(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2015-119711
(P2015-119711A)
(43)公開日　平成27年7月2日(2015.7.2)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
C07K 16/18	(2006.01)	C07K	16/18		4B064
C07K 16/24	(2006.01)	C07K	16/24		4B065
C07K 16/28	(2006.01)	C07K	16/28		4C084
C07K 16/22	(2006.01)	C07K	16/22		4C085

審査請求 有　請求項の数 17　ＯＬ　外国語出願　（全 225 頁）　最終頁に続く

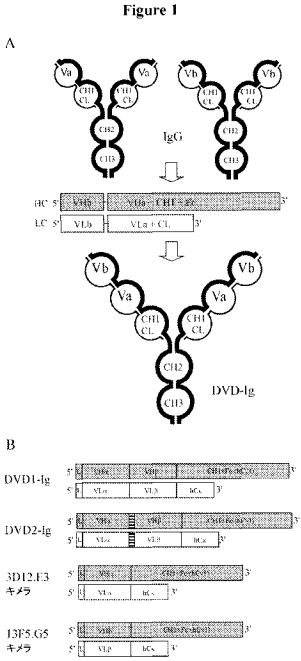
(21)出願番号　特願2015-4894(P2015-4894)
(22)出願日　平成27年1月14日(2015.1.14)
(62)分割の表示　特願2011-512615(P2011-512615)の分割
原出願日　平成21年6月3日(2009.6.3)
(31)優先権主張番号　61/130,776
(32)優先日　平成20年6月3日(2008.6.3)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/132,951
(32)優先日　平成20年6月24日(2008.6.24)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　512212195
アッヴィ・インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　６００６４　イリノイ州　ノース　シカゴ　ワウキガン　ロード　１エヌ.
(74)代理人　110001173
特許業務法人川口國際特許事務所
(72)発明者　タリク・ガユール
アメリカ合衆国、マサチユーセツツ・０１７４６、ホリストン、ワシントン・ストリート・１０１４
(72)発明者　アルフレート・ハーン
ドイツ国、６８１６３・マンハイム、シユバルツバルトシユトラーセ・３８

最終頁に続く

(54)【発明の名称】二重可変ドメイン免疫グロブリン及びその使用

(57)【要約】　（修正有）
【課題】操作された多価及び多重特異的な結合蛋白質、それらの製造方法、特に、疾病の予防、診断及び／又は治療におけるそれらの使用の提供。
【解決手段】第一及び第二のポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であって、前記ポリペプチド鎖はそれぞれ独立にＶＤ１－（Ｘ１）ｎ－ＶＤ２－Ｃ－（Ｘ２）ｎを含む結合蛋白質（ＶＤ１は第一の可変ドメイン；ＶＤ２は第二の可変ドメイン；Ｃは定常ドメイン；Ｘ１はリンカー；Ｘ２はＦｃ領域；ｎは０又は１）第一及び第二のポリペプチド鎖上のＶＤ１領域は第一の機能的標的結合部位を形成し、第一及び第二のポリペプチド鎖上のＶＤ２領域は第二の機能的標的結合部位を形成し、並びに、前記結合蛋白質は、Ａβ及びＡβ；ＴＮＦ－α及びＡβ；ＩＬ－１β及びＡβ；Ａβ及びＡβ；ＩＧＦ１，２及びＡβである結合蛋白質。
【選択図】図１



【特許請求の範囲】
【請求項１】
ポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であって、前記ポリペプチド鎖はＶＤ１－（Ｘ１）$_{n}$－ＶＤ２－Ｃ－（Ｘ２）$_{n}$を含み、
ＶＤ１は、第一の重鎖可変ドメインであり、
ＶＤ２は、第二の重鎖可変ドメインであり、
Ｃは、重鎖定常ドメインであり、
Ｘ１は、ＣＨ１ではないリンカーであり、
Ｘ２は、Ｆｃ領域であり、及び
ｎは、０又は１であり、
Ａβ（配列１）及びＡβ（配列３）；ＴＮＦ－α及びＡβ（配列２）；ＩＬ－１β及びＡβ（配列２）；Ａβ（配列１）及びＡβ（配列２）；ＩＧＦ１，２及びＡβ（配列２）；Ａβ（配列２）及びＩＬ－１８；ＩＬ－６及びＡβ（配列２）；ＴＮＦ－α及びＡβ（配列３）；ＩＬ－１β及びＡβ（配列３）；Ａβ（配列１）及びＡβ（配列３）；ＩＧＦ１，２及びＡβ（配列３）；Ａβ（配列３）及びＩＬ－１８；ＩＬ－６及びＡβ（配列３）；ＴＮＦ－α及びＡβ（配列１）；ＩＬ－１β及びＡβ（配列１）；ＩＧＦ１，２及びＡβ（配列１）；Ａβ（配列１）及びＩＬ－１８；ＩＬ－６及びＡβ（配列１）；Ａβ（配列１）及びＲＡＧＥ；ＮＧＦ及びＩＬ－１８；ＮＧＦ及びＩＬ－１β；ＮＧＦ及びＩＬ－６；ＴＮＦ－α及びＥＧＦＲ（配列２）；ＴＮＦ－α及びＲＡＧＥ；ＣＤ－２０及びＥＧＦＲ（配列１）；ＣＤ－２０及びＥＧＦＲ（配列２）；ＲＧＭＡ及びＴＮＦ－αからなる群から選択される抗原の対を結合することができる、
結合タンパク質。
【請求項２】
ＶＤ１及びＶＤ２が配列番号２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４及び５６からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項１に記載の結合タンパク質。
【請求項３】
ポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であって、前記ポリペプチド鎖はＶＤ１－（Ｘ１）$_{n}$－ＶＤ２－Ｃ－（Ｘ２）$_{n}$を含み、
ＶＤ１は、第一の軽重鎖可変ドメインであり、
ＶＤ２は、第二の軽重鎖可変ドメインであり、
Ｃは、軽鎖定常ドメインであり、
Ｘ１は、ＣＨ１ではないリンカーであり、
Ｘ２は、Ｆｃ領域を含まず、及び
ｎは、０又は１であり、
Ａβ（配列１）及びＡβ（配列３）；ＴＮＦ－α及びＡβ（配列２）；ＩＬ－１β及びＡβ（配列２）；Ａβ（配列１）及びＡβ（配列２）；ＩＧＦ１，２及びＡβ（配列２）；Ａβ（配列２）及びＩＬ－１８；ＩＬ－６及びＡβ（配列２）；ＴＮＦ－α及びＡβ（配列３）；ＩＬ－１β及びＡβ（配列３）；Ａβ（配列１）及びＡβ（配列３）；ＩＧＦ１，２及びＡβ（配列３）；Ａβ（配列３）及びＩＬ－１８；ＩＬ－６及びＡβ（配列３）；ＴＮＦ－α及びＡβ（配列１）；ＩＬ－１β及びＡβ（配列１）；ＩＧＦ１，２及びＡβ（配列１）；Ａβ（配列１）及びＩＬ－１８；ＩＬ－６及びＡβ（配列１）；Ａβ（配列１）及びＲＡＧＥ；ＮＧＦ及びＩＬ－１８；ＮＧＦ及びＩＬ－１β；ＮＧＦ及びＩＬ－６；ＴＮＦ－α及びＥＧＦＲ（配列２）；ＴＮＦ－α及びＲＡＧＥ；ＣＤ－２０及びＥＧＦＲ（配列１）；ＣＤ－２０及びＥＧＦＲ（配列２）；ＲＧＭＡ及びＴＮＦ－αからなる群から選択される抗原の対を結合することができる、
結合タンパク質。
【請求項４】
ＶＤ１及びＶＤ２軽鎖可変ドメインが配列番号２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１、４３、４５、４７、４９、５１、５３、５５及び５７からなる群から選択されるア

ミノ酸配列を含む、請求項３に記載の結合タンパク質。
【請求項５】
ｎが０である、請求項１又は３に記載の結合タンパク質。
【請求項６】
第一及び第二のポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であって、前記第一のポリペプチド鎖は第一のＶＤ１－（Ｘ１）$_n$－ＶＤ２－Ｃ－（Ｘ２）$_n$を含み、
ＶＤ１は、第一の重鎖可変ドメインであり、
ＶＤ２は、第二の重鎖可変ドメインであり、
Ｃは、重鎖定常ドメインであり、
Ｘ１は、ＣＨ１ではないリンカーであり、及び
Ｘ２は、Ｆｃ領域であり、並びに
前記第二のポリペプチド鎖は、第二のＶＤ１－（Ｘ１）$_n$－ＶＤ２－Ｃ－（Ｘ２）$_n$を含み、
ＶＤ１は、第一の軽鎖可変ドメインであり、
ＶＤ２は、第二の軽鎖可変ドメインであり、
Ｃは、軽鎖定常ドメインであり、
Ｘ１は、ＣＨ１ではないリンカーであり、
Ｘ２は、Ｆｃ領域を含まず、及び
ｎは、０又は１であり、
Ａβ（配列１）及びＡβ（配列３）；ＴＮＦ－α及びＡβ（配列２）；ＩＬ－１β及びＡβ（配列２）；Ａβ（配列１）及びＡβ（配列２）；ＩＧＦ１，２及びＡβ（配列２）；Ａβ（配列２）及びＩＬ－１８；ＩＬ－６及びＡβ（配列２）；ＴＮＦ－α及びＡβ（配列３）；ＩＬ－１β及びＡβ（配列３）；Ａβ（配列１）及びＡβ（配列３）；ＩＧＦ１，２及びＡβ（配列３）；Ａβ（配列３）及びＩＬ－１８；ＩＬ－６及びＡβ（配列３）；ＴＮＦ－α及びＡβ（配列１）；ＩＬ－１β及びＡβ（配列１）；ＩＧＦ１，２及びＡβ（配列１）；Ａβ（配列１）及びＩＬ－１８；ＩＬ－６及びＡβ（配列１）；Ａβ（配列１）及びＲＡＧＥ；ＮＧＦ及びＩＬ－１８；ＮＧＦ及びＩＬ－１β；ＮＧＦ及びＩＬ－６；ＴＮＦ－α及びＥＧＦＲ（配列２）；ＴＮＦ－α及びＲＡＧＥ；ＣＤ－２０及びＥＧＦＲ（配列１）；ＣＤ－２０及びＥＧＦＲ（配列２）；ＲＧＭＡ及びＴＮＦ－αからなる群から選択される抗原の対を結合することができる、
結合タンパク質。
【請求項７】
ＶＤ１及びＶＤ２重鎖可変ドメインが配列番号２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４及び５６からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、並びにＶＤ１及びＶＤ２軽鎖可変ドメインが配列番号２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１、４３、４５、４７、４９、５１、５３、５５及び５７からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項６に記載の結合タンパク質。
【請求項８】
Ｘ１又はＸ２が配列番号１から２６からなる群から選択されるアミノ酸配列である、請求項１、３又は６に記載の結合タンパク質。
【請求項９】
２つの第一のポリペプチド鎖及び２つの第二のポリペプチド鎖を含む、請求項６に記載の結合タンパク質。
【請求項１０】
Ｆｃ領域が原型配列Ｆｃ領域及び変形物配列Ｆｃ領域からなる群から選択される、請求項１、３又は６に記載の結合タンパク質。
【請求項１１】
Ｆｃ領域が、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ、ＩｇＭ、ＩｇＥ及びＩｇＤからのＦｃ領域からなる群から選択される、請求項１０に記載の結合タンパク質。
【請求項１２】

第一のポリペプチド鎖の前記ＶＤ１及び第二のポリペプチド鎖の前記ＶＤ１が、それぞれ、同じ第一及び第二の親抗体又はその抗原結合部分から得られる、請求項１、３又は６に記載の結合タンパク質。

【請求項１３】

第一のポリペプチド鎖の前記ＶＤ１及び第二のポリペプチド鎖の前記ＶＤ１が、それぞれ、異なる第一及び第二の親抗体又はその抗原結合部分から得られる、請求項１、３又は６に記載の結合タンパク質。

【請求項１４】

第一のポリペプチド鎖の前記ＶＤ２及び第二のポリペプチド鎖の前記ＶＤ２が、それぞれ、同じ第一及び第二の親抗体又はその抗原結合部分から得られる、請求項１、３又は６に記載の結合タンパク質。

【請求項１５】

第一のポリペプチド鎖の前記ＶＤ２及び第二のポリペプチド鎖の前記ＶＤ２が、それぞれ、異なる第一及び第二の親抗体又はその抗原結合部分から得られる、請求項１、３又は６に記載の結合タンパク質。

【請求項１６】

前記第一及び前記第二の親抗体が前記抗原上の異なるエピトープを結合する、請求項１３から１５の何れか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項１７】

前記第一の親抗体又はその抗原結合部分が、前記第二の親抗体又はその抗原結合部分が前記第二の抗原を結合する強度とは異なる強度で前記第一の抗原を結合する、請求項１３から１５の何れか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項１８】

前記第一の親抗体又はその抗原結合部分が、前記第二の親抗体又はその抗原結合部分が前記第二の抗原を結合する親和性とは異なる親和性で前記第一の抗原を結合する、請求項１３から１５の何れか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項１９】

前記第一の親抗体又はその抗原結合部分及び前記第二の親抗体又はその抗原結合部分がヒト抗体、ＣＤＲ移植抗体及びヒト化抗体からなる群から選択される、請求項１３から１５の何れか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項２０】

前記第一の親抗体又はその抗原結合部分及び前記第二の親抗体又はその抗原結合部分が、Ｆａｂ断片、Ｆ（ａｂ’）$_2$断片；ヒンジ領域において、ジスルフィド架橋によって連結された２つのＦａｂ断片を含む二価断片；ＶＨ及びＣＨ１ドメインからなるＦｄ断片；抗体の単一アームのＶＬ及びＶＨドメインからなるＦｖ断片；ｄＡｂ断片；単離された相補性決定領域（ＣＤＲ）；一本鎖抗体及びダイアボディからなる群から選択される、請求項１３から１５の何れか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項２１】

前記第一の親抗体若しくはその抗原結合部分又は前記第二の親抗体若しくはその抗原結合部分によって示される少なくとも１つ所望の特性を有する、請求項１、３又は６に記載の結合タンパク質。

【請求項２２】

前記所望の特性が１つ又はそれ以上の抗体パラメータから選択される、請求項２２に記載の結合タンパク質。

【請求項２３】

前記抗体パラメータが、抗原特異性、抗原に対する親和性、強度、生物学的機能、エピトープ認識、安定性、溶解度、産生効率、免疫原性、薬物動態学、生物学的利用性、組織交叉反応性及びオーソロガス抗原結合からなる群から選択される、請求項２１に記載の結合タンパク質。

【請求項２４】

４つのポリペプチド鎖を含む、２つの抗原を結合することができる結合タンパク質であって、２つのポリペプチド鎖は、ＶＤ１－（Ｘ１）$_n$－ＶＤ２－Ｃ－（Ｘ２）$_n$を含み、
ＶＤ１は、第一の重鎖可変ドメインであり、
ＶＤ２は、第二の重鎖可変ドメインであり、
Ｃは、重鎖定常ドメインであり、
Ｘ１は、ＣＨ１ではないリンカーであり、及び
Ｘ２は、Ｆｃ領域であり、並びに
２つのポリペプチド鎖は、ＶＤ１－（Ｘ１）$_n$－ＶＤ２－Ｃ－（Ｘ２）$_n$を含み、
ＶＤ１は、第一の軽鎖可変ドメインであり、
ＶＤ２は、第二の軽鎖可変ドメインであり、
Ｃは、軽鎖定常ドメインであり、
Ｘ１は、ＣＨ１ではないリンカーであり、
Ｘ２は、Ｆｃ領域を含まず、及び
ｎは、０又は１であり、ＶＤ１及びＶＤ２重鎖可変ドメインは、配列番号２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４及び５６からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、並びにＶＤ１及びＶＤ２軽鎖可変ドメインは、配列番号２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１、４３、４５、４７、４９、５１、５３、５５及び５７からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む
結合タンパク質。

【請求項２５】

４つのポリペプチド鎖を含む、２つの抗原を結合することができるタンパク質であって、２つのポリペプチド鎖は、ＶＤ１－（Ｘ１）$_n$－ＶＤ２－Ｃ－（Ｘ２）$_n$を含み、
ＶＤ１は、第一の重鎖可変ドメインであり、
ＶＤ２は、第二の重鎖可変ドメインであり、
Ｃは、重鎖定常ドメインであり、
Ｘ１は、ＣＨ１ではないリンカーであり、
Ｘ２は、Ｆｃ領域であり、及び
ｎは、０又は１であり、並びに
２つのポリペプチド鎖は、ＶＤ１－（Ｘ１）$_n$－ＶＤ２－Ｃ－（Ｘ２）$_n$を含み、
ＶＤ１は、第一の軽鎖可変ドメインであり、
ＶＤ２は、第二の軽鎖可変ドメインであり、
Ｃは、軽鎖定常ドメインであり、
Ｘ１は、ＣＨ１ではないリンカーであり、
Ｘ２は、Ｆｃ領域を含まず、及び
ｎは、０又は１であり、
ＤＶＤ－Ｉｇが、アミロイドβ（Ａβ）（配列１）、Ａβ（配列２）、Ａβ（配列３）、腫瘍壊死因子α（ＴＮＦ－α）、インターロイキン１β（ＩＬ－１β）、インシュリン様成長因子１（ＩＧＦ１）、インシュリン様成長因子２（ＩＧＦ２）、インターロイキン１８（ＩＬ－１８）、インターロイキン６（ＩＬ－６）、終末糖化産物受容体（ＲＡＧＥ）、神経成長因子（ＮＧＦ）、上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）（配列１）、ＥＧＦＲ（配列２）、ＣＤ－２０，及び反発性ガイダンス分子（ＲＧＭＡ）からなる群から選択される少なくとも１つの抗原を結合する、結合タンパク質。

【請求項２６】

表面プラズモン共鳴によって測定した場合に、少なくとも約$10^2M^{-1}s^{-1}$、少なくとも約$10^3M^{-1}s^{-1}$、少なくとも約$10^4M^{-1}s^{-1}$、少なくとも約$10^5M^{-1}s^{-1}$及び少なくとも約$10^6M^{-1}s^{-1}$からなる群から選択される前記１つ又はそれ以上の標的に対するオン速度定数（$K_{o}n$）を有する、請求項１、３、６、２４又は２５に記載の結合タンパク質。

【請求項２７】

表面プラズモン共鳴によって測定した場合に、最大約$10^{-3}s^{-1}$；最大約10^{-4}

s^{-1}；最大約$10^{-5}s^{-1}$；及び最大約$10^{-6}s^{-1}$からなる群から選択される前記１つ又はそれ以上の標的に対するオフ速度定数（K_{off}）を有する、請求項１、３、６、２４又は２５に記載の結合タンパク質。

【請求項２８】

最大約10^{-7}Ｍ；最大約10^{-8}Ｍ；最大約10^{-9}Ｍ；最大約10^{-10}Ｍ；最大約10^{-11}Ｍ；最大約10^{-12}Ｍ及び最大10^{-13}Ｍからなる群から選択される前記１つ又はそれ以上の標的への解離定数（K_D）を有する、請求項１、３、６、２４又は２５に記載の結合タンパク質。

【請求項２９】

請求項１、３、６、２４又は２５の何れか一項に記載の結合タンパク質を含む結合タンパク質連結物であって、免疫接着分子、画像化剤、治療剤及び細胞毒性剤からなる群から選択される因子をさらに含む、前記結合タンパク質連結物。

【請求項３０】

前記因子が放射性標識、酵素、蛍光標識、発光標識、生物発光標識、磁気標識及びビオチンからなる群から選択される画像化剤である、請求項２９に記載の結合タンパク質連結物。

【請求項３１】

前記画像化剤が、^{3}Ｈ、^{14}Ｃ、^{35}Ｓ、^{90}Ｙ、^{99}Ｔｃ、^{111}Ｉｎ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{177}Ｌｕ、^{166}Ｈｏ及び^{153}Ｓｍからなる群から選択される放射性標識である、請求項３０に記載の結合タンパク質連結物。

【請求項３２】

前記因子が、代謝抑制剤、アルキル化剤、抗生物質、成長因子、サイトカイン、抗血管新生剤、抗有糸分裂剤、アントラサイクリン、トキシン及びアポトーシス剤からなる群から選択される治療剤又は細胞毒性剤である、請求項３０に記載の結合タンパク質連結物。

【請求項３３】

結晶化された結合タンパク質である、請求項１、３、６、２４又は２５に記載の結合タンパク質。

【請求項３４】

前記結晶が担体を含まない医薬徐放結晶である、請求項３３に記載の結合タンパク質。

【請求項３５】

請求項３３に記載の結合タンパク質であって、前記結合タンパク質が前記結合タンパク質の可溶性対応物より長いインビボ半減期を有する、結合タンパク質。

【請求項３６】

生物学的活性を保持する、請求項３３に記載の結合タンパク質。

【請求項３７】

請求項１、３、６、２４又は２５の何れか一項に記載の結合タンパク質アミノ酸配列をコードする単離された核酸。

【請求項３８】

請求項３７に記載の単離された核酸を含むベクター。

【請求項３９】

ｐｃＤＮＡ、ｐＴＴ、ｐＴＴ３、ｐＥＦＢＯＳ、ｐＢＶ、ｐＪＶ、ｐｃＤＮＡ３．１ＴＯＰＯ、ｐＥＦ６ＴＯＰＯ及びｐＢＪからなる群から選択される、請求項３８に記載のベクター。

【請求項４０】

請求項３８に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項４１】

原核細胞である、請求項４０に記載の宿主細胞。

【請求項４２】

イー・コリである、請求項４１に記載の宿主細胞。

【請求項４３】

真核細胞である、請求項４０に記載の宿主細胞。
【請求項４４】
前記真核細胞が原生生物細胞、動物細胞、植物細胞及び真菌細胞からなる群から選択される、請求項４３に記載の宿主細胞。
【請求項４５】
前記真核細胞が哺乳動物細胞、鳥類細胞及び昆虫細胞からなる群から選択される動物細胞である、請求項４３に記載の宿主細胞。
【請求項４６】
ＣＨＯ細胞である、請求項４５に記載の宿主細胞。
【請求項４７】
ＣＯＳである、請求項４５に記載の宿主細胞。
【請求項４８】
酵母細胞である、請求項４３に記載の宿主細胞。
【請求項４９】
サッカロミセス・セレビシアエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）である、請求項４８に記載の宿主細胞。
【請求項５０】
昆虫Ｃｆ９細胞である、請求項４５に記載の宿主細胞。
【請求項５１】
結合タンパク質を産生するのに十分な条件下で、培地中において、請求項４０から５０の何れか一項に記載されている宿主細胞を培養することを含む、結合タンパク質を作製する方法。
【請求項５２】
作製された結合タンパク質の５０％から７５％が二重特異的な四価結合タンパク質である、請求項５１に記載の方法。
【請求項５３】
作製された結合タンパク質の７５％から９０％が二重特異的な四価結合タンパク質である、請求項５１に記載の方法。
【請求項５４】
作製された結合タンパク質の９０％から９５％が二重特異的な四価結合タンパク質である、請求項５１に記載の方法。
【請求項５５】
請求項５１に記載の方法に従って産生されたタンパク質。
【請求項５６】
請求項１から３６及び５５の何れか一項に記載の結合タンパク質及び医薬として許容される担体を含む医薬組成物。
【請求項５７】
少なくとも１つのさらなる治療剤をさらに含む、請求項５６に記載の医薬組成物。
【請求項５８】
前記さらなる治療剤が、治療剤、画像化剤、細胞毒性剤、血管新生阻害剤；キナーゼ阻害剤；共同刺激分子遮断薬；接着分子遮断薬；抗サイトカイン抗体又はその機能的断片；メトトレキサート；シクロスポリン；ラパマイシン；ＦＫ５０６；検出可能な標識又はレポーター；ＴＮＦアンタゴニスト；抗リウマチ薬；筋弛緩剤、催眠薬；非ステロイド性抗炎症薬（ＮＳＡＩＤ）、鎮痛薬、麻酔薬、鎮静薬、局所麻酔薬、神経筋遮断薬、抗微生物薬、抗乾癬薬、コルチコステロイド、タンパク同化ステロイド、エリスロポエチン、免疫化、免疫グロブリン、免疫抑制薬、成長ホルモン、ホルモン補充薬、放射性医薬、抗うつ病、精神病治療薬、興奮剤、喘息薬、βアゴニスト、吸入ステロイド、エピネフリン又は類縁体、サイトカイン及びサイトカインアンタゴニストからなる群から選択される、請求項５７に記載の医薬組成物。
【請求項５９】

治療が達成されるように、請求項１から３６及び５５の何れか一項に記載の結合タンパク質を対象に投与することによって、疾病又は疾患に関して対象を治療する方法。
【請求項６０】
前記疾患が関節リウマチ、骨関節炎、若年性慢性関節炎、化膿性関節炎、ライム関節炎、乾癬性関節炎、反応性関節炎、脊椎関節症、全身性紅斑性狼瘡、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、インシュリン依存性糖尿病、甲状腺炎、喘息、アレルギー性疾患、乾癬、皮膚炎　強皮症、移植片対宿主病、臓器移植拒絶、臓器移植に関連する急性又は慢性免疫疾患、サルコイドーシス、アテローム性動脈硬化症、播種性血管内凝固、川崎病、バセドウ病、ネフローゼ症候群、慢性疲労症候群、ウェゲナー肉芽腫症、ヘノッホ・シェーライン紫斑症、腎臓の顕微鏡的血管炎、慢性活動性肝炎、ブドウ膜炎、敗血症性ショック、毒素性ショック症候群、敗血症症候群、悪液質、感染性疾患、寄生性疾患、後天性免疫不全症候群、急性横断性脊髄炎、ハンチントン舞踏病、パーキンソン病、アルツハイマー病、発作、原発性胆汁性肝硬変、溶血性貧血、悪性腫瘍、心不全、心筋梗塞、アジソン病、孤発性の、多内分泌腺機能低下症候群Ｉ型及び多内分泌腺機能低下症候群ＩＩ型、シュミット症候群、成人（急性）呼吸促迫症候群、脱毛症、円形脱毛症、血清反応陰性関節症、関節症、ライター病、乾癬性関節症、潰瘍性大腸性関節症、腸疾患性滑膜炎、クラミジア、エルシニア及びサルモネラ関連関節症、脊椎関節症、アテローム性疾患／動脈硬化症、アトピー性アレルギー、自己免疫性水疱性疾患、尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、類天疱瘡、線状ＩｇＡ病、自己免疫性溶血性貧血、クームス陽性溶血性貧血、後天性悪性貧血、若年性悪性貧血、筋痛性脳炎／ロイヤルフリー病、慢性粘膜皮膚カンジダ症、巨細胞性動脈炎、原発性硬化性肝炎、突発性自己免疫性肝炎、後天性免疫不全症候群、後天性免疫不全症関連疾患、Ｂ型肝炎、Ｃ型肝炎、分類不能型免疫不全症（分類不能型原発性低γグロブリン血症）、拡張型心筋症、女性不妊症、卵巣機能不全、早期卵巣機能不全、繊維性肺疾患、突発性繊維化性肺胞炎、炎症後間質性肺疾患、間質性肺炎、結合組織疾患関連間質性肺疾患、混合性結合組織疾患関連肺疾患、全身性硬化症関連間質性肺疾患、関節リウマチ関連間質性肺疾患、全身性紅斑性狼瘡関連肺疾患、皮膚筋炎／多発性筋炎関連肺疾患、シェーグレン病関連肺疾患、強直性脊椎炎関連肺疾患、血管炎性びまん性肺疾患（ｖａｓｃｕｌｉｔｉｃ　ｄｉｆｆｕｓｅ　ｌｕｎｇ　ｄｉｓｅａｓｅ）、ヘモシデローシス関連肺疾患、薬物によって誘導された間質性肺疾患、繊維症、放射性繊維症、閉塞性細気管支炎、慢性好酸球性肺炎、リンパ球浸潤性肺疾患、感染後間質性肺疾患、通風関節炎、自己免疫性肝炎、１型自己免疫性肝炎（古典的自己免疫性又はルポイド肝炎）、２型自己免疫性肝炎（抗ＬＫＭ抗体肝炎）、自己免疫媒介性低血糖症、黒色表皮腫を伴うＢ型インシュリン抵抗性、副甲状腺機能低下症、臓器移植に関連する急性免疫疾患、臓器移植に関連する慢性免疫疾患、変形性関節症、原発性硬化性胆管炎、１型乾癬、２型乾癬、特発性白血球減少症、自己免疫性好中球減少症、腎臓病ＮＯＳ、糸球体腎炎、腎臓の顕微鏡的血管炎、ライム病、円板状紅斑性狼瘡、男性不妊症特発性又はＮＯＳ、精子自己免疫、多発性硬化症（全てのサブタイプ）、交感性眼炎、結合組織疾患に続発する肺高血圧症、グッドパスチャー症候群、結節性多発動脈炎の肺症状、急性リウマチ熱、リウマチ性脊椎炎、スチル病、全身性硬化症、シェーグレン症候群、高安病／動脈炎、自己免疫性血小板減少症、特発性血小板減少症、自己免疫性甲状腺疾患、甲状腺機能亢進症、甲状腺腫自己免疫性甲状腺機能低下症（橋本病）、萎縮性自己免疫性甲状腺機能低下症、原発性粘液水腫（ｐｒｉｍａｒｙ　ｍｙｘｏｅｄｅｍａ）、水晶体起因性ブドウ膜炎、原発性血管炎、白斑急性肝疾患、慢性肝疾患、アルコール性肝硬変、アルコール誘発性肝障害、胆汁うっ滞（ｃｈｏｌｅｏｓａｔａｔｉｓ）、特異体質性肝疾患、薬物誘発性肝炎、非アルコール性脂肪性肝炎、アレルギー及び喘息、Ｂ群連鎖球菌（ＧＢＳ）感染、精神障害（例えば、うつ病及び統合失調症）、Ｔｈ２型及びＴｈ１型によって媒介される疾病、急性及び慢性疼痛（疼痛の様々な形態）、並びに、肺癌、乳癌、胃癌、膀胱癌、大腸癌、膵臓癌、卵巣癌、前立腺癌及び直腸癌及び造血性悪性病変（白血病及びリンパ腫）などの癌　無βリポタンパク質血症、先端チアノーゼ、急性及び慢性寄生性又は感染性プロセス、急性白血病、急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、急性又は慢性細菌感染、

急性膵炎、急性腎不全、腺癌、心房（ａｅｒｉａｌ）異所性拍動、ＡＩＤＳ認知症複合、アルコール誘発性肝炎、アレルギー性結膜炎、アレルギー性接触性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、同種移植拒絶、α－１－アンチトリプシン欠乏症、筋萎縮性側索硬化症、貧血、狭心症、前角細胞変性、抗ｃｄ３治療、抗リン脂質症候群、抗受容体過敏症反応（ａｎｔｉ－ｒｅｃｅｐｔｏｒ　ｈｙｐｅｒｓｅｎｓｉｔｉｖｉｔｙ　ｒｅａｃｔｉｏｎｓ，）、大動脈及び末梢動脈瘤、大動脈解離、動脈性高血圧、動脈硬化症、動静脈瘻、運動失調、心房細動（持続的又は発作性）、心房粗動、房室ブロック、Ｂ細胞リンパ腫、骨移植拒絶、骨髄移植（ＢＭＴ）拒絶、脚ブロック、バーキットリンパ腫、火傷、心不整脈、心機能不全症候群（ｃａｒｄｉａｃ　ｓｔｕｎ　ｓｙｎｄｒｏｍｅ）、心臓腫瘍、心筋症、心肺バイパス炎症反応、軟骨移植拒絶、小脳皮質変性、小脳疾患、無秩序な又は多巣性心房頻脈、化学療法関連疾患、慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）、慢性アルコール症、慢性炎症性病変、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、慢性サリチル酸中毒、結腸直腸癌、うっ血性心不全、結膜炎、接触性皮膚炎、肺性心、冠動脈疾患、クロイツフェルトーヤコブ病、培養陰性敗血症、嚢胞性繊維症、サイトカイン療法関連疾患、ボクサー脳、脱髄性疾患、デング出血熱、皮膚炎、皮膚科学的症状、糖尿病、真性糖尿病、糖尿病性動脈硬化疾患、瀰漫性レビー小体病、拡張型うっ血性心筋症、大脳基底核の疾患、中年のダウン症候群、中枢神経系ドーパミン受容体を遮断する薬物によって誘発された薬物誘発性運動障害、薬物感受性、湿疹、脳脊髄炎、心内膜炎、内分泌疾患、喉頭蓋炎、エプスタインーバーウイルス感染、紅痛症、錐体外路及び小脳疾患、家族性血球貪食性リンパ組織球症（ｆａｍｉｌｉａｌ　ｈｅｍａｔｏｐｈａｇｏｃｙｔｉｃ　ｌｙｍｐｈｏｈｉｓｔｉｏｃｙｔｏｓｉｓ）、致死的胸腺移植拒絶、フリードライヒ失調症、機能的末梢動脈疾患、真菌性敗血症、ガス壊疽、胃潰瘍、糸球体腎炎、何れかの臓器又は組織の移植片拒絶、グラム陰性敗血症、グラム陽性敗血症、細胞内生物に起因する肉芽腫、有毛細胞白血病、ハラーホルデン・スパッツ病、橋本甲状腺炎、枯草熱、心臓移植拒絶、血色素症、血液透析、溶血性尿毒症症候群／血栓溶解血小板減少紫斑病、出血、肝炎（Ａ型）、ヒス束不整脈、ＨＩＶ感染／ＨＩＶ神経障害、ホジキン病、運動過剰性運動障害、過敏症反応、過敏性肺炎、高血圧、運動低下性運動障害、視床下部－下垂体－副腎皮質系評価、特発性アジソン病、特発性肺繊維症、抗体媒介性細胞傷害、無力症、乳児脊髄性筋萎縮症、大動脈の炎症、Ａ型インフルエンザ、電離放射線曝露、虹彩毛様体炎／ブドウ膜炎／視神経炎、虚血再灌流障害、虚血性発作、若年性関節リウマチ、若年性脊髄性筋萎縮症、カポジ肉腫、腎移植拒絶、レジオネラ、リーシュマニア症、ハンセン病、皮質脊髄系の病変、脂肪血症（ｌｉｐｅｄｅｍａ）、肝臓移植拒絶、リンパ浮腫（ｌｙｍｐｈｅｄｅｒｍａ）、マラリア、悪性リンパ腫、悪性組織球増殖症、悪性黒色腫、髄膜炎、髄膜炎菌血症（ｍｅｎｉｎｇｏｃｏｃｃｅｍｉａ）、代謝性／特発性疾患、偏頭痛、ミトコンドリア多系疾患（ｍｉｔｏｃｈｏｎｄｒｉａｌ　ｍｕｌｔｉ－ｓｙｓｔｅｍ　ｄｉｓｏｒｄｅｒ）、混合性結合組織病、モノクローナル高ガンマグロブリン血症、多発性骨髄腫、多系統変性（メンセル・デジェリーヌートーマス　シャイードレーガー及びマシャドージョセフ）、重症筋無力症、マイコバクテリウム・アビウム・イントラセルラーレ、マイコバクテリウム・チュバキュロシス、骨髄異形成症候群、心筋梗塞、心筋虚血疾患、上咽頭癌、新生児慢性肺疾患、腎炎、ネフローゼ、神経変性疾患、神経原性Ｉ筋萎縮、好中球減少性発熱、非ホジキンリンパ腫、腹部大動脈及びその分枝の閉塞、閉塞性動脈疾患、ｏｋｔ３療法、精巣炎／精巣上体炎、精巣炎／精管復元術処置、臓器肥大、骨粗鬆症、膵臓移植拒絶、膵癌、腫瘍随伴性症候群／悪性腫瘍の高カルシウム血症、副甲状腺移植拒絶、骨盤内炎症性疾患、通年性鼻炎、心膜疾患、末梢性アテローム性動脈硬化疾患、末梢血管疾患、腹膜炎、悪性貧血、ニューモシスチス・カリニ肺炎、肺炎、ＰＯＥＭＳ症候群（多発神経炎、臓器肥大、内分泌疾患、単クローン性γグロブリン血症及び皮膚変化症候群（ｓｋｉｎ　ｃｈａｎｇｅｓ　ｓｙｎｄｒｏｍｅ））、灌流後症候群（ｐｏｓｔ　ｐｅｒｆｕｓｉｏｎ　ｓｙｎｄｒｏｍｅ）、ポンプ後症候群（ｐｏｓｔ　ｐｕｍｐ　ｓｙｎｄｒｏｍｅ）、心筋梗塞後開心術症候群、子癇前症、進行性核上性麻痺、原発性肺高血圧、放射線療法、レイノー現象及び病、レイノー病、レフサム病、規則的なＱＲＳ幅の狭い頻脈症（ｒｅｇｕｌａｒ

ｎａｒｒｏｗ ＱＲＳ ｔａｃｈｙｃａｒｄｉａ）、腎血管性高血圧、再灌流障害、拘束型心筋症、肉腫、強皮症、老年性舞踏病、レビー小体型の老年性認知症、血清反応陰性関節症、ショック、鎌形赤血球貧血症、皮膚同種異系移植拒絶、皮膚変化症候群、小腸移植拒絶、固形腫瘍、固有不整脈（ｓｐｅｃｉｆｉｃ ａｒｒｙｔｈｍｉａｓ）、脊髄性運動失調、脊髄小脳変性、連鎖球菌性筋炎、小脳の構造的病変、亜急性硬化性全脳炎、失神、心血管系の梅毒、全身性アナフィラキシー、全身性炎症反応症候群、全身性発症若年性関節リウマチ、Ｔ細胞又はＦＡＢＡＬＬ、毛細血管拡張症、閉塞性血栓血管炎、血小板減少症、毒性、移植、外傷／出血、ＩＩＩ型過敏症反応、ＩＶ型過敏症、不安定狭心症、尿毒症、尿路性敗血症、じんましん、心臓弁膜症、静脈瘤、血管炎、静脈疾患、静脈血栓症、心室細動、ウイルス及び真菌感染、ウイルス性脳炎（ｖｉｔａｌ ｅｎｃｅｐｈａｌｉｔｉｓ）／無菌性髄膜炎、ウイルス（ｖｉｔａｌ）関連血球貪食症候群、ウェルニッケ－コルサコフ症候群、ウィルソン病、何れかの臓器又は組織の異種移植拒絶、急性冠動脈症候群、急性突発性多発性神経炎、急性炎症性脱髄性多発性神経障害、急性虚血、成体スチル病、円形脱毛症、アナフィラキシー、抗リン脂質抗体症候群、再生不良貧血、動脈硬化症、アトピー性湿疹、アトピー性皮膚炎、自己免疫性皮膚炎、連鎖球菌感染を伴う自己免疫性疾患、自己免疫性腸疾患、自己免疫性難聴、自己免疫性リンパ増殖性症候群（ＡＬＰＳ）、自己免疫性心筋炎、自己免疫性早発閉経、眼瞼炎、気管支拡張症、水疱性類天疱瘡、心血管疾患、劇症型抗リン脂質抗体症候群、セリアック病、頚部脊椎症、慢性虚血、瘢痕性類天疱瘡、多発性硬化症に対するリスクを有する最初のエピソードからなる症候群（ｃｉｓ；ｃｌｉｎｉｃａｌｌｙ ｉｓｏｌａｔｅｄ ｓｙｎｄｒｏｍｅ）、結膜炎、小児発症精神疾患、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、涙嚢炎、皮膚筋炎、糖尿病性網膜症、真性糖尿病、椎間板ヘルニア、椎間板脱出、薬物によって誘導される免疫溶血性貧血、心内膜炎、子宮内膜炎、眼内炎、上強膜炎、多型性紅斑、重症型多型性紅斑、妊娠性類天疱瘡、ギランバレー症候群（ＧＢＳ）、枯草熱、ヒューズ症候群、突発性パーキンソン病、突発性間質性肺炎、ＩｇＥ媒介性アレルギー、免疫溶血性貧血、封入体筋炎、感染性眼性炎症疾患、炎症性脱髄性疾患、炎症性心臓病、炎症性腎臓病、ＩＰＦ／ＵＩＰ、虹彩炎、角膜炎、乾性角結膜炎、クスマウル病又はクスマウル・マイヤー病、ランドリー麻痺、ランゲルハンス細胞組織球増殖症、網状皮斑、黄斑変性、顕微鏡的多発性血管炎、ベフテレフ病、運動神経疾患、粘膜類天疱瘡、多発性臓器不全、重症筋無力症、骨髄異形成症候群、心筋炎、神経根疾患、神経障害、非Ａ非Ｂ型肝炎、視神経炎、骨溶解、卵巣癌、少関節性ＪＲＡ、末梢動脈閉塞疾患（ＰＡＯＤ）、末梢血管疾患（ＰＶＤ）、末梢動脈疾患（ＰＡＤ
）、静脈炎、結節性多発性動脈炎（又は結節性動脈周囲炎）、多発性軟骨炎、リウマチ性多発性筋痛、白毛症、多関節性ＪＲＡ、多内分泌欠乏症候群、多発性筋炎、リウマチ性多発性筋痛（ＰＭＲ）、ポンプ後症候群（ｐｏｓｔ－ｐｕｍｐ）症候群、原発性パーキンソン病、前立腺及び直腸癌及び造血系の悪性腫瘍（白血病及びリンパ腫）、前立腺炎、純赤血球形成不全、原発性副腎不全、再発性視神経脊髄炎、再狭窄、リウマチ性心疾患、ｓａｐｈｏ（滑膜炎、ざ瘡、膿疱、骨肥大症及び骨炎）、強皮症、続発性アミロイドーシス、ショック肺、強膜炎、坐骨神経痛、続発性副腎不全、シリコーン関連結合組織疾患、スネドン－ウィルキンソン皮膚病、強直性脊椎炎、スティーブンス・ジョンソン症候群（ＳＪＳ）、全身性炎症性応答症候群、側頭動脈炎、トキソプラズマ網膜炎、毒性表皮剥離症、横断性脊髄炎、ＴＲＡＰＳ（腫瘍壊死因子受容体１型アレルギー性反応）、ＩＩ型糖尿病、じんましん、通常型間質性肺炎（ＵＩＰ）、血管炎、春季カタル、ウイルス性網膜炎、フォークト・コヤナギ・ハラダ症候群（ＶＫＨ症候群）、滲出型黄斑変性、創傷治癒、エルシニア及びサルモネラ関連関節症を含む群から選択される、請求項５９に記載の方法。

【請求項６１】

対象への前記投与が、非経口、皮下、筋肉内、静脈内、関節内、気管支内、腹部内、嚢内、軟骨内、腔内（ｉｎｔｒａｃａｖｉｔｙ）、腔内（ｉｎｔｒａｃｅｌｉａｌ）、小脳内、脳室内、結腸内、頚管内、胃内、肝臓内、心筋内、骨内、骨盤内、心臓周囲内、腹腔内、胸膜内、前立腺内、肺内、結腸内、腎臓内、網膜内、脊髄内、滑膜内、胸腔内、子宮

内、膀胱内、ボーラス、膣、直腸、口内、舌下、鼻内及び経皮から選択される少なくとも１つの様式による、請求項６０に記載の方法。

【請求項６２】

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

ａ）第一の抗原を結合することができる第一の親抗体又はその抗原結合部分を取得する工程；

ｂ）第二の抗原を結合することができる第二の親抗体又はその抗原結合部分を取得する工程；

ｃ）ＶＤ１－（Ｘ１）$_n$－ＶＤ２－Ｃ－（Ｘ２）$_n$

（ＶＤ１は、前記第一の親抗体又はその抗原結合部分から得られる第一の重鎖可変ドメインであり、

ＶＤ２は、前記第二の親抗体又はその抗原結合部分から得られる第二の重鎖可変ドメインであり、

Ｃは、重鎖定常ドメインであり、

Ｘ１は、ＣＨ１ではないリンカーであり、

Ｘ２は、Ｆｃ領域であり、及び

ｎは、０又は１である。）

を含む第一及び第三のポリペプチド鎖を構築する工程；

ｄ）ＶＤ１－（Ｘ１）$_n$－ＶＤ２－Ｃ－（Ｘ２）$_n$

（ＶＤ１は、前記第一の親抗体又はその抗原結合部分から得られる第一の軽鎖可変ドメインであり、

ＶＤ２は、前記第二の親抗体又はその抗原結合部分から得られる第二の軽鎖可変ドメインであり、

Ｃは、軽鎖定常ドメインであり、

Ｘ１は、ＣＨ１ではないリンカーであり、

Ｘ２は、Ｆｃ領域を含まず、及び

ｎは、０又は１である。）

を含む第二及び第四のポリペプチド鎖を構築する工程；

ｅ）前記第一及び前記第二の抗原を結合することができる二重可変ドメイン免疫グロブリンが作製されるように、前記第一、第二、第三及び第四のポリペプチド鎖を発現させる工程；

を含み、結合タンパク質は、Ａβ（配列１）及びＡβ（配列３）；ＴＮＦ－α及びＡβ（配列２）；ＩＬ－１β及びＡβ（配列２）；Ａβ（配列１）及びＡβ（配列２）；ＩＧＦ１，２及びＡβ（配列２）；Ａβ（配列２）及びＩＬ－１８；ＩＬ－６及びＡβ（配列２）；ＴＮＦ－α及びＡβ（配列３）；ＩＬ－１β及びＡβ（配列３）；Ａβ（配列１）及びＡβ（配列３）；ＩＧＦ１，２及びＡβ（配列３）；Ａβ（配列３）及びＩＬ－１８；ＩＬ－６及びＡβ（配列３）；ＴＮＦ－α及びＡβ（配列１）；ＩＬ－１β及びＡβ（配列１）；ＩＧＦ１，２及びＡβ（配列１）；Ａβ（配列１）及びＩＬ－１８；ＩＬ－６及びＡβ（配列１）；Ａβ（配列１）及びＲＡＧＥ；ＮＧＦ及びＩＬ－１８；ＮＧＦ及びＩＬ－１β；ＮＧＦ及びＩＬ－６；ＴＮＦ－α及びＥＧＦＲ（配列２）；ＴＮＦ－α及びＲＡＧＥ；ＣＤ－２０及びＥＧＦＲ（配列１）；ＣＤ－２０及びＥＧＦＲ（配列２）；ＲＧＭＡ及びＴＮＦ－αからなる群から選択される抗原の対を結合することができる、方法。

【請求項６３】

ＶＤ１及びＶＤ２重鎖可変ドメインが、配列番号２８、３０、３２、３４、３６、３８、４０、４２、４４、４６、４８、５０、５２、５４及び５６からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、並びにＶＤ１及びＶＤ２軽鎖可変ドメインが、配列番号２９、３１、３３、３５、３７、３９、４１、４３、４５、４７、４９、５１、５３、５５及び５７からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項６２の方法。

【請求項６４】

前記第一の親抗体又はその抗原結合部分及び前記第二の親抗体又はその抗原結合部分がヒト抗体、ＣＤＲ移植抗体及びヒト化抗体からなる群から選択される、請求項６２の方法。

【請求項６５】

前記第一の親抗体又はその抗原結合部分及び前記第二の親抗体又はその抗原結合部分が、Ｆａｂ断片、Ｆ（ａｂ’）$_2$断片；ヒンジ領域において、ジスルフィド架橋によって連結された２つのＦａｂ断片を含む二価断片；ＶＨ及びＣＨ１ドメインからなるＦｄ断片；抗体の単一アームのＶＬ及びＶＨドメインからなるＦｖ断片、ｄＡｂ断片、単離された相補性決定領域（ＣＤＲ）、一本鎖抗体及びダイアボディからなる群から選択される、請求項６２の方法。

【請求項６６】

前記第一の親抗体又はその抗原結合部分が二重可変ドメイン免疫グロブリンによって適切に呈される少なくとも１つの所望の特性を有する、請求項６２の方法。

【請求項６７】

前記第二の親抗体又はその抗原結合部分が二重可変ドメイン免疫グロブリンによって適切に呈される少なくとも１つの所望の特性を有する、請求項６２の方法。

【請求項６８】

Ｆｃ領域が原型配列Ｆｃ領域及び変形物配列Ｆｃ領域からなる群から選択される、請求項６２の方法。

【請求項６９】

Ｆｃ領域が、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ、ＩｇＭ、ＩｇＥ及びＩｇＤから得られるＦｃ領域からなる群から選択される、請求項６２の方法。

【請求項７０】

前記所望の特性が１つ又はそれ以上の抗体パラメータから選択される、請求項６６の方法。

【請求項７１】

前記所望の特性が１つ又はそれ以上の抗体パラメータから選択される、請求項６７の方法。

【請求項７２】

前記抗体パラメータが、抗原特異性、抗原に対する親和性、効力、生物学的機能、エピトープ認識、安定性、溶解度、産生効率、免疫原性、薬物動態学、生物学的利用性、組織交叉反応性及びオーソロガス抗原結合からなる群から選択される、請求項７０の方法。

【請求項７３】

前記抗体パラメータが、抗原特異性、抗原に対する親和性、効力、生物学的機能、エピトープ認識、安定性、溶解度、産生効率、免疫原性、薬物動態学、生物学的利用性、組織交叉反応性及びオーソロガス抗原結合からなる群から選択される、請求項７１の方法。

【請求項７４】

前記第一の親抗体又はその抗原結合部分が、前記第二の親抗体又はその抗原結合部分が前記第二の抗原を結合する親和性とは異なる親和性で前記第一の抗原を結合する、請求項６２の方法。

【請求項７５】

前記第一の親抗体又はその抗原結合部分が、前記第二の親抗体又はその抗原結合部分が前記第二の抗原を結合する強度とは異なる強度で前記第一の抗原を結合する、請求項６２の方法。

【請求項７６】

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

ａ）第一の抗原を結合することができ、及び二重可変ドメイン免疫グロブリンによって呈される少なくとも１つの望ましい特性を有する第一の親抗体又はその抗原結合部分を取得する工程；

ｂ）第二の抗原を結合することができ、及び二重可変ドメイン免疫グロブリンによって呈される少なくとも１つの望ましい特性を有する第二の親抗体又はその抗原結合部分を取得する工程；

ｃ）ＶＤ１－（Ｘ１）$_{n}$－ＶＤ２－Ｃ－（Ｘ２）$_{n}$

（ＶＤ１は、前記第一の親抗体又はその抗原結合部分から得られる第一の重鎖可変ドメインであり、

ＶＤ２は、前記第二の親抗体又はその抗原結合部分から得られる第二の重鎖可変ドメインであり、

Ｃは、重鎖定常ドメインであり、

Ｘ１は、ＣＨ１ではないリンカーであり、

Ｘ２は、Ｆｃ領域であり、及び

ｎは、０又は１である。）

を含む第一及び第三のポリペプチド鎖を構築する工程；

ｄ）ＶＤ１－（Ｘ１）$_{n}$－ＶＤ２－Ｃ－（Ｘ２）$_{n}$

（ＶＤ１は、前記第一の親抗体又はその抗原結合部分から得られる第一の軽鎖可変ドメインであり、

ＶＤ２は、前記第二の親抗体又はその抗原結合部分から得られる第二の軽鎖可変ドメインであり、

Ｃは、軽鎖定常ドメインであり、

Ｘ１は、ＣＨ１ではないリンカーであり、

Ｘ２は、Ｆｃ領域を含まず、及び

ｎは、０又は１である。）

を含む第二及び第四のポリペプチド鎖を構築する工程；

ｅ）所望の特性を有し、前記第一及び前記第二の抗原を結合することができる二重可変ドメイン免疫グロブリンが作製されるように、前記第一、第二、第三及び第四のポリペプチド鎖を発現させる工程；

を含み、結合タンパク質は、Ａβ（配列１）及びＡβ（配列３）；ＴＮＦ－α及びＡβ（配列２）；ＩＬ－１β及びＡβ（配列２）；Ａβ（配列１）及びＡβ（配列２）；ＩＧＦ１，２及びＡβ（配列２）；Ａβ（配列２）及びＩＬ－１８；ＩＬ－６及びＡβ（配列２）；ＴＮＦ－α及びＡβ（配列３）；ＩＬ－１β及びＡβ（配列３）；Ａβ（配列１）及びＡβ（配列３）；ＩＧＦ１，２及びＡβ（配列３）；Ａβ（配列３）及びＩＬ－１８；ＩＬ－６及びＡβ（配列３）；ＴＮＦ－α及びＡβ（配列１）；ＩＬ－１β及びＡβ（配列１）；ＩＧＦ１，２及びＡβ（配列１）；Ａβ（配列１）及びＩＬ－１８；ＩＬ－６及びＡβ（配列１）；Ａβ（配列１）及びＲＡＧＥ；ＮＧＦ及びＩＬ－１８；ＮＧＦ及びＩＬ－１β；ＮＧＦ及びＩＬ－６；ＴＮＦ－α及びＥＧＦＲ（配列２）；ＴＮＦ－α及びＲＡＧＥ；ＣＤ－２０及びＥＧＦＲ（配列１）；ＣＤ－２０及びＥＧＦＲ（配列２）；ＲＧＭＡ及びＴＮＦ－αからなる群から選択される抗原の対を結合することができる、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

関連出願の参照

本願は、２００８年６月３日に出願された米国仮特許出願６１／１３０，７７６号及び２００８年６月２４日に出願された米国仮特許出願６１／１３２，９５１号（参照により、これらの内容は本明細書に組み込まれる。）に対する優先権を主張する非仮出願である。

【０００２】

発明の分野

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

【背景技術】
【０００３】
発明の背景
２つ又はそれ以上の抗原に結合することが可能な多重特異的抗体などの加工されたタンパク質が、本分野において公知である。このような多重特異的結合タンパク質は、細胞融合、化学的連結又は組み換えＤＮＡ技術を用いて作製することが可能である。
【０００４】
二特異的抗体は、二特異的抗体の所望される特異性を有するマウスモノクローナル抗体（ｍＡｂ）を発現する２つの異なるハイブリドーマ細胞株の体細胞融合に基づき、クアドローマ技術（Ｍｉｌｓｔｅｉｎ，Ｃ．　ａｎｄ　Ａ．Ｃ．　Ｃｕｅｌｌｏ，（１９８３）Ｎａｔｕｒｅ３０５（５９３４）：５３７－４０参照）を用いて作製されてきた。得られたハイブリッド－ハイブリドーマ（又はクアドローマ）細胞株内で２つの異なる免疫グロブリン（Ｉｇ）重鎖と軽鎖がランダムに対合するために、最大１０個の異なるＩｇ種が生成され、そのうち１つだけが機能的な二特異的抗体である。誤対合された副産物の存在及び大幅に減少した産生率は、精巧な精製操作が必要とされることを意味している。
【０００５】
二特異的抗体は、２つの異なるｍＡｂの化学的連結によっても生産することが可能である（Ｓｔａｅｒｚ，Ｕ．Ｄ．，ｅｔ　ａｌ．，（１９８５）Ｎａｔｕｒｅ３１４（６０１２）６２８－３１参照）。このアプローチは、均一な調製を与えない。他のアプローチは、２つの異なるｍＡｂ又はより小さな抗体断片の化学的連結を使用してきた（Ｂｒｅｎｎａｎ，Ｍ．，ｅｔ　ａｌ．，（１９８５）Ｓｃｉｅｎｃｅ２２９（４７０８）８１－３参照）。
【０００６】
二特異的抗体を作製するために使用される別の方法は、２つの親抗体をヘテロ二機能的クロスリンカーとカップリングさせることであるが、クロスリンカーの親抗体との反応が部位指定的でないので、得られた二特異的抗体には著しい分子不均一性という問題がある。二特異的抗体のより均一な調製物を得るために、２つの異なるＦａｂ断片が、部位指定された様式で、それらのヒンジシステイン残基において化学的に架橋されてきた（Ｇｌｅｎｎｉｅ，Ｍ．Ｊ．，ｅｔ　ａｌ．，（１９８７）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３９（７）：２３６７－７５参照）。しかし、この方法は、Ｆａｂ’２断片をもたらし、完全なＩｇＧ分子をもたらさない。
【０００７】
多岐にわたる他の組み換え二特異的抗体フォーマットが、最近、開発されている（Ｋｒｉａｎｇｋｕｍ，Ｊ．，ｅｔ　ａｌ．，（２００１）Ｂｉｏｍｏｌ　Ｅｎｇ．１８（２）：３１－４０参照）。それらのうち、直列型一本鎖Ｆｖ分子及びダイアボディ並びにこれらの様々な誘導体が、組み換え二特異的抗体の構築のために、最も広く使用されている。一般に、これらの分子の構築は、異なる抗原を認識する２つの一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）断片から始まる（Ｅｃｏｎｏｍｉｄｅｓ，Ａ．Ｎ．，ｅｔ　ａｌ．，（２００３）Ｎａｔ　Ｍｅｄ．９（１）：４７－５２参照）。直列型ｓｃＦｖ分子（ｔａＦｖ）は、２つのｓｃＦｖ分子を付加的ペプチドリンカーと単に接続する単純なフォーマットである。これらの直列型ｓｃＦｖ分子中に存在する２つのｓｃＦｖ断片は、別個の折り畳み実体を形成する。２つのｓｃＦｖ断片及び最大６３個の残基の長さを有するリンカーを接続するために、様々なリンカーを使用することが可能である（Ｎａｋａｎｉｓｈｉ，Ｋ．，ｅｔ　ａｌ．（２００１）Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１９：４２３－７４参照）。親ｓｃＦｖ断片は、通常、細菌内で、可溶性形態で発現されることができるが、直列型ｓｃＦｖ分子は、細菌中で不溶性凝集物を形成することがしばしば観察される。従って、可溶性直列型ｓｃＦｖ分子を作製するために、一般に、再折り畳みプロトコール又は哺乳動物発現系の使用が適用される。最近の研究において、トランスジェニックウサギ及びウシによる、ＣＤ２８及び悪性黒色腫関連プロテオグリカンに対して誘導された直列型ｓｃＦｖのインビボ発現が報告された（Ｇｒａｃｉｅ，Ｊ．Ａ．，ｅｔ　ａｌ．（１９９９）Ｊ．Ｃｌｉｎ

．Ｉｎｖｅｓｔ．１０４（１０）：１３９３－４０１参照）。この構築物では、２つのｓｃＦｖ分子は、ＣＨ１リンカーによって接続され、二特異的抗体の最大１００ｍｇ／Ｌの血清濃度が見出された。細菌中での可溶性発現を可能とするために、ドメイン順序の変動、又は変動する長さ若しくは柔軟性を有する中央リンカーを使用することを含む様々な戦略が使用された。現在、幾つかの研究が、極めて短いＡｌａ３リンカー又はグリシン／セリンが豊富な長いリンカーを用いた、細菌中での可溶性直列型ｓｃＦｖ分子の発現が報告されている（Ｌｅｕｎｇ，Ｂ．Ｐ．，ｅｔ　ａｌ．（２０００）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６４（１２）：６４９５－５０２；Ｉｔｏ，Ａ．，ｅｔ　ａｌ．（２００３）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１７０（９）：４８０２－９；Ｋａｒｎｉ，Ａ．，ｅｔ　ａｌ．（２００２）Ｊ．Ｎｅｕｒｏｉｍｍｕｎｏｌ．１２５（１－２）：１３４－４０参照）。別の最近の研究では、細菌中で、可溶性及び活性形態で産生された分子を濃縮するために、３又は６個の残基の長さを有する無作為化された中央リンカーを含有する直列型ｓｃＦｖレパートリーのファージディスプレイが使用された。このアプローチは、６アミノ酸残基のリンカーを有する直列型ｓｃＦｖ分子の単離をもたらした（Ａｒｎｄｔ，Ｍ．　ａｎｄ　Ｊ．　Ｋｒａｕｓｓ（２００３）Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２０７：３０５－２１参照）。このリンカー配列が、直列型ｓｃＦｖ分子の可溶性発現に対する一般的な解決策であるかどうかは不明である。それにも関わらず、この研究は、位置指定突然変異導入と組み合わせた直列型ｓｃＦｖ分子のファージディスプレイが、これらの分子（これらの分子は、細菌内で、活性形態で発現され得る。）を濃縮するための強力なツールであることを示した。

【０００８】

二特異的ダイアボディ（Ｄｂ）は、発現のためにダイアボディフォーマットを使用する。ダイアボディは、ＶＨ及びＶＬドメインを接続するリンカーの長さを、約５残基まで減少させることによってｓｃＦｖ断片から作製される（Ｐｅｉｐｐ，Ｍ．　ａｎｄ　Ｔ．Ｖａｌｅｒｉｕｓ（２００２）Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．Ｔｒａｎｓ．３０（４）：ｐ．５０７－１１参照。）。リンカーサイズのこの減少は、ＶＨ及びＶＬドメインの交差対合による２つのポリペプチド鎖の二量体化を促進する。二特異的ダイアボディは、構造ＶＨＡ－ＶＬＢ及びＶＨＢ－ＶＬＡ（ＶＨ－ＶＬ配置）又はＶＬＡ－ＶＨＢ及びＶＬＢ－ＶＨＡ（ＶＬ－ＶＨ配置）の何れかとともに、２つのポリペプチド鎖を同一細胞内で発現させることによって作製される。異なる様々な二特異的ダイアボディが過去に作製されており、それらの多くは、細菌中で、可溶性形態で発現される。しかしながら、最近の比較研究は、可変ドメインの方向性が、活性な結合部位の発現及び形成に影響を与え得ることを示している（Ｍａｃｋ，Ｍ．ｅｔ　ａｌ．（１９９５），Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９２（１５）：７０２１－５参照）。それにもかかわらず、細菌中での可溶性発現は、直列型ｓｃＦｖ分子に比べて重要な利点を示す。しかしながら、２つの異なるポリペプチド鎖が単一の細胞内で発現されるので、活性なヘテロ二量体とともに、不活性なホモ二量体が産生され得る。これにより、二特異的ダイアボディの均一な調製物を得るために、さらなる精製工程の実施が必要となる。二特異的ダイアボディの生成を強制する１つのアプローチは、ノブ・イントゥ・ホールダイアボディの作製である（Ｈｏｌｌｉｇｅｒ，Ｐ．，Ｔ．Ｐｒｏｓｐｅｒｏ，ａｎｄ　Ｇ．　Ｗｉｎｔｅｒ（１９９３），Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９０（１４）：６４４４－８．１８参照）。このアプローチは、ＨＥＲ２及びＣＤ３に対して誘導された二特異的ダイアボディに対して示された。Ｖａｌ３７をＰｈｅと交換し、Ｌｅｕ４５をＴｒｐと交換することによって、ＶＨドメイン中に大きなノブが導入され、抗ＨＥＲ２又は抗ＣＤ３可変ドメインの何れかにおいて、Ｐｈｅ９８をＭｅｔに変異させ、Ｔｒｙ８７をＡｌａに変異させることによって、ＶＬドメイン中に相補的な穴が作製された。このアプローチを使用することによって、二特異的ダイアボディの産生は、親ダイアボディによる７２％からノブ・イントゥ・ホールダイアボディによる９０％超まで増加し得る。重要なことに、産生率は、これらの変異の結果として、僅かに減少したに過ぎなかった。しかしながら、幾つかの構築物に対して抗原結合活性の低下が観察された。従って、このかなり精巧なアプロー

チは、変化を受けていない結合活性を有するヘテロ二量体分子を産生する変異を同定するために、様々な構築物の分析を必要とする。さらに、このようなアプローチは、定常領域に免疫グロブリン配列の変異的修飾を必要とし、このため、抗体配列の非原型及び非天然形態を作製し、これは、増加した免疫原性、乏しいインビボ安定性及び望ましくない薬物動態をもたらし得る。

【０００９】

一本鎖ダイアボディ（ｓｃＤｂ）は、二特異的ダイアボディ様分子の形成を改善するための別の戦略である（Ｈｏｌｌｉｇｅｒ，Ｐ．ａｎｄ Ｇ．Ｗｉｎｔｅｒ（１９９７），Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．４５（３－４）：１２８－３０；Ｗｕ，Ａ．Ｍ．，ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｉｍｍｕｎｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ２（１）：ｐ．２１－３６参照）。二特異的一本鎖ダイアボディは、２つのダイボディ形成ポリペプチド鎖を、約１５アミノ酸残基の長さを有する追加の中央リンカーと接続することによって作製される。従って、単量体の一本鎖ダイアボディ（５０から６０ｋＤａ）に対応する分子量を有する全ての分子が二特異的である。二特異的一本鎖ダイアボディは、細菌中において、可溶性且つ活性な形態で発現され、精製された分子の大半が単量体として存在することが、幾つかの研究によって示されている（Ｈｏｌｌｉｇｅｒ，Ｐ．ａｎｄ Ｇ．Ｗｉｎｔｅｒ（１９９７）Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．４５（３－４）：１２８－３０；Ｗｕ，Ａ．Ｍ．，ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｉｍｍｕｎｏｔｅｃｈｎｏｌ．２（１）：２１－３６；Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ，Ａ．ａｎｄ Ｐ．Ｐａｃｋ（１９９７）Ｉｍｍｕｎｏｔｅｃｈｎｏｌ．３（２）：８３－１０５；Ｒｉｄｇｗａｙ，Ｊ．Ｂ．，ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎ．９（７）：６１７－２１参照）。従って、一本鎖ダイアボディは、直列型ｓｃＦｖ（全ての単量体は二特異的である。）とダイアボディ（細菌中での可溶性発現）の利点を併有している。

【００１０】

より最近になって、ダイアボディは、ジーダイアボディと名づけられた、よりＩｇ様の分子を作製するためにＦｃに融合されている（Ｌｕ，Ｄ．，ｅｔ ａｌ．（２００４）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７９（４）：２８５６－６５）。さらに、ＩｇＧの重鎖中に２つのＦａｂリピートを含み、４つの抗原分子を結合することが可能な多価の抗体構築物が記載されている（ＷＯ０１７７３４２Ａ１，及びＭｉｌｌｅｒ，Ｋ．，ｅｔ ａｌ．（２００３）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１７０（９）：４８５４－６１参照）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【００１１】

【特許文献１】国際公開第０１／７７３４２号

【非特許文献】

【００１２】

【非特許文献１】（Ｍｉｌｓｔｅｉｎ，Ｃ．ａｎｄ Ａ．Ｃ．Ｃｕｅｌｌｏ，Ｎａｔｕｒｅ、３０５（５９３４）、１９８３年、ｐｐ．５３７－４０

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

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

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

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

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

【非特許文献７】Ｎａｋａｎｉｓｈｉ，Ｋ．他、Ａｎｎｕ Ｒｅｖ Ｉｍｍｕｎｏｌ，１

9、２００１年、ｐｐ．４２３－７４
【非特許文献８】Ｇｒａｃｉｅ，Ｉ．Ａ．他、Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ、１０４（１０）、１９９９年、ｐｐ．１３９３－４０１
【非特許文献９】Ｌｅｕｎｇ，Ｂ．Ｐ．他、Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ、１６４（１２）、２０００年、ｐｐ．６４９５－５０２
【非特許文献１０】Ｉｔｏ，Ａ．他、Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ、１７０（９）、２００３年、ｐｐ．４８０２－９
【非特許文献１１】Ｋａｒｎｉ，Ａ．他、Ｊ Ｎｅｕｒｏｉｍｍｕｎｏｌ、１２５（１－２）、２００２年、ｐｐ．１３４－４０
【非特許文献１２】Ａｒｎｄｔ，Ｍ．及びＪ． Ｋｒａｕｓｓ，Ｍｅｔｈｏｄｓ ＭｏＩ Ｂｉｏｌ、２０７、２００３年、ｐｐ．３０５－２１
【非特許文献１３】Ｐｅｉｐｐ，Ｍ．及びＴ． ＶａｌｅｒｉｕｓＢｉｏｃｈｅｍ Ｓｏｃ Ｔｒａｎｓ，３０（４）、２００２年、ｐｐ．５０７－１１
【非特許文献１４】Ｍａｃｋ，Ｍ．，Ｇ． Ｒｉｅｔｈｍｕｌｌｅｒ及びＰ．Ｋｕｆｅｒ，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ，９２（１５）、１９９５年、ｐｐ．７０２１－５
【非特許文献１５】Ｈｏｌｌｉｇｅｒ，Ｐ．，Ｔ． Ｐｒｏｓｐｅｒｏ及びＧ．ＷｉｎｔｅｒＰｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ，９０（１４）、１９９３年、ｐｐ．６４４４－８．１８
【非特許文献１６】Ｈｏｌｌｉｇｅｒ，Ｐ．及びＧ． Ｗｉｎｔｅｒ、Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ，４５（３－４）、１９９７年、ｐｐ．１２８－３０
【非特許文献１７】Ｗｕ，Ａ．Ｍ．他、Ｉｍｍｕｎｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，．２（１）、１９９６年、ｐｐ．２１－３６
【非特許文献１８】Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ，Ａ．及びＰ．Ｐａｃｋ、Ｉｍｍｕｎｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，．３（２）、１９９７年、ｐｐ．８３－１０５
【非特許文献１９】Ｒｉｄｇｗａｙ，Ｊ．Ｂ．他、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ，９（７）、１９９６年、ｐｐ．６１７－２１
【非特許文献２０】Ｌｕ，Ｄ．他、Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ，２７９（４）、２００４年、ｐｐ．２８５６－６５
【非特許文献２１】Ｍｉｌｌｅｒ，Ｋ．他、Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ，１７０（９）、２００３年、ｐｐ．４８５４－６１

【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００１３】
本分野において、２つ又はそれ以上の抗原を結合することが可能な改良された多価結合タンパク質に対する要求が存在する。米国特許出願１１／５０７，０５０号は、高い親和性で２つ又はそれ以上の抗原を結合することができる結合タンパク質の新規ファミリーを提供し、二重可変ドメイン免疫グロブリン（ＤＶＤ－Ｉｇ^{TM}）と称されている。本発明は２つ又はそれ以上の抗原を結合することが可能なさらなる新規結合タンパク質を提供する。
【課題を解決するための手段】
【００１４】
（発明の要旨）
本発明は２つ又はそれ以上の抗原を結合することが可能な多価結合タンパク質に関する。本発明は、高い親和性で、２つ又はそれ以上の抗原を結合することが可能な結合タンパク質の新規ファミリーを提供する。
【００１５】
一実施形態において、本発明は、ＶＤ１－（Ｘ１）$_n$－ＶＤ２－Ｃ－（Ｘ２）$_n$（ＶＤ１は第一の可変ドメインであり、ＶＤ２は第二の可変ドメインであり、Ｃは定常ドメイン

であり、Ｘ１はアミノ酸又はポリペプチドを表し、Ｘ２はＦｃ領域を表し、及びｎは０又は１である。）を含むポリペプチド鎖を含む結合タンパク質を提供する。一実施形態において、結合タンパク質中のＶＤ１及びＶＤ２は、重鎖可変ドメインである。別の実施形態において、重鎖可変ドメインは、マウス重鎖可変ドメイン、ヒト重鎖可変ドメイン、ＣＤＲ移植された重鎖可変ドメイン及びヒト化重鎖可変ドメインからなる群から選択される。さらに別の実施形態において、ＶＤ１及びＶＤ２は、同一の抗原を結合することができる。別の実施形態において、ＶＤ１及びＶＤ２は、異なる抗原を結合することができる。さらに別の実施形態において、Ｃは重鎖定常ドメインである。例えば、Ｘ１はリンカーである（但し、Ｘ１はＣＨ１ではない。）。例えば、Ｘ１は、ＡＫＴＴＰＫＬＥＥＧＥＦＳＥＡＲ（配列番号１）；ＡＫＴＴＰＫＬＥＥＧＥＦＳＥＡＲＶ（配列番号２）；ＡＫＴＴＰＫＬＧＧ（配列番号３）；ＳＡＫＴＴＰＫＬＧＧ（配列番号４）；ＳＡＫＴＴＰ（配列番号５）；ＲＡＤＡＡＰ（配列番号６）；ＲＡＤＡＡＰＴＶＳ（配列番号７）；ＲＡＤＡＡＡＡＧＧＰＧＳ（配列番号８）；ＲＡＤＡＡＡＡ（$G_4S)_4$（配列番号９）；ＳＡＫＴＴＰＫＬＥＥＧＥＦＳＥＡＲＶ（配列番号１０）；ＡＤＡＡＰ（配列番号１１）；ＡＤＡＡＰＴＶＳＩＦＰＰ（配列番号１２）；ＴＶＡＡＰ（配列番号１３）；ＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰＰ（配列番号１４）；ＱＰＫＡＡＰ（配列番号１５）；ＱＰＫＡＡＰＳＶＴＬＦＰＰ（配列番号１６）；ＡＫＴＴＰＰ（配列番号１７）；ＡＫＴＴＰＰＳＶＴＰＬＡＰ（配列番号１８）；ＡＫＴＴＡＰ（配列番号１９）；ＡＫＴＴＡＰＳＶＹＰＬＡＰ（配列番号２０）；ＡＳＴＫＧＰ（配列番号２１）；ＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰ（配列番号２２）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号２３）；ＧＥＮＫＶＥＹＡＰＡＬＭＡＬＳ（配列番号２４）；ＧＰＡＫＥＬＴＰＬＫＥＡＫＶＳ（配列番号２５）；及びＧＨＥＡＡＡＶＭＱＶＱＹＰＡＳ（配列番号２６）からなる群から選択されるリンカーである。一実施形態において、Ｘ２はＦｃ領域である。別の実施形態において、Ｘ２は変形物Ｆｃ領域である。

【００１６】

一実施形態において、本明細書に開示されている結合タンパク質はポリペプチド鎖を含み、ポリペプチド鎖は$VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$（ＶＤ１は第一の重鎖可変ドメインであり、ＶＤ２は第二の重鎖可変ドメインであり、Ｃは重鎖定常ドメインであり、Ｘ１はリンカーであり（但し、ＣＨ１ではない。）、及びＸ２はＦｃ領域である。）を含む。

【００１７】

一実施形態において、結合タンパク質中のＶＤ１及びＶＤ２は、軽鎖可変ドメインである。一実施形態において、軽鎖可変ドメインは、マウス軽鎖可変ドメイン、ヒト軽鎖可変ドメイン、ＣＤＲ移植された軽鎖可変ドメイン及びヒト化軽鎖可変ドメインからなる群から選択される。一実施形態において、ＶＤ１及びＶＤ２は、同一の抗原を結合することができる。別の実施形態において、ＶＤ１及びＶＤ２は、異なる抗原を結合することができる。一実施形態において、Ｃは、軽鎖定常ドメインである。別の実施形態において、Ｘ１はリンカーである（但し、Ｘ１はＣＬ１ではない。）。一実施形態において、Ｘ１は、ＡＫＴＴＰＫＬＥＥＧＥＦＳＥＡＲ（配列番号１）；ＡＫＴＴＰＫＬＥＥＧＥＦＳＥＡＲＶ（配列番号２）；ＡＫＴＴＰＫＬＧＧ（配列番号３）；ＳＡＫＴＴＰＫＬＧＧ（配列番号４）；ＳＡＫＴＴＰ（配列番号５）；ＲＡＤＡＡＰ（配列番号６）；ＲＡＤＡＡＰＴＶＳ（配列番号７）；ＲＡＤＡＡＡＡＧＧＰＧＳ（配列番号８）；ＲＡＤＡＡＡＡ（$G_4S)_4$（配列番号９）；ＳＡＫＴＴＰＫＬＥＥＧＥＦＳＥＡＲＶ（配列番号１０）；ＡＤＡＡＰ（配列番号１１）；ＡＤＡＡＰＴＶＳＩＦＰＰ（配列番号１２）；ＴＶＡＡＰ（配列番号１３）；ＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰＰ（配列番号１４）；ＱＰＫＡＡＰ（配列番号１５）；ＱＰＫＡＡＰＳＶＴＬＦＰＰ（配列番号１６）；ＡＫＴＴＰＰ（配列番号１７）；ＡＫＴＴＰＰＳＶＴＰＬＡＰ（配列番号１８）；ＡＫＴＴＡＰ（配列番号１９）；ＡＫＴＴＡＰＳＶＹＰＬＡＰ（配列番号２０）；ＡＳＴＫＧＰ（配列番号２１）；ＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰ（配列番号２２）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号２３）；ＧＥＮＫＶＥＹＡＰＡＬＭＡＬＳ（配列番号２４）；ＧＰＡＫＥＬＴＰＬＫＥＡＫＶＳ（配列

番号２５）；及びＧＨＥＡＡＡＶＭＱＶＱＹＰＡＳ（配列番号２６）からなる群から選択されるリンカーである。一実施形態において、結合タンパク質はＸ２を含まない。

【００１８】

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

【００１９】

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

【００２０】

別の実施形態において、本発明は、２つのポリペプチド鎖を含み、前記第一のポリペプチド鎖がＶＤ１－（Ｘ１）$_n$－ＶＤ２－Ｃ－（Ｘ２）$_n$（ＶＤ１は第一の重鎖可変ドメインであり、ＶＤ２は第二の重鎖可変ドメインであり、Ｃは重鎖定常ドメインであり、Ｘ１はリンカーであり（但し、ＣＨ１ではない。）、及びＸ２はＦｃ領域である。）を含み；並びに前記第二のポリペプチド鎖がＶＤ１－（Ｘ１）$_n$－ＶＤ２－Ｃ－（Ｘ２）$_n$（ＶＤ１は第一の軽鎖可変ドメインであり、ＶＤ２は第二の軽鎖可変ドメインであり、Ｃは軽鎖定常ドメインであり、Ｘ１はリンカーであり（但し、ＣＨ１ではない。）、及びＸ２はＦｃ領域を含まない。）を含む結合タンパク質を提供する。特定の実施形態において、二重可変ドメイン（ＤＶＤ）結合タンパク質は４つのポリペプチド鎖を含み、第一の２つのポリペプチド鎖は、それぞれ、ＶＤ１－（Ｘ１）$_n$－ＶＤ２－Ｃ－（Ｘ２）$_n$（ＶＤ１は第一の重鎖可変ドメインであり、ＶＤ２は第二の重鎖可変ドメインであり、Ｃは重鎖定常ドメインであり、Ｘ１はリンカーであり（但し、ＣＨ１ではない。）、及びＸ２はＦｃ領域である。）を含み；並びに第二の２つのポリペプチド鎖は、それぞれ、ＶＤ１－（Ｘ１）$_n$－ＶＤ２－Ｃ－（Ｘ２）$_n$（ＶＤ１は第一の軽鎖可変ドメインであり、ＶＤ２は第二の軽鎖可変ドメインであり、Ｃは軽鎖定常ドメインであり、Ｘ１はリンカーであり（但し、ＣＨ１ではない。）、及びＸ２はＦｃ領域を含まない。）を含む。このような二重可変ドメイン（ＤＶＤ）タンパク質は、４つの抗原結合部位を有する。

【００２１】

別の実施形態において、本明細書に開示されている結合タンパク質は、１つ又はそれ以上の標的を結合することが可能である。一実施形態において、標的は、サイトカイン、細胞表面タンパク質、酵素及び受容体からなる群から選択される。別の実施形態において、結合タンパク質は、１つ又はそれ以上の標的の生物学的機能を調節することが可能である。別の実施形態において、結合タンパク質は、１つ又はそれ以上の標的を中和することが可能である。本発明の結合タンパク質は、リンホカイン、モノカイン、ポリペプチドホルモン、受容体又は腫瘍マーカーからなる群から選択されるサイトカインを結合することができる。例えば、本発明のＤＶＤ－Ｉｇは、以下の２つ又はそれ以上を結合することができる。アミロイドβ（Ａβ）（配列１）、Ａβ（配列２）、Ａβ（配列３）、腫瘍壊死因子α（ＴＮＦ－α）、インターロイキン１β（ＩＬ－１β）、インシュリン様成長因子１（ＩＧＦ１）、インシュリン様成長因子２（ＩＧＦ２）、インターロイキン１８（ＩＬ－１８）、インターロイキン６（ＩＬ－６）、終末糖化産物受容体　（ＲＡＧＥ）、神経成長因子（ＮＧＦ）、上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）（配列１）、ＥＧＦＲ（配列Ｔ）、ＣＤ－２０，及び反発性ガイダンス分子（ＲＧＭＡ）（表２も参照）。特定の実施形態において、結合タンパク質は、Ａβ（配列１）及びＡβ（配列３）；ＴＮＦ－α及びＡβ（

配列２）；ＩＬ－１β及びＡβ（配列２）；Ａβ（配列１）及びＡβ（配列２）；ＩＧＦ１，２及びＡβ（配列２）；Ａβ（配列２）及びＩＬ－１８；ＩＬ－６及びＡβ（配列２）；ＴＮＦ－α及びＡβ（配列３）；ＩＬ－１β及びＡβ（配列３）；Ａβ（配列１）及びＡβ（配列３）；ＩＧＦ１，２及びＡβ（配列３）；Ａβ（配列３）及びＩＬ－１８；ＩＬ－６及びＡβ（配列３）；ＴＮＦ－α及びＡβ（配列１）；ＩＬ－１β及びＡβ（配列１）；ＩＧＦ１，２及びＡβ（配列１）；Ａβ（配列１）及びＩＬ－１８；ＩＬ－６及びＡβ（配列１）；Ａβ（配列１）及びＲＡＧＥ；ＮＧＦ及びＩＬ－１８；ＮＧＦ及びＩＬ－１β；ＮＧＦ及びＩＬ－６；ＴＮＦ－α及びＥＧＦＲ（配列２）；ＴＮＦ－α及びＲＡＧＥ；ＣＤ－２０及びＥＧＦＲ（配列１）；ＣＤ－２０及びＥＧＦＲ（配列２）；ＲＧＭＡ及びＴＮＦ－αからなる群から選択される標的の結合対を結合することができる（実施例２．１から２．２７参照）。

【００２２】

一実施形態において、Ａβ（配列１）及びＡβ（配列３）を結合することができる結合タンパク質は、配列番号６２及び配列番号６４からなる群から選択されるＤＶＤ重鎖アミノ酸配列並びに配列番号６３及び配列番号６５からなる群から選択されるＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、Ａβ（配列１）及びＡβ（配列３）を結合することができる結合タンパク質は、配列番号６２のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号６３のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、Ａβ（配列１）及びＡβ（配列３）を結合することができる結合タンパク質は逆の方向性を有し、配列番号６４のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号６５のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。

【００２３】

一実施形態において、ＴＮＦ－α及びＡβ（配列２）を結合することができる結合タンパク質は、配列番号６６及び配列番号６８からなる群から選択されるＤＶＤ重鎖アミノ酸配列並びに配列番号６７及び配列番号６９からなる群から選択されるＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、ＴＮＦ－α及びＡβ（配列２）を結合することができる結合タンパク質は、配列番号６６のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号６７のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、ＴＮＦ－α及びＡβ（配列２）を結合することができる結合タンパク質は逆の方向性を有し、配列番号６８のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号６９のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。

【００２４】

一実施形態において、ＩＬ－１β及びＡβ（配列２）を結合することができる結合タンパク質は、配列番号７０及び配列番号７２からなる群から選択されるＤＶＤ重鎖アミノ酸配列並びに配列番号７１及び配列番号７３からなる群から選択されるＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、ＩＬ－１β及びＡβ（配列２）を結合することができる結合タンパク質は、配列番号７０のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号７１のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、ＩＬ－１β及びＡβ（配列２）を結合することができる結合タンパク質は逆の方向性を有し、配列番号７２のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号７３のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。

【００２５】

一実施形態において、Ａβ（配列１）及びＡβ（配列２）を結合することができる結合タンパク質は、配列番号７４及び配列番号７６からなる群から選択されるＤＶＤ重鎖アミノ酸配列並びに配列番号７５及び配列番号７７からなる群から選択されるＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、Ａβ（配列１）及びＡβ（配列２）を結合することができる結合タンパク質は、配列番号７４のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号７５のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、Ａβ（配列１）及びＡβ（配列２）を結合することができる結合タンパク質は逆の方向性を有し、配列番号７６のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号７７のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。

【００２６】

一実施形態において、ＩＧＦ１，２及びＡβ（配列２）を結合することができる結合タンパク質は、配列番号７８及び配列番号８０からなる群から選択されるＤＶＤ重鎖アミノ

酸配列並びに配列番号７９及び配列番号８１からなる群から選択されるＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、ＩＧＦ１，２及びＡβ（配列２）を結合することができる結合タンパク質は、配列番号７８のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号７９のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、ＩＧＦ１，２及びＡβ（配列２）を結合することができる結合タンパク質は逆の方向性を有し、配列番号８０のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号８１のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。

【００２７】

一実施形態において、Ａβ（配列２）及びＩＬ－１８を結合することができる結合タンパク質は、配列番号８２及び配列番号８４からなる群から選択されるＤＶＤ重鎖アミノ酸配列並びに配列番号８３及び配列番号８５からなる群から選択されるＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、Ａβ（配列２）及びＩＬ－１８を結合することができる結合タンパク質は、配列番号８２のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号８３のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、Ａβ（配列２）及びＩＬ－１８を結合することができる結合タンパク質は逆の方向性を有し、配列番号８４のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号８５のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。

【００２８】

一実施形態において、ＩＬ－６及びＡβ（配列２）を結合することができる結合タンパク質は、配列番号８６及び配列番号８８からなる群から選択されるＤＶＤ重鎖アミノ酸配列並びに配列番号８７及び配列番号８９からなる群から選択されるＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、ＩＬ－６及びＡβ（配列２）を結合することができる結合タンパク質は、配列番号８６のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号８７のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、ＩＬ－６及びＡβ（配列２）を結合することができる結合タンパク質は逆の方向性を有し、配列番号８８のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号８９のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。

【００２９】

一実施形態において、ＴＮＦ－α及びＡβ（配列３）を結合することができる結合タンパク質は、配列番号９０及び配列番号９２からなる群から選択されるＤＶＤ重鎖アミノ酸配列並びに配列番号９１及び配列番号９３からなる群から選択されるＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、ＴＮＦ－α及びＡβ（配列３）を結合することができる結合タンパク質は、配列番号９０のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号９１のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、ＴＮＦ－α及びＡβ（配列３）を結合することができる結合タンパク質は逆の方向性を有し、配列番号９２のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号９３のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。

【００３０】

一実施形態において、ＩＬ－１β及びＡβ（配列３）を結合することができる結合タンパク質は、配列番号９４及び配列番号９６からなる群から選択されるＤＶＤ重鎖アミノ酸配列並びに配列番号９５及び配列番号９７からなる群から選択されるＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、ＩＬ－１β及びＡβ（配列３）を結合することができる結合タンパク質は、配列番号９４のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号９５のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、ＩＬ－１β及びＡβ（配列３）を結合することができる結合タンパク質は逆の方向性を有し、配列番号９６のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号９７のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。

【００３１】

一実施形態において、Ａβ（配列１）及びＡβ（配列３）を結合することができる結合タンパク質は、配列番号９８及び配列番号１００からなる群から選択されるＤＶＤ重鎖アミノ酸配列並びに配列番号９９及び配列番号１０１からなる群から選択されるＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、Ａβ（配列１）及びＡβ（配列３）を結合することができる結合タンパク質は、配列番号９８のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号９９のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、Ａβ（配列１）及びＡβ（配列３）を結合することができる結合タンパク質は逆の方向性を有し、配列番号１００

のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号１０１のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。

【００３２】

一実施形態において、ＩＧＦ１，２及びＡβ（配列３）を結合することができる結合タンパク質は、配列番号１０２及び配列番号１０４からなる群から選択されるＤＶＤ重鎖アミノ酸配列並びに配列番号１０３及び配列番号１０５からなる群から選択されるＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、ＩＧＦ１，２及びＡβ（配列３）を結合することができる結合タンパク質は、配列番号１０２のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号１０３のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、ＩＧＦ１，２及びＡβ（配列３）を結合することができる結合タンパク質は逆の方向性を有し、配列番号１０４のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号１０５のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。

【００３３】

一実施形態において、Ａβ（配列３）及びＩＬ－１８を結合することができる結合タンパク質は、配列番号１０６及び配列番号１０８からなる群から選択されるＤＶＤ重鎖アミノ酸配列並びに配列番号１０７及び配列番号１０９からなる群から選択されるＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、Ａβ（配列３）及びＩＬ－１８を結合することができる結合タンパク質は、配列番号１０６のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号１０７のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、Ａβ（配列３）及びＩＬ－１８を結合することができる結合タンパク質は逆の方向性を有し、配列番号１０８のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号１０９のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。

【００３４】

一実施形態において、ＩＬ－６及びＡβ（配列３）を結合することができる結合タンパク質は、配列番号１１０及び配列番号１１２からなる群から選択されるＤＶＤ重鎖アミノ酸配列並びに配列番号１１１及び配列番号１１３からなる群から選択されるＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、ＩＬ－６及びＡβ（配列３）を結合することができる結合タンパク質は、配列番号１１０のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号１１１のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、ＩＬ－６及びＡβ（配列３）を結合することができる結合タンパク質は逆の方向性を有し、配列番号１１２のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号１１３のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。

【００３５】

一実施形態において、ＴＮＦ－α及びＡβ（配列１）を結合することができる結合タンパク質は、配列番号１１４及び配列番号１１６からなる群から選択されるＤＶＤ重鎖アミノ酸配列並びに配列番号１１５及び配列番号１１７からなる群から選択されるＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、ＴＮＦ－α及びＡβ（配列１）を結合することができる結合タンパク質は、配列番号１１４のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号１１５のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、ＴＮＦ－α及びＡβ（配列１）を結合することができる結合タンパク質は逆の方向性を有し、配列番号１１６のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号１１７のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。

【００３６】

一実施形態において、ＩＬ－１β及びＡβ（配列１）を結合することができる結合タンパク質は、配列番号１１８及び配列番号１２０からなる群から選択されるＤＶＤ重鎖アミノ酸配列並びに配列番号１１９及び配列番号１２１からなる群から選択されるＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、ＩＬ－１β及びＡβ（配列１）を結合することができる結合タンパク質は、配列番号１１８のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号１１９のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、ＩＬ－１β及びＡβ（配列１）を結合することができる結合タンパク質は逆の方向性を有し、配列番号１２０のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号１２１のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。

【００３７】

一実施形態において、ＩＧＦ１，２及びＡβ（配列１）を結合することができる結合タンパク質は、配列番号１２２及び配列番号１２４からなる群から選択されるＤＶＤ重鎖アミノ酸配列並びに配列番号１２３及び配列番号１２５からなる群から選択されるＤＶＤ軽

鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、ＩＧＦ１，２及びＡβ（配列１）を結合することができる結合タンパク質は、配列番号１２２のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号１２３のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、ＩＧＦ１，２及びＡβ（配列１）を結合することができる結合タンパク質は逆の方向性を有し、配列番号１２４のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号１２５のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。

【００３８】

一実施形態において、Ａβ（配列１）及びＩＬ－１８を結合することができる結合タンパク質は、配列番号１２６及び配列番号１２８からなる群から選択されるＤＶＤ重鎖アミノ酸配列並びに配列番号１２７及び配列番号１２９からなる群から選択されるＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、Ａβ（配列１）及びＩＬ－１８を結合することができる結合タンパク質は、配列番号１２６のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号１２７のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、Ａβ（配列１）及びＩＬ－１８を結合することができる結合タンパク質は逆の方向性を有し、配列番号１２８のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号１２９のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。

【００３９】

一実施形態において、ＩＬ－６及びＡβ（配列１）を結合することができる結合タンパク質は、配列番号１３０及び配列番号１３２からなる群から選択されるＤＶＤ重鎖アミノ酸配列並びに配列番号１３１及び配列番号１３３からなる群から選択されるＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、ＩＬ－６及びＡβ（配列１）を結合することができる結合タンパク質は、配列番号１３０のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号１３１のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、ＩＬ－６及びＡβ（配列１）を結合することができる結合タンパク質は逆の方向性を有し、配列番号１３２のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号１３３のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。

【００４０】

一実施形態において、Ａβ（配列１）及びＲＡＧＥを結合することができる結合タンパク質は、配列番号１３４及び配列番号１３６からなる群から選択されるＤＶＤ重鎖アミノ酸配列並びに配列番号１３５及び配列番号１３７からなる群から選択されるＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、Ａβ（配列１）及びＲＡＧＥを結合することができる結合タンパク質は、配列番号１３４のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号１３５のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、Ａβ（配列１）及びＲＡＧＥを結合することができる結合タンパク質は逆の方向性を有し、配列番号１３６のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号１３７のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。

【００４１】

一実施形態において、ＮＧＦ及びＩＬ－１８を結合することができる結合タンパク質は、配列番号１３８及び配列番号１４０からなる群から選択されるＤＶＤ重鎖アミノ酸配列並びに配列番号１３９及び配列番号１４１からなる群から選択されるＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、ＮＧＦ及びＩＬ－１８を結合することができる結合タンパク質は、配列番号１３８のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号１３９のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、ＮＧＦ及びＩＬ－１８を結合することができる結合タンパク質は逆の方向性を有し、配列番号１４０のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号１４１のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。

【００４２】

一実施形態において、ＮＧＦ及びＩＬ－１βを結合することができる結合タンパク質は、配列番号１４２及び配列番号１４４からなる群から選択されるＤＶＤ重鎖アミノ酸配列並びに配列番号１４３及び配列番号１４５からなる群から選択されるＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、ＮＧＦ及びＩＬ－１βを結合することができる結合タンパク質は、配列番号１４２のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号１４３のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、ＮＧＦ及びＩＬ－１βを結合することができる結合タンパク質は逆の方向性を有し、配列番号１４４のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号１４５のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。

【００４３】
一実施形態において、ＮＧＦ及びＩＬ－６を結合することができる結合タンパク質は、配列番号１４６及び配列番号１４８からなる群から選択されるＤＶＤ重鎖アミノ酸配列並びに配列番号１４７及び配列番号１４９からなる群から選択されるＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、ＮＧＦ及びＩＬ－６を結合することができる結合タンパク質は、配列番号１４６のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号１４７のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、ＮＧＦ及びＩＬ－６を結合することができる結合タンパク質は逆の方向性を有し、配列番号１４８のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号１４９のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。
【００４４】
一実施形態において、ＴＮＦ－α及びＥＧＦＲ（配列２）を結合することができる結合タンパク質は、配列番号１５０及び配列番号１５２からなる群から選択されるＤＶＤ重鎖アミノ酸配列並びに配列番号１５１及び配列番号１５３からなる群から選択されるＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、ＴＮＦ－α及びＥＧＦＲ（配列２）を結合することができる結合タンパク質は、配列番号１５０のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号１５１のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、ＴＮＦ－α及びＥＧＦＲ（配列２）を結合することができる結合タンパク質は逆の方向性を有し、配列番号１５２のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号１５３のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。
【００４５】
一実施形態において、ＴＮＦ－α及びＲＡＧＥを結合することができる結合タンパク質は、配列番号１５４及び配列番号１５６からなる群から選択されるＤＶＤ重鎖アミノ酸配列並びに配列番号１５５及び配列番号１５７からなる群から選択されるＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、ＴＮＦ－α及びＲＡＧＥを結合することができる結合タンパク質は、配列番号１５４のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号１５５のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、ＴＮＦ－α及びＲＡＧＥを結合することができる結合タンパク質は逆の方向性を有し、配列番号１５６のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号１５７のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。
【００４６】
一実施形態において、ＣＤ－２０及びＥＧＦＲ（配列１）を結合することができる結合タンパク質は、配列番号１５８及び配列番号１６０からなる群から選択されるＤＶＤ重鎖アミノ酸配列並びに配列番号１５９及び配列番号１６１からなる群から選択されるＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、ＣＤ－２０及びＥＧＦＲ（配列１）を結合することができる結合タンパク質は、配列番号１５８のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号１５９のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、ＣＤ－２０及びＥＧＦＲ（配列１）を結合することができる結合タンパク質は逆の方向性を有し、配列番号１６０のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号１６１のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。
【００４７】
一実施形態において、ＣＤ－２０及びＥＧＦＲ（配列２）を結合することができる結合タンパク質は、配列番号１６２及び配列番号１６４からなる群から選択されるＤＶＤ重鎖アミノ酸配列並びに配列番号１６３及び配列番号１６４からなる群から選択されるＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、ＣＤ－２０及びＥＧＦＲ（配列２）を結合することができる結合タンパク質は、配列番号１６２のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号１６３のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、ＣＤ－２０及びＥＧＦＲ（配列２）を結合することができる結合タンパク質は逆の方向性を有し、配列番号１６４のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号１６５のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。
【００４８】
一実施形態において、ＲＧＭＡ及びＴＮＦ－αを結合することができる結合タンパク質

は、配列番号１６６及び配列番号１６８からなる群から選択されるＤＶＤ重鎖アミノ酸配列並びに配列番号１６７及び配列番号１６９からなる群から選択されるＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。一実施形態において、ＲＧＭＡ及びＴＮＦ－αを結合することができる結合タンパク質は、配列番号１６６のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号１６７のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。別の実施形態において、ＲＧＭＡ及びＴＮＦ－αを結合することができる結合タンパク質は逆の方向性を有し、配列番号１６８のＤＶＤ重鎖アミノ酸配列及び配列番号１６９のＤＶＤ軽鎖アミノ酸配列を含む。

【００４９】

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

【００５０】

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

【００５１】

別の実施形態において、本発明の結合タンパク質は、第一及び第二のポリペプチド鎖を含む（前記第一のポリペプチド鎖は、第一のＶＤ１－（Ｘ１）$_n$－ＶＤ２－Ｃ－（Ｘ２）$_n$（ＶＤ１は、第一の親抗体又はその抗原結合部分から得られる第一の重鎖可変ドメインであり、ＶＤ２は、第二の親抗体又はその抗原結合部分から得られる第二の重鎖可変ドメインであり、Ｃは、重鎖定常ドメインであり、（Ｘ１）$_n$は、リンカーであり（但し、ＣＨ１ではない。）、前記（Ｘ１）$_n$は、存在し又は不存在であり、及び（Ｘ２）$_n$は、Ｆｃ領域であり、前記（Ｘ２）$_n$は、存在し又は不存在である。）を含み、並びに前記第二のポリペプチド鎖は、第二のＶＤ１－（Ｘ１）$_n$－ＶＤ２－Ｃ－（Ｘ２）$_n$（ＶＤ１は、第一の親抗体又はその抗原結合部分から得られる第一の軽鎖可変ドメインであり、ＶＤ２は、第二の親抗体又はその抗原結合部分から得られる第二の軽鎖可変ドメインであり、Ｃは、軽鎖定常ドメインであり、（Ｘ１）$_n$は、リンカーであり（但し、ＣＨ１ではない。）、前記（Ｘ１）$_n$は、存在し又は不存在であり、及び（Ｘ２）$_n$は、Ｆｃ領域を含まず、前記（Ｘ２）$_n$は、存在し又は不存在である。）を含む。）。別の実施形態において、結合タンパク質は２つの第一のポリペプチド鎖及び２つの第二のポリペプチド鎖を含む。さらに別の実施形態において、（Ｘ２）$_n$は、第二のポリペプチドに存在しない。さらに別の実施形態において、Ｆｃ領域は、第一のポリペプチド中に存在する場合、固有配列Ｆｃ領域及び変形物配列Ｆｃ領域からなる群から選択される。さらに別の実施形態において、Ｆｃ領域は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ、ＩｇＭ、ＩｇＥ又はＩｇＤから得られるＦｃ領域からなる群から選択される。

【００５２】

別の実施形態において、本発明の結合タンパク質は、４つのポリペプチド鎖を含む２つの抗原を結合することができるＤＶＤ－Ｉｇである（第一及び第三のポリペプチド鎖は、ＶＤ１－（Ｘ１）$_n$－ＶＤ２－Ｃ－（Ｘ２）$_n$（ＶＤ１は、第一の親抗体又はその抗原結合部分から得られる第一の重鎖可変ドメインであり、ＶＤ２は、第二の親抗体又はその抗

原結合部分から得られる第二の重鎖可変ドメインであり、Ｃは、重鎖定常ドメインであり、（Ｘ１）$_n$は、リンカーであり（但し、ＣＨ１ではない。）、前記（Ｘ１）$_n$は、存在し又は不存在であり、及び（Ｘ２）$_n$は、Ｆｃ領域であり、前記（Ｘ２）$_n$は、存在し又は不存在である。）を含み、並びに第二及び第四のポリペプチド鎖は、ＶＤ１－（Ｘ１）$_n$－ＶＤ２－Ｃ－（Ｘ２）$_n$（ＶＤ１は、第一の親抗体又はその抗原結合部分から得られる第一の軽鎖可変ドメインであり、ＶＤ２は、第二の親抗体又はその抗原結合部分から得られる第二の軽鎖可変ドメインであり、Ｃは、軽鎖定常ドメインであり、（Ｘ１）$_n$は、リンカーであり（但し、ＣＨ１ではない。）、前記（Ｘ１）$_n$は、存在し又は不存在であり、及び（Ｘ２）$_n$は、Ｆｃ領域を含まず、前記（Ｘ２）$_n$は、存在し又は不存在である。）を含む。）。

【００５３】

本発明は、親抗体を予め選択することによって、ＤＶＤ－Ｉｇ結合タンパク質を作製する方法を提供する。一実施形態において、ａ）第一の抗原を結合することができる第一の親抗体又はその抗原結合部分を取得する工程；ｂ）第二の抗原を結合することができる第二の親抗体又はその抗原結合部分を取得する工程；ｃ）ＶＤ１－（Ｘ１）$_n$－ＶＤ２－Ｃ－（Ｘ２）$_n$（ＶＤ１は、前記第一の親抗体又はその抗原結合部分から得られる第一の重鎖可変ドメインであり、ＶＤ２は、前記第二の親抗体又はその抗原結合部分から得られる第二の重鎖可変ドメインであり、Ｃは、重鎖定常ドメインであり、（Ｘ１）$_n$は、リンカーであり（但し、ＣＨ１ではない。）、前記（Ｘ１）$_n$は、存在し又は不存在であり、及び（Ｘ２）$_n$は、Ｆｃ領域であり、前記（Ｘ２）$_n$は、存在し又は不存在である。）を含む第一及び第三のポリペプチド鎖を構築する工程；ｄ）ＶＤ１－（Ｘ１）$_n$－ＶＤ２－Ｃ－（Ｘ２）$_n$（ＶＤ１は、前記第一の親抗体又はその抗原結合部分から得られる第一の軽鎖可変ドメインであり、ＶＤ２は、前記第二の親抗体又はその抗原結合部分から得られる第二の軽鎖可変ドメインであり、Ｃは、軽鎖定常ドメインであり、（Ｘ１）$_n$は、リンカーであり（但し、ＣＨ１ではない。）、前記（Ｘ１）$_n$は、存在し又は不存在であり、及び（Ｘ２）$_n$はＦｃ領域を含まず、前記（Ｘ２）$_n$は、存在し又は不存在である。）を含む第二及び第四のポリペプチド鎖を構築する工程；ｅ）前記第一及び前記第二の抗原を結合することができる二重可変ドメイン免疫グロブリンが作製されるように、前記第一、第二、第三及び第四のポリペプチド鎖を発現させる工程；を含む、２つの抗原を結合することができる二重可変ドメイン免疫グロブリンを作製する方法。

【００５４】

さらに別の実施形態において、本発明は、ａ）第一の抗原を結合することができ、及び二重可変ドメイン免疫グロブリンによって呈される少なくとも１つの所望の特性を有する第一の親抗体又はその抗原結合部分を取得する工程；ｂ）第二の抗原を結合することができ、及び二重可変ドメイン免疫グロブリンによって呈される少なくとも１つの所望の特性を有する第二の親抗体又はその抗原結合部分を取得する工程；ｃ）ＶＤ１－（Ｘ１）$_n$－ＶＤ２－Ｃ－（Ｘ２）$_n$（ＶＤ１は、前記第一の親抗体又はその抗原結合部分から得られる第一の重鎖可変ドメインであり、ＶＤ２は、前記第二の親抗体又はその抗原結合部分から得られる第二の重鎖可変ドメインであり、Ｃは、重鎖定常ドメインであり、（Ｘ１）$_n$は、リンカーであり（但し、ＣＨ１ではない。）、前記（Ｘ１）$_n$は、存在し又は不存在であり、及び（Ｘ２）$_n$は、Ｆｃ領域であり、前記（Ｘ２）$_n$は、存在し又は不存在である。）を含む第一及び第三のポリペプチド鎖を構築する工程；ｄ）ＶＤ１－（Ｘ１）$_n$－ＶＤ２－Ｃ－（Ｘ２）$_n$（ＶＤ１は、前記第一の親抗体又はその抗原結合部分から得られる第一の軽鎖可変ドメインであり、ＶＤ２は、前記第二の親抗体又はその抗原結合部分から得られる第二の軽鎖可変ドメインであり、Ｃは、軽い鎖定常ドメインであり、（Ｘ１）$_n$は、リンカーであり（但し、ＣＨ１ではない。）、前記（Ｘ１）$_n$は、存在し又は不存在であり、及び（Ｘ２）$_n$は、Ｆｃ領域を含まず、前記（Ｘ２）$_n$は、存在し又は不存在である。）を含む第二及び第四のポリペプチド鎖を構築する工程；ｅ）所望の特性を有し、前記第一及び前記第二の抗原を結合することができる二重可変ドメイン免疫グロブリンが作製されるように、前記第一、第二、第三及び第四のポリペプチド鎖を発現させる工程

；を含む、所望の特性を有し、２つの抗原を結合することができる二重可変ドメイン免疫グロブリンを作製する方法を提供する。

【００５５】

一実施形態において、本明細書に開示されている第一及び第二のポリペプチド鎖のＶＤ１は、同じ親抗体又はその抗原結合部分から得られる。別の実施形態において、本明細書に開示されている第一及び第二のポリペプチド鎖のＶＤ１は、異なる親抗体又はその抗原結合部分から得られる。別の実施形態において、本明細書に開示されている第一及び第二のポリペプチド鎖のＶＤ２は、同じ親抗体又はその抗原結合部分から得られる。別の実施形態において、本明細書に開示されている第一及び第二のポリペプチド鎖のＶＤ２は、異なる親抗体又はその抗原結合部分から得られる。

【００５６】

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

【００５７】

一実施形態において、第一の親抗体又はその抗原結合部分は第一の抗原を結合し、第二の親抗体又はその抗原結合部分は第二の抗原を結合する。特定の実施形態において、第一及び第二の抗原は同じ抗原である。別の実施形態において、親抗体は同じ抗原上の異なるエピトープを結合する。別の実施形態において、第一及び第二の抗原は異なる抗原である。別の実施形態において、第一の親抗体又はその抗原結合部分は、第二の親抗体又はその抗原結合部分が第二の抗原を結合する強度とは異なる強度で第一の抗原を結合する。さらに別の実施形態において、第一の親抗体又はその抗原結合部分は、第二の親抗体又はその抗原結合部分が第二の抗原を結合する親和性とは異なる親和性で第一の抗原を結合する。

【００５８】

別の実施形態において、第一の親抗体又はその抗原結合部分及び第二の親抗体又はその抗原結合部分は、ヒト抗体、ＣＤＲ移植抗体及びヒト化抗体からなる群から選択される。一実施形態において、抗原結合部分は、Ｆａｂ断片、Ｆ（ａｂ’）$_2$断片（ヒンジ領域において、ジスルフィド架橋によって連結された２つのＦａｂ断片を含む二価断片）、ＶＨ及びＣＨ１ドメインからなるＦｄ断片、抗体の単一アームのＶＬ及びＶＨドメインからなるＦｖ断片、ｄＡｂ断片、単離された相補性決定領域（ＣＤＲ）、一本鎖抗体及びダイアボディからなる群から選択される。

【００５９】

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

明細書に記載されている多価及び／又は多重特異的結合タンパク質は、これらの特性の１つ又はそれ以上の改善を示し得る。さらに、本明細書に記載されているように、多価結合タンパク質として構築された場合、親抗体は、これらの特性の何れか１つ又はそれ以上を欠如し得るが、それらを付与され得る。

【００６０】

別の実施形態において、本発明の結合タンパク質は、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、少なくとも約$10^{2}M^{-1}s^{-1}$；少なくとも約$10^{3}M^{-1}s^{-1}$；少なくとも約$10^{4}M^{-1}s^{-1}$；少なくとも約$10^{5}M^{-1}s^{-1}$；及び少なくとも約$10^{6}M^{-1}s^{-1}$からなる群から選択される、１つ又はそれ以上の標的へのオン速度定数（K_{on}）を有する。一実施形態、本発明の結合タンパク質は、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、$10^{2}M^{-1}s^{-1}$と$10^{3}M^{-1}s^{-1}$の間、$10^{3}M^{-1}s^{-1}$と$10^{4}M^{-1}s^{-1}$の間、$10^{4}M^{-1}s^{-1}$と$10^{5}M^{-1}s^{-1}$の間、又は$10^{5}M^{-1}s^{-1}$と$10^{6}M^{-1}s^{-1}$の間の、１つ又はそれ以上の標的に対するオン速度定数（K_{on}）を有する。

【００６１】

別の実施形態において、結合タンパク質は、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約$10^{-3}s^{-1}$；最大約$10^{-4}s^{-1}$；最大約$10^{-5}s^{-1}$；及び最大約$10^{-6}s^{-1}$からなる群から選択されるからなる群から選択される、１つ又はそれ以上の標的に対するオフ速度定数（K_{off}）を有する。一実施形態において、本発明の結合タンパク質は、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、$10^{-3}s^{-1}$から$10^{-4}s^{-1}$の、$10^{-4}s^{-1}$から$10^{-5}s^{-1}$の、又は$10^{-5}s^{-1}$から$10^{-6}s^{-1}$の、１つ又はそれ以上の標的へのオフ速度定数（K_{off}）を有する。

【００６２】

別の実施形態において、結合タンパク質は、最大約$10^{-7}M$；最大約$10^{-8}M$；最大約$10^{-9}M$；最大約$10^{-10}M$；最大約$10^{-11}M$；最大約$10^{-12}M$及び最大$10^{-13}M$からなる群から選択される、１つ又はそれ以上の標的への解離定数（K_{D}）を有する。一実施形態において、本発明の結合タンパク質は、$10^{-7}M$から$10^{-8}M$の；$10^{-8}M$から$10^{-9}M$の；$10^{-9}M$から$10^{-10}M$の；$10^{-10}M$から$10^{-11}M$の；$10^{-11}M$から$10^{-12}M$の；又は$10^{-12}M$から$10^{-13}M$の、その標的への解離定数（K_{D}）を有する。

【００６３】

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

【００６４】

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

【００６５】

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

【００６６】

本発明の一態様は、本明細書に開示されている結合タンパク質の何れか１つをコードする単離された核酸に関する。さらなる実施形態は、本明細書に開示されている単離された核酸を含むベクターを提供し、前記ベクターは、ｐｃＤＮＡ；ｐＴＴ（Ｄｕｒｏｃｈｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　２００２，Ｖｏｌ３０，Ｎｏ．２）；ｐＴＴ３（さらなる多重クローニング部位を有するｐＴＴ；ｐＥＦＢＯＳ（Ｍｉｚｕｓｈｉｍａ，Ｓ．　ａｎｄ　Ｎａｇａｔａ，Ｓ．，（１９９０）　Ｎｕｃｌｅｉｃ　ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｖｏｌ１８，Ｎｏ．１７）；ｐＢＶ；ｐＪＶ；ｐｃＤＮＡ３．１ＴＯＰＯ、ｐＥＦ６ＴＯＰＯ及びｐＢＪからなる群から選択される。一実施形態において、ベクターは、米国特許出願６１／０２１，２８２号に開示されているベクターである。

【００６７】

別の態様において、宿主細胞は、本明細書に開示されたベクターで形質転換される。一実施形態において、宿主細胞は原核細胞である。別の実施形態において、宿主細胞はイー・コリ（Ｅ．Ｃｏｌｉ）である。関連する実施形態において、宿主細胞は真核細胞である。別の実施形態において、真核細胞は、原生生物細胞、動物細胞、植物細胞及び真菌細胞からなる群から選択される。さらに別の実施形態において、宿主細胞は、ＣＨＯ、ＣＯＳ；ＮＳ０、ＳＰ２、ＰＥＲ．Ｃ６を含む（但し、これらに限定されない。）哺乳動物細胞；又はサッカロミセス・セレビシアエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）などの真菌細胞；又はＳｆ９などの昆虫細胞である。

【００６８】

一実施形態において、例えば、異なる特異性を有する２つ又はそれ以上のＤＶＤ－Ｉｇは、単一の組換え宿主細胞中で産生される。例えば、抗体の混合物の発現は、Ｏｌｉｇｏｃｌｏｎｉｃｓ™と称されている、（Ｍｅｒｕｓ　Ｂ．Ｖ．，　Ｔｈｅ　Ｎｅｔｈｅｒｌａｎｄｓ）米国特許第７，２６２，０２８号；米国特許第７，４２９，４８６号。

【００６９】

本発明の別の態様は、結合タンパク質を産生するのに十分な条件下で、同じく本明細書に開示されている宿主細胞の何れか１つを培地中において培養することを含む、本明細書に開示されている結合タンパク質を生産する方法を提供する。一実施形態において、この方法によって生産された結合タンパク質の５０％から７５％が、二重特異的四価結合タンパク質である。特定の実施形態において、この方法によって生産された結合タンパク質の７５％から９０％が、二重特異的四価結合タンパク質である。特定の実施形態において、生産された結合タンパク質の９０％から９５％が、二重特異的四価結合タンパク質である。

【００７０】

一実施形態は、結合タンパク質の放出のための組成物を提供し、組成物は、製剤を含み、該製剤は、本明細書に開示されている結晶化された結合タンパク質及び成分並びに少なくとも１つのポリマー性担体を含む。例えば、ポリマー性担体は、：ポリ（アクリル酸）、ポリ（シアノアクリラート）、ポリ（アミノ酸）、ポリ（無水物）、ポリ（デプシペプチド）、ポリ（エステル）、ポリ（乳酸）、ポリ（乳酸グリコール酸共重合体）又はＰＬＧＡ、ポリ（ｂ－ヒドロキシブチラート）、ポリ（カプロラクトン）、ポリ（ジオキサノン）；ポリ（エチレングリコール）、ポリ（（ヒドロキシプロピル）メタクリルアミド、ポリ［（オルガノ）ホスファゼン］、ポリ（オルトエステル）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリ（ビニルピロリドン）、無水マレイン酸－アルキルビニルエーテル共重合体、プルロニックポリオール、アルブミン、アルギナート、セルロース及びセルロース誘導体、コラーゲン、フィブリン、ゼラチン、ヒアルロン酸、オリゴ糖、グリカミノグリカン、硫酸化された多糖、これらの混合物及び共重合体からなる群の１つ又はそれ以上から選択されるポリマーである。例えば、成分は、アルブミン、ショ糖、トレハロース、ラクチトール、ゼラチン、ヒドロキシプロピル－β－シクロデキストリン、メトキシポリエチレングリコール及びポリエチレングリコールからなる群から選択される。別の実施形態は、本明細書に開示された組成物の有効量を哺乳動物に投与する工程を含む哺乳動物を治療する方

法を提供する。

【００７１】

本発明は、本明細書に開示された結合タンパク質と、及び医薬として許容される担体とを含む医薬組成物も提供する。さらなる実施形態において、医薬組成物は、疾患を治療するための少なくとも１つの追加の治療剤を含む。例えば、追加の薬剤は、治療剤、画像化剤、細胞毒性剤、血管新生阻害剤（抗ＶＥＧＦ抗体又はＶＥＧＦ－トラップが含まれるが、これらに限定されない。）、キナーゼ阻害剤（ＫＤＲ及びＴＩＥ－２阻害剤が含まれるが、これらに限定されない。）、共刺激分子遮断剤（抗Ｂ７．１、抗Ｂ７．２、ＣＴＬＡ４－Ｉｇ、抗ＣＤ２０が含まれるが、これらに限定されない。）、接着分子遮断剤（抗ＬＦＡ－１抗体、抗Ｅ／Ｌセレクチン抗体、小分子阻害剤が含まれるが、これらに限定されない。）、抗サイトカイン抗体又はその機能的断片（抗ＩＬ－１８、抗ＴＮＦ及び抗ＩＬ－６／サイトカイン受容体抗体が含まれるが、これらに限定されない。）、メトトレキサート、シクロスポリン、ラパマイシン、ＦＫ５０６、検出可能な標識又はレポーター、ＴＮＦアンタゴニスト、抗リウマチ薬、筋肉弛緩剤、催眠薬、非ステロイド系抗炎症薬（ＮＳＡＩＤ）、鎮痛剤、麻酔、鎮静剤、局所麻酔、神経筋肉遮断剤、抗微生物剤、抗乾癬剤、コルチコステロイド、アナボリックステロイド、エリスロポエチン、免疫化、免疫グロブリン、免疫抑制剤、成長ホルモン、ホルモン置換薬、放射性薬剤、抗うつ剤、抗精神病薬、刺激物質、喘息薬、βアゴニスト、吸引用ステロイド、エピネフリン又は類縁体、サイトカイン及びサイトカインアンタゴニストからなる群から選択される。

【００７２】

別の態様において、本発明は、本明細書に開示されている結合タンパク質によって結合されることができる標的又は複数の標的が有害である疾患に罹患しているヒト対象を治療する方法であり、ヒト対象中の標的若しくは複数の標的の活性が阻害され、及び１つ若しくはそれ以上の症候が緩和され、又は治療が達成されるように、本明細書に開示されている結合タンパク質をヒト対象に投与することを含む、前記方法を提供する。例えば、疾患は、関節炎、骨関節炎、若年性慢性関節炎、化膿性関節炎、ライム関節炎、乾癬性関節炎、反応性関節炎、脊椎関節症、全身性紅斑性狼瘡、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、インシュリン依存性糖尿病、甲状腺炎、喘息、アレルギー性疾患、乾癬、皮膚炎、強皮症、移植片対宿主病、臓器移植拒絶、臓器移植に関連する急性又は慢性免疫疾患、サルコイドーシス、アテローム性動脈硬化症、播種性血管内凝固、川崎病、バセドウ病、ネフローゼ症候群、慢性疲労症候群、ウェゲナー肉芽腫症、ヘノッホ・シェーライン紫斑症、腎臓の顕微鏡的血管炎、慢性活動性肝炎、ブドウ膜炎、敗血症性ショック、毒素性ショック症候群、敗血症症候群、悪液質、感染性疾患、寄生性疾患、後天性免疫不全症候群、急性横断性脊髄炎、ハンチントン舞踏病、パーキンソン病、アルツハイマー病、発作、原発性胆汁性肝硬変、溶血性貧血、悪性腫瘍、心不全、心筋梗塞、アジソン病、孤発性の、多内分泌腺機能低下症候群Ｉ型及び多内分泌腺機能低下症候群ＩＩ型、シュミット症候群、成人（急性）呼吸促迫症候群、脱毛症、円形脱毛症、血清反応陰性関節症、関節症、ライター病、乾癬性関節症、潰瘍性大腸性関節症、腸疾患性滑膜炎、クラミジア、エルシニア及びサルモネラ関連関節症、脊椎関節症、アテローム性疾患／動脈硬化症、アトピー性アレルギー、自己免疫性水疱性疾患、尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、類天疱瘡、線状ＩｇＡ病、自己免疫性溶血性貧血、クームス陽性溶血性貧血、後天性悪性貧血、若年性悪性貧血、筋痛性脳炎／ロイヤルフリー病、慢性粘膜皮膚カンジダ症、巨細胞性動脈炎、原発性硬化性肝炎、突発性自己免疫性肝炎、後天性免疫不全症候群、後天性免疫不全症関連疾患、Ｂ型肝炎、Ｃ型肝炎、分類不能型免疫不全症（分類不能型原発性低γグロブリン血症）、拡張型心筋症、女性不妊症、卵巣機能不全、早期卵巣機能不全、繊維性肺疾患、突発性繊維化性肺胞炎、炎症後間質性肺疾患、間質性肺炎、結合組織疾患関連間質性肺疾患、混合性結合組織疾患関連肺疾患、全身性硬化症関連間質性肺疾患、関節リウマチ関連間質性肺疾患、全身性紅斑性狼瘡関連肺疾患、皮膚筋炎／多発性筋炎関連肺疾患、シェーグレン病関連肺疾患、強直性脊椎炎関連肺疾患、血管炎性びまん性肺疾患（ｖａｓｃｕｌｉｔｉｃ　ｄｉｆｆｕｓｅ　ｌｕｎｇ　ｄｉｓｅａｓｅ）、ヘモシデローシス関連肺疾患、薬物

によって誘導された間質性肺疾患、繊維症、放射性繊維症、閉塞性細気管支炎、慢性好酸球性肺炎、リンパ球浸潤性肺疾患、感染後間質性肺疾患、通風関節炎、自己免疫性肝炎、１型自己免疫性肝炎（古典的自己免疫性又はルポイド肝炎）、２型自己免疫性肝炎（抗ＬＫＭ抗体肝炎）、自己免疫媒介性低血糖症、黒色表皮腫を伴うＢ型インシュリン抵抗性、副甲状腺機能低下症、臓器移植に関連する急性免疫疾患、臓器移植に関連する慢性免疫疾患、変形性関節症、原発性硬化性胆管炎、１型乾癬、２型乾癬、特発性白血球減少症、自己免疫性好中球減少症、腎臓病ＮＯＳ、糸球体腎炎、腎臓の顕微鏡的血管炎、ライム病、円板状紅斑性狼瘡、男性不妊症特発性又はＮＯＳ、精子自己免疫、多発性硬化症（全てのサブタイプ）、交感性眼炎、結合組織疾患に続発する肺高血圧症、グッドパスチャー症候群、結節性多発動脈炎の肺症状、急性リウマチ熱、リウマチ性脊椎炎、スチル病、全身性硬化症、シェーグレン症候群、高安病／動脈炎、自己免疫性血小板減少症、特発性血小板減少症、自己免疫性甲状腺疾患、甲状腺機能亢進症、甲状腺腫自己免疫性甲状腺機能低下症（橋本病）、萎縮性自己免疫性甲状腺機能低下症、原発性粘液水腫（ｐｒｉｍａｒｙ ｍｙｘｏｅｄｅｍａ）、水晶体起因性ブドウ膜炎、原発性血管炎、白斑急性肝疾患、慢性肝疾患、アルコール性肝硬変、アルコール誘発性肝障害、胆汁うっ滞（ｃｈｏｌｅｏｓａｔａｔｉｓ）、特異体質性肝疾患、薬物誘発性肝炎、非アルコール性脂肪性肝炎、アレルギー及び喘息、Ｂ群連鎖球菌（ＧＢＳ）感染、精神障害（例えば、うつ病及び統合失調症）、Ｔｈ２型及びＴｈ１型によって媒介される疾病、急性及び慢性疼痛（疼痛の様々な形態）、並びに、肺癌、乳癌、胃癌、膀胱癌、大腸癌、膵臓癌、卵巣癌、前立腺癌及び直腸癌及び造血性悪性病変（白血病及びリンパ腫）などの癌、無βリポタンパク質血症、先端チアノーゼ、急性及び慢性寄生性又は感染性プロセス、急性白血病、急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、急性又は慢性細菌感染、急性膵炎、急性腎不全、腺癌、心房（ａｅｒｉａｌ）異所性拍動、ＡＩＤＳ認知症複合、アルコール誘発性肝炎、アレルギー性結膜炎、アレルギー性接触性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、同種移植拒絶、α－１－アンチトリプシン欠乏症、筋萎縮性側索硬化症、貧血、狭心症、前角細胞変性、抗ｃｄ３治療、抗リン脂質症候群、抗受容体過敏症反応（ａｎｔｉ－ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｈｙｐｅｒｓｅｎｓｉｔｉｖｉｔｙ ｒｅａｃｔｉｏｎｓ，）、大動脈及び末梢動脈瘤、大動脈解離、動脈性高血圧、動脈硬化症、動静脈瘻、運動失調、心房細動（持続的又は発作性）、心房粗動、房室ブロック、Ｂ細胞リンパ腫、骨移植拒絶、骨髄移植（ＢＭＴ）拒絶、脚ブロック、バーキットリンパ腫、火傷、心不整脈、心機能不全症候群（ｃａｒｄｉａｃ ｓｔｕｎ ｓｙｎｄｒｏｍｅ）、心臓腫瘍、心筋症、心肺バイパス炎症反応、軟骨移植拒絶、小脳皮質変性、小脳疾患、無秩序な又は多巣性心房頻脈、化学療法関連疾患、慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）、慢性アルコール症、慢性炎症性病変、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、慢性サリチル酸中毒、結腸直腸癌、うっ血性心不全、結膜炎、接触性皮膚炎、肺性心、冠動脈疾患、クロイツフェルトーヤコブ病、培養陰性敗血症、嚢胞性繊維症、サイトカイン療法関連疾患、ボクサー脳、脱髄性疾患、デング出血熱、皮膚炎、皮膚科学的症状、糖尿病、真性糖尿病、糖尿病性動脈硬化疾患、瀰漫性レビー小体病、拡張型うっ血性心筋症、大脳基底核の疾患、中年のダウン症候群、中枢神経系ドーパミン受容体を遮断する薬物によって誘発された薬物誘発性運動障害、薬物感受性、湿疹、脳脊髄炎、心内膜炎、内分泌疾患、喉頭蓋炎、エプスタインーバーウイルス感染、紅痛症、錐体外路及び小脳疾患、家族性血球貪食性リンパ組織球症（ｆａｍｉｌｉａｌ ｈｅｍａｔｏｐｈａｇｏｃｙｔｉｃ ｌｙｍｐｈｏｈｉｓｔｉｏｃｙｔｏｓｉｓ）、致死的胸腺移植拒絶、フリードライヒ失調症、機能的末梢動脈疾患、真菌性敗血症、ガス壊疽、胃潰瘍、糸球体腎炎、何れかの臓器又は組織の移植片拒絶、グラム陰性敗血症、グラム陽性敗血症、細胞内生物に起因する肉芽腫、有毛細胞白血病、ハラーホルデン・スパッツ病、橋本甲状腺炎、枯草熱、心臓移植拒絶、血色素症、血液透析、溶血性尿毒症症候群／血栓溶解血小板減少紫斑病、出血、肝炎（Ａ型）、ヒス束不整脈、ＨＩＶ感染／ＨＩＶ神経障害、ホジキン病、運動過剰性運動障害、過敏症反応、過敏性肺炎、高血圧、運動低下性運動障害、視床下部－下垂体－副腎皮質系評価、特発性アジソン病、特発性肺繊維症、抗体媒介性細胞傷害、無力症、乳児脊髄性筋萎縮症、大動脈の炎症、Ａ

型インフルエンザ、電離放射線曝露、虹彩毛様体炎／ブドウ膜炎／視神経炎、虚血再灌流障害、虚血性発作、若年性関節リウマチ、若年性脊髄性筋萎縮症、カポジ肉腫、腎移植拒絶、レジオネラ、リーシュマニア症、ハンセン病、皮質脊髄系の病変、脂肪血症（ｌｉｐｅｄｅｍａ）、肝臓移植拒絶、リンパ浮腫（ｌｙｍｐｈｅｄｅｒｍａ）、マラリア、悪性リンパ腫、悪性組織球増殖症、悪性黒色腫、髄膜炎、髄膜炎菌血症（ｍｅｎｉｎｇｏｃｏｃｃｅｍｉａ）、代謝性／特発性疾患、偏頭痛、ミトコンドリア多系疾患（ｍｉｔｏｃｈｏｎｄｒｉａｌ ｍｕｌｔｉ－ｓｙｓｔｅｍ ｄｉｓｏｒｄｅｒ）、混合性結合組織病、モノクローナル高ガンマグロブリン血症、多発性骨髄腫、多系統変性（メンセル・デジェリーヌ－トーマス シャイ－ドレーガー及びマシャド－ジョセフ）、重症筋無力症、マイコバクテリウム・アビウム・イントラセルラーレ、マイコバクテリウム・チュバキュロシス、骨髄異形成症候群、心筋梗塞、心筋虚血疾患、上咽頭癌、新生児慢性肺疾患、腎炎、ネフローゼ、神経変性疾患、神経原性Ｉ筋萎縮、好中球減少性発熱、非ホジキンリンパ腫、腹部大動脈及びその分枝の閉塞、閉塞性動脈疾患、ｏｋｔ３療法、精巣炎／精巣上体炎、精巣炎／精管復元術処置、臓器肥大、骨粗鬆症、膵臓移植拒絶、膵癌、腫瘍随伴性症候群／悪性腫瘍の高カルシウム血症、副甲状腺移植拒絶、骨盤内炎症性疾患、通年性鼻炎、心膜疾患、末梢性アテローム性動脈硬化疾患、末梢血管疾患、腹膜炎、悪性貧血、ニューモシスチス・カリニ肺炎、肺炎、ＰＯＥＭＳ症候群（多発神経炎、臓器肥大、内分泌疾患、単クローン性γグロブリン血症及び皮膚変化症候群（ｓｋｉｎ ｃｈａｎｇｅｓ ｓｙｎｄｒｏｍｅ））、灌流後症候群（ｐｏｓｔ ｐｅｒｆｕｓｉｏｎ ｓｙｎｄｒｏｍｅ）、ポンプ後症候群（ｐｏｓｔ ｐｕｍｐ ｓｙｎｄｒｏｍｅ）、心筋梗塞後開心術症候群、子癇前症、進行性核上性麻痺、原発性肺高血圧、放射線療法、レイノー現象及び病、レイノー病、レフサム病、規則的なＱＲＳ幅の狭い頻脈症（ｒｅｇｕｌａｒ ｎａｒｒｏｗ ＱＲＳ ｔａｃｈｙｃａｒｄｉａ）、腎血管性高血圧、再灌流障害、拘束型心筋症、肉腫、強皮症、老年性舞踏病、レビー小体型の老年性認知症、血清反応陰性関節症、ショック、鎌形赤血球貧血症、皮膚同種異系移植拒絶、皮膚変化症候群、小腸移植拒絶、固形腫瘍、固有不整脈（ｓｐｅｃｉｆｉｃ ａｒｒｙｔｈｍｉａｓ）、脊髄性運動失調、脊髄小脳変性、連鎖球菌性筋炎、小脳の構造的病変、亜急性硬化性全脳炎、失神、心血管系の梅毒、全身性アナフィラキシー、全身性炎症反応症候群、全身性発症若年性関節リウマチ、Ｔ細胞又はＦＡＢＡＬＬ、毛細血管拡張症、閉塞性血栓血管炎、血小板減少症、毒性、移植、外傷／出血、ＩＩＩ型過敏症反応、ＩＶ型過敏症、不安定狭心症、尿毒症、尿路性敗血症、じんましん、心臓弁膜症、静脈瘤、血管炎、静脈疾患、静脈血栓症、心室細動、ウイルス及び真菌感染、ウイルス性脳炎（ｖｉｔａｌ ｅｎｃｅｐｈａｌｉｔｉｓ）／無菌性髄膜炎、ウイルス（ｖｉｔａｌ）関連血球貪食症候群、ウェルニッケ－コルサコフ症候群、ウィルソン病、何れかの臓器又は組織の異種移植拒絶からなる群から選択される。

【００７３】

一実施形態において、本発明の組成物及び方法を用いて治療又は診断することができる疾病には、乳癌、大腸癌、直腸癌、肺癌、口腔咽頭癌、下咽頭癌、食道癌、胃癌、膵臓癌、肝臓癌、胆嚢及び胆管癌、小腸癌、尿路癌（腎臓、膀胱及び尿路上皮を含む。）、雌性生殖路（子宮頚部、子宮、卵巣並びに絨毛癌及び妊娠性絨毛性疾患を含む。）、雄性生殖路（前立腺、精嚢、精巣及び胚細胞腫瘍を含む。）、内分泌腺癌（甲状腺、副腎及び下垂体を含む。）及び皮膚癌並びに血管腫、悪性黒色腫、肉腫（骨及び軟組織から生じる肉腫並びにカポジ肉腫を含む。）、脳、神経、眼の腫瘍及び髄膜（星状膠細胞腫、神経膠腫、神経膠芽腫、網膜芽細胞腫、神経腫、神経芽細胞腫、シュワン細胞腫及び髄膜腫を含む。）、白血病及びリンパ腫（ホジキン及び非ホジキンリンパ腫の両方）などの造血系悪性腫瘍から生じる固形腫瘍などの、原発性及び転移性癌が含まれるが、これらに限定されない。

【００７４】

本発明のＤＶＤ－Ｉｇは、以下の疾病：急性冠不全症候群、急性突発性多発性神経炎、急性炎症性脱髄性多発性神経障害、急性虚血、成体スチル病、円形脱毛症、アナフィラキシー、抗リン脂質抗体症候群、再生不良貧血、動脈硬化症、アトピー性湿疹、アトピー性

皮膚炎、自己免疫性皮膚炎、連鎖球菌感染を伴う自己免疫性疾患、自己免疫性腸疾患、自己免疫性難聴、自己免疫性リンパ増殖性症候群（ＡＬＰＳ）、自己免疫性心筋炎、自己免疫性血小板減少症（ＡＩＴＰ）、自己免疫性早発閉経、眼瞼炎、気管支拡張症、水疱性類天疱瘡、心血管疾患、劇症型抗リン脂質抗体症候群、セリアック病、頚部脊椎症、慢性虚血、瘢痕性類天疱瘡、多発性硬化症に対するリスクを有する最初のエピソードからなる症候群（ｃｉｓ；ｃｌｉｎｉｃａｌｌｙ　ｉｓｏｌａｔｅｄ　ｓｙｎｄｒｏｍｅ）、結膜炎、小児発症精神疾患、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、涙嚢炎、皮膚筋炎、糖尿病性網膜症、真性糖尿病、椎間板ヘルニア、椎間板脱出、薬物によって誘導される免疫溶血性貧血、心内膜炎、子宮内膜炎、眼内炎、上強膜炎、多型性紅斑、重症型多型性紅斑、妊娠性類天疱瘡、ギランバレー症候群（ＧＢＳ）、枯草熱、ヒューズ症候群、突発性パーキンソン病、突発性間質性肺炎、ＩｇＥ媒介性アレルギー、免疫溶血性貧血、封入体筋炎、感染性眼性炎症疾患、炎症性脱髄性疾患、炎症性心臓病、炎症性腎臓病、ＩＰＦ／ＵＩＰ、虹彩炎、角膜炎、乾性角結膜炎、クスマウル病又はクスマウル・マイヤー病、ランドリー麻痺、ランゲルハンス細胞組織球増殖症、網状皮斑、黄斑変性、悪性腫瘍、顕微鏡的多発性血管炎、ベフテレフ病、運動神経疾患、粘膜類天疱瘡、多発性臓器不全、重症筋無力症、骨髄異形成症候群、心筋炎、神経根疾患、神経障害、非Ａ非Ｂ型肝炎、視神経炎、骨溶解、卵巣癌、少関節性ＪＲＡ、末梢動脈閉塞疾患（ＰＡＯＤ）、末梢血管疾患（ＰＶＤ）、末梢動脈疾患（ＰＡＤ）、静脈炎、結節性多発性動脈炎（又は結節性動脈周囲炎）、多発性軟骨炎、リウマチ性多発性筋痛、白毛症、多関節性ＪＲＡ、多内分泌欠乏症候群、多発性筋炎、リウマチ性多発性筋痛（ＰＭＲ）、ポンプ後症候群（ｐｏｓｔ－ｐｕｍｐ）症候群、原発性パーキンソン病、前立腺及び直腸癌及び造血系の悪性腫瘍（白血病及びリンパ腫）、前立腺炎、純赤血球形成不全、原発性副腎不全、再発性視神経脊髄炎、再狭窄、リウマチ性心疾患、ＳＡＰＨＯ（滑膜炎、ざ瘡、膿疱、骨肥大症及び骨炎）、強皮症、続発性アミロイドーシス、ショック肺、強膜炎、坐骨神経痛、続発性副腎不全、シリコーン関連結合組織疾患、スネドン－ウィルキンソン皮膚病、強直性脊椎炎、スティーブンス・ジョンソン症候群（ＳＪＳ）、全身性炎症性応答症候群、側頭動脈炎、トキソプラズマ網膜炎、毒性表皮剥離症、横断性脊髄炎、ＴＲＡＰＳ（腫瘍壊死因子受容体１型アレルギー性反応）、ＩＩ型糖尿病、じんましん、通常型間質性肺炎（ＵＩＰ）、血管炎、春季カタル、ウイルス性網膜炎、フォークト・コヤナギ・ハラダ症候群（ＶＫＨ症候群）、滲出型黄斑変性、創傷治癒、エルシニア及びサルモネラ関連関節症の１つ又はそれ以上も治療し得る。

【００７５】

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

【００７６】

別の態様において、本発明は、本明細書に論述されているような第二の因子の投与前、投与と同時又は投与後に、本明細書に開示されている結合タンパク質の何れか１つを投与する工程を含む、疾患に罹患している患者を治療する方法を提供する。特定の実施形態において、第二の因子は、ブデノシド、上皮成長因子、コルチコステロイド、シクロスポリン、スルファサラジン、アミノサリチラート、６－メルカプトプリン、アザチオプリン、メトロニダゾール、リポキシゲナーゼ阻害剤、メサラミン、オルサラジン、バルサラジド、抗酸化剤、トロンボキサン阻害剤、ＩＬ－１受容体アンタゴニスト、抗ＩＬ－１βモノクローナル抗体、抗ＩＬ－６モノクローナル抗体、成長因子、エラスターゼ阻害剤、ピリジニル－イミダゾール化合物、ＴＮＦ、ＬＴ、ＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－８、ＩＬ－１２、ＩＬ－１３、ＩＬ－１５、ＩＬ－１６、ＩＬ－１８、ＩＬ－２３、ＥＭＡＰ－Ｅ、ＧＭ－ＣＳＦ、ＦＧＦ及びＰＤＧＦの抗体又はアゴニスト、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ－１９、ＣＤ２５、ＣＤ２８、ＣＤ３０、ＣＤ４０、ＣＤ４５、ＣＤ６９、ＣＤ９０又はこれらのリガンドの抗体、メトトレキサート、シクロスポリン、ＦＫ５０６、ラパマイシン、ミコフェノラート・モフェチル、レフルノミド、ＮＳ

ＡＩＤ、イブプロフェン、コルチコステロイド、プレドニゾロン、ホスホジエステラーゼ阻害剤、アデノシンアゴニスト、抗血栓剤、補体阻害剤、アドレナリン作動薬、ＩＲＡＫ、ＮＩＫ、ＩＫＫ、ｐ３８、ＭＡＰキナーゼ阻害剤、ＩＬ－１β変換酵素阻害剤、ＴＮＦα変換酵素阻害剤、Ｔ細胞シグナル伝達阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、スルファサラジン、アザチオプリン、６－メルカプトプリン、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、可溶性サイトカイン受容体、可溶性ｐ５５ＴＮＦ受容体、可溶性ｐ７５ＴＮＦ受容体、ｓＩＬ－１ＲＩ、ｓＩＬ－１ＲＩＩ、ｓＩＬ－６Ｒ、抗炎症性サイトカイン、ＩＬ－４、ＩＬ－１０、ＩＬ－１１、ＩＬ－１３及びＴＧＦβからなる群から選択される。特定の実施形態において、本明細書に開示されている医薬組成物は、非経口、皮下、筋肉内、静脈内、関節内、気管支内、腹腔内、嚢内、軟骨内、腔内（ｉｎｔｒａｃａｖｉｔｙ）、腔内（ｉｎｔｒａｃｅｌｉａｌ）、小脳内、脳室内、結腸内、頸管内、胃内、肝臓内、心筋内、骨内、骨盤内、心臓周囲内、腹腔内、胸膜内、前立腺内、肺内、結腸内、腎臓内、網膜内、脊髄内、滑膜内、胸腔内、子宮内、膀胱内、ボーラス、膣、直腸、口内、舌下、鼻内及び経皮から選択される少なくとも１つの様式によって、患者に投与される。

【００７７】

本発明の一態様は、本発明の少なくとも１つの結合タンパク質に対する少なくとも１つの抗イディオタイプ抗体を提供する。抗イディオタイプ抗体には、これらに限定されないが本発明の結合タンパク質中に取り込まれることができる、重鎖若しくは軽鎖又はそのリガンド結合部分の少なくとも１つの相補性決定領域（ＣＤＲ）、重鎖又は軽鎖可変領域、重鎖又は軽鎖定常領域、フレームワーク領域又はその何れかの一部など、免疫グロブリン分子の少なくとも一部を含む何れかのタンパク質又はペプチド含有分子が含まれる。

【図面の簡単な説明】

【００７８】

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

【発明を実施するための形態】

【００７９】

発明の詳細な記述

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

【００８０】

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

【００８１】

一般的に、本明細書に記載されている細胞及び組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学並びにタンパク質及び核酸化学及びハイブリド形成に関連して使用される命名

法及びこれらの技術は、周知のものであり、本分野において一般的に使用されている。本発明の方法及び技術は、別段の記載がなければ、本分野において周知の慣用方法に従い、並びに本明細書を通じて引用及び論述されている様々な一般的参考文献及びより具体的な参考文献中に記載されているように、一般に実施される。酵素反応及び精製技術は、製造業者の仕様書に従って、本分野で一般的に遂行されているように、又は本明細書に記載されているように、実施される。本明細書に記載されている分析化学、合成有機化学及び医薬品化学及び薬化学に関して使用される命名法、並びに本明細書に記載されている分析化学、合成有機化学及び医薬品化学及び薬化学の実験室操作及び技術は、周知のものであり、本分野で一般的に使用されているものである。化学合成、化学分析、医薬の調製、調合、及び送達、及び患者の治療に対しては、標準的な技術が使用される。

【００８２】

本発明をさらに容易に理解し得るように、特定の用語を以下に定義する。

【００８３】

本明細書において使用される「ポリペプチド」という用語は、アミノ酸のあらゆるポリマー鎖を表す。「ペプチド」及び「タンパク質」という用語は、ポリペプチドという用語と互換的に使用され、同じく、アミノ酸のポリマー鎖を表す。「ポリペプチド」という用語は、固有又は人工のタンパク質、タンパク質断片及びタンパク質配列のポリペプチド類縁体を包含する。ポリペプチドは、単量体又は多量体であり得る。本明細書における「ポリペプチド」の使用は、文脈上反対の記載がなければ、ポリペプチド並びにその断片及び変形物（変形物の断片を含む。）を包含するものとする。抗原性ポリペプチドに関しては、ポリペプチドの断片は、ポリペプチドの少なくとも１つの連続するエピトープ又は非直線エピトープを含有してもよい。少なくとも１つのエピトープ断片の正確な境界は、本分野における通常の技術を用いて確認することができる。断片は、少なくとも約１０の連続するアミノ酸、少なくとも約１５の連続するアミノ酸又は少なくとも約２０の連続するアミノ酸など、少なくとも約５の連続するアミノ酸を含む。ポリペプチドの変形物は、本明細書に記載されているとおりである。

【００８４】

「単離されたタンパク質」又は「単離されたポリペプチド」という用語は、その由来起源又は由来源のために、その固有の状態において当該タンパク質又はポリペプチドとともに存在する天然に随伴される成分を伴わないタンパク質又はポリペプチドであり、同じ種に由来する他のタンパク質を実質的に含まず、異なる種から得られた細胞によって発現され、又は天然には存在しない。従って、化学的に合成されたポリペプチド、又はポリペプチドが本来由来する細胞とは異なる細胞系の中で合成されたポリペプチドは、本来付随しているその成分から「単離」されている。タンパク質は、本分野で周知のタンパク質精製技術を使用し、単離によって、本来付随している成分が実質的に存在しないようにすることもできる。

【００８５】

本明細書において使用される「回収する」という用語は、例えば、本分野で周知のタンパク質精製技術を使用して、単離によって、ポリペプチドなどの化学種を、本来付随する成分を実質的に含まないようにする過程を表す。

【００８６】

本明細書において使用される「生物学的活性」は、分子のあらゆる１つ又はそれ以上の固有の生物学的特性（インビボで見出されるように天然に存在するか、又は組換え手段によって提供若しくは可能にされるかどうかを問わない。）を表す。生物学的特性には、受容体を結合すること；細胞増殖の誘導、細胞増殖を阻害すること、他のサイトカインの誘導、アポトーシスの誘導及び酵素活性が含まれるが、これらに限定されない。生物学的活性には、Ｉｇ分子の活性も含まれる。

【００８７】

第二の化学種との抗体、タンパク質又はペプチドの相互作用に関して、本明細書において使用される「特異的結合」又は「特異的に結合する」という用語は、相互作用が、化学

種、例えば、抗体上の特定の構造（例えば、抗原決定基又はエピトープ）の存在に依存し、タンパク質一般ではなく、特異的なタンパク質構造を認識し、結合することを意味する。抗体がエピトープ「Ａ」に対して特異的であれば、標識された「Ａ」及び抗体を含有する反応中での、エピトープＡを含有する分子（すなわち、標識されていない遊離のＡ）の存在は、抗体に結合した、標識されたＡの量を減少させる。

【００８８】

本明細書において使用される「抗体」という用語は、４つのポリペプチド鎖（２つの重（Ｈ）鎖及び２つの軽（Ｌ）鎖）から構成されるあらゆる免疫グロブリン（Ｉｇ）分子又はＩｇ分子の本質的なエピトープ結合特性を保持した全ての機能的分子、変異体、変形物又はこれらの誘導体を広く表す。このような変異体、変形物又は誘導体抗体のフォーマットは、本分野において公知である。これらの非限定的な実施形態は、以下に論述されている。

【００８９】

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

【００９０】

「Ｆｃ領域」という用語は、無傷の抗体のパパイン消化によって生成され得る、免疫グロブリン重鎖のＣ末端領域を定義するために使用される。Ｆｃ領域は、固有配列のＦｃ領域又は変形物Ｆｃ領域であり得る。免疫グロブリンのＦｃ領域は、一般に、２つの定常ドメイン（ＣＨ２ドメイン及びＣＨ３ドメイン）を含み、任意にＣＨ４ドメインを含む。抗体エフェクター機能を変化させるために、Ｆｃ部分中のアミノ酸残基を置換することが、本分野において公知である（Ｗｉｎｔｅｒ，ｅｔ　ａｌ．米国特許第５，６４８，２６０号及び米国特許第５，６２４，８２１号）。抗体のＦｃ部分は、幾つかの重要なエフェクター機能、例えば、サイトカイン誘導、ＡＤＣＣ、食作用、補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）並びに抗体及び抗原－抗体複合体の半減期／排除速度を媒介する。幾つかの事例において、これらのエフェクター機能は、治療用抗体のために望ましいが、別の事例では、治療目的に応じて、必要でない場合があり得、又は有害である場合さえあり得る。ある種のヒトＩｇＧイソタイプ、特に、ＩｇＧ１及びＩｇＧ３は、それぞれ、ＦｃγＲ及び補体Ｃ１ｑへの結合を介して、ＡＤＣＣ及びＣＤＣを媒介する。新生児Ｆｃ受容体（ＦｃＲｎ）は、抗体の循環半減期を決定する重要な成分である。さらに別の実施形態において、少なくとも１つのアミノ酸残基は、抗体のエフェクター機能が変化されるように、抗体の定常領域、例えば、抗体のＦｃ領域において置換されている。免疫グロブリンの２つの同一の重鎖の二量体化は、ＣＨ３ドメインの二量体化によって媒介され、ヒンジ領域内のジスルフィド結合によって安定化される（Ｈｕｂｅｒ　ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ；２６４：４１５－２０；Ｔｈｉｅｓ　ｅｔ　ａｌ　１９９９　Ｊ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ；２９３：６７－７９．）。重鎖－重鎖ジスルフィド結合を防止するための、ヒンジ領域内のシステイン残基の変異は、ＣＨ３ドメインの二量体化（ｄｉｍｅｒａｔｉｏｎ）を不安定化させる。ＣＨ３二量体化にとって必要とされる残基が同定されている（Ｄａｌｌ’　Ａｃｑｕａ　１９９８　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　３７：９２６６－７３．）。従って、一価の半Ｉｇを生成することが可能である。興味深いことに、これらの一価の半Ｉｇ分子は、ＩｇＧ及

びＩｇＡ両サブクラスに対して、天然に見出されている（Ｓｅｌｉｇｍａｎ　１９７８　Ａｎｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　１２９：８５５－７０．　；Ｂｉｅｗｅｎｇａ　ｅｔ　ａｌ　１９８３　Ｃｌｉｎ　Ｅｘｐ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　５１：３９５－４００）。ＦｃＲｎ：ＩｇＦｃ領域の化学量論は、２：１であることが決定されており（Ｗｅｓｔ　ｅｔ　ａｌ．２０００　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　３９：９６９８－７０８）、半Ｆｃは、ＦｃＲｎ結合を媒介するのに十分である（Ｋｉｍ　ｅｔ　ａｌ　１９９４　Ｅｕｒ　Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ；２４：５４２－５４８．）。ＣＨ３二量体化にとって重要な残基がＣＨ３βシート構造の内部界面上に位置しているのに対して、ＦｃＲｎ結合に必要とされる領域は、ＣＨ２－ＣＨ３ドメインの外側界面に位置しているので、ＣＨ３ドメインの二量体化を崩壊させるための変異は、そのＦｃＲｎ結合に対して、より大きな悪影響を有さないかもしれない。しかしながら、半Ｉｇ分子は、通常の抗体よりサイズが小さいので、組織透過においてある種の利点を有し得る。一実施形態において、少なくとも１つのアミノ酸残基は、重鎖の二量体化が破壊されて、半ＤＶＤＩｇ分子をもたらすように、本発明の結合タンパク質の定常領域、例えば、Ｆｃ領域において置換されている。ＩｇＧの抗炎症活性は、ＩｇＧＦｃ断片のＮ結合型グリカンのシアル化に依存する。適切なＩｇＧ１Ｆｃ断片を作製することができ、これにより、大幅に増強された強度を有する完全な組換えシアル化ＩｇＧ１Ｆｃが作製され得るように、抗炎症活性のための正確なグリカンの必要性は決定されている（Ａｎｔｈｏｎｙ，Ｒ．Ｍ．，ｅｔ　ａｌ．，（２００８）Ｓｃｉｅｎｃｅ３２０：３７３－３７６）。

【００９１】

本明細書において使用される抗体の「抗原結合部分」（又は単に「抗体部分」）という用語は、抗原に特異的に結合する能力を保持する、抗体の１つ又はそれ以上の断片を表す。抗体の抗原結合機能は、完全長抗体の断片によって実行可能であることは示されている。このような抗体の実施形態は、二特異的、二重特異的又は多重特異的フォーマットでもあり得、２つ又はそれ以上の異なる抗原に特異的に結合する。抗体の「抗原結合部分」という用語に包含される結合断片の例には、（ｉ）Ｆａｂ断片（ＶＬ、ＶＨ、ＣＬ及びＣＨ１ドメインからなる一価断片）、（ｉｉ）Ｆ（ａｂ’）$_2$断片（ヒンジ領域において、ジスルフィド架橋によって連結された２つのＦａｂ断片を含む二価断片）、（ｉｉｉ）ＶＨ及びＣＨ１ドメインからなるＦｄ断片、（ｉｖ）抗体の単一アームのＶＬ及びＶＨドメインからなるＦｖ断片、（ｖ）単一の可変ドメインを含むｄＡｂ断片（Ｗａｒｄ　ｅｔ　ａｌ．（１９８９）　Ｎａｔｕｒｅ　３４１：５４４－５４６、Ｗｉｎｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，ＰＣＴ公開ＷＯ９０／０５１４４Ａ１、参照により、本明細書に組み込まれる。）及び（ｖｉ）単離された相補性決定領域（ＣＤＲ）が含まれる。さらに、Ｆｖ断片の２つのドメインであるＶＬ及びＶＨは別個の遺伝子によってコードされているが、これらは、ＶＬ及びＶＨ領域が対合して一価分子を形成している単一のタンパク質鎖として、これらの作製を可能とする合成リンカーによって、組み換え法を用いて連結することが可能である（一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）として知られている。例えば、Ｂｉｒｄ　ｅｔ　ａｌ．（１９８８）　Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４２：４２３－４２６；及びＨｕｓｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９８８）　Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．　ＵＳＡ　８５：５８７９－５８８３を参照）。このような一本鎖抗体も、抗体の「抗原結合部分」という用語に包含されるものとする。ダイアボディなどの一本鎖抗体の他の形態も包含される。ダイアボディは、ＶＨ及びＶＬドメインが単一のポリペプチド鎖上に発現されているが、同一鎖上にある２つのドメイン間での対合を可能とするには短すぎるリンカーを使用することにより、両ドメインを別の鎖の相補的ドメインと対合するように強制し、２つの抗原結合部位を作出する二価の二特異的抗体である（例えば、Ｈｏｌｌｉｇｅｒ，Ｐ．，ｅｔ　ａｌ．（１９９３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ９０：６４４４－６４４８；Ｐｏｌｊａｋ，Ｒ．Ｊ．，ｅｔ　ａｌ．（１９９４）Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ２：１１２１－１１２３を参照）。このような抗体結合部分は、本分野において公知である（Ｋｏｎｔｅｒｍａｎｎ　ａｎｄ　Ｄｕｂｅｌ　ｅｄｓ．，Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ（２００１）　Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ．Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ．７９０　ｐｐ．（Ｉ

ＳＢＮ　３－５４０－４１３５４－５）。さらに、一本鎖抗体も、相補的軽鎖ポリペプチドと一緒に、抗原結合領域の対を形成する直列Ｆｖセグメントの対を含む「直鎖抗体」（ＶＨ－ＣＨ１－ＶＨ－ＣＨ１）に含まれる（Ｚａｐａｔａ　ｅｔ　ａｌ．Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇ．８（１０）：１０５７－１０６２（１９９５）；及び米国特許第５，６４１，８７０号）。

【００９２】

本明細書を通じて、「多価結合タンパク質」という用語は、２つ又はそれ以上の抗原結合部位を含む結合タンパク質を表すために使用される。一実施形態において、多価結合タンパク質は、３つ又はそれ以上の抗原結合部位を有するように加工され、一般に、天然に存在しない抗体である。「多重特異的結合タンパク質」という用語は、２つ又はそれ以上の関連する標的又は無関係な標的に結合することが可能な結合タンパク質を表す。本発明の二重可変ドメイン（ＤＶＤ）結合タンパク質は、２つ又はそれ以上の抗原結合部位を含み、四価又は多価結合タンパク質である。ＤＶＤは、単一特異的であり得（すなわち、１つの抗原を結合することができる。）、又は多重特異的（すなわち、２つ又はそれ以上の抗原を結合することができる。）であり得る。２つの重鎖ＤＶＤポリペプチド及び２つの軽鎖ＤＶＤポリペプチドを含むＤＶＤ結合タンパク質は、ＤＶＤＩｇと表される。ＤＶＤＩｇの各半分は、重鎖ＤＶＤポリペプチド及び軽鎖ＤＶＤポリペプチド及び２つの抗原結合部位を含む。各結合部位は、重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含み、計６ＣＤＲが抗原結合部位当たりの抗原結合に関与する。

【００９３】

本明細書に使用される「二特異的抗体」という用語は、クアドローマ技術（Ｍｉｌｓｔｅｉｎ，Ｃ．　ａｎｄ　Ａ．Ｃ．　Ｃｕｅｌｌｏ，Ｎａｔｕｒｅ，１９８３．３０５（５９３４）：ｐ．５３７－４０参照）によって、２つの異なるモノクローナル抗体の化学的連結によって（Ｓｔａｅｒｚ，Ｕ．Ｄ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，１９８５．３１４（６０１２）：ｐ．６２８－３１参照）、又はノブ・イントゥ・ホール若しくはＦｃ領域中に変異を導入する類似のアプローチによって（Ｈｏｌｌｉｇｅｒ，Ｐ．，Ｔ．Ｐｒｏｓｐｅｒｏ，ａｎｄ　Ｇ．Ｗｉｎｔｅｒ，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ，１９９３．９０（１４）：ｐ．６４４４－８．１８参照）作製され、そのうち１つのみが機能的な二特異的抗体である複数の異なる免疫グロブリン種をもたらす、完全長抗体を表す。分子機能によって、二特異的抗体は、その２つの結合アーム（ＨＣ／ＬＣの１つの対）の１つの上に存在する１つの抗原（又はエピトープ）を結合し、その第二のアーム（ＨＣ／ＬＣの異なる対）の上に存在する異なる抗原（又はエピトープ）を結合する。この定義によって、二特異的抗体は、（特異性及びＣＤＲ配列の両者において）２つの異なる抗原結合アームを有し、それが結合する各抗原に対して一価である。

【００９４】

本明細書において使用される「二重特異的抗体」という用語は、その２つの結合アーム（ＨＣ／ＬＣの対）の各々の中に存在する２つの異なる抗原（又はエピトープ）を結合することが可能な完全長抗体を表す（ＰＣＴ公開ＷＯ０２／０２７７３参照）。従って、二重特異的結合タンパク質は、同一の特異性と同一のＣＤＲ配列を有する２つの同一の抗原結合アームを有し、これが結合する各抗原に対して二価である。

【００９５】

結合タンパク質の「機能的抗原結合部位」とは、標的抗原を結合することが可能な部位である。抗原結合部位の抗原結合親和性は、必ずしも、当該抗原結合部位が由来する親抗体と同程度に強力であるとは限らないが、抗原を結合する能力は、抗原への抗体結合を評価するための公知の様々な方法の何れか１つを用いて測定可能でなければならない。さらに、本明細書において、多価抗体の抗原結合部位の各々の抗原結合親和性は、定量的に同一である必要はない。

【００９６】

「サイトカイン」という用語は、１つの細胞集団によって放出され、細胞間媒介物質として別の細胞集団に対して作用するタンパク質に対する包括的用語である。このようなサ

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

【００９７】

「リンカー」という用語は、ペプチド結合によって連結された２つ又はそれ以上のアミノ酸残基を含むポリペプチドを表し、１つ又はそれ以上の抗原結合部分を連結するために使用される。このようなリンカーポリペプチドは、本分野において周知である（例えば、Ｈｏｌｌｉｇｅｒ，Ｐ．，ｅｔ　ａｌ．（１９９３）　Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９０：６４４４－６４４８；Ｐｏｌｊａｋ，ＲＪ．，ｅｔ　ａｌ．（１９９４）　Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ　２：１１２１－１１２３参照）。典型的なリンカーには、Ｘ１は、ＡＫＴＴＰＫＬＥＥＧＥＦＳＥＡＲ（配列番号１）；ＡＫＴＴＰＫＬＥＥＧＥＦＳＥＡＲＶ（配列番号２）；ＡＫＴＴＰＫＬＧＧ（配列番号３）；ＳＡＫＴＴＰＫＬＧＧ（配列番号４）；ＳＡＫＴＴＰ（配列番号５）；ＲＡＤＡＡＰ（配列番号６）；ＲＡＤＡＡＰＴＶＳ（配列番号７）；ＲＡＤＡＡＡＡＧＧＰＧＳ（配列番号８）；ＲＡＤＡＡＡＡ（G_4S）$_4$（配列番号９）；ＳＡＫＴＴＰＫＬＥＥＧＥＦＳＥＡＲＶ（配列番号１０）；ＡＤＡＡＰ（配列番号１１）；ＡＤＡＡＰＴＶＳＩＦＰＰ（配列番号１２）；ＴＶＡＡＰ（配列番号１３）；ＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰＰ（配列番号１４）；ＱＰＫＡＡＰ（配列番号１５）；ＱＰＫＡＡＰＳＶＴＬＦＰＰ（配列番号１６）；ＡＫＴＴＰＰ（配列番号１７）；ＡＫＴＴＰＰＳＶＴＰＬＡＰ（配列番号１８）；ＡＫＴＴＡＰ（配列番号１９）；ＡＫＴＴＡＰＳＶＹＰＬＡＰ（配列番号２０）；ＡＳＴＫＧＰ（配列番号２１）；ＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰ（配列番号２２）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号２３）；ＧＥＮＫＶＥＹＡＰＡＬＭＡＬＳ（配列番号２４）；ＧＰＡＫＥＬＴＰＬＫＥＡＫＶＳ（配列番号２５）；及びＧＨＥＡＡＡＶＭＱＶＱＹＰＡＳ（配列番号２６）が含まれるが、これらに限定されない。

【００９８】

「免疫グロブリン定常ドメイン」は、重鎖又は軽鎖定常ドメインを表す。ヒトＩｇＧ重鎖及び軽鎖定常ドメインアミノ酸配列は、本分野において公知である。

【００９９】

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

物と異なり、各ｍＡｂは、抗原上の単一の決定基に対して誘導される。「モノクローナル」という修飾語は、何れかの特定の方法によって、抗体を産生することを要求するものと解釈すべきではない。

【０１００】

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

【０１０１】

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

【０１０２】

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

．ＢｉｏＬ２２６：８８９－８９６（１９９２）によって記載されており、選択的な突然変異導入位置、接触又は高頻度変異位置での、活性増強アミノ酸残基による選択的変異は、米国特許第６，９１４，１２８号Ｂ１に記載されている。

【０１０３】

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

【０１０４】

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

【０１０５】

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

【０１０６】

「Ｋａｂａｔ番号」、「Ｋａｂａｔ定義」及び「Ｋａｂａｔ標識」という用語は、本明細書において、互換的に使用される。本分野において認知されているこれらの用語は、抗体又はその抗原結合部分の重鎖及び軽鎖可変領域中の他のアミノ酸残基に比べて、より可変的な（すなわち、超可変的な）アミノ酸残基に付番するシステムを表す（Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．（１９７１） Ａｎｎ．ＮＹ Ａｃａｄ，Ｓｃｉ．１９０：３８２－３９１ ａｎｄ ，Ｋａｂａｔ，Ｅ．Ａ．，ｅｔ ａｌ．（１９９１） Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，Ｆｉｆｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｕ．Ｓ． Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ，ＮＩＨ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ ＮＯ．９１－３２４２）。重鎖可変領域の場合、超可変領域は、ＣＤＲ１に対するアミノ酸位置３１から３５、ＣＤＲ２に対するアミノ酸位置５０から６５及びＣＤＲ３に対するアミノ酸位置９５から１０２にわたる。軽鎖可変領域の場合、超可変領域は、ＣＤＲ１に対するアミノ酸位置２４から３４、ＣＤＲ２に対するアミノ酸位置５０から５６及びＣＤＲ３に対するアミノ酸位置８９から９７にわたる。

【０１０７】
本明細書で使用される「ＣＤＲ」という用語は、抗体可変配列内の相補性決定領域を表す。重鎖及び軽鎖の各可変領域中には３つのＣＤＲが存在し、これらは、各可変領域に対して、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３と表記される。本明細書において使用される「ＣＤＲセット」という用語は、抗原を結合することが可能な単一の可変領域中に存在する３つのＣＤＲの群を表す。これらのＣＤＲの正確な境界は、異なる系に従って、異なって定義されてきた。Ｋａｂａｔによって記載された系（Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．（１９８７） ａｎｄ（１９９１））は、抗体の何れの可変領域に対しても適用可能な明瞭な残基付番系を提供するのみならず、３つのＣＤＲを定義する正確な残基境界を提供する。これらのＣＤＲは、ＫａｂａｔＣＤＲと称され得る。Ｃｈｏｔｈｉａ及び共同研究者（Ｃｈｏｔｈｉａ ＆Ｌｅｓｋ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１－９１７（１９８７）及びＣｈｏｔｈｉａ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３４２：８７７－８８３（１９８９））は、ＫａｂａｔＣＤＲ内のある種の亜部分が、アミノ酸配列のレベルで大きな多様性を有するにも関わらず、ほぼ同一のペプチド骨格立体構造を採ることを見出した。これらの亜部分は、Ｌ１、Ｌ２及びＬ３又はＨ１、Ｈ２及びＨ３（「Ｌ」及び「Ｈ」は、それぞれ、軽鎖及び重鎖領域を表記する。）と表記される。これらの領域は、ＣｈｏｔｈｉａＣＤＲと称される場合があり、これは、ＫａｂａｔＣＤＲと重複する境界を有する。ＫａｂａｔＣＤＲと重複するＣＤＲを定義する他の境界が、Ｐａｄｌａｎ（ＦＡＳＥＢ Ｊ． ９：１３３－１３９（１９９５））及びＭａｃＣａｌｌｕｍ（Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ２６２（５）：７３２－４５（１９９６））によって記載されている。さらに別のＣＤＲ境界定義が、本明細書の系の１つに厳格に従わない場合があり得るが、それにも関わらず、ＫａｂａｔＣＤＲと重複するが、これらは、特定の残基又は残基の群又はＣＤＲ全体さえ、抗原結合に著しい影響を与えないという予測又は実験的な発見に照らして、短縮又は延長され得る。本明細書に使用されている方法は、これらの系の何れかに従って定義されたＣＤＲを使用し得るが、ある種の実施形態は、Ｋａｂａｔ又はＣｈｏｔｈｉａによって定義されたＣＤＲを使用する。

【０１０８】
本明細書で使用される「フレームワーク」又は「フレームワーク配列」という用語は、ＣＤＲを差し引いた可変領域の残りの配列を表す。ＣＤＲ配列の正確な定義は、異なる系によって決定され得るので、フレームワーク配列の意義は、これに対応して、異なる解釈に供せられる。６つのＣＤＲ（軽鎖のＣＤＲ－Ｌ１、－Ｌ２及び－Ｌ３並びに重鎖のＣＤＲ－Ｈ１、－Ｈ２及び－Ｈ３）は、軽鎖及び重鎖上のフレームワーク領域も、各鎖上の４つの亜領域（ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３及びＦＲ４）に分割し、ＣＤＲ１はＦＲ１とＦＲ２の間に位置し、ＣＤＲ２はＦＲ２とＦＲ３の間に、ＣＤＲ３はＦＲ３とＦＲ４の間に位置する。他者によって表記されるように、ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３又はＦＲ４として特定の亜領域を特定せずに、フレームワーク領域は、天然に存在する単一の免疫グロブリン鎖の可変領域内の組み合わされたＦＲを表す。本明細書において使用される、１つのＦＲは、４つの亜領域の１つを表し、複数のＦＲは、フレームワーク領域を構成する４つの亜領域の２つ又はそれ以上を表す。

【０１０９】
本明細書において使用される「生殖系列抗体遺伝子」又は「遺伝子断片」という用語は、特定の免疫グロブリンの発現のために遺伝的再編成及び変異をもたらす成熟プロセスを経ていない非リンパ系細胞によってコードされる免疫グロブリン配列を表す。（例えば、Ｓｈａｐｉｒｏ ｅｔ ａｌ．，Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２２（３）：１８３－２００（２００２）；Ｍａｒｃｈａｌｏｎｉｓ ｅｔ ａｌ．，Ａｄｖ Ｅｘｐ Ｍｅｄ Ｂｉｏｌ．４８４：１３－３０（２００１）参照）。本発明の様々な実施形態によって提供される利点の１つは、生殖系列抗体遺伝子は、成熟した抗体遺伝子より、種内の個体に特徴的な必須のアミノ酸配列構造を保存する傾向がより大きく、このため、その種

において治療的に使用された場合に、外来源に由来するものと認識される可能性がより低いという認識から生じる。

【０１１０】

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

【０１１１】

「活性」という用語は、２つ又はそれ以上の抗原に対するＤＶＤ－Ｉｇの結合特異性及び親和性などの活性を含む。

【０１１２】

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

【０１１３】

本明細書において使用される「表面プラズモン共鳴」という用語は、例えば、ＢＩＡｃｏｒｅ（Ｒ）システム（ＢＩＡｃｏｒｅ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ ＡＢ，a ＧＥ Ｈｅａｌｔｈ ｃｏｍｐａｎｙ Ｕｐｐｓａｌａ，Ｓｗｅｄｅｎ ａｎｄ Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）を用いて、バイオセンサーマトリックス内のタンパク質濃度の変化を検出することによって、リアルタイムな生物特異的相互作用の分析を可能とする光学現象を表す。さらなる記載については、Ｊｏｎｓｓｏｎ，Ｕ．，ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ａｎｎ．Ｂｉｏｌ．Ｃｌｉｎ．５１：１９－２６；Ｊｏｎｓｓｏｎ，Ｕ．，ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １１：６２０－６２７；Ｊｏｈｎｓｓｏｎ，Ｂ．，ｅｔ ａｌ．（１９９５） Ｊ．Ｍｏｌ．Ｒｅｃｏｇｎｉｔ．８：１２５－１３１；及びＪｏｈｎｎｓｏｎ，Ｂ．，ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１９８：２６８－２７７を参照されたい。

【０１１４】

本明細書において使用される「K_{on}」という用語は、本分野において公知であるように、例えば、抗体／抗原複合体を形成するための抗原への結合タンパク質（例えば、抗体）の会合に対するオン速度定数を表すものとする。「K_{on}」は、本明細書において互換的に使用される「会合速度定数」または「k_a」という用語によっても知られている。標的抗原への抗体の結合速度又は抗体と抗原間の複合体形成の速度を示すこの値は、以下の式によっても示される。

【０１１５】

抗体（「Ａｂ」）＋抗原（「Ａｇ」）－＞Ａｂ－Ａｇ

本明細書において使用される「K_{off}」という用語は、本分野において公知であるように、例えば、抗体／抗原複合体からの結合タンパク質（例えば、抗体）の解離に対するオフ速度定数又は「解離速度定数」を表すものとする。この値は、以下の式によって示されるように、抗体のその標的抗原からの解離速度又は遊離の抗体及び抗原への経時的なＡｂ－Ａｇ複合体の分離を示す。

【０１１６】

Ａｂ＋Ａｇ＜－Ａｂ－Ａｇ

本明細書において使用される「K_D」という用語は、「平衡解離定数」を表すものであり、平衡状態での滴定測定で得られた又は解離速度定数（k_{off}）を会合速度定数（k_{on}）で割ることによって得られた値を表す。会合速度定数、解離速度定数及び平衡解離定数は、抗原への抗体の結合親和性を表すために使用される。会合及び解離速度定数を測定するための方法は、本分野において周知である。蛍光を基礎とする技術を使用することによって、平衡状態での生理的緩衝液中の試料を調べるための高い感度及び能力が得られる。ＢＩＡcore（Ｒ）（ｂｉｏｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎ ａｎａｌｙｓｉｓ）アッセイなどの他の実験的アプローチ及び装置を使用することができる（例えば、ＢＩＡcore Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ ＡＢ，a ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ ｃｏｍｐａｎｙ，Ｕｐｐｓａｌａ，Ｓｗｅｄｅｎから入手可能な装置）。さらに、Ｓａｐｉｄｙｎｅ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ（Ｂｏｉｓｅ，Ｉｄａｈｏ）から入手可能なＫｉｎＥｘＡ（Ｒ） Ｋｉｎｅｔｉｃ Ｅｘｃｌｕｓｉｏｎ Ａｓｓａｙ）アッセイも使用することができる。

【０１１７】

「標識」及び「検出可能な標識」は、例えば、抗体及び分析物などの特異的結合対の要素間の反応を検出可能にするために、抗体又は分析物などの特異的結合対に付着される部分を意味し、このようにして標識された特異的結合対（例えば、抗体又は分析物）は、「検出可能に標識された」と称される。従って、本明細書において使用される「標識された結合タンパク質」という用語は、結合タンパク質の同定を与える取り込まれた標識を有するタンパク質を表す。一実施形態において、標識は、視覚的又は装置的手段（例えば、放射性標識されたアミノ酸の取り込み、又は印を付けたアビジン（例えば、光学的方法又は比色分析法によって検出することができる、蛍光マーカー又は酵素活性を含有するストレプトアビジン）によって検出することができるビオチン部分のポリペプチドへの付着）によって検出可能なシグナルを生成することができる検出可能なマーカーである。ポリペプチド用の標識の例には、以下の放射性同位体又は放射性核種（例えば、^{3}H、^{14}C、^{35}S、^{90}Y、^{99}Tc、^{111}In、^{125}I、^{131}I、^{177}Lu、^{166}Ho又は^{153}Sm）；発色原；蛍光標識（例えば、ＦＩＴＣ、ローダミン、ランタニドリン光体）；酵素的標識（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）；化学発光マーカー；ビオチニル基、二次レポーターによって認識される所定のポリペプチドエピトープ（例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体に対する結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ）；及びガドリニウムキレートなどの磁気因子が含まれるが、これらに限定されない。イムノアッセイのために一般的に使用される標識の代表例には、光を生成する部分（例えばアクリジニウム化合物）及び蛍光を生成する部分（例えば、フルオレセイン）が含まれる。他の標識が、本明細書に記載されている。これに関して、部分そのものは検出可能に標識されなくてもよいが、さらに別の部分との反応に際して、検出可能となり得る。「検出可能に標識された」という使用は、検出可能な標識の後者の種類を包含するものとする。

【０１１８】

「連結体」という用語は、第二の化学部分（治療剤又は細胞毒性剤など）に化学的に連結された抗体などの結合タンパク質を表す。本明細書において、「因子」という用語は、化学的化合物、化学的化合物の混合物、生物学的高分子又は生物学的物質から作製された抽出物を表記するために使用される。一実施形態において、治療剤又は細胞毒性因子には、百日咳毒素、タキソール、サイトカラシンＢ、グラミシジンＤ、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンＤ、１－デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール及びピューロマイシン並びにこれらの類縁体又は相同体が含まれるが、これらに限定されるものではない。イムノアッセイの文脈において使用される場合、連結体抗体は検出抗体として使用される検出可能に標識された抗体であり得る。

【０１１９】
本明細書において使用される「結晶」及び「結晶化された」という用語は、結晶の形態で存在する結合タンパク質（例えば、抗体）又はその抗原結合部分を表す。結晶は、物質の固体状態の一形態であり、これは、非晶質の固体状態又は液体の結晶状態などの他の形態とは異なる。結晶は、原子、イオン、分子（例えば、抗体などのタンパク質）又は分子集合体（例えば、抗原／抗体複合体）の規則的な反復する三次元配列から構成される。これらの三次元配列は、本分野においてよく理解されている特異的な数学的関係に従って整列されている。結晶中で反復されている基礎的単位又は構築ブロックは、非対称単位と呼ばれる。所定の十分に確定された結晶的対称性に合致する配置での非対称単位の反復は、結晶の「単位格子」を与える。三つの次元全てでの規則的な転換による単位格子の反復は、結晶を与える。「Ｇｉｅｇｅ，Ｒ．ａｎｄ Ｄｕｃｒｕｉｘ，Ａ．Ｂａｒｒｅｔｔ，Ｃｒｙｓｔａｌｌｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ ａｎｄ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ，ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ，２ｎｄ ｅａ．，ｐｐ．２０１－１６，Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，（１９９９）」を参照されたい。
【０１２０】
「ポリヌクレオチド」という用語は、２つ又はそれ以上のヌクレオチド（リボヌクレオチド若しくはデオキシヌクレオチドの何れか又はヌクレオチドの何れかのタイプの修飾された形態）のポリマー形態を意味する。本用語は、ＤＮＡの一本鎖及び二本鎖形態を含む。
【０１２１】
「単離されたポリペプチド」という用語は、（例えば、ゲノム、ｃＤＮＡ若しくは合成起源又はこれらの幾つかの組み合わせの）ポリヌクレオチドを意味するものとし、その起源のために、「単離されたポリヌクレオチド」は、「単離されたポリヌクレオチド」が本来一緒に見出されるポリヌクレオチドの全部又は一部を伴っていない、本来連結されていないポリヌクレオチドに作用可能に連結されている、又はより大きな配列の一部として本来存在しない、ことを意味する。
【０１２２】
「ベクター」という用語は、核酸分子に連結されている別の核酸を輸送することができる該核酸分子を表すものとする。ベクターの１つの種類は「プラスミド」であり、これは、その中にさらなるＤＮＡセグメントを連結し得る環状二本鎖ＤＮＡループを表す。ベクターの別の種類はウイルスベクターであり、ここで、追加のＤＮＡセグメントはウイルスゲノム中に連結され得る。ある種のベクターは、当該ベクターがその中に導入された宿主細胞中で自律的複製を行うことができる（例えば、細菌の複製起点を有する細菌ベクター及びエピソーム哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター）は、宿主細胞中へ導入された際に、宿主細胞のゲノム中に組み込まれることが可能であり、これにより、宿主ゲノムとともに複製される。さらに、ある種のベクターは、それらが作用可能に連結されている遺伝子の発現を誘導することが可能である。このようなベクターは、本明細書において、「組換え発現ベクター」（又は単に、「発現ベクター」）と称される。一般に、組換えＤＮＡ技術において有用な発現ベクターは、しばしば、プラスミドの形態である。プラスミドは、最も一般的に使用されるベクターの形態であるので、本明細書において、「プラスミド」及び「ベクター」は互換的に使用され得る。しかしながら、本発明は、均等な機能を果たす、ウイルスベクターなどの（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス及びアデノ随伴ウイルス）発現ベクターのような他の形態を含むものとする。
【０１２３】
「作用可能に連結された」という用語は、記載された成分がそれらを所期の様式で機能させることができる関係にある併置を表す。コード配列に対して「作用可能に連結された」制御配列は、制御配列と適合的な条件下で、コード配列の発現が達成されるように連結されている。「作用可能に連結された」配列は、目的の遺伝子と連続する発現調節配列及

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

【０１２４】

「形質転換」とは、外来ＤＮＡが宿主細胞に入る全てのプロセスを表す。形質転換は、本分野で周知の様々な方法を用いて、自然の条件又は人工の条件下で起こり得る。形質転換は、原核又は真核宿主細胞中へ外来核酸配列を挿入するための何れかの公知の方法に依拠し得る。本方法は、形質転換されている宿主細胞に基づいて選択され、ウイルス感染、電気穿孔、リポフェション及び粒子照射を含み得るが、これらに限定されない。このような「形質転換された」細胞には、挿入されたＤＮＡが、自律的に複製するプラスミドとして、又は宿主染色体の一部として、その中で複製することできる安定に形質転換された細胞が含まれる。これらには、挿入されたＤＮＡ又はＲＮＡを、限られた時間にわたって一過性に発現する細胞も含まれる。

【０１２５】

「組換え宿主細胞」（又は単に、「宿主細胞」）という用語は、外来ＤＮＡがその中に導入されている細胞を表すものとする。一実施形態において、宿主細胞は、例えば、米国特許第７，２６２，０２８号に記載されている宿主細胞のように、抗体をコードする２つ又はそれ以上の（例えば、複数の）核酸を含む。このような用語は、当該細胞を表すのみならず、このような細胞の子孫も表すものとすることを理解すべきである。突然変異又は環境的な影響のために、後続の世代中にある種の修飾が生じ得るので、このような子孫は、実際には親細胞と同一でないことがあり得るが、本明細書において使用される「宿主細胞」という用語の範囲になお含まれる。一実施形態において、宿主細胞には、生物の何れかの界から選択される原核及び真核細胞が含まれる。別の実施形態において、真核細胞には、原生生物、真菌、植物及び動物細胞が含まれる。別の実施形態において、宿主細胞には、原核細胞株イー・コリ；哺乳動物細胞株ＣＨＯ、ＨＥＫ２９３、ＣＯＳ、ＮＳ０、ＳＰ２及びＰＥＲ．Ｃ６；昆虫細胞株Ｓｆ９及び真菌細胞サッカロミセス・セレビシアエが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【０１２６】

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

【０１２７】

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

【０１２８】

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

【０１２９】

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

【０１３０】

「アゴニスト」という用語は、目的分子と接触したときに、アゴニストの不存在下で観察される活性又は機能の規模と比べて、分子のある種の活性又は機能の規模の増加を引き起こす調節物質を表す。興味深い具体的なアゴニストには、ポリペプチド、核酸、炭水化物又は抗原に結合する他の全ての分子が含まれ得るが、これらに限定されるものではない。

【０１３１】

「アンタゴニスト」又は「阻害剤」という用語は、目的分子と接触したときに、アンタゴニストの不存在下で観察される活性又は機能の規模と比べて、分子のある種の活性又は機能の規模の減少を引き起こす調節物質を表す。興味深い具体的なアンタゴニストには、抗原の生物学的又は免疫学的活性を遮断又は調節するアンタゴニストが含まれる。抗原のアンタゴニスト及び阻害剤には、タンパク質、核酸、炭水化物又は抗原に結合する他の全ての分子が含まれ得るが、これらに限定されるものではない。

【０１３２】

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

【０１３３】

「患者」及び「対象」は、霊長類（例えば、ヒト、サル及びチンパンジー）、非霊長類（例えば、ウシ、ブタ、ラクダ、ラマ、ウマ、ヤギ、ウサギ、ヒツジ、ハムスター、モルモット、ネコ、イヌ、ラット、マウス、クジラ）などの哺乳動物、鳥（例えば、アヒル又はガチョウ）及びサメなどの動物を表すために本明細書において互換的に使用され得る。好ましくは、患者又は対象は、疾病、疾患若しくは症状に関して治療されている若しくは評価されているヒト、疾病、疾患若しくは症状に対してリスクを有するヒト、疾病、疾患若しくは症状を有するヒト及び／又は疾病、疾患若しくは症状に対して治療されているヒトなどのヒトである。

【０１３４】

本明細書で使用される「試料」という用語は、その最も広義で使用される。本明細書において使用される「生物学的試料」は、生物又は生物であったものから得られた物質の何れかの量を含むが、これらに限定されない。このような生物には、ヒト、マウス、ラット、サル、イヌ、ウサギ及びその他の動物が含まれるが、これらに限定されない。このような物質には、血液（例えば、全血）、血漿、血清、尿、羊水、滑液、内皮細胞、白血球、単球、他の細胞、臓器、組織、骨髄、リンパ節及び脾臓が含まれるが、これらに限定されない。

【０１３５】

「成分」、「複数の成分」及び「少なくとも１つの成分」は、本明細書に記載されている方法及び本分野において公知の他の方法に従って、患者の尿、血清又は血漿試料などの検査試料のアッセイのために、キット中に含めることができる、捕捉抗体、検出又は連結体抗体、対照、検量物質、一連の検量物質、感度パネル、容器、緩衝液、希釈液、塩、酵素、酵素に対する補因子、検出試薬、前処理試薬／溶液、基質（例えば、溶液として）、停止溶液などを全般的に表す。従って、本開示の文脈において、「少なくとも１つの成分」、「成分」及び「複数の成分」は、抗分析物（例えば、抗ポリペプチド）抗体への結合などによって、固体支持体上に任意に固定化された、ポリペプチドなどの分析物を含む組成物などの、ポリペプチド又は上記他の分析物を含むことができる。幾つかの成分は、アッセイにおいて使用するために、溶液中に入れ又は再構成するために凍結乾燥され得る。

【０１３６】

「対照」は、分析物を含まない（「陰性対照）又は分析物を含む（「陽性対照」）ことが知られた組成物を表す。陽性対照は、分析物の既知濃度を含み得る。「対照」、「陽性対照」及び「検量物質」は、分析物の既知濃度を含む組成物を表すために、本明細書において互換的に使用され得る。「陽性対照」は、アッセイ性能特性を確立するために使用することができ、試薬（例えば、分析物）の完全性の有用な指標である。

【０１３７】

「所定のカットオフ」及び「所定のレベル」は、アッセイ結果を所定のカットオフ／レベルに対して比較することによって、診断／予後／治療の有効性結果を評価するために使用されるアッセイカットオフ値を全般的に表し、所定のカットオフ／レベルは、様々な臨床的パラメータ（例えば、疾病の重度、進行／非進行／改善など）と既に連関又は関連付けられている。本開示は、典型的な所定のレベルを提供し得るが、カットオフ値は、イムノアッセイの性質（例えば、使用される抗体など）に応じて変動し得ることが周知である。さらに、この開示を基礎として、他のイムノアッセイに対するイムノアッセイ特異的カットオフ値を得るために、他のイムノアッセイに対して本明細書の開示を適宜に改変することは、当業者の通常の技術水準に十分属する。所定のカットオフ／レベルの正確な値はアッセイ間で変動し得るが、（相関があれば）本明細書に記載されている相関が一般に適用可能なはずである。

【０１３８】

本明細書に記載されている診断アッセイにおいて使用される「前処理試薬」、例えば、溶解、沈殿及び／又は可溶化試薬は、検査試料中に存在するあらゆる細胞を溶解し及び／又はあらゆる分析物を可溶化する試薬である。本明細書中にさらに記載されているように、前処理は全ての試料に対して必要なわけではない。とりわけ、分析物（例えば、目的のポリペプチド）を可溶化することには、試料中に存在するあらゆる内在性結合タンパク質からの分析物の放出を伴い得る。前処理試薬は、均質（分離工程を必要としない。）又は不均質（分離工程を必要とする。）であり得る。不均質な前処理試薬を用いる場合、アッセイの次の工程に進む前に、検査試料からの沈殿したあらゆる分析物結合タンパク質の除去が存在する。

【０１３９】

本明細書に記載されているイムノアッセイ及びキットの文脈における「品質管理試薬」には、検量物質、対照及び感度パネルが含まれるが、これらに限定されない。「検量物質」又は「標準」は、分析物（抗体又は分析物など）の濃度を内挿するための検量（標準）

曲線を確立するために、通例使用される（例えば、１つ又はそれ以上、複数など）。あるいは、所定の陽性／陰性カットオフ値に近い単一の検量物質を使用することができる。「感度パネル」を構成するために、複数の検量物質（すなわち、２以上の検量物質又は検量物質の変動する量）を組み合わせて使用することができる。

【０１４０】

「リスク」は、現在又は将来の何れかの時点で、ある事象が起こる可能性又は確率を表す。「リスク階層化」は、医師が、特定の疾病、疾患又は症状を発症する低、中、高又は最高のリスクへ患者を分類することを可能にする既知の臨床的リスク因子の列を表す。

【０１４１】

特異的な結合対（例えば、抗原（又はその断片）と抗体（又は抗原的に反応性のその断片）の要素間での相互作用の文脈における「特異的」及び「特異性」は、相互作用の選択的な反応性を表す。「～に特異的に結合する」という用語及び類似の用語は、分析物（又はその断片）に特異的に結合し、他の物体には特異的に結合しない抗体（又は抗原的に反応性のその断片）の能力を表す。

【０１４２】

「特異的な結合パートナー」は、特異的結合対の要素である。特異的結合対は、化学的又は物理的な手段を通じて互いに特異的に結合する２つの異なる分子を含む。従って、一般的なイムノアッセイの抗原及び抗体特異的結合対の他に、他の特異的結合対には、ビオチンとアビジン（又はストレプトアビジン）、炭水化物とレクチン、相補的ヌクレオチド配列、エフェクターと受容体分子、補因子と酵素、酵素阻害剤と酵素などが含まれ得る。さらに、特異的結合対には、元の特異的結合要素の類縁体である要素（例えば、分析物類縁体）が含まれ得る。免疫反応性特異的結合要素には、単離されたか又は組み換え的に産生されたかを問わず、抗原、抗原断片及び抗体（モノクローナル及びポリクローナル抗体を含む。）並びにこれらの複合体、断片及び変形物（変形物の断片を含む。）が含まれる。

【０１４３】

本明細書において使用される「変形物」は、アミノ酸の付加（例えば、挿入）、欠失又は保存的置換によってアミノ酸配列中の所定のポリペプチド（例えば、ＩＬ－１８、ＢＮＰ、ＮＧＡＬ又はＨＩＶポリペプチド又は抗ポリペプチド抗体）と異なるが、所定のポリペプチドの生物学的活性を保持する（例えば、変形物ＩＬ－１８は、ＩＬ－１８への結合に関して、抗ＩＬ－１８抗体と競合し得る。）ポリペプチドを意味する。アミノ酸の保存的置換（すなわち、アミノ酸を類似の特性（例えば、親水性並びに帯電した領域の程度及び分布）の異なるアミノ酸で置換すること）は、本分野において、通例僅かな変化を伴うものと認識されている。これらの僅かな変化は、本分野において理解されているように、アミノ酸のハイドロパチー指数を検討することによって、一部同定することができる（例えば、Ｋｙｔｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１５７：１０５－１３２（１９８２））参照）。アミノ酸のハイドロパチー指数は、アミノ酸の疎水性と電荷の検討に基づいている。類似のハイドロパチー指数のアミノ酸は置換すること可能であり、なおタンパク質機能を保持し得ることが本分野において知られている。一態様において、±２のハイドロパチー指数を有するアミノ酸が置換される。アミノ酸の親水性も、生物学的機能を保持するタンパク質をもたらす置換を明らかにするために使用することができる。ペプチドに関してアミノ酸の親水性を検討することによって、そのペプチドの最大局所平均親水性（抗原性及び免疫原性とよく相関すると報告されている有用な指標（例えば、米国特許第４，５５４，１０１号を参照）の計算が可能となる。類似の親水性値を有するアミノ酸の置換は、本分野において理解されているように、生物学的活性、例えば、免疫原性を保持するペプチドをもたらし得る。一態様において、互いの±２内の親水性値を有するアミノ酸を用いて置換が行われる。アミノ酸の疎水性指数及び親水性値は何れも、そのアミノ酸の特定の側鎖によって影響を受ける。その観察と合致して、生物学的機能と適合するアミノ酸置換は、疎水性、親水性、電荷、サイズ及び他の特性によって明らかとされるように、アミノ酸（特に、アミノ酸の側鎖）の相対的類似性に依存すると理解されてい

る。「変形物」は、タンパク分解、リン酸化又は他の翻訳後修飾などによって異なってプロセッシングされているが、その生物学的活性又は抗原反応性（例えば、ＩＬ－１８への結合能）をなお保持するポリペプチド又はその断片を記載するためにも使用することができる。文脈上反対の記載がなければ、本明細書における「変形物」の使用は、変形物の断片を包含するものとする。

【０１４４】

Ｉ．ＤＶＤ結合タンパク質の作製

本発明は、１つ又はそれ以上の標的を結合することが可能な二重可変ドメイン結合タンパク質及びこれを作製する方法に関する。一実施形態において、結合タンパク質はポリペプチド鎖を含み、前記ポリペプチド鎖はＶＤ１－（Ｘ１）$_n$－ＶＤ２－Ｃ－（Ｘ２）$_n$（ＶＤ１は第一の可変ドメインであり、ＶＤ２は第二の可変ドメインであり、Ｃは定常ドメインであり、Ｘ１はアミノ酸又はポリペプチドを表し、Ｘ２はＦｃ領域を表し、及びｎは０又は１である。）を含む。本発明の結合タンパク質は、様々な技術を用いて作製することが可能である。本発明は、発現ベクター、宿主細胞及び結合タンパク質を作製する方法を提供する。

【０１４５】

Ａ．親モノクローナル抗体の作製

ＤＶＤ結合タンパク質の可変ドメインは、目的の抗原を結合することができるポリクローナル及びモノクローナル抗体など、親抗体から取得することが可能である。これらの抗体は、天然に存在し得、又は組み換え技術によって作製され得る。

【０１４６】

ｍＡｂは、ハイブリドーマ、組み換え及びファージディスプレイ技術又はこれらの組み合わせの使用など、本分野で公知の多様な技術を用いて調製することが可能である。例えば、ｍＡｂは、本分野において公知であり、例えば、「Ｈａｒｌｏｗ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，２ｎｄ ｅｄ． １９８８）；Ｈａｍｍｅｒｌｉｎｇ，ｅｔ ａｌ．，ｉｎ：Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓ ５６３－６８１（Ｅｌｓｅｖｉｅｒ，Ｎ．Ｙ．，１９８１）」（前記参考文献の全体が、参照により、組み込まれる。）に教示されているものなど、ハイブリドーマ技術を用いて作製することが可能である。本明細書において使用される「モノクローナル抗体」という用語は、ハイブリドーマ技術を通じて産生された抗体に限定されない。「モノクローナル抗体」という用語は、あらゆる真核、原核又はファージクローンなど、単一のクローンに由来する抗体を表し、それが産生される方法によらない。ハイブリドーマは、以下の実施例１に論述されているように、選択され、クローニングされ、頑強なハイブリドーマ増殖、高い抗体産生及び所望の抗体特性など、所望の特性についてさらにスクリーニングされる。ハイブリドーマは、培養され、同系の動物中において、免疫系を欠く動物（例えば、ヌードマウス）中においてインビボで増殖され又はインビトロでの細胞培養で増殖され得る。ハイブリドーマを選択し、クローニングし、増殖させる方法は、当業者に周知である。特定の実施形態において、ハイブリドーマはマウスハイブリドーマである。別の実施形態において、ハイブリドーマは、ラット、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウシ又はウマなど、非ヒト非マウス種の中で産生され得る。別の実施形態において、ハイブリドーマは、ヒト非分泌性骨髄腫が、特異的抗原を結合することが可能な抗体を発現するヒト細胞と融合されているヒトハイブリドーマである。

【０１４７】

また、組み換えモノクローナル抗体は、米国特許第５，６２７，０５２号、ＰＣＴ公開ＷＯ９２／０２５５１及びＢａｂｃｏｃｋ，Ｊ．Ｓ． ｅｔ ａｌ．（１９９６） Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９３：７８４３－７８４８に記載されているように、選択リンパ球抗体法（ＳＬＡＭ；ｓｅｌｅｃｔｅｄ ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｍｅｔｈｏｄ）として本分野で呼ばれている手法を用いて、単一の単

離されたリンパ球からも作製される。この方法では、目的の抗体を分泌する単一細胞、例えば、免疫された動物に由来するリンパ球が同定され、重鎖及び軽鎖可変領域ｃＤＮＡが、逆転写酵素－ＰＣＲによって細胞から救出され、これらの可変領域は、次いで、ＣＯＳ又はＣＨＯ細胞などの哺乳動物宿主細胞中で、適切な免疫グロブリン定常領域（例えば、ヒト定常領域）に関連して発現することが可能である。増幅された免疫グロブリン配列で形質移入され、インビボで選択されたリンパ球に由来する宿主細胞は、次いで、例えば、目的の抗原に対する抗体を発現する細胞を単離するために、形質移入された細胞をパニングすることによって、インビトロで、さらに分析及び選択を行うことが可能である。増幅された免疫グロブリン配列は、さらに、ＰＣＴ公開ＷＯ９７／２９１３１及びＰＣＴ公開ＷＯ００／５６７７２に記載されているものなど、インビトロでのアフィニティー成熟法によるなど、インビトロで操作することが可能である。

【０１４８】

モノクローナル抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の幾つか又は全てを含む非ヒト動物を目的の抗原で免疫することによっても産生される。一実施形態において、非ヒト動物は、ＸＥＮＯＭＯＵＳＥトランスジェニックマウス（ヒト免疫グロブリン遺伝子座の巨大断片を含み、マウス抗体産生を欠失している改変されたマウス系統）である。例えば、Ｇｒｅｅｎ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ７：１３－２１（１９９４）並びに米国特許第５，９１６，７７１号、米国特許第５，９３９，５９８号、米国特許第５，９８５，６１５号、米国特許第５，９９８，２０９号、米国特許第６，０７５，１８１号、米国特許第６，０９１，００１号、米国特許第６，１１４，５９８及び米国特許第６，１３０，３６４号を参照されたい。１９９１年７月２５日に公開されたＷＯ９１／１０７４１、１９９４年２月３日に公開されたＷＯ９４／０２６０２、ともに１９９６年１０月３１日に公開されたＷＯ９６／３４０９６及びＷＯ９６／３３７３５、１９９８年４月２３日に公開されたＷＯ９８／１６６５４、１９９８年６月１１日に公開されたＷＯ９８／２４８９３、１９９８年１１月１２日に公開されたＷＯ９８／５０４３３、１９９９年９月１０日に公開されたＷＯ９９／４５０３１、１９９９年１０月２１日に公開されたＷＯ９９／５３０４９、２０００年２月２４日に公開されたＷＯ０００９５６０及び２０００年６月２９日に公開されたＷＯ００／０３７５０４も参照されたい。ＸＥＮＯＭＯＵＳＥトランスジェニックマウスは、完全なヒト抗体の成人様ヒトレパートリーを産生し、抗原特異的ヒトモノクローナル抗体を生成する。ＸＥＮＯＭＯＵＳＥトランスジェニックマウスは、ヒト重鎖遺伝子座及びｘ軽鎖遺伝子座のメガ塩基サイズの生殖系列配置ＹＡＣ断片の導入を通じて、ヒト抗体レパートリーの約８０％を含有する。Ｍｅｎｄｅｚ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ １５：１４６－１５６（１９９７），Ｇｒｅｅｎ ａｎｄ Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓ Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１８８：４８３－４９５（１９９８）（これらの開示は、参照により、本明細書に組み込まれる。）を参照されたい。

【０１４９】

親抗体を作製するために、インビトロ法も使用することが可能であり、抗体ライブラリーは、所望の結合特異性を有する抗体を同定するためにスクリーニングされる。組み換え抗体ライブラリーのこのようなスクリーニングの方法は、本分野において周知であり、例えば、Ｌａｄｎｅｒ ｅｔ ａｌ．米国特許第５，２２３，４０９号；Ｋａｎｇ ｅｔ ａｌ．ＰＣＴ公開ＷＯ９２／１８６１９；Ｄｏｗｅｒ ｅｔ ａｌ．ＰＣＴ公開ＷＯ９１／１７２７１；Ｗｉｎｔｅｒ ｅｔ ａｌ ＰＣＴ公開ＷＯ９２／２０７９１；Ｍａｒｋｌａｎｄ ｅｔ ａｌ．ＰＣＴ公開ＷＯ９２／１５６７９；Ｂｒｅｉｔｌｉｎｇ ｅｔ ａｌ．ＰＣＴ公開ＷＯ９３／０１２８８；ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙ ｅｔ ａｌ．ＰＣＴ公開ＷＯ９２／０１０４７；Ｇａｒｒａｒｄ ｅｔ ａｌ．ＰＣＴ公開ＷＯ９２／０９６９０；Ｆｕｃｈｓ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ９：１３７０－１３７２；Ｈａｙ ｅｔ ａｌ．（１９９２） Ｈｕｍ Ａｎｔｉｂｏｄ Ｈｙｈｒｉｄｏｍａｓ ３：８１－８５；Ｈｕｓｅ ｅｔ ａｌ．（１９８９） Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４６：１２７５－１２８１；ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙ ｅｔ ａｌ，Ｎａｔｕｒｅ（１

９９０）３４８：５５２－５５４；Ｇｒｉｆｆｉｔｈｓ ｅｔ ａｌ（１９９３）ＥＭＢＯ Ｊ １２：７２５－７３４；Ｈａｗｋｉｎｓ ｅｔ ａｌ．（１９９２） Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ２２６：８８９－８９６；Ｃｌａｃｋｓｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９９１） Ｎａｔｕｒｅ ３５２：６２４－６２８；Ｇｒａｍ ｅｔ ａｌ．（１９９２） ＰＮＡＳ ８９：３５７６－３５８０；Ｇａｒｒａｄ ｅｔ ａｌ．（１９９１） Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ９：１３７３－１３７７；Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍ ｅｔ ａｌ．（１９９１） Ｎｕｃ Ａｃｉｄ Ｒｅｓ １９：４１３３－４１３７；ａｎｄ Ｂａｒｂａｓ ｅｔ ａｌ（１９９１） ＰＮＡＳ ８８：７９７８－７９８２，米国特許公開第２００３０１８６３７４号及びＰＣＴ公開ＷＯ９７／２９１３１（これらの各々の内容は、参照により、本明細書に組み込まれる。）に記載されている方法が含まれる。

【０１５０】

本発明の親抗体は、本分野で公知の様々なファージディスプレイ法を用いて作製することも可能である。ファージディスプレイ法では、機能的抗体ドメインは、これらをコードしているポリヌクレオチド配列を担持するファージ粒子の表面上にディスプレイされる。特に、このようなファージは、レパートリー又はコンビナトリアル抗体ライブラリー（例えば、ヒト又はマウス）から発現される抗原結合ドメインをディスプレイするために使用することが可能である。目的の抗原を結合する抗原結合ドメインを発現するファージは、抗原を用いて、例えば、標識された抗原又は固体表面若しくはビーズに結合若しくは捕捉された抗原を用いて、選択又は同定することが可能である。これらの方法で使用されるファージは、典型的には、ファージ遺伝子ＩＩＩ又は遺伝子ＶＩＩＩタンパク質の何れかに組み換え的に融合されたＦａｂ、Ｆｖ又はジスルフィドで安定化されたＦｖ抗体ドメインとともにファージから発現されたｆｄ及びＭ１３結合ドメインを含む糸状ファージである。本発明の抗体を作製するために使用することが可能なファージディスプレイ法の例には、「Ｂｒｉｎｋｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ． Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ１８２：４１－５０（１９９５）；Ａｍｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ． Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ １８４：１７７－１８６（１９９５）；Ｋｅｔｔｌｅｂｏｒｏｕｇｈ ｅｔ ａｌ．，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２４：９５２－９５８（１９９４）；Ｐｅｒｓｉｃ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ １８７ ９－１８（１９９７）；Ｂｕｒｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ５７：１９１－２８０（１９９４）；ＰＣＴ出願ＰＣＴ／ＧＢ９１／０１１３４；ＰＣＴ国際公開ＷＯ９０／０２８０９；ＷＯ９１／１０７３７；ＷＯ９２／０１０４７；ＷＯ９２／１８６１９；ＷＯ９３／１１２３６；ＷＯ９５／１５９８２；ＷＯ９５／２０４０１；並びに米国特許第５，６９８，４２６号；米国特許第５，２２３，４０９号；米国特許第５，４０３，４８４号；米国特許第５，５８０，７１７号；米国特許第５，４２７，９０８号；米国特許第５，７５０，７５３号；米国特許第５，８２１，０４７号；米国特許第５，５７１，６９８号；米国特許第５，４２７，９０８号；米国特許第５，５１６，６３７号；米国特許第５，７８０，２２５号；米国特許第５，６５８，７２７号；米国特許第５，７３３，７４３号及び米国特許第５，９６９，１０８号」（これらの各々の全体が、参照により、本明細書に組み込まれる。）に開示されているものが含まれる。

【０１５１】

本明細書中の参考文献に記載されているように、ファージ選択後、ヒト抗体又は他の所望される全ての抗原結合断片を含む完全な抗体を作製するために、ファージから得た抗体コード領域を単離及び使用し、例えば、以下に詳述されているように、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母及び細菌など、あらゆる所望の宿主中で発現させることが可能である。例えば、ＰＣＴ公開ＷＯ９２／２２３２４；Ｍｕｌｌｉｎａｘ ｅｔ ａｌ．，ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ１２（６）：８６４－８６９（１９９２）；及びＳａｗａｉ ｅｔ ａｌ．，ＡＪＲＩ ３４：２６－３４（１９９５）；及びＢｅｔｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４０：１０４１－１０４３（１９８８）（前記参考文献の全体が、参照により、組み込まれる。）に開示されている方法などの本分野で公知の方法を用いて、Ｆａｂ、Ｆａｂ’及びＦ（ａｂ’）２断片を組み換え的に産生するための技術も使

用することが可能である。一本鎖Ｆｖ及び抗体を作製するために使用することが可能な技術の例には、米国特許第４，９４６，７７８号及び米国特許第５，２５８，４９８号；Ｈｕｓｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ ２０３：４６－８８（１９９１）；Ｓｈｕ ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ ９０：７９９５－７９９９（１９９３）；並びにＳｋｅｒｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４０：１０３８－１０４０（１９８８）に記載されているものが含まれる。

【０１５２】

ファージディスプレイによる組み換え抗体ライブラリーのスクリーニングに代えて、巨大なコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングするための本分野で公知の他の方法を、親抗体の同定のために適用することが可能である。代替的発現系の１つの種類は、Ｓｚｏｓｔａｋ及びＲｏｂｅｒｔｓによるＰＣＴ公開ＷＯ９８／３１７００並びにＲｏｂｅｒｔｓ，Ｒ．Ｗ．ａｎｄ Ｓｚｏｓｔａｋ，Ｊ．Ｗ．（１９９７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９４，１２２９７－１２３０２に記載されているような、組み換え抗体ライブラリーがＲＮＡ－タンパク質融合物として発現されるものである。この系では、ピューロマイシン（ペプチジルアクセプター抗生物質）をその３’末端に担持する合成ｍＲＮＡのインビトロ翻訳によって、ｍＲＮＡとｍＲＮＡがコードするペプチド又はタンパク質との間で、共有結合的融合物が作製される。従って、特異的なｍＲＮＡは、コードされているペプチド又はタンパク質、例えば抗体又はその一部の特性（抗体又はその一部の、二重特異性抗原への結合など）に基づいて、ｍＲＮＡの複雑な混合物（例えば、コンビナトリアルライブラリー）から濃縮することが可能である。このようなライブラリーのスクリーニングから回収された、抗体又はその一部をコードする核酸配列は、本明細書に記載されている組み換え手段によって（例えば、哺乳動物宿主細胞中で）発現されることが可能であり、さらに、最初に選択された配列中に変異が導入されているｍＲＮＡ－ペプチド融合物のスクリーニングのさらなるラウンドによって、又は本明細書に記載されているような、組み換え抗体のインビトロでの親和性成熟のためのその他の方法によって、さらなる親和性成熟に供することが可能である。

【０１５３】

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

【０１５４】

本明細書に開示されている抗体は、ＣＤＲ移植された及びヒト化された親抗体を作製するために、さらに修飾を施すことが可能である。ＣＤＲ移植された親抗体は、ヒト抗体由来の重鎖及び軽鎖可変領域配列を含み、V_H及び／又はV_LのＣＤＲ領域の１つ又はそれ以上が、目的の抗原を結合することが可能なマウス抗体のＣＤＲ配列と置換される。あらゆるヒト抗体から得られるフレームワーク配列が、ＣＤＲ移植のためのテンプレートとしての役割を果たし得る。しかしながら、このようなフレームワーク上への直鎖の置換は、しばしば、抗原への結合親和性を若干喪失させる。元のマウス抗体に対して、ヒト抗体がより相同であるほど、ヒトフレームワークとマウスＣＤＲの組み合わせは、親和性を低下させ得るＣＤＲ中の歪みを導入する可能性がより低くなる。従って、一実施形態において、ＣＤＲ以外のマウス可変フレームワークを置換するために選択されたヒト可変フレームワークは、マウス抗体可変領域フレームワークと少なくとも６５％の配列同一性を有する。一実施形態において、ＣＤＲを除くヒト及びマウス可変領域は、少なくとも７０％の配列同一性を有する。特定の実施形態において、ＣＤＲを除くヒト及びマウス可変領域は、少なくとも７５％の配列同一性を有する。別の実施形態において、ＣＤＲを除くヒト及び

マウス可変領域は、少なくとも８０％の配列同一性を有する。このような抗体を作製する方法は、本分野において公知である（ＥＰ２３９，４００；ＰＣＴ公開ＷＯ９１／０９９６７；米国特許第５，２２５，５３９号；米国特許第５，５３０，１０１号；及び米国特許第５，５８５，０８９号参照）、ベニアリング（ｖｅｎｅｅｒｉｎｇ）又はリサーフェシング（ｒｅｓｕｒｆａｃｉｎｇ）（ＥＰ ５９２，１０６；ＥＰ ５１９，５９６；Ｐａｄｌａｎ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２８（４／５）：４８９－４９８（１９９１）；Ｓｔｕｄｎｉｃｋａ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ７（６）：８０５－８１４（１９９４）；Ｒｏｇｕｓｋａ ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ ９１：９６９－９７３（１９９４）），及びチェーンシャッフリング（米国特許第５，５６５，３５２号）及び抗イディオタイプ抗体。

【０１５５】

ヒト化抗体は、非ヒト種に由来する１つ又はそれ以上の相補性決定領域（ＣＤＲ）と、ヒト免疫グロブリン分子由来のフレームワーク領域とを有する所望の抗原を結合する非ヒト種抗体から得られる抗体分子である。公知のヒトＩｇ配列は、開示されている。例えば、ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｅｎｔｒｅｚ－／ｑｕｅｒｙ．ｆｃｇｉ；ｗｗｗ．ａｔｃｃ．ｏｒｇ／ｐｈａｇｅ／ｈｄｂ．ｈｔｍｌ；ｗｗｗ．ｓｃｉｑｕｅｓｔ．ｃｏｍ／；ｗｗｗ．ａｂｃａｍ．ｃｏｍ／；ｗｗｗ．ａｎｔｉｂｏｄｙｒｅｓｏｕｒｃｅ．ｃｏｍ／ｏｎｌｉｎｅｃｏｍｐ．ｈｔｍｌ；ｗｗｗ．ｐｕｂｌｉｃ．ｉａｓｔａｔｅ．ｅｄｕ／．ａｂｏｕｔ．ｐｅｄｒｏ／ｒｅｓｅａｒｃｈ＿ｔｏｏｌｓ．ｈｔｍｌ；ｗｗｗ．ｍｇｅｎ．ｕｎｉ－ｈｅｉｄｅｌｂｅｒｇ．ｄｅ／ＳＤ／ＩＴ／ＩＴ．ｈｔｍｌ；ｗｗｗ．ｗｈｆｒｅｅｍａｎ．ｃｏｍ／ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ／ＣＨ－０５／ｋｕｂｙ０５．ｈｔｍ；ｗｗｗ．ｌｉｂｒａｒｙ．ｔｈｉｎｋｑｕｅｓｔ．ｏｒｇ／１２４２９／Ｉｍｍｕｎｅ／Ａｎｔｉｂｏｄｙ．ｈｔｍｌ；ｗｗｗ．ｈｈｍｉ．ｏｒｇ／ｇｒａｎｔｓ／ｌｅｃｔｕｒｅｓ／１９９６／ｖｌａｂ／；ｗｗｗ．ｐａｔｈ．ｃａｍ．ａｃ．Ｕｋ／．ａｂｏｕｔ．ｍｒｃ７／ｍ．－ｉｋｅｉｍａｇｅｓ．ｈｔｍｌ；ｗｗｗ．ａｎｔｉｂｏｄｙｒｅｓｏｕｒｃｅ．ｃｏｍ／；ｍｃｂ．ｈａｒｖａｒｄ．ｅｄｕ／ＢｉｏＬｉｎｋｓ／Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ．ｈｔｍｌ．ｗｗｗ．ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙｌｉｎｋ．ｃｏｍ／；ｐａｔｈｂｏｘ．ｗｕｓｔｌ．ｅｄｕ／．ａｂｏｕｔ．ｈｃｅｎｔｅｒ／ｉｎｄｅｘ．－ｈｔｍｌ；ｗｗｗ．ｂｉｏｔｅｃｈ．ｕｆｌ．ｅｄｕ／．ａｂｏｕｔ．ｈｃｌ／；ｗｗｗ．ｐｅｂｉｏ．ｃｏｍ／ｐａ／３４０９１３／３４０９１３．ｈｔｍｌ－；ｗｗｗ．ｎａｌ．ｕｓｄａ．ｇｏｖ／ａｗｉｃ／ｐｕｂｓ／ａｎｔｉｂｏｄｙ／；ｗｗｗ．ｍ．ｅｈｉｍｅ－ｕ．ａｃｊｐ／．ａｂｏｕｔ．ｙａｓｕｈｉｔｏ－／Ｅｌｉｓａ．ｈｔｍｌ；ｗｗｗ．ｂｉｏｄｅｓｉｇｎ．ｃｏｍ／ｔａｂｌｅ．ａｓｐ；ｗｗｗ．ｉｃｎｅｔ．ｕｋ／ａｘｐ／ｆａｃｓ／ｄａｖｉｅｓ／ｌｉｎ－ｋｓ．ｈｔｍｌ；ｗｗｗ．ｂｉｏｔｅｃｈ．ｕｆｌ．ｅｄｕ／．ａｂｏｕｔ．ｆｃｃｌ／ｐｒｏｔｏｃｏｌ．ｈｔｍｌ；ｗｗｗ．ｉｓａｃ－ｎｅｔ．ｏｒｇ／ｓｉｔｅｓ＿ｇｅｏ．ｈｔｍｌ；ａｘｉｍｔｌ．ｉｍｔ．ｕｎｉ－ｍａｒｂｕｒｇ．ｄｅ／．ａｂｏｕｔ．ｒｅｋ／ＡＥＰ－Ｓｔａｒｔ．ｈｔｍｌ；ｂａｓｅｒｖ．ｕｃｉ．ｋｕｎ．ｎｌ／．ａｂｏｕｔ．ｊｒａａｔｓ／ｌｉｎｋｓｌ．ｈｔｍｌ；ｗｗｗ．ｒｅｃａｂ．ｕｎｉ－ｈｄ．ｄｅ／ｉｍｍｕｎｏ．ｂｍｅ．ｎｗｕ．ｅｄｕ／；ｗｗｗ．ｍｒｃ－ｃｐｅ．ｃａｍ．ａｃ．ｕｋ／ｉｍｔ－ｄｏｃ／ｐｕｂｌｉｃ／ＩＮＴＲＯ．ｈｔｍｌ；ｗｗｗ．ｉｂｔ．ｕｎａｍ．ｍｘ／ｖｉｒ／Ｖ＿ｍｉｃｅ．ｈｔｍｌ；ｉｍｇｔ．ｃｎｕｓｃ．ｆｒ：８１０４／；ｗｗｗ．ｂｉｏｃｈｅｍ．ｕｃｌ．ａｃ．ｕｋ／．ａｂｏｕｔ．ｍａｒｔｉｎ／ａｂｓ／ｉｎｄｅｘ．ｈｔｍｌ；ａｎｔｉｂｏｄｙ．ｂａｔｈ．ａｃ．ｕｋ／；ａｂｇｅｎ．ｃｖｍ．ｔａｍｕ．ｅｄｕ／ｌａｂ／ｗｗｗａｂｇｅｎ．ｈｔｍｌ；ｗｗｗ．ｕｎｉｚｈ．ｃｈ／．ａｂｏｕｔ．ｈｏｎｅｇｇｅｒ／ＡＨＯｓｅｍｉｎａｒ／Ｓｌｉｄｅ０１．ｈｔｍｌ；ｗｗｗ．ｃｒｙｓｔ．ｂｂｋ．ａｃ．ｕｋ／．ａｂｏｕｔ．ｕｂｃｇ０７ｓ／；ｗｗｗ．ｎｉｍｒ．ｍｒｃ．ａｃ．ｕｋ／ＣＣ／ｃｃａｅｗｇ／ｃｃａｅｗｇ．ｈｔｍ；ｗｗｗ．ｐａｔｈ．ｃａｍ．ａｃ．ｕｋ／．ａｂｏｕｔ．ｍｒｃ７／ｈｕｍａｎｉｓａｔｉｏｎ／ＴＡＨＨＰ．ｈｔｍｌ；ｗｗｗ．ｉｂｔ．ｕｎａｍ．ｍｘ／ｖｉｒ／ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ／ｓｔａｔ＿ａｉｍ．ｈｔｍｌ；ｗｗ

ｗ．ｂｉｏｓｃｉ．ｍｉｓｓｏｕｒｉ．ｅｄｕ／ｓｍｉｔｈｇｐ／ｉｎｄｅｘ．ｈｔｍｌ；ｗｗｗ．ｃｒｙｓｔ．ｂｉｏｃ．ｃａｍ．ａｃ．ｕｋ／．ａｂｏ－ｕｔ．ｆｍｏｌｉｎａ／Ｗｅｂ－ｐａｇｅｓ／Ｐｅｐｔ／ｓｐｏｔｔｅｃｈ．ｈｔｍｌ；ｗｗｗ．ｊｅｒｉｎｉ．ｄｅ／ｆｒ ｒｏｄｕｃｔｓ．ｈｔｍ；ｗｗｗ．ｐａｔｅｎｔｓ．ｉｂｍ．ｃｏｍ／ｉｂｍ．ｈｔｍｌ．Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，Ｕ．Ｓ． Ｄｅｐｔ．Ｈｅａｌｔｈ（１９８３）（それぞれ、参照により、本明細書に完全に組み込まれる。）。このような導入された配列は、免疫原性を低下させるために、又は結合、親和性、結合速度、解離速度、結合力、特異性、半減期若しくは本分野で公知の他の何れかの適切な特性を減少、増強若しくは修飾するために使用することが可能である。

【０１５６】

ヒトフレームワーク領域中のフレームワーク残基は、抗原結合を変化させるために、例えば、抗原結合を改善させるために、ＣＤＲドナー抗体由来の対応する残基で置換され得る。これらのフレームワーク置換は、本分野で周知の方法によって、例えば、抗原結合にとって重要なフレームワーク残基を同定するために、ＣＤＲとフレームワーク残基の相互作用をモデル化することによって、及び特定の位置における異常なフレームワーク残基を同定するための配列比較によって同定される。（例えば、Ｑｕｅｅｎ ｅｔ ａｌ．，米国特許第５，５８５，０８９号；Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３３２：３２３（１９８８）（これらの全体が、参照により、本明細書に組み込まれる。）を参照されたい。）。三次元免疫グロブリンモデルが一般的に利用可能であり、当業者によく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列が採り得る三次元立体構造を図式及び表示するコンピュータプログラムを利用可能である。これらのディスプレイの検査は、候補免疫グロブリン配列の機能における残基の推定される役割の分析、すなわち、候補免疫グロブリンがその抗原を結合する能力に影響を与える残基の分析を可能とする。このようにして、ＦＲ残基は、所望される抗体特性（標的抗原に対する増加された親和性など）が達成されるように、コンセンサス及び輸入配列から選択され、組み合わせることが可能である。一般に、ＣＤＲ残基は、抗原結合に影響を与えることに直接、及び最も実質的に関与する。抗体は、Ｊｏｎｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ３２１：５２２（１９８６）；Ｖｅｒｈｏｅｙｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３９：１５３４（１９８８）），Ｓｉｍｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５１：２２９６（１９９３）；Ｃｈｏｔｈｉａ ａｎｄ Ｌｅｓｋ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１（１９８７），Ｃａｒｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ． Ｕ．Ｓ．Ａ．８９：４２８５（１９９２）；Ｐｒｅｓｔａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ． Ｉｍｍｕｎｏｌ． １５１：２６２３（１９９３），Ｐａｄｌａｎ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２８（４／５）：４８９－４９８（１９９１）；Ｓｔｕｄｎｉｃｋａ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ７（６）：８０５－８１４（１９９４）；Ｒｏｇｕｓｋａ． ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ ９１：９６９－９７３（１９９４）；ＰＣＴ公開ＷＯ９１／０９９６７、ＰＣＴ／：ＵＳ９８／１６２８０、ＵＳ９６／１８９７８、ＵＳ９１／０９６３０、ＵＳ９１／０５９３９、ＵＳ９４／０１２３４、ＧＢ８９／０１３３４、ＧＢ９１／０１１３４、ＧＢ９２／０１７５５；ＷＯ９０／１４４４３、ＷＯ９０／１４４２４、ＷＯ９０／１４４３０、ＥＰ２２９２４６、ＥＰ５９２，１０６；ＥＰ５１９，５９６、ＥＰ２３９，４００、米国特許第５，５６５，３３２号、米国特許第５，７２３，３２３号、米国特許第５，９７６，８６２号、米国特許第５，８２４，５１４，５，８１７，４８３，５８１４４７６号、米国特許第５７６３１９２号、米国特許第５７２３３２３号、米国特許第５，７６６８８６号、米国特許第５，７１４，３５２号、米国特許第６，２０４，０２３号、米国特許第６，１８０，３７０号、米国特許第５，６９３，７６２号、米国特許第５，５３０，１０１号、米国特許第５，５８５，０８９号、米国特許第５，２２５，５３９号、米国特許第４，８１６，５６７号（それぞれ、その中に引用されている参考文献を含み、参照により、本明細書に完全に組み込まれる。）に記載されているものなどの（但し、これらに限定されない。）、本分野で公知の様

々な技術を用いてヒト化することが可能である。

【０１５７】

Ｂ．親モノクローナル抗体を選択するための基準

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

【０１５８】

Ｂ１．抗原に対する親和性

治療用ｍＡｂの所望される親和性は、抗原の性質及び所望される治療的評価項目に依存し得る。一実施形態において、サイトカイン－サイトカイン受容体相互作用は通常高い親和性の相互作用（例えば、＜ｐＭから＜ｎＭの範囲）なので、モノクローナル抗体は、サイトカイン－サイトカイン受容体相互作用を遮断する場合に、より高い親和性（Ｋｄ＝０．０１から０．５０ｐＭ）を有する。このような事例において、標的に対するｍＡｂの親和性は、サイトカインの受容体に対するサイトカイン（リガンド）の親和性と等しく又はそれより優れているべきである。他方、より低い親和性を有するｍＡｂ（＞ｎＭ範囲）は、例えば、病原性を有する可能性がある循環タンパク質、例えば、Ａ－βアミロイドの循環種に結合し、取り囲み、及び排除するモノクローナル抗体を除去する上で、治療的に有効であり得る。他の事例では、起こり得る副作用（例えば、高親和性ｍＡｂは、その意図する標的の全てを取り囲み／中和することによって、標的とされるタンパク質の機能を完全に枯渇／除去し得る。）を回避するために、部位指定突然変異導入によって既存の高親和性ｍＡｂの親和性を低下させること又はその標的に対してより低い親和性を有するｍＡｂを使用することを使用し得る。このシナリオでは、低親和性ｍＡｂは、疾病の症候の原因となり得る標的の一部を囲い込み／中和し得るので（病理学的な又は過剰産生されたレベル）、標的の一部はその正常な生理的機能を遂行し続けることが可能である。従って、用量を調整し、及び／又は副作用を低減するために、Ｋｄを低下させることが可能であり得る。親ｍＡｂの親和性は、所望の治療的結果を達成するために、細胞表面分子に適切に標的化する上で役割を果たし得る。例えば、標的が、高い密度で癌細胞上に発現され、低い密度で正常な細胞上に発現されていれば、より低い親和性のｍＡｂは、正常な細胞より腫瘍細胞上の標的のより多数を結合し、ＡＤＣＣ又はＣＤＣを介した腫瘍細胞の除去をもたらし、従って、治療的に望ましい効果を有し得る。従って、所望の親和性を有するｍＡｂを選択することは、可溶性及び表面標的の両方に関して妥当であり得る。

【０１５９】

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

【０１６０】

結合タンパク質（例えば、抗体）の所望されるK_dは、所望される治療結果に応じて実験的に決定され得る。一実施形態において、特定の抗原に対してＤＶＤ－Ｉｇの所望される親和性と等しい又はそれを上回る同抗原に対する親和性（Ｋｄ）を有する親抗体が選択される。抗原結合の親和性及び速度論は、Ｂｉａｃｏｒｅ又は別の類似の技術によって評価される。一実施形態において、各親抗体は、最大約10^{-7}Ｍ；最大約10^{-8}Ｍ；最大約10^{-9}Ｍ；最大約10^{-10}Ｍ；最大約10^{-11}Ｍ；最大約10^{-12}Ｍ及び最大10^{-13}Ｍからなる群から選択される、その抗原への解離定数（K_d）を有する。Ｖ

ＤＶＤ１がそこから得られる第一の親抗体及びＶＤ２がそこから得られる第二の親抗体は、それぞれの抗原に対して、類似の又は異なる親和性（K_D）を有し得る。各親抗体は、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、少なくとも約$10^2 M^{-1} s^{-1}$、少なくとも約$10^3 M^{-1} s^{-1}$、少なくとも約$10^4 M^{-1} s^{-1}$、少なくとも約$10^5 M^{-1} s^{-1}$及び少なくとも約$10^6 M^{-1} s^{-1}$からなる群から選択される、抗原へのオン速度定数（K_{on}）を有する。ＶＤ１がそこから得られる第一の親抗体及びＶＤ２がそこから得られる第二の親抗体は、それぞれの抗原に対して、類似の又は異なるオン速度定数（K_{on}）を有し得る。一実施形態において、各親抗体は、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約$10^{-3} s^{-1}$；最大約$10^{-4} s^{-1}$；最大約$10^{-5} s^{-1}$；及び最大約$10^{-6} s^{-1}$からなる群から選択される、抗原へのオフ速度定数（K_{off}）を有する。ＶＤ１がそこから得られる第一の親抗体及びＶＤ２がそこから得られる第二の親抗体は、それぞれの抗原に対して、類似の又は異なるオフ速度定数（K_{off}）を有し得る。

【０１６１】

Ｂ２．強度

親モノクローナル抗体の所望される親和性／強度は、所望される治療結果に依存する。例えば、受容体－リガンド（Ｒ－Ｌ）相互作用に関して、親和性（k_d）は、Ｒ－Ｌのk_d（ｐＭ範囲）と等しく又はそれを上回る。病的な循環タンパク質の単純な排除のために、ｋｄは、低ｎＭ範囲であり得る（例えば、循環しているＡ－βペプチドの様々な種の排除）。さらに、ｋｄは、標的が同じエピトープの複数コピーを発現するかどうかにも依存する（例えば、Ａβオリゴマー中の立体構造エピトープを標的とするｍＡｂ）。

【０１６２】

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

【０１６３】

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

【０１６４】

Ｂ３．生物学的機能

モノクローナル抗体は、潜在的に幾つかの機能を発揮し得る。これらの機能の幾つかが、表１に列記されている。これらの機能は、インビトロアッセイ（例えば、細胞を基礎とする生化学的アッセイ）及びインビボ動物モデルの両方によって評価することができる。

【０１６５】

【表１】

表1:治療用抗体に対する幾つかの潜在的な適用

標的(クラス)	作用機序(標的)
可溶性 (サイトカイン、その他)	活性の中和(例えば、サイトカイン) 排除の強化(例えば、Aβオリゴマー) 半減期の増加(例えば、GLP1)
細胞表面 (受容体、その他)	アゴニスト(例えば、GLP1R;EPOR など) アンタゴニスト(例えば、インテグリンなど) 細胞傷害性(CD20 など)
タンパク質沈着	排除／分解の強化(例えば、Aβ斑、アミロイド沈着)

【０１６６】

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

【０１６７】

Ｂ４．エピトープ認識：

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

【０１６８】

エピトープ及びｍＡｂ機能の例には、受容体－リガンド（Ｒ－Ｌ）相互作用を遮断すること（Ｒ－相互作用部位を結合する中和ｍＡｂ）、減少したＲ－結合をもたらす又はＲ－結合をなくす立体的妨害が含まれるが、これらに限定されない。Ａｂは、受容体結合部位以外の部位において標的を結合することができるが、立体構造の変化を誘導することによ

って、標的の受容体結合及び機能をなお妨害し、及び機能を喪失させ（例えば、Ｘｏｌａｉｒ）、Ｒに結合するが、シグナル伝達を遮断する（１２５－２Ｈ）。

【０１６９】

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

【０１７０】

Ｂ５．生理化学及び薬学的特性：

抗体を用いた治療的処置には、（典型的に高い分子量の結果、質量当りの能力が低いために）高い用量（しばしば、数ｍｇ／ｋｇ）の投与をしばしば必要とする。患者に服薬を遵守させ、及び慢性疾患の療法及び外来患者の治療に十分に対処するために、治療用ｍＡｂの皮下（ｓ．ｃ．）又は筋肉内（ｉ．ｍ．）投与が望ましい。例えば、皮下投与のための最大の望ましい容量は、約１．０ｍＬであり、従って、＞１００ｍｇ／ｍＬの濃度は、注射回数／投薬を限定することが望ましい。一実施形態において、治療用抗体は１回の投薬で投与される。しかしながら、タンパク質－タンパク質相互作用（例えば、免疫原性リスクを増大させる可能性を有する凝集）によって、並びに加工及び輸送の間の限界によって（例えば、粘度）、このような製剤の開発は制約される。その結果、臨床的な有効性のために必要とされる多量及び付随する開発の制約は、抗体製剤の可能性の完全な活用及び高用量治療計画での皮下投与を制約する。タンパク質分子及びタンパク質溶液の生理化学的及び薬学的特性（例えば、安定性、溶解度及び粘度特性）は、最も有用であると思われる。

【０１７１】

Ｂ５．１．安定性：

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

【０１７２】

様々な温度で長期間にわたってインビトロで安定なＤＶＤ－Ｉｇが望ましい。上昇した温度で、例えば、４０℃で、２から４週間、インビトロで安定な親ｍＡｂの迅速なスクリーニングによってこれを達成し、次いで、安定性を評価することができる。２から８℃での保存の間、タンパク質は、少なくとも１２ヶ月間、例えば、少なくとも２４ヶ月間、安定性を示す。安定性（単量体、完全な状態の分子の％）は、陽イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ及び生物活性検査などの様々な技術を用いて評価することができる。共有的及び立体構造的修飾を分析するために使用され得る分析技術のより包括的なリストに関しては、「Ｊｏｎｅｓ，Ａ．Ｊ．Ｓ．（１９９３）Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ ｔｈｅ ａｓｓｅｓｓｍｅｎｔ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎ ｆｏｒｍｕｌａｔｉｏｎｓ ａｎｄ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｓｙｓｔｅｍｓ．Ｉｎ：Ｃｌｅｌａｎｄ，Ｊ．Ｌ．；Ｌａｎｇｅｒ，Ｒ．，ｅｄｉｔｏｒｓ．Ｆｏｒｍｕｌａｔｉｏｎ ａｎｄ ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｏｆ ｐｅｐｔｉｄｅ

ｓ ａｎｄ ｐｒｏｔｅｉｎｓ，１ｓｔ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ，ＡＣＳ，ｐｇ．２２－４５；及びＰｅａｒｌｍａｎ，Ｒ．； Ｎｇｕｙｅｎ，Ｔ．Ｈ．（１９９０） Ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎ ｄｒｕｇｓ．Ｉｎ：Ｌｅｅ，Ｖ．Ｈ．，ｅｄｉｔｏｒ．Ｐｅｐｔｉｄｅ ａｎｄ ｐｒｏｔｅｉｎ ｄｒｕｇ ｄｅｌｉｖｅｒｙ，１ｓｔ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．，ｐｇ．２４７－３０１」を参照されたい。

【０１７３】

不均一性及び凝集物の形成：抗体の安定性は、製剤が、凝集物として存在するＧＭＰ抗体材料中に、約１０％未満、一実施形態において、約５％未満、別の実施形態において、約２％未満、又は一実施形態において、０．５％から１．５％又はそれ以下の範囲内を呈し得るような安定性であり得る。サイズ排除クロマトグラフィーは、タンパク質凝集物の検出において、高感度で、再現性があり、極めて強固な方法である。

【０１７４】

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

【０１７５】

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

【０１７６】

Ｂ５．２．溶解度：

ｍＡｂの「溶解度」は、正確に折り畳まれた単量体ＩｇＧの産生と相関する。従って、ＩｇＧの溶解度がＨＰＬＣによって評価され得る。例えば、可溶性（単量体）ＩｇＧはＨＰＬＣクロマトグラフィー上に単一のピークを生じるのに対して、不溶性の（例えば、多量体及び凝集した）は複数のピークを生じる。従って、当業者は、定型的なＨＰＬＣ技術を用いて、ＩｇＧの溶解度の増加又は減少を検出することができる。溶解度を分析するために使用され得る分析技術のより包括的なリストに関しては、Ｊｏｎｅｓ，Ａ．Ｇ．Ｄｅｐ．Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｅｎｇ．，Ｕｎｉｖ．Ｃｏｌｌ．Ｌｏｎｄｏｎ，Ｌｏｎｄｏｎ，ＵＫ．Ｅｄｉｔｏｒ（ｓ）：Ｓｈａｍｌｏｕ，Ｐ．Ａｙａｚｉ．Ｐｒｏｃｅｓｓ．Ｓｏｌｉｄ－Ｌｉｑ．Ｓｕｓｐｅｎｓｉｏｎｓ（１９９３），９３－１１７．Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒ：Ｂｕｔｔｅｒｗｏｒｔｈ－Ｈｅｉｎｅｍａｎｎ，Ｏｘｆｏｒｄ，ＵＫ ａｎｄ Ｐｅａｒｌｍａｎ，Ｒｏｄｎｅｙ；Ｎｇｕｙｅｎ，Ｔｕｅ Ｈ，Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ｐａｒｅｎｔｅｒａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（１９９０），４（Ｐｅｐｔ．Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ），２４７－３０１）を参照されたい。治療用ｍＡｂの溶解度は、十分な投薬のためにしばしば必要とされる高い濃度になるように調合するために不可欠である。本明細書に概説されているように、効率的な抗体投薬量を収容するためには、＞１００ｍｇ／ｍＬの溶解度が必要とされ得る。例えば、抗体の溶解度は、初期研究期では約５ｍｇ／ｍＬ以上であり得、一実施形態において、進んだプロセス科学段階では約２５ｍｇ／ｍＬ以上であり得、又は一実施形態において、約１００ｍｇ／ｍＬ以上であり得、又は一実施形態において、約１５０ｍｇ／ｍＬ以上であり得る。タンパク質

分子の固有の特性は、タンパク質溶液の重要な物理化学的特性（例えば、安定性、溶解度、粘度）であることが当業者に自明である。しかしながら、当業者は、最終のタンパク質製剤の特性に有益な影響を与えるための添加物として使用され得る幅広い様々な賦形剤が存在することを理解する。これらの賦形剤には、（ｉ）液体溶媒、共溶媒（例えば、エタノールなどのアルコール）、（ｉｉ）緩衝剤（例えば、ホスファート、アセタート、シトラート、アミノ酸緩衝液）；（ｉｉｉ）糖又は糖アルコール（例えば、ショ糖、トレハロース、フルクトース、ラフィノース、マニトール、ソルビトール、デキストラン）；（ｉｖ）界面活性剤（例えば、ポリソルベート２０、４０、６０、８０、ポロキサマー）；（ｖ）等張性改変物質（例えば、ＮａＣｌなどの塩、糖、糖アルコール）及び（ｖｉ）その他（例えば、防腐剤、キレート剤、抗酸化剤、キレート物質（例えば、ＥＤＴＡ）、生物分解性ポリマー、担体分子（例えば、ＨＳＡ、ＰＥＧ）が含まれ得る。

【０１７７】

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

【０１７８】

Ｂ５．３製造効率

チャイニーズハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ）などの哺乳動物細胞中で効率的に発現されるＤＶＤ－Ｉｇの作製は、一実施形態において、哺乳動物中でそれ自体効率的に発現される２つの親モノクローナル抗体を必要とする。安定な哺乳動物株（すなわち、ＣＨＯ）からの作製収率は、約０．５ｇ／Ｌ超、一実施形態において、約１ｇ／Ｌ超、別の実施形態において、約２から５ｇ／Ｌ又はそれ以上の範囲内とすべきである（Ｋｉｐｒｉｙａｎｏｖ ＳＭ，Ｌｉｔｔｌｅ Ｍ．１９９９ Ｍｏｌ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１２：１７３－２０１；Ｃａｒｒｏｌｌ Ｓ，Ａｌ－Ｒｕｂｅａｉ Ｍ．２００４ Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎ Ｂｉｏｌ Ｔｈｅｒ．４：１８２１－９）。

【０１７９】

哺乳動物細胞中での抗体及びＩｇ融合タンパク質の作製は、幾つかの因子によって影響を受ける。強力なプロモーター、エンハンサー及び選択マーカーの取り込みを介した発現ベクターの操作は、組み込まれたベクターコピーからの目的の遺伝子の転写を最大化し得る。遺伝子転写の高いレベルを許容するベクター組み込み部位の同定は、ベクターからのタンパク質の発現を増強し得る（Ｗｕｒｍ ｅｔ ａｌ，２００４，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，２００４，Ｖｏｌ／Ｉｓｓ／Ｐｇ．２２／１１（１３９３－１３９８））。さらに、産生のレベルは、抗体重鎖及び軽鎖の比並びにタンパク質の集合及び分泌の過程における様々な工程によって影響を受ける（Ｊｉａｎｇ ｅｔ ａｌ．２００６，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｐｒｏｇｒｅｓｓ，Ｊａｎ－Ｆｅｂ２００６，ｖｏｌ．２２，ｎｏ．１，ｐ。３１３－８）。

【０１８０】

Ｂ６．免疫原性

治療用ｍＡｂの投与は、免疫応答のある種の発生（すなわち、治療用ｍＡｂに対して誘導された内在性抗体の形態）をもたらし得る。免疫原性を誘導し得る潜在的な要素は、親モノクローナル抗体の選択の間に分析すべきであり、ＤＶＤ－Ｉｇの構築の前に、親モノクローナル抗体を最適化するために、このようなリスクを低減させるための工程を踏むことができる。マウス由来の抗体は、患者内で高度に免疫原性であることが見出されている

。マウスの可変領域とヒトの定常領域から構成されるキメラ抗体の作製が、治療用抗体の免疫原性を低下させるための論理的な次のステップを与える（Ｍｏｒｒｉｓｏｎ ａｎｄ Ｓｃｈｌｏｍ，１９９０）。あるいは、免疫原性は、Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ他、１９８８によって治療用抗体に関して記載されたように、ヒト抗体フレームワーク中にマウスＣＤＲ配列を転移させることによって低減させることができる（リシェーピング／ＣＤＲグラフティング／ヒト化）。別の方法は、げっ歯類の可変軽及び重ドメインから始まり、表面接近可能なフレームワークアミノ酸のみがヒトのアミノ酸に改変される一方、ＣＤＲ及び埋没されたアミノ酸は親げっ歯類抗体のままである、「リサーフェシング」又は「ベニアリング」と称される（Ｒｏｇｕｓｋａ ｅｔ ａｌ．，１９９６）。ヒト化の別の種類では、ＣＤＲ全体を移植する代わりに、１つの技術は、抗体の標的への抗体の結合に関与するＣＤＲ残基の亜群と定義される「特異性決定領域」（ＳＤＲ）のみを移植する（Ｋａｓｈｍｉｒｉ ｅｔ ａｌ．，２００５）。これには、抗体－標的複合体の利用可能な三次元構造の分析又は何れが標的と相互作用するかを決定するための抗体ＣＤＲ残基の変異分析の何れかを通じたＳＤＲの同定が必要とされる。あるいは、完全なヒト抗体は、マウス、キメラ又はヒト化抗体と比べて低下した免疫原性を有し得る。

【０１８１】

治療用抗体の免疫原性を低下させるための別のアプローチは、免疫原性であると予想されるある特定の配列を除去することである。１つのアプローチでは、第一世代の生物薬がヒトで検査され、許容できないほどに免疫原性であることが見出された後に、Ｂ細胞エピトープをマッピングし、次いで、免疫検出を回避するために変化させることができる。別のアプローチは、Ｔ細胞エピトープの候補を予測し、除去するための方法を使用する。ＭＨＣタンパク質に結合する可能性を有する生物的治療薬のペプチド配列を走査及び同定するために、コンピュータ法が開発されている（Ｄｅｓｍｅｔ ｅｔ ａｌ．，２００５）。あるいは、タンパク質アレルゲン候補中のＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞エピトープを同定するために、ヒトの樹状細胞を基礎とする方法を使用することができる（Ｓｔｉｃｋｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，２００５；Ｓ．Ｌ．Ｍｏｒｒｉｓｏｎ ａｎｄ Ｊ．Ｓｃｈｌｏｍ，Ｉｍｐｏｒｔａｎｔ Ａｄｖ．Ｏｎｃｏｌ．（１９９０），ｐｐ．３－１８；Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ，Ｌ．，Ｃｌａｒｋ，Ｍ．，Ｗａｌｄｍａｎｎ，Ｈ．ａｎｄ Ｗｉｎｔｅｒ，Ｇ．“Ｒｅｓｈａｐｉｎｇ ｈｕｍａｎ ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ｆｏｒ ｔｈｅｒａｐｙ”Ｎａｔｕｒｅ（１９８８）３３２：３２３－３２７；Ｒｏｇｕｓｋａ－Ｍ－Ａ，Ｐｅｄｅｒｓｅｎ－Ｊ－Ｔ，Ｈｅｎｒｙ－Ａ－Ｈ，Ｓｅａｒｌｅ－Ｓ－Ｍ，Ｒｏｊａ－Ｃ－Ｍ，Ａｖｅｒｙ－Ｂ，Ｈｏｆｆｅｅ－Ｍ，Ｃｏｏｋ－Ｓ，Ｌａｍｂｅｒｔ－Ｊ－Ｍ，Ｂｌａｔｔｌｅｒ－Ｗ－Ａ，Ｒｅｅｓ－Ａ－Ｒ，Ｇｕｉｌｄ－Ｂ－Ｃ．Ａ ｃｏｍｐａｒｉｓｏｎ ｏｆ ｔｗｏ ｍｕｒｉｎｅ ｍＡｂｓ ｈｕｍａｎｉｚｅｄ ｂｙ ＣＤＲ－ｇｒａｆｔｉｎｇ ａｎｄ ｖａｒｉａｂｌｅ ｄｏｍａｉｎ ｒｅｓｕｒｆａｃｉｎｇ．Ｐｒｏｔｅｉｎ ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，｛Ｐｒｏｔｅｉｎ－Ｅｎｇ｝，１９９６，ｖｏｌ．９，ｐ．８９５－９０４；Ｋａｓｈｍｉｒｉ－Ｓｙｅｄ－Ｖ－Ｓ，Ｄｅ－Ｐａｓｃａｌｉｓ－Ｒｏｂｅｒｔｏ，Ｇｏｎｚａｌｅｓ－Ｎｏｒｅｅｎ－Ｒ，Ｓｃｈｌｏｍ－Ｊｅｆｆｒｅｙ．ＳＤＲ ｇｒａｆｔｉｎｇ－ ａ ｎｅｗ ａｐｐｒｏａｃｈ ｔｏ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｈｕｍａｎｉｚａｔｉｏｎ．Ｍｅｔｈｏｄｓ（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ Ｃａｌｉｆ．），｛Ｍｅｔｈｏｄｓ｝，Ｍａｙ ２００５，ｖｏｌ．３６，ｎｏ．１，ｐ．２５－３４；Ｄｅｓｍｅｔ－Ｊｏｈａｎ，Ｍｅｅｒｓｓｅｍａｎ－Ｇｅｅｒｔ，Ｂｏｕｔｏｎｎｅｔ－Ｎａｔｈａｌｉｅ，Ｐｌｅｔｉｎｃｋｘ－Ｊｕｒｇｅｎ，Ｄｅ－Ｃｌｅｒｃｑ－Ｋｒｉｓｔａ，Ｄｅｂｕｌｐａｅｐ－Ｍａｊａ，Ｂｒａｅｃｋｍａｎ－Ｔｅｓｓａ，Ｌａｓｔｅｒｓ－Ｉｇｎａｃｅ．Ａｎｃｈｏｒ ｐｒｏｆｉｌｅｓ ｏｆ ＨＬＡ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｐｅｐｔｉｄｅｓ：ａｎａｌｙｓｉｓ ｂｙ ａ ｎｏｖｅｌ ａｆｆｉｎｉｔｙ ｓｃｏｒｉｎｇ ｍｅｔｈｏｄ ａｎｄ ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ ｖａｌｉｄａｔｉｏｎ．Ｐｒｏｔｅｉｎｓ，２００５，ｖｏｌ．５８，ｐ．５３－６９；Ｓｔｉｃｋｌｅｒ－Ｍ－Ｍ，Ｅｓｔｅｌｌ－Ｄ－Ａ，Ｈａｒｄｉｎｇ－Ｆ－Ａ．ＣＤ４＋ Ｔ－ｃｅｌｌ ｅｐｉｔｏｐｅ ｄｅｔｅｒｍｉｎａｔｉｏｎ ｕｓｉｎｇ ｕｎｅ

ｘｐｏｓｅｄ ｈｕｍａｎ ｄｏｎｏｒ ｐｅｒｉｐｈｅｒａｌ ｂｌｏｏｄ ｍｏｎｏ ｎｕｃｌｅａｒ ｃｅｌｌｓ．Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ ２０００，ｖｏｌ．２３，ｐ．６５４－６０）。

【０１８２】

Ｂ７．インビボでの有効性

所望のインビボ有効性を有するＤＶＤ－Ｉｇ分子を作製するために、組み合わせて与えられたときに、同様に所望のインビボ有効性を有するｍＡｂを作製及び選択することが重要である。しかしながら、幾つかの事例において、ＤＶＤ－Ｉｇは、２つの別個のｍＡｂの組み合わせを用いて達成することができないインビボ有効性を示し得る。例えば、ＤＶＤ－Ｉｇは２つの標的を近接させて、２つの別個のｍＡｂの組み合わせを用いて達成することができない活性をもたらし得る。さらなる望ましい生物学的機能が、本明細書の節Ｂ３に記載されている。ＤＶＤ－Ｉｇ分子において望ましい特徴を有する親抗体は、薬物動態ｔ１／２；組織分布；可溶性対細胞表面標的及び標的濃度－可溶性／密度－表面などの要因に基づいて選択され得る。

【０１８３】

Ｂ８．インビボ組織分布

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

【０１８４】

Ｂ９．イソタイプ：

イソタイプ、エフェクター機能及び循環半減期などの（但し、これらに限定されない。）所望の特性を有するＤＶＤ－Ｉｇ分子を作製するために、一実施形態において、治療用途及び所望の治療的評価項目に応じて適切なＦｃ－エフェクター機能を有する親ｍＡｂが選択される。５つの主要な重鎖クラス又はイソタイプが存在し、そのうち幾つかは数個のサブタイプを有し、これらが抗体分子のエフェクター機能を決定する。これらのエフェクター機能は、抗体分子のヒンジ領域、ＣＨ２及びＣＨ３ドメイン中に存在する。しかしながら、抗体分子の他の部分の残基も、エフェクター機能に影響を及ぼし得る。ヒンジ領域Ｆｃ－エフェクター機能には、（ｉ）抗体依存性細胞性細胞傷害、（ｉｉ）補体（Ｃ１ｑ）結合、活性化及び補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）、（ｉｉｉ）抗原－抗体複合体の貪食作用／排除並びに（ｉｖ）幾つかの事例におけるサイトカインの放出が含まれる。抗体分子のこれらのＦｃ－エフェクター機能は、クラス特異的な細胞表面受容体の組みとのＦｃ領域の相互作用を通じて媒介される。ＩｇＧ１イソタイプの抗体は最も活性が高いのに対して、ＩｇＧ２及びＩｇＧ４は最小限のエフェクター機能を有し又はエフェクター機能を有さない。ＩｇＧ抗体のエフェクター機能は、３つの構造的に相同的な細胞性Ｆｃ受容体のタイプ（及びサブタイプ）（ＦｃｇＲ１、ＦｃｇＲＩＩ及びＦｃｇＲＩＩＩ）との相互作用を通じて媒介される。ＩｇＧ１のこれらのエフェクター機能は、ＦｃｇＲ及びＣ１ｑ結合に必要とされるヒンジ領域下方の特定のアミノ酸残基（例えば、Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ）を変異させることによって除去することができる。Ｆｃ領域中のアミノ酸残基、特に、ＣＨ２－ＣＨ３ドメインも、抗体分子の循環半減期を決定する。このＦｃ機能は、酸性リソゾームから全身循環へ抗体分子をリサイクルするために必要な新生Ｆｃ受容体（ＦｃＲｎ）へのＦｃ領域の結合を通じて媒介される。

【０１８５】

ｍＡｂが活性なイソタイプ又は不活性なイソタイプを有するべきかどうかは、抗体に対して所望される治療的評価項目に依存する。イソタイプの使用及び所望される治療結果の

幾つかの例が、以下に列記されている。

【０１８６】

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

【０１８７】

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

【０１８８】

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

【０１８９】

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

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

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

【０１９０】

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

【０１９１】

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

【０１９２】

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

【０１９３】

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

・ＩｇＧ１－アロタイプ：Ｇ１ｍｚ
・ＩｇＧ１変異体－Ａ２３４、Ａ２３５
・ＩｇＧ２－アロタイプ：Ｇ２ｍ（ｎ－）

・κ－Ｋｍ３
・λ
などの典型的な適切な重鎖及び軽鎖定常領域であるが、これらに限定されない。
【０１９４】
Ｆｃ受容体及びＣ１ｑ研究：細胞膜上の何れかの過剰発現された標的への抗体の複合体形成による望ましくない抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ＡＤＣＣ）及び補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）の可能性は、ヒンジ領域の変異（例えば、Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ）によって除去され得る。ＦｃｇＲ結合はＩｇＧ１ヒンジ領域上の重複する部位内で起こると考えられているので、ｍＡｂのＩｇＧ１ヒンジ領域中に存在するこれらの置換されたアミノ酸は、ヒトＦｃ受容体へのｍＡｂの減少した結合をもたらす（が、ＦｃＲｎへの減少した結合はもたらさない）と予想される。ｍＡｂのこの特徴は、野生型ＩｇＧを含有する抗体に比べて改善された安全性特性をもたらし得る。ヒトＦｃ受容体へのｍＡｂの結合は、細胞株（例えば、ＴＨＰ－１、Ｋ５６２）及びＦｃｇＲＩＩｂ（又は他のＦｃｇＲ）を発現する加工されたＣＨＯ細胞株を用いるフローサイトメトリー実験によって測定することができる。ＩｇＧ１対照モノクローナル抗体と比べて、ｍＡｂはＦｃｇＲＩ及びＦｃｇＲＩＩａへの低下した結合を示すのに対して、ＦｃｇＲＩＩｂへの結合は影響を受けない。抗原／ＩｇＧ免疫複合体によるＣ１ｑの結合及び活性化は、古典的な補体カスケードの引き金を引き、その結果、炎症性及び／又は免疫制御応答の引き金を引く。ＩｇＧ上のＣ１ｑ結合部位は、ＩｇＧヒンジ領域内の残基に局在化されている。ｍＡｂの増加する濃度へのＣ１ｑの結合は、Ｃ１ｑＥＬＩＳＡによって評価された。結果は、野生型対照ＩｇＧ１の結合と比較したときに予想通り、ｍＡｂがＣ１ｑに結合できないことを示す。総合すると、Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａヒンジ領域の変異は、ＦｃｇＲＩ、ＦｃｇＲＩＩａ及びＣ１ｑへのｍＡｂの結合を失わせるが、ＦｃｇＲＩＩｂとのｍＡｂの相互作用に影響を与えない。このデータは、インビボにおいて、変異体Ｆｃを有するｍＡｂは、阻害的ＦｃｇＲＩＩｂと正常に相互作用するが、活性化ＦｃｇＲＩ及びＦｃｇＲＩＩａ受容体又はＣ１ｑと相互作用できない可能性が高いことを示唆する。
【０１９５】
ヒトＦｃＲｎ結合：新生受容体（ＦｃＲｎ）は、胎盤を横切るＩｇＧの輸送及びＩｇＧ分子の異化的半減期の調節に必要である。有効性を改善するために、投与の用量若しくは頻度を減らすために、又は標的への局在化を改善するために、抗体の最終半減期を増加させることが望ましい場合があり得る。あるいは、これとは逆のことを行う、すなわち、全身曝露を減らすために、又は標的対非標的結合比を改善するために、抗体の最終半減期を減少させることが有利であり得る。ＩｇＧとそのサルベージ受容体ＦｃＲｎ間の相互作用を改変することは、ＩｇＧの最終半減期を増加又は減少させるための方法を提供する。ＩｇＧなどの循環中のタンパク質は、血管内皮の細胞などのある種の細胞による微小飲作用を通じて液体相へ取り込まれる。ＩｇＧは、僅かに酸性の条件下で（ｐＨ６．０から６．５）、エンドソーム中でＦｃＲｎを結合することができ、細胞表面へリサイクルされ、そこで、ほぼ中性の条件下で（ｐＨ７．０から７．４）放出される。ＦｃＲｎ８０、１６、１７上のＦｃ領域結合部位のマッピングは、種間で保存されている２つのヒスチジン残基Ｈｉｓ３１０及びＨｉｓ４３５が、この相互作用のｐＨ依存性に必要であることを示した。ファージディスプレイ技術を用いて、ＦｃＲｎへの結合を増加させ、マウスＩｇＧの半減期を延長するマウスＦｃ領域の変異が同定された（Ｖｉｃｔｏｒ，Ｇ．ｅｔａｌ．；Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（１９９７），１５（７），６３７－６４０参照）。ｐＨ６．０でＦｃＲｎに対するヒトＩｇＧの結合親和性を増加させるが、ｐＨ７．４では増加させないＦｃ領域の変異も同定されている（Ｄａｌｌ’Ａｃｑｕａ Ｗｉｌｌｉａｍ Ｆ，ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（２００２），１６９（９），５１７１－８０参照）。さらに、ある事例では、結合の同様のｐＨ依存性増加（最大２７倍）は、アカゲザルＦｃＲｎに対しても観察され、これは、親ＩｇＧと比べて、アカゲザル中での血清半減期の２倍の増加をもたらした（Ｈｉｎｔｏｎ，Ｐａｕｌ Ｒ．ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｃ

ｈｅｍｉｓｔｒｙ（２００４），２７９（８），６２１３－６２１６参照）。これらの知見は、ＦｃＲｎとのＦｃ領域の相互作用を改変することによって、抗体治療薬の血漿半減期を延長させることができることを示唆する。逆に、ＦｃＲｎとの相互作用を弱めるＦｃ領域の変異は抗体半減期を短縮し得る。

【０１９６】

Ｂ．１０薬物動態（ＰＫ）：

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

【０１９７】

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

【０１９８】

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

【０１９９】

吸収：現在まで、治療用モノクローナル抗体の投与は、非経口経路（例えば、静脈内［ＩＶ］、皮下［ＳＣ］又は筋肉内［ＩＭ］）を介して行われている。皮下又は筋肉内投与の何れかの後の細胞間隙から全身循環中へのｍＡｂの吸収は、主に、リンパ経路を通じて行われる。飽和性、前全身性、タンパク分解性の分解は、血管外投与後に可変的な絶対的生物学的利用性をもたらし得る。通常、より高い用量での飽和したタンパク分解能のために、モノクローナル抗体の増加する用量に伴う、絶対的生物学的利用性の増加が観察され得る。リンパ液は血管系内にゆっくり排出するので、ｍＡｂに対する吸収プロセスは、通常極めて遅く、吸収の期間は、数時間から数日に起こり得る。皮下投与後のモノクローナル抗体の絶対的生物利用可能性は、一般に、５０％から１００％の範囲である。ＤＶＤ－Ｉｇ構築物によって標的とされる脳血液関門での輸送を媒介とする構造の場合には、中枢神経系区画（ＤＶＤ－Ｉｇは、ここで解離されて、その第二の抗原認識部位を介した相互作用が可能となる。）内への脳血液関門（ＢＢＢ）での増強された経細胞輸送のために、血漿中の循環時間が短縮され得る。

【０２００】

分布：静脈投与後に、モノクローナル抗体は、急速な分布期から開始し、その後に遅い除去期が続く、二相性の血清（又は血漿）濃度－時間特性に通常従う。一般に、二相性の指数関数的薬物動態モデルが、この種の薬物動態特性を最もよく記載する。ｍＡｂに対する中枢コンパートメント（Ｖｃ）中での分布の容積は、通常、血漿容積（２から３Ｌ）と

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

【０２０１】

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

【０２０２】

Ｂ．１１ヒト及びｔｏｘ種に対する組織交叉反応性パターン：

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

【０２０３】

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

【０２０４】

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

【０２０５】

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

【０２０６】

組織交叉反応性研究は、ＥＣＣＰＭＰガイドラインＩＩＩ／５２７１／９４“Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ａｎｄ ｑｕａｌｉｔｙ ｃｏｎｔｒｏｌ ｏｆ ｍＡｂｓ”及び１９９７ＵＳＦＤＡ／ＣＢＥＲ“Ｐｏｉｎｔｓ ｔｏ Ｃｏｎｓｉｄｅｒ ｉｎ ｔｈｅ Ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｅ ａｎｄ Ｔｅｓｔｉｎｇ ｏｆ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｐｒｏｄｕｃｔｓ ｆｏｒ Ｈｕｍａｎ Ｕｓｅ”などの適切な規制ガイドラインに従う。剖検又は生検で得られたヒト組織の凍結切片（５μｍ）を対物グラス上に固定し、乾燥させた。アビジン－ビオチン系を用いて、組織切片のペルオキシダーゼ染色を行った。食品医薬品局の指針“Ｐｏｉｎｔｓ ｔｏ Ｃｏｎｓｉｄｅｒ ｉｎ ｔｈｅ Ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｅ ａｎｄ Ｔｅｓｔｉｎｇ ｏｆ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｐｒｏｄｕｃｔｓ ｆｏｒ Ｈｕｍａｎ Ｕｓｅ”。適切な参考文献には、「Ｃｌａｒｋｅ Ｊ ２００４，Ｂｏｏｎ Ｌ． ２００２ａ，Ｂｏｏｎ Ｌ ２００

２ｂ，Ｒｙａｎ　Ａ　１９９９」が含まれる。
【０２０７】
組織交叉反応性研究は、しばしば、２段階で行われ、第一の段階は、１人のヒトドナーから得られる３２の組織（典型的には、副腎、胃腸管、前立腺、膀胱、心臓、骨格筋、血液細胞、腎臓、皮膚、骨髄、肝臓、脊髄、乳房、肺、脾臓、小脳、リンパ節、精巣、大脳皮質、卵巣、胸腺、大腸、膵臓、甲状腺、内皮、副甲状腺、尿管、眼、下垂体、子宮、ファロピア管及び胎盤）の凍結切片を含む。第二相では、完全な交叉反応性研究は、３人の無関係な成人から得られる最大３８の組織（副腎、血液、血管、骨髄、小脳、大脳、頚部、食道、眼、心臓、腎臓、大腸、肝臓、肺、リンパ節、乳房の乳腺、卵巣、卵管、膵臓、副甲状腺、末梢神経、下垂体、胎盤、前立腺、唾液腺、皮膚、小腸、脊髄、脾臓、胃、横紋筋、精巣、胸腺、甲状腺、扁桃腺、尿管、膀胱及び子宮を含む。）を用いて行われる。研究は、典型的には、最低２つの投薬レベルで行われる。
【０２０８】
治療用抗体（すなわち、検査品）及びイソタイプを合致させた対照抗体は、アビジン－ビオチン複合体（ＡＢＣ）検出のためにビオチン化され得る。他の検出法には、ＦＩＴＣ（又はその他の）標識された検査品のための三次抗体検出又は標識されていない検査品のための標識された抗ヒトＩｇＧとの事前の複合体形成が含まれ得る。
【０２０９】
要約すれば、剖検又は生検で得られたヒト組織の凍結切片（約５μｍ）を対物グラス上に固定し、乾燥させる。アビジン－ビオチン系を用いて、組織切片のペルオキシダーゼ染色を行う。まず（事前に複合体を形成する検出系の場合）、ビオチン化された二次抗ヒトＩｇＧとともに検査品を温置し、免疫複合体を生じさせる。検査品の２及び１０μｇ／ｍＬの最終濃度の免疫複合体を対物ガラス上の組織切片上に添加し、次いで、アビジン－ビオチン－ペルオキシダーゼキットと組織切片を３０分間反応させた。その後、組織染色のために、ペルオキシダーゼ反応に対する基質であるＤＡＢ（３，３’－ジアミノベンジジン）を４分間適用した。陽性対照組織切片として、抗原－セファロースビーズを使用する。
【０２１０】
何れの特異的染色も、問題となっている標的抗原の既知の発現に基づいて、予想された（例えば、抗原の発現と合致）反応性又は予想されない反応性の何れかであると判断される。特異的と判断された全ての染色には、強度と頻度に関してスコアを付与する。抗原又は血清競合又は遮断研究は、観察された染色が特異的又は非特異的であるかどうかの決定をさらに補助し得る。
【０２１１】
２つの選択された抗体が選択基準を充足する（適切な組織染色、ヒトと毒性学動物特異的組織間での合致する染色）ことが見出されたら、ＤＶＤ－Ｉｇ作製のために、それらを選択することができる。
【０２１２】
組織交叉反応性研究は、最終のＤＶＤ－Ｉｇ構築物を用いて繰り返さなければならないが、２つの親抗体の何れかから何らかの結合が生じ得、複雑な抗原競合研究を用いて、何らかの説明されない結合を確認する必要があるので、これらの研究は、本明細書に概説されているものと同じプロトコールに従うものの、より評価が複雑である。
【０２１３】
（１）予想されない組織交叉反応性の知見の欠如に関して、並びに（２）対応するヒト及び毒性学動物種の組織間での、組織交叉反応性の知見の適切な類似性に関して、２つの親抗体が選択されれば、ＤＶＤ－Ｉｇのような多重特異的分子を用いた組織交叉反応性研究の複雑な作業が大幅に簡略化されることは自明である。
【０２１４】
Ｂ．１２特異性及び選択性：
所望の特異性と選択性を有するＤＶＤ－Ｉｇ分子を作製するために、同様に所望の特異

性及び選択性特性を有する親ｍＡｂを作製及び選択することが必要である。

【０２１５】

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

【０２１６】

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

【０２１７】

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

【０２１８】

全血中のサイトカイン放出：ヒト血液細胞とのｍＡｂの相互作用は、サイトカイン放出アッセイによって調べることができる（Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ Ｉｎｃによって出版されたＷｉｎｇ，Ｍ．Ｇ．Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（１９９５），２（４），１８３－１９０；“Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ”，Ｓ．Ｊ．Ｅｎｎａ，Ｍｉｃｈａｅｌ Ｗｉｌｌｉａｍｓ，Ｊｏｈｎ Ｗ．Ｆｅｒｋａｎｙ，Ｔｅｒｒｙ Ｋｅｎａｋｉｎ，Ｐａｕｌ Ｍｏｓｅｒ，（ｅｄｓ．）；Ｍａｄｈｕｓｕｄａｎ，Ｓ．Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ（２００４），１０（１９），６５２８－６５３４；Ｃｏｘ，Ｊ．Ｍｅｔｈｏｄｓ（２００６），３８（４），２７４－２８２；Ｃｈｏｉ，Ｉ．Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（２００１），３１（１），９４－１０６））。簡潔に述べれば、ｍＡｂの様々な濃度をヒト全血とともに２４時間温置する。検査される濃度は、患者中の典型的な血液レベルを模倣する最終濃度を含む幅広い範囲を包含すべきである（１００ｎｇ／ｍＬから１００μｇ／ｍＬなど、これに限定されない。）。温置後、ＩＬ－１Ｒα、ＴＮＦ－α、ＩＬ－１ｂ、ＩＬ－６及びＩＬ－８の存在に関して、上清及び細胞可溶化液を分析した。ｍＡｂに関して作製されたサイトカイン濃度特性を、陰性ヒトＩｇＧ対照及び陽性ＬＰＳ又はＰＨＡ対照によって作製された特性と比較した。細胞上清及び細胞可溶化液の両方から得られたｍＡｂによって示されたサイトカイン特性は、対照ヒトＩｇＧと同等であった。一実施形態において、モノ

クローナル抗体は、炎症性サイトカインを自発的に放出するために、ヒト血液細胞と相互作用しない。

【０２１９】

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

【０２２０】

Ｂ．１３毒性学的研究のための他の種への交叉反応性：

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

【０２２１】

親ｍＡｂは、特異的な標的を結合することができる様々なｍＡｂから選択され得、本分野において周知である。これらには、抗ＴＮＦ抗体（米国特許第６，２５８，５６２号）、抗ＩＬ－１２及び／又は抗ＩＬ－１２ｐ４０抗体（米国特許第６，９１４，１２８号）；抗ＩＬ－１８抗体（米国特許公開第２００５／０１４７６１０Ａ１号）、抗Ｃ５、抗ＣＢＬ、抗ＣＤ１４７、抗ｇｐ１２０、抗ＶＬＡ－４、抗ＣＤ１１ａ、抗ＣＤ１８、抗ＶＥＧＦ、抗ＣＤ４０Ｌ、抗ＣＤ－４０（例えば、ＷＯ２００７１２４２９９参照）抗Ｉｄ、抗ＩＣＡＭ－、抗ＣＸＣＬ１３、抗ＣＤ２、抗ＥＧＦＲ、抗ＴＧＦ－β２、抗ＨＧＦ、抗ｃＭｅｔ、抗ＤＬＬ－４、抗ＮＰＲ１、抗ＰＬＧＦ、抗ＥｒｂＢ３、抗Ｅ－セレクチン、抗ＶＩＩ因子、抗Ｈｅｒ２／ｎｅｕ、抗Ｆｇｐ、抗ＣＤ１１／１８、抗ＣＤ１４、抗ＩＣＡＭ－３、抗ＲＯＮ、抗ＣＤ－１９、抗ＣＤ８０（例えば、ＷＯ２００３０３９４８６参照）、抗ＣＤ４、抗ＣＤ３、抗ＣＤ２３、抗β２－インテグリン、抗α４β７、抗ＣＤ５２、抗ＨＬＡＤＲ、抗ＣＤ２２（例えば、米国特許第５，７８９，５５４号参照）、抗ＣＤ２０、抗ＭＩＦ、抗ＣＤ６４（ＦｃＲ）、抗ＴＣＲαβ、抗ＣＤ２、抗ＨｅｐＢ、抗ＣＡ１２５、抗ＥｐＣＡＭ、抗ｇｐ１２０、抗ＣＭＶ、抗ｇｐＩＩｂＩＩＩａ、抗ＩｇＥ、抗ＣＤ２５、抗ＣＤ３３、抗ＨＬＡ、抗ＩＧＦ１，２、抗ＩＧＦＲ、抗ＶＮＲインテグリン、抗ＩＬ－１α、抗ＩＬ－１β、抗ＩＬ－１受容体、抗ＩＬ－２受容体、抗ＩＬ－４、抗ＩＬ－４受容体、抗ＩＬ５、抗ＩＬ－５受容体、抗ＩＬ－６、抗ＩＬ－６Ｒ、ＲＡＮＫＬ、ＮＧＦ、ＤＫＫ、αＶβ３、ＩＬ－１７Ａ、抗ＩＬ－８、抗ＩＬ－９、抗ＩＬ－１３、抗ＩＬ－１３受容体、抗ＩＬ－１７；抗ＩＬ－２３；ＩＬ－２３ｐ１９（Ｐｒｅｓｔａ ＬＧ．２００５ Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ，ｄｅｓｉｇｎ，ａｎｄ ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ｏｆ ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ｊ Ａｌｌｅｒｇｙ Ｃｌｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌ．１１６：７３１－６及び ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｐａｔｈ．ｃａｍ．ａｃ．ｕｋ／～ｍｒｃ７／ｈｕｍａｎｉｓａｔｉｏｎ／ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ．

ｈｔｍｌ参照）。
【０２２２】
親ｍＡｂは、使用に関して、臨床試験において又は臨床的使用のための開発において承認を受けた様々な治療用抗体からも選択され得る。このような治療用抗体には、リツキシマブ（Ｒｉｔｕｘａｎ（Ｒ）、ＩＤＥＣ／Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ／Ｒｏｃｈｅ）（例えば、米国特許第５，７３６，１３７号参照）、非ホジキンリンパ腫を治療するために承認を受けたキメラ抗ＣＤ２０抗体；ＨｕＭａｘ－ＣＤ２０、Ｇｅｎｍａｂによって現在開発されている抗ＣＤ２０、米国特許第５，５００，３６２号に記載されている抗ＣＤ２０抗体、ＡＭＥ－１３３（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ）、ｈＡ２０（Ｉｍｍｕｎｏｍｅｄｉｃｓ，Ｉｎｃ．）、ＨｕｍａＬＹＭ（Ｉｎｔｒａｃｅｌ）及びＰＲＯ７０７６９（ＰＣＴ／ＵＳ２００３／０４０４２６、発明の名称「Ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ Ｖａｒｉａｎｔｓ ａｎｄ Ｕｓｅｓ Ｔｈｅｒｅｏｆ」）、トラスツズマブ（Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（Ｒ），Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）（例えば、米国特許第５，６７７，１７１号参照）、乳癌を治療するために承認を受けたヒト化抗Ｈｅｒ２／ｎｅｕ抗体；Ｇｅｎｅｎｔｅｃによって現在開発されているペルツズマブ（ｒｈｕＭａｂ－２Ｃ４，Ｏｍｎｉｔａｒｇ（Ｒ））；米国特許第４，７５３，８９４号に記載されている抗Ｈｅｒ２抗体；セツキシマブ（Ｅｒｂｉｔｕｘ（Ｒ）、Ｉｍｃｌｏｎｅ）（米国特許第４，９４３，５３３号；ＰＣＴＷＯ９６／４０２１０）、様々な癌に対する臨床試験におけるキメラ抗ＥＧＦＲ抗体；Ａｂｇｅｎｉｘ－Ｉｍｍｕｎｅｘ－Ａｍｇｅｎによって現在開発されているＡＢＸ－ＥＧＦ（米国特許第６，２３５，８８３号）；Ｇｅｎｍａｂによって現在開発されているＨｕＭａｘ－ＥＧＦｒ（米国特許出願第１０／１７２，３１７号）；４２５、ＥＭＤ５５９００、ＥＭＤ６２０００及びＥＭＤ７２０００（Ｍｅｒｃｋ ＫＧａＡ）（米国特許第５，５５８，８６４号；Ｍｕｒｔｈｙ ｅｔ ａｌ．１９８７，Ａｒｃｈ Ｂｉｏｃｈｅｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ．２５２（２）：５４９－６０；Ｒｏｄｅｃｋ ｅｔ ａｌ．，１９８７，Ｊ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｃｈｅｍ．３５（４）：３１５－２０；Ｋｅｔｔｌｅｂｏｒｏｕｇｈ ｅｔ ａｌ．，１９９１，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．４（７）：７７３－８３）；ＩＣＲ６２（Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ）（ＰＣＴ ＷＯ９５／２００４５；Ｍｏｄｊｔａｈｅｄｉ ｅｔ ａｌ．，１９９３，Ｊ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｐｈｙｓ．１９９３，２２（ｌ－３）：１２９－４６；Ｍｏｄｊｔａｈｅｄｉ ｅｔ ａｌ，１９９３，Ｂｒ Ｊ Ｃａｎｃｅｒ．１９９３，６７（２）：２４７－５３；Ｍｏｄｊｔａｈｅｄｉ ｅｔ ａｌ，１９９６，Ｂｒ Ｊ Ｃａｎｃｅｒ，７３（２）：２２８－３５；Ｍｏｄｊｔａｈｅｄｉ ｅｔ ａｌ，２００３，Ｉｎｔ Ｊ Ｃａｎｃｅｒ，１０５（２）：２７３－８０）；ＴｈｅｒａＣＩＭｈＲ３（ＹＭ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｃａｎａｄａ ａｎｄ Ｃｅｎｔｒｏ ｄｅ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉａ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ，Ｃｕｂａ（米国特許第５，８９１，９９６号；米国特許第６，５０６，８８３号；Ｍａｔｅｏ ｅｔ ａｌ，１９９７，Ｉｍｍｕｎｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，３（１）：７１－８１）；ｍＡｂ－８０６（Ｌｕｄｗｉｇ Ｉｎｓｔｉｔｕｅ ｆｏｒ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｍｅｍｏｒｉａｌ Ｓｌｏａｎ－Ｋｅｔｔｅｒｉｎｇ）（Ｊｕｎｇｂｌｕｔｈ ｅｔ ａｌ．２００３，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ．１００（２）：６３９－４４）；ＫＳＢ－１０２（ＫＳ Ｂｉｏｍｅｄｉｘ）；ＭＲ１－１（ＩＶＡＸ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ）（ＰＣＴ ＷＯ０１６２９３１Ａ２）；並びにＳＣ１００（Ｓｃａｎｃｅｌｌ）（ＰＣＴＷＯ０１／８８１３８）；アレムツズマブ（Ｃａｍｐａｔｈ（Ｒ），Ｍｉｌｌｅｎｉｕｍ）、Ｂ細胞慢性リンパ性白血病の治療に関して現在承認を受けているヒト化ｍＡｂ；ムロモナブ－ＣＤ３（Ｏｒｔｈｏｃｌｏｎｅ ＯＫＴ３（Ｒ））、Ｏｒｔｈｏ Ｂｉｏｔｅｃｈ／Ｊｏｈｎｓｏｎ ＆ Ｊｏｈｎｓｏｎによって開発された抗ＣＤ３抗体、イブリツモマブ・チウキセタン（Ｚｅｖａｌｉｎ（Ｒ））、ＩＤＥＣ／Ｓｃｈｅｒｉｎｇ ＡＧによって開発された抗ＣＤ２０抗体、ゲムツズマブ・オゾガマイシン（Ｍｙｌｏｔａｒｇ（Ｒ））、Ｃｅｌｌｔｅｃｈ／Ｗｙｅｔｈによって開発された抗ＣＤ３３（ｐ６７タンパク質）抗体、アレファセプト（Ａｍｅｖｉｖｅ（Ｒ））、Ｂｉｏｇｅ

nによって開発された抗ＬＦＡ－３Ｆｃ融合物）、Ｃｅｎｔｏｃｏｒ／Ｌｉｌｌｙによって開発されたアブシキシマブ（ＲｅｏＰｒｏ（Ｒ））、Ｎｏｖａｒｔｉｓによって開発されたバシリキシマブ（Ｓｉｍｕｌｅｃｔ（Ｒ））、Ｍｅｄｉｍｍｕｎｅによって開発されたパリビズマブ（Ｓｙｎａｇｉｓ（Ｒ））、インフリキシマブ（Ｒｅｍｉｃａｄｅ（Ｒ））、Ｃｅｎｔｏｃｏｒによって開発された抗ＴＮＦα抗体、アダリムマブ（Ｈｕｍｉｒａ（Ｒ））、Ａｂｂｏｔｔによって開発された抗ＴＮＦα抗体、Ｈｕｍｉｃａｄｅ（Ｒ）、Ｃｅｌｌｔｅｃｈによって開発された抗ＴＮＦα抗体、ゴリムマブ（ＣＮＴＯ－１４８）、Ｃｅｎｔｏｃｏｒによって開発された完全ヒトＴＮＦ抗体、エタネルセプト（Ｅｎｂｒｅｌ（Ｒ））、Ｉｍｍｕｎｅｘ／Ａｍｇｅｎによって開発されたｐ７５ＴＮＦ受容体Ｆｃ融合物、レネルセプト、Ｒｏｃｈｅによって以前に開発されたｐ５５ＴＮＦ受容体Ｆｃ融合物、ＡＢＸ－ＣＢＬ、Ａｂｇｅｎｉｘによって開発されている抗ＣＤ１４７抗体、ＡＢＸ－ＩＬ８、Ａｂｇｅｎｉｘによって開発されている抗ＩＬ－８抗体、ＡＢＸ－ＭＡ１、Ａｂｇｅｎｉｘによって開発されている抗ＭＵＣ１８抗体、ペムツモマブ（Ｒ１５４９，９０Ｙ－ｍｕＨＭＦＧ１）、Ａｎｔｉｓｏｍａによって開発中の抗ＭＵＣ１、Ｔｈｅｒｅｘ（Ｒ１５５０）、Ａｎｔｉｓｏｍａによって開発されている抗ＭＵＣ１抗体、Ａｎｔｉｓｏｍａによって開発されているＡｎｇｉｏＭａｂ（ＡＳ１４０５）、Ａｎｔｉｓｏｍａによって開発されているＨｕＢＣ－１、Ａｎｔｉｓｏｍａによって開発されているＴｈｉｏｐｌａｔｉｎ（ＡＳ１４０７）、Ａｎｔｅｇｒｅｎ（Ｒ）（ナタリズマブ）、Ｂｉｏｇｅｎによって開発されている抗α－４－β－１（ＶＬＡ－４）及びα－４－β－７－抗体、ＶＬＡ－１ｍＡｂ、Ｂｉｏｇｅｎによって開発されている抗ＶＬＡ－１インテグリン抗体、ＬＴＢＲｍＡｂ、Ｂｉｏｇｅｎによって開発されている抗リンホトキシンβ受容体（ＬＴＢＲ）抗体、ＣＡＴ－１５２、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙによって開発されている抗ＴＧＦ－β２抗体、ＡＢＴ８７４（Ｊ６９５）、Ａｂｂｏｔｔによって開発されている抗ＩＬ－１２ｐ４０抗体、ＣＡＴ－１９２、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ及びＧｅｎｚｙｍｅによって開発されている抗ＴＧＦ－β１抗体、ＣＡＴ２１３、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙによって開発されている抗エオタキシン１抗体、ＬｙｍｐｈｏＳｔａｔ－Ｂ（Ｒ）、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ及びＨｕｍａｎ Ｇｅｎｏｍｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ Ｉｎｃ．，によって開発されている抗Ｂｌｙｓ抗体、ＴＲＡＩＬ－Ｒ１ｍＡｂ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ及びＨｕｍａｎ Ｇｅｎｏｍｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ Ｉｎｃ．，によって開発されている抗ＴＲＡＩＬ－Ｒ１抗体、Ａｖａｓｔｉｎ（Ｒ）ベバシズマブ、ｒｈｕＭＡｂ－ＶＥＧＦ、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈによって開発されている抗ＶＥＧＦ抗体、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈによって開発されている抗ＨＥＲ受容体ファミリー抗体、Ａｎｔｉ－Ｔｉｓｓｕｅ Ｆａｃｔｏｒ （ＡＴＦ）、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈによって開発されている抗組織因子抗体、Ｘｏｌａｉｒ（Ｒ）（オマリズマブ）、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈによって開発されている抗ＩｇＥ抗体、Ｒａｐｔｉｖａ（Ｒ）（エファリズマブ）、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ及びＸｏｍａによって開発されている抗ＣＤ１１ａ抗体、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ及びＭｉｌｌｅｎｉｕｍ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓによって開発されているＭＬＮ－０２抗体（以前には、ＬＤＰ－０２）、ＨｕＭａｘＣＤ４、Ｇｅｎｍａｂによって開発されている抗ＣＤ４抗体、ＨｕＭａｘ－ＩＬ１５、Ｇｅｎｍａｂ及びＡｍｇｅｎによって開発されている抗ＩＬ－１５抗体、Ｇｅｎｍａｂ及びＭｅｄａｒｅｘによって開発されているＨｕＭａｘ－Ｉｎｆｌａｍ、Ｈｕｍａｘ－Ｃａｎｃｅｒ、Ｇｅｎｍａｂ及びＭｅｄａｒｅｘ及びＯｘｆｏｒｄ ＧｅｏＳｃｉｅｎｃｅｓによって開発されている抗ヘパラナーゼＩ抗体、Ｇｅｎｍａｂ及びＡｍｇｅｎによって開発されているＨｕＭａｘ－Ｌｙｍｐｈｏｍａ、Ｇｅｎｍａｂによって開発されているＨｕＭａｘ－ＴＡＣ、ＩＤＥＣ－１３１及びＩＤＥＣ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓによって開発されている抗ＣＤ４０Ｌ抗体、ＩＤＥＣ－１５１（Ｃｌｅｎｏｌｉｘｉｍａｂ）、ＩＤＥＣ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓによって開発されている抗ＣＤ４抗体、ＩＤＥＣ－１１４、ＩＤＥＣ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓによって開発されている抗ＣＤ８０抗体、ＩＤＥＣ－１５２、ＩＤＥＣ Ｐｈａ

ｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓによって開発されている抗ＣＤ２３、ＩＤＥＣ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓによって開発されている抗マクロファージ遊走因子（ＭＩＦ）抗体、ＢＥＣ２、Ｉｍｃｌｏｎｅによって開発されている抗イディオタイプ抗体、ＩＭＣ－ＩＣ１１、Ｉｍｃｌｏｎｅによって開発されている抗ＫＤＲ抗体、ＤＣ１０１、Ｉｍｃｌｏｎｅによって開発されている抗ｆｌｋ－１抗体、Ｉｍｃｌｏｎｅによって開発されている抗ＶＥカドヘリン抗体、ＣＥＡ－Ｃｉｄｅ（Ｒ）（ラベツズマブ）、Ｉｍｍｕｎｏｍｅｄｉｃｓによって開発されている抗癌胎児性抗原（ＣＥＡ）抗体、ＬｙｍｐｈｏＣｉｄｅ（Ｒ）（エプラツズマブ）、Ｉｍｍｕｎｏｍｅｄｉｃｓによって開発されている抗ＣＤ２２抗体、Ｉｍｍｕｎｏｍｅｄｉｃｓによって開発されているＡＦＰ－Ｃｉｄｅ、Ｉｍｍｕｎｏｍｅｄｉｃｓによって開発されているＭｙｅｌｏｍａＣｉｄｅ、Ｉｍｍｕｎｏｍｅｄｉｃｓによって開発されているＬｋｏＣｉｄｅ、Ｉｍｍｕｎｏｍｅｄｉｃｓによって開発されているＰｒｏｓｔａＣｉｄｅ、ＭＤＸ－０１０、Ｍｅｄａｒｅｘによって開発されている抗ＣＴＬＡ４抗体、ＭＤＸ－０６０、Ｍｅｄａｒｅｘによって開発されている抗ＣＤ３０抗体、Ｍｅｄａｒｅｘによって開発されているＭＤＸ－０７０、Ｍｅｄａｒｅｘによって開発されているＭＤＸ－０１８、Ｏｓｉｄｅｍ（Ｒ）（ＩＤＭ－１）並びにＭｅｄａｒｅｘ及びＩｍｍｕｎｏ－Ｄｅｓｉｇｎｅｄ Ｍｏｌｅｃｕｌｅｓによって開発されている抗Ｈｅｒ２抗体、Ｈｕｍａｘ（Ｒ）－ＣＤ４、Ｍｅｄａｒｅｘ及びＧｅｎｍａｂによって開発されている抗ＣＤ４抗体、ＨｕＭａｘ－ＩＬ１５、Ｍｅｄａｒｅｘ及びＧｅｎｍａｂによって開発されている抗ＩＬ１５抗体、ＣＮＴＯ１４８、Ｍｅｄａｒｅｘ及びＣｅｎｔｏｃｏｒ／Ｊ＆Ｊによって開発されている抗ＴＮＦα抗体、ＣＮＴＯ１２７５、Ｃｅｎｔｏｃｏｒ／Ｊ＆Ｊによって開発されている抗サイトカイン抗体、ＭＯＲ１０１及びＭＯＲ１０２、ＭｏｒｐｈｏＳｙｓによって開発されている抗細胞間接着分子－１（ＩＣＡＭ－１）（ＣＤ５４）抗体、ＭＯＲ２０１、ＭｏｒｐｈｏＳｙｓによって開発されている抗繊維芽細胞成長因子受容体３（ＦＧＦＲ－３）抗体、Ｎｕｖｉｏｎ（Ｒ）（ビシリズマブ）、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｄｅｓｉｇｎ Ｌａｂｓによって開発されている抗ＣＤ３抗体、ＨｕＺＡＦ（Ｒ）、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｄｅｓｉｇｎ Ｌａｂｓによって開発されている抗γインターフェロン抗体、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｄｅｓｉｇｎ Ｌａｂｓによって開発されている抗α５β１インテグリン、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｄｅｓｉｇｎ Ｌａｂｓによって開発されている抗ＩＬ１２、ＩＮＧ－１、Ｘｏｍａによって開発されている抗Ｅｐ－ＣＡＭ抗体、Ｘｏｌａｉｒ（Ｒ）（オマリズマブ）、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ及びＮｏｖａｒｔｉｓによって開発されているヒト化抗ＩｇＥ抗体並びにＭＬＮ０１、Ｘｏｍａによって開発されている抗β２インテグリン抗体が含まれるが、これらに限定されない（このパラグラフに引用されている参考文献のすべてが、参照により、本明細書に組み込まれる。）。別の実施形態において、治療薬には、ＫＲＮ３３０（Ｋｉｒｉｎ）；ｈｕＡ３３抗体（Ａ３３，Ｌｕｄｗｉｇ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｆｏｒ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ）；ＣＮＴＯ９５（αＶインテグリン，Ｃｅｎｔｏｃｏｒ）；ＭＥＤＩ－５２２（αＶβ３インテグリン，Ｍｅｄｉｍｍｕｎｅ）；ボロシキシマブ（αＶβ１インテグリン，Ｂｉｏｇｅｎ／ＰＤＬ）；ヒトｍＡｂ２１６（Ｂ細胞グリコシル化されたエピトープ，ＮＣＩ）；ＢｉＴＥＭＴ１０３（二特異的ＣＤ１９×ＣＤ３，Ｍｅｄｉｍｍｕｎｅ）；４Ｇ７ｘＨ２２（二重特異的Ｂｃｅｌｌ×ＦｃｇａｍａＲ１，Ｍｅｄａｒｅｘ／Ｍｅｒｃｋ ＫＧａ）；ｒＭ２８（二特異的ＣＤ２８×ＭＡＰＧ、米国特許ＥＰ１４４４２６８）；ＭＤＸ４４７（ＥＭＤ８２６３３）（二特異的ＣＤ６４×ＥＧＦＲ，Ｍｅｄａｒｅｘ）；カツマキソマブ（レモバブ）（二特異的ＥｐＣＡＭ×抗ＣＤ３，Ｔｒｉｏｎ／Ｆｒｅｓ）；エルツマキソマブ（二特異的ＨＥＲ２／ＣＤ３，Ｆｒｅｓｅｎｉｕｓ Ｂｉｏｔｅｃｈ）；オレゴボマブ（ＯｖａＲｅｘ）（ＣＡ－１２５，ＶｉＲｅｘｘ）；Ｒｅｎｃａｒｅｘ（Ｒ）（ＷＸ Ｇ２５０）（炭酸脱水酵素ＩＸ、Ｗｉｌｅｘ）；ＣＮＴＯ８８８（ＣＣＬ２，Ｃｅｎｔｏｃｏｒ）；ＴＲＣ１０５（ＣＤ１０５（エンドグリン），Ｔｒａｃｏｎ）；ＢＭＳ－６６３５１３（ＣＤ１３７アゴニスト，Ｂｒｙｓｔｏｌ Ｍｙｅｒｓ Ｓｑｕｉｂｂ）；ＭＤＸ－１３４２（ＣＤ１９，Ｍｅｄａｒｅｘ）；シプリズマブ（ＭＥＤＩ－５０７）（ＣＤ２，Ｍｅｄｉｍｍｕｎｅ）；オフ

ァツムマブ（Ｈｕｍａｘ－ＣＤ２０）（ＣＤ２０，Ｇｅｎｍａｂ）；リツキシマブ（Ｒｉｔｕｘａｎ）（ＣＤ２０，Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）；ベルツズマブ（ｈＡ２０）（ＣＤ２０，Ｉｍｍｕｎｏｍｅｄｉｃｓ）；エプラツズマブ（ＣＤ２２，Ａｍｇｅｎ）；ルミリキシマブ（ＩＤＥＣ１５２）（ＣＤ２３，Ｂｉｏｇｅｎ）；ムロモナブ－ＣＤ３（ＣＤ３，Ｏｒｔｈｏ）；ＨｕＭ２９１（ＣＤ３ｆｃ受容体，ＰＤＬ　Ｂｉｏｐｈａｒｍａ）；ＨｅＦｉ－１，ＣＤ３０，ＮＣＩ）；ＭＤＸ－０６０（ＣＤ３０，Ｍｅｄａｒｅｘ）；ＭＤＸ－１４０１（ＣＤ３０，Ｍｅｄａｒｅｘ）；ＳＧＮ－３０（ＣＤ３０，Ｓｅａｔｔｌｅ　Ｇｅｎｅｎｔｉｃｓ）；ＳＧＮ－３３（リンツズマブ）（ＣＤ３３，Ｓｅａｔｔｌｅ　Ｇｅｎｅｎｔｉｃｓ）；ザノリムマブ（ＨｕＭａｘ－ＣＤ４）（ＣＤ４，Ｇｅｎｍａｂ）；ＨＣＤ１２２（ＣＤ４０，Ｎｏｖａｒｔｉｓ）；ＳＧＮ－４０（ＣＤ４０，Ｓｅａｔｔｌｅ　Ｇｅｎｅｎｔｉｃｓ）；Ｃａｍｐａｔｈ１ｈ（アレムツズマブ）（ＣＤ５２，Ｇｅｎｚｙｍｅ）；ＭＤＸ－１４１１（ＣＤ７０，Ｍｅｄａｒｅｘ）；ｈＬＬ１（ＥＰＢ－１）（ＣＤ７４．３８，Ｉｍｍｕｎｏｍｅｄｉｃｓ）；ガリキシマブ（ＩＤＥＣ－１４４）（ＣＤ８０，Ｂｉｏｇｅｎ）；ＭＴ２９３（ＴＲＣ０９３／Ｄ９３）（切断されたコラーゲン，Ｔｒａｃｏｎ）；ＨｕＬｕｃ６３（ＣＳ１，ＰＤＬ　Ｐｈａｒｍａ）；イピリムマブ（ＭＤＸ－０１０）（ＣＴＬＡ４，Ｂｒｙｓｔｏｌ　Ｍｙｅｒｓ　Ｓｑｕｉｂｂ）；トレメリムマブ（チシリムマブ，ＣＰ－６７５，２）（ＣＴＬＡ４，Ｐｆｉｚｅｒ）；ＨＧＳ－ＥＴＲ１（マパツムマブ）（ＤＲ４　ＴＲＡＩＬ－Ｒ１アゴニスト、Ｈｕｍａｎ　Ｇｅｎｏｍｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅ／ＧｌａｘｏＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ）；ＡＭＧ－６５５（ＤＲ５，Ａｍｇｅｎ）；アポマブ（ＤＲ５，Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）；ＣＳ－１００８（ＤＲ５，Ｄａｉｉｃｈｉ　Ｓａｎｋｙｏ）；ＨＧＳ－ＥＴＲ２（レキサツマブ）（ＤＲ５　ＴＲＡＩＬ－Ｒ２　アゴニスト，ＨＧＳ）；セツキシマブ（Ｅｒｂｉｔｕｘ）（ＥＧＦＲ，Ｉｍｃｌｏｎｅ）；ＩＭＣ－１１Ｆ８，（ＥＧＦＲ，Ｉｍｃｌｏｎｅ）；ニモツズマブ（ＥＧＦＲ，ＹＭ　Ｂｉｏ）；パニツムマブ（Ｖｅｃｔａｂｉｘ）（ＥＧＦＲ，Ａｍｇｅｎ）；ザルツムマブ（ＨｕＭａｘＥＧＦｒ）（ＥＧＦＲ，Ｇｅｎｍａｂ）；ＣＤＸ－１１０（ＥＧＦＲｖＩＩＩ，ＡＶＡＮＴ　Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ）；アデカツムマブ（ＭＴ２０１）（Ｅｐｃａｍ，Ｍｅｒｃｋ）；エドレコロマブ（Ｐａｎｏｒｅｘ，１７－１Ａ）（Ｅｐｃａｍ，Ｇｌａｘｏ／Ｃｅｎｔｏｃｏｒ）；ＭＯＲＡｂ－００３（葉酸受容体ａ、Ｍｏｒｐｈｏｔｅｃｈ）；ＫＷ－２８７１（ガングリオシドＧＤ３，Ｋｙｏｗａ）；ＭＯＲＡｂ－００９（ＧＰ－９，Ｍｏｒｐｈｏｔｅｃｈ）；ＣＤＸ－１３０７（ＭＤＸ－１３０７）（ｈＣＧｂ，Ｃｅｌｌｄｅｘ）；トラスツズマブ（Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ）（ＨＥＲ２，Ｃｅｌｌｄｅｘ）；ペルツズマブ（ｒｈｕＭＡｂ　２Ｃ４）（ＨＥＲ２（ＤＩ），Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）；アポリズマブ（ＨＬＡ－ＤＲβ鎖，ＰＤＬ　Ｐｈａｒｍａ）；ＡＭＧ－４７９（ＩＧＦ－ＩＲ，Ａｍｇｅｎ）；抗ＩＧＦ－１Ｒ　Ｒ１５０７（ＩＧＦｌ－Ｒ，Ｒｏｃｈｅ）；ＣＰ　７５１８７１（ＩＧＦ１－Ｒ，Ｐｆｉｚｅｒ）；ＩＭＣ－Ａ１２（ＩＧＦ１－Ｒ，Ｉｍｃｌｏｎｅ）；ＢＩＩＢ０２２（ＩＧＦ－１Ｒ，Ｂｉｏｇｅｎ）；Ｍｉｋ－β－１（ＩＬ－２Ｒｂ（ＣＤ１２２），Ｈｏｆｆｍａｎ　ＬａＲｏｃｈｅ）；ＣＮＴＯ　３２８（ＩＬ６，Ｃｅｎｔｏｃｏｒ）；抗ＫＩＲ（１－７Ｆ９）（Ｋｉｌｌｅｒ細胞Ｉｇ様受容体（ＫＩＲ），Ｎｏｖｏ）；Ｈｕ３Ｓ１９３（Ｌｅｗｉｓ（ｙ），Ｗｙｅｔｈ，Ｌｕｄｗｉｇ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　ｏｆ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）；ｈＣＢＥ－１１（ＬＴＢＲ，Ｂｉｏｇｅｎ）；ＨｕＨＭＦＧｌ（ＭＵＣ１，Ａｎｔｉｓｏｍａ／ＮＣＩ）；ＲＡＶ１２（Ｎ結合型炭水化物エピトープ，Ｒａｖｅｎ）；ＣＡＬ（副甲状腺ホルモン関連タンパク質（ＰＴＨ－ｒＰ），Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｏｆ　Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）；ＣＴ－０１１（ＰＤ１，ＣｕｒｅＴｅｃｈ）；ＭＤＸ－１１０６（ｏｎｏ－４５３８）（ＰＤ１，Ｍｅｄａｒｅｘ／Ｏｎｏ）；ＭＡｂＣＴ－０１１（ＰＤ１，Ｃｕｒｅｔｅｃｈ）；ＩＭＣ－３Ｇ３（ＰＤＧＦＲａ，Ｉｍｃｌｏｎｅ）；バビツキシマブ（ホスファチジルセリン、Ｐｅｒｅｇｒｉｎｅ）；ｈｕＪ５９１（ＰＳＭＡ，Ｃｏｒｎｅｌｌ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｆｏｕｎｄａｔｉｏｎ）；ｍｕＪ５９１（ＰＳＭＡ，Ｃｏｒｎｅｌｌ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｆｏｕｎｄａｔｉｏｎ）；ＧＣ１００８（ＴＧＦｂ（ｐａｎ）阻害剤（ＩｇＧ４），Ｇｅｎｚｙｍｅ）；インフリキシマブ（レミケイド）

（ＴＮＦａ，Ｃｅｎｔｏｃｏｒ）；Ａ２７．１５（トランスフェリン受容体、Ｓａｌｋ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ，ＩＮＳＥＲＮＷＯ２００５／１１１０８２）；Ｅ２．３（トランスフェリン受容体、Ｓａｌｋ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ）；ベバシズマブ（Ａｖａｓｔｉｎ）（ＶＥＧＦ，Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）；ＨｕＭＶ８３３（ＶＥＧＦ，Ｔｓｕｋｕｂａ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｌａｂ－ＷＯ／２０００／０３４３３７，Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｔｅｘａｓ）；ＩＭＣ－１８Ｆ１（ＶＥＧＦＲ１，Ｉｍｃｌｏｎｅ）；ＩＭＣ－１１２１（ＶＥＧＦＲ２，Ｉｍｃｌｏｎｅ）が含まれる。

【０２２３】

Ｂ．ＤＶＤ分子の構築：

二重可変ドメイン免疫グロブリン（ＤＶＤ－Ｉｇ）分子は、２つの異なる親モノクローナル由来の２つの異なる軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）が、組み換えＤＮＡ技術によって、直接又は短いリンカーを介して直列に連結され、その後に軽鎖定常ドメインが続くように設計される。同様に、重鎖は、直列に連結された２つの異なる重鎖可変ドメイン（ＶＨ）の後に、定常ドメインＣＨ１及びＦｃ領域（図１Ａ）を含む。

【０２２４】

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

【０２２５】

一実施形態において、第一及び第二の可変ドメインは、組み換えＤＮＡ技術を用いて、互いに直接連結されている。別の実施形態において、可変ドメインは、リンカー配列を介して連結されている。一実施形態において、２つの可変ドメインが連結されている。３つ又はそれ以上の可変ドメインも、直接又はリンカー配列を介して連結され得る。可変ドメインは、同じ抗原を結合し得、又は異なる抗原を結合し得る。本発明のＤＶＤ分子は、１つの免疫グロブリン可変ドメイン及び受容体のリガンド結合ドメイン、酵素の活性ドメインなどの１つの非免疫グロブリン可変ドメインを含み得る。ＤＶＤ分子は、２つ又はそれ以上の非Ｉｇドメインも含み得る。

【０２２６】

リンカー配列は、単一のアミノ酸又はポリペプチド配列であり得る。一実施形態において、リンカー配列は、ＡＫＴＴＰＫＬＥＥＧＥＦＳＥＡＲ（配列番号１）；ＡＫＴＴＰＫＬＥＥＧＥＦＳＥＡＲＶ（配列番号２）；ＡＫＴＴＰＫＬＧＧ（配列番号３）；ＳＡＫＴＴＰＫＬＧＧ（配列番号４）；ＳＡＫＴＴＰ（配列番号５）；ＲＡＤＡＡＰ（配列番号６）；ＲＡＤＡＡＰＴＶＳ（配列番号７）；ＲＡＤＡＡＡＡＧＧＰＧＳ（配列番号８）；ＲＡＤＡＡＡＡ（$G_4S)_4$（配列番号９）；ＳＡＫＴＴＰＫＬＥＥＧＥＦＳＥＡＲＶ（配列番号１０）；ＡＤＡＡＰ（配列番号１１）；ＡＤＡＡＰＴＶＳＩＦＰＰ（配列番号１２）；ＴＶＡＡＰ（配列番号１３）；ＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰＰ（配列番号１４）；ＱＰＫＡＡＰ（配列番号１５）；ＱＰＫＡＡＰＳＶＴＬＦＰＰ（配列番号１６）；ＡＫＴＴＰＰ（配列番号１７）；ＡＫＴＴＰＰＳＶＴＰＬＡＰ（配列番号１８）；ＡＫＴＴＡＰ（配列番号１９）；ＡＫＴＴＡＰＳＶＹＰＬＡＰ（配列番号２０）；ＡＳＴＫＧＰ（配列番号２１）；ＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰ（配列番号２２）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号２３）；ＧＥＮＫＶＥＹＡＰＡＬＭＡＬＳ（配列番号２４）；ＧＰＡＫＥＬＴＰＬＫＥＡＫＶＳ（配列番号２５）；及びＧＨＥＡＡＡＶＭＱＶＱＹＰＡＳ（配列番号２６）からなる群から選択される。リンカー配列の選択は、幾つかのＦａｂ分子の結晶構造分析に基づいている。Ｆａｂ又は抗体分子構造中の可変ドメインとＣＨ１／ＣＬ定常ドメインの間には、天然の柔軟な連結が存在する。この天然の連結は、ＶドメインのＣ末端由来の４から６残基及びＣＬ／ＣＨ１ドメインのＮ末端由来の４から６残基によって寄与される約１０から１２個のアミノ酸残基を含む。本発明のＤＶＤＩｇは、それぞれ、ＤＶＤ－Ｉｇの軽鎖及び重鎖中のリンカーとしてＣＬ又はＣＨ１のＮ末端の５から６アミノ酸残

基、又は１１から１２アミノ酸残基を用いて作製された。ＣＬ又はＣＨ１ドメインのＮ末端残基、特に最初の５から６個のアミノ酸残基は、強い二次構造なしにループ立体構造を採り、従って、２つの可変ドメイン間の柔軟なリンカーとして作用することが可能である。ＣＬ又はＣＨ１ドメインのＮ末端残基は、Ｉｇ配列の一部であるので、可変ドメインの天然の伸長であり、従って、リンカー及び連結から生じ得るあらゆる免疫原性の大部分を最小限に抑える。

【０２２７】

他のリンカー配列は、ＣＬ／ＣＨ１ドメインのあらゆる長さのあらゆる配列を含み得るが、ＣＬ／ＣＨ１ドメインの全ての残基は含まない。例えば、ＣＬ／ＣＨ１ドメインの最初の５から１２個のアミノ酸残基；軽鎖リンカーは、Ｃκ又はＣλに由来することが可能であり；並びに重鎖リンカーは、Ｃγ１、Ｃγ２、Ｃγ３、Ｃγ４、Ｃα１、Ｃα２、Ｃδ、Ｃε及びＣμを含む、何れかのイソタイプのＣＨ１に由来することが可能である。リンカー配列は、Ｉｇ様タンパク質（例えば、ＴＣＲ、ＦｃＲ、ＫＩＲ）、Ｇ／Ｓを基礎とする配列（例えば、Ｇ４Ｓリピート配列番号２７）；ヒンジ領域に由来する配列及び他のタンパク質から得られる他の天然配列などの他のタンパク質からも由来し得る。

【０２２８】

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

【０２２９】

別の実施形態において、２つの重鎖ＤＶＤポリペプチド及び２つの軽鎖ＤＶＤポリペプチドは組み合わされて、ＤＶＤ－Ｉｇ分子を形成する。表２は、疾病を治療するのに（例えば、癌を治療するのに）有用な標的に対する典型的な抗体のＶＨ及びＶＬ領域のアミノ酸配列を列記する。一実施形態において、本発明は、何れの方向性でも、表２に列記されているＶＨ及び／又はＶＬ領域の少なくとも２つを含むＤＶＤを提供する。

【０２３０】

【表２】

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

配列番号	ABT ユニーク ID	タンパク質領域	配列 12345678901234567890123456789012345678901234567890
28	AB001VH	CD20	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQT PGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVS A
29	AB001VL	CD20	QIVLSQSPAILSPSPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPG SSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAE DAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKR
30	AB003VH	EGFR(1st 配列)	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGDYYWTWIR QSPGKGLEWIGHIYYSGNTNYNPSLKSRLTISIDTSKTQF SLKLSSVTAADTAIYYCVRDRVTGAFDIWGQGTMVTVSS
31	AB003VL	EGFR(1st 配列)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKP GKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQP EDIATYFCQHFDHLPLAFGGGTKVEIKR
32	AB010VH	IGF1,2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQA TGQGLEWMGWMNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRNTSISTAY MELSSLRSEDTAVYYCARDPYYYYYGMDVWGQGTTVTVSS
33	AB010VL	IGF1,2	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIENNHVSWYQQL PGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQ TGDEADYYCETWDTSLSAGRVFGGGTKLTVLG
34	AB017VH	TNF	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQA PGKGLEWVSAITWNSGHIDYADSVEGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGTLVTVS S
35	AB017VL	TNF	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKP GKAPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIKR
36	AB020VH	NGF	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQP PGKGLEWIGIIWGDGTTDYNSAVKSRVTISKDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYYFDYWGQGTLVTVS S
37	AB020VL	NGF	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISNNLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQP EDIATYYCQQEHTLPYTFGQGTKLEIKR
38	AB032VH	IL-1b	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSVYGMNWVRQA PGKGLEWVAIIWYDGDNQYYADSVKGRFTISRDNSKNTLY LQMNGLRAEDTAVYYCARDLRTGPFDYWGQGTLVTVSS
39	AB032VL	IL-1b	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLHWYQQKP DQSPKLLIKYASQSFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEA EDAAAYYCHQSSSLPFTFGPGTKVDIKR

配列番号	ABT ユニーク ID	タンパク質領域	配列 12345678901234567890123456789012345678901234567890
40	AB033VH	EGFR (2nd 配列)	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQS PGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFF KMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSA
41	AB033VL	EGFR (2nd 配列)	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRT NGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVES EDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKR
42	AB040VH	IL-6	QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTNGMGVSWIR QPSGKGLEWLAHIYWDEDKRYNPSLKSRLTISKDTSNNQV FLKITNVDTADTATYYCARRRIIYDVEDYFDYWGQGTTLT VSS
43	AB040VL	IL-6	QIVLIQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQKPG SSPRLLIYDTSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAE DAATYYCQQWSGYPYTFGGGTKLEIKR
44	AB043VH	Abeta (配列 1)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQA PGKGLEWVASIRSGGGRTYYSDNVKGRFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCVRYDHYSGSSDYWGQGTLVTVSS
45	AB043VL	Abeta (配列 1)	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNW LLQKPGQSPQRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCWQGTHFPRTFGQGTKVEIKR
46	AB044VH	Abeta (配列 2)	EVKLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVASIHNRGTIFYLDSVKGRFTISRDNVRNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCTRGRSNSYAMDYWGQGTSVTVSS
47	AB044VL	Abeta (配列 2)	DVLVTQSPLSLPVTPGEPASISCRSTQTLVHRNGDTYLEW YLQKPGQSPQSLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYTFGQGTKLEIKR
48	AB045VH	Abeta (配列 3)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQA PGKGLELVASINSNGGSTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCASGDYWGQGTLVTVSS
49	AB045VL	Abeta (配列 3)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVYSNGDTYLHW YLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCSQSTHVPWTFGGGTKVEIKR
50	AB046VH	IL-18	EVQLVQSGTEVKKPGESLKISCKGSGYTVTSYWIGWVRQM PGKGLEWMGFIYPGDSETRYSPTFQGQVTISADKSFNTAF LQWSSLKASDTAMYYCARVGSGWYPYTFDIWGQGTMVTVS S
51	AB046VL	IL-18	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESISSNLAWYQQKP GQAPRLFIYTASTRATDIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQS EDFAVYYCQQYNNWPSITFGQGTRLEIKR
52	AB052VH	S1P	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCQSFGYIFIDHTIHWMRQM PGQGLEWMGAISPRHDITKYNEMFRGQVTISADKSSSTAY LQWSSLKASDTAMYFCARGGFYGSTIWFDFWGQGTMVTVS S
53	AB052VL	S1P	ETTVTQSPSFLSASVGDRVTITCITTTDIDDDMNWFQQEP GKAPKLLISEGNILRPGVPSRFSSSGYGTDFTLTISKLQP EDFATYYCLQSDNLPFTFGQGTKLEIKR
54	AB059VH	RGMa	EVQLVESGGGLVQPGSSLKLSCVASGFTFSNYGMNWIRQA PKKGLEWIGMIYYDSSEKHYADSVKGRFTISRDNSKNTLY LEMNSLRSEDTAIYYCAKGTTPDYWGQGVMVTVSS
55	AB059VL	RGMa	DVVLTQTPVSLSVTLGDQASMSCRSSQSLEYSDGYTFLEW FLQKPGQSPQLLIYEVSNRFSGVPDRFIGSGSGTDFTLKI SRVEPEDLGVYYCFQATHDPLTFGSGTKLEIKR

配列番号	ABT ユニーク ID	タンパク質領域	配列 12345678901234567890123456789012345678901234567890
56	AB060VH	RAGE	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNFGMNWVKQA PGKGLKWMGYINTNTGESIYSEEFKGRFAFSLETSASTAY LQINNLKNEDTATYFCARSRMVTAYGMDYWGQGTSVTVSS
57	AB060VL	RAGE	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSITCKASQNVGTAVAWYQQRP GQSPKLLIFSASNRYTGVPDRFTGSGSGTDFTLTLSNMQP EDLADYFCQQYSSYPLTFGVGTKLELKR

【０２３１】

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

【０２３２】

Ｃ．ＤＶＤタンパク質の作製

本発明の結合タンパク質は、本分野で公知の多数の何れかによって作製され得る。例えば、宿主細胞からの発現において、ＤＶＤ重鎖及びＤＶＤ軽鎖をコードする発現ベクターは、標準的な技術によって、宿主細胞中に形質移入される。「形質移入」という用語の様々な形態は、原核又は真核宿主細胞中への外来ＤＮＡの導入のために一般に使用される多様な技術、例えば、電気穿孔、リン酸カルシウム沈殿、ＤＥＡＥ－デキストラン形質移入などを包含するものとする。原核又は真核宿主細胞の何れの中でも、本発明のＤＶＤタンパク質を発現することは可能であるが、真核細胞（特に、哺乳動物細胞）は、原核細胞に比べて、適切に折りたたまれ、免疫学的に活性なＤＶＤタンパク質を組み立て及び分泌する傾向がより大きいので、ＤＶＤタンパク質は、真核細胞中、例えば、哺乳動物宿主細胞中で発現される。

【０２３３】

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

【０２３４】

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

ＤＶＤタンパク質を合成する方法を提供する。本方法は、培地からＤＶＤタンパク質を単離することをさらに含むことが可能である。

【０２３５】

ＤＶＤ－Ｉｇの重要な特徴は、ＤＶＤ－Ｉｇが、旧来の抗体と同様の様式で作製及び精製され得ることである。ＤＶＤ－Ｉｇの作製は、定常領域の何れの配列修飾もなしに、又は何れの種類の化学的修飾もなしに、所望される二重特異的活性を有する均一な単一主要産物をもたらす。「二特異的」、「多重特異的」及び「多重特異的多価」完全長結合タンパク質を作製するための他の以前に記載された方法は、単一の主要産物をもたらさず、代わりに、集合した不活性な単一特異的、多重特異的、多価の完全長結合タンパク質と、異なる結合部位の組み合わせを有する多価完全長結合タンパク質との混合物の細胞内産生又は分泌された産生をもたらす。例として、Ｍｉｌｌｅｒ　ａｎｄ　Ｐｒｅｓｔａ（ＰＣＴ公開ＷＯ２００１／０７７３４２（Ａ１））によって記載された設計に基づいて、重鎖及び軽鎖の１６の可能な組み合わせが存在する。その結果、タンパク質の僅か６．２５％が、所望の活性形態であり、他の１５個の可能な可能性と比べて、単一の主要な産物又は単一の主な産物として存在しない可能性がある。典型的には、大規模な製造において使用される標準的クロマトグラフィー技術を用いて、タンパク質の所望される完全に活性な形態を、タンパク質の不活性な形態及び部分的に活性な形態から分離することは、未だ示されていない。

【０２３６】

驚くべきことに、本発明の「二重特異的多価完全長結合タンパク質」の設計は、主として、所望される「二重特異的多価完全長結合タンパク質」へ集合する二重可変ドメイン軽鎖及び二重可変ドメイン重鎖をもたらす。

【０２３７】

集合され、及び発現された二重可変ドメイン免疫グロブリン分子の少なくとも５０％、好ましくは７５％及びより好ましくは９０％が、所望される二重特異的四価タンパク質である。本発明の本態様は、特に、本発明の商業的な利用を強化する。従って、本発明は、単一の細胞中で二重可変ドメイン軽鎖及び二重可変ドメイン重鎖を発現し、「二重特異的四価完全長結合タンパク質」の単一の主要産物をもたらす方法を含む。

【０２３８】

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

【０２３９】

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

【０２４０】

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

【０２４１】

ＩＩ．誘導体化されたＤＶＤ結合タンパク質：

一実施形態は、標識された結合タンパク質を提供し、ここで、本発明の結合タンパク質は、別の機能的分子（例えば、別のペプチド又はタンパク質）へ誘導体化され、又は連結される。例えば、本発明の標識された結合タンパク質は、別の抗体（例えば、二特異的抗体又はダイアボディ）、検出可能な因子、細胞毒性剤、薬剤及び／又は別の分子（ストレプトアビジンコア領域又はポリヒスチジンタグなど）との、結合タンパク質の会合を媒介

可能なタンパク質若しくはペプチドなどの１つ又はそれ以上の他の分子実体へ、（化学的カップリング、遺伝的融合、非共有会合又はその他によって）本発明の結合タンパク質を機能的に連結することによって誘導することが可能である。

【０２４２】

本発明の結合タンパク質を誘導体化し得る有用な検出可能因子には、蛍光化合物が含まれる。典型的な蛍光検出可能因子には、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアナート、ローダミン、５－ジメチルアミン－１－ナフタレンスルホニルクロリド、フィコエリトリンなどが含まれる。結合タンパク質は、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼなどの検出可能な酵素でも誘導体化され得る。結合タンパク質が検出可能な酵素で誘導体化される場合には、検出可能な反応産物を生成させるために、本酵素が使用するさらなる試薬を添加することによって結合タンパク質が検出される。例えば、検出可能因子西洋ワサビペルオキシダーゼが存在する場合には、過酸化水素及びジアミノベンジジンの添加は、検出可能な発色した反応産物をもたらす。結合タンパク質は、ビオチンを用いて誘導体化し、アビジン又はストレプトアビジン結合の間接的な測定を通じても検出され得る。

【０２４３】

本発明の別の実施形態は、結晶化された結合タンパク質並びにこのような結晶を含む製剤及び組成物を提供する。一実施形態において、結晶化された結合タンパク質は、結合タンパク質の可溶性対応物より大きなインビボ半減期を有する。別の実施形態において、結合タンパク質は、結晶化後の生物活性を保持する。

【０２４４】

本発明の結晶化された結合タンパク質は、本分野で公知の方法に従って、及びＷＯ０２０７２６３６（参照により、本明細書に組み込まれる。）に開示されているように産生され得る。

【０２４５】

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

【０２４６】

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

【０２４７】

さらに別の実施形態において、本発明の抗体又は抗原結合部分のグリコシル化は修飾さ

れる。例えば、無グリコシル化抗体を作製することが可能である（すなわち、抗体は、グリコシル化を欠如する。）。グリコシル化は、例えば、抗原に対する抗体の親和性を増加させるために改変することが可能である。このような炭水化物修飾は、例えば、抗体配列内のグリコシル化の１つ又はそれ以上の部位を変化させることによって達成することが可能である。例えば、それによって、当該部位のグリコシル化を除去するために、１つ又はそれ以上の可変領域グリコシル化部位の除去をもたらす１つ又はそれ以上のアミノ酸置換を施すことが可能である。このような無グリコシル化は、抗原に対する抗体の親和性を増加させ得る。このようなアプローチは、ＰＣＴ公開ＷＯ２００３０１６４６６Ａ２並びに米国特許第５，７１４，３５０号及び米国特許第６，３５０，８６１号（これらの各々の全体が、参照により、本明細書に組み込まれる。）に、さらに詳しく記載されている。

【０２４８】

これに加えて又はこれに代えて、フコシル残基の減少した量を有する低フコシル化抗体（Ｋａｎｄａ，Ｙｕｔａｋａ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（２００７），１３０（３），３００－３１０参照）又は増加した二分岐ＧｌｃＮＡｃ構造を有する抗体など、グリコシル化の変化した種類を有する本発明の修飾された結合タンパク質を作製することが可能である。このような変化されたグリコシル化パターンは、抗体のＡＤＣＣ能力を増加させることが示されている。このような炭水化物修飾は、例えば、変化したグリコシル化機構を有する宿主細胞中で抗体を発現させることによって達成することが可能である。変化したグリコシル化機構を有する細胞は本分野において記載されており、その中で、本発明の組み換え抗体を発現させることによって、変化したグリコシル化を有する抗体を産生するための宿主細胞として使用することができる。例えば、Ｓｈｉｅｌｄｓ，Ｒ．Ｌ．ｅｔ ａｌ．（２００２）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７７：２６７３３－２６７４０；Ｕｍａｎａ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．１７：１７６－１及び欧州特許ＥＰ１，１７６，１９５；ＰＣＴ公開ＷＯ０３／０３５８３５；ＷＯ９９／５４３４２８０（これらの各々の全体が、参照により、本明細書に組み込まれる。）を参照されたい。

【０２４９】

タンパク質グリコシル化は、対象のタンパク質のアミノ酸配列及びその中でタンパク質が発現される宿主細胞に依存する。異なる生物は、異なるグリコシル化酵素（例えば、グリコシル転移酵素及びグリコシダーゼ）を産生し得、利用可能な異なる基質（ヌクレオチド糖）を有し得る。このような要因のために、タンパク質グリコシル化パターン及びグリコシル残基の組成は、当該タンパク質がその中で発現されている宿主系に応じて異なり得る。本発明において有用なグリコシル残基には、グルコース、ガラクトース、マンノース、フコース、ｎ－アセチルグルコサミン及びシアル酸が含まれ得るが、これらに限定されない。一実施形態において、グリコシル化された結合タンパク質は、グリコシル化パターンがヒトであるように、グリコシル残基を含む。

【０２５０】

異なるタンパク質グリコシル化は異なるタンパク質特性をもたらし得ることが、当業者に公知である。例えば、酵母などの微生物宿主中で産生され、酵母内在経路を用いてグリコシル化された治療用タンパク質の効力は、ＣＨＯ細胞株などの哺乳動物細胞中で発現された同じタンパク質の効力と比べて低下され得る。また、このような糖タンパク質は、ヒトにおいて免疫原性であり得、投与後に、減少したインビボ半減期を示し得る。ヒト及び他の動物中の特異的な受容体は、特異的なグリコシル残基を認識し得、血流からのタンパク質の迅速な排除を促進し得る。他の有害な効果は、タンパク質の折り畳み、溶解度、プロテアーゼに対する感受性、運搬、輸送、区画化、分泌、他のタンパク質又は因子による認識、抗原性又はアレルギー誘発性の変化が含まれ得る。従って、当業者は、グリコシル化の特異的な組成及びパターン、例えば、ヒト細胞中又は意図される対象動物の種特異的細胞中で産生されるものと同一又は少なくとも類似のグリコシル化組成及びパターンを有する治療タンパク質を選択し得る。

【０２５１】

宿主細胞のものとは異なるグリコシル化されたタンパク質を発現することは、異種グリコシル化酵素を発現するために宿主細胞を遺伝的に修飾することによって達成され得る。本分野で公知の技術を使用して、当業者は、ヒトタンパク質グリコシル化を呈する抗体又はその抗原結合部分を作製し得る。例えば、酵母株中で産生されたグリコシル化されたタンパク質（糖タンパク質）が、動物細胞、特にヒト細胞のものと同一のタンパク質グリコシル化を呈するように（米国特許出願第２００４００１８５９０号及び米国特許出願第２００２０１３７１３４号並びにＰＣＴ公開ＷＯ２００５１００５８４Ａ２）、酵母株は、天然に存在しないグリコシル化酵素を発現するように遺伝的に修飾されている。

【０２５２】

結合タンパク質に加えて、本発明は、本発明のこのような結合タンパク質に対して特異的な抗イディオタイプ（抗Ｉｄ）抗体にも関する。抗Ｉｄ抗体は、別の抗体の抗原結合領域に一般的に付随する固有の決定基を認識する抗体である。抗Ｉｄは、結合タンパク質又はそのＣＤＲ含有領域で動物を免疫化することによって調製することが可能である。免疫された動物は、免疫抗体のイディオタイプ決定基を認識し、これに応答し、及び抗Ｉｄ抗体を産生する。ＤＶＤ－Ｉｇ分子中に取り込まれた２つ又はそれ以上の親抗体に対する抗イディオタイプ抗体を作製し、各親抗体のイディオタイプに対して特異的な抗イディオタイプ抗体がＤＶＤ－Ｉｇにおけるイディオタイプ（例えば、抗原結合部位）も認識することを確かめるために、本分野で十分に認知されている方法（例えば、ＢＩＡｃｏｒｅ、ＥＬＩＳＡ）による結合研究を確認することがより容易であることは自明である。ＤＶＤ－Ｉｇの２つ又はそれ以上の抗原結合部位の各々に対して特異的な抗イディオタイプ抗体は、ヒト患者血清中のヒトＤＶＤ－ＩｇのＤＶＤ－Ｉｇ濃度を測定するための理想的な試薬を提供する。ＤＶＤ－Ｉｇ濃度アッセイは、第一の抗原結合領域に対する抗体が固相（例えば、ＢＩＡｃｏｒｅチップ、ＥＬＩＳＡプレートなど）上に被覆され、濯ぎ緩衝液で濯ぎ、血清試料との温置、別の濯ぎ工程及びそれ自体結合反応の定量用酵素で標識された別の抗原結合部位に対する別の抗イディオタイプ抗体とともに最終的に温置する「サンドイッチアッセイＥＬＩＳＡフォーマット」を使用して確立することが可能である。一実施形態において、３以上の異なる結合部位を有するＤＶＤ－Ｉｇに関して、２つの最も外側の結合部位（定常領域から最も遠い及び近い）に対する抗イディオタイプ抗体は、ヒト血清中のＤＶＤ－Ｉｇ濃度を測定するのに役立つのみならず、インビボでの分子の完全性も記述する。各抗Ｉｄ抗体は、いわゆる抗抗Ｉｄ抗体を産生するさらに別の動物中に免疫応答を誘導するための「免疫原」としても使用し得る。

【０２５３】

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

【０２５４】

ＩＩＩ．ＤＶＤ－Ｉｇの使用

本発明の結合タンパク質は２つ又はそれ以上の抗原に結合することができるので、本発明の結合タンパク質は、酵素結合免疫吸着検定法（ＥＬＩＳＡ）、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）又は組織免疫組織化学など慣用のイムノアッセイを用いて、（例えば、血清又は血漿などの生物学的試料中で）抗原を検出するために使用することが可能である。ＤＶＤ－Ｉｇは、結合した又は結合していない抗体の検出を促進するために、検出可能な物質で直接又は間接的に標識される。適切な検出可能な物質には、様々な酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質及び放射性物質が含まれる。適切な酵素の例には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、β－ガラクトシダーゼ又はアセチルコリンエステラーゼが含まれる。適切な補欠分子族複合体の例には、ストレプトアビジン／ビオチン及びアビジン／ビオチンが含まれる。適切な蛍光物質の例には、ウンベリフェロン、フルオ

レセイン、フルオレセインイソチオシアナート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリド又はフィコエリトリンが含まれる。発光物質の例には、ルミノールが含まれる；及び適切な放射性材料の例には、^{3}Ｈ、^{14}Ｃ、^{35}Ｓ、^{90}Ｙ、^{99}Ｔｃ、^{111}Ｉｎ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{177}Ｌｕ、^{166}Ｈｏ又は^{153}Ｓｍが含まれる。

【０２５５】

一実施形態において、本発明の結合タンパク質は、インビトロ及びインビボの両者で、抗原の活性を中和することができる。従って、このようなＤＶＤ－Ｉｇは、例えば、抗原を含有する細胞培地中で、ヒト対象中で、本発明の結合タンパク質が交叉反応する抗原を有するその他の哺乳動物対象中で、抗原活性を阻害するために使用することができる。別の実施形態において、本発明は、抗原活性が有害である疾病又は疾患に罹患している対象中の抗原活性を低下させる方法を提供する。本発明の結合タンパク質は、治療目的のために、ヒト対象に投与することができる。

【０２５６】

本明細書において使用される「抗原活性が有害である疾患」という用語は、本疾患に罹患している対象中での抗原の存在が、疾患の病態生理の原因であることが示され若しくは疑われ又は疾患の悪化に寄与している因子であることが示され若しくは疑われている疾病及びその他の疾患を含むものとする。従って、抗原活性が有害である疾患は、抗原活性の低下が疾患の症候及び／又は進行を緩和することが予測される疾患である。このような疾患は、例えば、本疾患に罹患している患者の生物学的液体中の抗原濃度の増加（例えば、対象の血清、血漿、滑液中などの抗原の濃度の増加）によって明らかとされ得る。本発明の結合タンパク質で治療することが可能な疾患の非限定的な例には、以下に、及び本発明の抗体の医薬組成物に関するセクションに論述されている疾患が含まれる。

【０２５７】

本発明のＤＶＤ－Ｉｇは、１つの抗原又は複数の抗原を結合し得る。このような抗原には、以下のデータベース（データベースは、参照により、本明細書に組み込まれる。）に列記されている標的が含まれるが、これらに限定されるものではない。これらの標的データベースには、以下のリストが含まれる。

【０２５８】

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

サイトカイン及びサイトカイン受容体（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｃｙｔｏｋｉｎｅｗｅｂｆａｃｔｓ．ｃｏｍ／、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｃｏｐｅｗｉｔｈｃｙｔｏｋｉｎｅｓ．ｄｅ／ｃｏｐｅ．ｃｇｉ及びｈｔｔｐ：／／ｃｍｂｉ．ｂｊｍｕ．ｅｄｕ．ｃｎ／ｃｍｂｉｄａｔａ／ｃｇｆ／ＣＧＦ＿Ｄａｔａｂａｓｅ／ｃｙｔｏｋｉｎｅ．ｍｅｄｉｃ．ｋｕｍａｍｏｔｏ－ｕ．ａｃ．ｊｐ／ＣＦＣ／ｉｎｄｅｘＲ．ｈｔｍｌ）；

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

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

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

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

癌標的（ｈｔｔｐ：／／ｃｇｅｄ．ｈｇｃ．ｊｐ／ｃｇｉ－ｂｉｎ／ｉｎｐｕｔ．ｃｇｉ）；

潜在的な抗体標的としての分泌タンパク質（ｈｔｔｐ：／／ｓｐｄ．ｃｂｉ．ｐｋｕ．ｅｄｕ．ｃｎ／）；

タンパク質キナーゼ（ｈｔｔｐ：／／ｓｐｄ．ｃｂｉ．ｐｋｕ．ｅｄｕ．ｃｎ／）並び

に
ヒトＣＤマーカー（ｈｔｔｐ：／／ｃｏｎｔｅｎｔ．ｌａｂｖｅｌｏｃｉｔｙ．ｃｏｍ／ｔｏｏｌｓ／６／１２２６／ＣＤ＿ｔａｂｌｅ＿ｆｉｎａｌ＿ｌｏｃｋｅｄ．ｐｄｆ）及び（Ｚｏｌａ Ｈ，２００５ ＣＤ ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ ２００５：ｈｕｍａｎ ｃｅｌｌ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ Ｂｌｏｏｄ，１０６：３１２３－６）。

【０２５９】

ＤＶＤ－Ｉｇは、効力／安全を増強し、及び／又は患者の範囲を増加させるために、２つの異なる標的を同時に遮断するための治療剤として有用である。このような標的は、可溶性標的（ＴＮＦ）及び細胞表面受容体標的（ＶＥＧＦＲ及びＥＧＦＲ）が含まれ得る。このような標的は、癌療法のために腫瘍細胞とＴ細胞（Ｈｅｒ２とＣＤ３）との間に、又は自己免疫疾患若しくは移植のために自己反応性細胞とエフェクター細胞の間に、又はある所定の疾病において疾病を引き起こす細胞を除去するために何れかの標的細胞とエフェクター細胞の間に、再誘導された細胞障害を誘導するために使用することも可能である。

【０２６０】

さらに、同一受容体上の２つの異なるエピトープを標的とするように設計されている場合には、ＤＶＤ－Ｉｇは、受容体のクラスタリング及び活性化を惹起するために使用することが可能である。これは、アゴニスト及びアンタゴニスト作用を有する抗ＧＰＣＲ治療剤を作製する上で有用性を有し得る。この場合には、ＤＶＤ－Ｉｇは、クラスタリング／シグナル伝達（２つの細胞表面分子）又はシグナル伝達（１つの分子上）のために、１つの細胞上に存在する２つの異なるエピトープ（ループ領域及び細胞外ドメインの両方の上のエピトープを含む。）を標的とするために使用することが可能である。同様に、ＤＶＤ－Ｉｇ分子は、ＣＴＬＡ－４連結、及びＣＴＬＡ－４細胞外ドメインの２つの異なるエピトープ（又は同一エピトープの２コピー）を標的として免疫応答の下方制御をもたらすことによって、負のシグナルを惹起するように設計することが可能である。ＣＴＬＡ－４は、多数の免疫学的疾患の治療的処置に対して、臨床的に妥当性が確認された標的である。ＣＴＬＡ－４／Ｂ７相互作用は、細胞周期の進行、ＩＬ－２産生及び活性化に続くＴ細胞の増殖を弱化することによって、Ｔ細胞活性化を負に制御し、ＣＴＬＡ－４（ＣＤ１５２）の拘束は、Ｔ細胞の活性化を下方制御し、免疫寛容の誘導を促進することができる。しかしながら、ＣＴＬＡ－４の活性化は連結を必要とするので、アゴニスト性抗体によるＣＴＬＡ－４の拘束によって、Ｔ細胞の活性化を弱化するという戦略は成功を収めていない。ＣＴＬＡ－４／Ｂ７の分子相互作用は、結晶構造分析によって示されたように（Ｓｔａｍｐｅｒ ２００１ Ｎａｔｕｒｅ４１０：６０８）、「歪んだジッパー」アレイである。しかしながら、抗ＣＴＬＡ－４ｍＡｂを含む、現在利用可能なＣＴＬＡ－４結合試薬は何れも、連結特性を有しない。この問題に対処するために、幾つかの試みが行われてきた。１つの事例では、細胞要素が結合された一本鎖抗体が作製され、マウス中での同種異系拒絶を著しく阻害した（Ｈｗａｎｇ ２００２ ＪＩ １６９：６３３）。別の事例では、人工のＡＰＣ表面に連結された、ＣＬＴＡ－４に対する一本鎖抗体が作製され、Ｔ細胞応答を弱化させることが示された（Ｇｒｉｆｆｉｎ ２０００ ＪＩ １６４：４４３３）。何れの事例でも、人工の系内に近接して配置された膜結合型抗体によって、ＣＴＬＡ－４連結が達成された。これらの実験は、ＣＴＬＡ－４の負のシグナル伝達を引き起こすことによる免疫の下方制御という概念に対する証明を与えるが、これらの報告で使用された試薬は、治療的用途には適していない。この目的のために、ＣＴＬＡ－４細胞外ドメインの２つの異なるエピトープ（又は同一エピトープの２コピー）を標的とするＤＶＤ－Ｉｇ分子を使用することによって、ＣＴＬＡ－４連結が達成され得る。論拠は、ＩｇＧの２つの結合部位を貫く距離（約１５０から１７０Å）が、ＣＴＬＡ－４の活性な連結（２個のＣＴＬＡ－４ホモ二量体間で３０から５０Å）には大きすぎるということである。しかしながら、ＤＶＤ－Ｉｇ（１つのアーム）上の２つの結合部位間の距離はずっと短く、３０から５０Åの範囲にあるので、ＣＴＬＡ－４の適切な連結を可能とする。

【０２６１】

同様に、ＤＶＤ－Ｉｇは、細胞表面受容体複合体の２つの異なる要素（例えば、ＩＬ－１２Ｒα及びβ）を標的とすることが可能である。さらに、ＤＶＤ－Ｉｇは、標的可溶性タンパク質／病原体の迅速な排除を誘導するために、ＣＲ１及び可溶性タンパク質／病原体を標的とすることが可能である。

【０２６２】

さらに、本発明のＤＶＤ－Ｉｇは、細胞内送達（内部移行受容体及び細胞内分子を標的化すること）、脳内への送達（脳血液関門を横切るために、トランスフェリン受容体及び中枢神経系疾患媒介物質を標的化すること）など、組織特異的な送達（増強された局所ＰＫにより、より高い効力及び／又はより低い毒性を得るために、組織マーカー及び疾病媒介物質を標的とすること）のために使用することが可能である。ＤＶＤ－Ｉｇは、その抗原の非中和エピトープへの結合を介して特異的な位置へ抗原を送達するための担体タンパク質としての役割も果たすことができ、抗原の半減期を増加させることも可能である。さらに、ＤＶＤ－Ｉｇは、患者中に植え込まれた医療用具に物理的に連結され、又はこれらの医療用具を標的とするように設計することが可能である（Ｂｕｒｋｅ，Ｓａｎｄｒａ Ｅ．；Ｋｕｎｔｚ，Ｒｉｃｈａｒｄ Ｅ．；Ｓｃｈｗａｒｔｚ，Ｌｅｗｉｓ Ｂ．，Ｚｏｔａｒｏｌｉｍｕｓ ｅｌｕｔｉｎｇ ｓｔｅｎｔｓ．Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｒｅｖｉｅｗｓ（２００６），５８（３），４３７－４４６；Ｓｕｒｆａｃｅ ｃｏａｔｉｎｇｓ ｆｏｒ ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ ａｎｄ ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ ｍｅｄｉｃａｌ ｄｅｖｉｃｅｓ，Ｈｉｌｄｅｂｒａｎｄ，Ｈ．Ｆ．；Ｂｌａｎｃｈｅｍａｉｎ，Ｎ．；Ｍａｙｅｒ，Ｇ．；Ｃｈａｉ，Ｆ．；Ｌｅｆｅｂｖｒｅ，Ｍ．；Ｂｏｓｃｈｉｎ，Ｆ．，Ｓｕｒｆａｃｅ ａｎｄ Ｃｏａｔｉｎｇｓ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（２００６），２００（２２－２３），６３１８－６３２４；Ｄｒｕｇ／ ｄｅｖｉｃｅ ｃｏｍｂｉｎａｔｉｏｎｓ ｆｏｒ ｌｏｃａｌ ｄｒｕｇ ｔｈｅｒａｐｉｅｓ ａｎｄ ｉｎｆｅｃｔｉｏｎ ｐｒｏｐｈｙｌａｘｉｓ，Ｗｕ，Ｐｅｎｇ；Ｇｒａｉｎｇｅｒ，Ｄａｖｉｄ Ｗ．，Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ（２００６），２７（１１），２４５０－２４６７；Ｍｅｄｉａｔｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ ｃｙｔｏｋｉｎｅ ｎｅｔｗｏｒｋ ｉｎ ｔｈｅ ｉｍｐｌａｎｔａｔｉｏｎ ｏｆ ｏｒｔｈｏｐｅｄｉｃ ｄｅｖｉｃｅｓ．，Ｍａｒｑｕｅｓ，Ａ．Ｐ．；Ｈｕｎｔ，Ｊ．Ａ．；Ｒｅｉｓ，Ｒｕｉ Ｌ．，Ｂｉｏｄｅｇｒａｄａｂｌｅ Ｓｙｓｔｅｍｓ ｉｎ Ｔｉｓｓｕｅ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ａｎｄ Ｒｅｇｅｎｅｒａｔｉｖｅ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ（２００５），３７７－３９７参照）。要約すれば、医療用インプラントの部位へ、細胞の適切な種類を誘導することは、正常な組織機能の治癒及び回復を促進し得る。あるいは、用具に連結されたＤＶＤ、又は用具を標的とするＤＶＤによって、装置の植え込み時に放出される媒介物質（サイトカインが含まれるが、これに限定されない。）の阻害も提供される。例えば、封鎖された動脈をきれいにし、心筋への血流を改善するために、介入的心臓病学において、長年にわたってステントが使用されている。しかしながら、伝統的な地金ステントは、一部の患者に、再狭窄（治療された領域中の動脈が再び狭くなること）を引き起こすことが知られており、血栓を引き起こし得る。最近、抗ＣＤ３４抗体によって被覆されたステントが記載されており、これは、再狭窄を軽減し、血液全体を循環している内皮前駆細胞（ＥＰＣ）を捕捉することによって、血液凝固の発生を予防する。内皮細胞は、血管に整列している細胞であり、血液が滑らかに流れるようにしている。ＥＰＣは、ステントの硬い表面に付着して滑らかな層を形成し、この層は、治癒を促進するのみならず、従来ステントの使用に付随してきた合併症である再狭窄及び血液凝固を予防する（Ａｏｊｉ ｅｔ ａｌ．２００５ Ｊ Ａｍ Ｃｏｌｌ Ｃａｒｄｉｏｌ．４５（１０）：１５７４－９）。ステントを必要としている患者に対する結果を改善させることに加えて、心血管バイパス手術を必要としている患者に対しても改善が示唆されている。例えば、抗ＥＰＣ抗体で被覆された人工血管導管（人工動脈）は、バイパス手術移植のために、患者の足又は腕からの動脈を使用する必要性をなくする。これは、手術及び麻酔時間を短縮し、それにより、冠動脈手術死を低下させる。ＤＶＤ－Ｉｇは、細胞動員を促進するために、植え込まれた装置上に被覆された、細胞表面マーカー

（ＣＤ３４など）及びタンパク質（又は、タンパク質、脂質及び多糖を含む（但し、これらに限定されない。）あらゆる種類のエピトープ）に結合するように設計されている。このようなアプローチは、一般的に、他の医療用インプラントに対しても適用することが可能である。あるいは、ＤＶＤ－Ｉｇは、医療用具上に被覆することも可能であり、植え込まれた時に、（又はすでに充填されたＤＶＤ－Ｉｇの老朽化及び変性など、さらなる新鮮なＤＶＤ－Ｉｇを必要とし得る全ての他の要請に応じて）用具から全てのＤＶＤを放出し、装置は、新鮮なＤＶＤ－Ｉｇを患者に全身投与することによって、最充填することが可能であり、この場合、ＤＶＤ－Ｉｇは、結合部位の１セットを有する目的標的（サイトカイン、細胞表面マーカー（ＣＤ３４など）など）に結合し、及び結合部位の他のセットを有する装置上に被覆された標的（タンパク質、あらゆる種類のエピトープ（脂質、多糖及びポリマーを含むが、これらに限定されない。）を含む。）に結合するように設計されている。この技術は、被覆されたインプラントの有用性を拡張するという利点を有している。

【０２６３】

Ａ．様々な疾病におけるＤＶＤ－Ｉｇの使用

本発明のＤＶＤ－Ｉｇ分子は、様々な疾病を治療するための治療分子としても有用である。このようなＤＶＤ分子は、特定の疾病に関与する１つ又はそれ以上の標的を結合し得る。様々な疾病におけるこのような標的の例が、以下に記載されている。

【０２６４】

１．ヒト自己免疫及び炎症性応答

Ｃ５、ＣＣＬ１（１－３０９）、ＣＣＬ１１（エオタキシン）、ＣＣＬ１３（ｍｃｐ－４）、ＣＣＬ１５（ＭＩＰ－１ｄ）、ＣＣＬ１６（ＨＣＣ－４）、ＣＣＬ１７（ＴＡＲＣ）、ＣＣＬ１８（ＰＡＲＣ）、ＣＣＬ１９、ＣＣＬ２（ｍｃｐ－１）、ＣＣＬ２０（ＭＩＰ－３ａ）、ＣＣＬ２１（ＭＩＰ－２）、ＣＣＬ２３（ＭＰＩＦ－１）、ＣＣＬ２４（ＭＰＩＦ－２／エオタキシン－２）、ＣＣＬ２５（ＴＥＣＫ）、ＣＣＬ２６、ＣＣＬ３（ＭＩＰ－１ａ）、ＣＣＬ４（ＭＩＰ－１ｂ）、ＣＣＬ５（ＲＡＮＴＥＳ）、ＣＣＬ７（ｍｃｐ－３）、ＣＣＬ８（ｍｃｐ－２）、ＣＸＣＬ１、ＣＸＣＬ１０（ＩＰ－１０）、ＣＸＣＬＩｌ（Ｉ－ＴＡＣ／ＩＰ－９）、ＣＸＣＬ１２（ＳＤＦｌ）、ＣＸＣＬ１３、ＣＸＣＬ１４、ＣＸＣＬ２、ＣＸＣＬ３、ＣＸＣＬ５（ＥＮＡ－７８／ＬＩＸ）、ＣＸＣＬ６（ＧＣＰ－２）、ＣＸＣＬ９、ＩＬ１３、ＩＬ８、ＣＣＬ１３（ｍｃｐ－４）、ＣＣＲ１、ＣＣＲ２、ＣＣＲ３、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＣＲ６、ＣＣＲ７、ＣＣＲ８、ＣＣＲ９、ＣＸ３ＣＲ１、ＩＬ８ＲＡ、ＸＣＲ１（ＣＣＸＣＲ１）、ＩＦＮＡ２、ＩＬ１０、ＩＬ１３、ＩＬ１７Ｃ、ＩＬ１Ａ、ＩＬ１Ｂ、ＩＬ１Ｆ１０、ＩＬ１Ｆ５、ＩＬ１Ｆ６、ＩＬ１Ｆ７、ＩＬ１Ｆ８、ＩＬ１Ｆ９、ＩＬ２２、ＩＬ５、ＩＬ８、ＩＬ９、ＬＴＡ、ＬＴＢ、ＭＩＦ、ＳＣＹＥ１（内皮単球活性化サイトカイン）、ＳＰＰ１、ＴＮＦ、ＴＮＦＳＦ５、ＩＦＮＡ２、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＩＬ１３、ＩＬ１３ＲＡ１、ＩＬ５ＲＡ、ＩＬ９、ＩＬ９Ｒ、ＡＢＣＦ１、ＢＣＬ６、Ｃ３、Ｃ４Ａ、ＣＥＢＰＢ、ＣＲＰ、ＩＣＥＢＥＲＧ、ＩＬ１Ｒ１、ＩＬ１ＲＮ、ＩＬ８ＲＢ、ＬＴＢ４Ｒ、ＴＯＬＬＩＰ、ＦＡＤＤ、ＩＲＡＫ１、ＩＲＡＫ２、ＭＹＤ８８、ＮＣＫ２、ＴＮＦＡＩＰ３、ＴＲＡＤＤ、ＴＲＡＦ１、ＴＲＡＦ２、ＴＲＡＦ３、ＴＲＡＦ４、ＴＲＡＦ５、ＴＲＡＦ６、ＡＣＶＲ１、ＡＣＶＲ１Ｂ、ＡＣＶＲ２、ＡＣＶＲ２Ｂ、ＡＣＶＲＬ１、ＣＤ２８、ＣＤ３Ｅ、ＣＤ３Ｇ、ＣＤ３Ｚ、ＣＤ６９、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＮＲ１、ＣＴＬＡ４、ＣＹＳＬＴＲ１、ＦＣＥＲ１Ａ、ＦＣＥＲ２、ＦＣＧＲ３Ａ、ＧＰＲ４４、ＨＡＶＣＲ２、ＯＰＲＤ１、Ｐ２ＲＸ７、ＴＬＲ２、ＴＬＲ３、ＴＬＲ４、ＴＬＲ５、ＴＬＲ６、ＴＬＲ７、ＴＬＲ８、ＴＬＲ９、ＴＬＲ１０、ＢＬＲ１、ＣＣＬ１、ＣＣＬ２、ＣＣＬ３、ＣＣＬ４、ＣＣＬ５、ＣＣＬ７、ＣＣＬ８、ＣＣＬ１１、ＣＣＬ１３、ＣＣＬ１５、ＣＣＬ１６、ＣＣＬ１７、ＣＣＬ１８、ＣＣＬ１９、ＣＣＬ２０、ＣＣＬ２１、ＣＣＬ２２、ＣＣＬ２３、ＣＣＬ２４、ＣＣＬ２５、ＣＣＲ１、ＣＣＲ２、ＣＣＲ３、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＣＲ６、ＣＣＲ７、ＣＣＲ８、ＣＣＲ９、ＣＸ３ＣＬ１、ＣＸ３ＣＲ１、ＣＸＣＬ１、ＣＸＣＬ２、ＣＸＣＬ３、ＣＸＣＬ５、ＣＸＣＬ６、ＣＸＣＬ１０、ＣＸＣＬ１１、ＣＸＣＬ１２、Ｃ

ＸＣＬ１３、ＣＸＣＲ４、ＧＰＲ２、ＳＣＹＥ１、ＳＤＦ２、ＸＣＬ１、ＸＣＬ２、ＸＣＲ１、ＡＭＨ、ＡＭＨＲ２、ＢＭＰＲ１Ａ、ＢＭＰＲ１Ｂ、ＢＭＰＲ２、Ｃ１９ｏｒｆ１０（ＩＬ２７ｗ）、ＣＥＲ１、ＣＳＦ１、ＣＳＦ２、ＣＳＦ３、ＤＫＦＺｐ４５１Ｊ０１１８、ＦＧＦ２、ＧＦＩ１、ＩＦＮＡ１、ＩＦＮＢ１、ＩＦＮＧ、ＩＧＦ１、ＩＬ１Ａ、ＩＬ１Ｂ、ＩＬ１Ｒ１、ＩＬ１Ｒ２、ＩＬ２、ＩＬ２ＲＡ、ＩＬ２ＲＢ、ＩＬ２ＲＧ、ＩＬ３、ＩＬ４、ＩＬ４Ｒ、ＩＬ５、ＩＬ５ＲＡ、ＩＬ６、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ、ＩＬ７、ＩＬ８、ＩＬ８ＲＡ、ＩＬ８ＲＢ、ＩＬ９、ＩＬ９Ｒ、ＩＬ１０、ＩＬ１０ＲＡ、ＩＬ１０ＲＢ、ＩＬ１１、ＩＬ１１ＲＡ、ＩＬ１２Ａ、ＩＬ１２Ｂ、ＩＬ１２ＲＢ１、ＩＬ１２ＲＢ２、ＩＬ１３、ＩＬ１３ＲＡ１、ＩＬ１３ＲＡ２、ＩＬ１５、ＩＬ１５ＲＡ、ＩＬ１６、ＩＬ１７、ＩＬ１７Ｒ、ＩＬ１８、ＩＬ１８Ｒ１、ＩＬ１９、ＩＬ２０、ＫＩＴＬＧ、ＬＥＰ、ＬＴＡ、ＬＴＢ、ＬＴＢ４Ｒ、ＬＴＢ４Ｒ２、ＬＴＢＲ、ＭＩＦ、ＮＰＰＢ、ＰＤＧＦＢ、ＴＢＸ２１、ＴＤＧＦ１、ＴＧＦＡ、ＴＧＦＢ１、ＴＧＦＢ１Ｉ１、ＴＧＦＢ２、ＴＧＦＢ３、ＴＧＦＢＩ、ＴＧＦＢＲ１、ＴＧＦＢＲ２、ＴＧＦＢＲ３、ＴＨ１Ｌ、ＴＮＦ、ＴＮＦＲＳＦ１Ａ、ＴＮＦＲＳＦ１Ｂ、ＴＮＦＲＳＦ７、ＴＮＦＲＳＦ８、ＴＮＦＲＳＦ９、ＴＮＦＲＳＦ１１Ａ、ＴＮＦＲＳＦ２１、ＴＮＦＳＦ４、ＴＮＦＳＦ５、ＴＮＦＳＦ６、ＴＮＦＳＦ１１、ＶＥＧＦ、ＺＦＰＭ２及びＲＮＦ１１０（ＺＮＦ１４４）など、多くのタンパク質が、一般的な自己免疫及び炎症性応答に関与していると推定されている。一態様において、本明細書に列記されている標的の１つ又はそれ以上を結合することが可能なＤＶＤ－Ｉｇが提供される。

【０２６５】

２．喘息

アレルギー性喘息は、好酸球増加症、杯細胞異形成、上皮細胞の変化、気道過敏症（ＡＨＲ）並びにＴｈ２及びＴｈ１サイトカイン発現並びに上昇した血清ＩｇＥレベルの存在によって特徴付けられる。気道炎症が、喘息の発病の基礎を成す中心的な因子であることは、現在では広く受け入れられており、Ｔ細胞、Ｂ細胞、好酸球、肥満細胞及びマクロファージなどの炎症性細胞と、サイトカイン及びケモカインなどの分泌されるこれらの媒介物質の複雑な相互作用が関与している。コルチコステロイドは、今日、喘息に対する最も重要な抗炎症性治療であるが、それらの作用機序は非特異的であり、特に、若い患者集団では、安全性についての懸念が存在する。従って、より特異的で、標的化された治療の開発が必要とされる。マウス中のＩＬ－１３が、好酸球性炎症とは独立に、ＡＨＲ、粘膜の過剰分泌及び気道繊維症など、喘息の特徴の多くを模倣するという、証拠が増加している。（Ｆｉｎｏｔｔｏ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（２００５），１７（８），９９３－１００７；Ｐａｄｉｌｌａ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（２００５），１７４（１２），８０９７－８１０５）。

【０２６６】

ＩＬ－１３は、喘息を伴う病的応答を引き起こす上で中心的な役割を有すると推定されている。肺でのＩＬ－１３の効果を抑制するための抗ＩＬ－１３ｍＡｂ療法の開発は、喘息のための新規治療としてかなりの有望性を与える、刺激的な新しいアプローチである。しかしながら、異なる免疫学的経路の他の媒介物質も喘息の発病に関与しており、ＩＬ－１３に加えて、これらの媒介物質を遮断することは、さらなる治療的利点を与え得る。このような標的対には、ＩＬ－１３及び腫瘍壊死因子－α（ＴＮＦ－α）などの炎症促進性サイトカインが含まれるが、これに限定されるものではない。ＴＮＦ－αは、喘息における炎症性応答を増幅し得、疾病の重度と関連し得る（ＭｃＤｏｎｎｅｌｌ，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｇｒｅｓｓ ｉｎ Ｒｅｓｐｉｒａｔｏｒｙ Ｒｅｓｅａｒｃｈ（２００１），３１（Ｎｅｗ Ｄｒｕｇｓ ｆｏｒ Ａｓｔｈｍａ，Ａｌｌｅｒｇｙ ａｎｄ ＣＯＰＤ），２４７－２５０）。これは、ＩＬ－１３及びＴＮＦ－αの両方を遮断し、特に、重い気道疾病において、有益な効果を有し得ることを示唆する。別の実施形態において、本発明のＤＶＤ－Ｉｇは、標的であるＩＬ－１３及びＴＮＦαを結合し、喘息を治療するために使用される。

【０２６７】
炎症及びＡＨＲをともに評価することができる、ＯＶＡによって誘導された喘息マウスモデルなどの動物モデルが本分野において公知であり、様々なＤＶＤ－Ｉｇ分子が喘息を治療する能力を測定するために使用し得る。喘息を研究するための動物モデルは、Ｃｏｆｆｍａｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ（２００５），２０１（１２），１８７５－１８７９；Ｌｌｏｙｄ，ｅｔ ａｌ．，Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（２００１），７７，２６３－２９５；Ｂｏｙｃｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ（２００５），２０１（１２），１８６９－１８７３；及びＳｎｉｂｓｏｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｔｈｅ Ｂｒｉｔｉｓｈ Ｓｏｃｉｅｔｙ ｆｏｒ Ａｌｌｅｒｇｙ ａｎｄ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（２００５），３５（２），１４６－５２に開示されている。これらの標的対の定型的な安全性評価に加えて、免疫抑制の程度に対する特異的検査が保証され、最高の標的対を選択する上で役立ち得る（Ｌｕｓｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｔｏｘｉｃｏｌｏｇｙ（１９９４），９２（１－３），２２９－４３；Ｄｅｓｃｏｔｅｓ，ｅｔ ａｌ．，Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔｓ ｉｎ ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ ｓｔａｎｄａｒｄｉｚａｔｉｏｎ（１９９２），７７９９－１０２；Ｈａｒｔ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ａｌｌｅｒｇｙ ａｎｄ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（２００１），１０８（２），２５０－２５７参照）。

【０２６８】
本明細書に開示されている論拠に基づいて、並びに効力及び安全性のための同じ評価モデルを使用して、ＤＶＤ－Ｉｇ分子が結合することができ、喘息を治療するために有用であり得る他の標的対を決定し得る。ＩＬ－１βは、喘息における炎症応答にも関与が推定されているので、一実施形態において、このような標的には、ＩＬ－１３及びＩＬ－１β；ＩＬ－１３及びＩＬ－９など、炎症に関与しているＩＬ－１３及びサイトカイン及びケモカイン；ＩＬ－１３及びＩＬ－４；ＩＬ－１３及びＩＬ－５；ＩＬ－１３及びＩＬ－２５；ＩＬ－１３及びＴＡＲＣ；ＩＬ－１３及びＭＤＣ；ＩＬ－１３及びＭＩＦ；ＩＬ－１３及びＴＧＦ－β；ＩＬ－１３及びＬＨＲアゴニスト；ＩＬ－１３及びＣＬ２５；ＩＬ－１３及びＳＰＲＲ２ａ；ＩＬ－１３及びＳＰＲＲ２ｂ；並びにＩＬ－１３及びＡＤＡＭ８が含まれるが、これらに限定されるものではない。本発明は、ＣＳＦ１（ＭＣＳＦ）、ＣＳＦ２（ＧＭ－ＣＳＦ）、ＣＳＦ３（ＧＣＳＦ）、ＦＧＦ２、ＩＦＮＡ１、ＩＦＮＢ１、ＩＦＮＧ、ヒスタミン及びヒスタミン受容体、ＩＬ１Ａ、ＩＬ１Ｂ、ＩＬ２、ＩＬ３、ＩＬ４、ＩＬ５、ＩＬ６、ＩＬ７、ＩＬ８、ＩＬ９、ＩＬ１０、ＩＬ１１、ＩＬ１２Ａ、ＩＬ１２Ｂ、ＩＬ１３、ＩＬ１４、ＩＬ１５、ＩＬ１６、ＩＬ１７、ＩＬ１８、ＩＬ１９、ＫＴＩＬＧ、ＰＤＧＦＢ、ＩＬ２ＲＡ、ＩＬ４Ｒ、ＩＬ５ＲＡ、ＩＬ８ＲＡ、ＩＬ８ＲＢ、ＩＬ１２ＲＢ１、ＩＬ１２ＲＢ２、ＩＬ１３ＲＡ１、ＩＬ１３ＲＡ２、ＩＬ１８Ｒ１、ＴＳＬＰ、ＣＣＬ１、ＣＣＬ２、ＣＣＬ３、ＣＣＬ４、ＣＣＬ５、ＣＣＬ７、ＣＣＬ８、ＣＣＬ１３、ＣＣＬ１７、ＣＣＬ１８、ＣＣＬ１９、ＣＣＬ２０、ＣＣＬ２２、ＣＣＬ２４，ＣＸ３ＣＬ１、ＣＸＣＬ１、ＣＸＣＬ２、ＣＸＣＬ３、ＸＣＬ１、ＣＣＲ２、ＣＣＲ３、ＣＣＲ４、ＣＣＲ５、ＣＣＲ６、ＣＣＲ７、ＣＣＲ８、ＣＸ３ＣＲ１、ＧＰＲ２、ＸＣＲ１、ＦＯＳ、ＧＡＴＡ３、ＪＡＫ１、ＪＡＫ３、ＳＴＡＴ６、ＴＢＸ２１、ＴＧＦＢ１、ＴＮＦ、ＴＮＦＳＦ６、ＹＹ１、ＣＹＳＬＴＲ１、ＦＣＥＲ１Ａ、ＦＣＥＲ２、ＬＴＢ４Ｒ、ＴＢ４Ｒ２、ＬＴＢＲ及びキチナーゼからなる群から選択される、喘息に関与している１つ又はそれ以上の標的を結合することが可能なＤＶＤ－Ｉｇも提供する。

【０２６９】
３．関節リウマチ
全身性疾患である関節リウマチ（ＲＡ）は、関節の滑液中の慢性的炎症反応によって特徴付けられ、軟骨の変性と隣接する関節骨の磨耗を伴う。ＴＮＦ、ケモカイン及び成長因子など、多くの炎症促進性サイトカインが、罹患した関節中に発現されている。抗ＴＮＦ抗体又はｓＴＮＦＲ融合タンパク質の、ＲＡのマウスモデルへの全身投与は、抗炎症性及

び関節保護的であることが示された。ＲＡ患者中のＴＮＦの活性が、静脈内に投与されたインフリキシマブ（キメラ抗ＴＮＦモノクローナル抗体（ｍＡＢ））で遮断された臨床的調査（Ｈａｒｒｉｍａｎ Ｇ，Ｈａｒｐｅｒ ＬＫ，Ｓｃｈａｉｂｌｅ ＴＦ．１９９９ Ｓｕｍｍａｒｙ ｏｆ ｃｌｉｎｉｃａｌ ｔｒｉａｌｓ ｉｎ ｒｈｅｕｍａｔｏｉｄ ａｒｔｈｒｉｔｉｓ ｕｓｉｎｇ ｉｎｆｌｉｘｉｍａｂ，ａｎ ａｎｔｉ－ＴＮＦ ａｌｐｈａ ｔｒｅａｔｍｅｎｔ．Ａｎｎ Ｒｈｅｕｍ Ｄｉｓ ５８ Ｓｕｐｐｌ １：１６１－４）は、ＴＮＦがＩＬ－６、ＩＬ－８、ＭＣＰ－１及びＶＥＧＦ産生、免疫及び炎症性細胞の関節中への動員、血管新生並びにマトリックスメタロプロテイナーゼ－１及び－３の血液レベルの低下を制御するという証拠を提供した。関節リウマチにおける炎症性経路をより深く理解することによって、関節リウマチに関与する他の治療標的の同定に結びついた。過去、インターロイキン－６アンタゴニスト（Ｃｈｕｇａｉ，Ｒｏｃｈｅによって開発されたＩＬ－６受容体抗体ＭＲＡ（Ｎｉｓｈｉｍｏｔｏ，Ｎｏｒｉｈｉｒｏ ｅｔ ａｌ．，Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ ＆ Ｒｈｅｕｍａｔｉｓｍ（２００４）、５０（６），１７６１－１７６９参照））、ＣＴＬＡ４Ｉｇ（アバタセプト、Ｇｅｎｏｖｅｓｅ Ｍｃ ｅｔ ａｌ ２００５ Ａｂａｔａｃｅｐｔ ｆｏｒ ｒｈｅｕｍａｔｏｉｄ ａｒｔｈｒｉｔｉｓ ｒｅｆｒａｃｔｏｒｙ ｔｏ ｔｕｍｏｒ ｎｅｃｒｏｓｉｓ ｆａｃｔｏｒ ａｌｐｈａ ｉｎｈｉｂｉｔｉｏｎ．Ｎ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｍｅｄ．３５３：１１１４－２３．）、及び抗Ｂ細胞療法（リツキシマブ、Ｏｋａｍｏｔｏ Ｈ，Ｋａｍａｔａｎｉ Ｎ．２００４ Ｒｉｔｕｘｉｍａｂ ｆｏｒ ｒｈｅｕｍａｔｏｉｄ ａｒｔｈｒｉｔｉｓ．Ｎ Ｅｎｇｌ Ｊ Ｍｅｄ．３５１：１９０９）などの有望な治療が、無作為の対照化された臨床試験において既に検査されてきた。インターロイキン－１５（治療用抗体ＨｕＭａｘ－ＩＬ＿１５，ＡＭＧ７１４ Ｂａｓｌｕｎｄ，Ｂｏ ｅｔ ａｌ．，Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ ＆ Ｒｈｅｕｍａｔｉｓｍ（２００５），５２（９），２６８６－２６９２）、インターロイキン－１７及びインターロイキン－１８など、他のサイトカインが同定され、動物モデルにおいて有益であることが示されており、これらの因子の臨床試験が現在進行中である。抗ＴＮＦ及び別の媒介物質を組み合わせた二重特異的抗体療法は、臨床的効力及び／又は患者の対象範囲を増大させる上で大きな可能性を秘めている。例えば、ＴＮＦとＶＥＧＦ（何れも、ＲＡの病態生理学に関与している。）の両方を遮断することは、炎症及び血管新生を根絶することができる可能性を秘めている。ＴＮＦ及びＩＬ－１８；ＴＮＦ及びＩＬ－１２；ＴＮＦ及びＩＬ－２３；ＴＮＦ及びＩＬ－１β；ＴＮＦ及びＭＩＦ；ＴＮＦ及びＩＬ－１７；並びにＴＮＦ及びＩＬ－１５を含む（但し、これらに限定されない。）、ＲＡに関与している標的の他の対を、特異的ＤＶＤＩｇで遮断することも想定される。これらの標的対の定型的な安全性評価に加えて、免疫抑制の程度に対する特異的検査が保証され、最高の標的対を選択する上で役立ち得る（Ｌｕｓｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｔｏｘｉｃｏｌｏｇｙ（１９９４），９２（１－３），２２９－４３；Ｄｅｓｃｏｔｅｓ，ｅｔ ａｌ．，Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔｓ ｉｎ ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ ｓｔａｎｄａｒｄｉｚａｔｉｏｎ（１９９２），７７ ９９－１０２；Ｈａｒｔ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ａｌｌｅｒｇｙ ａｎｄ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（２００１），１０８（２），２５０－２５７参照）。ＤＶＤＩｇ分子が関節リウマチの治療に対して有用であるかどうかは、コラーゲンによって誘導された関節炎マウスモデルなど、前臨床動物ＲＡモデルを用いて評価することが可能である。他の有用なモデルも本分野において周知である（Ｂｒａｎｄ ＤＤ．，Ｃｏｍｐ Ｍｅｄ．（２００５） ５５（２）：１１４－２２参照）。ヒト及びマウスのオルソログ（例えば、ヒト及びマウスＴＮＦ、ヒト及びマウスＩＬ－１５に対する反応性など）に対する親抗体の交叉反応性に基づいて、マウスＣＩＡモデルでの検証研究は、「合致されたサロゲート抗体」由来のＤＶＤ－Ｉｇ分子を用いて実施され得る。要約すると、２つ（又はそれ以上の）マウス標的特異的抗体を基礎とするＤＶＤ－Ｉｇを、ヒトＤＶＤ－Ｉｇ構築のために使用された親ヒト又はヒト化抗体の特徴に可能な限り合致させ得る（類似の親和性、類似の中和能、類似の半減期など）。

【０２７０】

４．ＳＬＥ

ＳＬＥの免疫病原性の特徴は、ポリクローナルＢ細胞活性化であり、これは、高グロブリン血症、自己抗体産生及び免疫複合体形成をもたらす。基本的な異常は、全般的なＴ細胞の調節不全のために、Ｔ細胞が禁じられたＢ細胞クローンを抑制できないことであるように見受けられる。さらに、Ｂ及びＴ細胞の相互作用は、第二のシグナルを開始する、ＩＬ－１０並びにＣＤ４０とＣＤ４０Ｌ、Ｂ７及びＣＤ２８及びＣＴＬＡ－４などの共刺激分子などの幾つかのサイトカインによって促進される。これらの相互作用は、免疫複合体及びアポトーシス材料の食細胞性排除の異常とともに、生じた組織傷害によって免疫応答を永続化させる。以下の標的がＳＬＥに関与し得、治療的介入のためのＤＶＤ－Ｉｇアプローチのために使用できる可能性を秘めている。Ｂ細胞標的化療法：ＣＤ－２０、ＣＤ－２２、ＣＤ－１９、ＣＤ２８、ＣＤ４、ＣＤ８０、ＨＬＡ－ＤＲＡ、ＩＬ１０、ＩＬ２、ＩＬ４、ＴＮＦＲＳＦ５、ＴＮＦＲＳＦ６、ＴＮＦＳＦ５、ＴＮＦＳＦ６、ＢＬＲ１、ＨＤＡＣ４、ＨＤＡＣ５、ＨＤＡＣ７Ａ、ＨＤＡＣ９、ＩＣＯＳＬ、ＩＧＢＰ１、ＭＳ４Ａ１、ＲＧＳ１、ＳＬＡ２、ＣＤ８１、ＩＦＮＢ１、ＩＬ１０、ＴＮＦＲＳＦ５、ＴＮＦＲＳＦ７、ＴＮＦＳＦ５、ＡＩＣＤＡ、ＢＬＮＫ、ＧＡＬＮＡＣ４Ｓ－６ＳＴ、ＨＤＡＣ４、ＨＤＡＣ５、ＨＤＡＣ７Ａ、ＨＤＡＣ９、ＩＬ１０、ＩＬ１１、ＩＬ４、ＩＮＨＡ、ＩＮＨＢＡ、ＫＬＦ６、ＴＮＦＲＳＦ７、ＣＤ２８、ＣＤ３８、ＣＤ６９、ＣＤ８０、ＣＤ８３、ＣＤ８６、ＤＰＰ４、ＦＣＥＲ２、ＩＬ２ＲＡ、ＴＮＦＲＳＦ８、ＴＮＦＳＦ７、ＣＤ２４、ＣＤ３７、ＣＤ４０、ＣＤ７２、ＣＤ７４、ＣＤ７９Ａ、ＣＤ７９Ｂ、ＣＲ２、ＩＬ１Ｒ２、ＩＴＧＡ２、ＩＴＧＡ３、ＭＳ４Ａ１、ＳＴ６ＧＡＬ１、ＣＤ１Ｃ、ＣＨＳＴ１０、ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－ＤＲＡ及びＮＴ５Ｅ；共刺激シグナル：ＣＴＬＡ４又はＢ７．１／Ｂ７．２；Ｂ細胞生存の阻害：ＢｌｙＳ、ＢＡＦＦ；補体不活化：Ｃ５；サイトカイン調節。中心的な原理は、何れかの組織中での正味の生物応答が、炎症促進性サイトカイン又は抗炎症性サイトカインの局所レベル間のバランスの結果であるということである（Ｓｆｉｋａｋｉｓ ＰＰ ｅｔ ａｌ ２００５ Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｒｈｅｕｍａｔｏｌ １７：５５０－７参照）。ＳＬＥは、血清ＩＬ－４、ＩＬ－６、ＩＬ－１０の文献に報告された上昇を伴う、Ｔｈ２によって誘導される疾病であると考えられる。ＩＬ－４、ＩＬ－６、ＩＬ－１０、ＩＮＦ－α及びＴＮＦ－αからなる群から選択される１つ又はそれ以上の標的に結合することが可能なＤＶＤＩｇも想定される。本明細書において論述されている標的の組み合わせは、多数の狼瘡前臨床モデル中で検査することが可能なＳＬＥに対して治療的な効力を増強する（Ｐｅｎｇ ＳＬ（２００４） Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ Ｍｅｄ．；１０２：２２７－７２参照）。ヒト及びマウスのオルソログ（例えば、ヒト及びマウスＣＤ２０、ヒト及びマウスインターフェロンαに対する反応性など）に対する親抗体の交叉反応性に基づいて、マウス狼瘡モデルでの検証研究は、「合致されたサロゲート抗体」由来のＤＶＤ－Ｉｇ分子を用いて実施され得る。要約すると、２つ（又はそれ以上の）マウス標的特異的抗体を基礎とするＤＶＤ－Ｉｇを、ヒトＤＶＤ－Ｉｇ構築のために使用された親ヒト又はヒト化抗体の特徴に可能な限り合致させ得る（類似の親和性、類似の中和能、類似の半減期など）。

【０２７１】

５．多発性硬化症

多発性硬化症（ＭＳ）は、主に病因が不明である複雑なヒト自己免疫型疾病である。神経系全体でのミエリン塩基性タンパク質（ＭＢＰ）の免疫学的破壊が、多発性硬化症の主要な病因である。ＭＳは、CD^{4+}及びCD^{8+}Ｔ細胞による浸潤を伴う複雑な病変の疾病であり、中枢神経系内の応答の疾病である。サイトカイン、反応性窒素種及び共刺激分子の中枢神経系中での発現は全て、ＭＳにおいて記載されている。主に検討すべきであるのは、自己免疫の発達に寄与する免疫学的機序である。特に、Ｔｈ１及びＴｈ２細胞などの他のＴ細胞のバランス／調節を助ける、抗原発現、サイトカイン及び白血球相互作用並びに調節性Ｔ細胞は、治療標的の同定のための重要な領域である。

【０２７２】

ＩＬ－１２は、ＡＰＣによって産生される炎症促進性サイトカインであり、Ｔｈ１エフ

ェクター細胞の分化を促進する。ＩＬ－１２は、ＭＳ患者及びＥＡＥに罹患した動物中の発達している病変中で産生される。以前、ＩＬ－１２経路中の妨害がげっ歯類中のＥＡＥを効果的に抑制すること、及びコモンマモセット中のミエリン誘発性ＥＡＥモデル中で、抗ＩＬ－１２ｍＡｂを用いたＩＬ－１２ｐ４０のインビボ中和が有益な効果を有することが示された。

【０２７３】

ＴＷＥＡＫは、中枢神経系（ＣＮＳ）中で恒常的に発現されるＴＮＦファミリーのメンバーであり、細胞の種類に応じて炎症促進性、増殖性又はアポトーシス効果を有する。その受容体Ｆｎ１４は、内皮細胞、反応性星状膠細胞及び神経細胞によって、中枢神経系中で発現されている。ＴＷＥＡＫ及びＦＮ１４ｍＲＮＡ発現は、実験的自己免疫脳脊髄炎（ＥＡＥ）の間に、脊髄中で増加した。ミエリン乏突起膠細胞糖タンパク質（ＭＯＧ）によってＣ５７ＢＬ／６マウス中に誘導されたＥＡＥにおける抗ＴＷＥＡＫ抗体治療は、マウスが初回刺激相後に治療された場合に、疾病の重度及び白血球の浸潤の低下をもたらした。

【０２７４】

本発明の一態様は、ＩＬ－１２、ＴＷＥＡＫ、ＩＬ－２３、ＣＸＣＬ１３、ＣＤ４０、ＣＤ４０Ｌ、ＩＬ－１８、ＶＥＧＦ、ＶＬＡ－４、ＴＮＦ、ＣＤ４５ＲＢ、ＣＤ２００、ＩＦＮγ、ＧＭ－ＣＳＦ、ＦＧＦ、Ｃ５、ＣＤ５２及びＣＣＲ２からなる群から選択される１つ又はそれ以上、例えば２つの標的を結合することができるＤＶＤＩｇ分子に関する。一実施形態には、ＭＳの治療に対して有益な治療剤としての二重特異的抗ＩＬ－１２／ＴＷＥＡＫＤＶＤＩｇが含まれる。

【０２７５】

ＭＳを治療するためのＤＶＤ分子の有用性を評価するための幾つかの動物モデルが、本分野において公知である（Ｓｔｅｉｎｍａｎ Ｌ，ｅｔ ａｌ．，（２００５） Ｔｒｅｎｄｓ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２６（１１）：５６５－７１；Ｌｕｂｌｉｎ ＦＤ．，ｅｔ ａｌ．，（１９８５）Ｓｐｒｉｎｇｅｒ Ｓｅｍｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｐａｔｈｏｌ．８（３）：１９７－２０８；Ｇｅｎａｉｎ ＣＰ，ｅｔ ａｌ．，（１９９７） Ｊ Ｍｏｌ Ｍｅｄ．７５（３）：１８７－９７；Ｔｕｏｈｙ ＶＫ，ｅｔ ａｌ．，（１９９９） Ｊ Ｅｘｐ Ｍｅｄ．１８９（７）：１０３３－４２；Ｏｗｅｎｓ Ｔ，ｅｔ ａｌ．，（１９９５） Ｎｅｕｒｏｌ Ｃｌｉｎ．１３（１）：５１－７３；及び’ｔ Ｈａｒｔ ＢＡ，ｅｔ ａｌ．，（２００５） Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ １７５（７）：４７６１－８参照）。ヒト及び動物種のオルソログ（例えば、ヒト及びマウスＩＬ－１２、ヒト及びマウスＴＷＥＡＫに対する反応性など）に対する親抗体の交叉反応性に基づいて、マウスＥＡＥモデルでの検証研究は、「合致されたサロゲート抗体」由来のＤＶＤ－Ｉｇ分子を用いて実施され得る。要約すると、２つ（又はそれ以上の）マウス標的特異的抗体を基礎とするＤＶＤ－Ｉｇを、ヒトＤＶＤ－Ｉｇ構築のために使用された親ヒト又はヒト化抗体の特徴に可能な限り合致させ得る（類似の親和性、類似の中和能、類似の半減期など）。同じ概念が、他の非げっ歯類種の動物モデルにも当てはまる。「合致されたサロゲート抗体」由来のＤＶＤ－Ｉｇは、予想される薬理学及び可能であれば安全性研究のために選択される。これらの標的対の定型的な安全性評価に加えて、免疫抑制の程度に対する特異的検査が保証され、最高の標的対を選択する上で役立ち得る（Ｌｕｓｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｔｏｘｉｃｏｌｏｇｙ（１９９４），９２（１－３），２２９－４３；Ｄｅｓｃｏｔｅｓ，ｅｔ ａｌ．，Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔｓ ｉｎ ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ ｓｔａｎｄａｒｄｉｚａｔｉｏｎ（１９９２），７７ ９９－１０２；Ｊｏｎｅｓ Ｒ．２０００ Ｒｏｖｅｌｉｚｕｍａｂ（ＩＣＯＳ Ｃｏｒｐ）ＩＤｒｕｇｓ．３（４）：４４２－６）参照）。

【０２７６】

しかしながら、ＭＳは、免疫疾患であるのみならず、極めて重要な神経変性成分である。ＭＳにおける疾病の進行は、軸索の累積的な喪失及び損傷によるものであり、患者の最終的な疾病スコアは、これらの神経変性プロセスによって決定される（Ｃｏｍｐｓｔｏｎ

Ａ．＆Ｃｏｌｅｓ Ａ．（２００８）Ｌａｎｃｅｔ ３７２：１５０２－１５１７；Ｔｒａｐｐ ＢＤ．＆Ｎａｖｅ ＫＡ．（２００８）Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉｅｎｃｅ ３１：２４７－２６９）。幾つかの機序が、ＭＳにおける軸索の損傷を説明し得る。カルシウム媒介性神経毒性、一酸化窒素の放出及びその後の軸索の損傷、神経栄養性支持の喪失、ＲＧＭＡ、ＮＯＧＯＡ、セマフォリン、エフリンのようなｒｅｐｕｌｓｉｖｅ 又は軸索成長阻害分子の大規模な蓄積を伴う、神経伝達物質グルタミン酸の過剰な放出が、軸索誘導性神経変性及び軸索再生に寄与し得る。ＩＬ－１２、ＴＷＥＡＫ、ＩＬ－２３、ＣＸＣＬ１３、ＣＤ４０、ＣＤ４０Ｌ、ＩＬ－１８、ＶＥＧＦ、ＶＬＡ－４、ＴＮＦ、ＣＤ４５ＲＢ、ＣＤ２００、ＩＦＮγ、ＧＭ－ＣＳＦ、ＦＧＦ、Ｃ５、ＣＤ５２及びＣＣＲ２のような炎症促進性サイトカインに対して誘導された中和活性を有するＲＧＭＡ、ＮＯＧＯＡ、セマフォリン、エフリンは、現在の治療的ＭＳ原理の何れによっても達成されていない最終目標である、炎症及び神経再生に対する同時の集中を可能にする。神経再生の刺激は、ＭＳ中に観察された大規模な軸索神経再生によって引き起こされる機能的な損傷を補い得、失われた脳機能の回復を可能にする。

【０２７７】

６．敗血症

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

【０２７８】

敗血症及び敗血症性ショックの治療は、なお臨床的な難問であり、炎症性応答を標的とした生物学的応答修飾物質（すなわち、抗ＴＮＦ、抗ＭＩＦ）を用いた最近の前向き臨床試験は、若干の臨床的有益性を示したに過ぎなかった。最近、免疫抑制の付随期間を逆転させることを目指した治療法に関心が移っている。実験動物及び重病の患者における研究は、リンパ系臓器及び幾つかの実質組織の増加したアポトーシスが、この免疫抑制、アネルギー及び臓器系機能不全に寄与することを示している。敗血症症候群の間、リンパ球アポトーシスは、ＩＬ－２の不存在によって又はグルココルチコイド、グランザイム若しくはいわゆる「死亡（ｄｅａｔｈ）」サイトカイン：腫瘍壊死因子α又はＦａｓリガンドの放出によって引き金を引かれ得る。アポトーシスは、Ｂｃｌ－２ファミリーのアポトーシス促進性のメンバー及びアポトーシス抑制性のメンバーによって影響を受け得る、細胞質及び／又はミトコンドリアのカスパーゼの自己活性化を介して進行する。実験動物では、アポトーシスの阻害剤を用いた治療はリンパ系細胞のアポトーシスを抑制することができるのみならず、予後も改善し得る。抗アポトーシス因子を用いた臨床試験は、主にそれらの投与及び組織標的化に伴う技術的困難さが原因で、実現性が低いままであるが、リンパ球アポトーシスの阻害は、敗血症患者に対する魅力的な治療の標的である。同様に、炎症媒介物質及びアポトーシス媒介物質の両方を標的とする二重特異的因子は、さらなる有益性を有し得る。本発明の一態様は、ＴＮＦ、ＩＬ－１、ＭＩＦ、ＩＬ－６、ＩＬ－８、ＩＬ－１８、ＩＬ－１２、ＩＬ－２３、ＦａｓＬ、ＬＰＳ、トール様受容体、ＴＬＲ－４、組織因子、ＭＩＰ－２、ＡＤＯＲＡ２Ａ、ＣＡＳＰ１、ＣＡＳＰ４、ＩＬ－１０、ＩＬ－１Ｂ、ＮＦＫＢ１、ＰＲＯＣ、ＴＮＦＲＳＦ１Ａ、ＣＳＦ３、ＣＣＲ３、ＩＬ１ＲＮ、Ｍ

ＩＦ、ＮＦＫＢ１、ＰＴＡＦＲ、ＴＬＲ２、ＴＬＲ４、ＧＰＲ４４、ＨＭＯＸ１、ミッドカイン、ＩＲＡＫ１、ＮＦＫＢ２、ＳＥＲＰＩＮＡ１、ＳＥＲＰＩＮＥ１及びＴＲＥＭ１からなる群から選択される、敗血症に関与する１つ又はそれ以上の標的（一実施形態では、２つの標的）を結合することができるＤＶＤ－Ｉｇに関する。敗血症に対するこのようなＤＶＤＩｇの有効性は、本分野において公知の前臨床動物モデルにおいて評価することが可能である（Ｂｕｒａｓ ＪＡ，ｅｔ ａｌ．，（２００５） Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖ．４（１０）：８５４－６５及びＣａｌａｎｄｒａ Ｔ，ｅｔ ａｌ，（２０００）Ｎａｔ Ｍｅｄ．６（２）：１６４－７０）参照）。

【０２７９】

７．神経疾患

７．１神経変性疾患

神経変性疾患は、通常年齢依存性である慢性又は急性（例えば、発作、外傷性脳傷害、脊髄傷害など）の何れかである。神経変性疾患は、神経細胞機能の進行性の喪失（神経細胞死、軸索喪失、神経突起、神経炎性萎縮症（ｎｅｕｒｉｔｉｃ ｄｙｓｔｒｏｐｈｙ）、脱ミエリン化）、運動の喪失及び記憶の喪失によって特徴付けられる。慢性神経変性疾患（例えば、アルツハイマー病）の基礎を成す機序として明らかになりつつある知見は、複雑な病因を示しており、それらの発達及び進行に、様々な要因、例えば、年齢、血糖状態、アミロイド産生及び多量体化、ＲＡＧＥ（ＡＧＥに対する受容体）に結合する糖化終末産物（ＡＧＥ；ａｄｖａｎｃｅｄ ｇｌｙｃａｔｉｏｎ－ｅｎｄ ｐｒｏｄｕｃｔ）の蓄積、増加した脳の酸化的ストレス、減少した脳の血流、炎症性サイトカイン及びケモカインの放出を含む神経炎症、神経細胞の機能不全及びミクログリアの活性化が寄与していることが認められている。従って、これらの慢性神経変性疾患は、複数の細胞種及び媒介物質の間で複雑な相互作用を示す。このような疾病に対する治療戦略は限られており、非特異的な抗炎症剤（例えば、コルチコステロイド、ＣＯＸ阻害剤）又は神経細胞の喪失及び／又はシナプス機能を抑制するための因子で炎症プロセスを遮断することが大部分を占める。これらの治療は、疾病の進行を停止させることができない。最近の研究は、可溶性Ａ－ｂペプチド（Ａ－ｂオリゴマー形態を含む。）に対する抗体などのより標的化された療法が、疾病の進行を停止させるのに役立つことができるのみならず、記憶及びその他の認知機能を維持するのにも役立ち得ることを示唆している。これらの予備的な観察は、２以上の疾病媒介物質を標的とする特異的な療法（例えば、Ａ－ｂ及び炎症促進性サイトカイン（ＴＮＦなど））が、単一の疾病機序を標的化する場合に観察されたものより、慢性神経変性疾患に対して、ずっと優れた治療的効果を提供し得ることを示唆している（例えば、可溶性Ａ－バロン）（Ｃ．Ｅ．Ｓｈｅｐｈｅｒｄ，ｅｔ ａｌ，Ｎｅｕｒｏｂｉｏｌ Ａｇｉｎｇ．２００５ Ｏｃｔ ２４；Ｎｅｌｓｏｎ ＲＢ．，Ｃｕｒｒ Ｐｈａｒｍ Ｄｅｓ．２００５；１１：３３３５；Ｗｉｌｌｉａｍ Ｌ．Ｋｌｅｉｎ．；Ｎｅｕｒｏｃｈｅｍ Ｉｎｔ．２００２；４１：３４５；Ｍｉｃｈｅｌｌｅ Ｃ Ｊａｎｅｌｓｉｎｓ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｎｅｕｒｏｉｎｆｌａｍｍａｔｉｏｎ．２００５；２：２３；Ｓｏｌｏｍａｎ Ｂ．，Ｃｕｒｒ Ａｌｚｈｅｉｍｅｒ Ｒｅｓ．２００４；１：１４９；Ｉｇｏｒ Ｋｌｙｕｂｉｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｍｅｄ．２００５；１１：５５６－６１；Ａｒａｎｃｉｏ Ｏ，ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｊｏｕｒｎａｌ（２００４）１－１０；Ｂｏｒｎｅｍａｎｎ ＫＤ，ｅｔ ａｌ．，Ａｍ Ｊ Ｐａｔｈｏｌ．２００１；１５８：６３；Ｄｅａｎｅ Ｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｍｅｄ．２００３；９：９０７－１３；及びＥｌｉｅｚｅｒ Ｍａｓｌｉａｈ，ｅｔ ａｌ．，Ｎｅｕｒｏｎ．２００５；４６：８５７参照）。

【０２８０】

本発明のＤＶＤ－Ｉｇ分子は、アルツハイマー病などの慢性神経変性疾患に関与する１つ又はそれ以上の標的を結合することができる。このような標的には、ＡＤの発病に関与すると推定されている全ての媒介物質（可溶性又は細胞表面）、例えば、ＡＧＥ（Ｓ１００Ａ、アムホテリン）、炎症促進性サイトカイン（例えば、ＩＬ－１）、ケモカイン（例えば、ＭＣＰ１）、神経再生を阻害する分子（例えば、Ｎｏｇｏ、ＲＧＭ－Ａ）、神経突

起の成長を増強する分子（ニューロトロフィン）及び脳血液関門での輸送を媒介することができる分子（例えば、トランスフェリン受容体、インシュリン受容体又はＲＡＧＥ）が含まれるが、これらに限定されない。ＤＶＤ－Ｉｇ分子の効力は、アミロイド前駆体タンパク質又はＲＡＧＥを過剰発現し、アルツハイマー病様の症候を発症するトランスジェニックマウスなどの前臨床動物モデルで妥当性を確認することが可能である。さらに、ＤＶＤ－Ｉｇ分子を構築し、動物モデルで効力について検査することが可能であり、ヒト患者での検査のために、最良の治療的ＤＶＤ－Ｉｇを選択することができる。ＤＶＤ－Ｉｇ分子は、パーキンソン病などの他の神経変性疾患の治療のためにも使用することが可能である。α－シヌクレインが、パーキンソン病に関与している。α－シヌクレイン及び炎症性媒介物質（ＴＮＰ、ＩＬ－１、ＭＣＰ－１など）を標的とすることができるＤＶＤ－Ｉｇは、パーキンソン病に対する有効な治療であることを証明することが可能であり、本発明において想定される。

【０２８１】

ＲＧＭＡは、ＰＤ患者中の黒質中で強く上方制御されることが最近示されたので、あるいは、α－シニュクレイン及びＲＧＭＡを標的とすることができるＤＶＤ－Ｉｇは、パーキンソン病患者の黒質中の病的進行を停止させることができるのみならず、損傷を受けた神経突起の再生的増殖をもたらすことができる（ＢｏｓｓｅｒｓＫ．ｅｔ　ａｌ．（２００９）Ｂｒａｉｎ　Ｐａｔｈｏｌ．１９：９１－１０７）。

【０２８２】

７．２神経細胞の再生及び脊髄損傷

病的機序の知見の増大に関わらず、脊髄損傷（ＳＣＩ）は、なお、多大な損害を与える症状であり、高い医学的な要求を特徴とする医学的な適応症である。多くの脊髄損傷は、挫傷又は圧迫傷害であり、通常、原発性損傷に続いて、最初の損傷を悪化させ、病変部位の著しい拡大（特には、１０倍超）をもたらす続発性損傷機序（炎症媒介物質、例えば、サイトカイン及びケモカイン）が起こる。ＳＣＩにおけるこれらの原発及び続発性の機序は、他の手段、例えば外傷及び発作によって引き起こされた脳損傷における機序と極めて類似している。満足する治療は存在せず、メチルプレドニゾロン（ＭＰ）の高用量大量瞬時注射は、損傷から８時間後という狭い時間枠内で使用される唯一の療法である。しかしながら、この治療は、顕著な機能的回復が全くなしに、続発性損傷を予防することのみを目的としている。明瞭な効果の欠如並びにその後の感染症を伴う免疫抑制及び重い組織病理学的な筋肉の変化などの重い副作用に対して大きな批判が為されている。内在性の再生能を刺激する他の薬物、生物物質又は小分子は承認されていないが、有望な治療原理及び薬物候補が、近年、ＳＣＩの動物モデルにおいて有効性を示しており、最初の有望な臨床データが、ごく最近に提示されている。多くの場合、ヒトＳＣＩにおける機能的回復の欠如は、病変部位における、瘢痕組織中、ミエリン中及び損傷を伴う細胞上における神経突起の増殖を阻害する因子によって引き起こされる。このような因子は、ミエリン随伴タンパク質ＮｏｇｏＡ、ＯＭｇｐ及びＭＡＧ、ＲＧＭＡ、瘢痕随伴ＣＳＰＧ（コンドロイチン硫酸プロテオグリカン）及び反応性星状膠細胞に対する阻害因子（一部のセマホリン及びエフリン）である。しかしながら、病変部位では、増殖阻害分子が見出されるのみならず、ニューロトロフィン、ラミニン、Ｌ１及びその他のような神経突起成長刺激因子も見出される。阻害的な影響の低下が、バランスを、増殖阻害から増殖促進へとシフトさせ得るので、神経突起成長阻害分子と神経突起成長促進分子のこの協調は、ＮｏｇｏＡ又はＲＧＭＡのような単一の因子を遮断することが、げっ歯類ＳＣＩモデルにおいて著しい機能回復をもたらしたことを説明し得る。しかしながら、単一の神経突起成長阻害分子を遮断することによって観察された回復は完全ではなかった。より速く、より顕著な回復を達成するためには、２つの神経突起成長阻害分子（例えば、Ｎｏｇｏ及びＲＧＭＡ）を遮断し、又は神経突起成長阻害分子を遮断し、及び神経突起成長増強分子の機能を増強し（例えば、Ｎｏｇｏ及びニューロトロフィン）、又は神経突起成長阻害分子（例えば、Ｎｏｇｏ）及び炎症促進性分子（例えば、ＴＮＦ）を遮断することが、望ましい場合があり得る（ＭｃＧｅｅ　ＡＷ，ｅｔ　ａｌ．Ｔｒｅｎｄｓ　Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．２００３；２６：１９

３；Ｍａｒｃｏ Ｄｏｍｅｎｉｃｏｎｉ，ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｎｅｕｒｏｌ．Ｓｃｉ．２００５；２３３：４３；Ｍｉｌａｎ Ｍａｋｗａｎａｌ，ｅｔ ａｌ．ＦＥＢＳ Ｊ．２００５；２７２：２６２８；Ｂａｒｒｙ Ｊ．ＤｉｃｋｓｏｎＳｃｉｅｎｃｅ２００２；２９８：１９５９；Ｆｅｌｉｃｉａ Ｙｕ Ｈｓｕａｎ Ｔｅｎｇ，ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｎｅｕｒｏｓｃｉ Ｒｅｓ．２００５；７９：２７３；Ｔａｒａ Ｋａｒｎｅｚｉｓ，ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ Ｎｅｕｒｏｓｃｉｅｎｃｅ２００４；７：７３６；Ｇａｎｇ Ｘｕ，ｅｔ ａｌ．Ｊ． Ｎｅｕｒｏｃｈｅｍ．２００４；９１：１０１８参照）。

【０２８３】

一態様において、ＮｇＲ及びＲＧＭＡ；ＮｏｇｏＡ及びＲＧＭＡ；ＭＡＧ及びＲＧＭＡ；ＯＭＧｐ及びＲＧＭＡ；ＲＧＭＡ及びＲＧＭＢ；ＲＧＭＡ及びセマホリン３Ａ；ＲＧＭＡ及びセマホリン４；ＣＳＰＧ及びＲＧＭＡ；アグレカン、ミッドカイン、ニューロカン、ベルシカン、ホスファカン、Ｔｅ３８及びＴＮＦ－α；樹状突起及び軸索の出芽を促進する抗体と組み合わされたＡβ球状体（ｇｌｏｂｕｌｏｍｅｒ）特異的抗体などの標的対を結合することができるＤＶＤ－Ｉｇが提供される。樹状突起、軸索の損傷又は神経炎性萎縮症の病変は、ＡＤの極めて早期の兆候であり、ＮＯＧＯＡが樹状突起の成長を制限すること、及びミエリンに付随し、上記されている他の分子、例えば、ＲＧＭＡ、ＭＡＧ、ＯＭＧｐが軸索の再成長を損なうことが知られている。ａｂのこのような種類を、ＳＣＩ候補（ミエリンタンパク質）Ａｂの何れかと組み合わせることが可能である。他のＤＶＤ－Ｉｇ標的は、ＮｇＲ－ｐ７５、ＮｇＲ－Ｔｒｏｙ、ＮｇＲ－Ｎｏｇｏ６６（Ｎｏｇｏ）、ＮｇＲ－Ｌｉｎｇｏ、Ｌｉｎｇｏ－Ｔｒｏｙ、Ｌｉｎｇｏ－ｐ７５、ＭＡＧ又はＯｍｇｐのあらゆる組み合わせを含み得る。さらに、標的には、神経突起の阻害に関与すると推定されている全ての媒介物質（可溶性又は細胞表面）、例えば、Ｎｏｇｏ、Ｏｍｐｇ、ＭＡＧ、ＲＧＭＡ、セマフォリン、エフリン、可溶性Ａ－ｂ、炎症促進性サイトカイン（例えば、ＩＬ－１）、ケモカイン（例えば、ＭＩＰ１ａ）、神経再生を阻害する分子も含まれ得る。抗ｎｏｇｏ／抗ＲＧＭＡ又は類似のＤＶＤ－Ｉｇ分子の効力は、脊髄損傷の前臨床動物モデルにおいて、妥当性を確認することが可能である。さらに、これらのＤＶＤ－Ｉｇ分子を構築し、動物モデルで効力について検査することが可能であり、ヒト患者での検査のために、最良の治療的ＤＶＤ－Ｉｇを選択することができる。さらに、単一の受容体、例えば３つのリガンドＮｏｇｏ、ＯＭＰＧ及びＭＡＧを結合するＮｏｇｏ受容体並びにＡ－ｂ及びＳ１００Ａを結合するＲＡＧＥ上の２つの異なるリガンド結合部位を標的とするＤＶＤ－Ｉｇ分子を構築することが可能である。さらに、神経突起成長阻害剤、例えば、ｎｏｇｏ及びｎｏｇｏ受容体は、多発性硬化症のような免疫学的疾患において神経再生を抑制する上でも役割を果たす。ｎｏｇｏ－ｎｏｇｏ受容体の相互作用の阻害は、多発性硬化症の動物モデルの回復を増強させることが示されている。従って、１つの免疫媒介物質、例えば、ＩＬ－１２のようなサイトカイン、及び神経突起成長阻害分子、例えば、ｎｏｇｏ又はＲＧＭの機能を遮断することができるＤＶＤ－Ｉｇ分子は、免疫又は神経突起成長阻害剤分子のみを遮断するより、より速く、より大きな効力を与え得る。

【０２８４】

一般に、抗体は、脳血液関門（ＢＢＢ）を効率的及び適切な様式で横切らない。しかしながら、ある種の神経疾患（例えば、発作、外傷性脳傷害、多発性硬化症など）では、ＢＢＢが損なわれる場合があり得、ＤＶＤ－Ｉｇ及び抗体の脳内への増加した透過を許容する。ＢＢＢの漏出が起こらない他の神経症状では、グルコース及びアミノ酸担体などの担体媒介性輸送体並びにＢＢＢの血管内皮における受容体媒介性トランスサイトーシス媒介細胞構造／受容体を含む内在性輸送系の標的化を使用し得、これにより、ＤＶＤ－Ｉｇの経ＢＢＢ輸送が可能になる。このような輸送を可能にするＢＢＢでの構造には、インシュリン受容体、トランスフェリン受容体、ＬＲＰ及びＲＡＧＥが含まれるが、これらに限定されない。さらに、戦略は、低分子量の薬物、ナノ粒子及び核酸を含む、中枢神経系内へ薬物候補を輸送するためのシャトルとしてＤＶＤ－Ｉｇを使用することも可能にする（Ｃｏｌｏｍａ ＭＪ，ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｐｈａｒｍ Ｒｅｓ．１７（３）：２６６－７４；Ｂｏａｄｏ ＲＪ，ｅｔ ａｌ．（２００７）Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇ．Ｃｈｅ

ｍ．１８（２）：４４７－５５）。

【０２８５】

神経学的疾患を治療するために標的の以下の対を結合することができるＤＶＤＩｇが想定される。Ａβ（配列１）及びＡβ（配列３）；ＴＮＦ－α及びＡβ（配列２）；ＩＬ－１β及びＡβ（配列２）；Ａβ（配列１）及びＡβ（配列２）；ＩＧＦ１，２及びＡβ（配列２）；Ａβ（配列２）及びＩＬ－１８；ＩＬ－６及びＡβ（配列２）；ＴＮＦ－α及びＡβ（配列３）；ＩＬ－１β及びＡβ（配列３）；Ａβ（配列１）及びＡβ（配列３）；ＩＧＦ１，２及びＡβ（配列３）；Ａβ（配列３）及びＩＬ－１８；ＩＬ－６及びＡβ（配列３）；ＴＮＦ－α及びＡβ（配列１）；ＩＬ－１β及びＡβ（配列１）；ＩＧＦ１，２及びＡβ（配列１）；Ａβ（配列１）及びＩＬ－１８；ＩＬ－６及びＡβ（配列１）；Ａβ（配列１）及びＲＡＧＥ；ＮＧＦ及びＩＬ－１８；ＮＧＦ及びＩＬ－１β；ＮＧＦ及びＩＬ－６；ＴＮＦ－α及びＥＧＦＲ（配列２）；ＴＮＦ－α及びＲＡＧＥ；ＣＤ－２０及びＥＧＦＲ（配列１）；ＣＤ－２０及びＥＧＦＲ（配列２）；ＲＧＭＡ及びＴＮＦ－αからなる群から選択される標的の結合対を結合することができる（実施例２．１から２．２７参照）。

【０２８６】

８．腫瘍疾患

モノクローナル抗体療法が、癌に対する重要な治療様式として登場している（ｖｏｎ Ｍｅｈｒｅｎ Ｍ，ｅｔ ａｌ．（２００３）Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｍｅｄ．５４：３４３－６９）。抗体は、アポトーシス、再誘導された細胞毒性、リガンド－受容体相互作用の妨害を誘導し、又は新生物表現型にとって不可欠なタンパク質の発現を抑制することによって、抗腫瘍効果を発揮し得る。さらに、抗体は、腫瘍微小環境の成分を標的とすることが可能であり、腫瘍に付随する脈管構造の形成など不可欠な構造を擾乱する。抗体は、そのリガンドが増殖因子である受容体（上皮増殖因子受容体など）を標的とすることも可能である。従って、抗体は、細胞増殖を刺激する天然のリガンドが標的とされる腫瘍細胞へ結合することを阻害する。あるいは、抗体は、抗イディオタイプネットワーク、補体媒介性細胞傷害又は抗体依存性細胞性細胞傷害（ＡＤＣＣ）を誘導し得る。２つの別個の腫瘍媒介物質を標的とする二重特異的抗体の使用は、単一特異的療法に比べて、さらなる有利さを与えるものと思われる。

【０２８７】

別の実施形態において、本発明のＤＶＤは、ＶＥＧＦ及びホスファチジルセリン；ＶＥＧＦ及びＥｒｂＢ３；ＶＥＧＦ及びＰＬＧＦ；ＶＥＧＦ及びＲＯＢＯ４；ＶＥＧＦ及びＢＳＧ２；ＶＥＧＦ及びＣＤＣＰ１；ＶＥＧＦ及びＡＮＰＥＰ；ＶＥＧＦ及びｃ－ＭＥＴ；ＨＥＲ－２及びＥＲＢ３；ＨＥＲ－２及びＢＳＧ２；ＨＥＲ－２及びＣＤＣＰ１；ＨＥＲ－２及びＡＮＰＥＰ；ＥＧＦＲ及びＣＤ６４；ＥＧＦＲ及びＢＳＧ２；ＥＧＦＲ及びＣＤＣＰ１；ＥＧＦＲ及びＡＮＰＥＰ；ＩＧＦ１Ｒ及びＰＤＧＦＲ；ＩＧＦ１Ｒ及びＶＥＧＦ；ＩＧＦ１Ｒ及びＣＤ２０；ＣＤ２０及びＣＤ７４；ＣＤ２０及びＣＤ３０；ＣＤ２０及びＤＲ４；ＣＤ２０及びＶＥＧＦＲ２；ＣＤ２０及びＣＤ５２；ＣＤ２０及びＣＤ４；ＨＧＦ及びｃ－ＭＥＴ；ＨＧＦ及びＮＲＰ１；ＨＧＦ及びホスファチジルセリン；ＥｒｂＢ３及びＩＧＦ１Ｒ；ＥｒｂＢ３及びＩＧＦ１，２；ｃ－Ｍｅｔ及びＨｅｒ－２；ｃ－Ｍｅｔ及びＮＲＰ１；ｃ－Ｍｅｔ及びＩＧＦ１Ｒ；ＩＧＦ１，２及びＰＤＧＦＲ；ＩＧＦ１，２及びＣＤ２０；ＩＧＦ１，２及びＩＧＦ１Ｒ；ＩＧＦ２及びＥＧＦＲ；ＩＧＦ２及びＨＥＲ２；ＩＧＦ２及びＣＤ２０；ＩＧＦ２及びＶＥＧＦ；ＩＧＦ２及びＩＧＦ１Ｒ；ＩＧＦ１及びＩＧＦ２；ＰＤＧＦＲａ及びＶＥＧＦＲ２；ＰＤＧＦＲａ及びＰＬＧＦ；ＰＤＧＦＲａ及びＶＥＧＦ；ＰＤＧＦＲａ及びｃ－Ｍｅｔ；ＰＤＧＦＲａ及びＥＧＦＲ；ＰＤＧＦＲｂ及びＶＥＧＦＲ２；ＰＤＧＦＲｂ及びｃ－Ｍｅｔ；ＰＤＧＦＲｂ及びＥＧＦＲ；ＲＯＮ及びｃ－Ｍｅｔ；ＲＯＮ及びＭＴＳＰ１；ＲＯＮ及びＭＳＰ；ＲＯＮ及びＣＤＣＰ１；ＶＧＦＲ１及びＰＬＧＦ；ＶＧＦＲ１及びＲＯＮ；ＶＧＦＲ１及びＥＧＦＲ；ＶＥＧＦＲ２及びＰＬＧＦ；ＶＥＧＦＲ２及びＮＲＰ１；ＶＥＧＦＲ２及びＲＯＮ；ＶＥＧＦＲ２及びＤＬＬ４；ＶＥＧＦＲ２及びＥＧＦＲ；ＶＥＧＦＲ２及びＲＯＢＯ４；ＶＥＧＦＲ２

及びＣＤ５５；ＬＰＡ及びＳ１Ｐ；ＥＰＨＢ２及びＲＯＮ；ＣＴＬＡ４及びＶＥＧＦ；ＣＤ３及びＥＰＣＡＭ；ＣＤ４０及びＩＬ６；ＣＤ４０及びＩＧＦ；ＣＤ４０及びＣＤ５６；ＣＤ４０及びＣＤ７０；ＣＤ４０及びＶＥＧＦＲ１；ＣＤ４０及びＤＲ５；ＣＤ４０及びＤＲ４；ＣＤ４０及びＡＰＲＩＬ；ＣＤ４０及びＢＣＭＡ；ＣＤ４０及びＲＡＮＫＬ；ＣＤ２８及びＭＡＰＧ；ＣＤ８０及びＣＤ４０；ＣＤ８０及びＣＤ３０；ＣＤ８０及びＣＤ３３；ＣＤ８０及びＣＤ７４；ＣＤ８０及びＣＤ２；ＣＤ８０及びＣＤ３；ＣＤ８０及びＣＤ１９；ＣＤ８０及びＣＤ４；ＣＤ８０及びＣＤ５２；ＣＤ８０及びＶＥＧＦ；ＣＤ８０及びＤＲ５；ＣＤ８０及びＶＥＧＦＲ２；ＣＤ２２及びＣＤ２０；ＣＤ２２及びＣＤ８０；ＣＤ２２及びＣＤ４０；ＣＤ２２及びＣＤ２３；ＣＤ２２及びＣＤ３３；ＣＤ２２及びＣＤ７４；ＣＤ２２及びＣＤ１９；ＣＤ２２及びＤＲ５；ＣＤ２２及びＤＲ４；ＣＤ２２及びＶＥＧＦ；ＣＤ２２及びＣＤ５２；ＣＤ３０及びＣＤ２０；ＣＤ３０及びＣＤ２２；ＣＤ３０及びＣＤ２３；ＣＤ３０及びＣＤ４０；ＣＤ３０及びＶＥＧＦ；ＣＤ３０及びＣＤ７４；ＣＤ３０及びＣＤ１９；ＣＤ３０及びＤＲ５；ＣＤ３０及びＤＲ４；ＣＤ３０及びＶＥＧＦＲ２；ＣＤ３０及びＣＤ５２；ＣＤ３０及びＣＤ４；ＣＤ１３８及びＲＡＮＫＬ；ＣＤ３３及びＦＴＬ３；ＣＤ３３及びＶＥＧＦ；ＣＤ３３及びＶＥＧＦＲ２；ＣＤ３３及びＣＤ４４；ＣＤ３３及びＤＲ４；ＣＤ３３及びＤＲ５；ＤＲ４及びＣＤ１３７；ＤＲ４及びＩＧＦ１，２；ＤＲ４及びＩＧＦ１Ｒ；ＤＲ４及びＤＲ５；ＤＲ５及びＣＤ４０；ＤＲ５及びＣＤ１３７；ＤＲ５及びＣＤ２０；ＤＲ５及びＥＧＦＲ；ＤＲ５及びＩＧＦ１，２；ＤＲ５及びＩＧＦＲ，ＤＲ５及びＨＥＲ－２，ＥＧＦＲ及びＤＬＬ４を結合することができる。他の標的の組み合わせには、ＥＧＦ／ｅｒｂ－２／ｅｒｂ－３ファミリーの１つ又はそれ以上のメンバーが含まれる。ＤＶＤＩｇが結合し得る、腫瘍疾患に関与する他の標的（１つ又はそれ以上）には、ＣＤ５２、ＣＤ２０、ＣＤ１９、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＢＭＰ６、ＩＬ１２Ａ、ＩＬ１Ａ、ＩＬ１Ｂ、ＩＬ２、ＩＬ２４、ＩＮＨＡ、ＴＮＦ、ＴＮＦＳＦ１０、ＢＭＰ６、ＥＧＦ、ＦＧＦ１、ＦＧＦ１０、ＦＧＦ１１、ＦＧＦ１２、ＦＧＦ１３、ＦＧＦ１４、ＦＧＦ１６、ＦＧＦ１７、ＦＧＦ１８、ＦＧＦ１９、ＦＧＦ２、ＦＧＦ２０、ＦＧＦ２１、ＦＧＦ２２、ＦＧＦ２３、ＦＧＦ３、ＦＧＦ４、ＦＧＦ５、ＦＧＦ６、ＦＧＦ７、ＦＧＦ８、ＦＧＦ９、ＧＲＰ、ＩＧＦ１、ＩＧＦ２、ＩＬ１２Ａ、ＩＬ１Ａ、ＩＬ１Ｂ、ＩＬ２、ＩＮＨＡ、ＴＧＦＡ、ＴＧＦＢ１、ＴＧＦＢ２、ＴＧＦＢ３、ＶＥＧＦ、ＣＤＫ２、ＦＧＦ１０、ＦＧＦ１８、ＦＧＦ２、ＦＧＦ４、ＦＧＦ７、ＩＧＦ１Ｒ、ＩＬ２、ＢＣＬ２、ＣＤ１６４、ＣＤＫＮ１Ａ、ＣＤＫＮ１Ｂ、ＣＤＫＮ１Ｃ、ＣＤＫＮ２Ａ、ＣＤＫＮ２Ｂ、ＣＤＫＮ２Ｃ、ＣＤＫＮ３、ＧＮＲＨ１、ＩＧＦＢＰ６、ＩＬ１Ａ、ＩＬ１Ｂ、ＯＤＺ１、ＰＡＷＲ、ＰＬＧ、ＴＧＦＢ１Ｉ１、ＡＲ、ＢＲＣＡ１、ＣＤＫ３、ＣＤＫ４、ＣＤＫ５、ＣＤＫ６、ＣＤＫ７、ＣＤＫ９、Ｅ２Ｆ１、ＥＧＦＲ、ＥＮＯ１、ＥＲＢＢ２、ＥＳＲ１、ＥＳＲ２、ＩＧＦＢＰ３、ＩＧＦＢＰ６、ＩＬ２、ＩＮＳＬ４、ＭＹＣ、ＮＯＸ５、ＮＲ６Ａ１、ＰＡＰ、ＰＣＮＡ、ＰＲＫＣＱ、ＰＲＫＤ１、ＰＲＬ、ＴＰ５３、ＦＧＦ２２、ＦＧＦ２３、ＦＧＦ９、ＩＧＦＢＰ３、ＩＬ２、ＩＮＨＡ、ＫＬＫ６、ＴＰ５３、ＣＨＧＢ、ＧＮＲＨ１、ＩＧＦ１、ＩＧＦ２、ＩＮＨＡ、ＩＮＳＬ３、ＩＮＳＬ４、ＰＲＬ、ＫＬＫ６、ＳＨＢＧ、ＮＲ１Ｄ１、ＮＲ１Ｈ３、ＮＲ１Ｉ３、ＮＲ２Ｆ６、ＮＲ４Ａ３、ＥＳＲ１、ＥＳＲ２、ＮＲ０Ｂ１、ＮＲ０Ｂ２、ＮＲ１Ｄ２、ＮＲ１Ｈ２、ＮＲ１Ｈ４、ＮＲ１Ｉ２、ＮＲ２Ｃ１、ＮＲ２Ｃ２、ＮＲ２Ｅ１、ＮＲ２Ｅ３、ＮＲ２Ｆ１、ＮＲ２Ｆ２、ＮＲ３Ｃ１、ＮＲ３Ｃ２、ＮＲ４Ａ１、ＮＲ４Ａ２、ＮＲ５Ａ１、ＮＲ５Ａ２、ＮＲ６Ａ１、ＰＧＲ、ＲＡＲＢ、ＦＧＦ１、ＦＧＦ２、ＦＧＦ６、ＫＬＫ３、ＫＲＴ１、ＡＰＯＣ１、ＢＲＣＡ１、ＣＨＧＡ、ＣＨＧＢ、ＣＬＵ、ＣＯＬ１Ａ１、ＣＯＬ６Ａ１、ＥＧＦ、ＥＲＢＢ２、ＥＲＫ８、ＦＧＦ１、ＦＧＦ１０、ＦＧＦ１１、ＦＧＦ１３、ＦＧＦ１４、ＦＧＦ１６、ＦＧＦ１７、ＦＧＦ１８、ＦＧＦ２、ＦＧＦ２０、ＦＧＦ２１、ＦＧＦ２２、ＦＧＦ２３、ＦＧＦ３、ＦＧＦ４、ＦＧＦ５、ＦＧＦ６、ＦＧＦ７、ＦＧＦ８、ＦＧＦ９、ＧＮＲＨ１、ＩＧＦ１、ＩＧＦ２、ＩＧＦＢＰ３、ＩＧＦＢＰ６、ＩＬ１２Ａ、ＩＬ１Ａ、ＩＬ１Ｂ、ＩＬ２、ＩＬ２４、ＩＮＨＡ、ＩＮＳＬ３、ＩＮＳＬ４、ＫＬＫ１０、ＫＬＫ１２、ＫＬＫ１３、ＫＬＫ１４、ＫＬＫ１５、ＫＬＫ３、ＫＬＫ４、ＫＬＫ５、ＫＬＫ６、ＫＬＫ９、ＭＭＰ２、Ｍ

ＭＰ９、ＭＳＭＢ、ＮＴＮ４、ＯＤＺ１、ＰＡＰ、ＰＬＡＵ、ＰＲＬ、ＰＳＡＰ、ＳＥＲＰＩＮＡ３、ＳＨＢＧ、ＴＧＦＡ、ＴＩＭＰ３、ＣＤ４４、ＣＤＨ１、ＣＤＨ１０、ＣＤＨ１９、ＣＤＨ２０、ＣＤＨ７、ＣＤＨ９、ＣＤＨ１、ＣＤＨ１０、ＣＤＨ１３、ＣＤＨ１８、ＣＤＨ１９、ＣＤＨ２０、ＣＤＨ７、ＣＤＨ８、ＣＤＨ９、ＲＯＢＯ２、ＣＤ４４、ＩＬＫ、ＩＴＧＡ１、ＡＰＣ、ＣＤ１６４、ＣＯＬ６Ａ１、ＭＴＳＳ１、ＰＡＰ、ＴＧＦＢ１Ｉ１、ＡＧＲ２、ＡＩＧ１、ＡＫＡＰ１、ＡＫＡＰ２、ＣＡＮＴ１、ＣＡＶ１、ＣＤＨ１２、ＣＬＤＮ３、ＣＬＮ３、ＣＹＢ５、ＣＹＣ１、ＤＡＢ２ＩＰ、ＤＥＳ、ＤＮＣＬ１、ＥＬＡＣ２、ＥＮＯ２、ＥＮＯ３、ＦＡＳＮ、ＦＬＪ１２５８４、ＦＬＪ２５５３０、ＧＡＧＥＢ１、ＧＡＧＥＣ１、ＧＧＴ１、ＧＳＴＰ１、ＨＩＰ１、ＨＵＭＣＹＴ２Ａ、ＩＬ２９、Ｋ６ＨＦ、ＫＡＩ１、ＫＲＴ２Ａ、ＭＩＢ１、ＰＡＲＴ１、ＰＡＴＥ、ＰＣＡ３、ＰＩＡＳ２、ＰＩＫ３ＣＧ、ＰＰＩＤ、ＰＲ１、ＰＳＣＡ、ＳＬＣ２Ａ２、ＳＬＣ３３Ａ１、ＳＬＣ４３Ａ１、ＳＴＥＡＰ、ＳＴＥＡＰ２、ＴＰＭ１、ＴＰＭ２、ＴＲＰＣ６、ＡＮＧＰＴ１、ＡＮＧＰＴ２、ＡＮＰＥＰ、ＥＣＧＦ１、ＥＲＥＧ、ＦＧＦ１、ＦＧＦ２、ＦＩＧＦ、ＦＬＴ１、ＪＡＧ１、ＫＤＲ、ＬＡＭＡ５、ＮＲＰ１、ＮＲＰ２、ＰＧＦ、ＰＬＸＤＣ１、ＳＴＡＢ１、ＶＥＧＦ、ＶＥＧＦＣ、ＡＮＧＰＴＬ３、ＢＡＩ１、ＣＯＬ４Ａ３、ＩＬ８、ＬＡＭＡ５、ＮＲＰ１、ＮＲＰ２、ＳＴＡＢ１、ＡＮＧＰＴＬ４、ＰＥＣＡＭ１、ＰＦ４、ＰＲＯＫ２、ＳＥＲＰＩＮＦ１、ＴＮＦＡＩＰ２、ＣＣＬ１１、ＣＣＬ２、ＣＸＣＬ１、ＣＸＣＬ１０、ＣＸＣＬ３、ＣＸＣＬ５、ＣＸＣＬ６、ＣＸＣＬ９、ＩＦＮＡ１、ＩＦＮＢ１、ＩＦＮＧ、ＩＬ１Ｂ、ＩＬ６、ＭＤＫ、ＥＤＧ１、ＥＦＮＡ１、ＥＦＮＡ３、ＥＦＮＢ２、ＥＧＦ、ＥＰＨＢ４、ＦＧＦＲ３、ＨＧＦ、ＩＧＦ１、ＩＴＧＢ３、ＰＤＧＦＡ、ＴＥＫ、ＴＧＦＡ、ＴＧＦＢ１、ＴＧＦＢ２、ＴＧＦＢＲ１、ＣＣＬ２、ＣＤＨ５、ＣＯＬ１８Ａ１、ＥＤＧ１、ＥＮＧ、ＩＴＧＡＶ、ＩＴＧＢ３、ＴＨＢＳ１、ＴＨＢＳ２、ＢＡＤ、ＢＡＧ１、ＢＣＬ２、ＣＣＮＡ１、ＣＣＮＡ２、ＣＣＮＤ１、ＣＣＮＥ１、ＣＣＮＥ２、ＣＤＨ１（Ｅ－カドヘリン）、ＣＤＫＮ１Ｂ（ｐ２７Ｋｉｐ１）、ＣＤＫＮ２Ａ（ｐ１６ＩＮＫ４ａ）、ＣＯＬ６Ａ１、ＣＴＮＮＢ１（ｂ－カテニン）、ＣＴＳＢ（カテプシンＢ）、ＥＲＢＢ２（Ｈｅｒ－２）、ＥＳＲ１、ＥＳＲ２、Ｆ３（ＴＦ）、ＦＯＳＬ１（ＦＲＡ－１）、ＧＡＴＡ３、ＧＳＮ（ゲルソリン）、ＩＧＦＢＰ２、ＩＬ２ＲＡ、ＩＬ６、ＩＬ６Ｒ、ＩＬ６ＳＴ（糖タンパク質１３０）、ＩＴＧＡ６（ａ６インテグリン）、ＪＵＮ、ＫＬＫ５、ＫＲＴ１９、ＭＡＰ２Ｋ７（ｃ－Ｊｕｎ）、ＭＫＩ６７（Ｋｉ－６７）、ＮＧＦＢ（ＮＧＦ）、ＮＧＦＲ、ＮＭＥ１（ＮＭ２３Ａ）、ＰＧＲ、ＰＬＡＵ（ｕＰＡ）、ＰＴＥＮ、ＳＥＲＰＩＮＢ５（マスピン）、ＳＥＲＰＩＮＥ１（ＰＡＩ－１）、ＴＧＦＡ、ＴＨＢＳ１（トロンボスポンジン－１）、ＴＩＥ（Ｔｉｅ－１）、ＴＮＦＲＳＦ６（Ｆａｓ）、ＴＮＦＳＦ６（ＦａｓＬ）、ＴＯＰ２Ａ（トポイソメラーゼＩｉａ）、ＴＰ５３、ＡＺＧＰ１（亜鉛－ａ－糖タンパク質）、ＢＰＡＧ１（プレクチン）、ＣＤＫＮ１Ａ（ｐ２１Ｗａｐ１／Ｃｉｐ１）、ＣＬＤＮ７（クラウジン－７）、ＣＬＵ（クラステリン）、ＥＲＢＢ２（Ｈｅｒ－２）、ＦＧＦ１、ＦＬＲＴ１（フィブロネクチン）、ＧＡＢＲＰ（ＧＡＢＡａ）、ＧＮＡＳ１、ＩＤ２、ＩＴＧＡ６（ａ６インテグリン）、ＩＴＧＢ４（ｂ４インテグリン）、ＫＬＦ５（ＧＣ　Ｂｏｘ　ＢＰ）、ＫＲＴ１９（ケラチン１９）、ＫＲＴＨＢ６（毛髪特異的ＩＩ型ケラチン）、ＭＡＣＭＡＲＣＫＳ、ＭＴ３（メタロチオネクチン－ＩＩＩ）、ＭＵＣ１（ムチン）、ＰＴＧＳ２（ＣＯＸ－２）、ＲＡＣ２（ｐ２１Ｒａｃ２）、Ｓ１００Ａ２、ＳＣＧＢ１Ｄ２（リポフィリンＢ）、ＳＣＧＢ２Ａ１（マンマグロビン２）、ＳＣＧＢ２Ａ２（マンマグロビン１）、ＳＰＲＲ１Ｂ（Ｓｐｒ１）、ＴＨＢＳ１、ＴＨＢＳ２、ＴＨＢＳ４及びＴＮＦＡＩＰ２（Ｂ９４）、ＲＯＮ、ｃ－Ｍｅｔ、ＣＤ６４、ＤＬＬ４、ＰＬＧＦ、ＣＴＬＡ４、ホスファチジルセリン（ｐｈｏｐｈａｔｉｄｙｌｓｅｒｉｎｅ）、ＲＯＢＯ４、ＣＤ８０、ＣＤ２２、ＣＤ４０、ＣＤ２３、ＣＤ２８、ＣＤ８０、ＣＤ５５、ＣＤ３８、ＣＤ７０、ＣＤ７４、ＣＤ３０、ＣＤ１３８、ＣＤ５６、ＣＤ３３、ＣＤ２、ＣＤ１３７、ＤＲ４、ＤＲ５、ＲＡＮＫＬ、ＶＥＧＦＲ２、ＰＤＧＦＲ、ＶＥＧＦＲ１、ＭＴＳＰ１、ＭＳＰ、ＥＰＨＢ２、ＥＰＨＡ１、ＥＰＨＡ２、ＥｐＣＡＭ、ＰＧＥ２、ＮＫＧ２Ｄ、ＬＰＡ、ＳＩＰ、ＡＰＲＩＬ、ＢＣＭＡ、ＭＡＰＧ、ＦＬＴ３、ＰＤＧＦＲα、ＰＤＧＦＲβ、ＲＯＲ

１、ＰＳＭＡ、ＰＳＣＡ、ＳＣＤ１及びＣＤ５９からなる群から選択されるものが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【０２８８】

ＩＶ．医薬組成物

本発明は、本発明の結合タンパク質と、及び医薬として許容される担体とを含む医薬組成物も提供する。本発明の結合タンパク質を含む医薬組成物は、疾患を診断し、検出し、若しくはモニタリングし、疾患又は１つ若しくはそれ以上のその症候を予防し、治療し、管理し、若しくは軽減する上で、及び／又は研究において使用されるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、組成物は、１つ又はそれ以上の本発明の結合タンパク質を含む。別の実施形態において、医薬組成物は、１つ又はそれ以上の本発明の結合タンパク質と、及び疾患を治療するための、本発明の結合タンパク質以外の１つ又はそれ以上の予防又は治療剤とを含む。一実施形態において、予防剤又は治療剤は、疾患又は１つ若しくはそれ以上のその症候の予防、治療、管理又は軽減に有用であることが知られており、又は疾患又は１つ若しくはそれ以上のその症候の予防、治療、管理又は軽減においてこれまで使用されており、若しくは現在使用されている。これらの実施形態に従えば、組成物は、担体、希釈剤又は賦形剤をさらに含み得る。

【０２８９】

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

【０２９０】

様々な送達系が公知であり、例えば、リポソーム、微粒子、ミクロカプセル、抗体又は抗体断片を発現することができる組み換え細胞、受容体によって媒介されるエンドサイトーシス（例えば、Ｗｕ　ａｎｄ　Ｗｕ，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６２：４４２９－４４３２（１９８７）参照）、レトロウイルス又は他のベクターの一部としての核酸の構築物などの中に封入して、本発明の１つ若しくはそれ以上の抗体又は本発明の１つ若しくはそれ以上の抗体及び疾患又は１つ若しくはそれ以上のその症候を予防し、管理し、治療し、若しくは軽減するのに有用な予防剤又は治療剤の組み合わせを投与するために使用することが可能である。本発明の予防剤又は治療剤を投与する方法には、非経口投与（例えば、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内及び皮下）、硬膜外投与、腫瘍内投与及び粘膜投与（例えば、鼻内及び経口経路）が含まれるが、これらに限定されない。さらに、例えば、吸入装置又は噴霧器及びエアロゾル化剤を加えた製剤の使用によって、経肺投与を使用することが可能である。例えば、米国特許第６，０１９，９６８号、米国特許第５，９８５，３２０号、米国特許第５，９８５，３０９号、米国特許第５，９３４，２７２号、米国特許第５，８７４，０６４号、米国特許第５，８５５，９１３号；米国特許第５，２９０，５４０及び米国特許第４，８８０，０７８号；並びにＰＣＴ公開ＷＯ９２／１９２４４、ＷＯ９７／３２５７２、ＷＯ９７／４４０１３、ＷＯ９８／３１３４６及びＷＯ９９／６６９０３（これらの各々の全体が、参照により、本明細書に組み込まれる。）を参照されたい。一実施形態において、本発明の結合タンパク質、組み合わせ療法又は本発明の組成物は、ＡｌｋｅｒｍｅｓＡＩＲ（Ｒ）経肺薬物送達技術（Ａｌｋｅｒｍｅｓ，Ｉｎｃ．，Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，Ｍａｓｓ．）を用いて投与される。特定の実施形態において、本発明の予防剤又は治療剤は、筋肉内、静脈内、腫瘍内、経口、鼻内、経肺又は皮下投与される

。予防剤又は治療剤は、あらゆる都合のよい経路によって、例えば、注入若しくはボーラス注射によって、上皮又は粘膜皮下の裏打ち（例えば、口粘膜、直腸及び腸粘膜など）を通じた吸収によって投与され得、及び生物学的に活性な他の因子と一緒に投与され得る。投与は、全身又は局所であり得る。

【０２９１】

一実施形態において、抗体連結されたカーボンナノチューブ（ＣＮＴ）のインビトロでの腫瘍細胞への特異的結合に続く、近赤外（ＮＩＲ）光による極めて特異的な切除を、腫瘍細胞を標的とするために使用することができる。例えば、その後、１つ又はそれ以上の腫瘍抗原（例えば、ＣＤ２２）に対して誘導された、１つ又はそれ以上の異なるｎｅｕｔｒａｌｉｔｅアビジン誘導体化されたＤＶＤ－Ｉｇに付着される、安定で、生物適合的な非細胞障害性ＣＮＴ分散物を調製するために、ビオチン化された極性脂質を使用することができる（Ｃｈａｋｒａｖａｒｔｙ，Ｐ．ｅｔ　ａｌ．（２００８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ１０５：８６９７－８７０２）。

【０２９２】

特定の実施形態において、治療を必要としている部位へ局所的に、本発明の予防剤又は治療剤を投与することが望ましい場合があり得る。これは、例えば、局所的注入によって、注射によって、又はインプラントの手段によって達成され得るが、これらに限定されるものではなく、前記インプラントは、シアラスチック（ｓｉａｌａｓｔｉｃ）膜、ポリマー、繊維性マトリックス（例えば、Ｔｉｓｓｕｅｌ（Ｒ））又はコラーゲンマトリックスなどの、膜及びマトリックスを含む多孔性又は非多孔性材料である。一実施形態において、本発明の１つ又はそれ以上の抗体アンタゴニストの有効量は、疾患又はその症候を予防し、治療し、管理し、及び／又は軽減するために、対象の罹患した部位へ局所的に投与される。別の実施形態において、本発明の１つ又はそれ以上の抗体の有効量は、疾患又は１つ若しくはそれ以上のその症候を予防し、治療し、管理し、及び／又は軽減するために、本発明の結合タンパク質以外の１つ又はそれ以上の治療薬（例えば、１つ又はそれ以上の予防剤又は治療剤）の有効量と組み合わせて、対象の罹患した部位へ局所的に投与される。

【０２９３】

別の実施形態において、予防剤又は治療剤は、調節された放出系又は徐放系に入れて送達することが可能である。一実施形態において、調節された放出又は徐放を達成するためにポンプを使用し得る（Ｌａｎｇｅｒ，上記；Ｓｅｆｔｏｎ，１９８７，ＣＲＣ　Ｃｒｉｔ．Ｒｅｆ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｅｎｇ．１４：２０；Ｂｕｃｈｗａｌｄ　ｅｔ　ａｌ，１９８０，Ｓｕｒｇｅｒｙ　８８：５０７；Ｓａｕｄｅｋ　ｅｔ　ａｌ．，１９８９，Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．３２１：５７４参照）。別の実施形態において、本発明の治療薬の調節された放出又は徐放を達成するために、ポリマー材料を使用することが可能である。（例えば、Ｍｅｄｉｃａｌ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ　ｏｆ　Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ　Ｒｅｌｅａｓｅ，Ｌａｎｇｅｒ　ａｎｄ　Ｗｉｓｅ（ｅｄｓ．），ＣＲＣ　Ｐｒｅｓ．，Ｂｏｃａ　Ｒａｔｏｎ，Ｆｌａ．（１９７４）；Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ　Ｄｒｕｇ　Ｂｉｏａｖａｉｌａｂｉｌｉｔｙ，Ｄｒｕｇ　Ｐｒｏｄｕｃｔ　Ｄｅｓｉｇｎ　ａｎｄ　Ｐｅｒｆｏｒｍａｎｃｅ，Ｓｍｏｌｅｎ　ａｎｄ　Ｂａｌｌ（ｅｄｓ．），Ｗｉｌｅｙ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ（１９８４）；Ｒａｎｇｅｒ　ａｎｄ　Ｐｅｐｐａｓ，１９８３，Ｊ．，Ｍａｃｒｏｍｏｌ．Ｓｃｉ．Ｒｅｖ．Ｍａｃｒｏｍｏｌ．Ｃｈｅｍ．２３：６１を参照されたい。Ｌｅｖｙ　ｅｔ　ａｌ．，１９８５，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２２８：１９０；Ｄｕｒｉｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，１９８９，Ａｎｎ．Ｎｅｕｒｏｌ．２５：３５１；Ｈｏｗａｒｄ　ｅｔ　ａｌ．，１９８９，Ｊ．　Ｎｅｕｒｏｓｕｒｇ．７１：１０５）；米国特許第５，６７９，３７７号；米国特許第５，９１６，５９７号；米国特許第５，９１２，０１５号；米国特許第５，９８９，４６３号；米国特許第５，１２８，３２６号；ＰＣＴ公開ＷＯ９９／１５１５４；及びＰＣＴ公開ＷＯ９９／２０２５３も参照されたい。徐放製剤中で使用されるポリマーの例には、ポリ（２－ヒドロキシエチルメタクリラート）、ポリ（メチルメタクリラート）、ポリ（アクリル酸）、ポリ（エチレン－コビニルアセタート）、

ポリ（メタクリル酸）、ポリグリコリド（ＰＬＧ）、ポリ無水物、ポリ（Ｎ－ビニルピロリドン）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリアクリルアミド、ポリ（エチレングリコール）、ポリラクチド（ＰＬＡ）、ポリ（ラクチド－コーグリコリド）（ＰＬＧＡ）及びポリオルトエステルが含まれるが、これらに限定されるものではない。一実施形態において、徐放製剤中で使用されるポリマーは、不活性であり、溶脱可能な不純物を含まず、保存時に安定であり、無菌であり、及び生物分解性である。さらに別の実施形態において、調節された放出系又は徐放系は、予防剤又は治療剤の近くに配置されて、全身投薬量の一部のみを必要とするようにすることができる（例えば、Ｇｏｏｄｓｏｎ，ｉｎ Ｍｅｄｉｃａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｏｆ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ，上記，ｖｏｌ．２，ｐｐ．１１５－１３８（１９８４）参照）。

【０２９４】

徐放系は、Ｌａｎｇｅｒ（１９９０，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：１５２７－１５３３）による概説中に論述されている。本発明の１つ又はそれ以上の治療剤を含む徐放製剤を作製するために、当業者に公知のあらゆる技術を使用することが可能である。例えば、米国特許第４，５２６，９３８号、ＰＣＴ公開ＷＯ９１／０５５４８、ＰＣＴ公開ＷＯ９６／２０６９８、Ｎｉｎｇ ｅｔ ａｌ．，１９９６，“Ｉｎｔｒａｔｕｍｏｒａｌ Ｒａｄｉｏｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｈｙ ｏｆ ａ Ｈｕｍａｎ Ｃｏｌｏｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｘｅｎｏｇｒａｆｔ Ｕｓｉｎｇ ａ Ｓｕｓｔａｉｎｅｄ－ Ｒｅｌｅａｓｅ Ｇｅｌ，” Ｒａｄｉｏｔｈｅｒａｐｙ ＆Ｏｎｃｏｌｏｇｙ ３９：１７９－１８９，Ｓｏｎｇ ｅｔ ａｌ．，１９９５，“Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｍｅｄｉａｔｅｄ Ｌｕｎｇ Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ ｏｆ Ｌｏｎｇ－Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｎｇ Ｅｍｕｌｓｉｏｎｓ，” ＰＤＡ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ ＆ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ５０：３７２－３９７，Ｃｌｅｅｋ ｅｔ ａｌ．，１９９７，“Ｂｉｏｄｅｇｒａｄａｂｌｅ Ｐｏｌｙｍｅｒｉｃ Ｃａｒｒｉｅｒｓ ｆｏｒ ａ ｂＦＧＦ Ａｎｔｉｂｏｄｙ ｆｏｒ Ｃａｒｄｉｏｖａｓｃｕｌａｒ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ，” Ｐｒｏ．Ｌｎｔ’ｌ．Ｓｙｍｐ．Ｃｏｎｔｒｏｌ．Ｒｅｌ．Ｂｉｏａｃｔ．Ｍａｔｅｒ．２４：８５３－８５４，ａｎｄ Ｌａｍ ｅｔ ａｌ．，１９９７，”Ｍｉｃｒｏｅｎｃａｐｓｕｌａｔｉｏｎ ｏｆ Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ Ｈｕｍａｎｉｚｅｄ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｙ ｆｏｒ Ｌｏｃａｌ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ，“ Ｐｒｏｃ．ｌｎｔ’ｌ．Ｓｙｍｐ．Ｃｏｎｔｒｏｌ Ｒｅｌ．Ｂｉｏａｃｔ．Ｍａｔｅｒ．２４：７５９－７６０（これらの各々の全体が、参照により、本明細書に組み込まれる。）を参照されたい。

【０２９５】

本発明の組成物が予防剤又は治療剤をコードする核酸である特定の実施形態において、適切な核酸発現ベクターの一部として、核酸を構築し、例えば、レトロウイルスベクター（米国特許第４，９８０，２８６号参照）の使用によって、核酸が細胞内となるように核酸を投与することによって、又は直接の注射によって、又は微粒子照射（例えば、遺伝子銃；Ｂｉｏｌｉｓｔｉｃ，Ｄｕｐｏｎ）の使用によって、又は脂質若しくは細胞表面受容体若しくは形質移入剤でコーティングし、又は核内に入ることが知られているホメオボックス様ペプチドに連結して核酸を投与することによって（例えば、Ｊｏｌｉｏｔ ｅｔ ａｌ．，１９９１，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８８：１８６４－１８６８参照）、核酸がコードしている予防剤又は治療剤の発現を促進するために、核酸をインビボで投与することができる。あるいは、相同的組み換えによる発現のために、核酸を細胞内に導入し、宿主細胞ＤＮＡ内に取り込むことができる。

【０２９６】

本発明の医薬組成物は、その予定された投与経路と適合的であるように製剤化される。投与の経路の例には、非経口、例えば、静脈内、皮内、皮下、経口、鼻内（例えば、吸入）、経皮（例えば、局所）、経粘膜及び直腸投与が含まれるが、これらに限定されない。特異的な実施形態において、組成物は、ヒトへの静脈内、皮下、筋肉内、経口、鼻内又は局所投与に適合された医薬組成物として、定型的な操作に従って製剤化される。典型的に

は、静脈内投与のための組成物は、無菌の等張水性緩衝液中の溶液である。必要な場合には、組成物は、可溶化剤及び注射の部位における痛みを和らげるための局所麻酔剤（リグノカムン（ｌｉｇｎｏｃａｍｎｅ）など）も含み得る。

【０２９７】

本発明の組成物が局所的に投与されるべき場合には、組成物は、軟膏、クリーム、経皮パッチ、ローション、ゲル、シャンプー、スプレー、エアロゾル、溶液、エマルジョンの形態で又は当業者に周知の他の形態で製剤化することが可能である。例えば、「Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ ａｎｄ Ｉｎｔｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｔｏ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ，１９ｔｈ ｅｄ．，Ｍａｃｋ Ｐｕｂ．Ｃｏ．，Ｅａｓｔｏｎ，Ｐａ．（１９９５）」を参照されたい。一実施形態において、噴霧不能な局所剤形の場合には、局所適用に適合性のある担体又は１つ若しくはそれ以上の賦形剤を含み、及び水より大きな動粘性係数を有する粘性ないし半固体又は固体の形態が使用される。適切な製剤は、所望であれば、滅菌され、又は、例えば、浸透圧などの様々な特性に影響を及ぼすための補助剤（例えば、防腐剤、安定化剤、湿潤剤、緩衝剤又は塩）と混合された、溶液、懸濁液、エマルジョン、クリーム、軟膏（ｏｉｎｔｍｅｎｔ）、粉末、リニメント剤、軟膏（ｓａｌｖｅ）など（これらに限定されない）を含む。他の適切な局所剤形には、一実施形態において、固体又は液体不活性担体と組み合わされた活性成分が、加圧された揮発性物質（例えば、フレオンなどの気体状噴射剤）との混合物中又は搾り出し瓶中に梱包されている噴霧可能なエアロゾル調製物が含まれる。所望であれば、医薬組成物及び剤形に、加湿剤又は湿潤剤も添加することが可能である。このような追加の成分の例は、本分野において周知である。

【０２９８】

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

【０２９９】

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

れた放出又は徐放のために、適切に製剤化され得る。

【０３００】

本発明の方法は、例えば、吸入装置又は噴霧器の使用、エアロゾル化剤とともに製剤化された組成物の使用による経肺投与を含み得る。例えば、米国特許第６，０１９，９６８号、米国特許第５，９８５，３２０号、米国特許第５，９８５，３０９号、米国特許第５，９３４，２７２号、米国特許第５，８７４，０６４号、米国特許第５，８５５，９１３号、米国特許第５，２９０，５４０号及び米国特許第４，８８０，０７８号；並びにＰＣＴ公開ＷＯ９２／１９２４４、ＷＯ９７／３２５７２、ＷＯ９７／４４０１３、ＷＯ９８／３１３４６及びＷＯ９９／６６９０３（これらの各々の全体が、参照により、本明細書に組み込まれる。）を参照されたい。特定の実施形態において、本発明の結合タンパク質、組み合わせ療法及び／又は本発明の組成物は、ＡｌｋｅｒｍｅｓＡＩＲ（Ｒ）経肺薬物送達技術（Ａｌｋｅｒｍｅｓ，Ｉｎｃ．Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，Ｍａｓ．）を用いて投与される。

【０３０１】

本発明の方法は、注射による（例えば、大量瞬時注射又は連続的注入による）非経口投与のために製剤化された組成物の投与を含み得る。注射用製剤は、添加された防腐剤とともに、単位剤形で（例えば、アンプル又は複数投薬容器に入れて）与え得る。組成物は、油性又は水性ビヒクル中の懸濁液、溶液又はエマルジョンなどの形態を採り得、懸濁剤、安定化剤及び／又は分散剤などの処方剤を含有し得る。あるいは、活性成分は、使用前に適切なビヒクル（例えば、発熱物質を含まない無菌水）で構成するための粉末形態であり得る。

【０３０２】

本発明の方法は、さらに、デポ調製物として製剤化された組成物の投与を含み得る。このよな長期作用製剤は、（例えば、皮下又は筋肉内への）植え込みによって、又は筋肉内注射によって投与され得る。従って、例えば、組成物は、適切なポリマー材料若しくは疎水性材料（例えば、許容される油中のエマルジョンとして）又はイオン交換樹脂とともに、又は難溶性誘導体として（例えば、難溶性塩として）調合され得る。

【０３０３】

本発明の方法は、中性又は塩形態として製剤化された組成物の投与を包含する。医薬として許容される塩には、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などに由来するものなどの陰イオンとともに形成された塩、及び水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、２－エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどに由来するものなど、陽イオンとともに形成された塩が含まれる。

【０３０４】

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

【０３０５】

特に、本発明は、本発明の予防剤若しくは治療剤の１つ若しくはそれ以上又は医薬組成物が、薬剤の量を示した注射器又はにおい袋など、密閉された容器中に梱包されることも提供する。一実施形態において、本発明の予防剤若しくは治療剤の１つ若しくはそれ以上又は医薬組成物は、密閉された容器中の凍結乾燥された乾燥無菌粉末又は無水濃縮物として供給され、対象に投与するための適切な濃度になるように（例えば、水又は生理的食塩水で）再構成することができる。一実施形態において、本発明の予防剤若しくは治療剤の１つ若しくはそれ以上又は医薬組成物は、少なくとも５ｍｇ、少なくとも１０ｍｇ、少なくとも１５ｍｇ、少なくとも２５ｍｇ、少なくとも３５ｍｇ、少なくとも４５ｍｇ、少な

くとも５０ｍｇ、少なくとも７５ｍｇ又は少なくとも１００ｍｇの単位投薬量で、密封された容器中の凍結乾燥された乾燥無菌粉末として供給される。本発明の凍結乾燥された予防若しくは治療剤又は医薬組成物は、その元の容器中で、２℃と８℃の間で保存されるべきであり、本発明の予防剤若しくは治療剤又は医薬組成物は、再構成された後、１週以内、例えば、５日以内、７２時間以内、４８時間以内、２４時間以内、１２時間以内、６時間以内、５時間以内、３時間以内又は１時間以内に投与されるべきである。別の実施形態において、本発明の予防剤若しくは治療剤の１つ若しくはそれ以上又は本発明の医薬組成物は、薬剤の量及び濃度を示す密閉された容器中に、液体形態で供給される。一実施形態において、投与された組成物の液体形態は、少なくとも０．２５ｍｇ／ｍｌ、少なくとも０．５ｍｇ／ｍｌ、少なくとも１ｍｇ／ｍｌ、少なくとも２．５ｍｇ／ｍｌ、少なくとも５ｍｇ／ｍｌ、少なくとも８ｍｇ／ｍｌ、少なくとも１０ｍｇ／ｍｌ、少なくとも１５ｍｇ／ｋｇ、少なくとも２５ｍｇ／ｍｌ、少なくとも５０ｍｇ／ｍｌ、少なくとも７５ｍｇ／ｍｌ又は少なくとも１００ｍｇ／ｍｌで、密封された容器中に供給される。液体形態は、その元の容器中で、２℃と８℃の間で保存されるべきである。

【０３０６】

本発明の結合タンパク質は、非経口投与に適した医薬組成物中に取り込ませることが可能である。一実施形態において、抗体又は抗体部分は、０．１から２５０ｍｇ／ｍＬの結合タンパク質を含有する注射可能溶液として調製される。注射可能溶液は、フリント容器又は琥珀色の容器、注射器又は予め充填されたシリンジ中の液体又は凍結乾燥された剤形から構成され得る。緩衝液は、ｐＨ５．０から７．０（最適にはｐＨ６．０）のＬ－ヒスチジン（１から５０ｍＭ）、最適には５から１０ｍＭであり得る。他の適切な緩衝液には、コハク酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、リン酸ナトリウム又はリン酸カリウムが含まれるが、これらに限定されない。０から３００ｍＭの濃度に（最適には、液体剤形に対して１５０ｍＭ）の溶液の毒性を修飾するために、塩化ナトリウムを使用することが可能である。凍結乾燥された剤形に対して、凍結保護剤、主に、０から１０％のスクロース（最適には、０．５から１．０％）を含めることが可能である。他の適切な凍結保護剤には、トレハロース及びラクトースが含まれる。凍結乾燥された剤形に対して、充填剤、主に、１から１０％のマニトール（最適には、２から４％）を含めることが可能である。液体及び凍結乾燥された両剤形において、安定化剤、主に１から５０ｍＭのＬ－メチオニン（最適には、５から１０ｍＭ）を使用することができる。他の適切な充填剤には、グリシン、アルギニンが含まれ、０から０．０５％のポリソルベート－８０（最適には、０．００５から０．０１％）として含めることが可能である。さらなる界面活性剤には、ポリソルベート２０及びＢＲＩＪ界面活性剤が含まれるが、これらに限定されない。非経口投与用の注射可能な溶液として調製された本発明の結合タンパク質を含む医薬組成物は、治療用タンパク質（例えば、抗体）の吸収又は分散を増加させるために使用されるものなど、アジュバントとして有用な因子をさらに含むことができる。特に有用なアジュバントは、Ｈｙｌｅｎｅｘ（Ｒ）（組み換えヒトヒアルロニダーゼ）などのヒアルロニダーゼである。注射可能な溶液中へのヒアルロニダーゼの添加は、非経口投与、特に皮下投与後に、ヒト生物学的利用可能性を改善する。注射可能な溶液中へのヒアルロニダーゼの添加は、痛み及び不快感がより小さく、及び注射部位反応の発生を最小限に抑えながら、より大きな注射部位容量（すなわち、１ｍＬより大きい）も可能にする（ＷＯ２００４０７８１４０及びＵＳ２００６１０４９６８（参照により、本明細書に組み込まれる。）を参照）。

【０３０７】

本発明の組成物は、様々な形態であり得る。これらには、例えば、液体溶液（例えば、注射可能な溶液及び注入可能な溶液）など、分散液又は懸濁液、錠剤、丸薬、粉末、リポソーム及び坐薬）などの、液体、半固体及び固体剤形が含まれる。選択された形態は、予定される投与の様式及び治療用途に依存する。典型的な組成物は、他の抗体を用いたヒトの受動免疫に対して使用される組成物と同様の組成物など、注射可能溶液又は注入可能溶液の形態である。選択される投与の様式は、非経口（例えば、静脈内、皮下、腹腔内、筋肉内）である。一実施形態において、抗体は、静脈内注入又は注射によって投与される。

別の実施形態において、抗体は、筋肉内注入又は皮下注射によって投与される。

【０３０８】

治療組成物は、典型的には、製造及び保存の条件下で、無菌及び安定でなければならない。組成物は、溶液、ミクロエマルジョン、分散液、リポソーム又は高薬物濃度に適したその他の秩序化された構造として製剤化することができる。無菌注射可能溶液は、本明細書に列記されている成分の１つ又は組み合わせを加えた適切な溶媒中に、必要な量で活性な化合物（すなわち、抗体、抗体部分）を取り込ませ、その後、必要に応じて、ろ過された滅菌によって調製することが可能である。一般に、分散液は、塩基性分散溶媒及び本明細書に列記されたものから得られる必要なその他の成分を含有する無菌ビヒクル中に活性化合物を取り込ませることによって調製される。無菌注射可能溶液の調製のための凍結乾燥された無菌粉末の場合には、調製の方法は、予め滅菌ろ過されたその溶液から、あらゆる追加の所望される成分を加えた活性成分の粉末を与える真空乾燥及び粉末乾燥である。溶液の適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングを使用することによって、分散液の場合には、必要とされる粒径を維持することによって、及び界面活性剤を使用することによって維持することができる。注射可能組成物の延長された吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸塩及びゼラチンを組成物中に含めることによって実現することができる。

【０３０９】

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

【０３１０】

ある種の実施形態において、本発明の結合タンパク質は、例えば、不活性希釈剤又は同化可能な食用担体とともに経口投与され得る。また、化合物（及び、所望であれば、その他の成分）は、硬い若しくは軟い殻のゼラチンカプセル中に封入され、錠剤へと圧縮され、又は対象の食事中に直接取り込ませ得る。経口治療投与の場合、化合物は、賦形剤とともに取り込まれ、摂取可能な錠剤、口腔錠、トローチ、カプセル、エリキシル、懸濁液、シロップ、ウェハースなどの形態で使用され得る。非経口投与以外によって本発明の化合物を投与するために、その不活化を妨げるための物質で化合物を被覆し、又はその不活化を妨げるための物質とともに化合物を同時投与することが必要であり得る。

【０３１１】

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

【０３１２】

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

【０３１３】

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

【０３１４】

本発明に従って、本分野で利用可能な遺伝子治療のためのあらゆる方法を使用することが可能である。遺伝子治療の方法の一般的な概説については、Ｇｏｌｄｓｐｉｅｌ ｅｔ ａｌ．，１９９３，Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｐｈａｒｍａｃｙ １２：４８８－５０５；Ｗｕ ａｎｄ Ｗｕ，１９９１，Ｂｉｏｔｈｅｒａｐｙ ３：８７－９５；Ｔｏｌｓｔｏｓｈｅｖ，１９９３，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｔｏｘｉｃｏｌ．３２：５７３－５９６；Ｍｕｌｌｉｇａｎ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６０：９２６－９３２（１９９３）；及びＭｏｒｇａｎ ａｎｄ Ａｎｄｅｒｓｏｎ，１９９３，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．６２：１９１－２１７；Ｍａｙ，１９９３，ＴＩＢＴＥＣＨ １１（５）：１５５－２１５を参照されたい。使用可能な組み換えＤＮＡ技術の分野で一般的に知られた方法は、Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．（ｅｄｓ．），Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆Ｓｏｎｓ，ＮＹ（１９９３）；及びＫｒｉｅｇｌｅｒ，Ｇｅｎｅ Ｔｒａｎｓｆｅｒ ａｎｄ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｓｔｏｃｋｔｏｎ Ｐｒｅｓｓ，ＮＹ（１９９０）に記載されている。遺伝子治療の様々な方法の詳細な記述は、参照により本明細書に組み込まれるＵＳ２００５０００４２６６４Ａ１に開示されている。

【０３１５】

本発明の結合タンパク質は、結合タンパク質によって認識される標的が有害である様々な疾病を治療する上で有用である。このような疾病には、関節リウマチ、骨関節炎、若年性慢性関節炎、化膿性関節炎、ライム関節炎、乾癬性関節炎、反応性関節炎、脊椎関節症、全身性紅斑性狼瘡、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、インシュリン依存性糖尿病、甲状腺炎、喘息、アレルギー性疾患、乾癬、皮膚炎、強皮症、移植片対宿主病、臓器移植拒絶、臓器移植に関連する急性又は慢性免疫疾患、サルコイドーシス、アテローム性動脈硬化症、播種性血管内凝固、川崎病、バセドウ病、ネフローゼ症候群、慢性疲労症候群、ウェゲナー肉芽腫症、ヘノッホ・シェーライン紫斑症、腎臓の顕微鏡的血管炎、慢性活動性肝炎、ブドウ膜炎、敗血症性ショック、毒素性ショック症候群、敗血症症候群、悪液質、感染性疾患、寄生性疾患、後天性免疫不全症候群、急性横断性脊髄炎、ハンチントン舞踏病、パーキンソン病、アルツハイマー病、発作、原発性胆汁性肝硬変、溶血性貧血、悪性腫瘍、心不全、心筋梗塞、アジソン病、孤発性の、多内分泌腺機能低下症候群Ｉ型及び多内分泌腺機能低下症候群ＩＩ型、シュミット症候群、成人（急性）呼吸促迫症候群、脱毛症、円形脱毛症、血清反応陰性関節症、関節症、ライター病、乾癬性関節症、潰瘍性大腸性関節症、腸疾患性滑膜炎、クラミジア、エルシニア及びサルモネラ関連関節症、脊椎関節症、アテローム性疾患／動脈硬化症、アトピー性アレルギー、自己免疫性水疱性疾患、尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、類天疱瘡、線状ＩｇＡ病、自己免疫性溶血性貧血、クームス陽性溶血性貧血、後天性悪性貧血、若年性悪性貧血、筋痛性脳炎／ロイヤルフリー病、慢性粘膜皮膚カンジダ症、巨細胞性動脈炎、原発性硬化性肝炎、突発性自己免疫

性肝炎、後天性免疫不全症候群、後天性免疫不全症関連疾患、Ｂ型肝炎、Ｃ型肝炎、分類不能型免疫不全症（分類不能型低γグロブリン血症）、拡張型心筋症、女性不妊症、卵巣機能不全、早期卵巣機能不全、繊維性肺疾患、突発性繊維化性肺胞炎、炎症後間質性肺疾患、間質性肺炎、結合組織疾患関連間質性肺疾患、混合性結合組織疾患関連肺疾患、全身性硬化症関連間質性肺疾患、関節リウマチ関連間質性肺疾患、全身性紅斑性狼瘡関連肺疾患、皮膚筋炎／多発性筋炎関連肺疾患、シェーグレン病関連肺疾患、強直性脊椎炎関連肺疾患、血管炎性びまん性肺疾患（ｖａｓｃｕｌｉｔｉｃ ｄｉｆｆｕｓｅ ｌｕｎｇ ｄｉｓｅａｓｅ）、ヘモシデローシス関連肺疾患、薬物によって誘導された間質性肺疾患、繊維症、放射性繊維症、閉塞性細気管支炎、慢性好酸球性肺炎、リンパ球浸潤性肺疾患、感染後間質性肺疾患、通風関節炎、自己免疫性肝炎、１型自己免疫性肝炎（古典的自己免疫性又はルポイド肝炎）、２型自己免疫性肝炎（抗ＬＫＭ抗体肝炎）、自己免疫媒介性低血糖症、黒色表皮腫を伴うＢ型インシュリン抵抗性、副甲状腺機能低下症、臓器移植に関連する急性免疫疾患、臓器移植に関連する慢性免疫疾患、変形性関節症、原発性硬化性胆管炎、１型乾癬、２型乾癬、特発性白血球減少症、自己免疫性好中球減少症、腎臓病ＮＯＳ、糸球体腎炎、腎臓の顕微鏡的血管炎、ライム病、円板状紅斑性狼瘡、男性不妊症特発性又はＮＯＳ、精子自己免疫、多発性硬化症（全てのサブタイプ）、交感性眼炎、結合組織疾患に続発する肺高血圧症、グッドパスチャー症候群、結節性多発動脈炎の肺症状、急性リウマチ熱、リウマチ性脊椎炎、スチル病、全身性硬化症、シェーグレン症候群、高安病／動脈炎、自己免疫性血小板減少症、特発性血小板減少症、自己免疫性甲状腺疾患、甲状腺機能亢進症、甲状腺腫自己免疫性甲状腺機能低下症（橋本病）、萎縮性自己免疫性甲状腺機能低下症、原発性粘液水腫（ｐｒｉｍａｒｙ ｍｙｘｏｅｄｅｍａ）、水晶体起因性ブドウ膜炎、原発性血管炎、白斑急性肝疾患、慢性肝疾患、アルコール性肝硬変、アルコール誘発性肝障害、胆汁うっ滞（ｃｈｏｌｅｏｓａｔａｔｉｓ）、特異体質性肝疾患、薬物誘発性肝炎、非アルコール性脂肪性肝炎、アレルギー及び喘息、Ｂ群連鎖球菌（ＧＢＳ）感染、精神障害（例えば、うつ病及び統合失調症）、Ｔｈ２型及びＴｈ１型によって媒介される疾病、急性及び慢性疼痛（疼痛の様々な形態）、並びに、肺癌、乳癌、胃癌、膀胱癌、大腸癌、膵臓癌、卵巣癌、前立腺癌及び直腸癌及び造血性悪性病変（白血病及びリンパ腫）などの癌、無βリポタンパク質血症、先端チアノーゼ、急性及び慢性寄生性又は感染性プロセス、急性白血病、急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、急性又は慢性細菌感染、急性膵炎、急性腎不全、腺癌、心房（ａｅｒｉａｌ）異所性拍動、ＡＩＤＳ認知症複合、アルコール誘発性肝炎、アレルギー性結膜炎、アレルギー性接触性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、同種移植拒絶、α－１－アンチトリプシン欠乏症、筋萎縮性側索硬化症、貧血、狭心症、前角細胞変性、抗ｃｄ３治療、抗リン脂質症候群、抗受容体過敏症反応（ａｎｔｉ－ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｈｙｐｅｒｓｅｎｓｉｔｉｖｉｔｙ ｒｅａｃｔｉｏｎｓ，）、大動脈及び末梢動脈瘤、大動脈解離、動脈性高血圧、動脈硬化症、動静脈瘻、運動失調、心房細動（持続的又は発作性）、心房粗動、房室ブロック、Ｂ細胞リンパ腫、骨移植拒絶、骨髄移植（ＢＭＴ）拒絶、脚ブロック、バーキットリンパ腫、火傷、心不整脈、心機能不全症候群（ｃａｒｄｉａｃ ｓｔｕｎ ｓｙｎｄｒｏｍｅ）、心臓腫瘍、心筋症、心肺バイパス炎症反応、軟骨移植拒絶、小脳皮質変性、小脳疾患、無秩序な又は多巣性心房頻脈、化学療法関連疾患、慢性（ｃｈｒｏｍｉｃ）骨髄性白血病（ＣＭＬ）、慢性アルコール症、慢性炎症性病変、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、慢性サリチル酸中毒、結腸直腸癌、うっ血性心不全、結膜炎、接触性皮膚炎、肺性心、冠動脈疾患、クロイツフェルトーヤコブ病、培養陰性敗血症、嚢胞性繊維症、サイトカイン療法関連疾患、ボクサー脳、脱髄性疾患、デング出血熱、皮膚炎、皮膚科学的症状、糖尿病、真性糖尿病、糖尿病性動脈硬化疾患、瀰漫性レビー小体病、拡張型うっ血性心筋症、大脳基底核の疾患、中年のダウン症候群、中枢神経系ドーパミン受容体を遮断する薬物によって誘発された薬物誘発性運動障害、薬物感受性、湿疹、脳脊髄炎、心内膜炎、内分泌疾患、喉頭蓋炎、エプスタインーバーウイルス感染、紅痛症、錐体外路及び小脳疾患、家族性血球貪食性リンパ組織球症（ｆａｍｉｌｉａｌ ｈｅｍａｔｏｐｈａｇｏｃｙｔｉｃ ｌｙｍｐｈｏｈｉｓｔｉｏｃｙｔｏｓｉｓ）、致

死的胸腺移植拒絶、フリードライヒ失調症、機能的末梢動脈疾患、真菌性敗血症、ガス壊疽、胃潰瘍、糸球体腎炎、何れかの臓器又は組織の移植片拒絶、グラム陰性敗血症、グラム陽性敗血症、細胞内生物に起因する肉芽腫、有毛細胞白血病、ハラーホルデン・スパッツ病、橋本甲状腺炎、枯草熱、心臓移植拒絶、血色素症、血液透析、溶血性尿毒症症候群／血栓溶解血小板減少紫斑病、出血、肝炎（Ａ型）、ヒス束不整脈、ＨＩＶ感染／ＨＩＶ神経障害、ホジキン病、運動過剰性運動障害、過敏症反応、過敏性肺炎、高血圧、運動低下性運動障害、視床下部－下垂体－副腎皮質系評価、特発性アジソン病、特発性肺繊維症、抗体媒介性細胞傷害、無力症、乳児脊髄性筋萎縮症、大動脈の炎症、Ａ型インフルエンザ、電離放射線曝露、虹彩毛様体炎／ブドウ膜炎／視神経炎、虚血再灌流障害、虚血性発作、若年性関節リウマチ、若年性脊髄性筋萎縮症、カポジ肉腫、腎移植拒絶、レジオネラ、リーシュマニア症、ハンセン病、皮質脊髄系の病変、脂肪血症（ｌｉｐｅｄｅｍａ）、肝臓移植拒絶、リンパ浮腫（ｌｙｍｐｈｅｄｅｒｍａ）、マラリア、悪性リンパ腫、悪性組織球増殖症、悪性黒色腫、髄膜炎、髄膜炎菌血症（ｍｅｎｉｎｇｏｃｏｃｃｅｍｉａ）、代謝性／特発性疾患、偏頭痛、ミトコンドリア多系疾患（ｍｉｔｏｃｈｏｎｄｒｉａｌ ｍｕｌｔｉ－ｓｙｓｔｅｍ ｄｉｓｏｒｄｅｒ）、混合性結合組織病、モノクローナル高ガンマグロブリン血症、多発性骨髄腫、多系統変性（メンセル・デジェリーヌ－トーマス シャイ－ドレーガー及びマシャド－ジョセフ）、重症筋無力症、マイコバクテリウム・アビウム・イントラセルラーレ、マイコバクテリウム・チュバキュロシス、骨髄異形成症候群、心筋梗塞、心筋虚血疾患、上咽頭癌、新生児慢性肺疾患、腎炎、ネフローゼ、神経変性疾患、神経原性Ｉ筋萎縮、好中球減少性発熱、非ホジキンリンパ腫、腹部大動脈及びその分枝の閉塞、閉塞性動脈疾患、ｏｋｔ３療法、精巣炎／精巣上体炎、精巣炎／精管復元術処置、臓器肥大、骨粗鬆症、膵臓移植拒絶、膵癌、腫瘍随伴性症候群／悪性腫瘍の高カルシウム血症、副甲状腺移植拒絶、骨盤内炎症性疾患、通年性鼻炎、心膜疾患、末梢性アテローム性動脈硬化疾患、末梢血管疾患、腹膜炎、悪性貧血、ニューモシスチス・カリニ肺炎、肺炎、ＰＯＥＭＳ症候群（多発神経炎、臓器肥大、内分泌疾患、単クローン性γグロブリン血症及び皮膚変化症候群（ｓｋｉｎ ｃｈａｎｇｅｓ ｓｙｎｄｒｏｍｅ））、灌流後症候群（ｐｏｓｔ ｐｅｒｆｕｓｉｏｎ ｓｙｎｄｒｏｍｅ）、ポンプ後症候群（ｐｏｓｔ ｐｕｍｐ ｓｙｎｄｒｏｍｅ）、心筋梗塞後開心術症候群、子癇前症、進行性核上性麻痺、原発性肺高血圧、放射線療法、レイノー現象及び病、レイノー病、レフサム病、規則的なＱＲＳ幅の狭い頻脈症（ｒｅｇｕｌａｒ ｎａｒｒｏｗ ＱＲＳ ｔａｃｈｙｃａｒｄｉａ）、腎血管性高血圧、再灌流障害、拘束型心筋症、肉腫、強皮症、老年性舞踏病、レビー小体型の老年性認知症、血清反応陰性関節症、ショック、鎌形赤血球貧血症、皮膚同種異系移植拒絶、皮膚変化症候群、小腸移植拒絶、固形腫瘍、固有不整脈（ｓｐｅｃｉｆｉｃ ａｒｒｙｔｈｍｉａｓ）、脊髄性運動失調、脊髄小脳変性、連鎖球菌性筋炎、小脳の構造的病変、亜急性硬化性全脳炎、失神、心血管系の梅毒、全身性アナフィラキシー、全身性炎症反応症候群、全身性発症若年性関節リウマチ、Ｔ細胞又はＦＡＢＡＬＬ、毛細血管拡張症、閉塞性血栓血管炎、血小板減少症、毒性、移植、外傷／出血、ＩＩＩ型過敏症反応、ＩＶ型過敏症、不安定狭心症、尿毒症、尿路性敗血症、じんましん、心臓弁膜症、静脈瘤、血管炎、静脈疾患、静脈血栓症、心室細動、ウイルス及び真菌感染、ウイルス性脳炎（ｖｉｔａｌ ｅｎｃｅｐｈａｌｉｔｉｓ）／無菌性髄膜炎、ウイルス関連血球貪食症候群、ウェルニッケ－コルサコフ症候群、ウィルソン病、何れかの臓器又は組織の異種移植拒絶が含まれるが、これらに限定されない（Ｐｅｒｉｔｔ ｅｔ ａｌ．ＰＣＴ公開ＷＯ２００２０９７０４８Ａ２，Ｌｅｏｎａｒｄ ｅｔ ａｌ．，ＰＣＴ公開ＷＯ９５２４９１８Ａ１及びＳａｌｆｅｌｄ ｅｔ ａｌ．，ＰＣＴ公開ＷＯ００／５６７７２Ａ１参照）。

【０３１６】

本発明のＤＶＤ－Ｉｇは、以下の疾病の１つ又はそれ以上も治療し得る。急性冠動脈症候群、急性突発性多発性神経炎、急性炎症性脱髄性多発性神経障害、急性虚血、成体スチル病、円形脱毛症、アナフィラキシー、抗リン脂質抗体症候群、再生不良貧血、動脈硬化症、アトピー性湿疹、アトピー性皮膚炎、自己免疫性皮膚炎、連鎖球菌感染を伴う自己免

疫性疾患、自己免疫性難聴、自己免疫性リンパ増殖性症候群（ＡＬＰＳ）、自己免疫性心筋炎、自己免疫性血小板減少症（ＡＩＴＰ）、眼瞼炎、気管支拡張症、水疱性類天疱瘡、心血管疾患、劇症型抗リン脂質抗体症候群、セリアック病、頚部脊椎症、慢性虚血、瘢痕性類天疱瘡、多発性硬化症に対するリスクを有する最初のエピソードからなる症候群（ＣＩＳ；ｃｌｉｎｉｃａｌｌｙ ｉｓｏｌａｔｅｄ ｓｙｎｄｒｏｍｅ）、結膜炎、小児発症精神疾患、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、涙嚢炎、皮膚筋炎、糖尿病性網膜症、真性糖尿病、椎間板ヘルニア、椎間板脱出、薬物によって誘導される免疫溶血性貧血、心内膜炎、子宮内膜炎、眼内炎、上強膜炎、多型性紅斑、重症型多型性紅斑、妊娠性類天疱瘡、ギランバレー症候群（ＧＢＳ）、枯草熱、ヒューズ症候群、突発性パーキンソン病、突発性間質性肺炎、ＩｇＥ媒介性アレルギー、免疫溶血性貧血、封入体筋炎、感染性眼性炎症疾患、炎症性脱髄性疾患、炎症性心臓病、炎症性腎臓病、ＩＰＦ／ＵＩＰ、虹彩炎、角膜炎、乾性角結膜炎、クスマウル病又はクスマウル・マイヤー病、ランドリー麻痺、ランゲルハンス細胞組織球増殖症、網状皮斑、黄斑変性、悪性腫瘍、顕微鏡的多発性血管炎、ベフテレフ病、運動神経疾患、粘膜類天疱瘡、多発性臓器不全、重症筋無力症、骨髄異形成症候群、心筋炎、神経根疾患、神経障害、非Ａ非Ｂ型肝炎、視神経炎、骨溶解、卵巣癌、少関節性ＪＲＡ、末梢動脈閉塞疾患（ＰＡＯＤ）、末梢血管疾患（ＰＶＤ）、末梢動脈疾患（ＰＡＤ）、静脈炎、結節性多発性動脈炎（又は結節性動脈周囲炎）、多発性軟骨炎、リウマチ性多発性筋痛、白毛症、多関節性ＪＲＡ、多内分泌欠乏症候群、多発性筋炎、リウマチ性多発性筋痛（ＰＭＲ）、ポンプ後症候群（ｐｏｓｔ－ｐｕｍｐ）症候群、原発性パーキンソン病、前立腺及び直腸癌及び造血系の悪性腫瘍（白血病及びリンパ腫）、前立腺炎、純赤血球形成不全、原発性副腎不全、再発性視神経脊髄炎、再狭窄、リウマチ性心疾患、ＳＡＰＨＯ（滑膜炎、ざ瘡、膿疱、骨肥大症及び骨炎）、強皮症、続発性アミロイドーシス、ショック肺、強膜炎、坐骨神経痛、続発性副腎不全、シリコーン関連結合組織疾患、スネドン－ウィルキンソン皮膚病、強直性脊椎炎、スティーブンス・ジョンソン症候群（ＳＪＳ）、全身性炎症性応答症候群、側頭動脈炎、トキソプラズマ網膜炎、毒性表皮剥離症、横断性脊髄炎、ＴＲＡＰＳ（腫瘍壊死因子受容体１型アレルギー性反応）、ＩＩ型糖尿病、じんましん、通常型間質性肺炎（ＵＩＰ）、血管炎、春季カタル、ウイルス性網膜炎、フォークト・コヤナギ・ハラダ症候群（ＶＫＨ症候群）、滲出型黄斑変性及び創傷治癒。

【０３１７】

本発明の結合タンパク質は、自己免疫疾患、特に、関節リウマチ、脊椎炎、アレルギー、自己免疫性糖尿病、自己免疫性ブドウ膜炎などの、炎症を伴う自己免疫疾患を罹患しているヒトを治療するために使用することができる。一実施形態において、本発明の結合タンパク質又はその抗原結合部分は、関節リウマチ、クローン病、多発性硬化症、インシュリン依存性糖尿病及び乾癬を治療するために使用される。

【０３１８】

一実施形態において、本発明の組成物及び方法を用いて治療又は診断することができる疾病には、乳癌、大腸癌、直腸癌、肺癌、口腔咽頭癌、下咽頭癌、食道癌、胃癌、膵臓癌、肝臓癌、胆嚢及び胆管癌、小腸癌、尿路癌（腎臓、膀胱及び尿路上皮を含む。）、雌性生殖路（子宮頚部、子宮及び卵巣並びに絨毛癌及び妊娠性絨毛性疾患を含む。）、雄性生殖路（前立腺、精嚢、精巣及び胚細胞腫瘍を含む。）、内分泌腺癌（甲状腺、副腎及び下垂体を含む。）及び皮膚癌並びに血管腫、悪性黒色腫、肉腫（骨及び軟組織から生じる肉腫並びにカポジ肉腫を含む。）、脳、神経、眼の腫瘍及び髄膜（星状膠細胞腫、神経膠腫、神経膠芽腫、網膜芽細胞腫、神経腫、神経芽細胞腫、シュワン細胞腫及び髄膜腫を含む。）、白血病及びリンパ腫（ホジキン及び非ホジキンリンパ腫の両方）などの造血系悪性腫瘍から生じる固形腫瘍などの、原発性及び転移性癌が含まれるが、これらに限定されない。

【０３１９】

一実施形態において、本発明の抗体又はその抗原結合部分は、単独で又は放射線療法及び／若しくは他の化学療法剤と組み合わせて使用される場合、癌を治療するために、又は

本明細書に記載されている腫瘍からの転移の予防において使用される。

【０３２０】

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

【０３２１】

本発明の結合タンパク質は、様々な疾病の治療において有用な１つ又はそれ以上の追加の治療剤とともに投与することも可能である。

【０３２２】

本発明の結合タンパク質は、このような疾病を治療するために、単独で、又は組み合わせて使用することが可能である。結合タンパク質は、単独で、又は追加の因子、例えば治療剤と組み合わせて使用することが可能であり、前記追加の因子は、その意図される目的に対して、当業者によって選択されることを理解すべきである。例えば、追加の因子は、本発明の抗体によって治療されている疾病又は症状を治療するのに有用であると本分野で認識されている治療剤であり得る。追加の因子は、治療組成物に有益な属性を付与する因子、例えば、組成物の粘性に影響を与える因子とすることもできる。

【０３２３】

本発明に含まれるべき組み合わせは、それらの意図される目的に対して有用な組み合わせであることをさらに理解すべきである。以下に記されている因子は、例示を目的とするものであって、限定を意図するものではない。本発明の一部である組み合わせは、本発明の抗体及び以下のリストから選択される少なくとも１つの追加の因子であり得る。当該組み合わせにおいて、形成された組成物がその意図される機能を発揮することが可能であれば、組み合わせは、２以上の追加の因子、例えば、２又は３個の追加の因子を含むこともできる。

【０３２４】

自己免疫疾患及び炎症性疾患を治療するための組み合わせは、ＮＳＡＩＤとも称される非ステロイド性抗炎症薬（イブプロフェンのような薬物が含まれる。）である。他の組み合わせは、プレドニゾロンなどのコルチコステロイドである。ステロイド使用の周知の副作用は、本発明のＤＶＤＩｇと組み合わせて患者を治療するときに必要とされるステロイド用量を徐々に減らすことによって、低減することが可能であり、又は除去することさえ可能である。本発明の抗体又は抗体部分とともに組み合わせることが可能な関節リウマチに対する治療剤の非限定的な例には、以下のもの：サイトカイン抑制性抗炎症薬（ＣＳＡＩＤ）；その他のヒトサイトカイン又は成長因子（例えば、ＴＮＦ、ＬＴ、ＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－８、ＩＬ－１５、ＩＬ－１６、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、ＩＬ－２３、インターフェロン、ＥＭＡＰ－ＩＩ、ＧＭ－ＣＳＦ、ＦＧＦ及びＰＤＧＦ）に対する抗体又はこれらのアンタゴニストが含まれる。本発明の結合タンパク質又はその抗原結合部分は、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ２５、ＣＤ２８、ＣＤ３０、ＣＤ４０、ＣＤ４５、ＣＤ６９、ＣＤ８０（Ｂ７．１）、ＣＤ８６（Ｂ７．２）、ＣＤ９０、ＣＴＬＡ又はＣＤ１５４を含むこれらのリガンド（ｇｐ３９又はＣＤ４０Ｌ）などの細胞表面分子に対する抗体と組み合わせることが可能である。

【０３２５】

治療剤の好ましい組み合わせは、異なる点で、自己免疫及びこれに続く炎症カスケードを干渉し得る。例には、キメラ、ヒト化又はヒトＴＮＦ抗体、Ａｄａｌｉｍｕｍａｂ、（ＰＣＴ公開ＷＯ９７／２９１３１）、ＣＡ２（Ｒｅｍｉｃａｄｅ™）、ＣＤＰ５７１、

及び可溶性ｐ５５又はｐ７５ＴＮＦ受容体、これらの誘導体、（ｐ７５ＴＮＦＲＩｇＧ（Ｅｎｂｒｅｌ™）又はｐ５５ＴＮＦＲ１ｇＧ（Ｌｅｎｅｒｃｅｐｔ）及びＴＮＦα変換酵素（ＴＡＣＥ）阻害剤などのようなＴＮＦアンタゴニストが含まれる。同様にＩＬ－１阻害剤（インターロイキン－１変換酵素阻害剤、ＩＬ－１ＲＡなど）は、同じ理由のために有効であり得る。他の組み合わせには、インターロイキン１１が含まれる。さらに別組み合わせには、ＩＬ－１２機能と平行して、ＩＬ－１２機能に依存して、又はＩＬ－１２と協調して作用し得る自己免疫応答の中心的プレーヤーが含まれる。特に、ＩＬ－１８抗体又は可溶性ＩＬ－１８受容体又はＩＬ－１８結合タンパク質などのＩＬ－１８アンタゴニストである。ＩＬ－１２及びＩＬ－１８は、重複しているが、異なる機能を有しており、両者に対するアンタゴニストの組み合わせは、最も有効であり得ることが示されている。さらに別の組み合わせは、非枯渇性抗ＣＤ４阻害剤である。さらに別の組み合わせには、抗体、可溶性受容体又は拮抗性リガンドを含む、共同刺激経路ＣＤ８０（Ｂ７．１）又はＣＤ８６（Ｂ７．２）のアンタゴニストが含まれる。

【０３２６】

本発明の結合タンパク質は、メトトレキサート、６－ＭＰ、アザチオプリンスルファサラジン、メサラジン、オルサラジン、クロロキニン／ヒドロキシクロロキン、ペニシラミン、金チオリンゴ酸塩（筋肉内及び経口）、アザチオプリン、コルヒチン（ｃｏｃｈｉｃｉｎｅ）、コルチコステロイド（経口、吸入及び局所注射）、β－２アドレナリン作動性受容体アゴニスト（サルブタモール、テルブタリン、サルメテラール）、キサンチン（テオフィリン、アミノフィリン）、クロモグリカート、ネドクロミル、ケトチフェン、イプラトロピウム及びオキシトロピウム、シクロスポリン、ＦＫ５０６、ラパマイシン、ミコフェノラート・モフェチル、レフルノミド、ＮＳＡＩＤ、例えば、イブプロフェン、プレドニゾロンなどのコルチコステロイド、ホスホジエステラーゼ阻害剤、アデノシンアゴニスト、抗血栓剤、補体阻害剤、アドレナリン作用薬、ＴＮＦ－α又はＩＬ－１などの炎症促進性サイトカインによるシグナル伝達を妨害する因子（例えば、ＩＲＡＫ、ＮＩＫ、ＩＫＫ、ｐ３８又はＭＡＰキナーゼ阻害剤）、ＩＬ－１β変換酵素阻害剤、ＴＮＦα変換酵素（ＴＡＣＥ）阻害剤、キナーゼ阻害剤などのＴ細胞シグナル伝達阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、スルファサラジン、アザチオプリン、６－メルカプトプリン、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、可溶性サイトカイン受容体及びそれらの誘導体（例えば、可溶性ｐ５５又はｐ７５ＴＮＦ受容体及び誘導体ｐ７５ＴＮＦＲＩｇＧ（Ｅｎｂｒｅｌ™及びｐ５５ＴＮＦＲＩｇＧ（Ｌｅｎｅｒｃｅｐｔ））、ｓＩＬ－１ＲＩ、ｓＩＬ－１ＲＩＩ、ｓＩＬ－６Ｒ）、炎症抑制性サイトカイン（例えば、ＩＬ－４、ＩＬ－１０、ＩＬ－１１、ＩＬ－１３及びＴＧＦβ）、セレコキシブ、葉酸、硫酸ヒドロキシクロロキン、ロフェコキシブ、エタネルセプト、インフリキシマブ、ナプロキセン、バルデコキシブ、スルファサラジン、メチルプレドニゾロン、メロキシカム、酢酸メチルプレドニゾロン、金チオリンゴ酸ナトリウム、アスピリン、トリムシノロン・アセトニド、プロポキシフェンナプシラート／ａｐａｐ、フォラート、ナブメトン、ジクロフェナク、ピロキシカム、エトドラク、ジクロフェナクナトリウム、オキサプロジン、塩酸オキシコドン、ヒドロコドン二酒石酸塩／ａｐａｐ、ジクロフェナクナトリウム／ミソプロストール、フェンタニル、アナキンラ、ヒト組み換え、塩酸トラマドール、サルサラート、スリンダク、シアノコバラミン／ｆａ／ピリドキシン、アセトアミノフェン、アレンドロナートナトリウム、プレドニゾロン、硫酸モルヒネ、塩酸リドカイン、インドメタシン、硫酸グルコサミン／コンドロイチン、塩酸アミトリプチリン、スルファジアジン、塩酸オキシコドン／アセトアミノフェン、塩酸オロパタジン、ミソプロストール、ナプロキセンナトリウム、オメプラゾール、シクロホスファミド、リツキシマブ、ＩＬ－１ＴＲＡＰ、ＭＲＡ、ＣＴＬＡ４－ＩＧ、ＩＬ－１８ＢＰ、抗ＩＬ－１８、抗ＩＬ１５、ＢＩＲＢ－７９６、ＳＣＩＯ－４６９、ＶＸ－７０２，ＡＭＧ－５４８、ＶＸ７４０、ロフルミラスト、ＩＣ－４８５、ＣＤＣ－８０１及びメソプラムなどの因子とも組み合わされ得る。組み合わせには、メトトレキサート又はレフルノミドが含まれ、中度又は重度の関節リウマチの症例では、シクロスポリンが含まれる。

【０３２７】
関節リウマチを治療するために、結合タンパク質と組み合わせて使用することも可能な非限定的な追加の因子には、以下の非ステロイド性抗炎症薬（ＮＳＡＩＤｓ）；サイトカイン抑制性抗炎症薬（ＣＳＡＩＤｓ）；ＣＤＰ－５７１／ＢＡＹ－１０－３３５６（ヒト化された抗ＴＮＦα抗体；Ｃｅｌｌｔｅｃｈ／Ｂａｙｅｒ）；ｃＡ２／インフリキシマブ（キメラ抗ＴＮＦα抗体；Ｃｅｎｔｏｃｏｒ）；７５ｋｄＴＮＦＲ－ＩｇＧ／エタネルセプト（７５ｋＤＴＮＦ受容体－ＩｇＧ融合タンパク質；イムネックス；例えば、Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ ＆ Ｒｈｅｕｍａｔｉｓｍ（１９９４）Ｖｏｌ．３７，Ｓ２９５；Ｊ．Ｉｎｖｅｓｔ．Ｍｅｄ．（１９９６）Ｖｏｌ．４４，２３５Ａを参照；５５ｋｄＴＮＦ－ＩｇＧ（５５ｋＤＴＮＦ受容体－ＩｇＧ融合タンパク質；Ｈｏｆｆｍａｎｎ－ＬａＲｏｃｈｅ）；ＩＤＥＣ－ＣＥ９．１／ＳＢ２１０３９６（抗原刺激された（ｐｒｉｍａｔｉｚｅｄ）非枯渇性抗ＣＤ４抗体；ＩＤＥＣ／ＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ；例えば、Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ ＆ Ｒｈｅｕｍａｔｉｓｍ（１９９５） Ｖｏｌ．３８，Ｓ１８５を参照；ＤＡＢ４８６－ＩＬ－２及び／又はＤＡＢ３８９－ＩＬ－２（ＩＬ－２融合タンパク質；Ｓｅｒａｇｅｎ；例えば、Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ ＆ Ｒｈｅｕｍａｔｉｓｍ（１９９３）Ｖｏｌ．３６，１２２３）参照；抗Ｔａｃ（ヒト化抗ＩＬ－２Ｒα；Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｄｅｓｉｇｎ Ｌａｂｓ／Ｒｏｃｈｅ）；ＩＬ－４（抗炎症性サイトカイン；ＤＮＡＸ／Ｓｃｈｅｒｉｎｇ）；ＩＬ－１０（ＳＣＨ５２０００；組換えＩＬ－１０、抗炎症性サイトカイン；ＤＮＡＸ／Ｓｃｈｅｒｉｎｇ）；ＩＬ－４；ＩＬ－１０及び／又はＩＬ－４アゴニスト（例えば、アゴニスト抗体）；ＩＬ－１ＲＡ（ＩＬ－１受容体アンタゴニスト；Ｓｙｎｅｒｇｅｎ／Ａｍｇｅｎ）；アナキンラ（Ｋｉｎｅｒｅｔ（Ｒ）／Ａｍｇｅｎ）；ＴＮＦ－ｂｐ／ｓ－ＴＮＦ（可溶性ＴＮＦ結合タンパク質；例えば、Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ ＆ Ｒｈｅｕｍａｔｉｓｍ（１９９６） Ｖｏｌ．３９，Ｎｏ．９（補遺），Ｓ２８４参照；Ａｍｅｒ．Ｊ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．－Ｈｅａｒｔ ａｎｄ Ｃｉｒｃｕｌａｔｏｒｙ Ｐｈｙｓｉｏｌｏｇｙ（１９９５） Ｖｏｌ．２６８，ｐｐ．３７－４２）；Ｒ９７３４０１（ホスホジエステラーゼＩＶ型阻害剤；例えば、Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ ＆ Ｒｈｅｕｍａｔｉｓｍ（１９９６）Ｖｏｌ．３９，Ｎｏ．９（補遺），Ｓ２８２参照；ＭＫ－９６６（ＣＯＸ－２阻害剤；例えば、Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ ＆ Ｒｈｅｕｍａｔｉｓｍ（１９９６）Ｖｏｌ．３９，Ｎｏ．９（補遺），Ｓ８１参照）；Ｉｌｏｐｒｏｓｔ（例えば、Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ ＆ Ｒｈｅｕｍａｔｉｓｍ（１９９６）Ｖｏｌ．３９，Ｎｏ．９（補遺），Ｓ８２参照）；メトトレキサート；サリドマイド（例えば、Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ ＆ Ｒｈｅｕｍａｔｉｓｍ（１９９６） Ｖｏｌ．３９，Ｎｏ．９（補遺），Ｓ２８２参照）及びサリドマイド関連薬（例えば、Ｃｅｌｇｅｎ）；レフノミド（抗炎症性及びサイトカイン阻害剤；例えば、Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ ＆ Ｒｈｅｕｍａｔｉｓｍ（１９９６）Ｖｏｌ．３９，Ｎｏ．９（補遺），Ｓ１３１；Ｉｎｆｌａｍｍａｔｉｏｎ Ｒｅｓｅａｒｃｈ（１９９６）Ｖｏｌ．４５，ｐｐ．１０３－１０７参照）；トラネキサム酸（プラスミノーゲン活性化の阻害剤；例えば、Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ ＆ Ｒｈｅｕｍａｔｉｓｍ（１９９６）Ｖｏｌ．３９，Ｎｏ．９（補遺），Ｓ２８４参照）；Ｔ－６１４（サイトカイン阻害剤；例えば、Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ ＆ Ｒｈｅｕｍａｔｉｓｍ（１９９６）Ｖｏｌ．３９，Ｎｏ．９（補遺），Ｓ２８２参照）；プロスタグランジンＥ１（例えば、Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ ＆ Ｒｈｅｕｍａｔｉｓｍ（１９９６）Ｖｏｌ．３９，Ｎｏ．９（補遺），Ｓ２８２参照）；Ｔｅｎｉｄａｐ（非ステロイド性抗炎症薬；例えば、Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ ＆ Ｒｈｅｕｍａｔｉｓｍ（１９９６）Ｖｏｌ．３９，Ｎｏ．９（補遺），Ｓ２８０参照）；ナプロキセン（非ステロイド性抗炎症薬；例えば、Ｎｅｕｒｏ Ｒｅｐｏｒｔ（１９９６）Ｖｏｌ．７，ｐｐ．１２０９－１２１３参照）；メロキシカム（非ステロイド性抗炎症薬）；イブプロフェン（非ステロイド性抗炎症薬）；ピロキシカム（非ステロイド性抗炎症薬）；ジクロフェナク（非ステロイド性抗炎症薬）；インドメタシン（非ステロイド性抗炎症薬）；スルファサラジン（例えば、Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ ＆ Ｒｈｅｕｍａｔｉｓｍ（１９９６）Ｖｏｌ．３９，Ｎｏ．９（補遺），Ｓ２８１参照）；アザチオプリン（例えば、Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ ＆ Ｒｈｅｕｍａｔｉｓｍ（１９９６）Ｖｏｌ．３９，Ｎ

ｏ．９（補遺），Ｓ２８１参照）；ＩＣＥ阻害剤（酵素インターロイキン１β変換酵素の阻害剤）；ｚａｐ－７０及び／又はｌｃｋ阻害剤（チロシンキナーゼｚａｐ－７０又はｌｃｋの阻害剤）；ＶＥＧＦ阻害剤及び／又はＶＥＧＦ－Ｒ阻害剤（血管内皮細胞増殖因子又は血管内皮細胞増殖因子受容体の阻害剤；血管新生の阻害剤）；コルチコステロイド抗炎症薬（例えば、ＳＢ２０３５８０）；ＴＮＦ－コンベルターゼ阻害剤；抗ＩＬ－１２抗体；抗ＩＬ－１８抗体；インターロイキン－１１（例えば、Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ　＆　Ｒｈｅｕｍａｔｉｓｍ（１９９６）　Ｖｏｌ．３９，Ｎｏ．９（補遺），Ｓ２９６参照）；インターロイキン－１３（例えば、Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ　＆　Ｒｈｅｕｍａｔｉｓｍ（１９９６）Ｖｏｌ．３９，Ｎｏ．９（補遺），Ｓ３０８参照）；インターロイキン－１７阻害剤（例えば、Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ　＆　Ｒｈｅｕｍａｔｉｓｍ（１９９６）Ｖｏｌ．３９，Ｎｏ．９（補遺），Ｓ１２０参照）；金；ペニシラミン；クロロキン；クロラムブシル；ヒドロキシクロロキン；シクロスポリン；シクロホスファミド；全リンパ系照射；抗胸腺細胞グロブリン；抗ＣＤ４抗体；ＣＤ５トキシン；経口投与されたペプチド及びコラーゲン；ロベンザリト二ナトリウム；サイトカイン制御因子（ＣＲＡｓ）ＨＰ２２８及びＨＰ４６６（Ｈｏｕｇｈｔｅｎ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ，Ｉｎｃ．）；ＩＣＡＭ－Ｉアンチセンスホスホロチオアートオリゴデオキシヌクレオチド（ＩＳＩＳ２３０２；Ｉｓｉｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ，Ｉｎｃ．）；可溶性補体受容体１（ＴＰ１０；Ｔ　Ｃｅｌｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｉｎｃ．）；プレドニゾン；オルゴテイン；グリコサミノグリカンポリサルファート；ミノサイクリン；抗ＩＬ２Ｒ抗体；マウス及び植物脂質（魚及び植物種子脂肪酸；例えば、ＤｅＬｕｃａ　ｅｔ　ａｌ．（１９９５）Ｒｈｅｕｍ．Ｄｉｓ．Ｃｌｉｎ．Ｎｏｒｔｈ　Ａｍ．２１：７５９－７７７参照）；アウラノフィン；フェニルブタゾン；メクロフェナミン酸；フルフェナミン酸；静脈内免疫グロブリン；ジレウトン；アザリビン；ミコフェノール酸（ＲＳ－６１４４３）；タクロリムス（ＦＫ－５０６）；シロリムス（ラパマイシン）；アミプリロース（テラフェクチン）；クラドリビン（２－クロロデオキシアデノシン）；メトトレキサート；ｂｃｌ－２阻害剤（Ｂｒｕｎｃｋｏ，Ｍｉｌａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　（２００７），　５０（４），　６４１－６６２参照）抗ウイルス剤；及び免疫調節剤が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【０３２８】

一実施形態において、結合タンパク質又はその抗原結合部分は、関節リウマチの治療用の以下の因子の１つと組み合わせて投与される。ＫＤＲの小分子阻害剤、Ｔｉｅ－２の小分子阻害剤；メトトレキサート；プレドニゾン；セレコキシブ；葉酸；硫酸ヒドロキシクロロキン；ロフェコキシブ；エタネルセプト；インフリキシマブ；レフルノミド；ナプロキセン；バルデコキシブ；スルファサラジン；メチルプレドニゾロン；イブプロフェン；メロキシカム；酢酸メチルプレドニゾロン、金チオリンゴ酸ナトリウム；アスピリン；アザチオプリン；トリアムシノロン・アセトニド；プロプキシフェン・ナプシラート／ａｐａｐ；フォラート；ナブメトン；ジクロフェナク；ピロキシカム；エトドラク；ジクロフェナクナトリウム；オキサプロジン、塩酸オキシコドン、重酒石酸ヒドロコドン／ａｐａｐ；ジクロフェナクナトリウム／ミソプロストール；フェンタニル；アナキンラ、ヒト組み換え；塩酸トラマドール；サルサラート；スリンダク；シアノコバラミン／ｆａ／ピリドキシン；アセトアミノフェン；アレンドロナートナトリウム；プレドニゾロン；硫酸モルヒネ；塩酸リドカイン；インドメタシン；硫酸グルコサミン／コンドロイチン；シクロスポリン；塩酸アミトリプチリン；スルファジアジン；塩酸オキシコドン／アセトアミノフェン；塩酸オロパタジン；ミソプロストール；ナプロキセンナトリウム；オメプラゾール；ミコフェノラート・モフェチル；シクロホスファミド；リツキシマブ、ＩＬ－１ＴＲＡＰ；ＭＲＡ；ＣＴＬＡ４－ＩＧ；ＩＬ－１８ＢＰ；ＩＬ－１２／２３；抗ＩＬ－１８；抗ＩＬ－１５；ＢＩＲＢ－７９６；ＳＣＩＯ－４６９；ＶＸ－７０２；ＡＭＧ－５４８；ＶＸ７４０；ロフルミラスト；ＩＣ－４８５；ＣＤＣ－８０１及びメソプラム。

【０３２９】

本発明の結合タンパク質とともに組み合わせることが可能な炎症性腸疾患に対する治療

剤の非限定的な例には、以下のもの：ブデノシド；上皮成長因子；コルチコステロイド；シクロスポリン；スルファサラジン；アミノサリチラート；６－メルカプトプリン；アザチオプリン；メトロニダゾール；リポキシゲナーゼ阻害剤；メサラミン；オルサラジン；バルサラジド；抗酸化剤；トロンボキサン阻害剤；ＩＬ－１受容体アンタゴニスト；抗ＩＬ－１βモノクローナル抗体；抗ＩＬ－６モノクローナル抗体；成長因子；エラスターゼ阻害剤；ピリジニル－イミダゾール化合物；他のヒトサイトカイン又は成長因子（例えば、ＴＮＦ、ＬＴ、ＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－８、ＩＬ－１５、ＩＬ－１６、ＩＬ－１７、ＩＬ－１８、ＥＭＡＰ－ＩＩ、ＧＭ－ＣＳＦ、ＦＧＦ及びＰＤＧＦ）に対する抗体又はこれらのアンタゴニストが含まれる。本発明の抗体又はその抗原結合部分は、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ２５、ＣＤ２８、ＣＤ３０、ＣＤ４０、ＣＤ４５、ＣＤ６９、ＣＤ９０又はこれらのリガンドなどの細胞表面分子に対する抗体と組み合わせることが可能である。本発明の抗体又はその抗原結合部分は、メトトレキサート、シクロスポリン、ＦＫ５０６、ラパマイシン、ミコフェノラート・モフェチル、レフルノミド、ＮＳＡＩＤ、例えば、イブプロフェン、プレドニゾロンなどのコルチコステロイド、ホスホジエステラーゼ阻害剤、アデノシンアゴニスト、抗血栓剤、補体阻害剤、アドレナリン作用薬、ＴＮＦα又はＩＬ－１などの炎症促進性サイトカインによるシグナル伝達を妨害する因子（例えば、ＩＲＡＫ、ＮＩＫ、ＩＫＫ、ｐ３８又はＭＡＰキナーゼ阻害剤）、ＩＬ－１β変換酵素阻害剤、ＴＮＦα変換酵素阻害剤、キナーゼ阻害剤などのＴ細胞シグナル伝達阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、スルファサラジン、アザチオプリン、６－メルカプトプリン、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、可溶性サイトカイン受容体及びそれらの誘導体（例えば、可溶性ｐ５５又はｐ７５ＴＮＦ受容体、ｓＩＬ－１ＲＩ、ｓＩＬ－１ＲＩＩ、ｓＩＬ－６Ｒ）及び炎症抑制性サイトカイン（例えば、ＩＬ－４、ＩＬ－１０、ＩＬ－１１、ＩＬ－１３及びＴＧＦβ）及びｂｃｌ－２阻害剤などの因子とも組み合わされ得る。

【０３３０】

結合タンパク質を組み合わせることが可能な、クローン病に対する治療剤の例には、以下のもの：ＴＮＦアンタゴニスト、例えば、抗ＴＮＦ抗体、Ａｄａｌｉｍｕｍａｂ（ＰＣＴ公開９７／２９１３１；ＨＵＭＩＲＡ）、ＣＡ２（ＲＥＭＩＣＡＤＥ）、ＣＤＰ５７１、ＴＮＦＲ－Ｉｇ構築物、（ｐ７５ＴＮＦＲＩｇＧ（ＥＮＢＲＥＬ）及びｐ５５ＴＮＦＲＩｇＧ（ＬＥＮＥＲＣＥＰＴ））阻害剤及びＰＤＥ４阻害剤が含まれる。本発明の抗体又はその抗原結合部分は、コルチコステロイド、例えば、ブデノシド及びデキサメタゾンと組み合わせることが可能である。本発明の結合タンパク質又はその抗原結合部分は、スルファサラジン、５－アミノサリチル酸及びオルサラジンなどの因子と、並びにＩＬ－１などの炎症促進性サイトカインの合成又は作用を妨害する因子（例えば、ＩＬ－１β変換酵素阻害剤及びＩＬ－１ｒａ）とも組み合わされ得る。本発明の抗体又はその抗原結合部分は、Ｔ細胞シグナル伝達阻害剤、例えば、チロシンキナーゼ阻害剤６－メルカプトプリンとともに使用され得る。本発明の結合タンパク質又はその抗原結合部分は、ＩＬ－１１と組み合わせることが可能である。本発明の結合タンパク質又はその抗原結合部分は、メサラミン、プレドニゾン、アザチオプリン、メルカプトプリン、インフリキシマブ、コハク酸メチルプレドニゾロンナトリウム、ジフェノキシラート／硫酸アトロピン、塩酸ロペラミド、メトトレキサート、オメプラゾール、フォラート、シプロフロキサシン／デキストロース－水、重酒石酸ヒドロコドン／ａｐａｐ、テトラサイクリン塩酸塩、フルオシノニド、メトロニダゾール、チメロサール／ホウ酸、コレスチラミン／スクロース、塩酸シプロフロキサシン、硫酸ヒオスチアミン、塩酸メペリジン、塩酸ミダゾラム、塩酸オキシコドン／アセトアミノフェン、塩酸プロメタジン、リン酸ナトリウム、スルファメトキサゾール／トリメトプリム、セレコキシブ、ポリカルボフィル、ナプシル酸プロポキシフェン、ヒドロコルチゾン、マルチビタミン、バルサラジド二ナトリウム、リン酸コデイン／アセトアミノフェン（ａｐａｐ）、塩酸コレセベラム、シアノコバラミン、葉酸、レボフロキサシン、メチルプレドニゾロン、ナタリズマブ及びインターフェロンγと組み合わせることが可能である。

【０３３１】
本発明の結合タンパク質と組み合わせることが可能な、多発性硬化症のための治療剤の非限定的な例には、以下のもの：コルチコステロイド；プレドニゾロン；メチルプレドニゾロン；アザチオプリン；シクロホスファミド；シクロスポリン；メトトレキサート；４－アミノピリジン；チザニジン；インターフェロン－β１ａ（ＡＶＯＮＥＸ；Ｂｉｏｇｅｎ）；インターフェロン－β１ｂ（ＢＥＴＡＳＥＲＯＮ；Ｃｈｉｒｏｎ／Ｂｅｒｌｅｘ）；インターフェロンα－ｎ３）（Ｉｎｔｅｒｆｅｒｏｎ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ／Ｆｕｊｉｍｏｔｏ）、インターフェロン－α（Ａｌｆａ Ｗａｓｓｅｒｍａｎｎ／Ｊ＆Ｊ）、インターフェロン－β１Ａ－ＩＦ（Ｓｅｒｏｎｏ／Ｉｎｈａｌｅ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ）、ＰＥＧインターフェロンα２ｂ（Ｅｎｚｏｎ／Ｓｃｈｅｒｉｎｇ－Ｐｌｏｕｇｈ）、コポリマー１（Ｃｏｐ－１；ＣＯＰＡＸＯＮＥ；Ｔｅｖａ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｉｎｄｕｓｔｒｉｅｓ，Ｉｎｃ．）；高圧酸素；静脈内免疫グロブリン；クラブリビン；他のヒトサイトカイン又は成長因子（例えば、ＴＮＦ、ＬＴ、ＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－８、ＩＬ－２３、ＩＬ－１５、ＩＬ－１６、ＩＬ－１８、ＥＭＡＰ－ＩＩ、ＧＭ－ＣＳＦ、ＦＧＦ及びＰＤＧＦ）及びそれらの受容体に対する抗体又はこれらのアンタゴニストが含まれる。本発明の結合タンパク質は、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２５、ＣＤ２８、ＣＤ３０、ＣＤ４０、ＣＤ４５、ＣＤ６９、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ９０又はこれらのリガンドなどの細胞表面分子に対する抗体と組み合わせることが可能である。本発明の結合タンパク質は、メトトレキサート、シクロスポリン、ＦＫ５０６、ラパマイシン、ミコフェノラート・モフェチル、レフルノミド、ＮＳＡＩＤ、例えば、イブプロフェン、プレドニゾロンなどのコルチコステロイド、ホスホジエステラーゼ阻害剤、アデノシンアゴニスト、抗血栓剤、補体阻害剤、アドレナリン作用薬、ＴＮＦα又はＩＬ－１などの炎症促進性サイトカインによるシグナル伝達を妨害する因子（例えば、ＩＲＡＫ、ＮＩＫ、ＩＫＫ、ｐ３８又はＭＡＰキナーゼ阻害剤）、ＩＬ－１β変換酵素阻害剤、ＴＡＣＥ阻害剤、キナーゼ阻害剤などのＴ細胞シグナル伝達阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、スルファサラジン、アザチオプリン、６－メルカプトプリン、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、可溶性サイトカイン受容体及びそれらの誘導体（例えば、可溶性ｐ５５又はｐ７５ＴＮＦ受容体、ｓＩＬ－１ＲＩ、ｓＩＬ－１ＲＩＩ、ｓＩＬ－６Ｒ）及び炎症抑制性サイトカイン（例えば、ＩＬ－４、ＩＬ－１０、ＩＬ－１３及びＴＧＦβ）及びｂｃｌ－２阻害剤などの因子とも組み合わされ得る。

【０３３２】
本発明の結合タンパク質を組み合わせることが可能な、多発性硬化症のための治療剤の例には、インターフェロン－β、例えば、ＩＦＮβ１ａ及びＩＦＮ１ｂ；コパキソン（ｃｏｐａｘｏｎｅ）、コルチコステロイド、カスパーゼ阻害剤、例えばカスパーゼ－１の阻害剤、ＩＬ－１阻害剤、ＴＮＦ阻害剤並びにＣＤ４０リガンド及びＣＤ８０に対する抗体が含まれる。

【０３３３】
本発明の結合タンパク質は、アレムツズマブ、ドロナビノール、ユニメド、ダクリズマブ、ミトキサントロン、塩酸キサリプロデン、ファムプリジン、酢酸グラチラマー、ナタリズマブ、シンナビドール、ａ－イムノカインＮＮＳＯ３、ＡＢＲ－２１５０６２、ＡｎｅｒｇｉＸ．ＭＳ、ケモカイン受容体アンタゴニスト、ＢＢＲ－２７７８、カラグアリン、ＣＰＩ－１１８９、ＬＥＭ（リポソーム封入されたミトキサントロン）、ＴＨＣ．ＣＢＤ（カンナビノイドアゴニスト）ＭＢＰ－８２９８、メソプラム（ＰＤＥ４阻害剤）、ＭＮＡ－７１５、抗ＩＬ－６受容体抗体、ニューロバックス、ピルフェニドンアロトラップ１２５８（ＲＤＰ－１２５８）、ｓＴＮＦ－Ｒ１、タラムパネル、テリフルノミド、ＴＧＦ－β２、チプリモチド、ＶＬＡ－４アンタゴニスト（例えば、ＴＲ－１４０３５、ＶＬＡ４Ｕｌｔｒａｈａｌｅｒ、Ａｎｔｅｇｒａｎ－ＥＬＡＮ／Ｂｉｏｇｅｎ）、インターフェロンγアンタゴニスト、ＩＬ－４アゴニストなどの因子とも組み合わされ得る。

【０３３４】

本発明の結合タンパク質と組み合わせることが可能な、狭心症のための治療剤の非限定的な例には、以下のもの：アスピリン、ニトログリセリン、イソソルバイド・モノニトラート、コハク酸メトプロロール、アテノロール、酒石酸メトプロロール、ベシル酸アムロジピン、塩酸ジルチアゼム、二硝酸イソソルビド、重硫酸クロピドグレル、ニフェジピン、アトロバスタチンカルシウム、塩化カリウム、フロセミド、シンバスタチン、塩酸ベラパミル、ジゴキシン、塩酸プロプラノロール、カルベジロール、リシノプリル、スピロノラクトン、ヒドロクロロチアジド、マレイン酸エナラプリル、ナドロール、ラミプリル、エノキサパリンナトリウム、ヘパリンナトリウム、バルサルタン、塩酸ソタロール、フェノフィブラート、エゼチミブ、ブメタニド、ロサルタンカリウム、リシノプリル／ヒドロクロロチアジド、フェロジピン、カプトプリル、フマル酸ビソプロロールが含まれる。

【０３３５】

本発明の結合タンパク質と組み合わせることが可能な、強直性脊椎炎のための治療剤の非限定的な例には、以下のもの：イブプロフェン、ジクロフェナク及びミソプロストール、ナプロキセン、メロキシカム、インドメタシン、ジクロフェナク、セレコキシブ、ロフェコキシブ、スルファサラジン、メトトレキサート、アザチオプリン、ミノサイクリン、プレドニゾン、エタネルセプト、インフリキシマブが含まれる。

【０３３６】

本発明の結合タンパク質と組み合わせることが可能な、喘息のための治療剤の非限定的な例には、以下のもの：アルブテロール、サルメテロール／フルチカゾン、モンテルカストナトリウム、プロピオン酸フルチカゾン、ブデソニド、プレドニゾン、キシナホ酸サルメテロール、塩酸レバルブテロール、硫酸アルブテロール／イプラトロピウム、リン酸プレドニゾロンナトリウム、トリアムシノロン・アセトニド、二プロピオン酸ベクロメタゾン、イプラトロピウムブロミド、アジスロマイシン、酢酸ピルブテロール、プレドニゾロン、テオフィリン無水物、コハク酸メチルプレドニゾロンナトリウム、クラリスロマイシン、ザフィルルカスト、フマル酸フォルモテロール、インフルエンザウイルスワクチン、メチルプレドニゾロン、アミノキシシリン三水和物、フルニソリド、アレルギー注射、クロモリンナトリウム、塩酸フェキソフェナジン、フルニソリド／メントール、アモキシシリン／クラブラナート、レボフロキサシン、吸入補助装置、グアイフェネシン、リン酸デキサメタゾンナトリウム、塩酸モキシフロキサシン、ドキシサイクリン水和物（ｈｙｃｌａｔｅ）、グアイフェネシン／ｄ－メトルファン、ｐ－エフェドリン／ｃｏｄ／クロルフェニル、ガチフロキサシン、塩酸セチリジン、フロ酸モメタゾン、キシナホ酸サルメテロール、ベンゾナタート、セファレキシン、ｐｅ／ヒドロコドン／クロルフェニル、塩酸セチリジン／シュードエフェドリン、フェニレフリン／ｃｏｄ／プロメタジン、コデイン／プロメタジン、セフプロジル、デキサメタゾン、グアイフェネシン／シュードエフェドリン、クロルフェニラミン／ヒドロコドン、ネドクロミルナトリウム、硫酸テルブタリン、エピネフリン、メチルプレドニゾロン、硫酸メタプロテレノールが含まれる。

【０３３７】

本発明の結合タンパク質と組み合わせることができる、ＣＯＰＤに対する治療剤の非限定的な例には、以下のもの：硫酸アルブテロール／イプラトロピウム、イプラトロピウムブロミド、サルメテロール／フルチカゾン、アルブテロール、キシナホ酸サルメテロール、プロピオン酸フルチカゾン、プレドニゾン、テオフィリン無水物、コハク酸メチルプレドニゾロンナトリウム、モンテルカストナトリウム、ブデソニド、フマル酸フォルモテロール、トリアムシノロン・アセトニド、レボフロキサシン、グアイフェネシン、アジスロマイシン、ジプロピオン酸ベクロメタゾン、塩酸レバルブテロール、フルニソリド、セフトリアキソンナトリウム、アミノキシシリン三水和物、ガチフロキサシン、ザフィルルカスト、アモキシシリン／クラブラナート、フルニソリド／メントール、クロルフェニラミン／ヒドロコドン、硫酸メタプロテレノール、メチルプレドニゾロン、フロ酸モメタゾン、ｐ－エフェドリン／ｃｏｄ／クロロフェニル、酢酸ピルブテロール、ｐ－エフェドリン／ロラタジン、硫酸テルブタリン、チオトロピウムブロミド、（Ｒ，Ｒ）－フォルモテロール、ＴｇＡＡＴ、シロミラスト、ロフルミラストが含まれる。

【０３３８】
本発明の結合タンパク質と組み合わせることができる、ＨＣＶに対する治療剤の非限定的な例には、以下のもの：インターフェロン－α－２ａ、インターフェロン－α－２ｂ、インターフェロン－αｃｏｎ１、インターフェロン－α－ｎｌ、ＰＥＧ化されたインターフェロン－α－２ａ、ＰＥＧ化されたインターフェロン－α－２ｂ、リバビリン、Ｐｅｇインターフェロンα－２ｂ＋リバビリン、ウルソデオキシコール酸、グリシルリジン酸、チマルファシン、マキサミン、ＶＸ－４９７及び以下の標的：ＨＣＶポリメラーゼ、ＨＣＶプロテアーゼ、ＨＣＶヘリカーゼ、ＨＣＶＩＲＥＳ（配列内リボソーム進入部位）への介入を通じて、ＨＣＶを治療するために使用されるあらゆる化合物が含まれる。
【０３３９】
本発明の結合タンパク質と組み合わせることができる、特発性肺繊維症のための治療剤の非限定的な例には、以下のもの：プレドニゾン、アザチオプリン、アルブテロール、コルヒチン、硫酸アルブテロール、ジゴキシン、γインターフェロン、コハク酸メチルプレドニゾロンナトリウム、ロラゼパム、フロセミド、リシノプリル、ニトログリセリン、スピロノラクトン、シクロホスファミド、イプラトロピウムブロミド、アクチノマイシンｄ、アルテプラーゼ、プロピオン酸フルチカゾン、レボフロキサシン、硫酸メタプロテレノール、硫酸モルヒネ、塩酸オキシコドン、塩化カリウム、トリアムシノロン・アセトニド、タクロリムス無水物、カルシウム、インターフェロン－α、メトトレキサート、ミコフェノラート・モフェチル、インターフェロン－γ－１βが含まれる。
【０３４０】
本発明の結合タンパク質と組み合わせることができる、心筋梗塞のための治療剤の非限定的な例には、以下のもの：アスピリン、ニトログリセリン、酒石酸メトプロロール、エノキサパリンナトリウム、ヘパリンナトリウム、重硫酸クロピドグレル、カルベジロール、アテノロール、硫酸モルヒネ、コハク酸メトプロロール、ワルファリンナトリウム、リシノプリル、一硝酸イソソルビド、ジゴキシン、フロセミド、シンバスタチン、ラミプリル、テネクテプラーゼ、マレイン酸エナラプリル、トルセミド、レタバーゼ、ロサルタンカリウム、塩酸キナプリル／ｍａｇ　ｃａｒｂ、ブメタニド、アルテプラーゼ、エナラプリラート、塩酸アミオダロン、塩酸チロフィバンｍ－水和物、塩酸ジルチアゼム、カプトプリル、イルベサルタン、バルサルタン、塩酸プロプラノロール、フォシノプリルナトリウム、塩酸リドカイン、エプチフィバチド、セファゾリンナトリウム、硫酸アトロピン、アミノカプロン酸、スピロノラクトン、インターフェロン、塩酸ソタロール、塩化カリウム、ドキュセートナトリウム、塩酸ドブタミン、アルプラゾラム、プラバスタチンナトリウム、アトロバスタチンカルシウム、塩酸ミダゾラム、塩酸メペリジン、二硝酸イソソルビド、エピネフリン、塩酸ドーパミン、ビバリルジン、ロスバスタチン、エゼチミブ／シンバスタチン、アバシミブ、カリポリドが含まれる。
【０３４１】
本発明の結合タンパク質と組み合わせることが可能な、乾癬のための治療剤の非限定的な例には、以下のもの：ＫＤＲの小分子阻害剤Ｔｉｅ－２の小分子阻害剤、カルシポトリエン、プロピオン酸クロベタゾール、トリアムシノロン・アセトニド、プロピオン酸ハロベタゾール、タザロテン、メトトレキサート、フルオシノニド、増強された（ａｕｇｍｅｎｔｅｄ）二プロピオン酸ベタメタゾン、フルオシノロン・アセトニド、アシトレチン、タールシャンプー、吉草酸ベタメタゾン、フロ酸モメタゾン、ケトコナゾール、パラモキシン／フルオシノロン、吉草酸ヒドロコルチゾン、フルランドレノリド、尿素、ベタメタゾン、プロピオン酸クロベタゾール／皮膚軟化剤（ｅｍｏｌｌ）、プロピオン酸フルチカゾン、アジスロマイシン、ヒドロコルチゾン、保湿処方、葉酸、デソニド、ピメクロリムス、コールタール、二酢酸ジフロラゾン、葉酸エタネルセプト、乳酸、メトキサレン、ｈｃ／次没食子酸ビスマス（ｂｉｓｍｕｔｈ　ｓｕｂｇａｌ）／酸化亜鉛（ｚｎｏｘ）／ｒｅｓｏｒ、酢酸メチルプレドニゾロン、プレドニゾン、日焼け止め、ハルシノニド、サリチル酸、アンスラリン、ピバル酸クロコルトロン、石炭抽出物、コールタール／サリチル酸、コールタール／サリチル酸／硫黄、デスオキシメタゾン、ジアゼパム、皮膚軟化剤、

フルオシノニド／皮膚軟化剤、鉱物油／ひまし油／ｎａ　ｌａｃｔ、鉱物油／落花生油、石油／ミリスチン酸イソプロピル、ソラーレン、サリチル酸、石鹸／トリブロムサラン、チメロサール／ホウ酸、セレコキシブ、インフリキシマブ、シクロスポリン、アレファセプト、エファリズマブ、タクロリムス、ピメクロリムス、ＰＵＶＡ、ＵＶＢ、スルファサラジンが含まれる。

【０３４２】

本発明の結合タンパク質と組み合わせることができる、乾癬性関節炎のための治療剤の非限定的な例には、以下のもの：メトトレキサート、エタネルセプト、ロフェコキシブ、セレコキシブ、葉酸、スルファサラジン、ナプロキセン、レフルノミド、酢酸メチルプレドニゾロン、インドメタシン、硫酸ヒロドキシクロロキン、プレドニゾン、スリンダク、増強された二プロピオン酸ベタメタゾン、インフリキシマブ、メトトレキサート、フォラート、トリアムシノロン・アセトニド、ジクロフェナク、ジメチルスルホキシド、ピロキシカム、ジクロフェナクナトリウム、ケトプロフェン、メロキシカム、メチルプレドニゾロン、ナブメトン、トルメチンナトリウム、カルシポトリエン、シクロスポリン、ジクロフェナクナトリウム／ミソプロストール、フルオシノニド、硫酸グルコサミン、金チオリンゴ酸ナトリウム、二酒石酸ヒドロコドン／アセトアミノフェン、イブプロフェン、リセドロン酸ナトリウム、スルファジアジン、チオグアニン、バルデコキシブ、アレファセプト、エファリズマブ及びｂｃｌ－２阻害剤が含まれる。

【０３４３】

本発明の結合タンパク質と組み合わせることが可能な、再狭窄のための治療剤の非限定的な例には、以下のもの：シロリムス、パクリタキセル、エベロリムス、タクロリムス、ゾタロリムス、アセトアミノフェンが含まれる。

【０３４４】

本発明の結合タンパク質と組み合わせることが可能な、坐骨神経痛のための治療剤の非限定的な例には、以下のもの：二酒石酸ヒドロコドン／アセトアミノフェン、ロフェコキシブ、塩酸シクロベンザプリン、メチルプレドニゾロン、ナプロキセン、イブプロフェン、塩酸オキシコドン／アセトアミノフェン、セレコキシブ、バルデコキシブ、酢酸メチルプレドニゾロン、プレドニゾロン、リン酸コデイン／アセトアミノフェン、塩酸トラマドール／アセトアミノフェン、メタキサロン、メロキシカム、メトカルバモール、塩酸リドカイン、ジクロフェナクナトリウム、ギャバペンチン、デキサメタゾン、カリソプロドール、ケトロラク・トロメタミン、インドメタシン、アセトアミノフェン、ジアゼパム、ナブメトン、塩酸オキシコドン、塩酸チザニジン、ジクロフェナクナトリウム／ミソプロストール、ナプシル酸プロポキシフェン／アセトアミノフェン、ａｓａ／ｏｘｙｃｏｄ／コキシコドンｔｅｒ、イブプロフェン／重酒石酸ヒドロコドン、塩酸トラマドール、エトドラク、塩酸プロポキシフェン、塩酸アミトリプチリン、カリソプロドール／リン酸コデイン／ａｓａ、硫酸モルヒネ、マルチビタミン、ナプロキセンナトリウム、クエン酸オルフェナドリン、テマゼパムが含まれる。

【０３４５】

本発明の結合タンパク質と組み合わせることが可能な、ＳＬＥ（狼瘡）のための治療剤の例には、以下のもの：ＮＳＡＩＤ、例えば、ジクロフェナク、ナプロキセン、イブプロフェン、ピロキシカム、インドメタシン；ＣＯＸ２阻害剤、例えば、セレコキシブ、ロフェコキシブ、バルデコキシブ；抗マラリア剤、例えば、ヒドロキシクロロキン；ステロイド、例えば、プレドニゾン、プレドニゾロン、ブデノシド、デキサメタゾン；細胞毒性剤、例えば、アザチオプリン、シクロホスファミド、ミコフェノラート・モフェチル、メトトレキサート；ＰＤＥ４の阻害剤又はプリン合成阻害剤、例えば、Ｃｅｌｌｃｅｐｔが含まれる。本発明の結合タンパク質は、スルファサラジン、５－アミノサリチル酸、オルサラジン、イムランなどの因子と、並びにＩＬ－１などの炎症促進性サイトカインの合成、産生又は作用を妨害する因子、例えば、ＩＬ－１β変換酵素阻害剤及びＩＬ－１ｒａのようなカスパーゼ阻害剤とも組み合わされ得る。本発明の結合タンパク質は、また、Ｔ細胞シグナル伝達阻害剤、例えば、チロシンキナーゼ阻害剤；又はＴ細胞活性化分子を標的と

する分子、例えば、ＣＴＬＡ－４－ＩｇＧ又は抗Ｂ７抗体ファミリー抗体、抗ＰＤ－１ファミリー抗体とともに使用され得る。本発明の結合タンパク質は、ＩＬ－１１又は抗サイトカイン抗体、例えば、ホノトリズマブ（抗ＩＦＮｇ抗体）、又は抗受容体受容体抗体、例えば、抗ＩＬ－６受容体抗体及びＢ細胞表面分子に対する抗体と組み合わせることが可能である。本発明の抗体又はその抗原結合部分は、また、ＬＪＰ３９４（アベチムス（ａｂｅｔｉｍｕｓ））（Ｂ細胞を枯渇させ、又は不活化する因子）、例えば、リツキシマブ（抗ＣＤ２０抗体）、リンホスタット－Ｂ（抗ＢｌｙＳ抗体）、ＴＮＦアンタゴニスト、例えば、抗ＴＮＦ抗体、Ａｄａｌｉｍｕｍａｂ（ＰＣＴ公開ＷＯ９７／２９１３１；ＨＵＭＩＲＡ）、ＣＡ２（ＲＥＭＩＣＡＤＥ）、ＣＤＰ５７１、ＴＮＦＲ－Ｉｇ構築物（ｐ７５ＴＮＦＲＩｇＧ（ＥＮＢＲＥＬ及びｐ５５ＴＮＦＲＩｇＧ（ＬＥＮＥＲＣＥＰＴ））及びｂｃｌ－２阻害剤（トランスジェニックマウス中でのｂｃｌ－２の過剰発現は、狼瘡様の表現型を引き起こすことが示されているので（Ｍａｒｑｕｉｎａ，Ｒｅｇｉｎａ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（２００４）、１７２（１１），７１７７－７１８５）、阻害は治療効果を有すると予想される。）とともに使用され得る。

【０３４６】

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

【０３４７】

投薬計画は、最適な所望の応答（例えば、治療的応答又は予防的応答）を与えるように調整され得る。例えば、単一のボーラスを投与することができ、複数の分割された用量を経時的に投与することができ、又は治療状況の緊急性によって示されるように、用量を比例的に減少若しくは増加させ得る。投与の容易さ及び投薬量の均一性のために、投薬単位形態で非経口組成物を製剤化することが特に有利である。本明細書において使用される投薬単位形態は、治療されるべき哺乳動物対象に対する統一された投薬として適した、物理的に分離された単位を表し、各単位は、必要とされる医薬担体とともに、所望される治療効果を生じるように計算された活性化合物の所定量を含有する。本発明の投薬単位形態に対する規格は、（ａ）活性化合物の特有の特徴及び達成されるべき具体的な治療効果又は予防効果並びに（ｂ）個体における過敏症の治療用のこのような活性化合物を配合する分野に固有の制約によって規定され、これらに直接依存する。

【０３４８】

本発明の結合タンパク質の治療的又は予防的有効量に対する典型的な非限定的範囲は、０．１から２０ｍｇ／ｋｇ、例えば１から１０ｍｇ／ｋｇである。緩和されるべき症状の種類及び重度に応じて、投薬量の値が変化し得ることに注意すべきである。何れかの具体的な患者に対して、個体の要求に従って、組成物の投与を行い又は監督している者の専門的判断に従って、具体的な投薬計画を経時的に調整すべきこと、及び、本明細書に記載されている投薬量の範囲は典型的なものに過ぎず、特許請求の範囲に記載されている組成物の範囲又は実施に限定することを意図したものではないことをさらに理解すべきである。

【０３４９】

Ｖ．診断薬

本明細書中の開示は、診断的用途も提供する。これは、以下でさらに明解にされる。

【０３５０】

Ｉ．アッセイの方法

本開示は、本明細書に記載されている少なくとも１つのＤＶＤ－Ｉｇを用いて、検査試料中の分析物（又はその断片）の存在、量又は濃度を測定するための方法も提供する。本分野において公知であるあらゆる適切なアッセイを前記方法において使用することができる。例には、サンドイッチイムノアッセイ（放射性同位体検出（ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ））及び酵素検出（酵素イムノアッセイ（ＥＩＡ）又は酵素結合免疫吸着検定法（ＥＬＩＳＡ）（例えば、Ｑｕａｎｔｉｋｉｎｅ ＥＬＩＳＡアッセイ、Ｒ＆ＤＳｙｓｔｅｍｓ、Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ、ＭＮ））を含む、例えば、モノクローナル、ポリクローナル及び／又はＤＶＤ－Ｉｇサンドイッチイムノアッセイ又はそのあらゆる変形（例えば、モノクローナル／ＤＶＤ－Ｉｇ、ＤＶＤ－Ｉｇ／ポリクローナルなど））、競合阻害イムノアッセイ（例えば、フォワード及びリバース）、蛍光偏光イムノアッセイ（ＦＰＩＡ；ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ ｐｏｌａｒｉｚａｔｉｏｎ ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ）、酵素多重化イムノアッセイ技術（ＥＭＩＴ；ｅｎｚｙｍｅ ｍｕｌｔｉｐｌｉｅｄ ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ ｔｅｃｈｎｉｑｕｅ）、生物発光共鳴エネルギー転移（ＢＲＥＴ）；及び均質な化学発光アッセイなどのイムノアッセイが含まれるが、これらに限定されない。ＳＥＬＤＩをベースとするイムノアッセイでは、目的の分析物（又はその断片）を特異的に結合する捕捉試薬が、予め活性化されたタンパク質チップアレイなどの、質量分析プローブの表面に付着される。次いで、分析物（又はその断片）は、バイオチップ上に特異的に捕捉され、捕捉された分析物（又はその断片）は、質量分析によって検出される。あるいは、分析物（又はその断片）は捕捉試薬から溶出され、伝統的なＭＡＬＤＩ（マトリックス支援レーザー脱離／イオン化）によって又はＳＥＬＤＩによって検出することができる。化学発光微粒子イムノアッセイ、特に、ＡＲＣＨＩＴＥＣＴ（Ｒ）自動化分析装置（Ａｂｂｏｔｔ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ａｂｂｏｔｔ Ｐａｒｋ，ＩＬ）を使用するものは、好ましいイムノアッセイの一例である。

【０３５１】

例えば、本明細書に記載されているＤＶＤ－Ｉｇが免疫診断試薬として及び／又は分析物イムノアッセイキット中で使用される場合、尿、血液、血清及び血漿並びにその他の体液を収集し、取り扱い、及び加工処理するための本分野で周知の方法が本開示の実施において使用される。検査試料は、抗体、抗原、ハプテン、ホルモン、薬物、酵素、受容体、タンパク質、ペプチド、ポリペプチド、オリゴヌクレオチド及び／又はポリヌクレオチドなど、目的の分析物の他にさらなる部分を含むことができる。例えば、試料は、対象から得られる全血試料であり得る。検査試料（特に、全血）は、例えば、前処理試薬を用いて、本明細書に記載されているイムノアッセイの前に処理されることが必要であり得又は所望され得る。前処理が必要でない場合でさえ（例えば、多くの尿試料）、（例えば、市販のプラットフォーム上での治療計画の一環として）必要に応じて前処理を行うことができる。

【０３５２】

前処理試薬は、本発明のイムノアッセイ及びキットともに使用するのに適したあらゆる試薬であり得る。前処理は、（ａ）１つ若しくはそれ以上の溶媒（例えば、メタノール及びエチレングリコール）、及び必要に応じて塩、（ｂ）１つ若しくはそれ以上の溶媒及び塩、及び必要に応じて界面活性剤、（ｃ）界面活性剤又は（ｄ）界面活性剤及び塩を必要に応じて含む。前処理試薬は本分野において公知であり、このような前処理は、例えば、文献に記載されているように（例えば、Ｙａｔｓｃｏｆｆ ｅｔ ａｌ．，Ａｂｂｏｔｔ ＴＤｘ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ａｓｓａｙ Ｅｖａｌｕａｔｅｄ ｆｏｒ Ｍｅａｓｕｒｉｎｇ Ｃｙｃｌｏｓｐｏｒｉｎｅ ｉｎ Ｗｈｏｌｅ Ｂｌｏｏｄ，Ｃｌｉｎ．Ｃｈｅｍ．３６：１９６９－１９７３（１９９０）及びＷａｌｌｅｍａｃｑ ｅｔ ａｌ．，Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ Ｎｅｗ ＡｘＳＹＭ Ｃｙｃｌｏｓｐｏｒｉｎｅ Ａｓｓａｙ：Ｃｏｍｐａｒｉｓｏｎ ｗｉｔｈ ＴＤｘ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ｗｈｏｌｅ Ｂｌｏｏｄ ａｎｄ ＥＭＩＴ Ｃｙｃｌｏｓｐｏｒｉｎｅ Ａｓｓａｙｓ，Ｃｌｉｎ．Ｃｈｅｍ．４５：４３２－４３５（１９９９）を

参照）、及び／又は市販されているように、Ａｂｂｏｔｔ　ＴＤｘ、ＡｘＳＹＭ（Ｒ）及びＡＲＣＨＩＴＥＣＴ（Ｒ）分析装置（Ａｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，　Ａｂｂｏｔｔ　Ｐａｒｋ，　ＩＬ）上でのアッセイのために使用される場合のように、使用することができる。さらに、前処理は、Ａｂｂｏｔｔの米国特許第５，１３５，８７５号、欧州特許公開第０　４７１　２９３号、２００６年１２月２９日に出願された米国仮特許出願第６０／８７８，０１７号及び米国特許出願公開第２００８／００２０４０１号（前処理に関するその教示に関して、参照により、その全体が組み込まれる。）に記載されているように行うことができる。前処理試薬は、不均質剤又は均質剤であり得る。

【０３５３】

不均質な前処理試薬を用いると、前処理試薬は試料中に存在する分析物結合タンパク質（例えば、分析物又はその断片に結合することができるタンパク質）を沈殿させる。このような前処理工程は、試料に前処理剤を添加することによって形成された混合物の上清を沈殿された分析物結合タンパク質から分離することによって、全ての分析物結合タンパク質を除去することを含む。このようなアッセイでは、結合タンパク質が一切存在しない混合物の上清がアッセイにおいて使用され、抗体捕捉工程へと直接進む。

【０３５４】

均質な前処理試薬を用いると、このような分離工程は存在しない。検査試料と前処理試薬の完全な混合物を、標識された抗分析物抗体（又は抗原的に反応性のその断片）などの、分析物（又はその断片）に対する標識された特異的結合対と接触させる。このようなアッセイのために使用される前処理試薬は、第一の特異的結合対による捕捉の前又は間の何れかに、前処理された検査試料混合物中に通例希釈される。このような希釈に関わらず、前処理試薬のある量が、捕捉の間に、検査試料混合物中になお存在（又は残存）する。本発明によれば、標識された特異的結合対は、ＤＶＤ－Ｉｇ（又はその断片、変形物又は変形物の断片）であり得る。

【０３５５】

不均質なフォーマットでは、対象から検査試料を取得した後に、第一の混合物が調製される。混合物は、分析物（又はその断片）と第一の特異的結合対に関して評価されている検査試料を含有し、検査試料中に含有される第一の特異的結合対及び何れかの分析物は第一の特異的結合対－分析物複合体を形成する。好ましくは、第一の特異的結合対は、抗分析物抗体又はその断片である。第一の特異的結合対は、本明細書中に記載されているＤＶＤ－Ｉｇ（又はその断片、変形物若しくは変形物の断片）であり得る。混合物を形成するために検査試料及び第一の特異的結合対が添加される順番は重要でない。好ましくは、第一の特異的結合対は固相上に固定化される。（第一の特異的結合対及び任意に第二の特異的結合対に対する）イムノアッセイにおいて使用される固相は、磁気粒子、ビーズ、試験管、マイクロタイタープレート、キュベット、膜、足場分子、フィルム、ろ紙、ディスク及びチップなどの（但し、これらに限定されない。）、本分野において公知のあらゆる固相であり得る。

【０３５６】

第一の特異的結合対－分析物複合体を含有する混合物が形成された後、本分野において公知の何れかの技術を用いて、全ての結合していない分析物を複合体から除去する。例えば、結合していない分析物は洗浄によって除去することができる。しかしながら、望ましくは、検査試料中に存在する全ての分析物が第一の特異的結合対によって結合されるように、第一の特異的結合対は検査試料中に存在する全ての分析物より過剰に存在する。

【０３５７】

全ての結合していない分析物が除去された後、第一の特異的結合対－分析物－第二の特異的結合対複合体を形成するために、第二の特異的結合対を混合物に添加する。好ましくは、第二の特異的結合対は、第一の特異的結合対によって結合された分析物上のエピトープとは異なる分析物上のエピトープに結合する抗分析物抗体である。さらに、同じく好ましくは、第二の特異的結合対は、上記されている検出可能な標識で標識され、又は上記されている検出可能な標識を含有する。第二の特異的結合対は、本明細書中に記載されてい

るＤＶＤ－Ｉｇ（又はその断片、変形物若しくは変形物の断片）であり得る。
【０３５８】
本分野において公知のあらゆる適切な検出可能な標識を使用することができる。例えば、検出可能な標識は、放射性標識（^{3}Ｈ、^{125}Ｉ、^{35}Ｓ、^{14}Ｃ、^{32}Ｐ及び^{33}Ｐなど）、酵素標識（西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリペルオキシダーゼ、グルコース６－リン酸脱水素酵素など）、化学発光標識（アクリジニウムエステル、チオエステル又はスルホンアミド；ルミノール、イソルミノール、フェナントリジニウムエステルなど）、蛍光標識（フルオレセイン（例えば、５－フルオレセイン、６－カルボキシフルオレセイン、３’６－カルボキシフルオレセイン、５（６）－カルボキシフルオレセイン、６－ヘキサクロロ－フルオレセイン、６－テトラクロロフルオレセイン、フルオレセインイソチオシアナートなど））、ローダミン、フィコビリタンパク質、Ｒ－フィコエリトリン、量子ドット（例えば、硫化亜鉛でキャップされたセレン化カドミウム）、温度測定標識又はイムノ－ポリメラーゼ連鎖反応標識であり得る。標識、標識手法及び標識の検出についての序説は、「Ｐｏｌａｋ ａｎｄ Ｖａｎ Ｎｏｏｒｄｅｎ，Ｉｎｔｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｔｏ Ｉｍｍｕｎｏｃｙｔｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，２nd ｅｄ．，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ Ｖｅｒｌａｇ，Ｎ．Ｙ．（１９９７）」及びＭｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ，Ｉｎｃ．，Ｅｕｇｅｎｅ，Ｏｒｅｇｏｎによって発行されたハンドブック兼カタログである「Ｈａｕｇｌａｎｄ，Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ Ｐｒｏｂｅｓ ａｎｄ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ（１９９６）」に見出される。ＦＰＩＡでは、蛍光標識を使用することができる（例えば、米国特許第５，５９３，８９６号、米国特許第５，５７３，９０４号、米国特許第５，４９６，９２５号、米国特許第５，３５９，０９３号及び米国特許第５，３５２，８０３号参照（これらの全体は、参照により、本明細書に組み込まれる。））。均質な又は不均質な化学発光アッセイでは、アクリジニウム化合物を検出可能な標識として使用することができる（例えば、Ａｄａｍｃｚｙｋ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔ．１６：１３２４－１３２８（２００６）；Ａｄａｍｃｚｙｋ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔ．４：２３１３－２３１７（２００４）；Ａｄａｍｃｚｙｋ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔ．１４：３９１７－３９２１（２００４）；及びＡｄａｍｃｚｙｋ ｅｔ ａｌ．，Ｏｒｇ．Ｌｅｔｔ．５：３７７９－３７８２（２００３）参照）。
【０３５９】
好ましいアクリジニウム化合物は、アクリジニウム－９－カルボキサミドである。アクリジニウム９－カルボキサミドを調製するための方法は、「Ｍａｔｔｉｎｇｌｙ，Ｊ．Ｂｉｏｌｕｍｉｎ．Ｃｈｅｍｉｌｕｍｉｎ．６：１０７－１１４（１９９１）；Ａｄａｍｃｚｙｋ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．６３：５６３６－５６３９（１９９８）；Ａｄａｍｃｚｙｋ ｅｔ ａｌ．，Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ ５５：１０８９９－１０９１４（１９９９）；Ａｄａｍｃｚｙｋ ｅｔ ａｌ．，Ｏｒｇ．Ｌｅｔｔ．１：７７９－７８１（１９９９）；Ａｄａｍｃｚｙｋ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．１１：７１４－７２４（２０００）；Ｍａｔｔｉｎｇｌｙ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎ Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｃｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ；Ｄｙｋｅ，Ｋ．Ｖ．Ｅｄ．；ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ：Ｂｏｃａ Ｒａｔｏｎ，ｐｐ．７７－１０５（２００２）；Ａｄａｍｃｚｙｋ ｅｔ ａｌ．，Ｏｒｇ．Ｌｅｔｔ．５：３７７９－３７８２（２００３）；及び米国特許第５，４６８，６４６号、米国特許第５，５４３，５２４号及び米国特許第５，７８３，６９９号に記載されている。別の好ましいアクリジニウム化合物は、アクリジニウム－９－カルボキシラートアリールエステルである。アクリジニウム－９－カルボキシラートアリールエステルの例は、１０－メチル－９－（フェノキシカルボニル）アクリジニウムフルオロスルホナート（Ｃａｙｍａｎ Ｃｈｅｍｉｃａｌ，Ａｎｎ Ａｒｂｏｒ，ＭＩから入手可能）である。アクリジニウム９－カルボキシラートアリールエステルを調製する方法は、「ＭｃＣａｐｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｐｈｏｔｏｃｈｅｍ

．Ｐｈｏｔｏｂｉｏｌ．４：１１１１－２１（１９６５）；Ｒａｚａｖｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｃｅ　１５：２４５－２４９（２０００）；Ｒａｚａｖｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｃｅ　１５：２３９－２４４（２０００）及び米国特許第５，２４１，０７０号（これらの各々は、該当する箇所に関するその教示に関して、その全体が、参照により、本明細書に組み込まれる。）に記載されている。アクリジニウム９－カルボキシラートアリールエステル及びその使用に関するさらなる詳細は、米国特許公開第２００８－０２４８４９３号に記載されている。

【０３６０】

（例えば、上記アクリジニウム又は他の化学発光剤を使用する）化学発光アッセイは、「Ａｄａｍｃｚｙｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎａｌ．Ｃｈｉｍ．Ａｃｔａ５７９（１）：６１－６７（２００６）」に記載されている方法に従って実施することができる。あらゆる適切なアッセイフォーマットを使用することが可能であり、マイクロプレート化学発光測定装置（Ｍｉｔｈｒａｓ　ＬＢ－９４０，Ｂｅｒｔｈｏｌｄ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｕ．Ｓ．Ａ．，ＬＬＣ，Ｏａｋ　Ｒｉｄｇｅ，ＴＮ）は、少量の複数試料のアッセイを迅速に可能にする。

【０３６１】

化学発光アッセイのための混合物を形成するために検査試料及び特異的結合対が添加される順番は重要でない。第一の特異的結合対が、アクリジニウム化合物などの化学発光剤で検出可能に標識されていれば、検出可能に標識された第一の特異的結合対－分析物複合体が形成される。あるいは、第二の特異的結合対が使用され、及び第二の特異的結合対がアクリジニウム化合物などの化学発光剤で検出可能に標識されていれば、検出可能に標識された第一の特異的結合対－分析物－第二の特異的結合体の複合体が形成される。標識されているか又は標識されていないかを問わず、全ての結合されていない特異的結合対は、洗浄などの本分野で公知の何れかの技術を用いて混合物から除去することができる。

【０３６２】

過酸化水素は、混合物中において原位置で生成され得、又は上記アクリジニウム化合物の添加前、添加と同時若しくは添加後に、混合物に提供若しくは供給され得る（例えば、過酸化水素源は、過酸化水素を含有することが知られている１つ若しくはそれ以上の緩衝液又は他の溶液である。）。過酸化水素は、当業者に自明な多数の方法で、原位置にて生成され得る。

【０３６３】

試料に少なくとも１つの塩基性溶液を同時に又はその後に添加すると、分析物の存在の指標となる検出可能なシグナル（すなわち、化学発光シグナル）が生成される。塩基性溶液は、少なくとも１つの塩基を含有し、１０より大きい又は１０に等しい、好ましくは、１２より大きい又は１２に等しいｐＨを有する。塩基性溶液の例には、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム、水酸化アンモニウム、水酸化マグネシウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、水酸化カルシウム、炭酸カルシウム及び炭酸水素カルシウムが含まれるが、これらに限定されない。試料に添加される塩基性溶液の量は、塩基性溶液の濃度に依存する。使用される塩基性溶液の濃度に基づいて、当業者は、試料に添加される塩基性溶液の量を容易に決定することができる。

【０３６４】

生成される化学発光シグナルは、当業者に公知の定型的な技術を用いて検出することができる。生成されたシグナルの強度に基づいて、試料中の分析物の量を定量することができる。具体的には、試料中の分析物の量は生成されたシグナルの強度に比例する。存在する分析物の量は、生成された光の量を分析物に対する標準曲線と比較することによって、又は参照標準と比較することによって定量することができる。標準曲線は、質量分析法、重力測定法及び本分野で公知の他の技術によって、分析物の既知濃度の系列希釈又は溶液を用いて作製することができる。上記は、化学発光剤としてアクリジニウム化合物を使用することを強調して記載されているが、当業者は、他の化学発光剤を使用するために、容易にこの記述を改変することができる。

【０３６５】
一般に、分析物イムノアッセイは、サンドイッチフォーマットなど（但し、これに限定されない。）の本分野で公知のあらゆるフォーマットを用いて実施することができる。具体的には、１つのイムノアッセイフォーマットにおいて、試料中の分析物（ヒト分析物など）又はその断片を分離及び定量するために、少なくとも２つの抗体が使用される。より具体的には、少なくとも２つの抗体は、分析物（又はその断片）上の異なるエピトープに結合して、免疫複合体を形成し、これは、「サンドイッチ」と称される。一般に、イムノアッセイでは、検査試料中の分析物（又はその断片）を捕捉するために、１つ又はそれ以上の抗体を使用することが可能であり（これらの抗体は、しばしば、「捕捉」抗体と称される。）、１つ又はそれ以上の抗体は、サンドイッチに検出可能な（すなわち、定量可能な）標識を結合させるために使用することができる（これらの抗体は、しばしば、「検出抗体」、「連結体」と称される。）。従って、サンドイッチイムノアッセイフォーマットにおいて、本明細書に記載されているＤＶＤ－Ｉｇ（又はその断片、変形物若しくは変形物の断片）は、捕捉抗体、検出抗体又は両者として使用することができる。例えば、分析物（又はその断片）上の第一のエピトープを結合することができるドメインを有する１つのＤＶＤ－Ｉｇを捕捉抗体として使用することができ、及び／又は分析物（又はその断片）上の第二のエピトープを結合することができるドメインを有する別のＤＶＤ－Ｉｇを検出抗体として使用することができる。これに関して、分析物（又はその断片）上の第一のエピトープを結合することができる第一のドメイン及び分析物（又はその断片）上の第二のエピトープを結合することができる第二のドメインを有するＤＶＤ－Ｉｇは捕捉抗体及び／又は検出抗体として使用することができる。あるいは、２つ又はそれ以上の分析物を検出し、必要に応じて定量するために、第一の分析物（又はその断片）上のエピトープを結合することができる第一のドメイン及び第二の分析物（又はその断片）上のエピトープを結合することができる第二のドメインを有する１つのＤＶＤ－Ｉｇを捕捉抗体及び／又は検出抗体として使用することができる。単量体形態及び二量体／多量体形態など、ホモ又はヘテロ形態（ｈｅｔｅｒｏｍｅｒｉｃ）であり得る２以上の形態で、分析物が試料中に存在し得る場合には、単量体形態上にのみ露出されているエピトープを結合することができるドメインを有する１つのＤＶＤ－Ｉｇ及び二量体／多量体形態の異なる部分上のエピトープを結合することができるドメインを有する別のＤＶＤ－Ｉｇを捕捉抗体及び／又は検出抗体として使用することができ、これにより、その分析物の異なる形態の検出及び必要に応じて定量が可能になる。さらに、単一のＤＶＤ－Ｉｇ内で及び／又はＤＶＤ－Ｉｇ間で異なる親和性を有するＤＶＤ－Ｉｇを使用することは、結合力の利点を与え得る。本明細書に記載されているイムノアッセイにおいて、ＤＶＤ－Ｉｇの構造内に１つ又はそれ以上のリンカーを取り込ませることが一般に有用であり得、又は所望され得る。存在する場合、最適には、リンカーは、内側ドメインによるあるエピトープの結合及び外側ドメインによる別のエピトープの結合を可能にするのに十分な長さと構造的柔軟性を有するリンカーとすべきである。この点に関して、ＤＶＤ－Ｉｇが２つの異なる分析物を結合することができ、及び一方の分析物が他方より大きい場合には、望ましくは、より大きな分析物は外側ドメインによって結合される。

【０３６６】
一般的に言えば、分析物（又はその断片）に関して検査されている試料（例えば、分析物を含有することが疑われている試料）は、少なくとも１つの捕捉抗体及び少なくとも１つの検出抗体（例えば、捕捉及び／又は検出抗体が複数の抗体を含む場合のように、第二の検出抗体又は第三の検出抗体又は連続した次数の抗体でさえあり得る。）と、同時に又は逐次に、任意の順序で接触させることができる。例えば、検査試料は、まず、少なくとも１つの捕捉抗体と接触させ、次いで（逐次に）少なくとも１つの検出抗体と接触させることができる。あるいは、検査試料は、まず、少なくとも１つの検出抗体と接触させ、次いで（逐次に）少なくとも１つの捕捉抗体と接触させることができる。さらに別の方法では、検査試料は、捕捉抗体及び検出抗体と同時に接触させることができる。

【０３６７】

サンドイッチアッセイフォーマットでは、分析物（又はその断片）を含有すると疑われている試料を、まず、第一の抗体／分析物複合体の形成を可能にする条件下で、少なくとも１つの第一の捕捉抗体と接触させる。２以上の捕捉抗体が使用される場合、２つ又はそれ以上の捕捉抗体を含む第一の捕捉抗体／分析物複合体が形成される。サンドイッチアッセイでは、抗体、すなわち、好ましくは、少なくとも１つの捕捉抗体は、検査試料中に予想される分析物（又はその断片）の最大量のモル濃度過剰量で使用される。例えば、抗体の約５μｇから約１ｍｇ／ｍＬ緩衝液（例えば、微粒子コーティング緩衝液）を使用することができる。

【０３６８】

１つの抗体のみによる結合が必要とされるので、しばしば、小さな分析物を測定するために使用される競合阻害イムノアッセイは逐次的な古典的フォーマットを含む。逐次的競合阻害イムノアッセイにおいて、目的の分析物に対する捕捉抗体は、マイクロタイタープレートのウェル又はその他の固体支持体上に被覆される。目的の分析物を含有する試料がウェルに添加される場合、目的の分析物は捕捉抗体に結合する。洗浄後、標識された（例えば、ビオチン又は西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ））分析物の既知量がウェルに添加される。シグナルを生成するために、酵素標識に対する基質が必要である。ＨＲＰに対する適切な基質の例は、３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン（ＴＭＢ）である。洗浄後、標識された分析物によって生成されたシグナルが測定され、シグナルは試料中の分析物の量に反比例する。古典的な競合阻害イムノアッセイでは、目的の分析物に対する抗体が固体支持体（例えば、マイクロタイタープレートのウェル）上に被覆される。しかしながら、逐次的競合阻害イムノアッセイと異なり、試料及び標識された分析物は同時にウェルに添加される。試料中の何れかの分析物が、捕捉抗体への結合に関して、標識された分析物と競合する。洗浄後、標識された分析物によって生成されたシグナルが測定され、シグナルは試料中の分析物の量に反比例する。

【０３６９】

必要に応じて、少なくとも１つの捕捉抗体（例えば、第一の捕捉抗体）と検査試料を接触させる前に、少なくとも１つの捕捉抗体を固体支持体に結合させることが可能であり、これは検査試料からの第一の抗体／分析物（又はその断片）複合体の分離を容易にする。捕捉抗体が結合される基材は、試料からの捕捉抗体－分析物複合体の分離を容易にするあらゆる適切な固体支持体又は固相であり得る。

【０３７０】

例には、マイクロタイタープレートなどのプレートのウェル、試験管、多孔性ゲル（例えば、シリカゲル、アガロース、デキストラン又はゼラチン）、ポリマー性フィルム（例えば、ポリアクリルアミド）、ビーズ（例えば、ポリスチレンビーズ又は磁気ビーズ）、フィルター／膜（例えば、ニトロセルロース又はナイロン）の細片、微粒子（例えば、ラテックス粒子、磁気化可能な微粒子（例えば、酸化第二鉄又は酸化クロムコア及びホモ又はヘテロポリマー性コート及び約１から１０ミクロンの半径を有する微粒子））が含まれる。基材は、抗原を結合するための適切な表面親和性及び検出抗体による接近を可能にするのに十分な多孔性を有する適切な多孔性材料を含み得る。一般に、微孔性材料が好ましいが、水和された状態のゼラチン性材料を使用することができる。好ましくは、このような多孔性基材は、約０．０１から約０．５ｍｍ、好ましくは約０．１ｍｍの厚さを有するシートの形態である。孔の大きさは大きく変動し得るが、好ましくは、孔の大きさは、約０．０２５から約１５ミクロン、より好ましくは、約０．１５から約１５ミクロンである。このような基材の表面は、基材への抗体の共有結合を引き起こす化学的プロセスによって活性化することができる。一般に疎水性の力を通じた吸着による、抗原又は抗体の基材への不可逆的な結合が生じる。あるいは、抗体を基材へ共有的に結合させるために化学的カップリング剤又は他の手段を使用することができる（但し、このような結合は、分析物に結合する抗体の能力を妨害しない。）。あるいは、抗体は、ストレプトアビジン（例えば、ＤＹＮＡＬ（Ｒ）Ｍａｇｎｅｔｉｃ　Ｂｅａｄｓ，Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，　Ｃａｒｌｓｂａｄ，　ＣＡ）又はビオチン（例えば、Ｐｏｗｅｒ－Ｂｉｎｄ™－ＳＡ－ＭＰス

トレプトアビジンによって被覆された微粒子（Ｓｅｒａｄｙｎ，　Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ，　ＩＮ）を用いて）で予め被覆されている微粒子又は抗種特異的モノクローナル抗体と結合させることができる。必要であれば、抗体上の様々な官能基との反応性を許容するために、基材を誘導体化することができる。このような誘導体化は、ある種のカップリング剤の使用を必要とし、その例には、無水マレイン酸、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド及び１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミドが含まれるが、これらに限定されない。所望であれば、それぞれが分析物に対して特異的である１つ又はそれ以上の捕捉試薬（抗体（又はその断片）など）を、（例えば、バイオチップ構成におけるように）異なる物理的な又は割り当て可能な位置において、固相に付着させることができる（例えば、米国特許第６，２２５，０４７号、国際特許公開ＷＯ９９／５１７７３、米国特許第６，３２９，２０９号；国際特許公開ＷＯ００／５６９３４及び米国特許第５，２４２，８２８号を参照）。捕捉試薬が固相支持体としての質量分析プローブに付着されている場合、プローブに結合された分析物の量は、レーザー脱離イオン化質量分析法によって検出することができる。あるいは、１つ又はそれ以上の捕捉試薬で誘導体化されており、それにより、単一の場所に分析物を捕捉する異なるビーズを単一のカラムに充填することができる（抗体によって誘導体化された、ビーズをベースとする技術、例えば、Ｌｕｍｉｎｅｘ（Ａｕｓｔｉｎ，ＴＸ）のｘＭＡＰ技術を参照）。

【０３７１】

分析物（又はその断片）に関してアッセイされている検査試料を少なくとも１つの捕捉抗体（例えば、第一の捕捉抗体）と接触させた後、第一の抗体（又は複数の抗体）－分析物（又はその断片）複合体の形成を可能にするために、混合物を温置する。温置は、約４．５から約１０．０のｐＨで、約２℃から約４５℃の温度で、少なくとも約１分から約１８時間、好ましくは約１から約２４分間、最も好ましくは約４から約１８分間実施され得る。本明細書に記載されているイムノアッセイは、１工程で（検査試料、少なくとも１つの捕捉抗体及び少なくとも１つの検出抗体が、反応容器へ逐次に又は同時に全て添加されることを意味する。）又は２工程、３工程などの２以上の工程で実施することができる。

【０３７２】

（第一の又は複数の）捕捉抗体／分析物（又はその断片）複合体の形成後、次いで、この複合体を、（第一の又は複数の）捕捉抗体／分析物（又はその断片）／第二の検出抗体複合体の形成を可能にする条件下で少なくとも１つの検出抗体と接触させる。明確にするために、「第二の」抗体（例えば、第二の検出抗体）という見出しが付いているが、実際には、捕捉及び／又は検出のために複数の抗体が使用される場合、少なくとも１つの検出抗体は、イムノアッセイにおいて使用される第二、第三、第四の抗体などであり得る。捕捉抗体／分析物（又はその断片）複合体を２以上の検出抗体と接触させる場合、（第一の又は複数の）捕捉抗体／分析物（又はその断片）／（複数の）検出抗体複合体が形成される。捕捉抗体（例えば、第一の捕捉抗体）と同様に、少なくとも１つの（例えば、第二の及びあらゆる以降の）検出抗体を捕捉抗体／分析物（又はその断片）複合体と接触させる場合、（第一の又は複数の）捕捉抗体／分析物（又はその断片）／（第二の又は複数の）検出抗体複合体の形成のために、上に記載されている条件と同様の条件下での温置の期間が必要とされる。好ましくは、少なくとも１つの検出抗体は検出可能な標識を含有する。検出可能な標識は、（第一の又は複数の）捕捉抗体／分析物（又はその断片）／（第二の又は複数の）検出抗体複合体の形成の前に、同時に又は後に、少なくとも１つの検出抗体（例えば、第二の検出抗体）に結合させることができる。本分野において公知のあらゆる検出可能な標識を使用することができる（Ｐｏｌａｋ　ａｎｄ　Ｖａｎ　Ｎｏｏｒｄｅｎ（１９９７）　ａｎｄ　Ｈａｕｇｌａｎｄ（１９９６）参考文献を含む、上記考察を参照）。

【０３７３】

検出可能な標識は、直接又はカップリング剤を通じて抗体に結合させることができる。使用可能なカップリング剤の例は、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯから市販されているＥＤＡＣ（１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カル

ボジイミド、塩酸塩）である。使用可能な他のカップリング剤が、本分野において公知である。抗体に検出可能な標識を結合させる方法は、本分野において公知である。さらに、ＣＰＳＰ－アクリジニウムエステル（すなわち、９－［Ｎ－トシル－Ｎ－（３－カルボキシプロピル）］－１０－（３－スルホプロピル）アクリジニウムカルボキサミド）又はＳＰＳＰ－アクリジニウムエステル（すなわち、Ｎ１０－（３－スルホプロピル）－Ｎ－（３－スルホプロピル）－アクリジニウム－９－カルボキサミドなど、検出可能な標識の抗体へのカップリングを容易にする末端基を既に含有する多くの検出可能な標識を購入し、又は合成することができる。

【０３７４】

（第一の又は複数の）捕捉抗体／分析物／（第二の又は複数の）検出抗体複合体は、標識の定量前に、検査試料の残りから分離することができるが、分離しなければならないわけではない。例えば、少なくとも１つの捕捉抗体（例えば、第一の捕捉抗体）をウェル又はビーズなどの固体支持体に結合させる場合、分離は、固体支持体との接触から（検査試料の）流体を除去することによって達成され得る。あるいは、少なくとも１つの第一の捕捉抗体が固体支持体に結合されている場合には、第一の（複数の）抗体／分析物／第二の（複数の）抗体複合体を形成させるために、少なくとも１つの第一の捕捉抗体を、分析物を含有する試料及び少なくとも１つの第二の検出抗体と同時に接触させた後、固体支持体との接触から流体（検査試料）を除去し得る。少なくとも１つの第一の捕捉抗体が固体支持体に結合されていない場合、標識の量の定量のために、（第一の又は複数の）捕捉抗体／分析物／（第二の又は複数の）検出抗体複合体を検査試料から除去する必要はない。

【０３７５】

標識された捕捉抗体／分析物／検出抗体複合体（例えば、第一の捕捉抗体／分析物／第二の検出抗体複合体）の形成後、本分野において公知の技術を用いて、複合体中の標識の量を定量する。例えば、酵素標識が使用される場合、標識された複合体は、発色などの定量可能な反応を与える標識に対する基質と反応させる。標識が放射性標識であれば、標識は、シンチレーションカウンターなどの適切な手段を用いて定量される。標識が蛍光標識である場合、１つの色の光（「励起波長」として知られる。）で標識を刺激し、刺激に応答して標識により発せられる別の色（「発光波長」として知られる。）を検出することによって、標識を定量する。標識が化学発光標識である場合、視覚的に又はルミノメータ、Ｘ線フィルム、高速写真フィルム、ＣＣＤカメラなどを使用することによって発せられた光を検出することによって、標識を定量する。複合体中の標識の量が定量されたら、既知の濃度の分析物又はその断片の系列希釈を用いて作製された標準曲線の使用によるなど、適切な手段によって、検査試料中の分析物又はその断片の濃度を測定する。分析物又はその断片の系列希釈を使用する以外に、標準曲線は、重量分析的に、質量分析によって及び本分野で公知の他の技術によって作製することができる。

【０３７６】

ＡＲＣＨＩＴＥＣＴ（Ｒ）分析装置を使用する化学発光微粒子アッセイでは、連結体希釈液のｐＨは約６．０＋／－０．２とすべきであり、微粒子コーティング緩衝液は概ね室温（すなわち、約１７から約２７℃）に維持すべきであり、微粒子コーティング緩衝液のｐＨは約６．５＋／－０．２とすべきであり、微粒子希釈液のｐＨは約７．８＋／－０．２とすべきである。固体は、好ましくは約０．２％未満、約０．１５％未満、約０．１４％未満、約０．１３％未満、約０．１２％未満又は約０．１１％未満など、約０．１０％などである。

【０３７７】

ＦＰＩＡは、競合的結合イムノアッセイの原理に基づく。蛍光標識された化合物は、線形的に偏光された光によって励起されると、その回転速度に反比例する偏光度を有する蛍光を発する。蛍光的に標識された追跡物質－抗体複合体が線形的に偏光された光によって励起されると、光が吸収される時点と光が発せられる時点の間に、蛍光色素の回転が抑制されるので、発せられた光は高度に偏光された状態を保つ。「遊離の」追跡物質化合物（すなわち、抗体に結合されていない化合物）が線形的に偏光された光によって励起される

と、その回転は、競合的結合イムノアッセイにおいて産生された対応する追跡物質－抗体連結体よりずっと速い。特殊な取り扱い及び廃棄を必要とする放射性物質が存在しないので、ＦＰＩＡはＲＩＡより有利である。さらに、ＦＰＩＡは、容易に及び迅速に実施することができる均質なアッセイである。

【０３７８】

上記に照らして、検査試料中の分析物（又はその断片）の存在、量又は濃度を測定する方法が提供される。この方法は、（ｉ）（ｉ’）抗体、分析物に結合することができる抗体の断片、分析物に結合することができる抗体の変形物、分析物に結合することができる抗体の変形物の断片及び分析物に結合することができるＤＶＤ－Ｉｇ（又はその断片、変形物若しくは変形物の断片）の少なくとも１つ及び（ｉｉ’）少なくとも１つの検出可能な標識を使用すること、並びに（ｉｉ）検査試料中の分析物（又はその断片）の存在、量又は濃度の直接的な又は間接的な指標としての検出可能な標識によって生成されたシグナルを、対照又は検量物質中の分析物（又はその断片）の存在、量又は濃度の直接的な又は間接的な指標として生成されたシグナルと比較することを含む、アッセイによって、分析物（又はその断片）に関して検査試料をアッセイすることを含む。検量物質は、検量物質の各々が分析物の濃度において他の検量物質と異なる一連の検量物質の一部であってよい。

【０３７９】

前記方法は、（ｉ）第一の特異的結合対／分析物（又はその断片）複合体を形成するために、抗体、分析物に結合することができる抗体の断片、分析物に結合することができる抗体の変形物、分析物に結合することができる抗体の変形物の断片及び分析物に結合することができるＤＶＤ－Ｉｇ（又はその断片、変形物若しくは変形物の断片）からなる群から選択される、分析物（又はその断片）に対する少なくとも１つの第一の特異的結合対と検査試料を接触させること、（ｉｉ）第一の特異的結合対／分析物（又はその断片）／第二の特異的結合対複合体を形成するために、検出可能に標識された抗分析物抗体、分析物に結合することができる抗分析物抗体の検出可能に標識された断片、分析物に結合することができる抗分析物抗体の検出可能に標識された変形物、分析物に結合することができる抗分析物抗体の変形物の検出可能に標識された断片及び検出可能に標識されたＤＶＤ－Ｉｇ（又はその断片、変形物若しくは変形物の断片）からなる群から選択される、分析物（又はその断片）に対する少なくとも１つの第二の特異的結合対と第一の特異的結合対／分析物（又はその断片）複合体を接触させること、並びに（ｉｉｉ）（ｉｉ）で形成された第一の特異的結合対／分析物（又はその断片）／第二の特異的結合対複合体中の検出可能な標識によって生成されるシグナルを検出又は測定することによって、検査試料中の分析物の存在、量又は濃度を測定することを含み得る。本明細書中に記載されているような、分析物（又はその断片）に対する少なくとも１つの第一の特異的結合対及び／又は分析物（又はその断片）に対する少なくとも１つの第二の特異的結合対がＤＶＤ－Ｉｇ（又はその断片、変形物若しくは変形物の断片）である方法は、好ましい場合があり得る。

【０３８０】

あるいは、前記方法は、抗体、分析物に結合することができる抗体の断片、分析物に結合することができる抗体の変形物、分析物に結合することができる抗体の変形物の断片及びＤＶＤ－Ｉｇ（又はその断片、変形物若しくは変形物の断片）からなる群から選択される、分析物（又はその断片）に対する少なくとも１つの第一の特異的結合対と検査試料を接触させること、並びに、同時に又は逐次に、何れかの順序で、少なくとも１つの第一の特異的結合対への結合に関して分析物（又はその断片）と競合することが可能であり及び検出可能に標識された分析物、第一の特異的結合対に結合することができる分析物の検出可能に標識された断片、第一の特異的結合対に結合することができる分析物の検出可能に標識された変形物及び第一の特異的結合対に結合することができる分析物の変形物の検出可能に標識された断片からなる群から選択される少なくとも１つの第二の特異的結合対と検査試料を接触させることを含み得る。検査試料中に存在する何れかの分析物（又はその断片）及び少なくとも１つの第二の特異的結合対は、互いに競合して、それぞれ、第一の

特異的結合対／分析物（又はその断片）複合体及び第一の特異的結合対／第二の特異的結合対複合体を形成する。前記方法は、（ｉｉ）で形成された第一の特異的結合対／第二の特異的結合対複合体中の検出可能な標識によって生成されたシグナルを検出又は測定することによって、検査試料中の分析物の存在、量又は濃度を測定することをさらに含み、第一の特異的結合対／第二の特異的結合対／第二の特異的結合対複合体中の検出可能な標識によって生成されるシグナルは、検査試料中の分析物の量又は濃度に反比例する。

【０３８１】

上記方法は、検査試料が得られた患者の治療的／予防的処置の有効性を診断し、予測し、又は評価することをさらに含み得る。前記方法が、検査試料が得られた患者の治療的／予防的処置の有効性を評価することをさらに含む場合には、前記方法は、有効性を向上させる必要に応じて、患者の治療的／予防的処置を修正することを場合によってさらに含む。前記方法は、自動化されたシステム又は半自動化されたシステムで使用するために適宜に改変され得る。

【０３８２】

アッセイ（及びそのためのキット）の方法に関して、市販の抗分析物抗体又は文献に記載されている抗分析物を作製するための方法を使用することが可能であり得る。様々な抗体の商業的な供給物には、Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｃ．（Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ，ＣＡ）、Ｇｅｎ Ｗａｙ Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）及びＲ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ（ＲＤＳ；Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ）が含まれるが、これらに限定されない。

【０３８３】

一般に、例えば、疾病又は疾病のリスクを検出するために、分析物又はその断片に関して検査試料をアッセイする際に得られた結果を評価するためのベンチマークとして、所定のレベルを使用することができる。一般に、このような比較を行う際には、分析物の存在、量又は濃度の、疾病、疾患若しくは症状の特定の段階若しくは評価項目との又は特定の臨床的徴候との結び付け又は関連付けができるような適切な条件下で、十分な回数、特定のアッセイを実施することによって、所定のレベルが得られる。典型的には、所定のレベルは、参照対象（又は対象の集団）のアッセイを用いて得られる。測定される分析物には、その断片、その分解産物及び／又はその酵素的切断産物が含まれ得る。

【０３８４】

特に、疾病の進行及び／又は治療をモニターするために使用される所定のレベルに関して、分析物又はその断片の量又は濃度は、「変化せず」、「好ましい」（又は「好ましく変化した」）又は「好ましくない」（又は「好ましくないように変化した」）であり得る。「上昇した」又は「増加した」は、典型的な若しくは正常なレベル若しくは範囲（例えば、所定のレベル）より高い、又は別の参照レベル若しくは範囲（例えば、より早い又はベースライン試料）より高い検査試料中の量又は濃度を表す。「低下した」又は「減少した」という用語は、典型的な若しくは正常なレベル若しくは範囲（例えば、所定のレベル）より低い、又は別の参照レベル若しくは範囲（例えば、より早い又はベースライン試料）より低い検査試料中の量又は濃度を表す。「変化した」という用語は、典型的な若しくは正常なレベル若しくは範囲（例えば、所定のレベル）に比べて又は別の参照レベル若しくは範囲（例えば、より早い又はベースライン試料）に比べて変化した（増加した又は減少した）試料中の量又は濃度を表す。

【０３８５】

分析物に対する典型的な又は正常なレベル又は範囲は、標準的な慣行に従って定義される。幾つかの事例における分析物のレベルは極めて低いので、典型的な若しくは正常なレベル若しくは範囲又は参照レベル若しくは範囲と比べて、実験誤差又は試料の変動によって説明できない何らかの正味の変化が存在するときには、いわゆる変化したレベル又は変化が起こったと考えることができる。従って、ある試料中で測定されたレベルは、いわゆる正常な対象から得られた類似の試料中で測定されたレベル又はレベルの範囲と比較される。この文脈において、「正常な対象」は、検出可能な疾病を持たない個体であり、例え

ば、「正常な」（時に、「対照」と称される。）患者又は集団は、それぞれ、例えば、検出可能な疾病を示さない患者又は集団である。さらに、分析物はヒト集団の大半に高いレベルで一般に見出されないことに鑑みれば、「正常な対象」は、分析物の大幅な検出可能な増加した又は上昇した量又は濃度を持たない個体と考えることができ、「正常な」（時に、「対照」と称される。）患者又は集団は、分析物の大幅な検出可能な増加した又は上昇した量又は濃度を示さない患者又は集団である。「見かけ上正常な対象」は、分析物が未だ評価されていない又は現在評価されている対象である。分析物が通常検出不能である（例えば、正常なレベルがゼロであり、又は正常集団の約２５から約７５パーセンタイルの範囲内にある）が、検査試料中には検出される場合に、及び正常なレベルより高いレベルで、分析物が検査試料中に存在する場合に、分析物のレベルは「上昇した」と言われる。従って、とりわけ、本開示は、特定の疾病、疾患又は症状を有する又は有するリスクがある対象に対してスクリーニングする方法を提供する。アッセイの方法は、他のマーカーのアッセイなども含み得る。

【０３８６】

従って、本明細書に記載されている方法は、対象が所定の疾病、疾患若しくは症状を有するかどうか、又はこれらを発症するリスクを有するかどうかを決定するために使用することもできる。具体的には、このような方法は、以下の工程を含み得る。

【０３８７】

（ａ）（例えば、本明細書に記載されている方法又は本分野で公知の方法を用いて）分析物（又はその断片）の、対象から得た検査試料中の濃度又は量を測定する工程；及び

（ｂ）工程（ａ）で測定された分析物（又はその断片）の濃度又は量を所定のレベルと比較し、工程（ａ）で測定された分析物の濃度又は量が所定のレベルに関して好ましければ、対象は所定の疾病、疾患若しくは症状を有しておらず、又はこれらに対するリスクを有していないと決定される工程。しかしながら、工程（ａ）において測定された分析物の濃度又は量が所定のレベルに関して好ましくなければ、対象は、所定の疾病、疾患若しくは症状を有しており、又はこれらに対するリスクを有していると決定される。

【０３８８】

さらに、対象中の疾病の進行をモニターする方法が本明細書中に提供される。最適には、前記方法は、

（ａ）対象から得られた検査試料中の分析物の濃度又は量を測定する工程；

（ｂ）前記対象から得られたより後の検査試料中の分析物の濃度又は量を測定する工程；及び

（ｃ）工程（ｂ）で測定された分析物の濃度又は量を工程（ａ）で測定された分析物の濃度又は量と比較し、工程（ａ）で測定された分析物の濃度又は量と比較したときに、工程（ｂ）で測定された濃度又は量が変化せず又は好ましくなければ、対象中の疾病は継続し、進行し、又は悪化したと決定される工程を含む。比較すると、工程（ａ）で測定された分析物の濃度又は量と比較したときに、工程（ｂ）で測定された分析物の濃度又は量が好ましければ、対象中の疾病は継続せず、後退し、又は改善したと決定される。

【０３８９】

必要に応じて、前記方法は、工程（ｂ）で測定された分析物の濃度又は量を、例えば、所定のレベルと比較することをさらに含む。さらに、必要に応じて、比較が工程（ｂ）で測定された分析物の濃度又は量が、例えば、所定のレベルに関して好ましくないように変化した場合、前記方法は、ある期間、１つ又はそれ以上の医薬組成物で対象を治療することを含む。

【０３９０】

さらに、前記方法は、１つ又はそれ以上の医薬組成物での治療を受けている対象中の治療をモニターするために使用することができる。具体的には、このような方法は、対象が１つ又はそれ以上の医薬組成物を投与される前に、第一の検査試料を対象から得ることを含む。次に、（例えば、本明細書に記載されている方法又は本分野で公知の方法を用いて）、対象から得られた第一の検査試料中の分析物の濃度又は量が測定される。分析物の濃

度又は量が測定された後に、分析物の濃度又は量は、次いで、所定のレベルと必要に応じて比較される。第一の検査試料中で測定された分析物の濃度又は量が所定のレベルより低ければ、対象は１つ又はそれ以上の医薬組成物で治療されない。しかしながら、第一の検査試料中で測定された分析物の濃度又は量が所定のレベルより高ければ、対象は、ある期間、１つ又はそれ以上の医薬組成物で治療される。１つ又はそれ以上の医薬組成物で対象が治療される期間は、当業者によって決定され得る（例えば、前記期間は、約７日から約２年間、好ましくは、約１４日から約１年であり得る。）。

【０３９１】

１つ又はそれ以上の医薬組成物での治療の期間中、次いで、第二の及びその後の検査試料が対象から得られる。検査試料の数及び前記検査試料が対象から得られる時は重要ではない。例えば、１つ又はそれ以上の医薬組成物が対象に最初に投与されてから７日後に、第二の検査試料を取得することができ、１つ又はそれ以上の医薬組成物が対象に最初に投与されてから２週後に、第三の検査試料を取得することができ、１つ又はそれ以上の医薬組成物が対象に最初に投与されてから３週後に、第四の検査試料を取得することができ、１つ又はそれ以上の医薬組成物が対象に最初に投与されてから４週後に、第五の検査試料を取得することができる。

【０３９２】

各第二の又はその後の検査試料が対象から取得された後、（例えば、本明細書に記載されている又は本分野において公知の方法を用いて）、第二の又はその後の検査試料中の分析物の濃度又は量を測定する。次いで、第二の及びその後の各検査試料中において測定された分析物の濃度又は量を、第一の検査試料（例えば、最初に、所定のレベルと任意に比較された検査試料）中で測定された分析物の濃度又は量と比較する。工程（ａ）で測定された分析物の濃度又は量と比較したときに、工程（ｃ）で測定された分析物の濃度又は量が好ましければ、対象中の疾病は継続せず、後退し、又は改善したと決定され、対象は工程（ｂ）の１つ又は医薬組成物の投与を継続すべきである。しかしながら、工程（ａ）において測定された分析物の濃度又は量と比較したときに、工程（ｃ）において測定された濃度又は量が変化せず、又は好ましくない場合には、対象中の疾病は継続し、進行し、又は悪化したと決定され、対象は、工程（ｂ）において対象に投与された１つ若しくはそれ以上の医薬組成物のより高い濃度で治療されるべきであり、又は対象は、工程（ｂ）において対象に投与された１つ若しくはそれ以上の医薬組成物とは異なる１つ若しくはそれ以上の医薬組成物で治療されるべきである。具体的には、対象の分析物のレベルを減少又は低下させるために以前に対象が服用した１つ又はそれ以上の医薬組成物とは異なる１つ又はそれ以上の医薬組成物で対象を治療することができる。

【０３９３】

一般に、反復検査が行われ得るアッセイ（例えば、疾病の進行及び／又は治療に対する応答をモニターする）に関しては、第二の又はそれ以降の検査試料は、第一の検査試料が対象から得られた後の時点のある期間に得られる。具体的には、対象から得られた第二の検査試料は、第一の検査試料が対象から得られた後の分、時間、日、週又は年に取得され得る。例えば、第二の検査試料は、第一の検査試料が対象から得られた約１分、約５分、約１０分、約１５分、約３０分、約４５分、約６０分、約２時間、約３時間、約４時間、約５時間、約６時間、約７時間、約８時間、約９時間、約１０時間、約１１時間、約１２時間、約１３時間、約１４時間、約１５時間、約１６時間、約１７時間、約１８時間、約１９時間、約２０時間、約２１時間、約２２時間、約２３時間、約２４時間、約２日、約３日、約４日、約５日、約６日、約７日、約２週、約３週、約４週、約５週、約６週、約７週、約８週、約９週、約１０週、約１１週、約１２週、約１３週、約１４週、約１５週、約１６週、約１７週、約１８週、約１９週、約２０週、約２１週、約２２週、約２３週、約２４週、約２５週、約２６週、約２７週、約２８週、約２９週、約３０週、約３１週、約３２週、約３３週、約３４週、約３５週、約３６週、約３７週、約３８週、約３９週、約４０週、約４１週、約４２週、約４３週、約４４週、約４５週、約４６週、約４７週、約４８週、約４９週、約５０週、約５１週、約５２週、約１．５年、約２年、約２．５

年、約３．０年、約３．５年、約４．０年、約４．５年、約５．０年、約５．５．年、約６．０年、約６．５年、約７．０年、約７．５年、約８．０年、約８．５年、約９．０年、約９．５年又は約１０．０年後の時点で対象から取得され得る。

【０３９４】

疾病の進行をモニターするために使用される場合、上記アッセイは急性症状に罹患している対象中の疾病の進行をモニターするために使用することができる。急性症状（救急救命症状）としても知られる。）は、急性の命に関わる疾病又は例えば、心血管系若しくは排泄系が関与する他の重大な医学的症状を表す。典型的には、救急救命症状は、病院を基本とする状況（緊急治療室、集中治療室、負傷センター又は他の緊急治療状況など（但し、これらに限定されない。））での急性の医学的介入又は救急隊若しくは他の現場を拠点とする医療職員による管理を必要とする症状を表す。救急救命症状に関しては、反復モニタリングは、より短い時間枠内で、すなわち、分、時間又は日に（例えば、約１分、約５分、約１０分、約１５分、約３０分、約４５分、約６０分、約２時間、約３時間、約４時間、約５時間、約６時間、約７時間、約８時間、約９時間、約１０時間、約１１時間、約１２時間、約１３時間、約１４時間、約１５時間、約１６時間、約１７時間、約１８時間、約１９時間、約２０時間、約２１時間、約２２時間、約２３時間、約２４時間、約２日、約３日、約４日、約５日、約６日又は約７日）一般に行われ、同様に、最初のアッセイは、より短い時間枠内で（例えば、疾病又は症状の開始の概ね分、時間又は日に）一般に行われる。

【０３９５】

アッセイは、慢性又は非急性症状に罹患している対象中の疾病の進行をモニターするために使用することもできる。非救急救命症状又は非急性症状は、急性の、命に関わる疾病又は、例えば、心血管系及び／若しくは排泄系が関与する他の重大な医学的症状以外の症状を表す。典型的には、非急性症状には、より長期の又は慢性の期間の症状が含まれる。非急性症状に関しては、反復モニタリングは、一般に、より長い時間枠で、例えば、時間、日、週、月又は年で（例えば約１時間、約２時間、約３時間、約４時間、約５時間、約６時間、約７時間、約８時間、約９時間、約１０時間、約１１時間、約１２時間、約１３時間、約１４時間、約１５時間、約１６時間、約１７時間、約１８時間、約１９時間、約２０時間、約２１時間、約２２時間、約２３時間、約２４時間、約２日、約３日、約４日、約５日、約６日、約７日、約２週、約３週、約４週、約５週、約６週、約７週、約８週、約９週、約１０週、約１１週、約１２週、約１３週、約１４週、約１５週、約１６週、約１７週、約１８週、約１９週、約２０週、約２１週、約２２週、約２３週、約２４週、約２５週、約２６週、約２７週、約２８週、約２９週、約３０週、約３１週、約３２週、約３３週、約３４週、約３５週、約３６週、約３７週、約３８週、約３９週、約４０週、約４１週、約４２週、約４３週、約４４週、約４５週、約４６週、約４７週、約４８週、約４９週、約５０週、約５１週、約５２週、約１．５年、約２年、約２．５年、約３．０年、約３．５年、約４．０年、約４．５年、約５．０年、約５．５年、約６．０年、約６．５年、約７．０年、約７．５年、約８．０年、約８．５年、約９．０年、約９．５年又は約１０．０年）に行われ、同様に、最初のアッセイは、より長い時間枠内で（例えば、疾病又は症状の開始の概ね分、時間、日、月又は年）一般に行われる。

【０３９６】

さらに、上記アッセイは、対象から得られた第一の検査試料を用いて実施することが可能であり、第一の検査試料は、尿、血清又は血漿などのある源から得られる。必要に応じて、次いで、上記アッセイは、対象から得られた第二の検査試料を用いて反復することが可能であり、第二の検査試料は別の源から得られる。例えば、第一の検査試料が尿から得られれば、第二の検査試料は血清又は血漿から得ることができる。第一の検査試料及び第二の検査試料を用いるアッセイから得られた結果を比較することができる。比較は、対象中の疾病又は症状の状況を評価するために使用することができる。

【０３９７】

さらに、本開示は、所定の疾病、疾患若しくは症状に対して素因を有する対象又は所定

の疾病、疾患若しくは症状に罹患している対象に治療が有益かどうかを測定する方法にも関する。特に、本開示は、分析物コンパニオン診断法及び製品に関する。従って、本明細書に記載されている「対象中の疾病の治療をモニターする」方法は、さらに、治療に対する候補を選択し又は同定することも最適に包含し得る。

【０３９８】

従って、特定の実施形態において、本開示は、所定の疾病、疾患若しくは症状を有する対象又は所定の疾病、疾患若しくは症状に対してリスクを有する対象が治療の候補であるかどうかを測定する方法も提供する。一般に、対象は、所定の疾病、疾患若しくは症状のある症候を経験した者又は所定の疾病、疾患若しくは症状を有し若しくは所定の疾病、疾患若しくは症状に対してリスクを有すると実際に診断された者及び／又は本明細書に記載されているように、分析物若しくはその断片の好ましくない濃度若しくは量を示す者である。

【０３９９】

前記方法は、１つ若しくはそれ以上の医薬組成物で（例えば、特に、分析物を伴う作用機序に関連する医薬で）、免疫抑制療法で若しくは免疫吸収療法によって、対象を治療する前及び後に分析物が評価され、又はこのような治療後に、分析物が評価され、及び分析物の濃度若しくは量が所定のレベルに対して比較される、本明細書に記載されているアッセイを含んでもよい。治療後に観察される分析物の好ましくない濃度又は量は、さらなる治療又は継続した治療を受けることが対象にとって有益でないことを確認するのに対して、治療後に観察される分析物の好ましい濃度又は量は、さらなる治療又は継続した治療を受けることが対象にとって有益であることを確認する。この確認は、臨床試験の管理及び改善された患者の世話の提供を補助する。

【０４００】

本明細書中のある実施形態は、本明細書に論述されている所定の疾病、疾患又は症状を評価するために使用された場合に有利であるが、他の疾病、疾患及び症状において分析物を評価するために、アッセイ及びキットを使用できることは言うまでもない。アッセイの方法は、他のマーカーのアッセイなども含み得る。

【０４０１】

アッセイの方法は、所定の疾病、疾患又は症状を軽減する化合物を同定するために使用することもできる。例えば、分析物を発現する細胞は、候補化合物と接触させることができる。化合物と接触された細胞中の分析物の発現のレベルは、本明細書に記載されているアッセイの方法を用いて、対照細胞中のレベルと比較することができる。

【０４０２】

ＩＩ．キット

検査試料中の分析物（又はその断片）の存在、量又は濃度に関して検査試料をアッセイするためのキットも提供される。キットは、分析物（又はその断片）に関して検査試料をアッセイするための少なくとも１つの成分及び分析物（又はその断片）に関して検査試料をアッセイするための指示書を含む。分析物（又はその断片）に関して検査試料をアッセイするための少なくとも１つの成分は、任意に固相上に固定化された抗分析物ＤＶＤ－Ｉｇ（又はその断片、変形物若しくは変形物の断片）を含む組成物を含み得る。

【０４０３】

キットは、イムノアッセイ（例えば、化学発光微粒子イムノアッセイ）によって、分析物に関して検査試料をアッセイするための少なくとも１つの成分及びイムノアッセイ（例えば、化学発光微粒子イムノアッセイ）によって、分析物に関して検査試料をアッセイするための指示書を含み得る。例えば、キットは、分析物に対する少なくとも１つの特異的結合対（抗分析物、モノクローナル／ポリクローナル抗体（又は分析物に結合することができるその断片、分析物に結合することができるその変形物若しくは分析物に結合することができる変形物の断片）又は抗分析物ＤＶＤ－Ｉｇ（又はその断片、変形物若しくは変形物の断片）など、これらの何れも検出可能に標識することができる。）を含むことができる。これに代えて又はこれに加えて、キットは、抗分析物モノクローナル／ポリクロー

ナル抗体（又は分析物に結合することができるその断片、分析物に結合することができるその変形物若しくは分析物に結合することができる変形物の断片）又は抗分析物ＤＶＤ－Ｉｇ（又はその断片、変形物若しくは変形物の断片）（これらの何れも、固体支持体上に固定化され得る。）への結合に関して、検査試料中の何れかの分析物と競合することができる、検出可能に標識された分析物（又は抗分析物モノクローナル／ポリクローナル抗体若しくは抗分析物ＤＶＤ－Ｉｇ（又はこれらの断片、変形物若しくは変形物の断片）に結合することができるその断片）を含み得る。キットは、検量物質又は対照（例えば、単離された又は精製された分析物）を含み得る。キットは、アッセイを実施するための少なくとも１つの容器（例えば、例えば第一の特異的結合対で既に被覆され得るチューブ、マイクロタイタープレート又は片）及び／又はアッセイ緩衝液若しくは洗浄緩衝液（これらの何れの１つも、濃縮された溶液、検出可能な標識（例えば、酵素標識）に対する基質溶液又は停止溶液として与えることができる。）などの緩衝液を含み得る。好ましくは、キットは、アッセイを実施するために必要である全ての成分、すなわち、試薬、標準物質、緩衝液、希釈剤などを含む。指示書は、紙の形態又はディスク、ＣＤ、ＤＶＤなどのコンピュータ読み取り可能な形態であり得る。

【０４０４】

抗分析物抗体又は抗分析物ＤＶＤ－Ｉｇなどのあらゆる抗体若しくは追跡物質は、蛍光色素、放射性部分、酵素、ビオチン／アビジン標識、発色原、化学発光標識などの本明細書に記載されている検出可能な標識を取り込むことができ、又はキットは、検出可能な標識を実施するための試薬を含むことができる。抗体、検量物質及び／又は対照は、別の容器中に与え、又は適切なアッセイフォーマット中に（例えば、マイクロタイタープレート中に）予め分配することができる。

【０４０５】

必要に応じて、キットは、品質管理成分（例えば、感度パネル、検量物質及び陽性対照）を含む。品質管理試薬の調製は本分野において周知であり、様々な免疫診断製品に対する同封シート上に記載されている。感度パネルの要素は、アッセイ性能特性を確立するために必要に応じて使用され、さらに、イムノアッセイキット試薬の完全性及びアッセイの標準化の有用な指標となる。

【０４０６】

キットは、診断アッセイを実施し、又は品質管理評価を容易にするために必要とされる他の試薬（緩衝液、塩、酵素、酵素補因子、酵素基質、検出試薬など）も必要に応じて含み得る。検査試料の単離及び／又は処理のための緩衝液及び溶液などの他の成分（例えば、前処理試薬）も、キット中に含めることができる。キットは、１つ又はそれ以上の他の対照をさらに含むことができる。キットの成分の１つ又はそれ以上は凍結乾燥させることが可能であり、この場合には、キットは、凍結乾燥された成分を再構成するのに適した試薬をさらに含むことができる。

【０４０７】

キットの様々な成分は、必要に応じて、適切な容器（例えば、マイクロタイタープレート）中に任意に提供される。キットは、試料を保持又は保存するための容器（例えば、尿試料用の容器又はカートリッジ）をさらに含むことができる。適切な場合には、キットは、反応容器、混合容器及び試薬又は検査試料の調製を容易にする他の成分も必要に応じて含有し得る。キットは、注射器、ピペット、鉗子、計量スプーンなどの、検査試料の取得を補助するための１つ又はそれ以上の器具も含み得る。

【０４０８】

検出可能な標識が少なくとも１つのアクリジニウム化合物である場合、キットは、少なくとも１つのアクリジニウム－９－カルボキサミド、少なくとも１つのアクリジニウム－９－カルボキシラートアリールエステル又はこれらのあらゆる組み合わせを含むことができる。検出可能な標識が少なくとも１つのアクリジニウム化合物である場合、キットは、緩衝液、溶液及び／又は少なくとも１つの塩基性溶液などの、過酸化水素源も含むことができる。所望であれば、キットは、磁気粒子、ビーズ、試験管、マイクロタイタープレー

ト、キュベット、膜、足場分子、フィルム、ろ紙、ディスク又はチップなどの固相を含有し得る。

【０４０９】

ＩＩＩ．キット及び方法の改変

キット（又はその成分）及びアッセイ（本明細書中に記載されているイムノアッセイなど）によって検査試料中の分析物の存在、量又は濃度を測定する方法は、例えば、米国特許第５，０８９，４２４号及び米国特許第５，００６，３０９号に記載されているように、並びに例えば、ＡＲＣＨＩＴＥＣＴ（Ｒ）としてＡｂｂｏｔｔ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（Ａｂｂｏｔｔ Ｐａｒｋ，ＩＬ）によって市販されているように、様々な自動化及び半自動化された系（固相が微粒子を含む系を含む。）で使用するために改変することができる。

【０４１０】

自動化されていない系（例えば、ＥＬＩＳＡ）と比べた自動化又は半自動化された系の差の幾つかには、第一の特異的結合対（例えば、抗分析物モノクローナル／ポリクローナル抗体（又はその断片、その変形物若しくはその変形物の断片）又は抗分析物ＤＶＤ－Ｉｇ（又はその断片、その変形物若しくはその変形物の断片）が付着されており、何れかの方式で、サンドイッチの形成及び分析物の反応性を充填することができる基材並びに捕捉、検出及び／又は任意に行われる何れかの洗浄工程の長さ及びタイミングが含まれる。ＥＬＩＳＡなどの自動化されていないフォーマットは、試料及び捕捉試薬との相対的により長い温置時間（例えば、約２時間）を必要とし得るのに対して、自動化された又は半自動化されたフォーマット（例えば、ＡＲＣＨＩＴＥＣＴ（Ｒ）、Ａｂｂｏｔｔ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）は、相対的により短い温置時間（例えば、ＡＲＣＨＩＴＥＣＴ（Ｒ）に関して、約１８分）を有し得る。同様に、ＥＬＩＳＡなどの自動化されていないフォーマットは、相対的により長い温置時間（例えば、約２時間）、連結体試薬などの検出抗体を温置し得るのに対して、自動化された又は半自動化されたフォーマット（例えば、ＡＲＣＨＩＴＥＣＴ（Ｒ））は、相対的により短い温置時間（例えば、ＡＲＣＨＩＴＥＣＴ（Ｒ）に関して、約４分）を有し得る。

【０４１１】

Ａｂｂｏｔｔ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓから入手可能な他のプラットフォームには、ＡｘＳＹＭ（Ｒ）、ＩＭｘ（Ｒ）（例えば、参照により、その全体が本明細書に組み込まれる米国特許第５，２９４，４０４号参照）、ＰＲＩＳＭ（Ｒ）、ＥＩＡ（ビーズ）及びＱｕａｎｔｕｍ（ＴＭ）ＩＩ並びに他のプラットフォームが含まれるが、これらに限定されない。さらに、アッセイ、キット及びキット成分は、他のフォーマット中で、例えば、電気化学的又は他の携帯式又は治療地点（ｐｏｉｎｔ－ｏｆ－ｃａｒｅ）アッセイ系上で使用することができる。本開示は、例えば、サンドイッチイムノアッセイを実施する市販のＡｂｂｏｔｔ Ｐｏｉｎｔ ｏｆ Ｃａｒｅ（ｉ－ＳＴＡＴ（Ｒ）、Ａｂｂｏｔｔ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）電気化学的イムノアッセイ系に対して適用することができる。イムノセンサー並びに使い捨て検査装置におけるその製造及び操作方法は、例えば、米国特許第５，０６３，０８１号、米国特許公開第２００３／０１７０８８１号、米国特許公開第２００４／００１８５７７号、米国特許公開第２００５／００５４０７８号及び米国特許公開第２００６／０１６０１６４号（これらは、該当箇所に関するその教示に関して、その全体が、参照により、本明細書に組み込まれる。）に記載されている。

【０４１２】

特に、Ｉ－ＳＴＡＴ（Ｒ）システムに対する分析物アッセイの改変に関しては、以下の構成が好ましい。微小作製されたシリコンチップは、金電流測定作用電流測定電極と銀－塩化銀参照電極の対を用いて製造される。作用電極の１つの上では、固定化された抗分析物モノクローナル／ポリクローナル抗体（又はその断片、その変形物若しくはその変形物の断片）又は抗分析物ＤＶＤ－Ｉｇ（又はその断片、その変形物若しくはその変形物の断片）を有するポリスチレンビーズ（０．２ｍｍ直径）が、電極上のパターン化されたポリビニルアルコールのポリマーコーティングへ接着される。このチップは、イムノアッセイ

に適した流体工学フォーマットを用いて、Ｉ－ＳＴＡＴ（Ｒ）カートリッジ中に組み立てられる。カートリッジの試料保持チャンバーの壁の一部の上には、抗分析物モノクローナル／ポリクローナル抗体（又は分析物を結合することができる、その断片、その変形物若しくはその変形物の断片）又は抗分析物ＤＶＤ－Ｉｇ（又は分析物を結合することができる、その断片、その変形物若しくはその変形物の断片）などの（これらの何れもが、検出可能に標識され得る。）分析物に対する特異的結合対を含む層が存在する。カートリッジの流体小袋内には、ｐ－アミノフェノールホスファートを含む水性試薬が存在する。

【０４１３】

動作時に、分析物を含有すると疑われる試料が検査カートリッジの保持チャンバーに添加され、カートリッジはＩ－ＳＴＡＴ（Ｒ）リーダー中に挿入される。分析物に対する特異的結合対を試料中に溶解させた後、カートリッジ内のポンプ要素がチップを含有する導管内に試料を押し出す。ここでは、サンドイッチの形成を促進するように、ポンプ要素が振動する。アッセイの最後から２番目の工程では、チップから試料を洗浄除去し、廃棄チャンバー中に入れるために、流体は小袋から導管の中に押し出される。アッセイの最後の工程では、アルカリホスファターゼ標識は、ｐ－アミノフェノールホスファートと反応してホスファート基を切断し、解離されたｐ－アミノフェノールを作用電極において電気化学的に酸化させる。測定された電流に基づいて、読み取り装置は、埋め込まれたアルゴリズム及び工場によって測定された検量曲線を用いて、試料中の分析物の量を計算することができる。

【０４１４】

さらに、本明細書に記載されている方法及びキットがイムノアッセイを実施するための他の試薬及び方法を必ず包含することは言うまでもない。例えば、本分野で公知であり、並びに／又は例えば、洗浄のために、連結体希釈液、微粒子希釈液として、及び／若しくは検量物質希釈液として使用するために容易に調製され若しくは最適化され得る様々な緩衝液が包含される。典型的な連結体希釈液は、ある種のキット（Ａｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ａｂｂｏｔｔ　Ｐａｒｋ，ＩＬ）中で使用され並びに２－（Ｎ－モルホリノ）エタンスルホン酸（ＭＥＳ）、塩、タンパク質遮断剤、抗微生物剤及び界面活性剤を含有するＡＲＣＨＩＴＥＣＴ（Ｒ）連結体希釈液である。典型的な検量物質希釈液は、ＭＥＳ、他の塩、タンパク質遮断剤及び抗微生物剤を含有する緩衝液を含む、ある種のキット（Ａｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ａｂｂｏｔｔ　Ｐａｒｋ，ＩＬ）で使用されるＡＲＣＨＩＴＥＣＴ（Ｒ）ヒト検量物質希釈液である。さらに、２００８年１２月３１日に出願された米国特許出願第６１／１４２，０４８号に記載されているように、改善されたシグナル生成は、例えば、シグナル増幅物質としてシグナル抗体に連結された核酸配列を用いて、Ｉ－Ｓｔａｔカートリッジフォーマットで取得され得る。

【０４１５】

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

【実施例】

【０４１６】

（実施例１）

ＤＶＤ－Ｉｇの設計、構築及び分析

（実施例１．１）

親抗体及びＤＶＤ－Ｉｇを同定及び性質決定するために使用されたアッセイ

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

【０４１７】

（実施例１．１．１）

親抗体及びＤＶＤ－Ｉｇのそれらの標的抗原に対する結合及び親和性を測定するために使用されたアッセイ

（実施例１．１．１Ａ）

直接結合ＥＬＩＳＡ

所望の標的抗原を結合する抗体に関してスクリーニングするための酵素結合免疫吸着検定法を以下のように行った。所望の標的抗原（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ）又は所望の標的抗原細胞外ドメイン／ＦＣ融合タンパク質（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ）又はリン酸緩衝化された生理的食塩水（１０×ＰＢＳ、Ａｂｂｏｔｔ　Ｂｉｏｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｃｅｎｔｅｒ，Ｍｅｄｉａ　Ｐｒｅｐ＃　ＭＰＳ－０７３，Ｗｏｒｃｅｓｔｅｒ，ＭＡ）中のモノクローナルマウス抗ポリヒスチジン抗体（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　＃　ＭＡＢ０５０，Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ）の１０μｇ／ｍＬの１００μＬ／ウェルで、４℃で一晩、Ｈｉｇｈ　ｂｉｎｄ　ＥＬＩＳＡプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ　Ｃｏｓｔａｒ　＃　３３６９，Ａｃｔｏｎ，ＭＡ）を被覆した。０．０２％Ｔｗｅｅｎ２０を含有するＰＢＳで、プレートを４回洗浄した。室温で１／２時間、３００μＬ／ウェルのブロッキング溶液（無脂肪ドライミルク粉末、様々な小売業者、ＰＢＳ中に２％になるように希釈）の添加によってプレートをブロッキングした。ブロッキングの後、０．０２％Ｔｗｅｅｎ２０を含有するＰＢＳで、プレートを４回洗浄した。

【０４１８】

あるいは、上記モノクローナルマウス抗ポリヒスチジン抗体で被覆されたＥＬＩＳＡプレートに、ヒスチジン（Ｈｉｓ）タグ付加された所望の標的抗原（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ）の１０μｇ／ｍＬの１００μＬ／ウェルを添加し、室温で１時間温置した。０．０２％Ｔｗｅｅｎ２０を含有するＰＢＳで、ウェルを４回洗浄した。

【０４１９】

上述のようにブロッキング溶液中に希釈された抗体又はＤＶＤ－Ｉｇ調製物１００μＬを、上述のように調製された、所望の標的抗原プレート又は所望の標的抗原／ＦＣ融合プレート又は抗ポリヒスチジン抗体／Ｈｉｓタグ付加された所望の標的抗原プレートに添加し、室温で１時間温置した。０．０２％Ｔｗｅｅｎ２０を含有するＰＢＳで、ウェルを４回洗浄する。

【０４２０】

所望の標的抗原プレート又は抗ポリヒスチジン抗体／ヒスチジンタグ付加された所望の標的抗原プレートの各ウェルに、ヤギ抗ヒトＩｇＧ－ＦＣ特異的ＨＲＰ連結抗体（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈ　＃　２０４０－０５，Ｂｉｒｍｉｎｇｈａｍ，ＡＬ）１０ｎｇ／ｍＬの１００μＬを添加した。あるいは、所望の標的抗原／ＦＣ融合プレートの各ウェルに、ヤギ抗ヒトＩｇＧκ軽鎖特異的ＨＲＰ連結抗体（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈ　＃　２０６０－０５Ｂｉｒｍｉｎｇｈａｍ，ＡＬ）１０ｎｇ／ｍＬの１００μＬを添加し、室温で１時間温置した。０．０２％Ｔｗｅｅｎ２０を含有するＰＢＳで、プレートを４回洗浄した。

【０４２１】

各ウェルに、強化されたＴＭＢ溶液１００μＬ（Ｎｅｏｇｅｎ　Ｃｏｒｐ．＃３０８１７７，Ｋ　Ｂｌｕｅ，Ｌｅｘｉｎｇｔｏｎ，ＫＹ）を添加し、室温で１０分間温置した。１Ｎ硫酸５０μＬの添加によって、反応を停止させた。４５０ｎｍの波長で、プレートを分光学的に読み取った。

【０４２２】

表３は、直接結合アッセイにおいて使用された抗原のリストを含む。

【０４２３】

表４は、直接結合ＥＬＩＳＡアッセイにおいて検査された抗体及びＤＶＤ－Ｉｇ構築物に対するｎＭでのＥＣ５０として表された結合データを含む。

【０４２４】

直接結合ＥＬＩＳＡでは、おそらく、プラスチック表面に被覆されたときに標的抗原上の抗体結合部位が「遮蔽され」又は抗原が「歪んでいる」ために、結合が時折観察されなかった。ＤＶＤ－Ｉｇがその標的を結合することができなかったのも、直接結合ＥＬＩＳＡフォーマットによってＤＶＤ－Ｉｇに対して課された立体的制約によるものであり得る。直接結合ＥＬＩＳＡフォーマットにおいて結合しなかった親抗体及びＤＶＤ－Ｉｇは、ＦＡＣＳ、Ｂｉａｃｏｒｅ又はバイオアッセイなどの他のＥＬＩＳＡフォーマットにおいて標的抗原に結合した。前に示されているように、ＤＶＤ－Ｉｇの２つの可変ドメイン間のリンカー長を調節することによって、ＤＶＤ－Ｉｇの非結合も回復された。

【０４２５】

【表３】

表 3: 直接結合ELISAにおいて使用された抗原

アッセイ	抗原	供給業者の表記	供給業者	カタログ番号
RGMa	RGM-A	Repulsive Guidence Molecule A	R&D	2459-RM
RAGE	RAGE	RAGE/FC Chimera	R&D	1145-RG
IL-18	IL-18	IL-18	MBL	B003-5
IGF1	IGF-1	IGF-I	R&D	291-G1
IGF2	IGF-2	IGF-II	R&D	292-G2
IL-1β	IL-1β	IL-1β	R&D	201-LB
TNFα	TNFα	TNFα/TNFSF1A	R&D	210-TA
EGFR	EGFR	EGF R/FC Chimera	R&D	1095-ER

/FC = Fc領域融合

【０４２６】

【表４】

表4: 親抗体及びDVD構築物の直接結合ELISA

親抗体又はDVD番号	N末端可変ドメイン	C末端可変ドメイン	直接結合ELISA N末端VD EC50 (nM)	直接結合ELISA C末端VD EC50 (nM)
AB017	TNF		0.44	
DVD223	Aβ(配列1)	TNF		8.59
DVD224	TNF	Aβ(配列1)	0.43	
AB032	IL-1b(配列1)		5.27	
DVD225	Aβ(配列1)	IL-1b(配列1)		3938.56
DVD226	IL-1b(配列1)	Aβ(配列1)	9.52	
AB010	IGF1,2		10.1, 2.93	
DVD229	Aβ(配列1)	IGF1,2		210.16, 130.87
DVD230	IGF1,2	Aβ(配列1)	4.84, 2.44	
AB058	IL-18 (配列1)		3.77	
DVD231	Aβ(配列1)	IL-18 (配列1)		50.62
DVD232	IL-18 (配列1)	Aβ(配列1)	0.68	
AB033	EGFR (配列1)		0.68	
DVD236	EGFR (配列1)	CD-20 (配列1)	0.49	
AB017	TNF		0.19	
AB033	EGFR (配列1)		0.63	
DVD289	TNF	EGFR (配列1)	0.32	3.65
DVD290	EGFR (配列1)	TNF	0.54	41.05
AB017	TNF		0.19	
AB059	RGMa		0.13	
DVD291	TNF	RGMa	0.17	0.98
DVD292	RGMa	TNF	2.16	775.32
AB060	RAGE (配列1)		1.69	
DVD293	RAGE (配列1)	Aβ(配列1)	7.32	
DVD294	Aβ(配列1)	RAGE (配列1)		1.53
AB060	RAGE (配列1)		0.64	
AB017	TNF		0.50	
DVD295	RAGE (配列1)	TNF	0.48	6.57
DVD296	TNF	RAGE (配列1)	0.33	1.05

【０４２７】

全てのＤＶＤ－Ｉｇ構築物の結合が維持され、親抗体の結合と同等であった。全てのＮ末端可変ドメインは、ＤＶＤ－Ｉｇ構築物ＤＶＤ２８９、ＤＶＤ２９１、ＤＶＤ２９４及びＤＶＤ２９６のＣ末端可変ドメインと同様に、親抗体と類似の高い親和性で結合した。

【０４２８】

（実施例１．１．１．Ｂ）

Ａβ１－４２ＥＬＩＳＡ

所望の標的抗原を結合する抗体に関してスクリーニングするために、ＥＬＩＳＡアッセイを以下のように行った。６℃で一晩、コーティング緩衝液中に希釈されたＡβ１－４２の１μｇ／ｍＬの１００μＬ／ウェルで、ＭａｘｉｓｏｒｂＮＵＮＣＩｍｍｕｎｏプレートを被覆した。０．０２％Ｔｗｅｅｎ２０を含有するＰＢＳで、プレートを３回洗浄した。ＥＬＩＳＡ（Ｒｏｃｈｅ）のためのブロッキング試薬を水１００ｍＬ中に溶解することによってブロッキング溶液を調製し、次いで、使用前に、さらに１：１０希釈した。室温で２時間、２６５μＬ／ウェルのブロッキング溶液の添加によって、プレートをブロッキングした。０．０２％Ｔｗｅｅｎ２０を含有するＰＢＳでのブロッキング後、プレートを

３回洗浄した。

【０４２９】

ＰＢＳＴ＋０．５％ＢＳＡ中に、１００ｎｇ／μＬになるように、抗体又はＤＶＤ－Ｉｇを希釈し、１；３で系列希釈した。抗体又はＤＶＤ－Ｉｇ調製物１００μＬをプレートに添加し、室温で２時間温置した。０．０２％Ｔｗｅｅｎ２０を含有するＰＢＳで、ウェルを３回洗浄した。

【０４３０】

プレートの各ウェルに、１：５０００希釈された抗ヒトＰＯＤの２００μＬを添加し、室温で１時間温置した。０．０２％Ｔｗｅｅｎ２０を含有するＰＢＳで、プレートを３回洗浄した。

【０４３１】

ＴＭＢ溶液１００μＬを各ウェルに添加し、１０分間温置した。１００ｍＭ酢酸ナトリウムｐＨ４．９の２０ｍＬをＴＭＢ溶液２００μＬ（Ｒｏｃｈｅ＃９２８１７０６０）及び３％$H_2O_2$２９．５μＬを混合することによって、ＴＭＢ溶液を調製した。１Ｎ硫酸５０μＬの添加によって、反応を停止した。４５０ｎｍの波長で、プレートを分光学的に読み取った。結果が、表５に示されている。

【０４３２】

【表５】

表5: 親抗体及びDVD構築物のAβ 1-42 ELISA

親抗体又はDVD番号	N末端可変ドメイン	C末端可変ドメイン	Aβ ELISA N末端VD EC50 (nM)	Aβ ELISA C末端VD EC50 (nM)
AB043	Aβ(配列1)		0.012	
DVD223	Aβ(配列1)	TNF	0.014	
DVD224	TNF	Aβ(配列1)		0.032
AB043	Aβ(配列1)		0.012	
DVD225	Aβ(配列1)	IL-1b(配列1)	0.016	
DVD226	IL-1b(配列1)	Aβ(配列1)		0.045
AB043	Aβ(配列1)		0.012	
DVD229	Aβ(配列1)	IGF1,2	0.016	
DVD230	IGF1,2	Aβ(配列1)		0.039
AB043	Aβ(配列1)		0.012	
DVD231	Aβ(配列1)	IL-18 (配列1)	0.014	
DVD232	IL-18 (配列1)	Aβ(配列1)		0.048
AB043	Aβ(配列1)		0.012	
DVD233	Aβ(配列1)	IL-6	0.013	
AB043	Aβ(配列1)		0.012	
DVD293	RAGE (配列1)	Aβ(配列1)		0.048
DVD294	Aβ(配列1)	RAGE (配列1)	0.014	
AB043	Aβ(配列1)		0.012	
DVD201	7C6	Aβ(配列1)		0.024
DVD202	Aβ(配列1)	7C6	0.017	

【０４３３】

全てのＤＶＤ構築物の結合が維持され、親抗体と同等であった。全てのＮ末端可変ドメインは、親抗体と類似の高い親和性で結合した。

【０４３４】

（実施例１．１．１．Ｃ）

Ａβ２０－４２ＥＬＩＳＡ

所望の標的抗原を結合する抗体に関してスクリーニングするために、ＥＬＩＳＡアッセイを以下のように行った。３７℃で１分間、Ａβ２０－４２グロブロマー及びＰＢＳを予

め加温した。４℃で一晩、ＰＢＳ中に希釈されたＡβ２０－４２グロブロマーの２μｇ／ｍＬの１００μＬ／ウェルで、Ｈｉｇｈ ｂｉｎｄ ＥＬＩＳＡプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ Ｃｏｓｔａｒ ＃３３６９，Ａｃｔｏｎ，ＭＡ）を被覆した。１００％ ｓｕｐｅｒｂｌｏｃｋＰＢＳ緩衝液（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，＃３７５１５）の３２０μＬ／ウェルで、プレートをブロックし、室温で４５分間温置した。０．０２％Ｔｗｅｅｎ２０を含有するＰＢＳでのブロッキング後、プレートを３回洗浄した。

【０４３５】

ＰＢＳ中の１０％ｓｕｐｅｒｂｌｏｃｋ中に、抗体又はＤＶＤ－Ｉｇを２０００ｎｇ／ｍＬ、１０００ｎｇ／ｍＬ、２００ｎｇ／ｍＬ、４０ｎｇ／ｍＬ、８ｎｇ／ｍＬ、１．６ｎｇ／ｍＬ及び０．３２ｎｇ／ｍＬになるように希釈した。抗体又はＤＶＤ－Ｉｇ調製物１００μＬをプレートに３つ組みで添加し、室温で２時間温置した。０．０２％Ｔｗｅｅｎ２０を含有するＰＢＳで、ウェルを５回洗浄した。

【０４３６】

プレートの各ウェルに、１：４０，０００希釈されたヤギ抗ヒトＨＲＰ連結抗体（Ｐｉｅｒｃｅ＃３１４１２）の１００μＬを添加し、室温で３０分間温置した。０．０２％Ｔｗｅｅｎ２０を含有するＰＢＳで、プレートを５回洗浄した。

【０４３７】

ＴＭＢ溶液（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ－Ｚｙｍｅｄ； ＃００－２０２３）１００μＬを各ウェルに添加し、５分間温置した。２Ｎ硫酸１００μＬの添加によって、反応を停止した。４５０ｎｍの波長で、プレートを分光学的に読み取った。結果が、表６に示されている。

【０４３８】

【表６】

表6: 親抗体及びDVD構築物のAβ 20-42 ELISA

親抗体又はDVD番号	N末端可変ドメイン	C末端可変ドメイン	Aβ ELISA N末端VD EC50 (nM)	Aβ ELISA C末端VD EC50 (nM)
AB044	Aβ(配列2)		0.319	
DVD201	Aβ(配列2)	Aβ(配列1)	0.397	
DVD202	Aβ(配列1)	Aβ(配列2)		0.178

【０４３９】

全てのＤＶＤ構築物の結合が維持され、親抗体と同等であった。

【０４４０】

（実施例１．１．１．Ｄ）

捕捉ＥＬＩＳＡ

抗ヒトＦｃ抗体（ＰＢＳ中５μｇ／ｍＬ、Ｊａｃｋｓｏｎ Ｉｍｍｕｎｏｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｗｅｓｔ Ｇｒｏｖｅ，ＰＡ）とともに、ＥＬＩＳＡプレート（Ｎｕｎｃ，ＭａｘｉＳｏｒｐ，Ｒｏｃｈｅｓｔｅｒ，ＮＹ）を４℃で一晩温置する。洗浄緩衝液（０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０を含有するＰＢＳ）中で、プレートを３回洗浄し、ブロッキング緩衝液（１％ＢＳＡを含有するＰＢＳ）中において、２５℃で１時間ブロッキングする。ウェルを３回洗浄し、０．１％ＢＳＡを含有するＰＢＳ中の各抗体又はＤＶＤ－Ｉｇの系列希釈をウェルに添加し、２５℃で１時間温置する。ウェルを３回洗浄し、ビオチン化された抗原（２ｎＭ）をプレートに添加し、２５℃で１時間温置する。ウェルを３回洗浄し、ストレプトアビジン－ＨＲＰ（ＫＰＬ ＃４７４－３０００，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，ＭＤ）とともに、２５℃で１時間温置する。ウェルを３回洗浄し、ウェル当りＵＬＴＲＡ－ＴＭＢＥＬＩＳＡ（Ｐｉｅｒｃｅ，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ）の１００μＬを添加する。呈色後、１ＮＨＣｌを用いて反応を停止させ、４５０ｎｍでの吸光度を測定する。結果が、表７に示されている。

【０４４１】
（実施例１．１．１．Ｅ）
ＢＩＡＣＯＲＥ技術を用いた親和性の測定
【０４４２】
【表７】

表7: Biacore技術を用いた親和性測定

アッセイ	抗原	供給業者の表記	供給業者	カタログ番号
	IL-1β	組み換えヒトIL-1β	R&D systems	201-LB
	TNFα	組み換えヒトTNF-α/TNFSF1A	R&D systems	210-TA
	EGFR	組み換えヒトEGF受容体	R&D systems	1095-ER

ECD = 細胞外ドメイン
/FC = 抗原/IgG FCドメイン融合タンパク質

【０４４３】
ＢＩＡＣＯＲＥ法：
ＢＩＡＣＯＲＥアッセイ（Ｂｉａｃｏｒｅ，Ｉｎｃ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＩ）は、ｏｎ速度及びｏｆｆ速度定数の速度論的測定を用いて、抗体又はＤＶＤ－Ｉｇの親和性を測定する。標的抗原（例えば、精製された組換え標的抗原）への抗体又はＤＶＤ－Ｉｇの結合は、２５℃で走行ＨＢＳ－ＥＰ（１０ｍＭＨＥＰＥＳ［ｐＨ７．４］、１５０ｍＭＮａＣｌ、３ｍＭＥＤＴＡ及び０．００５％界面活性剤Ｐ２０）を使用して、Ｂｉａｃｏｒｅ（Ｒ）１０００又は３０００装置（Ｂｉａｃｏｒｅ（Ｒ）ＡＢ，Ｕｐｐｓａｌａ，Ｓｗｅｄｅｎ）を用いる表面プラズモン共鳴を基礎とする測定によって測定される。全ての化学物質は、Ｂｉａｃｏｒｅ（Ｒ）ＡＢ（Ｕｐｐｓａｌａ，Ｓｗｅｄｅｎ）又は本文中に記載されている別の入手先から取得する。例えば、製造業者の指示書に従う標準的なアミンカップリングキット及び２５μｇ／ｍＬでの操作を用いて、ＣＭ５研究等級バイオセンサーチップを横切って、１０ｍＭ酢酸ナトリウム（ｐＨ４．５）中に希釈されたヤギ抗マウスＩｇＧ、（Ｆｃγ）断片特異的ポリクローナル抗体（Ｐｉｅｒｃｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｃ，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ）の約５０００ＲＵを直接固定化する。バイオセンサー表面上の未反応部分は、エタノールアミンでブロックする。フローセル２及び４中の修飾されたカルボキシメチルデキストラン表面は、反応表面として使用する。フローセル１及び３中のヤギ抗マウスＩｇＧなしの修飾されていないカルボキシメチルデキストランは参照表面として使用する。速度論的分析のために、Ｂｉａｅｖａｌｕａｔｉｏｎ４．０．１ソフトウェアを用いて、８つの注射全ての会合及び解離相へ、（グローバルフィット解析を用いて）１：１のＬａｎｇｍｕｉｒ結合モデルから誘導される速度方程式を同時にフィッティングさせる。ヤギ抗マウスＩｇＧ特異的な反応表面を横切る捕捉のために、ＨＥＰＥＳによって緩衝化された生理的食塩水中に、精製された抗体又はＤＶＤ－Ｉｇを希釈する。リガンド（２５μｇ／ｍＬ）として捕捉されるべき抗体又はＤＶＤ－Ｉｇを、５μＬ／分の流速で反応マトリックス上に注入する。２５μＬ／分の継続的な流速下で、会合及び解離速度定数k_{on}（$M^{-1}s^{-1}$）及びk_{off}（s^{-1}）を測定する。１０から２００ｎＭの範囲の異なる抗原濃度で速度論的結合測定を行うことによって、速度定数が導かれる。次いで、以下の式：$K_D = k_{off} / k_{on}$によって速度論的速度定数から抗体又はＤＶＤ－Ｉｇと標的抗原間での反応の平衡解離定数（Ｍ）を計算する。結合は、時間の関数として記録され、速度論的速度定数が計算される。このアッセイでは、最大$10^6 M^{-1} S^{-1}$の速さのオン速度及び最小$10^{-6} s^{-1}$までの遅さのオフ速度を測定することができる。結果が、表８に示されている。
【０４４４】

【表８】

表8: 親抗体及びDVD構築物のBIACORE分析

親抗体又は DVD-Ig番号	N末端 可変ドメイン (VD)	C末端 可変ドメイン (VD)	k_{on} (M-1s-1)	k_{off} (s-1)	K_D (M)
AB017	TNF		3.37E+06	9.57E-05	2.84E-11
DVD223		TNF	3.80E+04	1.04E-04	2.74E-09
DVD224	TNF		1.03E+06	8.60E-05	8.36E-11
AB017	TNF		3.37E+06	9.57E-05	2.84E-11
AB033	EGFR (配列1)		7.81E+05	1.30E-03	1.67E-09
DVD289	TNF		1.25E+06	8.82E-05	7.05E-11
DVD289		EGFR (配列1)	8.73E+04	6.77E-04	7.76E-09
DVD290	EGFR (配列1)		1.06E+06	1.31E-03	1.23E-09
DVD290		TNF	1.74E+06	1.45E-04	8.31E-11
AB017	TNF		3.37E+06	9.57E-05	2.84E-11
AB059	RGMA		9.52E+05	6.09E-04	6.40E-10
DVD291	TNF		1.74E+06	1.45E-04	8.31E-11
DVD291		RGMA	3.89E+04	5.04E-04	1.30E-08
DVD292	RGMA		1.72E+06	5.23E-04	3.04E-10
DVD292		TNF	5.66E+04	1.25E-04	2.21E-09
AB017	TNF		3.37E+06	9.57E-05	2.84E-11
DVD295		TNF	3.90E+05	1.04E-03	2.68E-09
DVD296	TNF		1.35E+06	7.40E-05	5.48E-11

【０４４５】

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

【０４４６】

（実施例１．１．２）

親抗体及びＤＶＤ－Ｉｇの機能的活性を測定するために使用されたアッセイ

（実施例１．１．２．Ａ）

サイトカインバイオアッセイ

抗サイトカイン又は抗成長因子配列を含有する抗サイトカイン又は抗成長因子親抗体又はＤＶＤ－Ｉｇが標的サイトカイン又は成長因子の生物活性を阻害又は中和する能力は、抗体又はＤＶＤ－Ｉｇの阻害能力を測定することによって分析される。例えば、抗ＩＬ－４抗体がＩＬ－４媒介性ＩｇＥ産生を阻害する能力が使用され得る。例えば、ヒトナイーブＢ細胞は、それぞれ、Ｆｉｃｏｌｌ－ｐａｑｕｅ密度遠心による軟膜、続いて、ヒトｓＩｇＤＦＩＴＣ標識されたヤギＦ（ａｂ）$_2$抗体に対して特異的なＭＡＣＳビーズ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ，Ｂｅｒｇｉｓｃｈ Ｇｌａｄｂａｃｈ，Ｇｅｒｍａｎｙ）、続いて、抗ＦＩＴＣＭＡＣＳビーズを用いる磁気分離によって、末梢血から単離される。3×10^5細胞／ｍＬになるように、磁気的に分別されたナイーブＢ細胞をＸＶ１５中に調整し、３７℃、５％CO_2存在下での培養の１０日の間に、ＰＢＳが充填されたウェルによって取り囲まれたプレートの中心に、６×６アレイで、９６ウェルプレートの１００μＬ／ウェル中に播種する。検査されるべき抗体当り、それぞれ非誘導及び誘導対照の３ウェルからなるそれぞれ１つのプレートを調製し、７μｇ／ｍＬから始まり、２９ｎｇ／ｍＬの最終濃度まで３倍希釈で行う抗体滴定の５つ組みの反復を、希釈前の４倍濃縮された５０μＬ中に添加する。ＩｇＥ産生を誘導するために、２０ｎｇ／ｍＬのｒｈＩＬ－４＋０．５μｇ／ｍＬの最終濃度の抗ＣＤ４０モノクローナル抗体（Ｎｏｖａｒｔｉｓ，Ｂａｓｅｌ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）をそれぞれ５０μＬで、各ウェルに添加し、標準的なサンドイッチＥＬＩＳＡ法によって、培養期間の終了時にＩｇＥ濃度を測定する。

【０４４７】
（実施例１．１．２．Ｂ）
サイトカイン放出アッセイ
親抗体又はＤＶＤ－Ｉｇがサイトカイン放出を引き起こす能力が分析される。ヘパリン処理されたｖａｃｕｔａｉｎｅｒ管の中に、静脈穿刺によって、３人の健康なドナーから末梢血を採取する。ＲＰＭＩ－１６４０培地で全血を１：５希釈し、０．５ｍＬ／ウェルで、２４ウェルの組織培養プレート中に配置する。抗サイトカイン抗体（例えば、抗ＩＬ－４）をＲＰＭＩ－１６４０中に希釈し、０．５ｍＬ／ウェルでプレート中に配置して、２００、１００、５０、１０及び１μｇ／ｍＬの最終濃度を得た。培養プレート中の全血の最終希釈は、１：１０である。サイトカイン放出に対する陽性対照として、２μｇ／ｍＬ及び５μｇ／ｍＬの最終濃度で、ＬＰＳ及びＰＨＡを別々のウェルに添加する。陰性対照抗体として、ポリクローナルヒトＩｇＧを使用する。実験は、２つ組みで行う。３７℃、５％CO_2でプレートを温置する。２４時間後、ウェルの内容物を試験管の中に移し、１２００ｒｐｍで５分間遠心する。無細胞上清を集め、サイトカインアッセイのために凍結する。プレート上及び管中に残った細胞を溶解溶液０．５ｍＬで溶解し、－２０℃に配置し、融解する。（容量を無細胞上清試料と同じレベルにするために）培地０．５ｍＬを添加し、細胞調製物を集め、サイトカインアッセイのために凍結する。ＥＬＩＳＡによって、サイトカインレベルに関して（例えば、ＩＬ－８、ＩＬ－６、ＩＬ－１β、ＩＬ－１ＲＡ又はＴＮＦ－αのレベルに関して）無細胞上清及び細胞可溶化液をアッセイする。
【０４４８】
（実施例１．１．２．Ｃ）
サイトカイン交叉反応性研究
目的のサイトカインに対して誘導された抗サイトカイン親抗体又はＤＶＤ－Ｉｇが他のサイトカインと交叉反応する能力を分析する。Ｂｉａｃｏｒｅバイオセンサーマトリックス上に、親抗体又はＤＶＤ－Ｉｇを固定化する。まず、１００ｍＭＮ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）及び４００ｍＭＮ－エチル－Ｎ’－（３－ジメチルアミノプロピル）－カルボジイミド塩酸塩（ＥＤＣ）でマトリックス上のカルボキシル基を活性化することによって、遊離のアミン基を介して、抗ヒトＦｃｍＡｂをデキストランマトリックスに共有結合させる。酢酸ナトリウムｐＨ４．５中に希釈された２５μｇ／ｍＬの濃度の各抗体又はＤＶＤ－Ｉｇ調製物の約５０μＬを、活性化されたバイオセンサーを横切って注入し、タンパク質上の遊離アミンを活性化されたカルボキシル基に直接結合させる。典型的には、５０００共鳴単位（ＲＵ）を固定化する。未反応のマトリックスＥＤＣ－エステルは、１Ｍエタノールアミンの注入によって不活化させる。標準的なアミンカップリングキットを用いてヒトＩｇＧ１／Ｋを固定化することによって、参照標準として第二のフローセルを調製する。ＣＭバイオセンサーチップを用いて、ＳＰＲ測定を行う。バイオセンサー表面上の分析すべき全ての抗原を、０．０１％Ｐ２０を含有するＨＢＳ－ＥＰ走行緩衝液中に希釈する。
【０４４９】
サイトカイン結合特異性を調べるために、抗サイトカイン親抗体又はＤＶＤ－Ｉｇが固定化されたバイオセンサー表面を横切って、過剰な目的のサイトカイン（１００ｎＭ、例えば、可溶性組換えヒト）を注入する（５分の接触時間）。目的のサイトカインの注入前及び直後に、ＨＢＳ－ＥＰ緩衝液のみが各フローセルを通過して流れる。最終的な結合値を表すために、ベースラインとサイトカイン注入完了から約３０秒後に対応する点との間のシグナルの正味の差を取る。再度、共鳴単位で応答を測定する。結合現象を観察する場合には、次の試料の注入前に、１０ｍＭＨＣｌを用いてバイオセンサーマトリックスを再生し、そうでなければ、マトリックス上に走行緩衝液を注入した。あらゆる非特異的結合のバックグラウンドを記録するために、固定化されたマウスＩｇＧ１／Ｋ参照表面上に、ヒトサイトカイン（例えば、ＩＬ－１α、ＩＬ－１β、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－８、ＩＬ－９、ＩＬ－１０、ＩＬ－１１、ＩＬ－１２、ＩＬ－１３、ＩＬ－１５、ＩＬ－１６、ＩＬ－１７、ＩＬ－１８、ＩＬ－１９、Ｉ

Ｌ－２０、ＩＬ－２２、ＩＬ－２３、ＩＬ－２７、ＴＮＦ－α、ＴＮＦ－β及びＩＦＮ－γ）も同時に注入する。参照及び反応表面を調製することによって、Ｂｉａｃｏｒｅは、屈折率の変化及び注入のノイズの大半を除去するために、反応表面のデータから参照表面のデータを自動的に差し引くことができる。従って、抗サイトカイン抗体又はＤＶＤ－Ｉｇ結合反応に起因する真の結合応答を確かめることができる。

【０４５０】

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

【０４５１】

（実施例１．１．２．Ｄ）

組織交叉反応性

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

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

【０４５２】

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

【０４５３】

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

【０４５４】

抗体又はＤＶＤ－Ｉｇを、ビオチン化された二次抗ヒトＩｇＧとともに温置し、免疫複合体を生成させた。抗体又はＤＶＤ－Ｉｇの２及び１０μｇ／ｍＬの最終濃度の免疫複合体を対物ガラス上の組織切片上に添加し、次いで、アビジン－ビオチン－ペルオキシダーゼキットと組織切片を３０分間反応させる。その後、組織染色のために、ペルオキシダーゼ反応に対する基質であるＤＡＢ（３，３’－ジアミノベンジジン）を４分間適用する。

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

【０４５５】

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

【０４５６】

（実施例１．１．２．Ｅ）

ＶＥＧＦ親抗体及びＤＶＤ－Ｉｇ構築物によるＨＵＶＥＣ増殖／生存の阻害

アッセイのために播種する前に、正常なヒト臍帯血管内皮細胞又はＨＵＶＥＣ（経代２から６）を、ＥＧＭ－２ＳｉｎｇｌｅＱｕｏｔｓ（Ｌｏｎｚａ－Ｃｌｏｎｅｔｉｃｓ，Ｗａｌｋｅｒｓｖｉｌｌｅ，ＭＤ，＃ＣＣ－４１７６）が補充されたＥＢＭ－２（Ｌｏｎｚａ－Ｃｌｏｎｅｔｉｃｓ，Ｗａｌｋｅｒｓｖｉｌｌｅ，ＭＤ）中に維持する。成長因子の不存在下で０．１％ＦＢＳを加えた（１００μＬの）ＥＭＢ－２中、コラーゲンが被覆された黒い９６ウェルプレート上に、１０，０００細胞／ウェルで、ＨＵＶＥＣ細胞を播種する。翌日、成長因子の不存在下で、培地を０．１％ＦＢＳと交換する。翌日、ＥＭＢ－２の１００μＬ（成長因子又は血清なし）と培地を交換し、ＶＥＧＦ及び抗体／ＤＶＤ－Ｉｇを添加する前に、４時間温置する。（６７ｎＭ、６．７ｎＭ及び０．６７ｎＭの最終濃度の）抗ＶＥＧＦモノクローナル抗体又はＤＶＤ－Ｉｇを、０．１％ＢＳＡを加えたＥＭＢ－２中に希釈し、組換えヒト$VEGF_{165}$（５０ｎｇ／ｍＬ）とともに、５０μＬ、２５℃で１時間、事前温置する。次いで、細胞（５０μＬ）に抗体／ＤＶＤ－Ｉｇ及びＶＥＧＦ混合物を添加し、加湿された５％CO_2雰囲気中において、７２時間、３７℃で、プレートを温置した。製造業者の指示書に従って、ＡＴＰｌｉｔｅキット（Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ）を用いてＡＴＰレベルを評価することによって、細胞の生存／増殖を間接的に測定する。

【０４５７】

（実施例１．１．２．Ｆ）

ＩＬ－１α／βバイオアッセイ及び中和アッセイ

１００μＬの容量で、１．５から2×10^4細胞／ウェルで、ＭＲＣ５細胞を播種し、３７℃、５％CO_2で一晩温置した。完全なＭＥＭ培地中に、抗体の２０μｇ／ｍＬ作業原液（４×濃縮された）を調製した。Ｍａｒｓｈ希釈プレート中の完全なＭＥＭ中で、８点の系列希釈を行った（５μｇ／ｍＬから０．０００３μｇ／ｍＬ）。９６ウェルのｖ底（Ｃｏｓｔａｒ＃３８９４）プレートに、各抗体希釈の６５μＬ／ウェルを４つ組みで添加し、ＩＬ－１α若しくはＩＬ－１βの２００ｐｇ／ｍＬ溶液の６５μＬ又はＩＬ－１α及びＩＬ－１βの両方の５０ｐｇ／ｍＬ溶液を含有する混合溶液の６５μＬも添加した。対照ウェルには、２００ｐｇ／ｍＬＩＬ－１α若しくはＩＬ－１β又は混合された５０ｐｇ／ｍＬＩＬ－１α／β（４倍濃縮）＋６５μＬＭＥＭ培地を与え、培地対照ウェルには、培地１３０μＬを与えた。１時間の温置後、ＭＲＣ５細胞に、Ａｂ／Ａｇ混合物１００μＬを添加した。全てのウェル容積は、２００μＬに等しかった。次いで、全てのプレート試薬は１×濃縮した。１６から２０時間の温置後、９６ウェルの丸底プレート（Ｃｏｓｔａｒ＃３７９９）中に、ウェル内容物（１５０μＬ）を移し、－２０℃の凍結装置中に配置した。ヒトＩＬ－８ＥＬＩＳＡキット（Ｒ＆ＤＳｙｓｔｅｍｓ，Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ）又はｈＩＬ－８化学発光キット（ＭＤＳ）を使用することによって、ｈＩＬ－８レベルに関して、上清を検査した。ＩＬ－１α、ＩＬ－１β又はＩＬ－１α／β単独

の対照値に対する％阻害を計算することによって、中和能力を測定した。結果が、表９に示されている。

【０４５８】

【表９】

表 9: IL-1β親抗体及びDVD-Ig構築物を用いたIL-1β中和アッセイ

親抗体又は DVD-Ig番号	N末端 可変ドメイン (VD)	C末端 可変ドメイン (VD)	N末端 VD IL-1β 中和アッセイ EC50 nM	C末端 VD IL-1β 中和アッセイ EC50 nM
AB032	IL-1β		0.05	
DVD225	Aβ(配列1)	IL-1β		12.74
DVD226	IL-1β	Aβ(配列1)	0.028	

【０４５９】

Ｎ末端又はＣ末端位置の何れかの中にＡＢ０３２由来のＶＤを含有する全てのＤＶＤ－Ｉｇは、ＭＲＣ５ＩＬ－１α／β中和アッセイにおいて中和を示した。

【０４６０】

（実施例１．１．２．Ｇ）

ｈｕＴＮＦαの中和

半集密状態の密度まで、Ｌ９２９細胞を増殖させ、０．０５％トリプシン（Ｇｉｂｃｏ＃２５３００）を用いて採集した。ＰＢＳで細胞を洗浄し、計数し、４μｇ／ｍＬのアクチノマイシンＤを含有するアッセイ培地中に、１Ｅ６細胞／ｍＬで、再懸濁した。５０μＬの容量及び５Ｅ４細胞／ウェルで、９６ウェルプレート（Ｃｏｓｔａｒ＃３５９９）中に細胞を播種した。アッセイ培地中に、４倍濃度になるように、ＤＶＤ－Ｉｇ^{TM}及び対照ＩｇＧを希釈し、１：３系列希釈を行った。アッセイ培地中に、４００ｐｇ／ｍＬになるように、ｈｕＴＮＦαを希釈した。１：２の希釈スキームで、抗体試料（２００μＬ）をｈｕＴＮＦα（２００μＬ）に添加し、室温で０．５時間、温置した。

【０４６１】

１００ｐｇ／ｍＬｈｕＴＮＦα及び２５ｎＭから０．０００１４ｎＭＤＶＤ－Ｉｇ^{TM}の最終濃度にするために、１００μＬで、ＤＶＤ－Ｉｇ^{TM}／ｈｕＴＮＦα溶液を播種された細胞に添加した。３７℃、５％CO_2で、２０時間、プレートを温置した。生存率を定量するために、ウェルから１００μＬを取り除き、ＷＳＴ－Ｉ試薬（Ｒｏｃｈｅｃａｔ＃１１６４４８０７００１）１０μＬを添加した。アッセイ条件下で、プレートを３．５時間温置し、５００×ｇで遠心し、ＥＬＩＳＡプレート（Ｃｏｓｔａｒｃａｔ＃３３６９）に上清７５μＬを移した。Ｓｐｅｃｔｒｏｍａｘ１９０ＥＬＩＳＡプレート読取装置上において、ＯＤ４２０から６００ｎｍでプレートを読み取った。結果が、表１０に示されている。

【０４６２】

【表１０】

表10: hu-TNFα親抗体及びDVD-Ig構築物を用いたhuTNFα中和アッセイ

親抗体又はDVD-Ig番号	N末端可変ドメイン(VD)	C末端可変ドメイン(VD)	N末端VD TNFα中和アッセイ EC50 nM	C末端VD TNFα中和アッセイ EC50 nM
AB017	TNF		0.077	
DVD224	TNF	Aβ(配列1)	0.142	
DVD291	TNF	RGMa	0.248	
DVD295	RAGE	TNF		0.841
DVD296	TNF	RAGE	0.158	
DVD289	TNF	EGFR(配列1)	0.122	

【０４６３】

Ｎ末端又はＣ末端位置の何れかの中にＡＢ０１７由来のＶＤを含有する全てのＤＶＤ－Ｉｇは、ＴＮＦα中和アッセイにおいて中和を示した。

【０４６４】

（実施例１．１．２．Ｈ）

ＩＬ－６によって誘導されるｐＳＴＡＴ３アッセイ

２ｍＭｌ－グルタミン、１０ｍＭＨＥＰＥＳ、１００μＬ／ｍＬペニシリン／ストレプトマイシン、１．５ｇ／Ｌ炭酸水素ナトリウム、４．５ｇ／Ｌグルコース、１ｍＭピルビン酸ナトリウム、１０％ＦＢＳ及び２ｎｇ／ｍＬＧＭ－ＣＳＦを加えたＤＭＥＭ中で、ＴＦ－１細胞を培養する。１０μＬの容量で、１．５から２×１０^{5}細胞／ウェルで、ＴＦ－１細胞を播種し、アッセイ培地（ＧＭ－ＣＳＦを除いた完全なＤＭＥＭ）中で、３７℃、５％CO_2で一晩温置する。９６$_{1/2}$ウェル白色アッセイプレート中に、細胞を播種する。ＰＢＳ中に、抗体の５００μｇ／ｍＬ作業原液（４×濃縮）を調製する。Ｍａｒｓｈ希釈プレート中のアッセイ培地中に、抗体及びＤＶＤ－Ｉｇを１：５系列希釈する。細胞を含有する９６$_{1/2}$ウェル白色アッセイプレートに、各抗体希釈の５μＬ／ウェルを３つ組みで添加する。氷上で、３０分間、細胞及び抗体又はＤＶＤ－Ｉｇを事前温置する。内毒素を含まないＤ－ＰＢＳ（０．１％ＢＳＡ）中に、１０μｇ／ｍＬ原液で、ＩＬ－６を調製し、アッセイ培地を用いて１００ｎｇ／ｍＬ（４倍濃縮）の作業原液を調製する。１００ｎｇ／ｍＬのＩＬ－６の５μＬ／ウェルを各ウェルに添加する。プレートを３７℃で３０分間温置する。５×細胞溶解緩衝液５μＬを全てのウェルに添加することによって、細胞を溶解し、室温で１０分間、プレートを振盪する。－２０℃でプレートを凍結し、ｐＳＴＡＴ３ＳｕｒｅＦｉｒｅＡｓｓａｙを実施した（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）。

【０４６５】

室温でプレートを融解し、Ａｌｐｈａ　Ｓｃｒｅｅｎ　Ａｃｃｅｐｔｏｒ　Ｂｅｅｄｓを含有する反応緩衝液＋活性化緩衝液ミックス（反応緩衝液４０部、活性化緩衝液１０部及びアクセプタービーズ１部）の３０μＬ／ウェルを各ウェルに添加する。光から保護するために、プレートをホイルで密封し、３７℃で２時間穏やかに撹拌する。Ａｌｐｈａ　Ｓｃｒｅｅｎ　Ｄｏｎｏｒビーズを含有する希釈緩衝液（１２．５μＬ／ウェル）（ドナービーズ１部に対して希釈緩衝液２０部）を各ウェルに添加する。プレートをホイルで密封し、３７℃で２時間穏やかに撹拌する。プレートを室温にし、ＡｌｐｈａＳｃｒｅｅｎプレート読取装置上で読み取る。

【０４６６】

（実施例１．１．２．Ｉ）

インビトロでの腫瘍受容体モノクローナル抗体又はＤＶＤ－Ｉｇの増殖阻害効果

Ｄ－ＰＢＳ－ＢＳＡ（０．１％ＢＳＡを加えたダルベッコのリン酸緩衝化された生理的食塩水）２０μＬ中に希釈された腫瘍受容体モノクローナル抗体又はＤＶＤ－Ｉｇを、１８０μＬ中、０．０１μｇ／ｍＬから１００μｇ／ｍＬの最終濃度のヒト腫瘍細胞に添加する。３７℃で、加湿された５％CO_2雰囲気中において、３日間、プレートを温置する。腫瘍増殖阻害の％を測定するために、製造業者の指示書（Ｐｒｏｍｅｇａ，　Ｍａｄｉｓｏｎ，　ＷＩ）に従って、ＭＴＳ試薬を用いて、各ウェル中の生きた細胞の数を定量する。抗体処理なしのウェルは０％阻害の対照として使用されるのに対して、細胞なしのウェルは１００％阻害を示すと考えられる。

【０４６７】

（実施例１．１．２．Ｊ）

インビトロでの親又はＤＶＤ－Ｉｇ抗体の殺腫瘍効果

腫瘍細胞上の標的抗原に結合する親抗体又はＤＶＤ－Ｉｇは、殺腫瘍活性に関して分析され得る。簡潔に述べると、Ｄ－ＰＢＳ－ＢＳＡ（０．１％ＢＳＡを加えたダルベッコのリン酸緩衝化された生理的食塩水）中に親抗体又はＤＶＤ－Ｉｇを希釈し、２００μＬ中、０．０１μｇ／ｍＬから１００μｇ／ｍＬの最終濃度のヒト腫瘍細胞に添加する。３７℃で、加湿された５％CO_2雰囲気中において、３日間、プレートを温置する。腫瘍増殖阻害の％を測定するために、製造業者の指示書（Ｐｒｏｍｅｇａ，　Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）に従って、ＭＴＳ試薬を用いて、各ウェル中の生きた細胞の数を定量する。抗体処理なしのウェルは０％阻害の対照として使用されるのに対して、細胞なしのウェルは１００％阻害を示すと考えた。

【０４６８】

アポトーシスを評価するために、以下のプロトコールによって、カスパーゼ－３の活性化を測定する。室温で振盪しながら、２０分間、９６ウェルプレート中の抗体処理された細胞を１×溶解緩衝液１２０μＬ（１．６７ｍＭＨｅｐｅｓ、ｐＨ７．４、７ｍＭＫＣｌ、０．８３ｍＭ$MgCl_2$、０．１１ｍＭＥＤＴＡ、０．１１ｍＭＥＧＴＡ、０．５７％ＣＨＡＰＳ、１ｍＭＤＴＴ、１×プロテアーゼ阻害剤カクテル錠；無ＥＤＴＡ；ＲｏｃｈｅＰｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ，Ｎｕｔｌｅｙ，ＮＪ）中に溶解する。細胞溶解後、カスパーゼ－３反応緩衝液（４８ｍＭＨｅｐｅｓ、ｐＨ７．５、２５２ｍＭショ糖、０．１％ＣＨＡＰＳ、４ｍＭＤＴＴ及び２０μＭＡｃ－ＤＥＶＤ－ＡＭＣ基質；ＢｉｏｍｏｌＲｅｓｅａｒｃｈＬａｂｓ、Ｉｎｃ．、ＰｌｙｍｏｕｔｈＭｅｅｔｉｎｇ、ＰＡ）８０μＬを添加し、３７℃で２時間、プレートを温置する。以下の設定：励起＝３６０／４０、発光＝４６０／４０を用いて、１４２０ＶＩＣＴＯＲ　Ｍｕｌｔｉｌａｂｅｌ　Ｃｏｕｎｔｅｒ（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，　Ｄｏｗｎｅｒｓ　Ｇｒｏｖｅ，　ＩＬ）上でプレートを読み取る。イソタイプ抗体対照処理された細胞と比較した抗体処理細胞からの蛍光単位の増加がアポトーシスの指標である。

【０４６９】

（実施例１．１．２．Ｋ）

親抗体及びＤＶＤ－Ｉｇ構築物による細胞増殖の阻害

５％ウシ胎児血清が補充されたＲＰＭＩ培地中、９６ウェルの皿に、１００μＬ中、２，０００細胞／ウェルでＵ８７－ＭＧヒト神経膠腫瘍細胞を播種し、３７℃、５％CO_2で一晩温置する。翌日、抗体又はＤＶＤ－Ｉｇ（０．０１３ｎＭから１３３ｎＭの用量範囲）の系列希釈で細胞を処理し、３７℃で、加湿された５％CO_2雰囲気中において、５日間温置する。製造業者の指示書に従って、ＡＴＰｌｉｔｅキット（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ，　Ｗａｌｔｈａｍ，　ＭＡ）を用いてＡＴＰレベルを評価することによって、細胞の生存／増殖を間接的に測定する。

【０４７０】

（実施例１．１．２．Ｌ）

ＶＥＧＦ親抗体及びＤＶＤ－Ｉｇ構築物は、$VEGF_{165}$のＶＥＧＦＲ１との相互作用を抑制する

組換えＶＥＧＦＲ１細胞外ドメイン－Ｆｃ融合タンパク質（５μｇ／ｍｌ，　Ｒ＆Ｄ

ｓｙｓｔｅｍｓ，　Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，　ＭＮ）を含有するＰＢＳ１００μＬとともに、ＥＬＩＳＡプレート（Ｎｕｎｃ，　ＭａｘｉＳｏｒｐ，　Ｒｏｃｈｅｓｔｅｒ，　ＮＹ）を４℃で一晩温置する。洗浄緩衝液（０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０を含有するＰＢＳ）中で、プレートを３回洗浄し、ブロッキング緩衝液（１％ＢＳＡを含有するＰＢＳ）中において、２５℃で１時間ブロッキングする。０．１％ＢＳＡを含有するＰＢＳ中の各抗体／ＤＶＤ－Ｉｇの系列希釈物を、２５℃で１時間、２ｎＭのビオチン化されたＶＥＧＦの５０μＬとともに温置する。次いで、抗体／ＤＶＤ－Ｉｇ－ビオチン化ＶＥＧＦ混合物（１００μＬ）をＶＥＧＦＲ１－Ｆｃ被覆されたウェルに添加し、２５℃で１０分間温置する。ウェルを３回洗浄し、次いで、ストレプトアビジン－ＨＲＰ（ＫＰＬ＃４７４－３０００，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，ＭＤ）１００μＬとともに、２５℃で１時間温置する。ウェルを３回洗浄し、ウェル当りＵＬＴＲＡ－ＴＭＢＥＬＩＳＡ（Ｐｉｅｒｃｅ，　Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，　ＩＬ）の１００μＬを添加する。呈色後、１ＮＨＣｌを用いて反応を停止させ、４５０ｎｍでの吸光度を測定する。

【０４７１】

（実施例１．１．２．Ｍ）

インビトロでの親抗体又はＤＶＤ－Ｉｇ構築物による受容体リン酸化の阻害

無血清培地（ＤＭＥＭ＋０．１％ＢＳＡ）１８０μＬ中に、４０，０００細胞／ウェルで、９６ウェルプレート中に、ヒト癌腫細胞を播種し、３７℃、５％CO_2で一晩温置する。受容体捕捉抗体（４μｇ／ｍＬの最終濃度）の１００μＬ／ウェルで、ＣｏｓｔａｒＥＩＡプレート（Ｌｏｗｅｌｌ，ＭＡ）を被覆し、振盪しながら、室温で一晩温置する。翌日、受容体抗体で被覆されたＥＬＩＳＡプレートを洗浄し（ＰＢＳＴ＝ＰＢＳ、ｐＨ７．２から７．４中の０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０で３回）、振盪装置上にて、室温で２時間、ブロッキングするために、ブロッキング溶液２００μＬ（ＰＢＳ、ｐＨ７．２から７．４中の１％ＢＳＡ、０．０５％NaN_3）を添加する。ヒト腫瘍細胞を、抗体又はＤＶＤ－Ｉｇ及びリガンドと同時に温置した。Ｄ－ＰＢＳ－ＢＳＡ（０．１％ＢＳＡを加えたダルベッコのリン酸緩衝化された生理的食塩水）中に希釈されたモノクローナル抗体又はＤＶＤ－Ｉｇを、０．０１μｇ／ｍＬから１００μｇ／ｍＬの最終濃度のヒト癌腫細胞に添加する。１から１００ｎｇ／ｍＬの濃度で（２００μＬ）、成長因子を細胞に同時に添加し、３７℃で、加湿された５％CO_2雰囲気において、細胞を１時間温置する。冷細胞抽出緩衝液（１０ｍＭＴｒｉｓ、ｐＨ７．４、１００ｍＭＮａＣｌ、１ｍＭＥＤＴＡ、１ｍＭＥＧＴＡ、１ｍＭＮａＦ、１ｍＭオルトバナジン酸ナトリウム、１％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００、１０％グリセロール、０．１％ＳＤＳ及びプロテアーゼ阻害剤カクテル）１２０μＬ／ウェル中に細胞を溶解し、振盪しながら、４℃で２０分間温置する。ＥＬＩＳＡプレートに、細胞可溶化液（１００μＬ）を添加し、穏やかに振盪しながら、４℃で一晩温置する。翌日、ＥＬＩＳＡプレートを洗浄し、ｐＴｙｒ－ＨＲＰ検出Ａｂの１００μＬ／ウェルを添加し（ｐ－ＩＧＦ１Ｒ　ＥＬＩＳＡキット、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍ　＃　ＤＹＣ１７７０，Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ）、暗所にて、２５℃で２時間、プレートを温置する。製造業者の指示書に従って、リン酸化を測定するために、プレートを呈色させる。

【０４７２】

（実施例１．１．２．Ｎ）

ＶＥＧＦ親抗体及びＤＶＤ－Ｉｇ構築物によるＶＥＧＦＲ２（ＫＤＲ）リン酸化の阻害

１０％ＦＢＳが補充されたＤＭＥＭ中、９６ウェルプレート中に、２０，０００細胞／ウェル（１００μＬ）で、ヒトＶＥＧＦＲ２（ＫＤＲ）を発現するＮＩＨ３Ｔ３細胞を播種する。翌日、ＤＭＥＭで細胞を２回洗浄し、ＦＢＳなしのＤＭＥＭ中で３時間、血清飢餓状態にする。０．１％ＢＳＡを加えたＤＭＥＭ中に希釈された（６７ｎＭ、６．７ｎＭ及び０．６７ｎＭの最終濃度の）抗ＶＥＧＦ親抗体又はＤＶＤ－Ｉｇを、組換えヒト$VEGF_{165}$（５０ｎｇ／ｍＬ）とともに、２５℃で１時間、事前温置する。次いで、これらの抗体／ＤＶＤ－Ｉｇ及びＶＥＧＦ混合物を細胞に添加し、加湿された５％CO_2雰囲気中において、３７℃で１０分間、プレートを温置する。氷冷されたＰＢＳで、細胞を２

回洗浄し、０．１％ＮＰ４０が補充されたＣｅｌｌ　Ｌｙｓｉｓ　Ｂｕｆｆｅｒ（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ，Ｂｏｓｔｏｎ，ＭＡ）の１００μＬ／ウェルの添加によって溶解する。２つ組みの試料をプールし、抗ＶＥＧＦＲ２抗体（Ｒ＆Ｄ　ｓｙｓｔｅｍｓ，ＡＦ３５７，Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ）で予め被覆されたＥＬＩＳＡプレートのウェルに１７０μＬを添加し、穏やかに振盪しながら、２５℃で２時間温置する。洗浄緩衝液（０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０を含有するＰＢＳ）で、ウェルを５回洗浄し、ビオチン化された抗ホスホチロシン抗体（４Ｇ１０；Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ，Ｂｉｌｌｅｒｉｃａ，ＭＡ）の１：２０００希釈５０μＬとともに、２５℃で１時間温置する。０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０を含有するＰＢＳで、ウェルを５回洗浄し、次いで、ストレプトアビジン－ＨＲＰ（ＫＰＬ　＃４７４－３０００，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，ＭＤ）とともに、２５℃で１時間温置する。ストレプトアビジン－ＨＲＰ（ＫＰＬ＃４７４－３０００、Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ、ＭＤ）で、ウェルを３回洗浄する。０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０を含有するＰＢＳで、ウェルを３回洗浄し、ウェル当りＵＬＴＲＡ－ＴＭＢＥＬＩＳＡ（Ｐｉｅｒｃｅ，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ）の１００μＬを添加する。呈色後、１ＮＨＣｌを用いて反応を停止させ、４５０ｎｍでの吸光度を測定した。

【０４７３】

（実施例１．１．２．Ｏ）

ヒト癌腫皮下脇腹異種移植片の増殖に対するＤＶＤ－Ｉｇの有効性

９９％の生存率、組織培養フラスコ中で８５％の集密度になるように、Ａ－４３１ヒト類上皮癌腫細胞をインビトロで増殖させる。１９から２５グラムのＳＣＩＤ雌マウス（Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒｓ　Ｌａｂｓ，Ｗｉｌｍｉｎｇｔｏｎ，ＭＡ）の右の脇腹に、研究０日目に、1×10^{6}ヒト腫瘍細胞（１：１マトリゲル）を皮下注射する。約２００から３２０mm^{3}の平均腫瘍容積を有するマウスの群の中に、マウスの大きさを合わせた後、ヒトＩｇＧ対照又はＤＶＤ－Ｉｇの投与（腹腔内、ＱＤ、３回／週）の投与を開始した。腫瘍細胞注射から約１０日後に開始して、週に２回、腫瘍を測定する。

【０４７４】

（実施例１．１．２．Ｐ）

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

目的の細胞表面抗原を過剰発現する安定な細胞株又はヒト腫瘍細胞株を組織培養フラスコから採集し、５％ウシ胎児血清を含有するリン酸緩衝化された生理的食塩水（ＰＢＳ）（ＰＢＳ／ＦＢＳ）中に再懸濁した。染色の前に、ＰＢＳ／ＦＣＳ中の５μｇ／ｍＬのヒトＩｇＧ（１００μＬ）とともに、氷上で、ヒト腫瘍細胞を温置した。氷上で３０から６０分間、ＰＢＳ／ＦＢＳ中において、抗体又はＤＶＤ－Ｉｇ（２μｇ／ｍＬ）とともに、１から5×10^{5}細胞を温置した。細胞を２回洗浄し、Ｆ（ａｂ’）２ヤギ抗ヒトＩｇＧ、Ｆｃγ－フィコエリトリン（ＰＢＳ中の１：２００希釈）１００μＬ（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ，Ｗｅｓｔ　Ｇｒｏｖｅ，ＰＡ，Ｃａｔ．＃１０９－１１６－１７０）を添加した。氷上での３０分の温置後、細胞を２回洗浄し、ＰＢＳ／ＦＢＳ中に再懸濁した。Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ　ＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒ（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ，Ｓａｎ　Ｊｏｓｅ，ＣＡ）を用いて、蛍光を測定した。

【０４７５】

表１１は、ＤＶＤ－Ｉｇ構築物に対するＦＡＣＳデータを示している。幾何平均は、ｎ個の蛍光シグナルの積（ａ１×ａ２×ａ３．．．ａｎ）のｎ乗根である。対数変換されたデータとともに、幾何平均は、データ分布の重み付けを標準化するために使用される。以下の表は、親抗体及びＤＶＤ－Ｉｇ構築物のＦＡＣＳ幾何平均を含む。

【０４７６】

【表１１】

表 11: DVD-Ig構造物の蛍光活性化細胞分別

親抗体又は DVD-Ig番号	N末端 可変ドメイン (VD)	C末端 可変ドメイン (VD)	FACS幾何 N末端	FACS幾何 C末端
AB033	EGFR (配列2)		192.34	
DVD289	TNF	EGFR(配列2)		48.84
DVD290	EGFR (配列2)	TNF	239.34	
AB001	CD20		203.47	
AB033	EGFR (配列2)		192.34	
DVD236	EGFR (配列2)	CD20	256.34	

【０４７７】

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

【０４７８】

（実施例１．１．２．Ｑ）

フローサイトメトリーによって評価された、ヒト腫瘍細胞株の表面への親受容体抗体及びＤＶＤ－Ｉｇ構築物の結合

細胞表面受容体又はヒト腫瘍細胞株を過剰発現する安定な細胞株を組織培養フラスコから採集し、１％ウシ胎児血清を含有するダルベッコのリン酸緩衝化された生理的食塩水（ＤＰＢＳ）（ＤＰＢＳ／ＦＣＳ）中に再懸濁した。氷上で３０から６０分間、ＤＰＢＳ／ＦＣＳ中において、抗体又はＤＶＤ－Ｉｇ（１０μｇ／ｍＬ）１００μＬとともに、１から５×１０^{5}細胞を温置する。細胞を２回洗浄し、ヤギ抗ヒトＩｇＧ－フィコエリトリン（ＤＰＢＳ／ＢＳＡ中で１：５０希釈）５０μＬ（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ Ｂｉｏｔｅｃｈ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ，Ｂｉｒｍｉｎｇｈａｍ，ＡＬ ｃａｔ＃２０４０－０９）を添加する。氷上での３０から４５分の温置後、細胞を２回洗浄し、ＤＰＢＳ／ＦＣＳ中の１％ホルムアルデヒド１２５μＬ／ウェル中に再懸濁する。Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ ＬＳＲＩＩ（Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ，Ｓａｎ Ｊｏｓｅ，ＣＡ）を用いて、蛍光を測定した。

【０４７９】

（実施例１．２）

目的のヒト抗原に対する親モノクローナル抗体の作製

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

【０４８０】

（実施例１．２．Ａ）

目的のヒト抗原でのマウスの免疫化

完全フロイントアジュバント又はＩｍｍｕｎｏｅａｓｙアジュバント（Ｑｉａｇｅｎ，Ｖａｌｅｎｃｉａ，ＣＡ）と混合された組換え精製ヒト抗原（例えば、ＩＧＦ１，２）２０μｇを、第１日目に、５匹の６から８週齢のＢａｌｂ／Ｃ、５匹のＣ５７Ｂ／６マウス及び５匹のＡＪマウス中に皮下注射する。２４日、３８日及び４９日目に、不完全フロイントアジュバント又はＩｍｍｕｎｏｅａｓｙアジュバントと混合された組換え精製ヒト抗原変形物２０μｇを同じマウス中に皮下注射する。８４日又は１１２日又は１４４日目に、目的の組換え精製ヒト抗原１μｇをマウスの静脈内に注射する。

【０４８１】

（実施例１．２．Ｂ）

ハイブリドーマの作製

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

【０４８２】

（実施例１．２．Ｃ）

目的のヒト標的抗原に対する親モノクローナル抗体の同定及び性質決定

（実施例１．２．Ｃ．１）

親モノクローナル抗体の中和活性の分析

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

【０４８３】

（実施例１．２．Ｃ．２）

目的のカニクイザル標的抗原に対する親モノクローナル抗体交叉反応性の分析

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

【０４８４】

（実施例１．２．Ｄ）

各マウス抗ヒトモノクローナル抗体に対する可変領域のアミノ酸配列の測定

ｃＤＮＡの単離、組換え抗ヒトマウスｍＡｂの発現及び性質決定は、以下のように行われる。各アミノ酸配列の決定のために、約１×１０^{6}個のハイブリドーマ細胞を遠心によって単離し、製造業者の指示書に従って、Ｔｒｉｚｏｌ（Ｇｉｂｃｏ　ＢＲＬ／Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ．）を用いて全ＲＮＡを単離するために処理した。製造業者の指示書に従って、Ｓｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ　Ｆｉｒｓｔ－Ｓｔｒａｎｄ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）を用いて、全ＲＮＡを第一鎖ＤＮＡの合成に供する。ポリ（Ａ）＋ＲＮＡを選択するための

第一鎖合成を開始するために、オリゴ（ｄＴ）を使用する。次いで、マウス免疫グロブリン可変領域の増幅のために設計されたプライマーを用いるＰＣＲによって、第一鎖ｃＤＮＡ産物を増幅する（Ｉｇ－Ｐｒｉｍｅｒ Ｓｅｔｓ，Ｎｏｖａｇｅｎ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）。アガロースゲル上でＰＣＲ産物を分離し、切り出し、精製し、次いで、ｐＣＲ２．１－ＴＯＰＯベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）中に、ＴＯＰＯＣｌｏｎｉｎｇキットを用いてサブクローニングし、化学的に形質転換受容能力を有するＴＯＰ１０イー・コリ（Ｅ．ｃｏｌｉ）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）中に形質転換する。挿入物を含有するクローンを同定するために、形質転換体に対してコロニーＰＣＲを行う。ＱＩＡｐｒｅｐ Ｍｉｎｉｐｒｅｐキット（Ｑｉａｇｅｎ，Ｖａｌｅｎｃｉａ，ＣＡ）を用いて、挿入物を含有するクローンからプラスミドＤＮＡを単離する。Ｍ１３フォワード及びＭ１３リバースプライマー（Ｆｅｒｍｅｎｔａｓ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｈａｎｏｖｅｒ ＭＤ）を用いて、可変重鎖又は可変軽鎖ＤＮＡ配列を決定するために、両鎖に対して、プラスミド中の挿入物を配列決定する。ｍＡｂの可変重鎖及び可変軽鎖配列を同定する。一実施形態において、次工程の開発（ヒト化）のための、リードｍＡｂの群に関する選択基準には、以下のものが含まれる。

【０４８５】

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

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

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

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

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

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

・抗体は、凝集の低いレベルを有する

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

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

・抗体は、低い電荷不均一性を有する

・抗体は、サイトカインの放出を欠如する（実施例１．１．２．Ｂ参照）

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

・抗体は、予想外の組織交叉反応性を欠如する（実施例１．１．２．Ｄ参照）

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

【０４８６】

（実施例１．２．２）

組換えヒト化親抗体

（実施例１．２．２．１）

組換えキメラ抗ヒト親抗体の構築及び発現

細菌中での相同的組換えによって、２つのヒンジ領域アミノ酸変異を含有するヒトＩｇＧ１定常領域をコードするｃＤＮＡ断片によって、マウス抗ヒト親ｍＡｂの重鎖定常領域をコードするＤＮＡを置き換える。これらの変異は、２３４位のロイシンからアラニンへの変化（ＥＵ付番）及び２３５位のロイシンからアラニンへの変化である（Ｌｕｎｄ ｅｔ ａｌ．，１９９１，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１４７：２６５７）。これらの抗体のそれぞれの軽鎖定常領域は、ヒトκ定常領域によって置き換えられる。ｐＢＯＳ発現プラスミド中に連結されたキメラ重鎖及び軽鎖ｃＤＮＡの同時形質移入によって、完全長キメラ

抗体をＣＯＳ細胞中で一過性に発現させる（Ｍｉｚｕｓｈｉｍａ ａｎｄ Ｎａｇａｔａ，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ １９９０，Ｖｏｌ１８，ｐｇ５３２２）。プロテインＡセファロースクロマトグラフィーによって、組換えキメラ抗体を含有する細胞上清を精製し、酸緩衝液の添加によって、結合された抗体を溶出する。抗体を中性にし、ＰＢＳ中に透析する。

【０４８７】

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

【０４８８】

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

【０４８９】

（実施例１．２．２．２）

ヒト化抗ヒト親抗体の構築及び発現

（実施例１．２．２．２．Ａ）

ヒト抗体フレームワークの選択

ＶｅｃｔｏｒＮＴＩソフトウェアを用いて（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｉｇｂｌａｓｔ／ｒｅｔｒｉｅｖｅｉｇ．ｈｔｍｌ．で、ＮＣＢＩ Ｉｇ Ｂｌａｓｔウェブサイトから得られた）、４４のヒト免疫グロブリン生殖系列可変重鎖又は４６の生殖系列可変軽鎖配列に対して、それぞれのマウス可変重鎖及び可変軽鎖遺伝子配列を別々に並置する。

【０４９０】

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

【０４９１】

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

【０４９２】

マウスｍＡｂに関しては、適切な参照構造を同定するために、ＢＬＡＳＴ検索と視覚的検査の組み合わせが使用される。参照及び標的アミノ酸配列間での２５％の配列同一性は、相同性モデル化作業を試みるのに必要な最低条件と考えられる。配列の並置は手動で構築され、モデル座標はプログラムＪａｃｋａｌを用いて作製される（Ｐｅｔｒｅｙ，Ｄ．ｅｔ　ａｌ．（２００３）Ｐｒｏｔｅｉｎｓ５３（補遺６）：４３０－４３５参照）。

【０４９３】

選択された抗体のマウス及びヒトフレームワーク領域の一次配列は、著しい同一性を共有する。異なる残基の位置は、マウス抗体の観察された結合力を保持するために、ヒト化された配列中にマウス残基を含めるための候補である。ヒト及びマウス配列の間で異なるフレームワーク残基のリストは、手作業で構築される。表１２は、この研究のために選択されたフレームワーク配列を示している。

【０４９４】

【表１２】

表12: ヒトIgG重鎖定常ドメイン及び軽鎖定常ドメインの配列

タンパク質	配列番号	配列
		123456789**0**123456789**0**123456789**0**123456789**0**1
野生型 hIgG1 定常領域	**58**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**LL**GGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
変異体 hIgG1 定常領域	**59**	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**AA**GGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
Igκ定常領域	**60**	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Igλ定常領域	**61**	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAW KADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHR SYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

【０４９５】

あるフレームワーク残基が抗体の結合特性に影響を及ぼす確率は、ＣＤＲ残基へのその近接性に依存する。従って、モデル構造を使用する場合、マウスとヒト配列間で異なる残基は、ＣＤＲ中の何れかの原子からのそれらの距離に従って順位付けされる。何れかのＣＤＲ原子の４．５オングストローム以内に存在する残基は最も重要であると同定され、ヒト化抗体中にマウス残基を保持する（すなわち、逆変異）ための候補とすることが推奨される。

【０４９６】

コンピュータによって構築されたヒト化抗体は、オリゴヌクレオチドを用いて構築される。それぞれの可変領域ｃＤＮＡに対して、それぞれ６０から８０個のヌクレオチドのうち６個のヌクレオチドが、各オリゴヌクレオチドの５’及び／又は３’末端の２０ヌクレオチドだけ互いに重複するように設計される。徐冷反応では、６つのオリゴヌクレオチド全てを合わせ、沸騰させ、ｄＮＴＰの存在下で、徐冷する。重複するオリゴヌクレオチド間の約４０塩基対の間隙を埋めるために、ＤＮＡポリメラーゼＩ、巨大（Ｋｌｅｎｏｗ）

断片（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ #Ｍ０２１０，Ｂｅｖｅｒｌｅｙ，ＭＡ．）を添加する。修飾されたｐＢＯＳベクター中の多重クローニング部位に対して相補的な突出配列を含有する２つの最も外側のプライマーを用いて、可変領域遺伝子全体を増幅するために、ＰＣＲを実施する（Ｍｉｚｕｓｈｉｍａ，Ｓ．ａｎｄ Ｎａｇａｔａ，Ｓ．（１９９０）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１８：１７）。各ｃＤＮＡ集合物から得られたＰＣＲ産物をアガロースゲル上で分離し、予想された可変領域ｃＤＮＡサイズに対応するバンドを切り出し、精製する。細菌中での相同的組換えによって、２つのヒンジ領域アミノ酸変異を含有するヒトＩｇＧ１定常領域をコードするｃＤＮＡ断片上に、可変重領域をインフレームに挿入する。これらの変異は、２３４位のロイシンからアラニンへの変化（ＥＵ付番）及び２３５位のロイシンからアラニンへの変化である（Ｌｕｎｄ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４７：２６５７）。可変軽鎖領域は、相同的組換えによって、ヒトκ定常領域とインフレームに挿入する。細菌のコロニーを単離し、プラスミドＤＮＡを抽出する。ｃＤＮＡ挿入物の全体を配列決定する。完全長のヒト化抗ヒト抗体を一過性に作製するために、各抗体に対応する正しいヒト化重鎖及び軽鎖をＣＯＳ細胞中に同時形質移入する。プロテインＡセファロースクロマトグラフィーによって、組換えキメラ抗体を含有する細胞上清を精製し、酸緩衝液の添加によって、結合された抗体を溶出する。抗体を中性にし、ＰＢＳ中に透析する。

【０４９７】

（実施例１．２．２．３）

ヒト化抗体の性質決定

例えば、実施例１．１．２．Ａに記載されているサイトカインバイオアッセイを用いて、精製されたヒト化抗体が機能的活性を阻害する能力を測定する。実施例１．１．１．Ｂに記載されている表面プラズモン共鳴（Ｂｉａｃｏｒｅ（Ｒ））測定を用いて、組換えヒト抗原へのヒト化抗体の結合親和性を測定する。バイオアッセイから得られたIC_{50}値及びヒト化抗体の親和性に順位を付ける。親ハイブリドーマｍＡｂの活性を完全に維持するヒト化ｍＡｂを、将来の開発のための候補として選択する。最も好ましい上位２から３個のヒト化ｍＡｂをさらに性質決定する。

【０４９８】

（実施例１．２．２．３．Ａ）

ヒト化抗体の薬物動態的分析

Ｓｐｒａｇｕｅ－Ｄａｗｌｅｙラット及びカニクイザルにおいて、薬物動態的研究を実施する。雄及び雌のラット及びカニクイザルに、４ｍｇ／ｋｇのｍＡｂの単回用量を静脈内又は皮下に投薬し、抗原捕捉ＥＬＩＳＡを用いて試料を分析し、ノンコンパートメント分析によって、薬物動態的パラメータを測定する。要約すれば、ヤギ抗ビオチン抗体（５ｍｇ／ｍＬ、４℃、一晩）でＥＬＩＳＡプレートを被覆し、Ｓｕｐｅｒｂｌｏｃｋ（Ｐｉｅｒｃｅ）でブロッキングし、室温で２時間、１０％ＳｕｐｅｒｂｌｏｃｋＴＴＢＳ中の５０ｎｇ／ｍＬのビオチン化されたヒト抗原とともに温置する。血清試料を系列希釈し（ＴＴＢＳ中の０．５％血清、１０％Ｓｕｐｅｒｂｌｏｃｋ）、室温で３０分間、プレート上で温置する。ＨＲＰ標識されたヤギ抗ヒト抗体を用いて検出を行い、４パラメータロジスティックフィッティングを使用する標準曲線の助けを得て濃度を測定する。薬物動態的パラメータに対する値は、ＷｉｎＮｏｎｌｉｎソフトウェア（Ｐｈａｒｓｉｇｈｔ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ，Ｍｏｕｎｔａｉｎ Ｖｉｅｗ，ＣＡ）を使用するノンコンパートメントモデルによって測定する。優れた薬物動態的特性（$T_{1/2}$は、８から１３日又はこれより良好、低い排除速度及び優れた生物学的利用性５０から１００％を有する。）を有するヒト化ｍＡｂを選択する。

【０４９９】

（実施例１．２．２．３．Ｂ）

ヒト化モノクローナル抗体の物理化学的及びインビトロ安定性分析

サイズ排除クロマトグラフィー

２．５ｍｇ／ｍＬになるように、抗体を水で希釈し、ＴＳＫゲルＧ３０００ＳＷＸＬカ

ラム（Ｔｏｓｏｈ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ，　ｃａｔ＃　ｋ５５３９－０５ｋ）を使用するＳｈｉｍａｄｚｕＨＰＬＣシステム上で２０ｍＬを分析する。０．３ｍＬ／分の流速で、２１１ｍＭ硫酸ナトリウム、９２ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＨ７．０で、試料をカラムから溶出する。ＨＰＬＣシステムの作動条件は、以下のとおりである。

移動相：２１１ｍＭNa_2SO_4、９２ｍＭNa_2HPO_4＊$7H_2O$、ｐＨ７．０

勾配：等濃度

流速：０．３ｍＬ／分

検出波長：２８０ｎｍ

自動試料採取装置冷却温度：４℃

カラムオーブン温度：室温

実行時間：５０分

【０５００】

表１３は、上記プロトコールによって測定された％単量体（予想分子量の非凝集タンパク質）として表された親抗体及びＤＶＤ－Ｉｇ構築物の純度データを含む。

【０５０１】

【表１３】

表13: サイズ排除クロマトグラフィーによって測定された親抗体及びDVD-Ig構築物の純度

親抗体又は DVD-Ig番号	N末端 可変ドメイン (VD)	C末端 可変ドメイン (VD)	%単量体 (純度)
AB032	IL-1B		100
DVD225	Aβ(配列1)	IL-1B	86.5
DVD226	IL-1B	Aβ(配列1)	95.8
AB017	TNF		95.9
DVD223	Aβ(配列1)	TNF	91.6
DVD224	TNF	Aβ(配列1)	81.7
AB017	TNF		95.9
AB059	RGMA		100
DVD291	TNF	RGMA	91.9
DVD292	RGMA	TNF	93.3
AB017	TNF		95.9
AB060	RAGE		91.9
DVD295	RAGE	TNF	94.1
DVD296	TNF	RAGE	97.9
AB017	TNF		95.9
AB033	EGFR (配列1)		100
DVD289	TNF	EGFR (配列1)	85.4
DVD290	EGFR (配列1)	TNF	95.6

【０５０２】

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

【０５０３】

ＳＤＳ－ＰＡＧＥ

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

Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，　ｃａｔ＃　ＥＣ６００５ｂｏｘ，　ｌｏｔ＃　６１１１０２１）上に搭載し、還元されていない試料（１０ｍｇ／レーン）は、８％から１６％のｐｒｅｃａｓｔｔｒｉｓ－グリシンゲル（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，ｃａｔ＃　ＥＣ６０４５ｂｏｘ，ｌｏｔ＃　６１１１０２１）上に搭載する。分子量マーカーとして、ＢｌｕｅＰｌｕｓ２（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，　ｃａｔ＃ＬＣ５９２５，ｌｏｔ＃１３５１５４２）を使用する。ＸＣｅｌｌＳｕｒｅＬｏｃｋミニセルゲルボックス（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，ｃａｔ＃　ＥＩ０００１）中でゲルを走行させ、試料をゲル中に積み重ねるために、まず７５の電圧を印加した後、色素の先頭がゲルの底に到達するまで、１２５の定常電圧を印加することによってタンパク質を分離する。使用する走行緩衝液は、１０×ｔｒｉｓグリシンＳＤＳ緩衝液（ＡＢＣ，ＭＰＳ－７９－０８０１０６）から調製される１×ｔｒｉｓグリシンＳＤＳ緩衝液である。コロイド状青色染色（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　ｃａｔ＃４６－７０１５，４６－７０１６）を用いて、ゲルを一晩染色し、バックグラウンドが透明になるまで、Ｍｉｌｌｉ－Ｑ水で脱色させる。次いで、ＥｐｓｏｎＥｘｐｒｅｓｓｉｏｎスキャナー（モデル１６８０、Ｓ／ＮＤＡＳＸ００３６４１）を用いて、染色されたゲルをスキャンした。

【０５０４】

沈降速度分析

３つの標準的な２セクターカーボンエポンセンターピースのそれぞれの試料チャンバー中に抗体を搭載する。これらのセンターピースは１．２ｃｍの光路長を有しており、サファイアウィンドウを用いて作製されている。参照緩衝液のためにＰＢＳを使用し、各チャンバーは１４０μＬを含有した。ＢｅｃｋｍａｎＰｒｏｔｅｏｍｅＬａｂＸＬ－Ｉ分析用超遠心装置（シリアル番号ＰＬ１０６Ｃ０１）中の４つ穴（ＡＮ－６０Ｔｉ）ローターを用いて、全ての試料を同時に調べる。

【０５０５】

走行条件はプログラムされ、遠心の管理は、ＰｒｏｔｅｏｍｅＬａｂ（ｖ５．６）を用いて行われる。試料及びローターは、分析の前に１時間、熱的に平衡化させる（２０．０±０．１℃）。３０００ｒｐｍで適切な細胞の搭載の確認を行い、各細胞に対して単一の走査を記録する。沈降速度条件は、以下のとおりである。

試料セル容積：４２０ｍＬ
参照セル容積：４２０ｍＬ
温度：２０℃
ローター速度：３５，０００ｒｐｍ
時間：８：００時間
ＵＶ波長：２８０ｎｍ
放射状（ｒａｄｉａｌ）ステップのサイズ：０．００３ｃｍ
データ収集：シグナル平均化なしに、ステップ毎に１つのデータポイント
走査の総数：１００

【０５０６】

完全な状態の抗体のＬＣ－ＭＳ分子量測定

ＬＣ－ＭＳによって、完全な状態の抗体の分子量を分析する。約１ｍｇ／ｍＬになるように、水で各抗体を希釈する。脱塩し、ＡＰＩＱｓｔａｒｐｕｌｓａｒｉ質量分析装置（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）中に、試料５ｍｇを導入するために、タンパク質マイクロトラップ（Ｍｉｃｈｒｏｍ　Ｂｉｏｒｅｓｏｕｒｃｅｓ，Ｉｎｃ，ｃａｔ＃００４／２５１０９／０３）を備えた１１００ＨＰＬＣ（Ａｇｉｌｅｎｔ）システムを使用する。試料を溶出するために、短い勾配を使用する。５０ｍＬ／分の流速で、移動相Ａ（ＨＰＬＣ水中、０．０８％ＦＡ、０．０２％ＴＦＡ）及び移動相Ｂ（アセトニトリル中、０．０８％ＦＡ及び０．０２％ＴＦＡ）を用いて勾配を実行する。質量分析装置は、２０００から３５００質量対電荷比の走査範囲で、４．５ｋＶのスプレー電圧で操作する。

【０５０７】

抗体軽鎖及び重鎖のＬＣ－ＭＳ分子量測定

抗体軽鎖（ＬＣ）、重鎖（ＨＣ）及び脱グリコシル化されたＨＣの分子量測定は、ＬＣ－ＭＳによって分析する。１ｍｇ／ｍＬになるように、水で抗体を希釈し、３７℃で３０分間、１０ｍＭＤＴＴの最終濃度で、試料をＬＣ及びＨＣに還元する。抗体を脱グリコシル化するために、１００ｍＬの総容量で、ＰＧＮアーゼＦ２ｍＬ、１０％Ｎ－オクチルグルコシド５ｍＬとともに、３７℃で一晩、抗体１００ｍｇを温置する。脱グリコシル化後、１０ｍＭＤＴＴの最終濃度を用いて、３７℃で３０分間、試料を還元する。脱塩し、ＡＰＩＱｓｔａｒｐｕｌｓａｒｉ質量分析装置（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）中に、試料（５ｍｇ）を導入するために、Ｃ４カラム（Ｖｙｄａｃ，ｃａｔ＃２１４ＴＰ５１１５，Ｓ／Ｎ０６０２０６５３７２０４０６９）を備えたＡｇｉｌｅｎｔ１１００ＨＰＬＣシステムを使用する。試料を溶出するために、短い勾配を使用する。５０ｍＬ／分の流速で、移動相Ａ（ＨＰＬＣ水中、０．０８％ＦＡ、０．０２％ＴＦＡ）及び移動相Ｂ（アセトニトリル中、０．０８％ＦＡ及び０．０２％ＴＦＡ）を用いて勾配を実行する。質量分析装置は、８００から３５００質量対電荷比の走査範囲で、４．５ｋＶのスプレー電圧で操作する。

【０５０８】

ペプチドマッピング

７５ｍＭ炭酸水素アンモニウム中の６Ｍ塩酸グアニジンの最終濃度を用いて、室温で１５分間、抗体を変性させる。変性された試料を、３７℃で６０分間、１０ｍＭＤＴＴの最終濃度で還元した後、暗所にて、３７℃で３０分間、５０ｍＭヨード酢酸（ＩＡＡ）でアルキル化する。アルキル化に続いて、４℃で、１０ｍＭ炭酸水素アンモニウムの４リットルに対して、試料を一晩透析する。１０ｍＭ炭酸水素アンモニウム、ｐＨ７．８によって、透析された試料を１ｍｇ／ｍＬになるように希釈し、３７℃で４時間、１：２０（ｗ／ｗ）のトリプシン／Ｌｙｓ－Ｃ：抗体比で、トリプシン（Ｐｒｏｍｅｇａ，ｃａｔ＃Ｖ５１１１）又はＬｙｓ－Ｃ（Ｒｏｃｈｅ，ｃａｔ＃１１　０４７　８２５　００１）を用いて、抗体１００ｍｇを消化する。１ＮＨＣｌの１ｍＬで、消化物を反応停止させる。質量分析検出を用いたペプチドマッピングのために、Ａｇｉｌｅｎｔ１１００ＨＰＬＣシステムを有するＣ１８カラム（Ｖｙｄａｃ，ｃａｔ＃２１８ＴＰ５１，Ｓ／Ｎ　ＮＥ９６０６　１０．３．５）上での逆相高性能液体クロマトグラフィー（ＲＰＨＰＬＣ）によって、消化物４０ｍＬを分離する。５０ｍＬ／分の流速で、移動相Ａ（ＨＰＬＣ等級の水中の０．０２％ＴＦＡ及び０．０８％ＦＡ）及び移動相Ｂ（アセトニトリル中の０．０２％ＴＦＡ及び０．０８％ＦＡ）を使用する勾配を用いて、ペプチドの分離を行う。４．５ｋＶのスプレー電圧での陽性モード及び８００から２５００質量対電荷比のスキャン範囲で、ＡＰＩＱＳＴＡＲ　Ｐｕｌｓａｒｉ質量分析装置を操作する。

【０５０９】

ジスルフィド結合マッピング

抗体を変性させるために、抗体１００ｍＬを１００ｍＭ炭酸水素アンモニウム中の８Ｍ塩酸グアニジン３００ｍＬと混合する。ｐＨが７と８の間にあることを確かめるために、ｐＨをチェックし、６Ｍ塩酸グアニジンの最終濃度で、室温で１５分間、試料を変性させる。変性された試料の一部（１００ｍＬ）を、Ｍｉｌｌｉ－Ｑ水で６００ｍＬに希釈して、１Ｍの最終塩酸グアニジン濃度を得る。３７℃で約１６時間、１：５０のトリプシン又は１：５０のＬｙｓ－Ｃ：抗体（ｗ／ｗ）比（４．４ｍｇ酵素：２２０ｍｇ試料）のトリプシン（Ｐｒｏｍｅｇａ，ｃａｔ＃Ｖ５１１１，ｌｏｔ＃２２２６５９０１）又はＬｙｓ－Ｃ（Ｒｏｃｈｅ，ｃａｔ＃１１０４７８２５００１，ｌｏｔ＃１２８０８０００）の何れかで、試料（２２０ｍｇ）を消化する。試料に、トリプシン又はＬｙｓ－Ｃをさらに５ｍｇ添加し、３７℃でさらに２時間、消化を進行させる。各試料にＴＦＡ１ｍＬを添加することによって、消化を停止させる。ＡｇｉｌｅｎｔＨＰＬＣシステム上のＣ１８カラム（Ｖｙｄａｃ，ｃａｔ＃２１８ＴＰ５１　Ｓ／Ｎ　ＮＥ０２０６３０－４－１Ａ）を用いるＲＰＨＰＬＣによって、消化された試料を分離する。５０ｍＬ／分の流速で、移動相Ａ（ＨＰＬＣ等級の水中の０．０２％ＴＦＡ及び０．０８％ＦＡ）及び移動相Ｂ（アセトニトリル中の０．０２％ＴＦＡ及び０．０８％ＦＡ）を使用するペプチドマッピングに対し

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

【０５１０】

遊離のスルフヒドリルの決定

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

ＤＴＮＢ＋ＲＳＨ$^{(R)}$ＲＳ－ＴＮＢ＋ＴＮＢ－＋Ｈ$^{+}$で図示される。

【０５１１】

ＴＮＢ－の吸光度は、Ｃａｒｙ５０分光光度計を用いて、４１２ｎｍで測定される。遊離のＳＨ標準として、２メルカプトエタノール（ｂ－ＭＥ）の希釈物を用いて、吸光度曲線をプロットし、タンパク質中の遊離のスルフヒドリル基の濃度を試料の４１２ｎｍの吸光度から求める。

【０５１２】

０．１４２ｍＭの最終濃度まで、ＨＰＬＣ等級の水で１４．２Ｍｂ－ＭＥを系列希釈することによって、ｂ－ＭＥ標準原液を調製する。次いで、各濃度に対する３つ組みの標準を調製する。ａｍｉｃｏｎ　ｕｌｔｒａ　１０，０００ＭＷＣＯ遠心フィルター（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ，ｃａｔ＃　ＵＦＣ８０１０９６，ｌｏｔ＃　Ｌ３ＫＮ５２５１）を用いて、抗体を１０ｍｇ／ｍＬまで濃縮し、アダリムマブに対して使用される製剤緩衝液（５．５７ｍＭ一塩基性リン酸ナトリウム、８．６９ｍＭ二塩基性リン酸ナトリウム、１０６．６９ｍＭＮａＣｌ、１．０７ｍＭクエン酸ナトリウム、６．４５ｍＭクエン酸、６６．６８ｍＭマニトール、ｐＨ５．２、０．１％（ｗ／ｗ）Ｔｗｅｅｎ）に緩衝液を交換する。室温で２０分間、振盪装置上で試料を混合する。次いで、１００ｍＭＴｒｉｓ緩衝液、ｐＨ８．１の１８０ｍＬを各試料及び標準に添加した後、１０ｍＭリン酸緩衝液ｐＨ８．１中の２ｍＭＤＴＮＢの３００ｍＬを添加する。完全な混合後、Ｃａｒｙ５０分光光度計上で、４１２ｎｍでの吸収に関して、試料及び標準を測定する。遊離のＳＨの量とｂ－ＭＥ標準のOD_{412nm}をプロットすることによって標準曲線を得る。ブランクを差し引いた後のこの曲線に基づいて、試料の遊離ＳＨ含量を計算する。

【０５１３】

弱陽イオン交換クロマトグラフィー

１０ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＨ６．０を用いて、抗体を１ｍｇ／ｍＬまで希釈する。ＷＣＸ－１０　ＰｒｏＰａｃ分析用カラム（Ｄｉｏｎｅｘ，ｃａｔ＃０５４９９３，Ｓ／Ｎ０２７２２）を備えたＳｈｉｍａｄｚｕＨＰＬＣシステムを用いて、電荷の不均一性を分析する。８０％の移動相Ａ（１０ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＨ６．０）及び２０％の移動相Ｂ（１０ｍＭリン酸ナトリウム、５００ｍＭＮａＣｌ、ｐＨ６．０）中のカラムに試料を搭載し、１．０ｍＬ／分の流速で溶出する。

【０５１４】

オリゴ糖の特性決定

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

【０５１５】

重鎖のＦｃ部分からＮ結合型オリゴ糖を切断するために、まず、ＰＮＧアーゼＦを用いて抗体を消化する。ＰＮＧアーゼＦ２ｍＬ及び１０％Ｎ－オクチルグルコシド３ｍＬとと

もに、抗体（２００ｍｇ）を５００ｍＬのＥｐｐｅｎｄｏｒｆ管に入れる。最終容量を６０ｍＬにするために、リン酸緩衝化された生理的食塩水を添加する。７００ＲＰＭに設定されたＥｐｐｅｎｄｏｒｆ温熱ミキサー中にて、試料を３７℃で一晩温置する。対照として、アダリムマブロットＡＦＰ０４ＣもＰＮＧアーゼＦで消化する。

【０５１６】

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

【０５１７】

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

【０５１８】

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

【０５１９】

アセトニトリルの全てがカートリッジを通過した後、洗浄直後のディスクの中心に試料を点状に配置し、ディスク上に１０分間吸着させる。アセトニトリル１ｍＬ、続いて、９６％アセトニトリル１ｍＬの５つのｉｓｈｅで、ディスクを洗浄する。１．５ｍＬのＥｐｐｅｎｄｏｒｆ管上にカートリッジを配置し、ｍｉｌｌｉＱ水の３回ｉｓｈｅ（各ｉｓｈ４００ｍＬ）を用いて、２－ＡＢ標識されたオリゴ糖を溶出する。

【０５２０】

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

【０５２１】

高温での安定性

抗体の緩衝液は、５．５７ｍＭ一塩基性リン酸ナトリウム、８．６９ｍＭ二塩基性リン酸ナトリウム、１０６．６９ｍＭＮａＣｌ、１．０７ｍＭクエン酸ナトリウム、６．４５ｍＭクエン酸、６６．６８ｍＭマニトール、０．１％（ｗ／ｖ）Ｔｗｅｅｎ、ｐＨ５．２；又は１０ｍＭヒスチジン、１０ｍＭメチオニン、４％マニトール、ｐＨ５．９の何れかであり、Ａｍｉｃｏｎ超遠心フィルターを使用する。適切な緩衝液を用いて、抗体の最終濃度を２ｍｇ／ｍＬに調整する。次いで、抗体溶液をフィルター滅菌し、０．２５ｍＬの分取試料を無菌条件下で調製する。１、２又は３週間、分取試料を－８０℃、５℃、２５℃又は４０℃に放置する。温置期間の終了時に、サイズ排除クロマトグラフィー及びＳＤＳ－ＰＡＧＥによって試料を分析する。

【０５２２】

還元条件及び非還元条件下の両方でのＳＤＳ－ＰＡＧＥによって、安定性試料を分析す

る。使用した操作は、本明細書に記載されているものと同じである。コロイト状青色染色（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　ｃａｔ＃４６－７０１５，４６－７０１６）を用いて、ゲルを一晩染色し、バックグラウンドが透明になるまで、Ｍｉｌｌｉ－Ｑ水で脱色させる。次いで、ＥｐｓｏｎＥｘｐｒｅｓｓｉｏｎスキャナー（モデル１６８０、Ｓ／ＮＤＡＳＸ００３６４１）を用いて、染色されたゲルをスキャンした。より高い感度を得るために、銀染色キット（Ｏｗｌ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて、同じゲルを銀染色し、製造業者によって与えられた推奨操作を使用する。

【０５２３】

（実施例１．２．２．３．Ｃ）

ヒト癌腫異種移植片の増殖に対するヒト化モノクローナル抗体単独又は化学療法との組み合わせの有効性

９９％の生存率、組織培養フラスコ中で８５％の集密度になるように、ヒト癌細胞をインビトロで増殖させる。１９から２５グラムの雌又は雄のＳＣＩＤマウス（Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒｓ　Ｌａｂｓ）に耳標を付け、毛を剃った。次いで、研究の０日目に、２×10^6個のヒト腫瘍細胞０．２ｍＬ（１：１マトリゲル）をマウスの右脇腹に皮下接種する。約１５０から２００mm^3の平均腫瘍容積を有するマウスの別々のカゴの中に、マウスの大きさを合わせた後に、ビヒクル（ＰＢＳ）、ヒト化抗体及び／又は化学療法の投与（腹腔内、Ｑ３Ｄ／週）を開始する。接種から約１０日後に開始して、週に２回、測径器の対によって腫瘍を測定し、式Ｖ＝Ｌ×W^2／２（Ｖ：容積、mm^3；Ｌ：長さ、ｍＭ；Ｗ：幅、ｍｍ）に従って腫瘍容積を計算する。ｍＡｂのみで、又は化学療法と組み合わせて処理された動物中には、ビヒクルのみ又はイソタイプ対照ｍＡｂを与えた動物中の腫瘍と比べて、腫瘍容積の低下が見られる。

【０５２４】

（実施例１．２．２．３．Ｄ）

ＦＡＣＳを基礎とする再誘導された細胞傷害（ｒＣＴＬ）アッセイ

予め凍結させた単離された末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）から、負の選択濃縮カラム（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ；　Ｃａｔ．＃ＨＴＣＣ－５２５）によってヒトＣＤ３＋Ｔ細胞を単離した。フラスコ（ｖｅｎｔ　ｃａｐ，Ｃｏｒｎｉｎｇ，Ａｃｔｏｎ，ＭＡ）中でＴ細胞を４日間刺激し、Ｄ－ＰＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）中の、１０μｇ／ｍＬ抗ＣＤ３（ＯＫＴ－３，ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ，Ｉｎｃ．，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）及び２μｇ／ｍＬ抗ＣＤ２８（ＣＤ２８．２，ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ，Ｉｎｃ．，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）で被覆し、Ｌ－グルタミン、５５ｍＭβ－ＭＥ、ペニシリン／ストレプトマイシン、１０％ＦＢＳを加えた完全ＲＰＭＩ１６４０培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）中の３０Ｕ／ｍＬＩＬ－２（Ｒｏｃｈｅ）中で培養する。次いで、アッセイを使用する前に、３０Ｕ／ｍＬのＩＬ－２中で、Ｔ細胞を一晩休息させた。製造業者の指示書に従って、ＤｏＨＨ２又はＲａｊｉ標的細胞をＰＫＨ２６（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）で標識した。ｒＣＴＬアッセイを通じて、Ｌ－グルタミン及び１０％ＦＢＳ（Ｈｙｃｌｏｎｅ，Ｌｏｇａｎ，ＵＴ）を含有するＲＰＭＩ１６４０培地（フェノールなし、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）を使用した。（Ｄｒｅｉｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（２００２）　Ｉｎｔ　Ｊ　Ｃａｎｃｅｒ　１００：６９０を参照）。

【０５２５】

１０：１のＥ：Ｔ比を与えるために、それぞれ、９６ウェルプレート（Ｃｏｓｔａｒ＃３７９９，Ａｃｔｏｎ，ＭＡ）中の10^5及び10^4細胞／ウェルの最終細胞濃度で、エフェクターＴ細胞（Ｅ）及び標的（Ｔ）を播種した。濃度依存的滴定曲線を得るために、ＤＶＤ－Ｉｇ分子を希釈した。一晩の温置後、細胞を沈降させ、Ｄ－ＰＢＳ中に０．１％ＢＳＡ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）、０．１％アジ化ナトリウム及び０．５μｇ／ｍＬヨウ化プロピジウム（ＢＤ）を含有するＦＡＣＳ緩衝液中に再懸濁する前に、Ｄ－ＰＢＳを用いて１回洗浄する。ＦＡＣＳＣａｎｔｏＩＩ装置（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ，Ｓａｎ　Ｊｏｓｅ，ＣＡ）にＦＡＣＳデータを収集し、Ｆｌ

ｏｗｊｏ（Ｔｒｅｅｓｔａｒ）中で解析した。パーセント特異的溶解を測定するために、パーセント総標的（対照、無処置）によって除した、ＤＶＤ－Ｉｇ処理された試料中の生きた標的のパーセントを計算した。Ｐｒｉｓｍ（Ｇｒａｐｈｐａｄ）で、$ＩＣ_{５０}$を計算した。

【０５２６】

再誘導された毒性に関して、ＣＤ３／ＣＤ２０ＤＶＤ－Ｉｇを検査し、ＩＣ５０＝３２５ｐＭで、インビトロでの腫瘍の死滅を示した。このＣＤ３／ＣＤ２０ＤＶＤ－Ｉｇの配列は、米国特許出願２００７００７１６７５号に開示された。

【０５２７】

（実施例１．４）

ＤＶＤ－Ｉｇの作製

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

【０５２８】

（実施例１．４．１）

２つのリンカー長を有するＤＶＤ－Ｉｇの作製

ＡＤＣＣ／ＣＤＣエフェクター機能を除去するために、２３４及び２３５に変異を有するμ１Ｆｃを含有する定常領域を使用する。４つの異なる抗Ａ／ＢＤＶＤ－Ｉｇ構築物（２つは短いリンカーを有し、２つは長いリンカーを有する（それぞれ、２つの異なるドメイン方向性：$Ｖ_{Ａ}$－$Ｖ_{Ｂ}$－Ｃ及び$Ｖ_{Ｂ}$－$Ｖ_{Ａ}$－Ｃ）。）を作製する（表１４参照）。ヒトＣ１／Ｃｋ又はＣＨ１ドメインの Ｎ末端配列に由来するリンカー配列は、以下のとおりである。

【０５２９】

ＤＶＤＡＢ構築物の場合：

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

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

重鎖（γ１）：短いリンカー：ＡＳＴＫＧＰ（配列番号２１）；長いリンカー；ＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰ（配列番号２２）

ＤＶＤＢＡ構築物の場合：

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

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

重鎖（γ１）：短いリンカー：ＡＳＴＫＧＰ（配列番号２１）；長いリンカー；ＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰ（配列番号２２）

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

【０５３０】

表１４は、各抗Ａ／ＢＤＶＤ－Ｉｇタンパク質を発現させるために使用された重鎖及び軽鎖構築物を記載する。

【０５３１】

【表１４】

表 14: 抗A/B DVD-Ig構築物

DVD-Igタンパク質	重鎖構築物	軽鎖構築物
DVDABSL	DVDABHC-SL	DVDABLC-SL
DVDABLL	DVDABHC-LL	DVDABLC-LL
DVDBASL	DVDBAHC-SL	DVDBALC-SL
DVDBALL	DVDBAHC-LL	DVDBALC-LL

【０５３２】

（実施例１．４．２）

ＤＶＤＡＢＳＬ及びＤＶＤＡＢＬＬに対するＤＮＡ構築物の分子クローニング

重鎖構築物ＤＶＤＡＢＨＣ－ＬＬ及びＤＶＤＡＢＨＣ－ＳＬを作製するために、Ａ抗体のＶＨドメインは特異的なプライマー（３’プライマーは、それぞれ、ＳＬ／ＬＬ構築物に対する短い／長いライナー配列を含有する。）を用いて、ＰＣＲ増幅されるのに対して、Ｂ抗体のＶＨドメインは、特異的なプライマー（５’プライマーは、それぞれ、ＳＬ／ＬＬ構築物に対する短い／長いライナー配列を含有する。）を用いて増幅される。両ＰＣＲ反応は、標準的なＰＣＲ技術と操作に従って行われる。２つのＰＣＲ生成物をゲル精製し、その後の重複ＰＣＲ反応のための重複テンプレートとして一緒に使用する。標準的な相同的組換えアプローチを使用することによって、ＳｒｆＩ及びＳａｌＩによって二重消化されたｐＢＯＳ－ｈＣγｌ，ｚ、非ａ哺乳動物発現ベクター（Ａｂｂｏｔｔ）の中に重複するＰＣＲ産物をサブクローニングする。

【０５３３】

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

【０５３４】

（実施例１．４．３）

ＤＶＤＡＢＳＬ及びＤＶＤＢＡＬＬに対するＤＮＡ構築物の分子クローニング

重鎖構築物ＤＶＤＢＡＨＣ－ＬＬ及びＤＶＤＢＡＨＣ－ＳＬを作製するために、抗体ＢのＶＨドメインは特異的なプライマー（３’プライマーは、それぞれ、ＳＬ／ＬＬ構築物に対する短い／長いライナー配列を含有する。）を用いて、ＰＣＲ増幅されるのに対して、抗体ＡのＶＨドメインは、特異的なプライマー（５’プライマーは、それぞれ、ＳＬ／ＬＬ構築物に対する短い／長いライナー配列を含有する。）を用いて増幅される。両ＰＣＲ反応は、標準的なＰＣＲ技術と操作に従って行われる。２つのＰＣＲ生成物をゲル精製し、標準的なＰＣＲ条件を使用するその後の重複ＰＣＲ反応のための重複テンプレートとして一緒に使用する。標準的な相同的組換えアプローチを使用することによって、ＳｒｆＩ及びＳａｌＩによって二重消化されたｐＢＯＳ－ｈＣγｌ，ｚ、非ａ哺乳動物発現ベクター（Ａｂｂｏｔｔ）の中に重複するＰＣＲ産物をサブクローニングする。

【０５３５】

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

【０５３６】

（実施例１．４．４）

さらなるＤＶＤ－Ｉｇの構築及び発現

（実施例１．４．４．１）

ＤＶＤ－Ｉｇベクター構築物の調製

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

【０５３７】

例えば、アミノ酸配列から核酸のコドンを決定し、Ｂｌｕｅ　Ｈｅｒｏｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｉｎｃ．（ｗｗｗ．ｂｌｕｅｈｅｒｏｎｂｉｏ．ｃｏｍ）Ｂｏｔｈｅｌｌ，ＷＡ　ＵＳＡによって、オリゴヌクレオチドＤＮＡを合成した。３００から２，０００塩基対の二本鎖ＤＮＡ断片中にオリゴヌクレオチドを集合させ、プラスミドベクター中にクローニングし、配列を確認した。完全な遺伝子を得るために、酵素的方法を用いて、クローニングされた断片を集合させ、発現ベクター中にサブクローニングした。（７，３０６，９１４；７，２９７，５４１；７，２７９，１５９；７，１５０，９６９；２００８０１１５２４３；２００８０１０２４７５；２００８００８１３７９；２００８００７５６９０；２００８００６３７８０；２００８００５０５０６；２００８００３８７７７；２００８００２２４２２；２００７０２８９０３３；２００７０２８７１７０；２００７０２５４３３８；２００７０２４３１９４；２００７０２２５２２７；２００７０２０７１７１；２００７０１５０９７６；２００７０１３５６２０；２００７０１２８１９０；２００７０１０４７２２；２００７００９２４８４；２００７００３７１９６；２００７００２８３２１；２００６０１７２４０４；２００６０１６２０２６；２００６０１５３７９１；２００３０２１５４５８；２００３０１５７６４３参照）。

【０５３８】

親抗体及びＤＶＤ－Ｉｇのクローニングのために、ｐＨｙｂＥベクター（米国特許出願第６１／０２１，２８２号）の群を使用した。野生型定常領域を有する抗体及びＤＶＤ重鎖をクローニングするために、ｐＪＰ１８３；ｐＨｙｂＥ－ｈＣｇ１、ｚ、非－ａＶ２に由来するＶ１を使用した。κ定常領域を有する抗体及びＤＶＤ軽鎖をクローニングするために、ｐＪＰ１９１；ｐＨｙｂＥ－ｈＣｋＶ２に由来するＶ２を使用した。λ定常領域を有する抗体及びＤＶＤ軽鎖をクローニングするために、ｐＪＰ１９２；ｐＨｙｂＥ－ｈＣ１Ｖ２に由来するＶ３を使用した。λ－κハイブリッドＶドメインを有するＤＶＤ軽鎖をクローニングするために、λシグナルペプチド及びκ定常領域を用いて構築されたＶ４を使用した。κ－λハイブリッドＶドメインを有するＤＶＤ軽鎖をクローニングするために、κシグナルペプチド及びλ定常領域を用いて構築されたＶ５を使用した。（２３４，２３５ＡＡ）変異体定常領域を有する抗体及びＤＶＤ重鎖をクローニングするために、ｐＪ

Ｐ１８３；ｐＨｙｂＥ－ｈＣｇ１、ｚ、非－ａＶ２に由来するＶ７を使用した。
【０５３９】
表１５を参照すると、親抗体並びにＤＶＤ－ＩｇＶＨ及びＶＬ鎖のクローニングにおいて、多数のベクターが使用された。
【０５４０】

【表１５】

表15: 親抗体及びDVD-Igsをクローニングするために使用されたベクター

番号	重鎖ベクター	軽鎖ベクター
AB001	V1	V2
AB003	V1	V2
AB010	V1	V3
AB017	V1	V2
AB020	V1	V2
AB032	V1	V2
AB033	V1	V2
AB040	V1	V2
AB043	V1	V2
AB044	V1	V3
AB045	V1	V2
AB046	V1	V2
AB052	V1	V2
AB059	V1	V2
AB060	V1	V2
DVD193	V1	V2
DVD194	V1	V2
DVD195	V1	V2
DVD196	V1	V2
DVD197	V1	V2
DVD198	V1	V2
DVD201	V1	V2
DVD202	V1	V2
DVD203	V1	V5
DVD204	V1	V4
DVD205	V1	V2
DVD206	V1	V2
DVD207	V1	V2
DVD208	V1	V2
DVD209	V1	V2
DVD210	V1	V2
DVD211	V1	V2
DVD212	V1	V2
DVD215	V1	V2
DVD216	V1	V2
DVD217	V1	V5
DVD218	V1	V4
DVD219	V1	V2
DVD220	V1	V2
DVD221	V1	V2
DVD222	V1	V2
DVD223	V1	V2
DVD224	V1	V2
DVD225	V1	V2
DVD226	V1	V2

番号	重鎖ベクター	軽鎖ベクター
DVD229	V1	V5
DVD230	V1	V4
DVD231	V1	V2
DVD232	V1	V2
DVD233	V1	V2
DVD234	V1	V2
DVD235	V1	V2
DVD236	V1	V2
DVD239	V1	V2
DVD240	V1	V2
DVD243	V1	V2
DVD244	V1	V2
DVD247	V1	V2
DVD248	V1	V2
DVD255	V1	V2
DVD256	V1	V2
DVD289	V1	V2
DVD290	V1	V2
DVD291	V1	V2
DVD292	V1	V2
DVD293	V1	V2
DVD294	V1	V2
DVD295	V1	V2
DVD296	V1	V2

【０５４１】

（実施例１．４．４．２）

２９３細胞中での形質移入及び発現

ＤＶＤ－Ｉｇタンパク質を作製するために、ＤＶＤ－Ｉｇベクター構築物を２９３細胞中に形質移入する。使用した２９３一過性形質移入操作は、「Ｄｕｒｏｃｈｅｒ ｅｔ ａｌ．（２００２） Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．３０（２）：Ｅ９」及び「Ｐｈａｍ ｅｔ ａｌ．（２００５） Ｂｉｏｔｅｃｈ．Ｂｉｏｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ９０（３）：３３２－４４」に公表されている方法の改変である。形質移入において使用された試薬は、以下のものを含んだ。

【０５４２】

・１３０ｒｐｍ、３７℃及び５％CO_2に設定された、加湿された温置装置中の使い捨てエーレンマイヤーフラスコ中で培養されたＨＥＫ２９３－６Ｅ細胞（ＥＢＮＡ１を安定に発現するヒト胎児腎臓細胞株；Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｃｏｕｎｃｉｌ Ｃａｎａｄａから入手）

・培地：ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ ２９３ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｍｅｄｉｕｍ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ１２３３８－０１８）＋２５μｇ／ｍＬＧｅｎｅｔｉｃｉｎ（Ｇ４１８）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ １０１３１－０２７）及び０．１％ＰｌｕｒｏｎｉｃＦ－６８（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ ２４０４０－０３２）

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

・ポリエチレンイミン（ＰＥＩ）原液：直鎖２５ｋＤａＰＥＩ（Ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いて調製され、－１５℃未満で保存された１ｍｇ／ｍＬの無菌原溶液、ｐＨ７．０。

・Ｔｒｙｐｔｏｎｅ Ｆｅｅｄ Ｍｅｄｉｕｍ：ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ ２９３ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｍｅｄｉｕｍ中のＴｒｙｐｔｏｎｅ Ｎ１（Ｏｒｇａｎｏｔｅｃｈｎｉ

ｅ，１９５５４）の５％ｗ／ｖ無菌原液。

【０５４３】

形質移入のための細胞調製：形質移入の約２から４時間前に、遠心によってＨＥＫ２９３－６Ｅ細胞を採集し、約１００万の生きた細胞／ｍＬの細胞密度で培地中に再懸濁する。各形質移入に対して、細胞懸濁物４０ｍＬを使い捨ての２５０ｍＬエーレンマイヤーフラスコ中に移し、２から４時間温置する。

【０５４４】

形質移入：形質移入培地及びＰＥＩ原液を室温（ＲＴ）まで予め加温する。各形質移入のために、プラスミドＤＮＡ２５μｇ及びポリエチレンイミン（ＰＥＩ）５０μｇを、形質移入培地５ｍＬ中に合わせ、ＤＮＡ：ＰＥＩ複合体を形成させるために、室温で１５から２０分間温置する。ＢＲ３－Ｉｇ形質移入のために、形質移入当りＢＲ３－Ｉｇプラスミド２５μｇを使用する。予め調製された４０ｍＬの培養物に、それぞれのＤＮＡ：ＰＥＩ複合体混合物５ｍＬを添加し、１３０ｒｐｍ、３７℃及び５％CO_2に設定された、加湿された温置装置に戻す。２０から２８時間後に、各形質移入にＴｒｙｐｔｏｎｅ　Ｆｅｄ　Ｍｅｄｉｕｍ５ｍＬを添加し、培養を６日間継続する。

【０５４５】

表１６は、２９３細胞中での、ｍｇ／Ｌとして表された親抗体又はＤＶＤ－Ｉｇ構築物に対する収率データを含む。

【０５４６】

【表１６】

表16: 293細胞中での親抗体及びDVD-Ig構築物の収量の一過性発現

親抗体又は DVD-Ig番号	N末端 可変ドメイン (VD)	C末端 可変ドメイン (VD)	発現収量 (mg/L)
AB044	Aβ(配列2)		48.8
AB017	TNF		123.2
AB044	Aβ(配列2)		48.8
AB044	Aβ(配列2)		48.8
AB032	IL-1B		27
AB044	Aβ(配列2)		48.8
DVD201	Aβ(配列2)	Aβ(配列1)	7
DVD202	Aβ(配列1)	Aβ(配列2)	41.4
AB010	IGF1,2		38.6
AB044	Aβ(配列2)		48.8

親抗体又は DVD-Ig番号	N末端 可変ドメイン (VD)	C末端 可変ドメイン (VD)	発現収量 (mg/L)
AB044	Aβ(配列2)		48.8
AB040	IL-6		25.8
AB044	Aβ(配列2)		48.8
AB017	TNF		123.2
AB032	IL-1B		27.0
AB010	IGF1,2		38.6
AB040	IL-6		25.8
AB017	TNF		123.2
DVD223	Aβ(配列1)	TNF	18.2
DVD224	TNF	Aβ(配列1)	30.6
AB032	IL-1B		27
DVD225	Aβ(配列1)	IL-1B	4.4
DVD226	IL-1B	Aβ(配列1)	2.2
AB010	IGF1,2		38.6
DVD229	Aβ(配列1)	IGF1,2	64
DVD230	IGF1,2	Aβ(配列1)	11.4
DVD231	Aβ(配列1)	IL-18	11.2
DVD232	IL-18	Aβ(配列1)	18.4
AB040	IL-6		25.8
DVD233	Aβ(配列1)	IL-6	5.8
AB060	RAGE		107.2
DVD293	Aβ(配列1)	RAGE	48.4
DVD294	RAGE	Aβ(配列1)	87
AB020	NGF		28
AB020	NGF		28
AB032	IL-1B		27
AB020	NGF		28
AB040	IL-6		25.8
AB017	TNF		123.2
AB033	EGFR (配列2)		44.4
DVD289	TNF	EGFR (配列2)	14
DVD290	EGFR (配列2)	TNF	4.8
AB017	TNF		123.2
AB060	RAGE		107.2
DVD295	RAGE	TNF	46.4
DVD296	TNF	RAGE	39.6
AB001	CD20		90.2
AB017	TNF		123.2
AB059	RGMa		17.8
DVD291	TNF	RGMa	5.8
DVD292	RGMa	TNF	0.6
AB001	CD20		90.2
AB033	EGFR (配列2)		44.4
DVD235	CD20	EGFR (配列2)	0
DVD236	EGFR (配列2)	CD20	7.2

【０５４７】

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

【０５４８】

（実施例１．４．５）

Ａ／ＢＤＶＤ－Ｉｇの性質決定及びリード選択

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

【０５４９】

（実施例２）

二重可変ドメイン免疫グロブリン（ＤＶＤ－Ｉｇ）の作製及び性質決定

ＤＶＤ－Ｉｇ可変重及びＤＶＤ－Ｉｇ可変軽鎖配列をコードするポリヌクレオチド断片を合成し、実施例１．４．４．１に従って、ｐＨｙｂＣ－Ｄ２ベクター中に断片をクローニングすることによって、既知のアミノ酸配列を有する親抗体を用いて二重可変ドメイン免疫グロブリン（ＤＶＤ－Ｉｇ）を作製した。実施例１．４．４．２に記載されているように、ＤＶＤ－Ｉｇ構築物を２９３細胞中にクローニングし、発現させた。標準的な方法に従って、ＤＶＤ－Ｉｇタンパク質を精製した。表記されているように、実施例１．１．１及び１．１．２に記載されている方法に従って、機能的な特徴を決定した。本発明のＤＶＤ－Ｉｇに対するＤＶＤ－ＩｇＶＨ及びＶＬ鎖が、以下に記載されている。

【０５５０】

（実施例２．１）

Ａβ（配列１）及びＡβ（配列３）ＤＶＤ－Ｉｇの作製

【０５５１】

【表１７】

表17

配列番号	DVD可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 12345678901234567890123456789012345678901234
62	**VD193H**	AB044VH	AB045VH	EVKLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVASIHNRGTIFYLDSVKGRFT ISRDNVRNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGRSNS YAMDYWGQGTSVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLE LVASINSNGGSTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCASGDYWGQGTLVTVSS
63	**VD193L**	AB044VL	AB045VL	DVLVTQSPLSLPVTPGEPASISCRSTQTLVHRNG DTYLEWYLQKPGQSPQSLIYKVSNRFSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYT FGQGTKLEIKR**TVAAP**DIVMTQSPLSLPVTPGEP ASISCRSSQSLVYSNGDTYLHWYLQKPGQSPKLL IYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVYYCSQSTHVPWTFGGGTKVEIKR
64	**VD194H**	AB045VH	AB044VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGM SWVRQAPGKGLELVASINSNGGSTYYPDSVKGRF TISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASGDYW GQGTLVTVSS**ASTKGP**EVKLVESGGGLVKPGGSL RLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVASIH NRGTIFYLDSVKGRFTISRDNVRNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCTRGRSNSYAMDYWGQGTSVTVSS
65	**VD194L**	AB045VL	AB044VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVYSNG DTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPWT FGGGTKVEIKR**TVAAP**DVLVTQSPLSLPVTPGEP ASISCRSTQTLVHRNGDTYLEWYLQKPGQSPQSL IYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVYYCFQGSHVPYTFGQGTKLEIKR

【０５５２】

（実施例２．２）

ＴＮＦ及びＡβ（配列２）ＤＶＤ－Ｉｇの作製

【０５５３】

【表１８】

表18

配列番号	DVD可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 12345678901234567890123456789012345678901234
66	**VD195H**	AB044VH	AB017VH	EVKLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVASIHNRGTIFYLDSVKGRFT ISRDNVRNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGRSNS YAMDYWGQGTSVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLV QPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLE WVSAITWNSGHIDYADSVEGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQG TLVTVSS
67	**VD195L**	AB044VL	AB017VL	DVLVTQSPLSLPVTPGEPASISCRSTQTLVHRNG DTYLEWYLQKPGQSPQSLIYKVSNRFSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYT FGQGTKLEIKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATY YCQRYNRAPYTFGQGTKVEIKR
68	**VD196H**	AB017VH	AB044VH	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAM HWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDYADSVEGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYL STASSLDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVKLVESGG GLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVASIHNRGTIFYLDSVKGRFTISRDNVRNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGRSNSYAMDYWGQG TSVTVSS
69	**VD196L**	AB017VL	AB044VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLA WYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGT KVEIKR**TVAAP**DVLVTQSPLSLPVTPGEPASISC RSTQTLVHRNGDTYLEWYLQKPGQSPQSLIYKVS NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCFQGSHVPYTFGQGTKLEIKR

【０５５４】

（実施例２．３）

ＩＬ－１β及びＡβ（配列２）ＤＶＤ－Ｉｇの作製

【０５５５】

【表１９】

表19

配列番号	DVD可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 12345678901234567890123456789012345678901234
70	**VD197H**	AB044VH	AB032VH	EVKLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVASIHNRGTIFYLDSVKGRFT ISRDNVRNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGRSNS YAMDYWGQGTSVTVSS**ASTKGP**QVQLVESGGGVV QPGRSLRLSCAASGFTFSVYGMNWVRQAPGKGLE WVAIIWYDGDNQYYADSVKGRFTISRDNSKNTLY LQMNGLRAEDTAVYYCARDLRTGPFDYWGQGTLV TVSS
71	**VD197L**	AB044VL	AB032VL	DVLVTQSPLSLPVTPGEPASISCRSTQTLVHRNG DTYLEWYLQKPGQSPQSLIYKVSNRFSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYT FGQGTKLEIKR**TVAAP**EIVLTQSPDFQSVTPKEK VTITCRASQSIGSSLHWYQQKPDQSPKLLIKYAS QSFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAAAY YCHQSSSLPFTFGPGTKVDIKR
72	**VD198H**	AB032VH	AB044VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSVYGM NWVRQAPGKGLEWVAIIWYDGDNQYYADSVKGRF TISRDNSKNTLYLQMNGLRAEDTAVYYCARDLRT GPFDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVKLVESGGGLV KPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLE WVASIHNRGTIFYLDSVKGRFTISRDNVRNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCTRGRSNSYAMDYWGQGTSV TVSS
73	**VD198L**	AB032VL	AB044VL	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLH WYQQKPDQSPKLLIKYASQSFSGVPSRFSGSGSG TDFTLTINSLEAEDAAAYYCHQSSSLPFTFGPGT KVDIKR**TVAAP**DVLVTQSPLSLPVTPGEPASISC RSTQTLVHRNGDTYLEWYLQKPGQSPQSLIYKVS NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCFQGSHVPYTFGQGTKLEIKR

【０５５６】

（実施例２．４）

ＡβＡβ（配列１）及びＡβ（配列２）ＤＶＤ－Ｉｇの作製

【０５５７】

【表２０】

表 20

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側 可変ドメイン名	内側 可変ドメイン名	配列 12345678901234567890123456789012345678901234
74	**VD201H**	AB044VH	AB043VH	EVKLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVASIHNRGTIFYLDSVKGRFT ISRDNVRNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGRSNS YAMDYWGQGTSVTVSS**ASTKGP**EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQAPGKGLE WVASIRSGGGRTYYSDNVKGRFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCVRYDHYSGSSDYWGQGTL VTVSS
75	**VD201L**	AB044VL	AB043VL	DVLVTQSPLSLPVTPGEPASISCRSTQTLVHRNG DTYLEWYLQKPGQSPQSLIYKVSNRFSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYT FGQGTKLEIKR**TVAAP**DVVMTQSPLSLPVTPGEP ASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQKPGQSPQRL IYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVYYCWQGTHFPRTFGQGTKVEIKR
76	**VD202H**	AB043VH	AB044VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGM SWVRQAPGKGLEWVASIRSGGGRTYYSDNVKGRF TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRYDHY SGSSDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVKLVESGGGL VKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGL EWVASIHNRGTIFYLDSVKGRFTISRDNVRNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCTRGRSNSYAMDYWGQGTS VTVSS
77	**VD202L**	AB043VL	AB044VL	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCKSSQSLLDSDG KTYLNWLLQKPGQSPQRLIYLVSKLDSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPRT FGQGTKVEIKR**TVAAP**DVLVTQSPLSLPVTPGEP ASISCRSTQTLVHRNGDTYLEWYLQKPGQSPQSL IYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVYYCFQGSHVPYTFGQGTKLEIKR

【０５５８】

（実施例２．５）

ＩＧＦ１，２及びＡβ（配列２）ＤＶＤ－Ｉｇの作製

【０５５９】

【表２１】

表 21

配列番号	DVD可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 12345678901234567890123456789012345678901234
78	**VD203H**	AB044VH	AB010VH	EVKLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVASIHNRGTIFYLDSVKGRFT ISRDNVRNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGRSNS YAMDYWGQGTSVTVSS**ASTKGP**QVQLVQSGAEVK KPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQATGQGLE WMGWMNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRNTSISTAY MELSSLRSEDTAVYYCARDPYYYYYGMDVWGQGT TVTVSS
79	**VD203L**	AB044VL	AB010VL	DVLVTQSPLSLPVTPGEPASISCRSTQTLVHRNG DTYLEWYLQKPGQSPQSLIYKVSNRFSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYT FGQGTKLEIKR**TVAAP**QSVLTQPPSVSAAPGQKV TISCSGSSSNIENNHVSWYQQLPGTAPKLLIYDN NKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEAD YYCETWDTSLSAGRVFGGGTKLTVLG
80	**VD204H**	AB010VH	AB044VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDI NWVRQATGQGLEWMGWMNPNSGNTGYAQKFQGRV TMTRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPYY YYYGMDVWGQGTTVTVSS**ASTKGP**EVKLVESGGG LVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG LEWVASIHNRGTIFYLDSVKGRFTISRDNVRNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCTRGRSNSYAMDYWGQGT SVTVSS
81	**VD204L**	AB010VL	AB044VL	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIENNHV SWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKS GTSATLGITGLQTGDEADYYCETWDTSLSAGRVF GGGTKLTVLG**QPKAAP**DVLVTQSPLSLPVTPGEP ASISCRSTQTLVHRNGDTYLEWYLQKPGQSPQSL IYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVYYCFQGSHVPYTFGQGTKLEIKR

【０５６０】

（実施例２．６）

Ａβ（配列２）及びＩＬ－１８ＤＶＤ－Ｉｇの作製

【０５６１】

【表２２】

表 22

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側 可変ドメイン名	内側 可変ドメイン名	配列 12345678901234567890123456789012345678901234
82	**VD205H**	AB044VH	AB046VH	EVKLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVASIHNRGTIFYLDSVKGRFT ISRDNVRNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGRSNS YAMDYWGQGTSVTVSS**ASTKGP**EVQLVQSGTEVK KPGESLKISCKGSGYTVTSYWIGWVRQMPGKGLE WMGFIYPGDSETRYSPTFQGQVTISADKSFNTAF LQWSSLKASDTAMYYCARVGSGWYPYTFDIWGQG TMVTVSS
83	**VD205L**	AB044VL	AB046VL	DVLVTQSPLSLPVTPGEPASISCRSTQTLVHRNG DTYLEWYLQKPGQSPQSLIYKVSNRFSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYT FGQGTKLEIKR**TVAAP**EIVMTQSPATLSVSPGER ATLSCRASESISSNLAWYQQKPGQAPRLFIYTAS TRATDIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVY YCQQYNNWPSITFGQGTRLEIKR
84	**VD206H**	AB046VH	AB044VH	EVQLVQSGTEVKKPGESLKISCKGSGYTVTSYWI GWVRQMPGKGLEWMGFIYPGDSETRYSPTFQGQV TISADKSFNTAFLQWSSLKASDTAMYYCARVGSG WYPYTFDIWGQGTMVTVSS**ASTKGP**EVKLVESGG GLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVASIHNRGTIFYLDSVKGRFTISRDNVRNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGRSNSYAMDYWGQG TSVTVSS
85	**VD206L**	AB046VL	AB044VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESISSNLA WYQQKPGQAPRLFIYTASTRATDIPARFSGSGSG TEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPSITFGQG TRLEIKR**TVAAP**DVLVTQSPLSLPVTPGEPASIS CRSTQTLVHRNGDTYLEWYLQKPGQSPQSLIYKV SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCFQGSHVPYTFGQGTKLEIKR

【０５６２】

（実施例２．７）

ＩＬ－６及びＡβ（配列２）ＤＶＤ－Ｉｇの作製

【０５６３】

【表２３】

表 23

配列番号	DVD可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 12345678901234567890123456789012345678901234
86	**VD207H**	AB044VH	AB040VH	EVKLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVASIHNRGTIFYLDSVKGRFT ISRDNVRNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGRSNS YAMDYWGQGTSVTVSS**ASTKGP**QVTLKESGPGIL QPSQTLSLTCSFSGFSLSTNGMGVSWIRQPSGKG LEWLAHIYWDEDKRYNPSLKSRLTISKDTSNNQV FLKITNVDTADTATYYCARRRIIYDVEDYFDYWG QGTTLTVSS
87	**VD207L**	AB044VL	AB040VL	DVLVTQSPLSLPVTPGEPASISCRSTQTLVHRNG DTYLEWYLQKPGQSPQSLIYKVSNRFSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPYT FGQGTKLEIKR**TVAAP**QIVLIQSPAIMSASPGEK VTMTCSASSSVSYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSN LASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYY CQQWSGYPYTFGGGTKLEIKR
88	**VD208H**	AB040VH	AB044VH	QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTNGM GVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDEDKRYNPSLKSR LTISKDTSNNQVFLKITNVDTADTATYYCARRRI IYDVEDYFDYWGQGTTLTVSS**ASTKGP**EVKLVES GGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVASIHNRGTIFYLDSVKGRFTISRDNVR NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGRSNSYAMDYWG QGTSVTVSS
89	**VD208L**	AB040VL	AB044VL	QIVLIQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYW YQQKPGSSPRLLIYDTSNLASGVPVRFSGSGSGT SYSLTISRMEAEDAATYYCQQWSGYPYTFGGGTK LEIKR**TVAAP**DVLVTQSPLSLPVTPGEPASISCR STQTLVHRNGDTYLEWYLQKPGQSPQSLIYKVSN RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CFQGSHVPYTFGQGTKLEIKR

【０５６４】

（実施例２．８）

ＴＮＦ及びＡβ（配列３）ＤＶＤ－Ｉｇの作製

【０５６５】

【表２４】

表 24

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側 可変ドメイン名	内側 可変ドメイン名	配列 12345678901234567890123456789012345678
90	**VD209H**	AB045VH	AB017VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGM SWVRQAPGKGLELVASINSNGGSTYYPDSVKGRF TISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASGDYW GQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPGRSL RLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAIT WNSGHIDYADSVEGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGTLVTVS S
91	**VD209L**	AB045VL	AB017VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVYSNG DTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPWT FGGGTKVEIKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATY YCQRYNRAPYTFGQGTKVEIKR
92	**VD210H**	AB017VH	AB045VH	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAM HWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDYADSVEGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYL STASSLDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPGK GLELVASINSNGGSTYYPDSVKGRFTISRDNAKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCASGDYWGQGTLVTVS S
93	**VD210L**	AB017VL	AB045VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLA WYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGT KVEIKR**TVAAP**DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC RSSQSLVYSNGDTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVS NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCSQSTHVPWTFGGGTKVEIKR

【０５６６】

（実施例２．９）

ＩＬ－１β及びＡβ（配列３）ＤＶＤ－Ｉｇの作製

【０５６７】

【表２５】

表25

配列番号	DVD可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 12345678901234567890123456789012345678
94	**VD211H**	AB045VH	AB032VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGM SWVRQAPGKGLELVASINSNGGSTYYPDSVKGRF TISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASGDYW GQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLVESGGGVVQPGRSL RLSCAASGFTFSVYGMNWVRQAPGKGLEWVAIIW YDGDNQYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNGL RAEDTAVYYCARDLRTGPFDYWGQGTLVTVSS
95	**VD211L**	AB045VL	AB032VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVYSNG DTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPWT FGGGTKVEIKR**TVAAP**EIVLTQSPDFQSVTPKEK VTITCRASQSIGSSLHWYQQKPDQSPKLLIKYAS QSFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAAAY YCHQSSSLPFTFGPGTKVDIKR
96	**VD212H**	AB032VH	AB045VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSVYGM NWVRQAPGKGLEWVAIIWYDGDNQYYADSVKGRF TISRDNSKNTLYLQMNGLRAEDTAVYYCARDLRT GPFDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLE LVASINSNGGSTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCASGDYWGQGTLVTVSS
97	**VD212L**	AB032VL	AB045VL	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLH WYQQKPDQSPKLLIKYASQSFSGVPSRFSGSGSG TDFTLTINSLEAEDAAAYYCHQSSSLPFTFGPGT KVDIKR**TVAAP**DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC RSSQSLVYSNGDTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVS NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCSQSTHVPWTFGGGTKVEIKR

【０５６８】

（実施例２．１０）

Ａβ（配列１）及びＡβ（配列３）ＤＶＤ－Ｉｇの作製

【０５６９】

【表２６】

表 26

配列番号	DVD可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 12345678901234567890123456789012345678901234
98	**VD215H**	AB045VH	AB043VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGM SWVRQAPGKGLELVASINSNGGSTYYPDSVKGRF TISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASGDYW GQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFSNYGMSWVRQAPGKGLEWVASIR SGGGRTYYSDNVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCVRYDHYSGSSDYWGQGTLVTVSS
99	**VD215L**	AB045VL	AB043VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVYSNG DTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPWT FGGGTKVEIKR**TVAAP**DVVMTQSPLSLPVTPGEP ASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQKPGQSPQRL IYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVYYCWQGTHFPRTFGQGTKVEIKR
100	**VD216H**	AB043VH	AB045VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGM SWVRQAPGKGLEWVASIRSGGGRTYYSDNVKGRF TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRYDHY SGSSDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKGL ELVASINSNGGSTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCASGDYWGQGTLVTVSS
101	**VD216L**	AB043VL	AB045VL	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCKSSQSLLDSDG KTYLNWLLQKPGQSPQRLIYLVSKLDSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPRT FGQGTKVEIKR**TVAAP**DIVMTQSPLSLPVTPGEP ASISCRSSQSLVYSNGDTYLHWYLQKPGQSPKLL IYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVYYCSQSTHVPWTFGGGTKVEIKR

【０５７０】

（実施例２．１１）

ＩＧＦ１，２及びＡβ（配列３）ＤＶＤ－Ｉｇの作製

【０５７１】

【表２７】

表27

配列番号	DVD可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 12345678901234567890123456789012345678901234
102	**VD217H**	AB045VH	AB010VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGM SWVRQAPGKGLELVASINSNGGSTYYPDSVKGRF TISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASGDYW GQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLVQSGAEVKKPGASV KVSCKASGYTFTSYDINWVRQATGQGLEWMGWMN PNSGNTGYAQKFQGRVTMTRNTSISTAYMELSSL RSEDTAVYYCARDPYYYYYGMDVWGQGTTVTVSS
103	**VD217L**	AB045VL	AB010VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVYSNG DTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPWT FGGGTKVEIKR**TVAAP**QSVLTQPPSVSAAPGQKV TISCSGSSSNIENNHVSWYQQLPGTAPKLLIYDN NKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEAD YYCETWDTSLSAGRVFGGGTKLTVLG
104	**VD218H**	AB010VH	AB045VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDI NWVRQATGQGLEWMGWMNPNSGNTGYAQKFQGRV TMTRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPYY YYYGMDVWGQGTTVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKG LELVASINSNGGSTYYPDSVKGRFTISRDNAKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCASGDYWGQGTLVTVSS
105	**VD218L**	AB010VL	AB045VL	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIENNHV SWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKS GTSATLGITGLQTGDEADYYCETWDTSLSAGRVF GGGTKLTVLG**QPKAAP**DIVMTQSPLSLPVTPGEP ASISCRSSQSLVYSNGDTYLHWYLQKPGQSPKLL IYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVYYCSQSTHVPWTFGGGTKVEIKR

【０５７２】

（実施例２．１２）

Ａβ（配列３）及びＩＬ－１８ＤＶＤ－Ｉｇの作製

【０５７３】

【表２８】

表 28

配列番号	DVD可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 12345678901234567890123456789012345678901234
106	**VD219H**	AB045VH	AB046VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLELVASINSNGGSTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASGDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVQSGTEVKKPGESLKISCKGSGYTVTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGFIYPGDSETRYSPTFQGQVTISADKSFNTAFLQWSSLKASDTAMYYCARVGSGWYPYTFDIWGQGTMVTVSS
107	**VD219L**	AB045VL	AB046VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVYSNGDTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPWTFGGGTKVEIKR**TVAAP**EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESISSNLAWYQQKPGQAPRLFIYTASTRATDIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPSITFGQGTRLEIKR
108	**VD220H**	AB046VH	AB045VH	EVQLVQSGTEVKKPGESLKISCKGSGYTVTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGFIYPGDSETRYSPTFQGQVTISADKSFNTAFLQWSSLKASDTAMYYCARVGSGWYPYTFDIWGQGTMVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLELVASINSNGGSTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASGDYWGQGTLVTVSS
109	**VD220L**	AB046VL	AB045VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESISSNLAWYQQKPGQAPRLFIYTASTRATDIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPSITFGQGTRLEIKR**TVAAP**DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVYSNGDTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPWTFGGGTKVEIKR

【０５７４】

（実施例２．１３）

ＩＬ－６及びＡβ（配列３）ＤＶＤ－Ｉｇの作製

【０５７５】

【表２９】

表 29

配列番号	DVD可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 12345678901234567890123456789012345678
110	**VD221H**	AB045VH	AB040VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGM SWVRQAPGKGLELVASINSNGGSTYYPDSVKGRF TISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASGDYW GQGTLVTVSS**ASTKGP**QVTLKESGPGILQPSQTL SLTCSFSGFSLSTNGMGVSWIRQPSGKGLEWLAH IYWDEDKRYNPSLKSRLTISKDTSNNQVFLKITN VDTADTATYYCARRRIIYDVEDYFDYWGQGTTLT VSS
111	**VD221L**	AB045VL	AB040VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVYSNG DTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPWT FGGGTKVEIKR**TVAAP**QIVLIQSPAIMSASPGEK VTMTCSASSSVSYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSN LASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYY CQQWSGYPYTFGGGTKLEIKR
112	**VD222H**	AB040VH	AB045VH	QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTNGM GVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDEDKRYNPSLKSR LTISKDTSNNQVFLKITNVDTADTATYYCARRRI IYDVEDYFDYWGQGTTLTVSS**ASTKGP**EVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAP GKGLELVASINSNGGSTYYPDSVKGRFTISRDNA KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASGDYWGQGTLVT VSS
113	**VD222L**	AB040VL	AB045VL	QIVLIQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYW YQQKPGSSPRLLIYDTSNLASGVPVRFSGSGSGT SYSLTISRMEAEDAATYYCQQWSGYPYTFGGGTK LEIKR**TVAAP**DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCR SSQSLVYSNGDTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSN RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CSQSTHVPWTFGGGTKVEIKR

【０５７６】

（実施例２．１４）

ＴＮＦ及びＡβ（配列１）ＤＶＤ－Ｉｇの作製

【０５７７】

【表３０】

表 30

配列番号	DVD可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 12345678901234567890123456789012345678901234
114	**VD223H**	AB043VH	AB017VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGM SWVRQAPGKGLEWVASIRSGGGRTYYSDNVKGRF TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRYDHY SGSSDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGGL VQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGL EWVSAITWNSGHIDYADSVEGRFTISRDNAKNSL YLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQ GTLVTVSS
115	**VD223L**	AB043VL	AB017VL	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCKSSQSLLDSDG KTYLNWLLQKPGQSPQRLIYLVSKLDSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPRT FGQGTKVEIKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATY YCQRYNRAPYTFGQGTKVEIKR
116	**VD224H**	AB017VH	AB043VH	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAM HWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDYADSVEGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYL STASSLDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLLESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQAPGK GLEWVASIRSGGGRTYYSDNVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRYDHYSGSSDYWGQ GTLVTVSS
117	**VD224L**	AB017VL	AB043VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLA WYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGT KVEIKR**TVAAP**DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISC KSSQSLLDSDGKTYLNWLLQKPGQSPQRLIYLVS KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPRTFGQGTKVEIKR

【０５７８】

（実施例２．１５）

ＩＬ－１β及びＡβ（配列１）ＤＶＤ－Ｉｇの作製

【０５７９】

【表３１】

表 31

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側 可変ドメイン名	内側 可変ドメイン名	配列 12345678901234567890123456789012345678901234
118	**VD225H**	AB043VH	AB032VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGM SWVRQAPGKGLEWVASIRSGGGRTYYSDNVKGRF TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRYDHY SGSSDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLVESGGGV VQPGRSLRLSCAASGFTFSVYGMNWVRQAPGKGL EWVAIIWYDGDNQYYADSVKGRFTISRDNSKNTL YLQMNGLRAEDTAVYYCARDLRTGPFDYWGQGTL VTVSS
119	**VD225L**	AB043VL	AB032VL	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCKSSQSLLDSDG KTYLNWLLQKPGQSPQRLIYLVSKLDSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPRT FGQGTKVEIKR**TVAAP**EIVLTQSPDFQSVTPKEK VTITCRASQSIGSSLHWYQQKPDQSPKLLIKYAS QSFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAAAY YCHQSSSLPFTFGPGTKVDIKR
120	**VD226H**	AB032VH	AB043VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSVYGM NWVRQAPGKGLEWVAIIWYDGDNQYYADSVKGRF TISRDNSKNTLYLQMNGLRAEDTAVYYCARDLRT GPFDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLLESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQAPGKGLE WVASIRSGGGRTYYSDNVKGRFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCVRYDHYSGSSDYWGQGTL VTVSS
121	**VD226L**	AB032VL	AB043VL	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLH WYQQKPDQSPKLLIKYASQSFSGVPSRFSGSGSG TDFTLTINSLEAEDAAAYYCHQSSSLPFTFGPGT KVDIKR**TVAAP**DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISC KSSQSLLDSDGKTYLNWLLQKPGQSPQRLIYLVS KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPRTFGQGTKVEIKR

【０５８０】

（実施例２．１６）

ＩＧＦ１，２及びＡβ（配列１）ＤＶＤ－Ｉｇの作製

【０５８１】

【表３２】

表 32

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側 可変ドメイン名	内側 可変ドメイン名	配列 12345678901234567890123456789012345678901234
122	**VD229H**	AB043VH	AB010VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGM SWVRQAPGKGLEWVASIRSGGGRTYYSDNVKGRF TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRYDHY SGSSDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLVQSGAEV KKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQATGQGL EWMGWMNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRNTSISTA YMELSSLRSEDTAVYYCARDPYYYYYGMDVWGQG TTVTVSS
123	**VD229L**	AB043VL	AB010VL	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCKSSQSLLDSDG KTYLNWLLQKPGQSPQRLIYLVSKLDSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPRT FGQGTKVEIKR**TVAAP**QSVLTQPPSVSAAPGQKV TISCSGSSSNIENNHVSWYQQLPGTAPKLLIYDN NKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEAD YYCETWDTSLSAGRVFGGGTKLTVLG
124	**VD230H**	AB010VH	AB043VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDI NWVRQATGQGLEWMGWMNPNSGNTGYAQKFQGRV TMTRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPYY YYYGMDVWGQGTTVTVSS**ASTKGP**EVQLLESGGG LVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQAPGKG LEWVASIRSGGGRTYYSDNVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCVRYDHYSGSSDYWGQG TLVTVSS
125	**VD230L**	AB010VL	AB043VL	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIENNHV SWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKS GTSATLGITGLQTGDEADYYCETWDTSLSAGRVF GGGTKLTVLG**QPKAAP**DVVMTQSPLSLPVTPGEP ASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQKPGQSPQRL IYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVYYCWQGTHFPRTFGQGTKVEIKR

【０５８２】

（実施例２．１７）

ＡβＡ（配列１）及びＩＬ－１８ＤＶＤ－Ｉｇの作製

【０５８３】

【表３３】

表33

配列番号	DVD可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 12345678901234567890123456789012345678901234
126	**VD231H**	AB043VH	AB046VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGM SWVRQAPGKGLEWVASIRSGGGRTYYSDNVKGRF TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRYDHY SGSSDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVQSGTEV KKPGESLKISCKGSGYTVTSYWIGWVRQMPGKGL EWMGFIYPGDSETRYSPTFQGQVTISADKSFNTA FLQWSSLKASDTAMYYCARVGSGWYPYTFDIWGQ GTMVTVSS
127	**VD231L**	AB043VL	AB046VL	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCKSSQSLLDSDG KTYLNWLLQKPGQSPQRLIYLVSKLDSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPRT FGQGTKVEIKR**TVAAP**EIVMTQSPATLSVSPGER ATLSCRASESISSNLAWYQQKPGQAPRLFIYTAS TRATDIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVY YCQQYNNWPSITFGQGTRLEIKR
128	**VD232H**	AB046VH	AB043VH	EVQLVQSGTEVKKPGESLKISCKGSGYTVTSYWI GWVRQMPGKGLEWMGFIYPGDSETRYSPTFQGQV TISADKSFNTAFLQWSSLKASDTAMYYCARVGSG WYPYTFDIWGQGTMVTVSS**ASTKGP**EVQLLESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQAPGK GLEWVASIRSGGGRTYYSDNVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRYDHYSGSSDYWGQ GTLVTVSS
129	**VD232L**	AB046VL	AB043VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESISSNLA WYQQKPGQAPRLFIYTASTRATDIPARFSGSGSG TEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPSITFGQG TRLEIKR**TVAAP**DVVMTQSPLSLPVTPGEPASIS CKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQKPGQSPQRLIYLV SKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCWQGTHFPRTFGQGTKVEIKR

【０５８４】

（実施例２．１８）

ＩＬ－６及びＡβ（配列１）ＤＶＤ－Ｉｇの作製

【０５８５】

【表３４】

表34

配列番号	DVD可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 12345678901234567890123456789012345678901234
130	**VD233H**	AB043VH	AB040VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGM SWVRQAPGKGLEWVASIRSGGGRTYYSDNVKGRF TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRYDHY SGSSDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVTLKESGPGI LQPSQTLSLTCSFSGFSLSTNGMGVSWIRQPSGK GLEWLAHIYWDEDKRYNPSLKSRLTISKDTSNNQ VFLKITNVDTADTATYYCARRRIIYDVEDYFDYW GQGTTLTVSS
131	**VD233L**	AB043VL	AB040VL	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCKSSQSLLDSDG KTYLNWLLQKPGQSPQRLIYLVSKLDSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPRT FGQGTKVEIKR**TVAAP**QIVLIQSPAIMSASPGEK VTMTCSASSSVSYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSN LASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYY CQQWSGYPYTFGGGTKLEIKR
132	**VD234H**	AB040VH	AB043VH	QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTNGM GVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDEDKRYNPSLKSR LTISKDTSNNQVFLKITNVDTADTATYYCARRRI IYDVEDYFDYWGQGTTLTVSS**ASTKGP**EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQAP GKGLEWVASIRSGGGRTYYSDNVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRYDHYSGSSDYW GQGTLVTVSS
133	**VD234L**	AB040VL	AB043VL	QIVLIQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYW YQQKPGSSPRLLIYDTSNLASGVPVRFSGSGSGT SYSLTISRMEAEDAATYYCQQWSGYPYTFGGGTK LEIKR**TVAAP**DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCK SSQSLLDSDGKTYLNWLLQKPGQSPQRLIYLVSK LDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CWQGTHFPRTFGQGTKVEIKR

【０５８６】

（実施例２．１９）

ＡβＡ（配列１）及びＲＡＧＥＤＶＤ－Ｉｇの作製

【０５８７】

【表３５】

表35

配列番号	DVD可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 12345678901234567890123456789012345678
134	VD293H	AB060VH	AB043VH	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNFGM NWVKQAPGKGLKWMGYINTNTGESIYSEEFKGRF AFSLETSASTAYLQINNLKNEDTATYFCARSRMV TAYGMDYWGQGTSVTVSS**ASTKGP**EVQLLESGGG LVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQAPGKG LEWVASIRSGGGRTYYSDNVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCVRYDHYSGSSDYWGQG TLVTVSS
135	VD293L	AB060VL	AB043VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSITCKASQNVGTAVA WYQQRPGQSPKLLIFSASNRYTGVPDRFTGSGSG TDFTLTLSNMQPEDLADYFCQQYSSYPLTFGVGT KLELKR**TVAAP**DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISC KSSQSLLDSDGKTYLNWLLQKPGQSPQRLIYLVS KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCWQGTHFPRTFGQGTKVEIKR
136	VD294H	AB043VH	AB060VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGM SWVRQAPGKGLEWVASIRSGGGRTYYSDNVKGRF TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRYDHY SGSSDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QIQLVQSGPEL KKPGETVKISCKASGYTFTNFGMNWVKQAPGKGL KWMGYINTNTGESIYSEEFKGRFAFSLETSASTA YLQINNLKNEDTATYFCARSRMVTAYGMDYWGQG TSVTVSS
137	VD294L	AB043VL	AB060VL	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCKSSQSLLDSDG KTYLNWLLQKPGQSPQRLIYLVSKLDSGVPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPRT FGQGTKVEIKR**TVAAP**DIVMTQSQKFMSTSVGDR VSITCKASQNVGTAVAWYQQRPGQSPKLLIFSAS NRYTGVPDRFTGSGSGTDFTLTLSNMQPEDLADY FCQQYSSYPLTFGVGTKLELKR

【０５８８】

（実施例２．２０）

ＮＧＦ及びＩＬ－１８ＤＶＤ－Ｉｇの作製

【０５８９】

【表３６】

表 36

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側 可変ドメイン名	内側 可変ドメイン名	配列 12345678901234567890123456789012345678901234
138	**VD239H**	AB046VH	AB020VH	EVQLVQSGTEVKKPGESLKISCKGSGYTVTSYWI GWVRQMPGKGLEWMGFIYPGDSETRYSPTFQGQV TISADKSFNTAFLQWSSLKASDTAMYYCARVGSG WYPYTFDIWGQGTMVTVSS**ASTKGP**QVQLQESGP GLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGK GLEWIGIIWGDGTTDYNSAVKSRVTISKDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYYFDYW GQGTLVTVSS
139	**VD239L**	AB046VL	AB020VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASESISSNLA WYQQKPGQAPRLFIYTASTRATDIPARFSGSGSG TEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPSITFGQG TRLEIKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQSISNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHS GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQ EHTLPYTFGQGTKLEIKR
140	**VD240H**	AB020VH	AB046VH	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDL NWIRQPPGKGLEWIGIIWGDGTTDYNSAVKSRVT ISKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYWY ATSYYFDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**EVQLVQSGT EVKKPGESLKISCKGSGYTVTSYWIGWVRQMPGK GLEWMGFIYPGDSETRYSPTFQGQVTISADKSFN TAFLQWSSLKASDTAMYYCARVGSGWYPYTFDIW GQGTMVTVSS
141	**VD240L**	AB020VL	AB046VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISNNLN WYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGSG TDFTFTISSLQPEDIATYYCQQEHTLPYTFGQGT KLEIKR**TVAAP**EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC RASESISSNLAWYQQKPGQAPRLFIYTASTRATD IPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQY NNWPSITFGQGTRLEIKR

【０５９０】

（実施例２．２１）

ＮＧＦ及びＩＬ－１βＤＶＤ－Ｉｇの作製

【０５９１】

【表３７】

表 37

配列番号	DVD可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 12345678901234567890123456789012345678901234
142	**VD243H**	AB032VH	AB020VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSVYGM NWVRQAPGKGLEWVAIIWYDGDNQYYADSVKGRF TISRDNSKNTLYLQMNGLRAEDTAVYYCARDLRT GPFDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLQESGPGLV KPSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPPGKGLE WIGIIWGDGTTDYNSAVKSRVTISKDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYYFDYWGQG TLVTVSS
143	**VD243L**	AB032VL	AB020VL	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSLH WYQQKPDQSPKLLIKYASQSFSGVPSRFSGSGSG TDFTLTINSLEAEDAAAYYCHQSSSLPFTFGPGT KVDIKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQSISNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSG VPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQE HTLPYTFGQGTKLEIKR
144	**VD244H**	AB020VH	AB032VH	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDL NWIRQPPGKGLEWIGIIWGDGTTDYNSAVKSRVT ISKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYWY ATSYYFDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLVESGG GVVQPGRSLRLSCAASGFTFSVYGMNWVRQAPGK GLEWVAIIWYDGDNQYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNGLRAEDTAVYYCARDLRTGPFDYWGQG TLVTVSS
145	**VD244L**	AB020VL	AB032VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISNNLN WYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGSG TDFTFTISSLQPEDIATYYCQQEHTLPYTFGQGT KLEIKR**TVAAP**EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITC RASQSIGSSLHWYQQKPDQSPKLLIKYASQSFSG VPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAAAYYCHQS SSLPFTFGPGTKVDIKR

【０５９２】

（実施例２．２２）

ＮＧＦ及びＩＬ－６ＤＶＤ－Ｉｇの作製

【０５９３】

【表３８】

表38

配列番号	DVD可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 12345678901234567890123456789012345678901234
146	**VD247H**	AB040VH	AB020VH	QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTNGM GVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDEDKRYNPSLKSR LTISKDTSNNQVFLKITNVDTADTATYYCARRRI IYDVEDYFDYWGQGTTLTVSS**ASTKGP**QVQLQES GPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDLNWIRQPP GKGLEWIGIIWGDGTTDYNSAVKSRVTISKDTSK NQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYWYATSYYFD YWGQGTLVTVSS
147	**VD247L**	AB040VL	AB020VL	QIVLIQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYW YQQKPGSSPRLLIYDTSNLASGVPVRFSGSGSGT SYSLTISRMEAEDAATYYCQQWSGYPYTFGGGTK LEIKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR ASQSISNNLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGV PSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYCQQEH TLPYTFGQGTKLEIKR
148	**VD248H**	AB020VH	AB040VH	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLIGYDL NWIRQPPGKGLEWIGIIWGDGTTDYNSAVKSRVT ISKDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGGYWY ATSYYFDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVTLKESGP GILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTNGMGVSWIRQPS GKGLEWLAHIYWDEDKRYNPSLKSRLTISKDTSN NQVFLKITNVDTADTATYYCARRRIIYDVEDYFD YWGQGTTLTVSS
149	**VD248L**	AB020VL	AB040VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISNNLN WYQQKPGKAPKLLIYYTSRFHSGVPSRFSGSGSG TDFTFTISSLQPEDIATYYCQQEHTLPYTFGQGT KLEIKR**TVAAP**QIVLIQSPAIMSASPGEKVTMTC SASSSVSYMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLASGV PVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQWS GYPYTFGGGTKLEIKR

【０５９４】

（実施例２．２３）

ＴＮＦ及びＥＧＦＲ（配列２）ＤＶＤ－Ｉｇの作製

【０５９５】

【表３９】

表 39

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側 可変ドメイン名	内側 可変ドメイン名	配列 12345678901234567890123456789012345678901234
150	**VD289H**	AB017VH	AB033VH	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAM HWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDYADSVEGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYL STASSLDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QVQLKQSGP GLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGK GLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQ VFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQ GTLVTVSA
151	**VD289L**	AB017VL	AB033VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLA WYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGT KVEIKR**TVAAP**DILLTQSPVILSVSPGERVSFSC RASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISG IPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQN NNWPTTFGAGTKLELKR
152	**VD290H**	AB033VH	AB017VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGV HWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLS INKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYY DYEFAYWGQGTLVTVSA**ASTKGP**EVQLVESGGGL VQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGL EWVSAITWNSGHIDYADSVEGRFTISRDNAKNSL YLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQ GTLVTVSS
153	**VD290L**	AB033VL	AB017VL	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIH WYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSG TDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGT KLELKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQRY NRAPYTFGQGTKVEIKR

【０５９６】

（実施例２．２４）

ＴＮＦ及びＲＡＧＥＤＶＤ－Ｉｇの作製

【０５９７】

【表４０】

表40

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側 可変ドメイン名	内側 可変ドメイン名	配列 12345678901234567890123456789012345678
154	**VD295H**	AB060VH	AB017VH	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNFGM NWVKQAPGKGLKWMGYINTNTGESIYSEEFKGRF AFSLETSASTAYLQINNLKNEDTATYFCARSRMV TAYGMDYWGQGTSVTVSS**ASTKGP**EVQLVESGGG LVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKG LEWVSAITWNSGHIDYADSVEGRFTISRDNAKNS LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWG QGTLVTVSS
155	**VD295L**	AB060VL	AB017VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSITCKASQNVGTAVA WYQQRPGQSPKLLIFSASNRYTGVPDRFTGSGSG TDFTLTLSNMQPEDLADYFCQQYSSYPLTFGVGT KLELKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQRY NRAPYTFGQGTKVEIKR
156	**VD296H**	AB017VH	AB060VH	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAM HWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDYADSVEGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYL STASSLDYWGQGTLVTVSS**ASTKGP**QIQLVQSGP ELKKPGETVKISCKASGYTFTNFGMNWVKQAPGK GLKWMGYINTNTGESIYSEEFKGRFAFSLETSAS TAYLQINNLKNEDTATYFCARSRMVTAYGMDYWG QGTSVTVSS
157	**VD296L**	AB017VL	AB060VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLA WYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGT KVEIKR**TVAAP**DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSITC KASQNVGTAVAWYQQRPGQSPKLLIFSASNRYTG VPDRFTGSGSGTDFTLTLSNMQPEDLADYFCQQY SSYPLTFGVGTKLELKR

【０５９８】

（実施例２．２５）

ＣＤ－２０及びＥＧＦＲ（配列１）ＤＶＤ－Ｉｇの作製

【０５９９】

【表４１】

表41

配列番号	DVD可変ドメイン名	外側可変ドメイン名	内側可変ドメイン名	配列 12345678901234567890123456789012345678901234
158	**VD255H**	AB001VH	AB003VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNM HWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKA TLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYY GGDWYFNVWGAGTTVTVSA**ASTKGP**QVQLQESGP GLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGDYYWTWIRQSP GKGLEWIGHIYYSGNTNYNPSLKSRLTISIDTSK TQFSLKLSSVTAADTAIYYCVRDRVTGAFDIWGQ GTMVTVSS
159	**VD255L**	AB001VL	AB003VL	QIVLSQSPAILSPSPGEKVTMTCRASSSVSYIHW FQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGT SYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTK LEIKR**TVAAP**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQ ASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGV PSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYFCQHFD HLPLAFGGGTKVEIKR
160	**VD256H**	AB003VH	AB001VH	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGDY YWTWIRQSPGKGLEWIGHIYYSGNTNYNPSLKSR LTISIDTSKTQFSLKLSSVTAADTAIYYCVRDRV TGAFDIWGQGTMVTVSS**ASTKGP**QVQLQQPGAEL VKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGL EWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTA YMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGA GTTVTVSA
161	**VD256L**	AB003VL	AB001VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLN WYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSG TDFTFTISSLQPEDIATYFCQHFDHLPLAFGGGT KVEIKR**TVAAP**QIVLSQSPAILSPSPGEKVTMTC RASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGV PVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWT SNPPTFGGGTKLEIKR

【０６００】

（実施例２．２６）

ＣＤ－２０及びＥＧＦＲ（配列２）ＤＶＤ－Ｉｇの作製

【０６０１】

【表４２】

表42

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側 可変ドメイン名	内側 可変ドメイン名	配列 12345678901234567890123456789012345678901234
162	VD235H	AB001VH	AB033VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNM HWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKA TLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYY GGDWYFNVWGAGTTVTVSA**ASTKGP**QVQLKQSGP GLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGK GLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQ VFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQ GTLVTVSA
163	VD235L	AB001VL	AB033VL	QIVLSQSPAILSPSPGEKVTMTCRASSSVSYIHW FQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGT SYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTK LEIKR**TVAAP**DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCR ASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGI PSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNN NWPTTFGAGTKLELKR
164	VD236H	AB033VH	AB001VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGV HWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLS INKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYY DYEFAYWGQGTLVTVSA**ASTKGP**QVQLQQPGAEL VKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGL EWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTA YMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGA GTTVTVSA
165	VD236L	AB033VL	AB001VL	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIH WYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSG TDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGT KLELKR**TVAAP**QIVLSQSPAILSPSPGEKVTMTC RASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGV PVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWT SNPPTFGGGTKLEIKR

【０６０２】

（実施例２．２７）

ＲＧＭＡ及びＴＮＦＤＶＤ－Ｉｇの作製

【０６０３】

【表４３】

表43

配列番号	DVD 可変ドメイン名	外側 可変ドメイン名	内側 可変ドメイン名	配列 12345678901234567890123456789012345678
166	VD291H	AB017VH	AB059VH	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAM HWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDYADSVEGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYL STASSLDYWGQGTLVTVSSASTKGPEVQLVESGG GLVQPGSSLKLSCVASGFTFSNYGMNWIRQAPKK GLEWIGMIYYDSSEKHYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLEMNSLRSEDTAIYYCAKGTTPDYWGQGVMV TVSS
167	VD291L	AB017VL	AB059VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNYLA WYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGT KVEIKRTVAAPDVVLTQTPVSLSVTLGDQASMSC RSSQSLEYSDGYTFLEWFLQKPGQSPQLLIYEVS NRFSGVPDRFIGSGSGTDFTLKISRVEPEDLGVY YCFQATHDPLTFGSGTKLEIKR
168	VD292H	AB059VH	AB017VH	EVQLVESGGGLVQPGSSLKLSCVASGFTFSNYGM NWIRQAPKKGLEWIGMIYYDSSEKHYADSVKGRF TISRDNSKNTLYLEMNSLRSEDTAIYYCAKGTTP DYWGQGVMVTVSSASTKGPEVQLVESGGGLVQPG RSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVS AITWNSGHIDYADSVEGRFTISRDNAKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGTLV TVSS
169	VD292L	AB059VL	AB017VL	DVVLTQTPVSLSVTLGDQASMSCRSSQSLEYSDG YTFLEWFLQKPGQSPQLLIYEVSNRFSGVPDRFI GSGSGTDFTLKISRVEPEDLGVYYCFQATHDPLT FGSGTKLEIKRTVAAPDIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATY YCQRYNRAPYTFGQGTKVEIKR

【０６０４】

（実施例２．２８）

親抗体及びＤＶＤ－Ｉｇ配列をクローニングするために使用されたクローニングベクター配列

【０６０５】

【表４４】

表44

配列番号	ベクター名	ヌクレオチド配列 12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789001
170	V1	GCGTCGACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGC ACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCC GAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCAC ACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG AATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCT TGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGG GGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATC TCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGC GAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC TATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC AACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTC TACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC CTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGCGGCCGCTCGAGGCCGGCAAGGCCGG ATCCCCCGACCTCGACCTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAA TAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGG CAAATCATTTGGTCGAGATCCCTCGGAGATCTCTAGCTAGAGGATCGATCC CCGCCCCGGACGAACTAAACCTGACTACGACATCTCTGCCCCTTCTTCGCG GGGCAGTGCATGTAATCCCTTCAGTTGGTTGGTACAACTTGCCAACTGGGC CCTGTTCCACATGTGACACGGGGGGGGACCAAACACAAAGGGGTTCTCTGA CTGTAGTTGACATCCTTATAAATGGATGTGCACATTTGCCAACACTGAGTG GCTTTCATCCTGGAGCAGACTTTGCAGTCTGTGGACTGCAACACAACATTG CCTTTATGTGTAACTCTTGGCTGAAGCTCTTACACCAATGCTGGGGGACAT GTACCTCCCAGGGGCCCAGGAAGACTACGGGAGGCTACACCAACGTCAATC AGAGGGGCCTGTGTAGCTACCGATAAGCGGACCCTCAAGAGGGCATTAGCA ATAGTGTTTATAAGGCCCCCTTGTTAACCCTAAACGGGTAGCATATGCTTC CCGGGTAGTAGTATATACTATCCAGACTAACCCTAATTCAATAGCATATGT TACCCAACGGGAAGCATATGCTATCGAATTAGGGTTAGTAAAAGGGTCCTA AGGAACAGCGATATCTCCCACCCCATGAGCTGTCACGGTTTTATTTACATG GGGTCAGGATTCCACGAGGGTAGTGAACCATTTTAGTCACAAGGGCAGTGG CTGAAGATCAAGGAGCGGGCAGTGAACTCTCCTGAATCTTCGCCTGCTTCT TCATTCTCCTTCGTTTAGCTAATAGAATAACTGCTGAGTTGTGAACAGTAA GGTGTATGTGAGGTGCTCGAAAACAAGGTTTCAGGTGACGCCCCCAGAATA AAATTTGGACGGGGGGTTCAGTGGTGGCATTGTGCTATGACACCAATATAA CCCTCACAAACCCCTTGGGCAATAAATACTAGTGTAGGAATGAAACATTCT GAATATCTTTAACAATAGAAATCCATGGGGTGGGGACAAGCCGTAAAGACT GGATGTCCATCTCACACGAATTTATGGCTATGGGCAACACATAATCCTAGT GCAATATGATACTGGGGTTATTAAGATGTGTCCCAGGCAGGGACCAAGACA GGTGAACCATGTTGTTACACTCTATTTGTAACAAGGGGAAAGAGAGTGGAC GCCGACAGCAGCGGACTCCACTGGTTGTCTCTAACACCCCCGAAAATTAAA CGGGGCTCCACGCCAATGGGGCCCATAAACAAAGACAAGTGGCCACTCTTT TTTTTGAAATTGTGGAGTGGGGGCACGCGTCAGCCCCCACACGCCGCCCTG CGGTTTTGGACTGTAAAATAAGGGTGTAATAACTTGGCTGATTGTAACCCC GCTAACCACTGCGGTCAAACCACTTGCCCACAAAACCACTAATGGCACCCC GGGGAATACCTGCATAAGTAGGTGGGCGGGCCAAGATAGGGGCGCGATTGC TGCGATCTGGAGGACAAATTACACACACTTGCGCCTGAGCGCCAAGCACAG GGTTGTTGGTCCTCATATTCACGAGGTCGCTGAGAGCACGGTGGGCTAATG TTGCCATGGGTAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCC TAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCAT ATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCT

配列番号	ベクター名	ヌクレオチド配列 12345678901234567890123456789012345678901234567890
		GGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAA TCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATG CTATCCTAATAGAGATTAGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGG TAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATAT CTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCT AATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATA TGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTG GGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAAT CTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCTCATGATAAGCTGTCAAACATGAGA ATTTTCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAA TGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAA TGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTA TCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAG GAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGC GGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAA AGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCT CAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAAT GATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTTGA CGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTT GGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGT AAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAA CTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCA CAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAA TGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGC AACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCG GCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCT GCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGG TGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCC CTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGA ACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTA ACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCA TTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGAC CAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGA AAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTG CTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCA AGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGAT ACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAA CTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGC TGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATA GTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACA GCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGA GCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCC GGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGG AAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGA GCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGC CAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCA CATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGC CTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGA GTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCC CGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTG GAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTA GGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAAT TGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGC CAAGCTCTAGCTAGAGGTCGAGTCCCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAA GCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCA TCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGAC TAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTAT TCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGC TTTGCAAAGATGGATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTGCAGCTAATG GACCTTCTAGGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTG GGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGG CAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGA

配列番号	ベクター名	ヌクレオチド配列 12345678901234567890123456789012345678901234567890
		TGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATAT AAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAG AACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGG TTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGAT TCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTG CGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCG CTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGC TTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCT TTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGG TATTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCG CACATGTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACG GGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCC GTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGC GTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATG GAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAA AAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCG GGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTC TTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTG GGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGA ATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGT GGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGAGGAATTCTCTAGAG ATCCCTCGACCTCGAGATCCATTGTGCCCGGGCGCCACCATGGAGTTTGGG CTGAGCTGGCTTTTTCTTGTCGCGATTTTAAAAGGTGTCCAGTGC
171	V2	ACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTG AAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGA GAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC CAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC AGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCC TGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAAC AGGGGAGAGTGTTGAGCGGCCGCTCGAGGCCGGCAAGGCCGGATCCCCCGA CCTCGACCTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTT GGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATT TGGTCGAGATCCCTCGGAGATCTCTAGCTAGAGGATCGATCCCCGCCCCGG ACGAACTAAACCTGACTACGACATCTCTGCCCCTTCTTCGCGGGGCAGTGC ATGTAATCCCTTCAGTTGGTTGGTACAACTTGCCAACTGGGCCCTGTTCCA CATGTGACACGGGGGGGGACCAAACACAAAGGGGTTCTCTGACTGTAGTTG ACATCCTTATAAATGGATGTGCACATTTGCCAACACTGAGTGGCTTTCATC CTGGAGCAGACTTTGCAGTCTGTGGACTGCAACACAACATTGCCTTTATGT GTAACTCTTGGCTGAAGCTCTTACACCAATGCTGGGGGACATGTACCTCCC AGGGGCCCAGGAAGACTACGGGAGGCTACACCAACGTCAATCAGAGGGGCC TGTGTAGCTACCGATAAGCGGACCCTCAAGAGGGCATTAGCAATAGTGTTT ATAAGGCCCCCTTGTTAACCCTAAACGGGTAGCATATGCTTCCCGGGTAGT AGTATATACTATCCAGACTAACCCTAATTCAATAGCATATGTTACCCAACG GGAAGCATATGCTATCGAATTAGGGTTAGTAAAAGGGTCCTAAGGAACAGC GATATCTCCCACCCCATGAGCTGTCACGGTTTTATTTACATGGGGTCAGGA TTCCACGAGGGTAGTGAACCATTTTAGTCACAAGGGCAGTGGCTGAAGATC AAGGAGCGGGCAGTGAACTCTCCTGAATCTTCGCCTGCTTCTTCATTCTCC TTCGTTTAGCTAATAGAATAACTGCTGAGTTGTGAACAGTAAGGTGTATGT GAGGTGCTCGAAAACAAGGTTTCAGGTGACGCCCCCAGAATAAAATTTGGA CGGGGGGTTCAGTGGTGGCATTGTGCTATGACACCAATATAACCCTCACAA ACCCCTTGGGCAATAAATACTAGTGTAGGAATGAAACATTCTGAATATCTT TAACAATAGAAATCCATGGGGTGGGGACAAGCCGTAAAGACTGGATGTCCA TCTCACACGAATTTATGGCTATGGGCAACACATAATCCTAGTGCAATATGA TACTGGGGTTATTAAGATGTGTCCCAGGCAGGGACCAAGACAGGTGAACCA TGTTGTTACACTCTATTTGTAACAAGGGGAAAGAGAGTGGACGCCGACAGC AGCGGACTCCACTGGTTGTCTCTAACACCCCCGAAAATTAAACGGGGCTCC ACGCCAATGGGGCCCATAAACAAAGACAAGTGGCCACTCTTTTTTTTGAAA TTGTGGAGTGGGGGCACGCGTCAGCCCCCACACGCCGCCCTGCGGTTTTGG ACTGTAAAATAAGGGTGTAATAACTTGGCTGATTGTAACCCCGCTAACCAC TGCGGTCAAACCACTTGCCCACAAAACCACTAATGGCACCCCGGGGAATAC CTGCATAAGTAGGTGGGCGGGCCAAGATAGGGGCGCGATTGCTGCGATCTG GAGGACAAATTACACACACTTGCGCCTGAGCGCCAAGCACAGGGTTGTTGG

配列番号	ベクター名	ヌクレオチド配列 12345678901234567890123456789012345678901234567890
		TCCTCATATTCACGAGGTCGCTGAGAGCACGGTGGGCTAATGTTGCCATGG
		GTAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATA
		TCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCC
		TAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCAT
		AGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCT
		GGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCTAA
		TAGAGATTAGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATATA
		CTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGC
		ATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATAT
		CTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCT
		AATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATA
		TGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCG
		GGTAGCATATGCTATCCTCATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTTTCTTG
		AAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGAT
		AATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGG
		AACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCAT
		GAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTAT
		GAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTG
		CCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGA
		AGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGG
		TAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCAC
		TTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCA
		AGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTA
		CTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATT
		ATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCT
		GACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGG
		GGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCAT
		ACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTT
		GCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATT
		AATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGC
		CCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGG
		GTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTAT
		CGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAG
		ACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGA
		CCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATT
		TAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCC
		TTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAA
		AGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAC
		AAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACC
		AACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATAC
		TGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGC
		ACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAG
		TGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGA
		TAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTT
		GGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGA
		AAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGG
		CAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTG
		GTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATT
		TTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGC
		GGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTT
		TCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTG
		AGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAG
		CGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTG
		GCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGG
		CAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCA
		GGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGG
		ATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTA
		GCTAGAGGTCGAGTCCCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATC
		TCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCC
		TAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTT
		TTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGT
		AGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTTTGCAAAG

配列番号	ベクター名	ヌクレオチド配列 12345678901234567890123456789012345678901234567890
		ATGGATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTGCAGCTAATGGACCTTCTA GGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCG CACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAAC CGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTA CTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGT AGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGT AAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCC TTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCC CGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGG AGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCG CCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAA GTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTG GCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCGGT TTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTC GGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTC TCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGC CCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGA AAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCG GCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTT TCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTC CAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTG GGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGAC TGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCT TTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAG TTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGAGGAATTCTCTAGAGATCCCTCGA CCTCGAGATCCATTGTGCCCGGGCGCACCATGGACATGCGCGTGCCCGCCC AGCTGCTGGGCCTGCTGCTGCTGTGGTTCCCCGGCTCGCGATGC
172	V3	CAACCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAG CTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCG GGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGA GTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGC AGCTACCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGC TGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACA GAATGTTCATGAGCGGCCGCTCGAGGCCGGCAAGGCCGGATCCCCCGACCT CGACCTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGA ATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTTGG TCGAGATCCCTCGGAGATCTCTAGCTAGAGGATCGATCCCCGCCCCGGACG AACTAAACCTGACTACGACATCTCTGCCCCTTCTTCGCGGGGCAGTGCATG TAATCCCTTCAGTTGGTTGGTACAACTTGCCAACTGGGCCCTGTTCCACAT GTGACACGGGGGGGGACCAAACACAAAGGGGTTCTCTGACTGTAGTTGACA TCCTTATAAATGGATGTGCACATTTGCCAACACTGAGTGGCTTTCATCCTG GAGCAGACTTTGCAGTCTGTGGACTGCAACACAACATTGCCTTTATGTGTA ACTCTTGGCTGAAGCTCTTACACCAATGCTGGGGGACATGTACCTCCCAGG GGCCCAGGAAGACTACGGGAGGCTACACCAACGTCAATCAGAGGGGCCTGT GTAGCTACCGATAAGCGGACCCTCAAGAGGGCATTAGCAATAGTGTTTATA AGGCCCCCTTGTTAACCCTAAACGGGTAGCATATGCTTCCCGGGTAGTAGT ATATACTATCCAGACTAACCCTAATTCAATAGCATATGTTACCCAACGGGA AGCATATGCTATCGAATTAGGGTTAGTAAAAGGGTCCTAAGGAACAGCGAT ATCTCCCACCCCATGAGCTGTCACGGTTTTATTTACATGGGGTCAGGATTC CACGAGGGTAGTGAACCATTTTAGTCACAAGGGCAGTGGCTGAAGATCAAG GAGCGGGCAGTGAACTCTCCTGAATCTTCGCCTGCTTCTTCATTCTCCTTC GTTTAGCTAATAGAATAACTGCTGAGTTGTGAACAGTAAGGTGTATGTGAG GTGCTCGAAAACAAGGTTTCAGGTGACGCCCCCAGAATAAAATTTGGACGG GGGGTTCAGTGGTGGCATTGTGCTATGACACCAATATAACCCTCACAAACC CCTTGGGCAATAAATACTAGTGTAGGAATGAAACATTCTGAATATCTTTAA CAATAGAAATCCATGGGGTGGGGACAAGCCGTAAAGACTGGATGTCCATCT CACACGAATTTATGGCTATGGGCAACACATAATCCTAGTGCAATATGATAC TGGGGTTATTAAGATGTGTCCCAGGCAGGGACCAAGACAGGTGAACCATGT TGTTACACTCTATTTGTAACAAGGGGAAAGAGAGTGGACGCCGACAGCAGC GGACTCCACTGGTTGTCTCTAACACCCCCGAAAATTAAACGGGGCTCCACG CCAATGGGGCCCATAAACAAAGACAAGTGGCCACTCTTTTTTTTGAAATTG TGGAGTGGGGGCACGCGTCAGCCCCCACACGCCGCCCTGCGGTTTTGGACT

配列番号	ベクター名	ヌクレオチド配列 12345678901234567890123456789012345678901234567890
		GTAAAATAAGGGTGTAATAACTTGGCTGATTGTAACCCCGCTAACCACTGC
		GGTCAAACCACTTGCCCACAAAACCACTAATGGCACCCCGGGGAATACCTG
		CATAAGTAGGTGGGCGGGCCAAGATAGGGGCGCGATTGCTGCGATCTGGAG
		GACAAATTACACACACTTGCGCCTGAGCGCCAAGCACAGGGTTGTTGGTCC
		TCATATTCACGAGGTCGCTGAGAGCACGGTGGGCTAATGTTGCCATGGGTA
		GCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCT
		GGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAA
		TCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATAGG
		CTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGG
		TAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCTAATAG
		AGATTAGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATATACTA
		CCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATA
		TGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTG
		GGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAAT
		TTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGC
		TATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGT
		AGCATATGCTATCCTCATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTTTCTTGAAG
		ACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAAT
		AATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAAC
		CCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAG
		ACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAG
		TATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCT
		TCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGA
		TCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAA
		GATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTT
		TAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCAAGA
		GCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTC
		ACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATG
		CAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGAC
		AACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGA
		TCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACC
		AAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCG
		CAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAAT
		AGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCT
		TCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTC
		TCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGT
		AGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACA
		GATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCA
		AGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAA
		AAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTA
		ACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGG
		ATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAA
		AAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAAC
		TCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGT
		TCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACC
		GCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGG
		CGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAA
		GGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGA
		GCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAG
		CGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAG
		GGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTA
		TCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTT
		GTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGC
		CTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCC
		TGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGC
		TGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGA
		GGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCC
		GATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAG
		TGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGC
		TTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATA
		ACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTAGCT
		AGAGGTCGAGTCCCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCA

配列番号	ベクター名	ヌクレオチド配列 12345678901234567890123456789012345678901234567890
		ATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAA CTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTA TTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGT GAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTTTGCAAAGATG GATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTGCAGCTAATGGACCTTCTAGGT CTTGAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCAC ATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGG TGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTG GCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGT CGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAG TGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTG CGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGA GCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGC CCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCG CGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTC TCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCA AGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCGGTTTT TGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTCGGC GAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCA AGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCC GCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAG ATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCG CTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCC GTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAG GCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGG GGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGA AGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTT TGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTT TTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGAGGAATTCTCTAGAGATCCCTCGACCT CGAGATCCATTGTGCCCGGGCGCCACCATGACTTGGACCCCACTCCTCTTC CTCACCCTCCTCCTCCACTGCACAGGAAGCTTATCG
173	V4	ACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTG AAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGA GAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC CAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC AGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCC TGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAAC AGGGGAGAGTGTTGAGCGGCCGCTCGAGGCCGGCAAGGCCGGATCCCCCGA CCTCGACCTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTT GGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATT TGGTCGAGATCCCTCGGAGATCTCTAGCTAGAGGATCGATCCCCGCCCCGG ACGAACTAAACCTGACTACGACATCTCTGCCCCTTCTTCGCGGGGCAGTGC ATGTAATCCCTTCAGTTGGTTGGTACAACTTGCCAACTGGGCCCTGTTCCA CATGTGACACGGGGGGGGACCAAACACAAAGGGGTTCTCTGACTGTAGTTG ACATCCTTATAAATGGATGTGCACATTTGCCAACACTGAGTGGCTTTCATC CTGGAGCAGACTTTGCAGTCTGTGGACTGCAACACAACATTGCCTTTATGT GTAACTCTTGGCTGAAGCTCTTACACCAATGCTGGGGGACATGTACCTCCC AGGGGCCCAGGAAGACTACGGGAGGCTACACCAACGTCAATCAGAGGGGCC TGTGTAGCTACCGATAAGCGGACCCTCAAGAGGGCATTAGCAATAGTGTTT ATAAGGCCCCCTTGTTAACCCTAAACGGGTAGCATATGCTTCCCGGGTAGT AGTATATACTATCCAGACTAACCCTAATTCAATAGCATATGTTACCCAACG GGAAGCATATGCTATCGAATTAGGGTTAGTAAAAGGGTCCTAAGGAACAGC GATATCTCCCACCCCATGAGCTGTCACGGTTTTATTTACATGGGGTCAGGA TTCCACGAGGGTAGTGAACCATTTTAGTCACAAGGGCAGTGGCTGAAGATC AAGGAGCGGGCAGTGAACTCTCCTGAATCTTCGCCTGCTTCTTCATTCTCC TTCGTTTAGCTAATAGAATAACTGCTGAGTTGTGAACAGTAAGGTGTATGT GAGGTGCTCGAAAACAAGGTTTCAGGTGACGCCCCCAGAATAAAATTTGGA CGGGGGGTTCAGTGGTGGCATTGTGCTATGACACCAATATAACCCTCACAA ACCCCTTGGGCAATAAATACTAGTGTAGGAATGAAACATTCTGAATATCTT TAACAATAGAAATCCATGGGGTGGGGACAAGCCGTAAAGACTGGATGTCCA TCTCACACGAATTTATGGCTATGGGCAACACATAATCCTAGTGCAATATGA TACTGGGGTTATTAAGATGTGTCCCAGGCAGGGACCAAGACAGGTGAACCA

配列番号	ベクター名	ヌクレオチド配列 12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901
		TGTTGTTACACTCTATTTGTAACAAGGGGAAAGAGAGTGGACGCCGACAGC AGCGGACTCCACTGGTTGTCTCTAACACCCCCGAAAATTAAACGGGGCTCC ACGCCAATGGGGCCCATAAACAAAGACAAGTGGCCACTCTTTTTTTTGAAA TTGTGGAGTGGGGGCACGCGTCAGCCCCCACACGCCGCCCTGCGGTTTTGG ACTGTAAAATAAGGGTGTAATAACTTGGCTGATTGTAACCCCGCTAACCAC TGCGGTCAAACCACTTGCCCACAAAACCACTAATGGCACCCCGGGGAATAC CTGCATAAGTAGGTGGGCGGGCCAAGATAGGGGCGCGATTGCTGCGATCTG GAGGACAAATTACACACACTTGCGCCTGAGCGCCAAGCACAGGGTTGTTGG TCCTCATATTCACGAGGTCGCTGAGAGCACGGTGGGCTAATGTTGCCATGG GTAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATA TCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCC TAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCAT AGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCT GGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCTAA TAGAGATTAGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATATA CTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGC ATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATAT CTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCT AATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATA TGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCG GGTAGCATATGCTATCCTCATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTTTCTTG AAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGAT AATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGG AACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCAT GAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTAT GAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTG CCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGA AGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGG TAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCAC TTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCA AGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTA CTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATT ATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCT GACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGG GGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCAT ACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTT GCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATT AATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGC CCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGG GTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTAT CGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAG ACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGA CCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATT TAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCC TTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAA AGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAC AAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACC AACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATAC TGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGC ACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAG TGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGA TAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTT GGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGA AAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGG CAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTG GTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATT TTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGC GGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTT TCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTG AGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAG CGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTG GCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGG

配列番号	ベクター名	ヌクレオチド配列 12345678901234567890123456789012345678901234567890
		CAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCA GGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGG ATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTA GCTAGAGGTCGAGTCCCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATC TCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCC TAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTT TTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGT AGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTTTGCAAAG ATGGATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTGCAGCTAATGGACCTTCTA GGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCG CACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAAC CGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTA CTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGT AGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGT AAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCC TTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCC CGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGG AGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCG CCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAA GTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTG GCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCGGT TTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTC GGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTC TCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGC CCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGA AAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCG GCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTT TCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTC CAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTG GGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGAC TGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCT TTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAG TTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGAGGAATTCTCTAGAGATCCCTCGA CCTCGAGATCCATTGTGCCCGGGCGCACCATGACTTGGACCCCACTCCTCT TCCTCACCCTCCTCCTCCACTGCACAGGAAGCTTATCG
174	V5	CAACCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAG CTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCG GGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGA GTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGC AGCTACCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGC TGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACA GAATGTTCATGAGCGGCCGCTCGAGGCCGGCAAGGCCGGATCCCCCGACCT CGACCTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGA ATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTTGG TCGAGATCCCTCGGAGATCTCTAGCTAGAGGATCGATCCCCGCCCCGGACG AACTAAACCTGACTACGACATCTCTGCCCCTTCTTCGCGGGGCAGTGCATG TAATCCCTTCAGTTGGTTGGTACAACTTGCCAACTGGGCCCTGTTCCACAT GTGACACGGGGGGGGACCAAACACAAAGGGGTTCTCTGACTGTAGTTGACA TCCTTATAAATGGATGTGCACATTTGCCAACACTGAGTGGCTTTCATCCTG GAGCAGACTTTGCAGTCTGTGGACTGCAACACAACATTGCCTTTATGTGTA ACTCTTGGCTGAAGCTCTTACACCAATGCTGGGGGACATGTACCTCCCAGG GGCCCAGGAAGACTACGGGAGGCTACACCAACGTCAATCAGAGGGGCCTGT GTAGCTACCGATAAGCGGACCCTCAAGAGGGCATTAGCAATAGTGTTTATA AGGCCCCCTTGTTAACCCTAAACGGGTAGCATATGCTTCCCGGGTAGTAGT ATATACTATCCAGACTAACCCTAATTCAATAGCATATGTTACCCAACGGGA AGCATATGCTATCGAATTAGGGTTAGTAAAAGGGTCCTAAGGAACAGCGAT ATCTCCCACCCCATGAGCTGTCACGGTTTTATTTACATGGGGTCAGGATTC CACGAGGGTAGTGAACCATTTTAGTCACAAGGGCAGTGGCTGAAGATCAAG GAGCGGGCAGTGAACTCTCCTGAATCTTCGCCTGCTTCTTCATTCTCCTTC GTTTAGCTAATAGAATAACTGCTGAGTTGTGAACAGTAAGGTGTATGTGAG GTGCTCGAAAACAAGGTTTCAGGTGACGCCCCCAGAATAAAATTTGGACGG GGGGTTCAGTGGTGGCATTGTGCTATGACACCAATATAACCCTCACAAACC

配列番号	ベクター名	ヌクレオチド配列 12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901
		CCTTGGGCAATAAATACTAGTGTAGGAATGAAACATTCTGAATATCTTTAA CAATAGAAATCCATGGGGTGGGGACAAGCCGTAAAGACTGGATGTCCATCT CACACGAATTTATGGCTATGGGCAACACATAATCCTAGTGCAATATGATAC TGGGGTTATTAAGATGTGTCCCAGGCAGGGACCAAGACAGGTGAACCATGT TGTTACACTCTATTTGTAACAAGGGGAAAGAGAGTGGACGCCGACAGCAGC GGACTCCACTGGTTGTCTCTAACACCCCCGAAAATTAAACGGGGCTCCACG CCAATGGGGCCCATAAACAAAGACAAGTGGCCACTCTTTTTTTTGAAATTG TGGAGTGGGGGCACGCGTCAGCCCCCACACGCCGCCCTGCGGTTTTGGACT GTAAAATAAGGGTGTAATAACTTGGCTGATTGTAACCCCGCTAACCACTGC GGTCAAACCACTTGCCCACAAAACCACTAATGGCACCCCGGGGAATACCTG CATAAGTAGGTGGGCGGGCCAAGATAGGGGCGCGATTGCTGCGATCTGGAG GACAAATTACACACACTTGCGCCTGAGCGCCAAGCACAGGGTTGTTGGTCC TCATATTCACGAGGTCGCTGAGAGCACGGTGGGCTAATGTTGCCATGGGTA GCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCT GGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAA TCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATAGG CTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGG TAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCTAATAG AGATTAGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATATACTA CCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATA TGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTG GGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAAT TTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGC TATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGT AGCATATGCTATCCTCATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTTTCTTGAAG ACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAAT AATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAAC CCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAG ACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAG TATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCT TCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGA TCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAA GATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTT TAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCAAGA GCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTC ACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATG CAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGAC AACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGA TCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACC AAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCG CAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAAT AGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCT TCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTC TCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGT AGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACA GATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCA AGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAA AAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTA ACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGG ATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAA AAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAAC TCTTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGT TCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACC GCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGG CGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAA GGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGA GCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAG CGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAG GGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTA TCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTT GTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGC CTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCC

10 20 30 40

配列番号	ベクター名	ヌクレオチド配列 12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901
		TGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGC TGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGA GGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCC GATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAG TGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGC TTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATA ACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTAGCT AGAGGTCGAGTCCCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCA ATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAA CTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTA TTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGT GAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTTTGCAAAGATG GATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTGCAGCTAATGGACCTTCTAGGT CTTGAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCAC ATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGG TGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTG GCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGT CGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAG TGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTG CGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGA GCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGC CCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCG CGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTC TCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCA AGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCGGTTTT TGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTCGGC GAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCA AGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCC GCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAG ATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCG CTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCC GTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAG GCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGG GGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGA AGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTT TGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTT TTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGAGGAATTCTCTAGAGATCCCTCGACCT CGAGATCCATTGTGCCCGGGCGCCACCATGGACATGCGCGTGCCCGCCCAG CTGCTGGGCCTGCTGCTGCTGTGGTTCCCCGGCTCGCGATGC
175	V7	GCGTCGACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGC ACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCC GAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCAC ACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG AATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCT TGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCCGCGGGG GGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATC TCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGC GAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC TATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC AACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTC TACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC CTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGCGGCCGCTCGAGGCCGGCAAGGCCGG ATCCCCCGACCTCGACCTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAA TAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGG CAAATCATTTGGTCGAGATCCCTCGGAGATCTCTAGCTAGAGGATCGATCC

配列番号	ベクター名	ヌクレオチド配列 12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901
		CCGCCCCGGACGAACTAAACCTGACTACGACATCTCTGCCCCTTCTTCGCG GGGCAGTGCATGTAATCCCTTCAGTTGGTTGGTACAACTTGCCAACTGGGC CCTGTTCCACATGTGACACGGGGGGGGACCAAACACAAAGGGGTTCTCTGA CTGTAGTTGACATCCTTATAAATGGATGTGCACATTTGCCAACACTGAGTG GCTTTCATCCTGGAGCAGACTTTGCAGTCTGTGGACTGCAACACAACATTG CCTTTATGTGTAACTCTTGGCTGAAGCTCTTACACCAATGCTGGGGGACAT GTACCTCCCAGGGGCCCAGGAAGACTACGGGAGGCTACACCAACGTCAATC AGAGGGGCCTGTGTAGCTACCGATAAGCGGACCCTCAAGAGGGCATTAGCA ATAGTGTTTATAAGGCCCCCTTGTTAACCCTAAACGGGTAGCATATGCTTC CCGGGTAGTAGTATATACTATCCAGACTAACCCTAATTCAATAGCATATGT TACCCAACGGGAAGCATATGCTATCGAATTAGGGTTAGTAAAAGGGTCCTA AGGAACAGCGATATCTCCCACCCCATGAGCTGTCACGGTTTTATTTACATG GGGTCAGGATTCCACGAGGGTAGTGAACCATTTTAGTCACAAGGGCAGTGG CTGAAGATCAAGGAGCGGGCAGTGAACTCTCCTGAATCTTCGCCTGCTTCT TCATTCTCCTTCGTTTAGCTAATAGAATAACTGCTGAGTTGTGAACAGTAA GGTGTATGTGAGGTGCTCGAAAACAAGGTTTCAGGTGACGCCCCCAGAATA AAATTTGGACGGGGGGTTCAGTGGTGGCATTGTGCTATGACACCAATATAA CCCTCACAAACCCCTTGGGCAATAAATACTAGTGTAGGAATGAAACATTCT GAATATCTTTAACAATAGAAATCCATGGGGTGGGGACAAGCCGTAAAGACT GGATGTCCATCTCACACGAATTTATGGCTATGGGCAACACATAATCCTAGT GCAATATGATACTGGGGTTATTAAGATGTGTCCCAGGCAGGGACCAAGACA GGTGAACCATGTTGTTACACTCTATTTGTAACAAGGGGAAAGAGAGTGGAC GCCGACAGCAGCGGACTCCACTGGTTGTCTCTAACACCCCCGAAAATTAAA CGGGGCTCCACGCCAATGGGGCCCATAAACAAAGACAAGTGGCCACTCTTT TTTTTGAAATTGTGGAGTGGGGGCACGCGTCAGCCCCCACACGCCGCCCTG CGGTTTTGGACTGTAAAATAAGGGTGTAATAACTTGGCTGATTGTAACCCC GCTAACCACTGCGGTCAAACCACTTGCCCACAAAACCACTAATGGCACCCC GGGGAATACCTGCATAAGTAGGTGGGCGGGCCAAGATAGGGGCGCGATTGC TGCGATCTGGAGGACAAATTACACACACTTGCGCCTGAGCGCCAAGCACAG GGTTGTTGGTCCTCATATTCACGAGGTCGCTGAGAGCACGGTGGGCTAATG TTGCCATGGGTAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCC TAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCAT ATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCT GGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAA TCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATG CTATCCTAATAGAGATTAGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGG TAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATAT CTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCT AATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATA TGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTG GGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAAT CTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCTCATGATAAGCTGTCAAACATGAGA ATTTTCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAA TGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAA TGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTA TCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAG GAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGC GGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAA AGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCT CAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAAT GATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTTGA CGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTT GGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGT AAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAA CTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCA CAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAA TGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGC AACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCG GCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCT GCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGG TGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCC CTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGA

配列番号	ベクター名	ヌクレオチド配列 12345678901234567890123456789012345678901234567890
		ACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTA ACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCA TTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGAC CAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGA AAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTG CTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCA AGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGAT ACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAA CTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGC TGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATA GTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACA GCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGA GCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCC GGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGG AAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGA GCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGC CAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCA CATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGC CTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGA GTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCC CGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTG GAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTA GGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAAT TGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGC CAAGCTCTAGCTAGAGGTCGAGTCCCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAA GCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCA TCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGAC TAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTAT TCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGC TTTGCAAAGATGGATAAAGTTTTAAACAGAGAGGAATCTTTGCAGCTAATG GACCTTCTAGGTCTTGAAAGGAGTGGGAATTGGCTCCGGTGCCCGTCAGTG GGCAGAGCGCACATCGCCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGG CAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGA TGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATAT AAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAG AACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGG TTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACCTGGCTGCAGTACGTGAT TCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTG CGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCG CTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGC TTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCT TTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGG TATTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCG CACATGTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACG GGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCC GTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGC GTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATG GAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAA AAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCG GGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTC TTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTG GGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGA ATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGT GGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGAGGAATTCTCTAGAG ATCCCTCGACCTCGAGATCCATTGTGCCCGGGCGCCACCATGGAGTTTGGG CTGAGCTGGCTTTTTCTTGTCGCGATTTTAAAAGGTGTCCAGTGC

【０６０６】

本発明は、分子生物学及び薬物送達の分野において周知の技術全体を、参照により組み込む。これらの技術には、以下の刊行物に記載されている技術が含まれるが、これらに限定されない。

【０６０７】

Ausubel et al.（eds.），Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley &Sons, NY（１９９３）；

Ausubel, F.M. et al. eds., Short Protocols In Molecular Biology (4th Ed. 1999) John Wiley & Sons, NY. (ISBN 0-471-32938-X).
Controlled Drug Bioavailability. Drug Product Design and Performance. Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984);
Giege, R. and Ducruix, A. Barrett, Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach, 2nd ea., pp. 201-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999);
Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, vol. 2, pp. 115-138 (1984);
Hammerling, et al., in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981;
Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988);
Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) and (1991);
Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242;
Kontermann and Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. New York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5).
Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990);
Lu and Weiner eds., Cloning and Expression Vectors for Gene Function Analysis (2001) BioTechniques Press. Westborough, MA. 298 pp. (ISBN 1-881299-21-X).
Medical Applications of Controlled Release. Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974);
Old, R.W. & S.B. Primrose, Principles of Gene Manipulation: An Introduction To Genetic Engineering (3d Ed. 1985) Blackwell Scientific Publications, Boston. Studies in Microbiology; V. 2:409 pp. (ISBN 0-632-01318-4).
Sambrook, J. et al. eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d Ed. 1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. Vols. 1-3. (ISBN 0-87969-309-6).
Sustained and Controlled Release Drug D

elivery Systems. J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978
Winnacker, E. L. From Genes To Clones：Introduction To Gene Technology（1987） VCH Publishers, NY（translated by Horst Ibelgaufts）. 634 pp.（ISBN 0－89573－614－4）

【０６０８】

参照による組み込み

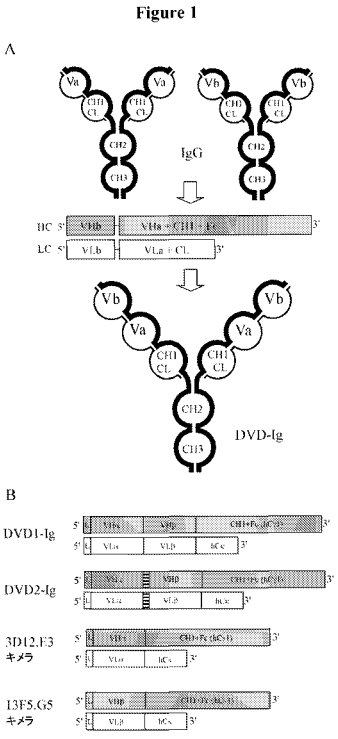
本願を通じて引用され得る全ての引用された参考文献（文献、特許、特許出願及びウェブサイトを含む。）の内容の全体は、本明細書中にこれらの参考文献が引用されるように、参照により、本明細書に明示的に組み込まれる。本発明の実施は、別段の記載がなければ、本分野において周知である免疫学、分子生物学及び細胞生物学の慣用技術を使用する。

【０６０９】

均等物

本発明は、その精神又は不可欠な特徴から逸脱することなく、他の具体的な形態で具現化され得る。従って、前記実施形態は、本明細書に記載されている本発明の限定ではなく、あらゆる点で例示的なものと考えなければならない。従って、本発明の範囲は、前記記載ではなく、添付の特許請求の範囲によって示され、従って、特許請求の範囲の意義及び均等の範囲に属する全ての変化は本発明に包含されるものとする。

【図１】



【配列表】
2015119711000001.app
【手続補正書】
【提出日】平成27年2月9日(2015.2.9)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
第一及び第二のポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であって、前記ポリペプチド鎖はそれぞれ独立にＶＤ１－（Ｘ１）$_n$－ＶＤ２－Ｃ－（Ｘ２）$_n$を含み、
ＶＤ１は、第一の可変ドメインであり；
ＶＤ２は、第二の可変ドメインであり；
Ｃは、定常ドメインであり；
Ｘ１は、リンカーであり；
Ｘ２は、Ｆｃ領域であり；
ｎは、０又は１であり、
第一及び第二のポリペプチド鎖上のＶＤ１領域は第一の機能的標的結合部位を形成し、第一及び第二のポリペプチド鎖上のＶＤ２領域は第二の機能的標的結合部位を形成し、ならびに、前記結合タンパク質は、以下：
（ａ）Ａβ及びＡβに結合することができ、及び、配列番号６２及び配列番号６３、配列番号６４及び配列番号６５、配列番号９８及び配列番号９９、又は配列番号１００及び配列番号１０１のアミノ酸を含む；
（ｂ）ＴＮＦ及びＡβに結合することができ、及び、配列番号６６及び配列番号６７、配列番号６８及び配列番号６９、配列番号９０及び配列番号９１、配列番号９２及び配列番号９３、又は配列番号１１４及び配列番号１１５のアミノ酸を含む；
（ｃ）ＩＬ－１β及びＡβに結合することができ、及び、配列番号７０及び配列番号７１、配列番号７２及び配列番号７３、配列番号９４及び配列番号９５、配列番号９６及び配列番号９７、又は配列番号１１８及び配列番号１１９のアミノ酸を含む；
（ｄ）ＩＧＦ１、２及びＡβに結合することができ、及び、配列番号７８及び配列番号７９、配列番号８０及び配列番号８１、配列番号１０２及び配列番号１０３、配列番号１０４及び配列番号１０５、又は配列番号１２２及び配列番号１２３のアミノ酸を含む；
（ｅ）Ａβ及びＩＬ－１８に結合することができ、及び、配列番号８２及び配列番号８３、配列番号８４及び配列番号８５、配列番号１０６及び配列番号１０７、配列番号１０８及び配列番号１０９、又は配列番号１２６及び配列番号１２７のアミノ酸を含む；
（ｆ）ＲＧＭＡ及びＴＮＦに結合することができ、及び、配列番号１６８及び配列番号１６９のアミノ酸を含む；
（ｇ）ＥＧＦＲ及びＣＤ－２０に結合することができ、及び、配列番号１５８及び配列番号１５９、配列番号１６０及び配列番号１６１、又は配列番号１６２及び配列番号１６３のアミノ酸を含む；
（ｈ）Ａβ及びＩＬ－６に結合することができ、及び、配列番号８６及び配列番号８７、配列番号８８及び配列番号８９、配列番号１３０及び配列番号１３１、又は配列番号１３２及び配列番号１３３のアミノ酸を含む；
（ｉ）ＮＧＦ及びＩＬ－１８に結合することができ、及び、配列番号１３８及び配列番号１３９、又は配列番号１４０及び配列番号１４１のアミノ酸を含む；
（ｊ）ＮＧＦ及びＩＬ－１βに結合することができ、及び、配列番号１４２及び配列番号１４３、又は配列番号１４４及び配列番号１４５のアミノ酸を含む；又は
（ｋ）ＮＧＦ及びＩＬ－６に結合することができ、及び、配列番号１４６及び配列番号１

４７、又は配列番号１４８及び配列番号１４９のアミノ酸を含む、結合タンパク質。
【請求項２】
２つの第一のポリペプチド鎖及び２つの第二のポリペプチド鎖を含み、４つの機能的標的結合部位を含む、請求項１に記載の結合タンパク質。
【請求項３】
請求項１又は２に記載の結合タンパク質であって、
（ａ）結合タンパク質が、結晶化結合タンパク質であり；
（ｂ）Ｆｃ領域が、変形物配列Ｆｃ領域であり；及び／又は
（ｃ）Ｆｃ領域が、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ、ＩｇＭ、ＩｇＥ、又はＩｇＤから得られる、前記結合タンパク質。
【請求項４】
請求項１～３の何れか１項に記載の結合タンパク質を含み、さらに免疫接着分子、造影剤、治療剤、又は細胞障害剤を含む、結合タンパク質連結体であって、前記造影剤が、放射性標識、酵素、蛍光標識、発光標識、生物発光標識、磁性標識又はビオチンであって良く、前記放射性標識が、^{3}Ｈ、^{14}Ｃ、^{35}Ｓ、^{90}Ｙ、^{99}Ｔｃ、^{111}Ｉｎ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{177}Ｌｕ、^{166}Ｈｏ、又は^{153}Ｓｍであって良く、又は、前記治療剤又は細胞障害剤が、抗代謝剤、アルキル化剤、抗生物質、成長因子、サイトカイン、抗血管形成剤、抗分裂剤、アントラサイクリン、トキシン、又はアポトーシス剤であって良い、結合タンパク質連結体。
【請求項５】
請求項１～３の何れか１項に記載の結合タンパク質と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物。
【請求項６】
請求項５に記載の医薬組成物であって、さらに少なくとも１種の追加の治療剤を含み、前記追加の治療剤が、造影剤、細胞毒性剤、血管新生阻害剤、キナーゼ阻害剤、共刺激分子遮断剤、接着分子遮断剤、抗サイトカイン抗体又はその機能的断片、メトトレキサート、シクロスポリン、ラパマイシン、ＦＫ５０６、検出可能な標識又はレポーター、ＴＮＦアンタゴニスト、抗リウマチ薬、筋肉弛緩剤、麻酔薬、非ステロイド系抗炎症薬（ＮＳＡＩＤ）、鎮痛剤、麻酔、鎮静剤、局所麻酔、神経筋肉遮断剤、抗微生物剤、抗乾癬剤、コルチコステロイド、アナボリックステロイド、エリスロポエチン、免疫化、イムノグロブリン、免疫抑制剤、成長ホルモン、ホルモン置換薬、放射性薬剤、抗うつ剤、抗精神病薬、刺激物質、喘息薬、βアゴニスト、吸引用ステロイド、エピネフリン又は類縁体、サイトカイン、及びサイトカインアンタゴニストからなる群から選択される、医薬組成物。
【請求項７】
疾病又は疾患を治療するための医薬の製造における、請求項１～３の何れか１項に記載の結合タンパク質の使用。
【請求項８】
前記疾患が、関節リウマチ、骨関節炎、若年性慢性関節炎、化膿性関節炎、ライム関節炎、乾癬性関節炎、反応性関節炎、脊椎関節症、全身性紅斑性狼瘡、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、インシュリン依存性糖尿病、甲状腺炎、喘息、アレルギー性疾患、乾癬、皮膚炎、強皮症、移植片対宿主病、臓器移植拒絶、臓器移植に関連する急性又は慢性免疫疾患、サルコイドーシス、アテローム性動脈硬化症、播種性血管内凝固、川崎病、バセドウ病、ネフローゼ症候群、慢性疲労症候群、ウェゲナー肉芽腫症、ヘノッホ・シェーライン紫斑症、腎臓の顕微鏡的血管炎、慢性活動性肝炎、ブドウ膜炎、敗血症性ショック、毒素性ショック症候群、敗血症症候群、悪液質、感染性疾患、寄生性疾患、後天性免疫不全症候群、急性横断性脊髄炎、ハンチントン舞踏病、パーキンソン病、アルツハイマー病、発作、原発性胆汁性肝硬変、溶血性貧血、悪性腫瘍、心不全、アジソン病、孤発性の、多内分泌腺機能低下症候群Ｉ型及び多内分泌腺機能低下症候群ＩＩ型、シュミット症候群、成人（急性）呼吸促迫症候群、脱毛症、円形脱毛症、関節炎、ライター病、乾癬性関節炎、潰瘍性大腸性関節炎、腸疾患性滑膜炎、クラミジア、エルシニア及びサルモネ

ラ関連関節炎、脊椎関節症、アテローム性疾患／アテローム性動脈硬化症、アトピー性アレルギー、自己免疫性水疱性疾患、尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、類天疱瘡、線状ＩｇＡ病、自己免疫性溶血性貧血、クームス陽性溶血性貧血、後天性悪性貧血、若年性悪性貧血、筋痛性脳脊髄炎／ロイヤルフリー病、慢性粘膜皮膚カンジダ症、巨細胞性動脈炎、原発性硬化性肝炎、突発性自己免疫性肝炎、後天性免疫不全関連疾患、Ｂ型肝炎、Ｃ型肝炎、分類不能型免疫不全症（分類不能型原発性低γグロブリン血症）、拡張型心筋症、女性不妊症、卵巣機能不全、早期卵巣機能不全、繊維性肺疾患、突発性間質性肺炎、炎症後間質性肺疾患、間質性肺炎、結合組織疾患関連間質性肺疾患、混合性結合組織疾患関連肺疾患、全身性硬化症関連間質性肺疾患、関節リウマチ関連間質性肺疾患、全身性紅斑性狼瘡関連肺疾患、皮膚筋炎／多発性筋炎関連肺疾患、シェーグレン病関連肺疾患、強直性脊椎炎関連肺疾患、血管炎性びまん性肺疾患（ｖａｓｃｕｌｉｔｉｃ ｄｉｆｆｕｓｅ ｌｕｎｇ ｄｉｓｅａｓｅ）、ヘモシデローシス関連肺疾患、薬物によって誘導された間質性肺疾患、繊維症、放射性繊維症、閉塞性細気管支炎、慢性好酸球性肺炎、リンパ球浸潤性肺疾患、感染後間質性肺疾患、通風関節炎、自己免疫性肝炎、１型自己免疫性肝炎（古典的自己免疫性又はルポイド肝炎）、２型自己免疫性肝炎（抗ＬＫＭ抗体肝炎）、自己免疫媒介性低血糖症、黒色表皮腫を伴うＢ型インシュリン抵抗性、副甲状腺機能低下症、臓器移植に関連する急性免疫疾患、臓器移植に関連する慢性免疫疾患、変形性関節症、原発性硬化性胆管炎、１型乾癬、２型乾癬、特発性白血球減少症、自己免疫性好中球減少症、腎臓病ＮＯＳ、糸球体腎炎、腎臓の顕微鏡的血管炎、ライム病、円板状紅斑性狼瘡、男性不妊症特発性又はＮＯＳ、精子自己免疫、多発性硬化症（全てのサブタイプ）、交感性眼炎、結合組織疾患に続発する肺高血圧症、グッドパスチャー症候群、結節性多発動脈炎の肺症状、急性リウマチ熱、リウマチ性脊椎炎、スチル病、全身性硬化症、シェーグレン症候群、高安病／動脈炎、自己免疫性血小板減少症、特発性血小板減少症、自己免疫性甲状腺疾患、甲状腺機能亢進症、甲状腺腫自己免疫性甲状腺機能低下症（橋本病）、萎縮性自己免疫性甲状腺機能低下症、原発性粘液水腫（ｐｒｉｍａｒｙ ｍｙｘｏｅｄｅｍａ）、水晶体起因性ブドウ膜炎、原発性血管炎、白斑急性肝疾患、慢性肝疾患、アルコール性肝硬変、アルコール誘発性肝障害、胆汁うっ滞（ｃｈｏｌｅｏｓａｔａｔｉｓ）、特異体質性肝疾患、薬物誘発性肝炎、非アルコール性脂肪性肝炎、アレルギー及び喘息、Ｂ群連鎖球菌（ＧＢＳ）感染、精神障害（うつ病、統合失調症）、Ｔｈ２型及びＴｈ１型によって媒介される疾病、急性及び慢性疼痛（疼痛の様々な形態）、並びに、肺癌、乳癌、胃癌、膀胱癌、大腸癌、膵臓癌、卵巣癌、前立腺癌及び腎臓癌及び造血性悪性病変（白血病、リンパ腫）などの癌、無βリポタンパク質血症、先端チアノーゼ、急性及び慢性寄生性又は感染性プロセス、急性白血病、急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、急性又は慢性細菌感染、急性膵炎、急性腎不全、腺癌、心房（ａｅｒｉａｌ）異所性拍動、ＡＩＤＳ認知症複合、アルコール誘発性肝炎、アレルギー性結膜炎、アレルギー性接触性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、同種移植拒絶、α－１－アンチトリプシン欠乏症、筋萎縮性側索硬化症、貧血、狭心症、前角細胞変性、抗ｃｄ３治療、抗リン脂質症候群、抗受容体過敏症反応（ａｎｔｉ－ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｈｙｐｅｒｓｅｎｓｉｔｉｖｉｔｙ ｒｅａｃｔｉｏｎｓ，）、大動脈（ａｏｒｄｉｃ）及び動脈瘤、大動脈解離、動脈性高血圧、動脈硬化症、動静脈瘻、運動失調、心房細動（持続的又は発作性）、心房粗動、房室ブロック、Ｂ細胞リンパ腫、骨移植拒絶、骨髄移植（ＢＭＴ）拒絶、脚ブロック、バーキットリンパ腫、火傷、心不整脈、心機能不全症候群（ｃａｒｄｉａｃ ｓｔｕｎ ｓｙｎｄｒｏｍｅ）、心臓腫瘍、心筋症、心肺バイパス炎症反応、軟骨移植拒絶、小脳皮質変性、小脳疾患、無秩序な又は多巣性心房頻脈、化学療法関連疾患、慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）、慢性アルコール症、慢性炎症性病変、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、慢性サリチル酸中毒、結腸直腸癌、うっ血性心不全、結膜炎、接触性皮膚炎、肺性心、冠動脈疾患、クロイツフェルトーヤコブ病、培養陰性敗血症、嚢胞性繊維症、サイトカイン療法関連疾患、ボクサー脳、脱髄性疾患、デング出血熱、皮膚炎、皮膚科学的症状、糖尿病、真性糖尿病、糖尿病性動脈硬化疾患、瀰漫性レビー小体病、拡張型うっ血性心筋症、大脳基底核の疾患、中年のダウン症候群、中枢神経ドーパミン受

容体を遮断する薬物によって誘発された薬物誘発性運動疾患、薬物感受性、湿疹、脳脊髄炎、心内膜炎、内分泌疾患、喉頭蓋炎、エプスタイン－バーウイルス感染、紅痛症、垂体外路及び小脳疾患、家族性血球貪食性リンパ組織球症（ｆａｍｉｌｉａｌ　ｈｅｍａｔｏｐｈａｇｏｃｙｔｉｃ　ｌｙｍｐｈｏｈｉｓｔｉｏｃｙｔｏｓｉｓ）、致死的胸腺移植組織拒絶、フリードライヒ失調症、機能的末梢動脈疾患、真菌性敗血症、ガス壊疽、胃潰瘍、糸球体腎炎、何れかの臓器又は組織の移植片拒絶、グラム陰性敗血症、グラム陽性敗血症、細胞内生物に起因する肉芽腫、有毛細胞白血病、ハラーホルデン・スパッツ病、橋本甲状腺炎、枯草熱、心臓移植拒絶、血色素症、血液透析、溶血性尿毒症症候群／血栓溶解血小板減少紫斑病、出血、Ａ型肝炎、ヒス束不整脈、ＨＩＶ感染／ＨＩＶ神経障害、ホジキン病、運動過剰疾患、過敏症反応、過敏性肺炎、高血圧、運動低下疾患、視床下部－下垂体－副腎皮質系評価、特発性アジソン病、特発性肺繊維症、抗体媒介性細胞毒性、無力症、乳児脊髄性筋萎縮症、大動脈の炎症、Ａ型インフルエンザ、電離放射線曝露、虹彩毛様体炎／ブドウ膜炎／視神経炎、虚血再灌流障害、虚血性発作、若年性関節リウマチ、若年性脊髄性筋萎縮症、カポジ肉腫、腎移植拒絶、レジオネラ、リーシュマニア症、ハンセン病、皮質脊髄系の病変、脂肪血症（ｌｉｐｅｄｅｍａ）、肝臓移植拒絶、リンパ浮腫（ｌｙｍｐｈｅｄｅｒｍａ）、マラリア、悪性リンパ腫、悪性組織球増殖症、悪性黒色腫、髄膜炎、髄膜炎菌血症（ｍｅｎｉｎｇｏｃｏｃｃｅｍｉａ）、代謝性／特発性、偏頭痛、ミトコンドリア多系疾患（ｍｉｔｏｃｈｏｎｄｒｉａｌ　ｍｕｌｔｉｓｙｓｔｅｍ　ｄｉｓｏｒｄｅｒ）、混合性結合組織病、モノクローナル高ガンマグロブリン血症、多発性骨髄腫、多系統変性（メンセル・デジェリーヌ－トーマス　シャイ－ドレーガー及びマシャド－ジョセフ）、マイコバクテリウム・アビウム・イントラセルラーレ、マイコバクテリウム・チュバキュロシス、骨髄形成異常、心筋梗塞、真菌虚血疾患、上咽頭癌、新生児慢性肺疾患、腎炎、ネフローゼ、神経変性疾患、神経原性筋萎縮、好中球減少性発熱、非ホジキンリンパ腫、腹部大動脈及びその分枝の閉塞、閉塞性動脈疾患、ｏｋｔ３療法、精巣炎／精巣上体炎、精巣炎／精管復元術処置、臓器肥大、骨粗鬆症、膵臓移植拒絶、膵癌、腫瘍随伴性症候群／悪性腫瘍の高カルシウム血症、副甲状腺移植拒絶、骨盤内炎症性疾患、通年性鼻炎、心膜疾患、末梢アテローム硬化性疾患、末梢血管疾患、腹膜炎、悪性貧血、ニューモシスチス・カリニ肺炎、肺炎、ＰＯＥＭＳ症候群（多発神経炎、臓器肥大、内分泌疾患、単クローン性γグロブリン血症及び皮膚変化症候群（ｓｋｉｎ　ｃｈａｎｇｅｓ　ｓｙｎｄｒｏｍｅ））、灌流後症候群（ｐｏｓｔ　ｐｅｒｆｕｓｉｏｎ　ｓｙｎｄｒｏｍｅ）、ポンプ後症候群（ｐｏｓｔ　ｐｕｍｐ　ｓｙｎｄｒｏｍｅ）、心筋梗塞後開心術症候群、子癇前症、進行性核上性麻痺、原発性肺高血圧、放射線療法、レイノー現象及び病、レイノー病、レフサム病、規則的なＱＲＳ幅の狭い頻脈症（ｒｅｇｕｌａｒ　ｎａｒｒｏｗ　ＱＲＳ　ｔａｃｈｙｃａｒｄｉａ）、腎血管性高血圧、再灌流障害、拘束型心筋症、肉腫、強皮症、老年性舞踏病、レビー小体型の老年性認知症、血清反応陰性関節炎、ショック、鎌形赤血球貧血症、皮膚同種異系移植拒絶、皮膚変化症候群、小腸移植拒絶、固形腫瘍、固有不整脈（ｓｐｅｃｉｆｉｃ　ａｒｒｙｔｈｍｉａｓ）、脊髄性運動失調、脊髄小脳変性、連鎖球菌性筋炎、小脳の構造的病変、亜急性硬化性全脳炎、湿疹、心血管系の梅毒、全身性アナフィラキシー、全身性炎症反応症候群、全身性発症若年性関節リウマチ、Ｔ細胞又はＦＡＢＡＬＬ、毛細血管拡張症、閉塞性血栓血管炎、血小板減少症、毒性、移植、外傷／出血、ＩＩＩ型過敏症反応、ＩＶ型過敏症、不安定狭心症、尿毒症、尿路性敗血症、じんましん、心臓弁膜症、静脈瘤、血管炎、静脈疾患、静脈血栓症、心室細動、ウイルス及び真菌感染、ウイルス性脳炎（ｖｉｔａｌ　ｅｎｃｅｐｈａｌｉｔｉｓ）／無菌性髄膜炎、ウイルス関連血球貪食症候群、ウェルニッケ－コルサコフ症候群、ウィルソン病、何れかの臓器又は組織の異種移植拒絶、急性冠不全症候群、急性突発性多発性神経炎、急性炎症性脱髄性多発性神経障害、急性虚血、成体スチル病、アナフィラキシー、抗リン脂質抗体症候群、再生不良貧血、アトピー性湿疹、アトピー性皮膚炎、自己免疫性皮膚炎、連鎖球菌感染を伴う自己免疫性疾患、自己免疫性腸疾患、自己免疫性難聴、自己免疫性リンパ増殖性症候群（ＡＬＰＳ）、自己免疫性心筋炎、自己免疫性早発閉経、眼瞼炎、気管支拡張症、水疱性類天疱瘡、心血管疾患、劇症型抗リン脂質抗体症候群、セ

リアック病、頚部脊椎症、慢性虚血、瘢痕性類天疱瘡、多発性硬化症に対するリスクを有する最初のエピソードからなる症候群（ｃｉｓ；ｃｌｉｎｉｃａｌｌｙ　ｉｓｏｌａｔｅｄ　ｓｙｎｄｒｏｍｅ）、小児発症精神疾患、涙嚢炎、皮膚筋炎、糖尿病性網膜症、椎間板ヘルニア、椎間板脱出、薬物によって誘導される免疫溶血性貧血、子宮内膜炎、眼内炎、上強膜炎、多型性紅斑、重症型多型性紅斑、妊娠性類天疱瘡、ギランバレー症候群（ＧＢＳ）、ヒューズ症候群、突発性パーキンソン病、突発性間質性肺炎、ＩｇＥ媒介性アレルギー、免疫溶血性貧血、封入体筋炎、感染性眼性炎症疾患、炎症性脱髄性疾患、炎症性心臓病、炎症性腎臓病、ＩＰＦ／ＵＩＰ、虹彩炎、角膜炎、乾性角結膜炎、クスマウル病又はクスマウル・マイヤー病、ランドリー麻痺、ランゲルハンス細胞組織球増殖症、網状皮斑、黄斑変性、顕微鏡的多発性血管炎、ベフテレフ病、運動神経疾患、粘膜類天疱瘡、多発性臓器不全、重症筋無力症、骨髄異形成症候群、心筋炎、神経根疾患、神経障害、非Ａ非Ｂ型肝炎、視神経炎、骨溶解、少関節性ＪＲＡ、末梢動脈閉塞疾患（ＰＡＯＤ）、末梢血管疾患（ＰＶＤ）、末梢動脈疾患（ＰＡＤ）、静脈炎、結節性多発性動脈炎（又は結節性動脈周囲炎）、多発性軟骨炎、白毛症、多関節性ＪＲＡ、多内分泌欠乏症候群、多発性筋炎、リウマチ性多発性筋痛（ＰＭＲ）、原発性パーキンソン病、前立腺炎、純赤血球形成不全、原発性副腎不全、再発性視神経脊髄炎、再狭窄、リウマチ性心疾患、ｓａｐｈｏ（滑膜炎、ざ瘡、嚢胞、骨肥大症及び骨炎）、続発性アミロイドーシス、ショック肺、強膜炎、坐骨神経痛、続発性副腎不全、シリコーン関連結合組織疾患、スネドン－ウィルキンソン皮膚病、強直性脊椎炎、スティーブンス・ジョンソン症候群（ＳＪＳ）、側頭動脈炎、トキソプラズマ網膜炎、毒性表皮剥離症、横断性脊髄炎、ＴＲＡＰＳ（腫瘍壊死因子受容体１型アレルギー性反応）、ＩＩ型糖尿病、じんましん、通常型間質性肺炎（ＵＩＰ）、血管炎、春季カタル、ウイルス性網膜炎、フォークト・コヤナギ・ハラダ症候群（ＶＫＨ症候群）、滲出型黄斑変性、又は創傷治癒である、請求項７に記載の使用。

【請求項９】

医薬が、非経口、皮下、筋肉内、静脈内、関節内、気管支内、腹内、嚢内、軟骨内、腔内（ｉｎｔｒａｃａｖｉｔａｒｉｌｙ）、腔内（ｉｎｔｒａｃｅｌｉａｌｌｙ）、小脳内、脳室内、結腸内、頸管内、胃内、肝臓内、心筋内、骨内、骨盤内、心臓周囲内、腹腔内、胸膜内、前立腺内、肺内、直腸内、腎臓内、網膜内、脊髄内、滑膜内、胸腔内、子宮内、膀胱内、ボーラス、膣、直腸、口内、舌下、鼻内、又は経皮投与される、請求項７又は８に記載の使用。

【請求項１０】

請求項１～３の何れか一項に記載の結合タンパク質をコードする単離された核酸。

【請求項１１】

請求項１０に記載の単離された核酸を含むベクターであって、前記ベクターがｐｃＤＮＡ、ｐＴＴ、ｐＴＴ３、ｐＥＦＢＯＳ、ｐＢＶ、ｐＪＶ、ｐｃＤＮＡ３．１ＴＯＰＯ、ｐＥＦ６ＴＯＰＯ、ｐＨｙｂＥ及びｐＢＪからなる群から選択されても良い前記ベクター。

【請求項１２】

請求項１１に記載のベクターを含む宿主細胞であって、前記宿主細胞が原核細胞、イー・コリ（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）細胞、真核細胞、原生生物細胞、動物細胞、植物細胞、真菌細胞、哺乳動物細胞、酵母細胞、鳥類細胞、昆虫細胞、ＣＨＯ細胞、ＣＯＳ細胞、サッカロミセス・セレビシアエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）細胞、及びＳｆ９細胞からなる群から選択されても良い前記宿主細胞。

【請求項１３】

結合タンパク質を産生するのに十分な条件下で、培地中において、請求項１２に記載されている宿主細胞を培養することを含む、結合タンパク質を作製する方法。

【請求項１４】

テスト試料中の少なくとも１つの標的又はそのフラグメントの存在、量又は濃度をイムノアッセイにより決定するための方法であって、

前記イムノアッセイは、テスト試料を、少なくとも１つの結合タンパク質及び少なくとも１つの検出可能な標識と接触させることを包含し、

前記少なくとも１つの結合タンパク質は、請求項１～３の何れか１項に記載の結合タンパク質を含む、前記方法。
【請求項１５】
さらに、
（ａ）テスト試料を少なくとも１つの結合タンパク質と接触させる工程（前記結合タンパク質は、前記標的又はそのフラグメント上のエピトープに結合し、第一の複合体を形成する）；
（ｂ）前記複合体を少なくとも１つの検出可能な標識と接触させる工程（前記検出可能な標識は、結合タンパク質に結合するか、又は結合タンパク質によって結合されない標的又はそのフラグメント上のエピトープに結合し、第二の複合体を形成する）；及び
（ｃ）第二の複合体中の検出可能な標識により生成されたシグナルに基づき、テスト試料中の標的又はそのフラグメントの存在、量又は濃度を検出する工程（前記標的又はそのフラグメントの存在、量又は濃度は、前記検出可能な標識によって生成されたシグナルに直接的に相関する）
を含む、請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
さらに、
（ａ）テスト試料を少なくとも１つの結合タンパク質と接触させる工程（前記結合タンパク質は、前記標的又はそのフラグメント上のエピトープに結合し、第一の複合体を形成する）；
（ｂ）前記複合体を少なくとも１つの検出可能な標識と接触させる工程（前記検出可能な標識は、結合タンパク質との結合に関して標的又はそのフラグメントと競合し、第二の複合体を形成し）；及び
（ｃ）第二の複合体中の検出可能な標識により生成されたシグナルに基づき、テスト試料中の標的又はそのフラグメントの存在、量又は濃度を検出する工程（前記標的又はそのフラグメントの存在、量又は濃度は、前記検出可能な標識によって生成されたシグナルに間接的に相関する）
を含む、請求項１４に記載の方法。
【請求項１７】
テスト試料を、標的又はそのフラグメントの存在、量、又は濃度についてアッセイするためのキットであって、
（ａ）テスト試料を、標的又はそのフラグメントについてアッセイするための説明書、及び
（ｂ）請求項１～３の何れか１項に記載の結合タンパク質を含む少なくとも１つの結合タンパク質
を含む、前記キット。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI			テーマコード（参考）
C12N 1/15	*(2006.01)*	C12N	1/15		4H045
C12N 1/19	*(2006.01)*	C12N	1/19		
C12N 1/21	*(2006.01)*	C12N	1/21		
C12N 5/10	*(2006.01)*	C12N	5/00	101	
C12P 21/02	*(2006.01)*	C12P	21/02	C	
C12N 15/02	*(2006.01)*	C12N	15/00	C	
A61K 38/00	*(2006.01)*	A61K	37/02		
A61K 39/395	*(2006.01)*	A61K	39/395	N	
A61K 45/00	*(2006.01)*	A61K	39/395	Y	
A61P 1/04	*(2006.01)*	A61K	45/00		
A61P 1/14	*(2006.01)*	A61P	1/04		
A61P 1/16	*(2006.01)*	A61P	1/14		
A61P 3/10	*(2006.01)*	A61P	1/16		
A61P 3/14	*(2006.01)*	A61P	3/10		
A61P 5/00	*(2006.01)*	A61P	3/14		
A61P 5/14	*(2006.01)*	A61P	5/00		
A61P 5/18	*(2006.01)*	A61P	5/14		
A61P 5/50	*(2006.01)*	A61P	5/18		
A61P 7/02	*(2006.01)*	A61P	5/50		
A61P 7/04	*(2006.01)*	A61P	7/02		
A61P 7/06	*(2006.01)*	A61P	7/04		
A61P 9/04	*(2006.01)*	A61P	7/06		
A61P 9/06	*(2006.01)*	A61P	9/04		
A61P 9/08	*(2006.01)*	A61P	9/06		
A61P 9/10	*(2006.01)*	A61P	9/08		
A61P 9/12	*(2006.01)*	A61P	9/10		
A61P 9/14	*(2006.01)*	A61P	9/10	101	
A61P 11/00	*(2006.01)*	A61P	9/12		
A61P 11/02	*(2006.01)*	A61P	9/14		
A61P 11/06	*(2006.01)*	A61P	11/00		
A61P 11/16	*(2006.01)*	A61P	11/02		
A61P 13/02	*(2006.01)*	A61P	11/06		
A61P 13/08	*(2006.01)*	A61P	11/16		
A61P 13/12	*(2006.01)*	A61P	13/02		
A61P 15/02	*(2006.01)*	A61P	13/08		
A61P 15/08	*(2006.01)*	A61P	13/12		
A61P 17/02	*(2006.01)*	A61P	15/02		
A61P 17/04	*(2006.01)*	A61P	15/08		
A61P 17/06	*(2006.01)*	A61P	17/02		
A61P 17/14	*(2006.01)*	A61P	17/04		
A61P 19/02	*(2006.01)*	A61P	17/06		
A61P 19/04	*(2006.01)*	A61P	17/14		
A61P 19/06	*(2006.01)*	A61P	19/02		
A61P 19/08	*(2006.01)*	A61P	19/04		
A61P 19/10	*(2006.01)*	A61P	19/06		
A61P 21/00	*(2006.01)*	A61P	19/08		
A61P 21/02	*(2006.01)*	A61P	19/10		

Ａ６１Ｐ 21/04	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	21/00		
Ａ６１Ｐ 25/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	21/02		
Ａ６１Ｐ 25/04	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	21/04		
Ａ６１Ｐ 25/08	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/00		
Ａ６１Ｐ 25/10	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/04		
Ａ６１Ｐ 25/14	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/08		
Ａ６１Ｐ 25/18	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/10		
Ａ６１Ｐ 25/16	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/14		
Ａ６１Ｐ 25/24	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/18		
Ａ６１Ｐ 25/28	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/16		
Ａ６１Ｐ 25/30	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/24		
Ａ６１Ｐ 25/32	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/28		
Ａ６１Ｐ 27/02	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/30		
Ａ６１Ｐ 27/16	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/32		
Ａ６１Ｐ 29/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	27/02		
Ａ６１Ｐ 31/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	27/16		
Ａ６１Ｐ 31/04	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00		
Ａ６１Ｐ 31/08	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00	１０１	
Ａ６１Ｐ 31/14	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/00		
Ａ６１Ｐ 31/16	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/04		
Ａ６１Ｐ 31/18	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/08		
Ａ６１Ｐ 31/22	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/14		
Ａ６１Ｐ 33/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/16		
Ａ６１Ｐ 33/02	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/18		
Ａ６１Ｐ 33/06	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	31/22		
Ａ６１Ｐ 35/02	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	33/00		
Ａ６１Ｐ 35/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	33/02		
Ａ６１Ｐ 37/06	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	33/06		
Ａ６１Ｐ 37/08	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/02		
Ａ６１Ｐ 39/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		
Ａ６１Ｐ 43/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/06		
Ｇ０１Ｎ 33/53	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/08		
Ｇ０１Ｎ 33/536	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	39/00		
		Ａ６１Ｐ	43/00	１１１	
		Ｇ０１Ｎ	33/53		Ｄ
		Ｇ０１Ｎ	33/536		Ａ

(72)発明者　ベルンハルト・ミユーラー
ドイツ国、６７４３５・ノイシユタツトーギンメルデインゲン、アルトバツハシユトラーセ・１０

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA43 BA61 CA01 DA01 DA02 DA06 DA12 DA20
EA04 GA11 HA01 HA15
4B064 AG26 AG27 BJ12 CA01 CA02 CA05 CA06 CA09 CA10 CA11
CA19 CC24 DA01 DA13
4B065 AA01X AA26X AA58X AA80X AA88X AA90Y AA91X AA99X AB01 AC14
BA02 CA24 CA25 CA44 CA46
4C084 AA01 AA02 AA03 AA06 AA07 AA19 BA17 BA18 BA41 DA39
MA02 MA55 MA56 MA57 MA59 MA60 MA63 MA66 NA14 ZA011
ZA021 ZA061 ZA081 ZA121 ZA151 ZA161 ZA181 ZA331 ZA341 ZA361
ZA371 ZA391 ZA421 ZA441 ZA451 ZA511 ZA531 ZA541 ZA551 ZA591
ZA601 ZA621 ZA661 ZA681 ZA691 ZA751 ZA811 ZA891 ZA921 ZA941

ZA961 ZA971 ZB071 ZB081 ZB111 ZB131 ZB151 ZB261 ZB271 ZB331
ZB351 ZB371 ZB381 ZC021 ZC031 ZC061 ZC081 ZC311 ZC351 ZC371
ZC391 ZC551 ZC751

4C085 AA14 AA37 EE01 EE03 GG01 GG02 GG03 GG04 GG05 GG06
GG10

4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA75 DA76 EA20 EA50 FA74

【外国語明細書】
2015119711000001.pdf

专利名称(译)	双变量免疫球蛋白及其用途		
公开(公告)号	JP2015119711A	公开(公告)日	2015-07-02
申请号	JP2015004894	申请日	2015-01-14
[标]申请(专利权)人(译)	阿布维公司		
申请(专利权)人(译)	AVVI公司		
[标]发明人	タリクガユール アルフレートハーン ベルンハルトミユーラー		
发明人	タリク·ガユール アルフレート·ハーン ベルンハルト·ミユーラー		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/18 C07K16/24 C07K16/28 C07K16/22 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 C12N15/02 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61P1/04 A61P1/14 A61P1/16 A61P3/10 A61P3/14 A61P5/00 A61P5/14 A61P5/18 A61P5/50 A61P7/02 A61P7/04 A61P7/06 A61P9/04 A61P9/06 A61P9/08 A61P9/10 A61P9/12 A61P9/14 A61P11/00 A61P11/02 A61P11/06 A61P11/16 A61P13/02 A61P13/08 A61P13/12 A61P15/02 A61P15/08 A61P17/02 A61P17/04 A61P17/06 A61P17/14 A61P19/02 A61P19/04 A61P19/06 A61P19/08 A61P19/10 A61P21/00 A61P21/02 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/04 A61P25/08 A61P25/10 A61P25/14 A61P25/18 A61P25/16 A61P25/24 A61P25/28 A61P25/30 A61P25/32 A61P27/02 A61P27/16 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/08 A61P31/14 A61P31/16 A61P31/18 A61P31/22 A61P33/00 A61P33/02 A61P33/06 A61P35/02 A61P35/00 A61P37/06 A61P37/08 A61P39/00 A61P43/00 G01N33/53 G01N33/536		
CPC分类号	A61P1/00 A61P1/04 A61P1/14 A61P1/16 A61P3/14 A61P11/00 A61P11/02 A61P11/06 A61P11/16 A61P13/02 A61P13/08 A61P13/12 A61P15/02 A61P15/08 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/04 A61P17/06 A61P17/14 A61P19/02 A61P19/04 A61P19/06 A61P19/08 A61P19/10 A61P21/00 A61P21/02 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/04 A61P25/08 A61P25/10 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/24 A61P25/28 A61P25/30 A61P25/32 A61P27/02 A61P27/16 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/08 A61P31/14 A61P31/16 A61P31/18 A61P31/22 A61P33/00 A61P33/02 A61P33/06 A61P35/00 A61P35/02 A61K47/6843 A61K47/6845 A61K47/6849 C07K16/18 C07K16/22 C07K16/241 C07K16/244 C07K16/245 C07K16/248 C07K16/2803 C07K16/2863 C07K16/2887 C07K2317/53 C07K2317/626 C07K2317/73 C07K2317/732 C07K2317/734 Y02A50/386 Y02A50/41 Y02A50/412 Y02A50/58 A61K39/3955 A61K45/06 C07K16/28 C07K16/2869 C07K2317/21 C07K2317/24 C07K2317/31 C07K2317/35 C07K2317/54 C07K2317/55 C07K2317/565 C07K2317/622 C07K2317/76 C07K2317/92 G01N33/6863 G01N2333/525		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/18 C07K16/24 C07K16/28 C07K16/22 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12P21/02.C C12N15/00.C A61K37/02 A61K39/395.N A61K39/395.Y A61K45/00 A61P1/04 A61P1/14 A61P1/16 A61P3/10 A61P3/14 A61P5/00 A61P5/14 A61P5/18 A61P5/50 A61P7/02 A61P7/04 A61P7/06 A61P9/04 A61P9/06 A61P9/08 A61P9/10 A61P9/10.101 A61P9/12 A61P9/14 A61P11/00 A61P11/02 A61P11/06 A61P11/16 A61P13/02 A61P13/08 A61P13/12 A61P15/02 A61P15/08 A61P17/02 A61P17/04 A61P17/06 A61P17/14 A61P19/02 A61P19/04 A61P19/06 A61P19/08 A61P19/10 A61P21/00 A61P21/02 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/04 A61P25/08 A61P25/10 A61P25/14 A61P25/18 A61P25/16 A61P25/24 A61P25/28 A61P25/30 A61P25/32 A61P27/02 A61P27/16 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/08 A61P31/14 A61P31/16 A61P31/18 A61P31/22 A61P33/00 A61P33/02 A61P33/06 A61P35/02 A61P35/00 A61P37/06 A61P37/08 A61P39/00 A61P43/00.111 G01N33/53.D G01N33/536.A A61K38/00 A61K38/16 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/13 C12N15/62.Z C12N15/63.Z C12N5/10		

F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA43 4B024/BA61 4B024/CA01 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/DA12 4B024/DA20 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA15 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/BJ12 4B064/CA01 4B064/CA02 4B064/CA05 4B064/CA06 4B064/CA09 4B064/CA10 4B064/CA11 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA26X 4B065/AA58X 4B065/AA80X 4B065/AA88X 4B065/AA90Y 4B065/AA91X 4B065/AA99X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA19 4C084/BA17 4C084/BA18 4C084/BA41 4C084/DA39 4C084/MA02 4C084/MA55 4C084/MA56 4C084/MA57 4C084/MA59 4C084/MA60 4C084/MA63 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA011 4C084/ZA021 4C084/ZA061 4C084/ZA081 4C084/ZA121 4C084/ZA151 4C084/ZA161 4C084/ZA181 4C084/ZA331 4C084/ZA341 4C084/ZA361 4C084/ZA371 4C084/ZA391 4C084/ZA421 4C084/ZA441 4C084/ZA451 4C084/ZA511 4C084/ZA531 4C084/ZA541 4C084/ZA551 4C084/ZA591 4C084/ZA601 4C084/ZA621 4C084/ZA661 4C084/ZA681 4C084/ZA691 4C084/ZA751 4C084/ZA811 4C084/ZA891 4C084/ZA921 4C084/ZA941 4C084/ZA961 4C084/ZA971 4C084/ZB071 4C084/ZB081 4C084/ZB111 4C084/ZB131 4C084/ZB151 4C084/ZB261 4C084/ZB271 4C084/ZB331 4C084/ZB351 4C084/ZB371 4C084/ZB381 4C084/ZC021 4C084/ZC031 4C084/ZC061 4C084/ZC081 4C084/ZC311 4C084/ZC351 4C084/ZC371 4C084/ZC391 4C084/ZC551 4C084/ZC751 4C085/AA14 4C085/AA37 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/GG01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG05 4C085/GG06 4C085/GG10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74
优先权	61/130776 2008-06-03 US 61/132951 2008-06-24 US
外部链接	Espacenet

摘要(译)

本发明涉及工程化的多价和多特异性结合蛋白，制备方法，并且具体涉及它们在疾病的预防，诊断和/或治疗中的用途。

(21)出願番号	特願2015-4894 (P2015-4894)
(22)出願日	平成27年1月14日 (2015.1.14)
(62)分割の表示	特願2011-512615 (P2011-512615)の分割
原出願日	平成21年6月3日 (2009.6.3)
(31)優先権主張番号	61/130,776
(32)優先日	平成20年6月3日 (2008.6.3)
(33)優先権主張国	米国 (US)
(31)優先権主張番号	61/132,951
(32)優先日	平成20年6月24日 (2008.6.24)
(33)優先権主張国	米国 (US)

(71)出願人 512212195
アッヴィ・インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 60064 イリノイ州 ノース シカゴ ワウキガン ロード 1エヌ.
(74)代理人 110001173
特許業務法人川口國際特許事務所
(72)発明者 タリク・ガユール
アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01746、ホリストン、ワシントン・ストリート・1014
(72)発明者 アルフレート・ハーン
ドイツ国、68163・マンハイム、シュバルツバルトシュトラーセ・38

最終頁に続く