

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-549362

(P2022-549362A)

(43)公表日 令和4年11月24日(2022.11.24)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/24 (2006.01)	C 0 7 K 16/24	4 C 0 8 5
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	4 H 0 4 5
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	Z N A
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全103頁)	

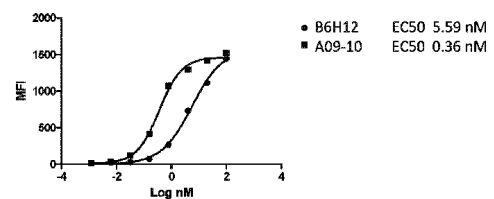
(21)出願番号	特願2022-519481(P2022-519481)	(71)出願人	522120107
(86)(22)出願日	令和2年9月28日(2020.9.28)		ベイジン スターマブ バイオメド テク
(85)翻訳文提出日	令和4年5月24日(2022.5.24)		ノロジ リミテッド
(86)国際出願番号	PCT/US2020/053064		中華人民共和国 1 0 2 2 0 6 ベイジン
(87)国際公開番号	WO2021/062361		チャンピンディストリクト シェンミン
(87)国際公開日	令和3年4月1日(2021.4.1)		ユアンロードナンバー 2 9 ビルディン
(31)優先権主張番号	62/907,275		グ1ルームB 2 1 3
(32)優先日	令和1年9月27日(2019.9.27)	(74)代理人	100095407
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 木村 満
(31)優先権主張番号	62/989,327	(74)代理人	100132883
(32)優先日	令和2年3月13日(2020.3.13)		弁理士 森川 泰司
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100148633
			弁理士 桜田 圭
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA	(74)代理人	100147924
	最終頁に続く		弁理士 美恵 英樹
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 一重特異性および多重特異性抗体

(57)【要約】

本明細書で開示されるのは、CD47、PD-L1、HSA、CD33、LAG3、およびCD16の1つ以上に対する特異性を有する、一重特異性および多重特異性一本鎖抗体である。

【選択図】図1



	B6H12	A09
Best-fit values		
logECF	0.7478	-0.4402
HillSlope	0.7792	1.063
F	= 50.00	= 50.00
Bottom	2.834	13.05
Top	1579	1462
ECF	5.594	0.3629

FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) C D 4 7 であって、V H H ドメインは配列番号 2 ～ 2 9 または 2 2 3 の 1 つのアミノ酸配列を有する、C D 4 7、

(b) P D - L 1 であって、V H H ドメインは配列番号 3 1 ～ 3 8 の 1 つのアミノ酸配列を有する、P D - L 1、

(c) ヒト血清アルブミン (H S A) であって、V H H ドメインは配列番号 4 0 ～ 4 8 の 1 つのアミノ酸配列を有する、ヒト血清アルブミン (H S A)、

(d) C D 3 3 であって、V H H ドメインは配列番号 5 0 ～ 7 8 の 1 つのアミノ酸配列を有する、C D 3 3、

(e) L A G 3 であって、V H H ドメインは配列番号 8 0 ～ 9 3 の 1 つのアミノ酸配列を有する、L A G 3、または、

(f) C D 1 6 であって、V H H ドメインは配列番号 9 6 ～ 9 9 の 1 つのアミノ酸配列を有する、C D 1 6、

の 1 つに対する抗原結合特異性を有する、可変重鎖 (V H H) ドメイン。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の V H H ドメインを含む、重鎖のみの抗体 (H C A b)。

【請求項 3】

第 1 の結合特異性を有する抗体結合ドメイン、および前記第 1 の結合特異性とは異なる第 2 の結合特異性を有する第 2 の抗体結合ドメインを含む多重特異性抗体であって、

前記第 1 の結合特異性は、C D 4 7、P D - L 1、H S A、C D 3 3、L A G 3、または C D 1 6 に対する特異性を有し、

(a) 前記 C D 4 7 結合特異性は、配列番号 2 ～ 2 9 または 2 2 3 の 1 つのアミノ酸配列により表され、

(b) 前記 P D - L 1 結合特異性は、配列番号 3 1 ～ 3 8 の 1 つのアミノ酸配列により表され、

(c) 前記 H S A 結合特異性は、配列番号 4 0 ～ 4 8 の 1 つのアミノ酸配列により表され、

(d) 前記 C D 3 3 結合特異性は、配列番号 5 0 ～ 7 8 の 1 つのアミノ酸配列により表され、

(e) 前記 L A G 3 結合特異性は、配列番号 8 0 ～ 9 3 の 1 つのアミノ酸配列により表され、

(f) 前記 C D 1 6 結合特異性は、配列番号 9 6 ～ 9 9 の 1 つのアミノ酸配列により表される、

多重特異性抗体。

【請求項 4】

前記第 2 の抗体結合ドメインは、C D 4 7、P D - L 1、H S A、C D 3 3、L A G 3、または C D 1 6 に対する特異性を有し、

(a) 前記 C D 4 7 結合特異性は、配列番号 2 ～ 2 9 または 2 2 3 の 1 つのアミノ酸配列により表され、

(b) 前記 P D - L 1 結合特異性は、配列番号 3 1 ～ 3 8 の 1 つのアミノ酸配列により表され、

(c) 前記 H S A 結合特異性は、配列番号 4 0 ～ 4 8 の 1 つのアミノ酸配列により表され、

(d) 前記 C D 3 3 結合特異性は、配列番号 5 0 ～ 7 8 の 1 つのアミノ酸配列により表され、

(e) 前記 L A G 3 結合特異性は、配列番号 8 0 ～ 9 3 の 1 つのアミノ酸配列により表され、

(f) 前記 C D 1 6 結合特異性は、配列番号 9 6 ～ 9 9 の 1 つのアミノ酸配列により表される、

10

20

30

40

50

請求項 3 に記載の多重特異性抗体。

【請求項 5】

1 ～ 5 つのさらなる抗体結合ドメインをさらに含む多重特異性抗体であって、

前記さらなる抗体結合ドメインの各々は、個別に CD 4 7、PD-L 1、HSA、CD 3 3、LAG 3、または CD 1 6 に対する特異性を有し、

(a) 前記 CD 4 7 結合特異性は、配列番号 2 ～ 2 9 または 2 2 3 の 1 つのアミノ酸配列により表され、

(b) 前記 PD-L 1 結合特異性は、配列番号 3 1 ～ 3 8 の 1 つのアミノ酸配列により表され、

(c) 前記 HSA 結合特異性は、配列番号 4 0 ～ 4 8 の 1 つのアミノ酸配列により表され、

(d) 前記 CD 3 3 結合特異性は、配列番号 5 0 ～ 7 8 の 1 つのアミノ酸配列により表され、

(e) 前記 LAG 3 結合特異性は、配列番号 8 0 ～ 9 3 の 1 つのアミノ酸配列により表され、

(f) 前記 CD 1 6 結合特異性は、配列番号 9 6 ～ 9 9 の 1 つのアミノ酸配列により表される、

請求項 3 に記載の多重特異性抗体。

【請求項 6】

1 ～ 4 つのさらなる抗体結合ドメインをさらに含む多重特異性抗体であって、

前記さらなる抗体結合ドメインの各々は、CD 4 7、PD-L 1、HSA、CD 3 3、LAG 3、または CD 1 6 に対する特異性を有し、

(a) 前記 CD 4 7 結合特異性は、配列番号 2 ～ 2 9 または 2 2 3 の 1 つのアミノ酸配列により表され、

(b) 前記 PD-L 1 結合特異性は、配列番号 3 1 ～ 3 8 の 1 つのアミノ酸配列により表され、

(c) 前記 HSA 結合特異性は、配列番号 4 0 ～ 4 8 の 1 つのアミノ酸配列により表され、

(d) 前記 CD 3 3 結合特異性は、配列番号 5 0 ～ 7 8 の 1 つのアミノ酸配列により表され、

(e) 前記 LAG 3 結合特異性は、配列番号 8 0 ～ 9 3 の 1 つのアミノ酸配列により表され、

(f) 前記 CD 1 6 結合特異性は、配列番号 9 6 ～ 9 9 の 1 つのアミノ酸配列により表される、

請求項 4 に記載の多重特異性抗体。

【請求項 7】

多重特異性一本鎖抗体 (MVSCA) である、請求項 3 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の多重特異性抗体。

【請求項 8】

リンカー L 1 (配列番号 1 0 0)、リンカー L 2 (配列番号 1 0 1)、またはリンカー L 4 (配列番号 1 0 3) が、非同一の抗体結合ドメインの 1 つ以上のペアの間に挟まれている、請求項 3 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の多重特異性抗体。

【請求項 9】

同一の特異性を有する抗体結合ドメインの少なくとも 1 つのペアを含む、請求項 3 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の多重特異性抗体。

【請求項 10】

同一の特異性を有する抗体結合ドメインの前記少なくとも 1 つのペアは、互いに隣接し、かつそれらの間にリンカー L 3 (配列番号 1 0 2) が挟まれている、請求項 9 に記載の多重特異性抗体。

【請求項 11】

10

20

30

40

50

N または C 末端に位置する、H S A に対する特異性を有する抗体結合ドメインであって、それに隣接する抗体結合ドメインとの間に切断可能なリンカーが挟まれている、抗体結合ドメイン含む、請求項 3 ～ 1 0 のいずれか 1 項に記載の多重特異性抗体。

【請求項 1 2】

前記切断可能なリンカーは、L 1 1 * 3 (配列番号 1 0 4)、L 1 1 * 4 (配列番号 1 0 5)、L 1 1 * 5 (配列番号 1 0 6)、L 1 1 * 6 (配列番号 1 0 7)、L 1 1 * 7 (配列番号 1 0 8)、L 1 1 * 8 (配列番号 1 0 9)、L 1 1 * 9 (配列番号 1 1 0)、L 1 1 * 1 0 (配列番号 1 1 1)、L 1 1 * 1 1 (配列番号 1 1 2)、L 1 1 * 1 2 (配列番号 1 1 3)、L 1 1 * 1 3 (配列番号 1 1 4)、L 1 1 * 1 4 (配列番号 1 1 5)、L 1 1 * 1 5 (配列番号 1 1 6)、L 1 1 * 1 6 (配列番号 1 1 7)、L 1 1 * 1 7 (配列番号 1 1 8)、または L 1 1 * 1 8 (配列番号 1 1 9) である、請求項 1 1 に記載の多重特異性抗体。

10

【請求項 1 3】

すべての前記抗体結合ドメインが V H H ドメインである、請求項 3 ～ 1 2 のいずれか 1 項に記載の多重特異性抗体。

【請求項 1 4】

H S A、C D 4 7、および P D - L 1 を認識する抗体結合ドメインを含む、請求項 3 ～ 1 3 のいずれか 1 項に記載の多重特異性抗体。

【請求項 1 5】

H S A、C D 4 7、および C D 3 3 を認識する抗体結合ドメインを含む、請求項 3 ～ 1 3 のいずれか 1 項に記載の多重特異性抗体。

20

【請求項 1 6】

H S A、L A G 3、および P D - L 1 を認識する抗体結合ドメインを含む、請求項 3 ～ 1 3 のいずれか 1 項に記載の多重特異性抗体。

【請求項 1 7】

H S A、L A G 3、および C D 3 3 を認識する抗体結合ドメインを含む、請求項 3 ～ 1 3 のいずれか 1 項に記載の多重特異性抗体。

【請求項 1 8】

C D 1 6、H S A、および P D - L 1 を認識する抗体結合ドメインを含む、請求項 3 ～ 1 3 のいずれか 1 項に記載の多重特異性抗体。

30

【請求項 1 9】

C D 1 6、H S A、および C D 3 3 を認識する抗体結合ドメインを含む、請求項 3 ～ 1 3 のいずれか 1 項に記載の多重特異性抗体。

【請求項 2 0】

C D 1 6、H S A、C D 4 7、および P D - L 1 を認識する抗体結合ドメインを含む、請求項 3 ～ 1 3 のいずれか 1 項に記載の多重特異性抗体。

【請求項 2 1】

C D 1 6、H S A、C D 4 7、および C D 3 3 を認識する抗体結合ドメインを含む、請求項 3 ～ 1 3 のいずれか 1 項に記載の多重特異性抗体。

【請求項 2 2】

C D 3 3 に対する特異性を有する抗体結合ドメインのペアを含む、多重特異性抗体。

40

【請求項 2 3】

H S A、F C 5 ナノボディ (配列番号 2 2 2)、または両方に対する特異性を有する抗体結合ドメインをさらに含む、請求項 2 2 に記載の多重特異性抗体。

【請求項 2 4】

請求項 1 に記載の V H H ドメイン、請求項 2 に記載の H C A b、または請求項 3 ～ 2 1 のいずれか 1 項に記載の多重特異性抗体を含む、医薬組成物。

【請求項 2 5】

請求項 2 4 に記載の医薬組成物を、治療を必要とする患者に投与することを含む、癌を治療する方法。

50

【請求項 26】

請求項 22 または 23 に記載の多重特異性抗体を含む、医薬組成物。

【請求項 27】

請求項 24 に記載の医薬組成物を、治療を必要とする患者に投与することを含む、アルツハイマー病または網膜疾患を治療する方法。

【請求項 28】

前記網膜疾患は、乾燥型加齢黄斑変性である、請求項 27 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本出願は、2019年9月27日に提出された米国仮特許出願番号第62/907,275号、および2020年3月13日に提出された米国仮特許出願番号第62/989,327号に基づき優先権を主張し、両方の内容全体は参照により全体が本明細書に援用される。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0002】

本明細書で開示されるのは、CD47、ヒト血清アルブミン(HSA)、PD-L1、CD33、CD16、およびLAG3に対する特異性を有する一重特異性の重鎖のみの抗体(HCAb)、ならびに1つ以上のそれらの抗原に対する特異性を有する、2つ以上のHCAb可変ドメインを組み込んだ多価一本鎖抗体である。

【0003】

いくつかの実施形態は、専ら、または主に、ラクダ抗体のVHHドメインを含む単一ドメイン抗体である。これらの実施形態は、一重特異性かつ1価である。

【0004】

いくつかの実施形態は、HCAbであるか、または従来の抗体の1以上の定常ドメイン、たとえばヒトIgG抗体のFc領域と融合したVHHドメインを含む。これらの実施形態は一重特異性であるが、通常2価である。他の結合価は、たとえば定常ドメインの選択により可能である。IgAおよびIgMのFc領域は高い結合価をもたらす得る。

【0005】

いくつかの実施形態は、一本のアミノ酸鎖に結合した同一の抗原に対する特異性を有する2つのVHHドメインを含む(多価一本鎖抗体)。これらの実施形態も、一重特異性かつ2価である。さらなるVHHドメインを結合させて、高い結合価を得ることができる。

【0006】

いくつかの実施形態は、2つ(またはそれ以上)のVHHドメインを含み、各VHHドメインは、一本のアミノ酸鎖に結合した異なる抗原に対する特異性を有する(多価多重特異性一本鎖抗体)。これらの実施形態は多価かつ多特異性である。3つ以上のVHHドメインを含むさらなる実施形態では、2つ以上のVHHドメインが同一の抗原に対する特異性を有してもよく、1つ以上の他のVHHドメインが別の抗原に対する特異性を有してもよい。そのような構造は、特異性よりも高次の結合価を有する。

【0007】

一重特異性の実施形態の各々は、CD47、HSA、PD-L1、CD33、CD16、またはLAG3に対する特異性を有する。多重特異性の実施形態の各々は、CD47、HSA、PD-L1、CD33、CD16、およびLAG3の1つ以上に対する特異性を有するが、1つ以上の他の抗原に対する特異性も有してもよい。

【0008】

いくつかの実施形態は、HSAおよび1つ以上の他の抗原に対する特異性を有する。これらの実施形態の観点では、HSA特異性のドメインは体内での半減期の延長をもたらす、他のドメインは治療効果を提供する。これらの実施形態の別の観点では、HSA特異性

10

20

30

40

50

のドメインは、隣接ドメインの結合活性を部分的に、または完全に阻害し得る。H S A 特異性のドメインは、たとえば腫瘍等の作用部位に存在するプロテアーゼにより切断される切断可能なリンカーにより結合させることができ、切断により隣接ドメイン阻害が緩和されるようにする。いくつかの多重特異性の実施形態は、三重特異性である。

【0009】

複数の抗原結合ドメインを含むいくつかの実施形態では、従来のV L - V H 対由来の抗原結合ドメインを、上述の実施形態における1つ以上（しかし全てではない）のV H H ドメインの代わりに使用することができる。

【0010】

特定の抗原に対する特異性を有する本明細書で開示される抗原結合ドメインは、抗原に結合するための手段と呼ばれ得る。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】C D 4 7 過剰発現細胞株に対する抗C D 4 7 H C A b A 0 9 - 1 0 およびB 6 H 1 2 の結合親和性のフローサイトメトリー解析を示す図である。

【図2】C D 4 7 に対する特性を有する多重特異性抗体1 5 1 1（配列番号1 5 6）および3 3 2 1（配列番号1 5 7）の競合E L I S A 結合解析を示す図である。

【図3】J u r k a t 細胞株でフローサイトメトリーを用いたC D 4 7 結合性多重特異性分子1 5 1 1 および3 3 2 1 の競合結合解析を示す図である。

【図4 A】C D 4 7 結合性多重特異性分子1 5 1 1 および3 3 2 1 を用いたヒト赤血球（R B C）凝集測定アッセイを示す図である。対照としてH u 5 F 9 を使用した。

【図4 B】1 5 1 1 および3 3 2 1 のH L - 6 0 およびヒト赤血球への結合を示す図である。

【図5】R a j a - L u c 異種移植マウスにおけるC D 4 7 結合性多重特異性分子1 5 1 1 および3 3 2 1 の抗腫瘍活性を示す図である。

【図6】P D - L 1 過剰発現C H O 細胞での抗P D - L 1 H C A b、P L 1 4 およびP L 1 6 のフローサイトメトリー結合解析を示す。対照としてアテゾリズマブを使用した。

【図7】P D - L 1 に対する結合特異性を有する多重特異性分子1 5 1 1、および対照としてアテゾリズマブの細胞ベースの機能アッセイである。

【図8 A】P D - L 1 結合性多重特異性分子1 5 1 8（配列番号1 3 5）による、B - h P D - L 1 マウスにおけるM C 3 8 - h P D - L 1 腫瘍の増殖阻害を示す図である。

【図8 B】P D - L 1 結合性多重特異性分子1 5 1 8（配列番号1 3 5）による、B - h P D - L 1 マウスにおけるM C 3 8 - h P D - L 1 腫瘍の増殖阻害を示す図である。

【図9】抗H S A H V V 抗体のO c t e t（登録商標）結合解析を示す図である。

【図10 A】抗C D 3 3 H V V 抗体のO c t e t（登録商標）親和性解析を示す図である。

【図10 B】抗C D 3 3 H V V 抗体のO c t e t（登録商標）親和性解析を示す図である。

【図11 A】抗C D 1 6 A H V V 分子C D 1 6 F 1 のO c t e t（登録商標）結合解析を示す図である。

【図11 B】抗C D 1 6 A H V V 分子C D 1 6 E 1 1 のO c t e t（登録商標）結合解析を示す図である。

【図12】I g G 1 B 6 H 1 2、および対照としてI g G 4 B 6 H 1 2 を用いたJ u r k a t N F A T C D 1 6 レポーターアッセイ（A D C C）における多重特異性分子1 5 1 1 および3 3 2 1 の細胞ベースの機能アッセイを示す図である。

【図13 A】H S A 結合ドメインおよびC D 4 7 結合ドメインを有する分子の三重特異性分子構成を示す図である。

【図13 B】H S A 結合ドメインおよびL A G 3 結合ドメインを有する分子の三重特異性分子構成を示す図である。

【図13 C】H S A 結合ドメインおよびC D 1 6 結合ドメインを有する分子の三重特異性

10

20

30

40

50

分子構成を示す図である。

【図 1 4 A】腫瘍プロテアーゼにより活性化される p r o - C D 4 7 の三重特異性分子構成を示す図である。

【図 1 4 B】腫瘍プロテアーゼにより活性化される p r o - C D 4 7 の S D S - P A G E 解析を示す図である。

【図 1 5】P D - L 1 / p r o - C D 4 7 対 P D - L 1 / 活性型 - C D 4 7 のリアルタイムカイネティクス O c t e t (登録商標) 結合解析を示す図である。

【図 1 6】多特異性分子の構成を示す図である。M o m = 1 価の結合ドメイン、B i V = 2 つの同一の 1 価の結合ドメインを含む 2 価の結合ドメイン。

【図 1 7】四重体 (四重特異性、図 1 4 A ~ D) の構成を示す図である。2 つの V H H 3 は同一の V H H、または同一の抗原の異なるエピトープに結合する異なる V H H であり得る。2 つの V H H 4 は同一の V H H、または同一の抗原の異なるエピトープに結合する異なる V H H であり得る。いくつかの実施形態では、V H H 2 は常に H S A 結合ドメインである。いくつかの実施形態では、V H H 1 は、C D 1 6 A アゴニスト V H H 等のペイロードである。図 1 7 C および 1 7 D は、プロドラッグ構成の四重体を表す。

【図 1 8】H L 6 0 細胞株での C D 4 7 結合性多重特異性分子 1 5 1 8 - H S 5 (配列番号 1 7 3) および 1 5 1 8 - H S 5 - G S 1 5 (配列番号 1 8 4) のフローサイトメトリ結合解析を示す図である。

【図 1 9】多重特異性分子 1 5 1 1 の O c t e t (登録商標) 結合解析を示す図である。

【図 2 0】多重特異性分子 3 3 2 1 の O c t e t (登録商標) 結合解析を示す図である。

【図 2 1】抗 C D 4 7 V H H 配列のアミノ酸配列アライメントを示す図である。

【図 2 2】抗 P D - L 1 V H H 配列のアミノ酸配列アライメントを示す図である。

【図 2 3】抗 H S A V H H 配列のアミノ酸配列アライメントを示す図である。

【図 2 4】抗 C D 3 3 V H H 配列のアミノ酸配列アライメントを示す図である。

【図 2 5】抗 L A G 3 V H H 配列のアミノ酸配列アライメントを示す図である。

【図 2 6】抗 C D 1 6 A V H H 配列のアミノ酸配列アライメントを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0 0 1 2】

本明細書で開示されるのは、C D 4 7、ヒト血清アルブミン (H S A)、P D - L 1、C D 3 3、C D 1 6、および L A G 3 に対する特異性を有する一重特異性の重鎖のみの抗体 (H C A b)、またはその可変ドメイン (V H H 単一ドメイン抗体 [s d A b] という)、および 1 つ以上のそれらの抗原に対する特異性を有する、2 つ以上の H C A b の可変ドメインを組み込んだ多価一本鎖抗体 (M V S C A) である。

【0 0 1 3】

いくつかの実施形態では、M V S C A は、同一の抗原に対する特異性を有する 2 つ以上の H C A b 可変ドメインを含む。つまり、M V S C A は多価であるが抗原に関しては一重特異性である。これらのいくつかの実施形態では、M V S C A は、同一の H C A b 可変ドメインの 2 回以上の反復、またはそれぞれが同一のエピトープに対する特異性を有する複数の H C A b 可変ドメインを含む。つまり、それらは多価であるが、エピトープに関しては単一特異性である。そのような M V S C A は、抗原モノマー上の単一の部位にのみ結合するが、モノマーの複数コピーにクロスリンクすることができる。別のこれらの実施形態では、M V S C A は、それぞれが同一の抗原の異なるエピトープに対する特異性を有する 2 つ以上の H C A b 可変ドメインを含む。つまり、これらは多価であるが、エピトープに関しては多特異性である。そのような M V S C A は、抗原モノマーの複数の部位に結合するか、または複数コピーの抗原モノマーにクロスリンクする。

【0 0 1 4】

いくつかの実施形態では、M V S C A は、異なる抗原に対する特異性を有する 2 つ以上の H C A b 可変ドメインを含み、それらは多価かつ抗原に関して多特異性である。さらなる実施形態では、M V S C A は、複数の H C A b 可変ドメインを含み、さらなる可変ドメインは第 1 の H C A b 可変ドメインと同一である場合、さらなる H C A b 可変ドメインは

第1の可変ドメインと異なるが同一の抗原上の異なるエピトープに対する特異性を有する場合、または更なるH C A b可変ドメインは第1のH C A b可変ドメインと異なるが異なる抗体に対する特異性を有する場合が、任意に組み合わせられる。

【0015】

2つ以上のH C A b可変ドメインを含むM V S C Aは、H C A b定常ドメインをさらに含み得る。たとえば、C末端のH C A b可変ドメインが、元のH C A b定常ドメインとの結合を維持することができる。あるいは、C末端のH C A b可変ドメインが、さらなる従来の抗体、たとえばヒトI g G抗体等のヒト抗体の定常ドメインまたはF c領域と結合することができる。いくつかの実施形態では、定常ドメインまたは全F c領域は、当業者にはよく知られているように、特定の機能性を付与し得る。別の実施形態では、2つ以上のH C A b可変ドメインを含むM V S C Aは、H C A b定常ドメインをさらに含み、H C A b定常ドメインは、H C A b可変ドメインのC末端に位置する代わりに、またはそれに加えて、H C A b可変ドメインの間またはN末端に位置する。

【0016】

(抗原)

インテグリン関連タンパク質(I A P)としても知られているC D 4 7 (C l u s t e r o f D i f f e r e n t i a t i o n 4 7)は、50K D aの膜貫通型タンパク質であり、ヒトにおいてC D 4 7遺伝子にコードされている。C D 4 7はイムノグロブリンスーパーファミリーに属し、膜インテグリンとパートナーであり、さらにトロンボスポンジン-1(T S P - 1)およびシグナル制御タンパク質アルファ(S I R P α)のリガンドに結合する。トロンボスポンジン-1は、血管発生および血管新生に役割を有する分泌型糖タンパク質であり、後者において、T S P 1 - C D 4 7相互作用は、血管細胞での一酸化窒素シグナル伝達を多段階で阻害する。T S P - 1のC D 4 7への結合は、細胞の移動および接着、細胞増殖またはアポトーシスを含むいくつかの基本的な細胞機能に影響し、血管新生および炎症の制御に役割がある。シグナル制御タンパク質アルファは、骨髄系細胞に存在する膜貫通型受容体である。C D 4 7 / S I R P α相互作用は双方向性のシグナル伝達をもたらし、ファゴサイトーシスの阻害、細胞間融合の刺激、T細胞の活性化を含むさまざまな細胞間反応をもたらす。C D 4 7は、免疫系のマクロファージに対する「私を食べないで(d o n ' t e a t m e)」シグナルとして機能し、それによりいくつかの癌の治療ターゲットとなる可能性がある。

【0017】

C D 2 7 9とも呼ばれるプログラム細胞死1(P D - 1)は、ヒトにおいてP D C D 1遺伝子にコードされているI型膜タンパク質である。これには2つのリガンド、P D - L 1およびP D - L 2がある。C D 2 7 4またはB 7 ホモログ1(B 7 - H 1)とも呼ばれるP D - L 1は、ヒトにおいてC D 2 7 4遺伝子にコードされている40k D aのI型膜貫通型タンパク質である。P D - L 1は活性型T細胞の表面上で発現し、P D - L 1は、樹状細胞およびマクロファージ等の抗原提示細胞(A P C)の表面上で発現する。また、P D - L 1は、乳癌、肺癌、膀胱癌、頭頸部癌、および他の癌を含むいくつかの腫瘍で過剰発現する。P D - L 1またはP D - L 2がP D - 1に結合すると、阻害シグナルがT細胞に送られ、サイトカイン産生を減少させ、T細胞増殖を抑制する。

【0018】

P D - 1経路はT細胞疲弊の重要な免疫抑制メディエーターである。P D - 1は、感染症に対する炎症反応において、自己免疫を制限するために末梢で既に活性化されたT細胞の活性を制限する機能を有する。この経路の遮断は、T細胞の活性化、拡大、およびエフェクター機能の強化をもたらす。そのように、P D - 1はT細胞応答を負に制御する。P D - 1は、慢性疾患状態でのT細胞疲弊のマーカーとして同定され、P D - 1 : P D - L 1相互作用の遮断はT細胞の機能を部分的に回復させることが示された(S a k u i s h i e t a l . , J E M , 2 0 7 : 2 1 8 7 - 2 1 9 4 , 2 0 1 0)。P D - 1経路を阻害することによる持続性感染症および癌の治療のための方法および組成物は、国際公開第2006/133396号に開示されている。P D - L 1に対するヒトモノ

10

20

30

40

50

クローナル抗体は、国際公開第2007/005874号、米国特許出願公開第2011/209230号、米国特許第8,217,149号、および国際公開第2014/055897号に記載されている。

【0019】

ヒト血清アルブミン(HSA)は、ヒト血清中で最も多いタンパク質であり、ヒト血清の約半分を構成する。アルブミンは、ホルモン、脂肪酸、および他の化合物の運搬、pHの緩衝し、膠質浸透圧の維持等の機能を有する。アルブミンは肝臓でプレプロアルブミンとして合成され、これは初期のタンパク質が粗面小胞体から放出される前に除去されるN末端タンパク質を有する。生成物であるプロアルブミンは、次にゴルジ小胞で切断されて分泌型アルブミンを生成する。血清半減期はおおよそ20日間である。アルブミンの長い血清半減期は、腎臓を介した除去を妨げるその大きさと、胎児性Fc受容体(FcRn)との相互作用により達成される。抗アルブミンs d A b (単ドメイン抗体)への融合は、抗腫瘍一本鎖抗体の半減期を1~2時間からおおよそ10日間に増加させるために使用されている。

10

【0020】

CD33またはシグレック-3(シアル酸結合Ig様レクチン3、SIGLEC3、SIGLEC-3、gp67、p67)は、骨髄系細胞で発現する膜貫通型受容体である。これは通常骨髄特異的であると考えられているが、一部のリンパ系細胞でも見られ得る。これはシアル酸と結合するので、レクチンのSIGLECファミリーの一員である。この受容体の細胞外部分は、2つのイムノグロブリンドメイン(一方はIgVドメイン、一方はIgC2ドメイン)を含むため、CD33はイムノグロブリンスーパーファミリーに位置づけられる。CD33の細胞内の部分は、細胞活性の抑制に関連する免疫受容抑制性チロシンモチーフ(ITIM)を含む。CD33の標的化により治療することができる疾患には、限定されないが、アルツハイマー病、ならびに黄斑浮腫(たとえば糖尿病黄斑浮腫)および加齢黄斑変性(AMD)(たとえば乾燥型AMDおよび湿潤型AMD)等の網膜症が含まれる。

20

【0021】

CD33は、急性骨髄性白血病の患者を治療するための抗体薬物複合体であるゲムツズマブオゾガマイシン(マイロターゲット(登録商標)、Pfizer/Wyeth-Ayerst Laboratories)の標的である。また、CD33は、Seattle Genetics社により、同社のADC技術を利用して開発された新規の抗体薬物複合体であるバダスツキシマブタリリン(SGN-CD33A)の標的でもある。

30

【0022】

503アミノ酸の膜貫通型タンパク質であるリンパ球活性化遺伝子3(LAG-3)は、エフェクターT細胞および制御性T細胞(Treg)の細胞表面上で見られるチェックポイント受容体タンパク質であり、T細胞の応答、活性化、および増殖を調節する機能を有する。LAG3はイムノグロブリン(Ig)スーパーファミリーの一員である。MHCクラスII分子へのLAG3の結合は、LAG3発現細胞への負のシグナルの送達をもたらし、抗原依存的なCD4およびCD8 T細胞の応答をダウンレギュレートする。LAG3は、T細胞の増殖能、サイトカイン産生能、および標的細胞の溶解能を負に制御し、これはT細胞の「疲弊」と呼ばれる。LAG3は腫瘍免疫および感染性免疫において重要な役割を有するため、免疫治療の理想的な標的である。モノクローナル抗体を含むアンタゴニストでのLAG3の遮断は、癌および慢性ウイルス感染症の治療において研究されている。

40

【0023】

FcγRIIIとしても知られるCD16は、ナチュラルキラー細胞、好中球、単球、およびマクロファージの表面上で見られる分化誘導分子の集団である。Fc受容体として同定されたCD16は、分離した遺伝子によりコードされる2つの形態:膜貫通型タンパク質であるFcγRIIIa(CD16a)、およびGP1アンカー型タンパク質であるFcγRIIIb(CD16b)で存在し、シグナル伝達に関与する。NK細胞による溶

50

解のトリガーとなる膜受容体として最もよく研究されているCD16は、抗体依存性細胞介在性細胞傷害（ADCC）に關与するイムノグロブリンスーパーファミリー（IgSF）の分子である。これは、CD16を指向する抗体を用いて、蛍光活性化細胞選別（FACS）または磁気活性化細胞選別により特定の免疫細胞の集団を分離するために使用され得る。これらの受容体はIgG抗体のFc部位に結合し、その後ヒトNK細胞における抗体依存性細胞介在性細胞傷害（ADCC）を活性化する。CD16はヒト単球によるADCCプロセスに必要である。ヒトにおいて、CD16を発現する単球は、特定の抗体の存在下で様々なADCC特性を有し、初代白血病細胞、癌細胞株、B型肝炎ウイルスに感染した細胞を殺すことができる。さらに、CD16は、一部のウイルス感染細胞および癌細胞を、抗体なしで直接殺傷することができる。IgG抗体の保存された部分等のリガンドに結合した後、ヒトNK細胞のCD16は、IL-2-R（CD25）等の表面活性化分子、ならびにIFN-ガンマおよびTNF等の炎症性サイトカインの遺伝子の転写を誘導する。このCD16誘導のNK細胞におけるサイトカインmRNAの発現は、様々なサイトカインの転写を調節するシクロスポリンA（CsA）感受性因子である活性化T細胞核内因子（NFATp）により仲介される。特定のサイトカイン遺伝子の発現は、CsA感受性かつカルシウム依存的な作用機構でアップレギュレートされる。

10

【0024】

CD16は、ワクチン接種後のナチュラルキラー（NK）細胞の早期活性化に重大な役割がある。さらに、CD16のダウンレギュレーションは、T細胞および抗体依存性シグナル伝達経路の両方において、NK細胞応答を緩和し、免疫恒常性を維持する可能性を示す。正常な健康な個体では、免疫複合体によるCD16（FcγRIII）のクロスリンクは、NK細胞において抗体依存性細胞傷害（ADCC）を誘導する。しかし、この経路は、免疫治療により癌細胞または疾患細胞において標的化され得る。インフルエンザワクチン接種後、CD16のダウンレギュレーションは、インフルエンザ特異的な血漿抗体の有意なアップレギュレーションと関連し、NK細胞の脱顆粒と正の相関を示す。

20

【0025】

CD16はヒト免疫細胞の異なるサブセットを確実に同定するためのさらなるマーカーとしてよく使用される。CD11bおよびCD33等の他のいくつかのCD分子は、ヒト骨髓系由来サブレッサー細胞（MDSC）のマーカーとして伝統的に使用されている。しかし、これらのマーカーは、NK細胞および骨髓系由来の他のすべての細胞でも発現しているので、CD14およびCD15等の他のマーカーが必要である。好中球ではCD14は低く、CD15は高く、単球ではCD14は高く、CD15は低い。これらの2つのマーカーは、好中球と単球を区別するためには十分である一方、好酸球は好中球と同様にCD15を発現する。したがって、CD16は、好中球を同定するためのさらなるマーカーとして使用される。成熟好中球ではCD16は高く、好酸球と単球の両方でCD16は低い。CD16は、この2種類の顆粒球の区別を可能にする。さらに、CD16の発現は、好中球発生の異なる段階間で異なる。分化能を有する好中球前駆細胞ではCD16は低く、後骨髓球、桿状核球、および成熟好中球でそれぞれCD16の発現が増加する。

30

【0026】

好中球での発現により、CD16は癌免疫治療における標的となる可能性がある。乳癌、膀胱癌、および他の固形癌の腫瘍細胞で発現するヒト上皮細胞成長因子受容体2（HER2）を識別するFc最適化モノクローナル抗体であるマルゲツキシマブは、CD16BよりもCD16Aを標的とする。さらに、CD16は、抗体を標的とした癌治療において役割を果たす可能性がある。抗CD19／CD16等の二重特異性の抗体断片は、国産治療薬の癌細胞への標的化を可能にする。抗CD19／CD16二重特異性抗体は、B細胞リンパ腫に対するナチュラルキラー細胞の応答を強化することが示された。さらに、FasLまたはTRAIL等の外因性因子の腫瘍細胞表面への標的化は、細胞死受容体のトリガーとなり、自己分泌と傍分泌の両方のプロセスによりアポトーシスを誘導する。

40

【0027】

（抗体）

50

抗体、および疾患の治療のためのそれらの使用は、当該分野でよく知られている。本明細書で使用される場合、「抗体」という用語は、抗原結合部位を含む1以上のポリペプチド鎖を含む、単量体または多量体タンパク質を意味する。抗体は、抗原に特異的に結合し、抗原の生体活性を調節することができる。本明細書で使用される場合、「抗体」という用語は、「全長抗体」および「抗体断片」を含み得る。本明細書で使用される場合、「結合部位」または「抗原結合部位」という用語は、リガンドが実際に結合する抗体分子の領域を意味する。「抗原結合部位」という用語は、抗体重鎖可変ドメイン（VH）および抗体軽鎖可変ドメイン（VL）を含むか、または重鎖のみの抗体の場合は、抗体重鎖可変領域を含む。

【0028】

抗体は、抗原の特定のエピトープに対する抗体の選択的識別を特に意味する。天然の抗体は、たとえば、一重特異性である。本明細書で使用される場合、「一重特異性」という用語は、各々が同一の抗原の同一のエピトープに結合する結合部位を1つ以上有する抗体を意味する。本明細書で開示される一重特異性抗体は、CD47、HSA、PD-L1、CD33、CD16、またはLAG3に特異的である。いくつかの実施形態では、一重特異性抗体は、重鎖のみの抗体（HCAb）である。別の実施形態では、一重特異性抗体は、1つ以上のタンパク質ドメイン、たとえばヒトFc領域と融合したVHHドメインを含む。さらに別の実施形態では、一重特異性抗体は、唯一の完全なタンパク質ドメインとしてVHHを含む、すなわち単一ドメイン抗体である。いくつかの実施形態では、単一ドメイン抗体は、Hisタグ等の短いペプチドをさらに含み得る。「VHHドメイン」および「HCAb可変ドメイン」という用語は、同じ意味で使用される。VHHドメインは、特定の標的（CD47、HSA、PD-L1、CD33、CD16、またはLAG3）と結合するための手段として言及され得る。VHHドメインを含む、またはVHHドメインを含むように構成される、本明細書で開示される様々な抗体の構造、構成、または構築はいずれも、指示標的を結合するための手段を備える抗体ということができる。いくつかの実施形態は、1つ以上の特定の抗体の構造、構成、または構築を特に含み得る。他の実施形態は、1つ以上の特定の抗体の構造、構成、または構築が特に除外される。

【0029】

本明細書で使用される場合、「に対する特異性を有する抗体」「を識別する抗体」「に対する親和性を有する抗体」「に対する結合部位を有する抗体」、および同様の構成は、同じ意味で使用される。

【0030】

「多重特異性抗体」は、2以上の抗原結合特異性を有する抗体を意味する。本明細書で開示される多重特異性抗体は、CD47、HSA、PD-L1、CD33、CD16、およびLAG3の少なくとも2つに特異的であるか、または上述の少なくとも1つの特異性と、少なくとも1つの第2の特異性を有する。いくつかの実施形態では、本明細書で開示される多重特異性抗体は、抗原に結合できるドメインを2つ、3つ、4つ、またはそれ以上含み得る。さらに、多重特異性抗体は、CD47、HSA、PD-L1、CD33、CD16、およびLAG3の少なくとも1つ、および少なくとも1つの第2の抗原に対する特異性を有する限り、同一の抗原結合配列の少なくとも2のコピーを含むか、または同一の抗原上の異なるエピトープに対する特異性を有する2つの抗原結合配列（biparatoptic）を含むことができる。いくつかの実施形態では、多重特異性抗体（MVSCA）は、CD47、HSA、PD-L1、CD33、CD16、およびLAG3の少なくとも2つに対する特性を有する。いくつかの実施形態では、本明細書で開示される多重特異性抗体は、一本鎖抗体である。したがって、いくつかの多重特異性抗体は、第1標的と結合するための手段、および第2標的と結合するための手段等を備える抗体として言及され得る。

【0031】

「二重特異性抗体」は、2つの異なる抗原結合特異性を有する抗体を意味する。いくつかの実施形態では、本明細書で開示される二重特異性抗体は、CD47、HSA、PD-

10

20

30

40

50

L 1、C D 3 3、C D 1 6、および L A G 3 のうちの 2 つに特異的である。二重特異性抗体の抗原結合部分をコードするアミノ酸配列は、様々な構成で連結することができる。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体の抗体結合部分をコードするアミノ酸配列は、本明細書で開示されるようなリンカーで連結される。

【 0 0 3 2 】

「三重特異性抗体」は、3 つの異なる抗原結合特異性を有する抗体を意味する。いくつかの実施形態では、本明細書で開示される三重特異性抗体は、C D 4 7、H S A、P D - L 1、C D 3 3、C D 1 6、および L A G 3 のうちの 3 つに特異的である。三重特異性抗体の抗原結合部分をコードするアミノ酸配列は、様々な構成で連結することができる。いくつかの実施形態では、三重特異性抗体の抗体結合部分をコードするアミノ酸配列は、本明細書で開示されるようなリンカーで連結される。いくつかの実施形態では、2 つのリンカーが使用され、これらは同じであっても異なってもよい。

10

【 0 0 3 3 】

「四重特異性抗体」は、4 つの異なる抗原結合特異性を有する抗体を意味する。いくつかの実施形態では、本明細書で開示される四重特異性抗体は、C D 4 7、H S A、P D - L 1、C D 3 3、C D 1 6、および L A G 3 のうちの 4 つに特異的である。四重特異性抗体の抗原結合部分をコードするアミノ酸配列は、様々な構成で連結することができる。いくつかの実施形態では、四重特異性抗体の抗体結合部分をコードするアミノ酸配列は、本明細書で開示されるようなリンカーで連結される。いくつかの実施形態では、2 つのリンカーが使用され、これらは同じであっても異なってもよい。

20

【 0 0 3 4 】

本明細書で使用される場合、「結合価」という用語は、抗体分子中の特定の数の結合部位の存在を意味する。したがって、「二価」、「三価」、「四価」、「五価」、「六価」、「七価」、および「八価」は、それぞれ抗体分子中の 2 つの結合部位、3 つの結合部位、4 つの結合部位、5 つの結合部位、6 つの結合部位、7 つの結合部位、および 8 つの結合部位の存在を意味する。本明細書で開示される二重特異性抗体は「二価」である。本明細書で開示される三重特異性抗体は「三価」である。本明細書で開示される四重特異性抗体は「四価」である。しかし、一重特異性多価抗体、たとえば、二価、三価、および四価抗体は、本開示の範囲内であり、それらは複数の抗原結合部位が同一の抗原と結合する。一重特異性の二価および三価（またはより高い結合価）の抗体の抗原結合部位は、抗原の同一のエピトープか、異なるエピトープかのいずれかに結合することができる。同様に、複数の一重特異性結合部位と、1 つ以上の他の特異性の結合部位を組み合わせることにより、多重特異性よりも結合価が高い抗体、たとえば三価の二重特異性抗体を構築することができる。

30

【 0 0 3 5 】

本明細書の「全長抗体」は、抗体の天然の生物学的形態を構成する構造を意味し、可変領域および定常領域を含む。たとえば、ヒトおよびマウスを含むほとんどの哺乳類では、I g G クラスの全長抗体は四量体であり、2 つの同一な、2 つのイムノグロブリン鎖の対からなり、各対は 1 つの軽鎖および 1 つの重鎖を有し、各軽鎖はイムノグロブリンドメイン V L および C L を備え、各重鎖はイムノグロブリンドメイン H V、C H 1、C H 2、および C H 3 を備える。一部の哺乳類では、たとえばラクダおよびラマでは、I g G 抗体は 2 つの重鎖のみ（H C A b）から構成することもでき、各重鎖は F c 領域（C H 2 および C H 3 ドメイン）に結合した可変ドメインを含む。

40

【 0 0 3 6 】

四量体の抗体は、通常、2 つの同一なポリペプチド鎖の対で構成され、各対は 1 つの「軽」鎖（通常約 2 5 k D a の分子量を有する）および 1 つの「重」鎖（通常約 5 0 ~ 7 0 k D a の分子量を有する）を有する。軽鎖および重鎖の各々は、可変領域および定常領域と呼ばれる 2 つの異なる領域でできている。イムノグロブリンの I g G クラスでは、重鎖は、N 末端から C 末端まで V H - C H 1 - C H 2 - C H 3 の順で連結された 4 つのイムノグロブリンドメインで構成され、それぞれ重鎖可変ドメイン、重鎖定常ドメイン 1、重鎖

50

定常ドメイン2、重鎖定常ドメイン3といわれる（VH-Cy1-Cy2-Cy3として言及される場合もあり、それぞれ重鎖可変ドメイン、定常ガンマ1ドメイン、定常ガンマ2ドメイン、定常ガンマ3ドメインといわれる）。IgG軽鎖は、N末端からC末端までVL-CLの順で連結された2つのイムノグロブリンドメインで構成され、それぞれ軽鎖可変ドメイン、軽鎖定常ドメインといわれる。定常領域は配列の多様性が少なく、多数の天然のタンパク質の結合に応答して重要な生化学的事象を引き起こすことができる。

【0037】

抗体の可変領域は、その分子の抗原結合決定基を含み、したがって、標的抗原に対する抗体の特異性を決定する。可変領域は、同じクラスの他の抗体と配列が最も異なるため、そう命名された。可変領域では、重鎖および軽鎖の各Vドメインで3つのループが集まって抗原結合部位を形成する。各ループは相補性決定領域といわれており（以下、本明細書では「CDR」という）、アミノ酸配列の差異が最も顕著である。重鎖および軽鎖に3つずつ、全部で6つのCDRがあり、VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2、およびVL CDR3である。可変領域のCDRの外側は、フレームワーク（FR）領域といわれる。CDRほどの多様性ではないが、異なる抗体間のFR領域では配列のばらつきがある。全体として、抗体のこの特徴的な構造は、安定した足場（FR領域）を提供し、その上で実質的な抗原結合の多様性（CDR）を免疫系で探索して、幅広い抗原に対する特異性を獲得することができる。

【0038】

イムノグロブリン遺伝子座をコードする遺伝子は、「D」および「J」と命名された短いヌクレオチド配列とともに複数のV領域を含み、VHの多様性を生じさせるのは、V、D、およびJヌクレオチド配列の組み合わせである。

【0039】

抗体は、定常領域によって遺伝的に決定される、アイソタイプともいわれるクラスに分類される。ヒト定常軽鎖は、カッパ（Cκ）およびラムダ（Cλ）軽鎖に分類される。重鎖は、ミュー（μ）、デルタ（δ）、ガンマ（γ）、アルファ（α）、またはイプシロン（ε）に分類され、IgM、IgD、IgG、IgA、およびIgEとして抗体のアイソタイプが定義される。IgGクラスは、治療目的で最も一般的に使用される。ヒトでは、このクラスはIgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4サブクラスを含む。マウスでは、このクラスはIgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3サブクラスを含む。IgMは、限定されないが、IgM1およびIgM2サブクラスを有する。IgAは、限定されないが、IgA1およびIgA2を含むいくつかのサブクラスを有する。したがって、本明細書で使用される場合、「アイソタイプ」は、定常領域の化学的および抗原的特徴により定義されるイムノグロブリンのクラスまたはサブクラスを意味する。既知のヒトイムノグロブリンアイソタイプは、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgM1、IgM2、IgD、およびIgEである。開示されたHCAb抗体、二重特異性および多特異性抗体は、上述のアイソタイプの全て、または一部を含み得る。

【0040】

また、本開示の範囲には、限定されないが、(i) VL、CL、VH、およびCH1ドメインを含むFab断片、(ii) VH1およびCH1ドメインを含むFd断片、(iii) 単一抗体のVLおよびVHドメインを含むFv断片、(iv) 単一の可変領域を含むdAb断片、(v) 分離したCDR領域、(vi) 連結された2つのFab断片を含む二価の断片であるF(ab')₂断片、(vii) 一本鎖Fv分子(scFv)を含む抗体断片が含まれ、VHドメインおよびVLドメインは、2つのドメインが結合して抗原結合部位を構成することを可能にするペプチドリンカーにより連結される。3つの異なる特異性を有し、切断可能、または切断不可能なリンカーにより連結された可変領域を含む三価または4価の抗体断片も開示される。ある実施形態では、抗体は、組換えDNA技術により製造される。さらなる実施形態では、抗体は、天然に存在する抗体を酵素により、または化学的に切断することにより製造される。

【0041】

本明細書で使用される場合、「一本鎖抗体」は、リンカーペプチドにより一般的に連結された、抗体の抗原結合部分（すなわち可変領域）の融合タンパク質をいう。本明細書で開示されるのは、多価の一重または多重特異性一本鎖抗体である。一重特異性多価抗体は、CD47、HSA、PD-L1、CD33、CD16、およびLAG3の少なくとも1つに対する特異性を有する。多重特異性一本鎖抗体は、CD47、HSA、PD-L1、CD33、CD16、およびLAG3の少なくとも1つに対する特異性と、少なくとも1つのさらなる特異性を有する。いくつかの実施形態では、多重特異性一本鎖抗体は、CD47、HSA、PD-L1、CD33、CD16、およびLAG3の少なくとも2つに対する特異性を有する。

10

【0042】

本明細書で使用される場合、「ヒト化」抗体は、ヒトのフレームワーク領域（FR）および1つ以上の非ヒト抗体の相補性決定領域（CDR）を含む抗体を意味する。CDRを提供する非ヒトは「ドナー」と呼ばれ、フレームワークを提供するヒトイムノグロブリンは「アクセプター」と呼ばれる。ある実施形態では、ヒト化は、主にドナーCDRをアクセプター（ヒト）のVLまたはVHフレームワークにグラフトすることによる。この方法は、「CDRグラフト」と言われる。最初のグラフト構造で失われた親和性を取り戻すために、選択されたアクセプターのフレームワーク残基を対応するドナー残基に「逆変異」することが必要な場合がある。最適なヒト化抗体は、イムノグロブリン定常領域、典型的にはヒトイムノグロブリンのそのの少なくとも一部を含み、典型的にはヒトFc領域を含むことが多いであろう。ヒト化、または非ヒト抗体可変領域の免疫原性を減少させる他の方法は、リサーフェシング法を含み得る。ある実施形態では、選択ベースの方法は、抗体可変領域をヒト化および／または親和性成熟させるために、すなわち、その標的抗原に対する可変領域の親和性を増加させるために採用され得る。他のヒト化方法は、CDRの一部のみのグラフトを含んでもよく、限定されないが、CDR移植に関して開示しているすべてについて参照により本明細書に援用される米国特許第6,797,492号に記載の方法が含まれる。構造ベースの方法は、たとえば、ヒト化および親和性成熟に関するすべての開示が参照により本明細書に援用される米国特許第7,117,096号に記載されているように、ヒト化および親和性成熟させるために採用することができる。

20

【0043】

本明細書の様々な実施形態では、抗体は重鎖のみの抗体（HCab）である。ラクダ類（ラクダ、ヒトコブラクダ、およびラマ）は、従来の重鎖および軽鎖の抗体（1つの抗体中に2つの軽鎖および2つの重鎖）に加え、二本鎖抗体（可変重鎖のみを含む）を含む。二量体抗体は、VHH遺伝子と呼ばれるVHセグメントの異なるセットによりコードされる。VHおよびVHHはゲノム中に散在している（すなわち、お互いの間に混在する）。VHおよびVHHのcDNAで同一のDセグメントが同定されたことは、VHおよびVHHでのDセグメントの共用を示唆している。天然のVHHを含む抗体は、重鎖の定常領域のCH1ドメイン全体が欠損している。CH1ドメインをコードするエクソンはゲノム中に存在するが、CH1エクソンの5'側の機能的スプライシング受容配列の欠損のために切り出される。その結果、VDJ領域はCH2エクソン上にスプライシングされる。VHHがそのような定常領域（CH2、CH3）に組み換えられる場合、半抗体が軽鎖/重鎖対ではなく一本鎖である抗体が生成される（すなわち、軽鎖との相互作用のない2つの重鎖の抗体）。抗原の結合は従来の抗体で見られるものとは異なるが、同様の方法、すなわち、可変領域の超変異およびそのような高親和性抗体を発現する細胞の選択で、高い親和性が達成される。

30

40

【0044】

例示的な実施形態では、開示されたHCAbは、内因性のマウス抗体発現が排除され、ラクダ科の遺伝子導入が行われたトランスジェニックマウスに免疫することにより産生される。HCAbマウスは、米国特許第8,883,150号、米国特許第8,921,524号、米国特許第8,921,522号、米国特許第8,507,748号、米国特許

50

第 8, 502, 014 号、米国特許公開第 2014/0356908 号、米国特許公開第 2014/0033335 号、米国特許公開第 2014/0037616 号、米国特許公開第 2014/0356908 号、米国特許公開第 2013/0344057 号、米国特許公開第 2013/0323235 号、米国特許公開第 2011/0118444 号、および米国特許公開第 2009/0307787 号で開示されており、これらの全ては、重鎖のみの抗体、およびそのトランスジェニックマウスでの産生について開示されているものについて、参照により本明細書に援用される。HCAb を免疫し、得られた脾臓細胞をマウス骨髄腫細胞と融合させ、ハイブリドーマを形成する。

【0045】

他の実施形態では、HCAb は所望の抗原でラマを免疫し、得られた抗原結合抗体の VHH 領域をコードする配列を単離することにより製造された。ある実施形態では、VHH は、ファージディスプレイライブラリーを使用して単離された。たとえば、国際公開第 91/17271 号、国際公開第 92/01047 号、および国際公開第 92/06204 号（これらの各々は、ファージライブラリーの作成の記載について、その全体が参照により本明細書に援用される）を参照されたい。

【0046】

また、本明細書で開示されるのは、2 つ以上の抗原結合ドメインが単一の融合タンパク質に結合している多重特異性または多価の抗体である。多特異性抗体は、(i) 多特異性 Fv 断片、(ii) 第 2 の特異性を有する第 2 の VH ドメインに結合した（またはそれに融合した）第 1 の特異性の重鎖、(iii) 第 2 の特異性を有する第 2 の VH ドメインに結合した第 1 の特異性を有する四量体モノクローナル抗体であって、第 2 の VH ドメインは第 1 の VH ドメインと結合している、(iv) 第 2 の特異性を有する第 2 の VH ドメインと結合した第 1 の特異性の Fab 断片 (VH-CH1/VL-CL) を含む多くの形態をとることができる。例示的な Fab 断片には、第 2 の特異性を有する第 2 の VH 配列が、第 1 の VH ドメインの C 末端もしくは N 末端、または第 1 CH1 もしくは第 1 CL ドメインの C 末端もしくは N 末端に結合したものを含む。さらなる実施形態では、第 2 および／または第 3 の特異性（またはそれ以上）を有する VH 配列は、第 1 の VH ドメインの C 末端もしくは N 末端、または第 1 CH1 もしくは第 1 CL ドメインの C 末端もしくは N 末端に結合（または融合）し得る。様々な実施形態では、任意のこれらの構成は、本明細書で開示される HCAb 可変ドメインを少なくとも 1 つ含み得る。

【0047】

多重特異性または多価の抗体は、特定の抗原結合ドメイン (VH または VHH 等) と他の抗原結合ドメインを連結するリンカー配列を含んでもよく、それはアミノ酸配列が適切に折りたたまれて所望の 3 次元構造および抗原結合プロファイルを作り出すのを可能にする。一般的に、リンカー配列は、適切に折りたたまれるためにドメイン間の十分な空間と柔軟性を提供する短いアミノ酸配列であろう。また、リンカーは、各ドメインの標的への結合を促進するために、立体障害を引き起こし得る。適切なリンカーには、限定されないが、表 15 のリンカー（配列番号 100~119）、EPKSCD（配列番号 224）、および ASTKGP（配列番号 225）が含まれる。さらなるリンカーが当業者に知られるであろう。

【0048】

また、本開示の範囲には、本明細書で開示される一重特異性または多重特異性抗体のアミノ酸配列バリエーションが含まれる。アミノ酸配列バリエーションは、抗体をコードする DNA に適切なヌクレオチドの変更を導入するか、またはペプチド合成により調製される。そのようなバリエーションには、たとえば欠失型、および／または本明細書の実施例の抗体のアミノ酸配列への残基の挿入および／または置換を含む。最終的な構造が所望の特性を保持する限り、欠失、挿入、および置換の任意の組み合わせにより最終的な構造に到達する。また、アミノ酸の変化も、グリコシル化部位の数または位置の変化等のヒト化抗体またはバリエーション抗体の翻訳後プロセス変化させ得る。

【0049】

抗体の変異誘発に好適な位置の特定の残基または領域を同定する有用な方法は、「アラニンスキャンニング突然変異」と呼ばれる。1つの残基または標的残基の群が同定され（たとえば、Arg、Asp、His、Lys、およびGlu等の荷電残基）、非荷電のアミノ酸（最も好ましくはアラニンまたはポリアラニン）で置き換えられて、アミノ酸と抗原の相互作用に影響する。置換に対して機能的な感受性を示すそれらのアミノ酸の位置は、その後、置換部位に、さらなる、または他の変異体を導入することにより改良される。したがって、アミノ酸配列の変異を導入するための部位は予め決定されるが、突然変異の性質そのものは、予め決定される必要はない。たとえば、所与の部位での突然変異の性能を解析するために、アラニンスキャンまたはランダム突然変異誘発が標的コドンまたは領域で行われ、発現した抗体バリエーションが所望の活性についてスクリーニングされる。

10

【0050】

アミノ酸配列の挿入には、1残基から、100以上の残基を含むポリペプチドまでの長さのアミノ末端および／またはカルボキシル末端への融合、および1つまたは複数のアミノ酸残基の配列内挿入が含まれる。末端挿入の例には、N末端メチオニル残基を有する本明細書で開示される抗体、またはエピトープタグと融合した抗体が含まれる。抗体分子の他の挿入バリエーションには、抗体のN末端またはC末端に、抗体の血清半減期を増大させる酵素またはポリペプチドの融合が含まれる。

【0051】

バリエーションの別の型は、1アミノ酸置換バリエーションである。これらのバリエーションは、抗体分子内の少なくとも1つのアミノ酸残基が除去され、その位置に別の残基が挿入される。置換変異誘発のための最も重要な部位は高頻度可変領域であるが、FRの改変も考えられる。保守的置換を、表1の「好ましい置換」の見出しの下に示す。そのような置換が生物学的活性の変化をもたらす場合、表1の「例示的置換」に示す、またはアミノ酸クラスに関連してさらに以下に説明されるような、より実質的な変更を導入して、産生物をスクリーニングする。

20

【0052】

【表1】

オリジナルの残基	例示的な残基	好ましい残基
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucine	Leu
Leu (L)	Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucine	Leu

30

40

50

【0053】

抗体の生物学的特性の実質的な修正は、(a)置換箇所におけるポリペプチド骨格の構造、たとえば、シートまたはらせん構造、(b)標的部位における分子の電化または疎水性、または(c)側鎖の大部分、を維持する効果が顕著に異なる置換を選択することにより遂行される。天然に存在する残基は、共通する側鎖の特性に基づいて、グループに分類される。

(1) 疎水性：N o l l o i s i n、M e t、A l a、V a l、L e u、I l e

(2) 中性親水性：C y s、S e r、T h r

(3) 酸性：A s p、G l u

(4) 塩基性：A s n、G i n、H i s、L y s、A r g

(5) 鎖の配向に影響を与える残基：G l y、P r o

(6) 芳香族：T r p、T y r、P h e

10

【0054】

非保守的置換は、これらのクラスのメンバーを他のクラスと交換することを意味する。

【0055】

分子の酸化安定性を改善し、異常なクロスリンクを防止するために、1重特異性または多重特異性抗体の適切な構造の維持に関与しない任意のシステイン残基も、一般的にはセリンで置換してもよい。逆に、安定性を改善するために抗体にシステイン結合をふかしてもよい(特に、抗体がFv断片等の抗体断片である場合)。

【0056】

20

別の型の置換バリエーションは、親抗体(たとえば、ヒト化抗体またはラクダ科抗体)の1つ以上の高頻度可変領域の残基を置換することを含む。一般的に、さらなる発展のために選択された得られたバリエーションは、それらが生成された親抗体に比べて改善された生物学的特性を有するであろう。そのような置換バリエーションを生成するための便利な方法は、ファージディスプレイを用いた親和性成熟である。手短にいうと、いくつかの高頻度可変領域(たとえば6~7部位)は、各部位においてすべての可能なアミノ残基を生成するように変異する。このように生成された抗体バリエーションは、繊維状ファージ粒子から、各粒子内にパッケージされたM13の遺伝子III産物への融合体として一価の様式で提示される。ファージディスプレイバリエーションは、その後、本明細書に開示されるようなそれらの生物学的活性(たとえば結合親和性)によりスクリーニングされる。修正のための高頻度可変領域の候補を同定するために、アラニンスキャニング突然変異を行い、抗原結合に大きく寄与している高頻度可変領域残基を同定することができる。あるいは、または加えて、抗原-抗体複合体の結晶構造を解析して、抗体と抗原の間の接触点を同定することが有益であり得る。そのような接触残基および隣接残基は、本明細書で詳述される技術による置換のための候補である。そのようなバリエーションが生成されると、バリエーションのパネルは、本明細書に記載されるようにスクリーニングに供され、1つ以上の関連するアッセイにおいて優れた特性を有する抗体は、さらなる開発のために選択され得る。

30

【0057】

抗体のアミノ酸バリエーションの別の型は、抗体のオリジナルのグリコシル化パターンを変更する。変更は、抗体中にみられる1つ以上の炭水化物部位を削除し、かつ/または抗体中々に存在しない1つ以上のグリコシル化部位を付加することを意味する。

40

【0058】

抗体のグリコシル化は、通常、N-結合型またはO-結合型のいずれかである。N-結合型は、アスパラギン残基の側鎖への炭水化物部分の結合をいう。アスパラギン-X-セリンおよびアスパラギン-X-スレオニンで、Xがプロリンを除く任意のアミノ酸であるのトリペプチド配列は、炭水化物部分をアスパラギン側鎖に酵素的に結合するための認識配列である。したがって、ポリペプチド中のいずれかのトリペプチド配列の存在により、潜在的なグリコシル化部位が作り出される。O-結合型グリコシル化は、糖であるN-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、またはキシロースの1つの、ヒドロキシアミノ酸への結合をいい、5-ヒドロキシプロリンまたは5-ヒドロキシリジンも使用され得るが

50

、最も一般的にはセリンまたはスレオニンである。

【0059】

抗体へのグリコシル化部位の付加は、アミノ酸配列が1つ以上の上述のトリペプチド配列を含むように変化することにより、都合よく行われる（N-結合型グリコシル化部位について）。この変化は1つ以上のセリンまたはスレオニン残基をオリジナルの抗体の配列に付加することにより、または置換することによって作り出されてもよい（O-結合型グリコシル化部位）。

【0060】

一重特異性または多重特異性抗体のアミノ酸配列バリエーションをコードする核酸分子は、当該分野で知られる様々な方法により調製される。これらの方法には、限定されないが、天然資源からの単離（天然に存在するアミノ酸配列バリエーションの場合）、または、本明細書に開示される抗体の先に調製された変異体または非変異体のオリゴヌクレオチドを介した（または部位特異的）突然変異誘発、PCRによる突然変異誘発、およびカセット突然変異誘発が含まれる。

【0061】

一重特異性抗体または多重特異性抗体の他の修飾が熟慮される。たとえば、疾患の治療における抗体の有効性を高めるために、エフェクター機能に関して抗体を修飾するのが望ましいかもしれない。たとえば、Fc領域にシステイン残基を導入して、この領域において鎖間のジスルフィド結合形成を可能にし得る。このように生成された二量体抗体は、内部能力が改善され、かつ／または補体仲介性の細胞死および抗体依存性細胞傷害（ADCC）を増強し得る。また、抗腫瘍活性が増強された二量体抗体は、ヘテロ二機能性クロスリンカーを用いて調製し得る。あるいは、2つのFc領域を有し、それにより補体溶解能とADCC能を向上させ得る抗体を設計することができる。

【0062】

他の実施形態では、抗体を予め標的化するために「受容体」（ストレプトアビジン等）と結合させてもよく、抗体-受容体コンジュゲートは患者に投与され、続いてクリア剤を用いて結合していないコンジュゲートを循環から除去し、その後、細胞傷害剤（たとえば放射性核種）と結合させた「リガンド」（たとえばアビジン）を投与する。

【0063】

また、一重特異性または多重特異性抗体の共有結合修飾も、本開示の範囲内である。これらは、場合により、化学合成により、または酵素的もしくは化学的な抗体の切断により作られる。抗体の共有結合修飾の他の類型は、抗体の標的アミノ酸残基を、選択された側鎖またはN末端もしくはC末端残基と反応することができる有機誘導体化剤と反応させることによって分子内に導入される。例示的なポリペプチドの共有結合修飾は、米国特許第5,534,615号に記載されており、ポリペプチドの共有結合修飾に関する開示のすべてについて参照により本明細書に援用される。抗体の共有結合修飾の例示的な類型は、抗体を様々な非蛋白質ポリマーのうちの1つ、たとえば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、またはポリオキシアルキレンに、米国特許第4,640,835号、米国特許第4,496,689号、米国特許第4,301,144号、米国特許第4,670,417号、米国特許第4,791,192号、または米国特許第4,179,337号に記載の方法で連結することを含む。

【0064】

本明細書で開示される一重特異性または多重特異性抗体は、組換え手段により製造され得る。したがって、本明細書で開示されるのは、抗体をコードする核酸、抗体をコードする核酸を含む発現ベクター、および抗体をコードする核酸を含む細胞である。組換え体製造の方法は、当該分野で広く知られており、原核および真核細胞におけるタンパク質の発現、それに続く抗体の単離、および通常は、薬学的に許容される純度のための精製を含む。前述のような宿主細胞における抗体の発現のために、抗体配列をコードする核酸は、標準的な方法により発現ベクターに挿入される。発現は、CHO細胞、NS0細胞、SP2/O細胞、HEK293細胞、COS細胞、PER.C6細胞、酵母または大腸菌細胞等

10

20

30

40

50

の適切な原核または真核宿主細胞において行われ、抗体は細胞（溶解後の上清または細胞）から回収される。組換え発現タンパク質は、使用する発現系、およびタンパク質が細胞質中で発現するか分泌されるかに応じて、N末端に開始メチオニン（またはホルミルメチオニン）またはシグナル配列が必要であることが理解される。したがって、いくつかの実施形態では、本明細書で開示されるタンパク質配列は、そのようなN末端がアミノ酸で修飾される。いくつかの実施形態では、そのようなN末端配列は、完全な成熟した配列から切断され（全部または一部）るが、他の実施形態ではそれらは保持される。

【0065】

したがって、本明細書で開示されるある実施形態は、a) 抗体をコードする核酸分子を含む少なくとも1つの発現ベクターで宿主細胞を形質転換すること、b) 抗体分子の合成を可能にする条件下で宿主細胞を培養すること、およびc) 培養物から前記抗体分子を回収すること、を含む、一重特異性または多重特異性抗体の調整方法を含む。

10

【0066】

抗体は、たとえば、プロテインA-セファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティークロマトグラフィー等の従来のイムノグロブリン精製手順により培養液から適切に分離される。

【0067】

本明細書で使用される場合、「細胞」、「細胞株」および「細胞培養」という表現は、同じ意味で使用され、全てのそのような名称には子孫細胞が含まれる。したがって、「形質転換体」および「形質転換細胞」には、最初の対象細胞、および多数の形質転換なしにそれに由来する培養物が含まれる。また、意図的な、または意図しない突然変異のために、すべての子孫がDNAの内容において正確に同一でない可能性があることも理解される。元の形質転換細胞についてスクリーニングされたものと同じの機能または生物学的活性を有する変異体の子孫も含まれる。異なる名称が意図されている場合は、文脈から明らかであろう。

20

【0068】

本明細書で使用される場合、「形質転換」という用語は、縮細胞中へのベクター／核酸の移動のプロセスをいう。宿主細胞として細胞壁障壁がない細胞が用いられる場合、たとえばリン酸カルシウム沈殿法によりトランスフェクションを行うことができる。しかし、たとえば核酸注入による、またはプロトプラスト融合によるDNAを細胞に導入するための他の方法も使用し得る。原核細胞または堅固な細胞壁構造を含む細胞が使用される場合、たとえば、トランスフェクションの方法の1つは塩化カルシウムを用いたカルシウム処理である。

30

【0069】

本明細書で使用される場合、「発現」は、核酸がmRNAに転写されるプロセス、および／または転写されたmRNA（転写産物ともいう）が続いてペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質に翻訳されるプロセスをいう。転写産物およびコードされるポリペプチドは、まとめて遺伝子産物という。ポリヌクレオチドがゲノムDNA由来である場合、真核細胞内での発現には、mRNAのスプライシングが含まれ得る。

【0070】

「ベクター」は特に自己複製する核酸分子であり、挿入された核酸分子を宿主細胞内および／または宿主細胞間に移行させる。この用語には、主にDNAやRNAを細胞に挿入する（たとえば染色体統合）機能のベクター、主にDNAまたはRNAを複製する機能のベクターの複製、およびDNAまたはRNAの転写および／または翻訳の機能の発現ベクターが含まれる。また、上述の機能の2つ以上を提供するベクターも含まれる。

40

【0071】

「発現ベクター」は、適切な宿主細胞に導入されると、ポリペプチドに転写および翻訳され得るポリヌクレオチドである。「発現系」は、大抵は、所望の発現産物を得るために機能し得る発現ベクターを含む適切な宿主細胞をいう。

【0072】

50

本明細書で使用される場合、「宿主細胞」は、本明細書で開示される抗体を産生するために設計された任意の細胞系を意味する。ある実施形態では、H E K 2 9 3 細胞および C H O 細胞が宿主細胞として使用される。

【0073】

原核生物に適切な制御配列には、たとえば、プロモーター、さらなるオペレーター配列、およびリボソーム結合部位が含まれる。真核細胞では、プロモーター、エンハンサー、ポリアデニル化シグナルを利用することが知られている。

【0074】

核酸は、他の核酸配列と機能的な関係に置かれたとき、「作動可能に連結」される。たとえば、プレ配列または分泌リーダーのDNAは、それがポリペプチドの分泌に参与するプレタンパク質として発現する場合、ポリペプチドのためのDNAに作動可能に連結され、プロモーターまたはエンハンサーは、それが配列の転写に影響する場合、コーディング配列に作動可能に連結され、または、リボソーム結合部位は、それが翻訳を促進する部位にある場合、コーディング配列に作動可能に連結される。一般的に、「作動可能に連結される」は、連結されているDNA配列は隣接しており、分泌リーダーの場合は隣接しており、かつリーディングフレーム内にある。しかし、エンハンサーは隣接している必要はない。連結は、便利な制限部位でのライゲーションにより達成される。そのような部位がない場合、従来の方法に従って合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーが使用される。

【0075】

また、本明細書で開示されるのは、抗体の製造のための核酸および組換え技術を含む、一重特異性または多重特異性抗体をコードする単離された核酸、ベクター、および宿主細胞である。

【0076】

抗体の組換え産物のために、それをコードする核酸は単離され、さらなるクローニング（DNAの増幅）または発現のために複製ベクターに挿入され得る。いくつかの実施形態では、抗体製造に関して開示しているすべてについて参照により本明細書に援用される米国特許第5,204,244号に記載されているように、相同組換えにより製造され得る。抗体をコードするDNAは、容易に単離され、従来の手順を用いて（たとえば、抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子と特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを用いて）シークエンスされる。多くのベクターは入手可能である。ベクターの構成要素は、一般的に、限定されないが、たとえばタンパク質発現に関して開示しているすべてについて参照により本明細書に援用される米国特許第5,534,615号に記載されているように、1つ以上の以下の物：シグナル配列、複製起点、1つ以上のマーカー遺伝子、エンハンサー配列、プロモーター、および転写終結配列を含む。

【0077】

本明細書においてベクターにDNAをクローニングまたは発現させるための適切な宿主細胞は、原核細胞、酵母、または上述の高等真核細胞である。この目的のために適切な原核生物には、グラム陰性菌またはグラム陽性菌等の真正細菌、たとえば、大腸菌等のエスキリア属、エンテロバクター属、エルウィニア属、クレブシエラ属、プロテウス属、*Salmonella typhimurium*等のサルモネラ属、*Serratia marcescans*等のセラチア属、および赤痢菌属等の腸内細菌科、ならびに *B. subtilis*、*B. licheniformis*等のバシラス綱、緑膿菌等のシュードモナス属、およびストレプトマイセス属が含まれる。1つの例示的な大腸菌クローニング宿主は、大腸菌294（ATCC31,446）であるが、大腸菌B、大腸菌X1776（ATCC31,537）および大腸菌W3110（ATCC27,325）等の他の株も適切である。これらの例は、限定的なものではなく、例示的なものである。

【0078】

原核生物に加えて、糸状菌または酵母等の真核微生物が、一重特異性または多重特異性抗体をコードするベクターのクローニングまたは発現に適切である。下等真核宿主微生物

10

20

30

40

50

の中では出芽酵母または通常のパン酵母が最もよく使用されている。しかし、分裂酵母；たとえば *K. lactis*、*K. fragilis* (ATCC12、424)、*K. bulgaricus* (ATCC16、045)、*K. wickerhamii* (ATCC24、178)、*K. waltii* (ATCC56、500)、*K. drosophilum* (ATCC36、906)、*K. thermotolerans*、and *K. marxianus* 等のクルイウェロマイセス属宿主、ヤロウイア属 (EP402、226)；*Pichia pastoris* (EP183、070)；カンジダ；*Trichoderma reesia* (EP244、234)；アカパンカビ；*Schwanniomyces occidentalis* 等の *Schwanniomyces* 属；およびたとえば、アカパンカビ属、アオカビ属、*Tolytocladium* 属、ならびに *A. nidulans* および *A. niger* 等のコウジカビ属等の糸状菌等の他の多くの属、種、および下部が通常入手可能であり、本明細書に有用である。

10

【0079】

グリコシル化された一重特異性または多重特異性抗体の発現に適切な宿主細胞は、多細胞生物由来であり、植物細胞および昆虫細胞等の非脊椎動物由来の細胞を含む。*Spodoptera frugiperda* (幼虫)、*Aedes aegypti* (蚊)、*Aedes albopictus* (蚊)、キイロショウジョウバエ (ミバエ)、*Bombyx mori* などの宿主からの多数のバキュロウイルスの株および変異体、並びに対応する許容昆虫宿主細胞が同定されている。トランスフェクション用の様々なウイルス株、たとえば、*Spodoptera frugiperda* 細胞のトランスフェクション用のウイルスが公知であり、そのようなウイルスは、本発明による本明細書のウイルスとして、特に *Spodoptera frugiperda* 細胞のトランスフェクションのために使用され得る。また、綿、トウモロコシ、ジャガイモ、ダイズ、ペチュニア、トマト、およびタバコの植物細胞培養物も宿主として利用することができる。

20

【0080】

しかし、脊椎動物の細胞への関心が最も高く、培養 (組織培養) における脊椎動物細胞の増殖が日常的な手順になっている。有用な哺乳類宿主細胞株は、SV40により形質転換されたサル腎臓CV1 (COS-7、ATCC CRL 1651)、ヒト胎児腎臓細胞 (浮遊培養での増殖のためにサブクローン化された293または293細胞)、ベビーハムスター腎臓細胞 (BHK、ATCC CCL 10) チャイニーズハムスター卵巣細胞 / -DHFR (CHO)、マウスセルトリ細胞 (TM4)、サル腎臓細胞 (CV1 ATCC CCL 70)、アフリカミドリザル腎臓細胞 (VERO-76、ATCC CRL-1587)、ヒト子宮頸癌細胞 (HELA、ATCC CCL 2)、イヌ腎臓細胞 (MDCK、ATCC CCL 34)、バッファローラット肝臓細胞 (BRL 3A、ATCC CRL 1442)、ヒト胚細胞 (W138、ATCC CCL 75)、ヒト肝臓細胞 (Hep G2、HB 8065)、マウス乳腺腫瘍 (MMT 060562、ATCC CCL 51)、TRI細胞、MRC5細胞、FS4細胞、およびヒト肝癌株 (Hep G2) である。

30

【0081】

宿主細胞は、一重特異性または多重特異性抗体を製造するために上述の発現ベクターで形質転換され、プロモーター誘導のために修正された従来の栄養培地で培養され、形質転換体を選択し、または所望の配列をコードする遺伝子を増幅する。

40

【0082】

一重特異性または多重特異性抗体を製造するための宿主細胞は、様々な培地で培養され得る。Ham F10 (Sigma)、最小必須培地 ((MEM)、Sigma)、RPMI-1640 (Sigma)、およびダルベッコ改変イーグル培地 ((DMEM)、Sigma) 等の市販の培地は、宿主細胞の培養に適している。さらに、米国特許第4,767,704号、米国特許第4,657,866号、米国特許第4,927,762号、米国特許第4,560,655号、米国特許第5,122,469号、国際公開第90/03430号、国際公開第87/00195、または米国再発行特許第30,985号は、宿

50

主細胞の培養培地として使用され得る。必要であれば、これらの任意の培地にホルモンおよび／または他の成長因子（インスリン、トランスフェリン、または上皮成長因子等）、塩（塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、およびリン酸等）、緩衝液（H E P E S 等）、ヌクレオチド（アデノシンおよびチミジン等）、抗生物質（G E N T A A M Y C I N（登録商標）等）、微量元素（通常、最終濃度がマイクロモラーの範囲で存在する無機化合物として定義される）、およびグルコースまたは同等のエネルギー源を追加してもよい。その他の必要な補助物質も、当業者に知られているような適切な濃度で含まれ得る。温度、pH等の培養条件は、発現のために選択された宿主細胞で従来から使用されてきたものであり、当業者に明らかであろう。

【0083】

組換え技術を使用する場合、抗体は細胞内、細胞膜周辺腔に産生されるか、または直接培地内に分泌され得る。抗体が細胞内で産生される場合、最初の段階として、宿主細胞または溶解した断片のいずれかである特定のデブリは、たとえば遠心分離または限外濾過により除去される。

【0084】

細胞から調製された抗体組成物は、たとえば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、およびアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製され、アフィニティークロマトグラフィーは好適な精製技術である。親和性リガンドとしてのプロテインAの適性は、抗体中に存在するイムノグロブリンFcドメインの種およびアイソタイプによる。プロテインAはFc領域を有さない抗体を精製するために使用することができるが、プロテインAは、ヒト $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、または $\gamma 4$ 重鎖ベースの抗体を精製するために使用することができる。プロテインGは、マウスの全てのアイソタイプ、およびヒト $\gamma 3$ に有用である。親和性リガンドが結合するマトリックスは、ほとんどの場合アガロースであるが、他のマトリックスも利用できる。コントロールドポアガラス（c o n t r o l l e d p o r e g l a s s）またはポリ（スチレンジビニル）ベンゼン等の機械的に安定したマトリックスは、アガロースで達成することができるよりも早い流速および短い処理時間を可能にする。抗体がCH3ドメインを含む場合、B a k e r b o n d A B X（商標）樹脂が精製に有用である。また、本明細書で開示される抗体および抗体断片は、ヒスチジンタグをつけて合成され、金属アフィニティークロマトグラフィーによりアフィニティ精製され得る。

【0085】

イオン交換カラムによる分取、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカのクロマトグラフィー、ヘパリンSEPHAROSE（商標）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（ポリアスパラギン酸カラム等）のクロマトグラフィー、等電点電気泳動、SDS-PAGE、および硫酸アンモニウム沈殿等のタンパク質精製のための他の技術も、回収される抗体に応じて利用可能である。

【0086】

任意の予備精製ステップに続いて、目的の抗体及び混入物を含む混合物を、約2.5～4.5の間のpHの溶出バッファーを用いた低pH疎水性相互作用クロマトグラフィーに供してもよく、好ましくは低塩濃度（例えば、約0～0.25M塩）で行う。

【0087】

また、本明細書で開示されるのは、腫瘍内微小環境で切断され得る多重特異性一本鎖抗体である。いくつかの実施形態では、腫瘍標的化ドメイン（腫瘍抗原結合ドメイン等）または他の機能的ドメイン（体内半減期を延長することができる抗HSAドメイン等）は、多重特異性一本鎖抗体が腫瘍に到達すると、治療効果をもたらす他のドメインを放出するためにリンカーで切断される。腫瘍内微小環境には、本明細書で開示されるリンカーを切断することができる多数のプロテアーゼが含まれる。腫瘍プロテアーゼの非限定的な例には、限定されないが、マトリックスメタロプロティナーゼ（たとえば、MMP1、MMP2、MMP3、MMP7、MMP8、MMP9、MMP12、およびMMP14）、ADAM（a d i s i n t e g r i n a n d m e t a l l o p r o t e a s e、たとえ

10

20

30

40

50

ば、ADAM10およびADAM17)、カリクレイン関連ペプチダーゼ(たとえば、KLK1、KLK2、KLK3、およびKLK6)、カテプシン(たとえば、CTS-B、CTS-L、およびCTS-S)、ウロキナーゼプラスミノゲンアクチベーター(uPA)、ヘプシン(HPN)、マトリプターゼ、レグメイン、またはジペプチジルペプチダーゼ(たとえば、DDP4)が含まれる。

【0088】

(抗体組成物)

また、本明細書で開示されるのは、CD47、HSA、PD-L1、CD33、CD16、またはLAG3等に対する特異性を有する一重特異性または多重特異性抗体を含む医薬組成物である。また、開示されるのは、医薬組成物の製造のための本明細書で開示される抗体の使用である。また、開示されるのは、様々な疾患および障害の治療のための、開示される抗体、および抗体を含む医薬組成物の使用方法である。

10

【0089】

医薬組成物は、ヒトにおける疾患の治療を意図したものであり、かつそれに適したものである。すなわち、全体として有益な効果を提供し、有益な効果の提供とは無関係の毒性または他の望ましくない効果を引き起こす成分または混入物を含まない。医薬組成物は、1種以上の活性剤を含み、活性剤または組成物全体の投与性、溶解性、吸収性もしくは生物学的利用能、およびまたは安定性等を補助するために溶媒、緩衝液、希釈剤、担体、および他の添加剤をさらに含み得る。

【0090】

20

また、本明細書で開示される一重特異性または多重特異性抗体は、リポソーム中に製剤化されてもよい。抗体を含むリポソームは、米国特許第4,485,045号、米国特許第4,544,545号、および米国特許第5,013,556号に記載されているような、当該分野で知られる方法により調製される。特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール、およびPEG誘導体化ホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)を含む脂質組成物で、逆相蒸発法により生成される。リポソームは、定められた孔径のフィルターを通して押し出され、所望の直径のリポソームが得られる。抗体のFab'断片は、ジスルフィド相互変換反応によりリポソームに結合し得る。

【0091】

本明細書で使用される場合、「医薬担体」には、生理的適合性がある、任意の、およびすべての溶媒、分散媒、コーティング剤および抗真菌剤、等張化剤および吸収遅延剤が含まれる。好ましくは、担体は、静脈内、筋肉内、眼内、硝子体内、皮下、非経口、脊髄または表皮投与(たとえば、注射または注入による)に適している。いくつかの実施形態では、担体は水性である。

30

【0092】

本明細書で開示される組成物は、当該分野で知られる様々な方法により投与することができる。当業者に明らかであるように、投与の経路および／または方法は、所望の結果に応じて変化するであろう。開示される抗体を特定の投与経路により投与するために、不活性化を防止するための物質と抗体を関連付けるか、またはそれと抗体を共投与することが必要であり得る。たとえば、抗体は、適切な担体、たとえば、リポソーム、または希釈剤中で対象に投与され得る。薬学的に許容される希釈剤には、生理食塩水および水性緩衝液が含まれる。薬学的に許容される担体には、滅菌された注入可能な溶液または分散剤を即時調製するための滅菌水性溶液または分散剤、および滅菌粉末が含まれる。薬学的活性物質に対するこのような媒体および薬剤の使用は、当該技術分野で知られている。

40

【0093】

本明細書で使用される場合、「非経口投与」および「非経口で投与される」という句は、大抵は注入による、経腸投与および局所投与以外の投与方法を意味し、限定されないが、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、眼内、硝子体内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、クモ膜下、脊髄内、硬膜外、および胸骨内への注射および点滴を含む。

50

【0094】

これらの組成物は、保存料、湿潤剤、乳化剤、分散剤等の添加剤も含み得る。微生物の存在防止は、前述の滅菌手順と、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸等の様々な抗菌剤および抗カビ剤の含有との両方によって確保され得る。また、糖、塩化ナトリウム等の等張剤を組成物中に含有させるのが望ましいこともある。さらに、注入可能な組成物形態の吸収の延長は、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチン等の吸収を遅らせる薬剤の含有によりもたらされ得る。

【0095】

いくつかの実施形態では、抗体を含む医薬組成物は、凍結乾燥ケーキである。凍結乾燥ケーキは、充填剤、緩衝液および／もしくは塩、または本明細書に記載されたような他の添加剤をさらに含む得る。凍結乾燥組成物は、患者への投与のために、滅菌水または水性緩衝液の添加により再構成される。

【0096】

選択された投与経路にかかわらず、適切な水和物の形態で使用し得る開示される抗体、および／または抗体を含む医薬組成物は、当業者に知られる従来の方法により薬学的に許容される剤形に製剤化される。

【0097】

医薬組成物中の活性成分の実際の用量は、特定の患者、組成物、および投与方法について、所望の治療反応を達成するのに効果的であり、患者に毒性がない量の活性成分を得るために様々であり得る。選択される用量レベルは、採用された本発明の特定の組成物の活性、投与経路、投与時間、採用された特定の組成物の排出率、治療期間、採用された特定の組成物と組み合わせて使用する他の薬剤、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、症状、一般的な健康状態および過去の病歴、医療分野でよく知られる他の要因を含む様々な薬物動態要因に基づくであろう。

【0098】

(開示されるMVSCAおよびそれらの構成抗体ドメイン、およびリンカーの機能)
(抗HSA HVV)

MVSCA中の抗HSAドメインの主な機能は、HSAに結合し、それにより体内でのMVSCAの半減期を延長することである。抗HSAドメインが含まれることにより、数時間だけの半減期を1週間超に延長することができる。ほとんどの場合、この目的のためには1つの抗HSAドメインで十分である。したがって、抗HSAドメインは、MVSCAの半減期を延長する手段を構成する。

【0099】

HSAとの結合により、抗HSAドメインは、隣接する結合ドメインの部分的または完全な遮断を仲介することができ、その活性(有効親和性)を阻害または調節することができる。遮断が実質的に完全であるか部分的であるかは、2つのドメインの間のリンカーの長さに依存し、リンカーが短いほど抗原の結合をより完全に遮断する。部分的な遮断は、VHHの抗原に対する見かけのまたは有効な親和性の低下として観察されることがよくある。場合によっては、部分的な遮断は、VHHの特異性の増加として観察されるが、これは、ドメインがより高い親和性を持つ抗原とは結合し続けるが、より低い親和性の抗原には有意な結合を示さないためである。したがって、抗HSAドメインは、隣接する結合ドメインの結合活性を阻害する手段を構成する。

【0100】

また、遮断は可逆的であり得る。抗HSAドメインを、MVSCAの末端部位に配置して切断可能なリンカーを結合させることにより、抗HSAドメインを除去することができ、隣接する結合ドメインの完全な結合活性が回復する。そのような抗体構造は、効果的なプロドラッグである。たとえば、所望の作用部位にみられるプロテアーゼによりリンカーが切断される場合、MVSCAは隣接する結合部位が不活性な状態で体内を巡るが、作用部位(たとえば腫瘍)に到達するとリンカーが切断され、抗HSAドメインが放出され、隣接する結合ドメインの結合活性の抑制が解かれる。したがって、抗HSAドメインは、

切断可能なリンカーと対になっている場合、M V S C Aまたは多重特異性抗体中の隣接する結合ドメインの結合活性を可逆的に阻害する手段を構成する。

【0101】

(抗CD47)

抗CD47ドメインの機能は、腫瘍細胞上のCD47の「私を食べないで」シグナルを阻害して、マクロファージに貪食されるようにすることである。CD47は広範に発現しており、抗CD47活性は、正常な健康な細胞への実質的な結合がある場合、問題となり得る。これは、いくつかの方法で避けることができる。CD47には複数の構造が存在し、腫瘍細胞で一般的に見られる構造は、例えばRBCで見られるものとは異なる。実施例1に示すように、本明細書で開示されるVHHは、腫瘍細胞上で発現するCD47に結合するが、RBCで発現するものには結合しない。また、M V S C Aが血流に取り込まれて標的への到達を妨げないように、RBCとの結合を避けることも重要である。

10

【0102】

M V S C AのCD47への望ましくない、または有害な稀有号を避ける別の方法は、上述のように、CD47への結合を減少させる、または妨害するような方法で、抗HSAドメインの隣接した場所に配置することにより達成され得る。別の結合ドメインを介してM V S C Aが腫瘍細胞に結合し、局所的なプロテアーゼにより抗HSAドメインが切断されて放出されると、抗CD47ドメインはCD47に結合でき、マクロファージとのファゴサイトーシス阻害相互作用を妨害する。

【0103】

したがって、抗CD47ドメインは、ファゴサイトーシスの阻害を減少させる手段を構成する。

20

【0104】

(抗CD16)

抗CD16ドメインの機能は、NK細胞のADCC活性をアップレギュレートすることである。CD16Bは広く組織に分布しているが、CD16AはNK細胞で特異的に発現する。CD16Aに特異的な抗体は、所望の標的であるNK細胞にのみ結合するため、好適である。しかし、CD16AとCD16Bの両方に結合する抗体、およびCD16にのみ結合する抗体は、両方ともNK細胞のADCC活性を促進することができるアゴニストである。

30

【0105】

CD16は、通常、抗体のFc部分と相互作用する。NK細胞のCD16Aが抗体のFc部分と結合すると、NK細胞の細胞溶解活性は、抗体の可変ドメインが結合した細胞または微生物に対して向けられる。しかし、複数のFc配列および複数の型のFc受容体があり、Fc領域により仲介される可能性のある複数の効果をもたらす。Fc領域に代えて抗CD16ドメインを用いることにより、M V S C Aは、他の特異性の標的に対してNKを介したADCCを特異的にリクルートすることができる。したがって、抗CD16ドメインは、NKを介したADCCをリクルートする手段を構成する。

【0106】

(抗PD-L1)

抗PD-L1ドメインは、免疫チェックポイント阻害剤と抗腫瘍抗原抗体の両方として機能する。抗PD-L1ドメインは、PD-1結合アンタゴニストとしてはたらく。PD-1（たとえばT細胞上の）との結合からPD-L1（たとえば腫瘍細胞上の）を遮断することにより、抗PD-L1ドメインは、関連する免疫チェックポイントを阻害し、T細胞を介した免疫応答の発生を解放する。抗PD-1または抗PD-L1抗体を用いたPD-1の遮断は、よく知られた癌の治療法である。したがって、抗PD-L1ドメインは、PD-1を遮断する手段、またはPD-1免疫チェックポイントを解除する手段を構成する。

40

【0107】

抗腫瘍抗原抗体としての抗PD-L1ドメインは、M V S C Aの腫瘍細胞との結合を仲

50

介することができる。MVSCAが抗CD16ドメインも含む場合、NKを介したADCCが促進される。抗CD47ドメインも含むMVSCAでは、マクロファージを介したファゴサイトーシスが促進される。腫瘍細胞への多価結合は、結合親和性およびADCCを改善する。これは、複数コピーの抗PD-L1ドメイン、および／または他の腫瘍抗原を標的とする1つ以上の結合ドメインを有することにより達成される。したがって、抗PD-L1ドメインは、腫瘍細胞に結合する手段、腫瘍抗原に結合する手段、またはPD-L1腫瘍抗原に結合する手段を構成する。

【0108】

(抗LAG3)

抗LAG3ドメインは、免疫チェックポイント阻害剤として機能する。抗LAG3ドメインは、LAG3のクラスII MHCタンパク質への結合のアンタゴニストとして機能する。T細胞上のLAG3を腫瘍細胞上のクラスII MHCの結合から遮断することにより、抗LAG3ドメインは、関連する免疫チェックポイントを阻害し、T細胞を介した免疫応答の発生を解放する。したがって、抗LAG3ドメインは、LAG3免疫チェックポイントを解除する手段を構成する。

10

【0109】

(抗CD33)

CD33は、抗CD33ドメインは、2つの方法で使用され得る。骨髄系細胞および一部のリンパ球で発現し、急性骨髄性白血病(AML)等の一部の血液癌で発現するため、腫瘍抗原である。腫瘍抗原抗体としての抗CD33ドメインは、MVSCAの腫瘍細胞への結合を仲介することができる。MVSCAが抗CD16ドメインも含む場合、NKを介したADCCが促進される。抗CD47ドメインも含むMVSCAでは、マクロファージを介したファゴサイトーシスが促進される。腫瘍細胞への多価結合は、結合親和性およびADCCを改善する。これは、複数コピーの抗CD33ドメイン、および／または他の腫瘍抗原を標的とする1つ以上の結合ドメインを有することにより達成される。したがって、抗CD33ドメインは、腫瘍細胞に結合する手段、腫瘍抗原に結合する手段、またはCD33腫瘍抗原に結合する手段を構成する。

20

【0110】

さらに、たとえば、 β -アミロイドまたは他の糖脂質沈着タンパク質において、CD33がシアル酸残基と結合する場合、阻害シグナル伝達カスケードが貪食活性の阻害をもたらす。抗CD33ドメインを備える抗体はCD33刺激のアンタゴニストとして機能し、それにより貪食活性を促進し、アルツハイマー病を治療するために除去する。また、乾燥型加齢黄斑変性(AMD)等の網膜疾患では不溶性の沈着物があり、ミクログリアのファゴサイトーシスにより除去され得る。したがって、抗CD33ドメインを備える抗体は、乾燥型AMDおよび他の網膜疾患の治療にも有用であり得る。したがって、抗CD33ドメインは、貪食活性を促進する手段(CD33を発現する細胞において)、 β -アミロイドの除去を促進する手段、または不溶性の沈着物を除去する手段を構成する。

30

【0111】

アルツハイマー病および網膜疾患の治療に適したMVSCAは、好ましくは、CD33について2価であり、半減期を改善するために抗HSAドメインを含む。これらは、ヒト血液脳関門をまたいだ移動を促進するためのFC5ナノボディドメイン(Rissiek et al., Front. Cell. Neurosci. 8:344, 2014)をさらに含む。

40

【0112】

(リンカー)

多くの実施形態では、個々の結合ドメインは互いに直接結合していないが、それらの間に挟まれた短いアミノ酸配列であるリンカーを有する。リンカーの例を表15に示す。リンカーの長さおよび配列は、MVSCAの発現レベルおよび構造、および連結されたドメインの結合親和性に重大な影響を及ぼし得る。長さを調節できるリンカーL2およびL4(表15を参照)を使用して、これらのパラメータを考慮してMVSCAを最適化する

50

ことができる。リンカー L 1、L 2、および L 4 は、切断不可能なリンカー手段、柔軟なリンカー手段、または柔軟で切断不可能なリンカー手段と称し得る。

【0113】

同じ V H H ドメインの 2 コピーが M V S C A 内で互いに近接して配置されると、互いに有害な相互作用をすることが多い。これは、2 つのコピーの間に比較的短くて曲がらないリンカーを挟むことにより回避することができる。いくつかの実施形態では、短くて曲がらないリンカーは、配列 A A A を有する（表 15 の L 3 を参照）。そのようなリンカーは、短くて曲がらないリンカー手段、または切断不可能な短くて曲がらないリンカー手段と称し得る。

【0114】

抗 H S A ドメインー H S A 複合体が、隣接する結合ドメインの結合活性に関するプロドラッグを生成するために使用される場合、2 つのドメインの間に切断可能なリンカーが挟まれるべきである。L 111 * 3 ~ L 111 * 18（表 15 を参照）は、M V S C A の発現レベルおよび構造、連結ドメインの結合親和性、および切断の観点から M V S C A を最適化するために使用できる、種々の長さおよび種々のプロテアーゼによる切断に対する感受性を有する切断可能リンカーの例である。リンカー L 111 * 3 ~ L 111 * 18 は、切断可能なリンカー手段、柔軟なリンカー手段、または柔軟で切断可能なリンカー手段と称し得る。

10

【0115】

(M V S C A)

本明細書に記載される結合ドメインおよびリンカーは、組み合わせられ、特定の疾患の治療に適合する多機能 M V S C A を作り出すことができる。それらは、他の結合ドメインをさらに組み合わせられてもよい。また、M V S C A は、各構成タイプの結合ドメインに関連する様々な機能を実現するための手段を含み、かつ／または、それらの関連する機能を実現するためのリンカー手段を含むとも言える。例示的な構造は、すぐ下で簡単に説明する。

20

【0116】

H S A / C D 47 / P D - L 1 : この構造は、P D - L 1 を発現する腫瘍の治療に適しており、ファゴサイトーシスを促進し、P D - 1 免疫チェックポイントを解除し、体内での半減期を延長するであろう。様々な実施形態では、M V S C A は、抗 C D - 47 および／または抗 P D - L 1 結合ドメインについて 2 価であり得る。使用されるリンカー次第で、抗 H S A ドメイン（一旦 H S A が結合すると）が C D 47 との結合を阻害するかしないかであり、阻害がある場合は切断可能なリンカーを切断することで回復させることが可能である。いくつかの実施形態では、結合ドメインは異なる順序で配列されているが、抗 H S A ドメインは、切断される場合には、末端位置にあるべきである。構成部分の 1 つ以上の機能の実現手段としてのこの構成の M V S C A の説明に加え、M V S C A は P D - L 1 発現腫瘍のファゴサイトーシスを促進する（かつ P D - 1 免疫チェックポイントを解除する）ための手段ともいえる。この構造のいくつかの実施形態を実施例 7 に示す。

30

【0117】

H S A / L A G 3 / P D - L 1 : この構造は、P D - L 1 を発現する腫瘍の治療に適しており、L A G 3 および P D - 1 免疫チェックポイントを解除し、体内での半減期を延長するであろう。様々な実施形態では、M V S C A は、抗 L A G 3 および／または抗 P D - L 1 結合ドメインについて 2 価であり得る。いくつかの実施形態では、結合ドメインは異なる順序で配列されている。構成部分の 1 つ以上の機能の実現手段としてのこの構成の M V S C A の説明に加え、T エフェクター細胞を M V S C A は P D - L 1 発現腫瘍にリクルートする（かつ L A G 3 および P D - 1 免疫チェックポイントを解除する）ための手段ともいえる。この構造のいくつかの実施形態を実施例 7 に示す。

40

【0118】

C D 16 A / C D 47 / P D - L 1 : この構造は、P D - L 1 を発現する腫瘍の治療に適しており、ファゴサイトーシスを促進し、N K 細胞をリクルートして A D C C を仲介し

50

、PD-1免疫チェックポイントを解除し、体内での半減期を延長するであろう。様々な実施形態では、MVSCAは、抗CD-47および／または抗PD-L1結合ドメインについて2価であり得る。いくつかの実施形態では、結合ドメインは異なる順序で配列されているが、抗HSAドメインは、切断される場合には、末端位置に配置されるべきである。使用されるリンカー次第で、抗HSAドメイン（一旦HSAが結合すると）がCD47との結合を阻害するかしないかであり、阻害がある場合は切断可能なリンカーを切断することで回復させることが可能である。構成部分の1つ以上の機能の実現手段としてのこの構成のMVSCAの説明に加え、MVSCAは、ファゴサイトーシスを促進し、NKを介したADCCをPD-L1発現腫瘍にリクルートする（かつPD-1免疫チェックポイントを解除する）ための手段ともいえる。この構造のいくつかの実施形態を実施例8に示す。

10

【0119】

CD16A／CD47／CD33：この構造は、CD33を発現する腫瘍の治療に適しており、ファゴサイトーシスを促進し、NK細胞をリクルートしてADCCを仲介し、体内での半減期を延長するであろう。様々な実施形態では、MVSCAは、抗CD-47および／または抗CD33結合ドメインについて2価であり得る。いくつかの実施形態では、結合ドメインは異なる順序で配列されているが、抗HSAドメインは、切断される場合には、末端位置に配置されるべきである。使用されるリンカー次第で、抗HSAドメイン（一旦HSAが結合すると）がCD47との結合を阻害するかしないかであり、阻害がある場合は切断可能なリンカーを切断することで回復させることが可能である。構成部分の1つ以上の機能の実現手段としてのこの構成のMVSCAの説明に加え、MVSCAは、ファゴサイトーシスを促進し、NKを介したADCCをCD33発現腫瘍にリクルートするための手段ともいえる。この構造のいくつかの実施形態を実施例8に示す。

20

【0120】

二価抗CD33MVSCA：これらの構造は、たとえばミクログリア細胞によるファゴサイトーシスの阻害を遮断することにより、不溶性物質の沈着に関連する疾患の治療に適している。そのような疾患には、アルツハイマー病および乾燥型AMDが含まれる。HSA／CD33／CD33構造は、循環半減期を延長するであろう。FC5／CD33／CD33構造は、血液脳関門を通過するであろう。FC5／CD33／CD33／HAS構造は、循環半減期を延長し、かつ血液脳関門を通過するであろう。単純なCD33／CD33構造は、眼または脳への局所注入に適しており、この場合、循環半減期の延長または血液脳関門を通過する能力は無視できるほど重要である。いくつかの実施形態では、結合ドメインは異なる順序で配列されている。構成部分の1つ以上の機能の実現手段としてのこの構成のMVSCAの説明に加え、MVSCAは、不溶性沈着物の（ミクログリアによる）ファゴサイトーシスを促進するための手段ともいえる。この構造のいくつかの実施形態を実施例9に示す。

30

【0121】

（開示された抗体の使用）

開示された抗体は医療に有用である。「治療」「治療する」等の用語は、疾患、病状、または障害を治療、改善、安定化、または予防することを意図して、患者を医療管理することをいう。この用語には、積極的治療、すなわち疾患、病状、または障害の改善を特に目的とした治療、および原因治療、すなわち疾患、病状、または障害に関連する原因を取り除くことを目的とした治療も含まれる。さらに、この用語には、緩和治療、すなわち疾患、病状、または障害の治療よりも症状の緩和のための治療、予防治療、すなわち関連する疾患、病状、または障害の発生を最小限にする、または部分的もしくは完全に阻害することを目的とした治療、および補助的治療、すなわち関連する疾患、病状、または障害の改善を目的とした他の特定の治療の補助として採用される治療が含まれる。

40

【0122】

また、診断および画像化における本明細書で開示される抗体の使用も企図される。

【0123】

50

る技術は、限定されないが、

- ・一部のリンパ節を含むしこりまたは腫瘍は、身体検査により外部から感じ、測定することができる

- ・一部の内部癌腫瘍は、X線またはCTスキャンで表示され、定規で測定できる

- ・臓器機能を測定するものを含む血液検査を実施できる

- ・特定の癌に対して腫瘍マーカー試験を行うことができる

等の癌の診断のために使用される試験と同様である。

【0128】

用いられる試験に関わらず、血液検査、細胞計数、腫瘍マーカー試験のいずれであっても、結果を前の同じ試験と比較できるように、一定の間隔で繰り返される。

【0129】

癌治療の寛解はいくつかの状態で定義される。

- ・完全寛解－すべての癌または腫瘍が消失し、疾患の痕跡がない。腫瘍マーカー（適用できる場合）の発現レベルは、正常の範囲に下がり得る。

- ・部分寛解－癌が何割か小さくなったが、疾患は残存している。腫瘍マーカー（適用できる場合）のレベルは下がっている（または腫瘍負担の減少を示すものとして、腫瘍マーカーに基づいて増加している）が、疾患の痕跡が残っている。

- ・安定疾患－癌は増殖も縮小もしておらず、疾患の量に変化がない。腫瘍マーカー（適用できる場合）に有意な変化がない。

- ・疾患の進行－癌が増殖し、治療前よりも疾患が悪化している。腫瘍マーカー（適用できる場合）試験は、腫瘍マーカーが増えたことを示す。

【0130】

癌治療の有効性の他の尺度には、全生存期間（診断から、または評価対象の治療開始から、任意の原因による死亡までの時間）、無癌生存期間（完全寛解後に癌が検出されなくなるまでの期間の長さ）、および無進行生存期間（疾患安定、または部分寛解後の腫瘍増殖の再開が検出されない期間の長さ）が含まれる。

【0131】

腫瘍サイズ（腫瘍負担）に関して固形癌治療寛解を評価する2つ基準方法、WHO基準およびRECIST基準がある。これらの方法は、固形腫瘍を測定し、現在の腫瘍と過去の測定値を比較するか、または将来の測定値との変化を比較して、治療方針を変更する。WHO法では、固形腫瘍の長軸および短軸を測定し、それらの2つの測定値の積を算出する。複数の固形腫瘍がある場合は、全ての積を加算する。RECIST法では、長軸のみを測定する。複数の固形腫瘍がある場合は、全ての長軸の測定値を加算する。ただし、リンパ節は、長軸に代えて短軸を測定する。

【0132】

本開示は、本明細書で開示される抗体を、そのような治療を必要とする患者に投与することを含む、眼の障害を治療する方法を提供する。眼の障害の例には、加齢黄斑変性（AMD）、たとえば湿潤型AMDおよび乾燥型AMD、または黄斑浮腫、たとえば糖尿病性黄斑浮腫が含まれる。いくつかの実施形態では、眼の障害は、網膜障害である。

【0133】

また、本開示は、限定されないが、アルツハイマー病、レビー小体病、パーキンソン病、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、白質ジストロフィー、進行性核上性麻痺、神経炎症、炎症性脱髄疾患、認知症、または神経障害を含む神経変性疾患を治療する方法も提供する。ある実施形態では、神経変性疾患はアルツハイマー病である。

【0134】

以下の実施例、配列表、および図面は、本発明の理解を助けるために提供されるものであり、その真の範囲は添付の特許請求の範囲に規定される。

【0135】

（特定の実施形態のリスト）

以下の実施形態のリストは、本明細書で説明される、幅、組み合わせおよびサブ組み合

10

20

30

40

50

わせ、発明のクラス等に関する様々な実施形態の例示であるが、本明細書でサポートするすべての実施形態の網羅的な列举を意図したものではない。

【0136】

実施形態1.

CD47に対する抗原結合特異性を有する可変重鎖（VHH）ドメイン。

【0137】

実施形態2.

配列番号2～29または223の1つのアミノ酸配列を有する、実施形態1のVHHドメイン。

【0138】

実施形態3.

PD-L1に対する抗原結合特異性を有する可変重鎖（VHH）ドメイン。

【0139】

実施形態4.

配列番号31～38の1つのアミノ酸配列を有する、実施形態3のVHHドメイン。

【0140】

実施形態5.

ヒト血清アルブミン（HSA）に対する抗原結合特異性を有する可変重鎖（VHH）ドメイン。

【0141】

実施形態6.

配列番号40～48の1つのアミノ酸配列を有する、実施形態5のVHHドメイン。

【0142】

実施形態7.

CD33に対する抗原結合特異性を有する可変重鎖（VHH）ドメイン。

【0143】

実施形態8.

配列番号50～78の1つのアミノ酸配列を有する、実施形態7のVHHドメイン。

【0144】

実施形態9.

LAG3に対する抗原結合特異性を有する可変重鎖（VHH）ドメイン。

【0145】

実施形態10.

配列番号80～93の1つのアミノ酸配列を有する、実施形態9のVHHドメイン。

【0146】

実施形態11.

CD16に対する抗原結合特異性を有する可変重鎖（VHH）ドメイン。

【0147】

実施形態12.

配列番号96～99の1つのアミノ酸配列を有する、実施形態11のVHHドメイン。

【0148】

実施形態13.

実施形態1～12のいずれか1つのVHHドメインを含む、重鎖のみの抗体（HCAb）。

【0149】

実施形態14.

1つ以上の定常ドメイン、および、CD47、HSA、PD-L1、CD33、CD16、またはLAG3に結合する手段を含む、抗体。

【0150】

実施形態15.

10

20

30

40

50

1つ以上の実施形態1～12のVHHドメイン、または、CD47、HSA、PD-L1、CD33、CD16、もしくはLAG3に結合する手段を含む、多重特異性抗体。

【0151】

実施形態16。

1つ以上のさらなる抗体結合ドメインをさらに含む、実施形態15の多重特異性抗体。

【0152】

実施形態17。

さらなる抗体結合ドメインは、FC5（配列番号222）を含む、実施形態16の多重特異性抗体。

【0153】

実施形態18。

さらなる抗体結合ドメインは、FvまたはFabを含む、実施形態16の多重特異性抗体。

【0154】

実施形態19。

多重特異性一本鎖抗体（MVSCA）である、実施形態15～17のいずれか1つの多重特異性抗体。

【0155】

実施形態20。

2、3、4、5、または6つの抗体結合ドメインを含む、実施形態19のMVSCA。

【0156】

実施形態21。

1、2、3、または4つの抗体結合特異性を有する、実施形態20のMVSCA。

【0157】

実施形態22。

HSA、CD47、およびPD-L1を認識する抗体結合ドメインを含む、実施形態19～21のいずれか1つのMVSCA。

【0158】

実施形態23。

HSA、CD47、およびCD33を認識する抗体結合ドメインを含む、実施形態19～21のいずれか1つのMVSCA。

【0159】

実施形態24。

HSA、LAG3、およびPD-L1を認識する抗体結合ドメインを含む、実施形態19～21のいずれか1つのMVSCA。

【0160】

実施形態25。

HSA、LAG3、およびCD33を認識する抗体結合ドメインを含む、実施形態19～21のいずれか1つのMVSCA。

【0161】

実施形態26。

CD16、HSA、およびPD-L1を認識する抗体結合ドメインを含む、実施形態19～21のいずれか1つのMVSCA。

【0162】

実施形態27。

CD16、HSA、およびCD33を認識する抗体結合ドメインを含む、実施形態19～21のいずれか1つのMVSCA。

【0163】

実施形態28。

CD16、HSA、CD47、およびPD-L1を認識する抗体結合ドメインを含む、

10

20

30

40

50

実施形態 19～21 のいずれか 1 つの M V S C A。

【0164】

実施形態 29。

C D 16、H S A、C D 47、および C D 33 を認識する抗体結合ドメインを含む、実施形態 19～21 のいずれか 1 つの M V S C A。

【0165】

実施形態 30。

C D 16、好ましくは C D 16 A を認識する抗体結合ドメインを含む、実施形態 14～21、または 26～29 のいずれか 1 つの M V S C A。

【0166】

実施形態 31。

同一の特異性を有する 2 つの隣接する抗体結合ドメインを含む、実施形態 19～30 のいずれか 1 つの M V S C A。

【0167】

実施形態 32。

同一の特異性を有する 2 つの隣接する抗体結合ドメインは、それらの間に挟まれた短くて曲がらないリンカー手段を有する、実施形態 31 の M V S C A。

【0168】

実施形態 33。

短くて曲がらないリンカー手段は、アミノ酸配列 A A A（配列番号 102）からなる、実施形態 31 の M V S C A。

【0169】

実施形態 34。

2 つの隣接する抗体結合ドメインは、C D 33 と結合する、実施形態 31～33 のいずれか 1 つの M V S C A。

【0170】

実施形態 35。

H S A を認識する抗体結合ドメインをさらに含む、実施形態 34 の M V S C A。

【0171】

実施形態 36。

F C 5 をさらに含む、実施形態 34 または 35 の M V S C A。

【0172】

実施形態 37。

2 つの隣接する抗体結合ドメインは、P D - L 1 と結合する、実施形態 31～33 のいずれか 1 つの M V S C A。

【0173】

実施形態 38。

2 つの隣接する抗体結合ドメインは、L A G 3 と結合する、実施形態 31～33 のいずれか 1 つの M V S C A。

【0174】

実施形態 39。

2 つの隣接する抗体結合ドメインは、C D 16 と結合する、実施形態 31～33 のいずれか 1 つの M V S C A。

【0175】

実施形態 40。

2 つの隣接する抗体結合ドメインは、C D 47 と結合する、実施形態 31～33 のいずれか 1 つの M V S C A。

【0176】

実施形態 41。

隣接する抗体結合ドメインの間にリンカーを含む、実施形態 19～30 のいずれか 1 つ

10

20

30

40

50

のMVSCA。

【0177】

実施形態42。

同一でない抗原結合ドメインの間に挟まれたリンカーは、L1（配列番号100）、L2（配列番号101）、またはL4（配列番号103）である、実施形態41のMVSCA。

【0178】

実施形態43。

同一でない抗原結合ドメインの間に挟まれた、柔軟で切断不可能なリンカー手段を含む、実施形態19～30のいずれか1つのMVSCA。

【0179】

実施形態44。

HSAと結合する、N末端またはC末端に位置する抗体結合ドメインを含む、実施形態19～30のいずれか1つのMVSCA。

【0180】

実施形態45。

HSAと結合すると、HSAと結合する抗体結合ドメインと隣接する抗体結合ドメインは、その抗原との結合が阻害される、実施形態44のMVSCA。

【0181】

実施形態46。

HSAと結合する抗体結合ドメインと隣接する抗体結合ドメインは、CD47を認識する、実施形態45のMVSCA。

【0182】

実施形態47。

切断可能なリンカーが、HSAと結合する抗体結合ドメインとそれに隣接する抗体結合ドメインの間に挟まれ、切断可能なリンカーは、L11*3（配列番号：104）、L11*4（配列番号：105）、L11*5（配列番号：106）、L11*6（配列番号：107）、L11*7（配列番号：108）、L11*8（配列番号：109）、L11*9（配列番号：110）、L11*10（配列番号：111）、L11*11（配列番号：112）、L11*12（配列番号：113）、L11*13（配列番号：114）、L11*14（配列番号：115）、L11*15（配列番号：116）、L11*16（配列番号：117）、L11*17（配列番号：118）、またはL11*18（配列番号：119）である、実施形態45または46のMVSCA。

【0183】

実施形態48。

切断可能なリンカー手段が、HSAと結合する抗体結合ドメインと、それに隣接する抗体結合ドメインの間に挟まれる、実施形態45または46のMVSCA。

【0184】

実施形態49。

すべての抗体結合ドメインがVHHドメインである、実施形態19～48のいずれか1つのMVSCA。

【0185】

実施形態50。

実施形態1～49のいずれか1つのVHHドメインまたは抗体を含む、医薬組成物。

【0186】

実施形態51。

HSAに結合する手段、多重特異性抗体またはMVSCAの体内半減期を延長する手段、隣接する結合ドメインの結合活性を可逆的に阻害する手段を含む、医薬組成物。

【0187】

実施形態52。

10

20

30

40

50

C Dに結合する手段、またはファゴサイトーシスの阻害を減少させる手段を含む、医薬組成物。

【0188】

実施形態53.

C D16もしくはC D16Aに結合する手段、またはNKを介したADCCをリクルートする手段を含む、医薬組成物。

【0189】

実施形態54.

PD-L1に結合する手段、PD-L1腫瘍抗原に結合する手段、PD-1遮断の手段、またはPD-1免疫チェックポイントを解除する手段を含む、医薬組成物。

10

【0190】

実施形態55.

腫瘍抗原に結合する手段、PD-L1腫瘍抗原に結合する手段、またはCD33腫瘍抗原に結合する手段を含む、医薬組成物。

【0191】

実施形態56.

LAG3に結合する手段、またはLAG3免疫チェックポイントを解除する手段を含む、医薬組成物。

【0192】

実施形態57.

免疫チェックポイントを解除する手段、PD-1免疫チェックポイントを解除する手段、またはLAG3免疫チェックポイントを解除する手段を含む、医薬組成物。

20

【0193】

実施形態58.

CD33に結合する手段、CD33腫瘍抗原に結合する手段、β-アミロイドの除去を促進する手段、または不溶性の沈着物を除去する手段を含む、医薬組成物。

【0194】

実施形態59.

PD-L1を発現する腫瘍のファゴサイトーシスを促進する手段を含む、医薬組成物。

【0195】

実施形態60.

TEフェクターをPD-L1を発現する腫瘍にリクルートする手段を含む、医薬組成物。

30

【0196】

実施形態61.

PD-L1を発現する腫瘍のファゴサイトーシスを促進する手段、およびNKを介したACDDを、PD-L1を発現する腫瘍にリクルートする手段を含む、医薬組成物。

【0197】

実施形態62.

CD33を発現する腫瘍のファゴサイトーシスを促進する手段、およびNKを介したACDDを、CD33を発現する腫瘍にリクルートする手段を含む、医薬組成物。

40

【0198】

実施形態63.

実施形態1～48のいずれか1つの抗体、または実施形態49～61のいずれか1つの医薬組成物を、治療を必要とする患者に投与することを含む、癌を治療する方法。

【0199】

実施形態64.

実施形態7～8、13～21、34～36、もしくは48～49のいずれか1つの抗体であって、CD33結合ドメインを含む抗体または実施形態58の医薬組成物を、治療を必要とする患者に投与することを含む、アルツハイマー病または網膜疾患を治療する方法

50

。

【0200】

実施形態65.

抗体は、CD47、PD-L1、LAG3、またはCD16を認識する抗体結合ドメインを含まない、実施形態64の方法。

【0201】

実施形態66.

網膜疾患は乾燥型AMDである、実施形態64または65の方法。

【0202】

実施形態63～66の各々について、治療における使用、医薬の製造における使用のための組成物、治療における組成物の使用、および医薬の製造における組成物の使用についての対応する実施形態がある。

【0203】

(実施例)

(実施例1)

抗CD47HCAb抗体

免疫付与したラマからの抗CD47HCAb抗体の単離

【0204】

(免疫付与)

標準プロトコールに従い、2匹のラマに、Abcore Inc (ラモーナ、CA) で免疫付与した。組換えヒトCD47 (細胞外ドメイン19-139、配列番号1) を、完全フロイントアジュバント (0日目)、または不完全フロイントアジュバント (免疫後) (Difco、BD Biosciences) と混合した。ラマ1匹あたり50 µg / 回を隔週で、6回皮下注射した。45日目に、組換えCD47タンパク質で免疫されたラマから血清を採取し、hCD47に対する抗体価をELISAで測定した。ELISAでは、96穴マキシソーププレート (Nunc) を100 ng / ウェルのhCD47でコーティングした。ブロッキングし、希釈した血清サンプルを加えた後、抗CD47抗体の存在は、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 結合ヤギ抗ラマIgG (H+L) 抗体 (Invitrogen) を用いて示された。

【0205】

配列番号1 ヒトCD47の細胞外ドメイン (19-139、Q08722)

QLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFVTNMEAQNTEVYVK
WKF KGRDIYTFDGA LNKSTVP TDFSSAKIEVSQ L L KGDAS
L KMDKSDA VSH TGN YTC EVTE L TREG ETI IEL KYRVVSWF
SP

【0206】

(ファージライブラリーの構築および選択)

末梢血単核細胞は、製造者の取り扱い説明書に従ってFicoll-Paque Plus (GE Healthcare) を用いて、組換えCD47タンパク質で免疫付与されたラマの45日目の血液サンプルから調製された。全RNAを、製造者の取り扱い説明書に従ってRNeasy Midi Kit (Qiagen) を用いて末梢血単核細胞から抽出し、RT-PCRの出発材料として使用して、VHHをコードする遺伝子断片を増幅した。これらの断片をファージミドベクターにクローニングし、ヘルパーファージを感染した後に、遺伝子-lll融合タンパク質としてVHHをファージ粒子表面に表示する組換えファージ粒子を製造できるようにした。ファージは標準的な方法により調製し、フィルター滅菌の後、さらなる使用のために4℃で保存した。

【0207】

CD47結合ファージの選択のために、ビオチン化CD47をファージライブラリーとインキュベートし、その後ストレプトアビジンDynabeads (Invitrogen) に捕捉された。完璧に洗浄後、結合したファージを1 mg / mlのトリプシンで溶出

10

20

30

40

50

した。選択出力物を大腸菌 T G 1 細胞内にレスキューした。コロニーを拾い、B A T J , I n c (サンディエゴ、C A) でシーケンスした。

【0208】

C D 4 7 結合 V H H をコードする c D N A は、A t u m (ニューアーク、C A) で C 末端にヒスチジンタグをつけて合成され、H E K 2 9 3 細胞に一過的にトランスフェクションされ、I M A C クロマトグラフィーによりポジティブな V H H を精製した。

【0209】

免疫付与したラマのファージライブラリーの C D 4 7 結合ファージコロニーをシーケンスし、各 V H H について以下 (表 2) にリストするアミノ酸配列を決定した。以下のアミノ酸配列に基づく c D N A 配列をヒト F c と融合し、p J 6 0 7 発現ベクターで合成した。この発現プラスミドを H E K 2 9 3 細胞株にトランスフェクトし、組換え抗 C D 4 7 H C A b 抗体を製造した。発現した抗 C D 4 7 H C A b を、H i T r a p プロテイン A カラムにより精製した。

【0210】

A 0 9 - 1 0 V H H を I G H V 3 - 2 3 ヒト生殖細胞系列配列に基づきヒト化した。

【0211】

10

20

30

40

50

【表 2 - 1】

ラム anti-CD47 VHH 配列

A09-08 (配列番号 2)	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGYGVNSYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGN INYADSAKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMY NYWGQGTQVTVSS
A09-31 (配列番号 3)	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGYGVNSYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGN INYADSAKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYIATAIKMY NYWGQGTQVTVSS
A09-61 (配列番号 4)	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGYGVNSYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGN INYADSAKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISFASKMY NYWGQGTQVTVSS
A09-004 (配列番号 5)	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGVMWSSALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGN INYADSAKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMY NYWGQGTQVTVSS
A09-006 (配列番号 6)	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGIRFFGSALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGN INYADSAKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMY NYWGQGTQVTVSS
A09-10 (配列番号 7)	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSG GNINYADSAKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTN MYNYWGQGTQVTVSS
hA09-10 (配列番号 8)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSG GNINYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTN MYNYWGQGTQVTVSS
hA09-10-1 (配列番号 9)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSG GNINYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTN MYNYWGQGTQVTVSS
hA09-10-2 (配列番号 10)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSG GNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTN MYNYWGQGTQVTVSS
hA09-10-3 (配列番号 11)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSG GNINYADSVKGRFTISRDNFKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTN MYNYWGQGTQVTVSS
hA09-10-4 (配列番号 12)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSG GNINYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTN MYNYWGQGTQVTVSS
hA09-10-45 (Biv)* (配列番号 13)	EVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSG GNIYYADSVKGRFTISRDNFKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTN MYNYWGQGTQVTVSSAAAQVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWF RQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLRAEDTAVY YCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSS
hA09-10-5 (配列番号 14)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSG GNINYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTN MYNYWGQGTQVTVSS
hA09-10-55 (Biv) (配列番号 15)	EVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSG GNIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTN MYNYWGQGTQVTVSSAAAQVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWF RQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLEPEDTAVY YCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSS
hA09-10-6 (配列番号 16)	AAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVSAISRSG GNIDYADSVKGRFTISRDNFKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTN MYNYWGQGTQVTVSS
hA09-10-66 (Biv) (配列番号 17)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVSAISRSG GNIDYADSVKGRFTISRDNFKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTN MYNYWGQGTQVTVSSAAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVSAISRSG

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

	RQAPGKEREFSVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLRAEDTAVY YCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSS
hA09-10-7 (配列番号 18)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFSVSAISRSG GNIDYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTN MYNYWGQGTQVTVSS
hA09-10-77 (Biv) (配列番号 19)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFSVSAISRSG GNIDYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTN MYNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFR QAPGKEREFSVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKPEDTAVY YCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSS
hA09-10-8 (配列番号 20)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFSVSAISRSG GNIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTN MYNYWGQGTQVTVSS
hA09-10-88 (Biv) (配列番号 21)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFSVSAISRSG GNIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTN MYNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFR QAPGKEREFSVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKPEDTAVY YCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSS
hA09-10-9 (配列番号 22)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMSWVRQAPGKEREFSVSAISRSG GNIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTN MYNYWGQGTQVTVSS
hA09-10-99 (Biv) (配列番号 23)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAPGKEREFSVSAISRSG GNIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTN MYNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFR QAPGKEREFSVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKPEDTAVY YCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSS
hA09-10-10 (配列番号 24)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMSWVRQAPGKEREFSVSAISRSG GNIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTN MYNYWGQGTQVTVSS
hA09-10-100 (Biv) (配列番号 25)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAPGKEREFSVSAISRSG GNIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTN MYNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFR QAPGKEREFSVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRAEDTAVY YCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSS
hA09-10-11 (配列番号 26)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMSWVRQAPGKEREFSVSAISRSG GNIYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTN MYNYWGQGTQVTVSS
hA09-10-12 (配列番号 27)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMSWVRQAPGKEREFSVSAISRSG GNIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTN MYNYWGQGTQVTVSS
hA09-10-13 (配列番号 28)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMSWVRQAPGKEREFSVSAISRSG GNIYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTN MYNYWGQGTQVTVSS
hA09-10-14 (配列番号 29)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMSWVRQAPGKEREFSVSAISRSG GNIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTN MYNYWGQGTQVTVSS
hA09-10-30 (配列番号 223)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFSVSAISRSG GNINADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTN MYNYWGQGTQVTVSS

* Biv = 二価

【0212】

表 2 の VHH は、CD47 に結合する手段を構成する。

【0213】

(抗 CD47 HCAb 分子の Octet (登録商標) 結合解析)

【0214】

ヒト CD47 (R&D systems) と抗 CD47 VHH の結合動態を測定するために、ラベルフリー技術である Bio-Layer Interferometry (BLI) を使用した。Anti-Penta-His capture (HIS1K) バイオセンサーチップ (ForteBio (登録商標)) を装着した Octet (登録商標) QK^e でアフィニティ測定を行った。1×PBS バッファー (Gibco (登録商標)、PBS pH 7.2) 中で、30℃でアッセイを行った。1000rpm でサンプルを攪

10

20

30

40

50

拌した。解析の前に、センサーを15分間湿らせた。精製した抗CD47 VHHのHIS1Kセンサーチップとの結合能を試験した。20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗CD47 VHHを用いてチップをロードした。300秒間のローディングにより、1.8~2 nmの捕捉レベルが得られた。結合解析のために、ヒトCD47抗原を、1×PBS中で100、150、250、350 nMの濃度に希釈して調製した。解離をモニターするために、会合を開始し、200秒間モニターした後、チップを1×PBSバッファー（Gibco、PBS pH 7.2）に移した。実験を通じてセンサーデータを収集し、処理し、Octet（登録商標）データ解析ソフトウェア7（FortéBioR）を用いて解析した。

【0215】

抗CD47 HCAbの結合親和性のOctet（登録商標）動態解析を表3に示す。HCAbs A09-04、A09-06、A09-08、およびA09-10はpM結合親和性を示す。

【0216】

【表3】

抗CD47 HCAbの結合親和性 (K_D)のOctet[®] 速度解析

VHH	K_{on} (1/Ms)	K_{off} (1/s)	K_D (M)
A09-08	3.33E+04	2.10E-06	6.30E-011
A09-31	2.75E+04	5.22E-04	1.90E-08
A09-61	6.21E+04	1.10E-04	1.77E-09
A09-04	1.10+05	2.98E-04	2.71E-011
A09-06	8.70E+04	1.09E-06	1.14E-011
A09-10	4.27E+04	1.14E-06	2.67E-011
hA09-10	3.98E+04	1.10E-06	2.76E-11

【0217】

（CD47過剰発現CHO細胞株に対する抗CD47 HCAbの結合親和性のフローサイトメトリー解析）

【0218】

氷温のFACSバッファー（PBS、1%BSA、0.1%NaN₃）中の1×10⁶細胞/mlのCD47過剰発現CHO細胞を、100 nM~0.00128 nMの範囲の濃度の抗CD47 HCAbと共に、または対照としてB6H12抗CD47抗体と共にインキュベートし、45分間氷上でインキュベートした。細胞をFACSバッファーで洗浄し、製造者の取り扱い説明書に従ってヤギ抗ヒトIgG Fc，FITC結合抗体（ThermoFisher）を加え、その後、4℃で30分間インキュベートした。データはGuava EasyCyte HTシステムを用いて取得した。

【0219】

上述のフローサイトメトリー法に従い、抗CD47 HCAbに対する結合親和性を、図1に示すように、EC₅₀として測定した。

【0220】

（抗CD47ドメインを有する多重特異性分子の競合ELISA結合アッセイ）

【0221】

競合ELISA結合アッセイを行って、CD47結合多重特異性分子1511（配列番号156、CD16F-L1-HSA-L1-CD47-L3-CD47-L1-PDL1-L3-PDL1）および3321（配列番号159、CD16F-L1-HSA-L1-CD47-L1-CD33-L3-CD33）をスクリーニングし、両者は、CD47抗原とその受容体SIPP α の結合を競合的に遮断する抗CD47 VHH A09-10を含む。多重特異性抗体は、その結合ドメイン（たとえばCD47）、および結合ドメインを分離するリンカー（たとえば、表15で特定されるL1）により特定される。96

10

20

30

40

50

穴プレート上に、1ウェルあたり100 ngのCD47-Fc (R&D systems) がコーティングされ、10 nMのビオチン化ヒトSIRPαと、多重特異性の分子1511および3321が異なる濃度でプレインキュベートされ、その後HRP結合ストレプトアビジンが添加される。多重特異性分子1511および3321は、CD47と、その受容体SIRPαとの結合を、図2に示すように、EC50で競合的に遮断する。

【0222】

(抗CD47ドメインを有する多重特異性分子の競合フローサイトメトリー結合解析)

【0223】

競合フローサイトメトリーアッセイを行い、多重特異性分子1511および3321が、自然にCD47を発現する細胞上でCD47抗原とその受容体SIRPαの結合を遮断することを確認した。氷温のFACSバッファー (PBS、1% BSA、0.1% NaN₃) 中の 1×10^6 細胞/mlのJurkat細胞 (ATCC) を、100 nM~0.00128 nMの濃度の1511または3321とともにインキュベートし、氷上で45分間インキュベートし、その後25 nMのSIRPα-Fc (R&D systems) を添加してさらに45分間インキュベートした。細胞をFACSバッファーで洗浄し、ヤギ抗ヒトVHH FITC結合抗体 (Jackson Immuno Research) を製造者の取り扱い説明書に従って添加し、その後4℃で30分間インキュベートした。データはGuava EasyCyte HTシステムを用いて取得した。多重特異性分子1511および3321は、Jurkat細胞の表面で、CD47とその受容体SIRPαの結合を、図3に示すように、EC50で競合的に遮断する。

【0224】

(抗CD47ドメインを有する多重特異性分子のヒトRBC血球凝集アッセイ)

【0225】

ヒト血液サンプルは、健康なドナーから提供された。全血を3000 rpm (1800 rcf) で5分間遠心分離し、血清および Buffy Coat を除去した。赤血球を、赤血球のおおよそ2倍量の通常の生理食塩水 (0.9% NaCl) に再懸濁し、チューブを転倒混和した。赤血球を2000 rpmで20分間さらに遠心分離し、赤血球を通常の生理食塩水と混合して、6% (v/v) の細胞懸濁液を得た。次に赤血球を96穴丸底プレートに加え、異なる量の抗体 (0~100 μg/ml) と混合した。プレートを37℃で2時間インキュベートした。Hu5F9抗CD47対照抗体とは異なり、多重特異性分子1511および3321は、図4に示すように、RBC血球凝集を誘導しなかった。

【0226】

フローサイトメトリー結合アッセイを行い、抗CD47 VHHを含む多重特異性分子1511および3321が、CD47をネイティブに発現する腫瘍細胞表面に選択的に結合できるが、RBC細胞表面CD47には結合できないことを確認した。氷温のFACSバッファー (PBS、1% BSA、0.1% NaN₃) 中の 1×10^6 細胞/mlのHL60細胞 (ATCC) または10%の洗浄ヒトRBC細胞 (Rockland Immunochemicals, Inc) を、500 nM~0.00128 nMの濃度範囲の1511または3321と、氷上で45分間インキュベートした。細胞をFACSバッファーで洗浄し、ヤギ抗ヒトVHH FITC結合抗体 (Jackson Immuno Research) を、製造者の取り扱い説明書に従って加え、その後4℃で30分間インキュベートした。データはGuava EasyCyte HTシステムを用いて取得した。多重特異性分子1511および3321は、図4Bに示すように、EC50でCD47をネイティブに発現する腫瘍細胞表面に選択的に結合したが、RBC細胞には結合しなかった。

【0227】

(抗CD47ドメインを有する多重特異性分子の抗腫瘍活性)

【0228】

1E6 Raji-Luc細胞をNSGマウスに静脈内接種した。マウスは、10 mg/kgの多重特異性分子3321、またはPBS対照のIV注射で毎日治療された。治療

開始（0日目）、実験中盤の3日目、実験終了時（7日目）のRaji腫瘍の代表的な生物発光画像。多重特異性分子3321は、図5に示すように、ヒト白血病から異種移植されたマウスを保護した。

【0229】

（実施例2）

（抗PD-L1 HCAb抗体）

（免疫付与したラマからの抗PD-L1 HCAb抗体の単離）

【0230】

標準的なプロトコールに従い、2匹のラマにAbcore Incで免疫付与した。組換えヒトPD-L1（細胞外ドメイン19-238、配列番号30）を完全フロイントアジュバント（0日目）、または不完全フロイントアジュバント（免疫後）と混合した。ラマ1匹あたり50 µg／回を隔週で、6回皮下注射した。45日目に、組換えPD-L1タンパク質で免疫されたラマから血清を採取し、PD-L1に対する抗体価をELISAで測定した。ELISAでは、96穴マキシソーププレートを100 ng／ウェルのPD-L1でコーティングした。ブロッキングし、希釈した血清サンプルを加えた後、抗PD-L1抗体の存在は、HRP結合ヤギ抗ラマIgG（H+L）抗体を用いて示された。

【0231】

配列番号30 ヒトPD-L1の細胞外ドメイン（19-238、Q9NZQ7）

FTVTVPKDL YVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYW
EMEDKNII IQFVHGEEDLK VQHSSYRQRARLLK DQLSLGNA
ALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKI
NQRILVVD PVTSEHE LTCQAEGYPKAEVIWTS SDHQVLSG
KTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPE
ENHTAELVIPLELPLAHPNER

【0232】

末梢血単核細胞は、製造者の取り扱い説明書に従ってFicoll-Paque+を用いて、組換えPD-L1で免疫されたラマの45日目の血液サンプルから調製された。全RNAを、製造者の取り扱い説明書に従ってRNeasy Midi Kitを用いて末梢血単核細胞から抽出し、RT-PCRの出発材料として使用して、VHHをコードする遺伝子断片を増幅した。これらの断片をファージミドベクターに組換えし、ヘルパーファージを感染した後に、遺伝子-lll融合タンパク質としてVHHをファージ粒子表面に表示する組換えファージ粒子を製造できるようにした。ファージは標準的な方法により製造し、フィルター滅菌の後、さらなる使用のために4℃で保存した。

【0233】

PD-L1結合VHHの選択のために、ビオチン化PD-L1をファージライブラリーとインキュベートし、その後ストレプトアビジンDynabeadsに捕捉された。完璧に洗浄後、結合したファージを1 mg／mlのトリプシンで溶出した。選択出力物を大腸菌TG1細胞内にレスキューした。コロニーを拾い、BATJ, Incでシークエンスした。

【0234】

PD-L1結合VHHをコードするcDNAは、C末端にヒスチジンタグをつけて合成され、HEK293細胞に一過的にトランスフェクションされ、IMACクロマトグラフィーによりポジティブなVHHを精製した。

【0235】

免疫付与したラマのファージライブラリーのPD-L1結合ファージコロニーをシークエンスした。各VHHについてアミノ酸配列を以下（表4）にリスト化した。以下のアミノ酸配列に基づくcDNA配列をヒトFcと融合し、pJ607発現ベクターで合成した。この発現プラスミドをHEK293細胞株にトランスフェクトし、組換え抗PD-L1 HCAb抗体を製造した。発現した抗PD-L1 HCAb抗体を、HiTrapプロテインAカラムにより精製した。2匹のラマのVHH、PL14およびPL16をIGHV3

ー 2 3 ヒト生殖細胞系列配列に基づきヒト化した。

【 0 2 3 6 】

【 表 4 】

ラマ抗 PD-L1 VHH 配列

PL2 (配列番号 31)	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGLTSLRYTMAWFRQAPGKEREFVAAIIRNSVS TFHEESVKGRFTISRDNVKNMMLQMNLTLPEDTAVYYCATNVGPTGGFSLQSVQRY DAWGQGTQVTVSS
PL11 (配列番号 32)	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFNTYDMGWFRRAPGKEREFVAGIDWYTTN TYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMRSLKPEDTAVYYCAAGIRSTATITGQADYWG QGAQVTVSS
PL14 (配列番号 33)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSTSGIYDMGWYRQAPGKLREVVGIITSGGTT NYADFAKGRFTISRDNKNNMMLQMNLSLKPEDTAVYYCNIRTRLIIWGQGTQVTVSS
PL16 (配列番号 34)	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAFSGGTFLTYSLGWFRQGPGRKEREFVASINWSGYM TSYVDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNLSLKPEDTALYYCAAARTAIAAKRSSEFDYW GGAQVTVSS
PL17 (配列番号 35)	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFNTYDMGWFRRTPGKEREFVAGMDWNTIN TYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMRSLKPEDTAVYYCAAGIRSTAIITGQADYWG QGTQVTVSS
PL18 (配列番号 36)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFNIYSMAWFRQAPGKEREFVVRINWNRGT TYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSNLKPEDTAVYYCAARGSPSTIGFTSASHY DYWGQGTQVTVSS
hPL14 (配列番号 37)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTSGIYDMGWYRQAPGKLREVVSVITSGGTT YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNIRTRLIIWGQGTQVTVSS
hPL16 (配列番号 38)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWSGYM TYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAIAAKRSSEFDYW GQGTQVTVSS

10

20

【 0 2 3 7 】

表 4 の V H H は、P D - L 1 に結合する手段を構成する。

【 0 2 3 8 】

(O c t e t (登録商標) キネティック結合解析)

【 0 2 3 9 】

実施例 1 と同様に O c t e t (登録商標) キネティック結合解析を実施した。手短にいうと、精製した抗 P D - L 1 V H H の H I S 1 K センサーチップとの結合能を試験した。20 μg / ml の抗 P D - L 1 V H H を用いてチップをロードした。300 秒間のローディングにより、1.8 ~ 2 nm の捕捉レベルが得られた。結合解析のために、ヒト P D - L 1 抗原を、1 × P B S 中で 100、150、250、350 nM の濃度に希釈して調製した。解離をモニターするために、会合を開始し、200 秒間モニターした後、チップを P D - L 1 タンパク質を含まない 1 × P B S バッファーに移した。

30

【 0 2 4 0 】

抗 C D 4 7 H C A b の結合親和性の O c t e t (登録商標) キネティック解析を表 5 に示す。解析により、P L 1 4、P L 1 6、P L 1 7 は p M の結合親和性を示すことが示された。

【 0 2 4 1 】

40

50

【表 5】

抗 PD-L1 HCAb (KD)の結合速度解析

VHH	K _{on} (1/Ms)	K _{off} (1/s)	K _D (M)
PL2	3.33E+04	2.10E-02	6.30E-07
PL11	2.75E+04	5.22E-04	1.90E-08
PL14	6.21E+04	1.10E-06	1.77E-011
PL16	1.10+05	2.98E-06	2.71E-011
PL17	8.70E+04	1.09E-06	1.14E-011
PL18	4.27E+04	1.14E-04	2.67E-09

10

【0242】

(抗 PD-L1 HCAb のフローサイトメトリー結合解析)

【0243】

氷温の FACS バッファー (PBS、1% BSA、0.1% NaN₃) 中の 1×10^6 細胞/ml の PD-L1 過剰発現 CHO 細胞を、100 nM ~ 0.00128 nM の範囲の抗 PD-L1 HCAb と共にインキュベートし、45 分間氷上でインキュベートした。細胞を FACS バッファーで洗浄し、ヤギ抗ヒト IgG Fc-FITC 結合抗体 (ThermoFisher) を加え、その後、4℃で30分間インキュベートした。データは Guava EasyCyte HT システムを用いて取得した。PD-L1 過剰発現 CHO 細胞の PD-L1 に対する抗 PD-L1 HCAb の結合親和性を、図 6 に示すように、EC₅₀ として測定した。

20

【0244】

(PD-L1 結合ドメインを有する多重特異性分子の細胞ベースの機能アッセイ)

【0245】

PD-L1 を発現する APC/CHO-K1 細胞を、96 穴プレートに 1 ウェルあたり 100 K で播種し、37℃で16時間インキュベートした。次に、多重特異性分子 1511 および対照抗体であるアテゾリズマブを 100 nM から開始して、1:3 に段階希釈し、25 μl/ウェルで細胞ウェルに添加した。最後に、PD-1 エフェクター細胞 (PD-1 およびルシフェラーゼを発現する細胞) を加え、37℃で6時間インキュベートした。6 時間後、75 μl の Bio-Glo (商標) ルシフェラーゼアッセイ試薬を加え、VICTOR マルチプレートリーダーを用いて発光を測定した。データ解析は、GraphPad Prism ソフトウェアで行った。

30

【0246】

細胞ベースの機能データは、多重特異性分子 1511 および対照抗体アテゾリズマブが、図 7 に示すように、EC₅₀ で PD-L1 活性を完全に遮断したことを示した。

【0247】

(PD-L1 結合ドメインを有する多重特異性分子の抗腫瘍活性)

【0248】

マウス大腸癌 MC38-hPD-L1 細胞 (Biocytogen Co., Ltd; 5×10^5) ホモ B-hPD-L1 マウス (メス、6 週齢、n=6) の皮下に植え付けた。腫瘍体積が約 100 mm³ に達した時点でマウスをグループ分けし、その時点で、図 8 A に示す用量およびスケジュールで、多重特異性分子 1518 (配列番号 157、CD16F-L1-HSA-L1-CD47-L3-CD47-L1-PDL1-L3-PDL1) で治療した。治療期間中の体重の変化を図 8 B に示す。図 8 A に示すように、多重特異性分子 1518 A1 は、B-hPD-L1 マウスにおいて腫瘍の成長を制御する効果があった。値は、平均値 ± SEM として表す。

40

【0249】

(実施例 3)

50

(抗HSA HCAb抗体)

(抗HSA抗体の特異性)

【0250】

実施例1と同様に、Abcore Incで、完全フロイントアジュバント(0日目)、または不完全フロイントアジュバント(免疫後)と混合した組換えヒトHSA(配列番号39)でラマに免疫付与した。

【0251】

ヒト血清アルブミン(配列番号39)

```

MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRRDAHKSEVAHRFKD LG
EENFKALVLI AFAQYLQQCFEDHVKL VNEVTEFAKTCVA
DESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQE
PERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFL
KKYLYEIAARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKA
ACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERAFAKAWA
VARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECAD
DRADLAKYICENQDSISSSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVEN
DEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVF LGMFLYEYA
RRHPDYSVVLL LRLAKTYET TLEKCCAAADPHECYAKVFD
EFKPLVEEPQNL IKQNC E LFEQLGEYKFQNAL LVRYTKKV
PQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSV
VLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDE
TYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKH
KPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AEEGKKL
VAASQAALGL

```

10

20

【0252】

抗HSA VHHの選択のために、ビオチン化HSAをファージライブラリーとインキュベートし、その後ストレプトアビジンDynabeads(Invitrogen)に捕捉された。完璧に洗浄後、結合したファージを1mg/mlのトリプシンで溶出した。選択出力物を大腸菌TG1細胞内にレスキューした。コロニーを拾い、BATJ, Inc(サンディエゴ、カリフォルニア)でシークエンスした。

30

【0253】

HSA特異的なVHHをコードするcDNAは、C末端にヒスチジンタグをつけて合成され、HEK293細胞に一過的にトランスフェクションされ、IMACクロマトグラフィーによりポジティブなVHHを精製した。

【0254】

ラマのファージライブラリーのHSA結合ファージコロニーをシークエンスし、各VHHについてアミノ酸配列を以下(表6)にリスト化した。以下のアミノ酸配列に基づくcDNA配列をpJ607発現ベクター内で合成した。この発現プラスミドをHEK293細胞株にトランスフェクトし、C末端にヒスチジンタグを有する組換え単一ドメイン抗体(sdAb)を製造した。発現したsdAbを、HisTrap HPにより精製した。

40

【0255】

2つのラマVHH、HS5およびHS10を、IGHV3-23ヒト生殖細胞系列配列に基づきヒト化した。

【0256】

【表 6】

ラマ抗 HSA VHH 配列

HS2 (配列番号 40)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRAFSSYAMGWFRQAPRKEREVATISLSG GYTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGESSSRQDKWYD YWGQGTQVTVSS
HS5 (配列番号 41)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRFTFTTHAMGWFRQAPGKEREVATINWGG RTTYADSVKGRFTISRDTGANTVYLQMNSLKPEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTT NSWGQGTQVTVSS
HS6 (配列番号 42)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRIFHTYAVGWFRQAPGKERESVVIINWSS DHTYVAQSVKGRFTISRDRAKNTFYLMNSLKPEDTAVYYCAVRRRLYLGLRESDF DSWGQGTQVTVSS
HS12 (配列番号 43)	QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGRFTISFSMGWFRQAPGKEREVVASITNSG SGILYGDsvKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGTGAGRYRYASM FDYWGQGTQVTVSS
HS22 (配列番号 44)	EVQLVESGGGLVHAGGSLRLSCAASGPTFSNYFMGWFRQAPGKEREVAAVKWSG YHTYYSDSVKQGTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAGGTFSNWYTRPR SGDSYDHWGQGTQVTVSS
HS27 (配列番号 45)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTSPYTMGWFRQASGKERESVAATTWTG SRSYGESVKGRFTISRDKNTMSLQMNSLKPEDTAVYYCAAADGAGLYTNRGQ YDYWGQGTQVTVSS
hHS5 (配列番号 46)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTFTTHAMGWFRQAPGKEREVSAINWGG RTTYADSVKGRFTISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTT NSWGQGTQVTVSS
HS10 (配列番号 47)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTDSAYRMGWFRQAPGKEREVSAINWSD GRTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADPDSRLYYTVPQ NYDYWGQGTQVTVSS
hHS10 (配列番号 48)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTDSAYRMGWFRQAPGKEREVSAINWSD GRTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADPDSRLYYTVPQ NYDYWGQGTQVTVSS

10

20

【0257】

VHHは、HSAに結合する手段を構成する。

【0258】

(Octet (登録商標) キネティック結合解析)

【0259】

実施例1と同様にOctet (登録商標) キネティック結合解析を実施し、結果を表7および図9に示す。HS5、HS6、HS12、およびHS27クローンはHSAへの親和性を示す。種を超えた活性を確認し、表8に示した。

30

【0260】

【表7】

抗HSA VHH抗体の結合親和性 (K_D)

sdAb	K_{on} (1/Ms)	K_{off} (1/s)	K_D (M)
HS2	1.72E+04	2.60E-02	1.51E-07
HS5	8.09E+05	7.65E-04	9.46E-10
HS6	1.67E+06	8.29E-04	4.980E-10
HS12	1.03E+06	5.83E-04	5.68E-10
HS22	1.73E+04	9.09E-05	5.25E-08
HS27	7.61E+05	8.65E-04	4.32E-08
HS5-41	4.22E+04	9.17E-05	1.14E-09
HS10	2.77E+04	8.01E-05	2.89E-09

40

【0261】

50

【表 8】

HS10 および HS5 VHH の種を超えた結合親和性

Samples	human (K _D)	Monkey (K _D)	mouse (K _D)
hHS10	3.18E-09	8.08E-09	4.57E-09
hHS5	8.17E-10	1.16E-08	NA

【0262】

(実施例 4)

(抗 CD33 HCAb 抗体)

(CD33 VHH 抗体の単離)

【0263】

実施例 1 と同様に、Abcore Inc で、完全フロイントアジュバント (0 日目)、または不完全フロイントアジュバント (免疫後) と混合した組換えヒト CD33 (配列番号 49) でラマに免疫し、ファージライブラリーを調製した。

【0264】

ヒト CD33 (配列番号 49、P20138、18-259)

DPNFWLQVQESVTVQEGLCVLVPCTFFHP I P Y Y D K N S P V
 H G Y W F R E G A I I S R D S P V A T N K L D Q E V Q E E T Q G R F R L L G D P
 S R N N C S L S I V D A R R R D N G S Y F F R M E R G S T K Y S Y K S P Q L S V
 H V T D L T H R P K I L I P G T L E P G H S K N L T C S V S W A C E Q G T P P I
 F S W L S A A P T S L G P R T T H S S V L I I T P R P Q D H G T N L T C Q V K F
 A G A G V T T E R T I Q L N V T Y V P Q N P T T G I F P G D G S G K Q E T R A G
 V V H

【0265】

抗 CD33 VHH の選択のために、ビオチン化 CD33 をファージライブラリーとインキュベートし、その後ストレプトアビジン Dynabeads に捕捉された。完璧に洗浄後、結合したファージを 1 mg/ml のトリプシンで溶出した。選択出力物を大腸菌 TG1 細胞内にレスキューした。コロニーを拾い、BATJ, Inc でシーケンスした。

【0266】

CD33 結合 VHH をコードする cDNA は、C 末端にヒスチジンタグをつけて合成され、HEK293 細胞に一過的にトランスフェクションされ、IMAC クロマトグラフィーによりポジティブな VHH を精製した。

【0267】

免疫付与したラマのファージライブラリーの CD33 結合ファージコロニーをシーケンスし、各 VHH についてアミノ酸配列を以下 (表 9) にリスト化した。以下のアミノ酸配列に基づく cDNA 配列をヒト Fc と融合し、pJ607 発現ベクターで合成した。この発現プラスミドを HEK293 細胞株にトランスフェクトし、組換え抗 CD33 HCAb 抗体を製造した。発現した抗 CD33 HCAb 抗体を、Hitrap プロテイン A カラムにより精製した。

【0268】

ラマ VHH の 1 つである 33-14 を、IGHV3-23 ヒト生殖細胞系列に基づきヒト化した。

【0269】

10

20

30

40

50

【表 9 - 1】

ラマ抗 CD33 VHH 配列

33-1 (配列番号:50)	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGGTFTNYAMGWFREAPGKEREVAGINNNG DTLYNTNSVKGRFTISRDNKNTVYLHMNSLKLEDTAVYYCAANLKGASWYSANY DYWGQGTQVTVSS
33-2 (配列番号:51)	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASANILRTAPMAWYRQAPGKQREFVALITADG TTDYQESVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLQSEDTARYFCVKVYSYWGQGTQVTVS S
33-4 (配列番号:52)	QVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCEASGSIFSIAHMGWYRQAPGKQRELVAVISSGG RTNYVDSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLKAEDTAVYFCNVAVVGGPRFDYWGQ GTQVTVSS
33-8 (配列番号:53)	EVQLMESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRVSTYVMGWFRQAPGKEREVFAEINRIG DTLYNRTSVKGRFTISRDNKNTVYLMNSLEPEDTAVYSCAARVIGTSTYNYWG QGTQVTVSS
33-13 (配列番号:54)	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSISSINSMNWYRQAPGKQREKVAGINSSG DTNYVDSVKGRFTISRDNARTTYLQMNNLKPEDTGLYYCNADPRPWPNDVAFGS WGQGTQVTVSS
33-14 (配列番号:55)	QVQLVESGGGLVQAGDSLKLSCAASGRVSLILAMAWWRQAPGKEREVAGRIWNN DMTRYSDSVKGRFTISKDNKNTVMVYLRMDNLGPEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQG TQVTVSS
33-24 (配列番号:56)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCLASGRVSSNSAMGWFRQAPGKEREVFGAITWNG DTTLYAYYVKDRFTISRDNKRMVYLMNSLKPEDTAVYYCAATDKFASSQADS YTTWGQGTQVTVSS
33-A1 (配列番号:57)	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGGTFTNYAMGWFREAPGKEREVAGINNNG DTLYNTNSVKGRFTISRDNKNTVYLHMNSLKLEDTAVYYCAAKFSGASWYSAQY HSWGQGTQVTVSS
33-A2 (配列番号:58)	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGGTFTNYAMGWFREAPGKEREVAGINNNG DTLYNTNSVKGRFTISRDNKNTVYLHMNSLKLEDTAVYYCAANFNGASWFAANY HFWGQGTQVTVSS
33-B1 (配列番号:59)	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGGTFTNYAMGWFREAPGKEREVAGINNNG DTLYNTNSVKGRFTISRDNKNTVYLHMNSLKLEDTAVYYCAAKLKGASWFASHY KSWGQGTQVTVSS
33-B2 (配列番号:60)	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGGTFTNYAMGWFREAPGKEREVAGINNNG DTLYNTNSVKGRFTISRDNKNTVYLHMNSLKLEDTAVYYCAANINAASWFAAKY DSWGQGTQVTVSS
33-B3 (配列番号:61)	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGGTFTNYAMGWFREAPGKEREVAGINNNG DTLYNTNSVKGRFTISRDNKNTVYLHMNSLKLEDTAVYYCAANVRGSSWFSSHY DFWGQGTQVTVSS

10

20

30

40

50

【表 9 - 2】

33-C1 (配列番号:62)	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGGTFTNYAMGWFREAPGKEREFVAGINNNG DTLYNTNSVKGRFTISRDNAKNTVYLHMNSLKLEDTAVYYCAANLSGASWFSQY EFWGQGTQVTVSS
33-C2 (配列番号:63)	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGGTFTNYAMGWFREAPGKEREFVAGINNNG DTLYNTNSVKGRFTISRDNAKNTVYLHMNSLKLEDTAVYYCAANVKGASWFSANY QSWGQGTQVTVSS
33-C3 (配列番号:64)	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCVASGGTFTNYAMGWFREAPGKEREFVAGINNNG DTLYNTNSVKGRFTISRDNAKNTVYLHMNSLKLEDTAVYYCAANFKGASWFASHY QSWGQGTQVTVSS
33-D1 (配列番号:65)	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGGTFTNYAMGWFREAPGKEREFVAGINNNG DTLYNTNSVKGRFTISRDNAKNTVYLHMNSLKLEDTAVYYCAANFNGASWFSNY EYWGQGTQVTVSS
33-D2 (配列番号:66)	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGGTFTNYAMGWFREAPGKEREFVAGINNNG DTLYNTNSVKGRFTISRDNAKNTVYLHMNSLKLEDTAVYYCAANIRGSSWFATHY DSWGQGTQVTVSS
33-D3 (配列番号:67)	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGGTFTNYAMGWFREAPGKEREFVAGINNNG DTLYNTNSVKGRFTISRDNAKNTVYLHMNSLKLEDTAVYYCAANLRGASWFAANY KYWGQGTQVTVSS
33-E2 (配列番号:68)	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGGTFTNYAMGWFREAPGKEREFVAGINNNG DTLYNTNSVKGRFTISRDNAKNTVYLHMNSLKLEDTAVYYCAAKLRGASWFAANY DSWGQGTQVTVSS
33-E3 (配列番号:69)	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGGTFTNYAMGWFREAPGKEREFVAGINNNG DTLYNTNSVKGRFTISRDNAKNTVYLHMNSLKLEDTAVYYCAANISAASWYASQY DFWGQGTQVTVSS
33-F1 (配列番号:70)	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGGTFTNYAMGWFREAPGKEREFVAGINNNG DTLYNTNSVKGRFTISRDNAKNTVYLHMNSLKLEDTAVYYCAANVSGASWYASHY EFWGQGTQVTVSS
33-F2 (配列番号:71)	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGGTFTNYAMGWFREAPGKEREFVAGINNNG DTLYNTNSVKGRFTISRDNAKNTVYLHMNSLKLEDTAVYYCAANVSEASWFASKY DFWGQGTQVTVSS
33-F3 (配列番号:72)	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGGTFTNYAMGWFREAPGKEREFVAGINNNG DTLYNTNSVKGRFTISRDNAKNTVYLHMNSLKLEDTAVYYCAAKISGASWFAAHY KSWGQGTQVTVSS
33-G1 (配列番号:73)	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGGTFTNYAMGWFREAPGKEREFVAGINNNG DTLYNTNSVKGRFTISRDNAKNTVYLHMNSLKLEDTAVYYCAAKFRGASWFS SHY NFWGQGTQVTVSS
33-G2 (配列番号:74)	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGGTFTNYAMGWFREAPGKEREFVAGINNNG DTLYNTNSVKGRFTISRDNAKNTVYLHMNSLKLEDTAVYYCAANVKGASWFSNY KYWGQGTQVTVSS
33-G3 (配列番号:75)	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGGTFTNYAMGWFREAPGKEREFVAGINNNG DTLYNTNSVKGRFTISRDNAKNTVYLHMNSLKLEDTAVYYCAANIKASSWYSSHY NYWGQGTQVTVSS
33-H1 (配列番号:76)	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGGTFTNYAMGWFREAPGKEREFVAGINNNG DTLYNTNSVKGRFTISRDNAKNTVYLHMNSLKLEDTAVYYCAANVRGASWFAAHY NSWGQGTQVTVSS
33-H2 (配列番号:77)	QVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGGTFTNYAMGWFREAPGKEREFVAGINNNG DTLYNTNSVKGRFTISRDNAKNTVYLHMNSLKLEDTAVYYCAAKVRAASWFAAQY KFWGQGTQVTVSS
h33-14 (配列番号:78)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWNN DMTRYSDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQG TQVTVSS

10

20

30

40

【0270】

表9のVHHは、CD33に結合する手段を構成する。

【0271】

実施例1と同様にOctet（登録商標）キネティック結合解析を実施し、K_Dの結果を図10および表10に示す。

【0272】

【表 10】

抗 CD33 VHH 抗体の結合親和性

VHH	K_{on} (1/Ms)	K_{off} (1/s)	K_D (M)
33-1	8.0+05	8.10E-04	1.01E-09
33-2	8.0E+05	6.0E-04	7.53E-10
33-4	9.0E+05	9.0E-04	9.95E-10
33-8	1.1E+06	7.0E-04	5.11E-10
33-13	1.0E+06	5E-04	4.09E-10
33-14	8.0E+05	1.09E-04	1.36E-010
33-24	8.0E+05	9E-04	1.13E-010

10

【0273】

(実施例 5)

(抗 LAG3 VHH)

(抗 LAG3 VHH 抗体の単離)

【0274】

標準的なプロトコールに従い、ラマに Abcore Inc で免疫付与した。組換えヒト LAG3 (細胞外ドメイン 19-238、配列番号 79) を完全フロイントアジュバント (0 日目)、または不完全フロイントアジュバント (免疫後) と混合した。ラマ 1 匹あたり $50 \mu\text{g}$ / 回を隔週で、6 回皮下注射した。45 日目に、組換えヒト LAG3 タンパク質で免疫されたラマから血清を採取し、ヒト LAG3 に対する抗体価を ELISA で決定した。ELISA では、96 穴マキシソーププレートを 100 ng / ウェルの LAG3 でコーティングした。ブロッキングし、希釈した血清サンプルを加えた後、抗 LAG3 1 抗体の存在は、ELISA によって抗血清の抗体価が決定された抗体を用いて示された。96 穴マキシソーププレートを 100 ng / ウェルの hLAG3 でコーティングした。ブロッキングし、希釈した血清サンプルを加えた後、抗 LAG3 1 抗体の存在は、HRP 結合ヤギ抗ラマ IgG (H+L) 抗体を用いて示された。

20

【0275】

ヒト LAG3 の細胞外ドメイン (配列番号 79、P18627、23-450)

VPV VWAQEGAP AQLPC SPTIPLQDLSLLRRAGVTWQHQP
DSGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSSWGPRPRRRTVLSVGP
GLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEY
RAAVHLRDRALSCRLRLRLGQASMTASPPGSLRASDWVIL
NCSFSRPDRPASVHWFNRNGQGGRVPVRES PHHHLAESFLF
LPQVSPMDSGPWGCILT YRDGFNVSIMYNLT VLGLEPPTP
LTVYAGAGSRVGLPCRLPAGVGTRSF LTAKWTPPGGGPDL
LVTGDNGDFTLRLEDV SQAQAGTYTCHIHLQEQQLNATVT
LAIIITVTPKSFSGPSGLGKLLCEVTPVSGQERFVWSSLD
PSQRSFSGPWLEAQEAQLLSQPWQCQLYQGERLLGA AVYF
TELS SPGAQRSGRAPGALPAGHL

30

40

【0276】

実施例 1~4 と同様にファージライブラリーを調製した。LAG3 結合 VHH をコードする cDNA は、C 末端にヒスチジンタグをつけて合成され、HEK293 細胞に一過的にトランスフェクションされ、IMAC クロマトグラフィーにより LAG3 結合 VHH を精製した。

【0277】

免疫付与したラマのファージライブラリーの LAG3 結合ファージコロニーをシーケンスし、各 VHH についてアミノ酸配列を以下 (表 11) にリスト化した。以下のアミノ

50

酸配列に基づく cDNA 配列をヒト Fc と融合し、pJ607 発現ベクターで合成した。この発現プラスミドを HEK293 細胞株にトランスフェクトし、組換え抗LAG3HCAb抗体を製造した。発現した抗LAG3HCAb抗体を、HiTrap プロテインA カラムにより精製した。

【0278】

ラマVHHの1つであるLG9を、IGHV3-23 ヒト生殖細胞系列に基づきヒト化した。

【0279】

【表11】

ラマ抗LAG3 VHH 配列

LG2 (配列番号 80)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGTIFSINAMGWYRQAPGKQRELVAIVTFGGS TNYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCSARNVQSPVQYHLAVWG QGTTLTVSS
LG6 (配列番号 81)	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGSIFSISTMGWYRQAPGKQRELVASITARG ADYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLKPEDTAVYYCNTDTRSTLYHYSWGQGT QVTVSS
LG9 (配列番号 82)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTIDDYPIGWFRQAPGKEREGVSCIDDSDE STYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCARGAIFMIDGVDVFLT YYDSWGQGTQVTVSS
hLG9 (配列番号 83)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTIDDYFMSWFRQAPGKGREGVAAIDDSDE STYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAIFMIDGVDVFLT YYDSWGQGTTLTVSS
LG19 (配列番号 84)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYAIGWFRQAPGKEREGVSCISSDG STYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAADRRGSCRQYDYWGQ GTQVTVSS
LG22 (配列番号 85)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYAIGWFRQAPGKEREGVSCIINSDG STYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCATDRYSDCRGPYDYWG QGTQVTVSS
LG-D8 (配列番号 86)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGKYAMSWVRQVPDKGLEWVSSISSGR DTSYADSAKGRFTIFRNNAANTVYLQMDNLKLEDTGVIYCVKCLEVWATREYDGGW QGTQVTVSS
LG-E12 (配列番号 87)	QVQLVESGGGLVHPGGSLNLSVAHGFSLDSDHMGWFRQAPGKEREVVACIKHRDG RIYILEAVKDRFVISRDNAKNTVYLEMNNLSDEDTAVYHCATASSCSDNWWLLIGD AYAGYWGQGTQVTVSS
LG15 (配列番号 88)	EVQLAESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFAFRSYVMSWVRQAPGKGLEWVSTINSDSR TSYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKVEDTAVYYCSKQSPGTSQRGQGTQVT VSS
LG65 (配列番号 89)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTSATYSIAWFRQAPGKEREGVSCISTGDG STYYAPAVKGRFTISSDNKNTVYLQMNLKPEDTAVYYCAKRAGYGSWFCPLDP SLQYDSWGQGTQVTVSS
LG99 (配列番号 90)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTIDDYFMSWFRQAPGKGREGVAAIDDSDE STYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGALFMIDGVDVFLT YYFEFWGQGTTLTVSS
LG-C4 (配列番号 91)	QVQLVESGGRLVQAGGSLGLSCAASGLAFREYSMGWFRRAPGKEREFVAAVDWTGI QYYADSVKGRATISRDTAKSTVFLQMNSLNPEDTAFYYCAAGKLTGIVLLTRTE YDYWGQGTQVTVSS
LG-E5 (配列番号 92)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAHSAGFTLDYYALGWFRQAPGKEREAVSCISSDG STYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCASTRYGSSCRGGQWDT GSWGQGTQVTVSS
LG-H4 (配列番号 93)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLDYYTIGWFRQAPGKEREAVSCINRSDG STYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCASTTYGTSCRGGQWDT GSWGQGTQVTVSS

【0280】

表11のVHHは、LAG3に結合する手段を構成する。

【0281】

実施例1～4と同様に抗LAG3VHHのOctet（登録商標）結合解析を実施し、

10

20

30

40

50

結果を表 1 2 に示す。

【 0 2 8 2 】

【表 1 2】

抗 LAG3 単ドメイン抗体の結合親和性 (K_D)

sdAb	K_{on} (1/Ms)	K_{off} (1/s)	K_D (M)
LG2	3.33E+04	2.10E-02	6.30E-07
LG6	2.75E+04	5.22E-04	1.90E-08
LG9	6.21E+04	1.10E-04	1.77E-09
LG9H	1.10+05	2.98E-04	2.71E-09
LG19	8.70E+04	1.09E-05	1.14E-010
LG22	4.27E+04	1.14E-05	2.67E-010
LG-D8	3.30E+04	9.82E-05	2.98E-09
LG-99	3.67E+05	2.91E-05	7.92E-11

10

【 0 2 8 3 】

(実施例 6)

(抗 CD 1 6 V H H)

(抗 CD 1 6 V H H 抗体の単離)

20

【 0 2 8 4 】

標準的なプロトコールに従い、ラマに A b c o r e I n c で免疫付与した。組換えヒト CD 1 6 A (配列番号 9 4) を完全フロイントアジュバント (0 日目)、または不完全フロイントアジュバント (免疫後) と混合した。ラマ 1 匹あたり 5 0 μ g / 回を隔週で、6 回皮下注射した。4 5 日目に、免疫されたラマから血清を採取し、抗体価を E L I S A で決定した。E L I S A では、9 6 穴マキシソーププレートに 1 0 0 n g / ウェルの抗原でコーティングした。ブロッキングし、希釈した血清サンプルを加えた後、特異的な抗体の存在は、H R P 結合ヤギ抗ラマ I g G (H + L) 抗体を用いて示された。

30

【 0 2 8 5 】

ヒト CD 1 6 A (配列番号 9 4)

MWQLLLPTALLLLVLSAGMRTEDLPKAVVFLEPQWYRVLE
KDSVTLKCKGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAA
TVDDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLQLAPRWVFK
EEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLLQNGKGRKYFHHNSDFYI
PKATLKD SG SYFCRGLFGSKNVSSSETVINITITQGLAVSTI
SSFFPPPGYQVSFCLVMVLLFAVD TGLYFSVKTNIRSSSTRD
WKD HKFKWRKDPQDK

【 0 2 8 6 】

ヒト CD 1 6 B (配列番号 9 5)

MWQLLLPTALLLLVLSAGMRTEDLPKAVVFLEPQWYSVLE
KDSVTLKCKGAYSPEDNSTQWFHNESLISSQASSYFIDAA
TVNDSGEYRCQTNLSTLSDPVQLEVHIGWLLQLAPRWVFK
EEDPIHLRCHSWKNTALHKVTYLLQNGKDRKYFHHNSDFHI
PKATLKD SG SYFCRGLVGSKNVSSSETVINITITQGLAVSTI
SSFSPPPGYQVSFCLVMVLLFAVD TGLYFSVKTN I

40

【 0 2 8 7 】

実施例 1 と同様にファージライブラリーを調製した。CD 1 6 A 結合 V H H をコードする c D N A は、C 末端にヒスチジンタグをつけて合成され、H E K 2 9 3 細胞に一過的に

50

トランスフェクションされ、I M A C クロマトグラフィーにより C D 1 6 A 結合 V H H を精製した。

【 0 2 8 8 】

免疫付与したラマのファージライブラリーの C D 1 6 A 結合ファージコロニーをシーケンシ、各 V H H についてアミノ酸配列を以下（表 1 3）にリスト化した。以下のアミノ酸配列に基づく c D N A 配列をヒト F c と融合し、p J 6 0 7 発現ベクターで合成した。この発現プラスミドを H E K 2 9 3 細胞株にトランスフェクトし、組換え抗 C D 1 6 H C A b 抗体を製造した。発現した抗 C D 1 6 H C A b 抗体を、H i T r a p プロテイン A カラムにより精製した。

【 0 2 8 9 】

ラマ V H H の 1 つである C D 1 6 F 1 を、I G H V 3 - 2 3 ヒト生殖細胞系列に基づきヒト化した。

【 0 2 9 0 】

【表 1 3】

抗 CD16 VHH 配列

CD16F1 (配列番号 96)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRT DYADSVKGRFTISRDNRAVYLMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTV SS
hCD16F1-1 (配列番号 97)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVSAITSGVRT YYADSVKGRFTISRDNRAVYLMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTV SS
hCD16F1-2 (配列番号 98)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVSAITSGVRT YYADSVKGRFTISRDNRAVYLMNSLRAEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTV SS
CD16E11 (配列番号 99)	QVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCRASGFTFSNHAMSWVRQAPGKGLEWVSEISFNHGA TRYADSLKGRFTISRDNRAVYLMNTLKPEDTAVYYCRKGWNATPQIGERGRGTQ VTVSS

【 0 2 9 1 】

表 1 3 の V H H は、C D 1 6 に結合する手段を構成する。

【 0 2 9 2 】

実施例 1 と同様に抗 C D 1 6 V H H の O c t e t （登録商標）結合解析を実施し、結果を表 1 4 および図 1 1 に示す。

【 0 2 9 3 】

【表 1 4】

抗 CD16 VHH 抗体の結合親和性(KD)

sdAb	K_{on} (1/Ms)	K_{off} (1/s)	K_D (M)
CD16F1	2.33E+04	1.09E-04	4.68E-09
CD16E11	1.99E+04	6.00E-05	3.02E-09

【 0 2 9 4 】

C D 1 6 - F 1 は C D 1 6 A に対し選択的である一方、C D 1 6 - E 1 1 は C D 1 6 A と C D 1 6 B の両方に結合する。

【 0 2 9 5 】

C D 1 6 F 1 と C D 1 6 E 1 1 は両方とも抗 C D 1 6 V H H 抗体のアゴニストであり、J u r k a t - L u c i a N F A T - C D 1 6 A D C C レポーターアッセイ（I n v i v o g e n）において C D 1 6 A を活性化させた。

【 0 2 9 6 】

多重特異性分子 1 5 1 1、3 3 2 1（抗 C D 1 6 A V H H C D 1 6 F 1 を含む）、

ならびに、対照抗CD47抗体、B6H12 IgG1およびB6H12 IgG4の機能アッセイを、Jurkat-Lucia NFAT-CD16レポーターアッセイ (InvivoGen) を用いて行い、結果を図12に示す。データは、CD16F1が強力なCD16Aアゴニストであることを示した。

【0297】

(実施例7)

(三重特異性一本鎖抗体 (HSA/CD47/PD-L1またはHSA/LAG3/PD-L1))

三重特異性一本鎖抗体を構築するために、抗HSA、抗CD47、および抗PD-L1もしくは抗CD33 VHH配列、または抗HSA、抗LAG3、および抗PD-L1もしくは抗CD33 VHH配列を、組換えDNA技術により、6通りの異なる様式でリンカーにより融合させた(図13)。図13は、例示的な三重特異性分子、抗HSA/CD47/PD-L1、抗HSA/CD47/CD33、および抗HSA/LAG3/PD-L1、抗HSA/LAG3/CD33抗体の構造を示す。例示的な切断不可能な、および切断可能なリンカー配列を、表15に示す。これらは、リンカー手段、またはタンパク質ドメインを連結する手段を構成する。これらの手段は、切断可能または切断不可能としてさらに特徴づけられる。例示的な三重特異性分子のアミノ酸配列を表16に示す。表16および17において、リンカー配列に下線が付されている。

10

【0298】

【表15】

20

切断不可能、および切断可能なリンカー配列

リンカー	配列	切断可能?
L1 (配列番号 100)	GGGSGGGS	No
L2 (配列番号 101)	(G ₄ S) _n (G ₃ S) _m (n=1-35; m=0-35)	No
L3 (配列番号 102)	AAA	No
L4 (配列番号 103)	(G ₄ S) _n	No
L11*3 (配列番号 104)	GGRGPLGLAGSRSAFGGS	Yes
L11*4 (配列番号 105)	GSPLGLAGS	Yes
L11*5 (配列番号 106)	GGSGPLGLAGSRSAFG	Yes
L11*6 (配列番号 107)	GPLGLAGSRSAAGGSQVQL	Yes
L11*7 (配列番号 108)	GSGPLGLAARSAGGS	Yes
L11*8 (配列番号 109)	GSGPLGLAARSAFGGS	Yes
L11*9 (配列番号 110)	GGSGRSAPLGLARQARQVGGS	Yes
L11*10 (配列番号 111)	GGSGRSAPLGLGRQARGGS	Yes
L11*11 (配列番号 112)	GGSPGLGLARQARGSGRSAGGS	Yes
L11*12 (配列番号 113)	GGSGRSAPLGLARQARVVGGS	Yes
L11*13 (配列番号 114)	GSRQARVVGGS	Yes
L11*14 (配列番号 115)	GSRQRRVVGGS	Yes
L11*15 (配列番号 116)	GSRQARGS	Yes
L11*16 (配列番号 117)	GSRQRRGS	Yes
L11*17 (配列番号 118)	GSRQARGGS	Yes
L11*18 (配列番号 119)	GSRQRRGS	Yes

30

40

【0299】

50

【表 16 - 1】

三重特異性分子

hHS5- <u>L11</u> *3- hA09-10-2- <u>L1</u> - hPL16 (配列番号 120)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFSAINWG GRTTYADSVKGRFIIISRDGTANTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAS NLDYTNVRAG TTNSWGQGTQVTVSS GGSP LGLAGRS AFGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CA ASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKERE FVA AISRS GGNIN YADSVKGRFTISRDNF KNTTYLQMS SLEPEDTAVYYCAA HYLLLPSYISTSTNM YNYWGQGTQVTVSSGG GGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGGTFLTYSMSWVRQAPGKERE F VSSINW SGYMTYYADSVKGRFTISR DN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAAART AIAAKRSSEFDYWGQGTQVTVSS
hHS5- <u>L11</u> *3- hA09-10-2- <u>L3</u> - A09-10- <u>L1</u> -hPL16 (配列番号 121)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFSAINWG GRTTYADSVKGRFIIISRDGTANTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAS NLDYTNVRAG TTNSWGQGTQVTVSS GGSP LGLAGRS AFGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CA ASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKERE FVA AISRS GGNIN YADSVKGRFTISRDNF KNTTYLQMS SLEPEDTAVYYCAA HYLLLPSYISTSTNM YNYWGQGTQVTVSSAA AQVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKERE FVA AIS SR SGNIN YADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMS SLEPEDTAVYYCAA HYLLLPS YISTSTNM YNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CA ASGGTFLTYSMSWVRQAPGKERE FVSSINW SGYMTYYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMN SLRAEDTAVYYCAA ARTAI AAKRSSEFDYWGQGTQVTVSS
hHS5- <u>L11</u> *3- hA09-10-2- <u>L3</u> - A09-10- <u>L1</u> - hPL16- <u>L3</u> -hPL16 (配列番号 122)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFSAINWG GRTTYADSVKGRFIIISRDGTANTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAS NLDYTNVRAG TTNSWGQGTQVTVSS GGSP LGLAGRS AFGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CA ASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKERE FVA AISRS GGNIN YADSVKGRFTISRDNF KNTTYLQMS SLEPEDTAVYYCAA HYLLLPSYISTSTNM YNYWGQGTQVTVSSAA AQVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKERE FVA AIS SR SGNIN YADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMS SLEPEDTAVYYCAA HYLLLPS YISTSTNM YNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CA ASGGTFLTYSMSWVRQAPGKERE FVSSINW SGYMTYYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMN SLRAEDTAVYYCAA ARTAI AAKRSSEFDYWGQGTQVTVSSAAAEVQL VESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMSWVRQAPGKERE FVSSINW SGYMT YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAAARTAI AAKRSSEFD YWGQGTQVTVSS
hA09-10-1- <u>L1</u> - hHS5- <u>L1</u> -hPL16 (配列番号 123)	EVQLVES GGGLVQPGGSLRLS CAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKERE FVA AIS R SGNIN YADSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMS SLRAEDTAVYYCAA HYLLLPSY ISTSTNM YNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CA SGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFSAINWGGRTTYADSVKGRFIIISRDGTANT LYLQMN SLRAEDTAVYYCAS NLDYTNVRAGTTNSWGQGTQVTVSS GGGGSGGG EVQLVES GGGLVQPGGSLRLS CAASGGTFLTYSMSWVRQAPGKERE FVSSINW GYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAAARTAI AAKRS SEFDYWGQGTQVTVSS
hA09-10-2- <u>L3</u> - A09-10- <u>L1</u> -hHS5- <u>L1</u> -hPL16 (配列番号 124)	EVQLVES GGGLVQPGGSLRLS CAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKERE FVA AIS R SGNIN YADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMS SLEPEDTAVYYCAA HYLLLPSY ISTSTNM YNYWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGGGR TF SNYALGWFRQAPGKERE FVA AISRS GGNIN YADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQ MS SLEPEDTAVYYCAA HYLLLPSYISTSTNM YNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGG EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFSAINWG GRTTYADSVKGRFIIISRDGTANTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAS NLDYTNVRAG TTNSWGQGTQVTVSS GGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGGTFL TYSMSWVRQAPGKERE FVSSINW SGYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAAARTAI AAKRSSEFDYWGQGTQVTVSS
hA09-10-2- <u>L3</u> - A09-10- <u>L1</u> -hHS5- <u>L1</u> -hPL16- <u>L3</u> - hPL16	EVQLVES GGGLVQPGGSLRLS CAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKERE FVA AIS R SGNIN YADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMS SLEPEDTAVYYCAA HYLLLPSY ISTSTNM YNYWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGGGR TF SNYALGWFRQAPGKERE FVA AISRS GGNIN YADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQ MS SLEPEDTAVYYCAA HYLLLPSYISTSTNM YNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGG

10

20

30

40

【表 16 - 2】

(配列番号 125)	EVQLLES GGGLVQ PGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWG GR TTTT YADSVKGRFIIISRD TGANTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAS NLD TYNVRAG TTNSWGQGTQVTVSS GGGSGGGSEVQLV ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFL TYSMSWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAAARTATAAKRSSEFDYWGQGTQVTVSS AAAEVQLV ESGGGL VQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMSWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVK GRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAAARTATAAKRSSEFDYWGQGTQ VTVSS
hA09-10-3- L1 - hHS5- L1 -hPL16- L3 -hPL16 (配列番号 126)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAIS RSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTVYLQMS SLRAEDTAVYYCAAHYLL PSY ISTSTNM YNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLV ESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFIIISRD TGANT LYLQMN SLRAEDTAVYYCAS NLD TYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGSGGGG EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMSWVRQAPGKEREFVSSINWS GYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAAARTATAAKRS SEFDYWGQGTQVTVSS AAAEVQLV ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMS WVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAE DTAVYYCAAARTATAAKRSSEFDYWGQGTQVTVSS
hHS5- L11 *3- hA09-10-3- L1 - H33-14 (配列番号 127)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWG GR TTTT YADSVKGRFIIISRD TGANTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAS NLD TYNVRAG TTNSWGQGTQVTVSS GGSP LGLAGRS AFGGSEVQLV ESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNF KNTVYLQMS SLRAEDTAVYYCAAHYLL PSYISTSTNM YNYWGQGTQVTVSSGG GGSGGGSQVQLV ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREF AGRIW WNNDMTRYSDSVKGRFTISR DN AKNTVYLQMS SLRAEDTAVYYCEADLI GGSRGWGQGTQVTVSS
hHS5- L11 *3- hA09-10-2- L3 - A09-10- L1 -H33- 14 (配列番号 128)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWG GR TTTT YADSVKGRFIIISRD TGANTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAS NLD TYNVRAG TTNSWGQGTQVTVSS GGSP LGLAGRS AFGGSEVQLV ESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNF KNTTYLQMS LEPEDTAVYYCAAHYLL PSYISTSTNM YNYWGQGTQVTVSSAA AQVQLV ESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAI SRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMS LEPEDTAVYYCAAHYLL PS YISTSTNM YNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSQVQLV ESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIW WNNDMTRYSDSVKGRFTISR DN AKN TVYLQMS SLRAEDTAVYYCEADLIG SGRGWGQGTQVTVSS
hHS5- L1 -hA09- 10-2- L3 -A09-10- L1 -H33-14- L3 - H33-14 (配列番号 129)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWG GR TTTT YADSVKGRFIIISRD TGANTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAS NLD TYNVRAG TTNSWGQGTQVTVSS GGGSGGGSEVQLV ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRT FSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQ MS LEPEDTAVYYCAAHYLL PSYISTSTNM YNYWGQGTQVTVSSAAAQVQLV ESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNI NYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMS LEPEDTAVYYCAAHYLL PSYISTSTN M YNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSQVQLV ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSL ILAMAWWRQAPGKEREFAGRIW WNNDMTRYSDSVKGRFTISR DN AKNTVYLQMS SLRAEDTAVYYCEADLIGSGRGWGQGTQVTVSS AAAQVQLV ESGGGLVQPGGSL RLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIW WNNDMTRYSDSVKGRFTISR DN AKNTVYLQMS SLRAEDTAVYYCEADLIGSGRGWGQGTQVTVSS
hHS5- L11 *3- hA09-10-2- L3 - A09-10- L1 -H33- 14- L3 -H3-14 (配列番号 130)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWG GR TTTT YADSVKGRFIIISRD TGANTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAS NLD TYNVRAG TTNSWGQGTQVTVSS GGSP LGLAGRS AFGGSEVQLV ESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNF KNTTYLQMS LEPEDTAVYYCAAHYLL PSYISTSTNM YNYWGQGTQVTVSSAA AQVQLV ESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAI SRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMS LEPEDTAVYYCAAHYLL PS

10

20

30

40

50

【表 16-3】

	YISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWNNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNAKN TVYLQMSSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSAAAQVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWNNNDMTRYSDSVK GRFTISRDNAKNTVYLQMSSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSS
hA09-10-3-L1- hHS5-L1-H33-14 (配列番号 131)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAIS RSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTVYLQMSSSLRAEDTAVYYCAHYLLPSY ISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLLESAGGLVQPGGSLRLSCAA SGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFTISRDTGANT LYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGSGGGG QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWNN NDMTRYSDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWG QGTQVTVSS
hA09-10-2-L3- A09-10-L1-hHS5- L1-H33-14 (配列番号 132)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAIS RSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSLEPEDTAVYYCAHYLLPSY ISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSAAAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRT FSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQ MSSLEPEDTAVYYCAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGG EVQLLESAGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWG GRTTYADSVKGRFTISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAG TTNSWGQGTQVTVSSGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSL ILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWNNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMS SLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSS
hA09-10-L1- hHS5-L1-H33-14- L3-H33-14 (配列番号 133)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAIS RSGGNINYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSSLRAEDTAVYYCAHYLLPSY ISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLLESAGGLVQPGGSLRLSCAA SGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFTISRDTGANT LYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGSGGGG QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWNN NDMTRYSDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWG QGTQVTVSSAAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPG KEREFAGRIWNNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSSLRAEDTAVYYC EADLIGGSRGWGQGTQVTVSS
hA09-10-2-L3- A09-10-L1-hHS5- L1-H33-14-L3- H33-14 (配列番号 134)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAIS RSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSLEPEDTAVYYCAHYLLPSY ISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSAAAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRT FSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQ MSSLEPEDTAVYYCAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGG EVQLLESAGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWG GRTTYADSVKGRFTISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAG TTNSWGQGTQVTVSSGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSL ILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWNNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMS SLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSAAAQVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWNNNDMTRYSDSVKGRFTISR DNAKNTVYLQMSSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSS
H33-14-L1-hHS5- L1-CD16F1 (配列番号 135)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWNN NDMTRYSDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWG QGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLLESAGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGW FRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFTISRDTGANTLYLQMNSLRAED TAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGR FTISRDNAKRAVYLMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSS
H33-14-L1-hHS5- L1-CD16F1-L3- CD16F1	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWNN NDMTRYSDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWG QGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLLESAGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGW

10

20

30

40

50

【表 16 - 4】

(配列番号 136)	FRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFIIISRD TGANTLYLQMNSLRAED TAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGR FTISRDNAKRAVYLMQNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSAAAE VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGV RTDYADSVKGRFTISRDNAKRAVYLMQNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQG TQVTVSS
H33-14-L3-H33- 14-L1-hHS5-L1- CD16F1 (配列番号 137)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWN NDMTRYSDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWG QGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPG KEREFAGRIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYC EADLIGGSRGWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFIIISRD TGANT LYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGSGGGG EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSG VRTDYADSVKGRFTISRDNAKRAVYLMQNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQ GTQVTVSS
H33-14-L3-H33- 14-L1-hHS5-L1- CD16F1-L3- CD16F1 (配列番号 138)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWN NDMTRYSDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWG QGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPG KEREFAGRIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYC EADLIGGSRGWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFIIISRD TGANT LYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGSGGGG EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSG VRTDYADSVKGRFTISRDNAKRAVYLMQNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQ GTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGK QRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNAKRAVYLMQNSLKPEDTAVYYCNV NLNTGNYWGQGTQVTVSS
hPL16-L1-hHS5- L1-CD16F1 (配列番号 139)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMSWVRQAPGKEREFVSSINWS GYMTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAI AAKRS SEFDYWQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTF TTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFIIISRD TGANTLYLQM NSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLV ESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDY ADSVKGRFTISRDNAKRAVYLMQNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVT VSS
hPL16-L3-hPL16- L1-hHS5-L1- CD16F1 (配列番号 140)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMSWVRQAPGKEREFVSSINWS GYMTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAI AAKRS SEFDYWQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMS WVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAAARTAI AAKRSSEFDYWQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLLESGGG LVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSV KGRFIIISRD TGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQ VTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQA PGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNAKRAVYLMQNSLKPEDTAVYY CNVNLNTGNYWGQGTQVTVSS
hPL16-L1-hHS5- L1-CD16F1-L3- CD16F1 (配列番号 141)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMSWVRQAPGKEREFVSSINWS GYMTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAI AAKRS SEFDYWQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTF TTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFIIISRD TGANTLYLQM NSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLV ESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDY ADSVKGRFTISRDNAKRAVYLMQNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVT VSSAAAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELV

10

20

30

40

【表 16 - 5】

	AAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNRAKRAVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNT GNYWGQGTQVTVSS
hPL16- <u>L3</u> -hPL16- <u>L1</u> -hHS5- <u>L1</u> - CD16F1- <u>L3</u> - CD16F1 (配列番号 142)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWS GYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAIAAKRS SEFDYWGQGTQVTVSS AAAA EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMS WVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAAARTAAIAAKRSSEFDYWGQGTQVTVSS GGGGGGGG EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSV KGRFIIISRDGTANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQ VTVSS GGGGGGGG EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQA PGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNRAKRAVYLQMNSLKPEDTAVYY CNVNLNTGNYWGQGTQVTVSS AAAA EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLF SARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNRAKRAVYLQMN SLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSS
hLG9- <u>L1</u> -hHS5- <u>L1</u> -hPL16 (005R) (配列番号 143)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTIDDYPMSWFRQAPGKREGVAAIDDS DESTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAIFMIDGVD VFLTYYYDSWGQGTQVTVSS GGGGGGGG EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFIIISRDGTANTL YLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSS GGGGGGGG SE VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWSG YMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAIAAKRSS EFDYWGQGTQVTVSS
hLG9- <u>L3</u> -hLG9- <u>L1</u> -hHS5- <u>L1</u> - hPL16 (配列番号 144)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTIDDYPMSWFRQAPGKREGVAAIDDS DESTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAIFMIDGVD VFLTYYYDSWGQGTQVTVSS AAAA EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTIDD YPMSWFRQAPGKREGVAAIDDSDESTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARGAIFMIDGVDVFLTYYYDSWGQGTQVTVSS GGGGGGGG SE VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGG RTTYADSVKGRFIIISRDGTANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTT NSWGQGTQVTVSS GGGGGGGG EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTY SMWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAAARTAAIAAKRSSEFDYWGQGTQVTVSS
hLG9- <u>L1</u> -hHS5- <u>L1</u> -hPL16- <u>L3</u> - hPL16 (配列番号 145)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTIDDYPMSWFRQAPGKREGVAAIDDS DESTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAIFMIDGVD VFLTYYYDSWGQGTQVTVSS GGGGGGGG EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFIIISRDGTANTL YLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSS GGGGGGGG SE VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWSG YMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAIAAKRSS EFDYWGQGTQVTVSS AAAA EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMW VRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAAARTAAIAAKRSSEFDYWGQGTQVTVSS
hLG9- <u>L3</u> -hLG9- <u>L1</u> -hHS5- <u>L1</u> - hPL16- <u>L3</u> -hPL16 (配列番号 146)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTIDDYPMSWFRQAPGKREGVAAIDDS DESTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAIFMIDGVD VFLTYYYDSWGQGTQVTVSS AAAA EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTIDD YPMSWFRQAPGKREGVAAIDDSDESTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARGAIFMIDGVDVFLTYYYDSWGQGTQVTVSS GGGGGGGG SE VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGG RTTYADSVKGRFIIISRDGTANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTT NSWGQGTQVTVSS GGGGGGGG EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTY SMWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAAARTAAIAAKRSSEFDYWGQGTQVTVSS AAAA EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGR FTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAAARTAAIAAKRSSEFDYWGQGTQVTVSS

10

20

30

40

50

【表 16-6】

hPL16- <u>L1</u> -hHS5- <u>L1</u> -hLG9 (配列番号 147)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWS GYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAI AAKRS SEFDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTF TTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYYADSVKGRFII SRDTGANTLYLQM NSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLL ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTIDDYPMSWFRQAPGKGREGVAAIDDSDESTY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAIFMIDGVDVFLTY YYDSWGQGTFLVTSS
hPL16- <u>L1</u> -hHS5- <u>L1</u> -hLG9- <u>L3</u> - hLG9 (配列番号 148)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWS GYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAI AAKRS SEFDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTF TTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYYADSVKGRFII SRDTGANTLYLQM NSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLL ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTIDDYPMSWFRQAPGKGREGVAAIDDSDESTY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAIFMIDGVDVFLTY YYDSWGQGTFLVTSSAAAEVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTIDDYPMSW FRQAPGKGREGVAAIDDSDESTY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARGAIFMIDGVDVFLTY YYDSWGQGTFLVTSS
hPL16- <u>L3</u> -hPL16- <u>L1</u> -hHS5- <u>L1</u> - hLG9 (配列番号 149)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWS GYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAI AAKRS SEFDYWGQGTQVTVSSAAAEVQLVES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMS WVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAAARTAI AAKRSSEFDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGG LVQPGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYYADSV KGRFII SRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQ VTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTIDDYPMSWFRQA PGKGREGVAAIDDSDESTY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARGAIFMIDGVDVFLTY YYDSWGQGTFLVTSS
hPL16- <u>L3</u> -hPL16- <u>L1</u> -hHS5- <u>L1</u> - hLG9- <u>L3</u> -hLG9 (配列番号 150)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWS GYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAI AAKRS SEFDYWGQGTQVTVSSAAAEVQLVES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMS WVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAAARTAI AAKRSSEFDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGG LVQPGGSLRLSCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYYADSV KGRFII SRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQ VTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTIDDYPMSWFRQA PGKGREGVAAIDDSDESTY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARGAIFMIDGVDVFLTY YYDSWGQGTFLVTSSAAAEVQLLES GGGGLVQPGGS LRLSCAASGSTIDDYPMSWFRQAPGKGREGVAAIDDSDESTY YADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAIFMIDGVDVFLTY YYDSWGQGTFLVT VSS

10

20

30

【0300】

HSAに結合する抗HSAドメインは、体内でのMVSCAの半減期を延長することができる。また、他のドメインの活性を阻害することもでき、場合によっては全身に分布するMVSCAにとって望ましいこともあるが、MVSCAが、作用が意図される部位、たとえば腫瘍にある場合は望ましくない。したがって、好ましくは作用が意図される部位で切断されうる切断可能なリンカーにより、抗HSAドメインと他の抗原結合ドメインが連結される。このように、MVSCAはプロドラッグとして働くことができる。HSA VHHとCD47 VHHまたはLAG3 VHHの間に使用されるプロテアーゼで切断可能な配列を含むリンカー、およびCD47 VHHとPD-L1を連結またはLAG3 VHHとPD-L1を連結するために使用される他のリンカーを有するようなMVSCAを図13および表9に示す。図14Bは図14Aの抗体のプロテアーゼ消化後のSDS-PAGE解析を示す。

40

【0301】

(プロテアーゼ解析)

【0302】

50

(1) MMP-9 活性アッセイ

組換えヒトMMP-9 (rhMMP-9、R&D Systems) をアッセイバッファ (50mM Tris、10mM CaCl₂、150mM NaCl、0.05% Brij-35、pH7.5) 中で100μg/mlに希釈した。その後、rhMMP-9は、APMA (p-アミノフェニル水銀酢酸塩、Sigma) を終濃度1mMになるように添加し、37℃で24時間インキュベートすることにより活性化される。活性化したrhMMP-9を、アッセイバッファ中の等量の20μMの抗体で滴定し、室温で1時間インキュベートする。得られた消化基質をSDS-PAGEで分析する。

【0303】

(2) u-プラスミノゲンアクチベーター (uPA、ウロキナーゼ) 活性アッセイ

基質をアッセイバッファ (50mM Tris、0.01% Tween20、pH8.5) 中で200μMに希釈し、アッセイバッファ中の等量の組換えヒトu-プラスミノゲンアクチベーター (rh uPA、R&D Systems) で滴定した。反応混合物を室温で1~2時間インキュベートし、得られた消化基質をSDS-PAGEで解析した。

【0304】

(3) マトリプターゼ活性アッセイ

基質をアッセイバッファ (50mM Tris、50mM NaCl、0.01% Tween20) 中で200μMに希釈し、アッセイバッファ中の等量の組換えヒトマトリプターゼ (R&D Systems) で滴定した。反応混合物を室温で1~2時間インキュベートし、得られた消化基質をSDS-PAGEで解析した。

【0305】

ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SESS-PAGE)。Invitrogen NuPAGE (登録商標) の仕様書に従って変性SDS-PAGEを行った。手短にいうと、7.5μLのタンパク質サンプル (3μgタンパク質) を2.5μLの4×LDSサンプルローディングバッファ (Invitrogen) と混合し、70℃で10分間加熱する。その後、サンプルを、プレキャストのNuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris 1.0mmミニゲル (Invitrogen) にロードする。その後、5μLのプレ染色SDS-PAGEスタンダード (Bio-Rad) を各ゲルランにロードする。定電圧 (200V) を用いて、1×NuPAGE MOPS SDSランニングバッファ (Invitrogen) の溶液中で、染料フロントが60mmゲルの端に到達するまで約45分間室温で電気泳動を行う。ゲルをSimply Blue SafeStain (Invitrogen) で染色する。

【0306】

図15は、10mg/ml HSA存在下でのPD-L1/pro-CD47 (HSA-CD47-PD-L1抗体) 対PD-L1/活性型CD47 (HSA結合ドメインが切断された同一の抗体) のリアルタイムでのキネティック結合解析を示す。PD-L1/pro-CD47は、全く、またはほとんどCD47と結合しないが、PD-L1/活性型CD47はCD47とのロバストな結合を示した。このアッセイにおいて、PD-L1結合に違いまたは影響はない。

【0307】

(実施例8)

(CD16A/HSA/CD47/(PD-L1またはCD33)を含む多重特異性分子

多重特異性分子を構築するために、抗CD16A、抗HSA、抗CD47、および抗PD-L1またはCD33 VHH配列を、組換えDNA技術により、8通りの異なる様式でリンカーにより融合させた。図16は、抗CD16A、抗HSA、抗CD47、および抗PD-L1またはCD33 VHHの例示的な多重特異性分子の構造を示す。例示的な多重特異性分子のアミノ酸配列を以下に示す (表17)。

【0308】

10

20

30

40

50

図 17 A は、VHH2 と VHH3 の間のリンカー、G₄S G₃S (L1、配列番号 100) 対 (G₄S)₃ (L4、配列番号 103) の長さを、HL60 細胞でのフローサイトメトリー結合アッセイで比較したものである。HL60 細胞は CD47 を発現するが、PD-L1 を発現しないため、1518-HS5 (配列番号 173) および 1518-HS5-GS15 (配列番号 184) の結合は、HL60 細胞表面で 2 つの分子が 1 つの CD47 に結合していることを示した。(G₄S)₃ (GS15 は 15 アミノ酸のリンカー) のような長いリンカー対 G₄S G₃S (9 アミノ酸) は CD47 の結合を改善し、EC50 は 8.4 対 26 nM であった。

【0309】

【表 17-1】

多重特異性分子

hPL16-L1-hHS5-L1-CD16F1 (配列番号 151)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSI NWSGYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAART IAAKRSSEFDYWGQGT LVT VSSGGGSGGGSEVQLLES GGGGLVQPGGSLRL SCAASGRFTTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTYYADSVKGRFTIS RDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVS SGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAP GKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDN AKRAVYLQMNSLKPEDTAV YYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSS
CD16F1-L1-hHS10-L1-hA09-10-2-L3-A09-10-L1-hPL16 (015-3) (配列番号 152)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAI TSGVRTDYADSVKGRFTISRDN AKRAVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNT GNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGST DSAYRMGWFRQAPGKEREFVSAINWSDGRITYADSVKGRFTISRDN SKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAADPDSRLYYTVPQNYDYWGQGT LVT VSSGGGGS GGGSEEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKE REFVAAISRSGGNINYADSAKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLKPEDTAVYY CAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSAAAQVQLVESGGGLVQAGG SLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSAK GRFTISRDNFKNTTYLQMSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNY WGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLT YSMSWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAAARTIAAKRSSEFDYWGQGTQVTVSS
hHS10-L11*12-CD16F1-L1-hA09-10-2-L3-A09-10-L1-hPL16 (配列番号 153)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTD SAYRMGWFRQAPGKEREFVSAI NWS DGRITYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADPDS RLYYTVPQNYDYWGQGT LVT VSSGGSGRSAPLGLARQARQVGGSEVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTD YADSVKGRFTISRDN AKRAVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGT QVTVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYA LGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMS SLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSAAAQVQLV ESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISR SGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMS SLEPEDTAVYYCAAHYLLPS YISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTIAAKRSSEFDYWGQGTQVTV SS
CD16F1-L1-hHS10-L1-A09-10-L1-hPL16 (015-2) (配列番号 154)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAI TSGVRTDYADSVKGRFTISRDN AKRAVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNT GNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGST DSAYRMGWFRQAPGKEREFVSAINWSDGRITYADSVKGRFTISRDN SKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAADPDSRLYYTVPQNYDYWGQGT LVT VSSGGGGS GGGSQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKER EFVAAISRSGGNINYADSAKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLKPEDTAVYYC AAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTIAAKRSSEFDY WGQGTQVTVSS
hHS10-L11*12-CD16F1-L1-hA09-10-2-L3-A09-10-L1-hPL16-L3-hPL16 (配列番号 155)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTD SAYRMGWFRQAPGKEREFVSAI NWS DGRITYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADPDS RLYYTVPQNYDYWGQGT LVT VSSGGSGRSAPLGLARQARQVGGSEVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTD YADSVKGRFTISRDN AKRAVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGT QVTVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYA LGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMS SLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSAAAQVQLV

10

20

30

40

50

【表 17-2】

	ESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFFVAAISRS GGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSLEPEDTAVYYCAAHYLLPS YISTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAIAAKRSSEFDYWGQGTQVTV SSAAAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKERE FVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA AARTAAIAAKRSSEFDYWGQGTQVTVSS
CD16F1-L1-hHS10-L1- hA09-10-2-L3-A09-10- L1-hPL16-L3-hPL16 (1511) (配列番号 156)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAI TSGVRTDYADSVKGRFTISRDNKRAVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNT GNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGST DSAYRMGWFRQAPGKEREFFVSAINWSDGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAADPDSRLYYTVPQNYDYWGQGTQVTVSSGGGGS GGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKER EFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSLEPEDTAVYYC AAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQAGGS LRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFFVAAISRSGGNINYADSVKGR FTISRDNFKNTTYLQMSSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYW GQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTY SMWVRQAPGKEREFFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAAARTAAIAAKRSSEFDYWGQGTQVTVSSAAAEVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFFVSSINWSGYMT YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAIAAKRSS EFDYWGQGTQVTVSS
CD16F1-L1-hHS10-L1- hA09-10-3-L3-hA09- 10-4-L1-hPL16-L3- hPL16 (1518) (配列番号 157)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAI TSGVRTDYADSVKGRFTISRDNKRAVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNT GNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGST DSAYRMGWFRQAPGKEREFFVSAINWSDGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAADPDSRLYYTVPQNYDYWGQGTQVTVSSGGGGS GGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKER EFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSLRAEDTAVYYC AAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFFVAAISRSGGNINYADSVKGR FTISRDNKNTTYLQMSSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYW GQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTY SMWVRQAPGKEREFFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAAARTAAIAAKRSSEFDYWGQGTQVTVSSAAAEVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFFVSSINWSGYMT YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAIAAKRSS EFDYWGQGTQVTVSS
hHS10-L11*9-CD16F1- L1-hA09-10-2-L3-A09- 10-L1-H33-14-L3-H33- 14 (配列番号 158)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTDSAYRMGWFRQAPGKEREFFVSAI NWSGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADPDS RLYYTVPQNYDYWGQGTQVTVSSGGSGRSAPLGLARQARQVGGSEVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTD YADSVKGRFTISRDNKRAVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGT QVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYA LGWFRQAPGKEREFFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMS LEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAAEVQLV ESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFFVAAISRS GGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSLEPEDTAVYYCAAHYLLPS YISTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFFAGRIWNNNDMTRYSDSVKGRFTIS RDNAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSAAAEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFFAGRIWW

10

20

30

40

【表 17-3】

	NNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGS RGWGQGTTLVTVSS
CD16F1-L1-hHS10-L1- hA09-10-3-L3-hA09- 10-4-L1-H33-14-L3- H33-14 (3321) (配列番号 159)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAI TSGVRTDYADSVKGRFTISRDNKRAVYLQMNLSLKPEDTAVYYCNVNLNT GNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG DSAYRMGWFRQAPGKEREFVSAINWSDGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMNLSRAEDTAVYYCAADPDSRLYYTVPQNYDYWGQGTTLVTVSSGGGS GGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKER EFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTVYLQMSLRAEDTAVYYC AAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGR FTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYW GQGTQVTVSSGGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLIL AMAWWRQAPGKEREFAGRIWNNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQ MSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTTLVTVSSAAQVQLVESGGGLVQ GGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWNNNDMTRYSDSVK GRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTTLVTVS S
hHS10-L11*9-CD16F1- L1-CD16F1-L1-hA09- 10-2-L3-A09-10-L1- hPL-16-L3-hPL-16 (配列番号 160)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTD SAYRMGWFRQAPGKEREFVSAI NWSGRTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAADPDS RLYYTVPQNYDYWGQGTTLVTVSSGGSGRSAPLGLARQARQVGGSEVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTD YADSVKGRFTISRDNKRAVYLQMNLSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQ TQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMG WYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNKRAVYLQMNLSLK PEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYA DSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTN MYNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSN YALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQ MSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSGGGGSG GGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFV SSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAAA RTAIAAKRSSEFDYWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAAARTAIAAKRSSEFDYWGQGTQVTVSS
CD16F1-L3-CD16F1- L1-hHS10-L1-hA09-10- 2-L3-A09-10-L1-H33- 14-L3-H33-14 (配列番号 161)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAI TSGVRTDYADSVKGRFTISRDNKRAVYLQMNLSLKPEDTAVYYCNVNLNT GNYWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVM GWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNKRAVYLQMNLS LKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGSTD SAYRMGWFRQAPGKEREFVSAINWSDGRTYYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAADPDSRLYYTVPQNYD YWQGTTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRT FSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTT YLQMSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSAAA QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVA AISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLEPEDTAVYYCAAHY LLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWNNNDMTRYSDSVKGR FTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTTLVTVSS AAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAG RIWNNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEAD LIGGSRGWGQGTTLVTVSS

10

20

30

40

50

【表 17-4】

hHS10-L11*12- CD16F1-L3-CD16F1- L1-hA09-10-2-L3-A09- 10-L1-H33-14-L3-H33- 14 (配列番号 162)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTD SAYRMGWFRQAPGKEREFVSAI NWSDGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADPDS RLYYTVPQNYDYWGQGT LVT VSSGGSGRSAPLGLARQAROVGGSEVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTD YADSVKGRFTISRDN AKRAVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQG TQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAP GKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDN AKRAVYLQMNSLKPEDTAV YYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGR FTISRDNFKNTTYLQMSSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWG QGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGW RQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSLEP EDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSQVQ LVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIW NDMTRYSDSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCEADLIGGS GWGQGT LVT VSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAW WRQAPGKEREFAGRIWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMSSL RAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGT LVT VSS	10
CD16F1-L3-CD16F1- L1-hA09-10-2-L3-A09- 10-L1-H33-14-L3-H33- 14 (配列番号 163)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAI TSGVRTDYADSVKGRFTISRDN AKRAVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNT GNYWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVM GWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDN AKRAVYLQMNSL KPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINY ADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTST NMNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFS NYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYL QMSSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGG GGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREF AGRIWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCEA DLIGGSRGWGQGT LVT VSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTS LILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDN AKNTVY LQMSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGT LVT VSS	20
H33-14-L3-H33-14-L1- hA09-10-2-L3-A09-10- L1-hHS10-L1-CD16F1 (配列番号 164)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRI WNNDMTRYSDSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCEADLIG GSRGWGQGT LVT VSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILA MAWWRQAPGKEREFAGRIWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMS SLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGT LVT VSSGGGGSGGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNI NYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYIST STNMNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRT FSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTT YLQMSSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGG GSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTD SAYRMGWFRQAPGKER EFVSAINWSDGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AADPDSRLYYTVPQNYDYWGQGT LVT VSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVK GRFTISRDN AKRAVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVS S	30
H33-14-L3-H33-14-L1- hA09-10-2-L3-A09-10- L1-hHS10-L1-CD16F1 (配列番号 165)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRI WNNDMTRYSDSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCEADLIG GSRGWGQGT LVT VSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILA MAWWRQAPGKEREFAGRIWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMS SLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGT LVT VSSGGGGSGGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNI	40

10

20

30

40

50

【表 17-5】

	NYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLEPEDTAVYYCAAHYLLLPSTYIST STNMYNYWGQGTQVTVSSAAAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRT FSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTT YLQMSLEPEDTAVYYCAAHYLLLPSTYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSGGG GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTD SAYRMGWFRQAPGKER EFVSAINWSDGRYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AADPDSRLYYTVPQNYDYWGQGTTLVTVSSGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVK GRFTISRDNKRAVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVS SAAAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQREL VAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNKRAVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNL NTGNYWGQGTQVTVSS	10
H33-14-L3-H33-14-L1- hA09-10-2-L3-A09-10- L1-CD16F1-L11*9- hHS10 (配列番号 166)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRI WWNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIG GSRGWGQGTTLVTVSSAAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILA MAWWRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMS SLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTTLVTVSSGGGGGGGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNI NYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLEPEDTAVYYCAAHYLLLPSTYIST STNMYNYWGQGTQVTVSSAAAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRT FSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTT YLQMSLEPEDTAVYYCAAHYLLLPSTYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSGGG GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQR ELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNKRAVYLQMNSLKPEDTAVYYCN VNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGSGRSAPLGLARQARQVGGSEVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGSTD SAYRMGWFRQAPGKEREFVSAINWSDGRYYA DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADPDSRLYYTVPQNY DYWGQGTTLVTVSS	20
H33-14-L3-H33-14-L1- hA09-10-2-L3-A09-10- L1-CD16-F1-L3- CD16F1-L11*9-hHS10 (配列番号 167)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRI WWNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIG GSRGWGQGTTLVTVSSAAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILA MAWWRQAPGKEREFAGRIWWNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMS SLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTTLVTVSSGGGGGGGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNI NYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLEPEDTAVYYCAAHYLLLPSTYIST STNMYNYWGQGTQVTVSSAAAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRT FSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTT YLQMSLEPEDTAVYYCAAHYLLLPSTYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSGGG GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQR ELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNKRAVYLQMNSLKPEDTAVYYCN VNLNTGNYWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSL FSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNKRAVY LQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGSGRSAPLGLARQ ARQVGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTD SAYRMGWFRQAPGKE REFVSAINWSDGRYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAADPDSRLYYTVPQNYDYWGQGTTLVTVSS	30
CD16F1-L1-hHS5-L1- hA09-10-2-L3-A09-10- L1-hPL16 (015-3-HS5) (配列番号 168)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAI TSGVRTDYADSVKGRFTISRDNKRAVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNT GNYWGQGTQVTVSSGGGGGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRT FTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTYYADSVKGRFTISRDTGANTL YLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGG GSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREF VAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLEPEDTAVYYCAA HYLLLPSTYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSAAAQVQLVESGGGLVQAGGSLR LSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRF	40

10

20

30

40

【表 17 - 6】

	TISRDNFKNTTYLQMSSEPEDTAVYYCAAHYLLLPSTSTNMNYWGGQ GTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSM SWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAAARTAAIAAKRSSEFDYWGGTQVTVSS
hHS5-L11*9-CD16F1- L1- hA09-10-2-L3-A09- 10-L1-hPL16 (配列番号 169)	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAI NWGGRTTYYADSVKGRFTISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDT YNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGSGRSAPLGLARQARQVGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYA DSVKGRFTISRDNKRAVYLMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNWGGQGTQ VTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALG WFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSE PEDTAVYYCAAHYLLLPSTSTNMNYWGGTQVTVSSAAAQVQLVES GGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGG NINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSEPEDTAVYYCAAHYLLLPSTYI STSTNMNYWGGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISR DNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAIAAKRSSEFDYWGGTQVTVSS
CD16F1-L1-hHS5-L1- A09-10-L1-hPL16 (015-2-HS5) (配列番号 170)	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAI NWGGRTTYYADSVKGRFTISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDT YNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLLESGLLVQPGGSLRLS CAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYYADSVKGRFTISR DTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSS GGGSGGGSQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQA PGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSEPEDT AVYYCAAHYLLLPSTSTNMNYWGGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVE SGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWSGYM TYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAIAAKRS SEFDYWGGTQVTVSS
hHS5-L11*9-CD16F1- L1-A09-10-L3-A0910- L1-hPL16-L3-hPL16 (配列番号 171)	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAI NWGGRTTYYADSVKGRFTISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDT YNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGSGRSAPLGLARQARQVGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYA DSVKGRFTISRDNKRAVYLMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNWGGQGTQ VTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALG WFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSAKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSE LKPEDTAVYYCAAHYLLLPSTSTNMNYWGGTQVTVSSAAAQVQLVES GGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGG NINYADSAKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSELKPEDTAVYYCAAHYLLLPSTYI STSTNMNYWGGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISR DNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAIAAKRSSEFDYWGGTQVTVSS GGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPG KEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAAARTAAIAAKRSSEFDYWGGTQVTVSS
CD16F1-L1-hHS5-L1- A09-10-L3-A09-10-L1- hPL16-L3-hPL16 (1511-HS5) (配列番号 172)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAI TSGVRTDYADSVKGRFTISRDNKRAVYLMNSLKPEDTAVYYCNVNLNT GNWGGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGRT FTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYYADSVKGRFTISRDTGANTL YLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGSGG GSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREF VAAISRSGGNINYADSAKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSELKPEDTAVYYCAA HYLLLPSTYI STSTNMNYWGGTQVTVSSAAAQVQLVESGGGLVQAGGSLR LSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSAKGRF TISRDNFKNTTYLQMSSELKPEDTAVYYCAAHYLLLPSTYI STSTNMNYWGG TQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSM

10

20

30

40

【表 17-7】

	SWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAAARTAAIAAKRSSEFDYWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGG GLVQPGGSLRLS CAASGGTFLTYSMSWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAIAAKRSSEF DYWGQGTQVTVSS
CD16F1-L1-hHS5-L1- hA09-10-3-L3-hA09- 10-4-L1-hPL16-L3- hPL16 (1518-HS5) (配列番号 173)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAI TSGVRTDYADSVKGRFTISRDN AKRAVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNT GNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGRT FTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFTISRDTGANTL YLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGG GSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREF VAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCAA HYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRF TISRDN AKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQ GTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGGTFLTYSM SWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAAARTAAIAAKRSSEFDYWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGG GLVQPGGSLRLS CAASGGTFLTYSMSWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAIAAKRSSEF DYWGQGTQVTVSS
hHS5-L11*9-CD16F1- L1-hA09-10-2-L3-A09- 10-L1-H33-14-L3-H33- 14 (配列番号 174)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAI NWGGRTTYADSVKGRFTISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDT YNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGSGRSAPLGLARQARQVGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLRLS CAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYA DSVKGRFTISRDN AKRAVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQ VTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGGGRTFSNYALG WFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTLYLQMSSL EPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVES GGGLVQAGGSLRLS CAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGG NINYADSVKGRFTISRDNFKNTLYLQMSSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYI STSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLS AASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWNNDMTRYSDSVKGRFTISR NAKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTTLVTVSSAAQVQL VESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWNN DMTRYSDSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRG WGQGTTLVTVSS
CD16F1-L1-hHS5-L1- hA09-10-3-L3-hA09- 10-4-L1-H33-14-L3- H33-14 (3211-HS5) (配列番号 175)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAI TSGVRTDYADSVKGRFTISRDN AKRAVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNT GNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGRT FTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFTISRDTGANTL YLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGG GSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREF VAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCAA HYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRF TISRDN AKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQ GTQVTVSSGGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGRTSLILAM AWWRQAPGKEREFAGRIWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMSS LRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTTLVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGG SLRLS CAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWNNDMTRYSDSVKGR FTISRDN AKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTTLVTVSS
hHS5-L11*9-CD16F1- L3-CD16F1-L1-hA09-	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAI NWGGRTTYADSVKGRFTISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDT YNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGSGRSAPLGLARQARQVGGSEVQLVESGG

10

20

30

40

【表 17 - 8】

10-2-L3-A09-10-L1-hPL-16-L3-hPL-16 (配列番号 176)	GLVQPPGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYA DSVKGRFTISRDNRAKRAVYLQMNLSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQ VTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGK QRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNRAKRAVYLQMNLSLKPEDTAVYY CNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFT ISRDNFKNTTYLQMSSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQG TQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQ APGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSLEPED TAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLV ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWSGY MTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAIAAKR SSEFDYWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLT YSMSWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAAARTAAIAAKRSSEFDYWGQGTQVTVSS
CD16F1-L3-CD16F1-L1-hHS5-L1-hA09-10-2-L3-A09-10-L1-H33-14-L3-H33-14 (配列番号 177)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAIT TSGVRTDYADSVKGRFTISRDNRAKRAVYLQMNLSLKPEDTAVYYCNVNLNT GNYWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVM GWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNRAKRAVYLQMNLS LKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLLESGGGL VQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYAD SVKGRFTISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSW GQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFS NYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYL QMSSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAQV QLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAI SRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSLEPEDTAVYYCAAHYLL PSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWNNDMTRYSDSVKGRF TISRDNKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTTLVTVSSAA AQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGR IWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCEADLI GGSRGWGQGTTLVTVSS
hHS5-L11*9-CD16F1-L3-CD16F1-L1-hA09-10-2-L3-A09-10-L1-H33-14-L3-H33-14 (配列番号 178)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAI NWGGRTTYADSVKGRFTISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDT YNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGSGRSAPLGLARQARQVGGSEVQLVESGG GLVQPPGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYA DSVKGRFTISRDNRAKRAVYLQMNLSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQ VTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGK QRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNRAKRAVYLQMNLSLKPEDTAVYY CNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFT ISRDNFKNTTYLQMSSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQG TQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQ APGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSLEPED TAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSQVQLV ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWNNND MTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGW GQGTTLVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWR QAPGKEREFAGRIWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLRAE DTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTTLVTVSS
H33-14-L3-H33-14-L1-hA09-10-2-L3-A09-10-L1-hHS5-L1-CD16F1 (配列番号 179)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRI WNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCEADLIG GSRGWGQGTTLVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILA MAWWRQAPGKEREFAGRIWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMS

10

20

30

40

【表 17-9】

	SLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNI NYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYIST STNMYNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRT FSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGINYADSVKGRFTISRDNFKNTT YLQMSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSGGG GSGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKER EFVSAINWGGRTTTYADSVKGRFTISRDTGANTLYLQMNLSRAEDTAVYYC ASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGR FTISRDNKRAVYLMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSS	
H33-14-L3-H33-14-L1- hA09-10-2-L3-A09-10- L1-hHS5-L1-CD16F1- L3-CD16F1 (配列番号 180)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRI WWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIG GSRGWGQGTTLVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILA MAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMS SLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNI NYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYIST STNMYNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRT FSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGINYADSVKGRFTISRDNFKNTT YLQMSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSGGG GSGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKER EFVSAINWGGRTTTYADSVKGRFTISRDTGANTLYLQMNLSRAEDTAVYYC ASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGR FTISRDNKRAVYLMNSLKPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSA AAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVA AITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNKRAVYLMNSLKPEDTAVYYCNVNLNT GNYWGQGTQVTVSS	10
H33-14-L3-H33-14-L1- hA09-10-2-L3-A09-10- L1-CD16F1-L11*9- hHS5 (配列番号 181)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRI WWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIG GSRGWGQGTTLVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILA MAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMS SLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNI NYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYIST STNMYNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRT FSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGINYADSVKGRFTISRDNFKNTT YLQMSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSGGG GSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQ RELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNKRAVYLMNSLKPEDTAVYYCN VNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGSGRSAPLGLARQARQVGGSEVQLLES GG LVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYA DSVKGRFTISRDTGANTLYLQMNLSRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNS WGQGTQVTVSS	20
H33-14-L3-H33-14-L1- hA09-10-2-L3-A09-10- L1-CD16-F1-L3- CD16F1-L11*9-hHS5 (配列番号 182)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRI WWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIG GSRGWGQGTTLVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILA MAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMS SLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNI NYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYIST STNMYNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRT FSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGINYADSVKGRFTISRDNFKNTT YLQMSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSGGG GSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQ RELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNKRAVYLMNSLKPEDTAVYYCN VNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGSGRSAPLGLARQARQVGGSEVQLLES GG LVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYA DSVKGRFTISRDTGANTLYLQMNLSRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNS WGQGTQVTVSS	30
	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRI WWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIG GSRGWGQGTTLVTVSSAAQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILA MAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMS SLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNI NYADSVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYIST STNMYNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGGRT FSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGINYADSVKGRFTISRDNFKNTT YLQMSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSGGG	40

【表 17 - 10】

	GSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQR ELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNRAKRAVYLQMNSLKPEDTAVYYCN VNLYNTGNYWGQGTQVTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSL FSARVMGWYRQAPGKQRELVAAITSGVRTDYADSVKGRFTISRDNRAKRAVY LQMNSLKPEDTAVYYCNVNLYNTGNYWGQGTQVTVSSGGSGRSAPLGLARQ ARQVGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTFTTHAMGWFRQAPGKE REFVSAINWGGRTTYADSVKGRFTISRDTGANTLYLQMNSLRAEDTAVYY CASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSS	
CD16F1-L1-hHS5-L4- hA09-10-3-L3-hA09- 10-4-L1-H33-14-L3- H33-14 (3321-HS5-GS15) (配列番号 183)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAI TSGVRTDYADSVKGRFTISRDNRAKRAVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLYNT GNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGR FTTHAMGWFRQAPGKEREFEVSAINWGGRTTYADSVKGRFTISRDTGANTL YLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGG GGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRFTFSNYALGWFRQAP GKEREFEVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTVYLQMNSLRAEDTA VYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGGGRFTFSNYALGWFRQAPGKEREFEVAAISRSGGNINYAD SVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNM YNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR FTTHAMGWFRQAPGKEREFEVSAINWGGRTTYADSVKGRFTISRDNKNTV YLQMNSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGRFTSLILAMAWWRQAPGKEREFEVSAINWGGRTTY ADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGT VTVSS	10
CD16F1-L1-hHS5-L1- hA09-10-3-L3-hA09- 10-4-L1-hPL16-L3- hPL16 (1518-HS5-GS15) (配列番号 184)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAI TSGVRTDYADSVKGRFTISRDNRAKRAVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLYNT GNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGR FTTHAMGWFRQAPGKEREFEVSAINWGGRTTYADSVKGRFTISRDTGANTL YLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGG GGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRFTFSNYALGWFRQAP GKEREFEVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTVYLQMNSLRAEDTA VYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGGGRFTFSNYALGWFRQAPGKEREFEVAAISRSGGNINYAD SVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNM YNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR FTYMSWVRQAPGKEREFEVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAKRSSEFDYWGQGTQVTVSSAAAEVQ LVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGFTLYMSWVRQAPGKEREFEVSSINWS GYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAA KRSSEFDYWGQGTQVTVSS	20
hCD16F1-1-L1-hHS5- L4-hA09-10-45-L1- hPL16-L3-hPL-16 (配列番号 185)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAI TSGVRTYYADSVKGRFTISRDNRAKRAVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLYNT GNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGR FTTHAMGWFRQAPGKEREFEVSAINWGGRTTYADSVKGRFTISRDTGANTL YLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGG GGSGGGSEVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGGGRFTFSNYAMGWFRQAP GKEREFEVSAISRSGGNIIYADSVKGRFTISRDNFKNTVYLQMNSLRAEDTA VYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGVVR PGGSLRLSCAASGGGRFTFSNYAMGWFRQAPGKEREFEVSAISRSGGNIIYAD SVKGRFTISRDNFKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNM YNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGR FTYMSWVRQAPGKEREFEVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAKRSSEFDYWGQGTQVTVSSAAAEVQ LVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGFTLYMSWVRQAPGKEREFEVSSINWS	30

10

20

30

40

【表 17-11】

	GYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAAARTAI AA KRSSEFDYWGQGTQVT VSS
hCD16F1-2- <u>L1</u> -hHS5- <u>L4</u> -hA09-10-45- <u>L1</u> - hPL16- <u>L3</u> -hPL-16 (配列番号 186)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVS AI TSGVRTYYADSVKGRFTISRDN AKRAVYLQMS SLRAEDTAVYYC NVNLYNT GNYWGQGTQVT VSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGRT FTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFIISRDTGANTL YLQMN SLRAEDTAVYYCASNLD TYNVRAGTTNSWGQGTQVT VSSGGGGSGG GGSGGGGSEVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAP GKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDNFKNTVYLQMS SLRAEDTA VYYCAAHYLLLP SYISTSTNM NYWGQGTQVT VSSAAAQVQLVESGGGVVR PGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYAD SVKGRFTISRDNFKNTTYLQMS SLRAEDTAVYYCAAHYLLLP SYISTSTNM YNYWGQGTQVT VSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGT FLTYSMSWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTL YLQMN SLRAEDTAVYYCAAARTAI AAKRSSEFDYWGQGTQVT VSSAAAEVQ LVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMSWVRQAPGKEREFVSSINWS GYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAAARTAI AA KRSSEFDYWGQGTQVT VSS
hCD16F1-1- <u>L1</u> -hHS5- <u>L4</u> -hA09-10-55- <u>L1</u> - hPL16- <u>L3</u> -hPL16 (配列番号 187)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVS AI TSGVRTYYADSVKGRFTISRDN AKRAVYLQMS SLEPEDTAVYYC NVNLYNT GNYWGQGTQVT VSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGRT FTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFIISRDTGANTL YLQMN SLRAEDTAVYYCASNLD TYNVRAGTTNSWGQGTQVT VSSGGGGSGG GGSGGGGSEVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAP GKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMS SLEPEDTA VYYCAAHYLLLP SYISTSTNM NYWGQGTQVT VSSAAAQVQLVESGGGVVR PGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMS SLEPEDTAVYYCAAHYLLLP SYISTSTNM YNYWGQGTQVT VSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGT FLTYSMSWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTL YLQMN SLRAEDTAVYYCAAARTAI AAKRSSEFDYWGQGTQVT VSSAAAEVQ LVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMSWVRQAPGKEREFVSSINWS GYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAAARTAI AA KRSSEFDYWGQGTQVT VSS
hCD16F1-2- <u>L1</u> -hHS5- <u>L4</u> -hA09-10-55- <u>L1</u> - hPL16- <u>L3</u> -hPI-16 (配列番号 188)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVS AI TSGVRTYYADSVKGRFTISRDN AKRAVYLQMS SLRAEDTAVYYC NVNLYNT GNYWGQGTQVT VSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGRT FTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFIISRDTGANTL YLQMN SLRAEDTAVYYCASNLD TYNVRAGTTNSWGQGTQVT VSSGGGGSGG GGSGGGGSEVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAP GKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMS SLEPEDTA VYYCAAHYLLLP SYISTSTNM NYWGQGTQVT VSSAAAQVQLVESGGGVVR PGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMS SLEPEDTAVYYCAAHYLLLP SYISTSTNM YNYWGQGTQVT VSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGT FLTYSMSWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTL YLQMN SLRAEDTAVYYCAAARTAI AAKRSSEFDYWGQGTQVT VSSAAAEVQ LVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMSWVRQAPGKEREFVSSINWS GYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAAARTAI AA KRSSEFDYWGQGTQVT VSS
hCD16F1-1- <u>L1</u> -hHS5- <u>L4</u> -hA09-10-66- <u>L1</u> - hPL16- <u>L3</u> -hPL-16 (配列番号 189)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVS AI TSGVRTYYADSVKGRFTISRDN AKRAVYLQMS SLKPEDTAVYYC NVNLYNT GNYWGQGTQVT VSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGRT FTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFIISRDTGANTL YLQMN SLRAEDTAVYYCASNLD TYNVRAGTTNSWGQGTQVT VSSGGGGSGG

10

20

30

40

【表 17-12】

	GGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAP GKEREFSVSAISRSGGNIDYADSVKGRFTISRDNFKNTVYLQMSLRAEDTA VYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAAQVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFSVSAISRSGGNIYAD SVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNM YNYWGQGTQVTVSSGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGT FLTYSMSWVRQAPGKEREFSVINWGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMSLRAEDTAVYYCAAARTAAAKRSSEFDYWGQGTQVTVSSAAAEVQ LVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMSWVRQAPGKEREFSVINW GYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAAARTAA KRSSEFDYWGQGTQVTVSS
hCD16F1-2- <u>L1</u> -hHS5- <u>L4</u> -hA09-10-66- <u>L1</u> - hPL16- <u>L3</u> -hPL-16 (配列番号 190)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVAI TSGVRTYYADSVKGRFTISRDNKRAVYLQMSLRAEDTAVYYCNVNLNT GNYWGQGTQVTVSSGGGGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRT FTTHAMGWFRQAPGKEREFSVINWGGRTYYADSVKGRFTISRDTGANTL YLQMSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGGG GGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAP GKEREFSVSAISRSGGNIDYADSVKGRFTISRDNFKNTVYLQMSLRAEDTA VYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAAQVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFSVSAISRSGGNIYAD SVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNM YNYWGQGTQVTVSSGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGT FLTYSMSWVRQAPGKEREFSVINWGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMSLRAEDTAVYYCAAARTAAAKRSSEFDYWGQGTQVTVSSAAAEVQ LVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMSWVRQAPGKEREFSVINW GYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAAARTAA KRSSEFDYWGQGTQVTVSS
hCD16F1-1- <u>L1</u> -hHS5- <u>L4</u> -hA09-10-77- <u>L1</u> - hPL16- <u>L3</u> -hPL-16 (配列番号 191)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVAI TSGVRTYYADSVKGRFTISRDNKRAVYLQMSLLEPEDTAVYYCNVNLNT GNYWGQGTQVTVSSGGGGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRT FTTHAMGWFRQAPGKEREFSVINWGGRTYYADSVKGRFTISRDTGANTL YLQMSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGGG GGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAP GKEREFSVSAISRSGGNIDYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLKPETA VYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAAQVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFSVSAISRSGGNIDYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLKPETA VYYCAAHYLLPSYISTSTNM YNYWGQGTQVTVSSGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGT FLTYSMSWVRQAPGKEREFSVINWGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMSLRAEDTAVYYCAAARTAAAKRSSEFDYWGQGTQVTVSSAAAEVQ LVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMSWVRQAPGKEREFSVINW GYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAAARTAA KRSSEFDYWGQGTQVTVSS
hCD16F1-2- <u>L1</u> -hHS5- <u>L4</u> -hA09-10-77- <u>L1</u> - hPL16- <u>L3</u> -hPL-16 (配列番号 192)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVAI TSGVRTYYADSVKGRFTISRDNKRAVYLQMSLRAEDTAVYYCNVNLNT GNYWGQGTQVTVSSGGGGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRT FTTHAMGWFRQAPGKEREFSVINWGGRTYYADSVKGRFTISRDTGANTL YLQMSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGGG GGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAP GKEREFSVSAISRSGGNIDYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLKPETA VYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAAQVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFSVSAISRSGGNIDYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLKPETA VYYCAAHYLLPSYISTSTNM YNYWGQGTQVTVSSGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGT FLTYSMSWVRQAPGKEREFSVINWGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTL

10

20

30

40

【表 17-13】

	YLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAIAAKRSSEFDYWGQGTQVTVSSAAAEVQ LVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMSWVRQAPGKEREFFVSSINWS GYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAIAA KRSSEFDYWGQGTQVTVSS
hCD16F1-1- <u>L1</u> -hHS5- <u>L4</u> -hA09-10-88- <u>L1</u> - hPL16- <u>L3</u> -hPL-16 (配列番号 193)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVS TSQVRYTYYADSVKGRFTISRDN AKRAVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNT GNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRT FTTHAMGWFRQAPGKEREFFVSAINWGGRTYYADSVKGRFIISRDTGANTL YLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGG GGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAP GKEREFFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSSLKPEDTA VYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFFVSAISRSGGNIYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNM YNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGT FLTYSMSWVRQAPGKEREFFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAIAAKRSSEFDYWGQGTQVTVSSAAAEVQ LVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMSWVRQAPGKEREFFVSSINWS GYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAIAA KRSSEFDYWGQGTQVTVSS
hCD16F1-2- <u>L1</u> -hHS5- <u>L4</u> -hA09-10-88- <u>L1</u> - hPL16- <u>L3</u> -hPL-16 (配列番号 194)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVS TSQVRYTYYADSVKGRFTISRDN AKRAVYLQMNSLRAEDTAVYYCNVNLNT GNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRT FTTHAMGWFRQAPGKEREFFVSAINWGGRTYYADSVKGRFIISRDTGANTL YLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGG GGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAP GKEREFFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSSLKPEDTA VYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFFVSAISRSGGNIYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNM YNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGT FLTYSMSWVRQAPGKEREFFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAIAAKRSSEFDYWGQGTQVTVSSAAAEVQ LVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMSWVRQAPGKEREFFVSSINWS GYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAIAA KRSSEFDYWGQGTQVTVSS
hCD16F1-1- <u>L1</u> -hHS5- <u>L4</u> -hA09-10-99- <u>L1</u> - hPL16- <u>L3</u> -hPL-16 (配列番号 195)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVS TSQVRYTYYADSVKGRFTISRDN AKRAVYLQMNLEPEDTAVYYCNVNLNT GNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRT FTTHAMGWFRQAPGKEREFFVSAINWGGRTYYADSVKGRFIISRDTGANTL YLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGG GGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAP GKEREFFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSSLKPEDTA VYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAPGKEREFFVSAISRSGGNIYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNM YNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGT FLTYSMSWVRQAPGKEREFFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAIAAKRSSEFDYWGQGTQVTVSSAAAEVQ LVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMSWVRQAPGKEREFFVSSINWS GYMTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAIAA KRSSEFDYWGQGTQVTVSS
hCD16F1-2- <u>L1</u> -hHS5- <u>L4</u> -hA09-10-99- <u>L1</u> - hPL16- <u>L3</u> -hPL-16	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVS TSQVRYTYYADSVKGRFTISRDN AKRAVYLQMNSLRAEDTAVYYCNVNLNT GNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRT

10

20

30

40

50

【表 17-14】

(配列番号 196)	FTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFIIISRDGTANTL YLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGG GGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAP GKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLKPEDTA VYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAAQVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNM YNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGT FLTYSMSWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAIAAKRSSEFDYWQGTQVTVSSAAAEVQ LVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMSWVRQAPGKEREFVSSINWS GYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAIAA KRSSEFDYWQGTQVTVSS
hCD16F1-1-L1-hHS5- L4-hA09-10-100-L1- hPL16-L3-hPL-16 (配列番号 197)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVS TSQVTRTYADSVKGRFTISRDNKRAVYLQMNLEPEDTAVYYCNVNLNT GNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRT FTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFIIISRDGTANTL YLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGG GGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAP GKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLRAEDTA VYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAAQVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNM YNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGT FLTYSMSWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAIAAKRSSEFDYWQGTQVTVSSAAAEVQ LVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMSWVRQAPGKEREFVSSINWS GYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAIAA KRSSEFDYWQGTQVTVSS
hCD16F1-2-L1-hHS5- L4-hA09-10-100-L1- hPL16-L3-hPL-16 (配列番号 198)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVS TSQVTRTYADSVKGRFTISRDNKRAVYLQMNSLRAEDTAVYYCNVNLNT GNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRT FTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFIIISRDGTANTL YLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGG GGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAP GKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLRAEDTA VYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAAQVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNM YNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGT FLTYSMSWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAIAAKRSSEFDYWQGTQVTVSSAAAEVQ LVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMSWVRQAPGKEREFVSSINWS GYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAAIAA KRSSEFDYWQGTQVTVSS
CD16F1-L1-hHS5-L4- hA09-10-L3-hA09-10- L1-H33-14-L3-H33-14 (3321-HS5-GS15) (配列番号 199)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVA TSQVTRTDYADSVKGRFTISRDNKRAVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNT GNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRT FTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFIIISRDGTANTL YLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGG GGSGGGSEVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAP GKEREFVAAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDNFKNTVYLQMSLRAEDTA VYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAAQVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNIYYAD SVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNM

10

20

30

40

50

【表 17 - 15】

	YNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWNNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTTLVTVSS	
hCD16F1-1- <u>L1</u> -hHS5- <u>L4</u> -hA09-10-3- <u>L3</u> -hA09-10-4- <u>L1</u> -H33-14- <u>L3</u> -H33-14 (配列番号 200)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVSATSGVRTYYADSVKGRFTISRDNKRAVYLMSSLEPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFII SRDTGANTLYLQMSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGSGGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCAAHYLLLP SYISTSTNM YNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWNNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTTLVTVSS	10
hCD16F1-2- <u>L1</u> -hHS5- <u>L4</u> -hA09-10-3- <u>L3</u> -hA09-10-4- <u>L1</u> -H33-14- <u>L3</u> -H33-14 (配列番号 201)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVSATSGVRTYYADSVKGRFTISRDNKRAVYLMSSLRAEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFII SRDTGANTLYLQMSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGSGGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCAAHYLLLP SYISTSTNM YNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWNNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTTLVTVSS	20
hCD16F1-1- <u>L1</u> -hHS5- <u>L4</u> -hA09-10-45- <u>L1</u> -H33-14- <u>L3</u> -H33-14 (配列番号 202)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVSATSGVRTYYADSVKGRFTISRDNKRAVYLMSSLEPEDTAVYYCNVNLNTGNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFII SRDTGANTLYLQMSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGSGGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGNIYYADSVKGRFTISRDNFKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCAAHYLLLP SYISTSTNM YNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWNNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSGGGSGGGGGSGGGSEVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGNIYYADSVKGRFTISRDNFKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCAAHYLLLP SYISTSTNM YNYWGQGTQVTVSSGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWNNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSS	30

10

20

30

40

50

【表 17-16】

hCD16F1-2- <u>L1</u> -hHS5- <u>L4</u> -hA09-10-45- <u>L1</u> - H33-14- <u>L3</u> -H33-14 (配列番号 203)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVSAI TSGVRTYYADSVKGRFTISRDNKRAVYLQMSSLRAEDTAVYYCNVNLNT GNYWGQGTQVTVSSGGGGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRT FTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFTISRDTGANTL YLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGGGG GGGGGGSEVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAP GKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDNFKNTVYLQMSSLRAEDTA VYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAAQVQLVESGGGVVR PGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYAD SVKGRFTISRDNFKNTTYLQMSSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNM YNYWGQGTQVTVSSGGGGGGGQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRT SLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTV YLQMSSLRAEDTAVYYCEADLIGSRGWGQGTQVTVSSAAAQVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWNNDMTRYSD SVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCEADLIGSRGWGQGTQ VTVSS	10
hCD16F1-1- <u>L1</u> -hHS5- <u>L4</u> -hA09-10-55- <u>L1</u> - H33-14- <u>L3</u> -H33-14 (配列番号 204)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVSAI TSGVRTYYADSVKGRFTISRDNKRAVYLQMSSLEPEDTAVYYCNVNLNT GNYWGQGTQVTVSSGGGGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRT FTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFTISRDTGANTL YLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGGGG GGGGGGSEVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAP GKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLEPEDTA VYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAAQVQLVESGGGVVR PGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNM YNYWGQGTQVTVSSGGGGGGGQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRT SLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTV YLQMSSLRAEDTAVYYCEADLIGSRGWGQGTQVTVSSAAAQVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWNNDMTRYSD SVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCEADLIGSRGWGQGTQ VTVSS	20
hCD16F1-2- <u>L1</u> -hHS5- <u>L4</u> -hA09-10-55- <u>L1</u> - H33-14- <u>L3</u> -H33-14 (配列番号 205)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVSAI TSGVRTYYADSVKGRFTISRDNKRAVYLQMSSLRAEDTAVYYCNVNLNT GNYWGQGTQVTVSSGGGGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRT FTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFTISRDTGANTL YLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGGGG GGGGGGSEVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAP GKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLEPEDTA VYYCAAHYLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAAQVQLVESGGGVVR PGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLEPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNM YNYWGQGTQVTVSSGGGGGGGQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRT SLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTV YLQMSSLRAEDTAVYYCEADLIGSRGWGQGTQVTVSSAAAQVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWNNDMTRYSD SVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCEADLIGSRGWGQGTQ VTVSS	30
hCD16F1-1- <u>L1</u> -hHS5- <u>L4</u> -hA09-10-77- <u>L1</u> - H33-14- <u>L3</u> -H33-14 (配列番号 206)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVSAI TSGVRTYYADSVKGRFTISRDNKRAVYLQMSSLEPEDTAVYYCNVNLNT GNYWGQGTQVTVSSGGGGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRT FTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFTISRDTGANTL YLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGGGG GGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAP GKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLEPEDTA	40

10

20

30

40

50

【表 17 - 17】

	VYYCAAHYLLLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAAQVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIDYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLKPEDTAVYYCAAHYLLLLPSYISTSTNM YNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRT SLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTV YLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSAAAQVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSD SVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQ VTVSS	
hCD16F1-2- <u>L1</u> -hHS5- <u>L4</u> -hA09-10-77- <u>L1</u> - H33-14- <u>L3</u> -H33-14 (配列番号 207)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVSAI TSGVRTYYADSVKGRFTISRDNKRAVYLLQMSLRAEDTAVYYCNVNLYNT GNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRT FTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFIISRDTGANTL YLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGG GGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAP GKEREFVSAISRSGGNIDYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLKPEDTA VYYCAAHYLLLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAAQVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIDYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLKPEDTAVYYCAAHYLLLLPSYISTSTNM YNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRT SLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTV YLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSAAAQVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSD SVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQ VTVSS	10
hCD16F1-1- <u>L1</u> -hHS5- <u>L1</u> -hA09-10-66- <u>L1</u> - H33-14- <u>L3</u> -H33-14 (配列番号 208)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVSAI TSGVRTYYADSVKGRFTISRDNKRAVYLLQMSLKPEDTAVYYCNVNLYNT GNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRT FTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFIISRDTGANTL YLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGG GGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAP GKEREFVSAISRSGGNIDYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTA VYYCAAHYLLLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAAQVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYAD SVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCAAHYLLLLPSYISTSTNM YNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRT SLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTV YLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSAAAQVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSD SVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQ VTVSS	20
hCD16F1-2- <u>L1</u> -hHS5- <u>L4</u> -hA09-10-66- <u>L1</u> - H33-14- <u>L3</u> -H33-14 (配列番号 209)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVSAI TSGVRTYYADSVKGRFTISRDNKRAVYLLQMSLRAEDTAVYYCNVNLYNT GNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRT FTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFIISRDTGANTL YLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGG GGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAP GKEREFVSAISRSGGNIDYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTA VYYCAAHYLLLLPSYISTSTNMNYWGQGTQVTVSSAAAQVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYAD SVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCAAHYLLLLPSYISTSTNM YNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRT SLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTV YLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSAAAQVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSD SVKGRFTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQ VTVSS	30
		40

【表 17 - 18】

	DSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQ VTVSS
hCD16F1-1-L1-hHS5- L4-hA09-10-88-L1- H33-14-L3-H33-14 (配列番号 210)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVS TSGVRTYYADSVKGRFTISRDNKRAVYLMNSLKPEDTAVYYCNVNLNT GNYWGQGTQVTVSSGGGGGGGSEVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGRT FTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTYYADSVKGRFIISRDTGANTL YLMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGGGG GGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAP GKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLMSSLKPEDTA VYYCAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLMSSLKPEDTAVYYCAHYLLPSYISTSTNM YNYWGQGTQVTVSSGGGGGGGSGVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRT SLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTV YLMSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWNNDMTRYSD SVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQ VTVSS
hCD16F1-2-L1-hHS5- L4-hA09-10-88-L1- H33-14-L3-H33-14 (配列番号 211)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVS TSGVRTYYADSVKGRFTISRDNKRAVYLMNSLRAEDTAVYYCNVNLNT GNYWGQGTQVTVSSGGGGGGGSEVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGRT FTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTYYADSVKGRFIISRDTGANTL YLMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGGGG GGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAP GKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLMSSLKPEDTA VYYCAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLMSSLKPEDTAVYYCAHYLLPSYISTSTNM YNYWGQGTQVTVSSGGGGGGGSGVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRT SLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTV YLMSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWNNDMTRYSD SVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQ VTVSS
hCD16F1-1-L1-hHS5- L4-hA09-10-99-L1- H33-14-L3-H33-14 (配列番号 212)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVS TSGVRTYYADSVKGRFTISRDNKRAVYLMNSLEPEDTAVYYCNVNLNT GNYWGQGTQVTVSSGGGGGGGSEVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGRT FTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTYYADSVKGRFIISRDTGANTL YLMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGGGG GGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAP GKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLMSSLKPEDTA VYYCAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLMSSLKPEDTAVYYCAHYLLPSYISTSTNM YNYWGQGTQVTVSSGGGGGGGSGVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRT SLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTV YLMSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSAAQVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWNNDMTRYSD SVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQ VTVSS
hCD16F1-2-L1-hHS5- L4-hA09-10-99-L1- H33-14-L3-H33-14 (配列番号 213)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVS TSGVRTYYADSVKGRFTISRDNKRAVYLMNSLRAEDTAVYYCNVNLNT GNYWGQGTQVTVSSGGGGGGGSEVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGRT FTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTYYADSVKGRFIISRDTGANTL YLMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGGGG

10

20

30

40

50

【表 17 - 19】

	GGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAP GKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKPEDTA VYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSAAAQVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKPEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNM YNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRT SLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWNNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTV YLQMSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSAAAQVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWNNNDMTRYSD SVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQ VTVSS	
hCD16F1-1-L1-hHS5- L4-hA09-10-100-L1- H33-14-L3-H33-14 (配列番号 214)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVAI TSGVRTYYADSVKGRFTISRDNKRAVYLQMNSLEPEDTAVYYCNVNLYNT GNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRT FTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFTISRDTGANTL YLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGG GGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAP GKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRAEDTA VYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSAAAQVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNM YNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRT SLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWNNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTV YLQMSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSAAAQVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWNNNDMTRYSD SVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQ VTVSS	10
hCD16F1-2-L1-hHS5- L4-hA09-10-100-L1- H33-14-L3-H33-14 (配列番号 215)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMSWVRQAPGKQRELVAI TSGVRTYYADSVKGRFTISRDNKRAVYLQMNSLRAEDTAVYYCNVNLYNT GNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRT FTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFTISRDTGANTL YLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGG GGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAP GKEREFVSAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRAEDTA VYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSAAAQVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGGGRTFSNYAMGWFRQAPGKEREFVSAISRSGGNIYYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTSTNM YNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRT SLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWNNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNTV YLQMSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSAAAQVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWNNNDMTRYSD SVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQ VTVSS	20
CD16F1-L1-hHS10-L4- hA09-10-3-L3-hA09- 10-4-L1-H33-14-L3- H33-14 (3321-GS15) (配列番号 216)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAI TSGVRTDYADSVKGRFTISRDNKRAVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLYNT GNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRT DSAYRMGWFRQAPGKEREFVSAINWSDGRTTYADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAADPDSRLYYTVPQNYDYWGQGTQVTVSSGGGG GGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQ APGKEREFVAAISRSGGNIYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLRAED TAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSSAAAQVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNIYY ADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTST NMYNYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG RTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWNNNDMTRYSDSVKGRFTISRDNKNT	30

【表 17 - 20】

	TVYLQMSSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQGTTLVTVSS <u>AAAQVQLVESG</u> GGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNDMTR YSDSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQG TLVTVSS
CD16F1- <u>L1</u> -hHS10- <u>L4</u> - hA09-10-3- <u>L3</u> -hA09- 10-4- <u>L1</u> -hPL16- <u>L3</u> - hPL16 (1518-GS15) (配列番号 217)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGSLFSARVMGWYRQAPGKQRELVAAI TSGVRTDYADSVKGRFTISRDNKRAVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVNLNT GNYWGQGTQVTVSS <u>GGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGST</u> DSAYRMGWFRQAPGKEREFVSAINWSDGRITYYADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAADPDSRLYYTVPQNYDYWGQGTTLVTVSS <u>GGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQ</u> APGKEREFVAAISRSGGNINYADSVKGRFTISRDNFKNTVYLQMSSSLRAED TAVYYCAAHYLLPSYISTSTNMYNYWGQGTQVTVSS <u>AAAQVQLVESGGGL</u> VQPGGSLRLSCAASGGGRTFSNYALGWFRQAPGKEREFVAAISRSGGNINY ADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMSSSLRAEDTAVYYCAAHYLLPSYISTST NMYNYWGQGTQVTVSS <u>GGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG</u> GTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSINWSGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAI AAKRSSEFDYWGQGTQVTVSS <u>AAAE</u> VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFLTYSMWVRQAPGKEREFVSSIN WSGYMTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAARTAI AAKRSSEFDYWGQGTQVTVSS

10

【0310】

実施例 8 と同様に多重特異性分子の Octet（登録商標）結合解析を実施し、結果を
図 17 および 18 に示す。

20

【0311】

(実施例 9)

(アルツハイマー病および網膜疾患の治療のための抗 CD33 ドメインを含む MVSC
A)

【0312】

30

40

50

【表 18】

抗 CD33 VHH を含む MVSCA*

hHS5- <u>L1</u> -H33-14- <u>L3</u> - H33-14** (配列番号 218)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFTTHAMGWFRQAPGKER EFVSAINWGGRTTYADSVKGRFIIISRD TGANTLYLQMNSLRAED TAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSQVQ LVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAG GRIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMSSLRAEDTAV YYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSAAAQVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSDS VKGRFTISRDN AKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWG QGTQVTVSSHHHHHH
FC5- <u>L1</u> -H33-14- <u>L3</u> - H33-14 (配列番号 219)	EVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAASGFKITHYTMGWFRQAPGKER EFVSRITWGGDNTFYNSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLKPED TADYYCAAGSTSTATPLRVDYWGKGTQVTVSSGGGGSGGGSQVQL VESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAG RIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMSSLRAEDTAVY YCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSAAAQVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSDSV KGRFTISRDN AKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQ GTQVTVSS
FC5- <u>L1</u> -H33-14- <u>L3</u> - H33-14- <u>L1</u> -hHS5 (配列番号 220)	EVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAASGFKITHYTMGWFRQAPGKER EFVSRITWGGDNTFYNSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLKPED TADYYCAAGSTSTATPLRVDYWGKGTQVTVSSGGGGSGGGSQVQL VESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAG RIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMSSLRAEDTAVY YCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSAAAQVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRYSDSV KGRFTISRDN AKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSRGWGQ GTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRT FTTHAMGWFRQAPGKEREFVSAINWGGRTTYADSVKGRFIIISRD TGANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNLDTYNVRAGTTNSWGQGTQ VTVSS
H33-14- <u>L3</u> -H3314 (配列番号 221)	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKER EFAGRIWWNNDMTRYSDSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMSSLRAED TAVYYCEADLIGGSRGWGQGTQVTVSSAAAQVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGRTSLILAMAWWRQAPGKEREFAGRIWWNNDMTRY SDSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMSSLRAEDTAVYYCEADLIGGSR GWGQGTQVTVSS

* VHH ドメイン間に挟まれたリンカー配列に下線を付す

** この配列は、任意に C 末端ヒスチジンタグを付けて示す

【0313】

表 18 の 4 つの MVSCA の各々は、リンカー L3 (配列 AAA ; 配列番号 102) により結合された抗 CD33 対を含む。表 18 の最初のもは、hHS5-L1-H33-14-L3-H33-14 であり、体内半減期を増加させるために N 末端抗 HSA ドメインを含む。表 18 の 2 番目のものは、FC5-L1-H33-14-L3-H33-14 であり、血液脳関門の通過を促進するために N 末端 FC5 ナノボディドメインを含む。表 18 の 3 番目のものは、FC5-L1-H33-14-L3-H33-14-L1-hHS5 であり、血液脳関門の通過を促進するために N 末端 FC5 ナノボディドメイン、および体内半減期を増加させるために C 末端抗 HSA ドメインを含む。これらの構成は、一般的に、全身投与、たとえば静脈内もしくは皮下注射、または注入に適している。表 18 の 4 番目のものは、H33-14-L3-H3314 であり、CD33 のみに対する特異性

を有する二価の一重特異性MVSCAである。このより小さいサイズにより、脳または眼への局所注射により適している。

【0314】

FC5ナノボディドメインのアミノ酸配列は、

EVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAASGFKITHYTMGWFRQ
APGKEREFVSRITWGGDNTFYSNSVKGRFTISRDNANKNTV
YLQMNSLKPEDTADYYCAAGSTSTATPLRV D Y W G K G T Q V T
VSS（配列番号222）である。

【0315】

（実施例10）

（複数配列のアライメント）

図21～26は、本明細書で開示されるVHH配列の各特異性についてのClustal O（1.2.4）による複数配列のアライメントであり、同一の、保存された、および高度可変位置を容易に確認することが可能である。アライメントの各位置の下には、記号が表示されており、アラインメントされた配列間で、アスタリスクは同一性を、コロンは保存性が高いことを、ピリオドは保存性が低いことを、スペースは保存性がほぼないことをそれぞれ示している。

【0316】

特に明記しない限り、明細書および特許請求の範囲で使用される成分量、分子量、反応条件などの量を表すすべての数字は、すべての事例において、「約」という用語によって加減されると理解されるべきである。本明細書で使用される場合、「約」および「およそ」という用語は、10～15%以内、好ましくは5～10%以内を意味する。したがって、反対に示されない限り、本明細書および添付する特許請求の範囲に示す数値パラメータは、本発明によって得られようとする所望の特性に応じて変動し得る近似値である。少なくとも、等価物としての適用を特許請求の範囲に限定しようとするものではなく、各数値パラメータは、報告された有効数字の数に照らして、通常の丸め手段を適用することによって、少なくとも解釈されるべきである。本発明の広い範囲を示す数値範囲およびパラメータは近似値であるにもかかわらず、特定の実施例で示す数値は、可能な限り正確に報告されている。ただし、いかなる数値にも、それぞれの試験測定で見られる標準偏差から必然的に生じる誤差が本質的に含まれている。

【0317】

本発明を説明する文脈で（特に以下の請求項の文脈で）使用される用語「a」、「an」、「the」、および類似の言及は、別段の記載がない限り、または文脈によって明らかに矛盾しない限り、単数形および複数形の両方をカバーすると解釈されるべきである。本明細書における値の範囲の列挙は、単に、範囲内に含まれるそれぞれの個別の値を個々に言及するための略記法として機能することを意図している。本明細書で別段の記載がない限り、個々の値は、本明細書で個々に列挙されているかのように、本明細書に組み込まれる。本明細書に記載されるすべての方法は、本明細書に別段の記載がない限り、または文脈によって明らかに矛盾しない限り、任意の適切な順序で実行することができる。本明細書で提供されるあらゆる全ての実施例、または例示的な言語（例えば、「のような」）の使用は、本発明をよりよく明らかにすることを意図しており、別途請求項に記載された発明の範囲を限定するものではない。本明細書中の記載は、本発明の実施に不可欠な、請求項以外の要素を示すものと解釈されるべきではない。

【0318】

本明細書に開示した本発明の代替要素または実施形態のグループ化は、限定として解釈されるべきではない。各グループの構成要素は、個別に、またはグループの他の構成要素または本明細書で見られる他の要素との任意の組み合わせで参照され、主張され得る。利便性や特許性の理由から、グループの1以上の構成要素が、グループに含まれるか、またはグループから削除されることが予想される。そのような包含または削除が発生した場合、本明細書は変更されたグループを含むものと見なされ、添付の特許請求の範囲で使用さ

10

20

30

40

50

れるマーカッシュグループのすべての記載を満たす。

【0319】

本明細書では、発明者が知る本発明を実施するための最良の形態を含む、本発明のいくつかの実施形態について説明する。もちろん、これらの説明された実施形態の変形は、前述の説明を読めば当業者に明らかであろう。発明者は、当業者がそのような変形を適切に使用することを期待し、発明者は、本明細書に具体的に記載した以外の方法で本発明を実施することを意図している。したがって、本発明は、適用される法律によって許可されるように、添付の特許請求の範囲に記載された主題の変更および同等物の一切を含む。さらに、考えうるあらゆる変形をした上述の要素の組み合わせは、本明細書に別段の記載がない限り、または文脈によって明らかに矛盾しない限り、本発明に含まれる。

10

【0320】

本明細書に開示された実施形態のいくつかは、「からなる」または「本質的にからなる」という文言の使用により、特許請求の範囲においてさらに限定され得る。請求項中で使用される場合、出願時のものであれ、補正によって追加されたものであれ、「からなる」という移行句は、請求項で指定されていない要素、ステップ、または成分を除外する。「から本質的になる」という移行句は、請求項の範囲を、特定の材料またはステップ、および基本的かつ新規の特徴（複数可）に実質的に影響しないものに限定する。そのようにクレームされた本発明の実施形態は、本明細書において本質的または明示的に記載され、可能になる。

【0321】

さらに、本明細書全体を通じて、多数の特許および印刷刊行物を参照している。上記の各引用文献および印刷刊行物は、その全体が、個別に本明細書に援用される。

20

【0322】

最後に、本明細書に開示された本発明の実施形態は、本発明の原理を例示するものであることを理解すべきである。採用され得る他の変更は、本発明の範囲内である。したがって、限定ではなく実施例として、本発明の代替構成を本明細書の教示に従って利用することができる。したがって、本発明は、示され、記載されたとおりに正確に限定されるものではない。

【0323】

（付記）

30

（付記1）

（a）CD47であって、VHHドメインは配列番号2～29または223の1つのアミノ酸配列を有する、CD47、

（b）PD-L1であって、VHHドメインは配列番号31～38の1つのアミノ酸配列を有する、PD-L1、

（c）ヒト血清アルブミン（HSA）であって、VHHドメインは配列番号40～48の1つのアミノ酸配列を有する、ヒト血清アルブミン（HSA）、

（d）CD33であって、VHHドメインは配列番号50～78の1つのアミノ酸配列を有する、CD33、

（e）LAG3であって、VHHドメインは配列番号80～93の1つのアミノ酸配列を有する、LAG3、または、

40

（f）CD16であって、VHHドメインは配列番号96～99の1つのアミノ酸配列を有する、CD16、

の1つに対する抗原結合特異性を有する、可変重鎖（VHH）ドメイン。

【0324】

（付記2）

付記1に記載のVHHドメインを含む、重鎖のみの抗体（HCAb）。

【0325】

（付記3）

第1の結合特異性を有する抗体結合ドメイン、および前記第1の結合特異性とは異なる

50

第 2 の結合特異性を有する第 2 の抗体結合ドメインを含む多重特異性抗体であって、

前記第 1 の結合特異性は、CD 47、PD-L1、HSA、CD33、LAG3、または CD16 に対する特異性を有し、

(a) 前記 CD 47 結合特異性は、配列番号 2～29 または 223 の 1 つのアミノ酸配列により表され、

(b) 前記 PD-L1 結合特異性は、配列番号 31～38 の 1 つのアミノ酸配列により表され、

(c) 前記 HSA 結合特異性は、配列番号 40～48 の 1 つのアミノ酸配列により表され、

(d) 前記 CD 33 結合特異性は、配列番号 50～78 の 1 つのアミノ酸配列により表され、

(e) 前記 LAG3 結合特異性は、配列番号 80～93 の 1 つのアミノ酸配列により表され、

(f) 前記 CD 16 結合特異性は、配列番号 96～99 の 1 つのアミノ酸配列により表される、

多重特異性抗体。

【0326】

(付記 4)

前記第 2 の抗体結合ドメインは、CD 47、PD-L1、HSA、CD33、LAG3、または CD16 に対する特異性を有し、

(a) 前記 CD 47 結合特異性は、配列番号 2～29 または 223 の 1 つのアミノ酸配列により表され、

(b) 前記 PD-L1 結合特異性は、配列番号 31～38 の 1 つのアミノ酸配列により表され、

(c) 前記 HSA 結合特異性は、配列番号 40～48 の 1 つのアミノ酸配列により表され、

(d) 前記 CD 33 結合特異性は、配列番号 50～78 の 1 つのアミノ酸配列により表され、

(e) 前記 LAG3 結合特異性は、配列番号 80～93 の 1 つのアミノ酸配列により表され、

(f) 前記 CD 16 結合特異性は、配列番号 96～99 の 1 つのアミノ酸配列により表される、

付記 3 に記載の多重特異性抗体。

【0327】

(付記 5)

1～5 つのさらなる抗体結合ドメインをさらに含む多重特異性抗体であって、

前記さらなる抗体結合ドメインの各々は、個別に CD 47、PD-L1、HSA、CD33、LAG3、または CD16 に対する特異性を有し、

(a) 前記 CD 47 結合特異性は、配列番号 2～29 または 223 の 1 つのアミノ酸配列により表され、

(b) 前記 PD-L1 結合特異性は、配列番号 31～38 の 1 つのアミノ酸配列により表され、

(c) 前記 HSA 結合特異性は、配列番号 40～48 の 1 つのアミノ酸配列により表され、

(d) 前記 CD 33 結合特異性は、配列番号 50～78 の 1 つのアミノ酸配列により表され、

(e) 前記 LAG3 結合特異性は、配列番号 80～93 の 1 つのアミノ酸配列により表され、

(f) 前記 CD 16 結合特異性は、配列番号 96～99 の 1 つのアミノ酸配列により表される、

付記 3 に記載の多重特異性抗体。

【0328】

(付記 6)

1～4つのさらなる抗体結合ドメインをさらに含む多重特異性抗体であって、

前記さらなる抗体結合ドメインの各々は、CD47、PD-L1、HSA、CD33、LAG3、またはCD16に対する特異性を有し、

(a) 前記CD47結合特異性は、配列番号2～29または223の1つのアミノ酸配列により表され、

(b) 前記PD-L1結合特異性は、配列番号31～38の1つのアミノ酸配列により表され、

(c) 前記HSA結合特異性は、配列番号40～48の1つのアミノ酸配列により表され、

(d) 前記CD33結合特異性は、配列番号50～78の1つのアミノ酸配列により表され、

(e) 前記LAG3結合特異性は、配列番号80～93の1つのアミノ酸配列により表され、

(f) 前記CD16結合特異性は、配列番号96～99の1つのアミノ酸配列により表される、

付記 4 に記載の多重特異性抗体。

【0329】

(付記 7)

多重特異性一本鎖抗体(MVSCA)である、付記3～6のいずれか1つに記載の多重特異性抗体。

【0330】

(付記 8)

リンカーL1(配列番号100)、リンカーL2(配列番号101)、またはリンカーL4(配列番号103)が、非同一の抗体結合ドメインの1つ以上のペアの間に挟まれている、付記3～7のいずれか1つに記載の多重特異性抗体。

【0331】

(付記 9)

同一の特異性を有する抗体結合ドメインの少なくとも1つのペアを含む、付記3～8のいずれか1つに記載の多重特異性抗体。

【0332】

(付記 10)

同一の特異性を有する抗体結合ドメインの前記少なくとも1つのペアは、互いに隣接し、かつそれらの間にリンカーL3(配列番号102)が挟まれている、付記9に記載の多重特異性抗体。

【0333】

(付記 11)

NまたはC末端に位置する、HSAに対する特異性を有する抗体結合ドメインであって、それに隣接する抗体結合ドメインとの間に切断可能なリンカーが挟まれている、抗体結合ドメイン含む、付記3～10のいずれか1つに記載の多重特異性抗体。

【0334】

(付記 12)

前記切断可能なリンカーは、L11*3(配列番号104)、L11*4(配列番号105)、L11*5(配列番号106)、L11*6(配列番号107)、L11*7(配列番号108)、L11*8(配列番号109)、L11*9(配列番号110)、L11*10(配列番号111)、L11*11(配列番号112)、L11*12(配列番号113)、L11*13(配列番号114)、L11*14(配列番号115)、L11*15(配列番号116)、L11*16(配列番号117)、L11*17(配列

10

20

30

40

50

番号 1 1 8)、または L 1 1 * 1 8 (配列番号 1 1 9) である、付記 1 1 に記載の多重特異性抗体。

【0 3 3 5】

(付記 1 3)

すべての前記抗体結合ドメインが V H H ドメインである、付記 3 ~ 1 2 のいずれか 1 つに記載の多重特異性抗体。

【0 3 3 6】

(付記 1 4)

H S A、C D 4 7、および P D - L 1 を認識する抗体結合ドメインを含む、付記 3 ~ 1 3 のいずれか 1 つに記載の多重特異性抗体。

10

【0 3 3 7】

(付記 1 5)

H S A、C D 4 7、および C D 3 3 を認識する抗体結合ドメインを含む、付記 3 ~ 1 3 のいずれか 1 つに記載の多重特異性抗体。

【0 3 3 8】

(付記 1 6)

H S A、L A G 3、および P D - L 1 を認識する抗体結合ドメインを含む、付記 3 ~ 1 3 のいずれか 1 つに記載の多重特異性抗体。

【0 3 3 9】

(付記 1 7)

H S A、L A G 3、および C D 3 3 を認識する抗体結合ドメインを含む、付記 3 ~ 1 3 のいずれか 1 つに記載の多重特異性抗体。

20

【0 3 4 0】

(付記 1 8)

C D 1 6、H S A、および P D - L 1 を認識する抗体結合ドメインを含む、付記 3 ~ 1 3 のいずれか 1 つに記載の多重特異性抗体。

【0 3 4 1】

(付記 1 9)

C D 1 6、H S A、および C D 3 3 を認識する抗体結合ドメインを含む、付記 3 ~ 1 3 のいずれか 1 つに記載の多重特異性抗体。

30

【0 3 4 2】

(付記 2 0)

C D 1 6、H S A、C D 4 7、および P D - L 1 を認識する抗体結合ドメインを含む、付記 3 ~ 1 3 のいずれか 1 つに記載の多重特異性抗体。

【0 3 4 3】

(付記 2 1)

C D 1 6、H S A、C D 4 7、および C D 3 3 を認識する抗体結合ドメインを含む、付記 3 ~ 1 3 のいずれか 1 つに記載の多重特異性抗体。

【0 3 4 4】

(付記 2 2)

C D 3 3 に対する特異性を有する抗体結合ドメインのペアを含む、多重特異性抗体。

40

【0 3 4 5】

(付記 2 3)

H S A、F C 5 ナノボディ (配列番号 2 2 2)、または両方に対する特異性を有する抗体結合ドメインをさらに含む、付記 2 2 に記載の多重特異性抗体。

【0 3 4 6】

(付記 2 4)

付記 1 に記載の V H H ドメイン、付記 2 に記載の H C A b、または付記 3 ~ 2 1 のいずれか 1 つに記載の多重特異性抗体を含む、医薬組成物。

【0 3 4 7】

50

(付記 2 5)

付記 2 4 に記載の医薬組成物を、治療を必要とする患者に投与することを含む、癌を治療する方法。

【 0 3 4 8 】

(付記 2 6)

付記 2 2 または 2 3 に記載の多重特異性抗体を含む、医薬組成物。

【 0 3 4 9 】

(付記 2 7)

付記 2 4 に記載の医薬組成物を、治療を必要とする患者に投与することを含む、アルツハイマー病または網膜疾患を治療する方法。

【 0 3 5 0 】

(付記 2 8)

前記網膜疾患は、乾燥型加齢黄斑変性である、付記 2 7 に記載の方法。

【 図 面 】

【 図 1 】

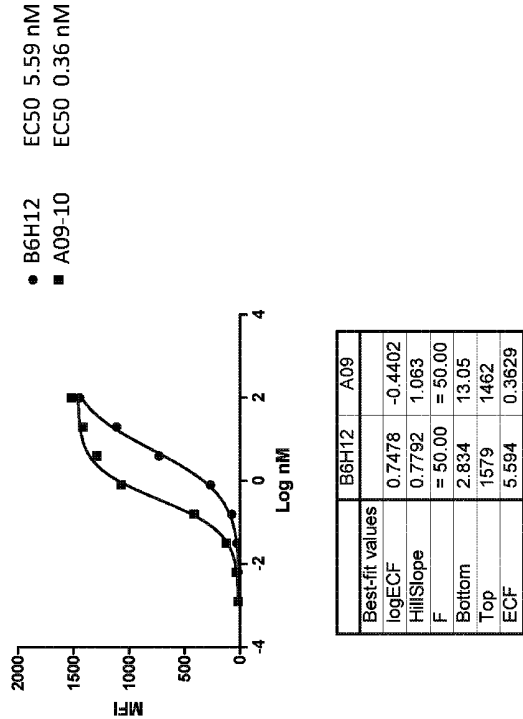


FIG. 1

【 図 2 】

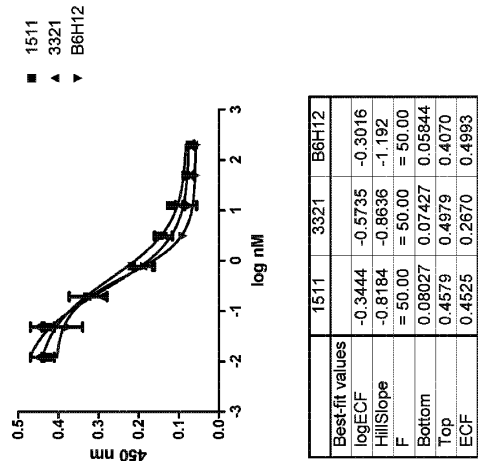


FIG. 2

10

20

30

40

50

【 図 3 】

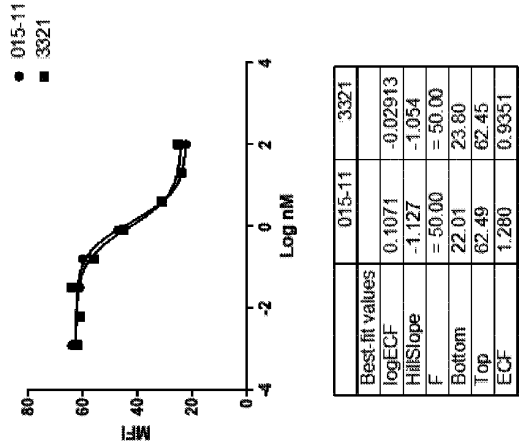


FIG. 3

【 図 4 A 】

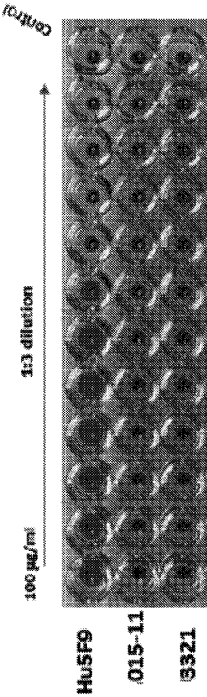


FIG. 4A

【 図 4 B 】

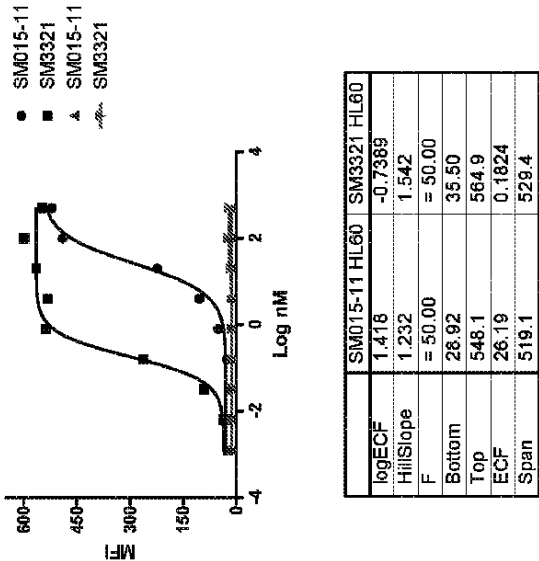


FIG. 4B

【 図 5 】

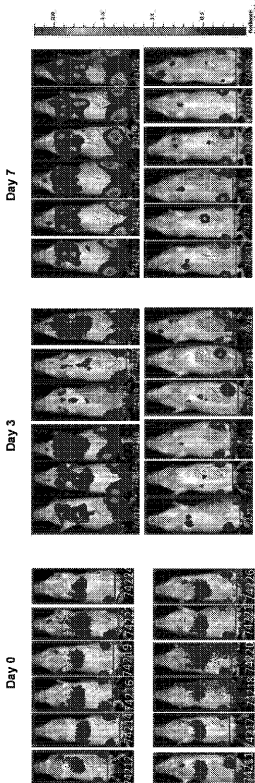


FIG. 5

10

20

30

40

50

【 図 6 】

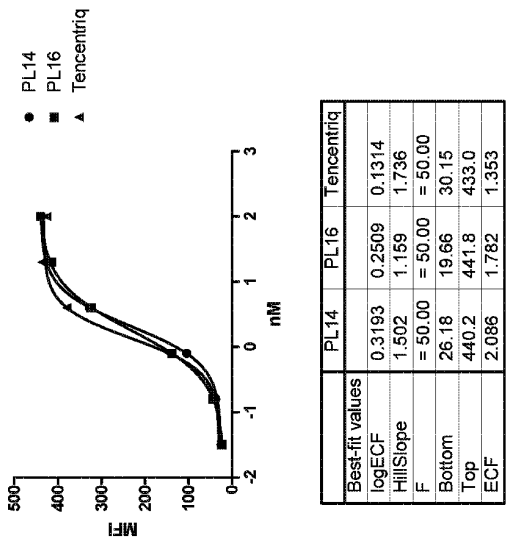


FIG. 6

【 図 7 】

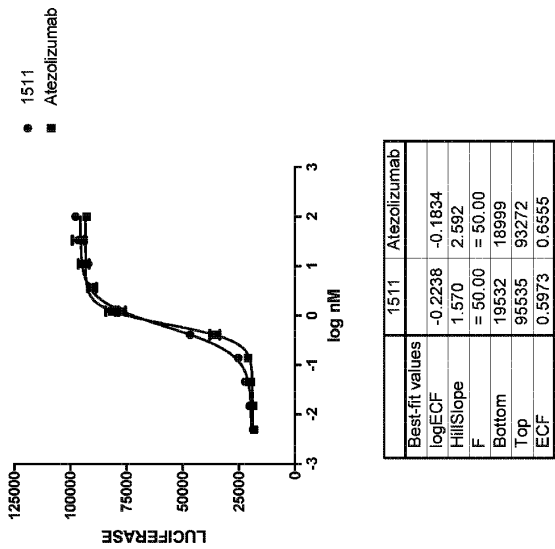


FIG. 7

【 図 8 A 】

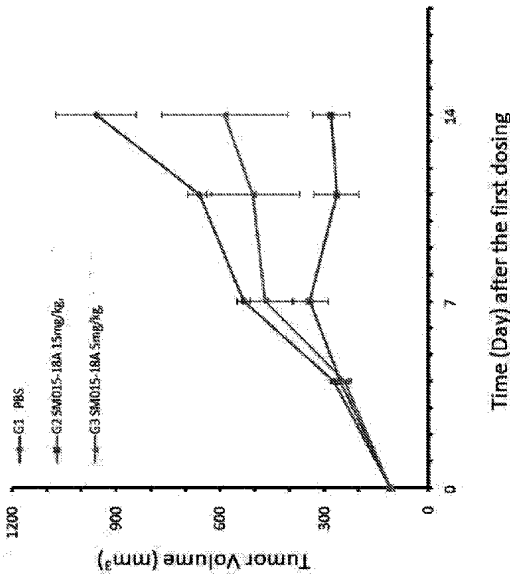


FIG. 8A

【 図 8 B 】

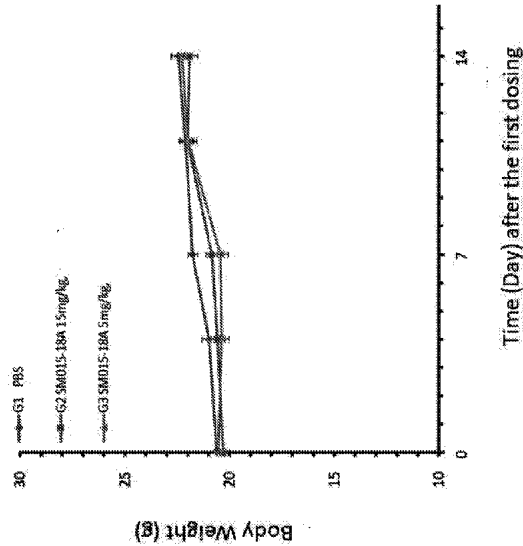


FIG. 8B

10

20

30

40

50

【図 9】

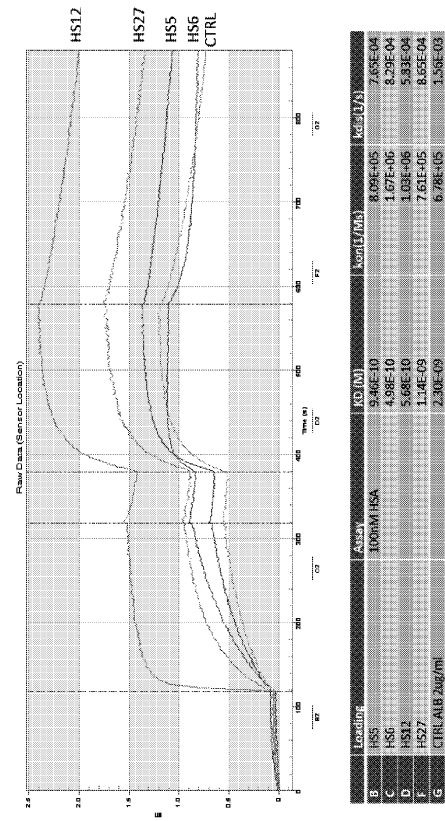


FIG. 9

【図 10 A】

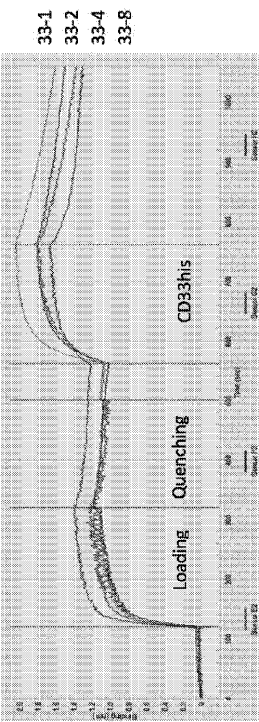


FIG. 10A

【図 10 B】

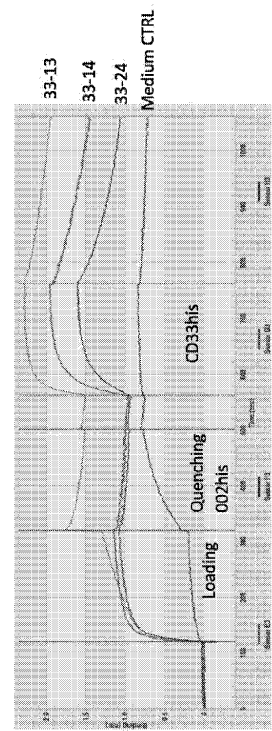


FIG. 10B

【図 11 A】

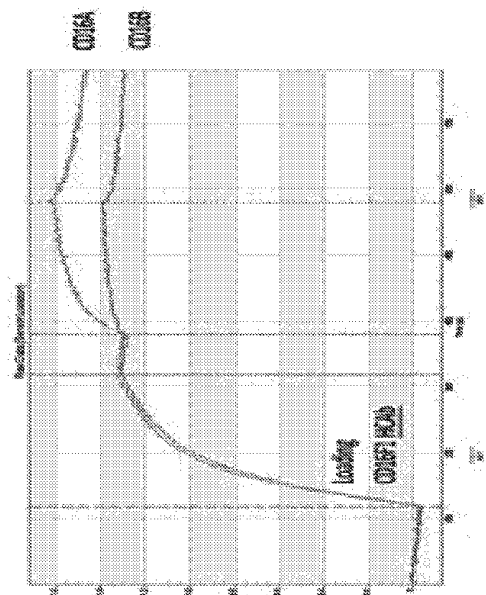


FIG. 11A

10

20

30

40

50

【 図 1 1 B 】

WO 2021/062361

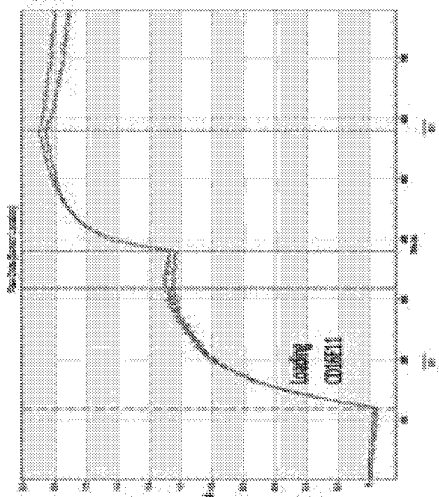


FIG. 11B

【 図 1 2 】

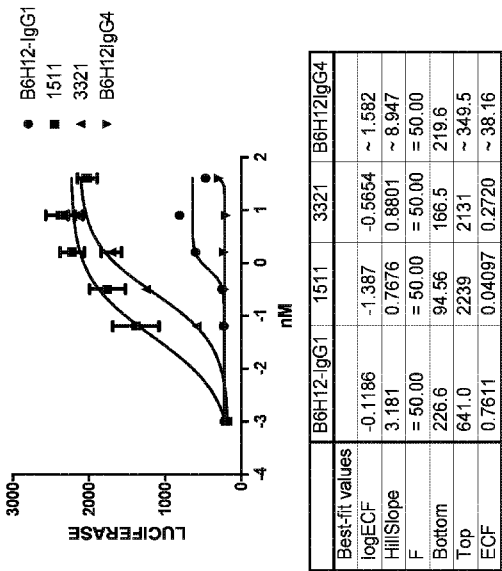


FIG. 12

【 図 1 3 A 】

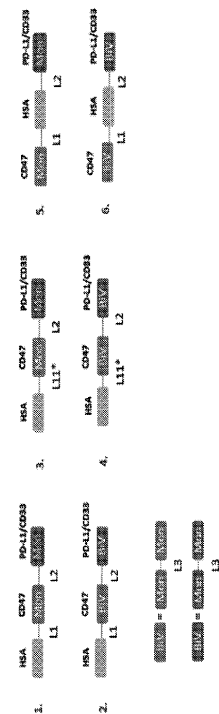


FIG. 13A

【 図 1 3 B 】

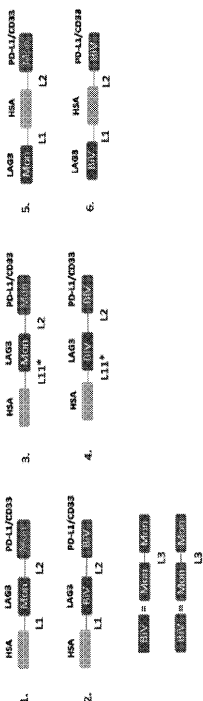


FIG. 13B

10

20

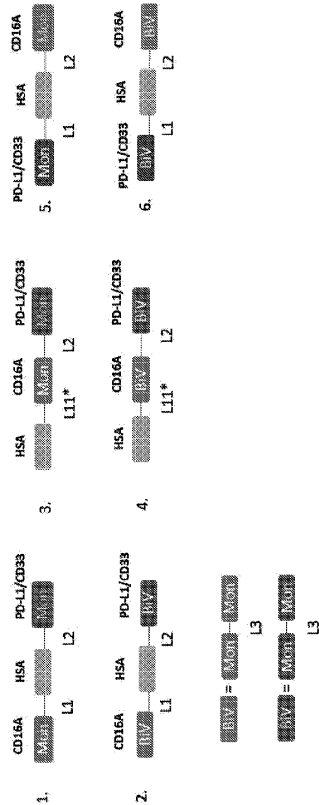
30

40

50

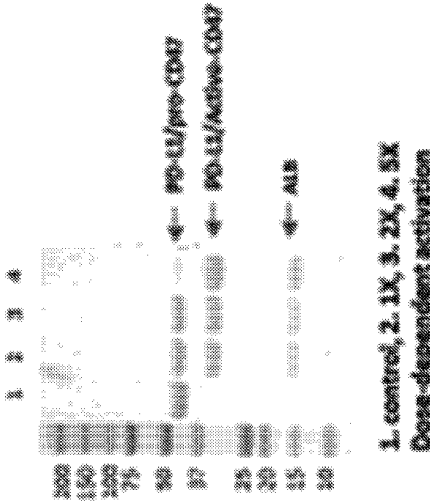
【 図 1 3 C 】

FIG. 13C



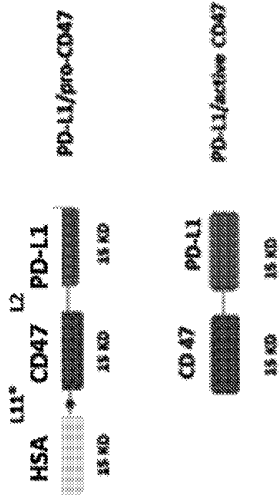
【 図 1 4 B 】

FIG. 14B



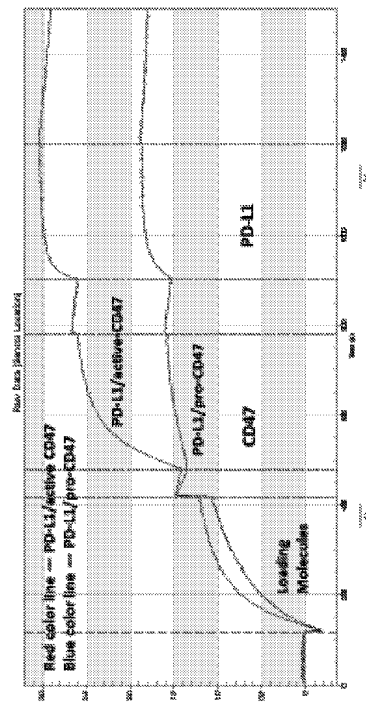
【 図 1 4 A 】

FIG. 14A



【 図 1 5 】

FIG. 15



【図 16】

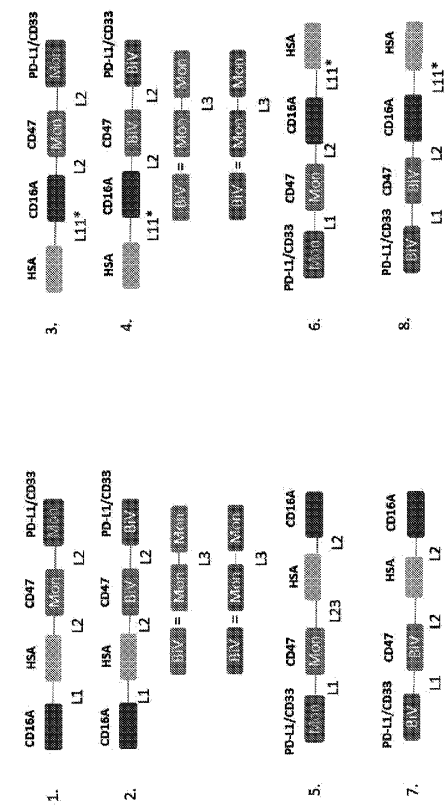


FIG. 16

【図 18】

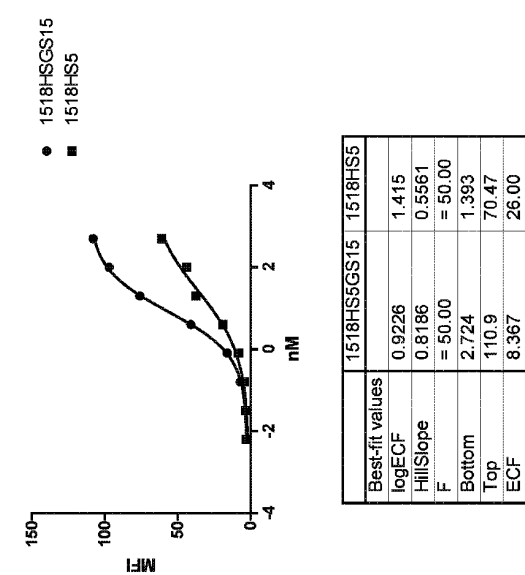


FIG. 18

【図 17】

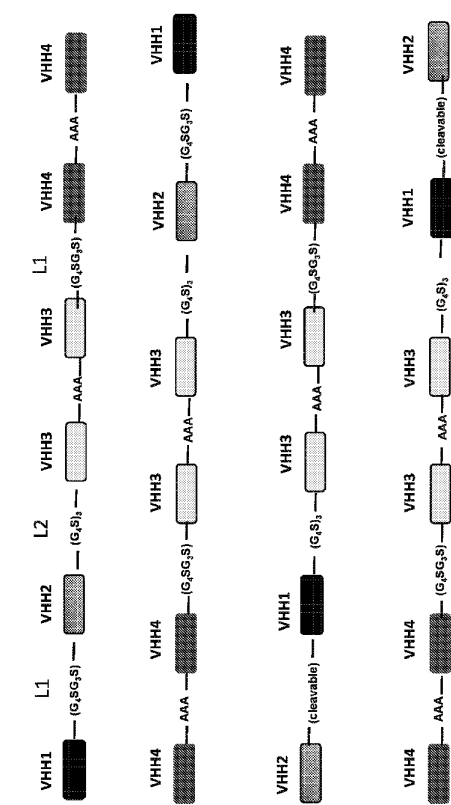


FIG. 17

【図 19】

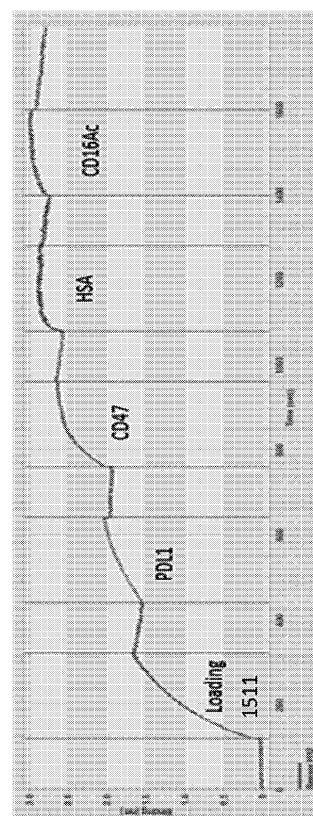


FIG. 19

10

20

30

40

50

【図 20】

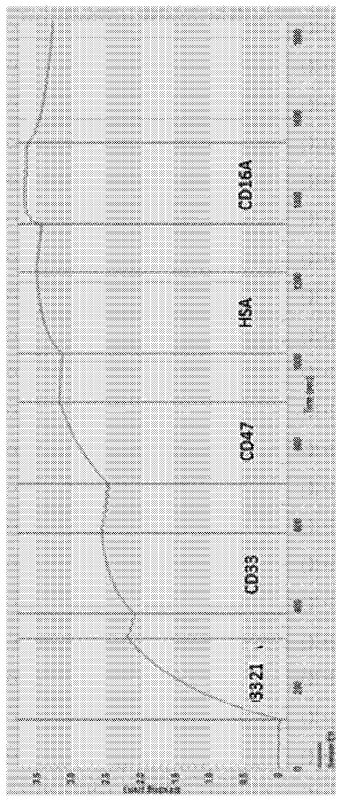


FIG. 20

【図 21】

```
A09-10 QVQLVESGGGLVQAGGSRLRSCAASGGGRTFNYALGWFRQAPGKEREFAAISRSGGNI 60
A09-006 QVQLVESGGGLVQAGGSRLRSCAASG--IRFTGSALGWFRQAPGKEREFAAISRSGGNI 58
A09-004 QVQLVESGGGLVQAGGSRLRSCAASG--GVMMWSALGWFRQAPGKEREFAAISRSGGNI 58
A09-08 QVQLVESGGGLVQAGGSRLRSCAASG--YGVNSYALGWFRQAPGKEREFAAISRSGGNI 58
A09-31 QVQLVESGGGLVQAGGSRLRSCAASG--YGVNSYALGWFRQAPGKEREFAAISRSGGNI 58
A09-61 QVQLVESGGGLVQAGGSRLRSCAASG--YGVNSYALGWFRQAPGKEREFAAISRSGGNI 58
*****

A09-10 NYADSAKGRFTISRDNFNTTYLQMSLKPEDTAVVYCAAHYLLPSYISTSTMTNYWG 120
A09-006 NYADSAKGRFTISRDNFNTTYLQMSLKPEDTAVVYCAAHYLLPSYISTSTMTNYWG 118
A09-004 NYADSAKGRFTISRDNFNTTYLQMSLKPEDTAVVYCAAHYLLPSYISTSTMTNYWG 118
A09-08 NYADSAKGRFTISRDNFNTTYLQMSLKPEDTAVVYCAAHYLLPSYISTSTMTNYWG 118
A09-31 NYADSAKGRFTISRDNFNTTYLQMSLKPEDTAVVYCAAHYLLPSYISTSTMTNYWG 118
A09-61 NYADSAKGRFTISRDNFNTTYLQMSLKPEDTAVVYCAAHYLLPSYISTSTMTNYWG 118
*****

A09-10 QGTQVTVS 129 SEQ ID NO:7
A09-006 QGTQVTVS 127 SEQ ID NO:6
A09-004 QGTQVTVS 127 SEQ ID NO:5
A09-08 QGTQVTVS 127 SEQ ID NO:2
A09-31 QGTQVTVS 127 SEQ ID NO:3
A09-61 QGTQVTVS 127 SEQ ID NO:4
*****
```

FIG. 21

【図 22】

```
PL2 QVQLVESGGGLVQAGGSRLRSCAVSGLTSLRYTMANFRQAPGKEREFAAIIIRNSVSTFH 60
PL14 EVQLVESGGGLVQAGGSRLRSCAASGSTSGIYDMGWYRQAPGKEREVVGII--TSGGTTY 59
hPL14 EVQLVESGGGLVQAGGSRLRSCAASGSTSGIYDMGWYRQAPGKEREVVGII--TSGGTTY 59
PL16 QVQLVESGGGLVQAGGSRLRSCAASGFTFLYSLGWFRQAPGKEREFAVINWSGYMTSY 60
hPL16 EVQLVESGGGLVQAGGSRLRSCAASGFTFLYSLGWFRQAPGKEREFAVINWSGYMTSY 60
PL17 QVQLVESGGGLVQAGGSRLRSCAASGRTFNTYDMGWFRQAPGKEREFAVAGIDWYNTIYY 60
PL18 EVQLVESGGGLVQAGGSRLRSCAASGRTFNTYDMGWFRQAPGKEREFAVAGIDWYNTIYY 60
*****

PL2 EESVKGRFTISRDNVNMNYLQMSLKPEDTAVVYCATNVGPTGGFSLQSVQRYDAWGQ 120
PL14 ADEAKGRFTISRDNVNMNYLQMSLKPEDTAVVYCNIRTL-----IIWGQ 107
hPL14 ADEAKGRFTISRDNVNMNYLQMSLKPEDTAVVYCNIRTL-----IIWGQ 107
PL16 VDSVKGRFTISRDNVNMNYLQMSLKPEDTAVVYCAARTAI-----AAKRSSEFDYWGQ 117
hPL16 VDSVKGRFTISRDNVNMNYLQMSLKPEDTAVVYCAARTAI-----AAKRSSEFDYWGQ 117
PL17 ADEAKGRFTISRDNVNMNYLQMSLKPEDTAVVYCAAGIRST---AIIIGQADYWGQ 116
PL18 ADEAKGRFTISRDNVNMNYLQMSLKPEDTAVVYCAAGIRST---AIIIGQADYWGQ 116
*****

PL2 TQVTVS 127 SEQ ID NO:31
PL14 TQVTVS 114 SEQ ID NO:33
hPL14 TQVTVS 114 SEQ ID NO:37
PL16 TQVTVS 124 SEQ ID NO:34
hPL16 TQVTVS 124 SEQ ID NO:38
PL11 TQVTVS 123 SEQ ID NO:32
PL17 TQVTVS 123 SEQ ID NO:35
PL18 TQVTVS 127 SEQ ID NO:36
*****
```

FIG. 22

【図 23】

```
H810 EVQLVESGGGLVQAGGSRLRSCAASGSTDSAYTMGWFRQAPGKEREFAVINWSGRTTY 60
H827 EVQLVESGGGLVQAGGSRLRSCAASGRTFSPYTMGWFRQAPGKEREFAVINWSGRTTY 60
H812 EVQLVESGGGLVQAGGSRLRSCAASGRTFSPYTMGWFRQAPGKEREFAVINWSGRTTY 60
H82 EVQLVESGGGLVQAGGSRLRSCAASGRTFSPYTMGWFRQAPGKEREFAVINWSGRTTY 60
H822 EVQLVESGGGLVQAGGSRLRSCAASGRTFSPYTMGWFRQAPGKEREFAVINWSGRTTY 60
H86 EVQLVESGGGLVQAGGSRLRSCAASGRTFSPYTMGWFRQAPGKEREFAVINWSGRTTY 60
H85 EVQLVESGGGLVQAGGSRLRSCAASGRTFSPYTMGWFRQAPGKEREFAVINWSGRTTY 60
*****

H810 ADSVKGRFTISRDNVNMNYLQMSLKPEDTAVVYCAADPDSRLYITP---QRYDYGQ 117
H827 GESVKGRFTISRDNVNMNYLQMSLKPEDTAVVYCAADPDSRLYITP---QRYDYGQ 116
H812 ADSVKGRFTISRDNVNMNYLQMSLKPEDTAVVYCAADPDSRLYITP---QRYDYGQ 116
H82 ADSVKGRFTISRDNVNMNYLQMSLKPEDTAVVYCAADPDSRLYITP---QRYDYGQ 114
H822 ADSVKGRFTISRDNVNMNYLQMSLKPEDTAVVYCAADPDSRLYITP---QRYDYGQ 120
H86 ADSVKGRFTISRDNVNMNYLQMSLKPEDTAVVYCAADPDSRLYITP---QRYDYGQ 115
H85 ADSVKGRFTISRDNVNMNYLQMSLKPEDTAVVYCAADPDSRLYITP---QRYDYGQ 115
*****

H810 GTLVTVSS 125 SEQ ID NO:47
H827 GTLVTVSS 124 SEQ ID NO:45
H812 GTLVTVSS 124 SEQ ID NO:43
H82 GTLVTVSS 122 SEQ ID NO:40
H822 GTLVTVSS 128 SEQ ID NO:44
H86 GTLVTVSS 123 SEQ ID NO:42
H85 GTLVTVSS 123 SEQ ID NO:41
*****
```

FIG. 23

10

20

30

40

50

【図 24-1】

```

33-13 QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASG9ISSINSMWFRQAPGKREKVGAINSGDNT-Y 59
33-2 QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASG9ISSINSMWFRQAPGKREKREKVALITADGTD-Y 59
33-4 QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASG9ISSINSMWFRQAPGKREKREKVALITADGTD-Y 59
33-14 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTISINSMWFRQAPGKREKREKVALITADGTD-Y 60
33-24 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTISINSMWFRQAPGKREKREKVALITADGTD-Y 60
33-8 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTISINSMWFRQAPGKREKREKVALITADGTD-Y 60
33-33 QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTISINSMWFRQAPGKREKREKVALITADGTD-Y 60
33-33 QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTISINSMWFRQAPGKREKREKVALITADGTD-Y 60
33-C1 QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTISINSMWFRQAPGKREKREKVALITADGTD-Y 60
33-F1 QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTISINSMWFRQAPGKREKREKVALITADGTD-Y 60
33-E3 QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTISINSMWFRQAPGKREKREKVALITADGTD-Y 60
33-F2 QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTISINSMWFRQAPGKREKREKVALITADGTD-Y 60
33-H2 QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTISINSMWFRQAPGKREKREKVALITADGTD-Y 60
33-B2 QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTISINSMWFRQAPGKREKREKVALITADGTD-Y 60
33-A1 QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTISINSMWFRQAPGKREKREKVALITADGTD-Y 60
33-G1 QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTISINSMWFRQAPGKREKREKVALITADGTD-Y 60
33-B3 QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTISINSMWFRQAPGKREKREKVALITADGTD-Y 60
33-D2 QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTISINSMWFRQAPGKREKREKVALITADGTD-Y 60
33-C3 QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTISINSMWFRQAPGKREKREKVALITADGTD-Y 60
33-B1 QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTISINSMWFRQAPGKREKREKVALITADGTD-Y 60
33-F3 QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTISINSMWFRQAPGKREKREKVALITADGTD-Y 60
33-D3 QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTISINSMWFRQAPGKREKREKVALITADGTD-Y 60
33-E2 QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTISINSMWFRQAPGKREKREKVALITADGTD-Y 60
33-H1 QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTISINSMWFRQAPGKREKREKVALITADGTD-Y 60
33-A2 QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTISINSMWFRQAPGKREKREKVALITADGTD-Y 60
33-1 QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTISINSMWFRQAPGKREKREKVALITADGTD-Y 60
33-D1 QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTISINSMWFRQAPGKREKREKVALITADGTD-Y 60
33-C2 QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTISINSMWFRQAPGKREKREKVALITADGTD-Y 60
33-G2 QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTISINSMWFRQAPGKREKREKVALITADGTD-Y 60
:***:***** ** *:*** ** * * *:***:*** ** * .

```

FIG. 24

【図 24-2】

```

33-A1 TNSVKGRFTISRDNKNTVYLHNSLKLEDVAVYCAAKFSGASWFSASYSWQQTQVT 120
33-G1 TNSVKGRFTISRDNKNTVYLHNSLKLEDVAVYCAAKFSGASWFSASYSWQQTQVT 120
33-E3 TNSVKGRFTISRDNKNTVYLHNSLKLEDVAVYCAAKFSGASWFSASYSWQQTQVT 120
33-D2 TNSVKGRFTISRDNKNTVYLHNSLKLEDVAVYCAAKFSGASWFSASYSWQQTQVT 120
33-C3 TNSVKGRFTISRDNKNTVYLHNSLKLEDVAVYCAAKFSGASWFSASYSWQQTQVT 120
33-B1 TNSVKGRFTISRDNKNTVYLHNSLKLEDVAVYCAAKFSGASWFSASYSWQQTQVT 120
33-F3 TNSVKGRFTISRDNKNTVYLHNSLKLEDVAVYCAAKFSGASWFSASYSWQQTQVT 120
33-D3 TNSVKGRFTISRDNKNTVYLHNSLKLEDVAVYCAAKFSGASWFSASYSWQQTQVT 120
33-E2 TNSVKGRFTISRDNKNTVYLHNSLKLEDVAVYCAAKFSGASWFSASYSWQQTQVT 120
33-H1 TNSVKGRFTISRDNKNTVYLHNSLKLEDVAVYCAAKFSGASWFSASYSWQQTQVT 120
33-A2 TNSVKGRFTISRDNKNTVYLHNSLKLEDVAVYCAAKFSGASWFSASYSWQQTQVT 120
33-1 TNSVKGRFTISRDNKNTVYLHNSLKLEDVAVYCAAKFSGASWFSASYSWQQTQVT 120
33-D1 TNSVKGRFTISRDNKNTVYLHNSLKLEDVAVYCAAKFSGASWFSASYSWQQTQVT 120
33-C2 TNSVKGRFTISRDNKNTVYLHNSLKLEDVAVYCAAKFSGASWFSASYSWQQTQVT 120
33-G2 TNSVKGRFTISRDNKNTVYLHNSLKLEDVAVYCAAKFSGASWFSASYSWQQTQVT 120
**:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

```

```

33-13 VSS 121 SEQ ID NO:54
33-2 VSS 111 SEQ ID NO:51
33-4 VSS 118 SEQ ID NO:52
33-14 VSS 117 SEQ ID NO:55
33-24 VSS 123 SEQ ID NO:56
33-8 VSS 119 SEQ ID NO:53
33-G3 VSS 123 SEQ ID NO:75
33-C1 VSS 123 SEQ ID NO:62
33-F1 VSS 123 SEQ ID NO:70
33-E3 VSS 123 SEQ ID NO:69
33-F2 VSS 123 SEQ ID NO:71
33-H2 VSS 123 SEQ ID NO:77
33-B2 VSS 123 SEQ ID NO:60
33-A1 VSS 123 SEQ ID NO:57
33-G1 VSS 123 SEQ ID NO:73
33-B3 VSS 123 SEQ ID NO:61
33-D2 VSS 123 SEQ ID NO:66
33-C3 VSS 123 SEQ ID NO:64
33-B1 VSS 123 SEQ ID NO:59
33-F3 VSS 123 SEQ ID NO:72
33-D3 VSS 123 SEQ ID NO:67
33-E2 VSS 123 SEQ ID NO:68
33-H1 VSS 123 SEQ ID NO:76
33-A2 VSS 123 SEQ ID NO:58
33-1 VSS 123 SEQ ID NO:50
33-D1 VSS 123 SEQ ID NO:65
33-C2 VSS 123 SEQ ID NO:63
33-G2 VSS 123 SEQ ID NO:74
***

```

FIG. 24. (cont.)

【図 25】

```

LG-C4 QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGLAPREY9MWFRRAPGKREKREKVAAND-WFGIQQY 59
LG-E12 QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGLAPREY9MWFRRAPGKREKREKVAAND-WFGIQQY 60
LG-E2 QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGLAPREY9MWFRRAPGKREKREKVAAND-WFGIQQY 60
LG6 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTISINSMWFRQAPGKREKREKVALITADGTD-Y 59
LG-D8 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTISINSMWFRQAPGKREKREKVALITADGTD-Y 59
LG15 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTISINSMWFRQAPGKREKREKVALITADGTD-Y 60
LG9 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTISINSMWFRQAPGKREKREKVALITADGTD-Y 60
LG99 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTISINSMWFRQAPGKREKREKVALITADGTD-Y 60
LG9H EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTISINSMWFRQAPGKREKREKVALITADGTD-Y 60
LG65 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTISINSMWFRQAPGKREKREKVALITADGTD-Y 60
LG-E5 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTISINSMWFRQAPGKREKREKVALITADGTD-Y 60
LG-H4 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTISINSMWFRQAPGKREKREKVALITADGTD-Y 60
LG19 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTISINSMWFRQAPGKREKREKVALITADGTD-Y 60
LG22 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTISINSMWFRQAPGKREKREKVALITADGTD-Y 60
:***:***** ** *:*** ** * * *:***:*** ** * .

```

```

LG-C4 ADSVKGRATISRDNKNTVYLHNSLKLEDVAVYCAAKGLT--IVLLTRRTYDWTG 117
LG-E12 LEAVKDRFTISRDNKNTVYLHNSLKLEDVAVYCAAKGLT--IVLLTRRTYDWTG 117
LG2 ADSVKGRFTISRDNKNTVYLHNSLKLEDVAVYCAAKGLT--IVLLTRRTYDWTG 112
LG6 ADSVKGRFTISRDNKNTVYLHNSLKLEDVAVYCAAKGLT--IVLLTRRTYDWTG 109
LG-D8 ADSAKGRFTISRDNKNTVYLHNSLKLEDVAVYCAAKGLT--IVLLTRRTYDWTG 112
LG15 ADSVKGRFTISRDNKNTVYLHNSLKLEDVAVYCAAKGLT--IVLLTRRTYDWTG 106
LG9 ADSVKGRFTISRDNKNTVYLHNSLKLEDVAVYCAAKGLT--IVLLTRRTYDWTG 119
LG99 ADSVKGRFTISRDNKNTVYLHNSLKLEDVAVYCAAKGLT--IVLLTRRTYDWTG 119
LG9H ADSVKGRFTISRDNKNTVYLHNSLKLEDVAVYCAAKGLT--IVLLTRRTYDWTG 119
LG65 APSVKGRFTISRDNKNTVYLHNSLKLEDVAVYCAAKGLT--IVLLTRRTYDWTG 120
LG-E5 ADSVKGRFTISRDNKNTVYLHNSLKLEDVAVYCAAKGLT--IVLLTRRTYDWTG 116
LG-H4 ADSVKGRFTISRDNKNTVYLHNSLKLEDVAVYCAAKGLT--IVLLTRRTYDWTG 116
LG19 ADSVKGRFTISRDNKNTVYLHNSLKLEDVAVYCAAKGLT--IVLLTRRTYDWTG 111
LG22 ADSVKGRFTISRDNKNTVYLHNSLKLEDVAVYCAAKGLT--IVLLTRRTYDWTG 112
:***:***** ** *:*** ** * * *:***:*** ** * .

```

```

LG-C4 QGTQTVSS 126 SEQ ID NO:91
LG-E12 QGTQTVSS 128 SEQ ID NO:87
LG2 QGTQTVSS 121 SEQ ID NO:80
LG6 QGTQTVSS 118 SEQ ID NO:81
LG-D8 QGTQTVSS 121 SEQ ID NO:86
LG15 QGTQTVSS 115 SEQ ID NO:88
LG9 QGTQTVSS 128 SEQ ID NO:82
LG99 QGTQTVSS 128 SEQ ID NO:90
LG9H QGTQTVSS 128 SEQ ID NO:83
LG65 QGTQTVSS 129 SEQ ID NO:89
LG-E5 QGTQTVSS 125 SEQ ID NO:92
LG-H4 QGTQTVSS 125 SEQ ID NO:93
LG19 QGTQTVSS 120 SEQ ID NO:84
LG22 QGTQTVSS 121 SEQ ID NO:85
*** *****

```

FIG. 25

【図 26】

```

CD16F1 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGLAPREY9MWFRRAPGKREKREKVAAND-WFGIQQY 59
CD16E11 EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGLAPREY9MWFRRAPGKREKREKVAAND-WFGIQQY 60
:*****:***** ** *:*** ** * * *:***:*** ** * .

```

FIG. 26

```

CD16F1 (SEQ ID NO:96)
CD16E11 (SEQ ID NO:99)

```

10

20

30

40

50

【配列表】

2022549362000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 20/53064

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - C07K 14/28; C07K 14/00 (2021.01)

CPC - C07K 14/28; C07K 2317/569; C07K 16/2893; C07K 16/283

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)

See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2019/068302 A1 (JOINT STOCK COMPANY "BIOCAD") 11 April 2019 (11.04.2019) pg 5, para 7; pg 23, para 4	1-2
A	WO 2019/118770 A1 (SALK INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STUDIES) 20 June 2019 (20.06.2019) pg 13, ln 33-35; SEQ ID NO: 31	1-2
A	WO 2004/062551 A2 (ABLYNX N.V. et al.) 29 July 2004 (29.07.2004) pg 17, ln 23-25; SEQ ID NO: 23	1-2

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 February 2021

Date of mailing of the international search report

MAR 15 2021

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. 571-273-8300

Authorized officer

Lee Young

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 20/53064

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item I.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☒ forming part of the international application as filed:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 20/53064

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.: 8-21, 24-25, 27-28
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:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Continued on Supplemental Page

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.:
1-2

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US 20/53064

Continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking

Group I+, Claims 1-2, directed to a variable heavy (VHH) domain having an antigen-binding specificity for a single antigen. The VHH antibody will be searched to the extent that the antibody encompasses antigen-binding specificity for (a) CD47, wherein the VHH domain has the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 (note, these are the first claimed sequences for VHH binding specificity). It is believed that claims 1-2 encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that the antibody encompasses antigen-binding specificity for (a) CD47, wherein the VHH domain has the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2. Additional VHH antibody sequence(s) with additional specificities will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected VHH antibody(ies). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be a VHH antibody comprising an antigen-binding specificity for (b) PD-L1, wherein the VHH domain has the amino acid sequence of SEQ ID NO: 31 (claims 1-2).

10

Group II+, Claims 3-7, 22-23, 26, directed to a multi-specific antibody comprising two different binding specificities. Group II+ will be searched upon payment of additional fees. The multi-specific antibody may be searched, for example, to encompass a bispecific antibody wherein the first, binding specificity is specific for CD47 represented by the amino acid sequence of SEQ ID No:2, and the second antibody binding domain is specific for PD-L1 represented by the amino acid sequence of SEQ ID No: 31, for an additional fee and election as such. It is believed that claims 3-4, 7, read on this exemplary invention. Additional multi-specific antibodies will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected multi-specific antibodies. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. Another exemplary election would be a multi-specific antibody comprising a bispecific antibody wherein the first, binding specificity is specific for CD47 represented by the amino acid sequence of SEQ ID No:3, and the second antibody binding domain is specific for PD-L1 represented by the amino acid sequence of SEQ ID No:32 (claims 3-4, 7).

The inventions listed as Groups I+ and II+ do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

20

Special technical features

The inventions of Groups I+ and II+ each include the special technical feature of a unique amino acid sequence. Each amino acid sequence encodes a unique antibody polypeptide, and is considered a distinct technical feature. Additionally, Group I+ has the special technical feature of a mono-specific VHH antibody, that is not required by Group II+. Group II+ has the special technical feature of a multi-specific antibody comprising two or more different binding specificities, that is not required by Group I+.

Common technical features

No technical features are shared between the antibody amino acid sequences in each of Groups I+ and II+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ and II+ were considered to share the technical features of including: an antibody having an antigen-binding specificity for one of:

- (a) CD47
- (b) PD-L1
- (c) human serum albumin (HSA)
- (d) CD33
- (e) LAG3 or
- (f) CD16,

these shared technical features are previously disclosed by prior art, as discussed below.

30

Group I+ inventions further share the technical feature of:

variable heavy (VHH) domain having an antigen-binding specificity for one antigen.

Group II+ inventions further share the technical feature of:

multi-specific antibody comprising a antibody binding domain with first binding specificity and a second antibody binding domain with a second binding specificity that is different than the first binding specificity.

However, these shared technical features are previously disclosed by WO 2019/068302 A1 to Joint Stock Company "Biocad" (hereinafter 'Biocad') (Citations are according to the English translation).

Biocad discloses a variable heavy (VHH) domain having an antigen-binding specificity for one of: (a) CD47; (b) PD-L1; (c) human serum albumin (HSA); (d) CD33; (e) LAG3; or (f) CD16 (pg 5, para 7 - "FIG. 6. Schematic representation of the domain structure of anti-PD-L1 / anti-CD47 bispecific antibodies, where A is based on anti-CD47 scFv fragments and B on anti-CD47 VHH fragments. At the same time, the PD-L1 binding part is represented by the Fab fragment."; pg 23, para 4 - "Specific phage antibodies against CD47 were obtained from phage Fab, VHH or scFv display libraries...").

Biocad further discloses a multi-specific antibody comprising an antibody binding domain with first binding specificity and a second antibody binding domain with a second binding specificity that is different than the first binding specificity wherein the first, binding specificity is specific for CD47, PD-L1, HSA, CD33, LAG3, or CD16 (pg 5, para 7 - "FIG. 6. Schematic representation of the domain structure of anti-PD-L1 / anti-CD47 bispecific antibodies, where A is based on anti-CD47 scFv fragments and B on anti-CD47 VHH fragments. At the same time, the PD-L1 binding part is represented by the Fab fragment.").

40

Continued on Next Supplemental Page

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 20/53064

Continued from Previous Supplemental Page

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Therefore, Group I+ and II+ inventions lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

NOTE, continuation of Item 4 above: claims 8-21, 24-25, 27-28 are held unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

30

40

50

フロントページの続き

,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,D
K,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),O
A(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,B
B,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD
,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,
LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,
RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,Z
W

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. B R I J

2. T W E E N

(72)発明者 リャン、ヤンビン

アメリカ合衆国 9 2 6 1 8 カリフォルニア州 アーバイン バランカパークウェイ 1 5 3 7 5 G
1 0 4 - 1 0 5

Fターム (参考) 4C085 AA14 CC23 EE01 GG01

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 DA76 EA20 FA74