

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

それぞれ独立して V D 1 - (X 1) n - V D 2 - C - (X 2) n を含む、第一および第二のポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であって、

V D 1 は、第一の可変ドメインであり、

V D 2 は、第二の可変ドメインであり、

C は、定常ドメインであり、

X 1 は、リンカーであり、但し、C H 1 ではなく、

X 2 は、F c 領域であり、

n は、0 または 1 であり、

10

第一および第二のポリペプチド鎖上の V D 1 ドメインが、第一の機能的標的結合部位を形成し、第一および第二のポリペプチド鎖上の V D 2 ドメインが、第二の機能的標的結合部位を形成し、

(a) 結合タンパク質が E G F R と E G F R を結合させることができ、E G F R の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 3 0 からの 3 つの C D R と配列番号 3 1 からの 3 つの C D R ;

配列番号 3 2 からの 3 つの C D R と配列番号 3 3 からの 3 つの C D R ;

配列番号 3 4 からの 3 つの C D R と配列番号 3 5 からの 3 つの C D R ; もしくは

配列番号 3 6 からの 3 つの C D R と配列番号 3 7 からの 3 つの C D R

を独立して含み、

20

(b) 結合タンパク質が R O N と R O N を結合させることができ、R O N の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 5 4 からの 3 つの C D R と配列番号 5 5 からの 3 つの C D R ; もしくは

配列番号 5 6 からの 3 つの C D R と配列番号 5 7 からの 3 つの C D R

を独立して含み、

(c) 結合タンパク質が I G F - 1 R と I G F - 1 R を結合させることができ、I G F - 1 R の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 4 8 からの 3 つの C D R と配列番号 4 9 からの 3 つの C D R ;

配列番号 5 0 からの 3 つの C D R と配列番号 5 1 からの 3 つの C D R ; もしくは

配列番号 5 2 からの 3 つの C D R と配列番号 5 3 からの 3 つの C D R

を独立して含み、

30

(d) 結合タンパク質が E r b - B 3 と E r b - B 3 を結合させることができ、E r b - B 3 の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 3 8 からの 3 つの C D R と配列番号 3 9 からの 3 つの C D R ;

配列番号 4 0 からの 3 つの C D R と配列番号 4 1 からの 3 つの C D R ; もしくは

配列番号 4 2 からの 3 つの C D R と配列番号 4 3 からの 3 つの C D R

を独立して含み、

(e) 結合タンパク質が E G F R と H E R 2 を結合させることができ、E G F R の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 3 0 からの 3 つの C D R と配列番号 3 1 からの 3 つの C D R ;

配列番号 3 2 からの 3 つの C D R と配列番号 3 3 からの 3 つの C D R ;

配列番号 3 4 からの 3 つの C D R と配列番号 3 5 からの 3 つの C D R ; もしくは

配列番号 3 6 からの 3 つの C D R と配列番号 3 7 からの 3 つの C D R

を含み、

40

H E R 2 の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 4 4 からの 3 つの C D R と配列番号 4 5 からの 3 つの C D R ; もしくは

配列番号 4 6 からの 3 つの C D R と配列番号 4 7 からの 3 つの C D R

を含み、

(f) 結合タンパク質が E G F R と I G F - 1 R を結合させることができ、E G F R の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

50

配列番号 30 からの 3 つの C D R と配列番号 31 からの 3 つの C D R ;
配列番号 32 からの 3 つの C D R と配列番号 33 からの 3 つの C D R ;
配列番号 34 からの 3 つの C D R と配列番号 35 からの 3 つの C D R ; もしくは
配列番号 36 からの 3 つの C D R と配列番号 37 からの 3 つの C D R

を含み、

I G F - 1 R の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、
配列番号 48 からの 3 つの C D R と配列番号 49 からの 3 つの C D R ;
配列番号 50 からの 3 つの C D R と配列番号 51 からの 3 つの C D R ; もしくは
配列番号 52 からの 3 つの C D R と配列番号 53 からの 3 つの C D R

を含み、

(g) 結合タンパク質が E G F R と E r b - B 3 を結合させることができ、E G F R の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 30 からの 3 つの C D R と配列番号 31 からの 3 つの C D R ;
配列番号 32 からの 3 つの C D R と配列番号 33 からの 3 つの C D R ;
配列番号 34 からの 3 つの C D R と配列番号 35 からの 3 つの C D R ; もしくは
配列番号 36 からの 3 つの C D R と配列番号 37 からの 3 つの C D R

を含み、

E r b - B 3 の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、
配列番号 38 からの 3 つの C D R と配列番号 39 からの 3 つの C D R ;
配列番号 40 からの 3 つの C D R と配列番号 41 からの 3 つの C D R ; もしくは
配列番号 42 からの 3 つの C D R と配列番号 43 からの 3 つの C D R

を含み、

(h) 結合タンパク質が E G F R と R O N を結合させることができ、E G F R の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 30 からの 3 つの C D R と配列番号 31 からの 3 つの C D R ;
配列番号 32 からの 3 つの C D R と配列番号 33 からの 3 つの C D R ;
配列番号 34 からの 3 つの C D R と配列番号 35 からの 3 つの C D R ; もしくは
配列番号 36 からの 3 つの C D R と配列番号 37 からの 3 つの C D R

を含み、

R O N の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、
配列番号 54 からの 3 つの C D R と配列番号 55 からの 3 つの C D R ; もしくは
配列番号 56 からの 3 つの C D R と配列番号 57 からの 3 つの C D R

を含み、

(i) 結合タンパク質が H E R 2 と R O N を結合させることができ、H E R 2 の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 44 からの 3 つの C D R と配列番号 45 からの 3 つの C D R ; もしくは
配列番号 46 からの 3 つの C D R と配列番号 47 からの 3 つの C D R

を含み、

R O N の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、
配列番号 54 からの 3 つの C D R と配列番号 55 からの 3 つの C D R ; もしくは
配列番号 56 からの 3 つの C D R と配列番号 57 からの 3 つの C D R

を含み、

(j) 結合タンパク質が E r b - B 3 と R O N を結合させることができ、E r b - B 3 の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 38 からの 3 つの C D R と配列番号 39 からの 3 つの C D R ;
配列番号 40 からの 3 つの C D R と配列番号 41 からの 3 つの C D R ; もしくは
配列番号 42 からの 3 つの C D R と配列番号 43 からの 3 つの C D R

を含み、

R O N の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、
配列番号 54 からの 3 つの C D R と配列番号 55 からの 3 つの C D R ; もしくは

10

20

30

40

50

配列番号 56 からの 3 つの C D R と配列番号 57 からの 3 つの C D R
を含み、

(k) 結合タンパク質が I G F-1 R と R O N を結合させることができ、I G F-1 R
の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 48 からの 3 つの C D R と配列番号 49 からの 3 つの C D R ;

配列番号 50 からの 3 つの C D R と配列番号 51 からの 3 つの C D R ; もしくは

配列番号 52 からの 3 つの C D R と配列番号 53 からの 3 つの C D R

を含み、

R O N の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 54 からの 3 つの C D R と配列番号 55 からの 3 つの C D R ; もしくは

配列番号 56 からの 3 つの C D R と配列番号 57 からの 3 つの C D R

を含み、

(l) 結合タンパク質が I G F-1 R と E r b-B 3 を結合させることができ、I G F-1 R
の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 48 からの 3 つの C D R と配列番号 49 からの 3 つの C D R ;

配列番号 50 からの 3 つの C D R と配列番号 51 からの 3 つの C D R ; もしくは

配列番号 52 からの 3 つの C D R と配列番号 53 からの 3 つの C D R

を含み、

E r b-B 3 の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 38 からの 3 つの C D R と配列番号 39 からの 3 つの C D R ;

配列番号 40 からの 3 つの C D R と配列番号 41 からの 3 つの C D R ; もしくは

配列番号 42 からの 3 つの C D R と配列番号 43 からの 3 つの C D R

を含み、

(m) 結合タンパク質が I G F-1 R と H E R 2 を結合させることができ、I G F-1 R
の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 48 からの 3 つの C D R と配列番号 49 からの 3 つの C D R ;

配列番号 50 からの 3 つの C D R と配列番号 51 からの 3 つの C D R ; もしくは

配列番号 52 からの 3 つの C D R と配列番号 53 からの 3 つの C D R

を含み、

H E R 2 の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 44 からの 3 つの C D R と配列番号 45 からの 3 つの C D R ; もしくは

配列番号 46 からの 3 つの C D R と配列番号 47 からの 3 つの C D R

を含み、

または

(n) 結合タンパク質が E r b-B 3 と H E R 2 を結合させることができ、E r b-B 3
の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 38 からの 3 つの C D R と配列番号 39 からの 3 つの C D R ;

配列番号 40 からの 3 つの C D R と配列番号 41 からの 3 つの C D R ; もしくは

配列番号 42 からの 3 つの C D R と配列番号 43 からの 3 つの C D R

を含み、

H E R 2 に対して機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 44 からの 3 つの C D R と配列番号 45 からの 3 つの C D R ; もしくは

配列番号 46 からの 3 つの C D R と配列番号 47 からの 3 つの C D R

を含む結合タンパク質。

【請求項 2】

それぞれ独立して V D 1-(X 1) n-V D 2-C-(X 2) n を含む、2 つの第一の
ポリペプチド鎖および 2 つの第二のポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であって、

V D 1 は、第一の可変ドメインであり、

V D 2 は、第二の可変ドメインであり、

C は、定常ドメインであり、

10

20

30

40

50

X 1 は、リンカーであり、但し、C H 1 ではなく、
 X 2 は、F c 領域であり、
 n は、0 または 1 であり、

全部で 4 つの機能的標的結合部位について、第一および第二のポリペプチド鎖上の V D 1 ドメインが、第一の機能的標的結合部位を形成し、第一および第二のポリペプチド鎖上の V D 2 ドメインが、第二の機能的標的結合部位を形成する、請求項 1 に記載の結合タンパク質。

【請求項 3】

第一のポリペプチド鎖が、第一の V D 1 - (X 1) n - V D 2 - C - (X 2) n を含み、

10

V D 1 は、第一の重鎖可変ドメインであり、
 V D 2 は、第二の重鎖可変ドメインであり、
 C は、重鎖定常ドメインであり、
 X 1 は、第一のリンカーであり、但し、C H 1 ではなく、
 X 2 は、F c 領域であり、
 n は、0 または 1 であり、
 第二のポリペプチド鎖が、第二の V D 1 - (X 1) n - V D 2 - C - (X 2) n を含み、

V D 1 は、第一の軽鎖可変ドメインであり、
 V D 2 は、第二の軽鎖可変ドメインであり、
 C は、軽鎖定常ドメインであり、
 X 1 は、第二のリンカーであり、但し、C H 1 ではなく、
 X 2 は、F c 領域を含まず、
 n は、0 または 1 であり、

20

第一および第二のポリペプチド鎖上の V D 1 ドメインが、第一の機能的標的結合部位を形成し、第一および第二のポリペプチド鎖上の V D 2 ドメインが、第二の機能的標的結合部位を形成する、請求項 1 または 2 に記載の結合タンパク質。

【請求項 4】

(a) X 1 が、配列番号 1 - 27 のいずれか 1 つであり、

(b) X 1 が、C L ではなく、

30

(c) (X 1) n が (X 1) 0 であり、および／もしくは (X 2) n が (X 2) 0 であり、

(d) 結合タンパク質が、2 つの第一のポリペプチド鎖および 2 つの第二のポリペプチド鎖を含み、

(e) F c 領域が、可変配列 F c 領域であり、

(f) F c 領域が、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A、I g M、I g E もしくは I g D 由来の F c 領域であり、ならびに／または

(g) 結合タンパク質が、結晶化された結合タンパク質である、
 請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項 5】

40

免疫接着 (i m m u n o a d h e n s i o n) 分子、造影剤、治療剤または細胞毒性剤である薬剤をさらに含み、場合によって、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、磁気標識またはビオチンであり、場合によって、前記放射性標識が ³H、¹⁴C、³⁵S、⁹⁰Y、⁹⁹Tc、¹¹¹In、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁷⁷Lu、¹⁶⁶Ho または ¹⁵³Sm であり、または場合によって、前記治療剤または細胞毒性剤が代謝抑制剤、アルキル化剤、抗生物質、増殖因子、サイトカイン、抗血管新生剤、抗有糸分裂剤、アントラサイクリン、トキシシンまたはアポトーシス剤である、請求項 1 から 4 のいず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コンジュゲート。

【請求項 6】

請求項 1 から 4 のいず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。

50

【請求項 7】

場合によって、p c D N A、p T T、p T T 3、p E F B O S、p B V、p J V、p c D N A 3、1 T O P O、p E F 6、p H y b E、T O P Oまたはp B Jである、請求項 6に記載の単離された核酸を含むベクター。

【請求項 8】

場合によって、原核細胞、エシュリキア・コリ (*Escherichia coli*)、真核細胞、原生生物細胞、動物細胞、植物細胞、真菌細胞、酵母細胞、S f 9細胞、哺乳動物細胞、鳥類細胞、昆虫細胞、C H O細胞またはC O S細胞である、請求項 7に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 9】

結合タンパク質を産生するのに十分な条件下で、請求項 8に記載の宿主細胞を培地中において培養することを含む、結合タンパク質を生産する方法。

【請求項 10】

請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の結合タンパク質および医薬として許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項 11】

前記追加の治療剤が、場合によって、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またはその機能的断片；メトトレキサート；シクロスポリン；ラパマイシン；F K 5 0 6；検出可能な標識またはレポーター；T N Fアンタゴニスト；抗リウマチ薬；筋肉弛緩剤、麻酔薬、非ステロイド系抗炎症薬 (N S A I D)、鎮痛剤、麻酔、鎮静剤、局所麻酔、神経筋肉遮断剤、抗微生物剤、抗乾癬剤、コルチコステロイド、アナボリックステロイド、エリスロポエチン、免疫化、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、放射性医薬、抗うつ剤、抗精神病薬、刺激物質、喘息薬、βアゴニスト、吸入用ステロイド、エピネフリンまたは類似体、サイトカインまたはサイトカインアンタゴニストである、少なくとも 1 つの追加の治療剤をさらに含む、請求項 10に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

治療が達成されるように、結合タンパク質を対象に投与することによって、疾患または障害について対象を治療するための医薬の製造における、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の結合タンパク質の使用であって、場合によって、障害が、関節リウマチ、変形性関節症、若年性慢性関節炎、敗血症性関節炎、ライム関節炎、乾癬性関節炎、反応性関節炎、脊椎関節症、全身性紅斑性狼瘡、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、インシュリン依存性糖尿病、甲状腺炎、喘息、アレルギー性疾患、乾癬、皮膚炎、強皮症、移植片対宿主病、臓器移植拒絶、臓器移植に関連する急性または慢性免疫疾患、サルコイドーシス、アテローム性動脈硬化症、播種性血管内凝固、川崎病、バセドウ病、ネフローゼ症候群、慢性疲労症候群、ウェゲナー肉芽腫症、ヘノッホ・シェーライン紫斑症、腎臓の顕微鏡的血管炎、慢性活動性肝炎、ブドウ膜炎、敗血症性ショック、毒素性ショック症候群、敗血症症候群、悪液質、感染性疾患、寄生性疾患、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 型および多内分泌腺機能低下症候群 I I 型、シュミット症候群、成人（急性）呼吸促迫症候群、脱毛症、円形脱毛症、血清反応陰性関節炎、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、エルシニアおよ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 I g A 病、自己免疫性溶血性貧血、クームス陽性溶血性貧血、後天性悪性貧血、若年性悪性貧血、筋痛性脳脊髄炎／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、後天性免疫不全症候群、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、線維性肺疾患、突発性間質性肺炎、炎

10

20

30

40

50

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、線維症、放射性線維症、閉塞性細気管支炎、慢性好酸球性肺炎、リンパ球浸潤性肺疾患、感染後間質性肺疾患、通風関節炎、自己免疫性肝炎、1型自己免疫性肝炎（古典的自己免疫性またはルポイド肝炎）、2型自己免疫性肝炎（抗LKM抗体肝炎）、自己免疫媒介性低血糖症、黒色表皮腫を伴うB型インシュリン抵抗性、副甲状腺機能低下症、臓器移植に関連する急性免疫疾患、臓器移植に関連する慢性免疫疾患、変形性関節症、原発性硬化性胆管炎、1型乾癬、2型乾癬、特発性白血球減少症、自己免疫性好中球減少症、腎臓病NOS、糸球体腎炎、腎臓の顕微鏡的血管炎、ライム病、円板状紅斑性狼瘡、男性不妊症特発性またはNOS、精子自己免疫、多発性硬化症（すべてのサブタイプ）、交感性眼炎、結合組織疾患に続発する肺高血圧症、グッドパスチャー症候群、結節性多発動脈炎の肺症状、急性リウマチ熱、リウマチ性脊椎炎、スチル病、全身性硬化症、シェーグレン症候群、高安病／動脈炎、自己免疫性血小板減少症、特発性血小板減少症、自己免疫性甲状腺疾患、甲状腺機能亢進症、甲状腺腫自己免疫性甲状腺機能低下症（橋本病）、萎縮性自己免疫性甲状腺機能低下症、原発性粘液水腫（*primary myxoedema*）、水晶体起因性ブドウ膜炎、原発性血管炎、白斑急性肝疾患、慢性肝疾患、アルコール性肝硬変、アルコール誘発性肝障害、胆汁うっ滞（*choleostasis*）、特異体質性肝疾患、薬物誘発性肝炎、非アルコール性脂肪性肝炎、アレルギーおよび喘息、B群連鎖球菌（GBS）感染、精神障害（例えば、うつ病および統合失調症）、Th2型およびTh1型によって媒介される疾病、急性および慢性疼痛（疼痛の異なる形態）、ならびに、肺癌、乳癌、胃癌、膀胱癌、大腸癌、膵臓癌、卵巣癌、前立腺癌および腎臓癌および造血性悪性病変（白血病およびリンパ腫）などの癌、無βリポタンパク質血症、先端チアノーゼ、急性および慢性寄生性または感染性プロセス、急性白血病、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、急性骨髄性白血病（AML）、急性または慢性細菌感染、急性膵炎、急性腎不全、腺癌、心房（*aerial*）異所性拍動、AIDS認知症複合、アルコール誘発性肝炎、アレルギー性結膜炎、アレルギー性接触性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、同種移植拒絶、α-1-アンチトリプシン欠乏症、筋萎縮性側索硬化症、貧血、狭心症、前角細胞変性、抗cd3治療、抗リン脂質症候群、抗受容体過敏症反応（*anti-receptor hypersensitivity reactions*）、大動脈（*aortic*）および動脈瘤、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（持続的または発作性）、心房粗動、房室ブロック、B細胞リンパ腫、骨移植拒絶、骨髄移植（BMT）拒絶、脚ブロック、バーキットリンパ腫、火傷、心不整脈、心機能不全症候群（*cardiac stun syndrome*）、心臓腫瘍、心筋症、心肺バイパス炎症反応、軟骨移植拒絶、小脳皮質変性、小脳疾患、無秩序なまたは多巣性心房頻脈、化学療法関連疾患、慢性骨髄性白血病（CML）、慢性アルコール症、慢性炎症性病変、慢性リンパ性白血病（CLL）、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、慢性サリチル酸中毒、結腸直腸癌、うっ血性心不全、結膜炎、接触性皮膚炎、肺性心、冠動脈疾患、クロイツフェルトーヤコブ病、培養陰性敗血症、嚢胞性線維症、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、垂体外路および小脳疾患、家族性血球貪食性リンパ組織球症（*familial hematophagocytic lymphohistiocytosis*）、致死性胸腺移植組織拒絶、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、いずれかの臓器または組織の移植片拒絶、グラム陰性敗血症、グラム陽性敗血症、細胞内生物に起因する肉芽腫、有

10

20

30

40

50

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、視床下部一下垂体一副腎皮質系評価、特発性アジソン病、特発性肺線維症、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（lymphedema）、マラリア、悪性リンパ腫、悪性組織球増殖症、悪性黒色腫、髄膜炎、髄膜炎菌血症（meningococcemia）、代謝性／特発性、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・シャイドレーガーおよびマシャドジョセフ）、重症筋無力症、マイコバクテリウム・アビウム・イントラセルラーレ、マイコバクテリウム・チューバキュロシス、骨髄形成異常、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I筋萎縮、好中球減少性発熱、非ホジキンリンパ腫、腹部大動脈およびその分枝の閉塞、閉塞性動脈疾患、okt3療法、精巣炎／精巣上体炎、精巣炎／精管復元術処置、臓器肥大、骨粗鬆症、脾臓移植拒絶、脾癌、腫瘍随伴性症候群／悪性腫瘍の高カルシウム血症、副甲状腺移植拒絶、骨盤内炎症性疾患、通年性鼻炎、心膜疾患、末梢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グロブリン血症および皮膚変化症候群（skin changes syndrome））、灌流後症候群（post perfusion syndrome）、ポンプ後症候群（post pump syndrome）、心筋梗塞後開心術症候群、子癇前症、進行性核上性麻痺、原発性肺高血圧、放射線療法、レイノー現象および病、レイノー病、レフサム病、規則的なQRS幅の狭い頻脈症（regular narrow QRS tachycardia）、腎血管性高血圧、再灌流障害、拘束型心筋症、肉腫、強皮症、老年性舞蹈病、レビー小体型の老年性認知症、血清反応陰性関節炎、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 arrhythmias）、脊髄性運動失調、脊髄小脳変性、連鎖球菌性筋炎、小脳の構造的病変、亜急性硬化性全脳炎、失神、心血管系の梅毒、全身性アナフィラキシー、全身性炎症反応症候群、全身性発症若年性関節リウマチ、T細胞またはFABALL、毛細血管拡張症、閉塞性血栓血管炎、血小板減少症、毒性、移植、外傷／出血、III型過敏症反応、IV型過敏症、不安定狭心症、尿毒症、尿路性敗血症、じんましん、心臓弁膜症、静脈瘤、血管炎、静脈疾患、静脈血栓症、心室細動、ウイルスおよび真菌感染、ウイルス性脳炎（vital encephalitis）／無菌性髄膜炎、ウイルス関連血球貪食症候群、ウェルニッケーコルサコフ症候群、ウィルソン病、いずれかの臓器または組織の異種移植拒絶、急性冠症候群、急性特発性多発性神経炎、急性炎症性脱髄性多発神経根神経障害、急性虚血、成人スチル病、アナフィラキシー、抗リン脂質抗体症候群、再生不良性貧血、アトピー性湿疹、アトピー性皮膚炎、自己免疫性皮膚炎、連鎖球菌感染に伴う自己免疫異常、自己免疫性腸症、自己免疫性難聴、自己免疫性リンパ増殖症候群（ALPS）、自己免疫性心筋炎、自己免疫性早期卵巣不全、眼瞼炎、気管支拡張症、水疱性類天疱瘡、心血管疾患、劇症型抗リン脂質症候群、セリアック病、頸部脊椎症、慢性虚血、癬痕性類天疱瘡、多発性硬化症のリスクを有する臨床的孤発症候群（cis）、小児発症精神障害、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、薬物誘発免疫性溶血性貧血、子宮内膜症、眼内炎、上強膜炎、多形性紅斑、重症型多形性紅斑、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、特発性パーキンソン病、特発性間質性肺炎、IgE媒介性アレルギー、免疫性溶血性貧血、封入体筋炎、感染性眼炎症疾患、炎症性脱髄疾患、炎症性心疾患、炎症性腎

10

20

30

40

50

疾患、I P F / U I P、虹彩炎、角膜炎、乾性角結膜炎、クスマウル病またはクスマウルマイヤー病、ランドリー麻痺、ランゲルハンス細胞性組織球症、網状皮斑、黄斑変性、顕微鏡的多発性血管炎、モルブス・ベヒテレフ (morbus bechterev)、運動ニューロン疾患、粘膜性類天疱瘡、多臓器不全、骨髄異形成症候群、心筋炎、神経根障害、神経障害、非A非B型肝炎、視神経炎、骨溶解、卵巣癌、小関節性J R A、末梢動脈

閉塞疾患 (P A O D)、末梢血管疾患 (P V D)、末梢動脈疾患 (P A D)、静脈炎、結節性多発性動脈炎 (または結節性動脈周囲炎)、多発性軟骨炎、リウマチ性多発性筋痛、白毛症、多関節性J R A、多内分泌欠損症候群、多発性筋炎、ポンプ後症候群、原発性パーキンソニズム、前立腺癌および直腸癌および造血性悪性病変 (白血病およびリンパ腫)、前立腺炎、赤芽球癆、原発性副腎不全、再発性視神経脊髄炎、再狭窄、リウマチ性心疾患、s a p h o (滑膜炎、アクネ、膿疱症、骨過形成および骨髄炎)、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、二次性副腎不全、シリコーン関連結合組織病、スネドナーウィルキンソン皮膚症、強直性脊椎炎、スティーブンス・ジョンソン症候群 (S J S)、全身性炎症反応症候群、側頭動脈炎、トキソプラズマ性網膜炎、中毒性表皮剥離症、横断性脊髄炎、T R A P S (腫瘍壊死因子受容体)、1型アレルギー反応、I I型糖尿病、通常型間質性肺炎 (U I P)、春季結膜炎、ウイルス性網膜炎、フォークト・小柳・原田症候群 (V K H症候群)、滲出型黄斑変性または創傷治癒である使用。

10

【請求項 13】

20

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 (i n t r a c a v i t a r y)、腔内 (i n t r a c e l l i a l)、小脳内、脳室内、結腸内、頸管内、胃内、肝臓内、心筋内、骨内、骨盤内、心臓周囲内、腹腔内、胸膜内、前立腺内、肺内、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、鼻内または経皮投与のために製剤化される、請求項 12に記載の使用。

【請求項 14】

イムノアッセイは、試験試料を少なくとも1つの結合タンパク質および少なくとも1つの検出可能な標識と接触させることを含み、
少なくとも1つの結合タンパク質は、請求項1から4のいずれか一項に記載の結合タンパク質を含む、
イムノアッセイによって試験試料中の少なくとも1つの標的またはその断片の存在、量または濃度を決定するためのインビトロ法。

30

【請求項 15】

(i) 第一の複合体を形成するために、試験試料を、標的またはその断片上のエピトープに結合する少なくとも1つの結合タンパク質と接触させること、
(i i) 第二の複合体を形成するために、複合体を、結合タンパク質に結合しまたは結合タンパク質が結合しない標的もしくはその断片上のエピトープに結合する少なくとも1つの検出可能な標識を接触させることおよび
(i i i) 第二の複合体における検出可能な標識によって発生したシグナルに基づいて、試験試料中の標的またはその断片の存在、量または濃度を検出すること
をさらに含み、標的またはその断片の存在、量または濃度が、検出可能な標識によって発生したシグナルと直接相関する、請求項14に記載の方法。

40

【請求項 16】

(i) 第一の複合体を形成するために、試験試料を、標的またはその断片上のエピトープに結合する少なくとも1つの結合タンパク質と接触させること、
(i i) 第二の複合体を形成するために、前記複合体を、結合タンパク質への結合について標的またはその断片と競合する少なくとも1つの検出可能な標識と接触させることおよび
(i i i) 第二の複合体における検出可能な標識によって発生したシグナルに基づいて、

50

試験試料中の標的またはその断片の存在、量または濃度を検出すること
をさらに含み、標的またはその断片の存在、量または濃度が、検出可能な標識によって発生したシグナルに間接的に関連する、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 17】

前記試験試料が患者由来であり、前記方法が、

(a) 患者の治療的／予防的処置の効力を診断、予後診断または評価することをさらに含み、

前記方法が、患者の治療的／予防的処置の効力を評価することをさらに含む場合、効力を改善するために必要な、患者の治療的／予防的処置を改変することの場合によってさらに含み、

(b) 自動化システムまたは半自動化システムにおける使用に適合され、および／または
(c) 試料中の 1 を超える標的の存在、量または濃度を決定する、請求項 14 から 16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

(a) 標的またはその断片について試験試料をアッセイするための説明書および

(b) 請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の結合タンパクを含む少なくとも 1 つの結合タンパク質

を含む、標的またはその断片の存在、量または濃度についてインビトロ試験試料をアッセイするためのキット。

【請求項 19】

(a) 結合タンパク質が EGF R と EGF R を結合させることができ、EGF R の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 30 と配列番号 31 ；

配列番号 32 と配列番号 33 ；

配列番号 34 と配列番号 35 ；もしくは

配列番号 36 と配列番号 37

を独立して含み、

(b) 結合タンパク質が RON と RON を結合させることができ、RON の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 54 と配列番号 55 ；もしくは

配列番号 56 と配列番号 57

を独立して含み、

(c) 結合タンパク質が IGF-1 R と IGF-1 R を結合させることができ、IGF-1 R の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 48 と配列番号 49 ；

配列番号 50 と配列番号 51 ；もしくは

配列番号 52 と配列番号 53

を独立して含み、

(d) 結合タンパク質が Erb-B3 と Erb-B3 を結合させることができ、Erb-B3 の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 38 と配列番号 39 ；

配列番号 40 と配列番号 41 ；もしくは

配列番号 42 と配列番号 43

を独立して含み、

(e) 結合タンパク質が EGF R と HER2 を結合させることができ、EGF R の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 30 と配列番号 31 ；

配列番号 32 と配列番号 33 ；

配列番号 34 と配列番号 35 ；もしくは

配列番号 36 と配列番号 37

10

20

30

40

50

を含み、

HER2の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、
配列番号44と配列番号45；もしくは
配列番号46と配列番号47

を含み、

(f) 結合タンパク質がEGFRとIGF-1Rを結合させることができ、EGFRの機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号30と配列番号31；
配列番号32と配列番号33；
配列番号34と配列番号35；もしくは
配列番号36と配列番号37

10

を含み、

IGF-1Rの機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、
配列番号48と配列番号49；
配列番号50と配列番号51；もしくは
配列番号52と配列番号53

を含み、

(g) 結合タンパク質がEGFRとErb-B3を結合させることができ、EGFRの機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号30と配列番号31；
配列番号32と配列番号33；
配列番号34と配列番号35；もしくは
配列番号36と配列番号37

20

を含み、

Erb-B3の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、
配列番号38と配列番号39；
配列番号40と配列番号41；もしくは
配列番号42と配列番号43

を含み、

(h) 結合タンパク質がEGFRとRONを結合させることができ、EGFRの機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

30

配列番号30と配列番号31；
配列番号32と配列番号33；
配列番号34と配列番号35；もしくは
配列番号36と配列番号37

を含み、

RONの機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、
配列番号54と配列番号55；もしくは
配列番号56と配列番号57

40

を含み、

(i) 結合タンパク質がHER2とRONを結合させることができ、HER2の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号44と配列番号45；もしくは
配列番号46と配列番号47

を含み、

RONの機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、
配列番号54と配列番号55；もしくは
配列番号56と配列番号57

を含み、

(j) 結合タンパク質がErb-B3とRONを結合させることができ、Erb-B3

50

の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 38 と配列番号 39 ；

配列番号 40 と配列番号 41 ；もしくは

配列番号 42 と配列番号 43

を含み、

RON の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 54 と配列番号 55 ；もしくは

配列番号 56 と配列番号 57

を含み、

(k) 結合タンパク質が IGF-1R と RON を結合させることができ、IGF-1R 10

の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 48 と配列番号 49 ；

配列番号 50 と配列番号 51 ；もしくは

配列番号 52 と配列番号 53

を含み、

RON の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 54 と配列番号 55 ；もしくは

配列番号 56 と配列番号 57

を含み、

(l) 結合タンパク質が IGF-1R と Erb-B3 を結合させることができ、IGF 20

-1R の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 48 と配列番号 49 ；

配列番号 50 と配列番号 51 ；もしくは

配列番号 52 と配列番号 53

を含み、

Erb-B3 の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 38 と配列番号 39 ；

配列番号 40 と配列番号 41 ；もしくは

配列番号 42 と配列番号 43

を含み、

(m) 結合タンパク質が IGF-1R と HER2 を結合させることができ、IGF-1 30

R の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 48 と配列番号 49 ；

配列番号 50 と配列番号 51 ；もしくは

配列番号 52 と配列番号 53

を含み、

HER2 の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 44 と配列番号 45 ；もしくは

配列番号 46 と配列番号 47

を含み、

または 40

(n) 結合タンパク質が Erb-B3 と HER2 を結合させることができ、Erb-B 3

の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 38 と配列番号 39 ；

配列番号 40 と配列番号 41 ；もしくは

配列番号 42 と配列番号 43

を含み、

HER2 の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 44 と配列番号 45 ；もしくは

配列番号 46 と配列番号 47

を含む、

請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項 20】

DVD 2206-DVD 2219、DVD 2226-DVD 2231、DVD 2238-DVD 2249、DVD 2266-DVD 2311、DVD 2314-DVD 2343、または DVD 2346-DVD 2349 のいずれか 1 つを含む、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、その全体が参照により本明細書に組み込まれている、2011年12月30日に出願した米国仮特許出願第 61/581,963 号の優先権の利益を主張する。

【0002】

同じ細胞上に発現した同じ受容体または 2 つの異なる受容体の 2 つの重複しないエピトープを標的とする多価および多重特異的結合タンパク質、製造方法、ならびに疾患の診断、予防および／または治療における使用が提供される。

【背景技術】

【0003】

2 つまたはそれ以上の抗原に結合することができる多重特異的結合タンパク質などの工学的に作製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、化学的連結または組換え DNA 技術を用いて作製することが可能である。当該技術分野において公知の多重特異的結合タンパク質の構造は様々な存在し、多数の構造および方法には明らかな不利益がある。

【0004】

二特異的抗体は、クアドローマ技術を用いて作製されてきた。しかしながら、この技術における誤対合された副産物の存在および大幅に減少した産生率は、複雑な精製操作が必要とされることを意味している。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。しかしながら、このアプローチは、均一な調製を与えない。

【0005】

以前に使用された他のアプローチは、ヘテロー二官能性クロスリンカーを有する 2 つの親抗体のカップリング、タンデムな一本鎖 Fv 分子、ダイアボディ、二特異的ダイアボディ、一本鎖ダイアボディおよびジードイアボディの製造を含む。しかしながら、これらのアプローチのそれぞれは不利益を有する。さらに、IgG の重鎖中に 2 つの Fab リピートを含み、4 つの抗原分子に結合することができる多価の抗体構築物が記載されている (PCT 公開 WO 0177342 および Miller et al. (2003) J. Immunol. 170 (9): 4854-61 参照)。

【0006】

リガンド-受容体系は、特異性を維持するために同時に進化してきた。それらの相互作用は、特定の生物活性に関して特定のシグナル伝達を活性化する。しかしながら、非リガンド-受容体結合タンパク質、例えば、単一特異性抗体、二重もしくは多重特異性結合タンパク質、非競合性抗体の組合せまたは受容体の細胞外ドメイン (ECD) に対する他の受容体結合タンパク質は、受容体リガンド-結合部位と異なるエピトープを認識し得る。受容体の ECD に対するこのような異なるエピトープへの結合は、新たな予期しないシグナル伝達カスケードを生じ得る細胞内ドメインに立体構造変化を形質導入することがある。

【0007】

米国特許第 7,612,181 号は、二重可変ドメイン結合タンパク質 (DVD 結合タンパク質) または二重可変ドメイン免疫グロブリン (DVD-Ig (商標)) と呼ばれる、高親和性を有する 2 つ以上の抗原に結合することが可能な結合タンパク質の新規なファ

10

20

30

40

50

ミリーを提供する。DVD-Ig分子は、同じ分子または同時に2つの異なる分子上の2つの異なるエピトープに結合することができる四価の二重特異的Ig様タンパク質である。DVD-Igは、二価抗体のN末端に融合した2つの可変ドメインから構成される固有の結合タンパク質である。可変ドメインは、互いに直接融合されてもよく、または各種の長さおよびアミノ酸組成を有する合成ペプチドリンカーを介して直接接続されてもよい。DVD-Igは、完全であり、機能的なFcドメインを用いて遺伝子操作され得て、次に適切なエフェクター機能を媒介することができる。DVD-Igフォーマットは、抗体対の最適な柔軟性、2つの抗原結合ドメインの配向およびこれらを連結するリンカーの長さに起因して、受容体の生物学のいくつかの固有の態様と、おそらく新たな治療法を明らかにすることができる。

10

【0008】

種々の構造が当該技術分野において提供され、いくつかは利点と欠点を有するが、特定の構築物は、特定の標的に結合する特定の特性を有する多価結合タンパク質を調製するために必要とされる。さらに、新しい可変ドメイン配列は、結合タンパク質の特性をさらに改善することができる。具体的には、ある種の先行技術のDVD-Ig構築物を用いた場合、ある程度の立体障害は、これらの先行技術のDVD-Ig構築物への標的の結合に影響を与えている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

20

【特許文献1】国際公開第2001/077342号

【特許文献2】米国特許第7,612,181号明細書

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Miller et al. (2003) J. Immunol. 170 (9): 4854-61

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

同じ細胞上に発現した同じ受容体または2つの異なる受容体の2つの重複しないエピトープに結合することができる、改良された多価結合タンパク質が、当該技術分野において必要とされている。同じ細胞上に発現した同じ受容体または2つの異なる受容体の2つの重複しないエピトープに結合する新規な結合タンパク質が提供され、ここで、結合タンパク質は、EGFRとEGFR、RONとRON、IGF-1RとIGF-1R、ErbB3とErbB3、EGFRとHER2、EGFRとIGF-1R、EGFRとErbB3、EGFRとRON；RONとHER2；RONとErbB3；RONとIGF-1R；IGF-1RとErbB3；IGF-1RとHER2；またはHER2とErbB3を結合させることができる。

30

【課題を解決するための手段】

【0012】

40

（発明の要旨）

同じ細胞上に発現した同じ受容体または2つの異なる受容体の2つの異なる（例えば、重複しない）エピトープを標的とすることができる結合タンパク質が提供される。一実施形態において、高親和性で、同じ細胞上に発現した同じ受容体または2つの異なる受容体の2つの異なる（例えば、重複しない）エピトープに結合することができる結合タンパク質が提供される。

【0013】

一実施形態において、同じ細胞上に発現した同じ受容体または2つの異なる受容体の2つの異なる（例えば、重複しない）エピトープに結合するポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であって、ポリペプチド鎖は、VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_nを含

50

み、VD 1は第一の可変ドメインであり、VD 2は第二の可変ドメインであり、Cは定常ドメインであり、X 1はアミノ酸またはポリペプチドを表し、X 2はFc領域を表し、nは0または1である結合タンパク質が提供される。一実施形態において、結合タンパク質中のVD 1およびVD 2は、重鎖可変ドメインである。別の実施形態において、VD 1およびVD 2は、同じ受容体の2つの重複しないエピトープに結合することができる。別の実施形態において、VD 1およびVD 2は、同じ細胞上に発現した2つの異なる受容体に結合することができる。さらに別の実施形態において、Cは、重鎖定常ドメインである。例えば、X 1はリンカーである（但し、X 1はCH 1ではない。）。

【0014】

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、同じ細胞上に発現した同じ受容体または2つの異なる受容体の2つの異なる（例えば、重複しない）エピトープに結合するポリペプチド鎖を含み、ポリペプチド鎖は、VD 1-(X 1)n-VD 2-C-(X 2)nを含み、VD 1は第一の重鎖可変ドメインであり、VD 2は第二の重鎖可変ドメインであり、Cは重鎖定常ドメインであり、X 1はリンカーであり、X 2はFc領域である。一実施形態において、X 1は、リンカーであり、但し、CH 1ではない。一実施形態において、VD 1およびVD 2重鎖可変ドメインは、配列番号30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54または56からの3つのCDRを独立して含む。別の実施形態において、結合タンパク質は、EGFRとEGFR、RONとRON、IGF-1RとIGF-1R、Erb-B3とErb-B3、EGFRとHER2、EGFRとIGF-1R、EGFRとErb-B3、EGFRとRON；RONとHER2；RONとErb-B3；RONとIGF-1R；IGF-1RとErb-B3；IGF-1RとHER2；またはHER2とErb-B3を結合させることができる。一実施形態において、VD 1およびVD 2重鎖可変ドメインは、配列番号30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54または56を独立して含む。

【0015】

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、同じ細胞上に発現した同じ受容体または2つの異なる受容体の2つの異なる（例えば、重複しない）エピトープに結合するポリペプチド鎖を含み、ポリペプチド鎖は、VD 1-(X 1)n-VD 2-C-(X 2)nを含み、VD 1は第一の軽鎖可変ドメインであり、VD 2は第二の軽鎖可変ドメインであり、Cは軽鎖定常ドメインであり、X 1はリンカーであり、X 2はFc領域を含まない。一実施形態において、X 1はリンカーであり、但し、CLではない。一実施形態において、VD 1およびVD 2軽鎖可変ドメインは、配列番号31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55または57からの3つのCDRを独立して含む。別の実施形態において、結合タンパク質は、EGFRとEGFR、RONとRON、IGF-1RとIGF-1R、Erb-B3とErb-B3、EGFRとHER2、EGFRとIGF-1R、EGFRとErb-B3、EGFRとRON；RONとHER2；RONとErb-B3；RONとIGF-1R；IGF-1RとErb-B3；IGF-1RとHER2；またはHER2とErb-B3を結合させることができる。一実施形態において、VD 1およびVD 2軽鎖可変ドメインは、配列番号31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55または57を独立して含む。

【0016】

別の実施形態において、同じ細胞上に発現した同じ受容体または2つの異なる受容体の2つの異なる（例えば、重複しない）エピトープに結合し、2つのポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であって、第一のポリペプチド鎖はVD 1-(X 1)n-VD 2-C-(X 2)n（VD 1は第一の重鎖可変ドメインであり、VD 2は第二の重鎖可変ドメインであり、Cは重鎖定常ドメインであり、X 1は第一のリンカーであり、X 2はFc領域である。）を含み、前記第二のポリペプチド鎖はVD 1-(X 1)n-VD 2-C-(X 2)n（VD 1は第一の軽鎖可変ドメインであり、VD 2は第二の軽鎖可変ドメインであり、

10

20

30

40

50

Cは軽鎖定常ドメインであり、X1は第二のリンカーであり、X2はFc領域を含まない。)を含む、結合タンパク質が提供される。いくつかの実施形態において、第一および第二のX1は同じである。他の実施形態において、第一および第二のX1は異なっている。いくつかの実施形態において、第一のX1はCH1ドメインではなく、および／または第二のX1はCLドメインではない。一実施形態において、第一のX1および第二のX1は短い(例えば、6アミノ酸)リンカーである。別の実施形態において、第一のX1および第二のX1は長い(例えば、6を超えるアミノ酸)リンカーである。別の実施形態において、第一のX1は短いリンカーであり、第二のX1は長いリンカーである。別の実施形態において、第一のX1は長いリンカーであり、第二のX1は短いリンカーである。一実施形態において、VD1およびVD2重鎖可変ドメインは、配列番号30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54または56からの3つのCDRを独立して含み、VD1およびVD2軽鎖可変ドメインは、配列番号31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55または57からの3つのCDRを独立して含む。別の実施形態において、結合タンパク質は、EGFRとEGFR、RONとRON、IGF-1RとIGF-1R、Erb-B3とErb-B3、EGFRとHER2、EGFRとIGF-1R、EGFRとErb-B3、EGFRとRON; RONとHER2; RONとErb-B3; RONとIGF-1R; IGF-1RとErb-B3; IGF-1RとHER2; またはHER2とErb-B3を結合させることができる。一実施形態において、VD1およびVD2重鎖可変ドメインは、配列番号30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54または56を独立して含み、VD1およびVD2軽鎖可変ドメインは、配列番号31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55または57を独立して含む。

【0017】

一実施形態において、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のそれぞれは、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は第一のリンカーであり、X2はFc領域であり、第二の2つのポリペプチド鎖のそれぞれは、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は第二のリンカーであり、X2はFc領域を含まない。このようなDVD結合タンパク質は、4つの抗原結合部位を有している。いくつかの実施形態において、第一および第二のX1は同じである。他の実施形態において、第一および第二のX1は異なる。いくつかの実施形態において、第一のX1は、CH1ドメインでないおよび／または第二のX1はCLドメインでない。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、同じ細胞上に発現した同じ受容体または2つの異なる受容体の2つの異なる(例えば、重複しない)エピトープに結合することができる。したがって、いくつかの実施形態において、結合タンパク質は、任意の配向で、同じ細胞に発現した同じ受容体または2つの異なる受容体の2つの異なる(例えば、重複しない)エピトープに結合することができる少なくとも2つの可変ドメイン配列(例えば、VD1およびVD2)を含む。いくつかの実施形態において、VD1およびVD2は、独立して選択される。したがって、いくつかの実施形態において、VD1およびVD2は、同一の配列番号を含み、他の実施形態において、VD1およびVD2は、異なる配列番号を含む。一実施形態において、VD1およびVD2重鎖可変ドメインは、配列番号30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54または56からの3つのCDRを独立して含み、VD1およびVD2軽鎖可変ドメインは、配列番号31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55または57からの3つのCDRを独立して含む。別の実施形態において、結合タンパク質は、EGFRとEGFR、RONとRON、IGF-1RとIGF-1R、Erb-B3とErb-B3、EGFRとHER2、EGFRとIGF-1R、EGFR

と E r b - B 3、E G F R と R O N；R O N と H E R 2；R O N と E r b - B 3；R O N と I G F - 1 R；I G F - 1 R と E r b - B 3；I G F - 1 R と H E R 2；または H E R 2 と E r b - B 3 を結合させることができる。一実施形態において、V D 1 および V D 2 重鎖可変ドメインは、配列番号 30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54 または 56 を独立して含み、V D 1 および V D 2 軽鎖可変ドメインは、配列番号 31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55 または 57 を独立して含む。

【0018】

別の実施形態において、結合タンパク質は、表 1 に示される重鎖および軽鎖配列を含む。

10

【0019】

重鎖、軽鎖、二本鎖または四本鎖の実施形態のいずれかのさらなる実施形態は、A K T T P K L E E G E F S E A R（配列番号 1）；A K T T P K L E E G E F S E A R V（配列番号 2）；A K T T P K L G G（配列番号 3）；S A K T T P K L G G（配列番号 4）；S A K T T P（配列番号 5）；R A D A A P（配列番号 6）；R A D A A P T V S（配列番号 7）；R A D A A A A G G P G S（配列番号 8）；R A D A A A A（G₄S）₄（配列番号 9）；S A K T T P K L E E G E F S E A R V（配列番号 10）；A D A A P（配列番号 11）；A D A A P T V S I F P P（配列番号 12）；T V A A P（配列番号 13）；T V A A P S V F I F P P（配列番号 14）；Q P K A A P（配列番号 15）；Q P K A A P S V T L F P P（配列番号 16）；A K T T P P（配列番号 17）；A K T T P P S V T P L A P（配列番号 18）；A K T T A P（配列番号 19）；A K T T A P S V Y P L A P（配列番号 20）；A S T K G P（配列番号 21）；A S T K G P S V F P L A P（配列番号 22）；G G G G S G G G G S G G G G S（配列番号 23）；G E N K V E Y A P A L M A L S（配列番号 24）；G P A K E L T P L K E A K V S（配列番号 25）；または G H E A A A V M Q V Q Y P A S（配列番号 26）；T V A A P S V F I F P P T V A A P S V F I F P P（配列番号 27）；A S T K G P S V F P L A P A S T K G P S V F P L A P（配列番号 28）；または G / S に基づく配列（例えば、G₄S と G₄S リピート；配列番号 29）を含む少なくとも 1 つの X₁ リンカーを含む。一実施形態において、X₂ は F c 領域である。別の実施形態において、X₂ は可変 F c 領域である。

20

30

【0020】

さらに別の実施形態において、F c 領域は、第一のポリペプチド中に存在する場合、天然配列 F c 領域またはバリエーション配列 F c 領域である。さらに別の実施形態において、F c 領域は、I g G 1 の F c 領域、I g G 2 の F c 領域、I g G 3 の F c 領域、I g G 4 の F c 領域、I g A の F c 領域、I g M の F c 領域、I g E の F c 領域または I g D の F c 領域である。

【0021】

同じ細胞上に発現した同じ受容体または 2 つの異なる受容体の 2 つの異なる（例えば、重複しない）エピトープに結合する結合タンパク質を作製する方法が提供される。一実施形態において、同じ細胞上に発現した同じ受容体または 2 つの異なる受容体の 2 つの異なる（例えば、重複しない）エピトープに結合する結合タンパク質を作製する方法は、第一のエピトープまたは受容体に結合する第一の親抗体またはその抗原結合部分を得る工程；b）第二のエピトープまたは受容体に結合する第二の親抗体またはその抗原結合部分を得る工程；c）本明細書に記載されている結合タンパク質のいずれかをコードする構築物（単数または複数）を調製する工程；および d）ポリペプチド鎖を発現させ、第一および第二のエピトープまたは受容体に結合する結合タンパク質を生じさせる工程を含む。

40

【0022】

本明細書における実施形態のいずれかにおいて、存在する場合、V D 1 重鎖可変ドメイン、および存在する場合、軽鎖可変ドメインは、第一の親抗体またはその抗原結合部分由来であってもよく；存在する場合、V D 2 重鎖可変ドメイン、および存在する場合、軽鎖

50

可変ドメインは、第二の親抗体またはその抗原結合部分由来であってもよい。第一および第二の親抗体は同じであってもよくまたは異なってもよい。

【0023】

一実施形態において、第一の親抗体またはその抗原結合部分は第一の抗原に結合し、第二の親抗体またはその抗原結合部分は第二の抗原に結合する。一実施形態において、第一および第二の抗原は同じ抗原である。別の実施形態において、親抗体は同じ抗原上の異なるエピトープに結合する。別の実施形態において、第一および第二の抗原は異なる抗原である。別の実施形態において、第一および第二の抗原は、同じ細胞上に発現した2つの異なる受容体由来である。別の実施形態において、第一の親抗体またはその抗原結合部分は、第二の親抗体またはその抗原結合部分が第二の抗原に結合する効力と異なる効力で第一の抗原に結合する。さらに別の実施形態において、第一の親抗体またはその抗原結合部分は、第二の親抗体またはその抗原結合部分が第二の抗原に結合する親和性と異なる親和性で第一の抗原に結合する。

【0024】

別の実施形態において、第一の親抗体またはその抗原結合部分および第二の親抗体またはその抗原結合部分は、ヒト抗体、CDR移植された抗体、ヒト化抗体および／または親和性成熟された抗体である。

【0025】

別の実施形態において、結合タンパク質は、第一の親抗体もしくはその抗原結合部分または第二の親抗体も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つの所望の特性を有する。あるいは、第一の親抗体もしくはその抗原結合部分または第二の親抗体もしくはその抗原結合部分は、結合タンパク質によって示される少なくとも1つの所望の特性を有する。一実施形態において、所望の特性は、1つ以上の抗体パラメーターである。別の実施形態において、抗体パラメーターは、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、可溶性、生産効率、免疫原性、薬物動態、生物学的利用率、組織交差反応性またはオルソログ抗原結合性である。一実施形態において、結合タンパク質は多価である。別の実施形態において、結合タンパク質は多重特異的である。本明細書に記載されている多価および／または多重特異的結合タンパク質は、特に治療的見地から望ましい特性を有する。例えば、多価および／または多重特異的結合タンパク質は、(1)抗体が結合する抗原を発現している細胞によって、二価抗体より速く内部に取り込まれる(および／または異化される)；(2)タンパク質に結合するアゴニストであり；および／または(3)多価結合タンパク質が結合することができる抗原を発現している細胞の細胞死および／またはアポトーシスを誘導し得る。多価および／または多重特異的結合タンパク質の少なくとも1つの抗原結合特異性を提供する「親抗体」は、抗体が結合する抗原を発現している細胞によって内部に取り込まれ(および／または異化される)抗体であり得、および／またはアゴニスト、細胞死誘導および／またはアポトーシス誘導抗体であり得、本明細書に記載されている多価および／または多重特異的結合タンパク質は、これらの特性の1つ以上の改善を示し得る。さらに、親抗体は、これらの特性の任意の1つ以上を欠損してもよいが、本明細書に記載されるように、多価結合タンパク質として構築された場合、これらの1つ以上を取得してもよい。

【0026】

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、少なくとも約 $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ；少なくとも約 $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ；少なくとも約 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ；少なくとも約 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ；または少なくとも約 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ のうちの1つ以上の標的への結合速度定数(K_{on})を有する。一実施形態において、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、約 $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から約 $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、約 $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から約 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、約 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から約 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、または約 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から約 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の、1つ以上の標的に対する結合速度定数(K_{on})を有する。

【0027】

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} ; または最大約 10^{-6} s^{-1} のうちの1つ以上の標的への解離速度定数 (K_{off}) を有する。一実施形態において、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、約 10^{-3} s^{-1} から約 10^{-4} s^{-1} の、約 10^{-4} s^{-1} から約 10^{-5} s^{-1} の、または約 10^{-5} s^{-1} から約 10^{-6} s^{-1} の間の、1つ以上の標的に対する解離速度定数 (K_{off}) を有する。

【0028】

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 または最大約 10^{-13} M のうちの1つ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、結合タンパク質は、約 10^{-7} M から約 10^{-8} M の ; 約 10^{-8} M から約 10^{-9} M の ; 約 10^{-9} M から約 10^{-10} M の ; 約 10^{-10} M から約 10^{-11} M の ; 約 10^{-11} M から約 10^{-12} M の ; または約 10^{-12} M から約 10^{-13} M のその標的に対する解離定数 (K_d) を有する。

【0029】

別の実施形態において、結合タンパク質は、薬剤をさらに含むコンジュゲートである。一実施形態において、抗原は、免疫接着分子、造影剤、治療剤または細胞毒性剤である。一実施形態において、造影剤は、放射性標識、酵素、蛍光標識、発光標識、生物発光標識、磁気標識またはビオチンである。別の実施形態において、放射性標識は、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho または ^{153}Sm である。さらに別の実施形態において、治療剤または細胞毒性剤は、代謝抑制剤、アルキル化剤、抗生物質、成長因子、サイトカイン、抗血管新生剤、抗有糸分裂剤、アントラサイクリン、トキシシンまたはアポトーシス剤である。

【0030】

別の実施形態において、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、この結晶は、無担体医薬徐放結晶である。別の実施形態において、結晶化された結合タンパク質は、この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。

【0031】

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る。例えば、グリコシル化パターンは、ヒトグリコシル化パターンである。

【0032】

本明細書に開示されている結合タンパク質のいずれか1つをコードする単離された核酸も提供される。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、ベクターは、p cDNA ; p TT (Durocher et al. (2002) Nucleic Acids Res. 30 (2) ; p TT3 (追加の多重クロニング部位を有する p TT) ; p EF BOS (Mizushima and Nagata, (1990年) Nucleic Acids Res. 18 : (17) ; p BV ; p JV ; p cDNA 3.1 TOPO ; p EF6 TOPO ; p BOS ; p HybE ; または p BJ である。一実施形態において、ベクターは、米国特許公開第 20090239259 号に開示されているベクターである。

【0033】

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、例えば、E. コリ (E. coli) である。別の実施形態において、宿主細胞は真核細胞、例えば、原生生物細胞、動物細胞、植物細胞または真菌細胞である。一実施形態において、宿主細胞は、これらに限定されないが、CHO、COS ; NS0、SP2、PER.C6 を含む哺乳動物細胞 ; またはサッカロミセス・セレビシアエ (Saccharomyces cerevisiae) などの真菌細胞

10

20

30

40

50

胞；またはSf9などの昆虫細胞である。一実施形態において、異なる特異性を有する2つまたはそれ以上の結合タンパク質は、単一の組換え宿主細胞中で生産される。例えば、抗体の混合物の発現は、Oligoclomics（商標）（Merus B. V., The Netherlands）米国特許第7, 262, 028号および第7, 429, 486号と呼ばれている。

【0034】

結合タンパク質を生産するのに十分な条件下で、本明細書に開示されている宿主細胞のいずれか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が提供される。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。別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。別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。

【0035】

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、この組成物は、結晶化された結合タンパク質、成分、および少なくとも1つのポリマー性担体を含む。一実施形態において、ポリマー担体は、ポリ（アクリル酸）、ポリ（シアノアクリレート）、ポリ（アミノ酸）、ポリ（無水物）、ポリ（デブシペプチド）、ポリ（エステル）、ポリ（乳酸）、ポリ（乳酸-α-グリコール酸）またはPLGA、ポリ（b-ヒドロキシブチレート）、ポリ（カプロラクトン）、ポリ（ジオキサノン）；ポリ（エチレングリコール）、ポリ（（ヒドロキシプロピル）メタクリルアミド、ポリ〔（オルガノ）ホスファゼン〕、ポリ（オルトエステル）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリ（ビニルピロリドン）、無水マレイン酸-アルキルビニルエーテル共重合体、プルロニックポリオール、アルブミン、アルギナート、セルロースおよびセルロース誘導体、コラーゲン、フィブリン、ゼラチン、ヒアルロン酸、オリゴ糖、グリカミノグリカン、硫酸化多糖またはこれらの混和物および共重合体である。一実施形態において、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またはポリエチレングリコールである。

【0036】

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。

【0037】

本明細書に開示された結合タンパク質および医薬として許容される担体を含む医薬組成物が提供される。さらなる実施形態において、この医薬組成物は、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、化学治療剤、造影剤、細胞毒性剤、血管新生阻害剤（抗VEGF抗体または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および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、CTL4-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セレクトリン抗体、小分子阻害剤が含まれるが、これらに限定されない。）、抗サイトカイン抗体またはその機能的断片（抗IL-18、抗TNFおよび抗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；検出可能な標識またはレポーター、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、エピネフリンまたは類似体、サイトカインまたはサイトカインアンタゴニストであり得る。

【0038】

本明細書に開示されている結合部分によって結合され得る標的または複数の標的が有害である障害に罹患しているヒト対象を診断および／または治療する方法であって、標的または複数の標的の活性が、ヒト対象において阻害され、1以上の症状が緩和されまたは治療が達成されるように、本明細書に開示されている結合タンパク質をヒト対象に投与することを含む方法が提供される。本明細書において提供される結合タンパク質は、乳房、結腸、直腸、肺、中咽頭、下咽頭、食道、胃、膵臓、肝臓、胆嚢および胆管、小腸、尿路（腎臓、膀胱および尿路上皮を含む。）、女性生殖路（子宮頸部、子宮および卵巣ならびに絨毛癌および妊娠性絨毛性疾患を含む。）、男性生殖路（前立腺、精嚢、精巣および生殖細胞腫瘍を含む。）、内分泌腺（甲状腺、副腎および下垂体を含む。）および皮膚の癌腫ならびに血管腫、悪性黒色腫、肉腫（骨および軟部組織から生じるものならびにカボジ肉腫を含む。）、脳、神経、眼および髄膜の腫瘍（星状膠細胞腫、神経膠腫、神経膠芽細胞腫、網膜芽細胞腫、神経腫、神経芽細胞腫、シュワン細胞腫および髄膜腫を含む。）、白血病などの造血性悪性病変から生じる固形腫瘍およびリンパ腫（ホジキンリンパ腫と非ホジキンリンパ腫の両方）を含む原発性および転移性の癌に罹患しているヒトを診断および／または治療するために使用することができる。

10

【0039】

別の実施形態において、治療されるべき障害または状態は、例えば、HIV、ヒトライノウイルス、エンテロウイルス、コロナウイルス、ヘルペスウイルス、インフルエンザウイルス、パラインフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルスまたはアデノウイルスによって引き起こされる、ヒトにおけるウイルス感染によって生じる症状を含む。

20

【0040】

本明細書において提供される結合タンパク質は、神経障害を治療するために用いることができる。一実施形態において、本明細書において提供される結合タンパク質またはその抗原結合部分は、神経再生および脊髄損傷を含む神経変性疾患および状態を治療するために用いられる。

【0041】

別の実施形態は、疾患または障害の治療における結合タンパク質の使用を提供し、前記疾患または障害は、関節リウマチ、変形性関節症、若年性慢性関節炎、敗血症性関節炎、ライム関節炎、乾癬性関節炎、反応性関節炎、脊椎関節症、全身性紅斑性狼瘡、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、インシュリン依存性糖尿病、甲状腺炎、喘息、アレルギー性疾患、乾癬、皮膚炎、強皮症、移植片対宿主病、臓器移植拒絶、臓器移植に関連する急性または慢性免疫疾患、サルコイドーシス、アテローム性動脈硬化症、播種性血管内凝固、川崎病、バセドウ病、ネフローゼ症候群、慢性疲労症候群、ウェゲナー肉芽腫症、ヘノッホ・シェーライン紫斑症、腎臓の顕微鏡的血管炎、慢性活動性肝炎、ブドウ膜炎、敗血症性ショック、毒素性ショック症候群、敗血症症候群、悪液質、感染性疾患、寄生性疾患、後天性免疫不全症候群、急性横断性脊髄炎、ハンチントン舞踏病、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型および多内分泌腺機能低下症候群Ⅱ型、シュミット症候群、成人（急性）呼吸促迫症候群、脱毛症、円形脱毛症、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、エルシニアおよびサルモネラ関連関節炎、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、線維性肺疾患、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

30

40

50

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、線維症、放射性線維症、閉塞性細気管支炎、慢性好酸球性肺炎、リンパ球浸潤性肺疾患、感染後間質性肺疾患、通風関節炎、自己免疫性肝炎、1型自己免疫性肝炎 (古典的自己免疫性またはルポイド肝炎)、2型自己免疫性肝炎 (抗LKM抗体肝炎)、自己免疫媒介性低血糖症、黒色表皮腫を伴うB型インシュリン抵抗性、副甲状腺機能低下症、臓器移植に関連する急性免疫疾患、臓器移植に関連する慢性免疫疾患、変形性関節症、原発性硬化性胆管炎、1型乾癬、2型乾癬、特発性白血球減少症、自己免疫性好中球減少症、腎臓病NOS、糸球体腎炎、腎臓の顕微鏡的血管炎、ライム病、円板状紅斑性狼瘡、男性不妊症特発性またはNOS、精子自己免疫、多発性硬化症 (すべてのサブタイプ)、交感性眼炎、結合組織疾患に続発する肺高血圧症、グッドパスチャー症候群、結節性多発動脈炎の肺症状、急性リウマチ熱、リウマチ性脊椎炎、スチル病、全身性硬化症、シェーグレン症候群、高安病/動脈炎、自己免疫性血小板減少症、特発性血小板減少症、自己免疫性甲状腺疾患、甲状腺機能亢進症、甲状腺腫自己免疫性甲状腺機能低下症 (橋本病)、萎縮性自己免疫性甲状腺機能低下症、原発性粘液水腫 (primary myxoedema)、水晶体起因性ブドウ膜炎、原発性血管炎、白斑急性肝疾患、慢性肝疾患、アルコール性肝硬変、アルコール誘発性肝障害、胆汁うっ滞 (choleostasis)、特異体質性肝疾患、薬物誘発性肝炎、非アルコール性脂肪性肝炎、アレルギーおよび喘息、B群連鎖球菌 (GBS) 感染、精神障害、うつ病、統合失調症、Th2型およびTh1型によって媒介される疾病、急性および慢性疼痛、疼痛の様々な形態、癌、肺癌、乳癌、胃癌、膀胱癌、大腸癌、膵臓癌、卵巣癌、前立腺癌、直腸癌、造血性悪性病変、白血病、リンパ腫、無βリポタンパク質血症、先端チアノーゼ、急性および慢性寄生性または感染性プロセス、急性白血病、急性リンパ芽球性白血病 (ALL)、急性骨髄性白血病 (AML)、急性または慢性細菌感染、急性膵炎、急性腎不全、腺癌、心房 (aerial) 異所性拍動、AIDS認知症複合、アルコール誘発性肝炎、アレルギー性結膜炎、アレルギー性接触性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、同種移植拒絶、α-1-アンチトリプシン欠乏症、筋萎縮性側索硬化症、貧血、狭心症、前角細胞変性、抗cd3治療、抗リン脂質症候群、抗受容体過敏症反応 (anti-receptor hypersensitivity reactions)、大動脈 (aortic) および動脈瘤、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 (持続的または発作性)、心房粗動、房室ブロック、B細胞リンパ腫、骨移植拒絶、骨髄移植 (BMT) 拒絶、脚ブロック、パーキットリンパ腫、火傷、心不整脈、心機能不全症候群 (cardiac stuns syndrome)、心臓腫瘍、心筋症、心肺バイパス炎症反応、軟骨移植拒絶、小脳皮質変性、小脳疾患、無秩序なまたは多巣性心房頻脈、化学療法関連疾患、慢性骨髄性白血病 (CML)、慢性アルコール症、慢性炎症性病変、慢性リンパ性白血病 (CLL)、慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、慢性サリチル酸中毒、結腸直腸癌、うっ血性心不全、結膜炎、接触性皮膚炎、肺性心、冠動脈疾患、クロイツフェルトーヤコブ病、培養陰性敗血症、嚢胞性線維症、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、垂体外路および小脳疾患、家族性血球貪食性リンパ組織球症 (familial hematophagocytic lymphohistiocytosis)、致命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、いずれかの臓器または組織の移植片拒絶、グラム陰性敗血症、グラム陽性敗血症、細胞内生物に起因する肉芽腫、有毛細胞白血病、ハラーホルデン・スパッツ病、橋本甲状腺炎、枯草熱、心臓移植拒絶、血色素症、血液透析、溶血性尿毒症症候群/血栓溶解血小板減少紫斑病、出血、肝炎 (A型)、ヒス束不整脈、HIV感染/HIV神経障害、ホジキン病、運動過剰疾患、過敏症反応、過敏性肺炎、高血圧、運動低下疾患

10

20

30

40

50

、視床下部一下垂体一副腎皮質系評価、特発性アジソン病、特発性肺線維症、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 (lip edema)、肝臓移植拒絶、リンパ浮腫 (lymph edema)、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 (meningococciemia)、代謝性／特発性、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・マース・シャイードレーガーおよびマシャド・ジョセフ)、マイコバクテリウム・アビウム・イントラセルラレ、マイコバクテリウム・チューバキュロシス、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、腹部大動脈およびその分枝の閉塞、閉塞性動脈疾患、okt3療法、精巣炎／精巣上体炎、精巣炎／精管復元術処置、臓器肥大、骨粗鬆症、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グロブリン血症および皮膚変化症候群 (skin changes syndrome))、灌流後症候群 (post perfusion syndrome)、ポンプ後症候群 (post pump syndrome)、心筋梗塞後開心術症候群、子癇前症、進行性核上性麻痺、原発性肺高血圧、放射線療法、レイノー現象および病、レイノー病、レフサム病、規則的なQRS幅の狭い頻脈症 (regular narrow QRS tachycardia)、腎血管性高血圧、再灌流障害、拘束型心筋症、肉腫、強皮症、老年性舞蹈病、レビー小体型の老年性認知症、血清反応陰性関節炎、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 arrhythmias)、脊髄性運動失調、脊髄小脳変性、連鎖球菌性筋炎、小脳の構造的病変、亜急性硬化性全脳炎、失神、心血管系の梅毒、全身性アナフィラキシー、全身性炎症反応症候群、全身性発症若年性関節リウマチ、T細胞またはFABALL、毛細血管拡張症、閉塞性血栓血管炎、血小板減少症、毒性、移植、外傷／出血、III型過敏症反応、IV型過敏症、不安定狭心症、尿毒症、尿路性敗血症、心臓弁膜症、静脈瘤、血管炎、静脈疾患、静脈血栓症、心室細動、ウイルスおよび真菌感染、ウイルス性脳炎 (vitalencephalitis)／無菌性髄膜炎、ウイルス関連血球貪食症候群、ウェルニッケーコルサコフ症候群、ウィルソン病、いずれかの臓器または組織の異種移植拒絶、急性冠症候群、急性特発性多発性神経炎、急性炎症性脱髄性多発神経根神経障害、急性虚血、成人スチル病、アナフィラキシー、抗リン脂質抗体症候群、再生不良性貧血、アトピー性湿疹、アトピー性皮膚炎、自己免疫性皮膚炎、連鎖球菌感染に伴う自己免疫異常、自己免疫性腸症、自己免疫性難聴、自己免疫性リンパ増殖症候群 (ALPS)、自己免疫性心筋炎、自己免疫性早期卵巣不全、眼瞼炎、気管支拡張症、水疱性類天疱瘡、心血管疾患、劇症型抗リン脂質症候群、セリアック病、頸部脊椎症、慢性虚血、瘢痕性類天疱瘡、多発性硬化症のリスクを有する臨床的孤発症候群 (cिस)、小児発症精神障害、涙囊炎、皮膚筋炎、糖尿病性網膜症、椎間板ヘルニア、椎間板脱出、薬物誘発免疫性溶血性貧血、子宮内膜症、眼内炎、上強膜炎、多形性紅斑、重症型多形性紅斑、妊娠性類天疱瘡、ギラン・バレー症候群 (GBS)、ヒューズ症候群、特発性パーキンソン病、特発性間質性肺炎、IgE媒介性アレルギー、免疫性溶血性貧血、封入体筋炎、感染性眼炎症疾患、炎症性脱髄疾患、炎症性心疾患、炎症性腎疾患、IPF／UIP、虹彩炎、角膜炎、乾性角結膜炎 (keratoconjunctivitis sicca)、クスマウル病またはクスマウルマイヤー病、ランドリー麻痺、ランゲルハンス細胞性組織球症、網状皮斑、黄斑変性、顕微鏡的多発性血管炎、モルブス・ベヒテレフ (morbus bechterev)、運動ニュー

ロン疾患、粘膜性類天疱瘡、多臓器不全、重症筋無力症、骨髄異形成症候群、心筋炎、神経根障害、神経障害、非A非B型肝炎、視神経炎、骨溶解、小関節性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（または結節性動脈周囲炎）、多発性軟骨炎、白毛症、多関節性JRA、多

内分泌欠損症候群、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ニズム、前立腺炎、赤芽球癆、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、アクネ、膿疱症、骨過形成および骨髄炎）、続発性アミロイドーシス、ショック肺、強膜炎、坐骨神経痛、坐骨神経痛、シリコン関連結合組織病、スネドナーウィルキンソン皮膚症、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、トキソプラズマ性網膜炎、中毒性表皮剥離症、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、春季結膜炎、ウイルス性網膜炎、フォークト・小柳・原田症候群（VKH症候群）、滲出型黄斑変性、もしくは創傷治癒である。

【0042】

一実施形態において、結合タンパク質またはその抗原結合部分は、単独でまたは放射線療剤および／または化学療法剤と組み合わせて用いる場合、癌を治療するために使用されまたは本明細書に記載されている腫瘍からの転移の予防もしくは阻害において使用される。

【0043】

一実施形態において、本明細書において提供される結合タンパク質と組み合わせることができる化学療法剤は、以下：13-cis-レチノイン酸；2-CdA；2-クロロデオキシアデノシン；5-アザシチジン；5-フルオロウラシル；5-FU；6-メルカプトプリン；6-MP；6-TG；6-チオグアニン；アブラキサン；Accutane（登録商標）；アクチノマイシン-D；Adriamycin（登録商標）；Adrucil（登録商標）；Afinitor（登録商標）；Agylin（登録商標）；Ala-Cort（登録商標）；アルデスロイキン；アレムツズマブ；ALIMTA；アリトレチノイン；Alkaban-AQ（登録商標）；Alkeran（登録商標）；オールトランスレチノイン酸；アルファインターフェロン；アルトレタミン；アメトプテリン；アミホスチン；アミノグルテチミド；アナグレリド；Anandron（登録商標）；アナストロゾール；アラビノシルシトシン；Ara-C Aranesp（登録商標）；Aredia（登録商標）；Arimidex（登録商標）；Aromasin（登録商標）；Arranon（登録商標）；三酸化ヒ素；Arzerra（商標）；アスパラギナーゼ；ATRA；Avastin（登録商標）；アザシチジン；BCG；BCNU；ベンダムスチン；ベバシズマブ；ベキサロテン；BEXXAR（登録商標）；ビカルタミド；BiCNU；Blenoxane（登録商標）；ブレオマイシン；ボルテゾミブ；ブスルファン；Busulfex（登録商標）；C225；カルシウムロイコボリン；Campath（登録商標）；Camptosar（登録商標）；カンプトセシン-11；カペシタビン；Carac（商標）；カルボプラチン；カルムスチン；カルムスチンウエハー；Casodex（登録商標）；CC-5013；CCI-779；CCNU；CDDP；CeeNU；セルビジン；セツキシマブ；クロラムブシル；シスプラチン；シトロバラム因子；クラドリビン；コルチゾン；Cosmegen（登録商標）；CPT-11；シクロフォスファミド；Cytadren（登録商標）；シタラビン；シタラビンリボゾーマル；Cytosar-U（登録商標）；Cytosan（登録商標）；ダカルバジン；ダコゲン；ダクチノマイシン；ダルベポエチンアルファ；ダサチニブ；ダウノマイシン；ダウノルビシン；塩酸ダウノルビシン；ダウノルビシンリボゾーマル；DaunoXome（登録商標）；デカドロン；デシタビン；Delta-Cortef（登録商標）；Deltasone（登録商標）；デニロイキン；ジフチトクス；DepoCyt（商標）；デキサメタゾン；酢酸デキサメタゾン；リン酸デキサメタゾンナトリウム；デキサゾン；デクスラゾキサン；DHAD；DIC；ジオデックス；ドセタキセル；Doxil（登録商

10

20

30

40

50

標) ; ドキソルビシン ; ドキソルビシンリポゾーマル ; Droxia (商標) ; DTIC
 ; DTIC-Dome (登録商標) ; Duralone (登録商標) ; Efudex (登
 録商標) ; Eligard (商標) ; Ellence (商標) ; Eloxatin (商標
) ; Elspar (登録商標) ; Emcyt (登録商標) ; エピルビシン ; エポエチンア
 ルファ ; エルビタックス ; エルロチニブ ; エルウィニア L-アスパラギナーゼ ; エスト
 ラムスチン ; エチオール ; Etopophos (登録商標) ; エトポシド ; リン酸エトポ
 シド ; Eulexine (登録商標) ; エベロリムス ; Evista (登録商標) ; エキ
 セメスタン ; Fareston (登録商標) ; Faslodex (登録商標) ; Fema
 ra (登録商標) ; フィルグラスチム ; フロクスウリジン ; Fludara (登録商標)
 ; フルダラビン ; Fluoroplex (登録商標) ; フルオロウラシル ; フルオロウラ 10
 シル (クリーム) ; フルオキシムエステロン ; フルタミド ; フォリン酸 ; FUDR (登録
 商標) ; フルベストラント ; ゲフィチニブ ; ゲムシタビン ; ゲムツズマブオゾガマイシン
 ; ジェムザール ; Gleevec (商標) ; Gliadel (登録商標) ウエハー ; GM
 -CSF ; ゴセレリン ; 顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) ; 顆粒球マクロファージ
 コロニー刺激因子 (G-MCSF) ; Halotestin (登録商標) ; Hercep
 tin (登録商標) ; ヘキサドロール ; Hexalen (登録商標) ; ヘキサメチルメラ
 ミン ; HMM ; Hycamtin (登録商標) ; Hydrea (登録商標) ; Hydro
 cort Acetate (登録商標) ; ヒドロコルチゾン ; リン酸ヒドロコルチゾンナ
 トリウム ; コハク酸ヒドロコルチゾンナトリウム ; リン酸ハイドロコートン ; ヒドロキシ
 尿素 ; イブリツモマブ ; イブリツモマブチウキセタン ; Idamycin (登録商標) ; 20
 Idarubicin ifex (登録商標) ; インターフェロン-アルファ ; インター
 フェロン-アルファ-2b (PEGコンジュゲート) ; イホスファミド ; インターロイキ
 ン-11 (IL-11) ; インターロイキン-2 (IL-2) ; メシル酸イマチニブ ; イ
 ミダゾールカルボキサミド ; Intron A (登録商標) ; Iressa (登録商標)
 ; イリノテカン ; イソトレチノイン ; イキサベピロン ; Ixempra (商標) ; キドロ
 ラーゼ (t) ; Lanacort (登録商標) ; ラパチニブ ; L-アスパラギナーゼ ; L
 CR ; レナリドミド ; レトロゾール ; ロイコボリン ; リューケラン ; Leukin (商標
) ; ロイプロリド ; ロイコクリスチン ; Leustatin (商標) ; リポゾーマルAr
 a-C ; Liquid Pred (登録商標) ; ロムスチン ; L-PAM ; L-サルコリ
 ジン ; Lupron (登録商標) ; Lupron Depot (登録商標) ; Matul 30
 ane (登録商標) ; マキシデックス ; メクロレタミン ; 塩酸メクロレタミン ; Medr
 alone (登録商標) ; Medrol (登録商標) ; Megace (登録商標) ; メゲ
 ストロール ; 酢酸メゲストロール ; メルファラン ; メルカプトプリン ; メスナ ; Mesn
 ex (商標) ; メトトレキサート ; メトトレキサートナトリウム ; メチルプレドニゾロン
 ; Meticorten (登録商標) ; マイトマイシン ; マイトマイシン-C ; ミトキサ
 ントロン ; M-Prednisol (登録商標) ; MTC ; MTX ; Mustargen
 (登録商標) ; ムスチン ; Mutamycin (登録商標) ; Myleran (登録商標
) ; Mylocel (商標) ; Mylotarg (登録商標) ; Navelbine (登
 録商標) ; ネララビン ; Neosar (登録商標) ; Neulasta (商標) ; Neu
 mega (登録商標) ; Neupogen (登録商標) ; Nexavar (登録商標) ; 40
 Nilandron (登録商標) ; ニルタミド ; Nipent (登録商標) ; Nitro
 gen Mustard Novaldex (登録商標) ; Novantrone (登録
 商標) ; エヌプレート ; オクトレオチド ; 酢酸オクトレオチド ; オフタツムマブ ; Onc
 ospar (登録商標) ; Oncovin (登録商標) ; Ontak (登録商標) ; On
 xal (商標) ; オブレルベキン ; Orapred (登録商標) ; Orasone (登録
 商標) ; オキサリプラチン ; パクリタキセル ; タンパク質に結合したパクリタキセル ; パ
 ミドロネート ; パニツムマブ ; Panretin (登録商標) ; Paraplatin (登
 録商標) ; パゾパニブ ; Pediapred (登録商標) ; PEGインターフェロン ;
 ペグアスパラガーゼ ; ペグフィルグラスチム ; PEG-INTRON (商標) ; PEG-
 L-アスパラギナーゼ ; PEMETREXED ; ペントスタチン ; フェニルアラニンマス 50

タード；Platinol（登録商標）；Platinol-AQ（登録商標）；プレドニゾロン；プレドニゾン；Prelone（登録商標）；プロカルバジン；PROCRI
 T（登録商標）；Proleukin（登録商標）；カルムスチンインプラントを伴うP
 rolifeprospan 20；Purinethol（登録商標）；ラロキシフェン；Revlimid（登録商標）；Rheumatrex（登録商標）；Rituxan
 （登録商標）；リツキシマブ；Roferon-A（登録商標）；ロミプロスチン；R
 ubex（登録商標）；塩酸ルビドマイシン；Sandostatatin（登録商標）；S
 andostatatin LAR（登録商標）；サングラモスティム；Solue-Cort
 ef（登録商標）；Solue-Medrol（登録商標）；ソラフェニブ；SPRYCE
 L（商標）；STI-571；ストレプトゾシン；SU11248；スニチニブ；Sut
 ent（登録商標）；Tamoxifen Tarceva（登録商標）；Targre
 tin（登録商標）；Tasigna（登録商標）；Taxol（登録商標）；Taxo
 tere（登録商標）；Temodar（登録商標）；テモゾロマイド；テムシロリムス
 ；テニポシド；TESPA；サリドマイド；Thalomid（登録商標）；Thera
 Cys（登録商標）；チオグアニン；Thioguanine Tabloid（登録商
 標）；チオホスファミド；Thioplex（登録商標）；チオテパ；TICE（登録商
 標）；Toposar（登録商標）；トポテカン；トレミフェン；Torisel（登録
 商標）；トシツモマブ；トラスツズマブ；Treanda（登録商標）；トレチノイン；
 Trexall（商標）；Trisenox（登録商標）；TSPA；VCR；Vect
 ibix（商標）；Velban（登録商標）；Velcade（登録商標）；Vepe
 sid（登録商標）；Vesanoïd（商標）；Viadur（登録商標）；Vida
 za（登録商標）；ビンブラスチン；硫酸ビンブラスチン；Vincasar Pfs（
 登録商標）；ピンクリスチン；ビノレルビン；酒石酸ビノレルビン；VLB；VM-26
 ；ポリノスタット；ヴォトリエント；VP-16；Vumon（登録商標）；Xeloda
 （登録商標）；Zanosar（登録商標）；Zevalin（商標）；Zineca
 rd（登録商標）；Zoladex（登録商標）；ゾレドロン酸；ゾリンザ；またはZome
 meta（登録商標）を含む。

【0044】

別の態様において、本明細書に論述されているような第二の作用物質の投与前、投与と
 同時または投与後に、本明細書に開示されている結合タンパク質のいずれか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が提供される。一実施形態におい
 て、第二の作用物質は、ブデノシド、上皮増殖因子、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-1 β mAb、抗IL-6またはIL-6受容体mAb、増殖因子、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-11、GM-CSF、FGFまたはPDGFの抗体またはアゴニスト、CD2
 、CD3、CD4、CD8、CD-19、CD25、CD28、CD30、CD40、C
 D45、CD69、CD90またはこれらのリガンドに対する抗体、メトトレキサート、
 シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノラート・モフェチル、レフルノ
 ミド、NSAID、イブプロフェン、プレドニゾロン、ホスホジエステラーゼ阻害剤、ア
 デノシンアゴニスト、抗血栓剤、補体阻害剤、アドレナリン作動薬、IRAK、NIK、
 IKK、p38、MAPキナーゼ阻害剤、IL-1 β 変換酵素阻害剤、TNF α 変換酵素
 阻害剤、T細胞シグナル伝達阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、スルファサラジン、
 アザチオプリン、6-メルカプトプリン、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、可溶性サイ
 トカイン受容体、可溶性p55TNF受容体、可溶性p75TNF受容体、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R、抗炎症性サイトカイン、IL-4、IL-10、
 IL-11、IL-13またはTGF β である。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、囊内、軟骨内、腔内（intracavity）、腔内（intracellular）、小脳内、脳室内、結腸内、頸管内、胃内、肝臓内、心筋内、骨内、骨盤内、心臓周囲内、腹腔内、胸膜内、前立腺内、肺内、結腸内、腎臓内、網膜内、脊髄内、滑膜内、胸腔内、子宮内、膀胱内、ボラス、膈、直腸、口内、舌下、鼻内または経皮投与によって、患者に投与される。

【0045】

また、本明細書に開示されている結合タンパク質に対する抗イディオタイプ抗体も提供される。抗イディオタイプ抗体は、本明細書において提供される結合タンパク質に組み込むことができる、限定されないが、重鎖もしくは軽鎖の少なくとも1つの相補性決定領域（CDR）またはそのリガンド結合部分、重鎖または軽鎖可変領域、重鎖または軽鎖定常領域、フレームワーク領域または任意のその一部などの、免疫グロブリン分子の少なくとも一部を含む任意のタンパク質またはペプチド含有分子を含む。

【0046】

試験試料における1以上の抗原もしくはその断片の存在、量または濃度を決定する方法が提供され、1以上の抗原は、EGFR、RON、IGF-1R、ErbB-3および／またはHER2である。この方法は、イムノアッセイによって、抗原またはその断片について試験試料をアッセイすることを含む。イムノアッセイは、（i）少なくとも1つの結合タンパク質および少なくとも1つの検出可能な標識を使用し、（ii）試験試料中の抗原またはその断片の存在、量または濃度の直接的または間接的指標としての検出可能な標識によって生じるシグナルと、対照または校正因子における抗原またはその断片の存在、量または濃度の直接的または間接的指標として生じるシグナルとを比較することを含む。校正因子は、場合によって、一連の校正因子の一部であり、この場合、校正因子のそれぞれは、抗原またはその断片の濃度によって、その一連の校正因子中の他の校正因子と異なっている。本方法は、（i）捕捉剤／抗原またはその断片の複合体を形成するために、試料を、抗原またはその断片上のエピトープに結合する少なくとも1つの捕捉剤と接触させること、（ii）捕捉剤／抗原またはその断片／検出剤の複合体を形成するために、捕捉剤／抗原またはその断片の複合体を、検出可能な標識を含み、抗原またはその断片上のエピトープに結合し、捕捉剤に結合しない少なくとも1つの検出剤と接触させることおよび（iii）（ii）において形成された捕捉剤／抗原またはその断片／検出剤の複合体における検出可能な標識によって発生するシグナルに基づいて、試験試料中の抗原またはその断片の存在、量または濃度を決定することを含むことができ、少なくとも1つの捕捉剤および／または少なくとも1つの検出剤は少なくとも1つの結合タンパク質である。

【0047】

あるいは、本方法は、（i）捕捉剤／抗原またはその断片の複合体を形成するために、試験試料と、抗原またはその断片上のエピトープに結合する少なくとも1つの捕捉剤とを接触させ、同時にまたはいずれかの順番で連続して、試験試料と、少なくとも1つの捕捉剤への結合に関して試験試料中の任意の抗原またはその断片と競合し得る、検出可能に標識された抗原またはその断片とを接触させ、試験試料中に存在する任意の抗原またはその断片および検出可能に標識された抗原は互いに競合し、それぞれ、捕捉剤／抗原またはその断片の複合体と捕捉剤／検出可能に標識された抗原またはその断片の複合体を形成することおよび（ii）（ii）において形成された捕捉剤／検出可能に標識された抗原またはその断片の複合体において検出可能な標識によって発生するシグナルに基づいて、試験試料中の抗原またはその断片の存在、量または濃度を決定することを含むことができ、少なくとも1つの捕捉剤は、少なくとも1つの結合タンパク質であり、捕捉剤／検出可能に標識された抗原またはその断片の複合体における検出可能な標識によって生じるシグナルは、試験試料中の抗原またはその断片の量または濃度に反比例する。

【0048】

試験試料は、患者由来であり得、この場合、本方法は、患者の治療的／予防的処置の効力を診断、予後診断または評価する工程をさらに含み得る。本方法が、患者の治療的／予

防的処置の効力を評価することをさらに含む場合、この方法は、場合によって、効力を改善するために必要な、患者の治療的／予防的処置の改変を加えることをさらに含む。本方法は、自動化システムまたは半自動化システムにおける使用に適合させることができる。したがって、本明細書に記載されている方法はまた、対象が、所与の疾患、障害または状態を有するまたはそれを発症する危険性があるか否かを判定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、以下：

(a) 対象由来の試験試料中の、分析物またはその断片の濃度または量を（例えば、本明細書に記載されている方法または当該技術分野において公知の方法を用いて）決定する工程；

(b) 工程 (a) において決定された分析物またはその断片の濃度または量と、予め決定されたレベルとを比較する工程を含むことができ、工程 (a) において決定された分析物の濃度または量が予め決定されたレベルと比較して好ましい場合、対象は、所定の疾患、障害または状態を有さないまたはその危険性がないと決定される。

しかしながら、工程 (a) において決定された分析物の濃度または量が予め決定されたレベルと比較して好ましくない場合、対象は、所定の疾患、障害または状態を有するまたはその危険性があると決定される。

【0049】

さらに、対象における疾患の進行を監視する方法が本明細書に提供される。場合によって、本方法は、以下：

(a) 分析物の対象由来の試験試料中の濃度または量を決定する工程；

(b) 分析物の対象由来の後者の試験試料中の濃度または量を決定する工程；および

(c) 工程 (b) において決定された分析物の濃度または量と、工程 (a) において決定された分析物の濃度または量とを比較することを含み、工程 (b) において決定された濃度または量が変化しない場合または工程 (a) において決定された分析物の濃度または量と比較して好ましくない場合、対象における疾患は継続し、進行または悪化していると判断される。比較して、工程 (b) において決定された分析物の濃度または量が、工程 (a) において決定された分析物の濃度または量と比較して好ましい場合、対象における疾患は中断し、軽減または改善されたと判断される。

【0050】

場合によって、本方法は、工程 (b) において決定された分析物の濃度または量と、例えば、予め決定されたレベルとを比較することをさらに含む。さらに、場合によって、例えば、工程 (b) において決定された分析物の濃度または量が、予め決定されたレベルと比較して、不利に変更されたことを比較が示す場合、本方法は、ある期間、1以上の医薬組成物を用いて対象を治療することを含む。

【0051】

また、1以上の抗原またはその断片について試験試料をアッセイするキットが提供され、1つ以上の抗原は、EGFR、RON、IGF-1R、Erb-B3および／またはHER2である。キットは、抗原またはその断片について試験試料をアッセイするための少なくとも1つの成分、抗原またはその断片について試験試料をアッセイするための指示書を含み、少なくとも1つの成分は、本明細書に開示されている結合タンパク質を含む少なくとも1つの組成物を含み、結合タンパク質は、場合によって、検出可能に標識されている。

【図面の簡単な説明】

【0052】

【図1】二重可変ドメイン (DVD) 結合タンパク質構築物の模式図であり、2つの親抗体からDVD結合タンパク質を作製するための戦略を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0053】

同じ細胞上に発現する同じ受容体または2つの異なる受容体の2つの異なる（例えば、重複しない）エピトープに結合することができる多価および／または多重特異的結合タン

10

20

30

40

50

パク質が提供される。二重可変ドメイン結合タンパク質（DVD結合タンパク質）または二重可変ドメイン免疫グロブリン（DVD-Ig（商標））およびこれらの医薬組成物ならびに核酸、組換え発現ベクターおよびこのようなDVD結合タンパク質を作製するための宿主細胞もまた提供される。インビトロまたはインビボのいずれかにおいて、特定の抗原を検出するDVD結合タンパク質を使用する方法もまた提供される。

【0054】

本明細書に別段の定義がなければ、本明細書で使用される科学および技術用語は、当業者によって一般的に理解される意味を有する。何らかの曖昧さが伏在している場合には、本明細書中に付与されている定義は、すべての辞書または本明細書外の定義に優越する。文脈上別段の必要がなければ、単数形用語は複数形を含むものとし、複数形用語は単数を含むものとする。「または」の使用は、別段の記載がなければ、「および／または」を意味する。「含んでいる」という用語ならびに「含む」および「含まれた」などのその他の形式の使用は、限定的なものではない。

【0055】

一般的に、本明細書に記載されている細胞および組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学ならびにタンパク質および核酸化学およびハイブリッド形成に関連して使用される命名法は、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。一般に、本明細書において提供される方法および技術は、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、ならびに本明細書を通じて引用および論述されている様々な一般的参考文献およびより具体的な参考文献中に記載されているように、実施することができる。酵素反応および精製技術は、製造業者の説明書に従って、本分野で一般的に遂行されているように、または本明細書に記載されているように、実施される。本明細書に記載されている分析化学、合成有機化学および医薬品化学および薬化学に関して使用される命名法、ならびに本明細書に記載されている分析化学、合成有機化学および医薬品化学および薬化学の実験室操作および技術は、周知のものであり、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、および送達、および患者の治療に対しては、標準的な技術を使用し得る。

【0056】

本開示がより容易に理解し得るように、特定の用語を以下に定義する。

【0057】

「抗体」という用語は、4つのポリペプチド鎖（2つの重（H）鎖および2つの軽（L）鎖）から一般に構成される免疫グロブリン（Ig）分子またはIg分子のエピトープ結合特性を保持した機能的断片、変異体、バリエーションまたはこれらの誘導体を表すものとする。このような断片、変異体、バリエーションまた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。完全長の抗体の一実施形態において、各重鎖は、重鎖可変領域（VH）および重鎖定常領域（CH）から構成される。CHは、3つのドメインCH1、CH2およびCH3から構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域（VL）および軽鎖定常領域（CL）から構成される。CLは単一のCLドメインから構成される。VHおよびVL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。一般に、各VHおよびVLは、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順で、アミノ末端からカルボキシ末端に配置された3つのCDRおよび4つのFRから構成される。免疫グロブリン分子は、あらゆる種類（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgAおよびIgY）、クラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2）またはサブクラスであり得る。

【0058】

「二特異的抗体」という用語は、その2つの結合アーム（HC/LCの一对）の1つの上に1つの抗原（またはエピトープ）を結合し、その第二の結合アーム（HC/LCの異なる対）の上の異なる抗原（またはエピトープ）に結合する抗体を指す。二特異的抗体は、2つの異なる抗原結合アーム（特異性とCDR配列の両方における）を有し、それが結

合するそれぞれの抗原について一価である。二特異的抗体には、クアドローマ技術 (M i l l s t e i n および C u e l l o (1983年) N a t u r e 305 (5934) : 537-40) によって、2つの異なるモノクローナル抗体の化学的コンジュゲーション (S t a e r z e t a l . (1985年) N a t u r e 314 (6012) : 628-31) によってまたはノブ・イントゥ・ホールもしくはFc領域中に突然変異を導入する同様のアプローチ (H o l l i g e r e t a l . (1993) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 90 (14) : 6444-6448) によって生成されるものが含まれる。

【0059】

「親和性成熟された」抗体とは、変化を有しない親抗体と比べて、抗体の1つ以上のC D R中に、抗原に対する抗体の親和性の改善をもたらす1つ以上の変化を有する抗体である。典型的な親和性成熟された抗体は、標的抗原に対してnMの親和性を有し、またはpMの親和性さえ有する。親和性成熟された抗体は、本分野において公知の操作によって産生される。「M a r k s e t a l . (1992) B i o T e c h n o l o g y 10 : 779-783」は、VHおよびVLドメインシャッフリングによる親和性成熟を記載している。C D Rおよび／またはフレームワーク残基の無作為な突然変異導入は、B a r b a s e t a l . (1994) P r o c N a t . A c a d . S c i . U S A 91 : 3809-3813 ; S c h i e r e t a l . (1995) G e n e 169 : 147-155 ; Y e l t o n e t a l . (1995) J . I m m u n o l . 155 : 1994-2004 ; J a c k s o n e t a l . (1995) J . I m m u n o l . 154 (7) : 3310-9 ; H a w k i n s e t a l (1992) J . M o l . B i o l . 226 : 889-896によって記載されており、活性増強アミノ酸残基による選択的突然変異導入位置、接触または過剰変異位置での突然変異は、米国特許第6, 914, 128号に記載されている。

【0060】

「C D R移植された抗体」という用語は、VHおよび／またはVLのC D R領域の1つ以上の配列が別の抗体のC D R配列で置換されている重鎖および軽鎖可変領域配列を含む抗体を指す。例えば、2つの抗体は、マウスC D Rの1つ以上がヒトC D R配列で置換されているマウス重鎖および軽鎖可変領域を有する抗体などの異なる種由来であり得る。

【0061】

「ヒト化抗体」という用語は、ヒト以外の種由来の、より「ヒト類似に」、すなわち、ヒト生殖系列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、非ヒトC D R配列がヒトのVHおよびVL配列中に導入されて、対応するヒトC D R配列が置換されているC D R移植された抗体である。「ヒト化抗体」はまた、ヒト抗体のアミノ酸配列を実質的に（例えば、アミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%の同一性で）有するフレームワーク領域 (F R) 配列と、非ヒト抗体のアミノ酸配列を実質的に有する少なくとも1つのC D Rを含む抗体またはそのバリエーション、誘導体、類似体もしくは断片である。ヒト化抗体は、C D R領域のすべてまたは実質的にすべての配列が非ヒト免疫グロブリン（すなわち、ドナー抗体）の配列に対応し、F R領域のすべてまたは実質的にすべての配列がヒト免疫グロブリンの配列である、少なくとも1つの、典型的には2つ可変ドメイン (F a b、F a b'、F (a b')₂、F a b C、F v) の実質的にすべてを含んでもよい。ヒト化抗体はまた、重鎖のC H 1、ヒンジ、C H 2、C H 3およびC H 4領域を含んでもよい。一実施形態において、ヒト化抗体はまた、ヒト免疫グロブリンFc領域の少なくとも一部を含む。いく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。いく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。いくつかの実施形態において、ヒト化抗体は、軽鎖のヒト化可変ドメインおよび／または重鎖のヒト化可変ドメインのみを含有する。いくつかの実施形態において、ヒト化抗体は、重鎖、ならびに軽鎖の少なくとも可変ドメインを含有する

。

【0062】

「二重可変ドメイン結合タンパク質」および「二重可変ドメイン免疫グロブリン」という用語は、その2つの結合アーム（例えば、H C / L Cの一对）のそれぞれにおいて2つの可変ドメインを有する結合タンパク質を指し（P C T出願公開第W O 0 2 / 0 2 7 7 3号参照）、それぞれが抗原に結合することができる。一実施形態において、それぞれの可変ドメインは、異なる抗原またはエピトープに結合する。別の実施形態において、それぞれの可変ドメインは、同じ抗原またはエピトープに結合する。別の実施形態において、二重可変ドメイン結合タンパク質は、同一の特異性と同一のC D R配列を有する2つの同一の抗原結合アームを有し、それが結合するそれぞれの抗原に対して二価である。一実施形態において、D V D結合タンパク質は、単一特異的であってもよく、すなわち、1つの抗原に結合することができまたは多重特異的であってもよく、すなわち、2つ以上の抗原に結合することができる。2つの重鎖D V Dポリペプチドおよび2つの軽鎖D V Dポリペプチドを含むD V D結合タンパク質は、D V D - I g（商標）と呼ばれる。一実施形態において、4本鎖D V D結合タンパク質の各半分は、重鎖D V Dポリペプチド、軽鎖D V Dポリペプチドおよび2つの抗原結合部位を含む。一実施形態において、それぞれの結合部位は、抗原結合部位あたりの抗原結合に関与する全6つのC D Rを有する重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを含む。

10

【0063】

「抗イディオタイプ抗体」という用語は、別の抗体の抗原結合部位のアミノ酸配列に対して惹起された抗体を指す。抗イディオタイプ抗体は、抗原に対する免疫応答を増強するために投与され得る。

20

【0064】

「生物学的活性」という用語は、分子の1つ以上の固有の生物学的特性（インビボで見られるように天然に存在するものであっても、組換え手段によって提供される、または可能にされるものであっても）を表す。生物学的特性には、受容体に結合すること；細胞増殖の誘導、細胞増殖を阻害すること、他のサイトカインの誘導、アポトーシスの誘導および酵素活性が含まれるが、これらに限定されない。

【0065】

「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した場合、抗原の生物学的活性を相殺することを指す。一実施形態において、中和結合タンパク質は、抗原（例えば、サイトカイン）に結合し、少なくとも約20%、40%、60%、80%、85%またはそれ以上にその生物学的活性を低下させる。

30

【0066】

「特異性」とは、抗原に選択的に結合する結合タンパク質の能力を指す。

【0067】

「親和性」は、結合タンパク質と抗原との間の相互作用の強さであり、結合タンパク質のC D Rの配列によって、ならびに抗原の性質、例えばそのサイズ、形状および／または電荷によって決定される。結合タンパク質は、負の副作用を最小限にしながら、所望の治療の評価項目を提供する親和性について選択することができる。親和性は、当業者に公知の方法（U S 2 0 0 9 0 3 1 1 2 5 3）を用いて測定することができる。

40

【0068】

「効力」という用語は、所望の効果を達成するための結合タンパク質の能力を意味し、その治療有効性の測定である。効力は、当業者に公知の方法（U S 2 0 0 9 0 3 1 1 2 5 3）を用いて評価することができる。

【0069】

「交差反応性」という用語は、惹起された標的以外の標的に結合する結合タンパク質の能力を指す。一般に、結合タンパク質は、適切に高い親和性でその標的組織（単数または複数）／抗原（単数または複数）に結合するが、非標的の正常組織に対して適切に低い親和性を示す。個々の結合タンパク質は、一般に、2つの基準を満たすように選択される。

50

(1) 抗体標的の既知の発現に適切な組織染色。(2) 同じ臓器からのヒトとto x種(マウスおよびカニクイザル)との間の類似した染色パターン。交差反応性を評価するためのこれらの方法および他の方法は、当業者に公知である(US 20090311253)。

【0070】

「生物学的機能」という用語は、結合タンパク質の特異的なインビトロまたはインビボにおける作用を意味する。結合タンパク質は、抗原のいくつかのクラスを対象とし、複数の作用機序を介して所望の治療結果を達成することができる。結合タンパク質は、可溶性タンパク質、細胞表面抗原ならびに細胞外タンパク質沈着物を対象にすることができる。結合タンパク質は、それらの標的の活性を作働させ、拮抗しまたは中和することができる。結合タンパク質は、それらが結合する標的のクリアランスを助けることができまたは細胞に結合したときに細胞毒性をもたらすことがある。2つ以上の抗体の部分は、単一の結合タンパク質分子において異なる機能を達成するために、多価フォーマットに組み込むことができる。生物学的機能の評価するために使用されるインビトロアッセイおよびインビボモデルは、当業者に知られている(US 20090311253)。

10

【0071】

「安定な」結合タンパク質は、結合タンパク質が、保存時にその物理的安定性、化学的安定性および／または生物学的活性を本質的に保持しているものである。長期間にわたって、種々の温度にてインビトロで安定である多価結合タンパク質が望ましい。結合タンパク質を安定化し、種々の温度でそれらの安定性を評価する方法は、当業者に知られている(US 20090311253)。

20

【0072】

「溶解性」という用語は、水性溶液中に分散させたままにするタンパク質の能力を意味する。水性製剤中のタンパク質の溶解性は、疎水性および親水性アミノ酸残基の適切な分布に依存し、したがって、溶解性は、正確に折り畳まれたタンパク質の生成と相関し得る。当業者は、日常的なHPLC技術および当業者に公知の方法(US 20090311253)を用いて、結合タンパク質の可溶性の増加または減少を検出することができる。

【0073】

結合タンパク質は、様々な宿主細胞を用いて生成されてもよく、またはインビトロで生成されてもよく、労力あたりの相対収率は「生成効率」を決定する。生成効率に影響を及ぼす因子には、限定されないが、宿主細胞型(原核生物または真核生物)、発現ベクターの選択、ヌクレオチド配列の選択および使用される方法が挙げられる。結合タンパク質生成に使用される材料および方法、ならびに生成効率の測定は、当業者に公知である(US 20090311253)。

30

【0074】

「免疫原性」という用語は、免疫応答を誘導する物質の能力を意味する。治療的結合タンパク質の投与は、免疫応答の特定の発生率をもたらし得る。多価形式の免疫原性を誘導し得る潜在的な要素は、親抗体の選択中に分析することができ、このような危険性を低下させるための工程は、多価結合タンパク質形式にそれらの配列を組み込む前に、親抗体を最適化するために採用することができる。抗体と結合タンパク質の免疫原性を減少させる方法は、当業者に公知である(US 20090311253)。

40

【0075】

「標識」および「検出可能な標識」という用語は、特異的結合対のメンバー間の反応(例えば、結合)を検出可能なものにするために、抗体またはその分析物などの特異的結合対のメンバーに結合させた部分を意味する。特異的結合対の標識された部分は、「検出可能に標識されている」と呼ばれる。したがって、「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標識が取り込まれたタンパク質を表す。一実施形態において、標識は、視覚または計測手段によって検出可能な信号を生成することができる、検出可能なマーカーであり、例えば、放射性標識されたアミノ酸の取り込み、または印を付けたアビジン(例えば、光学的方法または比色分析法によって検出することができる

50

、蛍光マーカーまたは酵素活性を含有するストレプトアビジン）によって検出することができる。ポリペプチドへの付着である。ポリペプチド用の標識の例には、以下の放射性同位体または放射性核種（例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho または ^{153}Sm ）；色原体、蛍光標識（例えば、FITC、ローダミン、ランタニドリン光体）；酵素的標識（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）；化学発光マーカー；ビオチニル基、二次レポーターによって認識される所定のポリペプチドエピトープ（例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体に対する結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ）；およびガドリニウムキレートなどの磁気作用物質が含まれるが、これらに限定されない。イムノアッセイに一般に使用される標識の代表例には、光を生じる部分、例えばアクリジニウム化合物および蛍光を生じる部分、例えばフルオレセインが含まれる。この関連で、部分自体が検出可能に標識され得るが、さらに別の部分との反応後に検出可能にされ得る。

【0076】

「連結体」という用語は、第二の化学部分（治療剤または細胞毒性剤など）に化学的に連結された抗体などの結合タンパク質を表す。「作用物質」という用語は、化学的化合物、化学的化合物の混合物、生物学的高分子または生物由来物質から作製された抽出物を含む。一実施形態において、治療剤または細胞毒性剤には、百日咳毒素、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロールおよびピューロマイシンならびにこれらの類似体または相同体が含まれるが、これらに限定されるものではない。イムノアッセイとの関連において使用される場合、連結抗体は、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ってよい。

【0077】

「結晶」および「結晶化された」という用語は、結晶の形態で存在する結合タンパク質（例えば、抗体）または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、非晶質の固体状態または液体の結晶状態などの他の形態とは異なる。結晶は、原子、イオン、分子（例えば、抗体などのタンパク質）または分子集合体（例えば、抗原／抗体複合体）の規則的な反復する三次元配列から構成される。これらの三次元配列は、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または構築ブロックは、非対称単位と呼ばれる。所定の十分に整えら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。すべての三次元中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。

【0078】

「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。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。他のベクターにはRNAベクターが含まれる。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およびエピソーム哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター）は、宿主細胞中へ導入されて、宿主細胞のゲ

10

20

30

40

50

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。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」（または単に、「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」および「ベクター」は互換的に使用され得る。しかしながら、発現ベクターの他の形態もまた含まれ、例えば、同等の機能を果たすウイルスベクター（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス）なども含まれる。一群のpHybEベクター（米国特許出願第61/021,282号）は、親抗体およびDVD結合タンパク質のクローニングに使用された。pJP183由来のV1；pHybE-hCg1, z, 非V2は、抗体および野生型定常領域を有するDVD重鎖をクローニングするために使用された。pJP191由来のV2；pHybE-hCK V3は、抗体およびカップ定常領域を有するDVD軽鎖をクローニングするために使用された。pJP192由来のV3；pHybE-hCI V2は、抗体およびランダ定常領域を有するDVD軽鎖をクローニングするために使用された。V4は、ラムダシグナルペプチドおよびカップ定常領域を用いて構築され、ラムダーカップハイブリッドVドメインを有するDVD軽鎖をクローニングするために使用された。V5は、カップシグナルペプチドおよびラムダ定常領域を用いて構築され、カップラムダハイブリッドVドメインを有するDVD軽鎖をクローニングするために使用された。pJP183由来のV7；pHybE-hCg1, z, 非V2は、抗体および（234、235AA）突然変異定常領域を有するDVD重鎖をクローニングするために使用された。

10

20

【0079】

「組換え宿主細胞」または「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。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。突然変異または環境的な影響のために、後続の世代中にある種の修飾が生じ得るので、このような子孫は、実際には親細胞と同一でないことがあり得るが、本明細書において使用される「宿主細胞」という用語の範囲になお含まれる。一実施形態において、宿主細胞には、原核および真核細胞が含まれる。一実施形態において、真核細胞には、原生生物、真菌、植物および動物細胞が含まれる。別の実施形態において、宿主細胞には、原核細胞株E. コリ；哺乳動物細胞株CHO、HEK293、COS、NS0、SP2およびPER. C6；昆虫細胞株Sf9および真菌細胞サッカロミセス・セレビシアエが含まれるが、これらに限定されるものではない。

30

【0080】

「トランスフェクション」という用語は、宿主細胞への外因性核酸（例えば、DNA）を導入するために一般的に用いられる様々な技術を包含し、例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、DEAE-デキストラントランスフェクションなどが挙げられる。

【0081】

「サイトカイン」という用語は、細胞間媒介物質として別の細胞集団に作用する1つの細胞集団から放出されるタンパク質を指す。「サイトカイン」という用語には、天然由来または組換え細胞培養物由来のタンパク質および天然配列のサイトカインの生物学的に活性な同等物が含まれる。

40

【0082】

「生物学的試料」という用語は、生物または生物であったものから得られた物質の量を意味する。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、リンパ節および脾臓が含まれるが、これらに限定されない。

【0083】

「成分」という用語は、組成物の要素を指す。診断キットに関連して、例えば、成分は

50

、試験試料のアッセイ用のキットに含めることができる、捕捉抗体、検出またはコンジュゲート抗体、対照、校正因子、一連の校正因子、感受性パネル、容器、緩衝液、希釈剤、塩、酵素、酵素の補因子、検出試薬、前処理試薬／溶液、基質（例えば、溶液として）、停止液などであってもよい。したがって、「成分」は、例えば、抗分析物（例えば、抗ポリペプチド）抗体に結合させることによって、固体支持体上に固定されている、上記のポリペプチドまたは他の分析物を含めることができる。いくつかの成分は、溶液中にあってよくまたはアッセイにおける使用として再構成するために凍結乾燥されてもよい。

【0084】

「対照」は、分析物を含まない（「陰性対照」）または分析物を含む（「陽性対照」）ことが知られている組成物を表す。陽性対照は、既知の濃度の分析物を含み得る。「対照」、「陽性対照」および「校正物質」は、既知の濃度の分析物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可能であり、試薬（例えば、分析物）の完全性の有用な指標である。

10

【0085】

「所定のカットオフ」および「所定のレベル」は、所定のカットオフ／レベルに対してアッセイの結果を比較することにより診断／予後診断／治療的効力の結果を評価するために使用されるアッセイのカットオフ値を一般に表し、所定のカットオフ／レベルは様々な臨床的パラメーター（例えば、疾患の重症度、進行／非進行／改善など）にすでにつながっておりまたは関連している。本開示は例示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）に応じて様々となり得ることが周知である。さらに、本明細書における開示を他のイムノアッセイに適合させて、本開示を基礎とする他のイムノアッセイについてのイムノアッセイ特異的なカットオフ値を得ることは、当業者の通常の技術の範囲内に十分にある。所定のカットオフ／レベルの正確な値はアッセイ間で様々となり得るが、（もしあれば）本明細書に記載されている相関は一般に適用可能であるはずである。

20

【0086】

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、沈殿および／または可溶化試薬は、あらゆる細胞を溶解するものおよび／または試験試料中に存在するあらゆる分析物を可溶化するものである。前処理は、本明細書でさらに記載されるように、すべての試料に必要というわけでない。とりわけ、分析物（例えば、目的のポリペプチド）の可溶化は、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。前処理試薬は均一（分離工程を必要としない）または不均一（分離工程を必要とする）であり得る。不均一前処理試薬を使用すると、アッセイの次の工程に進行する前に任意の沈殿した分析物結合タンパク質は試験試料から除去される。

30

【0087】

本明細書に記載されているイムノアッセイおよびキットとの関連で「品質管理試薬」には、校正物質、対照および感受性パネルが含まれるが、これらに限定されない。「校正物質」または「標準物質」は、抗体または分析物などの分析物の濃度を内挿するための校正（標準）曲線を確立するために典型的に（例えば複数など、1つ以上）使用される。あるいは、所定の陽性／陰性カットオフ近くにある単一の校正物質を使用することが可能である。「感受性パネル」を含むように、複数の校正物質（すなわち、2つ以上の校正物質または様々な量の（複数の）校正物質）を組み合わせて使用することが可能である。

40

【0088】

「特異的結合パートナー」という用語は、特異的結合対のメンバーである。特異的結合対は、化学的または物理的な手段を介して互いに特異的に結合する2つの異なる分子を含む。したがって、抗原および抗体の特異的結合に加えて、他の特異的結合対は、ビオチンおよびアビジン（またはスト렙トアビジン）、炭水化物およびレクチン、相補的なヌクレオチド配列、エフェクターおよび受容体分子、補因子および酵素、酵素阻害剤および酵素などを含み得る。さらに、特異的結合対は、元の特異的結合メンバーの類似体、例えば

50

、分析物類似体であるメンバーを含み得る。免疫反応性特異的結合メンバーには、単離または組換えで産生された抗原、抗原断片およびモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を含む抗体ならびにその複合体、断片およびバリエーション（バリエーションの断片を含む）が含まれる。

【0089】

「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。Fc領域は、固有配列のFc領域またはバリエーションFc領域であり得る。免疫グロブリンのFc領域は、一般に、2つの定常ドメイン（CH2ドメインおよびCH3ドメイン）を含み、場合によって、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、
10 本分野において周知である（例えば、米国特許第5,648,260号および第5,624,821号）。Fc領域は、いく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、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）、食作用、補体依存性細胞傷害（CDC）および抗体と抗原-抗体複合体の半減期／クリアランス速度を媒介する。いくつかの場合において、これらのエフェクター機能は、治療用の免疫グロブリンに対して望ましいが、他の場合において、治療目的に応じて、不要であるまたは有害でさえあり得る。

【0090】

結合タンパク質の「抗原結合部分」という用語は、抗原に特異的に結合する能力を保持する結合タンパク質（例えば、抗体）の1つ以上の断片を意味する。結合タンパク質の抗原結合部分は、完全長の抗体の断片、ならびに、2つ以上の異なる抗原に特異的に結合する、二特異的、二重特異的または多重特異的フォーマットで行うことができる。結合タンパク質の「抗原結合部分」という用語に包含される結合断片の例には、（i）Fab断片（VL、VH、CLおよびCH1ドメインからなる一価断片）、（ii）F(ab')₂断片（ヒンジ領域において、ジスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片を含む二価断片）、（iii）VHおよびCH1ドメインからなるFd断片、（iv）抗体の単一アームのVLおよびVHドメインからなるFv断片、（v）単一の可変ドメインを含むdAb断片および（vi）単離された相補性決定領域（CDR）が含まれる。さらに、Fv断片の2つのドメインであるVLおよびVHは別個の遺伝子によってコードされているが、これらは、VLおよびVH領域が対合して一価分子を形成している単一のタンパク質鎖として、これらの作製を可能とする合成リンカーによって、組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。）。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。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）を含む。

【0091】

「多価結合タンパク質」という用語は、2つまたはそれ以上の抗原結合部位を含む結合タンパク質を意味する。一実施形態において、多価結合タンパク質は、3つまたはそれ以上の抗原結合部位を有するように工学的に作製され、天然に存在しない抗体である。「多重特異的結合タンパク質」という用語は、2つ以上の関連標的または非関連標的に結合することができる結合タンパク質を指す。一実施形態において、本明細書に提供される二重可変ドメイン（DVD）結合タンパク質は、2つ以上の抗原結合部位を含み、四価または多価の結合タンパク質である。

【0092】

「リンカー」という用語は、アミノ酸残基または2つのポリペプチド（例えば、2つのVHまたは2つのVLドメイン）に連結させて用いられるペプチド結合によって接続された2つ以上のアミノ酸残基を含むポリペプチドを意味する。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 et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak et al. (1994) Structure 2:1121-1123 参照
50

）。

【0093】

「Kabat 番号」、「Kabat 定義」および「Kabat 標識」という用語は、本明細書において、互換的に使用される。本分野において認められているこれらの用語は、抗体またはその抗原結合部分の重鎖および軽鎖可変領域中の他のアミノ酸残基に比べて、より可変的な（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 および Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication NO. 91-3242）。重鎖可変領域の場合、超可変領域は、CDR1 に対するアミノ酸位置 31 から 35、CDR2 に対するアミノ酸位置 50 から 65 および CDR3 に対するアミノ酸位置 95 から 102 にわたる。軽鎖可変領域の場合、超可変領域は、CDR1 に対するアミノ酸位置 24 から 34、CDR2 に対するアミノ酸位置 50 から 56 および CDR3 に対するアミノ酸位置 89 から 97 にわたる。

【0094】

「CDR」という用語は、免疫グロブリン可変領域配列内の相補性決定領域を意味する。重鎖および軽鎖可変領域のそれぞれについて、CDR1、CDR2 および CDR3 と命名されている、重鎖および軽鎖の可変領域のそれぞれにおいて3つのCDRが存在する。「CDRセット」という用語は、抗原に結合することができる単一の可変領域中に生じる3つのCDR群を指す。これらのCDRの正確な境界は、異なる系に従って、異なっており定義されてきた。Kabatによって記載された系（Kabat et al. (1987) and (1991)）は、抗体のいずれの可変領域に対しても適用可能な明瞭な残基付番系を提供するのみならず、3つのCDRを定義する正確な残基境界を提供する。これらのCDRは、Kabat CDRと称され得る。Chothia および共同研究者（Chothia and Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al. (1989) Nature 342:877-883）は、Kabat CDR内のある種の垂部分が、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。これらの垂部分は、L1、L2 および L3 または H1、H2 および H3（「L」および「H」は、それぞれ、軽鎖および重鎖領域を表記する。）と表記される。これらの領域は、Chothia CDRと称される場合があり、これは、Kabat CDRと重複する境界を有する。Kabat CDRと重複するCDRを定義する他の境界が、Padlan (1995) FASEB J. 9:133-139 および MacCallum (1996) J. Mol. Biol. 262(5):732-45によって記載されている。さらに別のCDR境界定義が、上記系の1つに厳格に従わない場合があり得るが、それにも関わらず、Kabat CDRと重複するが、これらは、特定の残基または残基の群またはさらにはCDR全体が、抗原結合に著しい影響を与えないという予測または実験的な発見に照らして、短縮または延長され得る。本明細書に使用されている方法は、これらの系のいずれかに従って定義されたCDRを使用し得るが、ある種の実施形態は、KabatまたはChothiaによって定義されたCDRを使用する。

【0095】

「エピトープ」という用語は、結合タンパク質、例えば、免疫グロブリンまたはT細胞受容体に特異的に結合することができる、ポリペプチドおよび／または他の決定因子によって結合される抗原の領域を意味する。ある種の実施形態において、エピトープ決定基は、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリルまたはスルホリルなどの分子の化学的に活性な表面基を含み、ある種の実施形態において、特異的な三次元構造的特徴および／または特異的な電荷特徴を有し得る。一実施形態において、エピトープは、特異的結合パートナー上の相補的部位に結合することが知られている抗原（またはその断片）の領域のアミノ酸残基を含

む。抗原断片は1を超えるエピトープを含むことができる。ある種の実施形態において、結合タンパク質が、タンパク質および／また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。抗体が交差競合する（一方が他方の結合または調節作用を妨げる）場合、結合タンパク質は「同じエピトープに結合する」。さらに、エピトープの構造上の定義（重複、類似、同一）は有益であり、機能上の定義は、構造上（結合）および機能上（調節、競合）のパラメーターを包含する。タンパク質の異なる領域は、異なる機能を果たすことができる。例えば、サイトカインの特定の領域は、受容体活性をもたらすそのサイトカイン受容体と相互作用し、一方、このタンパク質の他の領域は、サイトカインを安定化するために必要とされ得る。サイトカインシグナル伝達の負の影響を排除するために、サイトカインは、受容体相互作用領域（単数または複数）に特異的に結合する結合タンパク質を用いて標的化され得て、それによってその受容体の結合を阻止する。あるいは、結合タンパク質は、サイトカイン安定化に関与する領域を標的化され得て、それによって、分解のためのタンパク質を指定する。エピトープ認識を可視化し、モデル化する方法は、当業者に知られている（US 20090311253）

10

【0096】

「薬物動態」とは、薬物が、生物によって、吸収され、分散され、代謝されおよび排泄されるプロセスを指す。所望の薬物動態プロファイルを有する多価結合タンパク質分子を生成するために、同様の所望の薬物動態プロファイルを有する親モノクローナル抗体が選択される。選択された親モノクローナル抗体のPKプロファイルは、当業者に公知の方法（US 20090311253）を用いて、げっ歯類において容易に決定することができる。

20

【0097】

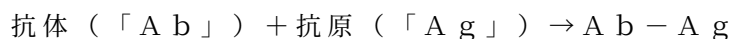
「生物学的利用能」とは、投与後にその標的に到達する活性薬剤の量を指す。生物学的利用能は、安定性、溶解性、免疫原性および薬物動態を含む前述の特性のいくつかの関数であり、当業者に知られている方法（US 20090311253）を用いて評価することができる。

【0098】

「表面プラズモン共鳴」という用語は、例えば、BIAcore（登録商標）システム（BIAcore International AB（GE Healthcareの会社）、Uppsala, Swedenおよび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意味する。さらなる記載については、Jonsson et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51: 19-26を参照されたい。「 K_{on} 」という用語は、例えば、DVD-Ig／抗原複合体を形成する、結合タンパク質（例えば、抗体またはDVD-Ig）と抗原の結合についての結合速度（on rate）定数を意味する。「 K_{on} 」という用語はまた、本明細書において互換的に用いられ、「会合速度定数」または「 k_a 」を意味する。その標的抗原への結合タンパク質の結合速度または結合タンパク質、例えば抗体、と抗原との間の複合体形成の速度を示すこの値はまた、以下の式によって示される。

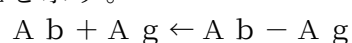
30

40



【0099】

「 K_{off} 」という用語は、結合タンパク質（例えば、抗体またはDVD-Ig）の、例えば、本分野で知られているDVD-Ig／抗原複合体からの解離についての解離速度（off rate）定数または「解離速度（dissociation rate）定数」を意味する。この値は、以下の式によって示されるように、結合タンパク質、例えば抗体、のその標的抗原からの解離速度または遊離抗体と抗原への経時的なAb-Ag複合体の分離を示す。



【0100】

50

「 K_d 」および「平衡解離定数」という用語は、平衡状態での滴定測定においてまたは解離速度定数 (K_{off}) を結合速度定数 (K_{on}) で割ることによって得られた値を意味する。会合速度定数、解離速度定数および平衡解離定数は、抗原への結合タンパク質（例えば、抗体または DVD-Ig）の結合親和性を表すために使用される。結合および解離速度定数を決定する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の使用は、高い感度を提供し、平衡状態で生理的緩衝液中の試料を調べることができる。BIAcore（登録商標）（生体分子相互作用分析）アッセイなどの他の実験的アプローチおよび機器を使用することが可能である（例えば、BIAcore International AB, GE Healthcare 社, Uppsala, Sweden から入手可能な機器）。さらに、Sapidyne Instruments (Boise, Idaho) から入手可能な KinExA（登録商標）（動態排除アッセイ）アッセイも使用することが可能である。

10

【0101】

「バリエーション」という用語は、アミノ酸の付加（例えば、挿入）、欠失または保存的置換によってアミノ酸配列中の所与のポリペプチドとは異なるが、所与のポリペプチドの生物活性を保持するポリペプチドを意味する（例えば、バリエーション EGF R 抗体は、EGF R との結合について抗 EGF R 抗体と競合することができる。）。アミノ酸の保存的置換、すなわち特性が類似する（例えば、親水性ならびに荷電領域の程度および分布）異なるアミノ酸とのアミノ酸の置き換えは、微小変化が典型的に関与すると本分野で認識されている。これらの微小変化は、本分野で理解されているように、アミノ酸のヒドロパシーインデックスを考慮することにより部分的に特定することが可能である（例えば、Kytte et al. (1982) J. Mol. Biol. 157:105-132 参照）。アミノ酸のヒドロパシーインデックスは、この疎水性および荷電の考慮を基礎とする。タンパク質中のヒドロパシーインデックスの類似したアミノ酸を置換することが可能であり、このタンパク質はタンパク質の機能を依然として保持す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 のヒドロパシーインデックスを有するアミノ酸が置換される。アミノ酸の親水性は、生物学的機能を保持するタンパク質となる置換を明らかにするために使用することも可能である。ペプチドとの関連でアミノ酸の親水性を考慮すると、抗原性および免疫原性とよく相関することが報告されている有用な尺度である、そのペプチドの最大の局所平均親水性の計算が可能となる（例えば、米国特許第 4,554,101 号参照）。本分野で理解されているように、類似した親水性値を有するアミノ酸の置換は、生物活性、例えば免疫原性を保持するペプチドをもたらす得る。一態様において、互いに ±2 以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。アミノ酸のヒドロパシーインデックスと疎水性値はどちらもそのアミノ酸の特定の側鎖によって影響を受ける。この観察に一致して、生物学的機能と適合するアミノ酸置換は、アミノ酸、特に、疎水性、親水性、荷電、サイズおよび他の特性によって明らかにされるこれらのアミノ酸の側鎖の相対的類似性に依存することが理解されている。「バリエーション」という用語は、タンパク質分解、リン酸化または他の翻訳後修飾などによって異なる形でプロセッシングされているが、その生物活性または抗原反応性、例えば EGF R に結合する能力を保持するポリペプチドまたはその断片を含む。「バリエーション」という用語は、他に定義がなければ、バリエーションの断片を包含する。バリエーションは、野生型配列に対して 99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76% または 75% 同一であってもよい。

20

30

40

【0102】

I. 結合タンパク質の生成

同じ細胞上に発現した同じ受容体または 2 つの異なる受容体の 2 つの異なる（例えば、重複しない）エピトープに結合することができる結合タンパク質およびそれを作製する方法が提供される。結合タンパク質は、様々な技術を用いて生成することができる。発現ベクター、宿主細胞および結合タンパク質を生成する方法が提供され、当該技術分野に

50

において周知である。

【0103】

A. 親モノクローナル抗体の作製

DVD結合タンパク質の可変ドメインは、目的の抗原に結合することができるポリクローナルAbおよびmAbなど、親抗体から取得することが可能である。これらの抗体は、天然に存在し得、または組換え技術によって作製され得る。当業者は、例えば、限定されないが、ハイブリドーマ技術の使用、選択されたリンパ球抗体法（SLAM）、ファージ、酵母もしくはRNA-タンパク質融合ディスプレイまたは他のライブラリーの使用、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の少なくとも一部を含む非ヒト動物の免疫化、ならびにキメラ抗体、CDR移植された抗体およびヒト化された抗体の調製を含む、抗体を生成するための多数の方法に精通している。例えば、米国特許公開第20090311253 A1参照。可変ドメインは、親和性成熟技術を用いて調製することができる。

10

【0104】

B. 親モノクローナル抗体を選択するための基準

DVD結合タンパク質分子において望まれる少なくとも1つ以上の特性を有する親抗体を選択することを含む実施形態が提供される。一実施形態において、所望の特性は、例えば、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、可溶性、生産効率、免疫原性、薬物動態、生物学的利用能、組織交差反応性またはオルソロガス抗原結合などの1つ以上の抗体パラメーターである。例えば、米国特許出願公報第20090311253号を参照されたい。

20

【0105】

C. 結合タンパク質分子の構築

結合タンパク質は、2つの異なる親モノクローナル抗体由来の2つの異なる軽鎖可変ドメイン（VL）が、組換えDNA技術によって、直接または短いリンカーを介して直列に連結され、その後に軽鎖定常ドメインCLが続くように設計され得る。同様に、重鎖は、直接的にまたはリンカーを介して、タンデムに連結された2つの異なる重鎖可変ドメイン（VH）、その後に定常ドメインCH1およびFc領域を含む（図1A）。

【0106】

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

30

【0107】

リンカー配列は、単一のアミノ酸またはポリペプチド配列であり得る。一実施形態において、リンカー配列の選択は、いくつかのFab分子の結晶構造分析に基づいている。Fabまたは抗体分子構造中の可変ドメインとCH1/CL定常ドメインの間には、天然の柔軟な連結が存在する。この天然の連結は、VドメインのC末端由来の4-6残基およびCL/CH1ドメインのN末端由来の4-6残基によって構成される約10から12個のアミノ酸残基を含む。DVD結合タンパク質は、それぞれ、軽鎖および重鎖中のリンカーとしてCLまたはCH1のN末端の5から6アミノ酸残基、または11から12アミノ酸残基を用いて作製された。CLまたはCH1ドメインのN末端残基、特に最初の5から6個のアミノ酸残基は、強い二次構造なしにループ立体構造を採ることが可能であり、したがって、2つの可変ドメイン間の柔軟なリンカーとして作用することが可能である。CLまたはCH1ドメインのN末端残基は、それらがIg配列の一部であるため、可変ドメインの天然の伸長である。したがって、それらの使用は、リンカーおよび接合分析物から潜在的に生じる任意の免疫原性を大幅に最小化する。

40

【0108】

さらなる実施形態において、重鎖、軽鎖、二本鎖または四本鎖の実施形態のいずれかは

50

、AKTTPKLEEGEFSEAR（配列番号1）；AKTTPKLEEGEFSEARV（配列番号2）；AKTTPKLG（配列番号3）；SAKTTPKLG（配列番号4）；SAKTTP（配列番号5）；RADAAP（配列番号6）；RADAAPTVS（配列番号7）；RADAAAAGGPGS（配列番号8）；RADAAA（G₄S）₄（配列番号9）；SAKTTPKLEEGEFSEARV（配列番号10）；ADAAAP（配列番号11）；ADAAPTVSIFPP（配列番号12）；TVAAAP（配列番号13）；TVAAPSVFIFFPP（配列番号14）；QPKAAP（配列番号15）；QPKAAPSVTLFFPP（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）；GGGGSGGGGGSGGGGS（配列番号23）；GENKVEYAPALMAL（配列番号24）；GPAKELTPLKEAKVS（配列番号25）；またはGHEAAAVMQVQYPAS（配列番号26）；TVAAAPSVFIFFPPTVAAPSVFIFFPP（配列番号27）；ASTKGPSVFPLAPASTKGPSVFPLAP（配列番号28）；またはG/Sに基づく配列（例えば、G₄Sリピート；配列番号29）を含む、少なくとも1つのリンカーを含む。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はバリエーションFc領域である。

10

【0109】

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ドメインのすべての残基は含まない。例えば、CL/CH1ドメインの最初の5から12個のアミノ酸残基；軽鎖リンカーは、C_κまたはC_λに由来することが可能であり；ならびに重鎖リンカーは、C_γ1、C_γ2、C_γ3、C_γ4、C_α1、C_α2、C_δ、C_εおよびC_μを含む、いずれかのアイソタイプの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29）；ヒンジ領域に由来する配列および他のタンパク質から得られる他の天然配列などの他のタンパク質からも由来し得る。

20

【0110】

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

30

【0111】

別の実施形態において、2つの重鎖DVDポリペプチドおよび2つの軽鎖DVDポリペプチドは組み合わされて、DVD結合タンパク質を形成する。表1は、疾患の治療に有用な例示的な抗体のVHおよびVL領域のアミノ酸配列を列挙している。一実施形態において、いずれかの配向における、表1に列挙されたVHおよび/またはVL領域の少なくとも2つを含むDVDが提供される。いくつかの実施形態において、VD1およびVD2は、独立して選択される。よって、いくつかの実施形態において、VD1およびVD2は同じ配列番号を含み、他の実施形態において、VD1およびVD2は異なる配列番号を含む。以下に与えられるVHおよびVLドメイン配列は、当該技術分野において知られているまたは当該技術分野において知られている方法を用いて容易に識別され得る相補性決定領域（CDR）およびフレームワーク配列を含む。いくつかの実施形態において、1つ以上のこれらのCDRおよび/またはフレームワーク配列は、同じ抗原に結合する、当該技術

40

50

分野において知られている結合タンパク質由来の他の C D R および／またはフレームワーク配列によって、機能を損なうことなく置換される。

【 0 1 1 2 】

【 表 1 】

表 1: 多価結合タンパク質を含む結合タンパク質を生成するための抗体の VH および VL 領域の

アミノ酸配列のリスト

(CDR 配列を太字で示す。)

配列 番号	ABT 固有 ID	タンパク質領域	配列 1234567890123456789012345678901234567890
30	AB064VH	VH-EGFR (配列1)	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSISS SDFAWN WIRQPPGKGLEWM GYISYSGNTRY QPSLKS RITISRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVT AGRGFPYWGQ GLVTVSS
31	AB064VL	VL-EGFR (配列1)	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTITC CHSSQDINSNIG WLQQKPGKSFKGLIY HGTNLDD GVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYC QVYAQFPWTF GGG TKLEIKR
32	AB003VH	VH-EGFR (配列2)	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSVSS SGDYIYWT WIRQSPGKGLEW IGHIYYSGNT YNPSLKS RLTISIDTSKTQFSLKLSSVTAADTAIYYCV RDRVTGA FDIWGQGTMTVTVSS
33	AB003VL	VL-EGFR (配列2)	DIQMTQSPSSLSASVSGDRVTITC QASQDISNYLN WYQQKPGKAPKLLIY DASNLET GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYFC QHFDHLPLAF GGG TKVEIKR
34	AB400VH	VH-EGFR (配列3)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLT NYGVH WVRQAPGKGLEWLG VGWSGGNTDYNTPFTS RSLTINKDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARA LTWYDYEFAYWGQ GLVTVSS
35	AB400VL	VL-EGFR (配列3)	DILLTQSPGTLSPGERATLSC CRASQSIYTN HWYQQKPGQAPRLLIK YASESIS GIPIRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQNLNWPTTF GGG TKLEIKR
36	AB033VH	VH-EGFR (配列4)	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLT NYGVH WVRQSPGKGLEWLG VIWSGGNTDYNTPFTS RSLINKDNSKSKQVFFKMNSLQNDTAIYYCARA LTYYDYEFAYWGQ GLVTVSA
37	AB033VL	VL-EGFR (配列4)	DILLTQSPVILSVSPGERVTSF CRASQSIGTN HWYQQRTNGSPRLLIK YASESIS GIPIRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYC QQNNNWPTTF GAG TKLEIKR
38	AB116VH	VH-ERBB3 (配列1)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS HYVMA WVRQAPGKGLEWVS SISSSGGWTL YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYYCTR GLKMATIFDYWGQ GLVTVSS
39	AB116VL	VL-ERBB3 (配列1)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCT GTSSDVGSYNVVS WYQQHPGKAPKLI IY EVSQRPS GVSNRFGSGSGNTASLTISGLQTEDEADYYC CSYAGSSI FVIFGGG TKVTVLG
40	AB063VH	VH-ERBB3 (配列2)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS IYSMN WVRQAPGKGLEWVS YISSSSSTIY ADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNLSLREEDTAVYYCAR DRGDFDA FDIWGQGTMTVTVSS
41	AB063VL	VL-ERBB3 (配列2)	DIQMTQSPSSLSASVSGDRVTITC QASQDITNYLN WYQQKPGKAPKLLIY DASNLET GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYNC QQCENFPITF GGG TRLEIKR
42	AB062VH	VH-ERBB3 (配列3)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSF SGYYWS WIRQPPGKGLEWIG EINHSGSTNYNPSLKS RVTSIVETSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARD KWTWYFDLWGRG TLVTVSS
43	AB062VL	VL-ERBB3 (配列3)	DIEMTQSPDSLAVSLGERATINC RSSQSVLYSSSNRNYLA WYQQNPGQP PKLLIY WASTRES GVDPDRFGSGSGTDFTLTISLQAEADVAVYYC QQYY STPRTFGQ GTKEIKR

10

20

30

40

配列 番号	ABT 固有 ID	タンパク質領域	配列 1234567890123456789012345678901234567890
44	AB080VH	VH-HER2 (配列1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFT DTY TMDWVRQAPGKGLEWVA DVNPNSGGSI YNQRFKGR FTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR NLG PSFYFDY WGQGTLLTVSS
45	AB080VL	VL-HER2 (配列1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTIT CKASQDVSIG VAWYQQKPKGAPKLLIY S ASYRYT GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQ PEDFATYYC QQY IYPYTF GQGTKVEIKR
46	AB004VH	VH-HER2(配列2)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK DTYI HWVRQAPGKGLEWVA RIYPTNGYTRY ADSVKGR FTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR WG GDGFYAMDY WGQGTLLTVSS
47	AB004VL	VL-HER2 (配列2)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTIT CRASQDVNTA VAWYQQKPKGAPKLLIY S ASFLY SGVPSRFSGSRSGTDFTLTIS SLQ PEDFATYYC QQH YTPPTF GQGTKVEIKR
48	AB075VH	VH-IGF1R (配列1)	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFF SYAI SWVRQAPGGGLEWVG GI PIFGTANYAQKFQGR VTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR AP LRFL EWSTQ DH YYYYYMDVWGKGTTTVTVSS
49	AB075VL	VL-IGF1R (配列1)	SSELTQDPAVSVAGQTVRITC QGDSLRSYYAT WYQQKPGQAPILVIY G EN KRPS GIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYC KSRDGS QH LV FGGGTKLTVLG
50	AB011VH	VH-IGF1R (配列2)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFF SYAMN WVRQAPGKGLEWVS A ISGSGGTTFYADSVKGR FTISRDN SRT LYLQMN SLRAEDTAVYYCAK DLG WSDSY YYYY GMDV WGQGT TVTVSS
51	AB011VL	VL-IGF1R (配列2)	DIQMTQFPSSLSASVGDRTIT CRASQGIRNDL GWYQQKPKGAPKRLIY A ASRLHR GVPSRFSGSGSGTEFTLTIS SLQ PEDFATYYC LQHNSY PCSF GQGTKLEIKR
52	AB077VH	VH-IGF1R (配列3)	EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFF SFAMH WVRQAPGKGLEWIS V IDTRGATYYADSVKGR FTISRDN AKNS LYLQMN SLRAEDTAVYYCARL GN FYYGMDV WGQGT TVTVSS
53	AB077VL	VL-IGF1R (配列3)	EIVLTQSPGTLSVSPGERATLSC RASQSIGSS LHWYQQKPGQAPRLLIK Y ASQSL SGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC HQSSRL PHTF GQGTKVEIKR
54	AB005VH	VH-RON (配列1)	EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFF SYAMH WVRQAPGKGLEWVA V ISYDGSNKYYADSVKGR FTISRDN SKNT LYLQMN SLRAEDTAVYYCAR F SGWPN NYYYY GMDV WGQGT TVTVSS
55	AB005VL	VL-RON (配列1)	DVVMTQSPSLSPVTPGEPASIS CRSSQSL LHSNGFN YVD WYLQKPGQSP HLLIY FGSYRAS GV PDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDGVVY YCMQALQ T PPWTF GQGTKVEIRR
56	AB034VH	VH-RON (配列2)	QVQLQESGPGLVKPS EILSLTCTVSGGSIS SHYWSWVRQPPGKGLEWIG Y IYYSGSTNYPN SLKSRVTISVDTSKNQFSLNLS SVTAADTAVYYCARI P NY YDRSGYYPGY WYFDL WGRGTLTVTVSS
57	AB034VL	VL-RON (配列2)	QAVLTQPSLSAPPASASLTCT TLRSGFN VD SYRIS WYQQKPGSP PQYL LRY KSDSDKQ QSGVPSRFSGSGSKDASANAGILLISGLQSEDEADYYC MI WHSSAWVFGGGTKLTVLR

10

20

30

【0113】

特異的な標的に結合することができる特異的D V D結合タンパク質およびこれを作製する方法の詳細な説明は、以下の実施例の部において提供される。

40

【0114】

D. 結合タンパク質の作製

本明細書において提供される結合タンパク質は、本分野で公知の多数のいず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、D V D重鎖およびD V D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。原核または真核宿主細胞のいずれの中でも、本明細書において提供されるD V D結合タンパク質を発現することは可能であるが、真核細胞（特に、哺乳動物細胞）は、原核細胞に比べて、適切に折り畳まれ、免疫学的に活性なD V D結合タンパク質を集合および分泌する傾向がより大きいので、D V D結合タンパク質は真核細胞、例えば哺乳動物宿主細胞中で発

50

現される。

【0115】

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重鎖および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、重鎖および軽鎖遺伝子は、遺伝子の転写の高いレベルを誘導するために、各々、CMVエンハンサー／AdMPLプロモーター制御要素へ作用可能に連結されている。組換え発現ベクターは、メトトレキサート選択／増幅を用いて、ベクターで形質移入されたCHO細胞の選択を可能とするDHFR遺伝子も担持する。選択された形質転換体宿主細胞は、DVD重鎖およびDVD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結合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。DVDタンパク質が合成されるまで、適切な培地中で、本明細書において提供される宿主細胞を培養することによって、本明細書において提供されるDVDタンパク質を合成する方法も提供される。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。

10

【0116】

DVD結合タンパク質の重要な特徴は、DVD結合タンパク質が、慣用の抗体として、類似の様式で産生および精製され得ることである。DVD結合タンパク質の産生は、定常領域の配列修飾、または化学的修飾を必要とせずに、所望される二重特異的活性を有する均一な単一の主産物をもたらす。「二特異的」、「多重特異的」および「多重特異的多価」完全長結合タンパク質を作製するための他の以前に記載された方法は、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合せを有する多価完全長結合タンパク質との混合物の細胞内産生または分泌された産生をもたらし得る。

20

【0117】

驚くべきことに、本明細書において提供される「二重特異的多価完全長結合タンパク質」の設計は、主として、所望される「二重特異的多価完全長結合タンパク質」へ集合する二重可変ドメイン軽鎖および二重可変ドメイン重鎖をもたらす。

【0118】

集合され、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%、少なくとも75%および少なくとも90%が、所望の二重特異的四価タンパク質であり、したがって、増大した商用的有用性を有する。したがって、単一の細胞中で二重可変ドメイン軽鎖および二重可変ドメイン重鎖を発現し、「二重特異的四価完全長結合タンパク質」の単一の主要産物をもたらす方法が提供される。

30

【0119】

「二重特異的四価完全長結合タンパク質」の「主要産物」をもたらす単一細胞において二重可変ドメイン軽鎖および二重可変ドメイン重鎖を発現させる方法であって、「主要産物」は、二重可変ドメイン軽鎖および二重可変ドメイン重鎖を含むすべての集合されたタンパク質の50%超であり、例えば、75%超および90%超である方法が提供される。

40

【0120】

II. 結合タンパク質の使用

本明細書において提供される結合タンパク質は2つまた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)または組織免疫組織化学など慣用のイムノアッセイを用いて、(例えば、血清または血漿などの生物学的試料中で)抗原を検出するために使用することが可能である。結合タンパク質は、結合したまたは結合していない抗体の検出を促進するために、検出可能な物質で直接または間接的に標識される。適切な検出可能な物質には、様々な酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質および放射性物質が含まれる。適切な酵素の例には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクト

50

シダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼが含まれる。適切な補欠分子族複合体の例には、ストレプトアビジン／ビオチンおよびアビジン／ビオチンが含まれる。適切な蛍光物質の例には、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアナート、ロードミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリンが含まれる。発光物質の例は、ルミノールであり、適切な放射性材料の例には、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho または ^{153}Sm が含まれる。

【0121】

一実施形態において、本明細書に提供される結合タンパク質はインビトロとインビボの両方においてそれらの抗原標的の活性を中和することができる。したがって、このような結合タンパク質は、例えば、抗原を含有する細胞培地中で、ヒト対象中で、本明細書において提供される結合タンパク質が交差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可能である。別の実施形態において、抗原活性が有害である疾病または疾患に罹患している対象中の抗原活性を低下させる方法が提供される。本明細書において提供される結合タンパク質は、治療目的のために、ヒト対象に投与することができる。

【0122】

「抗原活性が有害である障害」という用語は、障害に罹患している対象における抗原の存在が、障害の病態生理に関与しているまたは障害の悪化に寄与する因子のいずれかであるまたはそれが疑われることが示されている疾患および他の障害を含むことを意図する。したがって、抗原活性が有害である疾患は、抗原活性の低下が疾患の症候および／または進行を緩和することが予測される疾患である。このような疾患は、例えば、本疾患に罹患している患者の生物学的液体中の抗原濃度の増加（例えば、対象の血清、血漿、滑液中などの抗原の濃度の増加）によって明らかとされ得る。本明細書において提供される結合タンパク質で治療することが可能な疾患の非限定的な例には、以下に、および結合タンパク質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。

【0123】

DVD結合タンパク質は、効力／安全を増強し、および／または患者の対象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。

【0124】

さらに、本明細書において提供されるDVD結合タンパク質は、細胞内送達（内部移行受容体および細胞内分子を標的化すること）、脳内への送達（血液脳関門を横切るために、トランスフェリン受容体および中枢神経系疾患媒介物質を標的化すること）など、組織特異的な送達（増強された局所PKにより、より高い効力および／またはより低い毒性を得るために、組織マーカーおよび疾病媒介物質を標的とすること）のために使用することが可能である。また、DVD結合タンパク質は、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、さらに、抗原の半減期を増加させることもできる。さらに、DVD結合タンパク質は、患者に植え込まれた医療デバイスに物理的に連結されまたはこれらの医療デバイスを標的とするように設計され得る（Burke et al.、(2006) *Advanced Drug Deliv. Rev.* 58 (3) : 437-446; Hildebrand et al.、(2006) *Surface and Coatings Technol.* 200 (22-23) : 6318-6324; Drug/device combinations for local drug therapies and infection prophylaxis、Wu (2006) *Biomaterials* 27 (11) : 2450-2467; Mediation of the cytokine network in the implantation of orthopedic devices.、Marques (2005) *Biodegradable Systems in Tissue Engineer. Regen. Med.* 377-397 参照)。要約すれば、医療用インプラントの部位へ、細胞の適切な種類

を誘導することは、正常な組織機能の治癒および回復を促進し得る。あるいは、用具に連結されたDVD、または用具を標的とするDVD-Ig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。

【0125】

A. 様々な疾病における結合タンパク質の使用

本明細書において提供される結合タンパク質分子は、様々な疾患を治療するための治療分子としても有用であり、例えば、結合タンパク質によって認識される標的は有害である。このような結合タンパク質は、特定の疾患に関与する1つ以上の標的に結合することができる。また、EGFR、RON、IGF-1R、Erb-B3および／またはHER2の阻害は、動物モデルにおいて抗腫瘍療法を増強することが示されており、原発性および転移性癌の治療に有益であり得る。

【0126】

開示を制限することなく、特定の疾患状態に関する追加情報が提供される。

【0127】

1. ヒト自己免疫および炎症性応答

膜貫通型受容体は、一般的な自己免疫および炎症反応に関与しており、例えば、喘息、アレルギー、アレルギー性肺疾患、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、線維症、嚢胞性線維症（CF）、線維性肺疾患、特発性肺線維症、肝線維症、狼瘡、B型肝炎関連肝疾患および線維症、敗血症、全身性エリテマトーデス（SLE）、糸球体腎炎、炎症性皮膚疾患、乾癬、糖尿病、インスリン依存性糖尿病、炎症性腸疾患（IBD）、潰瘍性大腸炎（UC）、クローン病（CD）、関節リウマチ（RA）、変形性関節症（OA）、多発性硬化症（MS）、移植片対宿主病（GVHD）、移植拒絶反応、虚血性心疾患（IHD）、セリアック病、接触過敏症、アルコール性肝疾患、ベーチェット病、アテローム硬化性血管疾患、眼球表面の炎症性疾患またはライム病などが挙げられる。

【0128】

本明細書において提供される結合タンパク質は、神経疾患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、本明細書において提供される結合タンパク質またはその抗原結合部分は、神経変性疾患ならびに神経再生および脊髄損傷を伴う状態を治療するために使用される。

【0129】

2. 喘息

アレルギー性喘息は、好酸球増加症、杯細胞異形成、上皮細胞の変化、気道過敏症（AHR）ならびにTh2およびTh1サイトカイン発現ならびに上昇した血清IgEレベルの存在によって特徴付けられる。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。したがって、より特異的で、標的化された治療の開発が必要とされる。

【0130】

炎症およびAHRと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、様々な結合タンパク質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. (2005) J. Exp. Med. 201 (12): 1875-1879; Lloyd et al. (2001) Adv. Immunol. 77, 263-295; Boyce et al. (2005) J. Exp. Med. 201 (12): 1869-1873; および Snibson et al. (2005) J. Brit. Soc. Allergy Clin. Immunol. 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

10

20

30

40

50

et al. (1994) Toxicol. 92 (1-3): 229-43; Descotes et al. (1992) Dev. Biol. Standard. 77: 99-102; Hart et al. (2001) J. Allergy Clin. Immunol. 108 (2): 250-257 参照)。

【0131】

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ただれを伴う。多くの炎症促進性サイトカイン、ケモカインおよび成長因子が、罹患した関節中に発現されている。結合タンパク質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 (2005) Comp. Med. 55 (2): 114-22 参照)。ヒトおよびマウスオルソログに対する親抗体の交差反応性 (例えば、ヒトおよびマウス TNF、ヒトおよびマウス IL-15 などに対する反応性) を基礎として、「適合代理抗体」由来結合タンパク質分子を用いてマウス CIA モデルにおける妥当性確認研究を行うことが可能である; 簡潔に述べると、2つ (またはそれ以上) のマウス標的特異的抗体を基礎とする結合タンパク質は、ヒト結合タンパク質構築に使用される親ヒトまたはヒト化抗体の特徴に可能な限り適合し得る (例えば、類似した親和性、類似した中和効力、類似した半減期など)。

【0132】

4. 全身性エリテマトーデス (SLE)

SLE の免疫病原性の特徴は、ポリクローナル B 細胞活性化であり、これは、高グロブリン血症、自己抗体産生および免疫複合体形成をもたらす。ヒトおよびマウスオルソログに対する親抗体の交差反応性 (例えば、ヒトおよびマウス CD20、ヒトおよびマウスインターフェロン α などに対する反応性) を基礎として、「適合代理抗体」由来結合タンパク質分子を用いてマウスループスモデルにおける妥当性確認研究を行うことが可能である。簡潔に述べると、2つ (またはそれ以上) のマウス標的特異的抗体を基礎とする結合タンパク質は、ヒト結合タンパク質構築に使用される親ヒトまたはヒト化抗体の特徴に可能な限り適合し得る (例えば、類似した親和性、類似した中和効力、類似した半減期など)。

【0133】

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。神経系を通じた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。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 および Th2 細胞などの他の T 細胞のバランス/調節を補助する、抗原発現、サイトカインおよび白血病相互作用ならびに調節性 T 細胞は、治療標的の同定のための重要な領域である。MS を治療するための結合タンパク質の有用性を評価するためのいくつかの動物モデルが、本分野において公知である (Steinman et al. (2005) Trends Immunol. 26 (11): 565-71; Lublin et al. (1985) Springer Semin. Immunopathol. 8 (3): 197-208; Genain et al. (1997) J. Mol. Med. 75 (3): 187-97; Tuohy et al. (1999) J. Exp. Med. 189 (7): 1033-42; Owens et al. (1995) Neurol. Clin. 13 (1): 51-73; および Hart et al. (2005) J. Immunol. 175 (7): 4761-8 参照)。ヒトおよび動物種オルソログに対する親抗体の交差反応性を基礎として、「適合代理抗体」由来結合タンパク質分子を用いてマウス EAE モデルにおける妥当性確認研究を行うことが可能である。簡潔に述べると、2つ (またはそれ以上) のマウス標的特異的抗体を基礎とする結合タンパク質は、ヒト結合タンパク質構築に使用される親ヒトまたはヒト化抗体の特徴に可能な限

り適合し得る（例えば、類似した親和性、類似した中和効力、類似した半減期など）。同じ概念は他の非げっ歯類種の動物モデルに当てはまり、「適合代理抗体」由来結合タンパク質は予期される薬理学および場合によると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. (1994) Toxicol. 92 (1-3): 229-43; Descotes et al. (1992) Devel. Biol. Standard. 77: 99-102; Jones (2000) I Drugs 3 (4): 442-6）参照）。

【0134】

6. 敗血症

圧倒的な炎症性応答および免疫応答は、敗血症性ショックの本質的な特徴であり、敗血症によって誘導される組織損傷、多臓器不全および死亡の病因において中心的な役割を果たす。サイトカインは、敗血症性ショックの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。一実施形態は、敗血症に関与する1つ以上の標的に結合することができる結合タンパク質に関する。敗血症を治療するためのこのような結合タンパク質の有効性は、当該技術分野で公知の前臨床動物モデルにおいて評価することができる（Burasら（2005）Nat. Rev. Drug Discov. 4 (10): 854-65およびCalandraら（2000）Nat. Med. 6 (2): 164-70を参照されたい。）。

【0135】

7. 神経疾患

a. 神経変性疾患

神経変性疾患は、通常、それらが年齢依存性である場合においては慢性でありまたは急性（例えば、脳卒中、外傷性脳損傷、脊髄損傷など）である。それらは、神経機能の進行性の喪失（例えば、神経細胞死、軸索損失、神経炎性ジストロフィー、脱髄）、運動能力の喪失および記憶喪失によって特徴付けられる。これらの慢性神経変性疾患は、複数の細胞種および媒介物質の間で複雑な相互作用を示す。このような疾病に対する治療戦略は限られており、非特異的な抗炎症剤（例えば、コルチコステロイド、COX阻害剤）または神経細胞の喪失および／またはシナプス機能を抑制するための作用物質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。1を超える疾患媒介物を標的とする特定の治療は、単一の疾患メカニズムを標的にして観察されるものよりも、慢性神経変性疾患のさらにより良好な治療効果を提供することができる（Deaneら（2003）Nature Med. 9: 907-13; およびMasliahら（2005）Neuron. 46: 857を参照されたい。）。

【0136】

本明細書において提供される結合タンパク質分子は、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つ以上の標的に結合することが可能である。結合タンパク質分子の効力は、アミロイド前駆体タンパク質またはRAGEを過剰発現し、アルツハイマー病様の症候を発症するトランスジェニックマウスなどの前臨床動物モデルで妥当性を確認することが可能である。さらに、結合タンパク質分子を構築し、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、最良の治療的結合タンパク質を選択することができる。結合タンパク質分子は、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。

【0137】

b. 神経細胞の再生および脊髄損傷

病的機序の知見の増大にかかわらず、脊髄損傷（SCI）は、なお、多大な損害を与える症状であり、高い医学的な要求を特徴とする医学的な適応症である。多くの脊髄損傷は、挫傷または圧迫傷害であり、通常、一次損傷に続いて、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）をもたらす二次的な損傷機序（炎症媒介物質、例え

ば、サイトカインおよびケモカイン）が起こる。結合タンパク質分子の効力は、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、これらの結合タンパク質分子を構築し、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、最良の治療的結合タンパク質を選択することができる。一般に、抗体は、脳血液関門（BBB）を効率的およ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、脳卒中、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、結合タンパク質および抗体の脳内への増加した浸透を許容する。BBBの漏出が起こらない他の神経症状では、グルコースおよびアミノ酸担体などの担体媒介性輸送体ならびにBBBの血管内皮における受容体媒介性トランスサイトosis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することができ、これにより、結合タンパク質のトランス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、限定されないが、インスリン受容体、トランスフェリン受容体、LRPおよびRAGEが含まれる。さらに、戦略は、低分子量の薬物、ナノ粒子および核酸を含む、CNSへ潜在的薬物を輸送するためのシャトルとして結合タンパク質を使用することも可能である（Coloma et al. (2000) Pharm Res. 17 (3): 266-74; Boado et al. (2007) Bioconj. Chem. 18 (2): 447-55）。

10

【0138】

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法として登場している（von Mehren et al. (2003) Annu. Rev. Med. 54: 343-69）。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。

20

【0139】

一実施形態において、本明細書において提供される組成物および方法を用いて治療または診断され得る疾患には、限定されないが、乳房、結腸、直腸、肺、中咽頭、下咽頭、食道、胃、脾臓、肝臓、胆嚢および胆管、小腸、尿路（腎臓、膀胱および尿路上皮を含む。）、女性生殖路（子宮頸部、子宮および卵巣ならびに絨毛癌および妊娠性絨毛性疾患を含む。）、男性生殖路（前立腺、精嚢、精巣および生殖細胞腫瘍を含む。）、内分泌腺（甲状腺、副腎および下垂体を含む。）および皮膚の癌腫ならびに血管腫、悪性黒色腫、肉腫（骨および軟部組織から生じるものならびにカポジ肉腫を含む。）、脳、神経、眼および髄膜の腫瘍（星状膠細胞腫、神経膠腫、神経膠芽細胞腫、網膜芽細胞腫、神経腫、神経芽細胞腫、シュワン細胞腫および髄膜腫を含む。）、白血病などの造血性悪性病変から生じる固形腫瘍およびリンパ腫（ホジキンリンパ腫と非ホジキンリンパ腫の両方）を含む原発性および転移性の癌が挙げられる。

30

【0140】

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

40

【0141】

9. 遺伝子治療

特定の実施形態において、本明細書において提供される結合タンパク質をコードする核酸配列または本明細書において提供される別の予防薬もしくは治療薬は、遺伝子治療を手段として、障害または1つ以上の症状を治療、予防、管理または改善するために投与される。遺伝子治療とは、発現されたまたは発現可能な核酸の対照への投与によって行われる治療を指す。この実施形態において、核酸は、予防効果または治療効果を媒介する本明細書において提供されるそれらによってコードされた抗体または予防薬もしくは治療薬を生成する。

【0142】

50

当該技術分野において利用可能である遺伝子治療のための方法のいずれかは、本明細書において提供される方法において使用され得る。遺伝子治療の方法に関する一般的な概説については、Goldspielら(1993) Clin. Pharmacy 12: 488-505; WuおよびWu(1991) Biotherapy 3: 87-95; Tolstoshev(1993) Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32: 573-596; Mulligan(1993) Science 260: 926-932; MorganおよびAnderson(1993) Ann. Rev. Biochem. 62: 191-217; ならびにMay(1993) TIBTECH 11(5): 155-215を参照されたい。使用することができる組換えDNA技術の、当該技術分野において一般的に知られている方法は、Ausubelら(編集)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY(1993); およびKriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY(1990)に記載されている。遺伝子治療の様々な方法の詳細な説明は、米国特許出願公開第US 20050042664号に開示されている。

【0143】

III. 医薬組成物

単独または予防薬、治療薬および／または医薬として許容される担体と組み合わせた、1つ以上の結合タンパク質を含む医薬組成物が提供される。本明細書において提供される結合タンパク質を含む医薬組成物は、疾患を診断し、検出し、もしくはモニタリングし、疾患または1つもしくはそれ以上のその症候を予防し、治療し、管理し、もしくは軽減する上で、および／または研究において使用されるが、これらに限定されない。単独または予防薬、治療薬および／または医薬として許容される担体と組み合わせた医薬組成物の製剤は、当業者に公知である(米国特許出願公開第20090311253A1)。

【0144】

本明細書において提供される予防薬または治療薬を投与する方法には、限定されないが、非経口投与(例えば、皮内、筋内、腹腔内、静脈内および皮下)、硬膜外投与、腫瘍内投与、粘膜投与(例えば、鼻腔内および経口経路)および経肺投与(例えば、吸入器または噴霧器を用いて投与されるエアロゾル化合物)が挙げられる。特定の投与経路のための医薬組成物の製剤ならびに投与の様々な方法に必要とされる材料および技術が利用可能であり、当業者に公知である(米国特許出願公開第20090311253A1)。

【0145】

投与計画は、最適な所望の反応(例えば、治療的または予防的反応)を提供するように調整されてもよい。例えば、単回ボラスが投与されてもよく、いくつかに分割した用量は経時的に投与されてもよく、または用量は比例的に減少されてもよくもしくは治療状況の緊急性によって示されるように増加されてもよい。投与の容易性および投与量の均一性のために投薬単位形態において非経口組成物を処方することが特に有利である。「投薬単位形態」という用語は、処置されるべき哺乳動物対象のための単位用量として適した物理的に別個の単位を指し; それぞれの単位は、必要とされる医薬的担体と共に所望の治療効果を生じるように計算された所定量の活性化化合物を含有する。本明細書において提供される投薬単位形態の仕様は、(a) 活性化化合物の固有の特性および達成されるべき特定の治療効果または予防効果および(b) 個体における感受性の処置のために、このような活性化化合物の配合に関する当該技術分野における固有の制限、によって決定され、直接的に依存する。

【0146】

本明細書において提供される結合タンパク質の治療的または予防的な有効量についての例示的であり、非限定的な範囲は、0.1-20 mg/kgであり、例えば、1-10 mg/kgである。用量値は、緩和されるべき状態の種類および重症度によって変化し得ることに留意すべきである。いずれかの特定の対象について、特定の投薬処方、個々の必

要性および組成物を投与しまたは投与を管理している者の専門的な判断に従って、経時的に調整されてもよく、本明細書において記載されている用量範囲は、単に例示的であり、請求される組成物の範囲または実施を制限することを意図していないことはさらに理解されるべきである。

【0147】

IV. 併用療法

本明細書において提供される結合タンパク質はまた、種々の疾患の治療に有用な1つ以上の追加の治療薬とともに投与することができ、追加の薬剤は、その意図される目的で当業者によって選択される。例えば、追加の薬剤は、本明細書において提供される抗体によって治療される疾患または状態の治療に有用であるとして当該技術分野において認識されている治療薬であり得る。組合せは、1を超える追加の薬剤、例えば、2つまたは3つの追加の薬剤を含むことができる。

10

【0148】

併用療法剤には、限定されないが、抗腫瘍剤、放射線療法、化学療法、例えばDNAアルキル化剤、シスプラチン、カルボプラチン、抗チューブリン剤、パクリタキセル、ドセタキセル、タキソール、ドキシソルビシン、ゲムシタビン、ジェムザール、アントラサイクリン、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、ゲフィチニブ)、COX-2阻害剤(例えば、セレコキシブ)、キナーゼ阻害剤およびsiRNAが含まれる。

20

【0149】

本明細書において提供される結合タンパク質と組み合わせることができる化学療法剤の非制限的な例には、以下: 13-cis-レチノイン酸; 2-CdA; 2-クロロデオキシアデノシン; 5-アザシチジン; 5-フルオロウラシル; 5-FU; 6-メルカプトプリン; 6-MP; 6-TG; 6-チオグアニン; アブラキサン; Accutane (登録商標); アクチノマイシン-D; Adriamycin (登録商標); Adrucil (登録商標); Afinitor (登録商標); Agrylin (登録商標); Ala-Cort (登録商標); アルデスロイキン; アレムツズマブ; ALIMTA; アリトレチノイン; Alkaban-AQ (登録商標); Alkeran (登録商標); オールトランスレチノイン酸; アルファインターフェロン; アルトレタミン; アメトプテリン; アミホスチン; アミノグルテチミド; アナグレリド; Anandron (登録商標); アナストロゾール; アラビノシルシトシン; Ara-C Aranesp (登録商標); Aredia (登録商標); Arimidex (登録商標); Aromasin (登録商標); Arranon (登録商標); 三酸化ヒ素; Arzerra (商標); アスパラギナーゼ; ATRA; Avastin (登録商標); アザシチジン; BCG; BCNU; ベンダムスチン; ベバシズマブ; ベキサロテン; BEXXAR (登録商標); ビカルタミド; BiCNU; Blenoxane (登録商標); プレオマイシン; ボルテゾミブ; ブスルファン; Busulfex (登録商標); C225; カルシウムロイコボリン; Campath (登録商標); Camptosar (登録商標); Camptothecin-11; カベシタビン; Carac (商標); カルボプラチン; カルムスチン; カルムスチンウエハー; Casodex (登録商標); CC-5013; CCI-779; CCNU; CDDP; CeeNU; Cerubidine (登録商標); セツキシマブ; クロラムブシル; シスプラチン; シトロボラム因子; クラドリビン; コルチゾン; Cosmegen (登録商標); CPT-11; シクロフォスファミド; Cytadren (登録商標); シタラビン; シタラビンリボゾーマル; Cytosar-U (登録商標); Cytosan (登録商標); ダカルバジン; ダコゲン; ダクチノマイシン; ダルベポエチンアルファ; ダサチニブ; ダウノマイシン; ダウノルビシン; 塩酸ダウノルビシン; ダウノルビシンリボゾーマル; Daunoxome (登録商標); デカドロン; デシタビン; Delta-Cortef (登録商標); Deltasone (登録商標); デニロイキン; ジフチトクス; DepoCyt (商標); デキサメタゾン; 酢酸デキサメタゾン; リン酸デキサメタゾ

30

40

50

ンナトリウム；デキサゾン；デクスラゾキサン；DHAD；DIC；ジオデックス；ドセ
 タキセル；Doxil（登録商標）；ドキソルビシン；ドキソルビシンリポゾーマル；D
 roxia（商標）；DTIC；DTIC-Dome（登録商標）；Duralone（
 登録商標）；Efudex（登録商標）；Eligard（商標）；Ellence（商
 標）；Eloxatin（商標）；Elspar（登録商標）；Emcyt（登録商標）
 ；エピルビシン；エポエチンアルファ；エルビタックス；エルロチニブ；エルウィニア
 L-アスパラギナーゼ；エストラムスチン；エチオール；Etopophos（登録商標）
 ；エトポシド；リン酸エトポシド；Eulexin（登録商標）；エベロリムス；Ev
 ista（登録商標）；エキセメスタン；Fareston（登録商標）；Faslod
 ex（登録商標）；Femara（登録商標）；フィルグラスチム；フロクスウリジン；
 Fludara（登録商標）；フルダラビン；Fluoroplex（登録商標）；フル
 オロウラシル；フルオロウラシル（クリーム）；フルオキシムエステロン；フルタミド；
 フォリン酸；FUDR（登録商標）；フルベストラント；ゲフィチニブ；ゲムシタビン；
 ゲムツズマブオゾガマイシン；ジェムザール；Gleevec（商標）；Gliadel
 （登録商標）ウエハー；GM-CSF；ゴセレリン；顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）
 ；顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）；Halotestin
 （登録商標）；Herceptin（登録商標）；ヘキサドロール；Hexalen（登
 録商標）；ヘキサメチルメラミン；HMM；Hycamtin（登録商標）；Hydre
 a（登録商標）；Hydrocort Acetate（登録商標）；ヒドロコルチゾン
 ；リン酸ヒドロコルチゾンナトリウム；コハク酸ヒドロコルチゾンナトリウム；リン酸ハ
 イドロコルチン；ヒドロキシ尿素；イブリツモマブ；イブリツモマブチウキセタン；Id
 amycin（登録商標）；Idarubicin Ifex（登録商標）；インターフ
 エロン-アルファ；インターフェロン-アルファ-2b（PEGコンジュゲート）；イホ
 スファミド；インターロイキン-11（IL-11）；インターロイキン-2（IL-2）
 ；メシル酸イマチニブ；イミダゾールカルボキサミド；Intron A（登録商標）
 ；Iressa（登録商標）；イリノテカン；イソトレチノイン；イキサベピロン；Ix
 empra（商標）；キドロラーゼ（t）；Lanacort（登録商標）；ラパチニブ
 ；L-アスパラギナーゼ；LCR；レナリドミド；レトロゾール；ロイコボリン；リユー
 ケラン；Leukine（商標）；ロイプロリド；ロイコクリスチン；Leustatin
 （商標）；リポゾーマルAra-C；Liquid Pred（登録商標）；ロムスチ
 ン；L-PAM；L-サルコリジン；Lupron（登録商標）；Lupron Dep
 ot（登録商標）；Matulane（登録商標）；マキシデックス；メクロレタミン；
 塩酸メクロレタミン；Medralone（登録商標）；Medrol（登録商標）；M
 egace（登録商標）；メゲストロール；酢酸メゲストロール；メルファラン；メルカ
 プトプリン；メスナ；メスネックス（商標）；メトトレキサート；メトトレキサートナト
 リウム；メチルプレドニゾロン；Meticorten（登録商標）；マイトマイシン；
 マイトマイシン-C；ミトキサントロン；M-Prednisol（登録商標）；MTC
 ；MTX；Mustargen（登録商標）；ムスチン；Mutamycin（登録商標）
 ；Myleran（登録商標）；Myllocel（商標）；Mylotarg（登録商標）
 ；Navelbine（登録商標）；ネララビン；Neosar（登録商標）；Ne
 ulasta（商標）；Neumega（登録商標）；Neupogen（登録商標）；
 Nexavar（登録商標）；Nilandron（登録商標）；ニルタミド；Nipe
 nt（登録商標）；Nitrogen Mustard Novaldex（登録商標）
 ；Novantrone（登録商標）；エヌプレート；オクトレオチド；酢酸オクトレオ
 チド；オクタツムマブ；Oncospar（登録商標）；Oncovin（登録商標）；
 Ontak（登録商標）；Onxal（商標）；オブレルベキン；Orapred（登録
 商標）；Orasone（登録商標）；オキサリプラチン；パクリタキセル；タンパク質
 に結合したパクリタキセル；パミドロネート；パニツムマブ；Panretin（登録商
 標）；Paraplatin（登録商標）；パゾパニブ；Pediapred（登録商標）
 ；PEGインターフェロン；ペグアスパラガーゼ；ペグフィルグラスチム；PEG-I

N T R O N (商標) ; P E G - L - アスパラギナーゼ ; ペメトレキセド ; ペントスタチン ; フェニルアラニンマスタード ; P l a t i n o l (登録商標) ; P l a t i n o l - A Q (登録商標) ; プレドニゾロン ; プレドニゾン ; P r e l o n e (登録商標) ; プロカルバジン ; P R O C R I T (登録商標) ; P r o l e u k i n (登録商標) ; カルムスチンインプラントを伴うプロリフェブロスパン 20 ; P u r i n e t h o l (登録商標) ; ラロキシフェン ; R e v l i m i d (登録商標) ; R h e u m a t r e x (登録商標) ; R i t u x a n (登録商標) ; リツキシマブ ; R o f e r o n - A (登録商標) ; ロミブロスチン ; R u b e x (登録商標) ; 塩酸ルビドマイシン ; S a n d o s t a t i n (登録商標) ; S a n d o s t a t i n L A R (登録商標) ; サーグラモスティム ; S o l u - C o r t e f (登録商標) ; S o l u - M e d r o l (登録商標) ; ソラフェニブ ; S P R I C E L (商標) ; S T I - 571 ; ストレプトゾシン ; S U 11248 ; スニチニブ ; S u t e n t (登録商標) ; T a m o x i f e n T a r c e v a (登録商標) ; T a r g r e t i n (登録商標) ; T a s i g n a (登録商標) ; T a x o l (登録商標) ; T a x o t e r e (登録商標) ; T e m o d a r (登録商標) ; テモゾロマイド ; テムシロリムス ; テニボシド ; T E S P A ; サリドマイド ; T h a l o m i d (登録商標) ; T h e r a C y s (登録商標) ; チオグアニン ; T h i o g u a n i n e T a b l o i d (登録商標) ; チオホスファミド T h i o p l e x (登録商標) ; チオテパ ; T I C E (登録商標) ; T o p o s a r (登録商標) ; トポテカン ; トレミフェン ; T o r i s e l (登録商標) ; トシツモマブ ; トラスツズマブ ; T r e a n d a (登録商標) ; トレチノイン ; T r e x a l l (商標) ; T r i s e n o x (登録商標) ; T S P A ; T Y K E R B (商標) ; V C R ; V e c t i b i x (商標) ; V e l b a n (登録商標) ; V e l c a d e (登録商標) ; V e p e s i d (登録商標) ; V e s a n o i d (登録商標) ; V i a d u r (商標) ; V i d a z a (登録商標) ; ビンブラスチン ; 硫酸ビンブラスチン ; V i n c a s a r - P f s (登録商標) ; ビンクリスチン ; ビノレルビン ; 酒石酸ビノレルビン ; V L B ; V M - 26 ; ボリノスタット ; ヴォトリエント ; V P - 16 ; V u m o n (登録商標) ; X e l o d a (登録商標) ; Z a n o s a r (登録商標) ; Z e v a l i n (商標) ; Z i n e c a r d (登録商標) ; Z o l a d e x (登録商標) ; ゴレドロン酸 ; ゴリンザ ; または Z o m e t a (登録商標) が含まれる。

【0150】

自己免疫疾患および炎症性疾患を治療するための組合せは、イブプロフェンのような薬剤を含む、N S A I D S ととも称される非ステロイド性抗炎症薬（単数または複数）である。他の組合せは、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、本明細書において提供される結合タンパク質と組み合わせて患者を治療するときに必要とされるステロイド用量を徐々に減らすことによって、低減することが可能でありまたは除去することさえ可能である。本明細書において提供される抗体またはその抗体結合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：サイトカイン抑制抗炎症薬（単数または複数）（C S A I D）；他のヒトサイトカインまたは増殖因子、例えば、T N F、L T、I L - 1、I L - 2、I L - 3、I L - 4、I L - 5、I L - 6、I L - 7、I L - 8、I L - 15、I L - 16、I L - 18、I L - 21、I L - 23、インターフェロン、E M A P - I I、G M - C S F、F G F および P D G F に対する抗体またはこれらのアンタゴニストが含まれる。本明細書において提供される結合タンパク質またはその抗原結合部分は、C D 2、C D 3、C D 4、C D 8、C D 25、C D 28、C D 30、C D 40、C D 45、C D 69、C D 80 (B7. 1)、C D 86 (B7. 2)、C D 90、C T L A または C D 154 を含むこれらのリガンド (g p 39 または C D 40 L) 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できる。

【0151】

治療剤の組合せは、異なる点で、自己免疫およびこれに続く炎症カスケードを干渉し得る。例には、本明細書において開示される結合タンパク質、ならびにキメラ、ヒト化またはヒト T N F 抗体、アダリムマブ (P C T 公開第 W O 97/29131 号)、C A 2 (R

emicade (商標))、CDP571、可溶性p55もしくはp75TNF受容体、またはこれらの誘導体(p75TNFR1gG(Enbre1(商標))またはp55TNFR1gG(Lenercept))およびTNF α 変換酵素(TACE)阻害剤のようなTNFアンタゴニスト;または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)が挙げられる。他の組合せには、本明細書において開示される結合タンパク質およびインターロイキン11が含まれる。さらに別の組合せには、IL-12機能と平行して、IL-12機能に依存してまたはIL-12と協調して作用し得る自己免疫応答の中心的プレーヤーが含まれる;特に、IL-18抗体または可溶性IL-18受容体またはIL-18結合タンパク質などのIL-18アンタゴニストが関連する。IL-12およびIL-18は重複しているが、異なる機能を有しており、両者に対するアンタゴニストの組合せは、最も有効であり得ることが示されている。さらに別の組合せは、本明細書において開示される結合タンパク質と非枯渇性抗CD4阻害剤である。さらに他の組合せには、本明細書において開示される結合タンパク質と、抗体、可溶性受容体または拮抗性リガンドを含む、共同刺激経路CD80(B7.1)またはCD86(B7.2)のアンタゴニストが含まれる。

10

【0152】

本明細書において提供される結合タンパク質はまた、薬剤と併用されてもよく、例えば、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(pencilamine)、金チオリンゴ酸塩(筋内および経口)、アザチオプリン、コルヒチン(cochicine)、コルチコステロイド(経口、吸入および局所注射)、 β -2アドレナリン受容体アゴニスト(サルブタモール、テルブタリン、サルメテラル)、キサンチン(テオフィリン、アミノフィリン)、クロモグリカート、ネドクロミル、ケトチフェン、イプラトロピウム、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、プレドニゾンなどのコルチコステロイド、ホスホジエステラーゼ阻害剤、アデノシンアゴニスト、抗血栓剤、補体阻害剤、アドレナリン作用薬、TNF α またはIL-1などの炎症促進性サイトカインによるシグナル伝達を妨害する薬剤(例えば、IRAK、NIK、IKK、p38またはMAPキナーゼ阻害剤)、IL-1 β 変換酵素阻害剤、TNF α 変換酵素(TACE)阻害剤、キナーゼ阻害剤などのT細胞シグナル伝達阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、スルファサラジン、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、可溶性サイトカイン受容体およびそれらの誘導体(例えば、可溶性p55またはp75TNF受容体または誘導体p75TNFR1gG(Enbre1(商標))およびp55TNFR1gG(Lenercept))、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R)、炎症抑制性サイトカイン(例えば、IL-4、IL-10、IL-11、IL-13およびTGF β)、セレコキシブ、葉酸、硫酸ヒドロキシクロロキン、ロフェコキシブ、エタネルセプト、インフリキシマブ、ナプロキセン、バルデコキシブ、スルファサラジン、メチルプレドニゾン、メロキシカム、酢酸メチルプレドニゾン、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、プロボキシフェンナブシラート/apap、フォラート、ナブメトン、ジクロフェナク、ピロキシカム、エトドラク、ジクロフェナクナトリウム、オキサプロジン、塩酸オキシコドン、ヒドロコドン二酒石酸塩/apap、ジクロフェナクナトリウム/ミソプロストール、フェンタニル、アナキンラ、ヒト組み換え、塩酸トラマドール、サルサラート、スリンダク、シアノコバラミン/fa/ピリドキシン、アセトアミノフェン、アレンドロナートナトリウム、プレドニゾン、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、CTL4-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-48

20

30

40

50

5、CDC-801およびメソプラムなどの作用物質とも組み合わせられ得る。組合せには、メトトレキサートまたはレフルノミドとシクロスポリンが含まれる。

【0153】

一実施形態において、結合タンパク質またはその抗原結合部分は、関節リウマチの治療用の以下の薬剤の1つと併用して投与される：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ngo酸ナトリウム；アスピリン；アザチオプリン；トリウムシノロンアセトニド；プロブキシフェンナブシラート/apap；
 フォラート；ナブメトン；ジクロフェナク；ピロキシカム；エトドラク；ジクロフェナクナトリウム；オキサプロジン；塩酸オキシコドン；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-1
 5；BIRB-796；SCIO-469；VX-702；AMG-548；VX-740；ロフルミラスト；IC-485；CDC-801またはメソプラム。

【0154】

本明細書において提供される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：ブデノシド；上皮細胞増殖因子；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-1 β mAb；抗IL-6mAb；増殖因子；エラスターゼ阻害剤；ピリジニル-イミダゾール化合物；他のヒトサイトカインまたは増殖因子、例えば、TNF、LT、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、EMAP-11、GM-CSF、FGFおよびPDGFに対する抗体またはこれらのアンタゴニストが含まれる。本明細書において提供される抗体またはその抗原結合部分は、CD2、CD3、CD4、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD90またはそ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できる。本明細書において提供される抗体またはその抗原結合部分はまた、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、TNF α またはIL-1
 などの炎症促進性サイトカインによるシグナル伝達を妨害する作用物質（例えば、IRAK、NIK、IKK、p38またはMAPキナーゼ阻害剤）、IL-1 β 変換酵素阻害剤、TNF α 変換酵素阻害剤、キナーゼ阻害剤などのT細胞シグナル伝達阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、スルファサラジン、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、可溶性サイトカイン受容体およびそれらの誘導体（例えば、可溶性p55またはp75TNF受容体、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R）または炎症抑制性サイトカイン（例えば、IL-4、IL-10、IL-11、IL-13またはTGF β ）またはbc1-2阻害剤などの薬剤とも組み合わせられ得る。

【0155】

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

：TNFアンタゴニスト、例えば、抗TNF抗体、アダリムマブ（PCT公開第WO97/29131号；HUMIRA）、CA2（REMICADE）、CDP571、TNFR-Ig構築物、（p75TNFR-IgG（ENBREL）またはp55TNFR-IgG（LENERCEPT））阻害剤またはPDE4阻害剤が含まれる。本明細書において提供される抗体またはその抗原結合部分は、コルチコステロイド、例えば、ブデノシドおよびデキサメタゾンと組み合わせることができる。本明細書において提供される結合タンパク質またはこれらの抗原結合部分はまた、スルファサラジン、5-アミノサリチル酸およびオルサラジンなどの薬剤、ならびにIL-1などの炎症促進性サイトカインの合成または作用を妨害する薬剤、例えば、IL-1 β 変換酵素阻害剤またはIL-1raと組み合わせ得る。本明細書において提供される抗体またはその抗原結合部分はまた、T細胞シグナル伝達阻害剤、例えば、チロシンキナーゼ阻害剤または6-メルカプトプリンとともに使用され得る。本明細書において提供される結合タンパク質またはその抗原結合部分は、IL-11と組み合わせることができる。本明細書において提供される結合タンパク質また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、ジフェノキシレート/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、フォレート、シプロフロキサシン/デキストロースー水、重酒石酸ヒドロコドン/apap、テトラサイクリン塩酸塩、フルオシノニド、メトロニダゾール、チメロサル/ホウ酸、コレステラミン/スクロース、塩酸シプロフロキサシン、硫酸ヒヨスチアミン、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、メチルプレドニソロン、ナタリズマブまたはインターフェロンガンマと組み合わせることができる。

【0156】

本明細書において提供される結合タンパク質とともに組み合わせることが可能な多発性硬化症に対する治療剤の非限定的な例には、以下：コルチコステロイド；プレドニゾロン；メチルプレドニゾロン；アザチオプリン；シクロホスファミド；シクロスポリン；メトトレキサート；4-アミノピリジン；チザニジン；インターフェロン- β 1a（AVONEX；Biogen）；インターフェロン- β 1b（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- β 1A-IF（Serono/Inhale Therapeutics）、PEGインターフェロン α 2b（Enzon/Schering-Plough）、コポリマー1（Copoly1；COPAXONE；Teva Pharmaceutical Industries, Inc.）；高圧酸素；静脈内免疫グロブリン；クラブリピン；他のヒトサイトカインまたは成長因子およびこれらの受容体（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またはPDGF）に対する抗体もしくはアンタゴニストが含まれる。本明細書において提供される結合タンパク質は、CD2、CD3、CD4、CD8、CD19、CD20、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD80、CD86、CD90またはそ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できる。本明細書において提供される結合タンパク質はまた、メトトレキサート、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノレート・モフェチル、レフルノミド、NSAID、例えば、イブプロフェン、プレドニゾロンなどのコルチコステロイド、ホスホジエステラーゼ阻害剤、アデノシンアゴニスト、抗血栓剤、補体阻害剤、アドレナリン作用薬、TNF α またはIL-1などの炎症促進性サイトカインによるシグナル伝達を妨害する作用物質（例えば、IRAK、NIK、IKK、p38またはMAPキナーゼ阻害剤）、IL-

10

20

30

40

50

1 β 変換酵素阻害剤、TACE阻害剤、キナーゼ阻害剤などのT細胞シグナル伝達阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、スルファサラジン、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、可溶性サイトカイン受容体およびそれらの誘導体（例えば、可溶性p55またはp75TNF受容体、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R）または炎症抑制性サイトカイン（例えば、IL-4、IL-10、IL-13またはTGF β ）またはbc1-2阻害剤などの薬剤と組み合わせられ得る。

【0157】

本明細書において提供される結合タンパク質を組み合わせることが可能な多発性硬化症のための治療剤の例には、インターフェロン β 、例えば、IFN β 1aおよびIFN β 1b；コパキソン、コルチコステロイド、カスパーゼ阻害剤、例えばカスパーゼ-1の阻害剤、IL-1阻害剤、TNF阻害剤ならびにCD40リガンドおよびCD80に対する抗体が含まれる。

【0158】

本明細書において提供される結合タンパク質とともに組み合わせることが可能な喘息に対する治療剤の非限定的な例には、以下：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、トリウムシノロンアセトニド、ニプロピオン酸ベクロメタゾン、イプラトロピウム臭化物、アジスロマイシン、酢酸ビルブテロール、プレドニゾン、テオフィリン無水物、コハク酸メチルプレドニゾロンナトリウム、クラリスロマイシン、ザフィルルカスト、フマル酸フォルモテロール、インフルエンザウイルスワクチン、メチルプレドニゾン、アミノキシシリン三水合物、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、塩酸マキシフロキサシン、ドキシサイクリン水和物（hydrate）、グアイフェネシン／d-メトルファン、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、p-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prozil、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、メチルプレドニゾン、硫酸メタプロテレノールが含まれる。

【0159】

本明細書において提供される結合タンパク質とともに組み合わせることが可能なCOPDに対する治療剤の非限定的な例には、以下：硫酸アルブテロール／イプラトロピウム、イプラトロピウムプロミド、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、トリウ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合物、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、メチルプレドニゾン、フロ酸モメタゾン、p-エフェドリン／cod／クロルフェニル、酢酸ビルブテロール、p-エフェドリン／ロラタジン、硫酸テルブタリン、チオトロピウムプロミド、(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。

【0160】

本明細書において提供される結合タンパク質とともに組み合わせることが可能な乾癬に対する治療剤の非限定的な例には、以下：KDRの小分子阻害剤、Tie-2の小分子阻

10

20

30

40

50

害剤、カルシポトリエン、プロピオン酸クロベタゾール、トリウムシノロンアセトニド、プロピオン酸ハロベタゾール、タザロテン、メトトレキサート、フルオシノニド、増強された (a u g m e n t e d) ニ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、プラモキシシ／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 (e m o l l) 、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、h c / 次没食子酸ビスマス (b i s m u t h s u b g a l) / 酸化亜鉛 (z n o x) / r e s o r、酢酸メチルプレドニゾロン、プレドニゾロン、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、鈹物油／ひまし油／n a l a c t、鈹物油／落花生油、石油／ミリスチン酸イソプロピル、ソラーレン、サリチル酸、石鹼／トリブロムサラン、チメロサル／ホウ酸、セレコキシブ、インフリキシマブ、シクロスポリン、アレファセプト、エファリズマブ、タクロリムス、ピメクロリムス、P U V A、U V B、スルファサラジンが含まれる。

10

【0161】

本明細書において提供される結合タンパク質を組み合わせることが可能な S L E (狼瘡) に対する治療剤の例には、以下：N S A I D、例えば、ジクロフェナク、ナプロキセン、イブプロフェン、ピロキシカム、インドメタシン；C O X 2 阻害剤、例えば、セレコキシブ、ロフェコキシブ、バルデコキシブ；抗マラリア剤、例えば、ヒドロキシクロロキン；ステロイド、例えば、プレドニゾン、プレドニゾロン、ブデノシド、デキサメタゾン；細胞障害剤、例えば、アザチオプリン、シクロホスファミド、ミコフェノラートモフェチル、メトトレキサート；P D E 4 の阻害剤またはプリン合成阻害剤、例えば、C e l l c e p t が含まれる。本明細書において提供される結合タンパク質はまた、薬剤と併用されてもよく、例えば、スルファサラジン、5-アミノサリチル酸、オルサラジン、イムランならびに I L-1 などの炎症促進性サイトカインの合成、産生または作用を妨害する作用物質、例えば、I L-1 β 変換酵素阻害剤および I L-1 r a のようなカスパーゼ阻害剤とも組み合わせられ得る。本明細書において提供される結合タンパク質はまた、T 細胞シグナル伝達阻害剤、例えば、チロシンキナーゼ阻害剤；または T 細胞活性化分子を標的とする分子、例えば、C T L A-4-I g G または抗 B 7 抗体ファミリー抗体、抗 P D-1 ファミリー抗体とともに使用され得る。本明細書において提供される結合タンパク質は、I L-1 1 または抗サイトカイン抗体、例えば、ホノトリズマブ (抗 I F N γ 抗体) または抗受容体受容体抗体、例えば、抗 I L-6 受容体抗体および B 細胞表面分子に対する抗体と組み合わせることができる。本明細書において提供される抗体またはその抗原結合部分はまた、L J P 3 9 4 (アベチムス)、B 細胞を枯渇させまたは不活化する薬剤、例えば、リツキシマブ (抗 C D 2 0 抗体)、リンホスタット-B (抗 B l y s 抗体)、T N F アンタゴニスト、例えば、抗 T N F 抗体、アダリムマブ (P C T 公開第 W O 9 7 / 2 9 1 3 1 号；H U M I R A)、C A 2 (R E M I C A D E)、C D P 5 7 1、T N F R-I g 構築物 (p 7 5 T N F R I g G (E N B R E L) および p 5 5 T N F R I g G (L E N E R C E P T)) および b c l-2 阻害剤 (トランスジェニックマウスにおける b c l-2 過剰発現が狼瘡様表現型をもたらすことが実証されているためである (M a r q u i n a 参照)。) とともに使用され得る。

20

30

40

【0162】

本明細書において提供される医薬組成物は、本明細書において提供される結合タンパク質の「治療的有効量」または「予防的有効量」を含み得る。「治療的有効量」は、所望の治療的結果を達成するための投薬量で、および所望の治療的結果を達成するために必要な期間にわたって有効な量を表す。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、病状、年齢、性別および個体の体重ならびに結合タンパク質が個体内で所望の応

50

答を惹起する能力などの因子に従って変動し得る。治療の有効量は、抗体または抗体部分のあらゆる毒性効果または有害効果が、治療的に有益な効果によって凌駕される量でもある。「予防的有効量」は、所望の予防的結果を達成するために必要な投薬量で、および所望の予防的結果を達成するために必要な期間にわたって有効な量を表す。典型的には、疾病のより初期段階の前にまたは疾病のより初期段階において、予防的投薬が患者に使用されるので、予防的有効量は、治療の有効量より少ない。

【0163】

V. 診断

本明細書における開示はまた診断の適用例を提供し、限定されないが、診断アッセイ法、1つ以上の結合タンパク質を含む診断用キット、ならびに自動化および／または半自動化システムにおける使用のための方法およびキットの適応が含まれる。提供される方法、キットおよび適応は、個体における疾患または障害の検出、監視および／または治療に用いることができる。これは、以下でさらに明らかにされる。

【0164】

A. 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つの結合タンパク質を使用して試験試料中の分析物またはその断片の存在、量または濃度を決定する方法も提供する。本分野において知られているあらゆる適切なアッセイは、この方法において使用することが可能である。例には、限定されないが、イムノアッセイおよび／または質量分析法を用いる方法が含まれる。

【0165】

本開示によって提供されるイムノアッセイは、とりわけ、サンドイッチイムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ (RIA)、エンザイムイムノアッセイ (EIA)、酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA)、競合阻害イムノアッセイ、蛍光偏光イムノアッセイ (FPIA)、酵素増幅イムノアッセイ技術 (EMIT)、生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET) および均一系化学発光アッセイを含む。

【0166】

化学発光微粒子イムノアッセイ、特に ARCHITECT (登録商標) 自動分析器 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) を使用するものは、イムノアッセイの例である。

【0167】

質量分析法を用いる方法は、本開示によって提供され、限定されないが、MALDI (マトリックス支援レーザー脱離／イオン化) または SELDI (表面増強レーザー脱離／イオン化) が含まれる。

【0168】

イムノアッセイおよび質量分析法を用いて生物学的試験試料を回収し、操作し、処理しおよび分析するための方法は、本開示の実施において提供される (US 2009-0311253 A1)。

【0169】

B. キット

試験試料における分析物またはその断片の存在、量または濃度について試験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、分析物またはその断片について試験試料をアッセイするための少なくとも1つの成分および分析物またはその断片について試験試料をアッセイするための説明書を含む。分析物またはその断片について試験試料をアッセイするための少なくとも1つの成分は、場合によって、固相上に固定されている、本明細書に開示されている結合タンパク質および／または抗分析物結合タンパク質 (またはその断片、バリエーションまたはそのバリエーションの断片) を含む組成物を含むことができる。

【0170】

場合によって、キットは、単離されたまたは精製された分析物を含み得る、校正因子または対照を含むことができる。キットは、イムノアッセイおよび／または質量分析法によ

10

20

30

40

50

って、分析物について試験試料をアッセイするための少なくとも1つの成分を含むことができる。キット成分は、分析物、結合タンパク質および／または抗分析物結合タンパク質またはその断片を含み、場合によって、当該分野で公知の任意の検出可能な標識を用いて標識されてもよい。本開示の実施において提供される構築のための材料および方法は、当業者に公知である（米国2009-0311253A1）。

【0171】

C. キットおよび方法の適合

本明細書に記載されているイムノアッセイなどのアッセイによって試験試料における分析物の存在、量または濃度を決定するキット（またはその成分）ならびに方法は、例えば、米国特許第5,089,424号および第5,006,309号に記載され、例えば、Abbott Laboratories (Abbott Park, IL) によってARCHITECT（登録商標）として商業的に販売されている（固相が微粒子を含むものを含めて）様々な自動化システムおよび半自動化システムにおける使用に適合させることが可能である。

【0172】

Abbott Laboratoriesから入手可能な他のプラットフォームには、ASYM（登録商標）、IMx（登録商標）（例えば、米国特許第5,294,404号を参照されたい、PRISM（登録商標）、EIA（ビーズ）およびQuantum（商標）IIなら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、キットおよびキットの成分は、他のフォーマットにおいて、例えば、電気化学的または他の携帯もしくはポイントオブケアアッセイシステムで使用することが可能である。本開示は、例えば、サンドイッチイムノアッセイを行う商業的Abbott Point of Care (i-STAT（登録商標）、Abbott Laboratories）電気化学的イムノアッセイシステムに適用可能である。免疫センサーならびに単回使用試験装置におけるこれらの製造および操作方法は、例えば、米国特許第5,063,081号、第7,419,821号、および第7,682,833号；ならびに米国特許公開第20040018577号、第20060160164号、およびUS20090311253に記載されている。

【0173】

本明細書に記載されている本方法の他の適切な改変および適合が明白であり、本明細書に開示されている範囲または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は、当業者に容易に明確になる。ここに、ある種の実施形態を詳細に記載してきたが、例示のみを目的とし、限定することを意図したものではない、下記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】

【0174】

【実施例1】 二重可変ドメイン（DVD）結合タンパク質の生成および特徴付け

既知のアミノ酸配列を有する親抗体を用いた四本鎖二重可変ドメイン（DVD）結合タンパク質は、DVD結合タンパク質の可変重鎖配列およびDVD結合タンパク質の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、当該技術分野において公知の方法に従って、pHybC-D2ベクターに断片をクローニングすることにより生成された。DVD結合タンパク質構築物は、当該技術分野において既知の方法に従って、293細胞にクローニングされ、そこで発現させ、精製された。DVD結合タンパク質についてのDVD-VH鎖およびVL鎖を以下に提供する。

【0175】

DVDの構築に使用されるリンカーを表2に示す。

【0176】

【表 2】

表2

配列 番号	リンカー名	配列
21	HG-短鎖	ASTKGP
15	LL-短鎖	QPKAAP
10	LK-短鎖	TVAAP
14	LK-長鎖	TVAAPSVFIFPP
22	HG-長鎖	ASTKGPSVFPLAP
16	LL-長鎖	QPKAAPSVTLFPP

10

【0177】

〔実施例1. 1〕 同一標的タンパク質の重複しないエピトープに対して指向されたD V
D結合タンパク質

【0178】

【表 3】

表 3

配列 番号	DVD可変 ドメイン名	外部可変 ドメイン名	リンカー	内部可変 ドメイン名
58	DVD2202H	AB033VH	HG-短鎖	AB003VH
59	DVD2202L	AB033VL	LK-短鎖	AB003VL
60	DVD2203H	AB003VH	HG-短鎖	AB033VH
61	DVD2203L	AB003VL	LK-短鎖	AB033VL
62	DVD2204H	AB033VH	HG-短鎖	AB003VH
63	DVD2204L	AB033VL	LK-長鎖	AB003VL
64	DVD2205H	AB003VH	HG-短鎖	AB033VH
65	DVD2205L	AB003VL	LK-長鎖	AB033VL
67	DVD2206H	AB033VH	HG-長鎖	AB003VH
68	DVD2206L	AB033VL	LK-短鎖	AB003VL
69	DVD2207H	AB003VH	HG-長鎖	AB033VH
70	DVD2207L	AB003VL	LK-短鎖	AB033VL
71	DVD2208H	AB005VH	HG-短鎖	AB034VH
72	DVD2208L	AB005VL	LK-短鎖	AB034VL
73	DVD2209H	AB034VH	HG-短鎖	AB005VH
74	DVD2209L	AB034VL	LK-短鎖	AB005VL
75	DVD2210H	AB005VH	HG-短鎖	AB034VH
76	DVD2210L	AB005VL	LK-長鎖	AB034VL
77	DVD2211H	AB034VH	HG-短鎖	AB005VH
78	DVD2211L	AB034VL	LK-長鎖	AB005VL
79	DVD2212H	AB005VH	HG-長鎖	AB034VH
80	DVD2212L	AB005VL	LK-短鎖	AB034VL
81	DVD2213H	AB034VH	HG-長鎖	AB005VH
82	DVD2213L	AB034VL	LK-短鎖	AB005VL
83	DVD2214H	AB075VH	HG-短鎖	AB011VH
84	DVD2214L	AB075VL	LL-短鎖	AB011VL
85	DVD2215H	AB011VH	HG-短鎖	AB075VH
86	DVD2215L	AB011VL	LK-短鎖	AB075VL
87	DVD2216H	AB075VH	HG-短鎖	AB011VH
88	DVD2216L	AB075VL	LL-長鎖	AB011VL
89	DVD2217H	AB011VH	HG-短鎖	AB075VH
90	DVD2217L	AB011VL	LK-長鎖	AB075VL
91	DVD2218H	AB075VH	HG-長鎖	AB011VH
92	DVD2218L	AB075VL	LL-短鎖	AB011VL
93	DVD2219H	AB011VH	HG-長鎖	AB075VH
94	DVD2219L	AB011VL	LK-短鎖	AB075VL
95	DVD2226H	AB075VH	HG-短鎖	AB077VH
96	DVD2226L	AB075VL	LL-短鎖	AB077VL

10

20

30

40

配列 番号	DVD可変 ドメイン名	外部可変 ドメイン名	リンカー	内部可変 ドメイン名
97	DVD2227H	AB077VH	HG-短鎖	AB075VH
98	DVD2227L	AB077VL	LK-短鎖	AB075VL
99	DVD2228H	AB075VH	HG-短鎖	AB077VH
100	DVD2228L	AB075VL	LL-長鎖	AB077VL
101	DVD2229H	AB077VH	HG-短鎖	AB075VH
102	DVD2229L	AB077VL	LK-長鎖	AB075VL
103	DVD2230H	AB075VH	HG-長鎖	AB077VH
104	DVD2230L	AB075VL	LL-短鎖	AB077VL
105	DVD2231H	AB077VH	HG-長鎖	AB075VH
106	DVD2231L	AB077VL	LK-短鎖	AB075VL
107	DVD2238H	AB062VH	HG-短鎖	AB063VH
108	DVD2238L	AB062VL	LK-短鎖	AB063VL
109	DVD2239H	AB063VH	HG-短鎖	AB062VH
110	DVD2239L	AB063VL	LK-短鎖	AB062VL
111	DVD2240H	AB062VH	HG-短鎖	AB063VH
112	DVD2240L	AB062VL	LK-長鎖	AB063VL
113	DVD2241H	AB063VH	HG-短鎖	AB062VH
114	DVD2241L	AB063VL	LK-長鎖	AB062VL
115	DVD2242H	AB062VH	HG-長鎖	AB063VH
116	DVD2242L	AB062VL	LK-短鎖	AB063VL
117	DVD2243H	AB063VH	HG-長鎖	AB062VH
118	DVD2243L	AB063VL	LK-短鎖	AB062VL
119	DVD2244H	AB062VH	HG-短鎖	AB116VH
120	DVD2244L	AB062VL	LK-短鎖	AB116VL
121	DVD2245H	AB116VH	HG-短鎖	AB062VH
122	DVD2245L	AB116VL	LK-短鎖	AB062VL
123	DVD2246H	AB062VH	HG-短鎖	AB116VH
124	DVD2246L	AB062VL	LK-長鎖	AB116VL
125	DVD2247H	AB116VH	HG-短鎖	AB062VH
126	DVD2247L	AB116VL	LK-長鎖	AB062VL
127	DVD2248H	AB062VH	HG-長鎖	AB116VH
128	DVD2248L	AB062VL	LK-短鎖	AB116VL
129	DVD2249H	AB116VH	HG-長鎖	AB062VH
130	DVD2249L	AB116VL	LK-短鎖	AB062VL

10

20

30

【0179】

[実施例1. 2] 同じ細胞に発現した2つの異なる受容体に対して指向されたDVD結合タンパク質

40

【0180】

【表 4】

表 4

配列 番号	DVD可変 ドメイン名	外部可変 ドメイン名	リンカー	内部可変 ドメイン名
131	DVD2266H	AB033VH	HG-短鎖	AB080VH
132	DVD2266L	AB033VL	LK-短鎖	AB080VL
133	DVD2267H	AB080VH	HG-短鎖	AB033VH
134	DVD2267L	AB080VL	LK-短鎖	AB033VL
135	DVD2268H	AB080VH	HG-短鎖	AB003VH
136	DVD2268L	AB080VL	LK-短鎖	AB003VL
137	DVD2269H	AB003VH	HG-短鎖	AB080VH
138	DVD2269L	AB003VL	LK-短鎖	AB080VL
139	DVD2270H	AB080VH	HG-短鎖	AB063VH
140	DVD2270L	AB080VL	LK-短鎖	AB063VL
141	DVD2271H	AB063VH	HG-短鎖	AB080VH
142	DVD2271L	AB063VL	LK-短鎖	AB080VL
143	DVD2272H	AB080VH	HG-短鎖	AB116VH
144	DVD2272L	AB080VL	LK-短鎖	AB116VL
145	DVD2273H	AB116VH	HG-短鎖	AB080VH
146	DVD2273L	AB116VL	LL-短鎖	AB080VL
147	DVD2274H	AB080VH	HG-短鎖	AB062VH
148	DVD2274L	AB080VL	LK-短鎖	AB062VL
149	DVD2275H	AB062VH	HG-短鎖	AB080VH
150	DVD2275L	AB062VL	LK-短鎖	AB080VL
151	DVD2276H	AB075VH	HG-短鎖	AB003VH
152	DVD2276L	AB075VL	LL-短鎖	AB003VL
153	DVD2277H	AB003VH	HG-短鎖	AB075VH
154	DVD2277L	AB003VL	LK-短鎖	AB075VL
155	DVD2278H	AB075VH	HG-短鎖	AB063VH
156	DVD2278L	AB075VL	LL-短鎖	AB063VL
157	DVD2279H	AB063VH	HG-短鎖	AB075VH
158	DVD2279L	AB063VL	LK-短鎖	AB075VL
159	DVD2280H	AB075VH	HG-短鎖	AB116VH
160	DVD2280L	AB075VL	LL-短鎖	AB116VL
161	DVD2281H	AB116VH	HG-短鎖	AB075VH
162	DVD2281L	AB116VL	LL-短鎖	AB075VL
163	DVD2282H	AB075VH	HG-短鎖	AB062VH
164	DVD2282L	AB075VL	LL-短鎖	AB062VL
165	DVD2283H	AB062VH	HG-短鎖	AB075VH
166	DVD2283L	AB062VL	LK-短鎖	AB075VL
167	DVD2284H	AB075VH	HG-短鎖	AB064VH
168	DVD2284L	AB075VL	LL-短鎖	AB064VL

10

20

30

40

配列 番号	DVD可変 ドメイン名	外部可変 ドメイン名	リンカー	内部可変 ドメイン名
169	DVD2285H	AB064VH	HG-短鎖	AB075VH
170	DVD2285L	AB064VL	LK-短鎖	AB075VL
171	DVD2286H	AB075VH	HG-短鎖	AB004VH
172	DVD2286L	AB075VL	LL-短鎖	AB004VL
173	DVD2287H	AB004VH	HG-短鎖	AB075VH
174	DVD2287L	AB004VL	LK-短鎖	AB075VL
175	DVD2288H	AB075VH	HG-短鎖	AB080VH
176	DVD2288L	AB075VL	LL-短鎖	AB080VL
177	DVD2289H	AB080VH	HG-短鎖	AB075VH
178	DVD2289L	AB080VL	LK-短鎖	AB075VL
179	DVD2290H	AB400VH	HG-短鎖	AB003VH
180	DVD2290L	AB400VL	LK-短鎖	AB003VL
181	DVD2291H	AB003VH	HG-短鎖	AB400VH
182	DVD2291L	AB003VL	LK-短鎖	AB400VL
183	DVD2292H	AB400VH	HG-短鎖	AB063VH
184	DVD2292L	AB400VL	LK-短鎖	AB063VL
185	DVD2293H	AB063VH	HG-短鎖	AB400VH
186	DVD2293L	AB063VL	LK-短鎖	AB400VL
187	DVD2294H	AB400VH	HG-短鎖	AB116VH
188	DVD2294L	AB400VL	LK-短鎖	AB116VL
189	DVD2295H	AB116VH	HG-短鎖	AB400VH
190	DVD2295L	AB116VL	LL-短鎖	AB400VL
191	DVD2296H	AB400VH	HG-短鎖	AB062VH
192	DVD2296L	AB400VL	LK-短鎖	AB062VL
193	DVD2297H	AB062VH	HG-短鎖	AB400VH
194	DVD2297L	AB062VL	LK-短鎖	AB400VL
195	DVD2298H	AB400VH	HG-短鎖	AB005VH
196	DVD2298L	AB400VL	LK-短鎖	AB005VL
197	DVD2299H	AB005VH	HG-短鎖	AB400VH
198	DVD2299L	AB005VL	LK-短鎖	AB400VL
199	DVD2300H	AB400VH	HG-短鎖	AB004VH
200	DVD2300L	AB400VL	LK-短鎖	AB004VL
201	DVD2301H	AB004VH	HG-短鎖	AB400VH
202	DVD2301L	AB004VL	LK-短鎖	AB400VL
203	DVD2302H	AB400VH	HG-短鎖	AB080VH
204	DVD2302L	AB400VL	LK-短鎖	AB080VL
205	DVD2303H	AB080VH	HG-短鎖	AB400VH
206	DVD2303L	AB080VL	LK-短鎖	AB400VL
207	DVD2304H	AB400VH	HG-短鎖	AB075VH
208	DVD2304L	AB400VL	LK-短鎖	AB075VL
209	DVD2305H	AB075VH	HG-短鎖	AB400VH
210	DVD2305L	AB075VL	LL-短鎖	AB400VL

10

20

30

40

配列 番号	DVD可変 ドメイン名	外部可変 ドメイン名	リンカー	内部可変 ドメイン名
211	DVD2306H	AB400VH	HG-短鎖	AB077VH
212	DVD2306L	AB400VL	LK-短鎖	AB077VL
213	DVD2307H	AB077VH	HG-短鎖	AB400VH
214	DVD2307L	AB077VL	LK-短鎖	AB400VL
215	DVD2308H	AB004VH	HG-短鎖	AB005VH
216	DVD2308L	AB004VL	LK-短鎖	AB005VL
217	DVD2309H	AB005VH	HG-短鎖	AB004VH
218	DVD2309L	AB005VL	LK-短鎖	AB004VL
219	DVD2310H	AB004VH	HG-短鎖	AB034VH
220	DVD2310L	AB004VL	LK-短鎖	AB034VL
221	DVD2311H	AB034VH	HG-短鎖	AB004VH
222	DVD2311L	AB034VL	LL-短鎖	AB004VL
223	DVD2314H	AB004VH	HG-短鎖	AB077VH
224	DVD2314L	AB004VL	LK-短鎖	AB077VL
225	DVD2315H	AB077VH	HG-短鎖	AB004VH
226	DVD2315L	AB077VL	LK-短鎖	AB004VL
227	DVD2316H	AB005VH	HG-短鎖	AB080VH
228	DVD2316L	AB005VL	LK-短鎖	AB080VL
229	DVD2317H	AB080VH	HG-短鎖	AB005VH
230	DVD2317L	AB080VL	LK-短鎖	AB005VL
231	DVD2318H	AB005VH	HG-短鎖	AB063VH
232	DVD2318L	AB005VL	LK-短鎖	AB063VL
233	DVD2319H	AB063VH	HG-短鎖	AB005VH
234	DVD2319L	AB063VL	LK-短鎖	AB005VL
235	DVD2320H	AB005VH	HG-短鎖	AB116VH
236	DVD2320L	AB005VL	LK-短鎖	AB116VL
237	DVD2321H	AB116VH	HG-短鎖	AB005VH
238	DVD2321L	AB116VL	LL-短鎖	AB005VL
239	DVD2322H	AB005VH	HG-短鎖	AB062VH
240	DVD2322L	AB005VL	LK-短鎖	AB062VL
241	DVD2323H	AB062VH	HG-短鎖	AB005VH
242	DVD2323L	AB062VL	LK-短鎖	AB005VL
243	DVD2324H	AB005VH	HG-短鎖	AB077VH
244	DVD2324L	AB005VL	LK-短鎖	AB077VL
245	DVD2325H	AB077VH	HG-短鎖	AB005VH
246	DVD2325L	AB077VL	LK-短鎖	AB005VL
247	DVD2326H	AB005VH	HG-短鎖	AB011VH
248	DVD2326L	AB005VL	LK-短鎖	AB011VL
249	DVD2327H	AB011VH	HG-短鎖	AB005VH
250	DVD2327L	AB011VL	LK-短鎖	AB005VL
251	DVD2328H	AB034VH	HG-短鎖	AB080VH
252	DVD2328L	AB034VL	LL-短鎖	AB080VL

10

20

30

40

配列 番号	DVD可変 ドメイン名	外部可変 ドメイン名	リンカー	内部可変 ドメイン名
253	DVD2329H	AB080VH	HG-短鎖	AB034VH
254	DVD2329L	AB080VL	LK-短鎖	AB034VL
255	DVD2330H	AB034VH	HG-短鎖	AB063VH
256	DVD2330L	AB034VL	LL-短鎖	AB063VL
257	DVD2331H	AB063VH	HG-短鎖	AB034VH
258	DVD2331L	AB063VL	LK-短鎖	AB034VL
259	DVD2332H	AB034VH	HG-短鎖	AB116VH
260	DVD2332L	AB034VL	LL-短鎖	AB116VL
261	DVD2333H	AB116VH	HG-短鎖	AB034VH
262	DVD2333L	AB116VL	LL-短鎖	AB034VL
263	DVD2334H	AB034VH	HG-短鎖	AB062VH
264	DVD2334L	AB034VL	LL-短鎖	AB062VL
265	DVD2335H	AB062VH	HG-短鎖	AB034VH
266	DVD2335L	AB062VL	LK-短鎖	AB034VL
267	DVD2336H	AB034VH	HG-短鎖	AB077VH
268	DVD2336L	AB034VL	LL-短鎖	AB077VL
269	DVD2337H	AB077VH	HG-短鎖	AB034VH
270	DVD2337L	AB077VL	LK-短鎖	AB034VL
271	DVD2338H	AB034VH	HG-短鎖	AB400VH
272	DVD2338L	AB034VL	LL-短鎖	AB400VL
273	DVD2339H	AB400VH	HG-短鎖	AB034VH
274	DVD2339L	AB400VL	LK-短鎖	AB034VL
275	DVD2340H	AB034VH	HG-短鎖	AB011VH
276	DVD2340L	AB034VL	LL-短鎖	AB011VL
277	DVD2341H	AB011VH	HG-短鎖	AB034VH
278	DVD2341L	AB011VL	LK-短鎖	AB034VL
279	DVD2342H	AB064VH	HG-短鎖	AB080VH
280	DVD2342L	AB064VL	LK-短鎖	AB080VL
281	DVD2343H	AB080VH	HG-短鎖	AB064VH
282	DVD2343L	AB080VL	LK-短鎖	AB064VL
283	DVD2346H	AB064VH	HG-短鎖	AB077VH
284	DVD2346L	AB064VL	LK-短鎖	AB077VL
285	DVD2347H	AB077VH	HG-短鎖	AB064VH
286	DVD2347L	AB077VL	LK-短鎖	AB064VL
287	DVD2348H	AB064VH	HG-短鎖	AB400VH
288	DVD2348L	AB064VL	LK-短鎖	AB400VL
289	DVD2349H	AB400VH	HG-短鎖	AB064VH
290	DVD2349L	AB400VL	LK-短鎖	AB064VL

10

20

30

40

【0181】

表5は、293細胞において、1リットルあたりのmgとして発現した親抗体およびDVD-Igタンパク質に関する収量データを含む。

【0182】

【表 5】

表 5: 293 細胞による親抗体および DVD-Ig タンパク質の一時的な発現収量

親抗体または DVD-IgのID	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)
DVD2202	EGFR (配列4)	EGFR (配列2)	12.96
DVD2203	EGFR (配列2)	EGFR (配列4)	17.22
DVD2204	EGFR (配列4)	EGFR (配列2)	11.34
DVD2205	EGFR (配列2)	EGFR (配列4)	5.34
DVD2206	EGFR (配列4)	EGFR (配列2)	13.06
DVD2207	EGFR (配列2)	EGFR (配列4)	25.84
DVD2208	RON (配列1)	RON (配列2)	2.82
DVD2209	RON (配列2)	RON (配列1)	5.58
DVD2210	RON (配列1)	RON (配列2)	8.24
DVD2211	RON (配列2)	RON (配列1)	2.16
DVD2212	RON (配列1)	RON (配列2)	10.78
DVD2213	RON (配列2)	RON (配列1)	2.92
DVD2214	IGF1R (配列1)	IGF1R (配列2)	22.94
DVD2216	IGF1R (配列1)	IGF1R (配列2)	8.42
DVD2218	IGF1R (配列1)	IGF1R (配列2)	16.24
DVD2226	IGF1R (配列1)	IGF1R (配列3)	55.84
DVD2227	IGF1R (配列3)	IGF1R (配列1)	28.4
DVD2228	IGF1R (配列1)	IGF1R (配列3)	26.18
DVD2229	IGF1R (配列3)	IGF1R (配列1)	21.06
DVD2230	IGF1R (配列1)	IGF1R (配列3)	28.36
DVD2231	IGF1R (配列3)	IGF1R (配列1)	20.58
DVD2238	ErbB3 (配列3)	ErbB3 (配列2)	0.82
DVD2240	ErbB3 (配列3)	ErbB3 (配列2)	0.46
DVD2242	ErbB3 (配列3)	ErbB3 (配列2)	1.5
DVD2245	ErbB3 (配列1)	ErbB3 (配列3)	0.84
DVD2247	ErbB3 (配列1)	ErbB3 (配列3)	0.48
DVD2249	ErbB3 (配列1)	ErbB3 (配列3)	0.64
DVD2266	EGFR (配列4)	HER-2 (配列1)	2.02
DVD2267	HER-2 (配列1)	EGFR (配列4)	41.9
DVD2268	HER-2 (配列1)	EGFR (配列2)	103.42
DVD2269	EGFR (配列2)	HER-2 (配列1)	57.34
DVD2270	HER-2 (配列1)	ErbB3 (配列2)	7.06
DVD2271	ErbB3 (配列2)	HER-2 (配列1)	0.6
DVD2272	HER-2 (配列1)	ErbB3 (配列1)	20.26
DVD2273	ErbB3 (配列1)	HER-2 (配列1)	13.84
DVD2274	HER-2 (配列1)	ErbB3 (配列3)	13.66
DVD2275	ErbB3 (配列3)	HER-2 (配列1)	3.32

10

20

30

40

DVD2276	IGF1R (配列1)	EGFR (配列2)	4.42
DVD2277	EGFR (配列2)	IGF1R (配列1)	11.64
DVD2278	IGF1R (配列1)	ErbB3 (配列2)	0.84
DVD2279	ErbB3 (配列2)	IGF1R (配列1)	1.04
DVD2280	IGF1R (配列1)	ErbB3 (配列1)	5.9
DVD2281	ErbB3 (配列1)	IGF1R (配列1)	32.66
DVD2282	IGF1R (配列1)	ErbB3 (配列3)	2.24
DVD2283	ErbB3 (配列3)	IGF1R (配列1)	3.36
DVD2284	IGF1R (配列1)	EGFR (配列1)	19.54
DVD2285	EGFR (配列1)	IGF1R (配列1)	43.16
DVD2286	IGF1R (配列1)	HER-2 (配列2)	16.86
DVD2287	HER-2 (配列2)	IGF1R (配列1)	121.98
DVD2288	IGF1R (配列1)	HER-2 (配列1)	17.1
DVD2289	HER-2 (配列1)	IGF1R (配列1)	53.56
DVD2290	EGFR (配列3)	EGFR (配列2)	23.42
DVD2291	EGFR (配列2)	EGFR (配列3)	38.7
DVD2292	EGFR (配列3)	ErbB3 (配列2)	3.86
DVD2293	ErbB3 (配列2)	EGFR (配列3)	7.6
DVD2294	EGFR (配列3)	ErbB3 (配列1)	0.72
DVD2295	ErbB3 (配列1)	EGFR (配列3)	11.7
DVD2296	EGFR (配列3)	ErbB3 (配列3)	0.34
DVD2297	ErbB3 (配列3)	EGFR (配列3)	2.56
DVD2298	EGFR (配列3)	RON (配列1)	25.44
DVD2299	RON (配列1)	EGFR (配列3)	42.3
DVD2300	EGFR (配列3)	HER-2 (配列2)	22.82
DVD2301	HER-2 (配列2)	EGFR (配列3)	77.62
DVD2302	EGFR (配列3)	HER-2 (配列1)	1.1
DVD2303	HER-2 (配列1)	EGFR (配列3)	63.8
DVD2304	EGFR (配列3)	IGF1R (配列1)	3.78
DVD2305	IGF1R (配列1)	EGFR (配列3)	9.04
DVD2306	EGFR (配列3)	IGF1R (配列3)	23.34
DVD2307	IGF1R (配列3)	EGFR (配列3)	59.14
DVD2308	HER-2 (配列2)	RON (配列1)	117.56
DVD2309	RON (配列1)	HER-2 (配列2)	127.18
DVD2310	HER-2 (配列2)	RON (配列2)	50.56
DVD2311	RON (配列2)	HER-2 (配列2)	2.54
DVD2314	HER-2 (配列2)	IGF1R (配列3)	107.28
DVD2315	IGF1R (配列3)	HER-2 (配列2)	21.18
DVD2316	RON (配列1)	HER-2 (配列1)	61.18
DVD2317	HER-2 (配列1)	RON (配列1)	76.78
DVD2318	RON (配列1)	ErbB3 (配列2)	28.66
DVD2319	ErbB3 (配列2)	RON (配列1)	18.88
DVD2320	RON (配列1)	ErbB3 (配列1)	23.02
DVD2321	ErbB3 (配列1)	RON (配列1)	39.22
DVD2322	RON (配列1)	ErB3 (U1-59)	17.3
DVD2323	ErbB3 (配列3)	RON (配列1)	11.42
DVD2324	RON (配列1)	IGF1R (配列3)	91.7
DVD2325	IGF1R (配列3)	RON (配列1)	94.96

10

20

30

40

DVD2326	RON (配列1)	IGF1R (配列2)	48.64
DVD2327	IGF1R (配列2)	RON (配列1)	20.26
DVD2328	RON (配列2)	HER-2 (配列1)	12.26
DVD2329	HER-2 (配列1)	RON (配列2)	0.54
DVD2330	RON (配列2)	ErbB3 (配列2)	0
DVD2331	ErbB3 (配列2)	RON (配列2)	0.34
DVD2332	RON (配列2)	ErbB3 (配列1)	4.36
DVD2333	ErbB3 (配列1)	RON (配列2)	11
DVD2334	RON (配列2)	ErbB3 (配列3)	0.98
DVD2335	ErbB3 (配列3)	RON (配列2)	3.16
DVD2336	RON (配列2)	IGF1R (配列3)	22.38
DVD2337	IGF1R (配列3)	RON (配列2)	8.3
DVD2338	RON (配列2)	EGFR (配列3)	8.42
DVD2339	EGFR (配列3)	RON (配列2)	0.22
DVD2340	RON (配列2)	IGF1R (配列2)	22.62
DVD2341	IGF1R (配列2)	RON (配列2)	0
DVD2342	EGFR (配列1)	HER-2 (配列1)	15.6
DVD2343	HER-2 (配列1)	EGFR (配列1)	55.52
DVD2346	EGFR (配列1)	IGF1R (配列3)	66.6
DVD2347	IGF1R (配列3)	EGFR (配列1)	81.46
DVD2348	EGFR (配列1)	EGFR (配列3)	11.9
DVD2349	EGFR (配列3)	EGFR (配列1)	4.14

10

20

【0183】

すべてのDVD-Igタンパク質は293細胞において十分に発現した。DVD-Igタンパク質は、プロテインAカラムを通して容易に精製することができた。大部分の場合において、5mg/Lを超える精製されたDVD-Igタンパク質が、293細胞の上清から容易に得ることができた。

【0184】

〔実施例2〕 親抗体およびDVD-Igタンパク質の機能的活性を決定するために使用されるアッセイ

【0185】

30

〔実施例2.1〕 BIAcore技術を用いた親和性測定

【0186】

【表6】

表6: Biacore 分析に用いた試薬

アッセイ	抗原	供給業者による指定	供給業者	カタログ番号
	EGFR	組換えヒトEGFR ECD	R&D systems	1506-D4-050
	IGF1R	組換えヒトIGF1R	R&D systems	391-GR-050
	Her2	組換えヒトErbB2/FCキメラ-Hisタグ	R&D systems	1129-ER-050
	ErbB3	組換えヒトErbB3/FCキメラ-Hisタグ	R&D systems	348-RB
	RON	組換えヒトMSP受容体ECD-Hisタグ	R&D systems	1947-MS-050

40

【0187】

BIAcore法:

BIAcoreアッセイ (Biacore, Inc, Piscataway, NJ) は

50

、結合 (on-rate) 定数および解離 (off-rate) 定数の反応速度測定を用いて抗体またはDVD-Igの親和性を決定した。標的抗原 (例えば、精製された組換え標的抗原) への抗体またはDVD-Igタンパク質の結合は、Biacore (登録商標) 1000または3000装置 (Biacore (登録商標) AB, Uppsala, Sweden) により、25℃で稼働しているHBS-EP (10mMのHEPES [pH 7.4]、150mMのNaCl、3mMのEDTA、および0.005%サーファクタントP20) を用いて表面プラズモン共鳴に基づく測定によって決定された。すべての化学物質は、Biacore (登録商標) AB (Uppsala, Sweden) から入手し、または他には本明細書に記載される別の供給元から入手した。例えば、10mM酢酸ナトリウム (pH 4.5) 中に希釈された、約5000RUのヤギ抗マウスIgG、(Fcγ)、断片特異的なポリクローナル抗体 (Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL) は、製造業者の使用説明書に従って標準的なアミンカップリングキットおよび25μg/mlでの操作を用いてCM5研究等級のバイオセンサーチップ全体に直接固定化された。バイオセンサー表面上の未反応部分をエタノールアミンを用いてブロックした。フローセル2および4において修飾されたカルボキシメチルデキストラン表面を反応表面として使用した。フローセル1および3におけるヤギ抗マウスIgGなしの未修飾のカルボキシメチルデキストランを基準表面として使用した。反応速度分析のために、Biaevaluation 4.0.1ソフトウェアを用いて、8個すべての注入物の結合および解離相に対して、1:1ラングミュア (Langmuir) 結合モデルから誘導された速度方程式を同時にフィッティングさせた (グローバルフィット分析を使用)。ヤギ抗マウスIgG特異的反応表面の全体で捕捉するために、HEPES緩衝生理食塩水中に、精製された抗体またはDVD-Igタンパク質試料を希釈した。リガンドとして捕捉されるべき抗体またはDVD-Igタンパク質 (25μg/ml) を5μl/分の流速で反応マトリックス全体に注入した。結合速度定数および解離結合定数の k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$) および k_{off} (s^{-1}) は、25μl/分の連続的流速下で決定された。10–200nMの範囲の異なる抗原濃度にて速度論結合測定を行うことによって速度定数を導いた。次に、以下の式: $K_D = k_{off} / k_{on}$ によって、速度論的速度定数から抗体またはDVD-Igタンパク質および標的抗原間の反応の平衡解離定数 (M) を計算した。結合を時間の関数として記録し、速度論的速度定数を計算した。

【0188】

10

20

30

【表 7】

表7: 親抗体およびDVD-Igタンパク質のBIAcore分析

親抗体または DVD-IgのID	N末端可変 ドメイン(VD)	C末端可変 ドメイン(VD)	$k_{on}(M^{-1}s^{-1})$	$k_{off}(s^{-1})$	$K_D(M)$
DVD2202	EGFR (配列4)	EGFR (配列2)	8.0E+05	1.7E-03	2.1E-09
DVD2203	EGFR (配列2)	EGFR (配列4)	2.3E+05	2.5E-04	1.1E-09
DVD2204	EGFR (配列4)	EGFR (配列2)	2.7E+05	1.1E-03	4.3E-09
DVD2206	EGFR (配列4)	EGFR (配列2)	7.7E+05	1.6E-03	2.1E-09
DVD2208	RON (配列1)	RON (配列2)	8.3E+04	1.3E-03	1.6E-08
DVD2209	RON (配列2)	RON (配列1)			2.3E-08
DVD2210	RON (配列1)	RON (配列2)	1.1E+05	1.7E-03	1.5E-08
DVD2211	RON (配列2)	RON (配列1)			1.5E-08
DVD2212	RON (配列1)	RON (配列2)	7.4E+04	1.2E-03	1.6E-08
DVD2213	RON (配列2)	RON (配列1)			1.8E-08
DVD2214	IGF1R (配列1)	IGF1R (配列2)	2.6E+04	1.4E-04	5.5E-09
DVD2216	IGF1R (配列1)	IGF1R (配列2)	1.9E+04	1.2E-04	6.6E-09
DVD2218	IGF1R (配列1)	IGF1R (配列2)	2.5E+04	1.3E-04	5.3E-09
DVD2226	IGF1R (配列1)	IGF1R (配列3)	2.7E+04	7.3E-05	2.8E-09
DVD2227	IGF1R (配列3)	IGF1R (配列1)	6.2E+04	2.3E-07	3.7E-12
DVD2228	IGF1R (配列1)	IGF1R (配列3)	2.7E+04	1.0E-05	3.7E-10
DVD2229	IGF1R (配列3)	IGF1R (配列1)	6.2E+04	7.4E-06	1.2E-10
DVD2230	IGF1R (配列1)	IGF1R (配列3)	2.5E+04	3.6E-05	1.4E-09
DVD2231	IGF1R (配列3)	IGF1R (配列1)	6.3E+04	3.8E-06	6.0E-11
DVD2238	ERBB3 (配列3)	ERBB3 (配列2)	5.1E+04	3.0E-04	5.9E-09
DVD2242	ERBB3 (配列3)	ERBB3 (配列2)	6.7E+04	5.1E-04	7.6E-09
DVD2249	ERBB3 (配列1)	ERBB3 (配列3)	3.9E+04	2.2E-04	5.6E-09
DVD2266	EGFR (配列4)		3.6E+05	1.4E-03	3.8E-09
DVD2266		HER-2 (配列1)	NT	NT	NT
DVD2267	HER-2 (配列1)		2.5E+04	2.2E-05	8.7E-10
DVD2267		EGFR (配列4)	3.1E+04	2.8E-04	9.1E-09
DVD2268	HER-2 (配列1)		NT	NT	NT
DVD2268		EGFR (配列2)	1.9E+04	3.5E-04	1.8E-08
DVD2270	HER-2 (配列1)		1.4E+04	7.7E-06	5.7E-10
DVD2270		ERBB3 (配列2)	NT	NT	NT
DVD2272	HER-2 (配列1)		1.1E+04	1.6E-04	1.5E-08
DVD2272		ERBB3 (配列1)	結合しなかった		
DVD2274	HER-2 (配列1)		2.5E+04	3.1E-05	1.2E-09
DVD2274		ERBB3 (配列3)	結合しなかった		

10

20

30

40

DVD2278	IGF1R (配列1)		2.5E+04	2.1E-04	8.6E-09
DVD2278		ERBB3 (配列2)	NT	NT	NT
DVD2279	ERBB3 (配列2)		NT	NT	NT
DVD2279		IGF1R (配列1)	4.9E+04	2.3E-06	4.7E-11
DVD2281	ERBB3 (配列1)		4.0E+04	2.4E-04	6.1E-09
DVD2281		IGF1R (配列1)	NT	NT	NT
DVD2282	IGF1R (配列1)		2.5E+04	1.3E-04	5.2E-09
DVD2282		ERBB3 (配列3)	NT	NT	NT
DVD2283	ERBB3 (配列3)		NT	NT	NT
DVD2283		IGF1R (配列1)	2.5E+04	1.2E-04	5.0E-09
DVD2284	IGF1R (配列1)		2.6E+04	1.9E-04	7.4E-09
DVD2284		EGFR(806)	2.6E+05	1.6E-03	6.1E-09
DVD2286	IGF1R (配列1)		2.2E+04	2.5E-04	1.1E-08
DVD2286		HER-2 (配列2)	2.3E+04	2.0E-05	8.4E-10
DVD2288	IGF1R (配列1)		2.2E+04	2.6E-04	1.2E-08
DVD2288		HER-2 (配列1)	7.6E+03	1.1E-06	1.5E-10
DVD2289	HER-2 (配列1)		1.9E+04	2.3E-05	1.2E-09
DVD2289		IGF1R (配列1)	NT	NT	NT
DVD2308	HER-2 (配列2)		1.0E+05	1.0E-06	9.7E-12
DVD2308		RON (配列1)	結合しなかった		
DVD2309	RON (配列1)		NT	NT	NT
DVD2309		HER-2 (配列2)	1.4E+04	1.8E-04	1.2E-08
DVD2311	RON (配列2)				2.3E-08
DVD2311		HER-2 (配列2)	NT	NT	NT
DVD2314	HER-2 (配列2)		8.9E+04	1.0E-06	1.1E-11
DVD2314		IGF1R (配列3)	結合しなかった		
DVD2315	IGF1R (配列3)		結合しなかった		
DVD2315		HER-2 (配列2)	NT	NT	NT
DVD2316	RON (配列1)		4.6E+04	8.9E-04	1.9E-08
DVD2316		HER-2 (配列1)	NT	NT	NT
DVD2317	HER-2 (配列1)		NT	NT	NT
DVD2317		RON (配列1)	結合しなかった		
DVD2318	RON (配列1)		5.5E+04	9.2E-04	1.7E-08
DVD2318		ERBB3 (配列2)	結合しなかった		
DVD2319	ERBB3 (配列2)		3.1E+05	1.7E-03	5.4E-09
DVD2319		RON (配列1)	結合しなかった		
DVD2320	RON (配列1)		3.7E+04	9.4E-04	2.5E-08
DVD2320		ERBB3 (配列1)	結合しなかった		

10

20

30

40

DVD2321	ERBB3 (配列1)		2.5E+04	3.1E-04	1.2E-08
DVD2321		RON (配列1)	結合しなかった		
DVD2322	RON (配列1)		5.1E+04	8.7E-04	1.7E-08
DVD2322		ERBB3 (配列3)	結合しなかった		
DVD2323	ERBB3 (配列3)		6.0E+04	4.6E-04	7.7E-09
DVD2323		RON (配列1)	結合しなかった		
DVD2324	RON (配列1)		4.4E+04	9.3E-04	2.1E-08
DVD2324		IGF1R (配列3)	結合しなかった		
DVD2325	IGF1R (配列3)		6.0E+04	6.6E-06	1.1E-10
DVD2325		RON (配列1)	結合しなかった		
DVD2326	RON (配列1)		4.4E+04	9.1E-04	2.1E-08
DVD2326		IGF1R (配列2)	結合しなかった		
DVD2327	IGF1R (配列2)		4.6E+04	7.0E-05	1.5E-09
DVD2327		RON (配列1)	結合しなかった		
DVD2332	RON (配列2)		結合しなかった		
DVD2332		ERBB3 (配列1)	結合しなかった		
DVD2333	ERBB3 (配列1)		結合しなかった		
DVD2333		RON (配列2)	結合しなかった		
DVD2334	RON (配列2)				4.9E-09
DVD2334		ERBB3 (配列3)	結合しなかった		
DVD2335	ERBB3 (配列3)		NT	NT	NT
DVD2335		RON (配列2)	1.3E+05	5.1E-03	3.9E-08
DVD2336	RON (配列2)				4.0E-08
DVD2336		IGF1R (配列3)	結合なし		
DVD2340	RON (配列2)				2.3E-08
DVD2340		IGF1R (配列2)	結合なし		
DVD2348	EGFR(806)		2.8E+04	2.4E-04	8.5E-09
DVD2348		EGFR (配列3)	NT	NT	NT
DVD2349	EGFR (配列3)		5.8E+05	4.5E-04	7.6E-10
DVD2349		EGFR(806)	NT	NT	NT

【0189】

表7において、「NT」は、試験されていないDVD-Igタンパク質を示す。Biacore技術によって特徴付けられたすべてのDVD-Igタンパク質の結合能力は維持され、親抗体の結合能力に匹敵していた。

【0190】

[実施例2.2] フローサイトメトリーによって評価される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している安定な細胞株またはヒト腫瘍細胞株を組織培養

10

20

30

40

50

フラスコから回収し、5%ウシ胎児血清を含むリン酸緩衝生理食塩水PBS (PBS/FBS) に再懸濁した。染色前に、ヒト腫瘍細胞は、PBS/FCS中の $5\mu\text{g}/\text{ml}$ の($100\mu\text{l}$) ヒトIgGとともに氷上でインキュベートされた。 $1-5\times 10^5$ 個の細胞は、PBS/FBS中の抗体またはDVD-Ig ($2\mu\text{g}/\text{mL}$) とともに30-60分間、氷上でインキュベートされた。細胞を2回洗浄し、 $100\mu\text{l}$ のF(ab')₂ヤギ抗ヒトIgG、Fcγ-フィコエリトリン (PBS中に1:200に希釈) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, Cat. #109-116-170) を添加した。氷上で30分のインキュベーション後、細胞を2回洗浄し、PBS/FBS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。

10

【0191】

表8は、DVD-Igタンパク質に関するFACSデータを示す。幾何平均は、 n 個の蛍光シグナルの乗算積 ($a_1 \times a_2 \times a_3 \dots a_n$) の n 乗根である。対数変換されたデータを用いると、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。次の表は、親抗体およびDVD-Igタンパク質のFACS幾何平均を含む。

【0192】

【表 8】

表8: DVD-Igタンパク質および親抗体の蛍光活性化セルソーティング

親抗体または DVD-IgのID	N末端可変 ドメイン(VD)	C末端可変 ドメイン(VD)	N末端VD 幾何平均	C末端VD 幾何平均
AB003	EGFR (配列2)		483.44	
AB400	EGFR (配列3)		439.44	
AB064	EGFR (配列1)		25.24	
AB063	ERBB3 (配列2)		128.19	
AB062	ErbB3 (配列3)		132.19	
AB067	ErbB3 (配列1)		127.19	
DVD2290	EGFR (配列3)	EGFR (配列2)	448.44	448.44
DVD2291	EGFR (配列2)	EGFR (配列3)	541.44	541.44
DVD2292	EGFR (配列3)	ErbB3 (配列2)	519.44	20.59
DVD2293	ErbB3 (配列2)	EGFR (配列3)	135.19	NA
DVD2294	EGFR (配列3)	ErbB3 (配列1)	618.44	14.99
DVD2295	ErbB3 (配列1)	EGFR (配列3)	79.99	317.44
DVD2296	EGFR (配列3)	ErbB3 (配列3)	490.44	16.59
DVD2297	ErbB3 (配列3)	EGFR (配列3)	135.19	106.44
DVD2298	EGFR (配列3)	RON (配列1)	400.44	NA
DVD2299	RON (配列1)	EGFR (配列3)	NA	320.44
DVD2301	HER-2 (配列2)	EGFR (配列3)	NA	210.44
DVD2302	EGFR (配列3)	HER-2 (配列1)	563.44	NA
DVD2303	HER-2 (配列1)	EGFR (配列3)	NA	185.44
DVD2304	EGFR (配列3)	IGF1R (IMCL)	512.44	NA
DVD2306	EGFR (配列3)	IGF1R (配列3)	546.44	NA
DVD2307	IGF1R (配列3)	EGFR (配列3)	NA	266.44
DVD2338	RON (配列2)	EGFR (配列3)	NA	252.44
DVD2342	EGFR (配列1)	HER-2 (配列1)	44.84	NA
DVD2343	HER-2 (配列1)	EGFR (配列1)	NA	6.47
DVD2346	EGFR (配列1)	IGF1R (配列3)	24.14	NA
DVD2347	IGF1R (配列3)	EGFR (配列1)	NA	9.84

【0193】

すべてのDVD-Igタンパク質は、それらの細胞表面標的への結合を示した。DVD-Igタンパク質のN-末端ドメインは、細胞表面上でそれらの標的に結合しならびに／または親抗体よりも良好であった。結合は、リンカーの長さを調整することによって回復または向上させることができる。

【0194】

〔実施例2.3〕 親抗体およびDVD-Igタンパク質の機能的活性を決定するために使用される細胞増殖アッセイ

【0195】

細胞増殖アッセイ

液体窒素で保存した状態から細胞を解凍し、細胞が上げられ適切な生存率に到達するまで培養され、予期された2倍時間（典型的には2週間）で分割された。10%ウシ胎児血清（FBS）を含有する、表9に記載される細胞培地中で細胞を維持した。抗体の添加の24時間前に、組織培養処理されたアッセイプレートにおいて、表9に記載される細胞密度（1536細胞／ウェル）にて、2%FBSを含有するスクリーニング培地に細胞を播

種した。遠心分離によってアッセイプレート中で細胞を平衡化し、処置前の24時間、37℃にて投与モジュールに取り付けられたインキュベーターに入れた。投与中、指示した濃度（後述および表10と11中）にて抗体を用いて細胞を処置した。第3b期に関して、単一薬剤データを8点の用量反応曲線において回収し、開始濃度は20nMであった。全6回の反復物がスクリーンのために回収された（2アッセイプレート全体）。処理されたアッセイプレートを96時間抗体とともにインキュベートした。96時間後、ATPLite（Perkin Elmer）を用いて、評価項目分析についてプレートを発色させた。エンビジョンプレートリーダー（Perkin Elmer）上の超高感度発光を用いてプレートを読み取った。すべてのデータポイントは、自動化されたプロセスを介して回収された；品質管理され；Chalice Analyzer（商標）ソフトウェア（Zaliscus Inc.）を用いて分析された。アッセイプレートが次の品質管理基準に合格した場合は、アッセイプレートを容認した：相対ルシフェラーゼ値は、実験全体を通じて一致し、Z-因子スコアは0.6よりも大きく、未処理／ビヒクル対照はプレート上で一貫した反応を示す。

【0196】

【表9】

表9: 両方の細胞増殖アッセイに使用される細胞株

細胞株名	組織	腫瘍タイプ	増殖培地	1536密度(細胞/ウェル)
A549	肺	癌腫、未特定、NSCLC_扁平上皮	10%FBSを含むF12K	100
BT-549	乳房	腺管癌	10%FBSと0.023IU/mlインスリンを含むRPMI	400
BxPC-3	膵臓	腺癌	10%FBSを含むRPMI	100
FaDu	頭頸部	癌腫、咽頭	10%FBSを含むイーグルMEM	100
HCC1395	乳房	癌腫、腺管	10%FBSを含むRPMI	500
MDA-MB-453	乳房	腺癌	10%FBSを含むRPMI(5%CO ₂ 下)	100
MDA-MB-468	乳房	腺癌	10%FBSを含むDMEM(5%CO ₂ 下)	400
NCI-H1650	肺	腺癌	10%FBSを含むRPMI	400
NCI-H1975	肺	腺癌、NSCLC	10%FBSを含むRPMI	100
NCI-H441	肺	腺癌	10%FBSを含むRPMI	200
NCI-H460	肺	大細胞	10%FBSを含むRPMI	100
NCI-SNU-5	肺	腺癌	10%FBSを含むRPMI	400

【0197】

すべての細胞株を10%FBSに維持した。抗体添加の24時間前に、2%FBSを含有するスクリーニング培地に細胞を入れた。

【0198】

抗体調製

抗体は500倍濃度で提供された。抗体は、1:500のそれらの最も高い所望のスクリーニング濃度で384ウェルポリプロピレン「母プレート」に添加された。抗体は、クエン酸緩衝液（10mMクエン酸、10mMリン酸二水素ナトリウム、pH6.0）中で、連続して1:2に希釈された。投薬時まで母プレートを4℃で保存した。投与時に、母プレートは、音響分配（acoustic dispensing）のために、「娘プレート」（LDV COC音響グレードプラスチック）に「スタンプ」された。すべてのプレートを使用前に室温に平衡化させた。

【0199】

【表 10】

表 10: ペアワイズ組合せスクリーンのために示唆された濃度-1つのビン(bin)を有する抗体

抗体名	最も高い濃度(uM)	倍数希釈	ステップ数
AB004	0.02	2	6
AB063	0.02	2	6
AB064	0.02	2	6
AB080	0.02	2	6
AB005	0.02	2	6
AB067	0.02	2	6
AB075	0.02	2	6
AB400	0.02	2	6
AB401	0.02	2	6
アイソタイプ対照	0.02	2	6

10

【0200】

【表 11】

表 11: ペアワイズ組合せスクリーンのために示唆された濃度-2つのビンを有する抗体

20

抗体名	最も高い濃度(uM)	倍数希釈	ステップ数	細胞株
AB011	0.005	2	6	HT-29
	0.02	2	6	残りの細胞株
AB033	2.50E-03	2	6	Calu-3, FaDu, HCC827
	0.01	2	6	残りの細胞株
AB062	0.005	2	6	BxPC-3
	0.02	2	6	残りの細胞株
AB003	2.50E-03	2	6	Calu-3, FaDu
	0.01	2	6	残りの細胞株
AB077	0.005	2	6	HT-29
	0.02	2	6	残りの細胞株

30

【0201】

【実施例 2. 4】 親抗体およびDVD-Igタンパク質の機能的活性を決定するために使用される分析法

【0202】

阻害割合

40

複製データは平均値で重ね合わせ、阻害割合は、細胞生存率の尺度として決定された。0%の阻害レベルは、治療によって細胞増殖が阻害されないことを表す。100%の阻害は、処置ウィンドウ中の細胞数が倍加しないことを表す。両方の細胞増殖抑制および細胞毒性処置は、100%の阻害割合を得ることができる。阻害割合は、以下のように計算される： $I = 1 - T/U$ 、ここで、Tは処置済み、Uは未処置である。

【0203】

相乗効果スコア分析

相乗効果相互作用の強さを特徴付けるためのスカラー指標は、相乗効果スコアと呼ばれ、Loewe加算性(Zallicus)を超える組合せ効果を測定するために使用された。相乗効果スコアは次のように計算される：

50

【0204】

【数1】

$$\text{相乗効果スコア} = \log f_x \log f_y \sum \max(0, I_{\text{data}}) (I_{\text{data}} - I_{\text{Loewe}})$$

【0205】

行列中のそれぞれの成分薬剤と組合せポイントの分画阻害は、すべてのビヒクル処理された対照ウェルの中央値と比較して計算された。相乗効果スコア式は、加算性についてLoeweモデルを使用して、成分薬剤の活性から数値的に由来するモデル表面を超えて、行列のそれぞれの点で実験的に観察された活性ボリュームを統合した。相乗効果スコア式（上記）における追加の用語は、個々の薬剤について使用される様々な希釈係数を標準化し、実験全体にわたる相乗効果スコアの比較を可能にするために使用された。 10

【0206】

Zallicus cHTSプラットフォームを使用して、2つの薬剤は、広範囲の濃度および比率を捕捉するために組み合わせスクリーニングすることができる。併用効果は、効力シフトに帰し、または強化として最大効果に帰することができる。より高い活性レベルは、色のより明るい／より温かい行列を用いて表示される。任意の組合せの2つ単剤成分について回収されたデータを用いて、組合せの各成分間のゼロ相互作用について組合せ用量モデルを作成することができる（形状モデル）。このゼロ相互作用行列は、成分間に相互作用がない場合に予期されたものを超えて、活性値を同定するために、実験的に由来したデータ（データ表面）から減算される。この過剰のマトリックスボリュームは、相乗効果スコアを生じさせるために統合される（上記）。 20

【0207】

自己架橋分析

組合せスクリーン分析についてヒット基準を客観的に確立するために、自己架橋組合せは、追加の非相乗作用反応を経験的に決定するための手段として、細胞株パネル全体ですべての組合せについて回収された。これらのベースライン加算値に統計学的に優先した効果レベルが得られたこれらの薬物の組合せは相乗的であると考えられた。加算性ボリュームは、平均自己架橋+3標準偏差（3）より大きい組合せは、相乗効果の候補と考えることができる。この戦略は細胞株中心であり、細胞株パネル活性のグローバル評価に対するそれぞれの細胞株における自己架橋挙動に着目した。 30

【0208】

観察された全体的な阻害活性ならびに組合せ効果の数は細胞株によって変化した。3σを超える相乗効果との組合せは、通常のエラーを想定し、-99%の信頼の「個別に重要」である。各細胞株のための自己架橋相乗効果スコアを表12および表13に示す。それぞれの細胞株について閾値を上回る相乗効果スコアとのそれらの組合せを表12および13において強調した。

【0209】

【表 1 2】

表 12: A549、BT-549、BxPC-3、FaDu、HCC1395 および MDA-MB-453 細胞株における自己架橋
相乗効果スコア

DVD-Ig #	A549	BT-549	BxPC-3	FaDu	HCC1395	MDA-MB-453
DVD2202	-0.63	5.36	25.63	65.04	15.61	15.31
DVD2203	14.02	10.26	5.64	62.34	10.65	5.40
DVD2204	4.65	3.67	14.80	68.38	3.84	24.28
DVD2205	23.42	4.19	20.74	64.45	10.61	5.79
DVD2206	5.09	11.82	2.05	60.37	6.55	5.32
DVD2207	4.76	3.96	11.24	65.04	6.19	3.70
DVD2208	11.05	-1.55	13.71	24.73	2.30	18.21
DVD2209	14.76	3.43	12.97	3.47	5.93	27.21
DVD2210	5.24	-0.64	2.69	8.75	15.79	23.72
DVD2211	13.48	7.07	9.23	16.09	6.41	1.06
DVD2212	8.11	6.05	7.17	3.56	10.97	6.80
DVD2213	6.72	11.07	17.84	6.28	12.15	11.43
DVD2214	5.86	3.49	33.93	7.14	11.07	14.64
DVD2216	7.05	8.48	6.56	30.04	4.66	6.54
DVD2218	6.28	6.77	3.67	9.49	10.38	5.09
DVD2226	4.32	6.18	13.47	4.27	10.46	10.29
DVD2227	7.15	4.74	6.44	7.70	0.70	27.20
DVD2228	6.29	10.49	28.87	5.66	12.85	15.32
DVD2229	10.74	6.37	12.79	13.94	5.48	6.76
DVD2230	8.85	12.84	20.89	12.75	7.48	8.26
DVD2231	8.00	5.76	13.88	11.21	8.52	11.00
DVD2264	8.97	3.47	8.00	63.16	5.18	8.84
DVD2265	7.09	5.95	10.77	65.81	5.25	3.21
DVD2267	8.67	4.16	30.22	45.24	6.86	6.01
DVD2268	9.50	6.64	26.75	79.76	9.38	3.02
DVD2269	19.29	17.88	37.62	72.29	3.36	8.21
DVD2270	2.94	6.44	46.62	21.46	21.30	5.16
DVD2272	0.09	7.87	26.72	22.02	4.00	16.10
DVD2273	13.17	10.51	38.60	24.38	11.68	7.78
DVD2274	15.44	8.85	27.55	24.32	13.11	10.55
DVD2276	4.03	7.11	7.72	54.97	12.85	13.87
DVD2277	1.67	12.47	7.60	68.28	14.94	9.98
DVD2280	14.16	6.77	5.79	8.55	10.43	23.57
DVD2281	5.84	12.85	42.99	43.32	7.37	9.11
DVD2284	5.70	3.83	19.39	13.90	5.54	4.12
DVD2285	4.38	13.59	29.14	9.51	16.05	9.56
DVD2286	1.62	3.65	33.10	12.19	10.11	7.27

10

20

30

40

DVD2287	8.74	10.96	18.78	33.12	9.88	-1.62
DVD2288	11.41	9.21	38.86	31.55	8.41	6.95
DVD2289	7.07	13.18	27.50	36.79	6.45	9.79
DVD2290	9.41	13.84	36.64	70.96	10.79	5.68
DVD2291	5.23	6.71	18.90	67.85	10.76	3.06
DVD2293	9.35	11.02	23.84	61.20	13.03	13.28
DVD2295	12.51	10.41	40.56	55.45	8.34	8.19
DVD2298	8.30	6.82	5.66	64.97	6.51	10.44
DVD2299	4.55	10.60	12.45	37.82	5.23	11.42
DVD2300	4.12	3.14	18.32	65.09	7.94	10.17
DVD2301	8.58	5.17	20.59	72.12	6.08	5.08
DVD2303	9.00	8.86	39.80	61.84	6.63	8.30
DVD2305	6.17	7.00	21.43	37.69	11.14	9.95
DVD2306	3.12	4.43	22.92	63.49	8.13	14.80
DVD2307	1.99	5.25	11.87	38.09	15.31	20.36
DVD2308	9.27	1.75	45.35	12.16	3.71	13.79
DVD2309	6.43	5.02	13.11	7.63	9.20	13.13
DVD2310	5.78	8.32	16.02	9.32	7.51	10.23
DVD2314	11.61	10.52	25.10	42.27	10.63	1.75
DVD2315	8.70	19.61	5.96	9.62	6.14	9.91
DVD2316	4.27	5.36	15.54	8.94	8.89	15.51
DVD2317	7.19	4.46	12.10	29.27	8.57	10.68
DVD2318	8.70	7.88	6.15	-7.75	2.40	14.97
DVD2319	4.56	14.86	15.57	23.63	7.36	7.67
DVD2320	6.37	4.03	10.77	3.39	11.00	16.42
DVD2321	10.14	8.25	9.19	41.12	3.26	7.47
DVD2322	7.44	6.50	5.54	-2.53	6.77	11.53
DVD2323	3.68	8.61	46.76	40.37	10.68	8.75
DVD2324	9.13	14.78	1.08	7.24	14.77	7.87
DVD2325	12.74	14.45	13.07	31.82	11.17	7.61
DVD2326	7.15	8.65	10.55	2.99	7.65	8.62
DVD2327	4.51	3.70	13.57	10.48	10.14	3.44
DVD2328	3.05	7.32	20.83	35.50	10.48	10.10
DVD2332	8.05	15.43	12.72	9.29	7.68	2.83
DVD2333	7.30	11.03	16.75	26.52	10.83	34.60
DVD2336	0.15	8.33	22.29	8.22	9.57	13.58
DVD2337	4.34	9.99	13.81	3.31	18.19	15.07
DVD2338	1.66	11.21	12.05	50.18	21.40	2.56
DVD2340	6.83	5.70	13.61	11.74	4.22	1.90
DVD2342	8.67	14.03	8.48	1.58	12.65	0.53
DVD2343	4.95	10.69	20.81	8.09	2.76	7.81
DVD2346	6.02	6.58	18.52	6.37	1.20	5.96
DVD2347	-0.87	9.90	11.98	9.36	9.57	10.78
DVD2348	10.45	10.20	15.05	27.77	5.22	1.23

10

20

30

40

DVD2349	4.97	8.69	10.12	63.78	10.08	-1.41
DVD2213	5.43	0.79	18.58	8.42	11.83	10.85
DVD2208	15.91	4.13	11.20	3.14	7.61	18.21
DVD2245	5.94	6.37	32.75	25.18	3.97	12.57
DVD2211	5.71	4.83	9.44	10.73	5.55	5.75
DVD2238	9.43	4.18	22.38	44.30	6.49	13.55
DVD2302	18.10	6.63	54.92	77.10	6.85	-1.74
DVD2294	6.93	6.21	57.51	82.31	5.36	1.25
DVD2334	10.21	4.69	13.42	13.09	2.44	-3.42
DVD2242	2.47	2.12	20.76	51.42	3.00	4.17
DVD2249	8.06	9.30	32.10	47.62	4.71	9.38

10

【0210】

細胞増殖によって特徴付けられる多数のDVD-Igタンパク質は、A549、BT-549、BxPC-3、Fadu、HCC1395およびMDA-MB-453細胞株において相乗効果を示した。細胞増殖はまた、追加の細胞株において測定することができた。

【0211】

【表 1 3】

表 13: MDA-MB-468、NCI-H1650、NCI-H1975、NCI-H441、NCI-H460 および NCI-SNU-5 細胞株
における自己架橋相乗効果スコア

DVD-Ig #	MDA-MB-468	NCI-H1650	NCI-H1975	NCI-H441	NCI-H460	NCI-SNU-5
DVD2202	11.79	3.73	29.11	7.37	6.59	8.54
DVD2203	19.52	17.60	41.42	8.60	6.85	3.20
DVD2204	10.18	3.29	33.05	12.67	5.84	8.78
DVD2205	14.85	7.35	36.25	7.33	6.59	8.24
DVD2206	10.52	5.50	36.62	14.51	7.88	8.19
DVD2207	8.66	1.45	30.70	14.04	8.66	5.66
DVD2208	3.42	4.95	8.98	8.04	5.29	7.51
DVD2209	1.32	9.23	15.56	10.40	6.67	7.50
DVD2210	5.33	6.36	6.82	6.46	4.17	6.36
DVD2211	5.06	12.63	20.26	5.72	6.04	3.25
DVD2212	4.74	7.11	8.46	4.66	0.66	9.01
DVD2213	2.59	4.93	7.57	9.65	6.96	10.55
DVD2214	0.84	6.26	14.86	7.96	4.37	5.90
DVD2216	0.25	7.66	8.66	6.77	5.46	5.79
DVD2218	3.23	5.25	2.67	4.45	1.82	13.44
DVD2226	10.21	2.35	9.38	8.02	2.90	3.31
DVD2227	4.39	7.48	11.69	5.70	5.29	2.52
DVD2228	2.57	2.67	9.26	3.76	2.68	8.64
DVD2229	0.66	7.46	16.47	11.33	5.36	-1.55
DVD2230	11.44	7.46	7.47	7.52	4.86	9.10
DVD2231	3.26	1.36	11.61	1.44	4.74	3.09
DVD2264	12.94	-1.81	22.70	18.29	8.04	-2.38
DVD2265	18.34	13.77	26.54	13.40	6.93	3.85
DVD2267	3.91	-2.52	23.83	8.24	6.50	5.55
DVD2268	2.88	-5.12	19.08	10.03	3.15	4.79
DVD2269	13.95	1.11	15.67	10.17	2.90	6.13
DVD2270	0.10	8.09	3.04	3.13	-0.21	10.16
DVD2272	3.48	11.40	10.55	10.62	3.24	12.33
DVD2273	9.46	4.33	36.75	1.48	3.69	5.46
DVD2274	10.81	10.26	9.13	9.49	18.58	8.50
DVD2276	3.15	10.64	23.28	16.11	8.63	1.67
DVD2277	24.58	14.94	25.41	12.26	4.53	14.02
DVD2280	9.19	3.40	17.00	12.47	3.21	4.57
DVD2281	5.53	2.94	18.82	8.80	5.19	3.30
DVD2284	6.70	10.65	12.24	4.97	0.78	8.14
DVD2285	5.59	3.76	22.63	5.30	2.89	4.75
DVD2286	2.29	3.46	11.49	23.92	3.44	26.19

10

20

30

40

DVD2287	1.71	15.37	31.61	6.87	5.29	1.25
DVD2288	1.24	8.91	10.11	11.09	11.54	9.75
DVD2289	1.40	7.25	14.31	12.34	3.45	7.68
DVD2290	18.01	10.79	28.54	13.72	4.09	9.21
DVD2291	14.90	15.77	29.13	11.32	11.24	3.82
DVD2293	7.25	3.82	17.58	8.43	6.65	5.75
DVD2295	3.32	9.25	24.19	3.38	5.53	12.62
DVD2298	16.38	13.39	26.27	11.11	2.38	41.70
DVD2299	7.37	8.21	19.31	-2.30	6.29	10.27
DVD2300	18.13	22.56	37.50	6.44	2.44	2.41
DVD2301	5.10	-8.79	16.70	5.27	6.68	7.20
DVD2303	7.52	-3.17	16.79	11.19	0.34	7.10
DVD2305	16.18	10.32	30.10	5.65	5.73	10.23
DVD2306	20.94	19.52	37.73	9.66	8.99	8.85
DVD2307	7.74	6.92	21.49	3.41	0.92	4.31
DVD2308	0.64	15.50	13.42	9.13	9.93	7.06
DVD2309	-0.89	5.88	6.76	5.71	1.97	10.58
DVD2310	6.82	17.25	22.05	3.15	1.51	6.81
DVD2314	6.79	14.08	20.70	11.37	0.27	13.46
DVD2315	6.30	4.47	11.81	5.58	2.61	5.37
DVD2316	3.76	2.52	11.68	5.68	8.55	29.45
DVD2317	6.92	6.34	16.43	3.28	2.15	15.36
DVD2318	6.02	9.72	9.10	4.09	4.62	7.34
DVD2319	6.51	5.20	13.72	6.27	7.89	28.78
DVD2320	8.82	7.17	11.70	2.03	-0.10	9.63
DVD2321	12.13	8.79	9.55	4.47	4.43	7.41
DVD2322	-0.78	7.23	32.10	2.70	3.38	10.93
DVD2323	5.90	5.81	11.16	2.12	6.25	5.61
DVD2324	3.73	10.00	17.08	1.14	1.55	8.22
DVD2325	0.08	7.36	12.23	7.56	-0.26	3.36
DVD2326	4.65	14.57	6.88	-0.12	1.37	12.54
DVD2327	3.05	10.26	14.86	6.59	2.65	2.71
DVD2328	2.94	15.32	13.63	6.38	3.68	9.98
DVD2332	0.83	5.37	18.84	2.13	2.73	3.10
DVD2333	6.88	9.02	6.97	4.85	4.06	8.88
DVD2336	0.32	4.44	11.42	6.91	0.69	9.82
DVD2337	9.00	6.79	14.03	6.35	3.05	5.05
DVD2338	5.42	15.46	16.86	14.71	3.26	6.78
DVD2340	4.91	6.32	1.97	0.76	8.84	9.74
DVD2342	5.14	5.69	14.74	3.92	3.43	1.17
DVD2343	15.03	-1.73	8.44	6.68	5.30	9.18
DVD2346	3.60	5.03	21.30	-0.31	8.05	14.85
DVD2347	9.21	15.97	4.09	9.39	7.64	0.87
DVD2348	1.23	2.42	21.36	10.89	6.93	9.46

10

20

30

40

DVD2349	11.17	18.67	29.09	12.14	3.67	4.99
DVD2213	5.07	7.07	7.90	-0.84	6.60	8.74
DVD2208	9.07	6.68	3.39	6.43	8.00	5.10
DVD2245	5.78	3.68	11.57	5.87	6.17	12.41
DVD2211	8.33	3.74	18.93	4.62	1.26	1.01
DVD2238	7.19	4.57	11.81	13.39	3.89	9.49
DVD2302	21.42	-1.91	15.11	8.24	1.85	8.17
DVD2294	11.83	6.83	9.26	7.41	7.95	10.56
DVD2334	-0.24	6.77	6.59	5.72	6.57	6.15
DVD2242	1.07	6.79	16.25	7.35	8.62	7.96
DVD2249	5.16	2.37	0.81	5.25	1.73	7.04

10

【0212】

細胞増殖によって特徴付けられる多数のDVD-Igタンパク質は、MDA-MB-468、NCI-H1650、NCI-H1975、NCI-H441、NCI-H460およびNCI-SNU-5細胞株において相乗効果を示した。細胞増殖はまた、追加の細胞株において測定することができた。

【0213】

相乗効果スコアが、低濃度で生じる組合せ効果に加重されるため、不十分な用量サンプリングに起因した乏しい単剤曲線フィッティングは、自己架橋スコアの人工的な増加に寄与する場合がある。さらに、実験ノイズ、急な用量遷移または長い細胞株倍加時間などの他の次善の因子が、自己架橋相乗効果スコアに不注意に影響を与え得る「部分的に発生した」表現効果に寄与する。相乗的相互作用の二つの異なる尺度にわたって統計的自己架橋分析を行うことにより、一つの尺度または他の統計的に起因するバイアスを正規化することができる。それぞれの自己架橋行列に自己架橋分析を通過できなかったものの組合せの手動による比較は、細胞株パネル全体に微妙であるが一貫性のある組合せ効果を明らかにするために有用であることがわかっている。

20

【0214】

〔実施例3〕 抗体およびDVD-Igタンパク質の特徴付け

機能的活性を阻害するための精製されたDVD-Igタンパク質の能力は、例えば、実施例2に記載されるようにサイトカインバイオアッセイを用いて決定された。組換えヒト抗原に対するDVD-Igタンパク質の結合親和性は、実施例2に記載されるように表面プラズモン共鳴（Biacore（登録商標））測定を用いて決定された。抗体およびDVD-Igタンパク質のバイオアッセイからのIC₅₀値および親和性を位置付けた。親mAbの活性を完全に維持するDVD-Igタンパク質は、将来の進行のための候補対象として選択された。上位2-3の最も有益なDVD-Igタンパク質をさらに特徴付けた。

30

【0215】

〔実施例3.1〕 ヒト化抗体またはDVD-Igタンパク質の薬物動態分析

薬物動態研究は、Sprague-Dawleyラットおよびカニクイザルにおいて行われる。雄性および雌性のラットならびにカニクイザルは、4mg/kgのmAbまたはDVD-Igタンパク質の単回投薬で静脈内または皮下に投薬され、抗原捕捉ELISAを用いて試料を分析し、薬物動態パラメーターを非コンパートメント分析によって決定する。要約すると、ヤギ抗ビオチン抗体（5mg/ml、4℃、一晚）を用いてELISAプレートを被覆し、Superblock（Pierce）を用いてブロックし、10% SuperblockのTTBS中の50ng/mlのビオチン化ヒト抗原とともに室温で2時間インキュベートする。血清試料を連続的に希釈し（TTBS中の0.5%血清、10% Superblock）およびプレート上で30分間、室温にてインキュベートする。HRP標識されたヤギ抗ヒト抗体を用いて検出を行い、4パラメーターのロジスティックフィットを用いて、標準曲線の助けにより濃度を決定する。薬物動態パラメーターに

40

50

関する値は、WinNonlinソフトウェア（Pharsight Corporation, Mountain View, CA）を用いて、非コンパートメントモデルによって決定される。良好な薬物動態プロファイルを有するヒト化mAb（T1／2は8－13日またはそれより良好であり、低クリアランスおよび優れた生物学的利用率は50－100％である）を選択する。

【0216】

〔実施例3．2〕 ヒト化モノクローナル抗体およびDVD-Igタンパク質の物理化学的およびインビトロでの安定性分析

【0217】

サイズ排除クロマトグラフィー

10

水を用いて抗体またはDVD-Igタンパク質を2．5mg／mLに希釈し、20mLをTSKゲルG3000SWXLカラム（Tosoh Bioscience、カタログ#k5539-05k）を用いてShimadzu HPLCシステム上で分析した。211mM硫酸ナトリウム、92mMリン酸ナトリウム、pH7．0を用いて、流速0．3mL／分にて試料をカラムから溶出した。HPLCシステムの操作条件は以下の通りである：

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

勾配：アイソクラチック

流速：0．3mL／分

20

検出波長：280nm

オートサンプラー冷却装置温度：4℃

カラムオープン温度：周囲

実行時間：50分

【0218】

表13は、上記プロトコルにより測定したモノマー（予想される分子量を有する非凝集タンパク質）％として表される親抗体およびDVD-Igタンパク質の純度データを含む。

【0219】

【表 1 4】

表13: サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)によって測定された親抗体およびDVD-Igタンパク質の純度

親抗体または DVD-IgのID	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%)
DVD2202	EGFR (配列4)	EGFR (配列2)	98.4
DVD2203	EGFR (配列2)	EGFR (配列4)	90.7
DVD2204	EGFR (配列4)	EGFR (配列2)	96.5
DVD2205	EGFR (配列2)	EGFR (配列4)	67.7
DVD2206	EGFR (配列4)	EGFR (配列2)	96.8
DVD2207	EGFR (配列2)	EGFR (配列4)	25.2
DVD2208	RON (配列1)	RON (配列2)	92
DVD2209	RON (配列2)	RON (配列1)	97.8
DVD2210	RON (配列1)	RON (配列2)	100
DVD2211	RON (配列2)	RON (配列1)	98.9
DVD2212	RON (配列1)	RON (配列2)	100
DVD2213	RON (配列2)	RON (配列1)	97.6
DVD2214	IGF1R (配列1)	IGF1R (配列2)	100
DVD2216	IGF1R (配列1)	IGF1R (配列2)	98.4
DVD2218	IGF1R (配列1)	IGF1R (配列2)	98.5
DVD2226	IGF1R (配列1)	IGF1R (配列3)	92.6
DVD2227	IGF1R (配列3)	IGF1R (配列1)	93.9
DVD2228	IGF1R (配列1)	IGF1R (配列3)	93.3
DVD2229	IGF1R (配列3)	IGF1R (配列1)	96.5
DVD2230	IGF1R (配列1)	IGF1R (配列3)	93.1
DVD2231	IGF1R (配列3)	IGF1R (配列1)	95.6
DVD2238	ErbB3 (配列3)	ErbB3 (配列2)	100
DVD2240	ErbB3 (配列3)	ErbB3 (配列2)	100
DVD2242	ErbB3 (配列3)	ErbB3 (配列2)	100
DVD2245	ErbB3 (配列1)	ErbB3 (配列3)	100
DVD2247	ErbB3 (配列1)	ErbB3 (配列3)	100
DVD2249	ErbB3 (配列1)	ErbB3 (配列3)	100
DVD2266	EGFR (配列4)	HER-2 (配列1)	100
DVD2267	HER-2 (配列1)	EGFR (配列4)	98.2
DVD2268	HER-2 (配列1)	EGFR (配列2)	94.1
DVD2269	EGFR (配列2)	HER-2 (配列1)	36.8
DVD2270	HER-2 (配列1)	ErbB3 (配列2)	96.9
DVD2271	ErbB3 (配列2)	HER-2 (配列1)	100
DVD2272	HER-2 (配列1)	ErbB3 (配列1)	89.9
DVD2273	ErbB3 (配列1)	HER-2 (配列1)	79.6
DVD2274	HER-2 (配列1)	ErbB3 (配列3)	96.8
DVD2275	ErbB3 (配列3)	HER-2 (配列1)	100

10

20

30

40

DVD2276	IGF1R (配列1)	EGFR (配列2)	66.9
DVD2277	EGFR (配列2)	IGF1R (配列1)	56.7
DVD2278	IGF1R (配列1)	ErbB3 (配列2)	91.2
DVD2279	ErbB3 (配列2)	IGF1R (配列1)	92.5
DVD2281	ErbB3 (配列1)	IGF1R (配列1)	97.6
DVD2282	IGF1R (配列1)	ErbB3 (配列3)	100
DVD2283	ErbB3 (配列3)	IGF1R (配列1)	100
DVD2284	IGF1R (配列1)	EGFR (配列1)	87.2
DVD2285	EGFR (配列1)	IGF1R (配列1)	69.8
DVD2286	IGF1R (配列1)	HER-2 (配列2)	94.1
DVD2287	HER-2 (配列2)	IGF1R (配列1)	78.5
DVD2288	IGF1R (配列1)	HER-2 (配列1)	95.5
DVD2289	HER-2 (配列1)	IGF1R (配列1)	87.4
DVD2290	EGFR (配列3)	EGFR (配列2)	98.5
DVD2291	EGFR (配列2)	EGFR (配列3)	95.7
DVD2292	EGFR (配列3)	ErbB3 (配列2)	100
DVD2293	ErbB3 (配列2)	EGFR (配列3)	97.7
DVD2294	EGFR (配列3)	ErbB3 (配列1)	100
DVD2295	ErbB3 (配列1)	EGFR (配列3)	90.1
DVD2297	ErbB3 (配列3)	EGFR (配列3)	98.9
DVD2298	EGFR (配列3)	RON (配列1)	100
DVD2299	RON (配列1)	EGFR (配列3)	92.4
DVD2300	EGFR (配列3)	HER-2 (配列2)	98.4
DVD2301	HER-2 (配列2)	EGFR (配列3)	91.9
DVD2303	HER-2 (配列1)	EGFR (配列3)	91.8
DVD2304	EGFR (配列3)	IGF1R (配列1)	97.6
DVD2305	IGF1R (配列1)	EGFR (配列3)	97.9
DVD2306	EGFR (配列3)	IGF1R (配列3)	100
DVD2307	IGF1R (配列3)	EGFR (配列3)	96.2
DVD2308	HER-2 (配列2)	RON (配列1)	91.3
DVD2309	RON (配列1)	HER-2 (配列2)	94.6
DVD2310	HER-2 (配列2)	RON (配列2)	71.8
DVD2311	RON (配列2)	HER-2 (配列2)	88.5
DVD2314	HER-2 (配列2)	IGF1R (配列3)	88.6
DVD2315	IGF1R (配列3)	HER-2 (配列2)	88.7
DVD2316	RON (配列1)	HER-2 (配列1)	96.1
DVD2317	HER-2 (配列1)	RON (配列1)	93.9
DVD2318	RON (配列1)	ErbB3 (配列2)	91.5
DVD2319	ErbB3 (配列2)	RON (配列1)	93.6
DVD2320	RON (配列1)	ErbB3 (配列1)	87.2
DVD2321	ErbB3 (配列1)	RON (配列1)	84.2
DVD2322	RON (配列1)	ErbB3 (U1-59)	99.1
DVD2323	ErbB3 (配列3)	RON (配列1)	84.5
DVD2324	RON (配列1)	IGF1R (配列3)	96.2
DVD2325	IGF1R (配列3)	RON (配列1)	87.7
DVD2326	RON (配列1)	IGF1R (配列2)	97.5
DVD2327	IGF1R (配列2)	RON (配列1)	96.9
DVD2328	RON (配列2)	HER-2 (配列1)	60.5

10

20

30

40

DVD2329	HER-2 (配列1)	RON (配列2)	79
DVD2332	RON (配列2)	ErbB3 (配列1)	96.7
DVD2333	ErbB3 (配列1)	RON (配列2)	95
DVD2334	RON (配列2)	ErbB3 (配列3)	91.4
DVD2335	ErbB3 (配列3)	RON (配列2)	96.1
DVD2336	RON (配列2)	IGF1R (配列3)	84.8
DVD2337	IGF1R (配列3)	RON (配列2)	76.6
DVD2338	RON (配列2)	EGFR (配列3)	95
DVD2340	RON (配列2)	IGF1R (配列2)	91.6
DVD2342	EGFR (配列1)	HER-2 (配列1)	88.5
DVD2343	HER-2 (配列1)	EGFR (配列1)	84.2
DVD2346	EGFR (配列1)	IGF1R (配列3)	96.3
DVD2347	IGF1R (配列3)	EGFR (配列1)	97.1
DVD2348	EGFR (配列1)	EGFR (配列3)	96.9
DVD2349	EGFR (配列3)	EGFR (配列1)	97.6

10

【0220】

DVD-Igタンパク質は、大部分のDVD-Igタンパク質が90%を超えるモノマーを示す優れたSECプロファイルを示した。このDVD-Igタンパク質プロファイルは、親抗体について観察されたものと類似していた。

【0221】

20

SDS-PAGE

還元条件下および非還元条件下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) によって抗体およびDVD-Igタンパク質を分析する。Adalimumab (ロットAFP04C) を対照として用いる。還元条件について、100mMのDTTを含む2×トリスグリシンSDS-PAGE試料緩衝液 (Invitrogen、カタログ#LC2676、ロット#1323208) と1:1で試料を混合し、60℃で30分間加熱する。非還元条件について、試料緩衝液と1:1で試料を混合し、100℃で5分間加熱する。還元試料 (10mg/レーン) を12%プレキャストのトリス-グリシンゲル (Invitrogen、カタログ#EC6005box、ロット#6111021) 上に装填し、非還元試料 (10mg/レーン) を8%-16%プレキャストのトリス-グリシンゲル (Invitrogen、カタログ#EC6045box、ロット#6111021) 上に装填する。SeeBlue Plus 2 (Invitrogen、カタログ#LC5925、ロット#1351542) を分子量マーカーとして用いる。ゲルをXCell SureLockミニセルゲルボックス (Invitrogen、カタログ#EI0001) に入れ、最初に、ゲル内の試料を積層するために電圧75を加え、次にダイフロン (dye front) がゲルの底に到達するまで定電圧125にしてタンパク質を分離する。使用される泳動緩衝液は1×トリスグリシンSDS緩衝液であり、10×トリスグリシンSDS緩衝液 (ABC、MPS-79-080106) から調製される。コロイド状青色染色 (Invitrogen、カタログ#46-7015、46-7016) を用いてゲルを一晩染色し、バックグラウンドを除くためにMi

30

40

【0222】

沈降速度分析

3つの標準的な2セクターのカーボン・エボンセンターピースの各々の試料チャンバー内に抗体またはDVD-Igタンパク質を装填する。これらのセンターピースは1.2cmの光路長を有し、サファイアウィンドウで構築される。基準緩衝液に関してはPBSを使用し、各チャンバーは140μLを含む。Beckman Proteome Lab XL-I分析用超遠心分離機 (シリアル#PL106C01) の4ホール (AN-60Ti) ローターを用いて、すべての試料を同時に試験する。

50

【0223】

実行条件をプログラムし、ProteomeLab (v5.6) を用いて遠心分離制御を行う。試料およびローターは、分析前の1時間 ($20.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$) 熱平衡化させる。適切なセル装填の確認を3000rpmで行い、1回のスキャンを各ウェルについて記録する。沈降速度条件は以下の通りである：

試料細胞体積：420mL

基準細胞体積：420mL

温度：20℃

ローター速度：35,000rpm

時間：8:00時間

UV波長：280nm

半径刻み幅：0.003cm

データ回収：信号加算平均なしの1工程あたり1データポイント

スキャン総数：100

10

【0224】

完全な抗体のLC-MS分子量測定

完全な抗体およびDVD-Igタンパク質の分子量をLC-MSによって分析する。水を用いて各抗体またはDVD-Igタンパク質を約1mg/mLに希釈する。タンパク質マイクロトラップ (Michrom Bioresources, Inc、カタログ#004/25109/03) を備えた1100HPLC (Agilent) システムを用いて、脱塩し、試料の5mgをAPI Qstarパルサーi質量分析計 (Applied Biosystems) に導入する。短い勾配を用いて試料を溶出する。勾配は、移動相A (HPLC水中の0.08% TFA、0.02% TFA) および移動相B (アセトニトリル中の0.08% FAおよび0.02% TFA) を用いて、50mL/分の流速にて勾配を実行する。質量分析計は、4.5キロボルトの噴霧電圧で操作され、スキャン範囲は2000から3500の質量対電荷比である。

20

【0225】

抗体およびDVD-Igタンパク質の軽鎖および重鎖のLC-MS分子量測定

抗体およびDVD-Igタンパク質の軽鎖 (LC)、重鎖 (HC) および脱グリコシル化されたHCの分子量測定をLC-MSによって分析する。水を用いて抗体およびDVD-Igタンパク質を1mg/mLに希釈し、試料は、最終濃度が10mMのDTTを用いて、30分間、37℃でLCおよびHCに還元される。抗体およびDVD-Igタンパク質を脱グリコシル化するために、100mgの抗体またはDVD-Igタンパク質は、100mLの全体積中の2mLのPNGase F、5mLの10% N-オクチルグルコシドとともに、一晚37℃にてインキュベートされる。脱グリコシル化後、最終濃度が10mMのDTTを用いて、試料を30分間、37℃にて還元する。C4カラム (Vydac、カタログ#214TP5115、S/N060206537204069) を備えたAgilent 1100HPLCシステムを用いて脱塩し、試料 (5mg) をAPI Qstarパルサーi質量分析計 (Applied Biosystems) に導入する。短い勾配を用いて試料を溶出する。勾配は、移動相A (HPLC水中の0.08% FA、0.02% TFA) および移動相B (アセトニトリル中の0.08% FAおよび0.02% TFA) を用いて、50mL/分の流速にて勾配を実行する。質量分析計は、4.5キロボルトの噴霧電圧で操作され、スキャン範囲は800から3500の質量対電荷比である。

30

40

【0226】

ペプチドマッピング

75mM重炭酸アンモニウム中の最終濃度が6Mの塩酸グアニジンを用いて抗体またはDVD-Igタンパク質を15分間、室温にて変性させる。変性試料は、最終濃度が10mMのDTTを用いて、37℃、60分間還元させ、次に、暗所にて37℃、30分間、50mMヨード酢酸 (IAA) を用いてアルキル化される。アルキル化後、4リットルの

50

10 mM重炭酸アンモニウムに対して、一晚4℃で試料を透析する。透析された試料は、10 mM重炭酸アンモニウム、pH 7.8を用いて1 mg/mLに希釈され、100 mgの抗体またはDVD-Igタンパク質は、1:20 (w/w)トリプシン/Lys-C:抗体またはDVD-Igタンパク質の比でトリプシン (Promega、カタログ#V5111) またはLys-C (Roche、カタログ#11047825001)を用いて37℃で4時間消化される。消化物は、1 NのHClを1 mL用いてクエンチされる。質量分析計検出を用いたペプチドマッピングについて、40 mLの消化物は、Agilent 1100 HPLCシステムを備えた、C18カラム (Vydac、カタログ#218TP51、S/N NE960610.3.5) 上で逆相高速液体クロマトグラフィー (RPHPLC) によって分離される。ペプチドの分離は、移動相A (HPLC等級の水中の0.02% TFAおよび0.08% FA) および移動相B (アセトニトリル中の0.02% TFAおよび0.08% FA) を使用する勾配を用いて、50 mL/分の流速にて実行する。API QSTAR Pulsar i 質量分析計は、4.5 キロボルトの噴霧電圧のポジティブモードで操作され、スキャン範囲は800から2500の質量対電荷比である。

【0227】

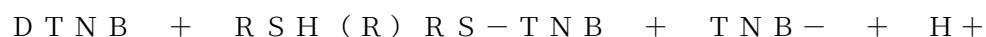
ジスルフィド結合マッピング

抗体またはDVD-Igタンパク質を変性するために、100 mLの抗体またはDVD-Igタンパク質は、100 mM重炭酸アンモニウム中の8 MグアニジンHClの300 mLと混合される。pHをチェックして、pHが7から8の間であることを確認し、最終濃度が6 MのグアニジンHCl中で15分間、室温にて試料を変性させる。一部の变性試料 (100 mL) をMilli-Q水で600 mLに希釈し、最終のグアニジン-HCl濃度を1 Mとする。試料 (220 mg) は、1:50のトリプシン:抗体もしくはDVD-Igタンパク質または1:50のLys-C:抗体もしくはDVD-Igタンパク質 (w/w) の比 (4.4 mg 酵素:220 mg 試料) でトリプシン (Promega、カタログ#V5111、ロット#22265901) またはLys-C (Roche、カタログ#11047825001、ロット#12808000) を用いて37℃で約16時間消化される。さらに5 mgのトリプシンまたはLys-Cを試料に添加し、消化をさらに2時間、37℃で進行させる。各試料に1 mLのTFAを添加することによって消化を停止させる。消化された試料は、Agilent HPLCシステム上のC18カラム (Vydac、カタログ#218TP51、S/N NE020630-4-1A) を用いてRPHPLCによって分離される。分離は、移動相A (HPLC等級の水中の0.02% TFAおよび0.08% FA) および移動相B (アセトニトリル中の0.02% TFAおよび0.08% FA) を用いて、ペプチドマッピングについて使用されたものと同じ勾配で50 mL/分の流速にて実行する。HPLCの操作条件は、ペプチドマッピングについて使用された条件と同じである。API QSTAR Pulsar i 質量分析計は、4.5 キロボルトの噴霧電圧のポジティブモードで操作され、スキャン範囲は800から2500の質量対電荷比である。ジスルフィド結合は、ペプチドの実測されたMWと、ジスルフィド結合によって連結されたトリプシンまたはLys-Cペプチドの予測されたMWとを合致させることによって割り当てられる。

【0228】

遊離スルフィドリル決定

抗体またはDVD-Igタンパク質中の遊離システインを定量するために使用される方法は、特徴的な発色生成物である5-チオ- (2-ニトロ安息香酸) (TNB) を生じさせる、エルマン試薬である5, 5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸) (DTNB) とスルフィドリル基 (SH) の反応に基づいている。反応は、式:



において説明される。

【0229】

TNB-の吸光度は、Cary 50分光光度計を用いて、412 nmで測定される。

吸光度曲線は、遊離SH標準として2メルカプトエタノール(b-ME)の希釈を用いてプロットし、タンパク質中の遊離スルフヒドリル基の濃度は、試料の412nmでの吸光度から決定される。

【0230】

b-ME標準ストックは、最終濃度が0.142mMになるように、HPLC等級の水を用いて14.2Mのb-MEを連続希釈することによって調製される。次に、各濃度について3点測定 of 標準を調製する。アミコンウルトラ10,000MWCO遠心フィルター(Millipore、カタログ#UFC801096、ロット#L3KN5251)を用いて抗体またはDVD-Igタンパク質を10mg/mLに濃縮し、緩衝液をアダリムマブについて使用した処方緩衝液(5.57mMリン酸一水素ナトリウム、8.69mMリン酸二水素ナトリウム、106.69mMのNaCl、1.07mMクエン酸ナトリウム、6.45mMクエン酸、66.68mMマンニトール、pH5.2、0.1%(w/v)Tween)に交換する。試料をシェーカー上で室温にて20分間混合する。次に、180mLの100mMのTris緩衝液、pH8.1を各試料に添加し、標準は、10mMリン酸緩衝液、pH8.1中の2mMのDTNBを300mL添加する。完全に混合した後、Cary 50分光光度計上で412nmの吸光度について試料および標準を測定する。遊離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。試料の遊離SH含有量は、ブランクを差し引いた後、この曲線に基づいて計算される。

【0231】

弱い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を用いて抗体またはDVD-Igタンパク質を1mg/mLに希釈する。電荷異質性は、WCX-10 ProPac分析用カラム(Dionex、カタログ#054993、S/N02722)を備えたShimadzu HPLCシステムを用いて分析される。試料を80%移動相A(10mMリン酸ナトリウム、pH6.0)および20%移動相B(10mMリン酸ナトリウム、500mMのNaCl、pH6.0)においてカラムに充填し、1.0mL/分の流速で溶出する。

【0232】

オリゴ糖プロファイリング

抗体またはDVD-Igタンパク質のPNGase F処理後に放出されるオリゴ糖は、2-アミノベンズアミド(2-AB)標識試薬を用いて誘導される。蛍光標識されたオリゴ糖は、順相の高速液体クロマトグラフィー(NPHPLC)によって分離され、異なる形態のオリゴ糖は、保持時間に基づいて、既知の標準と比較して特徴付けられる。

【0233】

抗体またはDVD-Igタンパク質を最初にPNGase Fを用いて消化し、重鎖のFc部分からN結合のオリゴ糖を切断する。2mLのPNGase Fおよび3mLの10%N-オクチルグルコシドとともに500mLエッペンドルフチューブに抗体またはDVD-Igタンパク質(200mg)を入れる。リン酸緩衝生理食塩水を添加し、最終体積を60mLにする。700RPMに設定したエッペンドルフのサーモミキサー中で一晚37℃にて試料をインキュベートする。また、Adalimumab(ロットAFP04C)を対照としてPNGase Fを用いて消化する。

【0234】

PNGase F処理後、750RPMに設定されたエッペンドルフのサーモミキサー中で95℃、5分間、試料をインキュベートしてタンパク質を沈殿させ、次に、2分間、10,000RPMでエッペンドルフの遠心分離機に試料を置き、沈殿したタンパク質を沈降させる。オリゴ糖を含む上清を500mLのエッペンドルフチューブに移し、スピード-vac中、65℃で乾燥させる。

【0235】

Prozymeから購入される2AB標識キット(カタログ#GKK-404、ロット#132026)を用いて、オリゴ糖を2ABで標識する。製造業者の使用説明書に従っ

10

20

30

40

50

て標識試薬を調製する。酢酸（150 mL、キットにおいて提供される）をDMSOバイアル（キットにおいて提供される）に添加し、溶液を数回、上下にピペティングすることによって混合する。酢酸/DMSO混合物（100 mL）を2-AB色素のバイアル（使用直前）に移し、色素が完全に溶解するまで混合する。次に、色素溶液を還元剤（キットにおいて提供される）のバイアルに添加し、十分に混合に混合する（標識試薬）。標識試薬（5 mL）を各々乾燥させたオリゴ糖試料バイアルに添加し、完全に混合する。65℃で700-800 RPMに設定されたエッペンドルフのサーモミキサーに反応バイアルを置き、2時間反応させる。

【0236】

標識反応後、Prozymeから入手されるGlycoCleansカートリッジ（カタログ#GKI-4726）を用いて過剰の蛍光色素を取り除く。試料を添加前、カートリッジを1 mLのmilli-Q水で洗浄し、その後、1 mLの30%酢酸溶液で5回洗浄する。試料を添加直前に、1 mLのアセトニトリル（Burdick and Jackson、カタログ#AH015-4）をカートリッジに添加する。

10

【0237】

すべてのアセトニトリルがカートリッジを通過した後、新たに洗浄したディスクの中心に試料をスポット状に置き、ディスク上に10分間吸着させる。1 mLのアセトニトリルを用いてディスクを洗浄し、続いて、1 mLの96%アセトニトリルで5回洗浄する。カートリッジを1.5 mLのエッペンドルフチューブ上に置き、2-AB標識されたオリゴ糖をmilli-Q水の3回の洗浄（各洗浄あたり400 mL）により溶出させる。

20

【0238】

Shimadzu HPLCシステムに連結させたGlycosep N HPLC（カタログ#GKI-4728）カラムを用いてオリゴ糖を分離する。Shimadzu HPLCシステムは、システムコントローラー、脱気装置、二重ポンプ、試料冷却器を備えたオートサンプラーおよび蛍光検出器からなっていた。

【0239】

高温での安定性

抗体またはDVD-Igタンパク質の緩衝液は、5.57 mMリン酸一水素ナトリウム、8.69 mMリン酸二水素ナトリウム、106.69 mMのNaCl、1.07 mMクエン酸ナトリウム、6.45 mMクエン酸、66.68 mMマンニトール、0.1%（w/v）Tween、pH 5.2；または10 mMヒスチジン、10 mMメチオニン、4%マンニトール、pH 5.9のいずれかであり、Amicon超遠心フィルターを用いる。適切な緩衝液を用いて、抗体またはDVD-Igタンパク質の最終濃度を2 mg/mLに調整する。次に、抗体またはDVD-Igタンパク質の溶液を濾過滅菌し、0.25 mLのアリコートは無菌条件下で調製する。アリコートを-80℃、5℃、25℃または40℃で1、2または3週間放置する。インキュベーション期間の終わりに、サイズ排除クロマトグラフィーおよびSDS-PAGEによって試料を分析する。

30

【0240】

安定性試料は、還元条件下および非還元条件下でSDS-PAGEによって分析される。使用される手法は、本明細書に記載されたものと同じである。コロイド状青色染色（Invitrogen、カタログ#46-7015、46-7016）を用いてゲルを一晩染色させ、バックグラウンドが透明になるまでMilli-Q水で脱染される。次に、Epson Expressionスキャナー（モデル1680、S/N DASX003641）を用いて、染色されたゲルをスキャンする。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、製造業者によって提供される推奨の手順を用いる。

40

【0241】

参照による援用

本出願を通して引用されてもよい、すべての引用される参考資料（参考文献、特許、特許出願およびウェブサイトを含む）の内容は、これによって、これらの参考資料がそこに

50

記載されているかのように、いずれかの目的で参考資料の全体を参照することにより明確に援用される。本開示は、別段の記載がない限り、当該技術分野において周知である免疫学、分子生物学および細胞生物学の従来技術を使用する。

【0242】

本開示は、分子生物学および薬物送達分野で周知の技術全体も、参照により組み込む。これらの技術には、以下の公報に記載されている技術が含まれるが、これに限定されるものではない。

【0243】

【表 1 5】

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 ed., pp. 20 1-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999); 10

Goodson, in MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE, vol. 2, pp. 115-138 (1984); Hammerling, et al., in: MONOCLONAL ANTIBODIES AND T-CELL HYBRIDOMAS 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981);

Harlow et al., ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988);

Kabat et al., SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) and (1991); 20

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). 30

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 DELIVERY SYSTEMS, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978 40

Winnacker, E.L. FROM GENES TO CLONES: INTRODUCTION TO GENE TECHNOLOGY (1987) VCH Publishers, NY (translated by Horst Ibelgauffs). 634 pp. (ISBN 0-89573-614-4).

【 0 2 4 4 】

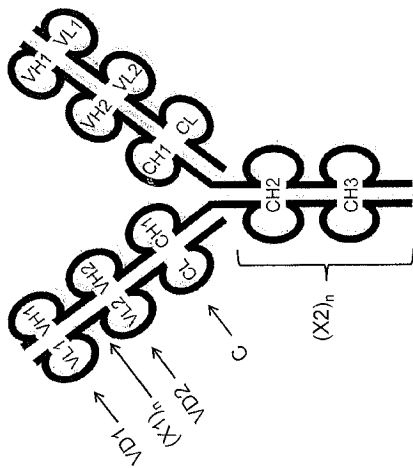
均等

本開示は、その精神または本質的な特徴から逸脱せずに他の具体的な形態で実施することができる。したがって、前述の実施形態は、本開示を限定するというよりはむしろ、すべての点において例示していると考えるべきである。よって、本開示の範囲は、前述の記 50

載によるというよりはむしろ、添付される特許請求の範囲によって示され、したがって、特許請求の範囲の意味および均等の範囲内にあるすべての変更は本明細書に包含されることが意図される。

【図 1】

Figure 1



【配列表】

2015509704000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成26年8月27日(2014.8.27)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、その全体が参照により本明細書に組み込まれている、2011年12月30日に出願した米国仮特許出願第61/581,963号の優先権の利益を主張する。

【0002】

配列表

本出願は、E F S - W e bを介したA S C I Iフォーマットで提出された配列表を含み、その全体が本明細書に参照として援用される。前記A S C I Iコピーは、2013年1月9日に作製され、010160WO. t x tと命名され、40,680バイトのサイズである。

【0003】

同じ細胞上に発現した同じ受容体または2つの異なる受容体の2つの重複しないエピトープを標的とする多価および多重特異的結合タンパク質、製造方法、ならびに疾患の診断、予防および／または治療における使用が提供される。

【背景技術】

【0004】

2つまたはそれ以上の抗原に結合することができる多重特異的結合タンパク質などの工学的に作製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、化学的連結または組換えDNA技術を用いて作製することが可能である。当該技術分野において公知の多重特異的結合タンパク質の構造は様々な存在し、多数の構造および方法には明らかな不利益がある。

【0005】

二特異的抗体は、クアドローマ技術を用いて作製されてきた。しかしながら、この技術における誤対合された副産物の存在および大幅に減少した産生率は、複雑な精製操作が必要とされることを意味している。二特異的抗体は、2つの異なるm A bの化学的連結によっても生産することが可能である。しかしながら、このアプローチは、均一な調製を与えない。

【0006】

以前に使用された他のアプローチは、ヘテロ二官能性クロスリンカーを有する2つの親抗体のカップリング、タンデムな一本鎖F v分子、ダイアボディ、二特異的ダイアボディ、一本鎖ダイアボディおよびジーダイアボディの製造を含む。しかしながら、これらのアプローチのそれぞれは不利益を有する。さらに、I g Gの重鎖中に2つのF a bリピートを含み、4つの抗原分子に結合することができる多価の抗体構築物が記載されている（P C T公開WO 0177342およびM i l l e r e t a l. (2003) J. I m m u n o l. 170 (9) : 4854-61参照）。

【0007】

リガンド-受容体系は、特異性を維持するために同時に進化してきた。それらの相互作用は、特定の生物活性に関して特定のシグナル伝達を活性化する。しかしながら、非リガンド-受容体結合タンパク質、例えば、単一特異性抗体、二重もしくは多重特異性結合タンパク質、非競合性抗体の組合せまたは受容体の細胞外ドメイン（E C D）に対する他の

受容体結合タンパク質は、受容体リガンドー結合部位と異なるエピトープを認識し得る。受容体のECDに対するこのような異なるエピトープへの結合は、新たな予期しないシグナル伝達カスケードを生じ得る細胞内ドメインに立体構造変化を形質導入することがある。

【0008】

米国特許第7,612,181号は、二重可変ドメイン結合タンパク質（DVD結合タンパク質）または二重可変ドメイン免疫グロブリン（DVD-Ig（商標））と呼ばれる、高親和性を有する2つ以上の抗原に結合することが可能な結合タンパク質の新規なファミリーを提供する。DVD-Ig分子は、同じ分子または同時に2つの異なる分子上の2つの異なるエピトープに結合することができる四価の二重特異的Ig様タンパク質である。DVD-Igは、二価抗体のN末端に融合した2つの可変ドメインから構成される固有の結合タンパク質である。可変ドメインは、互いに直接融合されてもよく、または各種の長さおよびアミノ酸組成を有する合成ペプチドリンカーを介して直接接続されてもよい。DVD-Igは、完全であり、機能的なFcドメインを用いて遺伝子操作され得て、次に適切なエフェクター機能を媒介することができる。DVD-Igフォーマットは、抗体対の最適な柔軟性、2つの抗原結合ドメインの配向およびこれらを連結するリンカーの長さに起因して、受容体の生物学のいくつかの固有の態様と、おそらく新たな治療法を明らかにすることができる。

【0009】

種々の構造が当該技術分野において提供され、いくつかは利点と欠点を有するが、特定の構築物は、特定の標的に結合する特定の特性を有する多価結合タンパク質を調製するために必要とされる。さらに、新しい可変ドメイン配列は、結合タンパク質の特性をさらに改善することができる。具体的には、ある種の先行技術のDVD-Ig構築物を用いた場合、ある程度の立体障害は、これらの先行技術のDVD-Ig構築物への標的の結合に影響を与えている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】国際公開第2001/077342号

【特許文献2】米国特許第7,612,181号明細書

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】Miller et al. (2003) J. Immunol. 170 (9): 4854-61

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

同じ細胞上に発現した同じ受容体または2つの異なる受容体の2つの重複しないエピトープに結合することができる、改良された多価結合タンパク質が、当該技術分野において必要とされている。同じ細胞上に発現した同じ受容体または2つの異なる受容体の2つの重複しないエピトープに結合する新規な結合タンパク質が提供され、ここで、結合タンパク質は、EGFRとEGFR、RONとRON、IGF-1RとIGF-1R、Erb-B3とErb-B3、EGFRとHER2、EGFRとIGF-1R、EGFRとErb-B3、EGFRとRON；RONとHER2；RONとErb-B3；RONとIGF-1R；IGF-1RとErb-B3；IGF-1RとHER2；またはHER2とErb-B3を結合させることができる。

【課題を解決するための手段】

【0013】

（発明の要旨）

同じ細胞上に発現した同じ受容体または2つの異なる受容体の2つの異なる（例えば、

重複しない) エピトープを標的とすることができる結合タンパク質が提供される。一実施形態において、高親和性で、同じ細胞上に発現した同じ受容体または2つの異なる受容体の2つの異なる(例えば、重複しない) エピトープに結合することができる結合タンパク質が提供される。

【0014】

一実施形態において、同じ細胞上に発現した同じ受容体または2つの異なる受容体の2つの異なる(例えば、重複しない) エピトープに結合するポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であって、ポリペプチド鎖は、 $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$ 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、 $X1$ はアミノ酸またはポリペプチドを表し、 $X2$ はFc領域を表し、 n は0または1である結合タンパク質が提供される。一実施形態において、結合タンパク質中の $VD1$ および $VD2$ は、重鎖可変ドメインである。別の実施形態において、 $VD1$ および $VD2$ は、同じ受容体の2つの重複しないエピトープに結合することができる。別の実施形態において、 $VD1$ および $VD2$ は、同じ細胞上に発現した2つの異なる受容体に結合することができる。さらに別の実施形態において、 C は、重鎖定常ドメインである。例えば、 $X1$ はリンカーである(但し、 $X1$ は $CH1$ ではない。)。

【0015】

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、同じ細胞上に発現した同じ受容体または2つの異なる受容体の2つの異なる(例えば、重複しない) エピトープに結合するポリペプチド鎖を含み、ポリペプチド鎖は、 $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$ 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、 $X1$ はリンカーであり、 $X2$ はFc領域である。一実施形態において、 $X1$ は、リンカーであり、但し、 $CH1$ ではない。一実施形態において、 $VD1$ および $VD2$ 重鎖可変ドメインは、配列番号30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54または56からの3つのCDRを独立して含む。別の実施形態において、結合タンパク質は、EGFRとEGFR、RONとRON、IGF-1RとIGF-1R、Erb-B3とErb-B3、EGFRとHER2、EGFRとIGF-1R、EGFRとErb-B3、EGFRとRON; RONとHER2; RONとErb-B3; RONとIGF-1R; IGF-1RとErb-B3; IGF-1RとHER2; またはHER2とErb-B3を結合させることができる。一実施形態において、 $VD1$ および $VD2$ 重鎖可変ドメインは、配列番号30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54または56を独立して含む。

【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、同じ細胞上に発現した同じ受容体または2つの異なる受容体の2つの異なる(例えば、重複しない) エピトープに結合するポリペプチド鎖を含み、ポリペプチド鎖は、 $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$ 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、 $X1$ はリンカーであり、 $X2$ はFc領域を含まない。一実施形態において、 $X1$ はリンカーであり、但し、 CL ではない。一実施形態において、 $VD1$ および $VD2$ 軽鎖可変ドメインは、配列番号31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55または57からの3つのCDRを独立して含む。別の実施形態において、結合タンパク質は、EGFRとEGFR、RONとRON、IGF-1RとIGF-1R、Erb-B3とErb-B3、EGFRとHER2、EGFRとIGF-1R、EGFRとErb-B3、EGFRとRON; RONとHER2; RONとErb-B3; RONとIGF-1R; IGF-1RとErb-B3; IGF-1RとHER2; またはHER2とErb-B3を結合させることができる。一実施形態において、 $VD1$ および $VD2$ 軽鎖可変ドメインは、配列番号31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55または57を独立して含む。

【0017】

別の実施形態において、同じ細胞上に発現した同じ受容体または2つの異なる受容体の2つの異なる（例えば、重複しない）エピトープに結合し、2つのポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であって、第一のポリペプチド鎖はVD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n（VD1は第一の重鎖可変ドメインであり、VD2は第二の重鎖可変ドメインであり、Cは重鎖定常ドメインであり、X1は第一のリンカーであり、X2はFc領域である。）を含み、前記第二のポリペプチド鎖はVD1-(X1)n-VD2-C-(X2)n（VD1は第一の軽鎖可変ドメインであり、VD2は第二の軽鎖可変ドメインであり、Cは軽鎖定常ドメインであり、X1は第二のリンカーであり、X2はFc領域を含まない。）を含む、結合タンパク質が提供される。いくつかの実施形態において、第一および第二のX1は同じである。他の実施形態において、第一および第二のX1は異なっている。いくつかの実施形態において、第一のX1はCH1ドメインではなく、および／または第二のX1はCLドメインではない。一実施形態において、第一のX1および第二のX1は短い（例えば、6アミノ酸）リンカーである。別の実施形態において、第一のX1および第二のX1は長い（例えば、6を超えるアミノ酸）リンカーである。別の実施形態において、第一のX1は短いリンカーであり、第二のX1は長いリンカーである。別の実施形態において、第一のX1は長いリンカーであり、第二のX1は短いリンカーである。一実施形態において、VD1およびVD2重鎖可変ドメインは、配列番号30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54または56からの3つのCDRを独立して含み、VD1およびVD2軽鎖可変ドメインは、配列番号31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55または57からの3つのCDRを独立して含む。別の実施形態において、結合タンパク質は、EGFRとEGFR、RONとRON、IGF-1RとIGF-1R、Erb-B3とErb-B3、EGFRとHER2、EGFRとIGF-1R、EGFRとErb-B3、EGFRとRON；RONとHER2；RONとErb-B3；RONとIGF-1R；IGF-1RとErb-B3；IGF-1RとHER2；またはHER2とErb-B3を結合させることができる。一実施形態において、VD1およびVD2重鎖可変ドメインは、配列番号30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54または56を独立して含み、VD1およびVD2軽鎖可変ドメインは、配列番号31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55または57を独立して含む。

【0018】

一実施形態において、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のそれぞれは、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は第一のリンカーであり、X2はFc領域であり、第二の2つのポリペプチド鎖のそれぞれは、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は第二のリンカーであり、X2はFc領域を含まない。このようなDVD結合タンパク質は、4つの抗原結合部位を有している。いくつかの実施形態において、第一および第二のX1は同じである。他の実施形態において、第一および第二のX1は異なる。いくつかの実施形態において、第一のX1は、CH1ドメインでないおよび／または第二のX1はCLドメインでない。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、同じ細胞上に発現した同じ受容体または2つの異なる受容体の2つの異なる（例えば、重複しない）エピトープに結合することができる。したがって、いくつかの実施形態において、結合タンパク質は、任意の配向で、同じ細胞に発現した同じ受容体または2つの異なる受容体の2つの異なる（例えば、重複しない）エピトープに結合することができる少なくとも2つの可変ドメイン配列（例えば、VD1およびVD2）を含む。いくつかの実施形態において、VD1およびVD2は、独立して選択される。したがって、いくつかの実施形態において、VD1

およびVD2は、同一の配列番号を含み、他の実施形態において、VD1およびVD2は、異なる配列番号を含む。一実施形態において、VD1およびVD2重鎖可変ドメインは、配列番号30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54または56からの3つのCDRを独立して含み、VD1およびVD2軽鎖可変ドメインは、配列番号31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55または57からの3つのCDRを独立して含む。別の実施形態において、結合タンパク質は、EGFRとEGFR、RONとRON、IGF-1RとIGF-1R、Erb-B3とErb-B3、EGFRとHER2、EGFRとIGF-1R、EGFRとErb-B3、EGFRとRON；RONとHER2；RONとErb-B3；RONとIGF-1R；IGF-1RとErb-B3；IGF-1RとHER2；またはHER2とErb-B3を結合させることができる。一実施形態において、VD1およびVD2重鎖可変ドメインは、配列番号30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54または56を独立して含み、VD1およびVD2軽鎖可変ドメインは、配列番号31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55または57を独立して含む。

【0019】

別の実施形態において、結合タンパク質は、表1に示される重鎖および軽鎖配列を含む。

【0020】

重鎖、軽鎖、二本鎖または四本鎖の実施形態のいずれかのさらなる実施形態は、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）；RADAAAAG₄S₄（配列番号9）；SAKTTPKLEEGEFSEARV（配列番号10）；ADAAAP（配列番号11）；ADAAPTVSIFPP（配列番号12）；TVAAAP（配列番号13）；TVAAAPSVFIFPP（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）；またはGHEAAAVMQVQYPAS（配列番号26）；TVAAAPSVFIFPPPTVAAAPSVFIFPP（配列番号27）；ASTKGPSVFPLAPASTKGPSVFPLAP（配列番号28）；またはG/Sに基づく配列（例えば、G4SとG4Sリピート；配列番号29として開示される「G4S」）を含む少なくとも1つのX1リンカーを含む。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は可変Fc領域である。

【0021】

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、天然配列Fc領域またはバリエーション配列Fc領域である。さらに別の実施形態において、Fc領域は、IgG1のFc領域、IgG2のFc領域、IgG3のFc領域、IgG4のFc領域、IgAのFc領域、IgMのFc領域、IgEのFc領域またはIgDのFc領域である。

【0022】

同じ細胞上に発現した同じ受容体または2つの異なる受容体の2つの異なる（例えば、重複しない）エピトープに結合する結合タンパク質を作製する方法が提供される。一実施形態において、同じ細胞上に発現した同じ受容体または2つの異なる受容体の2つの異なる（例えば、重複しない）エピトープに結合する結合タンパク質を作製する方法は、第一のエピトープまたは受容体に結合する第一の親抗体またはその抗原結合部分を得る工程；

b) 第二のエピトープまたは受容体に結合する第二の親抗体またはその抗原結合部分を得る工程； c) 本明細書に記載されている結合タンパク質のいずれかをコードする構築物（単数または複数）を調製する工程； および d) ポリペプチド鎖を発現させ、第一および第二のエピトープまたは受容体に結合する結合タンパク質を生じさせる工程を含む。

【0023】

本明細書における実施形態のいずれかにおいて、存在する場合、VD1重鎖可変ドメイン、および存在する場合、軽鎖可変ドメインは、第一の親抗体またはその抗原結合部分由来であってもよく； 存在する場合、VD2重鎖可変ドメイン、および存在する場合、軽鎖可変ドメインは、第二の親抗体またはその抗原結合部分由来であってもよい。第一および第二の親抗体は同じであってもよくまたは異なってもよい。

【0024】

一実施形態において、第一の親抗体またはその抗原結合部分は第一の抗原に結合し、第二の親抗体またはその抗原結合部分は第二の抗原に結合する。一実施形態において、第一および第二の抗原は同じ抗原である。別の実施形態において、親抗体は同じ抗原上の異なるエピトープに結合する。別の実施形態において、第一および第二の抗原は異なる抗原である。別の実施形態において、第一および第二の抗原は、同じ細胞上に発現した2つの異なる受容体由来である。別の実施形態において、第一の親抗体またはその抗原結合部分は、第二の親抗体またはその抗原結合部分が第二の抗原に結合する効力と異なる効力で第一の抗原に結合する。さらに別の実施形態において、第一の親抗体またはその抗原結合部分は、第二の親抗体またはその抗原結合部分が第二の抗原に結合する親和性と異なる親和性で第一の抗原に結合する。

【0025】

別の実施形態において、第一の親抗体またはその抗原結合部分および第二の親抗体またはその抗原結合部分は、ヒト抗体、CDR移植された抗体、ヒト化抗体および／または親和性成熟された抗体である。

【0026】

別の実施形態において、結合タンパク質は、第一の親抗体もしくはその抗原結合部分または第二の親抗体も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つの所望の特性を有する。あるいは、第一の親抗体もしくはその抗原結合部分または第二の親抗体もしくはその抗原結合部分は、結合タンパク質によって示される少なくとも1つの所望の特性を有する。一実施形態において、所望の特性は、1つ以上の抗体パラメーターである。別の実施形態において、抗体パラメーターは、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、可溶性、生産効率、免疫原性、薬物動態、生物学的利用率、組織交差反応性またはオルソロガス抗原結合性である。一実施形態において、結合タンパク質は多価である。別の実施形態において、結合タンパク質は多重特異的である。本明細書に記載されている多価および／または多重特異的結合タンパク質は、特に治療的見地から望ましい特性を有する。例えば、多価および／または多重特異的結合タンパク質は、(1) 抗体が結合する抗原を発現している細胞によって、二価抗体より速く内部に取り込まれる（および／または異化される）； (2) タンパク質に結合するアゴニストであり； および／または (3) 多価結合タンパク質が結合することができる抗原を発現している細胞の細胞死および／またはアポトーシスを誘導し得る。多価および／または多重特異的結合タンパク質の少なくとも1つの抗原結合特異性を提供する「親抗体」は、抗体が結合する抗原を発現している細胞によって内部に取り込まれ（および／または異化される）抗体であり得、および／またはアゴニスト、細胞死誘導および／またはアポトーシス誘導抗体であり得、本明細書に記載されている多価および／または多重特異的結合タンパク質は、これらの特性の1つ以上の改善を示し得る。さらに、親抗体は、これらの特性の任意の1つ以上を欠損してもよいが、本明細書に記載されるように、多価結合タンパク質として構築された場合、これらの1つ以上を取得してもよい。

【0027】

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、少なくとも約 $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; 少なくとも約 $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; 少なくとも約 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; 少なくとも約 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; または少なくとも約 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ のうちの1つ以上の標的への結合速度定数 (K_{on}) を有する。一実施形態において、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、約 $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から約 $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、約 $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から約 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、約 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から約 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、または約 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から約 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の、1つ以上の標的に対する結合速度定数 (K_{on}) を有する。

【0028】

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} ; または最大約 10^{-6} s^{-1} のうちの1つ以上の標的への解離速度定数 (K_{off}) を有する。一実施形態において、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、約 10^{-3} s^{-1} から約 10^{-4} s^{-1} の、約 10^{-4} s^{-1} から約 10^{-5} s^{-1} の、または約 10^{-5} s^{-1} から約 10^{-6} s^{-1} の間の、1つ以上の標的に対する解離速度定数 (K_{off}) を有する。

【0029】

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 または最大約 10^{-13} M のうちの1つ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、結合タンパク質は、約 10^{-7} M から約 10^{-8} M の ; 約 10^{-8} M から約 10^{-9} M の ; 約 10^{-9} M から約 10^{-10} M の ; 約 10^{-10} M から約 10^{-11} M の ; 約 10^{-11} M から約 10^{-12} M の ; または約 10^{-12} M から約 10^{-13} M のその標的に対する解離定数 (K_d) を有する。

【0030】

別の実施形態において、結合タンパク質は、薬剤をさらに含むコンジュゲートである。一実施形態において、抗原は、免疫接着分子、造影剤、治療剤または細胞毒性剤である。一実施形態において、造影剤は、放射性標識、酵素、蛍光標識、発光標識、生物発光標識、磁気標識またはビオチンである。別の実施形態において、放射性標識は、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho または ^{153}Sm である。さらに別の実施形態において、治療剤または細胞毒性剤は、代謝抑制剤、アルキル化剤、抗生物質、成長因子、サイトカイン、抗血管新生剤、抗有糸分裂剤、アントラサイクリン、トキシシンまたはアポトーシス剤である。

【0031】

別の実施形態において、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、この結晶は、無担体医薬徐放結晶である。別の実施形態において、結晶化された結合タンパク質は、この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。

【0032】

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る。例えば、グリコシル化パターンは、ヒトグリコシル化パターンである。

【0033】

本明細書に開示されている結合タンパク質のいずれか1つをコードする単離された核酸も提供される。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、ベクターは、p cDNA ; p T T (Durocher et al. (2002) Nucleic Acids Res. 30 (2) ; p T T 3 (追加の多重クローニング部位を有する p T T) ; p E F B O S (Mizushima and Nagata, (1990年) Nucleic Acids Res. 18 : (17) ; p B V ; p J V ; p cDNA 3.1 T O P O ; p E F 6 T O P O ; p B O S ; p H y b E ; または p B J である。一実施形態において、ベクターは、米国特許公開第 2 0 0 9 0 2 3

9259号に開示されているベクターである。

【0034】

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、例えば、E. コリ (E. coli) である。別の実施形態において、宿主細胞は真核細胞、例えば、原生生物細胞、動物細胞、植物細胞または真菌細胞である。一実施形態において、宿主細胞は、これらに限定されないが、CHO、COS; NS0、SP2、PER. C6を含む哺乳動物細胞；またはサッカロミセス・セレビシアエ (Saccharomyces cerevisiae) などの真菌細胞；または Sf9 などの昆虫細胞である。一実施形態において、異なる特異性を有する2つまたはそれ以上の結合タンパク質は、単一の組換え宿主細胞中で生産される。例えば、抗体の混合物の発現は、Oligoclones (商標) (Merus B. V., The Netherlands) 米国特許第7, 262, 028号および第7, 429, 486号と呼ばれている。

【0035】

結合タンパク質を生産するのに十分な条件下で、本明細書に開示されている宿主細胞のいずれか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が提供される。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。別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。別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。

【0036】

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、この組成物は、結晶化された結合タンパク質、成分、および少なくとも1つのポリマー性担体を含む。一実施形態において、ポリマー担体は、ポリ(アクリル酸)、ポリ(シアノアクリレート)、ポリ(アミノ酸)、ポリ(無水物)、ポリ(デブシペプチド)、ポリ(エステル)、ポリ(乳酸)、ポリ(乳酸-α-グリコール酸)またはPLGA、ポリ(b-ヒドロキシブチレート)、ポリ(カプロラクトン)、ポリ(ジオキサノン)；ポリ(エチレングリコール)、ポリ((ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド、ポリ[(オルガノ)ホスファゼン]、ポリ(オルトエステル)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリ(ビニルピロリドン)、無水マレイン酸-アルキルビニルエーテル共重合体、ブルロニックポリオール、アルブミン、アルギナート、セルロースおよびセルロース誘導体、コラーゲン、フィブリン、ゼラチン、ヒアルロン酸、オリゴ糖、グリカミノグリカン、硫酸化多糖またはこれらの混和物および共重合体である。一実施形態において、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またはポリエチレングリコールである。

【0037】

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。

【0038】

本明細書に開示された結合タンパク質および医薬として許容される担体を含む医薬組成物が提供される。さらなる実施形態において、この医薬組成物は、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、化学治療剤、造影剤、細胞毒性剤、血管新生阻害剤(抗VEGF抗体または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および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、CTL4-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セレクトリン抗体、小分子阻害剤が含まれるが、これらに限定されない。)、抗サイトカイン抗体またはその機能的断片(抗IL-18、抗TNFおよび抗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；検出可能な標識またはレポーター、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、エピネフリンまたは類似体、サイトカインまたはサイトカインアンタゴニストであり得る。

【0039】

本明細書に開示されている結合部分によって結合され得る標的または複数の標的が有害である障害に罹患しているヒト対象を診断および／または治療する方法であって、標的または複数の標的の活性が、ヒト対象において阻害され、1以上の症状が緩和されまたは治療が達成されるように、本明細書に開示されている結合タンパク質をヒト対象に投与することを含む方法が提供される。本明細書において提供される結合タンパク質は、乳房、結腸、直腸、肺、中咽頭、下咽頭、食道、胃、脾臓、肝臓、胆嚢および胆管、小腸、尿路（腎臓、膀胱および尿路上皮を含む。）、女性生殖路（子宮頸部、子宮および卵巣ならびに絨毛癌および妊娠性絨毛性疾患を含む。）、男性生殖路（前立腺、精嚢、精巣および生殖細胞腫瘍を含む。）、内分泌腺（甲状腺、副腎および下垂体を含む。）および皮膚の癌腫ならびに血管腫、悪性黒色腫、肉腫（骨および軟部組織から生じるものならびにカポジ肉腫を含む。）、脳、神経、眼および髄膜の腫瘍（星状膠細胞腫、神経膠腫、神経膠芽細胞腫、網膜芽細胞腫、神経腫、神経芽細胞腫、シュワン細胞腫および髄膜腫を含む。）、白血病などの造血性悪性疾患から生じる固形腫瘍およびリンパ腫（ホジキンリンパ腫と非ホジキンリンパ腫の両方）を含む原発性および転移性の癌に罹患しているヒトを診断および／または治療するために使用することができる。

【0040】

別の実施形態において、治療されるべき障害または状態は、例えば、HIV、ヒトライノウイルス、エンテロウイルス、コロナウイルス、ヘルペスウイルス、インフルエンザウイルス、パラインフルエンザウイルス、呼吸器合胞体ウイルスまたはアデノウイルスによって引き起こされる、ヒトにおけるウイルス感染によって生じる症状を含む。

【0041】

本明細書において提供される結合タンパク質は、神経障害を治療するために用いることができる。一実施形態において、本明細書において提供される結合タンパク質またはその抗原結合部分は、神経再生および脊髄損傷を含む神経変性疾患および状態を治療するために用いられる。

【0042】

別の実施形態は、疾患または障害の治療における結合タンパク質の使用を提供し、前記疾患または障害は、関節リウマチ、変形性関節症、若年性慢性関節炎、敗血症性関節炎、ライム関節炎、乾癬性関節炎、反応性関節炎、脊椎関節症、全身性紅斑性狼瘡、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、インシュリン依存性糖尿病、甲状腺炎、喘息、アレルギー性疾患、乾癬、皮膚炎、強皮症、移植片対宿主病、臓器移植拒絶、臓器移植に関連する急性または慢性免疫疾患、サルコイドーシス、アテローム性動脈硬化症、播種性血管内凝固、川崎病、バセドウ病、ネフローゼ症候群、慢性疲労症候群、ウェゲナー肉芽腫症、ヘノッホ・シェーライン紫斑症、腎臓の顕微鏡的血管炎、慢性活動性肝炎、ブドウ膜炎、敗血症性ショック、毒素性ショック症候群、敗血症症候群、悪液質、感染性疾患、寄生性疾患、後天性免疫不全症候群、急性横断性脊髄炎、ハンチントン舞踏病、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型および多内分泌腺機能低下症候群Ⅱ型、シュミット症候群、成人（急性）呼吸促迫症候群、脱毛症、円形脱毛症、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、エルシニアおよびサルモネラ関連関節炎、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Ⅰ

g A病、自己免疫性溶血性貧血、クームス陽性溶血性貧血、後天性悪性貧血、若年性悪性貧血、筋痛性脳脊髄炎／ロイアルフリー病、慢性粘膜皮膚カンジダ症、巨細胞性動脈炎、原発性硬化性肝炎、突発性自己免疫性肝炎、後天性免疫不全関連疾患、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、線維性肺疾患、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、線維症、放射性線維症、閉塞性細気管支炎、慢性好酸球性肺炎、リンパ球浸潤性肺疾患、感染後間質性肺疾患、通風関節炎、自己免疫性肝炎、1型自己免疫性肝炎（古典的自己免疫性またはルポイド肝炎）、2型自己免疫性肝炎（抗LKM抗体肝炎）、自己免疫媒介性低血糖症、黒色表皮腫を伴うB型インシュリン抵抗性、副甲状腺機能低下症、臓器移植に関連する急性免疫疾患、臓器移植に関連する慢性免疫疾患、変形性関節症、原発性硬化性胆管炎、1型乾癬、2型乾癬、特発性白血球減少症、自己免疫性好中球減少症、腎臓病NOS、糸球体腎炎、腎臓の顕微鏡的血管炎、ライム病、円板状紅斑性狼瘡、男性不妊症特発性またはNOS、精子自己免疫、多発性硬化症（すべてのサブタイプ）、交感性眼炎、結合組織疾患に続発する肺高血圧症、グッドパスチャー症候群、結節性多発動脈炎の肺症状、急性リウマチ熱、リウマチ性脊椎炎、スチル病、全身性硬化症、シェーグレン症候群、高安病／動脈炎、自己免疫性血小板減少症、特発性血小板減少症、自己免疫性甲状腺疾患、甲状腺機能亢進症、甲状腺腫自己免疫性甲状腺機能低下症（橋本病）、萎縮性自己免疫性甲状腺機能低下症、原発性粘液水腫（*primary myxoedema*）、水晶体起因性ブドウ膜炎、原発性血管炎、白斑急性肝疾患、慢性肝疾患、アルコール性肝硬変、アルコール誘発性肝障害、胆汁うっ滞（*choleostasis*）、特異体質性肝疾患、薬物誘発性肝炎、非アルコール性脂肪性肝炎、アレルギーおよび喘息、B群連鎖球菌（GBS）感染、精神障害、うつ病、統合失調症、Th2型およびTh1型によって媒介される疾病、急性および慢性疼痛、疼痛の様々な形態、癌、肺癌、乳癌、胃癌、膀胱癌、大腸癌、膵臓癌、卵巣癌、前立腺癌、直腸癌、造血性悪性病変、白血病、リンパ腫、無 β リポタンパク質血症、先端チアノーゼ、急性および慢性寄生性または感染性プロセス、急性白血病、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、急性骨髄性白血病（AML）、急性または慢性細菌感染、急性膵炎、急性腎不全、腺癌、心房（*aerial*）異所性拍動、AIDS認知症複合、アルコール誘発性肝炎、アレルギー性結膜炎、アレルギー性接触性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、同種移植拒絶、 α -1-アンチトリプシン欠乏症、筋萎縮性側索硬化症、貧血、狭心症、前角細胞変性、抗cd3治療、抗リン脂質症候群、抗受容体過敏症反応（*anti-receptor hypersensitivity reactions*）、大動脈（*aortic*）および動脈瘤、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（持続的または発作性）、心房粗動、房室ブロック、B細胞リンパ腫、骨移植拒絶、骨髄移植（BMT）拒絶、脚ブロック、パーキットリンパ腫、火傷、心不整脈、心機能不全症候群（*cardiac stun syndrome*）、心臓腫瘍、心筋症、心肺バイパス炎症反応、軟骨移植拒絶、小脳皮質変性、小脳疾患、無秩序なまたは多巣性心房頻脈、化学療法関連疾患、慢性骨髄性白血病（CML）、慢性アルコール症、慢性炎症性病変、慢性リンパ性白血病（CLL）、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、慢性サリチル酸中毒、結腸直腸癌、うっ血性心不全、結膜炎、接触性皮膚炎、肺性心、冠動脈疾患、クロイツフェルトーヤコブ病、培養陰性敗血症、嚢胞性線維症、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、

垂体外路および小脳疾患、家族性血球貪食性リンパ組織球症 (familial hematophagocytic lymphohistiocytosis)、致死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、いずれかの臓器または組織の移植片拒絶、グラム陰性敗血症、グラム陽性敗血症、細胞内生物に起因する肉芽腫、有毛細胞白血病、ハラーホルデン・スパッツ病、橋本甲状腺炎、枯草熱、心臓移植拒絶、血色素症、血液透析、溶血性尿毒症症候群／血栓溶解血小板減少紫斑病、出血、肝炎 (A型)、ヒス束不整脈、HIV感染／HIV神経障害、ホジキン病、運動過剰疾患、過敏症反応、過敏性肺炎、高血圧、運動低下疾患、視床下部一下垂体－副腎皮質系評価、特発性アジソン病、特発性肺線維症、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、カボジ肉腫、腎移植拒絶、レジオネラ、リーシュマニア症、ハンセン病、皮質脊髄系の病変、脂肪血症 (lipedema)、肝臓移植拒絶、リンパ浮腫 (lymphedema)、マラリア、悪性リンパ腫、悪性組織球増殖症、悪性黒色腫、髄膜炎、髄膜炎菌血症 (meningococcemia)、代謝性／特発性、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・シャイドレーガーおよびマシャドージョセフ)、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・チューバキュロシス、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、腹部大動脈およびその分枝の閉塞、閉塞性動脈疾患、okt3療法、精巣炎／精巣上体炎、精巣炎／精管復元術処置、臓器肥大、骨粗鬆症、脾臓移植拒絶、脾癌、腫瘍随伴性症候群／悪性腫瘍の高カルシウム血症、副甲状腺移植拒絶、骨盤内炎症性疾患、通年性鼻炎、心膜疾患、末梢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グロブリン血症および皮膚変化症候群 (skin changes syndrome))、灌流後症候群 (post perfusion syndrome)、ポンプ後症候群 (post pump syndrome)、心筋梗塞後開心術症候群、子癇前症、進行性核上性麻痺、原発性肺高血圧、放射線療法、レイノー現象および病、レイノー病、レフサム病、規則的なQRS幅の狭い頻脈症 (regular narrow QRS tachycardia)、腎血管性高血圧、再灌流障害、拘束型心筋症、肉腫、強皮症、老年性舞蹈病、レビー小体型の老年性認知症、血清反応陰性関節炎、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 arrhythmias)、脊髄性運動失調、脊髄小脳変性、連鎖球菌性筋炎、小脳の構造的病変、亜急性硬化性全脳炎、失神、心血管系の梅毒、全身性アナフィラキシー、全身性炎症反応症候群、全身性発症若年性関節リウマチ、T細胞またはFABALL、毛細血管拡張症、閉塞性血栓血管炎、血小板減少症、毒性、移植、外傷／出血、III型過敏症反応、IV型過敏症、不安定狭心症、尿毒症、尿路性敗血症、心臓弁膜症、静脈瘤、血管炎、静脈疾患、静脈血栓症、心室細動、ウイルスおよび真菌感染、ウイルス性脳炎 (vitalencephalitis)／無菌性髄膜炎、ウイルス関連血球貪食症候群、ウェルニッケーコルサコフ症候群、ウィルソン病、いずれかの臓器または組織の異種移植拒絶、急性冠症候群、急性特発性多発性神経炎、急性炎症性脱髄性多発神経根神経障害、急性虚血、成人スチル病、アナフィラキシー、抗リン脂質抗体症候群、再生不良性貧血、アトピー性湿疹、アトピー性皮膚炎、自己免疫性皮膚炎、連鎖球菌感染に伴う自己免疫異常、自己免疫性腸症、自己免疫性難聴、自己免疫性リンパ増殖症候群 (ALPS)、自己免疫性心筋炎、自己免疫性早期卵巣不全、眼瞼炎、気管支拡張症、水疱性類天疱瘡、心血管疾患、劇症型抗リン脂質症候群、セリアック病、頸部脊椎症、慢性虚血、瘢痕性類天疱瘡、多発性硬化症のリスクを有する臨床的孤発症候群 (c i s)、小児発症精神障害、涙囊炎、皮膚筋炎、糖

尿病性網膜症、椎間板ヘルニア、椎間板脱出、薬物誘発免疫性溶血性貧血、子宮内膜症、眼内炎、上強膜炎、多形性紅斑、重症型多形性紅斑、妊娠性類天疱瘡、ギラン・バレー症候群（GBS）、ヒューズ症候群、特発性パーキンソン病、特発性間質性肺炎、I g E 媒介性アレルギー、免疫性溶血性貧血、封入体筋炎、感染性眼炎症疾患、炎症性脱髄疾患、炎症性心疾患、炎症性腎疾患、I P F / U I P、虹彩炎、角膜炎、乾性角結膜炎（*keratoconjunctivitis sicca*）、クスマウル病またはクスマウルマイヤー病、ランドリー麻痺、ランゲルハンス細胞性組織球症、網状皮斑、黄斑変性、顕微鏡的多発性血管炎、モルブス・ベヒテレフ（*morbus bechterev*）、運動ニューロン疾患、粘膜性類天疱瘡、多臓器不全、重症筋無力症、骨髄異形成症候群、心筋炎、神経根障害、神経障害、非 A 非 B 型肝炎、視神経炎、骨溶解、小関節性 J R A、末梢動脈閉塞疾患（P A O D）、末梢血管疾患（P V D）、末梢動脈疾患（P A D）、静脈炎、結節性多発性動脈炎（または結節性動脈周囲炎）、多発性軟骨炎、白毛症、多関節性 J R A、多

内分泌欠損症候群、多発性筋炎、リウマチ性多発性筋痛（P M R）、原発性パーキンソニズム、前立腺炎、赤芽球癆、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、アクネ、膿疱症、骨過形成および骨髄炎）、続発性アミロイドーシス、ショック肺、強膜炎、坐骨神経痛、坐骨神経痛、シリコーン関連結合組織病、スネドナーウィルキンソン皮膚症、強直性脊椎炎、ステューブンス・ジョンソン症候群（S J S）、側頭動脈炎、トキシプラズマ性網膜炎、中毒性表皮剥離症、横断性脊髄炎、T R A P S（腫瘍壊死因子受容体）、1 型アレルギー反応、I I 型糖尿病、じんましん、通常型間質性肺炎（U I P）、血管炎、春季結膜炎、ウイルス性網膜炎、フォークト・小柳・原田症候群（V K H 症候群）、滲出型黄斑変性、もしくは創傷治癒である。

【0043】

一実施形態において、結合タンパク質またはその抗原結合部分は、単独でまたは放射線療剤および／または化学療法剤と組み合わせて用いる場合、癌を治療するために使用されまたは本明細書に記載されている腫瘍からの転移の予防もしくは阻害において使用される。

【0044】

一実施形態において、本明細書において提供される結合タンパク質と組み合わせることができる化学療法剤は、以下：1 3 - c i s - レチノイン酸；2 - C d A；2 - クロロデオキシアデノシン；5 - アザシチジン；5 - フルオロウラシル；5 - F U；6 - メルカプトプリン；6 - M P；6 - T G；6 - チオグアニン；アブラキサ；*Accutane*（登録商標）；アクチノマイシン-D；*Adriamycin*（登録商標）；*Adrucil*（登録商標）；*Afinitor*（登録商標）；*Agrilyn*（登録商標）；*Ala-Cort*（登録商標）；アルデスロイキン；アレムツズマブ；A L I M T A；アリトレチノイン；*Alkaban-AQ*（登録商標）；*Alkeran*（登録商標）；オールトランスレチノイン酸；アルファインターフェロン；アルトレタミン；アメトプテリン；アミホスチン；アミノグルテチミド；アナグレリド；*Anandron*（登録商標）；アナストロゾール；アラビノシルシトシン；*Ara-C Aranesp*（登録商標）；*Aredia*（登録商標）；*Arimidex*（登録商標）；*Aromasin*（登録商標）；*Arranon*（登録商標）；三酸化ヒ素；*Arzerra*（商標）；アスパラギナーゼ；A T R A；*Avastin*（登録商標）；アザシチジン；B C G；B C N U；ベンダムスチン；ベバシズマブ；ベキサロテン；B E X X A R（登録商標）；ビカルタミド；B i C N U；*Blenoxane*（登録商標）；ブレオマイシン；ボルテゾミブ；ブスルフアン；*Busulfex*（登録商標）；C 2 2 5；カルシウムロイコボリン；*Campath*（登録商標）；*Camptosar*（登録商標）；カンプトセシン-11；カペシタビン；*Carac*（商標）；カルボプラチン；カルムスチン；カルムスチンウエハー；*asodex*（登録商標）；C C - 5 0 1 3；C C I - 7 7 9；C C N U；C D D P；C e e N U；セルビジン；セツキシマブ；クロラムブシル；シスプラチン；シトロボラム因子；クラドリビン；コルチゾン；*Cosmegen*（登録商標）；C P T - 1 1；シクロ

フォスファミド；Cytadren（登録商標）；シタラビン；シタラビンリボゾーマル；Cytosar-U（登録商標）；Cytosan（登録商標）；ダカルバジン；ダコゲン；ダクチノマイシン；ダルベポエチンアルファ；ダサチニブ；ダウノマイシン；ダウノルピシン；塩酸ダウノルピシン；ダウノルピシンリボゾーマル；DaunoXome（登録商標）；デカドロン；デシタビン；Delta-Cortef（登録商標）；Deltasone（登録商標）；デニロイキン；ジフチトクス；DepoCyt（商標）；デキサメタゾン；酢酸デキサメタゾン；リン酸デキサメタゾンナトリウム；デキサゾン；デクスラゾキサン；DHAD；DIC；ジオデックス；ドセタキセル；Doxil（登録商標）；ドキソルピシン；ドキソルピシンリボゾーマル；Droxia（商標）；DTIC；DTIC-Dome（登録商標）；Duralone（登録商標）；Efudex（登録商標）；Eligard（商標）；Ellence（商標）；Eloxatin（商標）；Elspar（登録商標）；Emcyt（登録商標）；エビルピシン；エポエチンアルファ；エルビタックス；エルロチニブ；エルウィニア L-アスパラギナーゼ；エストラムスチン；エチオール；Etopophos（登録商標）；エトポシド；リン酸エトポシド；Eulexine（登録商標）；エベロリムス；Evista（登録商標）；エキセメスタン；Fareston（登録商標）；Faslodex（登録商標）；Femara（登録商標）；フィルグラスチム；フロクスウリジン；Fludara（登録商標）；フルダラビン；Fluoroplex（登録商標）；フルオロウラシル；フルオロウラシル（クリーム）；フルオキシムエステロン；フルタミド；フォルイン酸；FUDR（登録商標）；フルベストラント；ゲフィチニブ；ゲムシタビン；ゲムツズマブオゾガマイシン；ジェムザール；Gleevec（商標）；Gliadel（登録商標）ウエハー；GM-CSF；ゴセレリン；顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）；顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（G-MCSF）；Halotestin（登録商標）；Herceptin（登録商標）；ヘキサドロール；Hexalen（登録商標）；ヘキサメチルメラミン；HMM；Hycamtin（登録商標）；Hydrea（登録商標）；Hydrocort Acetate（登録商標）；ヒドロコルチゾン；リン酸ヒドロコルチゾンナトリウム；コハク酸ヒドロコルチゾンナトリウム；リン酸ハイドロコートン；ヒドロキシ尿素；イブリツモマブ；イブリツモマブチウキセタン；Idamycin（登録商標）；Idarubicin ifex（登録商標）；インターフェロン-アルファ；インターフェロン-アルファ-2b（PEGコンジュゲート）；イホスファミド；インターロイキン-11（IL-11）；インターロイキン-2（IL-2）；メシル酸イマチニブ；イミダゾールカルボキサミド；Intron A（登録商標）；Iressa（登録商標）；イリノテカン；イソトレチノイン；イキサベピロン；Ixempra（商標）；キドロラーゼ（t）；Lanacort（登録商標）；ラパチニブ；L-アスパラギナーゼ；LCR；レナリドミド；レトロゾール；ロイコボリン；リューケラン；Leukin（商標）；ロイプロリド；ロイコクリスチン；Leustatin（商標）；リボゾーマルArac；Liquid Pred（登録商標）；ロムスチン；L-PAM；L-サルコリジン；Lupron（登録商標）；Lupron Depot（登録商標）；Matulane（登録商標）；マキシデックス；メクロレタミン；塩酸メクロレタミン；Medralone（登録商標）；Medrol（登録商標）；Megace（登録商標）；メゲストロール；酢酸メゲストロール；メルファラン；メルカプトプリン；メスナ；Mesnex（商標）；メトトレキサート；メトトレキサートナトリウム；メチルプレドニゾロン；Meticorten（登録商標）；マイトマイシン；マイトマイシン-C；ミトキサントロン；M-Prednisol（登録商標）；MTC；MTX；Mustargen（登録商標）；ムスチン；Mutamycin（登録商標）；Myleran（登録商標）；Mylocel（商標）；Mylotarg（登録商標）；Navelbine（登録商標）；ネララビン；Neosar（登録商標）；Neulasta（商標）；Neumega（登録商標）；Neupogen（登録商標）；Nexavar（登録商標）；Nilandron（登録商標）；ニルタミド；Nipent（登録商標）；Nitrogen Mustard Novaldex（登録商標）；Novantrone（登録

商標) ; エヌプレート ; オクトレオチド ; 酢酸オクトレオチド ; オフタツムマブ ; Oncospar (登録商標) ; Oncovin (登録商標) ; Ontak (登録商標) ; Onxal (商標) ; オブレルベキン ; Orapred (登録商標) ; Orasone (登録商標) ; オキサリプラチン ; パクリタキセル ; タンパク質に結合したパクリタキセル ; パミドロネート ; パニツムマブ ; Panretin (登録商標) ; Paraplatin (登録商標) ; パゾパニブ ; PEDIAPRED (登録商標) ; PEGインターフェロン ; ベグアスバラガーゼ ; ベグフィルグラスチム ; PEG-INTRON (商標) ; PEG-ルーアスバラギナーゼ ; PEMETREXED ; ペントスタチン ; フェニララニンマスタード ; Platinoxal (登録商標) ; Platinoxal-AQ (登録商標) ; プレドニゾロン ; プレドニゾン ; Prelone (登録商標) ; プロカルバジン ; PROCRIT (登録商標) ; Proleukin (登録商標) ; カルムスチンインプラントを伴うProlifeprospan 20 ; Purinethol (登録商標) ; ラロキシフェン ; Revlimid (登録商標) ; Rheumatrex (登録商標) ; Rituxan (登録商標) ; リツキシマブ ; Roferon-A (登録商標) ; ロミプロスチン ; Rubex (登録商標) ; 塩酸ルビドマイシン ; Sandostatine (登録商標) ; Sandostatine LAR (登録商標) ; サーグラモスティム ; Solu-Cortef (登録商標) ; Solu-Medrol (登録商標) ; ソラフェニブ ; SPRYCEL (商標) ; STI-571 ; ストレプトゾシン ; SU11248 ; スニチニブ ; Sutent (登録商標) ; Tamoxifen Tarceva (登録商標) ; Targretin (登録商標) ; Tasigna (登録商標) ; Taxol (登録商標) ; Taxotere (登録商標) ; Temodar (登録商標) ; テモゾロマイド ; テムシロリムス ; テニポシド ; TESPAA ; サリドマイド ; Thalomid (登録商標) ; Theracys (登録商標) ; チオグアニン ; Thioguanine Tabloid (登録商標) ; チオホスファミド ; Thioplex (登録商標) ; チオテパ ; TICE (登録商標) ; Toposar (登録商標) ; トポテカン ; トレミフェン ; Torisel (登録商標) ; トシツモマブ ; トラスツズマブ ; Treanda (登録商標) ; トレチノイン ; Trexall (商標) ; Trisenox (登録商標) ; TSPA ; VCR ; Vectibix (商標) ; Velban (登録商標) ; Velcade (登録商標) ; Vepesid (登録商標) ; Vesanoide (商標) ; Viadur (登録商標) ; Vidaza (登録商標) ; ビンブラスチン ; 硫酸ビンブラスチン ; Vincasar Pfs (登録商標) ; ビンクリスチン ; ビノレルビン ; 酒石酸ビノレルビン ; VLB ; VM-26 ; ボリノスタット ; ヴォトリエント ; VP-16 ; Vumon (登録商標) ; Xeloda (登録商標) ; Zanosar (登録商標) ; Zevalin (商標) ; Zinecard (登録商標) ; Zoladex (登録商標) ; ゴレドロン酸 ; ゴリンザ ; または Zometax (登録商標) を含む。

【0045】

別の態様において、本明細書に論述されているような第二の作用物質の投与前、投与と同時にまたは投与後に、本明細書に開示されている結合タンパク質のいずれか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が提供される。一実施形態において、第二の作用物質は、ブデノシド、上皮増殖因子、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、メトロナダゾール、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-1 β mAb、抗IL-6またはIL-6受容体mAb、増殖因子、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-II、GM-CSF、FGFまたはPDGFの抗体またはアゴニスト、CD2、CD3、CD4、CD8、CD-19、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD90またはこれらのリガンドに対する抗体、メトトレキサート、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノラート・モフェチル、レフルノ

ミド、NSAID、イブプロフェン、プレドニゾロン、ホスホジエステラーゼ阻害剤、アデノシンアゴニスト、抗血栓剤、補体阻害剤、アドレナリン作動薬、IRAK、NIK、IKK、p38、MAPキナーゼ阻害剤、IL-1 β 変換酵素阻害剤、TNF α 変換酵素阻害剤、T細胞シグナル伝達阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、スルファサラジン、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、アンジ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またはTGF β である。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、ボラス、膣、直腸、口内、舌下、鼻内または経皮投与によって、患者に投与される。

【0046】

また、本明細書に開示されている結合タンパク質に対する抗イディオタイプ抗体も提供される。抗イディオタイプ抗体は、本明細書において提供される結合タンパク質に組み込むことができる、限定されないが、重鎖もしくは軽鎖の少なくとも1つの相補性決定領域（CDR）またはそのリガンド結合部分、重鎖または軽鎖可変領域、重鎖または軽鎖定常領域、フレームワーク領域または任意のその一部などの、免疫グロブリン分子の少なくとも一部を含む任意のタンパク質またはペプチド含有分子を含む。

【0047】

試験試料における1以上の抗原もしくはその断片の存在、量または濃度を決定する方法が提供され、1以上の抗原は、EGFR、RON、IGF-1R、ErbB-3および／またはHER2である。この方法は、イムノアッセイによって、抗原またはその断片について試験試料をアッセイすることを含む。イムノアッセイは、（i）少なくとも1つの結合タンパク質および少なくとも1つの検出可能な標識を使用し、（ii）試験試料中の抗原またはその断片の存在、量または濃度の直接的または間接的指標としての検出可能な標識によって生じるシグナルと、対照または校正因子における抗原またはその断片の存在、量または濃度の直接的または間接的指標として生じるシグナルとを比較することを含む。校正因子は、場合によって、一連の校正因子の一部であり、この場合、校正因子のそれぞれは、抗原またはその断片の濃度によって、その一連の校正因子中の他の校正因子と異なっている。本方法は、（i）捕捉剤／抗原またはその断片の複合体を形成するために、試料を、抗原またはその断片上のエピトープに結合する少なくとも1つの捕捉剤と接触させること、（ii）捕捉剤／抗原またはその断片／検出剤の複合体を形成するために、捕捉剤／抗原またはその断片の複合体を、検出可能な標識を含み、抗原またはその断片上のエピトープに結合し、捕捉剤に結合しない少なくとも1つの検出剤と接触させることおよび（iii）（ii）において形成された捕捉剤／抗原またはその断片／検出剤の複合体における検出可能な標識によって発生するシグナルに基づいて、試験試料中の抗原またはその断片の存在、量または濃度を決定することを含むことができ、少なくとも1つの捕捉剤および／または少なくとも1つの検出剤は少なくとも1つの結合タンパク質である。

【0048】

あるいは、本方法は、（i）捕捉剤／抗原またはその断片の複合体を形成するために、試験試料と、抗原またはその断片上のエピトープに結合する少なくとも1つの捕捉剤とを接触させ、同時にまたはいずれかの順番で連続して、試験試料と、少なくとも1つの捕捉剤への結合に関して試験試料中の任意の抗原またはその断片と競合し得る、検出可能に標識された抗原またはその断片とを接触させ、試験試料中に存在する任意の抗原またはその断片および検出可能に標識された抗原は互いに競合し、それぞれ、捕捉剤／抗原またはその断片の複合体と捕捉剤／検出可能に標識された抗原またはその断片の複合体を形成することおよび（ii）（ii）において形成された捕捉剤／検出可能に標識された抗原また

はその断片の複合体において検出可能な標識によって発生するシグナルに基づいて、試験試料中の抗原またはその断片の存在、量または濃度を決定することを含むことができ、少なくとも1つの捕捉剤は、少なくとも1つの結合タンパク質であり、捕捉剤／検出可能に標識された抗原またはその断片の複合体における検出可能な標識によって生じるシグナルは、試験試料中の抗原またはその断片の量または濃度に反比例する。

【0049】

試験試料は、患者由来であり得、この場合、本方法は、患者の治療的／予防的処置の効力を診断、予後診断または評価する工程をさらに含む得る。本方法が、患者の治療的／予防的処置の効力を評価することを含む場合、この方法は、場合によって、効力を改善するために必要な、患者の治療的／予防的処置の改変を加えることをさらに含む。本方法は、自動化システムまたは半自動化システムにおける使用に適合させることができる。したがって、本明細書に記載されている方法はまた、対象が、所与の疾患、障害または状態を有するまたはそれを発症する危険性があるか否かを判定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、以下：

(a) 対象由来の試験試料中の、分析物またはその断片の濃度または量を（例えば、本明細書に記載されている方法または当該技術分野において公知の方法を用いて）決定する工程；

(b) 工程(a)において決定された分析物またはその断片の濃度または量と、予め決定されたレベルとを比較する工程を含むことができ、工程(a)において決定された分析物の濃度または量が予め決定されたレベルと比較して好ましい場合、対象は、所定の疾患、障害または状態を有さないまたはその危険性がないと決定される。

しかしながら、工程(a)において決定された分析物の濃度または量が予め決定されたレベルと比較して好ましくない場合、対象は、所定の疾患、障害または状態を有するまたはその危険性があると決定される。

【0050】

さらに、対象における疾患の進行を監視する方法が本明細書に提供される。場合によって、本方法は、以下：

(a) 分析物の対象由来の試験試料中の濃度または量を決定する工程；

(b) 分析物の対象由来の后者の試験試料中の濃度または量を決定する工程；および

(c) 工程(b)において決定された分析物の濃度または量と、工程(a)において決定された分析物の濃度または量とを比較することを含み、工程(b)において決定された濃度または量が変化しない場合または工程(a)において決定された分析物の濃度または量と比較して好ましくない場合、対象における疾患は継続し、進行しまたは悪化していると判断される。比較して、工程(b)において決定された分析物の濃度または量が、工程(a)において決定された分析物の濃度または量と比較して好ましい場合、対象における疾患は中断し、軽減しまたは改善されたと判断される。

【0051】

場合によって、本方法は、工程(b)において決定された分析物の濃度または量と、例えば、予め決定されたレベルとを比較することを含む。さらに、場合によって、例えば、工程(b)において決定された分析物の濃度または量が、予め決定されたレベルと比較して、不利に変更されたことを比較が示す場合、本方法は、ある期間、1以上の医薬組成物を用いて対象を治療することを含む。

【0052】

また、1以上の抗原またはその断片について試験試料をアッセイするキットが提供され、1つ以上の抗原は、EGFR、RON、IGF-1R、ErbB3および／またはHER2である。キットは、抗原またはその断片について試験試料をアッセイするための少なくとも1つの成分、抗原またはその断片について試験試料をアッセイするための指示書を含み、少なくとも1つの成分は、本明細書に開示されている結合タンパク質を含む少なくとも1つの組成物を含み、結合タンパク質は、場合によって、検出可能に標識されている。

【図面の簡単な説明】

【0053】

【図1】二重可変ドメイン（DVD）結合タンパク質構築物の模式図であり、2つの親抗体からDVD結合タンパク質を作製するための戦略を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0054】

同じ細胞上に発現する同じ受容体または2つの異なる受容体の2つの異なる（例えば、重複しない）エピトープに結合することができる多価および／または多重特異的結合タンパク質が提供される。二重可変ドメイン結合タンパク質（DVD結合タンパク質）または二重可変ドメイン免疫グロブリン（DVD-Ig（商標））およびこれらの医薬組成物ならびに核酸、組換え発現ベクターおよびこのようなDVD結合タンパク質を作製するための宿主細胞もまた提供される。インビトロまたはインビボのいずれかにおいて、特定の抗原を検出するDVD結合タンパク質を使用する方法もまた提供される。

【0055】

本明細書に別段の定義がなければ、本明細書で使用される科学および技術用語は、当業者によって一般的に理解される意味を有する。何らかの曖昧さが伏在している場合には、本明細書中に付与されている定義は、すべての辞書または本明細書外の定義に優越する。文脈上別段の必要がなければ、単数形の用語は複数形を含むものとし、複数形の用語は単数を含むものとする。「または」の使用は、別段の記載がなければ、「および／または」を意味する。「含んでいる」という用語ならびに「含む」および「含まれた」などのその他の形式の使用は、限定的なものではない。

【0056】

一般的に、本明細書に記載されている細胞および組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学ならびにタンパク質および核酸化学およびハイブリッド形成に関連して使用される命名法は、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。一般に、本明細書において提供される方法および技術は、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、ならびに本明細書を通じて引用および論述されている様々な一般的参考文献およびより具体的な参考文献中に記載されているように、実施することができる。酵素反応および精製技術は、製造業者の説明書に従って、本分野で一般的に遂行されているように、または本明細書に記載されているように、実施される。本明細書に記載されている分析化学、合成有機化学および医薬品化学および薬化学に関して使用される命名法、ならびに本明細書に記載されている分析化学、合成有機化学および医薬品化学および薬化学の実験室操作および技術は、周知のものであり、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、および送達、および患者の治療に対しては、標準的な技術を使用し得る。

【0057】

本開示がより容易に理解し得るように、特定の用語を以下に定義する。

【0058】

「抗体」という用語は、4つのポリペプチド鎖（2つの重（H）鎖および2つの軽（L）鎖）から一般に構成される免疫グロブリン（Ig）分子またはIg分子のエピトープ結合特性を保持した機能的断片、変異体、バリエーションまたはこれらの誘導体を表すものとする。このような断片、変異体、バリエーションまた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。完全長の抗体の一実施形態において、各重鎖は、重鎖可変領域（VH）および重鎖定常領域（CH）から構成される。CHは、3つのドメインCH1、CH2およびCH3から構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域（VL）および軽鎖定常領域（CL）から構成される。CLは単一のCLドメインから構成される。VHおよびVL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。一般に、各VHおよびVLは、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順で、アミノ末端からカルボキシ末端に配置された3つのCDRおよび4つのF

Rから構成される。免疫グロブリン分子は、あらゆる種類（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgAおよびIgY）、クラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2）またはサブクラスであり得る。

【0059】

「二特異的抗体」という用語は、その2つの結合アーム（HC/LCの一对）の1つの上に1つの抗原（またはエピトープ）を結合し、その第二の結合アーム（HC/LCの異なる対）の上の異なる抗原（またはエピトープ）に結合する抗体を指す。二特異的抗体は、2つの異なる抗原結合アーム（特異性とCDR配列の両方における）を有し、それが結合するそれぞれの抗原について一価である。二特異的抗体には、クアドローマ技術（MilsteinおよびCuello（1983年）Nature 305（5934）：537-40）によって、2つの異なるモノクローナル抗体の化学的コンジュゲーション（Staerz et al.（1985年）Nature 314（6012）：628-31）によってまたはノブ・イントゥ・ホールもしくはFc領域中に突然変異を導入する同様のアプローチ（Holliger et al.（1993）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90（14）：6444-6448）によって生成されるものが含まれる。

【0060】

「親和性成熟された」抗体とは、変化を有しない親抗体と比べて、抗体の1つ以上のCDR中に、抗原に対する抗体の親和性の改善をもたらす1つ以上の変化を有する抗体である。典型的な親和性成熟された抗体は、標的抗原に対してnMの親和性を有し、またはpMの親和性さえ有する。親和性成熟された抗体は、本分野において公知の操作によって産生される。「Marks et al.（1992）BioTechnology 10：779-783」は、VHおよびVLドメインシャッフリングによる親和性成熟を記載している。CDRおよび／またはフレームワーク残基の無作為な突然変異導入は、Barbas et al.（1994）Proc Natl. Acad. Sci. USA 91：3809-3813；Schier et al.（1995）Gene 169：147-155；Yelton et al.（1995）J. Immunol. 155：1994-2004；Jackson et al.（1995）J. Immunol. 154（7）：3310-9；Hawkins et al（1992）J. Mol. Biol. 226：889-896によって記載されており、活性増強アミノ酸残基による選択的突然変異導入位置、接触または過剰変異位置での突然変異は、米国特許第6,914,128号に記載されている。

【0061】

「CDR移植された抗体」という用語は、VHおよび／またはVLのCDR領域の1つ以上の配列が別の抗体のCDR配列で置換されている重鎖および軽鎖可変領域配列を含む抗体を指す。例えば、2つの抗体は、マウスCDRの1つ以上がヒトCDR配列で置換されているマウス重鎖および軽鎖可変領域を有する抗体などの異なる種由来であり得る。

【0062】

「ヒト化抗体」という用語は、ヒト以外の種由来の、より「ヒト類似に」、すなわち、ヒト生殖系列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、非ヒトCDR配列がヒトのVHおよびVL配列中に導入されて、対応するヒトCDR配列が置換されているCDR移植された抗体である。「ヒト化抗体」はまた、ヒト抗体のアミノ酸配列を実質的に（例えば、アミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%の同一性で）有するフレームワーク領域（FR）配列と、非ヒト抗体のアミノ酸配列を実質的に有する少なくとも1つのCDRを含む抗体またはそのバリエーション、誘導体、類似体もしくは断片である。ヒト化抗体は、CDR領域のすべてまたは実質的にすべての配列が非ヒト免疫グロブリン（すなわち、ドナー抗体）の配列に対応し、FR領域のすべてまたは実質的にすべての配列がヒト免疫グロブリンの配列である、少なくとも1つの、典型的には2つ可変ドメイン（Fab、Fab'、F(ab')₂、FabC、Fv）の実質的にす

べてを含んでもよい。ヒト化抗体はまた、重鎖のCH1、ヒンジ、CH2、CH3およびCH4領域を含んでもよい。一実施形態において、ヒト化抗体はまた、ヒト免疫グロブリンFc領域の少なくとも一部を含む。いく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。いく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。いくつかの実施形態において、ヒト化抗体は、軽鎖のヒト化可変ドメインおよび／または重鎖のヒト化可変ドメインのみを含有する。いくつかの実施形態において、ヒト化抗体は、軽鎖、ならびに重鎖の少なくとも可変ドメインを含有する。いくつかの実施形態において、ヒト化抗体は、重鎖、ならびに軽鎖の少なくとも可変ドメインを含有する。

【0063】

「二重可変ドメイン結合タンパク質」および「二重可変ドメイン免疫グロブリン」という用語は、その2つの結合アーム（例えば、HC/LCの一对）のそれぞれにおいて2つの可変ドメインを有する結合タンパク質を指し（PCT出願公開第WO02/02773号参照）、それぞれが抗原に結合することができる。一実施形態において、それぞれの可変ドメインは、異なる抗原またはエピトープに結合する。別の実施形態において、それぞれの可変ドメインは、同じ抗原またはエピトープに結合する。別の実施形態において、二重可変ドメイン結合タンパク質は、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、それが結合するそれぞれの抗原に対して二価である。一実施形態において、DVD結合タンパク質は、単一特異的であってもよく、すなわち、1つの抗原に結合することができまたは多重特異的であってもよく、すなわち、2つ以上の抗原に結合することができる。2つの重鎖DVDポリペプチドおよび2つの軽鎖DVDポリペプチドを含むDVD結合タンパク質は、DVD-Ig（商標）と呼ばれる。一実施形態において、4本鎖DVD結合タンパク質の各半分は、重鎖DVDポリペプチド、軽鎖DVDポリペプチドおよび2つの抗原結合部位を含む。一実施形態において、それぞれの結合部位は、抗原結合部位あたりの抗原結合に参与する全6つのCDRを有する重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを含む。

【0064】

「抗イディオタイプ抗体」という用語は、別の抗体の抗原結合部位のアミノ酸配列に対して惹起された抗体を指す。抗イディオタイプ抗体は、抗原に対する免疫応答を増強するために投与され得る。

【0065】

「生物学的活性」という用語は、分子の1つ以上の固有の生物学的特性（インビボで見られるように天然に存在するものであっても、組換え手段によって提供される、または可能にされるものであっても）を表す。生物学的特性には、受容体に結合すること；細胞増殖の誘導、細胞増殖を阻害すること、他のサイトカインの誘導、アポトーシスの誘導および酵素活性が含まれるが、これらに限定されない。

【0066】

「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した場合、抗原の生物学的活性を相殺することを指す。一実施形態において、中和結合タンパク質は、抗原（例えば、サイトカイン）に結合し、少なくとも約20%、40%、60%、80%、85%またはそれ以上にその生物学的活性を低下させる。

【0067】

「特異性」とは、抗原に選択的に結合する結合タンパク質の能力を指す。

【0068】

「親和性」は、結合タンパク質と抗原との間の相互作用の強さであり、結合タンパク質のCDRの配列によって、ならびに抗原の性質、例えばそのサイズ、形状および／または電荷によって決定される。結合タンパク質は、負の副作用を最小限にしながら、所望の治療の評価項目を提供する親和性について選択することができる。親和性は、当業者に公知の方法（US20090311253）を用いて測定することができる。

【0069】

「効力」という用語は、所望の効果を達成するための結合タンパク質の能力を意味し、その治療有効性の測定である。効力は、当業者に公知の方法（US 20090311253）を用いて評価することができる。

【0070】

「交差反応性」という用語は、惹起された標的以外の標的に結合する結合タンパク質の能力を指す。一般に、結合タンパク質は、適切に高い親和性でその標的組織（単数または複数）／抗原（単数または複数）に結合するが、非標的の正常組織に対して適切に低い親和性を示す。個々の結合タンパク質は、一般に、2つの基準を満たすように選択される。

（1）抗体標的の既知の発現に適切な組織染色。（2）同じ臓器からのヒトとmouse種（マウスおよびカンクイザル）との間の類似した染色パターン。交差反応性を評価するためのこれらの方法および他の方法は、当業者に公知である（US 20090311253）。

【0071】

「生物学的機能」という用語は、結合タンパク質の特異的なインビトロまたはインビボにおける作用を意味する。結合タンパク質は、抗原のいくつかのクラスを対象とし、複数の作用機序を介して所望の治療結果を達成することができる。結合タンパク質は、可溶性タンパク質、細胞表面抗原ならびに細胞外タンパク質沈着物を対象にすることができる。結合タンパク質は、それらの標的の活性を作働させ、拮抗しまたは中和することができる。結合タンパク質は、それらが結合する標的のクリアランスを助けることができまたは細胞に結合したときに細胞毒性をもたらすことがある。2つ以上の抗体の部分は、単一の結合タンパク質分子において異なる機能を達成するために、多価フォーマットに組み込むことができる。生物学的機能の評価するために使用されるインビトロアッセイおよびインビボモデルは、当業者に知られている（US 20090311253）。

【0072】

「安定な」結合タンパク質は、結合タンパク質が、保存時にその物理的安定性、化学的安定性および／または生物学的活性を本質的に保持しているものである。長期間にわたって、種々の温度にてインビトロで安定である多価結合タンパク質が望ましい。結合タンパク質を安定化し、種々の温度でそれらの安定性を評価する方法は、当業者に知られている（US 20090311253）。

【0073】

「溶解性」という用語は、水性溶液中に分散させたままにするタンパク質の能力を意味する。水性製剤中のタンパク質の溶解性は、疎水性および親水性アミノ酸残基の適切な分布に依存し、したがって、溶解性は、正確に折り畳まれたタンパク質の生成と相関し得る。当業者は、日常的なHPLC技術および当業者に公知の方法（US 20090311253）を用いて、結合タンパク質の可溶性の増加または減少を検出することができる。

【0074】

結合タンパク質は、様々な宿主細胞を用いて生成されてもよく、またはインビトロで生成されてもよく、労力あたりの相対収率は「生成効率」を決定する。生成効率に影響を及ぼす因子には、限定されないが、宿主細胞型（原核生物または真核生物）、発現ベクターの選択、ヌクレオチド配列の選択および使用される方法が挙げられる。結合タンパク質生成に使用される材料および方法、ならびに生成効率の測定は、当業者に公知である（US 20090311253）。

【0075】

「免疫原性」という用語は、免疫応答を誘導する物質の能力を意味する。治療的結合タンパク質の投与は、免疫応答の特定の発生率をもたらし得る。多価形式の免疫原性を誘導し得る潜在的な要素は、親抗体の選択中に分析することができ、このような危険性を低下させるための工程は、多価結合タンパク質形式にそれらの配列を組み込む前に、親抗体を最適化するために採用することができる。抗体と結合タンパク質の免疫原性を減少させる方法は、当業者に公知である（US 20090311253）。

【0076】

「標識」および「検出可能な標識」という用語は、特異的結合対のメンバー間の反応（例えば、結合）を検出可能なものにするために、抗体またはその分析物などの特異的結合対のメンバーに結合させた部分を意味する。特異的結合対の標識された部分は、「検出可能に標識されている」と呼ばれる。したがって、「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標識が取り込まれたタンパク質を表す。一実施形態において、標識は、視覚または計測手段によって検出可能な信号を生成することができる、検出可能なマーカーであり、例えば、放射性標識されたアミノ酸の取り込み、または印を付けたアビジン（例えば、光学的方法または比色分析法によって検出することができる、蛍光マーカーまたは酵素活性を含有するストレプトアビジン）によって検出することができるビオチン部分のポリペプチドへの付着である。ポリペプチド用の標識の例には、以下の放射性同位体または放射性核種（例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho または ^{153}Sm ）；色原体、蛍光標識（例えば、FITC、ローダミン、ランタニドリン光体）；酵素的標識（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）；化学発光マーカー；ビオチニル基、二次レポーターによって認識される所定のポリペプチドエピトープ（例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体に対する結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ）；およびガドリニウムキレートなどの磁気作用物質が含まれるが、これらに限定されない。イムノアッセイに一般に使用される標識の代表例には、光を生じる部分、例えばアクリジニウム化合物および蛍光を生じる部分、例えばフルオレセインが含まれる。この関連で、部分自体が検出可能に標識され得るが、さらに別の部分との反応後に検出可能にされ得る。

【0077】

「連結体」という用語は、第二の化学部分（治療剤または細胞毒性剤など）に化学的に連結された抗体などの結合タンパク質を表す。「作用物質」という用語は、化学的化合物、化学的化合物の混合物、生物学的高分子または生物由来物質から作製された抽出物を含む。一実施形態において、治療剤または細胞毒性剤には、百日咳毒素、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロールおよびピューロマイシンならびにこれらの類似体または相同体が含まれるが、これらに限定されるものではない。イムノアッセイとの関連において使用される場合、連結抗体は、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ってよい。

【0078】

「結晶」および「結晶化された」という用語は、結晶の形態で存在する結合タンパク質（例えば、抗体）または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、非晶質の固体状態または液体の結晶状態などの他の形態とは異なる。結晶は、原子、イオン、分子（例えば、抗体などのタンパク質）または分子集合体（例えば、抗原／抗体複合体）の規則的な反復する三次元配列から構成される。これらの三次元配列は、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または構築ブロックは、非対称単位と呼ばれる。所定の十分に整えら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。すべての三次元中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。

【0079】

「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。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。他のベクターにはRNAベクターが含まれる。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およびエピソード哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソード哺乳動物ベクター）は、宿主細胞中へ導入されて、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。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」（または単に、「発現ベクター」と）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」および「ベクター」は互換的に使用され得る。しかしながら、発現ベクターの他の形態もまた含まれ、例えば、同等の機能を果たすウイルスベクター（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス）なども含まれる。一群のpHybEベクター（米国特許出願第61/021,282号）は、親抗体およびDVD結合タンパク質のクローニングに使用された。pJP183由来のV1；pHybE-hCg1, z, 非V2は、抗体および野生型定常領域を有するDVD重鎖をクローニングするために使用された。pJP191由来のV2；pHybE-hCK V3は、抗体およびカップ定常領域を有するDVD軽鎖をクローニングするために使用された。pJP192由来のV3；pHybE-hCI V2は、抗体およびランダ定常領域を有するDVD軽鎖をクローニングするために使用された。V4は、ラムダシグナルペプチドおよびカップ定常領域を用いて構築され、ラムダーカップハイブリッドVドメインを有するDVD軽鎖をクローニングするために使用された。V5は、カップシグナルペプチドおよびラムダ定常領域を用いて構築され、カップラムダハイブリッドVドメインを有するDVD軽鎖をクローニングするために使用された。pJP183由来のV7；pHybE-hCg1, z, 非V2は、抗体および（234、235AA）突然変異定常領域を有するDVD重鎖をクローニングするために使用された。

【0080】

「組換え宿主細胞」または「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。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。突然変異または環境的な影響のために、後続の世代中にある種の修飾が生じ得るので、このような子孫は、実際には親細胞と同一でないことがあり得るが、本明細書において使用される「宿主細胞」という用語の範囲になお含まれる。一実施形態において、宿主細胞には、原核および真核細胞が含まれる。一実施形態において、真核細胞には、原生生物、真菌、植物および動物細胞が含まれる。別の実施形態において、宿主細胞には、原核細胞株E. コリ；哺乳動物細胞株CHO、HEK293、COS、NS0、SP2およびPER. C6；昆虫細胞株Sf9および真菌細胞サッカロミセス・セレビシアエが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0081】

「トランスフェクション」という用語は、宿主細胞への外因性核酸（例えば、DNA）を導入するために一般的に用いられる様々な技術を包含し、例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、DEAEーデキストラントランスフェクションなどが挙げられる。

【0082】

「サイトカイン」という用語は、細胞間媒介物質として別の細胞集団に作用する1つの細胞集団から放出されるタンパク質を指す。「サイトカイン」という用語には、天然由来または組換え細胞培養物由来のタンパク質および天然配列のサイトカインの生物学的に

活性な同等物が含まれる。

【0083】

「生物学的試料」という用語は、生物または生物であったものから得られた物質の量を意味する。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、骨髓、リンパ節および脾臓が含まれるが、これらに限定されない。

【0084】

「成分」という用語は、組成物の要素を指す。診断キットに関連して、例えば、成分は、試験試料のアッセイ用のキットに含めることができる、捕捉抗体、検出またはコンジュゲート抗体、対照、校正因子、一連の校正因子、感受性パネル、容器、緩衝液、希釈剤、塩、酵素、酵素の補因子、検出試薬、前処理試薬／溶液、基質（例えば、溶液として）、停止液などであってもよい。したがって、「成分」は、例えば、抗分析物（例えば、抗ポリペプチド）抗体に結合させることによって、固体支持体上に固定されている、上記のポリペプチドまたは他の分析物を含めることができる。いくつかの成分は、溶液中にあってよくまたはアッセイにおける使用として再構成するために凍結乾燥されてもよい。

【0085】

「対照」は、分析物を含まない（「陰性対照」）または分析物を含む（「陽性対照」）ことが知られている組成物を表す。陽性対照は、既知の濃度の分析物を含み得る。「対照」、「陽性対照」および「校正物質」は、既知の濃度の分析物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可能であり、試薬（例えば、分析物）の完全性の有用な指標である。

【0086】

「所定のカットオフ」および「所定のレベル」は、所定のカットオフ／レベルに対してアッセイの結果を比較することにより診断／予後診断／治療的効力の結果を評価するために使用されるアッセイのカットオフ値を一般に表し、所定のカットオフ／レベルは様々な臨床的パラメーター（例えば、疾患の重症度、進行／非進行／改善など）にすでにつながっておりまたは関連している。本開示は例示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）に応じて様々となり得ることが周知である。さらに、本明細書における開示を他のイムノアッセイに適合させて、本開示を基礎とする他のイムノアッセイについてのイムノアッセイ特異的なカットオフ値を得ることは、当業者の通常の技術の範囲内に十分にある。所定のカットオフ／レベルの正確な値はアッセイ間で様々となり得るが、（もしあれば）本明細書に記載されている相関は一般に適用可能であるはずである。

【0087】

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、沈殿および／または可溶化試薬は、あらゆる細胞を溶解するものおよび／または試験試料中に存在するあらゆる分析物を可溶化するものである。前処理は、本明細書でさらに記載されるように、すべての試料に必要なというわけでない。とりわけ、分析物（例えば、目的のポリペプチド）の可溶化は、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。前処理試薬は均一（分離工程を必要としない）または不均一（分離工程を必要とする）であり得る。不均一前処理試薬を使用すると、アッセイの次の工程に進行する前に任意の沈殿した分析物結合タンパク質は試験試料から除去される。

【0088】

本明細書に記載されているイムノアッセイおよびキットとの関連で「品質管理試薬」には、校正物質、対照および感受性パネルが含まれるが、これらに限定されない。「校正物質」または「標準物質」は、抗体または分析物などの分析物の濃度を内挿するための校正（標準）曲線を確立するために典型的に（例えば複数など、1つ以上）使用される。あるいは、所定の陽性／陰性カットオフ近くにある単一の校正物質を使用することが可能である。「感受性パネル」を含むように、複数の校正物質（すなわち、2つ以上の校正物質ま

たは様々な量の（複数の）較正物質）を組み合わせ使用することが可能である。

【0089】

「特異的結合パートナー」という用語は、特異的結合対のメンバーである。特異的結合対は、化学的または物理的な手段を介して互いに特異的に結合する2つの異なる分子を含む。したがって、抗原および抗体の特異的結合に加えて、他の特異的結合対は、ビオチンおよびアビジン（またはストレプトアビジン）、炭水化物およびレクチン、相補的なヌクレオチド配列、エフェクターおよび受容体分子、補因子および酵素、酵素阻害剤および酵素などを含み得る。さらに、特異的結合対は、元の特異的結合メンバーの類似体、例えば、分析物類似体であるメンバーを含み得る。免疫反応性特異的結合メンバーには、単離または組換えで産生された抗原、抗原断片およびモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を含む抗体ならびにその複合体、断片およびバリエーション（バリエーションの断片を含む）が含まれる。

【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。Fc領域は、固有配列のFc領域またはバリエーションFc領域であり得る。免疫グロブリンのFc領域は、一般に、2つの定常ドメイン（CH2ドメインおよびCH3ドメイン）を含み、場合によって、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、本分野において周知である（例えば、米国特許第5,648,260号および第5,624,821号）。Fc領域は、いく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、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）、食作用、補体依存性細胞傷害（CDC）および抗体と抗原-抗体複合体の半減期／クリアランス速度を媒介する。いくつかの場合において、これらのエフェクター機能は、治療用の免疫グロブリンに対して望ましいが、他の場合において、治療目的に応じて、不要であるまたは有害でさえあり得る。

【0091】

結合タンパク質の「抗原結合部分」という用語は、抗原に特異的に結合する能力を保持する結合タンパク質（例えば、抗体）の1つ以上の断片を意味する。結合タンパク質の抗原結合部分は、完全長の抗体の断片、ならびに、2つ以上の異なる抗原に特異的に結合する、二特異的、二重特異的または多重特異的フォーマットで行うことができる。結合タンパク質の「抗原結合部分」という用語に包含される結合断片の例には、(i) Fab断片（VL、VH、CLおよびCH1ドメインからなる一価断片）、(ii) F(ab')₂断片（ヒンジ領域において、ジスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片を含む二価断片）、(iii) VHおよびCH1ドメインからなるFd断片、(iv) 抗体の単一アームのVLおよびVHドメインからなるFv断片、(v) 単一の可変ドメインを含むdAb断片および(vi) 単離された相補性決定領域（CDR）が含まれる。さらに、Fv断片の2つのドメインであるVLおよびVHは別個の遺伝子によってコードされているが、これらは、VLおよびVH領域が対合して一価分子を形成している単一のタンパク質鎖として、これらの作製を可能とする合成リンカーによって、組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。）。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。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）を含む。

【0092】

「多価結合タンパク質」という用語は、2つまたはそれ以上の抗原結合部位を含む結合タンパク質を意味する。一実施形態において、多価結合タンパク質は、3つまたはそれ以上の抗原結合部位を有するように工学的に作製され、天然に存在しない抗体である。「多重特異的結合タンパク質」という用語は、2つ以上の関連標的または非関連標的に結合することができる結合タンパク質を指す。一実施形態において、本明細書に提供される二重可変ドメイン（DVD）結合タンパク質は、2つ以上の抗原結合部位を含み、四価または

多価の結合タンパク質である。

【0093】

「リンカー」という用語は、アミノ酸残基または2つのポリペプチド（例えば、2つのVHまたは2つのVLドメイン）に連結させて用いられるペプチド結合によって接続された2つ以上のアミノ酸残基を含むポリペプチドを意味する。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 et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak et al. (1994) Structure 2:1121-1123 参照）。

【0094】

「Kabat 番号」、「Kabat 定義」および「Kabat 標識」という用語は、本明細書において、互換的に使用される。本分野において認められているこれらの用語は、抗体またはその抗原結合部分の重鎖および軽鎖可変領域中の他のアミノ酸残基に比べて、より可変的な（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 および Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication NO. 91-3242）。重鎖可変領域の場合、超可変領域は、CDR1 に対するアミノ酸位置31から35、CDR2 に対するアミノ酸位置50から65 および CDR3 に対するアミノ酸位置95から102 にわたる。軽鎖可変領域の場合、超可変領域は、CDR1 に対するアミノ酸位置24から34、CDR2 に対するアミノ酸位置50から56 および CDR3 に対するアミノ酸位置89から97 にわたる。

【0095】

「CDR」という用語は、免疫グロブリン可変領域配列内の相補性決定領域を意味する。重鎖および軽鎖可変領域のそれぞれについて、CDR1、CDR2 および CDR3 と命名されている、重鎖および軽鎖の可変領域のそれぞれにおいて3つのCDRが存在する。「CDRセット」という用語は、抗原に結合することができる単一の可変領域中に生じる3つのCDR群を指す。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. (1987) and (1991)）は、抗体のいずれの可変領域に対しても適用可能な明瞭な残基付番系を提供するのみならず、3つのCDRを定義する正確な残基境界を提供する。これらのCDRは、Kabat CDR と称され得る。Chothia および共同研究者（Chothia and Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al. (1989) Nature 342:877-883）は、Kabat CDR 内のある種の亜部分が、アミノ酸配列のレベルで大きな多様性を有するにも関わらず、ほぼ同一のペプチド骨格立体構造を採ることを見出した。これらの亜部分は、L1、L2 および L3 または H1、H2 および H3（「L」および「H」は、それぞれ、軽鎖および重鎖領域を表記する。）と表記される。これらの領域は、Chothia CDR と称される場合があり、これは、Kabat CDR と重複する境界を有する。Kabat CDR と重複するCDRを定義する他の境界が、Padlan (1995) FASEB J. 9:133-139 および MacCallum (1996) J. Mol. Biol. 262 (5):732-45 によって記載されている。さらに別のCDR境界定義が、上記系の1つに厳格に従わない場合があり得るが、それにも関わらず、Kabat CDR と重複するが、これらは、特定の残基または残基の群またはさらにはCDR全体が、抗原結合に著しい影響を与えないという予測または実験的な発見に照らして、短縮または延長され得る。本明細書に使用されている方法は、これらの系のいずれかに従って定義されたCDRを使用し得るが、ある種の実施形態は、Kabat または Chothia によって定義されたCDRを使用する。

【0096】

「エピトープ」という用語は、結合タンパク質、例えば、免疫グロブリンまたはT細胞受容体に特異的に結合することができる、ポリペプチドおよび／または他の決定因子によって結合される抗原の領域を意味する。ある種の実施形態において、エピトープ決定基は、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリルまたはスルホリルなどの分子の化学的に活性な表面基を含み、ある種の実施形態において、特異的な三次元構造的特徴および／または特異的な電荷特徴を有し得る。一実施形態において、エピトープは、特異的結合パートナー上の相補的部位に結合することが知られている抗原（またはその断片）の領域のアミノ酸残基を含む。抗原断片は1を超えるエピトープを含むことができる。ある種の実施形態において、結合タンパク質が、タンパク質および／また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。抗体が交差競合する（一方が他方の結合または調節作用を妨げる）場合、結合タンパク質は「同じエピトープに結合する」。さらに、エピトープの構造上の定義（重複、類似、同一）は有益であり、機能上の定義は、構造上（結合）および機能上（調節、競合）のパラメーターを包含する。タンパク質の異なる領域は、異なる機能を果たすことができる。例えば、サイトカインの特定の領域は、受容体活性をもたらすそのサイトカイン受容体と相互作用し、一方、このタンパク質の他の領域は、サイトカインを安定化するために必要とされ得る。サイトカインシグナル伝達の負の影響を排除するために、サイトカインは、受容体相互作用領域（単数または複数）に特異的に結合する結合タンパク質を用いて標的化され得て、それによってその受容体の結合を阻止する。あるいは、結合タンパク質は、サイトカイン安定化に参与する領域を標的化され得て、それによって、分解のためのタンパク質を指定する。エピトープ認識を可視化し、モデル化する方法は、当業者に知られている（US 20090311253）。

【0097】

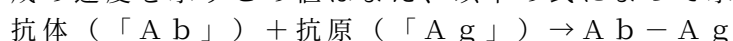
「薬物動態」とは、薬物が、生物によって、吸収され、分散され、代謝されおよび排泄されるプロセスを指す。所望の薬物動態プロファイルを有する多価結合タンパク質分子を生成するために、同様の所望の薬物動態プロファイルを有する親モノクローナル抗体が選択される。選択された親モノクローナル抗体のPKプロファイルは、当業者に公知の方法（US 20090311253）を用いて、げっ歯類において容易に決定することができる。

【0098】

「生物学的利用能」とは、投与後にその標的に到達する活性薬剤の量を指す。生物学的利用能は、安定性、溶解性、免疫原性および薬物動態を含む前述の特性のいくつかの関数であり、当業者に知られている方法（US 20090311253）を用いて評価することができる。

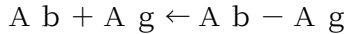
【0099】

「表面プラズモン共鳴」という用語は、例えば、BIAcore（登録商標）システム（BIAcore International AB（GE Healthcareの会社）、Uppsala、Swedenおよび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意味する。さらなる記載については、Jonsson et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51: 19-26を参照されたい。「 K_{on} 」という用語は、例えば、DVD-Ig／抗原複合体を形成する、結合タンパク質（例えば、抗体またはDVD-Ig）と抗原の結合についての結合速度（on rate）定数を意味する。「 K_{on} 」という用語はまた、本明細書において互換的に用いられ、「会合速度定数」または「 k_a 」を意味する。その標的抗原への結合タンパク質の結合速度または結合タンパク質、例えば抗体、と抗原との間の複合体形成の速度を示すこの値はまた、以下の式によって示される。



【0100】

「 K_{off} 」という用語は、結合タンパク質（例えば、抗体またはDVD-Ig）の、例えば、本分野で知られているDVD-Ig/抗原複合体からの解離についての解離速度（ $off\ rate$ ）定数または「解離速度（ $dissociation\ rate$ ）定数」を意味する。この値は、以下の式によって示されるように、結合タンパク質、例えば抗体、のその標的抗原からの解離速度または遊離抗体と抗原への経時的なAb-Ag複合体の分離を示す。



【0101】

「 K_d 」および「平衡解離定数」という用語は、平衡状態での滴定測定においてまたは解離速度定数（ K_{off} ）を結合速度定数（ K_{on} ）で割ることによって得られた値を意味する。会合速度定数、解離速度定数および平衡解離定数は、抗原への結合タンパク質（例えば、抗体またはDVD-Ig）の結合親和性を表すために使用される。結合および解離速度定数を決定する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の使用は、高い感度を提供し、平衡状態で生理的緩衝液中の試料を調べることができる。BIAcore（登録商標）（生体分子相互作用分析）アッセイなどの他の実験的アプローチおよび機器を使用することが可能である（例えば、BIAcore International AB, GE Healthcare社, Uppsala, Swedenから入手可能な機器）。さらに、Sapidyne Instruments（Boise, Idaho）から入手可能なKinExA（登録商標）（動態排除アッセイ）アッセイも使用することが可能である。

【0102】

「バリエント」という用語は、アミノ酸の付加（例えば、挿入）、欠失または保存的置換によってアミノ酸配列中の所与のポリペプチドとは異なるが、所与のポリペプチドの生物活性を保持するポリペプチドを意味する（例えば、バリエントEGFR抗体は、EGFRとの結合について抗EGFR抗体と競合することができる。）。アミノ酸の保存的置換、すなわち特性が類似する（例えば、親水性ならびに荷電領域の程度および分布）異なるアミノ酸とのアミノ酸の置き換えは、微小変化が典型的に関与すると本分野で認識されている。これらの微小変化は、本分野で理解されているように、アミノ酸のヒドロパシーインデックスを考慮することにより部分的に特定することが可能である（例えば、Kyte et al. (1982) J. Mol. Biol. 157:105-132参照）。アミノ酸のヒドロパシーインデックスは、この疎水性および荷電の考慮を基礎とする。タンパク質中のヒドロパシーインデックスの類似したアミノ酸を置換することが可能であり、このタンパク質はタンパク質の機能を依然として保持す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のヒドロパシーインデックスを有するアミノ酸が置換される。アミノ酸の親水性は、生物学的機能を保持するタンパク質となる置換を明らかにするために使用することも可能である。ペプチドとの関連でアミノ酸の親水性を考慮すると、抗原性および免疫原性とよく相関することが報告されている有用な尺度である、そのペプチドの最大の局所平均親水性の計算が可能となる（例えば、米国特許第4,554,101号参照）。本分野で理解されているように、類似した親水性値を有するアミノ酸の置換は、生物活性、例えば免疫原性を保持するペプチドをもたらす得る。一態様において、互いに±2以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。アミノ酸のヒドロパシーインデックスと疎水性値はどちらもそのアミノ酸の特定の側鎖によって影響を受ける。この観察に一致して、生物学的機能と適合するアミノ酸置換は、アミノ酸、特に、疎水性、親水性、荷電、サイズおよび他の特性によって明らかにされるこれらのアミノ酸の側鎖の相対的類似性に依存することが理解されている。「バリエント」という用語は、タンパク質分解、リン酸化または他の翻訳後修飾などによって異なる形でプロセッシングされているが、その生物活性または抗原反応性、例えばEGFRに結合する能力を保持するポリペプチドまたはその断片を含む。「バリエント」という用語は、他に定義がなければ、バリエントの断片を包含する。バリエントは、野生型配列に対して99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、

86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76%または75%同一であってもよい。

【0103】

I. 結合タンパク質の生成

同じ細胞上に発現した同じ受容体または2つの異なる受容体の2つの異なる（例えば、重複しない）エピトープに結合することができる結合タンパク質およびそれを作製する方法が提供される。結合タンパク質は、様々な技術を用いて生成することができる。発現ベクター、宿主細胞および結合タンパク質を生成する方法が提供され、当該技術分野において周知である。

【0104】

A. 親モノクローナル抗体の作製

DVD結合タンパク質の変ドメインは、目的の抗原に結合することができるポリクローナルAbおよびmAbなど、親抗体から取得することが可能である。これらの抗体は、天然に存在し得、または組換え技術によって作製され得る。当業者は、例えば、限定されないが、ハイブリドーマ技術の使用、選択されたリンパ球抗体法（SLAM）、ファージ、酵母もしくはRNA-タンパク質融合ディスプレイまたは他のライブラリーの使用、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の少なくとも一部を含む非ヒト動物の免疫化、ならびにキメラ抗体、CDR移植された抗体およびヒト化された抗体の調製を含む、抗体を生成するための多数の方法に精通している。例えば、米国特許公開第20090311253 A1参照。変ドメインは、親和性成熟技術を用いて調製することができる。

【0105】

B. 親モノクローナル抗体を選択するための基準

DVD結合タンパク質分子において望まれる少なくとも1つ以上の特性を有する親抗体を選択することを含む実施形態が提供される。一実施形態において、所望の特性は、例えば、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、可溶性、生産効率、免疫原性、薬物動態、生物学的利用能、組織交差反応性またはオルソロガス抗原結合などの1つ以上の抗体パラメーターである。例えば、米国特許出願公報第20090311253号を参照されたい。

【0106】

C. 結合タンパク質分子の構築

結合タンパク質は、2つの異なる親モノクローナル抗体由来の2つの異なる軽鎖可変ドメイン（VL）が、組換えDNA技術によって、直接または短いリンカーを介して直列に連結され、その後に軽鎖定常ドメインCLが続くように設計され得る。同様に、重鎖は、直接的にまたはリンカーを介して、タンデムに連結された2つの異なる重鎖可変ドメイン（VH）、その後に定常ドメインCH1およびFc領域を含む（図1A）。

【0107】

変ドメインは、本明細書に記載されている方法のいずれか1つによって作製された親抗体から得られた組換え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、変ドメインは、マウス重鎖または軽鎖可変ドメインである。別の実施形態において、変ドメインは、CDR移植されたまたはヒト化された可変重鎖または軽鎖ドメインである。一実施形態において、変ドメインは、ヒト重鎖または軽鎖可変ドメインである。

【0108】

リンカー配列は、単一のアミノ酸またはポリペプチド配列であり得る。一実施形態において、リンカー配列の選択は、いくつかのFab分子の結晶構造分析に基づいている。Fabまたは抗体分子構造中の可変ドメインとCH1/CL定常ドメインの間には、天然の柔軟な連結が存在する。この天然の連結は、VドメインのC末端由来の4-6残基およびCL/CH1ドメインのN末端由来の4-6残基によって構成される約10から12個のアミノ酸残基を含む。DVD結合タンパク質は、それぞれ、軽鎖および重鎖中のリンカーとしてCLまたはCH1のN末端の5から6アミノ酸残基、または11から12アミノ酸

残基を用いて作製された。CLまたはCH1ドメインのN末端残基、特に最初の5から6個のアミノ酸残基は、強い二次構造なしにループ立体構造を採ることが可能であり、したがって、2つの可変ドメイン間の柔軟なリンカーとして作用することが可能である。CLまたはCH1ドメインのN末端残基は、それらがIg配列の一部であるため、可変ドメインの天然の伸長である。したがって、それらの使用は、リンカーおよび接合分析物から潜在的に生じる任意の免疫原性を大幅に最小化する。

【0109】

さらなる実施形態において、重鎖、軽鎖、二本鎖または四本鎖の実施形態のいずれかは、AKTTPKLEEGEFSEAR（配列番号1）；AKTTPKLEEGEFSEARV（配列番号2）；AKTTPKLG（配列番号3）；SAKTTPKLG（配列番号4）；SAKTTP（配列番号5）；RADAAP（配列番号6）；RADAAPTVS（配列番号7）；RADAAAAGGPGS（配列番号8）；RADAAA（G₄S）₄（配列番号9）；SAKTTPKLEEGEFSEARV（配列番号10）；ADAAP（配列番号11）；ADAAPTVSIFPP（配列番号12）；TVAAP（配列番号13）；TVAAPSVFIFPP（配列番号14）；QPKAAP（配列番号15）；QPKAAPSVTLFPP（配列番号16）；AKTTPP（配列番号17）；AKTTPPSVTPLAP（配列番号18）；AKTTAP（配列番号19）；AKTTAPSVYPLAP（配列番号20）；ASTKGP（配列番号21）；ASTKGPSVFPLAP（配列番号22）；GGGGSGGGGGSGGGGS（配列番号23）；GENKVEYAPALMALS（配列番号24）；GPAKELTPLKEAKVS（配列番号25）；またはGHEAAAVMQVQYPAS（配列番号26）；TVAAPSVFIFPPPTVAAPSVFIFPP（配列番号27）；ASTKGPSVFPLAPASTKGPSVFPLAP（配列番号28）；またはG/Sに基づく配列（例えば、G₄Sリピート；配列番号29）を含む、少なくとも1つのリンカーを含む。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はバリエーションFc領域である。

【0110】

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ドメインのすべての残基は含まない。例えば、CL/CH1ドメインの最初の5から12個のアミノ酸残基；軽鎖リンカーは、C_κまたはC_λに由来することが可能であり；ならびに重鎖リンカーは、C_γ1、C_γ2、C_γ3、C_γ4、C_α1、C_α2、C_δ、C_εおよびC_μを含む、いずれかのアイソタイプの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29）；ヒンジ領域に由来する配列および他のタンパク質から得られる他の天然配列などの他のタンパク質からも由来し得る。

【0111】

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

【0112】

別の実施形態において、2つの重鎖DVDポリペプチドおよび2つの軽鎖DVDポリペプチドは組み合わされて、DVD結合タンパク質を形成する。表1は、疾患の治療に有用な例示的な抗体のVHおよびVL領域のアミノ酸配列を列挙している。一実施形態におい

て、いずれかの配向における、表 1 に列挙された V H および／または V L 領域の少なくとも 2 つを含む D V D が提供される。いくつかの実施形態において、V D 1 および V D 2 は、独立して選択される。よって、いくつかの実施形態において、V D 1 および V D 2 は同じ配列番号を含み、他の実施形態において、V D 1 および V D 2 は異なる配列番号を含む。以下に与えられる V H および V L ドメイン配列は、当該技術分野において知られているまたは当該技術分野において知られている方法を用いて容易に識別され得る相補性決定領域 (C D R) およびフレームワーク配列を含む。いくつかの実施形態において、1 つ以上のこれらの C D R および／またはフレームワーク配列は、同じ抗原に結合する、当該技術分野において知られている結合タンパク質由来の他の C D R および／またはフレームワーク配列によって、機能を損なうことなく置換される。

【 0 1 1 3 】

【表 1】

表 1: 多価結合タンパク質を含む結合タンパク質を生成するための抗体の VH および VL 領域の
アミノ酸配列のリスト
(CDR 配列を太字で示す。)

配列 番号	ABT 固有 ID	タンパク質領域	配列 1234567890123456789012345678901234567890
30	AB064VH	VH-EGFR (配列1)	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSISS SDFAWN WIRQPPGKGLEWM GYISYSGNTRY QPSLKS RITISRDTSKNQFFLKLNSVTAADTATYYCVT AGRGFPY WGQGLVTVSS
31	AB064VL	VL-EGFR (配列1)	DIQMTQSPSSMSVSVGDRVTIT CHSSQDINSNIG WLQQKPGKSFKGLIY HGTNLDD GVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYC VQYAQFPWTF GGGKLEIKR
32	AB003VH	VH-EGFR (配列2)	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSVSS SGDYWT WIRQSPGKGLEW IGHIYSGNTN YNPSLKS RLTISIDTSKTQFSLKLSSVTAADTAIYYCV RDRVTGAFDI WGQGTMTVTVSS
33	AB003VL	VL-EGFR (配列2)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC QASQDISNYLN WYQQKPGKAPKLLIY DASNLET GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYFC QHFDHLPLAF GGGKVEIKR
34	AB400VH	VH-EGFR (配列3)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLT NYGVH WVRQAPGKGLEWLG VGWSGGNTDYNTPFTS RSLTINKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYC ARA LTWYDYEFAY WGQGLVTVSS
35	AB400VL	VL-EGFR (配列3)	DILLTQSPGTLTSLSPGERATLSC CRASQSIYTN HWYQQKPGQAPRLLIK YASESIS GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQNLNWPTTF GQGTKLEIKR
36	AB033VH	VH-EGFR (配列4)	QVQLQESGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLT NYGVH WVRQSPGKGLEWLG VIWSGGNTDYNTPFTS RSLINKDNSKSKQVFFKMNSLQSDNTAIYYC ARA LTWYDYEFAY WGQGLVTVSA
37	AB033VL	VL-EGFR (配列4)	DILLTQSPVILSVSPGERVVSF CRASQSIGTN HWYQQRTNGSPRLLIK YASESIS GIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYC QQNNWPTTF GAGTKLEIKR
38	AB116VH	VH-ERBB3 (配列1)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS HYVMA WVRQAPGKGLEWVS SISSSGGWTLYADSVKGR FTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR GLKMATIFDY WGQGLVTVSS
39	AB116VL	VL-ERBB3 (配列1)	QSALTQPASVSGSPQSITISCT TGTSSDVGSYNVVS WYQQHPGKAPKLI IY EVSRQPS GVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQTEADYYC CSYAGSSI FVIFGGG TKVTVLG
40	AB063VH	VH-ERBB3 (配列2)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS IYSMN WVRQAPGKGLEWVS YISSSSSTIYYADSVKGR FTISRDNKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCAR DRGDFDAFDI WGQGTMTVTVSS
41	AB063VL	VL-ERBB3 (配列2)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC QASQDITNYLN WYQQKPGKAPKLLIY DASNLET GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYNC QQCENFPITF GQGTRLEIKR
42	AB062VH	VH-ERBB3 (配列3)	QVQLQQWAGALLKPSETLSLTCAVYGGSF SGYYWS WIRQPPGKGLEWIG EINHSGSTNYPNPSLKS RVTSVETSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARD KWTWYFDLWGR GLVTVSS
43	AB062VL	VL-ERBB3 (配列3)	DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCR SSQSVLYSSSNRNYLAWY QQNPGQP PKLLIY WASTRES GVDPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEADVAVYYC QQYY STPRTF GQGTKVEIKR

配列 番号	ABT 固有 ID	タンパク質領域	配列 1234567890123456789012345678901234567890
44	AB080VH	VH-HER2 (配列1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFT DTY TMDWVRQAPGKGLEWVA DVNPNSGGSI YNQRFKGR FTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR NLG PSFYFDY WGQGLVTVSS
45	AB080VL	VL-HER2 (配列1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTIT CKASQDVSIG VAWYQQKPKAPKLLIY S ASYRYT GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQ PEDFATYYC QQY IY PYTF GQGTKVEIKR
46	AB004VH	VH-HER2(配列2)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK DTYI HWVRQAPGKGLEWVA RIYPTNGYTRY ADSVKGR FTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR WG GDGYAMDY WGQGLVTVSS
47	AB004VL	VL-HER2 (配列2)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTIT CRASQDVNTA VAWYQQKPKAPKLLIY S ASFLY SGVPSRFSGSRSGTDFTLTIS SLQ PEDFATYYC QQH Y TTPTF GQGTKVEIKR
48	AB075VH	VH-IGF1R (配列1)	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTF SSYAI SWVRQAPGGGLEWVG GI IPIFGTANYAQKFQGR VTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR AP LRFL EWSTQ DH YYYYYMDVWGKGTITVTVSS
49	AB075VL	VL-IGF1R (配列1)	SSELTQDPAVSVAGQTVRITC QGDSLRSYYAT WYQQKPGQAPILVIY G EN KRPS GIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYC KSRDGS QH LV FGGGTKLTVLG
50	AB011VH	VH-IGF1R (配列2)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFT SSYAMN WVRQAPGKGLEWVS A ISGSGGTTFYADSVKGR FTISRDN SRT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAK DLG WSDSY YYYYGMDVWGQGTITVTVSS
51	AB011VL	VL-IGF1R (配列2)	DIQMTQFPSSLSASVGDRTIT CRASQGIRNDL GWYQQKPKAPKRLIY A ASRLHR GVPSRFSGSGSGTEFTLTIS SLQ PEDFATYYC LQHNSY PC SF GQGTKLEIKR
52	AB077VH	VH-IGF1R (配列3)	EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT SSFAMH WVRQAPGKGLEWIS V IDTRGATYYADSVKGR FTISRDN AKNS LYLQMNSLRAEDTAVYYCAR L GN FYYGMDV WGQGTITVTVSS
53	AB077VL	VL-IGF1R (配列3)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSC RASQSIGSS LHWYQQKPGQAPRLLIK Y ASQSL SGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC HQSSRL P HTF GQGTKVEIKR
54	AB005VH	VH-RON (配列1)	EVQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT SSYAMH WVRQAPGKGLEWVA V ISYDGSNKYYADSVKGR FTISRDN SKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAR F SGWPN NYYYYGMDVWGQGTITVTVSS
55	AB005VL	VL-RON (配列1)	DVVMTQSPSLSPVTPGEPASIS CRSSQSL LHSNGFN YVD WYLQKPGQSP HLLIY FGSYRAS GV PDR FSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC MQALQ T PPWT FGQGTKVEIRR
56	AB034VH	VH-RON (配列2)	QVQLQESGPGLVKPSEILSLTCTVSGGSIS SHYWS WVRQPPGKGLEWIG Y IYYSGSTN YN PSLKS RVTI SVD TSKNQFSLNLS SVTA ADTAVYYCARI P NY YDRSGYYPGY WYFDL WGRGTLTVTVSS
57	AB034VL	VL-RON (配列2)	QAVLTQPSLSAPPASASLTCT TLRSGFN VD SYRIS WYQQKPGSP PQYL LRY KSDSDKQQSG GVPSRFSGSKDASANAGILLISGLQSEDEADYYC MI WHSSAWVFGGGTKLTVLR

【0114】

特異的な標的に結合することができる特異的D V D結合タンパク質およびこれを作製する方法の詳細な説明は、以下の実施例の部において提供される。

【0115】

D. 結合タンパク質の作製

本明細書において提供される結合タンパク質は、本分野で公知の多数のいず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、D V D重鎖およびD V D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。原核または真核宿主細胞のいずれの中でも、本明細書において提供されるD V D結合タンパク質を発現することは可能であるが、真核細胞（特に、哺乳動物細胞）は、原核細胞に比べて、適切に折り畳まれ、免疫学的に活性なD V D結合タンパク質を集合および分泌する傾向がより大きいので、D V D結合タンパク質は真核細胞、例えば哺乳動物宿主細胞中で発

現される。

【0116】

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重鎖および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、重鎖および軽鎖遺伝子は、遺伝子の転写の高いレベルを誘導するために、各々、CMVエンハンサー／AdMPLプロモーター制御要素へ作用可能に連結されている。組換え発現ベクターは、メトトレキサート選択／増幅を用いて、ベクターで形質移入されたCHO細胞の選択を可能とするDHFR遺伝子も担持する。選択された形質転換体宿主細胞は、DVD重鎖およびDVD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結合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。DVDタンパク質が合成されるまで、適切な培地中で、本明細書において提供される宿主細胞を培養することによって、本明細書において提供されるDVDタンパク質を合成する方法も提供される。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。

【0117】

DVD結合タンパク質の重要な特徴は、DVD結合タンパク質が、慣用の抗体として、類似の様式で産生および精製され得ることである。DVD結合タンパク質の産生は、定常領域の配列修飾、または化学的修飾を必要とせずに、所望される二重特異的活性を有する均一な単一の主産物をもたらす。「二特異的」、「多重特異的」および「多重特異的多価」完全長結合タンパク質を作製するための他の以前に記載された方法は、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合せを有する多価完全長結合タンパク質との混合物の細胞内産生または分泌された産生をもたらし得る。

【0118】

驚くべきことに、本明細書において提供される「二重特異的多価完全長結合タンパク質」の設計は、主として、所望される「二重特異的多価完全長結合タンパク質」へ集合する二重可変ドメイン軽鎖および二重可変ドメイン重鎖をもたらす。

【0119】

集合され、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%、少なくとも75%および少なくとも90%が、所望の二重特異的四価タンパク質であり、したがって、増大した商用的有用性を有する。したがって、単一の細胞中で二重可変ドメイン軽鎖および二重可変ドメイン重鎖を発現し、「二重特異的四価完全長結合タンパク質」の単一の主要産物をもたらす方法が提供される。

【0120】

「二重特異的四価完全長結合タンパク質」の「主要産物」をもたらす単一細胞において二重可変ドメイン軽鎖および二重可変ドメイン重鎖を発現させる方法であって、「主要産物」は、二重可変ドメイン軽鎖および二重可変ドメイン重鎖を含むすべての集合されたタンパク質の50%超であり、例えば、75%超および90%超である方法が提供される。

【0121】

II. 結合タンパク質の使用

本明細書において提供される結合タンパク質は2つまた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)または組織免疫組織化学など慣用のイムノアッセイを用いて、(例えば、血清または血漿などの生物学的試料中で)抗原を検出するために使用することが可能である。結合タンパク質は、結合したまたは結合していない抗体の検出を促進するために、検出可能な物質で直接または間接的に標識される。適切な検出可能な物質には、様々な酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質および放射性物質が含まれる。適切な酵素の例には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクト

シダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼが含まれる。適切な補欠分子族複合体の例には、ストレプトアビジン／ビオチンおよびアビジン／ビオチンが含まれる。適切な蛍光物質の例には、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアナート、ロードミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリンが含まれる。発光物質の例は、ルミノールであり、適切な放射性材料の例には、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho または ^{153}Sm が含まれる。

【0122】

一実施形態において、本明細書に提供される結合タンパク質はインビトロとインビボの両方においてそれらの抗原標的の活性を中和することができる。したがって、このような結合タンパク質は、例えば、抗原を含有する細胞培地中で、ヒト対象中で、本明細書において提供される結合タンパク質が交差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可能である。別の実施形態において、抗原活性が有害である疾病または疾患に罹患している対象中の抗原活性を低下させる方法が提供される。本明細書において提供される結合タンパク質は、治療目的のために、ヒト対象に投与することができる。

【0123】

「抗原活性が有害である障害」という用語は、障害に罹患している対象における抗原の存在が、障害の病態生理に関与しているまたは障害の悪化に寄与する因子のいずれかであるまたはそれが疑われることが示されている疾患および他の障害を含むことを意図する。したがって、抗原活性が有害である疾患は、抗原活性の低下が疾患の症候および／または進行を緩和することが予測される疾患である。このような疾患は、例えば、本疾患に罹患している患者の生物学的液体中の抗原濃度の増加（例えば、対象の血清、血漿、滑液中などの抗原の濃度の増加）によって明らかとされ得る。本明細書において提供される結合タンパク質で治療することが可能な疾患の非限定的な例には、以下に、および結合タンパク質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。

【0124】

DVD結合タンパク質は、効力／安全を増強し、および／または患者の対象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。

【0125】

さらに、本明細書において提供されるDVD結合タンパク質は、細胞内送達（内部移行受容体および細胞内分子を標的化すること）、脳内への送達（血液脳関門を横切るために、トランスフェリン受容体および中枢神経系疾患媒介物質を標的化すること）など、組織特異的な送達（増強された局所PKにより、より高い効力および／またはより低い毒性を得るために、組織マーカーおよび疾病媒介物質を標的とすること）のために使用することが可能である。また、DVD結合タンパク質は、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、さらに、抗原の半減期を増加させることもできる。さらに、DVD結合タンパク質は、患者に植え込まれた医療デバイスに物理的に連結されまたはこれらの医療デバイスを標的とするように設計され得る（Burke et al., (2006) *Advanced Drug Deliv. Rev.* 58 (3): 437-446; Hildebrand et al., (2006) *Surface and Coatings Technol.* 200 (22-23): 6318-6324; Drug/device combinations for local drug therapies and infection prophylaxis, Wu (2006) *Biomaterials* 27 (11): 2450-2467; Mediation of the cytokine network in the implantation of orthopedic devices, Marques (2005) *Biodegradable Systems in Tissue Engineer. Regen. Med.* 377-397 参照)。要約すれば、医療用インプラントの部位へ、細胞の適切な種類

を誘導することは、正常な組織機能の治癒および回復を促進し得る。あるいは、用具に連結されたDVD、または用具を標的とするDVD-Ig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。

【0126】

A. 様々な疾病における結合タンパク質の使用

本明細書において提供される結合タンパク質分子は、様々な疾患を治療するための治療分子としても有用であり、例えば、結合タンパク質によって認識される標的は有害である。このような結合タンパク質は、特定の疾患に関与する1つ以上の標的に結合することができる。また、EGFR、RON、IGF-1R、Erb-B3および／またはHER2の阻害は、動物モデルにおいて抗腫瘍療法を増強することが示されており、原発性および転移性癌の治療に有益であり得る。

【0127】

開示を制限することなく、特定の疾患状態に関する追加情報が提供される。

【0128】

1. ヒト自己免疫および炎症性応答

膜貫通型受容体は、一般的な自己免疫および炎症反応に関与しており、例えば、喘息、アレルギー、アレルギー性肺疾患、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、線維症、嚢胞性線維症（CF）、線維性肺疾患、特発性肺線維症、肝線維症、狼瘡、B型肝炎関連肝疾患および線維症、敗血症、全身性エリテマトーデス（SLE）、糸球体腎炎、炎症性皮膚疾患、乾癬、糖尿病、インスリン依存性糖尿病、炎症性腸疾患（IBD）、潰瘍性大腸炎（UC）、クローン病（CD）、関節リウマチ（RA）、変形性関節症（OA）、多発性硬化症（MS）、移植片対宿主病（GVHD）、移植拒絶反応、虚血性心疾患（IHD）、セリアック病、接触過敏症、アルコール性肝疾患、ベーチェット病、アテローム硬化性血管疾患、眼球表面の炎症性疾患またはライム病などが挙げられる。

【0129】

本明細書において提供される結合タンパク質は、神経疾患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、本明細書において提供される結合タンパク質またはその抗原結合部分は、神経変性疾患ならびに神経再生および脊髄損傷を伴う状態を治療するために使用される。

【0130】

2. 喘息

アレルギー性喘息は、好酸球増加症、杯細胞異形成、上皮細胞の変化、気道過敏症（AHR）ならびにTh2およびTh1サイトカイン発現ならびに上昇した血清IgEレベルの存在によって特徴付けられる。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。したがって、より特異的で、標的化された治療の開発が必要とされる。

【0131】

炎症およびAHRと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、様々な結合タンパク質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. (2005) J. Exp. Med. 201 (12): 1875-1879; Lloyd et al. (2001) Adv. Immunol. 77, 263-295; Boyce et al. (2005) J. Exp. Med. 201 (12): 1869-1873; および Snibson et al. (2005) J. Brit. Soc. Allergy Clin. Immunol. 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. (1994) Toxicol. 92 (1-3): 229-43; Descotes et al. (1992) Dev. Biol. Standard. 77: 99-102; Hart et al. (2001) J. Allergy Clin. Immunol. 108 (2): 250-257 参照)。

【0132】

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ただれを伴う。多くの炎症促進性サイトカイン、ケモカインおよび成長因子が、罹患した関節中に発現されている。結合タンパク質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 (2005) Comp. Med. 55 (2): 114-22 参照)。ヒトおよびマウスオルソログに対する親抗体の交差反応性 (例えば、ヒトおよびマウス TNF、ヒトおよびマウス IL-15 などに対する反応性) を基礎として、「適合代理抗体」由来結合タンパク質分子を用いてマウス CIA モデルにおける妥当性確認研究を行うことが可能である；簡潔に述べると、2つ (またはそれ以上) のマウス標的特異的抗体を基礎とする結合タンパク質は、ヒト結合タンパク質構築に使用される親ヒトまたはヒト化抗体の特徴に可能な限り適合し得る (例えば、類似した親和性、類似した中和効力、類似した半減期など)。

【0133】

4. 全身性エリテマトーデス (SLE)

SLE の免疫病原性の特徴は、ポリクローナル B 細胞活性化であり、これは、高グロブリン血症、自己抗体産生および免疫複合体形成をもたらす。ヒトおよびマウスオルソログに対する親抗体の交差反応性 (例えば、ヒトおよびマウス CD20、ヒトおよびマウスインターフェロン α などに対する反応性) を基礎として、「適合代理抗体」由来結合タンパク質分子を用いてマウスループスモデルにおける妥当性確認研究を行うことが可能である。簡潔に述べると、2つ (またはそれ以上) のマウス標的特異的抗体を基礎とする結合タンパク質は、ヒト結合タンパク質構築に使用される親ヒトまたはヒト化抗体の特徴に可能な限り適合し得る (例えば、類似した親和性、類似した中和効力、類似した半減期など)。

【0134】

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。神経系を通じた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。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 および Th2 細胞などの他の T 細胞のバランス／調節を補助する、抗原発現、サイトカインおよび白血病相互作用ならびに調節性 T 細胞は、治療標的の同定のための重要な領域である。MS を治療するための結合タンパク質の有用性を評価するためのいくつかの動物モデルが、本分野において公知である (Steinman et al. (2005) Trends Immunol. 26 (11): 565-71; Lublin et al. (1985) Springer Semin. Immunopathol. 8 (3): 197-208; Genain et al. (1997) J. Mol. Med. 75 (3): 187-97; Tuohy et al. (1999) J. Exp. Med. 189 (7): 1033-42; Owens et al. (1995) Neurol. Clin. 13 (1): 51-73; および Hart et al. (2005) J. Immunol. 175 (7): 4761-8 参照)。ヒトおよび動物種オルソログに対する親抗体の交差反応性を基礎として、「適合代理抗体」由来結合タンパク質分子を用いてマウス EAE モデルにおける妥当性確認研究を行うことが可能である。簡潔に述べると、2つ (またはそれ以上) のマウス標的特異的抗体を基礎とする結合タンパク質は、ヒト結合タンパク質構築に使用される親ヒトまたはヒト化抗体の特徴に可能な限

り適合し得る（例えば、類似した親和性、類似した中和効力、類似した半減期など）。同じ概念は他の非げっ歯類種の動物モデルに当てはまり、「適合代理抗体」由来結合タンパク質は予期される薬理学および場合によると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. (1994) Toxicol. 92 (1-3): 229-43; Descotes et al. (1992) Devel. Biol. Standard. 77: 99-102; Jones (2000) IDrugs 3 (4): 442-6）参照）。

【0135】

6. 敗血症

圧倒的な炎症性応答および免疫応答は、敗血症性ショックの本質的な特徴であり、敗血症によって誘導される組織損傷、多臓器不全および死亡の病因において中心的な役割を果たす。サイトカインは、敗血症性ショックの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。一実施形態は、敗血症に関与する1つ以上の標的に結合することができる結合タンパク質に関する。敗血症を治療するためのこのような結合タンパク質の有効性は、当該技術分野で公知の前臨床動物モデルにおいて評価することができる（Burasら（2005）Nat. Rev. Drug Discov. 4 (10): 854-65およびCalandraら（2000）Nat. Med. 6 (2): 164-70を参照されたい。）。

【0136】

7. 神経疾患

a. 神経変性疾患

神経変性疾患は、通常、それらが年齢依存性である場合においては慢性でありまたは急性（例えば、脳卒中、外傷性脳損傷、脊髄損傷など）である。それらは、神経機能の進行性の喪失（例えば、神経細胞死、軸索損失、神経炎性ジストロフィー、脱髄）、運動能力の喪失および記憶喪失によって特徴付けられる。これらの慢性神経変性疾患は、複数の細胞種および媒介物質の間で複雑な相互作用を示す。このような疾病に対する治療戦略は限られており、非特異的な抗炎症剤（例えば、コルチコステロイド、COX阻害剤）または神経細胞の喪失および／またはシナプス機能を抑制するための作用物質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。1を超える疾患媒介物を標的とする特定の治療は、単一の疾患メカニズムを標的にして観察されるものよりも、慢性神経変性疾患のさらにより良好な治療効果を提供することができる（Deaneら（2003）Nature Med. 9: 907-13; およびMasliahら（2005）Neuron. 46: 857を参照されたい。）。

【0137】

本明細書において提供される結合タンパク質分子は、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つ以上の標的に結合することが可能である。結合タンパク質分子の効力は、アミロイド前駆体タンパク質またはRAGEを過剰発現し、アルツハイマー病様の症候を発症するトランスジェニックマウスなどの前臨床動物モデルで妥当性を確認することが可能である。さらに、結合タンパク質分子を構築し、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、最良の治療的結合タンパク質を選択することができる。結合タンパク質分子は、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。

【0138】

b. 神経細胞の再生および脊髄損傷

病的機序の知見の増大にかかわらず、脊髄損傷（SCI）は、なお、多大な損害を与える症状であり、高い医学的な要求を特徴とする医学的な適応症である。多くの脊髄損傷は、挫傷または圧迫傷害であり、通常、一次損傷に続いて、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）をもたらす二次的な損傷機序（炎症媒介物質、例え

ば、サイトカインおよびケモカイン）が起こる。結合タンパク質分子の効力は、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、これらの結合タンパク質分子を構築し、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、最良の治療的結合タンパク質を選択することができる。一般に、抗体は、脳血液関門（BBB）を効率的およ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、脳卒中、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、結合タンパク質および抗体の脳内への増加した浸透を許容する。BBBの漏出が起こらない他の神経症状では、グルコースおよびアミノ酸担体などの担体媒介性輸送体ならびにBBBの血管内皮における受容体媒介性トランスサイトosis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することができ、これにより、結合タンパク質のトランス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、限定されないが、インスリン受容体、トランスフェリン受容体、LRPおよびRAGEが含まれる。さらに、戦略は、低分子量の薬物、ナノ粒子および核酸を含む、CNSへ潜在的薬物を輸送するためのシャトルとして結合タンパク質を使用することも可能である（Coloma et al. (2000) Pharm Res. 17 (3): 266-74; Boado et al. (2007) Bioconj. Chem. 18 (2): 447-55）。

【0139】

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法として登場している（von Mehren et al. (2003) Annu. Rev. Med. 54: 343-69）。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。

【0140】

一実施形態において、本明細書において提供される組成物および方法を用いて治療または診断され得る疾患には、限定されないが、乳房、結腸、直腸、肺、中咽頭、下咽頭、食道、胃、脾臓、肝臓、胆嚢および胆管、小腸、尿路（腎臓、膀胱および尿路上皮を含む。）、女性生殖路（子宮頸部、子宮および卵巣ならびに絨毛癌および妊娠性絨毛性疾患を含む。）、男性生殖路（前立腺、精嚢、精巣および生殖細胞腫瘍を含む。）、内分泌腺（甲状腺、副腎および下垂体を含む。）および皮膚の癌腫ならびに血管腫、悪性黒色腫、肉腫（骨および軟部組織から生じるものならびにカポジ肉腫を含む。）、脳、神経、眼および髄膜の腫瘍（星状膠細胞腫、神経膠腫、神経膠芽細胞腫、網膜芽細胞腫、神経腫、神経芽細胞腫、シュワン細胞腫および髄膜腫を含む。）、白血病などの造血性悪性病変から生じる固形腫瘍およびリンパ腫（ホジキンリンパ腫と非ホジキンリンパ腫の両方）を含む原発性および転移性の癌が挙げられる。

【0141】

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

【0142】

9. 遺伝子治療

特定の実施形態において、本明細書において提供される結合タンパク質をコードする核酸配列または本明細書において提供される別の予防薬もしくは治療薬は、遺伝子治療を手段として、障害または1つ以上の症状を治療、予防、管理または改善するために投与される。遺伝子治療とは、発現されたまたは発現可能な核酸の対照への投与によって行われる治療を指す。この実施形態において、核酸は、予防効果または治療効果を媒介する本明細書において提供されるそれらによってコードされた抗体または予防薬もしくは治療薬を生成する。

【0143】

当該技術分野において利用可能である遺伝子治療のための方法のいずれかは、本明細書において提供される方法において使用され得る。遺伝子治療の方法に関する一般的な概説については、Goldspielら(1993) Clin. Pharmacy 12: 488-505; WuおよびWu(1991) Biotherapy 3: 87-95; Tolstoshev(1993) Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32: 573-596; Mulligan(1993) Science 260: 926-932; MorganおよびAnderson(1993) Ann. Rev. Biochem. 62: 191-217; ならびにMay(1993) TIBTECH 11(5): 155-215を参照されたい。使用することができる組換えDNA技術の、当該技術分野において一般的に知られている方法は、Ausubelら(編集)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY(1993); およびKriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY(1990)に記載されている。遺伝子治療の様々な方法の詳細な説明は、米国特許出願公開第US20050042664号に開示されている。

【0144】

III. 医薬組成物

単独または予防薬、治療薬および／または医薬として許容される担体と組み合わせた、1つ以上の結合タンパク質を含む医薬組成物が提供される。本明細書において提供される結合タンパク質を含む医薬組成物は、疾患を診断し、検出し、もしくはモニタリングし、疾患または1つもしくはそれ以上のその症候を予防し、治療し、管理し、もしくは軽減する上で、および／または研究において使用されるが、これらに限定されない。単独または予防薬、治療薬および／または医薬として許容される担体と組み合わせた医薬組成物の製剤は、当業者に公知である(米国特許出願公開第20090311253A1)。

【0145】

本明細書において提供される予防薬または治療薬を投与する方法には、限定されないが、非経口投与(例えば、皮内、筋内、腹腔内、静脈内および皮下)、硬膜外投与、腫瘍内投与、粘膜投与(例えば、鼻腔内および経口経路)および経肺投与(例えば、吸入器または噴霧器を用いて投与されるエアロゾル化合物)が挙げられる。特定の投与経路のための医薬組成物の製剤ならびに投与の様々な方法に必要とされる材料および技術が利用可能であり、当業者に公知である(米国特許出願公開第20090311253A1)。

【0146】

投与計画は、最適な所望の反応(例えば、治療的または予防的反応)を提供するように調整されてもよい。例えば、単回ボラスが投与されてもよく、いくつかに分割した用量は経時的に投与されてもよく、または用量は比例的に減少されてもよくもしくは治療状況の緊急性によって示されるように増加されてもよい。投与の容易性および投与量の均一性のために投薬単位形態において非経口組成物を処方することが特に有利である。「投薬単位形態」という用語は、処置されるべき哺乳動物対象のための単位用量として適した物理的に別個の単位を指し; それぞれの単位は、必要とされる医薬的担体と共に所望の治療効果を生じるように計算された所定量の活性化化合物を含有する。本明細書において提供される投薬単位形態の仕様は、(a) 活性化化合物の固有の特性および達成されるべき特定の治療効果または予防効果および(b) 個体における感受性の処置のために、このような活性化化合物の配合に関する当該技術分野における固有の制限、によって決定され、直接的に依存する。

【0147】

本明細書において提供される結合タンパク質の治療的または予防的な有効量についての例示的であり、非限定的な範囲は、0.1-20mg/kgであり、例えば、1-10mg/kgである。用量値は、緩和されるべき状態の種類および重症度によって変化し得ることに留意すべきである。いずれかの特定の対象について、特定の投薬処方、個々の必

要性および組成物を投与しまたは投与を管理している者の専門的な判断に従って、経時的に調整されてもよく、本明細書において記載されている用量範囲は、単に例示的であり、請求される組成物の範囲または実施を制限することを意図していないことはさらに理解されるべきである。

【0148】

IV. 併用療法

本明細書において提供される結合タンパク質はまた、種々の疾患の治療に有用な1つ以上の追加の治療薬とともに投与することができ、追加の薬剤は、その意図される目的で当業者によって選択される。例えば、追加の薬剤は、本明細書において提供される抗体によって治療される疾患または状態の治療に有用であるとして当該技術分野において認識されている治療薬であり得る。組合せは、1を超える追加の薬剤、例えば、2つまたは3つの追加の薬剤を含むことができる。

【0149】

併用療法剤には、限定されないが、抗腫瘍剤、放射線療法、化学療法、例えばDNAアルキル化剤、シスプラチン、カルボプラチン、抗チューブリン剤、パクリタキセル、ドセタキセル、タキソール、ドキソルビシン、ゲムシタビン、ジェムザール、アントラサイクリン、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、ゲフィチニブ)、COX-2阻害剤(例えば、セレコキシブ)、キナーゼ阻害剤およびsiRNAが含まれる。

【0150】

本明細書において提供される結合タンパク質と組み合わせることができる化学療法剤の非制限的な例には、以下: 13-cis-レチノイン酸; 2-CdA; 2-クロロデオキシアデノシン; 5-アザシチジン; 5-フルオロウラシル; 5-FU; 6-メルカプトプリン; 6-MP; 6-TG; 6-チオグアニン; アブラキサン; Accutane (登録商標); アクチノマイシン-D; Adriamycin (登録商標); Adrucil (登録商標); Afinitor (登録商標); Agrylin (登録商標); Ala-Cort (登録商標); アルデスロイキン; アレムツズマブ; ALIMTA; アリトレチノイン; Alkaban-AQ (登録商標); Alkeran (登録商標); オールトランスレチノイン酸; アルファインターフェロン; アルトレタミン; アメトプテリン; アミホスチン; アミノグルテチミド; アナグレリド; Anandron (登録商標); アナストロゾール; アラビノシルシトシン; Ara-C Aranesp (登録商標); Aredia (登録商標); Arimidex (登録商標); Aromasin (登録商標); Arranon (登録商標); 三酸化ヒ素; Arzerra (商標); アスパラギナーゼ; ATRA; Avastin (登録商標); アザシチジン; BCG; BCNU; ベンダムスチン; ベバシズマブ: ベキサロテン; BEXXAR (登録商標); ビカルタミド; BiCNU; Blenoxane (登録商標); プレオマイシン; ボルテゾミブ; ブスルファン; Busulfex (登録商標); C225; カルシウムロイコボリン; Campath (登録商標); Camptosar (登録商標); Camptothecin-11; カベシタビン; Carac (商標); カルボプラチン; カルムスチン; カルムスチンウエハー; Casodex (登録商標); CC-5013; CCI-779; CCNU; CDDP; CeeNU; Cerubidine (登録商標); セツキシマブ; クロラムブシル; シスプラチン; シトロボラム因子; クラドリビン; コルチゾン; Cosmegen (登録商標); CPT-11; シクロフォスファミド; Cytadren (登録商標); シタラビン; シタラビンリボゾーマル; Cytosar-U (登録商標); Cytosan (登録商標); ダカルバジン; ダコゲン; ダクチノマイシン; ダルベポエチンアルファ; ダサチニブ; ダウノマイシン; ダウノルビシン; 塩酸ダウノルビシン; ダウノルビシンリボゾーマル; DaunoXome (登録商標); デカドロン; デシタビン; Delta-Cortef (登録商標); Deltasone (登録商標); デニロイキン; ジフチトクス; DepoCyt (商標); デキサメタゾン; 酢酸デキサメタゾン; リン酸デキサメタゾ

ンナトリウム；デキサゾン；デクスラゾキサン；DHAD；DIC；ジオデックス；ドセ
タキセル；Doxil（登録商標）；ドキシソルビシン；ドキシソルビシンリポゾーマル；D
roxia（商標）；DTIC；DTIC-Dome（登録商標）；Duralone（
登録商標）；Efudex（登録商標）；Eligard（商標）；Ellence（商
標）；Eloxatin（商標）；Elspar（登録商標）；Emcyt（登録商標）
；エピルビシン；エポエチンアルファ；エルビタックス；エルロチニブ；エルウィニア
Lーアスパラギナーゼ；エストラムスチン；エチオール；Etopophos（登録商標）
；エトポシド；リン酸エトポシド；Eulexin（登録商標）；エベロリムス；Evi
sta（登録商標）；エキセメスタン；Fareston（登録商標）；Faslode
x（登録商標）；Femara（登録商標）；フィルグラスチム；フロクスウリジン；
Fludara（登録商標）；フルダラビン；Fluoroplex（登録商標）；フル
オロウラシル；フルオロウラシル（クリーム）；フルオキシムエステロン；フルタミド；
フォルイン酸；FUDR（登録商標）；フルベストラント；ゲフィチニブ；ゲムシタビン；
ゲムツズマブオゾガマイシン；ジェムザール；Gleevec（商標）；Gliadel
（登録商標）ウエハー；GM-CSF；ゴセレリン；顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）
；顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）；Halotestin
（登録商標）；Herceptin（登録商標）；ヘキサドロール；Hexalen（登
録商標）；ヘキサメチルメラミン；HMM；Hycamtin（登録商標）；Hydre
a（登録商標）；Hydrocort Acetate（登録商標）；ヒドロコルチゾン
；リン酸ヒドロコルチゾンナトリウム；コハク酸ヒドロコルチゾンナトリウム；リン酸ハ
イドロコートン；ヒドロキシ尿素；イブリツモマブ；イブリツモマブチウキセタン；Id
amycin（登録商標）；Idarubicin Ifex（登録商標）；インターフ
ェロンーアルファ；インターフェロンーアルファー2b（PEGコンジュゲート）；イホ
スファミド；インターロイキンー11（IL-11）；インターロイキンー2（IL-2）
；メシル酸イマチニブ；イミダゾールカルボキサミド；Intron A（登録商標）
；Iressa（登録商標）；イリノテカン；イソトレチノイン；イキサベピロン；Ix
empra（商標）；キドロラーゼ（t）；Lanacort（登録商標）；ラパチニブ
；Lーアスパラギナーゼ；LCR；レナリドミド；レトロゾール；ロイコボリン；リユー
ケラン；Leukine（商標）；ロイプロリド；ロイコクリスチン；Leustatin
（商標）；リポゾーマルAra-C；Liquid Pred（登録商標）；ロムスチ
ン；L-PAM；Lーサルコリジン；Lupron（登録商標）；Lupron Dep
ot（登録商標）；Matulane（登録商標）；マキシデックス；メクロレタミン；
塩酸メクロレタミン；Medralone（登録商標）；Medrol（登録商標）；Me
gace（登録商標）；メゲストロール；酢酸メゲストロール；メルファラン；メルカ
プトプリン；メスナ；メスネックス（商標）；メトトレキサート；メトトレキサートナト
リウム；メチルプレドニゾロン；Meticorten（登録商標）；マイトマイシン；
マイトマイシンーC；ミトキサントロン；M-Prednisol（登録商標）；MTC
；MTX；Mustargen（登録商標）；ムスチン；Mutamycin（登録商標）
；Myleran（登録商標）；Mylotecel（商標）；Mylotarg（登録商
標）；Navelbine（登録商標）；ネララビン；Neosar（登録商標）；Ne
ulasta（商標）；Neumega（登録商標）；Neupogen（登録商標）；
Nexavar（登録商標）；Nilandron（登録商標）；ニルタミド；Nipe
nt（登録商標）；Nitrogen Mustard Novaldex（登録商標）
；Novantrone（登録商標）；エヌプレート；オクトレオチド；酢酸オクトレオ
チド；オфтаツムマブ；Oncospar（登録商標）；Oncovin（登録商標）；
Ontak（登録商標）；Onxal（商標）；オプレルベキン；Orapred（登録
商標）；Orasone（登録商標）；オキサリプラチン；パクリタキセル；タンパク質
に結合したパクリタキセル；パミドロネート；パニツムマブ；Panretin（登録商
標）；Paraplatin（登録商標）；パゾパニブ；Pediapred（登録商標）
；PEGインターフェロン；ペグアスパラガーゼ；ペグフィルグラスチム；PEG-I

N T R O N (商標) ; P E G - L - アスパラギナーゼ ; ペメトレキセド ; ペントスタチン ; フェニルアラニンマスタード ; P l a t i n o l (登録商標) ; P l a t i n o l - A Q (登録商標) ; プレドニゾロン ; プレドニゾン ; P r e l o n e (登録商標) ; プロカルバジン ; P R O C R I T (登録商標) ; P r o l e u k i n (登録商標) ; カルムスチンインプラントを伴うプロリフェブロスパン 20 ; P u r i n e t h o l (登録商標) ; ラロキシフェン ; R e v l i m i d (登録商標) ; R h e u m a t r e x (登録商標) ; R i t u x a n (登録商標) ; リツキシマブ ; R o f e r o n - A (登録商標) ; ロミブロスチン ; R u b e x (登録商標) ; 塩酸ルビドマイシン ; S a n d o s t a t i n (登録商標) ; S a n d o s t a t i n L A R (登録商標) ; サーグラモスティム ; S o l u - C o r t e f (登録商標) ; S o l u - M e d r o l (登録商標) ; ソラフェニブ ; S P R I C E L (商標) ; S T I - 571 ; ストレプトゾシン ; S U 11248 ; スニチニブ ; S u t e n t (登録商標) ; T a m o x i f e n T a r c e v a (登録商標) ; T a r g r e t i n (登録商標) ; T a s i g n a (登録商標) ; T a x o l (登録商標) ; T a x o t e r e (登録商標) ; T e m o d a r (登録商標) ; テモゾロマイド ; テムシロリムス ; テニボシド ; T E S P A ; サリドマイド ; T h a l o m i d (登録商標) ; T h e r a C y s (登録商標) ; チオグアニン ; T h i o g u a n i n e T a b l o i d (登録商標) ; チオホスファミド T h i o p l e x (登録商標) ; チオテパ ; T I C E (登録商標) ; T o p o s a r (登録商標) ; トポテカン ; トレミフェン ; T o r i s e l (登録商標) ; トシツモマブ ; トラスツズマブ ; T r e a n d a (登録商標) ; トレチノイン ; T r e x a l l (商標) ; T r i s e n o x (登録商標) ; T S P A ; T Y K E R B (商標) ; V C R ; V e c t i b i x (商標) ; V e l b a n (登録商標) ; V e l c a d e (登録商標) ; V e p e s i d (登録商標) ; V e s a n o i d (登録商標) ; V i a d u r (商標) ; V i d a z a (登録商標) ; ビンブラスチン ; 硫酸ビンブラスチン ; V i n c a s a r - P f s (登録商標) ; ビンクリスチン ; ビノレルビン ; 酒石酸ビノレルビン ; V L B ; V M - 26 ; ボリノスタット ; ヴォトリエント ; V P - 16 ; V u m o n (登録商標) ; X e l o d a (登録商標) ; Z a n o s a r (登録商標) ; Z e v a l i n (商標) ; Z i n e c a r d (登録商標) ; Z o l a d e x (登録商標) ; ゴレドロン酸 ; ゴリンザ ; または Z o m e t a (登録商標) が含まれる。

【0151】

自己免疫疾患および炎症性疾患を治療するための組合せは、イブプロフェンのような薬剤を含む、N S A I D S ととも称される非ステロイド性抗炎症薬（単数または複数）である。他の組合せは、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、本明細書において提供される結合タンパク質と組み合わせて患者を治療するときに必要とされるステロイド用量を徐々に減らすことによって、低減することが可能でありまたは除去することさえ可能である。本明細書において提供される抗体またはその抗体結合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：サイトカイン抑制抗炎症薬（単数または複数）（C S A I D）；他のヒトサイトカインまたは増殖因子、例えば、T N F、L T、I L - 1、I L - 2、I L - 3、I L - 4、I L - 5、I L - 6、I L - 7、I L - 8、I L - 15、I L - 16、I L - 18、I L - 21、I L - 23、インターフェロン、E M A P - I I、G M - C S F、F G F および P D G F に対する抗体またはこれらのアンタゴニストが含まれる。本明細書において提供される結合タンパク質またはその抗原結合部分は、C D 2、C D 3、C D 4、C D 8、C D 25、C D 28、C D 30、C D 40、C D 45、C D 69、C D 80 (B7. 1)、C D 86 (B7. 2)、C D 90、C T L A または C D 154 を含むこれらのリガンド (g p 39 または C D 40 L) 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できる。

【0152】

治療剤の組合せは、異なる点で、自己免疫およびこれに続く炎症カスケードを干渉し得る。例には、本明細書において開示される結合タンパク質、ならびにキメラ、ヒト化またはヒト T N F 抗体、アダリムマブ (P C T 公開第 W O 97/29131 号)、C A 2 (R

em icade (商標))、CDP571、可溶性p55もしくはp75TNF受容体、またはこれらの誘導体(p75TNFR1gG(Enbre1(商標))またはp55TNFR1gG(Lenercept))およびTNF α 変換酵素(TACE)阻害剤のようなTNFアンタゴニスト；または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)が挙げられる。他の組合せには、本明細書において開示される結合タンパク質およびインターロイキン11が含まれる。さらに別の組合せには、IL-12機能と平行して、IL-12機能に依存してまたはIL-12と協調して作用し得る自己免疫応答の中心的プレーヤーが含まれる；特に、IL-18抗体または可溶性IL-18受容体またはIL-18結合タンパク質などのIL-18アンタゴニストが関連する。IL-12およびIL-18は重複しているが、異なる機能を有しており、両者に対するアンタゴニストの組合せは、最も有効であり得ることが示されている。さらに別の組合せは、本明細書において開示される結合タンパク質と非枯渇性抗CD4阻害剤である。さらに他の組合せには、本明細書において開示される結合タンパク質と、抗体、可溶性受容体または拮抗性リガンドを含む、共同刺激経路CD80(B7.1)またはCD86(B7.2)のアンタゴニストが含まれる。

【0153】

本明細書において提供される結合タンパク質はまた、薬剤と併用されてもよく、例えば、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(pencilamine)、金チオリンゴ酸塩(筋内および経口)、アザチオプリン、コルヒチン(cochicine)、コルチコステロイド(経口、吸入および局所注射)、 β -2アドレナリン受容体アゴニスト(サルブタモール、テルブタリン、サルメテラル)、キサンチン(テオフィリン、アミノフィリン)、クロモグリカート、ネドクロミル、ケトチフェン、イプラトロピウム、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、プレドニゾンなどのコルチコステロイド、ホスホジエステラーゼ阻害剤、アデノシンアゴニスト、抗血栓剤、補体阻害剤、アドレナリン作用薬、TNF α またはIL-1などの炎症促進性サイトカインによるシグナル伝達を妨害する薬剤(例えば、IRAK、NIK、IKK、p38またはMAPキナーゼ阻害剤)、IL-1 β 変換酵素阻害剤、TNF α 変換酵素(TACE)阻害剤、キナーゼ阻害剤などのT細胞シグナル伝達阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、スルファサラジン、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、可溶性サイトカイン受容体およびそれらの誘導体(例えば、可溶性p55またはp75TNF受容体または誘導体p75TNFR1gG(Enbre1(商標))およびp55TNFR1gG(Lenercept))、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R)、炎症抑制性サイトカイン(例えば、IL-4、IL-10、IL-11、IL-13およびTGF β)、セレコキシブ、葉酸、硫酸ヒドロキシクロロキン、ロフェコキシブ、エタネルセプト、インフリキシマブ、ナプロキセン、バルデコキシブ、スルファサラジン、メチルプレドニゾン、メロキシカム、酢酸メチルプレドニゾン、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、プロボキシフェンナブシラート/apap、フォラート、ナブメトン、ジクロフェナク、ピロキシカム、エトドラク、ジクロフェナクナトリウム、オキサプロジン、塩酸オキシコドン、ヒドロコドン二酒石酸塩/apap、ジクロフェナクナトリウム/ミソプロストール、フェンタニル、アナキンラ、ヒト組み換え、塩酸トラマドール、サルサラート、スリンダク、シアノコバラミン/fa/ピリドキシン、アセトアミノフェン、アレンドロナートナトリウム、プレドニゾン、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、CTL4-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-48

5、CDC-801およびメソプラムなどの作用物質とも組み合わせられ得る。組合せには、メトトレキサートまたはレフルノミドとシクロスポリンが含まれる。

【0154】

一実施形態において、結合タンパク質またはその抗原結合部分は、関節リウマチの治療用の以下の薬剤の1つと併用して投与される：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；トリウムシノロンアセトニド；プロブキシフェンナブシラート/apap；フォラート；ナブメトン；ジクロフェナク；ピロキシカム；エトドラク；ジクロフェナクナトリウム；オキサプロジン；塩酸オキシコドン；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；VX-740；ロフルミラスト；IC-485；CDC-801またはメソプラム。

【0155】

本明細書において提供される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：ブデノシド；上皮細胞増殖因子；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-1 β mAb；抗IL-6mAb；増殖因子；エラスターゼ阻害剤；ピリジニル-イミダゾール化合物；他のヒトサイトカインまたは増殖因子、例えば、TNF、LT、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、EMAP-11、GM-CSF、FGFおよびPDGFに対する抗体またはこれらのアンタゴニストが含まれる。本明細書において提供される抗体またはその抗原結合部分は、CD2、CD3、CD4、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD90またはそ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できる。本明細書において提供される抗体またはその抗原結合部分はまた、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、TNF α またはIL-1などの炎症促進性サイトカインによるシグナル伝達を妨害する作用物質（例えば、IRAK、NIK、IKK、p38またはMAPキナーゼ阻害剤）、IL-1 β 変換酵素阻害剤、TNF α 変換酵素阻害剤、キナーゼ阻害剤などのT細胞シグナル伝達阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、スルファサラジン、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、可溶性サイトカイン受容体およびそれらの誘導体（例えば、可溶性p55またはp75TNF受容体、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R）または炎症抑制性サイトカイン（例えば、IL-4、IL-10、IL-11、IL-13またはTGF β ）またはbc1-2阻害剤などの薬剤とも組み合わせられ得る。

【0156】

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

：TNFアンタゴニスト、例えば、抗TNF抗体、アダリムマブ（PCT公開第WO97/29131号；HUMIRA）、CA2（REMICADE）、CDP571、TNFR-Ig構築物、（p75TNFR-IgG（ENBREL）またはp55TNFR-IgG（LENERCEPT））阻害剤またはPDE4阻害剤が含まれる。本明細書において提供される抗体またはその抗原結合部分は、コルチコステロイド、例えば、ブデノシドおよびデキサメタゾンと組み合わせることができる。本明細書において提供される結合タンパク質またはこれらの抗原結合部分はまた、スルファサラジン、5-アミノサリチル酸およびオルサラジンなどの薬剤、ならびにIL-1などの炎症促進性サイトカインの合成または作用を妨害する薬剤、例えば、IL-1 β 変換酵素阻害剤またはIL-1raと組み合わせ得る。本明細書において提供される抗体またはその抗原結合部分はまた、T細胞シグナル伝達阻害剤、例えば、チロシンキナーゼ阻害剤または6-メルカプトプリンとともに使用され得る。本明細書において提供される結合タンパク質またはその抗原結合部分は、IL-11と組み合わせることができる。本明細書において提供される結合タンパク質また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、ジフェノキシレート/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、フォレート、シプロフロキサシン/デキストロースー水、重酒石酸ヒドロコドン/apap、テトラサイクリン塩酸塩、フルオシノニド、メトロニダゾール、チメロサル/ホウ酸、コレステラミン/スクロース、塩酸シプロフロキサシン、硫酸ヒヨスチアミン、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、メチルプレドニソロン、ナタリズマブまたはインターフェロンガンマと組み合わせることができる。

【0157】

本明細書において提供される結合タンパク質とともに組み合わせることが可能な多発性硬化症に対する治療剤の非限定的な例には、以下：コルチコステロイド；プレドニゾロン；メチルプレドニゾロン；アザチオプリン；シクロホスファミド；シクロスポリン；メトトレキサート；4-アミノピリジン；チザニジン；インターフェロン- β 1a（AVONEX；Biogen）；インターフェロン- β 1b（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- β 1A-IF（Serono/Inhale Therapeutics）、PEGインターフェロン α 2b（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；クラブリピン；他のヒトサイトカインまたは成長因子およびこれらの受容体（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またはPDGF）に対する抗体もしくはアンタゴニストが含まれる。本明細書において提供される結合タンパク質は、CD2、CD3、CD4、CD8、CD19、CD20、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD80、CD86、CD90またはそ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できる。本明細書において提供される結合タンパク質はまた、メトトレキサート、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノレート・モフェチル、レフルノミド、NSAID、例えば、イブプロフェン、プレドニゾロンなどのコルチコステロイド、ホスホジエステラーゼ阻害剤、アデノシンアゴニスト、抗血栓剤、補体阻害剤、アドレナリン作用薬、TNF α またはIL-1などの炎症促進性サイトカインによるシグナル伝達を妨害する作用物質（例えば、IRAK、NIK、IKK、p38またはMAPキナーゼ阻害剤）、IL-

1 β 変換酵素阻害剤、TACE阻害剤、キナーゼ阻害剤などのT細胞シグナル伝達阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、スルファサラジン、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、可溶性サイトカイン受容体およびそれらの誘導体（例えば、可溶性p55またはp75TNF受容体、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R）または炎症抑制性サイトカイン（例えば、IL-4、IL-10、IL-13またはTGF β ）またはbc1-2阻害剤などの薬剤と組み合わせられ得る。

【0158】

本明細書において提供される結合タンパク質を組み合わせることが可能な多発性硬化症のための治療剤の例には、インターフェロン β 、例えば、IFN β 1aおよびIFN β 1b；コパキソン、コルチコステロイド、カスパーゼ阻害剤、例えばカスパーゼ-1の阻害剤、IL-1阻害剤、TNF阻害剤ならびにCD40リガンドおよびCD80に対する抗体が含まれる。

【0159】

本明細書において提供される結合タンパク質とともに組み合わせることが可能な喘息に対する治療剤の非限定的な例には、以下：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、トリウムシノロンアセトニド、ニプロピオン酸ベクロメタゾン、イプラトロピウム臭化物、アジスロマイシン、酢酸ビルブテロール、プレドニゾン、テオフィリン無水物、コハク酸メチルプレドニゾロンナトリウム、クラリスロマイシン、ザフィルルカスト、フマル酸フォルモテロール、インフルエンザウイルスワクチン、メチルプレドニゾン、アミノキシリル三水和物、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、塩酸マキシフロキサシン、ドキシサイクリン水和物（hydrate）、グアイフェネシン／d-メトルファン、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、p-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prozil、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、メチルプレドニゾン、硫酸メタプロテレノールが含まれる。

【0160】

本明細書において提供される結合タンパク質とともに組み合わせることが可能なCOPDに対する治療剤の非限定的な例には、以下：硫酸アルブテロール／イプラトロピウム、イプラトロピウムプロミド、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、トリウ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、アミノキシリル三水和物、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、メチルプレドニゾン、フロ酸モメタゾン、p-エフェドリン／cod／クロルフェニル、酢酸ビルブテロール、p-エフェドリン／ロラタジン、硫酸テルブタリン、チオトロピウムプロミド、(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。

【0161】

本明細書において提供される結合タンパク質とともに組み合わせることが可能な乾癬に対する治療剤の非限定的な例には、以下：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、トリウムシノロンアセトニド、プロピオン酸ハロベタゾール、タザロテン、メトトレキサート、フルオシノニド、増強された (a u g m e n t e d) ニ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、プラモキシシ／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 (e m o l l) 、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、h c / 次没食子酸ビスマス (b i s m u t h s u b g a l) / 酸化亜鉛 (z n o x) / r e s o r、酢酸メチルプレドニゾロン、プレドニゾロン、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、鈹物油／ひまし油 / n a l a c t、鈹物油／落花生油、石油／ミリスチン酸イソプロピル、ソラーレン、サリチル酸、石鹼／トリブロムサラン、チメロサル／ホウ酸、セレコキシブ、インフリキシマブ、シクロスポリン、アレファセプト、エファリズマブ、タクロリムス、ピメクロリムス、P U V A、U V B、スルファサラジンが含まれる。

【0162】

本明細書において提供される結合タンパク質を組み合わせることが可能な S L E (狼瘡) に対する治療剤の例には、以下：N S A I D、例えば、ジクロフェナク、ナプロキセン、イブプロフェン、ピロキシカム、インドメタシン；C O X 2 阻害剤、例えば、セレコキシブ、ロフェコキシブ、バルデコキシブ；抗マラリア剤、例えば、ヒドロキシクロロキン；ステロイド、例えば、プレドニゾン、プレドニゾロン、ブデノシド、デキサメタゾン；細胞障害剤、例えば、アザチオプリン、シクロホスファミド、ミコフェノラートモフェチル、メトトレキサート；P D E 4 の阻害剤またはプリン合成阻害剤、例えば、C e l l c e p t が含まれる。本明細書において提供される結合タンパク質はまた、薬剤と併用されてもよく、例えば、スルファサラジン、5-アミノサリチル酸、オルサラジン、イムランならびに I L - 1 などの炎症促進性サイトカインの合成、産生または作用を妨害する作用物質、例えば、I L - 1 β 変換酵素阻害剤および I L - 1 r a のようなカスパーゼ阻害剤とも組み合わせられ得る。本明細書において提供される結合タンパク質はまた、T細胞シグナル伝達阻害剤、例えば、チロシンキナーゼ阻害剤；またはT細胞活性化分子を標的とする分子、例えば、C T L A - 4 - I g G または抗 B 7 抗体ファミリー抗体、抗 P D - 1 ファミリー抗体とともに使用され得る。本明細書において提供される結合タンパク質は、I L - 1 1 または抗サイトカイン抗体、例えば、ホノトリズマブ (抗 I F N γ 抗体) または抗受容体受容体抗体、例えば、抗 I L - 6 受容体抗体およびB細胞表面分子に対する抗体と組み合わせることができる。本明細書において提供される抗体またはその抗原結合部分はまた、L J P 3 9 4 (アベチムス)、B細胞を枯渇させまたは不活化する薬剤、例えば、リツキシマブ (抗 C D 2 0 抗体)、リンホスタット-B (抗 B l y s 抗体)、T N F アンタゴニスト、例えば、抗 T N F 抗体、アダリムマブ (P C T 公開第 W O 9 7 / 2 9 1 3 1 号；H U M I R A)、C A 2 (R E M I C A D E)、C D P 5 7 1、T N F R - I g 構築物 (p 7 5 T N F R I g G (E N B R E L) および p 5 5 T N F R I g G (L E N E R C E P T)) および b c l - 2 阻害剤 (トランスジェニックマウスにおける b c l - 2 過剰発現が狼瘡様表現型をもたらすことが実証されているためである (M a r q u i n a 参照)。) とともに使用され得る。

【0163】

本明細書において提供される医薬組成物は、本明細書において提供される結合タンパク質の「治療的有効量」または「予防的有効量」を含み得る。「治療的有効量」は、所望の治療的結果を達成するための投薬量で、および所望の治療的結果を達成するために必要な期間にわたって有効な量を表す。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、病状、年齢、性別および個体の体重ならびに結合タンパク質が個体内で所望の応

答を惹起する能力などの因子に従って変動し得る。治療の有効量は、抗体または抗体部分のあらゆる毒性効果または有害効果が、治療的に有益な効果によって凌駕される量でもある。「予防的有効量」は、所望の予防的結果を達成するために必要な投薬量で、および所望の予防的結果を達成するために必要な期間にわたって有効な量を表す。典型的には、疾病のより初期段階の前にまたは疾病のより初期段階において、予防的投薬が患者に使用されるので、予防的有効量は、治療の有効量より少ない。

【0164】

V. 診断

本明細書における開示はまた診断の適用例を提供し、限定されないが、診断アッセイ法、1つ以上の結合タンパク質を含む診断用キット、ならびに自動化および／または半自動化システムにおける使用のための方法およびキットの適応が含まれる。提供される方法、キットおよび適応は、個体における疾患または障害の検出、監視および／または治療に用いることができる。これは、以下でさらに明らかにされる。

【0165】

A. 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つの結合タンパク質を使用して試験試料中の分析物またはその断片の存在、量または濃度を決定する方法も提供する。本分野において知られているあらゆる適切なアッセイは、この方法において使用することが可能である。例には、限定されないが、イムノアッセイおよび／または質量分析法を用いる方法が含まれる。

【0166】

本開示によって提供されるイムノアッセイは、とりわけ、サンドイッチイムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ (RIA)、エンザイムイムノアッセイ (EIA)、酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA)、競合阻害イムノアッセイ、蛍光偏光イムノアッセイ (FPIA)、酵素増幅イムノアッセイ技術 (EMIT)、生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET) および均一系化学発光アッセイを含む。

【0167】

化学発光微粒子イムノアッセイ、特に ARCHITECT (登録商標) 自動分析器 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) を使用するものは、イムノアッセイの例である。

【0168】

質量分析法を用いる方法は、本開示によって提供され、限定されないが、MALDI (マトリックス支援レーザー脱離／イオン化) または SELDI (表面増強レーザー脱離／イオン化) が含まれる。

【0169】

イムノアッセイおよび質量分析法を用いて生物学的試験試料を回収し、操作し、処理しおよび分析するための方法は、本開示の実施において提供される (US 2009-0311253 A1)。

【0170】

B. キット

試験試料における分析物またはその断片の存在、量または濃度について試験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、分析物またはその断片について試験試料をアッセイするための少なくとも1つの成分および分析物またはその断片について試験試料をアッセイするための説明書を含む。分析物またはその断片について試験試料をアッセイするための少なくとも1つの成分は、場合によって、固相上に固定されている、本明細書に開示されている結合タンパク質および／または抗分析物結合タンパク質 (またはその断片、バリエーションまたはそのバリエーションの断片) を含む組成物を含むことができる。

【0171】

場合によって、キットは、単離されたまたは精製された分析物を含み得る、校正因子または対照を含むことができる。キットは、イムノアッセイおよび／または質量分析法によ

って、分析物について試験試料をアッセイするための少なくとも1つの成分を含むことができる。キット成分は、分析物、結合タンパク質および／または抗分析物結合タンパク質またはその断片を含み、場合によって、当該分野で公知の任意の検出可能な標識を用いて標識されてもよい。本開示の実施において提供される構築のための材料および方法は、当業者に公知である（米国2009-0311253A1）。

【0172】

C. キットおよび方法の適合

本明細書に記載されているイムノアッセイなどのアッセイによって試験試料における分析物の存在、量または濃度を決定するキット（またはその成分）ならびに方法は、例えば、米国特許第5,089,424号および第5,006,309号に記載され、例えば、Abbott Laboratories (Abbott Park, IL) によってARCHITECT（登録商標）として商業的に販売されている（固相が微粒子を含むものを含めて）様々な自動化システムおよび半自動化システムにおける使用に適合させることが可能である。

【0173】

Abbott Laboratoriesから入手可能な他のプラットフォームには、ASYM（登録商標）、IMx（登録商標）（例えば、米国特許第5,294,404号を参照されたい）、PRISM（登録商標）、EIA（ビーズ）およびQuantum（商標）IIなら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、キットおよびキットの成分は、他のフォーマットにおいて、例えば、電気化学的または他の携帯もしくはポイントオブケアアッセイシステムで使用することが可能である。本開示は、例えば、サンドイッチイムノアッセイを行う商業的Abbott Point of Care (i-STAT（登録商標）、Abbott Laboratories) 電気化学的イムノアッセイシステムに適用可能である。免疫センサーならびに単回使用試験装置におけるこれらの製造および操作方法は、例えば、米国特許第5,063,081号、第7,419,821号、および第7,682,833号；ならびに米国特許公開第20040018577号、第20060160164号、およびUS20090311253に記載されている。

【0174】

本明細書に記載されている本方法の他の適切な改変および適合が明白であり、本明細書に開示されている範囲または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は、当業者に容易に明確になる。ここに、ある種の実施形態を詳細に記載してきたが、例示のみを目的とし、限定することを意図したものではない、下記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】

【0175】

【実施例1】 二重可変ドメイン（DVD）結合タンパク質の生成および特徴付け

既知のアミノ酸配列を有する親抗体を用いた四本鎖二重可変ドメイン（DVD）結合タンパク質は、DVD結合タンパク質の可変重鎖配列およびDVD結合タンパク質の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、当該技術分野において公知の方法に従って、pHybC-D2ベクターに断片をクローニングすることにより生成された。DVD結合タンパク質構築物は、当該技術分野において既知の方法に従って、293細胞にクローニングされ、そこで発現させ、精製された。DVD結合タンパク質についてのDVD-VH鎖およびVL鎖を以下に提供する。

【0176】

DVDの構築に使用されるリンカーを表2に示す。

【0177】

【表 2】

表2

配列 番号	リンカー名	配列
21	HG-短鎖	ASTKGP
15	LL-短鎖	QPKAAP
13	LK-短鎖	TVAAP
14	LK-長鎖	TVAAPSVFIFPP
22	HG-長鎖	ASTKGPSVFPLAP
16	LL-長鎖	QPKAAPSVTLFPP

【0178】

〔実施例1.1〕 同一標的タンパク質の重複しないエピトープに対して指向されたD V
D結合タンパク質

【0179】

【表 3】

表 3

配列 番号	DVD可変 ドメイン名	外部可変 ドメイン名	リンカー	内部可変 ドメイン名
58	DVD2202H	AB033VH	HG-短鎖	AB003VH
59	DVD2202L	AB033VL	LK-短鎖	AB003VL
60	DVD2203H	AB003VH	HG-短鎖	AB033VH
61	DVD2203L	AB003VL	LK-短鎖	AB033VL
62	DVD2204H	AB033VH	HG-短鎖	AB003VH
63	DVD2204L	AB033VL	LK-長鎖	AB003VL
64	DVD2205H	AB003VH	HG-短鎖	AB033VH
65	DVD2205L	AB003VL	LK-長鎖	AB033VL
67	DVD2206H	AB033VH	HG-長鎖	AB003VH
68	DVD2206L	AB033VL	LK-短鎖	AB003VL
69	DVD2207H	AB003VH	HG-長鎖	AB033VH
70	DVD2207L	AB003VL	LK-短鎖	AB033VL
71	DVD2208H	AB005VH	HG-短鎖	AB034VH
72	DVD2208L	AB005VL	LK-短鎖	AB034VL
73	DVD2209H	AB034VH	HG-短鎖	AB005VH
74	DVD2209L	AB034VL	LK-短鎖	AB005VL
75	DVD2210H	AB005VH	HG-短鎖	AB034VH
76	DVD2210L	AB005VL	LK-長鎖	AB034VL
77	DVD2211H	AB034VH	HG-短鎖	AB005VH
78	DVD2211L	AB034VL	LK-長鎖	AB005VL
79	DVD2212H	AB005VH	HG-長鎖	AB034VH
80	DVD2212L	AB005VL	LK-短鎖	AB034VL
81	DVD2213H	AB034VH	HG-長鎖	AB005VH
82	DVD2213L	AB034VL	LK-短鎖	AB005VL
83	DVD2214H	AB075VH	HG-短鎖	AB011VH
84	DVD2214L	AB075VL	LL-短鎖	AB011VL
85	DVD2215H	AB011VH	HG-短鎖	AB075VH
86	DVD2215L	AB011VL	LK-短鎖	AB075VL
87	DVD2216H	AB075VH	HG-短鎖	AB011VH
88	DVD2216L	AB075VL	LL-長鎖	AB011VL
89	DVD2217H	AB011VH	HG-短鎖	AB075VH
90	DVD2217L	AB011VL	LK-長鎖	AB075VL
91	DVD2218H	AB075VH	HG-長鎖	AB011VH
92	DVD2218L	AB075VL	LL-短鎖	AB011VL
93	DVD2219H	AB011VH	HG-長鎖	AB075VH
94	DVD2219L	AB011VL	LK-短鎖	AB075VL
95	DVD2226H	AB075VH	HG-短鎖	AB077VH
96	DVD2226L	AB075VL	LL-短鎖	AB077VL

配列 番号	DVD可変 ドメイン名	外部可変 ドメイン名	リンカー	内部可変 ドメイン名
97	DVD2227H	AB077VH	HG-短鎖	AB075VH
98	DVD2227L	AB077VL	LK-短鎖	AB075VL
99	DVD2228H	AB075VH	HG-短鎖	AB077VH
100	DVD2228L	AB075VL	LL-長鎖	AB077VL
101	DVD2229H	AB077VH	HG-短鎖	AB075VH
102	DVD2229L	AB077VL	LK-長鎖	AB075VL
103	DVD2230H	AB075VH	HG-長鎖	AB077VH
104	DVD2230L	AB075VL	LL-短鎖	AB077VL
105	DVD2231H	AB077VH	HG-長鎖	AB075VH
106	DVD2231L	AB077VL	LK-短鎖	AB075VL
107	DVD2238H	AB062VH	HG-短鎖	AB063VH
108	DVD2238L	AB062VL	LK-短鎖	AB063VL
109	DVD2239H	AB063VH	HG-短鎖	AB062VH
110	DVD2239L	AB063VL	LK-短鎖	AB062VL
111	DVD2240H	AB062VH	HG-短鎖	AB063VH
112	DVD2240L	AB062VL	LK-長鎖	AB063VL
113	DVD2241H	AB063VH	HG-短鎖	AB062VH
114	DVD2241L	AB063VL	LK-長鎖	AB062VL
115	DVD2242H	AB062VH	HG-長鎖	AB063VH
116	DVD2242L	AB062VL	LK-短鎖	AB063VL
117	DVD2243H	AB063VH	HG-長鎖	AB062VH
118	DVD2243L	AB063VL	LK-短鎖	AB062VL
119	DVD2244H	AB062VH	HG-短鎖	AB116VH
120	DVD2244L	AB062VL	LK-短鎖	AB116VL
121	DVD2245H	AB116VH	HG-短鎖	AB062VH
122	DVD2245L	AB116VL	LK-短鎖	AB062VL
123	DVD2246H	AB062VH	HG-短鎖	AB116VH
124	DVD2246L	AB062VL	LK-長鎖	AB116VL
125	DVD2247H	AB116VH	HG-短鎖	AB062VH
126	DVD2247L	AB116VL	LK-長鎖	AB062VL
127	DVD2248H	AB062VH	HG-長鎖	AB116VH
128	DVD2248L	AB062VL	LK-短鎖	AB116VL
129	DVD2249H	AB116VH	HG-長鎖	AB062VH
130	DVD2249L	AB116VL	LK-短鎖	AB062VL

【0180】

[実施例1. 2] 同じ細胞に発現した2つの異なる受容体に対して指向されたDVD結合タンパク質

【0181】

【表 4】

表 4

配列 番号	DVD可変 ドメイン名	外部可変 ドメイン名	リンカー	内部可変 ドメイン名
131	DVD2266H	AB033VH	HG-短鎖	AB080VH
132	DVD2266L	AB033VL	LK-短鎖	AB080VL
133	DVD2267H	AB080VH	HG-短鎖	AB033VH
134	DVD2267L	AB080VL	LK-短鎖	AB033VL
135	DVD2268H	AB080VH	HG-短鎖	AB003VH
136	DVD2268L	AB080VL	LK-短鎖	AB003VL
137	DVD2269H	AB003VH	HG-短鎖	AB080VH
138	DVD2269L	AB003VL	LK-短鎖	AB080VL
139	DVD2270H	AB080VH	HG-短鎖	AB063VH
140	DVD2270L	AB080VL	LK-短鎖	AB063VL
141	DVD2271H	AB063VH	HG-短鎖	AB080VH
142	DVD2271L	AB063VL	LK-短鎖	AB080VL
143	DVD2272H	AB080VH	HG-短鎖	AB116VH
144	DVD2272L	AB080VL	LK-短鎖	AB116VL
145	DVD2273H	AB116VH	HG-短鎖	AB080VH
146	DVD2273L	AB116VL	LL-短鎖	AB080VL
147	DVD2274H	AB080VH	HG-短鎖	AB062VH
148	DVD2274L	AB080VL	LK-短鎖	AB062VL
149	DVD2275H	AB062VH	HG-短鎖	AB080VH
150	DVD2275L	AB062VL	LK-短鎖	AB080VL
151	DVD2276H	AB075VH	HG-短鎖	AB003VH
152	DVD2276L	AB075VL	LL-短鎖	AB003VL
153	DVD2277H	AB003VH	HG-短鎖	AB075VH
154	DVD2277L	AB003VL	LK-短鎖	AB075VL
155	DVD2278H	AB075VH	HG-短鎖	AB063VH
156	DVD2278L	AB075VL	LL-短鎖	AB063VL
157	DVD2279H	AB063VH	HG-短鎖	AB075VH
158	DVD2279L	AB063VL	LK-短鎖	AB075VL
159	DVD2280H	AB075VH	HG-短鎖	AB116VH
160	DVD2280L	AB075VL	LL-短鎖	AB116VL
161	DVD2281H	AB116VH	HG-短鎖	AB075VH
162	DVD2281L	AB116VL	LL-短鎖	AB075VL
163	DVD2282H	AB075VH	HG-短鎖	AB062VH
164	DVD2282L	AB075VL	LL-短鎖	AB062VL
165	DVD2283H	AB062VH	HG-短鎖	AB075VH
166	DVD2283L	AB062VL	LK-短鎖	AB075VL
167	DVD2284H	AB075VH	HG-短鎖	AB064VH
168	DVD2284L	AB075VL	LL-短鎖	AB064VL

配列 番号	DVD可変 ドメイン名	外部可変 ドメイン名	リンカー	内部可変 ドメイン名
169	DVD2285H	AB064VH	HG-短鎖	AB075VH
170	DVD2285L	AB064VL	LK-短鎖	AB075VL
171	DVD2286H	AB075VH	HG-短鎖	AB004VH
172	DVD2286L	AB075VL	LL-短鎖	AB004VL
173	DVD2287H	AB004VH	HG-短鎖	AB075VH
174	DVD2287L	AB004VL	LK-短鎖	AB075VL
175	DVD2288H	AB075VH	HG-短鎖	AB080VH
176	DVD2288L	AB075VL	LL-短鎖	AB080VL
177	DVD2289H	AB080VH	HG-短鎖	AB075VH
178	DVD2289L	AB080VL	LK-短鎖	AB075VL
179	DVD2290H	AB400VH	HG-短鎖	AB003VH
180	DVD2290L	AB400VL	LK-短鎖	AB003VL
181	DVD2291H	AB003VH	HG-短鎖	AB400VH
182	DVD2291L	AB003VL	LK-短鎖	AB400VL
183	DVD2292H	AB400VH	HG-短鎖	AB063VH
184	DVD2292L	AB400VL	LK-短鎖	AB063VL
185	DVD2293H	AB063VH	HG-短鎖	AB400VH
186	DVD2293L	AB063VL	LK-短鎖	AB400VL
187	DVD2294H	AB400VH	HG-短鎖	AB116VH
188	DVD2294L	AB400VL	LK-短鎖	AB116VL
189	DVD2295H	AB116VH	HG-短鎖	AB400VH
190	DVD2295L	AB116VL	LL-短鎖	AB400VL
191	DVD2296H	AB400VH	HG-短鎖	AB062VH
192	DVD2296L	AB400VL	LK-短鎖	AB062VL
193	DVD2297H	AB062VH	HG-短鎖	AB400VH
194	DVD2297L	AB062VL	LK-短鎖	AB400VL
195	DVD2298H	AB400VH	HG-短鎖	AB005VH
196	DVD2298L	AB400VL	LK-短鎖	AB005VL
197	DVD2299H	AB005VH	HG-短鎖	AB400VH
198	DVD2299L	AB005VL	LK-短鎖	AB400VL
199	DVD2300H	AB400VH	HG-短鎖	AB004VH
200	DVD2300L	AB400VL	LK-短鎖	AB004VL
201	DVD2301H	AB004VH	HG-短鎖	AB400VH
202	DVD2301L	AB004VL	LK-短鎖	AB400VL
203	DVD2302H	AB400VH	HG-短鎖	AB080VH
204	DVD2302L	AB400VL	LK-短鎖	AB080VL
205	DVD2303H	AB080VH	HG-短鎖	AB400VH
206	DVD2303L	AB080VL	LK-短鎖	AB400VL
207	DVD2304H	AB400VH	HG-短鎖	AB075VH
208	DVD2304L	AB400VL	LK-短鎖	AB075VL
209	DVD2305H	AB075VH	HG-短鎖	AB400VH
210	DVD2305L	AB075VL	LL-短鎖	AB400VL

配列 番号	DVD可変 ドメイン名	外部可変 ドメイン名	リンカー	内部可変 ドメイン名
211	DVD2306H	AB400VH	HG-短鎖	AB077VH
212	DVD2306L	AB400VL	LK-短鎖	AB077VL
213	DVD2307H	AB077VH	HG-短鎖	AB400VH
214	DVD2307L	AB077VL	LK-短鎖	AB400VL
215	DVD2308H	AB004VH	HG-短鎖	AB005VH
216	DVD2308L	AB004VL	LK-短鎖	AB005VL
217	DVD2309H	AB005VH	HG-短鎖	AB004VH
218	DVD2309L	AB005VL	LK-短鎖	AB004VL
219	DVD2310H	AB004VH	HG-短鎖	AB034VH
220	DVD2310L	AB004VL	LK-短鎖	AB034VL
221	DVD2311H	AB034VH	HG-短鎖	AB004VH
222	DVD2311L	AB034VL	LL-短鎖	AB004VL
223	DVD2314H	AB004VH	HG-短鎖	AB077VH
224	DVD2314L	AB004VL	LK-短鎖	AB077VL
225	DVD2315H	AB077VH	HG-短鎖	AB004VH
226	DVD2315L	AB077VL	LK-短鎖	AB004VL
227	DVD2316H	AB005VH	HG-短鎖	AB080VH
228	DVD2316L	AB005VL	LK-短鎖	AB080VL
229	DVD2317H	AB080VH	HG-短鎖	AB005VH
230	DVD2317L	AB080VL	LK-短鎖	AB005VL
231	DVD2318H	AB005VH	HG-短鎖	AB063VH
232	DVD2318L	AB005VL	LK-短鎖	AB063VL
233	DVD2319H	AB063VH	HG-短鎖	AB005VH
234	DVD2319L	AB063VL	LK-短鎖	AB005VL
235	DVD2320H	AB005VH	HG-短鎖	AB116VH
236	DVD2320L	AB005VL	LK-短鎖	AB116VL
237	DVD2321H	AB116VH	HG-短鎖	AB005VH
238	DVD2321L	AB116VL	LL-短鎖	AB005VL
239	DVD2322H	AB005VH	HG-短鎖	AB062VH
240	DVD2322L	AB005VL	LK-短鎖	AB062VL
241	DVD2323H	AB062VH	HG-短鎖	AB005VH
242	DVD2323L	AB062VL	LK-短鎖	AB005VL
243	DVD2324H	AB005VH	HG-短鎖	AB077VH
244	DVD2324L	AB005VL	LK-短鎖	AB077VL
245	DVD2325H	AB077VH	HG-短鎖	AB005VH
246	DVD2325L	AB077VL	LK-短鎖	AB005VL
247	DVD2326H	AB005VH	HG-短鎖	AB011VH
248	DVD2326L	AB005VL	LK-短鎖	AB011VL
249	DVD2327H	AB011VH	HG-短鎖	AB005VH
250	DVD2327L	AB011VL	LK-短鎖	AB005VL
251	DVD2328H	AB034VH	HG-短鎖	AB080VH
252	DVD2328L	AB034VL	LL-短鎖	AB080VL

配列 番号	DVD可変 ドメイン名	外部可変 ドメイン名	リンカー	内部可変 ドメイン名
253	DVD2329H	AB080VH	HG-短鎖	AB034VH
254	DVD2329L	AB080VL	LK-短鎖	AB034VL
255	DVD2330H	AB034VH	HG-短鎖	AB063VH
256	DVD2330L	AB034VL	LL-短鎖	AB063VL
257	DVD2331H	AB063VH	HG-短鎖	AB034VH
258	DVD2331L	AB063VL	LK-短鎖	AB034VL
259	DVD2332H	AB034VH	HG-短鎖	AB116VH
260	DVD2332L	AB034VL	LL-短鎖	AB116VL
261	DVD2333H	AB116VH	HG-短鎖	AB034VH
262	DVD2333L	AB116VL	LL-短鎖	AB034VL
263	DVD2334H	AB034VH	HG-短鎖	AB062VH
264	DVD2334L	AB034VL	LL-短鎖	AB062VL
265	DVD2335H	AB062VH	HG-短鎖	AB034VH
266	DVD2335L	AB062VL	LK-短鎖	AB034VL
267	DVD2336H	AB034VH	HG-短鎖	AB077VH
268	DVD2336L	AB034VL	LL-短鎖	AB077VL
269	DVD2337H	AB077VH	HG-短鎖	AB034VH
270	DVD2337L	AB077VL	LK-短鎖	AB034VL
271	DVD2338H	AB034VH	HG-短鎖	AB400VH
272	DVD2338L	AB034VL	LL-短鎖	AB400VL
273	DVD2339H	AB400VH	HG-短鎖	AB034VH
274	DVD2339L	AB400VL	LK-短鎖	AB034VL
275	DVD2340H	AB034VH	HG-短鎖	AB011VH
276	DVD2340L	AB034VL	LL-短鎖	AB011VL
277	DVD2341H	AB011VH	HG-短鎖	AB034VH
278	DVD2341L	AB011VL	LK-短鎖	AB034VL
279	DVD2342H	AB064VH	HG-短鎖	AB080VH
280	DVD2342L	AB064VL	LK-短鎖	AB080VL
281	DVD2343H	AB080VH	HG-短鎖	AB064VH
282	DVD2343L	AB080VL	LK-短鎖	AB064VL
283	DVD2346H	AB064VH	HG-短鎖	AB077VH
284	DVD2346L	AB064VL	LK-短鎖	AB077VL
285	DVD2347H	AB077VH	HG-短鎖	AB064VH
286	DVD2347L	AB077VL	LK-短鎖	AB064VL
287	DVD2348H	AB064VH	HG-短鎖	AB400VH
288	DVD2348L	AB064VL	LK-短鎖	AB400VL
289	DVD2349H	AB400VH	HG-短鎖	AB064VH
290	DVD2349L	AB400VL	LK-短鎖	AB064VL

【 0 1 8 2 】

表 5 は、293 細胞において、1 リットルあたりの m g として発現した親抗体および D V D - I g タンパク質に関する収量データを含む。

【 0 1 8 3 】

【表 5】

表 5: 293 細胞による親抗体および DVD-Ig タンパク質の一時的な発現収量

親抗体または DVD-IgのID	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)
DVD2202	EGFR (配列4)	EGFR (配列2)	12.96
DVD2203	EGFR (配列2)	EGFR (配列4)	17.22
DVD2204	EGFR (配列4)	EGFR (配列2)	11.34
DVD2205	EGFR (配列2)	EGFR (配列4)	5.34
DVD2206	EGFR (配列4)	EGFR (配列2)	13.06
DVD2207	EGFR (配列2)	EGFR (配列4)	25.84
DVD2208	RON (配列1)	RON (配列2)	2.82
DVD2209	RON (配列2)	RON (配列1)	5.58
DVD2210	RON (配列1)	RON (配列2)	8.24
DVD2211	RON (配列2)	RON (配列1)	2.16
DVD2212	RON (配列1)	RON (配列2)	10.78
DVD2213	RON (配列2)	RON (配列1)	2.92
DVD2214	IGF1R (配列1)	IGF1R (配列2)	22.94
DVD2216	IGF1R (配列1)	IGF1R (配列2)	8.42
DVD2218	IGF1R (配列1)	IGF1R (配列2)	16.24
DVD2226	IGF1R (配列1)	IGF1R (配列3)	55.84
DVD2227	IGF1R (配列3)	IGF1R (配列1)	28.4
DVD2228	IGF1R (配列1)	IGF1R (配列3)	26.18
DVD2229	IGF1R (配列3)	IGF1R (配列1)	21.06
DVD2230	IGF1R (配列1)	IGF1R (配列3)	28.36
DVD2231	IGF1R (配列3)	IGF1R (配列1)	20.58
DVD2238	ErbB3 (配列3)	ErbB3 (配列2)	0.82
DVD2240	ErbB3 (配列3)	ErbB3 (配列2)	0.46
DVD2242	ErbB3 (配列3)	ErbB3 (配列2)	1.5
DVD2245	ErbB3 (配列1)	ErbB3 (配列3)	0.84
DVD2247	ErbB3 (配列1)	ErbB3 (配列3)	0.48
DVD2249	ErbB3 (配列1)	ErbB3 (配列3)	0.64
DVD2266	EGFR (配列4)	HER-2 (配列1)	2.02
DVD2267	HER-2 (配列1)	EGFR (配列4)	41.9
DVD2268	HER-2 (配列1)	EGFR (配列2)	103.42
DVD2269	EGFR (配列2)	HER-2 (配列1)	57.34
DVD2270	HER-2 (配列1)	ErbB3 (配列2)	7.06
DVD2271	ErbB3 (配列2)	HER-2 (配列1)	0.6
DVD2272	HER-2 (配列1)	ErbB3 (配列1)	20.26
DVD2273	ErbB3 (配列1)	HER-2 (配列1)	13.84
DVD2274	HER-2 (配列1)	ErbB3 (配列3)	13.66
DVD2275	ErbB3 (配列3)	HER-2 (配列1)	3.32

DVD2276	IGF1R (配列1)	EGFR (配列2)	4.42
DVD2277	EGFR (配列2)	IGF1R (配列1)	11.64
DVD2278	IGF1R (配列1)	ErbB3 (配列2)	0.84
DVD2279	ErbB3 (配列2)	IGF1R (配列1)	1.04
DVD2280	IGF1R (配列1)	ErbB3 (配列1)	5.9
DVD2281	ErbB3 (配列1)	IGF1R (配列1)	32.66
DVD2282	IGF1R (配列1)	ErbB3 (配列3)	2.24
DVD2283	ErbB3 (配列3)	IGF1R (配列1)	3.36
DVD2284	IGF1R (配列1)	EGFR (配列1)	19.54
DVD2285	EGFR (配列1)	IGF1R (配列1)	43.16
DVD2286	IGF1R (配列1)	HER-2 (配列2)	16.86
DVD2287	HER-2 (配列2)	IGF1R (配列1)	121.98
DVD2288	IGF1R (配列1)	HER-2 (配列1)	17.1
DVD2289	HER-2 (配列1)	IGF1R (配列1)	53.56
DVD2290	EGFR (配列3)	EGFR (配列2)	23.42
DVD2291	EGFR (配列2)	EGFR (配列3)	38.7
DVD2292	EGFR (配列3)	ErbB3 (配列2)	3.86
DVD2293	ErbB3 (配列2)	EGFR (配列3)	7.6
DVD2294	EGFR (配列3)	ErbB3 (配列1)	0.72
DVD2295	ErbB3 (配列1)	EGFR (配列3)	11.7
DVD2296	EGFR (配列3)	ErbB3 (配列3)	0.34
DVD2297	ErbB3 (配列3)	EGFR (配列3)	2.56
DVD2298	EGFR (配列3)	RON (配列1)	25.44
DVD2299	RON (配列1)	EGFR (配列3)	42.3
DVD2300	EGFR (配列3)	HER-2 (配列2)	22.82
DVD2301	HER-2 (配列2)	EGFR (配列3)	77.62
DVD2302	EGFR (配列3)	HER-2 (配列1)	1.1
DVD2303	HER-2 (配列1)	EGFR (配列3)	63.8
DVD2304	EGFR (配列3)	IGF1R (配列1)	3.78
DVD2305	IGF1R (配列1)	EGFR (配列3)	9.04
DVD2306	EGFR (配列3)	IGF1R (配列3)	23.34
DVD2307	IGF1R (配列3)	EGFR (配列3)	59.14
DVD2308	HER-2 (配列2)	RON (配列1)	117.56
DVD2309	RON (配列1)	HER-2 (配列2)	127.18
DVD2310	HER-2 (配列2)	RON (配列2)	50.56
DVD2311	RON (配列2)	HER-2 (配列2)	2.54
DVD2314	HER-2 (配列2)	IGF1R (配列3)	107.28
DVD2315	IGF1R (配列3)	HER-2 (配列2)	21.18
DVD2316	RON (配列1)	HER-2 (配列1)	61.18
DVD2317	HER-2 (配列1)	RON (配列1)	76.78
DVD2318	RON (配列1)	ErbB3 (配列2)	28.66
DVD2319	ErbB3 (配列2)	RON (配列1)	18.88
DVD2320	RON (配列1)	ErbB3 (配列1)	23.02
DVD2321	ErbB3 (配列1)	RON (配列1)	39.22
DVD2322	RON (配列1)	ErB3 (U1-59)	17.3
DVD2323	ErbB3 (配列3)	RON (配列1)	11.42
DVD2324	RON (配列1)	IGF1R (配列3)	91.7
DVD2325	IGF1R (配列3)	RON (配列1)	94.96

DVD2326	RON (配列1)	IGF1R (配列2)	48.64
DVD2327	IGF1R (配列2)	RON (配列1)	20.26
DVD2328	RON (配列2)	HER-2 (配列1)	12.26
DVD2329	HER-2 (配列1)	RON (配列2)	0.54
DVD2330	RON (配列2)	ErbB3 (配列2)	0
DVD2331	ErbB3 (配列2)	RON (配列2)	0.34
DVD2332	RON (配列2)	ErbB3 (配列1)	4.36
DVD2333	ErbB3 (配列1)	RON (配列2)	11
DVD2334	RON (配列2)	ErbB3 (配列3)	0.98
DVD2335	ErbB3 (配列3)	RON (配列2)	3.16
DVD2336	RON (配列2)	IGF1R (配列3)	22.38
DVD2337	IGF1R (配列3)	RON (配列2)	8.3
DVD2338	RON (配列2)	EGFR (配列3)	8.42
DVD2339	EGFR (配列3)	RON (配列2)	0.22
DVD2340	RON (配列2)	IGF1R (配列2)	22.62
DVD2341	IGF1R (配列2)	RON (配列2)	0
DVD2342	EGFR (配列1)	HER-2 (配列1)	15.6
DVD2343	HER-2 (配列1)	EGFR (配列1)	55.52
DVD2346	EGFR (配列1)	IGF1R (配列3)	66.6
DVD2347	IGF1R (配列3)	EGFR (配列1)	81.46
DVD2348	EGFR (配列1)	EGFR (配列3)	11.9
DVD2349	EGFR (配列3)	EGFR (配列1)	4.14

【0184】

すべてのDVD-Igタンパク質は293細胞において十分に発現した。DVD-Igタンパク質は、プロテインAカラムを通して容易に精製することができた。大部分の場合において、5mg/Lを超える精製されたDVD-Igタンパク質が、293細胞の上清から容易に得ることができた。

【0185】

〔実施例2〕 親抗体およびDVD-Igタンパク質の機能的活性を決定するために使用されるアッセイ

【0186】

〔実施例2.1〕 BIAcore技術を用いた親和性測定

【0187】

【表6】

表6: Biacore 分析に用いた試薬

アッセイ	抗原	供給業者による指定	供給業者	カタログ番号
	EGFR	組換えヒトEGFR ECD	R&D systems	1506-D4-050
	IGF1R	組換えヒトIGF1R	R&D systems	391-GR-050
	Her2	組換えヒトErbB2/FCキメラ-Hisタグ	R&D systems	1129-ER-050
	ErbB3	組換えヒトErbB3/FCキメラ-Hisタグ	R&D systems	348-RB
	RON	組換えヒトMSP受容体ECD-Hisタグ	R&D systems	1947-MS-050

【0188】

BIAcore法:

BIAcoreアッセイ (Biacore, Inc, Piscataway, NJ) は

、結合 (on-rate) 定数および解離 (off-rate) 定数の反応速度測定を用いて抗体またはDVD-Igの親和性を決定した。標的抗原 (例えば、精製された組換え標的抗原) への抗体またはDVD-Igタンパク質の結合は、Biacore (登録商標) 1000または3000装置 (Biacore (登録商標) AB, Uppsala, Sweden) により、25℃で稼働しているHBS-EP (10mMのHEPES [pH 7.4]、150mMのNaCl、3mMのEDTA、および0.005%サーファクタントP20) を用いて表面プラズモン共鳴に基づく測定によって決定された。すべての化学物質は、Biacore (登録商標) AB (Uppsala, Sweden) から入手し、または他には本明細書に記載される別の供給元から入手した。例えば、10mM酢酸ナトリウム (pH 4.5) 中に希釈された、約5000RUのヤギ抗マウスIgG、(Fcγ)、断片特異的なポリクローナル抗体 (Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL) は、製造業者の使用説明書に従って標準的なアミンカップリングキットおよび25μg/mlでの操作を用いてCM5研究等級のバイオセンサーチップ全体に直接固定化された。バイオセンサー表面上の未反応部分をエタノールアミンを用いてブロックした。フローセル2および4において修飾されたカルボキシメチルデキストラン表面を反応表面として使用した。フローセル1および3におけるヤギ抗マウスIgGなしの未修飾のカルボキシメチルデキストランを基準表面として使用した。反応速度分析のために、Biaevaluation 4.0.1ソフトウェアを用いて、8個すべての注入物の結合および解離相に対して、1:1ラングミュア (Langmuir) 結合モデルから誘導された速度方程式を同時にフィッティングさせた (グローバルフィット分析を使用)。ヤギ抗マウスIgG特異的反応表面の全体で捕捉するために、HEPES緩衝生理食塩水中に、精製された抗体またはDVD-Igタンパク質試料を希釈した。リガンドとして捕捉されるべき抗体またはDVD-Igタンパク質 (25μg/ml) を5μl/分の流速で反応マトリックス全体に注入した。結合速度定数および解離結合定数の k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$) および k_{off} (s^{-1}) は、25μl/分の連続的流速下で決定された。10–200nMの範囲の異なる抗原濃度にて速度論結合測定を行うことによって速度定数を導いた。次に、以下の式： $K_D = k_{off} / k_{on}$ によって、速度論的速度定数から抗体またはDVD-Igタンパク質および標的抗原間の反応の平衡解離定数 (M) を計算した。結合を時間の関数として記録し、速度論的速度定数を計算した。

【0189】

【表 7】

表7: 親抗体およびDVD-Igタンパク質のBIAcore分析

親抗体または DVD-IgのID	N末端可変 ドメイン(VD)	C末端可変 ドメイン(VD)	$k_{on}(M^{-1}s^{-1})$	$k_{off}(s^{-1})$	$K_D(M)$
DVD2202	EGFR (配列4)	EGFR (配列2)	8.0E+05	1.7E-03	2.1E-09
DVD2203	EGFR (配列2)	EGFR (配列4)	2.3E+05	2.5E-04	1.1E-09
DVD2204	EGFR (配列4)	EGFR (配列2)	2.7E+05	1.1E-03	4.3E-09
DVD2206	EGFR (配列4)	EGFR (配列2)	7.7E+05	1.6E-03	2.1E-09
DVD2208	RON (配列1)	RON (配列2)	8.3E+04	1.3E-03	1.6E-08
DVD2209	RON (配列2)	RON (配列1)			2.3E-08
DVD2210	RON (配列1)	RON (配列2)	1.1E+05	1.7E-03	1.5E-08
DVD2211	RON (配列2)	RON (配列1)			1.5E-08
DVD2212	RON (配列1)	RON (配列2)	7.4E+04	1.2E-03	1.6E-08
DVD2213	RON (配列2)	RON (配列1)			1.8E-08
DVD2214	IGF1R (配列1)	IGF1R (配列2)	2.6E+04	1.4E-04	5.5E-09
DVD2216	IGF1R (配列1)	IGF1R (配列2)	1.9E+04	1.2E-04	6.6E-09
DVD2218	IGF1R (配列1)	IGF1R (配列2)	2.5E+04	1.3E-04	5.3E-09
DVD2226	IGF1R (配列1)	IGF1R (配列3)	2.7E+04	7.3E-05	2.8E-09
DVD2227	IGF1R (配列3)	IGF1R (配列1)	6.2E+04	2.3E-07	3.7E-12
DVD2228	IGF1R (配列1)	IGF1R (配列3)	2.7E+04	1.0E-05	3.7E-10
DVD2229	IGF1R (配列3)	IGF1R (配列1)	6.2E+04	7.4E-06	1.2E-10
DVD2230	IGF1R (配列1)	IGF1R (配列3)	2.5E+04	3.6E-05	1.4E-09
DVD2231	IGF1R (配列3)	IGF1R (配列1)	6.3E+04	3.8E-06	6.0E-11
DVD2238	ERBB3 (配列3)	ERBB3 (配列2)	5.1E+04	3.0E-04	5.9E-09
DVD2242	ERBB3 (配列3)	ERBB3 (配列2)	6.7E+04	5.1E-04	7.6E-09
DVD2249	ERBB3 (配列1)	ERBB3 (配列3)	3.9E+04	2.2E-04	5.6E-09
DVD2266	EGFR (配列4)		3.6E+05	1.4E-03	3.8E-09
DVD2266		HER-2 (配列1)	NT	NT	NT
DVD2267	HER-2 (配列1)		2.5E+04	2.2E-05	8.7E-10
DVD2267		EGFR (配列4)	3.1E+04	2.8E-04	9.1E-09
DVD2268	HER-2 (配列1)		NT	NT	NT
DVD2268		EGFR (配列2)	1.9E+04	3.5E-04	1.8E-08
DVD2270	HER-2 (配列1)		1.4E+04	7.7E-06	5.7E-10
DVD2270		ERBB3 (配列2)	NT	NT	NT
DVD2272	HER-2 (配列1)		1.1E+04	1.6E-04	1.5E-08
DVD2272		ERBB3 (配列1)	結合しなかった		
DVD2274	HER-2 (配列1)		2.5E+04	3.1E-05	1.2E-09
DVD2274		ERBB3 (配列3)	結合しなかった		

DVD2278	IGF1R (配列1)		2.5E+04	2.1E-04	8.6E-09
DVD2278		ERBB3 (配列2)	NT	NT	NT
DVD2279	ERBB3 (配列2)		NT	NT	NT
DVD2279		IGF1R (配列1)	4.9E+04	2.3E-06	4.7E-11
DVD2281	ERBB3 (配列1)		4.0E+04	2.4E-04	6.1E-09
DVD2281		IGF1R (配列1)	NT	NT	NT
DVD2282	IGF1R (配列1)		2.5E+04	1.3E-04	5.2E-09
DVD2282		ERBB3 (配列3)	NT	NT	NT
DVD2283	ERBB3 (配列3)		NT	NT	NT
DVD2283		IGF1R (配列1)	2.5E+04	1.2E-04	5.0E-09
DVD2284	IGF1R (配列1)		2.6E+04	1.9E-04	7.4E-09
DVD2284		EGFR(806)	2.6E+05	1.6E-03	6.1E-09
DVD2286	IGF1R (配列1)		2.2E+04	2.5E-04	1.1E-08
DVD2286		HER-2 (配列2)	2.3E+04	2.0E-05	8.4E-10
DVD2288	IGF1R (配列1)		2.2E+04	2.6E-04	1.2E-08
DVD2288		HER-2 (配列1)	7.6E+03	1.1E-06	1.5E-10
DVD2289	HER-2 (配列1)		1.9E+04	2.3E-05	1.2E-09
DVD2289		IGF1R (配列1)	NT	NT	NT
DVD2308	HER-2 (配列2)		1.0E+05	1.0E-06	9.7E-12
DVD2308		RON (配列1)	結合しなかった		
DVD2309	RON (配列1)		NT	NT	NT
DVD2309		HER-2 (配列2)	1.4E+04	1.8E-04	1.2E-08
DVD2311	RON (配列2)				2.3E-08
DVD2311		HER-2 (配列2)	NT	NT	NT
DVD2314	HER-2 (配列2)		8.9E+04	1.0E-06	1.1E-11
DVD2314		IGF1R (配列3)	結合しなかった		
DVD2315	IGF1R (配列3)		結合しなかった		
DVD2315		HER-2 (配列2)	NT	NT	NT
DVD2316	RON (配列1)		4.6E+04	8.9E-04	1.9E-08
DVD2316		HER-2 (配列1)	NT	NT	NT
DVD2317	HER-2 (配列1)		NT	NT	NT
DVD2317		RON (配列1)	結合しなかった		
DVD2318	RON (配列1)		5.5E+04	9.2E-04	1.7E-08
DVD2318		ERBB3 (配列2)	結合しなかった		
DVD2319	ERBB3 (配列2)		3.1E+05	1.7E-03	5.4E-09
DVD2319		RON (配列1)	結合しなかった		
DVD2320	RON (配列1)		3.7E+04	9.4E-04	2.5E-08
DVD2320		ERBB3 (配列1)	結合しなかった		

DVD2321	ERBB3 (配列1)		2.5E+04	3.1E-04	1.2E-08
DVD2321		RON (配列1)	結合しなかった		
DVD2322	RON (配列1)		5.1E+04	8.7E-04	1.7E-08
DVD2322		ERBB3 (配列3)	結合しなかった		
DVD2323	ERBB3 (配列3)		6.0E+04	4.6E-04	7.7E-09
DVD2323		RON (配列1)	結合しなかった		
DVD2324	RON (配列1)		4.4E+04	9.3E-04	2.1E-08
DVD2324		IGF1R (配列3)	結合しなかった		
DVD2325	IGF1R (配列3)		6.0E+04	6.6E-06	1.1E-10
DVD2325		RON (配列1)	結合しなかった		
DVD2326	RON (配列1)		4.4E+04	9.1E-04	2.1E-08
DVD2326		IGF1R (配列2)	結合しなかった		
DVD2327	IGF1R (配列2)		4.6E+04	7.0E-05	1.5E-09
DVD2327		RON (配列1)	結合しなかった		
DVD2332	RON (配列2)		結合しなかった		
DVD2332		ERBB3 (配列1)	結合しなかった		
DVD2333	ERBB3 (配列1)		結合しなかった		
DVD2333		RON (配列2)	結合しなかった		
DVD2334	RON (配列2)				4.9E-09
DVD2334		ERBB3 (配列3)	結合しなかった		
DVD2335	ERBB3 (配列3)		NT	NT	NT
DVD2335		RON (配列2)	1.3E+05	5.1E-03	3.9E-08
DVD2336	RON (配列2)				4.0E-08
DVD2336		IGF1R (配列3)	結合なし		
DVD2340	RON (配列2)				2.3E-08
DVD2340		IGF1R (配列2)	結合なし		
DVD2348	EGFR(806)		2.8E+04	2.4E-04	8.5E-09
DVD2348		EGFR (配列3)	NT	NT	NT
DVD2349	EGFR (配列3)		5.8E+05	4.5E-04	7.6E-10
DVD2349		EGFR(806)	NT	NT	NT

【0190】

表7において、「NT」は、試験されていないDVD-Igタンパク質を示す。Biacore技術によって特徴付けられたすべてのDVD-Igタンパク質の結合能力は維持され、親抗体の結合能力に匹敵していた。

【0191】

[実施例2.2] フローサイトメトリーによって評価される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している安定な細胞株またはヒト腫瘍細胞株を組織培養

フラスコから回収し、5%ウシ胎児血清を含むリン酸緩衝生理食塩水PBS (PBS/FBS) に再懸濁した。染色前に、ヒト腫瘍細胞は、PBS/FCS中の $5\mu\text{g}/\text{ml}$ の($100\mu\text{l}$) ヒトIgGとともに氷上でインキュベートされた。 $1-5\times 10^5$ 個の細胞は、PBS/FBS中の抗体またはDVD-Ig ($2\mu\text{g}/\text{mL}$) とともに30-60分間、氷上でインキュベートされた。細胞を2回洗浄し、 $100\mu\text{l}$ のF(ab')₂ヤギ抗ヒトIgG、Fcγ-フィコエリトリン (PBS中に1:200に希釈) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, Cat. #109-116-170) を添加した。氷上で30分のインキュベーション後、細胞を2回洗浄し、PBS/FBS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。

【0192】

表8は、DVD-Igタンパク質に関するFACSデータを示す。幾何平均は、 n 個の蛍光シグナルの乗算積 ($a_1 \times a_2 \times a_3 \dots a_n$) の n 乗根である。対数変換されたデータを用いると、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。次の表は、親抗体およびDVD-Igタンパク質のFACS幾何平均を含む。

【0193】

【表 8】

表8: DVD-Igタンパク質および親抗体の蛍光活性化セルソーティング

親抗体または DVD-IgのID	N末端可変 ドメイン(VD)	C末端可変 ドメイン(VD)	N末端VD 幾何平均	C末端VD 幾何平均
AB003	EGFR (配列2)		483.44	
AB400	EGFR (配列3)		439.44	
AB064	EGFR (配列1)		25.24	
AB063	ERBB3 (配列2)		128.19	
AB062	ErbB3 (配列3)		132.19	
AB067	ErbB3 (配列1)		127.19	
DVD2290	EGFR (配列3)	EGFR (配列2)	448.44	448.44
DVD2291	EGFR (配列2)	EGFR (配列3)	541.44	541.44
DVD2292	EGFR (配列3)	ErbB3 (配列2)	519.44	20.59
DVD2293	ErbB3 (配列2)	EGFR (配列3)	135.19	NA
DVD2294	EGFR (配列3)	ErbB3 (配列1)	618.44	14.99
DVD2295	ErbB3 (配列1)	EGFR (配列3)	79.99	317.44
DVD2296	EGFR (配列3)	ErbB3 (配列3)	490.44	16.59
DVD2297	ErbB3 (配列3)	EGFR (配列3)	135.19	106.44
DVD2298	EGFR (配列3)	RON (配列1)	400.44	NA
DVD2299	RON (配列1)	EGFR (配列3)	NA	320.44
DVD2301	HER-2 (配列2)	EGFR (配列3)	NA	210.44
DVD2302	EGFR (配列3)	HER-2 (配列1)	563.44	NA
DVD2303	HER-2 (配列1)	EGFR (配列3)	NA	185.44
DVD2304	EGFR (配列3)	IGF1R (IMCL)	512.44	NA
DVD2306	EGFR (配列3)	IGF1R (配列3)	546.44	NA
DVD2307	IGF1R (配列3)	EGFR (配列3)	NA	266.44
DVD2338	RON (配列2)	EGFR (配列3)	NA	252.44
DVD2342	EGFR (配列1)	HER-2 (配列1)	44.84	NA
DVD2343	HER-2 (配列1)	EGFR (配列1)	NA	6.47
DVD2346	EGFR (配列1)	IGF1R (配列3)	24.14	NA
DVD2347	IGF1R (配列3)	EGFR (配列1)	NA	9.84

【0194】

すべてのDVD-Igタンパク質は、それらの細胞表面標的への結合を示した。DVD-Igタンパク質のN-末端ドメインは、細胞表面上でそれらの標的に結合しならびに／または親抗体よりも良好であった。結合は、リンカーの長さを調整することによって回復または向上させることができる。

【0195】

〔実施例2.3〕 親抗体およびDVD-Igタンパク質の機能的活性を決定するために使用される細胞増殖アッセイ

【0196】

細胞増殖アッセイ

液体窒素で保存した状態から細胞を解凍し、細胞が上げられ適切な生存率に到達するまで培養され、予期された2倍時間（典型的には2週間）で分割された。10%ウシ胎児血清（FBS）を含有する、表9に記載される細胞培地中で細胞を維持した。抗体の添加の24時間前に、組織培養処理されたアッセイプレートにおいて、表9に記載される細胞密度（1536細胞／ウェル）にて、2%FBSを含有するスクリーニング培地に細胞を播

種した。遠心分離によってアッセイプレート中で細胞を平衡化し、処置前の24時間、37℃にて投与モジュールに取り付けられたインキュベーターに入れた。投与中、指示した濃度（後述および表10と11中）にて抗体を用いて細胞を処置した。第3b期に関して、単一薬剤データを8点の用量反応曲線において回収し、開始濃度は20nMであった。全6回の反復物がスクリーンのために回収された（2アッセイプレート全体）。処理されたアッセイプレートを96時間抗体とともにインキュベートした。96時間後、ATPLite（Perkin Elmer）を用いて、評価項目分析についてプレートを発色させた。エンビジョンプレートリーダー（Perkin Elmer）上の超高感度発光を用いてプレートを読み取った。すべてのデータポイントは、自動化されたプロセスを介して回収された；品質管理され；Chalice Analyzer（商標）ソフトウェア（Zaliscus Inc.）を用いて分析された。アッセイプレートが次の品質管理基準に合格した場合は、アッセイプレートを容認した：相対ルシフェラーゼ値は、実験全体を通じて一致し、Z-因子スコアは0.6よりも大きく、未処理／ビヒクル対照はプレート上で一貫した反応を示す。

【0197】

【表9】

表9: 両方の細胞増殖アッセイに使用される細胞株

細胞株名	組織	腫瘍タイプ	増殖培地	1536密度(細胞/ウェル)
A549	肺	癌腫、未特定、NSCLC_扁平上皮	10%FBSを含むF12K	100
BT-549	乳房	腺管癌	10%FBSと0.023IU/mlインスリンを含むRPMI	400
BxPC-3	膵臓	腺癌	10%FBSを含むRPMI	100
FaDu	頭頸部	癌腫、咽頭	10%FBSを含むイーグルMEM	100
HCC1395	乳房	癌腫、腺管	10%FBSを含むRPMI	500
MDA-MB-453	乳房	腺癌	10%FBSを含むRPMI(5%CO ₂ 下)	100
MDA-MB-468	乳房	腺癌	10%FBSを含むDMEM(5%CO ₂ 下)	400
NCI-H1650	肺	腺癌	10%FBSを含むRPMI	400
NCI-H1975	肺	腺癌、NSCLC	10%FBSを含むRPMI	100
NCI-H441	肺	腺癌	10%FBSを含むRPMI	200
NCI-H460	肺	大細胞	10%FBSを含むRPMI	100
NCI-SNU-5	肺	腺癌	10%FBSを含むRPMI	400

【0198】

すべての細胞株を10%FBSに維持した。抗体添加の24時間前に、2%FBSを含有するスクリーニング培地に細胞を入れた。

【0199】

抗体調製

抗体は500倍濃度で提供された。抗体は、1:500のそれらの最も高い所望のスクリーニング濃度で384ウェルポリプロピレン「母プレート」に添加された。抗体は、クエン酸緩衝液（10mMクエン酸、10mMリン酸二水素ナトリウム、pH6.0）中で、連続して1:2に希釈された。投薬時まで母プレートを4℃で保存した。投与時に、母プレートは、音響分配（acoustic dispensing）のために、「娘プレート」（LDV COC音響グレードプラスチック）に「スタンプ」された。すべてのプレートを使用前に室温に平衡化させた。

【0200】

【表 10】

表 10: ペアワイズ組合せスクリーンのために示唆された濃度-1つのビン(bin)を有する抗体

抗体名	最も高い濃度(uM)	倍数希釈	ステップ数
AB004	0.02	2	6
AB063	0.02	2	6
AB064	0.02	2	6
AB080	0.02	2	6
AB005	0.02	2	6
AB067	0.02	2	6
AB075	0.02	2	6
AB400	0.02	2	6
AB401	0.02	2	6
アイソタイプ対照	0.02	2	6

【0201】

【表 11】

表 11: ペアワイズ組合せスクリーンのために示唆された濃度-2つのビンを有する抗体

抗体名	最も高い濃度(uM)	倍数希釈	ステップ数	細胞株
AB011	0.005	2	6	HT-29
	0.02	2	6	残りの細胞株
AB033	2.50E-03	2	6	Calu-3, FaDu, HCC827
	0.01	2	6	残りの細胞株
AB062	0.005	2	6	BxPC-3
	0.02	2	6	残りの細胞株
AB003	2.50E-03	2	6	Calu-3, FaDu
	0.01	2	6	残りの細胞株
AB077	0.005	2	6	HT-29
	0.02	2	6	残りの細胞株

【0202】

【実施例 2. 4】 親抗体およびDVD-Igタンパク質の機能的活性を決定するために使用される分析法

【0203】

阻害割合

複製データは平均値で重ね合わせ、阻害割合は、細胞生存率の尺度として決定された。0%の阻害レベルは、治療によって細胞増殖が阻害されないことを表す。100%の阻害は、処置ウィンドウ中の細胞数が倍加しないことを表す。両方の細胞増殖抑制および細胞毒性処置は、100%の阻害割合を得ることができる。阻害割合は、以下のように計算される： $I = 1 - T/U$ 、ここで、Tは処置済み、Uは未処置である。

【0204】

相乗効果スコア分析

相乗効果相互作用の強さを特徴付けるためのスカラー指標は、相乗効果スコアと呼ばれ、Loewe加算性(Zallicus)を超える組合せ効果を測定するために使用された。相乗効果スコアは次のように計算される：

【0205】

【数1】

$$\text{相乗効果スコア} = \log f_x \log f_y \sum \max(0, I_{\text{data}}) (I_{\text{data}} - I_{\text{Loewe}})$$

【0206】

行列中のそれぞれの成分薬剤と組合せポイントの分画阻害は、すべてのビヒクル処理された対照ウェルの中央値と比較して計算された。相乗効果スコア式は、加算性についてLoeweモデルを使用して、成分薬剤の活性から数値的に由来するモデル表面を超えて、行列のそれぞれの点で実験的に観察された活性ボリュームを統合した。相乗効果スコア式（上記）における追加の用語は、個々の薬剤について使用される様々な希釈係数を標準化し、実験全体にわたる相乗効果スコアの比較を可能にするために使用された。

【0207】

Zallicus cHTSプラットフォームを使用して、2つの薬剤は、広範囲の濃度および比率を捕捉するために組み合わせスクリーニングすることができる。併用効果は、効力シフトに帰し、または強化として最大効果に帰することができる。より高い活性レベルは、色のより明るい／より温かい行列を用いて表示される。任意の組合せの2つ単剤成分について回収されたデータを用いて、組合せの各成分間のゼロ相互作用について組合せ用量モデルを作成することができる（形状モデル）。このゼロ相互作用行列は、成分間に相互作用がない場合に予期されたものを超えて、活性値を同定するために、実験的に由来したデータ（データ表面）から減算される。この過剰のマトリックスボリュームは、相乗効果スコアを生じさせるために統合される（上記）。

【0208】

自己架橋分析

組合せスクリーン分析についてヒット基準を客観的に確立するために、自己架橋組合せは、追加の非相乗作用反応を経験的に決定するための手段として、細胞株パネル全体ですべての組合せについて回収された。これらのベースライン加算値に統計学的に優先した効果レベルが得られたこれらの薬物の組合せは相乗的であると考えられた。加算性ボリュームは、平均自己架橋+3標準偏差（3）より大きい組合せは、相乗効果の候補と考えることができる。この戦略は細胞株中心であり、細胞株パネル活性のグローバル評価に対するそれぞれの細胞株における自己架橋挙動に着目した。

【0209】

観察された全体的な阻害活性ならびに組合せ効果の数は細胞株によって変化した。3σを超える相乗効果との組合せは、通常のエラーを想定し、-99%の信頼の「個別に重要」である。各細胞株のための自己架橋相乗効果スコアを表12および表13に示す。それぞれの細胞株について閾値を上回る相乗効果スコアとのそれらの組合せを表12および13において強調した。

【0210】

【表 1 2】

表 12: A549、BT-549、BxPC-3、FaDu、HCC1395 および MDA-MB-453 細胞株における自己架橋
相乗効果スコア

DVD-Ig #	A549	BT-549	BxPC-3	FaDu	HCC1395	MDA-MB-453
DVD2202	-0.63	5.36	25.63	65.04	15.61	15.31
DVD2203	14.02	10.26	5.64	62.34	10.65	5.40
DVD2204	4.65	3.67	14.80	68.38	3.84	24.28
DVD2205	23.42	4.19	20.74	64.45	10.61	5.79
DVD2206	5.09	11.82	2.05	60.37	6.55	5.32
DVD2207	4.76	3.96	11.24	65.04	6.19	3.70
DVD2208	11.05	-1.55	13.71	24.73	2.30	18.21
DVD2209	14.76	3.43	12.97	3.47	5.93	27.21
DVD2210	5.24	-0.64	2.69	8.75	15.79	23.72
DVD2211	13.48	7.07	9.23	16.09	6.41	1.06
DVD2212	8.11	6.05	7.17	3.56	10.97	6.80
DVD2213	6.72	11.07	17.84	6.28	12.15	11.43
DVD2214	5.86	3.49	33.93	7.14	11.07	14.64
DVD2216	7.05	8.48	6.56	30.04	4.66	6.54
DVD2218	6.28	6.77	3.67	9.49	10.38	5.09
DVD2226	4.32	6.18	13.47	4.27	10.46	10.29
DVD2227	7.15	4.74	6.44	7.70	0.70	27.20
DVD2228	6.29	10.49	28.87	5.66	12.85	15.32
DVD2229	10.74	6.37	12.79	13.94	5.48	6.76
DVD2230	8.85	12.84	20.89	12.75	7.48	8.26
DVD2231	8.00	5.76	13.88	11.21	8.52	11.00
DVD2264	8.97	3.47	8.00	63.16	5.18	8.84
DVD2265	7.09	5.95	10.77	65.81	5.25	3.21
DVD2267	8.67	4.16	30.22	45.24	6.86	6.01
DVD2268	9.50	6.64	26.75	79.76	9.38	3.02
DVD2269	19.29	17.88	37.62	72.29	3.36	8.21
DVD2270	2.94	6.44	46.62	21.46	21.30	5.16
DVD2272	0.09	7.87	26.72	22.02	4.00	16.10
DVD2273	13.17	10.51	38.60	24.38	11.68	7.78
DVD2274	15.44	8.85	27.55	24.32	13.11	10.55
DVD2276	4.03	7.11	7.72	54.97	12.85	13.87
DVD2277	1.67	12.47	7.60	68.28	14.94	9.98
DVD2280	14.16	6.77	5.79	8.55	10.43	23.57
DVD2281	5.84	12.85	42.99	43.32	7.37	9.11
DVD2284	5.70	3.83	19.39	13.90	5.54	4.12
DVD2285	4.38	13.59	29.14	9.51	16.05	9.56
DVD2286	1.62	3.65	33.10	12.19	10.11	7.27

DVD2287	8.74	10.96	18.78	33.12	9.88	-1.62
DVD2288	11.41	9.21	38.86	31.55	8.41	6.95
DVD2289	7.07	13.18	27.50	36.79	6.45	9.79
DVD2290	9.41	13.84	36.64	70.96	10.79	5.68
DVD2291	5.23	6.71	18.90	67.85	10.76	3.06
DVD2293	9.35	11.02	23.84	61.20	13.03	13.28
DVD2295	12.51	10.41	40.56	55.45	8.34	8.19
DVD2298	8.30	6.82	5.66	64.97	6.51	10.44
DVD2299	4.55	10.60	12.45	37.82	5.23	11.42
DVD2300	4.12	3.14	18.32	65.09	7.94	10.17
DVD2301	8.58	5.17	20.59	72.12	6.08	5.08
DVD2303	9.00	8.86	39.80	61.84	6.63	8.30
DVD2305	6.17	7.00	21.43	37.69	11.14	9.95
DVD2306	3.12	4.43	22.92	63.49	8.13	14.80
DVD2307	1.99	5.25	11.87	38.09	15.31	20.36
DVD2308	9.27	1.75	45.35	12.16	3.71	13.79
DVD2309	6.43	5.02	13.11	7.63	9.20	13.13
DVD2310	5.78	8.32	16.02	9.32	7.51	10.23
DVD2314	11.61	10.52	25.10	42.27	10.63	1.75
DVD2315	8.70	19.61	5.96	9.62	6.14	9.91
DVD2316	4.27	5.36	15.54	8.94	8.89	15.51
DVD2317	7.19	4.46	12.10	29.27	8.57	10.68
DVD2318	8.70	7.88	6.15	-7.75	2.40	14.97
DVD2319	4.56	14.86	15.57	23.63	7.36	7.67
DVD2320	6.37	4.03	10.77	3.39	11.00	16.42
DVD2321	10.14	8.25	9.19	41.12	3.26	7.47
DVD2322	7.44	6.50	5.54	-2.53	6.77	11.53
DVD2323	3.68	8.61	46.76	40.37	10.68	8.75
DVD2324	9.13	14.78	1.08	7.24	14.77	7.87
DVD2325	12.74	14.45	13.07	31.82	11.17	7.61
DVD2326	7.15	8.65	10.55	2.99	7.65	8.62
DVD2327	4.51	3.70	13.57	10.48	10.14	3.44
DVD2328	3.05	7.32	20.83	35.50	10.48	10.10
DVD2332	8.05	15.43	12.72	9.29	7.68	2.83
DVD2333	7.30	11.03	16.75	26.52	10.83	34.60
DVD2336	0.15	8.33	22.29	8.22	9.57	13.58
DVD2337	4.34	9.99	13.81	3.31	18.19	15.07
DVD2338	1.66	11.21	12.05	50.18	21.40	2.56
DVD2340	6.83	5.70	13.61	11.74	4.22	1.90
DVD2342	8.67	14.03	8.48	1.58	12.65	0.53
DVD2343	4.95	10.69	20.81	8.09	2.76	7.81
DVD2346	6.02	6.58	18.52	6.37	1.20	5.96
DVD2347	-0.87	9.90	11.98	9.36	9.57	10.78
DVD2348	10.45	10.20	15.05	27.77	5.22	1.23

DVD2349	4.97	8.69	10.12	63.78	10.08	-1.41
DVD2213	5.43	0.79	18.58	8.42	11.83	10.85
DVD2208	15.91	4.13	11.20	3.14	7.61	18.21
DVD2245	5.94	6.37	32.75	25.18	3.97	12.57
DVD2211	5.71	4.83	9.44	10.73	5.55	5.75
DVD2238	9.43	4.18	22.38	44.30	6.49	13.55
DVD2302	18.10	6.63	54.92	77.10	6.85	-1.74
DVD2294	6.93	6.21	57.51	82.31	5.36	1.25
DVD2334	10.21	4.69	13.42	13.09	2.44	-3.42
DVD2242	2.47	2.12	20.76	51.42	3.00	4.17
DVD2249	8.06	9.30	32.10	47.62	4.71	9.38

【 0 2 1 1 】

細胞増殖によって特徴付けられる多数のDVD-I gタンパク質は、A549、BT-549、BxPC-3、Fadu、HCC1395およびMDA-MB-453細胞株において相乗効果を示した。細胞増殖はまた、追加の細胞株において測定することができた。

【 0 2 1 2 】

【表 1 3】

表 13: MDA-MB-468、NCI-H1650、NCI-H1975、NCI-H441、NCI-H460 および NCI-SNU-5 細胞株
における自己架橋相乗効果スコア

DVD-Ig #	MDA-MB-468	NCI-H1650	NCI-H1975	NCI-H441	NCI-H460	NCI-SNU-5
DVD2202	11.79	3.73	29.11	7.37	6.59	8.54
DVD2203	19.52	17.60	41.42	8.60	6.85	3.20
DVD2204	10.18	3.29	33.05	12.67	5.84	8.78
DVD2205	14.85	7.35	36.25	7.33	6.59	8.24
DVD2206	10.52	5.50	36.62	14.51	7.88	8.19
DVD2207	8.66	1.45	30.70	14.04	8.66	5.66
DVD2208	3.42	4.95	8.98	8.04	5.29	7.51
DVD2209	1.32	9.23	15.56	10.40	6.67	7.50
DVD2210	5.33	6.36	6.82	6.46	4.17	6.36
DVD2211	5.06	12.63	20.26	5.72	6.04	3.25
DVD2212	4.74	7.11	8.46	4.66	0.66	9.01
DVD2213	2.59	4.93	7.57	9.65	6.96	10.55
DVD2214	0.84	6.26	14.86	7.96	4.37	5.90
DVD2216	0.25	7.66	8.66	6.77	5.46	5.79
DVD2218	3.23	5.25	2.67	4.45	1.82	13.44
DVD2226	10.21	2.35	9.38	8.02	2.90	3.31
DVD2227	4.39	7.48	11.69	5.70	5.29	2.52
DVD2228	2.57	2.67	9.26	3.76	2.68	8.64
DVD2229	0.66	7.46	16.47	11.33	5.36	-1.55
DVD2230	11.44	7.46	7.47	7.52	4.86	9.10
DVD2231	3.26	1.36	11.61	1.44	4.74	3.09
DVD2264	12.94	-1.81	22.70	18.29	8.04	-2.38
DVD2265	18.34	13.77	26.54	13.40	6.93	3.85
DVD2267	3.91	-2.52	23.83	8.24	6.50	5.55
DVD2268	2.88	-5.12	19.08	10.03	3.15	4.79
DVD2269	13.95	1.11	15.67	10.17	2.90	6.13
DVD2270	0.10	8.09	3.04	3.13	-0.21	10.16
DVD2272	3.48	11.40	10.55	10.62	3.24	12.33
DVD2273	9.46	4.33	36.75	1.48	3.69	5.46
DVD2274	10.81	10.26	9.13	9.49	18.58	8.50
DVD2276	3.15	10.64	23.28	16.11	8.63	1.67
DVD2277	24.58	14.94	25.41	12.26	4.53	14.02
DVD2280	9.19	3.40	17.00	12.47	3.21	4.57
DVD2281	5.53	2.94	18.82	8.80	5.19	3.30
DVD2284	6.70	10.65	12.24	4.97	0.78	8.14
DVD2285	5.59	3.76	22.63	5.30	2.89	4.75
DVD2286	2.29	3.46	11.49	23.92	3.44	26.19

DVD2287	1.71	15.37	31.61	6.87	5.29	1.25
DVD2288	1.24	8.91	10.11	11.09	11.54	9.75
DVD2289	1.40	7.25	14.31	12.34	3.45	7.68
DVD2290	18.01	10.79	28.54	13.72	4.09	9.21
DVD2291	14.90	15.77	29.13	11.32	11.24	3.82
DVD2293	7.25	3.82	17.58	8.43	6.65	5.75
DVD2295	3.32	9.25	24.19	3.38	5.53	12.62
DVD2298	16.38	13.39	26.27	11.11	2.38	41.70
DVD2299	7.37	8.21	19.31	-2.30	6.29	10.27
DVD2300	18.13	22.56	37.50	6.44	2.44	2.41
DVD2301	5.10	-8.79	16.70	5.27	6.68	7.20
DVD2303	7.52	-3.17	16.79	11.19	0.34	7.10
DVD2305	16.18	10.32	30.10	5.65	5.73	10.23
DVD2306	20.94	19.52	37.73	9.66	8.99	8.85
DVD2307	7.74	6.92	21.49	3.41	0.92	4.31
DVD2308	0.64	15.50	13.42	9.13	9.93	7.06
DVD2309	-0.89	5.88	6.76	5.71	1.97	10.58
DVD2310	6.82	17.25	22.05	3.15	1.51	6.81
DVD2314	6.79	14.08	20.70	11.37	0.27	13.46
DVD2315	6.30	4.47	11.81	5.58	2.61	5.37
DVD2316	3.76	2.52	11.68	5.68	8.55	29.45
DVD2317	6.92	6.34	16.43	3.28	2.15	15.36
DVD2318	6.02	9.72	9.10	4.09	4.62	7.34
DVD2319	6.51	5.20	13.72	6.27	7.89	28.78
DVD2320	8.82	7.17	11.70	2.03	-0.10	9.63
DVD2321	12.13	8.79	9.55	4.47	4.43	7.41
DVD2322	-0.78	7.23	32.10	2.70	3.38	10.93
DVD2323	5.90	5.81	11.16	2.12	6.25	5.61
DVD2324	3.73	10.00	17.08	1.14	1.55	8.22
DVD2325	0.08	7.36	12.23	7.56	-0.26	3.36
DVD2326	4.65	14.57	6.88	-0.12	1.37	12.54
DVD2327	3.05	10.26	14.86	6.59	2.65	2.71
DVD2328	2.94	15.32	13.63	6.38	3.68	9.98
DVD2332	0.83	5.37	18.84	2.13	2.73	3.10
DVD2333	6.88	9.02	6.97	4.85	4.06	8.88
DVD2336	0.32	4.44	11.42	6.91	0.69	9.82
DVD2337	9.00	6.79	14.03	6.35	3.05	5.05
DVD2338	5.42	15.46	16.86	14.71	3.26	6.78
DVD2340	4.91	6.32	1.97	0.76	8.84	9.74
DVD2342	5.14	5.69	14.74	3.92	3.43	1.17
DVD2343	15.03	-1.73	8.44	6.68	5.30	9.18
DVD2346	3.60	5.03	21.30	-0.31	8.05	14.85
DVD2347	9.21	15.97	4.09	9.39	7.64	0.87
DVD2348	1.23	2.42	21.36	10.89	6.93	9.46

DVD2349	11.17	18.67	29.09	12.14	3.67	4.99
DVD2213	5.07	7.07	7.90	-0.84	6.60	8.74
DVD2208	9.07	6.68	3.39	6.43	8.00	5.10
DVD2245	5.78	3.68	11.57	5.87	6.17	12.41
DVD2211	8.33	3.74	18.93	4.62	1.26	1.01
DVD2238	7.19	4.57	11.81	13.39	3.89	9.49
DVD2302	21.42	-1.91	15.11	8.24	1.85	8.17
DVD2294	11.83	6.83	9.26	7.41	7.95	10.56
DVD2334	-0.24	6.77	6.59	5.72	6.57	6.15
DVD2242	1.07	6.79	16.25	7.35	8.62	7.96
DVD2249	5.16	2.37	0.81	5.25	1.73	7.04

【0213】

細胞増殖によって特徴付けられる多数のDVD-Igタンパク質は、MDA-MB-468、NCI-H1650、NCI-H1975、NCI-H441、NCI-H460およびNCI-SNU-5細胞株において相乗効果を示した。細胞増殖はまた、追加の細胞株において測定することができた。

【0214】

相乗効果スコアが、低濃度で生じる組合せ効果に加重されるため、不十分な用量サンプリングに起因した乏しい単剤曲線フィッティングは、自己架橋スコアの人工的な増加に寄与する場合がある。さらに、実験ノイズ、急な用量遷移または長い細胞株倍加時間などの他の次善の因子が、自己架橋相乗効果スコアに不注意に影響を与え得る「部分的に発生した」表現効果に寄与する。相乗的相互作用の二つの異なる尺度にわたって統計的自己架橋分析を行うことにより、一つの尺度または他の統計的に起因するバイアスを正規化することができる。それぞれの自己架橋行列に自己架橋分析を通過できなかったものの組合せの手動による比較は、細胞株パネル全体に微妙であるが一貫性のある組合せ効果を明らかにするために有用であることがわかっている。

【0215】

〔実施例3〕 抗体およびDVD-Igタンパク質の特徴付け

機能的活性を阻害するための精製されたDVD-Igタンパク質の能力は、例えば、実施例2に記載されるようにサイトカインバイオアッセイを用いて決定された。組換えヒト抗原に対するDVD-Igタンパク質の結合親和性は、実施例2に記載されるように表面プラズモン共鳴（Biacore（登録商標））測定を用いて決定された。抗体およびDVD-Igタンパク質のバイオアッセイからのIC₅₀値および親和性を位置付けた。親mAbの活性を完全に維持するDVD-Igタンパク質は、将来の進行のための候補対象として選択された。上位2-3の最も有益なDVD-Igタンパク質をさらに特徴付けた。

【0216】

〔実施例3.1〕 ヒト化抗体またはDVD-Igタンパク質の薬物動態分析

薬物動態研究は、Sprague-Dawleyラットおよびカニクイザルにおいて行われる。雄性および雌性のラットならびにカニクイザルは、4mg/kgのmAbまたはDVD-Igタンパク質の単回投薬で静脈内または皮下に投薬され、抗原捕捉ELISAを用いて試料を分析し、薬物動態パラメーターを非コンパートメント分析によって決定する。要約すると、ヤギ抗ビオチン抗体（5mg/ml、4℃、一晚）を用いてELISAプレートを被覆し、Superblock（Pierce）を用いてブロックし、10% SuperblockのTTBS中の50ng/mlのビオチン化ヒト抗原とともに室温で2時間インキュベートする。血清試料を連続的に希釈し（TTBS中の0.5%血清、10% Superblock）およびプレート上で30分間、室温にてインキュベートする。HRP標識されたヤギ抗ヒト抗体を用いて検出を行い、4パラメーターのロジスティックフィットを用いて、標準曲線の助けにより濃度を決定する。薬物動態パラメーターに

関する値は、WinNonlinソフトウェア（Pharsight Corporation, Mountain View, CA）を用いて、非コンパートメントモデルによって決定される。良好な薬物動態プロファイルを有するヒト化mAb（T1／2は8－13日またはそれより良好であり、低クリアランスおよび優れた生物学的利用率は50－100％である）を選択する。

【0217】

〔実施例3．2〕 ヒト化モノクローナル抗体およびDVD-Igタンパク質の物理化学的およびインビトロでの安定性分析

【0218】

サイズ排除クロマトグラフィー

水を用いて抗体またはDVD-Igタンパク質を2．5mg／mLに希釈し、20mLをTSKゲルG3000SWXLカラム（Tosoh Bioscience、カタログ#k5539-05k）を用いてShimadzu HPLCシステム上で分析した。211mM硫酸ナトリウム、92mMリン酸ナトリウム、pH7．0を用いて、流速0．3mL／分にて試料をカラムから溶出した。HPLCシステムの操作条件は以下の通りである：

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

勾配：アイソクラチック

流速：0．3mL／分

検出波長：280nm

オートサンプラー冷却装置温度：4℃

カラムオープン温度：周囲

実行時間：50分

【0219】

表13は、上記プロトコルにより測定したモノマー（予想される分子量を有する非凝集タンパク質）％として表される親抗体およびDVD-Igタンパク質の純度データを含む。

【0220】

【表 1 4】

表13: サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)によって測定された親抗体およびDVD-Igタンパク質の純度

親抗体または DVD-IgのID	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%)
DVD2202	EGFR (配列4)	EGFR (配列2)	98.4
DVD2203	EGFR (配列2)	EGFR (配列4)	90.7
DVD2204	EGFR (配列4)	EGFR (配列2)	96.5
DVD2205	EGFR (配列2)	EGFR (配列4)	67.7
DVD2206	EGFR (配列4)	EGFR (配列2)	96.8
DVD2207	EGFR (配列2)	EGFR (配列4)	25.2
DVD2208	RON (配列1)	RON (配列2)	92
DVD2209	RON (配列2)	RON (配列1)	97.8
DVD2210	RON (配列1)	RON (配列2)	100
DVD2211	RON (配列2)	RON (配列1)	98.9
DVD2212	RON (配列1)	RON (配列2)	100
DVD2213	RON (配列2)	RON (配列1)	97.6
DVD2214	IGF1R (配列1)	IGF1R (配列2)	100
DVD2216	IGF1R (配列1)	IGF1R (配列2)	98.4
DVD2218	IGF1R (配列1)	IGF1R (配列2)	98.5
DVD2226	IGF1R (配列1)	IGF1R (配列3)	92.6
DVD2227	IGF1R (配列3)	IGF1R (配列1)	93.9
DVD2228	IGF1R (配列1)	IGF1R (配列3)	93.3
DVD2229	IGF1R (配列3)	IGF1R (配列1)	96.5
DVD2230	IGF1R (配列1)	IGF1R (配列3)	93.1
DVD2231	IGF1R (配列3)	IGF1R (配列1)	95.6
DVD2238	ErbB3 (配列3)	ErbB3 (配列2)	100
DVD2240	ErbB3 (配列3)	ErbB3 (配列2)	100
DVD2242	ErbB3 (配列3)	ErbB3 (配列2)	100
DVD2245	ErbB3 (配列1)	ErbB3 (配列3)	100
DVD2247	ErbB3 (配列1)	ErbB3 (配列3)	100
DVD2249	ErbB3 (配列1)	ErbB3 (配列3)	100
DVD2266	EGFR (配列4)	HER-2 (配列1)	100
DVD2267	HER-2 (配列1)	EGFR (配列4)	98.2
DVD2268	HER-2 (配列1)	EGFR (配列2)	94.1
DVD2269	EGFR (配列2)	HER-2 (配列1)	36.8
DVD2270	HER-2 (配列1)	ErbB3 (配列2)	96.9
DVD2271	ErbB3 (配列2)	HER-2 (配列1)	100
DVD2272	HER-2 (配列1)	ErbB3 (配列1)	89.9
DVD2273	ErbB3 (配列1)	HER-2 (配列1)	79.6
DVD2274	HER-2 (配列1)	ErbB3 (配列3)	96.8
DVD2275	ErbB3 (配列3)	HER-2 (配列1)	100

DVD2276	IGF1R (配列1)	EGFR (配列2)	66.9
DVD2277	EGFR (配列2)	IGF1R (配列1)	56.7
DVD2278	IGF1R (配列1)	ErbB3 (配列2)	91.2
DVD2279	ErbB3 (配列2)	IGF1R (配列1)	92.5
DVD2281	ErbB3 (配列1)	IGF1R (配列1)	97.6
DVD2282	IGF1R (配列1)	ErbB3 (配列3)	100
DVD2283	ErbB3 (配列3)	IGF1R (配列1)	100
DVD2284	IGF1R (配列1)	EGFR (配列1)	87.2
DVD2285	EGFR (配列1)	IGF1R (配列1)	69.8
DVD2286	IGF1R (配列1)	HER-2 (配列2)	94.1
DVD2287	HER-2 (配列2)	IGF1R (配列1)	78.5
DVD2288	IGF1R (配列1)	HER-2 (配列1)	95.5
DVD2289	HER-2 (配列1)	IGF1R (配列1)	87.4
DVD2290	EGFR (配列3)	EGFR (配列2)	98.5
DVD2291	EGFR (配列2)	EGFR (配列3)	95.7
DVD2292	EGFR (配列3)	ErbB3 (配列2)	100
DVD2293	ErbB3 (配列2)	EGFR (配列3)	97.7
DVD2294	EGFR (配列3)	ErbB3 (配列1)	100
DVD2295	ErbB3 (配列1)	EGFR (配列3)	90.1
DVD2297	ErbB3 (配列3)	EGFR (配列3)	98.9
DVD2298	EGFR (配列3)	RON (配列1)	100
DVD2299	RON (配列1)	EGFR (配列3)	92.4
DVD2300	EGFR (配列3)	HER-2 (配列2)	98.4
DVD2301	HER-2 (配列2)	EGFR (配列3)	91.9
DVD2303	HER-2 (配列1)	EGFR (配列3)	91.8
DVD2304	EGFR (配列3)	IGF1R (配列1)	97.6
DVD2305	IGF1R (配列1)	EGFR (配列3)	97.9
DVD2306	EGFR (配列3)	IGF1R (配列3)	100
DVD2307	IGF1R (配列3)	EGFR (配列3)	96.2
DVD2308	HER-2 (配列2)	RON (配列1)	91.3
DVD2309	RON (配列1)	HER-2 (配列2)	94.6
DVD2310	HER-2 (配列2)	RON (配列2)	71.8
DVD2311	RON (配列2)	HER-2 (配列2)	88.5
DVD2314	HER-2 (配列2)	IGF1R (配列3)	88.6
DVD2315	IGF1R (配列3)	HER-2 (配列2)	88.7
DVD2316	RON (配列1)	HER-2 (配列1)	96.1
DVD2317	HER-2 (配列1)	RON (配列1)	93.9
DVD2318	RON (配列1)	ErbB3 (配列2)	91.5
DVD2319	ErbB3 (配列2)	RON (配列1)	93.6
DVD2320	RON (配列1)	ErbB3 (配列1)	87.2
DVD2321	ErbB3 (配列1)	RON (配列1)	84.2
DVD2322	RON (配列1)	ErbB3 (U1-59)	99.1
DVD2323	ErbB3 (配列3)	RON (配列1)	84.5
DVD2324	RON (配列1)	IGF1R (配列3)	96.2
DVD2325	IGF1R (配列3)	RON (配列1)	87.7
DVD2326	RON (配列1)	IGF1R (配列2)	97.5
DVD2327	IGF1R (配列2)	RON (配列1)	96.9
DVD2328	RON (配列2)	HER-2 (配列1)	60.5

DVD2329	HER-2 (配列1)	RON (配列2)	79
DVD2332	RON (配列2)	ErbB3 (配列1)	96.7
DVD2333	ErbB3 (配列1)	RON (配列2)	95
DVD2334	RON (配列2)	ErbB3 (配列3)	91.4
DVD2335	ErbB3 (配列3)	RON (配列2)	96.1
DVD2336	RON (配列2)	IGF1R (配列3)	84.8
DVD2337	IGF1R (配列3)	RON (配列2)	76.6
DVD2338	RON (配列2)	EGFR (配列3)	95
DVD2340	RON (配列2)	IGF1R (配列2)	91.6
DVD2342	EGFR (配列1)	HER-2 (配列1)	88.5
DVD2343	HER-2 (配列1)	EGFR (配列1)	84.2
DVD2346	EGFR (配列1)	IGF1R (配列3)	96.3
DVD2347	IGF1R (配列3)	EGFR (配列1)	97.1
DVD2348	EGFR (配列1)	EGFR (配列3)	96.9
DVD2349	EGFR (配列3)	EGFR (配列1)	97.6

【0221】

DVD-Igタンパク質は、大部分のDVD-Igタンパク質が90%を超えるモノマーを示す優れたSECプロファイルを示した。このDVD-Igタンパク質プロファイルは、親抗体について観察されたものと類似していた。

【0222】

SDS-PAGE

還元条件下および非還元条件下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) によって抗体およびDVD-Igタンパク質を分析する。Adalimumab (ロットAFP04C) を対照として用いる。還元条件について、100mMのDTTを含む2×トリスグリシンSDS-PAGE試料緩衝液 (Invitrogen、カタログ#LC2676、ロット#1323208) と1:1で試料を混合し、60℃で30分間加熱する。非還元条件について、試料緩衝液と1:1で試料を混合し、100℃で5分間加熱する。還元試料 (10mg/レーン) を12%プレキャストのトリス-グリシンゲル (Invitrogen、カタログ#EC6005box、ロット#6111021) 上に装填し、非還元試料 (10mg/レーン) を8%-16%プレキャストのトリス-グリシンゲル (Invitrogen、カタログ#EC6045box、ロット#6111021) 上に装填する。SeeBlue Plus 2 (Invitrogen、カタログ#LC5925、ロット#1351542) を分子量マーカーとして用いる。ゲルをXCell SureLockミニセルゲルボックス (Invitrogen、カタログ#EI0001) に入れ、最初に、ゲル内の試料を積層するために電圧75を加え、次にダイフロン (dye front) がゲルの底に到達するまで定電圧125にしてタンパク質を分離する。使用される泳動緩衝液は1×トリスグリシンSDS緩衝液であり、10×トリスグリシンSDS緩衝液 (ABC、MPS-79-080106) から調製される。コロイド状青色染色 (Invitrogen、カタログ#46-7015、46-7016) を用いてゲルを一晩染色し、バックグラウンドを除くためにMilli-Q水で脱染する。次に、Epson Expressionスキャナー (モデル1680、S/N DASX003641) を用いて、染色されたゲルをスキャンする。

【0223】

沈降速度分析

3つの標準的な2セクターのカーボン・エボンセンターピースの各々の試料チャンバー内に抗体またはDVD-Igタンパク質を装填する。これらのセンターピースは1.2cmの光路長を有し、サファイアウィンドウで構築される。基準緩衝液に関してはPBSを使用し、各チャンバーは140μLを含む。Beckman Proteome Lab XL-I分析用超遠心分離機 (シリアル#PL106C01) の4ホール (AN-60Ti) ローターを用いて、すべての試料を同時に試験する。

【0224】

実行条件をプログラムし、ProteomeLab (v5.6) を用いて遠心分離制御を行う。試料およびローターは、分析前の1時間 ($20.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$) 熱平衡化させる。適切なセル装填の確認を3000rpmで行い、1回のスキャンを各ウェルについて記録する。沈降速度条件は以下の通りである：

試料細胞体積：420mL

基準細胞体積：420mL

温度：20℃

ローター速度：35,000rpm

時間：8:00時間

UV波長：280nm

半径刻み幅：0.003cm

データ回収：信号加算平均なしの1工程あたり1データポイント

スキャン総数：100

【0225】

完全な抗体のLC-MS分子量測定

完全な抗体およびDVD-Igタンパク質の分子量をLC-MSによって分析する。水を用いて各抗体またはDVD-Igタンパク質を約1mg/mLに希釈する。タンパク質マイクロトラップ (Michrom Bioresources, Inc、カタログ#004/25109/03) を備えた1100HPLC (Agilent) システムを用いて、脱塩し、試料の5mgをAPI Qstarパルサーi質量分析計 (Applied Biosystems) に導入する。短い勾配を用いて試料を溶出する。勾配は、移動相A (HPLC水中の0.08% TFA、0.02% TFA) および移動相B (アセトニトリル中の0.08% FAおよび0.02% TFA) を用いて、50mL/分の流速にて勾配を実行する。質量分析計は、4.5キロボルトの噴霧電圧で操作され、スキャン範囲は2000から3500の質量対電荷比である。

【0226】

抗体およびDVD-Igタンパク質の軽鎖および重鎖のLC-MS分子量測定

抗体およびDVD-Igタンパク質の軽鎖 (LC)、重鎖 (HC) および脱グリコシル化されたHCの分子量測定をLC-MSによって分析する。水を用いて抗体およびDVD-Igタンパク質を1mg/mLに希釈し、試料は、最終濃度が10mMのDTTを用いて、30分間、37℃でLCおよびHCに還元される。抗体およびDVD-Igタンパク質を脱グリコシル化するために、100mgの抗体またはDVD-Igタンパク質は、100mLの全体積中の2mLのPNGase F、5mLの10% N-オクチルグルコシドとともに、一晚37℃にてインキュベートされる。脱グリコシル化後、最終濃度が10mMのDTTを用いて、試料を30分間、37℃にて還元する。C4カラム (Vydac、カタログ#214TP5115、S/N060206537204069) を備えたAgilent 1100HPLCシステムを用いて脱塩し、試料 (5mg) をAPI Qstarパルサーi質量分析計 (Applied Biosystems) に導入する。短い勾配を用いて試料を溶出する。勾配は、移動相A (HPLC水中の0.08% FA、0.02% TFA) および移動相B (アセトニトリル中の0.08% FAおよび0.02% TFA) を用いて、50mL/分の流速にて勾配を実行する。質量分析計は、4.5キロボルトの噴霧電圧で操作され、スキャン範囲は800から3500の質量対電荷比である。

【0227】

ペプチドマッピング

75mM重炭酸アンモニウム中の最終濃度が6Mの塩酸グアニジンを用いて抗体またはDVD-Igタンパク質を15分間、室温にて変性させる。変性試料は、最終濃度が10mMのDTTを用いて、37℃、60分間還元させ、次に、暗所にて37℃、30分間、50mMヨード酢酸 (IAA) を用いてアルキル化される。アルキル化後、4リットルの

10 mM重炭酸アンモニウムに対して、一晚4℃で試料を透析する。透析された試料は、10 mM重炭酸アンモニウム、pH 7.8を用いて1 mg/mLに希釈され、100 mgの抗体またはDVD-I gタンパク質は、1:20 (w/w)トリプシン/Lys-C:抗体またはDVD-I gタンパク質の比でトリプシン (Promega、カタログ# V5111) またはLys-C (Roche、カタログ# 11047825001)を用いて37℃で4時間消化される。消化物は、1 NのHClを1 mL用いてクエンチされる。質量分析計検出を用いたペプチドマッピングについて、40 mLの消化物は、Agilent 1100 HPLCシステムを備えた、C18カラム (Vydac、カタログ# 218TP51、S/N NE960610.3.5) 上で逆相高速液体クロマトグラフィー (RPHPLC) によって分離される。ペプチドの分離は、移動相A (HPLC等級の水中の0.02% TFAおよび0.08% FA) および移動相B (アセトニトリル中の0.02% TFAおよび0.08% FA) を使用する勾配を用いて、50 mL/分の流速にて実行する。API QSTAR Pulsar i 質量分析計は、4.5 キロボルトの噴霧電圧のポジティブモードで操作され、スキャン範囲は800から2500の質量対電荷比である。

【0228】

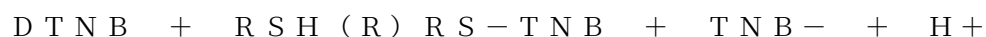
ジスルフィド結合マッピング

抗体またはDVD-I gタンパク質を変性するために、100 mLの抗体またはDVD-I gタンパク質は、100 mM重炭酸アンモニウム中の8 MグアニジンHClの300 mLと混合される。pHをチェックして、pHが7から8の間であることを確認し、最終濃度が6 MのグアニジンHCl中で15分間、室温にて試料を変性させる。一部の变性試料 (100 mL) をMilli-Q水で600 mLに希釈し、最終のグアニジン-HCl濃度を1 Mとする。試料 (220 mg) は、1:50のトリプシン:抗体もしくはDVD-I gタンパク質または1:50のLys-C:抗体もしくはDVD-I gタンパク質 (w/w) の比 (4.4 mg 酵素:220 mg 試料) でトリプシン (Promega、カタログ# V5111、ロット# 22265901) またはLys-C (Roche、カタログ# 11047825001、ロット# 12808000) を用いて37℃で約16時間消化される。さらに5 mgのトリプシンまたはLys-Cを試料に添加し、消化をさらに2時間、37℃で進行させる。各試料に1 mLのTFAを添加することによって消化を停止させる。消化された試料は、Agilent HPLCシステム上のC18カラム (Vydac、カタログ# 218TP51、S/N NE020630-4-1A) を用いてRPHPLCによって分離される。分離は、移動相A (HPLC等級の水中の0.02% TFAおよび0.08% FA) および移動相B (アセトニトリル中の0.02% TFAおよび0.08% FA) を用いて、ペプチドマッピングについて使用されたものと同じ勾配で50 mL/分の流速にて実行する。HPLCの操作条件は、ペプチドマッピングについて使用された条件と同じである。API QSTAR Pulsar i 質量分析計は、4.5 キロボルトの噴霧電圧のポジティブモードで操作され、スキャン範囲は800から2500の質量対電荷比である。ジスルフィド結合は、ペプチドの実測されたMWと、ジスルフィド結合によって連結されたトリプシンまたはLys-Cペプチドの予測されたMWとを合致させることによって割り当てられる。

【0229】

遊離スルフィドリル決定

抗体またはDVD-I gタンパク質中の遊離システインを定量するために使用される方法は、特徴的な発色生成物である5-チオ- (2-ニトロ安息香酸) (TNB) を生じさせる、エルマン試薬である5, 5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸) (DTNB) とスルフィドリル基 (SH) の反応に基づいている。反応は、式:



において説明される。

【0230】

TNB-の吸光度は、Cary 50分光光度計を用いて、412 nmで測定される。

吸光度曲線は、遊離SH標準として2メルカプトエタノール(b-ME)の希釈を用いてプロットし、タンパク質中の遊離スルフヒドリル基の濃度は、試料の412nmでの吸光度から決定される。

【0231】

b-ME標準ストックは、最終濃度が0.142mMになるように、HPLC等級の水を用いて14.2Mのb-MEを連続希釈することによって調製される。次に、各濃度について3点測定 of 標準を調製する。アミコンウルトラ10,000MWC O遠心フィルター(Millipore、カタログ#UFC801096、ロット#L3KN5251)を用いて抗体またはDVD-Igタンパク質を10mg/mLに濃縮し、緩衝液をアダリムマブについて使用した処方緩衝液(5.57mMリン酸一水素ナトリウム、8.69mMリン酸二水素ナトリウム、106.69mMのNaCl、1.07mMクエン酸ナトリウム、6.45mMクエン酸、66.68mMマンニトール、pH5.2、0.1%(w/v)Tween)に交換する。試料をシェーカー上で室温にて20分間混合する。次に、180mLの100mMのTris緩衝液、pH8.1を各試料に添加し、標準は、10mMリン酸緩衝液、pH8.1中の2mMのDTNBを300mL添加する。完全に混合した後、Cary 50分光光度計上で412nmの吸光度について試料および標準を測定する。遊離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。試料の遊離SH含有量は、ブランクを差し引いた後、この曲線に基づいて計算される。

【0232】

弱い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を用いて抗体またはDVD-Igタンパク質を1mg/mLに希釈する。電荷異質性は、WCX-10 ProPac分析用カラム(Dionex、カタログ#054993、S/N02722)を備えたShimadzu HPLCシステムを用いて分析される。試料を80%移動相A(10mMリン酸ナトリウム、pH6.0)および20%移動相B(10mMリン酸ナトリウム、500mMのNaCl、pH6.0)においてカラムに充填し、1.0mL/分の流速で溶出する。

【0233】

オリゴ糖プロファイリング

抗体またはDVD-Igタンパク質のPNGase F処理後に放出されるオリゴ糖は、2-アミノベンズアミド(2-AB)標識試薬を用いて誘導される。蛍光標識されたオリゴ糖は、順相の高速液体クロマトグラフィー(NPHPLC)によって分離され、異なる形態のオリゴ糖は、保持時間に基づいて、既知の標準と比較して特徴付けられる。

【0234】

抗体またはDVD-Igタンパク質を最初にPNGase Fを用いて消化し、重鎖のFc部分からN結合のオリゴ糖を切断する。2mLのPNGase Fおよび3mLの10%N-オクチルグルコシドとともに500mLエッペンドルフチューブに抗体またはDVD-Igタンパク質(200mg)を入れる。リン酸緩衝生理食塩水を添加し、最終体積を60mLにする。700RPMに設定したエッペンドルフのサーモミキサー中で一晚37℃にて試料をインキュベートする。また、Adalimumab(ロットAFP04C)を対照としてPNGase Fを用いて消化する。

【0235】

PNGase F処理後、750RPMに設定されたエッペンドルフのサーモミキサー中で95℃、5分間、試料をインキュベートしてタンパク質を沈殿させ、次に、2分間、10,000RPMでエッペンドルフの遠心分離機に試料を置き、沈殿したタンパク質を沈降させる。オリゴ糖を含む上清を500mLのエッペンドルフチューブに移し、スピード-vac中、65℃で乾燥させる。

【0236】

Prozymeから購入される2AB標識キット(カタログ#GKK-404、ロット#132026)を用いて、オリゴ糖を2ABで標識する。製造業者の使用説明書に従っ

て標識試薬を調製する。酢酸（150 mL、キットにおいて提供される）をDMSOバイアル（キットにおいて提供される）に添加し、溶液を数回、上下にピペティングすることによって混合する。酢酸／DMSO混合物（100 mL）を2-AB色素のバイアル（使用直前）に移し、色素が完全に溶解するまで混合する。次に、色素溶液を還元剤（キットにおいて提供される）のバイアルに添加し、十分に混合に混合する（標識試薬）。標識試薬（5 mL）を各々乾燥させたオリゴ糖試料バイアルに添加し、完全に混合する。65℃で700-800 RPMに設定されたエッペンドルフのサーモミキサーに反応バイアルを置き、2時間反応させる。

【0237】

標識反応後、Prozymeから入手されるGlycoCleansカートリッジ（カタログ#GKI-4726）を用いて過剰の蛍光色素を取り除く。試料を添加前、カートリッジを1 mLのmilli-Q水で洗浄し、その後、1 mLの30%酢酸溶液で5回洗浄する。試料を添加直前に、1 mLのアセトニトリル（Burdick and Jackson、カタログ#AH015-4）をカートリッジに添加する。

【0238】

すべてのアセトニトリルがカートリッジを通過した後、新たに洗浄したディスクの中心に試料をスポット状に置き、ディスク上に10分間吸着させる。1 mLのアセトニトリルを用いてディスクを洗浄し、続いて、1 mLの96%アセトニトリルで5回洗浄する。カートリッジを1.5 mLのエッペンドルフチューブ上に置き、2-AB標識されたオリゴ糖をmilli-Q水の3回の洗浄（各洗浄あたり400 mL）により溶出させる。

【0239】

Shimadzu HPLCシステムに連結させたGlycosep N HPLC（カタログ#GKI-4728）カラムを用いてオリゴ糖を分離する。Shimadzu HPLCシステムは、システムコントローラー、脱気装置、二重ポンプ、試料冷却器を備えたオートサンプラーおよび蛍光検出器からなっていた。

【0240】

高温での安定性

抗体またはDVD-Igタンパク質の緩衝液は、5.57 mMリン酸一水素ナトリウム、8.69 mMリン酸二水素ナトリウム、106.69 mMのNaCl、1.07 mMクエン酸ナトリウム、6.45 mMクエン酸、66.68 mMマンニトール、0.1%（w/v）Tween、pH 5.2；または10 mMヒスチジン、10 mMメチオニン、4%マンニトール、pH 5.9のいずれかであり、Amicon超遠心フィルターを用いる。適切な緩衝液を用いて、抗体またはDVD-Igタンパク質の最終濃度を2 mg/mLに調整する。次に、抗体またはDVD-Igタンパク質の溶液を濾過滅菌し、0.25 mLのアリコートは無菌条件下で調製する。アリコートを-80℃、5℃、25℃または40℃で1、2または3週間放置する。インキュベーション期間の終わりに、サイズ排除クロマトグラフィーおよびSDS-PAGEによって試料を分析する。

【0241】

安定性試料は、還元条件下および非還元条件下でSDS-PAGEによって分析される。使用される手法は、本明細書に記載されたものと同じである。コロイド状青色染色（Invitrogen、カタログ#46-7015、46-7016）を用いてゲルを一晩染色させ、バックグラウンドが透明になるまでMilli-Q水で脱染される。次に、Epson Expressionスキャナー（モデル1680、S/N DASX003641）を用いて、染色されたゲルをスキャンする。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、製造業者によって提供される推奨の手順を用いる。

【0242】

参照による援用

本出願を通して引用されてもよい、すべての引用される参考資料（参考文献、特許、特許出願およびウェブサイトを含む）の内容は、これによって、これらの参考資料がそこに

記載されているかのように、いずれかの目的で参考資料の全体を参照することにより明確に援用される。本開示は、別段の記載がない限り、当該技術分野において周知である免疫学、分子生物学および細胞生物学の従来技術を使用する。

【0243】

本開示は、分子生物学および薬物送達分野で周知の技術全体も、参照により組み込む。これらの技術には、以下の公報に記載されている技術が含まれるが、これに限定されるものではない。

【0244】

【表 1 5】

- 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 ed., pp. 20 1-16, 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 DELIVERY SYSTEMS, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978
- Winnacker, E.L. FROM GENES TO CLONES: INTRODUCTION TO GENE TECHNOLOGY (1987) VCH Publishers, NY (translated by Horst Ibelgauffs). 634 pp. (ISBN 0-89573-614-4).

【 0 2 4 5】

均等

本開示は、その精神または本質的な特徴から逸脱せずに他の具体的な形態で実施することができる。したがって、前述の実施形態は、本開示を限定するというよりはむしろ、すべての点において例示していると考えるべきである。よって、本開示の範囲は、前述の記

載によるというよりはむしろ、添付される特許請求の範囲によって示され、したがって、特許請求の範囲の意味および均等の範囲内にあるすべての変更は本明細書に包含されることが意図される。

【手続補正書】

【提出日】平成26年10月3日(2014.10.3)

【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】

第一および第二のポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であって、各々のポリペプチド鎖が、独立して、 $VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n$ 〔式中、

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または1である〕を含み、

第一および第二のポリペプチド鎖上のVD1ドメインが、第一の機能的標的結合部位を形成し、第一および第二のポリペプチド鎖上のVD2ドメインが、第二の機能的標的結合部位を形成する、並びに、

(a) 結合タンパク質がEGFRおよびEGFRを、第一および第二の機能的標的結合部位で結合させることができ、ここで、

EGFRの機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号30からの3つのCDRおよび配列番号31からの3つのCDR；

配列番号32からの3つのCDRおよび配列番号33からの3つのCDR；

配列番号34からの3つのCDRおよび配列番号35からの3つのCDR；もしくは

配列番号36からの3つのCDRおよび配列番号37からの3つのCDR

を独立して含み、

(b) 結合タンパク質がRONおよびRONを、第一および第二の機能的標的結合部位で結合させることができ、ここで、

RONの機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号54からの3つのCDRおよび配列番号55からの3つのCDR；もしくは

配列番号56からの3つのCDRおよび配列番号57からの3つのCDR

を独立して含み、

(c) 結合タンパク質がIGF-1RおよびIGF-1Rを、第一および第二の機能的標的結合部位で結合させることができ、ここで、

IGF-1Rの機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号48からの3つのCDRおよび配列番号49からの3つのCDR；

配列番号50からの3つのCDRおよび配列番号51からの3つのCDR；もしくは

配列番号52からの3つのCDRおよび配列番号53からの3つのCDR

を独立して含み、

(d) 結合タンパク質がErbb-3およびErbb-3を、第一および第二の機能的標的結合部位で結合させることができ、ここで、

Erbb-3の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号38からの3つのCDRおよび配列番号39からの3つのCDR；

配列番号40からの3つのCDRおよび配列番号41からの3つのCDR；もしくは

配列番号42からの3つのCDRおよび配列番号43からの3つのCDR

を独立して含み、

(e) 結合タンパク質が E G F R および H E R 2 を、第一および第二の機能的標的結合部位で結合させることができ、ここで、

E G F R の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 30 からの 3 つの C D R および配列番号 31 からの 3 つの C D R ；

配列番号 32 からの 3 つの C D R および配列番号 33 からの 3 つの C D R ；

配列番号 34 からの 3 つの C D R および配列番号 35 からの 3 つの C D R ；もしくは

配列番号 36 からの 3 つの C D R および配列番号 37 からの 3 つの C D R

を含み、および

H E R 2 の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 44 からの 3 つの C D R および配列番号 45 からの 3 つの C D R ；もしくは

配列番号 46 からの 3 つの C D R および配列番号 47 からの 3 つの C D R

を含み、

(f) 結合タンパク質が E G F R および I G F - 1 R を、第一および第二の機能的標的結合部位で結合させることができ、ここで、

E G F R の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 30 からの 3 つの C D R および配列番号 31 からの 3 つの C D R ；

配列番号 32 からの 3 つの C D R および配列番号 33 からの 3 つの C D R ；

配列番号 34 からの 3 つの C D R および配列番号 35 からの 3 つの C D R ；もしくは

配列番号 36 からの 3 つの C D R および配列番号 37 からの 3 つの C D R

を含み、および

I G F - 1 R の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 48 からの 3 つの C D R および配列番号 49 からの 3 つの C D R ；

配列番号 50 からの 3 つの C D R および配列番号 51 からの 3 つの C D R ；もしくは

配列番号 52 からの 3 つの C D R および配列番号 53 からの 3 つの C D R

を含み、

(g) 結合タンパク質が E G F R および E r b - B 3 を、第一および第二の機能的標的結合部位で結合させることができ、ここで、

E G F R の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 30 からの 3 つの C D R および配列番号 31 からの 3 つの C D R ；

配列番号 32 からの 3 つの C D R および配列番号 33 からの 3 つの C D R ；

配列番号 34 からの 3 つの C D R および配列番号 35 からの 3 つの C D R ；もしくは

配列番号 36 からの 3 つの C D R および配列番号 37 からの 3 つの C D R

を含み、および

E r b - B 3 の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 38 からの 3 つの C D R および配列番号 39 からの 3 つの C D R ；

配列番号 40 からの 3 つの C D R および配列番号 41 からの 3 つの C D R ；もしくは

配列番号 42 からの 3 つの C D R および配列番号 43 からの 3 つの C D R

を含み、

(h) 結合タンパク質が E G F R および R O N を、第一および第二の機能的標的結合部位で結合させることができ、ここで、

E G F R の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 30 からの 3 つの C D R および配列番号 31 からの 3 つの C D R ；

配列番号 32 からの 3 つの C D R および配列番号 33 からの 3 つの C D R ；

配列番号 34 からの 3 つの C D R および配列番号 35 からの 3 つの C D R ；もしくは

配列番号 36 からの 3 つの C D R および配列番号 37 からの 3 つの C D R

を含み、および

R O N の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 54 からの 3 つの C D R および配列番号 55 からの 3 つの C D R ；もしくは

配列番号 56 からの 3 つの C D R および配列番号 57 からの 3 つの C D R

を含み、

(i) 結合タンパク質がHER2およびRONを、第一および第二の機能的標的結合部位で結合させることができ、ここで、

HER2の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号44からの3つのCDRおよび配列番号45からの3つのCDR；もしくは
配列番号46からの3つのCDRおよび配列番号47からの3つのCDR

を含み、および

RONの機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号54からの3つのCDRおよび配列番号55からの3つのCDR；もしくは
配列番号56からの3つのCDRおよび配列番号57からの3つのCDR

を含み、

(j) 結合タンパク質がErB-B3およびRONを、第一および第二の機能的標的結合部位で結合させることができ、ここで、

ErB-B3の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号38からの3つのCDRおよび配列番号39からの3つのCDR；

配列番号40からの3つのCDRおよび配列番号41からの3つのCDR；もしくは
配列番号42からの3つのCDRおよび配列番号43からの3つのCDR

を含み、および

RONの機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号54からの3つのCDRおよび配列番号55からの3つのCDR；もしくは
配列番号56からの3つのCDRおよび配列番号57からの3つのCDR

を含み、

(k) 結合タンパク質がIGF-1RおよびRONを、第一および第二の機能的標的結合部位で結合させることができ、ここで、

IGF-1Rの機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号48からの3つのCDRおよび配列番号49からの3つのCDR；

配列番号50からの3つのCDRおよび配列番号51からの3つのCDR；もしくは
配列番号52からの3つのCDRおよび配列番号53からの3つのCDR

を含み、および

RONの機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号54からの3つのCDRおよび配列番号55からの3つのCDR；もしくは
配列番号56からの3つのCDRおよび配列番号57からの3つのCDR

を含み、

(l) 結合タンパク質がIGF-1RおよびErB-B3を、第一および第二の機能的標的結合部位で結合させることができ、ここで、

IGF-1Rの機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号48からの3つのCDRおよび配列番号49からの3つのCDR；

配列番号50からの3つのCDRおよび配列番号51からの3つのCDR；もしくは
配列番号52からの3つのCDRおよび配列番号53からの3つのCDR

を含み、および

ErB-B3の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号38からの3つのCDRおよび配列番号39からの3つのCDR；

配列番号40からの3つのCDRおよび配列番号41からの3つのCDR；もしくは
配列番号42からの3つのCDRおよび配列番号43からの3つのCDR

を含み、

(m) 結合タンパク質がIGF-1RおよびHER2を、第一および第二の機能的標的結合部位で結合させることができ、ここで、

IGF-1Rの機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号48からの3つのCDRおよび配列番号49からの3つのCDR；

配列番号50からの3つのCDRおよび配列番号51からの3つのCDR；もしくは

配列番号 52 からの 3 つの CDR および配列番号 53 からの 3 つの CDR
を含み、および

HER2 の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 44 からの 3 つの CDR および配列番号 45 からの 3 つの CDR ; もしくは
配列番号 46 からの 3 つの CDR および配列番号 47 からの 3 つの CDR
を含み、

或いは

(n) 結合タンパク質が Erb-B3 および HER2 を、第一および第二の機能的標的
結合部位で結合させることができ、ここで、

Erb-B3 の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 38 からの 3 つの CDR および配列番号 39 からの 3 つの CDR ;

配列番号 40 からの 3 つの CDR および配列番号 41 からの 3 つの CDR ; もしくは
配列番号 42 からの 3 つの CDR および配列番号 43 からの 3 つの CDR

を含み、および

HER2 の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 44 からの 3 つの CDR および配列番号 45 からの 3 つの CDR ; もしくは
配列番号 46 からの 3 つの CDR および配列番号 47 からの 3 つの CDR

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および 2 つの第二のポリペプチド鎖、並びに 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 または 2 に記載の結合タンパク質であって、

第一のポリペプチド鎖が、第一の $VD1 - (X1)_n - VD2 - C - (X2)_n$ [式中

、
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、

X2 は、Fc 領域であり、

n は、0 または 1 である] を含み、並びに

第二のポリペプチド鎖が、第二の $VD1 - (X1)_n - VD2 - C - (X2)_n$ [式中

、
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、

n は、 $(X1)_n$ について 0 または 1 であり、および

n は、 $(X2)_n$ について 0 である] を含み、

第一および第二のポリペプチド鎖上の VD1 ドメインが、第一の機能的標的結合部位を
形成し、第一および第二のポリペプチド鎖上の VD2 ドメインが、第二の機能的標的結合
部位を形成する、

結合タンパク質。

【請求項 4】

(a) X1 が、配列番号 1-27 のいずれか 1 つであり、

(b) X1 が、CH1 または CL でなく、

(c) Fc 領域が、可変配列 Fc 領域であり、

(d) Fc 領域が、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE
もしくは IgD 由来の Fc 領域であり、ならびに / あるいは

(e) 結合タンパク質が、結晶化された結合タンパク質である、
請求項 1～3 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項 5】

請求項 1～4 のいずれか一項に記載の結合タンパク質であって、

(a) 結合タンパク質が E G F R および E G F R を、第一および第二の機能的標的結合部位で結合させることができ、ここで、

E G F R の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 30 および配列番号 31 ；

配列番号 32 および配列番号 33 ；

配列番号 34 および配列番号 35 ；もしくは

配列番号 36 および配列番号 37

を独立して含み、

(b) 結合タンパク質が R O N および R O N を、第一および第二の機能的標的結合部位で結合させることができ、ここで、

R O N の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 54 および配列番号 55 ；もしくは

配列番号 56 および配列番号 57

を独立して含み、

(c) 結合タンパク質が I G F - 1 R および I G F - 1 R を、第一および第二の機能的標的結合部位で結合させることができ、ここで、

I G F - 1 R の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 48 および配列番号 49 ；

配列番号 50 および配列番号 51 ；もしくは

配列番号 52 および配列番号 53

を独立して含み、

(d) 結合タンパク質が E r b - B 3 および E r b - B 3 を、第一および第二の機能的標的結合部位で結合させることができ、ここで、

E r b - B 3 の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 38 および配列番号 39 ；

配列番号 40 および配列番号 41 ；もしくは

配列番号 42 および配列番号 43

を独立して含み、

(e) 結合タンパク質が E G F R および H E R 2 を、第一および第二の機能的標的結合部位で結合させることができ、ここで、

E G F R の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 30 および配列番号 31 ；

配列番号 32 および配列番号 33 ；

配列番号 34 および配列番号 35 ；もしくは

配列番号 36 および配列番号 37

を含み、および

H E R 2 の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 44 および配列番号 45 ；もしくは

配列番号 46 および配列番号 47

を含み、

(f) 結合タンパク質が E G F R および I G F - 1 R を、第一および第二の機能的標的結合部位で結合させることができ、ここで、

E G F R の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 30 および配列番号 31 ；

配列番号 32 および配列番号 33 ；

配列番号 34 および配列番号 35 ；もしくは

配列番号 3 6 および配列番号 3 7
を含み、および

I G F - 1 R の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 4 8 および配列番号 4 9 ;

配列番号 5 0 および配列番号 5 1 ; もしくは

配列番号 5 2 および配列番号 5 3

を含み、

(g) 結合タンパク質が E G F R および E r b - B 3 を、第一および第二の機能的標的結合部位で結合させることができ、ここで、

E G F R の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 3 0 および配列番号 3 1 ;

配列番号 3 2 および配列番号 3 3 ;

配列番号 3 4 および配列番号 3 5 ; もしくは

配列番号 3 6 および配列番号 3 7

を含み、および

E r b - B 3 の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 3 8 および配列番号 3 9 ;

配列番号 4 0 および配列番号 4 1 ; もしくは

配列番号 4 2 および配列番号 4 3

を含み、

(h) 結合タンパク質が E G F R および R O N を、第一および第二の機能的標的結合部位で結合させることができ、ここで、

E G F R の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 3 0 および配列番号 3 1 ;

配列番号 3 2 および配列番号 3 3 ;

配列番号 3 4 および配列番号 3 5 ; もしくは

配列番号 3 6 および配列番号 3 7

を含み、および

R O N の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 5 4 および配列番号 5 5 ; もしくは

配列番号 5 6 および配列番号 5 7

を含み、

(i) 結合タンパク質が H E R 2 および R O N を、第一および第二の機能的標的結合部位で結合させることができ、ここで、

H E R 2 の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 4 4 および配列番号 4 5 ; もしくは

配列番号 4 6 および配列番号 4 7

を含み、および

R O N の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 5 4 および配列番号 5 5 ; もしくは

配列番号 5 6 および配列番号 5 7

を含み、

(j) 結合タンパク質が E r b - B 3 および R O N を、第一および第二の機能的標的結合部位で結合させることができ、ここで、

E r b - B 3 の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 3 8 および配列番号 3 9 ;

配列番号 4 0 および配列番号 4 1 ; もしくは

配列番号 4 2 および配列番号 4 3

を含み、および

R O N の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 5 4 および配列番号 5 5 ; もしくは
配列番号 5 6 および配列番号 5 7
を含み、

(k) 結合タンパク質が I G F - 1 R および R O N を、第一および第二の機能的標的結合部位で結合させることができ、ここで、

I G F - 1 R の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 4 8 および配列番号 4 9 ;

配列番号 5 0 および配列番号 5 1 ; もしくは

配列番号 5 2 および配列番号 5 3

を含み、および

R O N の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 5 4 および配列番号 5 5 ; もしくは

配列番号 5 6 および配列番号 5 7

を含み、

(l) 結合タンパク質が I G F - 1 R および E r b - B 3 を、第一および第二の機能的標的結合部位で結合させることができ、ここで、

I G F - 1 R の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 4 8 および配列番号 4 9 ;

配列番号 5 0 および配列番号 5 1 ; もしくは

配列番号 5 2 および配列番号 5 3

を含み、および

E r b - B 3 の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 3 8 および配列番号 3 9 ;

配列番号 4 0 および配列番号 4 1 ; もしくは

配列番号 4 2 および配列番号 4 3

を含み、

(m) 結合タンパク質が I G F - 1 R および H E R 2 を、第一および第二の機能的標的結合部位で結合させることができ、ここで、

I G F - 1 R の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 4 8 および配列番号 4 9 ;

配列番号 5 0 および配列番号 5 1 ; もしくは

配列番号 5 2 および配列番号 5 3

を含み、および

H E R 2 の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 4 4 および配列番号 4 5 ; もしくは

配列番号 4 6 および配列番号 4 7

を含み、

或いは

(n) 結合タンパク質が E r b - B 3 および H E R 2 を、第一および第二の機能的標的結合部位で結合させることができ、ここで、

E r b - B 3 の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 3 8 および配列番号 3 9 ;

配列番号 4 0 および配列番号 4 1 ; もしくは

配列番号 4 2 および配列番号 4 3

を含み、および

H E R 2 の機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 4 4 および配列番号 4 5 ; もしくは

配列番号 4 6 および配列番号 4 7

を含む、

結合タンパク質。

【請求項 6】

請求項 1～4 のいずれか一項に記載の結合タンパク質であって、

(a) 結合タンパク質が E G F R および E G F R を、第一および第二の機能的標的結合部位で結合させることができ、並びに以下：

D V D 2 2 0 2 (配列番号 5 8 および配列番号 5 9 を含む) ;
D V D 2 2 0 3 (配列番号 6 0 および配列番号 6 1 を含む) ;
D V D 2 2 0 4 (配列番号 6 2 および配列番号 6 3 を含む) ;
D V D 2 2 0 5 (配列番号 6 4 および配列番号 6 5 を含む) ;
D V D 2 2 0 6 (配列番号 6 7 および配列番号 6 8 を含む) ;
D V D 2 2 0 7 (配列番号 6 9 および配列番号 7 0 を含む) ;
D V D 2 2 9 0 (配列番号 1 7 9 および配列番号 1 8 0 を含む) ;
D V D 2 2 9 1 (配列番号 1 8 1 および配列番号 1 8 2 を含む) ;
D V D 2 3 4 8 (配列番号 2 8 7 および配列番号 2 8 8 を含む) ; および
D V D 2 3 4 9 (配列番号 2 8 9 および配列番号 2 9 0 を含む) ;

のいずれか 1 つを含む、

(b) 結合タンパク質が R O N および R O N を、第一および第二の機能的標的結合部位で結合させることができ、並びに以下：

D V D 2 2 0 8 (配列番号 7 1 および配列番号 7 2 を含む) ;
D V D 2 2 0 9 (配列番号 7 3 および配列番号 7 4 を含む) ;
D V D 2 2 1 0 (配列番号 7 5 および配列番号 7 6 を含む) ;
D V D 2 2 1 1 (配列番号 7 7 および配列番号 7 8 を含む) ;
D V D 2 2 1 2 (配列番号 7 9 および配列番号 8 0 を含む) ; および
D V D 2 2 1 3 (配列番号 8 1 および配列番号 8 2 を含む) ;

のいずれか 1 つを含む、

(c) 結合タンパク質が I G F - 1 R および I G F - 1 R を、第一および第二の機能的標的結合部位で結合させることができ、並びに以下：

D V D 2 2 1 4 (配列番号 8 3 および配列番号 8 4 を含む) ;
D V D 2 2 1 5 (配列番号 8 5 および配列番号 8 6 を含む) ;
D V D 2 2 1 6 (配列番号 8 7 および配列番号 8 8 を含む) ;
D V D 2 2 1 7 (配列番号 8 9 および配列番号 9 0 を含む) ;
D V D 2 2 1 8 (配列番号 9 1 および配列番号 9 2 を含む) ;
D V D 2 2 1 9 (配列番号 9 3 および配列番号 9 4 を含む) ;
D V D 2 2 2 6 (配列番号 9 5 および配列番号 9 6 を含む) ;
D V D 2 2 2 7 (配列番号 9 7 および配列番号 9 8 を含む) ;
D V D 2 2 2 8 (配列番号 9 9 および配列番号 1 0 0 を含む) ;
D V D 2 2 2 9 (配列番号 1 0 1 および配列番号 1 0 2 を含む) ;
D V D 2 2 3 0 (配列番号 1 0 3 および配列番号 1 0 4 を含む) ; および
D V D 2 2 3 1 (配列番号 1 0 5 および配列番号 1 0 6 を含む) ;

のいずれか 1 つを含む、

(d) 結合タンパク質が E r b - B 3 および E r b - B 3 を、第一および第二の機能的標的結合部位で結合させることができ、並びに以下：

D V D 2 2 3 8 (配列番号 1 0 7 および配列番号 1 0 8 を含む) ;
D V D 2 2 3 9 (配列番号 1 0 9 および配列番号 1 1 0 を含む) ;
D V D 2 2 4 0 (配列番号 1 1 1 および配列番号 1 1 2 を含む) ;
D V D 2 2 4 1 (配列番号 1 1 3 および配列番号 1 1 4 を含む) ;
D V D 2 2 4 2 (配列番号 1 1 5 および配列番号 1 1 6 を含む) ;
D V D 2 2 4 3 (配列番号 1 1 7 および配列番号 1 1 8 を含む) ;
D V D 2 2 4 4 (配列番号 1 1 9 および配列番号 1 2 0 を含む) ;
D V D 2 2 4 5 (配列番号 1 2 1 および配列番号 1 2 2 を含む) ;
D V D 2 2 4 6 (配列番号 1 2 3 および配列番号 1 2 4 を含む) ;

D V D 2 2 4 7 (配列番号 1 2 5 および配列番号 1 2 6 を含む) ;
D V D 2 2 4 8 (配列番号 1 2 7 および配列番号 1 2 8 を含む) ; および
D V D 2 2 4 9 (配列番号 1 2 9 および配列番号 1 3 0 を含む) ;

のいずれか 1 つを含む、

(e) 結合タンパク質が E G F R および H E R 2 を、第一および第二の機能的標的結合部位で結合させることができ、並びに以下 :

D V D 2 2 6 6 (配列番号 1 3 1 および配列番号 1 3 2 を含む) ;
D V D 2 2 6 7 (配列番号 1 3 3 および配列番号 1 3 4 を含む) ;
D V D 2 2 6 8 (配列番号 1 3 5 および配列番号 1 3 6 を含む) ;
D V D 2 2 6 9 (配列番号 1 3 7 および配列番号 1 3 8 を含む) ;
D V D 2 3 0 0 (配列番号 1 9 9 および配列番号 2 0 0 を含む) ;
D V D 2 3 0 1 (配列番号 2 0 1 および配列番号 2 0 2 を含む) ;
D V D 2 3 0 2 (配列番号 2 0 3 および配列番号 2 0 4 を含む) ;
D V D 2 3 0 3 (配列番号 2 0 5 および配列番号 2 0 6 を含む) ;
D V D 2 3 4 2 (配列番号 2 7 9 および配列番号 2 8 0 を含む) ; および
D V D 2 3 4 3 (配列番号 2 8 1 および配列番号 2 8 2 を含む) ;

のいずれか 1 つを含む、

(f) 結合タンパク質が E G F R および I G F - 1 R を、第一および第二の機能的標的結合部位で結合させることができ、並びに以下 :

D V D 2 2 7 6 (配列番号 1 5 1 および配列番号 1 5 2 を含む) ;
D V D 2 2 7 7 (配列番号 1 5 3 および配列番号 1 5 4 を含む) ;
D V D 2 2 8 4 (配列番号 1 6 7 および配列番号 1 6 8 を含む) ;
D V D 2 2 8 5 (配列番号 1 6 9 および配列番号 1 7 0 を含む) ;
D V D 2 3 0 4 (配列番号 2 0 7 および配列番号 2 0 8 を含む) ;
D V D 2 3 0 5 (配列番号 2 0 9 および配列番号 2 1 0 を含む) ;
D V D 2 3 0 6 (配列番号 2 1 1 および配列番号 2 1 2 を含む) ;
D V D 2 3 0 7 (配列番号 2 1 3 および配列番号 2 1 4 を含む) ;
D V D 2 3 4 6 (配列番号 2 8 3 および配列番号 2 8 4 を含む) ; および
D V D 2 3 4 7 (配列番号 2 8 5 および配列番号 2 8 6 を含む) ;

のいずれか 1 つを含む、

(g) 結合タンパク質が E G F R および E r b - B 3 を、第一および第二の機能的標的結合部位で結合させることができ、並びに以下 :

D V D 2 2 9 2 (配列番号 1 8 3 および配列番号 1 8 4 を含む) ;
D V D 2 2 9 3 (配列番号 1 8 5 および配列番号 1 8 6 を含む) ;
D V D 2 2 9 4 (配列番号 1 8 7 および配列番号 1 8 8 を含む) ;
D V D 2 2 9 5 (配列番号 1 8 9 および配列番号 1 9 0 を含む) ;
D V D 2 2 9 6 (配列番号 1 9 1 および配列番号 1 9 2 を含む) ; および
D V D 2 2 9 7 (配列番号 1 9 3 および配列番号 1 9 4 を含む) ;

のいずれか 1 つを含む、

(h) 結合タンパク質が E G F R および R O N を、第一および第二の機能的標的結合部位で結合させることができ、並びに以下 :

D V D 2 2 9 8 (配列番号 1 9 5 および配列番号 1 9 6 を含む) ;
D V D 2 2 9 9 (配列番号 1 9 7 および配列番号 1 9 8 を含む) ;
D V D 2 3 3 8 (配列番号 2 7 1 および配列番号 2 7 2 を含む) ; および
D V D 2 3 3 9 (配列番号 2 7 3 および配列番号 2 7 4 を含む) ;

のいずれか 1 つを含む、

(i) 結合タンパク質が H E R 2 および R O N を、第一および第二の機能的標的結合部位で結合させることができ、並びに以下 :

D V D 2 3 0 8 (配列番号 2 1 5 および配列番号 2 1 6 を含む) ;
D V D 2 3 0 9 (配列番号 2 1 7 および配列番号 2 1 8 を含む) ;

D V D 2 3 1 0 (配列番号 2 1 9 および配列番号 2 2 0 を含む) ;
D V D 2 3 1 1 (配列番号 2 2 1 および配列番号 2 2 2 を含む) ;
D V D 2 3 1 6 (配列番号 2 2 7 および配列番号 2 2 8 を含む) ;
D V D 2 3 1 7 (配列番号 2 2 9 および配列番号 2 3 0 を含む) ;
D V D 2 3 2 8 (配列番号 2 5 1 および配列番号 2 5 2 を含む) ; および
D V D 2 3 2 9 (配列番号 2 5 3 および配列番号 2 5 4 を含む) ;

のいずれか 1 つを含む、

(j) 結合タンパク質が E r b - B 3 および R O N を、第一および第二の機能的標的結合部位で結合させることができ、並びに以下 :

D V D 2 3 1 8 (配列番号 2 3 1 および配列番号 2 3 2 を含む) ;
D V D 2 3 1 9 (配列番号 2 3 3 および配列番号 2 3 4 を含む) ;
D V D 2 3 2 0 (配列番号 2 3 5 および配列番号 2 3 6 を含む) ;
D V D 2 3 2 1 (配列番号 2 3 7 および配列番号 2 3 8 を含む) ;
D V D 2 3 2 2 (配列番号 2 3 9 および配列番号 2 4 0 を含む) ;
D V D 2 3 2 3 (配列番号 2 4 1 および配列番号 2 4 2 を含む) ;
D V D 2 3 3 0 (配列番号 2 5 5 および配列番号 2 5 6 を含む) ;
D V D 2 3 3 1 (配列番号 2 5 7 および配列番号 2 5 8 を含む) ;
D V D 2 3 3 2 (配列番号 2 5 9 および配列番号 2 6 0 を含む) ;
D V D 2 3 3 3 (配列番号 2 6 1 および配列番号 2 6 2 を含む) ;
D V D 2 3 3 4 (配列番号 2 6 3 および配列番号 2 6 4 を含む) ; および
D V D 2 3 3 5 (配列番号 2 6 5 および配列番号 2 6 6 を含む) ;

のいずれか 1 つを含む、

(k) 結合タンパク質が I G F - 1 R および R O N を、第一および第二の機能的標的結合部位で結合させることができ、並びに以下 :

D V D 2 3 2 4 (配列番号 2 4 3 および配列番号 2 4 4 を含む) ;
D V D 2 3 2 5 (配列番号 2 4 5 および配列番号 2 4 6 を含む) ;
D V D 2 3 2 6 (配列番号 2 4 7 および配列番号 2 4 8 を含む) ;
D V D 2 3 2 7 (配列番号 2 4 9 および配列番号 2 5 0 を含む) ;
D V D 2 3 3 6 (配列番号 2 6 7 および配列番号 2 6 8 を含む) ;
D V D 2 3 3 7 (配列番号 2 6 9 および配列番号 2 7 0 を含む) ;
D V D 2 3 4 0 (配列番号 2 7 5 および配列番号 2 7 6 を含む) ; および
D V D 2 3 4 1 (配列番号 2 7 7 および配列番号 2 7 8 を含む) ;

のいずれか 1 つを含む、

(l) 結合タンパク質が I G F - 1 R および E r b - B 3 を、第一および第二の機能的標的結合部位で結合させることができ、並びに以下 :

D V D 2 2 7 8 (配列番号 1 5 5 および配列番号 1 5 6 を含む) ;
D V D 2 2 7 9 (配列番号 1 5 7 および配列番号 1 5 8 を含む) ;
D V D 2 2 8 0 (配列番号 1 5 9 および配列番号 1 6 0 を含む) ;
D V D 2 2 8 1 (配列番号 1 6 1 および配列番号 1 6 2 を含む) ;
D V D 2 2 8 2 (配列番号 1 6 3 および配列番号 1 6 4 を含む) ; および
D V D 2 2 8 3 (配列番号 1 6 5 および配列番号 1 6 6 を含む) ;

のいずれか 1 つを含む、

(m) 結合タンパク質が I G F - 1 R および H E R 2 を、第一および第二の機能的標的結合部位で結合させることができ、並びに以下 :

D V D 2 2 8 6 (配列番号 1 7 1 および配列番号 1 7 2 を含む) ;
D V D 2 2 8 7 (配列番号 1 7 3 および配列番号 1 7 4 を含む) ;
D V D 2 2 8 8 (配列番号 1 7 5 および配列番号 1 7 6 を含む) ;
D V D 2 2 8 9 (配列番号 1 7 7 および配列番号 1 7 8 を含む) ;
D V D 2 3 1 4 (配列番号 2 2 3 および配列番号 2 2 4 を含む) ; および
D V D 2 3 1 5 (配列番号 2 2 5 および配列番号 2 2 6 を含む) ;

のいずれか 1 つを含む、
或いは

(n) 結合タンパク質が E r b - B 3 および H E R 2 を、第一および第二の機能的標的結合部位で結合させることができ、並びに以下：

D V D 2 2 7 0 (配列番号 1 3 9 および配列番号 1 4 0 を含む) ；
D V D 2 2 7 1 (配列番号 1 4 1 および配列番号 1 4 2 を含む) ；
D V D 2 2 7 2 (配列番号 1 4 3 および配列番号 1 4 4 を含む) ；
D V D 2 2 7 3 (配列番号 1 4 5 および配列番号 1 4 6 を含む) ；
D V D 2 2 7 4 (配列番号 1 4 7 および配列番号 1 4 8 を含む) ；および
D V D 2 2 7 5 (配列番号 1 4 9 および配列番号 1 5 0 を含む) ；

のいずれか 1 つを含む、
結合タンパク質。

【請求項 7】

請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の結合タンパク質を含む、結合タンパク質コンジュゲートであって、

さらに、免疫接着 (i m m u n o a d h e n s i o n) 分子、造影剤、治療剤または細胞毒性剤を含み、

前記造影剤が、場合によって、放射性標識、酵素、蛍光標識、発光標識、生物発光標識、磁気標識またはビオチンであり、

前記放射性標識が、場合によって、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho または ^{153}Sm であり、或いは

前記治療剤または細胞毒性剤が、場合によって、代謝抑制剤、アルキル化剤、抗生物質、増殖因子、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、トキシンまたはアポトーシス剤である、

結合タンパク質コンジュゲート。

【請求項 8】

請求項 1 ～ 6 のいず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 9】

請求項 8 に記載の単離された核酸を含むベクターであって、場合によって、p c D N A、p T T、p T T 3、p E F B O S、p B V、p J V、p c D N A 3. 1 T O P O、p E F 6、p H y b E、T O P Oまたはp B Jである、ベクター。

【請求項 10】

請求項 9 に記載のベクターを含む宿主細胞であって、場合によって、原核細胞、エシェリキア・コリ (E s c h e r i c h i a c o l i)、真核細胞、原生生物細胞、動物細胞、植物細胞、真菌細胞、酵母細胞、S f 9 細胞、哺乳動物細胞、鳥類の細胞、昆虫細胞、C H O 細胞またはC O S 細胞である、宿主細胞。

【請求項 11】

結合タンパク質を産生するのに十分な条件下で、請求項 10 に記載の宿主細胞を培地中で培養することを含む、結合タンパク質を生産する方法。

【請求項 12】

請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載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、医薬組成物。

【請求項 13】

さらに、少なくとも 1 つの追加の治療剤を含む、請求項 12 に記載の医薬組成物であって、

前記追加の治療剤が、場合によって、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またはその機能的断片；メトトレキサート；シクロスポリン；ラパマイシン；F K 5 0 6；検出可能な標識またはレポーター；T N F アンタゴニスト；抗リウマチ薬；筋肉弛緩剤、麻酔薬、非ステロイド系抗炎症薬 (N S A I D)、鎮痛剤、麻酔、鎮静剤、局所麻酔、神経筋肉遮断剤、抗微

生物剤、抗乾癬剤、コルチコステロイド、アナボリックステロイド、エリスロポエチン、免疫化、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、放射性医薬、抗うつ剤、抗精神病薬、刺激物質、喘息薬、 β アゴニスト、吸入用ステロイド、エピネフリンまたは類似体、サイトカインまたはサイトカインアンタゴニストである、医薬組成物。

【請求項 14】

結合タンパク質を対象に投与することによって、疾患または障害について対象を治療するための医薬の製造における、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の結合タンパク質の使用。

【請求項 15】

請求項 14 に記載の使用であって、前記障害が、関節リウマチ、変形性関節症、若年性慢性関節炎、敗血症性関節炎、ライム関節炎、乾癬性関節炎、反応性関節炎、脊椎関節症、全身性紅斑性狼瘡、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、インシュリン依存性糖尿病、甲状腺炎、喘息、アレルギー性疾患、乾癬、皮膚炎、強皮症、移植片対宿主病、臓器移植拒絶、臓器移植に関連する急性または慢性免疫疾患、サルコイドーシス、アテローム性動脈硬化症、播種性血管内凝固、川崎病、バセドウ病、ネフローゼ症候群、慢性疲労症候群、ウェゲナー肉芽腫症、ヘノッホ・シェーライン紫斑症、腎臓の顕微鏡的血管炎、慢性活動性肝炎、ブドウ膜炎、敗血症性ショック、毒素性ショック症候群、敗血症症候群、悪液質、感染性疾患、寄生性疾患、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 型および多内分泌腺機能低下症候群 II 型、シュミット症候群、成人（急性）呼吸促迫症候群、脱毛症、円形脱毛症、血清反応陰性関節炎、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、エルシニアおよ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、後天性免疫不全症候群、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、線維性肺疾患、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、線維症、放射性線維症、閉塞性細気管支炎、慢性好酸球性肺炎、リンパ球浸潤性肺疾患、感染後間質性肺疾患、通風関節炎、自己免疫性肝炎、1型自己免疫性肝炎（古典的自己免疫性またはルポイド肝炎）、2型自己免疫性肝炎（抗 LKM 抗体肝炎）、自己免疫媒介性低血糖症、黒色表皮腫を伴う B 型インシュリン抵抗性、副甲状腺機能低下症、臓器移植に関連する急性免疫疾患、臓器移植に関連する慢性免疫疾患、変形性関節症、原発性硬化性胆管炎、1型乾癬、2型乾癬、特発性白血球減少症、自己免疫性好中球減少症、腎臓病 N O S、糸球体腎炎、腎臓の顕微鏡的血管炎、ライム病、円板状紅斑性狼瘡、男性不妊症特発性または N O S、精子自己免疫、多発性硬化症（すべてのサブタイプ）、交感性眼炎、結合組織疾患に続発する肺高血圧症、グッドパスチャー症候群、結節性多発動脈炎の肺症状、急性リウマチ熱、リウマチ性脊椎炎、スチル病、全身性硬化症、シェーグレン症候群、高安病／動脈炎、自己免疫性血小板減少症、特発性血小板減少症、自己免疫性甲状腺疾患、甲状腺機能亢進症、甲状腺腫自己免疫性甲状腺機能低下症（橋本病）、萎縮性自己免疫性甲状腺機能低下症、原発性粘液水腫（*primary myxoedema*）、水晶体起因性ブドウ膜炎、原発性血管炎、白斑急性肝疾患、慢性肝疾患、アルコール性肝硬変

、アルコール誘発性肝障害、胆汁うっ滞 (choleostasis)、特異体質性肝疾患、薬物誘発性肝炎、非アルコール性脂肪性肝炎、アレルギーおよび喘息、B群連鎖球菌 (GBS) 感染、精神障害 (例えば、うつ病および統合失調症)、Th2型およびTh1型によって媒介される疾病、急性および慢性疼痛 (疼痛の異なる形態)、ならびに、肺癌、乳癌、胃癌、膀胱癌、大腸癌、膵臓癌、卵巣癌、前立腺癌および腎臓癌および造血性悪性病変 (白血病およびリンパ腫) などの癌、無βリポタンパク質血症、先端チアノーゼ、急性および慢性寄生性または感染性プロセス、急性白血病、急性リンパ芽球性白血病 (ALL)、急性骨髄性白血病 (AML)、急性または慢性細菌感染、急性膵炎、急性腎不全、腺癌、心房 (atrial) 異所性拍動、AIDS認知症複合、アルコール誘発性肝炎、アレルギー性結膜炎、アレルギー性接触性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、同種移植拒絶、α-1-アンチトリプシン欠乏症、筋萎縮性側索硬化症、貧血、狭心症、前角細胞変性、抗cd3治療、抗リン脂質症候群、抗受容体過敏症反応 (antireceptor hypersensitivity reactions)、大動脈 (aortic) および動脈瘤、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 (持続的または発作性)、心房粗動、房室ブロック、B細胞リンパ腫、骨移植拒絶、骨髄移植 (BMT) 拒絶、脚ブロック、バーキットリンパ腫、火傷、心不整脈、心機能不全症候群 (cardiac stunned syndrome)、心臓腫瘍、心筋症、心肺バイパス炎症反応、軟骨移植拒絶、小脳皮質変性、小脳疾患、無秩序なまたは多巣性心房頻脈、化学療法関連疾患、慢性骨髄性白血病 (CML)、慢性アルコール症、慢性炎症性病変、慢性リンパ性白血病 (CLL)、慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、慢性サリチル酸中毒、結腸直腸癌、うっ血性心不全、結膜炎、接触性皮膚炎、肺性心、冠動脈疾患、クロイツフェルトーヤコブ病、培養陰性敗血症、嚢胞性線維症、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、垂体外路および小脳疾患、家族性血球貪食性リンパ組織球症 (familial hematomphagocytic lymphohistiocytosis)、致死性胸腺移植組織拒絶、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、いずれかの臓器または組織の移植片拒絶、グラム陰性敗血症、グラム陽性敗血症、細胞内生物に起因する肉芽腫、有毛細胞白血病、ハラールホルデン・スパッツ病、橋本甲状腺炎、枯草熱、心臓移植拒絶、血色素症、血液透析、溶血性尿毒症症候群／血栓溶解血小板減少紫斑病、出血、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、視床下部一下垂体一副腎皮質系評価、特発性アジソン病、特発性肺線維症、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、カボジ肉腫、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 (lipidemia)、肝臓移植拒絶、リンパ浮腫 (lymphedema)、マラリア、悪性リンパ腫、悪性組織球増殖症、悪性黒色腫、髄膜炎、髄膜炎菌血症 (meningococcemia)、代謝性／特発性、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・シャイドレーガーおよびマシャドージョセフ)、重症筋無力症、マイコバクテリウム・アビウム・イントラセルラーレ、マイコバクテリウム・チューバキュロシス、骨髄形成異常、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I筋萎縮、好中球減少性発熱、非ホジキンリンパ腫、腹部大動脈およびその分枝の閉塞、閉塞性動脈疾患、okt3療法、精巣炎／精巣上体炎、精巣炎／精管復元術処置、臓器肥大、骨粗鬆症、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、P O E M S 症候群（多発神経炎、臓器肥大、内分泌疾患、単クローン性γグロブリン血症および皮膚変化症候群（skin changes syndrome））、灌流後症候群（post perfusion syndrome）、ポンプ後症候群（post pump syndrome）、心筋梗塞後開心術症候群、子癇前症、進行性核上性麻痺、原発性肺高血圧、放射線療法、レイノー現象および病、レイノー病、レフサム病、規則的なQRS幅の狭い頻脈症（regular narrow QRS tachycardia）、腎血管性高血圧、再灌流障害、拘束型心筋症、肉腫、強皮症、老年性舞蹈病、レビー小体型の老年性認知症、血清反応陰性関節炎、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 arrhythmias）、脊髄性運動失調、脊髄小脳変性、連鎖球菌性筋炎、小脳の構造的病変、亜急性硬化性全脳炎、失神、心血管系の梅毒、全身性アナフィラキシー、全身性炎症反応症候群、全身性発症若年性関節リウマチ、T細胞またはF A B A L L、毛細血管拡張症、閉塞性血栓血管炎、血小板減少症、毒性、移植、外傷／出血、I I I型過敏症反応、I V型過敏症、不安定狭心症、尿毒症、尿路性敗血症、じんましん、心臓弁膜症、静脈瘤、血管炎、静脈疾患、静脈血栓症、心室細動、ウイルスおよび真菌感染、ウイルス性脳炎（vital encephalitis）／無菌性髄膜炎、ウイルス関連血球貪食症候群、ウェルニッケーコルサコフ症候群、ウィルソン病、いずれかの臓器または組織の異種移植拒絶、急性冠症候群、急性特発性多発性神経炎、急性炎症性脱髄性多発神経根神経障害、急性虚血、成人スチル病、アナフィラキシー、抗リン脂質抗体症候群、再生不良性貧血、アトピー性湿疹、アトピー性皮膚炎、自己免疫性皮膚炎、連鎖球菌感染に伴う自己免疫異常、自己免疫性腸症、自己免疫性難聴、自己免疫性リンパ増殖症候群（ALPS）、自己免疫性心筋炎、自己免疫性早期卵巣不全、眼瞼炎、気管支拡張症、水疱性類天疱瘡、心血管疾患、劇症型抗リン脂質症候群、セリアック病、頸部脊椎症、慢性虚血、癩痕性類天疱瘡、多発性硬化症のリスクを有する臨床的孤発症候群（cis）、小児発症精神障害、涙囊炎、皮膚筋炎、糖尿病性網膜症、椎間板ヘルニア、椎間板脱出、薬物誘発免疫性溶血性貧血、子宮内膜症、眼内炎、上強膜炎、多形性紅斑、重症型多形性紅斑、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、特発性パーキンソン病、特発性間質性肺炎、I g E 媒介性アレルギー、免疫性溶血性貧血、封入体筋炎、感染性眼炎症疾患、炎症性脱髄疾患、炎症性心疾患、炎症性腎疾患、I P F／U I P、虹彩炎、角膜炎、乾性角結膜炎、クスマウル病またはクスマウルマイヤー病、ランドリー麻痺、ランゲルハンス細胞性組織球症、網状皮斑、黄斑変性、顕微鏡的多発性血管炎、モルブス・ベヒテレフ（morbus bechterev）、運動ニューロン疾患、粘膜性類天疱瘡、多臓器不全、骨髓異形成症候群、心筋炎、神経根障害、神経障害、非A非B型肝炎、視神経炎、骨溶解、卵巣癌、小関節性J R A、末梢動脈閉塞疾患（P A O D）、末梢血管疾患（P V D）、末梢動脈疾患（P A D）、静脈炎、結節性多発性動脈炎（または結節性動脈周囲炎）、多発性軟骨炎、リウマチ性多発性筋痛、白毛症、多関節

性J R A、多内分泌欠損症候群、多発性筋炎、ポンプ後症候群、原発性パーキンソニズム、前立腺癌および直腸癌および造血性悪性病変（白血病およびリンパ腫）、前立腺炎、赤芽球癆、原発性副腎不全、再発性視神経脊髄炎、再狭窄、リウマチ性心疾患、s a p h o（滑膜炎、アクネ、膿疱症、骨過形成および骨髄炎）、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、二次性副腎不全、シリコーン関連結合組織病、スネドナーウィルキンソン皮膚症、強直性脊椎炎、スティーブンス・ジョンソン症候群（S J S）、全身性炎症反応症候群、側頭動脈炎、トキシプラスマ性網膜炎、中毒性表皮剥離症、横断性脊髄炎、T R A P S（腫瘍壊死因子受容体）、I型アレルギー反応、I I型糖尿病、通常型間質性肺炎（U I P）、春季結膜炎、ウイルス性網膜炎、フォクト・小柳・原田症候群（V K H症候群）、滲出型黄斑変性または創傷治癒である、使用。

【請求項16】

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（intracavitary）、腔内（intracellular）、小脳内、脳室内、結腸内、頸管内、胃内、肝臓内、心筋内、骨内、骨盤内、心臓周囲内、腹腔内、胸膜内、前立腺内、肺内、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、膈、直腸、口内、舌下、鼻内または経皮投与のために製剤化される、請求項14に記載の使用。

【請求項17】

試験試料中の少なくとも1つの標的またはその断片の存在、量もしくは濃度を、イムノアッセイによって決定するためのインビトロ方法であって、

前記イムノアッセイは、前記試験試料を、少なくとも1つの結合タンパク質および少なくとも1つの検出可能な標識と接触させることを含み、および

前記少なくとも1つの結合タンパク質は、請求項1～6のいずれか一項に記載の結合タンパク質を含む、

インビトロ方法。

【請求項18】

さらに、

(i) 試験試料を、標的またはその断片上のエピトープに結合する少なくとも1つの結合タンパク質と接触させて、第一の複合体を形成すること、

(ii) 前記複合体を、結合タンパク質に結合するか或いは結合タンパク質によっては結合されない標的またはその断片上のエピトープに結合する少なくとも1つの検出可能な標識を接触させて、第二の複合体を形成すること、および

(iii) 第二の複合体における検出可能な標識によって発生したシグナルに基づいて、試験試料中の標的またはその断片の存在、量もしくは濃度を検出すること

を含み、

標的またはその断片の存在、量もしくは濃度が、検出可能な標識によって発生したシグナルと直接的に相関する、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

さらに、

(i) 試験試料を、標的またはその断片上のエピトープに結合する少なくとも1つの結合タンパク質と接触させて、第一の複合体を形成すること、

(ii) 前記複合体を、結合タンパク質への結合について標的またはその断片と競合する少なくとも1つの検出可能な標識と接触させて、第二の複合体を形成すること、および

(iii) 第二の複合体における検出可能な標識によって発生したシグナルに基づいて、試験試料中の標的またはその断片の存在、量もしくは濃度を検出すること

を含み、

標的またはその断片の存在、量もしくは濃度が、検出可能な標識によって発生したシグナルに間接的に相関する、請求項17に記載の方法。

【請求項20】

インビトロ試験試料を、標的またはその断片の存在、量もしくは濃度についてアッセイするためのキットであって、

(a) 標的またはその断片について試験試料をアッセイするための説明書、および

(b) 請求項1～6のいずれか一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、キット。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2012/071929

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/28 C07K16/46 C12N15/13 A61K39/395
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

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

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

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

EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, Sequence Search, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/127284 A2 (ABBOTT LAB [US]; GHAYUR TARIQ [US]; LIU JUNJIAN [US]; KINGSBURY GILLIA) 4 November 2010 (2010-11-04) examples 2.1, 2.2, 2.3, 2.4; tables 12-15; sequences 49,50, 59-74 -----	1-20
X	WO 2007/024715 A2 (ABBOTT LAB [US]; WU CHENGBIN [US]; GHAYUR TARIQ [US]; DIXON RICHARD W) 1 March 2007 (2007-03-01) page 52, line 29 - line 30; claims 23, 24 ----- -/-	1-20

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

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 September 2013

Date of mailing of the international search report

11/09/2013

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Weigl, Martina

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/071929

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WU CHENGBIN ET AL: "Simultaneous targeting of multiple disease mediators by a dual-variable-domain immunoglobulin", NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 25, no. 11, 1 November 2007 (2007-11-01), pages 1290-1297, XP009110104, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/NBT1345 the whole document -----	1-20
X	WO 2009/134776 A2 (ABBOTT LAB [US]; GHAYUR TARIQ [US]; MORGAN-LAPPE SUSAN E [US]; REILLY) 5 November 2009 (2009-11-05) example 2; sequences SEQ 31, 32, 59, 60 -----	1-20
X	WO 2009/149185 A2 (ABBOTT LAB [US]; GHAYUR TARIQ [US]; HAHN ALFRED [DE]; MUELLER BERNHARD) 10 December 2009 (2009-12-10) example 2; sequences 30, 31, 40, 41 -----	1-20
X	WO 2011/014659 A2 (ABBOTT LAB [US]; GHAYUR TARIQ [US]; LIU JUNJIAN [US]; IBRAGHIMOV ALEXA) 3 February 2011 (2011-02-03) example 2; sequences 32, 33, 40, 41 -----	1-20
X	WO 2011/028811 A2 (ABBOTT LAB [US]; GHAYUR TARIQ [US]; LIU JUNJIAN [US]; MANOJ SHARMILA []) 10 March 2011 (2011-03-10) claim 1; sequences 34,35, 62, 63 -----	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2012/071929**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

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

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

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

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

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

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

see additional sheet

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

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

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

1-20(partially)

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

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ US2012/ 071929

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-20(partially)

A dual variable domain immunoglobulin wherein the VD1 domains on the first and second polypeptide chains form a first functional target binding site capable of binding to EGFR and wherein the VD2 domains on the first and second polypeptide chains form a second functional target binding site capable of binding to EGFR wherein the variable domains that form one functional target binding site comprise the three CDRs from SEQ ID No 30 and the three CDRs from SEQ ID No 31

2. claims: 1-20(partially)

A dual variable domain immunoglobulin wherein the VD1 domains on the first and second polypeptide chains form a first functional target binding site capable of binding to EGFR and wherein the VD2 domains on the first and second polypeptide chains form a second functional target binding site capable of binding to EGFR wherein the variable domains that form one functional target binding site comprise the three CDRs from SEQ ID No 32 and the three CDRs from SEQ ID No 33

3. claims: 1-20(partially)

A dual variable domain immunoglobulin wherein the VD1 domains on the first and second polypeptide chains form a first functional target binding site capable of binding to EGFR and wherein the VD2 domains on the first and second polypeptide chains form a second functional target binding site capable of binding to EGFR wherein the variable domains that form one functional target binding site comprise the three CDRs from SEQ ID No 34 and the three CDRs from SEQ ID No 35

4. claims: 1-20(partially)

A dual variable domain immunoglobulin wherein the VD1 domains on the first and second polypeptide chains form a first functional target binding site capable of binding to EGFR and wherein the VD2 domains on the first and second polypeptide chains form a second functional target binding site capable of binding to EGFR wherein the variable domains that form one functional target binding site comprise the three CDRs from SEQ ID No 36 and the three CDRs from SEQ ID No 37

International Application No. PCT/ US2012/ 071929

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**5. claims: 1-20(partially)**

A dual variable domain immunoglobulin wherein the VD1 domains on the first and second polypeptide chains form a first functional target binding site capable of binding to RON and wherein the VD2 domains on the first and second polypeptide chains form a second functional target binding site capable of binding to RON

6. claims: 1-20(partially)

A dual variable domain immunoglobulin wherein the VD1 domains on the first and second polypeptide chains form a first functional target binding site capable of binding to IGF-1R and wherein the VD2 domains on the first and second polypeptide chains form a second functional target binding site capable of binding to IGF-1R

7. claims: 1-20(partially)

A dual variable domain immunoglobulin wherein the VD1 domains on the first and second polypeptide chains form a first functional target binding site capable of binding to Erb-B3 and wherein the VD2 domains on the first and second polypeptide chains form a second functional target binding site capable of binding to Erb-B3

8. claims: 1-20(partially)

A dual variable domain immunoglobulin wherein the VD1 domains on the first and second polypeptide chains form a first functional target binding site capable of binding to EGFR and wherein the VD2 domains on the first and second polypeptide chains form a second functional target binding site capable of binding to HER2 or vice versa

9. claims: 1-20(partially)

A dual variable domain immunoglobulin wherein the VD1 domains on the first and second polypeptide chains form a first functional target binding site capable of binding to EGFR and wherein the VD2 domains on the first and second polypeptide chains form a second functional target binding site capable of binding to IGF-1R or vice versa

10. claims: 1-20(partially)

A dual variable domain immunoglobulin wherein the VD1 domains on the first and second polypeptide chains form a first functional target binding site capable of binding to

International Application No. PCT/ US2012/ 071929

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

EGFR and wherein the VD2 domains on the first and second polypeptide chains form a second functional target binding site capable of binding to Erb-B3 or vice versa

11. claims: 1-20(partially)

A dual variable domain immunoglobulin wherein the VD1 domains on the first and second polypeptide chains form a first functional target binding site capable of binding to EGFR and wherein the VD2 domains on the first and second polypeptide chains form a second functional target binding site capable of binding to RON or vice versa

12. claims: 1-20(partially)

A dual variable domain immunoglobulin wherein the VD1 domains on the first and second polypeptide chains form a first functional target binding site capable of binding to HER2 and wherein the VD2 domains on the first and second polypeptide chains form a second functional target binding site capable of binding to RON or vice versa

13. claims: 1-20(partially)

A dual variable domain immunoglobulin wherein the VD1 domains on the first and second polypeptide chains form a first functional target binding site capable of binding to Erb-B3 and wherein the VD2 domains on the first and second polypeptide chains form a second functional target binding site capable of binding to RON or vice versa

14. claims: 1-20(partially)

A dual variable domain immunoglobulin wherein the VD1 domains on the first and second polypeptide chain forms a first functional target binding site capable of binding to IGF-1R and wherein the VD2 domains on the first and second polypeptide chains form a second functional target binding site capable of binding to RON or vice versa

15. claims: 1-20(partially)

A dual variable domain immunoglobulin wherein the VD1 domains on the first and second polypeptide chains form a first functional target binding site capable of binding to IGF-1R and wherein the VD2 domains on the first and second polypeptide chains form a second functional target binding site capable of binding to Erb-B3 or vice versa

International Application No. PCT/ US2012/ 071929

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**16. claims: 1-20(partially)**

A dual variable domain immunoglobulin wherein the VD1 domains on the first and second polypeptide chains form a first functional target binding site capable of binding to IGF-1R and wherein the VD2 domains on the first and second polypeptide chains form a second functional target binding site capable of binding to HER2 or vice versa

17. claims: 1-20(partially)

A dual variable domain immunoglobulin wherein the VD1 domains on the first and second polypeptide chains form a first functional target binding site capable of binding to Erb-B3 and wherein the VD2 domains on the first and second polypeptide chains form a second functional target binding site capable of binding to HER2 or vice versa

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2012/071929

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010127284 A2	04-11-2010	AR 076508 A1	15-06-2011
		AU 2010242830 A1	15-12-2011
		CA 2760213 A1	04-11-2010
		CN 102459347 A	16-05-2012
		CO 6470824 A2	29-06-2012
		CR 20110631 A	28-05-2012
		DO P2011000333 A	31-12-2011
		EC SP11011496 A	31-01-2012
		EP 2425010 A2	07-03-2012
		JP 2012525155 A	22-10-2012
		KR 20120044294 A	07-05-2012
		PE 08132012 A1	09-08-2012
		RU 2011148913 A	10-06-2013
		SG 175427 A1	29-12-2011
		TW 201042040 A	01-12-2010
		US 2011263827 A1	27-10-2011
		UY 32603 A	31-12-2010
		WO 2010127284 A2	04-11-2010
WO 2007024715 A2	01-03-2007	EP 1928506 A2	11-06-2008
		EP 2495257 A2	05-09-2012
		EP 2500352 A1	19-09-2012
		EP 2520588 A1	07-11-2012
		NZ 597168 A	26-07-2013
		TW 1323734 B	21-04-2010
		WO 2007024715 A2	01-03-2007
WO 2009134776 A2	05-11-2009	AR 071526 A1	23-06-2010
		AU 2009241589 A1	05-11-2009
		CA 2722466 A1	05-11-2009
		CN 102076355 A	25-05-2011
		CO 6331296 A2	20-10-2011
		DO P2010000325 A	15-11-2010
		EC SP10010580 A	30-11-2010
		EP 2282769 A2	16-02-2011
		JP 2011523400 A	11-08-2011
		KR 20110014607 A	11-02-2011
		NZ 588554 A	28-03-2013
		PE 18452009 A1	08-01-2010
		SG 190572 A1	28-06-2013
		TW 200950805 A	16-12-2009
		US 2010076178 A1	25-03-2010
		UY 31792 A	14-12-2009
		WO 2009134776 A2	05-11-2009
WO 2009149185 A2	10-12-2009	AR 072000 A1	28-07-2010
		AU 2009256246 A1	10-12-2009
		CA 2725666 A1	10-12-2009
		CN 102112494 A	29-06-2011
		CO 6331348 A2	20-10-2011
		DO P2010000369 A	31-12-2010
		EC SP10010643 A	28-02-2011
		EP 2297208 A2	23-03-2011
		JP 2012500621 A	12-01-2012
		KR 20110016959 A	18-02-2011
		NZ 589436 A	21-12-2012
		PE 00542010 A1	03-03-2010
		RU 2010153578 A	20-07-2012

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2012/071929

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		TW 201006485 A	16-02-2010
		US 2009304693 A1	10-12-2009
		UY 31861 A	05-01-2010
		WO 2009149185 A2	10-12-2009

WO 2011014659	A2 03-02-2011	AR 078087 A1	12-10-2011
		AU 2010278947 A1	01-03-2012
		CA 2769518 A1	03-02-2011
		CN 102791875 A	21-11-2012
		EP 2459729 A2	06-06-2012
		JP 2013500721 A	10-01-2013
		KR 20120047274 A	11-05-2012
		SG 178148 A1	29-03-2012
		TW 201109438 A	16-03-2011
		US 2011044980 A1	24-02-2011
		UY 32808 A	28-02-2011
		WO 2011014659 A2	03-02-2011

WO 2011028811	A2 10-03-2011	AR 078254 A1	26-10-2011
		AU 2010289527 A1	19-04-2012
		CA 2772628 A1	10-03-2011
		CN 102612524 A	25-07-2012
		CO 6511254 A2	31-08-2012
		DO P2012000055 A	31-07-2012
		EP 2473524 A2	11-07-2012
		JP 2013503607 A	04-02-2013
		KR 20120060877 A	12-06-2012
		PE 15302012 A1	22-12-2012
		SG 178602 A1	27-04-2012
		TW 201119673 A	16-06-2011
		US 2011091372 A1	21-04-2011
		UY 32870 A	28-02-2011
		WO 2011028811 A2	10-03-2011

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 P 21/08 (2006.01)
 C 0 7 K 16/24 (2006.01)
 C 0 7 K 16/28 (2006.01)
 C 0 7 K 16/46 (2006.01)
 A 6 1 K 51/00 (2006.01)
 A 6 1 K 49/00 (2006.01)
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)
 A 6 1 K 45/00 (2006.01)
 A 6 1 K 31/519 (2006.01)
 A 6 1 K 38/00 (2006.01)
 A 6 1 K 31/436 (2006.01)
 A 6 1 K 31/56 (2006.01)
 A 6 1 K 38/22 (2006.01)
 A 6 1 K 38/27 (2006.01)
 A 6 1 K 31/137 (2006.01)
 A 6 1 P 29/00 (2006.01)
 A 6 1 P 19/02 (2006.01)
 A 6 1 P 17/00 (2006.01)
 A 6 1 P 1/04 (2006.01)
 A 6 1 P 3/10 (2006.01)
 A 6 1 P 5/00 (2006.01)
 A 6 1 P 11/06 (2006.01)
 A 6 1 P 37/08 (2006.01)
 A 6 1 P 17/06 (2006.01)
 A 6 1 P 37/06 (2006.01)
 A 6 1 P 9/10 (2006.01)
 A 6 1 P 13/12 (2006.01)
 A 6 1 P 3/02 (2006.01)
 A 6 1 P 21/00 (2006.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 A 6 1 P 1/16 (2006.01)
 A 6 1 P 31/04 (2006.01)
 A 6 1 P 31/00 (2006.01)
 A 6 1 P 33/00 (2006.01)
 A 6 1 P 25/00 (2006.01)
 A 6 1 P 25/14 (2006.01)
 A 6 1 P 25/16 (2006.01)
 A 6 1 P 25/28 (2006.01)
 A 6 1 P 7/06 (2006.01)
 A 6 1 P 9/04 (2006.01)
 A 6 1 P 11/00 (2006.01)
 A 6 1 P 17/14 (2006.01)
 A 6 1 P 9/00 (2006.01)
 A 6 1 P 31/18 (2006.01)
 A 6 1 P 37/02 (2006.01)
 A 6 1 P 31/20 (2006.01)
 A 6 1 P 31/14 (2006.01)

C 1 2 P 21/08
 C 0 7 K 16/24
 C 0 7 K 16/28
 C 0 7 K 16/46
 A 6 1 K 49/02 A
 A 6 1 K 49/00 A
 A 6 1 K 49/00 C
 A 6 1 K 39/395 N
 A 6 1 K 45/00
 A 6 1 K 31/519
 A 6 1 K 37/02
 A 6 1 K 31/436
 A 6 1 K 31/56
 A 6 1 K 37/24
 A 6 1 K 37/36
 A 6 1 K 43/00
 A 6 1 K 31/137
 A 6 1 P 29/00 1 0 1
 A 6 1 P 19/02
 A 6 1 P 17/00
 A 6 1 P 1/04
 A 6 1 P 3/10
 A 6 1 P 5/00
 A 6 1 P 11/06
 A 6 1 P 37/08
 A 6 1 P 17/06
 A 6 1 P 37/06
 A 6 1 P 17/06
 A 6 1 P 29/00
 A 6 1 P 37/06
 A 6 1 P 9/10
 A 6 1 P 13/12
 A 6 1 P 3/02
 A 6 1 P 21/00
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 P 1/16
 A 6 1 P 31/04
 A 6 1 P 31/00
 A 6 1 P 33/00
 A 6 1 P 25/00
 A 6 1 P 25/14
 A 6 1 P 25/16
 A 6 1 P 25/28
 A 6 1 P 7/06
 A 6 1 P 9/04
 A 6 1 P 11/00
 A 6 1 P 17/14
 A 6 1 P 9/00
 A 6 1 P 31/18
 A 6 1 P 37/02
 A 6 1 P 31/20
 A 6 1 P 31/18

4 C 0 8 6
 4 C 2 0 6
 4 H 0 4 5

A 6 1 P	15/00	(2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	19/06	(2006.01)	A 6 1 P	31/20	
A 6 1 P	27/02	(2006.01)	A 6 1 P	31/14	
A 6 1 P	9/12	(2006.01)	A 6 1 P	15/00	
A 6 1 P	7/04	(2006.01)	A 6 1 P	19/06	
A 6 1 P	25/18	(2006.01)	A 6 1 P	27/02	
A 6 1 P	25/04	(2006.01)	A 6 1 P	9/12	
A 6 1 P	13/10	(2006.01)	A 6 1 P	7/04	
A 6 1 P	1/18	(2006.01)	A 6 1 P	25/18	
A 6 1 P	13/08	(2006.01)	A 6 1 P	25/04	
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	13/10	
A 6 1 P	11/02	(2006.01)	A 6 1 P	1/18	
A 6 1 P	17/02	(2006.01)	A 6 1 P	13/08	
A 6 1 P	25/32	(2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 P	25/36	(2006.01)	A 6 1 P	11/02	
A 6 1 P	17/08	(2006.01)	A 6 1 P	17/02	
A 6 1 P	21/04	(2006.01)	A 6 1 P	25/32	
A 6 1 P	31/16	(2006.01)	A 6 1 P	25/36	
A 6 1 P	31/08	(2006.01)	A 6 1 P	17/08	
A 6 1 P	33/06	(2006.01)	A 6 1 P	21/04	
A 6 1 P	25/06	(2006.01)	A 6 1 P	31/16	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/08	
A 6 1 P	11/04	(2006.01)	A 6 1 P	33/06	
A 6 1 P	19/10	(2006.01)	A 6 1 P	25/06	
A 6 1 P	9/06	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 P	13/02	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 P	31/10	(2006.01)	A 6 1 P	11/04	
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P	19/10	
A 6 1 P	27/16	(2006.01)	A 6 1 P	9/06	
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	A 6 1 P	13/02	
G 0 1 N	33/532	(2006.01)	A 6 1 P	31/10	
			A 6 1 P	31/12	
			A 6 1 P	27/16	
			G 0 1 N	33/53	D
			G 0 1 N	33/532	A

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

(72)発明者 グッドロー、 キャリー・エル

アメリカ合衆国、 マサチューセッツ・01056、 ラッドロー、 スティーブンス・レーン・201
Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA44 CA06 CA07 DA03 EA04 GA11 HA01 HA15
4B064 AG27 CA19 CC24 DA01 DA13
4B065 AA93X AA94Y AB01 AC14 BA01 CA25 CA44 CA46
4C084 AA12 AA19 DA01 DA11 DB22 DB56 MA02 NA05 ZA042 ZA082

	ZA122	ZA182	ZA592	ZA892	ZA942	ZB082	ZB112	ZB152	ZB352	ZC202
	ZC412									
4C085	AA13	AA14	AA21	AA25	AA27	AA38	CC23	EE01	EE03	EE06
	GG01	GG02	GG03	GG04	GG06	GG10	HH01	HH03	HH07	HH11
	KA29	KB02	KB07	KB11	KB18	KB82				
4C086	AA01	CB09	CB22	DA08	MA02	MA04	NA05			
4C206	AA01	FA10	MA02	MA04	NA05					
4H045	AA11	AA20	AA30	BA41	CA40	DA76	EA20	EA22	FA74	

专利名称(译)	针对受体的双可变结构域免疫球蛋白		
公开(公告)号	JP2015509704A	公开(公告)日	2015-04-02
申请号	JP2014550488	申请日	2012-12-28
[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	ガユールタリク グー・ジージエ グッドロー・キャリーエル		
发明人	ガユール,タリク グー,ジージエ グッドロー,キャリー・エル		
IPC分类号	C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 C07K16/24 C07K16/28 C07K16/46 A61K51/00 A61K49/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K31/519 A61K38/00 A61K31/436 A61K31/56 A61K38/22 A61K38/27 A61K31/137 A61P29/00 A61P19/02 A61P17/00 A61P1/04 A61P3/10 A61P5/00 A61P11/06 A61P37/08 A61P17/06 A61P37/06 A61P9/10 A61P13/12 A61P3/02 A61P21/00 A61P35/00 A61P1/16 A61P31/04 A61P31/00 A61P33/00 A61P25/00 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P7/06 A61P9/04 A61P11/00 A61P17/14 A61P9/00 A61P31/18 A61P37/02 A61P31/20 A61P31/14 A61P15/00 A61P19/06 A61P27/02 A61P9/12 A61P7/04 A61P25/18 A61P25/04 A61P13/10 A61P1/18 A61P13/08 A61P35/02 A61P11/02 A61P17/02 A61P25/32 A61P25/36 A61P17/08 A61P21/04 A61P31/16 A61P31/08 A61P33/06 A61P25/06 A61P43/00 A61P11/04 A61P19/10 A61P9/06 A61P13/02 A61P31/10 A61P31/12 A61P27/16 G01N33/53 G01N33/532		
CPC分类号	A61P1/04 A61P1/16 A61P1/18 A61P3/02 A61P3/10 A61P5/00 A61P7/04 A61P7/06 A61P9/00 A61P9/04 A61P9/06 A61P9/10 A61P9/12 A61P11/00 A61P11/02 A61P11/04 A61P11/06 A61P13/02 A61P13/08 A61P13/10 A61P13/12 A61P15/00 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P17/08 A61P17/14 A61P19/02 A61P19/06 A61P19/10 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/04 A61P25/06 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/28 A61P25/32 A61P25/36 A61P27/02 A61P27/16 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/08 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/14 A61P31/16 A61P31/18 A61P31/20 A61P33/00 A61P33/06 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 A61P43/00 C07K16/2863 C07K16/32 C07K2317/14 C07K2317/31 C07K2317/64 C07K2317/92 A61K39/3955 A61K39/39558 A61K45/06 A61K2039/505 C07K16/18 C07K16/30 C07K16/468 C07K2317/35 C07K2317/565 C07K2317/73 C07K2317/76		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12P21/08 C07K16/24 C07K16/28 C07K16/46 A61K49/02.A A61K49/00.A A61K49/00.C A61K39/395.N A61K45/00 A61K31/519 A61K37/02 A61K31/436 A61K31/56 A61K37/24 A61K37/36 A61K43/00 A61K31/137 A61P29/00.101 A61P19/02 A61P17/00 A61P1/04 A61P3/10 A61P5/00 A61P11/06 A61P37/08 A61P17/06 A61P29/00 A61P37/06 A61P9/10 A61P13/12 A61P3/02 A61P21/00 A61P35/00 A61P1/16 A61P31/04 A61P31/00 A61P33/00 A61P25/00 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P7/06 A61P9/04 A61P11/00 A61P17/14 A61P9/00 A61P31/18 A61P37/02 A61P31/20 A61P31/14 A61P15/00 A61P19/06 A61P27/02 A61P9/12 A61P7/04 A61P25/18 A61P25/04 A61P13/10 A61P1/18 A61P13/08 A61P35/02 A61P11/02 A61P17/02 A61P25/32 A61P25/36 A61P17/08 A61P21/04 A61P31/16 A61P31/08 A61P33/06 A61P25/06 A61P43/00.105 A61P43/00.111 A61P11/04 A61P19/10 A61P9/06 A61P13/02 A61P31/10 A61P31/12 A61P27/16 G01N33/53.D G01N33/532.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/CA06 4B024/CA07 4B024/DA03 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA93X 4B065/AA94Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA12 4C084/AA19 4C084/DA01 4C084/DA11 4C084/DB22 4C084/DB56 4C084/MA02		

优先权 61/581963 2011-12-30 US

摘要(译)

A schematic diagram of a Y-shaped antibody molecule. The molecule is composed of two heavy chain regions (CH1, CH2, CH3) and two light chain regions (VL1, VL2). The variable regions (VH1, VH2) are located at the tips of the arms. Labels include VD1, (X1)_n, VD2, C, and (X2)_n.