

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

第1および第2ポリペプチド鎖を含んでなる単離された多重特異性エピトープ結合性タンパク質であって、該第1および／または第2鎖が少なくとも2つのエピトープ結合性ドメイン（EBD）および1以上のFc領域を含む、タンパク質。

【請求項 2】

該第1鎖が、少なくとも1つのEBDのN末端側に連結された1以上のFc領域を含む、請求項1記載のタンパク質。

【請求項 3】

該第1鎖が、N末端からC末端へと、1以上のFc領域-EBD-EBD、として配置されたドメインおよびFc領域を含む、請求項2記載のタンパク質。

10

【請求項 4】

該第1鎖が、N末端からC末端へと、EBD-1以上のFc領域-EBD、として配置されたドメインおよびFc領域を含む、請求項2記載のタンパク質。

【請求項 5】

該第1鎖が、少なくとも1つのEBDのC末端側に連結された1以上のFc領域を含む、請求項1記載のタンパク質。

【請求項 6】

該第1鎖が、N末端からC末端へと、EBD-EBD-1以上のFc領域、として配置されたドメインおよびFc領域を含む、請求項5記載のタンパク質。

20

【請求項 7】

該第1鎖が、N末端からC末端へと、EBD-1以上のFc領域-EBD-EBD、として配置されたドメインおよびFc領域を含む、請求項5記載のタンパク質。

【請求項 8】

該第2鎖が、少なくとも1つのEBDのN末端側に連結された1以上のCκまたはCλ領域を含む、請求項1記載のタンパク質。

【請求項 9】

該第2鎖が、少なくとも1つのEBDのC末端側に連結された1以上のCκまたはCλ領域を含む、請求項1記載のタンパク質。

【請求項 10】

該第1および／または第2鎖が少なくとも3つのEBDを含む、請求項1記載のタンパク質。

30

【請求項 11】

該第1および／または第2鎖が少なくとも4つのエピトープ結合性ドメインEBDを含む、請求項10記載のタンパク質。

【請求項 12】

各Fc領域が少なくとも3つのEBDのN末端側に連結されている、請求項10または11記載のタンパク質。

【請求項 13】

該ドメインおよびFc領域がN末端からC末端へと、1以上のFc領域-EBD-EBD-EBD、として配置されている、請求項12記載のタンパク質。

40

【請求項 14】

該ドメインおよびFc領域がN末端からC末端へと、1以上のFc領域-EBD-EBD-EBD-EBD、として配置されている、請求項12記載のタンパク質。

【請求項 15】

各Fc領域が少なくとも1つのEBDのC末端側に連結されている、請求項10または11記載のタンパク質。

【請求項 16】

該ドメインおよびFc領域がN末端からC末端へと、EBD-EBD-EBD-1以上のFc領域、として配置されている、請求項15記載のタンパク質。

【請求項 17】

50

該ドメインおよびFc領域がN末端からC末端へと、EBD-EBD-EBD-EBD-1以上のFc領域、として配置されている、請求項16記載のタンパク質。

【請求項18】

各Fc領域が少なくとも1つのEBDのN末端側におよび少なくとも1つのEBDのC末端側に連結されている、請求項10または11記載のタンパク質。

【請求項19】

該ドメインおよびFc領域がN末端からC末端へと、少なくとも1つのEBD-1以上のFc領域-少なくとも1つのEBD、として配置されている、請求項18記載のタンパク質。

【請求項20】

該ドメインおよびFc領域がN末端からC末端へと、EBD-EBD-1以上のFc領域-EBD、として配置されている、請求項18記載のタンパク質。

10

【請求項21】

該ドメインおよびFc領域がN末端からC末端へと、EBD-EBD-1以上のFc領域-EBD-EBD-EBD、として配置されている、請求項18記載のタンパク質。

【請求項22】

該ドメインおよびFc領域がN末端からC末端へと、EBD-EBD-EBD-1以上のFc領域-EBD、として配置されている、請求項18記載のタンパク質。

【請求項23】

該ドメインおよびFc領域がN末端からC末端へと、EBD-EBD-1以上のFc領域-EBD-EBD、として配置されている、請求項18記載のタンパク質。

20

【請求項24】

該ドメインおよびFc領域がN末端からC末端へと、EBD-1以上のFc領域-EBD-EBD-EBD、として配置されている、請求項18記載のタンパク質。

【請求項25】

該第1ポリペプチド鎖が、N末端からC末端へと、scFv-scFv-Fc領域-scFv、として配置された3つのscFvおよびFc領域を含み、また該第2ポリペプチド鎖が、N末端からC末端へと、scFv-scFv-Fc領域-scFvとして配置された3つのscFvおよびFc領域を含む、請求項10記載のタンパク質。

【請求項26】

該第1ポリペプチド鎖が、N末端からC末端へと、scFv-scFv-Fc領域-scFv-scFv、として配置された4つのscFvおよびFc領域を含み、また該第2ポリペプチド鎖が、N末端からC末端へと、scFv-scFv-Fc領域-scFv-scFv、として配置された4つのscFvおよびFc領域を含む、請求項11記載のタンパク質。

30

【請求項27】

該タンパク質が第1および第2鎖を含み、

a. 該第1鎖が、N末端からC末端へと、scFv-抗体可変領域-Fc領域、として配置されたscFv、抗体可変領域およびFc領域を含み、

b. 該第2鎖が、N末端からC末端へと、抗体可変領域-C κ またはC λ 、として配置された抗体可変領域およびC κ ／ラムダ領域を含む、請求項1記載のタンパク質。

【請求項28】

40

該タンパク質が第1および第2鎖を含み、

a. 該第1鎖が、N末端からC末端へと、抗体可変領域-Fc領域、として配置された抗体可変領域およびFc領域を含み、

b. 該第2鎖が、N末端からC末端へと、scFv-抗体可変領域-C κ またはC λ 、として配置されたscFv、抗体可変領域およびC κ ／ラムダ領域を含む、

請求項1記載のタンパク質。

【請求項29】

該タンパク質が第1および第2鎖を含み、

a. 該第1鎖が、N末端からC末端へと、scFv-抗体可変領域-Fc領域、として配置されたscFv、抗体可変領域およびFc領域を含み、

50

b. 該第2鎖が、N末端からC末端へと、scFv-抗体可変領域-C κ またはC λ 、として配置されたscFv、抗体可変領域およびC κ ／ラムダ領域を含む、請求項1記載のタンパク質。

【請求項30】

少なくとも2つのEBDが少なくとも1つのFc領域のC末端側に連結されている、請求項27～29のいずれか1項記載のタンパク質。

【請求項31】

該タンパク質が抗体重鎖および抗体軽鎖を含む、請求項27～30のいずれか1項記載のタンパク質。

【請求項32】

第1および第2ポリペプチド鎖を含んでなる多重特異性エピトープ結合性タンパク質であって、該第1および／または第2鎖が少なくとも2つのEBDおよび1以上のCH1ドメインを含む、タンパク質。

10

【請求項33】

該タンパク質がC κ ／ラムダドメインを更に含む、請求項32記載のタンパク質。

【請求項34】

該第1鎖が、N末端からC末端へと、scFv-CH1-scFv、として配置されたCH1ドメインに連結された2つのscFvを含み、該第2鎖が、N末端からC末端へと、scFv-C κ ／ラムダ-scFv、として配置されたC κ ／ラムダドメインに連結された2つのscFvを含む、請求項33記載のタンパク質。

【請求項35】

20

該第1および／または第2鎖が抗体ヒンジドメインの全部または一部を含む、請求項34記載のタンパク質。

【請求項36】

該第1および第2ポリペプチド鎖がジスルフィド結合により連結されている、請求項35記載のタンパク質。

【請求項37】

少なくとも第1および第2鎖を含んでなる多重特異性エピトープ結合性タンパク質であって、該第1鎖が2つの可変ドメインおよびC κ またはC λ ドメインを含み、該第2鎖が2つの可変ドメイン、CH1、ヒンジ、CH2およびCH3ドメインを含み、ここで、該第1鎖内の可変ドメインが該第2鎖内の可変ドメインに結合し少なくとも2つの異なるエピトープ結合性部位を形成している、多重特異性エピトープ結合性タンパク質。

30

【請求項38】

該第1鎖が、N末端からC末端へと配置された第1エピトープおよび第2エピトープに特異的な可変ドメインを含み、該第2鎖が、N末端からC末端へと配置された該第1および第2エピトープに特異的な可変ドメインを含む、請求項37記載のタンパク質。

【請求項39】

第1および第2鎖を含んでなる多重特異性エピトープ結合性タンパク質であって、該第1鎖が少なくとも2つの抗体可変ドメインおよび少なくとも1つのCH1および／またはC κ ／ラムダドメインを含み、ここで、該第1鎖内の可変ドメインが該第2鎖内の可変ドメインに結合し少なくとも2つの異なるエピトープ結合性部位を形成している、多重特異性エピトープ結合性タンパク質。

40

【請求項40】

該第1鎖が抗体重鎖可変ドメイン（VH）、CH1ドメイン、抗体軽鎖可変ドメイン（VL）およびC κ ／ラムダドメインを含む、請求項39記載のタンパク質。

【請求項41】

該第1鎖がN末端からC末端へと、VH-CH1-VL-C κ ／ラムダ、として構成されている、請求項40記載のタンパク質。

【請求項42】

該第1鎖がN末端からC末端へと、VL-C κ ／ラムダ-VH1-CH1、として構成されている、請求項40記載のタンパク質。

50

【請求項 4 3】

該第1鎖が2つの抗体重鎖可変ドメイン（VH）および2つのCH1ドメインを含む、請求項39記載のタンパク質。

【請求項 4 4】

該第1鎖がN末端からC末端へと、VH-CH1-VH-CH1、として構成されている、請求項43記載のタンパク質。

【請求項 4 5】

該第1鎖が2つの抗体軽鎖可変ドメイン（VL）および2つのC kappa / ラムダドメインを含む、請求項39記載のタンパク質。

【請求項 4 6】

該第1鎖がN末端からC末端へと、VL-C kappa / ラムダ-VL-C kappa / ラムダ、として構成されている、請求項45記載のタンパク質。

【請求項 4 7】

該第1鎖がFc領域を更に含む、請求項39～46のいずれか1項記載のタンパク質。

【請求項 4 8】

該第2鎖がFc領域を含まない、請求項39～46のいずれか1項記載のタンパク質。

【請求項 4 9】

少なくとも第1および第2ポリペプチド鎖を含んでなる逆転（inverted）抗体タンパク質であって、該第1鎖が、CH1ドメインに連結された少なくとも1つの抗体重鎖可変領域（VH）を含み、該第2鎖が、C kappa / ラムダドメインに連結された抗体軽鎖可変領域（VL）を含み、該C kappa / ラムダ領域が更にFc領域に連結されており、ここで、該第1鎖内の可変領域が該第2鎖内の可変領域に結合しエピトープ結合性部位を形成している、タンパク質。

【請求項 5 0】

該第1鎖が該第2鎖にジスルフィド結合している、請求項49記載のタンパク質。

【請求項 5 1】

抗体様軽鎖および抗体様重鎖を含んでなる多重特異性エピトープ結合性タンパク質であって、該軽鎖が2つの可変ドメインおよびC kappa またはC lambda ドメインを含み、該重鎖が2つの可変ドメイン、CH1、ヒンジ、CH2およびCH3ドメインを含み、ここで、該軽鎖内の可変ドメインが該重鎖内の可変ドメインに結合し少なくとも2つの異なるエピトープ結合性部位を形成している、タンパク質。

【請求項 5 2】

該軽鎖が、N末端からC末端へと配置された、第1エピトープおよび第2エピトープに特異的な可変ドメインを含み、該重鎖が、N末端からC末端へと配置された、該第1および第2エピトープに特異的な可変ドメインを含む、請求項51記載のタンパク質。

【請求項 5 3】

該タンパク質が、少なくとも2つの連結されたEBDを更に含む、請求項52記載のタンパク質。

【請求項 5 4】

少なくとも1つのEBDが該重鎖のC末端に連結されている、請求項53記載のタンパク質。

【請求項 5 5】

少なくとも1つのEBDが該軽鎖のN末端に連結されている、請求項53記載のタンパク質。

【請求項 5 6】

少なくとも1つのEBDが該重鎖のN末端に連結されている、請求項53記載のタンパク質。

【請求項 5 7】

抗体軽鎖および抗体重鎖を含んでなる多重特異性エピトープ結合性タンパク質であって、該重鎖が、少なくとも2つの連結されたEBDを更に含む、タンパク質。

【請求項 5 8】

少なくとも1つのEBDが該重鎖のC末端に連結されている、請求項57記載のタンパク質。

【請求項 5 9】

10

20

30

40

50

少なくとも1つのEBDが該重鎖のN末端に連結されている、請求項57記載のタンパク質。

【請求項 60】

少なくとも1つのEBDが該重鎖のN末端およびC末端に連結されている、請求項57記載のタンパク質。

【請求項 6 1】

第1および第2ポリペプチド鎖を含んでなる多重特異性エピトープ結合性タンパク質であって、該第1および／または第2鎖が少なくとも3つのEBDを含み、該第1鎖がC κ またはC λ ドメインを含み、該第2鎖がCH1ドメインを含む、タンパク質。

【請求項 6 2】

図1～5のいずれか1つに示される構造形態を含んでなる多重特異性エピトープ結合性タンパク質。

【請求項 6 3】

各EBDが同一エピトープに特異的である、請求項1～24、30～36、または53～61のいずれか1項記載のタンパク質。

【請求項 64】

少なくとも2つのEBDが、異なるエピトープに特異的である、請求項1～24、30～36、または53～61のいずれか1項記載のタンパク質。

【請求項 65】

各エピトープが同一抗原上に位置する、請求項63または64記載のタンパク質。

【請求項 6 6】

各エピトープが、異なる抗原上に位置する、請求項65記載のタンパク質。

【請求項 67】

2以上のEBDが同一エピソードに特異的である、請求項1～24、30～36、または53～61のいずれか1項記載のタンパク質。

【請求項 68】

該タンパク質が、哺乳動物に投与された際またはin vitroにおいて、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つのエピトープに同時に結合できる、請求項1～67のいずれか1項記載のタンパク質。

【請求項 69】

少なくとも1つのEBDが、同一の単離された機能性EBDよりも低いアフィニティでエピトープに特異的に結合する、請求項1～24、30～36、または53～61のいずれか1項記載のタンパク質。

【請求項 7 0】

該EBDが、最もN末端側のEBD、N末端から2番目のEBDおよびN末端から3番目のEBDよりなる群から選ばれる、請求項69記載のタンパク質。

【請求項 7 1】

少なくとも1つのEBDが、scFv、一本鎖ダイアボディ、抗体模倣体 (mimetic) および抗体可変ドメインよりなる群から選ばれる、請求項1～24、30～36、53～61、63～67および69～70のいずれか1項記載のタンパク質。

【請求項 7 2】

該抗体模倣体が、ミニボディ (minibody)、マキシボディ (maxybody)、アビマー (avimer)、Fn3に基づくタンパク質スカフォールド、アンクリンリピート、VASPポリペプチド、鳥類臍ポリペプチド (aPP)、テトラネクチン (Tetranectin)、アフィリリン (affilililn)、ノッチン (knottin)、SH3、PDZドメイン、プロテインAドメイン、リポカリン (lipocalin)、トランスフェリンおよびクニツ (kunitz) ドメインよりなる群から選ばれる、請求項71記載のタンパク質。

【請求項 7 3】

該タンパク質が、異なる細胞表面受容体に特異的に結合し、該細胞表面受容体を阻害し
および／または中和する、請求項1～72のいずれか1項記載のタンパク質。

【請求項 7 4】

該細胞表面受容体が同一の受容体である、請求項73記載のタンパク質。

【請求項75】

該細胞表面受容体が同一の受容体ではない、請求項74記載のタンパク質。

【請求項76】

該タンパク質が、異なる可溶性リガンドに特異的に結合し、該リガンドを阻害しおよび／または中和する、請求項1～75のいずれか1項記載のタンパク質。

【請求項77】

該可溶性リガンドが同一である、請求項76記載のタンパク質。

【請求項78】

該可溶性リガンドが同一ではない、請求項76記載のタンパク質。

10

【請求項79】

該タンパク質が、異なる標的タンパク質に特異的に結合し、該標的タンパク質を阻害しおよび／または中和する、請求項1～78のいずれか1項記載のタンパク質。

【請求項80】

該標的タンパク質が同一である、請求項79記載のタンパク質。

【請求項81】

該標的タンパク質が同一ではない、請求項79記載のタンパク質。

【請求項82】

少なくとも1つのEBDが、該タンパク質から単離された同一EBDの機能活性を保持する、請求項1～24、30～36、53～61、63～67および69～70のいずれか1項記載のタンパク質。

20

【請求項83】

該タンパク質が、該タンパク質から単離された各EBDを含む組成物と少なくとも同等の機能活性を有する、請求項1～24、30～36、53～61、63～67および69～70のいずれか1項記載のタンパク質。

【請求項84】

該タンパク質が、該タンパク質から単離された各EBDを含む組成物よりも高い機能活性を有する、請求項1～24、30～36、53～61、63～67および69～70のいずれか1項記載のタンパク質。

【請求項85】

該タンパク質が、該タンパク質から単離された各EBDを含む組成物と比べて50%低い機能活性を有する、請求項1～24、30～36、53～61、63～67および69～70のいずれか1項記載のタンパク質。

30

【請求項86】

該タンパク質が、T細胞、B細胞、マスト細胞、好酸球、好塩基球、好中球、樹状細胞、単球、マクロファージおよび腫瘍細胞よりなる群から選ばれる細胞集団を枯渇させる機能活性を有する、請求項1～85のいずれか1項記載のタンパク質。

【請求項87】

該タンパク質が、T細胞、B細胞、マスト細胞、好酸球、好塩基球、好中球、樹状細胞、単球、マクロファージおよび腫瘍細胞よりなる群から選ばれる細胞の増殖を阻害または低減させる機能活性を有する、請求項1～85のいずれか1項記載のタンパク質。

40

【請求項88】

該タンパク質が、T細胞、B細胞、マスト細胞、好酸球、好塩基球、好中球、樹状細胞、単球、マクロファージおよび腫瘍細胞よりなる群から選ばれる細胞からの炎症伝達物質の分泌を阻害または低減させる機能活性を有する、請求項1～85のいずれか1項記載のタンパク質。

【請求項89】

該タンパク質が、T細胞、マスト細胞、好酸球、好塩基球、好中球、単球およびマクロファージよりなる群から選ばれる細胞からの細胞質顆粒の分泌を阻害または低減させる機能活性を有する、請求項1～85のいずれか1項記載のタンパク質。

【請求項90】

50

該タンパク質が、T細胞、B細胞、マスト細胞、好酸球、好塩基球、好中球、樹状細胞、単球、マクロファージおよび腫瘍細胞よりなる群から選ばれる細胞における活性化刺激に対する応答を阻害または低減させる機能活性を有する、請求項1～85のいずれか1項記載のタンパク質。

【請求項 9 1】

該タンパク質が、1以上のエピトープの結合によりタンパク質を活性化する機能活性を有する、請求項1～85のいずれか1項記載のタンパク質。

【請求項 9 2】

該タンパク質が、1以上のエピトープの結合によりタンパク質を不活性化する機能活性を有する、請求項1～85のいずれか1項記載のタンパク質。

10

【請求項 9 3】

該タンパク質が、哺乳動物に投与された場合またはin vitroにおいて、エフェクター機能を有する、請求項1～85のいずれか1項記載のタンパク質。

【請求項 9 4】

該エフェクター機能が抗体依存性細胞傷害である、請求項93記載のタンパク質。

【請求項 9 5】

該エフェクター機能が補体依存性細胞傷害である、請求項93記載のタンパク質。

【請求項 9 6】

請求項1～95のいずれか1項記載のタンパク質またはそのエピトープ結合性部分をコードする単離された核酸分子。

20

【請求項 9 7】

請求項96記載の核酸分子を含んでなる発現ベクター。

【請求項 9 8】

請求項97記載の発現ベクターを含んでなる宿主細胞。

【請求項 9 9】

請求項1～95のいずれか1項記載のタンパク質の製造方法であって、該製造方法が該タンパク質の規模拡張可能な製造プロセスを含んでなり、そのような規模拡張可能な製造プロセスが約10mg/L～約300mg/Lの該タンパク質の製造効率をもたらし、該タンパク質が少なくとも1つの機能活性を保持する、方法。

【請求項 1 0 0】

30

該製造プロセスから製造されたタンパク質が、HPSECによる測定で5重量%以下のタンパク質の凝集レベルを示す、請求項99記載の方法。

【請求項 1 0 1】

該製造プロセスにより製造されたタンパク質が、rCGEによる測定で5重量%以下のタンパク質の凝集レベルを示す、請求項99記載の方法。

【請求項 1 0 2】

該製造プロセスにより製造されたタンパク質が、HPSECによる測定で、無傷の該タンパク質に相当するピークにおける全ピーク面積の80%以上として示される低レベルの断片化を示す、請求項99記載の方法。

【請求項 1 0 3】

40

請求項1～95のいずれか1項記載のタンパク質を含んでなる液体製剤であって、該製剤がHPSECによる測定で5重量%以下のタンパク質の凝集レベルを示す、液体製剤。

【請求項 1 0 4】

請求項1～95のいずれか1項記載のタンパク質を含んでなる液体製剤であって、該製剤がrCGEによる測定で5重量%以下のタンパク質の凝集レベルを示す、液体製剤。

【請求項 1 0 5】

請求項1～95のいずれか1項記載のタンパク質を含んでなる液体製剤であって、該製剤が、HPSECによる測定で、無傷の該タンパク質に相当するピークにおける全ピーク面積の80%以上として示される低レベルの断片化を示す、液体製剤。

【請求項 1 0 6】

50

製薬上許容される賦形剤中に請求項1～95のいずれか1項記載のタンパク質の治療的有效量を含んでなる無菌製剤。

【請求項107】

癌またはその症状の改善、治療または予防方法であって、それを要する患者に、請求項106記載の製剤を投与することによる方法。

【請求項108】

該癌が、頭部、頸部、眼、口、喉、食道、胸部、骨、肺、結腸、直腸、結腸直腸、胃、脾臓、腎臓部、骨格筋、皮下組織、転移性メラノーマ、子宮内膜、前立腺、乳房、卵巣、精巣、皮膚、甲状腺、血液、リンパ節、腎臓、肝臓、膵臓、脳または中枢神経系の癌である、請求項107記載の方法。

10

【請求項109】

好酸球、好塩基球、好中球、T細胞、B細胞、マスト細胞、単球および腫瘍細胞よりなる群から選ばれる細胞集団を、哺乳動物において枯渇させる方法であって、該細胞を請求項106記載の製剤と接触させることを含んでなる方法。

【請求項110】

哺乳動物中の病原体を請求項106記載の製剤と接触させることを含んでなる、該病原体を殺すかまたは標的化する方法。

【請求項111】

哺乳動物中のサイトカインを請求項106記載の製剤と接触させることを含んでなる、サイトカインを不活性化し、阻害し、または枯渇させる方法。

20

【請求項112】

該サイトカインがC5aである、請求項111記載の方法。

【請求項113】

請求項106記載の製剤を投与することによる、必要のある患者における炎症または自己免疫疾患の予防、治療、管理または診断方法。

【請求項114】

請求項106記載の製剤を投与することによる、必要のある患者における血管新生の抑制方法。

【請求項115】

該患者が癌、関節リウマチ、SLEまたはシェーグレン症候群を有する、請求項113または114記載の方法。

30

【請求項116】

該タンパク質が、哺乳動物に投与された場合またはin vitroで細胞の集団を同定しおよび／または枯渇させるものであり、該細胞が、異なる細胞表面エピトープの発現により規定され、そのような異なる細胞表面エピトープは該タンパク質の少なくとも1つのエピトープ結合性ドメインに選択的に結合する、請求項1～95のいずれか1項記載のタンパク質。

【請求項117】

該細胞集団が、腫瘍細胞、癌幹細胞、B細胞およびT細胞よりなる群から選ばれる、請求項116記載のタンパク質。

【請求項118】

該タンパク質が、腫瘍細胞上に提示される細胞表面抗原群に特異的なエピトープ結合性ドメインを含む、請求項1～95のいずれか1項記載のタンパク質。

40

【請求項119】

該細胞表面抗原群が同時には提示されない、請求項118記載のタンパク質。

【請求項120】

該タンパク質が哺乳動物に投与される場合、少なくとも1つのエピトープ結合性ドメインが関与する場合に該タンパク質が腫瘍細胞に対する抗体エフェクター機能を惹起する、請求項118または119記載のタンパク質。

【請求項121】

該タンパク質が少なくとも1つのエピトープ結合性ドメインを含み、該タンパク質が哺乳

50

乳動物に投与された場合またはin vitroにおいて、該結合性ドメインが、細胞に送達されるべき積荷分子に特異的である、請求項1~95のいずれか1項記載のタンパク質。

【請求項122】

該積荷分子が、細胞毒性薬、代謝拮抗物質、毒素、ペプチド、DNA分子、RNA分子、小分子、放射性同位体、発蛍光団、酵素、酵素インヒビター、プロドラッグまたはミトコンドリア毒よりなる群から選ばれる、請求項121記載のタンパク質。

【請求項123】

該タンパク質が、該細胞に結合するとインターナリゼーションされる、請求項121または122記載のタンパク質。

【請求項124】

積荷分子に特異的なエピトープ結合性ドメインが、約pH7.4において該積荷分子に対する高い結合アフィニティを示し、約pH6.0において該積荷分子に対する低い結合アフィニティを示す、請求項121~123のいずれか1項記載のタンパク質。

【請求項125】

標的細胞集団を同定し、枯渇させ、活性化し、または抑制する方法であって、請求項1~95のいずれか1項記載のタンパク質を、哺乳動物に投与された場合またはin vitroにおいて、標的細胞集団と接触させることを含んでなり、ここで該タンパク質が非標的細胞集団を有意に枯渇させず、活性化せず、または抑制しない、方法。

【請求項126】

該タンパク質が、対照エピトープ結合性タンパク質よりも増加した、標的細胞集団に対するアビディティを示し、ここで該対照エピトープ結合性タンパク質が、

- a. 該多重特異性エピトープ結合性タンパク質中に存在するエピトープ結合性ドメインのサブセット、または
 - b. 該多重特異性エピトープ結合性タンパク質中に存在する少なくとも1つの単離されたエピトープ結合性ドメイン
- のいずれかを含む、請求項125記載の方法。

【請求項127】

該サブセットが、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、または少なくとも8つのエピトープ結合性ドメインを含む、請求項126記載の方法。

【請求項128】

該標的細胞が、癌細胞、癌幹細胞、T細胞、B細胞、メラノーマ細胞、リンパ腫細胞、腫瘍細胞、プレB細胞、プレT細胞、好塩基球、単球およびマクロファージよりなる群から選ばれる、請求項125~127のいずれか1項記載の方法。

【請求項129】

請求項1~95または116~124のいずれか1項記載のタンパク質を使用する、患者における急性または慢性疾患の予防、管理、治療または診断方法。

【請求項130】

請求項107~115または125~128のいずれか1項記載の方法を使用する、患者における急性または慢性疾患の予防、管理、治療または診断方法。

【請求項131】

アブリン、ブルシン、シクトキシン、ジフテリア毒素、ボツリヌス毒素、志賀毒素、内毒素、破傷風毒素、百日咳毒素、炭疽毒素、コレラ毒素、ファルカリノール (falcarinol)、アルファ毒素、ゲルダナマイシン (geldanamycin)、ゲロニン、ロタウストラリン (lotaustralin)、リシン、ストリキニーネ、ヘビ毒毒素およびテトラドトキシンよりなる群から選ばれる1以上の物質への曝露に関連した毒性を低減するための、哺乳動物における請求項1~95または116~124のいずれか1項記載のタンパク質の使用法。

【請求項132】

請求項1~95または116~124のいずれか1項記載のタンパク質を使用して、溶液から少なくとも1つの可溶性化合物を検出および／または精製する方法。

10

20

30

40

50

【請求項133】

該溶液が体液、細胞培養培地、発酵培養液、生物学的サンプルまたは飲料水である、請求項132記載の方法。

【請求項134】

該体液が、血液、汗、リンパ液、尿、涙、胆汁、唾液、血清、羊水、耳脂（耳垢）、カウパー液、精液、乳び、び汁、脳脊髄液、糞便、糞便水、腓液、滑液、眼房水、腸液、母乳、粘液、胸水、膿、皮脂および嘔吐物よりなる群から選ばれる、請求項133記載の方法。

【請求項135】

請求項1～95または116～124のいずれか1項記載のタンパク質を使用する、哺乳動物におけるサイトカインストームの毒性の低減方法。

10

【請求項136】

請求項1～95または116～124のいずれか1項記載のタンパク質を使用する、哺乳動物における療法誘発性毒性の低減方法であって、該療法が生物学的療法である、方法。

【請求項137】

該タンパク質が、該生物学的療法に由来する少なくとも1つのエピトープ結合性ドメインを含む、請求項136記載の方法。

【請求項138】

該タンパク質が、該生物学的療法の少なくとも1つの成分と競合する少なくとも1つのエピトープ結合性ドメインを含む、請求項136記載の方法。

20

【請求項139】

該タンパク質が、哺乳動物に投与された場合に少なくとも1日の半減期を示す、請求項1～95または116～124のいずれか1項記載のタンパク質。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

1. 発明の分野

本発明は、多重特異性エピトープ結合性タンパク質、その製造方法、および急性または慢性疾患の予防、管理、治療または診断におけるその使用に関する。

【背景技術】

30

【0002】

2. 発明の背景

1以上の抗原に結合しうるFab、scFv、ダイアボディ、トリボディおよびテトラボディのような抗体フラグメントは多数の臨床用途に適合しうる。これらのタイプのエピトープ結合性タンパク質は抗原に対する結合特異性を保持するが、結合抗原に対する免疫応答を刺激する機能的能力を欠く。すなわち、それらはエフェクター機能を欠く。

【0003】

価数、すなわち、個々の抗体分子が結合しうる抗原決定基の数を増加させるための試みは二重特異性抗体（BsAb）の開発につながった（例えば、Jimenezら Molecular Cancer Therapeutics 2005:4(3)427-434, Luら J. of Immun. Methods 1999:230, 159-171ならびに米国特許公開番号20070014794および20050100543を参照されたい）。BsAbは、同じまたは異なる抗原上の2つの異なるエピトープに結合する免疫グロブリン（Ig）に基づく分子である。該抗体は、例えば、腫瘍細胞抗原およびエフェクター細胞（例えば、活性化T細胞）または機能性物質（例えば、細胞毒）に特異的でありうるであろう。二重特異性T細胞EngagersまたはBiTE（商標）分子はBsAbの一種であり、これらは臨床用途に有用であることが示されている（例えば、米国特許第7,112,324号を参照されたい）。

40

【0004】

特異性を、2つを超える異なる抗原に対するものへと増加させるための試みは、生じるタンパク質を環化するためにジスルフィド結合により連結されうるヒンジ領域ドメインに隣接する3つの異なるscFvドメインから構成される三重特異性抗体様構造体の製造につな

50

がった（米国特許公開番号20050175606を参照されたい）。しかし、環化するのに単一のジスルフィド結合に頼っているため、該抗体様構造体の安定性が問題となっている。

【0005】

治療用物質としてのBsAbのような多重エピトープ結合性抗体の開発における大きな障害は、臨床研究に十分な量および質で抗体を製造するのが困難なことである。特に、2組の重鎖および軽鎖を発現する細胞を作製するために2つの異なるハイブリドーマを融合させるハイブリッドハイブリドーマおよび化学的コンジュゲート化（Carterら（1995）J. Hematotherapy 4:463-70）を含む伝統的な方法は不適當である。

【0006】

例えば、ハイブリッドハイブリドーマにおける2つの異なる組のIgG軽および重鎖の共発現は10個までの軽鎖および重鎖ペアを産生することが可能であり、これらのペアのうちの1つのみが機能性二重特異性ヘテロ二量体を形成する（Sureshら（1986）Methods Enzymol. 121:210-28）。ホモ二量体ならびに非コグネイトIg軽鎖および重鎖の誤対形成ヘテロ二量体のような非機能性種からの該抗体の精製は面倒であり、非効率的である。

【0007】

2つのIgGまたはそれらのフラグメントの化学的架橋も非効率的であり、抗体活性の喪失を招きうる（Zhuら（1994）Cancer Lett. 86:127-34）。ハイブリッドハイブリドーマアプローチと同様に、化学的コンジュゲート化から生じる多量体凝集物のような非機能性種からの該抗体の精製はしばしば困難であり、通常、収率は低い（Caoら（1998）Bioconj. Chem. 9:635-44）。

【0008】

多重エピトープ結合性抗体の製造の効率を改善するために、種々の組換え方法が開発されている。例えば、抗体フラグメント（Carterら（1995）; Pluckthunら（1997）Immunotechnology 3:83-105; Todorovskaら（2001）J. Immunol. Methods 248:47-66）および完全長IgG形態（Carter（2001）J. Immunol. Methods 248:7-15）の両方としてのBsAbの効率的製造方法が開発されている。例えば、効率的なIg CH3ドメインヘテロ二量体化のためのいわゆる「ノブ・イントゥ・ホール（knobs-into-holes）」操作により（Ridgwayら 1996 Protein Eng. 9:617-21; Merchantら 1998 Nat. Biotech. 16:677-81）、および異なる特異性の一本鎖Fv（scFv）を完全長IgG分子のNまたはC末端上に融合させることにより（Zhuangら Protein Eng. 2000 13:361-7; ColomaおよびMorrison Nat. Biotechnol. 1997 15:159-63）、均一な完全長IgG様BsAbの製造が達成されている。また、ダイアボディ（Holligerら（1993）Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1998 90:6444-8; Zhuら Bio/Technology (NY) 1996 14:192-6）、Fab-scFv融合（Schoonjansら J. Immunol. 2000 165:7050-7）および小型抗体（mini-antibody）形態（Packら Biochemistry 1992 31:1579-84; Packら Bio/Technology 1993 11:1271-7）により、ロイシンジッパー（Kostelnyら J. Immunol. 1992 148:1547-53; de Kruifら J. Biol. Chem. 1996 271:7630-4）およびIg C λ /CH1ドメイン（Mullerら FEBS Lett. 422:259-64）のような二量体化装置を介して柔軟なリンカーを使用してまたは使用せずに（Mallenderら J. Biol. Chem. 1994 269:199-206; Mackら Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995 92:7021-5; Zapataら Protein Eng. 1995 8:1057-62）、2つの一本鎖Fv（scFv）またはFabフラグメントを遺伝的に融合させることによりBsAbが構築されている。これらの場合の大多数においては、これらの組換えアプローチは、標的抗原のそれぞれに対して一価である二価二重特異性抗体分子の産生をもたらす。

【0009】

多重特異性エピトープ結合性タンパク質のような抗体代替物は、伝統的な標的化エピトープと比べた場合の多数の利点、例えば、イムノサイレント（immunosilent）ドメインへの接近、標的のレパートリーの拡張、新たな結合特異性ならびに薬物、放射性核種、毒素、酵素、リポソームおよびウイルスに対するコンジュゲート（これらに限定されるものではない）をもたらす。これらの重要な利点を考慮して、抗体のエフェクター機能を惹起する能力を保持しつつ高いアフィニティで少なくとも3つまたはそれ以上のエピトープに結合しうる機能性多価および多重特異性エピトープ結合性タンパク質を構築し効率的に製造

することが当技術分野で必要とされている。

【0010】

本明細書中の参考文献の引用または考察は、それらが本発明の先行技術であると自認するものと解釈されるものではない。

【発明の概要】

【0011】

3. 本発明の概要

本発明は、抗体定常ドメインのFc領域を含む、複数のエピトープに結合しうる新規多重特異性エピトープ結合性タンパク質を提供する。本明細書中で用いる「Fc領域」なる語は、CH3、CH2、および抗体の定常ドメインのヒンジ領域の少なくとも一部分を含むポリペプチドを意味する。場合によっては、Fc領域は、いくつかの抗体クラスにおいて存在するCH4ドメインを含みうる。本明細書中で用いるFc領域は、抗体の定常ドメインのヒンジ領域全体を含みうる。1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は抗体のFc領域およびCH1領域を含む。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、抗体の定常ドメインからのFc領域、CH1領域およびCカッパ／ラムダ領域を含む。1つの実施形態においては、本明細書に記載されている本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質および／またはポリペプチド鎖は天然に存在せず、また、天然配列（組成および配向）Ig分子でもない。また、1つの実施形態においては、本明細書に記載されている多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、抗体またはその抗原結合性フラグメントのペアを化学的に架橋することによってはin vitroで製造されない。

【0012】

本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は1、2、3、4またはそれ以上のポリペプチド鎖を含む。特定の実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は2～4のポリペプチド鎖を含む。本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質の各鎖は1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上のエピトープ結合性ドメインを含みうる。該エピトープ結合性ドメインはscFv、一本鎖ダイアボディ、抗体の可変領域（例えば、重鎖および／または軽鎖可変領域）、ペプチド模倣体、または当技術分野で公知の他のエピトープ結合性ドメインでありうる。

【0013】

該ポリペプチド鎖内に含まれるFc領域およびエピトープ結合性ドメインは多数の異なる配向で互いに連結されうる（本明細書の全体において用いる「連結」は、直接的に隣接していること、または介在配列もしくは構造体を介して間接的に連結されていることを意味しうる。例えば、エピトープ結合性ドメインに連結されたFc領域はエピトープ結合性ドメインに直接的に隣接していることが可能であり、あるいはFc領域は介在配列を介してエピトープ結合性ドメインに連結されうる）。1つの実施形態においては、1以上の鎖のエピトープ結合性ドメインはFc領域のC末端に連結されている。他の実施形態においては、1以上の鎖のエピトープ結合性ドメインはFc領域のN末端に連結されている。他の実施形態においては、1以上のエピトープ結合性ドメインはFc領域のN末端およびC末端の両方に連結されている。

【0014】

本発明の多重特異性エピトープ結合性ドメインは二量体、三量体、四量体またはそれ以上の次元の多量体であることが可能であり、ホモマーまたはヘテロマーであることが可能であり、すなわち、さらには、同じまたは異なる複数のポリペプチド鎖を含みうる。1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は2本のポリペプチド鎖のホモ二量体またはヘテロ二量体を含みうる。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は3本のポリペプチド鎖のホモ三量体またはヘテロ三量体を含みうる。さらにもう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は4本のポリペプチド鎖のホモ四量体またはヘテロ四量体を含みうる。本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質のポリペプチド鎖は、Fc領

域の成分、すなわち、CH3、CH2、ヒンジ領域（またはその一部分）および／またはCH1領域の存在を介して多量体化（すなわち、集合）しうる。その代わりにまたはそれに加えて、本発明の多重特性エピトープ結合性タンパク質のポリペプチド鎖は、構成ポリペプチド鎖内に存在する他のドメインの相互作用を介して多量体化（すなわち、集合）しうる。

【0015】

1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は（例えばin vivoまたはin vitroで）複数のエピトープに同時に結合しうる。1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質のエピトープ結合性ドメインは（例えばin vivoまたはin vitroで）少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上のエピトープに同時に結合しうる。もう1つの実施形態においては、各エピトープ結合性ドメインは同一エピトープに特異的である。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、異なるエピトープに特異的な1以上のエピトープ結合性ドメインを含みうる。

10

【0016】

1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質における各結合性ドメインは、同じまたは異なるエピトープに特異的である。1つの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質における各結合性ドメインは、単離された該結合性ドメインと比べて、抗原に対する異なる（すなわち、より高いまたはより低い）アフィニティを有する。

【0017】

免疫系は、抗体のエフェクター機能を介して特異的標的を抑制、低減または除去することが公知である。抗体依存性細胞傷害（ADCC）および補体依存性細胞傷害（CDC）は、伝統的な抗体のFc領域により調節されるエフェクター機能のうちの2つである。1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、Fc領域を介してエフェクター機能を効率的に刺激する能力を保持する。いくつかの状況においては、例えば、リガンドと受容体との間の相互作用の遮断が、所望の結果を達成するのに十分である場合には、エフェクター機能は望まれない。したがって、いくつかの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は標的に対するエフェクター機能を惹起し得ない。

20

【0018】

本発明はまた、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質の製造方法を提供する。1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質を形成するポリペプチド鎖は単一のベクターまたは複数のベクターから発現されうる。該ベクター内のポリペプチド鎖結合性ドメインのコード領域の配置は様々でありうる。例えば、Fc領域（例えば、CH3、CH2、ヒンジ領域（またはその一部分）および／またはCH1領域）のコード領域の配向は、該多重特異性エピトープ結合性ポリペプチド鎖内に含有されるエピトープ結合性ドメインのいずれかのコード領域に対して5'側または3'側でありうる。同様に、該エピトープ結合性ドメインのいずれかのコード領域の配向はFc領域のコード領域に対して5'側および／または3'側でありうる。いくつかの実施形態においては、エピトープ結合性ドメインのコード領域はFc領域のコード領域の5'側および3'側の両方に存在する。ある実施形態においては、Fc領域のコード領域の5'側にCH1ドメインが存在しうる。

30

40

【0019】

本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は多数の異なる発現系において産生されうる。1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は哺乳類細胞により産生され分泌される。特定の実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質はヒト細胞において産生され、該ヒト細胞から分泌される。さらに他の実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は植物細胞において産生され、該植物細胞から単離される。

【0020】

本発明はまた、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質の使用方法を提供する

50

。例えば、多数の細胞型は種々の共通の表面抗原を発現し、そして、細胞の特異的クラスを識別するのはその抗原の特異的組合せである。本発明のタンパク質を使用して、1つの実施形態においては、他の無関係な細胞集団との交差反応を伴うことなく細胞の特異的サブセットを標的化することが可能である。また、多数の細胞表面受容体は該サブユニットの架橋の結果として活性化または不活性化する。もう1つの実施形態においては、本発明のタンパク質は、細胞表面受容体を架橋することにより標的細胞における応答を刺激または抑制するために使用されうる。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、抗原との複数の細胞表面受容体の相互作用を遮断するために使用されうる。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、抗原との複数の細胞表面受容体の相互作用を増強するために使用されうる。もう1つの実施形態においては、同一抗原に対する特異性を共有する結合性ドメインを含有する本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質を使用して細胞表面受容体のホモ二量体を架橋することが可能でありうる。

10

【0021】

本発明はまた、伝統的な抗体では容易には標的化されないエピトープを標的化する方法を提供する。1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、隣接抗原を第1の標的とするために使用されることが可能であり、結合中に、別の結合性ドメインが潜在性 (cryptic) エピトープ (例えば、第1標的が結合するまでは接近できないエピトープ) に結合しうる。

【0022】

20

本発明はまた、異なる細胞型を結び付ける (すなわち、より近い位置関係にする) ための多重特異性エピトープ結合性タンパク質の使用方法を提供する。1つの実施形態においては、本発明のタンパク質は1つの結合性ドメインで標的細胞に結合し、別の結合性ドメインを介して別の細胞を呼び寄せ (リクルートし) うる。特定の実施形態においては、第1の細胞は癌細胞であり、第2の細胞は免疫エフェクター細胞、例えばNK細胞である。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、例えば抗原提示細胞およびT細胞のような2つの異なる細胞の間の相互作用を増強して、おそらくは免疫応答を増強するために使用されうる。

【0023】

30

本発明はまた、癌、炎症疾患および自己免疫疾患 (これらに限定されるものではない) を含む疾患、障害または感染に関連した1以上の症状の予防、管理、診断、治療または改善のための、単独でのまたは他の療法と組合せられた、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質の使用を含む。本発明はまた、単独でのまたは他の療法と組合せられた、癌、炎症疾患および自己免疫疾患 (これらに限定されるものではない) を含む疾患、障害または感染に関連した1以上の症状の予防、管理、治療または改善のための、ある成分 (例えば、治療用物質または薬物) にコンジュゲート化または融合された本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質の使用を含む。

【0024】

40

本発明はまた、診断試薬としての、多重特異性エピトープ結合性タンパク質の使用方法を提供する。そのような複数の結合特異性は、種々の抗原が効率的に同時に捕捉される必要があるキットまたは試薬において有用でありうる。

【0025】

4. 図面の簡潔な説明

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1-A】プロモーター、3つのscFv、ヒンジ-CH2-CH3 (Fc領域) をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む多重特異性エピトープ結合性タンパク質発現ベクターの具体例の概要図を示す。ヒンジ-CH2-CH3の種々の配向が示されている。同じ色または網掛けの領域は構造物内の同一または重複エピトープ結合性ドメインを表すと意図される。また、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質内に重複した (2つの) scFvを含む

50

実施形態が示されている（挿入図e）。また、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質内に同一の（3つの）scFvを含む実施形態が示されている（挿入図f）。

【図1-B】図1A（挿入図a）に示されている構築物から構築された多重特異性エピトープ結合性タンパク質の概要図を示す。該エピトープ結合性タンパク質は、3つのscFvおよびヒンジ-CH2-CH3（Fc領域）をそれぞれが含む2本のポリペプチド鎖のホモ二量体である。

【図2-A】プロモーター、4つのscFv、ヒンジ-CH2-CH3（Fc領域）をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む多重特異性エピトープ結合性タンパク質発現ベクターの具体例の概要図を示す。ヒンジ-CH2-CH3（Fc領域）の種々の配向が示されている。同じ色または網掛けの領域は構築物内の同一または重複エピトープ結合性ドメインを表すと意図される。また、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質内に重複したscFvを含む実施形態が示されている（挿入図e）。また、4つの異なるscFvを含む実施形態も示されている（挿入図f）。

【図2-B】図2A（挿入図a）に示されている構築物から構築された多重特異性エピトープ結合性タンパク質の代表的概要図を示す。該エピトープ結合性タンパク質は、4つのscFvおよびヒンジ-CH2-CH3（Fc領域）をそれぞれが含む2本のポリペプチド鎖のホモ二量体である。

【図2-C】2つの異なるポリペプチド鎖をコードする多重特異性エピトープ結合性タンパク質発現ベクターの一例の概要図を示す。重鎖はプロモーター、CH1ドメインに隣接する2つの抗体重鎖可変領域（VH1、VH2）をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。軽鎖はプロモーター、カッパ／ラムダ領域に隣接する2つの抗体軽鎖可変領域（VL1、VL2）をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。同じ色または網掛けの領域は構築物内の同一エピトープ結合特異性を表すと意図される。

【図2-D】図2Cに示されている構築物に類似した構築物から構築された多重特異性エピトープ結合性タンパク質「P6」の一例の概要図を示す。該多重特異性エピトープ結合性タンパク質は2本のポリペプチド鎖のヘテロ二量体である。重鎖は、CH1ドメインに隣接する2つの抗体可変領域（VH1、VH2）を含む。軽鎖は、カッパ／ラムダドメインに隣接する2つの抗体可変領域（VL1、VL2）を含む。可変領域VH1およびVL1はC5a特異的抗体1B8から誘導された。可変領域VH2およびVL2はC5a特異的抗体15から誘導された。1B8に対するエピトープと15抗体に対するエピトープとは異なる。

【図3-A】プロモーター、2つの異なるポリペプチド鎖をコードするポリヌクレオチド配列を含む多重特異性エピトープ結合性タンパク質発現ベクターの具体例の概要図を示す。重鎖はプロモーター、VHドメイン、Fc領域〔ヒンジ、CH2およびCH3（Fc領域）を含むもの〕、CH1、2つのscFvをコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。軽鎖はプロモーター、VLドメイン、Cカッパ／ラムダ領域をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。同じ色または網掛けの領域は構築物内の同一または重複エピトープ結合性ドメインを表すと意図される。また、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質内の重複scFvを含む実施形態が示されている（挿入図c）。

【図3-B】図3A（挿入図A、B）に示されている構築物から構築された多重特異性エピトープ結合性タンパク質の概要図を示す。該エピトープ結合性タンパク質は4本のポリペプチド鎖（2本の重鎖および2本の軽鎖）の多量体である。各重鎖はVHドメイン、ヒンジ、CH2およびCH3（Fc領域）、CH1ならびに2つのscFvを含み、各軽鎖はVLドメインおよびCカッパ／ラムダ領域を含む。

【図3-C】実施例に記載されている多重特異性エピトープ結合性タンパク質「P1」を製造するために使用する発現ベクターの概要図を示す。重鎖ベクターはプロモーター、VHドメイン、Fc領域（ヒンジ、CH2およびCH3を含むもの）、CH1、2つのscFvをコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。VHドメインはEphA2に特異的であり、scFv1は、EphAファミリーRTKに特異的なscFvである「EA」を表し、scFv2は、EphBファミリーRTKに特異的なscFvである「EB」を表す。軽鎖ベクターはプロモーター、VLドメイン、Cカッパ／ラムダをコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。軽鎖上に存在す

10

20

30

40

50

るVLドメインは、EphA2に特異的なVLドメインをコードしている。

【図3-D】図3Cに示されている構築物から構築された多重特異性エピトープ結合性タンパク質の概要図を示す。タンパク質「P1」は4本の鎖（2本の重鎖および2本の軽鎖）を含む。各重鎖は、EphA2に特異的なVHドメイン、ヒンジ-CH2-CH3（Fc領域）、EphAファミリーRTKに特異的なscFv、およびEphBファミリーRTKに特異的なscFvを含む。各軽鎖は、EphA2に特異的なVLドメインおよびCカップ／ラムダドメインを含む。

【図3-E】実施例に記載されている多重特異性エピトープ結合性タンパク質「P2」を製造するために使用する発現ベクターの概要図を示す。重鎖ベクターはプロモーター、VHドメイン、ヒンジ、CH2およびCH3（Fc領域）、CH1、一本鎖ダイアボディをコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。VHドメインはEphA2に特異的であり、一本鎖ダイアボディは、EphAファミリーRTKに特異的なscFv「EA」、およびEphBファミリーRTKに特異的な「EB」scFvを表す。軽鎖ベクターはプロモーター、VLドメイン、Cカップ／ラムダをコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。軽鎖上に存在するVLドメインは、EphA2に特異的なVLドメインをコードしている。

【図3-F】3Eに示されている構築物から構築された多重特異性エピトープ結合性タンパク質の概要図を示す。タンパク質「P2」は2本の重鎖および2本の軽鎖を含み、各重鎖は、EphA2に特異的なVHドメイン、ヒンジ、CH2、CH3（Fc領域）を含み、一本鎖ダイアボディは、EphAファミリーRTKに特異的なscFv「EA」、およびEphBファミリーRTKに特異的な「EB」scFvを表す。各軽鎖は、EphA2に特異的なVLドメインおよびCカップ／ラムダドメインを含む。

【図4-A】2つの異なるポリペプチド鎖をコードするポリヌクレオチド配列を含む多重特異性エピトープ結合性タンパク質発現ベクターの一例の概要図を示す。重鎖はプロモーター、2つのVHドメイン、Fc領域〔CH1、ヒンジ、CH2およびCH3（Fc領域）を含むもの〕、2つのscFvをコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。軽鎖はプロモーター、2つのVLドメイン、Cカップ／ラムダ領域をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。同じ色または網掛けの領域は構築物内の同一または重複エピトープ結合性ドメインを表すと意図される。また、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質内の重複scFvを含む実施形態が示されている（挿入図c）。

【図4-B】図4A（挿入図aおよびb）に示されている構築物から構築された多重特異性エピトープ結合性タンパク質の一例の概要図を示す。該エピトープ結合性タンパク質は4本のポリペプチド鎖（2本の重鎖および2本の軽鎖）の多量体であり、各重鎖は2つのVHドメイン、Fc領域〔CH1、ヒンジ、CH2およびCH3（Fc領域）を含む〕および2つのscFvを含み、各軽鎖は2つのVLドメインおよびCカップ／ラムダ領域を含む。

【図4-C】2つの異なるポリペプチド鎖をコードするポリヌクレオチド配列を含む多重特異性エピトープ結合性タンパク質発現ベクターの一例の概要図を示す。重鎖ベクターはプロモーター、VHドメイン、Fc領域（CH1、ヒンジ、CH2およびCH3を含むもの）をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。軽鎖ベクターはプロモーター、scFv、VLドメイン、Cカップ／ラムダをコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。同じ色または網掛けの領域は、同一結合特異性を有するドメインを表すと意図される。

【図4-D】図4Cに示されている構築物から構築された多重特異性エピトープ結合性タンパク質の一例の概要図を示す。該エピトープ結合性タンパク質は4本のポリペプチド鎖（2本の重鎖および2本の軽鎖）の多量体であり、各重鎖はVH1ドメイン、Fc領域（CH1、ヒンジ、CH2およびCH3を含む）を含み、各軽鎖はscFv、VLおよびCカップ／ラムダ領域を含む。

【図4-E】2つの異なるポリペプチド鎖をコードするポリヌクレオチド配列を含む多重特異性エピトープ結合性タンパク質発現ベクターの一例の概要図を示す。重鎖ベクターはプロモーター、scFvドメイン、VHドメイン、Fc領域（CH1、ヒンジ、CH2およびCH3を含むもの）をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。軽鎖ベクターはプロモーター、VLドメイン、Cカップ／ラムダをコードするポリヌクレオチド配列およびポリA

尾部を含む。同じ色または網掛けの領域は、同一結合特異性を有するドメインを表すと意図される。

【図４－Ｆ】図4Eに示されている構築物から構築された多重特異性エピトープ結合性タンパク質の一例の概要図を示す。該エピトープ結合性タンパク質は4本のポリペプチド鎖（2本の重鎖および2本の軽鎖）の多量体であり、各重鎖はscFvドメイン、VH1ドメイン、Fc領域（CH1、ヒンジ、CH2およびCH3を含む）を含み、各軽鎖はVLおよびCカップ／ラムダ領域を含む。

【図４－Ｇ】2つの異なるポリペプチド鎖をコードするポリヌクレオチド配列を含む多重特異性エピトープ結合性タンパク質発現ベクターの一例の概要図を示す。重鎖ベクターはプロモーター、scFvドメイン、VHドメイン、Fc領域（CH1、ヒンジ、CH2およびCH3を含むもの）をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。軽鎖ベクターはプロモーター、scFvドメイン、VLドメイン、Cカップ／ラムダをコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。同じ色または網掛けの領域は、同一結合特異性を有するドメインを表すと意図される。

【図４－Ｈ】図4Gに示されている構築物から構築された多重特異性エピトープ結合性タンパク質の一例の概要図を示す。該エピトープ結合性タンパク質は4本のポリペプチド鎖（2本の重鎖および2本の軽鎖）の多量体であり、各重鎖はscFvドメイン、VH1ドメイン、Fc領域（CH1、ヒンジ、CH2およびCH3を含む）を含み、各軽鎖はscFvドメイン、VLおよびCカップ／ラムダ領域を含む。この多重特異性エピトープ結合性タンパク質「P3」は、C5a（1B8）に結合する抗体、同様にC5aのエピトープに結合するscFv#1（15）、およびEphAファミリーRTKに結合するscFv#2（EA）から構成される。

【図４－Ｉ】2つの異なるポリペプチド鎖をコードするポリヌクレオチド配列を含む多重特異性エピトープ結合性タンパク質発現ベクターの一例の概要図を示す。重鎖ベクターはプロモーター、scFvドメイン、VHドメイン、Fc領域（CH1、ヒンジ、CH2およびCH3を含むもの）、追加的な2つのscFvをコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。軽鎖ベクターはプロモーター、scFvドメイン、VLドメイン、Cカップ／ラムダをコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。同じ色または網掛けの領域は、同一結合特異性を有するドメインを表すと意図される。

【図４－Ｊ】図4Iに示されている構築物から構築された多重特異性エピトープ結合性タンパク質の一例の概要図を示す。該エピトープ結合性タンパク質は4本のポリペプチド鎖（2本の重鎖および2本の軽鎖）の多量体であり、各重鎖はscFvドメイン、VH1ドメイン、Fc領域（CH1、ヒンジ、CH2およびCH3を含む）および2つの追加的なscFvを含み、各軽鎖はscFvドメイン、VLおよびCカップ／ラムダ領域を含む。

【図４－Ｋ】2つの異なるポリペプチド鎖をコードするポリヌクレオチド配列を含む多重特異性エピトープ結合性タンパク質発現ベクターの一例の概要図を示す。重鎖ベクターはプロモーター、scFvドメイン、VHドメイン、Fc領域（CH1、ヒンジ、CH2およびCH3を含むもの）、追加的なscFvをコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。軽鎖ベクターはプロモーター、scFvドメイン、VLドメイン、Cカップ／ラムダをコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。同じ色または網掛けの領域は、同一結合特異性を有するドメインを表すと意図される。

【図４－Ｌ】図4Kに示されている構築物から構築された多重特異性エピトープ結合性タンパク質の一例の概要図を示す。該エピトープ結合性タンパク質は4本のポリペプチド鎖（2本の重鎖および2本の軽鎖）の多量体であり、各重鎖はscFvドメイン、VH1ドメイン、Fc領域（CH1、ヒンジ、CH2およびCH3を含む）および追加的なscFvを含み、各軽鎖はscFvドメイン、VLおよびCカップ／ラムダ領域を含む。

【図４－Ｍ】4つの異なるポリペプチド鎖をコードするポリヌクレオチド配列を含む多重特異性エピトープ結合性タンパク質発現ベクターの一例の概要図を示す。重鎖ベクター（a）はプロモーター、第1 VHドメイン（VH2）、第1 CH1ドメイン、第2 VHドメイン（VH1）、Fc領域〔CH1（第2）、ヒンジ、CH2およびCH3を含むもの〕をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。軽鎖1ベクター（b）はプロモーター、第1 VLドメイン（V

10

20

30

40

50

L2)、第1 Cカップ／ラムダ領域、第2 VLドメイン (VL1)、第2 Cカップ／ラムダ領域をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。軽鎖2ペクター (c) はプロモーター、VLドメイン (VL2)、Cカップ／ラムダ領域をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。軽鎖3ペクター (d) はプロモーター、VLドメイン (VL1)、Cカップ／ラムダ領域をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。ペクター (a) 構築物によりコードされる重鎖ポリペプチドは、軽鎖1ペクター (b) によりコードされるポリペプチド、または軽鎖2および3 (c + d) の組合せと会合して、図4Nに示す機能性多重特異性エピトープ結合性タンパク質を形成しうると意図される。同じ色または網掛けの領域は、同一結合特異性を有するドメインを表すと意図される。

【図4-N】図4Mに示されている構築物から構築された多重特異性エピトープ結合性タンパク質 (二重FabドメインIgG形態1 (DFD-1)) の一例の概要図を示す。該エピトープ結合性タンパク質は4本のポリペプチド鎖 (2本の重鎖および2本の軽鎖) の多量体であることが可能であり、各重鎖は第1 VHドメイン (VH2)、第1 CH1ドメイン、第2 VHドメイン (VH1)、Fc領域 [CH1 (第2)、ヒンジ、CH2およびCH3を含むもの] を含み、各軽鎖は第1 VLドメイン (VL2)、第1 Cカップ／ラムダ領域、第2 VLドメイン (VL1)、第2 Cカップ／ラムダ領域を含む。あるいは、該エピトープ結合性タンパク質は6本のポリペプチド鎖 (2本の重鎖、2本の第1軽鎖および2本の第2軽鎖) の多量体であることが可能である。前記の2本の重鎖はそれぞれ、第1 VHドメイン (VH2)、第1 CH1ドメイン、第2 VHドメイン (VH1)、第2 CH1ドメインおよびFc領域 (ヒンジ、CH2およびCH3を含むもの) を含む。前記の2本の第1軽鎖はそれぞれ、VLドメイン (VL2) およびCカップ／ラムダ領域を含む (図4N、挿入図cを参照されたい)。前記の2本の第2軽鎖はそれぞれ、VLドメイン (VL1) およびCカップ／ラムダ領域を含む (図4N、挿入図dを参照されたい)。

【図4-O】4つの異なるポリペプチド鎖をコードするポリヌクレオチド配列を含む多重特異性エピトープ結合性タンパク質発現ベクターの一例の概要図を示す。重鎖ペクター (a) はプロモーター、VLドメイン (VL2)、Cカップ／ラムダ領域、VHドメイン (VH1)、Fc領域 (CH1、ヒンジ、CH2およびCH3を含むもの) をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。軽鎖1ペクター (b) はプロモーター、VHドメイン (VH2)、CH1、第2 VLドメイン (VL1)、Cカップ／ラムダ領域をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。軽鎖2ペクター (c) はプロモーター、VHドメイン (VH2)、CH1をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。軽鎖3ペクター (d) はプロモーター、VLドメイン (VL1)、Cカップ／ラムダ領域をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。ペクター (a) 構築物によりコードされる重鎖ポリペプチドは、軽鎖1ペクター (b) によりコードされるポリペプチド、または軽鎖2および3 (c + d) の組合せと会合して、図4Pに示す機能性多重特異性エピトープ結合性タンパク質を形成しうると意図される。同じ色または網掛けの領域は、同一結合特異性を有するドメインを表すと意図される。

【図4-P】図4Qに示されている構築物から構築された多重特異性エピトープ結合性タンパク質 (二重FabドメインIgG形態1 (DFD-2)) の一例の概要図を示す。該エピトープ結合性タンパク質は4本のポリペプチド鎖 (2本の重鎖および2本の軽鎖) の多量体であることが可能であり、各重鎖はVLドメイン (VL2)、Cカップ／ラムダ領域、VHドメイン (VH1)、Fc領域 (CH1、ヒンジ、CH2、CH3を含むもの) を含み、各軽鎖はVHドメイン (VH2)、CH1、VLドメイン (VL1) およびCカップ／ラムダ領域を含む。あるいは、該エピトープ結合性タンパク質は6本のポリペプチド鎖 (2本の重鎖、2本の第1軽鎖および2本の第2軽鎖) の多量体であることが可能である。前記の2本の重鎖はそれぞれ、VLドメイン (VL2)、Cカップ／ラムダ領域、VHドメイン (VH1)、Fc領域 (CH1、ヒンジ、CH2およびCH3を含むもの) を含む。前記の2本の第1軽鎖はそれぞれ、VHドメイン (VH2) およびCH1を含む (図4Q、挿入図cを参照されたい)。前記の2本の第2軽鎖はそれぞれ、VLドメイン (VL1) およびCカップ／ラムダ領域を含む (図4Q、挿入図dを参照されたい)。

【図4-Q】4つの異なるポリペプチド鎖をコードするポリヌクレオチド配列を含む多重特異性エピトープ結合性タンパク質発現ベクターの一例の概要図を示す。重鎖ペクター (

a) はプロモーター、第1 VLドメイン (VL2)、第1 Cカップ／ラムダ領域、第2 VLドメイン (VL1)、第2 Cカップ／ラムダ領域およびFc領域 (ヒンジ、CH2およびCH3を含むもの) をコードするポリヌクレオチド配列ならびにポリA尾部を含む。軽鎖ベクター (b、軽鎖1) はプロモーター、第1 VHドメイン (VH2)、第1 CH1、第2 VHドメイン (VH1)、第2 CH1 をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。軽鎖ベクター (c、軽鎖2) はプロモーター、VHドメイン (VH2)、CH1をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。軽鎖ベクター (d、軽鎖3) はプロモーター、VHドメイン (VH1)、CH1をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。ベクター (a) 構築物によりコードされる重鎖ポリペプチドは、軽鎖1ベクター (b) によりコードされるポリペプチド、または軽鎖2および3 (c + d) の組合せと会合して、図4Rに示す機能性多重特異性エピトープ結合性タンパク質を形成しうると意図される。同じ色または網掛けの領域は、同一結合特異性を有するドメインを表すと意図される。

10

【図4-R】図4Qに示されている構築物から構築された多重特異性エピトープ結合性タンパク質 (二重FabドメインIgG形態1 (DFD-3)) の一例の概要図を示す。該エピトープ結合性タンパク質は4本のポリペプチド鎖 (2本の重鎖および2本の軽鎖) の多量体であることが可能であり、各重鎖は第1 VLドメイン (VL2)、第1 Cカップ／ラムダ領域、第2 VLドメイン (VL1)、第2 Cカップ／ラムダ領域、およびFc領域 (ヒンジ、CH2、CH3を含むもの) を含み、各軽鎖は第1 VHドメイン (VH2)、第1 CH1、第2 VHドメイン (VH1) および第2 CH1を含む。あるいは、示されている多重特異性エピトープ結合性タンパク質は6本のポリペプチド鎖 (2本の重鎖、2本の第1軽鎖および2本の第2軽鎖) の多量体でありうる。前記の2本の重鎖はそれぞれ、第1 VLドメイン (VL2)、第1 Cカップ／ラムダ領域、第2 VLドメイン (VL1)、第2 Cカップ／ラムダ領域、およびFc領域 (ヒンジ、CH2およびCH3を含むもの) を含む。前記の2本の第1軽鎖はそれぞれ、VHドメイン (VH2) およびCH1を含む (図4Q、挿入図cを参照されたい)。前記の2本の第2軽鎖はそれぞれ、VHドメイン (VH1) およびCH1を含む (図4Q、挿入図dを参照されたい)。

20

【図4-S】4つの異なるポリペプチド鎖をコードするポリヌクレオチド配列を含む多重特異性エピトープ結合性タンパク質発現ベクターの一例の概要図を示す。重鎖ベクター (a) はプロモーター、VLドメイン (VL2)、Cカップ／ラムダ領域、VHドメイン (VH1) およびFc領域 (CH1、ヒンジ、CH2およびCH3を含むもの) をコードするポリヌクレオチド配列ならびにポリA尾部を含む。軽鎖ベクター (b、軽鎖1) はプロモーター、VHドメイン (VH2)、CH1、VLドメイン (VL1)、Cカップ／ラムダ領域およびポリA尾部を含む。軽鎖ベクター (c、軽鎖2) はプロモーター、VHドメイン (VH2)、CH1をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。軽鎖ベクター (d、軽鎖3) はプロモーター、VLドメイン (VL1)、Cカップ／ラムダ領域をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。該ベクター構築物によりコードされる重鎖ポリペプチドは、軽鎖1ポリペプチド (b)、または軽鎖2および3 (c + d) の組合せと会合して、図4Tに示す機能性多重特異性エピトープ結合性タンパク質を形成しうると意図される。同じ色または網掛けの領域は、同一結合特異性を有するドメインを表すと意図される。

30

【図4-T】図4Sに示されている構築物から構築された多重特異性エピトープ結合性タンパク質 (二重FabドメインIgG形態1 (DFD-4)) の一例の概要図を示す。該エピトープ結合性タンパク質は4本のポリペプチド鎖 (2本の重鎖および2本の軽鎖) の多量体であることが可能であり、各重鎖はVLドメイン (VL2)、Cカップ／ラムダ領域、VHドメイン (VH1) およびFc領域 (CH1、ヒンジ、CH2、CH3を含むもの) を含み、各軽鎖はVHドメイン (VH2)、CH1、VLドメイン (VL1) およびCカップ／ラムダ領域を含む。あるいは、示されている多重特異性エピトープ結合性タンパク質は6本のポリペプチド鎖 (2本の重鎖、2本の第1軽鎖および2本の第2軽鎖) の多量体でありうる。前記の2本の重鎖はそれぞれ、VLドメイン (VL2)、Cカップ／ラムダ領域、VHドメイン (VH1) およびFc領域 (CH1、ヒンジ、CH2およびCH3を含むもの) を含む。前記の2本の第1軽鎖はそれぞれ、VHドメイン (VH2) およびCH1を含む (図4S、挿入図cを参照されたい)。前記の2本の第2軽鎖はそれぞれ、VLドメイン (VL1) およびCカップ／ラムダ領域を含む (図4S、挿入図dを参照されたい)。

40

50

【図4-U】2つの異なるポリペプチド鎖をコードするポリヌクレオチド配列を含む逆転抗体発現ベクターの一例の概要図を示す。重鎖様鎖または第1ベクター (a) はプロモーター、VLドメイン (VL1)、Cカップ/ラムダ領域、Fc領域 (ヒンジ、CH2およびCH3を含むもの) およびポリA尾部を含む。軽鎖様鎖または第2ベクター (b) はプロモーター、VHドメイン (VH1)、CH1およびポリA尾部を含む。同じ色または網掛けの領域は、同一結合特性を有するドメインを表すと意図される。

【図4-V】図4Uに示されている構築物から構築された逆転抗体 (inverted antibody) の一例の概要図を示す。該逆転抗体は4本のポリペプチド鎖 (2本の重鎖様鎖および2本の軽鎖様鎖) の多量体であり、各重鎖様鎖は第1 VLドメイン (VL1)、Cカップ/ラムダ領域 Fc領域 (ヒンジ、CH2およびCH3を含む) を含み、各軽鎖様鎖は第1 VHドメイン (VH1) およびCH1を含む。

【図4-W】図4Uおよび4Vに示されているタイプの逆転抗体の一例の構築を表す概要図を示す。簡潔に説明すると、親抗EphA2抗体12G3H11を使用して、該抗体の構築を補助するためにPCRに基づくアプローチを行った。第1に、VH、CH1、および重鎖からのヒンジ領域の部分を増幅するために、プライマーを使用した。第2に、VL、CL、およびヒンジ領域の部分、ならびにCH3、CH2、およびヒンジ領域の重複部分を増幅するために、追加的なプライマーセットを使用した。第3に、重複PCR断片、ならびにVL領域のN末端およびCH3領域のC末端へのプライマーを使用して、完全長逆転重鎖を構築した。後続のクローニングは、図4Uおよび4Vに示されている「逆転抗体」の製造のためのベクターを与える。

【図5-A】2つの異なるポリペプチド鎖を含む多重特異性エピトープ結合性タンパク質発現カセットの概要図を示す。重鎖はプロモーター、2つのscFvドメイン、Fc領域 (CH1、ヒンジ、CH2およびCH3を含むもの) をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。軽鎖はプロモーター、2つのscFvドメイン、Cカップ/ラムダ領域をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。また、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質内の重複scFvを含む実施形態が示されている。

【図5-B】図5Aに示されている構築物から構築された多重特異性エピトープ結合性タンパク質の一例の概要図を示す。該エピトープ結合性タンパク質は4本のポリペプチド鎖 (2本の重鎖および2本の軽鎖) の多量体である。各重鎖は2つのscFvドメインおよびFc領域 (CH1、ヒンジ、CH2およびCH3ドメインを含む) および2つのscFvを含み、各軽鎖は2つのscFvドメインおよびCカップ/ラムダ領域を含む。

【図5-C】2つの異なるポリペプチド鎖をコードするポリヌクレオチド配列を含む多重特異性エピトープ結合性タンパク質発現ベクターの一例の概要図を示す。重鎖ベクターはプロモーター、scFvドメイン、VHドメイン、CH1ドメイン、追加的scFvドメインをコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。軽鎖ベクターはプロモーター、scFvドメイン、VLドメイン、Cカップ/ラムダ、追加的scFvドメインをコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。

【図5-D】図5Cに示されている構築物から構築された多重特異性エピトープ結合性タンパク質の一例の概要図を示す。該エピトープ結合性タンパク質は2本のポリペプチド鎖 (1本の重鎖および1本の軽鎖) の二量体である。重鎖はscFvドメイン、Fc領域 (CH1を含む) および追加的scFvドメインを含み、軽鎖はscFv、Cカップ/ラムダ領域および追加的scFvドメインを含む。

【図6】本発明のポリペプチド鎖において存在するscFvおよび一本鎖ダイアボディ形態におけるVHおよびVLドメインの相対配置の図式的表示を示す。各形態のそれぞれに関してリンカーの長さが表されている。scFv形態 (挿入図1) の場合、scFvの形成を促すために、各scFv単位のVHおよびVL領域間のリンカーの長さは長い (> 5アミノ酸より長い)。また、各scFv間のリンカーは、同様にscFv単位の正しい折り畳みを促すために長い。一本鎖ダイアボディ (挿入図2~7) のリンカーの長さは、一本鎖ダイアボディ構造を形成するようVHおよびVL領域の「折り畳み」を促すのに必要な長さを表す。

【図7】種々の多重特異性エピトープ結合性タンパク質を (A) 非変性または (B) 変性条件に付したPAGEゲル実験の結果を示す。レーン1および5は、1 μ g/ウェルでローディング

10

20

30

40

50

されたscFv-Fc領域タンパク質（3F2-522）を表す。レーン2および6は、4 μ g/ウェルでローディングされたscFv-Fc領域タンパク質（3F2-522）を表す。レーン3および7は、1 μ g/ウェルでローディングされたscFv-Fc領域タンパク質（522-Fc）を表す。レーン4および8は、4 μ g/ウェルでローディングされたscFv-Fc領域タンパク質（522-Fc）を表す。レーンMは標準分子量マーカ―を表す（SeeBlue2（商標））。

【図8】ELISA形態における共結合実験からの結果を示す。該結果は、多エピトープ結合性タンパク質が、それぞれの単離された機能性エピトープ結合性ドメインの結合特異性を保持することを示している。（A）においては、ELISAプレートに α v β 3インテグリンでコーティングし、522-Fc領域および3F2522-Fc領域と共にインキュベートする。プレートに結合したタンパク質をビオチン化EphA2-Fcの結合により検出した。（B）においては、3F2522-Fc領域タンパク質を結合EphA2または α v β 3インテグリンによりELISAプレート上に捕捉し、光学濃度により測定される二重特異性結合を実証する。

10

【図9】本発明のエピトープ結合性タンパク質の一群のポリアクリルアミドゲル電気泳動実験からの結果を示す。簡潔に説明すると、本発明のタンパク質のそれぞれの精製サンプルをPAGEゲル上でローディングし、泳動させ、ついでクーマシーブルーで染色した。ここに示されている本発明のタンパク質は以下のとおりである：レーン1 - 522-Fc、レーン2 - 3F2-522-Fc、レーン3 - P1、レーン4 - 3F2-522-Fc領域、レーン5 - 12G3H11-5-8、およびレーン6 - 3F2-522-Fc領域。

【図10】サイズ排除クロマトグラフィーカラムからの多重特異性エピトープ結合性タンパク質P2の溶出プロファイルを示す。該軌跡は各カラム画分（x軸）における相対タンパク質濃度を表す。該結果は、本発明のP2多エピトープ結合性タンパク質が単体として溶出することを示している。

20

【図11】カチオン交換クロマトグラフィーカラムからの多重特異性エピトープ結合性タンパク質P1の溶出プロファイルを示す。該軌跡は各カラム画分（x軸）における相対タンパク質濃度を表す。

【図12】図11に示されているカチオン交換クロマトグラフィーからのプール化画分のPAGE分析（AおよびB）および二重特異性結合分析（C）からの結果を示す。プール化画分を実施例6に示す。（A）においては、サンプルを非変性ポリアクリルアミドゲル上でローディングし、泳動させ、該ゲルをクーマシーで染色した。（B）においては、同等のサンプルを変性条件下でローディングし、泳動させ、クーマシーで染色した。（C）においては、同等のサンプルをEphA2および別のEphA2ファミリーRTK（EA）に対する二重結合特異性に関して試験した。各サンプルは、EphA2および他方のEphAファミリーRTK（EA）の両方に対する結合を示した。

30

【図13】種々のエピトープ結合性タンパク質に関して行った結合アッセイの結果を示す。特に示されているのは、抗体12G3H11ならびに多重特異性エピトープ結合性タンパク質P1およびP2によるEphA2に対する特異性である。予想どおり、EA、EB1およびEB2エピトープ結合性タンパク質はEphA2に対する特異性を示さない。

【図14】種々のエピトープ結合性タンパク質に関して行った結合アッセイの結果を示す。特に示されているのは、エピトープ結合性タンパク質EAならびに多重特異性エピトープ結合性タンパク質P1およびP2によるEphAファミリーRTKに対する特異性である。抗体12G3H11ならびに多重特異性エピトープ結合性タンパク質EB1およびEB2はEphAファミリーRTKに対する特異性を示さない。

40

【図15】種々のエピトープ結合性タンパク質に関して行った結合アッセイの結果を示す。特に示されているのは、エピトープ結合性タンパク質EB1およびEB2ならびに多重特異性エピトープ結合性タンパク質P1およびP2によるEphBファミリーRTKに対する特異性である。抗体12G3H11ならびにエピトープ結合性タンパク質EAはEphBファミリーRTKに対する特異性を示さない。

【図16】種々のエピトープ結合性タンパク質に関して行った二重特異性結合アッセイの結果を示す。（A）においては、多重特異性エピトープ結合性タンパク質P1およびP2はプレート結合EphA2により捕捉され、ビオチン化EphAファミリーRTKで検出される。これは、

50

多重特異性エピトープ結合性タンパク質P1およびP2がEphA2およびEphAファミリーRTKに同時に結合しうること示している。抗体12G3H11および多重特異性エピトープ結合性タンパク質EAは両方のエピトープに同時に結合しう。 (B)においては、多重特異性エピトープ結合性タンパク質P1およびP2はプレート結合EphA2により捕捉され、ビオチン化EphBファミリーRTKで検出される。これは、多重特異性エピトープ結合性タンパク質P1およびP2がEphA2およびEphBファミリーRTKに同時に結合しうること示している。多重特異性エピトープ結合性タンパク質EAおよびEB1は両方のエピトープに同時に結合しう。

【図17】種々のエピトープ結合性タンパク質に関して行った二重特異性結合アッセイの結果を示す。(A)においては、多重特異性エピトープ結合性タンパク質P1およびP2はプレート結合EphAファミリーRTKにより捕捉され、ビオチン化EphA2で検出される。これは、多重特異性エピトープ結合性タンパク質P1およびP2がEphA2およびEphAファミリーRTKに同時に結合しうること示している。抗体12G3H11および多重特異性エピトープ結合性タンパク質EB1は両方のエピトープに同時に結合しう。(B)においては、多重特異性エピトープ結合性タンパク質P1およびP2はプレート結合EphAファミリーRTKにより捕捉され、ビオチン化EphBファミリーRTKで検出される。これは、多重特異性エピトープ結合性タンパク質P1およびP2がEphA2およびEphBファミリーRTKに同時に結合しうること示している。抗体12G3H11および多重特異性エピトープ結合性タンパク質EB1は両方のエピトープに同時に結合しう。

【図18】種々のエピトープ結合性タンパク質に関して行った二重特異性結合アッセイの結果を示す。(A)においては、多重特異性エピトープ結合性タンパク質P1およびP2はプレート結合EphBファミリーRTKにより捕捉され、ビオチン化EphA2で検出される。これは、多重特異性エピトープ結合性タンパク質P1およびP2がEphA2およびEphBファミリーRTKに同時に結合しうること示している。抗体12G3H11および多重特異性エピトープ結合性タンパク質EB1は両方のエピトープに同時に結合しう。(B)においては、多重特異性エピトープ結合性タンパク質P1およびP2はプレート結合EphBファミリーRTKにより捕捉され、ビオチン化EphAファミリーRTKで検出される。これは、多重特異性エピトープ結合性タンパク質P1およびP2がEphAファミリーRTKおよびEphBファミリーRTKに同時に結合しうること示している。抗体12G3H11および多重特異性エピトープ結合性タンパク質EAは両方のエピトープに同時に結合しう。

【図19】生細胞上で発現されたエピトープに対する本発明のタンパク質に関する結合特異性の分析からの結果を示す。MiaPaCa2細胞をタンパク質、EA、EB2、12G3H11およびヒトIgGと共にインキュベートした。本発明のタンパク質の結合を、FITCにコンジュゲート化された抗ヒトFcにより検出した。本発明のタンパク質の結合をFACSにより分析した。該結果は、MiaPaCa2細胞がEA、EB2および12G3H11に対する特異的標的エピトープを示すことを実証している。

【図20】生細胞上で発現されたエピトープに対する該タンパク質に関する結合特異性からの分析の結果を示す。MiaPaCa2細胞をタンパク質、P1、P2およびヒトIgGと共にインキュベートした。残存タンパク質結合を、FITCにコンジュゲート化された抗ヒトFcにより検出した。タンパク質結合の度合をFACSにより分析した。該結果は、MiaPaCa2細胞がP1およびP2に対する特異的標的エピトープを示すことを実証している。

【図21】生細胞上で発現されたエピトープに対するエピトープ結合性タンパク質に関する結合特異性の分析からの結果を示す。MiaPaCa2細胞をEA、EB1、EB2、P1、P2、12G3H11、対照AbおよびヒトIgGと共にインキュベートした。残存タンパク質結合を、FITCにコンジュゲート化された抗ヒトFcにより検出した。タンパク質結合の度合をFACSにより分析した。該結果は、MiaPaCa2細胞が12G3H11、EA、EB1、EB2、P1およびP2に対する特異的標的エピトープを示すことを実証している。

【図22】生細胞上で発現されたエピトープに対する或るエピトープ結合性タンパク質に関する結合特異性の分析からの結果を示す。MiaPaCa2細胞をタンパク質P1、P2、EB2、EA、12G3H11および抗ヒトFcと共にインキュベートした。残存タンパク質結合を、FITCにコンジュゲート化された抗ヒトFcにより検出した。結合の度合をFACSにより分析した。該結

果は、MiaPaCa2細胞がP1、P2、EA、EB2および12G3H11に対する特異的標的エピトープを示すことを実証している。

【図 2 3】生細胞上で発現されたエピトープに対する或るエピトープ結合性タンパク質に関する結合の競合的抑制の分析からの結果を示す。過剰な可溶性EphA2-Fcの存在下、MiaPaCa2細胞をタンパク質P1、P2、EB2、EA、12G3H11および抗ヒトFcと共にインキュベートした。残存タンパク質結合を、FITCにコンジュゲート化された抗ヒトFcにより検出した。タンパク質結合の度合をFACSにより分析した。該結果は、可溶性EphA2-Fcタンパク質が、12G3H11の結合に関しては、MiaPaCa2細胞上のエピトープと競合しうるが、P1、P2、EB2およびEA（これらはそれぞれ、結合を保持する）に関しては競合しないことを示している。

【図 2 4】生細胞上で発現されたエピトープに対する或るエピトープ結合性タンパク質に関する結合の競合的抑制の分析からの結果を示す。過剰な可溶性EphAファミリーRTKの存在下、MiaPaCa2細胞を本発明のタンパク質、P1、P2、EB2、EA、12G3H11および抗ヒトFcと共にインキュベートした。残存タンパク質結合を、FITCにコンジュゲート化された抗ヒトFcにより検出した。タンパク質結合の度合をFACSにより分析した。該結果は、可溶性EphAファミリーRTKタンパク質が、EAの結合に関しては、MiaPaCa2細胞上のエピトープと競合しうるが、12G3H11、P1、P2およびEB2（これらはそれぞれ、結合を保持する）に関しては競合しないことを示している。

【図 2 5】生細胞上で発現されたエピトープに対する或るエピトープ結合性タンパク質に関する結合の競合的抑制の分析からの結果を示す。過剰な可溶性EphBファミリーRTKの存在下、MiaPaCa2細胞を本発明のタンパク質、P1、P2、EB2、EA、12G3H11および抗ヒトFcと共にインキュベートした。タンパク質の残存結合を、FITCにコンジュゲート化された抗ヒトFcにより検出した。タンパク質結合の度合をFACSにより分析した。該結果は、可溶性EphBファミリーRTKタンパク質が、EB2の結合に関しては、MiaPaCa2細胞上のエピトープと競合しうるが、12G3H11、P1、P2およびEA（これらはそれぞれ、結合を保持する）に関しては競合しないことを示している。

【図 2 6】生細胞上で発現されたエピトープに対する或るエピトープ結合性タンパク質に関する結合の競合的抑制の分析からの結果を示す。過剰な可溶性EphA2-FcおよびEphBファミリーRTKの存在下、MiaPaCa2細胞を本発明のタンパク質、P1、P2、EB2、EA、12G3H11および抗ヒトFcと共にインキュベートした。タンパク質の残存結合を、FITCにコンジュゲート化された抗ヒトFcにより検出し、FACSにより分析した。該結果は、可溶性EphA2-FcおよびEphBファミリーRTKタンパク質の組合せが、MiaPaCa2細胞上のエピトープと、EAおよび12G3H11の結合に関しては完全に競合しうるが、P1およびP2に関しては部分的に競合しうるに過ぎず、一方、EB2のみが結合を保持したことを示している。

【図 2 7】生細胞上で発現されたエピトープに特異的な或るエピトープ結合性タンパク質に関する結合の競合的抑制の分析からの結果を示す。過剰な可溶性EphAファミリーRTKおよびEphBファミリーRTKの存在下、MiaPaCa2細胞をタンパク質P1、P2、EB2、EA、12G3H11および抗ヒトFcと共にインキュベートした。タンパク質の残存結合を、FITCにコンジュゲート化された抗ヒトFcにより検出し、FACSにより分析した。該結果は、可溶性EphAファミリーRTKおよびEphBファミリーRTKタンパク質の組合せが、EAおよびEB2の結合に関しては、MiaPaCa2細胞上のエピトープと完全に競合しうるが、P1、P2および12G3H11は結合を保持したことを示している。

【図 2 8】生細胞上で発現されたエピトープに特異的な或るエピトープ結合性タンパク質に関する結合の競合的抑制の分析からの結果を示す。過剰な可溶性EphA2-Fc、EphAファミリーRTKおよびEphBファミリーRTKの存在下、MiaPaCa2細胞を本発明のタンパク質、P1、P2、EB2、EA、12G3H11および抗ヒトFcと共にインキュベートした。タンパク質の残存結合を、FITCにコンジュゲート化された抗ヒトFcにより検出し、FACSにより分析した。該結果は、可溶性EphA2-Fc、EphAファミリーRTKおよびEphBファミリーRTKタンパク質の組合せが、P1、P2、EB2、EAおよび12G3H11の結合に関して、MiaPaCa2細胞上のエピトープと競合しうることを示している。

【図 2 9】生細胞における標的受容体のリン酸化を刺激する能力に関して或るエピトープ

結合性タンパク質をアッセイする活性化アッセイからの結果をここに示す。標的化受容体を免疫沈降させ、ウェスタンブロットによりリン酸含量に関して分析した。この図に示すとおり、タンパク質P1およびP2で処理されたMiaPaCa2細胞はEphA2を活性化し、リン酸化する。陽性対照として、EphA2特異的抗体12G3H11を該研究に含めた。EA、EB1、EB2、対照Abおよび培地は該細胞におけるEphA2の活性化を刺激しなかった。

【図30】生細胞における標的受容体のリン酸化を刺激する能力に関して或るエピトープ結合性タンパク質をアッセイする活性化アッセイからの結果をここに示す。標的化受容体を免疫沈降させ、ウェスタンブロットによりリン酸含量に関して分析した。図30に示すとおり、本発明のタンパク質、P1およびP2で処理されたMiaPaCa2細胞はEphAファミリーRTKを活性化し、リン酸化する。陽性対照として、EphAファミリー特異的抗体EAを該研究に含めた。12G3H11、EB1、EB2、対照Abおよび培地は該細胞におけるEphAファミリーRTKの活性化を刺激しなかった。

10

【図31】生細胞における標的受容体のリン酸化を刺激する能力に関して或るエピトープ結合性タンパク質をアッセイする活性化アッセイからの結果をここに示す。標的化受容体を免疫沈降させ、ウェスタンブロットによりリン酸含量に関して分析した。図31に示すとおり、タンパク質P1およびP2で処理されたMiaPaCa2細胞はEphBファミリーRTKを活性化し、リン酸化する。陽性対照として、EphBファミリー特異的抗体EB2を該研究に含めた。12G3H11、EA、EB2、対照Abおよび培地は該細胞におけるEphBファミリーRTKの活性化を刺激しなかった。

【図32】図4Gに示す三重特異性エピトープ結合性タンパク質の発現を示すPAGEゲルをここに示す。該パネルにおいては、非還元性（レーン1および2）および変性ゲル（レーン3および4）は、それらの条件下の該三重特異性エピトープ結合性タンパク質の相対分子量を示す。レーン2においては、該三重特異性エピトープ結合性タンパク質は、非変性条件におけるPAGEゲル上の（a）泳動により表される伝統的抗体の予想分子量より大きい約240kDaの予想分子量を示す。レーン4においては、該三重特異性エピトープ結合性タンパク質は、重鎖に関しては約75kDaおよび軽鎖に関しては約50kDaまでの予想分子量を示す。これらの値は、同様の条件下で泳動された重鎖（b）および軽鎖（c）を含む伝統的抗体により示された予想分子量より高い。

20

【図33】多重特異性エピトープ結合性タンパク質「P3」のサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）分析からの結果をここに示す。図4Hに示されているこの構築物は3つの異なるエピトープ結合性領域を含む。該エピトープ結合性タンパク質を発現させ、SECにより分析した。点線の軌跡は、P3タンパク質の分子量を決定するために使用した一定の分子量の成分の組合せを表す。実線の軌跡はP3の溶出プロファイルを表す。ピーク1は、約240kDa（単量体）の推定分子量において、該タンパク質の約70%に相当する。ピーク2および3は、より高次の構造体（例えば、二量体）または凝集体を表す。

30

【図34】種々の形態のエピトープ結合性タンパク質に関して行ったプロテアーゼ感受性アッセイからの結果をここに示す。特に、タンパク質（親抗体および本明細書に記載されている種々の形態のエピトープ結合性タンパク質）を発現させ、精製し、トリプシン（抗体/エピトープ結合性タンパク質1μg当たりトリプシン20ng）、キモトリプシン（抗体/エピトープ結合性タンパク質1μg当たりキモトリプシン20ng）またはヒト血清（抗体/エピトープ結合性タンパク質1μg当たり血清1μg）の非存在下または存在下、（A）1時間または（B）20時間にわたって37℃でインキュベートした。該プロテアーゼの存在下のインキュベーションが完了したら、サンプルを還元性PAGEゲル上で泳動させ、クーマシーで染色して、タンパク質分解が生じたかどうかを判定した。示されているとおり、37℃で1時間のインキュベーションは、それらの種々の親抗体またはエピトープ結合性タンパク質のタンパク質分解を引き起こさない。延長して行ったインキュベーション（37℃で12時間）においては、該エピトープ結合性タンパク質の検出可能なタンパク質分解は観察されなかった。

40

【図35】種々の形態のエピトープ結合性タンパク質に関して行ったプロテアーゼ感受性アッセイからの結果をここに示す。特に、タンパク質（親抗体および本明細書に記載され

50

ている種々の形態のエピトープ結合性タンパク質)を発現させ、精製し、カテプシンB(抗体/エピトープ結合性タンパク質1μg当たりプロテアーゼ20ng)の非存在下(奇数)または存在下(偶数)、(A)1時間または(B)20時間にわたって37℃でインキュベートした。該プロテアーゼの存在下のインキュベーションが完了したら、サンプルを還元性PAGEゲル上で泳動させ、クーマシーで染色して、タンパク質分解が生じたかどうかを判定した。示されているとおり、37℃で1時間のインキュベーションは、それらの種々の親抗体またはエピトープ結合性タンパク質のタンパク質分解を引き起こさない。延長して行ったインキュベーション(37℃で20時間)においては、レーン8および9(タンパク質P2)ならびにレーン14および15(タンパク質P4)における該エピトープ結合性タンパク質の或る程度のタンパク質分解が明らかである(点線の丸印を参照されたい)。

10

【図36】多重特異性エピトープ結合性タンパク質による3つの異なる抗原の同時結合を示すBIAcore実験からの結果をここに示す。上側の曲線は、図4Dに示されている多重特異性エピトープ結合性タンパク質「P1」上に存在する3つの異なるエピトープ結合性ドメインの結合活性を表す。可溶性EB、EAおよびEphA2抗原を固定化P1に加え、相対結合を測定した。それらの3つの抗原に対応する矢印により示された3つの異なる屈曲は固定化P1への結合を示す。オボアルブミン(下側の曲線)を陰性対照として使用した。該固定化オボアルブミンへの可溶性EB、EAおよびEphA2の特異的結合は観察されなかった。

【図37】多重特異性エピトープ結合性タンパク質P1のインターナリゼーションを分析する研究の結果をここに示す。該画像は、P1タンパク質、12G3H11抗体および対照抗体(R347)の受容体媒介インターナリゼーションの経時的実験を表す。5μg/mlのP1タンパク質および抗体と共に0、10、20、30および60分間インキュベートした後、透過性亢進PC3細胞のAlexaFluor488(蛍光緑色色素)ヤギγヒトIgG抗体を使用して、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質および抗体を検出した。細胞核をDAPIで染色した。対応実施例に記載されているとおりに共焦点レーザー走査顕微鏡検査により画像を分析した。

20

【図38】PC-3細胞におけるEBファミリーRTKおよびEphA2の分解を導くP1タンパク質の能力を調べる研究の結果をここに示す。簡潔に説明すると、 3×10^5 個のPC-3(前立腺腺癌細胞)細胞を6ウェルプレートにおいてプレーティングし、一晚、付着させた。ついで、図示されているとおり、該細胞をP1タンパク質または対照抗体(抗EphA2、抗EB1、陰性対照抗体(R347)または未処理)(67nM)で処理した。P1タンパク質および対照抗体をPC-3細胞と共に、EB分解(A)のために4時間、そしてEphA2分解(B)のために24時間インキュベートした。ウェスタンブロットを抗EphA2、抗EB1および抗GAPDH特異的抗体でプローブした。EBファミリーRTK、EphA2およびGAPDH(グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ)の位置が図示されている。分子量はkDa単位で示されている。

30

【図39-1】P1タンパク質および対照抗体が投与されたPC-3腫瘍担持ヌードマウスにおけるEBファミリーRTKおよびEphA2のin vivo経時的分解からの結果をここに示す。簡潔に説明すると、 5×10^6 個のPC-3(前立腺腺癌細胞)をヌードマウスの右側腹部に皮下移植した。腫瘍を約100mm³まで進行させ、P1タンパク質、親抗EphA2または抗EB1抗体(67nmol/kg体重)を腹腔内投与した。投与後0、1、4、8、24、48、72、120および144時間の時点で投与群ごとに各時点で3匹のマウスから腫瘍を回収した。EBタンパク質発現(A)およびEphA2(C)に関してウェスタンブロットにより腫瘍ライセートを分析した。発現対照としてGAPDH(グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ)を使用した。各ゲル上にローディングされた各時点からの1つのサンプルと共に各腫瘍ライセートを3つの別々のゲルの1つにローディングした。この図においては、ただ1つの代表的ゲルが示されている。それらの3つのゲルにおけるタンパク質バンドをデンシトメトリー分析により定量し、0時間の時点からのタンパク質バンドに対して正規化した。1つのPBSで処理された(0時間)対照腫瘍を、それらの3つのプロットのそれぞれにおける対照として使用した。GraphPad Prism(登録商標)ソフトウェアを使用して、該正規化デンシトメトリー値を相対EB(B)またはEphA2(D)の平均としてプロットした。

40

【図39-2】図39-1の続きである。

【図40】PC-3腫瘍担持ヌードマウスにおけるP1タンパク質および対照抗体の薬物動態学

50

的分析をここに示す。簡潔に説明すると、 3×10^5 個のPC-3前立腺腺癌細胞をヌードマウスの右側腹部に皮下移植した。腫瘍を約 100mm^3 まで進行させ、P1タンパク質、親抗EphA2または抗EB1抗体（ 67nmol/kg 体重）を腹腔内投与した。投与後1、4、8、24、48、72、120および144時間の時点で投与群ごとに各時点で3匹のマウスから、尾静脈から採血し、血清を分離した。PBSが投与された3匹のマウスの、1つの追加的群からの血清を、投与直後（0時間）に集めた。EphA2およびEB1結合ELISAを用いて、P1タンパク質（抗EphA2および抗EphB4結合に関して、それぞれ、緑色および赤色の曲線）、親抗EphA2（黒色曲線）または抗EB1（青色曲線）対照抗体の存在に関して血清サンプルを分析した。

【発明を実施するための形態】

【0027】

10

5. 用語説明

本明細書中で用いる「抗体」なる語は、例えば、モノクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、ラクダ化抗体、キメラ抗体、一本鎖Fv（scFv）、ジスルフィド結合Fv（sdFv）、Fabフラグメント、F(ab')フラグメントおよび抗イディオタイプ（抗Id）抗体（例えば、本発明の抗体に対する抗Id抗体を含む）、および前記のいずれかのエピトープ結合性フラグメントを意味する。特に、抗体には、免疫グロブリン分子、および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性なフラグメント、すなわち、抗原結合性部位を含有する分子が含まれ、これらのフラグメントは別の免疫グロブリンドメイン（限定的なものではないがFc領域またはそのフラグメントを含む）に融合されていても融合されていなくてもよい。免疫グロブリン分子は任意のタイプ（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgAおよびIgY）、クラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2）またはサブクラスのものでありうる。

20

【0028】

天然抗体は、通常、2つの同一軽（L）鎖および2つの同一重（H）鎖から構成される約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。各軽鎖は1つの共有ジスルフィド結合により重鎖に連結され、一方、ジスルフィド結合の数は種々の免疫グロブリンイソタイプの重鎖によって異なる。各重鎖および軽鎖は、一定間隔で隔てられた鎖内ジスルフィド架橋をも有する。各重鎖は、一方の末端においては可変ドメイン（VH）を、そしてそれに続いて幾つかの定常ドメインを有する。各軽鎖は、一方の末端においては可変ドメイン（VL）を、他方の末端においては定常ドメインを有し、軽鎖の定常ドメインは重鎖の第1定常ドメインと並んでおり、軽鎖可変ドメインは重鎖の可変ドメインと並んでいる。「可変領域」なる語も、重鎖または軽鎖の可変ドメインを示すために用いられうる。特定のアミノ酸残基が軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとの境界を形成すると考えられている。そのような抗体は、ヒト、サル、ブタ、ウマ、ウサギ、イヌ、ネコ、マウスなど（これらに限定されるものではない）を含む任意の哺乳動物に由来しうる。

30

【0029】

「可変」なる語は、可変ドメインの或る部分が配列において抗体間で著しく異なり、それぞれの特定の抗体の、その特定の抗原に対する結合特異性をもたらすことを意味する。しかし、可変性は抗体の可変ドメインの全体にわたって均一に分布しているのではない。それは、軽鎖および重鎖可変ドメインの両方における相補性決定領域（CDR）と称される部分に集中している。可変ドメインの、より高度に保存された部分は、フレームワーク領域（FW）と称される。天然重鎖および軽鎖の可変ドメインはそれぞれ、4つのFW領域を含み、これは大部分が β シート配置をとり、これは3つのCDRにより接続され、これは、 β シート構造を接続する（そして幾つかの場合には β シート構造の一部分を形成する）ループを形成する。各鎖内のCDRは、FW領域により、接近してつなぎ合わされており、他方の鎖からのCDRと共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する（Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)を参照されたい）。定常ドメインは一般に、抗原結合に直接的には関与しないが、抗原結合アフィニティに影響を及ぼす可能性があり、ADCC、CDCおよび／またはアポトーシスにおける抗体の関与のような種々のエフェクター機能を示しうる。

40

50

【0030】

本明細書中で用いる「超可変領域」なる語は、抗原への抗体結合に関連した、抗体のアミノ酸残基を意味する。超可変領域は「相補性決定領域」もしくは「CDR」のアミノ酸残基（例えば、軽鎖可変ドメインの残基24-34 (L1)、50-56 (L2)および89-97 (L3)ならびに重鎖可変ドメインの残基31-35 (H1)、50-65 (H2)および95-102 (H3)；Kabatら、Sequence of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)) および／または「超可変ループ」からの残基（例えば、軽鎖可変ドメイン内の残基26-32 (L1)、50-52 (L2)および91-96 (L3)ならびに重鎖可変ドメイン内の26-32 (H1)、53-55 (H2)および96-101 (H3)；ChothiaおよびLesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987)) を含む。「フレームワーク」または「FW」残基は、CDRに隣接する可変ドメイン残基である。FW残基は、キメラ、ヒト化、ヒト、ドメイン抗体、一本鎖ダイアボディ、ワクシボディ (vaccibody)、直鎖状抗体および二重特異性抗体に存在する。

10

【0031】

本明細書中で用いる「モノクローナル抗体」なる語は、実質的に均一な抗体の集団から得られた抗体を意味する。すなわち、該集団を構成する個々の抗体は、少量存在しうる天然で生じる可能な突然変異以外では同一である。モノクローナル抗体は単一の抗原部位に対して高度に特異的である。さらに、種々の抗原決定基（エピトープ）に対する種々の抗体を典型的に含む通常の（ポリクローナル）抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は抗原上の単一の決定基に対するものである。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体は、他の免疫グロブリン産生細胞により汚染されていないハイブリドーマ細胞によりそれが合成されうる点で有利である。代替的な製造方法も当業者に公知であり、例えば、モノクローナル抗体は、該モノクローナル抗体をコードする重鎖および軽鎖遺伝子で安定または一過性にトランスフェクトされた細胞により製造されうる。

20

【0032】

「モノクローナル」なる修飾語は、実質的に均一な抗体集団から得られたものであるという抗体の性質を示し、いずれかの特定の方法による該抗体の操作を要するものと解釈されるべきではない。「モノクローナル」なる語は、本明細書においては、任意の真核生物クローン、原核生物クローンまたはファージクローンを含む、細胞のクローン集団に由来する抗体を意味するものとして用いられており、該抗体が操作された方法を指して用いられているのではない。例えば、本発明において使用されるモノクローナル抗体は、Kohlerら、Nature, 256:495 (1975)により最初に記載されたハイブリドーマ法により作製されることが可能であり、あるいは例えばClacksonら、Nature, 352:624-628 (1991) およびMarksら、J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)に記載されている技術を用いるファージ抗体ライブラリーからの単離を含む任意の組換えDNA法（例えば、米国特許第4,816,567号を参照されたい）により作製されうる。これらの方法は、モノクローナル哺乳類、キメラ、ヒト化、ヒト、ドメイン抗体、一本鎖ダイアボディ、ワクシボディおよび直鎖状抗体を製造するために用いられうる。

30

【0033】

「キメラ」抗体なる語は、重鎖および／または軽鎖の少なくとも一部分が、特定の種に由来するまたは特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応配列と同一または相同であり、該鎖の少なくとも1つの他の部分が、別の種に由来するまたは別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応配列と同一または相同である抗体、ならびに所望の生物活性を示す、そのような抗体のフラグメントを含む（米国特許第4,816,567号；Morrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)）。本発明において関心のあるキメラ抗体には、非ヒト霊長類（例えば旧世界サル、例えばヒヒ、アカゲザルまたはシノモルグスサル）に由来する可変ドメイン抗原結合性配列とヒト常領域配列とを含む「霊長類化 (primatized)」抗体が含まれる（米国特許第5,693,780号）。

40

【0034】

50

非ヒト（例えば、マウス）抗体の「ヒト化」形態としては、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含有するキメラ抗体が挙げられる。通例、ヒト化抗体は、所望の特異性、アフィニティおよび能力を有する例えばマウス、ラット、ウサギまたは非ヒト霊長類のような非ヒト種（ドナー抗体）の対応CDRからの残基により天然CDR残基が置換されたヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。いくつかの場合には、ヒト免疫グロブリンのFW領域残基は対応非ヒト残基により置換されている。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体において見出される残基を含みうる。これらの改変は、抗体の能力を更に改善するために施される。一般に、ヒト化抗体重鎖または軽鎖は、CDRの全てまたは実質的に全てが非ヒト免疫グロブリンのものに対応しFWの全てまたは実質的に全てがヒト免疫グロブリン配列である、少なくとも1以上の可変ドメインの実質的に全てを含む。ある実施形態においては、ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部分、典型的にはヒト免疫グロブリンの少なくとも一部分を含む。更なる詳細に関しては、Jonesら，*Nature*，321:522-525 (1986)；Riechmannら，*Nature*，332:323-329 (1988)；およびPresta，*Curr. Op. Struct. Biol.*，2:593-596 (1992)を参照されたい。

【0035】

「ヒト抗体」は、ヒトに由来する抗体であってよく、あるいは抗原チャレンジに応答して特異的ヒト抗体を産生するよう「操作」されたトランスジェニック生物から得られた抗体であってよく、当技術分野で公知の任意の方法により製造されうる。ある技術においては、内因性重鎖および軽鎖遺伝子座の標的化破壊を含有する胚幹細胞系に由来する生物の系統内にヒト重鎖および軽鎖遺伝子座の要素を導入する。該トランスジェニック生物は、ヒト抗原に特異的なヒト抗体を合成することが可能であり、該生物は、ヒト抗体分泌ハイブリドーマを製造するために使用されうる。また、ヒト抗体は、その重鎖および軽鎖が、1以上のヒトDNA源に由来するヌクレオチド配列によりコードされている抗体でありうる。完全ヒト抗体も、遺伝的または染色体トランスフェクション法およびファージディスプレイ技術、または*in vitro*活性化B細胞（それらはすべて、当技術分野で公知である）において構築されうる。

【0036】

「抗体依存性細胞傷害」および「ADCC」は、非特異的細胞傷害性細胞（例えば、ナチュラルキラー（NK）細胞、好中球およびマクロファージ）が標的細胞上の結合抗体を認識し次いで標的細胞の細胞溶解を引き起こす細胞性反応を意味する。1つの実施形態においては、そのような細胞はヒト細胞である。いずれの特定の作用メカニズムにも限定されるものではないが、ADCCを媒介するこれらの細胞傷害性細胞は一般には、Fc受容体（FcR）を発現する。ADCCを媒介するための一次細胞であるNK細胞はFcγRIIIを発現し、一方、単球はFcγRI、FcγRII、FcγRIIIおよび／またはFcγRIVを発現する。造血細胞上のFcR発現はRavetchおよびKinet，*Annu. Rev. Immunol.*，9:457-92 (1991)において要約されている。分子のADCC活性を評価するために、*in vitro* ADCCアッセイ（米国特許第5,500,362号または第5,821,337号に記載されているもの）を行った。そのようなアッセイのための有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞（PBMC）およびナチュラルキラー（NK）細胞が含まれる。その代わりにまたはそれに加えて、関心のある分子のADCC活性は、例えばClynesら，*Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*，95:652-656 (1998)に開示されている動物モデルにおいて*in vivo*で評価されうる。

【0037】

「補体依存性細胞傷害」または「CDC」は、補体活性化を開始し補体の存在下で標的を細胞溶解する分子の能力を意味する。補体活性化経路は、コグネイト抗原と複合体形成した分子（例えば、抗体）への補体系（C1q）の第1成分の結合により開始される。補体活性化を評価するために、CDCアッセイ（例えば、Gazzano-Santaroら，*J. Immunol. Methods*，202:163 (1996)に記載されているもの）を行うことが可能である。

【0038】

「エフェクター細胞」は、1以上のFcRを発現しエフェクター機能を発揮する白血球である。該細胞は少なくともFcγRI、FcγRII、FcγRIIIおよび／またはFcγRIVを発現し、AD

10

20

30

40

50

CCエフェクター機能を遂行する。ADCCを媒介するヒト白血球の具体例には、末梢血単核細胞（PBMC）、ナチュラルキラー（NK）細胞、単球、細胞傷害性T細胞および好中球が含まれる。

【0039】

「エピトープ」は、当技術分野で十分に理解されている用語であり、抗体への特異的結合を示す任意の化学的部分を意味する。「抗原」は、エピトープを含有しそのようなものとして抗体に特異的に結合もする部分または分子である。

【0040】

「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」は、50%ホルムアミド、5×SSC（750mM NaCl、75mMクエン酸三ナトリウム）、50mMリン酸ナトリウム（pH 7.6）、5×デンハルト液、10%硫酸デキストランおよび20 μg/ml変性せん断サケ精子DNAを含む溶液中の42℃で一晩のインキュベーション、ならびにそれに続く、0.1×SSC中の約65℃でのフィルターの洗浄を意味する。当技術分野で公知の任意の方法により、該ポリヌクレオチドが入手可能であり、該ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が決定されうる。例えば、抗体のヌクレオチド配列が公知であれば、該抗体をコードするポリヌクレオチドは化学合成オリゴヌクレオチドから構築可能であり（例えば、Kutmeierら、BioTechniques 17:242 (1994)に記載されているとおり）、簡潔に説明すると、この方法は、該抗体をコードする配列の部分を含む重複オリゴヌクレオチドの合成、アニーリングおよびそれらのオリゴヌクレオチドの連結、そしてそれに続く、PCRによる該連結オリゴヌクレオチドの増幅を含む。

【0041】

6. 発明の詳細な説明

本発明は、抗体定常ドメインのFc領域を含む新規多重特異性エピトープ結合性タンパク質を提供する。特に、Fc領域はCH3、CH2、抗体の定常ドメインからのヒンジ領域（またはその一部分）を含む。1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は抗体定常ドメインからのFc領域およびCH1領域を含む。他の実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は更に、Cカップ／ラムダ領域を含む。他の実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、またはそれ以上のCH1および／またはCカップ／ラムダ領域を含む。他の実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上のCH1および／またはCカップ／ラムダ領域を含む。もう1つの実施形態においては、Fc領域、CH1領域またはCカップ／ラムダ領域は、当技術分野で公知の任意の抗体サブタイプに由来する。他の実施形態においては、Fc領域は、当技術分野で公知の複数の抗体サブタイプに由来するキメラである。

【0042】

他の実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、Fc領域の非存在下、CH1またはCカップ／ラムダ領域を含む。他の実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープタンパク質は、Fc領域の非存在下、少なくとも1、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、またはそれ以上のCH1および／またはCカップ／ラムダ領域を含む。他の実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、Fc領域の非存在下、抗体のヒンジ領域の全部または一部を含む。

【0043】

Fc領域の変異体（例えば、アミノ酸の置換および／または付加および／または欠失）はエフェクター機能を増強または低減する（Prestaら、2002、Biochem Soc Trans 30:487-490；米国特許第5,624,821号、第5,885,573号およびPCT公開番号WO 00/42072、WO 99/58572およびWO 04/029207を参照されたい）。したがって、1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質のアミノ酸配列は変異体Fc領域を含む。1つの実施形態においては、多重特異性エピトープ結合性タンパク質の変異体Fc領域は、天然Fc

に類似したレベルのエフェクター機能の誘導を示す。もう1つの実施形態においては、変異体Fc領域は、天然Fcより高いエフェクター機能誘導を示す。もう1つの実施形態においては、変異体Fc領域は、天然Fcより低いエフェクター機能誘導を示す。もう1つの実施形態においては、変異体Fc領域は、天然Fcより高いADCC誘導を示す。もう1つの実施形態においては、変異体Fc領域は、天然Fcより低いADCC誘導を示す。もう1つの実施形態においては、変異体Fc領域は、天然Fcより高いCDC誘導を示す。もう1つの実施形態においては、変異体Fc領域は、天然Fcより低いCDC誘導を示す。変異体Fc領域の特定の実施形態を後記で詳細に示す。

【0044】

また、エフェクター機能を増加または減少させるために、Fc領域のグリコシル化が修飾されることが当技術分野で公知である（例えば、Umanaら，1999，Nat. Biotechnol 17: 176-180; Daviesら，2001，Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shieldsら，2002，J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawaら，2003，J Biol Chem 278:3466-3473，米国特許第6,602,684号; U.S. Ser. No. 10/277,370; U.S. Ser. No. 10/113,929; PCT WO 00/61739A1; PCT WO 01/292246A1; PCT WO 02/311140A1; PCT WO 02/30954A1; Potillegent（商標）技術（Biowa, Inc. Princeton, N.J.）; GlycoMAb（商標）グリコシル化操作技術（GLYCART バイオテクノロジーAG, Zurich, Switzerland）を参照されたい）。したがって、1つの実施形態においては、本発明の多重特異性ポリペプチドのFc領域はアミノ酸残基のグリコシル化の改変を含む。もう1つの実施形態においては、アミノ酸残基のグリコシル化の改変はエフェクター機能の低下をもたらす。もう1つの実施形態においては、アミノ酸残基のグリコシル化の改変はエフェクター機能の増加をもたらす。特定の実施形態においては、Fc領域は、低減されたフコシル化を有する。もう1つの実施形態においては、Fc領域はフコシル化されていない（例えば、米国特許出願公開番号2005/0226867を参照されたい）。

【0045】

最近の研究は、IgG分子上のオリゴ糖へのシアル酸の付加がそれらの抗炎症活性を増強し、それらの細胞傷害性を改変することを示唆している（Kenekoら，Science 313, 670-673(2006), Scallionら，Mol. Immuno. 2007 Mar;44(7):1524-34）。したがって、抗体治療剤の効力は、意図される用途に最も適合する糖形態の選択により最適化されうる。2つの抗体CH2ドメインの間に介在する2つのオリゴ糖鎖がFc領域のその受容体への結合に参与する。増加したシアリル化（シアリ酸化）を有するIgG分子は抗炎症特性を有し、減少したシアリル化を有するIgG分子は、増強した免疫刺激特性を有することを、前記の研究は示している。したがって、抗体治療剤は、個々の用途のための適当なシアリル化プロファイルを有するよう「特製（tailor-made）」されうる。抗体のシアリル化状態のモジュレーションのための方法がW02007/005786（題名“Methods And Compositions With Enhanced Therapeutic Activity”）およびW02007/117505（題名“Polypeptides With Enhanced Anti-Inflammatory And Decreased Cytotoxic Properties And Related Methods”）（それらのそれぞれの全体をあらゆる目的のために参照により本明細書に組み入れることとする）に記載されている。

【0046】

1つの実施形態においては、本発明の多重特異性ポリペプチドのFc領域は、基準の未改変Fc領域と比べて改変されたシアリル化プロファイルを含む。1つの実施形態においては、本発明の多重特異性ポリペプチドのFc領域は、基準の未改変Fc領域と比べて増加したシアリル化プロファイルを含む。いくつかの実施形態においては、本発明の多重特異性ポリペプチドのFc領域は、基準の未改変Fc領域と比べて約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約60%、約65%、約70%、約80%、約85%、約90%、約95%、約100%、約125%または約150%またはそれ以上のシアリル化の増加を含む。いくつかの実施形態においては、本発明の多重特異性ポリペプチドのFc領域は、基準の未改変Fc領域と比べて約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約10倍、約20倍、約50倍またはそれ以上のシアリル化の増加を含む。

【0047】

もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性ポリペプチドのFc領域は、基準の未改変Fc領域と比べて減少したシアリル化プロファイルを含む。いくつかの実施形態においては、本発明の多重特異性ポリペプチドのFc領域は、基準の未改変Fc領域と比べて約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約60%、約65%、約70%、約80%、約85%、約90%、約95%、約100%、約125%、約150%またはそれ以上のシアリル化の減少を含む。いくつかの実施形態においては、本発明の多重特異性ポリペプチドのFc領域は、基準の未改変Fc領域と比べて約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約10倍、約20倍、約50倍またはそれ以上のシアリル化の減少を含む。

【0048】

タンパク質の半減期を増加させるためにFc領域を修飾しうることが当技術分野で公知である。半減期の増加は、患者に投与する薬物の量の減少および投与の頻度の減少を可能にする。したがって、半減期の増加を伴う本発明の多重特異性エピトープは、FcとFcRn受容体との間の相互作用に参与するものとして特定されたアミノ酸残基を改変（例えば、置換、欠失または付加）することにより作製されうる（例えば、PCT公開番号97/34631および02/060919（それらのそれぞれの全体を参照により本明細書に組み入れることとする）を参照されたい）。また、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質の半減期は、当技術分野で広く利用されている技術によるPEGまたはアルブミンへのコンジュゲート化により増加されうる。いくつかの実施形態においては、本発明の多重特異性ポリペプチドのFc領域は、基準の未改変Fc領域と比べて約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約60%、約65%、約70%、約80%、約85%、約90%、約95%、約100%、約125%、約150%またはそれ以上の半減期における増加を含む。いくつかの実施形態においては、本発明の多重特異性ポリペプチドのFc領域は、基準の未改変Fc領域と比べて約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約10倍、約20倍、約50倍またはそれ以上の半減期における増加を含む。

【0049】

A. ポリペプチド鎖配向

本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は1本、2本、3本、4本またはそれ以上のポリペプチド鎖を含む。本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は2~4本のポリペプチド鎖を含みうる（以下、「本発明のポリペプチド鎖」と称されうる）。本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質の各ポリペプチド鎖は、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4または4を超えるエピトープ結合性ドメイン（本明細書においては「EBD」とも称される）を含むことが可能であり、さらに、以下の領域の1以上を含む：Fc領域、CH1領域、Cカップ／ラムダ領域。本発明のポリペプチド鎖は1以上のエピトープ結合性ドメインを含み、これはscFv、一本鎖ダイアボディ、抗体の可変領域、または別のタイプのエピトープ結合性ドメインでありうる。該エピトープ結合性ドメインは以下の領域の1以上のN末端側および／またはC末端側に連結されうる：Fc領域、CH1領域、Cカップ／ラムダ領域。他の実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上のFc、CH1またはCカップ／ラムダ領域を含みうる。

【0050】

1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖はFc領域を含む。以下の節における本発明のポリペプチド鎖の説明においては、「Fc領域」なる語は、ヒンジ領域またはその一部、CH2領域およびCH3領域を含むポリペプチド鎖を含むと理解される。もう1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は更に、抗体の定常領域からのCH1領域を含みうる。ある実施形態においては、CH1領域はFc領域のN末端側および／またはC末端側に連結されている。

【0051】

A.1. エピトープ結合性ドメインの配向

エピトープ結合性ドメイン（「EBD」とも称される）には、例えば、抗体可変領域、抗体フラグメント、scFv、一本鎖ダイアボディまたは他の結合性ドメイン（当技術分野で公知のもの）が含まれる。また、エピトープ結合性ドメインには、二重特異性一本鎖ダイア

ボディ、または2つの異なるエピトープに結合するよう設計された一本鎖ダイアボディが含まれる。また、エピトープに特異的に結合する抗体様分子または抗体模倣体、例えば、ミニボディ、マキシボディ、「A」ドメインオリゴマー（アビマーとしても公知である）（例えば、米国特許出願公開番号2005/0164301、2005/0048512および2004/017576（それらのそれぞれを参照により本明細書に組み入れることとする）を参照されたい）、Fn3に基づくタンパク質スカフォールド（例えば、米国特許出願公開2003/0170753（これを参照により本明細書に組み入れることとする）を参照されたい）、アングリンリピーター（DARpinsとしても公知である）、VASPポリペプチド、鳥類膜ポリペプチド（aPP）、テトラネクチン（CTLD3に基づく）、アフィリリン（ γ B-クリスタリン／ユビキチン）、ノッチン（Knottin）、SH3ドメイン、PDZドメイン、テンダミスタット（Tendamistat）、ネオカルジノスタチン（Neocarzinostatin）、プロテインAドメイン、リポカリン（Lipocalin）、トランスフェリン、およびクニツ（Kunitz）ドメイン（これらに限定されるものではない）が含まれる。1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質の構築において有用なエピトープ結合性ドメインは2007年10月31日付けの米国仮特許出願60/984,206（題名“Proteins Scaffolds”）（これをあらゆる目的に関して参照により本明細書に組み入れることとする）において例示されている。

10

【0052】

1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖の1、2、3またはそれ以上のエピトープ結合性ドメインがFc領域のC末端に連結されている。他の実施形態においては、1、2、3またはそれ以上のエピトープ結合性ドメインがFc領域のN末端に連結されている。他の実施形態においては、1、2、3またはそれ以上のエピトープ結合性ドメインがFc領域のN末端およびC末端の両方に連結されている。

20

【0053】

いくつかの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は以下の式の配向（N末端からC末端へ）を含みうる：EBD_n-抗体可変ドメイン_n-X_n-Fc領域_n-EBD_n（ここで、XはCH1またはCカッパ／ラムダであり、nは0～10の整数であり、各構造要素によって異なりうる）。

【0054】

A.2. ポリペプチド鎖を含有するC末端エピトープ結合性ドメイン

1つの実施形態においては、エピトープ結合性ドメイン（例えば、抗体可変領域、scFv、一本鎖ダイアボディ）は本発明のポリペプチド鎖のFc領域のC末端に連結されている。もう1つの実施形態においては、複数のエピトープ結合性ドメイン（例えば、抗体可変領域、scFv、一本鎖ダイアボディ）がFc領域のC末端に連結されている。もう1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、Fc領域のC末端に連結された複数のエピトープ結合性ドメイン（例えば、抗体可変領域、scFv、一本鎖ダイアボディ）を含む。もう1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、Fc領域のC末端に連結された少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上のエピトープ結合性ドメイン（例えば、抗体可変領域、scFv、一本鎖ダイアボディ）を含む。もう1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、Fc領域のC末端に連結された複数のエピトープ結合性ドメインを含み、ここで、該ドメインは、抗体可変領域、scFv、一本鎖ダイアボディまたは当技術分野で公知の別のエピトープ結合性ドメインよりなる群から選ばれる。

30

40

【0055】

ある実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、Fc領域のC末端に連結された2以上のタイプのエピトープ結合性ドメインを含む。限定的なものではないが、例えば、2つのエピトープ結合性ドメインを含む本発明のポリペプチド鎖は、Fc領域のC末端に連結された、scFvおよび一本鎖ダイアボディ、またはscFvおよび抗体可変領域、またはscFvおよび当技術分野で公知の別のエピトープ結合性ドメイン、または一本鎖ダイアボディおよび当技術分野で公知の別のエピトープ結合性ドメイン、または抗体可変領域および当技術分野で公知の別のエピトープ結合性ドメインを含みうる。

50

【0056】

特定の実施形態においては、1以上のエピトープ結合性ドメインはscFvである。1つの実施形態においては、1つのscFvが本発明のポリペプチド鎖のFc領域のC末端に連結されている（例えば、図1Bを参照されたい）。もう1つの実施形態においては、複数のscFvがFc領域のC末端に連結されている（例えば、図2B、3B、4Bを参照されたい）。もう1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、Fc領域のC末端に連結された複数のscFvを含む。もう1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、Fc領域のC末端に連結された少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上scFvを含む。

【0057】

特定の実施形態においては、1以上のエピトープ結合性ドメインは一本鎖ダイアボディである。1つの実施形態においては、一本鎖ダイアボディは本発明のポリペプチド鎖のFc領域のC末端に連結されている（例えば、図3Fを参照されたい）。もう1つの実施形態においては、複数の一本鎖ダイアボディがFc領域のC末端に連結されている。もう1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、Fc領域のC末端に連結された複数の一本鎖ダイアボディを含む。もう1つの実施形態においては、本発明の一方または両方のポリペプチド鎖が、Fc領域のC末端に連結された少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上の一本鎖ダイアボディを含む。

【0058】

特定の実施形態においては、1以上のエピトープ結合性ドメインは抗体可変領域である。1つの実施形態においては、抗体可変領域は本発明のポリペプチド鎖のFc領域のC末端に連結されている。もう1つの実施形態においては、複数の抗体可変領域がFc領域のC末端に連結されている。もう1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、Fc領域のC末端に連結された複数の抗体可変領域を含む。もう1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、Fc領域のC末端に連結された少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上の抗体可変領域を含む。

【0059】

A.3. ポリペプチド鎖を含有するN末端エピトープ結合性ドメイン

もう1つの実施形態においては、エピトープ結合性ドメイン（例えば、抗体可変領域、scFv、一本鎖ダイアボディ）は本発明のポリペプチド鎖のFc領域のN末端に連結されている。もう1つの実施形態においては、複数のエピトープ結合性ドメイン（例えば、抗体可変領域、scFv、一本鎖ダイアボディ）がFc領域のC末端に連結されている。もう1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、Fc領域のN末端に連結された複数のエピトープ結合性ドメイン（例えば、抗体可変領域、scFv、一本鎖ダイアボディ）を含む。もう1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、Fc領域のN末端に連結された少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上のエピトープ結合性ドメイン（例えば、抗体可変領域、scFv、一本鎖ダイアボディ）を含む。もう1つの実施形態においては、本発明の複数のポリペプチド鎖は複数のエピトープ結合性ドメインを含み、ここで、該ドメインは、抗体可変領域、scFv、一本鎖ダイアボディまたは当技術分野で公知の別のエピトープ結合性ドメインよりなる群から選ばれる。

【0060】

ある実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、Fc領域のN末端に連結された2以上のタイプのエピトープ結合性ドメインを含む。限定的なものではないが、例えば、2つのエピトープ結合性ドメインを含む本発明のポリペプチド鎖は、Fc領域のN末端に連結された、scFvおよび一本鎖ダイアボディ、またはscFvおよび抗体可変領域、またはscFvおよび当技術分野で公知の別のエピトープ結合性ドメイン、または一本鎖ダイアボディおよび当技術分野で公知の別のエピトープ結合性ドメイン、または抗体可変領域および当技術分野で公知の別のエピトープ結合性ドメインを含む。

【0061】

特定の実施形態においては、1以上のエピトープ結合性ドメインはscFvである。1つの実

10

20

30

40

50

施形態においては、1つのscFvが本発明のポリペプチド鎖のFc領域のN末端に連結されている。もう1つの実施形態においては、複数のscFvがFc領域のN末端に連結されている。もう1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、Fc領域のN末端に連結された少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上scFvを含む。

【0062】

特定の実施形態においては、1以上のエピトープ結合性ドメインは一本鎖ダイアボディである。1つの実施形態においては、一本鎖ダイアボディは本発明のポリペプチド鎖のFc領域のN末端に連結されている。もう1つの実施形態においては、複数の一本鎖ダイアボディがFc領域のN末端に連結されている。もう1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、Fc領域のN末端に連結された複数の一本鎖ダイアボディを含む。もう1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、Fc領域のN末端に連結された少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上の一本鎖ダイアボディを含む。

【0063】

特定の実施形態においては、1以上のエピトープ結合性ドメインは抗体可変領域である。1つの実施形態においては、抗体可変領域は本発明のポリペプチド鎖のFc領域のN末端に連結されている。もう1つの実施形態においては、複数の抗体可変領域がFc領域のN末端に連結されている（例えば、図4Dおよび5Bを参照されたい）。もう1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、Fc領域のN末端に連結された複数の抗体可変領域を含む。もう1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、Fc領域のN末端に連結された少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上の抗体可変領域を含む。

【0064】

A.4. ポリペプチド鎖を含有するC末端エピトープ結合性ドメイン

1つの実施形態においては、当技術分野で公知のエピトープ結合性ドメイン（例えば、抗体可変領域、scFv、一本鎖ダイアボディ）は本発明のポリペプチド鎖のFc領域のN末端およびC末端に連結されている。もう1つの実施形態においては、当技術分野で公知の複数のエピトープ結合性ドメインがFc領域のN末端およびC末端に連結されている。もう1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、Fc領域のN末端およびC末端に連結された当技術分野で公知の複数のエピトープ結合性ドメインを含む。もう1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、Fc領域のN末端およびC末端に連結された当技術分野で公知の少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上のエピトープ結合性ドメインを含む。もう1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は複数のエピトープ結合性ドメインを含み、ここで、該ドメインは、抗体可変領域、scFv、一本鎖ダイアボディまたは当技術分野で公知の別のエピトープ結合性ドメインよりなる群から選ばれる。

【0065】

ある実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、Fc領域のN末端およびC末端に連結された2以上のタイプのエピトープ結合性ドメインを含む。限定的なものではないが、例えば、2つのエピトープ結合性ドメインを含む本発明のポリペプチド鎖は、Fc領域のN末端およびC末端に連結された、scFvおよび一本鎖ダイアボディ、またはscFvおよび抗体可変領域、またはscFvおよび当技術分野で公知の別のエピトープ結合性ドメイン、または一本鎖ダイアボディおよび抗体可変領域、または一本鎖ダイアボディおよび当技術分野で公知の別のエピトープ結合性ドメイン、または抗体可変領域および当技術分野で公知の別のエピトープ結合性ドメインを含む。

【0066】

特定の実施形態においては、1以上のエピトープ結合性ドメインはscFvである。1つの実施形態においては、scFvは本発明のエピトープ結合性ポリペプチド鎖のFc領域のN末端およびC末端に連結されている。もう1つの実施形態においては、複数のscFvがFc領域のN末端およびC末端に連結されている（例えば、図4Bを参照されたい）。もう1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、Fc領域のN末端およびC末端に連結された複数のscFvを含む。もう1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、Fc領域のN末端およびC末端に連結された少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上scFvを含む。

【0067】

特定の実施形態においては、1以上のエピトープ結合性ドメインは一本鎖ダイアボディである。1つの実施形態においては、一本鎖ダイアボディは本発明のエピトープ結合性ポリペプチド鎖のFc領域のN末端およびC末端に連結されている（例えば、図3Fを参照されたい）。もう1つの実施形態においては、複数の一本鎖ダイアボディがFc領域のN末端およびC末端に連結されている。もう1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、Fc領域のN末端およびC末端に連結された複数の一本鎖ダイアボディを含む。もう1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、Fc領域のN末端およびC末端に連結された少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上の一本鎖ダイアボディを含む。

【0068】

特定の実施形態においては、1以上のエピトープ結合性ドメインは抗体可変領域である。1つの実施形態においては、抗体可変領域は本発明のエピトープ結合性ポリペプチド鎖のFc領域のN末端およびC末端に連結されている（例えば、図3Fを参照されたい）。もう1つの実施形態においては、複数の抗体可変領域がFc領域のN末端およびC末端に連結されている。もう1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、Fc領域のN末端およびC末端に連結された複数の抗体可変領域を含む。もう1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、Fc領域のN末端およびC末端に連結された少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上の抗体可変領域を含む。

【0069】

A.5. ポリペプチド鎖配向の特定の実施形態

1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、Fc領域に連結された3つのscFvを含む。特定の実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖はN末端からC末端へ以下のとおりに配置される：scFv-scFv-Fc領域-scFv（図1Bを参照されたい）またはその逆（scFv-Fc領域-scFv-scFv；図1A挿入図bを参照されたい）。もう1つの特定の実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖はN末端からC末端へ以下のとおりに配置される：Fc領域-scFv-scFv-scFv（図1A挿入図cを参照されたい）またはその逆（scFv-scFv-scFv-Fc領域）。

【0070】

1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、Fc領域に連結された4つのscFvを含む。もう1つの特定の実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖はN末端からC末端へ以下のとおりに配置される：scFv-scFv-Fc領域-scFv-scFv（図2Bを参照されたい）またはその逆。さらにもう1つの特定の実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖はN末端からC末端へ以下のとおりに配置される：scFv-Fc領域-scFv-scFv-scFv（図2A挿入図bを参照されたい）。さらにもう1つの特定の実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖はN末端からC末端へ以下のとおりに配置される：scFv-scFv-scFv-Fc領域-scFv（図2A挿入図dを参照されたい）またはその逆（図2A挿入図cを参照されたい）。

【0071】

もう1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖はscFv、抗体可変領域およびFc領域を含む。1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖はN末端からC末端へ以下のとおりに配置される：scFv-抗体可変領域-Fc領域（図4E挿入図a、図4G挿入図aを参照されたい）。

【0072】

もう1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖はscFv、抗体可変領域およびCカッパ／ラムダ領域を含む。1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖はN末端からC末端へ以下のとおりに配置される：scFv-抗体可変領域-Cカッパ／ラムダ領域（図4D挿入図b、図4G挿入図bを参照されたい）。

【0073】

もう1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖はscFv、抗体可変領域、Fc領域およびscFvを含む。1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖はN末端からC末端へ以下のとおりに配置される：scFv-抗体可変領域-Fc領域-scFv。もう1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖はscFv、抗体可変領域、Fc領域および2つのscFvを

10

20

30

40

50

含む。1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖はN末端からC末端へ以下のとおりに配置される：scFv-抗体可変領域-Fc領域-scFv-scFv（図4I挿入図aを参照されたい）。

【0074】

もう1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖はscFv、抗体可変領域、Fc領域およびscFvを含む。1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖はN末端からC末端へ以下のとおりに配置される：scFv-抗体可変領域-Fc領域-scFv。もう1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖はscFv、抗体可変領域、Fc領域およびscFvを含む。1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖はN末端からC末端へ以下のとおりに配置される：scFv-抗体可変領域-Fc領域-scFv（図4K挿入図aを参照されたい）。 10

【0075】

もう1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は抗体可変領域、Fc領域および2つのscFvを含む。もう1つの特定の実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖はN末端からC末端へ以下のとおりに配置される：抗体可変領域-Fc領域-scFv-scFv（図3Bを参照されたい）またはその逆。もう1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は2つの抗体可変領域および2つのscFvを含む。特定の実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖はN末端からC末端へ以下のとおりに配置される：抗体可変領域-抗体可変領域-Fc領域-scFv-scFv（図4Bを参照されたい）またはその逆。1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は本発明の2つのポリペプチド鎖を含む。

【0076】

いくつかの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上の抗体可変ドメインおよび1以上のCH1、C kappa/ラムダまたはFc領域を含む。いくつかの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は1以上のCH1、C kappa/ラムダまたはFc領域と共に2つの抗体可変領域を含む。いくつかの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、抗体重鎖可変領域もしくはドメイン（VH）および/または抗体軽鎖可変領域もしくはドメイン（VL）である抗体可変領域を含む。いくつかの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は抗体可変ドメイン型（限定的なものではないが例えばVHおよびVL抗体可変領域）の混合物を含む。 20

【0077】

特定の実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は2つの抗体可変ドメインおよび2つのC kappa/ラムダ領域を含む（例えば、図4Nを参照されたい）。もう1つの特定の実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は2つの抗体可変ドメインおよび2つのCH1ドメインを含む（例えば、図4Nを参照されたい）。特定の実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は2つの抗体可変ドメイン、CH1およびC kappa/ラムダを含む（例えば、図4Pおよび4Tを参照されたい）。 30

【0078】

もう1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、軽鎖可変ドメイン（VL）、C kappa/ラムダおよびFc領域を更に含む抗体重鎖を含む（例えば、図4Vを参照されたい）。もう1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、重鎖可変ドメイン（VH）およびC kappa/ラムダを更に含む抗体軽鎖を含む（例えば、図4Vを参照されたい）。 40

【0079】

いくつかの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、同一である抗体可変ドメインを含まない。他の実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、同一エピトープ結合特異性を有する抗体可変領域を含まない。いくつかの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は縦列抗体可変重鎖ドメイン（VH）を含まない。いくつかの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は縦列抗体可変軽鎖ドメイン（VL）を含まない。

【0080】

IgG1分子の重鎖に連結されたFabドメインを含む単一特異性多価抗体は、2001年3月20日付けのPCT公開WO 01/77342に記載されている。いくつかの実施形態においては、本発明のタンパク質は、IgG1分子の重鎖に連結されたFabドメインを含まない（PCT公開WO 01/7734 50

2の図4に示されている)。いくつかの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、PCT公開WO 01/77342の図4に示されているとおりではない。

【0081】

もう1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖はFc領域を含まない。1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖はCカップ／ラムダ領域を含む。もう1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖はCH1ドメインを含む。1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、Cカップ／ラムダ領域および／またはCH1領域に連結された抗体可変領域を含む。もう1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、Cカップ／ラムダ領域および／またはCH1領域のN末端および／またはC末端に連結された抗体可変領域を含む。もう1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、Cカップ／ラムダ領域および／またはCH1領域のN末端および／またはC末端に連結された抗体可変領域を含む。特定の実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、N末端からC末端へと以下の形態でCカップ／ラムダ領域に連結された2つの抗体可変領域を含む：VL-1Cカップ／ラムダ-VL2（図2Dを参照されたい）。もう1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、N末端からC末端へと以下の形態でCカップ／ラムダに連結された抗体可変領域および2つのscFvを含む：scFv-VL1-Cカップ／ラムダ-scFv（図5Dを参照されたい）。もう1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、N末端からC末端へと以下の形態でCH1領域に連結された2つの抗体可変領域を含む：VH1-CH1-VH2（図2Dを参照されたい）。もう1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、N末端からC末端へと以下の形態でCH1領域に連結された抗体可変領域および2つscFvを含む：scFv-VH1-CH1-scFv（すなわち、Fcドメインを欠く；図5Dを参照されたい）。

【0082】

A.6. リンカー長および一本鎖ダイアボディ形態

リンカー長は、scFvの可変領域がどのようにして折り畳まれ相互作用するのかに大きな影響を及ぼしうることが公知である。実際、短いリンカー（5～10アミノ酸）を使用した場合には、鎖内フォールディング（鎖内折り畳み）が妨げられ、機能性エピトープ結合部位を形成するために2つの可変領域を合体させるためには鎖間フォールディングが必要となる。生じる構造体は一本鎖ダイアボディと称され、例えば図6に示す種々の配向を有する。リンカーの配向およびサイズのより詳しい具体例については、Hollingerら、1993 Proc Natl Acad Sci. U.S.A. 90:6444-6448、米国特許出願公開番号2005/0100543、2005/0175606、2007/0014794ならびにPCT公開番号W02006/020258およびW02007/024715（それらのそれぞれをあらゆる目的のために参照により本明細書に組み入れることとする）を参照されたい。

【0083】

また、本発明のポリペプチド鎖のドメインおよび／または領域は種々の長さのリンカー領域により分離されうると理解される。いくつかの実施形態においては、該エピトープ結合性ドメインは、お互い、Cカップ／ラムダ、CH1、ヒンジ、CH2、CH3、またはFc領域全体からリンカー領域により分離される。そのようなリンカー領域はアミノ酸のランダムな組合せ、または限定された組合せのアミノ酸を含みうる。そのようなリンカー領域は柔軟または堅固でありうる。

【0084】

いくつかの場合に、リンカー配列の選択は幾つかのFab分子の結晶構造分析に基づく。Fabまたは抗体分子構造における可変ドメインとCH1／Cカップ／ラムダ定常ドメインとの間には天然の柔軟な連結が存在する。この天然連結は、VドメインのC末端から4～6残基およびCカップ／ラムダ／CH1ドメインのN末端から4～6残基が寄与する約10～12アミノ酸残基を含む。Cカップ／ラムダまたはCH1ドメインのN末端残基、特に最初の5～6アミノ酸残基は、強力な二次構造を伴わないループコンホメーションをとり、したがって、それらの2つの可変ドメインの間の柔軟なリンカーとして機能しうる。Cカップ／ラムダまたはCH1ドメインのN末端残基は、Ig配列の一部であるため、可変ドメインの天然伸長であり、したがって、該リンカーおよび結合部から潜在的に生じる免疫原性をかなりの度合で最小に

する。該リンカー配列は、任意の長さのCカッパ／ラムダ／CH1ドメインの任意の配列を含みうるが、Cカッパ／ラムダ／CH1ドメインの全ての残基を含むわけではなく（例えば、Cカッパ／ラムダ／CH1ドメインの最初の5～12アミノ酸残基）、重鎖リンカーは、C γ 1、C γ 2、C γ 3、C γ 4、C α 1、C α 2、C δ 、C ϵ およびC μ を含む任意のイソタイプのCH1に由来しうる。リンカー配列は、Ig様タンパク質（例えば、TCR、FcR、KIR）、ヒンジ領域由来配列および他のタンパク質からの他の天然配列のような他のタンパク質に由来することも可能である。

【0085】

本発明の1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、そのエピトープ結合性ドメイン、Cカッパ／ラムダドメイン、CH1ドメイン、ヒンジ領域、CH2ドメイン、CH3ドメインまたはFc領域の1以上の間に少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75個またはそれ以上のアミノ酸残基のリンカー領域を含む。該リンカー領域は任意の天然に存在するアミノ酸から構成されうる。いくつかの実施形態においては、アミノ酸グリシンおよびセリンはリンカー領域内にアミノ酸を含む。もう1つの実施形態においては、リンカー領域の配向は、グリシン反復(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_x（ここで、Xは1以上の正の整数である）の組合せを含む。

【0086】

A.7. ジスルフィド結合の形成および位置

抗体はCカッパ／ラムダおよびCH1ドメイン間に鎖間ジスルフィド結合を含むと当技術分野において理解されている。いくつかの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、鎖間ジスルフィド結合を促進しうる少なくとも1つのシステイン残基を含む。本発明のポリペプチド鎖のVL、VH、CH1、ヒンジ、CH2またはCH3領域に少なくとも1つのシステイン残基が存在しうる。いくつかの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、鎖間ジスルフィド結合を促進しうるシステイン残基を含まない。他の実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、鎖間ジスルフィド結合を形成しうる少なくとも1つのシステイン残基を除去するよう操作されうる。

【0087】

いくつかの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は抗体ヒンジ領域の全部または少なくとも一部分を含みうる。ヒンジ領域またはその一部分はエピトープ結合性ドメイン、CH1、Cカッパ／ラムダ、CH2またはCH3に直接的に接続されうる。他の実施形態においては、ヒンジ領域またはその一部分は可変長リンカー領域を介してエピトープ結合性ドメイン、CH1、Cカッパ／ラムダ、CH2またはCH3に接続されうる。

【0088】

いくつかの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は1、2、3、4、5、6またはそれ以上のヒンジ領域またはその一部分を含む。他の実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、同一であるヒンジ領域またはその一部分を含む。他の実施形態においては、ヒンジ領域またはその一部分は同一ではない。さらに他の実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖はヒトIgG1分子からのヒンジ領域またはその一部分を含む。他の実施形態においては、ヒンジ領域またはその一部分を操作して、天然に存在するシステイン残基を除去し、または天然に存在しないシステイン残基を導入し、または天然に存在する残基を天然に存在しないシステイン残基で置換することが可能である。いくつかの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、以下のアミノ酸配列を含む少なくとも1つのヒンジ領域またはその一部分を含有する：EPKSC（配列番号1）。他の実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、以下のアミノ酸配列を含む少なくとも1つのヒンジ領域またはその一部分を含有する：EPKSCDKTHTCPPCP（配列番号2）。いくつかの実施形態においては、少なくとも1つのヒンジ領域またはその一部分は、少なくとも1つの天然に存在するシステイン残基を別のアミノ酸残基で置換するために操作される。いくつかの実施形態においては、少なくとも1つの天然に存在するシステイン残基はセリンで置換される。特定の実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、以下のアミノ酸配列を含む少なくとも1つ

のヒンジ領域またはその一部分を含む：EPKSS（配列番号3）。

【0089】

追加的な実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、部位特異的コンジュゲート化に有用な天然に存在しないシステイン残基を含みうる。そのようなアプローチ、組成および方法は2008年1月18日付け出願の米国仮特許出願番号61/022,073（題名“Cysteine Engineered Antibodies for Site-Specific Conjugation”）および2005年9月22日付け出願の米国特許出願公開番号20070092940（それらのそれぞれの全体を参照により本明細書に組み入れることとする）に例示されている。

【0090】

A.8. 二量体化／多量体化ドメイン

本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質の構築は、多量体化を可能にするポリペプチド鎖に存在するドメインに依存する。例えば、通常の抗体は、ホモ二量体分子を形成するためにFcのCH2およびCH3領域の相互作用を利用する。同一分子内では、抗体は、ヘテロ二量体を形成するために重鎖および軽鎖サブユニットからのCH1およびC kappa／ラムダ領域を利用する。本発明のポリペプチド鎖が多重特異性エピトープ結合性タンパク質を形成するよう、天然に存在するタンパク質多量体化ドメインを利用することも可能である。いくつかの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、CH1、CH2、CH3、C kappa／ラムダ、ロイシンジッパードメイン（bZIP）、ヘリックス-ループ-ヘリックスモチーフ、EFハンド、ホスホチロシン結合性（PTB）ドメイン、Srcホモロジードメイン（SH2、SH3）、または当技術分野で公知の他のドメインから選ばれるタンパク質二量体化／多量体化ドメインを含む。他の実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、2006年12月5日付け出願の米国特許公開番号20070140966（その全体を参照により本明細書に組み入れることとする）に示されている多量体化ドメインを含む。

【0091】

B. 本発明のポリペプチド鎖をコードするベクター

本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は2～4本のポリペプチド鎖を含みうる。他の実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は5、6、7、8本またはそれ以上のポリペプチド鎖を含みうる。本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質の各ポリペプチド鎖は1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上のエピトープ結合性ドメインを含みうる。該ポリペプチド鎖は、scFv、一本鎖ダイアボディ、抗体の可変領域または当技術分野で公知の他の公知エピトープ結合性ドメインでありうるエピトープ結合性ドメインを含む。該Fc領域および該エピトープ結合性ドメインは多数の異なる配向で互いに連結されうる（例えば、第A節および図1～5を参照されたい）。本発明はまた、本発明のポリペプチド鎖および多重特異性エピトープ結合性タンパク質を作製および／または発現するためのポリヌクレオチドベクターを提供する。1つの実施形態においては、ポリペプチド鎖を作製するためのベクターは、Fc領域のC末端に連結されたエピトープ結合性ドメインをコードしている。もう1つの実施形態においては、該ポリペプチド鎖を作製するためのベクターは、Fc領域のN末端に連結されたエピトープ結合性ドメインをコードしている。もう1つの実施形態においては、該ポリペプチド鎖を作製するためのベクターは、Fc領域のN末端およびC末端に連結されたエピトープ結合性ドメインをコードしている。

【0092】

1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性ポリペプチド鎖は、プロモーター、本発明のポリペプチド鎖をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含むベクターから発現される。もう1つの実施形態においては、該発現ベクターは、プロモーター、Fc領域を含むエピトープ結合性ポリペプチド鎖をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。もう1つの実施形態においては、該発現ベクターは、プロモーター、1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上のエピトープ結合性ドメインのN末端側に連結されたFc領域を含むエピトープ結合性ポリペプチド鎖をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。もう1つの実施形態においては、該発現ベクターは

、プロモーター、1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上のエピトープ結合性ドメインのC末端側に連結されたFc領域を含むエピトープ結合性ポリペプチド鎖をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。さらにもう1つの実施形態においては、該発現ベクターは、プロモーター、Fc領域のN末端およびC末端側に連結された1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上のエピトープ結合性ドメインをコードするポリヌクレオチド配列を含む。

【0093】

他の実施形態においては、本発明のベクターは更に、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つまたはそれ以上のCH1および／またはCカップ／ラムダ領域を含む本発明の多重特異性エピトープ結合性ポリペプチド鎖をコードするポリヌクレオチド配列を含む。他の実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上のCH1および／またはCカップ／ラムダ領域を含む。もう1つの実施形態においては、Fc領域、CH1領域またはCカップ／ラムダ領域は、当技術分野で公知の任意の抗体サブタイプに由来する。他の実施形態においては、Fc領域は、当技術分野で公知の複数の抗体サブタイプに由来するキメラである。

【0094】

他の実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質はFc領域の非存在下でCH1またはCカップ／ラムダ領域を含みうる。他の実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、Fc領域の非存在下で少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つまたはそれ以上のCH1および／またはCカップ／ラムダ領域を含む。他の実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質はFc領域の非存在下で抗体のヒンジ領域の全部または一部を含みうる。

【0095】

B.1. C末端エピトープ結合性ドメインを有するポリペプチド鎖をコードするベクター
1つの実施形態においては、該発現ベクターは、プロモーター、Fc領域のC末端に連結されたscFvをコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む（例えば、図1A（挿入図a、b、c）を参照されたい）。もう1つの実施形態においては、該発現ベクターは、プロモーター、Fc領域のC末端に連結された複数のscFvをコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む（例えば、図2A（挿入図a、b、c）を参照されたい）。もう1つの実施形態においては、該発現ベクターは、プロモーター、Fc領域のC末端に連結された1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上のscFvをコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。

【0096】

もう1つの実施形態においては、該発現ベクターは、プロモーター、Fc領域のC末端に連結された一本鎖ダイアボディをコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む（例えば、図3E（挿入図a）を参照されたい）。もう1つの実施形態においては、該発現ベクターは、プロモーター、Fc領域のC末端に連結された複数の一本鎖ダイアボディをコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。もう1つの実施形態においては、該発現ベクターは、プロモーター、Fc領域のC末端に連結された1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上の一本鎖ダイアボディをコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。

【0097】

もう1つの実施形態においては、該発現ベクターは、プロモーター、Fc領域のC末端に連結された抗体可変領域をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。もう1つの実施形態においては、該発現ベクターは、プロモーター、Fc領域のC末端に連結された複数の抗体可変領域をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。もう1つの実施形態においては、該発現ベクターは、プロモーター、Fc領域のC末端に連結された1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上の抗体可変領域をコードするポリヌクレオチド

配列およびポリA尾部を含む。

【0098】

もう1つの実施形態においては、該発現ベクターは、プロモーター、Fc領域のC末端に連結された当技術分野で公知のエピトープ結合性ドメインをコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。もう1つの実施形態においては、該発現ベクターは、プロモーター、Fc領域のC末端に連結された当技術分野で公知の複数のエピトープ結合性ドメインをコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。もう1つの実施形態においては、該ベクターは、プロモーター、Fc領域のC末端に連結された1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上の当技術分野で公知のエピトープ結合性ドメインをコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。もう1つの実施形態においては、該ベクターは、プロモーター、Fc領域のC末端に連結された複数のエピトープ結合性ドメイン（該ドメインは、抗体可変領域、scFv、一本鎖ダイアボディおよび当技術分野で公知のもう1つのエピトープ結合性ドメインよりなる群から選ばれる）をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。

10

【0099】

B.2. N末端エピトープ結合性ドメインを有するポリペプチド鎖をコードするベクター

1つの実施形態においては、該発現ベクターは、プロモーター、Fc領域のN末端に連結されたscFvをコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む（例えば、図1A（挿入図a、b、d、eおよびf）を参照されたい）。もう1つの実施形態においては、該発現ベクターは、プロモーター、Fc領域のN末端に連結された複数のscFvをコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む（例えば、図2A（挿入図a、d、eおよびf）を参照されたい）。もう1つの実施形態においては、該発現ベクターは、プロモーター、Fc領域のN末端に連結された1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上のscFvをコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。

20

【0100】

もう1つの実施形態においては、該発現ベクターは、プロモーター、Fc領域のN末端に連結された一本鎖ダイアボディをコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。もう1つの実施形態においては、該発現ベクターは、プロモーター、Fc領域のN末端に連結された複数の一本鎖ダイアボディをコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。もう1つの実施形態においては、該発現ベクターは、プロモーター、Fc領域のN末端に連結された1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上の一本鎖ダイアボディをコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。

30

【0101】

もう1つの実施形態においては、該発現ベクターは、プロモーター、Fc領域のN末端に連結された抗体可変領域（例えば、重鎖および／または軽鎖可変領域）をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む（例えば、図3A（挿入図aおよびc）を参照されたい）。もう1つの実施形態においては、該発現ベクターは、プロモーター、Fc領域のN末端に連結された複数の抗体可変領域をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。もう1つの実施形態においては、該発現ベクターは、プロモーター、Fc領域のN末端に連結された1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上の抗体可変領域をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。

40

【0102】

もう1つの実施形態においては、該発現ベクターは、プロモーター、Fc領域のN末端に連結された当技術分野で公知のエピトープ結合性ドメインをコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。もう1つの実施形態においては、該発現ベクターは、プロモーター、Fc領域のN末端に連結された当技術分野で公知の複数のエピトープ結合性ドメインをコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。もう1つの実施形態においては、該ベクターは、プロモーター、Fc領域のN末端に連結された1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上の当技術分野で公知のエピトープ結合性ドメインをコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。もう1つの実施形態においては、該ベクターは、プロ

50

モーター、Fc領域のN末端に連結された複数のエピトープ結合性ドメイン（該ドメインは、抗体可変領域、scFv、一本鎖ダイアボディおよび当技術分野で公知のもう1つのエピトープ結合性ドメインよりなる群から選ばれる）をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。

【0103】

B.3. N末端およびC末端エピトープ結合性ドメインを有するポリペプチド鎖をコードするベクター

また、プロモーターならびにFc領域のN末端およびC末端の両方に連結された1以上のエピトープ結合性ドメインならびにポリA尾部を含む発現ベクターも本発明に含まれる。1つの実施形態においては、該発現ベクターは、（a）プロモーター、（b）N末端に連結された少なくとも1つのエピトープ結合性ドメインおよびC末端に連結された少なくとも1つのエピトープ結合性ドメインをコードするポリヌクレオチド配列、ならびに（c）ポリA尾部を含み、ここで、各エピトープ結合性ドメインは、抗体可変領域、scFv、一本鎖ダイアボディまたは当技術分野で公知のもう1つのエピトープ結合性ドメインよりなる群から選ばれる。もう1つの実施形態においては、同じタイプのエピトープ結合性ドメイン（例えば、scFv）がFc領域のN末端およびC末端の両方に連結されている。さらにもう1つの実施形態においては、異なるタイプのエピトープ結合性ドメインがFcのN末端およびC末端の両方に連結されている。限定的なものではないが例えば、1以上のscFvがN末端に連結されることが可能であり、1以上の一本鎖ダイアボディがC末端に連結されることが可能であり、あるいは1以上のscFvおよび1以上の一本鎖ダイアボディがN末端およびC末端に連結されていることが可能である。

【0104】

特定の実施形態においては、該発現ベクターは、プロモーター、Fc領域のN末端およびC末端に連結された少なくとも1つのscFvをコードするポリヌクレオチド配列ならびにポリA尾部を含む（例えば、図1A（挿入図aおよびb）および図2A（挿入図aおよびb）を参照されたい）。もう1つの実施形態においては、該発現ベクターは、プロモーター、Fc領域のN末端およびC末端に連結された複数のscFvをコードするポリヌクレオチド配列ならびにポリA尾部を含む（例えば、図2A（挿入図a）を参照されたい）。もう1つの実施形態においては、該発現ベクターは、プロモーター、Fc領域のN末端およびC末端に連結された1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上のscFvをコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。

【0105】

もう1つの実施形態においては、該発現ベクターは、プロモーター、Fc領域のN末端およびC末端に連結された少なくとも1つの一本鎖ダイアボディをコードするポリヌクレオチド配列ならびにポリA尾部を含む。もう1つの実施形態においては、該発現ベクターは、プロモーター、Fc領域のN末端およびC末端に連結された複数の一本鎖ダイアボディをコードするポリヌクレオチド配列ならびにポリA尾部を含む。もう1つの実施形態においては、該発現ベクターは、プロモーター、Fc領域のN末端およびC末端に連結された1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上の一本鎖ダイアボディをコードするポリヌクレオチド配列ならびにポリA尾部を含む。

【0106】

もう1つの実施形態においては、該発現ベクターは、プロモーター、Fc領域のN末端およびC末端に連結された少なくとも1つの抗体可変領域をコードするポリヌクレオチド配列ならびにポリA尾部を含む。もう1つの実施形態においては、該発現ベクターは、プロモーター、Fc領域のN末端およびC末端に連結された複数の抗体可変領域をコードするポリヌクレオチド配列ならびにポリA尾部を含む。もう1つの実施形態においては、該発現ベクターは、プロモーター、Fc領域のN末端およびC末端に連結された1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上の抗体可変領域をコードするポリヌクレオチド配列ならびにポリA尾部を含む。

【0107】

もう1つの実施形態においては、該発現ベクターは、プロモーター、Fc領域のN末端およ

びC末端に連結された当技術分野で公知のエピトープ結合性ドメインをコードするポリヌクレオチド配列ならびにポリA尾部を含む。もう1つの実施形態においては、該ベクターは、プロモーター、Fc領域のN末端およびC末端に連結された当技術分野で公知の複数のエピトープ結合性ドメインをコードするポリヌクレオチド配列ならびにポリA尾部を含む。もう1つの実施形態においては、該ベクターは、プロモーター、Fc領域のN末端およびC末端に連結された1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上の当技術分野で公知のエピトープ結合性ドメインをコードするポリヌクレオチド配列ならびにポリA尾部を含む。もう1つの実施形態においては、該ベクターは、プロモーター、Fc領域のN末端およびC末端に連結された複数のエピトープ結合性ドメイン（該ドメインは、抗体可変領域、scFv、一本鎖ダイアボディおよび当技術分野で公知のもう1つのエピトープ結合性ドメインよりなる群から選ばれる）をコードするポリヌクレオチド配列ならびにポリA尾部を含む。

10

【0108】

B.4. 本発明のポリペプチド鎖をコードするベクターの特定の実施形態

1つの実施形態においては、本発明のベクターは、プロモーター、Fc領域に連結された3つのscFvをコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。特定の実施形態においては、本発明のベクターは、プロモーター、Fc領域に連結された3つのscFv（N末端からC末端へと、scFv-scFv-Fc領域-scFvとして配置されている）をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む（図1A（挿入図a）を参照されたい）。もう1つの実施形態においては、本発明のベクターは、プロモーター、Fc領域に連結された4つのscFvをコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。もう1つの実施形態においては、本発明のベクターは、プロモーター、Fc領域に連結された4つのscFv（scFv-scFv-Fc領域-scFv-scFvとして配置されている）をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む（図2A（挿入図a）を参照されたい）。もう1つの実施形態においては、本発明のベクターは、プロモーター、Fc領域に連結された抗体可変領域および2つのscFvをコードするポリヌクレオチド配列ならびにポリA尾部を含む。もう1つの特定の実施形態においては、本発明のベクターは、プロモーター、抗体可変領域、2つのscFvおよびFc領域（抗体可変領域-Fc領域-scFv-scFvとして配置されている）をコードするポリヌクレオチド配列ならびにポリA尾部を含む（図3A（挿入図aおよびc）を参照されたい）。もう1つの実施形態においては、本発明のベクターは、プロモーター、Fc領域に連結された2つの抗体可変領域および2つのscFvをコードするポリヌクレオチド配列ならびにポリA尾部を含む。特定の実施形態においては、本発明のベクターは、プロモーター、Fc領域に連結された2つの抗体可変領域および2つのscFv（N末端からC末端へと、抗体可変領域-抗体可変領域-Fc領域-scFv-scFvとして配置されている）をコードするポリヌクレオチド配列ならびにポリA尾部を含む（図4A（挿入図aおよびc）を参照されたい）。さらにもう1つの特定の実施形態においては、本発明のベクターは、プロモーター、Fc領域に連結された抗体可変領域および2つのscFv（N末端からC末端へと、scFv-抗体可変領域-Fc領域-scFvとして配置されている）をコードするポリヌクレオチド配列ならびにポリA尾部を含む（図4K（挿入図a）を参照されたい）。

20

30

【0109】

もう1つの実施形態においては、本発明のベクターは、プロモーター、C kappa/ラムダ領域に連結された2つの抗体可変領域をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。特定の実施形態においては、本発明のベクターは、プロモーター、C kappa/ラムダ領域に連結された2つの抗体軽鎖可変ドメイン（N末端からC末端へと、以下の配向で配置されている：VL1-C kappa/ラムダ-VL2）をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む（図2C挿入図Aを参照されたい）。もう1つの特定の実施形態においては、本発明のベクターは、プロモーター、C kappa/ラムダ領域に連結された2つの抗体可変領域および2つのscFv（N末端からC末端へと、以下の配向で配置されている：scFv-VL1-C kappa/ラムダ-scFv）をコードするポリヌクレオチド配列ならびにポリA尾部を含む（図5C挿入図bを参照されたい）。

40

【0110】

50

もう1つの実施形態においては、本発明のベクターは、プロモーター、CH1領域に連結された2つの抗体可変領域をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。特定の実施形態においては、本発明のベクターは、プロモーター、CH1領域に連結された2つの抗体重鎖可変ドメイン（N末端からC末端へと、以下の配向で配置されている：VH1-CH1-VH2）をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む（図2C挿入図bを参照されたい）。もう1つの特定の実施形態においては、本発明のベクターは、プロモーター、CH1領域に連結された2つの抗体可変領域および2つのscFv（N末端からC末端へと、以下の配向で配置されている：scFv-VH1-CH1-scFv）をコードするポリヌクレオチド配列ならびにポリA尾部を含む（図5C挿入図aを参照されたい）。

【0111】

もう1つの実施形態においては、本発明のベクターは、プロモーター、CH1、Cカップ／ラムダまたはFc領域に隣接する2つの抗体可変ドメインをコードするポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態においては、該抗体可変ドメインは重鎖可変ドメインおよび／または軽鎖可変ドメインである。特定の実施形態においては、本発明のベクターは、プロモーター、2つの重鎖抗体可変ドメイン、2つのCH1ドメインおよびFc領域（N末端からC末端へと、以下の配向で配置されている：VH2-第1 CH1-VH1-第2 CH1-Fc領域）をコードするポリヌクレオチド配列ならびにポリA尾部を含む（図4M、挿入図Aを参照されたい）。もう1つの特定の実施形態においては、本発明のベクターは、プロモーター、2つの抗体軽鎖可変ドメイン（VL）および2つのCカップ／ラムダ領域（N末端からC末端へと、以下の配向で配置されている：VL2-第1 Cカップ／ラムダ-VL1-第2 Cカップ／ラムダ）をコードするポリヌクレオチド配列ならびにポリA尾部を含む（図4M、挿入図Bを参照されたい）。もう1つの特定の実施形態においては、本発明のベクターは、プロモーター、VLドメイン、Cカップ／ラムダ領域、VHドメイン、CH1ドメインおよびFc領域（N末端からC末端へと、以下の配向で配置されている：VL-Cカップ／ラムダ-VH-CH1-Fc領域）をコードするポリヌクレオチド配列ならびにポリA尾部を含む（図4O、挿入図aを参照されたい）。もう1つの特定の実施形態においては、本発明のベクターは、プロモーター、VHドメイン、CH1ドメイン、VLドメイン、Cカップ／ラムダドメイン（N末端からC末端へと、以下の配向で配置されている：VH-CH1-VL-Cカップ／ラムダ）をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む（図4O、挿入図bを参照されたい）。さらにもう1つの特定の実施形態においては、本発明のベクターは、プロモーター、2つの抗体軽鎖可変ドメイン、2つのCカップ／ラムダ領域およびFc領域（N末端からC末端へと、以下の配向で配置されている：VL-Cカップ／ラムダ-VL-Cカップ／ラムダ-Fc領域）をコードするポリヌクレオチド配列ならびにポリA尾部を含む（図4Q、挿入図aを参照されたい）。もう1つの特定の実施形態においては、本発明のベクターは、プロモーター、2つの抗体重鎖可変ドメインおよび2つのCH1ドメイン（N末端からC末端へと、以下の配向で配置されている：VH2-CH1-VH1-CH1）をコードするポリヌクレオチド配列ならびにポリA尾部を含む（図4Q、挿入図bを参照されたい）。もう1つの特定の実施形態においては、本発明のベクターは、抗体軽鎖可変ドメイン、Cカップ／ラムダ、抗体重鎖、CH1およびFc領域（N末端からC末端へと、以下の配向で配置されている：VL-Cカップ／ラムダ-VH-CH1-Fc領域）をコードするポリヌクレオチド配列ならびにポリA尾部を含む（図4S、挿入図aを参照されたい）。さらにもう1つの特定の実施形態においては、本発明のベクターは、プロモーター、抗体重鎖可変ドメイン、CH1、抗体軽鎖可変ドメインおよびCカップ／ラムダ（N末端からC末端へと、以下の配向で配置されている：VH-CH1-VL-Cカップ／ラムダ）をコードするポリヌクレオチド配列ならびにポリA尾部を含む（図4S、挿入図bを参照されたい）。

【0112】

他の特定の実施形態においては、本発明のベクターは、プロモーター、抗体軽鎖可変ドメインおよびCカップ／ラムダ（N末端からC末端へと、以下の配向で配置されている：VL-Cカップ／ラムダ）をコードするポリヌクレオチド配列ならびにポリA尾部を含む（図4M、挿入図cおよびd；図4O、挿入図d；ならびに図4S、挿入図dを参照されたい）。さらにもう1つの特定の実施形態においては、本発明のベクターは、プロモーター、抗体重鎖可変ド

10

20

30

40

50

メインおよびCH1（N末端からC末端へと、以下の配向で配置されている：VH-CH1）をコードするポリヌクレオチド配列ならびにポリA尾部を含む（図40、挿入図c；図4Q、挿入図cおよびd；図4S挿入図c；ならびに図4U、挿入図bを参照されたい）。

【0113】

もう1つの特定の実施形態においては、本発明のベクターは、プロモーター、抗体軽鎖可変ドメイン、Cカップ／ラムダおよびFc領域（N末端からC末端へと、以下の配向で配置されている：VL-Cカップ／ラムダ-Fc領域）をコードするポリヌクレオチド配列ならびにポリA尾部を含む（図4U、挿入図aを参照されたい）。

【0114】

いくつかの実施形態においては、本発明のベクターは2001年3月20日付け出願のPCT公開WO 01/77342の図5に記載されているベクターではない。

【0115】

C. 多重特異性エピトープ結合性タンパク質 - 2本鎖

以下の節においては、2本のポリペプチド鎖を含む本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質の構築および配向を説明する。

【0116】

いくつかの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は本発明の第1および第2ポリペプチド鎖を含み、ここで、第1および／または第2ポリペプチド鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上のエピトープ結合性ドメインに連結されたFc領域を含む。本発明のポリペプチド鎖は、scFv、一本鎖ダイアボディ、抗体の可変領域または当技術分野で公知の他のエピトープ結合性ドメインでありうるエピトープ結合性ドメインを含む。Fc領域およびエピトープ結合性ドメインは多数の異なる配向で互いに連結されうる（前記第A節を参照されたい）。1つの実施形態においては、該エピトープ結合性ドメインはFc領域のC末端に連結されている。他の実施形態においては、該エピトープ結合性ドメインはFc領域のN末端に連結されている。他の実施形態においては、該エピトープ結合性ドメインはFc領域のN末端およびC末端に連結されている。いくつかの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は本発明の第1および第2ポリペプチド鎖を含み、ここで、第1および／または第2ポリペプチド鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上のエピトープ結合性ドメインに連結された1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上のFc領域を含む。1つの実施形態においては、該エピトープ結合性ドメインは少なくとも1つのFc領域のC末端に連結されている。他の実施形態においては、該エピトープ結合性ドメインは少なくとも1つのFc領域のN末端に連結されている。他の実施形態においては、該エピトープ結合性ドメインは少なくとも1つのFc領域のN末端およびC末端の両方に連結されている。

【0117】

他の実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質はFc領域を含まない。本発明のそのようなタンパク質においては、該エピトープ結合性ドメインはCH1ドメインおよび／またはCカップ／ラムダドメインにN末端、C末端またはN-およびC-末端において連結されうる。以下の節においては、Fc領域を含まない本発明のタンパク質を含めるために、Fc領域なる語はCH1ドメインおよび／またはCカップ／ラムダにより置き換えられうる」と理解されるべきである。いくつかの代替的实施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は本発明の第1および第2ポリペプチド鎖を含み、ここで、第1および／または第2ポリペプチド鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上のエピトープ結合性ドメインに連結された1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上のCH1および／またはCカップ／ラムダ領域を含む。1つの実施形態においては、該エピトープ結合性ドメインは少なくとも1つのCH1および／またはCカップ／ラムダ領域のC末端に連結されている。他の実施形態においては、該エピトープ結合性ドメインは少なくとも1つのCH1および／またはCカップ／ラムダ領域のN末端に連結されている。他の実施形態においては、該エピトープ結合性ドメインは少なくとも1つのCH1および／またはCカップ／ラムダ領域のN末端およびC末端の両方に連結されている。

【0118】

C.1. Fc領域のC末端に連結されたエピトープ結合性ドメインを有する多重特異性エピトープ結合性タンパク質

1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1および第2ポリペプチド鎖を含み、ここで、第1および／または第2ポリペプチド鎖はFc領域を含む。1つの実施形態においては、多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1および第2ポリペプチド鎖を含み、ここで、第1および／または第2鎖は、Fc領域のC末端に連結されたscFvを含む（例えば、図1Bを参照されたい）。もう1つの実施形態においては、第1および／または第2ポリペプチド鎖は、Fc領域のC末端に連結された複数のscFvを含む（例えば、図2Bを参照されたい）。もう1つの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、Fc領域のC末端に連結された少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上のscFvを有する第1および／または第2鎖を含む。

10

【0119】

1つの実施形態においては、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1および第2ポリペプチド鎖を含み、ここで、第1および／または第2鎖は、Fc領域のC末端に連結された一本鎖ダイアボディを含む（例えば、図3Fを参照されたい）。もう1つの実施形態においては、第1および／または第2ポリペプチド鎖は、Fc領域のC末端に連結された複数の一本鎖ダイアボディを含む。もう1つの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、Fc領域のC末端に連結された少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上の一本鎖ダイアボディを有する第1および／または第2鎖を含む。

20

【0120】

1つの実施形態においては、多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1および第2ポリペプチド鎖を含み、ここで、第1および／または第2鎖は、Fc領域のC末端に連結された抗体可変領域を含む。もう1つの実施形態においては、第1および／または第2ポリペプチド鎖は、Fc領域のC末端に連結された複数の抗体可変領域を含む。もう1つの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、Fc領域のC末端に連結された少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上の抗体可変領域を有する第1および／または第2鎖を含む。

【0121】

1つの実施形態においては、多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1および第2ポリペプチド鎖を含み、ここで、第1および／または第2鎖は、Fc領域のC末端に連結された当技術分野で公知のエピトープ結合性ドメインを含む。もう1つの実施形態においては、第1および／または第2ポリペプチド鎖は、Fc領域のC末端に連結された当技術分野で公知の複数のエピトープ結合性ドメインを含む。もう1つの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、Fc領域のC末端に連結された当技術分野で公知の少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上のエピトープ結合性タンパク質（該ドメインは、抗体可変領域、scFv、一本鎖ダイアボディおよび当技術分野で公知の別のエピトープ結合性ドメインよりなる群から選ばれる）を有する第1および／または第2鎖を含む。

30

【0122】

C.2. Fc領域のN末端に連結されたエピトープ結合性ドメインを有する多重特異性エピトープ結合性タンパク質

1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1および第2ポリペプチド鎖を含み、ここで、第1および／または第2ポリペプチド鎖はFc領域を含む。1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1および第2ポリペプチド鎖を含み、ここで、第1および／または第2鎖は、Fc領域のN末端に連結されたscFvを含む（例えば、図1A（挿入図b）を参照されたい）。もう1つの実施形態においては、第1および／または第2ポリペプチド鎖は、Fc領域のN末端に連結された複数のscFvを含む（例えば、図1A（挿入図aおよびc）を参照されたい）。もう1つの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、Fc領域のN末端に連結された少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上のscFvを有する第1および／または第2鎖を

40

50

含む。

【0123】

1つの実施形態においては、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1および第2ポリペプチド鎖を含み、ここで、第1および／または第2鎖は、Fc領域のN末端に連結された一本鎖ダイアボディを含む。もう1つの実施形態においては、第1および／または第2ポリペプチド鎖は、Fc領域のN末端に連結された複数の一本鎖ダイアボディを含む。もう1つの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、Fc領域のN末端に連結された少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上の一本鎖ダイアボディを有する第1および／または第2鎖を含む。

【0124】

1つの実施形態においては、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1および第2ポリペプチド鎖を含み、ここで、第1および／または第2鎖は、Fc領域のN末端に連結された抗体可変領域を含む（例えば、図3Bを参照されたい）。もう1つの実施形態においては、第1および／または第2ポリペプチド鎖は、Fc領域のN末端に連結された複数の抗体可変領域を含む（例えば、図4Bを参照されたい）。もう1つの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、Fc領域のN末端に連結された少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上の抗体可変領域を有する第1および／または第2鎖を含む。

【0125】

1つの実施形態においては、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1および第2ポリペプチド鎖を含み、ここで、第1および／または第2鎖は、Fc領域のN末端に連結された当技術分野で公知のエピトープ結合性ドメインを含む。もう1つの実施形態においては、第1および／または第2ポリペプチド鎖は、Fc領域のN末端に連結された当技術分野で公知の複数のエピトープ結合性ドメインを含む。もう1つの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、Fc領域のN末端に連結された当技術分野で公知の少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上のエピトープ結合性タンパク質（該ドメインは、抗体可変領域、scFv、一本鎖ダイアボディおよび当技術分野で公知の別のエピトープ結合性ドメインよりなる群から選ばれる）を有する第1および／または第2鎖を含む。

【0126】

C.3. Fc領域のN末端またはC末端に連結されたエピトープ結合性ドメインを有する多重特異性エピトープ結合性タンパク質

1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1および第2ポリペプチド鎖を含み、ここで、第1および／または第2ポリペプチド鎖はFc領域を含む。1つの実施形態においては、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1および第2ポリペプチド鎖を含み、ここで、第1および／または第2鎖は、Fc領域のN末端またはC末端に連結されたscFvを含む。もう1つの実施形態においては、第1および／または第2ポリペプチド鎖は、Fc領域のN末端またはC末端に連結された複数のscFvを含む。もう1つの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、Fc領域のN末端またはC末端に連結された少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上のscFvを有する第1および／または第2鎖を含む。

【0127】

1つの実施形態においては、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1および第2ポリペプチド鎖を含み、ここで、第1および／または第2鎖は、Fc領域のN末端またはC末端に連結された一本鎖ダイアボディを含む。もう1つの実施形態においては、第1および／または第2ポリペプチド鎖は、Fc領域のN末端またはC末端に連結された複数の一本鎖ダイアボディを含む。もう1つの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、Fc領域のN末端またはC末端に連結された少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上の一本鎖ダイアボディを有する第1および／または第2鎖を含む。

【0128】

1つの実施形態においては、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1および第2ポリペプチド鎖を含み、ここで、第1および／または第2鎖は、Fc領域のC末端に連結され

た抗体可変領域を含む。もう1つの実施形態においては、第1および／または第2ポリペプチド鎖は、Fc領域のN末端またはC末端に連結された複数の抗体可変領域を含む。もう1つの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、Fc領域のN末端またはC末端に連結された少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上の抗体可変領域を有する第1および／または第2鎖を含む。

【0129】

1つの実施形態においては、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1および第2ポリペプチド鎖を含み、ここで、第1および／または第2鎖は、Fc領域のN末端またはC末端に連結された当技術分野で公知のエピトープ結合性ドメインを含む。もう1つの実施形態においては、第1および／または第2ポリペプチド鎖は、Fc領域のN末端またはC末端に連結された当技術分野で公知の複数のエピトープ結合性ドメインを含む。もう1つの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、Fc領域のN末端またはC末端に連結された当技術分野で公知の少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上のエピトープ結合性タンパク質（該ドメインは、抗体可変領域、scFv、一本鎖ダイアボディおよび当技術分野で公知の別のエピトープ結合性ドメインよりなる群から選ばれる）を有する第1および／または第2鎖を含む。

【0130】

C.4. Fc領域のN末端およびC末端に連結されたエピトープ結合性ドメインを有する多重特異性エピトープ結合性タンパク質

1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1および第2ポリペプチド鎖を含み、ここで、第1および／または第2ポリペプチド鎖はFc領域を含む。1つの実施形態においては、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1および第2ポリペプチド鎖を含み、ここで、第1および／または第2鎖は、Fc領域のN末端およびC末端に連結されたscFvを含む（例えば、図1Bを参照されたい）。もう1つの実施形態においては、第1および／または第2ポリペプチド鎖は、Fc領域のN末端およびC末端に連結された複数のscFvを含む（例えば、図2Bを参照されたい）。もう1つの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、Fc領域のN末端およびC末端に連結された少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上のscFvを有する第1および／または第2鎖を含む。

【0131】

1つの実施形態においては、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1および第2ポリペプチド鎖を含み、ここで、第1および／または第2鎖は、Fc領域のN末端およびC末端に連結された一本鎖ダイアボディを含む。もう1つの実施形態においては、第1および／または第2ポリペプチド鎖は、Fc領域のN末端およびC末端に連結された複数の一本鎖ダイアボディを含む。もう1つの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、Fc領域のN末端およびC末端に連結された少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上の一本鎖ダイアボディを有する第1および／または第2鎖を含む。

【0132】

1つの実施形態においては、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1および第2ポリペプチド鎖を含み、ここで、第1および／または第2鎖は、Fc領域のN末端およびC末端に連結された抗体可変領域を含む。もう1つの実施形態においては、第1および／または第2ポリペプチド鎖は、Fc領域のN末端およびC末端に連結された複数の抗体可変領域を含む。もう1つの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、Fc領域のN末端およびC末端に連結された少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上の抗体可変領域を有する第1および／または第2鎖を含む。

【0133】

1つの実施形態においては、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1および第2ポリペプチド鎖を含み、ここで、第1および／または第2鎖は、Fc領域のN末端およびC末端に連結された当技術分野で公知のエピトープ結合性ドメインを含む。もう1つの実施形態においては、第1および／または第2ポリペプチド鎖は、Fc領域のN末端およびC末端に連結

された当技術分野で公知の複数のエピトープ結合性ドメインを含む。もう1つの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、Fc領域のN末端およびC末端に連結された当技術分野で公知の少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上のエピトープ結合性タンパク質（該ドメインは、抗体可変領域、scFv、一本鎖ダイアボディおよび当技術分野で公知の別のエピトープ結合性ドメインよりなる群から選ばれる）を有する第1および／または第2鎖を含む。

【0134】

C.5. 多重特異性エピトープ結合性タンパク質の構築

もう1つの実施形態においては、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1および第2ポリペプチド鎖を含み、各鎖はFc領域を含む。もう1つの実施形態においては、第1および／または第2ポリペプチド鎖は、scFv、一本鎖ダイアボディ、抗体可変領域および当技術分野で公知の任意のエピトープ結合性ドメインを含む任意のエピトープ結合性ドメインを含む。もう1つの実施形態においては、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、Fc領域により二量化された第1および第2ポリペプチド鎖を含む。もう1つの実施形態においては、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1および第2ポリペプチド鎖を含み、ここで、第1および第2ポリペプチド鎖はアミノ酸配列において同一ではない。もう1つの実施形態においては、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1および第2ポリペプチド鎖を含み、第1および第2ポリペプチド鎖はアミノ酸配列において同一である。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質はヘテロ二量体である。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質はホモ二量体である。

【0135】

C.6. 特定の実施形態 - 2本鎖

1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1および第2ポリペプチド鎖を含み、ここで、第1および／または第2ポリペプチド鎖はFc領域を含み。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1および第2ポリペプチド鎖を含み、ここで、第1および／または第2ポリペプチド鎖は、Fc領域に連結された3つのscFvを含む。特定の実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1および第2ポリペプチド鎖を含み、第1および／または第2ポリペプチド鎖は、Fc領域に連結された3つのscFv（N末端からC末端へと、scFv-scFv-Fc領域-scFv（図1Bを参照されたい）またはその逆として配置されている）を含む。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、第1および第2ポリペプチド鎖を含み、ここで、第1および／または第2ポリペプチド鎖は、Fc領域に連結された4つのscFvを含む。特定の実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1および第2ポリペプチド鎖を含み、ここで、第1および／または第2ポリペプチド鎖は、Fc領域に連結された4本のscFv（N末端からC末端へと、scFv-scFv-Fc領域-scFv-scFv（図2Bを参照されたい）またはその逆（C末端からN末端にscFv-scFv-Fc領域-scFv-scFv）として配置されている）を含む。

【0136】

1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1および第2ポリペプチド鎖を含み、ここで、第1および／または第2ポリペプチド鎖はCカップ／ラムダ領域を含む。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1および第2ポリペプチド鎖を含み、ここで、第1および／または第2鎖は、Cカップ／ラムダドメインに連結された2つの抗体可変領域を含む。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1および第2ポリペプチド鎖を含み、ここで、第1および／または第2鎖は、Cカップ／ラムダ領域に連結された2つの抗体可変領域（N末端からC末端へと、VL1-Cカップ／ラムダ-VL2として配置されている）を含む（図2Dを参照されたい）。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1および第2ポリペプチド鎖を含み、ここで、第1および／または第2鎖は、Cカップ／ラムダ領域に連結された抗体可変領域および2つのscFvを含む

。特定の実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1および第2ポリペプチド鎖を含み、ここで、第1および／または第2鎖は、Cカップ／ラムダ領域に連結された抗体可変領域および2つのscFv（N末端からC末端へと、scFv-VL1-Cカップ／ラムダ-scFvとして配置されている）を含む（図5Cを参照されたい）。

【0137】

もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1および／または第2ポリペプチド鎖を含み、第1および／または第2鎖は、CH1に連結された2つの抗体可変領域を含む。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1および／または第2ポリペプチド鎖を含み、ここで、第1および／または第2鎖は、CH1に連結された2つの抗体可変領域（N末端からC末端へと、VH1-CH1-VH2として配置されている）を含む（図2Dを参照されたい）。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1および第2ポリペプチド鎖を含み、ここで、第1および／または第2鎖は、CH1領域に連結された抗体可変領域および2つのscFvを含む。特定の実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1および第2ポリペプチド鎖を含み、ここで、第1および／または第2鎖は、CH1に連結された抗体可変領域および2つのscFv（N末端からC末端へと、scFv-VH1-CH1-scFvとして配置されている）を含む（図5Cを参照されたい）。 10

【0138】

D. 多重特異性エピトープ結合性タンパク質 - 4本鎖

本発明は、4本のポリペプチド鎖、すなわち、それぞれ第1鎖、第2鎖、第3鎖および第4鎖（以下、「本発明のポリペプチド鎖」と総称されうる；例えば、図3B、3D、3F、4Bおよび5Bを参照されたい）を含む多重特異性エピトープ結合性タンパク質を提供する。本発明の4本鎖多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、本明細書中に例示されているとおり、4本の鎖のうちの2本は、前記節に記載されているとおりにFc領域を含むが、4本の鎖のうちの2本はFc領域を含まない。したがって、4本の鎖のうちの2本は、第A節に記載されているとおり本発明のポリペプチドを含むことが可能であり、2本は、後記で開示するとおり、ポリペプチドでありうる。 20

【0139】

D.1. Cカップ／ラムダ領域

本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は更に、抗体の定常領域からのCカップ／ラムダ領域を含みうる。Cカップ／ラムダの配向は該タンパク質内で様々でありうる。1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、他の成分（例えば、scFv、一本鎖ダイアボディ、抗体可変領域など）に対して任意の配向でCカップ／ラムダ領域を含む。 30

【0140】

1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は抗体のCカップ／ラムダ領域を含む。1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、エピトープ結合性ドメインに融合されたCカップ／ラムダ領域を含む。1つの実施形態においては、Cカップ／ラムダ領域はscFv、一本鎖ダイアボディ、抗体可変領域または当技術分野で公知の別のエピトープ結合性タンパク質に融合される。もう1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、Cカップ／ラムダ領域のN末端に連結されたエピトープ結合性ドメインを含む。もう1つの実施形態においては、複数のエピトープ結合性ドメインがCカップ／ラムダ領域のN末端に連結されている。さらにもう1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、Cカップ／ラムダ領域のN末端に連結された複数のscFv、一本鎖ダイアボディ、抗体可変領域および／または当技術分野で公知の他のエピトープ結合性ドメインを含む。 40

【0141】

a. Cカップ／ラムダ領域を含むポリペプチド鎖をコードするベクター

本発明はまた、Cカップ／ラムダドメイン（前記のとおり）を含む本発明のポリペプチド鎖を作製および／または発現するためのポリヌクレオチドベクターを提供する。1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は、プロモーター、Cカップ／ラムダを含 50

むエピトープ結合性ポリペプチド鎖をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含むベクターから発現される。1つの実施形態においては、該発現ベクターは、プロモーター、Cカップ／ラムダ領域に連結されたエピトープ結合性ドメインを含むエピトープ結合性ポリペプチド鎖をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。もう1つの実施形態においては、該発現ベクターは、プロモーター、Cカップ／ラムダ領域に連結されたscFv、一本鎖ダイアボディ、抗体可変領域または当技術分野で公知の別のエピトープ結合性ドメインをコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。もう1つの実施形態においては、該発現ベクターは、プロモーター、Cカップ／ラムダ領域のN末端に連結されたscFv、一本鎖ダイアボディ、抗体可変領域または当技術分野で公知の別のエピトープ結合性ドメインをコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。もう1つの実施形態においては、該発現ベクターは、プロモーター、Cカップ／ラムダ領域のN末端に連結された複数のscFv、一本鎖ダイアボディ、抗体可変領域または当技術分野で公知の別のエピトープ結合性ドメインをコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む。

10

【0142】

特定の実施形態においては、本発明の発現ベクターは、プロモーター、Cカップ／ラムダ領域のN末端に連結された抗体可変領域をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む（例えば、図3A（挿入図bおよびd）を参照されたい）。もう1つの特定の実施形態においては、本発明の発現ベクターは、プロモーター、Cカップ／ラムダドメインのN末端に連結された2つの抗体可変領域をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む（例えば、図4A（挿入図bおよびd）を参照されたい）。もう1つの特定の実施形態においては、本発明の発現ベクターは、プロモーター、Cカップ／ラムダ領域のN末端に連結された2つのscFvをコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む（例えば、図5A（挿入図a）を参照されたい）。

20

【0143】

もう1つの特定の実施形態においては、本発明の発現ベクターは、プロモーター、Cカップ／ラムダ領域のN末端に連結されたscFvおよび抗体可変領域をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む（例えば、図4C挿入図bを参照されたい）。もう1つの特定の実施形態においては、本発明の発現ベクターは、プロモーター、CH1領域のN末端に連結された抗体可変領域をコードするポリヌクレオチド配列およびポリA尾部を含む（例えば、図4C挿入図aを参照されたい）。

30

【0144】

D.2. 多重特異性エピトープ結合性タンパク質 - 4本鎖

以下の節においては、4本のポリペプチド鎖を含む本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質の構築および配向を説明する。

【0145】

1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1および／または第2および／または第3および／または第4ポリペプチド鎖を含み、第1および／または第2および／または第3および／または第4ポリペプチド鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上のエピトープ結合性ドメインに連結されたCH1およびFc領域（本明細書においては一緒にして「CH1／Fc領域」とも称される）またはCカップ／ラムダ領域を含む。本発明のタンパク質は、scFv、一本鎖ダイアボディ、抗体の可変領域または当技術分野で公知の他の公知エピトープ結合性ドメインでありうるエピトープ結合性ドメインを含む。

40

【0146】

1つの実施形態においては、CH1／Fc領域またはCカップ／ラムダ領域および該エピトープ結合性ドメインは多数の異なる配向で互いに連結されうる。1つの実施形態においては、該エピトープ結合性ドメインはCH1／Fc領域またはCカップ／ラムダ領域のC末端に連結されている。他の実施形態においては、該エピトープ結合性ドメインはCH1／Fc領域またはCカップ／ラムダ領域のN末端に連結されている。他の実施形態においては、該エピトープ

50

ブ結合性ドメインはCH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のN末端またはC末端に連結されている。他の実施形態においては、該エピトープ結合性ドメインはCH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のN末端およびC末端に連結されている。

【0147】

他の実施形態においては、4本の鎖を含む多重特異性エピトープ結合性タンパク質のFc領域はCH1ドメインに結合していない。他の実施形態においては、4本の鎖を含む多重特異性エピトープ結合性タンパク質のFc領域はCカップ/ラムダ領域に結合している。

【0148】

D.3. 逆転抗体

他の実施形態においては、本発明は、「抗体様」鎖を含む逆転抗体 (inverted antibody) (以下、「逆転抗体」または「本発明の逆転抗体タンパク質」と称する) を提供する。本発明の逆転抗体は少なくとも4本の鎖を含み、そのうちの少なくとも2本は抗体「重鎖様」鎖であり、少なくとも2本は抗体「軽鎖様」鎖である。本発明の逆転抗体を形成するポリペプチド鎖は、本明細書においては「本発明の逆転抗体ポリペプチド鎖」と称されることがあり、1つのタイプの本発明のポリペプチド鎖として含まれると理解されるべきである。

【0149】

いくつかの実施形態においては、本発明の重鎖様ポリペプチド鎖は少なくとも1つの抗体軽鎖可変領域および少なくとも1つのCカップ/ラムダ領域を含みうる。他の実施形態においては、本発明の重鎖様鎖は、Cカップ/ラムダドメインに対して縦列に並んだ少なくとも1つまたはそれ以上の抗体軽鎖可変領域 (VL) を含む。いくつかの実施形態においては、本発明の重鎖様ポリペプチド鎖は少なくとも1つまたはそれ以上のFc領域を含みうる。いくつかの実施形態においては、本発明の重鎖様ポリペプチド鎖はヒンジ領域の全部または一部を含む。他の実施形態においては、本発明の重鎖様ポリペプチド鎖は更に、本明細書に記載されている他のエピトープ結合性ドメインを含みうる。

【0150】

いくつかの実施形態においては、本発明の軽鎖様ポリペプチド鎖は少なくとも1つの抗体重鎖可変領域および少なくとも1つのCH1ドメインを含みうる。いくつかの実施形態においては、本発明の軽鎖様鎖は更に、CH1ドメインに対して縦列に並んだ少なくとも1つの追加的な抗体重鎖可変領域、またはCカップ/ラムダ領域に対して縦列に並んだ少なくとも1つの追加的な抗体軽鎖可変ドメインを含む。いくつかの実施形態においては、本発明の軽鎖様ポリペプチド鎖は、ヒンジ領域の全部または一部を含みうる。他の実施形態においては、本発明の軽鎖様ポリペプチド鎖は更に、本明細書に記載されている他のエピトープ結合性ドメインを含みうる。

【0151】

抗体重鎖様鎖および軽鎖様鎖が会合して、1本の重鎖様鎖の抗体可変ドメインが軽鎖様鎖の抗体可変ドメインに接近して機能性エピトープ結合部位を形成することにより、逆転抗体が形成される。例えば、抗体重鎖様鎖からのVLドメインは抗体軽鎖様鎖からのVHドメインと共に機能性結合部位を形成する (例えば、図4Uを参照されたい)。いくつかの実施形態においては、軽鎖様鎖は逆転抗体の重鎖様鎖にジスルフィド結合される。他の実施形態においては、1本の鎖からの抗体可変領域はもう1つの鎖と鎖間ジスルフィド結合を形成する。さらに他の実施形態においては、軽鎖様鎖の抗体可変領域は重鎖様鎖と鎖間ジスルフィド結合を形成する。他の実施形態においては、重鎖様鎖の抗体可変領域は軽鎖様鎖と鎖間ジスルフィド結合を形成する。

【0152】

D.4. CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のC末端に連結されたエピトープ結合性ドメインを有する多重特異性エピトープ結合性タンパク質

1つの実施形態においては、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1、第2、第3および第4ポリペプチド鎖を含み、ここで、少なくとも第1、第2、第3または第4鎖は更に、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のC末端に連結されたscFvを含む (例えば、図4

Bを参照されたい)。もう1つの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のC末端に連結された複数のscFvを含む(例えば、図4Bを参照されたい)。もう1つの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のC末端に連結された1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上のscFvを含有する少なくとも第1、第2、第3または第4鎖を含む。

【0153】

1つの実施形態においては、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1、第2、第3および第4ポリペプチド鎖を含み、ここで、少なくとも第1、第2、第3または第4鎖は更に、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のC末端に連結された一本鎖ダイアボディを含む。もう1つの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のC末端に連結された複数の一本鎖ダイアボディを含む。もう1つの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のC末端に連結された1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上の一本鎖ダイアボディを含有する少なくとも第1、第2、第3または第4鎖を含む。

【0154】

1つの実施形態においては、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1、第2、第3および第4ポリペプチド鎖を含み、ここで、少なくとも第1、第2、第3または第4鎖は更に、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のC末端に連結された抗体可変ドメインを含む。もう1つの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のC末端に連結された複数の抗体可変領域を含有する少なくとも第1、第2、第3または第4鎖を含む。もう1つの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のC末端に連結された1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上の抗体可変領域を含有する少なくとも第1、第2、第3または第4鎖を含む。

【0155】

1つの実施形態においては、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1、第2、第3および第4ポリペプチド鎖を含み、ここで、少なくとも第1、第2、第3または第4鎖は更に、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のC末端に連結された当技術分野で公知のエピトープ結合性タンパク質を含む。もう1つの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のC末端に連結された当技術分野で公知の複数のエピトープ結合性ドメインを含有する少なくとも第1、第2、第3または第4鎖を含む。もう1つの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のC末端に連結された1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上の当技術分野で公知のエピトープ結合性ドメイン(該エピトープ結合性ドメインは、scFv、一本鎖ダイアボディ、当技術分野で公知の他のエピトープ結合性ドメインの抗体可変領域よりなる群から選ばれる)を含有する少なくとも第1、第2、第3または第4鎖を含む。

【0156】

D.5. CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のN末端に連結されたエピトープ結合性ドメインを有する多重特異性エピトープ結合性タンパク質

1つの実施形態においては、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1、第2、第3および第4ポリペプチド鎖を含み、ここで、少なくとも第1、第2、第3または第4鎖は更に、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のN末端に連結されたscFvを含む(例えば、図5Bを参照されたい)。もう1つの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のC末端に連結された複数のscFvを含む(例えば、図5Bを参照されたい)。もう1つの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のN末端に連結された1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上のscFvを含有する少なくとも第1、第2、第3または第4鎖を含む。

【0157】

1つの実施形態においては、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1、第2、第3および第4ポリペプチド鎖を含み、ここで、少なくとも第1、第2、第3または第4鎖は更に、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のN末端に連結された一本鎖ダイアボディを含む。もう1つの実施形態においては、複数の一本鎖ダイアボディがCH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のN末端に連結されている。もう1つの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のN末端に連結された1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上の一本鎖ダイアボディを含有する少なくとも第1、第2、第3または第4鎖を含む。

【0158】

1つの実施形態においては、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1、第2、第3および第4ポリペプチド鎖を含み、ここで、少なくとも第1、第2、第3または第4鎖は更に、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のN末端に連結された抗体可変ドメインを含む。もう1つの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のN末端に連結された複数の抗体可変領域を含有する少なくとも第1、第2、第3または第4鎖を含む。もう1つの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のN末端に連結された1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上の抗体可変領域を含有する少なくとも第1、第2、第3または第4鎖を含む。

【0159】

1つの実施形態においては、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1、第2、第3および第4ポリペプチド鎖を含み、ここで、少なくとも第1、第2、第3または第4鎖は更に、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のN末端に連結された当技術分野で公知のエピトープ結合性タンパク質を含む。もう1つの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のN末端に連結された当技術分野で公知の複数のエピトープ結合性ドメインを含有する少なくとも第1、第2、第3または第4鎖を含む。もう1つの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のN末端に連結された1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上の当技術分野で公知のエピトープ結合性ドメイン（該エピトープ結合性ドメインは、scFv、一本鎖ダイアボディ、抗体可変領域、または当技術分野で公知の他のエピトープ結合性ドメインよりなる群から選ばれる）を含有する少なくとも第1、第2、第3または第4鎖を含む。

【0160】

D.6. CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のN末端またはC末端に連結されたエピトープ結合性ドメインを有する多重特異性エピトープ結合性タンパク質

1つの実施形態においては、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1、第2、第3および第4ポリペプチド鎖を含み、ここで、1本の鎖は更に、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のN末端またはC末端に連結されたscFvを含む（例えば、図4Bを参照されたい）。もう1つの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のN末端またはC末端に連結された複数のscFvを含む（例えば、図5Bを参照されたい）。もう1つの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のN末端またはC末端に連結された1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上のscFvを含有する少なくとも第1、第2、第3または第4鎖を含む。

【0161】

1つの実施形態においては、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1、第2、第3および第4ポリペプチド鎖を含み、ここで、少なくとも第1、第2、第3または第4鎖は更に、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のN末端またはC末端に連結されたscFvを含む。もう1つの実施形態においては、複数の一本鎖ダイアボディがCH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のN末端またはC末端に連結されている。もう1つの実施形態においては、本

発明のエピトープ結合性タンパク質は、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のN末端またはC末端に連結された複数の一本鎖ダイアボディを含む。もう1つの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のN末端またはC末端に連結された1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上の一本鎖ダイアボディを含有する少なくとも第1、第2、第3または第4鎖を含む。

【0162】

1つの実施形態においては、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1、第2、第3および第4ポリペプチド鎖を含み、ここで、少なくとも第1、第2、第3または第4鎖は更に、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のN末端またはC末端に連結された抗体可変ドメインを含む（例えば、図4Bを参照されたい）。もう1つの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のN末端またはC末端に連結された複数の抗体可変領域を含有する少なくとも第1、第2、第3または第4鎖を含む（例えば、図4Bを参照されたい）。もう1つの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のN末端またはC末端に連結された1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上の抗体可変領域を含有する少なくとも第1、第2、第3または第4鎖を含む。

【0163】

1つの実施形態においては、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1、第2、第3および第4ポリペプチド鎖を含み、ここで、少なくとも第1、第2、第3または第4鎖は更に、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のN末端またはC末端に連結された当技術分野で公知のエピトープ結合性タンパク質を含む。もう1つの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のN末端またはC末端に連結された当技術分野で公知の複数のエピトープ結合性ドメインを含有する少なくとも第1、第2、第3または第4鎖を含む。もう1つの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のN末端またはC末端に連結された1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上の当技術分野で公知のエピトープ結合性ドメイン（該ドメインは、抗体可変領域、scFv、一本鎖ダイアボディ、当技術分野で公知の別のエピトープ結合性ドメインよりなる群から選ばれる）を含有する少なくとも第1、第2、第3または第4鎖を含む。

【0164】

D.7. CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のN末端およびC末端に連結されたエピトープ結合性ドメインを有する多重特異性エピトープ結合性タンパク質

1つの実施形態においては、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1、第2、第3および第4ポリペプチド鎖を含み、ここで、1本の鎖は更に、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のN末端およびC末端に連結されたscFvを含む。もう1つの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のN末端およびC末端に連結された複数のscFvを含む。もう1つの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のN末端およびC末端に連結された1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上のscFvを含有する少なくとも第1、第2、第3または第4鎖を含む。

【0165】

1つの実施形態においては、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1、第2、第3および第4ポリペプチド鎖を含み、ここで、少なくとも第1、第2、第3または第4鎖は更に、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のN末端およびC末端に連結されたscFvを含む。もう1つの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のN末端およびC末端に連結された複数の一本鎖ダイアボディを含む。もう1つの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のN末端およびC末端に連結された1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上の一本鎖ダイアボディを含有する少なくとも第1、第2、第3または第4鎖を含む。

【0166】

1つの実施形態においては、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1、第2、第3および第4ポリペプチド鎖を含み、ここで、少なくとも第1、第2、第3または第4鎖は更に、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のN末端およびC末端に連結された抗体可変ドメインを含む。もう1つの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のN末端およびC末端に連結された複数の抗体可変領域を含有する少なくとも第1、第2、第3または第4鎖を含む。もう1つの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のN末端およびC末端に連結された1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上の抗体可変領域を含有する少なくとも第1、第2、第3または第4鎖を含む。

10

【0167】

1つの実施形態においては、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1、第2、第3および第4ポリペプチド鎖を含み、ここで、少なくとも第1、第2、第3または第4鎖は更に、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のN末端およびC末端に連結された当技術分野で公知のエピトープ結合性タンパク質を含む。もう1つの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のN末端およびC末端に連結された当技術分野で公知の複数のエピトープ結合性ドメインを含有する少なくとも第1、第2、第3または第4鎖を含む。もう1つの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域のN末端およびC末端に連結された1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上の当技術分野で公知のエピトープ結合性ドメイン（該ドメインは、scFv、一本鎖ダイアボディ、抗体可変領域、当技術分野で公知のエピトープ結合性ドメインよりなる群から選ばれる）を含有する少なくとも第1、第2、第3または第4鎖を含む。

20

【0168】

D.8. 4本鎖多重特異性エピトープ結合性タンパク質集合体

もう1つの実施形態においては、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質は4本の鎖を含み、各鎖はCH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域を含む。もう1つの実施形態においては、各ポリペプチド鎖は、scFv、一本鎖ダイアボディ、抗体可変領域または当技術分野で公知の任意のエピトープ結合性ドメインを包含する任意のエピトープ結合性ドメインを含む。もう1つの実施形態においては、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域により形成された二量体を含有する4本の鎖を含む。もう1つの実施形態においては、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質は2本以上の非同一ポリペプチド鎖を含む。1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は2本以上のポリペプチド鎖の多量体を含む。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、CH1/Fc領域またはCカップ/ラムダ領域により二量体化された2本の同一鎖を含む。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は4本の鎖を含み、そのうちの2本はFc領域により二量体化されており、2本の鎖はCH1およびCカップ/ラムダ領域により二量体化されている。

30

【0169】

D.9. 4本鎖多重特異性エピトープ結合性タンパク質の特定の実施形態

もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は少なくとも第1、第2、第3または第4ポリペプチド鎖を含み、第1鎖は、CH1/Fc領域に連結された抗体可変領域および2つのscFvを含み、第2鎖は、Cカップ/ラムダ領域に連結された抗体可変領域を含む。特定の実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1、第2、第3および第4ポリペプチド鎖を含み、第1鎖は、CH1/Fc領域に連結された抗体可変領域および2つのscFv（N末端からC末端へと、抗体可変領域-CH1/Fc領域-scFv-scFvとして配置されている）を含み、第2鎖は、Cカップ/ラムダ領域に連結された抗体可変領域を含む（図3Bを参照されたい）。

40

【0170】

50

もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は少なくとも第1、第2、第3または第4ポリペプチド鎖を含み、第1鎖は、CH1/Fc領域に連結された抗体可変領域および一本鎖ダイアボディを含み、第2鎖は、C kappa/ラムダ領域に連結された抗体可変領域を含む。特定の実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1、第2、第3および第4ポリペプチド鎖を含み、第1鎖は、CH1/Fc領域に連結された抗体可変領域および一本鎖ダイアボディ（N末端からC末端へと、抗体可変領域-CH1/Fc領域-一本鎖ダイアボディとして配置されている）を含み、第2鎖は、C kappa/ラムダ領域に連結された抗体可変領域を含む（図3Fを参照されたい）。

【0171】

もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は少なくとも第1、第2、第3または第4ポリペプチド鎖を含み、第1鎖は、CH1/Fc領域に連結された2つの抗体可変領域および2つのscFvを含み、第2鎖は、C kappa/ラムダ領域に連結された2つの抗体可変領域を含む。特定の実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1、第2、第3および第4ポリペプチド鎖を含み、第1鎖は、CH1/Fc領域に連結された2つの抗体可変領域および2つのscFv（N末端からC末端へと、抗体可変領域-抗体可変領域-CH1/Fc領域-scFv-scFvとして配置されている）を含み、第2鎖は、C kappa/ラムダ領域に連結された2つの抗体可変領域およびC kappa/ラムダ領域（N末端からC末端へと、抗体可変領域-抗体可変領域-C kappa/ラムダとして配置されている）を含む（図4Bを参照されたい）。

【0172】

もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は少なくとも第1、第2、第3または第4ポリペプチド鎖を含み、第1鎖は、CH1領域に連結された2つのscFvを含み、第2鎖は、C kappa/ラムダ領域に連結された2つのscFvを含む。特定の実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1、第2、第3および第4ポリペプチド鎖を含み、第1鎖は、CH1領域に連結された2つのscFv（N末端からC末端へと、scFv-scFv-CH1として配置されている）を含み、第2鎖は、C kappa/ラムダ領域に連結された2つのscFv（N末端からC末端へと、scFv-scFv-C kappa/ラムダとして配置されている）を含む（図5Bを参照されたい）。

【0173】

特定の実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は第1、第2、第3または第4ポリペプチド鎖を含み、第1鎖は、CH1/Fc領域に連結された2つの抗体可変領域を含み、第2鎖は、C kappa/ラムダ領域に連結された2つの抗体可変領域を含む。

【0174】

もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は少なくとも第1、第2、第3または第4鎖を含み、第1鎖は、N末端からC末端へと、以下の配向：scFv-抗体可変領域-C kappa/ラムダでC kappa/ラムダ領域に連結されたscFvおよび抗体可変領域を含み、第2鎖は、N末端からC末端へと、以下の配向：抗体可変領域-CH1/Fc領域でCH1/Fc領域に連結された抗体可変領域を含む（図4Dを参照されたい）。

【0175】

もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は少なくとも第1、第2、第3または第4鎖を含み、第1鎖は、N末端からC末端へと、以下の配向：scFv-抗体可変領域-CH1領域でCH1領域に連結されたscFvおよび抗体可変領域を含み、第2鎖は、N末端からC末端へと、以下の配向：抗体可変領域-C kappa/ラムダ領域でC kappa/ラムダ領域に連結された抗体可変領域を含む（図4Fを参照されたい）。

【0176】

もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は少なくとも第1、第2、第3または第4鎖を含み、第1鎖は、N末端からC末端へと、以下の配向：scFv-抗体可変領域-C kappa/ラムダでC kappa/ラムダ領域に連結されたscFvおよび抗体可変領域を含み、第2鎖は、N末端からC末端へと、以下の配向：scFv-抗体可変領域-CH1

10

20

30

40

50

／Fc領域-scFv-scFvでCH1／Fc領域に連結された3つのscFvおよび抗体可変領域を含む（図4Jを参照されたい）。

【0177】

もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は少なくとも第1、第2、第3または第4鎖を含み、第1鎖は、N末端からC末端へと、以下の配向：scFv-抗体可変領域-Cカップ／ラムダでCカップ／ラムダ領域に連結されたscFvおよび抗体可変領域を含み、第2鎖は、N末端からC末端へと、以下の配向：scFv-抗体可変領域-CH1／Fc領域-scFvでCH1／Fc領域に連結された2つのscFvおよび抗体可変領域を含む（図4Kを参照されたい）。

【0178】

もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は少なくとも第1、第2、第3または第4鎖を含み、第1鎖は、N末端からC末端へと、以下の配向：抗体可変領域（VL2）-第1 Cカップ／ラムダ-抗体可変領域（VL1）-第2 Cカップ／ラムダで2つの抗体軽鎖可変領域および2つのCカップ／ラムダ領域を含み、第2鎖は、N末端からC末端へと、以下の配向：抗体可変領域（VH2）-第1 CH1-抗体可変領域（VH1）-第2 CH1-Fc領域で2つの抗体重鎖可変領域、2つのCH1およびFc領域を含む（図4Nを参照されたい）。

【0179】

もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は少なくとも第1、第2、第3または第4鎖を含み、第1鎖は、N末端からC末端へと、以下の配向：抗体重鎖可変領域（VH2）-CH1-抗体軽鎖可変領域（VL1）-Cカップ／ラムダで抗体重鎖可変領域、CH1、抗体軽鎖可変領域およびCカップ／ラムダ領域を含み、第2鎖は、N末端からC末端へと、以下の配向：抗体軽鎖可変領域（VL2）-Cカップ／ラムダ-抗体重鎖可変領域（VH1）-CH1-Fc領域で抗体軽鎖可変領域、Cカップ／ラムダ、抗体重鎖可変領域、CH1およびFc領域を含む（図4Pを参照されたい）。

【0180】

もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は少なくとも第1、第2、第3または第4鎖を含み、第1鎖は、N末端からC末端へと、以下の配向：抗体重鎖可変領域（VH2）-CH1-抗体可変領域（VH1）-CH1で2つの抗体可変重鎖領域および2つのCH1ドメインを含み、第2鎖は、2つの抗体軽鎖可変領域、2つのCカップ／ラムダ領域およびFc領域（N末端からC末端へと、以下の配向：抗体軽鎖可変領域（VL2）-Cカップ／ラムダ-抗体軽鎖可変領域（VL1）-Cカップ／ラムダ-Fc領域で配置されている）を含む（図4Rを参照されたい）。

【0181】

もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は少なくとも第1、第2、第3または第4鎖を含み、第1鎖は、抗体重鎖可変領域、CH1、抗体軽鎖可変領域およびCカップ／ラムダ（N末端からC末端へと、以下の配向：抗体重鎖可変領域（VH2）-CH1-抗体軽鎖可変領域（VL1）-Cカップ／ラムダで配置されている）を含み、第2鎖は、抗体軽鎖可変領域、Cカップ／ラムダ、抗体可変重鎖、CH1およびFc領域（N末端からC末端へと、以下の配向：抗体軽鎖可変領域（VL2）-Cカップ／ラムダ-抗体重鎖可変領域（VH1）-CH1-Fc領域で配置されている）を含む（図4Tを参照されたい）。

【0182】

他の実施形態においては、本発明はまた、第1鎖が抗体重鎖可変領域およびCH1ドメイン（N末端からC末端へと、以下の配向：抗体重鎖可変領域-CH1で配置されている）を含み、第2鎖が抗体軽鎖可変領域、Cカップ／ラムダおよびFc領域（N末端からC末端へと、以下の配向：抗体軽鎖可変領域-Cカップ／ラムダ-Fc領域で配置されている）を含む、少なくとも第1、第2、第3または第4ポリペプチド鎖を含む逆転抗体を含む（図4Vを参照されたい）。

【0183】

いくつかの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性ポリペプチドは

10

20

30

40

50

、本出願において提供されている図面のいずれかにおける構造形態を含む。いくつかの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、本出願において提供されている図面のいずれかにおける構造形態を含む。いくつかの実施形態においては、本発明のベクターは、本出願において提供されている図面のいずれかにおける構造形態を含む。

【0184】

D.10. 6本鎖多重特異性エピトープ結合性タンパク質集合体

以下の節においては、6本のポリペプチド鎖を含む本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質の構築（集合）および配向を説明する。

【0185】

1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、第1、および／または第2、および／または第3、および／または第4、および／または第5、および／または第6のポリペプチド鎖を含み、ここで、第1、および／または第2、および／または第3、および／または第4、および／または第5、および／または第6ポリペプチド鎖は、1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上のエピトープ結合性ドメインに連結されたCH1およびFc領域（本明細書においては一緒にして「CH1/Fc領域」とも称される）またはCカップ／ラムダ領域を含む。本発明のタンパク質は、scFv、一本鎖ダイアボディ、抗体の可変領域または当技術分野で公知の他の公知エピトープ結合性ドメインでありうるエピトープ結合性ドメインを含む。

【0186】

1つの実施形態においては、CH1/Fc領域またはCカップ／ラムダ領域および該エピトープ結合性ドメインは多数の異なる配向で互いに連結されうる。1つの実施形態においては、該エピトープ結合性ドメインはCH1/Fc領域またはCカップ／ラムダ領域のC末端に連結されている。他の実施形態においては、該エピトープ結合性ドメインはCH1/Fc領域またはCカップ／ラムダ領域のN末端に連結されている。他の実施形態においては、該エピトープ結合性ドメインはCH1/Fc領域またはCカップ／ラムダ領域のN末端またはC末端に連結されている。他の実施形態においては、該エピトープ結合性ドメインはCH1/Fc領域またはCカップ／ラムダ領域のN末端およびC末端の両方に連結されている。

【0187】

他の実施形態においては、4本の鎖を含む多重特異性エピトープ結合性タンパク質のFc領域はCH1ドメインに結合していない。他の実施形態においては、6本の鎖を含む多重特異性エピトープ結合性タンパク質のFc領域はCカップ／ラムダ領域に結合している。

【0188】

D.11. 6本鎖多重特異性エピトープ結合性タンパク質の特定の実施形態

もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は少なくとも第1、第2、第3、第4、第5または第6鎖を含み、第1鎖は、N末端からC末端へと、以下の配向：抗体軽鎖可変領域（VL2）-Cカップ／ラムダで抗体軽鎖可変領域およびCカップ／ラムダ領域を含み、第2鎖は、抗体軽鎖可変領域およびCカップ／ラムダ（N末端からC末端へと、以下の配向：抗体軽鎖可変領域（VL1）-Cカップ／ラムダで配置されている）を含み、第3鎖は、N末端からC末端へと、以下の配向：抗体可変領域（VH2）-第1 CH1-抗体可変領域（VH1）-第2 CH1-Fc領域で2つの抗体重鎖可変領域、2つのCH1およびFc領域を含む（図4MおよびNを参照されたい）。

【0189】

もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は少なくとも第1、第2、第3、第4、第5または第6鎖を含み、第1鎖は、抗体重鎖可変領域およびCH1（N末端からC末端へと、以下の配向：抗体重鎖可変領域（VH2）-CH1で配置されている）を含み、第2鎖は、N末端からC末端へと、以下の配向：抗体軽鎖可変領域（VL1）-Cカップ／ラムダで抗体軽鎖可変領域およびCカップ／ラムダを含み、第3鎖は、N末端からC末端へと、以下の配向：抗体軽鎖可変領域（VL2）-Cカップ／ラムダ-抗体重鎖可変領域（VH1）-CH1-Fc領域で抗体軽鎖可変領域、Cカップ／ラムダ、抗体重鎖可変領域、CH1およびFc

領域を含む（図40およびPを参照されたい）。

【0190】

もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は少なくとも第1、第2、第3、第4、第5または第6鎖を含み、第1鎖は、N末端からC末端へと、以下の配向：抗体重鎖可変領域（VH2）-CH1で抗体重鎖可変領域およびCH1を含み、第2鎖は、抗体重鎖可変領域およびCH1（N末端からC末端へと、以下の配向：抗体重鎖可変領域（VH1）-CH1で配置されている）を含み、第3鎖は、N末端からC末端へと、以下の配向：抗体軽鎖可変領域（VL2）-C kappa/ラムダ-抗体軽鎖可変領域（VL1）-C kappa/ラムダ-Fc領域で2つの抗体軽鎖可変領域、2つのC kappa/ラムダおよびFc領域を含む（図4QおよびRを参照されたい）。

10

【0191】

もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は少なくとも第1、第2、第3、第4、第5または第6鎖を含み、第1鎖は抗体重鎖可変領域およびCH1（N末端からC末端へと、以下の配向：抗体重鎖可変領域（VH2）-CH1で配置されている）を含み、第2鎖は抗体軽鎖可変領域およびC kappa/ラムダ（N末端からC末端へと、以下の配向：抗体軽鎖可変領域（VL1）-C kappa/ラムダで配置されている）を含み、第3鎖は抗体軽鎖可変領域、C kappa/ラムダ、抗体可変重鎖、CH1およびFc領域（N末端からC末端へと、以下の配向：抗体軽鎖可変領域（VL2）-C kappa/ラムダ-抗体重鎖可変領域（VH1）-CH1-Fc領域で配置されている）を含む（図4SおよびTを参照されたい）。

【0192】

IgG1分子に連結されたFabドメインを含む単一特異性多価抗体は2001年3月20日付け出願のPCT公開WO 01/77342に記載されている。いくつかの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、IgG1分子に連結されたFabドメインを含まない。いくつかの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、Fc領域にN末端において連結されたFabを含まない。他の実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、IgG1分子に連結された少なくとも1つまたはそれ以上のFabドメインを含まない。他の実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、IgG1分子に連結された同一Fabを含まない。他の実施形態においては、多重特異性エピトープは、IgG1分子に連結されたFabを含まず、ここで、該Fabは、該IgG1分子と同一の抗体可変領域を含む。いくつかの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、IgG1分子に連結された少なくとも1つのFabを含み、ここで、該FabおよびIgG1は同じ結合特異性を有さない。いくつかの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、IgG1分子のFc領域にC末端において連結された少なくとも1つのFabを含む。いくつかの実施形態においては、本発明のタンパク質は、2001年3月20日付け出願のPCT公開WO 01/77342に記載されている。

20

30

【0193】

E. 多重特異性エピトープ結合性タンパク質の構築に関する特定の実施形態

いくつかの実施形態においては、本発明のタンパク質は、以下のものからの少なくとも1つのエピトープ結合性ドメイン、または結合に関して以下のものからのエピトープ結合性ドメインと競合するエピトープ結合性ドメインを含む：アバゴボマブ（abagovomab）、アバタセプト（abatcept）（ORENCIA（登録商標）としても公知である）、アブシキマブ（abciximab）（REOPRO（登録商標）、c7E3 Fab）、アダリムマブ（adalimumab）（HUMIR A（登録商標）としても公知である）、アデカツムマブ（adecatumumab）、アレムツズマブ（alemtuzumab）（CAMPATH（登録商標）、MabCampathまたはCampath-1Hとしても公知である）、アルツモマブ（altumomab）、アフェリモマブ（afelimomab）、アナツモマブ・マフェナトックス（anatumomab mafenatox）、アネツムマブ（anetumumab）、アンルキズマブ（anrukizumab）、アポリズマブ（apolizumab）、アルシツモマブ（arcitumomab）、アセリズマブ（aselizumab）、アトリズマブ（atlizumab）、アトロリムマブ（atorolimumab）、バピネウズマブ（bapineuzumab）、バシリキシマブ（basiliximab）（SIMULECT（登録商標）としても公知である）、バビツキシマブ（bavituximab）、ベクツモマブ（bec

40

50

tumomab) (LYMPHOSCAN (登録商標)としても公知である)、ベリムマブ (belimumab) (LYMPHO-STAT-B (登録商標))、ベルチリムマブ (bertilimumab)、ベシレソマブ (besile somab)、ベバシズマブ (bevacizumab) (AVASTIN (登録商標)としても公知である)、ビシロマブ・ブラロバルビタール (biciromab brallobarbitol)、ビバツズマブ・メルタンシン (bivatuzumab mertansine)、カンパス (campath)、カナキヌマブ (canakinumab) (ACZ885としても公知である)、カンツズマブ・メルタンシン (cantuzumab mertansine)、カプロマブ (capromab) (PROTASCINT (登録商標)としても公知である)、カツマキソマブ (catumaxomab) (REMOVAB (登録商標)としても公知である)、セデリズマブ (cedelizumab) (CIMZIA (登録商標)としても公知である)、セルトリズマブ・ペゴール (certolizumab pegol)、セツキシマブ (cetuximab) (ERBITUX (登録商標)としても公知である)、クレノリキシマブ (clenoliximab)、ダセツズマブ (dacetuzumab)、ダクリキシマブ (dacliximab)、ダクリズマブ (daclizumab) (ZENAPAX (登録商標)としても公知である)、デノスマブ (denosumab) (AMG 162としても公知である)、デツモマブ (detumomab)、ドルリモマブ・アリトクス (dorlimomab aritox)、ドルリキシズマブ (dorlixizumab)、ダンツムマブ (duntumumab)、ドゥリムルマブ (durimulumab)、ドゥルムルマブ (durmulumab)、エクロメキシマブ (ecromeximab)、エクリズマブ (eculizumab) (SOLIRIS (登録商標)としても公知である)、エドバコマブ (edobacomab)、エドレコロマブ (edrecolomab) (Mab17-1A、PANOREX (登録商標)としても公知である)、エファリズマブ (efalizumab) (RAPTIVA (登録商標)としても公知である)、エフングマブ (efungumab) (MYCOGRAB (登録商標)としても公知である)、エルシリモマブ (elsilimomab)、エンリモマブ・ペゴール (enlimomab pegol)、エピツモマブ・シツキセタン (epitumomab cituxetan)、エファリズマブ (efalizumab)、エピツモマブ (epitumomab)、エブラツズマブ (epratuzumab)、エルリズマブ (erlizumab)、エルツマキソマブ (ertumaxomab) (REXOMUN (登録商標))、エタネルセプト (etanercept) (ENBREL (登録商標)としても公知である)、エタラシズマブ (etaracizumab) (エタラツズマブ (etaratuzumab)、VITAXIN (登録商標)、ABEGRIN (商標))、エクスビビルマブ (exbivirumab)、ファノレソマブ (fanolesomab) (NEUTROSPEC (登録商標)としても公知である)、ファラリモマブ (faralimomab)、フェルビズマブ (felvizumab)、フォントリズマブ (fontolizumab) (HUZAF (登録商標)としても公知である)、ガリキシマブ (galiximab)、ガンテネルマブ (gantenerumab)、ガビリモマブ (gavilimomab) (ABX-CBL (登録商標)としても公知である)、ゲンツズマブ・オゾガミシン (gemtuzumab ozogamicin) (MYLOTARG (登録商標)としても公知である)、ゴリムマブ (golimumab) (CNTO 148としても公知である)、ゴミリキシマブ (gomiliximab)、イバリズマブ (ibalizumab) (TNX-355としても公知である)、イブリツモマブ・チウキセタン (ibritumomab tiuxetan) (ZEVALIN (登録商標)としても公知である)、イゴボマブ (igovomab)、インシロマブ (incirumab)、インフリキシマブ (infliximab) (REMICADE (登録商標)としても公知である)、イノリモマブ (inolimomab)、イノツズマブ・オゾガミシン (inotuzumab ozogamicin)、イピリムマブ (ipilimumab) (MDX-010、MDX-101としても公知である)、イラツムマブ (iratumumab)、ケリキシマブ (keliximab)、ラベツズマブ (labetuzumab)、レマレソマブ (lemalesomab)、レブリリズマブ (lebrilizumab)、レルデリムマブ (lerdelimumab)、レキサツムマブ (lexatumumab) (HGS-ETR2、ETR2-ST01としても公知である)、レキシツムマブ (lexitumumab)、リビビルマブ (libivirumab)、リンツズマブ (lintuzumab)、ルカツムマブ (lucatumumab)、ルミリキシマブ (lumiliximab)、マパツムマブ (mapatumumab) (HGS-ETR1、TRM-1としても公知である)、マスリモマブ (maslimomab)、マツズマブ (matuzumab) (EMD72000としても公知である)、メポリズマブ (mepolizumab) (BOSATRIA (登録商標)としても公知である)、メテリムマブ (metelimumab)、ミラツズマブ (milatuzumab)、ミンレツモマブ (minretumomab)、ミツモマブ (mitumomab)、モロリムマブ (morolimomab)、モタビズマブ (motavizumab) (NUMAX (商標)としても公知である)、ムロモナブ (muromonab) (OKT3としても公知である)、ナコロマブ・タフェナトクス (nacolomab tafenatox)、ナプツモマブ・エスタフェナトクス (naptu

momab estafenatox)、ナタリズマブ (natalizumab) (TYSABRI (登録商標)、ANTEGREN (登録商標)としても公知である)、ネバクマブ (nebacumab)、ネレリモマブ (nerelimomab)、ニモツズマブ (nimotuzumab) (THERACIM hr3 (登録商標)、THERA-CIM-hr3 (登録商標)、THERALOC (登録商標)としても公知である)、ノフェツモマブ・メルペンタン (nofetumomab merpentan) (VERLUMA (登録商標)としても公知である)、オクレリズマブ (ocrelizumab)、オデュリモマブ (odulimomab)、オフアツムマブ (ofatumumab)、オマリズマブ (omalizumab) (XOLAIR (登録商標)としても公知である)、オレゴボマブ (oregovomab) (OVAREX (登録商標)としても公知である)、オテリキシズマブ (otelixizumab)、パジバキシマブ (pagibaximab)、パリビズマブ (palivizumab) (SYNAGIS (登録商標)としても公知である)、パニツムマブ (panitumumab) (ABX-EGF、VECTIBIX (登録商標)としても公知である)、パスコリズマブ (pascalizumab)、ペンツモマブ (pentumomab) (THERAGYN (登録商標)としても公知である)、ペルツズマブ (pertuzumab) (2C4、OMNITARG (登録商標)としても公知である)、ペキセリズマブ (pexelizumab)、ピンツモマブ (pintumomab)、プリリキシマブ (priliximab)、プリツムマブ (pritumumab)、ラニビズマブ (ranibizumab) (LUCENTIS (登録商標)としても公知である)、ラキシバクマブ (raxibacumab)、レガビルマブ (regavirumab)、レスリズマブ (reslizumab)、リツキシマブ (rituximab) (RITUXAN (登録商標)、MabTHERA (登録商標)としても公知である)、ロベリズマブ (rovelizumab)、ルプリズマブ (ruplizumab)、サツモマブ (satumomab)、セビルマブ (sevirumab)、シブロッツズマブ (sibrotuzumab)、シプリズマブ (siplizumab) (MEDI-507としても公知である)、ソントズマブ (sontuzumab)、スタムルマブ (stamulumab) (MYO-029としても公知である)、スレソマブ (sulesomab) (LEUKOSCAN (登録商標)としても公知である)、タカツズマブ・テトラキセタン (tacetuzumab tetraxetan)、タドシズマブ (tadocizumab)、タリズマブ (talizumab)、タプリツモマブ・パプトクス (taplitumomab paptox)、テフィバズマブ (tefibazumab) (AUREXIS (登録商標)としても公知である)、テリモマブ・アリトクス (telimomab aritox)、テネリキシマブ (teneliximab)、テプリズマブ (teplizumab)、チシリムマブ (ticilimumab)、トシリズマブ (tocilizumab) (ACTEMRA (登録商標)としても公知である)、トラリズマブ (toralizumab)、トシツモマブ (tositumomab)、トラスツズマブ (trastuzumab) (HERCEPTIN (登録商標)としても公知である)、トレメリムマブ (tremelimumab) (CP-675,206としても公知である)、ツコツズマブ・セルモレウキン (tucotuzumab celmoleukin)、ツビルマブ (tuvirumab)、ウルトキサズマブ (urtoxazumab)、ウステキヌマブ (ustekinumab) (CNTO 1275としても公知である)、バパリキシマブ (vapaliximab)、ベルツズマブ (veltuzumab)、ベバリモマブ (vepalimomab)、ビシリズマブ (visilizumab) (NUVION (登録商標)としても公知である)、ボロシキシマブ (volociximab) (M200としても公知である)、ボツムマブ (votumumab) (HUMASPECT (登録商標)としても公知である)、ザルツムマブ (zalutumumab)、ザノリムマブ (zanolimumab) (HuMAX-CD4としても公知である)、ジラルムマブ (ziralinimumab) またはゾリモマブ・アリトクス (zolimumab aritox)。

【0194】

もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、2005年2月11日付け出願の米国特許出願公開番号20050215767および2004年11月26日付け出願の米国特許出願公開番号20080014141 (それらのそれぞれの全体を参照により本明細書に組み入れることとする) に開示されているエピトープ結合性タンパク質を含む少なくとも1つのエピトープ結合性ドメインを含む。

【0195】

他の実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、前記の抗体と同じ抗原に結合する少なくとも1つのエピトープ結合性ドメインを含む。

【0196】

他の実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、以下のものから選ばれる抗原に特異的に結合する少なくとも1つのエピトープ結合性ドメインを

含む：PDGFRアルファ、PDGFRベータ、PDGF、VEGF、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、VEGF-F、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、FGF、FGF2、HGF、KDR、flt-1、FLK-1、Ang-2、Ang-1、PLGF、CEA、CXCL13、Baff、IL-21、CCL21、TNF-アルファ、CXCL12、SDF-1、bFGF、MAC-1、IL23p19、FPR、IGFBP4、CXCR3、TLR4、CXCR2、EphA2、EphA4、EphrinB2、EGFR (ErbB1)、HER2(ErbB2またはp185^{neu})、HER3(ErbB3)、HER4 ErbB4またはtyro2)、SC1、LRP5、LRP6、RAGE、Nav1.7、GLP1、RSV、RSV Fタンパク質、インフルエンザHAタンパク質、インフルエンザNAタンパク質、HMGB1、CD16、CD19、CD20、CD21、CD28、CD32、CD32b、CD64、CD79、CD22、ICAM-1、FGFR1、FGFR2、HDGF、EphB4、GITR、 β -アミロイド、hMPV、PIV-1、PIV-2、OX40L、IGFBP3、cMet、PD-1、PLGF、ネプロリシン (Neprolysin)、CTD、IL-18、IL-6、CXCL-13、IL-1R1、IL-15、IL-4R、IgE、PAI-1、NGF、EphA2、CEA、uPAR、DL-4、 $\alpha v \beta 6$ 、 $\alpha 5 \beta 1$ 、インターフェロン受容体I型およびII型、CD19、ICOS、IL-17、因子II、Hsp90、IGF、CD19、GM-CSFR、PIV-3、CMV、IL-13、IL-9ならびにEBV。

【0197】

他の実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、TNFスーパーファミリーのメンバー（受容体またはリガンド）に特異的に結合する少なくとも1つのエピトープ結合性ドメインを含む。種々の分子には、限定的なものではないが以下のものが含まれる：腫瘍壊死因子（「TNFアルファ」）、腫瘍壊死因子ベータ（「TNF-ベータ」）、リンホトキシン-アルファ（「LT-アルファ」）、CD30リガンド、CD27リガンド、CD40リガンド、4-1 BBリガンド、Apo-1リガンド（FasリガンドまたはCD95リガンドとも称される）、Apo-2リガンド（TRAILとも称される）、Apo-3リガンド（TWEAKとも称される）、オステオプロテゲリン（OPG）、APRIL、RANKリガンド（TRANCEとも称される）、TALL-1（BlyS、BAFFまたはTHANKとも称される）、DR4、DR5（Apo-2、TRAIL-R2、TR6、Tango-63、hAPO8、TRICK2またはKILLERとしても公知である）、DR6、DcR1、DcR2、DcR3（TR6またはM68としても公知である）、CAR1、HVEM（ATARまたはTR2としても公知である）、GITR、ZTNFR-5、NTR-1、TNFL1、CD30、LTBr、4-1BB受容体およびTR9。

【0198】

もう1つの実施形態においては、本発明の結合性タンパク質は、以下のものよりなる群から選ばれる1以上の標的に結合しうる：5T4、ABL、ABCF1、ACVR1、ACVR1B、ACVR2、ACVR2B、ACVRL1、ADORA2A、アグレカン (Aggrecan)、AGR2、AICDA、AIFI、AIG1、AKAP1、AKAP2、AMH、AMHR2、ANGPT1、ANGPT2、ANGPTL3、ANGPTL4、ANPEP、APC、APOC1、AR、アロマターゼ、ATX、AX1、AZGP1（垂鉛-a-糖タンパク質）、B7.1、B7.2、B7-H1、BAD、BAFF、BAG1、BAI1、BCR、BCL2、BCL6、BDNF、BLNK、BLR1 (MDR15)、BlyS、BMP1、BMP2、BMP3B (GDF10)、BMP4、BMP6、BMP8、BMPRI1A、BMPRI1B、BMPRI2、BPAG1（プレクチン）、BRCA1、C19orf10 (IL27w)、C3、C4A、C5、C5R1、CANT1、CASP1、CASP4、CAV1、CCBP2 (D6 / JAB61)、CCL1 (1-309)、CCLI 1（エオタキシン）、CCL13 (MCP-4)、CCL15 (MIP-Id)、CCL16 (HCC-4)、CCL17 (TARC)、CCL18 (PARC)、CCL19 (MIP-3b)、CCL2 (MCP-1)、MCAF、CCL20 (MIP-3a)、CCL21 (MEP-2)、SLC、エキソデウス (exodus) -2、CCL22 (MDC / STC-I)、CCL23 (MPIF-I)、CCL24 (MPIF-2 / エオタキシン-2)、CCL25 (TECK)、CCL26 (エオタキシン-3)、CCL27 (CTACK / ILC)、CCL28、CCL3 (MIP-1a)、CCL4 (MIP-1b)、CCL5 (RANTES)、CCL7 (MCP-3)、CCL8 (mcp-2)、CCNA1、CCNA2、CCND1、CCNE1、CCNE2、CCR1 (CKR1 / HM145)、CCR2 (mcp-1R B / RA)、CCR3 (CKR3 / CMKBR3)、CCR4、CCR5 (CMKBR5 / ChemR13)、CCR6 (CMKBR6 / CKR-L3 / STRL22 / DRY6)、CCR7 (CKR7 / EBI1)、CCR8 (CMKBR8 / TER1 / CKR-L1)、CCR9 (GPR-9-6)、CCRL1 (VSHK1)、CCRL2 (L-CCR)、CD164、CD19、CD1C、CD20、CD200、CD-22、CD24、CD28、CD3、CD33、CD35、CD37、CD38、CD3E、CD3G、CD3Z、CD4、CD40、CD40L、CD44、CD45RB、CD52、CD69、CD72、CD74、CD79A、CD79B、CD8、CD80、CD81、CD83、CD86、CD137、CDH1 (E-カドヘリン)、CDH10、CDH12、CDH13、CDH18、CDH19、CDH20、CDH5、CDH7、CDH8、CDH9、CDK2、CDK3、CDK4、CDK5、CDK6、CDK7、CDK9、CDKN1A (p21Wap1/Cip1)、CDKN1B (p27Kip1)、CDKN1C、CDKN2A (p16INK4a)、CDKN2B、CDKN2C、CDKN3、CEBPB、CER1、CHGA、CHGB、キチナーゼ、CHST10、CKLFSF2、CKLFSF3、CKLFSF4、CKLFSF5、CKLFSF6、CKLFSF7、CKLFSF8、CLDN3、CLDN7（クラウジン (claudin) -7)、CLN3、CLU（クラステリン (clusterin)

)), CMKLR1, CMKOR1 (RDC1), CNR1, COL18A1, COL1A1, COL4A3, COL6A1, CR2, クリプト
 (Cripto), CRP, CSF1 (M-CSF), CSF2 (GM-CSF), CSF3 (G-CSF), CTLA4, CTL8, CTNNA1 (b-
 カテニン), CTSB (カテプシンB), CX3CL1 (SCYD1), CX3CR1 (V28), CXCL1(GR01), CXCL
 10 (IP-10), CXCL11 (I-TAC / IP-9), CXCL12 (SDF1), CXCL13, CXCL14, CXCL16, CXCL2
 (GR02), CXCL3 (GR03), CXCL5 (ENA-78 / LIX), CXCL6 (GCP-2), CXCL9 (MIG), CXCR3 (G
 PR9/CKR-L2), CXCR4, CXCR6 (TYMSTR /STRL33 / ボンゾ(Bonzo)), CYB5, CYC1, CYSLTR1,
 DAB2IP, DES, DKFZp451J0118, DNCL1, DPP4, E2F1, ECGF1, EDG1, EFNA1, EFNA3, EFNB2
 , EGF, EGFR, ELAC2, ENG, ENO1, ENO2, ENO3, EPHA1, EPHA2, EPHA3, EPHA4, EPHA5, EP
 HA6, EPHA7, EPHA8, EPHA9, EPHA10, EPHB1, EPHB2, EPHB3, EPHB4, EPHB5, EPHB6, EPHR
 IN-A1, EPHRIN-A2, EPHRIN-A3, EPHRIN-A4, EPHRIN-A5, EPHRIN-A6, EPHRIN-B1, EPHRIN- 10
 B2, EPHRIN-B3, EPHB4, EPG, ERBB2 (Her-2), EREG, ERK8, エストロゲン受容体, ESR1,
 ESR2, F3 (TF), FADD, ファルネシルトランスフェラーゼ, FasL, FASNf, FCER1A, FCER2,
 FCGR3A, FGF, FGF1 (aFGF), FGF10, FGF11, FGF12, FGF12B, FGF13, FGF14, FGF16, FG
 F17, FGF18, FGF19, FGF2 (bFGF), FGF20, FGF21, FGF22, FGF23, FGF3 (int-2), FGF4 (HST),
 FGF5, FGF6 (HST-2), FGF7 (KGF), FGF8, FGF9, FGFR3, FIGF (VEGFD), FIL1(EPSI
 LON), FBL1(ZETA), FLJ12584, FLJ25530, FLRT1 (フィブロネクチン), FLT1, FLT-3, FOS
 , FOSL1 (FRA-I), FY (DARC), GABRP (GABAa), GAGEB1, GAGEC1, GALNAC4S-6ST, GATA3,
 GD2, GDF5, GF11, GGT1, GM-CSF, GNAS1, GNRH1, GPR2 (CCR10), GPR31, GPR44, GPR81 (FKSG80),
 GRCC10 (C10), GRP, GSN (ゲルゾリン), GSTP1, HAVCR2, HDAC, HDAC4, HDAC5 20
 , HDAC7A, HDAC9, ヘッジホッグ, HGF, HIF1A, HIP1, ヒスタミンおよびヒスタミン受容
 体, HLA-A, HLA-DRA, HM74, HMOX1, HSP90, HUMCYT2A, ICEBERG, ICOSL, ID2, IFN-a, IF
 NA1, IFNA2, IFNA4, IFNA5, IFNA6, IFNA7, IFNB1, IFNガンマ, IFNW1, IGBP1, IGF1, IG
 F1R, IGF2, IGFBP2, IGFBP3, IGFBP6, DL-1, IL10, IL10RA, IL10RB, IL-1, IL1R1 (CD12
 1a), IL1R2(CD121b), IL-1RA, IL-2, IL2RA (CD25), IL2RB(CD122), IL2RG(CD132), IL-4
 , IL-4R(CD123), IL-5, IL5RA(CD125), IL3RB(CD131), IL-6, IL6RA (CD126), IR6RB(CD1
 30), IL-7, IL7RA(CD127), IL-8, CXCR1 (IL8RA), CXCR2 (IL8RB/CD128), IL-9, IL9R (C
 D129), IL-10, IL10RA(CD210), IL10RB(CDW210B), IL-11, IL11RA, IL-12, IL-12A, IL-1
 2B, IL-12RB1, IL-12RB2, IL-13, IL13RA1, IL13RA2, IL14, IL15, IL15RA, IL16, IL17,
 IL17A, IL17B, IL17C, IL17R, IL18, IL18BP, IL18R1, IL18RAP, IL19, IL1A, IL1B, IL
 1F10, IL1F5, IL1F6, IL1F7, IL1F8, IL1F9, IL1HY1, IL1R1, IL1R2, IL1RAP, IL1RAPL1, 30
 IL1RAPL2, IL1RL1, IL1RL2, IL1RN, IL2, IL20, IL20RA, IL21R, IL22, IL22R, IL22RA2
 , IL23, IL24, IL25, IL26, IL27, IL28A, IL28B, IL29, IL2RA, IL2RB, IL2RG, IL3, IL
 30, IL3RA, IL4, IL4R, IL6ST (糖タンパク質130), ILK, INHA, INHBA, INSL3, INSL4, IR
 AKI, IRAK2, ITGA1, ITGA2, ITGA3, ITGA6 (α6インテグリン), ITGAV, ITGB3, ITGB4 (β
 4インテグリン), JAG1, JAK1, JAK3, JTB, JUN, K6HF, KAI1, KDR, KITLG, KLF5 (GCボ
 ックスBP), KLF6, KLK10, KLK12, KLK13, KLK14, KLK15, KLK3, KLK4, KLK5, KLK6, KLK9
 , KRT1, KRT19 (ケラチン19), KRT2A, KRTHB6(毛特異的II型ケラチン), LAMA5, LEP(レプ
 チン), リンゴ (Lingo) -p75, リンゴ-Troy, LPS, LTA (TNF-b), LTβ, LTβ4R (GPR16), L
 TB4R2, LTBR, MACMARCKS, MAGまたはOmgp, MAP2K7 (c-Jun), MCP-1, MDK, MIB1, ミドカ
 イン (midkine), MIF, MISRII, MJP-2, MK, MKI67 (Ki-67), MMP2, MMP9, MS4A1, MSMB, 40
 MT3 (メタロチオネクチン-UI), mTOR, MTSS1, MUC1 (ムチン), MYC, MYD88, NCK2, ニュ
 ーロカン (neurocan), NFKB1, NFKB2, NGFB (NGF), NGFR, NgR-リンゴ, NgR-Nogo66 (ノ
 ゴ(Nogo)), NgR-p75, NgR-Troy, NM1 (NM23A), NOTCH, NOTCH1, NOX5, NPPB, NROB1, NR
 OB2, NR1D1, NR1D2, NR1H2, NR1H3, NR1H4, NR1I2, NR1I3, NR2C1, NR2C2, NR2E1, NR2E3
 , NR2F1, NR2F2, NR2F6, NR3C1, NR3C2, NR4A1, NR4A2, NR4A3, NR5A1, NR5A2, NR6A1, N
 RP1, NRP2, NT5E, NTN4, ODZ1, OPRD1, P2RX7, PAP, PART1, PATE, PAWR, PCA3, PCDGF,
 PCNA, PDGFA, PDGFB, PDGFRA, PDGFRB, PECAM1, peg-アスバラギナーゼ, PF4 (CXCL4), P
 GF, PGR, ホスファカン(phosphacan), PIAS2, PI3キナーゼ, PIK3CG, PLAU (uPA), PLG,
 PLXDC1, PKC, PKC-ベータ, PPBP (CXCL7), PPID, PRL, PRKCQ, PRKD1, PRL, PROC, PROK2
 , PSAP, PSCA, PTAFR, PTEN, PTGS2 (COX-2), PTN, RAC2 (P21Rac2), RANK, RANKリガン 50

10

F. 本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質の結合特性

20

【 0 2 0 0 】

30

40

50

くとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上は同じ結合特異性を有さない。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、該タンパク質内の他の一本鎖ダイアボディと同じ抗原上の別のエピトープに特異的である一本鎖ダイアボディを含む。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、該タンパク質内の別の一本鎖ダイアボディと同じ抗原上の別のエピトープに特異的である少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上の一本鎖ダイアボディを含む。

【0202】

1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、同一の結合特異性を有する抗体可変領域を含む。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、非同一の結合特異性を有する抗体可変領域を含む。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、該タンパク質内の他の抗体可変領域と同じ結合特異性を有する抗体可変領域を含む。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は抗体可変領域を含み、それらの少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上は同じ結合特異性を有する。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は抗体可変領域を含み、それらの少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上は同じ結合特異性を有さない。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、該タンパク質内の他の可変領域と同じ抗原上の別のエピトープに特異的である抗体可変領域を含む。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、該タンパク質内の別の抗体可変領域と同じ抗原上の別のエピトープに特異的である少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上の抗体可変領域を含む。

【0203】

1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、同一の結合特異性を有する当技術分野で公知のエピトープ結合性領域を含む。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、非同一の結合特異性を有する当技術分野で公知のエピトープ結合性領域を含む。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、該タンパク質内の当技術分野で公知の他のエピトープ結合性領域と同じ結合特異性を有する当技術分野で公知のエピトープ結合性領域を含む。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は当技術分野で公知のエピトープ結合性領域を含み、それらの少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上は同じ結合特異性を有する。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は当技術分野で公知のエピトープ結合性領域を含み、それらの少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上は同じ結合特異性を有さない。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、該タンパク質内の当技術分野で公知の他のエピトープ結合性領域と同じ抗原上の別のエピトープに特異的である当技術分野で公知のエピトープ結合性領域を含む。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、該タンパク質内の当技術分野で公知の別のエピトープ結合性領域と同じ抗原上の別のエピトープに特異的である当技術分野で公知の少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上のエピトープ結合性領域を含む。

【0204】

1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、scFv、一本鎖ダイアボディ、抗体可変領域または当技術分野で公知のエピトープ結合性ドメインよりなる群から選ばれる2以上のタイプのエピトープ結合性ドメインを含む。1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、同一の結合特異性を有する異なるエピトープ結合性ドメインを含む。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、非同一の結合特異性を有する異なるエピトープ結合性ドメインを含む。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エ

トープ結合性タンパク質は、該タンパク質内の他のscFv、一本鎖ダイアボディ、抗体可変領域または当技術分野で公知のエピトープ結合性ドメインと同じ結合特異性を有しうるscFv、一本鎖ダイアボディ、抗体可変領域または当技術分野で公知のエピトープ結合性ドメインを含む。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質はscFv、一本鎖ダイアボディ、抗体可変領域または当技術分野で公知のエピトープ結合性ドメインを含み、それらの少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上は同じ結合特異性を有する。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、該タンパク質内の他のscFv、一本鎖ダイアボディ、抗体可変領域または当技術分野で公知のエピトープ結合性ドメインと同じ抗原上の別のエピトープに特異的であるscFv、一本鎖ダイアボディ、抗体可変領域または当技術分野で公知のエピトープ結合性ドメインを含む。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、該タンパク質内の別のscFv、一本鎖ダイアボディ、抗体可変領域または当技術分野で公知のエピトープ結合性ドメインと同じ抗原上の別のエピトープに特異的である少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上のscFv、一本鎖ダイアボディ、抗体可変領域または当技術分野で公知のエピトープ結合性ドメインを含む。

10

【0205】

20

1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、エピトープに同時に結合しうるscFv、一本鎖ダイアボディ、抗体可変領域または当技術分野で公知のエピトープ結合性ドメインを含む。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、エピトープに同時に結合しうる、非同一の結合特異性を有するscFv、一本鎖ダイアボディ、抗体可変領域または当技術分野で公知のエピトープ結合性ドメインを含む。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、該タンパク質内の他のscFv、一本鎖ダイアボディ、抗体可変領域または当技術分野で公知のエピトープ結合性ドメインと同じ結合特異性を有していても有していなくてもよい、エピトープに同時に結合しうるscFv、一本鎖ダイアボディ、抗体可変領域または当技術分野で公知のエピトープ結合性ドメインを含む。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質はscFv、一本鎖ダイアボディ、抗体可変領域または当技術分野で公知のエピトープ結合性ドメインを含み、それらの少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上のエピトープは同時に結合される。

30

【0206】

1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、エピトープに連続的に結合しうるscFv、一本鎖ダイアボディ、抗体可変領域または当技術分野で公知のエピトープ結合性ドメインを含む。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、エピトープに同時に結合しうる、非同一の結合特異性を有するscFv、一本鎖ダイアボディ、抗体可変領域または当技術分野で公知のエピトープ結合性ドメインを含む。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、該タンパク質内の他のscFv、一本鎖ダイアボディ、抗体可変領域または当技術分野で公知のエピトープ結合性ドメインと同じ結合特異性を有していても有していなくてもよい、エピトープに連続的に結合しうるscFv、一本鎖ダイアボディ、抗体可変領域または当技術分野で公知のエピトープ結合性ドメインを含む。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質はscFv、一本鎖ダイアボディ、抗体可変領域または当技術分野で公知のエピトープ結合性ドメインを含み、それらの少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上のエピトープは連続的に結合される。抗原に連続的に結合する種々のエピトープ結合性ドメインを得るために、1つの方法は、特異的抗原に対するエピトープ結合性ドメインに関する結合（アフィニティ）および／または解離定数の調節を利用する。結合および／または解離定数の値の調節は、当技

40

50

術分野で受け入れられている公知の技術により行われうる。そのような結合および／または解離定数が改変されたドメインは、以下の節において表される値を示しうる。

【0207】

F.1. 多重特異性エピトープ結合性タンパク質のアフィニティ

本発明のエピトープ結合性タンパク質は、そのコグネイト抗原の1以上に対する高い結合アフィニティを有しうる。例えば、本明細書に記載されているエピトープ結合性タンパク質は、少なくとも $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、少なくとも $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、少なくとも $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ または少なくとも $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ の会合速度定数または k_{on} 速度（エピトープ結合性タンパク質（EBP）+ 抗原 $\rightarrow$ EBP-Ag）を有する。

10

【0208】

もう1つの実施形態においては、エピトープ結合性タンパク質は、 $5 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ 未満、 10^{-1} s^{-1} 未満、 $5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ 未満、 10^{-2} s^{-1} 未満、 $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 未満、 10^{-3} s^{-1} 未満、 $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 未満または 10^{-4} s^{-1} 未満の k_{off} 速度（EBP-Ag $\rightarrow$ EBP + Ag）を有しうる。もう1つの実施形態においては、エピトープ結合性タンパク質は、 $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 未満、 10^{-5} s^{-1} 未満、 $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 未満、 10^{-6} s^{-1} 未満、 $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ 未満、 10^{-7} s^{-1} 未満、 $5 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ 、 10^{-8} s^{-1} 未満、 $5 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ 、 10^{-9} s^{-1} 未満または 10^{-10} s^{-1} 未満の k_{off} 速度（EBP-Ag $\rightarrow$ EBP + Ag）を有しうる。

【0209】

もう1つの実施形態においては、エピトープ結合性タンパク質は、少なくとも 10^2 M^{-1} 、少なくとも $5 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも 10^3 M^{-1} 、少なくとも $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも 10^4 M^{-1} 、少なくとも $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも 10^5 M^{-1} 、少なくとも $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも 10^6 M^{-1} 、少なくとも $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも 10^7 M^{-1} 、少なくとも $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも 10^8 M^{-1} 、少なくとも $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも 10^9 M^{-1} 、少なくとも $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも 10^{10} M^{-1} 、少なくとも $5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも 10^{11} M^{-1} 、少なくとも $5 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも 10^{12} M^{-1} 、少なくとも $5 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも 10^{13} M^{-1} 、少なくとも $5 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも 10^{14} M^{-1} 、少なくとも $5 \times 10^{14} \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも 10^{15} M^{-1} または少なくとも $5 \times 10^{15} \text{ M}^{-1}$ の結合（アフィニティ）定数または K_a (k_{on}/k_{off}) を有しうる。さらにもう1つの実施形態においては、エピトープ結合性タンパク質は、 $5 \times 10^{-2} \text{ M}$ 未満、 10^{-2} M 未満、 $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ 未満、 10^{-3} M 未満、 $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ 未満、 10^{-4} M 未満、 $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ 未満、 10^{-5} M 未満、 $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ 未満、 10^{-6} M 未満、 $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ 未満、 10^{-7} M 未満、 $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ 未満、 10^{-8} M 未満、 $5 \times 10^{-9} \text{ M}$ 未満、 10^{-9} M 未満、 $5 \times 10^{-10} \text{ M}$ 未満、 10^{-10} M 未満、 $5 \times 10^{-11} \text{ M}$ 未満、 10^{-11} M 未満、 $5 \times 10^{-12} \text{ M}$ 未満、 10^{-12} M 未満、 $5 \times 10^{-13} \text{ M}$ 未満、 10^{-13} M 未満、 $5 \times 10^{-14} \text{ M}$ 未満、 10^{-14} M 未満、 $5 \times 10^{-15} \text{ M}$ または 10^{-15} M 未満の解離定数または K_d (k_{off}/k_{on}) を有しうる。

20

30

【0210】

本明細書に記載されている方法に従い使用されるエピトープ結合性タンパク質は、本明細書に記載されているまたは当業者に公知の方法（例えば、BIAcoreアッセイ、ELISA）（Biacore International AB, Uppsala, Sweden）を用いた評価で3000 pM未満、2500 pM未満、2000 pM未満、1500 pM未満、1000 pM未満、750 pM未満、500 pM未満、250 pM未満、200 pM未満、150 pM未満、100 pM未満、75 pM未満の解離定数（Kd）を有しうる。特定の実施形態においては、本明細書に記載されている方法に従い使用されるエピトープ結合性タンパク質は、本明細書に記載されているまたは当業者に公知の方法（例えば、BIAcoreアッセイ、ELISA）を用いた評価で25~3400 pM、25~3000 pM、25~2500 pM、25~2000 pM、25~1500 pM、25~1000 pM、25~750 pM、25~500 pM、25~250 pM、25~100 pM、25~75 pM、25~50 pMの解離定数（Kd）を有しうる。もう1つの実施形態においては、本明細書に記載されている方法に従い使用されるエピトープ結合性タンパク質は、本明細書に記載されているまたは当業者に公知の方法（例えば、BIAcoreアッセイ、ELISA）を用いた評価で500 pM、100 pM、75 pMまたは50 pMの解離定数（Kd）を有しうる。

40

【0211】

50

F.2. 多重特異性エピトープ結合性タンパク質の相対結合アフィニティ

本発明は、単離された状態で示される機能性と同様に該タンパク質における機能性を保持しうる複数のエピトープ結合性ドメインを含有するタンパク質を提供すると理解されるべきである（すなわち、該エピトープ結合性ドメインは、独立して発現または単離されたドメインと比べて類似した、多重特異性エピトープ結合性タンパク質の部分としての特性を示す）。例えば、エピトープYに特異的な単離されたscFvは、結合アフィニティ、アゴニストまたはアンタゴニスト機能を含む特異的機能性プロファイルを示す。本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質内の結合性ドメインとして発現された同じscFvは、単離されたscFvに類似した結合アフィニティおよび／またはアゴニストもしくはアンタゴニスト特性を示すと理解されるべきである。

10

【0212】

1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、scFv、一本鎖ダイアボディ、抗体可変領域または当技術分野で公知の他のエピトープ結合性ドメインからの同じ単離された（該多重特異性タンパク質の他の成分を含有しない）エピトープ結合性ドメインより低い結合アフィニティを有する、scFv、一本鎖ダイアボディ、抗体可変領域または当技術分野で公知の他のエピトープ結合性ドメインからのエピトープ結合性ドメインを含む。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、scFv、一本鎖ダイアボディ、抗体可変領域または当技術分野で公知の他のエピトープ結合性ドメインからの同じ単離された（該多重特異性タンパク質の他の成分を含有しない）エピトープ結合性ドメインより高い結合アフィニティを有する、scFv、一本鎖ダイアボディ、抗体可変領域または当技術分野で公知の他のエピトープ結合性ドメインからのエピトープ結合性ドメインを含む。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、scFv、一本鎖ダイアボディ、抗体可変領域または当技術分野で公知の他のエピトープ結合性ドメインからの対応する単離された（該多重特異性タンパク質の他の成分を含有しない）エピトープ結合性ドメインと実質的に同じ結合アフィニティを有する、scFv、一本鎖ダイアボディ、抗体可変領域または当技術分野で公知の他のエピトープ結合性ドメインからのエピトープ結合性ドメインを含む。

20

【0213】

結合アフィニティは、当技術分野で公知の多数の技術、例えばELISA、BiaCore（商標）、KinExA（商標）、細胞表面受容体結合、結合アッセイの競合阻害により、常套的にアッセイされうる。特定の実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質の結合アフィニティは、実施例10に記載されている技術によりアッセイされうる。もう1つの実施形態においては、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、実施例10に記載されている技術により測定された場合に、単離された機能性結合性ドメインより低い、特異性エピトープに対する結合アフィニティを示す。もう1つの実施形態においては、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、実施例10に記載されている技術により測定された場合に、単離された機能性結合性ドメインより高い、特異性エピトープに対する結合アフィニティを示す。もう1つの実施形態においては、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、実施例10に記載されている技術により測定された場合に、単離された機能性結合性ドメインに類似した、特異性エピトープに対する結合アフィニティを示す。

30

40

【0214】

1つの実施形態においては、多重特異性エピトープ結合性タンパク質のエピトープ結合性ドメインは、当技術分野で公知のいずれかのアッセイにより測定された場合に、単離された同一の機能性エピトープ結合性ドメインのアフィニティと比べて99%未満、95%未満、90%未満、80%未満、70%未満、60%未満、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満または10%未満の、特異性エピトープに対する結合アフィニティを示す。もう1つの実施形態においては、多重特異性エピトープ結合性タンパク質のエピトープ結合性ドメインは、実施例10に記載されている技術により測定された場合に、単離された同一の機能性結合性ドメインのアフィニティと比べて99%未満、95%未満、90%未満、80%未満、70%未満、60%未満、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満または10%未満の、特異的エピト

50

ープに対する結合アフィニティを示す。

【0215】

1つの実施形態においては、多重特異性エピトープ結合性タンパク質のエピトープ結合性ドメインは、当技術分野で公知のいずれかのアッセイにより測定された場合に、単離された同一の機能性結合性ドメインのアフィニティと比べて99%超、95%超、90%超、80%超、70%超、60%超、50%超、40%超、30%超、20%超または10%超の、特異的エピトープに対する結合アフィニティを示す。もう1つの実施形態においては、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、実施例10に記載されている技術により測定された場合に、単離された同一の機能性結合性ドメインのアフィニティと比べて99%超、95%超、90%超、80%超、70%超、60%超、50%超、40%超、30%超、20%超または10%超の、特異的エピトープに対する結合アフィニティを示す。

10

【0216】

結合アフィニティは、当技術分野で公知の多数の技術、例えばELISA、BiaCore（商標）、KinExA（商標）、細胞表面受容体結合、結合アッセイの競合阻害により、常套的にアッセイされうる。特定の実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質の結合アフィニティは、実施例13~20のいずれかに記載されている技術によりアッセイされうる。もう1つの実施形態においては、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、実施例13~20のいずれかに記載されている技術により測定された場合に、単離された機能性エピトープ結合性ドメインより低い、特異的エピトープに対する結合アフィニティを示す。もう1つの実施形態においては、多重特異性エピトープ結合性タンパク質のエピトープ結合性ドメインは、実施例13~20のいずれかに記載されている技術により測定された場合に、単離された同一の機能性エピトープ結合性ドメインより高い、特異的エピトープに対する結合アフィニティを示す。もう1つの実施形態においては、多重特異性エピトープ結合性タンパク質のエピトープ結合性ドメインは、実施例13~20のいずれかに記載されている技術により測定された場合に、単離された同一の機能性結合性ドメインに類似した、特異的エピトープに対する結合アフィニティを示す。

20

【0217】

もう1つの実施形態においては、多重特異性エピトープ結合性タンパク質のエピトープ結合性ドメインは、当技術分野で公知のいずれかのアッセイにより測定された場合に、単離された同一の機能性エピトープ結合性ドメインのアフィニティと比べて99%未満、95%未満、90%未満、80%未満、70%未満、60%未満、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満または10%未満の、特異的エピトープに対する結合アフィニティを示す。もう1つの実施形態においては、多重特異性エピトープ結合性タンパク質のエピトープ結合性ドメインは、実施例13~20のいずれかに記載されている技術により測定された場合に、単離された同一の機能性エピトープ結合性ドメインのアフィニティと比べて99%未満、95%未満、90%未満、80%未満、70%未満、60%未満、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満または10%未満の、特異的エピトープに対する結合アフィニティを示す。

30

【0218】

1つの実施形態においては、多重特異性エピトープ結合性タンパク質のエピトープ結合性ドメインは、当技術分野で公知のいずれかのアッセイにより測定された場合に、単離された同一の機能性結合性ドメインのアフィニティと比べて99%超、95%超、90%超、80%超、70%超、60%超、50%超、40%超、30%超、20%超または10%超の、特異的エピトープに対する結合アフィニティを示す。もう1つの実施形態においては、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、実施例13~20のいずれかに記載されている技術により測定された場合に、単離された同一の機能性結合性ドメインのアフィニティと比べて99%超、95%超、90%超、80%超、70%超、60%超、50%超、40%超、30%超、20%超または10%超の、特異的エピトープに対する結合アフィニティを示す。

40

【0219】

特定の実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は3つのscFvを含み、ここで、最もN末端側のscFvは、単離された同一の機能性scFvより低い結合ア

50

フィニティを有し、N末端から2番目のscFvは、単離された同一の機能性scFvより低い結合アフィニティを有し、N末端から3番目のscFvは、単離された同一の機能性scFvより低い結合アフィニティを有する。

【0220】

もう1つの特定の実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は4つのscFvを含み、ここで、最もN末端側のscFvは、単離された同一の機能性scFvより低い結合アフィニティを有するエピトープに結合し、N末端から2番目のscFvは、単離された同一の機能性scFvより低い結合アフィニティを有するエピトープに結合し、N末端から3番目のscFvは、単離された同一の機能性scFvより低い結合アフィニティを有するエピトープに結合し、N末端から4番目のscFvは、単離された同一の機能性scFvより低い結合アフィニティを有するエピトープに結合する。

10

【0221】

もう1つの特定の実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性ポリペプチド鎖は、抗体鎖に連結された2つのscFvを含み、ここで、該抗体は、単離された同一の機能性抗体に類似した結合アフィニティを有するエピトープに結合し、最もN末端側のscFvは、単離された同一の機能性scFvより低いアフィニティを有するエピトープに結合し、N末端から2番目のscFvは、単離された同一の機能性scFvより低いアフィニティを有するエピトープに結合する。

【0222】

20

特定の実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は2本のポリペプチド鎖を含み、第1鎖は2つのscFvを含み、ここで、最もN末端側のscFvは、単離された同一の機能性scFvより低い結合アフィニティを有するエピトープに結合し、N末端から2番目のscFvは、単離された同一の機能性scFvより低い結合アフィニティを有するエピトープに結合し、第2鎖は2つのscFvを含み、ここで、最もN末端側のscFvは、単離された同一の機能性scFvより低い結合アフィニティを有するエピトープに結合し、N末端から2番目のscFvは、単離された同一の機能性scFvより低い結合アフィニティを有するエピトープに結合する。

【0223】

もう1つの特定の実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、2つの抗体可変領域により形成される2つのエピトープ結合部位を含み、ここで、第1抗原可変領域は、単離された同一の機能性抗原可変領域より低いアフィニティを有するエピトープに結合し、第2抗原可変領域は、単離された同一の機能性抗原可変領域より低いアフィニティを有するエピトープに結合する。

30

【0224】

もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は選択的に、細胞の表面上の異なる受容体に結合し、該受容体を阻害しうる（例えば、哺乳動物（例えば、ヒト）においてin vivoで、および／またはin vitroで）。1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は選択的に、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上の異なる細胞表面受容体に結合し、該受容体を阻害しうる（例えば、哺乳動物（例えば、ヒト）においてin vivoで、および／またはin vitroで）。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は選択的に、細胞の表面上の異なる受容体に結合し、該受容体を活性化しうる（例えば、哺乳動物（例えば、ヒト）においてin vivoで、および／またはin vitroで）。1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は選択的に、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上の異なる細胞表面受容体に結合し、該受容体を活性化しうる（例えば、哺乳動物（例えば、ヒト）においてin vivoで、および／またはin vitroで）。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は選択的に、細胞の表面上の異なる受容体に結合し、該受容体を活性化または抑制しうる（例えば、哺乳動物（例えば、ヒト）においてin vivoで、および／またはin vitroで）。

40

50

oで)。1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は選択的に、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上の異なる細胞表面受容体に結合しうる（例えば、哺乳動物（例えば、ヒト）においてin vivoで、および／またはin vitroで）。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は細胞の表面上の異なる受容体に同時に結合する（例えば、哺乳動物（例えば、ヒト）においてin vivoで、および／またはin vitroで）。

【0225】

もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は選択的に、異なる可溶性リガンドに結合し、該リガンドを中和しうる（例えば、哺乳動物（例えば、ヒト）においてin vivoで、および／またはin vitroで）。1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は選択的に、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上の異なる可溶性リガンドに結合し、および／または該リガンドを中和しうる（例えば、哺乳動物（例えば、ヒト）においてin vivoで、および／またはin vitroで）。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は選択的に、異なる可溶性リガンドに同時に結合しうる（例えば、哺乳動物（例えば、ヒト）においてin vivoで、および／またはin vitroで）。

【0226】

もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は選択的に、異なる標的タンパク質に結合し、該標的タンパク質を抑制しうる（例えば、哺乳動物（例えば、ヒト）においてin vivoで、および／またはin vitroで）。1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は選択的に、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上の異なる標的タンパク質に結合し、該標的タンパク質を抑制しうる（例えば、哺乳動物（例えば、ヒト）においてin vivoで、および／またはin vitroで）。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は選択的に、異なる標的タンパク質に結合し、該標的タンパク質を活性化しうる。1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は選択的に、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上の異なる標的タンパク質に結合し、該標的タンパク質を活性化しうる（例えば、哺乳動物（例えば、ヒト）においてin vivoで、および／またはin vitroで）。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は選択的に、異なる標的タンパク質に結合し、該標的タンパク質を活性化または抑制しうる（例えば、哺乳動物（例えば、ヒト）においてin vivoで、および／またはin vitroで）。1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は選択的に、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上の異なる標的タンパク質に結合し、該標的タンパク質を活性化または抑制しうる（例えば、哺乳動物（例えば、ヒト）においてin vivoで、および／またはin vitroで）。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は選択的に、異なる標的タンパク質に同時に結合しうる（例えば、哺乳動物（例えば、ヒト）においてin vivoで、および／またはin vitroで）。

【0227】

G. 本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質およびその製剤の使用

本発明はまた、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質の使用を提供する。本発明はまた、癌、炎症および自己免疫疾患（これらに限定されるものではない）を含む疾患、疾患の障害または障害に関連した1以上の症状の予防、診断、管理、治療または改善のための、単独でのまたは他の両方と組合された本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質の使用を含む。本発明はまた、単独でのまたは他の療法と組合された、癌、炎症および自己免疫疾患（これらに限定されるものではない）を含む疾患、障害または感染に関連した1以上の症状の予防、診断、管理、治療または改善のための、ある成分（例えば、治療用物質または薬物）にコンジュゲート化または融合された本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質の使用を含む。

【0228】

多数の細胞型は種々の共通の表面抗原を発現し、そして、細胞の一定のサブセットを識別するのは抗原の特異的組合せである。本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質を使用して、他の無関係な細胞集団との交差反応を伴うことなく細胞の特異的サブセットを標的化することが可能である。さらに、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、非標的細胞集団上に存在する細胞表面抗原に結合する1～数個（2、3、4、5、6、7、8、9、10個など）のエピトープ結合性ドメインを含むことが可能であるが、標的細胞集団への有効レベルの結合（すなわち、治療的に有効なレベルの結合）をもたらすのは、エピトープ結合性ドメインのセットの、組合せられたアビディティである。言い換えると、該エピトープ結合性ドメインの幾つかは、特定の細胞型の標的化を促進するよう関与し、これは、個々の単離された（例えば、多重特異性タンパク質から単離された）ドメインの結合によっては達成されず、また、多重特異性タンパク質の一部としてではなく同じ細胞にさらされた、全部ではない1以上（すなわち、サブセット）のエピトープ結合性ドメイン（対照ペプチド）によっても達成されないであろう。各エピトープ結合性ドメインの相対アビディティの寄与は、関心のある特異的細胞集団のみを標的化するように適合化されうると予想される。そのようなアフィニティの改変は、当技術分野で受け入れられている技術、例えばアフィニティ成熟、部位特異的突然変異誘発および当技術分野で公知の他の技術により行われうる。また、各エピトープ結合性ドメインの相対アビディティの寄与は、多重特異性エピトープ結合性タンパク質における該エピトープ結合性ドメインの相対的配向を変化させることによっても改変されうると想定されうる。

【0229】

したがって、本発明は、1つの実施形態においては、（例えば、哺乳動物（例えば、ヒト）においてin vivoで、および／またはin vitroで）細胞集団を同定し、枯渇させ、モジュレーション（例えば、活性化、抑制）するための、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質の使用方法を提供する。1つの特定の実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、哺乳動物（例えば、ヒト）に投与された場合に、正常組織（例えば、非癌組織または非罹患組織、すなわち、非標的組織）には有意には結合しない。非標的組織への有意な結合の回避は1以上の非標的化細胞集団の枯渇、モジュレーション（活性化、抑制）を回避または最小化する。いくつかの実施形態においては、in vitroでまたは哺乳動物（例えば、ヒト）に投与された場合に標的細胞集団に関して本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質により示されるアビディティの増加は、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質から単離されたエピトープ結合性ドメインの全部ではなく1以上（すなわち、サブセット）を含む「対照エピトープ結合性タンパク質」と比べて少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍または少なくとも25倍である。いくつかの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質により示されるアビディティの増加は、前記の「対照エピトープ結合性タンパク質」に対して少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも150%である。

【0230】

いくつかの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質から単離されたエピトープ結合性ドメインの全部ではなく1以上（すなわち、サブセット）を含む対照エピトープ結合性タンパク質と比べて、特定の抗原に対するアビディティの増加を示す。いくつかの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質により示されるアビディティの増加は、前記の対照エピトープ結合性タンパク質に対して少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍または少なくとも25倍である。いくつかの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質により示

されるアビディティの増加は、前記の対照エピトープ結合性タンパク質に対して少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも150%である。

【0231】

他の実施形態においては、X個（ここで、Xは1~20の任意の正の整数である）のエピトープ結合性ドメインを含む本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、対照エピトープ結合性タンパク質（限定的なものではないが例えば、抗体、他の多重特異性エピトープ結合性タンパク質、scFvまたは一本鎖ダイアボディ）と比べて特定の抗原に対する（*in vitro*での、または哺乳動物（例えば、ヒト）に投与された場合の）アビディティの増加を示し、ここで、該対照エピトープ結合性タンパク質は、X-Y個（ここで、XおよびYは1~20の任意の正の整数であり、XはYより大きい）のエピトープ結合性ドメインを含み、該対照エピトープ結合性ドメインタンパク質における少なくとも1つのエピトープ結合性ドメインは、本発明のタンパク質に存在するエピトープ結合性ドメインと同じエピトープに特異的である。言い換えると、本発明は、より多いまたはより少ないエピトープ結合性ドメイン（ここで、少なくとも1つのエピトープ結合性ドメインは、本発明のタンパク質と共通の抗原に特異的である）を有する対照エピトープ結合性タンパク質と比べて増加した、特定の標的に対するアビディティを有する多重特異性エピトープ結合性タンパク質を提供する。

【0232】

多重特異性エピトープ結合性タンパク質におけるそのようなアビディティ変化は、動物におけるそのような治療用タンパク質（例えば、第E節「多重特異性エピトープ結合性集合体の特定の実施形態」に挙げられているいずれかの抗体の組合せ）の毒性の低減を可能にする。本発明のタンパク質は、*in vivo*での毒性を低減する「適合化（tailor-fit）」されたアビディティおよび／またはアフィニティを示しうると理解される。したがって、本発明はまた、対照エピトープ結合性タンパク質より低い毒性を動物において示す本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質を提供する。また、本発明は、本明細書に記載されている方法による本発明のタンパク質の毒性の低減方法も提供すると理解される。

【0233】

また、アビディティ変化は、容易に利用可能な*in vitro*法、例えば機能アッセイ（限定的なものではないが、サイトカイン発現／遊離／結合、遺伝子発現、形態学的変化、走化性、カルシウム流動などを含む）、BIAcoreにより測定される結合測定、または対照エピトープ結合性ドメインタンパク質を使用するKinExa測定により評価されうると理解される。いくつかの実施形態においては、対照エピトープ結合性タンパク質は本発明のタンパク質からのエピトープ結合性ドメインのサブセットを含有しうる。他の実施形態においては、対照エピトープ結合性タンパク質は、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質からの少なくとも1つまたはそれ以上の単離されたエピトープ結合性ドメインを含みうる。例えば、8つのエピトープ結合性ドメインを含有する本発明のタンパク質の場合、対照エピトープ結合性タンパク質は1、2、3、4、5、6または7つのエピトープ結合性ドメインを含むことが可能であり、少なくとも1つのエピトープ結合性ドメインは、本発明のタンパク質と該対照タンパク質との両方により認識される抗原に対する特異性を有する。他の実施形態においては、該対照エピトープ結合性タンパク質は、単離されたエピトープ結合性ドメインと本発明のタンパク質との両方により認識される抗原に対する特異性を有する単離されたエピトープ結合性ドメインを含む。

【0234】

1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、複数の細胞表面抗原の発現により定められる中和細胞を特異的に同定し、枯渇させ、活性化し、抑制し、または標的化するために使用される。もう1つの実施形態においては、本発明は、該タンパク質内の複数のエピトープ結合部位により認識される複数の抗原を発現する細胞を精製するための、本発明のタンパク質の使用を含む。したがって、本発明の方法は

、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質内の各エピトープ結合性ドメインの相対的アビディティ寄与をモジュレーションすることを含む。

【0235】

いくつかの実施形態においては、中和細胞を同定し、枯渇させ、活性化し、抑制し、または標的化するために使用される本発明の方法は、非標的細胞集団を有意には枯渇させず、活性化せず、または抑制しない。そのような実施形態においては、本発明のタンパク質の投与は、該治療自体から得られる利益に勝る負の結果を示さない。そのような負の結果には、非標的組織への結合、毒性の増強、細胞の病的枯渇、感染のリスクの増加などが含まれうる（それらに限定されるものではない）。伝統的なエピトープ結合性ドメイン（限定的なものではないが、抗体、scFv、一本鎖ダイアボディなどを含む）による療法により示される負の結果は、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質を使用する療法の実施により最小化されうる。

10

【0236】

また、癌細胞は腫瘍進行中に細胞表面分子を差示的に発現することが十分に理解されている。例えば、腫瘍細胞は良性状態においては細胞表面抗原を発現しうるが、転移するとその特定の細胞表面抗原をダウンレギュレーションしうる。この過程は多数の異なる腫瘍細胞型で生じうると理解される。したがって、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、多数の異なる癌進行段階においてそのような腫瘍細胞を標的化しうるエピトープ結合性ドメインを含むよう設計されうると予想される。言い換えると、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、腫瘍細胞型をその進行段階には無関係に標的化するために使用されうる。本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、種々の腫瘍進行段階において発現される特異的腫瘍細胞表面抗原に結合する複数のエピトープ結合性ドメインを含みうる。

20

【0237】

1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、同時に提示されてもされなくてもよい腫瘍細胞表面抗原に特異的であるエピトープ結合性ドメインを含む。他の実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、腫瘍細胞表面抗原に特異的である少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも7つ、または少なくとも8つのエピトープ結合性ドメインを含み、ここで、該抗原は、腫瘍細胞の表面上に同時に提示されなくてもよい。他の実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、腫瘍細胞表面抗原に特異的である少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも7つ、または少なくとも8つのエピトープ結合性ドメインを含み、ここで、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも7つ、または少なくとも8つの腫瘍細胞表面抗原は、例えばエフェクター機能、インターナリゼーションなどのような応答を惹起するよう該タンパク質により利用される。

30

【0238】

他の実施形態においては、本発明は、複数の細胞表面抗原の発現により定められる細胞型を枯渇させ、殺し、中和し、および／または隔離する方法を提供する。そのような細胞型には、T細胞（例えば、細胞傷害性記憶およびNK細胞）、B細胞、マスト細胞、好酸球、好塩基球、好中球、幹細胞（例えば、癌幹細胞）およびマクロファージが含まれるが、これらに限定されるものではない。

40

【0239】

本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、所望の治療効果を得るためおよび副作用を軽減するための両方に有効な量で使用される。サイトカインストームは、例えば免疫系が病原体と戦っているときに引き起こされるサイトカインと免疫細胞との間の正のフィードバックループよりなる潜在的に致死性の免疫反応である。サイトカインストーム（高サイトカイン血症（hypercytokinemia））は、150以上の炎症伝達物質（inflammator

50

y mediator) (サイトカイン、酸素フリーラジカルおよび凝固因子) の遊離を引き起こす健常で強力な免疫系の全身性発現である。サイトカインストームに罹っている患者の血清においては炎症性サイトカイン (例えば、腫瘍壊死因子アルファ、インターロイキン1およびインターロイキン6) および抗炎症性サイトカイン (例えば、インターロイキン10およびインターロイキン1受容体アンタゴニスト) の両方が上昇する。サイトカインストームは、移植片対宿主病 (GVHD)、成人呼吸窮迫症候群 (ARDS)、敗血症、トリインフルエンザ、天然痘、卒中、アレルギー反応 (過敏症)、心停止、中毒性ショック症候群および全身性炎症応答症候群 (SIRS) を含む多数の感染性および非感染性疾患において生じうる。サイトカインストームは伝統的な小分子または生物学的療法の結果としても誘導されうる。いくつかの実施形態においては、本発明の多重特異性結合性タンパク質は、遊離サイトカインを抑制し/拮抗し/中和し、および/または枯渇させることにより、サイトカインストームの予防、管理、抑制および/または改善において有用である。そのような多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、サイトカインストームにおいて存在するサイトカインに特異的な少なくとも1つのエピトープ結合性ドメインを含むであろう。そのようなタンパク質は患者における複数の上昇サイトカインに対する単剤療法に相当するであろう。他の実施形態においては、そのようなタンパク質およびその製剤は、サイトカインストームを予防または抑制するために予防的に投与されうるであろう。他の実施形態においては、そのようなタンパク質およびその製剤は、それを要する患者、例えば、サイトカインストームに現在罹っている患者に投与されうるであろう。他の実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、OX40に基づく療法 (OX40-Ig、Ox40リガンド)、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) インヒビター、アンジオテンシンII受容体ブロッカー (ARB)、コルチコステロイド、NSAIDおよび/またはフリーラジカルスカベンジャー (抗酸化剤) と組合せて、それを要する患者に投与されうる。他の実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、本発明のタンパク質の投与の前または非存在下と比べて少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%、哺乳動物 (例えば、ヒトまたは非ヒト霊長類) においてサイトカインストームを阻止し、拮抗し、抑制し、および/または中和しうる。

【0240】

他の実施形態においては、多重特異性エピトープ結合性タンパク質は特定の抗原の分解産物の標的化において有用である。 β -アミロイドタンパク質は種々の断片へのタンパク質分解に付され、疾患の進行における原因因子であると考えられるのはこれらの断片であることが、十分に理解されている。本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、例えば β -アミロイドタンパク質断片のような分解産物の種々の断片を減少させるのに有用でありうる。本発明のタンパク質は、各断片に特異的な少なくとも1つのエピトープ結合性ドメインを露出することにより、種々の断片を除去しうる。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、修飾後に露出されるに過ぎないエピトープ (例えば、分解産物) に特異的な少なくとも1つのEBDをも含むうる。本発明のタンパク質は、そのような潜在性エピトープを抑制し、阻止し、拮抗し、または中和するのに有用でありうる。

【0241】

また、多数の細胞表面受容体はサブユニットの架橋の結果として活性化または不活性化する。本発明のタンパク質は、細胞表面受容体の架橋により、標的細胞における応答を刺激または抑制するために使用されうる。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、抗原との複数の細胞表面受容体の相互作用を遮断するために使用されうる。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、抗原との複数の細胞表面受容体の相互作用を増強するために使用されうる。もう1つの具体例においては、同一抗原に対する特異性を共有する結合性ドメインを含有する本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質を使用して、細胞表面受容体のホモ二量体を架橋することが可能でありうる。もう1つの実施形態においては、本発

明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、サブユニットまたはヘテロ多量体受容体（限定的なものではないが例えば、ヘテロ二量体受容体）を架橋するのに有用である。他の実施形態においては、本発明のタンパク質は、少なくとも2つの異なる抗原を結合させることにより、ヘテロ多量体形成を拮抗し、阻止し、または抑制しうる。他の実施形態においては、本発明のタンパク質は、多量体受容体の種々のタンパク質成分との、該タンパク質内に存在する複数のエピトープ結合性ドメインの相互作用による、多量体受容体の標的化、作動、拮抗、抑制および／または刺激に有用である。

【0242】

もう1つの実施形態においては、本発明のタンパク質は、特異的細胞表面受容体にリガンドまたはリガンドアナログを送達するために使用されうる。いくつかの実施形態においては、本発明のタンパク質は、受容体に存在するリガンドの化学量論量を増加させるために有用でありうる。この場合、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、特定されたりガンドに結合する複数のエピトープ結合性ドメインを介してその他のものに対して2以上のリガンドアイソフォームを示しうるということが可能である。他の実施形態においては、本発明のタンパク質は1以上のリガンドを協同的に働かせて、該リガンドとの複数のエピトープ結合性ドメインの相互作用を介して受容体を適切に利用しうる。

【0243】

本発明はまた、伝統的な抗体では容易には達成されない、エピトープを標的化する方法を提供する。例えば、1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質を使用して、まず、隣接抗原を標的化し、結合中に、もう1つの結合ドメインが潜在性抗原に嵌合しうる。

【0244】

本発明はまた、複数のエピトープ結合性ドメインの使用による、細胞表面上に存在しないエピトープを標的化する方法を提供する。本発明のタンパク質は細胞の内部へのエピトープ結合性ドメインの送達において有用であると理解されるべきである。細胞表面抗原に特異的な少なくとも1つのエピトープ結合性ドメインを使用して、本発明のタンパク質は、直接的に（結合抗原のインターナリゼーションにより）、または本発明のタンパク質上に存在する連続的な膜透過性構造体（すなわち、イントラボディ）を介して間接的に標的化されうる。そのような場合、本発明のタンパク質で細胞内標的を標的化することが可能である。

【0245】

本発明はまた、循環可溶性抗原に結合させ、該抗原を拮抗し、抑制し、および／または中和する方法を提供する（例えば、哺乳動物（例えば、ヒト）においてin vivoで、および／またはin vitroで）。そのような抗原には、種々のサイトカイン、炎症伝達物質、ホルモン、アルブミン、ビタミン、トリグリセリド、小分子薬などが含まれる。また、本発明のタンパク質は、種々の異なる可溶性リガンドに特異的なエピトープ結合性ドメインを含みうると予想される。いくつかの実施形態においては、本発明のタンパク質は、特定の相互作用または効果を制御するために、患者に投与された種々の薬物に結合させ、該薬物を中和し、および／または抑制する方法において有用である。いくつかの実施形態においては、本発明のタンパク質は循環可溶性抗原の半減期を増加または減少させうる。他の実施形態においては、本発明のタンパク質は循環可溶性抗原の半減期には影響を及ぼさない。

【0246】

本発明のタンパク質は、個体内で循環する望ましくない物質の除去においても有用である。例えば、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質を使用して、病原体、サイトカイン、炎症伝達物質、ホルモン、アルブミン、ビタミン、トリグリセリドおよび小分子薬から選ばれる物質に対して結合および標的化して、それを除去することが可能である。

【0247】

本発明はまた、本発明のタンパク質を使用する、1以上の抗体または抗体フラグメント

(またはいずれかのペプチド)に基づく療法に関連した、治療により誘発される毒性を低減する方法を提供する。例えば、2つのポリペプチドが一緒に投与された場合(またはそれらがin vivoで相互作用しうる時点で投与された場合)にそれらのポリペプチドが毒性である場合、そのような相互作用に関連した毒性は、本発明の多重特異性タンパク質における個々のタンパク質の結合特性を操作することにより回避されうる。いくつかの実施形態においては、本発明の方法を使用する毒性の低減は、本発明のタンパク質での個々の療法の同一抗原の標的化を含む。いくつかの実施形態においては、本発明のタンパク質は、個々の療法と同じエピトープ結合性ドメインを含む。他の実施形態においては、本発明のタンパク質は、個々の療法と同じエピトープおよび/または抗原に対するエピトープ結合性ドメインを含む。いくつかの実施形態においては、本発明の方法は、1以上の抗体および/または抗体フラグメントに基づく療法(例えば、第E節「多重特異性エピトープ結合性集合体の特定の実施形態」に挙げられているいずれかの抗体の組合せ)に関連した毒性を、1以上の抗体および/または抗体フラグメントに基づく療法に関連した毒性と比べて少なくとも約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%または約95%低減する。

【0248】

本発明はまた、異なる細胞型を結びつけるための、多重特異性エピトープ結合性タンパク質の使用法を提供する。1つの実施形態においては、本発明のタンパク質は1つの結合性ドメインで標的細胞に結合し、もう1つの結合性ドメインを介して別の細胞を呼び寄せ(recruit)する。もう1つの実施形態においては、第1細胞は癌細胞であることが可能であり、第2細胞は免疫エフェクター細胞、例えばNK細胞である。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質を使用して、例えば抗原提示細胞およびT細胞のような2つの異なる細胞の間の相互作用を増強して、おそらくは免疫応答を増強することが可能である。

【0249】

本発明はまた、癌またはその症状を改善、治療または予防するための、多重特異性エピトープ結合性タンパク質の使用法を提供する。1つの実施形態においては、本発明の方法は、頭部、頸部、眼、口、喉、食道、胸部、皮膚、骨、肺、結腸、直腸、結腸直腸、胃、脾臓、腎臓、骨格筋、皮下組織、転移性メラノーマ、子宮内膜、前立腺、乳房、卵巣、精巣、甲状腺、血液、リンパ節、腎臓、肝臓、膵臓、脳または中枢神経系の癌の治療において有用である。本発明の方法により予防、管理、治療または改善されうる癌の具体例には、頭部、頸部、眼、口、喉、食道、胸部、骨、肺、結腸、直腸、胃、前立腺、乳房、卵巣、腎臓、肝臓、膵臓および脳の癌が含まれるが、これらに限定されるものではない。追加的な癌には、限定的なものではないが以下のものが含まれる：急性白血病、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、例えば骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性、赤白血病性白血病および骨髄形成異常症候群、慢性白血病、限定的なものではないが例えば慢性骨髄性(顆粒球性)白血病、慢性リンパ性白血病、ヘアリー細胞白血病；真性多血症；リンパ腫、限定的なものではないが例えばホジキン病、非ホジキン病；多発性骨髄腫、限定的なものではないが例えば、くすぶり型多発性骨髄腫、非分泌性(nonsecretory)骨髄腫、骨硬化性骨髄腫、形質細胞性白血病、単発性形質細胞腫および髄外性形質細胞腫；ワルデンシュトレーム・マクログロブリン血症；MGUS(monoclonal gammopathy of undetermined significance)；良性単クローン性γグロブリン異常症；重鎖病；骨癌および結合組織肉腫、限定的なものではないが例えば骨肉腫、骨髄腫骨疾患、多発性骨髄腫、真珠腫誘発性骨肉腫、骨パジェット病、骨肉腫、軟骨肉腫、ユーイング肉腫、悪性巨細胞腫、骨線維肉腫、脊索腫、骨膜肉腫、軟部肉腫、血管肉腫、線維肉腫、カボジ肉腫、平滑筋肉腫、脂肪肉腫、リンパ管肉腫、神経線維鞘腫、横紋筋肉腫および骨膜肉腫；脳腫瘍、限定的なものではないが例えば神経膠腫、星状細胞腫、脳幹神経膠腫、上衣腫、乏突起神経膠腫、非グリア腫瘍、聴神経鞘腫、頭蓋咽頭腫、髄芽腫、髄膜腫、松果体細胞腫、松果体芽細胞腫および原発性脳リンパ腫；乳癌、限定的なものではないが例えば、腺癌、小葉癌、管内癌、髄様乳癌、ムチン産生乳癌、細管乳癌、乳頭状乳癌、パジェット病(若年性パジ

ェット病を含む) および炎症性乳癌; 副腎癌、限定的なものではないが例えば、褐色細胞腫および副腎皮質癌; 甲状腺癌、限定的なものではないが例えば、乳頭状または小胞性甲状腺癌、髄様甲状腺癌および退形成甲状腺癌; 膵臓癌、限定的なものではないが例えば、インスリノーマ、ガストリン産生腫瘍、グルカゴン産生腫瘍、VIP産生腫瘍、ソマトスタチン分泌腫瘍およびカルチノイドまたは島細胞腫; 下垂体癌、限定的なものではないが例えば、クッシング病、プロラクチン分泌腫瘍、先端巨大症および尿崩症; 眼癌、限定的なものではないが例えば、眼メラノーマ、例えば虹彩メラノーマ、脈絡膜メラノーマおよび毛様体メラノーマおよび網膜芽細胞腫; 腔癌、例えば扁平上皮癌、腺癌およびメラノーマ; 外陰癌、例えば扁平上皮癌、メラノーマ、腺癌、基底細胞癌、肉腫およびパジェット病; 子宮頸癌、限定的なものではないが例えば、扁平上皮癌および腺癌; 子宮癌、限定的なものではないが例えば、子宮内膜癌および子宮肉腫; 卵巣癌、限定的なものではないが例えば、卵巣上皮癌、境界 (borderline) 腫瘍、胚細胞腫瘍および間質腫瘍; 食道癌、限定的なものではないが例えば、扁平上皮癌、腺癌、腺様嚢胞癌、粘表皮癌、腺様扁平上皮癌、肉腫、メラノーマ、プラズマ細胞腫、疣状癌および燕麦細胞 (小細胞) 癌; 胃癌、限定的なものではないが例えば、腺癌、菌状発育 (fungating) (ポリプ状)、潰瘍性、表在性、びまん性、悪性リンパ腫、脂肪肉腫、線維肉腫および癌肉腫; 結腸癌; 直腸癌; 肝癌、限定的なものではないが例えば、肝細胞癌および肝芽腫、胆嚢癌、例えば腺癌; 胆管癌、限定的なものではないが例えば、乳頭状、結節性およびびまん性; 肺癌、例えば非小細胞肺癌、扁平上皮癌 (類表皮癌)、腺癌、大細胞癌および小細胞肺癌; 精巣癌、限定的なものではないが例えば、胚芽性腫瘍、セミノーマ、無形成性、古典的 (典型的)、精母細胞、非セミノーマ、胎児性癌、テラトーマ癌、絨毛癌 (卵黄嚢腫瘍)、前立腺癌、限定的なものではないが例えば、腺癌、平滑筋肉腫および横紋筋肉腫; ペナル (penal) 癌; 口内癌、限定的なものではないが例えば、扁平上皮癌; 基底癌; 唾液腺癌、限定的なものではないが例えば、腺癌、粘表皮癌および腺様嚢胞癌; 咽頭癌、限定的なものではないが例えば、鱗状細胞癌および疣状; 皮膚癌、限定的なものではないが例えば、基底細胞癌、扁平上皮癌およびメラノーマ、表在性メラノーマ、結節性メラノーマ、悪性ほくろ、末端性ほくろ性メラノーマ、; 腎臓癌、限定的なものではないが例えば、腎細胞癌、腺癌、副腎腫、線維肉腫、移行上皮癌 (腎盤および/または尿管); ウィルムス腫瘍; 膀胱癌、限定的なものではないが例えば、移行上皮癌、鱗状細胞癌、腺癌、癌肉腫。また、癌には以下のものが含まれる: 粘液肉腫、骨原性肉腫、内皮肉腫、リンパ管内皮腫、中皮腫、滑膜腫、血管芽細胞腫、上皮癌、嚢胞腺癌、気管支癌、汗腺癌、脂腺癌、乳頭状癌および乳頭状腺癌 (そのような障害の概説としては、Fishmanら, 1985, Medicine, 2d Ed., J. B. Lippincott Co., PhiladelphiaおよびMurphyら, 1997, Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., inc., United States of Americaを参照されたい)。また、アポトーシスにおける異常により引き起こされる癌も本発明の方法および組成物により治療されうると想定される。そのような癌には、限定的なものではないが以下のものが含まれる: 濾胞性リンパ腫、p53突然変異を有する癌、乳房、前立腺および卵巣のホルモン依存性腫瘍、ならびに前癌性病変、例えば家族性腺腫様ポリプ症、および骨髓形成異常症候群。本発明はまた、細胞集団を枯渇させるための、多重特異性エピトープ結合性タンパク質の使用法を提供する。1つの実施形態においては、本発明の方法は、以下の細胞型を枯渇させるのに有用である: 好酸球、好塩基球、好中球、T細胞、B細胞、マスト細胞、単球、癌幹細胞および腫瘍細胞。

【0250】

本発明はまた、サイトカインを不活性化し、抑制し、または枯渇させるための、多重特異性エピトープ結合性タンパク質の使用法を提供する。1つの実施形態においては、本発明の方法は、以下のサイトカインの少なくとも1つを不活性化し、抑制し、または枯渇させるのに有用である: TGF- β 、TNF- α 、C5a、fMLP、ロイコトリエンA4およびB4、プロスタグランジンD、EおよびF、トロンボキサンA₂、インターフェロンアルファ (1, 2a, 2b, 4, 4b, 5, 6, 7, 8, 10, 14, 16, 17および21を含む)、インターフェロンベータ、イ

10

20

30

40

50

ンターフェロンオメガ、インターフェロンガンマ、インターロキンIL-1-33、CCL1-28、CXCL 1-17およびCX3CL1。

【0251】

本発明はまた、合成受容体としての多重特異性エピトープ結合性タンパク質の使用方を提供す。少なくとも1つまたはそれ以上のエピトープ結合性ドメインは、種々の分子（例えば、薬物分子、イメージング物質、およびそのような分子に対する受容体として使用される他の物質）に結合するよう操作されう。例えば、細胞（限定的なものではないが例えば、癌細胞）の集団に特異的な多重特異性エピトープ結合性タンパク質は細胞表面抗原に結合し、該細胞集団に対する小分子物質の特異的標的化のための足場（プラットフォーム）を与えるであろう。この方法は標的部位における物質濃度の増加を招きうる。該方法は、物質の全身投与量の減少により、正常組織に対する毒性を低減しうる。該方法は薬物／物質の薬動学的プロファイルおよび治療域（therapeutic window）の改変を可能にする。いくつかの実施形態においては、該物質は該多重特異性エピトープ結合性タンパク質の投与の前、途中または後で投与されるであろう。

【0252】

本発明はまた、アブリン、ブルシン、シクトキシン、ジフテリア毒素、ボツリヌス毒素、志賀毒素、内毒素、破傷風毒素、百日咳毒素、炭疽毒素、コレラ毒素、ファルカリノール（falcarinol）、アルファ毒素、ゲルダナマイシン（geldanamycin）、ゲロニン、ロタウストラリン（lotaustralin）、リシン、ストリキニーネ、ヘビ毒毒素およびテトラドトキシンよりなる群から選ばれる1以上の物質への曝露に関連した哺乳動物（例えば、ヒトまたは非ヒト霊長類）における毒性を低減するための、本発明のタンパク質の使用方を提供す。

【0253】

いくつかの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、要求される課題を達成するために、本明細書に記載されている1以上の使用を利用しうる。例えば、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、受容体二量体化を遮断し、それに伴ってコグネイト抗原を中和しうる。例えば、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、活性に要求される二量体化を遮断するためのIFNAR1受容体に対する少なくとも1つのエピトープを含むことが可能であり、一方、少なくとも1つの他のエピトープ結合性ドメインを使用して、IFNAR1に結合する可溶性インターフェロンアルファサブタイプに結合し、それを中和する。したがって、本発明のタンパク質は、相互作用の種々の特性に対する複数のエピトープ結合性ドメインの投与により、複数の課題を達成する方法を提供す。

【0254】

本発明はまた、in vivo（例えば、哺乳動物、例えばヒトに投与された場合）またはin vitro（例えば、患者由来のサンプル）での診断試薬としての多重特異性エピトープ結合性タンパク質の使用方を提供す。複数の結合特異性は、種々の抗原が同時に効率的に捕捉される必要があるキットまたは試薬において有用でありうる。したがって、いくつかの実施形態においては、本発明は、本発明のタンパク質を使用して、少なくとも1つの可溶性化合物を検出し、および／または溶液から精製する方法を提供す。いくつかの実施形態においては、そのような溶液は体液、細胞培養培地、発酵培養液、生物学的サンプル、飲料水でありうる。体液には、例えば、血液、汗、リンパ液、尿、涙、胆汁、唾液、血清、羊水、耳脂（耳垢）、カウパー液、精液、乳び、び汁、脳脊髄液、糞便、糞便水、脾液、滑液、眼房水、腸液、母乳、粘液、胸水、膿、皮脂および嘔吐物が含まれうる。

【0255】

本発明のタンパク質およびそれを含む組成物は、多数の目的に、例えば、限定的なものではないが以下のものを含む広範囲の慢性および急性の疾患および障害に対する治療用物質として有用である：シェーグレン症候群、関節リウマチ、狼瘡、乾癬、アテローム性動脈硬化症、糖尿病性および他の網膜症、水晶体後線維増殖症、加齢性黄斑変性、血管新生性緑内障、血管腫、甲状腺過形成（グレーブス病を含む）、角膜および他の組織移植、お

よび慢性炎症、敗血症、関節リウマチ、腹膜炎、クローン病、再灌流障害、敗血症、内毒素ショック、嚢胞性線維症、心内膜炎、乾癬、関節炎（例えば、乾癬性関節炎）、アナフィラキシーショック、臓器虚血、再灌流障害、脊髄損傷および同種移植片拒絶。自己免疫および／または炎症障害の他の具体例には、限定的なものではないが以下のものが含まれる：円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質症候群、自己免疫性アジソン病、副腎の自己免疫疾患、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性卵巣炎および精巣炎、シェーグレン症候群、乾癬、アテローム性動脈硬化症、糖尿病性および他の網膜症、水晶体後線維増殖症、加齢性黄斑変性、血管新生性緑内障、血管腫、甲状腺過形成（グレーヴス病を含む）、角膜および他の組織移植、および慢性炎症、敗血症、関節リウマチ、腹膜炎、クローン病、再灌流障害、敗血症、内毒素ショック、嚢胞性線維症、心内膜炎、乾癬、関節炎（例えば、乾癬性関節炎）、アナフィラキシーショック、臓器虚血、再灌流障害、脊髄損傷および同種移植片拒絶、自己免疫性血小板減少症、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、セリアックスブルー皮膚炎、慢性疲労免疫機能不全症候群（CFIDS）、慢性炎症性脱髄多発性神経障害、チャージェストラウス症候群、瘢痕性類天疱瘡、CREST症候群、寒冷凝集素症、クローン病、円板状狼瘡、必須混合クリオグロブリン血症、線維筋肉痛-線維筋炎、糸球体腎炎、グレーヴズ病、ギランバレー、橋本病甲状腺炎、特発性肺線維症、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、IgAニューロパチー、若年性関節炎、扁平苔癬、エリテマトーデス、メニエール病、混合性結合組織病、多発性硬化症、1型または免疫性糖尿病、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、悪性貧血、結節性多発動脈炎、多発性軟骨炎、多腺性症候群、リウマチ性多発筋痛症、多発性筋炎および皮膚筋炎、原発性ガンマグロブリン欠乏血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、乾癬性関節炎、レイノー現象、ライター症候群、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、全身硬直症候群、全身性エリテマトーデス、エリテマトーデス、高安動脈炎、側頭動脈炎／巨細胞性動脈炎、潰瘍性大腸炎、ぶどう膜炎、脈管炎、例えば疱疹状皮膚炎脈管炎、尋常性白斑およびウェゲナー肉芽腫症。炎症障害の具体例には、限定的なものではないが以下のものが含まれる：喘息、脳炎、炎症性腸疾患、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、アレルギー障害、敗血性ショック、肺線維症、未分化脊椎関節症、未分化関節障害、関節炎、炎症性骨溶解および慢性炎症（慢性ウイルスまたは細菌感染から生じるもの）。本発明の組成物および方法は、前記疾患を予防、管理または治療するために使用される1以上の通常の療法と共に使用されうる。

10

20

30

【0256】

1つの実施形態においては、本発明は、慢性炎症を治療しうる組成物を含む。1つの実施形態においては、該組成物は、破壊または不活性化のための免疫細胞の標的化において有用である。1つの実施形態においては、該組成物は活性化T細胞、休眠T細胞、B細胞、好中球、好酸球、好塩基球、マスト細胞、樹状細胞またはマクロファージの標的化において有用である。もう1つの実施形態においては、本発明は、免疫細胞の機能を低下させうる組成物を含む。もう1つの実施形態においては、該組成物は免疫細胞機能を除去しうる。

【0257】

T細胞は細胞性免疫において中心的な役割を果たしており、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、記憶T細胞およびNK T細胞を含む細胞集団を一括して表す。ヘルパーT細胞は、活性化されると、迅速に分裂し、サイトカインを分泌して免疫応答を調節する。1つの実施形態においては、本発明は、ヘルパーT細胞の分裂および／または増殖を抑制しうる組成物を含む。いくつかの実施形態においては、本発明の組成物は、ヘルパーT細胞の分裂および／または増殖を、未処理活性化ヘルパーT細胞と比べて少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%もしくは少なくとも100%またはそれ以上低減しうる。もう1つの実施形態においては、本発明の組成物は、分裂および／または増殖を、未処理活性化ヘルパーT細胞と比べて少なくとも2倍、少なくとも3倍、少

40

50

なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍、少なくとも50倍またはそれ以上低減しうる。もう1つの実施形態においては、本発明の組成物は活性化ヘルパーT細胞からのサイトカインの産生および／または分泌を抑制または低減しうる。いくつかの実施形態においては、本発明の組成物は、ヘルパーT細胞からのサイトカインの産生および／または分泌を、未処理活性化ヘルパーT細胞と比べて少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%もしくは少なくとも100%またはそれ以上抑制および／または低減しうる。いくつかの実施形態においては、本発明の組成物は、ヘルパーT細胞からのサイトカインの産生および／または分泌を、未処理活性化ヘルパーT細胞と比べて少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍、少なくとも50倍またはそれ以上抑制および／または低減しうる。

【0258】

細胞傷害性T細胞は、例えば腫瘍細胞またはウイルスもしくは他の病原体に感染した細胞における細胞死を誘導しうる。細胞傷害性T細胞は、活性化されると、IL-2サイトカインの補助によりクローン増殖を受ける。また、活性化に際して、細胞毒であるパーフォリンおよびグラニュリシン（granulysin）が細胞傷害性T細胞から遊離されて、標的細胞の破壊を補助する。1つの実施形態においては、本発明は、細胞傷害性T細胞の分裂および／または増殖を抑制しうる組成物を含む。いくつかの実施形態においては、本発明の組成物は、細胞傷害性T細胞の分裂および／または増殖を、未処理活性化細胞傷害性T細胞と比べて少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%もしくは少なくとも100%またはそれ以上低減しうる。もう1つの実施形態においては、本発明の組成物は、細胞傷害性T細胞の分裂および／または増殖を、未処理活性化細胞傷害性T細胞と比べて少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍、少なくとも50倍またはそれ以上低減しうる。もう1つの実施形態においては、本発明の組成物は活性化細胞傷害性T細胞からの細胞毒の産生および／または分泌を抑制または低減しうる。いくつかの実施形態においては、本発明の組成物は、細胞傷害性T細胞からの細胞毒の産生および／または分泌を、未処理活性化細胞傷害性T細胞と比べて少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%もしくは少なくとも100%またはそれ以上抑制および／または低減しうる。いくつかの実施形態においては、本発明の組成物は、ヘルパーT細胞からの細胞毒の産生および／または分泌を、未処理活性化細胞傷害性T細胞と比べて少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍、少なくとも50倍またはそれ以上抑制および／または低減しうる。もう1つの実施形態においては、該細胞毒は、パーフォリンおよびグラニュリシン（granulysin）よりなる群から選ばれる。もう1つの実施形態においては、パーフォリンの産生および／または分泌が低減される。もう1つの実施形態においては、グラニュリシンの産生および／または分泌が低減される。もう1つの実施形態においては、パーフォリンおよびグラニュリシンの産生および／または分泌が低減される。

【0259】

記憶T細胞は、過去の感染またはワクチン接種中に遭遇した細菌およびウイルスのような外来侵入体を認識しうるT細胞のクラスを代表するものである。該侵入体の2度目の遭遇

時には、最初の遭遇より迅速かつより強力な免疫応答を惹起するよう記憶T細胞が再生されうる。記憶T細胞は、免疫応答を刺激するサイトカインを産生し分泌する。いくつかの実施形態においては、本発明の組成物は、記憶T細胞の分裂および／または増殖を、未処理活性化記憶T細胞と比べて少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%もしくは少なくとも100%またはそれ以上低減しうる。もう1つの実施形態においては、本発明の組成物は、分裂および／または増殖を、未処理活性化記憶T細胞と比べて少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍、少なくとも50倍またはそれ以上抑制および／または低減しうる。もう1つの実施形態においては、本発明の組成物は活性化記憶T細胞からのサイトカインの産生および／または分泌を抑制または低減しうる。いくつかの実施形態においては、本発明の組成物は、記憶T細胞からのサイトカインの産生および／または分泌を、未処理活性化記憶T細胞と比べて少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%もしくは少なくとも100%またはそれ以上抑制および／または低減しうる。いくつかの実施形態においては、本発明の組成物は、記憶T細胞からのサイトカインの産生および／または分泌を、未処理活性化記憶T細胞と比べて少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍、少なくとも50倍またはそれ以上抑制および／または低減しうる。いくつかの実施形態においては、本発明の組成物は、IL-2、インターフェロンガンマおよび／またはIL-4の産生を低減する。

【0260】

ナチュラルキラー細胞（あるいはNK細胞として公知である）は、腫瘍細胞およびウイルス感染細胞の標的化破壊において或る役割を果たす細胞傷害性リンパ球の一種である。NK細胞は、標的細胞におけるアポトーシスを誘発するパーフォリンおよびグランザイムを含有する小さな細胞質顆粒を遊離することにより標的細胞を殺す。いくつかの実施形態においては、本発明の組成物はNK細胞からのパーフォリンおよび／またはグランザイムの遊離を阻害または減少させる。いくつかの実施形態においては、本発明の組成物は、NK細胞からのパーフォリンおよび／またはグランザイムの遊離を、未処理活性化NK細胞と比べて少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%もしくは少なくとも100%またはそれ以上抑制および／または低減しうる。いくつかの実施形態においては、本発明の組成物は、NK細胞からのパーフォリンおよび／またはグランザイムの遊離を、未処理活性化NK細胞と比べて少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍、少なくとも50倍またはそれ以上抑制および／または低減しうる。

【0261】

B細胞は、体液性免疫応答において或る役割を果たすリンパ球である。B細胞の主な機能は可溶性抗原に対する抗体の産生である。各B細胞は、1つの特定の抗原に結合する特有の受容体を有する。B細胞がそのコグネイト抗原に結合し、ヘルパーT細胞から追加的シグナルを受け取ると、それは抗体産生細胞となりうる。いくつかの実施形態においては、本発明の組成物はB細胞の活性化を抑制または低減しうる。いくつかの実施形態においては、本発明の組成物は、B細胞の活性化を、未処理B細胞と比べて少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%もしくは少なくとも100%またはそれ以上抑制および／または低減しうる。

5%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%もしくは少なくとも100%またはそれ以上抑制または低減しうる。いくつかの実施形態においては、本発明の組成物はB細胞の活性化を抑制または低減しうる。いくつかの実施形態においては、本発明の組成物は、B細胞の活性化を、未処理B細胞と比べて少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍もしくは少なくとも50倍またはそれ以上抑制および／または低減しうる。

【0262】

もう1つの実施形態においては、本発明の組成物はB細胞からの抗体の産生および／または分泌を抑制または低減しうる。いくつかの実施形態においては、本発明の組成物は、B細胞からの抗体の産生および／または分泌を、未処理B細胞と比べて少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%もしくは少なくとも100%またはそれ以上抑制または低減しうる。いくつかの実施形態においては、本発明の組成物は、B細胞からの抗体の産生および／または分泌を、未処理B細胞と比べて少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍もしくは少なくとも50倍またはそれ以上抑制または低減しうる。

【0263】

好酸球は、寄生虫による感染との戦いに関与する白血球である。また、好酸球は、アレルギーおよび喘息に関連したメカニズムにも関与する。好酸球は、例えばIL-3、IL-5およびGM-CSFのようなサイトカインに応答性である。活性化後、好酸球は、多数の免疫系メディエーター、例えば、反応性酸素種（限定的なものではないが例えば、スーパーオキシド）、脂質メディエーター（限定的なものではないが例えば、ロイコトリエン（LTB₄、LTC₄、LTD₄、LTE₄）、プロスタグランジン（PGE₂、トロンボキサンA₂）、酵素（例えば、エラスターゼ）、増殖因子（限定的なものではないが例えば、TGFベータ、VEGFおよびPDGF）およびサイトカイン（限定的なものではないが、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-13およびTNF-アルファを含む）を産生し分泌する。いくつかの実施形態においては、本発明の組成物は活性化好酸球からの免疫系メディエーターの産生および／または分泌を抑制または低減しうる。いくつかの実施形態においては、本発明の組成物は、活性化好酸球からの免疫系メディエーターの産生および／または分泌を、未処理活性化好酸球と比べて少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%もしくは少なくとも100%またはそれ以上抑制または低減しうる。いくつかの実施形態においては、本発明の組成物は、活性化好酸球からの免疫系メディエーターの産生および／または分泌を、未処理活性化好酸球と比べて少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍もしくは少なくとも50倍またはそれ以上抑制または低減しうる。

【0264】

好塩基球は、重要なヒスタミンおよびIL-4源の1つである白血球である。活性化されると、ヒスタミン、ヘパリン、コンドロイチン、エラスターゼ、リゾホスホリパーゼおよび種々のロイコトリエン（限定的なものではないが例えば、LTB₄、LTC₄、LTD₄、LTE₄）および幾つかのサイトカイン（限定的なものではないが、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-13およびTNFアルファを含む）を含有する大きな細胞質顆粒。いくつかの実施形態においては、本発明の組成物は活性化好塩基球からの細胞質顆粒の産生および／または遊離を抑制または低減しうる。いくつかの実施形態においては、本発明の組成物は、活性化

好塩基球からの細胞質顆粒の産生および／または遊離を、未処理活性化好塩基球と比べて少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%もしくは少なくとも100%またはそれ以上抑制または低減しうる。いくつかの実施形態においては、本発明の組成物は、活性化好塩基球からの細胞質顆粒の産生および／または遊離を、未処理活性化好塩基球と比べて少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍もしくは少なくとも50倍またはそれ以上抑制または低減しうる。

10

【0265】

好中球は、免疫応答の急性期に、特に細菌感染に応答して活性化される。好中球は、炎症部位へのそのリクルートメントを誘発するfMLP、C5a、LTB4、IL-8およびインターフェロンガンマ（これらに限定されるものではない）を含む多数の異なるケモカインに高応答性である。感染部位に到達すると、好中球は細菌および他の病原体を迅速に探索し破壊する。標的病原体の破壊は食作用および／または反応性酸素種の産生により達成される。好中球はまた、脱顆粒と称される過程において、一群のタンパク質（限定的なものではないが例えば、ラクトフェリン、カテリシジン、ミエロペルオキシダーゼ、デンプェシン、セリンプロテアーゼ、エラスターゼ、カテプシン、ゼラチナーゼ）を遊離する。いくつかの実施形態においては、本発明の組成物はケモカインに対する活性化好中球の応答を抑制または低減しうる。いくつかの実施形態においては、本発明の組成物は、ケモカインに対する活性化好中球の応答を、未処理活性化好中球と比べて少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%もしくは少なくとも100%またはそれ以上抑制または低減しうる。いくつかの実施形態においては、本発明の組成物は、ケモカインに対する活性化好中球の応答を、未処理活性化好中球と比べて少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍もしくは少なくとも50倍またはそれ以上抑制または低減しうる。

20

30

【0266】

いくつかの実施形態においては、本発明の組成物は活性化好中球の脱顆粒を抑制または低減しうる。いくつかの実施形態においては、本発明の組成物は、活性化好中球の脱顆粒を、未処理活性化好中球と比べて少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%もしくは少なくとも100%またはそれ以上抑制または低減しうる。いくつかの実施形態においては、本発明の組成物は活性化好中球の脱顆粒を抑制または低減しうる。いくつかの実施形態においては、本発明の組成物は、ケモカインに対する活性化好中球の脱顆粒を、未処理活性化好中球と比べて少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍もしくは少なくとも50倍またはそれ以上抑制または低減しうる。

40

【0267】

マスト細胞は炎症過程において重要な役割を果たす。マスト細胞は、活性化されると、特徴的な顆粒および種々の体液性メディエーターを迅速に遊離する。マスト細胞は、直接的な損傷、IgE受容体の架橋により、または活性化補体タンパク質により、脱顆粒するよう刺激されうる。マスト細胞顆粒は、免疫系モジュレーター、例えばヒスタミン、ヘパリン、セリンプロテアーゼ、プロスタグランジン、ロイコトリエンおよび他のサイトカイン（これらに限定されるものではない）を含有する。1つの実施形態においては、本発明の

50

組成物はマスト細胞の脱顆粒を抑制または低減しうる。いくつかの実施形態においては、本発明の組成物は、マスト細胞の脱顆粒を、未処理マスト細胞と比べて少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%もしくは少なくとも100%またはそれ以上抑制または低減しうる。いくつかの実施形態においては、本発明の組成物は、マスト細胞の脱顆粒を、未処理マスト細胞と比べて少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍もしくは少なくとも50倍またはそれ以上抑制または低減しうる。

10

【0268】

マクロファージは、循環血単球に由来する組織内の細胞である。その役割は、細胞残渣および病原体を貪食すること、ならびに該病原体に応答するよう他のリンパ球および他の免疫細胞を刺激することである。また、マクロファージは、それらの位置に基づいて呼称されている。例えば、肝臓内のマクロファージはクッパー細胞と称され、骨内のマクロファージは破骨細胞として公知である。定められている他の群のマクロファージには、塵埃細胞（肺胞）、組織球（結合組織）、ミクログリア細胞（神経組織）およびシノソイド（Sinosoidal）裏打ち細胞（脾臓）が含まれる。マクロファージは低酸素状態に応答性であり、慢性炎症を促進すると考えられている。いくつかの実施形態においては、本発明の組成物はマクロファージの貪食活性を阻害または減少させる。いくつかの実施形態においては、本発明の組成物は、マクロファージの貪食能を、未処理マクロファージと比べて少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%もしくは少なくとも100%またはそれ以上阻害または減少させる。いくつかの実施形態においては、本発明の組成物は、マクロファージの貪食能を、未処理マクロファージと比べて少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍もしくは少なくとも50倍またはそれ以上阻害または減少させる。

20

【0269】

もう1つの実施形態においては、本発明の組成物は血管新生を抑制または低減しうる。もう1つの実施形態においては、血管新生は腫瘍成長、関節リウマチ、SLE、シェーグレン症候群などに関連している。

30

【0270】

本発明はまた、例えばウイルス、真菌、真核微生物および細菌のような種々の感染因子を不活性化するための、エピトープ結合性タンパク質の使用を提供する。いくつかの実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、RSV、hMPV、PIVまたはインフルエンザウイルスを不活性化するために使用されうる。他の実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、真菌病原体、例えばNaegleria、Aspergillus、Blastomyces、Histoplasma、CandidaまたはTinea属（これらに限定されるものではない）のメンバーを不活性化するために使用されうる。他の実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、真核微生物、例えばGiardia、Toxoplasma、Plasmodium、TrypanosomaおよびEntamoeba属（これらに限定されるものではない）のメンバーを不活性化するために使用されうる。他の実施形態においては、本発明のエピトープ結合性タンパク質は、細菌病原体、例えばStaphylococcus、Streptococcus、Pseudomonas、Clostridium、Borrelia、VibrioおよびNeisseria属（これらに限定されるものではない）のメンバーを不活性化するために使用されうる。

40

【0271】

本発明のタンパク質およびそれを含む組成物は多数の目的に有用であり、例えば、ウイルス性、細菌性および真菌性疾患などの感染症（これらに限定されるものではない）を含

50

む多種多様な慢性および急性の疾患および障害に対する治療用物質として有用である。ウイルス病原体の具体例には、限定的なものではないが以下のものが含まれる：アデノウイルス科（例えば、マストアデノウイルス属およびアピアデノウイルス属）、ヘルペスウイルス科（例えば、単純ヘルペスウイルス1、単純ヘルペスウイルス2、単純ヘルペスウイルス5および単純ヘルペスウイルス6）、レヴィウイルス科（例えば、レヴィウイルス属、大腸菌ファージMS2、アロレヴィウイルス属）、ポックスウイルス科（例えば、チョルドポックスウイルス亜科、バラポックスウイルス属、アビポックスウイルス属、カプリポックスウイルス属、レポリポックスウイルス属、スイポックスウイルス属、モルスサイポックスウイルス属およびエントモポックスウイルス亜科）、パポーウイルス科（例えば、ポリオーマウイルス属およびパピローマウイルス属）、パラミクソウイルス科（例えば、パラミクソウイルス属、パラインフルエンザウイルス1、モルビリウイルス属（例えば、麻疹ウイルス）、ルブラウイルス属（例えば、ムンプスウイルス）、ニューモウイルス亜科（例えば、ニューモウイルス属、ヒトRSウイルス）、メタニューモウイルス（例えば、トリニューモウイルスおよびヒトメタニューモウイルス））、ピコナウイルス科（例えば、エンテロウイルス属、ライノウイルス属、ヘパトウイルス属（例えば、ヒトA型肝炎ウイルス）、カルザオウイルス属およびアフトウイルス属）、レオウイルス科（例えば、オルソレオウイルス属、オルビウイルス属、ロタウイルス属、シボウイルス属、フィジーウイルス属、フィトレオウイルス属およびオリザウイルス属）、レトロウイルス科（例えば、哺乳類B型レトロウイルス属、哺乳類C型レトロウイルス属、トリC型レトロウイルス属、D型レトロウイルス群、BLV-HTLVレトロウイルス、レンチウイルス属（例えば、ヒト免疫不全ウイルス1およびヒト免疫不全ウイルス2）、スプマウイルス属）、フラビウイルス科（例えば、C型肝炎ウイルス）、ヘパドナウイルス科（例えば、B型肝炎ウイルス）、トガウイルス科（例えば、アルファウイルス属（例えば、シンドビスウイルス）およびルビウイルス属（例えば、風疹ウイルス））、ラブドウイルス科（例えば、ベシクロウイルス属、リッサウイルス属、エフェメロウイルス属、シトラブドウイルス属およびヌクレオラブドウイルス属）、アレナウイルス科（例えば、アレナウイルス属、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、イッピーウイルスおよびラッサウイルス）、およびコロナウイルス科（例えば、コロナウイルス属およびトロウイルス属）。細菌病原体の具体例には、限定的なものではないが以下のものが含まれる：Aquaspirillum科、Azospirillum科、Azotobacteraceae科、Bacteroidaceae科、Bartonella種、Bdellovibrio科、Campylobacter種、Chlamydia種（例えば、Chlamydia pneumoniae）、クロストリジウム、Enterobacteriaceae科（例えば、Citrobacter種、Edwardsiella、Enterobacter aerogenes、Erwinia種、Escherichia coli、Hafnia種、Klebsiella種、Morganella種、Proteus vulgaris、Providencia、Salmonella種、Serratia marcescensおよびShigella flexneri）、Gardinerella科、Haemophilus influenzae、Halobacteriaceae科、Helicobacter科、Legionellaceae科、Listeria種、Methylococcaceae科、マイコバクテリア（例えば、Mycobacterium tuberculosis）、Neisseriaceae科、Oceanospirillum科、Pasteurellaceae科、Pneumococcus種、Pseudomonas種、Rhizobiaceae科、Spirillum科、Spirosomaceae科、Staphylococcus（例えば、メチシリン耐性Staphylococcus aureusおよびStaphylococcus pyrogenes）、Streptococcus（例えば、Streptococcus enteritidis、Streptococcus fasciaeおよびStreptococcus pneumoniae）、Vampirovibr Helicobacter科、およびVampirovibrio科。真菌病原体の具体例には、限定的なものではないが以下のものが含まれる：Absidia種（例えば、Absidia corymbiferaおよびAbsidia ramosa）、Aspergillus種（例えば、Aspergillus flavus、Aspergillus fumigatus、Aspergillus nidulans、Aspergillus nigerおよびAspergillus terreus）、Basidiobolus ranarum、Blastomyces dermatitidis、Candida種（例えば、Candida albicans、Candida glabrata、Candida kerr、Candida krusei、Candida parapsilosis、Candida pseudotropicalis、Candida quilliermondii、Candida rugosa、Candida stellatoideaおよびCandida tropicalis）、Coccidioides immitis、Conidiobolus種、Cryptococcus neoforms、Cunninghamella種、皮膚糸状菌、Histoplasma capsulatum、Microsporium gypseum、Mucor pusillus、Paracoccidioides brasiliensis、Pseudallescheria boydii、Rhinos

10

20

30

40

50

poridium seeberi、Pneumocystis carinii、Rhizopus種（例えば、Rhizopus arrhizus、Rhizopus oryzaeおよびRhizopus microsporus）、Saccharomyces種、Sporothrix schenckii、接合菌綱、ならびに例えばZygomycetes、Ascomycetes、Basidiomycetes、DeuteromycetesおよびOomycetesの等の綱。

【0272】

もう1つの実施形態においては、本発明は、癌、自己免疫、炎症もしくは感染症またはそれらの1以上の症状を予防、管理、治療または改善するための方法であって、それを要する対象に、本発明の1以上のエピトープ結合性タンパク質の予防的または治療的に有効な量を、手術と組合せてまたは単独で、あるいは更に、標準的または実験的な化学療法、ホルモン療法、生物学的療法／免疫療法および／または放射線療法と組合せて投与することを
10 含む方法を提供する。これらの実施形態においては、癌、自己免疫、炎症もしくは感染症またはそれらの1以上の症状を予防、管理、治療または改善するために使用される本発明のエピトープ結合性タンパク質は、ある要素（例えば、治療用物質または薬物）にコンジュゲート化または融合されていてもされていなくてもよい。

【0273】

本発明は、癌、自己免疫、炎症もしくは感染症またはそれらの1以上の症状を予防、管理、治療または改善するための方法であって、それを要する対象に、本発明の1以上のエ
20 ピトープ結合性タンパク質を、癌治療用物質ではない治療用物質（すなわち、非癌治療用物質）の1以上と組合せて投与することを含む方法を提供する。そのような物質の具体例には、制吐剤、抗真菌剤、抗細菌剤、例えば抗生物質、抗炎症剤および抗ウイルス剤が含まれるが、これらに限定されるものではない。制吐剤の非限定的な具体例には、メトピマジン（metopimazin）およびメトクロプラミド（metochlopramide）が含まれる。抗真菌剤の非限定的な具体例には、アゾール薬、イミダゾール、トリアゾール、ポリエン、アンホ
30 テリシンおよびリリミジン（ryrimidine）が含まれる。抗細菌剤の非限定的な具体例には、ダクチノマイシン、ブレオマイシン、エリスロマイシン、ペニシリン、ミトラマイシン、セファロスポリン、イミペネム、アクストレオナム（axtreonam）、バンコマイシン、シクロセリン、バシトラシン、クロラムフェニコール、クリンダマイシン、テトラサイクリン、ストレプトマイシン、トブラマイシン、ゲンタマイシン、アミカシン、カナマイシン、ネオマイシン、スペクチノマイシン、トリメトプリム、ノルフロキサシン、レファンピン（refampin）、ポリミキシン、アンホテリシンB、ナイスタチン、ケトカナゾール、
40 イソニアジド、メトロニダゾールおよびペンタミジンが含まれる。抗ウイルス剤の非限定的な具体例には、ヌクレオシド類似体（例えば、ジドブジン、アシクロビル、ガンシクロビル（ganciclovir）、ビダラビン（vidarabine）、イドクスウリジン、トリフルリジンおよびリバビリン）、フォスカルネット（foscarnet）、アマンタジン、リマンタジン、サキナビル（saquinavir）、インジナビル（indinavir）、リトナビル、インターフェロン（「IFN」）- α 、 β または γ およびAZTが含まれる。抗炎症剤の非限定的な具体例には、非
50 ステロイド性抗炎症薬（「NSAID」）、ステロイド性抗炎症薬、ベータ-アゴニスト、抗コリン作用剤およびメチルキサンチンが含まれる。

【0274】

もう1つの実施形態においては、本発明は、癌細胞表現型を抑制しうる組成物を含む。1
40 つの実施形態においては、該癌細胞表現型は細胞成長、細胞付着、細胞付着の喪失、受容体発現（例えば、Eph）の低減、受容体発現（例えば、Eph）の増強、転移能、細胞周期抑制、受容体チロシンキナーゼ、活性化／抑制などである。

【0275】

1つの実施形態においては、本発明は、慢性炎症を治療しうる組成物を含む。1つの実施
形態においては、該組成物は、破壊または不活性化のための免疫細胞の治療において有用である。1つの実施形態においては、該組成物は活性化T細胞、休眠T細胞、B細胞、好中球、好酸球、好塩基球、マスト細胞または樹状細胞の標的化において有用である。もう1つ
の実施形態においては、本発明は、免疫細胞の機能を低減しうる組成物を含む。もう1つ
50 の実施形態においては、該組成物は免疫細胞機能を排除しうる。

【0276】

本発明はまた、診断試薬としてのエピトープ結合性タンパク質の使用方法を提供する。本発明のタンパク質は、種々の抗原が同時に効率的に捕捉される必要があるキットまたは試薬において有用でありうる。

【0277】

H. 本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質をコードするポリヌクレオチドの作製

本発明は更に、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドおよびその断片を提供する。本発明は更に、本発明のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドおよびその断片を提供する。本発明はまた、ストリンジェントなまたはより低いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件下（例えば、本明細書中で定義されているもの）、本発明のエピトープ結合性タンパク質および／またはポリペプチド鎖をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む。

【0278】

エピトープ結合性タンパク質をコードするポリヌクレオチドは適当な起源からの核酸から製造されうる。例えば、特定のエピトープ結合性タンパク質をコードする核酸を含有するクローンが入手できないが該エピトープ結合性タンパク質分子の配列が公知である場合には、該タンパク質をコードする核酸を化学合成し、または適当な起源〔例えば、cDNAライブラリー、または該エピトープ結合性タンパク質を発現する任意の組織もしくは細胞（例えば、本発明のタンパク質を発現するよう選択されたハイブリドーマ細胞）から作製されたcDNAライブラリー、またはそのような組織もしくは細胞から単離された核酸、好ましくは、ポリA + RNA〕から得ることが可能であり、これは、該配列の3'および5'末端にハイブリダイズしうる合成プライマーを使用するPCR増幅により、または個々の遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを使用するクローニングにより行うことが可能であり、それにより、例えば、該タンパク質をコードするcDNAライブラリーからのcDNAクローンを特定することが可能である。ついで、PCRにより得られた増幅された核酸を、当技術分野でよく知られた任意の方法を用いて、複製可能なクローニングベクター内にクローニングすることが可能である。

【0279】

該エピトープ結合性タンパク質のヌクレオチド配列および対応アミノ酸配列を決定したら、ヌクレオチド配列の操作のための当技術分野でよく知られた方法、例えば組換えDNA技術、部位特異的突然変異誘発、PCRなどを用いて（例えば、Sambrookら、1990、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NYおよびAusubelら編、1998、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NYに記載されている技術を参照されたい）、該ヌクレオチド配列を操作して、異なるアミノ酸配列を有するエピトープ結合性タンパク質を得、そのようにして、例えばアミノ酸の置換、欠失および／または挿入を行うことが可能である。

【0280】

特定の実施形態においては、当技術分野で公知の方法により（例えば、配列超可変性の領域を決定するために他の重鎖および軽鎖可変領域の公知アミノ酸配列と比較することにより）、相補性決定領域（CDR）の配列を特定するために、本発明のエピトープ結合性タンパク質の重鎖および／または軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を調べることが可能である。通常の組換えDNA技術を用いて、該CDRの1以上をフレームワーク領域内、例えばヒトフレームワーク領域内に挿入して、非ヒト抗体をヒト化することが可能である。該フレームワーク領域は、天然に存在するまたはコンセンサスフレームワーク領域であることが可能であり、好ましくはヒトフレームワーク領域である（例えば、ヒトフレームワーク領域の一覧は、Chothiaら、J. Mol. Biol. 278: 457-479 (1998)を参照されたい）。好ましくは、フレームワーク領域およびCDRの組合せにより作製されたポリヌクレオチドは本発明のエピトープ結合性タンパク質をコードしている。

【0281】

好ましくは、1以上のアミノ酸置換は該フレームワーク領域内に施され、好ましくは、該アミノ酸置換は該エピトープ結合性タンパク質のその抗原への結合を改善する。該ポリヌクレオチドに対する他の改変も本発明に含まれ、通常の技量の範囲内である。

【0282】

I. 多重特異性エピトープ結合性タンパク質コンジュゲートおよび誘導体

本発明のタンパク質は、（例えば、該タンパク質への任意のタイプの分子の共有結合により）修飾された誘導体を含む。限定的なものではないが例えば、該誘導体は、修飾（例えば、グリコシル化、アセチル化、ペジル化（pegylation）、リン酸化、アミド化、公知の保護／遮蔽基による誘導体化、タンパク質分解切断、細胞リガンドまたは他のタンパク質への連結など）された本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質を含む。特異的

10

【0283】

本発明のエピトープ結合性タンパク質またはその断片は、マーカー配列、例えば精製を促進するペプチドに融合されうる。ある実施形態においては、該マーカーアミノ酸配列は、とりわけ、pQEベクター（QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311）において提供されるタグのようなヘキサ-ヒスチジンペプチド（それらの多くは商業的に入手可能である）である。例えばGentzら, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824に記載されているとおり、ヘキサ-ヒスチジンは融合タンパク質の簡便な精製をもたらす。精製に有用な他のペプチドタグには、インフルエンザ赤血球凝集素タンパク質に由来するエピトープに相当する赤血球凝集素（HA）タグ（Wilsonら, 1984, Cell, 37:767）、および「flag」タグが含まれるが、これらに限定されるものではない。

20

【0284】

本発明は更に、診断用または治療用物質にコンジュゲート化された多重特異性エピトープ結合性タンパク質を含む。該タンパク質は、臨床試験法の一部として腫瘍の発生または進行をモニターする（例えば、与えられた治療計画の有効性を決定する）ために診断的に用いられうる。検出は、検出可能な物質に該抗体を結合させることにより促進されうる。検出可能な物質には、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、放射性物質、種々の陽電子放射断層撮影法を使用する陽電子放出性金属、および非放射性常磁性金属イオンが含まれる。該検出可能物質は、当技術分野で公知の技術を用いて、該抗体（またはそのフラグメント）に直接的に、あるいは中間体（例えば、当技術分野で公知のリンカー）を介して間接的に結合またはコンジュゲート化されうる。例えば、本発明の診断用物質として使用される抗体にコンジュゲート化されうる金属イオンに関しては、米国特許第4,741,900号を参照されたい。適当な酵素の具体例には、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータ-カ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、適当な補欠分子族複合体の具体例には、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、適当な蛍光物質の具体例には、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、発光物質の具体例には、ルミノールが含まれ、生物発光物質の具体例には、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンが含まれ、適当な放射性物質の具体例には、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In または ^{99}Tc が含まれ（これらに限定されるものではない）、さらに、種々の陽電子放射断層撮影法を使用する陽電子放出性金属、非放射性常磁性金属イオン、および放射性標識されたまたは特定の放射性同位体にコンジュゲート化された分子が本発明のタンパク質にコンジュゲート化されうる。

30

40

【0285】

さらに、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、治療用要素、例えば細胞毒、例えば静細胞または殺細胞物質、治療用物質または放射性金属イオン、例えばアルフ

50

α-放射体、例えば²¹³Biにコンジュゲート化されうる。細胞毒または細胞毒性物質には、細胞に有害な任意の物質が含まれる。具体例には以下のものが含まれる：パクリタキソール、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、ミトザントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロールおよびピューロマイシンならびにそれらの類似体またはホモログ。治療用物質には以下のものが含まれるが、それらに限定されるものではない：代謝拮抗剤（例えば、メトトレキセート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン）、アルキル化剤（例えば、メクロルエタミン、チオエパクロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（BCNU）およびロムスチン（CCNU）、シクロトスファミド、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、およびシスジクロロジアミン白金（II）（DDP）シスプラチン）、アントラサイクリン（例えば、ダウノルビシン（旧称ダウノマイシン）およびドキソルビシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（旧称アクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシンおよびアントラマイシン（AMC））、抗有糸分裂物質（例えば、ビンクリスチンおよびビンブラスチン）。治療用要素の更に詳細な一覧はPCT公開WO 03/075957において見出されうる。

【0286】

本発明のコンジュゲートは、与えられた生物学的応答を修飾するために使用されうる。治療用物質または薬物要素は（薬物部分）は古典的な化学療法剤に限定されると解釈されるべきではない。例えば、該薬物要素は、所望の生物活性を有するタンパク質またはポリペプチドでありうる。そのようなタンパク質には例えば以下のものが含まれる：アブリン、リシンA、シュードモナス外毒素またはジフテリア毒素のような毒素；腫瘍壊死因子、アルファ-インターフェロン、ベータ-インターフェロン、神経成長因子、血小板由来増殖因子、組織プラスミノゲンアクチベーター、アポトーシス剤、例えばTNF-アルファ、TNF-ベータ、AIM I（国際公開番号WO 97/33899を参照されたい）、AIM II（国際公開番号WO 97/34911を参照されたい）、Fasリガンド（Takahashiら、Int. Immunol., 6: 1567-1574 (1994)）、VEGI（国際公開番号WO 99/23105を参照されたい）、CD40リガンド、血栓物質または抗血管新生物質、例えばアンジオスタチンまたはエンドスタチンのようなタンパク質；あるいは生物応答修飾物質、例えばリンホカイン、インターロイキン1（「IL-1」）、インターロイキン2（「IL-2」）、インターロイキン6（「IL-6」）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（「GM-CSF」）、顆粒球コロニー刺激因子（「G-CSF」）または他の増殖因子。

【0287】

J. 多重特異性エピトープ結合性タンパク質担体分子

本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、積荷（cargo）を細胞へ送達するためにも使用されうる。例えば、多重特異性エピトープ結合性タンパク質に積荷、例えば細胞毒性薬（これに限定されるものではない）を載せて、該薬物を特定の細胞集団に送達することが可能である。そのような技術はモノクローナル抗体に関して開発されており、薬物へのコンジュゲート化のためには、通常は不對システインにおける該抗体への共有結合修飾を要する。これらの化学的修飾は面倒であり、非効率的であり、しばしば、該抗体を不安定化させる。また、どのくらい多数の薬物分子が単一抗体に結合されるのかに関して一定の制限があるため、製造におけるばらつきが生じる。本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、効率的かつ予測可能な様態で積荷を細胞へ送達するよう操作されうる。該多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、細胞へ送達されるのに適した積荷、すなわち積荷に特異的であるエピトープ結合性ドメインを含みうると予想される。そのようなエピトープ結合性ドメインの具体例は、タキソール（Leuら、1993. Cancer Research Mar 15;53(6):1388-91）およびドキソルビシン（Morelliら、1996 Cancer Research May 1;56(9):2082-5）に対する抗体のように、既に記載されている。これらの多重特異性エ

ピトープ結合性タンパク質担体分子には、エピトープ結合性ドメインに結合した少なくとも1つの積荷が載せられ、該担体分子は患者に投与されうるであろう。

【0288】

1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、積荷分子を細胞へ送達するために使用されうる。他の実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、細胞へ送達すべき積荷分子に特異的な少なくとも1つのエピトープ結合性ドメインを含む。他の実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、送達すべき同一積荷に特異的な複数のエピトープ結合性ドメインを含む。他の実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、送達すべき異なる積荷分子に特異的な複数のエピトープ結合性ドメインを含む。

10

【0289】

いくつかの実施形態においては、送達すべき積荷分子は、細胞毒性薬、代謝拮抗物質、毒素、ペプチド、DNA分子、RNA分子、小分子、放射性同位体、発蛍光団、酵素、酵素インヒビター、プロドラッグまたはミトコンドリア毒である。他の実施形態においては、該積荷特異的エピトープ結合性ドメインは、細胞へ送り届けられる前は、該積荷分子の活性部位／領域を遮蔽しうる。他の実施形態においては、該積荷特異的エピトープ結合性ドメインはインターナリゼーションに際して該積荷分子を可逆的に放出する。

【0290】

いくつかの実施形態においては、該積荷特異的エピトープ結合性ドメインは該積荷分子への結合に関してpH依存性を示す。いくつかの実施形態においては、該積荷特異的エピトープ結合性ドメインは生理的pH（例えば、血液において見出されるpH）で該積荷分子に結合するが、リソソームpH（pH約6.0）においては該積荷分子に結合しない。

20

【0291】

いくつかの実施形態においては、少なくとも1つのエピトープ結合性ドメインは、種々の標的へのコンジュゲート化に有用なリンカー要素に特異的でありうる。そのような場合、使用者は、選択した積荷に該リンカー要素を「特別に適合化」させ、該特製積荷を細胞へ送達するために該リンカー特異的エピトープ結合性ドメインを使用することが可能である。伝統的な抗体に関するそのようなアプローチは、2005年11月8日付けで付与された米国特許第6,962,702号（その全体を参照により本明細書に組み入れることとする）に既に記載されている。

30

【0292】

K. エピトープ結合および活性に関するアッセイ

本発明の多重特異性結合性タンパク質は、当技術分野で公知の任意の方法により、特異的（すなわち、免疫特異的）結合に関してアッセイされうる。用いられうるイムノアッセイには、少数しか挙げないが例えばウエスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ELISA（酵素結合イムノソルベントアッセイ）、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体固定アッセイ、免疫放射線アッセイ、蛍光イムノアッセイ、プロテインAイムノアッセイのような技術を用いる競合および非競合アッセイ系が含まれるが、これらに限定されるものではない。そのようなアッセイは常套的なものであり、当技術分野で公知である（例えば、Ausubelら編，1994，Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New Yorkを参照されたい）。典型的なイムノアッセイを以下に簡潔に説明する（が、それらに限定されるものではない）。

40

【0293】

免疫沈降法は、一般に、タンパク質ホスファターゼおよび／またはプロテアーゼインヒビター（例えば、EDTA、PMSF、アプロチニン、パナジン酸ナトリウム）で補足されたRIPAバッファー（1% NP-40またはTriton X-100、1% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS、0.15M NaCl、0.01M リン酸ナトリウム(pH 7.2)、1% Trasyolol）のような細胞溶解バッファー中で細胞集団を細胞溶解し、関心のあるエピトープ結合性タンパク質を該細胞ライセートに加え、4℃で或る時間（例えば、1～4時間）にわたってインキュベートし、

50

プロテインAおよび／またはプロテインGセファロースビーズを該細胞ライセートに加え、4℃で約1時間またはそれ以上インキュベートし、細胞溶解バッファー中で該ビーズを洗浄し、該ビーズをSDS／サンプルバッファーに再懸濁させることを含む。関心のあるタンパク質が特定の抗原を免疫沈降させる能力を、例えばウエスタンブロット分析によりアッセイすることが可能である。抗原への該エピトープ結合性タンパク質の結合を増強しバックグラウンドを減少させる（例えば、該細胞ライセートをセファロースビーズで予め清澄化する）ために修飾されうるパラメーターに関しては、当業者に認識可能であろう。免疫沈降法に関する更なる考察に関しては、例えば、Ausubelら編，1994，*Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York, 10.16.1を参照されたい。

10

【0294】

ウエスタンブロット分析は、一般に、タンパク質サンプルを調製し、ポリアクリルアミドゲル（例えば、抗原の分子量に応じた8%～20%のSDS-PAGE）における該タンパク質サンプルの電気泳動を行い、該ポリアクリルアミドゲルからのタンパク質サンプルをニトロセルロース、PVDFまたはナイロンのような膜へトランスファーし、該膜をブロッキング溶液（例えば、3% BSAまたは脱脂乳を含有するPBS）中でブロッキングし、該膜を洗浄バッファー（例えば、PBS-Tween20）中で洗浄し、ブロッキングバッファーで希釈された一次抗体で該膜をブロッキングし、該膜を洗浄バッファー中で洗浄し、ブロッキングバッファー中で希釈された酵素基質（例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）または放射性分子（例えば、 ^{32}P または ^{125}I ）にコンジュゲート化された二次抗体（これは該一次抗体を認識する）で該膜をブロッキングし、該膜を洗浄バッファー中で洗浄し、該抗原の存在を検出することを含む。検出されるシグナルを増加させるためおよびバックグラウンドノイズを減少させるために修飾されうるパラメーターに関しては、当業者に認識可能であろう。ウエスタンブロット法に関する更なる考察は、例えば、Ausubelら編，1994，*Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York, 10.8.1を参照されたい。

20

【0295】

ELISAは、抗原を調製し、96ウェルマイクロタイタープレートのウェルを該抗原でコートし、検出可能な化合物、例えば酵素基質（例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）のようなコンジュゲート化された関心のあるエピトープ結合性タンパク質を該ウェルに加え、ある時間にわたってインキュベートし、該抗原の存在を検出することを含む。ELISAにおいては、関心のあるエピトープ結合性タンパク質は、検出可能な化合物にコンジュゲート化される必要はなく、その代わりに、検出可能な化合物にコンジュゲート化された二次抗体（これは、関心のあるタンパク質を認識する）が該ウェルに加えられる。さらに、該抗原で該ウェルをコートする代わりに、関心のあるタンパク質で該ウェルをコートすることが可能である。この場合、関心のある抗原を該コート化ウェルに加えた後で、検出可能な化合物にコンジュゲート化された二次抗体を加えることが可能である。検出されるシグナルを増強するために修飾されうるパラメーターおよび当技術分野で公知のELISAにおける他の変数に関しては、当業者に認識可能であろう。ELISAに関する更なる考察は、例えば、Ausubelら編，1994，*Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York, 11.2.1を参照されたい。

30

40

【0296】

抗原へのエピトープ結合性タンパク質の結合アフィニティおよび他の結合特性は、例えば平衡法（例えば、酵素結合イムノソルベントアッセイ（ELISA）またはラジオイムノアッセイ（RIA））または動力学（例えば、BIACORE（登録商標）分析）および他の方法、例えば間接結合アッセイ、競合結合アッセイ、蛍光共鳴エネルギー転移（FRET）、ゲル電気泳動およびクロマトグラフィー（例えば、ゲル濾過）を含む当技術分野で公知の種々の*in vitro*アッセイ法により決定されうる。これらおよび他の方法においては、検査されている1以上の成分上の標識を利用することが可能であり、および／または、色素原標識、蛍

50

光標識、発光標識または同位体標識（これらに限定されるものではない）を含む種々の検出方法を利用することが可能である。結合アフィニティおよび動力学の詳細な説明は、抗体-免疫原相互作用を中心に説明しているPaul, W.E.編, Fundamental Immunology, 4th Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (1999)において見出されうる。競合結合アッセイの一例としては、漸増量の未標識抗原の存在下、関心のあるエピトープ結合性タンパク質と共に標識抗原をインキュベートし、標識抗原に結合したエピトープ結合性タンパク質を検出することを含むラジオイムノアッセイが挙げられる。特定の抗原に対する、関心のあるエピトープ結合性タンパク質のアフィニティ、および結合オフ速度 (binding off-rate) は、スキッチャードプロット分析によるデータから決定されうる。また、二次抗体との競合は、ラジオイムノアッセイを用いて決定されうる。この場合、漸増量の未標識二次抗体の存在下、標識化合物にコンジュゲート化された関心のあるエピトープ結合性タンパク質と共に該抗原をインキュベートする。

10

【0297】

L. 変異Fc領域

本発明はまた、改変されたFc領域（本明細書においては「変異Fc領域」とも称される）を含有する多重特異性エピトープ結合性タンパク質を提供する。したがって、本発明の1つの実施形態においては、本発明のポリペプチド鎖は変異Fc領域（すなわち、後記のとおりに改変されたFc領域）を含む。変異Fc領域を含む本発明のポリペプチド鎖は本明細書においては「Fc変異タンパク質」とも称される。

【0298】

変異Fc領域の説明においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質のFc領域は、Kabatら (1991, NIH Publication 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, VA) におけるのと同様のEU指針に従う番号付けスキームを含むと理解される。

20

【0299】

本発明は、比較分子（例えば、野生型Fc領域を有する以外は同一のアミノ酸配列を有するタンパク質）と比べて改変された、Fcリガンド（例えば、Fc受容体、Clq）に対する結合特性を有するFc変異タンパク質を含む。結合特性の具体例には、結合特異性、平衡解離定数 (K_D)、解離および会合速度（それぞれ k_{off} および k_{on} ）、結合アフィニティならびに／またはアビディティが含まれるが、これらに限定されるものではない。低い K_D を有する結合性分子（例えば、Fc変異タンパク質、例えば、抗体）は、高い K_D を有する結合性分子にとって好ましいかもしれないと一般に理解されている。しかし、いくつかの場合には、 k_{on} または k_{off} の値が K_D の値より重要でありうる。当業者は、与えられたエピトープ結合性タンパク質の用途にとって、どの動力学のパラメーターが最も重要であるかを決定しうる。

30

【0300】

Fc領域のそのリガンドに対するアフィニティおよび結合特性は、Fc-Fc γ R相互作用、すなわち、Fc γ RへのFc領域の特異的結合を決定するための当技術分野で公知の種々のin vitroアッセイ法（生化学的または免疫学的アッセイ）、例えば平衡法（例えば、酵素結合イムノソルベントアッセイ (ELISA) またはラジオイムノアッセイ (RIA)）または動力学（例えば、BIACORE（登録商標）分析）および他の方法、例えば間接結合アッセイ、競合阻害アッセイ、蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET)、ゲル電気泳動およびクロマトグラフィー（例えば、ゲル濾過）を含む当技術分野で公知の種々のin vitroアッセイ法（これらに限定されるものではない）により決定されうる。これらおよび他の方法においては、検査されている1以上の成分上の標識を利用することが可能であり、および／または、色素原標識、蛍光標識、発光標識または同位体標識（これらに限定されるものではない）を含む種々の検出方法を利用することが可能である。結合アフィニティおよび動力学の詳細な説明は、抗体-免疫原相互作用を中心に説明しているPaul, W.E.編, Fundamental Immunology, 4th Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (1999)において見出されうる。

40

【0301】

50

1つの実施形態においては、Fc変異タンパク質は、比較分子と比べて増強された、1以上のFcリガンドへの結合を示す。もう1つの実施形態においては、Fc変異タンパク質は、比較分子の場合より少なくとも2倍、または少なくとも3倍、または少なくとも5倍、または少なくとも7倍、または少なくとも10倍、または少なくとも20倍、または少なくとも30倍、または少なくとも40倍、または少なくとも50倍、または少なくとも60倍、または少なくとも70倍、または少なくとも80倍、または少なくとも90倍、または少なくとも100倍、または少なくとも200倍以上大きい、Fcリガンドに対するアフィニティを有する。特定の実施形態においては、Fc変異タンパク質は、Fc受容体への、増強された結合を示す。もう1つの特定の実施形態においては、Fc変異タンパク質は、Fc受容体FcγRIIIAへの、増強された結合を示す。もう1つの特定の実施形態においては、Fc変異タンパク質は、Fc受容体FcγRIIBへの、増強された結合を示す。さらにもう1つの特定の実施形態においては、Fc変異タンパク質は、Fc受容体FcRnへの、増強された結合を示す。さらにもう1つの特定の実施形態においては、Fc変異タンパク質は、比較分子と比べて増強された、Clqへの結合を示す。

【0302】

Fc領域を含むタンパク質の血清半減期は、FcRnに対するFc領域の結合アフィニティを増加させることにより増加されうる。1つの実施形態においては、Fc変異タンパク質は、比較分子と比べて増加した血清半減期を示す。

【0303】

ADCCにより標的細胞の細胞溶解を媒介するいずれかの特定のFc変異タンパク質の能力はアッセイ可能である。ADCC活性を評価するためには、関心のあるFc変異タンパク質を標的細胞に免疫エフェクター細胞と共に加え、これは、抗原抗体複合体により活性化されて、該標的細胞の細胞溶解を引き起こしうる。細胞溶解は、一般に、細胞溶解された細胞からの標識（例えば、放射性基質、蛍光色素または天然細胞内タンパク質）の遊離により検出される。そのようなアッセイのための有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞（PBMC）およびナチュラルキラー（NK）細胞が含まれる。in vitro ADCCアッセイの具体例はWisecarverら，1985 79:277-282; Bruggemannら，1987, J Exp Med 166:1351-1361; Wilkinsonら，2001, J Immunol Methods 258:183-191; Patelら，1995 J Immunol Methods 184:29-38に記載されている。関心のあるFc変異タンパク質のADCC活性は、in vivo、例えば動物モデル、例えばClynesら，1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:652-656に開示されているものにおいても評価されうる。

【0304】

1つの実施形態においては、Fc変異タンパク質は、比較分子と比べて増強されたADCC活性を示す。特定の実施形態においては、Fc変異タンパク質は、比較分子の場合より少なくとも2倍、または少なくとも3倍、または少なくとも5倍、または少なくとも10倍、または少なくとも50倍、または少なくとも100倍大きいADCC活性を有する。もう1つの特定の実施形態においては、Fc変異タンパク質は、比較分子と比べて、Fc受容体FcγRIIIAへの、増強された結合を示し、増強されたADCC活性を示す。他の実施形態においては、Fc変異タンパク質は、比較分子と比べて増強されたADCC活性および増加した血清半減期の両方を示す。

【0305】

1つの実施形態においては、Fc変異タンパク質は、比較分子と比べて減少したADCC活性を示す。特定の実施形態においては、Fc変異タンパク質は、比較分子の場合より少なくとも2倍、または少なくとも3倍、または少なくとも5倍、または少なくとも10倍、または少なくとも50倍、または少なくとも100倍低いADCC活性を有する。もう1つの特定の実施形態においては、Fc変異タンパク質は、比較分子と比べて、Fc受容体FcγRIIIAへの、低減した結合を示し、低減したADCC活性を示す。他の実施形態においては、Fc変異タンパク質は、比較分子と比べて低減したADCC活性および増加した血清半減期の両方を示す。

【0306】

1つの実施形態においては、Fc変異タンパク質は、比較分子と比べて増強されたCDC活性

を示す。特定の実施形態においては、Fc変異タンパク質は、比較分子の場合より少なくとも2倍、または少なくとも3倍、または少なくとも5倍、または少なくとも10倍、または少なくとも50倍、または少なくとも100倍以上大きいCDC活性を有する。他の実施形態においては、Fc変異タンパク質は、比較分子と比べて増強されたCDC活性および増強された血清半減期の両方を示す。1つの実施形態においては、Fc変異タンパク質は、比較分子と比べて低減した、1以上のFcリガンドへの結合を示す。もう1つの実施形態においては、Fc変異タンパク質は、比較分子の場合より少なくとも2倍、または少なくとも3倍、または少なくとも5倍、または少なくとも7倍、または少なくとも10倍、または少なくとも20倍、または少なくとも30倍、または少なくとも40倍、または少なくとも50倍、または少なくとも60倍、または少なくとも70倍、または少なくとも80倍、または少なくとも90倍、または少なくとも100倍、または少なくとも200倍低い、Fcリガンドに対するアフィニティを示す。特定の実施形態においては、Fc変異タンパク質は、Fc受容体への、低減した結合を示す。もう1つの特定の実施形態においては、Fc変異タンパク質は、Fc受容体Fc γ RIIIAへの、低減した結合を示す。もう1つの特定の実施形態においては、本明細書に記載されているFc変異体は、比較分子の場合より少なくとも約5倍低い、Fc受容体Fc γ RIIIAに対するアフィニティを示し、ここで、該Fc変異体は、比較分子の場合の約2倍以内である、Fc受容体Fc γ RIBに対するアフィニティを示す。さらにもう1つの特定の実施形態においては、Fc変異タンパク質は、Fc受容体FcRnへの、低減した結合を示す。さらにもう1つの特定の実施形態においては、Fc変異タンパク質は、比較分子と比べて低減した、Clqへの結合を示す。

10

【0307】

20

1つの実施形態においては、本発明は、Fc変異体を提供し、ここで、該Fc領域は、Kabatに記載されているとおりのEU指針により番号付けされた場合に234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 251, 252, 254, 255, 256, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 279, 280, 284, 292, 296, 297, 298, 299, 305, 313, 316, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 339, 341, 343, 370, 373, 378, 392, 416, 419, 421, 440および443よりなる群から選ばれる1以上の位置における、非天然に生じるアミノ酸残基を含む。場合によっては、該Fc領域は、当業者に公知の追加的および／または代替的位置における非天然に生じるアミノ酸残基を含みうる（例えば、米国特許第5,624,821号；第6,277,375号；第6,737,056号；PCT特許公開WO 01/58957；WO 02/06919；WO 04/016750；WO 04/029207；WO 04/035752；WO 04/074455；WO 04/099249；WO 04/063351；WO 05/070963；WO 05/040217, WO 05/092925およびWO 06/020114を参照されたい）。

30

【0308】

特定の実施形態においては、本発明はFc変異体を提供し、ここで、該Fc領域は、Kabatに記載されているとおりのEU指針により番号付けされた場合に234D, 234E, 234N, 234Q, 234T, 234H, 234Y, 234I, 234V, 234F, 235A, 235D, 235R, 235W, 235P, 235S, 235N, 235Q, 235T, 235H, 235Y, 235I, 235V, 235F, 236E, 239D, 239E, 239N, 239Q, 239F, 239T, 239H, 239Y, 240I, 240A, 240T, 240M, 241W, 241 L, 241Y, 241E, 241 R, 243W, 243L, 243Y, 243R, 243Q, 244H, 245A, 247L, 247V, 247G, 251F, 252Y, 254T, 255L, 256E, 256M, 262I, 262A, 262T, 262E, 263I, 263A, 263T, 263M, 264L, 264I, 264W, 264T, 264 R, 264F, 264M, 264Y, 264E, 265G, 265N, 265Q, 265Y, 265F, 265V, 265I, 265L, 265H, 265T, 266I, 266A, 266T, 266M, 267Q, 267L, 268E, 269H, 269Y, 269F, 269R, 270E, 280A, 284M, 292P, 292L, 296E, 296Q, 296D, 296N, 296S, 296T, 296L, 296I, 296H, 296G, 297S, 297D, 297E, 298H, 298I, 298T, 298F, 299I, 299L, 299A, 299S, 299V, 299H, 299F, 299E, 305I, 313F, 316D, 325Q, 325L, 325I, 325D, 325E, 325A, 325T, 325V, 325H, 327G, 327W, 327N, 327L, 328S, 328M, 328D, 328E, 328N, 328Q, 328F, 328I, 328 V, 328T, 328H, 328A, 329F, 329H, 329Q, 330K, 330G, 330T, 330C, 330L, 330Y, 330V, 330I, 330F, 330R, 330H, 331G, 331A, 331L, 331M, 331F, 331W, 331K, 331Q, 331E, 331S, 331V, 331I, 331C, 331Y, 331H, 331R, 331N, 331D, 331T, 332D, 332S, 332W, 332 F, 332E, 332N, 332Q, 332T, 332H, 332Y, 332A, 339T, 370E, 370N, 378D, 392T, 396L,

40

50

416G, 419H, 421K, 440Yおよび434Wよりなる群から選ばれる少なくとも1つの非天然に生じるアミノ酸残基を含む。場合によっては、該Fc領域は、当業者に公知の追加的および／または代替的な非天然に生じるアミノ酸残基を含みうる（例えば、米国特許第5,624,821号；第6,277,375号；第6,737,056号；PCT特許公開WO 01/58957；WO 02/06919；WO 04/016750；WO 04/029207；WO 04/035752およびWO 05/040217を参照されたい）。

【0309】

もう1つの実施形態においては、本発明はFc変異体を提供し、ここで、該Fc領域は、Kabatに記載されているとおりのEU指針により番号付けされた場合に239、330および332よりなる群から選ばれる1以上の位置における少なくとも1つの非天然に生じるアミノ酸を含む。特定の実施形態においては、本発明はFc変異体を提供し、ここで、該Fc領域は、Kabatに記載されているとおりのEU指針により番号付けされた場合に239D、330Lおよび332Eよりなる群から選ばれる少なくとも1つの非天然に生じるアミノ酸を含む。場合によっては、該Fc領域は更に、Kabatに記載されているとおりのEU指針により番号付けされた場合に252、254および256よりなる群から選ばれる1以上の位置における追加的な非天然に生じるアミノ酸を含みうる。特定の実施形態においては、本発明はFc変異体を提供し、ここで、該Fc領域は、Kabatに記載されているとおりのEU指針により番号付けされた場合に239D、330Lおよび332Eよりなる群から選ばれる少なくとも1つの非天然に生じるアミノ酸、ならびにKabatに記載されているとおりのEU指針により番号付けされた場合に252Y、254Tおよび256Eよりなる群から選ばれる1以上の位置における少なくとも1つの非天然に生じるアミノ酸を含む。

【0310】

もう1つの実施形態においては、本発明はFc変異体を提供し、ここで、該Fc領域は、Kabatに記載されているとおりのEU指針により番号付けされた場合に234、235および331よりなる群から選ばれる1以上の位置における少なくとも1つの非天然に生じるアミノ酸を含む。特定の実施形態においては、本発明はFc変異体を提供し、ここで、該Fc領域は、Kabatに記載されているとおりのEU指針により番号付けされた場合に234F、235F、235Yおよび331Sよりなる群から選ばれる少なくとも1つの非天然に生じるアミノ酸を含む。もう1つの特定の実施形態においては、本発明のFc変異体は、Kabatに記載されているとおりのEU指針により番号付けされた場合に234F、235Fおよび331Sの非天然に生じるアミノ酸残基を含む。もう1つの特定の実施形態においては、本発明のFc変異体は、Kabatに記載されているとおりのEU指針により番号付けされた場合に234F、235Yおよび331Sの非天然に生じるアミノ酸残基を含む。場合によっては、該Fc領域は更に、Kabatに記載されているとおりのEU指針により番号付けされた場合に252、254および256よりなる群から選ばれる1以上の位置における追加的な非天然に生じるアミノ酸を含みうる。特定の実施形態においては、本発明はFc変異体を提供し、ここで、該Fc領域は、Kabatに記載されているとおりのEU指針により番号付けされた場合に234F、235F、235Yおよび331Sよりなる群から選ばれる少なくとも1つの非天然に生じるアミノ酸、ならびにKabatに記載されているとおりのEU指針により番号付けされた場合に252Y、254Tおよび256Eよりなる群から選ばれる1以上の位置における少なくとも1つの非天然に生じるアミノ酸を含む。

【0311】

他の実施形態においては、本発明のFc変異体は、例えばGhetie et al., 1997, Nat Biotech. 15:637-40; Duncan et al., 1988, Nature 332:563-564; Lund et al., 1991, J. Immunol 147:2657-2662; Lund et al., 1992, Mol Immunol 29:53-59; Alegre et al., 1994, Transplantation 57:1537-1543; Hutchins et al., 1995, Proc Natl. Acad Sci U S A 92:11980-11984; Jefferis et al., 1995, Immunol Lett. 44:111-117; Lund et al., 1995, Faseb J 9:115-119; Jefferis et al., 1996, Immunol Lett 54:101-104; Lund et al., 1996, J Immunol 157:4963-4969; Armour et al., 1999, Eur J Immunol 29:2613-2624; Idusogie et al., 2000, J Immunol 164:4178-4184; Reddy et al., 2000, J Immunol 164:1925-1933; Xu et al., 2000, Cell Immunol 200:16-26; Idusogie et al., 2001, J Immunol 166:2571-2575; Shields et al., 2001, J Biol Chem 276:6591-6604; Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82:57-65; Presta et al., 2002, Biochem Soc Trans 30:

487-490); 米国特許第5,624,821号; 第5,885,573号; 第5,677,425号; 第6,165,745号; 第6,277,375号; 第5,869,046号; 第6,121,022号; 第5,624,821号; 第5,648,260号; 第6,528,624号; 第6,194,551号; 第6,737,056号; 第6,821,505号; 第6,277,375号; 米国特許公開番号2004/0002587およびPCT公開WO 94/29351; WO 99/58572; WO 00/42072; WO 02/060919; WO 04/029207; WO 04/099249; WO 04/063351に開示されているような他の公知Fc変異体と組合せられる。また、欠失、付加および／または修飾を含むFc領域も本発明に含まれる。Fcドメインの更に他の修飾／置換／付加／欠失は当業者に容易に理解されるであろう。

【0312】

M. 本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質のグリコシル化

もう1つの実施形態においては、本発明において使用されるエピトープ結合性タンパク質のグリコシル化が修飾される。例えば、非グリコシル化エピトープ結合性タンパク質（すなわち、該抗体はグリコシル化を欠く）が製造されうる。グリコシル化は、例えば、標的抗原に対するエピトープ結合性タンパク質のアフィニティを増強するために改変される。そのような炭水化物修飾は、例えば、タンパク質配列内のグリコシル化の1以上の部位を改変することにより達成されうる。そのような非グリコシル化は、本発明のタンパク質のその抗原に対するアフィニティを増強しうる。そのようなアプローチは米国特許第5,714,350号および第6,350,861号に更に詳細に記載されている。また、Fc領域内に存在するグリコシル化部位（例えば、IgGのアスパラギン297）の除去をもたらす1以上のアミノ酸置換が施されうる。さらに、非グリコシル化エピトープ結合性タンパク質は、必要なグリコシル化装置を欠く細菌細胞において産生されうる。

【0313】

減少した量のフコシル残基を有する低フコシル化タンパク質または増加した二等分（bisecting）GlcNAc構造を有するタンパク質のような改変されたタイプのグリコシル化を有する本発明のエピトープ結合性タンパク質も製造されうる。そのような改変されたグリコシル化パターンは抗体のADCC能を増強することが示されている。そのような炭水化物修飾は、例えば、改変されたグリコシル化装置を有する宿主細胞において本発明のタンパク質を発現させることにより達成されうる。改変されたグリコシル化装置を有する細胞は当技術分野において既に記載されており、本発明の組換えタンパク質を発現させて改変グリコシル化を有するタンパク質を産生させるための宿主細胞として使用されうる。例えば、Shields, R.L.ら（2002）J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Umanaら（1999）Nat. Biotech. 17:176-1および米国特許第6,946,292号、欧州特許番号EP 1,176,195、PCT公開WO 03/035835、WO 99/54342（それらのそれぞれの全体を参照により本明細書に組み入れることとする）を参照されたい。

【0314】

抗体IgG分子のFc領域に結合性の複合型N-グリコシド結合糖鎖の非還元性末端へのガラクトースの付加、および還元性末端におけるN-アセチルグルコサミンへのフコースの付加に関して、多様性の存在が公知であり[Biochemistry, 36, 130 (1997)]、特に、糖鎖内の還元性末端におけるN-アセチルグルコサミンへの付加により、抗体のADCC活性が著しく低下することが報告されている[W000/61739, J. Biol. Chem., 278, 3466 (2003)]。したがって、効力を最大にするためには、Fc領域のフコシル化が低減または排除された多重

【0315】

特定の実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、未修飾多重特異性エピトープ結合性タンパク質と比べて低減したフコシル化を有する。1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質のフコシル化は、未修飾多重特異性エピトープ結合性タンパク質のレベルの少なくとも99%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、2.5%または1%である。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は非フコシル化体である。もう1つの実施形態においては、本発明の非フコシル化多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、未修飾多重

特異性エピトープ結合性タンパク質のフコシル化のレベルの5%、2.5%、1%、0.5%、0.1%または0.05%未満を含む。

【0316】

N. 多重特異性エピトープ結合性タンパク質の製造／産生

本発明はまた、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質の製造方法を提供する。該多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、単一のベクターから、または複数のベクターから発現されうる。該ベクター内の結合性ドメインの配置は様々でありうる。Fc領域（またはCH1/Fc領域）の配向は、該多重特異性エピトープ結合性ポリペプチド鎖内に含有される結合性ドメインのいずれかのN末端側またはC末端側でありうる。いくつかの実施形態においては、該エピトープ結合性ドメインは該ポリペプチド鎖内のFc領域（またはCH1/Fc領域）のN末端側またはC末端側に存在する。

【0317】

所望の多重特異性エピトープ結合性タンパク質が操作されたら、抗体の大規模製造のための当技術分野で公知の方法を用いて、該タンパク質は商業的規模で製造されうる。例えば、これは、限定的なものではないが例えば以下に記載する組換え発現系を用いて達成されうる。

【0318】

N.1. 組換え発現系

本発明のエピトープ結合性タンパク質の組換え発現は、本発明のエピトープ結合性タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターの構築を要する。本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドが得られたら、当技術分野で良く知られた技術を用いる組換えDNA技術により、該エピトープ結合性分子の製造のためのベクターが製造されうる。例えば、米国特許第6,331,415号（その全体を参照により本明細書に組み入れることとする）を参照されたい。したがって、ヌクレオチド配列をコードするポリヌクレオチドを発現させることによりタンパク質を製造するための方法は本明細書に記載されている。本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は多種多様な発現系において製造されうる。1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は哺乳類細胞により産生され分泌される。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質はヒト細胞により産生され分泌される。特定の実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は293F、CHOまたはNS0細胞系の細胞において製造される。

【0319】

タンパク質コード配列ならびに適当な転写および翻訳制御シグナルを含有する発現ベクターを構築するためには、当業者に公知の方法が用いられうる。これらの方法には、例えば、in vitro組換えDNA技術、合成技術、およびin vivo遺伝的組換えが含まれる。したがって、本発明は、プロモーターに機能的に連結されたエピトープ結合性タンパク質分子をコードするヌクレオチド配列を含む複製可能なベクターを提供する。

【0320】

通常の方法により該発現ベクターを宿主細胞に導入したら、ついでトランスフェクト化細胞を通常の方法により培養してエピトープ結合性タンパク質を得る。したがって、本発明は、異種プロモーターに機能的に連結された本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含有する宿主細胞を含む。

【0321】

本発明のエピトープ結合性タンパク質またはその一部分を発現させるためには、米国特許第5,807,715号に記載されているとおり、種々の宿主-発現ベクター系が使用されうる。例えば、ヒトサイトメガロウイルス由来の主要中間（major intermediate）初期遺伝子プロモーター要素のようなベクターと組合されたチャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）のような哺乳類細胞はエピトープ結合性タンパク質のための有効な発現系である（Foeckingら，Gene，45:101（1986）；およびCockettら，Bio/Technology，8:2（1990））。また、所望の特定の状態で挿入配列の発現をモジュレーションまたは遺伝子産物を修飾しプロ

セシングする宿主細胞株が選択されうる。タンパク質産物のそのような修飾（例えば、グリコシル化）およびプロセシング（例えば、切断）は該タンパク質の機能に重要でありうる。種々の宿主細胞は、タンパク質および遺伝子産物の翻訳後プロセシングおよび修飾のための特徴的かつ特異的なメカニズムを有する。本発明のタンパク質の適切な修飾およびプロセシングが保証されるよう、適当な細胞系または宿主系が選択されうる。この目的には、一次転写産物の適切なプロセシング、遺伝子産物のグリコシル化およびリン酸化のための細胞装置を有する真核宿主細胞が使用されうる。そのような哺乳類宿主細胞には、CHO、VERY、BHK、HeLa、COS、MDCK、293、3T3、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20およびT47D、NSO、CRL7030およびHsS78Bst細胞が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0322】

細菌系においては、発現されるタンパク質分子に意図される用途に応じて多数の発現ベクターが有利に選択されうる。例えば、本発明のエピトープ結合性タンパク質を含む医薬組成物の製造のために大量のそのようなエピトープ結合性タンパク質を製造したい場合には、容易に精製される高レベルの融合タンパク質産物の発現を導くベクターが望ましいかもしれない。そのようなベクターには、大腸菌（*E. coli*）発現ベクターpUR278（Ruthers, EMBO, 12:1791 (1983)）（この場合、融合タンパク質が産生されるよう、コード配列は個々に、lacZコード領域とインフレームで該ベクター内に連結されうる）、pINベクター（Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acids Res., 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem., 24:5503-5509 (1989)）などが含まれるが、これらに限定されるものではない。グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）との融合タンパク質として外来ポリペプチドを発現させるためには、pGEXベクターも使用されうる。一般に、そのような融合タンパク質は可溶性であり、吸着、およびグルタチオン-アガロースアフィニティマトリックスへの結合、およびそれに続く、遊離グルタチオンの存在下での溶出により、細胞溶解細胞から容易に精製されうる。クローニング標的遺伝子産物がGST部分から遊離されうるよう、pGEXベクターは、トロンビンおよび／またはXa因子プロテアーゼ切断部位を導入するように設計される。

【0323】

昆虫細胞系においては、外来遺伝子を発現させるためのベクターとして、Autographa californica核多角体病ウイルス（AcNPV）が使用される。該ウイルスはSpodoptera frugiperda細胞内で増殖する。該タンパク質コード配列は該ウイルスの非必須領域（例えば、多角体遺伝子）内に個々にクローニングされ、AcNPVプロモーター（例えば、多角体プロモーター）の制御下に配置されうる。

【0324】

哺乳類宿主細胞においては、ウイルスに基づく多数の発現系が使用されうる。発現ベクターとしてアデノウイルスを使用する場合には、関心のあるコード配列がアデノウイルス転写／翻訳制御複合体（例えば、後期プロモーターおよび三成分リーダー配列）に連結されうる。ついでこのキメラ遺伝子はin vitroまたはin vivo組換えによりアデノウイルスゲノム内に挿入されうる。該ウイルスゲノムの非必須領域（例えば、領域E1またはE3）内への挿入は、感染宿主内で該抗体分子を発現しうる生存可能な組換えウイルスを与える（例えば、Logan & Shenk, PNAS, 81:3655-3659 (1984)を参照されたい）。挿入された抗体コード配列の効率的な翻訳のためには、特異的開始シグナルも要求されうる。これらのシグナルはATG開始コドンおよび隣接配列を含む。さらに、全インサートの翻訳が保証されるためには、開始コドンは、一般に、所望のコード配列のリーディングフレームとインフレームであるべきである。これらの外因性翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、天然物および合成物の両方を含む種々のものに由来しうる。発現の効率は、適当な転写エンハンサー要素、転写ターミネーターなどを含有させることにより改善されうる（例えば、Bitter, Methods in Enzymol., 153:51-544 (1987)を参照されたい）。

【0325】

組換えタンパク質の長期的な高収率の産生のためには、安定な発現が用いられうる。例えば、該タンパク質分子を安定に発現する細胞系が作製されうる。発現制御要素（例えば

10

20

30

40

50

、プロモーター、エンハンサー、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位など）および選択マーカー遺伝子を含む適当に操作されたベクターで宿主細胞が形質転換されうる。外来DNAの導入の後、該細胞は富化培地内で1～2日間の増殖に付され、ついで選択培地と交換されうる。組換えプラスミド内の選択マーカーは該選択に対する耐性を付与し、染色体内に該プラスミドを安定に組み込んだ細胞が増殖しフォーカスを形成するのを可能にし、そしてそれはクローニングされ、細胞系にまで増殖されうる。本発明のエピトープ結合性タンパク質をコードするプラスミドは、培養内での製造に適した任意の細胞系内に遺伝子／cDNAを導入するために使用されうる。単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（Wiglerら, *Cell*, 11:223 (1977)）、ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ（Szybalska & Szybalski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 48:202 (1992)）およびアデニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ（Lowyら, *Cell*, 22:8-17 (1980)）遺伝子（これらに限定されるものではない）を含む多数の選択系が、それぞれ、 tk^- 、 $hgprt^-$ または apr^- 細胞において使用されうる。また、以下の遺伝子に関する選択の基礎として、代謝拮抗物質耐性が用いられうる： $dhfr$ 、これはメトトレキサートに対する耐性を付与する（Wiglerら, *Natl. Acad. Sci. USA*, 77:357 (1980)；O'Hareら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:1527 (1981)）； gpt 、これはミコフェノール酸に対する耐性を付与する（Mulligan & Berg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:2072 (1981)）； neo 、これはアミノグリコシド G-418 に対する耐性を付与する（Wu および Wu, *Biotherapy*, 3:87-95 (1981)；Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 32:573-596 (1993)；Mulligan, *Science*, 260:926-932 (1993)；ならびにMorgan およびAnderson, *Ann. Rev. Biochem.*, 62:191-217 (1993)；May, *TIB TECH* 11:155-215 (1993)）、および $hygro$ 、これはハイグロマイシンに対する耐性を付与する（Santerreら, *Gene*, 30:147 (1984)）。所望の組換えクローンを選択するためには、組換えDNA技術の当技術分野で一般に公知の方法が常套的に適用されることが可能であり、そのような方法は、例えば、Ausubelら(編), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993)；Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990)；ならびにChapters 12 および 13, Dracopoliら(編), *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY (1994)；Colberre-Garapinら, 1981, *J. Mol. Biol.*, 150:1（それらの全体を参照により本明細書に組み入れることとする）に記載されている。本発明のエピトープ結合性タンパク質が組換え発現により産生されたら、それは、免疫グロブリン分子の精製のための当技術分野で公知の任意の方法、例えば、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換、アフィニティー、特に、特異的抗原プロテインAまたはプロテインGに対するアフィニティによるもの、およびサイズカラムクロマトグラフィー）、遠心分離、溶解度差、またはタンパク質の精製のための任意の他の標準的な技術により精製されうる。さらに、本発明のタンパク質またはその断片は、精製を促進する本明細書に記載のまたは当技術分野で公知の異種ポリペプチド配列に融合されうる。

【0326】

0. 多重特異性エピトープ結合性タンパク質の規模拡張可能な製造

多量の本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質を得るために、これは、規模拡張可能（scalable）なプロセス（process）（以下、「本発明の規模拡張可能なプロセス」と称される）により製造されうる。いくつかの実施形態においては、多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、該タンパク質の機能活性を維持しながら分析用基準バイオリアクター（限定的なものではないが例えば、5L、10L、15L、30Lまたは50Lのバイオリアクター）において本発明のタンパク質を製造するために大規模化されうる、研究実験室における本発明の規模拡張可能なプロセスにより製造されうる。例えば、1つの実施形態においては、本発明の規模拡張可能なプロセスにより製造されるタンパク質は、HPSECまたはrCGEにより測定された場合に低レベルないし検出不能レベルの凝集、すなわち、5%以下、4%以下、3%以下、2%以下、1%以下もしくは0.5%以下（タンパク質の重量%）の凝集、および／または低レベルないし検出不能レベルの断片化、すなわち、無傷多重特異性エピトープ結合性タンパク質に相当するピークにおける全ピーク面積の80%以上、85%以上、

90%以上、95%以上、98%以上もしくは99%以上もしくは99.5%以上を示す。他の実施形態においては、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、製造用基準バイオリアクター（限定的なものではないが例えば、75L、100L、150L、300Lまたは500L）において本発明のタンパク質を製造するために大規模化されうる、研究実験室における本発明の規模拡張可能な方法により製造されうる。いくつかの実施形態においては、本発明の規模拡張可能なプロセスは、該研究実験室において行われる製造プロセスと比べて製造効率をほとんどまたは全く減少させない。他の実施形態においては、本発明の規模拡張可能なプロセスは、約10 mg/L、約20 mg/L、約30 mg/L、約50 mg/L、約75 mg/L、約100 mg/L、約125 mg/L、約150 mg/L、約175 mg/L、約200 mg/L、約250 mg/Lまたは約300 mg/Lまたはそれ以上の製造効率で多重特異性エピトープ結合性タンパク質を製造する。

10

【0327】

他の実施形態においては、本発明の規模拡張可能なプロセスは、少なくとも約10 mg/L、少なくとも約20 mg/L、少なくとも約30 mg/L、少なくとも約50 mg/L、少なくとも約75 mg/L、少なくとも約100 mg/L、少なくとも約125 mg/L、少なくとも約150 mg/L、少なくとも約175 mg/L、少なくとも約200 mg/L、少なくとも約250 mg/Lまたは少なくとも約300 mg/Lまたはそれ以上の製造効率で多重特異性エピトープ結合性タンパク質を製造する。

【0328】

他の実施形態においては、本発明の規模拡張可能な方法は、約10 mg/L～約300 mg/L、約10 mg/L～約250 mg/L、約10 mg/L～約200 mg/L、約10 mg/L～約175 mg/L、約10 mg/L～約150 mg/L、約10 mg/L～約100 mg/L、約20 mg/L～約300 mg/L、約20 mg/L～約250 mg/L、約20 mg/L～約200 mg/L、約20 mg/L～約175 mg/L、約20 mg/L～約150 mg/L、約20 mg/L～約125 mg/L、約20 mg/L～約100 mg/L、約30 mg/L～約300 mg/L、約30 mg/L～約250 mg/L、約30 mg/L～約200 mg/L、約30 mg/L～約175 mg/L、約30 mg/L～約150 mg/L、約30 mg/L～約125 mg/L、約30 mg/L～約100 mg/L、約50 mg/L～約300 mg/L、約50 mg/L～約250 mg/L、約50 mg/L～約200 mg/L、約50 mg/L～約175 mg/L、約50 mg/L～約150 mg/L、約50 mg/L～約125 mg/L、または約50 mg/L～約100 mg/Lの製造効率で多重特異性エピトープ結合性タンパク質を製造する。

20

【0329】

P. 多重特異性エピトープ結合性タンパク質の精製および単離

組換え技術を用いる場合、本発明のエピトープ結合性タンパク質は細胞内で産生され、あるいは細胞周辺腔で産生され、あるいは培地内に直接分泌されうる。該タンパク質が細胞内で産生される場合、第1工程として、例えば遠心分離または限外濾過により、粒子状残渣（宿主細胞または細胞溶解断片）が除去される。Carterら、Bio/Technology, 10:163-167 (1992)は、大腸菌（E. coli）の細胞周辺腔内に分泌される抗体を単離するための方法を記載している。簡潔に説明すると、細胞ペーストを酢酸ナトリウム（pH3.5）、EDTAおよびフェニルメチルスルホニルフルオリド（PMSF）の存在下で約30分間にわたって解凍する。細胞残渣は遠心分離により除去されうる。該エピトープ結合性タンパク質が培地内に分泌される場合、そのような発現系からの上清を、まず、商業的に入手可能なタンパク質濃縮フィルター、例えばAmiconまたはMillipore Pellicon限外濾過ユニットを使用して濃縮する。前記工程のいずれかにおいては、タンパク質分解を抑制するために、プロテアーゼインヒビター、例えばPMSFを含めることが可能であり、偶発的な混入物の増殖を妨げるために、抗生物質を含めることが可能である。

30

40

【0330】

該細胞から製造されたエピトープ結合性タンパク質組成物は、例えば、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析および／またはアフィニティクロマトグラフィーを単独でまたは他の精製工程と組合せて用いて精製されうる。アフィニティリガンドとしてのプロテインAの適合性は、該エピトープ結合性タンパク質において存在するいずれかの免疫グロブリンFcの種およびイソタイプに左右される。プロテインAは、ヒトγ1、γ2またはγ4重鎖に基づく抗体を精製するために使用されうる（Lindmarkら、J. Immunol. Methods, 6

50

2:1-13 (1983))。すべてのマウスイソタイプおよびヒト γ 3には、プロテインGが推奨される(Gussら, EMBO J., 5:15671575 (1986))。アフィニティリガンドが結合されるマトリックスは十中八九はアガロースであるが、他のマトリックスも利用可能である。物理的に安定なマトリックス、例えば制御化多孔性ガラスまたはポリ(スチレンジビニル)ベンゼンは、アガロースで達成されうるものより速い流速およびより短い加工時間を可能にする。本発明のタンパク質がCH3ドメインを含む場合には、Bakerbond ABX樹脂(J.T. Baker, Phillipsburg, NJ)が精製に有用である。タンパク質精製のための他の技術、例えばイオン交換カラム上での分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカ上のクロマトグラフィー、ヘパリン上のクロマトグラフィー、アニオンまたはカチオン交換樹脂上のSEPHAROSEクロマトグラフィー(例えば、ポリアスパラギン酸カラム)、等電点電気泳動、SDS-PAGEおよび硫酸アンモニウム沈殿も、回収すべき抗体に応じて利用可能である。

10

【0331】

いずれかの予備精製工程の後、関心のあるエピトープ結合性タンパク質および混入物を含む混合物は、約2.5~4.5のpHの溶出バッファーを使用し低い塩濃度(例えば、約0~0.25Mの塩)で行われる低pH疎水性相互作用クロマトグラフィーに付されうる。

【0332】

組換えタンパク質の単離および精製は、関心のあるタンパク質の物理的特性、例えばサイズ、電荷、疎水性、アフィニティなどを利用して、当技術分野で受け入れられている多数の技術により達成されうる。1つの実施形態においては、本発明のタンパク質は、当技術分野で公知の単離/精製方法、例えばサイズ排除クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーおよびアフィニティクロマトグラフィーに付される。もう1つの実施形態においては、本発明のタンパク質はプロテインAアフィニティクロマトグラフィーにより精製される。もう1つの実施形態においては、本発明のタンパク質は、該タンパク質における1以上の結合特異性を利用するアフィニティクロマトグラフィーにより精製される。

20

【0333】

多重特異性エピトープ結合性タンパク質の構成エピトープ結合性ドメインは、同じ単離された機能性エピトープ結合性ドメインにより示される機能の実質的に全てを保持すると理解されるべきである。1つの実施形態においては、多重特異性エピトープ結合性タンパク質の構成エピトープ結合性ドメインは、同じ単離された機能性エピトープ結合性ドメインにより示される機能の1以上を保持する。1つの実施形態においては、多重特異性エピトープ結合性タンパク質のエピトープ結合性ドメインにより示される機能には、同じ単離されたエピトープ結合性ドメインにより示される機能と実質的に同じ特異性、アフィニティ、作動性(例えば、図29、30および31を参照されたい)、拮抗性、架橋特性が含まれるが、これらに限定されるものではない。もう1つの実施形態においては、多重特異性エピトープ結合性タンパク質の構成エピトープ結合性ドメインは、同じ単離されたエピトープ結合性ドメインにより示される1以上の機能の少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも100%、少なくとも110%、少なくとも120%、少なくとも130%、少なくとも140%、少なくとも150%または少なくとも160%の活性を保持する。

30

40

【0334】

本発明のタンパク質の機能性を保証するために、適当な結合アッセイが開発されている。当技術分野で十分に記載されている技術、例えばELISA、BIACore(登録商標)およびKinExA(商標)に加えて、本発明は、多重特異性エピトープ結合性タンパク質の機能性を決定するためのアッセイを提供する。1つの実施形態においては、本発明のタンパク質の機能性は、実施例の節に記載されている方法を用いてアッセイされうる。もう1つの実施形態においては、本発明のタンパク質の機能性は、実施例10に記載されている方法を用いてアッセイされうる。もう1つの実施形態においては、本発明のタンパク質の機能性は、実施例13~20のいずれかに記載されている方法を用いてアッセイされうる。

【0335】

50

本発明のタンパク質の安定性を保証するために、適当なアッセイが開発されている。1つの実施形態においては、本発明のタンパク質の安定性は当技術分野における公知技術により特徴づけられる。他の実施形態においては、本発明のタンパク質の安定性は凝集および/または断片化の率（速度）またはプロファイルにより評価されうる。凝集または断片化のレベルを決定するためには、多数の技術が用いられうる。1つの実施形態においては、該凝集および/または断片化プロファイルは、分析用限界濾過（AUC）、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）、高速サイズ排除クロマトグラフィー（HPSEC）、融解温度（ T_m ）、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）、キャピラリーゲル電気泳動（CGE）、光散乱（SLS）、フーリエ変換赤外分光法（FTIR）、円二色性（CD）、尿素誘発性タンパク質アンフォールディング技術、内在性トリプトファン蛍光、示差走査熱量測定または1-アニリノ-8-ナフタレンスルホン酸（ANS）タンパク質結合技術の使用により評価されうる。もう1つの実施形態においては、本発明のタンパク質の安定性はポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）分析により特徴づけられる。もう1つの実施形態においては、本発明のタンパク質の安定性は、実施例3および6に記載されている方法により特徴づけられる。もう1つの実施形態においては、本発明のタンパク質の安定性はサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）プロファイル分析により特徴づけられる。もう1つの実施形態においては、本発明のタンパク質の安定性は、実施例10に記載されている方法により特徴づけられる。もう1つの実施形態においては、本発明のタンパク質の安定性は、実施例13~20のいずれかに記載されている方法を用いてアッセイされうる。

【0336】

安定性のもう1つの尺度は、タンパク質により示されるプロテアーゼ分解に対する相対的抵抗性である。1つの実施形態においては、本発明のタンパク質の安定性はプロテアーゼ抵抗性アッセイにより特徴づけられる。1つの実施形態においては、該プロテアーゼ抵抗性アッセイにおいて利用されるプロテアーゼはセリンプロテアーゼ、トレオニンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、メタロプロテアーゼまたはグルタミン酸プロテアーゼである。1つの実施形態においては、本発明のタンパク質は、プロテアーゼがトリプシン、キモトリプシン、カテプシンB、D、LまたはG、ペプシン、パパイン、エラスターゼ、HIV-1プロテアーゼ、キモシン、レンシン、プラスメプシン、プラスミン、カルボキシペプチダーゼE、カスパーゼ1-10またはカルパインであるプロテアーゼ抵抗性アッセイに付される。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エпитープ結合性タンパク質は低レベルのプロテアーゼ分解を示す。いくつかの実施形態においては、本発明の多重特異性エпитープ結合性タンパク質は、例えば37℃で1時間、12時間または24時間にわたるプロテアーゼの存在下のインキュベーションの後に該タンパク質の少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%またはそれ以上が未消化のままである、プロテアーゼ（例えば、トリプシン（20ng/1μgの抗体/エпитープ結合性タンパク質）またはキモトリプシン（20ng/1μgの抗体/エпитープ結合性タンパク質））抵抗性を示す。もう1つの実施形態においては、本発明の多重特異性エпитープ結合性タンパク質は低レベルのプロテアーゼ分解を示す。いくつかの実施形態においては、本発明の多重特異性エпитープ結合性タンパク質は、実施例28~29に記載されているのと実質的に同じ方法によるプロテアーゼの存在下のインキュベーションの後に該タンパク質の少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%またはそれ以上が未消化のままである、プロテアーゼ抵抗性を示す。

【0337】

本発明はまた、本発明の複数のエпитープ結合性タンパク質の試験方法を提供する。抗体または抗体様分子の結合特異性は、当技術分野で受け入れられている多種多様の技術、例えばファージディスプレイおよび他のELISA利用技術により評価されうる。1つの実施形態においては、本発明のタンパク質の結合特異性は当技術分野における任意の公知技術により試験されうる。もう1つの実施形態においては、本発明のタンパク質は、本明細書に記載されている技術のいずれかにより試験されうる。もう1つの実施形態においては、本

発明のタンパク質の結合特異性は、ELISAに基づくアッセイ、例えば実施例10に記載されているアッセイにより試験されうる。もう1つの実施形態においては、本発明のタンパク質の結合特異性は、実施例13～20のいずれかに記載されている方法により試験されうる。

【0338】

Q. 多重特異性エピトープ結合性タンパク質製剤の安定性および凝集のモニター方法

タンパク質の物理的および化学的構造に基づいて並びにその生物活性に基づいてタンパク質製剤の安定性を評価するために利用可能な種々の方法が存在する。例えば、タンパク質の変性を研究するためには、電荷移動吸収、熱分析、蛍光分光法、円二色性、NMR、rCGE（還元性キャピラリーゲル電気泳動）およびHPSEC（高速サイズ排除クロマトグラフィー）のような方法が利用可能である。例えば、Wangら, 1988, J. of Parenteral Science & Technology 42(Suppl):S4-S26を参照されたい。 10

【0339】

rCGEおよびHPSECは、タンパク質凝集、タンパク質分解およびタンパク質断片化の形成を評価するための最も一般的かつ最も単純な方法である。したがって、本発明の液体製剤の安定性はこれらの方法により評価されうる。

【0340】

例えば、本発明の液体製剤の安定性はHPSECまたはrCGEにより評価可能であり、この場合、ピークの面積の百分率は未分解多重特異性エピトープ結合性タンパク質に相当する。1つの実施形態においては、TSK SW×1ガードカラム（6.0 mm CX 4.0 cm）を備えたTosoH Biosep TSK G3000SWXLカラム（7.8 mm×30 cm）上に約250 μgの多重特異性エピトープ結合性タンパク質が注入される。該多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、0.8～1.0ml/分の流速で、0.1M硫酸ナトリウムおよび0.05%アジ化ナトリウムを含有する0.1Mリン酸二ナトリウムで無勾配で溶出される。溶出タンパク質は、280nmにおけるUV吸光度を用いて検出される。多重特異性エピトープ結合性タンパク質は参照標準との比較において移動されることが可能であり、結果は、含まれる実測体積ピークを除く全ての他のピークと比べた産物単量体ピークの面積の百分率として表される。該単量体ピークより早く溶出したピークは凝集物の百分率として表される。 20

【0341】

本発明の液体製剤は、HPSECまたはrCGEにより測定された場合に低レベルないし検出不能レベルの凝集、すなわち、5%以下、4%以下、3%以下、2%以下、1%以下もしくは0.5%以下（タンパク質の重量%）の凝集、および／または低レベルないし検出不能レベルの断片化、すなわち、無傷多重特異性エピトープ結合性タンパク質に相当するピークにおける全ピーク面積の80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上もしくは99%以上もしくは99.5%以上を示す。SDS-PAGEの場合、染色されたまたは放射性同位体で標識された各バンドの濃度または放射活性を測定することが可能であり、未分解多重特異性エピトープ結合性タンパク質に相当するバンドの濃度（%）または放射活性（%）を得ることが可能である。 30

【0342】

本発明の液体製剤は、低レベルないし検出不能レベルの非機能性（例えば、in vivoおよび／またはin vitroで機能性でない）二量体または多量体副産物（限定的なものではないが例えば、望ましくない軽鎖二量体）を示す。そのような望ましくない二量体または多量体副産物はHPSEC、rCGEまたはSDS-PAGEにより測定されうる。いくつかの実施形態においては、本発明の液体製剤は、HPSECまたはrCGEにより測定された場合に、低レベルないし検出不能レベル、すなわち、15%以下、10%以下、5%以下、4%以下、3%以下、2%以下、1%以下もしくは0.5%以下（全タンパク質の重量%）の、または無傷多重特異性エピトープ結合性タンパク質に相当するピークにおける全ピーク面積の80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上もしくは99%以上もしくは99.5%以上により表される非機能性二量体または多量体副産物を示す。あるいは、望ましくない副産物は、放射性標識アミノ酸の取り込みを用いるSDS-PAGEにより、または種々の免疫特異的試薬でのウェスタンブロット法により検出されうる。 40 50

【0343】

また、本発明の液体製剤の安定性は、該製剤中の多重特異性エピトープ結合性タンパク質の生物活性を測定する任意のアッセイにより評価されうる。多重特異性エピトープ結合性タンパク質の生物活性には、抗原結合活性、補体活性化活性、Fc-受容体結合活性、受容体／リガンド中和活性、受容体作動性または拮抗性などが含まれるが、これらに限定されるものではない。該多重特異性エピトープ結合性タンパク質の抗原結合活性は、ELISA、ラジオイムノアッセイ、ウエスタンブロットなど（これらに限定されるものではない）を含む当業者に公知の任意の方法により測定されうる（Harlowら、Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988（その全体を参照により本明細書に組み入れることとする）も参照されたい）。本発明の液体多重特異性エピトープ結合性タンパク質製剤の純度は、当業者に良く知られた任意の方法（例えば、HP SEC）により測定されうる。液体多重特異性エピトープ結合性タンパク質製剤の無菌性は以下のとおりに評価されうる。0.45 μ mの公称多孔度を有する無菌フィルターで液体多重特異性エピトープ結合性タンパク質製剤を濾過することにより、無菌ダイズ-カゼイン消化物培地および流体チオグリコラート培地に試験液体抗体製剤を接種する。Sterisur（商標）またはSteritest（商標）法を用いる場合には、各フィルター装置を約100mlの無菌ダイズ-カゼイン消化物培地または流体チオグリコラート培地で無菌的に満たす。通常の方法を用いる場合には、該負荷フィルターを100mlの無菌ダイズ-カゼイン消化物培地または流体チオグリコラート培地に無菌的に移す。該培地を適当な温度でインキュベートし、細菌または真菌の増殖の証拠に関して14日間にわたって3回観察する。

【0344】

本発明の液体製剤はまた、in vivo（例えば、哺乳動物への投与の際）における安定性の増強を示す。したがって、製剤中に存在する成分多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、哺乳動物への投与の後の安定性を評価するための前記方法により分析されうる。いくつかの実施形態においては、本発明の製剤は少なくとも1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、12時間もしくは24時間またはそれ以上にわたってin vivoで安定である。他の実施形態においては、本発明の製剤は少なくとも1日間、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、14日間、21日間もしくは30日間またはそれ以上にわたってin vivoで安定である。他の実施形態においては、本発明のタンパク質または製剤は哺乳動物への投与の後の少なくとも1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、12時間もしくは24時間またはそれ以上の半減期を示す。他の実施形態においては、本発明のタンパク質または製剤は哺乳動物への投与の後の少なくとも1日間、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、14日間、21日間もしくは30日間またはそれ以上の半減期を示す。

【0345】

R. 医薬組成物

もう1つの態様においては、本発明は、製薬上許容される担体と共に製剤化された本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質の1つまたは組合せを含有する組成物、例えば医薬組成物（これに限定されるものではない）を提供する。そのような組成物は、限定的なものではないが例えば、本発明の2以上の異なる多重特異性エピトープ結合性タンパク質の1つまたは組合せを含みうる。例えば、本発明の医薬組成物は、標的抗原上の異なるエピトープに結合するまたは相補的活性を有する多重特異性エピトープ結合性タンパク質の組合せを含みうる。

【0346】

本発明の医薬組成物は、例えば他の物質と組合せられた組合せ療法（併用療法）においても投与されうる。例えば、該組合せ療法は、少なくとも1つの他の療法（該療法は免疫療法、化学療法、放射線療法または薬物療法でありうる）と組合せられた本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質を含みうる。

【0347】

本発明の医薬組成物は、1以上の製薬上許容される塩を含みうる。そのような塩の具体

例には、酸付加塩および塩基付加塩が含まれる。酸付加塩には、無毒性無機酸、例えば塩酸、硝酸、リン酸、硫酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、リンなどに由来するもの、および無毒性有機酸、例えば脂肪族モノ-およびジ-カルボン酸、フェニル置換アルカン酸、ヒドロキシアルカン酸、芳香族酸、脂肪族酸および芳香族スルホン酸などに由来するものが含まれる。塩基付加塩には、アルカリ土類金属、例えばナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムなどに由来するもの、および無毒性有機酸、例えばN,N'-ジベンジルエチレンジアミン、N-メチルグルカミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、プロカインなどが含まれる。

【0348】

本発明の医薬組成物はまた、製薬上許容される抗酸化剤を含みうる。製薬上許容される抗酸化剤の具体例には、(1) 水溶性抗酸化剤、例えばアスコルビン酸、塩酸システイン、硫酸水素ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなど、(2) 油溶性抗酸化剤、例えばアスコルビルパルミタート、ブチル化ヒドロキシアニソール (BHA)、ブチル化ヒドロキシトルエン (BHT)、レシチン、プロビルガラート、アルファ-トコフェロールなど、および(3) 金属キレート剤、例えばクエン酸、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、ソルビトール、酒石酸、リン酸などが含まれる。

【0349】

本発明の医薬組成物において使用されうる適当な水性および非水性担体には、水、エタノール、ポリオール (例えば、グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど) およびそれらの適当な混合物、植物油、例えばオリーブ油、ならびに注射可能な有機エステル、例えばオレイン酸エチルが含まれる。適当な流動性は、例えば、コーティング剤、例えばレシチンの使用により、および分散液の場合には要求される粒径の維持により、および界面活性剤の使用により維持されうる。

【0350】

これらの組成物は、補助剤、例えば保存剤、湿潤剤、乳化剤および分散剤をも含有しうる。微生物の存在の予防は、滅菌法、ならびに種々の抗細菌および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノールソルビン酸などの配合の両方により確保されうる。等張化剤、例えば糖、塩化ナトリウムなどを該組成物に配合することも望ましいかもしれない。また、注射可能な医薬形態の持続的吸収は、吸収を遅らせる物質、例えばモノステアリン酸ナトリウムおよびゼラチンを配合することによりもたらされうる。

【0351】

医薬組成物は、典型的には、無菌であり、製造および貯蔵の条件下で安定でなければならない。該組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、リポソーム、または高薬物濃度に適した他の一定の構造体として製剤化されうる。担体は、例えば水、エタノール、ポリオール (例えばグリセロール、プロピレングリコールおよび液体ポリエチレングリコールなど) およびそれらの適当な混合物を含む溶媒または分散媒でありうる。適当な流動性は、例えば、コーティング剤、例えばレシチンの使用により、および分散液の場合には要求される粒径の維持により、および界面活性剤の使用により維持されうる。多くの場合、等張化剤、例えば糖、多価アルコール、例えばマンニトール、ソルビトールまたは塩化ナトリウムを該組成物に配合するのが適当であろう。注射可能な組成物の持続的吸収は、吸収を遅らせる物質、例えばモノステアリン酸塩およびゼラチンを該組成物に配合することによりもたらされうる。

【0352】

無菌注射可能溶液は、前記成分の1つまたは組合せと共に活性化合物の必要量を適当な溶媒に配合し、ついで滅菌精密濾過することにより製造されうる。一般に、分散液は、基礎分散媒および前記のものからの必要な他の成分を含有する無菌ビヒクルに活性化合物を配合することにより製造されうる。無菌注射可能溶液の製造のための無菌散剤の場合、好ましい製造方法は、有効成分およびその予め滅菌濾過された溶液からの任意の追加的な所望の成分の粉末を与える真空乾燥および凍結乾燥である。

【0353】

10

20

30

40

50

1つの実施形態においては、本発明の組成物は、内毒素および／または関連発熱原性物質を実質的に含有しない発熱物質非含有製剤である。内毒素には、微生物の内部に封じ込められた毒素および微生物が破壊または死亡した場合に放出される毒素が含まれる。また、発熱原性物質には、細菌および他の微生物の外膜からの発熱誘発性、熱安定性物質（糖タンパク質）が含まれる。これらの物質は共に、ヒトに投与されると発熱、低血圧およびショックを引き起こしうる。潜在的な有害な作用のため、少量の内毒素であっても静脈内投与医薬溶液から除去するのが有利である。Food & Drug Administration（「FDA」）は、静脈内薬物適用に関して1回の1時間における体重1kg当たり1用量当たり5内毒素単位（EU）の上限を設定している（The United States Pharmacopeial Convention, Pharmacopeial Forum 26 (1):223 (2000)）。治療用タンパク質を体重1kg当たり数百または数千ミリグラム10の量で投与する場合、微量の内毒素であっても除去するのが有利である。1つの実施形態においては、該組成物中の内毒素および発熱物質レベルは10 EU/mg未満、または5 EU/mg未満、または1 EU/mg未満、または0.1 EU/mg未満、または0.01 EU/mg未満、または0.001 EU/mg未満である。もう1つの実施形態においては、該組成物中の内毒素および発熱物質レベルは約10 EU/mg未満、または約5 EU/mg未満、または約1 EU/mg未満、または約0.1 EU/mg未満、または約0.01 EU/mg未満、または約0.001 EU/mg未満である。

【0354】

1つの実施形態においては、本発明のタンパク質およびそれを含むタンパク質は癌またはその症状の治療において有用である。1つの実施形態においては、本発明は、頭部、頸部、皮膚、喉、肺、骨、乳房、結腸、肝臓、脾臓、胃、腸、尿道、甲状腺、眼、精巣、中枢神経系、前立腺、卵巣、腎臓、直腸および副腎の充実性腫瘍の治療において有用な組成物を含む。もう1つの実施形態においては、本発明は、癌転移の治療において有用な組成物を含む。もう1つの実施形態においては、本発明は、非充実性腫瘍、例えば骨髄腫、リンパ腫および白血病（これらに限定されるものではない）の治療において有用な組成物を含む。20

【0355】

もう1つの実施形態においては、本発明は、癌細胞表現型を抑制しうる組成物を含む。1つの実施形態においては、該癌細胞表現型は細胞増殖、細胞付着、細胞付着の喪失、受容体発現（例えば、Eph）の低減、受容体発現（例えば、Eph）の増強、転移能、細胞周期抑制、受容体チロシンキナーゼ活性化／抑制などである。30

【0356】

もう1つの実施形態においては、本発明は、組成物を投与することを含み、該投与は、経口、非経口、筋肉内、鼻腔内、腔、直腸、舌、舌下、頬側、頬内、静脈内、皮膚、皮下または経皮である。

【0357】

もう1つの実施形態においては、本発明は更に、他の療法、例えば化学療法、ホルモン療法、生物学的療法、免疫療法または放射線療法と組合せて組成物を投与することを含む。

【0358】

S. 用量／投与

本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質を含む医薬組成物または無菌組成物を製造するためには、多重特異性エピトープ結合性タンパク質を製薬上許容される担体または賦形剤と混合する。治療用および診断用物質の製剤は、例えば凍結乾燥粉末、スラリー、水溶液、ローションまたは懸濁液の形態で、生理的に許容される担体、賦形剤または安定剤と混合することにより製造されうる（例えば、Hardmanら、(2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N.Y.; Genaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, N.Y.; Avisら、(編) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Liebermanら、(編) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Liebermanら、(編) (1990) Pharmaceut 40 50

ical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; WeinerおよびKotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.を参照されたい)。

【0359】

治療のための投与計画の選択は、該物質の血清または組織ターンオーバー速度、症状のレベル、該物質の免疫原性、および生物学的マトリックスにおける標的細胞の接近性を含む幾つかの要因に左右される。ある実施形態においては、投与計画は、許容される副作用レベルと調和させて、患者に送達される治療用物質の量を最大にする。したがって、送達される生物学的製剤の量は、部分的には、個々の物質および治療される状態の重症度に左右される。抗体、サイトカインおよび小分子の適当な用量を選択する際の指針は入手可能である (Wawrzynczak (1996) Antibody Therapy, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina (編) (1991) Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis, Marcel Dekker, New York, N.Y.; Bach (編) (1993) Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases, Marcel Dekker, New York, N.Y.; Baertら, (2003) New Engl. J. Med. 348:601-608; Milgromら, (1999) New Engl. J. Med. 341:1966-1973; Slamonら, (2001) New Engl. J. Med. 344:783-792; Beniaminovitzら, (2000) New Engl. J. Med. 342:613-619; Ghoshら, (2003) New Engl. J. Med. 348:24-32; Lipskyら, (2000) New Engl. J. Med. 343:1594-1602)。

【0360】

適当な用量の決定は、例えば、治療に影響を及ぼすことまたは治療に影響を及ぼすと予想されることが当技術分野で公知であるまたは疑われるパラメータおよび要因を用いて、臨床家によってなされる。一般に、投与は、最適用量より若干少ない量から開始され、ついで、いずれかの負の副作用との対比において所望のまたは最適な効果が達成されるまで、少しずつ投与量を増加させる。重要な診断尺度には、例えば炎症の症状の尺度、または産生される炎症サイトカインのレベルが含まれる。

【0361】

本発明の医薬組成物におけるの有効成分の実際の投与レベルは、患者にとって毒性となることなく個々の患者、組成物および投与方法に関する所望の治療応答を達成するのに有効な有効成分量が得られるような様々なレベルとなりうる。選択される投与レベルは、使用される本発明の個々の組成物またはそのエステル、塩もしくはアミドの活性、投与経路、投与時点、使用される個々の化合物の排泄速度、治療の持続期間、使用される個々の組成物と組合せて使用される他の薬物、化合物および／または物質、治療される患者の年齢、性別、体重、状態、全身健康状態および既往歴ならびに医学分野で公知の他の要因を含む種々の薬物動態学的要因に左右される。

【0362】

本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質を含む組成物は、連続的注入により、または例えば1日、1週間または週1~7回の間隔での投与により投与されうる。投与は、静脈内、皮下、局所、経口的、鼻腔内、直腸、筋肉内、脳内に、または吸入により行われうる。特定の投与プロトコールは、有意な望ましくない副作用を回避する最大用量または投与頻度を含むものである。週当たりの合計用量は、少なくとも0.05 $\mu\text{g/kg}$ 体重、少なくとも0.2 $\mu\text{g/kg}$ 、少なくとも0.5 $\mu\text{g/kg}$ 、少なくとも1 $\mu\text{g/kg}$ 、少なくとも10 $\mu\text{g/kg}$ 、少なくとも100 $\mu\text{g/kg}$ 、少なくとも0.2mg/kg、少なくとも1.0mg/kg、少なくとも2.0mg/kg、少なくとも10mg/kg、少なくとも25mg/kg、または少なくとも50mg/kgでありうる (例えば、Yangら, (2003) New Engl. J. Med. 349:427-434; Heroldら, (2002) New Engl. J. Med. 346:1692-1698; Liuら, (1999) J. Neurol. Neurosurg. Psych. 67:451-456; Portieljiら, (20003) Cancer Immunol. Immunother. 52:133-144を参照されたい)。多重特異性エピトープ結合性タンパク質の所望の用量は、モル/kg体重に基づいた抗体またはポリペプチドの場合とほぼ同じである。多重特異性エピトープ結合性タンパク質治療用物質の所望の血漿濃度は、モル/kg体重に基づいた抗体の場合とほぼ同じである。該用量は、少なくとも15 μg 、少なくとも20 μg 、少なくとも25 μg 、少なくとも30 μg 、少なくとも35 μg 、少

なくとも40 μg 、少なくとも45 μg 、少なくとも50 μg 、少なくとも55 μg 、少なくとも60 μg 、少なくとも65 μg 、少なくとも70 μg 、少なくとも75 μg 、少なくとも80 μg 、少なくとも85 μg 、少なくとも90 μg 、少なくとも95 μg 、または少なくとも100 μg でありうる。対象に投与される投与回数は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11もしくは12またはそれ以上でありうる。

【0363】

本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質の場合、患者に投与される投与量は0.0001 mg/kg~100 mg/kg（患者の体重1kg当たりのmg）でありうる。該投与量は、0.0001 mg/kg~20 mg/kg、0.0001 mg/kg~10 mg/kg、0.0001 mg/kg~5 mg/kg、0.0001~2 mg/kg、0.0001~1 mg/kg、0.0001 mg/kg~0.75 mg/kg、0.0001 mg/kg~0.5 mg/kg、0.0001 mg/kg~0.25 mg/kg、0.0001~0.15 mg/kg、0.0001~0.10 mg/kg、0.001~0.5 mg/kg、0.01~0.25 mg/kg、または0.01~0.10 mg/kg（患者の体重1kg当たりのmg）でありうる。

【0364】

本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質の投与量は、キログラム（kg）単位の患者の体重とmg/kg単位の投与用量とを掛け算することにより算出されうる。本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質の投与量は、150 $\mu\text{g/kg}$ 未満、125 $\mu\text{g/kg}$ 未満、100 $\mu\text{g/kg}$ 未満、95 $\mu\text{g/kg}$ 未満、90 $\mu\text{g/kg}$ 未満、85 $\mu\text{g/kg}$ 未満、80 $\mu\text{g/kg}$ 未満、75 $\mu\text{g/kg}$ 未満、70 $\mu\text{g/kg}$ 未満、65 $\mu\text{g/kg}$ 未満、60 $\mu\text{g/kg}$ 未満、55 $\mu\text{g/kg}$ 未満、50 $\mu\text{g/kg}$ 未満、45 $\mu\text{g/kg}$ 未満、40 $\mu\text{g/kg}$ 未満、35 $\mu\text{g/kg}$ 未満、30 $\mu\text{g/kg}$ 未満、25 $\mu\text{g/kg}$ 未満、20 $\mu\text{g/kg}$ 未満、15 $\mu\text{g/kg}$ 未満、10 $\mu\text{g/kg}$ 未満、5 $\mu\text{g/kg}$ 未満、2.5 $\mu\text{g/kg}$ 未満、2 $\mu\text{g/kg}$ 未満、1.5 $\mu\text{g/kg}$ 未満、1 $\mu\text{g/kg}$ 未満、0.5 $\mu\text{g/kg}$ 未満、または0.5 $\mu\text{g/kg}$ （患者の体重1kg当たりの μg ）でありうる。

【0365】

本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質の単位用量は0.1 mg~20 mg、0.1 mg~15 mg、0.1 mg~12 mg、0.1 mg~10 mg、0.1 mg~8 mg、0.1 mg~7 mg、0.1 mg~5 mg、0.1~2.5 mg、0.25 mg~20 mg、0.25~15 mg、0.25~12 mg、0.25~10 mg、0.25~8 mg、0.25 mg~7 mg、0.25 mg~5 mg、0.5 mg~2.5 mg、1 mg~20 mg、1 mg~15 mg、1 mg~12 mg、1 mg~10 mg、1 mg~8 mg、1 mg~7 mg、1 mg~5 mg、または1 mg~2.5 mgでありうる。

【0366】

本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質の投与量は、対象において少なくとも0.1 $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.5 $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも1 $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも2 $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも5 $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも6 $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも10 $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも15 $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも20 $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも25 $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも50 $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも100 $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも125 $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも150 $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも175 $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも200 $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも225 $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも250 $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも275 $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも300 $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも325 $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも350 $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも375 $\mu\text{g/ml}$ または少なくとも400 $\mu\text{g/ml}$ の血清力価を達成しうる。あるいは、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質の投与量は、対象において少なくとも0.1 $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも0.5 $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも1 $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも2 $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも5 $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも6 $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも10 $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも15 $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも20 $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも25 $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも50 $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも100 $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも125 $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも150 $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも175 $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも200 $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも225 $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも250 $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも275 $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも300 $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも325 $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも350 $\mu\text{g/ml}$ 、少なくとも375 $\mu\text{g/ml}$ または少なくとも400 $\mu\text{g/ml}$ の血清力価を達成しうる。

【0367】

本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質の投与は反復可能であり、それらの投与は、少なくとも1日間、2日間、3日間、5日間、10日間、15日間、30日間、45日間、2ヶ月間、75日間、3ヶ月間または少なくとも6ヶ月間、隔てられうる。

【0368】

個々の患者に対する有効量は、治療される状態、患者の全身健康状態、投与の方法、経路および用量ならびに副作用の重症度のような要因によって様々となりうる（例えば、Mynardら, (1996) A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice, Interpharm Press, Boca Raton, Fla.; Dent (2001) Good Laboratory and Good Clinical Practice, Urch Publ., London, UKを参照されたい）。

【0369】

投与の経路は、例えば、局所または皮膚適用、静脈内、腹腔内、脳内、筋肉内、眼内、動脈内、脳脊髄内、病変内への注射または注入、あるいは徐放系またはインプラントによるものでありうる（例えば、Sidmanら (1983) Biopolymers 22:547-556; Langerら, (1981) J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277; Langer (1982) Chem. Tech. 12:98-105; Epsteinら, (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688-3692; Hwangら, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030-4034; 米国特許第6,350,466号および第6,316,024号を参照されたい）。必要に応じて、該組成物は、可溶化剤、および注射部位の疼痛を低減するための局所麻酔薬、例えばリドカインをも含む。また、例えばを吸入器またはネブライザーの使用およびエアゾール化剤の配合により、肺投与も行われうる。例えば、米国特許第6,019,968号、第5,985,320号、第5,985,309号、第5,934,272号、第5,874,064号、第5,855,913号、第5,290,540号および第4,880,078号；ならびにPCT公開番号WO 92/19244、WO 97/32572、WO 97/44013、WO 98/31346およびWO 99/66903（それらのそれぞれの全体を参照により本明細書に組み入れることとする）を参照されたい。1つの実施形態においては、本発明の抗体、組合せ療法または組成物は、Alkermes AIR（商標）肺薬物送達技術（Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.）を用いて投与される。

【0370】

また、本発明の組成物は、当技術分野で公知の種々の方法の1以上を用いて、1以上の投与経路で投与されうる。当業者に理解されたとおり、投与の経路および／または方法は、所望の結果に応じて様々となろう。本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質に関する選択される投与経路には、静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、皮下、脊髄または他の非経口投与経路、例えば注射または注入が含まれる。非経口投与は経腸および局所投与以外の投与方法に相当しうるものであり、通常は注射によるものであり、限定的なものではないが静脈内、筋肉内、動脈内、鞘内、包内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、髄腔内、硬膜外および胸骨内の注射および注入を包含する。あるいは、本発明の組成物は、非-非経口経路、例えば局所、表皮または粘膜投与経路、例えば鼻腔内、経口、膣、直腸、舌下または局所経路により投与されうる。

【0371】

本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質が制御放出または徐放系で投与される場合には、制御放出または徐放を達成するためにポンプが使用されうる（例えば、Langer, 前掲; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:20; Buchwaldら, 1980, Surgery 88:507; Saudekら, 1989, N. Engl. J. Med. 321:574を参照されたい）。本発明の治療用物質の制御放出または徐放を達成するためには、高分子物質が使用されうる（例えば、Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (編), CRC Press, Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, SmolenおよびBall (編), Wiley, New York (1984); RangerおよびPeppas, 1983, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61を参照された；また、Levyら, 1985, Science 228:190; Duringら, 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howardら, 1989, J. Neurosurg. 71:105; 米国特許第5,679,377号；米国特許第5,916,597号；米国特許第5,912,015号；米国特許第5,989,463号；米国特許第5,128,326号；PCT公開番号WO 99/15154；およびPCT公開番号WO 99/20253も参照されたい）。徐放製剤において使用される重合体の具体例には、限定的なものではないが以下のものが含まれる：ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、ポリ(メチルメタクリレート)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(エチレン-コ-ビニルアセタート)、ポリ(メタクリル酸)、ポリグリコリド (PLG)、ポリ無水物、ポリ(N-ビ

ニルピロリドン)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリアクリルアミド、ポリ(エチレングリコール)、ポリラクチド (PLA)、ポリ(ラクチド-コ-グリコリド) (PLGA)、およびポリオルトエステル。1つの実施形態においては、徐放製剤において使用される高分子は不活性であり、浸出性不純物を含有せず、貯蔵時に安定であり、無菌であり、生分解性である。制御放出または徐放系は予防または治療標的に接近して配置され、したがって、全身投与量のごく一部を要するに過ぎない(例えば、Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)を参照されたい)。

【0372】

制御放出系はLanger (1990, Science 249:1527-1533)による総説において考察されている。本発明の1以上の多重特異性エピトープ結合性タンパク質を含む徐放製剤を製造するためには、当業者に公知の任意の技術が用いられうる。例えば、米国特許第4,526,938号、PCT公開WO 91/05548, PCT公開WO 96/20698, Ningら, 1996, "Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel," Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Songら, 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions," PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397, Cleekら, 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application," Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854, およびLamら, 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery," Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760 (それらのそれぞれの全体を参照により本明細書に組み入れることとする)を参照されたい。

【0373】

本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質を局所投与する場合、それは、軟膏剤、クリーム剤、経皮パッチ、ローション剤、ゲル剤、シャンプー、噴霧剤、エアゾール剤、溶液剤(水剤)、乳剤または当業者によく知られた他の形態で製剤化されうる。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19th ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995)を参照されたい。非噴霧可能局所剤形の場合、局所適用に適しており幾つかの場合には水より大きな粘性率を有する担体または1以上の賦形剤を含む粘性ないし半固体または固体形態が典型的に使用される。適当な製剤には、溶液剤(水剤)、懸濁剤、乳剤、クリーム剤、軟膏剤、散剤、リニメント剤、ロウ剤などが含まれ(これらに限定されるものではない)、これらは、所望により、滅菌され、または例えば浸透圧のような種々の特性に影響を及ぼすための補助物質(例えば、保存剤、安定剤、湿潤剤、バッファーまたは塩)と混合される。他の適当な局所剤形には、噴霧可能なエアゾール剤が含まれ、この場合、有効成分は、いくつかの場合には固体または液体不活性担体と組合されており、加圧揮発性物質(例えば、気体プロペラント、例えばフロン)との混合物として、またはスクイズボトル内に充填される。所望により、医薬組成物および剤形に保湿剤または湿潤剤も加えられうる。そのような追加的成分の具体例は当技術分野でよく知られている。

【0374】

多重特異性エピトープ結合性タンパク質を含む組成物を鼻腔内に投与する場合には、それは、エアゾール形態、噴霧剤、ミストまたは滴剤の形態で製剤化されうる。特に、本発明において使用する予防用または治療用物質は、適当なプロペラント(例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素または他の適当な気体)の使用により、加圧バックまたはネブライザーから、エアゾール噴霧剤の形態で簡便に送達されうる。加圧エアゾールの場合、一定量を送達するための弁を設けることにより投与単位が定められうる。吸入器または通気器において使用されるカプセル剤およびカートリッジ剤(例えばゼラチンから構成されるもの)は、該化合物と適当な粉末基剤(例えば、ラクトースまたはデンプン)との粉末混合物を含有するよう製剤化されうる。

【0375】

第2の治療用物質、例えばサイトカイン、ステロイド、化学療法剤、抗生物質または放射線による共投与または治療のための方法は当技術分野で公知である（例えば、Hardmanら、(編) (2001) GoodmanおよびGilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10.sup.th ed., McGraw-Hill, New York, N.Y.; PooleおよびPeterson (編) (2001) Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.; ChabnerおよびLongo (編) (2001) Cancer Chemotherapy and Biotherapy, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.を参照されたい）。治療用物質の有効量は、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも約30%、少なくとも40%または少なくとも50%、症状を軽減しうる。

【0376】

本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質と組合せて投与されうる追加的な療法（例えば、予防用または治療用因子）は、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質から5分未満を隔てて、30分未満を隔てて、1時間未満を隔てて、約1時間を隔てて、約1～約2時間を隔てて、約2時間～約3時間を隔てて、約3時間～約4時間を隔てて、約4時間～約5時間を隔てて、約5時間～約6時間を隔てて、約6時間～約7時間を隔てて、約7時間～約8時間を隔てて、約8時間～約9時間を隔てて、約9時間～約10時間を隔てて、約10時間～約11時間を隔てて、約11時間～約12時間を隔てて、約12時間～18時間を隔てて、18時間～24時間を隔てて、24時間～36時間を隔てて、36時間～48時間を隔てて、48時間～52時間を隔てて、52時間～60時間を隔てて、60時間～72時間を隔てて、72時間～84時間を隔てて、84時間～96時間を隔てて、または96時間～120時間を隔てて投与されうる。それらの2以上の療法は患者の1回の同じ来院時に投与されうる。

【0377】

本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質およびその他の療法は周期的に投与されうる。周期的 (cycling) 療法は、ある期間にわたる第1療法（例えば、第1の予防用または治療用因子）の投与、およびそれに続く、ある期間にわたる第2療法（例えば、第2の予防用または治療用因子）の投与、および場合によってはそれに続く、ある期間にわたる第3療法（例えば、予防用または治療用因子）などの投与、ならびにこの連続的投与の反復を含み、該周期は、それらの療法の1つに対する耐性の発生を低減するため、および／またはそれらの療法の1つの副作用を回避または軽減するため、および／またはそれらの療法の効力を改善するためのものである。

【0378】

ある実施形態においては、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質は、in vivoにおける適切な分布が確保されるよう製剤化されうる。例えば、血液-脳関門 (BBB) は多数の高親水性化合物を排除する。本発明の治療用化合物が（所望により）BBBを通過することを保証するために、それらは例えばリポソーム中に製剤化されうる。リポソームの製造方法に関しては、例えば、米国特許第4,522,811号、第5,374,548号および第5,399,331号を参照されたい。リポソームは、標的化薬物送達を促進するよう特定の細胞または器官へ選択的に輸送される1以上の部分を含みうる（例えば、V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685を参照されたい）。典型的な標的化部分には、ホラートまたはジオチン（例えば、Lowらの米国特許第5,416,016号を参照されたい）；マンノシド (Umezawaら, (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038)；抗体 (P.G. Bloemanら, (1995) FEBS Lett. 357:140; M. Owaisら, (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180)；界面活性剤プロテインA受容体 (Briscoeら, (1995) Am. J. Physiol. 1233:134)；p120 (Schreierら, (1994) J. Biol. Chem. 269:9090) (K. Keinänen; M.L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123; J.J. Killian; I.J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273も参照されたい) が含まれる。

【0379】

本発明は、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質を含む医薬組成物を、単独でまたは他の療法と組合せて、それを要する対象に投与するための方法を提供する。本発明の組合せ療法の療法（例えば、予防用または治療用因子）は同時または連続的に対象に

投与されうる。本発明の組合せ療法の療法（例えば、予防用または治療用因子）は周期的にも投与されうる。周期的（cycling）療法は、ある期間にわたる第1療法（例えば、第1の予防用または治療用因子）の投与、およびそれに続く、ある期間にわたる第2療法（例えば、第2の予防用または治療用因子）の投与、ならびにこの連続的投与の反復を含み、該周期は、それらの療法（例えば、因子）の1つに対する耐性の発生を低減するため、および／またはそれらの療法（例えば、因子）の1つの副作用を回避または低減するため、および／またはそれらの療法の効力を改善するためのものである。

【0380】

本発明の組合せ療法の療法（例えば、予防用または治療用因子）は同時に対象に投与されうる。「同時」なる語は、厳密に同一時点での療法（例えば、予防用または治療用因子）の投与に限定されるものではなく、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質がその他の療法と共に作用して、それらがそれ以外の状態で投与された場合に比べて増加した利益をもたらするように或る順序および時間間隔で、本発明の多重特異性エピトープ結合性タンパク質を含む医薬組成物が対象に投与されることを意味する。例えば、各療法は、同時に、または異なる時点においていずれかの順序で連続的に対象に投与されうるが、それらは、所望の治療または予防効果が得られるよう時間的に十分に接近して投与されるべきである。各療法は、任意の適当な形態および任意の適当な経路で、別々に対象に投与されうる。種々の実施形態においては、該療法（例えば、予防用または治療用因子）は、15分未満を隔てて、30分未満を隔てて、1時間未満を隔てて、約1時間を隔てて、約1～約2時間を隔てて、約2時間～約3時間を隔てて、約3時間～約4時間を隔てて、約4時間～約5時間を隔てて、約5時間～約6時間を隔てて、約6時間～約7時間を隔てて、約7時間～約8時間を隔てて、約8時間～約9時間を隔てて、約9時間～約10時間を隔てて、約10時間～約11時間を隔てて、約11時間～約12時間を隔てて、24時間を隔てて、48時間を隔てて、72時間を隔てて、または1週間を隔てて、対象に投与されうる。他の実施形態においては、2以上の療法（例えば、予防用または治療用因子）は患者の同一来院時に投与されうる。

【0381】

該組合せ療法の予防用または治療用因子は同一医薬組成物中で対象に投与されうる。あるいは、該組合せ療法の予防用または治療用因子は別々の医薬組成物中で同時に対象に投与されうる。該予防用または治療用因子は、同じまたは異なる投与経路により対象に投与されうる。

【0382】

T. キット

本発明の範囲内には、本発明の組成物（例えば、多重特異性エピトープ結合性タンパク質）と使用説明とを含むキットも含まれる。該キットは更に、少なくとも1つの追加的試薬または1以上の本発明の追加的多重特異性エピトープ結合性タンパク質を含有しうる。キットは、典型的には、該キットの内容物の意図される用途を示すラベルを含む。ラベルなる語は、該キット上で若しくは該キットと共に供給されるまたは該キットに付随するいずれかの文書または記録部材を含む。

【0383】

均等物

当業者は、本明細書に記載されている本発明の特定の実施形態に対する多数の均等物を認識し、またはごく通常の実験によりそれを確認しうるであろう。そのような均等物は以下の特許請求の範囲に含まれると意図される。

【0384】

本明細書に挙げられている全ての刊行物、特許および特許出願を、それぞれの個々の刊行物、特許または特許出願が参照により本明細書に組み入れられると明示的かつ個別に示されているのと同様に、参照により本明細書に組み入れることとする。

【0385】

U. 特定の実施形態

1. 第1および第2ポリペプチド鎖を含んでなる単離された多重特異性エピトープ結合性

タンパク質であって、該第1および／または第2鎖が少なくとも2つのエピトープ結合性ドメイン（EBD）および1以上のFc領域を含む、タンパク質。

【0386】

2. 該第1鎖が、少なくとも1つのEBDのN末端側に連結された1以上のFc領域を含む、実施形態1記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0387】

3. 該第1鎖が、N末端からC末端へと、1以上のFc領域-EBD-EBDとして配置されたドメインおよびFc領域を含む、実施形態2記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0388】

4. 該第1鎖が、N末端からC末端へと、EBD-1以上のFc領域-EBDとして配置されたドメインおよびFc領域を含む、実施形態2記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0389】

5. 該第1鎖が、少なくとも1つのEBDのC末端側に連結された1以上のFc領域を含む、実施形態1記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0390】

6. 該第1鎖が、N末端からC末端へと、EBD-EBD-1以上のFc領域として配置されたドメインおよびFc領域を含む、実施形態5記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0391】

7. 該第1鎖が、N末端からC末端へと、EBD-1以上のFc領域-EBD-EBDとして配置されたドメインおよびFc領域を含む、実施形態5記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0392】

8. 該第2鎖が、少なくとも1つのEBDのN末端側に連結された1以上のC κ またはC λ 領域を含む、実施形態1記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0393】

9. 該第2鎖が、少なくとも1つのEBDのC末端側に連結された1以上のC κ またはC λ 領域を含む、実施形態1記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0394】

10. 該第1および／または第2鎖が少なくとも3つのEBDを含む、実施形態1記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0395】

11. 該第1および／または第2鎖が少なくとも4つのエピトープ結合性ドメインEBDを含む、実施形態10記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0396】

12. 各Fc領域が少なくとも3つのEBDのN末端側に連結されている、実施形態10または11記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0397】

13. 該ドメインおよびFc領域がN末端からC末端へと、1以上のFc領域-EBD-EBD-EBDとして配置されている、実施形態12記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0398】

14. 該ドメインおよびFc領域がN末端からC末端へと、1以上のFc領域-EBD-EBD-EBD-EBDとして配置されている、実施形態12記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0399】

15. 各Fc領域が少なくとも1つのEBDのC末端側に連結されている、実施形態10または11記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0400】

16. 該ドメインおよびFc領域がN末端からC末端へと、EBD-EBD-EBD-1以上のFc領域として配置されている、実施形態15記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0401】

17. 該ドメインおよびFc領域がN末端からC末端へと、EBD-EBD-EBD-EBD-1以上のFc領域として配置されている、実施形態16記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0402】

18. 各Fc領域が少なくとも1つのEBDのN末端側におよび少なくとも1つのEBDのC末端側に連結されている、実施形態10または11記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

10

【0403】

19. 該ドメインおよびFc領域がN末端からC末端へと、少なくとも1つのEBD-1以上のFc領域-少なくとも1つのEBDとして配置されている、実施形態18記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0404】

20. 該ドメインおよびFc領域がN末端からC末端へと、EBD-EBD-1以上のFc領域-EBDとして配置されている、実施形態18記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

20

【0405】

21. 該ドメインおよびFc領域がN末端からC末端へと、EBD-EBD-1以上のFc領域-EBD-EBD-EBDとして配置されている、実施形態18記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0406】

22. 該ドメインおよびFc領域がN末端からC末端へと、EBD-EBD-EBD-1以上のFc領域-EBDとして配置されている、実施形態18記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0407】

23. 該ドメインおよびFc領域がN末端からC末端へと、EBD-EBD-1以上のFc領域-EBD-EBDとして配置されている、実施形態18記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

30

【0408】

24. 該ドメインおよびFc領域がN末端からC末端へと、EBD-1以上のFc領域-EBD-EBD-EBDとして配置されている、実施形態18記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0409】

25. 該第1ポリペプチド鎖が、N末端からC末端へと、scFv-scFv-Fc領域-scFvとして配置された3つのscFvおよびFc領域を含み、また該第2ポリペプチド鎖が、N末端からC末端へと、scFv-scFv-Fc領域-scFvとして配置された3つのscFvおよびFc領域を含む、実施形態10記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

40

【0410】

26. 該第1ポリペプチド鎖が、N末端からC末端へと、scFv-scFv-Fc領域-scFv-scFvとして配置された4つのscFvおよびFc領域を含み、また該第2ポリペプチド鎖が、N末端からC末端へと、scFv-scFv-Fc領域-scFv-scFvとして配置された4つのscFvおよびFc領域を含む、実施形態11記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0411】

27. 該タンパク質が第1および第2鎖を含み、

a. 該第1鎖が、N末端からC末端へと、scFv-抗体可変領域-Fc領域として配置されたscFv、抗体可変領域およびFc領域を含み、

50

b. 該第2鎖が、N末端からC末端へと、抗体可変領域-C κ またはC λ として配置された抗体可変領域およびCカップ／ラムダ領域を含む、実施形態1記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0412】

28. 該タンパク質が第1および第2鎖を含み、

a. 該第1鎖が、N末端からC末端へと、抗体可変領域-Fc領域として配置された抗体可変領域およびFc領域を含み、

b. 該第2鎖が、N末端からC末端へと、scFv-抗体可変領域-C κ またはC λ として配置されたscFv、抗体可変領域およびCカップ／ラムダ領域を含む、実施形態1記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

10

【0413】

29. 該タンパク質が第1および第2鎖を含み、

a. 該第1鎖が、N末端からC末端へと、scFv-抗体可変領域-Fc領域として配置されたscFv、抗体可変領域およびFc領域を含み、

b. 該第2鎖が、N末端からC末端へと、scFv-抗体可変領域-C κ またはC λ として配置されたscFv、抗体可変領域およびCカップ／ラムダ領域を含む、実施形態1記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0414】

30. 少なくとも2つのEBDが少なくとも1つのFc領域のC末端側に連結されている、実施形態27～29のいずれか1項記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

20

【0415】

31. 該タンパク質が抗体重鎖および抗体軽鎖を含む、実施形態27～30のいずれか1項記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0416】

32. 第1および第2ポリペプチド鎖を含んでなる多重特異性エピトープ結合性タンパク質であって、該第1および／または第2鎖が少なくとも2つのEBDおよび1以上のCH1ドメインを含む、多重特異性エピトープ結合性タンパク質。

【0417】

33. 該タンパク質がCカップ／ラムダドメインを更に含む、実施形態32記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

30

【0418】

34. 該第1鎖が、N末端からC末端へと、scFv-CH1-scFvとして配置されたCH1ドメインに連結された2つのscFvを含み、該第2鎖が、N末端からC末端へと、scFv-Cカップ／ラムダ-scFvとして配置されたCカップ／ラムダドメインに連結された2つのscFvを含む、実施形態33記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0419】

35. 該第1および／または第2鎖が抗体ヒンジドメインの全部または一部を含む、実施形態34記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0420】

36. 該第1および第2ポリペプチド鎖がジスルフィド結合により連結されている、実施形態35記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

40

【0421】

37. 少なくとも第1および第2鎖を含んでなる多重特異性エピトープ結合性タンパク質であって、該第1鎖が2つの可変ドメインおよびC κ またはC λ ドメインを含み、該第2鎖が2つの可変ドメイン、CH1、ヒンジ、CH2およびCH3ドメインを含み、ここで、該第1鎖内の可変ドメインが該第2鎖内の可変ドメインに結合し少なくとも2つの異なるエピトープ結合性部位を形成している、多重特異性エピトープ結合性タンパク質。

【0422】

38. 該第1鎖が、N末端からC末端へと配置された第1エピトープおよび第2エピトープに特異的な可変ドメインを含み、該第2鎖が、N末端からC末端へと配置された第1および第2

50

エピトープに特異的な可変ドメインを含む、実施形態37記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0423】

39. 第1および第2鎖を含んでなる多重特異性エピトープ結合性タンパク質であって、該第1鎖が少なくとも2つの抗体可変ドメインおよび少なくとも1つのCH1および／またはC kappa／ラムダドメインを含み、ここで、該第1鎖内の可変ドメインが該第2鎖内の可変ドメインに結合し少なくとも2つの異なるエピトープ結合性部位を形成している、多重特異性エピトープ結合性タンパク質。

【0424】

40. 該第1鎖が抗体重鎖可変ドメイン（VH）、CH1ドメイン、抗体軽鎖可変ドメイン（VL）およびC kappa／ラムダドメインを含む、実施形態39記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。 10

【0425】

41. 該第1鎖がN末端からC末端へと、VH-CH1-VL-C kappa／ラムダとして構成されている、実施形態40記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0426】

42. 該第1鎖がN末端からC末端へと、VL-C kappa／ラムダ-VH1-CH1として構成されている、実施形態40記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0427】

43. 該第1鎖が2つの抗体重鎖可変ドメイン（VH）および2つのCH1ドメインを含む、実施形態39記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。 20

【0428】

44. 該第1鎖がN末端からC末端へと、VH-CH1-VH-CH1として構成されている、実施形態43記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0429】

45. 該第1鎖が2つの抗体軽鎖可変ドメイン（VL）および2つのC kappa／ラムダドメインを含む、実施形態39記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0430】

46. 該第1鎖がN末端からC末端へと、VL-C kappa／ラムダ-VL-C kappa／ラムダとして構成されている、実施形態45記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。 30

【0431】

47. 該第1鎖がFc領域を更に含む、実施形態39～46のいずれか1項記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0432】

48. 該第2鎖がFc領域を含まない、実施形態39～46のいずれか1項記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0433】

49. 少なくとも第1および第2ポリペプチド鎖を含んでなる逆転抗体タンパク質であって、該第1鎖が、CH1ドメインに連結された少なくとも1つの抗体重鎖可変領域（VH）を含み、該第2鎖が、C kappa／ラムダドメインに連結された抗体軽鎖可変領域（VL）を含み、該C kappa／ラムダ領域が更にFc領域に連結されており、ここで、該第1鎖内の可変領域が該第2鎖内の可変領域に結合しエピトープ結合性部位を形成している、逆転抗体タンパク質。 40

【0434】

50. 該第1鎖が該第2鎖にジスルフィド結合している、実施形態49記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0435】

51. 抗体様軽鎖および抗体様重鎖を含んでなる多重特異性エピトープ結合性タンパク質であって、該軽鎖が2つの可変ドメインおよびC kappaまたはC lambdaドメインを含み、該重鎖が2つの可変ドメイン、CH1、ヒンジ、CH2およびCH3ドメインを含み、ここで、該軽鎖内の可変 50

ドメインが該重鎖内の可変ドメインに結合し少なくとも2つの異なるエピトープ結合性部位を形成している、多重特異性エピトープ結合性タンパク質。

【0436】

52. 該軽鎖が、N末端からC末端へと配置された、第1エピトープおよび第2エピトープに特異的な可変ドメインを含み、該重鎖が、N末端からC末端へと配置された、該第1および第2エピトープに特異的な可変ドメインを含む、実施形態51記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0437】

53. 該タンパク質が、少なくとも2つの連結されたEBDを更に含む、実施形態52記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

10

【0438】

54. 少なくとも1つのEBDが該重鎖のC末端に連結されている、実施形態53記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0439】

55. 少なくとも1つのEBDが該軽鎖のN末端に連結されている、実施形態53記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0440】

56. 少なくとも1つのEBDが該重鎖のN末端に連結されている、実施形態53記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0441】

57. 抗体軽鎖および抗体重鎖を含んでなる多重特異性エピトープ結合性タンパク質であって、該重鎖が、少なくとも2つの連結されたEBDを更に含む、多重特異性エピトープ結合性タンパク質。

20

【0442】

58. 少なくとも1つのEBDが該重鎖のC末端に連結されている、実施形態57記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0443】

59. 少なくとも1つのEBDが該重鎖のN末端に連結されている、実施形態57記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0444】

60. 少なくとも1つのEBDが該重鎖のN末端およびC末端に連結されている、実施形態57記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

30

【0445】

61. 第1および第2ポリペプチド鎖を含んでなる多重特異性エピトープ結合性タンパク質であって、該第1および／または第2鎖が少なくとも3つのEBDを含み、該第1鎖がC κ またはC λ ドメインを含み、該第2鎖がCH1ドメインを含む、多重特異性エピトープ結合性タンパク質。

【0446】

62. 図1～5のいずれか1つに示される構造形態を含んでなる多重特異性エピトープ結合性タンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

40

【0447】

63. 各EBDが同一エピトープに特異的である、実施形態1～24、30～36、または53～61のいずれか1項記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0448】

64. 少なくとも2つのEBDが、異なるエピトープに特異的である、実施形態1～24、30～36、または53～61のいずれか1項記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0449】

65. 各エピトープが同一抗原上に位置する、実施形態63または64記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

50

【0450】

66. 各エピトープが、異なる抗原上に位置する、実施形態65記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0451】

67. 2以上のEBDが同一エピトープに特異的である、実施形態1～24、30～36、または53～61のいずれか1項記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0452】

68. 該タンパク質が、哺乳動物に投与された際またはin vitroにおいて、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つのエピトープに同時に結合できる、実施形態1～67のいずれか1項記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。 10

【0453】

69. 少なくとも1つのEBDが、同一の単離された機能性EBDよりも低いアフィニティでエピトープに特異的に結合する、実施形態1～24、30～36、または53～61のいずれか1項記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0454】

70. 該EBDが、最もN末端側のEBD、N末端から2番目のEBDおよびN末端から3番目のEBDよりなる群から選ばれる、実施形態69記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。 20

【0455】

71. 少なくとも1つのEBDが、scFv、一本鎖ダイアボディ、抗体模倣体（mimetic）および抗体可変ドメインよりなる群から選ばれる、実施形態1～24、30～36、53～61、63～67および69～70のいずれか1項記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。 30

【0456】

72. 該抗体模倣体が、ミニボディ（minibody）、マキシボディ（maxybody）、アビマー（avimer）、Fn3に基づくタンパク質スカフォールド、アンクリンリピート、VASPポリペプチド、鳥類臍ポリペプチド（aPP）、テトラネクチン（Tetranectin）、アフィリリン（affililin）、ノッチン（knottin）、SH3、PDZドメイン、プロテインAドメイン、リポカリン（lipocalin）、トランスフェリンおよびクニツ（kunitz）ドメインよりなる群から選ばれる、実施形態71記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。 30

【0457】

73. 該タンパク質が、異なる細胞表面受容体に特異的に結合し、該細胞表面受容体を阻害しおよび／または中和する、実施形態1～72のいずれか1項記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0458】

74. 該細胞表面受容体が同一の受容体である、実施形態73記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0459】

75. 該細胞表面受容体が同一の受容体ではない、実施形態74記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。 40

【0460】

76. 該タンパク質が、異なる可溶性リガンドに特異的に結合し、該リガンドを阻害しおよび／または中和する、実施形態1～75のいずれか1項記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0461】

77. 該可溶性リガンドが同一である、実施形態76記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0462】

78. 該可溶性リガンドが同一ではない、実施形態76記載のタンパク質（または本発明の 50

いずれかのタンパク質)。

【0463】

79. 該タンパク質が、異なる標的タンパク質に特異的に結合し、該標的タンパク質を抑制しおよび／または中和する、実施形態1〜78のいずれか1項記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0464】

80. 該標的タンパク質が同一である、実施形態79記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0465】

81. 該標的タンパク質が同一ではない、実施形態79記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

10

【0466】

82. 少なくとも1つのEBDが、該タンパク質から単離された同一EBDの機能活性を保持する、実施形態1〜24、30〜36、53〜61、63〜67および69〜70のいずれか1項記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0467】

83. 該タンパク質が、該タンパク質から単離された各EBDを含む組成物と少なくとも同等の機能活性を有する、実施形態1〜24、30〜36、53〜61、63〜67および69〜70のいずれか1項記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0468】

84. 該タンパク質が、該タンパク質から単離された各EBDを含む組成物よりも高い機能活性を有する、実施形態1〜24、30〜36、53〜61、63〜67および69〜70のいずれか1項記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

20

【0469】

85. 該タンパク質が、該タンパク質から単離された各EBDを含む組成物と比べて50%低い機能活性を有する、実施形態1〜24、30〜36、53〜61、63〜67および69〜70のいずれか1項記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0470】

86. 該タンパク質が、T細胞、B細胞、マスト細胞、好酸球、好塩基球、好中球、樹状細胞、単球、マクロファージおよび腫瘍細胞よりなる群から選ばれる細胞集団を枯渇させる機能活性を有する、実施形態1〜85のいずれか1項記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

30

【0471】

87. 該タンパク質が、T細胞、B細胞、マスト細胞、好酸球、好塩基球、好中球、樹状細胞、単球、マクロファージおよび腫瘍細胞よりなる群から選ばれる細胞の増殖を阻害または低減させる機能活性を有する、実施形態1〜85のいずれか1項記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0472】

88. 該タンパク質が、T細胞、B細胞、マスト細胞、好酸球、好塩基球、好中球、樹状細胞、単球、マクロファージおよび腫瘍細胞よりなる群から選ばれる細胞からの炎症伝達物質の分泌を阻害または低減させる機能活性を有する、実施形態1〜85のいずれか1項記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

40

【0473】

89. 該タンパク質が、T細胞、マスト細胞、好酸球、好塩基球、好中球、単球およびマクロファージよりなる群から選ばれる細胞からの細胞質顆粒の分泌を阻害または低減させる機能活性を有する、実施形態1〜85のいずれか1項記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0474】

90. 該タンパク質が、T細胞、B細胞、マスト細胞、好酸球、好塩基球、好中球、樹状細胞、単球、マクロファージおよび腫瘍細胞よりなる群から選ばれる細胞における活性化刺

50

激に対する応答を阻害または低減させる機能活性を有する、実施形態1～85のいずれか1項記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0475】

91. 該タンパク質が、1以上のエピトープの結合によりタンパク質を活性化する機能活性を有する、実施形態1～85のいずれか1項記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0476】

92. 該タンパク質が、1以上のエピトープの結合によりタンパク質を不活性化する機能活性を有する、実施形態1～85のいずれか1項記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0477】

93. 該タンパク質が、哺乳動物に投与された場合またはin vitroにおいてエフェクター機能を有する、実施形態1～85のいずれか1項記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0478】

94. 該エフェクター機能が抗体依存性細胞傷害である、実施形態93記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0479】

95. 該エフェクター機能が補体依存性細胞傷害である、実施形態93記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0480】

96. 実施形態1～95のいずれか1項記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）またはそのエピトープ結合性部分をコードする単離された核酸分子。

【0481】

97. 実施形態96記載の核酸分子を含んでなる発現ベクター。

【0482】

98. 実施形態97記載の発現ベクターを含んでなる宿主細胞。

【0483】

99. 実施形態1～95のいずれか1項記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）の製造方法であって、該製造方法が該タンパク質の規模拡張可能な製造プロセスを含んでなり、そのような規模拡張可能な製造プロセスが約10mg/L～約300mg/Lの該タンパク質の製造効率をもたらし、該タンパク質が少なくとも1つの機能活性を保持する、製造方法。

【0484】

100. 該製造プロセスから製造されたタンパク質が、HPSECによる測定で5重量%以下のタンパク質の凝集レベルを示す、実施形態99記載の製造方法。

【0485】

101. 該製造プロセスにより製造されたタンパク質が、rCGEによる測定で5重量%以下のタンパク質の凝集レベルを示す、実施形態99記載の製造方法。

【0486】

102. 該製造プロセスにより製造されたタンパク質が、HPSECによる測定で、無傷の該タンパク質に相当するピークにおける全ピーク面積の80%以上により示される低レベルの断片化を示す、実施形態99記載の製造方法。

【0487】

103. 実施形態1～95のいずれか1項記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）を含んでなる液体製剤であって、該製剤がHPSECによる測定で5重量%以下のタンパク質の凝集レベルを示す、液体製剤。

【0488】

104. 実施形態1～95のいずれか1項記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）を含んでなる液体製剤であって、該製剤がrCGEによる測定で5重量%以下のタン

10

20

30

40

50

パク質の凝集レベルを示す、液体製剤。

【0489】

105. 実施形態1～95のいずれか1項記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）を含んでなる液体製剤であって、該製剤が、HPSECによる測定で、無傷の該タンパク質に相当するピークにおける全ピーク面積の80%以上として示される低レベルの断片化を示す、液体製剤。

【0490】

106. 製薬上許容される賦形剤中に実施形態1～95のいずれか1項記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）の治療的有効量を含んでなる無菌製剤。

【0491】

107. 癌またはその症状の改善、治療または予防方法であって、それを要する患者に、実施形態106記載の製剤を投与することによる方法。

【0492】

108. 該癌が、頭部、頸部、眼、口、喉、食道、胸部、骨、肺、結腸、直腸、結腸直腸、胃、脾臓、腎臓部、骨格筋、皮下組織、転移性メラノーマ、子宮内膜、前立腺、乳房、卵巣、精巣、皮膚、甲状腺、血液、リンパ節、腎臓、肝臓、膵臓、脳または中枢神経系の癌である、実施形態107記載の方法。

【0493】

109. 好酸球、好塩基球、好中球、T細胞、B細胞、マスト細胞、単球および腫瘍細胞よりなる群から選ばれる細胞集団を、哺乳動物において枯渇させる方法であって、該細胞を実施形態106記載の製剤と接触させることを含んでなる方法。

【0494】

110. 哺乳動物中の該病原体を実施形態106記載の製剤と接触させることを含んでなる、病原体を殺すかまたは標的化する方法。

【0495】

111. 哺乳動物中のサイトカインを実施形態106記載の製剤と接触させることを含んでなる、サイトカインを不活性化し、阻害し、または枯渇させる方法。

【0496】

112. 該サイトカインがC5aである、実施形態111記載の方法。

【0497】

113. 実施形態106記載の製剤を投与することによる、必要のある患者における炎症または自己免疫疾患の予防、治療、管理または診断方法。

【0498】

114. 実施形態106記載の製剤を投与することによる、必要のある患者における血管新生の抑制方法。

【0499】

115. 該患者が癌、関節リウマチ、SLEまたはシェーグレン症候群を有する、実施形態113または114記載の方法。

【0500】

116. 該タンパク質が、哺乳動物に投与された場合またはin vitroで細胞の集団を同定しおよび／または枯渇させるものであり、該細胞が、異なる細胞表面エピトープの発現により規定され、そのような異なる細胞表面エピトープは該タンパク質の少なくとも1つのエピトープ結合性ドメインに選択的に結合する、実施形態1～95のいずれか1項記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0501】

117. 該細胞集団が、腫瘍細胞、癌幹細胞、B細胞およびT細胞よりなる群から選ばれる、実施形態116記載のタンパク質（または本発明のいずれかのタンパク質）。

【0502】

118. 該タンパク質が、腫瘍細胞上に提示される細胞表面抗原群に特異的なエピトープ結合性ドメインを含む、実施形態1～95のいずれか1項記載のタンパク質（または本発明の

10

20

30

40

50

いずれかのタンパク質)。

【0503】

119. 該細胞表面抗原群が同時には提示されない、実施形態118記載のタンパク質 (または本発明のいずれかのタンパク質)。

【0504】

120. 該タンパク質が哺乳動物に投与される場合、少なくとも1つのエピトープ結合性ドメインが関与する場合に該タンパク質が腫瘍細胞に対する抗体エフェクター機能を惹起する、実施形態118または119記載のタンパク質 (または本発明のいずれかのタンパク質)。

【0505】

121. 該タンパク質が少なくとも1つのエピトープ結合性ドメインを含み、該タンパク質が哺乳動物に投与された場合またはin vitroにおいて、該結合性ドメインが、細胞に送達されるべき積荷 (cargo) 分子に特異的である、実施形態1~95のいずれか1項記載のタンパク質 (または本発明のいずれかのタンパク質)。

10

【0506】

122. 該積荷分子が、細胞毒性薬、代謝拮抗物質、毒素、ペプチド、DNA分子、RNA分子、小分子、放射性同位体、発蛍光団、酵素、酵素インヒビター、プロドラッグまたはミトコンドリア毒よりなる群から選ばれる、実施形態121記載のタンパク質 (または本発明のいずれかのタンパク質)。

【0507】

123. 該タンパク質が、該細胞に結合するとインターナリゼーションされる、実施形態121または122記載のタンパク質 (または本発明のいずれかのタンパク質)。

20

【0508】

124. 積荷分子に特異的なエピトープ結合性ドメインが、約pH7.4において該積荷分子に対する高い結合アフィニティを示し、約pH6.0において該積荷分子に対する低い結合アフィニティを示す、実施形態121~123のいずれか1項記載のタンパク質 (または本発明のいずれかのタンパク質)。

【0509】

125. 標的細胞集団を同定し、枯渇させ、活性化し、または抑制する方法であって、実施形態1~95のいずれか1項記載のタンパク質 (または本発明のいずれかのタンパク質) を、哺乳動物に投与された場合またはin vitroにおいて、標的細胞集団と接触させることを含んでなり、ここで該タンパク質が非標的細胞集団を有意に枯渇させず、活性化せず、または抑制しない、方法。

30

【0510】

126. 該タンパク質が、対照エピトープ結合性タンパク質よりも増加した、標的細胞集団に対するアビディティを示し、ここで該対照エピトープ結合性タンパク質が、

a. 該多重特異性エピトープ結合性タンパク質中に存在するエピトープ結合性ドメインのサブセット、または

b. 該多重特異性エピトープ結合性タンパク質中に存在する少なくとも1つの単離されたエピトープ結合性ドメイン

のいずれかを含む、実施形態125記載の方法。

40

【0511】

127. 該サブセットが、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、または少なくとも8つのエピトープ結合性ドメインを含む、実施形態126記載の方法。

【0512】

128. 該標的細胞が、癌細胞、癌幹細胞、T細胞、B細胞、メラノーマ細胞、リンパ腫細胞、腫瘍細胞、プレB細胞、プレT細胞、好塩基球、単球およびマクロファージよりなる群から選ばれる、実施形態125~127のいずれか1項記載の方法。

【0513】

129. 実施形態1~95または116~124のいずれか1項記載のタンパク質 (または本発明の

50

いずれかのタンパク質)を使用する、患者における急性または慢性疾患の予防、管理、治療または診断方法。

【0514】

130. 実施形態107~115または125~128のいずれか1項記載の方法を使用する、患者における急性または慢性疾患の予防、管理、治療または診断方法。

【0515】

131. アブリン、ブルシン、シクトキシン、ジフテリア毒素、ボツリヌス毒素、志賀毒素、内毒素、破傷風毒素、百日咳毒素、炭疽毒素、コレラ毒素、ファルカリノール (falc arinol)、アルファ毒素、ゲルダナマイシン (geldanamycin)、ゲロニン、ロタウストラリン (lotaustralin)、リシン、ストリキニーネ、ヘビ毒毒素およびテトラドトキシンよりなる群から選ばれる1以上の物質への曝露に関連した毒性を低減するための、哺乳動物における実施形態1~95または116~124のいずれか1項記載のタンパク質 (または本発明のいずれかのタンパク質) の使用方法。

10

【0516】

132. 実施形態1~95または116~124のいずれか1項記載のタンパク質 (または本発明のいずれかのタンパク質) を使用して、溶液から少なくとも1つの可溶性化合物を検出および/または精製する方法。

【0517】

133. 該溶液が体液、細胞培養培地、発酵培養液、生物学的サンプルまたは飲料水である、実施形態132記載の方法。

20

【0518】

134. 該体液が、血液、汗、リンパ液、尿、涙、胆汁、唾液、血清、羊水、耳脂 (耳垢)、カウパー液、精液、乳び、び汁、脳脊髄液、糞便、糞便水、腓液、滑液、眼房水、腸液、母乳、粘液、胸水、膿、皮脂および嘔吐物よりなる群から選ばれる、実施形態133記載の方法。

【0519】

135. 実施形態1~95または116~124のいずれか1項記載のタンパク質 (または本発明のいずれかのタンパク質) を使用する、哺乳動物におけるサイトカインストームの毒性の低減方法。

【0520】

136. 実施形態1~95または116~124のいずれか1項記載のタンパク質 (または本発明のいずれかのタンパク質) を使用する、哺乳動物における療法誘発性毒性の低減方法であって、該療法が生物学的療法である、方法。

30

【0521】

137. 該タンパク質が、該生物学的療法に由来する少なくとも1つのエピトープ結合性ドメインを含む、実施形態136記載の方法。

【0522】

138. 該タンパク質が、該生物学的療法の少なくとも1つの成分と競合する少なくとも1つのエピトープ結合性ドメインを含む、実施形態136記載の方法。

【0523】

139. 該タンパク質が、哺乳動物に投与された場合に少なくとも1日の半減期を示す、実施形態1~95または116~124のいずれか1項記載のタンパク質 (または本発明のいずれかのタンパク質) 。

40

【0524】

140. 該Fc領域が少なくとも1つの追加的ドメインに直接的に連結されている、実施形態1~95または116~124のいずれか1項記載のタンパク質 (または本発明のいずれかのタンパク質) 。

【0525】

141. 該Fc領域が少なくとも1つの追加的ドメインに間接的に連結されている、実施形態1~95または116~124のいずれか1項記載のタンパク質 (または本発明のいずれかのタンパ

50

ク質)。

【0526】

また、以下の米国仮特許出願の全体を、あらゆる目的で、参照により本明細書に組み入れることとする：2007年7月31日付け出願の60/935,199、2007年12月10日付け出願の61/012,656、および2008年6月20日付け出願の61/074,330。

【実施例】

【0527】

7. 実施例

以下の実施例は本発明を単に例示するためのものであり、本発明を何ら限定するものではないと意図される。

【0528】

実施例1. Fc領域に融合されたscFvドメインを含むタンパク質の発現

目的：Fc領域に連結されたscFvドメインを含むエピトープ結合性タンパク質の高レベル発現を実証すること。

【0529】

方法：293Fectin (商標) 試薬 (Invitrogen Cat. 51-0031) およびFreestyle (商標) 培地 (Invitrogen Cat. 12338) +10% ウシ胎児血清を該製造業者の推奨に従い使用して293F細胞をトランスフェクトするために、3F2-522-Fc領域および522-Fc領域をコードするベクターを使用する。トランスフェクション後の第3日に該細胞にフィードし、第6日に上清を回収する。該抗体の精製をプロテインAカラムにより行い、ついでPBS中への透析を行う。該タンパク質のサイズおよび相対純度を決定するために、タンパク質ゲル上の変性および非変性形態で該分子を評価する。

【0530】

結果：種々のタンパク質を (A) 非変性または (B) 変性条件に付したPAGEゲル実験の結果を図7に示す。レーン1および5は、1 μg/ウェルでローディングされた3F2-522-Fc領域 (Fc領域に連結された2つのscFvドメインの一例) を表す。レーン2および6は、4 μg/ウェルでローディングされた3F2-522-Fc領域を表す。レーン3および7は、1 μg/ウェルでローディングされたscFc-Fc領域タンパク質522-Fc (Fc領域に連結された1つのscFvの一例) を表す。レーン4および8は、4 μg/ウェルでローディングされた522-Fcを表す。レーンMは標準分子量マーカー (SeeBlue2 (商標)) を表す。該タンパク質の製造およびそれに続く精製は予想サイズの相当に純粋な産物を与えた。これらの結果は、タンパク質3F2-522scFv-Fcおよび522-Fcが、前記方法を用いて製造可能であり、均一状態にまで精製可能であることを示している。

【0531】

実施例2. 多重特異性結合性タンパク質は標的抗原に対する特異性を示す

目的：標的抗原への所定タンパク質の結合能を評価すること。

【0532】

方法：522-Fc領域および3F2-522-Fcの結合を評価するために、ELISAに基づく形態を用いた。一般には、EIA/RIA ELISAプレート (Costar cat. 3690) をPBS (pH 7.2) 中の50 μlの1 μg/mlの捕捉タンパク質でコーティングし、4°Cで一晩インキュベートした。翌日、秒間の振とう間隔により隔てられた1×PBST (1×PSB, 0.1% Tween 20) を使用する5つの分注/吸引洗浄工程に関してプログラムされたEl_x405自動プレート洗浄装置を使用して、該プレートを洗浄した。該プレートを、重ねた紙タオル上で叩いて乾燥させ、170 μlのブロッキングバッファー (1×PBST中の2% BSA w/v) で室温で1時間ブロッキングした。522-Fc領域および3F2-522-Fcを、別のプレート内でブロッキングバッファーで8ウェルにより、5 μg/mlから開始して力価測定し、そのブロッキングされたウェルELISAプレートに50 μlを加えた。室温で1時間のインキュベーション工程の後、El_x405自動プレート洗浄装置を使用して該プレートを再び洗浄し、叩いて乾燥させた。各ウェルに、50 μlの二次HRP標識抗体を加え、1時間インキュベートした。該プレートを洗浄し、180度回転させ、再び洗浄した。それらを叩いて乾燥させ、50 μlのSureBlue TMBペルオキシダーゼ (KPL cat. 52-0

10

20

30

40

50

0-03) を各ウェルに加え、約3分間にわたって現像した。該反応を50 μ l の0.2M H_2SO_4 で停止させ、ELISAシグナルを450nmで読み取った。(A)においては、捕捉タンパク質は $\alpha_v \beta_3$ インテグリンであり、(B)においては、捕捉タンパク質はEphA2または $\alpha_v \beta_3$ インテグリンであった。

【0533】

結果：エピトープ結合性タンパク質522-Fcおよび3F2-522-Fcを $\alpha_v \beta_3$ インテグリンおよびビオチン化EphA2-Fcへの結合能に関して分析した。その結果を図8Aに示す。3F2-522-Fcタンパク質の2つの異なるサンプルは、 $\alpha_v \beta_3$ インテグリン(該プレート上に固定化されているもの)および可溶性EphA2-Fcに同時に結合する能力を示した。該522-Fc領域タンパク質は該ビオチン化EphA2によっては検出されなかった。なぜなら、それは $\alpha_v \beta_3$ インテグリンのみに特異的であるからである。 $\alpha_v \beta_3$ インテグリンおよびEphA2に対する3F2-522-Fc領域タンパク質の二重特異性を分析した。その結果を図8Bに示す。EphA2または $\alpha_v \beta_3$ (該プレート上に固定化されているもの)を漸増濃度の可溶性3F2-522-Fc-ビオチンに結合させた。洗浄後、3F2-522-Fc-ビオチンの存在をストレプトアビジン結合試薬により検出した。漸増濃度において、該可溶性3F2-522-Fcは両方のプレート結合EphA2および $\alpha_v \beta_3$ インテグリンに特異的に結合する。これらの結果は、エピトープ結合性タンパク質3F2-522-Fc領域がEphA2および $\alpha_v \beta_3$ インテグリンの両方に結合できることを示している。

【0534】

実施例 3. Fc領域に融合したscFvドメインを含むエピトープ結合性タンパク質の高レベル発現

目的：Fc領域に融合したscFvドメインを含むエピトープ結合性タンパク質の高レベル発現を示す。

【0535】

方法：3つのエピトープ結合性タンパク質、EphA2に特異的な抗体(12G3H11)、EphAファミリーRTK(EA)に特異的なscFvおよびEphBファミリーRTK(EB)に特異的なscFvを合体させることにより、エピトープ結合性タンパク質P1を構築した。得られた構造を図3Cおよび3Dに開示する。

【0536】

293Fectin(商標)試薬(Invitrogen Cat. 51-0031)およびFreestyle(商標)培地(Invitrogen Cat. 12338)+10%ウシ胎児血清を該製造業者の推奨に従い使用して293F細胞をトランスフェクトするために、522-Fc領域、3F2-522-Fc領域、P1および12G3H11をコードするベクターを使用した。トランスフェクション後の第3日に該細胞をフィードし、第6日に上清を回収した。該エピトープ結合性タンパク質の精製をプロテインAカラムにより行い、ついでPBS中への透析を行う。該タンパク質のサイズおよび相対純度を決定するために、タンパク質ゲル上の変性および非変性形態で該分子を評価した。

【0537】

結果：一群の所定エピトープ結合性タンパク質のポリアクリルアミドゲル電気泳動からの結果を図9に示す。簡潔に説明すると、該タンパク質のそれぞれの精製サンプルをPAGEゲル上にローディングし泳動させ、ついでクーマシーブルーで染色した。示されているタンパク質は以下のとおりである：レーン1 - 522-Fc領域、レーン2 - 3F2-522-Fc領域、レーン3 - P1(構造の概要図は、図3C、Dを参照されたい)、レーン4 - F2-522-Fc、レーン5 - 12G3H11(EphA2に特異的な抗体)およびレーン6 - 3F2-522-Fc。該タンパク質の製造およびそれに続く精製は予想サイズの相当に純粋な産物を与えた。これらの結果は、図面および詳細な説明に記載されているようなエピトープ結合性タンパク質が、前記方法を用いて製造可能であり、均一状態にまで精製可能であることを示している。

【0538】

実施例 4. エピトープ結合性タンパク質P2のSEC精製

目的：サイズ排除クロマトグラフィーによるタンパク質組成の均一性を示すこと。

【0539】

方法：2つのエピトープ結合性タンパク質、EphA2に特異的な抗体(12G3H11)および一

本鎖ダイアボディ [一方はEphAファミリーRTK (EA) に特異的であり、他方はEphBファミリーRTK (EB) に特異的である、2組の可変領域を含むもの] を合体させることにより、エピトープ結合性タンパク質P2を構築した。得られた構造を図3Eおよび3Fに開示する。

【0540】

P2多重特異性エピトープ結合性タンパク質 (構造の概要図は、図3E、Fを参照されたい) をその大きなサイズに基づいて精製するために、該タンパク質をHi Prep 16/60 Sephacryl S-200カラム (Amersham cat. 17-1166-01) 上で移動させた。P2多重特異性エピトープ結合性タンパク質分子を4.3mg/mlで1mlの最終体積まで濃縮した。まず、Aktaプライマーを使用して、1×PBS中、1ml/分で1.5時間にわたってSECカラムを平衡化して、カラム貯蔵バッファーを除去した。該濃縮タンパク質を2mlのループ内に、ついでSECカラム上に注入した。該PBSバッファーを該カラム上に1ml/分で120分間にわたってローディングし、全実施で1mlの画分を集めた。

【0541】

結果：SECカラムからのP2タンパク質の溶出プロファイルを図10に示す。該軌跡は各カラム画分 (x軸) における相対タンパク質濃度を表す。結果は、P2多重特異性エピトープ結合性タンパク質が均一な単一物として溶出することを示している。

【0542】

実施例 5. エピトープ結合性タンパク質のカチオン交換クロマトグラフィープロファイル

目的：P1多重エピトープ結合性タンパク質のカチオン交換クロマトグラフィープロファイル

方法：イオン交換クロマトグラフィーによりP1タンパク質を精製した。約9.1のpIでは、pH6における該多重エピトープ結合性タンパク質は正味の正の電荷を有するであろう。種々の分子種を分離するために、強カチオン交換カラム (Amersham Cat. 17-5054-01) を使用した。20mM NaClを含有する50mM リン酸バッファー中で該カラムを平衡化した。平衡化後、該タンパク質をHitrap SP FFカラム上に1ml/分でローディングし、該カラムを3カラム体積の平衡化バッファーで洗浄した。該平衡化バッファーに関して、20mM NaClを含有する50mMリン酸バッファーへのAktaプライム上での100分間にわたる勾配溶出を準備した。種々のピークの、より良好なサンプリングを可能にするために、該勾配を種々の時点で保持した。全勾配にわたって画分を集めた。

【0543】

結果：カチオン交換カラムからのP1タンパク質の溶出プロファイルを図11に示す。該軌跡は各カラム画分 (x軸) における相対タンパク質濃度を表す。

【0544】

実施例 6. 精製P1タンパク質画分のPAGE分析

目的：実施例5に示すカチオン交換カラムからのP1含有画分の純度および機能性を評価すること。

【0545】

方法：実施例5に記載されているとおりに、該カラム画分を調製した。後続の分析は以下のとおりであった。該カラムから観察された溶出ピークに従いカラム画分をプールした (図11)。特に、以下のとおりに画分をプールした：群1 (5~22)、群2 (22~28)、群3 (29~34)、群4 (35~41)、群5 (42~49)、群6 (50~54) および群7 (55~73)。各群 (元のもの、1~7) からのサンプルを非変性 (A) および変性 (B) の両方のPAGEゲル上にローディングし、標準的な条件下で泳動させた。また、サンプル (元のもの、1~7) を、実施例2に記載されているのに類似したELISAに基づく結合アッセイにおいて、EphA2およびもう1つのEphAファミリーRTKへの結合能に関して試験した。P1タンパク質含有サンプルをELISAプレートに結合させ、ついで可溶性EphA2-FcまたはEphAファミリーRTK-Fcと共にインキュベートした。図12Cに示すとおり、該画分の全ては、元のサンプルと比べてEphA2およびもう1つのEphAファミリーRTKへの特異的結合を示している。群6および7は他方のEphAファミリーRTKへの結合の低減を示している。該結果は、P1タンパク質が、前記節に記

載されているカチオン交換クロマトグラフィーに付された後で結合特異性を保持することを実証している。

【0546】

実施例7. エピトープ結合性タンパク質P1およびP2の結合特異性の決定

方法：該実験は、実施例2に記載されているとおりに行ったが、この場合、捕捉抗原は別のEphAファミリーRTKとして示されている。

【0547】

結果：種々のエピトープ結合性タンパク質に関して行った結合アッセイの結果を図13に示す。ここで特に示されているのは抗体12G3H11ならびに多重特異性エピトープ結合性タンパク質P1およびP2によるEphA2に対する特異性である。予想どおり、EA、EB1およびEB2エピトープ結合性タンパク質はEphA2に対する特異性を示していない。なぜなら、それらはEphA2特異的結合性モチーフを含有していないからである。これらの結果は、P1およびP2タンパク質が、12G3H11に基づく抗体に類似したプロファイルでEphA2への結合を保持することを示している。

10

【0548】

実施例8. エピトープ結合性タンパク質P1およびP2の結合特異性の決定

方法：該実験は、実施例2に記載されているとおりに行ったが、この場合、捕捉抗原は別のEphAファミリーRTKとして示されている。

【0549】

結果：種々のエピトープ結合性タンパク質に関して行った結合アッセイの結果を図14に示す。ここで特に示されているのは多重特異性エピトープ結合性タンパク質P1およびP2ならびにEAによるEphAファミリーRTKに対する特異性である。予想どおり、12G3H11、EB1およびEB2エピトープ結合性タンパク質はEphAファミリーRTKに対する特異性を示していない。なぜなら、それらはEphAファミリーRTKに対する特異的結合性モチーフを含有していないからである。これらの結果は、P1およびP2タンパク質が、EAに基づく結合性タンパク質に類似したプロファイルでEphAファミリーRTKへの結合を保持することを示している。

20

【0550】

実施例9. エピトープ結合性タンパク質P1およびP2の結合特異性の決定

方法：該実験は、実施例2に記載されているとおりに行ったが、この場合、捕捉抗原はEphBファミリーRTKとして示されている。

30

【0551】

結果：種々のエピトープ結合性タンパク質に関して行った結合アッセイの結果を図14に示す。ここで特に示されているのはEB1、EB2ならびに多重特異性エピトープ結合性タンパク質P1およびP2によるEphBファミリーRTKに対する特異性である。予想どおり、12G3H11およびEAエピトープ結合性タンパク質はEphBファミリーRTKに対する特異性を示していない。なぜなら、それらはEphBファミリーRTKに対する特異的結合性モチーフを含有していないからである。P2タンパク質は、EphBファミリーRTKに対する、より低いアフィニティを有しているらしいが、それは特異性を示している。これらの結果は、P1およびP2タンパク質が、EB1およびEB2に基づく結合性タンパク質に類似したプロファイルでEphBファミリーRTKへの結合を保持することを示している。

40

【0552】

実施例10. エピトープ結合性タンパク質P1およびP2の多重結合特異性の決定

方法：あるエピトープ結合性タンパク質の多重結合特異性を評価するために、修飾されたELISAに基づく結合アッセイを行った。EIA/RIA ELISAプレート (Costar cat. 3690) をPBS (pH 7.2) 中の50 μ lの1 μ g/mlのEph受容体または α v β 3インテグリンでコーティングし、4°Cで一晩インキュベートした。翌日、3秒間の振とう間隔により隔てられた1×PBST (1×PSB, 0.1% Tween 20) を使用する5つの分注／吸引洗浄工程に関してプログラムされたEl_x405自動プレート洗浄装置を使用して、該プレートを洗浄した。該プレートを、重ねた紙タオル上で叩いて乾燥させ、170 μ lのブロッキングバッファー (1×PBST中の2% BSA w/v) で室温で1時間ブロッキングした。該抗体を、別のプレート内でブロッキングバ

50

ッファーで8ウェルにより、5 μ g/mlから開始して力価測定し、そのブロッキングされたウェルELISAプレートに50 μ lを加えた。室温で1時間のインキュベーション工程の後、El_x405自動プレート洗浄装置を使用して該プレートを再び洗浄し、叩いて乾燥させた。各ウェルに、50 μ lの二次HRP標識抗体を加え、1時間インキュベートした。該プレートを洗浄し、180度回転させ、再び洗浄した。それらを叩いて乾燥させ、50 μ lのSureBlue TMBペルオキシダーゼ (KPL cat. 52-00-03) を各ウェルに加え、約3分間にわたって現像した。該反応を50 μ lの0.2M H₂SO₄で停止させ、ELISAシグナルを450nmで読み取った。個々の抗原への多重特異性および親抗体結合の分析をEphA2、EphAファミリーRTK、EphBファミリーRTKまたは α v β 3インテグリンに関して社内で行った。

【0553】

各結合ドメインが機能性であることを確認するために、二重抗原結合に関する分析を行った。具体的には、EIA/RIA ELISAプレート (Costar cat. 3690) をPBS (pH 7.2) 中の50 μ lの1 μ g/mlのEph受容体または α v β 3インテグリンでコーティングし、4°Cで一晩インキュベートした。翌日、前記のとおりEl_x405自動プレート洗浄装置を使用して、該プレートを洗浄した。該プレートを170 μ lのブロッキングバッファーで室温で1時間ブロッキングした。Eph受容体または α v β 3インテグリンを、1つのEph受容体分子当たり8つのビオチンの負荷率でEZ-連結スルホ-NHS-ビオチン試薬 (Pierce cat. 21335) でビオチン化した。NAP5カラム (Pierce Cat. 17-0853-02) を使用して遊離ビオチンを除去し、ビオチン化タンパク質をブロッキングバッファー中で1 μ g/mlに希釈した。該プレートを、El_x405自動プレート洗浄装置を使用して再び洗浄し、叩いて乾燥させた。各ウェルに、50 μ lの該希釈ビオチン化Eph受容体または α v β 3を加え、37°Cで1時間インキュベートした。前記のとおり該プレートを洗浄し乾燥させ、50 μ lのニュートラビジン (neutravidin) -HRP 1:12500 (Pierce cat. 31002) を加えた。37°Cで1時間のインキュベーションの後、該プレートを洗浄し、180度回転させ、再び洗浄した。それらを叩いて乾燥させ、50 μ lのSureBlue TMBペルオキシダーゼ (KPL cat. 52-00-03) を各ウェルに加え、約5~10分間にわたって現像した。該反応を50 μ lの0.2M H₂SO₄で停止させ、ELISAシグナルを450nmで読み取った。該コート化Eph受容体抗原は、ELISAにおける後の工程に使用したビオチン化抗原とは異なるものであった。

【0554】

結果：図16 (A) においては、結合EphA2によりELISAプレート上で捕捉されビオチン化EphAファミリーRTKタンパク質により検出される能力に関して、12G3H11、EA、P1およびP2タンパク質を分析した。該軌跡は、P1およびP2のみがプレート結合EphA2およびビオチン化EphAファミリーRTKに同時に結合しうることを示している。12G3H11およびEAはEphA2で捕捉され得ず、ビオチン化EphAファミリーRTKに同時には結合し得なかった。図16 (B) においては、結合EphAファミリーRTKによりELISAプレート上で捕捉されビオチン化EphBファミリーRTKタンパク質により検出される能力に関して、EB2、EA、P1およびP2タンパク質を分析した。該軌跡は、P1およびP2のみがプレート結合EphAファミリーRTKおよびビオチン化EphBファミリーRTKに同時に結合しうることを示している。EAおよびEB2はEphAファミリーRTKで捕捉され得ず、ビオチン化EphBファミリーRTKに同時には結合し得なかった。

【0555】

実施例 11. エピトープ結合性タンパク質P1およびP2の多重結合特異性の決定

方法：以下の改変を伴うこと、すなわち、捕捉抗原がEphAファミリーRTKであったこと以外は実施例10に記載されているとおりに、該実験を行った。

【0556】

結果：図17 (A) においては、結合EphAファミリーRTKによりELISAプレート上で捕捉されビオチン化EphA2タンパク質により検出される能力に関して、12G3H11、EB1、P1およびP2タンパク質を分析した。該軌跡は、P1およびP2のみがプレート結合EphAファミリーRTKおよびビオチン化EphA2に同時に結合しうることを示している。12G3H11およびEB1はEphAファミリーRTKで捕捉され得ず、ビオチン化EphA2に同時には結合し得なかった。図17 (B) においては、結合EphAファミリーRTKによりELISAプレート上で捕捉されビオチン化EphBフ

ファミリーRTKタンパク質により検出される能力に関して、12G3H11、EB1、P1およびP2タンパク質を分析した。該軌跡は、P1およびP2のみがプレート結合EphAファミリーRTKおよびビオチン化EphBファミリーRTKに同時に結合しうることを示している。12G3H11およびEB2はEphAファミリーRTKで捕捉され得ず、ビオチン化EphBファミリーRTKに同時には結合し得なかった。これらの結果は、P1およびP2タンパク質により示される多重結合特異性を更に裏付けるものである。

【0557】

実施例12. P1およびP2タンパク質の多重特異性の評価

方法：以下の改変を伴うこと、すなわち、捕捉抗原がEphBファミリーRTKであったこと以外は実施例10に記載されているとおりに、該実験を行った。

10

【0558】

結果：図18 (A) においては、結合EphBファミリーRTKによりELISAプレート上で捕捉されビオチン化EphA2タンパク質により検出される能力に関して、12G3H11、EB1、P1およびP2タンパク質を分析した。該軌跡は、P1およびP2のみがプレート結合EphBファミリーRTKおよびビオチン化EphA2に同時に結合しうることを示している。12G3H11およびEB1はEphBファミリーRTKで捕捉され得ず、ビオチン化EphA2に同時には結合し得なかった。図18 (B) においては、結合EphBファミリーRTKによりELISAプレート上で捕捉されビオチン化EphAファミリーRTKタンパク質により検出される能力に関して、EA、12G3H11、EB1、P1およびP2タンパク質を分析した。該軌跡は、P1およびP2のみがプレート結合EphBファミリーRTKおよびビオチン化EphAファミリーRTKに同時に結合しうることを示している。12G3H11およびEA2はEphBファミリーRTKで捕捉され得ず、ビオチン化EphAファミリーRTKに同時には結合し得なかった。これらの結果は、P1およびP2タンパク質により示される多重結合特異性を更に裏付けるものである。

20

【0559】

実施例13. 細胞表面上に提示される結合性エピトープの検査

目的：ある多重特異性エピトープ結合性タンパク質を構築するために使用する単一特異性結合性タンパク質に関するベースライン測定値を確定すること。

【0560】

方法：細胞表面上で全3種のEph受容体を発現するヒト膵臓癌細胞系MiaPaCa2に関して、結合分析を行った。MiaPaCa2細胞を、コンフルエントなT-175フラスコから回収し、PBSで2回洗浄して残留培地およびトリプシンを除去した。200 μ lのPBS中の50万個の細胞を、200ngのエピトープ結合性タンパク質を含有する丸底96ウェルプレート (Falcon Cat. 35-3077) 内に配置し、4°Cで1時間インキュベートした。該細胞を冷PBSで2回洗浄し、200 μ lの1:1000希釈の免疫純粋ウサギ (Immunopure Rabbit) 抗ヒトIgG FCフルオレセイン (Fluorescein) (Pierce Cat. 31535) と共に4°Cで30分間インキュベートした。該インキュベーションの後、該細胞をPBSで再び、2回洗浄した。該標識細胞を200 μ lのPBSおよび10 μ lの1 μ g/ml ヨウ化プロピジウム (Calibiochem Cat.537059) に再懸濁させた。分析をGuava FACS分析装置で行った。

30

【0561】

結果：MiaPaCa2細胞への単一特異性エピトープ結合性タンパク質の結合のFACS分析を図19に示す。陰性対照として、検出試薬であるフルオレセイン結合抗ヒトIgG Fcを該細胞と共にインキュベートした。これは該細胞への低レベルの結合を示している。12G3H11抗体はMiaPaCa2細胞への高いアフィニティを示しており、一方、EB2およびEA単一特異性タンパク質は有意なレベルの染色を示している。これらの結果は、MiaPaCa2細胞が、12G3H11、EAおよびEB2の結合単位により結合されうる抗原を発現し提示することを示している。タンパク質P1およびP2の構築において、これらの結合単位を使用した。

40

【0562】

実施例14. 細胞表面上に提示される多重特異性エピトープ結合性タンパク質に対する結合性エピトープの検査

方法：前記実施例12に記載されているのと実質的に同じ方法で、該実験を行った。

50

【0563】

結果：MiaPaCa2細胞への多重特異性エピトープ結合性タンパク質の結合のFACS分析を図20に示す。陰性対照として、検出試薬であるフルオレセイン結合抗ヒトIgG Fcを該細胞と共にインキュベートした。これは該細胞への低レベルの結合を示した。P1およびP2多重特異性エピトープ結合性タンパク質はMiaPaCa2細胞への高いアフィニティを示した。これらの結果は、MiaPaCa2細胞が、P1およびP2の結合単位により結合されうる抗原を発現し提示することを示している。これらの結果は、MiaPaCa2細胞が、タンパク質P1およびP2により結合されるエピトープを提示することを示している。

【0564】

実施例15. 細胞表面上に提示されるエピトープ結合性タンパク質に対する結合性エピトープの検査

目的：所定エピトープ結合性タンパク質に関する相対結合特異性を確定すること。

【0565】

方法：前記実施例12に記載されているのと実質的に同じ方法で、該実験を行った。

【0566】

結果：多重特異性および単一特異性エピトープ結合性タンパク質の結合のFACS分析を図21に示す。陰性対照として、検出試薬であるフルオレセイン結合抗ヒトIgG Fcを該細胞と共にインキュベートした。これは該細胞への低レベルの結合を示した。また、対照抗体を該細胞と共にインキュベートした。これもまた、MiaPaCa2細胞への低いアフィニティを示した。P1およびP2多重特異性エピトープ結合性タンパク質はMiaPaCa2細胞への高いアフィニティを示した。単一特異性エピトープ結合性タンパク質EB2、EAおよび12G3H11は、該細胞上で提示されるエピトープに対する高いアフィニティを示した。単一特異性エピトープ結合性タンパク質EB1は、MiaPaCa2細胞に対する、より低いが特異的なアフィニティを示した。これらの結果は、MiaPaCa2細胞が、単一および多重特異性エピトープ結合性タンパク質により結合されうる抗原を提示することを示している。

【0567】

実施例16. エピトープ結合性タンパク質に関する競合アッセイ

目的：MiaPaCa2細胞に結合する所定タンパク質に関するベースライン結合プロファイルを確定すること。

【0568】

方法：以下の改変を伴う以外は実施例12に記載されているのと実質的に同じ方法で、該結合アッセイを行った。全結合ドメインが細胞表面受容体への結合に能動的に関与することを確認するために、該エピトープ結合性タンパク質を50倍モル過剰の遊離抗原と共に、該細胞とのインキュベーションの前に1時間プレインキュベートすることにより、遊離抗原での抑制アッセイを行った。ついで該エピトープ結合性タンパク質：抗原混合物を、実施例12に記載されているとおりにMiaPaCa2細胞と共にインキュベートした。該多重特異性ドメインの機能的結合を実証するために、該エピトープ結合性タンパク質を単一抗原および組合せ体と共にプレインキュベートした。この実施例においては、今後の研究のためのベースラインを確定するために、該エピトープ結合性タンパク質をビヒクル対照と混合した。

【0569】

結果：特定のタンパク質が関与する結合アッセイの模擬競合抑制からの結果を図22に示す。該軌跡はMiaPaCa2細胞の表面へのP2、P1、EB2、EAおよび12G3H11タンパク質の特異的結合を表す。これらの結果は、P2、P1、EB2、EAおよび12G3H11タンパク質が、生細胞上で提示されるエピトープに結合しうることを更に例証するものである。

【0570】

実施例17. 細胞表面結合の競合抑制

目的：あるエピトープ結合性タンパク質との結合を妨げるまたは該結合に関して競合する可溶性抗原の能力を評価すること。

【0571】

方法：以下の改変を伴う以外は実施例15に記載されているのと実質的に同じ方法で、該実験を行った。可溶性抗原EphA2を50倍モル過剰でエピトープ結合性タンパク質の溶液と共にプレインキュベートした。

【0572】

結果：該エピトープ結合性タンパク質および可溶性EphA2リガンドが関与する結合実験の競合抑制からの結果を図23に示す。該軌跡は、可溶性リガンドと共にインキュベートし次いでMiaPaCa2細胞に適用した後のMiaPaCa2細胞への或るタンパク質の残留結合を表す。P2、P1タンパク質はEphA2特異的結合性要素を含有するが、それらは該細胞に結合したままである。一方、12G3H11の軌跡は、EphA2に対する単一特異性を有し非特異的抗hu-Fc軌跡に類似したタンパク質を表す。これは、遊離リガンドEphA2が、細胞表面上で提示されるエピトープへの結合能を完全に飽和していることを示唆している。したがって、P1およびP2タンパク質は、おそらく別の結合モチーフによりもたらされる特異性により、結合を保持している。EB2およびEAタンパク質は、可溶性EphA2に特異的ではないため、結合を保持している。これらの結果は、可溶性EphA2が単一特異性エピトープ結合性タンパク質12G3H11の結合を抑制しうるが、多重特異性エピトープ結合性タンパク質P1およびP2（これらは共にEphA2結合性ドメインを含有する）の結合を抑制し得ないことを示している。P1およびP2タンパク質は、別の結合特異性により、細胞表面エピトープへの結合を保持しうる。該研究におけるその他のエピトープは依然として利用可能である。なぜなら、EAおよびEB2タンパク質は可溶性EphA2の存在下で細胞表面への結合を保持するからである。

10

【0573】

20

実施例 18. MiaPaCa2細胞へのタンパク質の結合の競合抑制

目的：エピトープ結合を妨げるまたは該結合に関して競合する可溶性抗原の能力を評価すること。

【0574】

方法：以下の改変を伴う以外は実施例15に記載されているのと実質的に同じ方法で、該実験を行った。可溶性抗原EphAファミリーRTKを50倍モル過剰で種々のタンパク質の溶液と共にプレインキュベートした。

【0575】

結果：P2、P1、EB2、EAおよび12G3H11タンパク質ならびに可溶性EphAファミリーRTKリガンドが関与する結合実験の競合抑制からの結果を図24に示す。該軌跡は、可溶性リガンドと共にインキュベートし次いでMiaPaCa2細胞に適用した後のMiaPaCa2細胞への該タンパク質の残留結合を表す。P2およびP1タンパク質はEphAファミリーRTK特異的結合性要素を含有するが、それらは該細胞に結合したままである。一方、EAの軌跡は、EphAファミリーRTKに対する単一特異性を有し非特異的抗hu-Fc軌跡に類似したタンパク質を表す。これは、遊離リガンドEphAファミリーRTKが、細胞表面上で提示されるエピトープへの結合能を完全に飽和していることを示唆している。P1およびP2タンパク質は、おそらく別の結合モチーフによりもたらされる特異性により、結合を保持している。EB2および12G3H11タンパク質は、可溶性EphAファミリーRTKに特異的ではないため、結合を保持している。これらの結果は、可溶性EphAファミリーRTKが単一特異性エピトープ結合性タンパク質EAの結合を抑制しうるが、多重特異性エピトープ結合性タンパク質P1およびP2（これらは共にEphAファミリーRTK結合性ドメインを含有する）の結合を抑制し得ないことを示している。P1およびP2タンパク質は、別の結合特異性により、細胞表面エピトープへの結合を保持しうる。該研究におけるその他のエピトープは依然として利用可能である。なぜなら、12G3H11およびEB2タンパク質は可溶性EphAファミリーRTKの存在下で細胞表面への結合を保持するからである。

30

40

【0576】

実施例 19. MiaPaCa2細胞へのタンパク質の結合の競合抑制

目的：結合を妨げるまたは該結合に関して競合する可溶性抗原の能力を評価すること。

【0577】

方法：以下の改変を伴う以外は実施例15に記載されているのと実質的に同じ方法で、該

50

実験を行った。可溶性抗原EphBファミリーRTKを50倍モル過剰で種々のタンパク質の溶液と共にプレインキュベートした。

【0578】

結果：該タンパク質および可溶性EphBファミリーRTKリガンドが関与する結合実験の競合抑制からの結果を図25に示す。該軌跡は、可溶性リガンドと共にインキュベートし次いでMiaPaCa2細胞に適用した後のMiaPaCa2細胞への該タンパク質の残留結合を表す。P2およびP1タンパク質はEphBファミリーRTK特異的結合性要素を含有するが、それらは該細胞に結合したままである。一方、EBの軌跡は、EphBファミリーRTKに対する単一特異性を有し非特異的抗hu-Fc軌跡に類似したタンパク質を表す。これは、遊離リガンドEphBファミリーRTKが、細胞表面上で提示されるエピトープへの結合能を完全に飽和していることを示唆している。P1およびP2タンパク質は、おそらく別の結合モチーフによりもたらされる特異性により、結合を保持している。EAおよび12G3H11タンパク質は、可溶性EphBファミリーRTKに特異的ではないため、結合を保持している。これらの結果は、可溶性EphBファミリーRTKが単一特異性エピトープ結合性タンパク質EB2の結合を抑制しうるが、多重特異性エピトープ結合性タンパク質P1およびP2（これらは共にEphBファミリーRTK結合性ドメインを含有する）の結合を抑制し得ないことを示している。P1およびP2タンパク質は、別の結合特異性により、細胞表面エピトープへの結合を保持しうる。該研究におけるその他のエピトープは依然として利用可能である。なぜなら、12G3H11およびEAタンパク質は可溶性EphBファミリーRTKの存在下で細胞表面への結合を保持するからである。

【0579】

実施例20. 2つの異なる可溶性抗原でのMiaPaCa2細胞へのタンパク質の結合の競合抑制

目的：結合を妨げるまたは該結合に関して競合する可溶性抗原の能力を評価すること。

【0580】

方法：以下の改変を伴う以外は実施例15に記載されているのと実質的に同じ方法で、該実験を行った。可溶性抗原EphA2およびもう1つのEphAファミリーRTKを50倍モル過剰で或るタンパク質の溶液と共にプレインキュベートした。

【0581】

結果：タンパク質P2、P1、EB2、EAおよび12G3H11ならびに可溶性EphA2およびEphAファミリーRTKリガンドが関与する結合実験の競合抑制からの結果を図26に示す。該軌跡は、可溶性リガンドと共にインキュベートし次いでMiaPaCa2細胞に適用した後のMiaPaCa2細胞への該タンパク質の残留結合を表す。P1タンパク質はEphA2およびEphBファミリーRTK特異的結合性要素を含有するが、それぞれEphA2およびEphAファミリーRTKに対する特異性を有する単一特異性12G3H11およびEAと比べて該細胞への残留結合を示す。一方、EBの軌跡は、EphBファミリーRTKに対する単一特異性を有し実施例15における模擬軌跡に類似したタンパク質を表す。これは、遊離リガンドEphA2およびEphAファミリーRTKが、細胞表面上で提示されるエピトープへの結合能を完全に飽和していることを示唆している。P1タンパク質は、おそらく他方の結合モチーフによりもたらされる特異性により、結合を保持している。EB2タンパク質は、可溶性EphA2にもEphAファミリーRTKにも特異的ではないため、結合を保持している。

【0582】

実施例21. 2つの異なる可溶性抗原でのMiaPaCa2細胞へのタンパク質の結合の競合抑制

目的：細胞表面受容体への結合を妨げるまたは該結合に関して競合する可溶性抗原の能力を評価すること。

【0583】

方法：以下の修飾を伴う以外は実施例15に記載されているのと実質的に同じ方法で、該実験を行った。可溶性抗原EphA2およびもう1つのEphAファミリーRTKを50倍モル過剰で或るタンパク質の溶液と共にプレインキュベートした。

【0584】

10

20

30

40

50

結果：タンパク質P2、P1、EB2、EAおよび12G3H11ならびに可溶性EphAファミリーRTKおよびEphBファミリーRTKリガンドが関与する結合実験の競合抑制からの結果を図27に示す。該軌跡は、可溶性リガンドと共にインキュベートし次いでMiaPaCa2細胞に適用した後のMiaPaCa2細胞への該タンパク質の残留結合を表す。P1およびP2タンパク質はEphAファミリーRTKおよびEphBファミリーRTK特異的結合性要素の両方を含有するが、それぞれEphAファミリーRTKおよびEphBファミリーRTKに対する特異性を有する単一特異性EAおよびEB2と比べて該細胞への残留結合を示す。一方、12G3H11の軌跡は、EphA2に対する単一特異性を有し実施例15における模擬軌跡に類似したタンパク質を表す。これは、遊離リガンドEphAファミリーRTKおよびEphBファミリーRTKが、細胞表面上で提示されるエピトープへの結合能を完全に飽和していることを示唆している。P1およびP2タンパク質は、おそらく他方の結合モチーフによりもたらされる特異性により、結合を保持している。12G3H11タンパク質は、可溶性EphAファミリーRTKにもEphBファミリーRTKにも特異的ではないため、結合を保持している。

10

【0585】

実施例22. 三重特異性エピトープ結合性タンパク質の競合抑制

目的：可溶性リガンドが細胞表面抗原とタンパク質の結合に関して競合しうることを示すこと。

【0586】

方法：以下の改変を伴う以外は実施例15に記載されているのと実質的に同じ方法で、該実験を行った。可溶性抗原EphA2、もう1つのEphAファミリーRTKおよびEphBファミリーRTKを50倍モル過剰で或るタンパク質の溶液と共にプレインキュベートした。

20

【0587】

結果：タンパク質P2、P1、EB2、EAおよび12G3H11ならびに可溶性EphA2、EphAファミリーRTKおよびEphBファミリーRTKリガンドが関与する結合実験の競合抑制からの結果を図28に示す。該軌跡は、可溶性リガンドと共にインキュベートし次いでMiaPaCa2細胞に適用した後のMiaPaCa2細胞への該タンパク質の残留結合を表す。調べたタンパク質（P2、P1、EB2、EAおよび12G3H11）の全ては、過剰のそれらの3つのリガンドとのプレインキュベーションの後で残留結合をほとんどまたは全く示さなかった。これらの結果は、それらのタンパク質が、別のメカニズムによってではなく、MiaPaCa2細胞上で発現される特異的エピトープに結合することを示している。三重特異性タンパク質P1およびP2は、含有されるエピトープ結合性単位の全てを介して特異的に結合する。

30

【0588】

実施例23. 多重特異性エピトープ結合性タンパク質の機能分析

目的：エピトープ結合性タンパク質が、親抗体および／または同一の単離された機能性エピトープ結合性ドメインに由来する機能的特性を保持することを示すこと。特に、親抗体の多数は、標的細胞に適用されると受容体アゴニストとして機能する。

【0589】

方法：受容体を作動させる多重特異性エピトープ結合性タンパク質の能力を評価するために、以下の実験プロトコルを用いた。MiaPaCa2細胞を6ウェルプレート内で 0.5×10^6 の密度で播き、24時間インキュベートした。該ウェルをPBSで2回洗浄した。該受容体を活性化するために、 $10 \mu\text{g}$ の親タンパク質または三重特異性エピトープ結合性タンパク質を3mlの培地に加え、 37°C で30分間インキュベートした。該培地を除去し、該細胞を冷PBSで注意深く2回洗浄した。ついで該細胞を、 $1 \times$ プロテイナーゼインヒビター混合物（Sigma cat. P8340）と共に200mlのトリトン細胞溶解バッファー（Boston Bioproducts Cat. BP115）を加えることにより細胞溶解し、室温で5分間インキュベートした。該ライセートを集め、 $6000 \times g$ 、 4°C で5分間遠心分離して細胞残渣を除去した。該ライセート中の全タンパク質濃度は、BCAアッセイ（Pierce Cat. 23225）を用いて定量されたものであった。受容体活性化を分析するために、細胞表面受容体を以下のとおりに精製し分析した。EphBファミリー受容体を4G10アガロース（Upstate Cat. 16-199）で免疫沈降させ、ヤギ抗マウスIgG（Pierce Cat. 31437）を二次抗体として使用して特異的抗EphBファミリー抗体で検

40

50

出した。EphA2を免疫沈降させるために、特異的EphA2抗体（1C1）を使用した。EphAファミリーRTKを免疫沈降させるために、ストレプトアビジンM280ビーズ（Invitrogen cat. 602-10）を500 μ gのビオチン化抗EphAファミリー抗体に結合させた。EZ-連結スルホ-NHS-ビオチン試薬（Pierce cat. 21335）を該製造業者の推奨に従い1:4の負荷比で使用して、該抗体をビオチン化した。該ビオチン化抗体および500 μ lのM280ビーズを混合し、室温で1時間インキュベートし、PBSで洗浄して未結合抗体を除去した。ビオチン化4G10（1:1000）抗ホスホチロシン（Upstate Cat. 16-204）抗体およびニュートラビジン（neutravidin）-HRP 1:12500（Pierce Cat. 31003）をウェスタンブロット検出において二次的に使用した。

【0590】

100 μ gの全ライセートタンパク質を20 μ lの4G10アガロースまたは50 μ lの該抗体結合M280ストレプトアビジンビーズと混合することにより、該処理細胞ライセートからのEph受容体の免疫沈降を行った。該ライセートビーズ混合物をローテーター上で4℃で2時間インキュベートした。ついで該混合物を2000 $\times$ gで遠心分離して該ビーズをペレット化し、上清を除去した。未結合物質を除去するために、該ビーズを冷細胞溶解バッファー中で2回洗浄した。該洗浄バッファーを該ビーズから除去し、5% β -メルカプトエタノールを含有する35 μ lのサンプルバッファー（Invitrogen cat. NP 0007）を加え、ついで100℃に10分間にわたって加熱した。上清を10% Nupageタンパク質ゲル（Invitrogen cat. NP0301）上にローディングし、200V（一定）で35分間にわたって電気泳動した。ニトロセルロース膜への転写を、Invitrogenの転写バッファー（Invitrogen cat. NP0006-1）およびそれらの推奨条件を用いて行った。該膜をブロッキングバッファー（1 $\times$ PBS、1% Tween20および1% BSA中の30% 冷魚ゼラチン）中で1時間インキュベートした。ブロッキングバッファーをデカントし、10mlの一次抗体を該膜に直接的に加えた。該膜を1時間インキュベートした後、それを洗浄バッファー（1 $\times$ PBS、1% Tween20および1% BSA）で5回洗浄した。ついで二次HRP標識試薬を洗浄バッファーに加え、ロッカー（rocker）上で室温で1時間にわたってインキュベートした。該ブロットを前記のとおり洗浄し、ECL溶液（Pierce Cat. 32106）に、該製造業者の示唆に従い浸漬した後、Hyperfilm ECLフィルム（Cat. RPN1674K）に曝露した。

【0591】

結果：タンパク質12G3H11、EA、EB2、EB1、P1およびP2で処理されたMiaPaCa2細胞のEphA2受容体活性化アッセイのウェスタンブロット分析を図29に示す。陽性対照として、精製されたリン酸化EphA2を含めた（レーン9）。陰性対照として、非特異的抗体（レーン7）および培地（レーン8）を含めた。この図に示されているとおり、12G3H11（レーン1）、P1（レーン5）およびP2（レーン6）で処理されたMiaPaCa2細胞は、受容体リン酸化により測定された場合に受容体活性化を模擬する。タンパク質EA（レーン2）、EB2（レーン3）およびEB1（レーン4）はEphA2を刺激しなかった。EA、EB1およびEB2は、EphA2に特異的な結合性ドメインを含有しないため、これらの結果は予想どおりである。12G3H11、P1およびP2タンパク質は、EphA2を作動させる能力を保持すると予想される。なぜなら、それらは、EphA2に特異的な結合性ドメインを含有するからである。これらの結果は、タンパク質P1およびP2が、親タンパク質に関して記載されているとおりにEphA2を作動させる能力を保持することを示唆している。

【0592】

実施例24. 種々のエピトープ結合性タンパク質の機能分析

目的：エピトープ結合性タンパク質が、親抗体に由来する機能的特性を保持することを示すこと。特に、親抗体の多数は、標的細胞に適用されると受容体アゴニストとして機能する。

【0593】

方法：以下の改変を伴う以外は実施例21に記載されているのと実質的に同じ方法で、該実験を行った。標的はEphAファミリーRTKであった。

【0594】

10

20

30

40

50

結果：タンパク質12G3H11、EA、EB2、EB1、P1およびP2で処理されたMiaPaCa2細胞のEphAファミリー受容体活性化アッセイのウエスタンブロット分析を図30に示す。陽性対照として、精製されたリン酸化EphAファミリーRTKを含めた（レーン9）。陰性対照として、非特異的抗体（レーン7）および培地（レーン8）を含めた。この図に示されているとおり、EA（レーン2）、P1（レーン5）およびP2（レーン6）で処理されたMiaPaCa2細胞は、受容体リン酸化により測定された場合に受容体活性化を模擬する。タンパク質12G3H11（レーン1）、EB2（レーン3）およびEB1（レーン4）はEphAファミリーRTKを刺激しなかった。12G3H11、EB1およびEB2は、EphAファミリーRTKに特異的な結合性ドメインを含有しないため、これらの結果は予想どおりである。EA、P1およびP2タンパク質は、EphAファミリーRTKを作動させる能力を保持すると予想される。なぜなら、それらは、EphAファミリーRTKに特異的な結合性ドメインを含有するからである。これらの結果は、タンパク質P1およびP2が、親タンパク質に関して記載されているとおりにEphAファミリーRTKを作動させる能力を保持することを示唆している。

10

【0595】

実施例25. 種々のエピトープ結合性タンパク質の機能分析

目的：多重特異性エピトープ結合性タンパク質が、親抗体に由来する機能的特性を保持することを示すこと。特に、親抗体の多数は、標的細胞に適用されると受容体アゴニストとして機能する。

【0596】

方法：以下の例外を伴う以外は実施例21に記載されているのと実質的に同じ方法で、該実験を行った。標的はEphBファミリーRTKであった。

20

【0597】

結果：タンパク質12G3H11、EA、EB2、EB1、P1およびP2で処理されたMiaPaCa2細胞のEphBファミリー受容体活性化アッセイのウエスタンブロット分析を図31に示す。陽性対照として、精製されたリン酸化EphBファミリーRTKを含めた（レーン9）。陰性対照として、非特異的抗体（レーン7）および培地（レーン8）を含めた。この図に示されているとおり、EB2（レーン2）、P1（レーン5）およびP2（レーン6）で処理されたMiaPaCa2細胞は、受容体リン酸化により測定された場合に受容体活性化を模擬する。タンパク質12G3H11（レーン1）、EA（レーン2）およびEB1（レーン4）はEphBファミリーRTKを刺激しなかった。12G3H11およびEAに関する結果は予想どおりである。なぜなら、これらのタンパク質は、EphBファミリーRTKに特異的な結合性ドメインを含有しないからである。EphBファミリーRTKをEB1が作動し得ないことは、十中八九、細胞の表面上に提示された抗原へのEB1の非効率的結合によるものであろう（実施例14を参照されたい）。EB1、P1およびP2タンパク質は、EphBファミリーRTKを作動させる能力を保持すると予想される。なぜなら、それらは、EphBファミリーRTKに特異的な結合性ドメインを含有するからである。これらの結果は、タンパク質P1およびP2が、親タンパク質に関して記載されているとおりにEphBファミリーRTKを作動させる能力を保持することを示唆している。

30

【0598】

実施例26. 三重特異性多重特異性エピトープ結合性タンパク質P3の発現

目的：抗体重鎖および軽鎖に融合されたscFvドメインを含む三重特異性エピトープ結合性タンパク質P3の高レベル発現を示すこと。

40

【0599】

方法：3つのエピトープ結合性タンパク質、C5aに特異的な抗体（1B8）、C5aに特異的なscFv（1B8）、C5aに特異的なscFv（15）およびEphAファミリーRTK（EA）に特異的なscFvを合体させることにより、エピトープ結合性タンパク質P3を構築した。得られた構造体を図2Dに開示する。エピトープ結合性タンパク質P3は、親抗体と少なくとも同等レベルで結合特異性およびアフィニティを保持する（データ非表示）。

【0600】

293Fectin（商標）試薬（Invitrogen Cat. 51-0031）およびFreestyle（商標）培地（Invitrogen Cat. 12338）+10%ウシ胎児血清を該製造業者の推奨に従い使用して293F細胞

50

をトランスフェクトするために、P3をコードするベクターを使用した。トランスフェクション後の第3日に該細胞をフィードし、第6日に上清を回収した。該エピトープ結合性タンパク質P3の精製をプロテインAカラムにより行い、ついでPBS中への透析を行った。該タンパク質のサイズおよび相対純度を決定するために、タンパク質ゲル上の変性および非変性形態で該分子を評価した。

【0601】

結果：図4Gに示す三重特異性エピトープ結合性タンパク質の発現を示すPAGEゲルを図32に示す。該パネルにおいては、非還元性（レーン1および2）および変性ゲル（レーン3および4）は、それらの条件下の該三重特異性エピトープ結合性タンパク質の相対分子量を示す。レーン2においては、該三重特異性エピトープ結合性タンパク質は、非変性条件におけるPAGEゲル上の（a）泳動により表される伝統的抗体の予想分子量より大きい約240kDaの予想分子量を示す。レーン4においては、該三重特異性エピトープ結合性タンパク質は、重鎖に関しては約75kDaおよび軽鎖に関しては約50kDaまでの予想分子量を示す。これらの値は、同様の条件下で泳動された重鎖（b）および軽鎖（c）を含む伝統的抗体により示された予想分子量より高い。これらの結果は、2つのscFv（一方は重鎖のN末端、他方は軽鎖のN末端）に融合された抗体から構成される多重特異性エピトープ結合性タンパク質が発現可能であり、予想された構造体の予想された分子量および組成（重鎖および軽鎖）を示すことを示している。

10

【0602】

実施例 27. 多重特異性エピトープ結合性タンパク質P3のサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）分析

20

目的：多重特異性エピトープ結合性タンパク質P3が、正しい見掛け分子量を示すことを示すこと。

【0603】

材料および方法：サイズ排除クロマトグラフィーは、分子（例えば、タンパク質）のその天然状態での見掛け分子量を決定するための当技術分野で公知の方法である。この実施例においては、実施例26に記載されているとおりに、多重特異性エピトープ結合性タンパク質P3を発現させ精製した。精製されたP3タンパク質を、100mM 硫酸ナトリウム、100mM リン酸ナトリウムを含有するバッファー（pH 6.8）中、SECカラム（TSK-GEL G3000SWXL）上にローディングした。該カラムを1ml/分の流量で運転した。見掛け分子量の決定のために加えた校正標準には以下のものが含まれた：チログロブリン（670kDa）、ウシガンマグロブリン（158kDa）、ニワトリオボアルブミン（44kDa）、ウマミオグロビン（17kDa）およびビタミンB12（1.35kDa）。

30

【0604】

結果：多重特異性エピトープ結合性タンパク質「P3」のサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）分析からの結果を図33に示す。図4Hに示されているこの構築物は3つの異なるエピトープ結合性領域を含む。該エピトープ結合性タンパク質を発現させ、SECにより分析した。点線の軌跡は、P3タンパク質の分子量を決定するために使用した一定の分子量の成分の組合せを表す。実線の軌跡はP3の溶出プロファイルを表す。ピーク1は、約240kDa（単量体）の推定分子量において、該タンパク質の約70%に相当する。ピーク2および3は、より高次の構造体（例えば、二量体）または凝集体を表す。これらの結果は、P3のような多重特異性エピトープ結合性タンパク質が天然状態におけるその推定分子量を示すことを示している。

40

【0605】

実施例 28. 多重特異性エピトープ結合性タンパク質のプロテアーゼ感受性

目的：親抗体との対比において多重特異性エピトープ結合性タンパク質のプロテアーゼ感受性のレベルを決定すること。

【0606】

材料および方法：抗体および該抗体由来の多重特異性エピトープ結合性タンパク質を前記のとおりが発現させ精製した。具体的には、多重特異性エピトープ結合性タンパク質P4

50

、P5およびP6は親抗体1B8および15に由来する。抗体15に由来するscFvから多重特異性エピトープ結合性タンパク質P4（図4Fに示されている）を構築し、ついでこれを1B8抗体の重鎖のN末端に融合させた。抗体15に由来するscFvから多重特異性エピトープ結合性タンパク質P5（図4Dに示されている）を構築し、ついでこれを1B8抗体の軽鎖のN末端に融合させた。該図に示されているとおりに1B8抗体のFabフラグメントに融合された抗体15の可変領域からの多重特異性エピトープ結合性タンパク質P6（図2Dに示されている）を構築した。エピトープ結合性タンパク質P4、P5およびP6は、親抗体と少なくとも同等レベルの結合特異性およびアフィニティを保持する（データ非表示）。それらの種々の抗体および多重特異性エピトープ結合性タンパク質を、トリプシン（20ng/1 μgの抗体/エピトープ結合性タンパク質）、キモトリプシン（20ng/1 μgの抗体/エピトープ結合性タンパク質）またはヒト血清（1 μg血清/1 μgの抗体/エピトープ結合性タンパク質）の非存在下または存在下、37℃で1時間（パネルA）または37℃で12時間（パネルB）インキュベートした。ついで、プロテアーゼまたは血清の非存在下でインキュベートされたサンプルと比較して断片化プロファイルを決断するために、該サンプルをPAGEにより分析した。

10

【0607】

結果：種々の形態のエピトープ結合性タンパク質に関して行ったプロテアーゼ感受性アッセイからの結果を図34に示す。該プロテアーゼの存在下のインキュベーションが完了したら、サンプルを還元性PAGEゲル上で泳動させ、クーマシーで染色して、タンパク質分解が生じたかどうかを判定した。示されているとおり、37℃で1時間のインキュベーションは、それらの種々の親抗体またはエピトープ結合性タンパク質のタンパク質分解を引き起こさない。延長して行ったインキュベーション（37℃で12時間）においては、該エピトープ結合性タンパク質の検出可能なタンパク質分解は観察されなかった。これらの結果は、本明細書に記載されている多重特異性エピトープ結合性タンパク質が、抗体分子に関して観察されたのと同様の高レベルのプロテアーゼ抵抗性を示すことを示している。

20

【0608】

実施例29. 多重特異性エピトープ結合性タンパク質のプロテアーゼ感受性

目的：親抗体との対比において多重特異性エピトープ結合性タンパク質のプロテアーゼ感受性のレベルを決断すること。

【0609】

材料および方法：抗体および該抗体由来の多重特異性エピトープ結合性タンパク質を前記のとおりに発現させ精製した。それらの種々の抗体および多重特異性エピトープ結合性タンパク質を、カテプシンB（20ng/1 μgの抗体/エピトープ結合性タンパク質）の非存在下または存在下、37℃で1時間（パネルA）または37℃で20時間（パネルB）インキュベートした。ついで、プロテアーゼまたは血清の非存在下でインキュベートされたサンプルと比較して断片化プロファイルを決断するために、該サンプルをPAGEにより分析した。

30

【0610】

結果：種々の形態のエピトープ結合性タンパク質に関して行ったプロテアーゼ（カテプシンB）感受性アッセイからの結果を図35に示す。具体的には、タンパク質（親抗体および本明細書に記載されている種々の形態のエピトープ結合性タンパク質）を発現させ、精製し、カテプシンB（抗体/エピトープ結合性タンパク質1 μg当たりプロテアーゼ20ng）の非存在下（奇数）または存在下（偶数）、（A）1時間または（B）20時間にわたって37℃でインキュベートした。該プロテアーゼの存在下のインキュベーションが完了したら、サンプルを還元性PAGEゲル上で泳動させ、クーマシーで染色して、タンパク質分解が生じたかどうかを判定した。示されているとおり、37℃で1時間のインキュベーションは、それらの種々の親抗体またはエピトープ結合性タンパク質のタンパク質分解を引き起こさない。延長して行ったインキュベーション（37℃で20時間）においては、レーン8および9（タンパク質P2）ならびにレーン14および15（タンパク質P4）における該エピトープ結合性タンパク質の或る程度のタンパク質分解が明らかである（点線の丸印を参照されたい）。これらの結果は、本明細書に記載されている多重特異性エピトープ結合性タンパク質が、抗体分子に関して観察されたのと同様の高レベルのプロテアーゼ（カテプシンB）抵抗性を

40

50

示すことを示している。

【0611】

実施例30. 多重特異性エピトープ結合性タンパク質の一過性発現

目的：種々の多重特異性エピトープ結合性タンパク質形態を一過性に発現させること。

【0612】

方法：全ての構築物を、Invitrogen Freestyle（商標）内で培養されたHEK293F細胞において発現させた。トランスフェクションの10日後に該培地を集め、全ての抗体形態を、製造業者のプロトコール（GE Healthcare, Piscataway, NJ）に従い、標準的なプロテインAアフィニティークロマトグラフィーにより精製し、バッファーを25mM ヒスチジン-HCl（pH 6.0）と交換した。還元性および非還元性条件下、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）を用いて、また、分析用サイズ排除クロマトグラフィーを用いて、該構築物の純度を分析した。社内で開発されたプロテインA結合アッセイを用いて、全IgG発現を測定した。簡潔に説明すると、HPLC系（Agilent 1100 Capillary LC System, Foster City, CA）を用いて、プロテインAカラム上に培地を自動的にローディングした。未結合物質を100mM リン酸ナトリウムバッファー（pH 6.8）の溶液で洗浄し、0.1% リン酸（pH 1.8）で抗体を溶出した。溶出ピークに対応する面積を積分し、IgG標準と比較することにより全抗体濃度を決定した。また、理論的に決定された吸光係数を用いて、280nmにおける吸光度を読取ることにより、精製抗体の濃度を決定した。結果を以下の表1に示す。

【表1】

表1. 多重特異性エピトープ結合性タンパク質の一過性発現

結合性タンパク質の形態	一過性発現レベル
伝統的 Ab	180 mg/L
図 4D	120 mg/L
図 4F	140 mg/L
図 4H	115 mg/L
図 4L	45 mg/L
図 3D	120 mg/L

【0613】

これらの結果は、典型的な多重特異性エピトープ結合性タンパク質（例えば、表1に詳記されているもの）が、通常の抗体と同様のレベルまで一過性に発現されうること示している。

【0614】

実施例31. 種々の多重特異性エピトープ結合性タンパク質の絶対分子量の決定

目的：多重特異性エピトープ結合性タンパク質の種々の溶液内パラメーターを決定すること。

【0615】

方法：溶液内分子量および他の分子パラメーター、例えば流体力学的半径および固有粘度を決定するために、示差屈折率、示差粘度および光散乱を自動的に測定する三重検出系に接続された分析用サイズ排除HPLCを用いた。表2は、三重検出分析により得られた分子パラメーターを示す。

【表 2】

表 2. 多重特異性エピトープ結合性タンパク質の生物物理学的特性解析

形態	保持時間 (分)	単量体 状態 (%)	理論的 分子量 (KDa)	実験的 分子量 (KDa)	流体 力学的 半径(R_h) (nm)	固有 粘度(η) (ml/g)
標準抗体	8.5	99	144	151	5.2	6
☒ 4D	8.0	95	197	204	6.3	7
☒ 4F	8.0	95	197	202	6.3	8
☒ 4H	7.7	92	250	265	7.0	8
☒ 3D	7.7	95	250	262	7.0	8

【0616】

約3.5KDaに相当する2つの抗体 C_H2 ドメインのそれぞれにおける1つのN-連結炭水化物部分の存在を考慮すれば、表2に示されている実験的分子量値は理論値と相関する。流体力学的半径(R_h)の計算値(これは、分子の拡散により決定された分子の有効サイズである)は、該構築物への少なくとも1つのエピトープ結合性ドメインの付加から予想されたとおり、5.2nmから増加した。固有粘度(η)(これはタンパク質鎖の長さに直接関連している)も、対照抗体の6mg/gから多重特異性構築物の7ml/g~8ml/gへと増加した。流体力学的半径および固有粘度値は、無傷抗体に関して報告されているものに相関する。例えば、無傷IgGの報告されている流体力学的半径は5.4nmであり、固有粘度は6ml/gである。総合すると、これらのデータは、実験的に決定された分子パラメーターが、操作された多重特異性エピトープ結合性形態のサイズおよび構造トポロジーと合致しており、該対照抗体と良く相関することを示している。また、これらのデータは、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質形態が凝集物を形成せず、有意な構造的均一性を有することを示している。さらに、これらの生物物理学的特性は4℃で数週間の貯蔵後に不変のままである。

【0617】

実施例 3 2. 示差走査熱量測定法による種々の多重特異性エピトープ結合性タンパク質形態の熱安定性

この実施例においては、種々の多重特異性エピトープ結合性タンパク質の熱変性プロファイルを示差走査熱量測定法により分析した。

【0618】

方法: Microcal VP-DSC 超高感度走査微小熱量測定法 (Microcal, Northampton, MA) を用いて、1℃/分の加熱速度での示差走査熱量測定法 (DSC) 実験を行った。25mM ヒスチジン-HCl (pH 6) 中で DSC 実験を行った。DSC に使用した全ての溶液およびサンプルを、0.22 ミクロン-フィルターを使用して濾過し、脱気した後、該熱量計内にローディングした。該 DSC 研究に使用した全ての抗体形態は、分析用ゲル濾過クロマトグラフィーによる判定で、> 90% 単量体であった。各組の測定に関して、まず、少なくとも1つのバッファー対ベースライン測定値を得た。その直後に、該バッファー溶液をサンプルセルから除去し、約0.5mlのサンプルを1mg/mlの濃度でローディングした。各測定に関して、参照セルをサンプルバッファーで満たした。各サンプル対バッファー実験に関して、対応するバッファー対バッファーベースライン測定値を差し引いた。濃度および走査速度に関して生データを正規化した。Microcal により提供された Origin (商標) DSC ソフトウェアを使用して、データ分析およびデコンボリューションを行った。非二状態モデル (non-two-state model) を用いる Privalov & Potekhin ("Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins", Methods Enzymol. (1986) 131, 4-51) に従い、デコンボリューション分析を行い、100 反復サイクルを用いて最良フィットを得た。簡潔に説明すると、最良のデコンボリューションフィットを非依存性または依存性スキーム (非二状態モデル) により分析した。非依存性スキームは、多ドメインタンパク質における各ド

メインが、隣接ドメインの状態には無関係に、独立してアンフォールドするという仮定に基づく。依存性スキームは、相互作用性ドメインが連続的にアンフォールドして、いずれかの与えられたドメインのアンフォールディングがその隣接部の状態に依存する定序的過程を仮定する。DSCデコンボリューションの結果の解釈は、多重特異性抗体形態中の異なるドメインが、免疫グロブリン (Tischenkoら (1982) "A thermodynamic study of cooperative structures in rabbit immunoglobulin G, Eur J Biochem., 126, 517-521) または他の多重ドメインタンパク質 (Bateyら (2008), "The folding pathway of a single domain in a multiple domain protein is not affected by its neighboring domain", J. Mol. Biol. 印刷中) に関して記載されているとおりに協調転移しながら独立にアンフォールドするという事実に基づくものであった。転移ピークの最高値に対応する変性温度 T_m を、少なくとも3つの反復実験から、各構築物に関して決定し、それは、 $\pm 2\%$ より大きな変動を示さなかった。変性後にサンプルを再走査することにより、リフォールディングを分析した。結果を以下の表3にまとめる。

【表 3】

表 3. 過剰熱容量曲線のデコンボリューションにより測定された、種々の多重特異性エピトープ結合性タンパク質に存在するエピトープ結合性ドメインにより示された転移温度 (T_m)

タンパク質形態	転移番号	対応ドメイン	$T_m(^{\circ}\text{C})$
Ab	1	C_H2	69
	2	Fab	75
	3	C_H3	82
図4D	1	scFv-軽鎖のN末端	57
	2	C_H2	69
	3	Fab	73
	4	C_H3	82
図4F	1	scFv-重鎖のN末端	63
	2	C_H2	69
	3	Fab	73
	4	C_H3	82
図4H	1	scFv-軽鎖のN末端	61
	2	scFv-重鎖のN末端	63
	3	C_H2	69
	4	Fab	75
	5	C_H3	82
図3D	1	第1 scFv-重鎖のC末端	57
	2	第2 scFv-重鎖のC末端	65
	3	C_H2	69
	4	Fab	75
	5	C_H3	82

【0619】

結果：対照抗体1B8に関するサーモグラムは、 69°C 、 75°C および 82°C の変性温度 T_m を有

する3つの異なるアンフォールディング転移を示している。これらの転移は、それぞれ、 C_H2 、Fabおよび C_H3 ドメインの変性に対応する。該IgG分子は、異なる条件下で変性する少なくとも3つの異なるドメインまたはドメイン群が存在する多重ドメインタンパク質であることを、これらの3つの異なるピークの存在は示している。したがって、該構築物およびそれらの潜在的多重ドメイン協同的変性の全安定性を調べるために、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質形態の変性転移を分析することは興味深い。図4Dに示す多重特異性形態のデコンボリューション分析（表3）は、4つの転移、すなわち、 57°C の T_m を有するもの、 69°C の T_m を有するもの、 73°C の T_m を有するもの、および 82°C の T_m を有するものを明らかに示している。 57°C の T_m を有するピークは、軽鎖のN末端に結合したscFvの変性転移に対応する（図4D）。一般に、scFvは、単一の転移事象により特徴づけられるアンフォールディングを伴う、ある与えられた抗体ドメインより低い変性温度を有する。図4Dの形態における軽鎖のN末端に連結されたscFvは該タンパク質スカフォールドの全安定性を不安定化しない。実際、図4Dの形態のFabドメインの変性のための 73°C の T_m は、親Fabで観察される T_m （これは 75°C である）と有意には異ならない（データ非表示）。また、図4Dの形態の C_H2 ドメインの変性温度（ $T_m = 69^\circ\text{C}$ ）および C_H3 ドメインの変性温度（ $T_m = 82^\circ\text{C}$ ）は、対照抗体に比べて変化していない。同様に、図4の形態のタンパク質における抗体重鎖のN末端において連結されたscFv（ $T_m = 63^\circ\text{C}$ ）は該タンパク質スカフォールドの全フォールディングを不安定化しない。実際、この形態に関しては、デコンボリューション（deconvolution）分析は、Fabドメインの変性（ $T_m = 73^\circ\text{C}$ ）が対照抗体のFabドメインの変性（ $T_m = 75^\circ\text{C}$ ）に非常に類似しており、図4Dの形態におけるFabドメインで観察される変性転移（ $T_m = 73^\circ\text{C}$ ）と同じであることを示している。さらに、この抗体形態では、 C_H2 ドメインの変性（ $T_m = 69^\circ\text{C}$ ）および C_H3 ドメインの変性（ $T_m = 82^\circ\text{C}$ ）は対照抗体と比べて不変のままである（表3）。

【0620】

図3Dの形態のタンパク質の変性に関するデンコンボリューションサーモグラムは、 C_H3 ドメインのC末端に連結されたscFvが、図3Dの形態における重鎖のC末端に連結された第1 scFvに関して 57°C の T_m および図3Dの形態における重鎖のC末端に連結された第2 scFvに関して 65°C の T_m を有する特有の変性転移を有することを示している。 C_H3 ドメインの後に連結されたこれらのscFvのアンフォールディングは該タンパク質スカフォールドの全体的なアンフォールディングを不安定化しない。実際、これらの2つの構築物は、Fab、 C_H2 および C_H3 ドメインに関して、対照抗体に類似した変性転移を有する（表3）。

【0621】

図4Hの形態のタンパク質のサーモグラムのデンコンボリューション分析は、 61°C 、 63°C 、 69°C 、 75°C および 82°C の T_m を有する5つの転移を明らかに示している（表3）。 61°C の転移 T_m を有するピークは、軽鎖のN末端に連結されたscFvの変性転移に対応する。 63°C の転移 T_m を有するピークは、重鎖のN末端に連結されたscFvの変性転移に対応し、一方、 69°C 、 75°C 、 82°C の転移 T_m を有するその他の3つのピークは、それぞれ、Fab、 C_H2 および C_H3 ドメインの変性転移に対応する。これらの前者の T_m 値は、図4Hの形態が対照抗体と同程度に安定であることを証明している。

【0622】

総合すると、これらの実験は、多重ドメインアンフォールディングにより特徴づけられた多重特異性エピトープ結合性タンパク質形態が、確固たる熱安定性を有することを証明している。また、非依存性DSCアンフォールディング転移は、該多重特異性エピトープ結合性タンパク質形態と同様に多重ドメインタンパク質における単一ドメインのフォールディング経路がその隣接ドメインにより影響されないことを示している最近の研究に合致している。

【0623】

実施例 3.3. 多重特異性エピトープ結合性タンパク質により示される3つの異なる抗原の同時結合

目的：BIAcore装置上に固定化された多重特異性エピトープ結合性タンパク質上の3つの

異なる抗原の同時結合を示すこと。

【0624】

方法：3つの抗原、すなわち、EB、EAおよびEphA2を連続的にP1コート化チップ上に注入することにより、P1（図3D）の三重特異性結合能をBIAcoreにより評価した。P1エピトープが第1抗原（EB）で飽和されていたら、第2抗原（EA）を注入し、ついで第3抗原（EphA2）を注入した。陰性結合対照として、オボアルブミンを使用した。

【0625】

結果：図36に示されているとおり、P1エピトープ結合性タンパク質は、3つの異なる抗原、すなわち、EB、EAおよびEphA2に同時に結合する能力を示している（上側の曲線）。この結合能はP1エピトープ結合性タンパク質に特異的である。なぜなら、オボアルブミンで行った類似実験は特異的結合を示さなかったからである（下側の曲線）。これらの結果は、多重特異性エピトープ結合性タンパク質が、成分エピトープ結合性ドメインにより認識される異なる抗原に同時に結合しうることを示している。

【0626】

実施例34. 多重特異性エピトープ結合性タンパク質の細胞インターナリゼーション

目的：多重特異性エピトープ結合性タンパク質の細胞インターナリゼーションを示すこと。

【0627】

方法：共焦点顕微鏡検査を用いる抗体インターナリゼーション - EphA2を発現するPC3細胞を 1×10^6 /ウェルの濃度で96ウェルU底プレートに加えた。該細胞をPBSで2回洗浄し、5 μ gの対照（R347）、親（12G3H11）または多重特異性エピトープ結合性タンパク質（P1）で氷上で30分間標識した。ついで細胞をPBSで2回洗浄し、37℃で増殖培地と共に0、10、20、30、60分間インキュベートした。ついで該細胞を3.7% パラホルムアルデヒド中で20分間固定し、PBS中で2回洗浄し、0.5% Triton X-100を使用して室温で5分間にわたり透過性亢進させた。該細胞を再びPBSで2回洗浄し、最後に1 μ gのAlexaFluor-488ヤギ- γ -ヒトIgG抗体（Invitrogen）で標識した。冷PBSでの2回の洗浄により、過剰の二次抗体を除去した。該細胞をコート化細胞スライド上へ遠心し、DAPI（Vector Laboratories）と共にVectasheild Hardsetマウンティング培地を使用してカバーガラス下にマウントした。Leica SP5（Mannheim, Germany）顕微鏡を使用して、63倍の倍率での共焦点レーザー走査顕微鏡検査により、インターナリゼーションを分析した。

【0628】

結果：該親抗体および多重特異性エピトープ結合性タンパク質の細胞取り込みを確認するために、3つの全ての標的受容体（EphA2、EAおよびEB）を発現するMiaPaca腫瘍細胞系を多重特異性エピトープ結合性タンパク質P1、親抗体または陰性対照抗体と共に5 μ g/mlで37℃で0、10、20、30および60分間インキュベートした。共焦点レーザー走査顕微鏡検査を用いて、蛍光標識抗Fc抗体により、受容体媒介インターナリゼーションが検出された。陽性インターナリゼーションは、典型的には、膜（細胞外）蛍光の減少と共に細胞の細胞質内の明るい蛍光により特徴づけられる。図37BおよびCから理解されたとおり、多重特異性エピトープ結合性タンパク質P1および親抗体（12G3H11）は、受容体媒介インターナリゼーションに典型的なパターンを伴う細胞内染色（緑色蛍光色）により示されたとおり、迅速（約10分間）にインターナリゼーションされた。293細胞での対照実験はP1または親抗体（12G3H11）の取り込みを示さなかった（データ非表示）。さらに、無関係な抗体（R347、図7A）を使用した場合には、MiaPaca細胞においてインターナリゼーションは検出されず、インターナリゼーションのために許容的でない条件である4℃において、検出可能なインターナリゼーションは観察できなかった。このデータは、多重特異性エピトープ結合性タンパク質P1が、抗EphA2親抗体と同様に、in vitroで効率的にインターナリゼーションされることを証明している。

【0629】

実施例35. 多重特異性エピトープ結合性タンパク質P1によるin vitroおよびin vivo受容体分解

10

20

30

40

50

目的：多重特異性エピトープ結合性タンパク質がその標的エピトープとin vivoで機能的に相互作用しうることを示すこと。

【0630】

方法：in vivo薬物動態学的（PK）および薬動学的（PD）分析：PC-3前立腺腺癌細胞を7週齢のヌードマウス（Harlan Sprague Dawley）の右側腹部に 5×10^6 細胞/マウスで皮下移植した。腫瘍を約100mm³まで進行させ、多重特異性エピトープ結合性タンパク質Pまたは親抗EphA2または抗EB1抗体を67nmol/kg体重で投与した。投与後1、4、8、24、48、72、120および144時間の時点で投与群ごとに各時点で3匹のマウスから腫瘍および血清を回収した。PBSが投与された3匹のマウスの追加的な1群からの腫瘍および血清を投与直後（0時間）に回収した。腫瘍および血清を、処理前に-80℃で保存した。Fast Prep 24 System（MP Biomedicals）上のLysing Matrix Aチューブ（MP Biomedicals）内で、25 μg/ml アプロチニンおよび10 μg/ml ロイペプチンを含有する1% Triton-細胞溶解バッファー中、腫瘍をホモジナイズした。ライセートを10,000rpm、4℃で5分間遠心分離した。上清を集め、BCA Protein Assay（Pierce）によりタンパク質濃度に関して分析した。該腫瘍上清からの30 μgの全タンパク質を10%ビス-トリスゲル上にローディングし、EphA2、EBおよびGAPDHに関してウエスタンブロットにより分析した。各ゲル上にローディングされた各時点からの1つのサンプルと共に腫瘍ライセートを3つの別々のゲル上にローディングした。ウエスタンブロット後のタンパク質バンドをデンスitrometry分析により定量し、それらの3つのブロットのそれぞれに存在する0時間の時点のPBS対照からの単一のタンパク質バンドに対して正規化した。EphA2またはEB結合性ELISAを用いて、P1タンパク質または親抗EphA2または抗EB対照抗体の存在に関して、該血清サンプルを分析した。簡潔に説明すると、96ウェルMaxisorp Elisaプレート（Nunc）をPBS（pH 7.4）中の5 μg/mlのヒトEphA2またはEBで4℃で一晩コートした。プレートを4% 脱脂乾燥乳でブロッキングし、洗浄し、血清サンプル（1:1000希釈物）をローディングし、22℃で1時間インキュベートした。EBおよびEphA2結合性ELISAの両方に関して、1mg/mlから10ng/mlまでの系列希釈で標準曲線を作成した。EB結合性ELISAでは、P1タンパク質血清サンプルを定量的ためにP1タンパク質標準曲線と比較し、抗EB対照抗体血清サンプルを抗EB対照抗体標準曲線と比較した。使用したHRP結合二次抗体は、抗EB対照抗体ELISAの場合にはヤギ抗マウス（Jackson Immuno labs）、P1タンパク質特異的ELISAの場合にはヤギ抗ヒト（Jackson Immunolabs）であった。EphA2結合性ELISAでは、P1タンパク質血清サンプルを定量的ためにP1タンパク質標準曲線と比較し、抗EphA2対照抗体血清サンプルを抗EphA2対照抗体標準曲線と比較した。抗EphA2対照抗体および三重特異性抗体EphA2 ELISAの両方に使用したHRP結合二次抗体はヤギ抗ヒト（Jackson Immunolabs）であった。

【0631】

結果：多重特異性エピトープ結合性タンパク質P1がin vitroおよびin vivoにおいてその標的受容体（EphA2、EAおよびEB）の分解を誘導するかどうかを判定するために、受容体分解アッセイを行った。EBおよびEphA2を発現するPC-3細胞を選択した。なぜなら、それは、ヌードマウスに注射されると腫瘍へと増殖しうるからである。残念なことに、PC-3細胞はEAを発現しない。したがって、この受容体のin vitro分解に関してはアッセイすることができなかった。一方、in vitro受容体リン酸化に関して記載されているとおり、MiaPaca細胞系はEA、EphA2およびEBを発現するが、これらの細胞を該受容体分解アッセイに使用することはできなかった。なぜなら、（1）それらは、in vivoにおいて、低く且つ可変的な腫瘍成長速度を示し、（2）MiaPaca細胞またはEAを発現する他の腫瘍細胞系においては、親抗EA抗体（ひいては多重特異性エピトープ結合性タンパク質P1）はEA分解を誘導し得ないからである。図6から理解されたとおり、P1タンパク質、PC3細胞と共にインキュベートされると、EB（図38A）およびEphA2（図38B）は共に、個々の抗EphA2および抗EB親抗体と比べて強力に分解される。つぎに、本発明者らは、P1タンパク質が全身投与後にin vivo腫瘍モデル系において標的受容体の分解を誘導するのかどうかを問うた。in vivo受容体分解を誘導するためには、該三重特異性抗体が腫瘍部位に到達する必要があるだけでなく腫瘍自体の内部へ浸透する必要もあることを指摘することは重要である。PC-3細胞を

ヌードマウスに接種し、P1タンパク質または親抗体での処理の後のEphA2およびEBの発現レベルを決定することにより、*in vivo* EphA2およびEB分解の成功を証明した。図7において理解されたとおり、EB (A, B) およびEphA2 (C, D) は共に、それぞれの親抗EphA2および抗EB抗体より良好にP1タンパク質により効率的に分解される。これらの結果は、3つの異なる抗原に同時に結合するよう設計されたP1タンパク質が細胞表面における異なる受容体の組合せのクラスター化を（個々の抗体より良好に）効率的に促進して、インターナリゼーションおよび分解の効率を改善し、これが相当な受容体ダウンレギュレーションを引き起こして、有意な抗腫瘍応答を招きうることを示唆している。

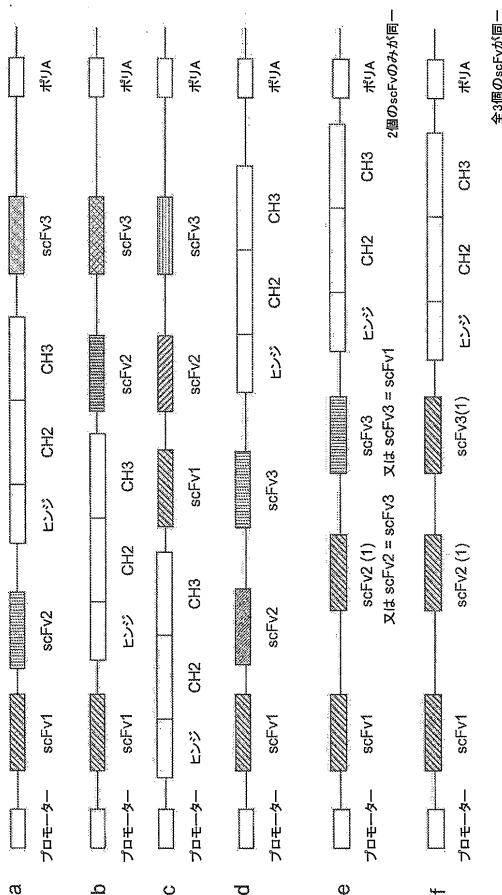
【0632】

10

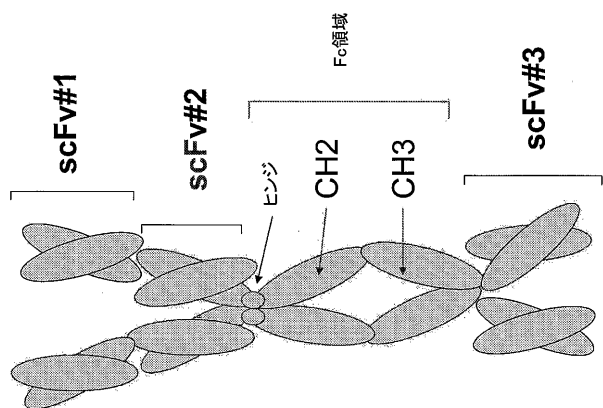
実施例 36. 多重特異性エピトープ結合性タンパク質の薬物動態学的分析

多重特異性エピトープ結合性タンパク質P1およびその親抗EphA2および抗EB抗体の薬物動態学的分析を、PC-3腫瘍担持ヌードマウスを使用して行った。P1タンパク質および親抗体の血漿中濃度を特定の時点においてELISAにより測定した。図40に示されているとおり、P1タンパク質は、投与後144時間の時点で尚も、EphA2またはEB ELISAを用いて検出可能（> 200nM）であり、P1タンパク質の血漿中濃度のレベルは個々の親抗体のレベルに匹敵する。これらのデータは、*in vivo*腫瘍モデルにおけるP1タンパク質の半減期が、そのそれぞれの親抗体のものに類似していることを示唆している。これらの結果はまた、P1タンパク質が*in vivo*で非常に安定であることを示唆している。

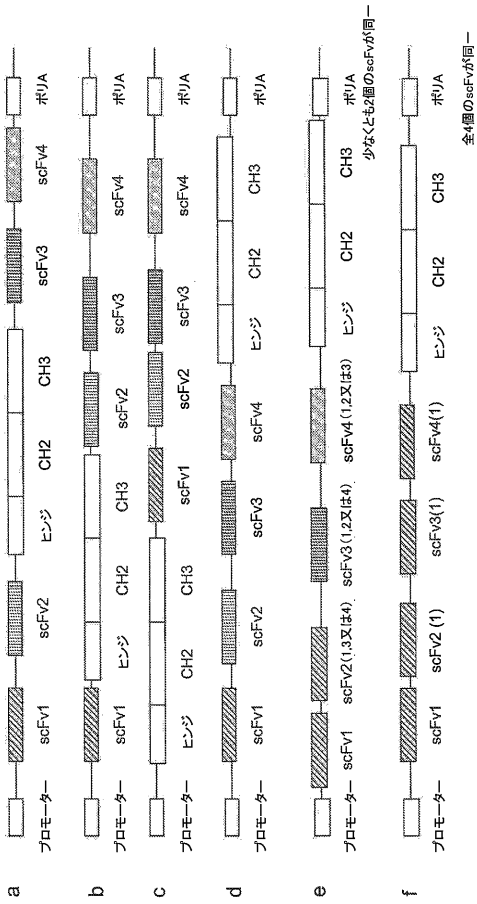
【図 1 - A】



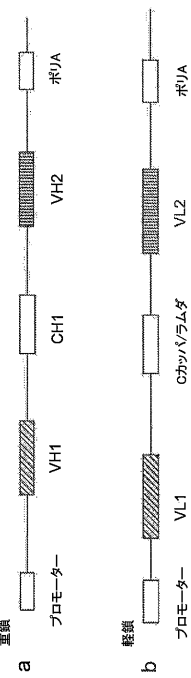
【図 1 - B】



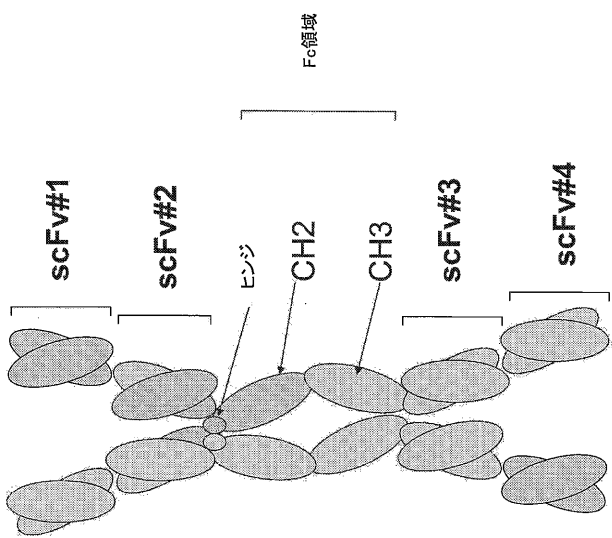
【図 2 - A】



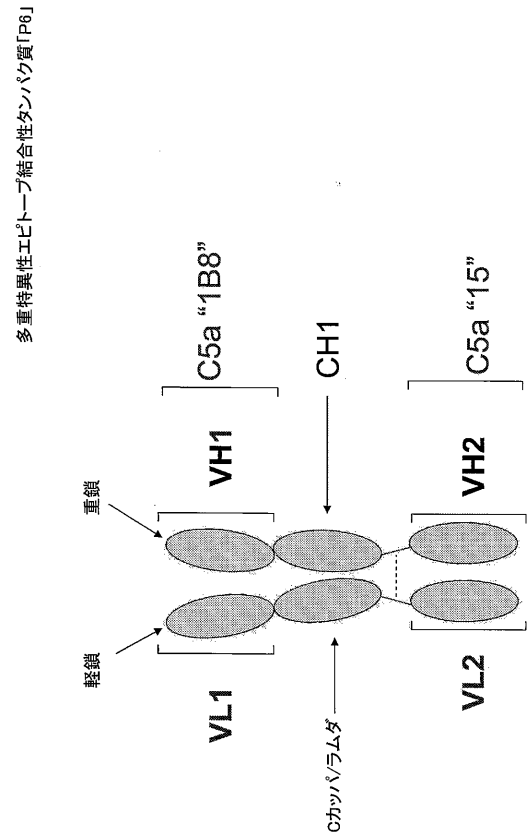
【図 2 - C】



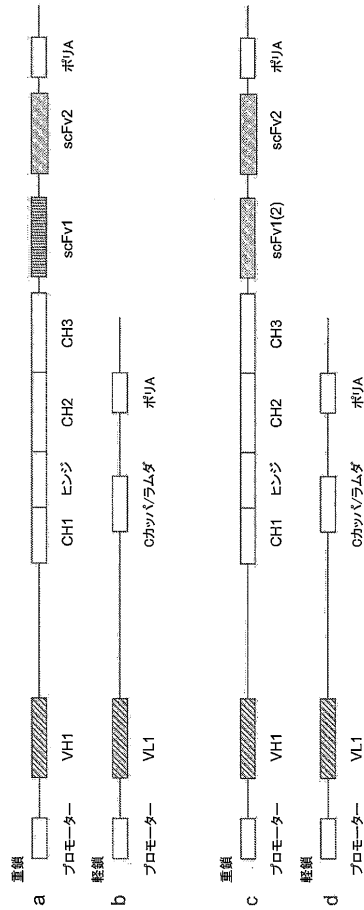
【図 2 - B】



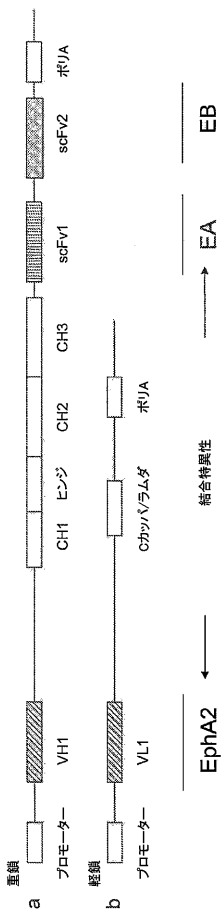
【図 2 - D】



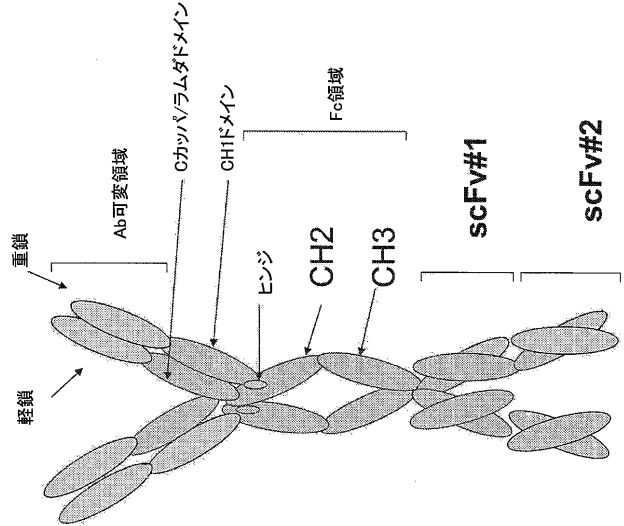
【図 3 - A】



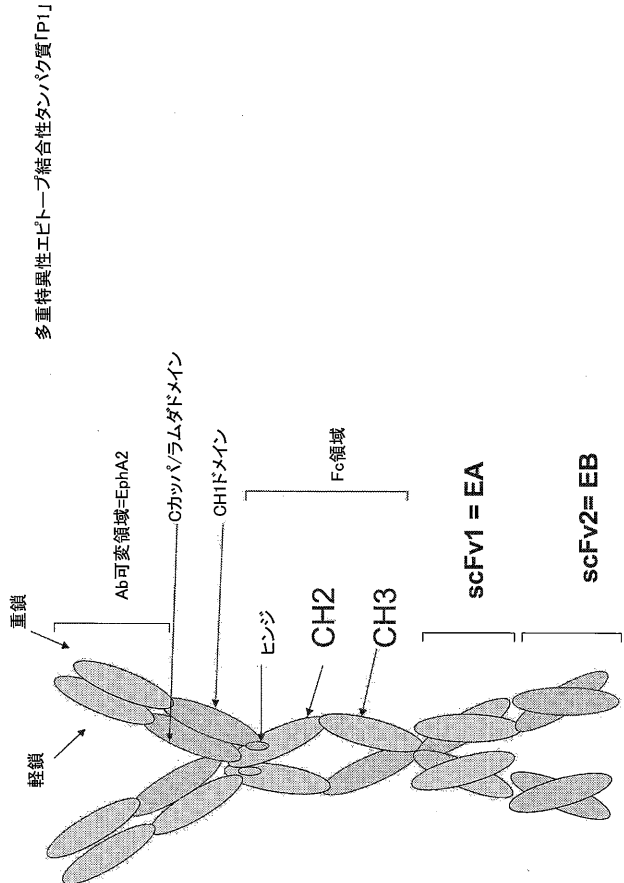
【図 3 - C】



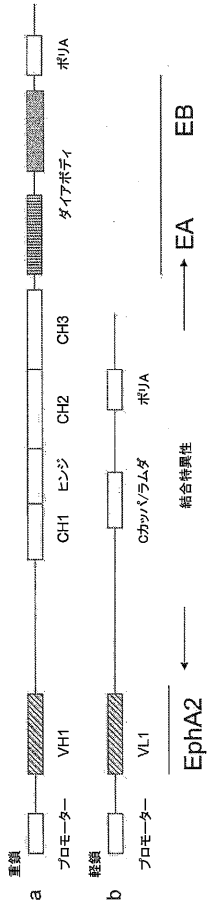
【図 3 - B】



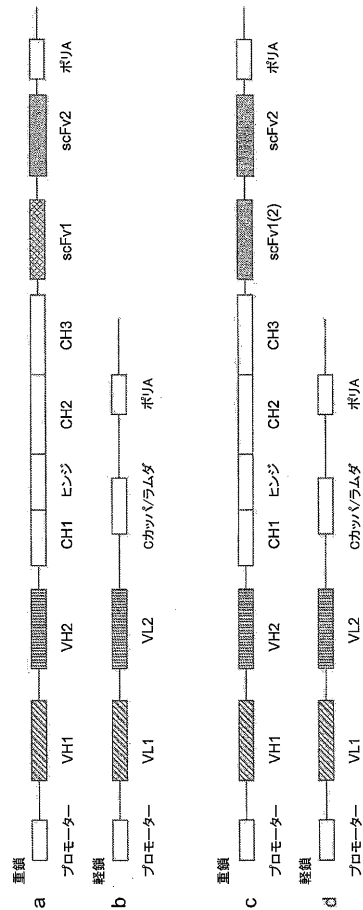
【図 3 - D】



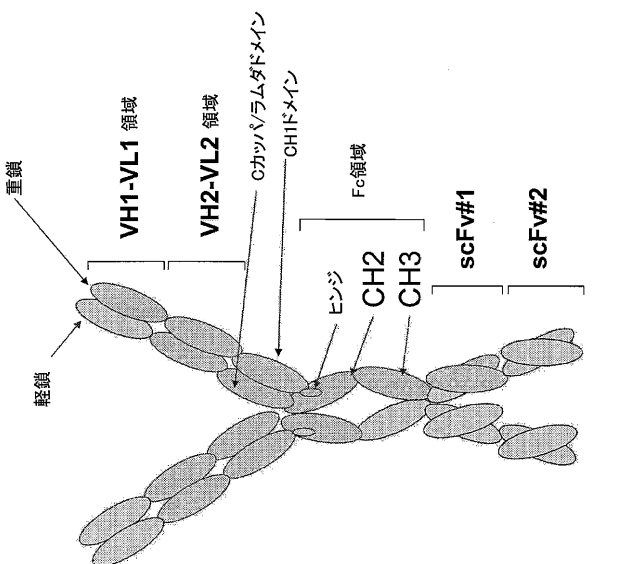
【図 3 - F】



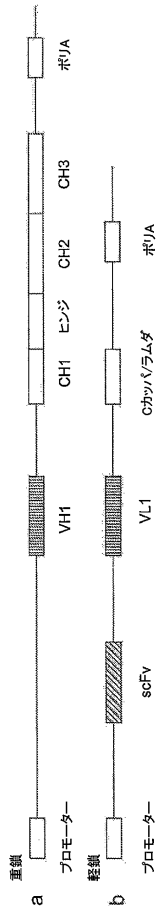
【図 4 - A】



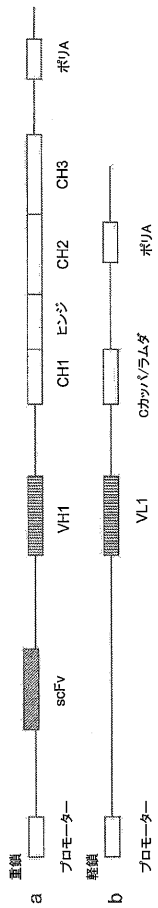
【図 4 - B】



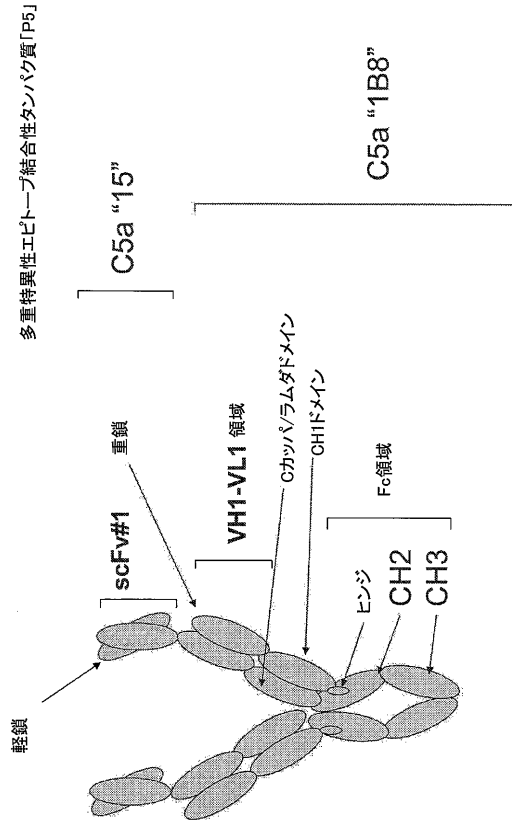
【図 4 - C】



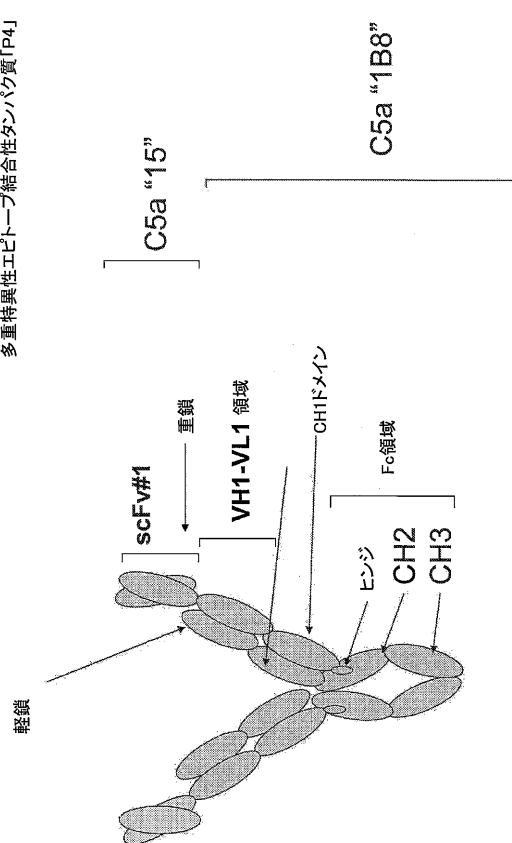
【図 4 - E】



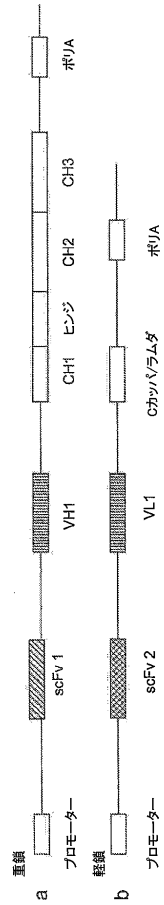
【図 4 - D】



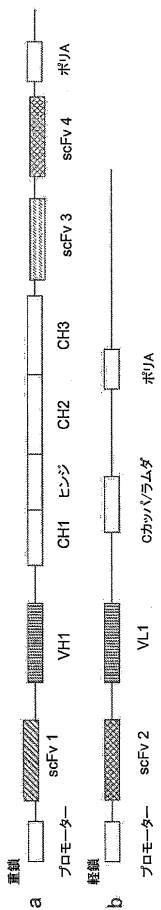
【図 4 - F】



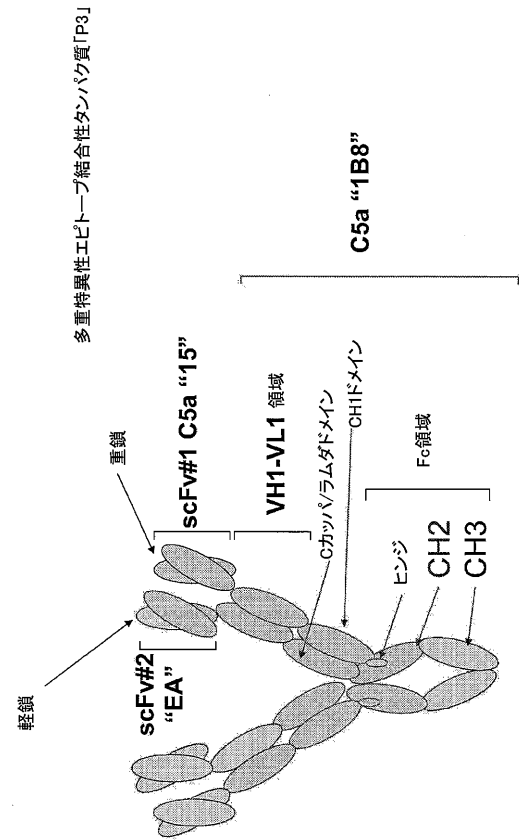
【図 4 - G】



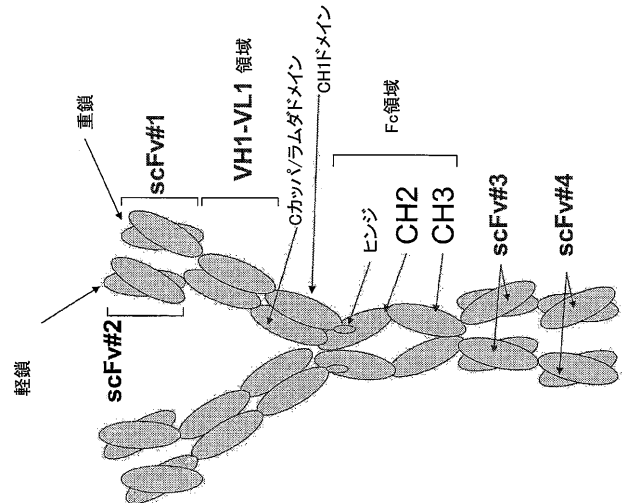
【図 4 - I】



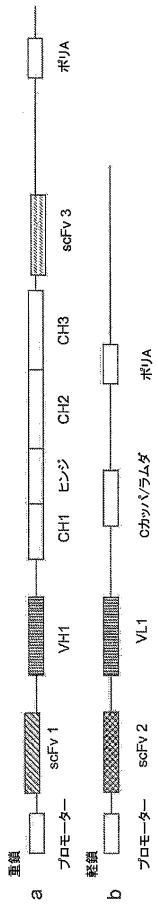
【図 4 - H】



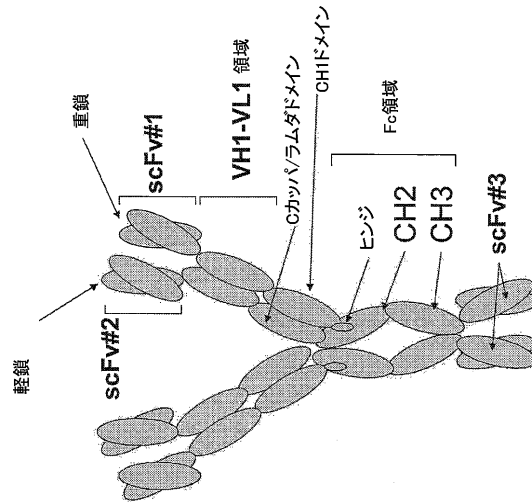
【図 4 - J】



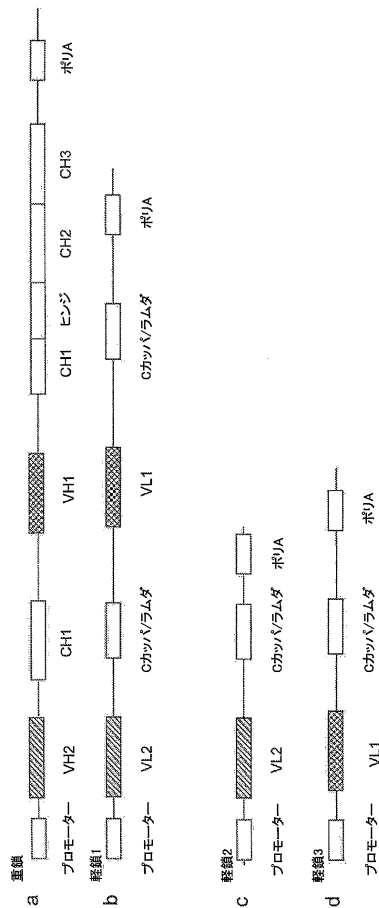
【図 4 - K】



【図 4 - L】

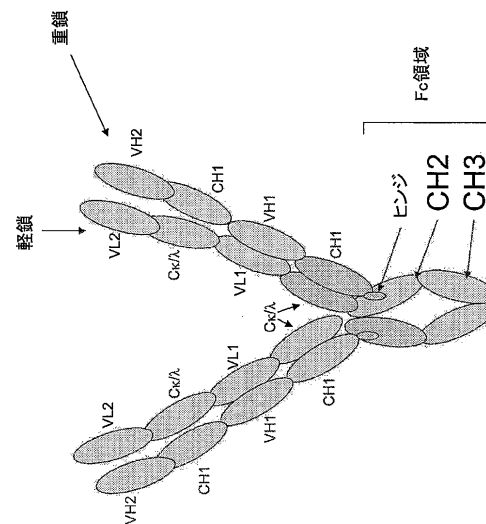


【図 4 - M】

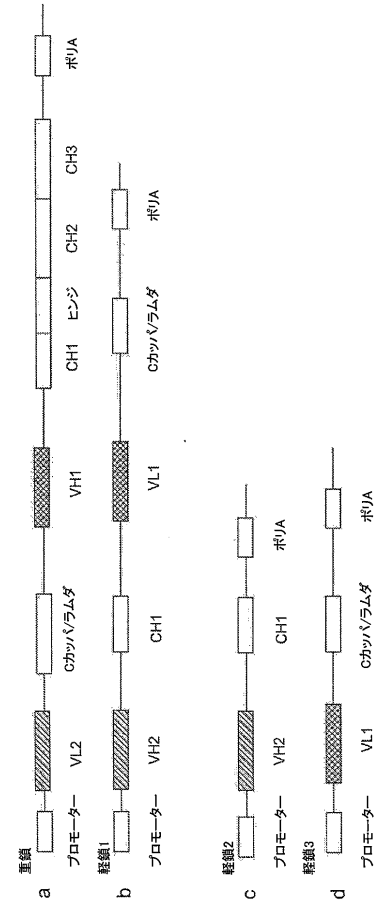


【図 4 - N】

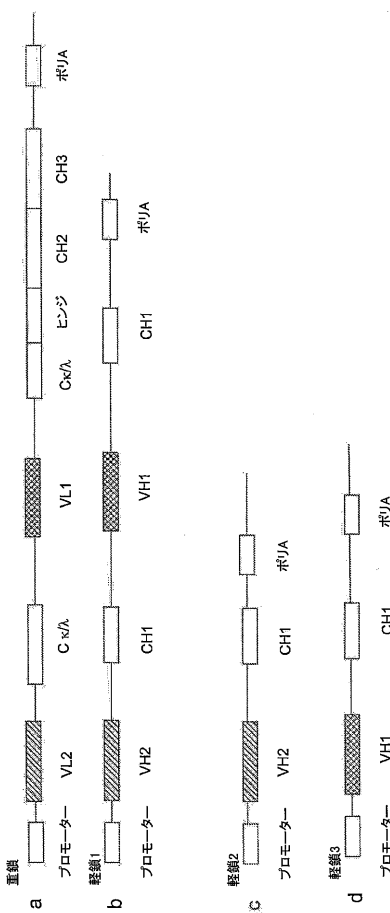
二重FabドメインIgG形態1 (DFD-1)



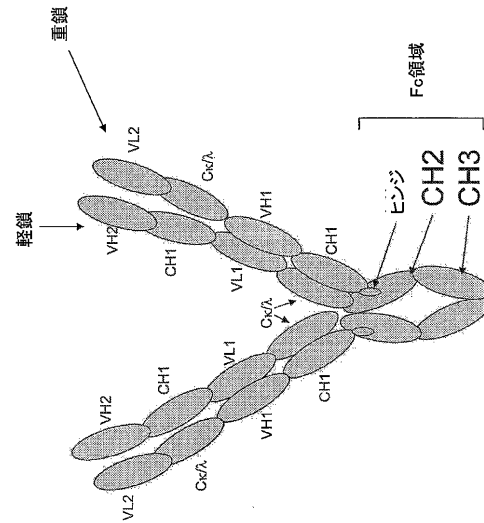
【図 4 - P】



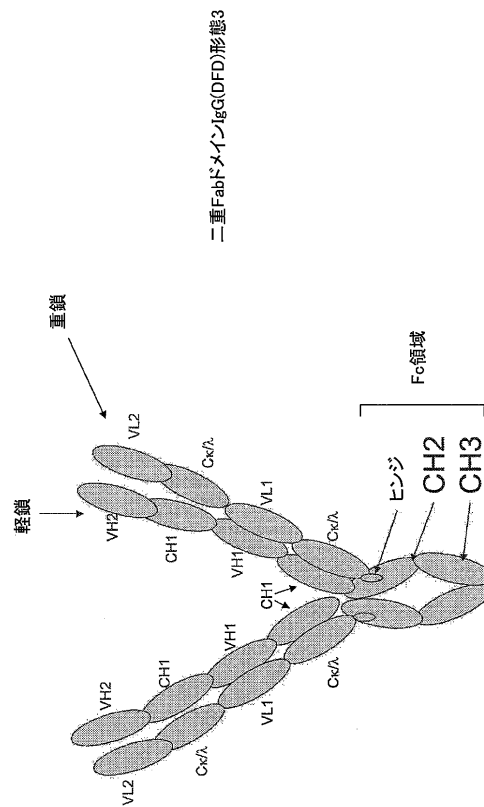
【図 4 - Q】



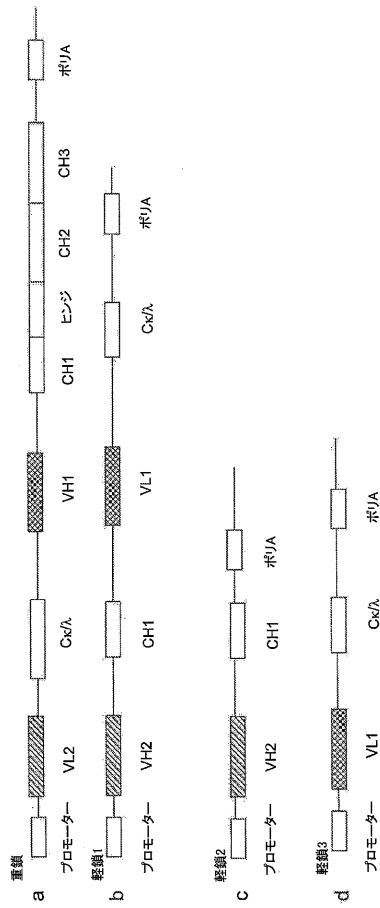
二重FabドメインIgG形態2 (DFD-2)



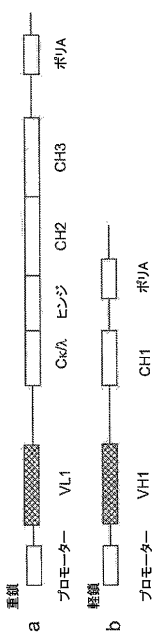
【図 4 - R】



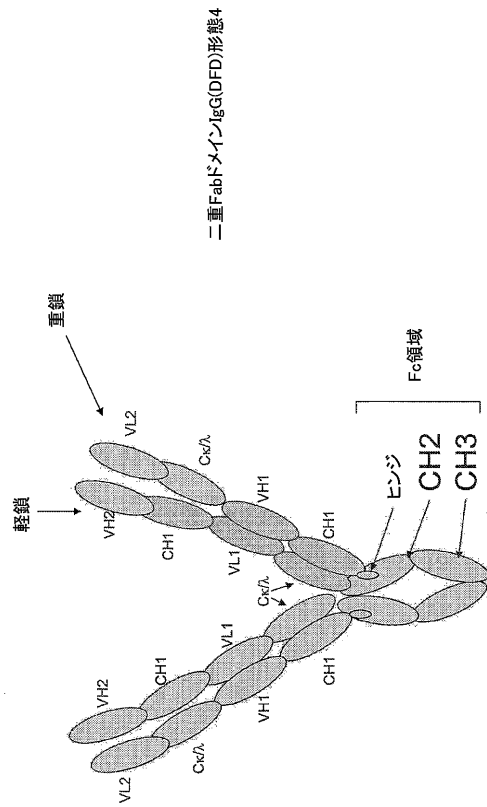
【図 4 - S】



【図 4 - U】

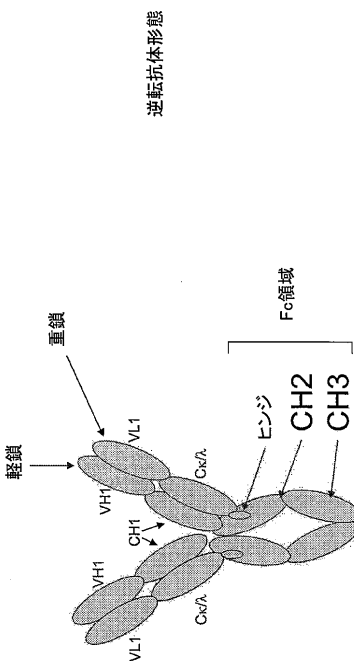


【図 4 - T】



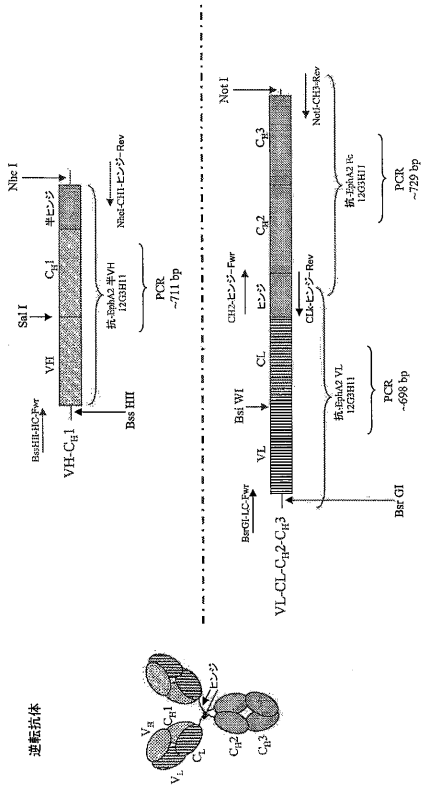
二重FabドメインIgG(DFD)形態4

【図 4 - V】

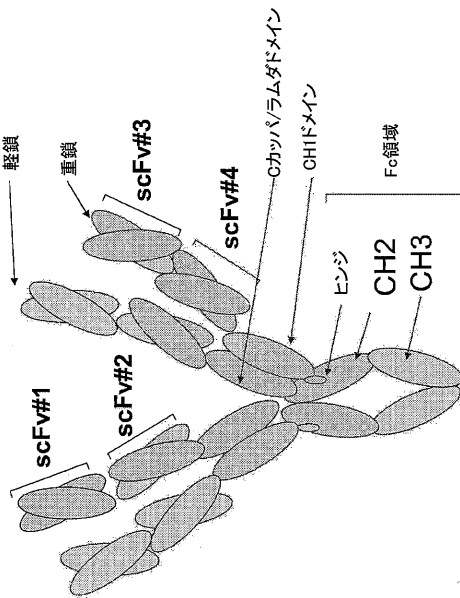


逆転抗体形態

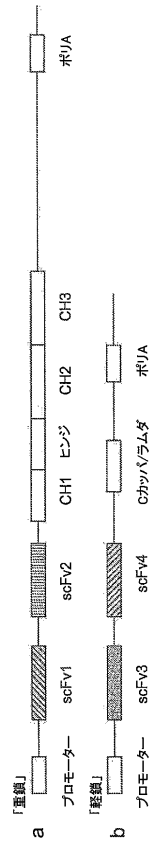
【図 4 - W】



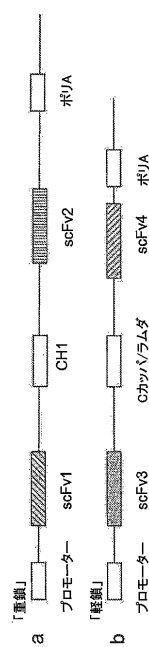
【図 5 - B】



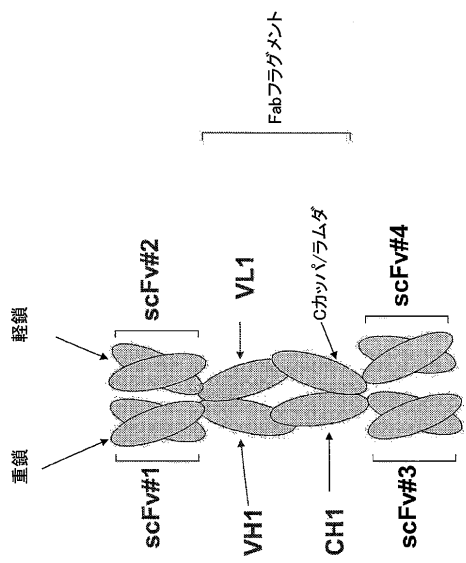
【図 5 - A】



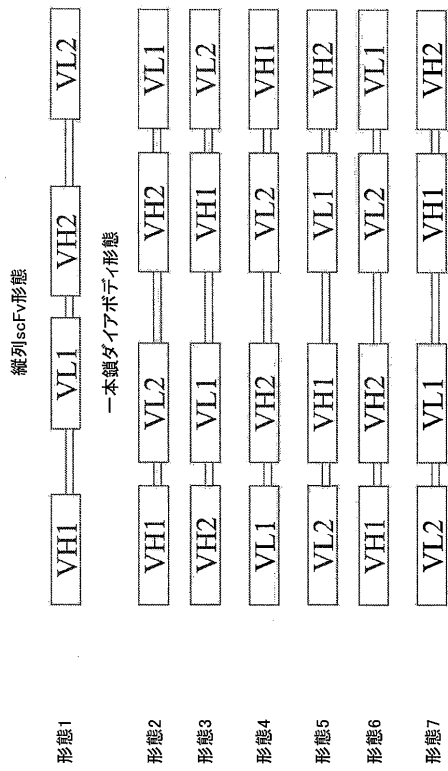
【図 5 - C】



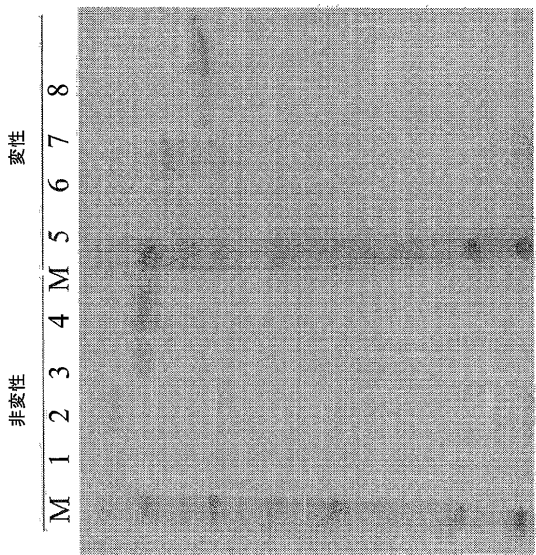
【図 5 - D】



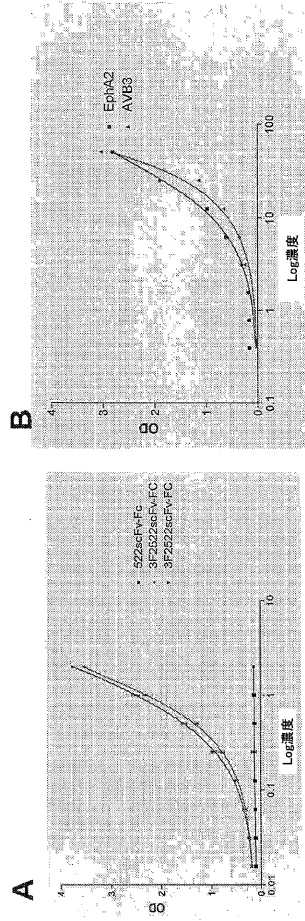
【図 6】



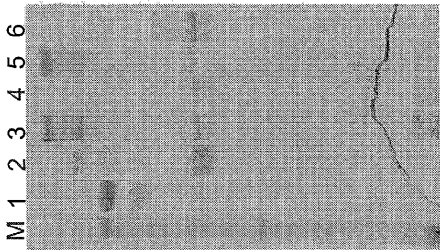
【図 7】



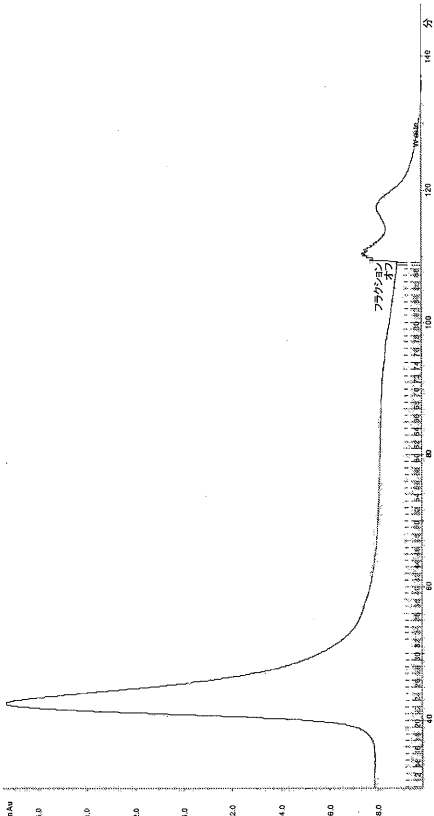
【図 8】



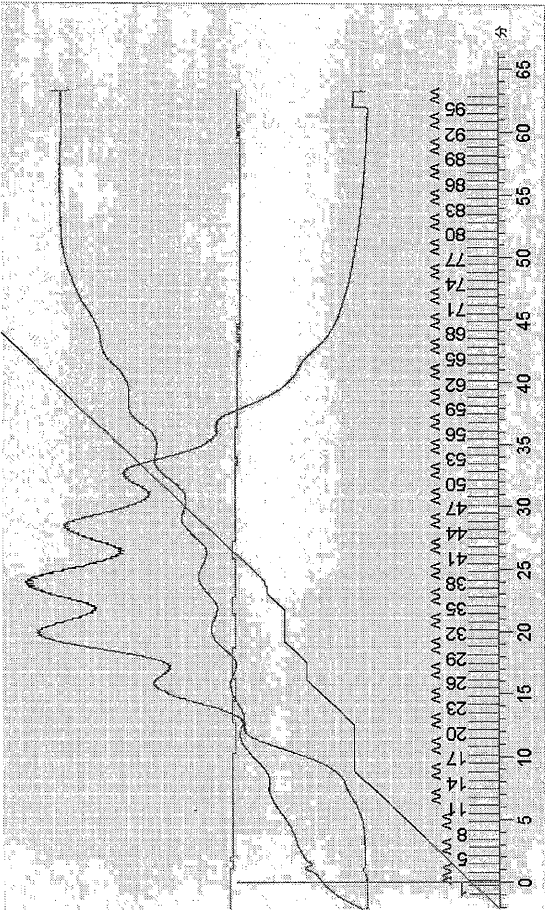
【図 9】



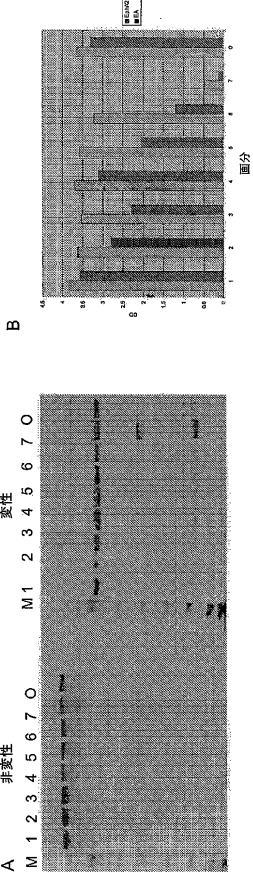
【図 10】



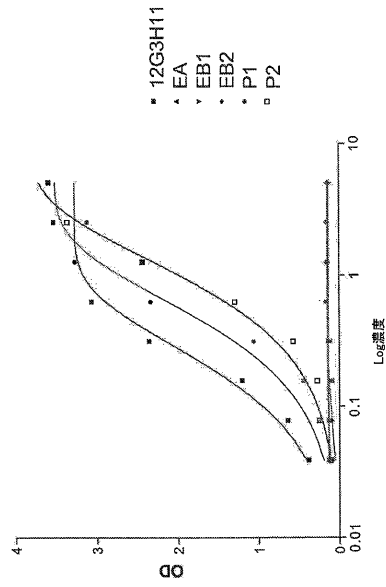
【図 11】



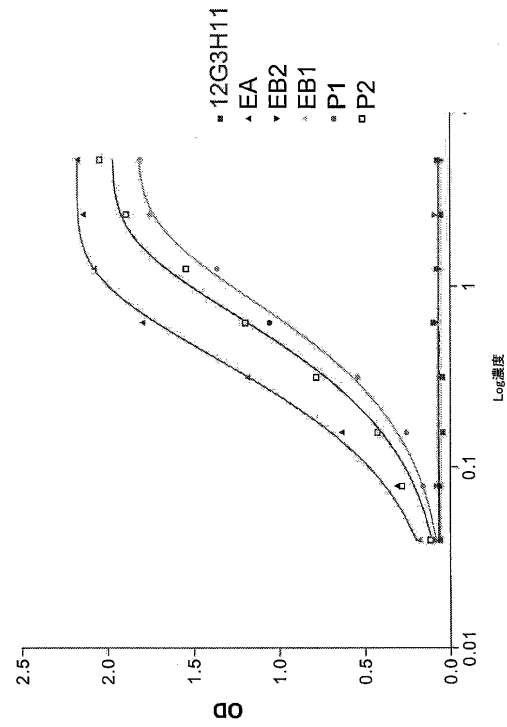
【図 12】



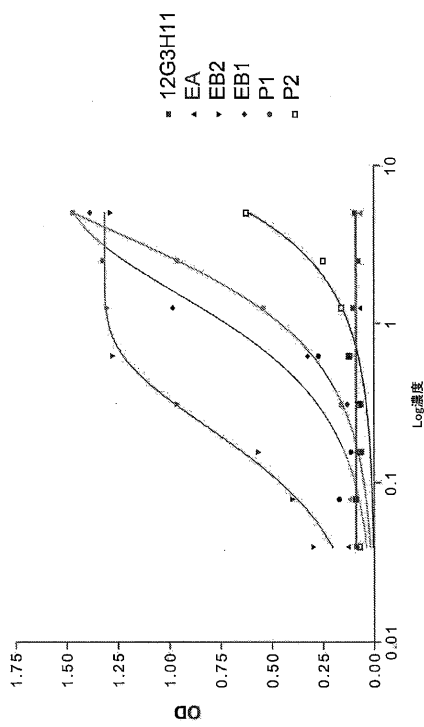
【図 13】



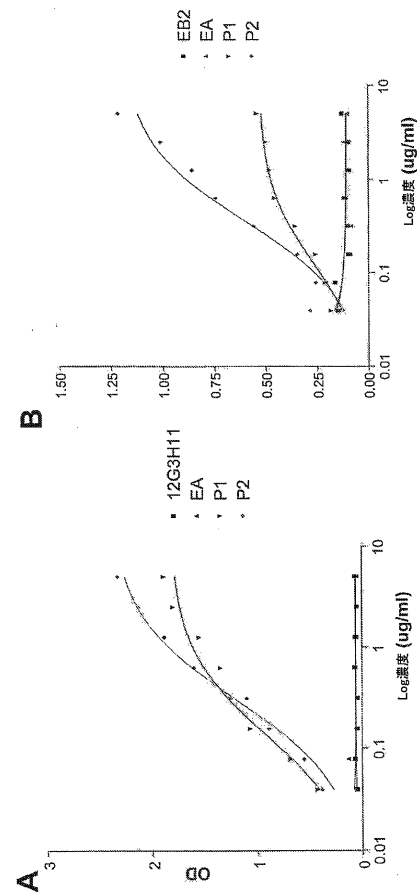
【図 14】



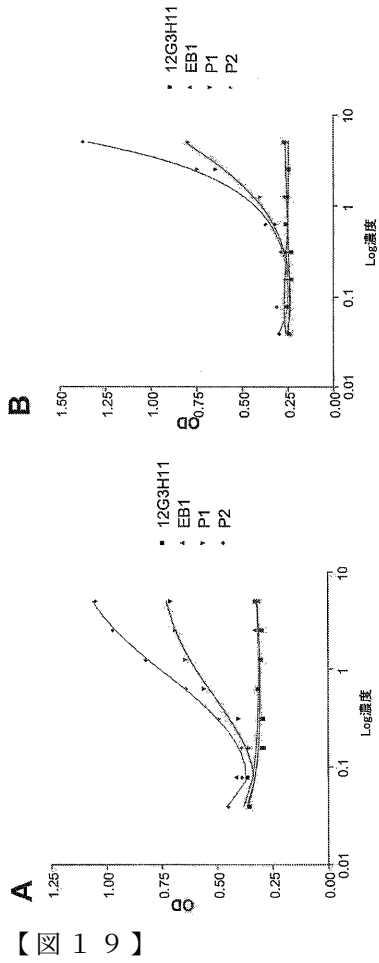
【図 15】



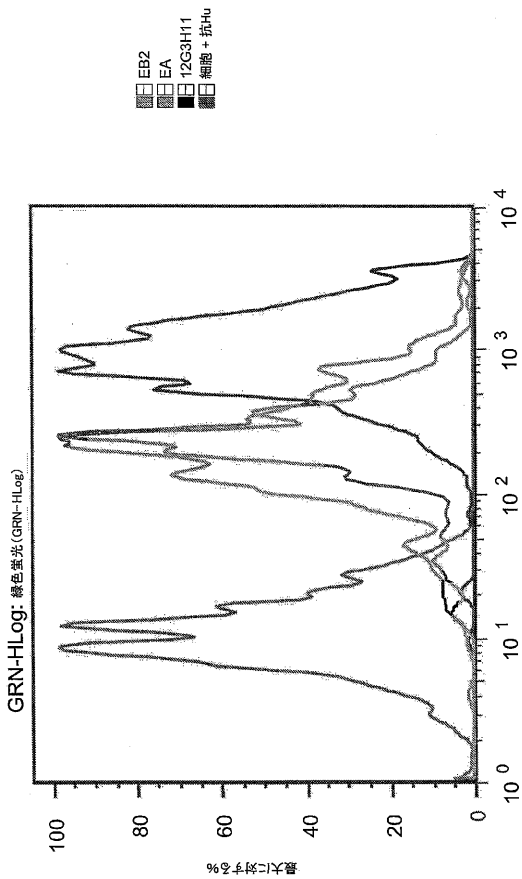
【図 16】



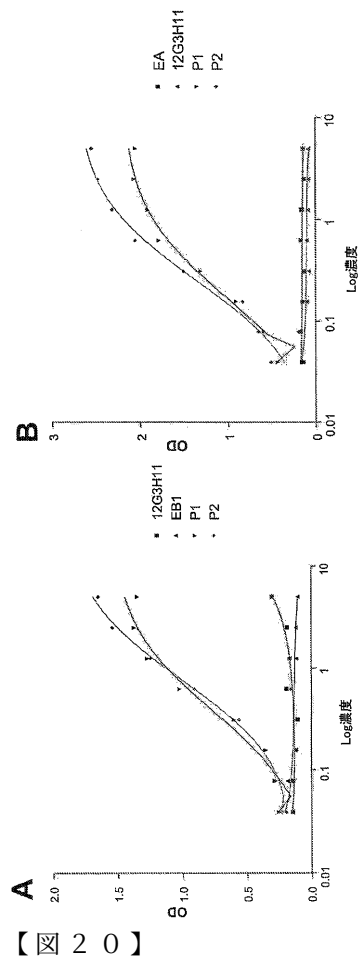
【図 17】



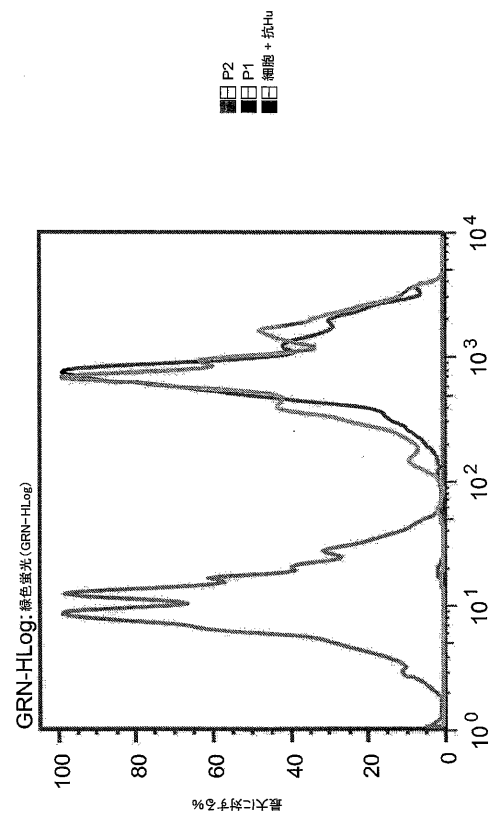
【図 19】



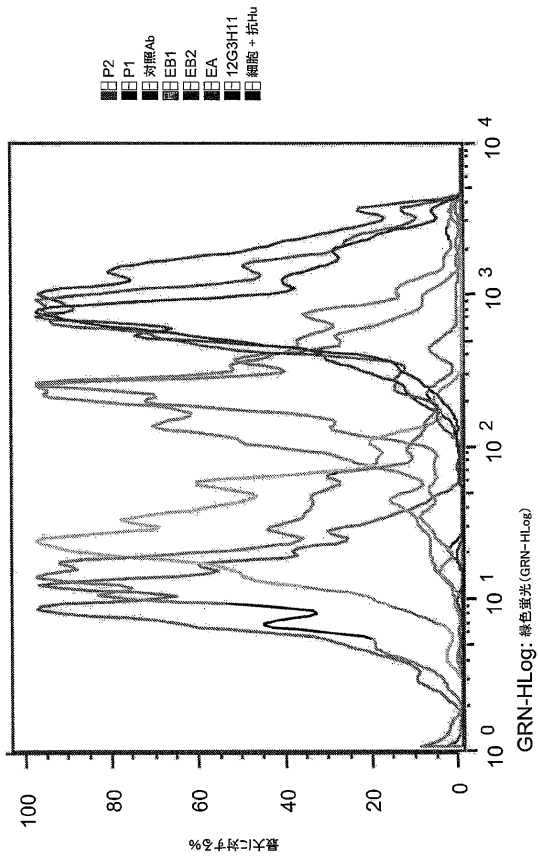
【図 18】



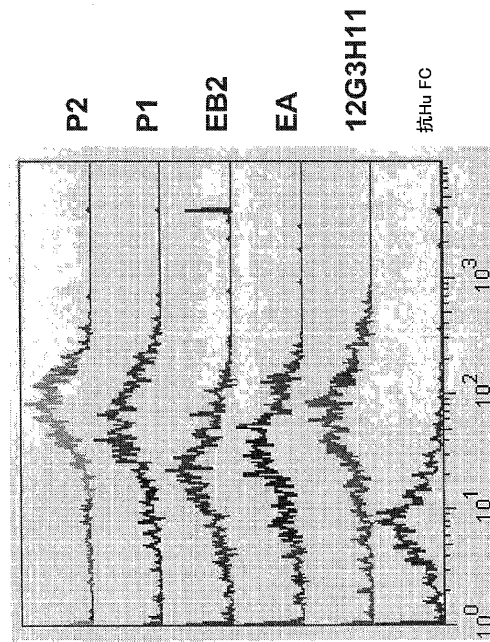
【図 20】



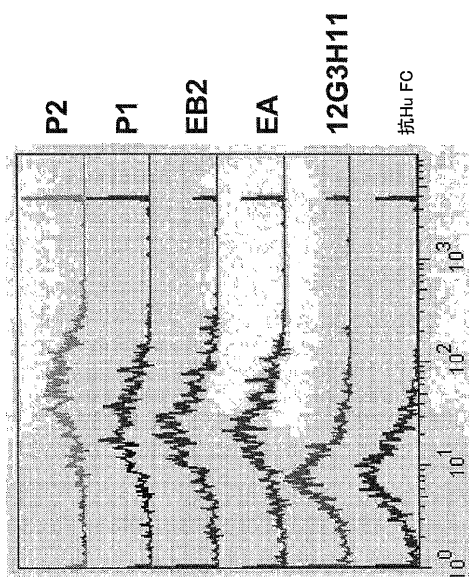
【図 2 1】



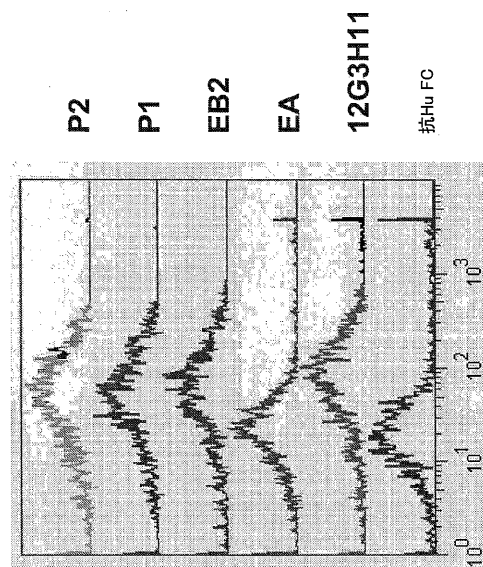
【図 2 2】



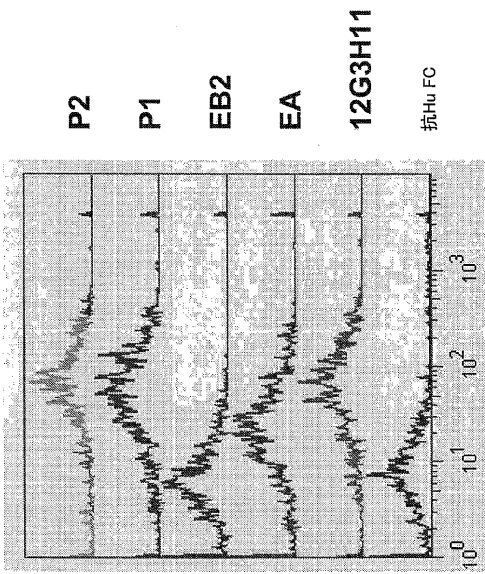
【図 2 3】



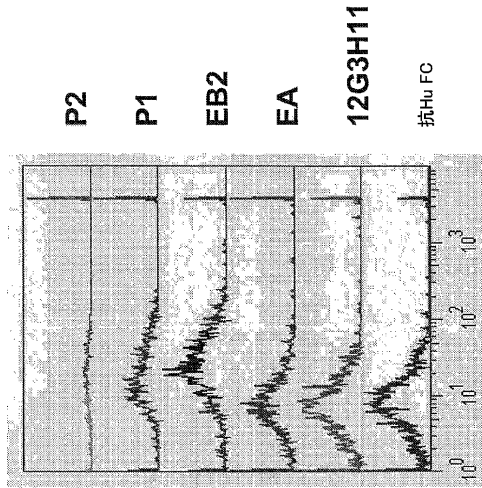
【図 2 4】



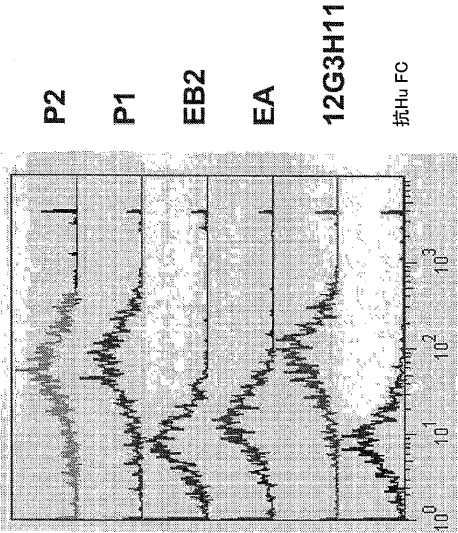
【図 2 5】



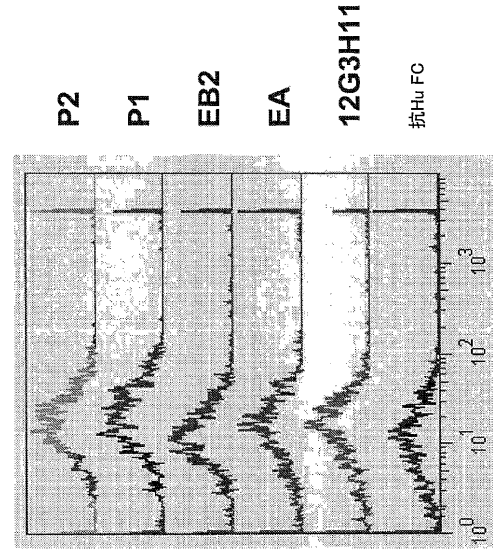
【図 2 6】



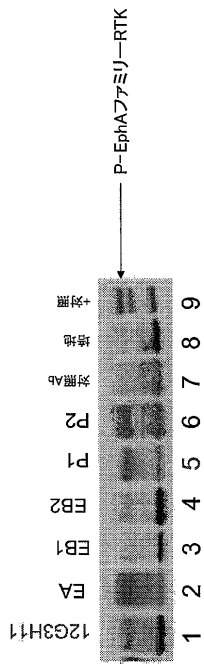
【図 2 7】



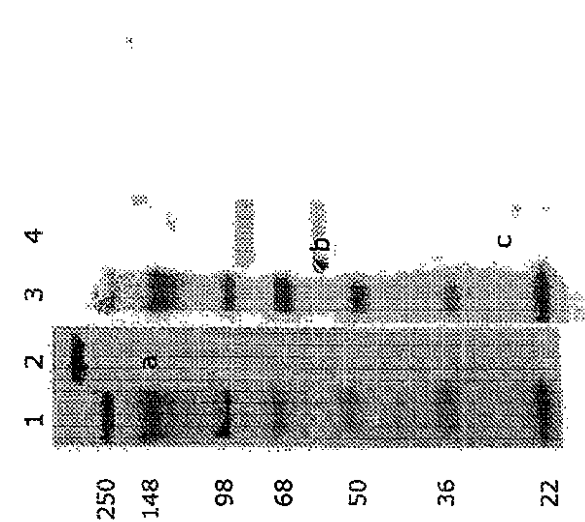
【図 2 8】



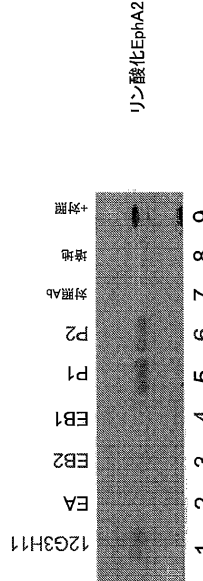
【図 30】



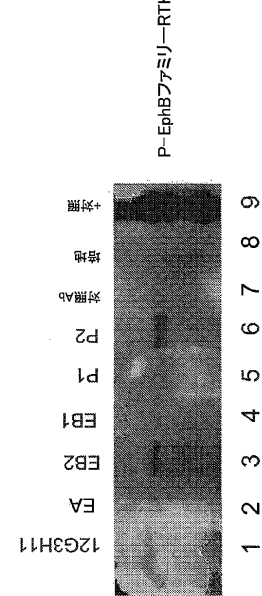
【図 32】



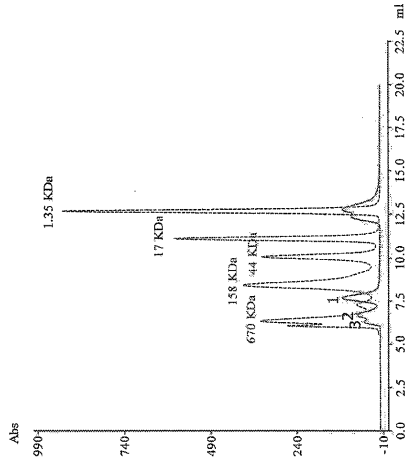
【図 29】



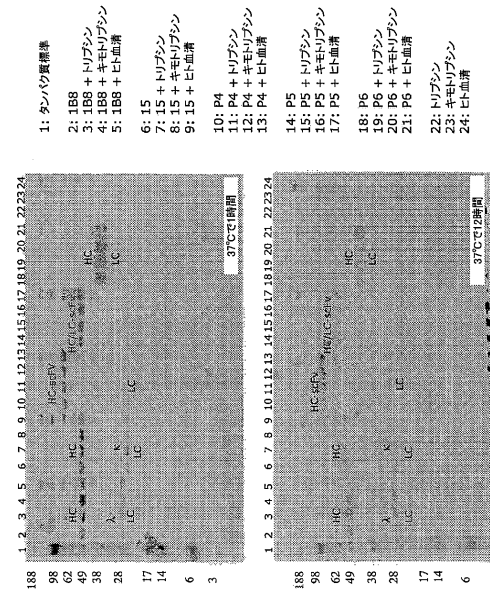
【図 31】



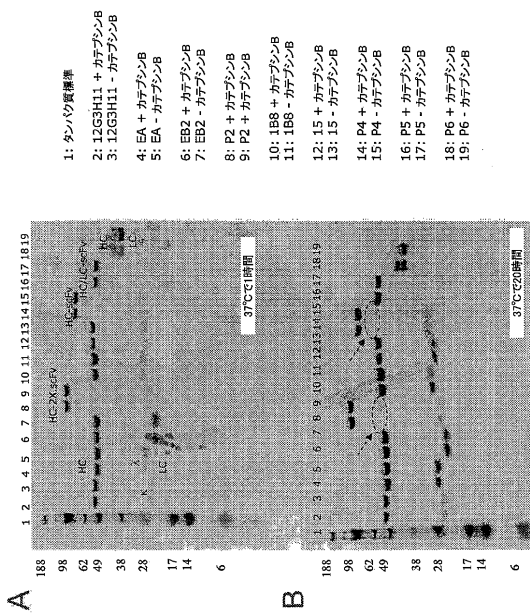
【図 3 3】



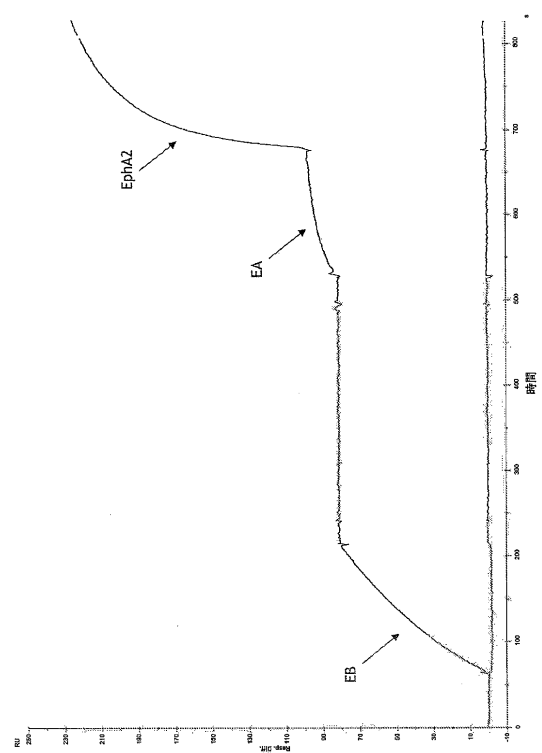
【図 3 4】



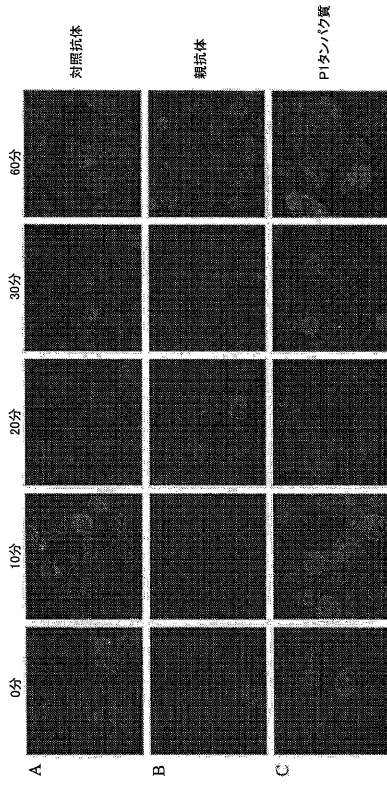
【図 3 5】



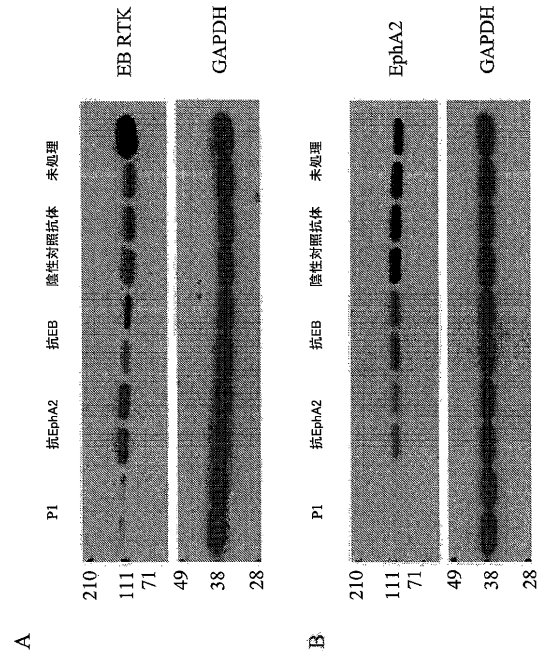
【図 3 6】



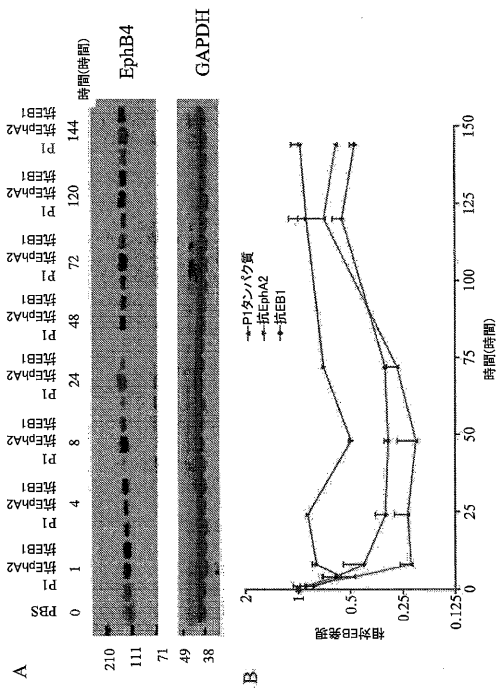
【図 3 7】



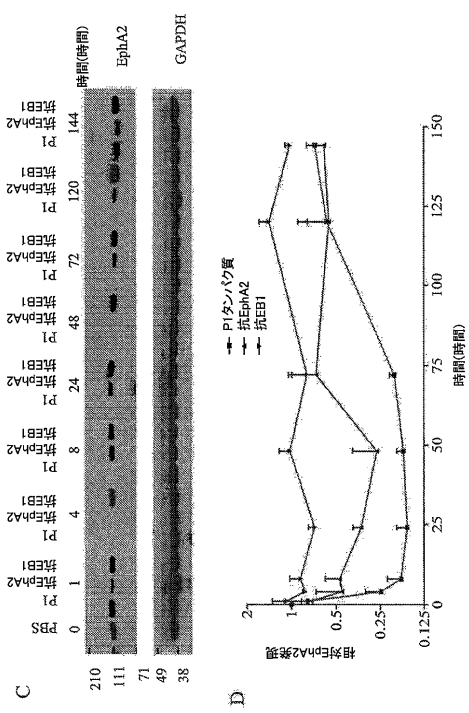
【図 3 8】



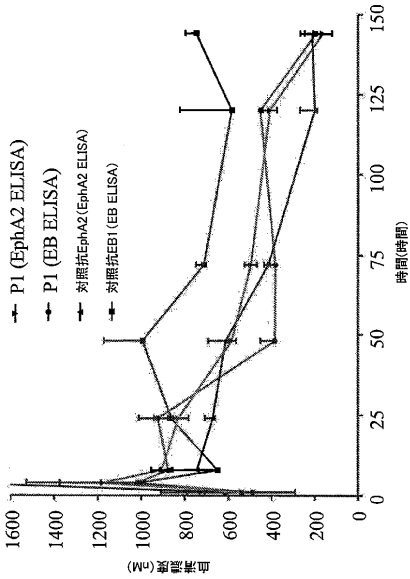
【図 3 9 - 1】



【図 3 9 - 2】



【図 40】



【配列表】

2010535032000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 08/71656

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - C07K 16/18, C07K 16/46 (2008.04)

USPC - 530/388.15, 530/388.8

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)

USPC: 530/388.15, 530/388.8

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC: 530/388.15, 530/388.8 (text search)

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

PubWEST(USPT,PGPB,EPAB,JPAB); Google Scholar

Search Terms: antibody engineering, tetravalent, multivalent, bispecific, multispecific, epitope binding domain, ScFv

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95/09917 A1 (MORRISON et al.). 13 April 1995 (13.04.1995). Especially pg 3 ln 15-18, sheet 3 fig 3, pg 10 ln 22-23.	1-7, 9-12, 15,16, 18-20, 22, 23, 32, 33, 57, 58, 61
Y		8
A		13, 14, 21, 24, 27-30, 34-46, 49-56,59,60,62
Y		8
A	US 2004/0259156 A1 (ZHU). 23 December 2004 (23.12.2004). Especially para [0017]; sheet 1 fig 1 Bs(scFv)4-IgG illustration	17,25-30, 34-50, 62

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

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" 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

25 November 2008 (25.11.2008)

Date of mailing of the international search report

05 DEC 2008

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT O&P: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 08/71656

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.: 31 and 63-139
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

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

Remark on Protest

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

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)		C 1 2 N 5/00	1 0 1
C 1 2 N 1/19 (2006.01)		C 1 2 N 1/19	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)		A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 9/08 (2006.01)		A 6 1 K 9/08	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)		A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)		A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 19/02 (2006.01)		A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 35/04 (2006.01)		A 6 1 P 35/04	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)		A 6 1 P 37/06	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		A 6 1 P 29/00	
		G 0 1 N 33/53	D

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

(72)発明者 ウー, ヘレン
アメリカ合衆国 2 0 8 4 1 メリーランド州, ボイズ, ハーベスト ムーン ロード 1 4 4 0 5

(72)発明者 ガオ, チャンショウ
アメリカ合衆国 2 0 8 5 4 メリーランド州, ポトマック, メープルクレスト レーン 1 0 8 2 2

(72)発明者 ヘイ, カール
アメリカ合衆国 2 0 8 7 2 メリーランド州, ダマスカス, ハニーサックル ドライブ 2 8 3 0 1

(72)発明者 ディマシー, ナッツァレーノ
アメリカ合衆国 2 0 8 7 8 メリーランド州, ゲイサーズバーク, ナンバー 3 4 7 マーケット ストリート イースト 3 1 1

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA31 BA41 CA01 GA11 HA01 HA03
4B065 AA90Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44 CA46
4C076 AA11 CC04 CC07 CC27
4C084 AA02 AA07 BA44 DA27 NA14 ZB082 ZB112 ZB152 ZB262 ZB272
4H045 AA11 BA41 CA40 DA76 DA86 EA20 FA74

专利名称(译)	多特异性表位结合蛋白及其用途		
公开(公告)号	JP2010535032A	公开(公告)日	2010-11-18
申请号	JP2010520165	申请日	2008-07-30
[标]申请(专利权)人(译)	免疫医疗公司		
申请(专利权)人(译)	MedImmune公司，有限责任公司		
[标]发明人	ウーヘレン ガオチャンショウ ヘイカール デイマシーナツツアレノ		
发明人	ウー,ヘレン ガオ,チャンショウ ヘイ,カール デイマシー,ナツツアレノ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/18 C07K14/47 C12N1/15 C12N1/21 C12N5/10 C12N1/19 A61K38/00 A61K9/08 A61P35/00 A61P35/02 A61P29/00 A61P19/02 A61P35/04 A61P37/06 G01N33/53		
CPC分类号	A61P19/02 A61P29/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P35/04 A61P37/06 C07K16/468 C07K2317/31 C07K2317/52 C07K2317/522 C07K2317/55 C07K2317/622 C07K2317/64		
FI分类号	C12N15/00.A C07K16/18.ZNA C07K14/47 C12N1/15 C12N1/21 C12N5/00.101 C12N1/19 A61K37/02 A61K9/08 A61P35/00 A61P35/02 A61P29/00.101 A61P19/02 A61P35/04 A61P37/06 A61P29/00 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/BA41 4B024/CA01 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024 /HA03 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C076/AA11 4C076/CC04 4C076/CC07 4C076/CC27 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA44 4C084 /DA27 4C084/NA14 4C084/ZB082 4C084/ZB112 4C084/ZB152 4C084/ZB262 4C084/ZB272 4H045 /AA11 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/FA74		
代理人(译)	荒井英一		
优先权	60/935199 2007-07-31 US 61/012656 2007-12-10 US 61/074330 2008-06-20 US		
其他公开文献	JP2010535032A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及多特异性表位结合蛋白，其制备方法及其在急性或慢性疾病的预防，管理，治疗或诊断中的用途。

Figure 4W.

