

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-517120
(P2025-517120A)

(43)公表日 令和7年6月3日(2025.6.3)

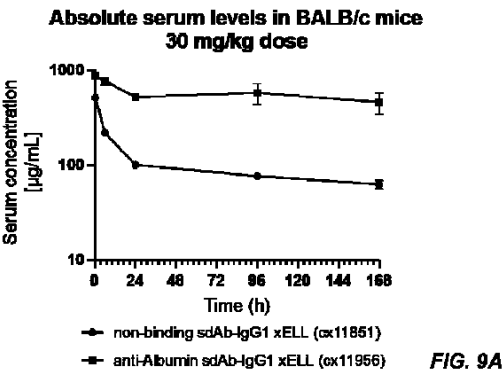
(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	16/18 (2006.01)	C 0 7 K	16/18		4 B 0 6 4
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13		4 C 0 7 6
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z	4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	4 C 0 8 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全62頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2024-564796(P2024-564796)	(71)出願人	524252194
(86)(22)出願日	令和5年5月4日(2023.5.4)	(74)代理人	インヒブルクス バイオサイエンシズ インコーポレイテッド
(85)翻訳文提出日	令和6年12月20日(2024.12.20)		アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア ラ ホーヤ ノース トーリー パインズ ロード 1 1 0 2 5 スイート 1 4 0
(86)国際出願番号	PCT/US2023/066580		110000796
(87)国際公開番号	WO2023/215810		弁理士法人三枝国際特許事務所
(87)国際公開日	令和5年11月9日(2023.11.9)		ホーランド アンドリュウ
(31)優先権主張番号	63/338,629	(72)発明者	アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア ラ ホーヤ スイート 1 4 0 ノース トーリー パインズ ロード 1 1 0 2 5 シーノオー インヒブルクス バイオサイエンシズ インコーポレイテッド
(32)優先日	令和4年5月5日(2022.5.5)	(72)発明者	マー ミルトン
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(31)優先権主張番号	63/351,362		
(32)優先日	令和4年6月11日(2022.6.11)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ)		
最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 アルブミン結合ポリペプチド及びその使用

(57)【要約】

本明細書では、アルブミンに結合するV H H含有ポリペプチドが提供される。V H H含有ポリペプチドの使用も提供される。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

アルブミンに結合する少なくとも 1 つの V H H ドメインを含むポリペプチドであって、アルブミンに結合する少なくとも 1 つの V H H ドメインは、配列番号 5 ~ 配列番号 8 から選択される C D R 1 配列、配列番号 9 ~ 配列番号 2 1 から選択される C D R 2 配列、及び配列番号 2 2 の C D R 3 配列を含む、ポリペプチド。

【請求項 2】

アルブミンに結合する各 V H H ドメインは、独立して、配列番号 5 ~ 配列番号 8 から選択される C D R 1 配列、配列番号 9 ~ 配列番号 2 1 から選択される C D R 2 配列、及び配列番号 2 2 の C D R 3 配列を含む、請求項 1 に記載のポリペプチド。

10

【請求項 3】

アルブミンに結合する少なくとも 1 つの V H H ドメインは、配列番号 5、配列番号 9、及び配列番号 2 2；配列番号 5、配列番号 1 0、及び配列番号 2 2；配列番号 5、配列番号 1 1、及び配列番号 2 2；配列番号 5、配列番号 1 2、及び配列番号 2 2；配列番号 5、配列番号 1 3、及び配列番号 2 2；配列番号 5、配列番号 1 4、及び配列番号 2 2；配列番号 5、配列番号 1 5、及び配列番号 2 2；配列番号 6、配列番号 1 5、及び配列番号 2 2；配列番号 7、配列番号 1 5、及び配列番号 2 2；配列番号 8、配列番号 1 5、及び配列番号 2 2；配列番号 6、配列番号 1 6、及び配列番号 2 2；配列番号 6、配列番号 1 7、及び配列番号 2 2；配列番号 6、配列番号 1 8、及び配列番号 2 2；配列番号 6、配列番号 1 9、及び配列番号 2 2；配列番号 6、配列番号 2 0、及び配列番号 2 2；並びに配列番号 6、配列番号 2 1、及び配列番号 2 2 から選択される C D R 1 配列、C D R 2 配列、及び C D R 3 配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載のポリペプチド。

20

【請求項 4】

アルブミンに結合する各 V H H ドメインは、独立して、配列番号 5、配列番号 9、及び配列番号 2 2；配列番号 5、配列番号 1 0、及び配列番号 2 2；配列番号 5、配列番号 1 1、及び配列番号 2 2；配列番号 5、配列番号 1 2、及び配列番号 2 2；配列番号 5、配列番号 1 3、及び配列番号 2 2；配列番号 5、配列番号 1 4、及び配列番号 2 2；配列番号 5、配列番号 1 5、及び配列番号 2 2；配列番号 6、配列番号 1 5、及び配列番号 2 2；配列番号 7、配列番号 1 5、及び配列番号 2 2；配列番号 8、配列番号 1 5、及び配列番号 2 2；配列番号 6、配列番号 1 6、及び配列番号 2 2；配列番号 6、配列番号 1 7、及び配列番号 2 2；配列番号 6、配列番号 1 8、及び配列番号 2 2；配列番号 6、配列番号 1 9、及び配列番号 2 2；配列番号 6、配列番号 2 0、及び配列番号 2 2；並びに配列番号 6、配列番号 2 1、及び配列番号 2 2 から選択される C D R 1 配列、C D R 2 配列、及び C D R 3 配列を含む、請求項 3 に記載のポリペプチド。

30

【請求項 5】

アルブミンに結合する少なくとも 1 つの V H H ドメインは、ヒト化されている、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 6】

アルブミンに結合する各 V H H ドメインは、ヒト化されている、請求項 5 に記載のポリペプチド。

40

【請求項 7】

アルブミンに結合する少なくとも 1 つの V H H ドメインは、配列番号 2 3 ~ 配列番号 4 3 及び配列番号 7 1 ~ 配列番号 7 4 から選択される配列と少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 % 同一の配列を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 8】

アルブミンに結合する各 V H H ドメインは、配列番号 2 3 ~ 配列番号 4 3 及び配列番号 7 1 ~ 配列番号 7 4 から選択される配列と少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9

50

% 同一の配列を含む、請求項 7 に記載のポリペプチド。

【請求項 9】

アルブミンに結合する少なくとも 1 つの V H H ドメインは、配列番号 2 3 ~ 配列番号 4 3 及び配列番号 7 1 ~ 配列番号 7 4 から選択される配列を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 10】

アルブミンに結合する各 V H H ドメインは、配列番号 2 3 ~ 配列番号 4 3 及び配列番号 7 1 ~ 配列番号 7 4 から選択される配列を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 11】

アルブミンに結合する少なくとも 1 つの V H H ドメインは、ヒトアルブミンに結合し、カニクイザル、マウス、及びラットのアルブミンから選択される少なくとも 1 つのアルブミンに結合する、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 12】

アルブミンに結合する各 V H H ドメインは、ヒトアルブミンに結合し、カニクイザル、マウス、及びラットのアルブミンから選択される少なくとも 1 つのアルブミンに結合する、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 13】

アルブミンに結合する少なくとも 1 つの V H H ドメインは、ヒト、カニクイザル、マウス、及びラットのアルブミンに結合する、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 14】

アルブミンに結合する各 V H H ドメインは、ヒト、カニクイザル、マウス、及びラットのアルブミンに結合する、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 15】

アルブミンに結合する少なくとも 1 つの V H H ドメインは、ヒトアルブミンに 5 n M 未満、2 n M 未満、1 n M 未満、又は 0 . 5 n M 未満の親和性で結合する、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 16】

アルブミンに結合する少なくとも 1 つの V H H ドメインは、ヒト、カニクイザル、マウス、及びラットのアルブミンのそれぞれに 5 n M 未満、2 n M 未満、1 n M 未満、又は 0 . 5 n M 未満の親和性で結合する、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 17】

アルブミンに結合する各 V H H ドメインは、ヒトアルブミンに 5 n M 未満、2 n M 未満、1 n M 未満、又は 0 . 5 n M 未満の親和性で結合する、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 18】

アルブミンに結合する各 V H H ドメインは、ヒト、カニクイザル、マウス、及びラットのアルブミンのそれぞれに 5 n M 未満、2 n M 未満、1 n M 未満、又は 0 . 5 n M 未満の親和性で結合する、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 19】

アルブミンに結合する各 V H H ドメインは、アルブミンドメイン 3 に結合しない、請求項 1 ~ 18 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 20】

アルブミンに結合する各 V H H ドメインは、F c R n へのアルブミンの結合を妨げない、請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 21】

前記ポリペプチドは、アルブミン以外のタンパク質に結合する少なくとも 1 つの結合ドメインを含む、請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

10

20

30

40

50

【請求項 22】

アルブミン以外のタンパク質に結合する少なくとも 1 つの結合ドメインは、V H H である、請求項 21 に記載のポリペプチド。

【請求項 23】

アルブミン以外のタンパク質に結合する各結合ドメインは、V H H である、請求項 22 に記載のポリペプチド。

【請求項 24】

アルブミン以外のタンパク質に結合する少なくとも 1 つの結合ドメインは、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む、請求項 21 に記載のポリペプチド。

【請求項 25】

アルブミン以外のタンパク質に結合する各結合ドメインは、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む、請求項 24 に記載のポリペプチド。

【請求項 26】

アルブミン以外のタンパク質に結合する少なくとも 1 つの結合ドメインは、治療用抗体の結合ドメインである、請求項 21 ~ 25 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 27】

アルブミン以外のタンパク質に結合する各結合ドメインは、治療用抗体の結合ドメインである、請求項 26 に記載のポリペプチド。

【請求項 28】

前記治療用抗体は、自己免疫疾患又は自己免疫障害、炎症性疾患又は炎症性障害、感染症、及び癌から選択される疾患又は障害の治療に有用である、請求項 26 又は 27 に記載のポリペプチド。

【請求項 29】

前記ポリペプチドは、治療用タンパク質のアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 28 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 30】

前記治療用タンパク質は、自己免疫疾患又は自己免疫障害、炎症性疾患又は炎症性障害、感染症、及び癌から選択される疾患又は障害の治療に有用である、請求項 29 に記載のポリペプチド。

【請求項 31】

前記ポリペプチドは、F c 領域を含む、請求項 1 ~ 30 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 32】

前記 F c 領域は、F c R n に結合する、請求項 31 に記載のポリペプチド。

【請求項 33】

前記 F c 領域は、I g G 1 F c 領域である、請求項 31 又は 32 に記載のポリペプチド。

【請求項 34】

前記 F c 領域は、半減期を高める 1 つ以上の置換を含む、請求項 31 ~ 33 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 35】

前記 F c 領域は、少なくとも 1 つの pH での F c R n 結合を増強し、及び / 又は F c と F c R n との解離速度を低下させる 1 つ以上の置換を含む、請求項 34 に記載のポリペプチド。

【請求項 36】

前記 F c 領域は、252、254、256、428、又は 434 から選択される 1 つ以上のアミノ酸位置での置換を含む、請求項 31 ~ 35 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 37】

前記 F c 領域は、アミノ酸位置 252、254、及び 256 ; 又はアミノ酸位置 252

10

20

30

40

50

及び 4 2 8 ; 又はアミノ酸位置 4 2 8 及び 4 3 4 での置換を含む、請求項 3 6 に記載のポリペプチド。

【請求項 3 8】

前記 F c 領域は、置換 M 2 5 2 Y、S 2 5 4 T、及び T 2 5 6 E ; M 2 5 2 Y 及び M 4 2 8 V ; 又は M 4 2 8 L 及び N 4 3 4 S を含む、請求項 3 7 に記載のポリペプチド。

【請求項 3 9】

前記 F c 領域は、配列番号 4 7 ~ 配列番号 6 8 及び配列番号 8 5 ~ 配列番号 8 7 から選択される配列を含む、請求項 3 1 ~ 3 8 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 4 0】

前記ポリペプチドの半減期は、アルブミンに結合する V H H ドメインを欠く同じポリペプチドの半減期よりも長い、請求項 1 ~ 3 9 のいずれか一項に記載のポリペプチド。 10

【請求項 4 1】

請求項 1 ~ 4 0 のいずれか一項に記載のポリペプチドと、薬学的に許容可能な担体とを含む医薬組成物。

【請求項 4 2】

請求項 1 ~ 4 0 のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードする単離された核酸。

【請求項 4 3】

請求項 4 2 に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 4 4】

請求項 4 2 に記載の核酸又は請求項 4 3 に記載のベクターを含む宿主細胞。 20

【請求項 4 5】

請求項 1 ~ 4 0 のいずれか一項に記載のポリペプチドを発現する宿主細胞。

【請求項 4 6】

請求項 1 ~ 4 0 のいずれか一項に記載のポリペプチドを生産する方法であって、前記ポリペプチドの発現に適した条件下で請求項 4 4 又は 4 5 に記載の宿主細胞をインキュベートすることを含む、方法。

【請求項 4 7】

前記ポリペプチドを単離することを更に含む、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

請求項 1 ~ 4 0 のいずれか一項に記載のポリペプチド、又は請求項 4 1 に記載の医薬組成物を被験体に投与することを含む方法。 30

【請求項 4 9】

疾患又は障害を治療する方法であって、疾患又は障害を伴う被験体に、請求項 1 ~ 4 0 のいずれか一項に記載のポリペプチド、又は請求項 4 1 に記載の医薬組成物を薬学的有効量、投与することを含む、方法。

【請求項 5 0】

前記疾患又は障害は、自己免疫疾患又は自己免疫障害、炎症性疾患又は炎症性障害、感染症、及び癌から選択される、請求項 4 9 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0 0 0 1】

[関連出願の相互参照]

本願は、2022 年 5 月 5 日付で出願された米国仮出願第 6 3 / 3 3 8 , 6 2 9 号及び 2022 年 6 月 1 1 日付で出願された米国仮出願第 6 3 / 3 5 1 , 3 6 2 号の優先権の利益を主張し、その全体があらゆる目的で引用することにより本明細書の一部をなす。

【0 0 0 2】

[配列表の参照による援用]

本願は、2023 年 4 月 2 7 日に作成された、0 1 2 0 2 - 0 0 2 0 - 0 0 P C T _ S T 2 6 と題する、本願とともに電子フォーマットで提出された 1 3 3 2 9 4 バイトのサイズの配列表を参照により援用する。 50

【 0 0 0 3 】

本発明は、アルブミン結合ポリペプチド、及びアルブミン結合ポリペプチドを使用して、例えば他の分子の半減期を改善する方法に関する。

【 背景技術 】

【 0 0 0 4 】

血漿タンパク質は、60 kDa未満の分子の腎臓濾過、及び内皮細胞による微飲作用という2つの主な機構によって循環から排除される。腎閾値未満のタンパク質は、循環から急速に除去され、結果として1日以下の半減期となるが、腎閾値よりも大きなタンパク質は、主に微飲作用によって除去され、半減期は3日～5日前後である。アルブミン及び免疫グロブリンG (IgG) は、その大きなサイズ(それぞれ66 kDa及び150 kDa) 及び胎児性Fc受容体 (FcRn) へのpH依存性結合を介して内皮微飲作用からリサイクルされる能力により、15日～30日前後の長い血漿半減期を有するタンパク質である。

10

【 0 0 0 5 】

長い血漿半減期は、治療剤が血漿薬物濃度を正確かつ精密に制御し、毒性を制限しながら有効性を最適化し、必要とされる薬物の頻度及び量を低減するのに有用である。サイズが小さいために血漿半減期が短い、又はFcRn結合を介してリサイクルされる能力を欠く治療用タンパク質は、アルブミン結合体に融合することで血漿半減期を延ばすことができる。シングルドメイン抗体VHHドメインは、サイズが約12 kDa～15 kDaの小さなドメインであり、組換え手段によって別のタンパク質又はペプチドに容易に融合することができ、単一のポリペプチドで構成される単一ドメインであり、免疫原性の可能性を低くするために容易にヒト化され、多くが親和性精製のためのプロテインAと自然に結合することから、理想的なアルブミン結合体である。

20

【 発明の概要 】

【 0 0 0 6 】

したがって、アルブミンに結合するVHHドメインが必要とされている。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 7 】

実施の形態1 . アルブミンに結合する少なくとも1つのVHHドメインを含むポリペプチドであって、アルブミンに結合する少なくとも1つのVHHドメインは、配列番号5～配列番号8から選択されるCDR1配列、配列番号9～配列番号21から選択されるCDR2配列、及び配列番号22のCDR3配列を含む、ポリペプチド。

30

【 0 0 0 8 】

実施の形態2 . アルブミンに結合する各VHHドメインは、独立して、配列番号5～配列番号8から選択されるCDR1配列、配列番号9～配列番号21から選択されるCDR2配列、及び配列番号22のCDR3配列を含む、実施の形態1に記載のポリペプチド。

【 0 0 0 9 】

実施の形態3 . アルブミンに結合する少なくとも1つのVHHドメインは、配列番号5、配列番号9、及び配列番号22；配列番号5、配列番号10、及び配列番号22；配列番号5、配列番号11、及び配列番号22；配列番号5、配列番号12、及び配列番号22；配列番号5、配列番号13、及び配列番号22；配列番号5、配列番号14、及び配列番号22；配列番号5、配列番号15、及び配列番号22；配列番号6、配列番号15、及び配列番号22；配列番号7、配列番号15、及び配列番号22；配列番号8、配列番号15、及び配列番号22；配列番号6、配列番号16、及び配列番号22；配列番号6、配列番号17、及び配列番号22；配列番号6、配列番号18、及び配列番号22；配列番号6、配列番号19、及び配列番号22；配列番号6、配列番号20、及び配列番号22；並びに配列番号6、配列番号21、及び配列番号22から選択されるCDR1配列、CDR2配列、及びCDR3配列を含む、実施の形態1又は実施の形態2に記載のポリペプチド。

40

50

【 0 0 1 0 】

実施の形態 4 . アルブミンに結合する各 V H H ドメインは、独立して、配列番号 5、配列番号 9、及び配列番号 2 2 ; 配列番号 5、配列番号 1 0、及び配列番号 2 2 ; 配列番号 5、配列番号 1 1、及び配列番号 2 2 ; 配列番号 5、配列番号 1 2、及び配列番号 2 2 ; 配列番号 5、配列番号 1 3、及び配列番号 2 2 ; 配列番号 5、配列番号 1 4、及び配列番号 2 2 ; 配列番号 5、配列番号 1 5、及び配列番号 2 2 ; 配列番号 6、配列番号 1 5、及び配列番号 2 2 ; 配列番号 7、配列番号 1 5、及び配列番号 2 2 ; 配列番号 8、配列番号 1 5、及び配列番号 2 2 ; 配列番号 6、配列番号 1 6、及び配列番号 2 2 ; 配列番号 6、配列番号 1 7、及び配列番号 2 2 ; 配列番号 6、配列番号 1 8、及び配列番号 2 2 ; 配列番号 6、配列番号 1 9、及び配列番号 2 2 ; 配列番号 6、配列番号 2 0、及び配列番号 2 2 ; 並びに配列番号 6、配列番号 2 1、及び配列番号 2 2 から選択される C D R 1 配列、C D R 2 配列、及び C D R 3 配列を含む、実施の形態 3 に記載のポリペプチド。 10

【 0 0 1 1 】

実施の形態 5 . アルブミンに結合する少なくとも 1 つの V H H ドメインは、ヒト化されている、実施の形態 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【 0 0 1 2 】

実施の形態 6 . アルブミンに結合する各 V H H ドメインは、ヒト化されている、実施の形態 5 に記載のポリペプチド。

【 0 0 1 3 】

実施の形態 7 . アルブミンに結合する少なくとも 1 つの V H H ドメインは、配列番号 2 3 ~ 配列番号 4 3 及び配列番号 7 1 ~ 配列番号 7 4 から選択される配列と少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 % 同一の配列を含む、実施の形態 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のポリペプチド。 20

【 0 0 1 4 】

実施の形態 8 . アルブミンに結合する各 V H H ドメインは、配列番号 2 3 ~ 配列番号 4 3 及び配列番号 7 1 ~ 配列番号 7 4 から選択される配列と少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 % 同一の配列を含む、実施の形態 7 に記載のポリペプチド。

【 0 0 1 5 】

実施の形態 9 . アルブミンに結合する少なくとも 1 つの V H H ドメインは、配列番号 2 3 ~ 配列番号 4 3 及び配列番号 7 1 ~ 配列番号 7 4 から選択される配列を含む、実施の形態 1 ~ 7 のいずれか一項に記載のポリペプチド。 30

【 0 0 1 6 】

実施の形態 1 0 . アルブミンに結合する各 V H H ドメインは、配列番号 2 3 ~ 配列番号 4 3 及び配列番号 7 1 ~ 配列番号 7 4 から選択される配列を含む、実施の形態 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【 0 0 1 7 】

実施の形態 1 1 . アルブミンに結合する少なくとも 1 つの V H H ドメインは、ヒトアルブミンに結合し、カニクイザル、マウス、及びラットのアルブミンから選択される少なくとも 1 つのアルブミンに結合する、実施の形態 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載のポリペプチド。 40

【 0 0 1 8 】

実施の形態 1 2 . アルブミンに結合する各 V H H ドメインは、ヒトアルブミンに結合し、カニクイザル、マウス、及びラットのアルブミンから選択される少なくとも 1 つのアルブミンに結合する、実施の形態 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【 0 0 1 9 】

実施の形態 1 3 . アルブミンに結合する少なくとも 1 つの V H H ドメインは、ヒト、カニクイザル、マウス、及びラットのアルブミンに結合する、実施の形態 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載のポリペプチド。 50

【 0 0 2 0 】

実施の形態 14 . アルブミンに結合する各 V H H ドメインは、ヒト、カニクイザル、マウス、及びラットのアルブミンに結合する、実施の形態 1 ~ 13 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【 0 0 2 1 】

実施の形態 15 . アルブミンに結合する少なくとも 1 つの V H H ドメインは、ヒトアルブミンに 5 n M 未満、2 n M 未満、1 n M 未満、又は 0 . 5 n M 未満の親和性で結合する、実施の形態 1 ~ 14 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【 0 0 2 2 】

実施の形態 16 . アルブミンに結合する少なくとも 1 つの V H H ドメインは、ヒト、カニクイザル、マウス、及びラットのアルブミンのそれぞれに 5 n M 未満、2 n M 未満、1 n M 未満、又は 0 . 5 n M 未満の親和性で結合する、実施の形態 1 ~ 15 のいずれか一項に記載のポリペプチド。 10

【 0 0 2 3 】

実施の形態 17 . アルブミンに結合する各 V H H ドメインは、ヒトアルブミンに 5 n M 未満、2 n M 未満、1 n M 未満、又は 0 . 5 n M 未満の親和性で結合する、実施の形態 1 ~ 16 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【 0 0 2 4 】

実施の形態 18 . アルブミンに結合する各 V H H ドメインは、ヒト、カニクイザル、マウス、及びラットのアルブミンのそれぞれに 5 n M 未満、2 n M 未満、1 n M 未満、又は 0 . 5 n M 未満の親和性で結合する、実施の形態 1 ~ 17 のいずれか一項に記載のポリペプチド。 20

【 0 0 2 5 】

実施の形態 19 . アルブミンに結合する各 V H H ドメインは、アルブミンドメイン 3 に結合しない、実施の形態 1 ~ 18 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【 0 0 2 6 】

実施の形態 20 . アルブミンに結合する各 V H H ドメインは、F c R n へのアルブミンの結合を妨げない、実施の形態 1 ~ 19 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【 0 0 2 7 】

実施の形態 21 . ポリペプチドは、アルブミン以外のタンパク質に結合する少なくとも 1 つの結合ドメインを含む、実施の形態 1 ~ 20 のいずれか一項に記載のポリペプチド。 30

【 0 0 2 8 】

実施の形態 22 . アルブミン以外のタンパク質に結合する少なくとも 1 つの結合ドメインは、V H H である、実施の形態 21 に記載のポリペプチド。

【 0 0 2 9 】

実施の形態 23 . アルブミン以外のタンパク質に結合する各結合ドメインは、V H H である、実施の形態 22 に記載のポリペプチド。

【 0 0 3 0 】

実施の形態 24 . アルブミン以外のタンパク質に結合する少なくとも 1 つの結合ドメインは、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む、実施の形態 21 に記載のポリペプチド。 40

【 0 0 3 1 】

実施の形態 25 . アルブミン以外のタンパク質に結合する各結合ドメインは、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む、実施の形態 24 に記載のポリペプチド。

【 0 0 3 2 】

実施の形態 26 . アルブミン以外のタンパク質に結合する少なくとも 1 つの結合ドメインは、治療用抗体の結合ドメインである、実施の形態 21 ~ 25 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【 0 0 3 3 】

実施の形態 27 . アルブミン以外のタンパク質に結合する各結合ドメインは、治療用 50

抗体の結合ドメインである、実施の形態 26 に記載のポリペプチド。

【0034】

実施の形態 28 . 治療用抗体は、自己免疫疾患又は自己免疫障害、炎症性疾患又は炎症性障害、感染症、及び癌から選択される疾患又は障害の治療に有用である、実施の形態 26 又は 27 に記載のポリペプチド。

【0035】

実施の形態 29 . ポリペプチドは、治療用タンパク質のアミノ酸配列を含む、実施の形態 1 ~ 28 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【0036】

実施の形態 30 . 治療用タンパク質は、自己免疫疾患又は自己免疫障害、炎症性疾患又は炎症性障害、感染症、及び癌から選択される疾患又は障害の治療に有用である、実施の形態 29 に記載のポリペプチド。 10

【0037】

実施の形態 31 . ポリペプチドは、Fc 領域を含む、実施の形態 1 ~ 30 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【0038】

実施の形態 32 . Fc 領域は、FcRn に結合する、実施の形態 31 に記載のポリペプチド。

【0039】

実施の形態 33 . Fc 領域は、IgG1 Fc 領域である、実施の形態 31 又は 32 に記載のポリペプチド。 20

【0040】

実施の形態 34 . Fc 領域は、半減期を高める 1 つ以上の置換を含む、実施の形態 31 ~ 33 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【0041】

実施の形態 35 . Fc 領域は、少なくとも 1 つの pH での FcRn 結合を増強し、及び / 又は Fc と FcRn との解離速度を低下させる 1 つ以上の置換を含む、実施の形態 34 に記載のポリペプチド。

【0042】

実施の形態 36 . Fc 領域は、252、254、256、428、又は 434 から選択される 1 つ以上のアミノ酸位置での置換を含む、実施の形態 31 ~ 35 のいずれか一項に記載のポリペプチド。 30

【0043】

実施の形態 37 . Fc 領域は、アミノ酸位置 252、254、及び 256 ; 又はアミノ酸位置 252 及び 428 ; 又はアミノ酸位置 428 及び 434 での置換を含む、実施の形態 36 に記載のポリペプチド。

【0044】

実施の形態 38 . Fc 領域は、置換 M252Y、S254T、及び T256E ; M252Y 及び M428V ; 又は M428L 及び N434S を含む、実施の形態 37 に記載のポリペプチド。 40

【0045】

実施の形態 39 . Fc 領域は、配列番号 47 ~ 配列番号 68 及び配列番号 85 ~ 配列番号 87 から選択される配列を含む、実施の形態 31 ~ 38 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【0046】

実施の形態 40 . ポリペプチドの半減期は、アルブミンに結合する VHH ドメインを欠く同じポリペプチドの半減期よりも長い、実施の形態 1 ~ 39 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【0047】

実施の形態 41 . 実施の形態 1 ~ 40 のいずれか一項に記載のポリペプチドと、薬学 50

的に許容可能な担体とを含む医薬組成物。

【 0 0 4 8 】

実施の形態 4 2 . 実施の形態 1 ~ 4 0 のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードする単離された核酸。

【 0 0 4 9 】

実施の形態 4 3 . 実施の形態 4 2 に記載の核酸を含むベクター。

【 0 0 5 0 】

実施の形態 4 4 . 実施の形態 4 2 に記載の核酸又は実施の形態 4 3 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【 0 0 5 1 】

実施の形態 4 5 . 実施の形態 1 ~ 4 0 のいずれか一項に記載のポリペプチドを発現する宿主細胞。

【 0 0 5 2 】

実施の形態 4 6 . 実施の形態 1 ~ 4 0 のいずれか一項に記載のポリペプチドを生産する方法であって、ポリペプチドの発現に適した条件下で実施の形態 4 4 又は 4 5 に記載の宿主細胞をインキュベートすることを含む、方法。

【 0 0 5 3 】

実施の形態 4 7 . ポリペプチドを単離することを更に含む、実施の形態 4 6 に記載の方法。

【 0 0 5 4 】

実施の形態 4 8 . 実施の形態 1 ~ 4 0 のいずれか一項に記載のポリペプチド、又は実施の形態 4 1 に記載の医薬組成物を被験体に投与することを含む方法。

【 0 0 5 5 】

実施の形態 4 9 . 疾患又は障害を治療する方法であって、疾患又は障害を伴う被験体に、実施の形態 1 ~ 4 0 のいずれか一項に記載のポリペプチド、又は実施の形態 4 1 に記載の医薬組成物を薬学的有効量、投与することを含む、方法。

【 0 0 5 6 】

実施の形態 5 0 . 疾患又は障害は、自己免疫疾患又は自己免疫障害、炎症性疾患又は炎症性障害、感染症、及び癌から選択される、実施の形態 4 9 に記載の方法。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 5 7 】

【 図 1 A - 1 C 】 図 1 A は、S 3 6 4 N、Y 4 0 7 N、及び K 4 0 9 T の突然変異を有する F c を含む、アルブミンに結合する単量体シングルドメイン抗体 (s d A b - N N T - F c) の概略図である。図 1 B 及び図 1 C は、ヒト血清アルブミン (H S A ; 図 1 B) 及びマウス血清アルブミン (M S A ; 図 1 C) に対する 4 A 0 1 - N N T - h F c (配列番号 2 3 及び配列番号 6 8) の一価結合を示す図である。

【 図 2 A - 2 B 】 図 2 A は、アルブミンドメイン 3 への結合を評定するバイオレイヤー干渉法の実験設計を示す概略図である。図 2 B は、4 A 0 1 - N N T - h F c (配列番号 2 3 及び配列番号 6 8) がアルブミンドメイン 3 に結合しないが、1 C 0 4 が結合することを示すバイオレイヤー干渉法のトレースを示す図である。

【 図 3 A - 3 B 】 図 3 A は、アルブミンへの B 2 M - F c R n 結合を評定するバイオレイヤー干渉法の実験設計を示す概略図である。図 3 B は、4 A 0 1 - N N T - h F c (配列番号 2 3 及び配列番号 6 8) 及びヒト化 4 A 0 1 v 5 1 - N N T - h F c がアルブミンへの B 2 m - F c R n 結合を阻止しないが、1 C 0 4 が阻止することを示すバイオレイヤー干渉法のトレースである。

【 図 4 A - 4 I 】 図 4 A は、或る特定の 4 A 0 1 ヒト化変異体 (配列番号 2 4 ~ 配列番号 4 3) のアラインメントを示す図である。図 4 B 及び図 4 C は、或る特定の 4 A 0 1 ヒト化変異体のヒトアルブミン (H S A) 結合 E L I S A を示す図である。図 4 D 及び図 4 E は、或る特定の 4 A 0 1 ヒト化変異体のカニクイザルアルブミン (C S A) 結合 E L I S A を示す図である。図 4 F 及び図 4 G は、或る特定の 4 A 0 1 ヒト化変異体のマウスアル

10

20

30

40

50

ブミン (M S A) 結合 E L I S A を示す図である。図 4 H 及び図 4 I は、或る特定の 4 A 0 1 ヒト化変異体のラットアルブミン (R S A) 結合 E L I S A を示す図である。

【図 5 A - 5 D】ヒト化 h z 4 A 0 1 v 5 1 のヒトアルブミン (H S A ; 図 5 A)、カニクイザルアルブミン (C S A ; 図 5 B)、マウスアルブミン (M S A ; 図 5 C)、及びラットアルブミン (R S A ; 図 5 D) 結合 E L I S A を示す図である。

【図 6】様々な単一特異性及び多重特異性シングルドメイン抗体フォーマットを示す図である。フォーマット (i) は、V H H - h I g G F c (h I g G F c を灰色で示す) としてフォーマットされた 2 つのアルブミン特異的 V H H ドメイン (黒色) を含む。フォーマット (i i) は、V H H - h I g G - N N T - F c (単量体 F c、灰色) としてフォーマットされた一価アルブミン特異的 V H H ドメイン (黒色) である。フォーマット (i i i) は、グリシン - セリンリンカーを介して接続されたアルブミン結合 V H H ドメイン (黒色) と非アルブミン標的化 V H H ドメイン (灰色) とからなる二重特異性ポリペプチドである。フォーマット (i v) は、h I g G 1 F c - V H H (h I g G F c を灰色で示す) としてフォーマットされた 2 つのアルブミン特異的 V H H ドメイン (黒色) を含む。フォーマット (v) は、非アルブミン抗体 (灰色で示す軽鎖及び重鎖を含む) の重鎖の C 末端に融合したアルブミン特異的 V H H ドメイン (黒色) を含む、各標的に対して二価の二重特異性ポリペプチドであり、このようなポリペプチドの重鎖は、V H - C H 1 - h I g G F c - V H H としてフォーマットすることができる。フォーマット (v i) は、非アルブミン抗体 (灰色で示す軽鎖及び重鎖を含む) の重鎖の N 末端に融合したアルブミン特異的 V H H ドメイン (黒色) を含む、各標的に対して二価の二重特異性ポリペプチドであり、このようなポリペプチドの重鎖は、V H H - V H - C H 1 - h I g G F c としてフォーマットすることができる。フォーマット (v i i) は、非アルブミン抗体 (灰色で示す軽鎖及び重鎖を含む) の C H 1 領域と F c 領域との間に融合したアルブミン特異的 V H H ドメイン (黒色) を含む、各標的に対して二価の二重特異性ポリペプチドであり、このようなポリペプチドの重鎖は、V H - C H 1 - V H H - h I g G F c としてフォーマットすることができる。フォーマット (v i i i) は、非アルブミン抗体 (灰色で示す軽鎖及び重鎖を含む) の軽鎖の N 末端に融合したアルブミン特異的 V H H ドメイン (黒色) を含む、各標的に対して二価の二重特異性ポリペプチドであり、このようなポリペプチドの軽鎖は、V H H - V L - C L としてフォーマットすることができる。フォーマット (i x) は、非アルブミン抗体 (灰色で示す軽鎖及び重鎖を含む) の軽鎖の C 末端に融合したアルブミン特異的 V H H ドメイン (黒色) を含む、各標的に対して二価の二重特異性ポリペプチドであり、このようなポリペプチドの軽鎖は、V L - C L - V H H としてフォーマットすることができる。

【図 7 A - 7 B】E L I S A によるヒトアルブミンへのアルブミン結合及び非アルブミン結合 s d A b ポリペプチドの結合を示す図である。図 7 A は p H 7 . 4 での結合を示し、図 7 B は p H 6 での結合を示す。図 7 A 及び図 7 B の構築物は、図 6 (i i i) に記載されるようにフォーマットされる。

【図 8】p H 7 . 4 での E L I S A によるヒト、カニクイザル、マウス、又はラットのアルブミンへの一価 s d A b ポリペプチド (c x 5 0 0 9) の結合を示す図である。図 9 の構築物は、図 6 (i i) に記載されるようにフォーマットされる。

【図 9 A - 9 D】非標的化二価 V H H - h I g G 1 - x E L L - F c ポリペプチド (c x 1 1 8 5 1) と比較した、アルブミン結合二価 V H H - h I g G 1 - x E L L - F c ポリペプチド (c x 1 1 9 5 6) の i n v i v o 薬物動態 (P K) プロファイルを示す図である。図 9 A 及び図 9 B は、E L I S A によって決定された、3 0 m g / k g の被験物質を投与した B A L B / c マウスにおける血清 P K プロファイルを示し、図 9 C 及び図 9 D は 0 . 3 m g / k g の被験物質を投与したマウスにおける血清 P K プロファイルを示す。図 9 A 及び図 9 C は、μ g / m L での絶対血清濃度を示し、図 9 B 及び図 9 D は、投与 3 0 分後の濃度 (c M a x) に対して正規化したデータを示す。図 9 A ~ 図 9 D の構築物は、図 6 (i) に記載されるようにフォーマットされる。

【図 1 0】バイオレイヤー干渉法 (B L I) による組換えビオチン化ヒト F C G R T (F

10

20

30

40

50

c R n) / B 2 M ヘテロ二量体へのヒト I g G 1 及びヒト I g G 1 - x E L L の結合を示す図である。F c R n への会合及び解離は、p H 6 及び p H 8 で検出した。

【図 1 1 A - 1 1 B】E L I S A による中性 p H (7 . 4) での組換えヒトアルブミン (図 1 1 A) 、及び I L - 4 R (図 1 1 B) への結合に対する異なる単一特異性及び二重特異性アルブミン結合シングルドメイン抗体フォーマットの結合を示す図である。単一特異性分子 (c x 1 2 5 8 3 及び c x 1 2 5 8 4) は、図 6 (i v) に記載されるようにフォーマットされ、二重特異性分子は、図 6 (v) (c x 1 2 5 8 7 及び c x 1 2 5 9 4) 又は図 6 (v i i) (c x 1 2 5 9 5 及び c x 1 2 5 9 6) に記載されるようにフォーマットされる。

【図 1 2 A - 1 2 D】p H 6 (図 1 2 A 及び図 1 2 C) 及び p H 7 . 4 (図 1 2 B 及び 1 2 D) での一価 V H H - h I g G 1 - N N T - F c ポリペプチド (図 1 1 A 及び図 1 1 B) 及び二価 V H H - h I g G 1 - x E L L - F c ポリペプチド (図 1 2 C 及び図 1 2 D) としてフォーマットされた或る特定の 4 A 0 1 ヒト化変異体のヒトアルブミン (H S A) 結合 E L I S A を示す図である。 10

【発明を実施するための形態】

【 0 0 5 8 】

本明細書に示される実施形態は、アルブミン結合ポリペプチド及びその使用に関する。

【 0 0 5 9 】

定義及び様々な実施形態

本明細書に使用されるセクションの見出しは編成のみを目的とし、記載される主題を限定すると解釈されるものではない。 20

【 0 0 6 0 】

特許出願、特許公報、及び G e n b a n k アクセス番号を含む本明細書で引用される全ての参考文献は、各個別の参考文献が、引用することによりその全体が本明細書の一部をなすと具体的かつ個別に示されているかのように、引用することにより本明細書の一部をなす。

【 0 0 6 1 】

本明細書に記載又は参照される技術及び手順は、一般に十分に理解されており、通常、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd. edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, et al. eds., (2003)), the series METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.), PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL、及びANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, ed. (1987)), Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed., 1984)、Methods in Molecular Biology, Humana Press、Cell Biology: A Laboratory Notebook (J. E. Cellis, ed., 1998) Academic Press、Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed., 1987)、Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press、Cell and Tissue Culture Laboratory Procedures (A. Doyle, J. B. Griffiths, and D. G. Newell eds., 1993-8) J. Wiley and Sons、Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds.)、Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller and M. P. Calos, eds., 1987)、PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994)、Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan et al. eds., 1991)、Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999)、Immunobiology (C. A. Janeway and P. Travers, 1997)、Antibodies (P. Finch, 1997)、Antibodies: A Practical Approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989)、Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2 30 40 50

000)、Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow and D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999)、The Antibodies (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995)、及びCancer: Principles and Practice of Oncology (V. T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 1993)並びにそれらの最新版に記載される広く利用されている方法論等の当業者による慣例的な方法論を用いて使用される。

【0062】

別段の規定がない限り、本開示に関連して使用される科学用語及び技術用語は、当業者によって一般に理解される意味を有するものとする。さらに、文脈により別段の要求がない限り、又は明白に特段の指示がない限り、単数名詞は複数を含み、複数名詞は単数を含むものとする。様々な出典又は参考文献の間での定義の矛盾については、本明細書に示される定義が優先される。

10

【0063】

一般に、免疫グロブリン重鎖定常領域における残基の番号付けは、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)でのようなE Uインデックスの番号付けである。「K a b a tでのようなE Uインデックス」は、ヒトIg G 1 E U抗体の残基番号付けを指す。

【0064】

本明細書に記載される本発明の実施形態は、「からなる (consisting)」実施形態及び/又は「から本質的になる (consisting essentially of)」実施形態を含むと理解される。本明細書で使用される場合に、単数形 ("a", "an", and "the") は、特段の指示がない限り複数の参照を含む。本明細書での「又は」という用語の使用は、選択肢が互いに排他的であることを意味すると解釈されない。

20

【0065】

本出願では、「又は」の使用は、明白に特段の指定がない限り又は当業者によって理解されない限り、「及び/又は」を意味する。多項従属請求項の文脈では、「又は」の使用は、2項以上の先行する独立請求項又は従属請求項を引用する。

【0066】

「参照試料」、「参照細胞」、又は「参照組織」という語句は、少なくとも1つの未知の特徴を有する試料との比較として使用され得る少なくとも1つの既知の特徴を有する試料を示す。幾つかの実施形態においては、参照試料は、陽性又は陰性の指標として使用され得る。参照試料を使用することで、未知の特徴を有する試料中に存在するタンパク質及び/又はmRNAのレベルに対して、例えば、健康な組織中に存在するタンパク質及び/又はmRNAのレベルを確立することができる。幾つかの実施形態においては、参照試料は、同じ被験体に由来するが、試験される部分とは異なる被験体の部分に由来する試料である。幾つかの実施形態においては、参照試料は、癌を取り囲む又は癌に隣接する組織領域に由来する試料である。幾つかの実施形態においては、参照試料は、試験される被験体に由来するものではなく、対象の障害を有する又は有しないことが既知の被験体に由来する試料である。幾つかの実施形態においては、参照試料は、同じ被験体に由来するものであるが、被験体が癌を発症する前の時点での試料である。幾つかの実施形態においては、参照試料は、同じ被験体又は異なる被験体からの良性癌試料に由来する試料である。比較のために陰性参照試料が使用される場合に、陰性参照試料における対象の分子の発現レベル又は量は、当業者が本開示を考慮して、該分子が存在しない及び/又は低いレベルの該分子が存在することを認識するレベルを示す。比較のために陽性参照試料が使用される場合に、陽性参照試料における対象の分子の発現レベル又は量は、当業者が本開示を考慮して、或るレベルの該分子が存在することを認識するレベルを示す。

30

40

【0067】

療法剤の投与から恩恵を受ける又は療法剤の投与に応答するという文脈において本明細書で使用される「便益」、「臨床的便益」、「応答性」、及び「治療的応答性」という用

50

語は、様々なエンドポイント、例えば、減速及び完全な停止を含む疾患進行の或る程度の障害、疾患エピソード及び／又は症状の数の減少、病変サイズの縮小、隣接する末梢器官及び／又は末梢組織内への疾患細胞浸潤の障害（すなわち、減少、減速、又は完全な停止）、病気蔓延の障害（すなわち、減少、減速、又は完全な停止）、障害に関連する1つ以上の症状の或る程度の軽減、治療後の無病提示、例えば無増悪生存期間の長さの増加、全生存期間の延長、より高い奏効率、及び／又は治療後の所与の時点での死亡率の低下を評価することによって推し量ることができる。「非応答性」又は「応答しない」被験体又は癌は、「応答する」という上記の条件を満たさないものである。

【0068】

「核酸分子」、「核酸」、及び「ポリヌクレオチド」という用語は、区別なく使用され、ヌクレオチドのポリマーを指し得る。そのようなヌクレオチドのポリマーは、天然及び／又は非天然のヌクレオチドを含み、限定されるものではないが、DNA、RNA、及びPNAを含み得る。「核酸配列」は、核酸分子又はポリヌクレオチドに含まれるヌクレオチドの線状配列を指す。

【0069】

「ポリペプチド」及び「タンパク質」という用語は、アミノ酸残基のポリマーを指すために区別なく使用され、最小の長さに限定されない。そのようなアミノ酸残基のポリマーは、天然又は非天然のアミノ酸残基を含み、限定されるものではないが、ペプチド、オリゴペプチド、アミノ酸残基の二量体、三量体、及び多量体を含み得る。この定義には、完全長タンパク質及びその断片の両方が含まれる。これらの用語はまた、ポリペプチドの発現後修飾、例えば、グリコシル化、シアル化、アセチル化、リン酸化等を含む。さらに、本開示の目的で、「ポリペプチド」は、タンパク質が所望の活性を維持する限り、天然配列に対する欠失、付加、及び置換等の修飾（一般に性質について保存的）を含むタンパク質を指す。これらの修飾は、部位特異的突然変異誘発によるような意図的なものであり得る、又はタンパク質を産生する宿主の突然変異若しくはPCR増幅によるエラーによるような偶発的なものであり得る。

【0070】

本明細書で使用される「アルブミン」は、細胞内でのアルブミン前駆体のプロセッシングから生ずるあらゆる天然の成熟アルブミンを指す。この用語は、特段の指示がない限り、霊長類（例えば、ヒト及びカニクイザル又はアカゲザル）及び齧歯類（例えば、マウス及びラット）等の哺乳動物を含むあらゆる脊椎動物起源からのアルブミンを含む。この用語はまた、スプライス変異体又はアレル変異体等のアルブミンの天然に存在する変異体を含む。非限定的な例示的な成熟ヒトアルブミンアミノ酸配列は、例えばUniProtアクセス番号P02768.2に示されている。配列番号1を参照されたい。非限定的な例示的なマウス、カニクイザル、及びラットアルブミンアミノ酸配列を配列番号2～配列番号4に示す。

【0071】

抗原又はエピトープに「特異的に結合する」という用語は、当該技術分野で十分に理解されている用語であり、そのような特異的な結合を決定する方法も当該技術分野で十分に知られている。別の細胞又は物質と反応又は会合するよりも特定の細胞又は物質とより頻繁に、より迅速に、より長い持続時間及び／又はより高い親和性で反応又は会合する場合に、分子は「特異的な結合」又は「優先的な結合」を示すと言及される。シングルドメイン抗体（sdAb）又はVHH含有ポリペプチドは、他の物質に結合するよりも高い親和性、アビディティーで、より容易に、及び／又はより長い持続時間で結合する場合に、標的に「特異的に結合」又は「優先的に結合」する。例えば、アルブミンエピトープに特異的に又は優先的に結合するsdAb又はVHH含有ポリペプチドは、他のアルブミンエピトープ又は非アルブミンエピトープに結合するよりも高い親和性、アビディティーで、より容易に、及び／又はより長い持続時間でこのエピトープに結合するsdAb又はVHH含有ポリペプチドである。また、この定義を解釈することにより、例えば、第1の標的に特異的又は優先的に結合するsdAb又はVHH含有ポリペプチドが、第2の標的に特異

的又は優先的に結合し得る又は結合し得ないことも理解される。したがって、「特異的な結合」又は「優先的な結合」は、排他的な結合を（含み得るものの）必ずしも必要としない。一般に、必ずしもそうとは限らないが、結合への言及は優先的な結合を意味する。「特異性」は、結合タンパク質が抗原に選択的に結合する能力を指す。

【 0 0 7 2 】

本明細書で使用される場合に、標的タンパク質の活性に関する「阻害する」という用語は、タンパク質の活性の低下を指す。幾つかの実施形態においては、「阻害する」とは、モジュレーターの非存在下のタンパク質と比較した活性の低下を指す。

【 0 0 7 3 】

本明細書で使用される場合に、「エピトープ」という用語は、抗原結合分子（例えば、
s d A b 又は V H H 含有ポリペプチド）が結合する標的分子（例えば、タンパク質、核酸
、炭水化物、又は脂質等の抗原）上の部位を指す。エピトープは、しばしば、アミノ酸、
ポリペプチド、又は糖側鎖等の分子の化学的に活性な表面編成物を含み、特定の三次元構
造的特徴及び特定の電荷特徴を有する。エピトープは、標的分子の連続残基及び／又は並
置された非連続残基（例えば、アミノ酸、ヌクレオチド、糖、脂質部分）の両方から形成
され得る。連続残基（例えば、アミノ酸、ヌクレオチド、糖、脂質部分）から形成される
エピトープは、通常、変性溶媒への曝露で保持されるが、三次フォールディングにより形
成されるエピトープは、通常、変性溶媒による処理で失われる。エピトープは、限定され
るものではないが、少なくとも 3 個、少なくとも 5 個、又は 8 個～10 個の残基（例えば
、アミノ酸又はヌクレオチド）を含み得る。幾つかの実施形態においては、エピトープは
、20 残基（例えば、アミノ酸又はヌクレオチド）未満、15 残基未満、又は 12 残基未
満の長さである。2つの抗体は、それらが抗原に対して競合的結合を示す場合に、抗原内
の同じエピトープに結合し得る。幾つかの実施形態においては、エピトープは、抗原結合
分子上の C D R 残基との或る特定の最小距離によって特定され得る。幾つかの実施形態
においては、エピトープは、上記距離によって特定され得て、抗原結合分子の残基と抗原残
基との間の結合（例えば、水素結合）に関与するそれらの残基に更に限定され得る。エピ
トープは、様々なスキャンによっても同様に特定され得る。例えば、アラニンスキャン又
はアルギニンスキャンは、抗原結合分子が相互作用し得る 1 つ以上の残基を示すことがで
きる。明示的に示されない限り、エピトープとしての残基のセットは、特定の抗原結合分
子に対するエピトープの一部であることから他の残基を除外するものではない。むしろ、
そのようなセットの存在は、最小のエピトープの列（又は種類のセット）を示す。したが
って、幾つかの実施形態においては、エピトープとして特定された残基のセットは、抗原
上のエピトープについての残基の排他的リストではなく、抗原に関連する最小のエピト
ープを示す。

【 0 0 7 4 】

「非線状エピトープ」又は「立体構造エピトープ」は、エピトープに特異的な抗原結合
分子が結合する抗原性タンパク質内の非連続的なポリペプチド、アミノ酸及び／又は糖を
含む。幾つかの実施形態においては、少なくとも 1 つの残基がエピトープの他の示された
残基と非連続的であるが、1 つ以上の残基が他の残基と連続的である場合もある。

【 0 0 7 5 】

「線状エピトープ」は、エピトープに特異的な抗原結合分子が結合する抗原性タンパク
質内の連続的なポリペプチド、アミノ酸及び／又は糖を含む。幾つかの実施形態におい
ては、線状エピトープ内の残基の全てが、抗原結合分子によって直接的に結合される（又は
結合に関与する）必要があるわけではないことに留意されたい。幾つかの実施形態におい
ては、線状エピトープは、事実上線状エピトープの配列からなるペプチドによる免疫化に
由来し得る、又はタンパク質の残部から相対的に分離されたタンパク質の構造区間に由来
し得る（こうして、抗原結合分子は、少なくとも主として、まさにその配列区間と相互作
用し得る）。

【 0 0 7 6 】

「抗体」という用語は、最も広い意味で使用され、限定されるものではないが、慣例的

10

20

30

40

50

な抗体（典型的には、少なくとも1つの重鎖及び少なくとも1つの軽鎖を含む）及びその断片（例えばs c F v、F a b）、シングルドメイン抗体（s d A b、少なくとも1つのV H Hドメイン及びF c領域を含む）、V H H含有ポリペプチド（少なくとも1つのV H Hドメインを含むポリペプチド）、及び所望の抗原結合活性を示す限り上述のいずれかの断片を含む抗体様抗原結合ドメインを含む様々なポリペプチドを包含する。幾つかの実施形態においては、抗体は二量体化ドメインを含む。そのような二量体化ドメインとしては、限定されるものではないが、重鎖定常ドメイン（C H 1、ヒンジ、C H 2、及びC H 3を含み、C H 1は典型的には、軽鎖定常ドメインC Lと対をなす一方で、ヒンジは二量体化を介在する）及びF c領域（ヒンジ、C H 2、及びC H 3を含み、ヒンジは二量体化を介在する）が挙げられる。

10

【0077】

抗体という用語には、限定されるものではないが、キメラ抗体、ヒト化抗体、及びラクダ（ラマを含む）、サメ、マウス、ヒト、カニクイザル等の様々な種の抗体も含まれる。

【0078】

本明細書で使用される「抗原結合ドメイン」という用語は、抗原に結合するのに十分な抗体の部分を目指す。幾つかの実施形態においては、慣例的な抗体の抗原結合ドメインは、3つの重鎖C D R及び3つの軽鎖C D Rを含む。したがって、幾つかの実施形態においては、抗原結合ドメインは、C D R 1 - F R 2 - C D R 2 - F R 3 - C D R 3と、抗原への結合を維持するのに必要とされるF R 1及び／又はF R 4の任意の部分とを含む重鎖可変領域、並びにC D R 1 - F R 2 - C D R 2 - F R 3 - C D R 3と、抗原への結合を維持するのに必要とされるF R 1及び／又はF R 4の任意の部分とを含む軽鎖可変領域を含む。幾つかの実施形態においては、s d A b又はV H H含有ポリペプチドの抗原結合ドメインは、V H Hドメインの3つのC D Rを含む。したがって、幾つかの実施形態においては、s d A b又はV H H含有ポリペプチドの抗原結合ドメインは、C D R 1 - F R 2 - C D R 2 - F R 3 - C D R 3と、抗原への結合を維持するのに必要とされるF R 1及び／又はF R 4の任意の部分とを含むV H Hドメインを含む。

20

【0079】

本明細書で使用される「V H H」又は「V H Hドメイン」又は「V H H抗原結合ドメイン」という用語は、ラクダ抗体又はサメ抗体等のシングルドメイン抗体の抗原結合部分を指す。幾つかの実施形態においては、V H Hは、F R 1、C D R 1、F R 2、C D R 2、F R 3、C D R 3、及びF R 4と表される3つのC D Rと4つのフレームワーク領域とを含む。幾つかの実施形態においては、V H Hは、V H Hが実質的に抗原結合及び特異性を維持する限り、部分的なF R 1及び／又はF R 4のみを含むように又はそれらのフレームワーク領域の一方若しくは両方を欠くように、N末端又はC末端で切断されていてもよい。

30

【0080】

「シングルドメイン抗体」及び「s d A b」という用語は、軽鎖及びF c領域を有しないV H Hドメイン等の少なくとも1つの単量体ドメインを含む抗体を指すために、本明細書において区別なく使用される。幾つかの実施形態においては、s d A bは、それぞれのポリペプチドが少なくとも1つのV H Hドメイン及びF c領域を含む2つのポリペプチドの二量体である。本明細書で使用される場合に、「シングルドメイン抗体」及び「s d A b」という用語は、多重V H Hドメインを含むポリペプチド、例えば、構造V H H₁ - V H H₂ - F c又はV H H₁ - V H H₂ - V H H₃ - F cを有し、ここで、V H H₁、V H H₂、及びV H H₃が同じか又は異なる場合があるポリペプチドを包含する。

40

【0081】

「V H H含有ポリペプチド」という用語は、少なくとも1つのV H Hドメインを含むポリペプチドを指す。幾つかの実施形態においては、V H Hポリペプチドは、2つ、3つ、又は4つ以上のV H Hドメインを含み、ここで、各V H Hドメインは、同じ又は異なっている。幾つかの実施形態においては、V H H含有ポリペプチドは、F c領域を含む。幾つかのそのような実施形態においては、V H H含有ポリペプチドは、s d A bと称さ

50

れ得る。さらに、幾つかのそのような実施形態においては、V H Hポリペプチドは、二量体を形成し得る。s d A bとも称されるV H H含有ポリペプチドの非限定的な構造としては、V H H₁ - F c、V H H₁ - V H H₂ - F c、及びV H H₁ - V H H₂ - V H H₃ - F cが挙げられ、ここで、V H H₁、V H H₂、及びV H H₃は、同じ又は異なっているもよい。そのような構造の幾つかの実施形態においては、或るV H Hは、リンカーによって別のV H Hに連結され得る、又は或るV H Hは、リンカーによってF cに連結され得る。幾つかのそのような実施形態においては、リンカーは、1個～20個のアミノ酸、好ましくは、主にグリシン及び任意にセリンから構成される1個～20個のアミノ酸を含む。非限定的なリンカーは配列番号88～配列番号93に示される。幾つかの実施形態においては、V H H含有ポリペプチドがF cを含む場合に、それは二量体を形成する。したがって、構造V H H₁ - V H H₂ - F cは、それが二量体を形成する場合に、四価であるとみなされる（すなわち、二量体は4つのV H Hドメインを有する）。同様に、構造V H H₁ - V H H₂ - V H H₃ - F cは、それが二量体を形成する場合に、六価であるとみなされる（すなわち、二量体は6つのV H Hドメインを有する）。

10

【0082】

「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体集団の抗体（s d A b又はV H H含有ポリペプチドを含む）を指す。すなわち、集団を構成する個々の抗体は、少量で存在し得る天然に生じる可能性のある突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は非常に特異的であり、単一の抗原部位に対するものである。さらに、典型的には、異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対する抗体である。したがって、モノクローナル抗体の試料は、抗原上の同じエピトープに結合することができる。「モノクローナル」という修飾成句は、抗体の実質的に均一な集団から得られる抗体の性質を示し、何らかの特定の方法による抗体の産生を必要とすると解釈されるべきではない。例えば、モノクローナル抗体は、Kohler and Milstein, 1975, Nature 256:495により最初に記載されたハイブリドーマ法によって作製され得る、又は米国特許第4,816,567号に記載されるような組換えDNA法によって作製され得る。モノクローナル抗体はまた、例えば、McCafferty et al., 1990, Nature 348:552-554に記載される技術を使用して作製されたファージライブラリーから単離され得る。

20

【0083】

「CDR」という用語は、少なくとも1つの当業者に対する特定様式によって定義される相補性決定領域を示す。幾つかの実施形態においては、CDRは、Chothia番号付けスキーム、Kabatt番号付けスキーム、KabattとChothiaとの組合せ、AbM定義、及び/又は接触定義（contact definition）のいずれかに従って定義され得る。V H Hは、CDR1、CDR2、及びCDR3と表される3つのCDRを含む。

30

【0084】

本明細書で使用される「重鎖定常領域」という用語は、少なくとも3つの重鎖定常ドメイン、すなわち、C_H1、ヒンジ、C_H2、及びC_H3を含む領域を指す。当然ながら、ドメイン内の機能を変えない欠失及び改変は、特段の指定がない限り、「重鎖定常領域」という用語の範囲内に含まれる。非限定的な例示的な重鎖定常領域としては、γ、δ、及びαが挙げられる。非限定的な例示的な重鎖定常領域としては、ε及びμも挙げられる。それぞれの重鎖定常領域は、1つの抗体アイソタイプに対応する。例えば、γ定常領域を含む抗体はIgG抗体であり、δ定常領域を含む抗体はIgD抗体であり、α定常領域を含む抗体はIgA抗体である。さらに、μ定常領域を含む抗体はIgM抗体であり、ε定常領域を含む抗体はIgE抗体である。或る特定のアイソタイプは、更にサブクラスに細分化され得る。例えば、IgG抗体としては、限定されるものではないが、IgG1抗体（γ₁定常領域を含む）、IgG2抗体（γ₂定常領域を含む）、IgG3抗体（γ₃定常領域を含む）、及びIgG4抗体（γ₄定常領域を含む）が挙げられ、IgA抗体としては、限定されるものではないが、IgA1抗体（α₁定常領域を含む）及びIgA2抗体（α₂定常領域を含む）が挙げられ、IgM抗体としては、限定されるものではないが

40

50

、I g M 1 及び I g M 2 が挙げられる。

【 0 0 8 5 】

本明細書で使用される「F c 領域」は、C H 2 及び C H 3 を含む重鎖定常領域の一部を指す。幾つかの実施形態においては、F c 領域は、ヒンジ、C H 2、及び C H 3 を含む。様々な実施形態において、F c 領域がヒンジを含む場合に、ヒンジは、2つのF c 含有ポリペプチド間の二量体化を介在する。F c 領域は、本明細書で論じられる任意の抗体重鎖定常領域アイソタイプのものであり得る。幾つかの実施形態においては、F c 領域は、I g G 1、I g G 2、I g G 3、又はI g G 4である。幾つかの実施形態においては、F c 領域は、ヒトF c 領域に由来し、C末端リジン残基を欠く。幾つかの実施形態においては、F c 領域は、ヒトF c 領域に由来し、C末端リジン残基を含む。幾つかの実施形態においては、F c 領域のC末端アミノ酸は、リジン以外のアミノ酸である。幾つかの実施形態においては、F c 領域は、ヒトF c 領域に由来し、C末端グリシン及びリジン残基を欠く。

10

【 0 0 8 6 】

本明細書で使用される「アクセプターヒトフレームワーク」は、本明細書で論じられるように、ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワークに由来する重鎖可変ドメイン(V_H)フレームワークのアミノ酸配列を含むフレームワークである。ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワークに由来するアクセプターヒトフレームワークは、その同じアミノ酸配列を含むことができる、又はアミノ酸配列の変化を含み得る。幾つかの実施形態においては、アミノ酸の変化の数は、V H H等の単一の抗原結合ドメイン内の全てのヒトフレームワークにわたって10個未満、又は9個未満、又は8個未満、又は7個未満、又は6個未満、又は5個未満、又は4個未満、又は3個未満である。

20

【 0 0 8 7 】

「親和性」は、分子(例えば、s d A b等の抗体又はV H H含有ポリペプチド)の単一の結合部位及びその結合相手(例えば、抗原)の間の非共有結合的相互作用の合計の強さを指す。分子Xのその相手Yに対する親和性又は見かけの親和性は、一般に、それぞれ解離定数(K_D)又はK_D(見かけ)によって表すことができる。親和性は、本明細書に記載されている方法を含む、当該技術分野で既知の通常の方法(例えば、E L I S A K_D、K i n E x A、フローサイトメトリー、及び/又は表面プラズモン共鳴デバイス等)によって測定され得る。このような方法としては、限定されるものではないが、B I A c o r e(登録商標)、O c t e t(登録商標)、又はフローサイトメトリーを要する方法が挙げられる。

30

【 0 0 8 8 】

本明細書で使用される「K_D」という用語は、抗原結合分子/抗原相互作用の平衡解離定数を指す。本明細書で「K_D」という用語が使用される場合に、それには、K_D及びK_D(見かけ)が含まれる。

【 0 0 8 9 】

幾つかの実施形態においては、抗原結合分子のK_Dは、フローサイトメトリーによって、抗原発現細胞系統を使用し、各抗体濃度で測定された平均蛍光を非線形1サイト結合方程式(graphpadのP r i s m S o f t w a r e)にフィッティングして測定される。幾つかのそのような実施形態においては、K_DはK_D(見かけ)である。

40

【 0 0 9 0 】

「生物学的活性」という用語は、分子の任意の1つ以上の生物学的特性(i n v i v oで見られるように天然に存在するか、又は組換え手段によって提供される若しくは可能となるかどうか)を指す。生物学的特性としては、限定されるものではないが、リガンドの結合、細胞増殖の誘導又は増加、及びサイトカインの発現の誘導又は増加が挙げられる。

【 0 0 9 1 】

「アゴニスト」抗体又は「活性化」抗体は、標的抗原の生物学的活性を増加及び/又は

50

活性化する抗体である。幾つかの実施形態においては、アゴニスト抗体は、抗原に結合し、その生物学的活性を少なくとも約 20 %、40 %、60 %、80 %、85 % 以上増加させる。

【0092】

「アンタゴニスト」抗体、「ブロック」抗体、又は「中和」抗体は、標的抗原の生物学的活性を阻害、低下及び/又は不活性化する抗体である。幾つかの実施形態においては、中和抗体は、抗原に結合し、その生物学的活性を少なくとも約 20 %、40 %、60 %、80 %、85 %、90 %、95 %、99 % 以上低下させる。

【0093】

「親和性成熟」s d A b 又は V H H 含有ポリペプチドは、s d A b 又は V H H 含有ポリペプチドの抗原に対する親和性に改善をもたらす改変を有しない親 s d A b 又は V H H 含有ポリペプチドと比較して 1 つ以上の C D R に 1 つ以上のそのような改変を有する s d A b 又は V H H 含有ポリペプチドを指す。

【0094】

本明細書で使用される「ヒト化 V H H」は、1 つ以上のフレームワーク領域が実質的にヒトフレームワーク領域で置き換えられた V H H を指す。幾つかの場合には、ヒト免疫グロブリンの或る特定のフレームワーク領域 (F R) 残基が、対応する非ヒト残基によって置き換えられる。さらに、ヒト化 V H H は、当初の V H H にもヒトフレームワーク配列にも見られないが、s d A b 又は V H H 含有ポリペプチドの性能を更に改良及び最適化するために含まれる残基を含み得る。幾つかの実施形態においては、ヒト化 s d A b 又は V H H 含有ポリペプチドは、ヒト F c 領域を含む。理解されるように、ヒト化配列は、その一次配列によって特定され得て、必ずしも抗体が作製された過程を示すわけではない。

【0095】

「エフェクター陽性 F c 領域」は、天然配列の F c 領域の「エフェクター機能」を有する。例示的な「エフェクター機能」としては、F c 受容体結合、C 1 q 結合及び補体依存性細胞傷害作用 (C D C)、F c 受容体結合、抗体依存性細胞介在性細胞傷害作用 (A D C C)、食作用、細胞表面受容体 (例えば、B 細胞受容体) の下方調節、並びに B 細胞活性化等が挙げられる。このようなエフェクター機能は、一般に、F c 領域を結合ドメイン (例えば、抗体可変ドメイン) と組み合わせることを要し、様々なアッセイを使用して評価することができる。

【0096】

「天然配列の F c 領域」は、天然に見られる F c 領域のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を含む。天然配列のヒト F c 領域としては、天然配列のヒト I g G 1 F c 領域 (非 A アロタイプ及び A アロタイプ)、天然配列のヒト I g G 2 F c 領域、天然配列のヒト I g G 3 F c 領域、及び天然配列のヒト I g G 4 F c 領域、並びにそれらの天然に存在する変異体が挙げられる。

【0097】

「変異型 F c 領域」は、少なくとも 1 つのアミノ酸修飾により天然配列の F c 領域のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含む。幾つかの実施形態においては、「変異型 F c 領域」は、少なくとも 1 つのアミノ酸修飾により天然配列の F c 領域のアミノ酸配列とは異なるが、天然配列の F c 領域の少なくとも 1 つのエフェクター機能を保持するアミノ酸配列を含む。幾つかの実施形態においては、変異型 F c 領域は、天然配列の F c 領域又は親ポリペプチドの F c 領域と比較して、天然配列の F c 領域又は親ポリペプチドの F c 領域において、少なくとも 1 個のアミノ酸置換、例えば、約 1 個 ~ 約 10 個のアミノ酸置換、好ましくは、約 1 個 ~ 約 5 個のアミノ酸置換を有する。幾つかの実施形態においては、本明細書の変異型 F c 領域は、天然配列の F c 領域及び/又は親ポリペプチドの F c 領域と少なくとも約 80 % の配列同一性、それらと少なくとも約 90 % の配列同一性、それらと少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、又は少なくとも約 99 % の配列同一性を有する。

【0098】

10

20

30

40

50

「Fc受容体」又は「FcR」は、抗体のFc領域に結合する受容体を記載している。幾つかの実施形態においては、FcγRは、天然のヒトFcRである。幾つかの実施形態においては、FcRは、IgG抗体（ガンマ受容体）に結合するものであり、FcγRIサブクラス、FcγRIIサブクラス、及びFcγRIIIサブクラスの受容体であって、これらの受容体のアレル変異体及び選択的スプライシングされた形態を含む受容体を含む。FcγRII受容体には、FcγRIIA（「活性化受容体」）及びFcγRIIB（「阻害受容体」）が含まれ、これらは同様のアミノ酸配列を有するが、主にその細胞質ドメインが異なる。活性化受容体FcγRIIAは、その細胞質ドメインに免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ（ITAM）を含む。阻害受容体FcγRIIBは、その細胞質ドメインに免疫受容体チロシンベースの阻害モチーフ（ITIM）を含む（例えば、Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)を参照されたい）。FcRは、例えば、Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991)、Capel et al., *Immunomethods* 4:25-34 (1994)、及びde Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995)でレビューされている。将来特定されるものを含む他のFcRは、本明細書では「FcR」という用語によって包含される。例えば、「Fc受容体」又は「FcR」という用語はまた、胎児性受容体FcRnを含み、これは、母体のIgGの胎児への移動（Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976)及びKim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)）及び免疫グロブリンの恒常性の調節の役割を担う。FcRnへの結合を測定する方法は既知である（例えば、Ghetie and Ward, *Immunol. Today* 18(12):592-598 (1997)、Ghetie et al., *Nature Biotechnology* 15(7):637-640 (1997)、Hinton et al., *J. Biol. Chem.* 279(8):6213-6216 (2004)、国際公開第2004/92219号（Hintonら）を参照されたい）。

【0099】

本明細書で使用される「実質的に同様」又は「実質的に同じ」という用語は、当業者が2つ以上の値の間の差を、上記値によって測定される生物学的特徴の文脈内で生物学的意義及び/又は統計学的有意性が殆どない又は全くないとみなすような、2つ以上の数値の間の十分に高度な類似性を示す。幾つかの実施形態においては、2つ以上の実質的に同様の値は、5%、10%、15%、20%、25%、又は50%のいずれか1つの概数以下だけ異なる。

【0100】

ポリペプチド「変異体」とは、配列をアラインメントし、必要に応じてギャップを導入して最大パーセントの配列同一性を達成した後に、配列同一性の部分として保存的置換を一切考慮せずに、天然配列のポリペプチドと少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する生物学的に活性なポリペプチドを意味する。そのような変異体としては、例えば、ポリペプチドのN末端又はC末端で1つ以上のアミノ酸残基が付加又は欠失されているポリペプチドが挙げられる。幾つかの実施形態においては、変異体は、少なくとも約80%のアミノ酸配列同一性を有する。幾つかの実施形態においては、変異体は、少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性を有する。幾つかの実施形態においては、変異体は、天然配列のポリペプチドと少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を有する。

【0101】

本明細書で使用される場合に、ペプチド配列、ポリペプチド配列、又は抗体配列に関する「パーセント(%)のアミノ酸配列同一性」及び「ホモロジー」は、配列をアラインメントし、必要に応じてギャップを導入して最大パーセントの配列同一性を達成した後に、配列同一性の部分として保存的置換を一切考慮せずに、特定のペプチド配列又はポリペプチド配列中のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージとして定義される。パーセントのアミノ酸配列同一性を決定するためのアラインメントは、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、又はMEGALIGN（商標）（DNASTAR）ソフトウェア等の公的に利用可能なコンピュータソフトウェアを使用して、当業者の技能の範囲内である様々な方法で達成され得る。当業者は、比較される配列の全長にわたって最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、ア

ラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。

【 0 1 0 2 】

アミノ酸置換には、限定されるものではないが、ポリペプチド中の或るアミノ酸を別のアミノ酸により置き換えることが含まれ得る。例示的な置換を表 1 に示す。アミノ酸置換を対象の抗体に導入し、産物を所望の活性、例えば、抗原結合の保持 / 改善、免疫原性の減少、又は A D C C 若しくは C D C の改善についてスクリーニングすることができる。

【 0 1 0 3 】

【表 1】

表 1

当初の残基	例示的な置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn; Glu
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノルロイシン
Leu (L)	ノルロイシン; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Val; Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン

10

20

30

【 0 1 0 4 】

共通の側鎖特性に従ってアミノ酸をグループ分けすることができる：

- (1) 疎水性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile、
- (2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln、
- (3) 酸性：Asp、Glu、
- (4) 塩基性：His、Lys、Arg、
- (5) 鎖の配向に影響する残基：Gly、Pro、
- (6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

【 0 1 0 5 】

非保存的置換は、これらのクラスの 1 つのメンバーを別のクラスに交換することを伴う。

40

【 0 1 0 6 】

「ベクター」という用語は、宿主細胞内で増殖され得る、クローニングされたポリヌクレオチド（単数又は複数）を含むように操作することができるポリヌクレオチドを記載するために使用される。ベクターは、以下のエレメントのうちの 1 つ以上を含み得る：複製起点、対象のポリペプチドの発現を調節する 1 つ以上の調節配列（例えば、プロモーター及び / 又はエンハンサー等）、及び / 又は 1 つ以上の選択可能なマーカー遺伝子（例えば、抗生物質耐性遺伝子及び比色アッセイで使用することができる遺伝子、例えば、β - ガラクトシダーゼ等）。「発現ベクター」という用語は、宿主細胞において対象のポリペ

50

チドを発現するために使用されるベクターを指す。

【0107】

「宿主細胞」は、ベクター又は単離されたポリヌクレオチドのレシピエントであり得る又はレシピエントであった細胞を指す。宿主細胞は、原核細胞又は真核細胞であり得る。例示的な真核細胞としては、霊長類動物細胞又は非霊長類動物細胞等の哺乳動物細胞、酵母等の真菌細胞、植物細胞、及び昆虫細胞が挙げられる。非限定的な例示的な哺乳動物細胞としては、限定されるものではないが、NSO細胞、PER.C6（商標）細胞（Cru cell）、並びに293細胞及びCHO細胞、並びにそれらの派生物、例えば293-6E細胞、CHO-DG44細胞、CHO-K1細胞、CHO-S細胞、及びCHO-DS細胞が挙げられる。宿主細胞には、単一の宿主細胞の子孫が含まれるが、自然突然変異、偶発突然変異、又は意図的突然変異のため、子孫は必ずしも当初の親細胞と完全に同一（形態又はゲノムDNA相補において）であるとは限らない。宿主細胞には、本明細書で提供されるポリヌクレオチド（複数の場合もある）と共に*in vivo*でトランスフェクションされた細胞も含まれる。

10

【0108】

本明細書で使用される「単離された」という用語は、典型的に天然に一緒に見出される又は一緒に産生される成分の少なくとも幾つかから分離された分子を指す。例えば、ポリペプチドは、それを産生した細胞の成分の少なくとも一部から分離される場合に、「単離された」と称される。ポリペプチドが発現後に細胞によって分泌される場合に、ポリペプチドを含む上清を、それを産生した細胞から物理的に分離することは、ポリペプチドを「単離する」とみなされる。同様に、ポリヌクレオチドは、それが典型的に天然に見られるより大きなポリヌクレオチド（例えば、DNAポリヌクレオチドの場合に、ゲノムDNA又はミトコンドリアDNA等）の一部ではない場合に、又は例えば、RNAポリヌクレオチドの場合に、それを産生した細胞の成分の少なくとも一部から分離される場合に、「単離された」と称される。したがって、宿主細胞内のベクターに含まれるDNAポリヌクレオチドは、「単離された」と称され得る。

20

【0109】

「個体」及び「被験体」という用語は、動物、例えば哺乳動物を指すために本明細書では区別なく使用される。幾つかの実施形態においては、限定されるものではないが、ヒト、齧歯類、サル、ネコ、イヌ、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、哺乳動物実験動物、哺乳動物家畜、哺乳動物競技用動物（sport animals）、及び哺乳動物ペットを含む哺乳動物を治療する方法が提供される。幾つかの例では、「個体」又は「被験体」は、疾患又は障害の治療を必要とする個体又は被験体を指す。幾つかの実施形態においては、治療を受ける被験体は、被験体が治療に関連する障害を有する又は障害を患う十分なリスクがあると特定されたことを表す患者であり得る。

30

【0110】

本明細書で使用される「疾患」又は「障害」は、治療が必要とされる及び／又は所望される状態を指す。

【0111】

「自己免疫障害」という用語は、典型的には、一般に内因性／外因性起源の1つ以上の免疫原性物質に対する被験体自身の液性免疫応答及び／又は細胞性免疫応答によって生じる非アナフィラキシー性過敏反応（II型、III型及び／又はIV型過敏反応）を伴う疾患又は障害を指す。

40

【0112】

「炎症性障害」という用語は、慢性又は急性の炎症性疾患を含むが、これに限定されない、炎症を伴う障害を指し、炎症性自己免疫疾患及び炎症性アレルギー状態を明示的に含む。

【0113】

「感染症」及び「感染性疾患又は感染性障害」という用語は、限定されるものではないが、細菌、ウイルス、真菌、原生動物、及び寄生生物等の外因性感染因子によって引き起

50

こされる疾患又は障害を指す。

【0114】

「癌」及び「腫瘍」という用語は、固形癌及び血液癌／リンパ腺癌を包含するとともに、異形成等の悪性腫瘍、前悪性腫瘍、及び良性腫瘍も包含する。例示的な癌としては、限定されるものではないが、基底細胞癌、胆道癌、膀胱癌、骨癌、脳及び中枢神経系癌、乳癌、腹膜癌、子宮頸癌、絨毛癌、結腸直腸癌、結合組織癌、消化器系癌、子宮内膜癌、食道癌、眼癌、頭頸部癌、胃癌（胃腸癌を含む）、膠芽腫、肝癌、肝細胞癌、上皮内新生物、腎臓癌又は腎癌、喉頭癌、白血病、肝臓癌、肺癌（例えば、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、及び肺扁平上皮癌）、黒色腫、骨髄腫、神経芽細胞腫、口腔癌（唇、舌、口、及び咽頭）、卵巣癌、脾臓癌、前立腺癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、直腸癌、呼吸器系癌、唾液腺癌、肉腫、皮膚癌、扁平上皮癌、胃部癌、精巣癌、甲状腺癌、子宮又は子宮内膜癌、泌尿器系癌、外陰癌、ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫及びB細胞リンパ腫を含むリンパ腫（低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）、小リンパ球（SL）NHL、中悪性度／濾胞性NHL、中悪性度びまん性NHL、高悪性度免疫芽球性NHL、高悪性度リンパ芽球性NHL、高悪性度小型非分割細胞NHL、巨大病変NHL、マントル細胞リンパ腫、AIDS関連リンパ腫、及びワルデンストレームマクログロブリン血症を含む）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、有毛細胞白血病、慢性骨髄芽球性白血病、並びにその他の癌腫及び肉腫、並びに移植後リンパ増殖性障害（PTLD）、並びに母斑症、浮腫（脳腫瘍に関連する浮腫等）及びメイグス症候群に関連する異常血管増殖が挙げられる。

10

20

【0115】

幾つかの実施形態においては、「増加」又は「減少」は、それぞれ、統計学的に有意な増加又は減少を指す。当業者に明らかであるように、「調節」はまた、試験作用物質が存在することを除き同じ条件と比較した、標的又は抗原のそのリガンド、結合相手、ホモ多量体形若しくはヘテロ多量体形へと会合する相手又は基質の1つ以上に対する親和性、アピディティー、特異性及び／又は選択性の変化（増加又は減少のいずれかであり得る）を引き起こすこと、標的又は抗原が存在する培地又は環境における1つ以上の条件（pH、イオン強度、補因子の存在等）に対する標的又は抗原の感受性の変化（増加又は減少のいずれかであり得る）を引き起こすこと、及び／又は細胞増殖若しくはサイトカイン産生を含み得る。これは、関与する標的に応じて、それ自体が既知の又は本明細書に記載される任意の適切な方法で及び／又は任意の適切なアッセイを使用して決定され得る。

30

【0116】

本明細書で使用される場合に、「治療」は、有益な又は所望の臨床結果を得るための手法である。本明細書で使用される「治療」は、ヒトを含む哺乳動物における疾患用の療法薬の任意の投与又は適用を対象とする。本開示の目的では、有益な又は所望の臨床結果としては、限定されるものではないが、1つ以上の症状の緩和、疾患の程度の減少、疾患の進展（例えば、転移、例えば肺又はリンパ節への転移）の未然防止又は遅延、疾患の再発の未然防止又は遅延、疾患の進行の遅延又は減速、疾患状態の改善、疾患又は疾患の進行の阻害、疾患又はその進行の阻害又は減速、その発達の阻止、及び寛解（部分的でも全体的でも）のいずれか1つ以上が挙げられる。「治療」には、増殖性疾患の病理学的結果の軽減も含まれる。本明細書で提供される方法は、治療のこれらの側面のいずれか1つ以上を企図している。上記に従って、治療という用語は、障害の全ての側面を100パーセント除去する必要はない。

40

【0117】

「改善」とは、療法剤を投与しない場合と比べて、1つ以上の症状が軽減又は向上することを意味する。「改善」には、症状の持続期間が短縮又は減少することにも含まれる。

【0118】

「抗癌剤」という用語は、本明細書では、その最も広い意味で、1つ以上の癌の治療に使用される作用物質を指すために使用される。そのような作用物質の例示的なクラスとしては、限定されるものではないが、化学療法剤、抗癌生物製剤（サイトカイン、受容体細

50

胞外ドメイン - Fc 融合物、及び抗体等)、放射線療法薬、CAR-T 療法薬、治療用オリゴヌクレオチド(アンチセンスオリゴヌクレオチド及び siRNA 等)、及び腫瘍溶解性ウイルスが挙げられる。

【0119】

「生体試料」という用語は、生きている生き物又はかつて生きていた生き物からの或る量の物質を意味する。そのような物質としては、限定されるものではないが、血液(例えば、全血)、血漿、血清、尿、羊水、滑液、内皮細胞、白血球、単球、他の細胞、器官、組織、骨髄、リンパ節、及び脾臓が挙げられる。

【0120】

「コントロール」又は「参照」という用語は、分析物を含まないことが既知の組成物(「ネガティブコントロール」)又は分析物を含むことが既知の組成物(「ポジティブコントロール」)を指す。ポジティブコントロールは、既知の濃度の分析物を含み得る。

10

【0121】

「阻害」又は「阻害する」という用語は、任意の表現型特徴の減少若しくは停止、又はその特徴の発生率、程度、若しくは可能性の減少若しくは停止を指す。「低減する」又は「阻害する」とは、参照と比較して、活性、機能、及び/又は量を減少させる、低減する、又は停止することである。幾つかの実施形態においては、「低減する」又は「阻害する」とは、10%以上の全体的な減少を引き起こす能力を意味する。幾つかの実施形態においては、「低減する」又は「阻害する」とは、50%以上の全体的な減少を引き起こす能力を意味する。幾つかの実施形態においては、「低減する」又は「阻害する」とは、75%、85%、90%、95%以上の全体的な減少を引き起こす能力を意味する。幾つかの実施形態においては、上記の量は、或る期間にわたって、同じ期間にわたるコントロールに対して阻害又は減少される。

20

【0122】

本明細書で使用される場合に、「疾患の発症を遅延させる」とは、疾患(癌等)の発症を遅らせる、妨げる、減速させる、遅滞させる、安定化させる、抑制する、及び/又は引き延ばすことを意味する。この遅延は、病歴及び/又は治療される個体に応じて、様々な長さの時間となり得る。当業者に明らかであるように、十分な又は大幅な遅延は、事実上、個体が疾患を発症しないという点で未然防止を包含し得る。例えば、転移の発生等の末期癌を遅延させることができる。

30

【0123】

本明細書で使用される「未然防止」は、疾患の素因を有し得るが、まだ疾患と診断されていない被験体における疾患の発生又は再発に対する予防をもたらすことを含む。特段の指示がない限り、「低減する」、「阻害する」、又は「未然防止する」という用語は、全期間にわたる完全な未然防止を示すのではなく又は必要とするのではなく、測定される期間だけにわたる未然防止を示す又は必要とする。

【0124】

物質/分子、アゴニスト又はアンタゴニストの「治療有効量」は、個体の疾患状態、年齢、性別、及び体重、並びに物質/分子、アゴニスト又はアンタゴニストが個体において所望の応答を誘発する能力等の要因によって変動し得る。治療有効量はまた、治療的に有益な作用が物質/分子、アゴニスト又はアンタゴニストの任意の有毒作用又は有害作用を上回る量である。治療有効量は、1回以上の投与で送達され得る。治療有効量は、必要な投与量で必要な時間にわたって、所望の治療的結果及び/又は予防的結果を達成するのに有効な量を指す。

40

【0125】

「医薬製剤」及び「医薬組成物」という用語は、区別なく使用され、有効成分(複数の場合もある)の生物学的活性が有効になることを可能にするような形態であり、製剤を投与する被験体に対して許容不可能なほど有毒な追加の成分を含まない調製物を指す。そのような製剤は滅菌され得る。

【0126】

50

「薬学的に許容可能な担体」は、被験体に投与するための「医薬組成物」を一緒に含む療法剤とともに使用される当該技術分野において慣用の非毒性の固体、半固体又は液体の充填剤、希釈剤、カプセル化材料、製剤補助剤、又は担体を指す。薬学的に許容可能な担体は、使用される投与量及び濃度でレシピエントに対して無毒であり、製剤の他の成分と適合性がある。薬学的に許容可能な担体は、使用される製剤にとって適切である。

【0127】

1つ以上の更なる療法剤と「組み合わせて」の投与には、同時（併用）投与及び任意の順序での連続投与が含まれる。

【0128】

「併用して」という用語は、本明細書では、2つ以上の療法剤の投与であって、投与の少なくとも一部が時間的に重複する、又は1つの療法剤の投与が他の療法剤の投与に対して短い期間に含まれる、又は両方の療法剤の治療効果が少なくとも或る期間にわたり重複する、投与を指すために使用される。

【0129】

「連続的に」という用語は、本明細書では、2つ以上の療法剤の投与であって、時間的に重複しない、又は療法剤の治療効果が重複しない、投与を指すために使用される。

【0130】

本明細書で使用される場合に、「～と組み合わせて」は、或る治療法の施与に別の治療法を加えることを指す。したがって、「～と組み合わせて」は、或る治療法を、個体に他の治療法を施す前、その間、又はその後を施すことを指す。

【0131】

「添付文書」という用語は、治療製品の市販パッケージに通例含まれる使用説明書であって、そのような治療製品の使用に関する指示、使用法、投与量、投与、併用療法、禁忌及び/又は警告に関する情報を含む、使用説明書を指すために使用される。

【0132】

「製造品」は、少なくとも1つの試薬、例えば、疾患若しくは障害（例えば、癌）の治療用の医薬、又は本明細書に記載されるバイオマーカーを特異的に検出するプローブを含む任意の製造物（例えば、パッケージ又は容器）又はキットである。幾つかの実施形態においては、製造物又はキットは、本明細書に記載される方法を実施するユニットとして宣伝、配送、又は販売される。

【0133】

「標識」及び「検出可能な標識」という用語は、例えば、抗体又は抗原に結合されて、特異的結合ペアのメンバー間の反応（例えば、結合）を検出可能にする部分を意味する。特異的結合ペアの標識されたメンバーは、「検出可能に標識された」と称される。したがって、「標識された結合タンパク質」という用語は、結合タンパク質の特定をもたらす標識が組み込まれたタンパク質を指す。幾つかの実施形態においては、標識は、視覚的に又は機器的手段により検出可能なシグナルを生成し得る検出可能なマーカー、例えば、放射性標識されたアミノ酸の組み込み又はマーキングされたアビジン（例えば、蛍光マーカー又は光学的方法若しくは比色法により検出され得る酵素活性を含むストレプトアビジン）によって検出され得るピオチニル部のポリペプチドへの結合である。ポリペプチドの標識の例としては、限定されるものではないが、放射性同位体又は放射性核種（例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho 、又は ^{153}Sm ）、色素原、蛍光標識（例えば、FITC、ローダミン、ランタニド蛍光体）、酵素標識（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）、化学発光マーカー、ピオチニル基、二次レポーターによって認識される予め決められたポリペプチドエピトープ（例えば、ロイシンジッパーペア配列、二次抗体のための結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ）、及びガドリニウムキレート等の磁性剤が挙げられる。イムノアッセイに通常使用される標識の代表的な例としては、光を発する部分、例えば、アクリジニウム化合物、及び蛍光を発する部分、例えば、フルオレセインが挙げられる。この点について、その部分自体は検出可能に標識されてい

10

20

30

40

50

い場合もあるが、更に別の部分と反応すると検出可能になり得る。

【0134】

例示的なアルブミン結合ポリペプチド

アルブミンに結合するVHHドメインを含むシングルドメイン抗体(s d A b)が本明細書で提供される。幾つかの実施形態においては、アルブミンに結合するVHHドメインは、FcRnへのアルブミンの結合を妨げない。幾つかの実施形態においては、アルブミンに結合するVHHドメインは、アルブミンのドメイン3に結合しない。幾つかの実施形態においては、アルブミンに結合するVHHドメインは、0.01 nM ~ 5 nM、又は0.01 nM ~ 2 nM、又は0.01 nM ~ 1 nM、0.01 nM ~ 0.5 nM、0.05 nM ~ 5 nM、又は0.05 nM ~ 2 nM、又は0.05 nM ~ 1 nM、又は0.05 nM ~ 0.5 nMの親和性(K_D)で結合する。 10

【0135】

様々な実施形態において、アルブミンに結合する少なくとも1つのVHHドメインを含むポリペプチドが提供される。幾つかの実施形態においては、アルブミンに結合する1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、又は8つのVHHドメインを含むポリペプチドが提供される。幾つかの実施形態においては、本明細書で提供されるポリペプチドは、アルブミンに結合する1つ、2つ、3つ、又は4つのVHHドメインを含む。そのようなポリペプチドは、アルブミン以外の1つ以上の標的タンパク質に結合する1つ以上の付加的なVHHドメインを含んでいてもよい。

【0136】

様々な実施形態において、アルブミンに結合する1つ以上のVHHドメインを含むポリペプチドは、治療用抗原結合ドメイン及び/又は治療用ポリペプチドも含む。そのような治療用抗原結合ドメインとしては、重鎖可変領域と軽鎖可変領域とを含む従来の抗体の抗原結合ドメイン、及びVHHドメイン等のシングルドメイン抗体の抗原結合ドメインが挙げられるが、これらに限定されない。アルブミンに結合する1つ以上のVHHドメインと、1つ以上の従来の抗体ドメインとを含むポリペプチドの非限定的なフォーマットを図6(v) ~ (ix)に提示する。他の非限定的な例示的な治療用ポリペプチドには、例えば、受容体細胞外ドメイン、酵素、及びリガンドが含まれる。様々な実施形態において、アルブミンに結合する少なくとも1つのVHHドメインを含むポリペプチドは、アルブミンに結合する少なくとも1つのVHHドメインを含まない同じポリペプチドよりも長い半減期をin vivoで有する。幾つかの実施形態においては、半減期は、アルブミンに結合するVHHドメインを含まないポリペプチドの半減期よりも少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、又は少なくとも5倍長い。 30

【0137】

幾つかの実施形態においては、アルブミンに結合する少なくとも1つのVHHドメインを含むポリペプチドは、Fc領域を含む。幾つかの実施形態においては、本明細書で提供されるポリペプチドは、アルブミンに結合する1つ、2つ、3つ、又は4つのVHHドメインと、Fc領域とを含む。幾つかの実施形態においては、Fc領域は、生理学的条件でポリペプチドの二量体化を媒介する。

【0138】

様々な実施形態において、アルブミンに結合するVHHドメインは、配列番号5 ~ 配列番号8から選択されるCDR1配列、配列番号9 ~ 配列番号21から選択されるCDR2配列、及び配列番号22のCDR3配列を含む。様々な実施形態において、アルブミンに結合する各VHHドメインは、配列番号5、配列番号9、及び配列番号22；配列番号5、配列番号10、及び配列番号22；配列番号5、配列番号11、及び配列番号22；配列番号5、配列番号12、及び配列番号22；配列番号5、配列番号13、及び配列番号22；配列番号5、配列番号14、及び配列番号22；配列番号5、配列番号15、及び配列番号22；配列番号6、配列番号15、及び配列番号22；配列番号7、配列番号15、及び配列番号22；配列番号8、配列番号15、及び配列番号22；配列番号6、配列番号16、及び配列番号22；配列番号6、配列番号17、及び配列番号22；配列番 50

10

20

30

40

50

号 6、配列番号 18、及び配列番号 22；配列番号 6、配列番号 19、及び配列番号 22；配列番号 6、配列番号 20、及び配列番号 22；並びに配列番号 6、配列番号 21、及び配列番号 22 から選択される CDR1 配列、CDR2 配列、及び CDR3 配列を含む。

【0139】

幾つかの実施形態においては、アルブミンに結合する VHH ドメインは、配列番号 23 ~ 配列番号 43 及び配列番号 71 ~ 配列番号 74 から選択される配列と少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % 同一の配列であるアミノ酸配列を含む。幾つかの実施形態においては、アルブミンに結合する VHH ドメインは、配列番号 23 ~ 配列番号 43 及び配列番号 71 ~ 配列番号 74 から選択されるアミノ酸配列を含む。

10

【0140】

幾つかの実施形態においては、アルブミンに結合する VHH ドメインが提供され、これはアルブミンへの結合について、配列番号 23 ~ 配列番号 43 及び配列番号 71 ~ 配列番号 74 から選択されるアミノ酸配列を含む VHH ドメインと競合する。

【0141】

幾つかの実施形態においては、アルブミンに結合する VHH ドメインはヒト化され得る。ヒト化抗体 (s d A b 又は VHH 含有ポリペプチド等) は、治療分子として有用である。それというのも、ヒト化抗体は、抗体療法薬に対する免疫応答をもたらして療法薬の有効性を低下させ得る非ヒト抗体に対するヒト免疫応答を低減又は排除するからである。一般に、ヒト化抗体は、CDR (又はその一部) が非ヒト抗体に由来し、FR (又はその一部) がヒト抗体配列に由来する 1 つ以上の可変ドメインを含む。ヒト化抗体はまた、任意に、ヒト定常領域の少なくとも一部を含む。幾つかの実施形態においては、ヒト化抗体における幾つかの FR 残基は、例えば、抗体の特異性又は親和性を回復又は改善するために、非ヒト抗体 (例えば、CDR 残基の元となる抗体) からの対応する残基で置換される。

20

【0142】

ヒト化抗体及びその作製方法は、例えば、Almagro and Fransson, (2008) Front. Biosci. 13: 1619-1633 においてレビューされており、例えば、Riechmann et al., (1988) Nature 332:323-329、Queen et al., (1989) Proc. Natl Acad. Sci. USA 86: 10029-10033、米国特許第 5, 821, 337 号、米国特許第 7, 527, 791 号、米国特許第 6, 982, 321 号、及び米国特許第 7, 087, 409 号、Kashmiri et al., (2005) Methods 36:25-34、Padlan, (1991) Mol. Immunol. 28:489-498 (「リサーフェイシング (resurfacing)」を記載している)、Daill'Acqua et al., (2005) Methods 36:43-60 (「FR シャッフリング (FR shuffling)」を記載している)、並びに Osbourn et al., (2005) Methods 36:61-68 及び Klimka et al., (2000) Br. J. Cancer, 83:252-260 (FR シャッフリングに対する「ガイド選択 (guided selection)」アプローチを記載している) で更に記載されている。

30

【0143】

ヒト化に使用され得るヒトフレームワーク領域としては、限定されるものではないが、「ベストフィット (best-fit)」法を使用して選択されたフレームワーク領域 (例えば、Sims et al. (1993) J. Immunol. 151:2296 を参照されたい)、重鎖可変領域の特定のサブグループのヒト抗体のコンセンサス配列に由来するフレームワーク領域 (例えば、Carter et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285、及び Presta et al. (1993) J. Immunol, 151:2623 を参照されたい)、ヒト成熟 (体細胞突然変異した) フレームワーク領域又はヒト生殖細胞系フレームワーク領域 (例えば、Almagro and Fransson, (2008) Front. Biosci. 13:1619-1633 を参照されたい)、及び FR ライブラリーのスクリーニングから得られるフレームワーク領域 (例えば、Baca et al., (1997) J. Biol. Chem. 272: 10678-10684、及び Rosok et al., (1996) J. Biol. Chem. 271:22611-22618 を参照されたい) が挙げられる。典型的には、VHH の FR 領域をヒト FR 領域と置き換えることで、ヒト化 VHH が作製される。幾つかの

40

50

実施形態においては、ヒト F R の或る特定の F R 残基を置き換えることで、ヒト化 V H H の 1 つ以上の特性が改善される。そのような置き換えられた残基を有する V H H ドメインも、本明細書では更に「ヒト化」と称される。

【 0 1 4 4 】

本明細書で提供されるように、アルブミンに結合する V H H ドメインを含む s d A b は、ヒト F c 領域を含む分子を含めて、それらが連結する分子のクリアランスを遅らせることができる。様々な実施形態において、アルブミン結合ポリペプチドに含まれる F c 領域は、ヒト F c 領域であるか、又はヒト F c 領域に由来する。F c 領域を含む非限定的な s d A b フォーマットを図 6 に示す。

【 0 1 4 5 】

幾つかの実施形態においては、アルブミン結合ポリペプチドに含まれる F c 領域は、ヒト F c 領域に由来し、I g G 1 E 2 3 3、L 2 3 4、及び L 2 3 5 に対応する 3 つのアミノ酸欠失を下部ヒンジに含み、本明細書で「F c x E L L」と称される。F c x E L L ポリペプチドは F c y R と結合しないため、「エフェクターサイレント」又は「エフェクターナル」と称されるが、幾つかの実施形態においては、x E L L F c 領域は F c R n に結合するため、半減期の延長及び F c R n 媒介性リサイクリング (F c R n mediated recycling) と関連したトランスサイトーシスを伴う。

【 0 1 4 6 】

幾つかの実施形態においては、アルブミン結合ポリペプチドに含まれる F c 領域は、ヒト F c 領域に由来し、「Y V」と称され得る突然変異 M 2 5 2 Y 及び M 4 2 8 V を含む。幾つかの実施形態においては、そのような突然変異は、エンドソームの酸性 p H (6 . 5 近く) で F c R n への結合を増強するのに対し、中性 p H (約 7 . 2) では検出可能な結合が失われることから、F c R n 媒介性リサイクリングの増強及び半減期の延長が可能となる。幾つかの実施形態においては、アルブミン結合ポリペプチドに含まれる F c 領域は、ヒト F c 領域に由来し、「Y T E」と称され得る突然変異 M 2 5 2 Y、S 2 5 4 T、及び T 2 5 6 E を含む。幾つかの実施形態においては、そのような突然変異は、F c と F c R n との解離速度を大幅に低下させることにより、ヒトにおける血清半減期を延長する。幾つかの実施形態においては、アルブミン結合ポリペプチドに含まれる F c 領域は、ヒト F c 領域に由来し、「L S」と称され得る突然変異 M 4 2 8 L 及び N 4 3 4 S を含む。幾つかの実施形態においては、そのような突然変異は、p H 6 での F c R n に対する F c の結合親和性を増大させ、解離速度を低下させることにより、ヒトにおける血清半減期を延長する。循環半減期を高める様々な F c 突然変異が、例えば Saunders, Front. Immunol. doi.org/10.3389/fimmu.2019.01296 (2019) に記載されている。

【 0 1 4 7 】

幾つかの実施形態においては、アルブミン結合ポリペプチドに含まれる F c 領域は、ヒト F c 領域に由来し、ヘテロ二量体化のために設計された突然変異を含み、本明細書において「ノブ」及び「ホール」と称される。幾つかの実施形態においては、「ノブ」F c 領域は、突然変異 T 3 6 6 W を含む。幾つかの実施形態においては、「ホール」F c 領域は、突然変異 T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、及び Y 4 0 7 V を含む。幾つかの実施形態においては、ヘテロ二量体化に使用される F c 領域は、ヘテロ二量体 F c ペアの第 1 のメンバー上の突然変異 S 3 5 4 C 等の追加の突然変異を含み、この突然変異は、ヘテロ二量体 F c ペアの第 2 のメンバー上の対応する突然変異 Y 3 4 9 C と非対称ジスルフィドを形成する。幾つかの実施形態においては、ヘテロ二量体 F c ペアの方のメンバーは、修飾 H 4 3 5 R 又は H 4 3 5 K を含むことで、F c R n 結合を維持しつつプロテイン A の結合を妨げる。幾つかの実施形態においては、ヘテロ二量体 F c ペアの方のメンバーは、修飾 H 4 3 5 R 又は H 4 3 5 K を含むのに対して、ヘテロ二量体 F c ペアの第 2 のメンバーは、H 4 3 5 で修飾されていない。様々な実施形態において、ホール F c 領域は、修飾 H 4 3 5 R 又は H 4 3 5 K を含むが (修飾が H 4 3 5 R である場合に、場合によっては「ホール - R」と称される)、ノブ F c 領域はそれを含まない。幾つかの場合には、ホール - R 突然変異は、存在し得るホモ二量体ホール F c 領域に対するヘテロ二量体の精製を改善する。

【 0 1 4 8 】

アルブミン結合ポリペプチドで使用され得る非限定的な例示的なFc領域としては、配列番号47～配列番号68、及び配列番号85～配列番号87のアミノ酸配列を含むFc領域が挙げられる。

【 0 1 4 9 】

アルブミン結合ポリペプチドの例示的な活性

様々な実施形態において、本明細書で提供されるアルブミン結合ポリペプチドは、ドメイン3の外側のアルブミンのエピトープに結合する。幾つかの実施形態においては、本明細書で提供されるアルブミン結合ポリペプチドは、FcRnへのアルブミンの結合を妨げない（すなわち、阻害しない）。アルブミン結合ポリペプチドがFcRnへのアルブミンの結合を妨げるかを決定する方法は、当該技術分野で既知であり、非限定的な例示的な方法が本明細書でも提供される。

10

【 0 1 5 0 】

幾つかの実施形態においては、本明細書で提供されるアルブミン結合ドメインを含むポリペプチドは、アルブミン結合ドメインを欠くポリペプチドよりも長い半減期をin vivoで有する。様々な実施形態において、本明細書で提供されるアルブミン結合ドメインを含むポリペプチドは、アルブミン結合ドメインを含まないポリペプチドの半減期よりも少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、又は少なくとも5倍長い半減期を有する。

【 0 1 5 1 】

ポリペプチドの発現及び産生

アルブミン結合ドメインを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む核酸分子が提供される。幾つかの実施形態においては、核酸分子はまた、アルブミン結合ドメインを含むポリペプチドの分泌を指示するリーダー配列もコードすることができ、そのリーダー配列は、典型的には、これが分泌されたポリペプチド中に存在しないように切断される。リーダー配列は、天然の重鎖（又はVHH）リーダー配列であり得る、又は別の異種リーダー配列であり得る。

20

【 0 1 5 2 】

核酸分子は、当該技術分野で慣用の組換えDNA技術を使用して構築され得る。幾つかの実施形態においては、核酸分子は、選択された宿主細胞における発現に適した発現ベクターである。

30

【 0 1 5 3 】

アルブミン結合ドメインを含むポリペプチドをコードする核酸を含むベクターが提供される。そのようなベクターとしては、限定されるものではないが、DNAベクター、ファージベクター、ウイルスベクター、レトロウイルスベクター等が挙げられる。幾つかの実施形態においては、CHO細胞若しくはCHO由来細胞等の所望の細胞型、又はNSO細胞におけるポリペプチドの発現のために最適化されたベクターが選択される。例示的なそのようなベクターは、例えば、Running Deer et al., Biotechnol. Prog. 20:880-889 (2004)に記載されている。

【 0 1 5 4 】

幾つかの実施形態においては、アルブミン結合ドメインを含むポリペプチドは、細菌細胞等の原核細胞において、又は真菌細胞（酵母等）、植物細胞、昆虫細胞、及び哺乳類細胞等の真核細胞において発現され得る。そのような発現は、例えば、当該技術分野で既知の手順に従って実施され得る。ポリペプチドの発現に使用され得る例示的な真核細胞としては、限定されるものではないが、COS7細胞を含むCOS細胞、293-6E細胞を含む293細胞、CHO-S、DG44、Lec13 CHO細胞及びFUT8 CHO細胞を含むCHO細胞、PER.C6（商標）細胞（CruCell）、並びにNSO細胞が挙げられる。幾つかの実施形態においては、ポリペプチドは、酵母において発現され得る。例えば、米国特許出願公開第2006/0270045号を参照されたい。幾つかの実施形態においては、特定の真核宿主細胞は、ポリペプチドに対して所望の翻訳後修飾を行う

40

50

その能力に基づいて選択される。例えば、幾つかの実施形態においては、CHO細胞は、293細胞で産生される同じポリペプチドよりも高レベルのシアル化を有するポリペプチドを産生する。

【0155】

所望の宿主細胞への1つ以上の核酸（ベクター等）の導入は、限定されるものではないが、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、感染等を含むあらゆる方法によって達成され得る。非限定的な例示的な方法は、例えばSambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)に記載されている。核酸は、任意の適切な方法に従って、所望の宿主細胞に一過的又は安定的にトランスフェクションされ得る。

【0156】

本明細書に記載される核酸又はベクターのいずれかを含む宿主細胞も提供される。幾つかの実施形態においては、本明細書に記載されるアルブミン結合ドメインを含むポリペプチドを発現する宿主細胞が提供される。宿主細胞で発現されたポリペプチドは、任意の適切な方法によって精製され得る。そのような方法としては、限定されるものではないが、親和性マトリックス又は疎水性相互作用クロマトグラフィーの使用が挙げられる。適切なアフィニティリガンドとしては、ROR1 ECD及びFc領域に結合する作用物質が挙げられる。例えば、プロテインA、プロテインG、プロテインA/G、又は抗体アフィニティカラムを使用して、Fc領域に結合することで、Fc領域を含むポリペプチドを精製することができる。疎水性相互作用クロマトグラフィー、例えば、ブチルカラム又はフェニルカラムもまた、抗体等の幾つかのポリペプチドを精製するのに適切であり得る。イオン交換クロマトグラフィー（例えば、陰イオン交換クロマトグラフィー及び/又は陽イオン交換クロマトグラフィー）もまた、抗体等の幾つかのポリペプチドを精製するのに適切であり得る。混合モードクロマトグラフィー（例えば、逆相/陰イオン交換、逆相/陽イオン交換、親水性相互作用/陰イオン交換、親水性相互作用/陽イオン交換等）も、抗体等の幾つかのポリペプチドを精製するのに適切であり得る。ポリペプチドを精製する多くの方法が当該技術分野で知られている。

【0157】

幾つかの実施形態においては、ポリペプチドは、無細胞系において産生される。非限定的な例示的な無細胞系は、例えば、Sitaraman et al., *Methods Mol. Biol.* 498: 229-44 (2009)、Spirin, *Trends Biotechnol.* 22: 538-45 (2004)、Endo et al., *Biotechnol. Adv.* 21: 695-713 (2003)に記載されている。

【0158】

幾つかの実施形態においては、上記の方法によって作製されたアルブミン結合ドメインを含むポリペプチドが提供される。幾つかの実施形態においては、ポリペプチドは、宿主細胞において作製される。幾つかの実施形態においては、ポリペプチドは、無細胞系において作製される。幾つかの実施形態においては、ポリペプチドは精製される。幾つかの実施形態においては、ポリペプチドを含む細胞培養培地が提供される。

【0159】

幾つかの実施形態においては、上記の方法によって作製された抗体を含む組成物が提供される。幾つかの実施形態においては、該組成物は、宿主細胞において作製されたアルブミン結合ドメインを含むポリペプチドを含む。幾つかの実施形態においては、該組成物は、無細胞系において作製されたポリペプチドを含む。幾つかの実施形態においては、該組成物は、精製されたポリペプチドを含む。

【0160】

アルブミン結合ポリペプチドを使用して疾患を治療する例示的な方法

幾つかの実施形態においては、本明細書で提供されるアルブミン結合ドメインを含む治療用ポリペプチドを投与することを含む、個体における疾患を治療する方法が提供される。このような疾患としては、治療用ポリペプチドを用いた治療から恩恵を受けるあらゆる

10

20

30

40

50

疾患が挙げられる。本明細書で提供されるアルブミン結合ドメインを含む治療用ポリペプチドで治療され得る非限定的な例示的な疾患には、感染性疾患、自己免疫疾患又は自己免疫障害、炎症性疾患又は炎症性障害、及び癌が含まれる。本方法は、本明細書で提供されるアルブミン結合ドメインを含む治療用ポリペプチドを有効量、個体に投与することを含む。そのような治療方法は、ヒト又は動物における治療方法であり得る。幾つかの実施形態においては、ヒトを治療する方法が提供される。

【0161】

本明細書で提供されるアルブミン結合ドメインを含む治療用ポリペプチドは、必要に応じて被験体に投与され得る。投与の頻度の決定は、治療される病態、治療される被験体の年齢、治療される病態の重症度、治療される被験体の全般的健康状態等の考慮に基づいて、主治医等の当業者によって行われ得る。幾つかの実施形態においては、有効用量の治療用ポリペプチドが被験体に1回以上投与される。幾つかの実施形態においては、有効用量の治療用ポリペプチドが、被験体に毎日、週に2回、毎週、2週間ごとに、月に1回等で投与される。有効用量の治療用ポリペプチドが被験体に少なくとも1回投与される。幾つかの実施形態においては、有効用量の治療用ポリペプチドは、少なくとも1ヶ月、少なくとも6ヶ月、又は少なくとも1年間にわたる複数回を含む複数回で投与され得る。

10

【0162】

幾つかの実施形態においては、医薬組成物は、疾患を治療するのに有効な量で投与される。治療有効量は、典型的には、治療される被験体の体重、その被験体の身体的状態若しくは健康状態、治療される病態の広範さ、又は治療される被験体の年齢に依存する。一般に、抗体は、用量当たり約0.05 mg/kg (体重) ~ 約100 mg/kg (体重) の範囲の量で投与され得る。幾つかの実施形態においては、抗体は、用量当たり約10 µg/kg (体重) ~ 約100 mg/kg (体重) の範囲の量で投与され得る。幾つかの実施形態においては、抗体は、用量当たり約50 µg/kg (体重) ~ 約5 mg/kg (体重) の範囲の量で投与され得る。幾つかの実施形態においては、抗体は、用量当たり約100 µg/kg (体重) ~ 約10 mg/kg (体重) の範囲の量で投与され得る。幾つかの実施形態においては、抗体は、用量当たり約100 µg/kg (体重) ~ 約20 mg/kg (体重) の範囲の量で投与され得る。幾つかの実施形態においては、抗体は、用量当たり約0.5 mg/kg (体重) ~ 約20 mg/kg (体重) の範囲の量で投与され得る。幾つかの実施形態においては、抗体は、用量当たり約0.5 mg/kg (体重) ~ 約10 mg/kg (体重) の範囲の量で投与され得る。幾つかの実施形態においては、抗体は、用量当たり約0.05 mg/kg (体重) ~ 約20 mg/kg (体重) の範囲の量で投与され得る。幾つかの実施形態においては、抗体は、用量当たり約0.05 mg/kg (体重) ~ 約10 mg/kg (体重) の範囲の量で投与され得る。幾つかの実施形態においては、抗体は、約5 mg/kg (体重) 以下、例えば4 mg/kg 未満、3 mg/kg 未満、2 mg/kg 未満、又は1 mg/kg 未満の抗体の範囲の量で投与され得る。

20

30

【0163】

幾つかの実施形態においては、治療用ポリペプチドは、限定されるものではないが、静脈内、動脈内、非経口、腹腔内、又は皮下を含む様々な経路によって *in vivo* で投与され得る。意図される用途に応じて、適切な製剤及び投与経路を選択することができる。

40

【0164】

医薬組成物

幾つかの実施形態においては、アルブミン結合ドメインを含むポリペプチドを含む組成物は、多種多様な薬学的に許容可能な担体を含む製剤で提供される(例えば、Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons: Drugfacts Plus, 20th ed. (2003)、Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7th ed., Lippencott Williams and Wilkins (2004)、Kibbe et al., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd ed., Pharmaceutical Press (2000)を参照されたい)。ビヒクル、アジュバ

50

ント、及び希釈剤を含む様々な薬学的に許容可能な担体が利用可能である。さらに、pH調整剤及び緩衝剤、張性調整剤、安定剤、湿潤剤等の様々な薬学的に許容可能な補助物質も利用可能である。非限定的な例示的な担体としては、生理食塩水、緩衝生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、及びそれらの組合せが挙げられる。

【0165】

幾つかの実施形態においては、医薬組成物は、アルブミン結合ドメインを含むポリペプチドを少なくとも10mg/mL、20mg/mL、30mg/mL、40mg/mL、50mg/mL、60mg/mL、70mg/mL、80mg/mL、90mg/mL、100mg/mL、125mg/mL、150mg/mL、175mg/mL、200mg/mL、225mg/mL、又は250mg/mLの濃度で含む。

10

【0166】

診断及び治療の非限定的な例示的な方法

幾つかの実施形態においては、本明細書に記載される方法は、被験体及び/又は被験体（例えば、癌患者）からの検体を評価するのに有用である。幾つかの実施形態においては、評価は、診断、予後診断、及び/又は治療への奏効のうちの1つ以上である。

【0167】

幾つかの実施形態においては、本明細書に記載される方法は、タンパク質の存在、非存在、又はレベルを評価することを含む。幾つかの実施形態においては、本明細書に記載される方法は、核酸の存在、非存在、又は発現のレベルを評価することを含む。これらの測定に本明細書に記載される組成物を使用することができる。幾つかの実施形態においては、評価により、治療（本明細書に記載されるポリペプチドによる治療を含む）が指示され得る。

20

【0168】

キット

本明細書に記載されるアルブミン結合ドメインを含むポリペプチドのいずれか及び適切な包装を含む製造品及びキットも提供される。幾つかの実施形態においては、本発明は、(i)アルブミン結合ドメインを含むポリペプチドと、(ii)該キットを使用してポリペプチドを個体に投与するための使用説明書とを備えるキットを含む。

【0169】

本明細書に記載される組成物に適切な包装は、当該技術分野で知られており、例えば、バイアル（例えば、密封バイアル）、容器、アンプル、ボトル、広口瓶、フレキシブルな包装（例えば、密封マイラー又はプラスチックバッグ）等が含まれる。これらの製造品は、更に滅菌及び/又は密封され得る。本明細書に記載される組成物を含む単位剤形も提供される。これらの単位剤形は、単回又は多回単位投与量で適切な包装内で保存され得て、更に滅菌及び密封もされ得る。本発明のキットに提供される使用説明書は、典型的には、ラベル又は添付文書（例えば、キットに含まれる紙シート）に書かれた指示であるが、機械可読の指示（例えば、磁気記憶ディスク又は光学記憶ディスクに保持された指示）も許容可能である。抗体の使用に関する使用説明書は一般に、意図された治療又は工業的使用のための投与量、投与スケジュール、及び投与経路に関する情報を含む。キットは、個々の適切な治療を選択することの説明を更に含み得る。

30

40

【0170】

容器は、単位用量、バルク包装（例えば、多回用量包装）又はサブユニット用量であり得る。例えば、1週間、2週間、3週間、4週間、6週間、8週間、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月以上のいずれかの概数の期間等の長期間にわたって個体に効果的な治療をもたらすのに十分な投与量の本明細書に開示される分子を含むキットも提供され得る。キットはまた、多回単位用量の分子及び使用説明書を含むことができ、薬局、例えば、病院薬局及び調剤薬局での保存及び使用に十分な量で包装され得る。幾つかの実施形態においては、キットは、再構成、再懸濁、又は再水和することで、一般的に抗体の安定な水性懸濁液を形成することができる乾燥（例えば、凍結乾燥）組成物を含む。

50

【実施例】

【0171】

以下で論じられる実施例は、本発明を純粹に例示することが意図され、決して本発明を限定するとみなされるべきではない。これらの実施例は、以下の実験が、実施された全て又は唯一の実験であることを表すとは意図されない。使用される数値（例えば、量、温度等）に関して正確さを保証するための努力がなされたが、幾らかの実験誤差及び偏差が考慮に入れられるべきである。特段の指示がない限り、部は重量部であり、分子量は平均分子量であり、温度は摂氏温度であり、圧力は大気圧であるか又は近大気圧である。

【0172】

実施例1：抗アルブミンシングルドメイン抗体（sdAb）の開発

10

ヒトアルブミンを標的とするシングルドメイン抗体を、ヒト血清アルブミン（配列番号1）の組換え型でラマ及びアルパカを免疫化することによって生成した。

【0173】

特異的な抗アルブミン抗体価の発現後に、ラマ/アルパカ末梢血単核細胞（PBMC）を免疫化動物の血液500mLから単離し、Qiagen RNeasy Maxi Kitを用いて全mRNAを単離し、続いてThermo Superscript IV Reverse Transcriptase及びオリゴdTプライミングを用いてファーストストランドcDNAに変換した。cDNAを鋳型として用いたPCRによってVHH配列を特異的に増幅し、VHH-Fc-AGA2融合タンパク質として酵母表面提示ベクターにクローニングした。FcはヒトIgG1 Fc、又は場合によっては、エフェク

20

【0174】

VHH-Fc-AGA2融合タンパク質を提示する酵母ライブラリーを、磁気ビーズ単離に続く蛍光活性化細胞選別（FACS）により、ヒトアルブミンの組換え型を用いて富化した。選別された酵母をプレートアウトし、単離したコロニーを96ウェルブロックに採取し、VHH-Fc-AGA2融合タンパク質の酵母細胞表面発現の誘導を行った。誘導された酵母にビオチン化組換えヒトアルブミン又は無関連ビオチン化タンパク質（アルブミン陰性）を直接適用し、洗浄し、フルオロフォア標識ストレプトアビジンで処理し、96ウェルフローサイトメトリーによって分析した。

【0175】

30

ビオチン化組換えヒトアルブミンに結合し、無関連ビオチン化タンパク質に結合しないVHHをコードする核酸配列を、ヒトFc x ELLコード領域とインフレームで哺乳動物発現ベクターにクローニングし、ポリエチレンイミンを用いたHEK293 Free style細胞（293F細胞）又はCHO細胞における一過性トランスフェクションにより発現させた。3日～7日後に上清を回収し、分泌された組換えタンパク質をプロテインAクロマトグラフィーによって精製し、280nmでの吸光度及び吸光係数から濃度を算出した。

【0176】

抗アルブミンsdAb 4A01をヒト化に選択した。

【0177】

40

実施例2：ヒト及びマウスのアルブミンへの抗アルブミンsdAb 4A01の一価結合
単量体抗アルブミンsdAb 4A01は、S364N、Y407N、及びK409Tの突然変異を含むヒトFcに4A01 VHHを融合させることによって作製した（4A01-NNT-hFc；配列番号23及び配列番号68；図1A）。単量体抗アルブミンsdAb 4A01の結合は、単量体sdAbを指定の種の固定化アルブミンタンパク質に対して滴定し（Medisorpプレート）、抗ヒトFc（HRP）を用いて検出することにより、ELISAによって以下のように評定した。

【0178】

プレートを2µg/ml、50µl/ウェルの指定の種のアルブミンタンパク質（Sigma）を用いて4で一晩コーティングした。コーティングしたウェルに1倍Fish

50

G e l a t i n (ブ ロ ッ キ ン グ 剤 、 B i o t i u m) を 添 加 し 、 室 温 で 1 時 間 イ ン キ ュ ベ ー ト し た 。 4 A 0 1 - N N T - h F c の 滴 定 (1 0 0 n M か ら 開 始 、 1 : 3 希 釈 、 最 後 の ウ ェ ル は ブ ラ ン ク) を 加 え た 後 、 室 温 で 1 時 間 イ ン キ ュ ベ ー ト し た 。 次 い で 、 プ レ ー ト を 0 . 1 % D - P B S T で 3 回 洗 浄 し て か ら 、 抗 ヒ ト F c H R P 抗 体 (0 . 1 % D - P B S T 中 1 : 2 0 0 0 、 J a c k s o n) を 添 加 し た 。 プ レ ー ト を 室 温 で 3 0 分 間 イ ン キ ュ ベ ー ト し た 後 、 0 . 1 % D - P B S T で 3 回 洗 浄 し た 。 次 い で 、 T M B 基 質 を 添 加 し 、 6 5 0 n m で の 吸 光 度 を プ レ ー ト リ ー ダ ー (M o l e c u l a r D e v i c e s) で 読 み 取 っ た 。 1 部 位 - 全 結 合 の 式 ($Y = B_{max} \times X / (K_d + X) + NS \times X + \text{バックグラウンド}$ 、 G r a p h P a d P r i s m) を 用 い て デ ー タ を プ ロ ッ ト し た 。

【 0 1 7 9 】

10

図 1 B 及 び 図 1 C に 示 さ れ る よ う に 、 抗 ア ル ブ ミ ン s d A b 4 A 0 1 は 、 ヒ ト 及 び マ ウ ス の 両 方 の ア ル ブ ミ ン に 同 等 の 親 和 性 で 結 合 し た 。 ヒ ト ア ル ブ ミ ン に 対 す る K_D は 0 . 2 3 n M で あ り 、 マ ウ ス ア ル ブ ミ ン に 対 す る K_D は 0 . 2 0 n M で あ っ た 。

【 0 1 8 0 】

実 施 例 3 : 抗 ア ル ブ ミ ン s d A b 4 A 0 1 は 、 ア ル ブ ミ ン ド メ イ ン 3 に 結 合 し な い

ア ル ブ ミ ン は 、 主 に ド メ イ ン 3 を 介 し て $\beta 2$ ミ ク ロ グ ロ ブ リ ン F c R n 複 合 体 に 結 合 し 、 そ の 結 合 は 、 抗 ア ル ブ ミ ン 抗 体 と 融 合 し た タ ン パ ク 質 、 又 は ア ル ブ ミ ン 自 体 と 融 合 し た タ ン パ ク 質 の 半 減 期 の 改 善 に 関 与 す る と 考 え ら れ て い る 。 抗 ア ル ブ ミ ン s d A b 4 A 0 1 が ア ル ブ ミ ン ド メ イ ン 3 に 結 合 す る か を 決 定 す る た め に 、 4 A 0 1 - N N T - h F c の 結 合 を バ イ オ レ イ ヤ ー 干 渉 法 に よ り 、 以 下 の よ う に ア ッ セ イ し た 。

20

【 0 1 8 1 】

ア ル ブ ミ ン ド メ イ ン 3 (マ ウ ス F c タ グ 付 き) を 抗 マ ウ ス I g G F c 捕 捉 バ イ オ セ ン サ ー に 固 定 化 し た 。 全 て の バ ッ フ ェ ー / タ ン パ ク 質 製 剤 は 、 M B S T 5 (5 0 n M M E S (p H 5) 、 1 5 0 m M N a C l 、 0 . 0 2 5 % T w e e n (登 録 商 標)) 中 で あ っ た 。 ベ ー ス ラ イ ン は 、 バ ッ フ ェ ー の み で 確 立 し た 。 マ ウ ス F c タ グ 付 き ヒ ト ア ル ブ ミ ン ド メ イ ン I I I (1 0 μ g / m l) を 抗 マ ウ ス I g G F c 捕 捉 バ イ オ セ ン サ ー (F o r t e B i o) に ロ ー ド し た 。 次 い で 、 抗 ア ル ブ ミ ン s d A b 4 A 0 1 (4 A 0 1 - N N T - h F c) 及 び 1 C 0 4 (類 似 フ ォ ー マ ッ ト) を ロ ー ド し 、 捕 捉 さ れ た ビ オ チ ン ド メ イ ン 3 と 会 合 さ せ た 後 、 M B S T 5 で 解 離 さ せ た 。 s d A b 1 C 0 4 は 、 ア ル ブ ミ ン ド メ イ ン 3 に 結 合 す る こ と が 知 ら れ て お り 、 ポ ジ テ ィ ブ コ ン ト ロ ー ル と し て 使 用 し た 。 図 2 A を 参 照 さ れ た い 。

30

【 0 1 8 2 】

図 2 B に 示 さ れ る よ う に 、 1 C 0 4 は 固 定 化 ア ル ブ ミ ン ド メ イ ン 3 に 結 合 し た が 、 4 A 0 1 は 結 合 し な か っ た 。

【 0 1 8 3 】

次 い で 、 抗 ア ル ブ ミ ン s d A b 4 A 0 1 (4 A 0 1 - N N T - h F c) 、 h z 4 A 0 1 v 5 1 、 及 び 1 C 0 4 を 、 ア ル ブ ミ ン - F c R n 結 合 へ の 干 渉 に つ い て 以 下 の よ う に 試 験 し た 。 ス ト レ プ ト ア ビ ジ ン バ イ オ セ ン サ ー に 固 定 化 し た ビ オ チ ン 化 組 換 え F c R n - B 2 M を 用 い た バ イ オ レ イ ヤ ー 干 渉 法 に よ り 、 結 合 を 評 定 し た 。 次 い で 、 固 定 化 F c R n - B 2 M を 組 換 え ヒ ト ア ル ブ ミ ン と 複 合 化 し た 。 全 て の バ ッ フ ェ ー / タ ン パ ク 質 製 剤 は 、 M B S T 5 (5 0 m M M E S (p H 5) 、 1 5 0 m M N a C l 、 0 . 0 2 5 % T w e e n (登 録 商 標)) 中 で あ っ た 。 ベ ー ス ラ イ ン は 、 バ ッ フ ェ ー の み で 確 立 し た 。 ビ オ チ ン 化 F c R n - B 2 M (1 0 μ g / m l 、 A c r o B i o s y s t e m s) を ス ト レ プ ト ア ビ ジ ン バ イ オ セ ン サ ー (F o r t e B i o) に ロ ー ド し 、 更 な る ベ ー ス ラ イ ン を 決 定 し た 。 次 い で 、 5 0 μ M 組 換 え ヒ ト ア ル ブ ミ ン (S i g m a) を 添 加 し 、 固 定 化 F c R n - B 2 M と 会 合 さ せ た 。 次 い で 、 抗 ア ル ブ ミ ン s d A b 4 A 0 1 及 び 4 A 0 1 v 5 1 、 並 び に s d A b 1 C 0 4 を ロ ー ド し 、 捕 捉 さ れ た ビ オ チ ン ド メ イ ン 3 と 会 合 さ せ た 後 、 M B S T 5 で 解 離 さ せ た 。 図 3 A を 参 照 さ れ た い 。

40

【 0 1 8 4 】

図 2 B に 示 さ れ る よ う に 、 4 A 0 1 及 び h x 4 A 0 1 v 5 1 は 、 ど ち ら も F c R n - B

50

2 M と会合したアルブミンに結合したが、1 C 0 4 は結合しなかった。

【0185】

実施例4：抗アルブミン s d A b 4 A 0 1 のヒト化及び種間交差反応性

ヒト重鎖フレームワーク V H 3 - 2 3 * 0 4 をベースとして s d A b 4 A 0 1 の様々なヒト化型を作製した。或る特定のアミノ酸をドナーアミノ酸へと復帰突然変異させ、或る特定の突然変異を、例えば C D R 2 において試験した。図 4 A は、ヒト重鎖アクセプター配列と 4 A 0 1 のヒト化型とのアラインメントを示す。

【0186】

ヒト血清アルブミン、カニクイザル血清アルブミン、マウス血清アルブミン、及びラット血清アルブミンへの単量体抗アルブミン s d A b 4 A 0 1 (「1 m 4 A 0 1」) 及びそのヒト化型の結合を E L I S A により以下のように決定した。M e d i s o r p プレートを $2 \mu\text{g} / \text{mL}$ 、 $50 \mu\text{L}$ / ウェルのアルブミンタンパク質を用いて 4 で一晩コーティングした (ヒト、マウス、及びラットのアルブミン - Sigma、カニクイザルアルブミン - Abcam)。アルブミンでコーティングしたウェルに 1 倍 F i s h G e l a t i n (ブロッキング剤、Bethyl Laboratories) を添加した後、室温で 1 時間インキュベートした。s d A b 融合タンパク質の滴定 (100 nM から開始、横 1 : 3 又は縦 1 : 4) を加え、室温で 1 時間インキュベートした。プレートを 0.1 % D - P B S T で 3 回洗浄した後、抗ヒト F c H R P 抗体 (0.1 % D - P B S T 中 1 : 2000、Jackson) を添加し、室温で 30 分間インキュベートした。プレートを 0.1 % D - P B S T で 3 回洗浄した後、T M B 基質を添加した。650 nm での吸光度をプレートリーダー (Molecular Devices) で読み取り、1 部位 - 全結合の式 (モデル: $Y = B_{\text{max}} \times X / (K_d + X) + N S \times X + \text{バックグラウンド}$ 、Graph Pad Prism) を用いてデータをプロットした。

【0187】

ヒトアルブミンへの 4 A 0 1 及び 4 A 0 1 のヒト化型の結合を図 4 B 及び図 4 C に示す。全ての s d A b が、 $0.10 \text{ nM} \sim 0.43 \text{ nM}$ の K_D でヒトアルブミンに結合した。カニクイザルアルブミンへの 4 A 0 1 及び 4 A 0 1 のヒト化型の結合を図 4 D 及び図 4 E に示す。全ての s d A b が、 $0.11 \text{ nM} \sim 0.34 \text{ nM}$ の K_D でカニクイザルアルブミンに結合した。マウスアルブミンへの 4 A 0 1 及び 4 A 0 1 のヒト化型の結合を図 4 F 及び図 4 G に示す。全ての s d A b が、 $0.11 \text{ nM} \sim \text{約 } 0.25 \text{ nM}$ の K_D でマウスアルブミンに結合した。ラットアルブミンへの 4 A 0 1 及び 4 A 0 1 のヒト化型の結合を図 4 H 及び図 4 I に示す。全ての s d A b が、 $0.14 \text{ nM} \sim \text{約 } 0.33 \text{ nM}$ の K_D でラットアルブミンに結合した。

【0188】

図 5 A ~ 図 5 D は、ヒト (図 5 A)、カニクイザル (図 5 B)、マウス (図 5 C)、及びラット (図 5 D) のアルブミンへの 4 A 0 1 及びヒト化 h z 4 A 0 1 v 5 1 の結合を示す。4 A 0 1 及び試験した全てのヒト化変異体が、4 種全てのアルブミンと 1 nM 未満の親和性で結合した。ヒト化 h z 4 A 0 1 v 5 1 は、4 種全てのアルブミンと 0.3 nM 未満の親和性で結合し、90 % を超える最大結合を達成した。

【0189】

実施例5：ヒトアルブミンへのシングルドメイン抗体ポリペプチドの結合

中性 pH (7.4) 又はエンドソーム pH (6) でのヒトアルブミンへのヒト化シングルドメイン抗体 (s d A b) ポリペプチドの結合を E L I S A により試験した。96 ウェル E L I S A プレートを P B S 中の $2 \mu\text{g} / \text{mL}$ 組換えアルブミンを用いて 4 で一晩コーティングし、P B S / 0.05 % T w e e n (登録商標) - 20 (P B S - T) で洗浄した後、P B S - T 中の 5 % 粉乳を用いて室温で 2 時間ブロッキングした。被験物質の段階希釈物を P B S (pH 7.4) 又は 20 mM H i s、 150 mM N a C l を含有するバッファー (pH 6) 中で調製し、プレートに添加した。プレートを 4 で 1 時間インキュベートした。インキュベーション後に細胞をそれぞれのバッファーで洗浄し、続いて s d A b を検出するホースラディッシュペルオキシダーゼ (H R P) コンジュゲート抗イ

10

20

30

40

50

デオタイプ抗体とともに室温で30分間インキュベートした。プレートそれぞれのバッファーで洗浄し、TMB基質を添加した。HRP-TMB反応を6分間進行させた後、同量のHClベースの停止液で停止した。450nmでの吸光度を96ウェルプレートリーダーで測定した。データをプロットし、GraphPad Prism分析ソフトウェアを用いて分析した。結果を図7に示す。

【0190】

図7A及び図7Bに示されるように、図6(iii)に示すようにフォーマットされた、配列番号43のアルブミン結合ドメイン(hz4A01v51 VHH)と非哺乳動物標的化結合ドメインを含む二価二重特異性sdAbポリペプチド(cx11917)は、低ナノモルないしサブナノモルの親和性でアルブミンに結合する。見かけの親和性は、僅かにしかpHの影響を受けず、pH6で2nMの K_d と比較して、中性pH(7.4)では0.7nMの K_d である。図6(iii)に記載のようにフォーマットされた2つの非哺乳動物標的化結合ドメインを含むsdAbポリペプチド(cx11916)が、試験したどのpHでも測定可能な親和性でアルブミンに結合しなかったため、結合は一価のアルブミン標的化sdAbサブユニットによってのみ媒介される。

10

【0191】

実施例6：アルブミン結合シングルドメイン抗体ポリペプチドの種間交差反応性

中性pH(7.4)での組換えヒト、カニクイザル、マウス又はラットアルブミンへのhz4A01v51 VHH(配列番号43)と単量体Fc領域(S364N、Y407N、及びK409Tの置換を有するFc領域、配列番号68)とを含むヒト化シングルドメイン抗体(sdAb)ポリペプチド(cx5009、配列番号69)の結合をELISAにより試験した。96ウェルELISAプレートをPBS中の2µg/mL組換えアルブミンを用いて4℃で一晩コーティングし、PBS/0.05%Tween(登録商標)-20(PBS-T)で洗浄した後、1倍fish gelatinを用いて室温で1時間ブロッキングした。被験物質の段階希釈物をPBS-T(pH7.4)中で調製し、プレートに添加した。プレートを室温で1時間インキュベートした。インキュベーション後に細胞をPBS-Tで洗浄し、続いてヒトIgG1に特異的なHRPコンジュゲート二次抗体とともに室温で30分間インキュベートした。次いで、プレートを洗浄してからTMB基質を添加した。HRP-TMB反応を進行させ、650nmでの吸光度を96ウェルプレートリーダーで測定した。データをプロットし、GraphPad Prism分析ソフトウェアを用いて分析した。結果を図3に示す。

20

30

【0192】

図8に示されるように、図6(ii)に示すようにフォーマットされたcx5009、一価アルブミン特異的sdAb、hz4A01v51 VHH-hIgG1-xELL-NN-T-Fc(配列番号69)は、ヒト、カニクイザル、マウス、及びラットに由来するアルブミンに結合する。中性pH(7.4)での見かけの親和性は、サブナノモル範囲(約0.2nM)の K_d にて種間で類似している。

【0193】

実施例7：アルブミン結合シングルドメイン抗体ポリペプチドのin vivo薬物動態プロファイル

40

ヒトIgGの血清曝露を延長するアルブミン結合シングルドメイン抗体(sdAb)の能力を健常マウスにおいて試験した。マウスアルブミンと交差反応性であり、hz4A01v51 VHH-hIgG1-xELL-Fcとしてフォーマットされたヒト化二価sdAbポリペプチド(cx11956、配列番号70)の薬物動態(PK)プロファイルを、マウスと交差反応性ではないが、同じVHH-hIgG1-xELL-Fc構造でフォーマットされた二価sdAbポリペプチド(cx11851)のプロファイルと比較した。ヒトIgG1のxELL変異は、Fcγ受容体結合を低減するが、FcRn結合には影響しない。これはバイオレイヤー干渉法を用いてin vitroで確認された。ヒトIgG1は、マウスFcRnと交差反応性であり、マウスにおけるヒト抗体のFcRn媒介性リサイクリングを可能にする。

50

【0194】

s d A b - h I g G x E L L - F c 被験物質の P K プロファイルを決定するために、B A L B / c マウスに 30 mg / kg 又は 0.3 mg / kg のいずれかの単回用量を静脈内注射し、被験物質注射の 30 分後、6 時間後、24 時間後、96 時間後及び 168 時間後に血清試料を採取した。マウス血清中の被験物質濃度を E L I S A により決定した。P K E L I S A については、ヒト F c R n / B 2 M ヘテロ二量体タンパク質 (H i s タグ、Acro Biosystem) を、P B S 中の 4 µg / mL タンパク質溶液を 4 で 12 時間インキュベートすることにより、96 ウェル E L I S A プレートに固定化した。翌日、プレートを 3 % B S A T B S - T バッファーで 2 時間ブロッキングしてから、これらのプレート上で血清試料を 2 時間インキュベートした。E L I S A プレートに固定化された F c R n への血清試料中の被験物質の結合は、s d A b に結合することが可能な H R P コンジュゲート二次抗イディオタイプ検出抗体を用いて検出した。二次抗体をプレート上で 1 時間インキュベートし、T M B 基質溶液を用いて結合を可視化した後、停止液 (1 M H₂ S O₄) を添加し、450 nm での吸光度を E m a x 分光光度計 (Molecular Devices) で測定した。吸光度値は、既知濃度のタンパク質による標準曲線を用いて S o f t M a x P r o で被験物質濃度に変換した。4 パラメーターロジスティック回帰を用いて標準曲線をフィッティングした。データをエクスポートし、G r a p h P a d P r i s m 分析ソフトウェアを用いてグラフ化した。

【0195】

図 9 に示されるように、アルブミン標的化 s d A b ポリペプチドは、I g G 1 に付着すると、ヒト I g G 1 のクリアランスを遅らせ、血清曝露を延長することができる。30 mg / kg (図 9 A) 又は 0.3 mg / kg (図 9 C) の単回投与後の血清中の抗アルブミン h z 4 A 0 1 v 5 1 V H H - I g G 1 x E L L - F c (c x 1 1 9 5 6) の絶対濃度は、アルブミンに結合しない同等のサイズの非標的化 V H H - I g G 1 x E L L - F c (c x 1 1 8 5 1) の濃度よりも有意に高い。同量のタンパク質 c x 1 1 8 5 1 を注射したにもかかわらず、注射 30 分後の c M a x レベルは、既に c x 1 1 9 5 6 のレベルよりも低い。さらに、非標的化構築物 (c x 1 1 8 5 1) のより迅速なクリアランスは、正規化プロットに示されるように、注射後最初の 6 時間にわたって続く (図 9 B 及び図 9 D) 。c M a x (30 分) 時点と比較して、非標的化 c x 1 1 8 5 1 濃度は、30 mg / kg 用量レベルのコホートでは 6 時間までにほぼ 60 % 低下するが、アルブミン結合 c x 1 1 9 5 6 濃度は、約 12 % しか低下しない (図 10 B) 。同様に、低用量レベル (0.3 mg / kg) では、アルブミン結合 c x 1 1 9 5 6 の濃度は、非アルブミン結合 c x 1 1 8 5 1 の c M a x の約 72 % と比較して、C m a x の約 87 % までにしか低下しなかった。

【0196】

これらの研究結果から、アルブミン結合 V H H ドメインが I g G 抗体の血清曝露を増強し得ることが実証される。いかなる特定の理論にも束縛されることを意図するものではないが、血清曝露の増強は、I g G / F c R n 媒介性リサイクリングとは独立したアルブミン / F c R n リサイクリング経路によるものである可能性がある。

【0197】

F c R n へのヒト I g G 1 - x E L L 及び野生型ヒト I g G の同等の結合を確認するために、組換えヒト F c R n / B 2 M への 2 つの I g G 1 F c 変異体のいずれかでフォーマットされた s d A b ポリペプチドの結合を、O c t e t 9 6 R e d リーダー (Sartorius) を用いたバイオレイヤー干渉法によって試験した。簡潔に述べると、ビオチン化ヒト F c R n / B 2 m をストレプトアビジンバイオセンサーにロードした。100 nM 被験物質希釈物にセンサーを浸漬することで、被験物質の会合を 60 秒間測定した。被験物質は、pH 6 の 50 mM M E S、150 mM N a C l 及び 0.025 % T w e e n (登録商標) - 20 を含有するバッファー又は pH 8 の 50 mM T r i s、150 mM N a C l 及び 0.025 % T w e e n (登録商標) - 20 を含むバッファーのいずれかで希釈した。被験物質を含まないそれぞれの pH バッファーにセンサーを浸漬することで、

被験物質の解離を300秒間追跡した。F o r t e データ分析ソフトウェアを用いて会合曲線及び解離曲線をエクスポートした。

【0198】

結果を図10に示す。これらの研究に使用したI g G 1 x E L L F c のF c R n 結合は、野生型I g G 1 F c のF c R n 結合と同等である。どちらの分子もp H 6で同様の会合速度を示し、p H 8ではF c R n に対して測定可能な親和性を有しない。したがって、アルブミン結合V H Hドメインは、I g G 1 x E L Lドメインを有する分子だけでなく、野生型I g G 1 F cドメインを有する分子の血清曝露を増強すると予想される。

【0199】

実施例8：ヒトアルブミンへの様々なシングルドメイン抗体フォーマットの結合

10

中性p H (7 . 4) で組換えヒトアルブミン及び第2の標的 (I L - 4 R) に結合する、異なる単一特異性及び二重特異性アルブミン結合シングルドメイン抗体フォーマットの能力をE L I S A により評価した。6残基又は12残基のグリシン - セリンリンカーを介してx E L L F c 領域のC末端に連結したアルブミン標的化s d A b (h z 4 A 0 1 v 5 1 V H H) を含む単一特異性抗体、F a bドメイン (I L - 4 R 標的化抗体 (デュピルマブ) のV L - C L (配列番号77) 及びV H - C H 1 (配列番号76))、I g G 1 又はI g G 4 F c 領域、及び異なる位置に配置されたアルブミン標的化s d A b (h z 4 A 0 1 v 5 1 V H H) を含む二重特異性抗体、並びにアルブミン標的化s d A b を欠く単一特異性コントロールI L - 4 R 標的化分子を評価した。本研究に使用したポリペプチドの被験物質の名称及び一般構造を表2にまとめる。E L I S A については、96ウェルE L I S A プレート (M a x i S o r b、Biolegend) を、1 μ g / m L (100 μ L / ウェル) のヒトアルブミン又はI L 4 R を用いてP B S 中4 で一晩コーティングした。プレートを0 . 05 % P B S T (150 μ L / ウェル) で3回洗浄した後、0 . 05 % P B S T (200 μ L / ウェル) 中のカゼインを用いて室温で2時間ブロッキングした。プレートを0 . 05 % P B S T で3回洗浄し、0 . 05 % P B S T 中の滴定被験物質100 μ L をプレートのウェルに添加し (100 n M から開始、1 : 3 希釈、11点滴定)、4 で1時間インキュベートした。次いで、もう一度洗浄した後、プレートをヒトI g G 1 に特異的な0 . 05 % P B S T (100 μ L / ウェル) 中のH R P コンジュゲート二次抗体 (Jackson ImmunoResearch) とともに室温で30分間インキュベートした。次いで、プレートを再び洗浄してから、プレートに添加する前に室温に戻したT M B 基質 (100 μ L / ウェル) を添加した。H R P - T M B 反応をおよそ10分間進行させた後、T M B 停止バッファーを添加し (100 μ L / ウェル)、プレートリーダー (M o l e c u l a r D e v i c e s) で450 n m での吸光度を測定し、650 n m での吸光度を減算した。データをプロットし、G r a p h P a d P r i s m 分析ソフトウェアを用いて分析した。結果を図11A及び図11Bに示す。

20

30

【0200】

40

50

【表 2】

表 2

名称	一般構造†	F c 領域のタイプ	配列番号
cx12583 [^]	F c 領域－G S 6－V H H	ヒ ト I g G 1 x E L L	77
cx12584 [^]	F c 領域－G S 1 2－V H H	ヒ ト I g G 1 x E L L	78
cx12585*	V L－C L（軽鎖）	n / a	75
	V H－C H 1－F c 領域（重鎖）	ヒ ト I g G 1 x E L L	79
cx12587*	V L－C L（軽鎖）	n / a	75
	V H－C H 1－F c 領域－V H H（重鎖）	ヒ ト I g G 1 x E L L	80
cx12596*	V L－C L（軽鎖）	n / a	75
	V H－C H 1－V H H－F c 領域（重鎖）	ヒ ト I g G 1 x E L L	81
cx12590*	V L－C L（軽鎖）	n / a	75
	V H－C H 1－F c 領域（重鎖）	ヒ ト I g G 4（P Y V）	82
cx12594*	V L－C L（軽鎖）	n / a	75
	V H－C H 1－F c 領域－V H H（重鎖）	ヒ ト I g G 4（P Y V）	83
cx12595*	V L－C L（軽鎖）	n / a	75
	V H－C H 1－V H H－F c 領域（重鎖）	ヒ ト I g G 4（P Y V）	84
V H H＝アルブミン結合 V H H 4 A 0 1 v 5 1 V L－C L＝デュピルマブの軽鎖 V H－C H 1＝デュピルマブの可変重鎖及び定常領域 1 [^] ホモ二量体の 1 つの鎖を示す；例えば、図 6（i i i）を参照されたい * 2 つの軽鎖及び 2 つの重鎖を有する四量体の 1 つの軽鎖及び 1 つの重鎖を示す；例えば、図 6（v）及び図 6（v i i）を参照されたい			

10

20

【0201】

図 1 1 A に示されるように、抗アルブミン V H H を含む分子は全て、アルブミンへの結合を示し、C H 1 と F c 領域との間に V H H を含むポリペプチドは、F c 領域の C 末端に抗アルブミン V H H を含む分子よりも僅かに高い親和性をアルブミンに対して示した。抗アルブミン V H H を欠く分子（c x 1 2 5 8 5 及び c x 1 2 5 9 0）には結合が観察されなかった。図 1 1 B に示されるように、第 2 の標的に対する結合ドメイン（すなわち、デュピルマブの F a b ドメイン）を含む分子は全て、非常に類似した親和性で第 2 の標的である I L - 4 R への結合を示し、アルブミン結合ドメインの存在が第 2 の標的への結合を妨げないことが実証された。第 2 の標的に対する結合ドメインを欠く分子（c x 1 2 5 8 3 及び c x 1 2 5 8 4）では、結合は観察されなかった。これらのデータは、実施例 7 に提示するデータとともに、アルブミン標的化 s d A b が、分子の N 末端、C 末端、又はポリペプチド内（例えば、ドメイン間）に位置する場合にアルブミン結合を媒介し得ることを示している。したがって、アルブミン結合 V H H ドメインは、アルブミン結合 V H H ドメインがどこに位置するかにかかわらず、F c 領域を含む分子を含む分子の血清曝露を増強することが予想される。

30

【0202】

実施例 9：抗アルブミン s d A b H z 4 A 0 1 v 5 1 の改変

H z 4 A 0 1 v 5 1 のフレームワーク領域を、或る特定の残基をドナーアミノ酸に復帰突然変異すること、及び / 又は代替の荷電残基を導入することを含めて、更に改変した。改変した V H H（H z 4 A 0 1 v 5 1 . 9、H z 4 A 0 1 v 5 1 . 1 1、H z 4 A 0 1 v 5 1 . 1 2、及び H z 4 A 0 1 v 5 1 . 1 3）を用いて、図 6（i i）に示す一般構造を有する一価（V H H が F c N T T に融合した）抗アルブミン結合分子を生成した。また、幾つか（H z 4 A 0 1 v 5 1 . 9、H z 4 A 0 1 v 5 1 . 1 2、及び H z 4 A 0 1 v 5 1 . 1 3）を用いて、図 6（i）に示す一般構造を有する二価（V H H が F c x E L L に融合した）抗アルブミン結合分子を生成した。p H 6 . 0 及び p H 7 . 0 でのヒト血清アルブミンへの一価及び二価抗アルブミン分子、並びに一価 H z 4 A 0 1 v 5 1 - N N T

40

50

- h F c の結合を、E L I S A により以下のように決定した。プレート (M a x i S o r b、Biolegend) を、 $2 \mu\text{g} / \text{mL}$ ($100 \mu\text{L}$) のアルブミンを用いて P B S 中 4 で一晚、又は $2 \mu\text{g} / \text{mL}$ ($100 \mu\text{L}$) のアルブミンを用いて 20mM H i s - H C l、 150mM N a C l (p H 6) 中 4 で一晚コーティングした。プレートを 0.05% P B S T 又は p H 6 バッファーで 3 回洗浄した後、 5% M i l k P B S T を用いて室温で 2 時間ブロッキングした。プレートを 0.05% P B S T 又は p H 6 バッファーで 3 回洗浄し、P B S T 又は p H 6 バッファー中の被験物質の滴定をプレートに加え (100nM から開始、 $1:5$ 希釈)、4 で 1 時間インキュベートした。次いで、もう一度洗浄した後、プレートを ヒト I g G 1 に特異的な H R P コンジュゲート二次抗体とともに室温で 30 分間インキュベートした。次いで、プレートを洗浄してから T M B 基質を添加した。H R P - T M B 反応を 6 分間進行させた後、T M B 停止バッファーを添加し、 450nm での吸光度をプレートリーダー (Molecular Devices) で測定した。データをプロットし、G r a p h P a d P r i s m 分析ソフトウェアを用いて分析した。ネガティブコントロール及び E L L 試料については、 0.16nM 滴定点は試験しなかった。

10

【 0 2 0 3 】

一価フォーマットでは、改変抗アルブミン抗体は、p H 6 (図 1 2 A) 及び p H 7 . 4 (図 1 2 B) で同様の結合プロファイルを示し、特に p H 6 で、いずれも H z 4 A 0 1 v 5 1 で観察された結合よりも改善された結合を示した。二価フォーマットでは、H z 4 A 0 1 v 5 1 . 9 及び H z 4 A 0 1 v 5 1 . 1 3 は、p H 6 (図 1 2 C) 及び p H 7 . 4 (図 1 2 D) の両方で H z 4 A 0 1 v 5 1 よりも改善された同様の結合プロファイルを示した。

20

【 0 2 0 4 】

本開示は、本発明の趣旨又は本質的な特徴から逸脱することなく、他の特定の形態で具体化され得る。したがって、上述の実施形態は、全ての点で例示としてみなされるべきであって、本開示を限定するものとはみなされない。したがって、本開示の範囲は、上述の詳細な説明ではなく、添付の特許請求の範囲によって示されるため、特許請求の範囲の意味及び均等の範囲内にある全ての変更は、本明細書に含まれることが意図される。

【 0 2 0 5 】

30

40

50

【表 3】

或る特定の配列の表

配列番号	説明	配列
1	ヒト血清アルブミン (HSA) ; UniProtKB / Swiss-Prot : P02768.2 ; 成熟型 : アミノ酸 25 ~ 609	MKWVTFISLL FLSSAYSRG VFRDRAHKSE VAHRFKDLGE ENFKA LVLIA FAQYLQQCPF EDHVKLVNEV TEFAKTCVAD ESAENCDKSL HTLFGDKLCT VATLRETYGE MADCCAKQEP ERNECFLQHK DDNP NLPRLV RPEVDVMCTA FHDNEETFLK KYLYEIARRH PYFYAPELL F FAKRYKAAFT ECCQAADKAA CLLPKLDEL R DEGKASSAKQ RLK CASLQKF GERAFAKAWAV ARLSQRFPA EFAEVSKLVT DLTQVHTE CC HGDLLCADD RADLAKYICE NQDSISSKLK ECCEKPLEK SH CIAEVEND EMPADLPSLA ADFVESKDVC KNYAEAKDVF LGMFLYE YAR RHPDYSVLL LRLAKTYETT LEKCCAAADP HECYAKVFDE F KPLVEEPQN LIKQNCLEFE QLGEYKFQNA LLVRYTKKVP QVSTPT LVEV SRNLGKVGSK CCKHPEAKRM PCAEDYLSVV LNQLCVLHEK TPVSDRVTKC CTESLVNRRP CFSALEVDET YVPKEFNAET FTFHA DICTL SEKERQIKKQ TALVELVKHK PKATKEQLKA VMDDFAAFVE KCKKADDKET CFAEEGKKLV AASQAALGL
2	マウス血清アルブミン (MSA) ; UniProtKB / Swiss-Prot : P07724.3 ; 成熟型 : アミノ酸 25 ~ 608	MKWVTFLLLL FVSGSAFSRG VFRREAHKSE IAHRYNDLGE QHFKG LVLIA FSQYLQKCSY DEHAKLVQEV TDFAKTCVAD ESAANCDKSL HTLFGDKLCA IPNLRENYGE LADCCCKQEP ERNECFLQHK DDNP SLPPFE RPEAEAMCTS FKENTTFMG HYLHEVARRH PYFYAPELL Y YAEQYNEILT QCCAADKES CLTPKLDGVK EKALVSSVRQ RMK CSSMQKF GERAFAKAWAV ARLSQTFPNA DFAEITKLAT DLTQVHTE CC HGDLLCADD RAELAKYMCE NQATISSKLQ TCCDKPLLK AH CLSEVEHD TMPADLPAIA ADFVEDQEV KNYAEAKDVF LGTFLEY YSR RHPDYSVSL LRLAKYEAT LEKCCAEANP PACYGTVLAE F QPLVEEPKN LVKTNCDLYE KLGEYGFQNA ILVRYTQKAP QVSTPT LVEA ARNLGRVGTK CCTLPEQRL PCVEDYLSAI LNRVCLLHEK TPVSEHVTCK CSGSLVERRP CFSALTVDET YVPKEFKAET FTFHS DICTL PEKEQIKKQ TALAELVKHK PKATAEQLKT VMDDFAQFLD TCKKAADKDT CFSTEGPNLV TRCKDALA
3	カニクイザル血清アルブミン (CSA) ; 成熟型 : アミノ酸 25 ~ 608	MKWVTFISLL FLSSAYSRG VFRDTHKSE VAHRFKDLGE EHFKE LVLVA FSQYLQQCPF EEHVKLVNEV TEFAKTCVAD ESAENCDKSL HTLFGDKLCT VATLRETYGE MADCCAKQEP ERNECFLQHK DDNP NLPLV RPEVDVMCTA FHDNEATFLK KYLYEVARRH PYFYAPELL F FAARYKAAFA ECCQAADKAA CLLPKLDEL R DEGKASSAKQ RLK CASLQKF GDRAFAKAWAV ARLSQKFPKA EFAEVSKLVT DLTQVHTE CC HGDLLCADD RADLAKYMCE NQDSISSKLK ECCDKPLEK SH CLAEVEND EMPADLPSLA ADYVESKDVC KNYAEAKDVF LGMFLYE YAR RHPDYSVLL LRLAKYEAT LEKCCAAADP HECYAKVFDE F QPLVEEPQN LVKQNCLEFE QLGEYKFQNA LLVRYTKKVP QVSTPT LVEV SRNLGKVGAK CCKLPEAKRM PCAEDYLSVV LNRLCVLHEK TPVSEKVTCK CTESLVNRRP CFSALELDEA YVPKAFNAET FTFHA DMCTL SEKEQVKKQ TALVELVKHK PKATKEQLKG VMDNFAAFVE KCKKADKKEA CFAEEGPKFV AASQAALA
4	ラット血清アルブミン (RSA) ; UniProtKB / Swiss-Prot : P02770.	MKWVTFLLLL FISGSAFSRG VFRREAHKSE IAHRFKDLGE QHFKG LVLIA FSQYLQKCPY EEHIKLVQEV TDFAKTCVAD ENAENCDKSI HTLFGDKLCA IPKL RDNYGE LADCCAKQEP ERNECFLQHK DDNP NLPPFQ RPEAEAMCTS FQENPTSFLG HYLHEVARRH PYFYAPELL

10

20

30

40

	2 ; 成熟型 : アミノ酸 2 5 ~ 6 0 8	Y YAEKYNEVLT QCCTESDKAA CLTPKLDVAV EKALVAAVRQ RMK CSSMQRF GERAFAKAWAV ARMSQRFPA EFAEITKLAT DVTKINKE CC HGDLLCADD RAEALAKYMCE NQATISSKLQ ACCDKPVLQK SQ CLAEIEHD NIPADLPSIA ADFVEDKEVC KNYAEAKDVF LGTFLYE YSR RHPDYSVSL LRLAKKYEAT LEKCCAEGDP PACYGTVLAE F QPLVEEPKN LVKTNCELYE KLGEYGFQNA VLVRYTQKAP QVSTPT LVEA ARNLGRVGTK CCTLPEAQL PCVEDYLSAI LNRLCVLHEK TPVSEKVTKC CSGSLVERRP CFSALTVD ET YVPKEFKAET FTFHS DICTL PDKEKQIKKQ TALAELVKHK PKATEDQLKT VMGDFAQFVD KCKKAADKDN CFATEGPNLV ARSKEALA
5	4A01, Hz4A01v1, Hz4A01v3, Hz4A01v4, Hz 4A01v5, Hz4A01v6, Hz4A 01v8, Hz4A01v9, Hz4A01 v3-5, Hz4A01v3-7, Hz4A 01v3-8 CDR1	GFAFSTSGMV
6	Hz4A01v3-1, Hz4A01v3-7.1k-RITA, Hz4A01v3-7.1k-RITI, Hz4A01v3-7.1k-RITL, Hz4A01v3-7.1k-RITS, Hz4A01v3-7.1k-RITT, Hz4A01v3-7.1k-RITV, Hz 4A01v51, Hz4A01v51.9, Hz4A01v51.11, Hz4A01v 51.12, Hz4A01v51.13 CD R1	GFTFSTSGMV
7	Hz4A01v3-3 CDR1	GFAFSTSGMA
8	Hz4A01v3-4 CDR1	GFAFSTSGMS
9	4A01, Hz4A01v1 CDR2	TISDDSRIR
10	Hz4A01v4 CDR2	TISDESRIIR
11	Hz4A01v5 CDR2	TISDEGRIIR
12	Hz4A01v6 CDR2	TISDSGRIIR
13	Hz4A01v8 CDR2	TISDNARIIR
14	Hz4A01v9 CDR2	TISDDTRIIR
15	Hz4A01v3 Hz4A01v3-1, Hz4A01v3-3, Hz4A01v3-4, Hz4A01v3-5, Hz4A01v3-7, Hz4A01v3-8 CDR2	TISDDARIIR
16	Hz4A01v3-7.1k-RITA CDR 2	TISDDARITA
17	Hz4A01v3-7.1k-RITI CDR 2	TISDDARITI
18	Hz4A01v3-7.1k-RITL CDR 2	TISDDARITL
19	Hz4A01v3-7.1k-RITS CDR 2	TISDDARITS

10

20

30

40

50

20	H _z 4A01v3-7.1k-RITT CDR 2	TISDDARITT
21	H _z 4A01v3-7.1k-RITV, H _z 4A01v51, H _z 4A01v51.9, H _z 4A01v51.11, H _z 4A01v51.12, H _z 4A01v51.13 CDR 2	TISDDARITV
22	4A01, H _z 4A01v1, H _z 4A01v3, H _z 4A01v4, H _z 4A01v5, H _z 4A01v6, H _z 4A01v8, H _z 4A01v9, H _z 4A01v3-1, H _z 4A01v3-3, H _z 4A01v3-4, H _z 4A01v3-5, H _z 4A01v3-7, H _z 4A01v3-8, H _z 4A01v3-7.1k-RITA, H _z 4A01v3-7.1k-RITI, H _z 4A01v3-7.1k-RITL, H _z 4A01v3-7.1k-RITS, H _z 4A01v3-7.1k-RITT, H _z 4A01v3-7.1k-RITV, H _z 4A01v51, H _z 4A01v51.9, H _z 4A01v51.11, H _z 4A01v51.12, H _z 4A01v51.13 CDR 3	YRAGSRIGSYEDYY
23	4A01 VHH	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSTSGMVVVRQATGKGLEWVS TISDDSRIRYADSVNGRFTISRDNANTLYLLMNSLKPEDTAVYYCAT YRAGSRIGSYEDYYRGQGTQVTVSS
24	H _z 4A01v1	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFAFSTSGMVVVRQAPGKGLEWVS TISDDSRIRYAESVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAT YRAGSRIGSYEDYYRGQGTLVTVKP
25	H _z 4A01v3	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFAFSTSGMVVVRQAPGKGLEWVS TISDDARIIRYAESVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAT YRAGSRIGSYEDYYRGQGTLVTVKP
26	H _z 4A01v4	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFAFSTSGMVVVRQAPGKGLEWVS TISDESRIIRYAESVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAT YRAGSRIGSYEDYYRGQGTLVTVKP
27	H _z 4A01v5	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFAFSTSGMVVVRQAPGKGLEWVS TISDEGRIIRYAESVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAT YRAGSRIGSYEDYYRGQGTLVTVKP
28	H _z 4A01v6	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFAFSTSGMVVVRQAPGKGLEWVS TISDSGRIIRYAESVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAT YRAGSRIGSYEDYYRGQGTLVTVKP
29	H _z 4A01v8	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFAFSTSGMVVVRQAPGKGLEWVS TISDNARIIRYAESVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAT YRAGSRIGSYEDYYRGQGTLVTVKP
30	H _z 4A01v9	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFAFSTSGMVVVRQAPGKGLEWVS TISDDTRIIRYAESVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAT YRAGSRIGSYEDYYRGQGTLVTVKP
31	H _z 4A01v3-1	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSGMVVVRQAPGKGLEWVS TISDDARIIRYAESVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAT YRAGSRIGSYEDYYRGQGTLVTVKP

10

20

30

40

50

32	Hz4A01v3-3	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFAFSTSGMAWVRQAPGKGLEWVS TISDDARIIRYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAT YRAGSRIGSYEDYYRGQGLVTVKP
33	Hz4A01v3-4	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFAFSTSGMSWVRQAPGKGLEWVS TISDDARIIRYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAT YRAGSRIGSYEDYYRGQGLVTVKP
34	Hz4A01v3-5	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFAFSTSGMVWVRQAPGKGLEWVS TISDDARIIRYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAT YRAGSRIGSYEDYYRGQGLVTVKP
35	Hz4A01v3-7	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFAFSTSGMVWVRQAPGKGLEWVS TISDDARIIRYAESVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAT YRAGSRIGSYEDYYRGQGLVTVKP
36	Hz4A01v3-8	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFAFSTSGMVWVRQAPGKGLEWVS TISDDARIIRYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAT YRAGSRIGSYEDYYWGQGLVTVKP
37	Hz4A01v3-7. 1k-RITA	EVQLVESGGGEVQPGKSLRLSCAASGFTFSTSGMVWVRQAPGKGLEWVS TISDDARITAYAESVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAT YRAGSRIGSYEDYYRGQGLVTVKP
38	Hz4A01v3-7. 1k-RITI	EVQLVESGGGEVQPGKSLRLSCAASGFTFSTSGMVWVRQAPGKGLEWVS TISDDARITIYAESVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAT YRAGSRIGSYEDYYRGQGLVTVKP
39	Hz4A01v3-7. 1k-RITL	EVQLVESGGGEVQPGKSLRLSCAASGFTFSTSGMVWVRQAPGKGLEWVS TISDDARITLYAESVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAT YRAGSRIGSYEDYYRGQGLVTVKP
40	Hz4A01v3-7. 1k-RITS	EVQLVESGGGEVQPGKSLRLSCAASGFTFSTSGMVWVRQAPGKGLEWVS TISDDARITSYAESVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAT YRAGSRIGSYEDYYRGQGLVTVKP
41	Hz4A01v3-7. 1k-RITT	EVQLVESGGGEVQPGKSLRLSCAASGFTFSTSGMVWVRQAPGKGLEWVS TISDDARITTYAESVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAT YRAGSRIGSYEDYYRGQGLVTVKP
42	Hz4A01v3-7. 1k-RITV	EVQLVESGGGEVQPGKSLRLSCAASGFTFSTSGMVWVRQAPGKGLEWVS TISDDARITVYAESVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAT YRAGSRIGSYEDYYRGQGLVTVKP
43	Hz4A01v51 VHH	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSGMVWVRQAPGKGLEWVS TISDDARITVYAESVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAT YRAGSRIGSYEDYYRGQGLVTVKP
71	Hz4A01v51. 9 VHH	QVQLLES GGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSGMVWVRQAPGKGLEWVS TISDDARITVYAESVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAT YRAGSRIGSYEDYYRGQGLVTVEP
72	Hz4A01v51. 11 VHH	QVQLLES GGKVKVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSGMVWVRQAPGKGLEWVS TISDDARITVYAESVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAT YRAGSRIGSYEDYYRGQGLVTVEP
73	Hz4A01v51. 12 VHH	EVQLLES GGKVKVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSGMVWVRQAPGKGLEWVS TISDDARITVYAESVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAT YRAGSRIGSYEDYYRGQGLVTVEP
74	Hz4A01v51. 13 VHH	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSGMVWVRQAPGKGLEWVS TISDDARITVYAESVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAT YRAGSRIGSYEDYYRGQGLVTVRP
69	cx5009	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSGMVWVRQAPGKGLEWVS TISDDARITVYAESVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAT YRAGSRIGSYEDYYRGQGLVTVKPGGGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL

10

20

30

40

50

		TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVNTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSGF FLNSTLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSG GGGS
70	c x 1 1 9 5 6 (示した ホモ二量体の1つの鎖)	EVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSGMVWVRQAPGKGLEWVS TISDDARITVYAESVKGRFTISRDNKNTVYQLQMNSLRAEDTAVYYCAT YRAGSRIGSYEDYYRGQGLVTVKPGGGGDKTHTCPPCPAPGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPVLDSGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK LSLSLSPGK
75	デュビルマブV L - C L (c x 1 2 5 8 5、c x 1 2 5 8 7、c x 1 2 5 9 6、c x 1 2 5 9 0、 c x 1 2 5 9 4、c x 1 2 5 9 5の軽鎖)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYSIGYNLDWYLQKSGQSP QLLIYLGSNRASGVDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGFYYCMQALQ TPYTFGGGTGLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKKHV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
76	デュビルマブV H - C H 1	EVQLVESGGGLEQPGGSLRLSCAGSGFTFRDYAMTWVRQAPGKGLEWVS SISGSGGNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYQLQMNSLRAEDTAVYYCAK DRLSITIRPRYYGLDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGKTITTCNVDHKPSNTKVDKRV
77	c x 1 2 5 8 3 (示した ホモ二量体の1つの鎖)	GGGGDKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSGFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSEVQLVESGGGEVQ PGGSLRLSCAASGFTFSTSGMVWVRQAPGKGLEWVSTISDDARITVYAE SVKGRFTISRDNKNTVYQLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDY YRGQGLVTVKP
78	c x 1 2 5 8 4 (示した ホモ二量体の1つの鎖)	GGGGDKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSGFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSEVQLVES GGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSGMVWVRQAPGKGLEWVSTISDDAR ITVYAESVKGRFTISRDNKNTVYQLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRI GSYEDYYRGQGLVTVKP
79	c x 1 2 5 8 5 重鎖 (示 した四量体の1つの鎖)	EVQLVESGGGLEQPGGSLRLSCAGSGFTFRDYAMTWVRQAPGKGLEWVS SISGSGGNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYQLQMNSLRAEDTAVYYCAK DRLSITIRPRYYGLDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGKTITTCNVDHKPSNTKVDKRVKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPVLDSGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSP
80	c x 1 2 5 8 7 重鎖 (示 した四量体の1つの鎖)	EVQLVESGGGLEQPGGSLRLSCAGSGFTFRDYAMTWVRQAPGKGLEWVS SISGSGGNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYQLQMNSLRAEDTAVYYCAK DRLSITIRPRYYGLDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV

10

20

30

40

50

		PSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVDKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGSGGSEVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSGMVVVRQ APGKGLEWVSTISDDARITVYAESVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLRA EDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQGLTVTKP
81	c x 1 2 5 9 6 重鎖 (示 した四量体の1つの鎖)	EVQLVESGGGLEQPGGSLRLSCAGSGFTFRDYAMTWVRQAPGKGLEWVS SISGSGGNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK DRLSITIRPRYYGLDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVGGSGGSEVQLVESGGGEVQPGG SLRLSCAASGFTFSTSGMVVVRQAPGKGLEWVSTISDDARITVYAESVK GRFTISRDN AKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRG QGLTVTKPGGGGDKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
82	c x 1 2 5 9 0 重鎖 (示 した四量体の1つの鎖)	EVQLVESGGGLEQPGGSLRLSCAGSGFTFRDYAMTWVRQAPGKGLEWVS SISGSGGNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK DRLSITIRPRYYGLDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSV FLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVVHEALHNHY TQKSLSLSLG
83	c x 1 2 5 9 4 重鎖 (示 した四量体の1つの鎖)	EVQLVESGGGLEQPGGSLRLSCAGSGFTFRDYAMTWVRQAPGKGLEWVS SISGSGGNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK DRLSITIRPRYYGLDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSV FLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVVHEALHNHY TQKSLSLSLGGSGGSEVQLVESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSTSGM VWVRQAPGKGLEWVSTISDDARITVYAESVKGRFTISRDN AKNTVYLQMN SLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRGQGLTVTKP
84	c x 1 2 5 9 5 重鎖 (示 した四量体の1つの鎖)	EVQLVESGGGLEQPGGSLRLSCAGSGFTFRDYAMTWVRQAPGKGLEWVS SISGSGGNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK DRLSITIRPRYYGLDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVGGSGGSEVQLVESGGGEVQPGG SLRLSCAASGFTFSTSGMVVVRQAPGKGLEWVSTISDDARITVYAESVK GRFTISRDN AKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRAGSRIGSYEDYYRG QGLTVTKPGGGGSEVQPGPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYIS RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL

10

20

30

40

50

		PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK
47	ヒ ト I g G 1 F c 領域	DKHTCPCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK
48	ヒ ト I g G 1 F c x E L L	DKHTCPCPPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK
49	I g G 1 F c 領域 M 2 5 2 Y 及び M 4 2 8 V (Y V) S 3 5 4 C T 3 6 6 W ノ ブ	DKHTCPCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK
50	I g G 1 F c 領域 M 2 5 2 Y、M 4 2 8 V、 H 4 3 5 R (Y V R) T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、 Y 4 0 7 V ホール	DKHTCPCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVHEALHNRYTQKSLSLSPGK
51	I g G 1 F c 領域 x E L L H 4 3 5 R	DKHTCPCPPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVHEALHNRYTQKSLSLSPGK
52	I g G 1 F c 領域 x E L L M 2 5 2 Y 及び M 4 2 8 V (Y V)	DKHTCPCPPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK
53	I g G 1 F c 領域 x E L L M 2 5 2 Y 及び M 4 2 8 L (Y L)	DKHTCPCPPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK
54	I g G 1 F c 領域 x E L L M 2 5 2 Y、M 4 2 8 L、H 4 3 5 R (Y L R)	DKHTCPCPPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVLHEALHNRYTQKSLSLSPGK
55	I g G 1 F c 領域 x E L L M 2 5 2 Y、M 4 2 8 V、H 4 3 5 R (Y V R)	DKHTCPCPPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVHEALHNRYTQKSLSLSPGK
56	I g G 1 F c 領域 x E L L S 3 5 4 C T 3 6 6 W ノ ブ	DKHTCPCPPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

20

30

40

57	I g G 1 F c 領域 x E L L H 4 3 5 R S 3 5 4 C T 3 6 6 W ノ ブ	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK KVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNRYTQKSLSLSPGK
58	I g G 1 F c 領域 x E L L M 2 5 2 Y 及び M 4 2 8 V (Y V) S 3 5 4 C T 3 6 6 W ノ ブ	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK KVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVVHEALHNHYTQKSLSLSPGK
59	I g G 1 F c 領域 x E L L M 2 5 2 Y 及び M 4 2 8 L (Y L) S 3 5 4 C T 3 6 6 W ノ ブ	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK KVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK
60	I g G 1 F c 領域 x E L L M 2 5 2 Y、M 4 2 8 L、H 4 3 5 R (Y L R) S 3 5 4 C T 3 6 6 W ノブ	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK KVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVLHEALHNRYTQKSLSLSPGK
61	I g G 1 F c 領域 x E L L M 2 5 2 Y、M 4 2 8 V、H 4 3 5 R (Y V R) S 3 5 4 C T 3 6 6 W ノブ	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK KVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVVHEALHNRYTQKSLSLSPGK
62	I g G 1 F c 領域 x E L L T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V ホ ール	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK KVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
63	I g G 1 F c 領域 x E L L H 4 3 5 R、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、 Y 4 0 7 V ホール	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK KVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNRYTQKSLSLSPGK
64	I g G 1 F c 領域 x E L L M 2 5 2 Y 及び M 4 2 8 V (Y V) T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、 Y 4 0 7 V ホール	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK KVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVVHEALHNHYTQKSLSLSPGK
65	I g G 1 F c 領域 x E L L M 2 5 2 Y 及び M 4 2 8 L (Y L) T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、 Y 4 0 7 V ホール	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK KVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK
66	I g G 1 F c 領域 x E L L M 2 5 2 Y、M 4 2 8 L、H 4 3 5 R (Y L R) T 3 6 6 S、 L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V ホール	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK KVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVLHEALHNRYTQKSLSLSPGK
67	I g G 1 F c 領域 x E L L M 2 5 2 Y、M	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK

10

20

30

40

50

	4 2 8 V、H 4 3 5 R (Y V R) T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V ホール	KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVVHEALHNRYTQKSLSLSPGK
68	I g G 1 F c 領域 S 3 6 4 N、Y 4 0 7 N、 及び K 4 0 9 T (N N T)	GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVNTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLNSTLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG
85	ヒト I g G 4 F c 領域	ESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDK SRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
86	I g G 4 F c 領域 S 2 2 8 P (P)	ESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDK SRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
87	I g G 4 F c 領域 S 2 2 8 P、M 2 5 2 Y 及 び M 4 2 8 V (P Y V)	ESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDK SRWQEGNVFSCSVVHEALHNHYTQKSLSLSLGK
88	リンカー 1	GGGG
89	リンカー 2	GSGGGS
90	リンカー 3	GSGGGS
91	リンカー 4	GGSGGGSGGGS
92	リンカー 5	GSGGS
93	リンカー 6	GGSGGGSGGGS
94	VH3-23*04	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS AISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC

10

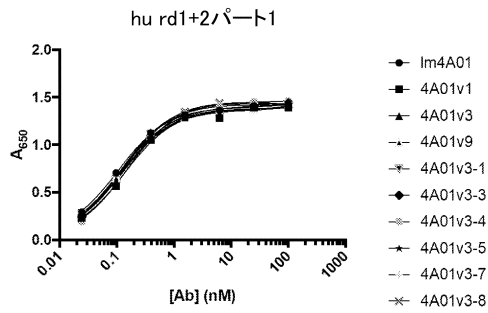
20

30

40

50

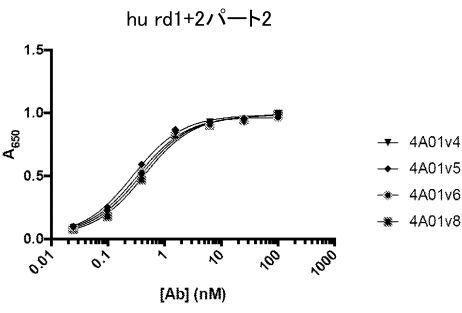
【 図 4 B 】



	Bmax	Kd
Im4A01	1.341	0.1047
4A01v1	1.338	0.1391
4A01v3	1.321	0.1245
4A01v9	1.351	0.1145
4A01v3-1	1.321	0.123
4A01v3-3	1.362	0.1287
4A01v3-4	1.427	0.1515
4A01v3-5	1.394	0.1215
4A01v3-7	1.398	0.1213
4A01v3-8	1.414	0.1355

FIG. 4B

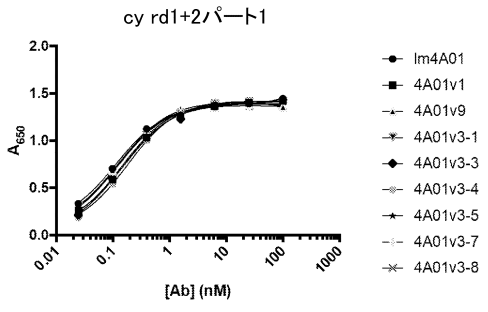
【 図 4 C 】



	Bmax	Kd
4A01v4	0.947	0.3783
4A01v5	0.9567	0.2763
4A01v6	0.9403	0.3321
4A01v8	0.9545	0.4283

FIG. 4C

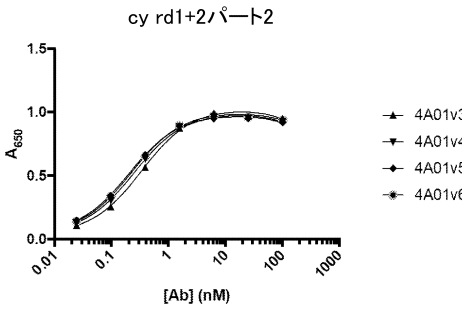
【 図 4 D 】



	Bmax	Kd
Im4A01	1.268	0.1126
4A01v1	1.309	0.1572
4A01v9	1.294	0.117
4A01v3-1	1.295	0.1272
4A01v3-3	1.35	0.1417
4A01v3-4	1.37	0.181
4A01v3-5	1.34	0.1262
4A01v3-7	1.312	0.1178
4A01v3-8	1.347	0.1467

FIG. 4D

【 図 4 E 】



	Bmax	Kd
4A01v3	0.9943	0.3381
4A01v4	0.9542	0.2474
4A01v5	0.9393	0.2032
4A01v6	0.9607	0.2253

FIG. 4E

10

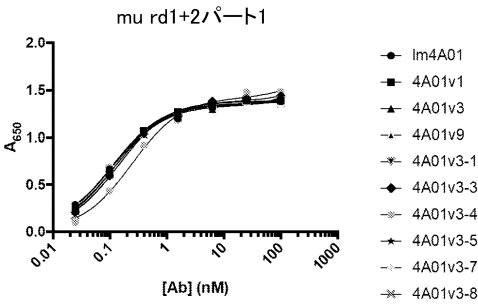
20

30

40

50

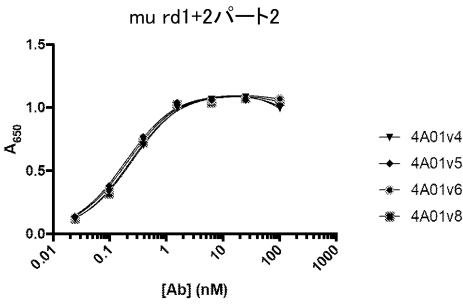
【 図 4 F 】



	Bmax	Kd
Im4A01	1.264	0.1141
4A01v1	1.352	0.1285
4A01v3	1.296	0.1207
4A01v9	1.303	0.1121
4A01v3-1	1.289	0.109
4A01v3-3	1.35	0.1417
4A01v3-4	1.401	0.2409
4A01v3-5	1.31	0.1117
4A01v3-7	1.317	0.1105
4A01v3-8	1.357	0.1427

FIG. 4F

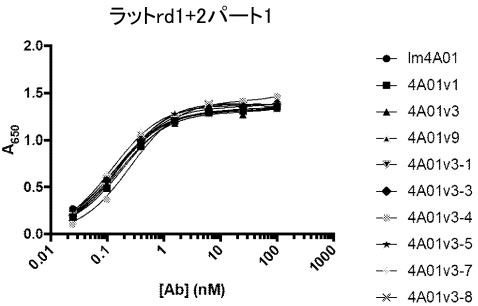
【 図 4 G 】



	Bmax	Kd
4A01v4	1.103	0.2503
4A01v5	1.095	0.1888
4A01v6	1.089	0.2064
4A01v8	1.097	0.2257

FIG. 4G

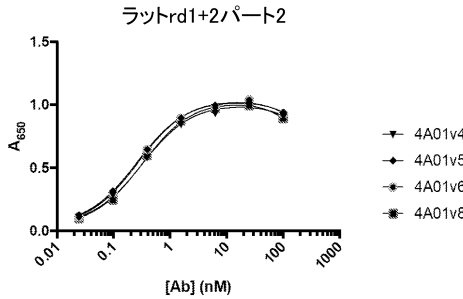
【 図 4 H 】



	Bmax	Kd
Im4A01	1.241	0.1444
4A01v1	1.285	0.1836
4A01v3	1.25	0.1617
4A01v9	1.269	0.1441
4A01v3-1	1.276	0.1296
4A01v3-3	1.32	0.1516
4A01v3-4	1.407	0.2518
4A01v3-5	1.347	0.1621
4A01v3-7	1.347	0.1226
4A01v3-8	1.389	0.1669

FIG. 4H

【 図 4 I 】



	Bmax	Kd
4A01v4	0.9724	0.3203
4A01v5	1.005	0.2599
4A01v6	1.016	0.2731
4A01v8	1.006	0.3279

FIG. 4I

10

20

30

40

50

【 図 5 A B 】

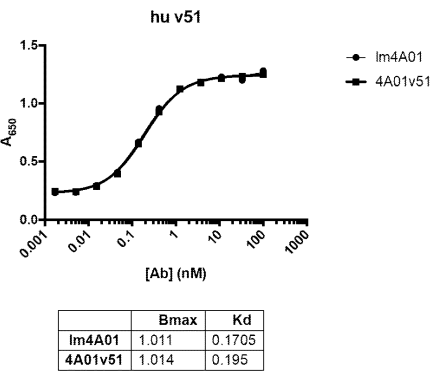


FIG. 5A

【 図 5 C D 】

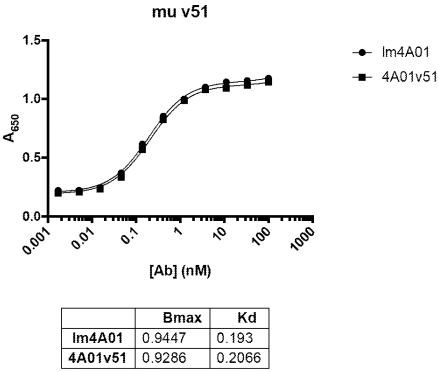


FIG. 5C

10

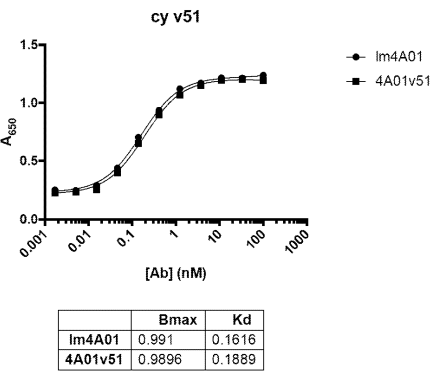


FIG. 5B

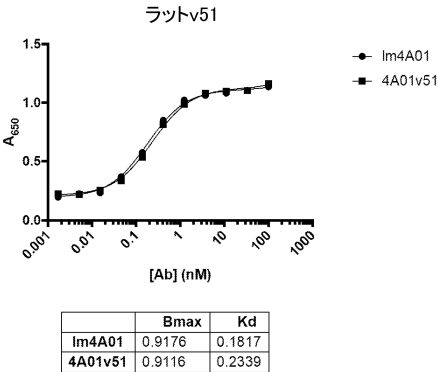


FIG. 5D

20

【 図 6 】

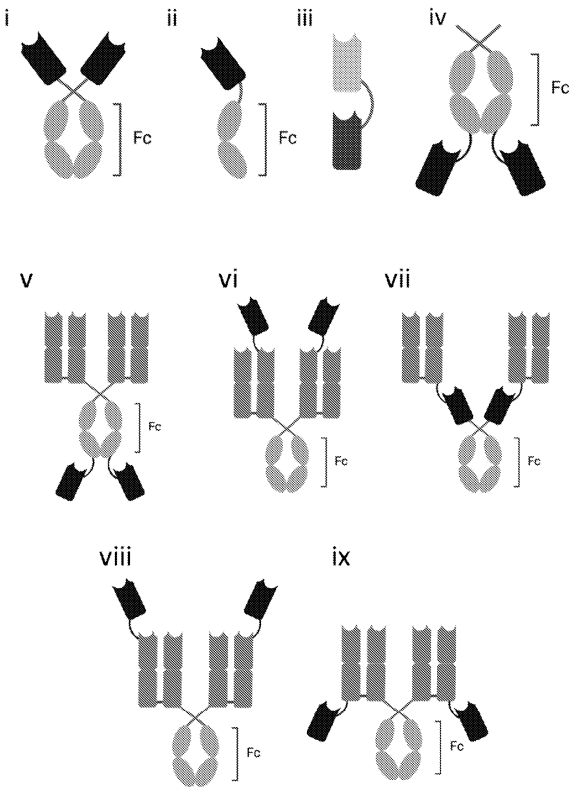
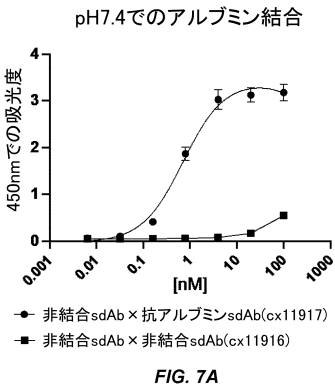
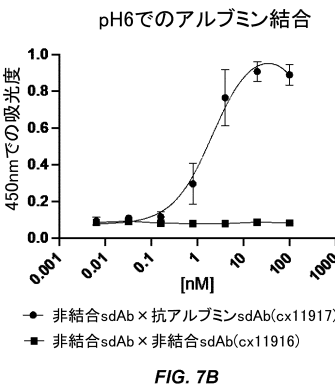


FIG. 6

【 図 7 】



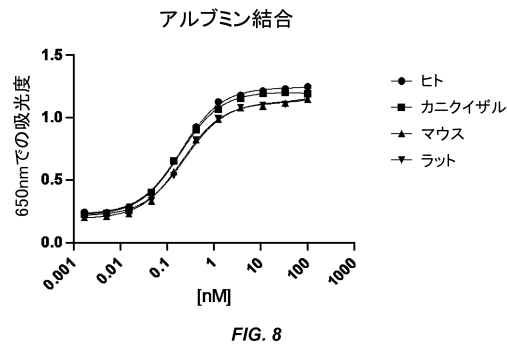
30



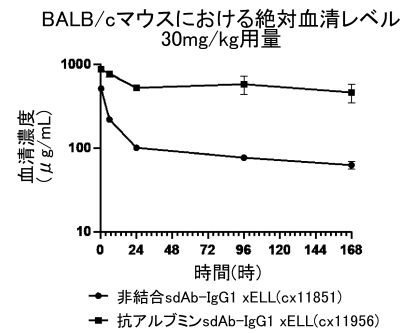
40

50

【 図 8 】

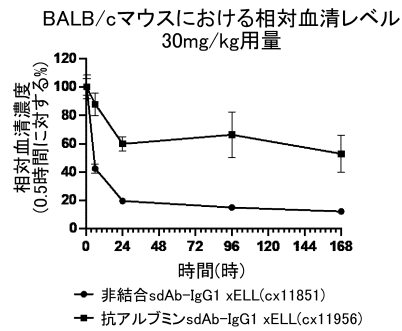


【 図 9 A 】

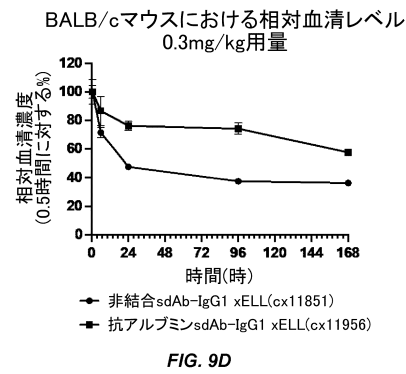


10

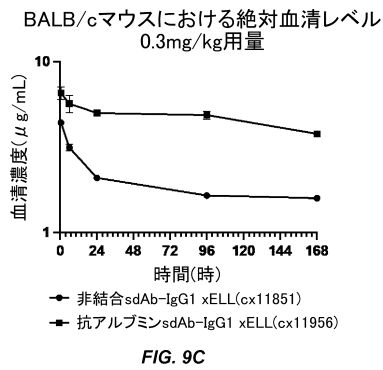
【 図 9 B C 】



【 図 9 D 】



20

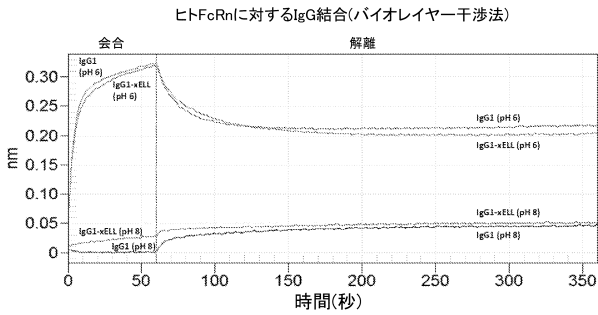


30

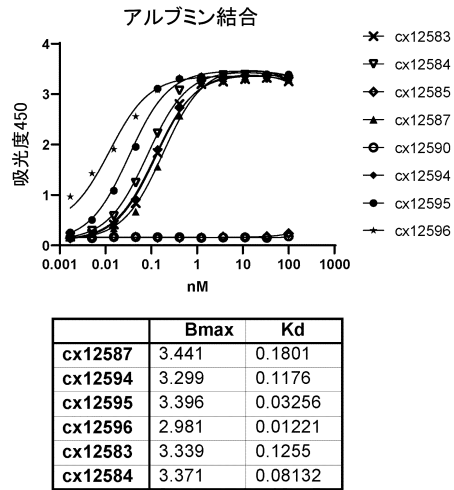
40

50

【 図 1 0 】

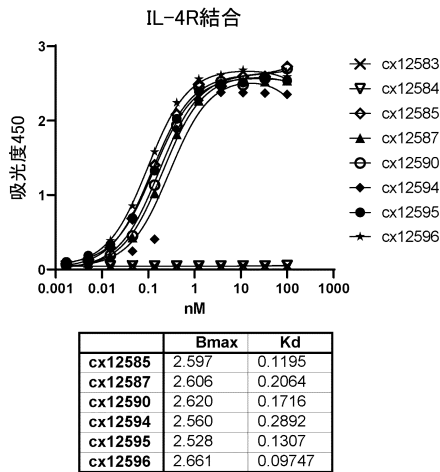


【 図 1 1 A 】

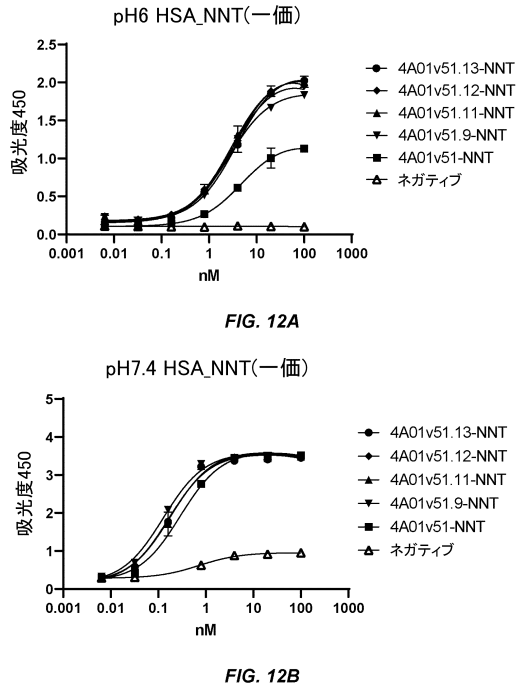


10

【 図 1 1 B 】



【 図 1 2 A B 】



20

30

40

50

【 図 1 2 C D 】

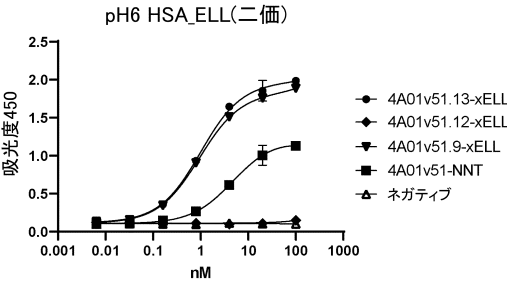


FIG. 12C

10

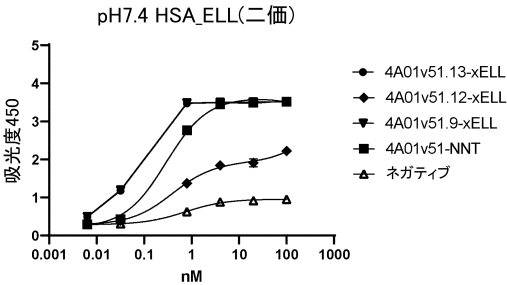


FIG. 12D

20

【 配 列 表 】

202551712000001.xml

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/066580

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/18 A61K39/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K A61K

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

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

EPO-Internal, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHEN XIAOLE ET AL: "A Dual Target-Directed Single Domain-Based Fusion Protein Against Interleukin-6 Receptor Decelerate Experimental Arthritis Progression Via Modulating JNK Expression", INFLAMMATION, PLENUM PRESS, NEW YORK, NY, US, vol. 44, no. 4, 10 March 2021 (2021-03-10), pages 1620-1628, XP037511256, ISSN: 0360-3997, DOI: 10.1007/S10753-021-01446-7 [retrieved on 2021-03-10]	1, 2, 5-8, 11-21, 29, 30, 40-46, 48-50
Y	abstract; figures 1-4; compounds VHH-0031	31-40
A	page 1623 - page 1626 ----- -/-	3, 4, 9, 10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 July 2023

Date of mailing of the international search report

08/08/2023

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schulz, Regine

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/066580

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020/172528 A1 (ANWITA BIOSCIENCES INC [US]) 27 August 2020 (2020-08-27)	1, 2, 5-8, 11-21, 29, 30, 40-46, 48-50
Y	abstract; claims 1, 6, 7, 16-29, 31-38,	31-40
A	43-50; figures 1-5; examples 1-9; tables 4, 5, 7-13; compounds A19, C1 - C4, C6, C7 -----	3, 4, 9, 10
X	US 2007/178082 A1 (SILENCE KAREN [BE] ET AL) 2 August 2007 (2007-08-02)	1, 2, 5-8, 11-30, 40-46, 48-50
Y	abstract; figures 2, 5, 11, 14; examples 1- 17, 25-30; tables 2, 3, 5; compounds MSA21, MSA24, MSA21VHH#3E, MSA21/MSA21/TNF3E -----	31-39 3, 4, 9, 10
Y	MALAQUIAS ANGELA DONATO MAIA ET AL: "A review of plant-based expression systems as a platform for single-domain recombinant antibody production", INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES, ELSEVIER BV, NL, vol. 193, 23 October 2021 (2021-10-23), pages 1130-1137, XP086894865, ISSN: 0141-8130, DOI: 10.1016/J.IJBIOMAC.2021.10.126 [retrieved on 2021-10-23] abstract; figures 1F, G; table 2 page 1134, paragraph 4.1 -----	31-40
Y	DE VLIJGER DORIEN ET AL: "Single-Domain Antibodies and Their Formatting to Combat Viral Infections", ANTIBODIES, vol. 8, no. 1, 20 December 2018 (2018-12-20), page 1, XP055811729, DOI: 10.3390/antib8010001 abstract; table 1 page 13, paragraph 1st - paragraph 2nd page 16, paragraph 1st full page 5, paragraph 1st full ----- -/--	31-40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2023/066580

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LAFAYE PIERRE ET AL: "Use of camel single-domain antibodies for the diagnosis and treatment of zoonotic diseases", COMPARATIVE IMMUNOLOGY, MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES, PERGAMON PRESS, OXFORD, GB, vol. 60, 25 September 2018 (2018-09-25), pages 17-22, XP085530731, ISSN: 0147-9571, DOI: 10.1016/J.CIMID.2018.09.009 abstract; figure 1 page 17 - page 19, left-hand column, paragraph first full -----	31-40

10

20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2023/066580

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.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.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT					International application No	
Information on patent family members					PCT/US2023/066580	
Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date	
WO 2020172528	A1	27-08-2020	CN	113508134	A	15-10-2021
			EP	3927740	A1	29-12-2021
			JP	2022520998	A	04-04-2022
			TW	202045545	A	16-12-2020
			US	2022195021	A1	23-06-2022
			WO	2020172528	A1	27-08-2020

US 2007178082	A1	02-08-2007	AT	517922	T	15-08-2011
			CN	102584997	A	18-07-2012
			DK	2316852	T3	16-06-2014
			ES	2466716	T3	11-06-2014
			ES	2551682	T3	23-11-2015
			ES	2655912	T3	22-02-2018
			PT	2316852	E	23-06-2014
			US	2007178082	A1	02-08-2007

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N 1/15 (2006.01)
 C 1 2 N 1/19 (2006.01)
 C 1 2 N 1/21 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 C 1 2 P 21/08 (2006.01)
 A 6 1 K 38/02 (2006.01)
 A 6 1 K 47/62 (2017.01)
 A 6 1 K 47/68 (2017.01)
 A 6 1 P 37/06 (2006.01)
 A 6 1 P 37/02 (2006.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 A 6 1 P 31/00 (2006.01)
 A 6 1 P 29/00 (2006.01)
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)
 C 0 7 K 16/46 (2006.01)

C 1 2 N 1/15
 C 1 2 N 1/19
 C 1 2 N 1/21
 C 1 2 N 5/10
 C 1 2 P 21/08
 A 6 1 K 38/02
 A 6 1 K 47/62
 A 6 1 K 47/68
 A 6 1 P 37/06
 A 6 1 P 37/02
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 P 31/00
 A 6 1 P 29/00
 A 6 1 K 39/395 L
 A 6 1 K 39/395 C
 C 0 7 K 16/46

4 H 0 4 5

,NA,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,D
 E,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,S
 M,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,
 AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,
 ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,L
 A,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,P
 H,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,ZW

アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア ラ ホーヤ スイート 1 4 0 ノース トーリー パイ
 ンズ ロード 1 1 0 2 5 シーノオー インヒブルクス バイオサイエンシズ インコーポレイテッド

(72)発明者

ティマー ジョン シー .

アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア ラ ホーヤ スイート 1 4 0 ノース トーリー パイ
 ンズ ロード 1 1 0 2 5 シーノオー インヒブルクス バイオサイエンシズ インコーポレイテッド

(72)発明者

エッケルマン ブレンダン ピー .

アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア ラ ホーヤ スイート 1 4 0 ノース トーリー パイ
 ンズ ロード 1 1 0 2 5 シーノオー インヒブルクス バイオサイエンシズ インコーポレイテッド

F ターム (参考)

4B064 AG27 CA19 CC24 CE12 DA01
 4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AB01 AC14 BA02 CA25 CA44
 4C076 CC04 CC07 CC27 CC31 EE41 EE59 FF31
 4C084 AA02 BA41 BA44 NA12 ZB07 ZB08 ZB11 ZB26 ZB32
 4C085 AA13 AA21 BB11 BB15 BB31 DD21 DD62 EE01
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 EA22 EA24 FA72
 FA74 GA26