

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-501881

(P2016-501881A)

(43) 公表日 平成28年1月21日(2016.1.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 16/28 (2006.01)</b>	C07K 16/28 ZNA	4B024
<b>C07K 16/46 (2006.01)</b>	C07K 16/46	4B064
<b>C12N 15/09 (2006.01)</b>	C12N 15/00 A	4B065
<b>C12N 1/11 (2006.01)</b>	C12N 1/11	4C084
<b>C12N 1/15 (2006.01)</b>	C12N 1/15	4C085

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 127 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-545821 (P2015-545821)	(71) 出願人 512212195 アッヴィ・インコーポレイテッド アメリカ合衆国、イリノイ・60064、 ノース・シカゴ、ノース・ワウキガン・ロ ード・1
(86) (22) 出願日 平成25年12月4日 (2013.12.4)	(74) 代理人 110001195 特許業務法人深見特許事務所
(85) 翻訳文提出日 平成27年7月7日 (2015.7.7)	(72) 発明者 ハンゼイティアン, デニス・カラオグル アメリカ合衆国、01760 マサチュー セッツ州、ネイティック、マーク・ストリ ート、12
(86) 国際出願番号 PCT/US2013/073114	(72) 発明者 ガユル, タリク アメリカ合衆国、01746 マサチュー セッツ州、ホリントン、ワシントン・スト リート、1014
(87) 国際公開番号 W02014/089209	最終頁に続く
(87) 国際公開日 平成26年6月12日 (2014.6.12)	
(31) 優先権主張番号 61/792, 163	
(32) 優先日 平成25年3月15日 (2013.3.15)	
(33) 優先権主張国 米国 (US)	
(31) 優先権主張番号 61/733, 252	
(32) 優先日 平成24年12月4日 (2012.12.4)	
(33) 優先権主張国 米国 (US)	

(54) 【発明の名称】 血液脳関門 (BBB) を透過する二重特異性結合タンパク質

(57) 【要約】

血液脳関門 (BBB) を透過することができる操作された多価および多特異性結合タンパク質が提供され、それと共に作製方法、ならびに疾患の予防、診断、および/または治療において使用する方法も提供される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

対象の脳血管の上皮組織に発現される抗原に特異的に結合し、かつ前記対象の脳への組成物の取り込みを促進する、二重可変ドメイン(DVD)結合タンパク質。

## 【請求項 2】

前記結合タンパク質が、3~30nMのEC<sub>50</sub>で前記抗原に結合する、請求項1に記載の結合タンパク質。

## 【請求項 3】

前記DVD結合タンパク質が、DVD-Igである、請求項1または2のいずれかに記載の結合タンパク質。

## 【請求項 4】

前記DVD結合タンパク質が、ハーフDVD-Ig、scDVD-Ig、fDVD-Ig、rDVD-Ig、pDVD-Ig、mDVD-Ig、およびcoDVD-Igからなる群から選択される、請求項1または2のいずれかに記載の結合タンパク質。

## 【請求項 5】

前記標的が、トランスフェリン受容体である、請求項1~4のいずれかに記載の結合タンパク質。

## 【請求項 6】

前記結合タンパク質が、哺乳動物対象に全身投与された場合、脳血管の上皮組織に発現した抗原に特異的に結合しない、結合タンパク質と同類の第2の結合タンパク質と比較したときに、前記哺乳動物対象において脳内濃度の1~10倍の増加を示す、請求項1~5のいずれかに記載の結合タンパク質。

## 【請求項 7】

前記結合タンパク質が哺乳動物対象に投与された場合に、前記結合タンパク質が哺乳動物対象の脳実質または神経細胞体に局在する、請求項1~6のいずれかに記載の結合タンパク質。

## 【請求項 8】

哺乳動物対象への全身投与から96時間後の前記哺乳動物対象の脳内の前記結合タンパク質の前記結合タンパク質濃度が、前記哺乳動物対象への全身投与から24時間後の前記哺乳動物対象の脳内の前記結合タンパク質の濃度の1%超である、請求項1~7のいずれかに記載の結合タンパク質。

## 【請求項 9】

全身投与が、静脈内投与、皮下投与、および腹腔内投与からなる群から選択される、請求項1~8のいずれかに記載の結合タンパク質。

## 【請求項 10】

前記対象が、哺乳動物である、請求項1~9のいずれかに記載の結合タンパク質。

## 【請求項 11】

前記哺乳動物が、マウス、ラット、アレチネズミ、ハムスター、ウサギ、類人猿、サル、ヒト、イヌ、ネコ、ラクダ、ラマ、ウシ、およびウマからなる群から選択される、請求項10に記載の結合タンパク質。

## 【請求項 12】

前記抗原が、インスリン受容体、トランスフェリン受容体、LRP、メラノコルチン受容体、ニコチン性アセチルコリン受容体、VACM-1受容体、血管、IGFR、EPCR、EGFR、TNFR、レプチン受容体、M6PR、リポタンパク質受容体、NCAM、LIFR、LFR、MRP1、AChR、DTr、グルタチオン輸送体、SR-B1、MYOF、TFRC、ECE1、LDLR、PVR、CDC50A、SCARF1、MRC1、HLA-DRA、RAMP2、VLDLR、STAB1、TLR9、CXCL16、NTRK1、CD74、DPP4、内皮成長因子受容体1、2、および3、グルココルチコイド受容体、イオンチャネル型グルタミン酸受容体、M3受容体、アリアル炭化水素受容体、GLUT-1、イノシトール-1,4,5-トリスリン酸(IP3)受容体、N

10

20

30

40

50

- メチル - D - アスパラギン酸受容体、S 1 P 1、P 2 Y受容体、T M E M 3 0 A、およびR A G Eからなる群から選択される、対象の脳血管の上皮組織に発現される受容体を含む、請求項 1 に記載の結合タンパク質。

【請求項 1 3】

組成物をさらに含み、前記組成物が、前記結合タンパク質と併用投与される、請求項 1 ~ 1 2 のいずれかに記載の結合タンパク質。

【請求項 1 4】

前記組成物が、前記結合タンパク質に共有結合する、請求項 1 3 に記載の結合タンパク質。

【請求項 1 5】

前記組成物が、リンカーにより前記結合タンパク質に共有結合する、請求項 1 3 に記載の結合タンパク質。

【請求項 1 6】

前記組成物が、ブデノシド、上皮成長因子、コルチコステロイド、シクロスポリン、スルファサラジン、アミノサリチル酸、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 m A b、抗IL - 6 もしくはIL - 6 受容体m A b、成長因子、エラスターゼ阻害剤、ピリジニル - イミダゾール化合物、TNF、LT、IL - 1、IL - 2、IL - 6、IL - 7、IL - 8、IL - 1 2、IL - 1 3、IL - 1 5、IL - 1 6、IL - 1 8、IL - 2 3、E M A P - I I、G M - C S F、F G F、もしくはP D G Fの抗体もしくはアゴニスト、C D 2、C D 3、C D 4、C D 8、C D - 1 9、C D 2 5、C D 2 8、C D 3 0、C D 4 0、C D 4 5、C D 6 9、C D 9 0 に対する抗体もしくはそのリガンド、メトトレキサート、シクロスポリン、F K 5 0 6、ラパマイシン、ミコフェノール酸モフェチル、レフルノミド、N S A I D、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、アドレナリン作動物質、I R A K、N I K、I K K、p 3 8、M A P キナーゼ阻害剤、IL - 1 変換酵素阻害剤、TNF 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p 5 5 TNF受容体、可溶性p 7 5 TNF受容体、s I L - 1 R I、s I L - 1 R I I、s I L - 6 R、抗炎症性サイトカイン、IL - 4、IL - 1 0、IL - 1 1、IL - 1 3、T G F、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 1 ~ 1 5 のいずれかに記載の結合タンパク質。

【請求項 1 7】

ポリペプチド鎖を含み、前記ポリペプチド鎖がV D 1 - ( X 1 ) n - V D 2 - C - ( X 2 ) nを含み、式中、

V D 1 が、第 1 の重鎖可変ドメインであり、

V D 2 が、第 2 の重鎖可変ドメインであり、

C が、重鎖定常ドメインであり、

X 1 はリンカーであるが、但し、それはC H 1 ではないものとし、

X 2 が、F c 領域であり、

( X 1 ) n が、( X 1 ) 0 または( X 1 ) 1 であり、

( X 2 ) n が、( X 2 ) 0 または( X 2 ) 1 であり、

前記結合タンパク質が、T f R またはH I R に特異的に結合し、

( a ) V D 1 またはV D 2 が、3 つのC D R を含み、少なくとも1 つのC D R が、配列番号7 6、7 7、7 8、8 2、8 3、1 1 5 ~ 1 1 7、および1 5 6 ~ 1 5 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、

( b ) V D 1 およびV D 2 が独立して、3 つのC D R を含み、少なくとも1 つのC D R が、配列番号7 6、7 7、7 8、8 2、8 3、1 1 5 ~ 1 1 7、および1 5 6 ~ 1 5 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、または

10

20

30

40

50

(c) VD1が、3つのCDRを含み、少なくとも1つのCDRが、配列番号76、77、78、82、83、115～117、および156～158からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつVD2が、3つのCDRを含み、少なくとも1つのCDRが、配列番号76、77、78、82、83、115～117、および156～158からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項1～16のいずれかに記載の結合タンパク質。

【請求項18】

(a) VD1またはVD2が、配列番号30、32、34、36、56、および104からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、または

(b) VD1およびVD2が独立して、配列番号30、32、34、36、56、および104からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項1～17のいずれかに記載の結合タンパク質。

10

【請求項19】

ポリペプチド鎖を含み、前記ポリペプチド鎖が、VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-C-(X2)<sub>n</sub>を含み、式中、

VD1が、第1の軽鎖可変ドメインであり、

VD2が、第2の軽鎖可変ドメインであり、

Cが、軽鎖定常ドメインであり、

X1はリンカーであるが、但し、それはCLではないものとし、

X2が、Fc領域を含まず、

(X1)<sub>n</sub>が、(X1)<sub>0</sub>または(X1)<sub>1</sub>であり、

(X2)<sub>n</sub>が、(X2)<sub>0</sub>または(X2)<sub>1</sub>であり、

前記結合タンパク質が、TfRまたはHIRに特異的に結合し、

(a) VD1またはVD2が、それぞれ3つのCDRを含み、少なくとも1つのCDRが、配列番号79、80、81、84、85、86、118、119、120、159、160、および161からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、

(b) VD1およびVD2が独立して、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号79、80、81、84、85、86、118、119、120、159、160、および161からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、または

(c) VD1が、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号79、80、81、84、85、86、118、119、120、159、160、および161からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつVD2が、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号79、80、81、84、85、86、118、119、120、159、160、および161からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項1～16に記載の結合タンパク質。

20

30

【請求項20】

(a) VD1またはVD2が、配列番号31、33、35、37、57、105、106、107、および108からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、または

(b) VD1およびVD2が独立して、配列番号31、33、35、37、57、105、106、107、および108からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項19に記載の結合タンパク質。

40

【請求項21】

(X1)<sub>n</sub>が(X1)<sub>0</sub>である、請求項19または20に記載の結合タンパク質。

【請求項22】

第1および第2のポリペプチド鎖を含み、前記第1のポリペプチド鎖が、第1のVD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-C-(X2)<sub>n</sub>を含み、式中、

VD1が、第1の重鎖可変ドメインであり、

VD2が、第2の重鎖可変ドメインであり、

Cが、重鎖定常ドメインであり、

X1が、第1のリンカーであり、

50

X 2 が、F c 領域であり、

前記第 2 のポリペプチド鎖が、第 2 の V D 1 - ( X 1 ) n - V D 2 - C - ( X 2 ) n を含み、式中、

V D 1 が、第 1 の軽鎖可変ドメインであり、

V D 2 が、第 2 の軽鎖可変ドメインであり、

C が、軽鎖定常ドメインであり、

X 1 が、第 2 のリンカーであり、

X 2 が、F c 領域を含まず、

( X 1 ) n が独立して、( X 1 ) 0 または ( X 1 ) 1 であり、( X 2 ) n が独立して、( X 2 ) 0 または ( X 2 ) 1 であり、

10

前記第 1 および第 2 の X 1 のリンカーが、同じであるか、または異なっており、

前記第 1 の X 1 のリンカーが C H 1 ではなく、かつ/または前記第 2 の X 1 のリンカーが、C L ではなく、

前記結合タンパク質が、T f R または H I R に特異的に結合し、

( a ) V D 1 または V D 2 の重鎖可変ドメインが、それぞれ 3 つの C D R を含み、前記 C D R のうちの少なくとも 1 つが、配列番号 7 6、7 7、7 8、8 2、8 3、1 1 5、1 1 6、1 1 7、1 5 6、1 5 7、および 1 5 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、

( b ) V D 1 および V D 2 の重鎖可変ドメインが独立して、3 つの C D R を含み、それぞれ、配列番号 7 6、7 7、7 8、8 2、8 3、1 1 5、1 1 6、1 1 7、1 5 6、1 5 7、および 1 5 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、あるいは

20

( c ) V D 1 の重鎖可変ドメインが、3 つの C D R を含み、それぞれ、配列番号 7 6、7 7、7 8、8 2、8 3、1 1 5、1 1 6、1 1 7、1 5 6、1 5 7、および 1 5 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつ V D 2 の重鎖可変ドメインが、3 つの C D R を含み、それぞれ、配列番号 7 6、7 7、7 8、8 2、8 3、1 1 5、1 1 6、1 1 7、1 5 6、1 5 7、および 1 5 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、

式中、

( a ) V D 1 または V D 2 の軽鎖可変ドメインが、3 つの C D R を含み、それぞれ、配列番号 7 9、8 0、8 1、8 4、8 5、8 6、1 1 8、1 1 9、1 2 0、1 5 9、1 6 0、および 1 6 1 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、

30

( b ) V D 1 および V D 2 の軽鎖可変ドメインが独立して、3 つの C D R を含み、それぞれ、配列番号 7 9、8 0、8 1、8 4、8 5、8 6、1 1 8、1 1 9、1 2 0、1 5 9、1 6 0、および 1 6 1 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、または

( c ) V D 1 の軽鎖可変ドメインが、3 つの C D R を含み、それぞれ、配列番号 7 9、8 0、8 1、8 4、8 5、8 6、1 1 8、1 1 9、1 2 0、1 5 9、1 6 0、および 1 6 1 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつ V D 2 の軽鎖可変ドメインが、3 つの C D R を含み、それぞれ、配列番号 7 9、8 0、8 1、8 4、8 5、8 6、1 1 8、1 1 9、1 2 0、1 5 9、1 6 0、および 1 6 1 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 2 1 のいずれかに記載の結合タンパク質。

40

【請求項 2 3】

( a ) V D 1 または V D 2 の重鎖可変ドメインが、配列番号 3 0、3 2、3 4、3 6、5 6、および 1 0 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、あるいは

( b ) V D 1 および V D 2 の重鎖可変ドメインが独立して、配列番号 3 0、3 2、3 4、3 6、5 6、および 1 0 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつ、

( a ) V D 1 または V D 2 の軽鎖可変ドメインが、配列番号 3 1、3 3、3 5、3 7、5 7、1 0 5、1 0 6、1 0 7、および 1 0 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、あるいは

( b ) V D 1 および V D 2 の軽鎖可変ドメインが独立して、配列番号 3 1、3 3、3 5、3 7、5 7、1 0 5、1 0 6、1 0 7、および 1 0 8 からなる群から選択されるアミノ

50

酸配列を含む、請求項 2 2 に記載の結合タンパク質。

【請求項 2 4】

X 1 が、配列番号 1 ~ 2 9、1 7 8、および 1 7 9 からなる群の一員から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドリンカーである、請求項 1 ~ 2 3 のいずれかに記載の結合タンパク質。

【請求項 2 5】

前記結合タンパク質が、2 つの第 1 のポリペプチド鎖および 2 つの第 2 のポリペプチド鎖を含む、2 4 に記載の結合タンパク質。

【請求項 2 6】

前記 F c 領域が、変異体配列 F c 領域を含む、請求項 1 ~ 2 5 のいずれかに記載の結合タンパク質。

10

【請求項 2 7】

前記 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、および I g D からなる群から選択される F c 領域を含む、請求項 1 ~ 2 6 のいずれかに記載の結合タンパク質。

【請求項 2 8】

前記第 1 のポリペプチド鎖の前記 V D 1 および前記第 2 のポリペプチド鎖の前記 V D 1 がそれぞれ、異なる第 1 および第 2 の親抗体、またはそれらの抗原結合部分に由来する、請求項 2 4 に記載の結合タンパク質。

【請求項 2 9】

前記第 1 のポリペプチド鎖の前記 V D 2 および前記第 2 のポリペプチド鎖の前記 V D 2 がそれぞれ、異なる第 1 および第 2 の親抗体、またはそれらの抗原結合部分に由来する、請求項 2 4 に記載の結合タンパク質。

20

【請求項 3 0】

前記第 1 および前記第 2 の親抗体が、前記抗原上の異なるエピトープと結合する、請求項 2 8 または 2 9 に記載の結合タンパク質。

【請求項 3 1】

ポリペプチド鎖を含み、前記ポリペプチド鎖が V D 1 - ( X 1 ) n - V D 2 - C - ( X 2 ) n を含み、式中、

V D 1 が、第 1 の重鎖可変ドメインであり、

V D 2 が、第 2 の重鎖可変ドメインであり、

C が、重鎖定常ドメインであり、

X 1 はリンカーであるが、但し、それは C H 1 ではないものとし、

X 2 が、F c 領域であり、

( X 1 ) n が、( X 1 ) 0 または ( X 1 ) 1 であり、

( X 2 ) n が、( X 2 ) 0 または ( X 2 ) 1 であり、

30

前記結合タンパク質が、A b e t a、B A C E、H e r - 2、R G M A、T N F、および A P P からなる群から選択される疾患標的に特異的に結合し、

( a ) V D 1 または V D 2 が、3 つの C D R を含み、それぞれ、配列番号 1 0 9、1 1 0、1 1 1、1 2 1、1 2 2、1 2 3、1 3 6、1 3 7、1 3 8、1 3 9、1 4 0、1 4 1、1 4 2、1 4 3、1 4 7、1 4 8、1 4 9、1 6 4、1 6 5、1 6 6、1 7 2、1 7 3、および 1 7 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、

40

( b ) V D 1 および V D 2 が独立して、3 つの C D R を含み、それぞれ、配列番号 1 0 9、1 1 0、1 1 1、1 2 1、1 2 3、1 3 6、1 3 7、1 3 8、1 3 9、1 4 0、1 4 1、1 4 2、1 4 3、1 4 7、1 4 8、1 4 9、1 6 4、1 6 5、1 6 6、1 7 2、1 7 3、および 1 7 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、あるいは

( c ) V D 1 が、3 つの C D R を含み、それぞれ、配列番号 1 0 9、1 1 0、1 1 1、1 2 1、1 2 2、1 2 3、1 3 6、1 3 7、1 3 8、1 3 9、1 4 0、1 4 1、1 4 2、1 4 3、1 4 7、1 4 8、1 4 9、1 6 4、1 6 5、1 6 6、1 7 2、1 7 3、および 1 7 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつ V D 2 が、3 つの C D R を含み

50

、それぞれ、配列番号 109、110、111、121、123、136、137、138、139、140、141、142、143、147、148、149、164、165、166、172、173、および 174 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1～30 のいずれかに記載の結合タンパク質。

【請求項 32】

(a) VD1 または VD2 が、配列番号 38、58、93、94、95、96、97、98、99、101、167、および 169 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、あるいは

(b) VD1 および VD2 が独立して、配列番号 38、58、93、94、95、96、97、98、99、101、162、および 170 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1～31 のいずれかに記載の結合タンパク質。

10

【請求項 33】

ポリペプチド鎖を含み、前記ポリペプチド鎖が VD1 - (X1)<sub>n</sub> - VD2 - C - (X2)<sub>n</sub> を含み、式中、

VD1 が、第 1 の軽鎖可変ドメインであり、

VD2 が、第 2 の軽鎖可変ドメインであり、

C が、軽鎖定常ドメインであり、

X1 はリンカーであるが、但し、それは CL ではないものとし、

X2 が、Fc 領域を含まず、

(X1)<sub>n</sub> が、(X1)<sub>0</sub> または (X1)<sub>1</sub> であり、

(X2)<sub>n</sub> が、(X2)<sub>0</sub> または (X2)<sub>1</sub> であり、

20

前記結合タンパク質が、Abeta、BACE、Her-2、RGMA、TNF、および APP からなる群から選択される疾患標的に特異的に結合し、

(a) VD1 または VD2 が、3つの CDR を含み、それぞれ、配列番号 112、113、114、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、150、151、152、167、168、169、175、176、および 177 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、

(b) VD1 および VD2 が独立して、3つの CDR を含み、それぞれ、配列番号 112、113、114、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、150、151、152、167、168、169、175、176、および 177 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、あるいは

30

(c) VD1 が、3つの CDR を含み、それぞれ、配列番号 112、113、114、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、150、151、152、167、168、169、175、176、および 177 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつ VD2 が、3つの、それぞれ、配列番号 112、113、114、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、150、151、152、167、168、169、175、176、および 177 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む CDR を含む、請求項 1～32 のいずれかに記載の結合タンパク質。

40

【請求項 34】

(a) VD1 または VD2 が、配列番号 39、59、87、88、89、90、91、92、100、102、163、および 171 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、あるいは

(b) VD1 および VD2 が独立して、配列番号 39、59、87、88、89、90、91、92、100、102、163、および 171 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 33 に記載の結合タンパク質。

【請求項 35】

(X1)<sub>n</sub> が、(X1)<sub>0</sub> である、請求項 33 または 34 に記載の結合タンパク質。

【請求項 36】

50

第1および第2のポリペプチド鎖を含む結合タンパク質であって、前記第1のポリペプチド鎖が、第1のVD1 - (X1)<sub>n</sub> - VD2 - C - (X2)<sub>n</sub>を含み、式中、

VD1が、第1の重鎖可変ドメインであり、  
VD2が、第2の重鎖可変ドメインであり、  
Cが、重鎖定常ドメインであり、  
X1が、第1のリンカーであり、  
X2が、Fc領域であり、

前記第2のポリペプチド鎖が、第2のVD1 - (X1)<sub>n</sub> - VD2 - C - (X2)<sub>n</sub>を含み、式中、

VD1が、第1の軽鎖可変ドメインであり、  
VD2が、第2の軽鎖可変ドメインであり、  
Cが、軽鎖定常ドメインであり、  
X1が、第2のリンカーであり、  
X2が、Fc領域を含まず、

(X1)<sub>n</sub>が独立して、(X1)<sub>0</sub>または(X1)<sub>1</sub>であり、(X2)<sub>n</sub>が独立して、(X2)<sub>0</sub>または(X2)<sub>1</sub>であり、

前記第1および第2のX1のリンカーが、同じであるか、または異なっており、

前記第1のX1のリンカーがCH1ではなく、かつ/または前記第2のX1のリンカーがCLではなく、

前記結合タンパク質が、Abeta、BACE、Her-2、RGMA、TNF、およびAPPからなる群から選択される疾患標的に特異的に結合し、

(a) VD1またはVD2の重鎖可変ドメインが、それぞれ3つのCDRを含み、少なくとも1つのCDRが、配列番号109、110、111、121、123、136、137、138、139、140、141、142、143、147、148、149、164、165、166、172、173、および174からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、

(b) VD1およびVD2の重鎖可変ドメインが独立して、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号109、110、111、121、123、136、137、138、139、140、141、142、143、147、148、149、164、165、166、172、173、および174からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、  
あるいは

(c) VD1の重鎖可変ドメインが、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号109、110、111、121、123、136、137、138、139、140、141、142、143、147、148、149、164、165、166、172、173、および174からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつVD2の重鎖可変ドメインが、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号109、110、111、121、123、136、137、138、139、140、141、142、143、147、148、149、164、165、166、172、173、および174からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、

(a) VD1またはVD2の軽鎖可変ドメインが、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号112、113、114、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、150、151、および152からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、

(b) VD1およびVD2の軽鎖可変ドメインが独立して、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号112、113、114、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、150、151、152、167、168、169、175、176、および177からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、あるいは

(c) VD1の軽鎖可変ドメインが、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号112、113、114、124、125、126、127、128、129、130、131

10

20

30

40

50

、 132、133、134、135、150、151、152、167、168、169、175、176、および177からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつVD2の軽鎖可変ドメインが、3つの、それぞれ、配列番号112、113、114、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、150、151、152、167、168、169、175、176、および177からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDRを含む、結合タンパク質。

【請求項37】

(a) VD1またはVD2の重鎖可変ドメインが、配列番号38、58、93、94、95、96、97、98、99、101、162、および170からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、あるいは

(b) VD1およびVD2の重鎖可変ドメインが独立して、配列番号38、58、93、94、95、96、97、98、99、101、162、および170からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、

かつ、

(a) VD1またはVD2の軽鎖可変ドメインが、配列番号39、59、87、88、89、90、91、92、100、102、163、および171からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、あるいは

(b) VD1およびVD2の軽鎖可変ドメインが独立して、配列番号39、59、87、88、89、90、91、92、100、102、163、および171からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項36に記載の結合タンパク質。

【請求項38】

X1が、配列番号1~29、178、および179のうちの1つである、請求項1~37のいずれかに記載の結合タンパク質。

【請求項39】

前記結合タンパク質が、2つの第1のポリペプチド鎖および2つの第2のポリペプチド鎖を含む、請求項1~38のいずれかに記載の結合タンパク質。

【請求項40】

第1および第2のポリペプチド鎖の第1の組が、請求項22に定義される通りであり、第1および第2のポリペプチド鎖の第2の組が、請求項36に定義される通りである、請求項39に記載の結合タンパク質。

【請求項41】

前記Fc領域が、変異体配列Fc領域である、請求項1~40のいずれかに記載の結合タンパク質。

【請求項42】

前記Fc領域が、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE、またはIgDからのFc領域である、請求項1~41のいずれかに記載の結合タンパク質。

【請求項43】

前記第1のポリペプチド鎖のVD1および前記第2のポリペプチド鎖のVD1が、それぞれ、異なる第1および第2の親抗体、またはそれらの抗原結合部分に由来する、請求項1~42のいずれかに記載の結合タンパク質。

【請求項44】

前記第1のポリペプチド鎖のVD2および前記第2のポリペプチド鎖のVD2が、それぞれ、異なる第1および第2の親抗体、またはそれらの抗原結合部分に由来する、請求項1~43のいずれかに記載の結合タンパク質。

【請求項45】

前記第1および前記第2の親抗体が、前記抗原上の異なるエピトープと結合する、請求項43または44に記載の結合タンパク質。

【請求項46】

ポリペプチド鎖を含み、前記ポリペプチド鎖がVD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-C-(X

10

20

30

40

50

2) n を含み、式中、

VD 1 が、第 1 の重鎖可変ドメインであり、

VD 2 が、第 2 の重鎖可変ドメインであり、

C が、重鎖定常ドメインであり、

X 1 はリンカーであるが、但し、それは CH 1 ではないものとし、

X 2 が、Fc 領域であり、

(X 1) n が、(X 1) 0 または (X 1) 1 であり、

(X 2) n が、(X 2) 0 または (X 2) 1 であり、

前記結合タンパク質が、TfR または HIR、および Abeta、BACE、Her-2、RGMA、TNF、または APP に特異的に結合し、

10

(a) VD 1 または VD 2 が、3 つの CDR を含み、それぞれ、配列番号 76、77、78、82、83、115~117、156~158、109、110、111、121、122、123、136、137、138、139、140、141、142、143、147、148、149、164、165、166、172、173、および 174 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、

(b) VD 1 および VD 2 が独立して、3 つの CDR を含み、それぞれ、配列番号 76、77、78、82、83、115~117、156~158、109、110、111、121、122、123、136、137、138、139、140、141、142、143、147、148、149、164、165、166、172、173、および 174 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、

20

(c) VD 1 が、3 つの CDR を含み、それぞれ、配列番号 76、77、78、82、83、115~117、および 156~158 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつ VD 2 が、3 つの CDR を含み、それぞれ、配列番号 109、110、111、121、122、123、136、137、138、139、140、141、142、143、147、148、149、164、165、166、172、173、および 174 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、あるいは

(d) VD 2 が、3 つの CDR を含み、それぞれ、配列番号 76、77、78、82、83、115~117、および 156~158 から選択されるアミノ酸配列を含み、かつ VD 1 が、3 つの CDR を含み、それぞれ、配列番号 109、110、111、121、122、123、136、137、138、139、140、141、142、143、147、148、149、164、165、166、172、173、および 174 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1~45 のいずれかに記載の結合タンパク質。

30

【請求項 47】

(a) VD 1 または VD 2 が、配列番号 30、32、34、36、56、104、38、58、93、94、95、96、97、98、99、101、162、および 170 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、あるいは

(b) VD 1 が、配列番号 30、32、34、36、56、または 104 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつ VD 2 が、配列番号 38、58、93、94、95、96、97、98、99、101、162、および 170 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1~46 のいずれかに記載の結合タンパク質。

40

【請求項 48】

ポリペプチド鎖を含み、前記ポリペプチド鎖が VD 1 - (X 1) n - VD 2 - C - (X

2) n を含み、式中、

VD 1 が、第 1 の軽鎖可変ドメインであり、

VD 2 が、第 2 の軽鎖可変ドメインであり、

C が、軽鎖定常ドメインであり、

X 1 はリンカーであるが、但し、それは CL ではないものとし、

X 2 が、Fc 領域を含まず、

(X 1) n が、(X 1) 0 または (X 1) 1 であり、

50

(X2)nが、(X2)0または(X2)1であり、  
前記結合タンパク質が、TfRまたはHIR、およびAbeta、BACE、Her-  
2、またはAPPに特異的に結合し、

(a)VD1またはVD2が、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号79、80、  
81、84、85、86、118、119、120、159、160、161、112、  
113、114、124、125、126、127、128、129、130、131、  
132、133、134、135、150、151、152、167、168、169、  
175、176、および177からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、

(b)VD1およびVD2が独立して、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号79  
、80、81、84、85、86、118、119、120、159、160、161、  
112、113、114、124、125、126、127、128、129、130、  
131、132、133、134、135、150、151、152、167、168、  
169、175、176、および177からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか

10

(c)VD1が、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号79、80、81、84、  
85、86、118、119、120、159、160、および161からなる群から選  
択されるアミノ酸配列を含み、かつVD2が、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号  
112、113、114、124、125、126、127、128、129、130、  
131、132、133、134、135、150、151、および152、167、1  
68、169、175、176、および177からなる群から選択されるアミノ酸配列を  
含むか、あるいは

20

(d)VD2が、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号79、80、81、84、  
85、86、118、119、120、159、160、および161からなる群から選  
択されるアミノ酸配列を含み、かつVD1が、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号  
112、113、114、124、125、126、127、128、129、130、  
131、132、133、134、135、150、151、152、167、168、  
169、175、176、および177からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、  
請求項1~47のいずれかに記載の結合タンパク質。

【請求項49】

(a)VD1またはVD2が、配列番号31、33、35、37、57、105、10  
6、107、108、39、59、87、88、89、90、91、92、100、10  
2、163、および171からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、あるいは

30

(b)VD1が、配列番号31、33、35、37、57、105、106、107、  
および108からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつVD2が、配列番号3  
9、59、87、88、89、90、91、92、100、102、163、および17  
1からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項48に記載の結合タンパク質。

【請求項50】

(X1)nが、(X1)0である、請求項48または49に記載の結合タンパク質。

【請求項51】

第1および第2のポリペプチド鎖を含み、前記第1のポリペプチド鎖が、第1のVD1  
- (X1)n - VD2 - C - (X2)nを含み、式中、

40

VD1が、第1の重鎖可変ドメインであり、

VD2が、第2の重鎖可変ドメインであり、

Cが、重鎖定常ドメインであり、

X1が、第1のリンカーであり、

X2が、Fc領域であり、

前記第2のポリペプチド鎖が、第2のVD1 - (X1)n - VD2 - C - (X2)nを  
含み、式中、

VD1が、第1の軽鎖可変ドメインであり、

VD2が、第2の軽鎖可変ドメインであり、

50

C が、軽鎖定常ドメインであり、  
 X 1 が、第 2 のリンカーであり、  
 X 2 が、Fc 領域を含まず、  
 ( X 1 ) n が独立して、( X 1 ) 0 または ( X 1 ) 1 であり、( X 2 ) n が独立して、  
 ( X 2 ) 0 または ( X 2 ) 1 であり、  
 前記第 1 および第 2 の X 1 のリンカーが、同じであるか、または異なっており、  
 前記第 1 の X 1 のリンカーが CH 1 ではなく、かつ/または前記第 2 の X 1 のリンカー  
 が、CL ではなく、

前記結合タンパク質が、TfR または HIR、および Abeta、BACE、Her-  
 2、RGMA、TNF、または APP に特異的に結合し、

( a ) VD 1 または VD 2 の重鎖可変ドメインが、3 つの CDR を含み、それぞれ、配  
 列番号 76、77、78、82、83、115 ~ 117、156 ~ 158、109、11  
 0、111、121、122、123、136、137、138、139、140、14  
 1、142、143、147、148、149、164、165、166、172、17  
 3、および 174 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、

( b ) VD 1 および VD 2 の重鎖可変ドメインが独立して、3 つの CDR を含み、それ  
 ぞれ、配列番号 76、77、78、82、83、115 ~ 117、156 ~ 158、10  
 9、110、111、121、122、123、136、137、138、139、14  
 0、141、142、143、147、148、149、164、165、166、17  
 2、173、および 174 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、

( c ) VD 1 の重鎖可変ドメインが、3 つの CDR を含み、それぞれ、配列番号 76、  
 77、78、82、83、115、116、117、156、157、158、164、  
 165、166、172、173、および 174 からなる群から選択されるアミノ酸配列  
 を含み、かつ VD 2 の重鎖可変ドメインが、3 つの CDR を含み、それぞれ、配列番号 1  
 09、110、111、121、123、136、137、138、139、140、1  
 41、142、143、147、148、および 149 からなる群から選択されるアミノ  
 酸配列を含むか、あるいは

( d ) VD 2 の重鎖可変ドメインが、3 つの CDR を含み、それぞれ、配列番号 76、  
 77、78、82、83、115、116、117、156、157、158、164、  
 165、166、172、173、および 174 からなる群から選択されるアミノ酸配列  
 を含み、かつ VD 1 の重鎖可変ドメインが、3 つの CDR を含み、それぞれ、配列番号 1  
 09、110、111、121、122、123、136、137、138、139、1  
 40、141、142、143、147、148、および 149 からなる群から選択され  
 るアミノ酸配列を含み、

かつ、

( a ) VD 1 または VD 2 の軽鎖可変ドメインが、3 つの CDR を含み、それぞれ、配  
 列番号 79、80、81、84、85、86、118、119、120、159、160  
 、161、112、113、114、124、125、126、127、128、129  
 、130、131、132、133、134、135、150、151、152、167  
 、168、169、175、176、および 177 からなる群から選択されるアミノ酸配  
 列を含むか、

( b ) VD 1 および VD 2 の軽鎖可変ドメインが独立して、3 つの CDR を含み、それ  
 ぞれ、配列番号 79、80、81、84、85、86、118、119、120、159  
 、160、161、112、113、114、124、125、126、127、128  
 、129、130、131、132、133、134、135、150、151、152  
 、167、168、169、175、176、および 177 からなる群から選択されるア  
 ミノ酸配列を含むか、

( c ) VD 1 の軽鎖可変ドメインが、3 つの CDR を含み、それぞれ、配列番号 79、  
 80、81、84、85、86、118、119、120、159、160、161、1  
 67、168、169、175、176、および 177 からなる群から選択されるアミノ

10

20

30

40

50

酸配列を含み、かつVD2の軽鎖可変ドメインが、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号112、113、114、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、150、151、および152からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、あるいは

(d) VD2の軽鎖可変ドメインが、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号79、80、81、84、85、86、118、119、120、159、160、161、167、168、169、175、176、および177からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつVD1軽鎖可変ドメインが、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号112、113、114、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、150、151、および152からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項1～50のいずれかに記載の結合タンパク質。

10

【請求項52】

(a) VD1またはVD2の重鎖可変ドメインが、配列番号30、32、34、36、56、104、38、58、93、94、95、96、97、98、99、101、-162、および170からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、あるいは

(b) VD1の重鎖可変ドメインが、配列番号30、32、34、36、56、または104からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつVD2の重鎖可変ドメインが、配列番号38、58、93、94、95、96、97、98、99、101、162、および170からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、

20

かつ、

(a) VD1またはVD2の軽鎖可変ドメインが、配列番号31、33、35、37、57、105、106、107、108、39、59、87、88、89、90、91、92、100、102、163、および171からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、あるいは

(b) VD1の軽鎖可変ドメインが、配列番号31、33、35、37、57、105、106、107、または108からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつVD2の軽鎖可変ドメインが、配列番号39、59、87、88、89、90、91、92、100、または102、163、および171からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項51に記載の結合タンパク質。

30

【請求項53】

X1が、配列番号1～29、178、および179のうちの1つを含む、請求項1～52のいずれかに記載の結合タンパク質。

【請求項54】

前記結合タンパク質が、2つの第1のポリペプチド鎖および2つの第2のポリペプチド鎖を含む、53に記載の結合タンパク質。

【請求項55】

前記Fc領域が、変異体配列Fc領域である、請求項1～54のいずれかに記載の結合タンパク質。

【請求項56】

前記Fc領域が、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE、またはIgDからのFc領域である、請求項1～55のいずれかに記載の結合タンパク質。

40

【請求項57】

前記第1のポリペプチド鎖のVD1および前記第2のポリペプチド鎖のVD1が、それぞれ、異なる第1および第2の親抗体、またはそれらの抗原結合部分に由来する、請求項1～56のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項58】

前記第1のポリペプチド鎖のVD2および前記第2のポリペプチド鎖のVD2が、それぞれ、異なる第1および第2の親抗体、またはそれらの抗原結合部分に由来する、請求項

50

1 ~ 57のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項59】

前記第1および前記第2の親抗体が、異なる抗原と結合する、請求項57または58に記載の結合タンパク質。

【請求項60】

請求項17に記載の重ポリペプチド鎖および請求項19に記載の軽ポリペプチド鎖、または請求項31に記載の重ポリペプチド請求項および請求項33に記載の軽ポリペプチド鎖を含む、単一特異性結合タンパク質。

【請求項61】

請求項17に記載の重ポリペプチド鎖および請求項33に記載の軽ポリペプチド鎖、請求項31に記載の重ポリペプチド請求項および請求項19に記載の軽ポリペプチド鎖、請求項46に記載の重ポリペプチド請求項および請求項19、33、もしくは48に記載の軽ポリペプチド鎖、または請求項17、31、もしくは46に記載の重ポリペプチド請求項および請求項48に記載の軽ポリペプチド鎖を含む、二特異性結合タンパク質。

10

【請求項62】

前記結合タンパク質が、 $Out1 - (X1)m - In1 - (X2)n$ を含み、式中、 $In1$ が、前記対象の前記脳血管の上皮組織に発現される前記抗原に特異的に結合し、 $Out1$ が、別の分子に特異的に結合し、 $X1$ がリンカーであり、 $X2$ がFc領域であり、 $m$ が0または1であり、 $n$ が0または1である、請求項1に記載の結合タンパク質。

【請求項63】

$In1$ が、約 $5nM \sim 0.01nM$ の $EC_{50}$ で、前記対象の前記脳血管の上皮組織に発現される前記抗原に特異的に結合する、請求項62に記載の結合タンパク質。

20

【請求項64】

$In1$ が、トランスフェリン受容体に特異的に結合する、請求項62に記載の結合タンパク質。

【請求項65】

$In1$ が、 $3nM$ 未満の $EC_{50}$ でトランスフェリン受容体に特異的に結合する、請求項64に記載の結合タンパク質。

【請求項66】

$In1$ が、配列番号56のアミノ配列を含む、請求項64に記載の結合タンパク質。

30

【請求項67】

$X1$ が、配列番号179のアミノ酸配列を含む、請求項63に記載の結合タンパク質。

【請求項68】

$Out1$ が、 $CGRP$ 、 $TNF$ 、 $RGMA$ 、サブスタンスP、ブラジキニン、 $Nav1.7$ 、 $LPA$ 、 $P2X3$ 、 $NGF$ 、 $Abeta$ ； $BACE1$ ； $IL-1$ ； $IGF1$ もしくは2； $IL-18$ ； $IL-6$ ； $RAGE$ ； $NGF$ ； $EGFR$ ； $cMet$ 、 $Her-2$ および $CD-20$ からなる群から選択される別の分子に結合する、請求項63に記載の結合タンパク質。

【請求項69】

$Out1$ が、約 $1nM \sim 100nM$ の $EC_{50}$ で、前記対象の前記脳血管の上皮組織に発現される前記抗原に特異的に結合する、請求項62に記載の結合タンパク質。

40

【請求項70】

$Out1$ が、トランスフェリン受容体に特異的に結合する、請求項69に記載の結合タンパク質。

【請求項71】

$Out1$ が、 $3nM$ 超の $EC_{50}$ でトランスフェリン受容体に特異的に結合する、請求項70に記載の結合タンパク質。

【請求項72】

$Out1$ が、配列番号36のアミノ配列を含む、請求項64に記載の結合タンパク質。

【請求項73】

50

X 1 が、配列番号 2 1 のアミノ酸配列を含む、請求項 6 9 に記載の結合タンパク質。

【請求項 7 4】

In 1 が、CGRP、TNF、RGMA、サブスタンス P、ブラジキニン、Nav 1.7、LPA、P2X3、NGF、Abeta; ACE1; IL-1; IGF1 もしくは 2; IL-18; IL-6; RAGE; NGF; EGFR; cMet、Her-2 および CD-20 からなる群から選択される別の分子に結合する、請求項 6 9 に記載の結合タンパク質。

【請求項 7 5】

前記第 1 の親抗体またはその抗原結合部分が、前記第 2 の親抗体またはその抗原結合部分が前記第 2 の抗原に結合する効力とは異なる効力で、前記第 1 の抗原に結合する、請求項 1 ~ 7 4 のいずれかに記載の結合タンパク質。

10

【請求項 7 6】

前記第 1 の親抗体またはその抗原結合部分が、前記第 2 の親抗体またはその抗原結合部分が前記第 2 の抗原に結合する親和性とは異なる親和性で、前記第 1 の抗原に結合する、請求項 1 ~ 7 5 のいずれかに記載の結合タンパク質。

【請求項 7 7】

前記結合タンパク質が、表面プラズモン共鳴により測定するとき、1 つ以上の標的に対して少なくとも約  $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、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  $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  のオン速度定数 ( $K_{on}$ ) を有する、請求項 1 ~ 7 6 のいずれかに記載の結合タンパク質。

20

【請求項 7 8】

前記結合タンパク質が、表面プラズモン共鳴により測定するとき、1 つ以上の標的に対して多くとも約  $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 、多くとも約  $10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 、多くとも約  $10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 、または多くとも約  $10^{-6} \text{ s}^{-1}$  のオフ速度定数 ( $K_{off}$ ) を有する、請求項 1 ~ 7 7 のいずれかに記載の結合タンパク質。

【請求項 7 9】

前記結合タンパク質が、1 つ以上の標的に対して多くとも約  $10^{-7} \text{ M}$ 、多くとも約  $10^{-8} \text{ M}$ 、多くとも約  $10^{-9} \text{ M}$ 、多くとも約  $10^{-10} \text{ M}$ 、多くとも約  $10^{-11} \text{ M}$ 、多くとも約  $10^{-12} \text{ M}$ 、または多くとも約  $10^{-13} \text{ M}$  の解離定数 ( $K_d$ ) を有する、請求項 1 ~ 7 8 のいずれかに記載の結合タンパク質。

30

【請求項 8 0】

前記結合タンパク質複合体が、薬剤をさらに含み、前記薬剤が、免疫接着分子、診断剤、造影剤、治療剤、または、細胞傷害性剤である、請求項 1 ~ 7 9 のいずれかに記載の結合タンパク質を含む結合タンパク質複合体。

【請求項 8 1】

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る、請求項 8 0 に記載の結合タンパク質複合体。

【請求項 8 2】

前記結合タンパク質が、結晶化結合タンパク質である、請求項 1 ~ 8 1 のいずれかに記載の結合タンパク質。

40

【請求項 8 3】

請求項 1 ~ 8 2 のいずれかに記載の結合タンパク質のアミノ酸配列をコードする、単離された核酸。

【請求項 8 4】

請求項 8 2 に記載の単離された核酸を含む、ベクター。

【請求項 8 5】

前記ベクターが、pcDNA、pTT、pTT3、pEFBOS、pBV、pJV、pcDNA3.1 TOPO、pEF6 TOPO、pHybE、pBOS、またはpBJ である、請求項 8 4 に記載のベクター。

50

- 【請求項 8 6】  
請求項 8 5 に記載のベクターを含む、宿主細胞。
- 【請求項 8 7】  
前記宿主細胞が、原核細胞である、請求項 8 6 に記載の宿主細胞。
- 【請求項 8 8】  
前記宿主細胞が、真核細胞である、請求項 8 6 に記載の宿主細胞。
- 【請求項 8 9】  
前記真核細胞が、原生生物細胞、動物細胞、植物細胞、酵母細胞、哺乳動物細胞、鳥類細胞、昆虫細胞、または真菌細胞である、請求項 8 8 に記載の宿主細胞。
- 【請求項 9 0】 10  
結合タンパク質を産生する方法であって、前記結合タンパク質を産生するのに十分な条件下で、培養培地中で請求項 8 6 ~ 8 9 のいずれか一項に記載の宿主細胞を培養することを含む、方法。
- 【請求項 9 1】  
請求項 9 0 に記載の方法から産生されたタンパク質。
- 【請求項 9 2】  
請求項 1 ~ 9 1 のいずれかに記載の結合タンパク質および薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。
- 【請求項 9 3】 20  
少なくとも 1 つの追加の治療剤をさらに含む、請求項 9 2 に記載の薬学的組成物。
- 【請求項 9 4】  
前記追加の治療剤が、造影剤、細胞傷害性剤、血管形成阻害剤、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もしくはその機能的断片、メトトレキサート、シクロスポリン、ラパマイシン、FK506、検出可能な標識もしくはレポーター、TNFアンタゴニスト、抗リウマチ剤、筋肉弛緩剤、麻酔剤、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(corticosteroid)、アナボリックステロイド、エリスロポエチン、免疫化、免疫グロブリン、免疫抑制剤、成長ホルモン、ホルモン補充薬、放射性医薬、抗鬱剤、抗精神病薬、刺激剤、喘息薬、ベータアゴニスト、吸引用ステロイド、エピネフリンもしくは類似体、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、請求項 9 3 に記載の薬学的組成物。
- 【請求項 9 5】 30  
前記追加の治療剤が、ブデノシド、上皮成長因子、コルチコステロイド、シクロスポリン、スルファサラジン、アミノサリチル酸、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 mAb、抗IL-6もしくはIL-6受容体mAb、成長因子、エラスターゼ阻害剤、ピリジニル-イミダゾール化合物、TNF、LT、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-18、IL-23、EMAP-II、GM-CSF、FGF、もしくはPDGFの抗体もしくはアゴニスト 40  
、CD2、CD3、CD4、CD8、CD-19、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD90に対する抗体もしくはそのリガンド、メトトレキサート、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノール酸モフェチル、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、アドレナリン作動物質、IRAK、NIK、IKK、p38、MAPキナーゼ阻害剤、IL-1変換酵素阻害剤、TNF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p55 TNF受容体、可溶性p75 TNF受容体、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R、抗炎症性サイトカイン、IL-4、I 50

L - 10、IL - 11、IL - 13、TGF、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 93 に記載の薬学的組成物。

【請求項 96】

治療が達成されるように、対象に前記結合タンパク質を投与することにより、疾患または障害に対して前記対象を治療するのに用いるための、請求項 1 ~ 95 のいずれかに記載の結合タンパク質。

【請求項 97】

前記障害が、脳障害である、請求項 96 に記載の結合タンパク質。

【請求項 98】

前記脳障害が、前記脳の自己免疫もしくは炎症性疾患、前記脳の感染性疾患、神経学的障害、神経変性障害、脳癌、または脳転移である、請求項 97 に記載の結合タンパク質。

【請求項 99】

前記障害が、ハンチントン舞踏病、パーキンソン病、アルツハイマー病、脳卒中、精神障害、鬱病、統合失調症、急性および慢性疼痛からなる群から選択される、請求項 98 に記載の結合タンパク質。

【請求項 100】

前記対象への投与が、非経口、皮下、筋肉内、静脈内、関節内 (intrarticular)、気管支内、腹腔内、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、腎内、網膜内、髄腔内、滑液嚢内、胸腔内、子宮内、膀胱内、ポラス、腔内、直腸、口腔内、舌下、鼻腔内、または経皮である、請求項 99 に記載の結合タンパク質。

【請求項 101】

2つの抗原に結合することができる結合タンパク質を生成するための方法であって、

a) 第1の抗原に結合することができる第1の親抗体またはその抗原結合部分を得るステップと、

b) 第2の抗原に結合することができる第2の親抗体またはその抗原結合部分を得るステップと、

c) 請求項 1 ~ 100 のいずれかに記載のポリペプチド鎖 (複数可) をコードする構築物 (複数可) を調製するステップと、

d) 前記ポリペプチド鎖 (複数可) を発現させるステップと、

を含み、それにより、前記第1および前記第2の抗原に結合することができる前記結合タンパク質が生成される、方法。

【請求項 102】

前記Fc領域が、変異体配列Fc領域である、請求項 101 に記載の方法。

【請求項 103】

前記Fc領域が、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE、またはIgDからのFc領域である、請求項 102 に記載の方法。

【請求項 104】

前記第1の親抗体またはその抗原結合部分が存在する場合、前記第2の親抗体またはその抗原結合部分が存在する場合に前記第2の抗原に結合する親和性および/または効力とは異なる親和性および/または効力で、前記第1の抗原に結合する、請求項 101 に記載の方法。

【請求項 105】

イムノアッセイにより試験試料中の少なくとも1つの抗原またはその断片の存在を決定する方法であって、

前記イムノアッセイが、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、前記少なくとも1つの結合タンパク質が、請求項 1 ~ 104 のいずれかに記載の結合タンパク質を含む、方法。

【請求項 106】

10

20

30

40

50

( i ) 前記試験試料を前記少なくとも1つの結合タンパク質と接触させることであって、前記結合タンパク質が前記抗原またはその断片上のエピトープに結合し、第1の複合体を形成する、接触させることと、

( i i ) 前記第1の複合体を前記少なくとも1つの検出可能な標識と接触させることであって、前記検出可能な標識が、前記結合タンパク質、または前記結合タンパク質により結合されない前記抗原もしくはその断片上のエピトープに結合し、第2の複合体を形成する、接触させることと、

( i i i ) 前記第2の複合体において前記検出可能な標識により生成されたシグナルに基づいて、前記試験試料中の前記抗原またはその断片の存在を検出することであって、前記抗原またはその断片の存在が、前記検出可能な標識により生成された前記シグナルを分析することにより特定または示される、検出することと、をさらに含む、請求項105に記載の方法。

10

【請求項107】

( i ) 前記試験試料を前記少なくとも1つの結合タンパク質と接触させることであって、前記結合タンパク質が前記抗原またはその断片上のエピトープに結合し、第1の複合体を形成する、接触させることと、

( i i ) 前記第1の複合体を前記少なくとも1つの検出可能な標識と接触させることであって、前記検出可能な標識が、前記結合タンパク質に結合して第2の複合体を形成することに対して、前記抗原またはその断片と競合する、接触させることと、

( i i i ) 前記第2の複合体において前記検出可能な標識により生成されたシグナルに基づいて、前記試験試料中の前記抗原またはその断片の存在を検出することであって、前記抗原またはその断片の前記存在が、前記検出可能な標識により生成された前記シグナルを分析することにより測定される、検出することと、をさらに含む、請求項105に記載の方法。

20

【請求項108】

前記試験試料が、患者からの試料であり、前記方法が、前記患者を診断する、予後予測する、または前記患者の治療的/予防的治療の効率を評価することをさらに含む、

任意に、前記方法が、前記患者の治療的/予防的治療の有効性を評価することをさらに含む場合、前記方法が、任意に、有効性を改善させる必要に応じて前記患者の前記治療的/予防的治療を改変することをさらに含む、請求項105～107のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項109】

前記方法が、自動システムまたは半自動システムで用いるのに適している、請求項105～108のいずれか一項に記載の方法。

【請求項110】

前記方法が、前記試料中の1つを超える抗原の存在を決定する、請求項105～109のいずれか一項に記載の方法。

【請求項111】

イムノアッセイにより試験試料中の抗原またはその断片の量または濃度を決定する方法であって、

40

前記イムノアッセイが、( a ) 少なくとも1つの薬剤および少なくとも1つの検出可能な標識を利用し、かつ( b ) 前記検出可能な標識により生成されたシグナルを、前記抗原またはその断片を含む対照または較正物質と比較することを含み、

前記較正物質が、任意に、一連の較正物質の一部であり、各較正物質が、前記抗原またはその断片の濃度により前記一連の他の較正物質とは異なり、

前記少なくとも1つの薬剤が、請求項1～110のいずれかに記載の結合タンパク質を含む、方法。

【請求項112】

( i ) 前記試験試料を前記少なくとも1つの結合タンパク質と接触させることであって、前記結合タンパク質が前記抗原またはその断片上のエピトープに結合し、第1の複合体

50

を形成する、接触させることと、

( i i ) 前記第 1 の複合体を前記少なくとも 1 つの検出可能な標識と接触させることであって、前記検出可能な標識が、前記結合タンパク質により結合されない前記抗原またはその断片上のエピトープに結合して、第 2 の複合体を形成する、接触させることと、

( i i i ) 前記第 2 の複合体において前記検出可能な標識により生成されたシグナルに基づいて、前記試験試料中の前記抗原またはその断片の量または濃度を決定することであって、前記抗原またはその断片の量または濃度が、前記検出可能な標識により生成された前記シグナルを分析することにより特定される、決定することと、をさらに含む、請求項 1 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 1 3】

( i ) 前記試験試料を前記少なくとも 1 つの結合タンパク質と接触させることであって、前記結合タンパク質が前記抗原またはその断片上のエピトープに結合し、第 1 の複合体を形成する、接触させることと、

( i i ) 前記複合体を前記少なくとも 1 つの検出可能な標識と接触させることであって、前記検出可能な標識が、前記結合タンパク質に結合して第 2 の複合体を形成することに対して、前記抗原またはその断片と競合する、接触させることと、

( i i i ) 前記第 2 の複合体において前記検出可能な標識により生成されたシグナルに基づいて、前記試験試料中の前記抗原またはその断片の量または濃度を決定することであって、前記抗原またはその断片の存在が、前記検出可能な標識により生成された前記シグナルを分析することにより示される、決定することと、をさらに含む、請求項 1 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 1 4】

前記試験試料が、患者からの試料であり、前記方法が、前記患者を診断すること、予後予測すること、または前記患者の治療的 / 予防的治療の効率を評価することをさらに含む、

前記方法が、前記患者の治療的 / 予防的治療の有効性を評価することをさらに含む場合、前記方法が、任意に、有効性を改善させる必要に応じて前記患者の前記治療的 / 予防的治療を改変することをさらに含む、請求項 1 1 1 ~ 1 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 1 5】

前記方法が、自動システムまたは半自動システムで用いるのに適している、請求項 1 1 1 ~ 1 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 1 6】

前記方法が、前記試料中の 1 つを超える抗原の量または濃度を決定する、請求項 1 1 1 ~ 1 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 1 7】

抗原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であって、

( a ) 前記抗原またはその断片について前記試験試料をアッセイするための説明書と、

( b ) 請求項 1 ~ 1 1 6 のいずれか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と、を含む、キット。

【請求項 1 1 8】

配列番号 3 0 ~ 3 7、5 6、および 5 7 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む T f R に特異的に結合する、ヒト化抗体。

【請求項 1 1 9】

配列番号 1 0 4 ~ 1 0 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む H I R に特異的に結合する、ヒト化抗体。

【請求項 1 2 0】

配列番号 1 0 3 に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドをさらに含む、前記ポリペプチドが、前記結合タンパク質に結合し得るか、または前記結合タンパク質に結合し得ない、請求項 1 ~ 1 1 9 のいずれかに記載の結合タンパク質。

10

20

30

40

50

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

## 関連出願

本国際出願は、2012年12月4日に出願された米国仮特許出願第61/733,252号および2013年3月15日に出願された米国仮特許出願第61/792,163号からの優先権を主張し、それらの内容は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

## 【0002】

## 技術分野

血液脳関門(BBB)上の受容体に結合し、かつ脳に別の脳標的ドメインを運ぶことができる多価および多特異性結合タンパク質、作製方法、脳におけるインピボ分布、ならびに急性および慢性神経系疾患、脳癌、疼痛の治療におけるそれらの使用が提供される。

## 【背景技術】

## 【0003】

脳は、血液脳関門(BBB)と称される高度な血管関門系により、脳実質への血流からの抗体および他の生物学的薬物の通過を妨げる。したがって、成功したCNS薬剤開発における最も重要な要因の1つは、そのような薬物を脳に効率的に送達する能力である。脳への抗体の不十分な分布は、脳への非効率的な対流的な取り込みにより(例えば、脳の血管内皮における「密着結合」のため)、また脳の間質液の速い代謝回転により、ある程度説明され得、これは脳からのIgGの効率的な対流の排除と相関し得る。サイズ、形状、親油性、および荷電等は、脳透過性を統制する重要なパラメーターであるため、公表値は0.01%程度に低いものから0.4%程度に高いものの範囲に及ぶものの、血液中のわずかに約0.1%のタンパク質が、受動拡散を通して中枢神経系にアクセスする(Bergman et al., 1998、Shen et al., 2004、Levites et al., 2006、Garg and Balthasar, 2009、Braen et al., 2010)。野生型動物およびFcRn欠損マウスにおけるネズミモノクローナルIgG1抗体の静脈内(IV)投与後に、実質的に同一のIgGの脳/血漿の曝露比が観察された(すなわち、0.0022±0.00015対0.0021±0.00011、P=0.3347、A. Garg and J. P. Balthasar, )。中枢神経系におけるIgG輸送体の機序および速度は、大部分が未知である。

## 【0004】

様々な薬物送達アプローチが、血液脳関門(BBB)の問題に対処するために採用されている。多くのこれらのアプローチは、脳血管の上皮組織に発現された特異的受容体の輸送能力を発揮して、脳へのBBBを横断する生物学的製剤を輸送する。これらの受容体はまた、BBBを横断するナノ粒子の輸送を媒介するように利用され得る。例えば、受容体を標的とするMAbに結合されたナノ粒子は、BBBを横断するロペラミドを輸送するために使用されている。

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0005】

しかしながら、一般に、既存のBBB送達技術と関連するいくつかの欠点がある。例えば、輸送体の輸送動態および構造上の結合必要条件は、結合を促進するために、生物学的製剤への改変を必要とし得る。抗受容体MAbを用いた研究は、受容体の媒介による取り込み後、受容体へのMAbの親和性が、MAbの解離を確実にするために大いに重要であることを示している。さらに、これらの受容体は、末梢器官における広範な発現も示し、これにより、脳に特異的な送達のためのそれらの適用を限定する。最後に、同時輸送された生物学的製剤の分子量は、取り込みを確実にするために比較的低い分子量のものでなければならない。したがって、特に、血液脳関門を妨げることなく、脳に透過し得る高分子量の操作された結合タンパク質に関しては、向上したBBB送達技術が、依然として緊急

10

20

30

40

50

に必要とされる。そのような高分子量の結合タンパク質には、二特異性抗体ならびに2つ以上の抗原に結合することができる他の多価および多特異性結合タンパク質が含まれる（PCT公開第WO0177342号および米国特許第7,612,181号を参照のこと）。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本開示は、対象の脳血管の上皮組織に発現し、かつ対象のBBBを横断するBBB抗原に結合することができる高分子量（HMW）の結合タンパク質（例えば、細胞外受容体、表面タンパク質、細胞内受容体、細胞内タンパク質、糖質、標的、およびリガンド受容体）を提供することにより当該技術分野において改善する。ある態様において、本開示は、少なくとも1つの結合ドメインまたは治療的に関連する標的に対して1つ以上の第2の結合ドメイン（例えば、可変ドメイン）と組み合わせた抗原（例えば、輸送受容体）を標的とする結合部位を含むHMWの多価結合タンパク質（例えば、DVD-Ig（商標））を提供する。さらに、他の結合タンパク質とは異なり、本開示の結合タンパク質は、BBBの取り込みの際に非占有である1つ以上の結合部位またはドメイン（例えば、1つ、2つ、または3つの結合部位）を有し、そのため、脳内に存在する治療関連標的分子との結合に依然として利用可能である。加えてまたは代替として、1つ以上の結合部位は、脳への薬剤の送達を促進するために、治療剤（例えば、内因性または外因性治療的タンパク質）で事前充填され得る。したがって、本発明の結合タンパク質は、アルツハイマー病、パーキンソン病、疼痛、てんかん 統合失調症、および脳癌が含まれるが、これらに限定されない、脳およびCNS疾患の治療に適切である。特に、脳組織へのDVD-Ig（商標）の全身送達の実行可能性は、脳の免疫組織化学を含む様々なアッセイにより確立されている。

10

20

【0007】

ある実施形態において、本開示は、対象の脳血管の上皮組織に発現される抗原に特異的に結合し、かつ組成物の対象の脳への取り込みを促進する、二重可変ドメイン（DVD）の結合タンパク質を提供する。ある実施形態において、本開示は、対象の脳血管の上皮組織に発現される受容体に特異的に結合する結合タンパク質を提供する。

【0008】

ある実施形態において、対象の脳血管の上皮組織に発現される受容体は、インスリン受容体、トランスフェリン受容体、LRPファミリー受容体、メラノコルチン受容体、ニコチン性アセチルコリン受容体、VACM-1受容体、血管内皮成長因子受容体1、2、および3、グルココルチコイド受容体、イオンチャネル型グルタミン酸受容体、M3受容体、アリアル炭化水素受容体、GLUT-1、イノシトール-1,4,5-トリスリン酸（IP3）受容体、N-メチル-D-アスパラギン酸受容体、S1P1、P2Y受容体、M6PR、神経性ニコチン性アセチルコリン受容体、リポタンパク質受容体、AChR、DTr、グルタチオン輸送体、SR-B1、MYOF、TFRC、ECE1,LDLR、PVR、CDC50A、SCARF1、MRC1、HLA-DRA、RAMP2、VLDLR、STAB1、TLR9、CXCL16、NTRK1、CD74、DPP4、TMEM30A、およびRAGEからなる群から選択され、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質（LRP）ファミリー受容体には、例えば、LRP1、LRP1b、LRP2、VLDL受容体、LRP4、およびLRP8が含まれる。任意に、LRPファミリー受容体は、LRP2またはLRP8から選択され得る。ある実施形態において、受容体は、トランスフェリン受容体である。結合タンパク質は、様々な実施形態において、標的を含む抗原に結合する。例えば、標的は、トランスフェリン受容体を含む。

30

40

【0009】

一実施形態において、結合タンパク質は、3~30nMのEC<sub>50</sub>で抗原に結合する。例えば、EC<sub>50</sub>は、少なくとも約3nM~約10nM、約10nM~約15nM、約15nM~約20nM、約20nM~約25nM、または約25nM~約30nMである。

【0010】

50

ある実施形態において、DVD結合タンパク質は、DVD-Igを含む。様々な実施形態において、DVD結合タンパク質は、ハーフDVD-Ig、scDVD-Ig、fDVD-Ig、rDVD-Ig、pDVD-Ig、mDVD-Ig、およびcoDVD-Igからなる群から選択される。例えば、DVD-Igは、ヒト化される。

【0011】

様々な実施形態において、結合タンパク質は、哺乳動物対象に全身投与された場合、脳血管の上皮組織に発現した抗原に特異的に結合しない、結合タンパク質と同類の第2の結合タンパク質と比較したときに、哺乳動物対象において脳内濃度の1~10倍の増加を示す。様々な実施形態において、対象は、静脈内または局所的に投与される。

【0012】

ある実施形態において、結合タンパク質は、複数の結合タンパク質を含み、例えば、結合タンパク質は、混合物、溶液、または組成物中にある。ある実施形態において、結合タンパク質は、結合タンパク質が哺乳動物対象に投与された場合、哺乳動物対象の脳実質または神経細胞体に局在する。

【0013】

ある実施形態において、哺乳動物対象への全身投与から96時間後の哺乳動物対象の脳内の結合タンパク質の濃度が、哺乳動物対象への全身投与から24時間後の哺乳動物対象の脳内の結合タンパク質の濃度の1%超である。ある実施形態において、全身投与は、静脈内投与、皮下投与、および腹腔内投与からなる群から選択される。様々な実施形態において、結合タンパク質は、アプリケーションと共使用するために製剤化される。例えば、このアプリケーションは、注射器、点滴器、パッチ、膜、またはメッシュである。

【0014】

ある実施形態において、結合タンパク質は、哺乳動物対象の脳血管の上皮組織に発現した抗原に特異的に結合する。様々な実施形態において、哺乳動物は、マウス、ラット、アレチネズミ、ハムスター、ウサギ、類人猿、サル、ヒト、イヌ、ネコ、ラクダ、ラマ、ウシ、およびウマからなる群から選択される。

【0015】

ある実施形態において、対象の脳血管の上皮組織に発現される受容体を含む結合タンパク質により結合した抗原は、インスリン受容体、トランスフェリン受容体、LRP、メラノコルチン受容体、ニコチン性アセチルコリン受容体、VACM-1受容体、血管、IGFR、EPCR、EGFR、TNFR、レプチン受容体、M6PR、リボタンパク質受容体、NCAM、LIFR、LFR、MRP1、AChR、DTr、グルタチオン輸送体、SR-B1、MYOF、TFRC、ECE1、LDLR、PVR、CDC50A、SCARF1、MRC1、HLA-DRA、RAMP2、VLDLR、STAB1、TLR9、CXCL16、NTRK1、CD74、DPP4、内皮成長因子受容体(EGFR)、例えばEGFR1、EGFR2、およびEGFR3、グルココルチコイド受容体、イオンチャンネル型グルタミン酸受容体、M3受容体、アリアル炭化水素受容体、GLUT-1、イノシトール-1,4,5-トリスリン酸(IP3)受容体、N-メチル-D-アスパラギン酸受容体、S1P1、P2Y受容体、TMEM30A、およびRAGEからなる群から選択される。

【0016】

ある実施形態において、結合タンパク質は、組成物をさらに含み、そのため、この組成物は、結合タンパク質と併用投与される。例えば、本組成物は、薬学的に許容される担体または緩衝液を含む。様々な実施形態において、本結合タンパク質および組成物は、共有結合せず、混合されるか、または互いに接触される。

【0017】

ある実施形態において、本組成物は、本結合タンパク質に共有結合する。ある実施形態において、本組成物は、リンカーにより本結合タンパク質に共有結合する。

【0018】

ある実施形態において、本組成物は、ブデノシド、上皮成長因子、コルチコステロイド

10

20

30

40

50

、シクロスポリン、スルファサラジン、アミノサリチル酸、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 mAbs、抗IL-6もしくはIL-6受容体mAb、成長因子、エラスターゼ阻害剤、ピリジニル-イミダゾール化合物、TNF、LT、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-18、IL-23、EMAP-II、GM-CSF、FGF、もしくはPDGFの抗体もしくはアゴニスト、CD2、CD3、CD4、CD8、CD-19、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD90に対する抗体もしくはそのリガンド、メトトレキサート、シクロスポリン、FK506、ラバマイシン、ミコフェノール酸モフェチル、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、アドレナリン作動物質、IRAK、NIK、IKK、p38、MAPキナーゼ阻害剤、IL-1変換酵素阻害剤、TNF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p55 TNF受容体、可溶性p75 TNF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、TGF $\beta$ 、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される。

10

## 【0019】

20

ある実施形態において、結合タンパク質は、ポリペプチド鎖を含み、そのため、このポリペプチド鎖はVD1-(X1) $n$ -VD2-C-(X2) $n$ を含み、式中、

VD1は、第1の重鎖可変ドメインであり、

VD2は、第2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はリンカーであるが、但し、それはCH1ではないものとし、

X2は、Fc領域であり、

(X1) $n$ は、(X1) $0$ または(X1) $1$ であり、

(X2) $n$ は、(X2) $0$ または(X2) $1$ であり、

そのため、本結合タンパク質は、TfRまたはHIRに特異的に結合し、

30

(a)VD1またはVD2は、3つのCDRを含み、少なくとも1つのCDRは、配列番号76、77、78、82、83、115~117、および156~158からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、

(b)VD1およびVD2は独立して、3つのCDRを含み、少なくとも1つのCDRは、配列番号76、77、78、82、83、115~117、および156~158からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、または

(c)VD1は、3つのCDRを含み、少なくとも1つのCDRは、配列番号76、77、78、82、83、115~117、および156~158からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、VD2は、3つのCDRを含み、少なくとも1つのCDRは、配列番号76、77、78、82、83、115~117、および156~158からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

40

## 【0020】

結合タンパク質のある実施形態において、

(a)VD1またはVD2は、配列番号30、32、34、36、56、および104からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、または

(b)VD1およびVD2は独立して、配列番号30、32、34、36、56、および104からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

## 【0021】

ある実施形態において、本結合タンパク質は、ポリペプチド鎖を含み、そのため、このポリペプチド鎖はVD1-(X1) $n$ -VD2-C-(X2) $n$ を含み、式中、

50

VD1は、第1の軽鎖可変ドメインであり、  
 VD2は、第2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はリンカーであるが、但し、それはCLではないものとし、  
 X2は、Fc領域を含まず、

(X1)<sub>n</sub>は、(X1)<sub>0</sub>または(X1)<sub>1</sub>であり、  
 (X2)<sub>n</sub>は、(X2)<sub>0</sub>または(X2)<sub>1</sub>であり、

本結合タンパク質は、TfRまたはHIRに特異的に結合し、かつ、

(a) VD1またはVD2はそれぞれ、3つのCDRを含み、少なくとも1つのCDRは、配列番号79、80、81、84、85、86、118、119、120、159、160、および161からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、

(b) VD1およびVD2は独立して、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号79、80、81、84、85、86、118、119、120、159、160、および161からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、または

(c) VD1は、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号79、80、81、84、85、86、118、119、120、159、160、および161からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつVD2は、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号79、80、81、84、85、86、118、119、120、159、160、および161からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

#### 【0022】

ある実施形態において、

(a) VD1またはVD2は、配列番号31、33、35、37、57、105、106、107、および108からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、あるいは

(b) VD1およびVD2は独立して、配列番号31、33、35、37、57、105、106、107、および108からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

#### 【0023】

結合タンパク質のある実施形態において、(X1)<sub>n</sub>は、(X1)<sub>0</sub>である。

ある実施形態において、本結合タンパク質は、第1および第2のポリペプチド鎖を含み、第1のポリペプチド鎖は、第1のVD1 - (X1)<sub>n</sub> - VD2 - C - (X2)<sub>n</sub>を含み、式中、

VD1は、第1の重鎖可変ドメインであり、

VD2は、第2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1のリンカーであり、

X2は、Fc領域であり、

第2のポリペプチド鎖は、第2のVD1 - (X1)<sub>n</sub> - VD2 - C - (X2)<sub>n</sub>を含み、式中、

VD1は、第1の軽鎖可変ドメインであり、

VD2は、第2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2のリンカーであり、

X2は、Fc領域を含まず、

(X1)<sub>n</sub>は独立して、(X1)<sub>0</sub>または(X1)<sub>1</sub>であり、(X2)<sub>n</sub>は独立して、(X2)<sub>0</sub>または(X2)<sub>1</sub>であり、

第1および第2のX1のリンカーが、同じであるか、または異なっており、

第1のX1のリンカーはCH1ではなく、かつ/または第2のX1のリンカーはCLではなく、

本結合タンパク質は、TfRまたはHIRに特異的に結合し、かつ、

(a) VD1またはVD2の重鎖可変ドメインはそれぞれ、3つのCDRを含み、CDRのうちの少なくとも1つは、配列番号76、77、78、82、83、115、116

10

20

30

40

50

、 117、156、157、および158からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、

(b) VD1およびVD2の重鎖可変ドメインは独立して、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号76、77、78、82、83、115、116、117、156、157、および158からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、あるいは

(c) VD1の重鎖可変ドメインは、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号76、77、78、82、83、115、116、117、156、157、および158からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつVD2の重鎖可変ドメインは、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号76、77、78、82、83、115、116、117、156、157、および158からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、

10

かつ、

(a) VD1またはVD2の軽鎖可変ドメインは、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号79、80、81、84、85、86、118、119、120、159、160、および161からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、

(b) VD1およびVD2の軽鎖可変ドメインは独立して、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号79、80、81、84、85、86、118、119、120、159、160、および161からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、あるいは

(c) VD1の軽鎖可変ドメインは、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号79、80、81、84、85、86、118、119、120、159、160、および161からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつVD2の軽鎖可変ドメインは、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号79、80、81、84、85、86、118、119、120、159、160、および161からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

20

#### 【0024】

ある実施形態において、

(a) VD1またはVD2の重鎖可変ドメインは、配列番号30、32、34、36、56、および104からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、あるいは

(b) VD1およびVD2の重鎖可変ドメインは独立して、配列番号30、32、34、36、56、および104からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、

かつ、

(a) VD1またはVD2の軽鎖可変ドメインは、配列番号31、33、35、37、57、105、106、107、および108からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、あるいは

30

(b) VD1およびVD2の軽鎖可変ドメインは独立して、配列番号31、33、35、37、57、105、106、107、および108からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

#### 【0025】

ある実施形態において、X1は、本明細書に記載される少なくとも1つのアミノ酸配列を含むペプチドリンカーである。例えば、1つのアミノ酸配列が、配列番号1~29、178、および179からなる群の一員から選択される。

40

#### 【0026】

ある実施形態において、Fc領域は、変異体配列Fc領域を含む。ある実施形態において、Fc領域は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE、およびIgDからなる群から選択されるFc領域を含む。様々な実施形態において、Fc領域は、ヒト化配列またはヒト配列を含む。

#### 【0027】

ある実施形態において、本結合タンパク質は、2つの第1のポリペプチド鎖および2つの第2のポリペプチド鎖を含む。

#### 【0028】

ある実施形態において、第1のポリペプチド鎖のVD1および第2のポリペプチド鎖の

50

V D 1 はそれぞれ、異なる第 1 および第 2 の親抗体、またはそれらの抗原結合部分に由来する。

【 0 0 2 9 】

ある実施形態において、第 1 のポリペプチド鎖の V D 2 および第 2 のポリペプチド鎖の V D 2 はそれぞれ、異なる第 1 および第 2 の親抗体、またはそれらの抗原結合部分に由来する。ある実施形態において、第 1 および第 2 の親抗体は、抗原上の異なるエピトープに結合する。

【 0 0 3 0 】

ある実施形態において、本結合タンパク質は、ポリペプチド鎖を含み、このポリペプチド鎖は、 $V D 1 - ( X 1 ) n - V D 2 - C - ( X 2 ) n$  を含み、式中、

V D 1 は、第 1 の重鎖可変ドメインであり、

V D 2 は、第 2 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 はリンカーであるが、但し、それは C H 1 ではないものとし、

X 2 は、F c 領域であり、

( X 1 ) n は、( X 1 ) 0 または ( X 1 ) 1 であり、

( X 2 ) n は、( X 2 ) 0 または ( X 2 ) 1 であり、

本結合タンパク質は、A b e t a、B A C E、H e r - 2、R G M A、T N F、および A P P からなる群から選択される疾患標的に特異的に結合し、

( a ) V D 1 または V D 2 は、3 つの C D R を含み、それぞれ、配列番号 1 0 9、1 1 0、1 1 1、1 2 1、1 2 2、1 2 3、1 3 6、1 3 7、1 3 8、1 3 9、1 4 0、1 4 1、1 4 2、1 4 3、1 4 7、1 4 8、1 4 9、1 6 4、1 6 5、1 6 6、1 7 2、1 7 3、および 1 7 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、

( b ) V D 1 および V D 2 は独立して、3 つの C D R を含み、それぞれ、配列番号 1 0 9、1 1 0、1 1 1、1 2 1、1 2 3、1 3 6、1 3 7、1 3 8、1 3 9、1 4 0、1 4 1、1 4 2、1 4 3、1 4 7、1 4 8、1 4 9、1 6 4、1 6 5、1 6 6、1 7 2、1 7 3、および 1 7 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、あるいは

( c ) V D 1 は、3 つの C D R を含み、それぞれ、配列番号 1 0 9、1 1 0、1 1 1、1 2 1、1 2 2、1 2 3、1 3 6、1 3 7、1 3 8、1 3 9、1 4 0、1 4 1、1 4 2、1 4 3、1 4 7、1 4 8、1 4 9、1 6 4、1 6 5、1 6 6、1 7 2、1 7 3、および 1 7 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつ V D 2 は、3 つの C D R を含み、それぞれ、配列番号 1 0 9、1 1 0、1 1 1、1 2 1、1 2 3、1 3 6、1 3 7、1 3 8、1 3 9、1 4 0、1 4 1、1 4 2、1 4 3、1 4 7、1 4 8、1 4 9、1 6 4、1 6 5、1 6 6、1 7 2、1 7 3、および 1 7 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 3 1 】

ある実施形態において、

( a ) V D 1 または V D 2 は、配列番号 3 8、5 8、9 3、9 4、9 5、9 6、9 7、9 8、9 9、1 0 1、1 6 7、および 1 6 9 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、あるいは

( b ) V D 1 および V D 2 は独立して、配列番号 3 8、5 8、9 3、9 4、9 5、9 6、9 7、9 8、9 9、1 0 1、1 6 2、および 1 7 0 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 3 2 】

ある実施形態において、本結合タンパク質は、ポリペプチド鎖を含み、このポリペプチド鎖は、 $V D 1 - ( X 1 ) n - V D 2 - C - ( X 2 ) n$  を含み、式中、

V D 1 は、第 1 の軽鎖可変ドメインであり、

V D 2 は、第 2 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 はリンカーであるが、但し、それは C L ではないものとし、

X 2 は、F c 領域を含まず、

( X 1 ) n は、( X 1 ) 0 または ( X 1 ) 1 であり、

( X 2 ) n は、( X 2 ) 0 または ( X 2 ) 1 であり、

本結合タンパク質は、A b e t a、B A C E、H e r - 2、R G M A、T N F、および A P P からなる群から選択される疾患標的に特異的に結合し、かつ

( a ) V D 1 または V D 2 は、3つの C D R を含み、それぞれ、配列番号 1 1 2、1 1 3、1 1 4、1 2 4、1 2 5、1 2 6、1 2 7、1 2 8、1 2 9、1 3 0、1 3 1、1 3 2、1 3 3、1 3 4、1 3 5、1 5 0、1 5 1、1 5 2、1 6 7、1 6 8、1 6 9、1 7 5、1 7 6、および 1 7 7 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、

( b ) V D 1 および V D 2 は独立して、3つの C D R を含み、それぞれ、配列番号 1 1 2、1 1 3、1 1 4、1 2 4、1 2 5、1 2 6、1 2 7、1 2 8、1 2 9、1 3 0、1 3 1、1 3 2、1 3 3、1 3 4、1 3 5、1 5 0、1 5 1、1 5 2、1 6 7、1 6 8、1 6 9、1 7 5、1 7 6、および 1 7 7 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、あるいは

( c ) V D 1 は、3つの C D R を含み、それぞれ、配列番号 1 1 2、1 1 3、1 1 4、1 2 4、1 2 5、1 2 6、1 2 7、1 2 8、1 2 9、1 3 0、1 3 1、1 3 2、1 3 3、1 3 4、1 3 5、1 5 0、1 5 1、1 5 2、1 6 7、1 6 8、1 6 9、1 7 5、1 7 6、および 1 7 7 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつ V D 2 は、3つの、それぞれ、配列番号 1 1 2、1 1 3、1 1 4、1 2 4、1 2 5、1 2 6、1 2 7、1 2 8、1 2 9、1 3 0、1 3 1、1 3 2、1 3 3、1 3 4、1 3 5、1 5 0、1 5 1、1 5 2、1 6 7、1 6 8、1 6 9、1 7 5、1 7 6、および 1 7 7 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む C D R を含む。

#### 【 0 0 3 3 】

ある実施形態において、

( a ) V D 1 または V D 2 は、配列番号 3 9、5 9、8 7、8 8、8 9、9 0、9 1、9 2、1 0 0、1 0 2、1 6 3、および 1 7 1 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、あるいは

( b ) V D 1 および V D 2 は独立して、配列番号 3 9、5 9、8 7、8 8、8 9、9 0、9 1、9 2、1 0 0、1 0 2、1 6 3、および 1 7 1 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

#### 【 0 0 3 4 】

結合タンパク質のある実施形態において、( X 1 ) n は、( X 1 ) 0 である。

本開示は、第 1 および第 2 のポリペプチド鎖を含む結合タンパク質を提供し、第 1 のポリペプチド鎖は、第 1 の V D 1 - ( X 1 ) n - V D 2 - C - ( X 2 ) n を含み、式中、

V D 1 は、第 1 の重鎖可変ドメインであり、

V D 2 は、第 2 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 1 のリンカーであり、

X 2 は、F c 領域であり、

第 2 のポリペプチド鎖は、第 2 の V D 1 - ( X 1 ) n - V D 2 - C - ( X 2 ) n を含み、式中、

V D 1 は、第 1 の軽鎖可変ドメインであり、

V D 2 は、第 2 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 2 のリンカーであり、

X 2 は、F c 領域を含まず、

( X 1 ) n は独立して、( X 1 ) 0 または ( X 1 ) 1 であり、( X 2 ) n は独立して、( X 2 ) 0 または ( X 2 ) 1 であり、

第 1 および第 2 の X 1 のリンカーは、同じであるか、または異なっており、

第 1 の X 1 のリンカーは C H 1 ではなく、かつ / または第 2 の X 1 のリンカーは C L で

はなく、

本結合タンパク質は、A beta、BACE、Her-2、RGMA、TNF、およびAPPからなる群から選択される疾患標的に特異的に結合し、かつ

(a) VD1またはVD2の重鎖可変ドメインは、それぞれ3つのCDRを含み、少なくとも1つのCDRが、配列番号109、110、111、121、123、136、137、138、139、140、141、142、143、147、148、149、164、165、166、172、173、および174からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、

(b) VD1およびVD2の重鎖可変ドメインは独立して、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号109、110、111、121、123、136、137、138、139、140、141、142、143、147、148、149、164、165、166、172、173、および174からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、あるいは

(c) VD1の重鎖可変ドメインは、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号109、110、111、121、123、136、137、138、139、140、141、142、143、147、148、149、164、165、166、172、173、および174からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつVD2の重鎖可変ドメインが、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号109、110、111、121、123、136、137、138、139、140、141、142、143、147、148、149、164、165、166、172、173、および174からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、

かつ、

(a) VD1またはVD2の軽鎖可変ドメインは、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号112、113、114、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、150、151、および152からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、

(b) VD1およびVD2の軽鎖可変ドメインは独立して、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号112、113、114、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、150、151、152、167、168、169、175、176、および177からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、あるいは

(c) VD1の軽鎖可変ドメインは、それぞれ3つのCDRを含み、配列番号112、113、114、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、150、151、152、167、168、169、175、176、および177からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつVD2の軽鎖可変ドメインは、3つの、それぞれ、配列番号112、113、114、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、150、151、152、167、168、169、175、176、および177からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDRを含む。

#### 【0035】

ある実施形態において、

(a) VD1またはVD2の重鎖可変ドメインは、配列番号38、58、93、94、95、96、97、98、99、101、162、および170からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、あるいは

(b) VD1およびVD2の重鎖可変ドメインは独立して、配列番号38、58、93、94、95、96、97、98、99、101、162、および170からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、

かつ、

(a) VD1またはVD2の軽鎖可変ドメインは、配列番号39、59、87、88、89、90、91、92、100、102、163、および171からなる群から選択さ

10

20

30

40

50

れるアミノ酸配列を含むか、あるいは

(b) VD1およびVD2の軽鎖可変ドメインは独立して、配列番号39、59、87、88、89、90、91、92、100、102、163、および171からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0036】

結合タンパク質のある実施形態において、X1は、本明細書に記載される配列のうちのいずれか1つである。例えば、X1は、配列番号1~29、178、および179のうちのいずれか1つを含む。

【0037】

ある実施形態において、本結合タンパク質は、2つの第1のポリペプチド鎖および2つの第2のポリペプチド鎖を含む。

10

【0038】

ある実施形態において、第1および第2のポリペプチド鎖の第1の組は、請求項22に定義される通りであり、第1および第2のポリペプチド鎖の第2の組は、請求項36に定義される通りである。

【0039】

ある実施形態において、Fc領域は、変異体配列Fc領域である。ある実施形態において、Fc領域は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE、またはIgDからのFc領域である。例えば、Fc領域は、哺乳動物、例えば、ヒトに由来する。

20

【0040】

ある実施形態において、第1のポリペプチド鎖のVD1および第2のポリペプチド鎖のVD1は、それぞれ、異なる第1および第2の親抗体、またはそれらの抗原結合部分に由来する。

【0041】

ある実施形態において、第1のポリペプチド鎖のVD2および第2のポリペプチド鎖のVD2は、それぞれ、異なる第1および第2の親抗体、またはそれらの抗原結合部分に由来する。

【0042】

ある実施形態において、第1および第2の親抗体は、抗原上の異なるエピトープに結合する。

30

【0043】

ある実施形態において、本結合タンパク質は、ポリペプチド鎖を含み、このポリペプチド鎖は、VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-C-(X2)<sub>n</sub>を含み、式中、

VD1は、第1の重鎖可変ドメインであり、

VD2は、第2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はリンカーであるが、但し、それはCH1ではないものとし、

X2は、Fc領域であり、

(X1)<sub>n</sub>は、(X1)<sub>0</sub>または(X1)<sub>1</sub>であり、

(X2)<sub>n</sub>は、(X2)<sub>0</sub>または(X2)<sub>1</sub>であり、

本結合タンパク質は、TfRまたはHIR、およびAbeta、BACE、Her-2、RGMA、TNF、またはAPPに特異的に結合し、

(a) VD1またはVD2は、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号76、77、78、82、83、115~117、156~158、109、110、111、121、122、123、136、137、138、139、140、141、142、143、147、148、149、164、165、166、172、173、および174からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、

(b) VD1およびVD2は独立して、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号76、77、78、82、83、115~117、156~158、109、110、111

40

50

、 121、122、123、136、137、138、139、140、141、142、143、147、148、149、164、165、166、172、173、および174からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、

(c) VD1は、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号76、77、78、82、83、115～117、および156～158からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつVD2は、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号109、110、111、121、122、123、136、137、138、139、140、141、142、143、147、148、149、164、165、166、172、173、および174からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、あるいは

(d) VD2は、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号76、77、78、82、83、115～117、および156～158からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつVD1は、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号109、110、111、121、122、123、136、137、138、139、140、141、142、143、147、148、149、164、165、166、172、173、および174からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

#### 【0044】

ある実施形態において、

(a) VD1またはVD2は、配列番号30、32、34、36、56、104、38、58、93、94、95、96、97、98、99、101、162、および170からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、あるいは

(b) VD1は、配列番号30、32、34、36、56、または104からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつVD2は、配列番号38、58、93、94、95、96、97、98、99、101、162、および170からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

#### 【0045】

本結合タンパク質のある実施形態において、ポリペプチド鎖は、VD1 - (X1)<sub>n</sub> - VD2 - C - (X2)<sub>n</sub>を含み、式中、

VD1は、第1の軽鎖可変ドメインであり、

VD2は、第2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はリンカーであるが、但し、それはCLではないものとし、

X2は、Fc領域を含まず、

(X1)<sub>n</sub>は、(X1)<sub>0</sub>または(X1)<sub>1</sub>であり、

(X2)<sub>n</sub>は、(X2)<sub>0</sub>または(X2)<sub>1</sub>であり、

本結合タンパク質は、TfRまたはHIR、およびAbeta、BACE、Her-2、またはAPPに特異的に結合し、

(a) VD1またはVD2は、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号79、80、81、84、85、86、118、119、120、159、160、161、112、113、114、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、150、151、152、167、168、169、175、176、および177からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、

(b) VD1およびVD2は独立して、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号79、80、81、84、85、86、118、119、120、159、160、161、112、113、114、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、150、151、152、167、168、169、175、176、および177からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、

(c) VD1は、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号79、80、81、84、85、86、118、119、120、159、160、および161からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつVD2は、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号

112、113、114、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、150、151、および152、167、168、169、175、176、および177からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、あるいは

(d) VD2は、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号79、80、81、84、85、86、118、119、120、159、160、および161からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつVD1は、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号112、113、114、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、150、151、152、167、168、169、175、176、および177からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

10

## 【0046】

ある実施形態において、

(a) VD1またはVD2は、配列番号31、33、35、37、57、105、106、107、108、39、59、87、88、89、90、91、92、100、102、163、および171からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、あるいは

(b) VD1は、配列番号31、33、35、37、57、105、106、107、および108からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつVD2は、配列番号39、59、87、88、89、90、91、92、100、102、163、および171からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

20

## 【0047】

一実施形態において、(X1)<sub>n</sub>は、(X1)<sub>0</sub>である。

ある実施形態において、本結合タンパク質は、第1および第2のポリペプチド鎖を含み、第1のポリペプチド鎖は、第1のVD1 - (X1)<sub>n</sub> - VD2 - C - (X2)<sub>n</sub>を含み、式中、

VD1は、第1の重鎖可変ドメインであり、

VD2は、第2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1のリンカーであり、

X2は、Fc領域であり、

第2のポリペプチド鎖は、第2のVD1 - (X1)<sub>n</sub> - VD2 - C - (X2)<sub>n</sub>を含み、式中、

30

VD1は、第1の軽鎖可変ドメインであり、

VD2は、第2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2のリンカーであり、

X2は、Fc領域を含まず、

(X1)<sub>n</sub>は独立して、(X1)<sub>0</sub>または(X1)<sub>1</sub>であり、(X2)<sub>n</sub>は独立して、(X2)<sub>0</sub>または(X2)<sub>1</sub>であり、

第1および第2のX1のリンカーは、同じであるか、または異なっており、

第1のX1のリンカーはCH1ではなく、かつ/または第2のX1のリンカーはCLではなく、

40

本結合タンパク質は、TfRまたはHIR、およびAbeta、BACE、Her-2、RGMA、TNF、またはAPPに特異的に結合し、

(a) VD1またはVD2の重鎖可変ドメインは、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号76、77、78、82、83、115~117、156~158、109、110、111、121、122、123、136、137、138、139、140、141、142、143、147、148、149、164、165、166、172、173、および174からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、

(b) VD1およびVD2の重鎖可変ドメインは独立して、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号76、77、78、82、83、115~117、156~158、10

50

9、110、111、121、122、123、136、137、138、139、140、141、142、143、147、148、149、164、165、166、172、173、および174からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、

(c) VD1の重鎖可変ドメインは、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号76、77、78、82、83、115、116、117、156、157、158、164、165、166、172、173、および174からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつVD2の重鎖可変ドメインは、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号109、110、111、121、123、136、137、138、139、140、141、142、143、147、148、および149からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、あるいは

(d) VD2の重鎖可変ドメインは、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号76、77、78、82、83、115、116、117、156、157、158、164、165、166、172、173、および174からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつVD1の重鎖可変ドメインは、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号109、110、111、121、122、123、136、137、138、139、140、141、142、143、147、148、および149からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつ、

(a) VD1またはVD2の軽鎖可変ドメインは、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号79、80、81、84、85、86、118、119、120、159、160、161、112、113、114、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、150、151、152、167、168、169、175、176、および177からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、

(b) VD1およびVD2の軽鎖可変ドメインは独立して、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号79、80、81、84、85、86、118、119、120、159、160、161、112、113、114、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、150、151、152、167、168、169、175、176、および177からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、

(c) VD1の軽鎖可変ドメインは、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号79、80、81、84、85、86、118、119、120、159、160、161、167、168、169、175、176、および177からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつVD2の軽鎖可変ドメインは、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号112、113、114、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、150、151、および152からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、あるいは

(d) VD2の軽鎖可変ドメインは、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号79、80、81、84、85、86、118、119、120、159、160、161、167、168、169、175、176、および177からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつVD1軽鎖可変ドメインは、3つのCDRを含み、それぞれ、配列番号112、113、114、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、150、151、および152からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

#### 【0048】

ある実施形態において、

(a) VD1またはVD2の重鎖可変ドメインは、配列番号30、32、34、36、56、104、38、58、93、94、95、96、97、98、99、101、-162、および170からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、あるいは

(b) VD1の重鎖可変ドメインは、配列番号30、32、34、36、56、または104からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつVD2の重鎖可変ドメインは

10

20

30

40

50

、配列番号 38、58、93、94、95、96、97、98、99、101、162、および 170 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつ、

(a) VD1 または VD2 の軽鎖可変ドメインは、配列番号 31、33、35、37、57、105、106、107、108、39、59、87、88、89、90、91、92、100、102、163、および 171 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、あるいは

(b) VD1 の軽鎖可変ドメインは、配列番号 31、33、35、37、57、105、106、107、または 108 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつ VD2 の軽鎖可変ドメインは、配列番号 39、59、87、88、89、90、91、92、100、または 102、163、および 171 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0049】

ある実施形態において、X1 は、配列番号 1 ~ 29、178、および 179 のうちのいずれか 1 つを含む。

【0050】

ある実施形態において、本結合タンパク質は、2 つの第 1 のポリペプチド鎖および 2 つの第 2 のポリペプチド鎖を含む。

【0051】

ある実施形態において、Fc 領域は、変異体配列 Fc 領域である。ある実施形態において、Fc 領域は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE、または IgD からの Fc 領域である。

【0052】

ある実施形態において、第 1 のポリペプチド鎖の VD1 および第 2 のポリペプチド鎖の VD1 はそれぞれ、異なる第 1 および第 2 の親抗体、またはそれらの抗原結合部分に由来する。

【0053】

ある実施形態において、第 1 のポリペプチド鎖の VD2 および第 2 のポリペプチド鎖の VD2 はそれぞれ、異なる第 1 および第 2 の親抗体、またはそれらの抗原結合部分に由来する。

【0054】

ある実施形態において、第 1 および第 2 の親抗体は、異なる抗原に結合する。

本開示は、請求項 17 に記載の重ポリペプチド鎖および請求項 19 に記載の軽ポリペプチド鎖、または請求項 31 に記載の重ポリペプチド請求項および請求項 33 に記載の軽ポリペプチド鎖を含む、単一特異性結合タンパク質を提供する。

【0055】

本開示は、請求項 17 に記載の重ポリペプチド鎖および請求項 33 に記載の軽ポリペプチド鎖、請求項 31 に記載の重ポリペプチド請求項および請求項 19 に記載の軽ポリペプチド鎖、請求項 46 に記載の重ポリペプチド請求項および請求項 19、33、もしくは 48 に記載の軽ポリペプチド鎖、または請求項 17、31、もしくは 46 に記載の重ポリペプチド請求項および請求項 48 に記載の軽ポリペプチド鎖を含む、二特異性結合タンパク質を提供する。

【0056】

本明細書中の実施形態のうちのいずれか、例えば、請求項 1 において、本結合タンパク質は、Out1 - (X1)<sub>m</sub> - In1 - (X2)<sub>n</sub> を含み、式中、In1 は、対象の脳血管の上皮組織に発現された抗原と特異的に結合し、Out1 は、別の分子と特異的に結合し、X1 はリンカーであり、X2 は Fc 領域であり、m は 0 または 1 であり、n は 0 または 1 である。

【0057】

ある実施形態において、In1 は、約 5 nM ~ 0.01 nM の EC<sub>50</sub> で、対象の脳血

10

20

30

40

50

管の上皮組織に発現された抗原と特異的に結合する。ある実施形態において、In 1は、トランスフェリン受容体に特異的に結合する。ある実施形態において、In 1は、3 nM未満のEC<sub>50</sub>でトランスフェリン受容体に特異的に結合する。ある実施形態において、In 1は、配列番号56のアミノ配列を含む。ある実施形態において、X 1は、配列番号179のアミノ酸配列を含む。

【0058】

ある実施形態において、Out 1は、CGRP、TNF、RGMA、サブスタンスP、ブラジキニン、Nav 1.7、LPA、P2X3、NGF、Abeta; BACE1; IL-1; IGF1もしくは2; IL-18; IL-6; RAGE; NGF; EGFR; cMet、Her-2、およびCD-20からなる群から選択される別の分子に結合する。

10

【0059】

ある実施形態において、Out 1は、約1 nM~100 nMのEC<sub>50</sub>で、対象の脳血管の上皮組織に発現された抗原と特異的に結合する。ある実施形態において、Out 1は、トランスフェリン受容体に特異的に結合する。ある実施形態において、Out 1は、3 nM超のEC<sub>50</sub>で、トランスフェリン受容体に特異的に結合する。ある実施形態において、Out 1は、配列番号36のアミノ配列を含む。ある実施形態において、X 1は、配列番号21のアミノ酸配列を含む。

【0060】

ある実施形態において、In 1は、CGRP、TNF、RGMA、サブスタンスP、ブラジキニン、Nav 1.7、LPA、P2X3、NGF、Abeta; BACE1; IL-1; IGF1もしくは2; IL-18; IL-6; RAGE; NGF; EGFR; cMet、Her-2、およびCD-20からなる群から選択される別の分子に結合する。

20

【0061】

本明細書中の実施形態のいずれにおいて、第1の親抗体またはその抗原結合部分は、ある実施形態において、第2の親抗体またはその抗原結合部分が第2の抗原に結合する効力とは異なる効力で、第1の抗原に結合する。

【0062】

本明細書中の実施形態のいずれにおいて、第1の親抗体またはその抗原結合部分は、ある実施形態において、第2の親抗体またはその抗原結合部分が第2の抗原に結合する親和性とは異なる親和性で、第1の抗原に結合する。

30

【0063】

本明細書中の実施形態のいずれにおいて、本結合タンパク質は、ある実施形態において、表面プラズモン共鳴により測定するとき、1つ以上の標的に対して少なくとも約 $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、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 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ のオン速度定数( $K_{on}$ )を有する。

【0064】

本明細書中の実施形態のいずれにおいて、本結合タンパク質は、ある実施形態において、表面プラズモン共鳴により測定するとき、1つ以上の標的に対して多くとも約 $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 、多くとも約 $10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 、多くとも約 $10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 、または多くとも約 $10^{-6} \text{ s}^{-1}$ のオフ速度定数( $K_{off}$ )を有する。

40

【0065】

本明細書中の実施形態のいずれにおいて、本結合タンパク質は、ある実施形態において、1つ以上の標的に対して多くとも約 $10^{-7} \text{ M}$ 、多くとも約 $10^{-8} \text{ M}$ 、多くとも約 $10^{-9} \text{ M}$ 、多くとも約 $10^{-10} \text{ M}$ 、多くとも約 $10^{-11} \text{ M}$ 、多くとも約 $10^{-12} \text{ M}$ 、または多くとも約 $10^{-13} \text{ M}$ の解離定数( $K_d$ )を有する。

【0066】

重鎖、軽鎖、2つの鎖、または4つの鎖の実施形態のいずれかのさらなる実施形態には

50



## 【0073】

別の態様において、宿主細胞は、本明細書に開示される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、大腸菌である。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、哺乳動物細胞であり、CHO、COS、NS0、SP2、PER.C6、またはサッカロマイセスセレヴィシエ等の真菌細胞、またはSf9等の昆虫細胞が含まれるが、これらに限定されない。一実施形態において、例えば、異なる特異性で、2つ以上の結合タンパク質は、単一の組換え宿主細胞において産生される。例えば、抗体の混合物の発現は、米国特許第7,262,028号および同第7,429,486号でOligoclonics(商標)(Merus B.V., The Netherlands)と称される。

10

## 【0074】

本開示はまた、本明細書に開示される結合タンパク質を産生する方法も提供し、本方法は、結合タンパク質を産生するのに十分な条件下で、培養培地中で本明細書に開示される宿主細胞のうちのいずれか1つを培養することを含む。一実施形態において、この方法により産生される結合タンパク質のうちの50%~75%は、二重特異性四価結合タンパク質である。別の実施形態において、この方法により産生される結合タンパク質のうちの75%~90%は、二重特異性四価結合タンパク質である。別の実施形態において、産生される結合タンパク質のうちの90%~95%は、二重特異性四価結合タンパク質である。本開示は、哺乳動物を治療するための方法を提供し、本方法は、哺乳動物に有効量の結合タンパク質を投与することを含む。

20

## 【0075】

本開示は、本明細書に記載される結合タンパク質、例えば、特許請求の範囲のいずれかに記載の結合タンパク質、および薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物を提供する。

## 【0076】

ある実施形態において、本組成物は、少なくとも1つの追加の治療剤をさらに含む。ある実施形態において、追加の治療剤は、造影剤、細胞傷害性剤、血管形成阻害剤、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もしくはその機能的断片、メトトレキサート、シクロスポリン、ラパマイシン、FK506、検出可能な標識もしくはレポーター、TNFアンタゴニスト、抗リウマチ剤、筋肉弛緩剤、麻酔剤、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(corticosteroid)、アナボリックステロイド、エリスロポエチン、免疫化、免疫グロブリン、免疫抑制剤、成長ホルモン、ホルモン補充薬、放射性医薬、抗鬱剤、抗精神病薬、刺激剤、喘息薬、ベータアゴニスト、吸引用ステロイド、エピネフリンもしくは類似体、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。

30

## 【0077】

ある実施形態において、追加の治療剤は、ブデノシド、上皮成長因子、コルチコステロイド、シクロスポリン、スルファサラジン、アミノサリチル酸、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 mAb、抗IL-6もしくはIL-6受容体mAb、成長因子、エラストラーゼ阻害剤、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、もしくはPDGFの抗体もしくはアゴニスト、CD2、CD3、CD4、CD8、CD-19、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD90に対する抗体もしくはそのリガンド、メトトレキサート、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノール酸モフェチル、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

40

50

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、アドレナリン作動物質、I R A K、N I K、I K K、p 3 8、M A Pキナーゼ阻害剤、I L - 1 変換酵素阻害剤、T N F 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p 5 5 T N F受容体、可溶性p 7 5 T N F受容体、s I L - 1 R I、s I L - 1 R I I、s I L - 6 R、抗炎症性サイトカイン、I L - 4、I L - 1 0、I L - 1 1、I L - 1 3、T G F、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される。

【0078】

本開示は、本明細書中の実施形態のうちのいずれかにおいて、治療が達成されるように、対象に結合タンパク質を投与することにより、疾患または障害の対象を治療するのに用いる、結合タンパク質を提供する。

10

【0079】

ある実施形態において、障害は、脳障害である。様々な実施形態において、脳障害は、脳の自己免疫もしくは炎症性疾患、脳の感染性疾患、神経学的障害、神経変性障害、脳癌、または脳転移である。

【0080】

ある実施形態において、障害は、ハンチントン舞蹈病、パーキンソン病、アルツハイマー病、脳卒中、精神障害、鬱病、統合失調症、急性疼痛、および慢性疼痛からなる群から選択される。

20

【0081】

本方法のある実施形態において、対象への投与は、非経口、皮下、筋肉内、静脈内、関節内 ( i n t r a r t i c u l a r )、気管支内、腹腔内、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、腎内、網膜内、髄腔内、滑液嚢内、胸腔内、子宮内、膀胱内、ポラス、腔内、直腸、口腔内、舌下、鼻腔内、または経皮である。ある実施形態において、本方法は、障害の兆候の減少を観察することをさらに含む。

【0082】

本開示は、2つの抗原に結合することができる結合タンパク質を生成するための方法を提供し、本方法は、

30

a) 第1の抗原に結合することができる第1の親抗体またはその抗原結合部分を得るステップと、

b) 第2の抗原に結合することができる第2の親抗体またはその抗原結合部分を得るステップと、

c) 前述の特許請求の範囲のいずれかに記載のポリペプチド鎖 (複数可) をコードする構築物 (複数可) を調製するステップと、

d) 第1および第2の抗原に結合することができる結合タンパク質が生成されるように、ポリペプチド鎖 (複数可) を発現させるステップと、を含む。

【0083】

ある実施形態において、F c領域は、変異体配列F c領域である。ある実施形態において、F c領域は、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、またはI g DからのF c領域である。

40

【0084】

ある実施形態において、第1の親抗体またはその抗原結合部分が存在する場合、第2の親抗体またはその抗原結合部分が存在する場合、第2の抗原に結合する親和性および/または効力とは異なる親和性および/または効力で、第1の抗原に結合する。

【0085】

本開示はまた、イムノアッセイにより試験試料中の少なくとも1つの抗原またはその断片の存在を決定する方法も提供する。

50

## 【0086】

ある実施形態において、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、前述の特許請求の範囲のいずれかに記載の結合タンパク質を含む。

## 【0087】

ある実施形態において、本方法は、

(i) 試験試料を少なくとも1つの結合タンパク質と接触させることであって、結合タンパク質は抗原またはその断片上のエピトープに結合し、第1の複合体を形成する、接触させることと、

(ii) 第1の複合体を少なくとも1つの検出可能な標識と接触させることであって、検出可能な標識は、結合タンパク質、または結合タンパク質により結合されない抗原もしくはその断片上のエピトープに結合し、第2の複合体を形成する、接触させることと、

(iii) 第2の複合体において検出可能な標識により生成された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を検出することであって、抗原またはその断片の存在が、検出可能な標識により生成されたシグナルを分析することにより特定または示される、検出することと、をさらに含む。

10

## 【0088】

ある実施形態において、本方法は、

(i) 試験試料を少なくとも1つの結合タンパク質と接触させることであって、結合タンパク質は抗原またはその断片上のエピトープに結合し、第1の複合体を形成する、接触させることと、

(ii) 第1の複合体を少なくとも1つの検出可能な標識と接触させることであって、検出可能な標識が結合タンパク質に結合して第2の複合体を形成することに対して、抗原またはその断片と競合する、接触させることと、

(iii) 第2の複合体において検出可能な標識により生成された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を検出することであって、抗原またはその断片の存在が、検出可能な標識により生成されたシグナルを分析することにより測定される、検出することと、をさらに含む。

20

## 【0089】

ある実施形態において、試験試料は、患者からの試料であり、本方法は、患者を診断すること、予後予測すること、または患者の治療的/予防的治療の効率を評価することをさらに含み、任意に、本方法が、患者の治療的/予防的治療の効率を評価することをさらに含む場合、本方法は、任意に、有効性を改善させる必要に応じて患者の治療的/予防的治療を改変することをさらに含む。

30

## 【0090】

ある実施形態において、本方法は、自動システムまたは半自動システムで用いるのに適している。ある実施形態において、本方法は、試料中の1つを超える抗原の存在を決定する。

## 【0091】

本開示は、イムノアッセイにより試験試料中の抗原またはその断片の量または濃度を決定する方法を提供する。

40

## 【0092】

ある実施形態において、イムノアッセイは、(a) 少なくとも1つの薬剤および少なくとも1つの検出可能な標識を利用し、かつ(b) 検出可能な標識により生成されたシグナルを、抗原またはその断片を含む対照または校正物質と比較することを含み、校正物質は、任意に、一連の校正物質の一部であり、各校正物質は、抗原またはその断片の濃度により一連の他の校正物質とは異なり、少なくとも1つの薬剤は、前述の特許請求の範囲のいずれかに記載の結合タンパク質を含む。

## 【0093】

ある実施形態において、本方法は、

50

( i ) 試験試料を少なくとも1つの結合タンパク質と接触させることであって、結合タンパク質は抗原またはその断片上のエピトープに結合し、第1の複合体を形成する、接触させることと、

( i i ) 第1の複合体を少なくとも1つの検出可能な標識と接触させることであって、検出可能な標識は、結合タンパク質により結合されない抗原またはその断片上のエピトープに結合して、第2の複合体を形成する、接触させることと、

( i i i ) 第2の複合体において検出可能な標識により生成された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量または濃度を決定することであって、抗原またはその断片の量または濃度は、検出可能な標識により生成されたシグナルを分析することにより特定される、決定することと、をさらに含む。

10

【0094】

ある実施形態において、本方法は、

( i ) 試験試料を少なくとも1つの結合タンパク質と接触させることであって、結合タンパク質は抗原またはその断片上のエピトープに結合し、第1の複合体を形成する、接触させることと、

( i i ) 複合体を少なくとも1つの検出可能な標識と接触させることであって、検出可能な標識が結合タンパク質に結合して第2の複合体を形成することに対して、抗原またはその断片と競合する、接触させることと、

( i i i ) 第2の複合体において検出可能な標識により生成された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量または濃度を決定することであって、抗原またはその断片の存在は、検出可能な標識により生成されたシグナルを分析することにより示される、決定することと、をさらに含む。

20

【0095】

ある実施形態において、試験試料は、患者からの試料であり、本方法は、患者を診断すること、予後予測すること、または患者の治療的 / 予防的治療の効率を評価することをさらに含み、本方法が、患者の治療的 / 予防的治療の有効性を評価することをさらに含む場合、本方法は、任意に、有効性を改善させる必要に応じて患者の治療的 / 予防的治療を改変することをさらに含む。

【0096】

ある実施形態において、本方法は、自動システムまたは半自動システムで用いるのに適している。ある実施形態において、本方法は、試料中の1つを超える抗原の量または濃度を決定する。

30

【0097】

本開示はまた、抗原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を提供し、本キットは、

( a ) 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説明書、および

( b ) 前述の特許請求の範囲のいずれか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。

【0098】

本開示は、配列番号30～37、56、および57からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むTfRに特異的に結合するヒト化抗体を提供する。

40

【0099】

本開示は、配列番号104～108からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むHIRに特異的に結合するヒト化抗体を提供する。

【0100】

配列番号103のアミノ酸配列を含むポリペプチドをさらに含むある実施形態において、ポリペプチドは、結合タンパク質に結合し得るか、または結合タンパク質に結合し得ない。

【図面の簡単な説明】

【0101】

50

【図1】二重可変ドメイン(DVD)結合タンパク質構築体の略図である。

【図2】治療投与後に、実質および神経細胞体(IHC)に局在する脳抽出物(MSD-ECL)中のTfR mAbの上昇を示す脳組織の顕微鏡写真である。

【図3】DVD-Ig(商標)レベルの上昇がIHCにより小脳中のプルキンエ細胞および脳神経細胞体に局在したことを示す脳組織の顕微鏡写真である。

【図4】受容体媒介性トランスサイトーシスドメインDVD-Igの生成およびインビトロ/インビボでのスクリーニングのために使用される方法およびシステムのフローチャートの説明である。

【図5】例示的なDVD-Igの図/説明である。DVD免疫グロブリンには、BBB抗原(抗BBB抗原)に特異的に結合する少なくとも1つの可変ドメイン、および標的Xに特異的に結合する異なる少なくとも1つの可変ドメインが含まれる。例えば、様々な実施形態において、DVD-Igは、TNF/TfR、RGMA/TfR、Abeta/TfR、およびHer2/TfRである。

【図6】抗体またはDVD-Ig(商標)の特徴を分析するために使用されるインビボでの組織分布プロトコルの図/説明である。

【図7】24時間にて40mpkの対照ヒトIgG、48時間にて20mpkの8C11-hFcのDVD、48時間にて30mpkの非特異的なDVD対照、24時間にて20mpkのTNF-GS-AB221のDVD、または24時間にて20mpkのTfR(AB405)-SL-TNFのDVDのいずれかを投与した対象からの染色した脳組織の顕微鏡写真である。

【図8】Bennett手術から15日後、BALB-Cネズミ対象に対して1日目および5日目の最大可能効果の割合(%MPE、縦座標)、および対照IgG(1注入につき48μg/10μlの投与)、8C11-GS-AB221のDVD-Ig(抗TNFa/抗TfR、1注入につき55μg/10μlの投与)、またはモルヒネ(1注入につき10μg/10μlの投与)を用いた、髄腔内注入後(横座標)を示す棒グラフである。注入は、Bennett手術後、5日間毎日行われた。機械的異痛は、Bennettモデルにおいて、1日目および5日目に、120分間の注入投与後に評価された。

【図9】対照IgG(1注入につき48μg/10μl/投与)、8C11-GS-AB221のDVD(抗TNFa/抗TfR、1注入につき55μg/10μl/投与)、またはガバペンチンの緊急手術後投与(1注入につき10μg/10μl/投与)を用いた、ネズミ対象における、有効性の割合(縦座標)および静脈内注入後15日間の1日目および5日目(横座標)を示す棒グラフである。注入は、Bennett手術後の5日間毎日行われた。機械的異痛は、上のBennettモデルにおいて、1日目および5日目に120分間の注入投与後に評価された。

【図10】24時間にて40mpkのRGMA(AE12-1)-hFc、30mpkのヒトIgG対照、20mpkのRGMA(AE12-1)-GS-AB403のDVD-Ig、または30mpkのRGMA(AE12-1)-GS-AB403のDVD-Igのいずれかを投与した対象からの染色した脳組織の顕微鏡写真である。

【発明を実施するための形態】

【0102】

ある態様において、本発明は、脳血管の上皮組織に発現された受容体に結合することができる多価および/または多特異性結合タンパク質を提供する。このような輸送を可能にする血液脳関門(「BBB」)での構造体には、インスリン受容体、トランスフェリン受容体、LRP、メラノコルチン受容体、ニコチン性アセチルコリン受容体、VACM-1受容体、血管内皮成長因子受容体1、2、および3、グルココルチコイド受容体、イオンチャンネル型グルタミン酸受容体、M3受容体、アリアル炭化水素受容体、GLUT-1、イノシトール-1,4,5-トリスリン酸(IP3)受容体、N-メチル-D-アスパラギン酸受容体、S1P1、P2Y受容体、およびRAGEが含まれるが、これらに限定されない。さらに、戦略は、低分子量薬物、ナノ粒子、および核酸を含むCNSへの潜在的な薬物を輸送するためのシャトルとしての結合タンパク質の使用を可能にする(Colo

10

20

30

40

50

ma et al. (2000) Pharm Res. 17 (3) : 266 - 74、Boado et al. (2007) Bioconj. Chem. 18 (2) : 447 - 55)。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) (商標))、およびその薬学的組成物、ならびにそのような DVD 結合タンパク質を作製するために核酸、組換え発現ベクターおよび宿主細胞もまた、提供される。インビトロまたはインビボのいずれかで、特異的抗原を検出するために、DVD 結合タンパク質を使用する方法もまた、提供される。

#### 【0103】

ある実施形態において、多価および/または多特異性結合タンパク質は、脳血管の上皮組織および治療的標的に発現された結合受容体に結合する。これらの治療的標的には、例えば、CGRP、TNF、RGM A、サブスタンス P、ブラジキニン、Nav 1.7、LPA、P2X3、NGF、Abeta; BACE1; IL-1; IGF1もしくは2; IL-18; IL-6; RAGE; NGF; EGFR; cMet; Her-2; および CD-20 が含まれる。様々な実施形態において、結合タンパク質またはペプチドは、エピトープ、抗原、受容体、または標的に特異的に結合するアミノ酸配列を含み、そのため、結合タンパク質またはペプチドは、BBBにまたはそれを横断する輸送に対して有効である。例えば、アミノ酸配列は、結合タンパク質またはペプチドが、エピトープ、抗原、受容体、または標的に結合する少なくとも約3つのアミノ酸、少なくとも約5つのアミノ酸、少なくとも約7つのアミノ酸、少なくとも約10のアミノ酸、少なくとも約15のアミノ酸、または少なくとも20のアミノ酸を含み、そのため、BBBにまたはそれを横断する輸送に対して有効である。これらの実施形態において、エピトープ、抗原、受容体、または標的には、例えば、インスリン受容体、トランスフェリン受容体、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質 (LRP)、例えば、LRP-1 および LRP-8、メラノコルチン受容体、ニコチン性アセチルコリン受容体、VACM-1 受容体、血管内皮成長因子受容体1、2、および3、グルココルチコイド受容体、イオンチャネル型グルタミン酸受容体、M3 受容体、アリール炭化水素受容体、GLUT-1、イノシトール-1, 4, 5-トリスリン酸 (IP3) 受容体、N-メチル-D-アスパラギン酸受容体、S1P1、P2Y 受容体、および RAGE が含まれる。

10

20

#### 【0104】

他の実施形態において、結合タンパク質またはペプチドはまた、1つ以上の標的の生物学的機能を調節することもできる。この実施形態のある態様において、結合タンパク質またはペプチドは、生物学的機能を調節するように、エピトープ、抗原、受容体、または標的に特異的に結合するアミノ酸配列を含む。これらの実施形態において、エピトープ、抗原、受容体、または標的は、CGRP、TNF、RGM A、サブスタンス P、ブラジキニン、Nav 1.7、LPA、P2X3、NGF、Abeta; BACE1; IL-1; IGF1もしくは2; IL-18; IL-6; RAGE; NGF; EGFR; cMet; Her-2; および CD-20 から選択され得る。

30

#### 【0105】

様々な実施形態において、結合タンパク質またはペプチドは、Fv、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、またはヒンジ領域においてジスルフィド架橋により連結された2つの Fab 断片を含む二価断片を含む。他の実施形態において、結合タンパク質は、少なくとも1つの重可変領域 (VH) および少なくとも1つの軽可変領域 (VL) を含む。ある実施形態において、結合タンパク質またはペプチドは、VH および CH1 ドメイン、VL および VH ドメイン、または単離された相補性決定領域 (CDR) を含む。様々な実施形態において、結合タンパク質またはペプチドは、少なくとも1つの VH、少なくとも1つの VL、または少なくとも1つの超可変 (hv) 部位を含む。様々な実施形態において、結合またはペプチドは、定常領域を含む。例えば、定常領域は、哺乳動物、例えば、ヒトおよびマウスに由来する。

40

#### 【0106】

ある実施形態において、結合タンパク質は、エピトープまたは抗原に対して単一特異的

50

である。これらの実施形態において、結合タンパク質またはペプチドは、BBBにまたはそれを横断する輸送に対して有効である。他の実施形態において、2つ以上の異なる結合領域を合わせて、キメラ結合タンパク質またはペプチドを構築する。例えば、キメラタンパク質は、少なくとも2つの非同結合領域を含む。例えば、結合タンパク質は、本明細書に記載されるDVD-Ig(商標)を含む。

#### 【0107】

結合タンパク質またはペプチドは、エピトープ、抗原、受容体、または標的に特異的に結合する少なくとも1つの結合領域を含む。様々な実施形態において、結合タンパク質は、一本鎖を含む。様々な実施形態において、結合タンパク質は、複数の鎖、すなわち、少なくとも2つのポリペプチド鎖を含む。様々な実施形態において、結合タンパク質またはペプチドは、それぞれが、エピトープ、抗原、受容体、または標的の同じまたは異なる部分に結合するような、順序付けられるか、または指向される複数の結合領域を含む。例えば、少なくとも1つの結合領域は、それぞれが、同じまたは異なる可変領域/ドメイン上に存在するように、別の結合領域に近位および/または遠位に位置する。様々な実施形態において、結合領域は、例えば、VHおよびVL上で互いに平行に位置する。様々な実施形態において、結合領域は、反対側にまたは対向するように位置し、例えば、第1の結合領域が第1のVHまたは第1のVL内にあり、第2の結合領域が第2のVHまたは第2のVL内にある。様々な実施形態において、複数の結合領域は、それぞれの結合領域が互いに相互作用し得るか、またはあるいは、互いに相互作用しないように、同じ別々の/第3の部分(例えば、定常ドメインまたはリンカー)に、それぞれ結合する。

10

20

#### 【0108】

様々な実施形態において、結合タンパク質は、受容体、抗原、または標的に単一特異的に結合する能力を有し、かつBBBを横断する分子である。様々な実施形態において、結合タンパク質は、一形態(例えば、ナノ粒子、リボソーム、混合物、または溶液)で製剤化、調合、または投与され、薬剤とともに脳に送達される。例えば、結合タンパク質は、薬剤(例えば、ペプチドまたはタンパク質)を含む組成物中に投与される。様々な実施形態において、薬剤に結合するか、または付着する結合タンパク質。例えば、結合タンパク質および薬剤は、組成物内に投与される。あるいは、薬剤または結合タンパク質は、互いに、数秒間、数分間、数時間、または数日にわたって、互いに前後で投与される。

30

#### 【0109】

様々な実施形態において、結合タンパク質は、二重特異性であり、2つの異なる抗原(またはエピトープ)に結合する。例えば、結合タンパク質は、BBBを横断するために、受容体、抗原、または標的に特異的に結合し、脳内において別の標的にも特異的に結合する。様々な実施形態において、結合タンパク質は、少なくとも1つのVHおよび少なくとも1つのVLを含む。例えば、結合タンパク質は、本明細書に記載されるDVD-Ig(商標)を含む。

#### 【0110】

ある実施形態において、結合タンパク質は、少なくとも2つのVHドメインを含む。いくつかの実施形態において、一方のVHドメインは、BBBを横断するために、受容体、抗原、または標的に特異的に結合し、もう一方のVHドメインは、脳内において別の標的に特異的に結合する。他の実施形態において、結合タンパク質は、少なくとも2つのVLドメインを含む。いくつかの実施形態において、一方のVLドメインは、BBBを横断するために、受容体、抗原、または標的に特異的に結合し、もう一方のVLドメインは、脳内において別の標的に特異的に結合する。他の実施形態において、結合タンパク質は、少なくとも2つのVHおよび少なくとも2つのVLドメインを含む。いくつかの実施形態において、一方のVLドメインは、BBBを横断するために、受容体、抗原、または標的に特異的に結合し、もう一方のVHドメインは、脳内において別の標的に特異的に結合するが、一方のVHドメインは、BBBを横断するために、受容体、抗原、または標的に特異的に結合し、もう一方のVHドメインは、脳内において別の標的に特異的に結合する。

40

#### 【0111】

50

他の実施形態によれば、結合タンパク質は、2つのポリペプチドまたはアームから作製される。それぞれのアームは、1つ以上のVHおよびVLドメインを有し得る。ある実施形態において、それぞれのアームは、2つのVHおよび2つのVLドメインを有する。他の実施形態において、アームは、2つのVHまたは2つのVLドメインのみ有する。ある実施形態において、結合タンパク質は、2つのアーム/領域を含み、それぞれのアームは、同じ標的に結合するか、または少なくとも2つの異なる標的に結合する。例えば、一方のアームは、BBBを横断するために、受容体、抗原、または標的に結合し、BBBを横断する際にもう一方のアームは、脳上または脳内の異なる標的（脳標的）に結合する。例えば、あるアーム上のVHまたはVLは、BBBを横断するために受容体に結合し、もう一方のアーム上のVHまたはVLは、標的に結合する。あるいは、様々な実施形態において、本結合タンパク質は、2つの同一の抗原を結合するアームを有し、それぞれのアームは、BBBを横断するために受容体に結合するVH/VL、およびBBBを横断する際に、脳の内部に見出される標的に結合するVH/VLを含有する。例えば、それぞれのアームは、同一の特異性および同一のCDR配列を有する。様々な実施形態において、本結合タンパク質は、BBB受容体に結合するか、あるいは脳上または脳内において標的に結合するVH1またはVH2を含有するDVD-Igである。例えば、VH1またはVL1は、BBB受容体に結合し、かつ、VH2またはVL2は、脳上または脳内において標的に結合する。あるいは、VH2またはVL2が、BBB受容体に結合し、かつ、VH1またはVL2が、脳上または脳内において標的に結合する。

10

20

#### 【0112】

様々な実施形態において、結合タンパク質は、少なくとも2つの異なる標的に結合する本明細書に記載されるDVD-Ig（商標）を含む。様々な実施形態において、結合タンパク質は、BBB受容体に結合するVH1、および脳上または脳内において標的に結合するVH2を含むDVD-Igである。あるいは、結合タンパク質は、BBB受容体に結合するVH2、および脳上または脳内において標的に結合するVH1を含むDVD-Igである。様々な実施形態において、VL1は、BBB受容体に結合し、VL2は、脳上または脳内において標的に結合する。様々な実施形態において、VL2は、BBB受容体に結合し、VL1は、脳上または脳内において標的に結合する。

#### 【0113】

様々な実施形態において、結合タンパク質またはペプチドは、可変結合領域を含む。例えば、可変結合領域は、VHまたはVLを含む。様々な実施形態において、VLは、VLに対して近位または遠位に位置する。例えば、VHは、VLに隣接、結合、または接続される。様々な実施形態において、VHは、VLに直接接触するか、またはVHは、リンカーによりVLに接続される。様々な実施形態において、VHは、VLに平行であるか、または隣接される。例えば、VHは、確認または配向においてVHおよびVLを維持する共有結合によりVLから分離される。

30

#### 【0114】

様々な実施形態において、結合タンパク質またはペプチドは、VD1が第1の可変ドメインであり、VD2が第2の可変ドメイン、Cが定常ドメインであり、X1がアミノ酸またはポリペプチドを表し、X2がFc領域を表し、nが0または1であるような、構造VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-C-(X2)<sub>n</sub>を有するポリペプチド鎖を含む。一実施形態において、この結合タンパク質における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、同じ抗原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、異なる抗原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はリンカーであるが、但し、X1はCH1ではないものとする。

40

#### 【0115】

一実施形態において、本明細書に開示される結合タンパク質またはペプチドは、ポリペプチド鎖がVD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-C-(X2)<sub>n</sub>を含み、VD1が第1の重鎖可変ドメインであり、VD2が第2の重鎖可変ドメインであり、Cが重鎖定常ドメインであ

50

り、X1がリンカーであり、X2がFc領域であるような、エピトープ、受容体、または抗原に結合するポリペプチド鎖を含む。一実施形態において、X1はリンカーであるが、但し、それはCH1ではないものとする。

#### 【0116】

様々な実施形態において、本結合タンパク質またはペプチドは、薬剤（例えば、治療剤または診断剤）に結合するか、または連結する。例えば、本結合タンパク質またはペプチドは、結合領域を分離し、かつ/または結合タンパク質またはペプチドを薬剤から分離する、リンカーを含む。関連実施形態におけるリンカーは、本結合タンパク質またはペプチドの結合領域および/またはサブセットを分離する。ある実施形態において、本結合タンパク質またはペプチドは、少なくとも1つの他のアミノ酸残基またはドメインに少なくとも1つの結合領域（例えば、VHまたはVL）を共有結合で結合するリンカーを含む。様々な実施形態において、リンカーは、ペプチド、タンパク質、糖、または核酸からなる群から選択される少なくとも1つを含む。関連実施形態において、リンカーは、本明細書に記載されるアミノ酸配列またはその一部分またはその複数部分を含む。様々な実施形態において、リンカーは、結合タンパク質またはペプチドを安定化し、エピトープ、抗原、受容体、または標的に対する結合領域またはペプチドのそれぞれの結合を妨害せず、そのため、このタンパク質またはペプチドは、BBBにまたはそれを横断する輸送に対して有効である。様々な実施形態において、結合タンパク質は、立体障害を減少させるリンカーを含む。

10

#### 【0117】

様々な実施形態において、結合タンパク質ペプチドは、組換え技術により生成される。ある実施形態において、組換え結合タンパク質は、ヌクレオチド配列によりコードされるか、または結合タンパク質は、本明細書に記載される配列、例えば、本明細書の実施例および表のいずれかに示される配列と実質的に同一であるか、または相同であるアミノ酸配列を含む。例えば、組換え結合タンパク質またはペプチドは、本明細書に記載される配列のいずれかを用いて、操作し、構築される。関連実施形態において、結合タンパク質またはペプチドは、結合タンパク質またはペプチドをコードするヌクレオチド配列を担持するベクターを用いて、対象に投与される。様々な実施形態において、結合タンパク質またはペプチド（薬剤を用いるまたは用いずに）は、例えば、リボソーム、脂質/ポリカチオン（LPD）、ペプチド、ナノ粒子、金粒子、およびポリマーを用いて送達される。

20

30

#### 【0118】

様々な実施形態において、結合タンパク質またはペプチドは、本明細書に示される配列からの保存的配列修飾を有するアミノ酸配列、例えば、配列番号1~185または表1~18中の配列を含む。「保存的配列修飾」という語句は、結合タンパク質、例えば、非修飾結合タンパク質と同様の様式で機能を可能にする同じ相対位置で側鎖を示す結合タンパク質のアミノ酸配列の特徴（例えば、結合、安定性、および配向）に、特に影響を与えないか、または変えないアミノ酸修飾を指す。保存的修飾は、例えば、結合タンパク質またはペプチドのアミノ酸配列の置換、付加、または欠失を含む。組換え多量体結合タンパク質のアミノ酸配列の修飾は、当該技術分野で任意の知られている技術、例えば、部位特異的突然変異誘発またはPCRベースの突然変異生成を用いて達成される。そのような技術は、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y., 1989およびAusubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1989に記載されている。保存的アミノ酸置換は、アミノ酸残基が同様の側鎖を有するアミノ酸残基と置換する、例えば、小アミノ酸を異なる小アミノ酸と、親水性アミノ酸を異なる親水性アミノ酸と置換するような修飾である。

40

#### 【0119】

いくつかの実施形態において、多価結合タンパク質は、150超のキロダルトン（kD

50

)を有する。他の実施形態において、本結合タンパク質は、150kD~1000kDの分子量を有する。他の実施形態において、本結合タンパク質は、150kD~500kD、150kD~350kD、150kD~250kD、および150kD~750kDの分子量を有する。他の実施形態において、本結合タンパク質は、150、200、250、300、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、1200、1250、1300、1350、1400、1450、および1500kD超の分子量を有する。

#### 【0120】

ある実施形態において、DVD結合タンパク質は、脳血管の上皮組織に発現される抗原（例えば、標的および受容体）に結合し、かつ別の非占有結合部位を有し得る。この非占有結合部位は、BBBを横断して同時輸送される組成物（例えば、内因性または外因性治療的タンパク質）に特異的であり得る。したがって、この方法において「事前に負荷された」結合タンパク質は、その所望の治療活性を発揮するために、脳内の所望の標的部位に送達され得る。あるいは、結合部位は、脳血管の上皮組織に発現される受容体への結合により、非占有の続く輸送体およびBBBの取り込みを維持することができ、そのため、それは、BBBの脳側において所望の標的分子を結合することができる。

10

#### 【0121】

本開示のある態様において、脳血管の上皮組織またはその中に発現される抗原（例えば、受容体）に対して、結合タンパク質の結合親和性間の逆相関関係がある。本結合タンパク質は、脳血管の上皮組織に発現される受容体に特異的に結合するが、それらは、特異的結合に対して結合親和性範囲の低い方の末端で結合させることができる。したがって、いくつかの実施形態において、本結合タンパク質は、 $1 \times 10^{-6} \text{ M} \sim 1 \times 10^{-7}$ の解離定数で、脳血管の上皮組織に発現される受容体に結合する。他の実施形態において、解離定数は、 $1 \times 10^{-6} \text{ M} \sim 1 \times 10^{-8}$ である。いくつかの実施形態において、より低い親和性は、非ヒト哺乳動物由来の抗体のヒト化を通して達成される。

20

#### 【0122】

他の実施形態において、様々な分量の結合タンパク質が、異なる親和性で脳血管の上皮組織に発現される受容体に結合する。ある実施形態において、本結合タンパク質は、DVD結合タンパク質である。ある実施形態において、DVD結合タンパク質は、2つのアームを備える。それぞれのアームは、重鎖および軽鎖を含む。それぞれの重鎖および軽鎖は、可変ドメインを含む。したがって、DVD結合タンパク質は、4つのVH/VL対を含む8つの可変ドメインまたは4つの結合部位を含み得る。これらのドメインのそれぞれは、異なる解離定数で既定の抗原に特異的に結合し得る。いくつかの実施形態において、ドメインは、 $1 \times 10^{-6} \text{ M} \sim 1 \times 10^{-7}$ の解離定数で抗原に結合する。他の実施形態において、解離定数は、 $1 \times 10^{-6} \text{ M} \sim 1 \times 10^{-8}$ である。ある特定の実施形態において、抗原は、脳血管の上皮組織に発現される受容体、BBBを横断して同時輸送される組成物、またはBBBの脳側における標的である。

30

#### 【0123】

本開示のある実施形態において、脳血管の上皮組織に発現される受容体に特異的に結合する結合タンパク質は、対照非特異性結合タンパク質と比較して、血液脳関門（BBB）を横断する組成物の取り込みの2倍以上の増加を有し得る。他の実施形態において、脳血管の上皮組織に発現される受容体に特異的に結合する結合タンパク質は、対照非特異性結合タンパク質と比較して、BBBを横断する組成物の取り込みの3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100倍またはそれ以上の増加を有し得る。

40

#### 【0124】

ある実施形態において、組成物は、脳血管の上皮組織に発現される受容体に特異的に結合する結合タンパク質と併用投与される。この組成物は、結合タンパク質に直接結合されるか、またはそれは、非共役形態で併用投与され得る。実施形態において、組成物は、

50

結合タンパク質に結合され、ある実施形態において、組成物は、リンカーを通して結合される。リンカーは、ポリペプチドリンカーであり得る。リンカーはまた、非ポリペプチドリンカーであり得る。多くのそのようなリンカーは、当該技術分野で知られている。

#### 【0125】

ある実施形態において、結合タンパク質と併用投与される組成物は、以下のブデノシド、上皮成長因子、コルチコステロイド、シクロスポリン、スルファサラジン、アミノサリチル酸、6-メルカプトプリン、アザチオプリン、メトロニダゾール、リボ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 mAb、抗IL-6もしくはIL-6受容体mAb、成長因子、エラスターゼ阻害剤、ピリジニル-イミダゾール化合物、TNF、LT、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-18、IL-23、EMAP-II、GM-CSF、FGF、もしくはPDGFの抗体もしくはアゴニスト、CD2、CD3、CD4、CD8、CD-19、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD90に対する抗体もしくはそのリガンド、メトトレキサート、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノール酸モフェチル、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、アドレナリン作動物質、IRAK、NIK、IKK、p38、MAPキナーゼ阻害剤、IL-1変換酵素阻害剤、TNF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p55 TNF受容体、可溶性p75 TNF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、およびTGFのうちの一つ以上から選択され得る。

10

20

30

40

#### 【0126】

本明細書で特に定義されない限り、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。何らかの潜在的な曖昧性がある場合には、本明細書に提供される定義が、あらゆる辞書または付帯的な定義よりも優先される。文脈によって特に必要とされない限り、単数形用語には複数形が含まれ、複数形用語には単数形が含まれるものとする。「または」の使用は、特に指示のない限り、「および/または」を意味する。「含む(including)」という用語、ならびに「含む(includes)」および「含む(included)」等の他の形態の使用は、限定されない。

#### 【0127】

一般に、本明細書に記載される細胞および組織培養物、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝子学、タンパク質および核酸の化学、ならびにハイブリダイゼーションに関連して使用する学名は、当該技術分野でよく知られており、かつ一般的に使用されるものである。本明細書に提供される方法および技術は、一般に、当該技術分野でよく知られている従来の方法に従って、本出願を通じて引用され考察される様々な一般およびより具体的な参考文献に記載されるように、行われる。酵素反応および精製技法は、当該技術分野で一般的に行われるように、または本明細書に記載されるように、製造業者の仕様書に従って行われる。本明細書に記載される、分析化学、合成有機化学、ならびに医学および薬学的化学と関連して使用される命名法、ならびにそれらの検査法および技術は、当該技術分野でよく知られており、一般に使用される。化学合成、化学分析、薬学的調製、製剤化、および送達、ならびに患者の治療に対して標準的技術が使用される。

40

#### 【0128】

本開示がより容易に理解され得るように、選択した用語が下記に定義される。

「抗体」という用語は、一般に、Ig分子のエピトープ結合特性を保持する、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、またはその機能的な断片、突然変異体、変異体、もしくは誘導体からなる、免疫グロブリン(Ig)分子を指す。その

50

ような断片、突然変異体、変異体、もしくは誘導体抗体形式が本技術分野で知られている。完全長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）からなる。CHは、3つのドメイン、CH1、CH2、およびCH3からなる。各軽鎖は、軽鎖可変領域（VL）および軽鎖定常領域（CL）からなる。CLは、単一のCLドメインからなる。VHおよびVLは、フレームワーク領域（FR）と呼ばれるより保存されている領域に散在する、相補性決定領域（CDR）と呼ばれる超可変性の領域にさらに細分化することができる。一般に、VHおよびVLのそれぞれは、3つのCDRおよび4つのFRからなり、アミノ末端からカルボキシ末端に、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、およびFR4の順で配列される。免疫グロブリン分子は、任意のタイプ（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）、またはサブクラスからなり得る。

10

**【0129】**

「二特異性抗体」という用語は、その2つの結合アームのうちの一つ（HC/LCの1対）上の1つの抗原（またはエピトープ）に結合し、かつその第2の結合アーム（HC/LCの異なる対）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。二特異性抗体は、2つの別々の抗原結合アーム（特異性およびCDR配列の両方において）を有し、それが結合するそれぞれの抗原に対して一価である。二特異性抗体には、クアドロマ技術（Milstein and Cuello (1983) Nature 305 (5934) : 537 - 40)、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) Nature 314 (6012) : 628 - 31）により、またはノブイントゥホール（knob - into - hole）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）により生成されるものが含まれる。

20

**【0130】**

「親和性成熟された」抗体は、変化（複数可）を有しない親抗体と比較して、抗原に対する抗体の親和性の改善をもたらす、その1つ以上のCDR中に1つ以上の変化を有する抗体である。例示的な親和性成熟された抗体は、標的抗原に対してナノモルまたはピコモルの親和性を有する。親和性成熟された抗体は、当該技術分野で知られている手順により產生される。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ランダムな突然変異導入は、Barbas et al. (1994) Proc. Nat. 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により記載されており、活性増強アミノ酸残基による選択的突然変異導入位置、接触または超変異位置での突然変異は、米国特許第6,914,128号に記載される通りである。

30

40

**【0131】**

「CDR移植された抗体」という用語は、VHおよび/またはVLのCDR領域のうちの一つ以上の配列が別の抗体のCDR配列で置換されている重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、異なる種、例えば、ネズミCDRのうちの一つ以上がヒトCDR配列で置換されているマウス重および軽鎖可変領域を有する抗体由来であり得る。

**【0132】**

「ヒト化抗体」という用語は、非ヒト種由来の、より「ヒト様」になる、すなわち、ヒト生殖細胞系配列により類似するように改変された抗体を指す。ヒト化抗体の一つのタ

50

イブは、非ヒトCDR配列がヒトVHおよびVL配列に導入されて、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と実質的に（例えば、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）を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とを含む抗体またはその変異体、誘導體、類似体、または断片である。ヒト化抗体は、CDR領域のすべてまたは実質的には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は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、および典型的には2つの可変ドメイン（Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、FabC、Fv）の実質的には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領域も含み得る。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分も含む。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。

#### 【0133】

「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、その結合アーム（複数可）（例えば、HC/LCの一对）のそれぞれのポリペプチド鎖において2つの可変ドメインを有する結合タンパク質を指し（PCT公開第WO 02/02773号を参照）、これらのそれぞれが、抗原に結合することができる。一実施形態において、各可変ドメインは、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、各可変ドメインは、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、同一の特異性および同一のCDR配列を有する2つの同一の抗原結合アームを有し、それが結合する各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よく、すなわち、1つの抗原に結合することができるか、または多特異性であってよく、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）と称される。ある実施形態において、DVD結合タンパク質は、BBB抗原に結合する少なくとも1つの領域を含む。他の実施形態において、DVD-Igは、受容体、抗原、標的、脳の細胞もしくは組織に結合する少なくとも1つの他の領域、または受容体、抗原、標的、脳の細胞もしくは組織をさらに含む。一実施形態において、4本鎖DVD結合タンパク質のそれぞれ半分は、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抗原結合に關する全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。

#### 【0134】

「一本鎖二重可変ドメイン免疫グロブリン」または「scDVD-Ig（商標）」または「scFvDVDIg（商標）」という用語は、抗体一本鎖Fv断片と類似するDVD分子の抗原結合断片を指す。scDVD-Ig（商標）は、米国特許出願第61/746,659号に記載されており、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。scDVD-Ig（商標）は、通常、式VH1-(X1)<sub>n</sub>-VH2-X2-VL1-(X3)<sub>n</sub>-VL2からなり、式中、VH1は第1の抗体重鎖可変ドメインであり、X1はリンカーであるが、但し、それは定常ドメインではないものとし、VH2は第2の抗体重鎖可変ドメインであり、X2はリンカーであり、VL1は第1の抗体軽鎖可変ドメインであり、X3はリンカーであるが、但し、それは定常ドメインではないものとし、VL2は第2の抗体軽鎖可変ドメインであり、nは0または1であり、VH1およびVL1、ならびにVH2およびVL2は、それぞれ、合わせて、2つの機能的抗原結合部位を形成する。

## 【0135】

「DVD - Fab」または「fDVD - Ig (商標)」という用語は、抗体 Fab 断片に類似する DVD - Ig (商標) 分子の抗原結合断片を指す。fDVD - Ig (商標) は、米国特許出願第 61 / 746 , 663 号に記載されており、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。ある実施形態において、fDVD - Ig (商標) は、一般式 VH1 - (X1) n - VH2 - C - (X2) n を有し、式中、VH1 は第 1 の重鎖可変ドメインであり、X1 はリンカーであるが、但し、それは定常ドメインではないものとし、VH2 は第 2 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、X2 は細胞表面タンパク質であり、n は 0 または 1 であり、VH1、VH2、および / または X1 のアミノ酸配列は独立して、ライブラリー内で変化する、第 1 のポリペプチド鎖を含む。ある実施形態において、fDVD - Ig (商標) はまた、一般式 VL1 - (Y1) n - VL2 - C を有し、式中、VL1 は第 1 の軽鎖可変ドメインであり、Y1 はリンカーであるが、但し、それは定常ドメインではないものとし、VL2 は第 2 の軽鎖可変ドメインであり、C は軽鎖定常ドメイン、n は 0 または 1 である、第 2 のポリペプチド鎖も含み、本結合タンパク質の第 1 のポリペプチド鎖の VH1 および VH2 ならびに第 2 のポリペプチド鎖の VL1 および VL2 を合わせて、2 つの機能的抗原結合部位を形成する。ある実施形態において、第 1 および第 2 のポリペプチド鎖を合わせて、fDVD - Ig (商標) を形成する。

10

## 【0136】

「受容体 DVD - Ig (商標)」構築物、または「rDVD - Ig (商標)」という用語は、少なくとも 1 つの受容体様結合ドメインを含む DVD - Ig (商標) 構築物を指す。rDVD - Ig (商標) は、米国特許出願第 61 / 746 , 616 号に記載されており、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。rDVD - Ig (商標) 分子の可変ドメインは、1 つの免疫グロブリン可変ドメインおよび 1 つの非免疫グロブリン可変ドメイン、例えば、受容体のリガンド結合ドメイン、または酵素の活性ドメインを含み得る。rDVD - Ig (商標) 分子はまた、2 つ以上の非 Ig ドメイン (PCT 公開第 WO 02 / 02773 号を参照) も含み得る。rDVD - Ig (商標) では、可変ドメインのうちの少なくとも 1 つは、受容体 (RD) のリガンド結合ドメインを含む。

20

## 【0137】

「受容体ドメイン」(RD)、または受容体結合ドメインは、当業者により一般に理解されるように、1 つ以上の受容体リガンドまたはシグナリング分子 (例えば、毒素、ホルモン、神経伝達物質、サイトカイン、成長因子、または細胞認識分子) に結合するように機能する、細胞表面受容体、細胞質受容体、核内受容体、または可溶性受容体の一部を指す。

30

## 【0138】

多特異性および多価 Ig G 様分子または「pDVD - Ig (商標)」という用語は、2 つ以上のタンパク質 (例えば、抗原) に結合することができる。pDVD - Ig (商標) は、米国特許出願第 61 / 746 , 617 号に記載されており、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。ある実施形態において、特異的に改変し、いくつかの概念に適用することにより生成される pDVD - Ig (商標) が、開示される。これらの概念としては、(1) CH3 の「ノブイントゥーホール」設計を用いて Fc ヘテロ二量体を形成すること、(2) CH1 / CL の交差を用いることにより軽鎖を欠く対合を減らすことと、(3) タンパク質産生段階で、「還元酸化」アプローチを用いて 2 つの別々のハーフ Ig G 分子を対合することと、が含まれるが、これらに限定されない。

40

## 【0139】

ある実施形態において、本発明の結合タンパク質は、DVD - Ig (商標) 由来の「ハーフ DVD - Ig」(商標) である。ハーフ DVD - Ig (商標) は、好ましくは、抗原クラスターリングおよび望ましくない活性をもたらし得る天然に存在する抗体で観察された架橋結合を促進しない。2012 年 8 月 9 日に公開された米国特許公開第 20120201746 号および 2012 年 6 月 28 日に公開された国際公開第 WO / 2012 / 088302 号を参照されたく、これらのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込

50

まれる。

【0140】

一実施形態において、pDVD-Ig(商標)の構築物は、2等分の異なるDVD-Ig(商標)分子、またはハーフDVD-Ig(商標)、およびハーフIgG分子を合わせることにより作製され得る。pDVD-Ig(商標)の構築物は、4つの独特の構築物から発現して、重鎖CH3の「ノブイントゥーホール」設計の使用により、一価の多特異性分子を作製し得る。別の実施形態において、pDVD-Ig(商標)の構築物は、2つの別個の軽鎖を含有し得、それらのそれぞれの重鎖との軽鎖の適切な対合を確実にするために、1つのアームのFc上で構造的改変を利用し得る。一態様において、重鎖定常領域CH1は、1つのFab上で軽鎖定常領域hckと交換され得る。別の態様において、全軽鎖可変領域とhckは、重鎖可変領域とCH1により交換され得る。これらの独特の構築条件に適合するpDVD-Ig(商標)の構築ベクターもまた、開示される。

10

【0141】

いくつかの実施形態において、pDVD-Ig(商標)は、4つのポリペプチド鎖、すなわち、第1、第2、第3、および第4のポリペプチド鎖を含む。一態様において、第1のポリペプチド鎖は、VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-CH-(X2)<sub>n</sub>を含み得、式中、VD1は第1の重鎖可変ドメインであり、VD2は第2の重鎖可変ドメインであり、CHは重鎖定常ドメインであり、X1はリンカーであるが、但し、それは定常ドメインではないものとし、X2はFc領域である。別の態様において、第2のポリペプチド鎖は、VD1-(X1)<sub>n</sub>-VD2-CL-(X2)<sub>n</sub>を含み得、式中、VD1は第1の軽鎖可変ドメインであり、VD2は第2の軽鎖可変ドメインであり、CLは軽鎖定常ドメインであり、X1はリンカーであるが、但し、それは定常ドメインではないものとし、X2はFc領域を含まない。別の態様において、第3のポリペプチド鎖は、VD3-(X3)<sub>n</sub>-VD4-CL-(X4)<sub>n</sub>を含み得、式中、VD3は第3の重鎖可変ドメインであり、VD4は第4の重鎖可変ドメインであり、CLは軽鎖定常ドメインであり、X3はリンカーであるが、但し、それは定常ドメインではないものとし、X4はFc領域である。別の態様において、第4のポリペプチド鎖は、VD3-(X3)<sub>n</sub>-VD4-CH-(X4)<sub>n</sub>を含み得、式中、VD3は第3の軽鎖可変ドメインであり、VD4は第4の軽鎖可変ドメインであり、CHは重鎖定常ドメインであり、X3はリンカーであるが、但し、それは定常ドメインではないものとし、X4はFc領域を含まない。別の態様において、nは0または1であり、第1および第2のポリペプチド鎖上のVD1ドメインは、抗原Aに対する1つの機能的結合部位を形成し、第1および第2のポリペプチド鎖上のVD2ドメインは、抗原Bに対する1つの機能的結合部位を形成し、第3および第4のポリペプチド鎖上のVD3ドメインは、抗原Cに対する1つの機能的結合部位を形成し、第3および第4のポリペプチド鎖上のVD4ドメインは、抗原Dに対する1つの機能的結合部位を形成する。一実施形態において、抗原A、B、C、およびDは、同じ抗原であり得るか、またはそれらはそれぞれ、異なる抗原であり得る。別の実施形態において、抗原AおよびBは、同じ抗原であり、抗原CおよびDは、同じ抗原である。

20

30

【0142】

本明細書に使用される「モノボディDVD-Ig(商標)」または「mDVD-Ig(商標)」は、一方の結合アームが非機能にされている結合分子の種を指す。mDVD-Ig(商標)は、米国特許出願第61/746,615号に記載されており、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。一態様において、mDVD-Ig(商標)は、リガンドに結合することができる一方の機能的アームのみを有する。別の態様において、もう一方の機能的アームは、異なるリガンドに結合するために1つ以上の結合ドメインを有し得る。リガンドは、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、アダプター、多糖、糖分子、糖質、脂質、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、合成分子、無機分子、有機分子、およびこれらの組み合わせであり得る。

40

【0143】

一実施形態において、mDVD-Ig(商標)は、4つのポリペプチド鎖を含み、4つ

50

のうちの2つのポリペプチド鎖は、VDH - (X1)<sub>n</sub> - C - (X2)<sub>n</sub>を含む。一態様において、VDHは重鎖可変ドメインであり、X1はリンカーであるが、但し、それはCH1ではないものとし、Cは重鎖定常ドメインであり、X2はFc領域であり、nは0または1である。4つのうちのその他の2つのポリペプチド鎖は、VDL - (X3)<sub>n</sub> - C - (X4)<sub>n</sub>を含み、式中、VDLは軽鎖可変ドメインであり、X3はリンカーであるが、但し、それはCH1ではないものとし、Cは軽鎖定常ドメインであり、X4はFc領域を含まず、nは0または1である。別の態様において、4つのうちの少なくとも1つのポリペプチド鎖は、可変ドメイン中に位置する突然変異体を含み、この突然変異体は、特異的抗原と突然変異体結合ドメインとの間の標的結合を阻害する。

【0144】

式VDH - (X1)<sub>n</sub> - C - (X2)<sub>n</sub>を有する2つのポリペプチド鎖のFc領域は、それぞれ、突然変異体を含み、2つのFc領域上の突然変異体は、2つのポリペプチド鎖のヘテロ二量化を増強する。一態様において、ノブイントゥーホールの突然変異体は、これらのFc領域に導入されて、Fc領域のヘテロ二量化を達成し得る。Atwell et al., J. Mol. Biol., 1997, 270: 26-35を参照のこと。

【0145】

本明細書に使用される「交差DVD - Ig (商標)」または「coDVD - Ig (商標)」は、可変ドメインの交差を用いて、いくつかのDVD - Ig (商標)分子の内部抗原結合ドメインにおける親和性喪失の問題を解決するDVD - Ig (商標)を指す。coDVD - Ig (商標)は、米国特許出願第61/746, 619号に記載されており、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。ある特定の実施形態において、交差二重可変ドメイン(DVD)のIgは、二重可変ドメイン(DVD)のIgまたはIg様タンパク質の軽鎖および重鎖可変ドメインを交差することにより生成される。別の態様において、可変ドメインに連結するリンカーの長さおよび配列は、それぞれの形式および抗体配列/構造(フレームワーク)に対して最適化されて、所望の特性を達成し得る。開示された概念および方法論はまた、2つを超える抗原結合ドメインを有するIgまたはIg様タンパク質まで拡張され得る。

【0146】

「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。

【0147】

「生物学的活性」という用語は、(インビボで見出されるような天然に存在する、組換え手段により提供される、または可能にされる)分子の任意の1つ以上の生物学的特性を指す。生物学的特性には、受容体に結合すること、細胞増殖を誘導すること、細胞増殖を阻害すること、他のサイトカインを誘導すること、アポトーシスを誘導すること、および酵素活性が含まれるが、これらに限定されない。

【0148】

「中和」という用語は、結合タンパク質が抗原に特異的に結合する場合、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、抗原の生物学的活性を少なくとも約20%、40%、60%、80%、85%またはそれ以上低下させる。

【0149】

「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。

「特異的に結合する」という用語は、結合タンパク質またはその断片が、生理学的条件下で、比較的安定している抗原を有する複合体を形成することを意味する。特異性結合は、少なくとも約 $1 \times 10^{-6}$  Mまたはそれ以下の解離定数により特徴付けられ得る。他の実施形態において、解離定数は、少なくとも約 $1 \times 10^{-7}$  M、 $1 \times 10^{-8}$  M、または $1 \times 10^{-9}$  Mである。2つの分子が特異的に結合するかどうかを判定するための方法は、当該技術分野でよく知られており、例えば、平衡透析、表面プラズモン共鳴等が含まれ

10

20

30

40

50

る。

【0150】

「哺乳動物」という用語は、齧歯類、霊長類、イヌ、ネコ、ラクダ科動物、および有蹄類を含む、哺乳類の一員であるあらゆる種を指す。「齧歯類」という用語は、マウス、ラット、ハムスター、アレチネズミ、およびウサギを含むネズミ目の一員であるあらゆる種を指す。「霊長類」という用語は、サル、類人猿、およびヒトを含むサル目の一員であるあらゆる種を指す。「ラクダ科動物」とは、ラクダおよびラマを含むラクダ科の一員であるあらゆる種を指す。「有蹄類」という用語は、ウシ、ウマ、およびラクダ科動物を含む有蹄上目の一員であるあらゆる種を指す。

【0151】

「親和性」は、結合タンパク質と抗原との間の相互作用の強度であり、結合タンパク質のCDRの配列、ならびに抗原の性質、例えば、そのサイズ、形状、および/または電荷により決定される。結合タンパク質は、負の副作用を最小限に抑えながら、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、当業者に知られている方法を用いて測定することができる（米国特許出願第20090311253号）。

【0152】

「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指し、治療有効性の測定である。効力は、当業者に知られている方法を用いて測定することができる（米国特許出願第20090311253号）。

【0153】

「交差反応性」という用語は、それが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（複数可）/抗原（複数可）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）抗体標識の知られている発現に適切な組織染色。（2）同じ臓器からのヒトとtox種（マウスおよびカニクイザル）の組織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および他の方法は、当業者に知られている（米国特許出願第20090311253号）。

【0154】

「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指す。結合タンパク質は、抗原のいくつかのクラスを標的とし、複数の作用機序を介して所望の治療結果を達成し得る。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標的とし得る。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、または中和させ得る。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促進し得るか、または細胞に結合した時に細胞毒性をもたらす場合がある。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、多価形式に組み込むことができる。生物学的機能を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（米国特許出願第20090311253号）。

【0155】

「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（米国特許出願第20090311253号）。

【0156】

「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指す。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応じて異なり、したがって、溶解性は、正確に折り置かれたタンパク質の産生と関連し得る。当業者は、日常的なHPLC技術および当業者に知られている方法を用いて、結合タ

10

20

30

40

50

ンパク質の溶解性の増加または減少を検出することができる（米国特許出願第20090311253号）。

【0157】

結合タンパク質は、様々な宿主細胞を用いて生成され得るか、またはインビトロで産生され得、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としては、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が、これらに限定されない。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、当業者に知られている（米国特許出願第20090311253号）。

【0158】

「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、そのようなリスク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。抗体および結合タンパク質の免疫原性を減少させる方法は、当業者に知られている（米国特許出願第20090311253号）。

【0159】

「標的」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等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メンバーは、「検出可能に標識されている」と称される。したがって、「標識された結合タンパク質」という用語は、結合タンパク質の特定を与える標識が組み込まれたタンパク質を指す。一実施形態において、標識は、可視または計測手段により検出可能なシグナルを生成することができる検出可能なマーカーであり、例えば、放射性標識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法により検出され得る、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）により検出することができるピオチニル部分のポリペプチドへの付着である。ポリペプチドの標的の例には、以下の放射性同位体または放射性核種（例えば、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、または $^{153}\text{Sm}$ ）；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；ピオチニル基；二次レポーターにより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等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的の代表的な例には、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。

【0160】

「連結体」という用語は、第2の化学部分、例えば、治療剤または細胞傷害性剤等に化学的に連結された抗体等の結合タンパク質を指す。「薬剤」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、または生物学的材料から作製された抽出物を含む。一実施形態において、治療剤または細胞傷害性剤には、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、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、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、ならびにその類似体または相同体が含まれるが、これらに限定されない。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

10

20

30

40

50

体であってよい。

【0161】

「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指す。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等の他の形態とは異なる。結晶は、原子、イオン、分子（例えば、抗体等のタンパク質）、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關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)を参照のこと。

10

【0162】

「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核酸分子を指す。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ループを指す。ベクターの別の種類は、ウイルスベクターであり、さらなる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。あるベクターは、それらが導入される宿主細胞中で自己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、宿主細胞中に導入されて、宿主細胞のゲノムに組み込まれることが可能であり、それにより、宿主ゲノムと共に複製される。あるベクターは、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。そ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。プラスミドはベクターの最も一般的に使用される形態であるので、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）等も含まれる。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、抗体およびカッパ定常領域を有する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-hCl V2は、抗体およびラム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パ定常領域を用いて構築され、ラムダ-カッパハイブリッド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、カッパ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、カッパ-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, 235 AA)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。

20

30

40

【0163】

「組換え宿主細胞」または「宿主細胞」という用語は、外来のDNAが導入されている細胞を指す。そのような用語は、特定の対象細胞だけでなく、そのような細胞の子孫も指す。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修飾が生じ得るため、そ

50

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、本明細書で使用される「宿主細胞」という用語の範囲内になお含まれる。一実施形態において、宿主細胞には、原核細胞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、原核細胞株大腸菌；哺乳動物細胞株CHO、HEK293、COS、NS0、SP2、およびPER.C6；昆虫細胞株Sf9；ならびに真菌細胞サッカロミセスセレビシアエが含まれるが、これらに限定されない。

【0164】

「トランスフェクション」という用語は、例えば、エレクトリポレーション、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等の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する。

10

【0165】

「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、天然源由来または組換え細胞培養物由来のタンパク質ならびに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。

【0166】

「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。そのような物質には、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。

20

【0167】

「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、検出もしくはコンジュゲート抗体、対照、校正物質、一連の校正物質、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）、停止液等であり得る。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）抗体に結合することにより、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、溶液中にあり得るか、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得る。

30

【0168】

「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指す。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指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、アッセイの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。

【0169】

「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指し、所定のカットオフは、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/改善等）にすでに連結されているか、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、使用される抗体等）に応じて異なり得ることがよく知られている。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、アッセイ間で異なり得るが、（もしあれば）本明細書に記載される相関は一般に適用可能であるはずである。

40

【0170】

50

本明細書に記載され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はない。とりわけ、分析物（例えば、目的とするポリペプチド）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。

#### 【0171】

本明細書に記載され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、抗体または分析物等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、複数等、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できる。「感受性パネル」を含むように、複数の校正物質（すなわち、1つを超える校正物質または様々な量の校正物質（複数可））を組み合わせ使用することができる。

#### 【0172】

「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、抗原および抗体特異的結合に加えて、他の特異的結合対は、ピ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等を含み得る。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、単離された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、および変異体（変異体の断片を含む）が含まれる。

#### 【0173】

「Fc領域」という用語は、無傷の抗体のパパイン消化により生成され得る、免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義する。Fc領域は、天然配列Fc領域または変異体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、および任意にCH4ドメインを含む。抗体エフェクター機能を変化させるために、Fc部分中のアミノ酸残基を置換することが、当該技術分野で知られている（例えば、米国特許第5,648,260号および同第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。

#### 【0174】

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、または多特異的形式により行うことができる。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')<sub>2</sub>断片、ヒンジ領域でジスルフィド架橋により連結された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、な

10

20

30

40

50

らびに (v i) 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、別々の遺伝子により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、一価分子を形成する単一のタンパク質鎖として、これらを作製することを可能にする合成リンカーにより、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。そのような一本鎖抗体もまた、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。ダイアボディ等の一本鎖抗体の他の形態もまた、包含される。さらに、一本鎖抗体はまた、相補的軽鎖ポリペプチドと一緒に、一对の抗原結合領域を形成する一对の直列 Fv セグメント (VH - CH1 - VH - CH1) を含む「直鎖抗体」も含む。

【0175】

「多価結合タンパク質」という用語は、2 つ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 つ以上の抗原結合部位を有するように操作され、天然に存在する抗体ではない。「多特異性結合タンパク質」という用語は、2 つ以上の関連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、四価または多価結合タンパク質である。

【0176】

「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) を連結するために使用されるペプチド結合により接続される 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。そのようなリンカーポリペプチドは、当該技術分野でよく知られている (例えば、Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444 - 6448、Poljak et al. (1994) Structure 2: 1121 - 1123)。

【0177】

「Kab at 付番」、「Kab at 定義」、および「Kab at 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。当該技術分野で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および軽鎖可変領域中の他のアミノ酸残基よりもさらに可変 (すなわち、超可変) であるアミノ酸残基に付番するシステムを指す (Kab at et al. (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190: 382 - 391、および Kab at 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、CDR 1 に対するアミノ酸位置 31 から 35、CDR 2 に対するアミノ酸位置 50 から 65、および CDR 3 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、CDR 1 に対するアミノ酸位置 24 から 34、CDR 2 に対するアミノ酸位置 50 から 56、および CDR 3 に対するアミノ酸位置 89 から 97 にわたる。

【0178】

「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。重鎖および軽鎖の各可変領域中には 3 つの CDR が存在し、これらは、各重および軽鎖可変領域に対して、CDR 1、CDR 2、および CDR 3 と表記される。「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 の群を指す。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。Kab at により記載された系 (Kab at 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、Kab at 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、Chot

10

20

30

40

50

hia et al. (1989) Nature 342: 877 - 883) は、Kab  
at CDR内のある亜部分が、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)と表記された。これらの領域は、Chothia CDR  
と称される場合があり、Kab at CDRと重複する境界を有する。Kab at C  
DRと重複するCDRを定義する他の境界は、Padlan(1995)FASEB J  
. 9: 133 - 139およびMacCallum(1996)J. Mol. Biol. 2  
62(5): 732 - 45)により記載されている。さらに他の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、Kab at 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CD  
Rを使用し得るが、ある実施形態は、Kab atまたはChothiaにより定義された  
CDRを使用する。

#### 【0179】

「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/または他の決定基により  
結合される抗原の領域を意味する。ある実施形態において、エピトープ決定基は、アミノ  
酸、糖側鎖、ホスホリル、またはスルホニル等の分子の化学的に活性な表面基を含み、あ  
る実施形態において、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つを超えるエピトープを含むことができる。ある実施形態において、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、抗原に特異的に結合する。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、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(複数可)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、それにより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、それにより分解のた  
めに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(米国特許出願第20090311253号)。

#### 【0180】

「薬物動態」とは、薬物が、生物により、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、当業者に知られてい  
る方法を用いて、齧歯類において容易に決定することができる(米国特許出願第2009  
0311253号)。

#### 【0181】

「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物の量を指す。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を用いて評価することができる(米国特許出願第  
20090311253号)。

#### 【0182】

10

20

30

40

50

「表面プラズモン共鳴」という用語は、例えば、B I A c o r e (登録商標)システム (B I A c o r e I n t e r n a t i o n a l A B、G E H e a l t h c a r e c o m p a n y、U p p s a l a、S w e d e n および P i s c a t a w a y、N J) 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の検出によりリアルタイムな生体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、J o n s s o n e t a l . ( 1 9 9 3 ) A n n . B i o l . C l i n . 5 1 : 1 9 - 2 6 を参照のこと。「 $K_{on}$ 」という用語は、例えば、DVD - I g (商標) / 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 - I g (商標)) と抗原の結合についてのオン速度定数を意味する。「 $K_{on}$ 」という用語はまた、本明細書において、互換的に使用されるように、「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、以下の式により示される。

10

【0183】

抗体 (「Ab」) + 抗原 (「Ag」)  $Ab - Ag$

「 $K_{off}$ 」という用語は、結合タンパク質 (例えば、抗体またはDVD - I g (商標)) の、例えば、当該技術分野で知られているDVD - I g (商標) / 抗原複合体からの解離についてのオフ速度定数、または「解離速度定数」を意味する。この値は、以下の式により示されるように、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。

20

【0184】

$Ab + Ag \rightleftharpoons Ab - Ag$

「 $K_d$ 」および「平衡解離定数」という用語は、平衡状態で滴定測定においてまたは解離速度定数 ( $K_{off}$ ) を会合速度定数 ( $K_{on}$ ) で割ることにより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 - I g (商標)) の結合親和性を表すために使用される。会合および解離速度定数を決定するための方法は、当該技術分野でよく知られている。蛍光を基礎とする技術の使用は、高い感度、および平衡状態で生理学的緩衝液中の試料を調べる能力を提供する。B I A c o r e (登録商標) (生体分子相互作用分析) アッセイ等の他の実験的アプローチおよび機器を使用することができる (例えば、B I A c o r e I n t e r n a t i o n a l A B、G E H e a l t h c a r e c o m p a n y、U p p s a l a、S w e d e n から入手可能な機器)。さらに、S a p i d y n e I n s t r u m e n t s (B o i s e、I d a h o) から入手可能なK i n E x A (登録商標) (動態排除アッセイ) アッセイも使用することができる。

30

【0185】

「変異体」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り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学的活性を保持するポリペプチドを意味する (例えば、変異体TfR抗体は、TfRとの結合について抗TfR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、同様の特性 (例えば、親水性ならびに荷電領域の程度および分布) の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当該技術分野で認識されている。これらの微小変化は、当該技術分野で理解されているように、アミノ酸のヒドロパシー指標を考慮することにより部分的に特定することができる (例えば、K y t e e t a l . ( 1 9 8 2 ) J . M o l . B i o l . 1 5 7 : 1 0 5 - 1 3 2 を参照のこと)。アミノ酸のヒドロパシー指標は、その疎水性および荷電の考慮を基礎とする。タンパク質中の同様のヒドロパシー指標のアミノ酸を置換することができ、タンパク質はタンパク質機能を依然として保持することが当該技術分野で知られている。一態様において、 $\pm 2$  のヒドロパシー指標を有するアミノ酸が置換される。アミノ酸の親水性はまた、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できる。ペプチドとの関連でアミノ酸の親水性の考慮により、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

40

50

(例えば、米国特許第4,554,101号を参照)。当該技術分野で理解されるように、同様の親水性値を有するアミノ酸の置換は、生物学的活性、例えば、免疫原性を保持するペプチドをもたらす得る。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。アミノ酸の疎水性指標および親水性値の両方は、そのアミノ酸の特定の側鎖により影響を受ける。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り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る。「変異体」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等により異なってプロセッシングされているが、その生物学的活性または抗原反応性、例えば、TfR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。「変異体」という用語は、他に定義がなければ、変異体の断片を包含する。変異体は、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。

10

#### 【0186】

##### I. 結合タンパク質の生成

TfR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、当該技術分野でよく知られている。

20

#### 【0187】

##### A. 親モノクローナル抗体の生成

DVD結合タンパク質の可変ドメインは、目的とする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を含む、親抗体から得ることができる。これらの抗体は、天然に存在し得るか、または組換え技術により生成され得る。当業者は、ハイブリドーマ技術、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、CDR移植された、およびヒト化抗体の調製を含むが、これらに限定されない、抗体を産生するための多くの方法に精通している。例えば、米国特許公開第20090311253 A1号を参照のこと。可変ドメインはまた、親和性成熟技術を用いても調製され得る。

30

#### 【0188】

##### 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、一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、1つ以上の抗体パラメーター、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、溶解性、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等である。例えば、米国特許公開第20090311253号を参照のこと。

40

#### 【0189】

##### 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技術により、直接的にまたはリンカーを介して直列に連結され、その後、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直列に連結された2つの異なる重鎖可変ドメイン(VH)を含み、その後、定常ドメインCH1およびFc領域が続く(図1)。

#### 【0190】

可変ドメインは、本明細書に記載される方法のいずれか1つにより生成された親抗体から組換えDNA技術を用いて得られ得る。一実施形態において、可変ドメインは、ネズミ重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

50

されたまたはヒト化可変重もしく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、ヒト重または軽鎖可変ドメインである。

【0191】

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定常ドメインとの間には、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残基により構成される約10~12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個のアミノ酸残基、または11から12のアミノ酸残基を用いて生成された。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り、したがって、それらの使用は、リンカーおよび接合部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。

10

【0192】

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(G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>(配列番号9)、SAKTTPKLEEGEFSEARV(配列番号10)、ADAAP(配列番号11)、ADAAPTIVSIFPP(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)、AKTTPPSVTLPLAP(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)、GGGGSGGGGSGGGGGS(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、G<sub>4</sub>S反復、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、変異体Fc領域である。

20

30

【0193】

様々な実施形態において、リンカーは、GS-H10(鎖H)のGGGGSGGGGGS(配列番号178)を含む。様々な実施形態において、リンカーは、GS-L10(鎖L)のGGS GGGGSG(配列番号179)を含む。様々な実施形態において、リンカーは、HG-短(鎖H)のASTKGP(配列番号21)を含む。様々な実施形態において、リンカーは、LK-長(鎖L)のTVAAPSVFIFPP(配列番号14)を含む。例えば、配列番号21および178は、DVD-Igの可変重鎖またはドメイン上に位置する。例えば、配列番号14および179は、DVD-Igの可変軽鎖またはドメイン上に位置する。

40

【0194】

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ず、例えば、CL/CH1ドメインの最初の5~12個のアミノ酸残基；軽鎖リンカーは、C<sub>1</sub>またはC<sub>2</sub>に由来し得、重鎖リンカーは、C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>、C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub>、C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>、C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub>、およびC<sub>μ</sub>を

50

含む、いずれかのアイソタイプのC H 1に由来し得る。リンカー配列はまた、I g様タンパク質（例えば、T C R、F c R、K I R）、G / Sに基づく配列（例えば、G 4 S反復、配列番号29）、ヒンジ領域由来の配列、および他のタンパク質からの他の天然配列等の他のタンパク質に由来し得る。

#### 【0195】

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、D V D重鎖は、F c領域にさらに連結されている。F c領域は、天然配列F c領域または変異体F c領域であり得る。別の実施形態において、F c領域は、ヒトF c領域である。別の実施形態において、F c領域には、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、またはI g DからのF c領域が含まれる。

10

#### 【0196】

別の実施形態において、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ポリペプチドを合わせて、D V D結合タンパク質を形成する。表1A~1Cは、疾患の治療に有用な例示的な抗体のV HおよびV L領域のアミノ酸配列を列挙する。一実施形態において、いずれかの配向における、表1に列挙される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。したがって、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。以下に提供されるV HおよびV Lドメイン配列は、当該技術分野で知られているか、または当該技術分野で知られている方法を用いて容易に識別できる相補性決定領域（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、これらのC D Rおよび/またはフレームワーク配列のうち1つ以上は、同じ抗原に結合する、当該技術分野で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り、機能を損なうことなく、置き換えられる。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それを作製する方法の詳細な説明は、以下の実施例の項において提供される。

20

30

#### 【0197】

##### D. 結合タンパク質の産生

本明細書に提供される結合タンパク質は、当該技術分野で知られている多くの技術のいずれかにより産生され得る。例えば、宿主細胞からの発現、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（複数可）は、標準的な技術により、宿主細胞にトランスフェクトされる。原核生物または真核生物の宿主細胞中で、本明細書に提供される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、原核細胞よりも、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、哺乳動物の宿主細胞中で発現される。

40

#### 【0198】

D V Dタンパク質の組換え発現のための例示的なシステムにおいて、リン酸カルシウムにより媒介されたトランスフェクションにより、D V D重鎖およびD V D軽鎖の両方をコードする組換え発現ベクターが、d h f r - C H O細胞中に導入される。組換え発現ベクター内で、D V D重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、それぞれ、C M Vエンハンサー / A d M L Pプロモーター制御要素に作動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、ベクターでトランスフェクトされたC H O細胞の選択を可能にするD H F R遺伝子も担持する。選択された形質転換体宿主細胞は、D V D重および軽鎖の発現を可能にするために培養され、無傷のD V Dタンパク質が培養培地から収集される。組換え発現ベクターを調製し、宿主細胞

50

をトランスフェクトし、形質転換体を選択し、宿主細胞を培養し、培養培地からDVDタンパク質を収集するために、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養培地中で、本明細書に提供される宿主細胞を培養することにより、本明細書に提供されるDVDタンパク質を合成する方法も提供される。本方法は、培養培地からDVDタンパク質を単離することをさらに含み得る。

#### 【0199】

DVD結合タンパク質の重要な特徴は、それが、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、所望の二重徳的活性を有する均一な単一の主産物をもたらす。「二特異性」、「多特異性」、および「多特異性多価」完全長結合タンパク質を作製するための他の前述の方法は、集合した不活性な単一特異的、多特異性、多価の完全長結合タンパク質と、異なる結合部位の組み合わせを有する多価の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。

10

#### 【0200】

驚くべきことに、本明細書に提供される「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、所望の「二重特異的多価完全長結合タンパク質」に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。

#### 【0201】

組み立てられ、発現された二重可変ドメイン免疫グロブリン分子のうちの少なくとも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、それ故に、増強された商業的有用性を有する。したがって、「二重特異的四価完全長結合タンパク質」の単一の主産物をもたらす単一細胞中の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ための方法が提供される。

20

#### 【0202】

「二重特異的四価完全長結合タンパク質」の「主産物」をもたらす単一細胞中の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。

#### 【0203】

##### E. DVDカセット

ある実施形態において、カセットは、対象の脳血管の上皮組織に発現される抗原に特異的に結合し、対象の脳への結合タンパク質の取り込みを促進する結合タンパク質を構築するために使用することができる。いくつかの実施形態において、これらの結合タンパク質の式は、

30

$Out1 - (X1)m - In1 - (X2)n(I)$  である。

#### 【0204】

式Iに従って、 $Out1$ は、第1の外部結合ドメインであり、 $In1$ は、第1の内部結合ドメインである。ある実施形態において、内部結合ドメインは、外部結合ドメインよりもDVD-Ig(商標)のFc領域により近接に位置する結合ドメインを表す。他の実施形態において、外部結合ドメインは、結合タンパク質のN末端部でまたはその近くに位置するが、内部結合ドメインは、結合タンパク質のC末端部でまたはその近くに位置する。

40

#### 【0205】

式Iに従って、 $X1$ は、リンカーである。いくつかの実施形態に従って、 $X1$ は、本明細書に定義されるリンカーのうちのいずれかである。他の特定の実施形態に従って、 $X1$ は、 $Out1$ が対象の脳への結合タンパク質の取り込みを促進する対象の脳血管の上皮組織に発現される抗原に特異的に結合し、 $In1$ が前記抗原に特異的に結合しない場合、配列番号14または21のアミノ酸配列を含む配列を有するが、 $X1$ は、 $In1$ が対象の脳への結合タンパク質の取り込みを促進する対象の脳血管の上皮組織に発現される抗原に特異的に結合し、 $Out1$ が前記抗原に特異的に結合しない場合、配列番号178または179のアミノ酸配列を含む配列を有する。式Iに従って、 $X2$ は、Fc領域である。式I

50

において、 $m$ および $n$ の値は、0または1である。ある実施形態において、 $n$ が0である場合、 $X_1$ は、 $X_1$ は、 $Out_1$ または $In_1$ が、対象の脳への結合タンパク質の取り込みを促進する対象の脳血管の上皮組織に発現される抗原に特異的に結合するかどうかに応じて、配列番号14または179のアミノ酸配列であるを含む。 $n$ が1である場合、 $X_1$ は、 $Out_1$ または $In_1$ が、前記抗原に特異的に結合するかどうかに応じて、配列番号21または178のアミノ酸配列を含む。

【0206】

$Out_1$ が脳への結合タンパク質の取り込みを促進する対象の脳血管の上皮組織に発現される抗原に特異的に結合するために使用される場合、それは、 $In_1$ が使用されるときほど高い親和性を有する必要がない。したがって、ある実施形態において、 $Out_1$ が対象の脳への結合タンパク質の取り込みを促進する対象の脳血管の上皮組織に発現される抗原特異的に結合する場合、 $Out_1$ が前記抗原に対して有する結合親和性は、 $In_1$ が前記抗原に結合される場合のものよりも低い。例えば、 $Out_1$ が前記抗原に特異的に結合する場合、この結合の $EC_{50}$ は、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10 nMを超える。他の実施形態において、 $Out_1$ が前記抗原に特異的に結合する場合、この結合の $EC_{50}$ は、約1~10 nM、2~8 nM、3~10 nM、3~9 nM、3~8 nM、3~7 nM、3~6 nM、3~5 nM、3~4 nM、4~10 nM、または5~10 nMである。

10

【0207】

他の実施形態において、 $Out_1$ がトランスフェリン受容体(TfR)に特異的に結合する場合、 $Out_1$ は、 $In_1$ がTfRに特異的に結合する場合よりもTfRに対して低い親和性を有する。例えば、 $Out_1$ が前記抗原に特異的に結合する場合、この結合の $EC_{50}$ は、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10 nMを超える。他の実施形態において、 $EC_{50}$ は、約3 nMを超える。他の実施形態において、 $Out_1$ がTfRに特異的に結合する場合、この結合の $EC_{50}$ は、約1~10 nM、2~8 nM、3~10 nM、3~9 nM、3~8 nM、3~7 nM、3~6 nM、3~5 nM、3~4 nM、4~10 nM、または5~10 nMである。他の実施形態において、 $EC_{50}$ は、約3~10 nM、3~9 nM、3~8 nM、3~7 nM、3~6 nM、3~5 nM、または3~4 nMである。ある実施形態において、 $Out_1$ は、配列番号56のアミノ酸配列を含む。

20

30

【0208】

他の実施形態において、 $Out_1$ が脳への結合タンパク質の取り込みを促進する対象の脳血管の上皮組織に発現される抗原に特異的に結合する場合、 $In_1$ は、別の抗原に結合する。この抗原は、CGRP、TNF、RGMA、サブスタンスP、ブラジキニン、Nav1.7、LPA、P2X3、NGF、Abeta; BACE1; IL-1; IGF1もしくは2; IL-18; IL-6; RAGE; NGF; EGFR; cMet、Her-2、およびCD-20から選択され得る。

【0209】

$In_1$ が脳への結合タンパク質の取り込みを促進する対象の脳血管の上皮組織に発現される抗原に特異的に結合するために使用される場合、それは、 $Out_1$ が使用される場合のものよりも高い親和性を有する必要がある。したがって、ある実施形態において、 $In_1$ が対象の脳への結合タンパク質の取り込みを促進する対象の脳血管の上皮組織に発現される抗原に特異的に結合する場合、 $In_1$ が前記抗原に対して有する結合親和性は、 $Out_1$ が前記抗原に結合する場合のものよりも高い。例えば、 $In_1$ が前記抗原に特異的に結合する場合、この結合の $EC_{50}$ は、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10 nMを超える。他の実施形態において、 $Out_1$ が前記抗原に特異的に結合する場合、この結合の $EC_{50}$ は、約1~0.001 nM、2~0.001 nM、3~0.0001 nM、3~0.001 nM、3~0.01 nM、3~0.1 nM、3~1 nM、3~5 nM、3~10 nM、4~10 nM、または5~10 nMである。

40

【0210】

50

他の実施形態において、Out 1がトランスフェリン受容体(TfR)に特異的に結合する場合、In 1は、Out 1がTfRに特異的に結合する場合のものよりもTfRに対して高い親和性を有する。例えば、In 1が前記抗原に特異的に結合する場合、この結合のEC<sub>50</sub>は、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10 nMを超える。他の実施形態において、EC<sub>50</sub>は、約3 nM未満である。他の実施形態において、In 1がTfRに特異的に結合する場合、この結合のEC<sub>50</sub>は、約1~0.001 nM、2~0.001 nM、3~0.0001 nM、3~0.001 nM、3~0.01 nM、3~0.1 nM、3~1 nM、3~5 nM、3~10 nM、4~10 nM、または5~10 nMである。他の実施形態において、EC<sub>50</sub>は、約3~0.0001 nM、3~0.001 nM、3~0.01 nM、3~0.1 nM、3~1 nM、3~5 nM、または3~10 nMである。ある実施形態において、In 1は、配列番号36のアミノ酸配列を含む。

10

#### 【0211】

他の実施形態において、Out 1が脳への結合タンパク質の取り込みを促進する対象の脳血管の上皮組織に発現される抗原に特異的に結合する場合、Out 1は、別の抗原に結合する。この抗原は、CGRP、TNF、RGMA、サブスタンスP、ブラジキニン、Nav1.7、LPA、P2X3、NGF、Abeta; BACE1; IL-1; IGF1もしくは2; IL-18; IL-6; RAGE; NGF; EGFR; cMet、Her-2、およびCD-20から選択され得る。

#### 【0212】

他の実施形態において、結合タンパク質は、第2の結合タンパク質を含む。いくつかの実施形態において、この第2の結合タンパク質における式は、

20

Out 2 - (X1)<sup>m</sup> - In 2 - (X2)<sup>n</sup> (II) である。

#### 【0213】

式IIに従って、Out 2は、第2の外部結合ドメインであり、In 2は、第2の内部結合ドメインである。上で説明されるように、ある実施形態において、内部結合ドメインは、外部結合ドメインよりもDVD-Ig(商標)のFc領域により近接に位置する結合ドメインを表す。他の実施形態において、外部結合ドメインは、結合タンパク質のN末端部でまたはその近くに位置するが、内部結合ドメインは、結合タンパク質のC末端部でまたはその近くに位置する。X1およびX2は、上の式Iについて定義される通りである。

30

#### 【0214】

Out 2およびIn 2は、上述のOut 1およびIn 1と同じ様式で操作される。この第2の結合タンパク質は、第1の結合タンパク質と結合して、DVD-Ig(商標)等の結合ポリペプチドを形成することができる。これらの実施形態において、第1の結合タンパク質では、nは1であり、第2の結合タンパク質では、nは0である。ある実施形態において、Out 1およびOut 2の両方は、対象の脳への結合タンパク質の取り込みを促進する対象の脳血管の上皮組織に発現される抗原に結合する。他の実施形態において、In 1およびIn 2の両方は、前記抗原に結合する。他の実施形態に従って、Out 1およびIn 2またはOut 2およびIn 1は、前記抗原に結合する。ある実施形態において、Out 2は、配列番号37のアミノ酸配列を含む。他の実施形態において、In 2は、配列番号57のアミノ酸配列を含む。

40

#### 【0215】

##### II. 結合タンパク質の使用

2つ以上の抗原に結合するそれらの能力を考えると、本明細書に提供される結合タンパク質は、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、または組織免疫組織化学等の慣用のイムノアッセイを用いて、(例えば、血清または血漿等の生物学的試料中の)抗原を検出するために使用することができる。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。好適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。好適な酵素の例には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエス

50

テラーゼが含まれ、好適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、好適な蛍光物質の例には、ウンベリフェロン、フルオロセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリド、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、好適な放射性物質の例には、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、および $^{153}\text{Sm}$ が含まれる。

#### 【0216】

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、インビトロおよびインビボの両方で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、そ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養中、ヒト対象中、または本明細書に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他の哺乳動物対象中の抗原活性を阻害するために使用することができる。別の実施形態において、抗原活性が有害である疾患または障害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。

10

#### 【0217】

「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、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てい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障害は、抗原活性の低下が障害の症候および/または進行を緩和することが予測される障害である。そのような障害は、例えば、障害に罹患している対象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、滑液等の抗原濃度の増加）により明らかとされ得る。本明細書に提供される結合タンパク質で治療することができる障害の非限定的な例には、以下に、および結合タンパク質を含む薬学的組成物に関連する項に論じられている障害が含まれる。

20

#### 【0218】

DVD結合タンパク質は、効力/安全性を増強し、かつ/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。

#### 【0219】

さらに、本明細書に提供されるDVD結合タンパク質は、細胞内送達（内部移行性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（血液脳関門を横断するためにトランスフェリン受容体およびCNS疾患媒介物質を標的化すること）を含む、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に対する組織マーカーおよび疾患媒介物質を標的化すること）のために使用することができる。DVD結合タンパク質はまた、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に抗原を送達するための担体タンパク質としての役目を果たすこともでき、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か、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 combination 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を参照のこと）。簡潔に言えば、医療用インプラントの部位へ適切な細胞型を誘導することは、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、デバイスに連結された、ま

30

40

50

たはそれを標的とするDVDにより、デバイス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。

#### 【0220】

##### A. 様々な疾患における結合タンパク質の使用

本明細書に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有用であり、例えば、結合タンパク質により認識される標的は有害である。そのような結合タンパク質は、特異的疾患に關与する1つ以上の対象に結合し得る。BBB受容体（例えば、TfR）への結合はまた、血液脳関門の透過を増強することも示され、それ故に、脳に治療剤を送達するために有用である。本開示を制限することなく、ある疾患状態に関するさらなる情報が提供される。

10

#### 【0221】

##### 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、脊髄損傷等）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り特徴付けられる。これらの慢性神経変性疾患は、複数の細胞型と媒介物質との間で複雑な相互作用を示す。そのような疾患に対する治療戦略は限定されており、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/もしくはシナプス機能を抑制するための薬剤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、疾患の進行を停止させることができない。1つを超える疾患媒介物質を標的とする特定の治療は、単一の疾患機構を標的にして観察されるものよりも慢性神経変性疾患に対してより良好な治療効力を提供することができる（Deane et al. (2003) Nature Med. 9: 907-13、およびMasliyah et al. (2005) Neuron. 46: 857を参照のこと）。

20

#### 【0222】

本明細書に提供される結合タンパク質分子は、血液脳関門を横断する治療剤の輸送を可能にし得る。ある実施形態において、これらの治療剤は、アルツハイマー病等の慢性神経変性疾患に關与する1つ以上の標的に結合する。結合タンパク質分子および他の治療剤とのその組み合わせの効力は、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等の前臨床動物モデルで妥当性を確認することができる。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また、パーキンソン病等の他の神経変性疾患の治療のためにも使用することができる。他の疼痛関連の標的には、CGRP、TNF、RGMa、サブスタンスP、ブラジキニン、Nav1.7、LPA、P2X3、およびNGFが含まれる。

30

#### 【0223】

##### b. 神経再生および脊髄損傷

病理学機構の知識の増加にかかわらず、脊髄損傷（SCI）は、依然として、破壊的狀態であり、高度の医療要求により特徴付けられる医学的適応を表す。多くの脊髄損傷は、挫傷または圧迫損傷であり、通常、原発性損傷の後に、初期損傷を悪化させ、病変部位を有意に、時には、10倍以上に広げる二次損傷機構（例えば、サイトカインおよびケモカイン等の炎症性メディエータ）が生ずる。

40

#### 【0224】

結合タンパク質分子の有効性は、脊髄損傷の前臨床動物モデルで妥当性を確認することができる。さらに、これらの結合タンパク質分子を構築し、動物モデルにおける有効性について検査することができる。ヒト患者における検査のために、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、効率的かつ関連のある様式で血液脳関門（BBB）を通過しない。しかしながら、例えば、脳卒中、外傷性脳損傷、多発性硬化症等のある神経疾患において、BBBは、損なわれる場合があり、脳への結合タンパク質およ

50

び抗体の透過の増加を可能にする。BBB漏出が生じない、他の神経学的状態において、グルコースおよびアミノ酸担体のような担体媒介性輸送体、ならびにBBBの血管内皮での受容体媒介トランスサイトシス媒介細胞構造体/受容体を含む内因性輸送系の標的に使用することができ、それ故に、結合タンパク質のトランスBBB輸送を可能にする。そのような輸送を可能にするBBBでの構造体には、インスリン受容体、例えば、ヒトインスリン受容体(HIR)、トランスフェリン受容体、LRPファミリー、IGFR、EPCR、EGFR、TNFR、レプチン受容体、M6PR、神経性ニコチン性アセチルコリン受容体、リポタンパク質受容体、AChR、DTr、グルタチオン輸送体、SR-B1、MYOF、TFRC、ECE1, LDLR、PVR、CDC50A、SCARF1、MRC1、HLA-DRA、RAMP2、VLDLR、STAB1、TLR9、CXCL16、NTRK1、CD74、DPP4、TMEM30A、およびRAGEが含まれるが、これらに限定されない。さらに、戦略は、低分子量薬物、ナノ粒子、および核酸を含むCNSへの潜在的な薬物を輸送するためのシャトルとしての結合タンパク質の使用を可能にする(Coloma et al. (2000) Pharm Res. 17(3): 266-74、Boado et al. (2007) Bioconj. Chem. 18(2): 447-55)。

10

#### 【0225】

##### c. 他の疾患標的

本発明の結合分子で治療され得る他の疾患標的または疾患状態は、米国特許出願第2009-0304693A1号および同第2010-0076178A1号に開示されており、これらのそれぞれは、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。例えば、神経学的使用に適している本発明の結合タンパク質は、Abeta、TNF-アルファ、BACE1、IL-1、ベータ、IGF1, 2、IL-18、IL-6、RAGE、NGF、EGFR、CD-20、およびRGM Aからなる群から選択される少なくとも1つの標的抗原に結合し得る。他の例示的な実施形態において、本開示の結合タンパク質は、抗癌使用に適しており、CD-20、CD-19、CD-80、CD-22、CD-40、CD-3、HER-2、EGFR、IGF1, 2、IGF1R、RON、HGF、c-MET、VEGF、DLL4、NRP1、PLGF、およびErbB3からなる群から選択される少なくとも1つの標的抗原に結合し得る。

20

#### 【0226】

##### d. 疼痛の調節

疼痛の認知および身体から送られるおよび受けるシグナルを統制する脳の経路は、依然として、完全には理解されていない。脊髄の接合は、中脳水道周囲灰白質領域を含む脳の様々な領域への疼痛の感覚の中継および調節に関与している(Ugeer, P.L., Eccles, J.C. および Ugeer, E.G. (1987). Molecular Neurobiology of the Mammalian Brain, Plenum Press, New York)。

30

#### 【0227】

疼痛は、急性または慢性に分類され得る。急性疼痛は、組織への損傷により生じ得、一般に、突然発症および限られた継続期間を有する。慢性疼痛は、急性疼痛よりも長く続く傾向があり、通常、長期間にわたる病気と関連する。それは、通常、治療に対してさらに耐性があり、疾患をよく表している特徴(線維筋痛等)であり得る。それは、損傷組織の結果であり得るが、大抵、神経損傷に起因すると考えられる。疼痛はまた、それを生じる損傷の種類によっても分類され得る。侵害受容性疼痛は、組織損傷により生じる疼痛であるが、神経障害性疼痛は、神経損傷により生じる疼痛である。侵害受容性疼痛は、3つの異なるサブカテゴリ：内臓痛、深部体性痛、および表在体性痛にさらに分割され得る。

40

#### 【0228】

疼痛の例としては、急性疼痛、慢性疼痛、筋肉痛、関節痛、胸痛、頸部疼痛、肩疼痛、臀部疼痛、腹痛、手根管症候群、膝痛、背痛、筋筋膜疼痛症候群、線維筋痛、関節痛、頭痛(例えば、片頭痛)、梨状筋症候群、むち打ち、慢性筋肉痛、侵害受容性疼痛、内臓痛

50

、深部体性痛 ( deep somatic pain )、表在体性痛、神経障害性疼痛、中枢性疼痛症候群、複合性局所疼痛症候群、糖尿病性末梢神経障害、带状疱疹に伴う疼痛、ヘルペス後神経痛、神経痛、三叉神経痛、坐骨神経痛、くも膜炎 ( 脊髄痛 )、中枢性疼痛症候群、幻肢痛、幻体痛、神経障害、筋区画症候群、急性ヘルペス性疼痛、ヘルペス後痛、灼熱痛、特発性疼痛、炎症性痛覚、癌疼痛、術後疼痛、間質性膀胱炎の痛み、過敏性腸症候群 ( IBS )、腱炎、突出痛、および偶発的な痛みが含まれるが、これらに限定されない。

#### 【 0 2 2 9 】

神経障害性疼痛は、複雑で、可変性の病因を有する慢性疼痛の特殊な型である。それは、しばしば、神経の完全もしくは部分的離断、神経、神経叢、または軟組織に対する外傷もしくは傷害、あるいは癌、AIDS、および突発性原因を含む他の状態に起因する慢性状態である。神経障害性疼痛は、痛覚過敏 ( 低下した痛覚閾値および増進した疼痛知覚 ) および異痛 ( 無害な機械的または熱刺激からの疼痛 ) により特徴付けられる。その状態は、しばしば、自然と進行する。神経障害性疼痛の知覚過敏の要素は、疼痛のより一般化され、急性の型と同じような薬学的介入に応答しないので、有効な長期間処理様式の開発が問題視されてきた。

10

#### 【 0 2 3 0 】

心因性疼痛は、心理学的、感情的、または行動刺激と関連しているか、または相関している状態である。したがって、身体的疼痛は、心理学的起源からなる。頭痛、筋肉痛、背痛、および腹痛は、対象に観察された心理学的疼痛の最も一般的なタイプのうちのいずれかである。

20

#### 【 0 2 3 1 】

鎮痛、または疼痛知覚の軽減は、例えば、鎮痛剤を使用すること、神経伝達物質の放出を阻害することによりそのような侵害経路に沿った伝達を直接減少させることを含む多くの方法により得られ得る ( 米国特許第 8 , 2 6 8 , 7 7 4 号を参照されたく、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる ) 。

#### 【 0 2 3 2 】

いかなる特定の理論または作用機序に拘束されることを望むものではないが、本明細書に記載される結合タンパク質またはペプチドは、疼痛の治療のための薬剤 ( 例えば、治療的および診断的 ) に対して有効な送達ビヒクルであることがここで想定される。対象の治療のために使用される薬学的組成物は、本明細書では、結合タンパク質またはペプチド、および少なくとも 1 つの治療剤を含む。本組成物は、BBB を効率的に透過し、かつ疼痛の治療および / または調節に対して有効である。

30

#### 【 0 2 3 3 】

ある実施形態において、結合タンパク質は、二特異性分子、例えば、本明細書に記載される二特異性 DVD - Ig である。様々な実施形態において、DVD - Ig は、BBB 受容体、抗原、または標的に特異的に結合する少なくとも 1 つの結合領域を有する。例えば、BBB 受容体、抗原、または標的は、インスリン受容体、トランスフェリン受容体、LRP、メラノコルチン受容体、ニコチン性アセチルコリン受容体、VACM - 1 受容体、血管内皮成長因子、グルココルチコイド受容体、イオンチャネル型グルタミン酸受容体、M3 受容体、アリール炭化水素受容体、GLUT - 1、イノシトール - 1 , 4 , 5 - トリスリン酸 ( IP3 ) 受容体、N - メチル - D - アスパラギン酸受容体、S1P1、P2Y 受容体、および終末糖化産物の受容体 ( RAGE ) 受容体を含む。

40

#### 【 0 2 3 4 】

様々な実施形態において、薬学的組成物には、結合タンパク質またはペプチド、および検出可能な薬剤が含まれる。様々な実施形態において、検出可能な薬剤は、脳の分析用の検出可能な薬剤または造影剤を含む。例えば、検出可能な薬剤は、蛍光剤、比色剤、酵素剤、または放射性薬剤を含む。

#### 【 0 2 3 5 】

### III . 薬学的組成物

50

単独で、あるいは予防剤、治療剤、および/または薬学的に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薬学的組成物が提供される。本明細書に提供される結合タンパク質を含む薬学的組成物は、障害の診断、検出、またはモニタリングする際、障害または1つ以上のその症状の予防、治療、管理、または改善する際、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。単独で、あるいは予防剤、治療剤、および/または薬学的に許容される担体と組み合わせた薬学的組成物の製剤化は、当業者には知られている（米国特許公開第20090311253 A1号）。

#### 【0236】

本明細書に提供される予防剤または治療剤の投与方法には、非経口投与（例えば、皮内、筋肉内、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）、ならびに肺内投与（例えば、吸入器または噴霧器で投与されたエアロゾル化された化合物）が含まれるが、これらに限定されない。投与の特定経路のための薬学的組成物の製剤化、ならびに様々な投与方法に必要な材料および技術が利用可能であり、当業者に知られている（米国特許公開第20090311253 A1号）。

10

#### 【0237】

投与量レジメンは、最適な所望の応答（例えば、治療的または予防的応答）が得られるように調節され得る。例えば、単回ボラスが投与されてよく、複数回分割用量が経時的に投与されてよく、あるいは、治療状況の緊急性により指示される通りに用量を比例的に減少または増加してもよい。投与の簡便さおよび投与量の均一性のために、単位投与形態で非経口組成物を製剤化することが特に有利である。「単位投与形態」という用語は、治療される哺乳動物対象に単位投与量として好適な物理的に個別の単位を指し、各単位は、必要な薬学的担体に関連して所望の治療効果を生み出すように計算された所定の量の活性化化合物を含有する。本明細書に提供される単位投与形態のための仕様は、(a) 活性化化合物の固有の特徴および達成される具体的な治療または予防効果、ならびに(b) 個人における感受性の処置のためにそのような活性化化合物を配合する際の当該技術分野に潜在的な限界により決定され、直接依存する。

20

#### 【0238】

本明細書に提供される結合タンパク質の治療上または予防上有効量の例示的非限定範囲は、0.1~20 mg/kg、例えば、1~10 mg/kgである。用量の値は緩和しようとする状態のタイプおよび重症度により異なり得ることに留意されたい。任意の特定の対象に関して、具体的な投与量レジメンは、個体の必要性、ならびに組成物の投与を施すかまたは指図する専門家の判断に従って経時的に調節されるべきであり、本明細書中に記述される投与量範囲は単なる例であって、特許請求されている組成物の範囲または実施を限定する意図はないことをさらに理解されたい。

30

#### 【0239】

##### IV. 併用療法

本明細書に提供される結合タンパク質はまた、様々な疾患の治療に有用な1つ以上のさらなる医薬剤または治療剤、その意図された目的のために専門医により選択されるさらなる薬剤と共に投与することもできる。例えば、さらなる薬剤は、本明細書に提供される抗体により治療されるべき疾患または状態を治療するのに有用である、当該技術分野において承認されている治療剤であり得る。この組み合わせはまた、1つを超えるさらなる薬剤、例えば、2つまたは3つのさらなる薬剤を含み得る。

40

#### 【0240】

様々な実施形態において、結合剤は、タンパク質、ペプチド、糖質、薬物、小分子、および遺伝物質（例えば、DNAまたはRNA）である薬剤と共に投与される。様々な実施形態において、この薬剤は、造影剤、細胞毒性剤、血管形成阻害剤、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もしくはその機能的断片、メトトレキサート、シクロスポリン、ラパマイシン、FK506、検出可能な標識もしくはレポーター、TNFアンタゴニスト、抗リウマチ剤、筋肉弛緩剤、麻酔剤、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

50

、抗乾癬剤、コルチコステロイド (corticosteroid)、アナボリックステロイド、エリスロポエチン、免疫化、免疫グロブリン、免疫抑制剤、成長ホルモン、ホルモン補充薬、放射性医薬、抗鬱剤、抗精神病薬、刺激剤、喘息薬、ベータアゴニスト、吸引用ステロイド、エピネフリンもしくは類似体、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。

#### 【0241】

様々な実施形態において、さらなる薬剤は、治療剤である。様々な実施形態において、治療剤は、ブデノシド、上皮成長因子、コルチコステロイド、シクロスポリン、スルファサラジン、アミノサリチル酸、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 mAbs、抗IL-6もしくはIL-6受容体mAb、成長因子、エラスターゼ阻害剤、ピリジニル-イミダゾール化合物、TNF、LT、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-18、IL-23、EMAP-II、GM-CSF、FGF、もしくはPDGFに対して特異的な抗体もしくはアゴニスト、CD2、CD3、CD4、CD8、CD-19、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD90に対する抗体もしくはそのリガンド、メトトレキサート、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノール酸モフェチル、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、アドレナリン作動物質、IRAK、NIK、IKK、p38、MAPキナーゼ阻害剤、IL-1変換酵素阻害剤、TNF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p55 TNF受容体、可溶性p75 TNF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を含む。

10

20

#### 【0242】

併用療法の薬剤には、抗腫瘍剤、放射線治療、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、バクリタキセル、ドセタキセル、タクソール、ドキシソルピシン、ゲムシタピン、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が含まれるが、これらに限定されない。

30

#### 【0243】

##### V. 診断

本明細書中の開示はまた、診断アッセイ方法、1つ以上の結合タンパク質を含む診断用キット、ならびに自動および/または半自動システムで用いる方法およびキットの適応が含まれるが、これらに限定されない、診断用適用も提供する。提供される方法、キット、および適応は、個人における疾患または障害の検出、モニタリング、および/または治療において使用され得る。これは、以下にさらに説明される。

40

#### 【0244】

##### A. アッセイの方法

本開示はまた、本明細書に記載される少なくとも1つの結合タンパク質を用いて、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ための方法も提供する。当該技術分野で知られている任意の好適なアッセイが、本方法において使用され得る。例には、イムノアッセイおよび/または質量分析を使用する方法が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0245】

本開示により提供されるイムノアッセイは、サンドイッチイムノアッセイ、ラジオイム

50

ノアッセイ (RIA)、酵素イムノアッセイ (EIA)、酵素連結免疫吸着アッセイ (ELISA)、競合阻害イムノアッセイ、蛍光偏光イムノアッセイ (FPPIA)、酵素免疫測定法の乗算 (EMIT)、生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET)、および均質化学発光アッセイ等を含み得る。

【0246】

化学発光微小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。

【0247】

質量分析を使用する方法は、本開示で提供され、これには、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) が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0248】

イムノアッセイおよび質量分析を用いた、生物学的試験試料の収集、取扱い、処理、および分析のための方法は、当業者にはよく知られており、本開示の実施に際して提供される (米国特許出願第 2009-0311253 A1 号)。

【0249】

B. キット

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。このキットは、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つの構成成分、および分析物またはその断片試験試料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、本明細書に開示される結合タンパク質および/または抗分析物の結合タンパク質 (またはその断片、変異体、または変異体の断片) を含むことができ、これは、任意に、固相上で固定化される。

20

【0250】

任意に、キットは、校正物質または対照を含み得、単離されたまたは精製された分析物を含み得る。キットは、イムノアッセイおよび/または質量分析による分析物のための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。分析物、結合タンパク質、および/または抗分析物の結合タンパク質、またはその断片を含むキット成分は、当該技術分野で知られている検出可能な標識を用いて任意に標識され得る。本開示の実施の際に提供される作製のための材料および方法は、当業者に知られ得る (米国特許公開第 2009-0311253 A1 号)。

30

【0251】

C. キットおよび方法の適合

キット (またはその成分)、および本明細書に記載されるイムノアッセイ等のアッセイによる試験試料中の分析物の存在、量、または濃度を決定する方法は、例えば、米国特許第 5,089,424 号および同第 5,006,309 号において記載される、ならびに例えば、ARCHITECT (登録商標) 等の Abbott Laboratories (Abbott Park, IL) により商業的に販売される、様々な自動および半自動システム (固相が微小粒子を含むものを含む) で用いるために適合され得る。

40

【0252】

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、PRISM (登録商標)、EIA (ビーズ)、および Quantum (商標) EI、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、他の形式において、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

50

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、同第7,419,821号、および同第7,682,833号、ならびに米国特許出願公開第20040018577号、同第20060160164号、同第20090311253号に記載されている。

【0253】

本明細書に記載される方法の他の好適な改変および適合が明白であり、本明細書に開示される実施形態の範囲から逸脱することなく、好適な均等物を用いて行われ得ることは当業者には容易に明らかであろう。これまで詳細にある実施形態を説明してきたが、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以下の実施例を参照することにより、本発明がより明確に理解されるであろう。

10

【実施例】

【0254】

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、四本鎖の二重可変ドメイン(DVD)-Ig結合タンパク質は、当該技術分野で知られている方法に従って、DVD結合タンパク質可変重およびDVD結合タンパク質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、かつpHybE-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体は、当該技術分野で知られている方法に従って、クローニングされ、293細胞中に発現し、精製された。DVD結合タンパク質におけるDVD VHおよびVL鎖、ならびに選択されたCDR配列が以下に提供される。

20

【0255】

【表 1 - 1】

表 2 : 多価結合タンパク質 (強調表示された CDR) 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一覧表

配列番号	登録番号	タンパク質領域	配列
30	AB402VH	VH-TfR	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <b>GFTFSNYGMHWI</b> RQAPGKGLEWIA <b>MIYYDSSKMNYADTVKGRFTISRDN</b> AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAV <b>PTSHYVVDVWGQ</b> GTTVTVSS
31	AB402VL	VL-TfR	AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <b>QASQDIGNWLA</b> WYQ QKPGKSPKLLIY <b>GATSLADG</b> VPSRFSGSRSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC <b>LQAYNTPWTF</b> GGGGTKVEIKR
32	AB403VH	VH-TfR	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <b>GFTFSNYGMHWI</b> RQAPGKGLEWIA <b>MIYYDSSKMNYADTVKGRFTISRDN</b> AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAV <b>PTSHYVVDVWGQ</b> GTTVTVSS
33	AB403VL	VL-TfR	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC <b>QASQDIGNWLA</b> WYQ QKPGQSPRLLIY <b>GATSLADG</b> VPARFSGSRSGTEFTLTISS LQSEDFAVYYC <b>LQAYNTPWTF</b> GGGGTKVEIKR
34	AB404VH	VH-TfR	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV <b>SCKASGFTFSNYGMHWI</b> IRQAPGQGLEWIA <b>MIYYDSSKMNYADTVKGRFTITRD</b> NSTNTLYMELSSLRSEDTAVYYCAV <b>PTSHYVVDVWG</b> QGTTVTVSS
35	AB404VL	VL-TfR	AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <b>QASQDIGNWLA</b> WYQ QKPGKSPKLLIY <b>GATSLADG</b> VPSRFSGSRSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC <b>LQAYNTPWTF</b> GGGGTKVEIKR
36	AB405VH	VH-TfR	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV <b>SCKASGFTFSNYGMHWI</b> IRQAPGQGLEWIA <b>MIYYDSSKMNYADTVKGRFTITRD</b> NSTNTLYMELSSLRSEDTAVYYCAV <b>PTSHYVVDVWG</b> QGTTVTVSS
37	AB405VL	VL-TfR	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC <b>QASQDIGNWLA</b> WYQ QKPGQSPRLLIY <b>GATSLADG</b> VPARFSGSRSGTEFTLTISS LQSEDFAVYYC <b>LQAYNTPWTF</b> GGGGTKVEIKR
38	AB043VH	VH-APP	EVQLLES <b>GGGLVQPGGSLRLS</b> CAAS <b>GFTFSNYGMSWV</b> RQAPGKGLEWVA <b>SIRSGGGRTYYSDNVKGRFTISRDN</b> SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVR <b>YDHYSGSSDYWG</b> QGLT <b>VTVSS</b>
39	AB043VL	VL-APP	DVVM <b>TQSP</b> LSLPVTPGEPASIS <b>CKSSQSLDSDGKTYL</b> NWLLQKPGQSPQRLIY <b>LVSKLD</b> SGVPDRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYC <b>WQGFHFPRTFGQ</b> GTKVEIKR
56	AB221VH	VH-TfR	EVQLVESGGGLVQPGNSLTLSCV <b>ASGFTFSNYGMHWI</b> RQAPKKGLEWIA <b>MIYYDSSKMNYADTVKGRFTISRDN</b> SKNTLYLEMNSLRSEDTAMYYCAV <b>PTSHYVVDVWGQ</b> GVS <b>TVSS</b>
57	AB221VL	VL-TfR	DIQMTQSPASLSASLEEIVTITC <b>QASQDIGNWLA</b> WYQQ KPGKSPQLLIY <b>GATSLADG</b> VPSRFSGSRSGTQFSLKISR VQVEDIGIYYC <b>LQAYNTPWTF</b> GGGGTKLELKR
58	AB004VH	VH-Her2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS <b>CAASGFNIKDTYIHWV</b> RQAPGKGLEWVA <b>RIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADT</b> SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR <b>WGGDGFYAMDY</b> WGQGLT <b>VTVSS</b>
59	AB004VL	VL-Her2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <b>CRASQDVNTAVA</b> WYQ QKPGKAPKLLIY <b>SASFLYSG</b> VPSRFSGSRSGTDFTLTISS LQPEDFATYYC <b>QQHYTPPTF</b> GQGTKVEIKR

10

20

30

40

【表 1 - 2】

87	BACE001VL	BACE1-VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASODVSTAVAWYQ QKPGKAPKLLIY <u>SASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLT</u> ISS LQPEDFATYYC <u>QOSYTTPTFGQGTKVEIKR</u>	
88	BACE002VL	BACE1-VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASODVSTAVAWYQ QKPGKAPKLLIY <u>SASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLT</u> ISS LQPEDFATYYC <u>QOFPTYLPTFGQGTKVEIKR</u> DIQMTQSPSS	
89	BACE003VL	BACE1-VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASODVSTAVAWYQ QKPGKAPKLLIY <u>SASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLT</u> ISS LQPEDFATYYC <u>QOQYNDPPTFGQGTKVEIKR</u> DIQMTQSPSS	10
90	BACE004VL	BACE1-VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASODVSTAVAWYQ QKPGKAPKLLIY <u>SASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLT</u> ISS LQPEDFATYYC <u>QOSSTDPTTFGQGTKVEIKR</u> DIQMTQSPSS	
91	BACE005VL	BACE1-VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASOVVANS <del>LA</del> WYQ QKPGKAPKLLIY <u>LASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLT</u> ISS LQPEDFATYYC <u>OODATSPPTFGQGTKVEIKR</u> DIQMTQSPSS	
92	BACE006VL	BACE1-VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASODVSTAVAWYQ QKPGKAPKLLIY <u>SASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLT</u> ISS LQPEDFATYYC <u>QOYATDPPTFGQGTKVEIKR</u> DIQMTQSPSS	20
93	BACE001VH	BACE1-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTEFSGYAIH</u> WV RQAPGKGLEWV <u>GWISPAGGSTDYADSVKGRFTISADT</u> SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARG <u>PFSPWMDY</u> W GQGLTVTVSS	
94	BACE002VH	BACE1-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTEFLGYGIH</u> WV RQAPGKGLEWV <u>GWISPAGGSTDYADSVKGRFTISADT</u> SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARG <u>PFSPWMDY</u> W GQGLTVTVSS	
95	BACE003VH	BACE1-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTEFSGYAIH</u> WV RQAPGKGLEWV <u>GWISPAGGSTDYADSVKGRFTISADT</u> SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARG <u>PFSPWMDY</u> W GQGLTVTVSS	30
96	BACE004VH	BACE1-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTEFSGYAIH</u> WV RQAPGKGLEWV <u>GWISPAGGSTDYADSVKGRFTISADT</u> SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARG <u>PFSPWMDY</u> W GQGLTVTVSS	
97	BACE005VH	BACE1-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTEFSGYAIH</u> WV RQAPGKGLEWV <u>GWISPAGGSTDYADSVKGRFTISADT</u> SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARG <u>PFSPWMDY</u> W GQGLTVTVSS	
98	BACE006VH	BACE1-VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTEFSGYAIH</u> WV RQAPGKGLEWV <u>GWISPAGGSTDYADSVKGRFTISADT</u> SKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARG <u>PFSPWMDY</u> W GQGLTVTVSS	40
99	ABETA001VH	VH-Abeta	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTEFSRYSMS</u> WV RQAPGKGLELVA <u>QINSVGNSTYYPDTVKGRFTISRDN</u> AKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS <u>GDYWGQGLTVTV</u> SS	
100	ABETA001VL	VL-Abeta	DVVMTQSPSLPVTLGQPASISCRSS <u>SOSLIYSDGNAYL</u> <u>HWFLQKPGQSPRLLIYKVSNRFS</u> GVPDFRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYCS <u>SOSTHVPWT</u> FGQGTKVEIKR	

【表 1 - 3】

101	ABETA002VH	VH-Abeta	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWV RQAPGKGLEWVSA <b>INASGTRTY</b> YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN <b>SI</b> .RAEDTAVYYCARG <b>KGNTHKPYGY</b> <b>VRYFDVWGQGLVTVSS</b>
102	ABETA002VL	VL-Abeta	DIVLTQSPATLSLSPGERATLSC <b>RASQSVSSSYLA</b> WYQ QKPGQAPRLLIY <b>GASSRATG</b> VPARFSGSGSGTDFLTIS SLEPEDFATYYC <b>LOIYNMPIT</b> FGQGTKVEIKRT
103	VHII- TMEM30A	VHH- TMEM30A	EVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAASG <b>FKITHYTMG</b> W FRQAPGKERE <b>FVSRITWGGDNTFYSNSVKGRFTISRDN</b> AKNTVYLQMN <b>SLKPEDTADYYCAA</b> G <b>STSTATPLRVD</b> <b>YWGKGTQVTSS</b>
104	HIR-VH	HIR-VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV <b>SCKASGYTFTNYDHW</b> VRQAPGQGLEW <b>MGWIYPGDG</b> STKYNE <b>KFKGRVTITA</b> DESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREWAY <b>WGQGT</b> <b>TVSS</b>
105	HIR1-VL	HIR-VL	DIQMTQSPSSLSASV <b>GDRTITCRASODIGGNLYWYQQ</b> KPGKAPKLLIY <b>ATSSLDSG</b> VPSRFSGSRSGTDYTLTISSL QPEDFATYYC <b>LOYSSSPWTF</b> FGQGTKVEIKR
106	HIR2-VL	HIR-VL	DIQMTQSPSSLSASV <b>GDRTITCRASODIGGNLYWLQQ</b> KPGKAPKRLIY <b>ATSSLDSG</b> VPKRFSGSRSGSDYTLTISSL QPEDFATYYC <b>LOYSSSPWTF</b> FGQGTKVEIKR
107	HIR3-VL	HIR-VL	DIQMTQSPSSLSASV <b>GDRTITCRASODIGGNLYWLQQ</b> KPGKTIKRLIY <b>ATSSLDSG</b> VPSRFSGSGSGTDYTLTISSL QPEDFATYYC <b>LOYSSSPWTF</b> FGQGTKVEIKR
108	HIR4-VL	HIR-VL	DIQMTQSPSSLSASV <b>GDRTITCRASODIGGNLYWYQQ</b> KPGKAPKLLIY <b>ATSSLDSG</b> VPSRFSGSGSGTDFLTTISSL QPEDFATYYC <b>LOYSSSPWTF</b> FGQGT <b>K</b> VEIKR
162	8C11-VH	VH	EFQLQQSGPELVKPGASVRIS <b>CKASGYSFTDYNMNWV</b> KQSN <b>GKSLEWGVINPNYGSSTYNOKFKGKATLTV</b> D QSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARK <b>WGQLGRGFFD</b> <b>VWGTGTTVTSS</b>
163	8C11-VL	VL	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMT <b>CRASSVSYMHWFQOK</b> PGSSPKPWIY <b>ATSNLASG</b> VPARFSGSGSGT <b>SYSLTISR</b> V EAEDAATYYC <b>QOWSSPLTF</b> GAGTKLELKR
170	RGMA-JL3- VH	VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKV <b>SCKASGYTFTSHGISWV</b> RQAPGQGLDWM <b>GWISPYSGNTNYAOKLQGRVTMTT</b> DTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR <b>VGSGPYYYMDV</b> <b>WGQGLVTVSS</b>
171	RGMA-JL3- VL	VL	QSAITQPRSVSGSPGQSVTIS <b>CTGTSSSVGDSIYVSWYQ</b> QHPGKAPKMLYDYTKR <b>PSGVPDRFSGSKSGNTASLTI</b> SGLQAED <b>EADYYCCSYAGDTL</b> FGGGTKVTVLG

10

20

30

【 0 2 5 8 】

【表 2 - 1】

表 3. CDR 配列

登録番号	CDR	配列	配列番号
AB402VH	CDR1	GFTFSNYGMH	76
	CDR2	MIYYDSSKMNYADTVKG	77
	CDR3	PTSHYVVDV	78
AB402VL	CDR1	QASQDIGNWLA	79
	CDR2	GATSLAD	80
	CDR3	LQAYNTPWT	81
AB403VH	CDR1	GFTFSNYGMH	76
	CDR2	MIYYDSSKMNYADTVKG	82
	CDR3	PTSHYVVDV	83
AB403VL	CDR1	QASQDIGNWLA	84
	CDR2	GATSLAD	85
	CDR3	LQAYNTPWT	86
AB404VH	CDR1	GFTFSNYGMH	76
	CDR2	MIYYDSSKMNYADTVKG	77
	CDR3	PTSHYVVDV	78

10

20

30

40

【 0 2 5 9 】

【表 2 - 2】

AB405VH	CDR1	GFTFSNYGMH	76
	CDR2	MIYYDSSKMNYADTVKG	77
	CDR3	PTSHYVVDV	78
AB405VL	CDR1	QASQDIGNWLA	79
	CDR2	GATSLAD	80
	CDR3	LQAYNTPWT	86
AB043VH	CDR1	GFTFSNYGMS	109
	CDR2	SIRSGGGRTYYSDNVKG	110
	CDR3	YDHYSGSSDY	111
AB043VL	CDR1	KSSQSLLDSDG	112
	CDR2	LVSKLDS	113
	CDR3	WQGTHFPRT	114
AB221VH	CDR1	GFTFSNYGMH	115
	CDR2	MIYYDSSKMNYADTVKG	116
	CDR3	PTSHYVVDV	117
AB221VL	CDR1	QASQDIGNWLA	118
	CDR2	GATSLAD	119
	CDR3	LQAYNTPWT	120

10

20

30

40

【 0 2 6 0 】

【表 2 - 3】

AB004VH	CDR1	GFNIKDTYIH	121	
	CDR2	RIYPTNGYTRYADSVKG	122	
	CDR3	WGGDGFYAMDY	123	
AB004VL	CDR1	RASQDVNTAVA	124	10
	CDR2	SASFLYS	125	
	CDR3	QQHYTTPPT	126	
BACE001VL	CDR1	RASQDVSTAVA	127	
	CDR2	SASFLYS	128	20
	CDR3	QQSYTTPPT	129	
BACE002VL	CDR1	RASQDVSTAVA	127	
	CDR2	SASFLYS	128	
	CDR3	QQFPTYLPT	130	30
BACE003VL	CDR1	RASQDVSTAVA	127	
	CDR2	SASFLYS	128	
	CDR3	QQGYNDPPT	131	
BACE004VL	CDR1	RASQDVSTAVA	127	
	CDR2	SASFLYS	128	40
	CDR3	QQSSTDPTT	132	

【 0 2 6 1 】

【表 2 - 4】

BACE005VL	CDR1	RASQVVANSLA	133
	CDR2	SASFLYS	128
	CDR3	QQDATSPPTF	134
BACE006VL	CDR1	RASQDVSTAVA	127
	CDR2	SASFLYS	128
	CDR3	QQYATDPPT	135
BACE001VH	CDR1	GFTFSGYAIH	136
	CDR2	GWISPAGGSTDYADSVKG	137
	CDR3	GPFSPWMDY	138
BACE002VH	CDR1	GFTFLGYGIH	139
	CDR2	GWISPAGGSTDYADSVKG	137
	CDR3	GPFSPWMDY	138
BACE003VH	CDR1	GFTFSGYAIH	140
	CDR2	GWISPAGGSTDYADSVKG	137
	CDR3	GPFSPWMDY	138
BACE004VH	CDR1	GFTFSGYAIH	140
	CDR2	GWISPAGGSTDYADSVKG	137
	CDR3	GPFSPWMDY	138

10

20

30

40

【 0 2 6 2 】

【表 2 - 5】

BACE005VH	CDR1	GFTFSGYAIH	140
	CDR2	GWISPAGGSTDYADSVKG	137
	CDR3	GPFPWVMDY	138
BACE005VH	CDR1	GFTFSGYAIH	140
	CDR2	GWISPAGGSTDYADSVKG	137
	CDR3	GPFPWVMDY	138
ABETA001VH	CDR1	GFTFSRYSMS	141
	CDR2	QINSVGNSTYYPDTVKG	142
	CDR3	GDY	143
ABETA001VL	CDR1	RSSQSLIYSDGNAYLH	144
	CDR2	KVSNRFS	145
	CDR3	SQSTHVPWT	146
ABETA002VH	CDR1	GFTFSSYAMS	147
	CDR2	AINASGTRTYYA	148
	CDR3	GKGNTHKPYGYVRYFDV	149
ABETA002VL	CDR1	RASQSVSSSYLA	150
	CDR2	GASSRAT	151
	CDR3	LQIYNMPIT	152

10

20

30

40

【 0 2 6 3 】

【表 2 - 6】

VHH-TMEM30A	CDR1	GFKITHYTMG	153
	CDR2	RITWGGDNTFYNSVKG	154
	CDR3	GSTSTATPLRVDY	155
HIR-VH	CDR1	GYTFTNYDIH	156
	CDR2	WIYPGDGSTKYNEKFKG	157
	CDR3	YWGQGTTV	158
HIR1-VL	CDR1	RASQDIGGNLY	159
	CDR2	ATSSLDS	160
	CDR3	LQYSSSPWT	161
HIR2-VL	CDR1	RASQDIGGNLY	159
	CDR2	ATSSLDS	160
	CDR3	LQYSSSPWT	161
HIR3-VL	CDR1	<b>RASQDIGGNLY</b>	159
	CDR2	<b>ATSSLDS</b>	160
	CDR3	<b>LQYSSSPWT</b>	161
HIR4-VL	CDR1	<b>RASQDIGGNLY</b>	159
	CDR2	<b>ATSSLDS</b>	160
	CDR3	<b>LQYSSSPWT</b>	161

10

20

30

40

【 0 2 6 4 】

【表 2 - 7】

8C11-VH	CDR1	<b>DYNMN</b>	164
	CDR2	<b>VINPNYGSSTYNQKFKG</b>	165
	CDR3	<b>KWGQLGRGFFD</b>	166
8C11-VL	CDR1	<b>RASSVSYMH</b>	167
	CDR2	<b>ATSNLAS</b>	168
	CDR3	<b>QQWSSSPLT</b>	169
RGMA-VH	CDR1	<b>SHGIS</b>	172
	CDR2	<b>WISPYSGNTNYAQKLO</b>	173
	CDR3	<b>VGSGPYYYMDV</b>	174
RGMA-VL	CDR1	<b>TGTSSSVGDSIYVS</b>	175
	CDR2	<b>DVTKRPS</b>	176
	CDR3	<b>CSYAGTDTL</b>	177

10

20

30

【 0 2 6 5 】

【表 3 - 1】

表 4. DVD配列

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	配列
40	DVD2358H	AB402VH	HG-短	AB043VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSNYGMHWIRQAPGKGLEWIAMIY YDSSKMNYADTVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTAVYYCAVPTSHY VVDVWGQGTTVTVSS <b>ASTKGPEVQL</b> LESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSN YGMSWVRQAPGKGLEWVASIRSGGG RTYYSDNVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVRYDHYSGSSD YWGQGLTVTVSS
41	DVD2358L	AB402VL	LK-短	AB043VL	AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQ DIGNWLA WYQQKPGKSPKLLIYGATS LADGVPSRFSRSGTDFLTISLQPE DFATYYCLQAYNTPWTFGGGTKVEIK <b>RTVAAPD</b> VVMTQSPLSLPVTGPGEPA SCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQKPGQ SPQRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGGT DFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGFTHFP RTFGGQTKVEIKR
42	DVD2359H	AB043VH	HG-短	AB402VH	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASG FTFSNYGMSWVRQAPGKGLEWVASI RSGGGRTYYS DNVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRYDHY SGSSDYWGQGLTVTVSS <b>ASTKGPEV</b> QLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFT FSNYGMHWIRQAPGKGLEWIAMIY DSSKMNYADTVKGRFTISRDNKNSL YLQMNSLRAEDTAVYYCAVPTSHYV VDVWGQGTTVTVSS
43	DVD2359L	AB043VL	LK-短	AB402VL	DVVMTQSPLSLPVTGPGEPA SCKSSQ SLLDSDGKTYLNWLLQKPGQSPQRLI YLVSKLDSGVPDRFSGSGGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCWQGFTHFPRTFGQ GKVEIKR <b>RTVAAP</b> AIQMTQSPSSLSAS VGDRVTITCQASQDIGNWLA WYQQK PGKSPKLLIYGATSLADGVPSRFSR SGTDFLTISLQPEDFATYYCLQAYN TPWTFGGGTKVEIKR
44	DVD2360H	AB403VH	HG-短	AB043VH	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASG FTFSNYGMHWIRQAPGKGLEWIAMIY YDSSKMNYADTVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTAVYYCAVPTSHY VVDVWGQGTTVTVSS <b>ASTKGPEVQL</b> LESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFSN YGMSWVRQAPGKGLEWVASIRSGGG RTYYSDNVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVRYDHYSGSSD YWGQGLTVTVSS

10

20

30

40

【表 3 - 2】

45	DVD2360L	AB043VL	LK-短	AB043VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCQASQ DIGNWLA WYQQKPGQSPRLLIYGATS LADGVPARFSGSRSGTEFTLTISLQSE DFAVYYCLQAYNTPWTFGGGKVEI KRTVAAPDVVMTQSPLSLPVTGPGEPA SISCKSSQLLSDGKTYLNWLLQKP GQSPQRILIYLVSKLDSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGT HFPRTFGQGTKVEIKR	
46	DVD2361H	AB043VH	HG-短	AB043VH	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSNYGMSWVRQAPGKGLEWVASI RSGGGRYYSDNVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRYDHY SGSSDYWGQGT LVTVSSASTKGPEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSNYGMHWIRQAPGKGLEWIAMIYY DSSKMNYADTVKGRFTISRDN AKNSL YLQMNSLRAEDTAVYYCAVPTSHYV VDVWGQGT LVTVSS	10
47	DVD2361L	AB043VL	LK-短	AB043VL	DVVMTQSPLSLPVTGPGEPA SISCKSSQ SLLSDGKTYLNWLLQKPGQSPQR LI YLVS KLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCWQGT HFPRTFGQ GTKVEIKRTVA APEIVMTQSPATLSVS PGERATLSCQASQDIGNWLA WYQQK PGQSPRLLIYGATSLADGV PARFSGSR SGTEFTLTISLQSE DFAVYYCLQAYN TPWTFGGGKVEIKR	20
48	DVD2362H	AB040VH	HG-短	AB043VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GFTFSNYGMHWIRQAPGQGLEWIAMI YYDSSKMNYADTVKGRFTITRDNSTN TLYMELSSLRSED TAVYYCAVPTSHY VDVWGQGT LVTVSSASTKGPEVQL LES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSN YGMSWVRQAPGKGLEWVASIRSGGG RTYYSDNVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVRYDHYSGSSD YWGQGT LVTVSS	30
49	DVD2362L	AB040VL	LK-短	AB043VL	AIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQ DIGNWLA WYQQKPGKSPKLLIYGATS LADGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPE DFATYYCLQAYNTPWTFGGGKVEIK RTVAAPDVVMTQSPLSLPVTGPGEPA SI SCKSSQLLSDGKTYLNWLLQKPGQ SPQRILIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGT HFP RTFGQGTKVEIKR	
50	DVD2363H	AB043VH	HG-短	AB040VH	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASG FTFSNYGMSWVRQAPGKGLEWVASI RSGGGRYYSDNVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRYDHY SGSSDYWGQGT LVTVSSASTKGPEV QLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFT FSNYGMHWIRQAPGQGLEWIAMIYY DSSKMNYADTVKGRFTITRDNSTNL YMELSSLRSED TAVYYCAVPTSHYVV VDVWGQGT LVTVSS	40

【表 3 - 3】

51	DVD2363L	AB043VL	LK-短	AB040VL	DV VMTQSPLSLPVTPEGEPASISCKSSQ SLLSDSGKTYLNWLLQKPGQSPQRLLI YLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCWQGT HFPRTFGQ GTKVEIKRTVA A PAIQMTQSPSSLSAS VGDRVTITCQASQDIGNWLA WYQQK PGKSPKLLIYGATSLADGVPSRFSGSR SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQAYN TPWTFGGGKVEIKR
52	DVD2365H	AB0405VH	HG-短	AB043VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GFTFSNYGMHWIRQAPGQGLEWIAM YYDSSKMNYADTVKGRFTITRDNSTN TLYMELSSLRSEDTAVYYCAVPTSHY VVDVWGQGT TTVTVSSASTKGPEVQL LESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSN YGM SWVRQAPGKGLEWVASIRSGGG RTYYSDNVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVRYDHYSGSSD YWGQGT LTVTVSS
53	DVD2365L	AB0405VL	LK-短	AB043VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCQASQ DIGNWLA WYQQKPGQSPRLLIYGATS LADGV PARFSGSRSGTEFTLTISSLQSE DFAVYYCLQAYNTPWTFGGGKVEI KRTVA A PDV VMTQSPLSLPVTPEGEP ASISCKSSQSLLSDSGKTYLNWLLQK PGQSPQRLLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGT HFPRTFGQGTKVEIKR
54	DVD2366H	AB043VH	HG-短	AB0405VH	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASG FTFSNYGMSWVRQAPGKGLEWVASI RSGGGRTYYSDNVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRYDHY SGSSDYWGQGT LTVTVSSASTKGPEV QLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFT FSNYGMHWIRQAPGQGLEWIAM IYY DSSKMNYADTVKGRFTITRDNSTNTL YMELSSLRSEDTAVYYCAVPTSHYVV DVWGQGT TTVTVSS
55	DVD2366L	AB043VL	LK-短	AB0405VL	DV VMTQSPLSLPVTPEGEPASISCKSSQ SLLSDSGKTYLNWLLQKPGQSPQRLLI YLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCWQGT HFPRTFGQ GTKVEIKRTVA A PEIVMTQSPATLSV SPGERATLSCQASQDIGNWLA WYQQK PGQSPRLLIYGATSLADGV PARFSGSR SGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCLQAYN TPWTFGGGKVEIKR
60	DVD1294H	AB221 VH	HG-短	AB043 VH	EVQLVESGGGLVQPGNSLT LSCVASG FTFSNYGMHWIRQAPKKGLEWIAM IY YDSSKMNYADTVKGRFTISRDN SKNT LYLEMNSL RSEDTAMYYCAVPTSHY VVDVWGQGVSVTVTVSSASTKGPEVQL LESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSN YGM SWVRQAPGKGLEWVASIRSGGG RTYYSDNVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVRYDHYSGSSD YWGQGT LTVTVSS

10

20

30

40

【表 3 - 4】

61	DVD1294L	AB221 VL	LK-短	AB043 VL	DIQMTQSPASLSASLEEIVTITCQASQD IGNWLA WYQQKPGKSPQLLIYGATSL ADGVPSRFGSRSGTQFSLKISR VQVE DIGIYYCLQAYNTPWTFGGGKLELK RTVAAPDVVMTQSPLSLPVTGPESASI SCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQKPGQ SPQRLIYL VSKLDSGVPDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGT HFP RTFGQGTKVEIKR	
62	DVD2667H	AB221 VH	HG-長	AB043 VH	EVQLVESGGGLVQPGNSLTLSCVASG FTFSNYGMHWIRQAPKKGLEWIAMIY YDSSKMNYADTVKGRFTISRDNKNT LYLEMNSLRSEDTAMYYCAVPTSHY VVDVWGQGVSVTVSSastkqpsvfplapEV QLLES GGGLVQPGSLRLSCAASGFT FSNYGMSWVRQAPGKLEWVASIRS GGGRTYSDNVKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCVRYDHYSG SSDYWGQGLVTVSS	10
63	DVD2667L	AB221 VL	LK-長	AB043 VL	DIQMTQSPASLSASLEEIVTITCQASQD IGNWLA WYQQKPGKSPQLLIYGATSL ADGVPSRFGSRSGTQFSLKISR VQVE DIGIYYCLQAYNTPWTFGGGKLELK RtvaapsvfifppDVVMTQSPLSLPVTGPES ASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQK PGQSPQRLIYL VSKLDSGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGT HFPRTFGQGTKVEIKR	20
62	DVD2668H	AB221 VH	HG-長	AB043 VH	DVD2667H と同様	
61	DVD2668L	AB221 VL	LK-短	AB043 VL	DVD1294L と同様	30
60	DVD2669H	AB221 VH	HG-短	AB043 VH	DVD1294H と同様	
63	DVD2669L	AB221 VL	LK-長	AB043 VL	DVD2667L と同様	
64	DVD1295H	AB043 VH	HG-短	AB221 VH	EVQLLES GGGLVQPGSLRLSCAASG FTFSNYGMSWVRQAPGKLEWVASI RSGGGRTYSDNVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCVRYDHY SGSSDYWGQGLVTVSSASTKGPVQ LVESGGGLVQPGNSLTLSCVASGFTFS NYGMHWIRQAPKKGLEWIAMIYYDS SKMNYADTVKGRFTISRDNKNTLYL EMNSLRSEDTAMYYCAVPTSHYVVD VWGQGVSVTVSS	40

【表 3 - 5】

65	DVD1295L	AB043 VL	LK-短	AB221 VL	DV VMTQSPLSLPVTGPGEASISCKSSQ SLLDSDGKTYLNWLLQKPGQSPQRLI YL VSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCWQGFHPRTFGQ GTKVEIKRTVAAPDIQMTQSPASLSAS LEEIVTITCQASQDIGNWLA WYQQKP GKSPQLLIYGATSLADGVPSRFSGRS GTQFSLKISR VQVEDIGIYYCLQAYNT PWTFGGGKLELKR	
66	DVD2575H	AB221 VH	HG-短	AB004 VH	EVQLVESGGGLVQPGNSLTLSCVASG FTFSNYGMHWIRQAPKKGLEWIAMIY YDSSKMNYADTVKGRFTISRDN SKNT LYLEMNSLRSED TAMYYCAVPTSHY VVDVWGQGVSVTVSSASTKGPVQL VESGGGLVQPGSLRLSCAASGFNIK DTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTN GYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFY AMDYWGQGLTVTVSS	10
67	DVD2575L	AB221 VL	LK-短	AB004 VL	DIQMTQSPASLSASLEEIVTITCQASQD IGNWLA WYQQKPGKSPQLLIYGATSL ADGVPSRFSGRSGTQFSLKISR VQVE DIGIYYCLQAYNTPWTFGGGKLELKR RTVAAPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCRASQDVNTA VA WYQQKPGKAPKL LIYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQHYYTTPPTFGQG TKVEIKR	20
68	DVD2576H	AB004 VH	HG-短	AB221 VH	EVQLVESGGGLVQPGSLRLSCAASG FNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIY PTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNT AYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGD GFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPV VQLVESGGGLVQPGNSLTLSCVASGF TFSNYGMHWIRQAPKKGLEWIAMIY YDSSKMNYADTVKGRFTISRDN SKNT LYLEMNSLRSED TAMYYCAVPTSHY VVDVWGQGVSVTVSS	30
69	DVD2576L	AB004 VL	LK-短	AB221 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DVNTA VA WYQQKPGKAPKLLIYSAS FLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQHYYTTPPTFGQGTKVEI KRTVAAPDIQMTQSPASLSASLEEIVTI TCQASQDIGNWLA WYQQKPGKSPQL LIYGATSLADGVPSRFSGRSGTQFSL KISR VQVEDIGIYYCLQAYNTPWTFG GGKLELKR	
74	DVD2671H	AB043VH	HG-長	AB221VH	EVQLLESGGGLVQPGSLRLSCAASG FTFSNYGMSWVRQAPKKGLEWVASI RSGGRTYYSDNVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRYDHY SGSSDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVF PLAPEVQLVESGGGLVQPGNSLTLSC VASGFTFSNYGMHWIRQAPKKGLEWI AMIYYDSSKMNYADTVKGRFTISRDN SKNTLYLEMNSLRSED TAMYYCAV TSHYVVDVWGQGVSVTVSS	40

【表 3 - 6】

75	DVD2671L	AB043VL	LK-短	AB221VL	DVVM TQSP LSLPVT PGE P ASISCKSSQ SLLDS DGKTYL N WLLQKPGQSPQR LI YL VSKLDSGVPDR FSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCWQGHFPRTFGQ GTKVEIKRTVAAPDIQMTQSPASLSAS LEEIVTITCQASQDIGNWLA WYQQKP GKSPQLLIYGATSLADGVPSRFSGSR S GTQFSLKISR VQVEDIGIYYCLQAYNT PWTFGGG TKLELKR
180	mTNF-GS- mTFR-H	8C11VH	GS	AB221VH	EFQLQQSGPELVKPGASVRISCKASGY SFTDYNMNWVKQSNKGSLEWVGVIN PNYGSSTYNQKFKGKATLTVDQSSST AYMQLNSLTSEDSAVYYCARKWGQL GRGFFDVWGTGTTVTVSSGGGGSGG <u>GGSEVQLVESGGGLVQPGNSLTLS</u> <u>ASGFTFSNYGMHWIRQAPKKGLEWIA</u> MIYYDSSKMNYADTVKGRFTISR DNS KNTLYLEMNSLRSEDTAMY YCAVPT SHYVVDVWGGQVSVTVSS
181	mTNF-GS- mTFR-L	8C11VL	GS	AB221VL	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASS SVSYMHW FQQKPGSSPKWIYATSNL ASGV PARFSGSGSGTSYSLTISRVEAE DAATYYCQQWSSSPLTFGAGTKLELKR <u>RGGSGGGSG</u> DIQMTQSPASLSASLE EIVTITCQASQDIGNWLA WYQQKPGK SPQLLIYGATSLADGVPSRFSGSRSGT QFSLKISR VQVEDIGIYYCLQAYNTPW TFGGG TKLELKR
182	mTFR(AB40 5)-SL mTNF-H	AB405VH	HG-短	8D11VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GFTFSNYGMHWIRQAPGQGLEWIAM I YYDSSKMNYADTVKGRFTITRDNSTN TLYMELSSLRSEDTAVYYCAVPTSHY VVDVWGGQTTVTVSSASTKGPEFQL QQSGPELVKPGASVRISCKASGYSFTD YNMNWVKQSNKGSLEWVGVINPNY GSSTYNQKFKGKATLTVDQSSSTAYM QLNSLTSEDSAVYYCARKWGQLGRG FFDVWGTGTTVTVSS
183	mTFR(AB40 5)-SL mTNF-L	AB405VL	LK-長	8D11VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCQASQ DIGNWLA WYQQKPGQSPRLLIYGATS LADGV PARFSGSRSGTEFTLTISLQSE DFAVYYCLQAYNTPWTFGGG TKVEI KR <u>TVAAPS VFIFPP</u> QIVLSQSPAILSAS PGEKVTMTCRASSSVSYMHW FQQK GSSPKWIYATSNLASGV PARFSGSGS GTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSS SPLTFGAGTKLELKR

10

20

30

40

【 0 2 7 1 】

【表 3 - 7】

184	RGMA-GS-mTFR(AB403)-H	RGMA(JL3)-VH	GS	AB403VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTSHGISWVRQAPGQGLDWMG WISPYSGNTNYAQKLQGRVTMTTDT TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARVGS GPYYYMDVWGQGLVTVSSGGGGG <b>GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRL</b> SCAASGFTFSNYGMHWIRQAPGKGLE WIAMIYYDSSKMNYADTVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA VPTSHYVVDVWGQGTTVTVSS
185	RGMA-GS-mTFR(AB403)-L	RGMA(JL3)-VL	GS	AB403VL	QSALTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSS VGDSIYVSWYQQHPGKAPKLMLYDV TKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYYCCSYAGTDTLFGGGTK VTVLGGGGGGGSGEIVMTQSPATL SVSPGERATLSCQASQDIGNWLAWY QQKPGQSPRLLIYGATSLADGVPARFS GSRSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCLQ AYNTPWTFGGGKVEIKR

10

【 0 2 7 2 】

20

実施例 2 : DVD - Ig ( 商標 ) の設計、構築、および分析

1 . 1 : ヒト化抗マウスまたはヒト親抗体の構築および発現

1 . 1 . A : ヒト抗体フレームワークの選択

各ネズミ可変重および可変軽鎖遺伝子配列は、Vector NTIソフトウェアを用いて、(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/retrieveig.html>のNCBI Ig Blastウェブサイトから得られた) 44個のヒト免疫グロブリン生殖系列可変重鎖または46個の生殖系列可変軽鎖配列に対して別々に整列させた。ヒト化は、アミノ酸配列相同性、CDRクラスター分析、発現されるヒト抗体間の使用頻度、およびヒト抗体の結晶構造に関する利用可能な情報に基づいた。抗体結合、VH-VL対形成、および他の要因に対する可能な効果を配慮して、ネズミおよびヒトフレームワークは、少数の例外を除いて異なる、ネズミ残基をヒト残基に突然変異させた。さらなるヒト化戦略を、ネズミ抗体可変領域の実際のアミノ酸配列に高度の相同性、すなわち、配列類似性を有するヒト生殖系列抗体配列またはそのサブグループの分析に基づいて設計した。

30

【 0 2 7 3 】

相同性モデリングを用いて、抗体結合部位であるCDRの構造に重要であると予測された、ネズミ抗体配列に特有の残基を特定した。相同性モデリングは、近似の三次元座標がタンパク質に対して生成される計算方法である。最初の座標、およびそれらのさらなる改良のためのガイダンスの出所は、三次元の座標が知られており、その配列が第1のタンパク質の配列に関連した、基準タンパク質の第2のタンパク質であった。2つのタンパク質の配列間の関係を使用して、基準タンパク質と、座標が望ましいタンパク質である標的タンパク質との間に対応させる。基準および標的タンパク質の一次配列を、基準タンパク質から標的タンパク質に直接移行される、2つのタンパク質の同一部分の座標と整列させる。例えば、残基の突然変異、挿入、または欠失に起因する、2つのタンパク質のミスマッチ部分の座標を、既に移行されたモデル座標との一貫性を確保するために改良された一般構造テンプレートおよびエネルギーから構築する。この計算によるタンパク質構造は、さらに改良され得るか、またはモデリング研究に直接使用され得る。モデル構造の品質は、基準および標的タンパク質が関連する競合の確度、ならびに配列アラインメントが構築される精度により決定される。

40

【 0 2 7 4 】

50

ネズミ mAb の場合、BLAST 検索および目視検査の組み合わせを用いて、好適な基準構造を特定する。基準と標的アミノ酸配列間の 25% の配列同一性は、相同性モデリング演習を試みるのに最低限必要であると考えられる。配列アラインメントを手作業で構築し、モデル座標をプログラム Jackal を用いて生成する (Petrey, D. et al. (2003) Proteins 53 (Suppl. 6) : 430-435 を参照)。

【0275】

選択された抗体のネズミおよびヒトフレームワーク領域の一次配列は、かなりの同一性を共有する。異なる残基位置は、ネズミ抗体の観察された結合効力を保持するために、ヒト化配列にネズミ残基を含めるための候補である。ヒトとネズミ配列間で異なるフレームワーク残基の一覧表を手作業で作成する。表 5 は、この研究のために選択されたフレームワーク配列を示す。

【0276】

【表 4】

表 5 : ヒト IgG 重鎖定常ドメインおよび軽鎖定常ドメインの配列

タンパク質	配列番号	配列
		1234567890123456789012345678901234567890
野生型 hIgG1 定常領域	70	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE <u>LL</u> GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
突然変異体 hIgG1 定常領域	71	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE <u>AA</u> GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
IgC <sub>1</sub> 定常領域	72	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Ig $\lambda$ 定常領域	73	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTV AWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQ WKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

【0277】

所与のフレームワーク残基が抗体の結合性に影響を及ぼす可能性は、CDR 残基に対するその近接により決まる。したがって、モデル構造を用いて、ネズミとヒト配列間で異なる残基を、CDR 中の任意の原子からの距離に応じて順位付けした。任意の CDR 原子の 4.5 Å 以内にある残基は、最も重要と見なされ、ヒト化抗体においてネズミ残基の保持のための候補であることが推奨される (すなわち、復帰突然変異)。

【0278】

実施例 3 : 親抗体および DVD-Ig (商標) を特定および特徴付けするために使用されるアッセイ

特に指定のない限り、以下のアッセイを実施例全体を通して使用し、親抗体および DVD-Ig (商標) を特定および特徴付けた。

## 【0279】

## 3.1 サイズ排除クロマトグラフィー

抗体を水で2.5 mg/mLに希釈し、20 mLをTSKゲルG3000 SWXLカラム(Tosoh Bioscience, カタログ番号k5539-05k)を用いてShimadzu HPLCシステムで分析する。211 mMの硫酸ナトリウム、92 mMのリン酸ナトリウム、pH 7.0を用いて、0.3 mL/分の流速にて、試料をカラムから溶出する。HPLCシステムの操作条件は、以下の通りである：

移動相：211 mMのNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、92 mMのNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 7H<sub>2</sub>O、pH 7.0

勾配：アイソクラチック

流速：0.3 mL/分

検出波長：280 nm

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

表6は、上のプロトコルにより決定されるパーセントモノマー（予想される分子量の非凝集タンパク質）として表されるDVD-Ig（商標）構築物を含む。

## 【0280】

## 【表5】

表6. サイズ排除クロマトグラフィーにより決定されるDVD-Ig（商標）構築物の純度

DVD-Ig ID	N末端/外部可変 ドメイン	C末端/内部可変ド メイン	モノマーの割合(%) (純度)
	(VD)	(VD)	
DVD1294	TfR	APP	95
DVD2669	TfR	APP	100
DVD2668	TfR	APP	98.1
DVD2667	TfR	APP	98.4
DVD1295	APP	TfR	97
DVD2671	APP	TfR	96.5
DVD2358	TfR(AB402)	APP	98
DVD2359	APP	TfR(AB402)	96
DVD2360	TfR(AB403)	APP	98
DVD2361	APP	TfR(AB403)	95
DVD2362	TfR(AB404)	APP	97.8
DVD2363	APP	TfR(AB404)	96.8
DVD2365	TfR(AB405)	APP	93
DVD2366	APP	TfR(AB405)	100
DVD2575	TfR	Her2	100
DVD2576	Her2	TfR	97

## 【0281】

DVD-Ig（商標）は、すべてのDVD-Ig（商標）が90%超の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（商標）プロファイルは、親抗体について観察されるものと類似している。

## 【0282】

実施例4：親抗体およびDVD-Ig（商標）のそれらの標的抗原（複数可）に対する結合および親和性を決定するために使用されたアッセイ

A：細胞に基づいた電気化学発光-メソスケールディスカバリーアッセイ（ECL-MSD）結合アッセイ

細胞表面上に発現された所望の標的抗原に結合する抗体またはDVDについてスクリーニングするためのメソスケールディスカバリー（MSD）電気化学発光（ECL）アッセイ

イは、以下の通りに行われた：マウストランスフェリン受容体を過剰発現する He k 2 9 3 細胞を、MSD 9 6 ウェルプレート (MSD カタログ番号 L 1 1 X B - 3、ロット番号 2 2 9 0 - E A) 上に添加し、ブロッキング緩衝液 (PBS 中 3 0 % FBS 血清 (Hyclone)) を用いて 3 7 で 1 時間ブロックした。穏やかに振とうしながら、室温で 3 0 分間インキュベートした後、プレートを DPBS で 3 回洗浄し、Ab / DVD (1 0 , 0 0 0 n g / m l) を添加した。室温で 1 時間インキュベートした後、プレートを DPBS で 3 回洗浄し、2 5 u l のヤギ抗ヒト S u l f o T A G (MSD カタログ番号 R 3 2 A C -、Lot # W 0 0 1 1 6 2) を 1 μ g / m l にて添加する。1 時間のインキュベーション後、室温で 1 時間、プレートを洗浄し、MSD S E C T O R I m a g e r 6 0 0 0 上で読み込む前に、MSD 読み込み緩衝液を添加する。X l f i t 4 ソフトウェアパッケージを用いて、E C <sub>5 0</sub> 値を得る。

10

【 0 2 8 3 】

#### 実施例 5 : B I A C O R E 技術を用いた親和性決定

##### B I A C O R E 法 :

B I A C O R E アッセイ (Biacore, Inc, Piscataway, NJ) を使用して、オン速度およびオフ速度定の反応速度測定を用いて、抗体または DVD - I g (商標) 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) に対する抗体または DVD - I g (商標) の結合は、泳動 HBS - EP (1 0 m M の HEPES [pH 7 . 4]、1 5 0 m M の NaCl、3 m M の EDTA、および 0 . 0 0 5 % 界面活性剤 P 2 0) を用いて 2 5 で、Biacore (登録商標) 1 0 0 0 または 3 0 0 0 装置 (Biacore (登録商標) AB, Uppsala, Sweden) により表面プラズモン共鳴に基づいた測定により決定された。すべての化学物質は、Biacore (登録商標) AB (Uppsala, Sweden) から入手するか、またはそうでなければ本文に記載される異なる供給元から入手した。例えば、1 0 m M の酢酸ナトリウム (pH 4 . 5) 中に希釈された、約 5 0 0 0 R U のヤギ抗ヒト I g G、(Fc)、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 2 5 μ g / m l での操作を用いて C M 5 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でブロックする。フローセル 2 および 4 における修飾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する。フローセル 1 および 3 におけるヤギ抗ヒト I g G なしの非修飾カルボキシメチルデキストランを基準表面として使用する。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会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)。ヤギ抗ヒト I g G 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 - I g (商標) 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 - I g (商標) (2 5 μ g / m l) を 5 μ l / 分の流速で反応マトリックス全体に注入した。会合速度定数および解離速度定数の  $K_{on}$  ( $M^{-1} s^{-1}$ ) および  $K_{off}$  ( $s^{-1}$ ) は、2 5 μ l / 分の連続的流速下で決定される。1 0 ~ 2 0 0 n M の範囲の異なる抗原濃度で速度論結合測定を行うことにより速度定数を導く。次いで、式:  $KD = K_{off} / K_{on}$  により、速度論的速度定数から抗体または DVD - I g (商標) と標的抗原との間の反応の平衡解離定数 (M) を計算する。結合を時間の関数として記録し、速度論速度定数を計算する。このアッセイでは、1 0 6  $M^{-1} s^{-1}$  程度に速いオン速度および 1 0  $s^{-1}$  程度に遅いオフ速度を測定することができる。

20

30

40

【 0 2 8 4 】

## 【表 6】

表7. トランスフェリン受容体AbおよびDVD Igを用いたトランスフェリン受容体結合アッセイおよびBiacore

トランスフェリン受容体Ab	発現収量 mg/L	Hek293/mTfRのMSD結合アッセイのEC50 (nM)	Biacore, mTfR (123-763)		
			Ka(1/Ms)	Kd (1/s)	KD (nM)
IgG	適用せず	結合なし			
AB221	110	0.1	3.94E04*	1.81E-04*	5*
AB402	47.5	0.06	1.64E04	6.12E-05	3.7
AB403	35.5	0.09	2.20E04	8.39E-05	3.8
AB404	63	3.0			結合なし
AB405	34	13.6			結合なし
DVD1294	11.7	0.11	不検出	不検出	不検出
DVD2669	8.8	0.12	不検出	不検出	不検出
DVD2668	9.7	0.10	不検出	不検出	不検出
DVD2667	9.3	不検出	不検出	不検出	不検出
DVD1295	13.8	3.70	不検出	不検出	不検出
DVD2671	6.1	1.20	不検出	不検出	不検出
DVD2358	12.9	0.10	3.13E04	4.06E-05	1.3
DVD2359	83.5	12.0	遅	遅	LOD
DVD2360	50.4	0.15	2.80E04	4.80E-05	1.7
DVD2361	62.8	10.7	遅	遅	LOD
DVD2362	19.6	3.0	遅	遅	LOD
DVD2363	21.8	結合なし			
DVD2365	13.8	3.2	9.87E03	7.71E-04	78
DVD2366	21.8	結合なし	不検出	不検出	不検出
DVD2575	62.8	0.11	不検出	不検出	不検出
DVD2576	80.2	3.40	不検出	不検出	不検出

\* r m T f R ( 1 1 9 ~ 7 6 3 ) を用いて測定

## 【0285】

細胞に基づいたMSD結合アッセイにより決定される、AB404および405であるAB221の低親和性変異体は、Biacoreにより有意な結合を示さなかった。Ab221の低親和性変異体を含むDVD-Ig(商標)は、細胞に基づいたMSD結合アッセイまたはBiacoreにより測定される、結合の低下を示すか、または有意な結合を示さなかった。

## 【0286】

実施例5: Ab/DVDのインビボでの生体内分布

A: マウス脳および血清における抗体およびDVD Ig(商標)の測定

6~8週齢の野生型雌C57B/6マウスに、抗TfR変異体、対照IgG、DVD-Ig(商標)(20mg/kg)を含む抗TfRを静脈内に注入した。指示された時間後、マウスを、2ml/分の速度で10分間、D-PBSで灌流した。脳を抽出し、Complete Mini EDTA不含プロテアーゼ阻害剤カクテルタブレット(Roche Diagnostics)を含有するPBS中1% NP-40(Calbiochem)においてBullet Blender Blue(Next Advance BBX24B)を用いて均質化した。均質化した脳試料を、14,000rpmで20分間回転させる前に、4で1時間回転させた。微量血清分離管(BDDiagnostics)中で灌流する前に全血を収集し、少なくとも30分間凝固させ、5000gで90秒間

沈降させた。血清中の抗体測定のために上清を単離した。マウス血清および脳試料中の抗体またはDVD-Ig（商標）濃度を、ECL-MSDアッセイで測定した。MSDの高結合96ウェルプレート（MSDカタログ番号L11XB-3）を、ロバ抗ヒトIgGのF(ab)2断片、Fc断片特異的なポリクローナル抗体（Jackson ImmunoResearch）で4℃で一晩コーティングした。プレートを、25℃で1時間、3% MSD Block緩衝液でブロックした。各抗体またはDVD-Ig（商標）を内部標準として使用して、それぞれの抗体またはDVD-Ig（商標）濃度を定量化した。プレートを洗浄緩衝液で洗浄し、1% MSDアッセイ緩衝液を含有する0.1%血清で希釈した標準物質および試料を添加し、25℃で2時間インキュベートした。結合した抗体をヤギ抗ヒトSulfo-TAG、MSDで検出し、MSD SECTOR Imager 6000上で読み込んだ。Excel Fitソフトウェアを用いて、5パラメーター非線形回帰プログラムにより標準曲線から濃度を決定した。

10

【0287】

#### B. 免疫組織化学

脳内の抗体分布を決定するために、野生型マウスに、指示された抗体またはDVD（20mg/kgまたは指示されるように）を静脈内に注入した。指示された時間後、上述のように、マウスを灌流し、4% パラホルムアルデヒド中で8時間脳を固定した。固定した後、組織を、段階的に一連のアルコールからキシレンを通して処理し、次いで、パラフィン包埋した。組織学的評価のために、5μmの脳切片を、抗ヒトIgGの検出のために染色した。

20

【0288】

第一に、これらの切片を脱パラフィン処理して、再水和し、トリス洗浄緩衝液に入れた。48のシステムに連結するDakoの自動染色器においてIHC染色を完了した。[0225]これらの切片を、3% 過酸化水素で30分間ブロックし、洗浄緩衝液で洗浄し、次いで、プロテアーゼで8分間インキュベートした。切片を、ストレプトアビジンおよびビオチンブロッキングキット（Vector Laboratories, Burlingame, CA）で各8分間ブロックし、続いて、Dakoタンパク質を30分間ブロックした。次に、切片を、ビオチン化したロバ抗ヒトIgG（F(ab')<sub>2</sub>断片化抗体を用いて、15μg/mlで、室温で1時間インキュベートし、続いて、ストレプトアビジンペルオキシダーゼ試薬を用いて30分間インキュベートした。ストレプトアビジンステップ後、切片をDAB色原体で3分間反応させて、茶色の沈殿物を形成した。次いで、切片を水で洗浄し、対比染色し、脱水し、微視的観察のために実装した。

30

【0289】

画像分析：1切片につき平均実質強度の半定量化分析を行った。小脳および皮質の切片を、Image Pro Plusソフトウェアを用いて、形態計測により分析した。20倍率で実質染色の3つの画像において、分析を行った。4つの代表的なヒトIgG陽性領域の平均強度を1動物につき選択した。各画像におけるすべての設定（フィルターおよび光源レベル）を、実験を通して一定に保った。測定は、平均強度測定として分析され、Microsoft Excelにエクスポートされた。

【0290】

40

## 【表 7】

表 8. 20 mg/kg の静脈内投与を用いたトランスフェリン受容体 Ab のインビボでの生体内分布の特徴付け

トランスフェリン受容体 Ab/インビボでの収集時間/静脈内注入用量	TfR 結合の EC50 (nM)	ID/ 脳 (g) の割合 (%)	IgG にわたる倍率の増加	脳内濃度 (nM)	血清濃度 (nM)	実質染色強度最大=4	神経染色強度最大=4
IgG, 24 時間, 20 mg/kg	NB	0.3 +/- 0.03	適用せず	1.14 +/- 0.17	1693	0	0
AB221, 1 時間, 20 mg/kg	0.1	0.06 +/- 0.03		2.14 +/- 0.13	2266	0	0
AB221, 24 時間, 20 mg/kg		0.46 +/- 0.15	1.5	1.51 +/- 0.59	466	1.5	1.9
AB221, 48 時間, 20 mg/kg		0.53 +/- 0.11		1.73 +/- 0.43	46	2	2.3
AB404, 1 時間, 20 mg/kg	3.0	0.84 +/- 0.28		2.78 +/- 0.59	2580	0	0
AB404, 24 時間, 20 mg/kg		1.97 +/- 0.11	6.6	6.48 +/- 1.09	1606	2.5	2.3
AB404, 48 時間, 20 mg/kg		1.59 +/- 0.21		4.83 +/- 0.27	993	2.5	1.5
AB405, 1 時間, 20 mg/kg	13.6	1.05 +/- 0.15		3.73 +/- 0.92	2566	0	0
AB405, 24 時間, 20 mg/kg		1.97 +/- 0.33	6.6	6.97 +/- 0.44	1966	2	2
AB405, 48 時間, 20 mg/kg		1.62 +/- 0.18		5.96 +/- 0.35	933	2	2.3

10

20

## 【0291】

脳への取り込みと親和性との間の反比例関係が、表 8 中に列挙される抗 TfR Ab で観察された。2 つの低親和性 TfR Ab ( AB 4 0 4 および AB 4 0 5 ) は、改善された取り込みを示し、場合によっては、対照 IgG を上回る注入された用量の % の 8 倍超の増加が測定された。注入から 24 時間後、強力な実質および神経染色が観察された。

30

## 【0292】

【表 8】

表 9. 20 mg/kg の静脈内注入 (\*10 mpk の注入) を施した 24 時間でのトランスフェリン受容体 DVD-Ig (商標) のインビボでの生体内分布の特徴

DVD-Ig (商標) s (商標)	ID / 脳 (g) の割合 (%)	対照 DVD-Ig (商標) を上回る倍率増加	脳内濃度 (nM)	血清濃度 (nM)	実質/神経染色
アイソタイプ対照 DVD-Ig (商標)	0.38 +/- 0.12	適用せず	0.95 +/- 0.30	1420	-/-
DVD2668	0.51 +/- 0.10	1.3	1.82 +/- 0.38	129.6	-/-
DVD2667	3.87 +/- 0.85	10.2	4.79 +/- 0.41	855.1	+/+
DVD1295	1.87 +/- 0.19	5.0	7.74 +/- 0.64	763.3	+/+
DVD2671	0.97 +/- 0.26	2.6	2.90 +/- 0.44	588.2	+/+
DVD2359	0.84 +/- 0.23	2.2	3.04 +/- 0.34	1494.2	+/+
DVD2361	0.79 +/- 0.12	2.1	3.09 +/- 0.28	887.8	+/+
DVD2362	4.08 +/- 0.27	10.7	17.42 +/- 2.09	459.3	+/+
DVD2365	3.87 +/- 0.85	10.2	15.83 +/- 2.48	432.8	+/+
DVD2575	0.53 +/- 0.15	1.4	1.4 +/- 0.4	188.2	+/+
DVD2576	1.14 +/- 0.21	3.0	2.4 +/- 0.7	18.3	+/+

10

20

【0293】

2 つの直交法による脳内で検出された上昇した DVD-Ig (商標) レベル:

静脈内投与による治療投与後に BBB を横断して輸送することを示す IHC による神経細胞および実質への局在 (図 3 および表 8)、ならびに MSD-ECL により測定されるように、対照 DVD-Ig (商標) 脳内濃度より高い (表 8)。DVD-Ig (商標) のいくつかに関しては、注入された用量 / 脳のグラムの割合 (%) により測定されるように、対照 DVD-Ig (商標) と比較して、最大 10 倍高い脳への取り込みが観察された。

30

【0294】

実施例 6: 全身投与の異なる経路による DVD-Ig (商標) の脳への取り込み

同様の脳への取り込みは、DVD2671 を用いた静脈内投与および腹腔内投与 (20 mg/kg) で観察された。皮下投与は、相対的に低い脳内温度および血清濃度を得た。

【0295】

【表 9】

表 10. 異なる投与経路による 24 時間後の 20 mpk の DVD2671 の脳への取り込み

投与経路	脳内濃度 (nM)	血清濃度 (nM)
IV	3.15 +/- 0.26	860
IP	3.72 +/- 0.82	730
SC	2.27 +/- 1.04	490

40

【0296】

実施例 7: DVD-Ig (商標) を用いた薬物動態学的研究

マウスに、20 mpk または 50 mpk の指示された DVD-Ig (商標) を皮下注入し、上述のように、96 時間後処理した。上述のように、96 時間後に処理する前に、別

50

の群に、2回(0および48時間)注入した。単回の20mpkの皮下投与から96時間後に、 $1.58 \pm 0.20$  nMの脳内血清濃度を保持した。異なる研究からの20mpkのTfRのAbまたはDVD2671の静脈内投与から24時間後に測定された脳内および血清濃度を、表10中に比較のために示す。

【0297】

【表 10】

表 1.1. 抗体結合タンパク質についての脳および血清データ

Ab/DVD	処理	試料収集時間 (時間)	血清 (nM)	脳 (nM)
DVD2671	皮下投与-0 時間で、 20mpk の単回 投与	1	3.7 +/- 3.1	1.58 +/- 0.20
		24	142.5 +/- 3.2	
		48	33.8 +/- 12.5	
		72	8.8 +/- 2.5	
		96	1.7 +/- 0.2	
	皮下投与-0 時間で、 50mpk の単回 投与	1	11.25 +/- 7.5	6.86 +/- 2.6
		24	680.0 +/- 143.6	
		48	185.5 +/- 65.6	
		96	6.1 +/- 1.7	
皮下投与-0 時間および 48 時間で、 40mpk の複数 回投与	1	3.24 +/- 2.5	9.03 +/- 1.4	
	24	110.0 +/- 16.83*		
	48	20.04 +/- 1.6		
	96	365.0 +/- 189.12 95.64 +/- 70.24		
IgG **	静脈内投与- 20mpk の単回 投与	24	1.79 +/- 127.3	1.5 +/- 0.3
AB221**	静脈内投与- 20mpk の単回 投与	24	643.3 +/- 61.27	1.6 +/- 0.22
AB404*	静脈内投与- 20mpk の単回 投与	24	1093 +/- 724	6.28 +/- 0.26
AB405*	静脈内投与- 20mpk の単回 投与	24	1227 +/- 628.5	7.00 +/- 0.04
対照 DVD-Ig	静脈内投与- 20mpk の単回 投与	24	1420 +/- 150	0.95 +/- 0.30
DVD2671	静脈内投与- 20mpk の単回 投与	24	588.2 +/- 136.7	2.90 +/- 0.44
		48	118.75 +/- 62.90	3.07 +/- 0.28
	I 静脈内投与- 50mpk の単回 投与	24	2396 +/- 929.4	5.08 +/- 1.25
		48	1281.57 +/- 195	5.27 +/- 1.40

• n = 2

• \*\* n = 3

• \*\*\* n = 4

実施例 8 : DVD - Ig の作製およびインビトロ / インビボスクリーニング

組換え方法を用いて、DVD - Ig 結合タンパク質を作製し、本明細書に記載されるインビトロおよびインビボシステムを用いてスクリーニングした(図4)。特に指定されない限り、以下の実施例において、前述の実施例に記載される方法およびシステム(例えば、親抗体およびDVD - Ig (商標)を特定および特徴付けるために使用されたアッセイ)が使用された。

## 【0299】

本明細書に記載される方法および材料を用いて、標的およびTfR (標的 / TfR DVD)に特異的に結合するドメインを有するDVD - Ig 結合タンパク質(約10~40個のDVD)が設計され、約5ミリグラム(mg)の濃度で発現された。インビトロ分析は、細胞に基づいたTfR結合アッセイ(低親和性が必要とされる)および細胞に基づいたバイオアッセイ標的(高効力が必要とされる)を用いて、標的 / TfR DVD - Ig において行われた。次いで、ネズミ対象を用いて、標的 / TfR DVD - Ig を分析し、インビボ生体内分布 / 脳透過性システムにおいて比較した。対象からの標本 / 試料(例えば、細胞および組織)を分析して、対象における標的 / TfR DVD - Ig の存在を判定した。一分量の標本 / 試料を分析して、脳内の標的 / TfR DVD の濃度を判定し、1グラムあたりの組織に注入された用量の割合(%ID/g)を計算した。別の分量の標本 / 試料を免疫組織化学的に分析して、脳内の標的 / TfR DVD - Ig の局在化が判定された。DVD - Ig (商標)設計が、標的 / TfR DVD を再設計かつ発現し、上述(例えば、インビトロ活性およびインビボ生体内分布 / 脳透過性)のアッセイおよび方法を用いて分析することにより最適化され得るように、副作用の兆候、準最適な取り込み、または標的効力におけるデータが分析された。

## 【0300】

次いで、試験および / または最適化された標的 / TfR DVD Ig が、大規模に発現された。インビトロ品質管理(QC)方法および条件は、有効性研究に使用された材料において行われた。次いで、得られたDVDは、24~96時間の期間にわたって、複数回投与の薬物動態(PK)研究において使用された。

## 【0301】

図5は、例示的なDVD - Ig 結合タンパク質を示す。DVD免疫グロブリンは、BBB抗原(抗BBB抗原)に特異的に結合する少なくとも1つの重鎖可変ドメインと、標的Xに特異的に結合する少なくとも1つの重鎖可変ドメインとを含む。いかなる特定の理論または作用機序に拘束されることを望むものではないが、これらの方法により操作および分析されたDVD - Ig がBBBを効率的に透過し、脳上または脳内の標的に結合することがここで想定される。

## 【0302】

実施例 9 : DVD - Ig のインビボ組織分布分析

図6に示されるように、抗体またはDVD - Ig におけるインビボ組織分布の分析が行われた。0日目に、ネズミ対象に、5~50mg/kg(mpk)のDVD - Ig (商標)、または対照ヒトIgG1k抗体を静脈内注入または腹腔内注入した。DVD - Ig (商標)は、BBB抗原に特異的な結合領域および標的に特異的な結合領域を含んだ。対象に、0時間、1時間、24時間、または96時間で注入した。対象は、ケタミンおよびキシラジンの混合物を用いて指示された時間に殺処分した。

## 【0303】

各対象からの血清を採取し、MSD - ESLアッセイを用いて、対照抗体またはDVD - Ig (商標)の濃度について分析した。アッセイは、ヒトIgG1k抗体およびDVD - Ig の両方に特異的に結合したロバ抗ヒトIgGのF(ab')<sub>2</sub>断片でコーティングしたプレートを使用した。次いで、プレートをsulfo検出タグを有する完全長抗ヒトIgと接触させ、抗体の存在を検出した。

## 【0304】

血清収集後、対象を、2ml/分の速度で10分間D - PBSで灌流した。脳を採取し

10

20

30

40

50

、垂直に分割し / 均等に 2 分割した ( 等分量の 大脳、視神経、下垂体、小脳、および脊髄を含む )。脳の 1 / 2 を均質化し、MSD - ECL アッセイを用いて分析した。脳のもう一方の 1 / 2 を免疫組織化学的方法により分析した。

【 0 3 0 5 】

免疫組織化学的分析については、組織をパラホルムアルデヒドで処理し、次いで、パラフィン包埋した。包埋した材料は、ビオチン化したロバ抗ヒト IgG ( H + L ) を用いて、抗ヒト IgG の検出のために染色した。次いで、この材料をビオチン、streptavidin、およびジアミノベンジジン ( DAB ) と接触させた。

【 0 3 0 6 】

MSD - ECL アッセイからのデータを使用して、血清中ならびに脳の異なる組織 / 細胞、例えば、血管、実質、および神経中の DVD - Ig の存在を特定した。DVD - Ig におけるデータを、対照ヒト IgG 1 k 抗体を投与した対象から得られたデータと比較した。

10

【 0 3 0 7 】

実施例 10 : 抗マウス TfR ( AB 2 2 1 ) 抗体およびヒト化変異体の分析

本明細書の実施例は、抗体 AB 2 2 1 ( ネズミ TfR を特異的に認識する IgG 2 a 抗体 ) およびヒト化変異体の結合および BBB 透過性の特徴を分析した ( 表 1 2 )。TfR 抗体 AB 2 2 1 およびそのヒト化変異体の存在は、図 6 に記載されるアッセイおよび方法を用いて分析された。データは、ヒトアイソタイプ IgG 1 対照と比較して、血清および脳内の TfR 抗体 AB 2 2 1 およびそのヒト化変異体のより高い存在を示す。免疫組織化学的染色は、対照アイソタイプヒト IgG 1 対照と比較して、小脳における血管およびプルキンエ細胞中の AB 2 2 1 抗マウス TfR 抗体に対してより多くの染色を示した ( 図 2 )。

20

【 0 3 0 8 】

【 表 1 1 】

表 1 2 . 抗マウス TfR ( AB 2 2 1 ) 抗体およびヒト化変異体における TfR 結合およびインビボ生体内分布データ

Ab の名称	mTFR 結合細胞に基づいたアッセイ (EC50 (nM))	脳内濃度 (nM) (20 mpk の静脈投与)	ID / 脳 (g) の割合 (%)	IgG を上回る倍率増加	血清濃度 (nM)	実質染色 最大 = 4	神経染色 最大 = 4
対照 IgG	NB	1.14 +/-0.17	0.3 +/-0.03	N/A		0	0
AB221	0.12	3.20 +/-0.35	0.96 +/-0.09	3.2	600 .0	1.5	1.0
AB402	0.06						
AB403	0.09						
AB404	3.0	6.0 +/-0.50	1.5	5	580	2.5	2.3
AB405	13.55	7.0 +/-0.71	1.5	5	800	2	2

30

40

【 0 3 0 9 】

いかなる特定の理論または作用機序に拘束されることを望むものではないが、低親和性 TfR 抗体が、同じ DVD - Ig の外側の配置で高親和性 TfR 抗体よりも BBB をより効率的に透過することがここで想定される。あるいは、DVD - Ig の内側の配置で高親和性 TfR 抗体 ( 結合アッセイまたは同様の方法により決定される ) が、同じ DVD - Ig の内側の配置で低親和性 TfR 抗体よりも BBB をより効率的に透過することもここで想定される。

【 0 3 1 0 】

50

実施例 11：治療投与後、2つの直交法（IHCおよびMSD-ECL）ならびにBBBを横断して輸送する能力により検出されたDVD-Igの上昇レベル

直交法（MSD-ECLアッセイおよびIHC染色）は、本明細書の実施例において使用され、TfRに結合する一部分を有するDVD-Igが、BBBを効率的に横断し、脳、例えば、神経細胞および実質に局在化されたかどうか判定した（表13）。

【0311】

【表12】

表13. MSD-ECLアッセイデータおよびDVD-Igにおける免疫組織化学的染色データ

DVD-Ig	IC50 (nM)	24時間で注入された用量/脳(g)の割合(%)	対照IgGを上回る倍率増加	24時間での実質染色	24時間での神経染色
アイソタイプ対照 DVD-Ig	NB	0.013 ± 0.003	適用せず	なし	なし
TfRLSAbeta DVD2668	0.1	0.06 ± 0.01	4.6	なし	なし
AbetaLSTfR DVD2671	1.2	0.14 ± 0.01	10.8	あり	あり
TfRSSHer2 DVD2575	0.1	0.07 ± 0.01	5.4	あり	あり
Her2SSTfR DVD2576	3.4	0.14 ± 0.01	10.8	あり	あり

10

20

30

【0312】

半最大阻害濃度（IC50）は、生物学的または生化学的機能の阻害における化合物の有効性の尺度である。TfRに特異的に結合した一部分を含むDVD-Igが、対照DVD-Ig（商標）よりも脳内においてTfRをより有効的に阻害し、より高濃度で存在したことが観察された（表13）。MSD-ECLおよび免疫組織化学的データは、DVD-Igが、治療投与後、BBBを横断して有効に輸送されたことを示す。図3は、DVD-Igが対照（非TfR）DVD-Igを投与された対象よりも脳の実質組織および神経細胞においてより局在化されたことを示す例示的な顕微鏡写真である。

【0313】

実施例 12：TNF/TfR DVD-Igの選択

表14は、TNF/TfR DVD-Igの一覧表を含む。その後の疼痛の有効性の分析におけるDVDの選択基準は、実施例10中のデータに基づいて、DVD-Igの外側の配置において低親和性TfR抗体がBBBをより効率的に透過する場合の、低TfR結合親和性を示すデータを含んだ。DVDは、血清および脳内の最大濃度、BBBを通過する透過、最大抗TNF効力に基づいてさらに選択された。

【0314】

データは、TNF抗体8C11が強力に結合し、TNFを阻害したことを示す。抗TNF抗体8C11は、以下の結合VHおよびVL領域を有する：

> VH (配列番号162)

EFQLQQSGPELVKPGASVRI SCKASGYSFTDYNMNWVKQSN  
NGKSLWVGVINPNYGSSTYNQKFKGKATLTVDQSSSTAY  
MQLNSLTSEDSAVYYCAR K WGQLGRGFFDVWGTGTTVTVS  
S

> VL (配列番号163)

QIVLSQSPA ILSASPG EKVTMTCRASSSVS YMHWFQQKPG  
SSPKPW IYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYS L TISRVEAE  
DAATYYCQQWSSSPLTFGAGTKLELKR

40

50

【 0 3 1 5 】

【 表 1 3 】

表 1 4. 疼痛効力の例

5 5 1 8 3 2 B B I - 3 3 6 P C 5 5 1 8 3 2 B B I - 3 3 6 P C に対する適合性について分析された TNF-TfR DVD-I g

DVD 対の名称	モノマーの割合 (%) (純度)	293/mTFR 細胞に基づいたアッセイ (EC50 (nM))	BMP アッセイ (IC50 (nM))	ID / 脳(g)の割合 (%) (10mpk*/20mpk**/30mpk***)	脳内濃度 (nM)	血清濃度 (nM)
DVD 対照	97.9	N/A	N/A	0.33 +/- 0.08***	2.5 +/- 0.63	2268 +/- 188.3
RGMA(AE12-1)	100%	N/A	0.25	0.4 +/- 0.16**	5.9 +/- 2.1	4512
RGMA(AE12-1)-LS-TfR(AB402)	99.3	127.4	0.213	3.0 +/- 0.60**	10.7 +/- 1.2	1183.75
RGMA(AE12-1)-SL-TfR(AB402)	90.5	2.13	0.367	1.7 +/- 0.34**	6.5 +/- 0.89	818.75
RGMA(AE12-1)-LL-TfR(AB402)	91.8	1.67	1.78	1.4 +/- 0.21**	6.2 +/- 0.89	533.75
RGMA(AE12-1)-SS-TfR(AB402)	96.4	30.85	0.436	3.9 +/- 0.62*	7.8 +/- 0.95	669.5
RGMA(AE12-1)-GS-TfR(AB402)	91.4	5.36	0.014	6.3 +/- 0.75*	9.9 +/- 1.2	187.04
RGMA(AE12-1)-LS-TfR(AB403)	99.1	25.73	<0.025nM	10.1 +/- 1.5*	18.4 +/- 5.0	481.4
RGMA(AE12-1)-SS-TfR(AB403)	98.2	71.03	1.18	4.4 +/- 0.49*	9.3 +/- 1.11	486.9
RGMA(AE12-1)-GS-TfR(AB403)	98.8	4.3	<0.025nM	3.1 +/- 0.36**	14.8 +/- 0.65	396.6
TfR(AB405)-SL-RGMA(AE12-1)	95.2	4.41	0.73	2.4 +/- 0.42**	13.1 +/- 2.8	642.8
TfR(AB405)-LS-RGMA(AE12-1)	99.2	3.9	阻害なし	11.4 +/- 3.99*	18.3 +/- 1.7	462.2
TfR(AB405)-GS-RGMA(AE12-1)	90.1	28.07	3.12	8.9 +/- 0.48*	19.1 +/- 1.88	611.9
TfR(AB405)-LL-RGMA(AE12-1)	98.9	4.44	0.701	10.2 +/- 0.48*	19.0 +/- 2.94	754.15
TfR(AB404)-LL-RGMA(AE12-1)	94.1	3.61	13.25	11.9 +/- 2.63*	24.8 +/- 3.77	464.4

RGMA (AE12-1) -GS-TfR (AB403) および TfR (AB405) -SL-RGMA (AE12-1) が、有効性に対して大規模であったことに留意する。

【 0 3 1 6 】

モノクローナル抗体 AB221 を、本明細書中の実施例において使用し、この抗体を用いたデータは、抗体 8C11 を用いたデータと比較した。抗体 8C11 の 6 つの CDR (軽鎖の CDR-L1、-L2、および -L3 ならびに重鎖の CDR-H1、-H2、および -H3 は、上の配列番号 162 ~ 163 の強調表示 / 太字部分である。重鎖の CDR は、DYNMN (配列番号 164)、VINPNYGSSTYNQKFKG (配列番号 165)、および KWGQLGRGF FD (配列番号 166) である。軽鎖の CDR は、RASSSVSYMH (配列番号 167)、ATSNLAS (配列番号 168)、および QQ

W S S S P L T (配列番号 1 6 9) である。

【 0 3 1 7 】

実施例 1 3 : 選択された DVD - I g の脳内濃度および配置分析

抗体 A B 2 2 1 またはヒト化変異体 A B 4 0 5 を有する一部分を有する DVD - I g が構築され、本明細書中の実施例において分析された。また、対照 DVD - I g も分析された。

【 0 3 1 8 】

8 C 1 1 - h F c の DVD - I g は、T N F に特異的に結合する 8 C 1 1 抗体およびヒト免疫グロブリン G の F c 部分に結合する抗体 ( h F c ) を含んだ。T N F - G S - A B 2 2 1 の DVD - I g は、T N F に結合する抗体、G S リンカー、およびネズミ T f R を特異的に認識するモノクローナル抗体 A B 2 2 1 ( I g G 2 a ) を含んだ。T f R ( A B 4 0 5 ) - S L - T N F の DVD - I g は、A B 4 0 5 ( A B 2 2 1 抗体のヒト化変異体 )、S L リンカー、および T N F に結合する抗体を含んだ。例示的な組織染色データを図 7 に示す。表 1 5 は、T f R ( A B 4 0 5 ) - S L - T N F の DVD - I g、T N F - G S - A B 2 2 1 の DVD、8 C 1 1 - h F c の DVD - I g、ヒト I g G、または DVD 対照を投与した対象における脳内の濃度および局在データを示す。

【 0 3 1 9 】

【表 1 4】

表 1 5. DVD - I g の脳内の濃度および局在

	HIgG (40 mpk 24 時間)	TNF (8C11)-hFc (20 mpk 24 時間)	DVD 対照 (30 mpk 48 時間)	TNF-GS-AB221 (20 mpk 24 時間)	TfR(AB405)-SL-TNF (20 mpk 24 時間)
脳 (nM)	5.4 +/- 1.0*	3.1 +/- 1.8	2.5 +/- 0.63*	5.58 +/- 0.88	16.2 +/- 1.3
脊髄 (nM)	不検出	不検出	不検出	不検出	10.0 +/- 0.5
IHC 染色 最大値 = 4 (平均) 実質/神経	0/0.12	0/0.12	0/0	0.5/1	1.5/1.9

【 0 3 2 0 】

実施例 1 4 : B B B を横断し、疼痛を有効に軽減した T N F / T f R の DVD - I g の髄腔内投与

本明細書中の実施例は、疼痛有効性モデルにおける T N F / T f R の DVD - I g の髄腔内投与の有効性を分析した。部分的神経損傷、例えば、坐骨神経の片側の緩い結紮または慢性収縮性損傷 ( C C I ) は、同側下肢を持続的に固定する動物をもたらす。結紮の堅さに応じて、異痛および痛覚過敏は、数時間または数日間持続し得る。知られているように、B e n n e t t モデルは、神経損傷を誘発するための手術を伴い、よく知られている薬物動態 ( P K ) および疼痛有効性モデルである。

【 0 3 2 1 】

B A L B / c ネズミ対象は、B e n n e t t 手術を受け、マウス F c に特異的な対照 I g G ( 1 注入につき 4 8 μ g / 1 0 μ l の投与 )、8 C 1 1 - G S - A B 2 2 1 の DVD - I g ( 抗 T N F α / 抗 T f R、1 注入につき 5 5 μ g / 1 0 μ l の投与 )、またはモル

ヒネ（1注入につき10 $\mu$ g / 10 $\mu$ lの投与）のいずれかを用いて、毎日髄腔内に注入した。対象に毎日注入した。機械的異痛は、上のBennettモデルにおいて、1日目および5日目にて120分間の注入投与後に評価された（図8）。

【0322】

Bennettモデルにおける8C11-GS-AB221のDVD-Ig（抗TNF $\alpha$  / 抗TfR）の髄腔内注入は、対象において、対照IgGの髄腔内注入よりもさらに疼痛を軽減したことが観察された。8C11-GS-AB221のDVD-Igを髄腔内注入した対象におけるデータは、モルヒネを髄腔内注入した対象において観察されたデータと比較された。データは、17nMの8C11-GS-AB221のDVD-Igが脳内に検出され、52nMの8C11-GS-AB221のDVD-Igが脊髄中に検出されたことを示す。静脈内注入後、脳内に存在する8C11-GS-AB221のDVD-Igの量は、同様であることが観察され（16nM、表15）、これは、効率的な量が20mpKの静脈内注入により脳内に得られたことを示す。

10

【0323】

実施例15：TNF / TfRのDVD-Igの静脈内投与は、BBBを横断し、疼痛を軽減するのに有効であった

本明細書中の実施例は、上述のBennett PK / 疼痛有効性モデルにおけるTNF / TfRのDVD-Igの静脈内投与の有効性を分析した。

【0324】

BALB/cネズミ対象は、Bennett手術を受け、マウスFcに特異的な対照IgG（1注入につき48 $\mu$ g / 10 $\mu$ lの投与）、8C11-GS-AB221のDVD-Ig（抗TNF $\alpha$  / 抗TfR、1注入につき55 $\mu$ g / 10 $\mu$ lの投与）、またはガバペンチンの緊急手術後投与（1注入につき10 $\mu$ g / 10 $\mu$ lの投与）を静脈内注入した。対象に毎日注入した（20mg / kg）。機械的異痛は、上のBennettモデルにおいて、1日目および5日目にて120分間の注入投与後に評価された。

20

【0325】

データは、8C11-GS-AB221のDVD-Ig（抗TNF $\alpha$  / 抗TfR）の静脈内注入が、Bennettモデルの対象において、対照IgGの静脈内注入よりも疼痛を軽減したことを示す（図9）。最も重要なことには、8C11-GS-AB221のDVD-Igの静脈内注入に対するデータは、ガバペンチンの緊急投与の静脈内注入で疼痛の軽減を得る際にわずかに有効であった。本明細書中のデータは、髄腔内投与または静脈内投与のいずれかによる8C11-GS-AB221のDVD-Igの投与は、疼痛を軽減するのに有効であったことを示す。

30

【0326】

実施例16：多発性硬化症モデルにおけるRGMA-TfRのDVD-Ig

多くの神経変性疾患の初期段階は、神経突起の損傷により特徴付けられ、シナプス機能に障害がおきる。神経突起の変性は、しばしば、神経細胞死をもたらし、罹患した神経においてシグナル伝導を損ない、感覚、動作、認識、または神経が関連する他の機能において機能障害を引き起こす。神経突起の変性はまた、自己免疫疾患の多発性硬化症（MS）の病理学的指標でもある。

40

【0327】

反発性誘導分子A（RGMA）は、網膜軸索における誘導分子である。誘発した脊髄損傷後、RGMAは、病変周辺の瘢痕組織中で蓄積し、RGMAの存在は、軸索成長の阻害剤であり得る。

【0328】

表14は、MSのモデルにおける適合性について分析されたRGMA-TfrのDVD-Igを列記する。DVD-Igは、外側の配置（N末端）または内側の配置（C末端）で抗BBB抗原部分または抗標的部分を有するように操作された。本明細書中の実施例は、抗BBBの上皮抗原部分の配置に応じて、低親和性抗体（外側の配置）または高親和性抗体（内側の配置）のいずれかを選択し得ることを示す。この実施例が外側の配置で抗B

50

BB抗原抗体を使用したため、MSの有効性モデルで用いるDVD-Igの選択基準は、低TfR結合親和性、最高の抗RGM A効力、最高の血清および脳内濃度、ならびに最大のBBB透過性であった。したがって、TfR(AB405)-SL-RGM A(AE12-1)のDVD-IgおよびTfR(AB405)-LS-RGM A(AE12-1)のDVD-Igが選択され、本明細書に記載されるMSモデルにおいて、より大規模に発現し、有効性について分析された。あるいは、内側の配置で抗BBB抗原抗体を用いて、高TfR結合親和性、最高の抗RGM A効力、最高の血清および脳内濃度、および最大のBBB透過性を有するDVD-Igを選択し得る。

## 【0329】

RGM A - J L 3 - V H ( A E 1 2 - 1 ) ( 配列番号 1 7 0 ) は、  
 E V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T S H G I S W V R Q A  
 P G Q G L D W M G W I S P Y S G N T N Y A Q K L Q G R V T M T T D T S T S T A Y  
 M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R V G S G P Y Y Y M D V W G Q G T L V T V S S  
 である。

10

## 【0330】

RGM A - J L 3 - V L ( A E 1 2 - 1 ) ( 配列番号 1 7 1 ) は、  
 Q S A L T Q P R S V S G S P G Q S V T I S C T G T S S S V G D S I Y V S W Y Q Q  
 H P G K A P K L M L Y D V T K R P S G V P D R F S G S K S G N T A S L T I S G L  
 Q A E D E A D Y Y C C S Y A G T D T L F G G G T K V T V L Gである。

20

## 【0331】

6つのCDR(軽鎖のCDR-L1、-L2、および-L3ならびに重鎖のCDR-H1、-H2、および-H3は、上の配列番号170~171の強調表示/太字部分である。重鎖のCDRは、SHGIS(配列番号172)、WISPYSGNTNYAQKLQ(配列番号173)、およびVGS GPYY YMDV(配列番号174)である。軽鎖のCDRは、TGTSSSVGDSIYVS(配列番号175)、DVTKRPS(配列番号176)、およびCSYAGTDTL(配列番号177)である。2010年3月25日に公開された米国特許公開第2010/0074900号および2013年8月1日に公開された国際公開第WO/2013/112922号を参照されたく、これらのそれぞれは、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

30

## 【0332】

図10は、24時間にて40mpkのRGM A(AE12-1)-hFc、30mpkのヒトIgG対照、20mpkのRGM A(AE12-1)-GS-AB403のDVD-Ig、または30mpkのRGM A(AE12-1)-GS-AB403のDVD-Igのいずれかを投与した対象からの染色下脳細胞の例示的な顕微鏡写真である。データは、RGM A(AE12-1)-GS-AB403のDVD-Igと接触した対象からの脳組織の有効な染色を示し、これは、DVD-IgがBBBを効率的に横断し、脳内の神経細胞/組織においてRGM Aに結合したことを示す。

40

## 【0333】

実施例17:アミロイド-ベータ/TfRのDVD-Igの透過性および分析

パピネオズマブは、神経毒性アミロイド-ベータペプチドを標的とするヒト化モノクローナル抗体(Mab)である。アミロイド-ベータ(A $\beta$ )は、アルツハイマー病および他の神経変性の病変の早期バイオマーカーである。ネズミ抗体3D6は、ヒト化モノクローナル抗体であるパピネオズマブの親である。

40

## 【0334】

A $\beta$ に特異的に結合する一部分、およびTfRに結合する別の部分を含んだDVD-Igが、設計かつ構築された。A $\beta$ に結合するDVD-Igおよび構成要素の例を表2~4に示す。表16は、TfRおよびA $\beta$ への結合、血清および脳内の濃度、ならびに実質および神経におけるIHC染色についてのアッセイおよびモデル系において操作され、分析されたA $\beta$ /TfRのDVD-Igの一覧表を示す。

50

## 【0335】

8週齢のC57BL/6N雌ネズミ対象に、20mpkのDVD-Igを静脈内投与した。AB405-SL-A(3D6)のDVD-Ig、A(3D6)-GS-AB403のDVD-Ig、およびA(3D6)-SS-AB402のDVD-Ig 2359はそれぞれ、TfRに再度高効力を有し、対照IgGを投与した対象よりも脳組織中でより多くの量で存在/局在したことが観察された。

【0336】

【表15】

表16. 脳内のAβ/TfRのDVD-IgのDVD-Ig濃度および局在

Ab/DVD	293/mTFR細胞に基づいたアッセイEC50 (nM)	Aβ結合 (ng/mL)	血清 (末端)		脳		IHC (最大=4) 染色	
			μg/mL	nM	ng/mL	nM	実質 (平均)	神経 (平均)
AB405-SL-Aβ(3D6)	4.71	73.9	84.2±8 .3	421.4± 41.6	2089± 269.4	10.4± 1.34	1.75	2.0
Aβ(3D6)-GS-AB403	1.98	29.6	89.6±1 0.9	448.1± 54.4	946.1± 84.9	4.7±0 .42	1.38	1.5
Aβ(3D6)-SS-AB402 のDVD2359	12	不検出	259.8± 72.5	1299± 362.9	1332± 343.7	6.6±1 .71	1	1
Aβ(3D6)-SS-AB405 のDVD2366	結合なし	不検出	248.6± 41.1	1243± 205.8	215.7± 22.9	1.0±0 .11	1	0.5
Ig Fc 突然変異体	結合なし	結合なし	379.1± 7.7	2527± 51.6	387.1± 102.6	2.5±0 .68	0.17	0

10

20

【0337】

実施例18: 血清および脳内のTNF/TfRのDVD-Ig濃度および局在

本明細書中の実施例は、上述のPK研究において、対象に投与したTfR(AB405)-SL-TNFのDVD-Igの濃度および局在を分析した。対象に、皮下(SC)、静脈内(IV)、または腹腔内(IP)のいずれかに異なる投与(20~40mpkの単回または複数回投与)でTfR(AB405)-SL-TNFのDVD-Igを投与した。

30

【0338】

表17中のデータは、静脈内および腹腔内の投与経路を用いて、TfR(AB405)-SL-TNFのDVD-Igに匹敵する血清および脳内濃度を示す。

【0339】

【表 16】

表 17. 脳内の T f R ( A B 4 0 5 ) - S L - T N F の D V D - I g 濃度および局在

処置	収集時間 (時間)	血清		脳 (nM)	脊髄 (nM)	IHC 染色 最 大=4 (平均)	
		(ug/mL)	(nM)				
皮下投与 - 20mpk の単 回投与	1	0.63 +/- 0.25	3.1 +/- 1.2	8.4 +/- 1.6	5.7 +/- 1.5	0.87	1.0
	24	38.9 +/- 11.5	194.9 +/- 57.5				
腹腔内投与 - 20mpk の 単回投与	1	34.7 +/- 8.6	173.6 +/- 43.2	16.2 +/- 1.3	10.0 +/- 0.5	1.5	1.9
	24	109.4 +/- 16.2	547.2 +/- 81.3				
静脈内投与 - 20mpk の 単回投与	1	83.8 +/- 21.1	419.5 +/- 105.9	16.8 +/- 1.8	9.3 +/- 1.5	1.9	1.4
	24	109.0 +/- 20.9	545.0 +/- 104.7				
皮下投与 - 40mpk の単 回投与	1	1.0 +/- 0.69	5.4 +/- 3.4	16.2 +/- 1.7	8.0 +/- 1.3	1.1	0.87
	24	88.0 +/- 7.3	440.0 +/- 36.9				
腹腔内投与 - 40mpk の 単回投与	1	45.0 +/- 11.5	225.5 +/- 57.8	22.4 +/- 4.3	9.6 +/- 2.2	1.5	0.87
	24	218.5 +/- 15.1	1092. +/- 75.4				
静脈内投与 - 40mpk の 単回投与	1	168.7 +/- 44.6	843.3 +/- 223.4	20.7 +/- 2.6	10.2 +/- 2.6	2.2	1.7
	24	172.6 +/- 9.9	863.2 +/- 49.9				
静脈内投与 - 20mpk の 複数回投与	48	860.4 +/- 65.3	4302 +/- 326.9	23.3 +/- 2.7			

10

20

30

## 【 0 3 4 0 】

## 実施例 19 : 血清および脳内の T f R / R G M A の D V D - I g 濃度および局在

本明細書中の実施例は、上述の P K 研究において、雄 B A L B / c ネズミ対象に投与した A B 4 0 5 - S L - R G M A D V D - I g の濃度および局在を分析した。対象に、皮下 ( S C )、静脈内 ( I V )、または腹腔内 ( I P ) のいずれかに異なる投与 ( 2 0 ~ 4 0 m p k の単回または複数回投与 ) で A B 4 0 5 - S L - R G M A の D V D - I g を投与した。表 1 8 は、A B 4 0 5 - S L - R G M A の D V D - I g を投与した対象における血清および脳内の濃度および局在データを示す。

40

## 【 0 3 4 1 】

【表 17】

表 18. PK研究における血清および脳内のAB405-SL-RGMAのDVD-Ig濃度および局在

Ab/DVD	処置	組織の 収集時間(時間)	血清		脳 (nM)	脊髄 (nM)	IHC 染色 最大=4 (平均)		
			ug/mL	(nM)					
AB405 -SL- RGMA	静脈内 - 20mpk の 単回投与	1	115.4 +/- 25.5	576.9 +/- 127.8					
		24	98.6 +/- 7.7	601.8 +/- 419.0	21.6 +/- 4.6	8.3 +/- 3.9	0.75	0.75	
		48	40.9 +/- 6.1	204.9 +/- 30.7	17.9 +/- 1.6	8.2 +/- 1.5	1.1	1.1	
	静脈内 - 40mpk の 単回投与	1	289.3 +/- 33.2	1446 +/- 166.6					
		24	207.1 +/- 21.7	1036 +/- 108.7	25.7 +/- 4.0	13.4 +/- 1.8	1.5	0.87	
		48	79.7 +/- 15.8	398.5 +/- 79.4	23.3 +/- 2.1	11.43 +/- 1.2	1.7	0.87	
	静脈内 - 0、24、48 時間にて 20mpk の 複数回投 与	48	538.9 +/- 26.9	2273 +/- 848.8	30.4 +/- 4.6	不検出			
	RGMA hFc の Lot 190431 8	静脈内 - 40mpk の 単回投与	24	653.0 +/- 151.6	4354 +/- 1011	5.3 +/- 1.8	不検出	0.25	0
	IgG Fc 突然変 異体 Lot 180464 6	静脈内 - 40mpk の 単回投与	24	449.8 +/- 77.3	2999 +/- 515.6	5.4 +/- 1.0	不検出	0	0.12

10

20

30

40

## 【0342】

いかなる特定の理論または作用機序に拘束されることを望むものではないが、実施例において本明細書に記載されるDVD-Igが単回全身注入(20mpk、静脈内)から2時間後、実質および神経細胞中のIHC染色により検出されたことがここで想定される。脳への取り込みの増加が、注入から24時間後に観察された。さらに、DVD-Igは、50mpkの単回静脈内注入後、少なくとも約96時間脳内に保持された。DVD-Ig

50

は、複数回の注入、例えば、2回の20mpkの静脈内注入を用いることにより脳内に蓄積された。実際に、同様の脳への取り込みデータがいずれかの静脈内で観察された。

【0343】

参照による組み込み

本出願全体にわたって引用され得るすべての引用された参照（文献参照、特許、特許出願、およびウェブサイトを含む）の内容は、その中に引用された参照と同じように、あらゆる目的のためにその全体が参照により本明細書に明白に組み込まれる。本開示は、特に指定されない限り、当該技術においてよく知られている免疫学、分子生物学、および細胞生物学の従来技術を採用する。

【0344】

本開示はまた、分子生物学および薬物送達分野でよく知られている技法を参照によりそれらの全体を組み込んでいる。これらの技法は、以下の出版物：

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)、

Bergman I, Burckart GJ, Pohl CR, Venkataramanan R, Barmada MA, Griffin JA, Cheung. Pharmacokinetics of IgG and IgM anti-ganglioside antibodies in rats and monkeys after intrathecal administration. J Pharmacol Exp Ther. 1998 Jan; 284(1): 111-5、

Braen AP, Perron J, Tellier P, Catala AR, Kolaitis G, Geng W. A 4-week intrathecal toxicity and pharmacokinetic study with trastuzumab in cynomolgus monkeys. Int J Toxicol. 2010 May-Jun; 29(3): 259-67、

CONTROLLED DRUG BIOAVAILABILITY, DRUG PRODUCT DESIGN AND PERFORMANCE, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984)、

Garg A, Balthasar JP. Investigation of the influence of FcRn on the distribution of IgG to the brain. AAPS J. 2009 Sep; 11(3): 553-7、

Giege, R. and Ducruix, A. Barrett, CRYSTALLIZATION OF NUCLEIC ACIDS AND PROTEINS, a Practical Approach, 2nd ed., pp. 201-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999)、

Goodson, in MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE, vol. 2, pp. 115-138 (1984)、

Hammerling, et al., in: MONOCLONAL ANTIBODIES AND T-CELL HYBRIDOMAS 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)、

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

Kabat et al., SEQUENCES OF PROTEINS OF IM

10

20

30

40

50

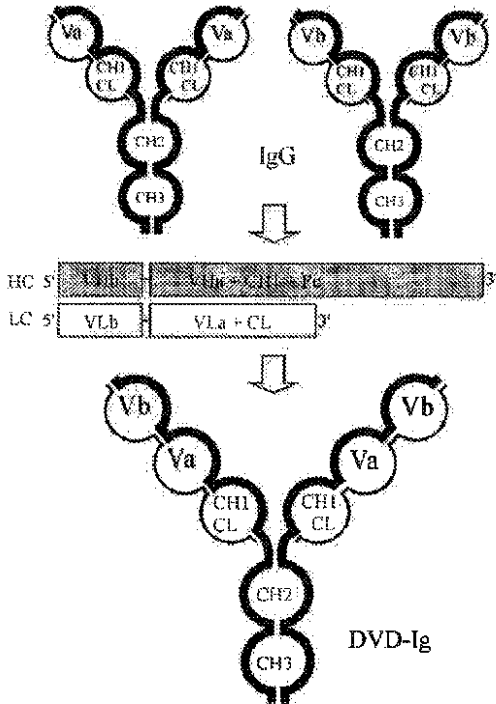
- MUNOLOGICAL INTEREST (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) and (1991)、Kabat, E. A., et al. (1991) SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242、Kontermann and Dubel eds., ANTI BODY ENGINEERING (2001) Springer-Verlag. New York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5)。
- Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990)、
- Levites Y, Smithson LA, Price RW, Dakin RS, Yuan B, Sierks MR, Kim J, McGowan E, Reed DK, Rosenberry TL, Das P, Golde TE. Insights into the mechanisms of action of anti-Aβ antibodies in Alzheimer's disease mouse models. FASEB J. 2006 Dec; 20(14): 2576-8. Epub 2006 Oct 26、
- 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 Press., 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)。
- Shen DD, Artru AA, Adkison KK. Principles and applicability of CSF sampling for the assessment of CNS drug delivery and pharmacodynamics. Adv Drug Deliv Rev. 2004 Oct 14; 56(12): 1825-57。
- 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 Ibelgafts). 634 pp. (ISBN 0-89573-614-4)、に記載される技法を含むが、これらに限定されない。

均等物

本開示は、その精神または本質的な特徴から逸脱することなく、他の具体的な形態において具現化され得る。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べきである。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り示され、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含まれることが意図される。

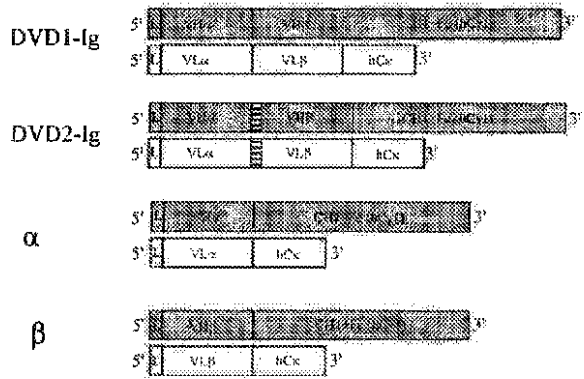
【図1A】

A

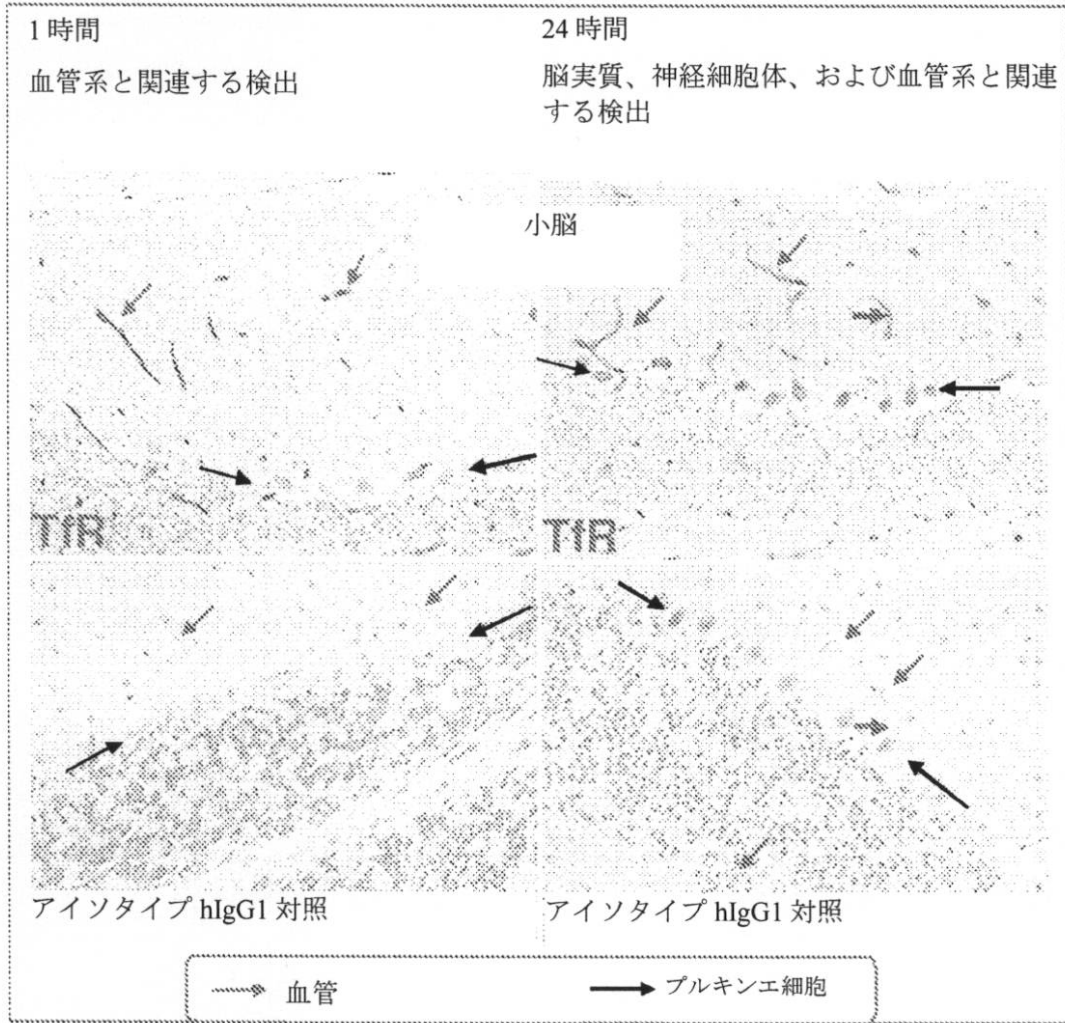


【図1B】

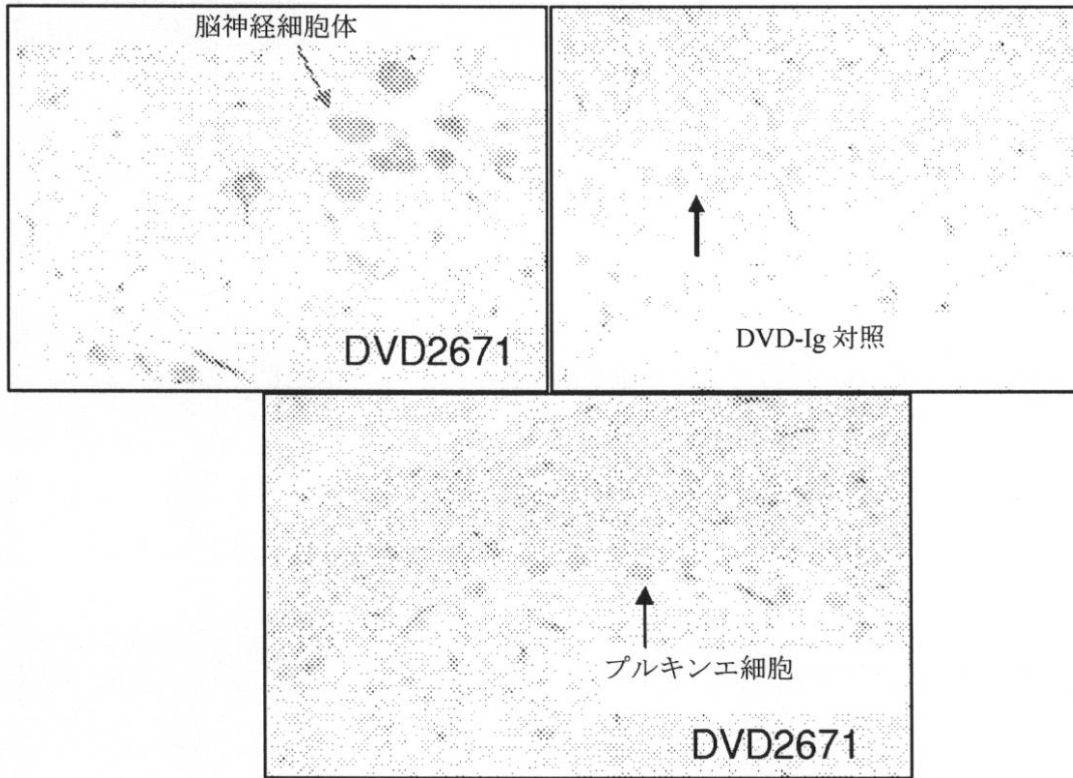
B



【図2】

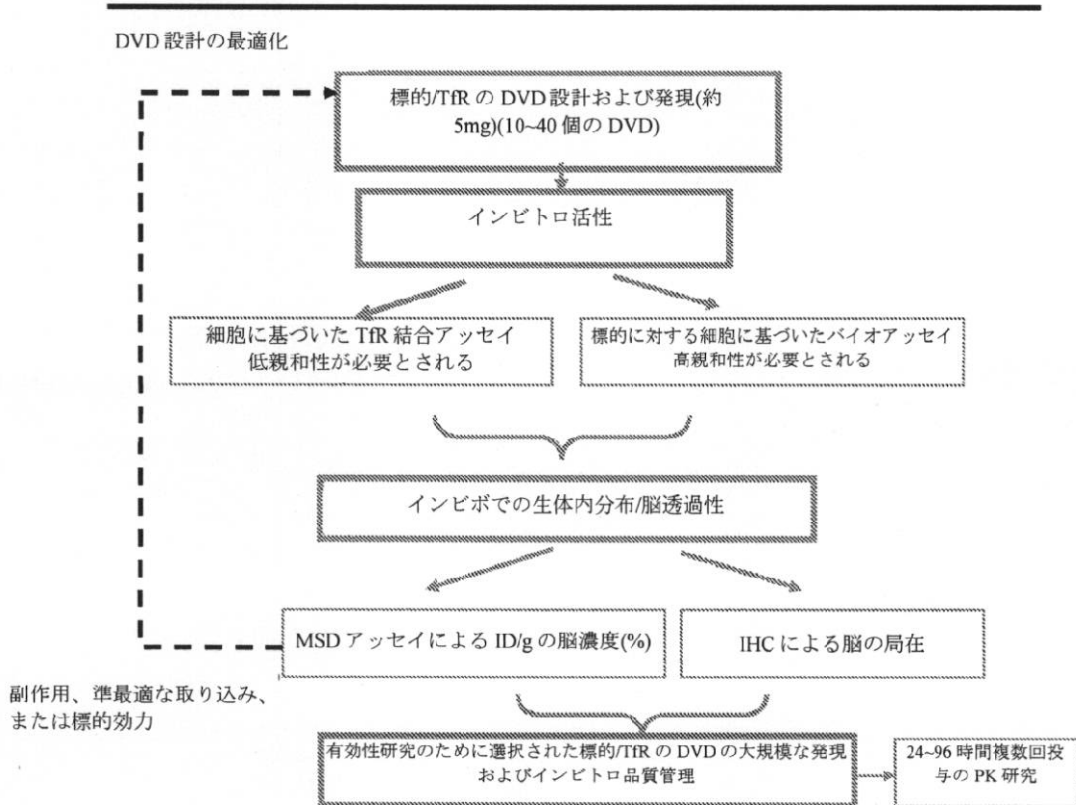


【 図 3 】

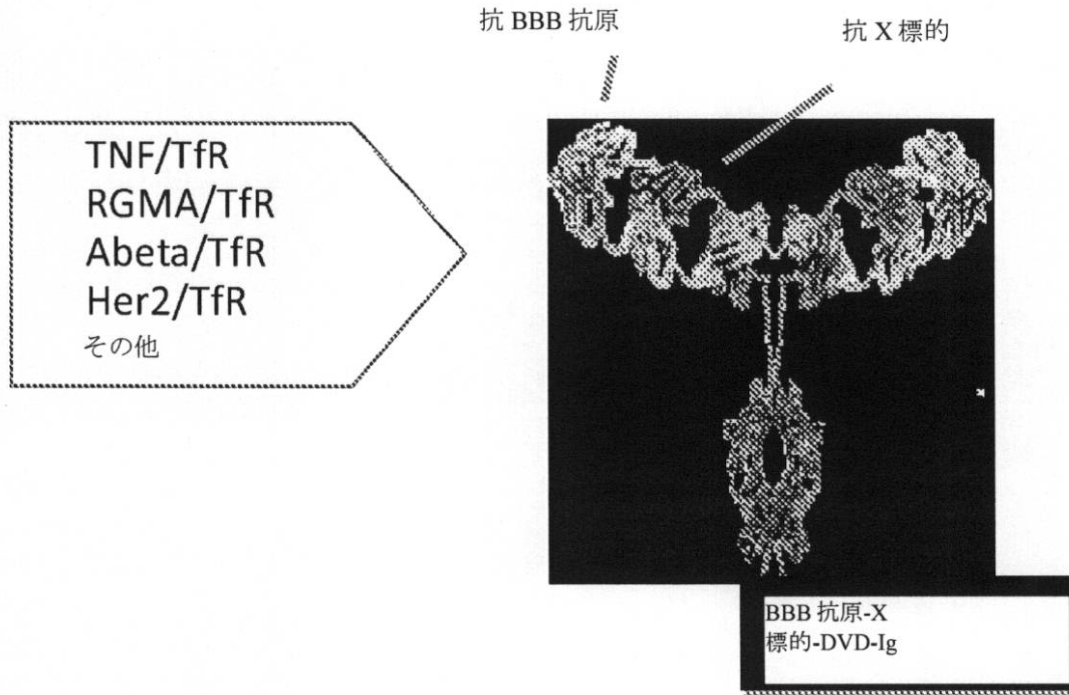


【 図 4 】

BBB-DVD-Ig の生成およびインビトロ/インビボでのスクリーニング

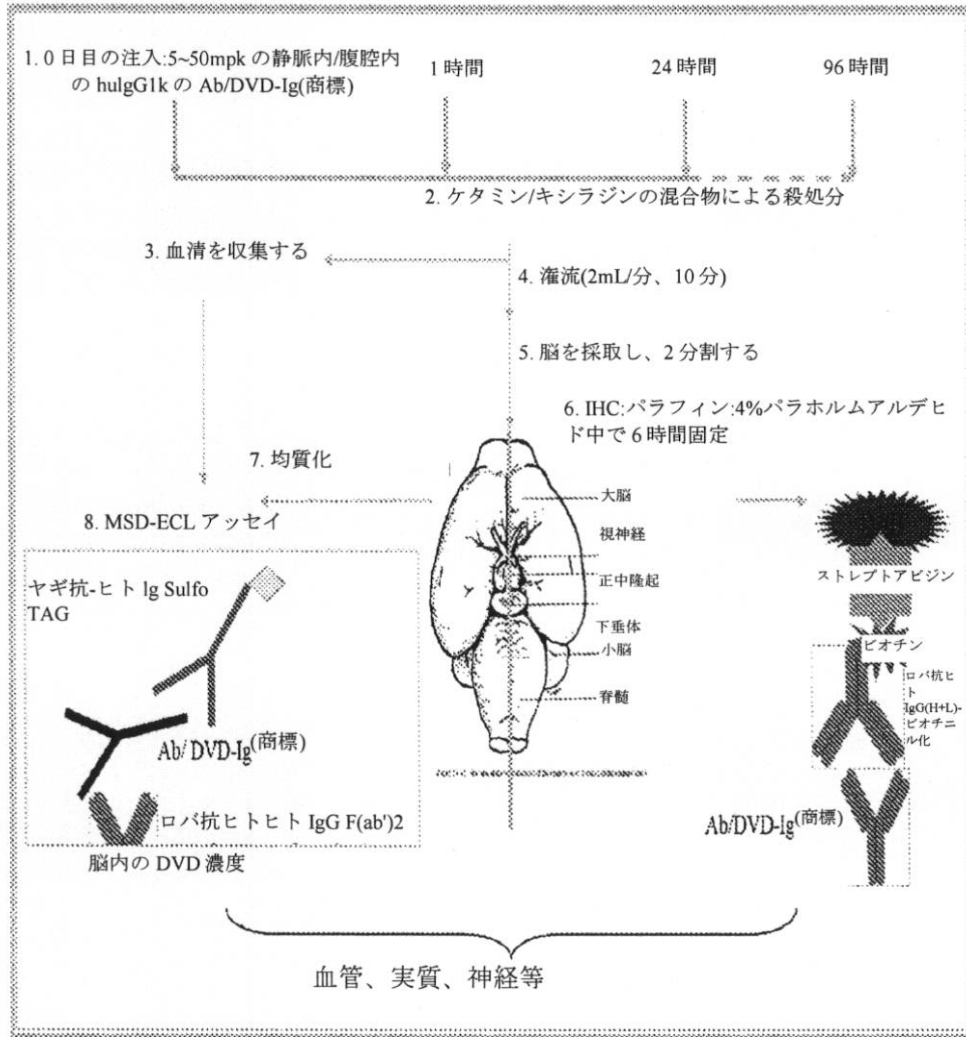


【 図 5 】

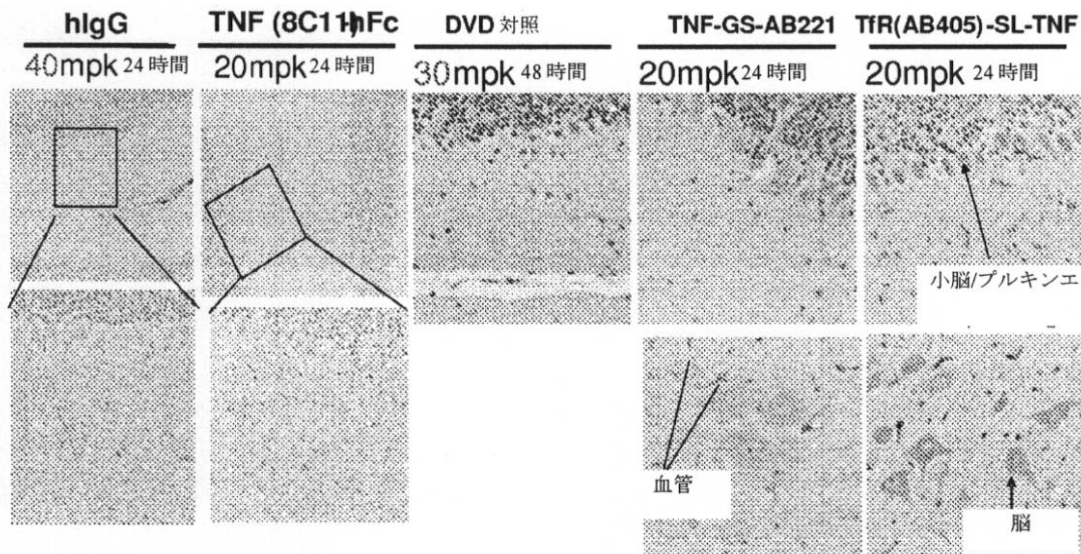


【 図 6 】

RMTD の Ab/DVD-Ig におけるインビボでの組織分布試験プロトコル

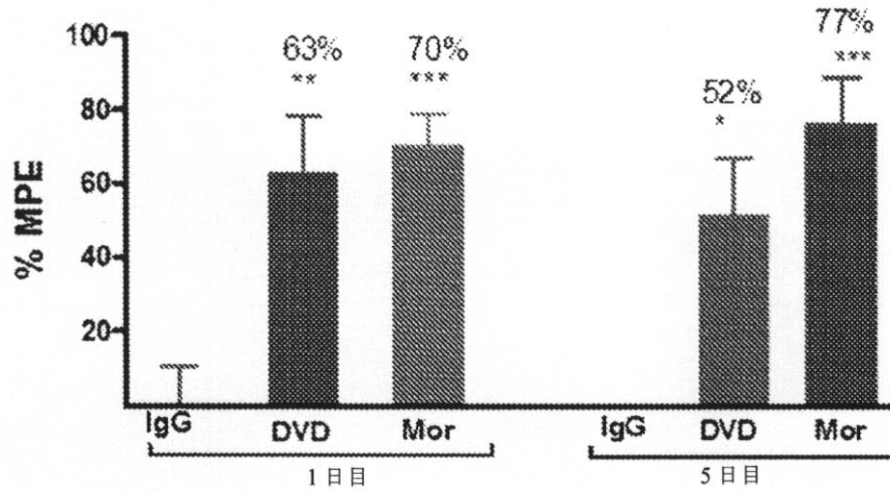


【 図 7 】



【 図 8 】

マウス CCI モデルにおける抗 TNF/Tfr の DVD の有効性  
1日2回、5日間の髄腔内投与



■ IgG 対照(IgG Fc mut, 1 注入につき 48ug/10ul の投与)  
 ■ 抗 TNFa/Tfr の DVD(8C11-GS-AB221, 1 注入につき 55μg/10μg の投与)  
 ■ モルヒネ(試験日のみ 10ug/10ul の注入)

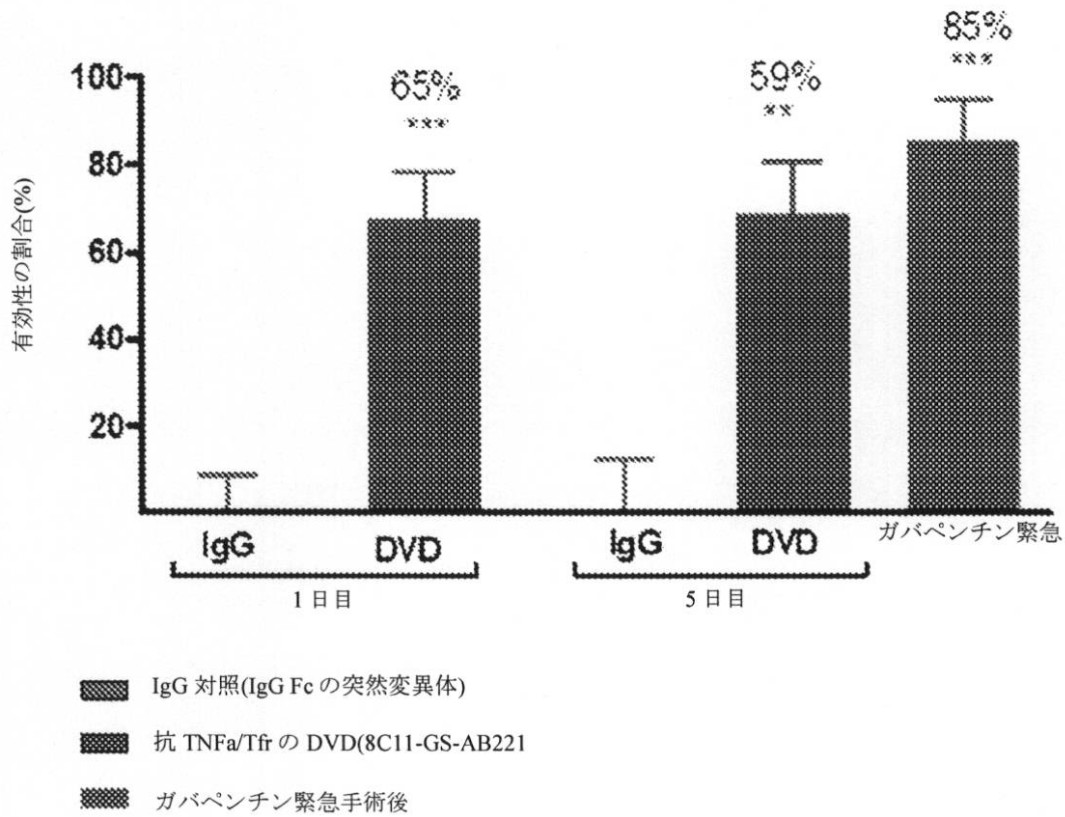
IgG(IgG Fc の突然変異体, 48ug/10ul/マウス)抗-TNFα/Tfr の DVD(8C11-GS-AB221, 55μg/10μg/マウス)は、1日2回、5日間髄腔内投与した。機械的無痛が、1日目と5日目にて120分間の薬物投与後に評価された。モルヒネ(生理食塩中 10ug/10ul/マウス)は、1日目と5日目の試験において緊急に髄腔内投与した。

実験は、BALB/c 雄マウスにおいて、Bennett 手術後、約15日間行われた。血清、脳、および脊髄の試料を5日目に採取した。

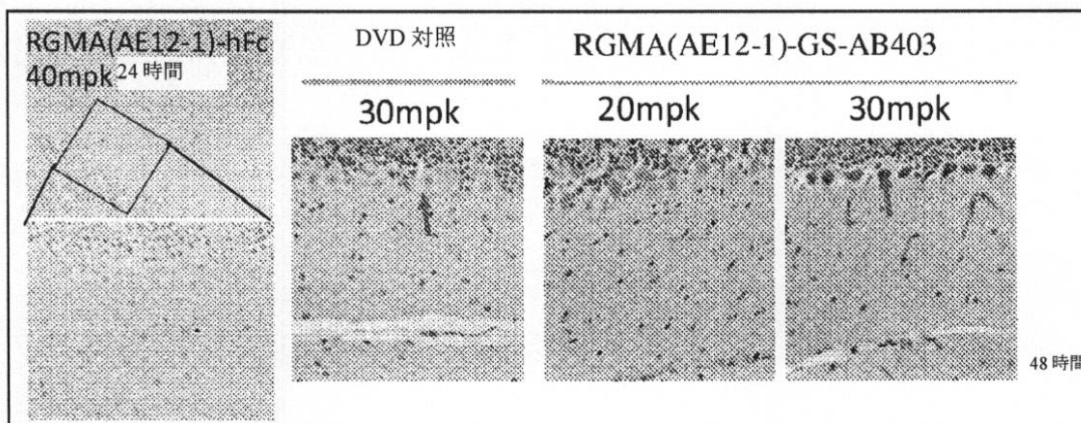
\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  対ビヒクル(n=10)。

【 図 9 】

マウス CCI モデルにおける抗 TNFa/Tfr の DVD の有効性  
20mg/kg、1日2回、5日間の髄腔内投与



【 図 1 0 】



【 配 列 表 】

[2016501881000001.app](#)

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2013/073114
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
INV. C07K16/18 A61P25/00	C07K16/28 A61K39/00	C07K16/32 C07K16/24 C07K16/42
ADD. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K		
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, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FRIDEN P M ET AL: "ANTI-TRANSFERRIN RECEPTOR ANTIBODY AND ANTIBODY-DRUG CONJUGATES CROSS THE BLOOD-BRAIN BARRIER", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 88, no. 11, 1 June 1991 (1991-06-01), pages 4771-4775, XP000371714, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.88.11.4771 e.g. abstract; the whole document ----- -/--	1-30,46, 47, 51-117
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 3 April 2014		Date of mailing of the international search report 07/07/2014
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Gruber, Andreas

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2006)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2013/073114
---

X(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>PARDRIDGE ET AL: "Blood-brain barrier delivery of protein and non-viral gene therapeutics with molecular Trojan horses", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 122, no. 3, 18 September 2007 (2007-09-18), pages 345-348, XP022336567, ISSN: 0168-3659, DOI: 10.1016/J.JCONREL.2007.04.001 e.g. abstract; page 345, right-hand column, paragraph 2; table 2; page 347, left-hand column, paragraph 3; the whole document</p> <p>-----</p>	1-30,46, 47, 51-117
Y	<p>WO 2012/075037 A1 (GENENTECH INC [US]; HOFFMANN LA ROCHE [CH]; DENNIS MARK [US]; WATTS RY) 7 June 2012 (2012-06-07) e.g. page 49, line 29-31; examples starting on page 60, in particular starting on page 64, paragraph 2; the whole document</p> <p>-----</p>	1-30,46, 47, 51-117
Y	<p>WO 2011/059755 A2 (ABBOTT LAB [US]; GHAYUR TARIQ [US]; SALFELD JOCHEN G [US]; MCPHERSON M) 19 May 2011 (2011-05-19) e.g. page 26, paragraph 2; page 87, line 4-8; the whole document</p> <p>-----</p>	1-30,46, 47, 51-117
Y	<p>PARDRIDGE WILLIAM M: "Biologic TNF[alpha]-inhibitors that cross the human blood-brain barrier", BIOENGINEERED BUGS, LANDES BIOSCIENCE, US, vol. 1, no. 4, 1 July 2010 (2010-07-01), pages 231-234, XP002669295, ISSN: 1949-1018 e.g. abstract; fig. 1; paragraph bridging page 231 and 232; the whole document</p> <p>-----</p>	1-30,46, 47, 51-117
A	<p>BOADO R J ET AL: "Fusion antibody for Alzheimer's disease with bidirectional transport across the blood-brain barrier and A[beta] fibril disaggregation", BIOCONJUGATE CHEMISTRY, ACS, WASHINGTON, DC, US, vol. 18, no. 2, 1 March 2007 (2007-03-01), pages 447-455, XP002610311, ISSN: 1043-1802, DOI: 10.1021/BC060349X [retrieved on 2007-02-22] e.g. abstract; fig. 2; paragraph bridging page 452 and 453; the whole document</p> <p>-----</p>	1-30,46, 47, 51-117
	----- -/--	

2

Form PCT/SA/210 (continuation of second sheet) (April 2009)

page 2 of 3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2013/073114
---

X(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>Y. ZHANG ET AL: "Delivery of -Galactosidase to Mouse Brain via the Blood-Brain Barrier Transferrin Receptor", JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, vol. 313, no. 3, 1 June 2005 (2005-06-01), pages 1075-1081, XP055111828, ISSN: 0022-3565, DOI: 10.1124/jpet.104.082974 e.g. abstract; the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	<p>1-30,46, 47, 51-117</p>
A	<p>GU JIJIE ET AL: "GENERATION OF DUAL-VARIABLE-DOMAIN IMMUNOGLOBULIN MOLECULES FOR DUAL-SPECIFIC TARGETING", METHODS IN ENZYMOLOGY; [METHODS IN ENZYMOLOGY], ACADEMIC PRESS, US, vol. 502, 1 January 2012 (2012-01-01), pages 25-41, XP009168885, ISSN: 0076-6879 e.g. abstract; page 27, penultimate sentence; the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	<p>1-30,46, 47, 51-117</p>

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/US2013/073114

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

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

- 1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
- 2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
- 3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

- 1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
- 2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
  
- 3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
- 4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1-30, 46, 47, 51-117(all partially)

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2013/073114

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

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

1. claims: 1-30, 46, 47, 51-117(all partially)

DVD according to claim 1, binding protein of claim 60,96, conjugate of claim 80, nucleic acid of claim 83, vector of claim 84, cell of claim 86, method of claim 90,105,111, protein of claim 91, composition of claim 92, kit of claim 117, that binds to transferrin receptor and comprises budesonide

1.1. claims: 1-30, 46, 47, 51-117(all partially)

DVD according to claim 1, binding protein of claim 60,61,96, conjugate of claim 80, nucleic acid of claim 83, vector of claim 84, cell of claim 86, method of claim 90,101,105,111, protein of claim 91, composition of claim 92, kit of claim 117, that binds to transferrin receptor and comprises TNFalpha binding protein

---

2-90. claims: 1-30, 46-117, 120(all partially)

DVD according to claim 1, binding protein of claim 36,60,61,96, conjugate of claim 80, nucleic acid of claim 83, vector of claim 84, cell of claim 86, method of claim 90,101,105,111, protein of claim 91, composition of claim 92, kit of claim 117, that binds to transferrin receptor and comprises any one of the compositions listed in claim 16, i.e. invention 2 being epidermal growth factor, invention 90 being TGFbeta

---

91-140. claims: 1-4, 6-30, 46-63, 67-69, 73-117, 120(all partially)

DVD according to claim 1, binding protein of claim 60,61,96, conjugate of claim 80, nucleic acid of claim 83, vector of claim 84, cell of claim 86, method of claim 90,101,105,111, protein of claim 91, composition of claim 92, kit of claim 117, that binds to any one of the molecules listed in claim 12, except for Tfr, i.e. invention 91 being insulin receptor, invention 140 being RAGE, and comprising a molecule listed in claim 16

---

141-146. claims: 31-45(completely); 60, 80-100, 105-117(partially)

binding protein of claim 31,36,60, conjugate of claim 80, nucleic acid of claim 83, vector of claim 84, cell of claim 86, method of claim 90,105,111, protein of claim 91, composition of claim 92, kit of claim 117, that binds Abeta (invention 141), BACE (invention 142), Her2 (invention 143), RGMA (invention 144), TNFalpha (invention 145), or APP (invention 146)

International Application No. PCT/US2013/073114

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

---

147. claim: 118

antibody of claim 118

---

148. claim: 119

antibody of claim 119

---

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2013/073114

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012075037 A1	07-06-2012	AR 084020 A1	17-04-2013
		AU 2011336716 A1	09-05-2013
		CA 2818173 A1	07-06-2012
		CN 103443125 A	11-12-2013
		CO 6721052 A2	31-07-2013
		CR 20130255 A	18-09-2013
		EA 201390785 A1	29-11-2013
		EP 2646470 A1	09-10-2013
		JP 2014500886 A	16-01-2014
		KR 20130137654 A	17-12-2013
		MA 34749 B1	03-12-2013
		SG 190900 A1	31-07-2013
		TW 201305200 A	01-02-2013
		US 2012171120 A1	05-07-2012
		WO 2012075037 A1	07-06-2012
WO 2011059755 A2	19-05-2011	AR 078795 A1	07-12-2011
		AU 2010319850 A1	14-06-2012
		CA 2778140 A1	19-05-2011
		CN 102770451 A	07-11-2012
		CO 6551686 A2	31-10-2012
		CR 20120266 A	14-08-2012
		EP 2493924 A2	05-09-2012
		JP 2013509189 A	14-03-2013
		KR 20140015145 A	06-02-2014
		NZ 600100 A	28-03-2014
		PE 15432012 A1	22-12-2012
		RU 2012121813 A	10-12-2013
		TW 201124534 A	16-07-2011
		US 2011212094 A1	01-09-2011
		UY 32979 A	28-02-2011
WO 2011059755 A2	19-05-2011		

## 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 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19		4 C 0 8 6		
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21		4 C 2 0 6		
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 2	4 H 0 4 5		
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 3			
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 1 2 P	21/08				
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	C 0 7 K	19/00				
A 6 1 K	49/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N			
A 6 1 K	51/00	(2006.01)	A 6 1 K	49/00	A			
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	49/02	A			
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00				
A 6 1 K	38/22	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	Y			
A 6 1 K	38/27	(2006.01)	A 6 1 K	43/00				
A 6 1 K	31/436	(2006.01)	A 6 1 K	37/02				
A 6 1 K	31/519	(2006.01)	A 6 1 K	37/24				
A 6 1 K	31/137	(2006.01)	A 6 1 K	37/36				
A 6 1 K	31/635	(2006.01)	A 6 1 K	31/436				
A 6 1 K	31/606	(2006.01)	A 6 1 K	31/519				
A 6 1 K	31/52	(2006.01)	A 6 1 K	31/137				
A 6 1 K	31/4164	(2006.01)	A 6 1 K	31/635				
A 6 1 K	31/343	(2006.01)	A 6 1 K	31/606				
A 6 1 K	31/42	(2006.01)	A 6 1 K	31/52				
A 6 1 K	31/192	(2006.01)	A 6 1 K	31/4164				
A 6 1 K	31/573	(2006.01)	A 6 1 K	31/343				
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 K	31/42				
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 K	31/192				
A 6 1 P	31/00	(2006.01)	A 6 1 K	31/573				
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	37/06				
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	29/00				
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/00				
A 6 1 P	35/04	(2006.01)	A 6 1 P	25/00				
A 6 1 P	25/16	(2006.01)	A 6 1 P	25/28				
A 6 1 P	25/14	(2006.01)	A 6 1 P	35/00				
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/04				
A 6 1 P	25/18	(2006.01)	A 6 1 P	25/16				
A 6 1 P	25/24	(2006.01)	A 6 1 P	25/14				
A 6 1 P	25/04	(2006.01)	A 6 1 P	9/00				
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	A 6 1 P	25/18				
			A 6 1 P	25/24				
			A 6 1 P	25/04				
			G 0 1 N	33/53				D

(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, KM, 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, H R, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, 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, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,

UA,UG,US

- (72)発明者 スターマン, アネット・ジェイ・シュワルツ  
 アメリカ合衆国、01541 マサチューセッツ州、プリンストン、ハバードストン・ロード、1  
 75
- (72)発明者 グッディール, アンドリュー  
 アメリカ合衆国、01770 マサチューセッツ州、シャーボーン、ピィ・オウ・ボックス・13  
 0
- (72)発明者 ハリス, マリア・クリスティーナ  
 アメリカ合衆国、01545 マサチューセッツ州、シュルーズベリー、トロブリッジ・レーン  
 、55

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA53 CA05 DA02 EA04  
 4B064 CC24 DA01 DA13  
 4B065 AA01X AA58X AA72X AA86X AA88X AA90X AB01 BA02 CA25 CA44  
 CA46  
 4C084 AA02 AA07 AA12 AA19 BA44 DA01 DA11 DA12 DA13 DA14  
 DA16 DA18 DA45 DA58 DA59 DB22 DB52 DB53 DB56 DB61  
 MA02 NA05 ZA011 ZA021 ZA042 ZA052 ZA081 ZA082 ZA121 ZA122  
 ZA151 ZA161 ZA181 ZA182 ZA212 ZA221 ZA232 ZA361 ZA542 ZA592  
 ZA892 ZA942 ZB081 ZB082 ZB111 ZB112 ZB152 ZB212 ZB261 ZB311  
 ZB322 ZC032 ZC082 ZC202 ZC212 ZC412 ZC422  
 4C085 AA14 AA15 AA16 AA21 AA25 BB33 BB34 BB35 BB36 BB37  
 BB42 CC01 CC04 CC05 CC07 CC22 CC23 DD62 EE01 EE03  
 GG02 GG03 GG04 GG06 KA04 KA05 KA27 KA28 KA29 KB57  
 4C086 AA01 BA06 BC38 BC67 CB07 CB09 CB22 DA10 DA17 DA20  
 MA03 MA05 NA05 ZA01 ZA02 ZA08 ZA12 ZA15 ZA16 ZA18  
 ZA22 ZA36 ZB08 ZB11 ZB26 ZB31  
 4C206 AA01 DA24 FA14 KA01 MA03 MA05 NA05 ZA01 ZA02 ZA08  
 ZA12 ZA15 ZA16 ZA18 ZA22 ZA36 ZB08 ZB11 ZB26 ZB31  
 4H045 AA11 BA41 DA76 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	渗透血脑屏障 ( BBB ) 的双特异性结合蛋白		
公开(公告)号	<a href="#">JP2016501881A</a>	公开(公告)日	2016-01-21
申请号	JP2015545821	申请日	2013-12-04
[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	ハンゼイティアンデニスカラオグル ガユルタリク スターマンアネットジェイシュワルツ グッディールアンドリュウ ハリスマリアクリスティーナ		
发明人	ハンゼイティアン,デニス・カラオグル ガユル,タリク スターマン,アネット・ジェイ・シュワルツ グッディール,アンドリュウ ハリス,マリア・クリスティーナ		
IPC分类号	C07K16/28 C07K16/46 C12N15/09 C12N1/11 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 C07K19/00 A61K39/395 A61K49/00 A61K51/00 A61K45/00 A61K38/00 A61K38/22 A61K38/27 A61K31 /436 A61K31/519 A61K31/137 A61K31/635 A61K31/606 A61K31/52 A61K31/4164 A61K31/343 A61K31/42 A61K31/192 A61K31/573 A61P37/06 A61P29/00 A61P31/00 A61P25/00 A61P25/28 A61P35/00 A61P35/04 A61P25/16 A61P25/14 A61P9/00 A61P25/18 A61P25/24 A61P25/04 G01N33 /53		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P25/00 A61P25/04 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/24 A61P25/28 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 C07K16/18 C07K16/241 C07K16/28 C07K16/2881 C07K16/32 C07K16/4241 C07K2317/24 C07K2317/31 C07K2317/52 C07K2317/64 C07K2317/76 C07K2317/92 C07K2317/94 C07K2319/00		
FI分类号	C07K16/28.ZNA C07K16/46 C12N15/00.A C12N1/11 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.102 C12N5/00.103 C12P21/08 C07K19/00 A61K39/395.N A61K49/00.A A61K49/02.A A61K45/00 A61K39 /395.Y A61K43/00 A61K37/02 A61K37/24 A61K37/36 A61K31/436 A61K31/519 A61K31/137 A61K31 /635 A61K31/606 A61K31/52 A61K31/4164 A61K31/343 A61K31/42 A61K31/192 A61K31/573 A61P37 /06 A61P29/00 A61P31/00 A61P25/00 A61P25/28 A61P35/00 A61P35/04 A61P25/16 A61P25/14 A61P9/00 A61P25/18 A61P25/24 A61P25/04 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/CA05 4B024/DA02 4B024/EA04 4B064/CC24 4B064 /DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA86X 4B065/AA88X 4B065 /AA90X 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA12 4C084/AA19 4C084/BA44 4C084/DA01 4C084/DA11 4C084/DA12 4C084/DA13 4C084 /DA14 4C084/DA16 4C084/DA18 4C084/DA45 4C084/DA58 4C084/DA59 4C084/DB22 4C084/DB52 4C084/DB53 4C084/DB56 4C084/DB61 4C084/MA02 4C084/NA05 4C084/ZA011 4C084/ZA021 4C084 /ZA042 4C084/ZA052 4C084/ZA081 4C084/ZA082 4C084/ZA121 4C084/ZA122 4C084/ZA151 4C084 /ZA161 4C084/ZA181 4C084/ZA182 4C084/ZA212 4C084/ZA221 4C084/ZA232 4C084/ZA361 4C084 /ZA542 4C084/ZA592 4C084/ZA892 4C084/ZA942 4C084/ZB081 4C084/ZB082 4C084/ZB111 4C084 /ZB112 4C084/ZB152 4C084/ZB212 4C084/ZB261 4C084/ZB311 4C084/ZB322 4C084/ZC032 4C084 /ZC082 4C084/ZC202 4C084/ZC212 4C084/ZC412 4C084/ZC422 4C085/AA14 4C085/AA15 4C085 /AA16 4C085/AA21 4C085/AA25 4C085/BB33 4C085/BB34 4C085/BB35 4C085/BB36 4C085/BB37 4C085/BB42 4C085/CC01 4C085/CC04 4C085/CC05 4C085/CC07 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085 /DD62 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG06 4C085/KA04 4C085/KA05 4C085/KA27 4C085/KA28 4C085/KA29 4C085/KB57 4C086/AA01 4C086/BA06 4C086		

/BC38 4C086/BC67 4C086/CB07 4C086/CB09 4C086/CB22 4C086/DA10 4C086/DA17 4C086/DA20  
 4C086/MA03 4C086/MA05 4C086/NA05 4C086/ZA01 4C086/ZA02 4C086/ZA08 4C086/ZA12 4C086  
 /ZA15 4C086/ZA16 4C086/ZA18 4C086/ZA22 4C086/ZA36 4C086/ZB08 4C086/ZB11 4C086/ZB26  
 4C086/ZB31 4C206/AA01 4C206/DA24 4C206/FA14 4C206/KA01 4C206/MA03 4C206/MA05 4C206  
 /NA05 4C206/ZA01 4C206/ZA02 4C206/ZA08 4C206/ZA12 4C206/ZA15 4C206/ZA16 4C206/ZA18  
 4C206/ZA22 4C206/ZA36 4C206/ZB08 4C206/ZB11 4C206/ZB26 4C206/ZB31 4H045/AA11 4H045  
 /BA41 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74

優先権 61/792163 2013-03-15 US  
 61/733252 2012-12-04 US

外部リンク [Espacenet](http://Espacenet)

摘要(译)

提供了能够穿透血脑屏障 (BBB) 的工程化的多价和多特异性结合蛋白，以及制备它们的方法以及在疾病的预防，诊断和/或治疗中的使用方法。它

(21) 出願番号	特願2015-545821 (P2015-545821)	(71) 出願人	512212195
(86) (22) 出願日	平成25年12月4日 (2013.12.4)		アッヴィ・インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成27年7月7日 (2015.7.7)		アメリカ合衆国、イリノイ・60064、
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/073114		ノース・シカゴ、ノース・ワウキガン・ロ
(87) 国際公開番号	WO2014/089209		ード・1
(87) 国際公開日	平成26年6月12日 (2014.6.12)	(74) 代理人	110001195
(31) 優先権主張番号	61/792,163		特許業務法人深見特許事務所
(32) 優先日	平成25年3月15日 (2013.3.15)	(72) 発明者	ハンセイティアン、デニス・カラオグル
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国、01760 マサチュー
(31) 優先権主張番号	61/733,252		セッツ州、ネイティック、マーク・ストリ
(32) 優先日	平成24年12月4日 (2012.12.4)		ート、12
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	ガユル、タリク
			アメリカ合衆国、01746 マサチュー
			セッツ州、ホリントン、ワシントン・スト
			リート、1014

最終頁に続く