニングにし、細胞株として増殖させてもよい。高収率で安定な細胞株を作製するための方法は当該技術分野において周知であり、試薬は一般に市販されている。

【０１４９】

ある態様では、本開示のｂｉＭａｂを細胞株に一過性に発現させる。一過性トランスフェクションは、細胞に導入された核酸がその細胞のゲノムまたは染色体ＤＮＡに組み込まれないプロセスである。実際、核酸は細胞内に染色体外エレメント、たとえばエピソームとして維持される。エピソームの核酸の転写プロセスは影響を受けず、エピソームの核酸によりコードされたタンパク質が産生される。

【０１５０】

細胞株は、安定なトランスフェクションあるいは一過性トランスフェクションを問わず、モノクローナル抗体の発現および産生につながる当該技術分野において周知の細胞培養培地及び条件で維持される。ある態様では、哺乳動物細胞培養培地は、たとえば、ＤＭＥＭまたはＨａｍ’ｓ　Ｆ１２を含む市販されている培地（ｍｅｄｉａ　ｆｏｒｍｕｌａｔｉｏｎ）に基づく。他の態様では、細胞増殖および生物学的タンパク質発現の両方の増加を支援するように細胞培養培地を改変する。本明細書で使用する場合、「細胞培養培地」、「培養培地」および「培地（ｍｅｄｉｕｍ　ｆｏｒｍｕｌａｔｉｏｎ）」という用語は、多細胞生物または組織の外側の人工的なインビトロ環境で細胞を維持、成長、伝播または増殖するための栄養液をいう。細胞培養培地は、たとえば、細胞増殖を促進するように処方された細胞培養増殖培地、または組換えタンパク質の産生を促進するように処方された細胞培養産生培地を含む特定の細胞培養用途に最適化してもよい。栄養素、成分および要素という用語は、本明細書において同義で使われ、細胞培養培地を構成する成分をいう。

【０１５１】

分子が産生されたら、分子を免疫グロブリン分子または他の多量体分子を精製するための当該技術分野において公知の任意の方法により、たとえば、クロマトグラフィー（たとえば、イオン交換クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー（特に特異的な抗原プ

ロテインＡまたはプロテインＧに対する親和性による）およびサイズカラムクロマトグラフィー）、遠心分離、溶解度差、またはタンパク質の精製ための他の任意の標準的技術により精製してもよい。さらに、本開示の分子またはそのフラグメントは、上述あるいはそれ以外の当該技術分野において公知の異種ポリペプチド配列（本明細書で「タグ」という）と融合して精製しやすくしてもよい。

【０１５２】

組換え技術を用いる場合、分子は、細胞内のペリプラズムに産生させても、あるいは培地に直接分泌させてもよい。分子を細胞内に産生させる場合、第１のステップとして、たとえば、遠心分離または限外濾過により、宿主細胞または溶解フラグメントを問わず、微粒子状の破片を除去する。Ｃａｒｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１０：１６３－１６７（１９９２）には、Ｅ．コリ（Ｅ．ｃｏｌｉ）のペリプラズムに分泌される抗体を単離するための手順が記載されている。分子を培地に分泌させる場合、市販されているタンパク質濃縮フィルター、たとえば、ＡｍｉｃｏｎまたはＭｉｌｌｉｐｏｒｅ Ｐｅｌｌｉｃｏｎ限外濾過装置を用いて、そうした発現系の上清を最初に濃縮するのが一般的である。プロテアーゼ阻害剤、たとえばＰＭＳＦを前述のステップのいずれかに含めてタンパク質分解を阻害してもよく、抗生物質を含めて外来汚染物質の増殖を防止してもよい。

【０１５３】

細胞から調製された組成物は、たとえば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析および／またはアフィニティークロマトグラフィーを単独あるいは他の精製ステップと組み合わせて精製してもよい。プロテインＡの親和性リガンドとしての適合性は、分子に任意の免疫グロブリンＦｃドメインが存在する場合、その種およびアイソタイプに依存し、その適合性は当業者に理解されるであろう。親和性リガンドが結合するマトリックスは、ほとんどの場合、アガロースであるが、他のマトリックスも利用できる。機械的に安定なマトリックス、たとえばコントロールドポアガラスまたはポリ（スチレンジビニル）ベンゼンを用いると、アガロースで達成できるよりも流速を速くし処理時間を短縮することができる。回収される分子に応じてタンパク質精製の他の技術、たとえばイオン交換カラムによる分画、エタノール沈殿、逆相ＨＰＬＣ、シリカクロマトグラフィー、ヘパリンクロマトグラフィー、アニオンまたはカチオン交換樹脂（ポリアスパラギン酸カラムなど）を用いたセファロースクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、ＳＤＳ－ＰＡＧＥおよび硫酸アンモニウム沈殿も利用することができる。

【０１５４】

任意の予備精製ステップ後、目的の分子および汚染物質を含む混合物は、ｐＨ約２．５～４．５の溶出緩衝液を用いて低ｐＨ疎水性相互作用クロマトグラフィーに付し、低塩濃度（たとえば、約０～０．２５Ｍ塩）で行ってもよい。

【０１５５】

ｂｉＭａｂは、たとえば、上記および／または実施例に記載の技術の任意の１つまたは組み合わせを用いて作製および精製してもよい。あくまで例示であるが、ｂｉＭａｂは、ＰＢＳ １×で平衡化したＨｉＴｒａｐ ｒＰｒｏｔｅｉｎＡ ＦＦカラムを用いて標準的プロテインＡアフィニティークロマトグラフィーにより親和性精製してもよい。ｂｉＭａｂをカラムに充填すればよく、これを洗浄して汚染物質および非結合材料を除去することができる。洗浄はＰＢＳ １×で、Ａ２８０の記録がベースラインに達するまで行ってもよい。その後結合タンパク質を２５ｍＭのグリシンｐＨ２．８で溶出すればよい。画分は、０．１倍量の１Ｍのトリス－ＨＣｌ緩衝液ｐＨ８の添加により直ちに中和してもよい。次いで画分をｂｉＭａｂ含有量についてＡ２８０の吸光度を読み取ることで解析することができる。ｂｉＭａｂを含む各画分はまとめてプールして、１０，０００キロダルトン（ｋＤａ）のカットオフ透析膜を使用して４℃、１０倍量のＰＢＳ １×で一晩透析してもよい。次いで透析したｂｉＭａｂは、０．２２ミクロンのフィルターを使用して濾過し、還元および非還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、たとえば４～１２％Ｎｕｐａｇｅゲル、ＭＯＰＳ

泳動用緩衝液で解析してもよい。

【０１５６】

プロテインＡ精製後、コンストラクトの分子量（ＭＷ、ダルトン）およびモノマー含有量を判定するため、ｂｉＭａｂを分析用サイズ排除クロマトグラフィーで解析してもよい。１００ｍＭのリン酸ナトリウム、ｐＨ６．８を含む緩衝液を用い１ｍｌ／ｍｉｎの流量で、約１０～５００ｋＤａの範囲のＭＷを有する球状タンパク質を分離するＴＳＫ－ＧＥＬ　Ｇ３０００ＳＷＸＬカラム（Ｔｏｓｏｈ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ　ＬＬＣ，Ｍｏｎｔｇｏｍｅｒｙｖｉｌｌｅ，ＰＡ）を使用してＳＥＣ－ＨＰＬＣを行ってもよい。

【０１５７】

どのようにｂｉＭａｂを精製するかにかかわらず、本開示のｂｉＭａｂの機能的結合を確認するため、結合アッセイ（精製の前および／または後）を行ってもよい。たとえば、二重ＥＬＩＳＡアッセイを行ってもよい。いくつかの態様では、第１の抗原をウェルにコートし、この抗原に結合するとｂｉＭａｂが固定化される。タグを付けた第２の抗原をウェルに加えて検出する。第１の抗原への結合により固定化され、かつ第２の抗原にも結合する二重特異性分子のみが検出される。

【０１５８】

Ｄ．　医薬製剤

ある態様では、本開示は医薬組成物を提供する。こうした医薬組成物は、ｂｉＭａｂをコードする核酸分子を含む組成物であってもよい。また、こうした医薬組成物は、ｂｉＭａｂまたはｂｉＭａｂの組み合わせと、薬学的に許容される賦形剤とを含む組成物であってもよい。ある態様では、本開示の医薬組成物は薬物として使用される。

【０１５９】

ある態様では、ｂｉＭａｂまたはｂｉＭａｂの組み合わせ（またはｂｉＭａｂまたはｂｉＭａｂの組み合わせをコードする核酸分子）を薬学的に許容されるキャリア、賦形剤または安定剤と共に医薬組成物として製剤化してもよい。ある態様では、こうした医薬組成物は、当該技術分野において公知の方法を用いて任意の１つまたは複数の投与経路を介してヒトまたは非ヒト動物に投与するのに好適である。当業者であれば理解するように、経路および／または投与モードは所望の結果によって異なる。「薬学的に許容されるキャリア」という用語は、活性成分の生物活性の有効性を阻害しない１種または複数種の無毒性材料を意味する。こうした調製物は通常、塩、緩衝剤、防腐剤、相性のよいキャリアおよび任意に他の治療薬を含んでもよい。こうした薬学的に許容される調製物は、相性のよい固体もしくは液体充填剤、希釈液またはヒトへの投与に好適なカプセル化材料をさらに含んでもよい。本明細書に記載の製剤に利用してもよい他の意図しているキャリア、賦形剤および／または添加剤には、たとえば、着香剤、抗菌剤、甘味料、酸化防止剤、帯電防止剤、脂質、タンパク質賦形剤、たとえば血清アルブミン、ゼラチン、カゼイン、塩形成対イオン、たとえばナトリウムおよび同種のものがある。これらおよび本明細書に記載の製剤に使用するのに好適な別の公知の薬学的キャリア、賦形剤および／または添加剤については、たとえば、「Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅ　＆　Ｐｒａｃｔｉｃｅ　ｏｆ　Ｐｈａｒｍａｃｙ」、２１st ｅｄ．，Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ　Ｗｉｌｌｉａｍｓ　＆　Ｗｉｌｋｉｎｓ，（２００５）、および「Ｐｈｙｓｉｃｉａｎ’ｓ　Ｄｅｓｋ　Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ」、６０th ｅｄ．，Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｅｃｏｎｏｍｉｃｓ，Ｍｏｎｔｖａｌｅ，Ｎ．Ｊ．（２００５）に記載されているように当該技術分野において公知である。所望または要求される投与モード、溶解性および／または安定性に好適な薬学的に許容されるキャリアを選択すればよい。

【０１６０】

本明細書に記載の製剤は、所望の投与に適切なｗ／ｖが得られる濃度で有効剤を含む。ある態様では、有効剤は、約１ｍｇ／ｍｌ～約２００ｍｇ／ｍｌ、約１ｍｇ／ｍｌ～約１００ｍｇ／ｍｌ、約１ｍｇ／ｍｌ～約５０ｍｇ／ｍｌまたは約１ｍｇ／ｍｌ～約２５ｍｇ／ｍｌの濃度で製剤に存在する。ある態様では、有効剤は約２５ｍｇ／ｍｌの濃度で存在する。ある態様では、製剤における有効剤の濃度は、約０．１～約１００重量％の範囲で

あってもよい。ある態様では、有効剤の濃度は、０．００３～１．０モルの範囲である。

【０１６１】

一態様では、本開示の製剤は、エンドトキシンおよび／または関連する発熱性物質を実質的に含まないパイロジェンフリー製剤である。エンドトキシンには、微生物内部に閉じ込められており、微生物が破壊されるかまたは死んだときにのみ放出されるトキシンがある。発熱性物質には、細菌および他の微生物の外膜由来の、発熱を引き起こす耐熱性物質（糖タンパク質）がある。これらの物質はどちらも、ヒトに投与される場合、発熱、低血圧およびショックを引き起こす恐れがある。有害作用の可能性があるため、少量のエンドトキシンでも静脈内投与される医薬品溶液から除去しなければならない。食品医薬品局（「ＦＤＡ」）は、静脈内薬剤投与の場合、１回につき体重１キログラム当たり１回１時間以内に５エンドトキシン単位（ＥＵ）の上限を設定している（Ｔｈｅ Ｕｎｉｔｅｄ Ｓｔａｔｅｓ Ｐｈａｒｍａｃｏｐｅｉａｌ Ｃｏｎｖｅｎｔｉｏｎ，Ｐｈａｒｍａｃｏｐｅｉａｌ Ｆｏｒｕｍ ２６（１）：２２３（２０００））。ある特定の態様では、組成物におけるエンドトキシンおよび発熱性物質のレベルは１０ＥＵ／ｍｇ未満、または５ＥＵ／ｍｇ未満、または１ＥＵ／ｍｇ未満、または０．１ＥＵ／ｍｇ未満、または０．０１ＥＵ／ｍｇ未満、または０．００１ＥＵ／ｍｇ未満である。

【０１６２】

本開示の製剤は、インビボ投与に使用する場合、無菌にすべきである。本開示の製剤は、無菌化濾過、放射線などを含む様々な滅菌方法により滅菌することができる。一態様では、滅菌済０．２２ミクロンフィルターで製剤を濾過滅菌する。注射用無菌組成物は、「Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ＆ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ」、２１ｓｔ ｅｄ．，Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ Ｗｉｌｌｉａｍｓ ＆ Ｗｉｌｋｉｎｓ，（２００５）に記載されているような従来の医療慣行に従い、製剤化してもよい。

【０１６３】

本開示の治療用組成物は、経口投与、経鼻投与、経肺投与、局所（頬粘膜および舌下など）投与、直腸投与、経膣投与および／または非経口投与など特定の投与経路用に製剤化してもよい。「非経口投与」および「非経口投与する」という語句は、本明細書で使用する場合、経腸投与および局所投与以外の通常注射による投与モードをいい、以下に限定されるものではないが、静脈内、筋肉内、動脈内、髄膜内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、嚢下、くも膜下、髄腔内、硬膜外および胸骨内の注射および注入がある。局所投与または経皮投与に好適な本開示の製剤には、散剤、スプレー剤、軟膏剤、ペースト剤、クリーム剤、ローション剤、ゲル剤、溶液剤、パッチ剤および吸入剤がある。ｂｉＭａｂは、滅菌条件下で薬学的に許容されるキャリア、および必要とされる場合がある任意の防腐剤、緩衝液または噴霧剤と混合してもよい（米国特許第７，３７８，１１０号明細書；同第７，２５８，８７３号明細書；同第７，１３５，１８０号明細書；米国特許出願公開第２００４－００４２９７２号明細書；および同第２００４－００４２９７１号明細書）。

【０１６４】

製剤は、単位剤形で提供すると都合がよいことがあり、薬学の技術分野において公知の任意の方法により調製することができる。本開示の医薬組成物中の活性成分の実際の投薬量レベルは、個々の患者に毒性がなく、患者、組成物および投与モードに求められる治療反応を達成するのに効果的な活性成分の量（たとえば、「治療有効量」）を得られるように変化させてもよい。選択される投与量レベルは、利用する特定の組成物の活性、投与経路、投与時間、利用している特定の化合物の排泄速度、処置の期間、他の薬剤、利用する特定の組成物と組み合わせて使用される化合物および／または材料、処置されている患者の年齢、性別、体重、状態、一般的な健康状態および既往歴、および医療技術分野でよく知られている同様の因子など種々の薬物動態学的因子によって異なる。好適な投与量は、約０．０００１～約１００ｍｇ／ｋｇ体重以上、たとえば約０．１ｍｇ／ｋｇ体重、１ｍｇ／ｋｇ体重、１０ｍｇ／ｋｇ体重または５０ｍｇ／ｋｇ体重の範囲であってもよく、約

１～約１０ｍｇ／ｋｇ体重が好適である。
【０１６５】
本開示は同様に、診断および研究用途に好適な製剤を製造することも意図していることに留意されたい。こうした製剤の有効剤の濃度のほか、賦形剤および／または発熱性物質の有無は、個々の用途および使用目的に基づき選択することができる。
【０１６６】
Ｅ．　使用
ｂｉＭａｂは、本明細書に記載するように、疾患または障害に関連する標的に結合することで、標的の活性を除去または他の方法で阻害し、疾患または障害を処置する、および／または、その症状を軽減するために使用することができる。いくつかの態様では、本開示のｂｉＭａｂは、被検体の血管新生、細胞増殖、細胞運動、細胞浸潤または細胞接着に関連する障害の処置を必要とする被検体に、疾患または障害の症状に関連する標的に結合する治療有効用量の本開示のｂｉＭａｂを投与することにより、被検体の血管新生、細胞増殖、細胞運動、細胞浸潤または細胞接着に関連する障害を処置するために使用してもよい。たとえば、増殖因子および／または増殖因子受容体による異常なシグナル伝達は、望ましくない細胞増殖および癌の一因になることが示されている。したがって、ｂｉＭａｂを使用して、増殖因子のシグナル伝達に関連する望ましくない細胞増殖および／または癌を処置してもよい。特に、増殖因子シグナル伝達経路のタンパク質を標的とするｂｉＭａｂの投与により、腫瘍の腫瘍増殖曲線および／または腫瘍の体積を低下させることができる。同様の戦略を特定の癌または他のシグナル伝達分子に関連する望ましくない細胞増殖の例に使用してもよい。
【０１６７】
特異的ｂｉＭａｂの例示的かつ非限定的な例として、ＥＧＦＲおよびＩＧＦＲに結合する二重特異性を持つ二価分子がある。このｂｉＭａｂを使用して、ＥＧＦおよびＩＧＦシグナル伝達に関連する望ましくない細胞増殖および／または癌を処置してもよい。別の非限定的かつ例示的な特異的ｂｉＭａｂとして、ＶＥＧＦおよびＡｎｇ２に結合する二重特異性を持つ二価の分子がある。このｂｉＭａｂを使用して、ＶＥＧＦおよびＡｎｇ２シグナル伝達に関連する望ましくない細胞増殖および／または癌を処置してもよい。たとえば、ｂｉＭａｂを使用して、腫瘍増殖を阻害する、および／または、存在している腫瘍の体積を減少させることができる。同様に、ｂｉＭａｂを診断に使用して、細胞または腫瘍を検出またはモニターしてもよい。さらに、ｂｉＭａｂを研究の場面で使用して、たとえば、野生型細胞および組織または病変細胞および組織の細胞増殖および生存率を研究してもよい。
【０１６８】
他の態様では、本開示のｂｉＭａｂを使用して、感染性因子、たとえばウイルス、細菌または寄生虫により引き起こされた疾患または障害を処置してもよい。ｂｉＭａｂは、感染性因子上の１つまたは複数の生体分子標的に結合することで、その因子が宿主細胞に侵入および／または感染できなくなるように設計してもよい。あるいは、複数のｂｉＭａｂが感染性因子に結合して、天然の免疫グロブリンのように免疫反応を誘発してもよい。最後に、ｂｉＭａｂは、感染性因子により放出される標的分子が宿主細胞および組織に作用するのを防止するため、標的に結合させるのに使用してもよい。
【０１６９】
さらに他の態様では、本開示のｂｉＭａｂを使用して、抗原、たとえば花粉、植物、昆虫の体の一部および／もしくは分泌物、動物のフケ、堅果または自己抗原に対する免疫反応を調節してもよい。ｂｉＭａｂは、これらの抗原に存在する生体分子標的、および／または、ＩｇＥ、アナフィラトキシンまたはヒスタミンのようにこれらの標的に対して免疫反応を媒介する標的に結合するように操作してもよい。
【０１７０】
本明細書に記載のものなど、本開示のｂｉＭａｂはまた診断を目的として使用してもよい。たとえば、標的の発現の変化に関連する疾患または障害をスクリーニングするため、

被検体の組織または細胞において１つまたは複数の標的生体分子を検出してもよい。診断キットは、標的分子に結合する１種または複数種のｂｉＭａｂ、およびｂｉＭａｂと標的との反応がある場合にそれを知らせる検出系を含んでもよい。

【０１７１】

本開示は、治療用途、診断用途および研究用途を含むｂｉＭａｂの多くの用途を意図している。診断用途および研究用途はインビボでも、あるいはエキソビボでもよい。たとえば、特定のｂｉＭａｂを使用して、細胞培養物、組織生検または動物もしくは動物モデルにおいて細胞または組織が特定の抗原を発現するかどうか、および抗体分子が２つの抗原に同時に結合することで検出が向上するかどうか、細胞生存または挙動が変化するか、および同種のものを明らかにしてもよい。さらに、ｂｉＭａｂの活性を通常の抗体の活性と比較して、正常状態または疾患状態における複数の標的または複数のシグナル伝達経路の相互作用または役割を評価してもよい（たとえば、２つの標的の阻害を同時に行うと、各標的を別々に阻害するのと比較して細胞挙動に異なる影響を与える）。

【０１７２】

Ｆ．　キット

本開示の別の態様はキットである。一態様では、キットは、上述の核酸、ポリペプチド、発現ベクターまたは宿主細胞の組成物または医薬組成物のいずれか、および適切な使用または投与を指示する説明書またはラベルを含む。任意に、キットは、１つまたは複数の容器および／もしくはシリンジ、または送達もしくは使用を容易にする他の装置をさらに含んでもよい。本開示は、研究アッセイ、診断アッセイを行うための、および／または、治療有効量の投与を行うための要素の全サブセットまたは任意のサブセットがキットに入れられていてもよいことを意図している。同様に、キットは、たとえば本開示のｂｉＭａｂをコードする核酸を好適な条件下で発現する宿主細胞を培養して、ポリペプチドを作製するための説明書を含んでもよい。別の例として、本開示のｂｉＭａｂの治療投与用のキットは、ｂｉＭａｂの医薬製剤を含む溶液またはｂｉＭａｂの凍結乾燥調製物と、組成物の投与を必要とする患者に組成物を投与するための説明書および／または凍結乾燥物を再溶解するための説明書とを含んでもよい。

【０１７３】

本開示はまた、パッケージ化され、ラベルが付けられた最終医薬製品を包含する。この製品は、適切な入れ物または容器、たとえばガラスバイアルまたは密封された他の容器に適切な単位剤形を含む。非経口投与に好適な剤形の場合、活性成分、たとえば、上述のｂｉＭａｂは無菌であり、粒子を含まない溶液としての投与に好適である。ある態様では、製剤は静脈内投与、たとえばヒトまたは動物への点滴静注に好適である。

【０１７４】

特定の態様では、本開示の製剤は滅菌液として単回投与バイアルに処方される。例示的容器には、バイアル、ビン、プレフィルドシリンジ、ＩＶバッグ、ブリスターパック（１種または複数種の丸剤を含む）があるが、これに限定されるものではない。任意に、こうした容器には、医薬品または生物学的製剤の製造、使用または販売を規制する政府機関により定められた形式の注意書が添付されていてもよく、注意書は、ヒトの診断および／または投与のための製造、使用または販売に関する政府機関による承認を反映する。

【０１７５】

どのような医薬製品であっても、包装材料および容器は、保管および輸送中の製品の安定性を保護するように設計される。さらに、本開示の製品は、使用説明書、または対象の疾患または障害を適切に予防または処置する方法について医師、技術者または患者に助言する他の情報資料を含む。言い換えれば、製品は、投与レジメン、以下に限定されるものではないが、実際の用量、モニタリング手順など、および他のモニタリング情報を指示または推奨する指示手段を含む。

【０１７６】

診断アッセイ用のキットは、本開示のｂｉＭａｂを含む溶液またはｂｉＭａｂの凍結乾燥調製物を含んでもよく、ｂｉＭａｂは１つまたは複数の標的のほか、そうしたｂｉＭａ

ｂを検出するための試薬に特異的に結合する。ｂｉＭａｂは、当該技術分野において公知であり、本明細書に記載の方法により標識してもよく、以下に限定されるものではないが、小分子蛍光タグなどの標識、ビオチン、ＧＦＰもしくは他の蛍光タンパク質などのタンパク質、またはｈｉｓもしくはｍｙｃなどのエピトープ配列がある。同様に、キットには、ｂｉＭａｂの検出に使用される一次抗体を含めてもよい。一次抗体は、ｂｉＭａｂ上の配列を標的としても、あるいはｂｉＭａｂを標識した標識、タグもしくはエピトープを標的としてもよい。さらに、一次抗体は検出のために標識されていてもよいし、あるいは、一次抗体は、さらなるシグナルの増幅が求められる場合、やはりキットに含まれていてもよい二次抗体により検出されてもよい。

【０１７７】

また、研究用途のキットも考慮されている。こうしたキットは、たとえば、診断用途または治療用途向けのキットに類似していてもよいが、キットおよびその用途が研究目的のみに限定されることを明記するレベルを含む。

【０１７８】

例示的な実施形態

１．タンパク質であって、

第１のエピトープに結合するＦａｂアーム、

第２のエピトープに結合する結合ドメイン（ＢＤ）、および

ＣＨ２ドメインおよびＣＨ３ドメインを含むＦｃ領域；

を含み、

ＢＤは第１のポリペプチドリンカー（Ｌ１）を介してＦａｂアームに、第２のポリペプチドリンカー（Ｌ２）を介してＦｃ領域に相互に連結されており；かつタンパク質は第１および第２の各エピトープへの結合に対して二価である

タンパク質。

【０１７９】

２．Ｌ１は１～５０アミノ酸残基を含む、実施形態１に記載のタンパク質。

【０１８０】

３．Ｌ２は１～５０アミノ酸残基を含む、実施形態１または２に記載のタンパク質。

【０１８１】

４．Ｌ１およびＬ２は各々１～５０アミノ酸残基を含む、実施形態１～３のいずれかに記載のタンパク質。

【０１８２】

５．Ｌ１およびＬ２は各々１５～３０アミノ酸残基を含む、実施形態１～４のいずれかに記載のタンパク質。

【０１８３】

６．Ｌ１はヒンジ部分およびリンカー部分を含む、実施形態１～５のいずれかに記載のタンパク質。

【０１８４】

７．Ｌ２はヒンジ部分およびリンカー部分を含む、実施形態１～６のいずれかに記載のタンパク質。

【０１８５】

８．Ｌ１およびＬ２は各々ヒンジ部分およびリンカー部分を含む、実施形態１～７のいずれかに記載のタンパク質。

【０１８６】

９．Ｌ１は抗体ヒンジ領域の少なくとも５アミノ酸残基含む、実施形態１～８のいずれかに記載のタンパク質。

【０１８７】

１０．Ｌ２は抗体ヒンジ領域の少なくとも５アミノ酸残基含む、実施形態１～９のいずれかに記載のタンパク質。

【０１８８】

１１．Ｌ１は抗体ヒンジ領域の少なくとも７アミノ酸残基含む、実施形態１～１０のいずれかに記載のタンパク質。

【０１８９】

１２．Ｌ２は抗体ヒンジ領域の少なくとも７アミノ酸残基含む、実施形態１～１１のいずれかに記載のタンパク質。

【０１９０】

１３．Ｌ２は抗体ヒンジ領域の少なくとも１２アミノ酸残基含む、実施形態１～１２のいずれかに記載のタンパク質。

【０１９１】

１４．Ｌ１は抗体ヒンジ領域の８アミノ酸残基含む、実施形態１～１３のいずれかに記載のタンパク質。

【０１９２】

１５．Ｌ２は抗体ヒンジ領域の１５アミノ酸残基含む、実施形態１～１４のいずれかに記載のタンパク質。

【０１９３】

１６．Ｌ１およびＬ２は各々抗体ヒンジ領域または修飾抗体ヒンジ領域の全部または一部を含む、実施形態１～１５のいずれかに記載のタンパク質。

【０１９４】

１７．Ｌ１は抗体ヒンジ領域の少なくとも５アミノ酸残基含み、かつヒンジ領域はＥＵ２２１位にアスパラギン酸からグリシンへの置換を含む、実施形態１～１６のいずれかに記載のタンパク質。

【０１９５】

１８．ヒンジ領域はシステインが別のアミノ酸で置換されている置換を含む、実施形態１６または１７に記載のタンパク質。

【０１９６】

１９．Ｌ２は抗体ヒンジ領域の少なくとも５アミノ酸残基含み、かつヒンジ領域はＥＵ２２０位にシステインからバリンへの置換を含む、実施形態１～１８のいずれかに記載のタンパク質。

【０１９７】

２０．Ｌ１はＧｌｙ－Ｓｅｒペプチドを含むリンカー部分を含む、実施形態１～１９のいずれかに記載のタンパク質。

【０１９８】

２１．Ｌ２はＧｌｙ－Ｓｅｒペプチドを含むリンカー部分を含む、実施形態１～２０のいずれかに記載のタンパク質。

【０１９９】

２２．Ｌ１およびＬ２は各々Ｇｌｙ－Ｓｅｒペプチドを含むリンカー部分を含む、実施形態１～２１のいずれかに記載のタンパク質。

【０２００】

２３．Ｇｌｙ－Ｓｅｒペプチドは式（Ｇｌｙ４Ｓｅｒ）ｎであり、ｎは１、２、３、４、５、６、７、８、９および１０からなる群から選択される正の整数である、実施形態２０～２２のいずれかに記載のタンパク質。

【０２０１】

２４．Ｌ１はヒンジ部分を含まない、実施形態１～５のいずれかに記載のタンパク質。

【０２０２】

２５．Ｌ２はヒンジ部分を含まない、実施形態１～５のいずれかに記載のタンパク質。

【０２０３】

２６．Ｌ１およびＬ２はヒンジ部分を含まない、実施形態１～５のいずれかに記載のタンパク質。

【０２０４】

２７．Ｌ１はアミノ酸配列ＥＰＫＳＣＤＫＴ（配列番号４）を含む、実施形態１～２３

のいずれかに記載のタンパク質。
【０２０５】
２８．Ｌ１はアミノ酸配列ＥＰＫＳＣＧＫＴ（配列番号６）を含む、実施形態１～２３のいずれかに記載のタンパク質。
【０２０６】
２９．Ｌ１はアミノ酸配列ＥＰＫＳＣ（配列番号３８）を含む、実施形態１～２３のいずれかに記載のタンパク質。
【０２０７】
３０．Ｌ２はアミノ酸配列ＥＰＫＳＶＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ（配列番号１２）を含む、実施形態１～２３、２７～２９のいずれかに記載のタンパク質。
【０２０８】
３１．Ｌ２はアミノ酸配列ＣＰＰＣＰ（配列番号１４）を含む、実施形態１～２３、２７～２９のいずれかに記載のタンパク質。
【０２０９】
３２．Ｌ２はアミノ酸配列ＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ（配列番号４０）を含む、実施形態１～２３、２７～２９のいずれかに記載のタンパク質。
【０２１０】
３３．ＢＤはｓｃＦｖ、単一ドメイン抗体、一本鎖ダイアボディ、抗体模倣体、抗体可変ドメインおよび受容体結合ドメインからなる群から選択される、実施形態１～３２のいずれかに記載のタンパク質。
【０２１１】
３４．ＢＤはｓｃＦｖを含む、実施形態３３に記載のタンパク質。
【０２１２】
３５．ｓｃＦｖはＶＨドメイン、ポリペプチドリンカーおよびＶＬドメインを含む、実施形態３４に記載のタンパク質。
【０２１３】
３６．ＦａｂドメインはＬ１を介してｓｃＦｖのＶＨドメインのＮ末端に相互に連結される、実施形態３５に記載のタンパク質。
【０２１４】
３７．ＦａｂドメインはＬ１を介してｓｃＦｖのＶＬドメインのＮ末端に相互に連結される実施形態３５に記載のタンパク質。
【０２１５】
３８．Ｆｃ領域はＬ２を介してｓｃＦｖのＶＨドメインのＣ末端に相互に連結される、実施形態３５または３７に記載のタンパク質。
【０２１６】
３９．Ｆｃ領域はＬ２を介してｓｃＦｖのＶＬドメインのＣ末端に相互に連結される、実施形態３５または３６に記載のタンパク質。
【０２１７】
４０．ｓｃＦｖのＶＬドメインはＫａｂａｔ位置１００にシステインを有する、実施形態３５～３９のいずれかに記載のタンパク質。
【０２１８】
４１．ｓｃＦｖのＶＨドメインはＫａｂａｔ位置４４にシステインを有する、実施形態３５～４０のいずれかに記載のタンパク質。
【０２１９】
４２．抗体模倣体はミニボディ、マキシボディ（ｍａｘｙｂｏｄｙ）、アビマー、Ｆｎ３を用いたタンパク質スキャフォールド、アンキリンリピート、ＶＡＳＰポリペプチド、トリ膵ポリペプチド（ａＰＰ）、テトラネクチン、アフィリリン、ノッチン（ｋｎｏｔｔｉｎ）、ＳＨ３、ＰＤＺドメイン、プロテインＡドメイン、リポカリン、トランスフェリンおよびｋｕｎｉｔｚドメインからなる群から選択される、実施形態３３に記載のタンパク質。

【０２２０】
４３．Ｆｃ領域はＩｇＧ１由来のＦｃ領域、ＩｇＧ２由来のＦｃ領域、ＩｇＧ３由来のＦｃ領域、ＩｇＧ４由来のＦｃ領域、ＩｇＡ由来のＦｃ領域、ＩｇＭ由来のＦｃ領域、ＩｇＥ由来のＦｃ領域およびＩｇＤ由来のＦｃ領域からなる群から選択される、実施形態１～４２のいずれかに記載のタンパク質。
【０２２１】
４４．Ｆｃ領域は変異Ｆｃ領域を含む、実施形態４３に記載のタンパク質。
【０２２２】
４５．Ｆｃ領域は非グリコシル化される、実施形態４３または４４に記載のタンパク質。
【０２２３】
４６．Ｆｃ領域は脱グリコシル化される、実施形態４３または４４に記載のタンパク質。
【０２２４】
４７．Ｆｃ領域はフコシル化を低下させてあるか、または非フコシル化されている、実施形態４３または４４に記載のタンパク質。
【０２２５】
４８．変異Ｆｃ領域は２９７位に置換を含む、実施形態４４～４７のいずれかに記載のタンパク質。
【０２２６】
４９．２９７位の置換は２９７Ｑである、実施形態４８に記載のタンパク質。
【０２２７】
５０．変異Ｆｃ領域はＥＵインデックスにより番号付けされた２３９位、２８２位、２８９位、２９７位、３１２位、３２４位、３３０位、３３５位、３３７位、３３９位、３５６位、３５９位、３６１位、３８３位、３８４位、３９８位、４００位、４４０位、４２２位および４４２位の１つまたは複数に置換を含む、実施形態４３～４９のいずれかに記載のタンパク質。
【０２２８】
５１．ＦａｂアームのＣＨ１ドメインはＥＵインデックスにより番号付けされた１３１位、１３２位、１３４位、１３５位、１３６位および１３９位の１つまたは複数に置換を含む、先行する実施形態のいずれかに記載のタンパク質。
【０２２９】
５２．置換はシステイン、リジン、チロシン、ヒスチジン、セレノシステインおよびセレノメチオニンから選択されるアミノ酸への置換を含む、実施形態５０または５１に記載のタンパク質。
【０２３０】
５３．置換はシステインである、実施形態５２に記載のタンパク質。
【０２３１】
５４．タンパク質はＮ末端からＣ末端に以下のポリペプチドドメインを含むキメラ重鎖を含み
ＶＨ１－ＣＨ１－Ｌ１－ＢＤ－Ｌ２－Ｆｃ；
ＶＨ１はＦａｂの重鎖可変ドメインを含み、ＣＨ１はＦａｂの重鎖定常ドメイン１を含み、Ｌ１は第１のリンカーポリペプチドを含み、ＢＤは結合ユニット２を含み、Ｌ２は第２のリンカーポリペプチドを含み、ＦｃはＣＨ２およびＣＨ３ドメインを含む、実施形態１～５３のいずれかに記載のタンパク質。
【０２３２】
５５．ＢＤはｓｃＦｖを含む、実施形態５４に記載のタンパク質。
【０２３３】
５６．ｓｃＦｖはＮ末端からＣ末端に下記を含み、
ＶＨ２－ポリペプチドリンカー－ＶＬ２またはＶＬ２－ポリペプチドリンカー－

ＶＨ２；
ＶＨ２はｓｃＦｖの重鎖可変ドメインを含み、ＶＬ２はｓｃＦｖの軽鎖可変ドメインを含む、実施形態５５記載のタンパク質。
【０２３４】
５７．Ｌ１はヒンジ部分およびリンカー部分を含む、実施形態５４～５６のいずれかに記載のタンパク質。
【０２３５】
５８．Ｌ２はヒンジ部分およびリンカー部分を含む、実施形態５４～５７のいずれかに記載のタンパク質。
【０２３６】
５９．Ｌ１はＮ末端からＣ末端にヒンジ部分およびリンカー部分を含む、実施形態５７または５８に記載のタンパク質。
【０２３７】
６０．Ｌ２はＮ末端からＣ末端にリンカー部分およびヒンジ部分を含む、実施形態５７～５９のいずれかに記載のタンパク質。
【０２３８】
６１．Ｆａｂアームは第１のエピトープに結合し、かつ前記第１のエピトープはＥＧＦＲ、ＩＧＦＲ１、ＶＥＧＦ、Ａｎｇ２、ＰｓｌまたはＰｃｒＶから選択される標的上にある、実施形態１～６０のいずれかに記載のタンパク質。
【０２３９】
６２．ＢＤは第２のエピトープに結合し、前記第２のエピトープはＥＧＦＲ、ＩＧＦＲ１、ＶＥＧＦ、Ａｎｇ２、ＰｓｌまたはＰｃｒＶから選択される標的上にある、実施形態１～６０のいずれかに記載のタンパク質。
【０２４０】
６３．Ｆａｂアームは ＥＧＦＲに結合する、実施形態６１または６２に記載のタンパク質。
【０２４１】
６４．Ｆａｂアームは ＶＥＧＦに結合する、実施形態６１または６２に記載のタンパク質。
【０２４２】
６５．Ｆａｂアームは ＰｃｒＶに結合する、実施形態６１または６２に記載のタンパク質
【０２４３】
６６．ＢＤはＩＧＦＲ１に結合する、実施形態６１～６５のいずれかに記載のタンパク質。
【０２４４】
６７．ＢＤはＡｎｇ２に結合する、実施形態６１～６５のいずれかに記載のタンパク質。
【０２４５】
６８．ＢＤはＰｓｌに結合する、実施形態６１～６５のいずれかに記載のタンパク質
【０２４６】
６９．Ｆａｂアームは配列番号２４、２７、３３、３６、４６および４９のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むＶＨ１ドメインを含む、実施形態１～６８のいずれかに記載のタンパク質。
【０２４７】
７０．Ｆａｂアームは配列番号２１、２６、３０、３５、４３および４８のいずれかに記載のアミノ酸配列を含むＶＬ１ドメインを含む、実施形態１～６９のいずれかに記載のタンパク質。
【０２４８】
７１．Ｆａｂアームは配列番号２４に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ１ドメインおよび

配列番号２１に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ１ドメインを含む、実施形態６９または７０に記載のタンパク質。

【０２４９】

７２．Ｆａｂアームは配列番号３３に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ１ドメインおよび配列番号３０に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ１ドメインを含む、実施形態６９または７０に記載のタンパク質。

【０２５０】

７３．Ｆａｂアームは配列番号４６に記載のアミノ酸配列を含むＶＨ１ドメインおよび配列番号４３に記載のアミノ酸配列を含むＶＬ１ドメインを含む、実施形態６９または７０に記載のタンパク質。

【０２５１】

７４．ＢＤはｓｃＦｖを含み、ｓｃＦｖは配列番号２４、２７、３３、３６、４９、４９、２１、２６、３０、３５　４３および４８に記載の配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、実施形態１～６７３のいずれかに記載のタンパク質。

【０２５２】

７５．ｓｃＦｖは配列番号２５に記載のアミノ酸配列を含む、実施形態７４に記載のタンパク質。

【０２５３】

７６．ｓｃＦｖは配列番号３４に記載のアミノ酸配列を含む、実施形態７４に記載のタンパク質。

【０２５４】

７７．ｓｃＦｖは配列番号４７に記載のアミノ酸配列を含む、実施形態７４に記載のタンパク質。

【０２５５】

７８．タンパク質は配列番号２３または３２または４５に記載のアミノ酸配列を含むキメラ重鎖を含む、実施形態１～５４のいずれかに記載のタンパク質。

【０２５６】

７９．タンパク質は配列番号１９または２８または４１に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、実施形態７８に記載のタンパク質。

【０２５７】

８０．第１および第２のエピトープは異なる、実施形態１～７９のいずれかに記載のタンパク質。

【０２５８】

８１．第１および第２のエピトープは同じである、実施形態１～６８のいずれかに記載のタンパク質。

【０２５９】

８２．Ｆａｂアームおよび／またはＦｃ領域は少なくとも１つの結合ユニットをさらに含む、実施形態１～８１のいずれかに記載のタンパク質。

【０２６０】

８３．少なくとも１つの結合ユニットはポリペプチドリンカーを介してＦａｂアームおよび／またはＦｃに相互に連結される、実施形態８２に記載のタンパク質。

【０２６１】

８４．少なくとも１つの結合ユニットはキメラ重鎖のＮ末端および／またはＣ末端で相互に連結される、実施形態８２または８３に記載のタンパク質。

【０２６２】

８５．少なくとも１つの結合ユニットは軽鎖のＮ末端および／またはＣ末端で相互に連結される、実施形態８２～８４のいずれか１つに記載のタンパク質。

【０２６３】

８６．少なくとも１つの結合ユニットが重鎖のＮ末端および／またはＣ末端で相互に連結され、かつ少なくとも１つの結合ユニットが軽鎖のＮ末端および／またはＣ末端に相互

に連結される、実施形態８４または８５に記載のタンパク質。
【０２６４】
８７．少なくとも１つの結合ユニットが重鎖のＮ末端およびＣ末端で相互に連結され、および／または少なくとも１つの結合ユニットが軽鎖のＮ末端およびＣ末端に相互に連結される、実施形態８４または８５に記載のタンパク質。
【０２６５】
８８．少なくとも１つの結合ユニットが重鎖のＮ末端およびＣ末端で相互に連結され、かつ少なくとも１つの結合ユニットが軽鎖のＮ末端およびＣ末端に相互に連結される、実施形態８４または８５に記載のタンパク質。
【０２６６】
８９．タンパク質はＦａｂアームとＦｃ領域との間に相互に連結された少なくとも１つの追加の結合ユニットをさらに含む、実施形態１～８８のいずれかに記載のタンパク質。
【０２６７】
９０．少なくとも１つの追加の結合ユニットがＬ１とＢＤとの間に相互に連結される、実施形態８９に記載のタンパク質。
【０２６８】
９１．少なくとも１つの追加の結合ユニットがＢＤとＬ２との間に相互に連結される、実施形態８９に記載のタンパク質。
【０２６９】
９２．少なくとも１つの追加の結合ユニットがポリペプチドリンカーによりＢＤに相互に連結される、実施形態９０または９１に記載のタンパク質。
【０２７０】
９３．各結合ユニットはＦａｂドメイン、ｓｃＦｖ、単一ドメイン抗体、一本鎖ダイアボディ、抗体模倣体、抗体可変ドメインおよび受容体結合ドメインからなる群から選択される、実施形態８２～９２のいずれかに記載のタンパク質。
【０２７１】
９４．結合ユニットは各々異なるエピトープに結合する、実施形態８２～９３のいずれか１つに記載のタンパク質。
【０２７２】
９５．２つ以上の結合ユニットが各々同じエピトープに結合する、実施形態８２～９３のいずれか１つに記載のタンパク質。
【０２７３】
９６．少なくとも１つの結合ユニットは第１のエピトープおよび／または第２のエピトープに結合しない、実施形態８２～９５のいずれか１つに記載のタンパク質。
【０２７４】
９７．少なくとも１つの結合ユニットは第１のエピトープに結合せず、かつ第２のエピトープにも結合しない、実施形態８２～９５のいずれか１つに記載のタンパク質。
【０２７５】
９８．薬学的に許容されるキャリアを用いて製剤化された、実施形態１～９７のいずれかに記載のタンパク質を含む組成物。
【０２７６】
９９．実施形態１～９７のいずれかに記載のタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子。
【０２７７】
１００．第１のヌクレオチド配列を含む第１の核酸分子および
第２のヌクレオチド配列を含む第２の核酸分子；
を含み、
実施形態１～９７のいずれかに記載のタンパク質が第１および第２の核酸分子によりコードされる
核酸組成物。

【０２７８】
１０１．実施形態９９または１００に記載の核酸を含むベクター。
【０２７９】
１０２．実施形態１０１に記載のベクターを含む宿主細胞。
【実施例】
【０２８０】
次に以下の例を参照しながら本開示を説明する。これらの例は、例示のみを目的として提供されるものであり、本開示をこれらの例に限定されるものと決して解釈してはならず、むしろ本明細書に提供される教示内容により明らかになるあらゆる変更形態を包含するものと解釈すべきである。一般的に言えば、本開示は、他に記載がない限り、分子生物学、化学、生化学、生物物理学、組換えＤＮＡ技術、免疫学および抗体工学の従来の技術を利用する。これらの技術はすべて、同じ分野で働いている人にとって周知の事実である。言うまでもなく、使用される特定の装置および試薬、大きさ、製造者などの具体的な記載または説明は、本開示を限定するものと見なしてはならないことが理解されよう。ただし、そうした記載がある場合、この限りではない。同様に機能する他の装置および試薬を容易に代用できることもさらに理解されよう。
【０２８１】
実施例１：代表的なｂｉＭａｂ。
図１は、本開示の代表的なｂｉＭａｂの模式図である。このｂｉＭａｂは、各エピトープに対して二価の二重特異性結合タンパク質であり、第１のエピトープに結合するＦａｂドメイン（結合ユニット１）は、ここでｓｃＦｖ（結合ユニット２）として示される第２のエピトープに結合する結合ドメインと遺伝的に連鎖しており、次いでこの結合ドメインは、Ｆｃドメインの少なくとも一部と遺伝的に連鎖している。キメラ重鎖（６つのドメインおよび３つの相互連結リンカーポリペプチド；ＶＨ１＋ＣＨ１＋上方ヒンジ／リンカー（Ｌ１ともいう）＋ｓｃＦｖ（ここではＶＬ２＋リンカー＋ＶＨ２として示す）＋リンカー／下方ヒンジ（Ｌ２ともいう）＋Ｆｃ（ここではC_H2＋C_H3を含む）で示す）は、一本鎖分子として発現させてもよい。ｂｉＭａｂはまた、κアイソタイプでも、あるいはλアイソタイプでもよい通常の軽鎖からなる。さらに、結合ユニット１および２が、通常の抗体の単一特異性を有するが四価である同じエピトープに結合するｂｉＭａｂも意図している。ｂｉＭａｂは任意に、この図に示すように、軽鎖、重鎖の１つもしくは複数またはヒンジ領域に１つまたは複数の天然の鎖間ジスルフィド架橋を有してもよい。しかしながら、本開示のｂｉＭａｂは、任意の鎖間ジスルフィド架橋を含まなくてもよく、ある態様では、鎖間ジスルフィド架橋をまったく含まない。簡潔にするため、図１に示すｂｉＭａｂの半分のみ模式的に符牒を付した。
【０２８２】
本明細書でｂｉＭａｂ「コア」ともいう図１に示す代表的なｂｉＭａｂでは、第２のエピトープに結合する結合ドメイン（ＢＤ）（符牒を付した結合ユニット２）は、エピトープ２に結合するｓｃＦｖである。ｂｉＭａｂがｓｃＦｖ、たとえば第２のエピトープに結合するｓｃＦｖを含む場合、ｓｃＦｖは、ＶＨ－リンカー－ＶＬの配向でも、あるいはＶＬ－リンカー－ＶＨの配向でもよい。ある態様では、結合ユニット２としての役割を果たすｓｃＦｖは、ＶＬ－リンカー－ＶＨの配向である。一般に、ｓｃＦｖのＶＬ部分およびＶＨ部分を相互に連結するリンカーはフレキシブルリンカー、たとえばグリシン－セリンリンカーである。好適なグリシン－セリンリンカーを含む好適なリンカーは当該技術分野において周知である。ｓｃＦｖは任意に、安定化突然変異を導入することにより、あるいは鎖間ジスルフィド結合（図１に白抜き三角形として示す）を導入することにより構造的に安定化してもよい。しかしながら、安定化突然変異および／または鎖間ジスルフィド結合の導入は必須ではなく、ある態様では、存在しない。
【０２８３】
図１に第１のエピトープに結合するＦａｂドメインとして示す第１の結合ユニットは、ポリペプチドリンカーを介してｓｃＦｖに相互に連結される。このポリペプチドリンカー

は上方ヒンジ／リンカーまたはＬ１とも呼ばれる。「ポリペプチドリンカー」という用語は、結合ユニット１と結合ユニット２とを、または結合ユニット２とＦｃドメインとを相互に連結するポリペプチドリンカーをいい、この用語は、リンカー配列のみを含む、ヒンジ配列のみを含む、またはリンカーおよびヒンジ配列の両方を含むポリペプチドを含む。ある態様では、Ｆａｂドメインは、鎖間ジスルフィド結合を作ることができるシステイン（少なくとも１つのシステイン）を含むポリペプチドリンカーを介して結合ユニット２のＮ末端（ここではｓｃＦｖのＶＨあるいはＶＬ）に相互に連結される。結合ユニット２のＣ末端（ここではｓｃＦｖのＶＨあるいはＶＬ）は、リンカーによりＩｇヒンジ－ＦｃのＮ末端に相互に連結される。このリンカーは、Ｉｇヒンジと類似の組成でもよく、システインを有してもよい。こうしたシステインは、鎖間ジスルフィド結合を作ることができる。

【０２８４】

図１に示したｂｉＭａｂは、少なくともＣ$_H$２領域およびＣ$_H$３領域を含むＦｃドメインをさらに含む。Ｆｃドメインは、Ｃ$_H$２ドメインなどでグリコシル化されてもよいし（図１に白丸として示す）、あるいはＦｃドメインは脱グリコシル化または非グリコシル化されてもよい。さらにまたはあるいは、Ｆｃドメインは任意に、安定化突然変異、たとえば操作された鎖内ジスルフィド結合を含んでもよい。Ｆｃ　Ｃ$_H$３ドメインは、安定化突然変異またはヘテロ２量化に都合がよい突然変異を含んでも、あるいは含まなくてもよい。さらに、Ｆｃドメインは本明細書に記載するような変異Ｆｃドメインであってもよい。

【０２８５】

図２は、例示的ｂｉＭａｂキメラ重鎖の核酸コード配列およびアミノ酸配列の情報を提供する。キメラ重鎖の各部分を図２Ａおよび２Ｂに示す。図２Ａの上部に、ＶＨ１領域のＤＮＡ配列およびタンパク質配列を模式的に示す。任意の特定のｂｉＭａｂでは、この配列は特定の結合ユニット１のＶＨ１、たとえば特定のＦａｂのＶＨ１に対応すると考えられる。次いで図２Ａは、Ｃ$_H$１ドメインのＤＮＡ配列およびタンパク質配列を提供する。この後に、ｂｉＭａｂのＦａｂとＢＤとを相互に連結するポリペプチドリンカー１（Ｌ１）のＤＮＡ配列およびアミノ酸配列を示す。Ｌ１は、ヒンジ部分およびリンカー部分（上方ヒンジ／リンカー）を含んでもよく、これを図２Ａに示す。図２Ａは最初にＬ１のヒンジ部分（上方ヒンジと表示、この場合はヒトＩｇ１上方ヒンジ）を示す。図２Ａは、ヒトＩｇＧ１上方ヒンジまたは修飾ヒトＩｇＧ１上方ヒンジと表示した、Ｌ１のヒンジ部分について考えられる３つの態様を示している点に留意されたい。これらのヒンジ部分は、修飾ヒンジ部分がＤからＧへの置換をシステインの直後に含むという点で異なる。次いで図２Ａは、Ｌ１のリンカー部分、ここではＧ$_4$Ｓリンカーを示す。比較のため全ヒトヒンジの配列を示す（配列番号９および１０）。上方ヒンジ部分およびリンカー部分は、一緒にＬ１（上方ヒンジ／リンカーともいう）を形成する。しかしながら、ある態様では、Ｌ１はリンカー部分のみ、またはヒンジ部分のみを含む。図２Ｂは、ＶＨ２－リンカー－ＶＬ２配向でも、あるいはＶＬ２－リンカー－ＶＨ２配向でもよい結合ユニット２、ここではｓｃＦｖのＤＮＡ配列およびタンパク質配列を模式的に示す。

【０２８６】

第２のポリペプチドリンカー（Ｌ２；リンカー／下方ヒンジとも呼ばれる）のＤＮＡ配列およびアミノ酸配列を図２Ｂに示す。Ｌ２のリンカー部分を図２Ｂの下部に示す。図示したように、このリンカー部分はＧ$_4$Ｓリンカーである。Ｌ２のヒンジ部分を図２Ｂの中央部に示す（注記、このヒンジ部分を下方ヒンジまたはヒンジ変異体として示す）。図２Ｂは、Ｌ２のヒンジ部分、ヒトＩｇＧ１のヒンジ変異体およびヒトＩｇＧ１の下方ヒンジの３つの態様を提供する。下方ヒンジ部分およびリンカー部分は一緒にＬ２（リンカー／下方ヒンジとも呼ばれる）を形成する。しかしながら、ある種の態様ではＬ２は、リンカー部分のみまたはヒンジ部分のみを含む。図２Ｃは、ＦｃのＣ$_H$２ドメインおよびＣ$_H$３ドメインのＤＮＡ配列およびアミノ酸配列を提供する。上記に詳述したように、図２Ｃに示したＣ$_H$２ドメインおよびＣ$_H$３ドメインはＩｇＧ１に由来するが、ｂｉＭａｂは、任意のＩｇクラス、たとえばＩｇＭ、ＩｇＧ、ＩｇＤ、ＩｇＡおよびＩｇＥ、さらに任意の

アイソタイプ、たとえばＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３およびＩｇＧ４由来のＦｃを用いて容易に作製することができる。

【０２８７】

図２Ａに図示したように、上方ヒンジの一態様（Ｌ１の一部として存在する）は、Ｆａｂドメインの軽鎖と重鎖との間の鎖間ジスルフィド架橋の形成に関与する、ヒトＩｇＧ１上方ヒンジの標準的なシステインを含む。図２Ａにこのシステインを太字および下線で示す。このシステインは、図２Ａに示した修飾上方ヒンジにも存在するが、下線で区別していない。図２Ｂに図示したように、下方ヒンジ領域（Ｌ２）の一態様は、ヒンジ領域のジスルフィドスクランブリングを最小限に抑えるためＥＵ位置に突然変異Ｃ２２０Ｖを有する変異体である。図２Ｂにこの変異体を太字および下線で示す。

【０２８８】

図３は、ｂｉＭａｂを例示的に模式化したもののキメラ重鎖のアミノ酸配列をもう１つ示す。言うまでもなく、ＶＨ１の特定配列（結合ユニット１の可変重鎖ドメイン１）および結合ドメイン２の特定配列（ＶＨ２－リンカー－ＶＬ２配向のｓｃＦｖとして図示される）は、示していないことを理解すべきである。これらの配列は、特定のｂｉＭａｂを構成する個々の結合ユニットによって異なる。しかしながら、相互に関連するｂｉＭａｂの各部分の相対位置は、維持される（たとえば、個々の結合ユニットが変わっても、ｂｉＭａｂ型は同じである）。

【０２８９】

図３では、Ｌ１およびＬ２を下線およびイタリック体で示し、Ｌ１およびＬ２のヒンジ部分を太字で示す。上のパネルではＬ１のヒンジ部分がヒトＩｇＧ１上方ヒンジに対応するのに対し、下のパネルではＬ１のヒンジ部分が修飾ヒトＩｇＧ１上方ヒンジに対応する。上のパネルではＬ２のヒンジ部分がヒトＩｇＧ１の下方ヒンジ変異体に対応するのに対し、下のパネルではＬ２のヒンジ部分がヒトＩｇＧ１の下方ヒンジに対応する。いずれの場合も、Ｌ１は、たとえば、結合ユニット１のＶＨ１と結合ユニット２のＶＨ２と相互に連結することにより結合ユニット１と結合ユニット２とを相互に連結する。Ｌ２は、たとえば、結合ユニット２のＶＬ２とＦｃのC_H2ドメインとを相互に連結することにより結合ユニット２とＦｃとを相互に連結する。

【０２９０】

ｂｉＭａｂをさらに模式化したものを図４および５に示す。これらの図は、Ｌ１およびＬ２のヒンジ部分の分子の相対位置を図示する。たとえば、図４Ａ、４Ｂおよび４Ｃでは、Ｌ１のヒンジ部分の相対位置を図示する。Ｌ１は、図４Ａ、４Ｂまたは４Ｃにその配列を示していないリンカー部分をさらに含んでもよい。リンカー部分をさらに含むＬ１の例は、配列番号６３、６４および６５に示す）。しかしながら、存在する場合、Ｌ１のヒンジ部分は結合ユニット１に直接相互に連結し（たとえば、結合ユニット１の一部と隣接し）、リンカー部分は結合ユニット２と直接相互に連結する（たとえば、結合ユニット２の一部と隣接する）点に留意されたい。この構造ため、Ｌ１は上方ヒンジ／リンカーともいう。図４Ｂに示したヒンジ部分は、ヒンジ関連の自発的自己切断を防止するために導入された突然変異Ｄ２２１Ｇを有する修飾ヒンジ部分である。変異させたＤＮＡ配列およびアミノ酸残基を太字、下線およびイタリック体で示す。図４Ｃに示したヒンジ部分は、図４Ａに示したヒンジの最後の３アミノ酸を欠損している短縮型である。さらに例を挙げると、図５Ａ、５Ｂおよび５ＣはＬ２のヒンジ部分の相対位置を示す。Ｌ２は、図５Ａまたは５Ｂにその配列を示していない追加のリンカー部分をさらに含んでもよい。しかしながら、存在する場合、Ｌ２のヒンジ部分はＦｃドメインと直接相互に連結し（たとえば、Ｆｃドメインの一部と隣接し）、リンカー部分は結合ユニット２と直接相互に連結する（たとえば、結合ユニット２の一部と隣接する）点に留意されたい。この構造のため、Ｌ２はリンカー／下方ヒンジとも呼ばれる。図５Ａに示した下方ヒンジ部分は、ヒンジ領域のジスルフィドスクランブリングを最小限に抑えるため導入された突然変異Ｃ２２０Ｖを有する修飾ヒンジである。あるいは、ヒンジ関連の自発的自己切断を防止するため、図５Ｂおよび５Ｃに示した下方ヒンジドメイン（すなわち、切断されたヒンジ領域）を使用してもよ

い。図４および５に示したＬ１およびＬ２の具体的なヒンジ部分は単に例示であり、本開示は、これらの任意の組み合わせの使用のほか、ヒンジ部分の非使用または他のヒンジ部分の使用を意図している。

【０２９１】

図６Ａ～Ｃは、ＥＧＦＲ（Ｆａｂドメイン）およびＩＧＦ１Ｒ（ｓｃＦｖドメイン）を標的とするｂｉＭａｂの軽鎖およびキメラ重鎖のＤＮＡ配列およびタンパク質配列を示し、ＥＧＦＲ結合ユニットは通常のモノクローナル抗体パニツムマブに由来し、ＩＧＦ１Ｒ結合ユニットは通常のモノクローナル抗体ダロツズマブに由来する。このｂｉＭａｂコンストラクトは、本出願ではｂｉＭａｂ－ＥＩ（ＰａｎｉＸ／Ｄａｌｏ）という。この特異的なｂｉＭａｂは、図４～５に記載されているような相互に連結するリンカーを含む。ＩＧＦ１Ｒを標的とするｓｃＦｖドメインはＶＬ－リンカー－ＶＨの配向であり、ＶＬドメインおよびＶＨドメインを連結するリンカーは２０アミノ酸長であり、４回繰り返されるグリシン－グリシン－グリシン－グリシン－セリンからなる。ｓｃＦｖのＶＬドメインおよびＶＨドメイン（ｂｉＭａｂの模式図に示されるＶＬ２およびＶＨ２）は、鎖間ジスルフィド結合を形成してｓｃＦｖを安定化するＶＬ－システイン１００突然変異およびＶＨ－システイン４４突然変異を含む。

【０２９２】

図７Ａ～Ｃは、ＶＥＧＦ（Ｆａｂドメイン）およびＡｎｇ２（ｓｃＦｖドメイン）を標的とするｂｉＭａｂの軽鎖およびキメラ重鎖のＤＮＡ配列およびタンパク質配列を示し、ＶＥＧＦ結合ユニットは通常のモノクローナル抗体ベバシズマブ／アバスチンに由来し、Ａｎｇ２結合ユニットはＬＣ０６と呼ばれる通常のモノクローナル抗体に由来する。このｂｉＭａｂコンストラクトは、本出願ではｂｉＭａｂ－ＶＡ（Ａｖａ／ＬＣ０６）という。このｂｉＭａｂは、図４～５に記載されているような相互に連結するリンカーを含む。Ａｎｇ２を標的とするｓｃＦｖドメインは、ＶＬ－リンカー－ＶＨの配向であり、ＶＬドメインおよびＶＨドメインを連結するリンカーは２０アミノ酸長であり、４回繰り返されるグリシン－グリシン－グリシン－グリシン－セリンからなる。ｓｃＦｖのＶＬドメインおよびＶＨドメイン（ｂｉＭａｂの模式図に示されるＶＬ２およびＶＨ２）は、ｓｃＦｖを安定化するため鎖間ジスルフィド結合を形成するＶＬ－システイン１００突然変異およびＶＨ－システイン４４突然変異を含む。

【０２９３】

図８Ａ～Ｄは、シュードモナス・エルジノーサ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）（Ｐ．エルジノーサ（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ））ＰｃｒＶ（Ｆａｂドメイン）およびＰｓｌエキソポリサッカライド（ｓｃＦｖドメイン）を標的とするｂｉＭａｂの軽鎖およびキメラ重鎖のＤＮＡ配列およびタンパク質配列を示し、ＰｃｒＶ結合ユニットはＶ２Ｌ２と呼ばれる通常のモノクローナル抗体に由来し、Ｐｓｌ結合ユニットはＷ４－ＲＡＤと呼ばれる通常のモノクローナル抗体に由来する。このｂｉＭａｂコンストラクトは、本出願ではＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃという。このｂｉＭａｂは、図４および５に記載されているような相互に連結するリンカーを含む。Ｐｓｌエキソポリサッカライドを標的とするｓｃＦｖドメインはＶＨ－リンカー－ＶＬの配向であり、ＶＬドメインおよびＶＨドメインを連結するリンカーは２０アミノ酸長であり、４回繰り返されるグリシン－グリシン－グリシン－グリシン－セリンからなる。ｓｃＦｖのＶＬドメインおよびＶＨドメイン（ｂｉＭａｂの模式図に示されるＶＬ２およびＶＨ２）は、ｓｃＦｖを安定化するため鎖間ジスルフィド結合を形成するシステイン突然変異を含む。

【０２９４】

これらのｂｉＭａｂの具体的な例は、本明細書に記載するようなｂｉＭａｂ型に存在する、二重特異性を持つ二価のポリペプチドの例示である。残りの例は、これらの例示的ｂｉＭａｂの構造および機能特性を評価するための実験の結果を報告する。これを行うには、多くの場合、その特性を各結合ユニットが由来した従来の親モノクローナル抗体の特性と比較する。言い換えれば、上述の特異的なｂｉＭａｂ－ＥＩは、従来の親抗体パニツムマブまたはダロツズマブと比較してもよい。また、特異的なｂｉＭａｂ－ＥＩは、同じ標

的あるいはさらに同じエピトープに結合するが、それ自体ｂｉＭａｂの結合ユニットを作製するのに使用していない他の通常の抗体と比較してもよい。同様に、上述の特異的なｂｉＭａｂ－ＶＡは、従来の親抗体ベバシズマブまたはＬＣ０６と比較してもよい。あるいは、特異的なｂｉＭａｂ－ＶＡはさらに、同じ標的あるいはさらに同じエピトープに結合する他の通常の抗体と比較してもよい。加えて、これらの例示的ｂｉＭａｂの特性はまた、同じ標的あるいはさらに同じエピトープに結合する従来の二重特異性抗体型と比較してもよい。

【０２９５】

実施例２：代表的なｂｉＭａｂの安定性。

代表的なｂｉＭａｂ　ｂｉＭａｂ－ＥＩ（ＰａｎｉＸ／Ｄａｌｏ）およびｂｉＭａｂ－ＶＡ（Ａｖａ／ＬＣ０６）の一過性発現レベルを、２９３細胞における発現から１０日後、ｍｇ／Ｌ単位で解析した（図９）。発現レベルは、プロテインＡ結合法を用いて判定した。さらに詳しくは、ｂｉＭａｂをコードするＤＮＡをＨＥＫ２９３Ｆ細胞および／またはＣＨＯ細胞に標準的なプロトコルを用いてトランスフェクトした。トランスフェクト細胞をＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎのＦｒｅｅｓｔｙｌｅ（商標）培地で１０日間培養した。組換え発現は、プロテインＡ結合アッセイを用いて判定した。簡単に説明すると、ＨＰＬＣシステム（Ａｇｉｌｅｎｔ　１１００　Ｃａｐｉｌｌａｒｙ　ＬＣ　Ｓｙｓｔｅｍ，Ｆｏｓｔｅｒ　Ｃｉｔｙ，ＣＡ）を用いて培養培地をプロテインＡカラムに自動的に充填した。非結合材料を１００ｍＭのリン酸ナトリウム緩衝液の溶液、ｐＨ６．８で洗浄し、抗体を０．１％リン酸、ｐＨ１．８で溶出した。溶出ピークに相当する面積を積分し、全抗体濃度を免疫グロブリン標準と比較して判定した。また、理論的に求められた吸光係数を用いて、２８０ｎｍの吸光度を読み取ることにより、精製されたコンストラクトの濃度も判定した。タンパク質の発現後、ｂｉＭａｂは、ＰＢＳ　１×で平衡化したＨｉＴｒａｐ　ｒＰｒｏｔｅｉｎＡ　ＦＦカラムを用いて、標準的なプロテインＡアフィニティークロマトグラフィーにより親和性精製した。ｂｉＭａｂをカラムに充填し、充填後ＰＢＳ　１×でＡ２８０の記録がベースラインに達するまでカラムを洗浄し、汚染物質および非結合材料を除去した。次いで結合タンパク質を２５ｍＭのグリシンｐＨ２．８で溶出した。画分は、０．１倍量の１Ｍ　トリス－ＨＣｌ緩衝液ｐＨ８を添加して直ちに中和した。画分は、そのｂｉＭａｂ含有量についてそのＡ２８０の吸光度を読み取ることで解析した。所望のｂｉＭａｂを含む画分をまとめてプールして、１０，０００キロダルトン（ｋＤａ）のカットオフ透析膜を使用して４℃、１０倍量のＰＢＳ　１×で一晩透析した。

【０２９６】

これらの研究から、ｂｉＭａｂは、通常のＩｇＧ抗体のようにプロテインＡに結合することができることが示される。本ｂｉＭａｂ－ＥＩの発現レベルは本ｂｉＭａｂ－ＶＡの発現レベルより低いものの、観察された発現は、ｂｉＭａｂ－ＥＩの結合ユニット２が由来する通常の抗体で観察された発現と整合する。

【０２９７】

本研究に使用した代表的なｂｉＭａｂを図６Ｄおよび７Ｄに模式的に示す。図６Ｄに図示したｂｉＭａｂはｂｉＭａｂ－ＥＩといい、使用した具体的な例がｂｉＭａｂ－ＥＩ（ＰａｎｉＸ／Ｄａｌｏ）である。このｂｉＭａｂのＦａｂ部分（結合ユニット１）はＥＧＦＲ（ＥＧＦ受容体）に結合し、結合ドメイン（結合ユニット２）はＩＧＦ１Ｒ（ＩＧＦ１受容体）に結合するｓｃＦｖである。このｂｉＭａｂは、ＦａｂとｓｃＦｖとを相互に連結するポリペプチドリンカー（Ｌ１）、およびｓｃＦｖとＦｃ領域とを相互に連結するポリペプチドリンカー（Ｌ２）をさらに含むことに留意されたい。図７Ｄに図示したｂｉＭａｂはｂｉＭａｂ－ＶＡといい、使用した具体的な例がｂｉＭＡｂ（Ａｖａ／ＬＣ０６）である。このｂｉＭａｂのＦａｂ部分（結合ユニット１）はＶＥＧＦに結合し、結合ドメイン（結合ユニット２）はＡｎｇ２に結合するｓｃＦｖである。このｂｉＭａｂは、ＦａｂとｓｃＦｖとを相互に連結するポリペプチドリンカー（Ｌ１）、およびｓｃＦｖとＦｃ領域とを相互に連結するポリペプチドリンカー（Ｌ２）をさらに含むことに留意されたい。これらのｂｉＭａｂの具体例の配列情報を図６Ａ、６Ｂ、６Ｃ、７Ａ、７Ｂおよび７

Ｃに示す。

【０２９８】

サイズ排除クロマトグラギーを使用して代表的なｂｉＭａｂのモノマー含有量を判定した。これを図９に示す。図１０は、プロテインＡによる精製および２５ｍＭのヒスチジン－ＨＣｌ　ｐＨ６による透析後のｂｉＭａｂ－ＥＩおよびｂｉＭａｂ－ＶＡのサイズ排除クロマトグラム（ＳＥＣ－ＨＰＬＣ）を示す。

【０２９９】

ＳＥＣ－ＨＰＬＣは、１００ｍＭのリン酸ナトリウム、ｐＨ６．８を含む緩衝液を用い１ｍｌ／ｍｉｎの流量で約１０～５００ｋＤａの範囲のＭＷを有する球状タンパク質を分離するＴＳＫ－ＧＥＬ　Ｇ３０００ＳＷＸＬカラム（Ｔｏｓｏｈ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ　ＬＬＣ，Ｍｏｎｔｇｏｍｅｒｙｖｉｌｌｅ，ＰＡ）を使用して、２８０ｎｍおよび２５℃で行った。ビタミンＢ１２（１１，３５０Ｄａ）、ウマミオグロビン（１７，０００Ｄａ）、ニワトリオボアルブミン（４４，０００Ｄａ）、ウシγ－グロブリン（１５８，０００Ｄａ）およびチログロブリン（６７０，０００Ｄａ）を含むＢｉｏ－Ｒａｄ（Ｈｅｒｃｕｌｅｓ，ＣＡ）製の低分子量ゲル濾過較正キットを分子量標準として使用した。さらに、高度に精製された９９％モノマーＩｇＧを免疫グロブリン分子量標準とした使用した。

【０３００】

図１０に示すように、プロテインＡによる精製後に高レベルのモノマー含有量（＞７０％）が得られた。ＳＥＣ－ＨＰＬＣ解析からは、プロテインＡによる精製後のｂｉＭａｂが伝統的な抗体と同様に主にモノマーであり、単分散であることが示される。

【０３０１】

これらの代表的なｂｉＭａｂ－ＥＩタンパク質およびｂｉＭａｂ－ＶＡタンパク質を示差走査熱量測定（ＤＳＣ）によりさらに解析した。図１１は、ｂｉＭａｂ－ＥＩ（ＰａｎｉＸ／Ｄａｌｏ）（図１１Ａ）およびｂｉＭａｂ－ＶＡ（Ａｖａ／ＬＣ０６）（図１１Ｂ）のＤＳＣを用いて得られたサーモグラムを示す。ｂｉＭａｂドメインに対応する転移温度を模式的に示し（図１１ＡおよびＢのどちらも黒線）、これらのｂｉＭａｂの結合ユニットが由来したそれぞれの通常の抗体（たとえば、ｂｉＭａｂ－ＥＩの場合、通常の抗ＥＧＦＲ抗体（ＰａｎｉＸ）および通常の抗ＩＧＦ１Ｒ抗体（Ｄａｌｏ）；ｂｉＭａｂ－ＶＡの場合、通常の抗ＶＥＧＦ抗体（Ａｖａ）および通常の抗Ａｎｇ２抗体（ＬＣ０６））の融解転移を重ねて示してある。図１１Ａ～Ｂに図示したような示差走査熱量測定（ＤＳＣ）実験は、Ｍｉｃｒｏｃａｌ　ＶＰ－ＤＳＣ（Ｍｉｃｒｏｃａｌ，Ｎｏｒｔｈａｍｐｔｏｎ，ＭＡ）を使用して１℃／ｍｉｎの昇温速度で行った。

【０３０２】

ＤＳＣ実験を２５ｍＭのヒスチジン－ＨＣｌ、ｐＨ６を用いて行った。ＤＳＣに使用した溶液およびサンプルはすべて０．２２ミクロンフィルターを用いて濾過し、熱量計に充填する前に脱気した。ＤＳＣ研究に使用した２種のｂｉＭａｂおよび４種の親抗体は、前述のように行った分析用ゲル濾過クロマトグラフィーで判断して＞９９％モノマーであった。測定セットごとに、少なくとも４回の緩衝液のベースラインラン（ｒｕｎ）を最初に得た。直後に、緩衝液溶液をサンプルセルから除去し、約０．７５ｍｌのサンプルを１ｍｇ／ｍｌの濃度で充填した。測定ごとに参照セルをサンプル緩衝液で満たした。サンプルと緩衝液との各実験では、対応する緩衝液の緩衝液ベースラインラン（ｒｕｎ）を差し引いた。生データは濃度および走査速度で補正した。データの解析およびデコンボリューションは、Ｍｉｃｒｏｃａｌが提供するＯｒｉｇｉｎ（商標）ＤＳＣソフトウェアを用いて行った。

【０３０３】

図１１Ａおよび１１Ｂに示したこのデータから、例示的ｂｉＭａｂが高い熱安定性を有することが示される。実際、これらの２つの例示的ｂｉＭａｂの最も低い融解転移が＞６０℃であり、ドメイン安定性は、そのそれぞれの通常の親抗体アームのそれに類似している。

【０３０４】
この例に記載された実験から、ｂｉＭａｂ型が、妥当な量で発現することができ、高いモノマー含有量および通常の抗体と同程度の熱安定性を有する安定な抗体型であることが証明される。
【０３０５】
実施例３：代表的なｂｉＭａｂの結合活性。
本ｂｉＭａｂ－ＥＩタンパク質およびｂｉＭａｂ－ＶＡタンパク質を解析して、ｂｉＭａｂ型においてこれらの結合ユニットがその標的抗原に結合する能力を保持し、かつこの結合がそのそれぞれの親抗体、本具体例では、ｂｉＭａｂ－ＥＩのＥＧＦＲおよびＩＧＦ１Ｒと、ｂｉＭａｂ－ＶＡのＶＥＧＦおよびＡｎｇ２と同程度であることを確認した。図１２Ａは、ｂｉＭａｂ－ＥＩ、通常の親抗ＥＧＦＲ抗体（ＰａｎｉＸ）、および通常の親抗ＩＧＦ１Ｒ抗体（Ｄａｌｏ）のＥＬＩＳＡにより測定した結合に関するデータを示す。図１２Ａの左側のパネルに示した実験では、固定化したＥＧＦＲに対する結合を評価した。予想通り、ｂｉＭａｂ－ＥＩおよび通常の親抗ＥＧＦＲ抗体は、固定化したＥＧＦＲに特異的に結合したが、通常の親抗ＩＧＦ１Ｒ抗体は結合しなかった。実際に、ｂｉＭａｂおよび通常の親抗ＥＧＦＲ抗体の結合は非常に類似しており、ｂｉＭａｂが通常の親抗ＥＧＦＲ抗体の結合特性を保持するという結論を裏付けた。図１２Ａの右側のパネルに示した実験では、固定化したＩＧＦＲ１に対する結合を評価した。予想通り、ｂｉＭａｂ－ＥＩおよび通常の親抗ＩＧＦＲ１抗体は、固定化したＩＧＦＲ１に特異的に結合したが、通常の親抗ＥＧＦＲ抗体は結合しなかった。実際に、ｂｉＭａｂおよび通常の親抗ＩＧＦＲ１抗体の結合は非常に類似しており、ｂｉＭａｂが通常の親抗ＩＧＦＲ１抗体の結合特性を保持するという結論を裏付けた。
【０３０６】
図１２Ｂは、ｂｉＭａｂ－ＶＡ、通常の親抗ＶＥＧＦ抗体（Ａｖａ）、および通常の親抗Ａｎｇ２抗体（ＬＣ０６）のＥＬＩＳＡにより測定した結合に関するデータを示す。図１２Ｂの左側のパネルに示した実験では、固定化したＶＥＧＦ－１６５に対する結合を評価した。予想通り、ｂｉＭａｂ－ＶＡおよび通常の親抗ＶＥＧＦ抗体は、固定化したＶＥＧＦ－１６５に特異的に結合したが、通常の親抗Ａｎｇ２抗体は結合しなかった。実際に、ｂｉＭａｂおよび通常の親抗ＶＥＧＦ抗体の結合は非常に類似しており、ｂｉＭａｂが通常の親抗ＶＥＧＦ抗体の結合特性を保持するという結論を裏付けた。図１２Ｂの右側のパネルに示した実験では、固定化したＡｎｇ２に対する結合を評価した。予想通り、ｂｉＭａｂ－ＶＡおよび通常の親抗Ａｎｇ２抗体は、固定化したＡｎｇ２に特異的に結合したが、通常の親抗ＶＥＧＦ抗体は結合しなかった。実際に、ｂｉＭａｂおよび通常の親抗Ａｎｇ２抗体の結合は非常に類似しており、ｂｉＭａｂが通常の親抗Ａｎ２抗体の結合特性を保持するという結論を裏付けた。
【０３０７】
上記のＥＬＩＳＡ結合アッセイでは、３０μＬのＰＢＳ、ｐＨ７．４中の各標的抗原（ＥＧＦＲ、ＩＧＦ１Ｒ、ＶＥＧＦ１６５およびＡｎｇ２）２μｇ／ｍＬをマイクロタイターウェルに室温で１時間コートした。抗原をコートしたウェルを、０．１％（ｖ／ｖ）Ｔｗｅｅｎ－２０を含むＰＢＳで３回洗浄し、室温にて１時間３％ＢＳＡでブロッキングした。ｂｉＭａｂおよび抗体を３０μＬのブロッキング溶液で段階希釈し、２時間３７℃でインキュベートし、続いて０．１％（ｖ／ｖ）Ｔｗｅｅｎ－２０を含むＰＢＳで十分に洗浄した。結合したｂｉＭａｂおよび抗体は、ＨＲＰコンジュゲート抗κ（図１２Ａ左パネル）二次抗体、抗ヒトＦｃ（図１１Ａ右パネルおよび図１２Ａ～Ｂ）二次抗体により検出し、３０μＬの３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン基質（Ｐｉｅｒｃｅ）を用いて可視化した。０．１８Ｍの硫酸（Ｐｉｅｒｃｅ）３０μＬを加えて反応を止めた。マイクロタイタープレートリーダーを用いて４５０ｎｍの吸光度を測定した。得られたデータは、Ｐｒｉｓｍ　５ソフトウェア（ＧｒａｐｈＰａｄ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）を用いて解析した。
【０３０８】

実施例４：代表的なｂｉＭａｂの同時結合活性。

図１３は、ｂｉＭａｂ－ＥＩ（ＰａｎｉＸ／Ｄａｌｏ）がその標的ＥＧＦＲおよびＩＧＦ１Ｒに同時に結合する能力をＢＩＡｃｏｒｅアッセイにより示す。ｂｉＭａｂ－ＥＩ（ＰａｎｉＸ／Ｄａｌｏ）をＣＭ５　ＢＩＡｃｏｒｅセンサーチップ（図１３ＡおよびＢ）に固定化した。ＥＧＦＲおよびＩＧＦ１Ｒの両方への同時結合は、レスポンスユニット（ＲＵ、図１３に示す２つのグラフのＹ軸）の上昇で表される。どちらのグラフも、ＥＧＦＲおよびＩＧＦ１Ｒの注入と、２つの標的の同時注入とを示す。ｂｉＭａｂ－ＥＩ（ＰａｎｉＸ／Ｄａｌｏ）のその標的への同時結合は、注入現象（たとえば、上のパネルに示すようにＥＧＦＲを最初に注入し、ＩＧＦＲ１を次に注入、または下のパネルに示すようにその逆）またはアッセイフォーマットに関係なく観察された。同時結合は、ＩＧＦ１Ｒを最初に注入してから、ＥＧＦＲおよびＩＧＦ１Ｒを同時注入しても（図１３Ａ）、これらの注入現象を戻してＥＧＦＲを最初に注入してからＩＧＦ１ＲおよびＥＧＦＲ（図１３Ｂ）を同時注入しても観察された。

【０３０９】

図１４は、ｂｉＭａｂ－ＶＡ（Ａｖａ／ＬＣ０６）がその標的ＶＥＧＦおよびＡｎｇ２に同時に結合する能力を示す。図１４Ａおよび１４Ｂにまとめた実験では、ｂｉＭａｂ－ＶＡ（Ａｖａ／ＬＣ０６）をＣＭ５　ＢＩＡｃｏｒｅセンサーチップに固定化した。ＶＥＧＦおよびＡｎｇ２の両方への同時結合は、レスポンスユニット（ＲＵ、図１４Ａおよびに示した２つのグラフの左軸）の上昇で表される。どちらのグラフも、ＶＥＧＦおよびＡｎｇ２の注入と、２つのリガンドの同時注入とを示す。ｂｉＭａｂ－ＶＡ（Ａｖａ／ＬＣ０６）のその標的への同時結合は、注入現象（たとえば、パネルＡに示すようにＶＥＧＦを最初に注入し、Ａｎｇ２を次に注入、またはパネルＢに示すようにその逆）またはアッセイフォーマットに関係なく観察された。同時結合は、ＶＥＧＦを最初に注入してから、Ａｎｇ２およびＶＥＧＦを同時注入しても（図１４Ａ）、これらの注入現象を戻してＡｎｇ２を最初に注入してからＡｎｇ２およびＶＥＧＦを同時注入しても（図１４Ｂ）観察された。

【０３１０】

さらに、図１４ＣおよびＤに示すように、同時結合はさらに、標的タンパク質のどちらか一方をセンサーチップに固定化した場合にも観察される。図１４Ｃに示した実験では、Ａｎｇ２を固定化した。図１４Ｄに示した実験では、ＶＥＧＦを固定化した。どちらの場合も、同時結合が観察された（レスポンスユニットの上昇により表される）。

【０３１１】

図１３および１４に記載した結果の場合、ｂｉＭａｂの同時結合は、ＢＩＡｃｏｒｅ３０００機器（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いて測定した。簡単に説明すると、ＣＭ５センサーチップの異なるフローセルに、異なるタンパク質サンプル（２０ｍＭの酢酸塩緩衝液ｐＨ４．０緩衝液中）をアミンカップリングにより固定化した。フローセル－１にはアイソタイプコントロール抗体（ＩｇＧ１）、フローセル－２にはｂｉＭａｂ－ＶＡ、フローセル－３にはＶＥＧＦおよびフローセル－４にはＡｎｇ－２であった。アイソタイプコントロール抗体（ＩｇＧ１）をフローセル－１に、ｂｉＭａｂ－ＥＩをフローセル－２に固定化して別のＣＭ５センサーチップを調製した。ｂｉＭａｂおよび抗原（ＶＥＧＦ、Ａｎｇ－２、ＥＧＦＲ－Ｆｃ、ＩＧＦ１Ｒ）は、ランニング緩衝液（ＨＢＳ－ＥＰ－１０ｍＭのＨｅｐｅｓ、ｐＨ７．４、１５０ｍＭのＮａＣｌ、３ｍＭのエチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）および０．０５％Ｐ２０）で希釈した。同時結合は、「同時注入（ｃｏ－ｉｎｊｅｃｔ）」手順を用いて判定した。ｂｉＭａｂ－ＥＩの同時結合は、固定化したｂｉＭａｂ－ＥＩを含むＣＭ５センサーチップを使用して解析した。アナライトの注入は、ＥＧＦＲ、続いてＥＧＦＲおよびＩＧＦ１Ｒの混合物で構成した（図１３Ａ）。実験の次のステップで抗原の注入順序を逆にした（すなわちＩＧＦ１Ｒ、続いてＩＧＦ１ＲおよびＥＧＦＲの混合物）（図１３Ｂ）。ｂｉＭａｂ－ＶＡの同時結合は、考えられる４つの配向すべてで行った。第１の実験（図１４Ａ）では、ＶＥＧＦとＶＥＧＦおよびＡｎｇ－２の混合物との同時注入を、固定化したｂｉＭａｂ－ＶＡ表面上で測定したのに対し、

第２の実験（図１４Ｂ）では、抗原注入の順序を逆にした。第３の実験（図１４Ｃ）では、ｂｉＭａｂ－ＶＡとｂｉＭａｂ－ＶＡおよびＶＥＧＦの混合物との同時注入を、固定化したＡｎｇ－２表面上で測定した。第４の実験（図１４Ｄ）では、ｂｉＭａｂ－ＶＡとｂｉＭａｂ－ＶＡおよびＡｎｇ－２の混合物の同時注入を、固定化したＶＥＧＦ表面上で測定した。

【０３１２】

実施例５：代表的なｂｉＭａｂはＦｃＲｎに結合する。

代表的なｂｉＭａｂがＦｃＲｎに結合する能力をＢＩＡｃｏｒｅ解析により評価した。簡単に説明すると、ｂｉＭａｂおよび対照抗体（２０ｍＭの酢酸塩緩衝液ｐＨ４．０中に１０μｇ／ｍＬ）をＣＭ５センサーチップにアミンカップリングにより固定化して所望の固定化レベル（約６００ＲＵ）にした。ＨｉＴｒａｐ脱塩カラム（ＧＥ　ｌｉｆｅｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いてヒトＦｃＲｎの緩衝液をランニング緩衝液（５０ｍＭのリン酸ナトリウム、ｐＨ６．０）と交換した。ヒトＦｃＲｎの倍数希釈液（３０μＭ～３０ｎＭ）を固定化した抗体に注入して３０μＬ／ｍｉｎで１分間結合平衡を測定した。アナライトをランニング緩衝液で５分間チップから解離させた。残りの任意のＦｃＲｎは、ＰＢＳ　ｐＨ７．４を２回６０秒注入してチップから除去した。ＢｉａＥｖａｌソフトウェアバージョン３．１を使用してセンサーグラムを作成して解析した。各注入で観察された平衡ＲＵをＦｃＲｎの濃度に対してプロットした。平衡K_D値は、ＢｉａＥｖａｌソフトウェアに含まれる定常状態の親和性モデルを使用してプロットを解析することにより得た。

【０３１３】

図１５は、ＢＩＡｃｏｒｅで測定したｂｉＭａｂ－ＥＩ（ＰａｎｉＸ／Ｄａｌｏ）およびｂｉＭａｂ－ＶＡ（Ａｖａ／ＬＣ０６）のＦｃＲｎ結合に対するK_Dを示す。代表的な親抗体（ＰａｎｉＸ、抗ＥＧＦＲ）のＦｃＲｎ結合に対するK_Dをさらに示す。図１５に示すように、ｂｉＭａｂはどちらもＦｃＲｎに結合する能力を保持し、こうした結合は親の従来抗体のそれと同程度である。観察されたK_Dの差異は、通常のＢＩＡｃｏｒｅの標準誤差内にある。

【０３１４】

実施例６：代表的なｂｉＭａｂはＣ１ｑに結合する。

代表的なｂｉＭａｂがＣ１ｑに結合する能力をＥＬＩＳＡにより評価した。簡単に説明すると、ＰＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎカタログ番号２００１２）を用いて１ミリリットル当たり５マイクログラム（３０μｌ／ウェル）のｂｉＭａｂまたは抗体抗ＥＧＦＲまたはＢＳＡをＥＬＩＳＡプレート（Ｃｏｓｔａｒ　３６９０）に一晩コートした。ＥＬＩＳＡプレートをＰＢＳＴ（１×ＰＢＳ　ｐＨ７．２、０．１％Ｔｗｅｅｎ－２０）で５回洗浄し、１５０μｌのＢＳＢ－ＰＢＳＴ（３％ＢＳＡ（Ｓｉｇｍａカタログ番号Ａ２１５３）、５０％Ｓｕｐｅｒｂｌｏｃｋ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｆｉｃ　カタログ番号３７５１５）を含むＰＢＳＴで１時間３７℃にてブロッキングした。ＢＳＢ－ＰＢＳＴによる１００μｇ／ｍｌからのヒトＣ１ｑ（Ｃｅｌｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓカタログ番号ＣＲＣ１６２Ｂ）の倍数希釈液を加え（３０μｌ／ウェル）、室温で１時間インキュベートした。インキュベーション後、ＥＬＩＳＡプレートをＰＢＳＴで５回洗浄し、１μｇ／ｍｌのヒツジ抗ヒトＣ１ｑ（Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　Ｃｏｎｓｕｌｔａｎｔｓ　Ｌａｂカタログ番号ＳＣ１Ｑ－８０Ａ）を含むＢＳＢ－ＰＢＳＴ３０μｌを加えた。ＥＬＩＳＡプレートをＰＢＳＴで再び５回洗浄し、１：２５００希釈のロバ抗ヒツジ／ヤギ－ＨＲＰ（ＳｅｒｏＴｅｃカタログ番号Ｓｔａｒ８８Ｐ）を含むＢＳＢ－ＰＢＳＴ３０μｌを加えた。プレートを最後にＰＢＳＴで５回洗浄し、（３０μｌ／ウェル）ＴＭＢ（ＫＰＬカタログ番号５３－０－０３）で５分発色させた。その後、３０μｌの０．２Ｎ　ＨＣｌを加えて反応を止めた。データはＰｒｉｓｍ５ソフトウェアを用いてプロットした。

【０３１５】

図１６に示すように、ｂｉＭａｂ－ＥＩ（ＰａｎｉＸ／Ｄａｌｏ）およびｂｉＭａｂ－ＶＡ（Ａｖａ／ＬＣ０６）はＣ１ｑに結合し、結合の親和性は、代表的な親の従来抗体の１つで陽性対照ともなる抗ＥＧＦＲ（ＰａｎｉＸ）のそれと同程度である。これらのデー

タは、ｂｉＭａｂ型が通常の抗体と同じ様な補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）を媒介する能力を保持するという結論を裏付ける。

【０３１６】

実施例７：代表的なｂｉＭａｂはその親の従来抗体で観察される細胞殺傷活性を保持する。

図１７は、（ｉ）ｂｉＭａｂ－ＥＩ（ＰａｎｉＸ／Ｄａｌｏ）、または（ｉｉ）親の従来の抗ＥＧＦＲ抗体（抗体ＰａｎｉＸ）と親の従来の抗ＩＧＦ１Ｒ抗体（抗体Ｄａｌｏ）との組み合わせ、または（ｉｉｉ）親の従来の抗ＥＧＦＲ抗体（ＰａｎｉＸ）単独、または（ｉｖ）親の従来の抗ＩＧＦ１Ｒ抗体（Ｄａｌｏ）単独、または（ｖ）アイソタイプ陰性対照抗体を対象とした細胞殺傷アッセイの結果を示す。この細胞毒性アッセイに使用した細胞はＨ３５８（ＥＧＦＲ受容体およびＩＧＦ１Ｒ受容体の両方を発現するヒト非小細胞肺腺癌細胞；ＡＴＣＣカタログ番号ＣＲＬ－５８０７）であった。Ｈ３５８細胞を、１２０μｌの完全な細胞培養培地（１×ＲＰＭＩ１６４０　Ｇｉｂｃｏカタログ番号１１８７５＋１０％Ｈｉ　ＦＢＳ　Ｇｉｂｃｏカタログ番号２５３００）を用いて５０，０００細胞／ウェルで９６ウェルプレート（Ｃｏｓｔａｒカタログ番号３７８８）に蒔いた。細胞培養培地を用いて２００ｎＭから５×最終濃度で、各抗体の希釈系列を作成した。３０μｌ／ウェルの希釈抗体をアッセイプレートに加え、３７℃、９５％湿度で７２時間インキュベートした。室温で平衡化したＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ（登録商標）細胞生存率アッセイ試薬（Ｐｒｏｍｅｇａカタログ番号Ｇ７５７１）をアッセイプレートに加え（１２０μｌ／ウェル）、続いて穏やかに混合し、室温で１５分間インキュベートした。インキュベーション後、製造者の推奨に従いＥｎｖｉｓｉｏｎ　２０１４　ｍｕｌｔｉｌａｂｅｌ　ｒｅａｄｅｒを用いてＡＴＰの発光を測定した。ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ（登録商標）発光細胞生存率アッセイは、代謝的に活性な細胞の存在を示唆するＡＴＰの存在の定量化に基づき、生存している培養細胞の数を判定するホモジニアス法である。

【０３１７】

図１７に示すように、ｂｉＭａｂ－ＥＩ（ＰａｎｉＸ／Ｄａｌｏ）は、親の２つの従来抗体を組み合わせた（ＰａｎｉＸ（抗ＥＧＦＲ）＋Ｄａｌｏ（抗ＩＧＦ１Ｒ））処理のレベルと同様のレベルでＨ３５８細胞を殺傷した（生細胞の％の低下として表される）。これらの結果から、ｂｉＭａｂ型は、それが由来した通常の抗体のそれぞれの機能を保持していたことが示される。

【０３１８】

実施例８：代表的なｂｉＭａｂは標的リガンドを阻害する機能活性を保持する。

図１８は、ｂｉＭａｂ－ＶＡによるＴｉｅ２（Ａｎｇ２の天然の受容体）リン酸化（図１８Ａ）およびＶＥＧＦＲ２（ＶＥＧＦの天然の受容体）リン酸化（図１８Ｂ）の阻害を示す。

【０３１９】

ｂｉＭａｂ－ＶＡ、抗Ａｎｇ２（ＬＣ０６）およびアイソタイプ陰性対照がヒトＡｎｇ２に結合し、Ａｎｇ２によるＴｉｅ２受容体リン酸化を阻止する能力を、以下の手順を用いて判定した。９６ウェル培養プレート（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ製のＣｏｒｎｉｎｇ　Ｃｅｌｌ－ｂｉｎｄ組織培養プレート）を用いて、全長ヒトＴｉｅ２受容体を発現する安定にトランスフェクトされたＨＥＫ２９３細胞株を、１０％ＦＢＳおよび２μｇ／ｍＬのピューロマイシンを補充したＤＭＥＭで３７℃および５％CO_2にて増殖させ、次いで１８時間血清飢餓させた。細胞を精製ヒト組換えＡｎｇ２（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓカタログ番号６２３－ＡＮ－ＣＦ；３．６μｇ／ｍＬの原液を含むＰＢＳに溶解させたＡｎｇ２）の存在下で２５分間刺激し、ｂｉＭａｂ－ＶＡ、抗Ａｎｇ２（ＬＣ０６）あるいはアイソタイプ陰性対照抗体とプレインキュベートした。抗体とＡｎｇ２との混合物を細胞に加え、１２０ｎＭの溶液から段階希釈した。次いで４０μＬの氷冷溶解緩衝液（７ｍｌのＲＩＰＡ溶解緩衝液、１チューブのＨａｌｔ阻害剤、ベンゾナーゼ－Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ－）で細胞を溶解し、捕捉用にマウス全Ｔｉｅ２抗体（Ａｂｃａｍカタログ番号ａｂ２４８５９）を、検出用にウサギ特異抗体（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓカタ

ログ番号ＡＦ２７２０）を用いＭｅｓｏ　Ｓｃａｌｅ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙを使用して、Ｔｉｅ２受容体のチロシン９９２のリン酸化レベルを全細胞ライセートから判定した。

【０３２０】

図１８Ａに示すように、Ａｎｇ２により媒介されるＴｉｅ２リン酸化の阻害は、ｂｉＭａｂ－ＶＡ（Ａｖａ／ＬＣ０６、ＩＣ５０　１．７９ｎＭ）またはその親の従来の抗Ａｎｇ２抗体（ＬＣ０６、ＩＣ５０　１．７２ｎＭ）の添加時に同程度である。アイソタイプ陰性対照抗体は、Ａｎｇ２によるＴｉｅ２のリン酸化を阻害しない。この実験から、ｂｉＭａｂ－ＶＡ（Ａｖａ／ＬＣ０６）がＡｎｇ２を機能的に阻害することが明らかにされる。ｎＭ単位のIC_{50}（半数阻害濃度）値を模式的に報告する。図示したように、ｂｉＭａｂ－ＶＡ（Ａｖａ／ＬＣ０６）およびその親の従来抗体、抗Ａｎｇ２（ＬＣ０６）は類似のIC_{50}を有する。

【０３２１】

ｂｉＭａｂ－ＶＡ、抗ＶＥＧＦ抗体およびアイソタイプ陰性対照抗体が、ＶＥＧＦにより媒介されるＶＥＧＦＲ２リン酸化を阻害する能力を、以下の手順を用いて判定した。ヒトＶＥＧＦＲ受容体（ｈＶＥＧＦＲ２）を、１０％ＦＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を含むＤＭＥＭ培地で増殖させたＡＤ２９３細胞に組換え技術により安定に発現させた。９６ウェル平底Ｃｏｒｎｉｎｇ　Ｃｅｌｌ－ｂｉｎｄ組織培養プレート（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）を用いて、細胞を１００μＬの培地に１５０００細胞ウェルで播種した。増殖から２４時間後、培地をまったく洗浄せず除去し、ＤＭＥＭ＋０．２％ＦＢＳ＋０．１％ＢＳＡからなる「飢餓」培地（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）を５０μＬ／ウェルで加えた。次いで細胞を一晩インキュベートした。培地を各ウェルから除去し、飢餓培地で調製した４ｎＭのヒトＶＥＧＦ１６５（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈカタログ番号１００－２０）５０μＬを細胞に加え、続いて４℃で３０分インキュベートした。同時に、ｂｉＭａｂ－ＶＡ、抗ＶＥＧＦ（Ａｖａ）およびアイソタイプ陰性対照抗体をさらに加え、２００μｇ／ｍＬから段階希釈した。次いで細胞を７分間３７℃でインキュベートし、培地を除去し、洗浄ステップを行わなかった。次いで細胞を４０μＬの氷冷溶解緩衝液（７ｍｌのＲＩＰＡ溶解緩衝液、１チューブのＨａｌｔ阻害剤、ベンゾナーゼ－Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ－）で溶解し、Ｍｅｓｏ　Ｓｃａｌｅ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙアッセイキット（ＭＳＤカタログ番号Ｋ１５１ＤＪＤ－２）を使用してＶＥＧＦＲ２のリン酸化を判定した。このキットは、ヒト全細胞ライセートにおいてホスホ－ＶＥＧＦＲ－２（Ｔｙｒ１０５４）を定量するためのアッセイ特異的成分を提供する。

【０３２２】

図１８Ｂに示すように、ＶＥＧＦにより媒介されるＶＥＧＦＲ２リン酸化の阻害は、ｂｉＭａｂ－ＶＡ（Ａｖａ／ＬＣ０６、ＩＣ５０　４．５８ｎＭ）およびその親の従来の抗ＶＥＧＦ抗体（Ａｖａ、ＩＣ５０　４．７８ｎＭ）の添加時に同程度である。アイソタイプ陰性対照抗体はＶＥＧＦによるｐＶＥＧＦＲ２のリン酸化を阻害しない。この実験から、ｂｉＭａｂ－ＶＡ（Ａｖａ／ＬＣ０６）がＶＥＧＦを機能的に阻害することが明らかにされる。ｎＭ単位のIC_{50}（半数阻害濃度）値を模式的に報告する。図示したように、ｂｉＭａｂ－ＶＡ（Ａｖａ／ＬＣ０６）およびその親の従来抗体、抗ＶＥＧＦ（Ａｖａ）は類似のIC_{50}を有する。

【０３２３】

実施例９：代表的なｂｉＭａｂの均一なモノマー含有量は濃度を上げても維持される。

図１９は、モノマー含有量に有害な影響を与えることなく代表的なｂｉＭａｂを濃縮することができることを示す。簡単に説明すると、プロテインＡ、および製造者の推奨に従いＣｅｒａｍｉｃ　Ｈｙｄｒｏｘｙａｐａｔｉｔｅ　Ｔｙｐｅ　ＩＩ　Ｍｅｄｉａ（ＢｉｏＲａｄカタログ番号１５８－２２００）を用いてｂｉＭａｂタンパク質を高いモノマー含有量に精製し、標準的なランニング緩衝液（０．１ｍＭのリン酸ナトリウム、０．１ｍＭの硫酸ナトリウムｐＨ６．８）でＳＥＣ－ＨＰＬＣにより解析した。精製したモノマータンパク質を２５ｍＭのヒスチジン－ＨＣｌ　ｐＨ６で一晩透析し、濃縮前のモノマー率を標準的なランニング緩衝液でＨＰＬＣ－ＳＥＣにより再び解析した。次いでＶｉｖａｓ

ｐｉｎ　２０，１００ｋＤａ　ＭＷＣＯ（ＧＥ　ｈｅａｌｔｈｃａｒｅカタログ番号２８－９３２３－６３）を用いて１４５５×ｇでｂｉＭａｂを１ミリリットル未満に濃縮し、Ａ２８０ｎｍ吸光度値を読み取り、モル吸光係数１．４を使用して濃度を判定した。濃縮した材料を、０．２２ミクロンシリンジフィルターを用いて濾過し、粒子の存在を目視し、２５ｍｇ／ｍＬに補正した。２５ｍｇ／ｍＬ溶液の２５０マイクログラムのタンパク質のアリコートを、標準的な緩衝液を使用してＨＰＬＣ－ＳＥＣにより解析して濃縮後のモノマー率を判定した。ＳＥＣ－ＨＰＬＣは、上記の実施例２に記載されているように行った。

【０３２４】

初濃度および最終濃度をｍｇ／ｍＬ単位で示す。作られた各ｂｉＭａｂの初濃度を図１９に示した表の上半分に、その初濃度で観察されたモノマー含有量（％）と共に示す。これらの初濃度でのモノマー含有量は９９％を超えていた。２０ｍｇ／ｍＬで作られた各ｂｉＭａｂのより濃縮された調製物を図１９に示した表の下半分に示す。図の上半分の各行を、それ対応する図の下半分の行と比較する（たとえば、図の上半分の第１行を図の下半分の第１行と比較する）と分かるように、ｂｉＭａｂは、モノマーを減少させずに濃縮することができる。％で表したモノマー含有量は、ＳＥＣ－ＨＰＬＣを用いて判定した。

【０３２５】

実施例１０：代表的なｂｉＭａｂと従来の二重特異性を持つ二価抗体型との比較。

抗ＰｃｒＶ抗体Ｖ２Ｌ２（配列番号４３および４６）および抗Ｐｓｌ抗体Ｗ４－ＲＡＤ（配列番号４８および４９）由来の可変領域を含む２つの従来の二重特異性を持つ二価型を用いて、別の二重特異性抗体（たとえば、Ｄｉｍａｓｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２００９　３９３：６２７－９２を参照されたい）を作製した。従来のＢｓ２二重特異性抗体型およびＢｓ３二重特異性抗体型と、同じ可変領域から作製された例示的ｂｉＭａｂとを模式化したものを図２０に示す。４抗体はすべて、いくつかのインビトロアッセイおよびインビボアッセイで以下の通り試験した。

【０３２６】

様々な二重特異性抗体およびＲ３４７（陰性対照）について、そのＲＢＣの溶解を防止する能力を評価した。簡単に説明すると、抗体を対数期Ｐ．エルジノーサ（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）６０７７（ｅｘｏＵ$^{+}$）および、洗浄したウサギ赤血球（ＲＢＣ）と混合し、２時間３７°でインキュベートする。インタクトなＲＢＣはペレット状にし、溶解の程度は無細胞上清のOD_{405}を測定することで判定する。抗体の存在下での溶解を、ｍＡｂを含まないウェルと比較してＲＢＣ溶解の阻害率阻害率を判定する。図２１に示すように、二重特異性抗体は親Ｖ２Ｌ２抗体と同様のレベルでＲＢＣ溶解を阻害した。

【０３２７】

さらに、単一のＢｓ２（ＢＳ２－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ）抗体、Ｂｓ３抗体およびｂｉＭａｂ抗体は、（ＤｉＧｉａｎｄｏｍｅｎｉｃｏ，Ａ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｉｎｆｅｃｔ　Ｉｍｍｕｎ　７２，７０１２－７０２１（２００４））の記載を改変してインビトロオプソニン貪食（ＯＰＫ）殺傷アッセイでも試験した。簡単に説明すると、アッセイは、ＯＰＫ要素；Ｐ．エルジノーサ（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株；希釈幼令ウサギ血清；分化ＨＬ－６０細胞；およびモノクローナル抗体をそれぞれ０．０２５ｍｌ使用して９６ウェルプレートで行った。一部のＯＰＫアッセイでは、記載されているように（Ｃｈｏｉ，Ｋ．Ｈ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　２，４４３－４４８（２００５））構築した発光性Ｐ．エルジノーサ（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株を使用した。発光性ＯＰＫアッセイは上記のように行ったが、相対ルシフェラーゼ単位（ＲＬＵ）の判定にはＰｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ　ＥＮＶＩＳＩＯＮ　Ｍｕｌｔｉｌａｂｅｌプレートリーダー（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）を使用した。図２２に示すように　Ｂｓ２－Ｖ２Ｌ２－２ＣおよびＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ抗体は、親Ｗ４－ＲＡＤ抗体と比較して同様の殺傷率を示す。一方、Ｂｓ３－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ抗体の殺傷率は低下した。このアッセイでは、ｂｉＭａｂ型は、親抗体型およびＢｓ２二重特異性抗体型の両方と同等の活性を有した。

【０３２８】

Ｂｓ２－Ｖ２Ｌ２コンストラクト、Ｂｓ３－Ｖ２Ｌ２コンストラクトおよびＢｓ４－Ｖ２Ｌ２コンストラクトについて、急性肺炎感染症の生存率をインビボＰ．エルジノーサ（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）６２０２急性肺炎モデルを用いていくつかの試験で評価した。マウス（ｎ＝１０）は、以下の通り処置した：（試験Ａ）Ｒ３４７（陰性対照、０．２ｍｇ／ｋｇ）、Ｂｓ２－Ｖ２Ｌ２（０．２８ｍｇ／ｋｇ）、Ｂｓ３－Ｖ２Ｌ２（０．２８ｍｇ／ｋｇ）、Ｖ２Ｌ２（０．２ｍｇ／ｋｇ）またはＷ４－ＲＡＤ（０．２ｍｇ／ｋｇ）；（試験ＢおよびＣ）Ｒ３４７（陰性対照、１ｍｇ／ｋｇ）、Ｂｓ２－Ｖ２Ｌ２（０．５ｍｇ／ｋｇまたは１ｍｇ／ｋｇ）またはＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ（０．５ｍｇ／ｋｇまたは１ｍｇ／ｋｇ）；（試験Ｄ）：Ｒ３４７（陰性対照、１ｍｇ／ｋｇ）、Ｂｓ３－Ｖ２Ｌ２（０．５ｍｇ／ｋｇまたは１ｍｇ／ｋｇ）またはＢｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ（０．５ｍｇ／ｋｇまたは１ｍｇ／ｋｇ）。処置から２４時間後、すべてのマウスに約（６．２５×１０^{5}～１×１０^{6}ＣＦＵ／動物）の６２０６（Ｏ１１－ＥｘｏＵ＋）を感染させた。すべてのマウスを１２０時間モニターした。試験結果をそれぞれ図２３Ａ～Ｄに示す。（Ａ）対照マウスはすべて感染から約３０時間で感染で死亡した。Ｂｓ３－Ｖ２Ｌ２動物はＶ２Ｌ２対照を投与された動物と共にすべて生存した。Ｗ４－ＲＡＤ接種動物の約９０％は生存した。一方、Ｂｓ２－Ｖ２Ｌ２動物の約５０％は１２０時間で感染で死亡した。（Ｂ～Ｄ）：対照マウスはすべて感染から約４８時間で感染により死亡した。（Ｂ）：Ｂｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃは１．０および０．５ｍｇ／ｋｇの両方でＢｓ２－Ｖ２Ｌ２と比較して大きな活性を有した。（Ｃ）：Ｂｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃは１．０ｍｇ／ｋｇでＢｓ２－Ｖ２Ｌ２と比較して大きな活性を有するようであった（結果は統計学的に有意ではない）。（Ｄ）：Ｂｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃは０．５ｍｇ／ｋｇでＢｓ３－Ｖ２Ｌ２と比較して大きな活性を有した。各抗体コンストラクトの有効性を解析するため、マウスを０．１ｍｇ／ｋｇ、０．２ｍｇ／ｋｇ、０．５ｍｇ／ｋｇ、１ｍｇ／ｋｇ、２ｍｇ／ｋｇ、５ｍｇ／ｋｇ、１０ｍｇ／ｋｇまたは１５ｍｇ／ｋｇで処置し、６２０６致死的肺炎モデルの生存率について解析した。生存率を、それぞれ比較のため括弧内に示した動物数と共に図２４に示した表に示す。

【０３２９】

これらのデータから、Ｂｓ４－Ｖ２Ｌ２－２Ｃ　ｂｉＭａｂ抗体型がＰ．エルジノーサ（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）株６２０６（ＥｘｏＵ＋）をチャレンジしたマウスの致死的肺炎の予防において親Ｗ４－ＲＡＤ抗体＋Ｖ２Ｌ２抗体の混合物として有効であり、かつ従来のＢｓ２二重特異性抗体型およびＢｓ３二重特異性抗体型より少なくとも有効である、あるいはさらにより有効であることが示される。

【０３３０】

援用

本明細書に言及した刊行物および特許はすべて、各個別の刊行物または特許を援用するために具体的に個々に示してかのようにその全体を本明細書に援用する。さらに、２０１１年１１月７日に出願された米国仮特許出願第６１／５５６，６４５号明細書；２０１２年４月１６日に出願された同第６１／６２４，６５１号明細書；２０１２年４月１７日に出願された同第６１／６２５，２９９号明細書；２０１２年９月６日に出願された同第６１／６９７，５８５号明細書および２０１２年１１月６日に出願された国際出願ＰＣＴ／ＵＳ２０１２／＿＿＿＿＿＿（代理人整理番号ＰＳＥＵＤ－１００ＷＯ１、「抗シュードモナス（ＰＳＥＵＤＯＭＯＮＡＳ）ＰＳＬ結合分子および抗シュードモナス（ＰＳＥＵＤＯＭＯＮＡＳ）ＰＣＲＶ結合分子を用いた併用療法（ＣＯＭＢＩＮＡＴＩＯＮ　ＴＨＥＲＡＰＩＥＳ　ＵＳＩＮＧ　ＡＮＴＩ－　ＰＳＥＵＤＯＭＯＮＡＳ　ＰＳＬ　ＡＮＤ　ＰＣＲＶ　ＢＩＮＤＩＮＧ　ＭＯＬＥＣＵＬＥＳ）」という名称）をあらゆる目的においてその全体を援用する。

【０３３１】

本開示の具体的な態様について考察してきたが、上記の記載は例示であり、限定するものではない。本明細書および下記の特許請求の範囲を検討すると、本開示の多くの変更形態が当業者には明らかになるであろう。本開示の全範囲は、特許請求の範囲をその均等物

の全範囲と共に、および本明細書をその変更形態と共に参照して決定されるべきである。

【図１】

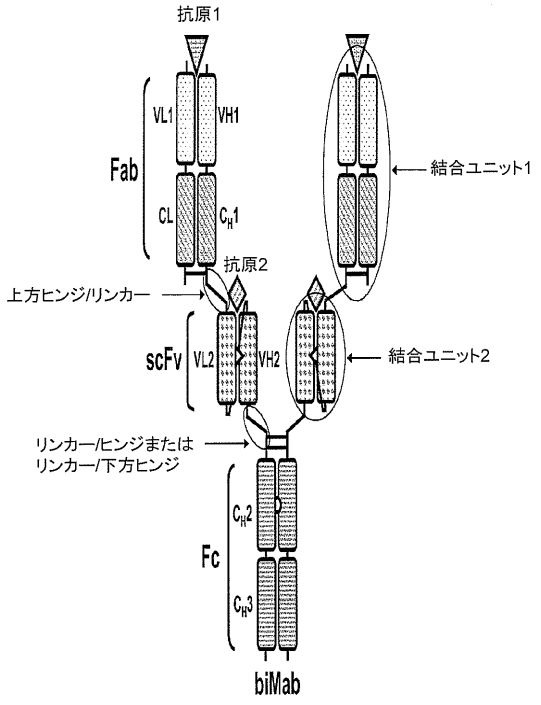


図1

【図２Ａ】

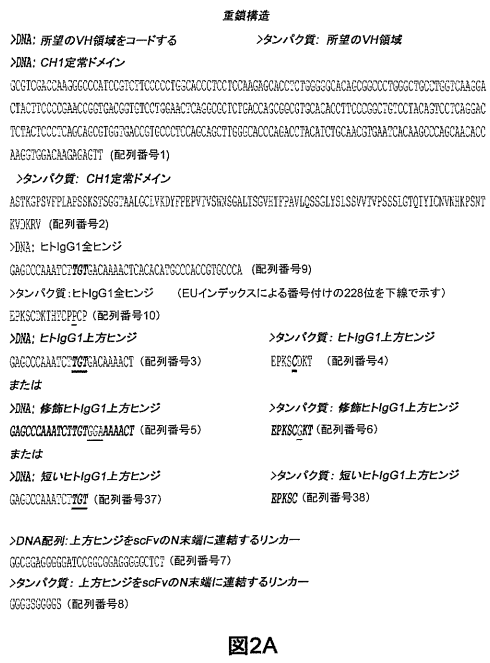


図2A

【図２Ｂ】

>DNA; 所望のscFv(VHーリンカーーVLまたはVLーリンカーーVH;安定化ジスルフィド結合を含んでもよい)をコードする

>タンパク質: 所望のscFv(VHーリンカーーVLまたはVLーリンカーーVH;安定化ジスルフィド結合を含んでもよい)

>DNA; scFvのC末端をヒンジのN末端に連結するリンカー

GGTGGCGGTGGCTCTGGTGGCGGTGGCTCT (配列番号7)

>タンパク質配列: scFvのC末端をヒンジのN末端に連結するリンカー

GGGGSGGGGS (配列番号8)

>DNA; ヒトIgG1のヒンジ変異体

GAGCCCAAATCTGTAGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCA (配列番号11)

>タンパク質: ヒトIgG1のヒンジ変異体

EPKSVDKTHTCPPCP (配列番号12)

または

>DNA; ヒトIgG1の下方ヒンジ

TGCCCACCGTGCCCA (配列番号13)

>タンパク質: ヒトIgG1の下方ヒンジ

CPPCP (配列番号14)

または

>DNA; ヒトIgG1のヒンジ変異体

GACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCA (配列番号39)

>タンパク質: ヒトIgG1のヒンジ変異体

DKTHTCPPCP (配列番号40)

図2B

【図２Ｃ】

>DNA; Fc定常ドメインCH2

GCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTG
AGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA
TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGAC
TGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCA
AA (配列番号15)

>タンパク質: Fc定常ドメインCH2 (234位、235位および331位を下線で示し、239位、330位および332位を太字と二重下線で示し、252位、254位および256位を拡大し波下線で示した。位置はすべてEUインデックスに従って番号付けした)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK (配列番号16)

>DNA; Fc定常ドメインCH3

GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTCTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCC
TGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCC
TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTC
TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCTTAAGCCTGTCTCCGGGTAAA (配列番号17)

>タンパク質: Fc定常ドメインCH3 (428位および434位を太字と二重下線で示す。位置はすべてEUインデックスに従って番号付けした)

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号18)

図2C

【図２Ｄ】

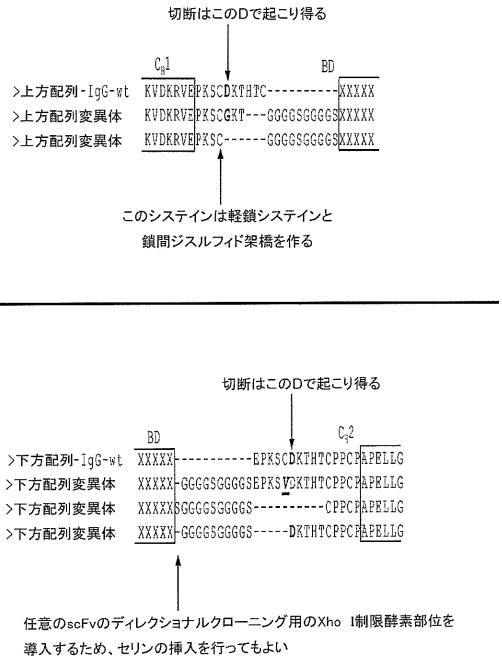


図2D

【図３】

>タンパク質: scFvを挟むヒトIgG1の上方ヒンジとヒトIgG1のヒンジ変異体とを有するキメラ重鎖(VHーリンカーーVL構造)

可変重鎖ドメインI - ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTGGGSGGGGS -scFv VHドメインII - GGGGSGGGGSGGG
GSGGGGS - scFv VLドメインII - GGGGSGGGGSEPKSVDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK (配列番号2、4、8、10、12、16、18を組み合わせた)

>タンパク質: scFvを挟む修飾ヒトIgG1の上方ヒンジとヒトIgG1の下方ヒンジとを有するキメラ重鎖(VHーリンカーーVL構造)

可変重鎖ドメインI - ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTGGGSGGGGS -scFv VHドメインII - GGGGSGGGGSGGG
GSGGGGS - scFv VLドメインII - GGGGSGGGGSCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK (配列番号2、6、8、10、14、16、18を組み合わせた)

リンカー/ヒンジ領域を下線とイタリック体で示す
ヒンジ領域をさらに太字で示す

図3

【図４Ａ】

>DNA配列：ヒトIgG1上方ヒンジ

GAGCCCAAATCTTGTGACAAAACT（配列番号3）

>タンパク質配列：ヒトIgG1上方ヒンジ

EPKSCDKT（配列番号4）

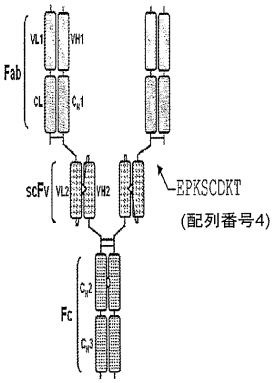


図4A

【図４Ｂ】

>DNA：修飾ヒトIgG1上方ヒンジ

GAGCCCAAATCTTGTGGAAAAACT（配列番号5）

>タンパク質：修飾ヒトIgG1上方ヒンジ

EPKSCGKT（配列番号6）

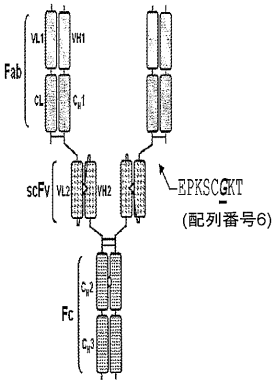


図4B

【図４Ｃ】

>DNA：短いヒトIgG1上方ヒンジ

GAGCCCAAATCT*TGT*（配列番号37）

>タンパク質：短いヒトIgG1上方ヒンジ

EPKSC（配列番号38）

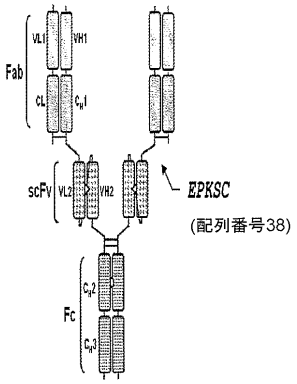


図4C

【図５Ａ】

>DNA：ポリーグリシンーセリンリンカーおよびヒトIgG1ヒンジドメイン変異体

GGTGGCGGTGGCTCTGGTGGCGGTGGCTCTGAGCCCAAA*TCTGTA*GACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCA
（配列番号65）

>タンパク質：ポリーグリシンーセリンリンカーおよびヒトIgG1ヒンジドメイン変異体

GGGGSGGGGSEPKS*V*DKTHTCPPCP（配列番号66）

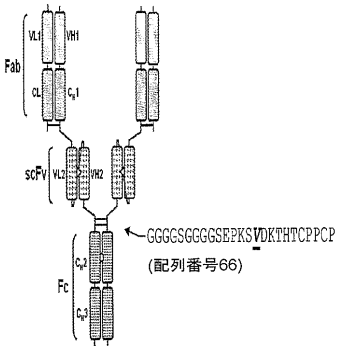


図5A

【図５Ｂ】

>DNA: ポリーグリシンーセリンリンカーおよびヒトIgG1下方ヒンジドメイン

GGAGGCGGAGGATCTGGCGGAGGCGGATCTTGCCCACCGTGCCCA（配列番号67）

>タンパク質: ポリーグリシンーセリンリンカーおよびヒトIgG1下方ヒンジドメイン

GGGGSGGGGSCPPCP（配列番号68）

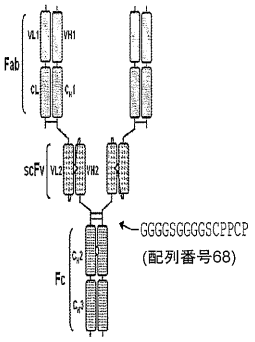


図5B

【図５Ｃ】

>DNA: ポリーグリシンーセリンリンカーおよびヒトIgG1ヒンジ変異体

GGTGGCGGTGGCTCTGGTGGCGGTGGCTCTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCA
(配列番号69)

>タンパク質: ポリーグリシンーセリンリンカーヒトIgG1ヒンジ変異体

GGGGSGGGGSDKTHTCPPCP（配列番号70）

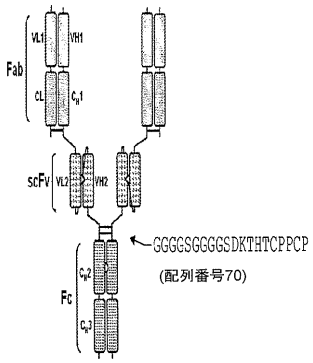


図5C

【図６Ａ】

>DNA配列: 軽鎖可変ドメイン1(Fab)およびk定常ドメイン(パニツムマブ由来の抗EGFR軽鎖)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGCCAGGCCAGCCAGGACATCAG
CAACTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGACGGCCAGCAACCTGGAGACAGGCGTGCCCA
GCAGATTCAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCTTCACCATCAGCAGCCTCCAGCCCGAGGATATCGCCACCTACTTTTGCCAG
CACTTCGACCACCTGCCCCTGGCCTTTGGCGGCGGAACAAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC
GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGA
AGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACC
CTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAG
CTTCAACAGGGGAGAGTGTTAGTGA（配列番号19）

>タンパク質配列: 軽鎖可変ドメイン1(Fab)およびk定常ドメイン(パニツムマブ由来の抗EGFR軽鎖)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYFCQ
HFDHLPLAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC（配列番号20）

>タンパク質配列: 軽鎖可変ドメイン1(VL)(パニツムマブ由来の抗EGFR軽鎖)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYFCQ
HFDHLPLAFGGGTKVEIK（配列番号21）

図6A

【図６Ｂ】

>DNA配列: 結合ユニット1を形成するFabのVH−CH1ドメイン(抗EGFR、パニツムマブ由来)、図4および図5に示すような連結リンカー、結合ユニット2のscFV(抗IGF1R、ダロツズマブ由来)およびFc(VHおよびC_H1部分を下線で示す)

CAGGTGCAGCTCCAGGAGAGCGGCCCTGGCCTGGTGAAGCCCAGCGAGACACTGAGCCTGACCTGCACCGTGTCCGGCGGCAGCGTGTC
CAGCGGCGACTACTACTGGACCTGGATCAGACAGAGCCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGCCACATCTACTACAGCGGCAACACCA
ACTACAACCCCAGCCTGAAGTCCAGACTGACCATCAGCATCGACACCAGCAAGAACCAGTTCAGCCTGAAGCTGTCCAGCGTGACAGCC
GCCGACACCGCCATCTACTACTGCGTGAGAGACAGAGTGACCGGCGCCTTTCGACATCTGGGGCCAGGGCACCATGGTGACCGTGTCCAG
CGCTCGACCAAGGGACCTAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCTACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTCGTGA
AGGACTACTTTCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCACTGACAAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGC
AGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACAGTGCCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCC
CAGCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAACCCAAGAGCTGCGGCAAAACAGGCGGCGGAGGATCCGGCGGAGGCGGCTCTGATATCG
TGATGACCCAGAGCCCCCTGAGCCTGCCTGTGACACCTGGCGAACCTGCCAGCATCAGCTGCAGATCCAGCCAGACATCGTGCACAGC
AACGGCAACACCTACCTGCAGTGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCTCAGCTGCTGATCTACAAGGTGTCCAACCGGCTGTACGG
CGTGCCCGACAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGAAGATCTCCCGGGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACT
ACTGTTTTCAAGGCAGCCACGTGCCCCTGGACCTTCGGCTGTGGCACAAAGGTGGAAATCAAGGGCGGAGCGGGATCTGGGGGCGGAGGC
TCTGGCGGGGGAGGAAGTGGGGGAGGCGGATCTCAGGTGCAGCTGCAGGAATCTGGCCCTGGCCTCCTGAAACCCAGCGAGACACTGAG
CCTGACATGCACCGTGTCCGGCTACAGCATCACCGGCGGCTACCTGTGGAACTGGATCAGACAGCCCCCTGGCAAGTGCCTGGAATGGA
TCGGCTACATCAGCTACGACGGCACCAACAACTACAACCCTCCCTGAAGCAGACGAGTGACCATCAGCCGGGACACCAGCAAGAACCAG
TTCAGCCTGAAGCTGTCCAGCGTGACAGCCGCCGATACCGCCGTGTACTATTGCGCCAGATACGGCCGGTGTTCTTCGACTATTGGGG
CCAGGGCACCCTGGTGACTGTGTCATCTGGGGGAGGGGGAAGCGGAGGCGGAGGAAGTTGTCCTCCTTGTCCTGCCCCCGAACTGCTGG
GCGGACCTTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGAT
GTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACA
GTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAAGTGTCCA
ACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGACAGCCCCGCGAGCCCCAAGTGTATACCCTGCCCCCTAGC
CGGGAAGAGATGACCAAGAATCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATTGCCGTGGAATGGGAGAGCAA
CGGCCAGCCCGAGAACAATTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACA
AGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTG
AGCCCCGGCAAA（配列番号22）

図6B

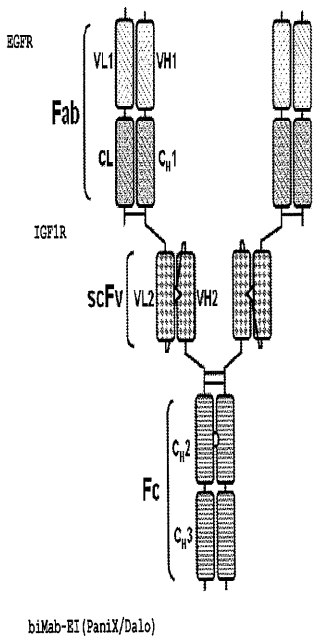
【図６Ｃ】

>タンパク質配列：結合ユニット1を形成するFabのVH－CH1ドメイン（抗EGFR、パニツムマブ由来）、図4および図5に示すような連結リンカー、結合ユニット2のscFV（抗IGF1R、ダロツズマブ由来）およびFc（VHおよびC_H1部分を下線で示す）

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGDYYWTWIRQSPGKGLEWIGHIYYSGNTNYNPSLKSRLTISIDTSKTQFSLKLSSVTA
ADTAIYYCVRERVTGAFDIWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTGGGSGGGGSDIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVHS
NGNTYLQWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRLYGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPWTFGCGTKVEIKGGGGSGGG
SGGGGSGGGSSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGYSITGGYLWNWIRQPPGKCLEWIGYISYDGTNNYKPSLKDRVTISRDTSKNQ
FSLKLSSVTAADTAVYYCARYGRVFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGYSITGGYLRNWIRQPPGKCL
EWIGYISYDGTNNYKPSLKDRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARYGRVFDYWGQGTLVTVSS (配列番号25)
>タンパク質配列：結合ユニット2のVLドメイン（抗IGF1R、ダロツズマブ由来）
DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVHSNGNTYLQWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRLYGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQ
GSHVPWTFGCGTKVEIK (配列番号26)
>タンパク質配列：結合ユニット2のVHドメイン（抗IGF1R、ダロツズマブ由来）
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGYSITGGYLRNWIRQPPGKCLEWIGYISYDGTNNYKPSLKDRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAA
DTAVYYCARYGRVFDYWGQGTLVTVSS (配列番号27)

図6C

【図６Ｄ】



biMab-EI(PaniX/Dalo)

【図７Ａ】

>DNA配列：軽鎖可変ドメイン1（Fab）およびκ定常ドメイン（ベバシズマブ/アバスチン由来の抗VEGF）軽鎖）

GACATCCAGATGACCCAGACCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTCACCATCACCTGTAGCGCCAGCCAGGACATCAG
CAACTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGGTGCTGATCTACTTCACCAGCTCCCTGCACAGCGGCGTGCCCA
GCAGATTTTCTGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAG
CAGTACAGCACCGTGCCTTGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC
GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGA
AGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACC
CTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAG
CTTCAACAGGGGAGAGTGT (配列番号28)
>タンパク質配列：軽鎖可変ドメイン1（Fab）およびκ定常ドメイン（ベバシズマブ/アバスチン由来の抗VEGF軽鎖）
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ
QYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号29)

>タンパク質配列：軽鎖可変ドメイン1（VL）（ベバシズマブ/アバスチン由来の抗VEGF軽鎖）
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ
QYSTVPWTFGQGTKVEIK (配列番号30)

図7A

【図７Ｂ】

>DNA配列：結合ユニット1を形成するFabのVH－CH1ドメイン（抗VEGF、ベバシズマブ/アバスチン由来）、図4および図5に示すような連結リンカー、結合ユニット2のscFV（抗Ang2、LC06由来）およびFc（VHおよびC_H1部分を下線で示す）

GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCTACACCTTCAC
CAACTACGGCATGAACTGGGTGCGCCAGGCCCCTGGCAAGGGACTGGAATGGGTGGGATGGATCAACACCTACACCGGCGAGCCCACCT
ACGCCGCCGACTTCAAGCGGCGTTCACCTTCAGCCTGGACACCAGCAAGAGCACCGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGGGCCGAG
GACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGTACCCCCACTACTACGGCAGCAGCCACTGGTACTTCGACGTGTGGGGCCAGGGCACCCTGGT
GACAGTGTCCAGCGCGTCGACCAAGGGACCTAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCCAGCAGCAAGTCTACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGG
GCTGCCTCGTGAAGGACTACTTTCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCACTGACAAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCC
GTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACAGTGCCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT
GAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAACCCAAGAGCTGCGGCAAAACAGGCGGCGGAGGATCCGGCGGAGGCG
GATCTCAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGCTGAAGTGAAGAAACCTGGGGCCAGCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTACACC
TTTACCGGCTACTACATGCACTGGGTGCGCCAGGCCCCTGGCCAGTGTCTGGAATGGGCTGGATCAACCCCAACAGCGGCGGCAC
CAACTACGCCCAGAAATTCCAGGGCAGACGTGACCATGACCCGGGACACCAGCATCAGCACCGCCTACATGGAACTGAGCCGGCTGAGAA
GCGACGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAAGCCCCAACCCCTACTACTACGACAGCAGCGGCTATTACTACCCTGGGGCCTTCGAC
ATCTGGGGACAGGGCACAATGGTCACCGTGTCTAGCGGAGGGGGAGGATCTGGGGGCGGAGGCTCTGGCGGGGGAGGAACTGGGGGAGG
CGGAAGCCAGCCTGGACTGACACAGCCTCCAAGCGTGTCAGTGGCCCCTGGACACACCCCCAGAATCACCTGTGGCGGCAACAACATCG
GCAGCAAGACCGTGCACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGACAGGCCCCACTGCTGGTGGTGTACGACGACAGCGATAGACCCAGCGGCATC
CCCGAGAGATTCAGCGGCAGCAACTCCGGCAATACCGCCACCCTGACCATCAGCAGAGTGGAAGCCGGCGACGAGGCCGACTACTACTG
CCAAGTGTGGGACAGCAGCAGCGACCACTACGTCTTCGGCTGTGGCACCAAAGTGACCGTGCTGGGAGGCGGGGGATCAGGGGGAGGGG
GGTCTTGTCCICCTTGTCCTGCTCCCGAACTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATC
AGCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCAGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGA
AGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGACT
GGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAAGCCCTGCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAG
CCCCGCGAGCCTCAAGTGTATACCCTGCCCCCTAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTT
CTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACG
GCTCATTCTTCCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGCCC
CTGCACAACCACTACACACAGAACTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAA (配列番号31)

図7B

【図７Ｃ】

>タンパク質配列：結合ユニット1を形成するFabのVH－CH1ドメイン（抗VEGF、ベバシズマブ/アバスチン由来）、図4および図5に示すような連結リンカー、結合ユニット2のscFV（抗Ang2、LC06由来）およびFc（VHおよびC$_H$1部分を下線で示す）

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAE
DTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCGKTGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYT
FTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARSPNPYYYDSSGYYYPGAFD
IWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQPGLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRPSGI
PERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHYVFGCGTKVTVLGGGGSGGGGSCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEA
LHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号32)

>タンパク質配列：結合ユニット1を形成するFabのVHドメイン（抗VEGF、ベバシズマブ/アバスチン由来）

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAE
DTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTLVTVSS (配列番号33)

>タンパク質配列：結合ユニット2のscFV（抗Ang2、LC06由来）

QVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQCLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSD
DTAVYYCARSPNPYYYDSSGYYYPGAFDIWGQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQPGLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGS
KSVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHYVFGCGTKVTVL (配列
番号34)

>タンパク質配列：結合ユニット2のVL（抗Ang2、LC06由来）

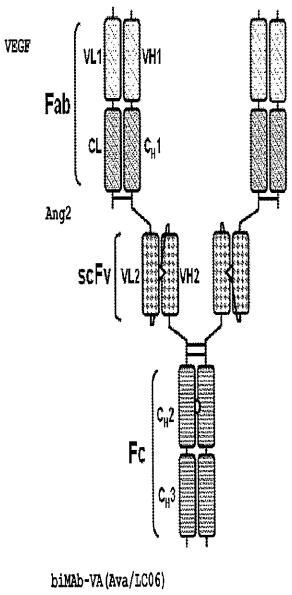
QPGLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQV
WDSSSDHYVFGCGTKVTVL (配列番号35)

>タンパク質配列：結合ユニット2のVH（抗Ang2、LC06由来）

QVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQCLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSD
DTAVYYCARSPNPYYYDSSGYYYPGAFDIWGQGTMVTVSS (配列番号36)

図7C

【図７Ｄ】



biMAb-VA(Ava/LC06)

【図８Ａ】

>DNA配列：軽鎖可変ドメイン1（Fab）およびκ定常ドメイン（抗PcrV抗体V2L2由来）

GCCATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAG
AAATGATTTAGGCTGGTATCAACAGAAGCCAGGGAAAGCCCCTAAACTCCTGATCTATTCTGCATCCACTTTACAAAGTGGGGTCCCAT
CAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGCACAGATTTCACTCTCTCCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTA
CAAGATTACAATTACCCGTGGACGGTTCGGCCAAGGGACCAAGTTGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC
GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGA
AGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACC
CTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAG
CTTCAACAGGGGAGACAGTGT (配列番号41)

>タンパク質配列：軽鎖可変ドメイン1（Fab）およびκ定常ドメイン（抗体V2L2由来の抗PcrV軽鎖）

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKLVIYSASTLQSGVPSRFSGSESGTDFTLSISSLQPDDFATYYCL
QDYNYPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号42)

>タンパク質配列：軽鎖可変ドメイン1（VL）抗PcrV軽鎖（抗体V2L2由来の抗PcrV軽鎖）

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKLVIYSASTLQSGVPSRFSGSESGTDFTLSISSLQPDDFATYYCL
QDYNYPWTFGQGTKVEIK (配列番号43)

図8A

【図８Ｂ】

>DNA配列：結合ユニット1を形成するFabのVH－CH1ドメイン（抗PcrV抗体V2L2由来）、図4Cおよび図5Cに示すような連結リンカー、結合ユニット2のscFV（抗Psl抗体W4－RAD由来）およびFc（VHおよびC$_H$1部分を下線で示す）

GAGATGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGC
AGCTATGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGGCAGGGGCTGGAGTGGGTCTCACCTATTACTATTAGTGGTATTACCGCATACTAC
ACCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGCCTGAGGGCCGGGGAC
ACGGCCGTATATTACTGTGCGAAGGAAGAATTTTTACCTGGAACGCACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTC
ACCGTCTCCTCAGCgTCgACCAAGGGCCCATCcGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGC
TGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCcTGGAACTCAGGCGCtCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTC
CTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAAT
CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACGCGGAGGGGGCTCTGGCGGAGGGgatccGAGGTGCAG
CTGTTGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCAATGTCGCTGGTGGCTCCATCAGTCCTTACTAC
TGGACCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGTGCCTGGAGTGGATTGGTTATATCCACTCCAGTGGGTACACCGGACTACAACCCCTCCCTC
AAGAGTCGAGTCACCATATCAGGAGACACGTCCAAGAAGCAGTTCTCCCTGCACCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTAC
TTCTGTCCGAGAGCCGATTGGGACCTGCTTCATGCTCTTGATATCTGGGGCCAAGGGACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGGCGGAGGGGC
TCTGGGGGAGGGGGCAGCGGCGGCGGAGGATCTGGGGGAGGGGGCAGCCAAATTGTGTTGACACAGTCTCCATCCTCCCTGTCTACATCT
GTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGAGCATTAGGAGCCATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCT
AAACTCCTGATCTATGGTGCATCCAATTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACC
ATTAGTAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTTTCCCCCTCACTTTCGGCTGTGGGACCAAGCTG
GAGATCAAAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGAGGGggatccGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGA
CCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACCTGAGC
CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAC
AGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCC
CTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTcTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAG
ATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG
GAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCttaagCCTGTCTCCGGGTAAA
(配列番号44)

図8B

【図８Ｃ】

>タンパク質配列：結合ユニット1を形成するFabのVH－CH1ドメイン（抗PcrV抗体V2L2由来）、図4Cおよび図5Cに示すような連結リンカー、結合ユニット2のscFV（抗Psl抗体W4－RAD由来）およびFc（VHおよびC_H1部分を下線で示す）

EMQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGEGLEWVSAITISGITAYYTDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAG
DTAVYYCAKEEFLPGTHYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCGGGGSGGGGSEVQLLESGPGLVKPSETLSLTCNVAGGSIS
PYYWTWIRQPPGKCLELIGYIHSSGYTDYNPSLKSRVTISGDTSKKQFSLHVSSVTAADTAVYFCARADWDLLHALDIWGQGTLVTVSS
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPSSLSTSVGDRVTITCRASQSIRSHLNWYQQKPGKAPKLLIYGASNLQSGVPSRFSGSGSGT
DFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSSPPLIFGCGTKLEIKGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK（配列番号45）

>タンパク質配列：結合ユニット1を形成するFabのVHドメイン（抗PcrV抗体V2L2由来）

EMQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGEGLEWVSAITISGITAYYTDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAG
DTAVYYCAKEEFLPGTHYYYGMDVWGQGTTVTVSS（配列番号46）

>タンパク質配列：結合ユニット2のscFV（抗Psl抗体W4－RAD由来）

EVQLLESGPGLVKPSETLSLTCNVAGGSISPYYWTWIRQPPGKCLELIGYIHSSGYTDYNPSLKSRVTISGDTSKKQFSLHVSSVTAAD
TAVYFCARADWDLLHALDIWGQGILVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPSSLSTSVGDRVTITCRASQSIRSHLNWYQQK
PGKAPKLLIYGASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSPPLTFGCGTKLEIK（配列番号47）

>タンパク質配列：結合ユニット2のVL（抗Psl抗体W4－RAD由来）

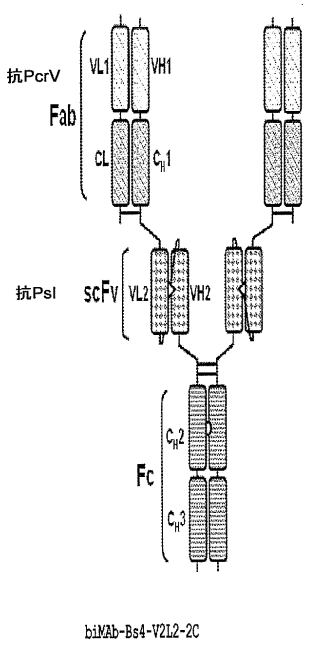
EIVLTQSPSSLSTSVGDRVTITCRASQSIRSHLNWYQQKPGKAPKLLIYGASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ
QSYSPPLTFGCGTKLEIK（配列番号48）

>タンパク質配列：結合ユニット2のVH（抗Psl抗体W4－RAD由来）

EVQLLESGPGLVKPSETLSLTCNVAGGSISPYYWTWIRQPPGKCLELIGYIHSSGYTDYNPSLKSRVTISGDTSKKQFSLHVSSVTAAD
TAVYFCARADWDLLHALDIWGQGTLVTVSS（配列番号49）

図8C

【図８Ｄ】



biMAb-Bs4-V2L2-2C

図8D

【図９】

被検細胞	293細胞を使用して10日後の一過性発現（mg/L）
biMab-EI(PaniX/Dalo)	20
biMab-VA(Ava/LC06)	130

図9

【図１０】

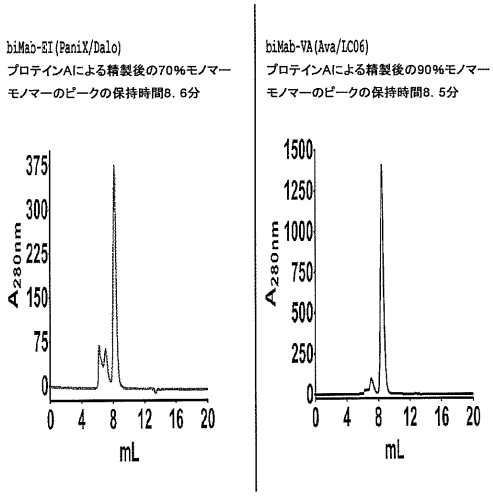


図10

【図１１Ａ】

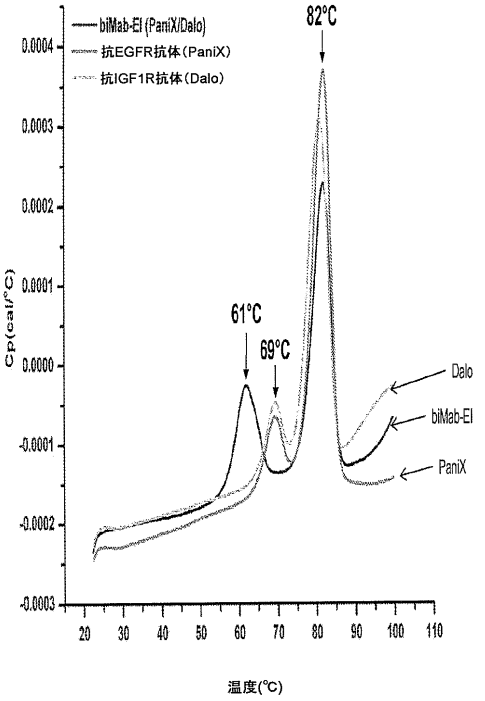


図11A

【図１１Ｂ】

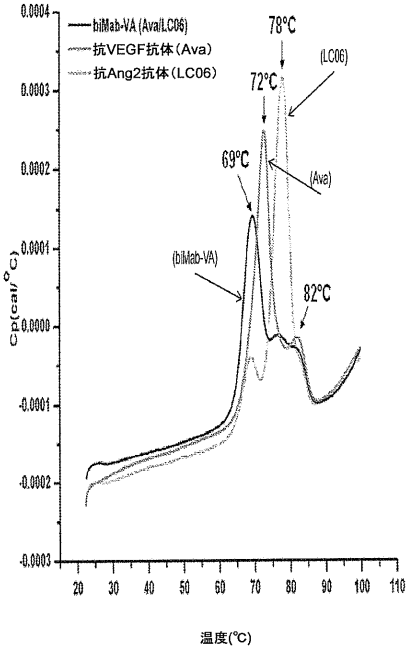


図11B

【図１２Ａ】

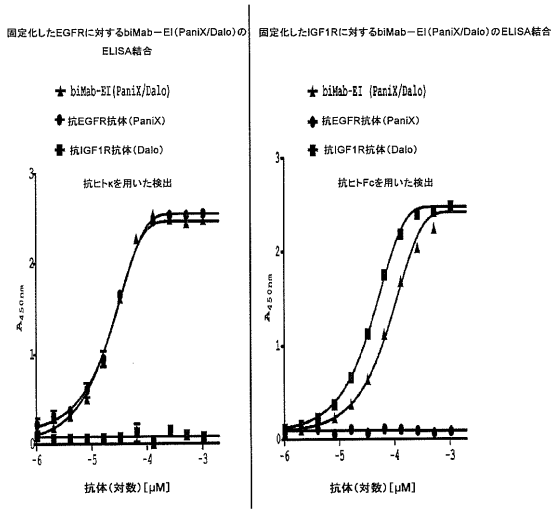


図12A

【図１２Ｂ】

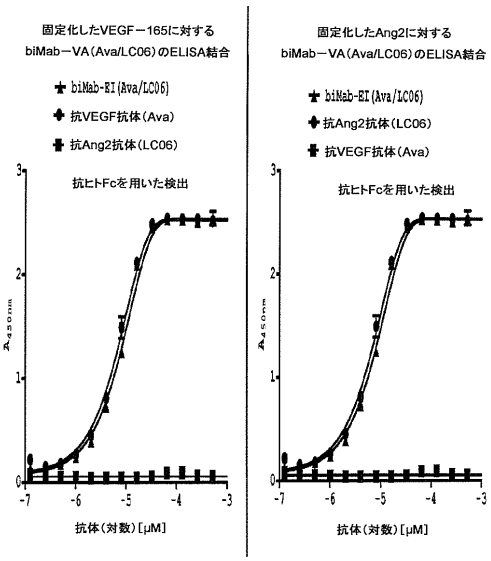


図12B

【図１３Ａ－Ｂ】

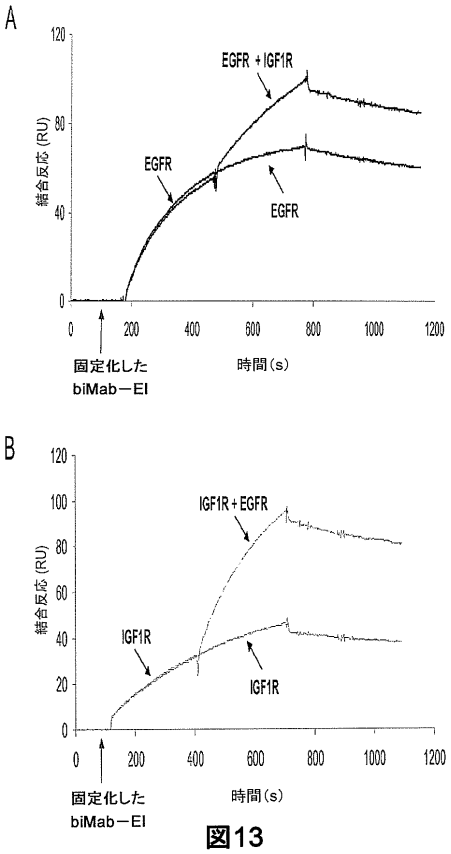


図13

【図１４Ａ－Ｄ】

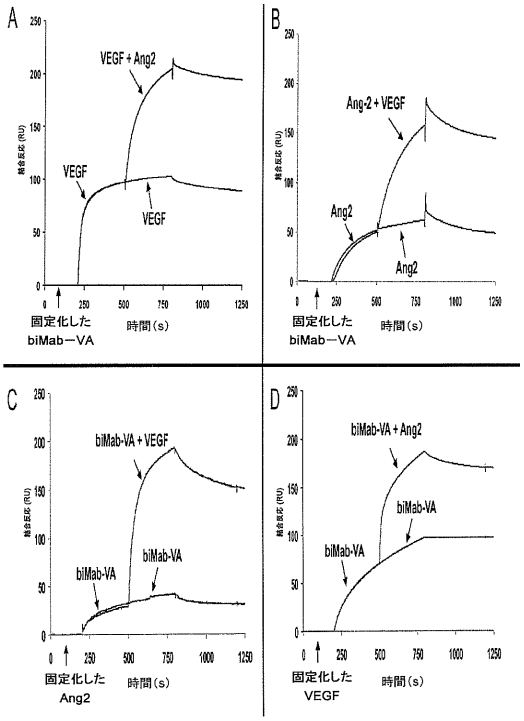


図14

【図１５】

アミンカップリング化学を用いて固定化した被検分子	ヒトFcRnのK_D (μM)
biMab-EI (PaniX/Dalo)	0.93
biMab-VA (Ava/LC06)	0.68
PaniX (抗EGFR)	0.84

図15

【図１６】

ヒトC1qに対するbiMabのELISA結合

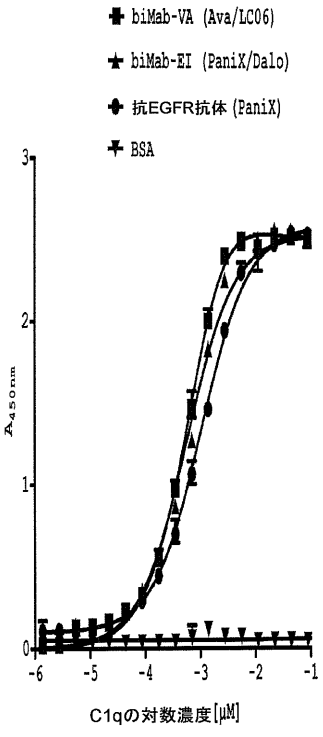


図16

【図１７】

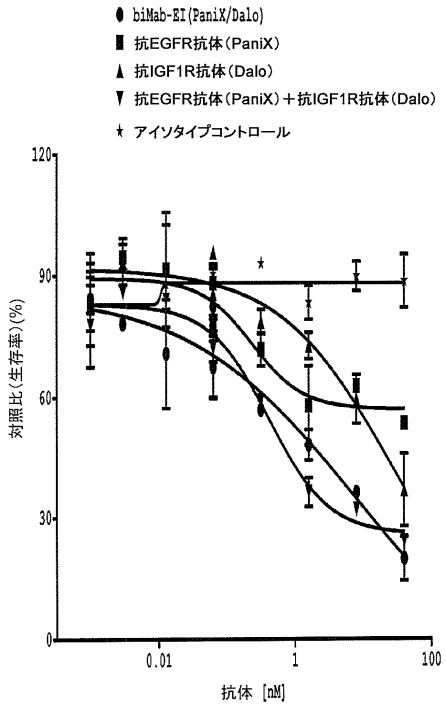


図17

【図１８Ａ】

Ang2により媒介されるヒトpTie2リン酸化の阻害。ヒトpTie2はHek293細胞の表面に発現した組換え体である

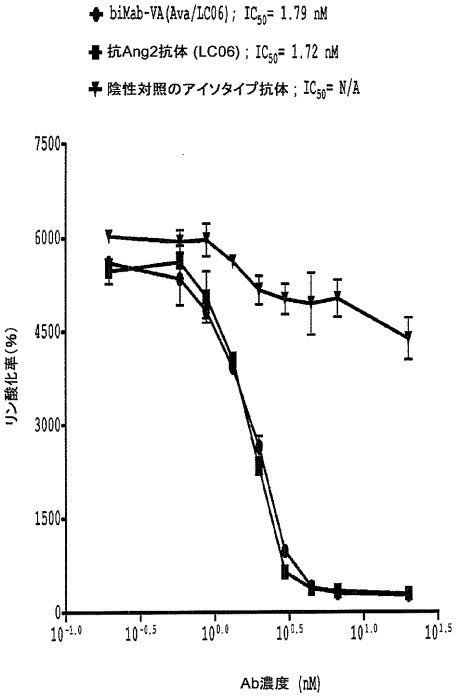


図18A

【図１８Ｂ】

VEGFによるヒトpVEGFR2リン酸化の阻害。ヒトpVEGFR2はHek293細胞の表面に発現した組換え体である

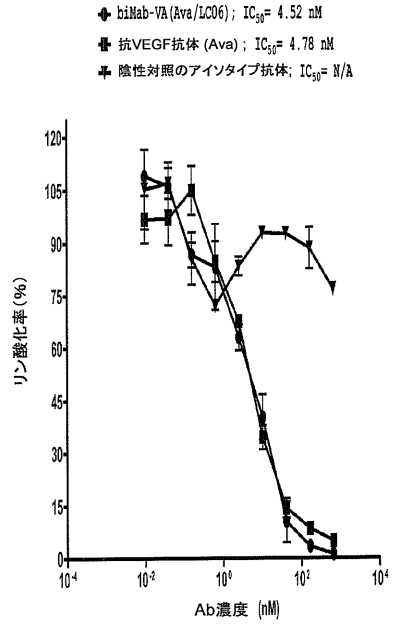


図18B

【図１９】

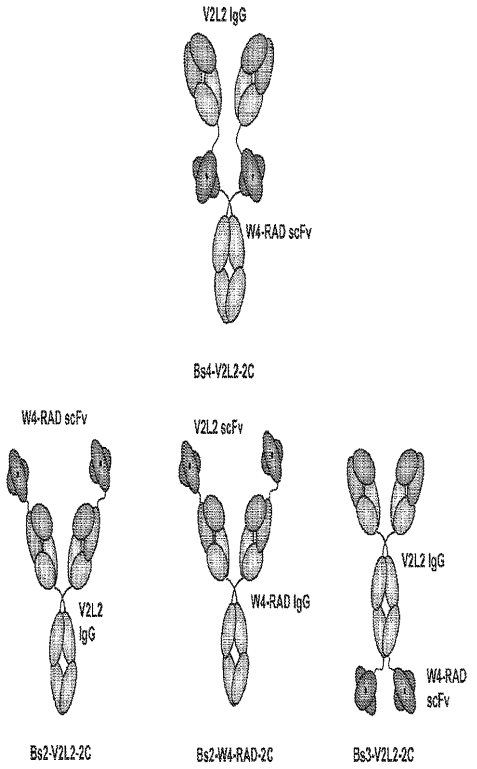
被検分子	初濃度 (mg/mL)	初濃度でのモノマー含有量 (%)
biMab-EI(PaniX/Dalo)	0.54	99
biMab-VA(Ava/LC06)	1.84	99

被検分子	最終濃度 (mg/mL)	最終濃度でのモノマー含有量 (%)
biMab-EI(PaniX/Dalo)	25	99
biMab-VA(Ava/LC06)	25	99

緩衝液:25mMのヒスチジンーHCl pH6.0

図19

【図２０】



【図２１】

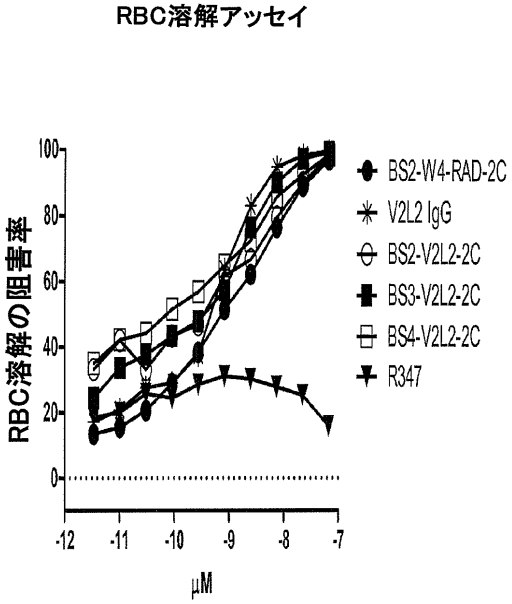


図21

【図２２】

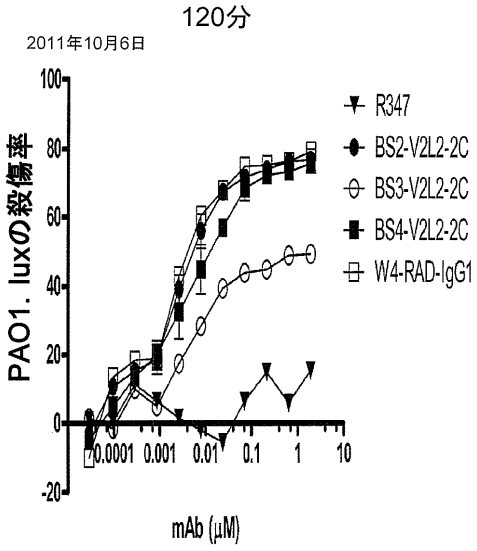


図22

【図２３Ａ】

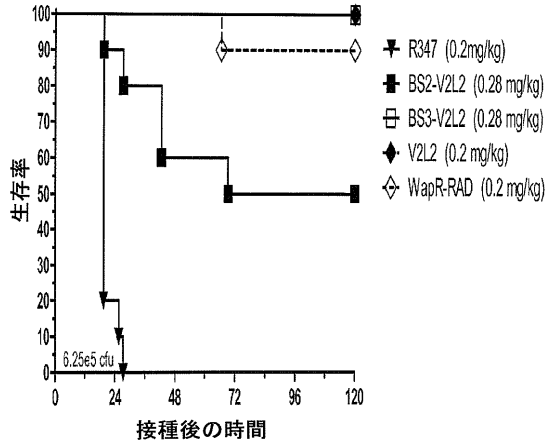


図23A

【図２３Ｂ】

試験AD－PA－11－043A　6206の生存率データ

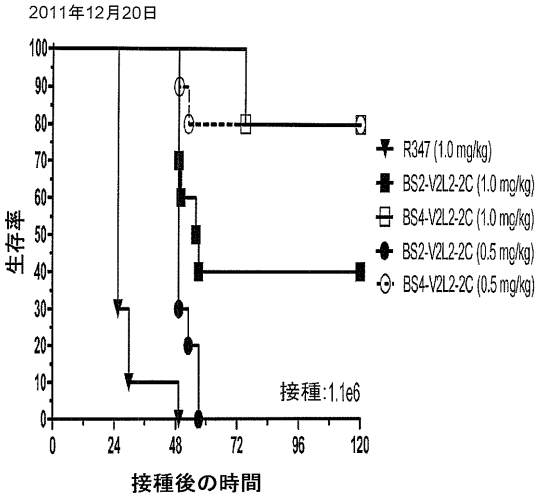


図23B

【図２３Ｃ】

試験AD－PA－12－003a　6206の生存率データ

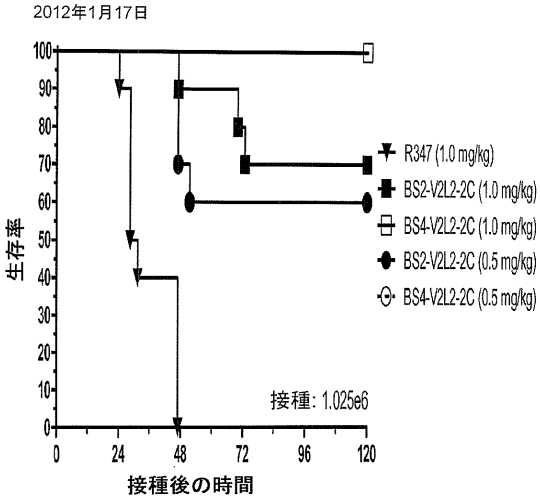


図23C

【図２３Ｄ】

試験AD－PA－12－001　6206の生存率データ

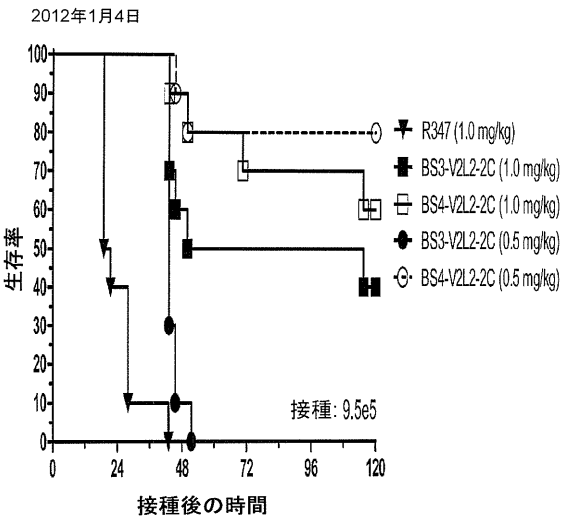


図23D

【図２４】

P. エルジノーサ（P. aeruginosa）株6206（O11－ExoU^{+}）をチャレンジしたマウスの致死的肺炎の予防率

	抗体濃度（mg/kg）							
抗体	15	10	5	2	1	0.5	0.2	0.1
BS2-V2L2[a]	100 (10)	-	100 (10)	-	67 (30)	40 (30)	-	-
BS2-V2L2-2C			90 (20)		25 (20)	0 (20)	0 (10)	
BS2-W4-RAD-2C			70 (10)		10 (10)	0 (10)	0 (10)	
BS3-V2L2-2C	-	80 (10)	40 (20)	-	10 (20)	0 (20)	0 (20)	-
BS4-V2L2-2C	-	-	100 (50)	-	88 (50)	60 (50)	10 (50)	-
V2L2	-	-	80 (10)	-	20 (10)	10 (10)	0 (10)	-
W4-RAD	0 (10)	-	0 (10)	-	0 (10)	-	-	-
	抗体濃度（mAbごとのmg/kg）							
混合物			5	2	1	0.5	0.2	0.1
W4-RAD + V2L2	-	-	100 (10)	100 (40)	78 (40)	15 (40)	-	3 (40)

感染から120時間後（約1．0e6CFU/動物を接種）

括弧は動物の総数を示す

[a]1mg/kgおよび0．5mg/kgは、動物をそれぞれ1．7mg/kgおよび0．55mg/kgで処置した試験を含む

図24

【図２５】

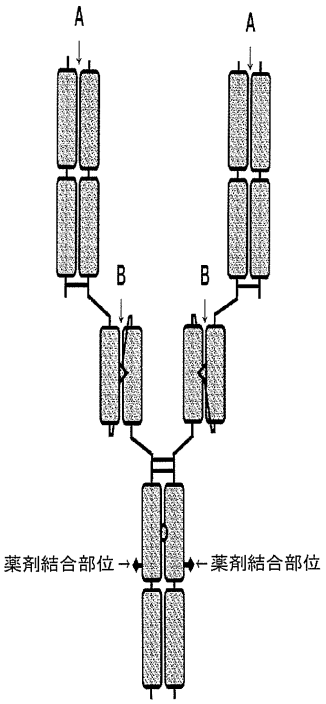


図25

【図２６】

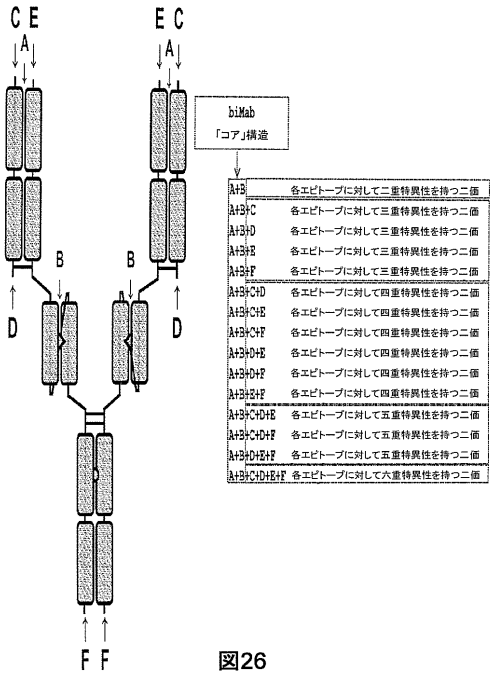


図26

【図２７Ａ】

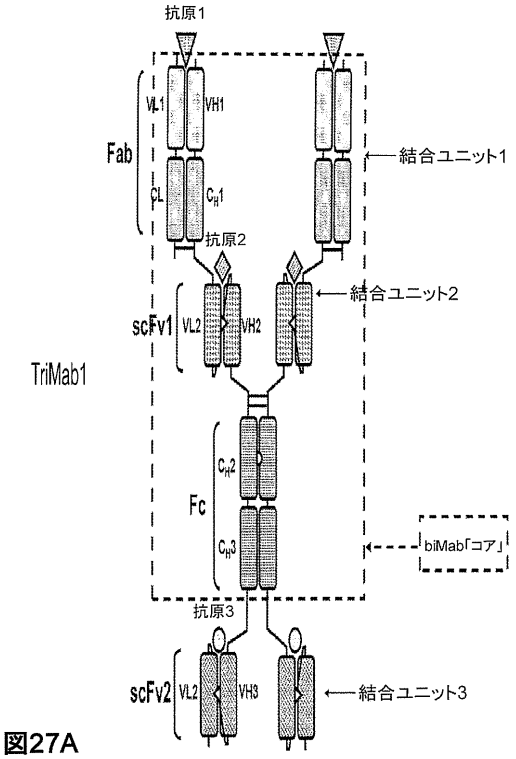


図27A

【図２７Ｂ】

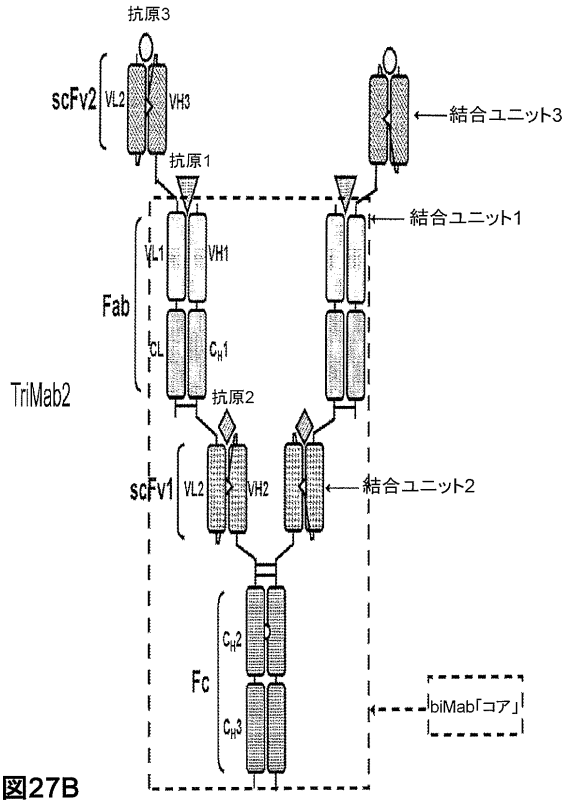


図27B

【図２７Ｃ】

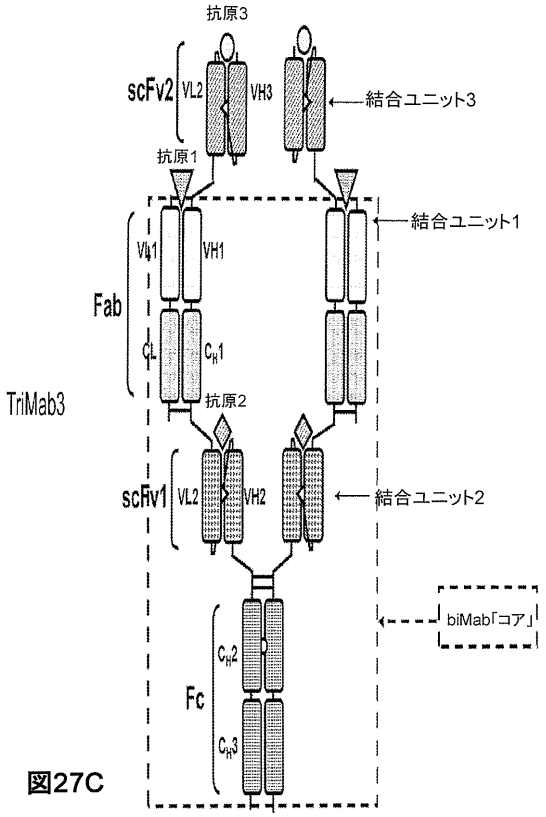


図27C

【図２７Ｄ】

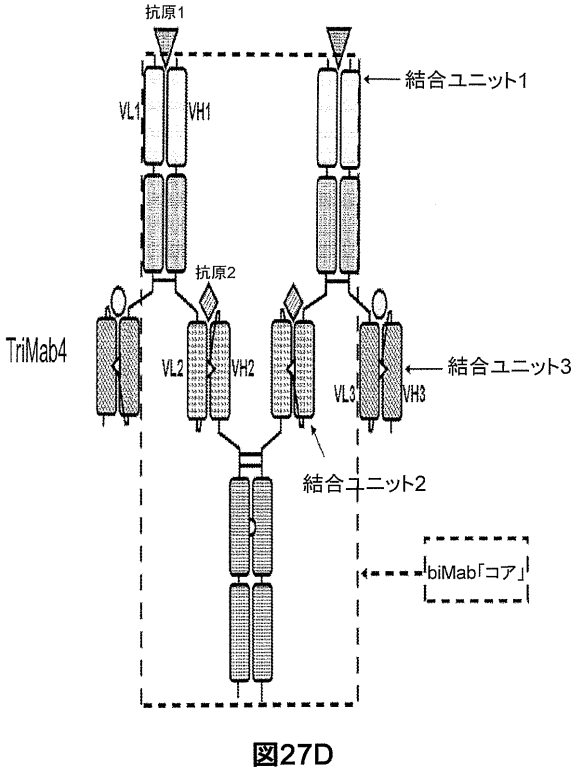


図27D

【図２７Ｅ】

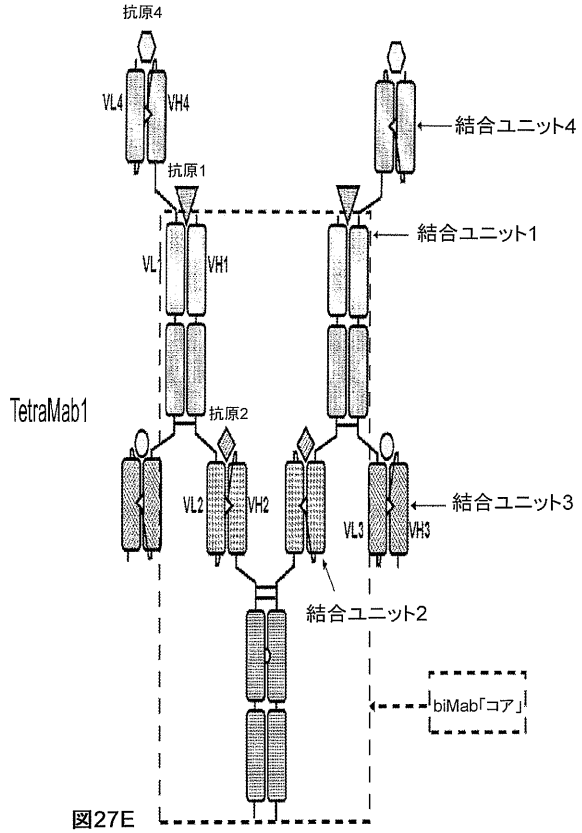


図27E

【図２７Ｆ】

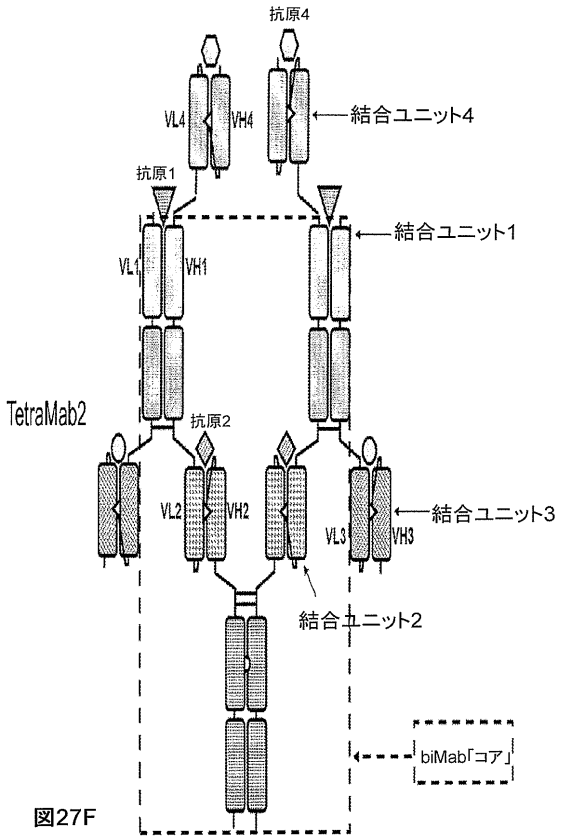


図27F

【図２７Ｇ】

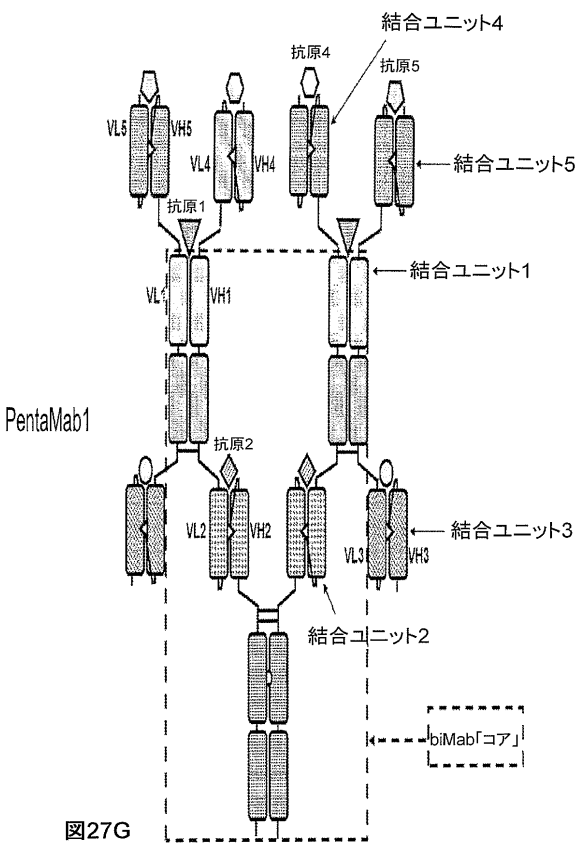


図27G

【図２７Ｈ】

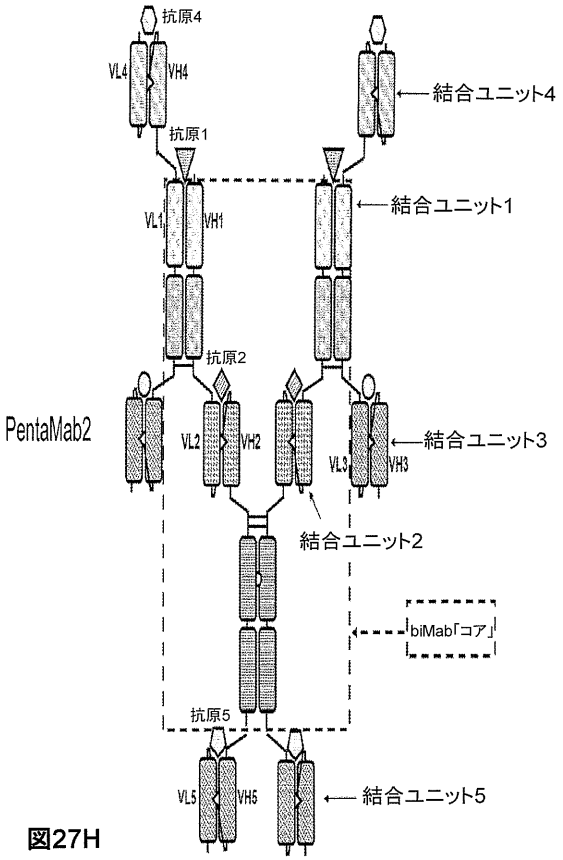


図27H

【図２７Ｉ】

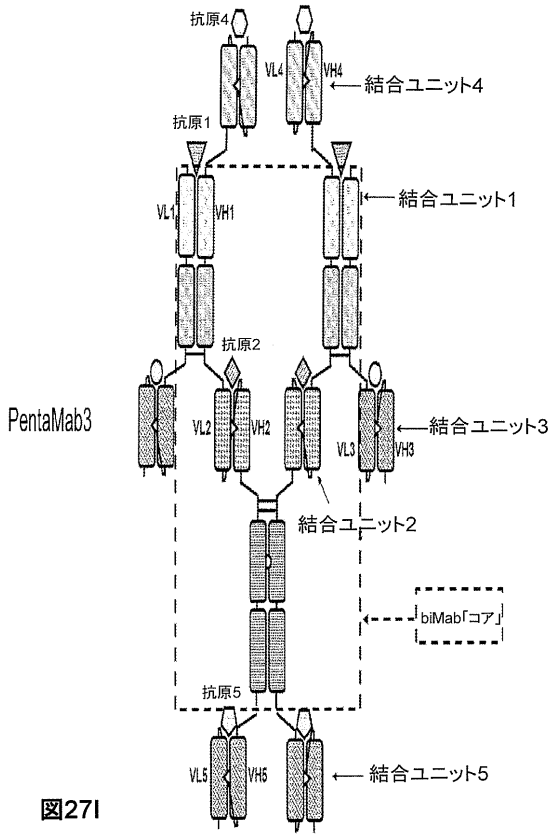


図27I

【図２７Ｋ】

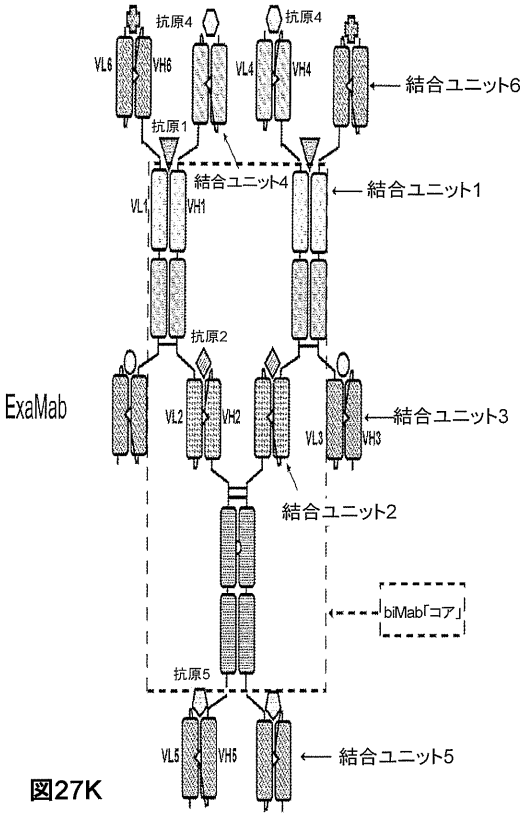


図27K

【図２８】

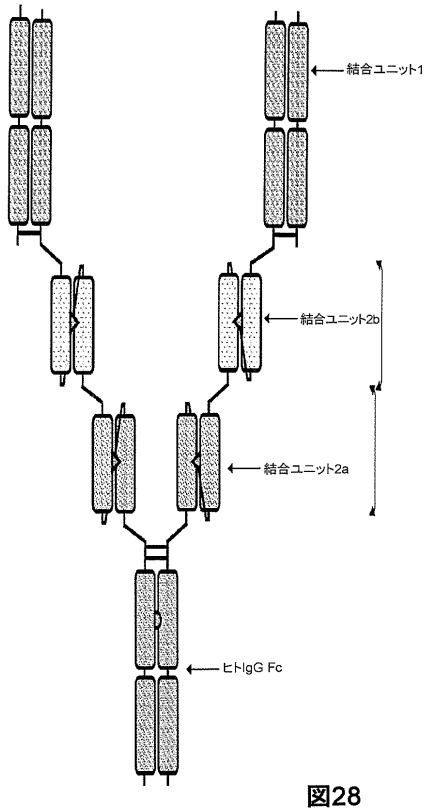


図28

【図２９】

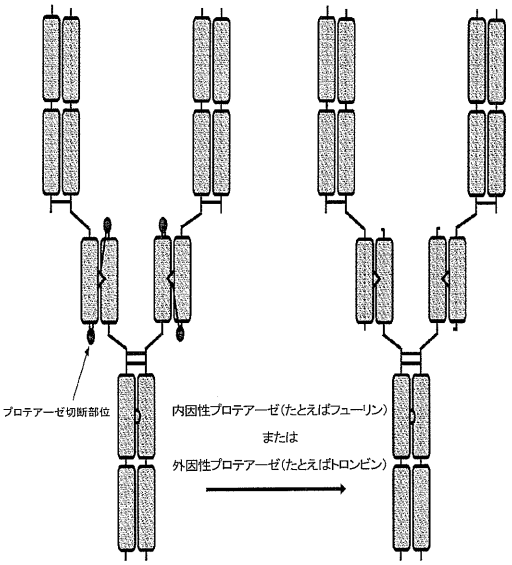


図29

【配列表】

2014533249000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2012/063639

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K 39/00 (2012.01)
USPC - 424/134.1
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC(8) - 424/1.49, 9.34, 134.1; 435 (all); 514 (all) (2012.01)
USPC - A61K 31/00, 39/00, 45/00; A61P (all); C07K 16/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
CPC - C07K 16/00, 2316/50, 2316/52, 2316/95, 2316/96

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PatBase, Google Patents

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2009/0215992 A1 (WU et al) 27 August 2009 (27.08.2009) entire document	1-3
A	US 2010/0172862 A1 (CORREIA et al) 08 July 2010 (08.07.2010) entire document	1-3

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
07 January 2013	22 JAN 2013
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2012/063639

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 4-83
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

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

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

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*1/21*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/21		
Ｃ１２Ｎ	*5/10*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/00	１０１	
Ａ６１Ｋ	*39/395*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｎ	

(31)優先権主張番号 61/556,645
(32)優先日 平成23年11月7日(2011.11.7)
(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC

(72)発明者 ディマシ，ナッツァレノ
アメリカ合衆国 ２０８７８ メリーランド州，ゲイサーズバーグ，ワン メディミューン ウェイ，メディミューン，エルエルシー
(72)発明者 フレミング，ライアン
アメリカ合衆国 ２０８７８ メリーランド州，ゲイサーズバーグ，ワン メディミューン ウェイ，メディミューン，エルエルシー
(72)発明者 ベツァベー，ビンヤム
アメリカ合衆国 ２０８７８ メリーランド州，ゲイサーズバーグ，ワン メディミューン ウェイ，メディミューン，エルエルシー
(72)発明者 ガオ，チャンショウ
アメリカ合衆国 ２０８７８ メリーランド州，ゲイサーズバーグ，ワン メディミューン ウェイ，メディミューン，エルエルシー

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA41 BA61 CA01 CA07 CA09 CA10 CA11 CA20
DA01 DA02 DA05 DA11 DA12 EA04 GA11 HA01 HA06 HA11
4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA90X AA90Y AB01 AC14 BA01 CA24
CA25 CA44 CA46
4C085 AA14 BB33 BB34 BB35 BB36 BB37 BB41 BB42 BB50 CC23
EE01 GG01 GG02 GG03 GG04 GG05 GG06 GG08 GG10
4H045 AA11 AA30 BA10 BA40 CA40 DA75 DA76 EA20 EA50 FA74
GA22 GA26