

(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2016-517277

(P2016-517277A)

(43) 公表日 平成28年6月16日 (2016. 6. 16)

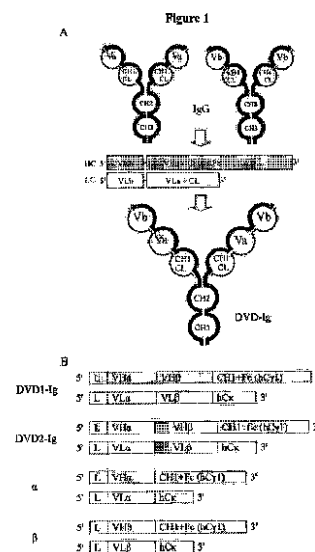
(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
C O 7 K 16/24 (2006.01)	C O 7 K 16/24	4 B 0 6 4
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46	4 B 0 6 5
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 C 0 7 6
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 125 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2016-502858 (P2016-502858)	(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26年3月14日 (2014. 3. 14)	(74) 代理人	110001173 特許業務法人川口国際特許事務所
(85) 翻訳文提出日	平成27年11月6日 (2015. 11. 6)	(72) 発明者	ガユール, タリク アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01 746、ホリストン、ワシントン・ストリ ート・1014
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/028646	(72) 発明者	グッドロー, キャリー アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01 056、ラッドロー、スティープンス・ス トリート・201
(87) 国際公開番号	W02014/144299		
(87) 国際公開日	平成26年9月18日 (2014. 9. 18)		
(31) 優先権主張番号	61/794, 964		
(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)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 TNF α に対して指向された二重特異的結合タンパク質

(57) 【要約】

TNF α 、IL-13、PGE2および／またはNGFに結合する遺伝子操作された多価および多重特異的結合タンパク質、ならびに作製する方法および疾患の予防、診断および／または治療における使用が提供される。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

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

$VD1$ は、第一の変域ドメインであり、

$VD2$ は、第二の変域ドメインであり、

C は、定常ドメインであり、

$X1$ は、リンカーであり、

$X2$ は、存在するまたは存在しない Fc 領域であり、

n は、0 または 1 であり、

10

第一および第二のポリペプチド鎖上の $VD1$ ドメインが、第一の機能的標的結合部位を形成し、第一および第二のポリペプチド鎖上の $VD2$ ドメインが、第二の機能的標的結合部位を形成し、結合タンパク質が、

(a) $TNF\alpha$ および $IL-13$ に結合することができ、ここで

(i) $TNF\alpha$ について機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、配列番号 38～43 および 48～49 からなる群から選択される配列を含み、ならびに／もしくは

(ii) $IL-13$ について機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、配列番号 32～37 からなる群から選択される配列を含み、

(b) $TNF\alpha$ および $PGE2$ に結合することができ、ここで

(i) $TNF\alpha$ について機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、配列番号 38～43 および 48～49 からなる群から選択される配列を含み、ならびに／もしくは

(ii) $PGE2$ について機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、配列番号 50～55 からなる群から選択される配列を含み、または

(c) $TNF\alpha$ および NGF に結合することができ、ここで

(i) $TNF\alpha$ について機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、配列番号 38～43 および 48～49 からなる群から選択される配列を含み、ならびに／もしくは

(ii) NGF について機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、配列番号 56～57 からなる群から選択される配列を含む、

結合タンパク質。

20

【請求項 2】

30

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

$VD1$ は、第一の変域ドメインであり、

$VD2$ は、第二の変域ドメインであり、

C は、定常ドメインであり、

$X1$ は、リンカーであり、

$X2$ は、存在するまたは存在しない Fc 領域であり、

n は、0 または 1 であり、

第一および第二のポリペプチド鎖上の $VD1$ ドメインが、第一の機能的標的結合部位を形成し、第一および第二のポリペプチド鎖上の $VD2$ ドメインが、第二の機能的標的結合部位を形成し、結合タンパク質が、

40

(a) $TNF\alpha$ および $IL-13$ に結合することができ、ここで

(i) $TNF\alpha$ について機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 38 からの $CDR1 \sim 3$ と配列番号 39 からの $CDR1 \sim 3$ 、

配列番号 40 からの $CDR1 \sim 3$ と配列番号 41 からの $CDR1 \sim 3$ 、

配列番号 42 からの $CDR1 \sim 3$ と配列番号 43 からの $CDR1 \sim 3$ 、もしくは

配列番号 48 からの $CDR1 \sim 3$ と配列番号 49 からの $CDR1 \sim 3$

を含み、および／もしくは

(ii) $IL-13$ について機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 32 からの $CDR1 \sim 3$ と配列番号 33 からの $CDR1 \sim 3$ 、

50

配列番号 34 からの C D R 1 ~ 3 と配列番号 35 からの C D R 1 ~ 3、もしくは
配列番号 36 からの C D R 1 ~ 3 と配列番号 37 からの C D R 1 ~ 3
を含み、

(b) T N F α および P G E 2 に結合することができ、ここで

(i) T N F α について機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、
配列番号 38 からの C D R 1 ~ 3 と配列番号 39 からの 3 つの C D R、
配列番号 40 からの C D R 1 ~ 3 と配列番号 41 からの 3 つの C D R、
配列番号 42 からの C D R 1 ~ 3 と配列番号 43 からの 3 つの C D R、もしくは
配列番号 48 からの C D R 1 ~ 3 と配列番号 49 からの 3 つの C D R

を含み、および／もしくは

10

(i i) P G E 2 について機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、
配列番号 50 からの C D R 1 ~ 3 と配列番号 51 からの C D R 1 ~ 3、
配列番号 52 からの C D R 1 ~ 3 と配列番号 53 からの C D R 1 ~ 3、もしくは
配列番号 54 からの C D R 1 ~ 3 と配列番号 55 からの C D R 1 ~ 3

を含み、または

(c) T N F α および N G F に結合することができ、ここで

(i) T N F α について機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、
配列番号 38 からの C D R 1 ~ 3 と配列番号 39 からの C D R 1 ~ 3、
配列番号 40 からの C D R 1 ~ 3 と配列番号 41 からの C D R 1 ~ 3、
配列番号 42 からの C D R 1 ~ 3 と配列番号 43 からの C D R 1 ~ 3、もしくは
配列番号 48 からの C D R 1 ~ 3 と配列番号 49 からの C D R 1 ~ 3

20

を含み、および／もしくは

(i i) N G F について機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 56 からの C D R 1 ~ 3 と配列番号 57 からの C D R 1 ~ 3 を含む、結合タンパク質。

【請求項 3】

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

V D 1 は、第一の重鎖可変ドメインであり、

V D 2 は、第二の重鎖可変ドメインであり、

C は、重鎖定常ドメインであり、

30

X 1 は、リンカーであり、

X 2 は、存在するまたは存在しない F c 領域であり、

n は、0 または 1 であり、

第二のポリペプチド鎖が、第二の V D 1 - (X 1) n - V D 2 - C を含み、

V D 1 は、第一の軽鎖可変ドメインであり、

V D 2 は、第二の軽鎖可変ドメインであり、

C は、軽鎖定常ドメインであり、

X 1 は、リンカーであり、

n は、0 または 1 であり、

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

40

【請求項 4】

(a) T N F α および I L - 1 3 に結合することができ、ここで

(i) T N F α について機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、

配列番号 38 および配列番号 39、

配列番号 40 および配列番号 41、

配列番号 42 および配列番号 43、もしくは

配列番号 48 および配列番号 49

を含み、ならびに／もしくは

50

(i i) I L - 1 3 について機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、
配列番号 3 2 および配列番号 3 3、
配列番号 3 4 および配列番号 3 5、もしくは
配列番号 3 5 および配列番号 3 7
を含み、

(b) T N F α および P G E 2 に結合することができ、ここで

(i) T N F α について機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、
配列番号 3 8 および配列番号 3 9、
配列番号 4 0 および配列番号 4 1、
配列番号 4 2 および配列番号 4 3、もしくは
配列番号 4 8 および配列番号 4 9
を含み、ならびに／もしくは

10

(i i) P G E 2 について機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、
配列番号 5 0 および配列番号 5 1、
配列番号 5 2 および配列番号 5 3、もしくは
配列番号 5 3 および配列番号 5 5

を含み、または

(c) T N F α および N G F に結合することができ、ここで

(i) T N F α について機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、
配列番号 3 8 および配列番号 3 9、
配列番号 4 0 および配列番号 4 1、
配列番号 4 2 および配列番号 4 3、もしくは
配列番号 4 8 および配列番号 4 9
を含み、ならびに／もしくは

20

(i i) N G F について機能的標的結合部位を形成する可変ドメインが、
配列番号 5 6 および配列番号 5 7

を含む、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項 5】

(a) T N F α および I L - 1 3 に結合することができ、表面プラズモン共鳴によって
測定された場合に最大約 5.8×10^{-11} M の K_D で T N F α に結合することができ、
および／もしくは表面プラズモン共鳴によって測定された場合に最大約 1.2×10^{-9}
M の K_D で I L - 1 3 に結合することができ、

30

(b) T N F α および P G E 2 に結合することができ、T N F α 中和アッセイにおいて
測定された場合に最大約 3.076 nM の I C 5 0 で T N F α を中和することができ、お
よび／もしくは P G E 2 中和アッセイにおいて測定された場合に最大約 124.8 nM の
I C 5 0 で P G E 2 を中和することができ、または

(c) T N F α および N G F に結合することができ、T N F α 中和アッセイによって測
定された場合に最大約 0.673 nM の I C 5 0 で T N F α を中和することができ、お
よび／もしくは T F - 1 細胞増殖バイオアッセイによって測定された場合に最大約 7.45
5 nM の I C 5 0 で N G F を中和することができる、
請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

40

【請求項 6】

2 つの第一のポリペプチド鎖および 2 つの第二のポリペプチド鎖および 4 つの機能的標
的結合部位を含む、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項 7】

X 1 が、配列番号 1 ~ 3 1 のいずれか 1 つである、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記
載の結合タンパク質。

【請求項 8】

X 1 が C H 1 または C L ではない、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の結合タンパ
ク質。

50

【請求項 9】

F c 領域が可変配列 F c 領域であり、および／または 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 または I g D 由来の F c 領域である、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項 10】

(a) (i) 野生型ヒト I g G 1 重鎖配列、もしくは

(i i) 1 つ以上のアミノ酸変化によって修飾されたヒト I g G 1 重鎖配列であって、任意選択により、前記変化は定常領域配列のアミノ酸位置 2 3 4 と 2 3 5 で置換を含み、任意選択により、前記変化は 2 3 4 と 2 3 5 位のロイシンのアラニンによる置換を含むヒト I g G 重鎖配列

を含む重鎖定常領域、および／または

(b) (i) 野生型ヒトカッパ軽鎖定常領域配列、もしくは

(i i) 野生型ヒトラムダ軽鎖定常領域配列

を含む軽鎖定常領域

を含む、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項 11】

結晶化された結合タンパク質である、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の結合タンパク質。

【請求項 12】

(a) 表 2 からのいずれかの D V D - I g V H および V L 配列対を含む T N F α および I L - 1 3、

(b) 表 3 からのいずれかの D V D - I g V H および V L 配列対を含む T N F α および P G E 2、

(c) 表 4 からのいずれかの D V D - I g V H および V L 配列対を含む T N F α および N G F

に結合することができる結合タンパク質。

【請求項 13】

免疫接着分子、造影剤、治療剤または細胞毒性剤をさらに含む、請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の結合タンパク質を含む結合タンパク質コンジュゲート。

【請求項 14】

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 13 に記載の結合タンパク質コンジュゲート。

【請求項 15】

放射性標識が、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho または ^{153}Sm である、請求項 14 に記載の結合タンパク質コンジュゲート。

【請求項 16】

治療剤または細胞毒性剤が、代謝抑制剤、アルキル化剤、抗生物質、増殖因子、サイトカイン、抗血管新生剤、抗有糸分裂剤、アントラサイクリン、トキシシンまたはアポトーシス剤である、請求項 13 に記載の結合タンパク質コンジュゲート。

【請求項 17】

請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の結合タンパク質アミノ酸配列をコードする単離された核酸。

【請求項 18】

請求項 17 に記載の単離された核酸を含むベクター。

【請求項 19】

ベクターが、p c D N A、p T T、p T T 3、p E F B O S、p B V、p J V、p c D N A 3. 1 T O P O、p E F 6、p H y b E、T O P O または p B J を含む、請求項 18 に記載のベクター。

【請求項 20】

10

20

30

40

50

請求項 18 または 19 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 21】

原核細胞、大腸菌、真核細胞、原生生物細胞、動物細胞、植物細胞、真菌細胞、酵母細胞、Sf9細胞、哺乳動物細胞、鳥類細胞、昆虫細胞、CHO細胞またはCOS細胞である、請求項 20 に記載の宿主細胞。

【請求項 22】

結合タンパク質を産生するのに十分な条件下で、請求項 20 または 21 に記載の宿主細胞を培地中において培養することを含む、結合タンパク質を生産する方法。

【請求項 23】

請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の結合タンパク質および医薬として許容される担体を含む医薬組成物。

10

【請求項 24】

少なくとも 1 つの追加の治療剤をさらに含む、請求項 23 に記載の医薬組成物。

【請求項 25】

追加の治療剤が、造影剤、細胞毒性剤、血管新生阻害剤、キナーゼ阻害剤、共刺激分子遮断剤、接着分子遮断剤、抗サイトカイン抗体またはその機能的断片、メトトレキサート、シクロスポリン、ラパマイシン、FK506、検出可能な標識またはレポーター、TNFアンタゴニスト、抗リウマチ薬、筋肉弛緩剤、麻酔薬、非ステロイド系抗炎症薬（NSAID）、鎮痛剤、麻酔、鎮静剤、局所麻酔、神経筋肉遮断剤、抗微生物剤、抗乾癬剤、コルチコステロイド、アナボリックステロイド、エリスロポエチン、免疫化、イムノグロブリン、免疫抑制剤、成長ホルモン、ホルモン置換薬、放射性医薬、抗うつ剤、抗精神病薬、刺激物質、喘息薬、ベータアゴニスト、吸入用ステロイド、エピネフリンまたは類似体、サイトカインまたはサイトカインアンタゴニストである、請求項 24 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 26】

請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の結合タンパク質を対象に投与することによって、疾患または障害について対象を治療する方法。

【請求項 27】

障害が、関節炎、変形性関節症、若年性慢性関節炎、敗血症性関節炎、ライム関節炎、乾癬性関節炎、反応性関節炎、脊椎関節症、全身性紅斑性狼瘡、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、インスリン依存性糖尿病、甲状腺炎、喘息、アレルギー性疾患、乾癬、皮膚炎、強皮症、移植片対宿主病、臓器移植拒絶、臓器移植に関連する急性または慢性免疫疾患、サルコイドーシス、アテローム性動脈硬化症、播種性血管内凝固、川崎病、バセドウ病、ネフローゼ症候群、慢性疲労症候群、ウェゲナー肉芽腫症、ヘノッホ・シェーライン紫斑症、腎臓の顕微鏡的血管炎、慢性活動性肝炎、ブドウ膜炎、敗血症性ショック、毒素性ショック症候群、敗血症症候群、悪液質、感染性疾患、寄生性疾患、急性横断性脊髄炎、ハンチントン舞踏病、パーキンソン病、アルツハイマー病、発作、原発性胆汁性肝硬変、溶血性貧血、悪性腫瘍、心不全、心筋梗塞、アジソン病、孤発性の多内分泌腺機能低下症候群 I 型および多内分泌腺機能低下症候群 II 型、シュミット症候群、成人（急性）呼吸促迫症候群、脱毛症、円形脱毛症、血清反応陰性関節炎、関節炎、ライター病、乾癬性関節炎、潰瘍性大腸性関節炎、腸疾患性滑膜炎、クラミジア、エルシニアおよびサルモネラ関連関節炎、脊椎関節症、アテローム性疾患／アテローム性動脈硬化症、アトピー性アレルギー、自己免疫性水疱性疾患、尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、類天疱瘡、線状 IgA 病、自己免疫性溶血性貧血、クームス陽性溶血性貧血、後天性悪性貧血、若年性悪性貧血、筋痛性脳脊髄炎／ロイヤルフリー病、慢性粘膜皮膚カンジダ症、巨細胞性動脈炎、原発性硬化性肝炎、突発性自己免疫性肝炎、後天性免疫不全症候群、後天性免疫不全関連疾患、B型肝炎、C型肝炎、分類不能型免疫不全症（分類不能型原発性低γグロブリン血症）、拡張型心筋症、女性不妊症、卵巣機能不全、早期卵巣機能不全、線維性肺疾患、突発性間質性肺炎、炎症後間質性肺疾患、間質性肺炎、結合組織疾患関連間質性肺疾患、混合性結合組織疾患関連肺疾患、全身性硬化症関連間質性肺疾患、関節リウマチ関連間質

30

40

50

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

10

20

30

40

50

、出血、A型肝炎、ヒス束不整脈、H I V感染／H I V神経障害、ホジキン病、運動過剰疾患、過敏症反応、過敏性肺炎、高血圧、運動低下疾患、視床下部一下垂体一副腎皮質系評価、特発性アジソン病、特発性肺線維症、抗体媒介性細胞毒性、無力症、乳児脊髄性筋萎縮症、大動脈の炎症、A型インフルエンザ、電離放射線曝露、虹彩毛様体炎／ブドウ膜炎／視神経炎、虚血再灌流障害、虚血性発作、若年性関節リウマチ、若年性脊髄性筋萎縮症、カポジ肉腫、腎移植拒絶、レジオネラ、リーシュマニア症、ハンセン病、皮質脊髄系の病変、脂肪血症（l i p e d e m a）、肝臓移植拒絶、リンパ浮腫（l y m p h e d e r m a）、マラリア、悪性リンパ腫、悪性組織球増殖症、悪性黒色腫、髄膜炎、髄膜炎菌血症（m e n i n g o c o c c e m i a）、代謝性／特発性、偏頭痛、ミトコンドリア多系疾患（m i t o c h o n d r i a l m u l t i . s y s t e m d i s o r d e r） 10

、混合性結合組織病、モノクローナル高ガンマグロブリン血症、多発性骨髄腫、多系統変性（メンセル・デジェリーヌートーマス・シャイードレーガーおよびマシャドージョセフ）、重症筋無力症、マイコバクテリウム・アビウム・イントラセルラーレ、マイコバクテリウム・チューバキュロシス、骨髄形成異常、真菌虚血疾患、上咽頭癌、新生児慢性肺疾患、腎炎、ネフローゼ、神経変性疾患、神経原性I筋萎縮、好中球減少性発熱、非ホジキンリンパ腫、腹部大動脈およびその分枝の閉塞、閉塞性動脈疾患、o k t 3療法、精巣炎／精巣上体炎、精巣炎／精管復元術処置、臓器肥大、骨粗鬆症、脾臓移植拒絶、脾癌、腫瘍随伴性症候群／悪性腫瘍の高カルシウム血症、副甲状腺移植拒絶、骨盤内炎症性疾患、通年性鼻炎、心膜疾患、末梢アテローム硬化性疾患、末梢血管疾患、腹膜炎、悪性貧血、ニューモシスチス・カリニ肺炎、肺炎、P O E M S症候群（多発神経炎、臓器肥大、内分泌疾患、単クローン性γグロブリン血症および皮膚変化症候群（s k i n c h a n g e s s y n d r o m e））、灌流後症候群（p o s t p e r f u s i o n s y n d r o m e）、ポンプ後症候群（p o s t p u m p s y n d r o m e）、心筋梗塞後開心術症候群、子癇前症、進行性核上性麻痺、原発性肺高血圧、放射線療法、レイノー現象および病、レイノー病、レフサム病、規則的なQRS幅の狭い頻脈症（r e g u l a r n a r r o w Q R S t a c h y c a r d i a）、腎血管性高血圧、再灌流障害、拘束型心筋症、肉腫、強皮症、老年性舞蹈病、レビー小体型の老年性認知症、血清反応陰性関節炎、ショック、鎌形赤血球貧血症、皮膚同種異系移植拒絶、皮膚変化症候群、小腸移植拒絶、固形腫瘍、固有不整脈（s p e c i f i c a r r y t h m i a s）、脊髄性運動失調、脊髄小脳変性、連鎖球菌性筋炎、小脳の構造的病変、亜急性硬化性全脳炎、湿疹、心血管系の梅毒、全身性アナフィラキシー、全身性炎症反応症候群、全身性発症若年性関節リウマチ、T細胞またはF A B A L L、毛細血管拡張症、閉塞性血栓血管炎、血小板減少症、毒性、移植、外傷／出血、I I I型過敏症反応、I V型過敏症、不安定狭心症、尿毒症、尿路性敗血症、じんましん、心臓弁膜症、静脈瘤、血管炎、静脈疾患、静脈血栓症、心室細動、ウイルスおよび真菌感染、ウイルス性脳炎（v i t a l e n c e p h a l i t i s）／無菌性髄膜炎、ウイルス関連血球貪食症候群、ウェルニッケーコルサコフ症候群、ウィルソン病、いずれかの臓器または組織の異種移植拒絶、急性冠症候群、急性特発性多発性神経炎、急性炎症性脱髄性多発神経根神経障害、急性虚血、成人スチル病、アナフィラキシー、抗リン脂質抗体症候群、再生不良性貧血、アトピー性湿疹、アトピー性皮膚炎、自己免疫性皮膚炎、連鎖球菌感染に伴う自己免疫異常、自己免疫性腸症、自己免疫性難聴、自己免疫性リンパ増殖症候群（A L P S）、自己免疫性心筋炎、自己免疫性早期卵巣不全、眼瞼炎、気管支拡張症、水疱性類天疱瘡、心血管疾患、劇症型抗リン脂質症候群、セリアック病、頸部脊椎症、慢性虚血、瘢痕性類天疱瘡、多発性硬化症のリスクを有する臨床的孤発症候群（c i s）、小児発症精神障害、涙囊炎、皮膚筋炎、糖尿病性網膜症、椎間板ヘルニア、椎間板脱出、薬物誘発免疫性溶血性貧血、子宮内膜症、眼内炎、上強膜炎、多形性紅斑、重症型多形性紅斑、妊娠性類天疱瘡、ギラン・バレー症候群（G B S）、枯草熱、ヒューズ症候群、特発性パーキンソン病、特発性間質性肺炎、I g E媒介性アレルギー、免疫性溶血性貧血、封入体筋炎、感染性眼炎症疾患、炎症性脱髄疾患、炎症性心疾患、炎症性腎疾患、I P F／U I P、虹彩炎、角膜炎、乾性角結膜炎、クスマウル病またはクスマウルマイヤー病、ランドリー麻痺、ランゲルハンス細胞性組織球症、網 40 50

状皮斑、黄斑変性、顕微鏡的多発性血管炎、モルブス・ベヒテレフ (morbus bechtere v)、運動ニューロン疾患、粘膜性類天疱瘡、多臓器不全、骨髓異形成症候群、心筋炎、神経根障害、神経障害、非A非B型肝炎、視神経炎、骨溶解、卵巣癌、小関節性JRA、末梢動脈閉塞疾患 (PAOD)、末梢血管疾患 (PVD)、末梢動脈疾患 (PAD)、静脈炎、結節性多発性動脈炎 (または結節性動脈周囲炎)、多発性軟骨炎、リウマチ性多発性筋痛、白毛症、多関節性JRA、多内分泌欠損症候群、多発性筋炎、ポンプ

後症候群、原発性パーキンソニズム、前立腺癌および直腸癌および造血性悪性病変 (白血病およびリンパ腫)、前立腺炎、赤芽球癆、原発性副腎不全、再発性視神経脊髄炎、再狭窄、リウマチ性心疾患、sapho (滑膜炎、アクネ、膿疱症、骨過形成および骨髄炎)、強皮症、続発性アミロイドーシス、ショック肺、強膜炎、坐骨神経痛、二次性副腎不全、シリコーン関連結合組織病、スネドナーウィルキンソン皮膚症、強直性脊椎炎、スティーブンス・ジョンソン症候群 (SJS)、全身性炎症反応症候群、側頭動脈炎、トキシプラズマ性網膜炎、中毒性表皮剥離症、横断性脊髄炎、TRAPS (腫瘍壊死因子受容体)、1型アレルギー反応、II型糖尿病、通常型間質性肺炎 (UIP)、春季結膜炎、ウイルス性網膜炎、フォクト・小柳・原田症候群 (VKH症候群)、滲出型黄斑変性または創傷治癒である、請求項26に記載の方法。

【請求項28】

障害が、自己免疫疾患、喘息、関節リウマチ、変形性関節症、全身性エリテマトーデス (SLE)、多発性硬化症、敗血症、神経変性疾患または腫瘍性障害である、請求項26または27に記載の方法。

【請求項29】

結合タンパク質が、非経口、皮下、筋肉内、静脈内、関節内、気管支内、腹内、嚢内、軟骨内、腔内 (intracavitary)、腔内 (intracelial)、小脳内、脳室内、結腸内、頸管内、胃内、肝臓内、心筋内、骨内、骨盤内、心臓周囲内、腹腔内、胸膜内、前立腺内、肺内、直腸内、腎臓内、網膜内、脊髄内、滑膜内、胸腔内、子宮内、膀胱内、ボーラス、膈、直腸、口内、舌下、鼻内または経皮投与用に製剤化される、請求項26から28のいずれか一項に記載の方法。

【請求項30】

イムノアッセイによって試験試料中の少なくとも1つの標的またはその断片の存在、量または濃度を決定する方法であって、

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、請求項1から12のいずれか一項に記載の結合タンパク質を含む、方法。

【請求項31】

(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、ここで、結合タンパク質は、標的またはその断片上のエピトープに結合して、第一の複合体を形成する、

(ii) 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、ここで、検出可能な標識は、結合タンパク質に結合するか、または結合タンパク質が結合しない標的もしくはその断片上のエピトープに結合して、第二の複合体を形成する、および

(iii) 第二の複合体における検出可能な標識によって発生したシグナルに基づいて、試験試料中の標的またはその断片の存在、量または濃度を検出すること、ここで、標的またはその断片の存在、量または濃度は、検出可能な標識によって発生したシグナルと直接的に相関する、

をさらに含む、請求項30に記載の方法。

【請求項32】

(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、ここで、結合タンパク質は、標的またはその断片上のエピトープに結合して第一の複合体を形成する、

(i i) 複合体を、少なくとも1つの検出可能な標識を接触させること、ここで、検出可能な標識は、結合タンパク質に結合する標的もしくはその断片と競合して、第二の複合体を形成する、および

(i i i) 第二の複合体における検出可能な標識によって発生したシグナルに基づいて、試験試料中の標的またはその断片の存在、量または濃度を検出すること、ここで、標的またはその断片の存在、量または濃度が、検出可能な標識によって発生したシグナルと間接的に相関する

をさらに含む、請求項30に記載の方法。

【請求項33】

(a) 標的またはその断片について試験試料をアッセイするための説明書、および (b) 請求項1から12のいずれか一項に記載の結合タンパク質を含む少なくとも1つの結合タンパク質を含む、試料中の標的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。

【請求項34】

疾患または障害を治療するための医薬の製造における請求項1から12のいずれか一項に記載の結合タンパク質の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2013年3月15日に提出した米国仮特許出願第61/794,964号の優先権を主張し、この出願は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

TNF α 、IL-13、PGE2および/またはNGFに結合する多価および多重特異的結合タンパク質、ならびに結合タンパク質を作製し、急性および慢性炎症性疾患、癌および他の疾患の診断、予防および/または治療において結合タンパク質を使用する方法が開示される。

【背景技術】

【0003】

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

【0004】

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

【0005】

以前に使用された他のアプローチは、ヘテロー二官能性クロスリンカーを有する2つの親抗体のカップリング、タンデムな一本鎖Fv分子、ダイアボディ、二特異的ダイアボディ、一本鎖ダイアボディおよびジ-ダイアボディの製造を含む。しかしながら、これらのアプローチのそれぞれは不利益を有する。さらに、IgGの重鎖中に2つのFabリピートを含み、4つの抗原分子に結合することができる多価の抗体構築物が記載されている (PCT公開WO0177342およびMiller et al. (2003) J. Immunol. 170 (9): 4854-61 参照)。

【0006】

米国特許第7,612,181号 (その全体が参照により本明細書に組み込まれている) は、二重可変ドメイン結合タンパク質 (DVD結合タンパク質) または二重可変ドメ

10

20

30

40

50

イン免疫グロブリン（DVD-Ig（商標））と呼ばれる、高親和性を有する2つ以上の抗原に結合することが可能な結合タンパク質の新規なファミリーを提供する。DVD-Ig分子は、同じ分子または同時に2つの異なる分子上の2つの異なるエピトープに結合するために使用され得るタンパク質である。DVDは、N末端定常領域に融合した2つの可変ドメインで構成された固有の結合タンパク質である。可変ドメインは、互いに直接融合されてもよく、または各種の長さおよびアミノ酸組成を有する合成ペプチドリンカーを介して直接接続されてもよい。DVD-Igタンパク質は、完全であり、機能的なFcドメインを用いて遺伝子操作され得て、適切なエフェクター機能を媒介することができる。DVD-Igフォーマットは、可変ドメイン対の選択の柔軟性、2つの抗原結合ドメインの配向およびこれらを連結するリンカーの長さに起因して、新たな治療法を提供することができる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】国際公開第2001/077342号

【特許文献2】米国特許第7,612,181号明細書

【非特許文献】

【0008】

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

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

（発明の要旨）

種々の構造が当該技術分野において提供され、いくつかは利点と欠点を有するが、特定の構築物は、特定の標的に結合する特定の特性を有する多価結合タンパク質を調製するために必要とされる。さらに、新しい可変ドメイン配列は、結合タンパク質の特性をさらに改善することができる。例えば、自己免疫、炎症または神経障害を予防、診断および／または治療するために、TNF α 、およびIL-13、PGE2またはNGFから選択される第2の標的に対する、より良好なターゲティングおよび／またはそれらに対する結合の所望の有効性を示す構築物がなお必要とされる。したがって、TNF α 、IL-13、PGE2および／またはNGFに結合することができる改善された多価結合タンパク質が、当該技術分野において必要とされる。

【課題を解決するための手段】

【0010】

したがって、本明細書に、米国特許第7,612,181号（その全体が参照により本明細書に組み込まれている。）に開示されている結合タンパク質フレームワークを用い、特定の第一および第二のポリペプチド鎖を含有する二重可変ドメイン免疫グロブリンが開示され、第一および第二のポリペプチド鎖のそれぞれは、TNF α 、IL-13、PGE2および／またはNGFなどの標的に結合するための機能性結合部位を形成する配列（例えば、表1に列挙された配列から選択される配列）を含む第一および第二の可変ドメインを含む。いくつかの実施形態において、結合タンパク質の第一および第二のポリペプチド鎖はそれぞれ、VD1-(X1)n-VD2-C-X2を独立して含み、VD1は、第一の可変ドメインであり；VD2は、第二の可変ドメインであり；Cは、定常ドメインであり；X1は、リンカーであり；X2は、存在するまたは存在しないFc領域であり；nは、0または1であり、第一および第二のポリペプチド鎖上のVD1ドメインは、TNF α 、IL-13、PGE2またはNGFについて第一の機能的標的結合部位を形成し、第一および第二のポリペプチド鎖上のVD2ドメインは、TNF α 、IL-13、PGE2またはNGFについて第二の機能的標的結合部位を形成する。いくつかの実施形態において、Fcドメインは、1つのポリペプチド鎖上に存在し、他のポリペプチド鎖上には

存在しない、または両方のポリペプチド鎖上に存在しない。いくつかの実施形態において、それぞれのポリペプチド鎖上の第一および第二の可変ドメインの配列（すなわち、VD 1 および VD 2）は、表 1 中の配列から選択され、機能的結合部位を形成する。いくつかの実施形態において、第一および第二の可変ドメインの配列はそれぞれ、表 1 に列挙された選択された配列から 3 つの CDR（すなわち、CDR 1～3）を含有し、表 1 に示されるのと同じ順番で整列され、それによって、機能的結合部位を形成する（すなわち、結合ドメインはそれらの標的抗原である TNF- α 、IL-13、PGE 2 または NGF に結合することができる。）。いくつかの実施形態において、第一および第二のポリペプチド鎖上の対形成した可変ドメイン配列（すなわち、第二の鎖上の VD 1 配列と対形成した第一の鎖上の VD 1 配列と第二の鎖上の VD 2 配列と対形成した第一の鎖上の VD 2 配列）は、標的 TNF- α 、IL-13、PGE 2 および／または NGF に結合するための機能的結合部位を形成する。いくつかの実施形態において、結合タンパク質は、TNF- α 、IL-13、PGE 2 および／または NGF に結合することができ、改善された結合親和性および／または中和効力を有する。

10

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図 1】本開示の特定の実施形態による二重可変ドメイン（DVD）結合タンパク質構築物の模式図を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0012】

20

TNF- α は、免疫および炎症要素を含む様々な疾患と関連した病理学において役割を果たし、疾患としては、例えば、自己免疫疾患、特に炎症を伴う自己免疫疾患、例えば、クローン病、乾癬（尋常性乾癬を含む。）、関節炎（関節リウマチ、乾癬性関節炎、変形性関節症または若年性特発性関節炎を含む。）、多発性硬化症、全身性エリテマトーデスおよび強直性脊椎炎が挙げられる。

【0013】

インターロイキン 13（IL-13）は、Th 2 系統の活性化された T 細胞によって産生される 17 kDa の糖タンパク質である。IL-13 の機能は、ヒト B 細胞における IgE への免疫グロブリンアイソタイプスイッチングおよび炎症性サイトカイン産生の抑制を含む。IL-13 は、主には、喘息などの気道炎症の誘発と関連している。また、他のアレルギー性疾患、線維症状態、癌および感染症に結び付けられている。

30

【0014】

本明細書において、TNF- α 、IL-13、PGE 2 および／または NGF に対する改善された結合タンパク質が開示されている。

【0015】

結合タンパク質

いくつかの実施形態において、それぞれ VD 1 - (X 1)_n - VD 2 - C - X 2 を独立して含む、第一および第二のポリペプチド鎖を含む結合タンパク質が開示され、VD 1 は、第一の可変ドメインであり；VD 2 は、第二の可変ドメインであり；C は、定常ドメインであり；X 1 は、リンカーであり；X 2 は、存在するまたは存在しない Fc 領域であり；n は、第一および第二の鎖上で独立して 0 または 1 であり、第一および第二のポリペプチド鎖上の VD 1 ドメインは、第一の機能的標的結合部位を形成し、第一および第二のポリペプチド鎖上の VD 2 ドメインは、第二の機能的標的結合部位を形成する。いくつかの実施形態において、結合タンパク質は、TNF- α 、IL-13、PGE 2 および NGF の 1 つ以上に結合することができる。いくつかの実施形態において、結合タンパク質は、一緒になって、TNF- α と IL-13、TNF- α と PGE 2 または TNF- α と NGF に結合することができる結合ドメインを形成する第一および第二のポリペプチド鎖上の VD 1 配列（すなわち、第二の鎖上の VD 1 配列と対形成した第一の鎖上の VD 1 配列）を含む。一実施形態において、高親和性で TNF- α と IL-13、TNF- α と PGE 2 または TNF- α と NGF に結合することができる結合タンパク質が提供される。いくつかの実施形態

40

50

において、結合タンパク質は、V D 1 位置で T N F α に結合し、V D 2 位置で第二の標的（I L - 1 3、P G E 2 または N G F）に結合することができる。いくつかの実施形態において、結合タンパク質は、V D 1 位置で第二の標的（I L - 1 3、P G E 2 または N G F）に結合し、V D 2 位置で T N F α に結合することができる。

【0016】

本明細書に開示されている結合タンパク質は、第一および第二の標的抗原に結合することができる V D 1 および V D 2 結合ドメインを含む。本明細書において使用するとき、V D 1 ドメインもしくは V D 2 ドメイン、または V D 1 位置もしくは V D 2 位置は、1 つのポリペプチド鎖上の可変ドメイン配列（例えば、V D 1 重鎖配列）または一緒になって機能的結合部位を形成する第一および第二のポリペプチド鎖上の可変ドメイン配列（例えば、V D 1 重鎖配列および V D 1 軽鎖配列）のいずれかを意味してもよい。

10

【0017】

いくつかの実施形態において、V D 1 結合部位を形成する V D 1 配列は、表 1 中の対形成した配列（例えば、一緒になって I L - 1 3 について結合部位を形成する表 1 中の配列番号 3 2 と 3 3 の対形成した配列）から選択される。いくつかの実施形態において、V D 2 結合部位を形成する V D 2 配列は、表 1 中の対形成した配列（例えば、一緒になって I L - 1 3 について結合部位を形成する表 1 中の配列番号 3 2 と 3 3 の対形成した配列）から選択される。いくつかの実施形態において、V D 1 および／または V D 2 配列は、表 1 から選択される配列の C D R 1 ～ 3 を含むが、異なる可変ドメインフレームワーク配列（例えば、C D R 移植され、親和性成熟され、ヒト化され、ヒト化および復帰変異された可変ドメイン、または表 1 に開示された配列の他の機能的改変体）を有する。

20

【0018】

結合タンパク質が表 1 から選択される配列からの C D R を含む場合、C D R は、表 1 中の配列によって特定される順番で整列され、機能的結合部位を形成するために適切なフレームワーク配列によって分けられる。標的についての機能的結合部位（すなわち、T N F α、I L - 1 3、P G E 2 または N G F についての結合部位）を形成する、表 1 から選択される対形成した配列またはこれらの配列からの C D R は、V D 1 または V D 2 ドメインのいずれかで結合部位を形成するために、第一および第二のポリペプチド鎖上の V D 1 または V D 2 位置のいずれかにおいて配置されてもよい。例えば、I L - 1 3 について結合部位を形成する、表 1 からの合致する重鎖および軽鎖可変ドメイン配列（例えば、配列番号 3 4 と 3 5）は、I L - 1 3 についての V D 1 結合部位を形成するために第一および第二のポリペプチド鎖上の V D 1 位置において配置され得る。別の例において、I L - 1 3 について結合部位を形成する、表 1 からの合致する重鎖および軽鎖配列（例えば、配列番号 3 4 と 3 5）は、I L - 1 3 についての V D 2 結合部位を形成するために第一および第二のポリペプチド鎖上の V D 2 位置において配置され得る。同じまたは異なる配列は、V D 1 と V D 2 の両方の位置を占めてもよい。例えば、配列番号 3 4 と 3 5 は、V D 1 位置および V D 2 位置で結合ドメインを形成するために使用され得て、配列番号 3 4 と 3 5 は、V D 1 および V D 2 位置の 1 つで結合ドメインを形成してもよく、一方、異なる配列対は、他の位置で結合ドメインを形成するために選択され得る。同様に、表 1 中の他の配列対のいずれかは、第一および第二のポリペプチド鎖上の V D 1 および V D 2 位置のいずれかまたはそれらの両方における使用のために選択されてもよい。

30

40

【0019】

いくつかの実施形態において、結合タンパク質において（すなわち、V D 1 および／または V D 2 位置で）I L - 1 3 について機能的標的結合部位を形成する第一および第二のポリペプチド鎖上の可変ドメイン配列は、表 1 中の配列から選択される対形成した可変ドメイン配列またはこれらの配列からの C D R 1 ～ 3 を含むことができる。例えば、I L - 1 3 について機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは、配列番号 3 2 と配列番号 3 3、配列番号 3 4 と配列番号 3 5、配列番号 3 6 と配列番号 3 7、またはこれらの対形成した可変ドメイン配列からの C D R 1 ～ 3 を含むことができる。例えば、I L - 1 3 について機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは、他の鎖上の配列番号 3 3 からの C D

50

R 1～3と対形成した1つのポリペプチド鎖の配列番号32からのCDR1～3を含むことができる。

【0020】

いくつかの実施形態において、結合タンパク質において（すなわち、VD1および／またはVD2位置で）TNFについて機能的標的結合部位を形成する第一および第二のポリペプチド鎖上の可変ドメイン配列は、表1中の配列から選択される対形成した可変ドメイン配列またはこれらの選択された配列からのCDR1～3を含むことができる。例えば、TNFについて機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは、配列番号38と配列番号39、配列番号40と配列番号41、配列番号42と配列番号43、配列番号48と配列番号49、またはこれらの対形成した可変ドメイン配列からのCDR1～3を含むことができる。例えば、TNFについて機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは、他の鎖上の配列番号39からのCDR1～3と対形成した1つのポリペプチド鎖の配列番号38からのCDR1～3を含むことができる。

10

【0021】

いくつかの実施形態において、結合タンパク質において（すなわち、VD1および／またはVD2位置で）PGE2についての機能的標的結合部位を形成する第一および第二のポリペプチド鎖上の可変ドメイン配列は、表1中の配列から選択される対形成した可変ドメイン配列またはそれらの配列からのCDR1～3を含むことができる。例えば、PGE2について機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは、配列番号50と配列番号51、配列番号52と配列番号53、配列番号54と配列番号55またはこれらの対形成した可変ドメイン配列からのCDR1～3を含むことができる。例えば、PGE2について機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは、他の鎖上の配列番号51からのCDR1～3と対形成した1つのポリペプチド鎖の配列番号50からのCDR1～3を含むことができる。

20

【0022】

いくつかの実施形態において、結合タンパク質において（すなわち、VD1および／またはVD2位置で）NGFについて機能的標的結合部位を形成する第一および第二のポリペプチド鎖上の可変ドメイン配列は、表1中の配列から選択される対形成した可変ドメイン配列またはこれらの配列からのCDR1～3を含むことができる。例えば、NGFについて機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは、配列番号56と配列番号57またはこれらの対形成した可変ドメイン配列からのCDR1～3を含むことができる。例えば、NGFについて機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは、他の鎖上の配列番号57からのCDR1～3と対形成した1つのポリペプチド鎖の配列番号56からのCDR1～3を含むことができる。

30

【0023】

一実施形態において、結合タンパク質は、TNFについて機能的標的結合部位（すなわち、VD1またはVD2位置のいずれかでのTNF結合部位）およびIL-13について機能的標的結合部位（すなわち、VD2またはVD1位置のいずれかでのIL-13結合部位）を含む。一実施形態において、TNF結合部位は、配列番号38からのCDR1～3と配列番号39からのCDR1～3、配列番号40からのCDR1～3と配列番号41からのCDR1～3、配列番号42からのCDR1～3と配列番号43からのCDR1～3または配列番号48からのCDR1～3と配列番号49からのCDR1～3を含む。一実施形態において、TNF結合部位は、配列番号38と配列番号39、配列番号40と配列番号41、配列番号42と配列番号43または配列番号48と配列番号49を含む。一実施形態において、IL-13結合部位は、配列番号32からのCDR1～3と配列番号33からのCDR1～3、配列番号34からのCDR1～3と配列番号35からのCDR1～3または配列番号36からのCDR1～3と配列番号37からのCDR1～3を含む。一実施形態において、IL-13結合部位は、配列番号32と配列番号33、配列番号34と配列番号35または配列番号36と配列番号37を含む。一実施形態において、第一および／または第二のポリペプチド鎖上のX1リンカーは、配列番号1-31のいずれ

40

50

か1つを含む。一実施形態において、結合タンパク質は、表2に列挙された対形成した重鎖および軽鎖の配列番号のいずれかを含む第一および第二のポリペプチド鎖を含む。一実施形態において、結合タンパク質は、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に最大約 5.8×10^{-11} M の K_D で TNF に結合することができ、および／もしくは TNF 中和アッセイにおいて測定された場合に最大約 0.731 nM の IC50 で TNF を中和することができ、ならびに／または結合タンパク質は、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に最大約 1.2×10^{-9} M の K_D で IL-13 に結合することができ、および／もしくは IL-13 中和アッセイにおいて測定された場合に最大約 1.379 nM の IC50 で IL-13 を中和することができる。

【0024】

一実施形態において、結合タンパク質は、TNF について機能的標的結合部位（すなわち、VD1 または VD2 位置のいずれかでの TNF 結合部位）および PGE2 について機能的標的結合部位（すなわち、VD2 または VD1 位置のいずれかでの PGE2 結合部位）を含む。一実施形態において、TNF 結合部位は、配列番号38からのCDR1～3と配列番号39からのCDR1～3、配列番号40からのCDR1～3と配列番号41からのCDR1～3、配列番号42からのCDR1～3と配列番号43からのCDR1～3または配列番号48からのCDR1～3と配列番号49からのCDR1～3を含む。一実施形態において、TNF 結合部位は、配列番号38と配列番号39、配列番号40と配列番号41、配列番号42と配列番号43または配列番号48と配列番号49を含む。一実施形態において、PGE2 結合部位は、配列番号50からのCDR1～3と配列番号51からのCDR1～3、配列番号52からのCDR1～3と配列番号53からのCDR1～3または配列番号54からのCDR1～3と配列番号55からのCDR1～3を含む。一実施形態において、PGE2 結合部位は、配列番号50と配列番号51、配列番号52と配列番号53または配列番号54と配列番号55を含む。一実施形態において、第一および／または第二のポリペプチド鎖上のX1リンカーは、配列番号1～31のいずれか1つを含む。一実施形態において、結合タンパク質は、表3に列挙された対形成した重鎖および軽鎖の配列番号のいずれかを含む第一および第二のポリペプチド鎖を含む。一実施形態において、結合タンパク質は、TNF 中和アッセイにおいて測定された場合に最大約 3.076 nM もしくは約 2.876 nM の IC50 で TNF を中和することができ、および／または結合タンパク質は、PGE2 中和アッセイにおいて測定された場合に最大約 124.8 nM、 34.78 nM、 12.05 nM もしくは 1.136 nM の IC50 で PGE2 を中和することができる。

【0025】

一実施形態において、結合タンパク質は、TNF について機能的標的結合部位（すなわち、VD1 または VD2 位置のいずれかでの TNF 結合部位）および NGF について機能的標的結合部位（すなわち、VD2 または VD1 位置のいずれかでの NGF 結合部位）を含む。一実施形態において、TNF 結合部位は、配列番号38からのCDR1～3と配列番号39からのCDR1～3、配列番号40からのCDR1～3と配列番号41からのCDR1～3、配列番号42からのCDR1～3と配列番号43からのCDR1～3または配列番号48からのCDR1～3と配列番号49からのCDR1～3を含む。一実施形態において、TNF 結合部位は、配列番号38と配列番号39、配列番号40と配列番号41、配列番号42と配列番号43または配列番号48と配列番号49を含む。一実施形態において、NGF 結合部位は、配列番号56からのCDR1～3と配列番号57からのCDR1～3を含む。一実施形態において、NGF 結合部位は、配列番号56と配列番号57を含む。一実施形態において、第一および／または第二のポリペプチド鎖上のX1リンカーは、配列番号1～31のいずれか1つを含む。一実施形態において、結合タンパク質は、表4に列挙された対形成した重鎖および軽鎖の配列番号のいずれかを含む第一および第二のポリペプチド鎖を含む。一実施形態において、結合タンパク質は、TNF 中和アッセイにおいて測定された場合に最大約 0.673 nM もしくは約 0.279 nM の IC50 で TNF を中和することができ、および／または結合タンパク質は、NGF 阻害アッセ

イにおいて測定された場合に最大約 7. 4 5 5 n M もしくは 2. 8 9 5 n M の I C 5 0 で N G F を阻害することができる。

【0026】

いくつかの実施形態において、上記される結合タンパク質は、第一および第二のポリペプチド鎖のそれぞれにある X 1 リンカー、および 2 つの鎖の 1 つにある X 2 F c 領域を含む。X 1 リンカーは、それぞれの鎖上に独立して存在するまたは存在しない（すなわち、n は、それぞれの鎖に 0 または 1 から独立して選択される。）。第一および第二のポリペプチド鎖上の X 1 リンカーは、存在する場合、同じまたは異なる配列を有することができる。一実施形態において、第一および第二のポリペプチド鎖上の X 1 は短い（「S」）（例えば、6 アミノ酸またはそれより短い。）リンカーである。別の実施形態において、第一および第二のポリペプチド鎖上の X 1 は、長い（「L」）（例えば、6 アミノ酸より大きい。）リンカーである。別の実施形態において、第一鎖上の X 1 は短いリンカーであり、第二の鎖上の X 1 は長いリンカーである。別の実施形態において、第一鎖上の X 1 は長いリンカーであり、第二の鎖上の X 1 は短いリンカーである。いくつかの実施形態において、第一および／または第二のポリペプチド鎖上の X 1 リンカーは、配列番号 1 ~ 3 1 のいずれか 1 つから独立して選択される。いくつかの実施形態において、結合タンパク質の第一および／または第二のポリペプチド鎖上の X 1 は、完全な C H 1 または C L ドメインではなく、これらのドメインの部分を含んでもよい。いくつかの実施形態において、第一の鎖上の X 1 は C H 1 ではなく、第二の鎖上の X 1 は C L でない、または第一の鎖上の X 1 は C L でなく、第二の鎖上の X 1 は C H 1 ではない。いくつかの実施形態において、第一および／または第二のポリペプチド鎖上の X 1 リンカーの選択は、結合タンパク質の結合動態に影響を与え得る（例えば、G S ベースのリンカーを選択することにより、結合親和性および／または効力を有意に改善することができる。）。 10 20

【0027】

いくつかの実施形態において、X 2（F c 領域）は第一のポリペプチド鎖上に存在し、第二のポリペプチド鎖上に存在しないが、一方、他の実施形態において、X 2 は第二の鎖上に存在し、第一の鎖上に存在せず、または X 2 は第一と第二の鎖の両方に存在しない。いくつかの実施形態において、X 2 は、可変配列 F c 領域である。特定の実施形態において、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。いくつかの実施形態において、結合タンパク質は、結 30

【0028】

いくつかの実施形態において、結合タンパク質の第一のポリペプチド鎖は、上記の通り、重鎖であり、第二のポリペプチド鎖は軽鎖である。第一のポリペプチド鎖が重鎖であり、第二のポリペプチド鎖が軽鎖である特定の実施形態において、X 1 は、それぞれの鎖上に独立して存在するまたは存在せず（すなわち、n は、それぞれの鎖上に 0 または 1 から独立して選択される。）、X 2 は、重鎖上に存在し、軽鎖上に存在しない。いくつかの実施形態において、結合タンパク質は、配列番号 1 ~ 3 1 のいずれか 1 つから独立して選択される重および／または軽ポリペプチド鎖上の X 1 リンカーを含む。 40

【0029】

いくつかの実施形態において、上述した結合タンパク質のいずれかは、2 つの第一のポリペプチド鎖と 2 つの第二のポリペプチド鎖および 4 つの機能的結合部位を含むことができる。例えば、第一および第二のポリペプチド鎖は、2 つの機能的結合部位を（V D 1 と V D 2 位置で）形成するために、結合タンパク質の 1 つのアーム上で対形成されてもよく、一方、第一および第二のポリペプチド鎖の第二のセットは、2 つのさらなる機能的結合部位を（V D 1 と V D 2 位置で）形成するために、結合タンパク質の他のアーム上で対形成されてもよい。2 つのアームを有する 4 つの鎖構造の一例は図 1 に示され、それぞれのアームは、第一および第二のポリペプチド鎖と二つの機能的結合部位を含む。いくつかの実施形態において、第一および第二のアーム上の V D 1 と V D 2 位置での結合ドメインは同一である。他の実施形態において、第一および第二のアームは、V D 1 と V D 2 位置で 50

異なるドメインを含有する。いくつかの実施形態において、VD 1 および VD 2 結合ドメインは、表 1 から選択される可変ドメイン配列を含むまたは選択された配列からの CDR を含む。

【0030】

様々な実施形態において、上記の結合タンパク質は、野生型および変異した配列から選択される定常領域のアミノ酸配列を含むことができる。いくつかの実施形態において、野生型ヒトカップ軽鎖定常領域配列が使用される。いくつかの実施形態において、野生型ヒトラムダ軽鎖定常領域配列が使用される。いくつかの実施形態において、野生型または変異したヒト Ig G 重鎖定常領域配列が使用される。いくつかの実施形態において、野生型または変異したヒト Ig G 1 重鎖定常領域配列が使用される。特定の実施形態において、変異した配列は、表 4 a に示されたものである。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されている結合タンパク質は、野生型ヒトカップ軽鎖定常領域配列を含み、さらに、野生型ヒト重鎖 Ig G 1 定常領域配列を含む。

【0031】

一実施形態において、ポリペプチド鎖が VD 1 - (X 1) n - VD 2 - C - X 2 を含み、VD 1 が第一の可変ドメインであり、VD 2 が第二の可変ドメインであり、C が定常ドメインであり、X 1 がアミノ酸またはポリペプチドを表し、X 2 が存在するまたは存在しない Fc 領域を表し、n が 0 または 1 である、TNF α および IL - 1 3、TNF α および PGE 2、または TNF α および NGF に結合するポリペプチド鎖を含む結合タンパク質が提供される。一実施形態において、結合タンパク質における VD 1 および / または VD 2 は重鎖可変ドメインである。一実施形態において、結合タンパク質における VD 1 および / または VD 2 は軽鎖可変ドメインである。別の実施形態において、VD 1 および VD 2 は、同一の抗原に結合することができる。別の実施形態において、VD 1 および VD 2 は、異なる抗原に結合することができる。さらなる別の実施形態において、C は重鎖定常ドメインである。例えば、X 1 はリンカーであり、ただし、X 1 は CH 1 ではない。

【0032】

一実施形態において、本明細書に開示されている結合タンパク質は、TNF α および IL - 1 3、TNF α および PGE 2、または TNF α および NGF に結合するポリペプチド鎖を含み、ポリペプチド鎖は VD 1 - (X 1) n - VD 2 - C - X 2 を含み、VD 1 は第一の重鎖可変ドメインであり、VD 2 は第二の重鎖可変ドメインであり、C は重鎖定常ドメインであり、X 1 はリンカーであり、X 2 は存在するまたは存在しない Fc 領域である。一実施形態において、X 1 はリンカーであり、ただし、X 1 は CH 1 ではない。

【0033】

一実施形態において、本明細書に開示されている結合タンパク質は、TNF α および IL - 1 3、TNF α および PGE 2、または TNF α および NGF に結合するポリペプチド鎖を含み、ポリペプチド鎖は VD 1 - (X 1) n - VD 2 - C - X 2 を含み、VD 1 は第一の軽鎖可変ドメインであり、VD 2 は第二の軽鎖可変ドメインであり、C は軽鎖定常ドメインであり、X 1 はリンカーであり、X 2 は存在しない。一実施形態において、X 1 はリンカーであり、ただし、X 1 は CL ではない。

【0034】

別の実施形態において、TNF α および IL - 1 3、TNF α および PGE 2、または TNF α および NGF に結合する結合タンパク質は、2 つのポリペプチド鎖を含み、第一のポリペプチド鎖は VD 1 - (X 1) n - VD 2 - C - X 2 を含み、VD 1 が第一の重鎖可変ドメインであり、VD 2 が第二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 が第 1 のリンカーであり、X 2 が Fc 領域であり；第二のポリペプチド鎖は、VD 1 - (X 1) n - VD 2 - C を含み、VD 1 が第一の軽鎖可変ドメインであり、VD 2 が第二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 が第二のリンカーであり、X 2 が存在しない（すなわち、第二のポリペプチド鎖上に Fc が存在しない）。いくつかの実施形態において、第一および第二のポリペプチド鎖上の X 1 は同一である。他の実施形態において、第一および第二のポリペプチド鎖上の X 1 は異なっている。

いくつかの実施形態において、第一のX1はCH1ドメインではなく、および／または第二のX1はCLドメインではない。一実施形態において、第一のX1と第二のX1は短い（例えば、6アミノ酸）リンカーである。別の実施形態において、第一のX1と第二のX1は長い（例えば、6アミノ酸より大きい。）リンカーである。別の実施形態において、第一のX1は短いリンカーであり、第二のX1は長いリンカーである。別の実施形態において、第一のX1は長いリンカーであり、第二のX1は短いリンカーである。

【0035】

一実施形態において、本開示は、4つのポリペプチド鎖を含む二重可変ドメイン（DVD）結合タンパク質を提供し、第一の2つのポリペプチド鎖のそれぞれはVD1-（X1）_n-VD2-C-X2を含み、VD1が第一の重鎖可変ドメインであり、VD2が第二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が第一のリンカーであり、X2がFc領域であり；第二の2つのポリペプチド鎖のそれぞれはVD1-（X1）_n-VD2-C-X2を含み、VD1が第一の軽鎖可変ドメインであり、VD2が第二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が第二のリンカーであり、X2が存在しない（すなわち、第二の2つのポリペプチド鎖上にFc領域が存在しない。）
。このようなDVDの結合タンパク質は、4つの抗原結合部位を有する。いくつかの実施形態では、最初の2つのポリペプチド鎖は同一であり、第2の2つのポリペプチド鎖は、DVD結合タンパク質の各アームに、2つの標的結合部位を形成する第二のポリペプチド鎖の一方と対形成する第1のポリペプチド鎖の一方と同一である。いくつかの実施形態において、第一および第二のポリペプチド鎖上のX1は同一である。他の実施形態において、第一および第二のポリペプチド鎖上のX1は異なっている。いくつかの実施形態において、第一のX1は完全なCH1ドメインではなく、および／または第二のX1は完全なCLドメインではない。別の実施形態において、本明細書に開示されている結合タンパク質は、TNFαおよびIL-13、TNFαおよびPGE2、またはTNFαおよびNGFに結合することができる。したがって、いくつかの実施形態において、結合タンパク質は、いずれかの配向でTNFαおよびIL-13、TNFαおよびPGE2、またはTNFαおよびNGFに結合することができる（すなわち、VD1位置でTNFα、IL-13、PGE2、またはNGFに結合することができ、VD2位置でも同様である。）少なくとも2つの可変ドメイン配列（例えば、VD1とVD2）を含む。いくつかの実施形態において、VD1およびVD2は、独立して選択される。したがって、いくつかの実施形態において、VD1およびVD2は、同一の配列番号を含むことができ、他の実施形態において、VD1およびVD2は、異なる配列番号を含むことができる。

【0036】

一実施形態において、本開示は、それぞれ独立してVD1-（X1）_n-VD2-C-X2を含む第一および第二のポリペプチド鎖を含む結合タンパク質を提供し、VD1は第一の可変ドメインであり；VD2は第二の可変ドメインであり；Cは定常ドメインであり；X1はリンカーであり、ただし、X1はCH1ではなく；X2は1つのポリペプチド鎖上に存在し、他の鎖上に存在しないFc領域であり；nは0または1であり、第一および第二のポリペプチド鎖上のVD1ドメインは第一の機能的標的結合部位を形成し、第一および第二のポリペプチド鎖上のVD2ドメインは第二の機能的標的結合部位を形成し、（a）結合タンパク質はTNFαおよびIL-13に結合することができ、ここで（i）TNFαについて機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは配列番号38～49からなる群から選択される配列を含み、および／もしくは結合タンパク質は、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に最大約 5.8×10^{-11} Mの K_D でTNFαに結合することができ、ならびに／もしくは（ii）IL-13について機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは配列番号32～37からなる群から選択される配列を含み、および／もしくは結合タンパク質は、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に最大約 1.2×10^{-9} Mの K_D でIL-13に結合することができ；（b）結合タンパク質はTNFαおよびPGE2に結合することができ、ここで（i）TNFαについて機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは配列番号38～49からなる群から選択される配列を含み、

および／もしくは結合タンパク質は、TNF α 中和アッセイによって測定された場合、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に最大約3.076 nMのIC50でTNF α を阻害することができ、ならびに／もしくは(ii)PGE2について機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは配列番号50～55からなる群から選択される配列を含み、および／もしくは結合タンパク質は、PGE2中和アッセイにおいて測定された場合に最大約124.8 nMのIC50でPGE2を阻害することができ；または(c)結合タンパク質はTNF α およびNGFに結合することができ、ここで(i)TNF α について機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは配列番号38～49からなる群から選択される配列を含み、および／もしくは結合タンパク質は、TNF α 中和アッセイによって測定された場合に最大約0.673 nMのIC50でTNF α を阻害することができ、ならびに／もしくは(ii)NGFについて機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは配列番号56～57からなる群から選択される配列を含み、および／もしくは結合タンパク質は、TF-1細胞増殖バイオアッセイによって測定された場合に最大約7.455 nMのIC50でNGFを阻害することができる。

【0037】

別の実施形態において、それぞれ独立してVD1-(X1)n-VD2-C-X2を含む第一および第二のポリペプチド鎖を含む結合タンパク質が提供され、VD1は第一の可変ドメインであり；VD2は第二の可変ドメインであり；Cは定常ドメインであり；X1はリンカーであり、ただし、X1はCH1ではなく；X2は1つのポリペプチド鎖上に存在し、他の鎖上に存在しないFc領域であり；nは0または1であり、第一および第二のポリペプチド鎖上のVD1ドメインは第一の機能的標的結合部位を形成し、第一および第二のポリペプチド鎖上のVD2ドメインは第二の機能的標的結合部位を形成し、(a)結合タンパク質はTNF α およびIL-13に結合することができ、ここで(i)TNF α について機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは、配列番号38からのCDR1～3と配列番号39からのCDR1～3、配列番号40からのCDR1～3と配列番号41からのCDR1～3、配列番号42からのCDR1～3と配列番号43からのCDR1～3、配列番号44からのCDR1～3と配列番号45からのCDR1～3もしくは配列番号46からのCDR1～3と配列番号47からのCDR1～3；配列番号48からのCDR1～3と配列番号49からのCDR1～3を含み；および／もしくは結合タンパク質は、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に最大約 5.8×10^{-11} Mの K_D でTNF α に結合することができ、ならびに／もしくは(ii)IL-13について機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは、配列番号32からのCDR1～3と配列番号33からのCDR1～3；配列番号34からのCDR1～3と配列番号35からのCDR1～3；もしくは配列番号36からのCDR1～3と配列番号37からのCDR1～3を含み、および／もしくは結合タンパク質は、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に最大約 1.2×10^{-9} Mの K_D でIL-13に結合することができ；(b)結合タンパク質は、TNF α およびPGE2に結合することができ、ここで(i)TNF α について機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは、配列番号38からのCDR1～3と配列番号39からのCDR1～3、配列番号40からのCDR1～3と配列番号41からのCDR1～3、配列番号42からのCDR1～3と配列番号43からのCDR1～3、配列番号44からのCDR1～3と配列番号45からのCDR1～3；もしくは配列番号46からのCDR1～3と配列番号47からのCDR1～3；配列番号48からのCDR1～3と配列番号49からのCDR1～3を含み；および／もしくは結合タンパク質は、TNF α 中和アッセイによって測定された場合に最大約3.076 nMのIC50でTNF α を阻害することができ、ならびに／もしくは(ii)PGE2について機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは、配列番号50からのCDR1～3と配列番号51からのCDR1～3；配列番号52からのCDR1～3と配列番号53からのCDR1～3；または配列番号54からのCDR1～3と配列番号55からのCDR1～3を含み；および／もしくは結合タンパク質は、PGE2中和アッセイにおいて測定された場合に最大約124.8 nMのIC50でPGE2を中和することができ；または(c)結合タンパク質はT

10

20

30

40

50

N F α および N G F に結合することができ、ここで (i) T N F α について機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは配列番号 38 からの C D R 1 ~ 3 と配列番号 39 からの C D R 1 ~ 3、配列番号 40 からの C D R 1 ~ 3 と配列番号 41 からの C D R 1 ~ 3、配列番号 42 からの C D R 1 ~ 3 と配列番号 43 からの C D R 1 ~ 3、配列番号 44 からの C D R 1 ~ 3 と配列番号 45 からの C D R 1 ~ 3 もしくは配列番号 46 からの C D R 1 ~ 3 と配列番号 47 からの C D R 1 ~ 3；配列番号 48 からの C D R 1 ~ 3 と配列番号 49 からの C D R 1 ~ 3 を含むおよび／もしくは結合タンパク質は、T N F α 中和アッセイによって測定された場合に最大約 0.673 nM の I C 50 で T N F α を阻害することができ、ならびに／もしくは (i i) N G F について機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは配列番号 56 からの C D R 1 ~ 3 と配列番号 57 からの C D R 1 ~ 3 を含む、および／もしくは結合タンパク質は、T F - 1 細胞増殖バイオアッセイによって測定された場合に最大約 7.455 nM の I C 50 で N G F を阻害することができる。

10

【0038】

一実施形態において、結合タンパク質は、第一の V D 1 - (X 1) n - V D 2 - C - X 2 を含む第一のポリペプチド鎖を含み、V D 1 は第一の重鎖可変ドメインであり；V D 2 は第二の重鎖可変ドメインであり；C は重鎖定常ドメインであり；X 1 はリンカーであり、ただし、C H 1 ではなく；X 2 は F c 領域であり；n が 0 または 1 であり、第 2 のポリペプチド鎖は、第二の V D 1 - (X 1) n - V D 2 - C を含み、V D 1 は第一の軽鎖可変ドメインであり；V D 2 は第二の軽鎖可変ドメインであり；C は軽鎖定常ドメインであり；X 1 はリンカーであり、ただし、C H 1 ではなく；n は 0 または 1 であり：該鎖は、F c 領域を含まず；n は 0 または 1 であり、第一および第二のポリペプチド鎖上の V D 1 ドメインは第一の機能的標的結合部位を形成し、および第一および第二のポリペプチド鎖上の V D 2 ドメインは第二の機能的標的結合部位を形成する。

20

【0039】

別の実施形態において、(a) 結合タンパク質は、T N F α および I L - 1 3 に結合することができ、(i) T N F α について機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは、(1) 配列番号 38 と配列番号 39、(2) 配列番号 40 と配列番号 41、(3) 配列番号 42 と配列番号 43、(4) 配列番号 44 と配列番号 45、(5) 配列番号 46 と配列番号 47、(6) 配列番号 48 と配列番号 49、を含み、および／または (i i) I L - 1 3 について機能的標的結合部位を形成する可変ドメインは、(1) 配列番号 32 と配列番号 33、(2) 配列番号 34 と配列番号 35、または (3) 配列番号 36 と配列番号 37 を含む。

30

【0040】

別の実施形態において、結合タンパク質は 2 つの第一のポリペプチド鎖と 2 つの第二のポリペプチド鎖を含み、結合タンパク質は 4 つの機能的標的結合部位を含む。別の実施形態において、X 1 は、配列番号 1 ~ 31 のいずれか 1 つである。別の実施形態において、X 1 は C L ではない。別の実施形態において、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。

【0041】

別の実施形態において、本開示は、表 2 からのいずれかの D V D - I g V H および V L を含む、T N F α および I L - 1 3 に結合することができる結合タンパク質を提供する。

40

【0042】

別の実施形態において、本開示は、表 3 からのいずれかの D V D - I g V H および V L を含む、T N F α および P G E 2 に結合することができる結合タンパク質を提供する。

【0043】

別の実施形態において、本開示は、表 4 からのいずれかの D V D - I g V H および V L を含む、T N F α および N G F に結合することができる結合タンパク質を提供する。

【0044】

別の実施形態において、結合タンパク質は、本明細書中の表 1 に示されるように、対形

50

成した重鎖および軽鎖配列を含み、対形成した重鎖および軽鎖から機能的結合部位を形成する。

【0045】

一実施形態において、重鎖、軽鎖、二本鎖または四本鎖の実施形態のいずれかは、

【0046】

【化1】

AKTTPKLEEGEFSEAR (配列番号 : 1); AKTTPKLEEGEFSEARV (配列番号 : 2);
 AKTTPKLGG (配列番号 : 3); SAKTTPKLGG (配列番号 : 4); SAKTTP (配列番号
 : 5); RADAAP (配列番号 : 6); RADAAPTVS (配列番号 : 7); RADAAAAGGPGS
 (配列番号 : 8); RADAAA(G₄S)₄ (配列番号 : 9); SAKTTPKLEEGEFSEARV (配列番号
 : 10); ADAAP (配列番号 : 11); ADAAPTVSIFPP (配列番号 : 12); TVAAP
 (配列番号 : 13); TVAAPSVFIFPP (配列番号 : 14); QPKAAP (配列番号 : 15);
 QPKAAPSVTLFPP (配列番号 : 16); AKTTPP (配列番号 : 17); AKTTPPSVTPLAP
 (配列番号 : 18); AKTTAP (配列番号 : 19); AKTTAPSVYPLAP (配列番号 : 20);
 ASTKGP (配列番号 : 21); ASTKGPSVFPLAP (配列番号 : 22);
 GGGGSGGGGSGGGGS (配列番号 : 23); GENKVEYAPALMALS (配列番号 : 24);
 GPAKELTPLKEAKVS (配列番号 : 25); or GHEAAVMQVQYPAS (配列番号 : 26);
 TVAAPSVFIFPPTVAAPSVFIFPP (配列番号 : 27);
 ASTKGPSVFPLAPASTKGPSVFPLAP (配列番号 : 28); GGGGSGGGGS (配列番号
 : 29); GGS GGGGSG (配列番号 : 30)

10

20

【0047】

またはG/Sに基づく配列（例えば、G₄SとG₄Sリピート；配列番号31）を含む少なくとも1つのX1リンカーを含む。一実施形態において、X1は、定常領域ではなく、CH領域ではなく、および／またはCL領域ではない。一実施形態において、X2はFc領域である。別の実施形態において、X2は可変Fc領域である。一実施形態において、リンカーは、第一の鎖上のGGGGSGGGGS（配列番号29）および／または第二の鎖上のGSGGGGSG（配列番号30）である。一実施形態において、リンカーは、第一の鎖上のGSGGGGSG（配列番号30）および／または第二の鎖上のGGGGSGGGGS（配列番号29）である。

30

【0048】

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

40

【0049】

結合タンパク質特性

ヒト治療薬として、例えば、抗炎症剤または神経学的薬剤として使用するための結合タンパク質の開発および生産は、所望の標的または複数の標的に結合することができる結合タンパク質の同定よりも多く必要とする場合がある。本明細書に開示されている結合タンパク質は、以下のカテゴリーの1つ以上において有益な特性を示す：（a）内側と外側の両方の抗原結合ドメインについての結合反応速度（結合速度、解離速度および親和性）、（b）様々な生化学的および細胞バイオアッセイにおける有効性、（c）関連する腫瘍モデルにおけるインビボ効力、（d）薬物動態学的および薬力学的特性、（e）選択された

50

細胞株におけるタンパク質発現レベルを含む製造性、拡張性、翻訳後修飾、物理化学的特性、例えば、モノマー百分率、溶解性および安定性（固有、凍結／融解、貯蔵安定性など）、（f）製剤特性、（g）潜在的な免疫原性リスク、（h）毒性、ならびに（I）結合モードおよび原子価。結合モードおよび原子価は、分子の結合特性および細胞効力に影響を及ぼす場合がある。

【0050】

本明細書に開示されている結合タンパク質は、上記で列挙されたカテゴリーのいくつかまたはそれぞれにおいて有益な特性を示し、驚くべきことに、同じ標的に対する他の結合特性と比較して、VD1とVD2位置の両方で高い結合親和性を含むが、異なる改変ドメインおよび／またはリンカー配列を含む。また、予期しないで、本明細書に開示されている結合タンパク質は、いくつかの実施形態において、1つ以上の特性の優れた組み合わせ、例えば、同一の標的に対するが、異なる可変ドメインおよび／またはリンカー配列を含む他の結合タンパク質と比較して、効果的な結合動態、改善された中和能力、高められたインビボでの有効性、優れた処方性、所望のグリコシル化パターン、有益な薬物動態プロファイルおよび宿主細胞における効率的な発現の1つ以上を示す。

【0051】

例えば、予想外に、本明細書に開示されている多数の結合タンパク質は、それらの標的に、それらの個々の親抗体の両方におよそ匹敵する親和性で結合することが見出された。例えば、表5から8および10の親抗体と結合タンパク質の比較を参照されたい。これは、結合親和性の損失が、二重可変ドメイン結合構造の使用から先験的に予想され得たため、驚くべきことである。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されている結合タンパク質は、同一の標的に対するが、異なる可変ドメインおよび／またはリンカー配列を含む他の結合タンパク質と比較して、溶解性、粘性、凍結融解における安定性、および／または熱ストレス中の他の有意な変化の欠失を含む驚くほど有益な物理化学的特性を示す。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されている結合タンパク質は、同一の標的に対する別々の抗体の二重投与と比較して、および／または同一の標的に対するが、異なる可変ドメインおよび／またはリンカー配列を含む他の結合タンパク質と比較して、インビボでの免疫原性の減少を示す。

【0052】

様々な実施形態において、本明細書に開示されている結合タンパク質は、炎症、自己免疫または神経学的状態に関する他の治療と比較して、改善された特性、例えば、安全性の向上、安定性の増大、大きな効力、炎症もしくは免疫応答の減少または他の有益なインビボでのヒト治療特性を示す。比較に適した治療としては、例えば、小分子抗炎症剤もしくは神経性剤の投与、本明細書に開示されている抗体によって結合された同一の標的についての別々の抗体の二重投与または同一の標的に対するが、異なる可変ドメインおよび／またはリンカー配列を含む他の結合タンパク質の投与を挙げることができる。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されている結合タンパク質は、自己免疫、炎症または神経学的状態に関する治療の現在の基準と比較して、改善された特性を示す。例えば、結合タンパク質は、改善された結合反応速度、優れたインビボでの治療効果、処方性の増大（凝集の減少および貯蔵安定性の改善を含む。）、薬物動態の改善、炎症もしくは免疫応答の低減、および／または宿主細胞発現レベルの増大を示すことができる。

【0053】

結合タンパク質の調製

別の態様において、本開示は、TNF α および／またはIL-13に結合する結合タンパク質を作製する方法を提供する。一実施形態では、TNF α および／またはIL-13に結合する結合タンパク質を作製する方法は、：a) TNF α に結合する第一の親抗体またはその抗原結合部分を得るステップ；b) IL-13に結合する第二の親抗体またはその抗原結合部分を得るステップ；c) 親抗体またはその抗原結合部分の可変ドメインの配列を決定するステップ；d) 本明細書に記載されている結合タンパク質のいずれかをコードする構築物（単数または複数）をそれらの可変ドメイン配列を用いて調製するステップ

；ならびに e) T N F α および I L - 1 3、T N F および P G E 2、または T N F および N G F に結合する結合タンパク質が生成されるようにポリペプチド鎖を発現させるステップを含む。

【0054】

T N F α および／または P G E 2 に結合する結合タンパク質を作製する方法が提供される。一実施形態において、T N F α および／または P G E 2 に結合する結合タンパク質を作製する方法は：a) T N F α に結合する第一の親抗体またはその抗原結合部分を得るステップ；b) P G E 2 に結合する第二の親抗体またはその抗原結合部分を得るステップ；c) 本明細書に記載されている結合タンパク質のいずれかをコードする構築物（単数または複数）を調製するステップ；ならびに d) 第一および第二の抗原に結合する結合タンパク質が生成されるようにポリペプチド鎖を発現させるステップ、を含む。

10

【0055】

T N F α および／または N G F に結合する結合タンパク質を作製する方法が提供される。一実施形態において、T N F α および／または N G F に結合する結合タンパク質を作製する方法は：a) T N F α に結合する第一の親抗体またはその抗原結合部分を得るステップ；b) N G F に結合する第二の親抗体またはその抗原結合部分を得るステップ；c) 本明細書に記載されている結合タンパク質のいずれかをコードする構築物（単数または複数）を調製するステップ；ならびに d) 第一および第二の抗原に結合する結合タンパク質が生成されるようにポリペプチド鎖を発現させるステップ、を含む。

【0056】

20

本明細書における実施形態のいずれかにおいて、存在する場合、V D 1 重鎖可変ドメイン、および存在する場合、軽鎖可変ドメインは、第一の親抗体またはその抗原結合部分由来であってもよく；存在する場合、V D 2 重鎖可変ドメイン、および存在する場合、軽鎖可変ドメインは、第二の親抗体またはその抗原結合部分由来であってもよい。第一および第二の親抗体は同じであってもよくまたは異なってもよい。

【0057】

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

30

【0058】

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

【0059】

40

別の実施形態において、結合タンパク質は、第一の親抗体もしくはその抗原結合部分または第二の親抗体もしくはその抗原結合部分によって示される少なくとも1つの所望の特性を有する。あるいは、第一の親抗体もしくはその抗原結合部分または第二の親抗体もしくはその抗原結合部分は、結合タンパク質によって示される少なくとも1つの所望の特性を有する。一実施形態において、所望の特性は、1つ以上の抗体パラメーターである。別の実施形態において、抗体パラメーターは、抗原特異性、抗原に対する親和性、効力、生物学的機能、エピトープ認識、安定性、可溶性、生産効率、免疫原性、薬物動態、生物学的利用率、組織交差反応性またはオルソロガス抗原結合性である。一実施形態において、結合タンパク質は多価である。別の実施形態において、結合タンパク質は多重特異的である。本明細書に記載されている多価および／または多重特異的結合タンパク質は、特に治

50

療的見地から望ましい特性を有する。例えば、多価および／または多重特異的結合タンパク質は、(1)抗体が結合する抗原を発現している細胞によって、二価抗体より速く内部に取り込まれる(および／または異化される)；(2)タンパク質に結合するアゴニストであり；および／または(3)多価結合タンパク質が結合することができる抗原を発現している細胞の細胞死および／またはアポトーシスを誘導し得る。多価および／または多重特異的結合タンパク質の少なくとも1つの抗原結合特異性を提供する「親抗体」は、抗体が結合する抗原を発現している細胞によって内部に取り込まれ(および／または異化される)抗体であり得、および／またはアゴニスト、細胞死誘導および／またはアポトーシス誘導抗体であり得、本明細書に記載されている多価および／または多重特異的結合タンパク質は、これらの特性の1つ以上の改善を示し得る。さらに、親抗体は、これらの特性の任意の1つ以上を欠損してもよいが、本明細書に記載されるように、多価結合タンパク質として構築された場合、これらの1つ以上を取得してもよい。

10

【0060】

別の実施形態において、結合タンパク質は、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、少なくとも約 $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ；少なくとも約 $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ；少なくとも約 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ；少なくとも約 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ；または少なくとも約 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ のうちの1つ以上の標的への結合速度定数(K_{on})を有する。一実施形態において、結合タンパク質は、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、約 $10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から約 $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、約 $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から約 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、約 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から約 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、または約 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ から約 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の、1つ以上の標的に対する結合速度定数(K_{on})を有する。

20

【0061】

別の実施形態において、結合タンパク質は、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、最大約 10^{-3} s^{-1} ；最大約 10^{-4} s^{-1} ；最大約 10^{-5} s^{-1} ；または最大約 10^{-6} s^{-1} のうちの1つ以上の標的への解離速度定数(K_{off})を有する。一実施形態において、結合タンパク質は、表面プラズモン共鳴によって測定された場合に、約 10^{-3} s^{-1} から約 10^{-4} s^{-1} の、約 10^{-4} s^{-1} から約 10^{-5} s^{-1} の、または約 10^{-5} s^{-1} から約 10^{-6} s^{-1} の間の、1つ以上の標的に対する解離速度定数(K_{off})を有する。

【0062】

別の実施形態において、結合タンパク質は、最大約 10^{-7} M ；最大約 10^{-8} M ；最大約 10^{-9} M ；最大約 10^{-10} M ；最大約 10^{-11} M ；最大約 10^{-12} M または最大約 10^{-13} M のうちの1つ以上の標的への解離定数(K_d)を有する。一実施形態において、結合タンパク質は、約 10^{-7} M から約 10^{-8} M の；約 10^{-8} M から約 10^{-9} M の；約 10^{-9} M から約 10^{-10} M の；約 10^{-10} M から約 10^{-11} M の；約 10^{-11} M から約 10^{-12} M の；または約 10^{-12} M から約 10^{-13} M のその標的に対する解離定数(K_d)を有する。

30

【0063】

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

40

【0064】

別の実施形態において、結合タンパク質は結晶化された結合タンパク質であり、結晶として存在する。一実施形態において、この結晶は、無担体医薬徐放結晶である。別の実施形態において、結晶化された結合タンパク質は、この結合タンパク質の可溶性対応物より

50

大きなインビボ半減期を有する。さらに別の実施形態において、結晶化された結合タンパク質は生物学的活性を保持する。

【0065】

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

【0066】

本明細書に開示されている結合タンパク質のいずれか1つをコードする単離された核酸も提供される。さらなる実施形態は、本明細書に開示されている単離された核酸を含むベクターを提供し、ベクターは、p cDNA ; pTT (Durocher et al. (2002) Nucleic Acids Res. 30 (2) ; pTT3 (追加の多重クローニング部位を有するpTT) ; pEFBOS (Mizushima and Nagata, (1990) Nucleic Acids Res. 18 : (17) ; pBV ; pJV ; p cDNA 3.1 TOPO ; pEF6 TOPO ; pBOS ; pHybE ; またはpBJである。一実施形態において、ベクターは、米国特許公開第20090239259号に開示されているベクターである。

【0067】

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

【0068】

結合タンパク質を生産するのに十分な条件下で、本明細書に開示されている宿主細胞のいずれか1つを培地中において培養することを含む、本明細書に開示されている結合タンパク質を生産する方法が提供される。一実施形態において、この方法によって生産される50% - 75%の結合タンパク質は、二重特異的四価結合タンパク質である。別の実施形態において、この方法によって生産された結合タンパク質の75%から90%が、二重特異的四価結合タンパク質である。別の実施形態において、生産された結合タンパク質の90%から95%が、二重特異的四価結合タンパク質である。

【0069】

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

【0070】

別の実施形態は、本明細書に開示された組成物の有効量を哺乳動物に投与する工程を含む哺乳動物を治療する方法を提供する。

【0071】

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

【0072】

治療および診断的使用

本明細書に開示されている結合部分によって結合され得る標的または複数の標的が有害である障害に罹患しているヒト対象を治療する方法であって、標的または複数の標的の活性が、ヒト対象において阻害され、1つ以上の症状が緩和されまたは治療が達成されるように、本明細書に開示されている結合タンパク質をヒト対象に投与することを含む方法が提供される。本明細書において提供されている結合タンパク質は、例えば、炎症に関連した疾患などの自己免疫疾患を患っているヒトを治療するために使用することができる。一実施形態において、本明細書において提供されている結合タンパク質またはその抗原結合部分は、喘息、アレルギー、アレルギー性肺疾患、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、線維症、嚢胞性線維症（CF）、線維性肺疾患、特発性肺線維症、肝線維症、狼瘡、B型肝炎関連肝疾患および線維症、敗血症、全身性エリテマトーデス（SLE）、糸球体腎炎、炎症性皮膚疾患、乾癬、糖尿病、インスリン依存性糖尿病、HIVによって引き起こされる感染症、炎症性腸疾患（IBD）、潰瘍性大腸炎（UC）、クローン病（CD）、関節リウマチ（RA）、変形性関節症（OA）、多発性硬化症（MS）、移植片対宿主病（GVHD）、移植拒絶反応、虚血性心疾患（IHD）、セリアック病、接触過敏症、アルコール性肝疾患、ベーチェット病、アテローム硬化性血管疾患、眼球表面の炎症性疾患またはライム病を治療するために使用される。

【0073】

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

【0074】

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

【0075】

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

10

【0076】

別の実施形態は、疾患または障害の治療における結合タンパク質の使用を提供し、疾患または障害は、関節リウマチ、変形性関節症、若年性慢性関節炎、敗血症性関節炎、ライム関節炎、乾癬性関節炎、反応性関節炎、脊椎関節症、全身性紅斑性狼瘡、クローン病、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、インスリン依存性糖尿病、甲状腺炎、喘息、アレルギー性疾患、乾癬、皮膚炎、強皮症、移植片対宿主病、臓器移植拒絶、臓器移植に関連する急性または慢性免疫疾患、サルコイドーシス、アテローム性動脈硬化症、播種性血管内凝固、川崎病、バセドウ病、ネフローゼ症候群、慢性疲労症候群、ウェゲナー肉芽腫症、ヘノッホ・シェーライン紫斑症、腎臓の顕微鏡的血管炎、慢性活動性肝炎、ブドウ膜炎、敗血症性ショック、毒素性ショック症候群、敗血症症候群、悪液質、感染性疾患、寄生性疾患、後天性免疫不全症候群、急性横断性脊髄炎、ハンチントン舞蹈病、パーキンソン病、アルツハイマー病、発作、原発性胆汁性肝硬変、溶血性貧血、悪性腫瘍、心不全、アジソン病、孤発性の、多内分泌腺機能低下症候群Ⅰ型および多内分泌腺機能低下症候群Ⅱ型、シュミット症候群、成人（急性）呼吸促迫症候群、脱毛症、円形脱毛症、関節炎、ライター病、乾癬性関節炎、潰瘍性大腸性関節炎、腸疾患性滑膜炎、クラミジア、エルシニアおよびサルモネラ関連関節炎、アテローム性疾患／アテローム性動脈硬化症、アトピー性アレルギー、自己免疫性水疱性疾患、尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、類天疱瘡、線状IgA病、自己免疫性溶血性貧血、クームス陽性溶血性貧血、後天性悪性貧血、若年性悪性貧血、筋痛性脳脊髄炎／ロイヤルフリー病、慢性粘膜皮膚カンジダ症、巨細胞性動脈炎、原発性硬化性肝炎、突発性自己免疫性肝炎、後天性免疫不全関連疾患、B型肝炎、C型肝炎、分類不能型免疫不全症（分類不能型原発性低γグロブリン血症）、拡張型心筋症、女性不妊症、卵巣機能不全、早期卵巣機能不全、線維性肺疾患、突発性間質性肺炎、炎症後間質性肺疾患、間質性肺炎、結合組織疾患関連間質性肺疾患、混合性結合組織疾患関連肺疾患、全身性硬化症関連間質性肺疾患、関節リウマチ関連間質性肺疾患、全身性紅斑性狼瘡関連肺疾患、皮膚筋炎／多発性筋炎関連肺疾患、シェーグレン病関連肺疾患、強直性脊椎炎関連肺疾患、血管炎性びまん性肺疾患（*vasculitic diffuse lung disease*）、ヘモシデローシス関連肺疾患、薬物によって誘導された間質性肺疾患、線維症、放射性線維症、閉塞性細気管支炎、慢性好酸球性肺炎、リンパ球浸潤性肺疾患、感染後間質性肺疾患、通風関節炎、自己免疫性肝炎、1型自己免疫性肝炎（古典的自己免疫性またはルポイド肝炎）、2型自己免疫性肝炎（抗LKM抗体肝炎）、自己免疫媒介性低血糖症、黒色表皮腫を伴うB型インスリン抵抗性、副甲状腺機能低下症、臓器移植に関連する急性免疫疾患、臓器移植に関連する慢性免疫疾患、変形性関節症、原発性硬化性胆管炎、1型乾癬、2型乾癬、特発性白血球減少症、自己免疫性好中球減少症、腎臓病NOS、糸球体腎炎、腎臓の顕微鏡的血管炎、ライム病、円板状紅斑性狼瘡、男性不妊症特発性またはNOS、精子自己免疫、多発性硬化症（すべてのサブタイプ）、交感性眼炎、結合組織疾患に続発する肺高血圧症、グッドパスチャー症候群、結節性多発動脈炎の肺症状、急性リウマチ熱、リウマチ性脊椎炎、スチル病、全身性硬化症、シェーグレン症候群、高安病／動脈炎、自己免疫性血小板減少症、特発性血小板減少症、自己免疫性甲状腺疾患、甲状腺機能亢進症、甲状腺腫自己免疫性甲状腺機能低下症（橋本病）、萎縮性自己

20

30

40

50

免疫性甲状腺機能低下症、原発性粘液水腫（primary myxoedema）、水
 晶体起因性ブドウ膜炎、原発性血管炎、白斑急性肝疾患、慢性肝疾患、アルコール性肝硬
 変、アルコール誘発性肝障害、胆汁うっ滞（choleostasis）、特異体質性
 肝疾患、薬物誘発性肝炎、非アルコール性脂肪性肝炎、アレルギーおよび喘息、B群連鎖
 球菌（GBS）感染、精神障害、うつ病、統合失調症、Th2型およびTh1型によって
 媒介される疾病、急性および慢性疼痛、疼痛の様々な形態、癌、肺癌、乳癌、胃癌、膀胱
 癌、大腸癌、膵臓癌、卵巣癌、前立腺癌、直腸癌、造血性悪性病変、白血病、リンパ腫、
 無βリポタンパク質血症、先端チアノーゼ、急性および慢性寄生性または感染性プロセス
 、急性白血病、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、急性骨髄性白血病（AML）、急性
 または慢性細菌感染、急性膵炎、急性腎不全、腺癌、心房（aerial）異所性拍動、
 AIDS認知症複合、アルコール誘発性肝炎、アレルギー性結膜炎、アレルギー性接触性
 皮膚炎、アレルギー性鼻炎、同種移植拒絶、α-1-アンチトリプシン欠乏症、筋萎縮性
 側索硬化症、貧血、狭心症、前角細胞変性、抗cd3治療、抗リン脂質症候群、抗受容体
 過敏症反応（antireceptor hypersensitivity reactions）、大動脈（aortic）および動脈瘤、大動脈解離、動脈性高血圧、動
 脈硬化症、動静脈瘻、運動失調、心房細動（持続的または発作性）、心房粗動、房室ブロ
 ック、B細胞リンパ腫、骨移植拒絶、骨髄移植（BMT）拒絶、脚ブロック、バーキッ
 トリンパ腫、火傷、心不整脈、心機能不全症候群（cardiac stunsyndrome）、心臓腫瘍、心筋症、心肺バイパス炎症反応、軟骨移植拒絶、小脳皮質変性、小
 脳疾患、無秩序なまたは多巣性心房頻脈、化学療法関連疾患、慢性骨髄性白血病（CML）
 、慢性アルコール症、慢性炎症性病変、慢性リンパ性白血病（CLL）、慢性閉塞性肺
 疾患（COPD）、慢性サリチル酸中毒、結腸直腸癌、うっ血性心不全、結膜炎、接触性
 皮膚炎、肺性心、冠動脈疾患、クロイツフェルトーヤコブ病、培養陰性敗血症、嚢胞性線
 維症、サイトカイン療法関連疾患、ボクサー脳、脱髄性疾患、デング出血熱、皮膚炎、皮
 膚科学的症状、糖尿病、真性糖尿病、糖尿病性動脈硬化疾患、瀰漫性レビー小体病、拡張
 型うっ血性心筋症、大脳基底核の疾患、中年のダウン症候群、中枢神経ドーパミン受容体
 を遮断する薬物によって誘発された薬物誘発性運動疾患、薬物感受性、湿疹、脳脊髄炎、
 心内膜炎、内分泌疾患、喉頭蓋炎、エプスタインバーウイルス感染、紅痛症、垂体外路
 および小脳疾患、家族性血球貪食性リンパ組織球症（familial hematophagocytic lymphohistiocytosis）、致死性胸腺移植組織
 拒絶、フリードライヒ失調症、機能的末梢動脈疾患、真菌性敗血症、ガス壊疽、胃潰瘍、
 糸球体腎炎、いずれかの臓器または組織の移植片拒絶、グラム陰性敗血症、グラム陽性敗
 血症、細胞内生物に起因する肉芽腫、有毛細胞白血病、ハラールホルデン・スパッツ病、橋
 本甲状腺炎、枯草熱、心臓移植拒絶、血色素症、血液透析、溶血性尿毒症症候群／血栓溶
 解血小板減少紫斑病、出血、肝炎（A型）、ヒス束不整脈、HIV感染／HIV神経障害
 、ホジキン病、運動過剰疾患、過敏症反応、過敏性肺炎、高血圧、運動低下疾患、視床下
 部一下垂体－副腎皮質系評価、特発性アジソン病、特発性肺線維症、抗体媒介性細胞毒性
 、無力症、乳児脊髄性筋萎縮症、大動脈の炎症、A型インフルエンザ、電離放射線曝露、
 虹彩毛様体炎／ブドウ膜炎／視神経炎、虚血再灌流障害、虚血性発作、若年性関節リウマ
 チ、若年性脊髄性筋萎縮症、カポジ肉腫、腎移植拒絶、レジオネラ、リーシュマニア症、
 ハンセン病、皮質脊髄系の病変、脂肪血症（lipidema）、肝臓移植拒絶、リンパ
 浮腫（lymphedema）、マラリア、悪性リンパ腫、悪性組織球増殖症、悪性黒
 色腫、髄膜炎、髄膜炎菌血症（meningococciemia）、代謝性／特発性、偏
 頭痛、ミトコンドリア多系疾患（mitochondrial multisystem disorder）、混合性結合組織病、モノクローナル高ガンマグロブリン血症、
 多発性骨髄腫、多系統変性（メンセル・デジェリーヌートーマス・シャイドレーガーお
 よびマシャドージョセフ）、マイコバクテリウム・アビウム・イントラセルラーレ、マイ
 コバクテリウム・チューバキュロシス、骨髄形成異常、心筋梗塞、真菌虚血疾患、上咽頭癌
 、新生児慢性肺疾患、腎炎、ネフローゼ、神経変性疾患、神経原性筋萎縮、好中球減少性
 発熱、非ホジキンリンパ腫、腹部大動脈およびその分枝の閉塞、閉塞性動脈疾患、okt

3 療法、精巣炎／精巣上体炎、精巣炎／精管復元術処置、臓器肥大、骨粗鬆症、脾臓移植拒絶、脾癌、腫瘍随伴性症候群／悪性腫瘍の高カルシウム血症、副甲状腺移植拒絶、骨盤内炎症性疾患、通年性鼻炎、心膜疾患、末梢アテローム硬化性疾患、末梢血管疾患、腹膜炎、悪性貧血、ニューモシスチス・カリニ肺炎、肺炎、POEMS症候群（多発神経炎、臓器肥大、内分泌疾患、単クローン性γグロブリン血症および皮膚変化症候群（skin changes syndrome））、灌流後症候群（post perfusion syndrome）、ポンプ後症候群（post pump syndrome）、心筋梗塞後開心術症候群、子癇前症、進行性核上性麻痺、原発性肺高血圧、放射線療法、レイノー現象および病、レイノー病、レフサム病、規則的なQRS幅の狭い頻脈症（regular narrow QRS tachycardia）、腎血管性高血圧、再灌流障害、拘束型心筋症、肉腫、強皮症、老年性舞蹈病、レビー小体型の老年性認知症、血清反応陰性関節炎、ショック、鎌形赤血球貧血症、皮膚同種異系移植拒絶、皮膚変化症候群、小腸移植拒絶、固形腫瘍、固有不整脈（specific arrhythmias）、脊髄性運動失調、脊髄小脳変性、連鎖球菌性筋炎、小脳の構造的病変、亜急性硬化性全脳炎、失神、心血管系の梅毒、全身性アナフィラキシー、全身性炎症反応症候群、全身性発症若年性関節リウマチ、T細胞またはFABALL、毛細血管拡張症、閉塞性血栓血管炎、血小板減少症、毒性、移植、外傷／出血、III型過敏症反応、IV型過敏症、不安定狭心症、尿毒症、尿路性敗血症、心臓弁膜症、静脈瘤、血管炎、静脈疾患、静脈血栓症、心室細動、ウイルスおよび真菌感染、ウイルス性脳炎（vital encephalitis）／無菌性髄膜炎、ウイルス関連血球貪食症候群、ウェルニッケーコルサコフ症候群、ウィルソン病、いずれかの臓器または組織の異種移植拒絶、急性冠症候群、急性特発性多発性神経炎、急性炎症性脱髄性多発神経根神経障害、急性虚血、成人スチル病、アナフィラキシー、抗リン脂質抗体症候群、再生不良性貧血、アトピー性湿疹、アトピー性皮膚炎、自己免疫性皮膚炎、連鎖球菌感染に伴う自己免疫異常、自己免疫性腸症、自己免疫性難聴、自己免疫性リンパ増殖症候群（ALPS）、自己免疫性心筋炎、自己免疫性早期卵巢不全、眼瞼炎、気管支拡張症、水疱性類天疱瘡、心血管疾患、劇症型抗リン脂質症候群、セリアック病、頸部脊椎症、慢性虚血、瘢痕性類天疱瘡、多発性硬化症のリスクを有する臨床的孤発症候群（c i s）、小児発症精神障害、涙囊炎、皮膚筋炎、糖尿病性網膜症、椎間板ヘルニア、椎間板脱出、薬物誘発免疫性溶血性貧血、子宮内膜症、眼内炎、上強膜炎、多形性紅斑、重症型多形性紅斑、妊娠性類天疱瘡、ギラン・バレー症候群（GBS）、ヒューズ症候群、特発性パーキンソン病、特発性間質性肺炎、IgE媒介性アレルギー、免疫性溶血性貧血、封入体筋炎、感染性眼炎症疾患、炎症性脱髄疾患、炎症性心疾患、炎症性腎疾患、IPF／UIP、虹彩炎、角膜炎、乾性角結膜炎（keratoconjunctivitis sicca）、クスマウル病またはクスマウルマイヤー病、ランドリー麻痺、ランゲルハンス細胞性組織球症、網状皮斑、黄斑変性、顕微鏡的多発性血管炎、モルブス・ベヒテレフ（morbus bechterev）、運動ニューロン疾患、粘膜性類天疱瘡、多臓器不全、重症筋無力症、骨髄異形成症候群、心筋炎、神経根障害、神経障害、非A非B型肝炎、視神経炎、骨溶解、小関節性JRA、末梢動脈閉塞疾患（PAOD）、末梢血管疾患（PVD）、末梢動脈疾患（PAD）、静脈炎、結節性多発性動脈炎（または結節性動脈周囲炎）、多発性軟骨炎、白毛症、多関節性JRA、多内分泌欠損症候群、多発性筋炎、リウマチ性多発性筋痛（PMR）、原発性パーキンソニズム、前立腺炎、赤芽球癆、原発性副腎不全、再発性視神経脊髄炎、再狭窄、リウマチ性心疾患、sapho（滑膜炎、アクネ、膿疱症、骨過形成および骨髄炎）、続発性アミロイドーシス、ショック肺、強膜炎、坐骨神経痛、坐骨神経痛、シリコーン関連結合組織病、スネドナーウィルキンソン皮膚症、強直性脊椎炎、ステーブンス・ジョンソン症候群（SJS）、側頭動脈炎、トキソプラズマ性網膜炎、中毒性表皮剥離症、横断性脊髄炎、TRAPS（腫瘍壊死因子受容体）、I型アレルギー反応、II型糖尿病、じんましん、通常型間質性肺炎（UIP）、血管炎、春季結膜炎、ウイルス性網膜炎、フォークト・小柳・原田症候群（VKH症候群）、滲出型黄斑変性、もしくは創傷治癒である。

10

20

30

40

50

【0077】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示されている結合タンパク質のいずれか1つは、上記に列挙された障害を治療するために用いることができる。特定の実施形態において、本明細書において説明されている障害のいずれかを治療するために使用される結合タンパク質は、表2-4に列挙された結合タンパク質の1つ以上である。

【0078】

一実施形態において、本明細書に開示されている結合タンパク質は、関節炎、関節リウマチ、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、ANCA血管炎、リウマチ性多発筋痛またはドライアイを治療するために使用される。実施形態において、結合タンパク質は、関節炎を治療するために使用される。実施形態において、結合タンパク質は、関節リウマチを治療するために使用される。実施形態において、結合タンパク質は、乾癬性関節炎を治療するために使用される。一実施形態において、結合タンパク質は、強直性脊椎炎を治療するために使用される。いくつかの実施形態において、結合タンパク質は、本明細書において開示されている結合タンパク質のいずれか1つである。特定の実施形態において、結合タンパク質は、表2-4に列挙された結合タンパク質の1つ以上である。

10

【0079】

いくつかの実施形態において、本明細書において開示されている結合タンパク質は、上記の状態の1つ（例えば、関節リウマチ）を治療するために使用されてもよく、TNF単剤療法と比較して改善された結果を示す。例えば、結合タンパク質は、抗TNF抗体よりも長く循環中に持続することができ、それによってより長期間の治療効果を提供し、投与頻度の減少の可能性をできるようにし、順に免疫応答を誘導する投与された薬剤の危険性を低減することができる。

20

【0080】

いくつかの実施形態において、結合タンパク質は、抗TNF抗体を投与することによって達成され得るものと比較して、関節リウマチと関連した炎症におけるより大きな減少、またはTNF α およびIL-13、TNFおよびPGE2、またはTNFおよびNGFに対する別々の抗体の二重投与後の阻害の総和によって達成されるものよりも大きな減少を生じさせ得る。炎症は、例えば、IL-6、CXCL-1、PGE-2、CXCL-5、G-CSFまたはMMP3発現のレベルを測定することによって評価され得る。いくつかの実施形態において、結合タンパク質は、TNF抗体を用いて、または単剤療法の組合せとして投与されるTNF α およびIL-13、TNFおよびPGE2、またはTNFおよびNGF抗体を用いて達成され得るものより多くの量によって、炎症、軟骨損失、および／または骨破壊を減少させるために使用することができる。したがって、本明細書に開示されている結合タンパク質を用いた炎症性メディエーターの組み合わせを標的とすることは、個々の単剤療法によって達成され得た患者の症状をより十分に制御し得る。

30

【0081】

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

40

【0082】

別の態様において、本明細書に論述されているような第二の作用物質の投与前、投与と同時にまたは投与後に、本明細書に開示されている結合タンパク質のいずれか1つを投与する工程を含む、疾患に罹患している患者を治療する方法が提供される。一実施形態において、第二の作用物質は、ブデノシド、上皮増殖因子、コルチコステロイド、シクロスポリン、スルファサラジン、アミノサリチラート、6-メルカプトプリン、アザチオプリン、メトロニダゾール、リポキシゲナーゼ阻害剤、メサラミン、オルサラジン、バルサラジド、抗酸化剤、トロンボキサン阻害剤、IL-1受容体アンタゴニスト、抗IL-1 β mAb、抗IL-6またはIL-6受容体 mAb、増殖因子、エラスターゼ阻害剤、ピリジニルイミダゾール化合物、TNF、LT、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、I

50

L-8、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-18、IL-23、EMAP-11、GM-CSF、FGFまたはPDGFの抗体またはアゴニスト、CD2、CD3、CD4、CD8、CD-19、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD90またはこれらのリガンドに対する抗体、メトトレキサート、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノラート・モフェチル、レフルノミド、NSAID、イブプロフェン、プレドニゾロン、ホスホジエステラーゼ阻害剤、アデノシンアゴニスト、抗血栓剤、補体阻害剤、アドレナリン作動薬、IRAK、NIK、IKK、p38、MAPキナーゼ阻害剤、IL-1 β 変換酵素阻害剤、TNF α 変換酵素阻害剤、T細胞シグナル伝達阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、スルファサラジン、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、アンジオテンシン変換酵素阻害剤、可溶性サイトカイン受容体、可溶性p55TNF受容体、可溶性p75TNF受容体、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R、抗炎症性サイトカイン、IL-4、IL-10、IL-11、IL-13またはTGF β である。特定の実施形態において、本明細書に開示されている医薬組成物は、非経口、皮下、筋肉内、静脈内、関節内、気管支内、腹腔内、嚢内、軟骨内、腔内（intracavity）、腔内（intracellial）、小脳内、脳室内、結腸内、頸管内、胃内、肝臓内、心筋内、骨内、骨盤内、心臓周囲内、腹腔内、胸膜内、前立腺内、肺内、結腸内、腎臓内、網膜内、脊髄内、滑膜内、胸腔内、子宮内、膀胱内、ボラス、膣、直腸、口内、舌下、鼻内または経皮投与によって、患者に投与される。

10

【0083】

20

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

【0084】

試験試料におけるTNF（およびIL-13、TNF（およびPGE2、またはTNF（およびNGFもしくはその断片の存在、量または濃度を決定する方法が提供される。この方法は、イムノアッセイによって、抗原またはその断片について試験試料をアッセイすることを含む。イムノアッセイは、（i）少なくとも1つの結合タンパク質および少なくとも1つの検出可能な標識を使用し、（ii）試験試料中の抗原またはその断片の存在、量または濃度の直接的または間接的指標としての検出可能な標識によって生じるシグナルと、対照または校正因子における抗原またはその断片の存在、量または濃度の直接的または間接的指標として生じるシグナルとを比較することを含む。校正因子は、一連の校正因子の一部であってよく、この場合、校正因子のそれぞれは、抗原またはその断片の濃度によって、その一連の校正因子中の他の校正因子と異なっている。本方法は、（i）捕捉剤／抗原またはその断片の複合体を形成するために、試験試料を、抗原またはその断片上のエピトープに結合する少なくとも1つの捕捉剤と接触させること、（ii）捕捉剤／抗原またはその断片／検出剤の複合体を形成するために、捕捉剤／抗原またはその断片の複合体を、検出可能な標識を含み、抗原またはその断片上のエピトープに結合し、捕捉剤に結合しない少なくとも1つの検出剤と接触させることおよび（iii）（ii）において形成された捕捉剤／抗原またはその断片／検出剤の複合体における検出可能な標識によって発生するシグナルに基づいて、試験試料中の抗原またはその断片の存在、量または濃度を決定することを含むことができ、少なくとも1つの捕捉剤および／または少なくとも1つの検出剤は少なくとも1つの結合タンパク質である。

30

40

【0085】

あるいは、本方法は、（i）捕捉剤／抗原またはその断片の複合体を形成するために、試験試料と、抗原またはその断片上のエピトープに結合する少なくとも1つの捕捉剤とを接触させ、同時にまたはいずれかの順番で連続して、試験試料と、少なくとも1つの捕捉

50

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

10

【0086】

試験試料は、患者由来であり得、この場合、本方法は、患者の治療的／予防的処置の効力を診断、予後診断または評価する工程をさらに含み得る。本方法が、患者の治療的／予防的処置の効力を評価することをさらに含む場合、この方法は、任意選択により、効力を改善するために必要な、患者の治療的／予防的処置の改変を加えることをさらに含む。本方法は、自動化システムまたは半自動化システムにおける使用に適合させることができる。したがって、本明細書に記載されている方法はまた、対象が、所与の疾患、障害または状態を有するまたはそれを発症する危険性があるか否かを判定するために使用することができる。具体的には、このような方法は、以下：(a) 対象由来の試験試料中の、分析物またはその断片の濃度または量を（例えば、本明細書に記載されている方法または当該技術分野において公知の方法を用いて）決定する工程；(b) 工程(a)において決定された分析物またはその断片の濃度または量と、予め決定されたレベルとを比較する工程を含むことができ、工程(a)において決定された分析物の濃度または量が予め決定されたレベルと比較して好ましい場合、対象は、所定の疾患、障害または状態を有さないまたはその危険性がないと決定される。しかしながら、工程(a)において決定された分析物の濃度または量が予め決定されたレベルと比較して好ましくない場合、対象は、所定の疾患、障害または状態を有するまたはその危険性があると決定される。

20

【0087】

さらに、対象における疾患の進行を監視する方法が本明細書に提供される。任意選択により、本方法は、以下：(a) 分析物の対象由来の試験試料中の濃度または量を決定する工程；(b) 分析物の対象由来の後者の試験試料中の濃度または量を決定する工程；および(c) 工程(b)において決定された分析物の濃度または量と、工程(a)において決定された分析物の濃度または量とを比較することを含み、工程(b)において決定された濃度または量が変化しない場合または工程(a)において決定された分析物の濃度または量と比較して好ましくない場合、対象における疾患は継続し、進行しまたは悪化していると判断される。比較して、工程(b)において決定された分析物の濃度または量が、工程(a)において決定された分析物の濃度または量と比較して好ましい場合、対象における疾患は中断し、軽減しまたは改善されたと判断される。

30

【0088】

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

40

【0089】

また、TNF α 、IL-13、PGE2および／またはNGFまたはその断片について試験試料をアッセイするキットが提供される。キットは、抗原またはその断片について試験試料をアッセイするための少なくとも1つの成分、抗原またはその断片について試験試料をアッセイするための指示書を含み、少なくとも1つの成分は、本明細書に開示されている結合タンパク質を含む少なくとも1つの組成物を含み、結合タンパク質は、任意選択

50

により、検出可能に標識されている。

【0090】

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

10

【0091】

一般的に、本明細書に記載されている細胞および組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学ならびにタンパク質および核酸化学およびハイブリッド形成に関連して使用される命名法は、周知のものであり、本分野において一般的に使用されている。一般に、本明細書において提供される方法および技術は、別段の記載がなければ、本分野において周知の慣用方法に従い、ならびに本明細書を通じて引用および論述されている様々な一般的参考文献およびより具体的な参考文献中に記載されているように、実施することができる。酵素反応および精製技術は、製造業者の説明書に従って、本分野で一般的に遂行されているように、または本明細書に記載されているように、実施される。本明細書に記載されている分析化学、合成有機化学および医薬品化学および薬化学に関して使用される命名法、ならびに本明細書に記載されている分析化学、合成有機化学および医薬品化学および薬化学の実験室操作および技術は、周知のものであり、本分野で一般的に使用されているものである。化学合成、化学分析、医薬の調製、調合、および送達、および患者の治療に対しては、標準的な技術を使用し得る。

20

【0092】

本開示がより容易に理解し得るように、特定の用語を以下に定義する。

【0093】

「抗体」という用語は、4つのポリペプチド鎖（2つの重（H）鎖および2つの軽（L）鎖）から一般に構成される免疫グロブリン（Ig）分子またはIg分子のエピトープ結合特性を保持した機能的断片、変異体、バリエーションまたはこれらの誘導体を表すものとする。このような断片、変異体、バリエーションまたは誘導体抗体のフォーマットは、本分野において公知である。完全長の抗体の一実施形態において、各重鎖は、重鎖可変領域（VH）および重鎖定常領域（CH）から構成される。CHは、3つのドメインCH1、CH2およびCH3から構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域（VL）および軽鎖定常領域（CL）から構成される。CLは単一のCLドメインから構成される。VHおよびVLは、より保存された領域（フレームワーク領域（FR）と称される。）が散在された超可変領域（相補性決定領域（CDR）と称される。）へ、さらに細分割することが可能である。一般に、各VHおよびVLは、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順で、アミノ末端からカルボキシ末端に配置された3つのCDRおよび4つのFRから構成される。免疫グロブリン分子は、あらゆる種類（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgAおよびIgY）、クラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2）またはサブクラスであり得る。

30

40

【0094】

「二特異的抗体」という用語は、この2つの結合アーム（HC/LCの一对）の1つの上に1つの抗原（またはエピトープ）を結合し、この第二の結合アーム（HC/LCの異なる対）の上の異なる抗原（またはエピトープ）に結合する抗体を指す。二特異的抗体は、2つの異なる抗原結合アーム（特異性とCDR配列の両方における）を有し、それが結合するそれぞれの抗原について一価である。二特異的抗体には、クアドローマ技術（MilsteinおよびCuello（1983）Nature 305（5934）：537-40）によって、2つの異なるモノクローナル抗体の化学的コンジュゲーション（S

50

taerz et al. (1985) Nature 314 (6012): 628-31) によってまたはノブ・イントゥ・ホールもしくはFc領域中に突然変異を導入する同様のアプローチ (Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (14): 6444-6448) によって生成されるものが含まれる。

【0095】

「親和性成熟された」抗体または結合タンパク質とは、変化（単数または複数）を有しない親抗体または結合タンパク質と比べて、抗原に対する親和性の改善をもたらす、1つ以上のCDRまたはそのフレームワーク（FR）領域中に1つ以上の変化を有する抗体または結合タンパク質を意味する。典型的な親和性成熟された抗体または結合タンパク質は、標的抗原に対してナノモル濃度またはさらにピコモル濃度の親和性を有する。親和性成熟された抗体または結合タンパク質は、本技術分野において公知の手順によって産生されてもよい。例えば、Marksら (1992) Biotechnology 10: 779-783は、VHおよびVLドメインシャッフリングによる親和性成熟を記載している。CDRおよび／またはフレームワーク残基の無作為な突然変異導入は、Barbas et al. (1994) Proc Natl. Acad. Sci. USA 91: 3809-3813; Schier et al. (1995) Gene 169: 147-155; Yelton et al. (1995) J. Immunol. 155: 1994-2004; Jackson et al. (1995) J. Immunol. 154 (7): 3310-9; Hawkins et al (1992) J. Mol. Biol. 226: 889-896によって記載されており、活性増強アミノ酸残基による選択的突然変異導入位置、接触または過剰変異位置での突然変異は、米国特許第6, 914, 128号に記載されている。

【0096】

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

【0097】

「ヒト化」抗体または結合タンパク質という用語は、ヒト以外の種由来の、より「ヒト類似に」、すなわち、ヒト生殖系列配列により類似するように改変された抗体または結合タンパク質を表す。ヒト化抗体または結合タンパク質の1つの種類は、非ヒトCDR配列がヒトのVHおよびVL配列中に導入されて、対応するヒトCDR配列が置換されているCDR移植された抗体または結合タンパク質である。ヒト化抗体または結合タンパク質はまた、ヒト抗体のアミノ酸配列を実質的に（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%の同一性で）有するフレームワーク領域（FR）配列と、非ヒト抗体のアミノ酸配列を実質的に有する少なくとも1つのCDRを含む抗体もしくは結合タンパク質のバリエーション、誘導体、類似体または断片を含む。ヒト化抗体または結合タンパク質は、CDR領域のすべてまたは実質的にすべての配列が非ヒト免疫グロブリン（すなわち、ドナー抗体）の配列に対応し、FR領域のすべてまたは実質的にすべての配列がヒト免疫グロブリンの配列である、少なくとも1つの可変ドメイン（Fab、Fab'、F(ab')₂、FabC、Fv）の実質的にすべてを含んでもよい。ヒト化抗体または結合タンパク質はまた、重鎖のCH1、ヒンジ、CH2、CH3およびCH4領域を含んでもよい。一実施形態において、ヒト化抗体または結合タンパク質はまた、Fc領域の少なくとも一部のヒト免疫グロブリンを含んでもよい。いくつかの実施形態において、ヒト化抗体または結合タンパク質は、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、ヒト化抗体または

は結合タンパク質は、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、ヒト化抗体または結合タンパク質は、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、ヒト化抗体または結合タンパク質は、ヒト化重鎖および少なくとも軽鎖の可変ドメインを含有する。

【0098】

「二重可変ドメイン結合タンパク質」および「二重可変ドメイン免疫グロブリン」という用語は、その2つの結合アーム（例えば、HC/LCの一对）のそれぞれにおいて2つの可変ドメインを有する結合タンパク質を指し（PCT公開第WO02/02773号参照）、それぞれが抗原に結合することができる。一実施形態において、それぞれの可変ドメインは、異なる抗原またはエピトープに結合する。別の実施形態において、それぞれの可変ドメインは、同じ抗原またはエピトープに結合する。別の実施形態において、二重可変ドメイン結合タンパク質は、同一の特異性と同一のCDR配列を有する2つの同一の抗原結合アームを有し、それが結合するそれぞれの抗原に対して二価である。一実施形態において、DVD結合タンパク質は、単一特異的であってもよく、すなわち、1つの抗原に結合することができるまたは多重特異的であってもよく、すなわち、2つ以上の抗原に結合することができる。2つの重鎖DVDポリペプチドおよび2つの軽鎖DVDポリペプチドを含むDVD結合タンパク質は、DVD-Ig（商標）と呼ばれる。一実施形態において、4本鎖DVD結合タンパク質の各半分は、重鎖DVDポリペプチド、軽鎖DVDポリペプチドおよび2つの抗原結合部位を含む。一実施形態において、それぞれの結合部位は、抗原結合部位あたりの抗原結合に関与する全6つのCDRを有する重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを含む。

【0099】

「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。

【0100】

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

【0101】

「中和」という用語は、結合タンパク質が抗原に特異的に結合した場合、抗原の生物学的活性を相殺することを指す。一実施形態において、中和結合タンパク質は、抗原（例えば、サイトカイン）に結合し、少なくとも約20%、40%、60%、80%、85%またはこれらを超えてその生物学的活性を低下させる。

【0102】

「特異性」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。

【0103】

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

【0104】

「効力」という用語は、所望の効果を達成するための結合タンパク質の能力を意味し、その治療有効性の測定である。効力は、当業者に公知の方法（US20090311253）を用いて評価することができる。

【0105】

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

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

【0106】

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

【0107】

「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、種々の温度でこれらの安定性を評価する方法は、当業者に知られている（US 20090311253）。

【0108】

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

【0109】

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

【0110】

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

【0111】

「標識」および「検出可能な標識」という用語は、特異的結合対のメンバー間の反応（例えば、結合）を検出可能なものにするために、抗体／結合タンパク質またはその分析物などの特異的結合対のメンバーに結合させた部分を意味する。特異的結合対の標識された部分は、「検出可能に標識されている」と呼ばれる。したがって、「標識された結合タン

10

20

30

40

50

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

【0112】

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

【0113】

「結晶」および「結晶化された」という用語は、結晶の形態で存在する結合タンパク質（例えば、抗体）またはその抗原結合部分を表す。結晶は、物質の固体状態の一形態であり、これは、非晶質の固体状態または液体の結晶状態などの他の形態とは異なる。結晶は、原子、イオン、分子（例えば、抗体などのタンパク質）または分子集合体（例えば、抗原／抗体複合体）の規則的な反復する三次元配列から構成される。これらの三次元配列は、本分野においてよく理解されている特異的な数学的関係に従って整列されている。結晶中で反復されている基礎的単位または構築ブロックは、非対称単位と呼ばれる。所定の十分に整えられた結晶的対称性に合致する配置での非対称単位の反復は、結晶の「単位格子」を与える。すべての三次元中での規則的な転換による単位格子の反復は、結晶を与える。Giege, R. and Ducruix, A. Barrett Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, a Practical Approach, 2nd ed., pp. 201-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999)を参照されたい。

【0114】

「ベクター」という用語は、核酸分子に連結されている別の核酸を輸送することができる該核酸分子を表す。ベクターの1つの種類は「プラスミド」であり、これは、その中にさらなるDNAセグメントを連結し得る環状二本鎖DNAループを表す。ベクターの別の種類はウイルスベクターであり、ここで、追加のDNAセグメントはウイルスゲノム中に

連結され得る。他のベクターにはRNAベクターが含まれる。ある種のベクターは、当該ベクターがその中に導入された宿主細胞中で自律的複製を行うことができる（例えば、細菌の複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソード哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソード哺乳動物ベクター）は、宿主細胞中へ導入されて、宿主細胞のゲノム中に組み込まれることが可能であり、これにより、宿主ゲノムとともに複製される。ある種のベクターは、これらが作用可能に連結されている遺伝子の発現を誘導することが可能である。このようなベクターは、本明細書において、「組換え発現ベクター」（または単に、「発現ベクター」と称される。一般に、組換えDNA技術において有用な発現ベクターは、しばしば、プラスミドの形態である。プラスミドは、最も一般的に使用されるベクターの形態であるので、本明細書において、「プラスミド」および「ベクター」は互換的に使用され得る。しかしながら、発現ベクターの他の形態もまた含まれ、例えば、同等の機能を果たすウイルスベクター（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス）なども含まれる。一群のpHybEベクター（米国特許出願第61/021,282号）は、親抗体およびDVD結合タンパク質のクローニングに使用され得る。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得る。pJP191由来のV2；pHybE-hCK V3は、抗体およびカップ定常領域を有するDVD軽鎖をクローニングするために使用され得る。pJP192由来のV3；pHybE-hCI V2は、抗体およびランダ定常領域を有するDVD軽鎖をクローニングするために使用され得る。V4は、ラムダシグナルペプチドおよびカップ定常領域を用いて構築され、ラムダーカップハイブリッドVD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得る。V5は、カップシグナルペプチドおよびラムダ定常領域を用いて構築され、カップラムダハイブリッドVD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得る。pJP183由来のV7；pHybE-hCg1, z, 非V2は、抗体および（234、235AA）突然変異定常領域を有するDVD重鎖をクローニングするために使用され得る。

10

20

【0115】

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

30

【0116】

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

40

【0117】

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

【0118】

「生物学的試料」という用語は、生物または生物であったものから得られた物質の量を意味する。このような物質には、血液（例えば、全血）、血漿、血清、尿、羊水、滑液、

50

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。

【0119】

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

10

【0120】

「対照」は、分析物を含まない（「陰性対照」）または分析物を含む（「陽性対照」）ことが知られている組成物を表す。陽性対照は、既知の濃度の分析物を含み得る。「対照」、「陽性対照」および「校正物質」は、既知の濃度の分析物を含む組成物を表すために本明細書において互換的に使用され得る。「陽性対照」は、アッセイ性能特性を確立するために使用することが可能であり、試薬（例えば、分析物）の完全性の有用な指標である。

【0121】

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

20

【0122】

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

30

【0123】

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

40

【0124】

「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

50

む。したがって、抗原および抗体の特異的結合に加えて、他の特異的結合対は、ビオチンおよびアビジン（またはストレプトアビジン）、炭水化物およびレクチン、相補的なヌクレオチド配列、エフェクターおよび受容体分子、補因子および酵素、酵素阻害剤および酵素などを含み得る。さらに、特異的結合対は、元の特異的結合メンバーの類似体、例えば、分析物類似体であるメンバーを含み得る。免疫反応性特異的結合メンバーには、単離または組換えで産生された抗原、抗原断片およびモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を含む抗体ならびにその複合体、断片およびバリエーション（バリエーションの断片を含む）が含まれる。

【0125】

「Fc領域」という用語は、無傷の抗体または結合タンパク質のパパイン消化によって生成され得る、免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義する。Fc領域は、固有配列のFc領域またはバリエーションFc領域であり得る。免疫グロブリンのFc領域は、一般に、2つの定常ドメイン（CH2ドメインおよびCH3ドメイン）を含み、CH4ドメインを含んでいてもよい。抗体エフェクター機能を変化させるために、Fc部分中のアミノ酸残基を置換することが、本分野において周知である（例えば、米国特許第5,648,260号および第5,624,821号）。Fc領域は、いくつかの重要なエフェクター機能、例えば、サイトカイン誘導、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）、食作用、補体依存性細胞傷害（CDC）および抗体または結合タンパク質と抗原-抗体または抗原-結合タンパク質複合体の半減期／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。

【0126】

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、完全長の結合タンパク質の断片、例えば、2つ以上の異なる抗原に特異的に結合する、二特異的、二重特異的または多重特異的フォーマットで行うことができる。結合タンパク質の「抗原結合部分」という用語に包含される結合断片の例には、(i) Fab断片（VL、VH、CLおよびCH1ドメインからなる一価断片）、(ii) F(ab')₂断片（ヒンジ領域において、ジスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片を含む二価断片）、(iii) VHおよびCH1ドメインからなるFd断片、(iv) 抗体または結合タンパク質の単一アームのVLおよびVHドメインからなるFv断片、(v) 単一の可変ドメインを含むdAb断片および(vi) 単離された相補性決定領域（CDR）が含まれる。さらに、Fv断片の2つのドメインであるVLおよびVHは別個の遺伝子によってコードされているが、これらは、VLおよびVH領域が対合して一価分子を形成している単一のタンパク質鎖として、これらの作製を可能とする合成リンカーによって、組換え法を用いて連結することが可能である（一本鎖Fv（scFv）として知られている）。このような一本鎖抗体または結合タンパク質も、抗体または結合タンパク質の「抗原結合部分」という用語に包含されるものとする。ダイアボディなどの一本鎖抗体の他の形態も包含される。さらに、一本鎖抗体または結合タンパク質も、相補的軽鎖ポリペプチドと一緒に、抗原結合領域の対を形成する直列Fvセグメントの対を含む「直鎖」抗体または結合タンパク質（VH-CH1-VH-CH1）を含む。

【0127】

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

【0128】

10

20

30

40

50

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

【0129】

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

【0130】

「CDR」という用語は、免疫グロブリン可変領域配列内の相補性決定領域を意味する。重鎖および軽鎖可変領域のそれぞれについて、CDR1、CDR2 および CDR3 と命名されている、重鎖および軽鎖の可変領域のそれぞれにおいて3つのCDRが存在する。

「CDRセット」という用語は、抗原に結合することができる単一の可変領域中に生じる3つのCDR群を指す。これらのCDRの正確な境界は、異なる系に従って、異なって定義されてきた。Kabatによって記載された系（Kabatら（1987）および（1991））は、抗体または結合タンパク質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、それぞれの重鎖または軽鎖配列における3つのCDRを定義する正確な残基境界を提供する。これらのCDRは、Kabat CDR と称され得る。Chothia および共同研究者（Chothia and Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al. (1989) Nature 342:877-883）は、Kabat CDR 内のある種の亜部分が、アミノ酸配列のレベルで大きな多様性を有するにも関わらず、ほぼ同一のペプチド骨格立体構造を採ることを見出した。これらの亜部分は、L1、L2 および L3 または H1、H2 および H3（「L」および「H」は、それぞれ、軽鎖および重鎖領域を表記する。）と表記される。これらの領域は、Chothia CDR と称される場合があり、これは、Kabat CDR と重複する境界を有する。Kabat CDR と重複する CDR を定義する他の境界が、Padlan (1995) FASEB J. 9:133-139 および MacCallum (1996) J. Mol. Biol. 262 (5):732-45 によって記載されている。さらに別のCDR境界定義が、上記系の1つに厳格に従わない場合があり得るが、それにも関わらず、Kabat CDR と重複するが、これらは、特定の残基または残基の群またはさらにはCDR全体が、抗原結合に著しい影響を与えないという予測または実験的な発見に照らして、短縮または延長され得る。本明細書に使用されている方法は、これらの系のいずれかに従って定義されたCDRを使用し得るが、ある種の実施形態は、Kabat または Chothia によって定義されたCDRを使用する。

【0131】

「エピトープ」という用語は、結合タンパク質、例えば、免疫グロブリンまたはT細胞受容体に特異的に結合することができる、ポリペプチドおよび／または他の決定因子によって結合される抗原の領域を意味する。ある種の実施形態において、エピトープ決定基は、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリルまたはスルホリルなどの分子の化学的に活性な表面基を含み、ある種の実施形態において、特異的な三次元構造的特徴および／または特異的な電荷特徴を有し得る。一実施形態において、エピトープは、特異的結合パートナー上の相補的部位に結合する公知の抗原（またはその断片）の領域のアミノ酸残基を含む。抗原断片は1を超えるエピトープを含むことができる。ある種の実施形態において、結合タンパク質が、タンパク質および／または高分子の複雑な混合物中で、この標的抗原を認識する場合に、抗体は抗原を特異的に結合する。抗体または結合タンパク質が交差競合する（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このサイトカイン受容体と相互作用し、一方、このタンパク質の他の領域は、サイトカインを安定化するために必要とされ得る。サイトカインシグナル伝達の負の影響を排除するために、サイトカインは、受容体相互作用領域（単数または複数）に特異的に結合する結合タンパク質を用いて標的化され得て、それによってこの受容体の結合を阻止する。あるいは、結合タンパク質は、サイトカイン安定化に関与する領域を標的化され得て、それによって、分解のためのタンパク質を指定する。エピトープ認識を可視化し、モデル化する方法は、当業者に知られている（US 20090311253）。

10

20

【0132】

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

【0133】

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

30

【0134】

「表面プラズモン共鳴」という用語は、例えば、BIAcore（登録商標）システム（BIAcore International AB（GE Healthcareの会社）、Uppsala、SwedenおよびPiscataway、NJ）を用いて、バイオセンサーマトリックス内のタンパク質濃度の変化を検出することによって、リアルタイムな生物特異的相互作用の分析を可能とする光学現象を意味する。さらなる記載については、Jonsson et al.（1993）Ann. Biol. Clin. 51：19-26を参照されたい。「 K_{on} 」という用語は、例えば、DVD-Ig／抗原複合体を形成する、結合タンパク質（例えば、抗体またはDVD-Ig）と抗原の結合についての結合速度（on rate）定数を意味する。「 K_{on} 」という用語はまた、本明細書において互換的に用いられ、「会合速度定数」または「 k_a 」を意味する。この標的抗原への結合タンパク質の結合速度または結合タンパク質、例えば抗体、と抗原との間の複合体形成の速度を示すこの値はまた、以下の式によって示される。

40

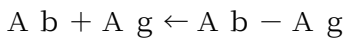
抗体（「Ab」）＋抗原（「Ag」） $\rightarrow$ Ab-Ag

【0135】

「 K_{off} 」という用語は、結合タンパク質（例えば、抗体またはDVD-Ig）の、

50

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



【0136】

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

【0137】

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

76%または75%同一であってもよい。

【0138】

結合タンパク質の生成

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

10

【0139】

A. 親モノクローナル抗体を選択するための基準

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

20

【0140】

B. 結合タンパク質分子の構築

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

30

【0141】

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

【0142】

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

40

50

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。

【0143】

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

【0144】

【化2】

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); RADAAAA(G₄S)₄ (配列番号 : 9); SAKTTPKLEEGEFSEARV (配列番号
 : 10); ADAAP (配列番号 : 11); ADAAPTVSIFPP (配列番号 : 12); TVAAP
 (配列番号 : 13); TVAAPSVFIFPP (配列番号 : 14); QPKAAP (配列番号 : 15);
 QPKAAPSVTLFPP (配列番号 : 16); AKTTPP (配列番号 : 17); AKTTPPSVTPLAP
 (配列番号 : 18); AKTTAP (配列番号 : 19); AKTTAPSVYPLAP (配列番号 : 20);
 ASTKGP (配列番号 : 21); ASTKGPSVFPLAP (配列番号 : 22);
 GGGGSGGGGSGGGGS (配列番号 : 23); GENKVEYAPALMALS (配列番号 : 24);
 GPAKELTPLKEAKVS (配列番号 : 25); or GHEAAAVMQVQYPAS (配列番号 : 26);
 TVAAPSVFIFPPTVAAPSVFIFPP (配列番号 : 27);
 ASTKGPSVFPLAPASTKGPSVFPLAP (配列番号 : 28); GGGGSGGGGGS (配列番号
 : 29); GGSGGGGSG (配列番号 : 30)

10

20

【0145】

またはG/Sに基づく配列（例えば、G4SおよびG4Sリピート；配列番号31）を含む、少なくとも1つのリンカーを含む。一実施形態において、X2はFc領域である。別の実施形態において、X2はバリエーションFc領域である。

【0146】

他のリンカー配列は、CL/CH1ドメインのあらゆる長さのあらゆる配列を含み得るが、CL/CH1ドメインのすべての残基は含まない。例えば、CL/CH1ドメインの最初の5から12個のアミノ酸残基；軽鎖リンカーは、C_κまたはC_λに由来することが可能であり；ならびに重鎖リンカーは、C_γ1、C_γ2、C_γ3、C_γ4、C_α1、C_α2、C_δ、C_εおよびC_μを含む、いずれかのアイソタイプのCH1に由来することが可能である。リンカー配列は、Ig様タンパク質（例えば、TCR、FcR、KIR）、G/Sを基礎とする配列（例えば、G4Sリピート；配列番号31）；ヒンジ領域に由来する配列および他のタンパク質から得られる他の天然配列などの他のタンパク質からも由来し得る。

30

【0147】

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

40

【0148】

50

一実施形態において、抗体またはその機能的な抗原結合断片が開示され、 $\text{TNF}\alpha$ 、 $\text{IL}-13$ 、 $\text{PGE}2$ または NGF に結合することができる機能的結合部位を有し、表1に列挙された対から選択される対形成した VH と VL 配列、またはこれらの VH と VL 領域の CDR 領域を含む可変領域を有する抗体を含む。例えば、抗体またはその機能的抗原結合性断片は、 $\text{IL}-13$ に結合することが可能であり、配列番号32と33を含む可変領域を有する。同様に、抗体またはその機能的抗原結合断片は、 TNF 、 $\text{PGE}2$ または NGF に結合することができ、表1中の配列から選択される対形成した配列を含む可変領域を有することができる。一実施形態において、上記の抗体の機能的抗原結合断片が開示され、抗原結合断片は、標的抗原に結合することができる結合部位を形成するのに十分な可変配列を保持する。例えば、抗原結合断片は、表1中の対形成した VH と VL 配列、または Fc ドメインを含むもしくは含まない全長 VH と VL 配列から取り出される CDR 領域を含んでもよい。機能的抗原結合断片は、他の例のうち、ヒト化、完全ヒト、ラクダ化、単鎖、キメラ、合成、組換え、ハイブリッド、変異、逆変異もしくは CDR 移植抗体、または Fab 、 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 、 Fv 、 scFv 、 Fd 、 dAb 断片、 VHH （ナノボディとも称される。）、または二特異的もしくは多重特異的抗体を含む抗原結合機能を保持する任意の他の抗体断片を含んでもよい。

10

【0149】

一実施形態において、表1中のものから選択される可変ドメインを含む結合タンパク質（例えば、二重可変ドメイン結合タンパク質）が開示されている。いくつかの実施形態において、結合タンパク質は、それぞれが $\text{VD}1-(\text{X}1)_n-\text{VD}2-\text{C}-\text{X}2$ を含む第一および第二のポリペプチド鎖を含み、結合タンパク質の第一および第二の鎖は、一緒になって、2つの機能的結合部位を形成し、それらの結合部位は $\text{TNF}\alpha$ および $\text{IL}-13$ 、 TNF および $\text{PGE}2$ 、または TNF および NGF に結合することができる。いくつかの実施形態において、 $\text{VD}1$ および $\text{VD}2$ 配列は、独立して選択される（すなわち、 $\text{VD}1$ 位置についての VH と VL 配列の選択は、 $\text{VD}2$ 位置についての配列の選択に影響を与えず、逆の場合も同様である。）。一実施形態において、それぞれの機能的結合部位は、表1に列挙されている対から選択される対形成した VH と VL 配列を含み（例えば、配列番号32と33の対形成した VH と VL 配列は、 $\text{IL}-13$ について結合部位を形成する。）、またはこれらの VH と VL 配列の CDR 領域を含む。いくつかの実施形態において、第一の鎖は、位置 $\text{VD}1$ での第一の VH 配列と位置 $\text{VD}2$ での第二の VH 配列を含み、両者は、表1から選択され、または $\text{VD}1$ と $\text{VD}2$ ドメインは、これらの選択された VH 配列からの CDR 配列を含有し、一方、第二の鎖は、位置 $\text{VD}1$ での第一の VL 配列と位置 $\text{VD}2$ での第二の VL 配列を含み、両者は、表1から選択され、または $\text{VD}1$ と $\text{VD}2$ ドメインは、それらの選択された VL 配列からの CDR 配列を含む。他の実施形態において、第一または第二の結合部位の $\text{VH}-\text{VL}$ 配置は、それぞれの鎖が VL 配列に連結された VH 配列を含むように2つのポリペプチド鎖を横切って反転し、一方、2つの鎖は一緒になって、2つの機能的結合部位をなおも形成する。例えば、第一のポリペプチド鎖は、 $\text{VD}1$ 位置で VH 配列と $\text{VD}2$ 位置で VL 配列を含んでもよく、一方、第二の鎖は、 $\text{VD}1$ 位置で対形成した VL 配列（第一の機能的結合部位を形成する。）と $\text{VD}2$ 位置で対形成した VH 配列（第二の結合部位を形成する。）を含む。

20

30

40

【0150】

一実施形態において、2つの第一の鎖ポリペプチドと2つの第二の鎖ポリペプチドは、2つのアームと4つの結合部位を有する DVD-Ig 結合タンパク質を形成するために組み合わせられる。2つのアームと4つの結合部位を有する DVD-Ig 結合タンパク質構造の例を図1に示す。一実施形態において、 DVD-Ig 結合タンパク質は、 $\text{VD}1$ と $\text{VD}2$ 位置で、それぞれのアーム上に、任意の配向で、表1に列挙された、少なくとも1つの、または少なくとも2つの、少なくとも3つのまたは少なくとも4つの VH と VL 配列対を含む。いくつかの実施形態において、結合部位を形成する配列対は、独立して選択される（例えば、1つのアーム上の $\text{VD}1$ 位置についての VH と VL 配列の選択は、他のアーム上の $\text{VD}1$ 位置についての配列の選択に影響を与えず、またはいずれかのアーム上の

50

V D 2 位置についての配列の選択に影響を与えない。) 。以下の表 1 に示されている V H と V L 配列は、相補性決定領域 (C D R) とフレームワーク配列を含む。いくつかの実施形態において、1 つ以上のフレームワーク配列は、例えば、同じ抗原に結合する、当該技術分野において知られている結合タンパク質由来の他のフレームワーク配列によって、機能を損なうことなく置換される。

【 0 1 5 1 】

別の実施形態において、2 つの重鎖 D V D - I g ポリペプチドおよび 2 つの軽鎖 D V D - I g ポリペプチドは組み合わせられて、D V D - I g 結合タンパク質を形成する。表 1 A - 1 C 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している。一実施形態において、いずれかの配向における、表 1 に列挙された V H および / または V L 領域の少なくとも 2 つを含む D V D - I g が提供される。いくつかの実施形態において、V D 1 および V D 2 は、独立して選択される。よって、いくつかの実施形態において、V D 1 および V D 2 は同じ配列番号を含み、他の実施形態において、V D 1 および V D 2 は異なる配列番号を含む。以下に与えられる V H および V L ドメイン配列は、当該技術分野において知られているまたは当該技術分野において知られている方法を用いて容易に識別され得る相補性決定領域 (C D R) およびフレームワーク配列を含む。いくつかの実施形態において、1 つ以上のこれらの C D R および / またはフレームワーク配列は、同じ抗原に結合する、当該技術分野において知られている結合タンパク質由来の他の C D R および / またはフレームワーク配列によって、機能を損なうことなく置換される。

【 0 1 5 2 】

10

20

【表 1】

表1: 多価結合タンパク質を含む結合タンパク質を生成するための
抗体のVHおよびVL領域のアミノ酸配列のリスト

配列 番号	ABT 固有ID	タンパク質領域	配列
			123456789012345678901234567890
32	AB397VH	VH-IL13 (seq 1)	EVTLRRESGPGLVKPTQTTLTCTLYGFSLS TSDMGVDWIRQPPGKGLEWLAHIWDDVKKR YNPALKSRLLTISKDTGKNQVVLKLTSDVPV DTATYYCARTVSSGYIYYAMQYWGQGTIVT VSS
33	AB397VL	VL-IL13 (seq 1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITSCRASQDIR NYLNWYQQKPGKAPKLLIFYTSKLSGVPS RFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDATYYCQQ GLTPPLTFGGGTKVEIKR
34	AB398VH	VH-IL13 (seq 2)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT TYGVSWVRQAPGQGLEWMGEIYPGNYNTYY NEKFRGRVTMTTDTSTSTAYMELRGLRSDD TAVYYCARWETSIFYSDYGYFDYWGQGTIVT VSS
35	AB398VL	VL-IL13 (seq 2)	DVVMTQSPPLSLFVTLQQPASISCRSSQSLV HSHGNTYLNHWYQQRFQSPRLLIYTVSNRF SGVPLDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV YYCSQSTHVPYTFGGGTKVEIKR
36	AB399VH	VH-IL13 (seq 3)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT SYWMHWVRQAPGQGLEWIGNINPKGGSNIY NEKFRGRVTMTTRDTSISTAYMELSKLRSD TAVYYCARLDYFGDSFDLWGQGTIVTVSS
37	AB399VL	VL-IL13 (seq 3)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIR NYLNWYQQKPGKAPKLLIYYASNLEVGVP RFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQ DNRFFPYTFGGGTKVEIKR
38	AB436VH	VH - TNF (seq 1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYGVTVWRQAPGKGLEWVEMIWADGSTHYA SSVKGRFTISRDNKNTLYLQNNSLRAEDT TAVYYCAREWQHGPVAYWGQGTIVTVSS
39	AB436VL	VL - TNF (seq 1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSLVS SAVAWYQQKPGKAPKLLIYWAGARRTGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ HYKTPFTFCQGTGLEIKR

10

20

30

配列 番号	ABT 固有ID	タンパク質領域	配列 123456789012345678901234567890
40	AB437VH	VH - TNF (seq 2)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYGVWVRQAPGKGLEWVSGIWAUGSTHYA DTVKSRFTISRNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAREWQRGPFVAYWGQGTLLVTVSS
41	AB437VL	VL - TNF (seq 2)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQLVLS SAVAWYQQKPGKAPKLLIYWASTLTGTGVP RFGSGSGGTDFLTITSSLPQEDFATYYCQQ HYRTFTTFGQGTGLEIKR
42	AB441VH	VH - TNF (seq 3)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFA NYGIWVRQAPGQGLEWMGWINTYTCKPTY AQKFQGRVTMTTDTSTSTAYMELSSLKSED TAVYYCARKLFTTMDVTDNAMDYWGQGTTV TVSS
43	AB441VL	VL - TNF (seq 3)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIS QYLNWYQQKPGKAPKLLIYYSRLQSGVPS RFGSGSGGTDFLTITSSLPQEDFATYYCQQ GNTWPPTFGQGTGLEIKR
48	AB444VH	VH - TNF (seq 3)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFN NYGIWVRQAPGQGLEWMGWINTYTCKPTY AQKFQGRVTMTTDTSTSTAYMELSSLKSED TAVYYCARKLFTTMDVTDNAMDYWGQGTTV TVSS
49	AB444VL	VL - TNF (seq 3)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIE NYLNWYQQKPGKAPKLLIYYSRLQSGVPS RFGSGSGGTDFLTITSSLPQEDFATYYCQQ GNTQPPTFGQGTGLEIKR
50	AB048VH	VH - PGE2 (seq 1)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT KYWLGWVRQAPGQGLEWMGDIYFGYDYTHY NEKFKDRVTITDTSTSTAYMELSSLKSED TAVYYCARSDGSSSTYWGQGTLLVTVSS
51	AB048VL	VL - PGE2 (seq 1)	DVLMTQTPLSLPVTPEGPASISCTSSQNIV HSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRF SGVPSRFSGSGGTDFLTISKISRAEDVGV YYCFQVSHVPYTFGGGTKEIKR
52	AB131VH	VH - PGE2 (AB016) (seq 2)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFS KYWLGWVRQAPGKGLEWVSDIYPGYDYTHY NEKFKDRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED TAVYYCARSDGSSSTYWGQGTLLVTVSS
53	AB131VL	VL - PGE2 (AB016) (seq 2)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCTSSQNIV HSNGNTYLEWYQQKPGKAPKLLIYKVSNRF SGVPSRFSGSGGTDFLTITSSLPQEDFAT YYCFQVSHVPYTFGQGTKEIKR
54	AB135VH	VH - PGE2 (AB022) (seq 3)	EVQLQQSGPELVTPGASVKISCKASGYTFT KYWLGWVKQSHGKSLEWIGDIYPGYDYTHY NEKFKDTATLTVDKSSSIAYMETRGLTSED SAVYYCARSDGSSSTYWGQGTLLVTVSA

10

20

30

40

配列 番号	ABT 固有ID	タンパク質領域	配列 123456789012345678901234567890
55	AB135VL	VL - PGE2 (AB022) (seq 3)	UVQMIQSPSSLSASLGDIVTMTCTSSQNIY RSNGNTYLEWFQOKPGKAPKLLIYKVSNRF GGVPSRFSGSGRYGTDFTLTISSEDEGLAT YFCFQVSHVPYTFGGGKLEIKR
56	AB267VH	VH - NGF	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLT NNNVNWVRQAPGKGLEWVGGVWAGGATDYN SALKSKFTISRDNKNTAYLQMNSLRAEDT AVYYCARDGGYSSSTLYAMDAWGQGLTVTV SS
57	AB267VL	VL - NGF	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASEDIY NALAWYQOKPGKAPKLLIYNTDTLHTGVPS RFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQH YFHYPRTEFGGQTKVEIKR

10

【0153】

表1に列挙されたそれぞれのVHとVL配列のCDR1～に下線を付す。例えば、CDR1～3は、配列番号32について、アミノ酸位置31～37（CDR1）、52～67（CDR2）および100～112（CDR3）で下線を付される。特定の標的に結合することができる特定のDVD結合タンパク質、およびそれを作製する方法に関する詳細な説明は、以下の実施例の部において提供される。

20

【0154】

C. 結合タンパク質の作製

本明細書において提供される結合タンパク質は、本分野で公知の多数のいずれかによって作製され得る。例えば、宿主細胞からの発現において、DVD-Ig重鎖およびDVD-Ig軽鎖をコードする発現ベクターは、標準的な技術によって、宿主細胞中に形質移入される。原核または真核宿主細胞のいずれの中でも、本明細書において提供されるDVD-Ig結合タンパク質を発現することは可能であるが、真核細胞（特に、哺乳動物細胞）は、原核細胞に比べて、適切に折り畳まれ、免疫学的に活性なDVD-Ig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、DVD-Ig結合タンパク質は真核細胞、例えば哺乳動物宿主細胞中で発現されることが好ましい。

30

【0155】

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

40

【0156】

DVD-Ig結合タンパク質の重要な特徴は、DVD-Ig結合タンパク質が、慣用の

50

抗体と類似の様式で産生および精製され得ることである。DVD-Ig結合タンパク質の産生は、定常領域の配列修飾、または化学的修飾を必要とせずに、所望される二重特異的活性を有する均一な単一の主産物をもたらす。「二特異的」、「多重特異的」および「多重特異的多価」完全長結合タンパク質を作製するための他の以前に記載された方法は、集合した不活性な単一特異的、多重特異的、多価の完全長結合タンパク質と、異なる結合部位の組合せを有する多価完全長結合タンパク質との混合物の細胞内産生または分泌された産生をもたらす得る。

【0157】

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

10

【0158】

いくつかの実施形態において、集合され、発現された二重可変ドメイン免疫グロブリン分子の少なくとも50%、少なくとも75%および少なくとも90%が、所望の二重特異的四価タンパク質であり、したがって、増大した商用的有用性を有する。したがって、様々な実施形態において、単一の細胞中で二重可変ドメイン軽鎖および二重可変ドメイン重鎖を発現し、「二重特異的四価完全長結合タンパク質」の単一の主要産物をもたらす方法が提供される。

【0159】

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

20

【0160】

結合タンパク質の使用

本明細書において提供される結合タンパク質は2つまたはそれ以上の抗原に結合することができるので、本発明の結合タンパク質は、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)または組織免疫組織化学など慣用のイムノアッセイを用いて、(例えば、血清または血漿などの生物学的試料中で)抗原を検出するために使用することが可能である。結合タンパク質は、結合したまたは結合していない抗体の検出を促進するために、検出可能な物質で直接または間接的に標識される。適切な検出可能な物質には、様々な酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質および放射性物質が含まれる。適切な酵素の例には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼまたはアセチルコリンエステラーゼが含まれる。適切な補欠分子族複合体の例には、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが含まれる。適切な蛍光物質の例には、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアナート、ローダミン、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、適切な放射性材料の例には、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho または ^{153}Sm が含まれる。

30

40

【0161】

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

【0162】

50

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

【0163】

10

DVD結合タンパク質は、効力／安全を増強し、および／または患者の対象範囲を増加させるために、2つの異なる標的を同時に遮断するための治療剤として有用である。

【0164】

さらに、本明細書において提供されるDVD結合タンパク質は、細胞内送達（内部移行受容体および細胞内分子を標的化すること）、脳内への送達（血液脳関門を横切るために、トランスフェリン受容体および中枢神経系疾患媒介物質を標的化すること）など、組織特異的な送達（増強された局所PKにより、より高い効力および／またはより低い毒性を得るために、組織マーカーおよび疾病媒介物質を標的とすること）のために使用することが可能である。また、DVD結合タンパク質は、その抗原の非中和エピトープへの結合を介して特異的な位置へ抗原を送達するための担体タンパク質としての役割も果たすことができ、さらに、抗原の半減期を増加させることもできる。さらに、DVD結合タンパク質は、患者に植え込まれた医療デバイスに物理的に連結されまたはこれらの医療デバイスを標的とするように設計され得る（Burke et al., (2006) *Advanced Drug Deliv. Rev.* 58 (3): 437-446; Hildebrand et al., (2006) *Surface and Coatings Technol.* 200 (22-23): 6318-6324; Drug/device combinations for local drug therapies and infection prophylaxis, Wu (2006) *Biomaterials* 27 (11): 2450-2467; Mediation of the cytokine network in the implantation of orthopedic devices., Marques (2005) *Biodegradable Systems in Tissue Engineer. Regen. Med.* 377-397 参照)。要約すれば、医療用インプラントの部位へ、細胞の適切な種類を誘導することは、正常な組織機能の治癒および回復を促進し得る。あるいは、用具に連結されたDVD、または用具を標的とするDVD-Igによって、装置の植え込み時に放出される媒介物質（サイトカインが含まれるが、これに限定されない。）の阻害も提供される。

20

30

【0165】

本明細書において提供される結合タンパク質分子は、様々な疾患を治療するための治療分子としても有用であり、例えば、結合タンパク質によって認識される標的は有害である。このような結合タンパク質は、特定の疾患に関与する1つ以上の標的に結合することができる。一実施形態において、本発明のDVD-Igタンパク質は、ヒト自己免疫または炎症障害、喘息、関節リウマチ、変形性関節症、敗血症、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、神経障害または腫瘍学的障害を治療または診断するために使用される。

40

【0166】

医薬組成物

様々な実施形態において、単独または予防薬、治療薬および／または医薬として許容される担体と組み合わせた、1つ以上の結合タンパク質を含む医薬組成物が提供される。本明細書において提供される結合タンパク質を含む医薬組成物は、疾患を診断し、検出し、もしくはモニタリングし、疾患または1つもしくはそれ以上のその症候を予防し、治療し

50

、管理し、もしくは軽減する上で、および／または研究において使用されるが、これらに限定されない。単独または予防薬、治療薬および／または医薬として許容される担体と組み合わせた医薬組成物の製剤は、当業者に公知である（米国特許出願公開第20090311253A1）。

【0167】

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

10

【0168】

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

20

【0169】

本明細書において提供される結合タンパク質の治療的または予防的な有効量についての例示的であり、非限定的な範囲は、0.1～20mg/kgであり、例えば、1～10mg/kgである。用量値は、緩和されるべき状態の種類および重症度によって変化し得ることに留意すべきである。いずれかの特定の対象について、特定の投薬処方、個々の必要性および組成物を投与しまたは投与を管理している者の専門的な判断に従って、経時的に調整されてもよく、本明細書において記載されている用量範囲は、単に例示的であり、請求される組成物の範囲または実施を制限することを意図していないことはさらに理解されるべきである。

30

【0170】

併用療法

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

40

【0171】

併用療法剤には、限定されないが、抗腫瘍剤、放射線療法、化学療法、例えばDNAアルキル化剤、シスプラチン、カルボプラチン、抗チューブリン剤、パクリタキセル、ドセタキセル、タキソール、ドキシソルビシン、ゲムシタビン、ジェムザール、アントラサイクリン、アドリアマイシン、トポイソメラーゼI阻害剤、トポイソメラーゼII阻害剤、5-フルオロウラシル（5-FU）、ロイコボリン、イリノテカン、受容体チロシンキナーゼ阻害剤（例えば、エルロチニブ、ゲフィチニブ）、COX-2阻害剤（例えば、セレコキシブ）、キナーゼ阻害剤およびsiRNAが含まれる。

50

【0172】

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

10

【0173】

治療剤の組合せは、異なる点で、自己免疫およびこれに続く炎症カスケードを干渉し得る；したがって、以下の1つ以上が、本明細書に開示されている結合タンパク質と併用して投与されてもよい。例には、本明細書において開示される結合タンパク質、ならびにキメラ、ヒト化またはヒトTNF抗体、アダリムマブ（PCT公開第WO97/29131号）、CA2（Remicade（商標））、CDP571、可溶性p55もしくはp75TNF受容体、またはこれらの誘導体（p75TNFR1gG（Enbrel（商標））またはp55TNFR1gG（Lenercept）およびTNF α 変換酵素（TACE）阻害剤のようなTNFアンタゴニスト；またはIL-1阻害剤（インターロイキン-1変換酵素阻害剤、IL-1RAなど）が挙げられる。他の組合せには、本明細書において開示される結合タンパク質およびインターロイキン11が含まれる。さらに別の組合せには、IL-12機能と平行して、IL-12機能に依存してまたはIL-12と協調して作用し得る自己免疫応答の中心的プレーヤーが含まれる；特に、IL-18抗体または可溶性IL-18受容体またはIL-18結合タンパク質などのIL-18アンタゴニストが関連する。IL-12およびIL-18は重複しているが、異なる機能を有しており、両者に対するアンタゴニストの組合せは、最も有効であり得ることが示されている。さらに別の組合せは、本明細書において開示される結合タンパク質と非枯渇性抗CD4阻害剤である。さらに他の組合せには、本明細書において開示される結合タンパク質と、抗体、可溶性受容体または拮抗性リガンドを含む、共同刺激経路CD80（B7.1）またはCD86（B7.2）のアンタゴニストが含まれる。

20

30

【0174】

本明細書において提供される結合タンパク質はまた、薬剤と併用されてもよく、例えば、メトトレキサート、6-MP、アザチオプリンスルファサラジン、メサラジン、オルサラジン、クロロキニン／ヒドロキシクロロキン、ペニシラミン（penicillamine）、金チオリンゴ酸塩（筋内および経口）、アザチオプリン、コルヒチン（colchicine）、コルチコステロイド（経口、吸入および局所注射）、 β -2アドレナリン作動性受容体アゴニスト（サルブタモール、テルブタリン、サルメテラル）、キサンチン（テオフィリン、アミノフィリン）、クロモグリカート、ネドクロミル、ケトチフェン、イプラトロピウムおよびオキシトロピウム、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノラートモフェチル、レフルノミド、NSAID、例えば、イブプロフェン、プレドニゾロンなどのコルチコステロイド、ホスホジエステラーゼ阻害剤、アデノシンアゴニスト、抗血栓剤、補体阻害剤、アドレナリン作用薬、TNF α またはIL-1などの

40

50

炎症促進性サイトカインによるシグナル伝達を妨害する薬剤（例えば、I R A K、N I K、I K K、p 3 8 または M A P キナーゼ阻害剤）、I L-1 β 変換酵素阻害剤、T N F α 変換酵素（T A C E）阻害剤、キナーゼ阻害剤などの T 細胞シグナル伝達阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、スルファサラジン、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、可溶性サイトカイン受容体およびこれらの誘導体（例えば、可溶性 p 5 5 または p 7 5 T N F 受容体または誘導体 p 7 5 T N F R I g G（E n b r e l（商標）および p 5 5 T N F R I g G（L e n e r c e p t））、s I L-1 R I、s I L-1 R I I、s I L-6 R）、炎症抑制性サイトカイン（例えば、I L-4、I L-1 0、I L-1 1、I L-1 3 および T G F β ）、セレコキシブ、葉酸、硫酸ヒドロキシクロロキン、ロフェコキシブ、エタネルセプト、インフリキシマブ、ナプロキセン、バルデコキシブ、スルファサラジン、メチルプレドニゾロン、メロキシカム、酢酸メチルプレドニゾロン、金チオリンゴ酸ナトリウム、アスピリン、トリムシノロン・アセトニド、プロボキシフェンナブシラート／a p a p、フォラート、ナブメトン、ジクロフェナク、ピロキシカム、エトドラク、ジクロフェナクナトリウム、オキサプロジン、塩酸オキシコドン、ヒドロコドン二酒石酸塩／a p a p、ジクロフェナクナトリウム／ミソプロストール、フェンタニル、アナキンラ、ヒト組換え、塩酸トラマドール、サルサラート、スリンダク、シアノコバラミン／f a／ピリドキシン、アセトアミノフェン、アレンドロナートナトリウム、プレドニゾロン、硫酸モルヒネ、塩酸リドカイン、インドメタシン、硫酸グルコサミン／コンドロイチン、塩酸アミトリプチリン、スルファジアジン、塩酸オキシコドン／アセトアミノフェン、塩酸オロパタジン、ミソプロストール、ナプロキセンナトリウム、オメプラゾール、シクロホスファミド、リツキシマブ、I L-1 T R A P、M R A、C T L A 4-I G、I L-1 8 B P、抗 I L-1 8、抗 I L 1 5、B I R B-7 9 6、S C I O-4 6 9、V X-7 0 2、A M G-5 4 8、V X 7 4 0、ロフルミラスト、I C-4 8 5、C D C-8 0 1 およびメソプラムなどの作用物質とも組み合わせられ得る。組合せは、メトトレキサートまたはレフルノミドを含み、中程度または重症の関節リウマチの症例においてはシクロスポリンを含む。

【0175】

一実施形態において、結合タンパク質またはその抗原結合部分は、関節リウマチの治療用の以下の薬剤の1つと併用して投与される：K D R の小分子阻害剤、T i e-2 の小分子阻害剤；メトトレキサート；プレドニゾン；セレコキシブ；葉酸；硫酸ヒドロキシクロロキン；ロフェコキシブ；エタネルセプト；インフリキシマブ；レフルノミド；ナプロキセン；バルデコキシブ；スルファサラジン；メチルプレドニゾロン；イブプロフェン；メロキシカム；酢酸メチルプレドニゾロン；金チオリンゴ酸ナトリウム；アスピリン；アザチオプリン；トリムシノロンアセトニド；プロボキシフェンナブシラート／a p a p；フォラート；ナブメトン；ジクロフェナク；ピロキシカム；エトドラク；ジクロフェナクナトリウム；オキサプロジン；塩酸オキシコドン；重酒石酸ヒドロコドン／a p a p；ジクロフェナクナトリウム／ミソプロストール；フェンタニル；アナキンラ、ヒト組換え；塩酸トラマドール；サルサラート；スリンダク；シアノコバラミン／f a／ピリドキシン；アセトアミノフェン；アレンドロナートナトリウム；プレドニゾロン；硫酸モルヒネ；塩酸リドカイン；インドメタシン；硫酸グルコサミン／コンドロイチン；シクロスポリン；塩酸アミトリプチリン；スルファジアジン；塩酸オキシコドン／アセトアミノフェン；塩酸オロパタジン；ミソプロストール；ナプロキセンナトリウム；オメプラゾール；ミコフェノラートモフェチル；シクロホスファミド；リツキシマブ、I L-1 T R A P；M R A；C T L A 4-I G；I L-1 8 B P；I L-1 2／2 3；抗 I L-1 8；抗 I L-1 5；B I R B-7 9 6；S C I O-4 6 9；V X-7 0 2；A M G-5 4 8；V X-7 4 0；ロフルミラスト；I C-4 8 5；C D C-8 0 1 またはメソプラム。

【0176】

本明細書において提供される結合タンパク質とともに組み合わせることが可能な炎症性腸疾患に対する治療剤の非限定的な例には、以下：ブデノシド；上皮細胞増殖因子；コルチコステロイド；シクロスポリン；スルファサラジン；アミノサリチラート；6-メルカ

プトプリン；アザチオプリン；メトロニダゾール；リ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 β mAb；抗IL-6mAb；増殖因子；エラスターゼ阻害剤；ピリジニルイミダゾール化合物；他のヒトサイトカインまたは増殖因子、例えば、TNF、LT、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、EMAP-11、GM-CSF、FGFおよびPDGFに対する抗体またはこれらのアンタゴニストが含まれる。本明細書において提供される抗体またはその抗原結合部分は、CD2、CD3、CD4、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD90またはこれらのリガンドなどの細胞表面分子に対する抗体と組み合わせることができる。本明細書において提供される抗体またはその抗原結合部分はまた、メトトレキサート、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノラートモフェチル、レフルノミド、NSAID、例えば、イブプロフェン、プレドニゾロンなどのコルチコステロイド、ホスホジエステラーゼ阻害剤、アデノシンアゴニスト、抗血栓剤、補体阻害剤、アドレナリン作用薬、TNF α またはIL-1などの炎症促進性サイトカインによるシグナル伝達を妨害する作用物質（例えば、IRAK、NIK、IKK、p38またはMAPキナーゼ阻害剤）、IL-1 β 変換酵素阻害剤、TNF α 変換酵素阻害剤、キナーゼ阻害剤などのT細胞シグナル伝達阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、スルファサラジン、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、可溶性サイトカイン受容体およびこれらの誘導体（例えば、可溶性p55またはp75TNF受容体、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R）または炎症抑制性サイトカイン（例えば、IL-4、IL-10、IL-11、IL-13またはTGF β ）またはbc1-2阻害剤などの薬剤とも組み合わせられ得る。

10

20

【0177】

結合タンパク質を組み合わせることが可能なクローン病に対する治療剤の例には、以下：TNFアンタゴニスト、例えば、抗TNF抗体、アダリムマブ（PCT公開第WO97/29131号；HUMIRA）、CA2（REMICADE）、CDP571、TNFR-Ig構築物、（p75TNFR-IgG（ENBRELL）またはp55TNFR-IgG（LENERCEPT））阻害剤またはPDE4阻害剤が含まれる。本明細書において提供される抗体またはその抗原結合部分は、コルチコステロイド、例えば、ブデノシドおよびデキサメタゾンと組み合わせることができる。本明細書において提供される結合タンパク質またはこれらの抗原結合部分はまた、スルファサラジン、5-アミノサリチル酸およびオルサラジンなどの薬剤、ならびにIL-1などの炎症促進性サイトカインの合成または作用を妨害する薬剤、例えば、IL-1 β 変換酵素阻害剤またはIL-1raと組み合わせられ得る。本明細書において提供される抗体またはその抗原結合部分はまた、T細胞シグナル伝達阻害剤、例えば、チロシンキナーゼ阻害剤または6-メルカプトプリンとともに使用され得る。本明細書において提供される結合タンパク質またはその抗原結合部分は、IL-11と組み合わせることができる。本明細書において提供される結合タンパク質またはその抗原結合部分は、メサラミン、プレドニゾン、アザチオプリン、メルカプトプリン、インフリキシマブ、コハク酸メチルプレドニゾンナトリウム、ジフェノキシレート／硫酸アトロピン、塩酸ロベラミド、メトトレキサート、オメプラゾール、フォレート、シプロフロキサシン／デキストロース水、重酒石酸ヒドロコドン／apap、テトラサイクリン塩酸塩、フルオシノニド、メトロニダゾール、チメロサル／ホウ酸、コレステラミン／スクロース、塩酸シプロフロキサシン、硫酸ヒヨスチアミン、塩酸メペリジン、塩酸ミダゾラム、塩酸オキシコドン／アセトアミノフェン、塩酸プロメタジン、リン酸ナトリウム、スルファメトキサゾール／トリメトプリム、セレコキシブ、ポリカルボフィル、ナプシル酸プロポキシフェン、ヒドロコルチゾン、マルチビタミン、バルサラジド二ナトリウム、リン酸コデイン／アセトアミノフェン（apap）、塩酸コレセベラム、シアノコバラミン、葉酸、レボフロキサシン、メチルプレドニゾン、ナタリズマブまたはインターフェロンガンマと組み合わせることができる。

30

40

【0178】

50

本明細書において提供される結合タンパク質とともに組み合わせることが可能な多発性硬化症に対する治療剤の非限定的な例には、以下：コルチコステロイド；プレドニゾロン；メチルプレドニゾロン；アザチオプリン；シクロホスファミド；シクロスポリン；メトトレキサート；4-アミノピリジン；チザニジン；インターフェロン-β 1a (AVONEX；Biogen)；インターフェロン-β 1b (BETASERON；Chiron／Berlex)；インターフェロン-α-n3) (Interferon Sciences／Fujimoto)、インターフェロン-α (Alfa Wassermann／J&J)、インターフェロン-β 1A-IF (Serono／Inhale Therapeutics)、PEGインターフェロン-α 2b (Enzon／Schering-Plough)、コポリマー-1 (Cop-1；COPAXONE；Teva Pharmaceutical Industries, Inc.)；高圧酸素；静脈内免疫グロブリン；クラブリビン；他のヒトサイトカインまたは増殖因子およびこれらの受容体（例えば、TNF、LT、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-23、IL-15、IL-16、IL-18、EMAP-11、GM-CSF、FGFまたはPDGF）に対する抗体もしくはアンタゴニストが含まれる。本明細書において提供される結合タンパク質は、CD2、CD3、CD4、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD90またはこれらのリガンドなどの細胞表面分子に対する抗体と組み合わせることができる。本明細書において提供される結合タンパク質はまた、メトトレキサート、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノレート・モフェチル、レフルノミド、NSAID、例えば、イブプロフェン、プレドニゾロンなどのコルチコステロイド、ホスホジエステラーゼ阻害剤、アデノシンアゴニスト、抗血栓剤、補体阻害剤、アドレナリン作用薬、TNFαまたはIL-1などの炎症促進性サイトカインによるシグナル伝達を妨害する作用物質（例えば、IRAK、NIK、IKK、p38またはMAPキナーゼ阻害剤）、IL-1β変換酵素阻害剤、TACE阻害剤、キナーゼ阻害剤などのT細胞シグナル伝達阻害剤、メタロプロテイナーゼ阻害剤、スルファサラジン、アザチオプリン、6-メルカプトプリン、アンギオテンシン変換酵素阻害剤、可溶性サイトカイン受容体およびこれらの誘導体（例えば、可溶性p55またはp75TNF受容体、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R）または炎症抑制性サイトカイン（例えば、IL-4、IL-10、IL-13またはTGFβ）またはbc1-2阻害剤などの薬剤と組み合わせられ得る。

【0179】

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

【0180】

本明細書において提供される結合タンパク質とともに組み合わせることが可能な喘息に対する治療剤の非限定的な例には、以下：アルブテロール、サルメテロール／フルチカゾン、モンテルカストナトリウム、プロピオン酸フルチカゾン、ブデソニド、プレドニゾン、キシナホ酸サルメテロール、塩酸レバルブテロール、硫酸アルブテロール／イプラトロピウム、リン酸プレドニゾンナトリウム、トリアムシノロンアセトニド、ニプロピオン酸ベクロメタゾン、イプラトロピウム臭化物、アジスロマイシン、酢酸ビルブテロール、プレドニゾン、テオフィリン無水物、コハク酸メチルプレドニゾンナトリウム、クラリスロマイシン、ザフィルルカスト、フマル酸フォルモテロール、インフルエンザウイルスワクチン、メチルプレドニゾン、アミノキシリリン三水合物、フルニソリド、アレルギー注射、クロモリンナトリウム、塩酸フェキソフェナジン、フルニソリド／メントール、アモキシシリン／クラブラナート、レボフロキサシン、吸入補助装置、グアイフェネシン、リン酸デキサメタゾンナトリウム、塩酸マキシフロキサシン、ドキシサイクリン水和物 (hydrate)、グアイフェネシン／d-メトトルファン、p-エフェドリン／c o

d / クロルフェニル、ガチフロキサシン、塩酸セチリジン、フロ酸モメタゾン、キシナホ酸サルメテロール、ベンゾナタート、セファレキシム、p e / ヒドロコドン / クロルフェニル、塩酸セチリジン / シュードエフェドリン、フェニレフリン / c o d / プロメタジン、コデイン / プロメタジン、セフprozil、デキサメタゾン、グアイフェネシン / シュードエフェドリン、クロルフェニラミン / ヒドロコドン、ネドクロミルナトリウム、硫酸テルブタリン、エピネフリン、メチルプレドニゾロン、硫酸メタプロテレノールが含まれる。

【0181】

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

【0182】

本明細書において提供される結合タンパク質とともに組み合わせることが可能な乾癬に対する治療剤の非限定的な例には、以下：KDRの小分子阻害剤、T i e - 2の小分子阻害剤、カルシポトリエン、プロピオン酸クロベタゾール、トリウムシノロンアセトニド、プロピオン酸ハロベタゾール、タザロテン、メトトレキサート、フルオシノニド、増強された (a u g m e n t e d) ニプロピオン酸ベタメタゾン、フルオシノロンアセトニド、アシトレチン、タールシャンプー、吉草酸ベタメタゾン、フロ酸モメタゾン、ケトコナゾール、プラモキシム / フルオシノロン、吉草酸ヒドロコルチゾン、フルランドレノリド、尿素、ベタメタゾン、プロピオン酸クロベタゾール / 皮膚軟化剤 (e m o l l)、プロピオン酸フルチカゾン、アジスロマイシン、ヒドロコルチゾン、保湿処方、葉酸、デソニド、ピメクロリムス、コールタール、二酢酸ジフロラゾン、葉酸エタネルセプト、乳酸、メトキサレン、h c / 次没食子酸ビスマス (b i s m u t h s u b g a l) / 酸化亜鉛 (z n o x) / r e s o r、酢酸メチルプレドニゾロン、プレドニゾロン、日焼け止め、ハルシノニド、サリチル酸、アンスラリン、ピバル酸クロコルトロン、石炭抽出物、コールタール / サリチル酸、コールタール / サリチル酸 / 硫黄、デスオキシメタゾン、ジアゼパム、皮膚軟化剤、フルオシノニド / 皮膚軟化剤、鉱物油 / ひまし油 / n a l a c t、鉱物油 / 落花生油、石油 / ミリスチン酸イソプロピル、ソラーレン、サリチル酸、石鹼 / トリブROMサラン、チメロサル / ホウ酸、セレコキシブ、インフリキシマブ、シクロスポリン、アレファセプト、エファリズマブ、タクロリムス、ピメクロリムス、P U V A、U V B、スルファサラジンが含まれる。

【0183】

本明細書において提供される結合タンパク質を組み合わせることが可能なSLE（狼瘡）に対する治療剤の例には、以下：N S A I D、例えば、ジクロフェナク、ナプロキセン、イブプロフェン、ピロキシカム、インドメタシン；COX2阻害剤、例えば、セレコキシブ、ロフェコキシブ、バルデコキシブ；抗マラリア剤、例えば、ヒドロキシクロロキン；ステロイド、例えば、プレドニゾン、プレドニゾロン、ブデノシド、デキサメタゾン；細胞障害剤、例えば、アザチオプリン、シクロホスファミド、ミコフェノラートモフェチル、メトトレキサート；PDE4の阻害剤またはプリン合成阻害剤、例えば、C e l l c e p tが含まれる。本明細書において提供される結合タンパク質はまた、薬剤と併用され

10

20

30

40

50

てもよく、例えば、スルファサラジン、5-アミノサリチル酸、オルサラジン、イムランならびにIL-1などの炎症促進性サイトカインの合成、産生または作用を妨害する作用物質、例えば、IL-1 β 変換酵素阻害剤およびIL-1raのようなカスパーゼ阻害剤とも組み合わせられ得る。本明細書において提供される結合タンパク質はまた、T細胞シグナル伝達阻害剤、例えば、チロシンキナーゼ阻害剤；またはT細胞活性化分子を標的とする分子、例えば、CTLA-4-IgGまたは抗B7抗体ファミリー抗体、抗PD-1ファミリー抗体とともに使用され得る。本明細書において提供される結合タンパク質は、IL-11または抗サイトカイン抗体、例えば、ホノトリズマブ（抗IFN γ 抗体）または抗受容体受容体抗体、例えば、抗IL-6受容体抗体およびB細胞表面分子に対する抗体と組み合わせることができる。本明細書において提供される抗体またはその抗原結合部分はまた、LJP394（アベチムス）、B細胞を枯渇させまたは不活化する薬剤、例えば、リツキシマブ（抗CD20抗体）、リンホスタット-B（抗BlyS抗体）、TNFアンタゴニスト、例えば、抗TNF抗体、アダリムマブ（PCT公開第WO97/29131号；HUMIRA）、CA2（REMICADE）、CDP571、TNFR-Ig構築物（p75TNFR-IgG（ENBRELL）およびp55TNFR-IgG（LENERCEPT））およびbc1-2阻害剤（トランスジェニックマウスにおけるbc1-2過剰発現が狼瘡様表現型をもたらすことが実証されているためである（Marquina参照）。）とともに使用され得る。本明細書において提供される医薬組成物は、本明細書において提供される結合タンパク質の「治療的有効量」または「予防的有効量」を含み得る。「治療的有効量」は、所望の治療的結果を達成するための投薬量で、および所望の治療的結果を達成するために必要な期間にわたって有効な量を表す。結合タンパク質の治療的有効量は、当業者によって決定され得、病状、年齢、性別および個体の体重ならびに結合タンパク質が個体内で所望の応答を惹起する能力などの因子に従って変動し得る。治療的有効量は、抗体または抗体部分のあらゆる毒性効果または有害効果が、治療的に有益な効果によって凌駕される量でもある。「予防的有効量」は、所望の予防的結果を達成するために必要な投薬量で、および所望の予防的結果を達成するために必要な期間にわたって有効な量を表す。典型的には、疾病のより初期段階の前にまたは疾病のより初期段階において、予防的投薬が患者に使用されるので、予防的有効量は、治療的有効量より少ない。

【0184】

診断

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

【0185】

D. アッセイの方法

本開示は、本明細書に記載されている少なくとも1つの結合タンパク質を使用して試験試料中の分析物またはその断片の存在、量または濃度を決定する方法も提供する。本分野において知られているあらゆる適切なアッセイは、この方法において使用することが可能である。例には、限定されないが、イムノアッセイおよび／または質量分析法を用いる方法が含まれる。

【0186】

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

【0187】

化学発光微粒子イムノアッセイ、特にARCHITECT（登録商標）自動分析器（A

10

20

30

40

50

bbott Laboratories, Abbott Park, IL) を使用するものは、イムノアッセイの例である。

【0188】

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

【0189】

イムノアッセイおよび質量分析法を用いて生物学的試験試料を回収し、操作し、処理しおよび分析するための方法は、本開示の実施において提供される（US2009-0311253A1）。

【0190】

E. キット

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

【0191】

任選択により、キットは、単離されたまたは精製された分析物を含み得る、校正因子または対照を含むことができる。キットは、イムノアッセイおよび／または質量分析法によって、分析物について試験試料をアッセイするための少なくとも1つの成分を含むことができる。キット成分は、分析物、結合タンパク質および／または抗分析物結合タンパク質またはその断片を含み、任意選択により、当該分野で公知の任意の検出可能な標識を用いて標識されてもよい。本開示の実施において提供される構築のための材料および方法は、当業者に公知である（米国2009-0311253A1）。

【0192】

F. キットおよび方法の適合

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

【0193】

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

10

20

30

40

50

【0194】

本明細書に記載されている本方法の他の適切な改変および適合が明白であり、本明細書に開示されている範囲または実施形態から逸脱することなく、適切な均等物を用いてこれらを行い得ることは、当業者に容易に明確になる。ここに、ある種の実施形態を詳細に記載してきたが、例示のみを目的とし、限定することを意図したものではない、下記の実施例を参照することによって、本発明がより明確に理解される。

【実施例】

【0195】

〔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

2つの4本鎖二重可変ドメイン（DVD）結合タンパク質は、親抗体からの可変ドメインを用いて、DVD結合タンパク質可変重鎖および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、従来知られている方法に従ってpHybCD2ベクターに該断片をクローニングすることによって生成された。DVD結合タンパク質構築物は、当該技術分野において既知の方法に従って、293細胞にクローニングされ、そこで発現させ、精製された。DVD結合タンパク質についてのDVD VH鎖およびVL鎖を以下に提供する。表2～4の左端の欄に列挙された配列番号は、表のそれぞれの列において特定されたDVD結合タンパク質の全可変ドメインの配列を指す。表2～4の右端の欄におけるそれぞれの列は、3つの配列番号を与える。第一の数は、外側可変ドメイン配列の配列番号を指し、第二の数は、リンカーの配列番号を指し、第三の数は、内側可変ドメイン配列の配列番号を指す。これらはともに、全DVD可変ドメイン配列（すなわち、VD1-X1-VD2を含む全DVD可変ドメイン）内に見出される。

【0196】

10

20

【表 2】

表 2: TNF および IL-13 に結合する DVD 結合タンパク質

配列番号	DVD-Ig可変ドメイン名	外側可変ドメイン名 (VD1)	リンカー	内側可変ドメイン名 (VD2)	配列番号式VD1-X1-VD2
120	DVD2683H	AB436VH	GS-H10	AB397VH	38-29-32
121	DVD2683L	AB436VL	GS-L10	AB397VL	39-30-33
122	DVD2684H	AB436VH	HG-短い	AB397VH	38-21-32
123	DVD2684L	AB436VL	LK-短い	AB397VL	39-13-33
124	DVD2686H	AB436VH	HG-短い	AB397VH	38-21-32
125	DVD2686L	AB436VL	LK-長い	AB397VL	39-14-33
126	DVD2687H	AB436VH	HG-長い	AB397VH	38-22-32
127	DVD2687L	AB436VL	LK-短い	AB397VL	39-13-33
128	DVD2688H	AB397VH	GS-H10	AB436VH	32-29-38
129	DVD2688L	AB397VL	GS-L10	AB436VL	33-30-39
130	DVD2689H	AB397VH	HG-短い	AB436VH	32-21-38
131	DVD2689L	AB397VL	LK-短い	AB436VL	33-13-39
132	DVD2691H	AB397VH	HG-短い	AB436VH	32-21-38
133	DVD2691L	AB397VL	LK-長い	AB436VL	33-14-39
134	DVD2692H	AB397VH	HG-長い	AB436VH	32-22-38
135	DVD2692L	AB397VL	LK-短い	AB436VL	33-13-39
136	DVD2733H	AB437VH	GS-H10	AB397VH	40-29-32
137	DVD2733L	AB437VL	GS-L10	AB397VL	41-30-33
138	DVD2734H	AB437VH	HG-短い	AB397VH	40-21-32
139	DVD2734L	AB437VL	LK-短い	AB397VL	41-13-33
140	DVD2736H	AB437VH	HG-短い	AB397VH	40-21-32
141	DVD2736L	AB437VL	LK-長い	AB397VL	41-14-33
142	DVD2737H	AB437VH	HG-長い	AB397VH	40-22-32
143	DVD2737L	AB437VL	LK-短い	AB397VL	41-13-33
144	DVD2738H	AB397VH	GS-H10	AB437VH	32-29-40
145	DVD2738L	AB397VL	GS-L10	AB437VL	33-30-41
146	DVD2739H	AB397VH	HG-短い	AB437VH	32-21-40
147	DVD2739L	AB397VL	LK-短い	AB437VL	33-13-41
148	DVD2741H	AB397VH	HG-短い	AB437VH	32-21-40
149	DVD2741L	AB397VL	LK-長い	AB437VL	33-14-41
150	DVD2742H	AB397VH	HG-長い	AB437VH	32-22-40
151	DVD2742L	AB397VL	LK-短い	AB437VL	33-13-41
152	DVD2783H	AB441VH	GS-H10	AB397VH	42-29-32
153	DVD2783L	AB441VL	GS-L10	AB397VL	43-30-33
154	DVD2784H	AB441VH	HG-短い	AB397VH	42-21-32

10

20

30

40

155	DVD2784L	AB441VL	LK-短い	AB397VL	43-13-33
156	DVD2786H	AB441VH	HG-短い	AB397VH	42-21-32
157	DVD2786L	AB441VL	LK-長い	AB397VL	43-14-33
158	DVD2787H	AB441VH	HG-長い	AB397VH	42-22-32
159	DVD2787L	AB441VL	LK-短い	AB397VL	43-13-33
160	DVD2788H	AB397VH	GS-H10	AB441VH	32-29-42
161	DVD2788L	AB397VL	GS-L10	AB441VL	33-30-43
162	DVD2789H	AB397VH	HG-短い	AB441VH	32-21-42
163	DVD2789L	AB397VL	LK-短い	AB441VL	33-13-43
164	DVD2791H	AB397VH	HG-短い	AB441VH	32-21-42
165	DVD2791L	AB397VL	LK-長い	AB441VL	33-14-43
166	DVD2792H	AB397VH	HG-長い	AB441VH	32-22-42
167	DVD2792L	AB397VL	LK-短い	AB441VL	33-13-43
168	DVD3008H	AB444VH	GS-H10	AB397VH	48-29-32
169	DVD3008L	AB444VL	GS-L10	AB397VL	49-30-33
170	DVD3009H	AB444VH	HG-短い	AB397VH	48-21-32
171	DVD3009L	AB444VL	LK-短い	AB397VL	49-13-33
172	DVD3011H	AB444VH	HG-短い	AB397VH	48-21-32
173	DVD3011L	AB444VL	LK-長い	AB397VL	49-14-33
174	DVD3012H	AB444VH	HG-長い	AB397VH	48-22-32
175	DVD3012L	AB444VL	LK-短い	AB397VL	49-13-33
176	DVD3013H	AB397VH	GS-H10	AB444VH	32-29-48
177	DVD3013L	AB397VL	GS-L10	AB444VL	33-30-49
178	DVD3014H	AB397VH	HG-短い	AB444VH	32-21-48
179	DVD3014L	AB397VL	LK-短い	AB444VL	33-13-49
180	DVD3016H	AB397VH	HG-短い	AB444VH	32-21-48
181	DVD3016L	AB397VL	LK-長い	AB444VL	33-14-49
182	DVD3017H	AB397VH	HG-長い	AB444VH	32-22-48
183	DVD3017L	AB397VL	LK-短い	AB444VL	33-13-49
184	DVD3083H	AB436VH	GS-H10	AB398VH	38-29-34
185	DVD3083L	AB436VL	GS-L10	AB398VL	39-30-35
186	DVD3084H	AB436VH	HG-短い	AB398VH	38-21-34
187	DVD3084L	AB436VL	LK-短い	AB398VL	39-13-35
188	DVD3086H	AB436VH	HG-短い	AB398VH	38-21-34
189	DVD3086L	AB436VL	LK-長い	AB398VL	39-14-35
190	DVD3087H	AB436VH	HG-長い	AB398VH	38-22-34
191	DVD3087L	AB436VL	LK-短い	AB398VL	39-13-35
192	DVD3088H	AB398VH	GS-H10	AB436VH	34-29-38
193	DVD3088L	AB398VL	GS-L10	AB436VL	35-30-39
194	DVD3089H	AB398VH	HG-短い	AB436VH	34-21-38
195	DVD3089L	AB398VL	LK-短い	AB436VL	35-13-39
196	DVD3091H	AB398VH	HG-短い	AB436VH	34-21-38

10

20

30

40

197	DVD3091L	AB398VL	LK-長い	AB436VL	35-14-39
198	DVD3092H	AB398VH	HG-長い	AB436VH	34-22-38
199	DVD3092L	AB398VL	LK-短い	AB436VL	35-13-39
200	DVD3093H	AB437VH	GS-H10	AB398VH	40-29-38
201	DVD3093L	AB437VL	GS-L10	AB398VL	41-30-39
202	DVD3094H	AB437VH	HG-短い	AB398VH	40-21-38
203	DVD3094L	AB437VL	LK-短い	AB398VL	41-13-39
204	DVD3096H	AB437VH	HG-短い	AB398VH	40-21-38
205	DVD3096L	AB437VL	LK-長い	AB398VL	41-14-39
206	DVD3097H	AB437VH	HG-長い	AB398VH	40-22-38
207	DVD3097L	AB437VL	LK-短い	AB398VL	41-13-39
208	DVD3098H	AB398VH	GS-H10	AB437VH	34-29-40
209	DVD3098L	AB398VL	GS-L10	AB437VL	35-30-41
210	DVD3099H	AB398VH	HG-短い	AB437VH	34-21-40
211	DVD3099L	AB398VL	LK-短い	AB437VL	35-13-41
212	DVD3101H	AB398VH	HG-短い	AB437VH	34-21-40
213	DVD3101L	AB398VL	LK-長い	AB437VL	35-14-41
214	DVD3102H	AB398VH	HG-長い	AB437VH	34-22-40
215	DVD3102L	AB398VL	LK-短い	AB437VL	35-13-41
216	DVD3103H	AB441VH	GS-H10	AB398VH	42-29-38
217	DVD3103L	AB441VL	GS-L10	AB398VL	43-30-39
218	DVD3104H	AB441VH	HG-短い	AB398VH	42-21-38
219	DVD3104L	AB441VL	LK-短い	AB398VL	43-13-39
220	DVD3106H	AB441VH	HG-短い	AB398VH	42-21-38
221	DVD3106L	AB441VL	LK-長い	AB398VL	43-14-39
222	DVD3107H	AB441VH	HG-長い	AB398VH	42-22-38
223	DVD3107L	AB441VL	LK-短い	AB398VL	43-13-39
224	DVD3108H	AB398VH	GS-H10	AB441VH	34-29-42
225	DVD3108L	AB398VL	GS-L10	AB441VL	35-30-43
226	DVD3109H	AB398VH	HG-短い	AB441VH	34-21-42
227	DVD3109L	AB398VL	LK-短い	AB441VL	35-13-43
228	DVD3111H	AB398VH	HG-短い	AB441VH	34-21-42
229	DVD3111L	AB398VL	LK-長い	AB441VL	35-14-43
230	DVD3112H	AB398VH	HG-長い	AB441VH	34-22-42
231	DVD3112L	AB398VL	LK-短い	AB441VL	35-13-43
232	DVD3113H	AB444VH	GS-H10	AB398VH	48-29-38
233	DVD3113L	AB444VL	GS-L10	AB398VL	49-30-39
234	DVD3114H	AB444VH	HG-短い	AB398VH	48-21-38
235	DVD3114L	AB444VL	LK-短い	AB398VL	49-13-39
236	DVD3116H	AB444VH	HG-短い	AB398VH	48-21-38
237	DVD3116L	AB444VL	LK-長い	AB398VL	49-14-39
238	DVD3117H	AB444VH	HG-長い	AB398VH	48-22-38

10

20

30

40

239	DVD3117L	AB444VL	LK-短い	AB398VL	49-13-39
240	DVD3118H	AB398VH	GS-H10	AB444VH	34-29-48
241	DVD3118L	AB398VL	GS-L10	AB444VL	35-30-49
242	DVD3119H	AB398VH	HG-短い	AB444VH	34-21-48
243	DVD3119L	AB398VL	LK-短い	AB444VL	35-13-49
244	DVD3121H	AB398VH	HG-短い	AB444VH	34-21-48
245	DVD3121L	AB398VL	LK-長い	AB444VL	35-14-49
246	DVD3122H	AB398VH	HG-長い	AB444VH	34-22-48
247	DVD3122L	AB398VL	LK-短い	AB444VL	35-13-49
248	DVD3143H	AB436VH	GS-H10	AB399VH	38-29-36
249	DVD3143L	AB436VL	GS-L10	AB399VL	39-30-37
250	DVD3144H	AB436VH	HG-短い	AB399VH	38-21-36
251	DVD3144L	AB436VL	LK-短い	AB399VL	39-13-37
252	DVD3146H	AB436VH	HG-短い	AB399VH	38-21-36
253	DVD3146L	AB436VL	LK-長い	AB399VL	39-14-37
254	DVD3147H	AB436VH	HG-長い	AB399VH	38-22-36
255	DVD3147L	AB436VL	LK-短い	AB399VL	39-13-37
256	DVD3153H	AB437VH	GS-H10	AB399VH	40-29-36
257	DVD3153L	AB437VL	GS-L10	AB399VL	41-30-37
258	DVD3154H	AB437VH	HG-短い	AB399VH	40-21-36
259	DVD3154L	AB437VL	LK-短い	AB399VL	41-13-37
260	DVD3156H	AB437VH	HG-短い	AB399VH	40-21-36
261	DVD3156L	AB437VL	LK-長い	AB399VL	41-14-37
262	DVD3157H	AB437VH	HG-長い	AB399VH	40-22-36
263	DVD3157L	AB437VL	LK-短い	AB399VL	41-13-37
264	DVD3158H	AB399VH	GS-H10	AB437VH	36-29-40
265	DVD3158L	AB399VL	GS-L10	AB437VL	37-30-41
266	DVD3159H	AB399VH	HG-短い	AB437VH	36-21-40
267	DVD3159L	AB399VL	LK-短い	AB437VL	37-13-41
268	DVD3163H	AB441VH	GS-H10	AB399VH	42-29-36
269	DVD3163L	AB441VL	GS-L10	AB399VL	43-30-37
270	DVD3164H	AB441VH	HG-短い	AB399VH	42-21-36
271	DVD3164L	AB441VL	LK-短い	AB399VL	43-13-37
272	DVD3166H	AB441VH	HG-短い	AB399VH	42-21-36
273	DVD3166L	AB441VL	LK-長い	AB399VL	43-14-37
274	DVD3167H	AB441VH	HG-長い	AB399VH	42-22-36
275	DVD3167L	AB441VL	LK-短い	AB399VL	43-13-37
276	DVD3168H	AB399VH	GS-H10	AB441VH	36-29-42
277	DVD3168L	AB399VL	GS-L10	AB441VL	37-30-43
278	DVD3169H	AB399VH	HG-短い	AB441VH	36-21-42
279	DVD3169L	AB399VL	LK-短い	AB441VL	37-13-43
280	DVD3173H	AB444VH	GS-H10	AB399VH	48-29-63

10

20

30

40

281	DVD3173L	AB444VL	GS-L10	AB399VL	49-30-37
282	DVD3174H	AB444VH	HG-短い	AB399VH	48-21-36
283	DVD3174L	AB444VL	LK-短い	AB399VL	49-13-37
284	DVD3176H	AB444VH	HG-短い	AB399VH	48-21-36
285	DVD3176L	AB444VL	LK-長い	AB399VL	49-14-37
286	DVD3177H	AB444VH	HG-長い	AB399VH	48-22-36
287	DVD3177L	AB444VL	LK-短い	AB399VL	49-13-37

【 0 1 9 7 】

【表 3】

表 3: TNF および PGE2 に結合する DVD 結合タンパク質

配列番号	DVD-Ig可変ドメイン名	外側可変ドメイン名 (VD1)	リンカー	内側可変ドメイン名 (VD2)	配列番号
288	DVD2693H	AB436VH	GS-H10	AB048VH	38-29-50
289	DVD2693L	AB436VL	GS-L10	AB048VL	39-30-51
290	DVD2694H	AB436VH	HG-短い	AB048VH	38-21-50
291	DVD2694L	AB436VL	LK-短い	AB048VL	39-13-51
292	DVD2696H	AB436VH	HG-短い	AB048VH	38-21-50
293	DVD2696L	AB436VL	LK-長い	AB048VL	39-14-51
294	DVD2697H	AB436VH	HG-長い	AB048VH	38-22-50
295	DVD2697L	AB436VL	LK-短い	AB048VL	39-13-51
296	DVD2698H	AB048VH	GS-H10	AB436VH	50-29-38
297	DVD2698L	AB048VL	GS-L10	AB436VL	51-30-39
298	DVD2699H	AB048VH	HG-短い	AB436VH	50-21-38
299	DVD2699L	AB048VL	LK-短い	AB436VL	51-13-39
300	DVD2701H	AB048VH	HG-短い	AB436VH	50-21-38
301	DVD2701L	AB048VL	LK-長い	AB436VL	51-14-39
302	DVD2702H	AB048VH	HG-長い	AB436VH	50-22-38
303	DVD2702L	AB048VL	LK-短い	AB436VL	51-13-39
304	DVD2743H	AB437VH	GS-H10	AB048VH	40-29-50
305	DVD2743L	AB437VL	GS-L10	AB048VL	41-30-51
306	DVD2744H	AB437VH	HG-短い	AB048VH	40-21-50
307	DVD2744L	AB437VL	LK-短い	AB048VL	41-13-51
308	DVD2746H	AB437VH	HG-短い	AB048VH	40-21-50
309	DVD2746L	AB437VL	LK-長い	AB048VL	41-14-51
310	DVD2747H	AB437VH	HG-長い	AB048VH	40-22-50
311	DVD2732L	AB437VL	LK-短い	AB048VL	41-13-51
312	DVD2748H	AB048VH	GS-H10	AB437VH	50-29-40
313	DVD2748L	AB048VL	GS-L10	AB437VL	51-30-41
314	DVD2749H	AB048VH	HG-短い	AB437VH	50-21-40
315	DVD2749L	AB048VL	LK-短い	AB437VL	51-13-41
316	DVD2751L	AB048VH	HG-短い	AB437VH	50-21-40
317	DVD2751L	AB048VL	LK-長い	AB437VL	51-14-41
318	DVD2752H	AB048VH	HG-長い	AB437VH	50-22-40
319	DVD2752L	AB048VL	LK-短い	AB437VL	51-13-41
320	DVD2793H	AB441VH	GS-H10	AB048VH	42-29-50
321	DVD2793L	AB441VL	GS-L10	AB048VL	43-30-51
322	DVD2794H	AB441VH	HG-短い	AB048VH	42-21-50
323	DVD2794L	AB441VL	LK-短い	AB048VL	43-13-51
324	DVD2796H	AB441VH	HG-短い	AB048VH	42-21-50

10

20

30

40

325	DVD2796L	AB441VL	LK-長い	AB048VL	43-14-51
326	DVD2797H	AB441VH	HG-長い	AB048VH	42-22-50
327	DVD2797L	AB441VL	LK-短い	AB048VL	43-13-51
328	DVD2798H	AB048VH	GS-H10	AB441VH	50-29-42
329	DVD2798L	AB048VL	GS-L10	AB441VL	51-30-43
330	DVD2799H	AB048VH	HG-短い	AB441VH	50-21-42
331	DVD2799L	AB048VL	LK-短い	AB441VL	51-13-43
332	DVD2801H	AB048VH	HG-短い	AB441VH	50-21-42
333	DVD2801L	AB048VL	LK-長い	AB441VL	51-14-43
334	DVD2802H	AB048VH	HG-長い	AB441VH	50-22-42
335	DVD2727L	AB048VL	LK-短い	AB441VL	51-13-43
336	DVD3018H	AB444VH	GS-H10	AB048VH	48-29-50
337	DVD3018L	AB444VL	GS-L10	AB048VL	49-30-51
338	DVD3019H	AB444VH	HG-短い	AB048VH	48-21-50
339	DVD3019L	AB444VL	LK-短い	AB048VL	49-13-51
340	DVD3021H	AB444VH	HG-短い	AB048VH	48-21-50
341	DVD3021L	AB444VL	LK-長い	AB048VL	49-14-51
342	DVD3022H	AB444VH	HG-長い	AB048VH	48-22-50
343	DVD3022L	AB444VL	LK-短い	AB048VL	49-13-51
344	DVD3023H	AB048VH	GS-H10	AB444VH	50-29-48
345	DVD3023L	AB048VL	GS-L10	AB444VL	51-30-49
346	DVD3024H	AB048VH	HG-短い	AB444VH	50-21-48
347	DVD3024L	AB048VL	LK-短い	AB444VL	51-13-49
348	DVD3026L	AB048VH	HG-短い	AB444VH	50-21-48
349	DVD3026L	AB048VL	LK-長い	AB444VL	51-14-49
350	DVD3027H	AB048VH	HG-長い	AB444VH	50-22-48
351	DVD3027L	AB048VL	LK-短い	AB444VL	51-13-49
352	DVD3203H	AB436VH	GS-H10	AB131VH	38-29-52
353	DVD3203L	AB436VL	GS-L10	AB131VL	39-30-53
354	DVD3204H	AB436VH	HG-短い	AB131VH	38-21-52
355	DVD3204L	AB436VL	LK-短い	AB131VL	39-13-53
356	DVD3206H	AB436VH	HG-短い	AB131VH	38-21-52
357	DVD3206L	AB436VL	LK-長い	AB131VL	39-14-53
358	DVD3207H	AB436VH	HG-長い	AB131VH	38-22-52
359	DVD3207L	AB436VL	LK-短い	AB131VL	39-13-53
360	DVD3208H	AB131VH	GS-H10	AB436VH	52-29-38
361	DVD3208L	AB131VL	GS-L10	AB436VL	53-30-39
362	DVD3209H	AB131VH	HG-短い	AB436VH	52-21-38
363	DVD3209L	AB131VL	LK-短い	AB436VL	53-13-39
364	DVD3211H	AB131VH	HG-短い	AB436VH	52-21-38
365	DVD3211L	AB131VL	LK-長い	AB436VL	53-14-39
366	DVD3212H	AB131VH	HG-長い	AB436VH	52-22-38
367	DVD3212L	AB131VL	LK-短い	AB436VL	53-13-39

10

20

30

40

368	DVD3213H	AB437VH	GS-H10	AB131VH	40-29-52
369	DVD3213L	AB437VL	GS-L10	AB131VL	41-30-53
370	DVD3214H	AB437VH	HG-短い	AB131VH	40-21-52
371	DVD3214L	AB437VL	LK-短い	AB131VL	41-13-53
372	DVD3216H	AB437VH	HG-短い	AB131VH	40-21-52
373	DVD3216L	AB437VL	LK-長い	AB131VL	41-14-53
374	DVD3217H	AB437VH	HG-長い	AB131VH	40-22-52
375	DVD3217L	AB437VL	LK-短い	AB131VL	41-13-53
376	DVD3218H	AB131VH	GS-H10	AB437VH	52-29-40
377	DVD3218L	AB131VL	GS-L10	AB437VL	53-30-41
378	DVD3219H	AB131VH	HG-短い	AB437VH	52-21-40
379	DVD3219L	AB131VL	LK-短い	AB437VL	53-13-41
380	DVD3221H	AB131VH	HG-短い	AB437VH	52-21-40
381	DVD3221L	AB131VL	LK-長い	AB437VL	53-14-41
382	DVD3222H	AB131VH	HG-長い	AB437VH	52-22-40
383	DVD3222L	AB131VL	LK-短い	AB437VL	53-13-41
384	DVD3223H	AB441VH	GS-H10	AB131VH	42-29-52
385	DVD3223L	AB441VL	GS-L10	AB131VL	43-30-53
386	DVD3224H	AB441VH	HG-短い	AB131VH	42-21-52
387	DVD3224L	AB441VL	LK-短い	AB131VL	43-13-53
388	DVD3226H	AB441VH	HG-短い	AB131VH	42-21-52
389	DVD3226L	AB441VL	LK-長い	AB131VL	43-14-53
390	DVD3227H	AB441VH	HG-長い	AB131VH	42-22-52
391	DVD3227L	AB441VL	LK-短い	AB131VL	43-13-53
392	DVD3228H	AB131VH	GS-H10	AB441VH	52-29-42
393	DVD3228L	AB131VL	GS-L10	AB441VL	53-30-43
394	DVD3229H	AB131VH	HG-短い	AB441VH	52-21-42
395	DVD3229L	AB131VL	LK-短い	AB441VL	53-13-43
396	DVD3231L	AB131VH	HG-短い	AB441VH	52-21-42
397	DVD3231L	AB131VL	LK-長い	AB441VL	53-14-43
398	DVD3232H	AB131VH	HG-長い	AB441VH	52-22-42
399	DVD3232L	AB131VL	LK-短い	AB441VL	53-13-43
400	DVD3233H	AB444VH	GS-H10	AB131VH	48-29-52
401	DVD3233L	AB444VL	GS-L10	AB131VL	49-30-53
402	DVD3234H	AB444VH	HG-短い	AB131VH	48-21-52
403	DVD3234L	AB444VL	LK-短い	AB131VL	49-13-53
404	DVD3236H	AB444VH	HG-短い	AB131VH	48-21-52
405	DVD3236L	AB444VL	LK-長い	AB131VL	49-14-53
406	DVD3237H	AB444VH	HG-長い	AB131VH	48-22-52
407	DVD3237L	AB444VL	LK-短い	AB131VL	49-13-53
408	DVD3238H	AB131VH	GS-H10	AB444VH	52-29-48
409	DVD3238L	AB131VL	GS-L10	AB444VL	53-30-49
410	DVD3239H	AB131VH	HG-短い	AB444VH	52-21-48

10

20

30

40

411	DVD3239L	AB131VL	LK-短い	AB444VL	53-13-49
412	DVD3241H	AB131VH	HG-短い	AB444VH	52-21-48
413	DVD3241L	AB131VL	LK-長い	AB444VL	53-14-49
414	DVD3242H	AB131VH	HG-長い	AB444VH	52-22-48
415	DVD3242L	AB131VL	LK-短い	AB444VL	53-13-49
416	DVD3263H	AB436VH	GS-H10	AB135VH	38-29-54
417	DVD3263L	AB436VL	GS-L10	AB135VL	39-30-55
418	DVD3264H	AB436VH	HG-短い	AB135VH	38-21-54
419	DVD3264L	AB436VL	LK-短い	AB135VL	39-13-55
420	DVD3267H	AB131VH	HG-長い	AB135VH	52-22-54
421	DVD3267L	AB131VL	LK-短い	AB135VL	53-13-55
422	DVD3273H	AB131VH	GS-H10	AB443VH	52-29-46
423	DVD3273L	AB131VL	GS-L10	AB443VL	53-30-47
424	DVD3274H	AB131VH	HG-短い	AB443VH	52-21-46
425	DVD3274L	AB131VL	LK-短い	AB443VL	53-13-47
426	DVD3276H	AB131VH	HG-短い	AB443VH	52-21-46
427	DVD3276L	AB131VL	LK-長い	AB443VL	53-14-47
428	DVD3277H	AB131VH	HG-長い	AB443VH	52-22-46
429	DVD3277L	AB131VL	LK-短い	AB443VL	53-13-47
430	DVD3279H	AB135VH	HG-短い	AB437VH	54-21-40
431	DVD3279L	AB135VL	LK-短い	AB437VL	55-13-41
432	DVD3283H	AB441VH	GS-H10	AB135VH	42-29-54
433	DVD3283L	AB441VL	GS-L10	AB135VL	43-30-55
434	DVD3284H	AB441VH	HG-短い	AB135VH	42-21-54
435	DVD3284L	AB441VL	LK-短い	AB135VL	43-13-55
436	DVD3286H	AB441VH	HG-短い	AB135VH	42-21-54
437	DVD3286L	AB441VL	LK-長い	AB135VL	43-14-55
438	DVD2697H	AB441VH	HG-長い	AB135VH	42-22-54
439	DVD2697L	AB441VL	LK-短い	AB135VL	43-13-55

10

20

30

【表 4】

表 4: TNF および NGF に結合する DVD 結合タンパク質

配列番号	DVD-Ig可変ドメイン名	外側可変ドメイン名 (VD1)	リンカー	内側可変ドメイン名 (VD2)	配列番号
440	DVD2713H	AB436VH	GS-H10	AB267VH	38-29-56
441	DVD2713L	AB436VL	GS-L10	AB267VL	39-30-57
442	DVD2714H	AB436VH	HG-短い	AB267VH	38-21-56
443	DVD2714L	AB436VL	LK-短い	AB267VL	39-13-57
444	DVD2716H	AB436VH	HG-短い	AB267VH	38-21-56
445	DVD2716L	AB436VL	LK-長い	AB267VL	39-14-57
446	DVD2717H	AB436VH	HG-長い	AB267VH	38-22-56
447	DVD2717L	AB436VL	LK-短い	AB267VL	39-13-57
448	DVD2718H	AB267VH	GS-H10	AB436VH	56-29-38
449	DVD2718L	AB267VL	GS-L10	AB436VL	57-30-39
450	DVD2719H	AB267VH	HG-短い	AB436VH	56-21-38
451	DVD2719L	AB267VL	LK-短い	AB436VL	57-13-39
452	DVD2721H	AB267VH	HG-短い	AB436VH	56-21-38
453	DVD2721L	AB267VL	LK-長い	AB436VL	57-14-39
454	DVD2722H	AB267VH	HG-長い	AB436VH	56-22-38
455	DVD2722L	AB267VL	LK-短い	AB436VL	57-13-39
456	DVD2763H	AB437VH	GS-H10	AB267VH	40-29-56
457	DVD2763L	AB437VL	GS-L10	AB267VL	41-30-57
458	DVD2764H	AB437VH	HG-短い	AB267VH	40-21-56
459	DVD2764L	AB437VL	LK-短い	AB267VL	41-13-57
460	DVD2766H	AB437VH	HG-短い	AB267VH	40-21-56
461	DVD2766L	AB437VL	LK-長い	AB267VL	41-14-57
462	DVD2767H	AB437VH	HG-長い	AB267VH	40-22-56
463	DVD2767L	AB437VL	LK-短い	AB267VL	41-13-57
464	DVD2768H	AB267VH	GS-H10	AB437VH	56-29-40
465	DVD2768L	AB267VL	GS-L10	AB437VL	57-30-41
466	DVD2769H	AB267VH	HG-短い	AB437VH	56-21-40
467	DVD2769L	AB267VL	LK-短い	AB437VL	57-13-41
468	DVD2771H	AB267VH	HG-短い	AB437VH	56-21-40
469	DVD2771L	AB267VL	LK-長い	AB437VL	57-14-41
470	DVD2772H	AB267VH	HG-長い	AB437VH	56-22-40
471	DVD2772L	AB267VL	LK-短い	AB437VL	57-13-41
472	DVD2813H	AB441VH	GS-H10	AB267VH	42-29-56
473	DVD2813L	AB441VL	GS-L10	AB267VL	43-30-57
474	DVD2814H	AB441VH	HG-短い	AB267VH	42-21-56
475	DVD2814L	AB441VL	LK-短い	AB267VL	43-13-57

10

20

30

40

476	DVD2816H	AB441VH	HG-短い	AB267VH	42-21-56
477	DVD2816L	AB441VL	LK-長い	AB267VL	43-14-57
478	DVD2817H	AB441VH	HG-長い	AB267VH	42-22-56
479	DVD2817L	AB441VL	LK-短い	AB267VL	43-13-57
480	DVD2818H	AB267VH	GS-H10	AB441VH	56-29-42
481	DVD2818L	AB267VL	GS-L10	AB441VL	57-30-43
482	DVD2819H	AB267VH	HG-短い	AB441VH	56-21-42
483	DVD2819L	AB267VL	LK-短い	AB441VL	57-13-43
484	DVD2821H	AB267VH	HG-短い	AB441VH	56-21-42
485	DVD2821L	AB267VL	LK-長い	AB441VL	57-14-43
486	DVD2822H	AB267VH	HG-長い	AB441VH	56-22-42
487	DVD2822L	AB267VL	LK-短い	AB441VL	57-13-43
488	DVD3038H	AB444VH	GS-H10	AB267VH	48-29-56
489	DVD3038L	AB444VL	GS-L10	AB267VL	49-30-57
490	DVD3039H	AB444VH	HG-短い	AB267VH	48-21-56
491	DVD3039L	AB444VL	LK-短い	AB267VL	49-13-57
492	DVD3041H	AB444VH	HG-短い	AB267VH	48-21-56
493	DVD3041L	AB444VL	LK-長い	AB267VL	49-14-57
494	DVD3042H	AB444VH	HG-長い	AB267VH	48-22-56
495	DVD3042L	AB444VL	LK-短い	AB267VL	49-13-57
496	DVD3043H	AB267VH	GS-H10	AB444VH	56-29-48
497	DVD3043L	AB267VL	GS-L10	AB444VL	57-30-49
498	DVD3044H	AB267VH	HG-短い	AB444VH	56-21-48
499	DVD3044L	AB267VL	LK-短い	AB444VL	57-13-49
500	DVD3046H	AB267VH	HG-短い	AB444VH	56-21-48
501	DVD3046L	AB267VL	LK-長い	AB444VL	57-14-49
502	DVD3047H	AB267VH	HG-長い	AB444VH	56-22-48
503	DVD3047L	AB267VL	LK-短い	AB444VL	57-13-49

10

20

30

【 0 1 9 9 】

表 2 ～ 4 中の上記で列挙された全ての D V D 結合タンパク質は、ヒト軽鎖カッパ定常領域および野生型ヒト重鎖 I g G 1 定常領域をさらに含んでもよい。定常ドメイン配列は、表 4 a 中の下記に示されている。

【 0 2 0 0 】

【表 5】

表4a:ヒlgG重鎖および軽鎖定常ドメイン

タンパク質	配列番号	配列
		1234567890123456789012345678901234567890123
野生型 hlgG1 定常領域		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
変異体hlg G1定常ド メイン(IgG1 、Z、non- a mut(23 4, 235))		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
Igカッパ 定常領域		TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Igラムダ 定常領域		QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVEVTPESKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

10

20

【0201】

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

【実施例 2. 1】 IL-13 バイオアッセイおよび中和アッセイ

A549細胞は、100 μ l 体積でウェルあたり $1.5 \sim 2 \times 10^5$ 細胞で播種され、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ で一晚インキュベートされた。16～20時間の一晚のインキュベーション後、元の100 μ l 培地播種容積が除かれ、100 μ Lの400 ng/mL (2 $\times$ 濃縮) rhTNF- α が全てのウェルに添加された。IL-13 および抗体またはDVD-Igタンパク質を添加するまで、プレートは、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ に置かれた。20 μ g/mL 作業ストックの抗体またはDVD-Igタンパク質 (4 $\times$ 濃縮) は完全F12培地中に調製された。8点の連続希釈は、マーシュ希釈プレートにおいて完全F12中で行われた (5 μ g/mL $\sim$ 0.0003 μ g/mL)。60 μ L/ウェルのそれぞれの抗体またはDVD-Igタンパク質希釈物は、96ウェルのv底 (Costar #3894) プレートに四連で添加され、IL-13の60 μ Lの4倍濃縮された (20 ng/mL) 溶液は、細胞のみの対照を除いて、全てのウェルに添加された。1時間のインキュベーション後、100 μ Lの上記IL-13/抗体またはDVD-Igタンパク質複合体は、A549細胞に添加された。全てのウェル体積は、200 μ Lに等しかった。組換えIL-13の最終濃度は5 ng/mLであり、rhTNF- α は200 ng/mLであった。次に、全てのプレート試薬は1 $\times$ に濃縮された。16～20時間のインキュベーション後、ウェル内容物 (200 μ l) は、96ウェル丸底プレート (Costar #3799) に移され、-20 $^{\circ}$ Cの冷凍庫に入れられた。上清は、アッセイ実験室におけるELISAによってhTARCレベルについて試験された。中和効力は、5 ng/mLのIL-13対照値のみと比較した阻害パーセントを計算することによって決定された。報告されたIC₅₀値 (S字曲線用量応答) は、GraphPad Prismを用いて計算された。表5を参照されたい。

30

40

【0202】

50

【表 6】

表 5: IL-13 親抗体と DVD-Ig タンパク質を用いた IL-13 中和アッセイ

親抗体または DVD-Ig ID	N末端可変ドメイン(VD)	C末端可変ドメイン(VD)	N末端VD IL13中 和アッセイIC50 nM	C末端VD IL13中 和アッセイIC50 nM
AB397	IL-13 (配列1)		0.066	
AB398	IL-13 (配列2)		0.068	
AB399	IL-13 (配列3)		0.075	
DVD2683	TNF (配列1)	IL-13 (配列1)		0.133
DVD2684	TNF (配列1)	IL-13 (配列1)		1.379
DVD2686	TNF (配列1)	IL-13 (配列1)		0.094
DVD2687	TNF (配列1)	IL-13 (配列1)		0.022
DVD2688	IL-13 (配列1)	TNF (配列1)	0.094	
DVD2689	IL-13 (配列1)	TNF (配列1)	0.147	
DVD2691	IL-13 (配列1)	TNF (配列1)	0.105	
DVD2692	IL-13 (配列1)	TNF (配列1)	0.131	
DVD2733	TNF (配列2)	IL-13 (配列1)		0.119
DVD2734	TNF (配列2)	IL-13 (配列1)		0.955
DVD2736	TNF (配列2)	IL-13 (配列1)		0.167
DVD2737	TNF (配列2)	IL-13 (配列1)		0.061
DVD2738	IL-13 (配列1)	TNF (配列2)	0.149	
DVD2739	IL-13 (配列1)	TNF (配列2)	0.132	
DVD2741	IL-13 (配列1)	TNF (配列2)	0.118	
DVD2742	IL-13 (配列1)	TNF (配列2)	0.064	
DVD2783	TNF (配列3)	IL-13 (配列1)		0.897
DVD2784	TNF (配列3)	IL-13 (配列1)		0.214
DVD2786	TNF (配列3)	IL-13 (配列1)		0.189
DVD2787	TNF (配列3)	IL-13 (配列1)		0.054
DVD2788	IL-13 (配列1)	TNF (配列3)	0.072	
DVD2789	IL-13 (配列1)	TNF (配列3)	0.078	
DVD2791	IL-13 (配列1)	TNF (配列3)	0.245	
DVD2792	IL-13 (配列1)	TNF (配列3)		0.361
DVD3008	TNF (配列4)	IL-13 (配列1)		0.278
DVD3009	TNF (配列4)	IL-13 (配列1)		0.563
DVD3011	TNF (配列4)	IL-13 (配列1)		0.242
DVD3012	TNF (配列4)	IL-13 (配列1)		0.207
DVD3013	IL-13 (配列1)	TNF (配列4)	0.077	
DVD3014	IL-13 (配列1)	TNF (配列4)	0.132	
DVD3016	IL-13 (配列1)	TNF (配列4)	0.081	
DVD3017	IL-13 (配列1)	TNF (配列4)	0.111	
DVD3083	TNF (配列1)	IL-13 (配列2)		0.098

DVD3084	TNF (配列1)	IL-13 (配列2)		0.587
DVD3086	TNF (配列1)	IL-13 (配列2)		0.12
DVD3087	TNF (配列1)	IL-13 (配列2)		0.082
DVD3088	IL-13 (配列2)	TNF (配列1)	0.103	
DVD3089	IL-13 (配列2)	TNF (配列1)	0.074	
DVD3091	IL-13 (配列2)	TNF (配列1)	0.056	
DVD3092	IL-13 (配列2)	TNF (配列1)	0.06	
DVD3093	TNF (配列2)	IL-13 (配列2)		0.067
DVD3094	TNF (配列2)	IL-13 (配列2)		0.444
DVD3096	TNF (配列2)	IL-13 (配列2)		0.064
DVD3097	TNF (配列2)	IL-13 (配列2)		0.072
DVD3098	IL-13 (配列2)	TNF (配列2)	0.059	
DVD3099	IL-13 (配列2)	TNF (配列2)	0.014	
DVD3101	IL-13 (配列2)	TNF (配列2)	0.037	
DVD3102	IL-13 (配列2)	TNF (配列2)	0.025	
DVD3103	TNF (配列3)	IL-13 (配列2)		0.042
DVD3104	TNF (配列3)	IL-13 (配列2)		1.052
DVD3106	TNF (配列3)	IL-13 (配列2)		0.074
DVD3107	TNF (配列3)	IL-13 (配列2)		0.029
DVD3108	IL-13 (配列2)	TNF (配列3)		
DVD3109	IL-13 (配列2)	TNF (配列3)	0.044	
DVD3111	IL-13 (配列2)	TNF (配列3)	0.018	
DVD3112	IL-13 (配列2)	TNF (配列3)	0.017	
DVD3113	TNF (配列4)	IL-13 (配列2)		0.065
DVD3114	TNF (配列4)	IL-13 (配列2)		0.781
DVD3116	TNF (配列4)	IL-13 (配列2)		0.081
DVD3117	TNF (配列4)	IL-13 (配列2)		0.015
DVD3118	IL-13 (配列2)	TNF (配列4)	0.013	
DVD3119	IL-13 (配列2)	TNF (配列4)	0.051	
DVD3121	IL-13 (配列2)	TNF (配列4)	0.013	
DVD3122	IL-13 (配列2)	TNF (配列4)	0.011	
DVD3143	TNF (配列1)	IL-13 (配列3)		0.057
DVD3144	TNF (配列1)	IL-13 (配列3)		0.209
DVD3146	TNF (配列1)	IL-13 (配列3)		0.051
DVD3147	TNF (配列1)	IL-13 (配列3)		0.745
DVD3153	TNF (配列2)	IL-13 (配列3)		0.064
DVD3154	TNF (配列2)	IL-13 (配列3)		0.175
DVD3156	TNF (配列2)	IL-13 (配列3)		0.062
DVD3157	TNF (配列2)	IL-13 (配列3)		0.035
DVD3158	IL-13 (配列3)	TNF (配列2)	0.137	
DVD3159	IL-13 (配列3)	TNF (配列2)	0.087	
DVD3163	TNF (配列3)	IL-13 (配列3)		0.076
DVD3164	TNF (配列3)	IL-13 (配列3)		0.335
DVD3166	TNF (配列3)	IL-13 (配列3)		0.072
DVD3167	TNF (配列3)	IL-13 (配列3)		0.046
DVD3168	IL-13 (配列3)	TNF (配列3)	0.081	

10

20

30

40

DVD3169	IL-13 (配列3)	TNF (配列3)	0.089	
DVD3173	TNF (配列4)	IL-13 (配列3)		0.079
DVD3174	TNF (配列4)	IL-13 (配列3)		0.527
DVD3176	TNF (配列4)	IL-13 (配列3)		0.152
DVD3177	TNF (配列4)	IL-13 (配列3)		0.078

【0203】

N末端またはC末端位置のいずれかでAB397、AB398またはAB399からのVDを含有する全てのDVD-Igタンパク質は、A549 IL-13中和アッセイにおいて中和を示した。

10

【0204】

[実施例2.2] PGE2 バイオアッセイおよび中和アッセイ

PGE2の細胞応答を阻害するための抗PGE2抗体および抗PGE2含有DVD-Ig分子の能力は、ヒトEP4受容体を用いて安定にトランスフェクトされたHEK293Gα16細胞におけるCa++フラックスアッセイにおいて決定された。細胞は、黒色／透明なポリ-D-リジンプレート(Corning #3667、Corning、N.Y.)に配置され、Ca++感受性色素(Molecular Devices)とともに90分間インキュベートされた。ストックPGE2(200ブルーフェタノール中)は、FLIPR緩衝液(1×HBSS(Invitrogen、Carlsbad、California)、20mM HEPES(Invitrogen、Carlsbad、California)、0.1%BSA(Sigma、St. Louis、Mo.)および2.5mMプロベネシド(Sigma、St. Louis、Mo.)を含有する。)を用いて希釈された。抗PGE2抗体、DVD-Ig分子またはアイソタイプが合致した対照抗体はまた、FLIPR緩衝液中に予め希釈された。25μlのPGE2またはプレインキュベートされたPGE2／抗体混合物またはプレインキュベートされたPGE2／DVD-Ig分子混合物は、細胞を予め播種したウェルに添加された。PGE2の用量応答は、PGE2の一連の滴定によって行われ、FLIPR1またはTetra(Molecular Devices)を用いて決定された。EC50は、Graphpad Prism 5(GraftPad Software、La Jolla、California)を用いて決定された。抗体およびDVD-Ig分子の試験について、EC50濃度でのPGE2は、様々な濃度の被験物質またはアイソタイプが合致した抗体(陰性対照)とともに20分間インキュベートされ、HEK293Gα16細胞中の色素運搬したヒトEP4に添加された。Ca++フラックスはFLIPR1を用いてモニターされ、データはGraphpad Prism 5を用いて分析された。PGE2阻害結果は、異なるTNF配列を含有するDVD-Ig構築物について表6に示される。

20

30

【0205】

【表 7】

表 6: PGE2 親抗体および DVD-Ig タンパク質を用いた PGE2 中和アッセイ

親抗体またはDVD-Ig ID	N末端可変ドメイン(VD)	C末端可変ドメイン(VD)	N末端VD PGE2 中和アッセイ IC50 nM	C末端VD PGE2 中和アッセイ IC50 nM
AB048	PGE2 (配列1)		0.401	
AB131	PGE2 (配列2)		29.66	
AB135	PGE2 (配列3)		N/A	
DVD2693	TNF (配列1)	PGE2 配列1		0.719
DVD2694	TNF (配列1)	PGE2 配列1		0.886
DVD2696	TNF (配列1)	PGE2 配列1		0.7
DVD2697	TNF (配列1)	PGE2 配列1		0.571
DVD2698	PGE2 配列1	TNF (配列1)	0.856	
DVD2699	PGE2 配列1	TNF (配列1)	0.869	
DVD2701	PGE2 配列1	TNF (配列1)	0.869	
DVD2702	PGE2 配列1	TNF (配列1)	0.801	
DVD2743	TNF (配列2)	PGE2 配列1		0.647
DVD2744	TNF (配列2)	PGE2 配列1		0.507
DVD2746	TNF (配列2)	PGE2 配列1		1.136
DVD2747	TNF (配列2)	PGE2 配列1		0.722
DVD2748	PGE2 配列1	TNF (配列2)	0.994	
DVD2749	PGE2 配列1	TNF (配列2)	0.566	
DVD2751	PGE2 配列1	TNF (配列2)	0.552	
DVD2752	PGE2 配列1	TNF (配列2)	0.949	
DVD2793	TNF (配列3)	PGE2 配列1		0.366
DVD2794	TNF (配列3)	PGE2 配列1		0.493
DVD2796	TNF (配列3)	PGE2 配列1		0.589
DVD2797	TNF (配列3)	PGE2 配列1		0.646
DVD2798	PGE2 配列1	TNF (配列3)	0.523	
DVD2799	PGE2 配列1	TNF (配列3)	0.597	
DVD2801	PGE2 配列1	TNF (配列3)	0.904	
DVD2802	PGE2 配列1	TNF (配列3)	0.883	
DVD3018	TNF (配列4)	PGE2 配列1		0.461
DVD3019	TNF (配列4)	PGE2 配列1		0.460
DVD3021	TNF (配列4)	PGE2 配列1		0.612
DVD3022	TNF (配列4)	PGE2 配列1		0.344
DVD3023	PGE2 配列1	TNF (配列4)	0.876	
DVD3024	PGE2 配列1	TNF (配列4)	0.663	
DVD3026	PGE2 配列1	TNF (配列4)	0.639	
DVD3027	PGE2 配列1	TNF (配列4)	0.396	
DVD3203	TNF (配列1)	PGE2 (AB016) 配列2		34.78

DVD3204	TNF (酉配列1)	PGE2 (AB016) 酉配列2		34.5
DVD3206	TNF (酉配列1)	PGE2 (AB016) 酉配列2		10.01
DVD3207	TNF (酉配列1)	PGE2 (AB016) 酉配列2		12.05
DVD3208	PGE2 (AB016) 酉配列2	TNF (酉配列1)	20.49	
DVD3209	PGE2 (AB016) 酉配列2	TNF (酉配列1)	109.7	
DVD3211	PGE2 (AB016) 酉配列2	TNF (酉配列1)	31.27	
DVD3212	PGE2 (AB016) 酉配列2	TNF (酉配列1)	20.86	
DVD3213	TNF (酉配列2)	PGE2 (AB016) 酉配列2		29.58
DVD3214	TNF (酉配列2)	PGE2 (AB016) 酉配列2		23.35
DVD3216	TNF (酉配列2)	PGE2 (AB016) 酉配列2		68735
DVD3217	TNF (酉配列2)	PGE2 (AB016) 酉配列2		>100000
DVD3218	PGE2 (AB016) 酉配列2	TNF (酉配列2)	60.14	
DVD3219	PGE2 (AB016) 酉配列2	TNF (酉配列2)	>100000	
DVD3221	PGE2 (AB016) 酉配列2	TNF (酉配列2)	>100000	
DVD3222	PGE2 (AB016) 酉配列2	TNF (酉配列2)	>100000	
DVD3223	TNF (酉配列3)	PGE2 (AB016) 酉配列2		>100000
DVD3224	TNF (酉配列3)	PGE2 (AB016) 酉配列2		>100000
DVD3226	TNF (酉配列3)	PGE2 (AB016) 酉配列2		>100000
DVD3227	TNF (酉配列3)	PGE2 (AB016) 酉配列2		>100000
DVD3228	PGE2 (AB016) 酉配列2	TNF (酉配列3)	34.96	
DVD3229	PGE2 (AB016) 酉配列2	TNF (酉配列3)	124.8	
DVD3231	PGE2 (AB016) 酉配列2	TNF (酉配列3)	>100000	
DVD3232	PGE2 (AB016) 酉配列2	TNF (酉配列3)	11.25	
DVD3233	TNF (酉配列4)	PGE2 (AB016) 酉配列2		27.26
DVD3234	TNF (酉配列4)	PGE2 (AB016) 酉配列2		111.3

10

20

30

40

DVD3236	TNF (配列4)	PGE2 (AB016) 配列2		>100000
DVD3237	TNF (配列4)	PGE2 (AB016) 配列2		>100000
DVD3238	PGE2 (AB016) 配列2	TNF (配列4)	1186	
DVD3239	PGE2 (AB016) 配列2	TNF (配列4)	62.05	
DVD3241	PGE2 (AB016) 配列2	TNF (配列4)	>100000	
DVD3242	PGE2 (AB016) 配列2	TNF (配列4)	>100000	
DVD3263	TNF (配列1)	PGE2 (AB022) 配列3		9.203
DVD3264	TNF (配列1)	PGE2 (AB022) 配列3		30.21
DVD3267	TNF (配列1)	PGE2 (AB022) 配列3		6.832
DVD3273	TNF (配列2)	PGE2 (AB022) 配列3		11.91
DVD3274	TNF (配列2)	PGE2 (AB022) 配列3		34.84
DVD3276	TNF (配列2)	PGE2 (AB022) 配列3		27048
DVD3277	TNF (配列2)	PGE2 (AB022) 配列3		32.08
DVD3279	PGE2 (AB022) 配列3	TNF (配列2)	30.71	
DVD3283	TNF (配列3)	PGE2 (AB022) 配列3		21.94
DVD3284	TNF (配列3)	PGE2 (AB022) 配列3		47.6
DVD3286	TNF (配列3)	PGE2 (AB022) 配列3		65.22
DVD3287	TNF (配列3)	PGE2 (AB022) 配列3		257

10

20

30

【0206】

N末端またはC末端位置のいずれかにおけるAB048、A131またはAB135からのVDを含有する全てのDVD-Igタンパク質は、EP4 PGE2中和アッセイにおいて中和を示した。

【0207】

[実施例2.3] Hu TNF α バイオアッセイおよび中和アッセイ

L929細胞は、半コンフルエントの密度まで増殖され、0.05%トリプシン(Gibco #25300)を用いて回収された。細胞はPBSで洗浄され、カウントされ、4 μ g/mLアクチノマイシンDを含有するアッセイ培地中で1E6細胞/mLにて再懸濁された。細胞は、50 μ lの体積で、5E4細胞/ウェルにて96ウェルプレート(Costar #3599)に播種された。DVD-Ig(商標)および対照IgGは、アッセイ培地で4倍濃度に希釈され、連続1:3希釈物は調製された。huTNF α は、アッセイ培地で400pg/mLに希釈された。抗体試料(200 μ l)は、1:2希釈スキームでhuTNF α (200 μ L)に添加され、0.5時間、室温でインキュベートされた。

40

50

【0208】

DVD-Ig (商標) / huTNF α 溶液は、最終濃度が100 pg/mLのhuTNF α および25 nM-0.00014 nMのDVD-Ig (商標) について100 μ lで、播種された細胞に添加された。プレートは、20時間、37℃、5%CO₂にてインキュベートされた。生存率を定量するために、100 μ Lがウェルから取り出され、10 μ LのWST-1 試薬 (Roche cat #11644807001) が添加された。プレートは、3.5時間、アッセイ条件下でインキュベートされ、500×gで遠心分離され、75 μ L上清がELISAプレート (Costar #3369) に移された。プレートは、Spectromax 190 ELISAプレートリーダー上でOD420-600 nmにて読まれた。いくつかのアッセイからの平均EC50は、様々なTNF配列を含有するDVD-Ig 構築物について表7に含まれる。

10

【0209】

【表 8】

表 7: TNF α 親抗体および DVD-Ig タンパク質を用いた huTNF α 中和アッセイ

親抗体またはDVD-Ig ID	N末端可変ドメイン(VD)	C末端可変ドメイン(VD)	N末端VD huTNF α 中和アッセイ IC50 nM	C末端VD huTNF α 中和アッセイ IC50 nM
AB436	TNF (配列1)		0.006	
AB437	TNF (配列2)		0.012	
AB441	TNF (配列3)		0.037	
AB444	TNF (配列4)		0.034	
DVD2683	TNF (配列1)	IL-13 (配列1)	0.006	
DVD2684	TNF (配列1)	IL-13 (配列1)	0.007	
DVD2686	TNF (配列1)	IL-13 (配列1)	0.103	
DVD2687	TNF (配列1)	IL-13 (配列1)	0.048	
DVD2688	IL-13 (配列1)	TNF (配列1)		0.093
DVD2689	IL-13 (配列1)	TNF (配列1)		0.076
DVD2691	IL-13 (配列1)	TNF (配列1)		0.041
DVD2692	IL-13 (配列1)	TNF (配列1)		0.04
DVD2733	TNF (配列2)	IL-13 (配列1)	0.009	
DVD2734	TNF (配列2)	IL-13 (配列1)	0.017	
DVD2736	TNF (配列2)	IL-13 (配列1)	0.009	
DVD2737	TNF (配列2)	IL-13 (配列1)	0.012	
DVD2738	IL-13 (配列1)	TNF (配列2)		0.452
DVD2739	IL-13 (配列1)	TNF (配列2)		0.517
DVD2741	IL-13 (配列1)	TNF (配列2)		0.202
DVD2742	IL-13 (配列1)	TNF (配列2)		0.129
DVD2783	TNF (配列3)	IL-13 (配列1)	0.008	
DVD2784	TNF (配列3)	IL-13 (配列1)	0.006	
DVD2786	TNF (配列3)	IL-13 (配列1)	0.008	
DVD2787	TNF (配列3)	IL-13 (配列1)	0.005	
DVD2788	IL-13 (配列1)	TNF (配列3)		0.23
DVD2789	IL-13 (配列1)	TNF (配列3)		0.186
DVD2791	IL-13 (配列1)	TNF (配列3)		0.064
DVD2792	IL-13 (配列1)	TNF (配列3)		0.136
DVD3008	TNF (配列4)	IL-13 (配列1)	0.029	
DVD3009	TNF (配列4)	IL-13 (配列1)	0.031	
DVD3011	TNF (配列4)	IL-13 (配列1)	0.024	
DVD3012	TNF (配列4)	IL-13 (配列1)	0.034	
DVD3013	IL-13 (配列1)	TNF (配列4)		0.229
DVD3014	IL-13 (配列1)	TNF (配列4)		0.49
DVD3016	IL-13 (配列1)	TNF (配列4)		0.148
DVD3017	IL-13 (配列1)	TNF (配列4)		0.234
DVD3083	TNF (配列1)	IL-13 (配列2)	0.011	

DVD3084	TNF (配列1)	IL-13 (配列2)	0.014	
DVD3086	TNF (配列1)	IL-13 (配列2)	0.023	
DVD3087	TNF (配列1)	IL-13 (配列2)	0.015	
DVD3088	IL-13 (配列2)	TNF (配列1)		0.472
DVD3089	IL-13 (配列2)	TNF (配列1)		0.52
DVD3091	IL-13 (配列2)	TNF (配列1)		0.192
DVD3092	IL-13 (配列2)	TNF (配列1)		0.096
DVD3093	TNF (配列2)	IL-13 (配列2)	0.012	
DVD3094	TNF (配列2)	IL-13 (配列2)	0.021	
DVD3096	TNF (配列2)	IL-13 (配列2)	0.019	
DVD3097	TNF (配列2)	IL-13 (配列2)	0.019	
DVD3098	IL-13 (配列2)	TNF (配列2)	0.012	
DVD3099	IL-13 (配列2)	TNF (配列2)	0.003	
DVD3101	IL-13 (配列2)	TNF (配列2)		0.308
DVD3102	IL-13 (配列2)	TNF (配列2)		0.294
DVD3103	TNF (配列3)	IL-13 (配列2)	0.016	
DVD3104	TNF (配列3)	IL-13 (配列2)	0.033	
DVD3106	TNF (配列3)	IL-13 (配列2)	0.018	
DVD3107	TNF (配列3)	IL-13 (配列2)	0.015	
DVD3108	IL-13 (配列2)	TNF (配列3)		0.183
DVD3109	IL-13 (配列2)	TNF (配列3)		0.731
DVD3111	IL-13 (配列2)	TNF (配列3)		0.146
DVD3112	IL-13 (配列2)	TNF (配列3)		0.387
DVD3113	TNF (配列4)	IL-13 (配列2)	0.01	
DVD3114	TNF (配列4)	IL-13 (配列2)	0.016	
DVD3116	TNF (配列4)	IL-13 (配列2)	0.025	
DVD3117	TNF (配列4)	IL-13 (配列2)	1.96	
DVD3118	IL-13 (配列2)	TNF (配列4)		0.065
DVD3119	IL-13 (配列2)	TNF (配列4)		0.163
DVD3121	IL-13 (配列2)	TNF (配列4)		0.036
DVD3122	IL-13 (配列2)	TNF (配列4)		0.018
DVD3143	TNF (配列1)	IL-13 (配列3)	0.008	
DVD3144	TNF (配列1)	IL-13 (配列3)	0.007	
DVD3146	TNF (配列1)	IL-13 (配列3)	0.006	
DVD3147	TNF (配列1)	IL-13 (配列3)	0.007	
DVD3153	TNF (配列2)	IL-13 (配列3)	0.021	
DVD3154	TNF (配列2)	IL-13 (配列3)	0.013	
DVD3156	TNF (配列2)	IL-13 (配列3)	0.022	
DVD3157	TNF (配列2)	IL-13 (配列3)	0.012	
DVD3158	IL-13 (配列3)	TNF (配列2)		0.62
DVD3159	IL-13 (配列3)	TNF (配列2)		0.414
DVD3163	TNF (配列3)	IL-13 (配列3)	0.015	
DVD3164	TNF (配列3)	IL-13 (配列3)	0.021	
DVD3166	TNF (配列3)	IL-13 (配列3)	0.016	
DVD3167	TNF (配列3)	IL-13 (配列3)	0.018	
DVD3168	IL-13 (配列3)	TNF (配列3)		0.146

10

20

30

40

DVD3169	IL-13 (醗配列3)	TNF (醗配列3)		0.169
DVD3173	TNF (醗配列4)	IL-13 (醗配列3)	0.009	
DVD3174	TNF (醗配列4)	IL-13 (醗配列3)	0.014	
DVD3176	TNF (醗配列4)	IL-13 (醗配列3)	0.015	
DVD3177	TNF (醗配列4)	IL-13 (醗配列3)	0.022	
DVD2693	TNF (醗配列1)	PGE2 醗配列1	0.001	
DVD2694	TNF (醗配列1)	PGE2 醗配列1	0.001	
DVD2696	TNF (醗配列1)	PGE2 醗配列1	NA	
DVD2697	TNF (醗配列1)	PGE2 醗配列1	0.000	
DVD2698	PGE2 醗配列1	TNF (醗配列1)		0.085
DVD2699	PGE2 醗配列1	TNF (醗配列1)		0.064
DVD2701	PGE2 醗配列1	TNF (醗配列1)		0.036
DVD2702	PGE2 醗配列1	TNF (醗配列1)		0.106
DVD2743	TNF (醗配列2)	PGE2 醗配列1	0.006	
DVD2744	TNF (醗配列2)	PGE2 醗配列1	0.003	
DVD2746	TNF (醗配列2)	PGE2 醗配列1	0.006	
DVD2747	TNF (醗配列2)	PGE2 醗配列1	0.003	
DVD2748	PGE2 醗配列1	TNF (醗配列2)		2.876
DVD2749	PGE2 醗配列1	TNF (醗配列2)		NA
DVD2751	PGE2 醗配列1	TNF (醗配列2)		NA
DVD2752	PGE2 醗配列1	TNF (醗配列2)		0.384
DVD2793	TNF (醗配列3)	PGE2 醗配列1	0.006	
DVD2794	TNF (醗配列3)	PGE2 醗配列1	0.003	
DVD2796	TNF (醗配列3)	PGE2 醗配列1	0.010	
DVD2797	TNF (醗配列3)	PGE2 醗配列1	0.002	
DVD2798	PGE2 醗配列1	TNF (醗配列3)		0.381
DVD2799	PGE2 醗配列1	TNF (醗配列3)		3.076
DVD2801	PGE2 醗配列1	TNF (醗配列3)		0.116
DVD2802	PGE2 醗配列1	TNF (醗配列3)		0.195
DVD3018	TNF (醗配列4)	PGE2 醗配列1	0.008	
DVD3019	TNF (醗配列4)	PGE2 醗配列1	0.009	
DVD3021	TNF (醗配列4)	PGE2 醗配列1	0.007	
DVD3022	TNF (醗配列4)	PGE2 醗配列1	0.016	
DVD3023	PGE2 醗配列1	TNF (醗配列4)		0.203
DVD3024	PGE2 醗配列1	TNF (醗配列4)		0.934
DVD3026	PGE2 醗配列1	TNF (醗配列4)		0.038
DVD3027	PGE2 醗配列1	TNF (醗配列4)		0.076
DVD3203	TNF (醗配列1)	PGE2 (AB016) 醗配列2	0.071	
DVD3204	TNF (醗配列1)	PGE2 (AB016) 醗配列2	0.001	
DVD3206	TNF (醗配列1)	PGE2 (AB016) 醗配列2	0.001	
DVD3207	TNF (醗配列1)	PGE2 (AB016) 醗配列2	0.005	
DVD3208	PGE2 (AB016) 醗配列2	TNF (醗配列1)		0.172

10

20

30

40

DVD3209	PGE2 (AB016) 醣配列2	TNF (醣配列1)		0.536
DVD3211	PGE2 (AB016) 醣配列2	TNF (醣配列1)		0.014
DVD3212	PGE2 (AB016) 醣配列2	TNF (醣配列1)		0.039
DVD3213	TNF (醣配列2)	PGE2 (AB016) 醣配列2	0.010	
DVD3214	TNF (醣配列2)	PGE2 (AB016) 醣配列2	0.020	
DVD3216	TNF (醣配列2)	PGE2 (AB016) 醣配列2	0.022	
DVD3217	TNF (醣配列2)	PGE2 (AB016) 醣配列2	0.008	
DVD3218	PGE2 (AB016) 醣配列2	TNF (醣配列2)		0.413
DVD3219	PGE2 (AB016) 醣配列2	TNF (醣配列2)		2.102
DVD3221	PGE2 (AB016) 醣配列2	TNF (醣配列2)		0.479
DVD3222	PGE2 (AB016) 醣配列2	TNF (醣配列2)		0.243
DVD3223	TNF (醣配列3)	PGE2 (AB016) 醣配列2	0.002	
DVD3224	TNF (醣配列3)	PGE2 (AB016) 醣配列2	0.004	
DVD3226	TNF (醣配列3)	PGE2 (AB016) 醣配列2	0.011	
DVD3227	TNF (醣配列3)	PGE2 (AB016) 醣配列2	0.002	
DVD3228	PGE2 (AB016) 醣配列2	TNF (醣配列3)		0.052
DVD3229	PGE2 (AB016) 醣配列2	TNF (醣配列3)		0.086
DVD3231	PGE2 (AB016) 醣配列2	TNF (醣配列3)		0.112
DVD3232	PGE2 (AB016) 醣配列2	TNF (醣配列3)		0.254
DVD3233	TNF (醣配列4)	PGE2 (AB016) 醣配列2	0.005	
DVD3234	TNF (醣配列4)	PGE2 (AB016) 醣配列2	0.009	
DVD3236	TNF (醣配列4)	PGE2 (AB016) 醣配列2	0.006	
DVD3237	TNF (醣配列4)	PGE2 (AB016) 醣配列2	0.010	
DVD3238	PGE2 (AB016) 醣配列2	TNF (醣配列4)		0.168
DVD3239	PGE2 (AB016) 醣配列2	TNF (醣配列4)		1.616

10

20

30

40

DVD3241	PGE2 (AB016) 配列2	TNF (配列4)		0.112
DVD3242	PGE2 (AB016) 配列2	TNF (配列4)		0.130
DVD3263	TNF (配列1)	PGE2 (AB022) 配列3	0.008	
DVD3264	TNF (配列1)	PGE2 (AB022) 配列3	0.006	
DVD3267	TNF (配列1)	PGE2 (AB022) 配列3	0.002	
DVD3273	TNF (配列2)	PGE2 (AB022) 配列3	0.020	
DVD3274	TNF (配列2)	PGE2 (AB022) 配列3	0.008	
DVD3276	TNF (配列2)	PGE2 (AB022) 配列3	0.083	
DVD3277	TNF (配列2)	PGE2 (AB022) 配列3	0.051	
DVD3279	PGE2 (AB022) 配列3	TNF (配列2)		
DVD3283	TNF (配列3)	PGE2 (AB022) 配列3	0.002	
DVD3284	TNF (配列3)	PGE2 (AB022) 配列3	0.012	
DVD3286	TNF (配列3)	PGE2 (AB022) 配列3	0.002	
DVD3287	TNF (配列3)	PGE2 (AB022) 配列3	0.018	
DVD2713	TNF (配列1)	NGF	0.006	
DVD2714	TNF (配列1)	NGF	0.008	
DVD2716	TNF (配列1)	NGF	0.014	
DVD2717	TNF (配列1)	NGF	0.278	
DVD2718	NGF	TNF (配列1)		0.249
DVD2719	NGF	TNF (配列1)		0.126
DVD2721	NGF	TNF (配列1)		0.029
DVD2722	NGF	TNF (配列1)		0.190
DVD2763	TNF (配列2)	NGF	0.004	
DVD2764	TNF (配列2)	NGF	0.012	
DVD2766	TNF (配列2)	NGF	0.010	
DVD2767	TNF (配列2)	NGF	0.010	
DVD2768	NGF	TNF (配列2)		0.189
DVD2769	NGF	TNF (配列2)		0.222
DVD2771	NGF	TNF (配列2)		0.060
DVD2772	NGF	TNF (配列2)		0.128
DVD2813	TNF (配列3)	NGF	0.016	
DVD2814	TNF (配列3)	NGF	0.012	
DVD2816	TNF (配列3)	NGF	0.009	
DVD2817	TNF (配列3)	NGF	0.013	
DVD2818	NGF	TNF (配列3)		0.072

10

20

30

40

DVD2819	NGF	TNF (配列3)		0.279
DVD2821	NGF	TNF (配列3)		0.090
DVD2822	NGF	TNF (配列3)		0.107
DVD3038	TNF (配列4)	NGF	0.002	
DVD3039	TNF (配列4)	NGF	0.012	
DVD3041	TNF (配列4)	NGF	0.006	
DVD3042	TNF (配列4)	NGF	0.006	
DVD3043	NGF	TNF (配列4)		0.128
DVD3044	NGF	TNF (配列4)		0.673
DVD3046	NGF	TNF (配列4)		0.050
DVD3047	NGF	TNF (配列4)		-

10

【0210】

N末端またはC末端位置のいずれかにおけるAB436、AB437、AB441またはAB444からのVDを含有する全てのDVD-Igタンパク質は、L929 huTNF α 中和アッセイにおいて中和を示した。

【0211】

〔実施例2.4〕 TF-1細胞増殖バイオアッセイにおけるNGFの阻害

TF-1は、RPMI1640 (Invitrogen) + 10%ウシ胎児血清 (Hyclone) + L-グルタミン (Invitrogen) + rhugM-CSF (R&D Systems) 中で培養され、TF-1細胞は、1mLあたり 1×10^5 細胞でRPMI1640 + L-グルタミン中で24時間、血清を枯渇され、37℃、5%CO₂で一晩インキュベートされた。実験の当日、TF-1細胞は、100 μ L体積+アッセイ培地 (RPMI-1640 + L-グルタミン + 4%FBS) 中でウェルあたり 2.5×10^4 細胞にて、不透明な壁のある96ウェルプレートに播種された。NGF/DVD-Igタンパク質または抗体を細胞に添加することによって細胞を刺激する。DVD-Ig (商標) タンパク質および対照IgGは、アッセイ培地で4倍希釈され、連続1:5希釈が行われた。huNGFはアッセイ培地で8ng/mLに希釈された。DVD-Ig (商標) タンパク質 (50 μ L) およびhuNGF (50 μ L) 溶液は、2ng/mLのhuNGF および25nM-0.000003nMのDVD-Ig (商標) タンパク質の最終濃度でプレートに添加された。プレートは、72時間、37℃、5%CO₂でインキュベートされた。生存率を定量するために、Cell Titer Gloキット (Promega cat #TB288) が使用された (100 μ Lの溶液が、製造業者の使用説明書に従ってそれぞれのウェルに添加された。)。プレートは、Spectromax 190 ELISAプレートリーダー上でルミネッセンスを用いて読まれた。表8を参照されたい。

20

30

【0212】

【表 9】

表 8: NGF 親抗体および DVD-Ig タンパク質を用いた NGF 阻害アッセイ

親抗体またはDVD-Ig ID	N末端可変ドメイン(VD)	C末端可変ドメイン(VD)	N末端VD NGF中和アッセイ IC50 nM	C末端VD NGF中和アッセイ IC50 nM
AB267	NGF		0.007	
DVD2713	TNF (配列1)	NGF		2.895
DVD2714	TNF (配列1)	NGF		6.852
DVD2716	TNF (配列1)	NGF		0.6242
DVD2717	TNF (配列1)	NGF		0.936
DVD2718	NGF	TNF (配列1)	0.008	
DVD2719	NGF	TNF (配列1)	0.019	
DVD2721	NGF	TNF (配列1)	0.041	
DVD2722	NGF	TNF (配列1)	0.053	
DVD2763	TNF (配列2)	NGF		0.871
DVD2764	TNF (配列2)	NGF		4.097
DVD2766	TNF (配列2)	NGF		
DVD2767	TNF (配列2)	NGF		0.646
DVD2768	NGF	TNF (配列2)	0.003	
DVD2769	NGF	TNF (配列2)	0.001	
DVD2771	NGF	TNF (配列2)	0.037	
DVD2772	NGF	TNF (配列2)	0.04	
DVD2813	TNF (配列3)	NGF		7.455
DVD2814	TNF (配列3)	NGF		0.019
DVD2816	TNF (配列3)	NGF		2.89
DVD2817	TNF (配列3)	NGF		1.275
DVD2818	NGF	TNF (配列3)	0.003	
DVD2819	NGF	TNF (配列3)	0.006	
DVD2821	NGF	TNF (配列3)	0.011	
DVD2822	NGF	TNF (配列3)	0.003	
DVD3038	TNF (配列4)	NGF		0.093
DVD3039	TNF (配列4)	NGF		0.088
DVD3041	TNF (配列4)	NGF		>10
DVD3042	TNF (配列4)	NGF		>10
DVD3043	NGF	TNF (配列4)	NA	
DVD3044	NGF	TNF (配列4)	NA	
DVD3046	NGF	TNF (配列4)	0.145	
DVD3047	NGF	TNF (配列4)	>10	

【0213】

N末端またはC末端位置のいずれかにおけるAB267からのVDを含有するすべてのDVD-Igタンパク質は、TF-1 NGF中和アッセイにおいて中和を示した。

【0214】

【実施例 2. 5】 BIAcore 技術を用いた親和性測定

【0215】

【表 10】

表 9: Biacore 分析に用いた試薬

抗原	供給業者による表示	供給業者	カタログ番号
TNF α	Recombinant Human TNF- α / TNFSF1A	R&D systems	210-TA
IL-13	Recombinant Human IL-13	R&D systems	213-IL
NGF	Recombinant Human β -NGF	R&D systems	256-GF

10

【0216】

B I A C O R E 法：

B I A C O R E アッセイ (G E , H e a l t h c a r e P i s c a t a w a y , N J) は、結合 (o n - r a t e) 定数および解離 (o f f - r a t e) 定数の反応速度測定を用いて抗体または D V D - I g の親和性を決定した。標的抗原 (例えば、精製された組換え標的抗原) への抗体または D V D - I g タンパク質の結合は、B i a c o r e T 2 0 0 により、G E H e a l t h c a r e から 2 5 °C で稼働している H B S - E P + 緩衝液を用いて表面プラズモン共鳴に基づく測定によって決定された。全ての化学物質は、G E H e a l t h c a r e から入手され、または他には本明細書に記載されているように異なる供給源から入手された。例えば、1 0 m M 酢酸ナトリウム (p H 4 . 5) 中に希釈された、約 5 0 0 0 R U のヤギ抗マウス I g G、(F c γ)、断片特異的なポリクローナル抗体 (P i e r c e B i o t e c h n o l o g y I n c , R o c k f o r d , I L) は、製造業者の使用説明書に従って標準的なアミンカップリングキットを用いて 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を用いてブロックした。フローセル 1 において修飾されたカルボキシメチルデキストラン表面を反応表面として使用した。速度定数は、0 . 8 ~ 1 0 0 n M の範囲の異なる抗原濃度で速度論的結合測定を行うことによって誘導された。結合は時間の関数として記録され、運動速度定数は計算された。このアッセイにおいて、結合速度は 5 分間評価され、解離は 1 0 分間モニターされた。速度論的スクリーニング分析のために、1 : 1 結合モデルから誘導された速度方程式は、B i a e v a l u a t i o n ソフトウェアを用いて、全ての注入物の結合および解離相に対して、(捕捉バリエーションを構成するために局所的に R m a x フィットによるグローバルフィット分析を用いて) 同時にフィッティングさせた。ヤギ抗マウス I g G 特異的反応表面の全体で捕捉するために、H E P E S 緩衝生理食塩水中に、精製された抗体または D V D - I g タンパク質試料を希釈した。リガンドとして捕捉されるべき抗体または D V D - I g タンパク質を 5 μ l / 分の流速で反応マトリックス全体に注入した。結合速度定数および解離結合定数の k_{on} (M⁻¹ s⁻¹) および k_{off} (s⁻¹) は、5 0 μ l / 分の連続的流速下で決定された。0 . 8 ~ 1 0 0 n M の範囲の異なる抗原濃度にて速度論結合測定を行うことによって速度定数を導いた。結合を時間の関数として記録し、速度論的速度定数を計算した。このアッセイにおいて、結合速度は 5 分間評価され、解離は 1 0 分間モニターされた。結果を表 1 0 に示す。

【0217】

40

【表 1 1】

表 10: 親抗体およびDVD-Ig タンパク質の BIACORE 分析

親抗体または DVD-Ig ID	N末端可変ドメイン(VD)	C末端可変ドメイン(VD)	k_{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_{off} (s ⁻¹)	k_D (M)
AB436	TNF (配列1)		1.10E+07	7.90E-05	7.10E-12
AB437	TNF (配列2)		1.20E+07	1.00E-04	8.60E-12
AB441	TNF (配列3)		7.50E+06	1.80E-05	2.40E-12
AB444	TNF (配列4)		1.10E+07	5.50E-05	4.80E-12
AB397	IL-13 (配列1)		9.20E+05	1.20E-04	1.30E-10
AB398	IL-13 (配列2)		6.30E+05	2.80E-05	4.50E-11
AB399	IL-13 (配列3)		3.40E+06	6.40E-05	1.90E-11
DVD2683	TNF (配列1)		1.50E+07	9.00E-05	5.80E-12
DVD2683		IL-13 (配列1)	6.80E+04	5.90E-05	8.70E-10
DVD2684	TNF (配列1)		1.40E+07	9.10E-05	6.60E-12
DVD2684		IL-13 (配列1)	4.80E+04	5.90E-05	1.20E-09
DVD2686	TNF (配列1)		1.50E+07	4.80E-05	3.10E-12
DVD2686		IL-13 (配列1)	1.40E+05	4.40E-05	3.20E-10
DVD2687	TNF (配列1)		1.80E+07	7.10E-05	4.00E-12
DVD2687		IL-13 (配列1)	1.10E+05	5.00E-05	4.70E-10
DVD2691	IL-13 (配列1)		9.50E+05	1.30E-04	1.30E-10
DVD2691		TNF (配列1)	2.00E+06	5.00E-05	2.50E-11
DVD2733	TNF (配列2)		1.60E+07	9.00E-05	5.60E-12
DVD2733		IL-13 (配列1)	7.90E+04	8.60E-05	1.10E-09
DVD2734	TNF (配列2)		1.50E+07	1.40E-04	9.60E-12
DVD2734		IL-13 (配列1)	5.80E+04	4.80E-05	8.20E-10
DVD2736	TNF (配列2)		1.80E+07	6.40E-05	3.70E-12
DVD2736		IL-13 (配列1)	1.50E+05	4.60E-05	3.00E-10
DVD2737	TNF (配列2)		1.70E+07	5.80E-05	3.40E-12
DVD2737		IL-13 (配列1)	1.20E+05	6.20E-05	5.00E-10
DVD3008	TNF (配列4)		1.60E+07	1.20E-04	7.10E-12
DVD3008		IL-13 (配列1)	1.10E+05	1.50E-05	1.40E-10
DVD3009	TNF (配列4)		1.50E+07	5.70E-05	3.90E-12
DVD3009		IL-13 (配列1)	8.70E+04	3.20E-05	3.60E-10
DVD3083	TNF (配列1)		1.70E+07	6.80E-05	3.90E-12
DVD3083		IL-13 (配列2)	5.20E+04	2.00E-06	3.80E-11

10

20

30

40

DVD3084	TNF (配列1)		1.50E+07	1.30E-04	8.60E-12
DVD3084		IL-13 (配列2)	8.70E+04	1.10E-06	1.20E-11
DVD3086	TNF (配列1)		1.70E+07	8.50E-05	5.00E-12
DVD3086		IL-13 (配列2)	6.50E+04	<1E-06	<1.5E-11
DVD3087	TNF (配列1)		1.70E+07	6.20E-05	3.70E-12
DVD3087		IL-13 (配列2)	5.10E+04	<1E-06	<2.0E-11
DVD3092	IL-13 (配列2)		5.80E+05	2.50E-05	4.40E-11
DVD3092		TNF (配列1)	1.80E+06	1.10E-04	5.80E-11
DVD3093	TNF (配列2)		1.90E+07	9.70E-05	5.20E-12
DVD3093		IL-13 (配列2)	5.10E+04	<1E-06	<2.0E-11
DVD3094	TNF (配列2)		7.40E+06	1.20E-04	1.60E-11
DVD3094		IL-13 (配列2)	8.90E+04	5.90E-06	6.70E-11
DVD3096	TNF (配列2)		1.90E+07	1.40E-04	7.20E-12
DVD3096		IL-13 (配列2)	7.00E+04	5.30E-08	7.60E-13
DVD3097	TNF (配列2)		2.00E+07	8.60E-05	4.30E-12
DVD3097		IL-13 (配列2)	4.80E+04	<1E-06	<2.1E-11
DVD3106	TNF (配列3)		3.90E+06	8.50E-05	2.20E-11
DVD3106		IL-13 (配列2)	5.70E+05	6.40E-05	1.10E-10
DVD3107	TNF (配列3)		2.80E+06	1.50E-04	5.30E-11
DVD3107		IL-13 (配列2)	8.10E+05	7.00E-05	8.70E-11
DVD3113	TNF (配列4)		1.80E+07	2.70E-05	1.50E-12
DVD3113		IL-13 (配列2)	7.50E+04	1.20E-06	1.50E-11
DVD3114	TNF (配列4)		1.50E+07	6.90E-05	4.70E-12
DVD3114		IL-13 (配列2)	1.70E+05	1.20E-06	6.90E-12
DVD3116	TNF (配列4)		1.40E+07	5.00E-05	3.60E-12
DVD3116		IL-13 (配列2)	5.80E+04	<1E-06	<1.7E-11
DVD3143	TNF (配列1)		1.50E+07	5.40E-05	3.50E-12
DVD3143		IL-13 (配列3)	1.70E+05	6.20E-05	3.70E-10
DVD3144	TNF (配列1)		1.30E+07	8.60E-05	6.50E-12
DVD3144		IL-13 (配列3)	6.20E+04	7.30E-06	1.20E-10
DVD3146	TNF (配列1)		1.40E+07	8.20E-05	6.00E-12
DVD3146		IL-13 (配列3)	1.90E+05	4.60E-05	2.40E-10
DVD3147	TNF (配列1)		1.30E+07	9.50E-05	7.40E-12
DVD3147		IL-13 (配列3)	1.30E+05	<1E-06	<7.7E-12
DVD3153	TNF (配列2)		1.50E+07	8.30E-05	5.40E-12
DVD3153		IL-13 (配列3)	1.80E+05	8.20E-05	4.50E-10
DVD3154	TNF (配列2)		1.40E+07	1.30E-04	9.40E-12
DVD3154		IL-13 (配列3)	5.30E+04	3.00E-05	5.80E-10
DVD3156	TNF (配列2)		1.70E+07	5.20E-05	3.10E-12

10

20

30

40

DVD3156		IL-13 (配列3)	1.60E+05	5.40E-05	3.40E-10
DVD3157	TNF (配列2)		1.10E+07	5.00E-05	4.70E-12
DVD3157		IL-13 (配列3)	1.10E+05	1.10E-06	9.50E-12
DVD3158	IL-13 (配列3)		1.20E+06	6.70E-05	5.70E-11
DVD3158		TNF (配列2)	1.30E+06	6.30E-05	4.70E-11
DVD3159	IL-13 (配列3)		1.40E+06	5.40E-05	3.90E-11
DVD3159		TNF (配列2)	1.20E+06	2.80E-05	2.30E-11
DVD3161	IL-13 (配列3)	TNF (配列2)			
DVD3163	TNF (配列3)		1.30E+07	5.00E-05	3.90E-12
DVD3163		IL-13 (配列3)	1.40E+05	8.40E-05	6.10E-10
DVD3164	TNF (配列3)		4.00E+06	6.50E-05	1.60E-11
DVD3164		IL-13 (配列3)	5.50E+04	4.80E-05	8.70E-10
DVD3166	TNF (配列3)		4.70E+06	1.30E-04	2.70E-11
DVD3166		IL-13 (配列3)	2.80E+05	5.10E-05	1.80E-10
DVD3168	IL-13 (配列3)		1.10E+06	7.40E-05	6.40E-11
DVD3168		TNF (配列3)	8.00E+05	3.60E-05	4.50E-11
DVD3169	IL-13 (配列3)		1.90E+06	2.00E-05	1.00E-11
DVD3169		TNF (配列3)	6.50E+05	<1E-06	<1.5E-12
DVD3173	TNF (配列4)		7.00E+06	2.20E-05	3.20E-12
DVD3173		IL-13 (配列3)	2.40E+05	8.80E-05	3.70E-10
DVD3174	TNF (配列4)		4.40E+06	1.40E-05	3.30E-12
DVD3174		IL-13 (配列3)	8.50E+04	7.70E-05	9.00E-10
DVD3176	TNF (配列4)		5.30E+06	1.30E-06	2.50E-13
DVD3176		IL-13 (配列3)	5.50E+05	4.80E-05	8.70E-11
DVD2693	TNF (配列1)	PGE2 配列1	4.4E+06	4.9E-05	1.1E-11
DVD2694	TNF (配列1)	PGE2 配列1	3.9E+06	6.2E-05	1.6E-11
DVD2696	TNF (配列1)	PGE2 配列1	4.1E+06	5.4E-05	1.3E-11
DVD2697	TNF (配列1)	PGE2 配列1	4.4E+06	4.7E-05	1.1E-11
DVD2698	PGE2 配列1	TNF (配列1)	2.1E+05	2.3E-05	1.1E-10
DVD2699	PGE2 配列1	TNF (配列1)	1.4E+05	5.8E-05	4.0E-10
DVD2701	PGE2 配列1	TNF (配列1)	3.6E+05	5.3E-05	1.5E-10
DVD2702	PGE2 配列1	TNF (配列1)	4.7E+05	5.2E-05	1.1E-10
DVD2743	TNF (配列2)	PGE2 配列1	4.6E+06	4.9E-05	1.1E-11
DVD2744	TNF (配列2)	PGE2 配列1	3.9E+06	7.5E-05	1.9E-11
DVD2746	TNF (配列2)	PGE2 配列1	4.7E+06	3.0E-05	6.4E-12
DVD2747	TNF (配列2)	PGE2 配列1	4.5E+06	5.1E-05	1.1E-11
DVD2748	PGE2 配列1	TNF (配列2)	1.3E+05	3.4E-05	2.7E-10
DVD2749	PGE2 配列1	TNF (配列2)	1.2E+05	3.6E-05	3.1E-10
DVD2751	PGE2 配列1	TNF (配列2)	2.7E+05	4.2E-05	1.5E-10

10

20

30

40

DVD2752	PGE2 配列1	TNF (配列2)	3.4E+05	7.0E-05	2.0E-10
DVD2797	TNF (配列3)	PGE2 配列1	3.4E+06	1.9E-05	5.5E-12
DVD2798	PGE2 配列1	TNF (配列3)	1.8E+05	3.2E-05	1.7E-10
DVD2799	PGE2 配列1	TNF (配列3)	6.5E+04	4.8E-05	7.3E-10
DVD2801	PGE2 配列1	TNF (配列3)	3.8E+05	6.6E-06	1.8E-11
DVD2802	PGE2 配列1	TNF (配列3)	2.6E+05	4.1E-05	1.6E-10
DVD3023	PGE2 配列1	TNF (配列4)	3.5E+05	4.8E-05	1.4E-10
DVD3024	PGE2 配列1	TNF (配列4)	1.2E+05	2.9E-06	2.4E-11
DVD3026	PGE2 配列1	TNF (配列4)	6.8E+05	3.5E-05	5.1E-11
DVD3027	PGE2 配列1	TNF (配列4)	6.1E+05	5.3E-05	8.6E-11
DVD3203	TNF (配列1)	PGE2 (AB016) 配列2	4.4E+06	3.1E-05	7.1E-12
DVD3204	TNF (配列1)	PGE2 (AB016) 配列2	3.6E+06	6.6E-05	1.8E-11
DVD3206	TNF (配列1)	PGE2 (AB016) 配列2	4.1E+06	4.9E-05	1.2E-11
DVD3207	TNF (配列1)	PGE2 (AB016) 配列2	4.7E+06	4.3E-05	9.3E-12
DVD3208	PGE2 (AB016) 配列2	TNF (配列1)	3.0E+05	7.0E-05	2.3E-10
DVD3209	PGE2 (AB016) 配列2	TNF (配列1)	1.8E+05	8.3E-05	4.6E-10
DVD3211	PGE2 (AB016) 配列2	TNF (配列1)	5.0E+05	3.2E-05	6.3E-11
DVD3212	PGE2 (AB016) 配列2	TNF (配列1)	3.1E+05	3.7E-05	1.2E-10
DVD3213	TNF (配列2)	PGE2 (AB016) 配列2	4.8E+06	4.1E-05	8.6E-12
DVD3214	TNF (配列2)	PGE2 (AB016) 配列2	3.9E+06	6.4E-05	1.6E-11
DVD3216	TNF (配列2)	PGE2 (AB016) 配列2	4.4E+06	5.1E-05	1.2E-11
DVD3217	TNF (配列2)	PGE2 (AB016) 配列2	5.0E+06	3.4E-05	6.8E-12
DVD3218	PGE2 (AB016) 配列2	TNF (配列2)	2.2E+05	5.8E-05	2.6E-10
DVD3219	PGE2 (AB016) 配列2	TNF (配列2)	1.3E+05	2.7E-05	2.1E-10
DVD3221	PGE2 (AB016) 配列2	TNF (配列2)	3.3E+05	1.4E-05	4.4E-11
DVD3222	PGE2 (AB016) 配列2	TNF (配列2)	3.6E+05	5.5E-05	1.5E-10
DVD3224	TNF (配列3)	PGE2 (AB016) 配列2	2.8E+06	4.0E-05	1.4E-11
DVD3226	TNF (配列3)	PGE2 (AB016) 配列2	3.5E+06	2.5E-05	7.0E-12
DVD3228	PGE2 (AB016) 配列2	TNF (配列3)	2.4E+05	3.4E-05	1.5E-10

10

20

30

40

DVD3229	PGE2 (AB016) 醗記列2	TNF (醗記列3)	1.0E+05	2.7E-06	2.6E-11
DVD3231	PGE2 (AB016) 醗記列2	TNF (醗記列3)	3.8E+05	1.3E-06	3.6E-12
DVD3232	PGE2 (AB016) 醗記列2	TNF (醗記列3)	3.4E+05	3.5E-05	1.0E-10
DVD3238	PGE2 (AB016) 醗記列2	TNF (醗記列4)	4.3E+05	3.1E-05	7.3E-11
DVD3239	PGE2 (AB016) 醗記列2	TNF (醗記列4)	1.6E+05	4.9E-06	3.1E-11
DVD3241	PGE2 (AB016) 醗記列2	TNF (醗記列4)	6.1E+05	2.6E-05	4.3E-11
DVD3242	PGE2 (AB016) 醗記列2	TNF (醗記列4)	6.4E+05	3.6E-05	5.6E-11
DVD3263	TNF (醗記列1)	PGE2 (AB022) 醗記列3	4.5E+06	4.1E-05	9.1E-12
DVD3273	TNF (醗記列2)	PGE2 (AB022) 醗記列3	4.3E+06	5.8E-05	1.4E-11
DVD3274	TNF (醗記列2)	PGE2 (AB022) 醗記列3	3.7E+06	6.7E-05	1.8E-11
DVD3277	TNF (醗記列2)	PGE2 (AB022) 醗記列3	4.6E+06	2.4E-05	5.2E-12
DVD3283	TNF (醗記列3)	PGE2 (AB022) 醗記列3	3.2E+06	2.6E-05	8.4E-12
DVD3284	TNF (醗記列3)	PGE2 (AB022) 醗記列3	2.7E+06	3.9E-05	1.4E-11
DVD3286	TNF (醗記列3)	PGE2 (AB022) 醗記列3	3.0E+06	1.3E-05	4.5E-12
DVD3287	TNF (醗記列3)	PGE2 (AB022) 醗記列3	3.1E+06	3.3E-05	1.1E-11
DVD2713	TNF (醗記列1)	NGF	4.40E+06	6.90E-05	1.60E-11
DVD2713	TNF (醗記列1)	NGF	6.90E+04	<1E-06	<1.4E-11
DVD2714	TNF (醗記列1)	NGF	4.20E+06	7.40E-05	1.80E-11
DVD2714	TNF (醗記列1)	NGF	2.90E+04	<1E-06	<3.4E-11
DVD2716	TNF (醗記列1)	NGF	4.20E+06	7.00E-05	1.70E-11
DVD2716	TNF (醗記列1)	NGF	4.40E+05	2.50E-06	5.70E-12
DVD2717	TNF (醗記列1)	NGF	4.00E+06	6.50E-05	1.60E-11
DVD2717	TNF (醗記列1)	NGF	9.90E+04	1.30E-06	1.30E-11
DVD2763	TNF (醗記列2)	NGF	4.80E+06	7.20E-05	1.50E-11
DVD2763	TNF (醗記列2)	NGF	6.90E+04	<1E-06	<1.4E-11
DVD2764	TNF (醗記列2)	NGF	3.90E+06	8.70E-05	2.20E-11
DVD2764	TNF (醗記列2)	NGF	3.20E+04	<1E-06	<3.1E-11
DVD2766	TNF (醗記列2)	NGF	4.60E+06	5.70E-05	1.20E-11
DVD2766	TNF (醗記列2)	NGF	3.70E+05	<1E-06	<2.7E-12
DVD2767	TNF (醗記列2)	NGF	5.00E+06	6.80E-05	1.40E-11
DVD2767	TNF (醗記列2)	NGF	8.70E+04	2.70E-06	3.20E-11

10

20

30

40

DVD2813	TNF (配列3)	NGF	3.20E+06	6.10E-05	1.90E-11
DVD2813	TNF (配列3)	NGF	3.30E+04	<1E-06	<3.0E-11
DVD2816	TNF (配列3)	NGF	3.90E+06	3.10E-05	8.00E-12
DVD2816	TNF (配列3)	NGF	6.00E+04	4.80E-06	8.00E-11
DVD3038	TNF (配列4)	NGF	5.40E+06	2.40E-05	4.40E-12
DVD3038	TNF (配列4)	NGF	1.10E+05	<1E-06	<9.1E-12

【0218】

10

Biacore技術によって特徴付けられた全てのDVD-Igタンパク質は結合を示した。すべての可変ドメインは、親抗体として類似した高親和性で結合する。

【0219】

〔実施例3〕 抗体およびDVD-Igタンパク質の特徴付け

機能的活性を阻害するための精製されたDVD-Igタンパク質の能力は、例えば、実施例1に記載されるようにサイトカインバイオアッセイを用いて決定された。組換えヒト抗原に対するDVD-Igタンパク質の結合親和性は、実施例2に記載されるように表面プラズモン共鳴（Biacore（登録商標））測定を用いて決定された。抗体およびDVD-Igタンパク質のバイオアッセイからのIC₅₀値および親和性を位置付けた。親mAbの活性を完全に維持するDVD-Igタンパク質は、将来の進行のための候補対象として選択された。上位2から3つの最も有益なDVD-Igタンパク質はさらに特徴付けられた。

20

【0220】

〔実施例3.1〕 ヒト化抗体またはDVD-Igタンパク質の薬物動態分析

薬物動態研究は、Sprague-Dawleyラットおよびカニクイザルにおいて行われる。雄性および雌性のラットならびにカニクイザルは、4mg/kgのmAbまたはDVD-Igタンパク質の単回投薬で静脈内または皮下に投薬され、抗原捕捉ELISAを用いて試料を分析し、薬物動態パラメーターを非コンパートメント分析によって決定する。要約すると、ヤギ抗ビオチン抗体（5mg/ml、4℃、一晚）を用いてELISAプレートを被覆し、Superblock（Pierce）を用いてブロックし、10% SuperblockのTTBS中の50ng/mlのビオチン化ヒト抗原とともに室温で2時間インキュベートする。血清試料を連続的に希釈し（TTBS中の0.5%血清、10% Superblock）およびプレート上で30分間、室温にてインキュベートする。HRP標識されたヤギ抗ヒト抗体を用いて検出を行い、4パラメーターのロジスティックフィットを用いて、標準曲線の助けにより濃度を決定する。薬物動態パラメーターに関する値は、WinNonlinソフトウェア（Pharsight Corporation, Mountain View, CA）を用いて、非コンパートメントモデルによって決定される。良好な薬物動態プロファイルを有するヒト化mAb（T1/2は8～13日またはそれより良好であり、低クリアランスおよび優れた生物学的利用率は50～100%である）を選択する。

30

40

【0221】

〔実施例3.2〕 ヒト化モノクローナル抗体およびDVD-Igタンパク質の物理化学的およびインビトロでの安定性分析

サイズ排除クロマトグラフィー

水を用いて抗体またはDVD-Igタンパク質を2.5mg/mLに希釈し、20mLをTSKゲルG3000SWXLカラム（Tosoh Bioscience、カタログ#k5539-05k）を用いてShimadzu HPLCシステム上で分析した。211mM硫酸ナトリウム、92mMリン酸ナトリウム、pH7.0を用いて、流速0.3mL/分にて試料をカラムから溶出した。HPLCシステムの操作条件は以下の通りである：

50

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

カラムオープン温度：周囲

実行時間：50分

【0222】

表11は、上記プロトコルにより測定したモノマー（予想される分子量を有する非凝集タンパク質）%として表される親抗体およびDVD-Igタンパク質の純度データを含む。

10

【0223】

【表 1 2】

表11: サイズ排除クロマトグラフィーによって測定された親抗体およびDVD-Igタンパク質の純度

親抗体または DVD-IgのID	N末端可変ドメイン (VD)	C末端可変ドメイン (VD)	単量体%(純度)
AB436	TNF (配列1)		85.7
AB437	TNF (配列2)		86.9
AB441	TNF (配列3)		82.7
AB444	TNF (配列4)		75.3
AB397	IL-13 (配列1)		93
AB398	IL-13 (配列2)		92.8
AB399	IL-13 (配列3)		98.8
DVD2683	TNF (配列1)	IL-13 (配列1)	89.4
DVD2684	TNF (配列1)	IL-13 (配列1)	91.6
DVD2686	TNF (配列1)	IL-13 (配列1)	96.2
DVD2687	TNF (配列1)	IL-13 (配列1)	88.9
DVD2688	IL-13 (配列1)	TNF (配列1)	76
DVD2689	IL-13 (配列1)	TNF (配列1)	77.7
DVD2691	IL-13 (配列1)	TNF (配列1)	80.2
DVD2692	IL-13 (配列1)	TNF (配列1)	72.7
DVD2733	TNF (配列2)	IL-13 (配列1)	97.3
DVD2734	TNF (配列2)	IL-13 (配列1)	86.4
DVD2736	TNF (配列2)	IL-13 (配列1)	91.1
DVD2737	TNF (配列2)	IL-13 (配列1)	85
DVD2738	IL-13 (配列1)	TNF (配列2)	53.7
DVD2739	IL-13 (配列1)	TNF (配列2)	55.2
DVD2741	IL-13 (配列1)	TNF (配列2)	54.8
DVD2742	IL-13 (配列1)	TNF (配列2)	48.9
DVD2783	TNF (配列3)	IL-13 (配列1)	79.2
DVD2784	TNF (配列3)	IL-13 (配列1)	76.6
DVD2786	TNF (配列3)	IL-13 (配列1)	77.9
DVD2787	TNF (配列3)	IL-13 (配列1)	74.8
DVD2788	IL-13 (配列1)	TNF (配列3)	56.5
DVD2789	IL-13 (配列1)	TNF (配列3)	59.6
DVD2791	IL-13 (配列1)	TNF (配列3)	61
DVD2792	IL-13 (配列1)	TNF (配列3)	61
DVD3008	TNF (配列4)	IL-13 (配列1)	84.9
DVD3009	TNF (配列4)	IL-13 (配列1)	79.9
DVD3011	TNF (配列4)	IL-13 (配列1)	77.2
DVD3012	TNF (配列4)	IL-13 (配列1)	75.2
DVD3013	IL-13 (配列1)	TNF (配列4)	49.1
DVD3014	IL-13 (配列1)	TNF (配列4)	68.9
DVD3016	IL-13 (配列1)	TNF (配列4)	69.4

10

20

30

40

DVD3017	IL-13 (配列1)	TNF (配列4)	72.1
DVD3083	TNF (配列1)	IL-13 (配列2)	91.7
DVD3084	TNF (配列1)	IL-13 (配列2)	97.8
DVD3086	TNF (配列1)	IL-13 (配列2)	95.8
DVD3087	TNF (配列1)	IL-13 (配列2)	94.3
DVD3088	IL-13 (配列2)	TNF (配列1)	67
DVD3089	IL-13 (配列2)	TNF (配列1)	79.5
DVD3091	IL-13 (配列2)	TNF (配列1)	76.3
DVD3092	IL-13 (配列2)	TNF (配列1)	86.6
DVD3093	TNF (配列2)	IL-13 (配列2)	93.4
DVD3094	TNF (配列2)	IL-13 (配列2)	93.5
DVD3096	TNF (配列2)	IL-13 (配列2)	97.5
DVD3097	TNF (配列2)	IL-13 (配列2)	93
DVD3098	IL-13 (配列2)	TNF (配列2)	76.4
DVD3099	IL-13 (配列2)	TNF (配列2)	59.8
DVD3101	IL-13 (配列2)	TNF (配列2)	57.4
DVD3102	IL-13 (配列2)	TNF (配列2)	59.6
DVD3103	TNF (配列3)	IL-13 (配列2)	75
DVD3104	TNF (配列3)	IL-13 (配列2)	78.3
DVD3106	TNF (配列3)	IL-13 (配列2)	81.9
DVD3107	TNF (配列3)	IL-13 (配列2)	80.1
DVD3108	IL-13 (配列2)	TNF (配列3)	53.7
DVD3109	IL-13 (配列2)	TNF (配列3)	56.3
DVD3111	IL-13 (配列2)	TNF (配列3)	76.6
DVD3112	IL-13 (配列2)	TNF (配列3)	58.1
DVD3113	TNF (配列4)	IL-13 (配列2)	84.8
DVD3114	TNF (配列4)	IL-13 (配列2)	90.9
DVD3116	TNF (配列4)	IL-13 (配列2)	91.3
DVD3118	IL-13 (配列2)	TNF (配列4)	66.4
DVD3119	IL-13 (配列2)	TNF (配列4)	65.1
DVD3121	IL-13 (配列2)	TNF (配列4)	73.5
DVD3122	IL-13 (配列2)	TNF (配列4)	68.9
DVD3143	TNF (配列1)	IL-13 (配列3)	96.3
DVD3144	TNF (配列1)	IL-13 (配列3)	97.3
DVD3146	TNF (配列1)	IL-13 (配列3)	99.4
DVD3147	TNF (配列1)	IL-13 (配列3)	87.5
DVD3153	TNF (配列2)	IL-13 (配列3)	97.90
DVD3154	TNF (配列2)	IL-13 (配列3)	98.00
DVD3156	TNF (配列2)	IL-13 (配列3)	98.40
DVD3157	TNF (配列2)	IL-13 (配列3)	90.50
DVD3158	IL-13 (配列3)	TNF (配列2)	100
DVD3163	TNF (配列3)	IL-13 (配列3)	93.7
DVD3164	TNF (配列3)	IL-13 (配列3)	94.6
DVD3166	TNF (配列3)	IL-13 (配列3)	88.7
DVD3167	TNF (配列3)	IL-13 (配列3)	76

10

20

30

40

DVD3168	IL-13 (配列3)	TNF (配列3)	100
DVD3169	IL-13 (配列3)	TNF (配列3)	70
DVD3173	TNF (配列4)	IL-13 (配列3)	86.9
DVD3174	TNF (配列4)	IL-13 (配列3)	88
DVD3176	TNF (配列4)	IL-13 (配列3)	88.2
DVD3177	TNF (配列4)	IL-13 (配列3)	65.9
AB048	PGE2 (配列1)		
AB131	PGE2 (AB016) 配列2		100
AB135	PGE2 (AB022) 配列3		100
DVD2693	TNF (配列1)	PGE2 (配列1)	92.2
DVD2694	TNF (配列1)	PGE2 (配列1)	94.3
DVD2696	TNF (配列1)	PGE2 (配列1)	98.2
DVD2697	TNF (配列1)	PGE2 (配列1)	96.4
DVD2698	PGE2 (配列1)	TNF (配列1)	97.3
DVD2699	PGE2 (配列1)	TNF (配列1)	96.4
DVD2701	PGE2 (配列1)	TNF (配列1)	96.3
DVD2702	PGE2 (配列1)	TNF (配列1)	94.1
DVD2743	TNF (配列2)	PGE2 (配列1)	96.7
DVD2744	TNF (配列2)	PGE2 (配列1)	98
DVD2746	TNF (配列2)	PGE2 (配列1)	100
DVD2747	TNF (配列2)	PGE2 (配列1)	98.6
DVD2748	PGE2 (配列1)	TNF (配列2)	98
DVD2749	PGE2 (配列1)	TNF (配列2)	97.3
DVD2751	PGE2 (配列1)	TNF (配列2)	97.6
DVD2752	PGE2 (配列1)	TNF (配列2)	98.5
DVD2793	TNF (配列3)	PGE2 (配列1)	75.4
DVD2794	TNF (配列3)	PGE2 (配列1)	64.5
DVD2796	TNF (配列3)	PGE2 (配列1)	75.5
DVD2797	TNF (配列3)	PGE2 (配列1)	98.6
DVD2798	PGE2 (配列1)	TNF (配列3)	98
DVD2799	PGE2 (配列1)	TNF (配列3)	97.3
DVD2801	PGE2 (配列1)	TNF (配列3)	97.6
DVD2802	PGE2 (配列1)	TNF (配列3)	98.5
DVD3018	TNF (配列4)	PGE2	75.4
DVD3019	TNF (配列4)	PGE2	64.5
DVD3021	TNF (配列4)	PGE2	75.5
DVD3022	TNF (配列4)	PGE2	76.7
DVD3023	PGE2	TNF (配列4)	98.1
DVD3024	PGE2	TNF (配列4)	97
DVD3026	PGE2	TNF (配列4)	98.6
DVD3027	PGE2	TNF (配列4)	98.9
DVD3203	TNF (配列1)	PGE2 (AB016) 配列2	86.1
DVD3204	TNF (配列1)	PGE2 (AB016) 配列2	95.2
DVD3206	TNF (配列1)	PGE2 (AB016) 配列2	84.9
DVD3207	TNF (配列1)	PGE2 (AB016) 配列2	86.2

10

20

30

40

DVD3208	PGE2 (AB016) 配列2	TNF (配列1)	95.6
DVD3209	PGE2 (AB016) 配列2	TNF (配列1)	95.4
DVD3211	PGE2 (AB016) 配列2	TNF (配列1)	87.3
DVD3212	PGE2 (AB016) 配列2	TNF (配列1)	90.8
DVD3213	TNF (配列2)	PGE2 (AB016) 配列2	95.3
DVD3214	TNF (配列2)	PGE2 (AB016) 配列2	97.6
DVD3216	TNF (配列2)	PGE2 (AB016) 配列2	91.4
DVD3217	TNF (配列2)	PGE2 (AB016) 配列2	93.9
DVD3218	PGE2 (AB016) 配列2	TNF (配列2)	96.9
DVD3219	PGE2 (AB016) 配列2	TNF (配列2)	97.3
DVD3221	PGE2 (AB016) 配列2	TNF (配列2)	91.4
DVD3222	PGE2 (AB016) 配列2	TNF (配列2)	93.9
DVD3223	TNF (配列3)	PGE2 (AB016) 配列2	75.8
DVD3224	TNF (配列3)	PGE2 (AB016) 配列2	88.7
DVD3226	TNF (配列3)	PGE2 (AB016) 配列2	80.9
DVD3227	TNF (配列3)	PGE2 (AB016) 配列2	78.8
DVD3228	PGE2 (AB016) 配列2	TNF (配列3)	93.4
DVD3229	PGE2 (AB016) 配列2	TNF (配列3)	93.5
DVD3231	PGE2 (AB016) 配列2	TNF (配列3)	83.8
DVD3232	PGE2 (AB016) 配列2	TNF (配列3)	93.6
DVD3233	TNF (配列4)	PGE2 (AB016) 配列2	73.1
DVD3234	TNF (配列4)	PGE2 (AB016) 配列2	74.6
DVD3236	TNF (配列4)	PGE2 (AB016) 配列2	67.5
DVD3237	TNF (配列4)	PGE2 (AB016) 配列2	70.8
DVD3238	PGE2 (AB016) 配列2	TNF (配列4)	92.3
DVD3239	PGE2 (AB016) 配列2	TNF (配列4)	95.5
DVD3241	PGE2 (AB016) 配列2	TNF (配列4)	91.7
DVD3242	PGE2 (AB016) 配列2	TNF (配列4)	96.6
DVD3263	TNF (配列1)	PGE2 (AB022) 配列3	82.8
DVD3264	TNF (配列1)	PGE2 (AB022) 配列3	
DVD3267	TNF (配列1)	PGE2 (AB022) 配列3	
DVD3273	TNF (配列2)	PGE2 (AB022) 配列3	100
DVD3274	TNF (配列2)	PGE2 (AB022) 配列3	100
DVD3276	TNF (配列2)	PGE2 (AB022) 配列3	100
DVD3277	TNF (配列2)	PGE2 (AB022) 配列3	
DVD3279	PGE2 (AB022) 配列3	TNF (配列2)	
DVD3283	TNF (配列3)	PGE2 (AB022) 配列3	83.4
DVD3284	TNF (配列3)	PGE2 (AB022) 配列3	91.4
DVD3286	TNF (配列3)	PGE2 (AB022) 配列3	
DVD3287	TNF (配列3)	PGE2 (AB022) 配列3	
DVD2713	TNF (配列1)	NGF	96.7
DVD2714	TNF (配列1)	NGF	92.4
DVD2716	TNF (配列1)	NGF	93.1
DVD2717	TNF (配列1)	NGF	84
DVD2718	NGF	TNF (配列1)	70.5

10

20

30

40

DVD2719	NGF	TNF (配列1)	68.2
DVD2721	NGF	TNF (配列1)	72.6
DVD2722	NGF	TNF (配列1)	72
DVD2763	TNF (配列2)	NGF	88.6
DVD2764	TNF (配列2)	NGF	85.9
DVD2766	TNF (配列2)	NGF	87.9
DVD2767	TNF (配列2)	NGF	85.50
DVD2768	NGF	TNF (配列2)	75.40
DVD2769	NGF	TNF (配列2)	73.60
DVD2771	NGF	TNF (配列2)	76.20
DVD2772	NGF	TNF (配列2)	72.60
DVD2813	TNF (配列3)	NGF	80.30
DVD2814	TNF (配列3)	NGF	76.20
DVD2816	TNF (配列3)	NGF	82.90
DVD2817	TNF (配列3)	NGF	78.3
DVD2818	NGF	TNF (配列3)	75
DVD2819	NGF	TNF (配列3)	74.9
DVD2821	NGF	TNF (配列3)	76.1
DVD2822	NGF	TNF (配列3)	78.7
DVD3038	TNF (配列4)	NGF	81.6
DVD3039	TNF (配列4)	NGF	74.2
DVD3041	TNF (配列4)	NGF	69.4
DVD3042	TNF (配列4)	NGF	66.2
DVD3043	NGF	TNF (配列4)	73.8
DVD3044	NGF	TNF (配列4)	69.9
DVD3046	NGF	TNF (配列4)	72.5
DVD3047	NGF	TNF (配列4)	72.6

10

20

【0224】

30

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

【0225】

SDS-PAGE

還元条件下および非還元条件下でドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によって抗体およびDVD-Igタンパク質を分析する。Adalimumab (ロットAFP04C) を対照として用いる。還元条件について、100mMのDTTを含む2×トリスグリシンSDS-PAGE試料緩衝液 (Invitrogen、カタログ#LC2676、ロット#1323208) と1:1で試料を混合し、60℃で30分間加熱する。非還元条件について、試料緩衝液と1:1で試料を混合し、100℃で5分間加熱する。還元試料 (10mg/レーン) を12%プレキャストのトリス-グリシングル (Invitrogen、カタログ#EC6005box、ロット#6111021) 上に装填し、非還元試料 (10mg/レーン) を8%~16%プレキャストのトリス-グリシングル (Invitrogen、カタログ#EC6045box、ロット#6111021) 上に装填する。SeeBlue Plus 2 (Invitrogen、カタログ#LC5925、ロット#1351542) を分子量マーカーとして用いる。ゲルをXCell SureLockミニセルゲルボックス (Invitrogen、カタログ#EI0001) に入れ、最初に、ゲル内の試料を積層するために電圧75を加え、次にダイフロン (dye front) がゲルの底に到達するまで定電圧1

40

50

25にしてタンパク質を分離する。使用される泳動緩衝液は1×トリスグリシンSDS緩衝液であり、10×トリスグリシンSDS緩衝液（ABC、MPS-79-080106）から調製される。コロイド状青色染色（Invitrogen、カタログ#46-7015、46-7016）を用いてゲルを一晩染色し、バックグラウンドを除くためにMilli-Q水で脱染する。次に、Epson Expressionスキャナー（モデル1680、S/N DAXX003641）を用いて、染色されたゲルをスキャンする。

【0226】

沈降速度分析

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

10

【0227】

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

20

試料細胞体積：420mL

基準細胞体積：420mL

温度：20℃

ローター速度：35,000rpm

時間：8:00時間

UV波長：280nm

半径刻み幅：0.003cm

データ回収：信号加算平均なしの1工程あたり1データポイント

スキャン総数：100

【0228】

完全な抗体のLC-MS分子量測定

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

40

【0229】

抗体およびDVD-Igタンパク質の軽鎖および重鎖のLC-MS分子量測定

抗体およびDVD-Igタンパク質の軽鎖（LC）、重鎖（HC）および脱グリコシル化されたHCの分子量測定をLC-MSによって分析する。水を用いて抗体およびDVD-Igタンパク質を1mg/mLに希釈し、試料は、最終濃度が10mMのDTTを用いて、30分間、37℃でLCおよびHCに還元される。抗体およびDVD-Igタンパク質を脱グリコシル化するために、100mgの抗体またはDVD-Igタンパク質は、100mLの全体積中の2mLのPNGase F、5mLの10%N-オクチルグルコシドとともに、一晩37℃にてインキュベートされる。脱グリコシル化後、最終濃度が10

50

mMのDTTを用いて、試料を30分間、37℃にて還元する。C4カラム（Vydac、カタログ#214TP5115、S/N060206537204069）を備えたAgilent 1100HPLCシステムを用いて脱塩し、試料（5mg）をAPI Qstarパルサーi質量分析計（Applied Biosystems）に導入する。短い勾配を用いて試料を溶出する。勾配は、移動相A（HPLC水中の0.08%FA、0.02%TFA）および移動相B（アセトニトリル中の0.08%FAおよび0.02%TFA）を用いて、50mL／分の流速にて勾配を実行する。質量分析計は、4.5キロボルトの噴霧電圧で操作され、スキャン範囲は800から3500の質量対電荷比である。

【0230】

ペプチドマッピング

75mM重炭酸アンモニウム中の最終濃度が6Mの塩酸グアニジンを用いて抗体またはDVD-Igタンパク質を15分間、室温にて変性させる。変性試料は、最終濃度が10mMのDTTを用いて、37℃、60分間還元させ、次に、暗所にて37℃、30分間、50mMヨード酢酸（IAA）を用いてアルキル化される。アルキル化後、4リットルの10mM重炭酸アンモニウムに対して、一晚4℃で試料を透析する。透析された試料は、10mM重炭酸アンモニウム、pH7.8を用いて1mg/mLに希釈され、100mgの抗体またはDVD-Igタンパク質は、1:20（w/w）トリプシン/Lys-C：抗体またはDVD-Igタンパク質の比でトリプシン（Promega、カタログ#V5111）またはLys-C（Roche、カタログ#11047825001）を用いて37℃で4時間消化される。消化物は、1NのHClを1mL用いてクエンチされる。質量分析計検出を用いたペプチドマッピングについて、40mLの消化物は、Agilent 1100HPLCシステムを備えた、C18カラム（Vydac、カタログ#218TP51、S/NNE960610.3.5）上で逆相高速液体クロマトグラフィー（RPHPLC）によって分離される。ペプチドの分離は、移動相A（HPLC等級の水中の0.02%TFAおよび0.08%FA）および移動相B（アセトニトリル中の0.02%TFAおよび0.08%FA）を使用する勾配を用いて、50mL／分の流速にて実行する。API QSTAR Pulsar i質量分析計は、4.5キロボルトの噴霧電圧のポジティブモードで操作され、スキャン範囲は800から2500の質量対電荷比である。

【0231】

ジスルフィド結合マッピング

抗体を変性するために、100mLの抗体またはDVD-Igタンパク質は、100mM重炭酸アンモニウム中の8MグアニジンHClの300mLと混合される。pHをチェックして、pHが7から8の間であることを確認し、最終濃度が6MのグアニジンHCl中で15分間、室温にて試料を変性させる。一部の变性試料（100mL）をMilli-Q水で600mLに希釈し、最終のグアニジン-HCl濃度を1Mとする。試料（220mg）は、1:50のトリプシン：抗体もしくはDVD-Igタンパク質または1:50のLys-C：抗体もしくはDVD-Igタンパク質（w/w）の比（4.4mg酵素：220mg試料）でトリプシン（Promega、カタログ#V5111、ロット#22265901）またはLys-C（Roche、カタログ#11047825001、ロット#12808000）を用いて37℃で約16時間消化される。さらに5mgのトリプシンまたはLys-Cを試料に添加し、消化をさらに2時間、37℃で進行させる。各試料に1mLのTFAを添加することによって消化を停止させる。消化された試料は、Agilent HPLCシステム上のC18カラム（Vydac、カタログ#218TP51、S/NNE020630-4-1A）を用いてRPHPLCによって分離される。分離は、移動相A（HPLC等級の水中の0.02%TFAおよび0.08%FA）および移動相B（アセトニトリル中の0.02%TFAおよび0.08%FA）を用いて、ペプチドマッピングについて使用されたものと同じ勾配で50mL／分の流速にて実行する。HPLCの操作条件は、ペプチドマッピングについて使用された条件と同じである

。API QSTAR Pulsar i 質量分析計は、4.5 キロボルトの噴霧電圧のポジティブモードで操作され、スキャン範囲は800から2500の質量対電荷比である。ジスルフィド結合は、ペプチドの実測されたMWと、ジスルフィド結合によって連結されたトリプシンまたはLys-Cペプチドの予測されたMWとを合致させることによって割り当てられる。

【0232】

遊離スルフヒドリル決定

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

DTNB + RSH (R) RS-TNB + TNB- + H+

において説明される。

【0233】

TNB-の吸光度は、Cary 50分光光度計を用いて、412 nmで測定される。吸光度曲線は、遊離SH標準として2メルカプトエタノール（b-ME）の希釈を用いてプロットし、タンパク質中の遊離スルフヒドリル基の濃度は、試料の412 nmでの吸光度から決定される。

【0234】

b-ME標準ストックは、最終濃度が0.142 mMになるように、HPLC等級の水を用いて14.2 Mのb-MEを連続希釈することによって調製される。次に、各濃度について3点測定の標準を調製する。アミコンウルトラ10,000 MWCO遠心フィルター（Millipore、カタログ#UFC801096、ロット#L3KN5251）を用いて抗体またはDVD-Igタンパク質を10 mg/mLに濃縮し、緩衝液をアダリムマブについて使用した処方緩衝液（5.57 mMリン酸一水素ナトリウム、8.69 mMリン酸二水素ナトリウム、106.69 mMのNaCl、1.07 mMクエン酸ナトリウム、6.45 mMクエン酸、66.68 mMマンニトール、pH 5.2、0.1%（w/v）Tween）に交換する。試料をシェーカー上で室温にて20分間混合する。次に、180 mLの100 mMのTris緩衝液、pH 8.1を各試料に添加し、標準は、10 mMリン酸緩衝液、pH 8.1中の2 mMのDTNBを300 mL添加する。完全に混合した後、Cary 50分光光度計上で412 nmの吸光度について試料および標準を測定する。遊離SHの量とb-ME標準のOD_{412 nm}をプロットすることによって、標準曲線を得る。試料の遊離SH含有量は、ブランクを差し引いた後、この曲線に基づいて計算される。

【0235】

弱い陽イオン交換クロマトグラフィー

10 mMリン酸ナトリウム、pH 6.0を用いて抗体またはDVD-Igタンパク質を1 mg/mLに希釈する。電荷異質性は、WCX-10 ProPac分析用カラム（Dionex、カタログ#054993、S/N02722）を備えたShimadzu HPLCシステムを用いて分析される。試料を80%移動相A（10 mMリン酸ナトリウム、pH 6.0）および20%移動相B（10 mMリン酸ナトリウム、500 mMのNaCl、pH 6.0）においてカラムに充填し、1.0 mL/分の流速で溶出する。

【0236】

オリゴ糖プロファイリング

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

【0237】

抗体またはDVD-Igタンパク質を最初にPNGase Fを用いて消化し、重鎖の

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

【0238】

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

【0239】

Prozymeから購入される2AB標識キット(カタログ#GKK-404、ロット#132026)を用いて、オリゴ糖を2ABで標識する。製造業者の使用説明書に従って標識試薬を調製する。酢酸(150 mL、キットにおいて提供される)をDMSOバイアル(キットにおいて提供される)に添加し、溶液を数回、上下にピペティングすることによって混合する。酢酸/DMSO混合物(100 mL)を2-AB色素のバイアル(使用直前)に移し、色素が完全に溶解するまで混合する。次に、色素溶液を還元剤(キットにおいて提供される)のバイアルに添加し、十分に混合に混合する(標識試薬)。標識試薬(5 mL)を各々乾燥させたオリゴ糖試料バイアルに添加し、完全に混合する。65℃で700~800 RPMに設定されたエッペンドルフのサーモミキサーに反応バイアルを置き、2時間反応させる。

【0240】

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

【0241】

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

【0242】

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

【0243】

高温での安定性

抗体またはDVD-Igタンパク質の緩衝液は、5.57 mMリン酸一水素ナトリウム、8.69 mMリン酸二水素ナトリウム、106.69 mMのNaCl、1.07 mMクエン酸ナトリウム、6.45 mMクエン酸、66.68 mMマンニトール、0.1%(w/v) Tween、pH 5.2; または10 mMヒスチジン、10 mMメチオニン、4%マンニトール、pH 5.9のいずれかであり、Amicon超遠心フィルターを用いる。適切な緩衝液を用いて、抗体またはDVD-Igタンパク質の最終濃度を2 mg/mLに調整する。次に、抗体またはDVD-Igタンパク質の溶液を濾過滅菌し、0.25 mLのアリコートが無菌条件下で調製する。アリコートを-80℃、5℃、25℃または40

10

20

30

40

50

℃で1、2または3週間放置する。インキュベーション期間の終わりに、サイズ排除クロマトグラフィーおよびSDS-PAGEによって試料を分析する。

【0244】

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

10

【0245】

動的走査蛍光光度法

DVD-Igタンパク質は、10mMクエン酸10mMリン酸緩衝液（pH6.0）中で透析され、1mg/mlの最終濃度を得た。3点測定は、それぞれのDVD-Igタンパク質について実施された。それぞれの試料について、27μlのDVD-Igタンパク質は、96ウェルプレートのウェルに添加され、3μlの4×希釈されたSYPROオレンジ色素（Invitrogen）とともに混合された。色素は、5000×濃度でDMF中に供給され、水で4×の作業濃度に希釈された。プレートは、30秒間遠心分離され、色素とタンパク質の両方が、ウェルの底に沈殿することを確保し、完全な混合がピペットチップにより穏やかな吸引によって確保された。次に、プレートは接着フィルムで密封された。

20

【0246】

リアルタイムPCR（Applied Biosciences、7500シリーズ）は、温度とともに蛍光強度の変化を測定するために使用された。プレートは、約0.5℃/分の温度ランプ速度にて、25℃から95℃まで加熱され、発光蛍光は、TAMRAフィルターを用いて回収された。データは、Microsoft Excelにエクスポートされ、それぞれのDVD-Igタンパク質について温度対蛍光としてプロットされた。融解の開始は、サーモグラムがベースライン蛍光を超えて上昇する温度として記述された。SYPROオレンジは疎水性色素であり、アンフォールディングタンパク質分子中の露出された疎水性残基に優先的に結合する。したがって、アンフォールディング温度の開始は、蛍光の増加によって測定され、DVD-Igタンパク質の熱安定性の指標である。DVD-Igタンパク質のアンフォールディング温度は、表12に見出すことができる。

30

【0247】

【表 1 3】

表 12: 動的走査蛍光光度法によって決定された DVD-Ig タンパク質の熱安定性

親抗体または DVD-Ig ID	N末端可変ドメイン(VD)	C末端可変ドメイン(VD)	T開始(°C)
DVD2683	TNF (配列1)	IL-13 (配列1)	58
DVD2684	TNF (配列1)	IL-13 (配列1)	58.2
DVD2686	TNF (配列1)	IL-13 (配列1)	64.3
DVD2687	TNF (配列1)	IL-13 (配列1)	57.9
DVD2691	IL-13 (配列1)	TNF (配列1)	59.2
DVD2734	TNF (配列2)	IL-13 (配列1)	64.31
DVD2736	TNF (配列2)	IL-13 (配列1)	65
DVD2737	TNF (配列2)	IL-13 (配列1)	65.5
DVD2742	IL-13 (配列1)	TNF (配列2)	
DVD2784	TNF (配列3)	IL-13 (配列1)	
DVD2786	TNF (配列3)	IL-13 (配列1)	
DVD2787	TNF (配列3)	IL-13 (配列1)	
DVD2789	IL-13 (配列1)	TNF (配列3)	
DVD2791	IL-13 (配列1)	TNF (配列3)	
DVD3009	TNF (配列4)	IL-13 (配列1)	63.3
DVD3011	TNF (配列4)	IL-13 (配列1)	
DVD3083	TNF (配列1)	IL-13 (配列2)	66.3
DVD3084	TNF (配列1)	IL-13 (配列2)	66.9
DVD3086	TNF (配列1)	IL-13 (配列2)	65.9
DVD3087	TNF (配列1)	IL-13 (配列2)	65
DVD3093	TNF (配列2)	IL-13 (配列2)	65.1
DVD3094	TNF (配列2)	IL-13 (配列2)	66
DVD3096	TNF (配列2)	IL-13 (配列2)	65.9
DVD3097	TNF (配列2)	IL-13 (配列2)	66.2
DVD3103	TNF (配列3)	IL-13 (配列2)	
DVD3106	TNF (配列3)	IL-13 (配列2)	64.1
DVD3107	TNF (配列3)	IL-13 (配列2)	65.1
DVD3113	TNF (配列4)	IL-13 (配列2)	65.6
DVD3143	TNF (配列1)	IL-13 (配列3)	63
DVD3144	TNF (配列1)	IL-13 (配列3)	62.6
DVD3146	TNF (配列1)	IL-13 (配列3)	61.8
DVD3147	TNF (配列1)	IL-13 (配列3)	61.5
DVD3154	TNF (配列2)	IL-13 (配列3)	63.3
DVD3156	TNF (配列2)	IL-13 (配列3)	61.4
DVD3157	TNF (配列2)	IL-13 (配列3)	62.5
DVD3163	TNF (配列3)	IL-13 (配列3)	62.4
DVD3164	TNF (配列3)	IL-13 (配列3)	63.4
DVD3166	TNF (配列3)	IL-13 (配列3)	60.8
DVD3167	TNF (配列3)	IL-13 (配列3)	
DVD3173	TNF (配列4)	IL-13 (配列3)	60.8
DVD3174	TNF (配列4)	IL-13 (配列3)	61.3
DVD3176	TNF (配列4)	IL-13 (配列3)	60.2

【 0 2 4 8】

大部分の DVD-Ig タンパク質は、アンフォールディング温度 > 50 °C を示した。こ

10

20

30

40

50

のDVD-Igタンパク質プロファイルは、親抗体について観察されたプロファイルと同様である。

【0249】

溶解度決定

DVD-Igタンパク質候補は、15mMのHis (pH 6.0) 中で透析された。これに続いて、30Kカットオフを有するセントリコンにおいて50 μ l までそれらを濃縮した。溶解度は、4℃での保存後、沈殿が存在しないことによって視覚的に確認し、280nmでUV吸光度を測定することによって定量的に決定された。

【0250】

【表 1 4】

表 13: DVD-Ig タンパク質の溶解度

親抗体またはDVD-Ig ID	N末端可変ドメイン(VD)	C末端可変ドメイン(VD)	視覚的観察	溶解度 (mg/mL)
DVD2683	TNF (配列1)	IL-13 (配列1)	透明	>248
DVD2684	TNF (配列1)	IL-13 (配列1)	透明	>154
DVD2686	TNF (配列1)	IL-13 (配列1)	透明	>124
DVD2687	TNF (配列1)	IL-13 (配列1)	透明	>131
DVD2691	IL-13 (配列1)	TNF (配列1)	透明	>110
DVD2734	TNF (配列2)	IL-13 (配列1)	透明	>168
DVD2736	TNF (配列2)	IL-13 (配列1)	透明	>189
DVD2737	TNF (配列2)	IL-13 (配列1)	透明	>165
DVD2742	IL-13 (配列1)	TNF (配列2)	透明	>78
DVD2784	TNF (配列3)	IL-13 (配列1)	透明	>93
DVD2786	TNF (配列3)	IL-13 (配列1)	透明	>75
DVD2787	TNF (配列3)	IL-13 (配列1)	透明	>80
DVD2789	IL-13 (配列1)	TNF (配列3)	透明	>114
DVD2791	IL-13 (配列1)	TNF (配列3)	透明	>83
DVD3009	TNF (配列4)	IL-13 (配列1)	透明	>64
DVD3011	TNF (配列4)	IL-13 (配列1)	透明	>60
DVD3083	TNF (配列1)	IL-13 (配列2)	透明	>128
DVD3084	TNF (配列1)	IL-13 (配列2)	透明	>36
DVD3086	TNF (配列1)	IL-13 (配列2)	透明	>108
DVD3087	TNF (配列1)	IL-13 (配列2)	透明	>174
DVD3093	TNF (配列2)	IL-13 (配列2)	透明	>162
DVD3094	TNF (配列2)	IL-13 (配列2)	透明	>134
DVD3096	TNF (配列2)	IL-13 (配列2)	透明	>118
DVD3097	TNF (配列2)	IL-13 (配列2)	透明	>161
DVD3103	TNF (配列3)	IL-13 (配列2)	透明	>103
DVD3106	TNF (配列3)	IL-13 (配列2)	透明	>171
DVD3107	TNF (配列3)	IL-13 (配列2)	透明	>185
DVD3113	TNF (配列4)	IL-13 (配列2)	透明	>83
DVD3143	TNF (配列1)	IL-13 (配列3)	透明	>160
DVD3144	TNF (配列1)	IL-13 (配列3)	透明	>174
DVD3146	TNF (配列1)	IL-13 (配列3)	透明	>148
DVD3147	TNF (配列1)	IL-13 (配列3)	透明	>83
DVD3154	TNF (配列2)	IL-13 (配列3)	透明	>179
DVD3156	TNF (配列2)	IL-13 (配列3)	透明	>179
DVD3157	TNF (配列2)	IL-13 (配列3)	透明	>142
DVD3163	TNF (配列3)	IL-13 (配列3)	透明	>250
DVD3164	TNF (配列3)	IL-13 (配列3)	透明	>229
DVD3166	TNF (配列3)	IL-13 (配列3)	透明	>160
DVD3167	TNF (配列3)	IL-13 (配列3)	透明	>81
DVD3173	TNF (配列4)	IL-13 (配列3)	透明	>128
DVD3174	TNF (配列4)	IL-13 (配列3)	透明	>90
DVD3176	TNF (配列4)	IL-13 (配列3)	透明	>64

大部分のDVD-Igタンパク質は、透明な外観を示し、25mg/mlを超えて濃縮され得た。このDVD-Igタンパク質プロファイルは、親抗体について観察されたプロファイルと同様である。

【0252】

参照による援用

本出願を通して引用されてもよい、すべての引用される参考資料（参考文献、特許、特許出願およびウェブサイトを含む）の内容は、これによって、これらの参考資料がそこに記載されているかのように、いずれかの目的で参考資料の全体を参照することにより明確に援用される。本開示は、別段の記載がない限り、当該技術分野において周知である免疫学、分子生物学および細胞生物学の従来技術を使用する。

10

【0253】

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

【0254】

【表15】

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);

20

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

- Giege, R. and Ducruix, A. Barrett, CRYSTALLIZATION OF NUCLEIC ACIDS AND PROTEINS, a Practical Approach, 2nd ea., pp. 20 1-16, Oxford University Press, New York, New York, (1999);
- Goodson, in MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE, vol. 2, pp. 115-138 (1984);
- Hammerling, et al., in: MONOCLONAL ANTIBODIES AND T-CELL HYBRIDOMAS 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981);
- Harlow et al., ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988);
- Kabat et al., SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) and (1991);
- Kabat, E.A., *et al.* (1991) SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242;
- Kontermann and Dubel eds., ANTIBODY ENGINEERING (2001) Springer-Verlag. New York. 790 pp. (ISBN 3-540-41354-5).
- Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990);
- Lu and Weiner eds., CLONING AND EXPRESSION VECTORS FOR GENE FUNCTION ANALYSIS (2001) BioTechniques Press. Westborough, MA. 298 pp. (ISBN 1-881299-21-X).
- MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974);
- Old, R.W. & S.B. Primrose, PRINCIPLES OF GENE MANIPULATION: AN INTRODUCTION TO GENETIC ENGINEERING (3d Ed. 1985) Blackwell Scientific Publications, Boston. Studies in Microbiology; V.2:409 pp. (ISBN 0-632-01318-4).
- Sambrook, J. et al. eds., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (2d Ed. 1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. Vols. 1-3. (ISBN 0-87969-309-6).
- SUSTAINED AND CONTROLLED RELEASE DRUG DELIVERY SYSTEMS, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978
- Winnacker, E.L. FROM GENES TO CLONES: INTRODUCTION TO GENE TECHNOLOGY (1987) VCH Publishers, NY (translated by Horst Ibelgauf). 634 pp. (ISBN 0-89573-614-4).

10

20

30

40

50

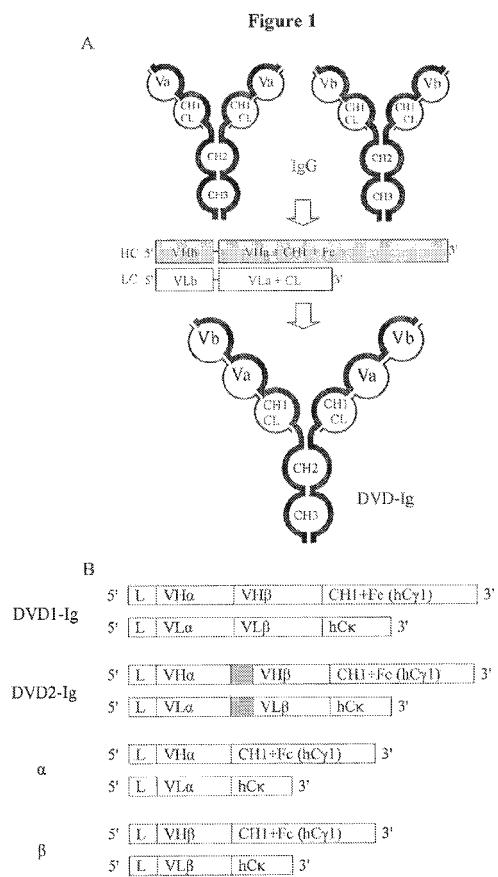
【 0 2 5 5 】

均等

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

特許請求の範囲の意味および均等の範囲内にあるすべての変更は本明細書に包含されることが意図される。

【図 1】



【配列表】

2016517277000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成27年11月12日(2015.11.12)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0001

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0001】

本出願は、35 U. S. C. 第119条の下で、2013年3月15日に出願した米国仮特許出願第61／794,964号の優先権の利益を主張し、この出願は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0196

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0196】

【表 2】

表 2: TNF および IL-13 に結合する DVD 結合タンパク質

配列番号	DVD-Ig可変ドメイン名	外側可変ドメイン名 (VD1)	リンカー	内側可変ドメイン名 (VD2)	配列番号式VD1-X1-VD2
120	DVD2683H	AB436VH	GS-H10	AB397VH	38-29-32
121	DVD2683L	AB436VL	GS-L10	AB397VL	39-30-33
122	DVD2684H	AB436VH	HG-短い	AB397VH	38-21-32
123	DVD2684L	AB436VL	LK-短い	AB397VL	39-13-33
124	DVD2686H	AB436VH	HG-短い	AB397VH	38-21-32
125	DVD2686L	AB436VL	LK-長い	AB397VL	39-14-33
126	DVD2687H	AB436VH	HG-長い	AB397VH	38-22-32
127	DVD2687L	AB436VL	LK-短い	AB397VL	39-13-33
128	DVD2688H	AB397VH	GS-H10	AB436VH	32-29-38
129	DVD2688L	AB397VL	GS-L10	AB436VL	33-30-39
130	DVD2689H	AB397VH	HG-短い	AB436VH	32-21-38
131	DVD2689L	AB397VL	LK-短い	AB436VL	33-13-39
132	DVD2691H	AB397VH	HG-短い	AB436VH	32-21-38
133	DVD2691L	AB397VL	LK-長い	AB436VL	33-14-39
134	DVD2692H	AB397VH	HG-長い	AB436VH	32-22-38
135	DVD2692L	AB397VL	LK-短い	AB436VL	33-13-39
136	DVD2733H	AB437VH	GS-H10	AB397VH	40-29-32
137	DVD2733L	AB437VL	GS-L10	AB397VL	41-30-33
138	DVD2734H	AB437VH	HG-短い	AB397VH	40-21-32
139	DVD2734L	AB437VL	LK-短い	AB397VL	41-13-33
140	DVD2736H	AB437VH	HG-短い	AB397VH	40-21-32
141	DVD2736L	AB437VL	LK-長い	AB397VL	41-14-33
142	DVD2737H	AB437VH	HG-長い	AB397VH	40-22-32
143	DVD2737L	AB437VL	LK-短い	AB397VL	41-13-33
144	DVD2738H	AB397VH	GS-H10	AB437VH	32-29-40
145	DVD2738L	AB397VL	GS-L10	AB437VL	33-30-41
146	DVD2739H	AB397VH	HG-短い	AB437VH	32-21-40
147	DVD2739L	AB397VL	LK-短い	AB437VL	33-13-41
148	DVD2741H	AB397VH	HG-短い	AB437VH	32-21-40
149	DVD2741L	AB397VL	LK-長い	AB437VL	33-14-41
150	DVD2742H	AB397VH	HG-長い	AB437VH	32-22-40
151	DVD2742L	AB397VL	LK-短い	AB437VL	33-13-41
152	DVD2783H	AB441VH	GS-H10	AB397VH	42-29-32
153	DVD2783L	AB441VL	GS-L10	AB397VL	43-30-33
154	DVD2784H	AB441VH	HG-短い	AB397VH	42-21-32

155	DVD2784L	AB441VL	LK-短い	AB397VL	43-13-33
156	DVD2786H	AB441VH	HG-短い	AB397VH	42-21-32
157	DVD2786L	AB441VL	LK-長い	AB397VL	43-14-33
158	DVD2787H	AB441VH	HG-長い	AB397VH	42-22-32
159	DVD2787L	AB441VL	LK-短い	AB397VL	43-13-33
160	DVD2788H	AB397VH	GS-H10	AB441VH	32-29-42
161	DVD2788L	AB397VL	GS-L10	AB441VL	33-30-43
162	DVD2789H	AB397VH	HG-短い	AB441VH	32-21-42
163	DVD2789L	AB397VL	LK-短い	AB441VL	33-13-43
164	DVD2791H	AB397VH	HG-短い	AB441VH	32-21-42
165	DVD2791L	AB397VL	LK-長い	AB441VL	33-14-43
166	DVD2792H	AB397VH	HG-長い	AB441VH	32-22-42
167	DVD2792L	AB397VL	LK-短い	AB441VL	33-13-43
168	DVD3008H	AB444VH	GS-H10	AB397VH	48-29-32
169	DVD3008L	AB444VL	GS-L10	AB397VL	49-30-33
170	DVD3009H	AB444VH	HG-短い	AB397VH	48-21-32
171	DVD3009L	AB444VL	LK-短い	AB397VL	49-13-33
172	DVD3011H	AB444VH	HG-短い	AB397VH	48-21-32
173	DVD3011L	AB444VL	LK-長い	AB397VL	49-14-33
174	DVD3012H	AB444VH	HG-長い	AB397VH	48-22-32
175	DVD3012L	AB444VL	LK-短い	AB397VL	49-13-33
176	DVD3013H	AB397VH	GS-H10	AB444VH	32-29-48
177	DVD3013L	AB397VL	GS-L10	AB444VL	33-30-49
178	DVD3014H	AB397VH	HG-短い	AB444VH	32-21-48
179	DVD3014L	AB397VL	LK-短い	AB444VL	33-13-49
180	DVD3016H	AB397VH	HG-短い	AB444VH	32-21-48
181	DVD3016L	AB397VL	LK-長い	AB444VL	33-14-49
182	DVD3017H	AB397VH	HG-長い	AB444VH	32-22-48
183	DVD3017L	AB397VL	LK-短い	AB444VL	33-13-49
184	DVD3083H	AB436VH	GS-H10	AB398VH	38-29-34
185	DVD3083L	AB436VL	GS-L10	AB398VL	39-30-35
186	DVD3084H	AB436VH	HG-短い	AB398VH	38-21-34
187	DVD3084L	AB436VL	LK-短い	AB398VL	39-13-35
188	DVD3086H	AB436VH	HG-短い	AB398VH	38-21-34
189	DVD3086L	AB436VL	LK-長い	AB398VL	39-14-35
190	DVD3087H	AB436VH	HG-長い	AB398VH	38-22-34
191	DVD3087L	AB436VL	LK-短い	AB398VL	39-13-35
192	DVD3088H	AB398VH	GS-H10	AB436VH	34-29-38
193	DVD3088L	AB398VL	GS-L10	AB436VL	35-30-39
194	DVD3089H	AB398VH	HG-短い	AB436VH	34-21-38
195	DVD3089L	AB398VL	LK-短い	AB436VL	35-13-39
196	DVD3091H	AB398VH	HG-短い	AB436VH	34-21-38

197	DVD3091L	AB398VL	LK-長い	AB436VL	35-14-39
198	DVD3092H	AB398VH	HG-長い	AB436VH	34-22-38
199	DVD3092L	AB398VL	LK-短い	AB436VL	35-13-39
200	DVD3093H	AB437VH	GS-H10	AB398VH	40-29-38
201	DVD3093L	AB437VL	GS-L10	AB398VL	41-30-39
202	DVD3094H	AB437VH	HG-短い	AB398VH	40-21-38
203	DVD3094L	AB437VL	LK-短い	AB398VL	41-13-39
204	DVD3096H	AB437VH	HG-短い	AB398VH	40-21-38
205	DVD3096L	AB437VL	LK-長い	AB398VL	41-14-39
206	DVD3097H	AB437VH	HG-長い	AB398VH	40-22-38
207	DVD3097L	AB437VL	LK-短い	AB398VL	41-13-39
208	DVD3098H	AB398VH	GS-H10	AB437VH	34-29-40
209	DVD3098L	AB398VL	GS-L10	AB437VL	35-30-41
210	DVD3099H	AB398VH	HG-短い	AB437VH	34-21-40
211	DVD3099L	AB398VL	LK-短い	AB437VL	35-13-41
212	DVD3101H	AB398VH	HG-短い	AB437VH	34-21-40
213	DVD3101L	AB398VL	LK-長い	AB437VL	35-14-41
214	DVD3102H	AB398VH	HG-長い	AB437VH	34-22-40
215	DVD3102L	AB398VL	LK-短い	AB437VL	35-13-41
216	DVD3103H	AB441VH	GS-H10	AB398VH	42-29-38
217	DVD3103L	AB441VL	GS-L10	AB398VL	43-30-39
218	DVD3104H	AB441VH	HG-短い	AB398VH	42-21-38
219	DVD3104L	AB441VL	LK-短い	AB398VL	43-13-39
220	DVD3106H	AB441VH	HG-短い	AB398VH	42-21-38
221	DVD3106L	AB441VL	LK-長い	AB398VL	43-14-39
222	DVD3107H	AB441VH	HG-長い	AB398VH	42-22-38
223	DVD3107L	AB441VL	LK-短い	AB398VL	43-13-39
224	DVD3108H	AB398VH	GS-H10	AB441VH	34-29-42
225	DVD3108L	AB398VL	GS-L10	AB441VL	35-30-43
226	DVD3109H	AB398VH	HG-短い	AB441VH	34-21-42
227	DVD3109L	AB398VL	LK-短い	AB441VL	35-13-43
228	DVD3111H	AB398VH	HG-短い	AB441VH	34-21-42
229	DVD3111L	AB398VL	LK-長い	AB441VL	35-14-43
230	DVD3112H	AB398VH	HG-長い	AB441VH	34-22-42
231	DVD3112L	AB398VL	LK-短い	AB441VL	35-13-43
232	DVD3113H	AB444VH	GS-H10	AB398VH	48-29-38
233	DVD3113L	AB444VL	GS-L10	AB398VL	49-30-39
234	DVD3114H	AB444VH	HG-短い	AB398VH	48-21-38
235	DVD3114L	AB444VL	LK-短い	AB398VL	49-13-39
236	DVD3116H	AB444VH	HG-短い	AB398VH	48-21-38
237	DVD3116L	AB444VL	LK-長い	AB398VL	49-14-39
238	DVD3117H	AB444VH	HG-長い	AB398VH	48-22-38

239	DVD3117L	AB444VL	LK-短い	AB398VL	49-13-39
240	DVD3118H	AB398VH	GS-H10	AB444VH	34-29-48
241	DVD3118L	AB398VL	GS-L10	AB444VL	35-30-49
242	DVD3119H	AB398VH	HG-短い	AB444VH	34-21-48
243	DVD3119L	AB398VL	LK-短い	AB444VL	35-13-49
244	DVD3121H	AB398VH	HG-短い	AB444VH	34-21-48
245	DVD3121L	AB398VL	LK-長い	AB444VL	35-14-49
246	DVD3122H	AB398VH	HG-長い	AB444VH	34-22-48
247	DVD3122L	AB398VL	LK-短い	AB444VL	35-13-49
248	DVD3143H	AB436VH	GS-H10	AB399VH	38-29-36
249	DVD3143L	AB436VL	GS-L10	AB399VL	39-30-37
250	DVD3144H	AB436VH	HG-短い	AB399VH	38-21-36
251	DVD3144L	AB436VL	LK-短い	AB399VL	39-13-37
252	DVD3146H	AB436VH	HG-短い	AB399VH	38-21-36
253	DVD3146L	AB436VL	LK-長い	AB399VL	39-14-37
254	DVD3147H	AB436VH	HG-長い	AB399VH	38-22-36
255	DVD3147L	AB436VL	LK-短い	AB399VL	39-13-37
256	DVD3153H	AB437VH	GS-H10	AB399VH	40-29-36
257	DVD3153L	AB437VL	GS-L10	AB399VL	41-30-37
258	DVD3154H	AB437VH	HG-短い	AB399VH	40-21-36
259	DVD3154L	AB437VL	LK-短い	AB399VL	41-13-37
260	DVD3156H	AB437VH	HG-短い	AB399VH	40-21-36
261	DVD3156L	AB437VL	LK-長い	AB399VL	41-14-37
262	DVD3157H	AB437VH	HG-長い	AB399VH	40-22-36
263	DVD3157L	AB437VL	LK-短い	AB399VL	41-13-37
264	DVD3158H	AB399VH	GS-H10	AB437VH	36-29-40
265	DVD3158L	AB399VL	GS-L10	AB437VL	37-30-41
266	DVD3159H	AB399VH	HG-短い	AB437VH	36-21-40
267	DVD3159L	AB399VL	LK-短い	AB437VL	37-13-41
268	DVD3163H	AB441VH	GS-H10	AB399VH	42-29-36
269	DVD3163L	AB441VL	GS-L10	AB399VL	43-30-37
270	DVD3164H	AB441VH	HG-短い	AB399VH	42-21-36
271	DVD3164L	AB441VL	LK-短い	AB399VL	43-13-37
272	DVD3166H	AB441VH	HG-短い	AB399VH	42-21-36
273	DVD3166L	AB441VL	LK-長い	AB399VL	43-14-37
274	DVD3167H	AB441VH	HG-長い	AB399VH	42-22-36
275	DVD3167L	AB441VL	LK-短い	AB399VL	43-13-37
276	DVD3168H	AB399VH	GS-H10	AB441VH	36-29-42
277	DVD3168L	AB399VL	GS-L10	AB441VL	37-30-43
278	DVD3169H	AB399VH	HG-短い	AB441VH	36-21-42
279	DVD3169L	AB399VL	LK-短い	AB441VL	37-13-43
280	DVD3173H	AB444VH	GS-H10	AB399VH	48-29- <u>36</u>

281	DVD3173L	AB444VL	GS-L10	AB399VL	49-30-37
282	DVD3174H	AB444VH	HG-短い	AB399VH	48-21-36
283	DVD3174L	AB444VL	LK-短い	AB399VL	49-13-37
284	DVD3176H	AB444VH	HG-短い	AB399VH	48-21-36
285	DVD3176L	AB444VL	LK-長い	AB399VL	49-14-37
286	DVD3177H	AB444VH	HG-長い	AB399VH	48-22-36
287	DVD3177L	AB444VL	LK-短い	AB399VL	49-13-37

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0200

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0200】

【表 5】

表4a: ヒトIgG重鎖および軽鎖定常ドメイン

タンパク質	配列番号	配列
		12345678901234567890123456789012345678901234567890123
野生型 hlgG1 定常領域	<u>504</u>	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE <u>LL</u> GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
変異体 hlgG1 定常領域 (IgG1, z, non-a mut(234, 235))	<u>505</u>	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE <u>AA</u> GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
Igカッパ 定常領域	<u>506</u>	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Igラムダ 定常領域	<u>507</u>	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2014/028646

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/22 C07K16/26 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/065882 A1 (ABBOTT LAB [US]; JAKOB CLARISSA G [US]; WU CHENGBIN [US]; WALTER KARL) 10 June 2010 (2010-06-10) the whole document	1-34
A	WO 2010/006060 A2 (ABBOTT LAB [US]; GHAYUR TARIQ [US]; GU JIJIE [US]; ISAKSON PETER C [US]) 14 January 2010 (2010-01-14) page 8 - page 10	1-34
A	WO 2011/047262 A2 (ABBOTT LAB [US]; GHAYUR TARIQ [US]; KAMATH RAJESH V [US]; LIU JUNJIAN) 21 April 2011 (2011-04-21) page 8 - page 9	1-34
	----- -/--	
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
7 August 2014		17/10/2014
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Pérez-Mato, Isabel

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2014/028646**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.:

1-34(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 SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2014/028646

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2012/034160 A1 (GHAYUR TARIQ [US] ET AL) 9 February 2012 (2012-02-09) the whole document in particular, page 41, paragraph 327 -----	1-34
Y	WU CHENGBIN ET AL: "Simultaneous targeting of multiple disease mediators by a dual-variable-domain immunoglobulin", NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 25, no. 11, 1 November 2007 (2007-11-01), pages 1290-1297, XP009110104, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/NBT1345 the whole document -----	1-34

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2014/028646

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010065882 A1	10-06-2010	AU 2009322236 A1	23-06-2011
		CA 2745271 A1	10-06-2010
		CN 102300879 A	28-12-2011
		EP 2373692 A1	12-10-2011
		JP 2012510821 A	17-05-2012
		KR 20110097913 A	31-08-2011
		NZ 593314 A	28-03-2013
		RU 2011127198 A	10-01-2013
		SG 171812 A1	28-07-2011
		US 2010233079 A1	16-09-2010
		WO 2010065882 A1	10-06-2010
WO 2010006060 A2	14-01-2010	AU 2009268585 A1	14-01-2010
		CA 2729949 A1	14-01-2010
		CN 102149825 A	10-08-2011
		EP 2321422 A2	18-05-2011
		JP 2011527580 A	04-11-2011
		KR 20110031369 A	25-03-2011
		NZ 590074 A	21-12-2012
		NZ 603698 A	28-03-2014
		RU 2011104348 A	20-08-2012
		SG 192489 A1	30-08-2013
		TW 201012475 A	01-04-2010
		US 2010074900 A1	25-03-2010
WO 2011047262 A2	21-04-2011	WO 2010006060 A2	14-01-2010
		AR 078651 A1	23-11-2011
		AU 2010306677 A1	31-05-2012
		CA 2775959 A1	21-04-2011
		CN 102666875 A	12-09-2012
		CO 6541597 A2	16-10-2012
		CR 20120248 A	14-08-2012
		DO P2012000104 A	31-01-2013
		EP 2488658 A2	22-08-2012
		GT 201200109 A	11-09-2013
		JP 2013507928 A	07-03-2013
		KR 20140015139 A	06-02-2014
US 2012034160 A1	09-02-2012	PE 15312012 A1	22-12-2012
		RU 2012119756 A	20-11-2013
		TW 201119676 A	16-06-2011
		US 2011091463 A1	21-04-2011
		UY 32948 A	28-02-2011
		WO 2011047262 A2	21-04-2011
		AR 082461 A1	12-12-2012
		AU 2011285852 A1	14-03-2013
		CA 2807014 A1	09-02-2012
		CN 103298834 A	11-09-2013
		CO 6680687 A2	31-05-2013
		CR 20130058 A	12-06-2013
		DO P2013000025 A	31-01-2014
		EP 2601218 A2	12-06-2013
		JP 2013537415 A	03-10-2013
		KR 20130100118 A	09-09-2013
		PE 14122013 A1	19-01-2014
		RU 2013109275 A	10-09-2014
		SG 188190 A1	30-04-2013
		TW 201206473 A	16-02-2012

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2014/028646

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2012034160 A1	09-02-2012
		US 2014219912 A1	07-08-2014
		US 2014220019 A1	07-08-2014
		US 2014234208 A1	21-08-2014
		UY 33543 A	29-02-2012
		WO 2012018790 A2	09-02-2012

International Application No. PCT/US2014/028646

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-34(partially)

directed to a binding protein comprising first and second polypeptide chains, each independently comprising VD1-(X1)n-VD2-C-X2, wherein VD1 is a first variable domain; VD2 is a second variable domain; C is a constant domain; X1 is a linker; X2 is an Fc region that is either present or absent; n is 0 or 1, wherein the VD1 domains on the first and second polypeptide chains form a first functional target binding site and the VD2 domains on the first and second polypeptide chains form a second functional target binding site, and wherein the binding protein is capable of binding TNF-alpha and IL-13.

2. claims: 1-34(partially)

directed to a binding protein comprising first and second polypeptide chains, each independently comprising VD1-(X1)n-VD2-C-X2, wherein VD1 is a first variable domain; VD2 is a second variable domain; C is a constant domain; X1 is a linker; X2 is an Fc region that is either present or absent; n is 0 or 1, wherein the VD1 domains on the first and second polypeptide chains form a first functional target binding site and the VD2 domains on the first and second polypeptide chains form a second functional target binding site, and wherein the binding protein is capable of binding TNF-alpha and PGE2.

3. claims: 1-34(partially)

directed to a binding protein comprising first and second polypeptide chains, each independently comprising VD1-(X1)n-VD2-C-X2, wherein VD1 is a first variable domain; VD2 is a second variable domain; C is a constant domain; X1 is a linker; X2 is an Fc region that is either present or absent; n is 0 or 1, wherein the VD1 domains on the first and second polypeptide chains form a first functional target binding site and the VD2 domains on the first and second polypeptide chains form a second functional target binding site, and wherein the binding protein is capable of binding TNF-alpha and NGF.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード (参考)

4H045

C 1 2 N 1/19 (2006.01)
 C 1 2 N 1/21 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)
 A 6 1 K 47/42 (2006.01)
 A 6 1 K 47/48 (2006.01)
 A 6 1 P 19/02 (2006.01)
 A 6 1 P 17/00 (2006.01)
 A 6 1 P 1/04 (2006.01)
 A 6 1 P 3/10 (2006.01)
 A 6 1 P 5/14 (2006.01)
 A 6 1 P 11/06 (2006.01)
 A 6 1 P 37/08 (2006.01)
 A 6 1 P 17/06 (2006.01)
 A 6 1 P 37/06 (2006.01)
 A 6 1 P 9/10 (2006.01)
 A 6 1 P 7/02 (2006.01)
 A 6 1 P 13/12 (2006.01)
 A 6 1 P 1/16 (2006.01)
 A 6 1 P 27/02 (2006.01)
 A 6 1 P 31/04 (2006.01)
 A 6 1 P 7/00 (2006.01)
 A 6 1 P 31/00 (2006.01)
 A 6 1 P 33/00 (2006.01)
 A 6 1 P 25/14 (2006.01)
 A 6 1 P 25/16 (2006.01)
 A 6 1 P 25/28 (2006.01)
 A 6 1 P 7/06 (2006.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 A 6 1 P 9/00 (2006.01)
 A 6 1 P 17/14 (2006.01)
 A 6 1 P 31/10 (2006.01)
 A 6 1 P 37/02 (2006.01)
 A 6 1 P 31/20 (2006.01)
 A 6 1 P 31/14 (2006.01)
 A 6 1 P 15/00 (2006.01)
 A 6 1 P 11/00 (2006.01)
 A 6 1 P 29/00 (2006.01)
 A 6 1 P 21/00 (2006.01)
 A 6 1 P 5/18 (2006.01)
 A 6 1 P 25/00 (2006.01)
 A 6 1 P 7/04 (2006.01)
 A 6 1 P 25/24 (2006.01)
 A 6 1 P 25/18 (2006.01)
 A 6 1 P 35/02 (2006.01)
 A 6 1 P 1/18 (2006.01)
 A 6 1 P 11/02 (2006.01)

C 1 2 N 1/19
 C 1 2 N 1/21
 C 1 2 N 5/10
 A 6 1 K 39/395
 A 6 1 K 39/395
 A 6 1 K 47/42
 A 6 1 K 47/48
 A 6 1 K 39/395
 A 6 1 K 39/395
 A 6 1 P 19/02
 A 6 1 P 17/00
 A 6 1 P 1/04
 A 6 1 P 3/10
 A 6 1 P 5/14
 A 6 1 P 11/06
 A 6 1 P 37/08
 A 6 1 P 17/06
 A 6 1 P 37/06
 A 6 1 P 9/10
 A 6 1 P 7/02
 A 6 1 P 13/12
 A 6 1 P 1/16
 A 6 1 P 27/02
 A 6 1 P 31/04
 A 6 1 P 7/00
 A 6 1 P 31/00
 A 6 1 P 31/04
 A 6 1 P 7/00
 A 6 1 P 31/00
 A 6 1 P 33/00
 A 6 1 P 25/14
 A 6 1 P 25/16
 A 6 1 P 25/28
 A 6 1 P 7/06
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 P 25/14
 A 6 1 P 31/10
 A 6 1 P 37/02
 A 6 1 P 31/20
 A 6 1 P 17/14
 A 6 1 P 31/10
 A 6 1 P 37/02
 A 6 1 P 31/20
 A 6 1 P 31/14
 A 6 1 P 15/00
 A 6 1 P 11/00
 A 6 1 P 29/00
 A 6 1 P 21/00
 A 6 1 P 5/18
 A 6 1 P 25/00
 A 6 1 P 7/04

C
 L
 D
 N

1 0 1

1 0 1

A 6 1 P	17/02	(2006.01)	A 6 1 P	25/24
A 6 1 P	9/06	(2006.01)	A 6 1 P	25/18
A 6 1 P	27/14	(2006.01)	A 6 1 P	35/02
A 6 1 P	5/00	(2006.01)	A 6 1 P	1/18
A 6 1 P	31/18	(2006.01)	A 6 1 P	11/02
A 6 1 P	19/10	(2006.01)	A 6 1 P	17/02
A 6 1 P	3/14	(2006.01)	A 6 1 P	9/06
A 6 1 P	17/10	(2006.01)	A 6 1 P	27/14
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	A 6 1 P	5/00
			A 6 1 P	31/18
			A 6 1 P	19/10
			A 6 1 P	3/14
			A 6 1 P	17/10
			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,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,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,HR,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

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA61 CA01 CA12 DA01 DA02 DA05 DA11 EA04
GA11
4B064 AG26 CA19 CC24 DA01 DA13
4B065 AA01X AA57X AA87X AB01 BA02 CA25 CA44 CA46
4C076 CC41 EE41 EE59 FF31 FF34
4C085 AA13 AA14 AA21 CC01 CC08 DD62 EE01
4H045 AA11 AA30 BA41 CA40 DA75 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	针对TNFα的双特异性结合蛋白		
公开(公告)号	JP2016517277A	公开(公告)日	2016-06-16
申请号	JP2016502858	申请日	2014-03-14
[标]申请(专利权)人(译)	阿布维公司		
申请(专利权)人(译)	AVVI公司		
[标]发明人	ガユールタリク グッドローキャリー		
发明人	ガユール,タリク グッドロー,キャリー		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/24 C07K16/46 C12P21/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K39/395 A61K47/42 A61K47/48 A61P19/02 A61P17/00 A61P1/04 A61P3/10 A61P5/14 A61P11/06 A61P37/08 A61P17/06 A61P37/06 A61P9/10 A61P7/02 A61P13/12 A61P1/16 A61P27/02 A61P31/04 A61P7/00 A61P31/00 A61P33/00 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P7/06 A61P35/00 A61P9/00 A61P17/14 A61P31/10 A61P37/02 A61P31/20 A61P31/14 A61P15/00 A61P11/00 A61P29/00 A61P21/00 A61P5/18 A61P25/00 A61P7/04 A61P25/24 A61P25/18 A61P35/02 A61P1/18 A61P11/02 A61P17/02 A61P9/06 A61P27/14 A61P5/00 A61P31/18 A61P19/10 A61P3/14 A61P17/10 G01N33/53		
CPC分类号	A61K45/06 A61K47/6879 A61K51/109 A61P1/04 A61P1/16 A61P1/18 A61P3/14 A61P11/00 A61P11/02 A61P11/06 A61P13/12 A61P15/00 A61P17/00 A61P17/02 A61P17/06 A61P17/10 A61P17/14 A61P19/02 A61P19/10 A61P21/00 A61P25/00 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/24 A61P25/28 A61P27/02 A61P27/14 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/14 A61P31/18 A61P31/20 A61P33/00 A61P35/00 A61P35/02 C07K16/22 C07K16/241 C07K16/244 C07K16/26 C07K2317/31 C07K2317/35 C07K2317/56 C07K2317/64 C07K2317/76 C07K2317/92 C07K2317/94 C07K2319/00 G01N33/6863 G01N33/6869 Y02A50/58		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/24 C07K16/46 C12P21/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K39/395.C A61K39/395.L A61K47/42 A61K47/48 A61K39/395.D A61K39/395.N A61P19/02 A61P17/00 A61P1/04 A61P3/10 A61P5/14 A61P11/06 A61P37/08 A61P17/06 A61P37/06 A61P9/10.101 A61P7/02 A61P13/12 A61P1/16 A61P27/02 A61P31/04 A61P7/00 A61P31/00 A61P33/00 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/28 A61P7/06 A61P35/00 A61P9/00 A61P9/10 A61P17/14 A61P31/10 A61P37/02 A61P31/20 A61P31/14 A61P15/00 A61P11/00 A61P29/00.101 A61P21/00 A61P29/00 A61P5/18 A61P25/00 A61P7/04 A61P25/24 A61P25/18 A61P35/02 A61P1/18 A61P11/02 A61P17/02 A61P9/06 A61P27/14 A61P5/00 A61P31/18 A61P19/10 A61P3/14 A61P17/10 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA61 4B024/CA01 4B024/CA12 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA04 4B024/GA11 4B064/AG26 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C076/CC41 4C076/EE41 4C076/EE59 4C076/FF31 4C076/FF34 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA21 4C085/CC01 4C085/CC08 4C085/DD62 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	61/794964 2013-03-15 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了与TNFα，IL-13，PGE2和/或NGF结合的基因工程多价和多特异性结合蛋白，以及制备和用于疾病预防，诊断和/或治疗的方法。

