

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6764858号
(P6764858)

(45) 発行日 令和2年10月7日(2020.10.7)

(24) 登録日 令和2年9月16日(2020.9.16)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 K 19/00 (2006.01)

C O 7 K 19/00 Z N A

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10

C 1 2 P 21/02 (2006.01)

C 1 2 P 21/02 C

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 E

請求項の数 25 (全 133 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-508075 (P2017-508075)
 (86) (22) 出願日 平成27年8月14日 (2015.8.14)
 (65) 公表番号 特表2017-525698 (P2017-525698A)
 (43) 公表日 平成29年9月7日 (2017.9.7)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2015/068798
 (87) 国際公開番号 W02016/024021
 (87) 国際公開日 平成28年2月18日 (2016.2.18)
 審査請求日 平成30年8月13日 (2018.8.13)
 (31) 優先権主張番号 62/038,196
 (32) 優先日 平成26年8月15日 (2014.8.15)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(73) 特許権者 308014846
 メルク パテント ゲーエムベーハー
 ドイツ国 6 4 2 9 3 ダルムシュタット
 , フランクフルター シュトラッセ 2 5
 O
 (74) 代理人 100079108
 弁理士 稲葉 良幸
 (74) 代理人 100109346
 弁理士 大貫 敏史
 (74) 代理人 100117189
 弁理士 江口 昭彦
 (74) 代理人 100134120
 弁理士 内藤 和彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 S I R P-アルファ免疫グロブリン融合タンパク質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

シグナル調節タンパク質アルファ (S I R P) 免疫グロブリン融合タンパク質であって、

(i) (a) 配列番号 6 の残基 3 ~ 1 1 5、(b) 配列番号 8 の残基 3 ~ 1 1 4、または配列番号 1 9 0 の残基 1 ~ 1 1 5 に対して少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む S I R P または S I R P バリエントの I g V 細胞外ドメインと、ここで、前記 S I R P バリエントが、配列番号 6、配列番号 8 または配列番号 1 9 0 の 6、2 7、3 1、3 7、5 4、5 6、または 7 2 位に対応する 1 つ以上の位置におけるアミノ酸の改変を含み、

前記改変が、 V 6 I ; V 2 7 I ; A 2 7 I ; I 3 1 R ; I 3 1 T ; Q 3 7 W ; Q 3 7 H ; E 5 4 P ; H 5 6 P ; S 6 6 Q ; L 6 6 Q ; および M 7 2 R からなる群から選択される置換であり、

前記 S I R P バリエントが腫瘍細胞上の C D 4 7 に結合する能力を有する；

(i i) 腫瘍細胞上の表面抗原に結合する免疫グロブリン分子またはその一部とを含む S I R P 免疫グロブリン融合タンパク質。

【請求項 2】

(i) 前記表面抗原が腫瘍抗原であり；

(i i) 前記 S I R P バリエントが、配列番号 6 の残基 3 ~ 1 1 5、配列番号 8 の残基 3 ~ 1 1 4、または配列番号 1 9 0 の残基 1 ~ 1 1 5 に対して少なくとも 9 5 % 同一であ

るアミノ酸配列を含み；そして／あるいは

(i i i) 前記 S I R P バリアントが、配列番号 6 の残基 1 ～ 1 1 5 または配列番号 8 の残基 1 ～ 1 1 4 に対して少なくとも少なくとも 9 5 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の S I R P 免疫グロブリン融合タンパク質。

【請求項 3】

(i) 前記 S I R P バリアントが、配列番号 1 9 3 の残基 1 ～ 1 1 4、配列番号 1 9 4 の残基 1 ～ 1 1 5、配列番号 1 9 5 の残基 1 ～ 1 1 5、配列番号 1 9 6 の残基 1 ～ 1 1 5、配列番号 1 9 7 の残基 1 ～ 1 1 4、配列番号 1 9 8 の残基 1 ～ 1 1 4、配列番号 1 9 9 の残基 1 ～ 1 1 5、配列番号 2 0 0 の残基 1 ～ 1 1 4、および配列番号 1 9 0 の残基 1 ～ 1 1 5 からなる群から選択される配列に対して少なくとも 9 5 % 同一であるアミノ酸配列を含むか、または

(i i) 前記 I g V 細胞外ドメインが、配列番号 6 の残基 1 ～ 1 1 5、配列番号 8 の残基 1 ～ 1 1 4、配列番号 1 9 3 の 1 ～ 1 1 4、配列番号 1 9 4 の残基 1 ～ 1 1 5、配列番号 1 9 5 の残基 1 ～ 1 1 5、配列番号 1 9 6 の残基 1 ～ 1 1 5、残基 1 9 7 の残基 1 ～ 1 1 4、配列番号 1 9 8 の残基 1 ～ 1 1 4、配列番号 1 9 9 の残基 1 ～ 1 1 5、配列番号 2 0 0 の残基 1 ～ 1 1 4、および配列番号 1 9 0 の残基 1 ～ 1 1 5 からなる群から選択される配列を含み、もしくは前記 S I R P バリアントが、配列番号 6 の残基 1 ～ 3 4 3 に対して少なくとも 9 5 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の免疫グロブリン融合タンパク質。

【請求項 4】

前記免疫グロブリン分子またはその一部が、抗体可変ドメイン、抗原結合部位を含有するように遺伝子操作された F c 領域を含む、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の免疫グロブリン融合タンパク質。

【請求項 5】

前記免疫グロブリン分子が、インタクト抗体または抗体の抗原結合部分を含む、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の免疫グロブリン融合タンパク質。

【請求項 6】

前記 S I R P または S I R P バリアントが、抗体軽鎖またはその一部、あるいは抗体重鎖またはその一部に連結されている、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の免疫グロブリン融合タンパク質。

【請求項 7】

免疫グロブリン融合タンパク質が F a b 抗体断片、F (a b ') 2 抗体断片、または単鎖抗体を含む免疫グロブリン分子の一部を含むか、あるいは、前記免疫グロブリン分子またはその一部が、前記 S I R P または S I R P バリアントにリンカー部分を介して連結されている、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の免疫グロブリン融合タンパク質。

【請求項 8】

前記 S I R P または S I R P バリアントが、
(i) その N 末端において前記免疫グロブリン分子またはその一部に連結されているか、
(i i) その C 末端において前記免疫グロブリン分子またはその一部に連結されているか、

(i i i) 前記免疫グロブリン分子またはその一部の N 末端に連結されているか、あるいは

(i v) 前記免疫グロブリン分子またはその一部の C 末端に連結されている、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の免疫グロブリン融合タンパク質。

【請求項 9】

前記腫瘍細胞上の表面抗原が、H E R 2、H E R 3、E G F R、C D 2 0、G D 2、P D - L 1、および C D 1 9 からなる群から選択される、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の免疫グロブリン融合タンパク質。

【請求項 1 0】

前記抗体が、抗 E G F R 抗体である、請求項 5 に記載の免疫グロブリン融合タンパク質

。

【請求項 1 1】

前記抗 E G F R 抗体が、セツキシマブであるか、あるいは前記抗 E G F R 抗体が、セツキシマブの相補性決定領域を含む、請求項 1 0 に記載の免疫グロブリン融合タンパク質。

【請求項 1 2】

S I R P 免疫グロブリン融合タンパク質であって、

抗 E G F R 抗体またはその抗原結合部分と、

配列番号 6 の残基 1 ~ 1 1 5 または配列番号 8 の残基 1 ~ 1 1 4 に対して少なくとも 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む S I R P または S I R P バリアントの I g V 細胞外ドメインとを含み、

(i) 前記 S I R P バリアントが、配列番号 6 または配列番号 8 の 6、2 7、3 1、3 7、5 4、5 6、6 6、または 7 2 位に対応する 1 つ以上の位置におけるアミノ酸の改変を含むか、そして / あるいは

(i i) 前記 S I R P バリアントが、配列番号 6 または配列番号 8 の 3 7 位に対応する位置におけるアミノ酸の改変であって、置換が Q 3 7 W である、改変を含み、前記 S I R P バリアントが腫瘍細胞上の C D 4 7 に結合する能力を有する、

S I R P 免疫グロブリン融合タンパク質。

【請求項 1 3】

(i) 前記抗 E G F R 抗体が、セツキシマブの重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含むか、

(i i) 前記抗 E G F R 抗体が、セツキシマブの相補性決定領域を含むか、

(i i i) 前記抗 E G F R 抗体が、セツキシマブであるか、あるいは

(i v) 前記 E G F R 抗体が、セツキシマブ、パニツムマブ、ニモツズマブ、マツズマブ、フツキシマブ、イムガツズマブおよびネシツムマブからなる群から選択される、請求項 1 2 に記載の S I R P 免疫グロブリン融合タンパク質。

【請求項 1 4】

請求項 1 に記載の免疫グロブリン融合タンパク質であって、

前記表面抗原が腫瘍細胞抗原であり、

前記融合タンパク質が、抗 C D 4 7 抗体に対する % 赤血球 (R B C) 結合平均蛍光強度 (M F I) を 1 0 0 % において較正する場合、1 0 % 以下の % R B C 結合 M F I を有し、
前記抗 C D 4 7 抗体は、B 6 H 1 2 / h u I g G 1 であり、

前記融合タンパク質が、非赤血球上の C D 4 7 抗原にも結合する、
免疫グロブリン融合タンパク質。

【請求項 1 5】

S I R P または S I R P バリアントの前記 I g V 細胞外ドメインが、配列番号 6 の残基 3 ~ 1 1 5 または配列番号 8 の 3 ~ 1 1 4 に対して少なくとも 9 5 % 同一であるアミノ酸配列を含むか、そして / あるいは S I R P または S I R P バリアントの前記 I g V 細胞外ドメインが、配列番号 6 の 1 ~ 1 1 5 または配列番号 8 の 1 ~ 1 1 4 に対して少なくとも 9 5 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 4 に記載の免疫グロブリン融合タンパク質。

【請求項 1 6】

前記腫瘍細胞抗原が、E G F R であるか、そして / あるいは前記免疫グロブリン分子が、インタクト抗体である、請求項 1 4 または 1 5 に記載の免疫グロブリン融合タンパク質

。

【請求項 1 7】

前記抗体が、抗 E G F R 抗体である、請求項 1 6 に記載の免疫グロブリン融合タンパク質。

【請求項 1 8】

前記抗 E G F R 抗体が、セツキシマブであるか、あるいは前記抗 E G F R 抗体が、セツキシマブの相補性決定領域を含む、請求項 1 7 に記載の免疫グロブリン融合タンパク質。

10

20

30

40

50

【請求項 19】

(i) 10 % 未満、5 % 未満、4 % 未満、3 % 未満、2 % 未満、または 1 % 未満の % R B C 結合 M F I を有するか

(i i) 0 ~ 1 %、0 ~ 2 %、0 ~ 3 %、0 ~ 4 %、1 ~ 2 %、1 ~ 3 %、1 ~ 4 %、2 ~ 3 %、2 ~ 4 %、3 ~ 4 %、5 ~ 10 %、3 ~ 7 %、または 3 ~ 10 % の % R B C 結合 M F I を有するか、あるいは

(i i i) 5 % 以下、4 % 以下、3 % 以下、2 % 以下、または 1 % 以下の % R B C 結合 M F I を有する、請求項 15 ~ 18 のいずれか一項に記載の免疫グロブリン融合タンパク質。

【請求項 20】

10

前記非赤血球が、腫瘍細胞である、請求項 15 ~ 18 のいずれか一項に記載の免疫グロブリン融合タンパク質。

【請求項 21】

請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の免疫グロブリン融合タンパク質をコードする 1 つまたは複数の核酸。

【請求項 22】

請求項 21 に記載の 1 つまたは複数の核酸を含む細胞。

【請求項 23】

請求項 22 に記載の細胞を、請求項 21 に記載の 1 つまたは複数の核酸の発現を可能とする条件下で維持することにより免疫グロブリン融合タンパク質を産生する方法。

20

【請求項 24】

医薬有効量の請求項 1 ~ 21 のいずれか一項に記載の免疫グロブリン融合タンパク質および薬学的に許容可能な担体を含む医薬組成物。

【請求項 25】

哺乳動物の癌の治療における使用のための、請求項 1 ~ 21 のいずれか一項に記載の免疫グロブリン融合タンパク質であって、前記癌が、乳癌、結腸直腸癌、肺癌、膀胱癌、子宮内膜癌、卵巣癌、胃癌、前立腺癌、腎臓癌、子宮頸癌、骨髄腫、リンパ腫、白血病、甲状腺癌、子宮癌、膀胱癌、神経内分泌癌、頭頸部癌、肝臓癌、鼻咽腔癌、精巣癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、黒色腫、基底細胞皮膚癌、扁平上皮皮膚癌、隆起性皮膚線維肉腫、メルケル細胞癌、膠芽細胞腫、神経膠腫、肉腫、中皮腫、または骨髄異形成症候群である

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、内容が参照により本明細書に組み込まれる 2014 年 8 月 15 日に出願された米国仮特許出願第 62 / 038, 196 号の優先権および利益を主張する。

【0002】

発明の分野

本発明は、一般に、疾患促進細胞、例えば、腫瘍細胞上の C D 4 7 および表面抗原に結合する能力を有する融合タンパク質に関する。

40

【背景技術】

【0003】

発明の背景

マクロファージは、食作用により疾患細胞、例えば、癌細胞を一掃する主要な食細胞である。マクロファージが標的細胞の食作用を行うか否かは、食作用促進および抗食作用シグナルの相対強度に依存する。

【0004】

正常な健常細胞は、食作用を免れる。それというのも、正常細胞上でユビキタスに発現される C D 4 7 は、マクロファージ上のシグナル調節タンパク質アルファ (S I R P)

50

と相互作用し、自己「ドント・イート・ミー (don't eat me)」シグナルをトリガーするためである。

【0005】

しかしながら、癌細胞はそれらの生存率を向上させるように適応するため、それらは、正常免疫制御機序を破壊してCD47を過剰発現することにより免疫サーベイランスを逃れ、それらをマクロファージに対して耐性とする。例えば、CD47は、食作用を回避するためにヒト白血病細胞上で上方調節されることが示されている (Jaiswal et al., Cell, 138:271-285, 2009)。さらに、CD47は、ヒト急性骨髄性白血病 (AML) 幹細胞上で高度に発現され、予後不良因子である (Majeti et al., Cell, 138:266-299, 2009)。生存機序としてのCD47過剰発現は、抗体オプソニン化腫瘍細胞が免疫細胞上の活性化Fc受容体 (FcR) にエンゲージして抗体依存性細胞食作用 (ADCP) および抗体依存性細胞毒性 (ADCC) を誘発すると予測されるという事実にもかかわらず、なぜ多くの治療抗体が制限された抗腫瘍効力を有するのかを部分的に説明する。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

したがって、CD47の発現を介して食作用を回避する腫瘍細胞の能力を妨害する治療法が当技術分野において必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0007】

20

発明の概要

本明細書において、腫瘍細胞抗原およびCD47の両方に特異的な免疫グロブリン融合タンパク質により腫瘍細胞を標的化する方法および組成物が記載される。具体的には、免疫グロブリン融合タンパク質は、腫瘍細胞抗原に特異的な免疫グロブリン部分を含み、CD47に特異的な第2の部分を含む。

【0008】

一態様において、本発明は、SIRP 免疫グロブリン融合タンパク質を対象とする。融合タンパク質は、配列番号6の残基3～115または配列番号8の3～114に対して少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を有するSIRP またはSIRP バリアントのIgV細胞外ドメインを含む。融合タンパク質は、疾患促進細胞上の表面抗原に結合する免疫グロブリン分子またはその一部を含む。一実施形態において、疾患促進細胞は腫瘍細胞であり、表面抗原は腫瘍抗原である。

30

【0009】

ある実施形態において、免疫グロブリン融合タンパク質は、配列番号6の残基3～115または配列番号8の3～114に対して少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を有するSIRP バリアントを含む。

【0010】

ある実施形態において、免疫グロブリン融合タンパク質は、配列番号6の残基1～115または配列番号8の1～114に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を有するSIRP バリアントを含む。

40

【0011】

一部の実施形態において、IgV細胞外ドメインは、配列番号6の残基1～115である一方、他の実施形態において、IgV細胞外ドメインは、配列番号8の残基1～114である。一部の実施形態において、IgV細胞外ドメインは、配列番号6の残基3～115である一方、他の実施形態において、IgV細胞外ドメインは、配列番号8の残基3～114である。さらに他の実施形態において、IgV細胞外ドメインは、配列番号193の残基1～114または配列番号194の残基1～115または配列番号195の残基1～115または配列番号196の残基1～115または配列番号197の残基1～114または配列番号198の残基1～114または配列番号199の残基1～115または配

50

列番号 200 の残基 1 ~ 114 または配列番号 190 の残基 1 ~ 115 である。

【0012】

他の実施形態において、SIRP バリアントは、配列番号 6 の残基 1 ~ 343 に対して少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、または少なくとも 95 % 同一であるアミノ酸配列を有する。他の実施形態において、SIRP の IgV 細胞外ドメインは、野生型ヒト SIRP IgV 細胞外ドメインである。

【0013】

他の実施形態において、SIRP バリアントは、配列番号 193 の残基 1 ~ 114 または配列番号 194 の残基 1 ~ 115 または配列番号 195 の残基 1 ~ 115 または配列番号 196 の残基 1 ~ 115 または配列番号 197 の残基 1 ~ 114 または配列番号 198 の残基 1 ~ 114 または配列番号 199 の残基 1 ~ 115 または配列番号 200 の残基 1 ~ 114 または配列番号 190 の残基 1 ~ 115 に対して少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、または少なくとも 95 % 同一であるアミノ酸配列を有する。

【0014】

ある実施形態において、免疫グロブリン融合タンパク質の SIRP バリアントは、配列番号 6 または 8 に対応する 6、27、31、37、54、56、66、または 72 位の 1 つ以上におけるアミノ酸の改変を有する。改変は、アミノ酸の置換、欠失、または挿入であり得る。好ましい実施形態において、改変は、置換である。

【0015】

ある実施形態において、免疫グロブリン融合タンパク質の SIRP バリアントは、V6I、V27I、A27I、I31R、I31T、Q37W、Q37H、E54P、H56P、S66Q、L66A、および M72R からなる群から選択される配列番号 6 または配列番号 8 の 6、27、31、37、54、56、66、または 72 位に対応する位置における 1 つ以上の置換を含む。一実施形態において、置換は、V6I に対応する。別の実施形態において、置換は、V27I または A27I に対応する。別の実施形態において、置換は、I31R に対応する。別の実施形態において、置換は、I31T に対応する。別の実施形態において、置換は、Q37W に対応する。別の実施形態において、置換は、Q37H に対応する。別の実施形態において、置換は、E54P に対応する。別の実施形態において、置換は、H56P に対応する。別の実施形態において、置換は、S66Q または L66Q に対応する。別の実施形態において、置換は、M72R に対応する。

【0016】

ある実施形態において、免疫グロブリン融合タンパク質の SIRP バリアントは、配列番号 6 または配列番号 8 の 4、6、27、31、35、37、47、52、53、54、56、66、67、68、72、92 または 94 位に対応する位置の 1 つ以上におけるアミノ酸の改変を有する。改変は、アミノ酸の置換、欠失、または挿入であり得る。好ましい実施形態において、改変は、置換である。

【0017】

ある実施形態において、免疫グロブリン融合タンパク質の SIRP バリアントは、以下の置換の 1 つ以上を含む：

- a . L4V である、4 位に対応する位置における置換；
- b . V6A、V6C、V6D、V6E、V6G、V6I、V6L、V6M、V6N、V6Q、V6S、もしくは V6T から選択される 6 位に対応する位置における置換；
- c . A27C、A27D、A27G、A27H、A27I、A27K、A27L、A27N、A27Q、A27R、A27S、A27T、もしくは A27V；もしくは V27A、V27C、V27D、V27G、V27H、V27I、V27K、V27L、V27N、V27Q、V27R、V27S、もしくは V27T から選択される 27 位に対応する位置における置換；
- d . I31A、I31C、I31E、I31K、I31Q、I31R、I31T、もしくは I31V から選択される 31 位に対応する位置における置換；

e . P 3 5 A、P 3 5 C、P 3 5 E、P 3 5 G、P 3 5 N、P 3 5 Q、もしくはP 3 5 S から選択される3 5 位に対応する位置における置換；

f . Q 3 7 A、Q 3 7 C、Q 3 7 E、Q 3 7 G、Q 3 7 H、Q 3 7 K、Q 3 7 L、Q 3 7 M、Q 3 7 N、Q 3 7 R、Q 3 7 S、Q 3 7 T、もしくはQ 3 7 Wから選択される3 7 位に対応する位置における置換；

g . E 4 7 A、E 4 7 C、E 4 7 D、E 4 7 F、E 4 7 G、E 4 7 H、E 4 7 I、E 4 7 K、E 4 7 L、E 4 7 M、E 4 7 N、E 4 7 Q、E 4 7 R、E 4 7 S、E 4 7 T、E 4 7 V、E 4 7 W、もしくはE 4 7 Yから選択される4 7 位に対応する位置における置換；

h . Q 5 2 A、Q 5 2 C、Q 5 2 E、Q 5 2 HもしくはQ 5 2 Mから選択される5 2 位に対応する位置における置換；

10

i . K 5 3 Rである、5 3 位に対応する位置における置換；

j . E 5 4 DもしくはE 5 4 Pから選択される5 4 位に対応する位置における置換；

k . H 5 6 A、H 5 6 C、H 5 6 D、H 5 6 E、H 5 6 F、H 5 6 G、H 5 6 I、H 5 6 K、H 5 6 L、H 5 6 M、H 5 6 N、H 5 6 P、H 5 6 Q、H 5 6 R、H 5 6 S、H 5 6 T、H 5 6 V、H 5 6 W、もしくはH 5 6 Yから選択される5 6 位に対応する位置における置換；

l . L 6 6 A、L 6 6 C、L 6 6 D、L 6 6 E、L 6 6 F、L 6 6 G、L 6 6 H、L 6 6 I、L 6 6 K、L 6 6 M、L 6 6 N、L 6 6 P、L 6 6 Q、L 6 6 S、L 6 6 T、L 6 6 V、L 6 6 W、もしくはL 6 6 Y；もしくはS 6 6 A、S 6 6 C、S 6 6 D、S 6 6 E、S 6 6 F、S 6 6 G、S 6 6 H、S 6 6 I、S 6 6 K、S 6 6 L、S 6 6 M、S 6 6 N、S 6 6 P、S 6 6 Q、S 6 6 T、S 6 6 V、S 6 6 W、もしくはS 6 6 Yから選択される6 6 位に対応する位置における置換；

20

m . T 6 7 A、T 6 7 C、T 6 7 D、T 6 7 E、T 6 7 F、T 6 7 G、T 6 7 H、T 6 7 I、T 6 7 L、T 6 7 M、T 6 7 N、T 6 7 Q、T 6 7 R、T 6 7 S、T 6 7 V、T 6 7 W、もしくはT 6 7 Yから選択される6 7 位に対応する位置における置換；

n . K 6 8 Rである、6 8 位に対応する位置における置換

o . M 7 2 A、M 7 2 C、M 7 2 D、M 7 2 E、M 7 2 F、M 7 2 G、M 7 2 H、M 7 2 I、M 7 2 K、M 7 2 L、M 7 2 N、M 7 2 Q、M 7 2 R、M 7 2 S、M 7 2 T、M 7 2 V、M 7 2 W、もしくはM 7 2 Yから選択される7 2 位に対応する位置における置換；

p . V 9 2 A、V 9 2 C、V 9 2 D、V 9 2 E、V 9 2 G、V 9 2 I、V 9 2 M、V 9 2 N、V 9 2 Q、V 9 2 R、V 9 2 S、もしくはV 9 2 Tから選択される9 2 位に対応する位置における置換；および/または

30

q . F 9 4 Lである、9 4 位に対応する位置における置換。

【0018】

一部の実施形態において、S I R P バリエントは、野生型S I R P と比較してC D 4 7 についてのS I R P バリエントの結合親和性を減少させる改変、好ましくは、置換を有する。さらに他の実施形態において、S I R P バリエントは、野生型S I R P と比較してC D 4 7 についてのS I R P バリエントの結合親和性を増加させる改変、好ましくは、置換を有する。

【0019】

40

ある実施形態において、免疫グロブリン分子は、インタクト抗体である一方、他の実施形態において、免疫グロブリン分子は、抗体の抗原結合部分である。さらに別の実施形態において、免疫グロブリン分子は、抗体可変ドメインである抗体の一部である。一部の実施形態において、抗体可変ドメインは、抗原結合断片、例えば、F a b、F a b'、F (a b')₂、F v、s c F v、単鎖抗体、ミニボディ (minibody)、ダイアボディ (diabody)、または単ドメイン抗体 (ナノボディ (nanobody)) である。一実施形態において、インタクト抗体は、抗 E G F R 抗体、例えば、セツキシマブである。

【0020】

他の実施形態において、免疫グロブリン分子は、F c 領域である抗体の抗原結合部分であり、F c 領域は、抗原結合部位、例えば、F c a b 部分を含有するように遺伝子操作さ

50

れている。一部の実施形態において、免疫グロブリン分子が F c a b である場合、S I R P または S I R P バリエントは、その N 末端により免疫グロブリン分子に連結されている一方、他の実施形態において、S I R P または S I R P バリエントは、免疫グロブリン分子にその C 末端を介して連結されている。

【 0 0 2 1 】

一部の実施形態において、S I R P または S I R P バリエントは、その N 末端により免疫グロブリン分子に連結されている一方、他の実施形態において、S I R P または S I R P バリエントは、その C 末端を介して免疫グロブリン分子に連結されている。他の実施形態において、免疫グロブリン分子がインタクト抗体である場合、S I R P または S I R P バリエントは、重鎖の C 末端、または軽鎖の C 末端に、場合により、リンカーを介して連結されている。他の実施形態において、免疫グロブリン分子がインタクト抗体である場合、S I R P または S I R P バリエントは、重鎖の N 末端、または軽鎖の N 末端に、場合により、リンカーを介して連結されている。

10

【 0 0 2 2 】

さらに他の実施形態において、免疫グロブリン分子またはその一部は、S I R P または S I R P バリエントにリンカー部分を介して連結されている。リンカー部分は、S I R P または S I R P バリエントに、S I R P 部分の N 末端または C 末端のいずれかにおいて融合させることができる。

【 0 0 2 3 】

さらに他の実施形態において、免疫グロブリン分子またはその一部は、その N 末端を介して S I R P または S I R P バリエントに、場合により、リンカー部分を介して連結されている一方、他の実施形態において、免疫グロブリン分子またはその一部は、その C 末端を介して S I R P または S I R P バリエントに、場合により、リンカー部分を介して連結されている。他の実施形態において、S I R P または S I R P バリエントは、抗体軽鎖またはその一部の N 末端に連結されている一方、別の実施形態において、S I R P または S I R P バリエントは、抗体軽鎖またはその一部の C 末端に連結されている。他の実施形態において、S I R P または S I R P バリエントは、抗体重鎖またはその一部の N 末端に連結されている一方、別の実施形態において、S I R P または S I R P バリエントは、抗体重鎖またはその一部の C 末端に連結されている。S I R P または S I R P バリエントおよび免疫グロブリン分子またはその一部間のリンカーは、一部の実施形態において企図される。

20

30

【 0 0 2 4 】

ある実施形態において、免疫グロブリン分子またはその一部が結合する腫瘍抗原は、H E R 2、H E R 3、E G F R、C D 2 0、G D 2、P D - L 1、および C D 1 9 から選択される。

【 0 0 2 5 】

別の実施形態において、本発明は、配列番号 1 9 0 の残基 1 ~ 1 1 5 に対して少なくとも 8 0 % 同一であるアミノ酸配列を有する S I R P または S I R P バリエントの I g V 細胞外ドメイン；および疾患促進細胞上の表面抗原に結合する免疫グロブリン分子またはその一部を含む S I R P 免疫グロブリン融合タンパク質を対象とする。疾患促進細胞は腫瘍細胞であり得、抗原は腫瘍抗原であり得る。

40

【 0 0 2 6 】

一実施形態において、S I R P バリエントは、配列番号 1 9 0 の残基 1 ~ 1 1 5 に対して少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 % 同一であるアミノ酸配列を有する。

【 0 0 2 7 】

別の実施形態において、S I R P バリエントは、配列番号 1 9 0 の 6、2 7、3 1、3 7、5 4、5 6、6 6、または 7 2 位に対応する 1 つ以上の位置におけるアミノ酸の改変を有する。さらなる実施形態において、改変は、V 6 I；V 2 7 I；A 2 7 I；I 3 1 R；I 3 1 T；Q 3 7 W；Q 3 7 H；E 5 4 P；H 5 6 P；S 6 6 Q；L 6 6 Q；および

50

M72Rからなる群から選択される。

【0028】

別の実施形態において、本発明は、抗EGFR抗体またはその抗原結合部分および配列番号6の残基3～115または配列番号8の3～114に対して少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を有するSIRP またはSIRP バリアントのIgV細胞外ドメインを含むSIRP 免疫グロブリン融合タンパク質を対象とする。

【0029】

さらなる実施形態において、SIRP またはSIRP バリアントは、配列番号6の残基3～115または配列番号8の3～114に対して少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、または少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を有する。

10

【0030】

さらに別の実施形態において、SIRP またはSIRP バリアントは、配列番号6の残基1～115または配列番号8の1～114に対して少なくとも80%同一、少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、または少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を有する。

【0031】

さらなる実施形態において、抗EGFR抗体またはその抗原結合部分は、セツキシマブ、パニツムマブ、ニモツズマブ、マツズマブ、フツキシマブ(futuximab)、イムガツズマブ、またはネシツムマブから選択される抗体からの重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含有する。さらに別の実施形態において、抗EGFR抗体またはその抗原結合部分は、セツキシマブ、パニツムマブ、ニモツズマブ、マツズマブ、フツキシマブ、イムガツズマブ、またはネシツムマブから選択される抗体からの相補性決定領域を含有する。さらに別の実施形態において、抗EGFR抗体またはその抗原結合部分は、セツキシマブ、パニツムマブ、ニモツズマブ、マツズマブ、フツキシマブ、イムガツズマブ、またはネシツムマブから選択される抗体からの重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含有する。いっそうさらなる実施形態において、抗EGFR抗体は、セツキシマブ、パニツムマブ、ニモツズマブ、マツズマブ、フツキシマブ、イムガツズマブ、またはネシツムマブから選択される。別の実施形態において、抗EGFR抗体は、セツキシマブである。

20

【0032】

別の実施形態において、SIRP またはSIRP バリアントは、抗EGFR抗体またはその抗原結合部分の重鎖または軽鎖のN末端に、場合により、リンカーを介して連結されている。別の実施形態において、SIRP またはSIRP バリアントは、抗EGFR抗体またはその抗原結合部分の重鎖または軽鎖のC末端に、場合により、リンカーを介して連結されている。

30

【0033】

さらなる実施形態において、SIRP - 抗EGFR免疫グロブリン融合タンパク質は、配列番号6または配列番号8の6、27、31、37、54、56、66または72位に対応する位置の1つ以上における改変を有するSIRP またはSIRP バリアントのIgV細胞外ドメインを含む。一実施形態において、改変は、Q37Wに対応する置換である。別の実施形態において、改変は、V6I、C27I、A271、I31R、Q37W、Q37H、E54P、H56P、S66Q、L66Q、およびM72Rから選択される置換に対応する1つ以上の置換である。

40

【0034】

さらなる実施形態において、本発明は、腫瘍細胞抗原に結合する免疫グロブリン分子またはその一部および配列番号6の残基3～115または配列番号8の3～114に対して少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を有するSIRP またはSIRP バリアントのIgV細胞外ドメインを含むCD47結合部分を有する免疫グロブリン融合タンパク質を対象とする。融合タンパク質は、抗CD47抗体に対する%赤血球(RBC)結合平均蛍光強度(MFI)を100%において校正する場合、35%以下の%RBC結合MFIを有する。抗CD47抗体は、B6H12/huIgG1である。融合タンパク質は、

50

非赤血球上のCD47にも結合する。一実施形態において、非赤血球は、腫瘍細胞である。

【0035】

一実施形態において、免疫グロブリン融合タンパク質は、配列番号6の残基3～115または配列番号8の3～114に対して少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を有するSIRP またはSIRP バリアントのIgV細胞外ドメインを有する。

【0036】

一実施形態において、免疫グロブリン融合タンパク質は、配列番号6の残基1～115または配列番号8の1～114に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を有するSIRP またはSIRP バリアントのIgV細胞外ドメインを有する。

10

【0037】

一実施形態において、腫瘍細胞抗原は、EGFRである。一実施形態において、免疫グロブリン分子は、インタクト抗体である。例えば、インタクト抗体は、一実施形態において抗EGFR抗体である一方、ある実施形態において、抗EGFR抗体は、セツキシマブである。

【0038】

一実施形態において、融合タンパク質は、30%未満、25%未満、20%未満、15%未満、10%未満、5%未満、4%未満、3%未満、2%未満、または1%未満の%RBC結合MFIを有する。一実施形態において、%RBC結合MFIは、10%未満である。

20

【0039】

さらに別の実施形態において、融合タンパク質は、0～1%、0～2%、0～3%、0～4%、1～2%、1～3%、1～4%、2～3%、2～4%、3～4%、3～7%、3～10%または5～10%の%RBC結合MFIを有する。

【0040】

さらに別の実施形態において、融合タンパク質は、5%以下、4%以下、3%以下、2%以下、または1%以下の%RBC結合MFIを有する。

【0041】

さらなる実施形態において、抗体部分は、抗EGFR抗体である。例えば、抗EGFR抗体は、セツキシマブである一方、別の実施形態において、抗EGFR抗体は、パニツムマブ、ニモツズマブ、マツズマブ、フツキシマブ、イムガツズマブ、またはネシツムマブである。

30

【0042】

別の態様において、本発明は、本明細書に記載のSIRP 免疫グロブリン融合タンパク質をコードする核酸を含む。本明細書に記載の免疫グロブリン融合タンパク質は、2つ以上のペプチド鎖のアセンブリを要求し得るため、本発明は、発現時にアセンブルして融合タンパク質を形成する個々のペプチド鎖をコードするために要求される核酸を企図する。別の態様において、本発明は、本明細書に記載の免疫グロブリン融合タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸を含む細胞を含む。さらに別の態様において、本発明は、本発明の免疫グロブリン融合タンパク質をコードする1つまたは複数の核酸の発現を可能とする条件下でそのような細胞を維持することにより、免疫グロブリン融合タンパク質を産生する方法を含む。

40

【0043】

さらなる態様において、本発明は、薬学的に許容可能な担体を含む、医薬有効量の本明細書に記載の免疫グロブリン融合タンパク質を含む医薬組成物を対象とする。

【0044】

いっそうさらなる実施形態において、本発明は、有効量の本明細書に記載の免疫グロブリン融合タンパク質を投与することにより、癌を治療する方法を対象とする。治療するこ

50

とができる癌としては、乳癌、結腸直腸癌、肺癌、膵臓癌、子宮内膜癌、卵巣癌、胃癌、前立腺癌、腎臓癌、子宮頸癌、骨髄腫、リンパ腫、白血病、甲状腺癌、子宮癌、膀胱癌、神経内分泌癌、頭頸部癌、肝臓癌、鼻咽腔癌、精巣癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、黒色腫、基底細胞皮膚癌、扁平上皮皮膚癌、隆起性皮膚線維肉腫、メルケル細胞癌、膠芽細胞腫、神経膠腫、肉腫、中皮腫、または骨髄異形成症候群が挙げられる。

【図面の簡単な説明】

【0045】

図面の簡単な説明

【図1A】図1A～Oは、本発明の融合タンパク質の異なるDNAおよびタンパク質構築物を模式的に説明する。抗体-SIRP 融合タンパク質の発現のためのDNA構築物の2つの模式図を示す。DNA構築物1（上段）は、抗体の重鎖可変ドメイン（VH）、それに続く軽鎖定常ドメイン（CH1、ヒンジ（H）-CH2-CH3）が任意選択リンカー（L）を介して遺伝子的に融合しているSIRP をコードする。DNA構築物2（下段）は、抗体の軽鎖可変ドメイン（VL）、それに続く軽鎖定常ドメイン（CL）をコードする。

10

【図1B】2つのポリペプチド構成要素（すなわち、軽鎖および重鎖）が、図1Aに示されるDNA構築物によりそれぞれコードされる四量体構造を有する抗体-SIRP 融合タンパク質の模式図である。

【図1C】Fc融合タンパク質の2つの模式図を示す。これらは左から右に（1）SIRP - Fcおよび（2）Fc - SIRP である。

20

【図1D】四価二重特異的抗体の発現のための3つのDNA構築物を示す。DNA構築物1（上段）は、第1の抗体の重鎖可変ドメイン（VH（1））、それに続く重鎖定常ドメイン（CH1、ヒンジ（H）-CH2-CH3）が任意選択リンカー（L）を介して遺伝子的に融合している第2の抗体の軽鎖可変ドメイン（VL（2））、それに続く軽鎖定常ドメイン（CL）をコードする。DNA構築物2（中段）は、第1の抗体の軽鎖可変ドメイン（VL（1））、それに続く軽鎖定常ドメイン（CL）をコードする。DNA構築物3（下段）は、第2の抗体の重鎖可変ドメイン（VH（2））、それに続く重鎖定常ドメイン1（CH1）、およびアッパーヒンジ領域（H*）をコードする。

【図1E】3つのポリペプチド構成要素が図1Dに示されるDNA構築物によりコードされる六量体構造を有する四価二重特異的抗体（TetBiAb）の模式図である。

30

【図1F】抗体-SIRP の発現のためのDNA構築物の模式図である。DNA構築物1（上段）は、抗体の重鎖可変ドメイン（VH）、それに続く重鎖定常ドメイン（CH1、ヒンジ（H）-CH2-CH3）をコードする。DNA構築物2（下段）は、抗体の軽鎖可変ドメイン（VL）、それに続く軽鎖定常ドメイン（CL）が任意選択リンカー（L）を介して遺伝的に融合しているSIRP をコードする。

【図1G】図1Fに示されるDNA構築物によりコードされる2つのポリペプチド構成要素を含む四量体構造を示す抗体-SIRP の模式図である。

【図1H】SIRP - 抗体の発現のためのDNA構築物の模式図である。DNA構築物1（上段）は、SIRP が任意選択リンカー（L）を介して遺伝的に融合している重鎖定常ドメイン（ヒンジ（H）-CH2-CH3）が任意選択リンカー（L）を介して遺伝的に融合している抗体の重鎖可変ドメイン（VH）、それに続く重鎖定常ドメイン1（CH1）、およびアッパーヒンジ領域（H）をコードする。DNA構築物2（下段）は、抗体の軽鎖可変ドメイン（VL）、それに続く軽鎖定常ドメイン（CL）をコードする。

40

【図1I】図1Hに示されるDNA構築物によりコードされる2つのポリペプチド構成要素を含む四量体構造を示すSIRP - 抗体の模式図である。

【図1J】SIRP - Fc - scFvの発現のためのDNA構築物の模式図である。DNA構築物は、SIRP が任意選択リンカー（L）を介して遺伝的に融合している重鎖定常ドメイン（ヒンジ（H）-CH2-CH3）が任意選択リンカー（L）を介して遺伝的に融合している抗体の重鎖可変ドメイン（VH）が任意選択リンカー（L）を介し

50

て遺伝子的に融合している抗体の軽鎖可変ドメイン（V_L）をコードする。

【図1K】図1Jに示されるDNA構築物によりコードされるポリペプチド構成要素を含む二量体構造を示すSIRP - Fc - scFvの模式図である。

【図1L】scFv - Fc - SIRP の発現のためのDNA構築物の模式図である。DNA構築物は、抗体の重鎖可変ドメイン（V_H）が任意選択リンカー（L）を介して遺伝子的に融合している抗体の軽鎖可変ドメイン（V_L）が任意選択リンカー（L）を介して遺伝子的に融合している重鎖定常ドメイン（ヒンジ（H） - CH₂ - CH₃）が任意選択リンカー（L）を介して遺伝子的に融合しているSIRP をコードする。

【図1M】図1Lに示されるDNA構築物によりコードされるポリペプチド構成要素を含む二量体構造を示すscFv - Fc - SIRP の模式図である。

【図1N】SIRP - Fc a bの発現のためのDNA構築物の模式図である。DNA構築物は、SIRP が任意選択リンカー（L）を介して遺伝子的に融合している、抗原に結合するように改変された定常ドメイン3を有する重鎖定常ドメイン（ヒンジ（H） - CH₂ - CH₃）をコードする。

【図1O】図1Nに示されるDNA構築物によりコードされるポリペプチド構成要素を含む二量体構造を示すSIRP - Fc a bの模式図である。鎖間ジスルフィド結合を、2つのポリペプチド鎖間の短いバーとして示す。リンカーは任意選択である。

【図2A】カニクイザルにおける赤血球カウントに対する抗CD47B6H12の効果を示す棒グラフである。

【図2B】カニクイザルにおけるヘマトクリットレベルに対する抗CD47B6H12の効果を示す棒グラフである。

【図3A】実施例2に記載のSDS - PAGEによる抗CD20 - huIgG1 - SIRP V2の2つのポリペプチドの発現の分析を示す。

【図3B】実施例2に記載のサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）による完全四量体分子のアセンブリの分析を示す。

【図4A】CD47を発現する細胞（CD47形質移入CHO細胞）への抗CD20 - huIgG1 - SIRP V2の結合を示す。

【図4B】CD47を発現する細胞（白血球濃縮全血）への抗CD20 - huIgG1 - SIRP V2の結合を示す。

【図4C】CD20およびCD47の両方を発現する細胞（Raji細胞）への抗CD20 - huIgG1 - SIRP V2の結合を示す。

【図4D】CD20およびCD47の両方を発現する細胞（Namalwa細胞）への抗CD20 - huIgG1 - SIRP V2の結合を示す。

【図5A】Daudi細胞による注射および四価二重特異的抗CD20 / 抗CD47による処理後のマウスの生存率を示す。

【図5B】Raji細胞による注射および四価二重特異的抗CD20 / 抗CD47による処理後のマウスの生存率を示す。

【図6A】実施例4に記載のSDS - PAGEによる抗EGFR - huIgG1 - SIRP の2つのポリペプチドの発現の分析を示す。

【図6B - 1】実施例4に記載のサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）による完全四量体分子のアセンブリの分析を示す。

【図6B - 2】実施例4に記載のサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）による完全四量体分子のアセンブリの分析を示す。

【図7A】CD47を発現する細胞（CD47形質移入CHO細胞）への抗EGFR - huIgG1 - SIRP タンパク質の結合を示す。

【図7B】CD47を発現する細胞（白血球濃縮全血）への抗EGFR - huIgG1 - SIRP タンパク質の結合を示す。

【図7C】EGFRおよびCD47の両方を発現する細胞（A549細胞）への抗EGFR - huIgG1 - SIRP タンパク質の結合を示す。

【図8】A549標的細胞および遺伝子操作Jurkatエフェクター細胞を使用するADCC

10

20

30

40

50

アッセイにおける抗EGFR-huIgG1-SIRP V2のインビトロ活性を示す。

【図9A】マウスにおける抗EGFR-huIgG1-SIRP V2の薬物動態分析を示す。

【図9B】マウスにおける同所性A549肺腫瘍モデルにおける抗EGFR-huIgG1-SIRP V2による処理後のマウスの生存率を示す（逆向き黒色三角：アイソタイプ対照；黒色丸：抗EGFR；黒色三角：SIRP-Fc；黒色菱形：抗EGFRおよびSIRP-Fc；白色丸：抗EGFR-huIgG1-SIRP V2）。

【図10A】実施例5に記載のSDS-PAGEによる抗HER2-huIgG1-SIRP V2の2つのポリペプチドの発現の分析を示す。

【図10B】実施例5に記載のサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）による完全四量体分子のアセンブリの分析を示す。

【図11A】CD47を発現する細胞（CD47形質移入CHO細胞）への抗HER2-huIgG1-SIRP V2の結合を示す。

【図11B】CD47を発現する細胞（白血球濃縮全血）への抗HER2-huIgG1-SIRP V2の結合を示す。

【図11C】HER2およびCD47の両方を発現する細胞（BT474細胞）への抗HER2-huIgG1-SIRP V2の結合を示す。

【図12A】実施例7に記載のSDS-PAGEによる抗PD-L1-huIgG1-muSIRPの2つのポリペプチドの発現の分析を示す。

【図12B】実施例7に記載のサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）による完全四量体分子のアセンブリの分析を示す。

【図13】PD-L1およびCD47を発現するA20細胞への抗PD-L1-huIgG1-muSIRPの結合を示す。

【図14A】実施例8に記載のSDS-PAGEによる抗EGFR-huIgG1-SIRP（N110Q）の2つのポリペプチドの発現の分析を示す。

【図14B】実施例8に記載のサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）による完全四量体分子のアセンブリの分析を示す。

【図15】CD47を発現する細胞（CD47形質移入CHO細胞）への抗EGFR-huIgG1-SIRP（N110Q）の結合を示す。

【図16A】実施例10に記載のSDS-PAGEによるSIRP V2-Fc（huIgG1）-抗EGFR（Fab）の2つのポリペプチドの発現の分析を示す。

【図16B】実施例10に記載のおよびサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）による完全四量体分子のアセンブリの分析を示す。

【図17A】実施例10に記載のCD47を発現する細胞（CD47形質移入CHO細胞）へのSIRP V2-Fc（huIgG1）-抗EGFR（Fab）の結合を示す。

【図17B】実施例10に記載のA549細胞および遺伝子操作Jurkatエフェクター細胞を使用するADCCアッセイにおけるSIRP V2-Fc（huIgG1）-抗EGFR（Fab）のインビトロ活性を示す。

【図18】同所性A549肺腫瘍モデルにおけるSIRP V2-Fc（huIgG1）-抗EGFR（Fab）による処理後のマウスの生存率を示す（逆向き黒色三角：アイソタイプ対照；黒色丸：抗EGFR；x：抗EGFRおよびSIRP-Fc；白色丸：抗EGFR-huIgG1-SIRP V2；黒色菱形：SIRP V2-Fc（huIgG1）-抗EGFR（Fab））。

【図19A】実施例15に記載のSDS-PAGEによるSIRP V2-Fcab（HER2）のポリペプチドの発現の分析を示す。

【図19B】実施例15に記載のサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）による完全二量体分子のアセンブリの分析を示す。

【図20A】CD47を発現する細胞（CD47形質移入CHO細胞）へのSIRP V2-Fcab（HER2）の結合を示す。

【図20B】HER2およびCD47の両方を発現する細胞（BT474細胞）へのSIRP V2-Fcab（HER2）の結合を示す。

10

20

30

40

50

R P V 2 - F c a b (H E R 2) の結合を示す。

【図 2 1 A】実施例 9 に記載の S D S - P A G E による抗 E G F R - h u I g G 1 / 抗 E G F R - L C - S I R P V 2 の 2 つのポリペプチドの発現の分析を示す。

【図 2 1 B - 1】実施例 9 に記載のサイズ排除クロマトグラフィー (S E C) による完全四量体分子のアセンブリの分析を示す。

【図 2 1 B - 2】実施例 9 に記載のサイズ排除クロマトグラフィー (S E C) による完全四量体分子のアセンブリの分析を示す。

【図 2 1 C】C D 4 7 を発現する細胞 (C D 4 7 形質移入 C H O 細胞) への抗 E G F R - h u I g G 1 / 抗 E G F R - L C - S I R P V 2 の結合の分析を示す。

【図 2 2 A】実施例 1 8 に記載の S D S - P A G E による抗 E G F R - h u I g G 1 - S I R P V 2 (Q 3 7 W) の 2 つのポリペプチドの発現の分析を示す。

【図 2 2 B】実施例 1 8 に記載のサイズ排除クロマトグラフィー (S E C) による完全四量体分子のアセンブリの分析を示す。

【図 2 3】同所性 A 5 4 9 肺腫瘍モデルにおける抗 E G F R - h u I g G 1 - S I R P V 2 または抗 E G F R - h u I g G 1 - S I R P V 2 (Q 3 7 W) による処理後のマウスの生存率を示す。

【図 2 4 A】実施例 1 9 に記載の S D S - P A G E による抗 C D 2 0 - h u I g G 1 - S I R P V 2 (Q 3 7 W) の 2 つのポリペプチドの発現の分析を示す。

【図 2 4 B】実施例 1 9 に記載のサイズ排除クロマトグラフィー (S E C) による完全四量体分子のアセンブリの分析を示す。

【図 2 5】Daudi 播種性リンパ腫モデルにおける抗 C D 2 0 および F c - S I R P V 2 または F c - S I R P V 2 (Q 3 7 W) の組合せによる処理後のマウスの生存率を示す。

【図 2 6】既知ヒト S I R P アレルの I g V ドメイン : I g V (V 1) (配列番号 6 の残基 1 ~ 1 1 5)、I g V (V 2) (配列番号 8)、I g V (V 3) (配列番号 1 9 3)、I g V (V 4) (配列番号 1 9 4)、I g V (V 5) (配列番号 1 9 5)、I g V (V 6) (配列番号 1 9 6)、I g V (V 7) (配列番号 1 9 7)、I g V (V 8) (配列番号 1 9 8)、I g V (V 9) (配列番号 1 9 9)、および I g V (V 1 0) (配列番号 2 0 0) のアラインメントを示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 4 6 】

発明の詳細な説明

本発明は、向上した腫瘍標的化およびエフェクター機能を有する免疫グロブリン融合タンパク質を対象とする。一般に、本発明の免疫グロブリン融合タンパク質は、C D 4 7 結合剤部分および免疫グロブリン部分を含む。免疫グロブリン部分は、疾患促進細胞上の表面抗原に結合する一方、C D 4 7 結合剤部分は、同一細胞上の C D 4 7 に結合する。一実施形態において、本発明は、腫瘍特異的免疫グロブリン部分を、C D 4 7 に結合する部分に遺伝子的に結合させることを含む。好ましい C D 4 7 結合剤は、S I R P または S I R P のバリエーションである。したがって、本発明のある実施形態は、C D 4 7 を発現する腫瘍細胞に結合する免疫グロブリン融合タンパク質を対象とする。

【 0 0 4 7 】

C D 4 7 は、全てのヒト細胞上でユビキタスに発現される。腫瘍細胞、特に癌幹細胞はより高レベルの C D 4 7 を発現するが、造血幹細胞も C D 4 7 を過剰発現する。したがって、S I R P、S I R P バリエーション、または C D 4 7 についての十分な結合親和性を有する別の C D 4 7 結合剤は、癌細胞および正常細胞、例として、5 0 億個の細胞 / m L において循環中で存在し、血液容量の約半分を占める赤血球を区別する可能性が低い。したがって、本発明の免疫グロブリン融合タンパク質は、腫瘍細胞上の腫瘍抗原への高い親和性結合および C D 4 7 についての低い結合親和性を有するように設計される。これは、正常細胞上の C D 4 7 への免疫グロブリン融合タンパク質の弱い結合をもたらす。こうして、免疫グロブリン融合タンパク質は、正常細胞を標的化しないように設計され、それに

よりCD47のユビキタス発現から生じる正常細胞に対する毒性を避け、さらに正常細胞上でユビキタスに発現されるCD47が、そうでなければ抗体療法に典型的な週1回または2週1回レジメン(regiment)と不適合である不所望な薬物動態をもたらす抗CD47療法についての薬物シンク(drug sink)になるのを防止する。この理由のため、融合部分が低い親和性でCD47に結合する一方、SIRPと相互作用するCD47の能力を依然として遮断することが好ましい。

【0048】

本発明の免疫グロブリン融合タンパク質は、(1)腫瘍細胞上の腫瘍特異的抗原についての高い結合親和性を有し；(2)同一腫瘍細胞上のCD47への融合部分の低い親和性結合により提供される追加のアビディティを介して向上した腫瘍標的化を達成し；(3)CD47「ドント・イート・ミー」シグナルの遮断および免疫エフェクター細胞のFc依存性活性化の組合せを介して強力なADCPおよびADCCを誘発し；(4)正常細胞、例として、赤血球上のCD47への低い親和性結合により毒性を回避する。重要なことに、CD47結合剤、例えば、SIRPまたはSIRPバリエーションが、FcRエンゲージメントに最適でない構成で抗体部分のFc領域に結合している場合、ADCC/ADCPにより誘導される正常細胞に対する毒性はさらに低下し、例えば、天然抗体と類似するアミノからカルボキシルへの向きを有するX-Fc構成は、Fc-X構成よりも高いADCC活性を誘発する。

【0049】

本発明によれば、免疫グロブリン融合タンパク質の標的化特異性は、主として抗体部分の、ユビキタスに発現される抗原のCD47ではなくそのコグネイト腫瘍特異的抗原への結合によりドライブされる。さらに、標的化特異性は、腫瘍細胞上で過剰発現されるCD47への融合相手のシス結合により提供されるアビディティ効果によりさらに向上する。シスの良好な二重特異的標的化は、相対受容体密度および細胞表面上の2つの標的の物理的局在にかなり依存する。このような向上した腫瘍標的化は、抗CD47抗体および他のCD47遮断剤と比較して優れた効力および安全性の両方に関してより良好な治療指数を提供するはずである。

【0050】

CD47結合剤

本発明の免疫グロブリン融合タンパク質は、CD47に結合し得る部分を含む。一実施形態において、CD47結合剤としては、CD47に対する抗体が挙げられる。他の実施形態において、CD47結合剤は、CD47についての結合親和性を有する非抗体タンパク質または分子、例えば、CD47受容体に結合するリガンドである。例えば、一実施形態において、融合タンパク質のCD47結合剤部分は、抗CD47抗体である。好ましい実施形態において、CD47結合剤は、SIRP、SIRPバリエーション、またはSIRPの親和性最適化バリエーションである。

【0051】

「SIRP」は、野生型シグナル調節タンパク質アルファまたは野生型シグナル調節タンパク質アルファもしくはシグナル調節タンパク質アルファの天然または天然存在アレルバリエーションのアミノ酸配列を有する組換えもしくは非組換えポリペプチドのアミノ酸配列を指す。一実施形態において、SIRPは、野生型哺乳動物SIRPである一方、好ましい実施形態において、SIRPは、野生型ヒトSIRPである。優性野生型ヒトSIRP(SIRP V1)の成熟形態についてのアミノ酸配列を、表4に配列番号6として提供する。一実施形態において、SIRPは、シグナル配列を含む一方、別の態様において、SIRPは、タンパク質の成熟形態を指す。

【0052】

一実施形態によれば、SIRPは、SIRP細胞外ドメイン、すなわち、膜貫通および細胞ドメインを除外するように遺伝子操作されたSIRPタンパク質である。別の実施形態において、SIRPは、少なくとも細胞外ドメインを含む。一実施形態において、SIRPタンパク質は、ヒトSIRP細胞外ドメインである。野生型SIRP

10

20

30

40

50

V1の細胞外ドメインの配列は、配列番号6の残基1～343である。

【0053】

さらに別の実施形態において、SIRPは、細胞外ドメインのSIRP IgVドメインである。一実施形態において、SIRP IgVドメインは、ヒトSIRP IgVドメインである。例えば、一実施形態において、SIRP IgVドメインは、配列番号6の残基1～115である一方、別の実施形態において、SIRP IgVは、配列番号8の残基1～114である一方、さらに別の実施形態において、SIRP IgVは、配列番号6の残基3～115である一方、さらに別の実施形態において、SIRP IgVは、配列番号8の残基3～114である。別の実施形態において、SIRP IgVドメインは、配列番号193の残基1～114である。別の実施形態において、SIRP IgVドメインは、配列番号194の残基1～115である。別の実施形態において、SIRP IgVドメインは、配列番号195の残基1～115である。別の実施形態において、SIRP IgVドメインは、配列番号196の残基1～115である。別の実施形態において、SIRP IgVドメインは、配列番号197の残基1～114である。別の実施形態において、SIRP IgVドメインは、配列番号198の残基1～114である。別の実施形態において、SIRP IgVドメインは、配列番号199の残基1～155である。別の実施形態において、SIRP IgVドメインは、配列番号200の残基1～114である。さらに別の実施形態において、SIRPは、少なくとも細胞外ドメインのSIRP IgVドメインを含む。

10

【0054】

本発明はまた、SIRPの「バリエーション」を含む。SIRPの「バリエーション」は、野生型SIRPと比較して1つ以上のアミノ酸により変更されたSIRPアミノ酸配列と定義される。バリエーションは、置換されたアミノ酸が類似の構造または化学的特性を有する「保存的」変化、例えば、イソロイシンによるロイシンの置き換えを有し得る。より希に、バリエーションは、「非保存的」変化、例えば、トリプトファンによるグリシンの置き換えを有し得る。類似のマイナーバリエーションとしては、アミノ酸欠失もしくは挿入、またはその両方を挙げることできる。

20

【0055】

一実施形態において、SIRP バリエーションは、野生型SIRPと少なくとも約70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を有するポリペプチドを含む。

30

【0056】

別の実施形態において、SIRP バリエーションは、野生型SIRP 細胞外ドメインと少なくとも約70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を有するポリペプチドを含む。一実施形態において、SIRP バリエーションは、配列番号6の残基1～343と少なくとも約70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を有するポリペプチドを含む。

40

【0057】

さらに別の実施形態において、SIRP バリエーションは、野生型SIRP 細胞外ドメインのIgVドメイン、例えば、一実施形態において配列番号6の残基1～115、別の実施形態において配列番号8の残基1～114、さらに別の実施形態において配列番号193の残基1～114、さらに別の実施形態において配列番号194の1～115、さらに別の実施形態において配列番号195の1～115、さらに別の実施形態において配列番号196の1～115、さらに別の実施形態において配列番号197の1～114、さらに別の実施形態において配列番号198の1～114、さらに別の実施形態において配列番号199の1～115、またはさらに別の実施形態において配列番号200の1～1

50

14と少なくとも約70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を有するポリペプチドを含む。1つの特定の実施形態において、SIRP バリアントは、配列番号6の残基1～115のIgVドメインと少なくとも約70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を有するポリペプチドを含む。別の実施形態において、SIRP バリアントは、配列番号8の残基1～114のIgVドメインと少なくとも約70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を有するポリペプチドを含む。別の実施形態において、SIRP バリアントは、配列番号193の残基1～114のIgVドメインと少なくとも約70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を有するポリペプチドを含む。別の実施形態において、SIRP バリアントは、配列番号194の残基1～115のIgVドメインと少なくとも約70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を有するポリペプチドを含む。別の実施形態において、SIRP バリアントは、配列番号195の残基1～115のIgVドメインと少なくとも約70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を有するポリペプチドを含む。別の実施形態において、SIRP バリアントは、配列番号196の残基1～115のIgVドメインと少なくとも約70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を有するポリペプチドを含む。別の実施形態において、SIRP バリアントは、配列番号197の残基1～114のIgVドメインと少なくとも約70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を有するポリペプチドを含む。別の実施形態において、SIRP バリアントは、配列番号198の残基1～114のIgVドメインと少なくとも約70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を有するポリペプチドを含む。別の実施形態において、SIRP バリアントは、配列番号199の残基1～115のIgVドメインと少なくとも約70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を有するポリペプチドを含む。別の実施形態において、SIRP バリアントは、配列番号200の残基1～114のIgVドメインと少なくとも約70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を有するポリペプチドを含む。別の実施形態において、SIRP バリアントは、配列番号190の残基1～114のIgVドメインと少なくとも約70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上の配列同一性を有するポリペプチドを含む。配列番号190は、10の既知ヒトSIRP IgVドメインのコンセンサス配列である。

【0058】

10

20

30

40

50

2つのアミノ酸配列または2つの核酸の一致率を決定するため、配列を最適な比較目的のためにアラインする（例えば、第2のアミノ酸または核酸配列との最適なアラインメントのために第1のアミノ酸または核酸配列中にギャップを導入することができる）。2つの配列間の一致率は、それらの配列により共有される同一位置の数の関数である（すなわち、%相同性 = (同一位置の数 / 位置の総数) × 100）。2つの配列間の相同率の決定は、数学的アルゴリズムを使用して達成することができる。2つの配列の比較に利用される数学的アルゴリズムの非限定的な例は、Karlin and Altschul, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:5873-77のとおり修正されたKarlin and Altschul, (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:2264-68のアルゴリズムである。このようなアルゴリズムは、Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol., 215:403-10のNBLASTおよびXBLASTプログラムに組み込まれる。BLASTヌクレオチド検索は、NBLASTプログラム、スコア = 100、ワード長 = 12により実施することができる。BLASTタンパク質検索は、XBLASTプログラム、スコア = 50、ワード長 = 3により実施することができる。比較目的のためにギャップ付きアラインメントを得るため、Gapped BLASTをAltschul et al., (1997) Nucleic Acids Research, 25(17):3389-3402に記載のとおり利用することができる。BLASTおよびGapped BLASTプログラムを利用する場合、それぞれのプログラム（例えば、XBLASTおよびNBLAST）のデフォルトパラメータを使用することができる。

【0059】

一部の実施形態において、SIRP バリエーションは、野生型SIRPと比較して細胞外ドメインの可変ドメイン中の1つ以上の突然変異を含む。本発明により企図される突然変異を以下に記載し、以下の実施例6に見出される表1および2、ならびに以下の実施例17に見出される表3にも提供する。

【0060】

一実施形態において、本発明のSIRP バリエーションは、配列番号6または配列番号8または配列番号190に対応する6、27、31、37、54、56、66、または72位の1つ以上に対応する位置におけるアミノ酸の改変を有する。改変は、欠失、置換、または挿入であり得る。好ましい実施形態において、改変は、置換である。他の実施形態において、SIRP バリエーションは、配列番号6または配列番号8または配列番号190に対応する6、27、31、37、54、56、66、または72位に対応する2つ以上における、3つ以上における、4つ以上における、5つ以上における、6つ以上における、7つ以上における、または8つの位置におけるアミノ酸の改変を有する。

【0061】

さらなる実施形態において、本発明のSIRP バリエーションは、以下の1つ以上の置換を有する：V6I、V27I、A27I、I31R、I31T、Q37W、Q37H、E54P、H56P、S66Q、L66A、およびM72R。一実施形態において、置換は、V6Iに対応する。別の実施形態において、置換は、V27IまたはA27Iに対応する。別の実施形態において、置換は、I31Rに対応する。別の実施形態において、置換は、I31Tに対応する。別の実施形態において、置換は、Q37Wに対応する。別の実施形態において、置換は、Q37Hに対応する。別の実施形態において、置換は、E54Pに対応する。別の実施形態において、置換は、H56Pに対応する。別の実施形態において、置換は、S66QまたはL66Qに対応する。別の実施形態において、置換は、M72Rに対応する。

【0062】

一実施形態において、本発明のSIRP バリエーションは、配列番号6または配列番号8または配列番号190の4、6、27、31、35、37、47、52、53、54、56、66、67、68、72、92または94位に対応する1つ以上の位置におけるアミノ酸の改変を有する。改変は、アミノ酸の欠失、置換、または挿入であり得る。好ましい実施形態において、改変は、置換である。他の実施形態において、SIRP バリエーションは、配列番号6または配列番号8または配列番号190の4、6、27、31、35、37、47、52、53、54、56、66、67、68、72、92または94位に対応

する2つ以上における、3つ以上における、4つ以上における、5つ以上における、6つ以上における、7つ以上における、8つ以上における、9つ以上における、10以上における、11以上における、12以上における、13以上における、14以上における、15以上における、16以上における、または17の位置におけるアミノ酸の改変を有する。

【0063】

さらなる実施形態において、本発明のSIRPバリエーションは、以下の1つ以上の置換を有する：

- a . L 4 Vである、4位に対応する位置における置換；
- b . V 6 A、V 6 C、V 6 D、V 6 E、V 6 G、V 6 I、V 6 L、V 6 M、V 6 N、V 6 Q、V 6 S、もしくはV 6 Tから選択される6位に対応する位置における置換； 10
- c . A 2 7 C、A 2 7 D、A 2 7 G、A 2 7 H、A 2 7 I、A 2 7 K、A 2 7 L、A 2 7 N、A 2 7 Q、A 2 7 R、A 2 7 S、A 2 7 T、もしくはA 2 7 V；もしくはV 2 7 A、V 2 7 C、V 2 7 D、V 2 7 G、V 2 7 H、V 2 7 I、V 2 7 K、V 2 7 L、V 2 7 N、V 2 7 Q、V 2 7 R、V 2 7 S、もしくはV 2 7 Tから選択される27位に対応する位置における置換；
- d . I 3 1 A、I 3 1 C、I 3 1 E、I 3 1 K、I 3 1 Q、I 3 1 R、I 3 1 T、もしくはI 3 1 Vから選択される31位に対応する位置における置換；
- e . P 3 5 A、P 3 5 C、P 3 5 E、P 3 5 G、P 3 5 N、P 3 5 Q、もしくはP 3 5 Sから選択される35位に対応する位置における置換； 20
- f . Q 3 7 A、Q 3 7 C、Q 3 7 E、Q 3 7 G、Q 3 7 H、Q 3 7 K、Q 3 7 L、Q 3 7 M、Q 3 7 N、Q 3 7 R、Q 3 7 S、Q 3 7 T、もしくはQ 3 7 Wから選択される37位に対応する位置における置換；
- g . E 4 7 A、E 4 7 C、E 4 7 D、E 4 7 F、E 4 7 G、E 4 7 H、E 4 7 I、E 4 7 K、E 4 7 L、E 4 7 M、E 4 7 N、E 4 7 Q、E 4 7 R、E 4 7 S、E 4 7 T、E 4 7 V、E 4 7 W、もしくはE 4 7 Yから選択される47位に対応する位置における置換；
- h . Q 5 2 A、Q 5 2 C、Q 5 2 E、Q 5 2 HもしくはQ 5 2 Mから選択される52位に対応する位置における置換；
- i . K 5 3 Rである、53位に対応する位置における置換；
- j . E 5 4 DもしくはE 5 4 Pから選択される54位に対応する位置における置換； 30
- k . H 5 6 A、H 5 6 C、H 5 6 D、H 5 6 E、H 5 6 F、H 5 6 G、H 5 6 I、H 5 6 K、H 5 6 L、H 5 6 M、H 5 6 N、H 5 6 P、H 5 6 Q、H 5 6 R、H 5 6 S、H 5 6 T、H 5 6 V、H 5 6 W、もしくはH 5 6 Yから選択される56位に対応する位置における置換；
- l . L 6 6 A、L 6 6 C、L 6 6 D、L 6 6 E、L 6 6 F、L 6 6 G、L 6 6 H、L 6 6 I、L 6 6 K、L 6 6 M、L 6 6 N、L 6 6 P、L 6 6 Q、L 6 6 S、L 6 6 T、L 6 6 V、L 6 6 W、もしくはL 6 6 Y；もしくはS 6 6 A、S 6 6 C、S 6 6 D、S 6 6 E、S 6 6 F、S 6 6 G、S 6 6 H、S 6 6 I、S 6 6 K、S 6 6 L、S 6 6 M、S 6 6 N、S 6 6 P、S 6 6 Q、S 6 6 T、S 6 6 V、S 6 6 W、もしくはS 6 6 Yから選択される66位に対応する位置における置換； 40
- m . T 6 7 A、T 6 7 C、T 6 7 D、T 6 7 E、T 6 7 F、T 6 7 G、T 6 7 H、T 6 7 I、T 6 7 L、T 6 7 M、T 6 7 N、T 6 7 Q、T 6 7 R、T 6 7 S、T 6 7 V、T 6 7 W、もしくはT 6 7 Yから選択される67位に対応する位置における置換；
- n . K 6 8 Rである、68位に対応する位置における置換
- o . M 7 2 A、M 7 2 C、M 7 2 D、M 7 2 E、M 7 2 F、M 7 2 G、M 7 2 H、M 7 2 I、M 7 2 K、M 7 2 L、M 7 2 N、M 7 2 Q、M 7 2 R、M 7 2 S、M 7 2 T、M 7 2 V、M 7 2 W、もしくはM 7 2 Yから選択される72位に対応する位置における置換；
- p . V 9 2 A、V 9 2 C、V 9 2 D、V 9 2 E、V 9 2 G、V 9 2 I、V 9 2 M、V 9 2 N、V 9 2 Q、V 9 2 R、V 9 2 S、もしくはV 9 2 Tから選択される92位に対応する位置における置換；および/または 50

q . F 9 4 L である、9 4 位に対応する位置における置換。

【 0 0 6 4 】

C D 4 7 への結合についての S I R P バリアントの親和性を決定するため、表面プラズモン共鳴 (S P R) を使用することができる。例示的なプロトコルにおいて、Biacore 4000 装置 (GE Healthcare) を使用してアミンカップリング化学反応を使用して精製ヤギ抗ヒト I g G F c (Jackson Immuno Research Laboratories) を CM5 チップ上に固定化する。Biacore CM-5 チップ、エタノールアミン、N H S / E D C カップリング試薬および緩衝液を、Biacore (GE Healthcare) から入手する。固定化ステップを、H E P E S 緩衝液 (2 0 m M の H E P E S 、 1 5 0 m M の N a C l 、 3 . 4 m M の E D T A および 0 . 0 0 5 % の P 2 0 界面活性剤) 中で 3 0 μ l / 分の流速において実施する。センサ表面を、N H S (0 . 0 5 M) および E D C (0 . 2 M) の混合物により 7 分間活性化させる。ヤギ抗ヒト I g G F c を、1 0 m M の酢酸ナトリウム、p H 5 . 0 中で約 3 0 μ g / m l の濃度において 7 分間インジェクトする。エタノールアミン (1 M 、 p H 8 . 5) を 7 分間インジェクトしていかなる残留活性化基もブロックする。平均 1 2 , 0 0 0 応答単位 (R U) の捕捉抗体をそれぞれのフローセル上に固定化する。同一の H E P E S 緩衝液 (2 0 m M の H E P E S 、 1 5 0 m M の N a C l 、 3 . 4 m M の E D T A および 0 . 0 0 5 % の P 2 0 界面活性剤) を使用して動的結合実験を実施し、2 5 において平衡化する。0 . 5 および 1 μ g / m l において S I R P バリアントを 3 0 μ l / 分の流速において 2 分間インジェクトし、次いで同一流速において 3 0 秒間緩衝液洗浄することにより、動的データを回収する。ヒト C D 4 7 - H i s を、異なる濃度において 3 分間結合させ、次いで解離ステップを 3 0 μ l / 分の流速において 1 0 分間行う。BIA 評価ソフトウェアにより 1 : 1 ラングミュア結合モデルを使用してデータをフィットさせる。動的速度定数を会合および解離相のフィットから決定し、それらの定数の比から K_D を導出する。

【 0 0 6 5 】

C D 4 7 への結合についての S I R P バリアントのアビディティを決定する代替的な方法において、細胞結合アッセイを使用することができる。例示的なプロトコルにおいて、C D 4 7 により形質移入されたウェル当たり 2×10^5 個のチャニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞を、P B S + 1 % の F B S 中で希釈された変動濃度の抗体と 9 6 ウェルプレート中で氷上で 6 0 分間インキュベートする。P B S + 1 % の F B S により洗浄した後、細胞を P B S + 1 % の F B S 中で 1 : 2 0 0 希釈された F I T C F (a b *) 2 ヤギ抗ヒト I g G 、 F c (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) と氷上で 6 0 分間インキュベートした。再度洗浄した後、細胞を P B S 中 1 % のホルムアルデヒドにより固定する。細胞をフローサイトメトリー (MACSQuant, Miltenyi Biotec, Cologne, Germany) により分析する。データを Graph Pad Prism によりシグモイド曲線 (l o g (アゴニスト) 対応答 - 変数傾斜 (4 つのパラメータ)) にフィットさせることにより、E C 5 0 を計算する。

【 0 0 6 6 】

これらの突然変異を S I R P または S I R P を含む融合タンパク質中に導入する場合、得られるバリアントは、一般に、治療タンパク質として有用であるために十分な S I R P 生物学的活性を有する。一部の実施形態において、S I R P バリアントの生物学的活性は、野生型 S I R P または野生型 S I R P を含む融合タンパク質の生物学的活性の少なくとも 0 . 0 1 倍、0 . 0 3 倍、0 . 0 6 倍、0 . 1 倍、0 . 3 倍、0 . 6 倍、1 倍、3 倍、5 倍、6 倍、1 0 倍、2 0 倍、3 0 倍、4 0 倍、5 0 倍、6 0 倍または 1 0 0 倍である。本発明の S I R P バリアントの生物学的活性は、インビトロまたはインビボアッセイにおいて試験することができる。C D 4 7 を発現する細胞に対する S I R P の生物学的活性を決定するためのインビトロアッセイは、当技術分野において十分確立されている。例えば、生物学的活性は、Liu et.al. (J.Mol.Bio., 365:680, 2007) により記載されている白血球移動アッセイにおいて決定することができる。

【 0 0 6 7 】

免疫グロブリン部分

本明細書において使用される用語「抗体」は、インタクト抗体（例えば、インタクトモノクローナル抗体）を意味する。一部の実施形態において、「抗体」は、抗体の抗原結合断片を含む。抗原結合断片としては、 Fab 、 Fab' 、 $F(ab')_2$ 、 Fv 、単鎖抗体（例えば、 $scFv$ ）、ミニボディ、ダイアボディ、および単ドメイン抗体（「 $s d A b$ 」または「ナノボディ」または「ラクダ科抗体（*camelid*）」）が挙げられる。さらに他の実施形態において、抗体は、最適化、遺伝子操作または化学コンジュゲートされたインタクト抗体または抗体の抗原結合断片（例えば、完全ヒト抗体を含むファージディスプレイ抗体、半合成抗体または完全合成抗体）を含む。最適化された抗体の例は、親和性成熟抗体である。遺伝子操作された抗体の例は、 Fc 最適化抗体、および多重特異的抗体（例えば、二重特異的抗体）である。毒素部分にコンジュゲートしている抗体は、化学コンジュゲート抗体の一例である。一部の実施形態において、抗体は、 $IgG1$ 、 $IgG2$ 、 $IgG3$ 、 $IgG4$ 、 IgM 、 IgE 、 IgD 、または IgA であり得る。

【0068】

本明細書において使用される用語「免疫グロブリン」または「免疫グロブリン分子」は、本明細書に定義される抗体または抗体の抗原結合断片を意味するが、抗体の一部、例えば、重鎖または軽鎖可変または定常領域も含む。免疫グロブリンの一部の例としては、 $CH1$ 、 $CH2$ 、 $CH3$ 、ヒンジ、 $VH1$ 、 CL および VL ドメインならびに Fc 領域が挙げられる。さらに、「免疫グロブリン」は、抗原結合部位を含むように遺伝子操作された Fc 断片または領域（「 $Fcab$ 」）を含む。例えば、一実施形態において、本発明の免疫グロブリン融合タンパク質は、腫瘍抗原についての結合特異性を有する「 $Fcab$ 」部分を含む。「 $Fcab$ 」は、当技術分野において、例えば、国際公開第2008/003103号および国際公開第2012/007167号において考察されている。さらに、実施例15は、免疫グロブリン部分が $HER2$ に対する $Fcab$ である本発明の免疫グロブリン融合タンパク質の一例を提供する。一部の実施形態において、「免疫グロブリン」は、さらなる可変もしくは定常重鎖もしくは軽鎖領域が、それがなければインタクトな抗体に付加された、または可変もしくは定常領域が元の位置から抗体内の新たな位置に再局在化または再配置された遺伝子操作抗体を含む。例えば、図1Eは、四価二重特異的抗体、すなわち、第2の可変領域を含むように遺伝子操作された抗体である免疫グロブリンを示す。再局在化または再配置の一例を、図1Iに示し、免疫グロブリン部分が、抗体の重鎖可変ドメイン（ VH ）、それに続く重鎖定常ドメイン1（ $CH1$ ）、およびアッパーヒンジ領域（ H ）に融合している Fc 領域である。

【0069】

本発明によれば、融合部分、例えば、 $SIRP$ は、腫瘍抗原への抗体の結合に悪影響を与えないように免疫グロブリンに遺伝子的に結合させることができる。好ましくは、融合部分は、 FcR エンゲージメントに最適でない構成で Fc に結合しており、正常細胞に対する縮小した $ADCC/ADCP$ 活性をもたらす。一部の実施形態において、 Fc 領域は、改変 FcR 結合能力を保持し、または有する。ヒト抗体断片（例えば、親および最適化バリエーション）は、規定のエフェクター機能（例えば、抗体依存性細胞毒性（ $ADCC$ ））を有するある定常（すなわち、 Fc ）領域を含有するように遺伝子操作することができる。ヒト定常領域は、当技術分野において公知である。

【0070】

全長抗体と同一または同等の結合特徴を有する抗体の断片も存在し得る。このような断片は、1つまたは両方の Fab 断片または $F(ab')_2$ 断片を含有し得る。抗体断片は、全長抗体の6つ全ての CDR を含有し得るが、全てよりも少ないそのような領域、例えば、3、4または5つの CDR を含有する断片も機能的である。

【0071】

本発明によれば、一実施形態における免疫グロブリン融合タンパク質の免疫グロブリン部分は、インタクト抗体である。さらに別の実施形態において、免疫グロブリン部分は、四価二重特異的抗体である。この実施形態を、例えば、図1Eに例示する。ある実施形態において、 $SIRP$ 部分は、例えば、図1Bまたは図1Mにおいて重鎖のC末端に融合

10

20

30

40

50

している一方、他の実施形態において、SIRP 部分は、例えば、図1Gにおいて軽鎖のC末端に融合している。SIRP 部分は、免疫グロブリン部分に任意選択のリンカーにより融合させることができる。

【0072】

いっそうさらなる実施形態において、免疫グロブリン部分は、例えば、図1Iにおける、C末端においてVHおよびCH1ドメインを含むように遺伝子操作され、軽鎖が重鎖可変領域に結合しているFcである。一部の実施形態において、SIRP 部分は、Fc部分のN末端に、場合により、リンカーを介して融合している。他の実施形態において、SIRP 部分は、軽鎖のC末端または重鎖のC末端に、場合により、リンカーを介して融合している。

10

【0073】

さらに別の実施形態において、免疫グロブリン部分は、そのC末端においてscFvに結合しているFc部分である。この実施形態を、例えば、図1Kに例示する。このような実施形態において、SIRP 部分は、Fc領域のN末端に、場合により、リンカーを介して融合させることができる。さらに別の実施形態において、免疫グロブリン部分は、そのC末端においてFc領域に結合しているscFvである。この実施形態を、例えば、図1Mに例示する。このような実施形態において、SIRP 部分は、Fc領域のC末端に、場合により、リンカーを介して融合させることができる。

【0074】

さらなる実施形態において、免疫グロブリン部分は、抗原結合ドメインを含むように遺伝子操作されたFc領域である。例えば、一部の実施形態において、Fc領域は、例えば、CH3ドメイン中の抗原結合ドメインを含むように遺伝子操作されたFc領域であるFcab領域である。この実施形態を、例えば、図1Oに例示する。一部の実施形態において、SIRP 部分は、FcまたはFcab領域のN末端に、場合により、リンカーを介して融合させることができる一方、他の実施形態において、SIRP 部分は、そのC末端に、場合により、リンカーを介して融合させることができる。

20

【0075】

さらに別の実施形態において、免疫グロブリン部分は、Fabである。さらに別の実施形態において、免疫グロブリン部分は、Fab'である。さらに別の実施形態において、免疫グロブリン部分は、F(ab')₂である。さらに別の実施形態において、免疫グロブリン部分は、Fvである。さらに別の実施形態において、免疫グロブリン部分は、scFvである。さらに別の実施形態において、免疫グロブリン部分は、ミニボディである。さらに別の実施形態において、免疫グロブリン部分は、ダイアボディである。いっそうさらなる実施形態において、免疫グロブリン部分は、単ドメイン抗体(ナノボディ)である。

30

【0076】

本明細書に開示の免疫グロブリン部分のいずれも、免疫グロブリン部分のN末端においてまたは免疫グロブリン部分のC末端においてCD47結合剤に結合させることができる。免疫グロブリン部分がインタクト抗体であり、または重鎖(または重鎖の一部)および軽鎖(または軽鎖の一部)の両方を含む実施形態において、CD47結合剤は、好ましくは、重鎖のC末端に付着しており;しかしながら、CD47結合剤は、軽鎖のC末端に、または重鎖のN末端に、または軽鎖のN末端に付着させることも企図される。免疫グロブリン部分がFcまたはFcabである実施形態において、CD47結合剤は、好ましくは、Fc部分のN末端に付着しているが、一部の実施形態において、CD47結合剤は、Fc部分のC末端に付着している。一実施形態において、CD47結合剤は、免疫グロブリン部分のN末端に融合している。別の実施形態において、CD47結合剤は、免疫グロブリン部分のC末端に融合している。

40

【0077】

本発明の免疫グロブリン融合タンパク質の作出において有用であり得る当技術分野において公知の抗体としては、抗EGFR抗体、例えば、セツキシマブ、パニツムマブ、ニモ

50

ツズマブ、マツズマブ、フツキシマブ、モドツキシマブ、イムガツズマブ、ネシツムマブ；抗CD20抗体、例えば、リツキシマブ、オフアツムマブ、オビヌツズマブ、イブリツモマブ、チウキセタン、オカラツズマブ、オクレリズマブ、トシツモマブI-131、ウブリツキシマブ、ベルツズマブ；および抗HER2抗体、例えば、トラスツズマブ、ペルツズマブ、マルゲツキジマブ；および抗PD-L1抗体、例えば、アテゾリズマブ、アベルマブ、およびダバルマブが挙げられる。別の実施形態において、本発明は、上記抗体の公知重鎖および/または軽鎖配列の改変を、それらの改変抗体がユニーク重鎖および軽鎖相補性決定領域または非改変抗体の抗原についての結合特異性を保持するために十分な相補性決定領域を保持する限り企図する。

【0078】

リンカー配列

本発明の免疫グロブリン融合タンパク質は、融合タンパク質のCD47結合剤部分を、融合タンパク質の抗体または免疫グロブリン部分と結合させるリンカー配列を含み得る。好ましいリンカーは、変動長さのGly₄Serフレキシブルリンカーである。例えば、リンカー配列は、(Gly₄Ser)_nであり、種々の実施形態によれば、n=1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10である。一実施形態において、n=4である。変動長さのGly₄Serフレキシブルリンカーは、標的化およびエフェクター機能を最適化するために導入することができる。

【0079】

一実施形態において、一実施形態においてSIRPまたはSIRPバリエーションであり得るCD47結合剤は、抗体または免疫グロブリン部分に、CD47結合剤のN末端を融合タンパク質の免疫グロブリン部分の抗体のC末端と連結するポリペプチドリンカー配列を介して結合している。

【0080】

別の実施形態において、一実施形態においてSIRPまたはSIRPバリエーションであり得るCD47結合剤は、抗体または免疫グロブリン部分に、CD47結合剤のC末端を融合タンパク質の抗体または免疫グロブリン部分のN末端と連結するポリペプチドリンカー配列を介して結合している。

【0081】

本発明はまた、融合タンパク質のCD47結合剤部分および融合タンパク質の抗体または免疫グロブリン部分が化学リンカーであることを企図する。

【0082】

腫瘍細胞抗原

本発明の免疫グロブリン融合タンパク質は、CD47に特異的であるのに加え、腫瘍細胞抗原に特異的であるように設計される。上記のとおり、本発明の免疫グロブリン融合タンパク質は、CD47および腫瘍細胞抗原の両方に二重特異的であることにより、健常細胞上のCD47への結合を回避する所望のアウトカムを達成し得る。したがって、本発明の免疫グロブリン融合タンパク質は、任意の腫瘍抗原に特異的であり得る。例示的な腫瘍細胞抗原としては、限定されるものではないが、4-1BB、4F2、a-ルイスy、A2aR、AATK、ACKR、ACVR、ADCYAP1R1、ADIPO1R1、ADIPO2R2、ADORA1、ADORA2、ADORA3、ADR、AGTR、AHR、ALK、AMHR2、ANGPT1、ANGPT2、ANGPT4、APLNR、APRILR、AR、AVPR1A、AVPR1B、AVPR2、AXL、B7.1、B7.2、B7-DC、B7-H1、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7RP1、BAFF、BAFFR、BAI1、BAI2、BDKRB1、BDKRB2、BMPR1A、BMPR1B、BMPR2、BRD8、BRS3、BTLA、C3AR1、C5AR1、C5AR2、CALCR、CASR、CCKAR、CCKBR、CCR1、CCR10、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR11、CCR12、CD2、CD3、CD4、CD5、CD6、CD7、CD11、CD15、CD18、CD19、CD20、CD22、CD24、CD25、CD27、C

10

20

30

40

50

D28、CD30、CD33、CD37、CD38、CD3E、CD40、CD40L、
 CD43、CD44、CD47、CD52、CD54、CD55、CD56、CD66、
 CD70、CD73、CD74、CD80、CD86、CD97、CD112、CD12
 3、CD133、CD137、CD137L、CD152、CD154、CD155、C
 D161、CD163、CD166、CD172、CD200、CD200R、CD20
 6、CD244、CD300、CEA、CEACAM3、CELSR、CHRM1、CH
 RM2、CHRM3、CHRM4、CHRM5、CIITA、CMKLR1、CNR1、
 CNR2、CNTFR、CRHR1、CRHR2、CRIM1、CRLF1、CRLF2
 、CRLF3、CSPG4、CSF1R、CSF2R、CSF3R、CTLA4、CX3
 CR1、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、
 CXCR7、CYSLTR1、CYSLTR2、C r i p t o、DARC、DDR1、D
 DR2、ジゴキシン、DII4、DRD1、DRD2、DRD3、DRD4、DRD5、
 DTR4、EDA2R、EDAR、ED-B、EDNRA、EDNRB、EGFR、EG
 FRvIII、ELTD1、EMR1、EMR2、EMR3、EMR4P、ENG、EP
 CAM、EPHR、エピシアリン、EPOR、ERBB2、ERBB3、ERBB4、E
 SR1、ESR2、ESRR、F2R、F4/80、FAS、FCER2、FCGR1、
 FDF、FFAR、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、FGFRL1、
 フィブリン、FKBP、FLT1、FLT3、FLT4、FN14、FOLR1、FPR
 1、FSHR、FZD1、FZD10、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZ
 D6、FZD7、FZD8、FZD9、G-28、GABBR、GAL9、GALR、G
 CGR、GD2、GD3、GDNFR、GHR、GHRHR、GHSR、GIPR、GI
 TR、GLP1R、GLP2R、GM3、GM-CSFR、GNRHR、GPBAR1、
 GPER、Gr-1、ハプテン、HCAR、HCRTR、HER1、HER2、HER3
 、HER4、HLA-DR10、HLA-DRB、HLA-G、HPV16、HPVE6
 、HPVE7、HMGB1、HMW-MAA、HRH、HTR1、HTR2、HTR3、
 HTR4、HTR5、HTR6、HTR7、HVEM、ICOS、IDO、IFNAR、
 IFNGR、IFNLR、IGF1R、IGF2R、IL10R、IL11R、IL12
 R、IL13R、IL15R、IL17R、IL18R1、IL18RAP、IL1R、
 IL1RL、IL20R、IL21R、IL22R、IL23R、IL27RA、IL2
 8RA、IL2R、IL31RA、IL35R、IL3RA、IL4R、IL5RA、I
 L6R、IL7R、IL9R、ILT2、ILT3、ILT4、ILT5、INSR、I
 NSRR、IRAK、IRP-2、ITGA1、ITGA10、ITGA11、ITGA
 2、ITGA2B、ITGA3、ITGA4、ITGA5、ITGA6、ITGA7、I
 TGA8、ITGA9、ITGAD、ITGAE、ITGAL、ITGAM、ITGAV
 、ITGAX、ITGB1、ITGB2、ITGB3、ITGB4、ITGB5、ITG
 B6、ITGB7、ITGB8、KAR、KIR、KISS1R、KIT、L6抗原、L
 AG3、LAIR1、LEPR、ルイスY、LGR4、LGR5、LGR6、LHCGR
 、LIFR、LIR、LMTK2、LMTK3、LPAR、LPHN、LTB4R、LT
 BR、LTK、リゾチーム、MAGE-1、MAGE-3、MAS1、MAS1L、MC
 1R、MC2R、MC3R、MC4R、MC5R、MCHR、MERTK、メソテリン、
 MET、MFG-E8、MIR、MIG、MLNR、MPL、MRGPRD、MRGPR
 E、MRGPRF、MRGPRG、MRGPRX1、MRGPRX2、MRGPRX3、
 MRGPRX4、MST1R、MTNR1、MUC1、MUC16、MUSK、NAIP
 、NCAM1、NGFR、NIP-cap、NKG2A、NKp46、NLRC、NLR
 P、NLRX1、NMBR、NMUR1、NMUR2、NOD1、NOD2、NPBWR
 1、NPBWR2、NPFFR、NPR1、NPR2、NPR3、NPSR1、NPY1
 R、NPY2R、NPY4R、NPY5R、NPY6R、NR0B1、NR0B2、NR
 1D1、NR1D2、NR1H2、NR1H3、NR1H4、NR1H5P、NR1I2
 、NR1I3、NR2C1、NR2C2、NR2E1、NR2E3、NR2F1、NR2
 F2、NR2F6、NR3C1、NR3C2、NR4A1、NR4A2、NR4A3、N

10

20

30

40

50

R5A1、NR5A2、NR6A1、NRP1、NRP2、NTRK、NTSR2、OGFR、OPR、OSMR、OX40、OX40L、OXER1、OXGR1、OXTR、P2RY、PD-1、PDGFR、PD-L1、PGR、PGRMC2、ホスファチジルセリン、PLAP、PLAUR、PLXN、PPAR、PRLHR、PRLR、PODXL、PROKR、PSCA、PSMA、PTAFR、PTGDR、PTGDS、PTGER、PTGFR、PTGIR、PTH1R、PTH2R、PTPR、QRFPR、RANK、RAR、RELT、RET、ROBO、ROR、ROS1、RXFP、RXR、RYK、S100A8、S100A9、SIPR、SCTR、SERPINB1、Siglec-F、SDC、SLAMF7、SMO、SORT1、SPOCK2、SSEA-1、SSTR、ST2、STYK1、SUCN1、TAAR、TACR、TAG72、TBXA2R、TEK、TGFR、THR、TIE1、TIGIT、TIM1、TIM2、TIM3、TIM4、TLR1、TLR10、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TNC、TNFRSF11A、TNFRSF11B、TNFRSF13B、TNFRSF14、TNFRSF17、TNFRSF19、TNFRSF1A、TNFRSF1B、TNFRSF21、TNFRSF25、TNFRSF6B、TPRA1、TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRAIL-R3、TRAIL-R4、TRHR、TSHR、TUBB3、TWEAKR、TYRO3、UTS2R、VCAM1、VDR、VEGFR、VEGFR2、VIPR1、VIPR2、VISTA、およびXCR1が挙げられる。

10

【0083】

20

腫瘍細胞抗原に対する抗体を調製する方法は当技術分野において公知であり、それとしては、ハイブリドーマベース法、ファージディスプレイベース法、および酵母ディスプレイが挙げられる。

【0084】

さらに、公知の方法により任意の腫瘍細胞抗原に対する新たな抗体を作出し、それにより生成された抗体を使用して本発明の免疫グロブリン融合タンパク質を作出することが可能である。

【0085】

免疫グロブリン融合タンパク質の特性

上記のとおり、免疫グロブリン融合タンパク質による任意のレベルのCD47結合が融合タンパク質の治療的使用について許容可能なレベルのままであるように、本発明の免疫グロブリン融合タンパク質は、疾患産生細胞、例えば、腫瘍細胞上のCD47に結合する能力を有する一方、正常細胞、特に赤血球 (red blood cell) (赤血球 (erythrocyte)) 上のCD47に結合せず、または少なくとも許容可能な低いレベルにおいて結合することが望まれる。

30

【0086】

したがって、本発明は、本発明の免疫グロブリン融合タンパク質を、赤血球 (red blood cell) (赤血球 (erythrocyte)) への対照の結合と比較した赤血球へのそれらの相対結合により特徴付けすることができることを企図する。エリスロサイトへの本発明の免疫グロブリン融合タンパク質の相対結合の試験の一例を、以下の実施例17に提供する。

40

【0087】

例えば、対照としてのCD47抗体への%赤血球結合の平均蛍光強度 (MFI) を同定するためにフローサイトメトリーのような技術を使用し、その値を100%に設定して、融合タンパク質の相対%赤血球結合MFIを計測することができる。一実施形態において、本発明の免疫グロブリン融合タンパク質は、100%において較正されたRBC MFIを有する対照抗体と比較して35%未満、30%未満、25%未満、20%未満、15%未満、10%未満、9%未満、8%未満、7%未満、6%未満、5%未満、4%未満、3%未満、2%未満、または1%未満の赤血球結合MFIを有する。他の実施形態において、本発明の免疫グロブリン融合タンパク質の%RBC MFIは、抗CD47抗体の%RBC MFIを100%において較正する場合、0~1%、0~2%、0~3%、0~

50

4 %、0 ~ 5 %、0 ~ 6 %、0 ~ 7 %、0 ~ 8 %、0 ~ 9 %、0 ~ 10 %、0 ~ 15 %、0 ~ 20 %、0 ~ 25 %、0 ~ 30 %、0 ~ 35 %、1 ~ 2 %、1 ~ 3 %、1 ~ 4 %、1 ~ 5 %、1 ~ 6 %、1 ~ 7 %、1 ~ 8 %、1 ~ 9 %、1 ~ 10 %、1 ~ 15 %、1 ~ 20 %、1 ~ 25 %、1 ~ 30 %、1 ~ 35 %、2 ~ 3 %、2 ~ 4 %、2 ~ 5 %、2 ~ 6 %、2 ~ 7 %、2 ~ 8 %、2 ~ 9 %、2 ~ 10 %、3 ~ 4 %、3 ~ 5 %、3 ~ 6 %、3 ~ 7 %、3 ~ 8 %、3 ~ 9 %、3 ~ 10 %、4 ~ 5 %、4 ~ 6 %、4 ~ 7 %、4 ~ 8 %、4 ~ 9 %、4 ~ 10 %、5 ~ 6 %、5 ~ 7 %、5 ~ 8 %、5 ~ 9 %、5 ~ 10 %、5 ~ 15 %、5 ~ 20 %、5 ~ 25 %、5 ~ 30 %、5 ~ 35 %、6 ~ 7 %、6 ~ 8 %、6 ~ 9 %、6 ~ 10 %、7 ~ 8 %、7 ~ 9 %、7 ~ 10 %、8 ~ 9 %、8 ~ 10 %、9 ~ 10 %、10 ~ 15 %、10 ~ 20 %、10 ~ 25 %、10 ~ 30 %、または10 ~ 35 %である。さらに別の実施形態において、本発明の免疫グロブリン融合タンパク質の% R B C M F I は、抗 C D 4 7 抗体の% R B C M F I を100 %において較正する場合、35 %以下、30 %以下、25 %以下、20 %以下、15 %以下、10 %以下、9 %以下、8 %以下、7 %以下、6 %以下、5 %以下、4 %以下、3 %以下、2 %以下、または1 %以下である。一実施形態において、対照として使用される抗 C D 4 7 抗体は、軽鎖および重鎖アミノ酸配列が表4に配列番号146（軽鎖）および配列番号148（重鎖）として見出される B 6 H 1 2 / h u I g G 1 である。融合タンパク質は、非赤血球上の C D 4 7 にも結合する。非赤血球は、一実施形態において、腫瘍細胞である。

10

【0088】

本発明はまた、本発明の融合タンパク質をそれらの赤血球凝集プロファイルに基づき同定する方法を企図する。赤血球に対する本発明の免疫グロブリン融合タンパク質の赤血球凝集を試験する一例を、以下の実施例18に提供する。

20

【0089】

融合タンパク質の使用

本明細書に開示の融合タンパク質は、種々の形態の癌を治療するために使用することができる。治療するために本発明の免疫グロブリン融合タンパク質を使用することができる癌の非限定的なリストとしては、副腎癌、肛門癌、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脳 / C N S、基底細胞皮膚癌、乳癌、原発不明癌、キャスルマン病、子宮頸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、食道癌、隆起性皮膚線維肉腫、ユーイング腫瘍ファミリー、眼癌、胆嚢癌、消化管カルチノイド腫瘍、消化管間質腫瘍 (G I S T)、胃癌、妊娠性絨毛性疾患、神経膠腫、膠芽細胞腫、頭頸部癌、ホジキン病、カボジ肉腫、腎臓癌、咽頭および下咽頭癌、白血病、急性リンパ球性白血病 (A L L)、急性骨髄性白血病 (A M L)、慢性リンパ球性白血病 (C L L)、慢性骨髄性白血病、慢性骨髄単球性白血病 (C M M L)、肝臓癌、肺癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、肺カルチノイド腫瘍、肝臓癌、リンパ腫、皮膚のリンパ腫、悪性中皮腫、メルケル細胞癌、黒色腫、多発性骨髄腫、骨髄腫、骨髄異形成症候群、鼻腔および副鼻腔癌、鼻咽腔癌、神経内分泌癌、神経芽細胞腫、非ホジキンリンパ腫、口腔および口腔咽頭癌、骨肉腫、卵巣癌、膵臓癌、陰茎癌、下垂体癌、前立腺癌、腎臓癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、唾液腺癌、肉腫、肉腫 - 成人軟部肉腫、扁平上皮皮膚癌、小腸癌、胃癌、精巣癌、胸腺癌、甲状腺癌、子宮癌、子宮肉腫、陰癌、外陰癌、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、およびウィルムス腫瘍が挙げられる。

30

40

【0090】

癌細胞を、治療有効量の融合タンパク質に曝露させて癌細胞の増殖を阻害する。一部の実施形態において、融合タンパク質は、癌細胞増殖を少なくとも40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、95 %、98 %、99 %、または100 %だけ阻害する。

【0091】

一部の実施形態において、融合タンパク質を治療法において使用する。例えば、融合タンパク質を使用して哺乳動物（例えば、ヒト患者）における腫瘍成長を阻害することができる。一部の実施形態において、哺乳動物における腫瘍成長を阻害するための融合タンパク質の使用は、哺乳動物に治療有効量の融合タンパク質を投与することを含む。他の実施形態において、融合タンパク質は、腫瘍細胞の増殖を阻害するために使用することができ

50

る。

【0092】

本明細書において使用される「治療する」、「治療すること」、および「治療」は、哺乳動物における、例えば、ヒトにおける疾患の治療を意味する。これとしては、(a)疾患を阻害すること、すなわち、その発症を停止させること；および(b)疾患を緩和させること、すなわち、病状の退行を引き起こすことが挙げられる。

【0093】

一般に、治療有効量の活性構成要素は、 $0.1\text{ mg/kg} \sim 100\text{ mg/kg}$ 、例えば、 $1\text{ mg/kg} \sim 100\text{ mg/kg}$ 、例えば、 $1\text{ mg/kg} \sim 10\text{ mg/kg}$ の範囲内である。投与される量は、可変要素、例えば、治療すべき疾患または適応症のタイプおよび程度、患者の一般的健康状態、抗体のインビボ効能、医薬配合物、ならびに投与経路に依存する。初回投与量を上限レベルを超えて増加させて所望の血中レベルまたは組織レベルを急速に達成することができる。あるいは、初回投与量は、最適用量よりも少なくてもよく、投与量は、治療過程の間に徐々に増加させることができる。最適用量は、定型的な実験により決定することができる。非経口投与について、 $0.1\text{ mg/kg} \sim 100\text{ mg/kg}$ の間、あるいは $0.5\text{ mg/kg} \sim 50\text{ mg/kg}$ の間、あるいは $1\text{ mg/kg} \sim 25\text{ mg/kg}$ の間、あるいは $2\text{ mg/kg} \sim 10\text{ mg/kg}$ の間、あるいは $5\text{ mg/kg} \sim 10\text{ mg/kg}$ の間の用量を投与し、例えば、治療サイクル当たり週1回、隔週1回、3週1回、または月1回で与えることができる。

【0094】

治療的使用のため、本発明の融合タンパク質を、好ましくは、薬学的に許容可能な担体と組み合わせる。本明細書において使用される「薬学的に許容可能な担体」は、過度の毒性も刺激もアレルギー応答も他の問題も合併症もなしで妥当な利益/リスク比に見合うヒトおよび動物の組織との接触における使用に好適な緩衝液、担体、および賦形剤を意味する。担体は、配合物の他の成分と適合性であり、レシピエントに有害でないという意味で「許容可能」であるべきである。薬学的に許容可能な担体としては、医薬投与と適合性である緩衝液、溶媒、分散媒、コーティング、等張および吸収遅延剤などが挙げられる。薬学的に活性な物質のためのこのような媒体および薬剤の使用は、当技術分野において公知である。

【0095】

融合タンパク質、例えば、本明細書に開示のものを含有する医薬組成物は、単位剤形で提供することができ、任意の好適な方法により調製することができる。医薬組成物は、その意図される投与経路と適合性であるように配合すべきである。投与経路の例は、静脈内(IV)、皮内、吸入、経皮、局所、経粘膜、および直腸投与である。医薬組成物は、治療的治療のための非経口、鼻腔内、局所、経口、または例えば、経皮手段による外用投与を目的とする。医薬組成物は、非経口的に(例えば、静脈内、筋肉内、または皮下注射により)、または経口摂取により、または血管もしくは癌病態を発症した区域における局所施与もしくは関節内注射により投与することができる。追加の投与経路としては、血管内、動脈内、腫瘍内、腹腔内、脳室内、硬膜外内(intraepidural)、ならびに鼻腔内、眼内、強膜内、眼窩内、直腸、局所、またはエアロゾル吸入投与が挙げられる。

【0096】

本発明は、許容可能な担体、好ましくは、水性担体、例えば、水、緩衝水、生理食塩水、PBS中などで溶解または懸濁された上記薬剤を含む非経口投与のための組成物を提供する。組成物は、生理学的条件に近似させるために要求される薬学的に許容可能な助剤物質、例えば、pH調整および緩衝剤、張度調整剤、湿潤剤、洗浄剤などを含有し得る。本発明はまた、錠剤、カプセル剤などの配合のための不活性成分、例えば、結合剤または増量剤を含有し得る経口送達のための組成物を提供する。さらに、本発明は、クリーム剤、軟膏剤などの配合のための不活性成分、例えば、溶媒または乳化剤を含有し得る外用投与のための組成物を提供する。

【0097】

融合タンパク質の好ましい投与経路は、I V 注入である。有用な配合物は、薬学分野において周知の方法により調製することができる。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed. (Mack Publishing Company, 1990) 参照。非経口投与に好適な配合物構成要素としては、無菌希釈剤、例えば、注射用水、生理食塩水、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒；抗菌剤、例えば、ベンジルアルコールまたはメチルパラベン；酸化防止剤、例えば、アスコルビン酸または重亜硫酸ナトリウム；キレート剤、例えば、EDTA；緩衝液、例えば、酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩；および張度調整のための薬剤、例えば、塩化ナトリウムまたはデキストロースが挙げられる。

【0098】

10

静脈内投与について、好適な担体としては、生理食塩水、静菌水、Cremophor EL (商標) (BASF, Parsippany, NJ) またはリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) が挙げられる。担体は、製造および貯蔵の条件下で安定であるべきであり、微生物に対して保存すべきである。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール (例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体プロピレングリコール)、およびそれらの好適な混合物を含有する溶媒または分散媒であり得る。

【0099】

医薬配合物は、好ましくは、無菌である。滅菌は、例えば、滅菌濾過膜を介する濾過により達成することができる。組成物を凍結乾燥する場合、フィルタ滅菌は、凍結乾燥および再構成の前または後に実施することができる。水溶液は、即時使用のために包装し、または凍結乾燥し、凍結乾燥調製物は、投与前に無菌水性担体と組み合わせる。調製物の pH は、典型的には、3 ~ 11 の間、より好ましくは、5 ~ 9 の間または 6 ~ 8 の間、最も好ましくは、7 ~ 8 の間、例えば、7 ~ 7.5 である。固体形態で得られる組成物は、固定量の上記の 1 つまたは複数の薬剤をそれぞれ含有する複数の単一用量単位で、例えば、錠剤またはカプセル剤の密封包装で包装することができる。

20

【0100】

融合タンパク質産生

本発明の免疫グロブリン融合タンパク質は、一般に、融合タンパク質を発現するように遺伝子操作された 1 つまたは複数の核酸を含有する哺乳動物細胞を使用して組換えにより産生する。本発明の免疫グロブリン融合タンパク質が、融合タンパク質のアセンブリのために 2 つ以上の発現させるべきポリペプチド鎖を要求する場合、本発明は、ポリペプチド鎖のそれぞれをコードする核酸を 1 つまたは複数の細胞内に含有させて免疫グロブリン融合タンパク質の組換え産生を容易にすることを企図する。例えば、一実施形態において、核酸は、本発明の免疫グロブリン融合タンパク質の重鎖またはその一部をコードする一方、別の核酸は、本発明の免疫グロブリン融合タンパク質の軽鎖またはその一部をコードする。重鎖もしくはその一部をコードする核酸または軽鎖もしくはその一部をコードする核酸のいずれかは、CD47 結合部分、例えば、本明細書に記載の SIRP 部分をコードする核酸配列も含む。さらなる実施形態において、細胞は、本発明の免疫グロブリン融合タンパク質の重鎖またはその一部をコードする核酸を含有し、本発明の免疫グロブリン融合タンパク質の軽鎖またはその一部をコードする核酸を含有する。本発明の免疫グロブリン融合タンパク質の重鎖もしくはその一部をコードする核酸またはその軽鎖もしくはその一部をコードする核酸のいずれかは、CD47 結合部分、例えば、本明細書に記載の SIRP 部分をコードする核酸も含有する。

30

40

【0101】

融合タンパク質発現および産生の例示的方法を、例えば、以下の実施例 2 および 4 に記載するが、広範な好適なベクター、細胞系およびタンパク質産生法を使用して生物医薬を産生し、本発明の融合タンパク質の合成において使用することができた。このような方法は当業者の知識の範囲内である。

【実施例】

【0102】

50

実施例

実施例 1 : カニクイザルにおける赤血球に対する抗 C D 4 7 B 6 H 1 2 の効果

赤血球 (R B C) に対する抗 C D 4 7 B 6 H 1 2 モノクローナル抗体 (キメラ B 6 H 1 2 - ヒト I g G 4 (Lindberg et al, JBC 269:1567, 1994) のインビボ効果を、カニクイザルにおいて評価した。3匹のサルは、それぞれ 1 2 m g / k g における B 6 H 1 2 の単一静脈内投与を 0 日目に受けた。血液試料を - 1 0 (ベースラインレベルを得るために注射 1 0 日前)、R B C カウントおよびヘマトクリット (H C T) 決定のために単一静脈内投与の 0、1、3、5 および 7 日後に採取した。図 2 A ~ B は、5 日目までの $5 \cdot 8 \times 10^9$ 個から $3 \cdot 7 \times 10^9$ 個の R B C / m L への赤血球の強力な低減、すなわち、40 % の減少 (図 2 A) が、ヘマトクリットレベルの対応する低減 (図 2 B) と一緒に存在したことを示す。したがって、抗 C D 4 7 抗体による処理は、重症貧血をもたらす得る。

10

【 0 1 0 3 】

実施例 2 : 抗 C D 2 0 - h u I g G 1 - S I R P 免疫グロブリン融合タンパク質 2 (A) 抗 C D 2 0 - h u I g G 1 - S I R P の構築および発現

例示的な抗 C D 2 0 - h u I g G 1 - S I R P の生成は、抗 C D 2 0 2 B 8 (リツキシマブ) モノクローナル抗体 (Reff et al, Blood 83:435, 1994) および S I R P タンパク質 (Jiang et al, JBC 274: 559, 1999) をベースとする。2 B 8 についての F a b 軽鎖の D N A およびタンパク質配列を、それぞれ配列番号 1 および配列番号 2 に提供する。2 B 8 についての F a b 重鎖の D N A およびタンパク質配列を、それぞれ配列番号 3 および配列番号 4 に提供する。S I R P アレル V 1 の D N A およびタンパク質配列を、それぞれ配列番号 5 および配列番号 6 に提供する。S I R P アレル V 2 の I g V ドメインの D N A およびタンパク質配列を、それぞれ配列番号 7 および配列番号 8 に提供する。抗 C D 2 0 - h u I g G 1 - S I R P V 2 は、抗 C D 2 0 重鎖ポリペプチドの C 末端を、S I R P V 2 の I g V ドメインに (G 4 S) ₄ リンカーを介して結合させることにより生成した。

20

【 0 1 0 4 】

抗 C D 2 0 - h u I g G 1 - S I R P V 2 の発現のため、図 1 A におけるように以下の 2 つの遺伝子構築物を標準的な組換え D N A 技術によりアセンブルし、哺乳動物発現ベクター p T T 5 (分泌のためのマウス軽鎖シグナルペプチド配列を含有) 中にクローニングした : (1) 以下のエレメント : 抗 C D 2 0 重鎖可変ドメイン、それに続くヒト重鎖定常ドメイン 1 ~ 3 アイソタイプ I g G 1、それに続く (G 4 S) ₄ リンカーおよび S I R P V 2 をコードする構築物 V H (抗 C D 2 0) - C H 1 - H - C H 2 - C H 3 - (G 4 S) ₄ - S I R P V 2 (配列番号 1 1) ならびに (2) 抗 C D 2 0 軽鎖可変ドメイン、それに続くヒトカッパ軽鎖定常ドメインをコードする構築物 V L (抗 C D 2 0) - C L (配列番号 1)。これら 2 つの例示的構築物についての対応するアミノ酸配列を、それぞれ配列番号 1 2 および配列番号 2 に示す。

30

【 0 1 0 5 】

抗 C D 2 0 - h u I g G 1 - S I R P V 2 発現のための 2 つのベクターのセットを、Expi293細胞中にExpi293fectin (Life Technologies, Grand Island, NY) を使用して一過的に同時形質移入した。タンパク質を、プロテイン A 親和性クロマトグラフィーによる単一ステップで精製した。2つのポリペプチドの発現および完全四量体分子のアセンブリを、S D S - P A G E および S E C 上で確認した。S D S - P A G E のため、精製タンパク質試料を D T T により還元し、NuPAGE MES 4-12% Gel 上で 2 0 0 V において 3 5 分間ランさせ、次いでクーマシー染色した。ゲル上の 2 つの主要バンドは、予測 MW および正確な化学量論比を > 9 5 % 純度で有した (図 3 A)。図 3 A において、レーン 1 は分子量 (M W) マーカーを示し、レーン 2 は予測 MW (6 3 , 2 3 k D a) および抗 C D 2 0 - h u I g G 1 - S I R P V 2 の 2 つのポリペプチドの正確な化学量論比 (1 : 1) を示す。S E C のため、精製タンパク質試料を、5 0 m M のリン酸ナトリウム、4 0 0 m M の過塩素酸ナトリウム、p H 6 . 3 + 0 . 1 および 3 8 + 2 . 0 m S / c m ² により平衡化された TSK-GEL Super SW3000 S E C カラム 4 . 6 x 3 0 0 m m (Tosoh Biosciences、東京、

40

50

日本)上で分析した。サイズ排除クロマトグラフィーは、単量体抗CD20-huIgG1-SIRPV2についての約172kDaの予測MWにおけるピークを示した(図3B)。

【0106】

さらに、標準的なモノクローナル抗体フォーマットの抗CD20および抗CD47(抗CD20huIgG1および抗CD47huIgG1)ならびにFc融合タンパク質フォーマットのSIRPV2(Fc-SIRPV2)(図1C)を対照として生成して抗CD20-huIgG1-SIRPV2フォーマットと比較した。

【0107】

2(B)(i)細胞上で発現されたCD47への抗CD20-huIgG1-SIRPV2の結合 10

細胞表面上で発現されたCD47に結合する抗CD20-huIgG1-SIRPV2の能力を計測し、対照分子と比較した。CD47により形質移入されたウェル当たり 2×10^5 個のチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞を、PBS+1%のFBS中で希釈された変動濃度のタンパク質と96ウェルプレート中で氷上で60分間インキュベートした。PBS+1%のFBSにより洗浄した後、細胞を、PBS+1%のFBS中で1:200希釈されたFITC-F(ab')₂ヤギ抗ヒトIgG、Fc(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)と氷上で60分間インキュベートした。再度洗浄した後、細胞をPBS中1%のホルムアルデヒドにより固定した。細胞をフローサイトメトリー(MACSQuant, Miltenyi Biotec, Cologne, Germany)により分析した。 20

【0108】

結果は、抗CD20-huIgG1-SIRPV2、抗CD47、SIRPV2-FcおよびFc-SIRPV2がCD47形質移入CHO細胞上で発現されたCD47に結合したが、CD20は発現されないため抗CD20が結合しなかったことを示す(図4A)。Fc-SIRPV2および抗CD47は類似のEC50(7~8nM)で結合したが、SIRPV2-Fcはより良好に結合した(EC50=3nM)。しかしながら、蛍光中央値は、抗CD47について最大であり、次いでSIRPV2-Fcであり、Fc-SIRPV2および抗CD20-huIgG1-SIRPV2については最小であった。

【0109】

血球の細胞表面上で発現されたCD47に結合する抗CD20-huIgG1-SIRPV2の能力を計測し、対照分子と比較した。健常ヒトドナーからの新鮮全血をデキストラン沈殿により白血球について濃縮し、PBS+1%のFBSにより洗浄した。ウェル当たり 2×10^5 個の白血球濃縮ヒト全血細胞を、PBS+1%のFBS中で希釈された50μg/mlのタンパク質と96ウェルプレート中で氷上で60分間インキュベートした。PBS+1%のFBSにより洗浄した後、タンパク質検出およびフローサイトメトリーによる細胞ソーティングのために細胞をPBS+1%のFBS中1:200希釈のFITC-F(ab')₂ヤギ抗ヒトIgG、Fc(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)、1:100希釈のPEマウス抗ヒトCD235a(BD Biosciences, San Jose, CA)、および1:100希釈のeFluor450マウス抗ヒトCD45(eBioscience, San Diego, CA)と氷上で60分間インキュベートした。再度洗浄した後、細胞をPBS中1%のホルムアルデヒドにより固定した。細胞をフローサイトメトリー(MACSQuant, Miltenyi Biotec, Cologne, Germany)により分析した。 40

【0110】

結果は、抗CD47が赤血球および白血球上で発現されたCD47に結合したが、抗CD20-huIgG1-SIRPV2、SIRPV2-FcおよびFc-SIRPV2が白血球上で発現されたCD47にのみ結合し、赤血球上で発現されたCD47に結合しなかったことを示す(図4B)。

【0111】

2(B)(ii)細胞上で発現された両方の抗原への結合による抗CD20-huIgG 50

1 - S I R P のアビディティの実証

C D 2 0 を過剰発現し、C D 4 7 を発現するヒト R a m o s B 細胞リンパ腫細胞、および C D 4 7 を過剰発現し、C D 2 0 を発現するヒト N a m a l w a B 細胞リンパ腫細胞上で、細胞表面上の C D 2 0 および C D 4 7 への抗 C D 2 0 - h u I g G 1 - S I R P V 2 の結合を計測した。ウェル当たり 2×10^5 個の R a j i または N a m a l w a 細胞を、P B S + 1 % の F B S 中で希釈された変動濃度のタンパク質と 9 6 ウェルプレート中で氷上で 6 0 分間インキュベートした。P B S + 1 % の F B S により洗浄した後、細胞を、P B S + 1 % の F B S 中で 1 : 2 0 0 希釈された F I T C F (a b ') 2 ヤギ抗ヒト I g G、F c (J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h , W e s t G r o v e , P A) と氷上で 6 0 分間インキュベートした。再度洗浄した後、細胞をフローサイトメトリー (M A C S Q u a n t , M i l t e n y i B i o t e c , C o l o g n e , G e r m a n y) により分析した。

【 0 1 1 2 】

結果は、R a j i および N a m a l w a 細胞の両方への抗 C D 2 0 - h u I g G 1 - S I R P V 2 結合が、対照分子と比較していくぶん向上したことを示し (図 4 C ~ D)、アビディティ効果を示唆する。フルオロフォア標識が C D 4 7 への S I R P の結合を停止させたため、結合を抗 F c 検出によりアッセイした。しかしながら、C 末端に付着している追加のタンパク質部分を有する F c 領域への抗 F c 結合が、追加部分を有さない同一の F c 領域と比較して縮小することが細胞結合アッセイにおいて既に見出されており (データ示さず)、理論により拘束されるものではないが、F c 融合タンパク質への抗 F c 結合がそれに関して立体障害を受け得ることを示唆する。したがって、抗 F c による抗 C D 2 0 - h u I g G 1 - S I R P V 2 および抗 C D 2 0 の類似結合の観察は、抗 C D 2 0 - h u I g G 1 - S I R P V 2 細胞結合の量を過小評価する可能性が高く、実際、細胞への抗 C D 2 0 - h u I g G 1 - S I R P V 2 結合についてのアビディティ効果を示唆する。同一細胞上の 2 つの腫瘍標的への結合により腫瘍細胞への結合のアビディティを利用する抗 C D 2 0 - h u I g G 1 - S I R P V 2 の能力は、より特異的な標的化およびより少ないインビボ副作用をもたらし得る。

【 0 1 1 3 】

実施例 3 : 抗 C D 2 0 / 抗 C D 4 7 二重特異的抗体

3 (A) 抗 C D 2 0 / 抗 C D 4 7 の説明

C D 2 0 および C D 4 7 に対する例示的な四価二重特異的抗体 (T e t B i A b) の生成は、抗 C D 2 0 2 B 8 (リツキシマブ) モノクローナル抗体 (R e f f e t a l , B l o o d 83 : 435, 1994) および抗 C D 4 7 B 6 H 1 2 モノクローナル抗体 (L i n d b e r g e t a l , J B C 269 : 1567, 1994) をベースとする。C D 2 0 および C D 4 7 に対する抗 C D 2 0 / 抗 C D 4 7 T e t B i A b において、抗 C D 2 0 重鎖ポリペプチドの C 末端は、抗 C D 4 7 F a b 軽鎖の N 末端に G 4 S リンカーを介して結合している (図 1 D + E)。抗 C D 2 0 / 抗 C D 4 7 の構築、発現、および結合特性は、国際特許出願公開の国際公開第 2 0 1 4 / 1 4 4 3 5 7 号に記載されている。

【 0 1 1 4 】

3 (B) 抗 C D 2 0 / 抗 C D 4 7 のインビボ生物学的活性

抗 C D 2 0 - h u I g G 1 - S I R P のための代用物としての抗 C D 2 0 / 抗 C D 4 7 の有用性は、以下のインビボ実験により示された。播種性リンパ腫モデル S C I D マウスに、 5×10^6 個の C D 2 0 + ヒト D a u d i リンパ腫細胞または 1×10^6 個の C D 2 0 + ヒト R a j i リンパ腫細胞のいずれかを静脈内注射し、次いで $25 \mu g$ / マウスの抗体アイソタイプ対照、 $25 \mu g$ / マウスの抗 C D 2 0、 $25 \mu g$ / マウスの抗 C D 4 7、または等モル量の四価二重特異的抗体である $42 \mu g$ / マウスの抗 C D 2 0 / 抗 C D 4 7 を腹腔内注射した。全ての群 ($n = 10 \sim 11$) は、週 2 回の処理を 3 週間受け、結果を一般的健康状態、例えば、死亡前に 10 ~ 14 日だけ生じる麻痺、およびマウスの生存率として報告した。抗 C D 2 0 / 抗 C D 4 7 四価二重特異的抗体による処理は、D a u d i (図 5 A) および R a j i (図 5 B) 腫瘍モデルの両方で 2 つの単独療法よりも優れていることが見出された。類似の結果が、抗 C D 2 0 - h u I g G 1 - S I R P について予測される。

【0115】

実施例4：抗EGFR-huIgG1-SIRP 免疫グロブリン融合タンパク質

4(A) 抗EGFR-huIgG1-SIRP の構築および発現

例示的な抗EGFR-huIgG1-SIRP の生成は、抗EGFR C225 (セツキシマブ) モノクローナル抗体 (Kawamoto, PNAS 80:1337, 1983) およびSIRP タンパク質 (Jiang et al, JBC 274: 559, 1999) をベースとする。C225についてのFab軽鎖のDNAおよびタンパク質配列を、それぞれ配列番号13および配列番号14に提供する。C225についてのFab重鎖のDNAおよびタンパク質配列を、それぞれ配列番号15および配列番号16に提供する。SIRP アレルV1のDNAおよびタンパク質配列を、それぞれ配列番号5および配列番号6に提供する。SIRP アレルV2のIgVドメインのDNAおよびタンパク質配列を、それぞれ配列番号7および配列番号8に提供する。例示的な抗EGFR-huIgG1-SIRP V1は、抗EGFR重鎖ポリペプチドのC末端を、SIRP V1のIgVドメインに(G4S)₄ リンカーを介して結合させることにより生成した。例示的な抗EGFR-huIgG1-SIRP V2は、抗EGFR重鎖ポリペプチドのC末端を、SIRP V2のIgVドメインに(G4S)₃、(G4S)₄、または(G4S)₅ リンカーを介して結合させることにより生成した。

10

【0116】

抗EGFR-huIgG1-SIRP V1の発現のため、図1Aにおけるように以下の2つの遺伝子構築物を標準的な組換えDNA技術によりアセンブルし、哺乳動物発現ベクターpTT5 (分泌のためのマウス軽鎖シグナルペプチド配列を含有) 中にクローニングした：(1) 以下のエレメント：抗EGFR重鎖可変ドメイン、それに続くヒト重鎖定常ドメイン1~3アイソタイプIgG1、それに続く(G4S)₄ リンカーおよびSIRP V1のIgVドメインをコードする構築物VH (抗EGFR) - CH1 - H - CH2 - CH3 - (G4S)₄ - SIRP V1 (配列番号17) ならびに(2) 抗EGFR軽鎖可変ドメイン、それに続くヒトカッパ軽鎖定常ドメインをコードする構築物VL (抗EGFR) - CL (配列番号13)。これら2つの構築物についての対応するアミノ酸配列を、それぞれ配列番号18および配列番号14に示す。

20

【0117】

変動リンカー長さを有する抗EGFR-huIgG1-SIRP V2の発現のため、図1Aにおけるように以下の4つの遺伝子構築物を標準的な組換えDNA技術によりアセンブルし、哺乳動物発現ベクターpTT5 (分泌のためのマウス軽鎖シグナルペプチド配列を含有) 中にクローニングした：(1) 以下のエレメント：抗EGFR重鎖可変ドメイン、それに続くヒト重鎖定常ドメイン1~3アイソタイプIgG1、それに続く(G4S)₃ リンカーおよびSIRP V2のIgVドメインをコードする構築物VH (抗EGFR) - CH1 - H - CH2 - CH3 - (G4S)₃ - SIRP V2 (配列番号69)、(2) 以下のエレメント：抗EGFR重鎖可変ドメイン、それに続くヒト重鎖定常ドメイン1~3アイソタイプIgG1、それに続く(G4S)₄ リンカーおよびSIRP V2のIgVドメインをコードする構築物VH (抗EGFR) - CH1 - H - CH2 - CH3 - (G4S)₄ - SIRP V2 (配列番号19)、(3) 以下のエレメント：抗EGFR重鎖可変ドメイン、それに続くヒト重鎖定常ドメイン1~3アイソタイプIgG1、それに続く(G4S)₅ リンカーおよびSIRP V2のIgVドメインをコードする構築物VH (抗EGFR) - CH1 - H - CH2 - CH3 - (G4S)₅ - SIRP V2 (配列番号71)、ならびに(4) 以下のエレメント：抗EGFR軽鎖可変ドメイン、それに続くヒトカッパ軽鎖定常ドメインをコードする構築物VL (抗EGFR) - CL (配列番号13)。これら4つの構築物についての対応するアミノ酸配列を、それぞれ配列番号70、20、72および配列番号14に示す。

30

40

【0118】

抗EGFR-huIgG1-SIRP V2発現のための2つのベクターのそれぞれのセットを、Expi293細胞中にExpi293fectin (Life Technologies, Grand Island, NY) を使

50

用して一過的に同時形質移入した。タンパク質を、プロテイン A 親和性クロマトグラフィーによる単一ステップで精製した。2つのポリペプチドの発現および完全四量体分子のアセンブリを、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) およびサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 上で確認した。SDS-PAGE のため、精製タンパク質試料を DTT により還元し、NuPAGE MES 4-12% Gel 上で 200 V において 35 分間ランさせ、次いでクーマシー染色した。ゲル上の 2つの主要バンドは、予測分子量 (MW) および正確な化学量論比を > 95 % 純度で有した (図 6 A)。図 6 A において、レーン 1 は分子量 (MW) マーカーを示し、レーン 2 は予測 MW (64, 23 kDa) および抗 EGFR - hu IgG1 - SIRP V1 の 2つのポリペプチドの正確な化学量論比 (1 : 1) を示し、レーン 3 は予測 MW (64, 23 kDa) および抗 EGFR - hu IgG1 - (G4S)₃ - SIRP V2 の 2つのポリペプチドの正確な化学量論比 (1 : 1) を示し、レーン 4 は予測 MW (64, 23 kDa) および抗 EGFR - hu IgG1 - (G4S)₄ - SIRP V2 の 2つのポリペプチドの正確な化学量論比 (1 : 1) を示し、レーン 5 は予測 MW (64, 23 kDa) および抗 EGFR - hu IgG1 - (G4S)₅ - SIRP V2 の 2つのポリペプチドの正確な化学量論比 (1 : 1) を示す。SEC のため、精製タンパク質試料を、50 mM のリン酸ナトリウム、400 mM の過塩素酸ナトリウム、pH 6.3 ± 0.1 および 38 ± 2.0 mS / cm² により平衡化された TSK-GEL Super SW3000 SEC カラム 4.6 × 300 mm (Tosoh Bioscience s、東京、日本) 上で分析した。サイズ排除クロマトグラフィーは、単量体抗 EGFR - hu IgG1 - SIRP タンパク質のそれぞれについての約 173 kDa の予測 MW におけるピークを示した (図 6 B (i) ~ (iv))。

【0119】

さらに、標準的なモノクローナル抗体フォーマットの抗 EGFR および抗 CD47 (抗 EGFR hu IgG1 および抗 CD47 hu IgG1) ならびに Fc 融合タンパク質フォーマットの SIRP (SIRP V2 - Fc、Fc - SIRP V2、および Fc - SIRP V2 CC) (図 1 C) を対照として生成して抗 EGFR - hu IgG1 - SIRP フォーマットと比較した。Fc - SIRP V2 CC は、SIRP ECD 部分が、アレル V1 の IgC ドメインに連結されているアレル V2 の IgV ドメインを有する Fc 融合タンパク質である (配列番号 192)。

【0120】

4 (B) (1) 細胞上で発現された CD47 への抗 EGFR - hu IgG1 - SIRP の結合

細胞表面上で過剰発現された CD47 に結合する例示的な抗 EGFR - hu IgG1 - SIRP の能力を計測し、対照分子と比較した。CD47 により形質移入されたウェル当たり 2×10^5 個の CHO 細胞を、PBS + 1 % の FBS 中で希釈された変動濃度の抗体と 96 ウェルプレート中で氷上で 60 分間インキュベートした。PBS + 1 % の FBS により洗浄した後、細胞を、PBS + 1 % の FBS 中で 1 : 200 希釈された FITC F(ab')₂ ヤギ抗ヒト IgG、Fc (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) と氷上で 60 分間インキュベートした。再度洗浄した後、細胞を PBS 中 1 % のホルムアルデヒドにより固定した。細胞をフローサイトメトリー (MACSQuant, Miltenyi Biotec, Cologne, Germany) により分析した。

【0121】

結果は、抗 EGFR - hu IgG1 - SIRP タンパク質、抗 CD47、SIRP - Fc V2 および Fc - SIRP V2 が CD47 形質移入 CHO 細胞上で発現された CD47 に結合したが、EGFR は発現されないため抗 EGFR が結合しなかったことを示す (図 7 A)。抗 EGFR - hu IgG1 - hu SIRP V2 は、CHO 細胞上で発現された CD47 に、抗 EGFR - hu IgG1 - hu SIRP V1 よりも良好に結合した。Fc および SIRP 間のリンカーの長さによっては、細胞上で発現された CD47 についての SIRP の親和性は変化しなかった。SIRP - Fc V2 は CD47 形質移入 CHO 細胞上で発現された CD47 に、Fc - SIRP V2 よりも良好に結合し、

それは Fc - S I R P V 2 C C よりも良好に結合したことも見出された（データ示さず）。

【 0 1 2 2 】

血球の細胞表面上で発現された C D 4 7 に結合する例示的な抗 E G F R - h u I g G 1 - S I R P の能力を計測し、対照分子と比較した。健康ヒトドナーからの新鮮全血をデキストラン沈殿により白血球について濃縮し、P B S + 1 % の F B S により洗浄した。ウェル当たり 2×10^5 個の白血球濃縮ヒト全血細胞を、P B S + 1 % の F B S 中で希釈された $50 \mu\text{g} / \text{ml}$ のタンパク質と 96 ウェルプレート中で氷上で 60 分間インキュベートした。P B S + 1 % の F B S により洗浄した後、タンパク質検出およびフローサイトメトリーによる細胞ソーティングのために細胞を P B S + 1 % の F B S 中 1 : 200 希釈の F I T C F (a b ') 2 ヤギ抗ヒト I g G、Fc (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)、1 : 100 希釈の P E マウス抗ヒト C D 2 3 5 a (BD Biosciences, San Jose, CA)、および 1 : 100 希釈の e F l u o r 4 5 0 マウス抗ヒト C D 4 5 (eBioscience, San Diego, CA) と氷上で 60 分間インキュベートした。再度洗浄した後、細胞を P B S 中 1 % のホルムアルデヒドにより固定した。細胞をフローサイトメトリー (MACSQuant, Miltenyi Biotec, Cologne, Germany) により分析した。

10

【 0 1 2 3 】

結果は、抗 C D 4 7 が赤血球および白血球上で発現された C D 4 7 に結合したが、抗 E G F R - h u I g G 1 - S I R P V 2、S I R P - F c および Fc - S I R P が白血球上で発現された C D 4 7 にのみ結合し、赤血球上で発現された C D 4 7 に結合しなかったことを示す (図 7 B) 。

20

【 0 1 2 4 】

4 (B) (i i) 細胞上で発現された両方の抗原への結合による抗 E G F R - h u I g G 1 - S I R P のアビディティの実証

E G F R を過剰発現し、C D 4 7 を発現するヒト A 5 4 9 扁平上皮癌細胞上で、細胞表面上の E G F R および C D 4 7 にアビディティにより結合する例示的な抗 E G F R - h u I g G 1 - S I R P の能力を計測した。ウェル当たり 2×10^5 個の A 5 4 9 細胞を、P B S + 1 % の F B S 中で希釈された変動濃度の抗体と 96 ウェルプレート中で氷上で 60 分間インキュベートした。P B S + 1 % の F B S により洗浄した後、細胞を、P B S + 1 % の F B S 中で 1 : 200 希釈された F I T C F (a b ') 2 ヤギ抗ヒト I g G、Fc (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) と氷上で 60 分間インキュベートした。細胞をフローサイトメトリー (MACSQuant, Miltenyi Biotec, Cologne, Germany) により分析した。

30

【 0 1 2 5 】

結果は、A 5 4 9 細胞への抗 E G F R - h u I g G 1 - S I R P V 2 の結合が、抗 E G F R のものと類似したことを示す (図 7 C) 。抗 Fc 検出は、追加の C 末端部分を有する Fc 融合タンパク質の細胞への結合を過小評価する可能性が高いため (実施例 2 B (i i) に記載のとおり)、抗 E G F R - h u I g G 1 - S I R P および抗 E G F R の類似結合の観察は、細胞への抗 E G F R - h u I g G 1 - S I R P 結合についてのそのアビディティ効果を示唆する。C H O 細胞上で発現された C D 4 7 への結合とは対照的に、A 5 4 9 腫瘍細胞上の内因性 C D 4 7 への抗 C D 4 7 の結合が、S I R P - F c よりもかなり良好であり、次いでそれは Fc - S I R P よりもかなり良好であったことは、注目に値する。さらに、理論により拘束されるものではないが、アビディティは、向上したインビトロ A D C C (図 8) および向上したインビボ抗腫瘍活性 (図 9 B) の両方に関して観察される抗 E G F R と比較して増加した抗 E G F R - h u I g G 1 - S I R P V 2 融合タンパク質の生物学的活性に寄与する可能性が高い。同一細胞上の 2 つの腫瘍標的への結合により腫瘍細胞への結合のアビディティを利用する抗 E G F R - h u I g G 1 - S I R P の能力は、より特異的な標的化およびより少ないインビボ副作用をもたらし得る。

40

【 0 1 2 6 】

4 (C) 抗 E G F R - h u I g G 1 - S I R P の薬物動態分析

50

抗EGFR-huIgG1-SIRPの薬物動態分析をマウス中への注射後に計測し、対照分子と比較した。Charles River Laboratoriesからの36匹の健常雌C57BL/6マウス(8週齢)を少なくとも3日間馴化させた。分子のそれぞれについての2つの投与レベル(単一IVボラス)をマウスに100 μ L/マウス(マウス当たり20もしくは200 μ g、または約1もしくは10mg/kgに相当)の容量で与えた。投与日、36匹のマウスを6つの群に無作為に割り付け(N=6/群)、それぞれの群は1用量/1分子をマウス尾静脈を介して静脈内でそれぞれ受けた。マウス体重を記録した。同一用量/物品(N=6)を受けたマウスを、2つの下位群(n=3)にさらに分類した。4回の採血をそれぞれの下位群から行い、すなわち、ある下位群は、1時間、24時間、72時間および168時間である一方、別の下位群は7時間、48時間、120時間および240時間であった。示される時点において、ヘパリン化マイクロガラスキャピラリーを使用して少量の血液試料を採取し、凝固防止のためにヘパリンによりコートされたチューブ中で回収した。細胞を除去するための遠心分離後、血漿中のタンパク質の濃度をELISAにより決定し、抗ヒトIgG H+L (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) による捕捉によりアッセイし、次いで抗EGFR-huIgG1-SIRPを検出するためのペルオキシダーゼコンジュゲート抗ヒトIgG Fc (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) により検出した。

10

【0127】

結果は、抗EGFR-huIgG1-SIRP V2が抗体と同様にクリアランスされたことを示す(図9A)。最初の時点における初回の分布相の2倍降下後、血漿濃度は、約8日間の循環半減期に従って線形的に下落した。曝露は用量依存的であり、10日後のAUCは20 μ g用量について2059h \cdot μ g/mLであり、200 μ g用量について13164h \cdot μ g/mLであった。クリアランスは用量依存的であり、20 μ g用量については0.49mL/h \cdot kgであり、200 μ g用量については0.76mL/h \cdot kgであった。

20

【0128】

4(D)(i)抗EGFR-huIgG1-SIRPのインビトロ生物学的活性

抗EGFR-huIgG1-SIRPのインビトロ生物学的活性は、抗体依存性細胞媒介細胞毒性(ADCC)アッセイにおいて示される。6 \times 10⁴個のヒトA549扁平上皮癌細胞を、96ウェルプレートのそれぞれのウェルに移し、37において一晩インキュベートした。細胞からの培地を除去し、0.02~1600ng/mLの濃度についての組換え抗体の段階希釈物により置き換えた。37における15~30分のインキュベーション後、抗体およびA549細胞を含有するプレートのそれぞれのウェルに、1.5 \times 10⁵個のエフェクター細胞(FcRIIa受容体、V158(高親和性)バリアント、およびホタルルシフェラーゼの発現をドライブするNFAT応答エレメントを安定的に発現する遺伝子操作Jurkat細胞(Promega Madison, WI))を添加した(エフェクター細胞と標的細胞との比2.5:1)。24時間のインキュベーション後、Bio-Glo試薬(Promega Madison, WI)を添加し、15分間のインキュベーション後のルミネセンスを計測することにより、ルシフェラーゼ活性を介してADCC活性を計測した。

30

【0129】

抗EGFR-huIgG1-SIRP V2は、抗EGFR、SIRP V2-FcおよびFc-SIRP V2よりも有意に高いADCC活性を有することが見出された(図8)。理論により拘束されるものではないが、抗EGFRと比較してかなり向上した抗EGFR-huIgG1-SIRP V2のインビトロ活性は、同一細胞上のEGFRおよび融合タンパク質間のより高い親和性の相互作用が生じたらCD47へのアビディティドライブ結合により引き起こされる可能性が最も高く、同一細胞上の2つの腫瘍標的の同時結合をもたらす。

40

【0130】

4(D)(ii)抗EGFR-huIgG1-SIRPのインビボ生物学的活性

抗EGFR-huIgG1-SIRPの有用性は、インビボ実験により示される。同

50

所性肺腫瘍モデルにおいて、NOD - SCIDマウスに、 2.5×10^6 個のヒト A549 - luc 扁平上皮癌細胞を静脈内注射し、次いで $250 \mu\text{g}$ / マウスの抗体アイソタイプ対照、 $250 \mu\text{g}$ / マウスの抗 EGFR、 $250 \mu\text{g}$ / マウスの抗 CD47、 $132 \mu\text{g}$ / マウスの SIRP - Fc、 $250 \mu\text{g}$ / マウスの抗 EGFR および $132 \mu\text{g}$ / マウスの SIRP - Fc の組合せ、または等モル量の融合タンパク質である $292 \mu\text{g}$ / マウスの抗 EGFR - hu IgG1 - SIRP V2 を腹腔内注射した。全ての群 ($n = 7$) は、週 2 回の処理を 3 週間受け、結果を肺からの生物発光シグナル、一般的健康状態、例えば、死亡前に 10 ~ 14 日だけ生じる麻痺、およびマウスの生存率として報告した。

【0131】

抗 EGFR - hu IgG1 - SIRP V2 による処理は、2つの単独療法よりも優れていることが見出された (図 9B)。具体的には、生存日数中央値に基づく、抗 EGFR - hu IgG1 - SIRP V2 は、抗 EGFR よりも有意に有効であった (40 日対 31 日、 $p = 0.0175$)。さらに、全生存率に基づく、SIRP - Fc が標的 A549 細胞に Fc - SIRP よりも良好に結合するという事実にもかかわらず、融合タンパク質は、2つの単独療法の組合せよりもいくぶん有効であった。理論により拘束されるものではないが、抗 EGFR - hu IgG1 - SIRP V2 の向上した抗腫瘍活性は、同一細胞上の EGFR および融合タンパク質間のより高い親和性の相互作用が生じたら CD47 へのアビディティドライブ結合により引き起こされる可能性が最も高く、向上したインビボ ADCP および ADC をもたらす。EGF / EGFR および SIRP / CD47 相互作用の両方を同時に遮断すること、したがって、これら 2つの経路のシグナリングを防止することも、向上したインビボ抗腫瘍活性に寄与し得る。

【0132】

実施例 5：抗 HER2 - hu IgG1 - SIRP 免疫グロブリン融合タンパク質

5 (A) 抗 HER2 - hu IgG1 - SIRP の構築および発現

例示的な抗 HER2 - hu IgG1 - SIRP の生成は、抗 HER2 4D5 (トラスツズマブ) モノクローナル抗体 (Carter et al, PNAS 89:4285, 1992) および SIRP タンパク質 (Jiang et al, JBC 274: 559, 1999) をベースとする。4D5 についての Fab 軽鎖の DNA およびタンパク質配列を、それぞれ配列番号 21 および配列番号 22 に提供する。4D5 についての Fab 重鎖の DNA およびタンパク質配列を、それぞれ配列番号 23 および配列番号 24 に提供する。SIRP アレル V2 の IgV ドメインの DNA およびタンパク質配列を、それぞれ配列番号 7 および配列番号 8 に提供する。抗 HER2 - hu IgG1 - SIRP V2 は、抗 HER2 重鎖ポリペプチドの C 末端を、SIRP V2 の IgV ドメインに (G4S)₄ リンカーを介して結合させることにより生成した。

【0133】

抗 HER2 - hu IgG1 - SIRP V2 の発現のため、図 1A におけるように以下の 2つの遺伝子構築物を標準的な組換え DNA 技術によりアセンブルし、哺乳動物発現ベクター pTT5 (分泌のためのマウス軽鎖シグナルペプチド配列を含有) 中にクローニングした：(1) 以下のエレメント：抗 HER2 重鎖可変ドメイン、それに続くヒト重鎖定常ドメイン 1 ~ 3、それに続く (G4S)₄ リンカーおよび SIRP V2 の IgV ドメインをコードする構築物 VH (抗 HER2) - CH1 - H - CH2 - CH3 - (G4S)₄ - SIRP V2 (配列番号 25) ならびに (2) 以下のエレメント：抗 HER2 軽鎖可変ドメイン、それに続くヒト軽鎖定常ドメインをコードする構築物 VL (抗 HER2) - CL (配列番号 21)。これら 2つの構築物についての対応するアミノ酸を、それぞれ配列番号 26 および配列番号 22 に示す。

【0134】

抗 HER2 - hu IgG1 - SIRP の発現のために、2つのベクターを、Expi293 細胞中に Expi293fectin (Life Technologies, Grand Island, NY) を使用して一過的に同時形質移入した。タンパク質を、プロテイン A 親和性クロマトグラフィーによる単一ステッ

10

20

30

40

50

ブで精製した。2つのポリペプチドの発現および完全四量体分子のアセンブリを、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) およびサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 上で確認した。SDS-PAGEのため、精製タンパク質試料をDTTにより還元し、NuPAGE MES 4-12% Gel上で200Vにおいて35分間ランさせ、次いでクーマシー染色した。ゲル上の2つの主要バンドは、予測分子量 (MW) および正確な化学量論比を>95%純度で有した (図10A)。図10Aにおいて、レーン1は分子量 (MW) マーカーを示し、レーン2は予測MW (64, 23 kDa) および抗HER2-huIgG1-SIRP V2の2つのポリペプチドの正確な化学量論比 (1:1) を示す。SECのため、精製タンパク質試料を、50 mMのリン酸ナトリウム、400 mMの過塩素酸ナトリウム、pH 6.3 + 0.1 および38 + 2.0 mS/cm²により平衡化されたTSK-GEL Super SW3000 SECカラム 4.6 × 300 mm (Tosoh Biosciences、東京、日本) 上で分析した。サイズ排除クロマトグラフィーは、単量体抗HER2-huIgG1-SIRP V2についての約173 kDaの予測MWにおけるピークを示した (図10B)。

【0135】

さらに、標準的なモノクローナル抗体フォーマットの抗HER2および抗CD47 (抗HER2 huIgG1および抗CD47 huIgG1) ならびにFc融合タンパク質フォーマットのSIRP (SIRP V2-FcおよびFc-SIRP V2) (図1C) を対照として生成して抗HER2-huIgG1-SIRP フォーマットと比較した。

【0136】

5 (B) (i) 細胞上で発現されたCD47への抗HER2-huIgG1-SIRPの結合

細胞表面上で発現されたCD47に結合する抗HER2-huIgG1-SIRPの能力を計測し、対照分子と比較した。CD47により形質移入されたウェル当たり 2×10^5 個のCHO細胞を、PBS + 1%のFBS中で希釈された変動濃度の抗体と96ウェルプレート中で氷上で60分間インキュベートした。PBS + 1%のFBSにより洗浄した後、細胞を、PBS + 1% FBS中で1:200希釈されたFITC-F(ab')₂ヤギ抗ヒトIgG、Fc (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) と氷上で60分間インキュベートした。細胞をフローサイトメトリー (MACSQuant, Miltenyi Biotec, Cologne, Germany) により分析した。

【0137】

結果は、抗HER2-huIgG1-SIRP V2、抗CD47、SIRP V2-FcおよびFc-SIRP V2がCD47形質移入CHO細胞上で過剰発現されたCD47に結合したが、HER2は発現されないため抗HER2が結合しなかったことを示す (図11A)。ここでも、SIRP-Fcは、Fc-SIRPよりも高い蛍光中央値を示した。

【0138】

血球の細胞表面上で発現されたCD47に結合する抗HER2-huIgG1-SIRPの能力を計測し、対照分子と比較した。健常ヒトドナーからの新鮮な全血をデキストラン沈殿により白血球について濃縮し、PBS + 1%のFBSにより洗浄した。ウェル当たり 2×10^5 個の白血球濃縮ヒト全血細胞を、PBS + 1%のFBS中で希釈された50 μg/mlのタンパク質と96ウェルプレート中で氷上で60分間インキュベートした。PBS + 1%のFBSにより洗浄した後、タンパク質検出およびフローサイトメトリーによる細胞ソーティングのために細胞をPBS + 1%のFBS中1:200希釈のFITC-F(ab')₂ヤギ抗ヒトIgG、Fc (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)、1:100希釈のPEマウス抗ヒトCD235a (BD Biosciences, San Jose, CA)、および1:100希釈のeFluor 450マウス抗ヒトCD45 (eBioscience, San Diego, CA) と氷上で60分間インキュベートした。再度洗浄した後、細胞をPBS中1%のホルムアルデヒドにより固定した。細胞をフローサイトメトリー (MACSQuant, Miltenyi B

10

20

30

40

50

iotec, Cologne, Germany) により分析した。

【 0 1 3 9 】

結果は、抗 C D 4 7 が赤血球および白血球上で発現された C D 4 7 に結合したが、抗 H E R 2 - h u I g G 1 - S I R P V 2、S I R P V 2 - F c および F c - S I R P V 2 が白血球上で発現された C D 4 7 にのみ結合し、赤血球上で発現された C D 4 7 に結合しなかったことを示す (図 1 1 B)。

【 0 1 4 0 】

5 (B) (i i) 両方の抗原を発現する細胞に対する抗 H E R 2 - h u I g G 1 - S I R P の結合アビディティ

H E R 2 を過剰発現し、C D 4 7 を発現するヒト B T 4 7 4 乳腺 / 乳腺腺癌細胞上で、細胞表面上の H E R 2 および C D 4 7 にアビディティにより結合する抗 H E R 2 - h u I g G 1 - S I R P の能力を計測した。ウェル当たり 2×10^5 個の B T 4 7 4 細胞を、P B S + 1 % の F B S 中で希釈された変動濃度の抗 H E R 2 - h u I g G 1 - S I R P、F c - S I R P、抗 H E R 2、および抗 C D 4 7 と 9 6 ウェルプレート中で氷上で 6 0 分間インキュベートした。P B S + 1 % の F B S により洗浄した後、細胞を、P B S + 1 % の F B S 中で 1 : 2 0 0 希釈された F I T C F (a b ') 2 ヤギ抗ヒト I g G、F c (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) と氷上で 6 0 分間インキュベートした。再度洗浄した後、細胞を P B S 中 1 % のホルムアルデヒドにより固定した。細胞をフローサイトメトリー (MACSQuant, Miltenyi Biotec, Cologne, Germany) により分析した。

【 0 1 4 1 】

結果は、B T 4 7 4 細胞への抗 H E R 2 - h u I g G 1 - S I R P V 2 結合が、対照分子と比較して個々にまたは組合せのいずれでも向上することを示し (図 1 1 C)、アビディティについての証拠を提供する。上記実施例において説明されるとおり、抗 F c ベース検出は、細胞への抗体 - S I R P 融合タンパク質の結合を過小評価する可能性が高い。したがって、抗 H E R 2 - h u I g G 1 - S I R P V 2 および抗 H E R 2 の類似結合の観察は、細胞への抗 H E R 2 - h u I g G 1 - S I R P 結合についてのアビディティ効果を示唆する。同一細胞上の 2 つの腫瘍標的への結合により腫瘍細胞への結合のアビディティを利用する抗 H E R 2 - h u I g G 1 - S I R P の能力は、より特異的な標的化およびより少ないインビボ副作用をもたらし得る。

【 0 1 4 2 】

実施例 6 : 抗 G D 2 - h u I g G 1 - S I R P 免疫グロブリン融合タンパク質

例示的な抗 G D 2 - h u I g G 1 - S I R P の生成は、抗 G D 2 1 4 . 1 8 モノクローナル抗体 (Hank et al, Clin. Cancer Re. 15: 5923, 2009) および S I R P タンパク質 (Jiang et al, JBC 274: 559, 1999) をベースとする。1 4 . 1 8 についての F a b 軽鎖の D N A およびタンパク質配列を、それぞれ配列番号 2 7 および配列番号 2 8 に提供する。1 4 . 1 8 についての F a b 重鎖の D N A およびタンパク質配列を、それぞれ配列番号 2 9 および配列番号 3 0 に提供する。S I R P アレル V 2 の I g V ドメインの D N A およびタンパク質配列を、それぞれ配列番号 7 および配列番号 8 に提供する。抗 G D 2 - h u I g G 1 - S I R P V 2 は、抗 G D 2 重鎖ポリペプチドの C 末端を、S I R P V 2 に (G 4 S) ₄ リンカーを介して結合させることにより生成する。

【 0 1 4 3 】

抗 G D 2 - h u I g G 1 - S I R P V 2 の発現のため、図 1 A におけるように以下の 2 つの遺伝子構築物を標準的な組換え D N A 技術によりアSEMBルし、哺乳動物発現ベクター p T T 5 (分泌のためのマウス軽鎖シグナルペプチド配列を含有) 中にクローニングする : (1) 以下のエレメント : 抗 G D 2 重鎖可変ドメイン、それに続くヒト重鎖定常ドメイン 1 ~ 3、それに続く (G 4 S) ₄ リンカーおよび S I R P V 2 の I g V ドメインをコードする構築物 V H (抗 G D 2) - C H 1 - H - C H 2 - C H 3 - (G 4 S) ₄ - S I R P V 2 (配列番号 3 1) ならびに (2) 以下のエレメント : 抗 G D 2 軽鎖可変ドメイン、それに続くヒト軽鎖定常ドメインをコードする構築物 V L (抗 G D 2) - C L (配列番号 2 7)。これら 2 つの構築物についての対応するアミノ酸を、それぞれ配列

番号 3 2 および配列番号 2 8 に示す。

【 0 1 4 4 】

さらに、標準的なモノクローナル抗体フォーマットの抗 G D 2 および抗 C D 4 7 (抗 G D 2 h u I g G 1 および抗 C D 4 7 h u I g G 1) ならびに F c 融合タンパク質フォーマットの S I R P (S I R P V 2 - F c および F c - S I R P V 2) (図 1 C) を対照として生成して抗 G D 2 - h u I g G 1 - S I R P フォーマットと比較する。

【 0 1 4 5 】

実施例 7 : 抗 P D - L 1 - h u I g G 1 - S I R P 免疫グロブリン融合タンパク質 7 (A) 抗 P D - L 1 - h u I g G 1 - S I R P の構築および発現

例示的な抗 P D - L 1 - h u I g G 1 - S I R P の生成は、抗 P D - L 1 モノクローナル抗体アベルマブ (国際特許出願公開の国際公開第 2 0 1 3 / 0 7 9 1 7 4 号) および S I R P タンパク質 (Jiang et al, JBC 274:559, 1999) をベースとする。抗 P D - L 1 についての F a b 軽鎖の D N A およびタンパク質配列を、それぞれ配列番号 3 3 および配列番号 3 4 に提供する。抗 P D - L 1 についての F a b 重鎖の D N A およびタンパク質配列を、それぞれ配列番号 3 5 および配列番号 3 6 に提供する。S I R P アレル V 2 のヒト I g V ドメインの D N A およびタンパク質配列を、それぞれ配列番号 7 および配列番号 8 に提供する。ネズミ S I R P の D N A およびタンパク質配列を、それぞれ配列番号 3 7 および配列番号 3 8 に提供する。抗 P D - L 1 - h u I g G 1 - m u S I R P は、抗 P D - L 1 重鎖ポリペプチドの C 末端を、m u S I R P の I g V ドメインに (G 4 S)₄ リンカーを介して結合させることにより生成した。

【 0 1 4 6 】

抗 P D - L 1 - h u I g G 1 - m u S I R P の発現のため、図 1 A におけるように以下の 2 つの遺伝子構築物を標準的な組換え D N A 技術によりアセンブルし、哺乳動物発現ベクター p T T 5 (分泌のためのマウス軽鎖シグナルペプチド配列を含有) 中にクローニングした : (1) 以下のエレメント : 抗 P D - L 1 重鎖可変ドメイン、それに続くヒト重鎖定常ドメイン 1 ~ 3、それに続く (G 4 S)₄ リンカーおよび m u S I R P の I g V ドメインをコードする構築物 V H (抗 P D - L 1) - C H 1 - H - C H 2 - C H 3 - (G 4 S)₄ - m u S I R P (配列番号 4 1) ならびに (2) 以下のエレメント : 抗 P D - L 1 軽鎖可変ドメイン、それに続くヒト軽鎖定常ドメインをコードする構築物 V L (抗 P D - L 1) - C L (配列番号 3 3)。これら 2 つの構築物についての対応するアミノ酸を、それぞれ配列番号 4 2 および配列番号 3 4 に示す。

【 0 1 4 7 】

抗 P D - L 1 - h u I g G 1 - m u S I R P の発現のため、2 つのベクターを、Expi 293 細胞中に Expi293fectin (Life Technologies, Grand Island, NY) を使用して一過的に同時形質移入した。タンパク質を、プロテイン A 親和性クロマトグラフィーによる単ステップで精製した。2 つのポリペプチドの発現および完全四量体分子のアセンブリを、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (S D S - P A G E) およびサイズ排除クロマトグラフィー (S E C) 上で確認した。S D S - P A G E のため、精製タンパク質試料を D T T により還元し、NuPAGE MES 4-12% Gel 上で 2 0 0 V において 3 5 分間ランさせ、次いでクーマシー染色した。ゲル上の 2 つの主要バンドは、予測分子量 (M W) および正確な化学量論比を > 9 5 % 純度で有した (図 1 2 A)。図 1 2 A において、レーン 1 は分子量 (M W) マーカーを示し、レーン 2 は予測 M W (6 4 , 2 3 k D a) および抗 P D - L 1 - h u I g G 1 - m u S I R P の 2 つのポリペプチドの正確な化学量論比 (1 : 1) を示す。S E C のため、精製タンパク質試料を、5 0 m M のリン酸ナトリウム、4 0 0 m M の過塩素酸ナトリウム、p H 6 . 3 + 0 . 1 および 3 8 + 2 . 0 m S / c m² により平衡化された TSK-GEL Super SW3000 S E C カラム 4 . 6 x 3 0 0 m m (Tosoh Biosciences, 東京、日本) 上で分析した。サイズ排除クロマトグラフィーは、単量体抗 P D - L 1 - h u I g G 1 - m u S I R P についての約 1 7 3 k D a の予測 M W におけるピークを示した (図 1 2 B)。

【 0 1 4 8 】

さらに、標準的なモノクローナル抗体フォーマットの抗PD-L1および抗CD47（抗PD-L1 IgG1および抗CD47 huIgG1）ならびにFc融合タンパク質フォーマットのSIRP（SIRP V2-Fc、Fc-huSIRP V2、およびFc-muSIRP）（図1C）を対照として生成して抗PD-L1-huIgG1-SIRP フォーマットと比較する。

【0149】

7(B)両方の抗原を発現する細胞上の抗PD-L1-huIgG1-SIRP の結合アビディティ

PD-L1を過剰発現し、CD47を発現するマウスA20B細胞リンパ腫細胞上で、細胞表面上のPD-L1およびCD47にアビディティにより結合する抗PD-L1-huIgG1-muSIRP の能力を計測した。ウェル当たり 2×10^5 個のA20細胞を、PBS+1%のFBS中で希釈された変動濃度の抗PD-L1-huIgG1-muSIRP、Fc-muSIRP、および抗PD-L1と96ウェルプレート中で氷上で60分間インキュベートした。PBS+1%のFBSにより洗浄した後、細胞を、PBS+1%のFBS中で1:200希釈されたFITC-F(ab')₂ヤギ抗ヒトIgG、Fc（Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA）と氷上で60分間インキュベートした。再度洗浄した後、細胞をPBS中1%のホルムアルデヒドにより固定した。細胞をフローサイトメトリー（MACSQuant, Miltenyi Biotec, Cologne, Germany）により分析した。

【0150】

結果は、A20細胞への抗PD-L1-huIgG1-muSIRP 結合が、対照分子の結合と比較して一般に向上することを示し（図13C）、アビディティについての証拠を提供する。上記実施例において説明されるとおり、抗Fcベース検出は、細胞への抗体-SIRP 融合タンパク質の結合を過小評価する可能性が高い。したがって、抗PD-L1-huIgG1-muSIRP および抗PD-L1の類似結合の観察は、細胞への抗PD-L1-huIgG1-muSIRP 結合についてのアビディティ効果を示唆する。同一細胞上の2つの腫瘍標的への結合により腫瘍細胞への結合をアビディティを利用する抗PD-L1-huIgG1-muSIRP の能力は、より特異的な標的化およびより少ないインビボ副作用をもたらし得る。

【0151】

実施例8：抗EGFR-huIgG1-SIRP（非グリコシル化）免疫グロブリン融合タンパク質

8(A)抗EGFR-huIgG1-SIRP（非グリコシル化）の構築および発現
例示的な抗EGFR-huIgG1-SIRP（非グリコシル化）の生成は、抗EGFR C225（セツキシマブ）モノクローナル抗体（Kawamoto, PNAS 80: 1337, 1983）およびN110Q突然変異を有するSIRP タンパク質（Jiang et al, JBC 274:559, 1999）をベースとする。非グリコシル化SIRP は、N110Qを介して、グリコシル化SIRP よりも不良にCD47に結合することが示された（Ogura et al, JBC 279:1371, 2004）。C225についてのFab軽鎖のDNAおよびタンパク質配列を、それぞれ配列番号13および14に提供する。C225についてのFab重鎖のDNAおよびタンパク質配列を、それぞれ配列番号15および16に提供する。SIRP アレルV1のDNAおよびタンパク質配列を、それぞれ配列番号5および6に提供する。抗EGFR-huIgG1-SIRP V1（N110Q）は、抗EGFR重鎖ポリペプチドのC末端を、SIRP V1（N110Q）のIgVドメインに（G4S）₄ リンカーを介して結合させることにより生成する。

【0152】

抗EGFR-huIgG1-SIRP V1（N110Q）の発現のため、図1Aにおけるように以下の2つの遺伝子構築物を標準的な組換えDNA技術によりアセンブルし、哺乳動物発現ベクターpTT5（分泌のためのマウス軽鎖シグナルペプチド配列を含む）中にクローニングした：（1）以下のエレメント：抗EGFR重鎖可変ドメイン、それに続くヒト重鎖定常ドメイン1~3アイソタイプIgG1、それに続く（G4S）₄ リンカ

10

20

30

40

50

ーおよびSIRP V1(N110Q)のIgVドメインをコードする構築物VH(抗EGFR)-CH1-H-CH2-CH3-(G4S)₄-SIRP V1(N110Q)(配列番号43)、2)以下のエレメント:抗EGFR軽鎖可変ドメイン、それに続くヒトカップ軽鎖定常ドメインをコードする構築物VL(抗EGFR)-CL(配列番号13)。これら2つの構築物についての対応するアミノ酸配列を、それぞれ配列番号44および配列番号14に示す。

【0153】

抗EGFR-huIgG1-SIRP V1(N110Q)の発現のため、2つのベクターを、Expi293細胞中にExpi293fectin(Life Technologies,Grand Island,NY)を使用して一過的に同時形質移入した。タンパク質を、プロテインA親和性クロマトグラフィーによる単一ステップで精製した。2つのポリペプチドの発現および完全四量体分子のアセンブリを、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)およびサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)上で確認した。SDS-PAGEのため、精製タンパク質試料をDTTにより還元し、NuPAGE MES 4-12% Gel上で200Vにおいて35分間ランさせ、次いでクーマシー染色した。ゲル上の2つの主要バンドは、予測分子量(MW)および正確な化学量論比を>95%純度で有した(図14A)。図14Aにおいて、レーン1は分子量(MW)マーカを示し、レーン2は予測MW(64,23kDa)および抗EGFR-huIgG1-SIRP V1(N110Q)の2つのポリペプチドの正確な化学量論比(1:1)を示す。SECのため、精製タンパク質試料を、50mMのリン酸ナトリウム、400mMの過塩素酸ナトリウム、pH6.3+0.1および38+2.0mS/cm²により平衡化されたTSK-GEL Super SW3000 SECカラム4.6×300mm(Tosoh Biosciences、東京、日本)上で分析した。サイズ排除クロマトグラフィーは、単量体抗EGFR-huIgG1-SIRP V1(N110Q)についての約173kDaの予測MWにおけるピークを示した(図14B)。

【0154】

さらに、標準的なモノクローナル抗体フォーマットの抗EGFRおよび抗CD47(抗EGFR huIgG1および抗CD47 huIgG1)ならびにFc融合タンパク質フォーマットのSIRP (SIRP V2-FcおよびFc-SIRP V2)(図1C)を対照として生成して抗EGFR-huIgG1-SIRP フォーマットと比較する。

【0155】

8(B)細胞上で発現されたCD47への抗EGFR-huIgG1-SIRP (非グリコシル化)の結合

細胞表面上で過剰発現されたCD47に結合する抗EGFR-huIgG1-SIRP V1(N110Q)の能力を計測し、対照分子と比較した。CD47により形質移入されたウェル当たり 2×10^5 個のCHO細胞を、PBS+1%のFBS中で希釈された変動濃度の抗体と96ウェルプレート中で氷上で60分間インキュベートした。PBS+1%のFBSにより洗浄した後、細胞を、PBS+1%のFBS中で1:200希釈されたFITC F(ab')₂ヤギ抗ヒトIgG、Fc (Jackson ImmunoResearch,West Grove,PA)と氷上で60分間インキュベートした。再度洗浄した後、細胞をPBS中1%のホルムアルデヒドにより固定した。細胞をフローサイトメトリー(MACSQuant,Miltenyi Biotec,Cologne,Germany)により分析した。

【0156】

結果は、抗EGFR-huIgG1-SIRP V1(N110Q)が形質移入CHO細胞上で発現されたCD47に結合したことを示す(図15)。従来の報告(Ogura et al, JBC 279:13711,2004)とは異なり、抗EGFR-huIgG1-huSIRP V1(N110Q)は、抗EGFR-huIgG1-huSIRP V1と同様に十分にCD47に結合した。

【0157】

実施例9:抗EGFR-huIgG1/抗EGFR-LC-SIRP 免疫グロブリン融

合タンパク質

9 (A) 抗EGFR-huIgG1/抗EGFR-LC-SIRP の構築および発現

例示的な抗EGFR-huIgG1/抗EGFR-LC-SIRP の生成は、抗EGFR C225 (セツキシマブ) モノクローナル抗体 (Kawamoto, PNAS 80:1337, 1983) およびSIRP タンパク質 (Jiang et al, JBC 274:559, 1999) をベースとする。C225 についてのFab軽鎖のDNAおよびタンパク質配列を、それぞれ配列番号13および配列番号14に提供する。C225についてのFab重鎖のDNAおよびタンパク質配列を、それぞれ配列番号15および配列番号16に提供する。SIRP アレルV1のDNAおよびタンパク質配列を、それぞれ配列番号5および配列番号6に提供し、SIRP アレルV2のIgVドメインのDNAおよびタンパク質配列を、それぞれ配列番号7および配列番号8に提供する。特定の実施形態において、抗EGFR-huIgG1/抗EGFR-LC-SIRP は、抗EGFR軽鎖ポリペプチドのC末端を、SIRP V2のIgVドメインに(G4S)₄ リンカーを介して結合させることにより生成し、いかなるリンカーも用いず直接、または(GXS)_Y (X, Y = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8以上) を用いて融合させることもできる。

【0158】

抗EGFR-huIgG1/抗EGFR-LC-SIRP V2の発現のため、図1Fにおけるように以下の2つの遺伝子構築物を標準的な組換えDNA技術によりアセンブルし、哺乳動物発現ベクターpTT5 (分泌のためのマウス軽鎖シグナルペプチド配列を含む) 中にクローニングした: (1) 以下のエレメント: 抗EGFR重鎖可変ドメイン、それに続くヒト重鎖定常ドメイン1~3アイソタイプIgGをコードする構築物VH (抗EGFR)-CH1-H-CH2-CH3 (配列番号45) ならびに(2) 以下のエレメント: 抗EGFR軽鎖可変ドメイン、それに続くヒトカッパ軽鎖定常ドメイン、それに続く(G4S)₄ リンカーおよびSIRP V2のIgVドメインをコードする構築物VL (抗EGFR)-CL-(G4S)₂-SIRP V2 (配列番号47)。これら2つの構築物についての対応するアミノ酸配列を、それぞれ配列番号46および配列番号48に示す。

【0159】

抗EGFR-ds1-huIgG1/抗EGFR-LC-SIRP V2の発現のため、図1Fにおけるように以下の2つの遺伝子構築物を標準的な組換えDNA技術によりアセンブルし、哺乳動物発現ベクターpTT5 (分泌のためのマウス軽鎖シグナルペプチド配列を含む) 中にクローニングした: (1) 以下のエレメント: 軽鎖融合の脱安定化を補うための安定化突然変異(ds1: G44C) (Orcutt et al, PEDS 23:221, 2010) を有する抗EGFR重鎖可変ドメイン、それに続くヒト重鎖定常ドメイン1~3アイソタイプIgGをコードする構築物VH (抗EGFR)(ds1-G44C)-CH1-H-CH2-CH3 (配列番号73) ならびに(2) 以下のエレメント: 安定化突然変異(ds1: A100C) を有する抗EGFR軽鎖可変ドメイン、それに続くヒトカッパ軽鎖定常ドメイン、それに続く(G4S)₄ リンカーおよびSIRP V2のIgVドメインをコードする構築物VL (抗EGFR)(ds1-A100C)-CL-(G4S)₄-SIRP V2 (配列番号77)。これら2つの構築物についての対応するアミノ酸配列を、それぞれ配列番号74および配列番号78に示す。

【0160】

抗EGFR-ds2-huIgG1/抗EGFR-LC-SIRP の発現のため、図1Fにおけるように以下の2つの遺伝子構築物を標準的な組換えDNA技術によりアセンブルし、哺乳動物発現ベクターpTT5 (分泌のためのマウス軽鎖シグナルペプチド配列を含む) 中にクローニングした: (1) 以下のエレメント: 軽鎖融合の脱安定化を補うための安定化突然変異(ds2: Q105C) (Orcutt et al, PEDS 23:221, 2010) を有する抗EGFR重鎖可変ドメイン、それに続くヒト重鎖定常ドメイン1~3アイソタイプIgGをコードする構築物VH (抗EGFR)(ds2-Q105C)-CH1-H-CH2-CH3 (配列番号75) ならびに(2) 以下のエレメント: 安定化突然変異(ds2:

10

20

30

40

50

S 4 3 C) を有する抗 E G F R 軽鎖可変ドメイン、それに続くヒトカッパ軽鎖定常ドメイン、それに続く (G 4 S)₄ リンカーおよび S I R P V 2 の I g V ドメインをコードする構築物 V L (抗 E G F R) (d s 2 - S 4 3 C) - C L - (G 4 S)₄ - S I R P V 2 (配列番号 7 9)。これら 2 つの構築物についての対応するアミノ酸配列を、それぞれ配列番号 7 6 および配列番号 8 0 に示す。

【 0 1 6 1 】

さらに、標準的なモノクローナル抗体フォーマットの抗 E G F R および抗 C D 4 7 (抗 E G F R h u I g G 1 および抗 C D 4 7 h u I g G 1) ならびに F c 融合タンパク質フォーマットの S I R P (S I R P V 2 - F c および F c - S I R P V 2) (図 1 C) を対照として生成して抗 E G F R - h u I g G 1 / 抗 E G F R - L C - S I R P フォーマットと比較する。

10

【 0 1 6 2 】

重鎖 C H 1 ドメイン中の 2 つの突然変異 (配列番号 4 6 の S 1 3 1 C および C 2 2 2 S) を導入することにより I g G 4 の重鎖および軽鎖ジスルフィド対合フォーマットを導入することにより、安定化の代替的方法を試験した。通常、重鎖 C 2 2 2 と対合する軽鎖 C 末端システインは、目下、C 1 3 1 とジスルフィド結合を形成する。さらに、この突然変異重鎖は、よりいっそう高い安定性向上のための d s 1 または d s 2 突然変異のいずれかを有し得、それぞれの (d s 1 または d s 2) 軽鎖と対合している。

【 0 1 6 3 】

抗 E G F R - h u I g G 1 / 抗 E G F R - L C - S I R P の発現のため、2 つのベクターのそれぞれを、Expi293 細胞中に Expi293fectin (Life Technologies, Grand Island, NY) を使用して一過的に同時形質移入した。タンパク質をプロテイン A 親和性クロマトグラフィーによる単一ステップで精製した。2 つのポリペプチドの発現および完全四量体分子のアセンブリを、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (S D S - P A G E) およびサイズ排除クロマトグラフィー (S E C) 上で確認した。S D S - P A G E のため、精製タンパク質試料を D T T により還元し、NuPAGE MES 4-12% Gel 上で 2 0 0 V において 3 5 分間ランさせ、次いでクーマシー染色した。ゲル上の 2 つの主要バンドは、予測分子量 (M W) および正確な化学量論比を > 9 5 % 純度で有した (図 2 1 A)。図 2 1 A において、レーン 1 は分子量 (M W) マーカーを示し、レーン 2 は予測 M W (4 9 , 3 6 k D a) および抗 E G F R - h u I g G 1 / 抗 E G F R - L C - S I R P の 2 つのポリペプチドの正確な化学量論比 (1 : 1) を示し、レーン 3 は予測 M W (4 9 , 3 6 k D a) および抗 E G F R - d s 1 - h u I g G 1 / 抗 E G F R - L C - S I R P の 2 つのポリペプチドの正確な化学量論比 (1 : 1) を示し、レーン 4 は予測 M W (4 9 , 3 6 k D a) および抗 E G F R - d s 2 - h u I g G 1 / 抗 E G F R - L C - S I R P の 2 つのポリペプチドの正確な化学量論比 (1 : 1) を示す。V H および V L ドメインの野生型配列は、d s 1 および d s 2 突然変異が軽鎖融合を安定化させるという予測とは異なり、S D S P A G E 上の最小数の追加バンドを有した。S E C のため、精製タンパク質試料を、5 0 m M のリン酸ナトリウム、4 0 0 m M の過塩素酸ナトリウム、p H 6 . 3 + 0 . 1 および 3 8 + 2 . 0 m S / c m² により平衡化された TSK-GEL Super SW3000 S E C カラム 4 . 6 × 3 0 0 m m (Tosoh Biosciences、東京、日本) 上で分析した。サイズ排除クロマトグラフィーは、単量体抗 E G F R - h u I g G 1 / 抗 E G F R - L C - S I R P についての約 1 7 2 k D a の予測 M W におけるピークを示した (図 2 1 B)。

20

30

40

【 0 1 6 4 】

さらに、標準的なモノクローナル抗体フォーマットの抗 E G F R および抗 C D 4 7 (抗 E G F R h u I g G 1 および抗 C D 4 7 h u I g G 1) ならびに F c 融合タンパク質フォーマットの S I R P (S I R P V 2 - F c および F c - S I R P V 2) (図 1 C) を対照として生成して抗 E G F R - h u I g G 1 - S I R P フォーマットと比較する。

【 0 1 6 5 】

9 (B) 細胞上で発現された C D 4 7 への抗 E G F R - h u I g G 1 / 抗 E G F R - L C

50

- S I R P の結合

細胞表面上で過剰発現された C D 4 7 に結合する抗 E G F R - h u I g G 1 / 抗 E G F R - L C - S I R P V 2 の能力を計測し、対照分子と比較した。C D 4 7 により形質移入されたウェル当たり 2×10^5 個の C H O 細胞を、P B S + 1 % の F B S 中で希釈された変動濃度の抗体と 9 6 ウェルプレート中で氷上で 6 0 分間インキュベートした。P B S + 1 % の F B S により洗浄した後、細胞を、P B S + 1 % の F B S 中で 1 : 2 0 0 希釈された F I T C - F (a b ') 2 ヤギ抗ヒト I g G、F c (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) と氷上で 6 0 分間インキュベートした。再度洗浄した後、細胞を P B S 中 1 % のホルムアルデヒドにより固定した。細胞をフローサイトメトリー (MACSQuant, Miltenyi Biotec, Cologne, Germany) により分析した。結果は、抗 E G F R - h u I g G 1 / 抗 E G F R - L C - S I R P V 2 が形質移入 C H O 細胞上で発現された C D 4 7 に結合したが、抗 E G F R - h u I g G 1 - S I R P V 2 ほど十分に結合しなかったことを示す (図 2 1 C)。

【 0 1 6 6 】

実施例 1 0 : S I R P - F c (h u I g G 1) - 抗 E G F R (F a b) 免疫グロブリン融合タンパク質

1 0 (A) S I R P - F c (h u I g G 1) - 抗 E G F R (F a b) の構築および発現
例示的な S I R P - F c (h u I g G 1) - 抗 E G F R (F a b) の生成は、抗 E G F R C 2 2 5 (セツキシマブ) モノクローナル抗体 (Kawamoto, PNAS 80:1337, 1983) および S I R P タンパク質 (Jiang et al, JBC 274:559, 1999) をベースとする。C 2 2 5 についての F a b 軽鎖の D N A およびタンパク質配列を、それぞれ配列番号 1 3 および配列番号 1 4 に提供する。C 2 2 5 についての F a b 重鎖の D N A およびタンパク質配列を、それぞれ配列番号 1 5 および配列番号 1 6 に提供する。S I R P アレル V 2 の I g V ドメインの D N A およびタンパク質配列を、それぞれ配列番号 7 および配列番号 8 に提供する。S I R P - F c (h u I g G 1) - 抗 E G F R (F a b) は、S I R P を F c 重鎖の N 末端に (G 4 S) ₂ リンカーを介して結合させ、次いで抗 E G F R F a b 重鎖を F c 重鎖の C 末端に (G 4 S) ₄ リンカーを介して結合させることにより生成した。

【 0 1 6 7 】

S I R P V 2 - F c (h u I g G 1) - 抗 E G F R (F a b) の発現のため、図 1 H におけるように以下の 2 つの遺伝子構築物を標準的な組換え D N A 技術によりアセンブルし、哺乳動物発現ベクター p T T 5 (分泌のためのマウス軽鎖シグナルペプチド配列を含む) 中にクローニングした：(1) 以下のエレメント：S I R P V 2 の I g V ドメイン、それに続く (G 4 S) ₄ リンカーおよびシステイン (軽鎖とのジスルフィド結合を天然に形成する) がセリンに突然変異しているヒト重鎖ヒンジ領域 (E P K S S、配列番号 5 0)、それに続く定常ドメイン 2 および 3、それに続く (G 4 S) ₄ リンカー、および抗 E G F R 重鎖可変ドメイン、それに続くヒト重鎖定常ドメイン 1、それに続くヒンジ領域 (E P K S C、配列番号 5 1、抗 E G F R 軽鎖とのジスルフィド架橋を可能とするため) をコードする構築物 S I R P V 2 - (G 4 S) ₂ - H - C H 2 - C H 3 - (G 4 S) ₄ - V H (抗 E G F R) - C H 1 (配列番号 4 9) ならびに (2) 以下のエレメント：抗 E G F R 軽鎖可変ドメイン、それに続くヒト軽鎖定常ドメインをコードする構築物 V L (抗 E G F R) - C L (配列番号 1 3)。これら 2 つの構築物についての対応するアミノ酸配列を、それぞれ配列番号 5 2 および配列番号 1 4 に示す。

【 0 1 6 8 】

S I R P V 2 - F c (h u I g G 1) - 抗 E G F R (F a b) の発現のため、2 つのベクターを、Expi293細胞中にExpi293fectin (Life Technologies, Grand Island, NY) を使用して一過的に同時形質移入した。タンパク質を、プロテイン A 親和性クロマトグラフィーによる単一ステップで精製した。2 つのポリペプチドの発現および完全四量体分子のアセンブリを、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (S D S - P A G E) およびサイズ排除クロマトグラフィー (S E C) 上で確認した。S D S - P A G E のため、精製タンパク質試料を D T T により還元し、NuPAGE MES 4-12% Gel 上で 2 0 0 V

10

20

30

40

50

において35分間ランさせ、次いでクーマシー染色した。ゲル上の2つの主要バンドは、予測分子量(MW)および正確な化学量論比を>95%純度で有した(図16A)。図16Aにおいて、レーン1は分子量(MW)マーカーを示し、レーン2は予測MW(64,23kDa)およびSIRP-Fc(huIgG1)-抗EGFR(Fab)の2つのポリペプチドの正確な化学量論比(1:1)を示す。SECのため、精製タンパク質試料を、50mMのリン酸ナトリウム、400mMの過塩素酸ナトリウム、pH6.3+0.1および38+2.0mS/cm²により平衡化されたTSK-GEL Super SW3000 SECカラム4.6×300mm(Tosoh Biosciences、東京、日本)上で分析した。サイズ排除クロマトグラフィーは、単量体SIRP-Fc(huIgG1)-抗EGFR(Fab)についての約173kDaの予測MWにおけるピークを示した(図16B)。

10

【0169】

さらに、標準的なモノクローナル抗体フォーマットの抗EGFRおよび抗CD47(抗EGFR huIgG1および抗CD47 huIgG1)ならびにFc融合タンパク質フォーマットのSIRP(SIRP V2-FcおよびFc-SIRP V2)(図1C)を対照として生成してSIRP-Fc(huIgG1)-抗EGFR(Fab)フォーマットと比較する。

【0170】

10(B)細胞上で発現されたCD47へのSIRP-Fc(huIgG1)-抗EGFR(Fab)の結合

細胞表面上で過剰発現されたCD47に結合するSIRP-Fc(huIgG1)-抗EGFR(Fab)の能力を計測し、対照分子と比較した。CD47により形質移入されたウェル当たり 2×10^5 個のCHO細胞を、PBS+1%のFBS中で希釈された変動濃度の抗体と96ウェルプレート中で氷上で60分間インキュベートした。PBS+1%のFBSにより洗浄した後、細胞を、PBS+1%のFBS中で1:200希釈されたFITC(Fab')₂ヤギ抗ヒトIgG、Fc(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)と氷上で60分間インキュベートした。再度洗浄した後、細胞をPBS中1%のホルムアルデヒドにより固定した。細胞をフローサイトメトリー(MACSQuant, Miltenyi Biotec, Cologne, Germany)により分析した。

20

【0171】

結果は、SIRP-Fc(huIgG1)-抗EGFR(Fab)がCD47形質移入CHO細胞上で発現されたCD47に結合したことを示す(図17A)。SIRP-Fc(huIgG1)-抗EGFR(Fab)または対照SIRP V2-Fcの結合は、抗CD47のものと類似し、抗EGFR-huIgG1-huSIRP V2またはFc-SIRP V2のものよりも良好であった。

30

【0172】

10(C)(i)SIRPa-Fc(huIgG1)-抗EGFR(Fab)のインビボ生物学的活性

SIRP-Fc(huIgG1)-抗EGFR(Fab)のインビボ生物学的活性は、抗体依存性細胞媒介細胞毒性(ADCC)アッセイにおいて示される。 6×10^4 個のヒトA549扁平上皮癌細胞を、96ウェルプレートのそれぞれのウェルに移し、37において一晩インキュベートした。細胞からの培地を除去し、0.02~1600ng/mlの濃度についての組換え抗体の段階希釈物により置き換えた。37における15~30分間のインキュベーション後、抗体およびA549細胞を含有するプレートのそれぞれのウェルに、 1.5×10^5 個のエフェクター細胞(FcRIIIa受容体、V158(高親和性)バリエーション、およびホタルルシフェラーゼの発現をドライブするNFAT応答エレメントを安定的に発現する遺伝子操作Jurkat細胞(Promega Madison, WI))を添加した(エフェクター細胞と標的細胞との比2.5:1)。24時間のインキュベーション後、Bio-Glo試薬(Promega Madison, WI)を添加し、15分間のインキュベーション後のルミネセンスを計測することにより、ルシフェラーゼ活性を介してADCC活性を計測した。

40

50

【0173】

SIRP V2 - Fc(huIgG1) - 抗EGFR(Fab)は、抗EGFRよりも低いADCC活性を有するが、Fc - SIRP V2よりも高いADCC活性を有することが見出された(図17B)。Fcドメインに対する結合ドメインの向きは、ADCC活性を決定する。したがって、SIRP - FcV2はFc - SIRP V2(図17B)よりも高い活性を有し、抗EGFRはFc - 抗EGFR(Fab)(データを示さないが、活性は観察されず)よりも高い活性を有する。理論により拘束されるものではないが、SIRP V2 - Fc(huIgG1) - 抗EGFR(Fab)の抗EGFR(Fab)部分は細胞にSIRP部分よりも高い親和性で結合したため、それは最適なADCC活性についての向きでFcを位置決めし得る。

10

【0174】

10(C)(ii) SIRP - Fc(huIgG1) - 抗EGFR(Fab)のインビボ生物学的活性

SIRP V2 - Fc(huIgG1) - 抗EGFR(Fab)の有用性は、インビボ実験により示される。同所性肺腫瘍モデルにおいて、NOD - SCIDマウスに、 2.5×10^6 個のヒトA549 - luc扁平上皮癌細胞を静脈内注射し、次いで400 µg / マウスの抗体アイソタイプ対照、250 µg / マウスの抗EGFR、250 µg / マウスの抗EGFRおよび136 µg / マウスのSIRP V2 - Fcの組合せ、298 µg / マウスの抗EGFR - huIgG1 - SIRP V2、または等モル量の融合タンパク質である298 µg / マウスのSIRP V2 - Fc(huIgG1) - 抗EGFR(Fab)を腹腔内注射した。全ての群(n = 7)は、週2回の処理を3週間受け、結果を肺からの生物発光シグナル、一般的健康状態、例えば、死亡前に10 ~ 14日だけ生じる麻痺、およびマウスの生存率として報告した。

20

【0175】

SIRP V2 - Fc(huIgG1) - 抗EGFR(Fab)融合タンパク質による処理は、EGFRへの類似の結合およびCD47への優れた結合を有するにもかかわらず、組合せおよび抗EGFR - huIgG1 - SIRP V2よりもわずかに劣ることが見出された(それぞれ、生存中央値40日、42日および43.5日、図18)。図17Bに示されるADCCの低減は、抗EGFR - huIgG1 - SIRP V2と比較して減少したSIRP V2 - Fc(huIgG1) - 抗EGFR(Fab)の抗腫瘍効力の原因となり得る。

30

【0176】

実施例11: SIRP - Fc(huIgG1) - 抗EGFR(scFv)免疫グロブリン融合タンパク質

例示的なSIRP - Fc(huIgG1) - 抗EGFR(scFv)の生成は、SIRPタンパク質(Jiang et al, JBC 274:559, 1999)および抗EGFR(scFv)C225(米国特許第7,820,165号)をベースとする。SIRP アレルV2のIgVドメインのDNAおよびタンパク質配列を、それぞれ配列番号7および配列番号8に提供する。抗EGFR(scFv)C225のDNAおよびタンパク質配列を、それぞれ配列番号53および配列番号54に提供する。SIRPV2 - Fc(huIgG1) - 抗EGFR(scFv)は、SIRPのIgVドメインを、Fc重鎖のN末端に(G4S)₂リンカーを介して結合させ、次いで抗EGFR(scFv)をFc重鎖のC末端に(G4S)₄リンカーを介して結合させることにより生成する。

40

【0177】

SIRP V2 - Fc(huIgG1) - 抗EGFR(scFv)C225の発現のため、図1Jにおけるように以下の遺伝子構築物を標準的な組換えDNA技術によりアセンブルし、哺乳動物発現ベクターpTT5(分泌のためのマウス軽鎖シグナルペプチド配列を含む)中にクローニングした: 以下のエレメント: SIRP V2のIgVドメイン、それに続く(G4S)₄リンカーおよびシステイン(軽鎖とのジスルフィド結合を天然に形成する)がセリンに突然変異しているヒト重鎖ヒンジ領域(EPKSS、配列番号50

50

)、それに続く定常ドメイン2および3、それに続く $(G4S)_4$ リンカーおよび抗EGFR重鎖可変ドメイン、それに続く $(G4S)_3$ リンカーおよび抗EGFR軽鎖可変ドメインをコードする構築物SIRP V2- $(G4S)_2$ -H-CH₂-CH₃- $(G4S)_4$ -C225(VH)- $(G4S)_3$ -C225(VL)(配列番号55)。この構築物についての対応するアミノ酸配列を配列番号56に示す。

【0178】

さらに、標準的なモノクローナル抗体フォーマットの抗EGFRおよび抗CD47(抗EGFR huIgG1および抗CD47 huIgG1)、scFvフォーマットの抗EGFR(抗EGFR(scFv))、ならびにFc融合タンパク質フォーマットのSIRP(SIRP V2-FcおよびFc-SIRP V2)(図1C)を対照として生成してSIRP V2-Fc(huIgG1)-抗EGFR(scFv)フォーマットと比較した。

10

【0179】

実施例12:抗EGFR(scFv)-Fc(huIgG1)-SIRP 免疫グロブリン融合タンパク質

例示的な抗EGFR(scFv)-Fc(huIgG1)-SIRPの生成は、抗EGFR(scFv)C225(米国特許第7,820,165号)およびSIRPタンパク質(Jiang et al, JBC 274:559, 1999)をベースとする。抗EGFR(scFv)C225のDNAおよびタンパク質配列を、それぞれ配列番号53および配列番号54に提供する。SIRP アレルV2のIgVドメインのDNAおよびタンパク質配列を、それぞれ配列番号7および配列番号8に提供する。抗EGFR(scFv)-Fc(huIgG1)-SIRP V2は、抗EGFR(scFv)をFc重鎖のN末端に $(G4S)_2$ リンカーを介して結合させ、次いでSIRP V2のIgVドメインをFc重鎖のC末端に $(G4S)_4$ リンカーを介して結合させることにより生成する。

20

【0180】

抗EGFR(scFv)C225-Fc(huIgG1)-SIRP V2の発現のため、図1Lにおけるように以下の遺伝子構築物を標準的な組換えDNA技術によりアセンブルし、哺乳動物発現ベクターpTT5(分泌のためのマウス軽鎖シグナルペプチド配列を含有)中にクローニングした:以下のエレメント:抗EGFR重鎖可変ドメイン、それに続く $(G4S)_3$ リンカーおよび抗EGFR軽鎖可変ドメイン、それに続く $(G4S)_4$ リンカーおよびシステイン(軽鎖とのジスルフィド結合を天然に形成する)がセリンに突然変異しているヒト重鎖ヒンジ領域(EPKSS、配列番号50)、それに続く定常ドメイン2および3、それに続く $(G4S)_4$ リンカーおよびSIRP V2のIgVドメインをコードする構築物C225(VH)- $(G4S)_3$ -C225(VL)- $(G4S)_2$ -H-CH₂-CH₃- $(G4S)_4$ -SIRP V2(配列番号57)。この構築物についての対応するアミノ酸配列を、配列番号58に示す。

30

【0181】

さらに、標準的なモノクローナル抗体フォーマットの抗EGFRおよび抗CD47(抗EGFR huIgG1および抗CD47 huIgG1)、scFvフォーマットの抗EGFR(抗EGFR(scFv))、ならびにFc融合タンパク質フォーマットのSIRP(SIRP V2-FcおよびFc-SIRP V2)(図1C)を対照として生成して抗EGFR(scFv)-Fc(huIgG1)-SIRP V2フォーマットと比較した。

40

【0182】

実施例13:SIRP-Fc(huIgG1)-抗CD19(scFv)免疫グロブリン融合タンパク質

SIRP-Fc(huIgG1)-抗CD19(scFv)の生成は、SIRPタンパク質(Jiang et al, JBC 274:559, 1999)および抗CD19(scFv)CHRI-19Fv1(Nicholson et al, Molecular Immunology 34:1157, 1997)をベースとする。SIRP アレルV2のIgVドメインのDNAおよびタンパク質配列を、それぞれ配列番

50

号7および配列番号8に提供する。CHRI-19Fv1のDNAおよびタンパク質配列を、それぞれ配列番号59および配列番号60に提供する。SIRP V2-Fc(huIgG1)-抗CD19(scFv)は、SIRP V2のIgVドメインをFc重鎖のN末端に(G4S)₂リンカーを介して結合させ、次いで抗CD19(scFv)をFc重鎖のC末端に(G4S)₄リンカーを介して結合させることにより生成する。

【0183】

SIRP V2-Fc(huIgG1)-抗CD19(scFv)の発現のため、図1Jにおけるように以下の遺伝子構築物を標準的な組換えDNA技術によりアセンブルし、哺乳動物発現ベクターpTT5(分泌のためのマウス軽鎖シグナルペプチド配列を含有)中にクローニングした：以下のエレメント：SIRP V2、それに続く(G4S)₄リンカーおよびシステイン(軽鎖とのジスルフィド結合を天然に形成する)がセリンに突然変異しているヒト重鎖ヒンジ領域(EPKSS、配列番号50)、それに続く定常ドメイン2および3、それに続く(G4S)₄リンカーおよび抗CD19重鎖可変ドメイン、それに続く(G4S)₃リンカーおよび抗CD19軽鎖可変ドメインをコードする構築物SIRP V2-(G4S)₂-H-CH2-CH3-(G4S)₄-CHRI-19Fv1(VH)-リンカー-CHRI-19Fv1(VL)(配列番号61)。この構築物についての対応するアミノ酸配列を配列番号62に示す。

【0184】

さらに、標準的なモノクローナル抗体フォーマットの抗CD47(抗CD47 huIgG1)、scFvフォーマットの抗CD19(抗CD19(scFv))、Fc融合タンパク質フォーマットのSIRP (SIRP V2-FcおよびFc-SIRP V2)(図1C)を対照として生成してSIRP V2-Fc(huIgG1)-抗CD19(scFv)フォーマットと比較する。

【0185】

実施例14：抗CD19(scFv)-Fc(huIgG1)-SIRP 免疫グロブリン融合タンパク質

例示的な抗CD19(scFv)-Fc(huIgG1)-SIRP の生成は、抗CD19(scFv)CHRI-19Fv1(Nicholson et al, Molecular Immunology 34: 1157, 1997)およびSIRP タンパク質(Jiang et al, JBC 274: 559, 1999)をベースとする。CHRI-19Fv1のDNAおよびタンパク質配列をそれぞれ配列番号59および配列番号60に提供する。SIRP アレルV2のIgVドメインのDNAおよびタンパク質配列を、それぞれ配列番号7および配列番号8に提供する。抗CD19(scFv)-Fc(huIgG1)-SIRP V2は、抗CD19(scFv)をFc重鎖のN末端に(G4S)₂リンカーを介して結合させ、次いでSIRP V2のIgVドメインをFc重鎖のC末端に(G4S)₄リンカーを介して結合させることにより生成する。

【0186】

抗CD19(scFv)-Fc(huIgG1)-SIRP V2の発現のため、図1Lにおけるように以下の遺伝子構築物を標準的な組換えDNA技術によりアセンブルし、哺乳動物発現ベクターpTT5(分泌のためのマウス軽鎖シグナルペプチド配列を含有)中にクローニングした：以下のエレメント：抗CD19重鎖可変ドメイン、それに続く(G4S)₃リンカーおよび抗CD19軽鎖可変ドメイン、それに続く(G4S)₄リンカーおよびシステイン(軽鎖とのジスルフィド結合を天然に形成する)がセリンに突然変異しているヒト重鎖ヒンジ領域(EPKSS、配列番号50)、それに続く定常ドメイン2および3、それに続く(G4S)₄リンカーおよびSIRP V2のIgVドメインをコードする構築物CHRI-19Fv1(VH)-リンカー-CHRI-19Fv1(VL)-(G4S)₂-H-CH2-CH3-(G4S)₄-SIRP V2(配列番号63)。この構築物についての対応するアミノ酸配列を配列番号64に示す。

【0187】

さらに、標準的なモノクローナル抗体フォーマットの抗CD47(抗CD47 huIgG1)、scFvフォーマットの抗CD19(抗CD19(scFv))、およびFc

融合タンパク質フォーマットのSIRP (SIRP V2 - FcおよびFc - SIRP V2) (図1C)を対照として生成して抗CD19 (scFv) - Fc (huIgG1) - SIRP V2フォーマットと比較する。

【0188】

実施例15: SIRP - Fcab (HER2) 免疫グロブリン融合タンパク質
15(A) SIRP - Fcab (HER2) の構築および発現

例示的なSIRP - Fcab (HER2) の生成は、SIRP タンパク質 (Jiang et al, JBC 274:559, 1999) および抗HER2 Fcab H10 - 03 - 6 (Wozniak-Knopp et al, PEDS 23:289, 2010) をベースとする。SIRP アレルV2のIgVドメインのDNAおよびタンパク質配列をそれぞれ配列番号7および配列番号8に提供する。Fc 10
cab (HER2) のDNAおよびタンパク質配列を、それぞれ配列番号65および配列番号66に提供する。SIRP V2 - Fcab (HER2) は、SIRP V2のIgVドメインをFc cab (HER2) のN末端に (G4S)₂ リンカーを介して結合させることにより生成する。

【0189】

SIRP V2 - Fcab (HER2) の発現のため、図1Fにおけるように以下の遺伝子構築物を標準的な組換えDNA技術によりアセンブルし、哺乳動物発現ベクターpTT5 (分泌のためのマウス軽鎖シグナルペプチド配列を含有) 中にクローニングした: 以下のエレメント: SIRP V2、それに続く (G4S)₄ リンカーおよびシステイン (軽鎖とのジスルフィド結合を天然に形成する) がセリンに突然変異しているヒト重鎖ヒンジ領域 (EPKSS、配列番号50)、それに続くHER2にAB、CD、およびEFループを介して結合するように改変された定常ドメイン2および定常ドメイン3をコードする構築物SIRP V2 - (G4S)₂ - H - CH2 - CH3 (抗HER2) (配列番号67)。この構築物についての対応するアミノ酸配列を配列番号68に示す。

【0190】

SIRP V2 - Fcab (HER2) の発現のため、ベクターを、Expi293細胞中にExpi293fectin (Life Technologies, Grand Island, NY) を使用して一過的に形質移入した。タンパク質を、プロテインA親和性クロマトグラフィーによる単一ステップで精製した。分子の発現を、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS - PAGE) およびサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 上で確認した。SDS - PAGE 30
のため、精製タンパク質試料をDTTにより還元し、NuPAGE MES 4-12% Gel上で200Vにおいて35分間ランさせ、次いでクーマシー染色した。ゲル中の主要バンドは、予測分子量 (MW) を > 95% 純度で有した (図19A)。図19Aにおいて、レーン1は分子量 (MW) マーカーを示し、レーン2はSIRP V2 - Fcab (HER2) の予測MW (40 kDa) を示す。SECのため、精製タンパク質試料を、50 mMのリン酸ナトリウム、400 mMの過塩素酸ナトリウム、pH 6.3 ± 0.1および38 ± 2.0 mS / cm² により平衡化されたTSK-GEL Super SW3000 SECカラム4.6 × 300 mm (Tosoh Biosciences、東京、日本) 上で分析した。サイズ排除クロマトグラフィーは、単量体SIRP V2 - Fcab (HER2) についての約80 kDaの予測MWにおけるピークを示した (図19B)。

【0191】

さらに、標準的なモノクローナル抗体フォーマットの抗HER2および抗CD47 (抗HER2 huIgG1および抗CD47 huIgG1)、Fc cab (HER2)、およびFc - 融合タンパク質フォーマットのSIRP (SIRP V2 - FcおよびFc - SIRP V2) (図1C)を対照として生成してSIRP V2 - Fcab (HER2) フォーマットと比較した。

【0192】

15(B) (i) 細胞上で発現されたCD47へのSIRP - Fcab (HER2) の結合

細胞表面上で発現されたCD47に結合するSIRP V2 - Fcab (HER2) の

10

20

30

40

50

能力を計測し、対照分子と比較した。CD47により形質移入されたウェル当たり 2×10^5 個のCHO細胞を、PBS + 1%のFBS中で希釈された変動濃度の抗体と96ウェルプレート中で氷上で60分間インキュベートした。PBS + 1%のFBSにより洗浄した後、細胞を、PBS + 1%のFBS中で1:200希釈されたFITC-F(ab')₂ヤギ抗ヒトIgG、Fc (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)と氷上で60分間インキュベートした。再度洗浄した後、細胞をPBS中1%のホルムアルデヒドにより固定した。細胞をフローサイトメトリー (MACSQuant, Miltenyi Biotec, Cologne, Germany) により分析した。

【0193】

結果は、SIRP V2 - Fcab (HER2)、抗CD47、およびSIRP - Fcが形質移入CHO細胞上で発現されたCD47に結合したが、HER2は発現されないため抗HER2およびFcab (HER2)が結合しなかったことを示す(図20A)。

【0194】

15 (B) (ii) 両方の抗原を発現する細胞上のSIRP - Fcab (HER2)の結合アビディティ

HER2を過剰発現し、CD47を発現するヒトBT474乳腺/乳腺腺癌細胞上で、細胞表面上のHER2およびCD47にアビディティにより結合するSIRP V2 - Fcab (HER2)の能力を計測した。ウェル当たり 2×10^5 個のBT474細胞を、PBS + 1%のFBS中で希釈された変動濃度のSIRP V2 - Fcab (HER2)、SIRP V2 - Fc、Fcab (HER2)、抗HER2、および抗CD47と96ウェルプレート中で氷上で60分間インキュベートした。PBS + 1%のFBSにより洗浄した後、細胞を、PBS + 1%のFBS中で1:200希釈されたFITC-F(ab')₂ヤギ抗ヒトIgG、Fc (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)と氷上で60分間インキュベートした。再度洗浄した後、細胞をPBS中1%のホルムアルデヒドにより固定した。細胞をフローサイトメトリー (MACSQuant, Miltenyi Biotec, Cologne, Germany) により分析した。

【0195】

結果は、BT474細胞へのSIRP V2 - Fcab (HER2)結合が、特に低い濃度においてFcab (HER2)の結合と比較して向上したことを示し(図20B)、アビディティについての強力な証拠を提供する。同一細胞上の2つの腫瘍標的への結合により腫瘍細胞への結合をアビディティを利用するSIRP V2 - Fcab (HER2)の能力は、より特異的な標的化およびより少ないインビボ副作用をもたらし得る。

【0196】

実施例16: CD47結合に影響を与えるSIRP 残基を同定するコンピュータ利用法
当業者が精通するコンピュータ利用法を使用してCD47へのSIRP の結合に影響を与え得るSIRP 残基を同定し、CD47に対するSIRP の結合親和性を減少または増加させる潜在性を有する突然変異を予測し、実験により追求する価値のある候補を同定した。手短に述べると、CD47/SIRP 複合体の結晶構造を分析してCD47結合に影響を与えることが予測されるSIRP 残基位置を同定した。

【0197】

コンピュータによる突然変異誘発をSIRP 位置の選択セットに対して実施して野生型SIRP と比較した種々の推定突然変異の結合エネルギーの差についての値を得、野生型SIRP に対して低減したCD47についての親和性または増加した親和性のいずれかを有することが予測される突然変異を分類するために閾値を設定した。低減または増加した親和性SIRP パリアントの指定のために設定する閾値が重複したため、表1および表2(以下参照)に列記されるコンピュータにより予測された突然変異の有意な重複も存在した。

【0198】

【表 1】

表1:CD47結合を低減させることが予測されるSIRPα突然変異

SIRPαV1 (異なる場合は SIRPαV2) 残基	配列番号6 または 配列番号8 残基番号	SIRPαV1またはSIRPαV2中のいずれかの コンピュータ設計された突然変異(合計)
V	6	A,C,D,E,G,I,L,M,N,Q,S,T (12)
A(V)	27	C,D,G,H,L,N,S,T,V (9)
I	31	A,C,E,K,Q,R,T,V (8)
P	35	A,C,E,G,Q,S (6)
Q	37	A,C,E,G,H,K,L,M,N,R,S,T (12)
E	47	A,C,D,F,G,H,I,K,L,M,N,Q,R,S,T,V,W,Y (18)
Q	52	A,C,E,M (4)
E	54	D (1)
H	56	A,C,D,E,F,G,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y (19)
L(S)	66	A,C,D,E,F,G,H,I,M,N,P,Q,S,T,V,W,Y (17)
T	67	A,C,D,E,F,G,H,I,L,M,N,Q,R,S,V,W,Y (17)
M	72	A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,N,Q,R,S,T,V,W,Y (18)
V	92	A,C,D,E,G,I,M,N,Q,R,S,T (12)

10

20

【0199】

【表 2】

表2:野生型と比較してタイトなCD47結合を有することが予測されるSIRPα突然変異

SIRPαV1 (異なる 場合は SIRPαV2) 残基	配列 番号6または 配列 番号8 残基番号	SIRPαV1またはSIRPαV2中の いずれかのコンピュータ設計された 突然変異(合計)
V	6	A,D,I
A(V)	27	A,G,I,K,Q,R,S,T
I	31	C,K,R,T
P	35	G,N,Q,S
Q	37	A,G,H,W
E	47	G,S,W,Y
Q	52	E,H
E	54	P
H	56	C,I,P,Y
L(S)	66	A,C,D,E,F,H,K,L,M,N,P,Q,V,W
T	67	D,E,F,N,Q,W,Y
M	72	A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,N,Q,R,S,W,Y
V	92	N

30

40

【0200】

主として表2からの単一点突然変異を含有する33のSIRPバリエントを、さらなる実験による特徴付けのために選択した(実施例17の表3参照)。

【0201】

実施例17:抗EGFR-huIgG1-SIRPバリエント

17(A)抗EGFR-huIgG1-SIRPバリエントの構築および発現

抗体-SIRPバリエントを、実施例4に記載の抗EGFR-huIgG1-SIR

50

P V 2 に関して生成した。S I R P アレル V 2 の I g V ドメイン中の突然変異を表 3 (配列番号 8 を参照) に列記する。抗 E G F R - h u I g G 1 - S I R P V 2 バリアントは、抗 E G F R 重鎖ポリペプチドの C 末端をバリアント S I R P V 2 の I g V ドメインに (G 4 S)₄ リンカーを介して結合させることにより生成した。

【 0 2 0 2 】

抗 E G F R - h u I g G 1 - S I R P V 2 バリアントのそれぞれの発現のため、図 1 A におけるように以下の 2 つの遺伝子構築物を標準的な組換え DNA 技術によりアセンブルし、哺乳動物発現ベクター p T T 5 (分泌のためのマウス軽鎖シグナルペプチド配列を含有) 中にクローニングした: (1) それぞれのバリアントについて表 3 に列記される特定の突然変異をコードするように改変される配列を有する構築物 V H (抗 E G F R) - C H 1 - H - C H 2 - C H 3 - (G 4 S)₄ - S I R P V 2 (配列番号 1 9); この構築物は、以下のエレメントをコードした: 抗 E G F R 重鎖可変ドメイン、それに続くヒト重鎖定常ドメイン 1 ~ 3 アイソタイプ I g G 1、それに続く (G 4 S)₄ リンカーおよびバリアント S I R P V 2 の I g V ドメインならびに (2) 以下のエレメント: 抗 E G F R 軽鎖可変ドメイン、それに続くヒトカッパ軽鎖定常ドメインをコードする構築物 V L (抗 E G F R) - C L (配列番号 1 3)。これら 2 つの構築物についての対応するアミノ酸配列を、それぞれ配列番号 2 0 (配列は、表 3 に列記される特定の突然変異を含むように改変しなければならない) および配列番号 1 4 に示す。

【 0 2 0 3 】

抗 E G F R - h u I g G 1 - S I R P V 2 バリアントのそれぞれの発現のため、抗 E G F R - h u I g G 1 - S I R P V 2 バリアントのそれぞれについての 2 つのベクターのセットを、Expi293 細胞中に Expi293fectin (Life Technologies, Grand Island, NY) を使用して一過的に同時形質移入した。タンパク質を、プロテイン A 親和性クロマトグラフィーによる単一ステップで精製した。2 つのポリペプチドの発現および完全四量体分子のアセンブリを、サイズ排除クロマトグラフィー (S E C) 上で確認した。S E C のため、精製タンパク質試料を、5 0 m M のリン酸ナトリウム、4 0 0 m M の過塩素酸ナトリウム、p H 6 . 3 + 0 . 1 および 3 8 + 2 . 0 m S / c m² により平衡化された TSK-GEL Super SW3000 S E C カラム 4 . 6 _ 3 0 0 m m (Tosoh Biosciences、東京、日本) 上で分析した。サイズ排除クロマトグラフィーは、単量体抗 E G F R - h u I g G 1 - S I R P V 2 についての約 1 7 3 k D a の予測 MW におけるピークを示した。全ての S E C ピークに対する単量体ピークの割合を表 3 のそれぞれのバリアントについて報告した。

【 0 2 0 4 】

さらに、野生型抗 E G F R - h u I g G 1 - S I R P V 2 (「W T」)、キメラ抗体 B 6 H 1 2 / h u I g G 1 (「抗 C D 4 7」)、および複数の突然変異を有する抗 E G F R - h u I g G 1 - S I R P V 2 (「1 D 4」(V 2 7 I / K 5 3 R / S 6 6 T / K 6 8 R / F 1 0 3 V)、(Weiskopf, Science 341:88, 2013); 「A S 2」(K 5 3 R / S 6 6 T / K 6 8 R); および「A S 1」(L 4 V / V 2 7 I / I 3 1 T / K 5 3 R / S 6 6 T / K 6 8 R / F 9 4 L)) を陽性対照として生成し、抗 E G F R を陰性対照として生成した。

【 0 2 0 5 】

1 7 (B) (i) 細胞上で発現された C D 4 7 への抗 E G F R - h u I g G 1 - S I R P バリアントの結合

細胞表面上で過剰発現された C D 4 7 に結合する抗 E G F R - h u I g G 1 - S I R P V 2 バリアントの能力を計測し、対照分子と比較した。高レベルの C D 4 7 を発現するように形質移入されたウェル当たり 2×10^5 個の C H O 細胞を、P B S + 1 % の F B S 中で希釈された変動濃度の抗体と 9 6 ウェルプレート中で氷上で 6 0 分間インキュベートした。P B S + 1 % の F B S により洗浄した後、細胞を、P B S + 1 % の F B S 中で 1 : 2 0 0 希釈された F I T C - F (a b ') 2 ヤギ抗ヒト I g G、F c (Jackson Immuno Research, West Grove, PA) と氷上で 6 0 分間インキュベートした。再度洗浄した後、細胞を P B S 中 1 % のホルムアルデヒドにより固定した。細胞をフローサイトメトリー (MACS

10

20

30

40

50

Quant, Miltenyi Biotec, Cologne, Germany) により分析した。それぞれのバリエーションについて、CHO細胞上で発現されたCD47への結合について、Graph Pad Prismによりデータをシグモイド曲線 (\log (アゴニスト) 対応答 - 変数傾斜 (4つのパラメータ)) にフィットさせることによりEC50を計算し、表3に報告した。

【0206】

結果は、多くの抗EGFR-huIgG1-SIRP V2バリエーション、例として、V6I、V27I、I31R、I31T、Q37H、Q37W、H56P、およびS66Qが、形質移入CHO細胞上で発現されたCD47に、野生型抗EGFR-huIgG1-SIRP V2よりも高い親和性で結合したことを示す(表3) 一方、バリエーションE54PおよびM72Rは類似の親和性で結合した。予測されるとおり、陽性対照の抗CD47、1D4、AS2、およびAS1もCD47により大きい親和性で結合し、陰性対照の抗EGFRは結合しなかった。それというのも、EGFRは発現されないためである。結果は、SIRP 中の単一点突然変異がCD47についてのSIRP の親和性を増加させるために十分であることを示す。

【0207】

固有結合親和性を比較するため、すなわち、高い受容体密度において生じる二価エンゲージメントに起因するアビディティ効果を最小化するため、低レベルのCD47を発現する細胞への抗EGFR-huIgG1-SIRP V2バリエーションおよび対照分子の結合を決定した。ウェル当たり 2×10^5 個のCD47^{hi} ヒトRamossリンパ腫細胞を、PBS + 1%のFBS中で希釈された変動濃度の抗体と96ウェルプレート中で氷上で60分間インキュベートした。PBS + 1%のFBSにより洗浄した後、細胞を、PBS + 1%のFBS中で1:200希釈されたFITC-F(ab')₂ ヤギ抗ヒトIgG、Fc (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) と氷上で60分間インキュベートした。再度洗浄した後、細胞をPBS中1%のホルムアルデヒドにより固定した。細胞をフローサイトメトリー (MACSQuant, Miltenyi Biotec, Cologne, Germany) により分析した。それぞれのバリエーションについて、Ramoss細胞上で発現されたCD47への結合について、Graph Pad Prismによりデータをシグモイド曲線 (\log (アゴニスト) 対応答 - 変数傾斜 (4つのパラメータ)) にフィットさせることによりEC50を計算し、表3に報告した。

【0208】

結果は、多くの抗EGFR-huIgG1-SIRP V2バリエーション、例として、V6I、V27I、I31R、I31T、Q37H、Q37W、E54P、H56P、S66Q、およびM72RがRamoss細胞上で発現されたCD47に、野生型抗EGFR-huIgG1-SIRP V2よりも高い親和性で結合したが(表3)、バリエーション間のEC50値の差は、CD47^{hi} 細胞について見られる差と比較して大きかったことを示す。予測されるとおり、陽性対照の抗CD47、1D4、AS2、およびAS1もCD47により大きい親和性で結合し、陰性対照の抗EGFRはRamoss細胞に結合しなかった。それというのも、EGFRは発現されないためである。

【0209】

血球の細胞表面上で発現されたCD47に結合するより高い親和性の抗EGFR-huIgG1-SIRP V2バリエーションの能力を計測し、対照分子と比較した。健常ヒトドナーからのウェル当たり 2×10^5 個の新鮮全血細胞を、PBS + 1%のFBS中で希釈された $50 \mu\text{g/ml}$ のタンパク質と96ウェルプレート中で氷上で60分間インキュベートした。PBS + 1%のFBSにより洗浄した後、抗EGFR-huIgG1-SIRP V2バリエーションの結合を検出するためのPBS + 1%のFBS中1:200希釈のFITC-F(ab')₂ ヤギ抗ヒトIgG、Fc (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) および赤血球を選択するための1:100の希釈のPEマウス抗ヒトCD235a (BD Biosciences, San Jose, CA) と細胞を氷上で60分間インキュベートした。再度洗浄した後、細胞をPBS中1%のホルムアルデヒドにより固定した。細胞をフローサイトメトリー (MACSQuant, Miltenyi Biotec, Cologne, Germany) により分析した。 $50 \mu\text{g/ml}$

1のそれぞれの抗EGFR-huIgG1-SIRPV2バリエーションにおける蛍光強度中央値(MFI)を決定し、表3に報告した。さらに、赤血球への結合の程度を抗CD47 MFIの% $\left((100 \times (\text{タンパク質のMFI}) / (\text{抗CD47のMFI})) \right)$ として表現した。

【0210】

結果は、既に示されたとおり(図7B)、抗CD47が赤血球上で発現されたCD47に結合するが、抗EGFR-huIgG1-SIRPV2が結合しない(表3)ことを裏付けた。抗EGFR-huIgG1-SIRPV2バリエーションのいくつか、例として、V6I、V27I、I31T、Q37H、E54P、およびM72Rは、野生型抗EGFR-huIgG1-SIRPV2(抗CD47結合の3%以下)と同様に、赤血球への結合の欠落を保持した。しかしながら、他のバリエーション、例として、I31RおよびS66Qは、陽性対照1D4(53%)、AS2(12%)、およびAS1(37%)と同様に、いくらかの赤血球への結合レベル(それぞれ、抗CD47結合の12%および21%)を有した。Q37WおよびH56Pのみが赤血球に弱く結合した(抗CD47結合の4%)。

【0211】

【表 3】

表3:SECによる単量体率、CD47^{HI}細胞(CD47形質移入CHO細胞)およびCD47^{LO}細胞(Ramos細胞)上で発現されたCD47への結合のEC50(nM)、ヒト赤血球(RBC)に結合している50μg/mlにおけるタンパク質のMFI(平均蛍光強度)、および抗CD47MFIに対するRBC結合の%((100×(タンパク質のMFI)/(抗CD47のMFI))として計算)を示す抗EGFR-hulgG1-SIRPαV2バリエーションのリスト。野生型抗EGFR-hulgG1-SIRPαV2(「WT」)、陽性対照のキメラ抗体B6H12/hulgG1(「抗CD47」)、および陰性対照の抗EGFRを太字で、より高い親和性SIRPα陽性対照(「1D4」、「AS2」および「AS1」)をイタリックで示す。

タンパク質	% 単量体	CD47 ^{HI} 細胞 EC50 (nM)	CD47 ^{LO} 細胞 EC50 (nM)	RBC MFI	抗CD47の % RBC MFI
WT	97	8	85	0.4	2%
抗CD47	96	7	6	23.3	100%
抗EGFR	99	NB	NB	0.3	1%
<i>1D4</i>	<i>97</i>	<i>3</i>	<i>2</i>	<i>12.1</i>	<i>52%</i>
<i>AS2</i>	<i>97</i>	<i>3</i>	<i>2</i>	<i>2.9</i>	<i>12%</i>
<i>AS1</i>	<i>94</i>	<i>7</i>	<i>3</i>	<i>8.7</i>	<i>37%</i>
V6I	96	3	9	0.4	1%
V27I	97	2	2	0.7	3%
V27Q	93	> 100			
I31R	91	2	14	2.9	12%
I31T	97	4	13	0.5	2%
P35G	97	18			
P35N	97	> 100			
Q37A	96	> 100			
Q37H	96	6	71	0.3	2%
Q37V	97	13			
Q37W	95	2	3	1	4%
E47Y	97	10			
Q52E	88	> 100			
Q52H	90	> 100			
E54P	91	8	81	0.3	1%
H56P	97	2	13	0.9	4%
H56Y	90	12			
S66E	90	33			

【 0 2 1 2 】

【表 4】

タンパク質	% 単量体	CD47 ^{HI} 細胞 EC50 (nM)	CD47 ^{LO} 細胞 EC50 (nM)	RBC MFI	抗CD47の % RBC MFI
S66H	86	25			
S66Q	90	5	2	4.9	21%
S66W	97	> 100			
T67E	91	> 100			
T67W	91	> 100			
K68A	97	> 100			
K68E	97	> 100			
K68H	99	56			
K68I	97	> 100			
K68T	97	> 100			
M72I	96	> 100			
M72N	90	40			
M72R	87	8	84	0.3	1%
M72W	96	> 100			
V92N	80	72			
K53I+K68I	97	NB			
K53N+K68E	98	NB			
K53Q+K68T	97	NB			
K53T+K68A	95	NB			
K53V+K68H	97	NB			

【0213】

癌の治療における抗EGFR-huIgG1-SIRP 融合タンパク質の治療指数を潜在的に改善するため、抗EGFR-huIgG1-SIRP と比較してCD47^{HI} およびCD47^{LO}細胞上のCD47への結合の最適な増加、および赤血球への結合の相対欠落（特に、抗CD47と比較して）を有する抗EGFR-huIgG1-SIRP バリエーションを選択することが望ましいことがある。例えば、野生型抗EGFR-huIgG1-SIRP と比較して約5倍から約30倍のCD47^{LO}細胞への結合の増加、および抗CD47と比較して約30%以下、約10%以下、約5%以下、または約3%以下の赤血球への結合を有するバリエーションを選択することができる。このような基準を満たす場合、例示的バリエーション抗EGFR-huIgG1-SIRP V2(Q37W)の生物学的活性をさらに特徴付けした。異なる腫瘍抗原、例えば、CD20またはHER2を標

【0214】

実施例18：抗EGFR-huIgG1-SIRP (Q37W)

18(A)抗EGFR-huIgG1-SIRP (Q37W)の構築および発現

抗EGFR-huIgG1-SIRP V2(Q37W)の発現のため、実施例17からの抗EGFR-huIgG1-SIRP V2(Q37W)ベクターを、Expi293細胞中にExpi293fectin (Life Technologies, Grand Island, NY) を使用して一過的に同時形質移入した。タンパク質を、プロテインA親和性クロマトグラフィーによる単一ステップで精製した。2つのポリペプチドの発現および完全四量体分子のアセンブリを、ドデシル硫

酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) およびサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 上で確認した。SDS-PAGE のため、精製タンパク質試料を DTT により還元し、NuPAGE MES 4-12% Gel 上で 200 V において 35 分間ランさせ、次いでクーマシー染色した。ゲル上の 2 つの主要バンドは、予測分子量 (MW) および正確な化学量論比を > 95 % 純度で有した (図 22A)。図 22A において、レーン 1 は分子量 (MW) マーカーを示し、レーン 2 は予測 MW (64, 23 kDa) および抗 EGFR-huIgG1-SIRP V2 (Q37W) の 2 つのポリペプチドの正確な化学量論比 (1:1) を示す。SEC のため、精製タンパク質試料を、50 mM のリン酸ナトリウム、400 mM の過塩素酸ナトリウム、pH 6.3 + 0.1 および 38 + 2.0 mS/cm² により平衡化された TSK-GEL Super SW3000 SEC カラム 4.6 × 300 mm (Toso 10 h Biosciences、東京、日本) 上で分析した。サイズ排除クロマトグラフィーは、単量体抗 EGFR-huIgG1-SIRP V2 (Q37W) についての約 173 kDa の予測 MW におけるピークを示した (図 22B)。

【0215】

さらに、標準的なモノクローナル抗体フォーマットの抗 EGFR および抗 CD47 (抗 EGFR huIgG1 および抗 CD47 huIgG1) ならびに Fc 融合タンパク質フォーマットの SIRP (SIRP V2-Fc、Fc-SIRP V2、および Fc-SIRP V2 (Q37W)) (図 1C) ならびに野生型抗 EGFR-huIgG1-SIRP V2 を対照として生成して抗 EGFR-huIgG1-SIRP V2 (Q37W) と比較した。 20

【0216】

18 (B) 抗 EGFR-huIgG1-SIRP (Q37W) のインビトロ生物学的活性

赤血球を赤血球凝集させる抗 EGFR-huIgG1-SIRP V2 (Q37W) の能力を決定し、対照分子と比較した。ウェル当たり 30 ~ 50 μ l の新鮮ヒト全血細胞を、100 μ l の HBSS + 0.5 % の BSA の総容量で 1、3、10 および 30 μ g/ml の試験タンパク質と、96 ウェルプレート中で 37 °C において 2 ~ 4 時間インキュベートした。プレートを遠心分離し、上清を除去した。細胞ペレットを 100 μ l の PBS により再懸濁させた。ウェルを、RBC の完全可溶化 (赤血球凝集なし)、部分的なペレットおよび可溶化 (+ 赤血球凝集) および可溶化なしの細胞の緻密ペレット (++) 赤血球凝集) 間で順位付けした。 30

【0217】

結果は、抗 CD47 が赤血球を赤血球凝集させるが (3 μ g/ml において + 赤血球凝集、ならびに 10 および 30 μ g/ml において ++ 赤血球凝集)、抗 EGFR-huIgG1-SIRP V2 は全ての試験濃度において赤血球凝集させないことを裏付け、図 7B に示される赤血球結合の欠落と相関した (データ示さず)。赤血球への抗 EGFR-huIgG1-SIRP V2 (Q37W) の増加した結合にもかかわらず、抗 EGFR-huIgG1-SIRP V2 (Q37W) も、全ての試験濃度において、赤血球を赤血球凝集させなかった。このデータは、抗 EGFR-huIgG1-SIRP V2 (Q37W) が、赤血球関連毒性を増加させない結合の増加により、より良好な治療指数を達成し得るというさらなる補強証拠を提供する。 40

【0218】

18 (C) 抗 EGFR-huIgG1-SIRP (Q37W) のインビボ生物学的活性
抗 EGFR-huIgG1-SIRP V2 (Q37W) の有用性は、インビボ実験により示される。同所性肺腫瘍モデルにおいて、NOD-SCID マウスに、 2.5×10^6 個のヒト A549-luc 扁平上皮癌細胞を静脈内注射し、次いで 400 μ g/マウスの抗体アイソタイプ対照、250 μ g/マウスの抗 EGFR、298 μ g/マウスの抗 EGFR-huIgG1-SIRP V2、または等モル量の融合タンパク質である 298 μ g/マウスの抗 EGFR-huIgG1-SIRP V2 (Q37W) を腹腔内注射した。全ての群 (n = 8) は、週 2 回の処理を 3 週間受け、結果を肺からの生物発光シグナ 50

ル、一般的健康状態、例えば、死亡前に10～14日だけ生じる麻痺、およびマウスの生存率として報告した。

【0219】

抗EGFR-huIgG1-SIRP V2(Q37W)融合タンパク質による処理は、2つの単独療法および抗EGFR-huIgG1-SIRP V2よりも優れていることが見出された(図23)。融合タンパク質のSIRP V2部分中の単一Q37W突然変異の導入は、生存日数中央値を、野生型抗EGFR-huIgG1-SIRP V2についての43.5日から55日に改善し、差は高度に有意である($p=0.0019$)。結果は、CD47についてのSIRPの親和性の増加が、向上した抗腫瘍効力をもたらしたことを明らかに示し、理論により拘束されるものではないが、それは向上したアビディティドライブCD47結合、および免疫細胞による排除のためのA549細胞の標化により最も容易に説明することができる。次いで、野生型抗EGFR-huIgG1-SIRP V2は、抗EGFR抗体よりも有効であり、生存日数中央値を35.5日から43.5日に延長させ($p=0.0187$)、事前の実験(図9B)において観察されたものを裏付けた。したがって、このデータは、抗EGFR-huIgG1-SIRP V2(Q37W)が、赤血球関連毒性を増加させない効力の改善により、より良好な治療指数を達成し得るというさらなる補強証拠を提供する。

10

【0220】

実施例19：抗CD20-huIgG1-SIRP (Q37W)

19(A)抗CD20-huIgG1-SIRP (Q37W)の構築および発現

20

例示的な抗CD20-huIgG1-SIRP V2(Q37W)の生成は、実施例2に記載の抗CD20-huIgG1-SIRP V2をベースとする。抗CD20-huIgG1-SIRP V2(Q37W)は、抗CD20重鎖ポリペプチドのC末端を、Q37W突然変異を含有するバリエーションSIRP V2のIgVドメインに(G4S)₄リンカーを介して結合させることにより生成した。

【0221】

抗CD20-huIgG1-SIRP V2の発現のため、図1Aにおけるように以下の2つの遺伝子構築物を標準的な組換えDNA技術によりアセンブルし、哺乳動物発現ベクターpTT5(分泌のためのマウス軽鎖シグナルペプチド配列を含有)中にクローニングした：(1)以下のエレメント：抗CD20重鎖可変ドメイン、それに続くヒト重鎖定常ドメイン1～3アイソタイプIgG1、それに続く(G4S)₄リンカーおよびQ37Wにおける突然変異を有するバリエーションSIRP V2のIgVドメインをコードする構築物VH(抗CD20)-CH1-H-CH2-CH3-(G4S)₄-SIRP V2(Q37W)(突然変異Q37WをコードするSIRP アレルV2により変更された配列番号11)ならびに(2)抗CD20軽鎖可変ドメイン、それに続くヒトカッパ軽鎖定常ドメインをコードする構築物VL(抗CD20)-CL(配列番号1)。これら2つの構築物についての対応するアミノ酸配列を、それぞれ、SIRP アレルV2突然変異Q37Wをさらに含有する配列番号12および配列番号2に示す。

30

【0222】

抗CD20-huIgG1-SIRP V2(Q37W)発現のための2つのベクターのセットを、Expi293細胞中にExpi293fectin(Life Technologies,Grand Island,NY)を使用して一過的に同時形質移入した。タンパク質を、プロテインA親和性クロマトグラフィーによる単一ステップで精製した。2つのポリペプチドの発現および完全四量体分子のアセンブリを、SDS-PAGEおよびSEC上で確認した。SDS-PAGEのため、精製タンパク質試料をDTTにより還元し、NuPAGE MES 4-12% Gel上で200Vにおいて35分間ランさせ、次いでクーマシー染色した。ゲル上の2つの主要バンドは、予測MWおよび正確な化学量論比を>95%純度で有した(図24A)。図24Aにおいて、レーン1は分子量(MW)マーカを示し、レーン2は予測MW(63,23kDa)および抗CD20-huIgG1-SIRP V2の2つのポリペプチドの正確な化学量論比(1:1)を示す。SECのため、精製タンパク質試料を、50mMのリン酸ナトリウム、

40

50

400 mMの過塩素酸ナトリウム、pH 6.3 + 0.1および38 + 2.0 mS/cm²により平衡化されたTSK-GEL Super SW3000 SECカラム4.6 × 300 mm (Tosoh Biosciences、東京、日本)上で分析した。サイズ排除クロマトグラフィーは、単量体抗CD20-huIgG1-SIRPV2 (Q37W)についての約172 kDaの予測MWにおけるピークを示した(図24B)。

【0223】

さらに、標準的なモノクローナル抗体フォーマットの抗CD20および抗CD47 (抗CD20-huIgG1および抗CD47-huIgG1)ならびにFc融合タンパク質フォーマットのSIRPV2 (SIRPV2-Fc、Fc-SIRPV2、およびFc-SIRPV2 (Q37W)) (図1C)ならびに実施例2からの野生型抗CD20-huIgG1-SIRPV2を対照として生成して抗CD20-huIgG1-SIRPV2 (Q37W)と比較した。

10

【0224】

19(B)抗CD20とFc-SIRPV2 (Q37W)との組合せのインビボ生物学的活性

抗CD20-huIgG1-SIRPV2と比較して改善された抗CD20-huIgG1-SIRPV2 (Q37W)の生物学的活性についての指標として、マウスにおける播種性リンパ腫モデルを使用して抗CD20と、Fc-SIRPV2またはFc-SIRPV2 (Q37W)とのいずれかの組合せを試験した。SCIDマウスに、5 × 10⁶個のCD20+ヒトDaudiリンパ腫細胞を静脈内注射し、次いで25 μg/マウスの抗体アイソタイプ対照、25 μg/マウスの抗CD20、25 μg/マウスの抗CD20および14 μg/マウスのFc-SIRPV2の組合せ、または25 μg/マウスの抗CD20および14 μg/マウスのFc-SIRPV2 (Q37W)の組合せを腹腔内注射した。全ての群(n = 10)は、週2回の処理を3週間受け、結果を一般的健康状態、例えば、死亡前に10~14日だけ生じる麻痺、およびマウスの生存率として報告した。

20

【0225】

本実験は依然として完了されていない一方、処理開始の100日後において、抗CD20およびFc-SIRPV2 (Q37W)の組合せにより処理された10匹のマウスの10匹、ならびに抗CD20およびFc-SIRPV2の組合せにより処理された10匹のマウスの8匹が、抗CD20単独により処理された10匹のマウスの6匹と比較して依然として生存することが見出された(図25)。したがって、これまでのところ、抗CD20およびFc-SIRPV2 (Q37W)の組合せによる処理が、抗CD20およびFc-SIRPV2の組合せよりも優れており、次いでそれは抗CD20単独療法よりも優れていることが見出された。抗CD20-huIgG1-SIRPV2 (Q37W)も、抗CD20-huIgG1-SIRPV2と比較して改善された活性を有することが予測される。

30

【0226】

【表 5】

表4:アミノ酸および核酸配列

配列 番号	名称	説明	配列
1	抗CD20- LC	<u>2B8(VL)</u> -CK	<p>CAAATTGTTCTCTCCAGTCTCCAGCAATCCTGTCTGCATCTCCA GGGGAGAAGGTCACAATGACTTGCAGGGCCAGCTCAAGTGTA AGTTACATCCACTGGTTCCAGCAGAAGCCAGGTTCTCCCCCAA ACCCTGGATTTATGCCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGT TCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACTTCTTACTCTCTACCAT CAGCAGAGTGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAG CAGTGGACTAGTAACCCACCCACGTTTCGAGGGGGGACCAAGC TGGAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTC CCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGT GTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAG TGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGA GTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAG CAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAA AGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCG TCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT</p>
2	抗CD20- LC	<u>2B8(VL)</u> -CK	<p>QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSIHWFQKPGSSPKP WIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQW TSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSTLTSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC</p>
3	抗 CD20(VH)- CH1	<u>2B8(VH)</u> -CH1	<p>CAAGTCCAATTGCAGCAGCCCGGCGCCGAACCTCGTGAAGCCGG GAGCTTCCGTGAAAATGAGCTGCAAGGCCTCCGGATACACCTT CACCTCCTACACATGCACTGGGTGAAACAGACCCAGGGAGG GGTCTGGAGTGGATTGGGGCTATCTACCCGGGAAACGGCGAC ACCAGCTATAACCAAGAAGTTTAAGGGAAAGGCCACCTGACTG CCGACAAGTCTCGTGCAGTGCATACATGCAGCTCTCGAGCTG ACTTCGAGGACAGCGCAGTGTATTACTGCGCACGCTCCACTTA CTACGGCGGAGATTGGTACTTCAACGTCTGGGGCGCGGGCACC ACTGTGACTGTGTCGGCCGCCTCCACTAAGGGCCCTAGCGTGT CCCCTTGGCGCCATCGTCAAAGTCCACCTCCGGTGGCACTGCCG CCCTGGGATGCCTTGTGAAGGACTACTTCCCGAACCTGTGACC GTGTCTGGAACCTCGGGCGCACTGACTTCGGGGGTGCACACCT TTCCTGCCGTCTGCAATCGAGCGGTCTGTACTCCCTCTCGTCCG TGGTCACCGTGCCGTCTAGCTCCCTCGGAACCCAGACCTACATC TGCAACGTCAACCAAGCCGAGCAACACCAAAGTGGATAAGA GAGTGGAGCCGAAGTCATGC</p>
4	抗 CD20(VH)- CH1	<u>2B8(VH)</u> -CH1	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPG RLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLT SEDSAVYYCARSTYYGWDWYFNVWGAGTTVTVAASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA</p>

【表 6】

配列番号	名称	説明	配列
			VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKRVEPKSC
5	huSIRPαV 1	huSIRPa_ECD(V1-c1-C2)- 膜貫通-CD	<p>GAGGAGGAGCTGCAGGTGATTGAGCCTGACAAGTCCGTGTTGG TTGCAGCTGGAGAGACAGCCACTCTGCGCTGCACTGCGACCTCT CTGATCCCTGTGGGGCCCATCCAGTGGTTGAGAGGAGCTGGACC AGGCCGGGAATTAATCTACAATCAAAAAGAAGGCCACTTCCCC GGGTAACTGTTTCAGACCTCACAAGAGAAACAACATGGAC TTTCCATCCGCATCGGTAACATCAGCCAGCAGATGCCGGCACC TACTACTGTGTGAAGTTCCGGAAGGGAGCCCCGATGACGTGG AGTTTAAGTCTGGAGCAGGCACTGAGCTGTCTGTGCGGCCAAA CCCTCTGCCCCGTGGTATCGGGCCCTGCGCGAGGGCCACACC TCAGCACACAGTGAGCTTCACCTGCGAGTCCCACGGCTTCTACC CAGAGACATCACCTGAAATGGTTCAAAAATGGGAATGAGCTCT CAGACTTCCAGACCAACGTGGACCCGTTAGGAGAGAGCGTGTCC TACAGCATCCACAGCACAGCAAGGTGGTGTGACCCGCGAGG ACGTTCACTCTCAAGTCATCTGCGAGGTGGCCACGTACCTTGC AGGGGGACCTCTTCGTGGGACTGCCAACTTGTCTGAGACCATC CGAGTTCACCCACCTTGAGGTTACTCAACAGCCCGTGAGGGC AGAGAACCAGGTGAATGTACCTGCCAGGTGAGGAAGTTCTACC CCCAGAGACTACAGCTGACCTGGTTGGAGAATGGAACGTGTCC CGGACAGAAACGGCCTCAACCGTTACAGAGAACAAGGATGGTA CCTACAAGTGGATGAGCTGGCTCCTGGTGAATGTATCTGCCCAC AGGGATGATGTGAAGCTCACCTGCCAGGTGGAGCATGACGGGC AGCCAGCGGTGAGCAAAAGCCATGACCTGAAGGTCTCAGCCAC CCGAAGGAGCAGGGCTCAAATACGCCGCTGAGAACACTGGAT CTAATGAACGGAACATCTATATTGGTGGGTGTGGTGTGCACC TTGCTGGTGGCCCTACTGATGGCGGCCCTTACCTCGTCCGAATC AGACAGAAGAAAGCCAGGGCTCCACTTCTTACAAGTTGCA TGAGCCCGAGAAGAATGCCAGAGAAATAACACAGGACACAAAT GATATCACATATGCAGACCTGAACCTGCCAAGGGGAAGAAGCC TGCTCCCCAGGCTGCGGAGCCCAACAACACACGAGTATGCCA GCATTAGACCAGCCCGCAGCCCGCTCGGAGGACACCCTCACC TATGCTGACCTGGACATGGTCCACCTCAACCGGACCCCAAGCA GCCGGCCCCAAGCCTGAGCCGTCTTCTCAGAGTACGCCAGCG TCCAGGTCCCGAGGAAG</p>
6	huSIRPαV 1	huSIRPa_ECD(V1-c1-C2)- 膜貫通-CD	<p>EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLIPVGPIQWFRGAGPGR ELIYNQKEGHFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYICV KFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRakpsapvvsgpaaratpqhtvsftcesh gfsprditlkwfknelsdfqtnvdpvgesvsysihstakvltredvhsqviceva hvtlqgdplrgtanlsetirvpPTLEVTTQPPVRAENQVNVTCQVRKFYPQ RLQLTWLENGNVSRTEASTVTENKDGTYNWMWLLVNVSAHR DDVKLTQVEHDGQPAVSKSHDLKVSHPKEQGSNTAAENTGS NERNIYivvgvvtllvalliiaalylvRIRQKKAQGSTSSTRLHEPEKNAREI TQDNDITYADLNLPGKGPAPQAAEPNNHTEYASIQTSPPQASED</p>

【表 7】

配列番号	名称	説明	配列
			TLTYADLDMVHLNRTPKQPAPKPEPSFSEYASVQVPRK
7	huSIRPaV2(IgV)	huSIRPa_IgV(V2)	GAGGAAGAGCTGCAGGTCATCCAGCCTGACAAGTCAGTCAGCGTGGCAGCTGGAGAGAGCGCCATTCTGCACTGCACAGTCACTTCCCTGATCCCAGTGAGGACCCATTAGTGGTTCGAGGCGCAGGACCAGCCAGGGAAGTATCTACAACCAGAAGGAGGGCCATTTCCCCGCGTCACAACCGTGAGCGAATCTACCAAACGAGAGAATATGGACTTTAGTATCTCAATTAGCAACATTACTCCCGCTGATGCAGGCACCCTACTATTGCTGAAGTTCCGAAAGGAAGCCCTGACACTGAGTTCAAGTCCGGGGCCGGCACCAGCTGTCTGTGCGC
8	huSIRPaV2(IgV)	huSIRPa_IgV(V2)	<u>EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSIPVGP IQWFRGAGPAR ELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTYCYVK FRKGSPTDFKSGAGTELSVR</u>
9	抗CD20(VH)-CH1	2B8(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3)- (huIgG1m3:ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPa(V1)	CAAGTCCAATTGCAGCAGCCCCGGCGCGGAAGTCTGTAAGCCGGGAGCTTCCGTGAAAATGAGCTGCAAGGCCTCCGGATACACCTTACCTCTACAACATGCACTGGGTGAAACAGACCCAGGGAGGGGTCTGGAGTGGATTGGGGTATCTACCCGGGAAACGGCGACACAGCTATAACCAGAAGTTTAAGGGAAAGGCCACCCTGACTGCCGACAAGTCTCGTCACTGCATACATGCAGCTCTCGAGCCTGACTTCCGAGGACAGCGCAGTGTATTACTGCGCACGCTCCACTTACTACGGCGAGATTGGTACTTCAACGTCTGGGGCGCGGGCACCCTGTGACTGTGTGCGCCgcctccactaagggccctagcgtgttcccttggcgccatcgtaaaagtcacactccggtggcactgcccgcctgggatgccttgtgaaggactacttccccgaacctgtgacctgtcctggaactcgggcgcactgacttcgggggtgcacaccttctctgcccgtcgaatcgagcgggtctgtactccctctcgtcgtgtgacccgtgcgtctagctccctcggaaccagacctacatctgcaacgtcaaccacaagccgagcaacaccaaagtgataagagagtggAGCCGAAGTCATGCGACAAGACTCATACTTGTCCTCCCATGCCCCGCCCCGGAAGTCTGCTGGGGggcccatccgtgttctgttcccgccgaacctaaggacacctgatgatttcgagaactccggaagtgcactgtgtggtggtgcagctgtccacagaggatccggaggtcaagtccaattggtacgtgcagcggagtgggaagtcacaacgccaaagaccaagccccgggaggagcagtagaactccacttaccgggtggtgtcgtgtgacgtgtgtgcatcaggattggctgaacggaaaggagtataagtgaagtgtaaacaaaggcaattgctgcgcaatcgaaaagaccattagcaaggccaagGCCAGCCAGGGAACACAGGTGTACACTCTGCCCCCTCCCGCAAGAAATGACCAAGAACCAAGTGCTCACTGACATGCCTCGTGAAGGGATTITACCGTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAATCGAACGGTCAACCTGAACAACACTACAAGACGACCCCTCCGGTCTGGACAGCGATGGCTCATCTTCTGTACTCCAAGCTTACGGTGGACAAGTCCCGGTGGCAACAGGGAAATGTGTTTTCTGTCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCACTCTCCCTGAGCCCCGGCGc

【表 8】

配列 番号	名称	説明	配列
			gggggtggtggaagcggaggaggggggtctgggggtggcggttccggcgggcgcg gatccGAGGAGGAACTTCAGGTCATCCAGCCGACAAGAGCGTG CTCGTGGCGGCCGGAGAAACCGCAACTCTGAGATGCACCGCTA CCTCGTGATTCCCGTGGGGCCTATCCAGTGGTTCCGCGGGGCC GGACCCGGACGCGAGCTCATCTACAACCAGAAGGAGGGGCAC TTCCGAGGGTCACCACCGTGTGCGGACCTACCAAGCGCAACA ACATGGACTTCAGCATTGCGATCGGCAACATCACCCCGCCGAC GCCGGCACCTATTACTGCGTGAAGTTCGGAAGGGCAGCCCTG ACGACGTGGAGTTCAAAGCGGAGCCGGAACCGAGCTGTCCG TGAGA
10	抗 CD20- hulG1- SIRPαV1	2B8(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) -(hulG1m3:ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPa(V1)	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYFTSYNMHWVKQTPGR GLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSE DSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAastkgpsvflapss kstsggtaalgclvkdyppepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvp ssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGgpsvfl fppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeq ynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapietkiskakGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK SLSPGaggggsggggsggggsggggsggggEEELQVIQPKSVLVAAGETAT LRCTATSLIPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQKEGHFPRVTTVSDLT RNNMDFSIRIGNITPADAGTYVCVKFRKGSPPDVEFKSGAGTELS VR
11	抗 CD20- hulG1- SIRPαV2	2B8(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) -(hulG1m3:ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPa(V2)	CAAGTCCAATTGCAGCAGCCCGGCCCGAACTCGTGAAGCCGG GAGCTTCCGTGAAAATGAGCTGCAAGGCCTCCGATACACCTTC ACCTCTACAACATGCACTGGGTGAAACAGACCCAGGGAGGG GTCTGGAGTGATTGGGGCTATCTACCCGGGAAACGGCGACAC CAGCTATAACCAGAAGTTAAGGGAAAGGCCACCTGACTGCCG ACAAGTCTCGTCTGACTGCATACATGCACTCTCGAGCTGACTT CCGAGGACAGCGCAGTGTATTACTGCGCACGCTCCACTTACTAC GGCGGAGATTGGTACTTCAACGTCTGGGGCGCGGCACCACTG TGACTGTGTCGCCgcctcactaaggccctagcgtgttcccttgccgcat cgtcaaagtccactccggtggcactgcccctgggatgccttgaaggactactt cccgaacctgtgacctgtcctggaactcggcgactgacttcgggggtgcacac ctttctgccgtcctgcaatcgagcggtctgtactcctctcgtccgtggtcaccgtgc cgttagctccctcggaaccagacctacatctgcaacgtcaaccacaagccgagc aacaccaaagtgataagagagtgGAGCCGAAGTCATGCGACAAGACT CATACTGTCCCCCATGCCCGCCCCGGAAGTGTGGGGgggcccatt ccgtgttctgttcccggaacctaaaggacacctgatgttgcgagaactcc

【表 9】

配列番号	名称	説明	配列
			<p> <u>ggaagtgaacctgtgtggtggtcgacgtgtcccacgaggatccggaggtcaagt</u> <u>tcaattggtacgtcgacggagtggaaagtcacaacgccaaagccaagccccgg</u> <u>gaggagcagtacaactccacttacggggtggtgtccgtgctgacctgtgtcat</u> <u>caggattggctgaacggaaaggagtataagtgcaaagtgtcaacaaggca</u> <u>ttgcttgcgcaatcgaaaagaccattagcaaggccaag</u><u>GGCCAGCCCG</u> <u>GGAACCACAGGTGTACACTCTGCCCCGTCCCGCGAAGAAATGA</u> <u>CCAAGAACCAAGTGTCACTGACATGCCTCGTGAAGGGATTTTAC</u> <u>CCGTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAATCGAACGGTCAACCTGA</u> <u>AAACAACTACAAGACGACCCCTCCGGTCTTGACAGCGATGGCT</u> <u>CATTCTTCTGTACTCCAAGCTTACGGTGGACAAGTCCCGGTGGC</u> <u>AACAGGGAAATGTGTTTTCTGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG</u> <u>CACAACCACTACCCCAGAAGTCACTCTCCCTGAGCCCCGGCgcg</u> <u>gggggtggtggaagcggaggaggggggtctgggggtggcggtccggcgggcg</u> <u>gatccGAGGAGGAGCTCCAGGTCATCCAGCCTGACAAGTCCGTG</u> <u>TCGGTGGCCGCGGGAGAGTCCGCCATTCTGCACTGCACCGTGA</u> <u>CCTCCCTCATCCCCGTGGGACCTATCCAGTGGTTCAGAGGAGCC</u> <u>GGGCCCCGCACGGAACTGATCTATAACCAGAAGGAGGGGCCATT</u> <u>TCCCCCGCGTGACCACCGTGTCCGAGAGCACCAAGAGGGAAAA</u> <u>CATGGACTTCAGCATTTGATCAGCAACATCACTCCCGCTGACG</u> <u>CCGGGACCTACTACTGCGTGAAGTTCCGGAAAGGAAGCCCGGA</u> <u>CACCGAGTTCAAAAGCGGAGCCGGCACCGAACTGTGCGTCCGC</u> </p>
12	抗CD20-huIgG1-SIRPαV2	2B8(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(huigg1m3)- -(huIgG1m3:ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPa(V2)	<p> QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGR GLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSE DSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVAastkgpsvflapss kstsggtaalglvkdypcpvtvswngaltsvghtfpavlqssglysisvvtp ssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkrvEPKSCDKHTCPPCPAPELLGgpsvfl fppkpkdtlmisrtpcvttvvdshdepvkfwnvyvdgvevhnaktkpreeq ynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGaggggsggggsggggsggggsEEELQVIQPDKSVSVAAGESAI LHCTVTSVIPVGIQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTK RENMDFSISISNITPADAGTYCYVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVR </p>
13	抗EGFR-LC	C225(VL)-CK	<p> GACATCTTGCTGACTCAGTCTCCAGTCATCCTGTCTGTGAGTCCA GGAGAAAGAGTCAGTTTCTCTGCAGGGCCAGTCAGAGTATTG GCACAAACATACACTGGTATCAGCAAAGAACAAATGGTTCTCC AAGGCTTCTCATAAAGTATGCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCC CTTCAGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTT AGCATCAACAGTGTGGAGTCTGAAGATATTGCAGATTATTA GTCAACAAAATAATAACTGGCCAACCAGTTCCGGTCTGGGAC CAAGCTGGAGCTGAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTC ATCTTCCCGCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTC TGTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAG TACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCCCA </p>

【表 10】

配列 番号	名称	説明	配列
			GGAGAGTGTACACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAG CCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAA CACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTC GCCCCGCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
14	抗 EGFR- LC	<u>C225(VL)</u> -CK	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRL IKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVESEDIADYQCQNNNW PTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
15	抗 EGFR(VH)- CH1	<u>C225(VH)</u> - CH1(huIgG1m3)	CAAGTCCAACTGAAGCAGTCCGGGCGGGGACTCGTGAGCCGT CGCAGTCACTGTCCATCACTTGACGGGTGCAGGCTTTTCCTTGA CCAACTACGGAGTGCACTGGGTGCGCCAGTCCCCTGGAAAGGG GCTGGAGTGGCTTGGCGTGATTTGGTCCGGAGGAAACACAGAC TACAACACTCCTTTCACCTCCCGCTGAGCATTAAACAAGGACAA CTCCAAGTCCCAAGTGTCTTCAAGATGAACAGCCTGCAGAGCA ATGATACCGCCATCTACTATTGTGCCGGGCTCTCACCTACTACG ACTACGAATTCGCCTACTGGGGACAGGGAACCCTGGTCACTGT CTCCGCGGCCTCCACTAAGGGCCCTAGCGTGTTCCCTTGGCGC CATCGTCAAAGTCCACCTCCGGTGGCACTGCCGCCCTGGGATGC CTTGTAAGGACTACTTCCCCGAACCTGTGACCGTGTCTGGAA CTCGGGCGCACTGACTTCGGGGGTGCACACCTTCTGCCGTCC TGCAATCGAGCGGTCTGTAATCCCTCTCGTCCGTGGTCACCGTG CCGTCTAGCTCCCTCGGAACCCAGACCTACATCTGCAACGTCAA CCACAAGCCGAGCAACACCAAAGTGGATAAGAGAGTGGAGCC GAAGTCATGC
16	抗 EGFR(VH)- CH1	<u>C225(VH)</u> - CH1(huIgG1m3)	QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHVVVRQSPGKG LEWLGVIWSGGNTDYNTPTFSRLSINKDNSKQVFFKMNSLQSN DTAIYYCARALTYDYEFAYWQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC

10

20

30

【表 1 1】

配列番号	名称	説明	配列
17	抗EGFR-huIgG1-SIRPαV1	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ (HUIGG1M3) -(huIgG1m3:ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPa(V1)	<p>CAAGTCCAACCTGAAGCAGTCCGGGCCGGGACTCGTGCAGCCGTC GCAGTCACTGTCCATCACTTGCACGGTGTGAGGCTTTCTTAC CAACTACGGAGTGCAGTGGGTGCGCCAGTCCCTGGAAAGGGG CTGGAGTGGCTTGGCGTGATTGGTCCGGAGGAAACACAGACT ACAACACTCCTTACCTCCCGCTGAGCATTAAACAGGACAACT CCAAGTCCCAAGTGTCTTCAAGATGAACAGCCTGCAGAGCAAT GATACCGCCATCTACTATTGTGCCCCGGGCTCTACCTACTACGAC TACGAATTCGCCTACTGGGGACAGGGAACCTGGTCACTGTCTC CGCGgcctccactaagggccctagcgtgtccccttggcgccatcgtaaatcca cctccgggtggcactgccgccctgggatgcctgtgaaggactacttccccgaactgt gacctgtcctggaactcggcgactgacttgggggtgcacaccttctgctgcgtc ctgcaatcgagcgtctgtactccctctcgtcgtggtcaccgtgccgtctagctcct cggaaccagacctacatctgcaactcaaccacaagccgagcaacacaaagt gataagagagtGAGCCGAAGTCATGCGACAAGACTCATACTTGTG CCCCATGCCCGCCCCGGAAGTGTGGGGggccatccgtgttctgtt cccgcgaaacctaaaggacacctgatgatttcgagaactccggaagtgcctg tgtgtgtgtgcagctgtcccacgaggatccggaggtaagttaattggtacgt cgacggagtgaagtccacaacgccaagaccaagccccgggaggagcagta caactccacttaccgggtgtgtcgtgctgacctgctgcatcaggattgctg aacggaagaggatataagtgaaggtgtcaacaaggcattgcctgcgcaa tcgaaaagaccattagcaaggccaagGCCCAGCCCAGGGAACACAG GTGTACACTCTGCCCCGTCCCGCAAGAAATGACCAAGAACCA AGTGTCACTGACATGCCTCGTGAAGGGATTTTACCGTCCGATAT CGCCGTGGAATGGGAATCGAACGGTCAACCTGAAAACAACATACA AGACGACCCCTCCGGTCTGGACAGCGATGGCTCATTCTTCTGT ACTCCAAGCTTACGGTGGACAAGTCCCGTGGCAACAGGGAAA TGTGTTTTCTGTGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTA CAGGAGAAAGTCACTCTCCCTGAGCCCCGGGcggggggtggtggaag cggaggaggggggtctgggggtggcggttcggcgcgcgatccGAGGAGG AACTTCAGGTCATCCAGCCCGACAAGAGCGTGTCTGTGGCGGC CGGAGAAACCGCAACTCTGAGATGCACCGCTACCTCGTGATTTC CCGTGGGGCCTATCCAGTGGTTCCGCGGGGCCGACCCGGACG CGAGTCTATCTACAACCAGAAGGAGGGGCACTTCCGAGGGGTC ACCACCGTGTGCGACCTACCAAGCGCAACAACATGGACTTCA GCATTGCGATCGGCAACATACCCCCCGGACGCGCGCACCTAT TACTGCGTGAAGTTCGGAAGGGCAGCCCTGACGACGTGGAGT TCAAAGCGGAGCCGGAACCGAGCTGTCCGTGAGA</p>
18	抗EGFR-huIgG1-SIRPαV1	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ (HUIGG1M3) -(huIgG1m3:ch2- CH3)-a-(g4s)x4-	<p>QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHVVVRQSPGKGLE WLGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKQVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAYWQGTLVTVSAastkgspsvflapsskstsggta algclvkdyppepvtvswngaltsghvhtpavlqssglyslssvvtvpssslgtqy icvnvhkpsntkvdkrvEPKSCDKHTCPPCPAPELLGgpsvflfppkpkdt lmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv svltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakGQPREPQVYTLPPSR</p>

【表 1 2】

配列 番号	名称	説明	配列
		huSIRPa(V1)	EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEELQVIQPDKSVLVAAGETATL RCTATSLIPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQKEGHFPRVTTVSDLTKR NNMDFSIRIGNITPADAGTYICVKFRKGSPPDDVEFKSGAGTELSV R
19	抗 EGFR- hulG1- SIRPαV2	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ (HUIGG1M3)- -(hulG1m3:ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPa(V2)	CAAGTCCAAGTGAAGCAGTCCGGGCCGGGACTCGTGCAGCCGTC GCAGTCACTGTCCATCACTTGCACGGTGTCAAGGCTTTCTTGAC CAACTACGGAGTGCAGTGGGTGCCAGTCCCCTGAAAGGGG CTGGAGTGGCTTGGCGTGATTGGTCCGGAGGAAACACAGACT ACAACACTCCTTTCACCTCCCGCTGAGCATTAAACAGGACAAT CCAAGTCCCAAGTGTCTTCAAGATGAACAGCCTGCAGAGCAAT GATACGCCATCTACTATTGTGCCGGGCTCTCACCTACTACGAC TACGAATTCGCCTACTGGGGACAGGGAACCTGGTCACTGTCTC CGCGGcctccactaaggccctagcgtgtcccttggcgccatcgtcaagtcca cctccggtggcactgccgccctgggatgcctgtgaaggactactccccgaactgt gaccgtgtcctggaactgggagcactgactcgggggtgcacaccttctgcccgtc ctgcaatcgagcgtgtactccctctcgtccgtggtcaccgtgccgtctagtcctt cggaaccagacctacatctgcaactgcaaccacaagccgagcaacaccaaagt gataagagagtGAGCCGAAGTCATGCGACAAGACTCATACTTGTG CCCCATGCCCCCGCCGGAAGTCTGGGGggccatccgtgttctctgtt cccgccgaacctaaggacacctgatgatttcgagaactccggaagtgcctg tgtgtgtgtgcagctgtcccacgaggatccggaggtcaagttcaattgttacgt cgacggagtgtgaagtccacaacgccaagaccaagccccgggaggagcagta caactccacttaccgggtgtgtccgtgtgaccgtgtgcatcaggattggctg aacggaagaggagtataagtgcaagtgtaaacaaaggcattgctgcgcaa tcgaaagaccattagcaaggccaagGGCCAGCCAGGGAACACAG GTGTACTCTGCCCCGTCCCGCAAGAAATGACCAAGAACCA AGTGTCACTGACATGCCTCGTGAAGGGATTTTACCCGTCCGATAT CGCCGTGGAATGGGAATCGAACGGTCAACCTGAAAACAACTACA AGACGACCCCTCCGGTCTGGACAGCGATGGCTATTCTTCTCTGT ACTCCAAGCTTACGGTGGACAAGTCCCGGTGGCAACAGGGAAA TGTGTTTTCTGTCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTA CACCCAGAAGTCACTCTCCCTGAGCCCCGGCcggggggtggtggaag cggaggaggggggtctgggggtggcggtccggcgcgcgatccGAGGAGG AGTCCAGGTCATCCAGCCTGACAAGTCCGTGTGGTGGCCGC GGGAGAGTCCGCCATTCTGCACTGCACCGTGACCTCCCTCATCC CCGTGGGACCTATCCAGTGGTTCAGAGGAGCCGGGCCGACG GGAAGTGTCTATAACCAGAAGGAGGGCCATTTCCCCCGCTG ACCACCGTGTCCGAGAGCACCAGAGGGAAAACATGGACTTCA GCATTTCTGATCAGCAACATCACTCCCGCTGACGCCGGGACCTAC TACTGCGTGAAGTTCGGAAAGGAAGCCCGGACACCGAGTTCA AAAGCGGAGCCGGCACCGAAGTGTGCGTCCGC

10

20

30

40

【表 1 3】

配列 番号	名称	説明	配列
20	抗 EGFR- hulG1- SIRPaV2	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ (HUIGG1M3) -(hulG1m3: ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPa(V2)	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLE WLGVIWSSGNTDYNTPTFSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAYWGQGLTVSAastkgsvfplapsskstsggta alglvkdylfepvtvswngaltsghvhtfpavlsqsglyslssvvtvpsslgqty icnvnhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCAPELLGgpsvflfpkpkdt lmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv svltvlhqdwlingkeykckvsnkalpapiektiskakGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEELQVIQPDKSVSVAAGESAIL HCTVTSIPVGPQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKR ENMDFSISINIPADAGTYCVKFRKGSPTDFKSGAGTELSVR
21	抗 HER2- LC	Herceptin(VL)-CK	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCGAGCG TGGGCGACAGAGTGACAATCACCTGCAGGGCCAGCCAGGACG TGAATACCGCCGTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCCGGCAAGGC CCCTAAGCTGCTGATCTACTCCGCCTCCTTCTCTACAGCGGCGT GCCCAGCAGGTTTAGCGGCAGCAGGAGCGGCACAGATTTCAAC CTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCGAGGACTTCGCCACCTACTA CTGCCAGCAGCATTACACCACCCCCCACCTTCGCCAGGGAA CAAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCTCCAGCGTGTT CATCTTCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGAACCGCC AGCGTGGTGTGCTGTGAACAACCTTACCCAGGGAGGCTA AGGTGCAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTGCAGAGCGGCAATA GCCAGGAGTCCGTGACCGAACAGGACAGCAAGGACAGCACCT ACAGCCTGAGCAGCACCTGACACTGAGCAAGGCCGACTACGA GAAGCACAAGGTACGCTGCGAGGTGACCCACCAGGGACT GAGCAGCCCCGTGACCAAGTCTTCAACAGGGGCGAGTGC
22	抗 HER2- LC	Herceptin(VL)-CK	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKA PKLLIYSASFYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQH YTPPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
23	抗 HER2(VH)- CH1	Herceptin(VH)- CH1(hulG1m3)	GAAGTCCAACCTGTGGAGAGCGGCGGGGGCCTGGTCCAGCCT GGAGGATCCCTGCGGCTGTCTGCGCCGCTTCCGGATTCAACAT TAAGGATACCTACATTCACTGGGTGAGCAGGCCCCGGGAAAG GGGCTGGAATGGGTGGCCAGGATCTACCCGACCAACGGCTACA CTCGCTACGCCGACTCAGTGAAGGGTCGCTTACCATCTCCGCC GACACGTCCAAGAACACAGCGTACCTCCAGATGAATTCAGTGC GGGCCGAGGATACCGCTGTGTACTACTGTTCGCGATGGGGCGG CGACGGATTCTATGCGATGGACTACTGGGGACAGGGAACCTC GTGACTGTGTCCTCCGCTCCACTAAGGGCCCTAGCGTGTCCC CTTGCGCCATCGTCAAAGTCCACCTCCGGTGGCACTGCCGCC TGGGATGCCTTGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCTGTGACCGTG

10

20

30

40

【表 1 4】

配列 番号	名称	説明	配列
			TCCTGGAAC TCGGGCGCACTGACTTCGGGGGTGCACACCTTTCC TGCCGTCCTGCAATCGAGCGGTCTGACTCCCTCTCGTCCGTGGT CACCGTGCCGTCTAGCTCCCTCGGAACCCAGACCTACATCTGCA ACGTCAACCACAAGCCGAGCAACACCAAAGTGGATAAGAGAG TGGAGCCGAAGTCATGC
24	抗 HER2(VH)- CH1	Herceptin(VH)- CH1(hulG1m3)	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGL</u> <u>EWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRRAED</u> <u>TAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAP</u> <u>SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ</u> <u>SSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC</u>
25	抗HER2- hulG1- SIRPαV2	Herceptin(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ (HUIGG1M3) -(hulG1m3:ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPa(V2)	GAAGTCCAAC TTGTGGAGAGCGGCGGGGCTGGTCCAGCCTG GAGGATCCCTGCGGCTGTCTGCGCCGCTTCCGGATTCAACATTA AGGATACCTACATTCACTGGGTGAGACAGGCCCGGGAAAGGG GCTGGAATGGGTGGCCAGGATCTACCCGACCAACGGCTACACTC GCTACGCCGACTCAGTGAAGGGTCGCTTACCATCTCCGCCGAC ACGTCCAAGAACACAGCGTACCTCCAGATGAATCACTGCGGGC CGAGGATACCGCTGTGTACTACTGTTCCGATGGGCGGCGAC GGATTCTATGCGATGGACTACTGGGGACAGGGAACCTCGTGAC TGTCCTCCGcctccactaagggccctagcgtgttcccttggcgccatcgtca aagtccacctccggtggcactgccccctgggatgccttgaaggactactccccg aacctgtgacctgtcctggaactcggcgccactgactcgggggtgcacaccttcc tgccgtcctgcaatcgagcggtctgtactccctctcgtcgtggtcaccgtgcgtcta gctccctcggaaccagacctacatctgcaacgtcaaccacaagccgagcaacacc aaagtgagataagagagtgGAGCCGAAGTCATGCGACAAGACTCATAAC TTGTCCCCCATGCCCCGCCCCGGAAGTCTGGGGggcccatcgtgtt cctgttcccgccgaacctaaggacacccctgatgttgcgagaactccggaagt gacctgtgtgtgtgtgcagctgtccacgaggatccggaggtcaagttcaattg gtacgtgcagggagtggaggtcacaacgccaagaccaagccccgggaggag cagtacaactccacttaccgggtgtgtcgtgctgacctgtgtcatcaggatt ggctgaacgggaaggagtataagtgcgaagtgtcaacaaggcattgcctgc gccaatcgaaaagaccattagcaaggccaagGGCCAGCCAGGGAACC ACAGGTGTACTCTGCCCCGTCGCCGGAAGAAATGACCAAGA ACCAAGTGTCACTGACATGCCTCGTGAAGGGATTTTACCCGTCC GATATCGCCGTGGAATGGGAATCGAACGGTCAACCTGAAAAACA ACTACAAGACGACCCCTCCGGTCTGGACAGCGATGGCTCATTCT TTCTGTACTCCAAGCTTACGGTGGACAAGTCCCGGTGGCAACA GGGAAATGTGTTTTCTGTGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACCCAGAAGTCACTCTCCCTGAGCCCCGGCgcgggggg tggtggaagcggaggaggggggtctgggggtggcggtccggcgcgcggtatcc GAGGAGGAGCTCCAGGTCATCCAGCCTGACAAGTCCGTGTCTGG TGGCCGCGGGAGAGTCCGCCATTCTGCACTGCACCGTGACCTCC CTCATCCCCGTGGGACCTATCCAGTGGTTCAGAGGAGCCGGGC CCGCACGGGAAGTCTATAACCAGAAGGAGGGCCATTCCCC CCGCGTGACCACCGTGTCCGAGAGCACCAAGAGGGAAAAACAT

10

20

30

40

【表 15】

配列番号	名称	説明	配列
			GGACTTCAGCATTTTCGATCAGCAACATCACTCCCGCTGACGCCG GGACCTACTACTGCGTGAAGTTCGGAAGGAAGCCCGGACAC CGAGTTCAAAAGCGGAGCCGGCACCGAACGTGTCGGTCCGC
26	抗 HER2- hulG1- SIRPαV2	Herceptin(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ (HUIGG1M3) -(hulG1m3:ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPa(V2)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLE WVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA VYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSastkgpsvfplapssktsstg gtaalglclvkdypfpvtvswngaltsgvhtfpavlsqsglyslssvvtvpssslgt qtyicnvnhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCAPELLGgpsvflfpkp kdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynsty rvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GAGGGGGSGGGSGGGSGGGGSEELQVIQPKSVSVAAGESAI LHCTVTSVIPVGIQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTK RENMDFSISISNITPADAGTYICVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVR
27	抗 GD2- LC	aGD2:14.18(VL)- huCK	GACGTGGTGATGACCCAGACCCCTGAGCCTGCCCGTGACCCC CGGCGAGCCCGCCAGCATCAGCTGCAGGAGCAGCCAGAGCCTG GTGCACAGGAACGGCAACACCTACCTGCACTGGTACCTGCAGA AGCCCGGCCAGAGCCCAAGCTGCTGATCCACAAGGTGAGCAA CAGGTTACAGCGCGTGCCCGACAGGTTACAGCGGCAGCGGCAGC GGCACCGACTTCACCCTGAAGATCAGCAGGGTGGAGGCCGAG GACCTGGGCGTGACTTCTGCAGCCAGAGCACCCAGTGGCCCCC CCTGACCTTCGGCGCCGGCACCAAGCTGGAGCTGAAGAGGACC GTGGCCGCCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCAGCGACGAGCA GCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGCTGTGCTGCTGAACAAC TTCTACCCAGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAAC GCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAG GACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCC TGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCTGCG AGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCAGCCCCGTGACCAAGAGCTT CAACAGGGGCGAGTGC

10

20

30

40

【表 16】

配列番号	名称	説明	配列
28	抗 GD2-LC	aGD2:14.18(VL)-huCK	DVVMTQTPLSLPVTGPGEASISCRSSQSLVHRNGNTYLHWYQKP GQSPKLLIHKVSNRFSGVPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDLGVYF CSQSTHVPPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLST LTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
29	抗 GD2(VH)-CH1	aGD2:14.18(VH)-CH1(huIgG1m3)	GAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGGAGAAGCCC GGCGCCAGCGTGAAGATCAGCTGCAAGGCCAGCGGCAGCAGC TTCACCGGCTACAACATGAACTGGGTGAGGCAGAACATCGGCA AGAGCCTGGAGTGGATCGGCGCCATCGACCCCTACTACGGCGG CACCAGCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAGGGCCACCTGACC GTGGACAAGAGCACCAGCACCAGCCTACATGCACCTGAAGAGCC TGAGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGTGAGCGGCAT GGAGTACTGGGGCCAGGGCACCAGCGTGACCGTGAGCAGCGC CAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCAGCAGCA AGAGCACCAGCGGCGGCACCGCCGCTGGGTGCCTGGTGAA GGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGAGCTGGAACAGCGGC GCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCCGCGGTGCTGCAGAG CAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCAGC AGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACA AGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGA GCTGC
30	抗 GD2(VH)-CH1	aGD2:14.18(VH)-CH1(huIgG1m3)	EVQLVQSGAEVEKPGASVKISCKASGSSFTGYNMNWWVRQNIKGS LEWIGAIIDPYGGTSYNQKFKGRATLTVDKSTSTAYMHLKSLRSE DTAVYYCVSGMEYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSL SSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
31	抗 GD2-huIgG1-SIRPαV2	aGD2:14.18(VH)-ch1(huigg1m3)-ヒンジ(HUIGG1M3)-(huIgG1m3:ch2-CH3)-a-(g4s)x4-huSIRPaV2	GAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGGAGAAGCCC GGCGCCAGCGTGAAGATCAGCTGCAAGGCCAGCGGCAGCAGCT TCACCGGCTACAACATGAACTGGGTGAGGCAGAACATCGGCAA GAGCCTGGAGTGGATCGGCGCCATCGACCCCTACTACGGCGGC ACCAGCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAGGGCCACCTGACCGT GGACAAGAGCACCAGCACCAGCCTACATGCACCTGAAGAGCCTGA GGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGTGAGCGGCATGGA GTACTGGGGCCAGGGCACCAGCGTGACCGTGAGCAGCgcccagcac caagggccccagcgtgttccccctggccccagcagcaagagcaccagggcgga ccgcccctgggctgctgtgaaggactacttccccgagcccgtgacctgagct ggaacagcgccgctgaccagcggtgcacaccttccccgctgtgtagagc agcggcctgtacagcctgagcagcgtggtgacctgcccagcagcagcctgggac ccagacctacatctgaacgtgaaccacaagcccagcaacaccaaggtggacaag aaggtgGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCT GCCCCGCCCCGAGCTGCTGGGCgccccagcgtgttctgttccccca agcccaaggacacctgatgatcagcaggacccccaggtgacctgctggtg gtggacgtgagccacgaggacccccaggtgaagttcaactggtacgtggacg

10

20

30

40

【表 17】

配列番号	名称	説明	配列
			<p>gcgtggagggtgcacaacgccaagaccaagcccaggaggagcagtacaaca gcacctacagggtggtgagcgtgctgaccgtgctgcaccaggactggtgaac ggcaaggagtacaagtgaagggtgagcaacaaggccctgccgcccccatcg agaagaccatcagcaaggccaagGGCCAGCCAGGGAGCCCCAGGT GTACACCTGCCCCAGCAGGGACGAGCTGACCAAGAACCAG GTGAGCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACAT CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAACCTAC AAGACCACCCCCCGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTCT GTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGC AACGTGTTCTGAGCTGACGCTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCA CTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGAGCCCCGGCgcccggcggc ggcagcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc GGAGGAGCTGCAGGTGATCCAGCCCACAAGAGCGTGAGCGT GGCCGCCGGCAGAGCGCCATCCTGCACTGCACCGTGACCAGC CTGATCCCCGTGGGCCCCATCCAGTGGTTCAGGGGCGCCGGCCC CGCCAGGGAGCTGATCTACAACCAGAAGGAGGGCCACTTCCCC AGGGTGACCACCGTGAGCGAGAGCACCAAGAGGGAGAATATG GACTTCAGCATCAGCATCAGCAACATCACCCCCGCCGACGCCGG CACCTACTACTGCGTGAAGTTCAGGAAGGGCAGCCCCGACACC GAGTTCAAGAGCGGCGCCGGCACCGAGCTGAGCGTGAGG</p>
32	抗 GD2- hulG1- SIRP α V2	aGD2:14.18(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3)- (hulG1m3:ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPaV2	<p>EVQLVQSGAEVEKPGASVKISCKASGSSFTGYNMNWWVRQNIKSL EWIGAIIDPYGGTSYNQKFKGRATLTVDKSTSTAYMHLKSLRSEDTA VYYCVSGMEYWGQGTSTVSSastkgpsvfplapsskstsggtaalgclvk dyfpepvtvswngaltsgvhtfpavllqssgylssvvtvpssslgtqyticnvnh kpsntkvdkkvEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGgpsvlfppkpkdtimisrt pevtcvvvdvshdepevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvl hqdwlngkeykckvsnkalpapietiskakGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGaggggg ggggsgggsgggsggggEEELQVIQPKSVSVAAGESAILHCTVTSIPVG PIQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKRENMDFSISISN ITPADAGTYVCVKFRKGSPTDFKSGAGTELSVR</p>
33	抗 PDL1- LC	aPDL1(VL)-CL	<p>CAGAGCGCTTTGACTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCTCCTGG ACAGTCGATCACCATCTCCTGCACTGGAACCAGCAGTGACGTTG GTGGCTATAATTATGTCTCCTGGTACCAACAACACCCAGGCAAA GCCCCAAACTCATGATTATGATGTCTAGTAATCGGCCCTCAGG GGTTTCTAATCGCTTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTC CCTGACCATCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTACT ACTGCAGCTCATATACAAGCAGCAGCACTCGAGTCTTCGGAAC GGGACCAAGGTCACCGTCCTAGGTGAGCCCAAGGCCAACCCCA CTGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTCCAAGCCAACA AGGCCACACTAGTGTGTCTGATCAGTGACTTCTACCCGGGAGCT GTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATGGCAGCCCCGTCAAGGCG GGAGTGAGACCACCAAAACCCTCAAACAGAGCAACAACAAG</p>

10

20

30

40

【表 18】

配列 番号	名称	説明	配列
			TACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCGAGCAGTGGA AGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAG CACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA
34	抗 PDL1- LC	<u>aPDL1(VL)-CL</u>	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGK APKLMYDVSNRPSGVSNRFSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC SSYTSSSTRVFGTGKVTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATL VCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKNYAASS YLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
35	抗 PDL1(VH)- CH1	<u>aPDL1(VH)-CH1</u>	GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTACAGCCTGG TGTTCTTTACGTCTTTCTTGCCTGCTTCCGGATTCACTTTCTCT AGCTACATCATGATGTGGGTTCCGCAAGCTCCTGGTAAAGGTTT GGAGTGGGTTTCTTCTATCTATCCTTCTGGTGGCATTACTTTTAA TGCTGACACCGTTAAAGGTCGCTTCACTATCTCTAGAGACAAC CTAAGAATACTCTACTTGCAGATGAACAGCTTAAGGGCTGA GGACACAGCCGTGTATTACTGTGCACGGATCAAGTTGGGTACA GTAAGTACGGTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCG TCTCAAGCGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCA CCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCAGGTGACGGTGTCTGTG GAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCT GTCCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAC CGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACG TGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTG AGCCCAAATCTTGT
36	抗 PDL1(VH)- CH1	<u>aPDL1(VH)-CH1</u>	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYIMMWVRQAPGKG LEWVSSIYPSGGITFYADTVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARIKLGTVTTVDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC

10

20

30

【 0 2 4 0 】

【 0 2 4 1 】

10
20
30
40

【表 20】

配列 番号	名称	説明	配列
39	抗 PDL1- hulG1- SIRPαV1	aPDL1(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ (HUIGG1M3) -(hulG1m3: ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPaV1	GAGGTGCAGCTGCTGGAGAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAGCCCG GCGGCAGCCTGAGGCTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTC AGCAGCTACATCATGATGTGGGTGAGGCAGGCCCGGCAAGG GCCTGGAGTGGGTGAGCAGCATCTACCCAGCGGCGGCATCAC CTTCTACGCCGACACCGTGAAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGG ACAACAGCAAGAACACCTGTACTGCAGATGAACAGCCTGAGG GCCGAGGACACCGCGTGTACTACTGCCAGGATCAAGCTGG GCACCGTGACACCGTGGACTACTGGGGCCAGGGCACCTGGT GACCGTGAGCAGCGccagcaccaaggccccagcgtgtccccctggccccc gcagcaagagcaccagcggcgccagcccgctgggctgcctggaaggacta cttccccagccccgtgaccgtgagctggaacagcgccctgaccagcgccgtgc acaccttcccccgctgctgagcagcagcgccctgtacagcctgagcagcgtggtga ccgtgcccagcagcagcctgggcacccagacctacatctgcaacgtgaaccacaag cccagcaacaccaaggtggacaagaagtgGAGCCCAAGAGCTGCGACA AGACCCACACCTGCCCCCTGCCCCGCCCCGAGCTGCTGGGCg gccccagcgtgttctgttcccccaagcccaaggacacctgatgatcagcag gacccccgaggtgacctgcgtggtggtggacgtgagccacgaggacccccgag gtgaagttcaactgtgtacgtggcggtggaggtgcacaacgccaagacca agccccagggagcagcagtaacaacagcacctacaggggtggtgagcgtgctgac cgtgctgcaccaggaactggtgaacggcaaggagtaacgtgaaggtgagc aacaaggccctgcccccccatcgagaagaccatcagcaaggccaagGGCC AGCCCGAGGAGCCCCAGGTGTACACCTGCCCCAGCAGGGA CGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTGAAG GGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACG GCCAGCCCGAGAACTACAAGACCACCCCCCGTGTGGAC AGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCTGGACAA GAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTAGCTGCAGCGTGATG CACGAGGCCCTGCACAACCACTACCCAGAAGAGCCTGAGCCT GAGCCCCGGCgccccggcgccggcgccagcggcgccggcgccggcgccggc ggcagcggcgccggcgccgagcGAGGAGGAGCTGCAGGTGATCCAGCC CGACAAGAGCGTGTGGTGGCCGCCGGCGAGACCGCCACCCTG AGGTGCACCGCCACCAGCCTGATCCCCGTGGGCCCCATCCAGTG GTTAGGGGGCGCCGGCCCCGGCAGGGAGCTGATCTACAACCAG AAGGAGGGCCACTTCCCAGGGTGACCACCGTGAGCGACCTGA CCAAGAGGAACAACATGGACTTCAGCATCAGGATCGGCAACAT CACCCCGCCGACGCCGGCACCTACTACTGCGTGAAGTTCAGGA AGGGCAGCCCCGACGACGTGGAGTTCAGAGCGGGCGCCGGCA CCGAGCTGAGCGTGAGG
40	抗 PDL1- hulG1- SIRPαV1	aPDL1(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ (HUIGG1M3) -(hulG1m3: ch2- CH3)-a-(g4s)x4-	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYIMMWVRQAPGKGL EWVSSIYPSGGITFYADTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNLSRAEDTA VYYCARIKLGTVTTVDYWGQGLVTVSSastkgpsvfplapsskstsggta algclvkdyfpepvtvswngaltsghvhtfpavllqssgylslsvvtvpssslgtqty icvnvhkpsntkvdkkvEPKSCDKHTCPPCPAPPELLGgpsvfllfpkpkd tlmisrtpevtcvvvdshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrv

【表 2 1】

[illegible]

【表 2 2】

[illegible]

【表 2 3】

配列番号	名称	説明	配列
			CGAGCTCATCTACAACCAGAAGGAGGGGCACTTCCCAGGGGT ACCACCGTGTCGGACCTCACCAAGCGCAACAACATGGACTTCA GCATTTCGGATCGGCCAAATCACCCTCCGCGACGCCGGCACCTAT TACTGCGTGAAGTTCCGGAAGGGCAGCCCTGACGACGTGGAGT TCAAAGCGGAGCCGGAACCGAGCTGTCCGTGAGA
44	抗EGFR- hulgG1- SIRPaV1(d (脱グリコシル 化)	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) - (hulgG1m3:ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPaV1(N110Q)	QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLE WLGVIWSGGNTDYNTPTFSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTSVAastkgpsvfplapssktssgta algclvkdyfpepvtswnsgaltsgvhtfpavlqssglyslsvvtvpssslgtqty icnvnhkpsntkvdkrvePKSCDKTHTCPPCPAPELLGgpsvflfpkpkd lmisrtpevtcvvdvsshedpevkfnwyvdgvevhnaaktkpreeqynstyrvv svltvlhqdwlngkeyckcvsnkpalpiektiskakGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGa ggggsgggsgggsgggsgggsgggEEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSL IPVGPIQWFRGAGPGRELIYNQKEGHFPRVTTVSDLTKRNNMDF SIRIGQITPADAGTYICVKFRKGGSPDDVEFKSGAGTELSVR
45	抗EGFR- hulgG1	C225(VH)- ch1(huigg1eu)- ヒンジ(HUIGG1EU)- (hulgG1eu:ch2- CH3)	CAGGTGCAGCTGAAGCAGAGCGGCCCGGCCTGGTGCAGCCCA GCCAGAGCCTGAGCATCACCTGCACCGTGAGCGGCTTCAGCCTG ACCAACTACGGCGTGCACTGGGTGAGGCAGAGCCCCGGCAAGG GCCTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGAGCGGCGGCAACACCGA CTACAACACCCCTTCACCAGCAGGCTGAGCATCAACAAGGACA ACAGCAAGAGCCAGGTGTTCTTCAAGATGAACAGCCTGCAGAGC AACGACACCGCCATCTACTACTGCGCCAGGGCCCTGACCTACTAC GACTACGAGTTGCGCTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGT GAGCGCCGCCAGACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCCC CCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACCGCCGCCCTGGGCTG CCTGGTGAAGGACTACTTCCCGAGCCCGTGACCGTGAGCTGGA ACAGCGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCCGCCGTG CTGCAGAGCAGCGGCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCG TGCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG AACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGGGTGGAGC CCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCGCC CCCGAGCTGCTGGGCGGCCCCAGCGTGTTCTGTCCCCCCAA

【表 2 4】

配列 番号	名称	説明	配列
			GCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCT GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCCCGAGGTGAAGTT CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACC AAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGTTGGTGA GCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGA GTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGCCCTGCCGCCCCCATCG AGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCAGGGAGCCCCA GGTGTACACCCTGCCCCCAGCAGGGAGGAGATGACCAAGAAC CAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGA CATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAAAC TACAAGACCACCCCCCGTGTGGACAGCGACGGCAGCTTCTT CCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG GGCAACGTGTTAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAA CCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGAGCCCCGGC
46	抗EGFR- hulgG1	C225(VH)- ch1(huigg1eu)- ヒンジ(HUIGG1EU)- (hulgG1eu:ch2- CH3)	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLE WLGVWISGGNTDYNTPTFSLRSINKDNSKQVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAYWQGTLVTVSAastkgpsvflapsskstsggta alglclvkdypcptvswngaltsghvhtfpavllqssgylssvvtvpssslgtqty icnvnhkpsntkvdkrvEPKSCDKHTCPPCPAPPELLGgpsvflfpkpkdt lmsrtpcvttvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv svltvlhqdwingkeykckvsnkalpapiektiskakGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG
47	抗 EGFR(LC)- SIRPαV2	C225(VL)- huck- (G4S)X2-sirpav2	GACATTCTCTGACACAGAGCCCCGTGATCTGAGCGTGAGCCC TGGCGAAAGGGTGAGCTTCAGCTGCAGGGCCAGCCAGAGCATC GGCACCAACATCCACTGGTACCAGCAGAGGACAAACGGCAGCC CTAGGCTGCTGATCAAGTACGCCAGCGAGAGCATCAGCGGCATC CCCAGCAGGTTTAGCGGAAGCGGCAGCGGCACCGACTTACCCT GTCCATCAATTCCGTGGAGTCCGAGGACATCGCCGACTACTACT GCCAGCAGAACAACAAGTGGCTACCACCTTCGGCGCCGGCACC AAGCTGGAAGTGAAGcgtacgggtggcccccagcgtgttcattttcccc cagcgagcagcagtgaaaagcggcaccgctcgtgtgtgctgtgaacaact tctaccctaggaggccaaggtgcagtggagggtggacaacgctccagtcgggc aacagccaggagagcgtcaccgagcaggacagcaaggacagcacctacagcgtg agcagcacctgaccctgagcaaggccgactacgagaagcacaaggtgtatgcct gcgaggtgaccaccaggcctgagctcccctgtgaccaagtccttaacaggggc gagtgcGGGGAGGAGGCTCAGGGGGCGGAGGGTCAgaagaggaa ctgcaagtgtaccagcccagacaagtccgtgtgtgtggccgctggcagtgctgcca tcctgcactgcaccgtgacctccctgatccccgtgggaccatccagtggttcgtg gcgctggccctgcccgtgagctgatctacaaccagaaagagggcacttcccc gtgtgaccaccgtgtccgagtcaccaagcgcgagaaatggacttctccatctc catcagcaacatcacccctgccgatccggcactactactgctgaagtccgt aagggtcccccgacaccgagttcaagtctggcgtggcaccgagctgtgtgtg

10

20

30

40

【 0 2 4 7 】

配列 番号	名称	説明	配列
			<i>cgt</i>
48	抗 EGFR(LC)- SIRPαV2	C225(VL)- huck- <i>(G4S)</i> X2- sirpav2	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNTNGSPRLLIK YASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQQNNNNWPTT FGAGTKLELKrtaapsvfifppsdeqlksgtasvvcllnnfybreakvqwkvd nalqsgnsqesvteqdkstkstyslsltlskadyekhkvyacevthqglsspvtk sfnrgecGGGGSGGGGSeelqviqpdksvsvaagesailhctvtslipvgpi qwfrrgagpareliynqkeghfprvttvsestkrenmdfsisisnitpadagtyyc vkfrkgsdpdtefksagatelsvr
49	SIRPαV2- Fc(hulgG1)- 抗_EGFR (VH)-CH1	huSIRPαV2-(g4s)x2- ヒンジ(<i>HUIGG1M3</i>) -(hulgG1m3: ch2- CH3)-a-(g4s)x4- C225(VH)- <u>ch1(huigg1m3)</u>	GAGGAAGAACTCCAAGTGATCCAACCGGACAAATCCGTGAGCG TGGCCGCCGGAGAAAGCGCCATCCTGCACTGCACCGTCACGTCA CTGATTCTGTGGGCCCAATTCAGTGGTTCAGAGGAGCGGGGCC AGCCCGGAACTGATCTACAACAGAAGGAGGGTCACTTCCCTC GGGTCACTACCGTGTCCGAGTCAACCAAGCGGGAACATGGA CTTCTCGATCTCCATCTCCAACATTACCCCTGCGGACGCCGGCAC ATACTATTGCGTCAAATCCGCAAGGGTTCGCCGGACACCGAGT TCAAGTCCGGAGCTGGTACCGAACTGAGCGTGCGGgggggaggcg gaagcggaggcggcgatcgGAGCCCAATCGTCTGACAAGACCCACA CCTGTCCGCCCTGTCTGCAACCGGAACCTTCTGGGCGgaccttcctgt tcctgttccacctaagcctaaggacacctcatgatctccggagccccggaggtc acttgctgggtggatgtgtccacgaggaccgggaagtgaagtcaattgg tacgtggacggcgtggaagtcacacgcgaagaccaagccaaggaggaa cagtacaacagcacctacaggggtggtgcagtgtcactgtgtgtcatcaggac tggctcaacgggaagaggtacaagtgaaggtctccaacaaggccttgccgc tccaattgaaaagaccatttcgaaggccaagGGCCAGCCAGAGAGCCG CAAGTGTACACCCTGCCCCGTGCGCGGAGGAGATGACCAAGAA TCAAGTCTCCCTCACTTGTCTCGTGAAGGGCTTTTACCCTTCGGAT ATCGCAGTGGAATGGGAATCCAACGGACAGCCGGAAAAACAAT ACAAGACGACCCCGCCCGTGTGGATTGAGACGGCTCCTTCTTCT TGTA CTCAAAGCTGACGGTGGACAAGTCACGGTGGCAACAGGG AAACGTCTTTTCTGCTCCGTGATGCATGAAGCCCTGCAACAACA TTAACTCAGAAGTCGTGTCGCTTAGCCCTGGAagcggcggtggag gttcggaggggggtggaagcggcggaggaggaagcggggcgggggctcc CAG GTCCA ACTGAAGCAGAGCGGTCCAGGACTGGTCCAGCCGTCCC AGTCCCTGTCTATTACTTGACCGTGTCCGGCTTTTCCCTGACTA ACTATGGTGTCACTGGGTGCGCAGTCGCCCGGAAGGGGCT GGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGAGCGGCGGGAACACCGACTA TAACACTCCTTTCACTTCACGCCTGTCCATCAACAAGGATAACA

40

【表 2 6】

配列 番号	名称	説明	配列
			GCAAGAGCCAGGTGTTCTTTAAGATGAACTCACTCCAGTCCAAC GACACCGCCATCTACTACTGCGCCCGCGCTCTCACCTACTACGAC TACGAATTCGCTACTGGGGACAAGGCACCCTGGTCACCGTGTG <u>GCGGccagcaccaaggagccgtccgtgttcccctggcgccgtcctcaagtcca</u> <u>cttcggcgccgaccgctgccctgggatgcctcgtgaaggattattccggagcctgt</u> <u>gaccgtgtcctggaactccggtgccctgacatccggcgtgcacaccttccctgcggtg</u> <u>ctgcagtccagcggactgtactccctctcctcggtcgtgaccgtgccgtcctcctccct</u> <u>gggaactcagacttacatctgcaacgtgaaccataagccctccaataccaaagtggg</u> <u>caagagagtggagcccaagagctgc</u>
50	突然変異 ヒンジ 領域	突然変異ヒンジ 領域	EPKSS
51	ヒンジ 領域	ヒンジ領域	EPKSC
52	SIRPαV2- Fc(hulgG1)- 抗_EGFR (VH)-CH1	huSIRPαV2-(g4s)x2- ヒンジ(<i>HUIGG1M3</i>) -(hulgG1m3: ch2 - CH3)-a-(g4s)x4- C225(VH) - <u>ch1(huigg1m3)</u>	EEELQVIQPKSVSVAAGESAILHCTVTSLIPVGPIQWFRGAGPARE LIYNQKEGHFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTYYCVKFR KGSPDTEFKSGAGTELSVR <u>ggggs</u> <u>ggggs</u> <u>EPKSSDKTHTCPPCPAPELL</u> <u>Ggpsvflfpkpkdtlmsirtpcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnak</u> <u>tkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakGQ</u> <u>PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE</u> <u>NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH</u> <u>NHYTQKSLSLSPG</u> <u>aggggs</u> <u>ggggs</u> <u>ggggs</u> <u>ggggs</u> <u>QVQLKQSGPGLVQPS</u> <u>QSLISITCVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGGNTDY</u> <u>NTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYDYE</u> <u>FAYWQGQGLTVT</u> <u>VSAAstkgpsvflapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtv</u> <u>swnsgaltsgvhtfpavilqssglyslssvvtvpssslgtqtyicvnvhkpsntkvdkrv</u> <u>epksc</u>
53	抗EGFR (scFv)	外部 C225(VH) - (<i>g4s</i>)x3- <u>外部C225(VL)</u>	CAGGTGCAGCTGAAGCAGAGCGGCCCGGCTGGTGCAGCCCCA GCCAGAGCCTGAGCATCACCTGCACCGTGAGCGGCTTCAGCCT GACCAACTACGGCGTGCACTGGGTGAGGCAGAGCCCCGGCAA GGGCCTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGAGCGCGCGGCAACAC CGACTACAACACCCCTTCACCAGCAGGCTGAGCATCAACAAG GACAACAGCAAGAGCCAGGTGTTCTTCAAGATGAACAGCCTGC

【 0 2 4 9 】

配列番号	名称	説明	配列
			AGAGCAACGACACCGCCATCTACTACTGCGCCAGGGCCCTGAC CTACTACGACTACGAGTTTCGCCTACTGGGGCCAGGGCACCTG GTGACCGTGAGCGCCggcgggcgggcgagcgggcgggcgggcgagcggc ggcgggcgggcgagGACATCCTGCTGACCCAGAGCCCCGTGATCCTGA GCGTGAGCCCCGCGGAGAGGGTGAGCTTCAGCTGCAGGGCCAG CCAGAGCATCGGCACCAACATCCACTGGTACCAGCAGAGGACCA ACGGCAGCCCCAGGCTGCTGATCAAGTACGCCAGCGAGAGCATC AGCGGCATCCCCAGCAGGTTGAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCG ACTTCACCCTGAGCATCAACAGCGTGGAGAGCGAGGACATCGCC GACTACTACTGCCAGCAGAACAACAAGTGGCCCCACCACTTCGGC GCCGGCACCAAGCTGGAGCTGAAG
54	抗EGFR (scFv)	外部C225(VH)- (g4s)x3- 外部C225(VL)	QVQLKQSGPGLVQPSSQLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKG LEWLGIWVSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSN DTAIYYCARALTYDYEFAYWVGQGLTVTSAggggsgggsggggs DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLIK YASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQNNNNWPTT FGAGTKLELK
55	SIRPαV2- Fc(hulG1)- 抗_EGFR (scFv)	huSIRPαV2-(g4s)x2- ヒンジ(HUIGG1M3) -(hulG1m3:ch2- CH3)-a-(g4s)x4- 外部C225(VH)- (g4s)x3- 外部C225(VL)	GAGGAGGAGCTGCAGGTGATCCAGCCCCACAAGAGCGTGAGC GTGGCCGCCGGCGAGAGCGCCATCCTGCACTGCACCGTGACCA GCCTGATCCCCGTGGGCCCCATCCAGTGGTTGAGGGCGCCGGC CCCCGACGGGAGCTGATCTACAACCAGAAGGAGGGCCACTTCCC CAGGGTGACCACCGTGAGCGAGAGCACCAAGAGGGAGAACATG GACTTCAGCATCAGCATCAGCAACATCACCCCCGCCGACCGCG CACCTACTACTGCGTGAAGTTGAGGAAGGGCAGCCCCGACACCG AGTTCAAGAGCGGCGCGCGGACCGAGCTGAGCGTGAGGGGCG GCGGCGGACAGCGGCGGCGGCGGAGCGAGCCCAAGAGCAGCG ACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCCGCCCGAGCTGCTG GGCGGCCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGACAC CCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTG GACGTGAGCCACGAGGACCCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTACG TGGACGGCGTGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGGGA GGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGAGCGTGCTGACC GTGCTGCACCAAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCA AGGTGAGCAACAAGGCCCTGCCCGCCCCATCGAGAAGACCATC AGCAAGGCCAAGGGCCAGCCAGGGAGCCCCAGGTGTACACCC TGCCCCCAGCAGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCT GACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAGCAACGCGCAGCCCGAGAACAATAAGACCAC CCCCCGCTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCA AGCTGACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTT CAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCC AGAAGAGCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGCGGCGGCGGCGGCA GCGGCGGCGGCGGCGAGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG GGCAGCCAGGTGACGTGAAGCAGAGCGGCCCCGGCTGGTGCG

【表 2 8】

[illegible]

【表 2 9】

配列 番号	名称	説明	配列
57	抗 EGFR(scFv)- Fc(huIgG1)-SIRPαV2	C225(VH)-(g4s)x3- C225(VL)-(g4s)x2- ヒンジ(HUIGG1M3) -(huIgG1m3:ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPαV2	CAGGTGCAGCTGAAGCAGAGCGGCCCCGGCCTGGTGCAGCCCA GCCAGAGCCTGAGCATCACCTGCACCGTGAGCGGCTTCAGCCTG ACCAACTACGGCGTGCACTGGGTGAGGCAGAGCCCCGGCAAGG GCCTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGAGCGGCGGCAACACCGA CTACAACACCCCTTCACCAGCAGGCTGAGCATCAACAAGGACA ACAGCAAGAGCCAGGTGTTCTTCAAGATGAACAGCCTGCAGAGC AACGACACCGCCATCTACTACTGCGCCAGGGCCCTGACCTACTAC GACTACGAGTTCGCCTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGT GAGCGCCGGCGGGCGGGCGAGCGGGCGGGCGGGCGAGCGGGCGG CGGCGGCAGCGACATCCTGCTGACCCAGAGCCCCGTGATCCTGA GCGTGAGCCCCGGCGAGAGGGTGAGCTTCAGCTGCAGGGCCAG CCAGAGCATCGGCACCAACATCCACTGGTACCAGCAGAGGACCA ACGGCAGCCCCAGGCTGCTGATCAAGTACGCCAGCGAGAGCAT CAGCGGCATCCCCAGCAGGTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCC GACTTCACCTGAGCATCAACAGCGTGGAGAGCGAGGACATCG CCGACTACTACTGCCAGCAGAACAACAACTGGCCCCACCATCTCG GCGCCGGCACCAAGCTGGAGCTGAAGGGCGGGCGGGCGGACGCG GCGGGCGGGCGGCGAGCGCCCAAGAGCAGCGACAAGACCCACAC CTGCCCCCTGCCCCGCCCCGAGCTGCTGGGCGGCCCCAGCG TGTTCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCA GGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA GGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCAGGGAGGAGCAGTACAACA GCACCTACAGGGTGGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGA CTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAG GCCCTGCCCCCCCCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGG CCAGCCAGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCAGCAGGG AGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTGAA GGGCTTCTACCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAAC GGCCAGCCCAGACAACACTACAAGACACCCCCCGTGTGGA CAGCGACGGCAGCTTCTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACA AGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCACTGCAGCGTGAT GCACGAGGCCCTGCACAACCACTACCCAGAGAGCCTGAGCC TGAGCCCCGGCGGGCGGGCGGGCGGCGAGCGGGCGGGCGGCA GCGGCGGGCGGGCAGCGGGCGGGCGGGCAGCGAGGAGGAG CTGCAGGTGATCCAGCCCAGAGAGCGTGAGCGTGGCCGCCG GCGAGAGCGCCATCCTGCACTGCACCGTGACCAGCCTGATCCCC GTGGGCCCATCCAGTGGTTCAGGGGCGCGGGCCCCGCCAGGG AGCTGATCTACAACCAGAAGGAGGGCCACTTCCCCAGGGTGACC ACCGTGAGCGAGAGCACCAAGAGGGGAGAACATGGACTTCAGCA TCAGCATCAGCAACATACCCCCGCGGACGCGGCACCTACTACT GCGTGAAGTTCAGGAAGGGCAGCCCCGACACCGAGTTCAAGAG CGGCGCGGCACCGAGCTGAGCGTGAGG

10

20

30

40

【表 3 0】

配列 番号	名称	説明	配列
58	抗 EGFR(scFv)- Fc(hulgG1)-SIRPαV2	C225(VH) -(g4s)x3- <u>C225(VL)</u> -(g4s)x2- ヒンジ(HUIGG1M3) -(hulgG1m3:ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPαV2	QVQLKQSGPGLVQPSSQLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKG LEWLGVIVSGGNTDYNTPTFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSN DTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAggggsgggsgggsgggsgD/ LLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIK ASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQNNNWPTTF GAGTKLELkgggsgggsgggsgEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGggsvfllfppkp kdtlmisrtpetvcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynsty rvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSP GaggsgsgggsgggsgggsgggsgEEELQVIQPDKSVSVAAAGESAILHCTVT SLIPVGPVQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTVVSESTKRENMDF SISISNITPADAGTYCVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVR
59	抗 CD19 (scFv)	aCD19(VH) -(g4s)x3- <u>aCD19(VL)</u>	GAGGTGAAGCTGCAGGAGAGCGGCCCGGCTGGTGGCCCCCA GCCAGAGCCTGAGCGTGACCTGCACCGTGAGCGGCGTGAGCCT GCCCCACTACGGCGTGAGCTGGATCAGGCAGCCCCCAGGAAG GGCCTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGCGAGCGAGACCACCT ACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCAGGCTGACCATCATCAAGGAC AACAGCAAGAGCCAGGTGTTCTGAAGATGAACAGCCTGCAGA CCGACGACACCGCCATCTACTACTGCGCCAGCACTACTACTACG GCGGCGACTACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCAGCGT GACCGTGAGCAGCGGCGGCGGCGGCGAGCGGCGGCGGCGGCGAG CGGCGGCGGCGGCGAGCGACATCCAGATGACCCAGACCACCAGC AGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGAGAGGGTGACCATCAGCTGCA GGGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAAGTGTACAGCA GAAGCCCCAGCGCACCGTGAAGCTGCTGATCTACCAACCAGCA GGCTGCACAGCGGCGTGCCAGCAGGTTAGCGGCGAGCGGCGAG CGGCACCGACTACAGCCTGACCATCAGCAACCTGGAGCAGGAG GACATCGCCACCTACTTCTGCCAGCAGGGCAACACCTGCCCTAC ACCTTCGGCGGCGGCGACCAAGCTGGAGATCACC
60	抗 CD19 (scFv)	aCD19(VH) -(g4s)x3- <u>aCD19(VL)</u>	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGL EWLGVIVWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQDDT AIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSSggggsgggsgggsg DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQKPDGTVKLL IYHYSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLP YTFGGGKLEIT

10

20

30

【表 3 1】

配列 番号	名称	説明	配列
61	SIRPαV2- Fc(hulgG1)- 抗_CD19 (scFv)	huSIRPαV2-(g4s)x2- ヒンジ(HUIGG1M3) -(hulgG1m3:ch2- CH3)-a-(g4s)x4- aCD19(VH)-(g4s)x3- aCD19(VL)	GAGGAGGAGCTGCAGGTGATCCAGCCCCACAAGAGCGTGAGC GTGGCCGCCGGCGAGAGCGCCATCCTGCACTGCACCGTGACCA GCCTGATCCCCGTGGGCCCCATCCAGTGTTTCAAGGGCGCCGGC CCCGCCAGGGAGCTGATCTACAACCAGAAGGAGGGGCACTTCCC CAGGGTGACCACCGTGAGCGAGAGCACCAAGAGGGGAGAATCG GACTTCAGCATCAGCATCAGCAACATCACCCCCGCCGACGCCGG CACCTACTACTGCGTGAAGTTCAGGAAGGGGAGCCCCGACACCG AGTTCAAGAGCGGGCGCCGGCACCGAGCTGAGCGTGAGGGGCG GCGGCGGCAGCGGGCGGGCGGCAGCGAGCCCAAGAGCAGCG ACAAGACCCACACTGCCCCCTGCCCCCCCCGAGCTGCTG GGCGGCCCCAGCGTGTCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGACAC CCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTG GACGTGAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTACG TGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGGGA GGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGAGCGTGCTGACC GTGCTGCAACAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCA AGGTGAGCAACAAGGCCCTGCCCGCCCCATCGAGAAGACCATC AGCAAGGCCAAGGGCCAGCCAGGGAGCCCCAGGTGTACACCC TGCCCCCAGCAGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCT GACCTGCTGTTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAATAAGACCAC CCCCCGTGTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCA AGCTGACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGT CAGCTGACGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCC AGAAGAGCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGCGGGCGGGCGGGCA GCGGCGGGCGGGCGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGC GGCAGCGAGGTGAAGCTGCAGGAGAGCGGCCCGGCGCTGGTG GCCCCAGCCAGAGCCTGAGCGTGACCTGCACCGTGAGCGGGC TGAGCCTGCCCCACTACGGCGTGAGCTGGATCAGGCAGCCCCC AGGAAGGGCCTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGGGCAGCGAG ACCACCTACTACAACAGCGCCCTGAAGAGCAGGCTGACCATCAT CAAGGACAACAGCAAGAGCCAGGTGTTCTGAAGATGAACAGC CTGCAGACCGACGACACCGCCATCTACTACTGCGCCAAGCACTA CTACTACGGCGGCGCTACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGC ACCAGCGTGACCGTGAGCAGCGGGCGGGCGGGCAGCGGGCGG GGCGGCAGCGGGCGGGCGGGCAGCGACATCCAGATGACCCAG ACCACAGCAGCCTGAGCGCCAGCCTGGGCGACAGGGTGACCA TCAGCTGCAGGGCCAGCCAGGACATCAGCAAGTACCTGAAGTG GTACCAGCAGAAGCCCGACGGCACCGTGAAGCTGCTGATCTACC ACACCAGCAGGCTGCACAGCGGGCGTCCAGCAGGTTTCAGCGG CAGCGGCAGCGGCACCGACTACAGCCTGACCATCAGCAACCTGG AGCAGGAGGACATCGCCACCTACTTCTGCCAGCAGGGCAACACC CTGCCCTACACCTTCGGCGGGCGGCACCAAGCTGGAGATCACC

10

20

30

40

10

20

30

40

【 0 2 5 5 】

[illegible]

40

【表 3 4】

配列 番号	名称	説明	配列
			TGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGC CTGAGCCCCGGCAAG
66	抗HER2 (Fcab)	ヒンジ(HUIGG1M3) - (抗HER_Fcab_H10 036:ch2-CH3)	EPKSSDKTHTCPPEPELLGgpsvflfpkpkdtlmisrtpetvcvvvdvsh edpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlingkeykc kvsnkakpapietkiskakGQPREPQVYTLPPSRDEYLYGDVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPRHSAR MWRWAHGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
67	SIRPαV2- 抗_HER2 (Fcab)	huSIRPαV2-(g4s)x2- ヒンジ(HUIGG1M3) - (抗HER_Fcab_H10 036:ch2-CH3)	GAGGAGGAGCTGCAGGTGATCCAGCCCCACAAGAGCGTGAGC GTGGCCGCCGGCGAGAGCGCCATCCTGCACTGCACCGTGACCA GCCTGATCCCCGTGGGCCCCATCCAGTGGTTCAGGGGCGCCGGC CCCCGAGGAGCTGATCTACAACCAGAAGGAGGGCCACTTCCC CAGGGTGACCACCGTGAGCGAGAGCACCAAGAGGGAGAACATG GACTTCAGCATCAGCATCAGCAACATCACCCCGCCGACGCCGG CACCTACTACTGCGTGAAGTTCAGGAAGGGCAGCCCCGACACCG AGTTCAAGAGCGGCGCCGGCAGCGAGCTGAGCGTGAGGGGCG GCGGCGGACGCGGCGGCGGCGGAGCGAGCCCAAGAGCAGCG ACAAGACCCACACTGCCCCCCTGCCCCGCCCCGAGCTGCTG GGCGGCCCCAGCGTGTCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGACAC CCTGATGATCAGCAGGACCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGT GACGTGAGCCACGAGGACCCGAGGTGAAGTTCAGTGGTACG TGACGCGCTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCAGGGA GGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGAGCGTGCTGACC GTGCTGACCAAGGACTGGTGAACGCGCAAGGAGTACAAGTGCA AGGTGAGCAACAAGGCCCTGCCCCCCCCATCGAGAAGACCATC AGCAAGGCCAAGGGCCAGCCAGGGAGCCCCAGGTGTACACCC TGCCCCCAGCAGGGACGAGTACCTGTACGGCGACGTGAGCCT GACCTGCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAATAAGACCAC CCCCCGTGTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCA AGCTGACCGTGCCAGGCACAGCGCCAGGATGTGGAGGTGGGC CCACGGCAACGTGTTAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGC ACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG
68	SIRPαV2- 抗_HER2 (Fcab)	huSIRPαV2-(g4s)x2- ヒンジ(HUIGG1M3) - (抗HER_Fcab_H10 036:ch2-CH3)	EEELQVIQPKDSVSVAAGESAILHCTVTSIPVGIQWFRGAGPARE LIYNQKEGHFPRVTVSESTKRENMDFSISINITPADAGTYCVKFR KGSPDTEFKSGAGTELSVRgggsgggsggEPKSSDKTHTCPPEPELL Ggpsvflfpkpkdtlmisrtpetvcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnak tkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlingkeyckkvsnkakpapietkiskakGQ PREPQVYTLPPSRDEYLYGDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPN NYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVPRHSARMWRWAHGNVFSVSM

10

20

30

40

【表 3 5】

配列 番号	名称	説明	配列
			HEALHNHYTQKSLSPGK
69	抗EGFR- hulG1- (G4S)3- SIRPαV2	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) -(hulG1m3:ch2- CH3)-a-(g4s)x3- huSIRPa(V2)	CAAGTCCAACCTGAAGCAGTCCGGGCCGGGACTCGTGACGCCGTC GCAGTCACTGTCCATCACTTGACGGTGTGAGGCTTTTCCTTGAC CAACTACGGAGTGCACTGGGTGCGCCAGTCCCTGGAAAGGGG CTGGAGTGGCTTGCGTGATTTGGTCCGGAGGAAACACAGACT ACAACACTCCTTTCACCTCCCGCTGAGCATTAAACAGGACAAC CCAAGTCCCAAGTGTTCTTCAAGATGAACAGCCTGCAGAGCAAT GATACCGCCATCTACTATTGTGCCGGGCTCTCACCTACTACGAC TACGAATTCGCCTACTGGGGACAGGGAACCTGGTCACTGTCTC CGCGGcctccactaaggccctagcgtgtcccttggcgccatcgtaaagtcca cctccggtggcactgcccctgggatgccttgaaggactactccccgaacctgt gacctgtcctggaactcggcgccactgactcgggggtgcacaccttctgcctgc ctgcaatcgagcggctgtactccctctcgtccgtgtcaccgtgccttagctccct cggaaccagacctacatctgcaacgtcaaccacaagccgagcaacacaaagt gataagagagtgGAGCCGAAGTCATGCGACAAGACTCATACTTGTC CCCCATGCCCCGCCCCGGAAGTGTGGGGggcccatcgtgttctgtt cccgcggaacctaaaggacacctgatgatttcgagaactccggaagtgcctg tgtgtgtgtcgcgtgtccacgaggatccggagggtcaagttcaattggtacgt cgacggagtgggaagtcacacgccaagaccaagccccgggaggagcagta caactccacttaccgggtgtgtccgtgtgacctgtgcatcaggattgggtg aacgggaaggagtataagtgaaggtgcaacaaggcattgcctgcgcca tcgaaaagaccattagcaaggccaagGGCCAGCCAGGGAACACAG GTGTACTCTGCCCCGTCCCGCAAGAAATGACCAAGAACCA AGTGTCACTGACATGCCTCGTGAAGGGATTTACCCGTCCGATAT CGCCGTGGAATGGGAATCGAACGGTCAACCTGAAAACAACATACA AGACGACCCCTCCGGTCTGGACAGCGATGGCTCATTCTTCCTGT ACTCCAAGCTTACGGTGGACAAGTCCCGGTGGCAACAGGGAAA TGTGTTTTCTGTCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTA CACCCAGAAGTCACTCTCCCTGAGCCCCGGCgcgggggtggtggaag cggaggagggggtctgggggtggcggttccGAGGAGGAGCTCCAGGTCA TCCAGCCTGACAAGTCCGTGTGCGTGGCCGCGGAGAGTCCGC CATTCTGCACTGCACCGTGACCTCCCTCATCCCCGTGGGACCTAT CCAGTGGTTCAGAGGAGCCGGGCCCCGACGGGAACCTGATCTAT AACCAGAAGGAGGGCCATTTCCCCCGCTGACCACCGTGTCCG AGAGCACCAAGAGGGAAAACATGGACTTCAGCATTTCGATCAG CAACATCACTCCCGCTGACGCCGGGACCTACTACTGCGTGAAGT TCCGGAAGGAAGCCCGGACACCGAGTTCAAAAGCGGAGCCG GCACCGAACTGTCGGTCCGC

10

20

30

40

【表 3 6】

配列 番号	名称	説明	配列
70	抗EGFR- hulgG1- (G4S)3- SIRPaV2	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) -(hulgG1m3: ch2- CH3)-a-(g4s)x3- huSIRPa(V2)	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHVVVRQSPGKGLE WLGVIWSGGNTDYNTPTFSRLSINKDNSKQVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSAastkgpsvflapssksts ggta algclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqty icvnvhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGgpsvflfpkppkdt lmisrtpvctcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv svltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG AGGGGSGGGSGGGGSEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTS LIPVGPIQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKRENMDF SISISNITPADAGTYICVKFRKGSPTDFKSGAGTELSVR
71	抗EGFR- hulgG1- (G4S)5- SIRPaV2	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) -(hulgG1m3: ch2- CH3)-a-(g4s)x5- huSIRPa(V2)	CAAGTCCAAGTGAAGCAGTCCGGGCCGGGACTCGTGACGCCGTC GCAGTCACTGTCCATCACTTGACCGGTGTGAGGCTTTTCTTGAC CAACTACGAGTGCACTGGGTGCGCCAGTCCCCTGGAAAGGGG CTGGAGTGGCTTGGCGTGATTTGGTCCGGAGGAAACACAGACT ACAACACTCCTTTCACTCCCGCTGAGCATTAAACAGGACAAC CCAAGTCCCAAGTGTCTTCAAGATGAACAGCCTGCAGAGCAAT GATACCGCCATCTACTATTGTGCCGGGCTCTCACCTACTACGAC TACGAATTGCCTACTGGGGACAGGGAACCTGGTCACTGTCTC CGCGcctccactaaggccctagcgtgttcccttggcgccatcgtaagtc cctccggtggcactgcccctgggatgccttgaaggactacttccccgaacctgt gacctgtcctggaactcggcgccactgactcgggggtgcacaccttctcgctc ctgcaatcgagcggctgtactccctctcgtcgtggtcaccgtgccgttagctccct cggaaaccagacctacatctgcaactcaaccacaagccgagcaacaccaagtg gataagagagtgGAGCCGAAGTCATGCGACAAGACTCATACTTGTC CCCCATGCCCCCGCCGGAAGTCTGCGGGGgcccacatcgtgttctctgtt cccgcgaacctaaggacacctgatgattcgagaactccggaagtgcctg tgtgtgtgtgacgtgtcccacgaggatccggaggtaagttcaattgtacgt cgacggagtgggaagtccacaacgccaagccaagccccgggaggagcagta caactccacttaccgggtgtgtcctgtgctgaccgtgctcatcaggattgctg aacggaaaggagtataagtcaaatgtcaacaaggcattgctgtgcgcaa tcgaaaagaccattagcaaggccaagGGCCAGCCAGGGAACACAG GTGTCACTCTGCCCCGTCCCGCAAGAAATGACCAAGAACCA AGTGTCACTGACATGCCTCGTGAAGGGATTTTACCGTCCGATAT CGCCGTGGAATGGGAATCGAACGGTCAACCTGAAAACAACTACA AGACGACCCCTCCGGTCTGGACAGCGATGGCTATTCTTCTGT ACTCCAAGCTTACGGTGGACAAGTCCCGTGGCAACAGGGGAAA TGTGTTTTCTGTGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTA CACCCAGAAGTCACTCTCCCTGAGCCCCGGCgcggggggtggtggaag cggaggagggggtctgggggtggcggttccggcgggcgatccggcgggcg gatccGAGGAGGAGCTCCAGGTATCCAGCTGACAAGTCCGTG TCGGTGGCCGCGGAGAGTCCGCCATTCTGACTGCACCGTGA CCTCCCTCATCCCCGTGGGACCTATCCAGTGGTTCAGAGGAGCC

10

20

30

40

【表 3 7】

配列 番号	名称	説明	配列
			GGGCCCCGACGGGAACTGATCTATAACCAGAAGGAGGGCCATT TCCCCCGCTGACCACCGTGTCCGAGAGCACCAAGAGGGAAAA CATGGACTTCAGCATTTTCGATCAGCAACATCACTCCCGCTGACG CCGGGACCTACTACTGCGTGAAGTTCCGAAAGGAAGCCCGGA CACCGAGTTCAAAAGCGGAGCCGGCACCGAACTGTCGGTCCGC
72	抗EGFR- hulG1- (G4S)5- SIRPαV2	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) -(hulG1m3:ch2- CH3)-a-(g4s)x5- huSIRPa(V2)	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWRQSPGKLE WLGVIWSGNTDYNTPTFTSRLSINKDNSKQVFFKMNSLQSDTAI YYCARALYYDYEFAYWGQGLTVTVSAastkgpsvflapsskstsggta alglvkdyppepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqty icvnvhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGgpsvflfpkpdkdt lmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv svltulhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakGQPREPOVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEELQVIQPKSVSVAA GESAILHCTVTSVIPGPIQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTV SESTKRENMDFSISISNITPADAGTYCVKFRKGGSPDTEFKSGAGTE LSVR
73	抗 EGFR(VH_ ds1_G44C) -hulG1	C225(VH_ds1_G44 C)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) -(hulG1m3:ch2- CH3)	CAGGTGCAGCTGAAGCAGAGCGGCCCGGCCTGGTGCAGCCCA GCCAGAGCCTGAGCATCACCTGCACCGTGAGCGGCTTCAGCCTG ACCAACTACGGCGTGCACTGGGTGAGGCAGAGCCCCGGCAAGT GCCTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGAGCGGCGCAACACCGA CTACAACACCCCTTCACCAGCAGGCTGAGCATCAACAAGGACA ACAGCAAGAGCCAGGTGTTCTTCAAGATGAACAGCCTGCAGAGC AACGACACCGCCATCTACTACTGCGCCAGGGCCCTGACCTACTAC GACTACGAGTTCGCCTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGT GAGCGCCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCC CCAGCAGCAAGAGCACCAAGCGGCGGCACCGCCGCTGGGCTG CCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGAGCTGGA ACAGCGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCCGCGGTG CTGCAGAGCAGCGGCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCG TGCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG AACCACAAGCCCAGCAACCAAGGTGGACAAGAGGGTGGAGC CCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCTGCCCCGCC

10

20

30

40

【表 3 8】

配列番号	名称	説明	配列
			<p>CCCGAGCTGCTGGGCGGCCAGCGTGTTCTGTTCCTGTTCCCCCAAGGACACCTGATGATCAGCAGGACCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACC</p> <p>AAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGA</p> <p>GCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGCCCTGCCCGCCCCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGGGAGCCCCA</p> <p>GGTGTACACCTGCCCCCAGCAGGGAGGAGATGACCAAGAAC</p> <p>CAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGCATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCAGAGAACAATACAAGACCACCCCCCGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTT</p> <p>CCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGAGCCCCGGC</p>
74	抗EGFR(VH_ds1_G44C)-hulgG1	C225(VH_ds1_G44C)- ch1(huigg1m3) -ヒンジ(HUIGG1M3)-(hulgG1m3: ch2-CH3)	<p>QVQLKQSGPGLVQPQSLISITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKCLEWLGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWQGTLVTVAastkgpsvflpapskstssgtalgclvkdyfpepvtvswnsgaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGgpsvflfpkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeyckvsnkalpapiektiskakGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKITTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>
75	抗EGFR(VH_ds2_Q105C)-hulgG1	C225(VH_ds2_Q105C)- ch1(huigg1m3) -ヒンジ(HUIGG1M3)-(hulgG1m3: ch2-CH3)	<p>CAGGTGCAGCTGAAGCAGAGCGGCCCGCCTGGTGCAGCCCA</p> <p>GCCAGAGCCTGAGCATCACCTGCACCGTGAGCGGCTTCAGCCTG</p> <p>ACCAACTACGGCGTGACTGGGTGAGGCAGAGCCCCGGCAAGG</p> <p>GCCTGGAGTGGCTGGGCGTGATCTGGAGCGGCGGCAACCCGA</p> <p>CTACAACACCCCCCTTACCAGCAGGCTGAGCATCAACAAGGACA</p> <p>ACAGCAAGAGCCAGGTGTTCTTCAAGATGAACAGCCTGCAGAGC</p> <p>AACGACACCGCCATCTACTACTGCGCCAGGGCCCTGACCTACTAC</p> <p>GACTACGAGTTCGCTACTGGGGCTGCGGCACCCTGGTGACCGT</p> <p>GAGCGCCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCCC</p> <p>CCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACCGCCGCCCTGGGCTG</p> <p>CCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGAGCTGGA</p> <p>ACAGCGGCGCCCTGACCAGCGCGTGACACCTTCCCCGCCGTG</p> <p>CTGCAGAGCAGCGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCG</p> <p>TGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG</p> <p>AACCACAAGCCCAGCAACCAAGGTGGACAAGAGGGTGGAGC</p> <p>CCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCCTGCCCGCC</p> <p>CCCGAGCTGCTGGGCGGCCAGCGTGTTCTGTTCCCCCAAGGACACCTGATGATCAGCAGGACCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACC</p>

【表 3 9】

配列 番号	名称	説明	配列
			AAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGA GCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGA GTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGCCCTGCCCGCCCCATCG AGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCAGGGAGCCCCA GGTGATACACCTGCCCCAGCAGGGAGGAGATGACCAAGAAC CAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGA CATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAAC TACAAGACCACCCCCCGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTT CCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG GGCAACGTGTTAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAA CCACTACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGAGCCCCGGC
76	抗 EGFR(VH_ ds2_Q105 C)-hulgG1	C225(VH_ds2_Q10 5C)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) -(hulgG1m3:ch2- CH3)	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLE WLGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAYWGCGTLVTVSAastkgpsvflapsskstsggtaa lgclvkdyppepvtvswngaltsgvhtfpavllqssglyssvvtvpssslgtqtyi cnvnhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGgpsvflfpkpkdtl misrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv svltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
77	抗 EGFR(VL_ ds1_A100 C)-huCK- SIRPαV2	C225(VL_ds1_A100 C)-huck-(G4S)X2- sirpav2	GACATCTGCTGACCCAGAGCCCCGTGATCCTGAGCGTGAGCCC CGGCGAGAGGGTGAGCTTCAGCTGCAGGGCCAGCCAGAGCATC GGCACCACATCCACTGGTACCAGCAGAGGACCAACGGCAGCCC CAGGCTGCTGATCAAGTACGCCAGCGAGAGCATCAGCGGCATCC CCAGCAGGTTACGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCCTG AGCATCAACAGCGTGAGAGCGGAGGACATCGCCGACTACTACT GCCAGCAGAACAACTGGCCACCACTTCGGCTGCGGCACC AAGCTGGAGCTGAAGAGGACCGTGCCGCCCCAGCGTGTTCA TCTTCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGC GTGGTGTGCTGCTGAACAACTTCTACCCAGGGAGGCCAAGGT GCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAG GAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCC TGAGCAGCACCTGACCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCA CAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACAGGGCCTGAGCAGC CCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGCGGCGGCGGCG GCAGCGGCGGCGGCGGCGAGGAGGAGCTGAGGTGATCC AGCCCGACAAGAGCGTGAGCGTGCCGCGGCGAGAGCGCCAT CCTGCACTGCACCGTGACCAGCCTGATCCCCGTGGGCCCATCCA GTGGTTAGGGGCGCGGCCCGCCAGGGAGCTGATCTACAAC CAGAAGGAGGGCCACTTCCCAGGGTGACCACCGTGAGCGAGA GCACCAAGAGGGAGAACATGGACTTCAGCATCAGCATCAGCAA CATACCCCCCGGACCGGCGCACCTACTACTGCGTGAAGTTCA GGAAGGGCAGCCCCGACACCGAGTTCAAGAGCGGCGCGGCGCAC

10

20

30

40

【表 40】

配列 番号	名称	説明	配列
			CGAGCTGAGCGTGAGG
78	抗 EGFR(VL_ ds1_A100 C)-huCK- SIRPαV2	C225(VL_ds1_A100 C)-huck-(G4S)X2- <i>sirpav2</i>	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLIK YASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQQNNNWPTT FGCGTKLELKrtaapsvfifppsdeqlksgtasvvcInnfypreakvqwkvd nalqsgnsqesvteqdsksdstylsstltlskadyekkhkvyacevthqglsspvtk sfnrgecGGGGSGGGGSeeelqviqpdksvsvaagesailhctvtslipvgpi qwfrgagpareliynqkeghfprvtvsestkretnmdfsisisnitpadagtyyc vkfrkgsdpdefksgagtelsvr
79	抗 EGFR(VL_ ds2_S43C) -huCK- SIRPαV2	C225(VL_ds2_S43C) -huck-(G4S)X2- <i>sirpav2</i>	GACATCCTGCTGACCCAGAGCCCCGTGATCCTGAGCGTGAGCCC CGGCGAGAGGGTGAGCTTCAGCTGCAGGGCCAGCCAGAGCATC GGCACCACATCCACTGGTACCAGCAGAGGACCAACGGCTGCCC CAGGCTGCTGATCAAGTACGCCAGCGAGAGCATCAGCGGCATCC CCAGCAGGTTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCTG AGCATCAACAGCGTGAGAGCGAGGACATCGCCGACTACTACT GCCAGCAGAACAACAACCTGGCCACACCTTCGGCGCCGGCACC AAGCTGGAGCTGAAGAGGACCGTGCCGCCCCAGCGTGTTCA TCTTCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGC GTGGTGTGCTGCTGAACAACCTTACCCAGGGAGGCCAAGGT GCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAG GAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCC TGAGCAGCACCTGACCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCA CAAGGTGTACGCCCTGCGAGGTGACCCACAGGGCCTGAGCAGC CCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGCGCGCGCGCG GCAGCGGCGCGCGCGGCGAGGAGGAGCTGCAAGTGATCC AGCCCGACAAGAGCGTGAGCGTGCCCGCGCGAGAGCGCCAT CCTGCACTGCACCGTGACCGAGCTGATCCCCGTGGGCCCATCCA GTGGTTACGGGGCGCGGCCCGCCAGGGAGCTGATCTACAAC CAGAAGGAGGGGCACTTCCCAGGGTGACACCGTGAGCGAGA GCACCAAGAGGGGAGAATGGACTTCAGCATCAGCATCAGCAA CATCACCCCGCGACGCCGGCACCTACTACTGCGTGAAGTTCA GGAAGGGCAGCCCCGACACCGAGTTCAAGAGCGGCGCCGGCAC CGAGCTGAGCGTGAGG
80	抗 EGFR(VL_ ds2_S43C)	C225(VL_ds2_S43C) -huck-(G4S)X2- <i>sirpav2</i>	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGCPRLLI KYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQQNNNWPT TFGAGTKLELKrtaapsvfifppsdeqlksgtasvvcInnfypreakvqwk dnalqsgnsqesvteqdsksdstylsstltlskadyekkhkvyacevthqglsspvt

10

20

30

40

【表 4 1】

配列 番号	名称	説明	配列
	-huCK- SIRPαV2		<i>ksfnrgecGGGGSGGGGSeelqviqpdksvsaaagesailhctvtslipvgpi qwfgrgagpareliynqkeghfprvttvsestkrenmdfsisisnitpadagtyyc vkfrkgsdpdefksgagtelsvr</i>
81	セツキシマブ (HC)	抗EGFR:HC	QVQLKQSGPGLVQPSSQLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLE WLGVIWSSGGNTDYNTPTFSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAYWGQGLTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTHTCPP CPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
82	セツキシマブ (LC)	抗EGFR:LC	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLIK YASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQNNNNWPTT FGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSPVTKSFNRGA
83	パニツムマブ (HC)	抗EGFR:HC	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGDYYWTWIRQSPGKG LEWIGHIYSGNTNYPNLSKRLTISIDTSKQFSLKLSVTAADTAIYY CVRDRVTGAFDIWGQGMVTSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA ALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPCAPPVAG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL PAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
84	パニツムマブ (LC)	抗EGFR:LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQDISNYLNWYQKPGKAPKL LIYDASNLETGVPSPRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDATYFCQHFHLP LAFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
85	ニモツズマブ (HC)	抗EGFR:Fab(H)	QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYFTFTNYIYVVRQAPGQGL EWIGGINPTSGGSNFNEKFKTRVTITADESSTAYMELSSLRSEDTAF YFCTRQGLWFDSDGRGDFWGGQTTVTSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVP
86	ニモツズマブ	抗EGFR:Fab(L)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSQNIVHSNGNTYLDWYQQTP GKAPKLLIYKVSNRFGVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDATYYCF QYSHVPWTFGQGTQLQITREVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL

10

20

30

40

【表 4 2】

配列 番号	名称	説明	配列
	(LC)		NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
87	マツズマブ (HC)	抗 EGFR:Fab(H)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTTSHWMHWVRQAPGQ GLEWIGEFNPSNGRTNYNEKFKSKATMTVDTSNTAYMELSSLRSE DTAVYYCASRDYDYGRIYFDYWGQGLTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
88	マツズマブ (LC)	抗 EGFR:Fab(L)	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCSASSSVTYMYWYQQKPGKAPKLLI YDTSNLAGVPSRFSGSGSGTDYFTISSLQPEDATYYCQQWSSHIF TFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
89	フツキシマブ (HC)	抗 EGFR:HC	EVQLQQPGSELVRPGASVKLSCKASGYFTTSYWMHWVKQRPGQG LEWIGNIYPGSRSTNYDEKFKSKATLTVDTSSTAYMQLSSLTSEDSA VYYCTRNQDYYVSSGDAMDYWGQGTSTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNL GKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
90	フツキシマブ (LC)	抗 EGFR:LC	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRTSQDIGNYLNWYQQKPDGTVKL LIYYTSLRHSVPSRFSGSGSGTDFSLTINNVEQEDVATYFCQHYNTV PPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
91	モドツキシマブ (HC)	抗 EGFR:HC	QVQLQQPGAELEVPGGSVKLSCKASGYFTTSHWMHWVKQRPGQG GLEWIGELNPSGRNNYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQFSSLTSED SAVYYCVRYGYDEAMDYWGQGTSTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
92	モドツキシマブ (LC)	抗 EGFR:LC	DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLHSNGITYLYWYLQKPGQ SPQLLIYQMSNLASGVPDFRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDGVYYCA QNLELPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSK

10

20

30

40

【表 4 3】

配列 番号	名称	説明	配列
			ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
93	イムガツズ マブ(HC)	抗EGFR:HC	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFTDYKIHVVVRQAPGQGL EWMGYFNPNSGYSTYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDT AVYYCARLSPGGYYVMDAWGQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
94	イムガツズ マブ(LC)	抗EGFR:LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGINNYLNWYQQKPGKAPK RLIYNTNNLQGTGVPSTRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNS FPTFGGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
95	ネシツムマブ (HC)	抗EGFR:HC	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKG LEWIGIYYSGSTDYNPSTLKSRTVMSVDTSKNQFSLKVNSTAAADTA VYYCARVSIFGVGTFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVLPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
96	ネシツムマブ (LC)	抗EGFR:LC	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRL LIYDASNRTGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCHQYGSTP LTFGGGTGAIEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
97	リツキシマブ (HC)	抗CD20:HC	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGR GLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSE DSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWVGAGTTTVVSAASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS

10

20

30

40

【表 4 4】

配列 番号	名称	説明	配列
			KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
98	リツキシマブ (LC)	抗 CD20:LC	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFOQKPGSSPKPWI YATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNP PTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
99	オフアツム マブ(HC)	抗 CD20:Fab(H)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAPGKG LEWVSTISWNSGSGYADSVKGRFTISRDNAKSLYLQMNSLRAD TALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAP GSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP
100	オフアツム マブ	抗 CD20:Fab(L)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLI YDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRNWP ITFGQGTREIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
101	オビヌツズ マブ(HC)	抗 CD20:HC	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYAFSYSWINWVRQAPGQG LEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
102	オビヌツズ マブ(LC)	抗 CD20:LC	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLHSGITYLYWYLQKPGQS PQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQ NLELPYTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
103	イブリツモ マブ チウキセタン (HC)	抗 CD20:HC	QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCKASGYFTSYNMHWVKQTPRQG LEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDS AVYFCARVVYYSNSYWFVDVWGTTVTVSAPSVYPLAPVCGDIT GSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSS VTVTSSWPSQSITCNVAHPASSTKVDDKIEPRGPTIKPCPPCKCPAP NLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVDVSEDDPDVQISWVFN NVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVN

10

20

30

40

【表 4 5】

配列 番号	名称	説明	配列
			NKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTD FMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGYSFYMSKLRVEKKN WVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKFSR
104	イブリツモ マブ チウキセタン (LC)	抗 CD20:LC	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYMHWWYQQKPGSSPKP WIYAPSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSE NPPTFGAGTKLELKRADAAPTTFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
105	オカラツズ マブ(HC)	抗 CD20:HC	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGRTFTSYNMHWVRQMPGKGL EWMGAIYPLTGDTSYNQSKLQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARSTYVGGDWQFDVWGKGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKIKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKQKGPQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
106	オカラツズ マブ(LC)	抗 CD20:LC	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASSSVPIHWWYQQKPGQAPRLIY ATSALASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWLSNPPT FGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
107	オクレリズマ ブ(HC)	抗 CD20:HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSTSYNMHWVRQAPGKG LEWVGAIYPGNGDTSYNQKFKGRFTISVDKSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARVYYNSYWFYFDVWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
108	オクレリズマ ブ(LC)	抗 CD20:LC	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASSSVSYMHWWYQQKPGKAPKP LIYAPSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWSFN PPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKADYEEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

20

30

40

【表 4 6】

配列 番号	名称	説明	配列
109	トシツモマブ I-131 (HC)	抗CD20:HC	QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPRQG LEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDS AVYFCARVYYNSYWFYFDVWGTGTTVTSGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
110	トシツモマブ I-131 (LC)	抗CD20:LC	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYMHWYQQKPGSSPKP WIYAPSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWWSF NPPTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYF REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
111	ウブリツキシ マブ(HC)	抗CD20:HC	QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPRQG LEWIGGIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTVGKSSSTAYMQLSSLTSEDS AVYFCARYDYNAMDYWGQGTSTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
112	ウブリツキシ マブ(LC)	抗CD20:LC	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYMHWYQQKPGSSPKP WIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYFTISRVEAEDAATYYCQQWTF NPPTFGGGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYF REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
113	ベルツズマブ (HC)	抗CD20:HC	QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYNMHWVKQAPGQ GLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADESTNTAYMELSSLRSE DTAFYYCARSTYYGGDWYFDVWGGQTTVTSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

20

30

40

【表 47】

配列 番号	名称	説明	配列
114	ペルツズマブ (LC)	抗 CD20:LC	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTMTCRASSSVSIHWFQKPGKAPKP WYIATSNLASGVPVRFSGSGSGTDYFTFTISSLQPEDATYYCQQWTS NPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYE KHVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
115	トランスツズ マブ(HC)	抗 HER2:HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLE WVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRADTA VYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSKVHFFPAVLQSSGLY SLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNGVFSCSMVHEALHNHYTQKSLSLSPGK
116	トランスツズ マブ(LC)	抗 HER2:LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPK LLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTT PPTFGGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
117	ペルツズマブ (HC)	抗 HER2:HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMWDVVRQAPGKG LEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARNLGPSTFYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSKVHFFPAVLQSSGLY SLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNGVFSCSMVHEALHNHYTQKSLSLSPG
118	ペルツズマブ (LC)	抗 HER2:LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSGVAWYQQKPGKAPKL LIYSASYRYTGVPSTFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYIYP YTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEK KHVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
119	マルゲツキシ マブ(HC)	抗 HER2:HC	QVQLQQSGPELVKPGASLKLSCTASGFNIKDTYIHWVKRPEQGLE WIGRIYPTNGYTRYDPKFQDKATITADTSNTAYLQVSRLTSED TAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQASVTWNSGALTSKVHFFPAVLQSSGLY LSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKVEPKSCDKTHTCPP CPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF

10

20

30

40

【表 48】

配列 番号	名称	説明	配列
			NWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTLRVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPLVDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
120	マルゲツキシマブ(LC)	抗 HER2:LC	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVNTAVAWYQQKPGHSP KLLIYSASFRTYGVDPDRFTGSRSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHY TTPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
121	アテゾリズマブ(HC)	抗 PDL1:HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGL EWWAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDT AVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPLVDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
122	アテゾリズマブ(LC)	抗 PDL1:LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPK LLIYSASFYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYLHY PATFGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
123	ダブルマブ(HC)	抗 PDL1:HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKG LEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTC PPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPLVDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
124	ダブルマブ(LC)	抗 PDL1:LC	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQVRVSSYLAWYQQKPGQAPRL LIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSLP WTFGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
125	huSIRPαV	huSIRPαV1	EEELQVIQPKSVLVAAGETATLRCTITSLIPVGPIQWFRGAGPGREL IYNQKEGHFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIIRIGNITPADAGTYCVKFR

10

20

30

40

【表 49】

配列 番号	名称	説明	配列
	1 (A27I)	(A27Iを有するV1ドメイン)	KGSPDDVEFKSGAGTELSVR
126	huSIRPαV 2 (V27I)	huSIRPαV2 (V27Iを有するV2ドメイン)	EEELQVIQPKSVSVAAGESAILHCTITSLIPVGPIQWFRGAGPARELI YINQKEGHFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTYVCVKFRK GSPDTEFKSGAGTELSVR
127	huSIRPαV 1 (H56P)	huSIRPαV1 (H56Pを有するV1ドメイン)	EEELQVIQPKSVLVAAGETATLRCTATSLIPVGPIQWFRGAGPGRE LIYNQKEGHPFRVTTVSDLTNRNNMDFSIRIGNITPADAGTYVCVKF RKGSPDDVEFKSGAGTELSVR
128	huSIRPαV 2 (H56P)	huSIRPαV2 (H56Pを有するV2ドメイン)	EEELQVIQPKSVSVAAGESAILHCTVTSIPVGPIQWFRGAGPARE LIYNQKEGHPFRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTYVCVKFR KGSPDTEFKSGAGTELSVR
129	huSIRPαV 1 (V6I)	huSIRPαV1 (V6Iを有するV1ドメイン)	EEELQIIQPKSVLVAAGETATLRCTATSLIPVGPIQWFRGAGPGREL IYNQKEGHFPRVTTVSDLTNRNNMDFSIRIGNITPADAGTYVCVKFR KGSPDDVEFKSGAGTELSVR
130	huSIRPαV 2 (V6I)	huSIRPαV2 (V6Iを有するV2ドメイン)	EEELQIIQPKSVSVAAGESAILHCTVTSIPVGPIQWFRGAGPARELI YINQKEGHFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTYVCVKFRK GSPDTEFKSGAGTELSVR
131	huSIRPαV 1 (I31T)	huSIRPαV1 (I31Tを有するV1ドメイン)	EEELQVIQPKSVLVAAGETATLRCTATSLTPVGPIQWFRGAGPGR ELIYNQKEGHFPRVTTVSDLTNRNNMDFSIRIGNITPADAGTYVCVK FRKGSPDDVEFKSGAGTELSVR
132	huSIRPαV 2 (I31T)	huSIRPαV2 (I31Tを有するV2ドメイン)	EEELQVIQPKSVSVAAGESAILHCTVTSIPVGPIQWFRGAGPARE LIYNQKEGHFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTYVCVKFR KGSPDTEFKSGAGTELSVR
133	huSIRPαV 1 (I31R)	huSIRPαV1 (I31Rを有するV1ドメイン)	EEELQVIQPKSVLVAAGETATLRCTATSLRPVGPIQWFRGAGPGR ELIYNQKEGHFPRVTTVSDLTNRNNMDFSIRIGNITPADAGTYVCVK FRKGSPDDVEFKSGAGTELSVR
134	huSIRPαV 2 (I31R)	huSIRPαV2 (I31Rを有するV2ドメイン)	EEELQVIQPKSVSVAAGESAILHCTVTSLRPVGPIQWFRGAGPARE LIYNQKEGHFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTYVCVKFR KGSPDTEFKSGAGTELSVR
135	huSIRPαV 1 (Q37W)	huSIRPαV1 (Q37Wを有する V1ドメイン)	EEELQVIQPKSVLVAAGETATLRCTATSLIPVGPIWWFRGAGPGR ELIYNQKEGHFPRVTTVSDLTNRNNMDFSIRIGNITPADAGTYVCVK FRKGSPDDVEFKSGAGTELSVR
136	huSIRPαV 2 (Q37W)	huSIRPαV2 (Q37Wを有する V2ドメイン)	EEELQVIQPKSVSVAAGESAILHCTVTSIPVGPIWWFRGAGPARE LIYNQKEGHFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTYVCVKFR KGSPDTEFKSGAGTELSVR

10

20

30

40

【表 5 0】

配列 番号	名称	説明	配列
137	huSIRPαV 1 (L66Q)	huSIRPαV1 (V1 (L66Qを有するV1ドメイン))	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLIPVGPIQWFRGAGPGRE LIYNQKEGHFPRVTTVSDQTKRNNMDFISIRIGNITPADAGTYVCVKF RKGSPDDVEFKSGAGTELSVR
138	huSIRPαV 2 (S66Q)	huSIRPαV2 (V2 (S66Qを有するV2ドメイン))	EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSIPVGPIQWFRGAGPARE LIYNQKEGHFPRVTTVSEQTKRENMDFSISISNITPADAGTYVCVKFR KGSPDTEFKSGAGTELSVR
139	huSIRPαV 1 (Q37H)	huSIRPαV1 (V1 (Q37Hを有するV1ドメイン))	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLIPVGPIHWFRGAGPGRE LIYNQKEGHFPRVTTVSDLTQRNNMDFISIRIGNITPADAGTYVCVKF RKGSPDDVEFKSGAGTELSVR
140	huSIRPαV 2 (Q37H)	huSIRPαV2 (V2 (Q37Hを有するV2ドメイン))	EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSIPVGPIHWFRGAGPAREL IYNQKEGHFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTYVCVKFRK GSPDTEFKSGAGTELSVR
141	huSIRPαV 1 (E54P)	huSIRPαV1 (V1 (E54Pを有するV1ドメイン))	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLIPVGPIQWFRGAGPGRE LIYNQKPGHFPRVTTVSDLTQRNNMDFISIRIGNITPADAGTYVCVKF RKGSPDDVEFKSGAGTELSVR
142	huSIRPαV 2 (E54P)	huSIRPαV2 (V2 (E54Pを有するV2ドメイン))	EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSIPVGPIQWFRGAGPARE LIYNQKPGHFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTYVCVKFR KGSPDTEFKSGAGTELSVR
143	huSIRPαV 1 (M72R)	huSIRPαV1 (V1 (M72Rを有するV1ドメイン))	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLIPVGPIQWFRGAGPGRE LIYNQKEGHFPRVTTVSDLTQRNNRDFSIRIGNITPADAGTYVCVKFR KGSPDDVEFKSGAGTELSVR
144	huSIRPαV 2 (M72R)	huSIRPαV2 (V2 (M72Rを有するV2ドメイン))	EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSIPVGPIQWFRGAGPARE LIYNQKEGHFPRVTTVSESTKRENRDFSISISNITPADAGTYVCVKFRK GSPDTEFKSGAGTELSVR
145	抗CD47- LC	B6H12(VL)-CK	<u>GATATTGTGATGACTCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGACTCCA</u> <u>GGAGATAGAGTCTCTCTTCCTGCAGGGCCAGCCAGACTATTAG</u> <u>CGACTACTTACACTGGTATCAACAAAAATCACATGAGTCTCCAAG</u> <u>GCTTCTCATCAAATTTGCTTCCCAATCCATTTCTGGGATCCCCTCC</u> <u>AGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGCTCAGATTTCACTCTCAGTAT</u> <u>CAACAGTGTGGAACCTGAAGATGTTGGAGTGATTACTGTCAAA</u> <u>ATGGTCACGGCTTTCCTCGGACGTTCCGGTGGAGGGACCAAGCTG</u> <u>GAAATAAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCG</u> <u>CCATCTGATGAGCAGCTTAAGTCTGGAACGCTCTGTTGTGTGC</u> <u>CTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGA</u> <u>GGTGATAACGCCCTCAATCGGGTAATCCCAGGAGAGTGTCA</u> <u>CAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCAC</u> <u>CCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACG</u> <u>CCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG</u>

10

20

30

40

【表 5 1】

配列 番号	名称	説明	配列
			AGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
146	抗CD47- LC	B6H12(VL)-CK	<u>DIVITQSPATLSVTPGDRVLSRCRASQTISDYLHWYQQKSHESPRLLI</u> <u>KFASQISGISRFSGSGSGSDFTLINSVEPEDVGVYQCQNGHGFPR</u> <u>TFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA</u> KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
147	抗CD47- hulgG1	B6H12(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) -(hulgG1m3:ch2- CH3)	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACTTAGTGAAGCCTG GAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCA GTGGCTATGGCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCAGACAAGAGG CTGGAGTGGGTCGCAACCATTACTAGTGGTGGTACTTACACCTA CTATCCAGACAGTGTGAAGGGGCGATTACCATCTCCAGAGACA ATGCCAAGAACCCTGTACCTGCAAATAGACAGTCTGAAGTCT GAGGATACAGCCATATATTCTGTGCAAGATCCCTCGCGGGA TGCTATGGACTACTGGGTCAAGGACCAGCGTCACCGTCTCCT CAGctagcaccaggcccatcggtcttccccctggcaccctctccaagagcacct ctgggggcacagcgccctgggctgctgtcaaggactacttccccgaaccggtg acggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggtgcacaccttcccgctgtc ctacagtctcaggacttactccctcagcagcggtgtgacctgacctcagcagct tgggcacccagacctacatctgcaactgaatcacaagccagcaacaccaagggtg gacaagagagttGAGCCCAAATCTTGACAAAACCTCACACATGCCC ACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGgggaccgtcagttcttcttcc cccaaaacccaaggacacctcatgatctccggacctgaggtcacatcggt gggtgggtgacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtgg acggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgaggagagcagtagaca acagcagtagcgtgtggtcagcgctcaccgtctgcaccaggactggctga atggcaaggagtacaagtgaagggtctccaacaagccctcccagccccatc gagaaaacctctccaagccaaaGGGCAGCCCCGAGAACACAGGT GTACACCTGCCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGG TCAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCG CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAA GACCACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTCTA TAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAA
148	抗CD47- hulgG1	B6H12(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) -(hulgG1m3:ch2-	EVQLQESGGDLVKPGGSLKLSAASGFTFSGYGMSWVRQTPDKRL EWVATITSGGTYTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQIDSLKSEDTAI YFCARSLAGNAMDYWGQGTITVTVSSastkgpsvfplapsskstsggtaal gclvkdyfpepvtvswngaltsghvhtfpavllqssglyssvvtvpssslgtqtyic nvnhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGgpsvflfpkpkdltl

【表 5 2】

配列 番号	名称	説明	配列
		<u>CH3</u>)	<i>misrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv vltvlhqdwlngkeykckvsnkaldpapiektiskAKAGQPREQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK</i>
149	抗EGFR- hulG1- SIRPaV2(1 D4)	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) -(hulG1m3:ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPa(V2:1D4)	<i>QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLE WLGVIWSSGNTDYNTPTFTRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVAastkgpsvfplapsskstsggta algclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlqssglyslssvvtvpssslgtqy icvnvhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGgpsvflfpkpdkdt lmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv svltvlhqdwlngkeykckvsnkaldpapiektiskakGQPREQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEELQVIQPKSVSVAAGESAIL HCTITSLIPVGPIQWFRGAGPARELIYNQREGHFPRVTTVSETTRR NMDFISISINITPADAGTYCYVKFRKGSPDTEVKSAGATELSVR</i>
150	抗EGFR- hulG1- SIRPaV2(6 Ang)	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) -(hulG1m3:ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPa(V2:6Ang)	<i>QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLE WLGVIWSSGNTDYNTPTFTRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVAastkgpsvfplapsskstsggta algclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlqssglyslssvvtvpssslgtqy icvnvhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGgpsvflfpkpdkdt lmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv svltvlhqdwlngkeykckvsnkaldpapiektiskakGQPREQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEELQVIQPKSVSVAAGESAIL HCTVTSIPVGPIQWFRGAGPARELIYNQREGHFPRVTTVSETTRR ENMDFISISINITPADAGTYCYVKFRKGSPDTEFKSAGATELSVR</i>
151	抗EGFR- hulG1- SIRPaV2(8 Ang)	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) -(hulG1m3:ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPa(V2:8Ang)	<i>QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLE WLGVIWSSGNTDYNTPTFTRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVAastkgpsvfplapsskstsggta algclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlqssglyslssvvtvpssslgtqy icvnvhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGgpsvflfpkpdkdt lmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv svltvlhqdwlngkeykckvsnkaldpapiektiskakGQPREQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEELQVIQPKSVSVAAGESAIL HCTITSLIPVGPIQWFRGAGPARELIYNQREGHFPRVTTVSETTRR ENMDFISISINITPADAGTYCYVKLRKGSPDTEFKSAGATELSVR</i>

10

20

30

40

【表 5 3】

配列 番号	名称	説明	配列
152	抗EGFR- hulG1- SIRPαV2(V 6I)	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) -(hulG1m3: ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPa(V2:V6I)	QVQLKQSGPGLVQPSSQLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLE WLGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAYWQGGLTVSAastk g psvfplapssksts g gta algclvkdyfpepvtvswngalts g vhftpavlqssgylsssvtvpssslgtqty icnvnhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG g psvflfppkpkdt <i>Imisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv</i> <i>svltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskak</i> GQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEELQIIQPKDSVSVAAGESAILH CTVTSLIPVGPIQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKRE NMDFSISISNITPADAGTYCVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVR
153	抗EGFR- hulG1- SIRPαV2(V 27I)	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) -(hulG1m3: ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPa(V2:V27I)	QVQLKQSGPGLVQPSSQLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLE WLGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAYWQGGLTVSAastk g psvfplapssksts g gta algclvkdyfpepvtvswngalts g vhftpavlqssgylsssvtvpssslgtqty icnvnhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG g psvflfppkpkdt <i>Imisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv</i> <i>svltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskak</i> GQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEELQVIQPKDSVSVAAGESAIL HCTITSLIPVGPIQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKRE NMDFSISISNITPADAGTYCVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVR
154	抗EGFR- hulG1- SIRPαV2(V 27Q)	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) -(hulG1m3: ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPa(V2:V27Q)	QVQLKQSGPGLVQPSSQLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLE WLGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAYWQGGLTVSAastk g psvfplapssksts g gta algclvkdyfpepvtvswngalts g vhftpavlqssgylsssvtvpssslgtqty icnvnhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG g psvflfppkpkdt <i>Imisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv</i> <i>svltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskak</i> GQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEELQVIQPKDSVSVAAGESAIL HCTQTSLIPVGPIQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKR ENMDFSISISNITPADAGTYCVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVR
155	抗EGFR- hulG1- SIRPαV2(I 31R)	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) -(hulG1m3: ch2- CH3)-a-(g4s)x4-	QVQLKQSGPGLVQPSSQLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLE WLGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAYWQGGLTVSAastk g psvfplapssksts g gta algclvkdyfpepvtvswngalts g vhftpavlqssgylsssvtvpssslgtqty icnvnhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG g psvflfppkpkdt <i>Imisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv</i> <i>svltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskak</i> GQPREPQVYTLPPSR

10

20

30

40

【表 5 4】

配列 番号	名称	説明	配列
		huSIRPa(V2:I31R)	<u>EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD</u> <u>GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u> AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEELQVIQPKSVSVAAGESAIL HCTVTSLRPVGPIQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTK RENMDFSISISNITPADAGTYICVKFRKGSPTDFKSGAGTELSVR
156	抗EGFR- hulG1- SIRPαV2(I 31T)	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) -(hulG1m3:ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPa(V2:I31T)	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHVVQRSPGKGLE WLGVIWSSGNTDYNTPTFSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAYWGQGLTIVSAastkgpsvfplapsskstsggta algclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlaqssglyslssvvtvpssslgtqty icnvnhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGgpsvflfpkpdkdt <i>Imisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv</i> <i>svltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakGQPREPQVYTLPPSR</i> <u>EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD</u> <u>GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u> AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEELQVIQPKSVSVAAGESAIL HCTVTSLRPVGPIQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTK RENMDFSISISNITPADAGTYICVKFRKGSPTDFKSGAGTELSVR
157	抗EGFR- hulG1- SIRPαV2(P 35G)	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) -(hulG1m3:ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPa(V2:P35G)	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHVVQRSPGKGLE WLGVIWSSGNTDYNTPTFSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAYWGQGLTIVSAastkgpsvfplapsskstsggta algclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlaqssglyslssvvtvpssslgtqty icnvnhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGgpsvflfpkpdkdt <i>Imisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv</i> <i>svltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakGQPREPQVYTLPPSR</i> <u>EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD</u> <u>GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u> AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEELQVIQPKSVSVAAGESAIL HCTVTSVIPVGGIQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKR ENMDFSISISNITPADAGTYICVKFRKGSPTDFKSGAGTELSVR
158	抗EGFR- hulG1- SIRPαV2(P 35N)	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) -(hulG1m3:ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPa(V2:P35N)	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHVVQRSPGKGLE WLGVIWSSGNTDYNTPTFSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAYWGQGLTIVSAastkgpsvfplapsskstsggta algclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlaqssglyslssvvtvpssslgtqty icnvnhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGgpsvflfpkpdkdt <i>Imisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv</i> <i>svltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakGQPREPQVYTLPPSR</i> <u>EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD</u> <u>GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u> AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEELQVIQPKSVSVAAGESAIL HCTVTSVIPVGNIQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKR ENMDFSISISNITPADAGTYICVKFRKGSPTDFKSGAGTELSVR

10

20

30

40

【表 5 5】

配列 番号	名称	説明	配列
159	抗EGFR- hulG1- SIRPαV2(Q37A)	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) -(hulG1m3: ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPa(V2:Q37A)	QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWRQSPGKGLE WLGVIWSSGNTDYNTPTFSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVAastkgpsvflapsskstsggta algclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlaqssglyslssvtpssslgtqty icnvnhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGgpsvflfppkpkdt <i>Imisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv</i> <i>svltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskak</i> GQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEELQVIQPDKSVSVAAGESAIL HCTVTSVIPVGPIAWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKR ENMDFSISISNITPADAGTYTCVKFRKGSPTDFKSGAGTELSVR
160	抗EGFR- hulG1- SIRPαV2(Q37H)	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) -(hulG1m3: ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPa(V2:Q37H)	QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWRQSPGKGLE WLGVIWSSGNTDYNTPTFSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVAastkgpsvflapsskstsggta algclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlaqssglyslssvtpssslgtqty icnvnhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGgpsvflfppkpkdt <i>Imisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv</i> <i>svltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskak</i> GQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEELQVIQPDKSVSVAAGESAIL HCTVTSVIPVGPIHWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKR ENMDFSISISNITPADAGTYTCVKFRKGSPTDFKSGAGTELSVR
161	抗EGFR- hulG1- SIRPαV2(Q37V)	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) -(hulG1m3: ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPa(V2:Q37V)	QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWRQSPGKGLE WLGVIWSSGNTDYNTPTFSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVAastkgpsvflapsskstsggta algclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlaqssglyslssvtpssslgtqty icnvnhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGgpsvflfppkpkdt <i>Imisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv</i> <i>svltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskak</i> GQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEELQVIQPDKSVSVAAGESAIL HCTVTSVIPVGPIVWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKR ENMDFSISISNITPADAGTYTCVKFRKGSPTDFKSGAGTELSVR
162	抗EGFR- hulG1- SIRPαV2(Q37W)	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) -(hulG1m3: ch2- CH3)-a-(g4s)x4-	QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWRQSPGKGLE WLGVIWSSGNTDYNTPTFSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVAastkgpsvflapsskstsggta algclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlaqssglyslssvtpssslgtqty icnvnhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGgpsvflfppkpkdt <i>Imisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv</i> <i>svltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskak</i> GQPREPQVYTLPPSR

10

20

30

40

【表 5 6】

配列 番号	名称	説明	配列
		huSIRPa(V2:Q37W)	EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEELQVIQPKSVSVAAGESAIL HCTVTSVIPVGPIWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKR ENMDFSISISNITPADAGTYICVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVR
163	抗EGFR- hulG1- SIRPαV2(E 47Y)	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) -(hulG1m3:ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPa(V2:E47Y)	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWRQSPGKGLE WLGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSDTAI YYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSAastkgpsvfplapsskstsggta algclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlqssglyslssvvtvpssslgtqy icnvnhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGgpsvflfppkpkdt Imisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv svltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEELQVIQPKSVSVAAGESAIL HCTVTSVIPVGPIQWFRGAGPARLYIYNQKEGHFPRVTTVSESTKR ENMDFSISISNITPADAGTYICVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVR
164	抗EGFR- hulG1- SIRPαV2(Q52E)	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) -(hulG1m3:ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPa(V2:Q52E)	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWRQSPGKGLE WLGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSDTAI YYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSAastkgpsvfplapsskstsggta algclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlqssglyslssvvtvpssslgtqy icnvnhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGgpsvflfppkpkdt Imisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv svltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEELQVIQPKSVSVAAGESAIL HCTVTSVIPVGPIQWFRGAGPARELIYNEKEGHFPRVTTVSESTKR ENMDFSISISNITPADAGTYICVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVR
165	抗EGFR- hulG1- SIRPαV2(Q52H)	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) -(hulG1m3:ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPa(V2:Q52H)	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWRQSPGKGLE WLGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSDTAI YYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSAastkgpsvfplapsskstsggta algclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlqssglyslssvvtvpssslgtqy icnvnhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGgpsvflfppkpkdt Imisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv svltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEELQVIQPKSVSVAAGESAIL HCTVTSVIPVGPIQWFRGAGPARELIYNHKEGHFPRVTTVSESTKR ENMDFSISISNITPADAGTYICVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVR

10

20

30

40

【表 5 7】

配列 番号	名称	説明	配列
166	抗EGFR- hulG1- SIRPαV2(E 54P)	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) -(hulG1m3: ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPa(V2:E54P)	QVQLKQSGPGLVQPSSQLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLE WLGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAastkgpsvflapsskstsggta algclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlaqssglyslssvvtvpssslgtqty icnvnhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCAPELLGgpsvflfppkpkdt <i>Imisrtpevtcvvvvdshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv</i> <i>svltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskak</i> GQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEELQVIQPKSVSVAAGESAIL HCTVTSVIPVGPIQWFRGAGPARELIYNQKPGHFPRVTTVSESTKR ENMDFSISISNITPADAGTYCYVKFRKGSPPDETFKSGAGTELSVR
167	抗EGFR- hulG1- SIRPαV2(H 56P)	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) -(hulG1m3: ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPa(V2:H56P)	QVQLKQSGPGLVQPSSQLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLE WLGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAastkgpsvflapsskstsggta algclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlaqssglyslssvvtvpssslgtqty icnvnhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCAPELLGgpsvflfppkpkdt <i>Imisrtpevtcvvvvdshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv</i> <i>svltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskak</i> GQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEELQVIQPKSVSVAAGESAIL HCTVTSVIPVGPIQWFRGAGPARELIYNQKEGPFPRVTTVSESTKR ENMDFSISISNITPADAGTYCYVKFRKGSPPDETFKSGAGTELSVR
168	抗EGFR- hulG1- SIRPαV2(H 56Y)	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) -(hulG1m3: ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPa(V2:H56Y)	QVQLKQSGPGLVQPSSQLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLE WLGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAastkgpsvflapsskstsggta algclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlaqssglyslssvvtvpssslgtqty icnvnhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCAPELLGgpsvflfppkpkdt <i>Imisrtpevtcvvvvdshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv</i> <i>svltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskak</i> GQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEELQVIQPKSVSVAAGESAIL HCTVTSVIPVGPIQWFRGAGPARELIYNQKEGYFPRVTTVSESTKR ENMDFSISISNITPADAGTYCYVKFRKGSPPDETFKSGAGTELSVR
169	抗EGFR- hulG1- SIRPαV2(S 66E)	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) -(hulG1m3: ch2- CH3)-a-(g4s)x4-	QVQLKQSGPGLVQPSSQLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLE WLGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAastkgpsvflapsskstsggta algclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlaqssglyslssvvtvpssslgtqty icnvnhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCAPELLGgpsvflfppkpkdt <i>Imisrtpevtcvvvvdshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv</i> <i>svltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskak</i> GQPREPQVYTLPPSR

10

20

30

40

【表 5 8】

配列 番号	名称	説明	配列
		huSIRPa(V2:S66E)	EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEELQVIQPKSVSVAAGESAIL HCTVTSVIPVGPQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSEETKR ENMDFISISNITPADAGTYVCVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVR
170	抗EGFR- hulG1- SIRPαV2(S 66H)	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) -(hulG1m3:ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPa(V2:S66H)	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWRQSPGKGLE WLGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAastkgpsvflapsskstsggta algcivkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlssglyslssvvtvpssslgtqty icnvnhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGgpsvflfppkpkdt lmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv svltvlhqdwlngkeykckvsnkcalpapietiskakGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEELQVIQPKSVSVAAGESAIL HCTVTSVIPVGPQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSEETKR ENMDFISISNITPADAGTYVCVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVR
171	抗EGFR- hulG1- SIRPαV2(S 66Q)	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) -(hulG1m3:ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPa(V2:S66Q)	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWRQSPGKGLE WLGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAastkgpsvflapsskstsggta algcivkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlssglyslssvvtvpssslgtqty icnvnhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGgpsvflfppkpkdt lmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv svltvlhqdwlngkeykckvsnkcalpapietiskakGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEELQVIQPKSVSVAAGESAIL HCTVTSVIPVGPQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSEETKR ENMDFISISNITPADAGTYVCVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVR
172	抗EGFR- hulG1- SIRPαV2(S 66W)	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) -(hulG1m3:ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPa(V2:S66W)	QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWRQSPGKGLE WLGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAastkgpsvflapsskstsggta algcivkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlssglyslssvvtvpssslgtqty icnvnhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGgpsvflfppkpkdt lmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv svltvlhqdwlngkeykckvsnkcalpapietiskakGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEELQVIQPKSVSVAAGESAIL HCTVTSVIPVGPQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSEWTK RENMDFISISNITPADAGTYVCVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVR

10

20

30

40

【表 5 9】

配列 番号	名称	説明	配列
173	抗EGFR- hulG1- SIRPαV2(T 67E)	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3)- (hulG1m3:ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPa(V2:T67E)	QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWRQSPGKGLE WLGVIWSSGNTDYNTPTFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSAastkgpsvflapsskstsggta algclvkdyppepvtvswngaltsghvhtfpavqlssgylssvvtvpssslgtqty icnvnhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGgpsvflfppkpkdt <i>lmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv svltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskak</i> GQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEELQVIQPKSVSVAAGESAIL HCTVTSVIPVGPQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESEKR ENMDFISISINITPADAGTYVCVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVR
174	抗EGFR- hulG1- SIRPαV2(T 67W)	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3)- (hulG1m3:ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPa(V2:T67W)	QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWRQSPGKGLE WLGVIWSSGNTDYNTPTFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSAastkgpsvflapsskstsggta algclvkdyppepvtvswngaltsghvhtfpavqlssgylssvvtvpssslgtqty icnvnhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGgpsvflfppkpkdt <i>lmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv svltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskak</i> GQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEELQVIQPKSVSVAAGESAIL HCTVTSVIPVGPQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESWK RENMDFISISINITPADAGTYVCVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVR
175	抗EGFR- hulG1- SIRPαV2(K 68A)	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3)- (hulG1m3:ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPa(V2:K68A)	QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWRQSPGKGLE WLGVIWSSGNTDYNTPTFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSAastkgpsvflapsskstsggta algclvkdyppepvtvswngaltsghvhtfpavqlssgylssvvtvpssslgtqty icnvnhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGgpsvflfppkpkdt <i>lmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv svltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskak</i> GQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEELQVIQPKSVSVAAGESAIL HCTVTSVIPVGPQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTAR ENMDFISISINITPADAGTYVCVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVR
176	抗EGFR- hulG1- SIRPαV2(K 68E)	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3)- (hulG1m3:ch2- CH3)-a-(g4s)x4-	QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWRQSPGKGLE WLGVIWSSGNTDYNTPTFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSAastkgpsvflapsskstsggta algclvkdyppepvtvswngaltsghvhtfpavqlssgylssvvtvpssslgtqty icnvnhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGgpsvflfppkpkdt <i>lmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv svltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskak</i> GQPREPQVYTLPPSR

10

20

30

40

【表 6 0】

配列 番号	名称	説明	配列
		huSIRPa(V2:K68E)	<u>EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD</u> <u>GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u> AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEELQVIQPDKSVSVAAGESAIL HCTVTSVIPVGPIQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTER ENMDFSISISNITPADAGTYVCVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVR
177	抗EGFR- hulG1- SIRPaV2(K 68H)	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) -(hulG1m3: ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPa(V2:K68H)	QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLE WLGVIWSSGNTDYNTPTFSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAastkgpsvflapsskstsggta algclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvtpssslgtqty icnvnhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGgpsvflfpkpkdt <i>lmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv</i> <i>svltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapietiskakGQPREPQVYTLPPSR</i> <u>EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD</u> <u>GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u> AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEELQVIQPDKSVSVAAGESAIL HCTVTSVIPVGPIQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTHR ENMDFSISISNITPADAGTYVCVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVR
178	抗EGFR- hulG1- SIRPaV2(K 68I)	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) -(hulG1m3: ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPa(V2:K68I)	QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLE WLGVIWSSGNTDYNTPTFSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAastkgpsvflapsskstsggta algclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvtpssslgtqty icnvnhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGgpsvflfpkpkdt <i>lmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv</i> <i>svltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapietiskakGQPREPQVYTLPPSR</i> <u>EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD</u> <u>GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u> AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEELQVIQPDKSVSVAAGESAIL HCTVTSVIPVGPIQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTIRE NMDFSISISNITPADAGTYVCVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVR
179	抗EGFR- hulG1- SIRPaV2(K 68T)	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) -(hulG1m3: ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPa(V2:K68T)	QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLE WLGVIWSSGNTDYNTPTFSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAastkgpsvflapsskstsggta algclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvtpssslgtqty icnvnhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGgpsvflfpkpkdt <i>lmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv</i> <i>svltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapietiskakGQPREPQVYTLPPSR</i> <u>EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD</u> <u>GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</u> AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEELQVIQPDKSVSVAAGESAIL HCTVTSVIPVGPIQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTTR ENMDFSISISNITPADAGTYVCVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVR

10

20

30

40

【表 6 1】

配列 番号	名称	説明	配列
180	抗EGFR- hulG1- SIRPαV2(M72I)	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) -(hulG1m3:ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPa(V2:M72I)	QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLE WLGVIWSSGNTDYNTPTFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTSAastkgspsvflapsskstsggta algclvkdyppepvtvswngaltsghvhtfpavlqssgylssvvtvpssslgtqy icnvnhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGgpsvflfppkpkdt <i>Imisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv</i> <i>svltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskak</i> GQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEELQVIQPKSVSVAAGESAIL HCTVTSIPVGPQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKR ENRDFSISISNITPADAGTYCYVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVR
181	抗EGFR- hulG1- SIRPαV2(M72N)	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) -(hulG1m3:ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPa(V2:M72N)	QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLE WLGVIWSSGNTDYNTPTFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTSAastkgspsvflapsskstsggta algclvkdyppepvtvswngaltsghvhtfpavlqssgylssvvtvpssslgtqy icnvnhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGgpsvflfppkpkdt <i>Imisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv</i> <i>svltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskak</i> GQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEELQVIQPKSVSVAAGESAIL HCTVTSIPVGPQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKR ENRDFSISISNITPADAGTYCYVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVR
182	抗EGFR- hulG1- SIRPαV2(M72R)	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) -(hulG1m3:ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPa(V2:M72R)	QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLE WLGVIWSSGNTDYNTPTFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTSAastkgspsvflapsskstsggta algclvkdyppepvtvswngaltsghvhtfpavlqssgylssvvtvpssslgtqy icnvnhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGgpsvflfppkpkdt <i>Imisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv</i> <i>svltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskak</i> GQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEELQVIQPKSVSVAAGESAIL HCTVTSIPVGPQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKR ENRDFSISISNITPADAGTYCYVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVR
183	抗EGFR- hulG1- SIRPαV2(M72W)	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) -(hulG1m3:ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPa(V2:M72W)	QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLE WLGVIWSSGNTDYNTPTFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTSAastkgspsvflapsskstsggta algclvkdyppepvtvswngaltsghvhtfpavlqssgylssvvtvpssslgtqy icnvnhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGgpsvflfppkpkdt <i>Imisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv</i> <i>svltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskak</i> GQPREPQVYTLPPSR

10

20

30

40

【表 6 2】

配列 番号	名称	説明	配列
)	EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGQNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEELQVIQPKSVSVAAGESAIL HCTVTSVIPVGPIQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKR ENWDFISISNITPADAGTYCYVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVR
184	抗EGFR- hulG1- SIRPαV2(V 92N)	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) -(hulG1m3:ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPa(V2:V92N)	QVQLKQSGPGLVQPQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWRQSPGKGLE WLGVIWSSGNTDYNTPTFSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAastkgpsvflapsskstsggta algclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlssglyslssvvtvpssslgtqty icnvnhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGgpsvflfppkpkdt lmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv svltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapietiskakGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGQNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEELQVIQPKSVSVAAGESAIL HCTVTSVIPVGPIQWFRGAGPARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKR ENMDFISISNITPADAGTYCYCNKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVR
185	抗EGFR- hulG1- SIRPαV2(K 53+K68I)	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) -(hulG1m3:ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPa(V2:K53I+K 68I)	QVQLKQSGPGLVQPQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWRQSPGKGLE WLGVIWSSGNTDYNTPTFSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAastkgpsvflapsskstsggta algclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlssglyslssvvtvpssslgtqty icnvnhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGgpsvflfppkpkdt lmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv svltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapietiskakGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGQNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEELQVIQPKSVSVAAGESAIL HCTVTSVIPVGPIQWFRGAGPARELIYNQIEGHFPRVTTVSESTIRE NMDFSISISNITPADAGTYCYVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVR
186	抗EGFR- hulG1- SIRPαV2(K 53N+K68E)	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) -(hulG1m3:ch2- CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPa(V2:K53N+ K68E)	QVQLKQSGPGLVQPQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWRQSPGKGLE WLGVIWSSGNTDYNTPTFSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAastkgpsvflapsskstsggta algclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlssglyslssvvtvpssslgtqty icnvnhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGgpsvflfppkpkdt lmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv svltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapietiskakGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGQNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEELQVIQPKSVSVAAGESAIL HCTVTSVIPVGPIQWFRGAGPARELIYNQNEGHFPRVTTVSESTER ENMDFISISNITPADAGTYCYVKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVR

10

20

30

40

【表 6 3】

配列番号	名称	説明	配列
187	抗EGFR-huIgG1-SIRPαV2(K53Q+K68T)	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) -(huIgG1m3: ch2-CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPa(V2:K53Q+K68T)	QVQLKQSGPGLVQPSSQLSITCTVSGFSLTNYGVHWRQSPGKGLE WLGVIWSSGNTDYNTPTFSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVAastkgpsvfplapsskstsggta algclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlqssglyslssvvtvpssslgtqty icnvnhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGgpsvfjfpkpkdt lmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv svtlvhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEELQVIQPDKSVSVAAGESAIL HCTVTSVIPVGPQWFRGAGPARELIYNQEGHFPRVTTVSESTTR ENMDFSISISNITPADAGTYCYVKFRKGSPTDFKSGAGTELSVR
188	抗EGFR-huIgG1-SIRPαV2(K53T+K68A)	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) -(huIgG1m3: ch2-CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPa(V2:K53T+K68A)	QVQLKQSGPGLVQPSSQLSITCTVSGFSLTNYGVHWRQSPGKGLE WLGVIWSSGNTDYNTPTFSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVAastkgpsvfplapsskstsggta algclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlqssglyslssvvtvpssslgtqty icnvnhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGgpsvfjfpkpkdt lmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv svtlvhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEELQVIQPDKSVSVAAGESAIL HCTVTSVIPVGPQWFRGAGPARELIYNQTEGHFPRVTTVSESTAR ENMDFSISISNITPADAGTYCYVKFRKGSPTDFKSGAGTELSVR
189	抗EGFR-huIgG1-SIRPαV2(K53V+K68H)	C225(VH)- ch1(huigg1m3)- ヒンジ(HUIGG1M3) -(huIgG1m3: ch2-CH3)-a-(g4s)x4- huSIRPa(V2:K53V+K68H)	QVQLKQSGPGLVQPSSQLSITCTVSGFSLTNYGVHWRQSPGKGLE WLGVIWSSGNTDYNTPTFSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAI YYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVAastkgpsvfplapsskstsggta algclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlqssglyslssvvtvpssslgtqty icnvnhkpsntkvdkrvEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGgpsvfjfpkpkdt lmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvv svtlvhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEELQVIQPDKSVSVAAGESAIL HCTVTSVIPVGPQWFRGAGPARELIYNQVEGHFPRVTTVSESTHR ENMDFSISISNITPADAGTYCYVKFRKGSPTDFKSGAGTELSVR

10

20

30

40

【表 6 4】

配列 番号	名称	説明	配列
190	SIRPα IgV アレル	SIRPα IgVここで X ₁ はEまたは Gであり;X ₂ はFまたはSであり; X ₃ はLまたはSであり;X ₄ はSまた はTであり;X ₅ はIまたはTであり; X ₆ はH、LまたはRであり;X ₇ はA またはVであり;X ₈ はAまたはG であり;X ₉ はDまたはEであり; X ₁₀ はLまたはSであり;X ₁₁ はE またはNであり;X ₁₂ はPまたはS であり;X ₁₃ はRまたはSであり; X ₁₄ はGまたはSであり;X ₁₅ は 残基欠落(欠失)またはDであり; X ₁₆ はTまたはVであり;X ₁₈ はA またはGである。	EEX ₁ LQVIQPDKX ₂ VX ₃ VAAGEX ₄ AX ₅ LX ₆ CTX ₇ TSLIPVGPIQWFRGA GPX ₈ RELIYNQKEGHFPRVTTVSX ₉ X ₁₀ DLTKRX ₁₁ NMDFX ₁₂ IX ₁₃ IX ₁₄ N ITPADAGTYICVKFRKGSPDX ₁₅ X ₁₆ EFKSGAGTELSVR
191	Fc- SIRPαV2C C	ヒンジ(HUIGG1M3: ES 突然変異)- <u>ch2(huigg1m3)-</u> CH3(HUIGG1M3)- a(g4s)x4- <u>HUSIRPAV2-c1-C2</u>	GAACCGAAGTCCTCCGACAAGACTCACACTTGTCCCCATGCCCG GCCCCTGAGCTGCTGGGAggcccacccgtgttctgttccgccgaaaccta aggacaccctgatatttcgagaactccggaagtgaacctgtgtgtgtcgcacgtgtc ccacgaggatccgagggtcaagttcaattggtacgtcgacggagtggagtcacaa cgccaagaccaagccccgggaggagcagtacaactccacttaccgggtgtgtcgt gctgacctgtgtcatcaggattggctgaacggaaaggagtataagtgcaagtgctc aaacaaggcattgcctgcgccaatcgaaaagaccattagcaaggccaagGGCCA GCCCAGGGAACACAGGTGTACACTCTGCCCCGTCCCGCGAA GAAATGACCAAGAACCAAGTGTCACTGACATGCCTCGTGAAGG GATTTTACCCGTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAATCGAACGG TCAACCTGAAAACAACATAAGACGACCCCTCCGGTCTCGGACA GCGATGGCTCATTCTTCTGTACTCCAAGCTTACGTTGGACAAG TCCCGGTGGCAACAGGAAATGTGTTTTCTGTCTCCGTGATGC ATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCACTCTCCCTG AGCCCCGGCgcgggggggtgtggaagcggaggagggggtctgggggtggcg gttcggcgggcggtatccGAGGAGGAGCTCCAGGTATCCAGCCTG ACAAGTCCGTGTCTGGTGGCCGCGGAGAGTCCGCCATTCTGCAC TGCACCGTGACCTCCCTCATCCCCGTGGGACCTATCCAGTGGTTC AGAGGAGCCGGGCCGCGCACGGGAAGTATCTATAACCAGAAGG AGGGCCATTTCCCCCGGTGACCACCGTGTCCGAGAGCACCAAG AGGGAAAACATGGACTTCAGCATTTTCGATCAGCAACATCACTCC CGCTGACGCCGGGACCTACTACTGCGTGAAGTTCCGAAAGGA AGCCCCGACACCGAGTTCAAAGCGGAGCCGGCACCGAACTGT CGGTCCGCgccaagccttcgccccgtgtgtcaggaccggcccgagcaa ctccgcaacactgtgtcttttacttgcaatcccacgggttcagccctcgggacatt acctgaagtgttcaagaacgggaacgaactgagcgactccagaccaactgga cccagtgggcgaatcagtgcttactcgatccattcgaccgccaaggtcgtgtgacc

10

20

30

40

【表 6 5】

配列 番号	名称	説明	配列	
			cgcgaggatgtgcactcccaagtcactctgcgaggtggcccacgtgacactccagggc gacccctgagaggcaccggaacctgtccgaaccattcggtgccc CCTACGC TCGAAGTGACCCAGCAGCCAGTCCGCGCCGAAAACAGGTCAA CGTGACCTGTCAAGTCCGCAAGTTCTACCCGCAACGGCTGCAGC TTACCTGGCTGGAGAACGGCAACGTGTCCCGGACCGAGACTGC GAGCACCGTCACCGAGAACCAAGGATGGAACCTACAATTGGAT GTCTGTGCTTCTCGTGAATGTGTGCGGCGCATAGGGACGACGTG AAGCTGACTTGCCAGGTGCAACACGACGACGACGCCGCTGTGT CCAAGTCACACGATCTCAAAGTGTCCGCCACCCGAAGGAGCA GGGAAGCAACACTGCTGCCGAGAACACCGGTTCCAACGAAAG AAACATCTAC	10
192	Fc- SIRPαV2C C	ヒンジ(HUIGG1M3: ES 突然変異)- ch2(huigg1m3)- CH3(HUIGG1M3)- a(g4s)x4- <u>HUSIRPAV2-c1-C2</u>	EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGgpsvflfpkpkdltlmisrtpevtcvvvdvsh edpevkfnwvydgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhqdwlngkeykck vsnkalpapiektiskak GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTDKSR WQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG aggggsgggsgsgggsgs ggggsgsEEELQVIQPKSVSVAAGESAILHCTVTSLIPVGPIQWFRGAG PARELIYNQKEGHFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTYYC VKFRKGSPDTEFKSGAGTELSVRakpsapvsvgpaaratpqhtsvftcesh gfsprditlkwfkngnlsdfqtnvdpvgesvsysihstakvltredvhsqviceva hvtlqgdplrgtanlsetirvp PTLEVTQQPVRAENQVNVTCQVRKFYPO RLQLTWLENGNVSRTEASTVTENKDGTYNWMWSWLLVNVSAHR DDVKLTQVEHDGQPAVSKSHDLKVS AHPKEQGSNTAAENTGS NERNIY	20
193	huSIRPα IgV(V3)	huSIRPα IgV(V3)	EEELQVIQPKSVSVAAGESAILLCTVTSLIPVGPIQWFRGAGPAREL IYNQKEGHFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTYYCVKFRK GSPDTEFKSGAGTELSVR	30
194	huSIRPα IgV(4)	huSIRPα IgV(4)	EEGLQVIQPKSVSVAAGESAILHCTATSLIPVGPIQWFRGAGPGRE LIYNQKEGHFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCVKF RKGSPDDVEFKSGAGTELSVR	
195	huSIRPα IgV(5)	huSIRPα IgV(5)	EEELQVIQPKFVLVAAGETATLRCTATSLIPVGPIQWFRGAGPGRE LIYNQKEGHFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYYCVKF RKGSPDDVEFKSGAGTELSVR	
196	huSIRPα IgV(6)	huSIRPα IgV(6)	EEELQVIQPKSVLVAAGETATLRCTATSLIPVGPIQWFRGAGPGRE LIYNQKEGHFPRVTTVSDLTKRNNMDFPIRIGNITPADAGTYYCVKF RKGSPDDVEFKSGAGTELSVR	40
197	huSIRPα IgV(7)	huSIRPα IgV(7)	EEELQVIQPKSVSVAAGESAILHCTVTSLIPVGPIQWFRGAGPAREL LIYNQKEGHFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTYYCVKFR	

【表 6 6】

配列番号	名称	説明	配列
			KGSPDTEFKSGAGTELSVR
198	huSIRPα IgV(8)	huSIRPα IgV(8)	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLIPVGPIQWFRGAGPARE LIYNQKEGHFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTYVCVKFR KGSPDTEFKSGAGTELSVR
199	huSIRPα IgV(9)	huSIRPα IgV(9)	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTATSLIPVGPIQWFRGAGPGRE LIYNQKEGHFPRVTTVSDLTKRNNMDFSIRISNITPADAGTYVCVKF RKGSPDDVEFKSGAGTELSVR
200	huSIRPα IgV(10)	huSIRPα IgV(10)	EEELQVIQPDKSVSVAAGESAILHCTVTSLIPVGPIQWFRGAGPARE LIYNQKEGHFPRVTTVSESTKRENMDFSISISNITPADAGTYVCVKFR KGSPDTEFKSGAGTELSVR

10

【図 1 A】

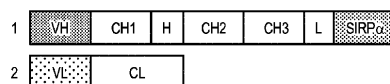


FIG. 1A

【図 1 B】

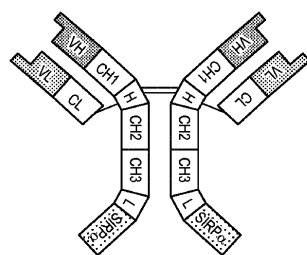


FIG. 1B

【図 1 C】

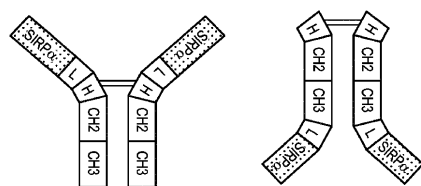


FIG. 1C

【図 1 D】

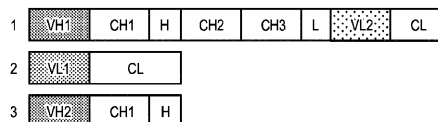


FIG. 1D

【図 1 E】

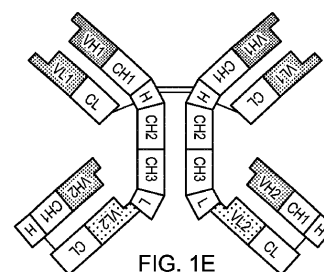


FIG. 1E

【図 1 F】

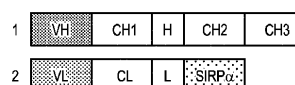


FIG. 1F

【 1 G 】

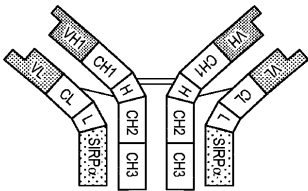


FIG. 1G

【 1 H 】

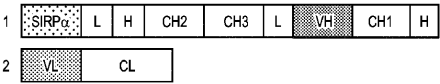


FIG. 1H

【 1 I 】

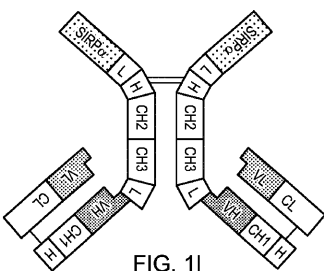


FIG. 1I

【 1 M 】

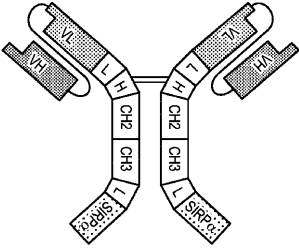


FIG. 1M

【 1 N 】

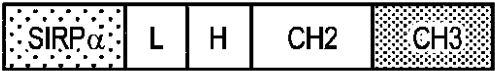


FIG. 1N

【 1 J 】

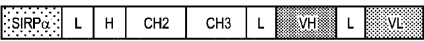


FIG. 1J

【 1 K 】

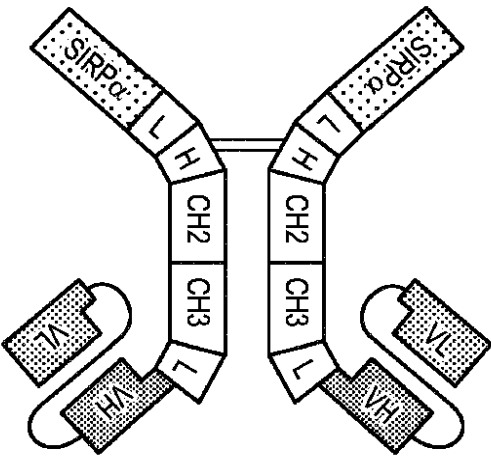


FIG. 1K

【 1 L 】

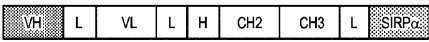


FIG. 1L

【 1 O 】

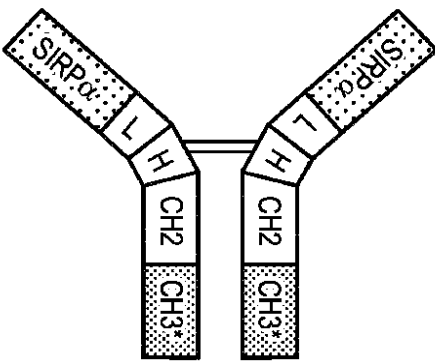
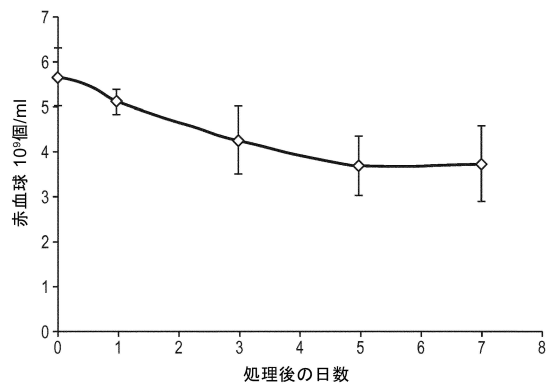
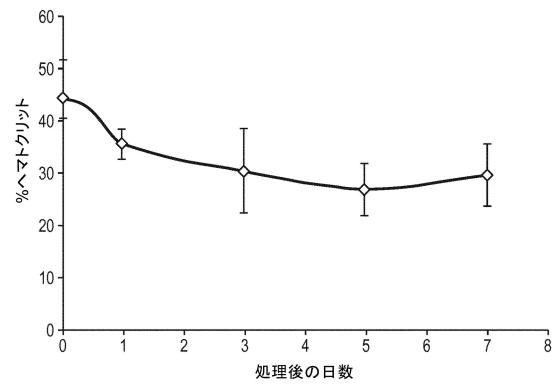


FIG. 1O

【図 2 A】



【図 2 B】



【図 3 A】

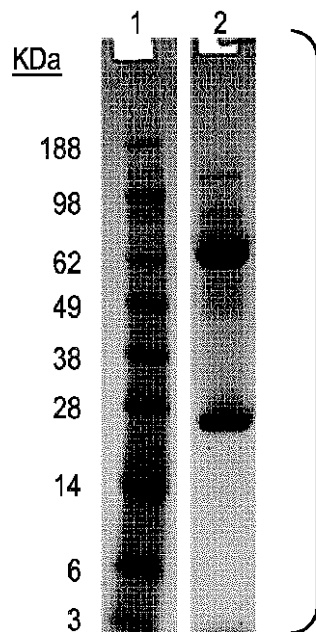
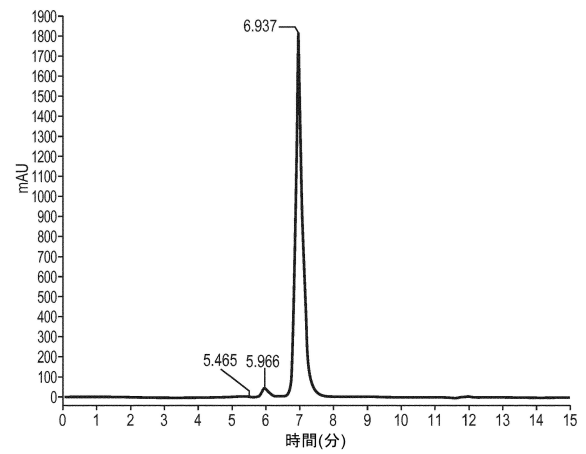
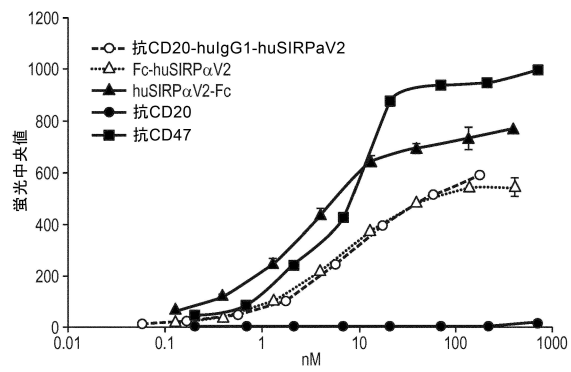


FIG. 3A

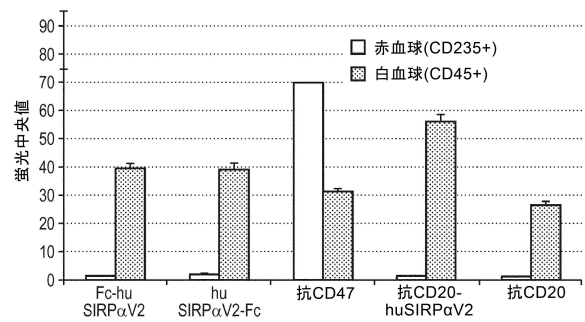
【図 3 B】



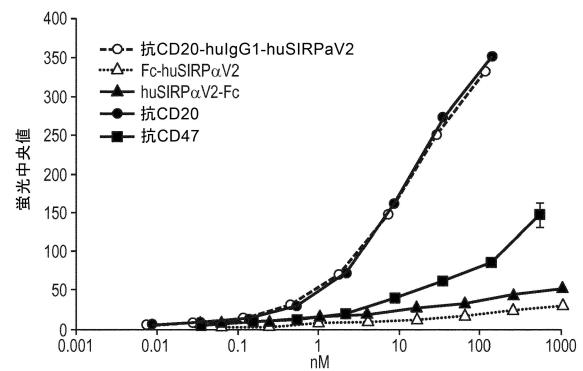
【図 4 A】



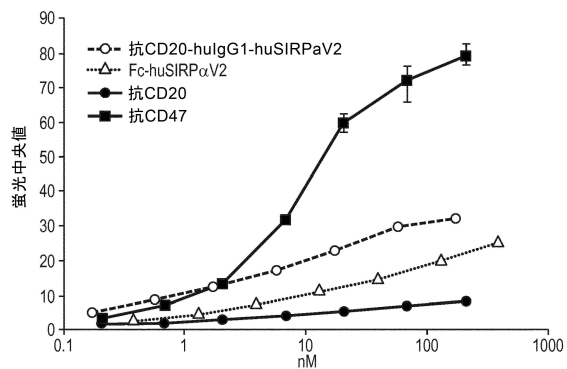
【図 4 B】



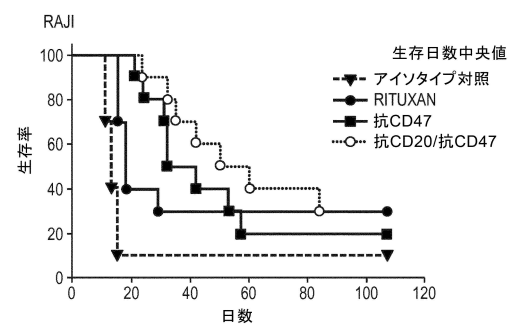
【図 4 C】



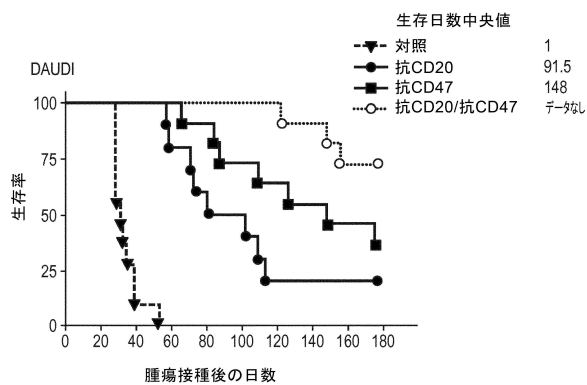
【図 4 D】



【図 5 B】



【図 5 A】



【図 6 A】

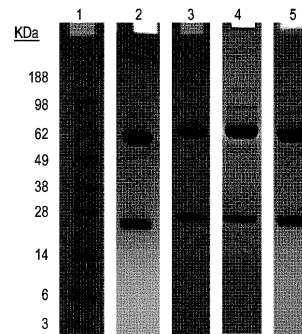
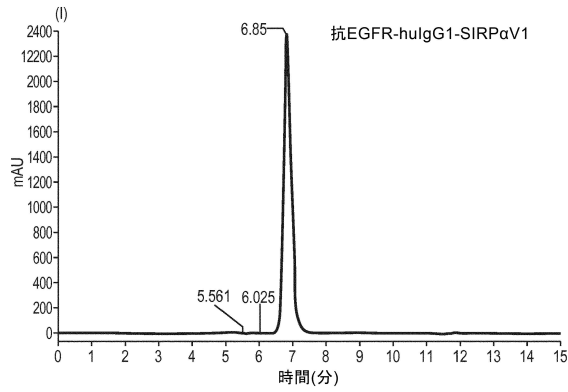
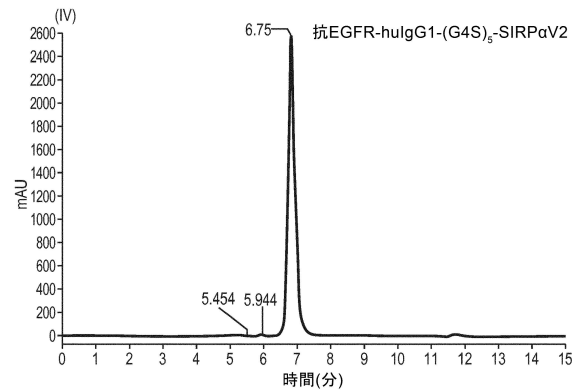
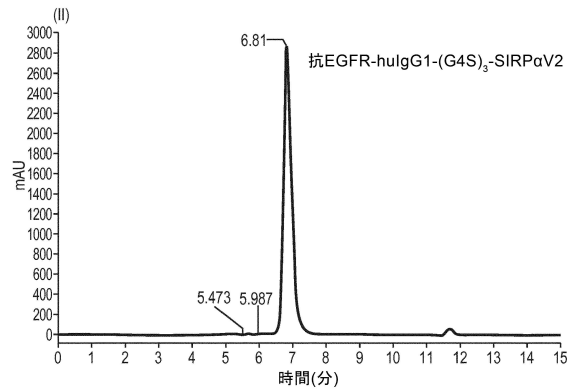
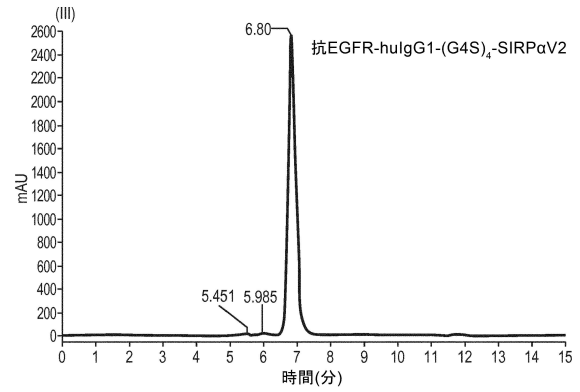


FIG. 6A

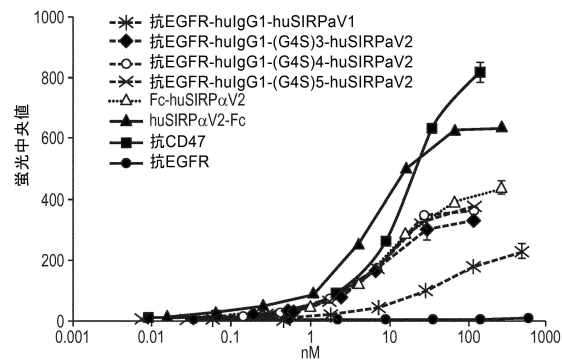
【図 6 B - 1】



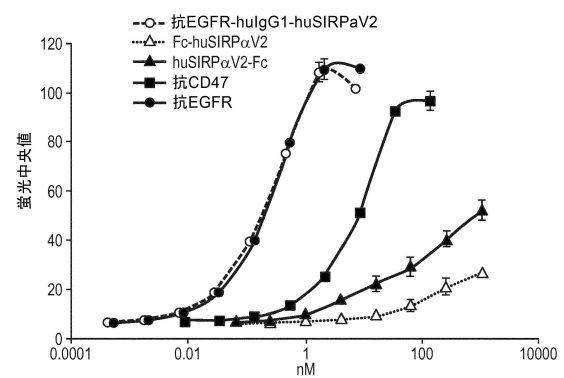
【図 6 B - 2】



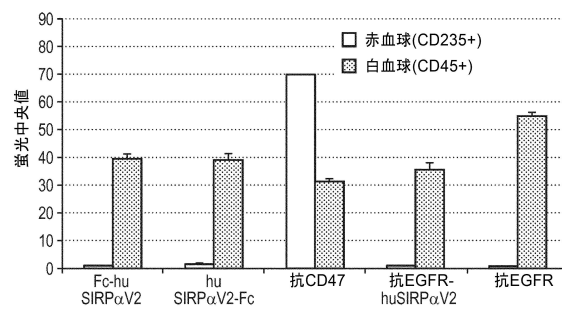
【図 7 A】



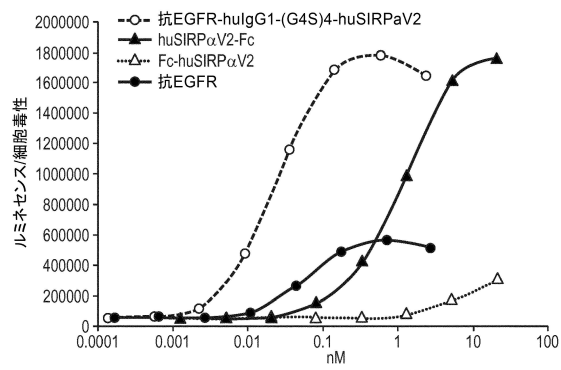
【図 7 C】



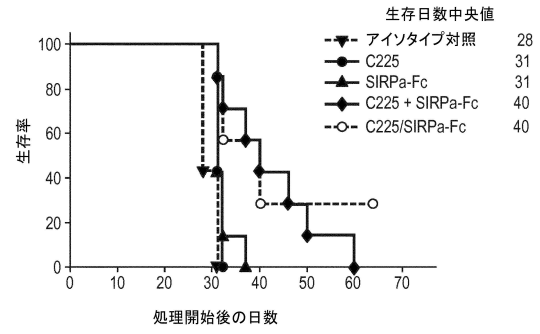
【図 7 B】



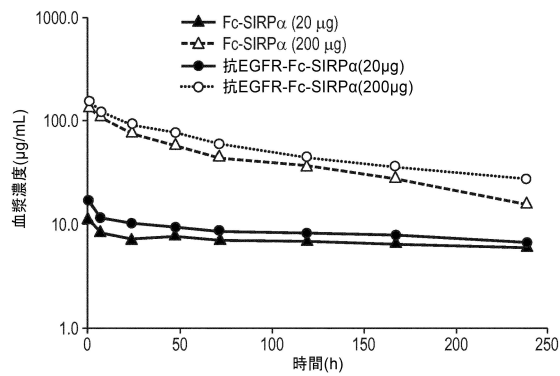
【図 8】



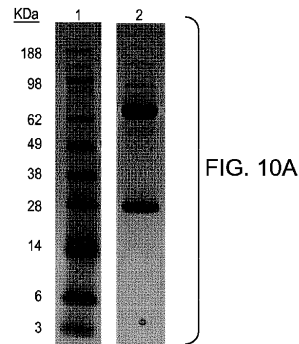
【図 9 B】



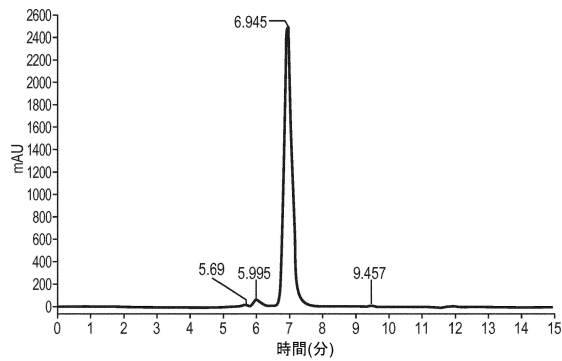
【図 9 A】



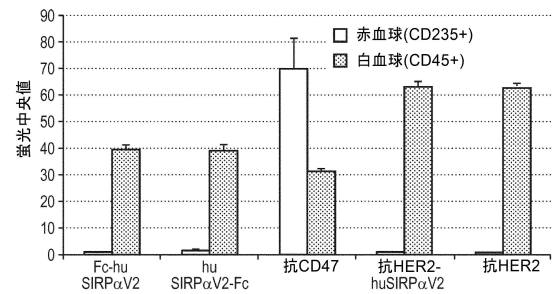
【図 10 A】



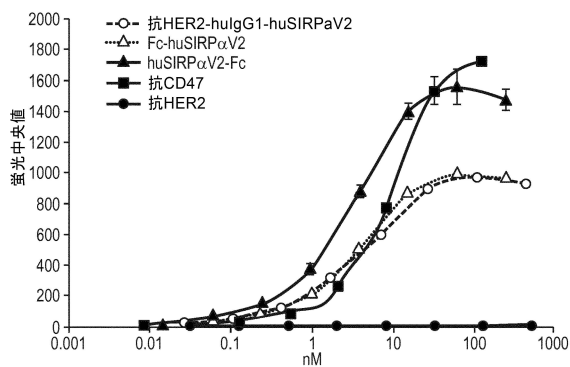
【図 10 B】



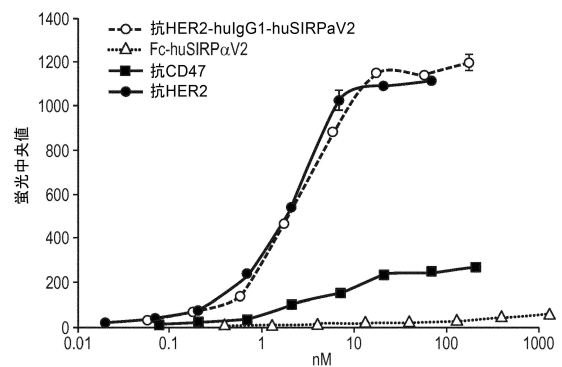
【図 11 B】



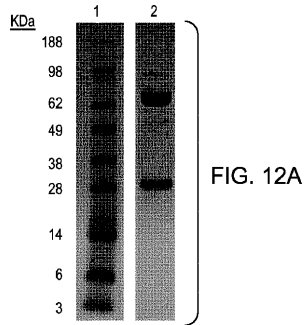
【図 11 A】



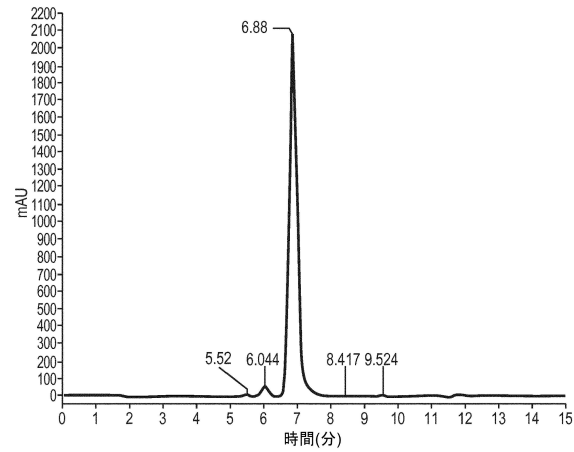
【図 11 C】



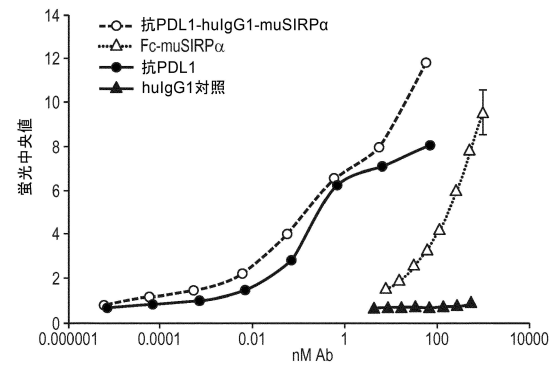
【図 1 2 A】



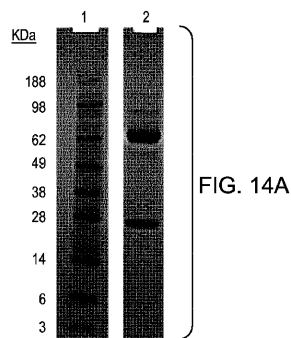
【図 1 2 B】



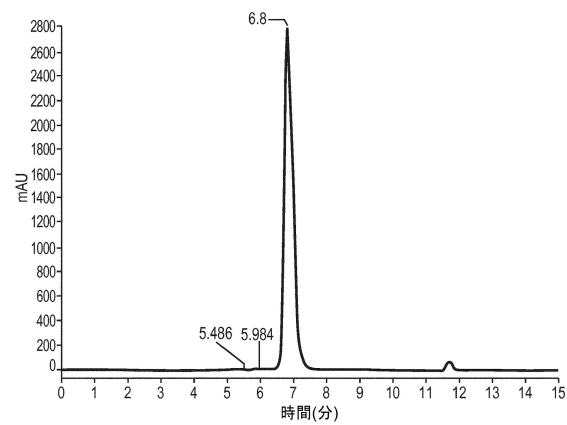
【図 1 3】



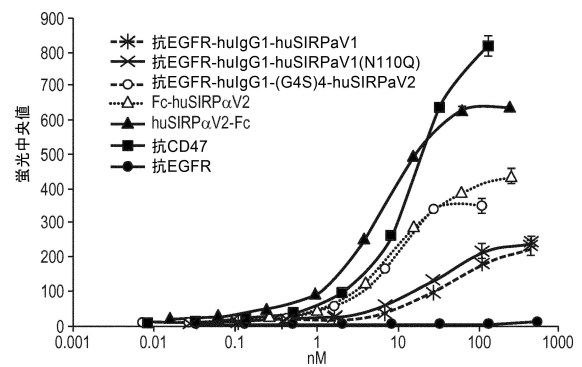
【図 1 4 A】



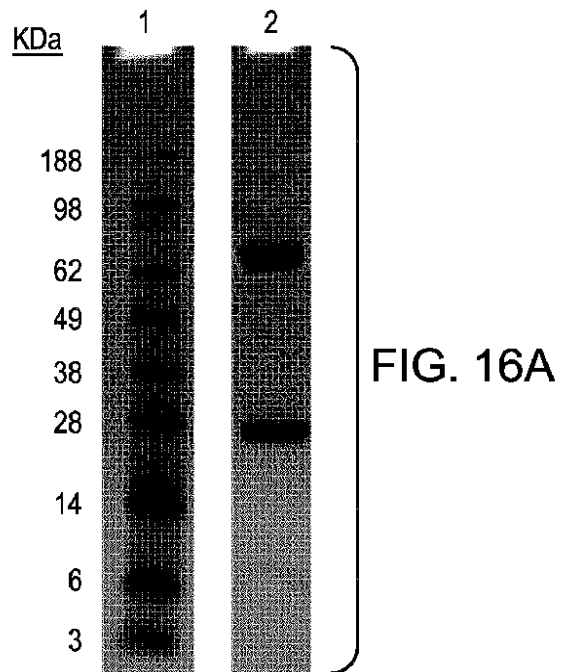
【図 1 4 B】



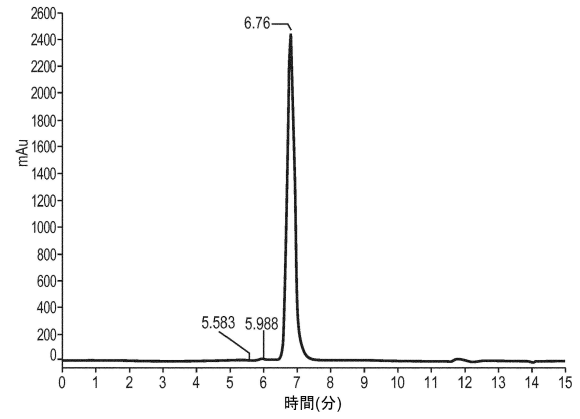
【図 1 5】



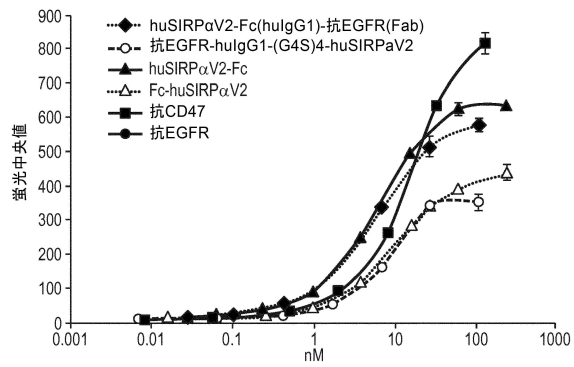
【図 16 A】



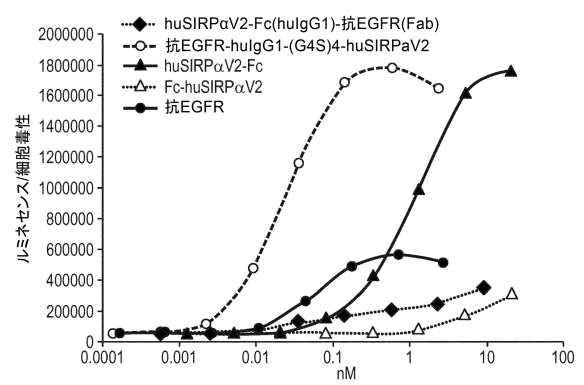
【図 16 B】



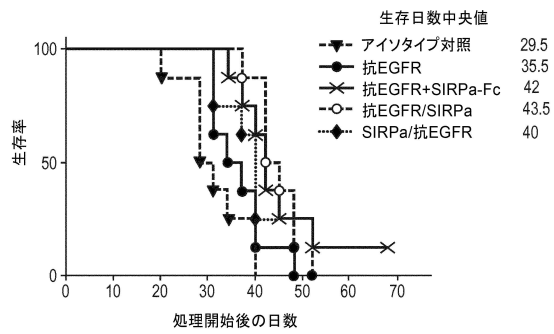
【図 17 A】



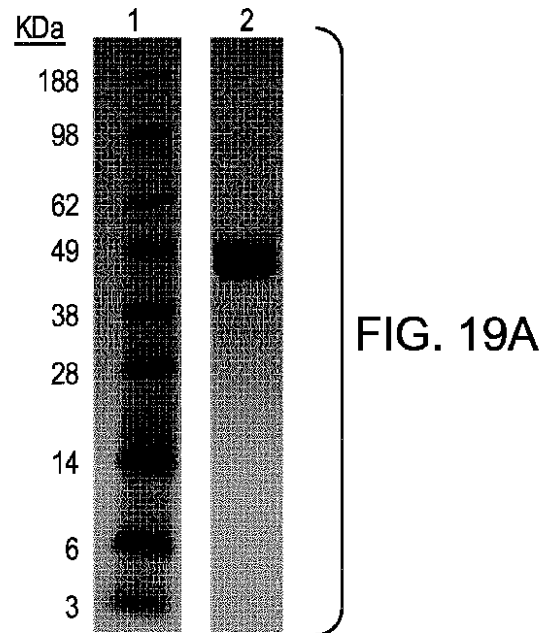
【図 17 B】



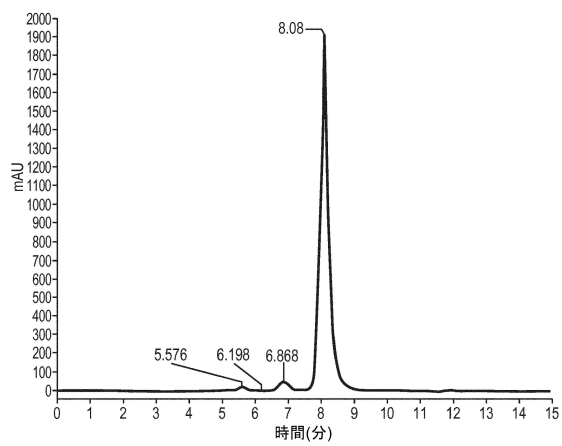
【図 18】



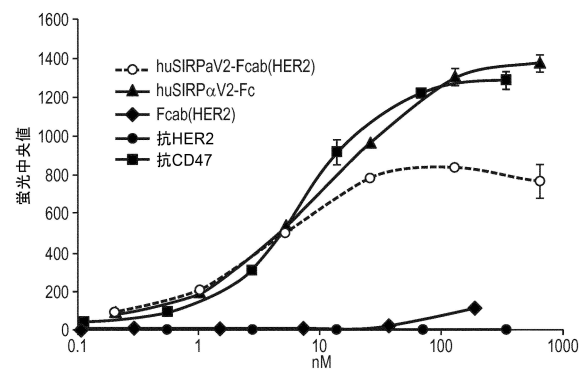
【図 19 A】



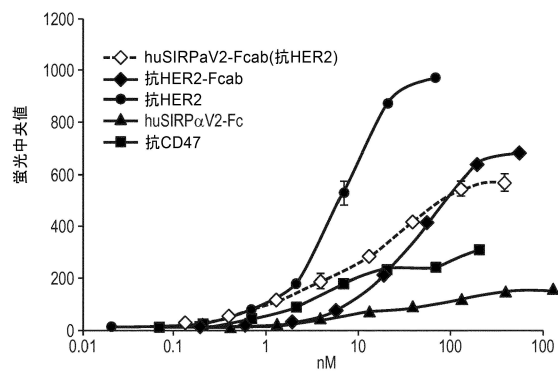
【図 19 B】



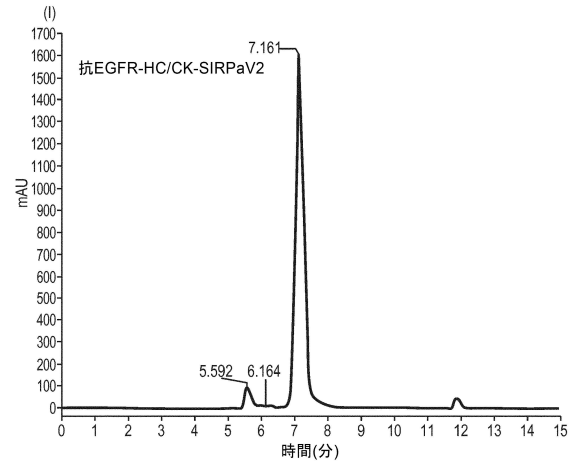
【図 20 A】



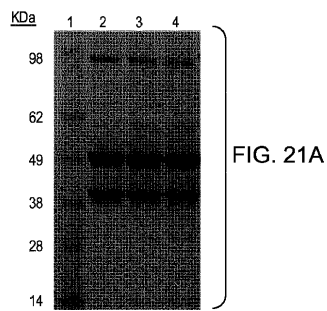
【図 20 B】



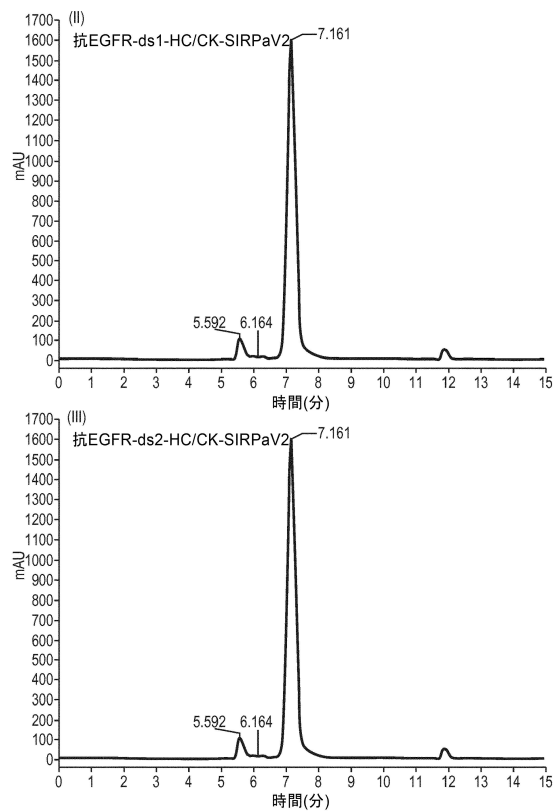
【図 21 B - 1】



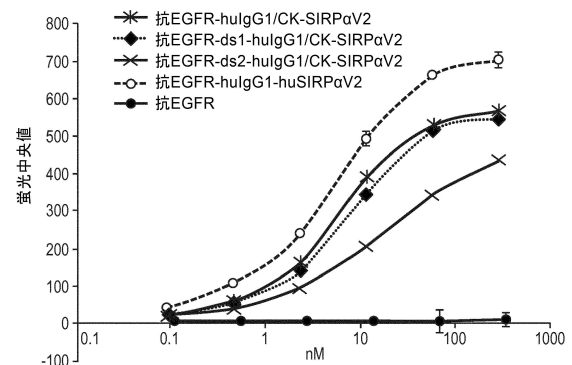
【図 21 A】



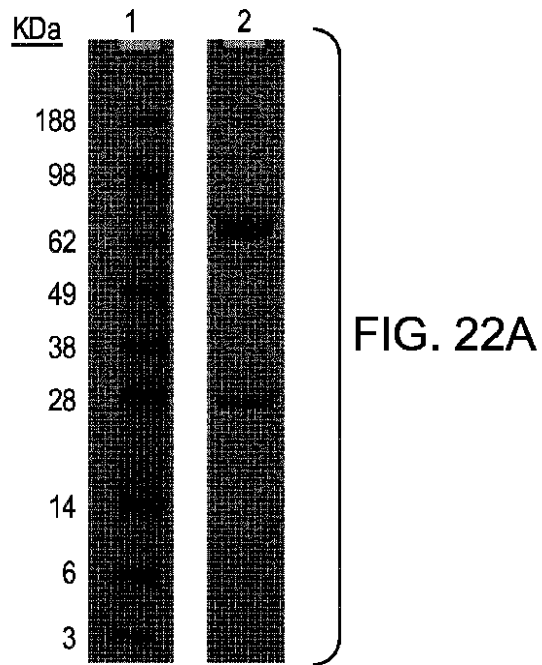
【図 21 B - 2】



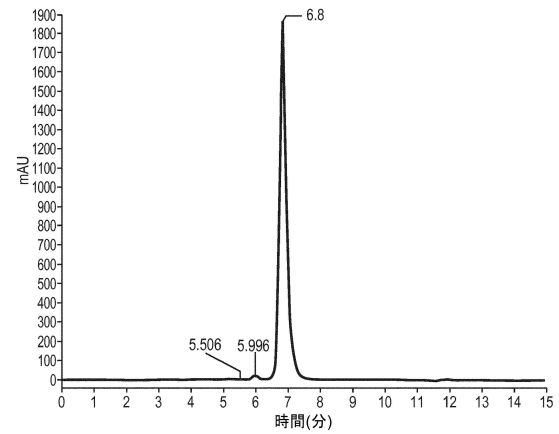
【図 21 C】



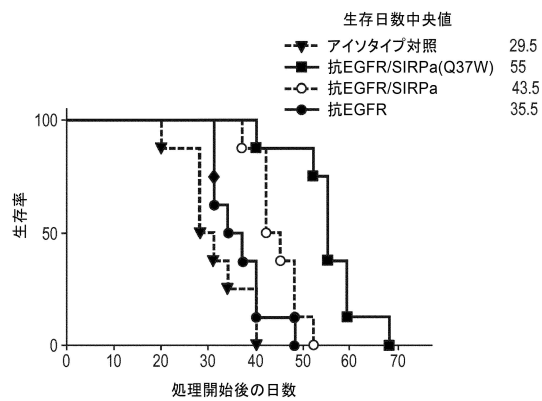
【図 2 2 A】



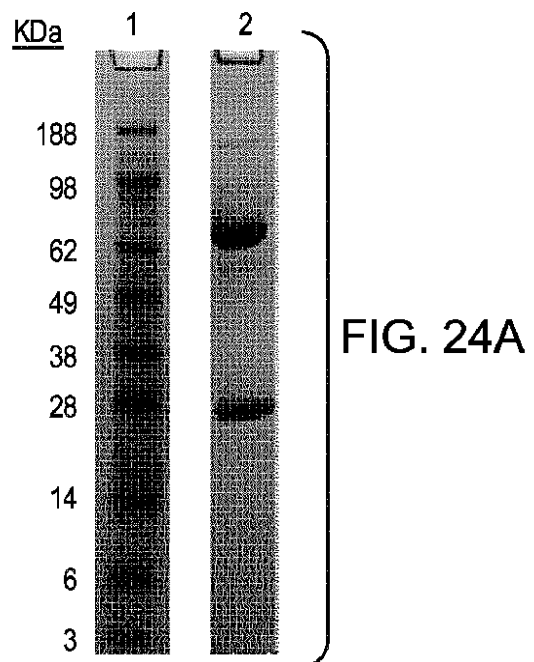
【図 2 2 B】



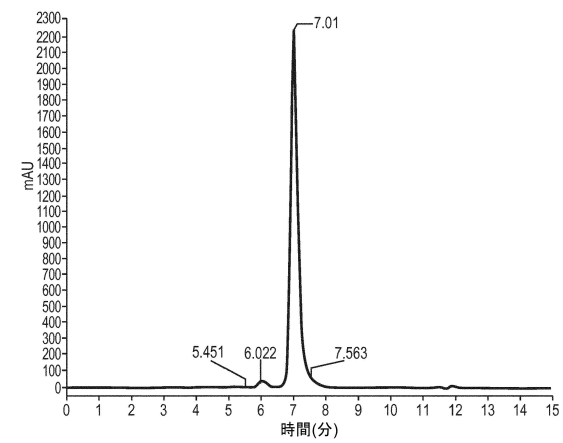
【図 2 3】



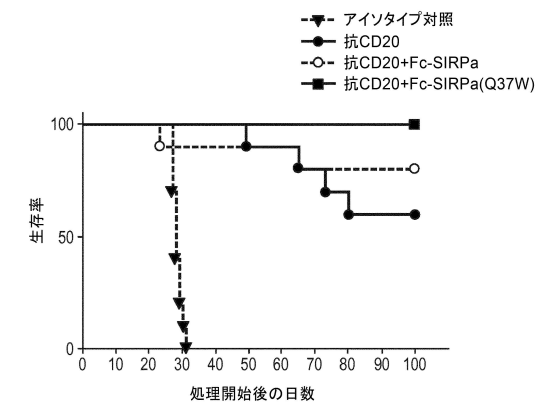
【図 2 4 A】



【図 2 4 B】



【図 2 5】



【図 2 6】

FIG. 26

	1	11	21	31	41	51
IgV (V1)	EEELQVIGPKSVLVAAGETATLRCTATSLIPVGPIONFRGAGPGRSLIYNQKSGHFPRV					
IgV (V2)	EEELQVIGPKSVSVAAGESAILHCTVLSLIPVGPIONFRGAGPARSLIYNQKSGHFPRV					
IgV (V3)	EEELQVIGPKSVSVAAGESAILLCTVLSLIPVGPIONFRGAGPARSLIYNQKSGHFPRV					
IgV (V4)	EEELQVIGPKSVSVAAGESAILHCTVLSLIPVGPIONFRGAGPGRSLIYNQKSGHFPRV					
IgV (V5)	EEELQVIGPKSVLVAAGETATLRCTATSLIPVGPIONFRGAGPGRSLIYNQKSGHFPRV					
IgV (V6)	EEELQVIGPKSVLVAAGETATLRCTATSLIPVGPIONFRGAGPGRSLIYNQKSGHFPRV					
IgV (V7)	EEELQVIGPKSVSVAAGESAILHCTVLSLIPVGPIONFRGAGPARSLIYNQKSGHFPRV					
IgV (V8)	EEELQVIGPKSVLVAAGETATLRCTATSLIPVGPIONFRGAGPARSLIYNQKSGHFPRV					
IgV (V9)	EEELQVIGPKSVLVAAGETATLRCTATSLIPVGPIONFRGAGPGRSLIYNQKSGHFPRV					
IgV (V10)	EEELQVIGPKSVSVAAGESAILHCTVLSLIPVGPIONFRGAGPARSLIYNQKSGHFPRV					
	61	71	81	91	101	111
IgV (V1)	TTVSDLTNRNNDPFSIRIGNITPADAGTYCYVKFRGSPDDVEFKSGAGTSLSVR					
IgV (V2)	TTVSESTKRNNDFPISISINITPADAGTYCYVKFRGSPD-TEFKSGAGTSLSVR					
IgV (V3)	TTVSESTKRNNDFPISISINITPADAGTYCYVKFRGSPD-TEFKSGAGTSLSVR					
IgV (V4)	TTVSDLTNRNNDPFSIRIGNITPADAGTYCYVKFRGSPDDVEFKSGAGTSLSVR					
IgV (V5)	TTVSDLTNRNNDPFSIRIGNITPADAGTYCYVKFRGSPDDVEFKSGAGTSLSVR					
IgV (V6)	TTVSDLTNRNNDPFSIRIGNITPADAGTYCYVKFRGSPDDVEFKSGAGTSLSVR					
IgV (V7)	TTVSESTKRNNDFPISISINITPADAGTYCYVKFRGSPD-TEFKSGAGTSLSVR					
IgV (V8)	TTVSESTKRNNDFPISISINITPADAGTYCYVKFRGSPD-TEFKSGAGTSLSVR					
IgV (V9)	TTVSDLTNRNNDPFSIRIGNITPADAGTYCYVKFRGSPDDVEFKSGAGTSLSVR					
IgV (V10)	TTVSESTKRNNDFPISISINITPADAGTYCYVKFRGSPD-TEFKSGAGTSLSVR					

【配列表】

0006764858000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 A 6 1 P 35/00 (2006.01) A 6 1 P 35/00

- (72)発明者 ロー, キン - ミン
 アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 4 2 0, レキシントン, キャロル レーン 6
- (72)発明者 ジズルスパージャー, ノラ エー . イー .
 アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 4 6 0, ニュートン, リンウッド アベニュー 1 6
 4
- (72)発明者 シルカー, アループ
 アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 1 8 2 1, ビレリカ, コンコード ロード 1 5 8, ア
 パートメント イー 0 6

審査官 川合 理恵

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 1 4 / 1 2 1 0 9 3 (WO , A 1)
 Curr. Opin. Immunol., 2012, Vol. 24, pp. 225-232
 Science, 2013, Vol. 341, No. 6141, pp. 41-42
 Science, 2013, Vol. 341, No. 6141, pp. 88-91
 J. Biol. Chem., 2009, Vol. 284, No. 39, pp. 26613-26619

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
 C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)