

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11) 公表番号

特表2023-535485

(P2023-535485A)

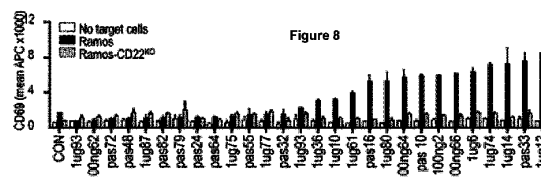
(43)公表日 令和5年8月17日(2023.8.17)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13	Z N A	4 B 0 6 4
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z	4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/867 (2006.01)	C 1 2 N	15/867	Z	4 C 0 8 4
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15		4 C 0 8 5
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19		4 C 0 8 7
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全123頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-505903(P2023-505903)	(71)出願人	595006223		
(86)(22)出願日	令和3年7月27日(2021.7.27)		ナショナル リサーチ カウンシル オブ		
(85)翻訳文提出日	令和5年3月20日(2023.3.20)		カナダ		
(86)国際出願番号	PCT/CA2021/051046		カナダ国, オンタリオ ケー1エー 0ア		
(87)国際公開番号	WO2022/020945		ール6, オタワ, モントリオール ロード		
(87)国際公開日	令和4年2月3日(2022.2.3)		1 2 0 0		
(31)優先権主張番号	63/058,203	(74)代理人	110002572		
(32)優先日	令和2年7月29日(2020.7.29)		弁理士法人平木国際特許事務所		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(72)発明者	マッコーム, スコット		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く		カナダ国 ケー1エイチ 7エー9 オン タリオ, オタワ, ブライアー ヒル ドラ イブ 2 3 4 0		
		(72)発明者	ウィーラトナ, リシニ		
			カナダ国 ケー2ジー 6ジー5 オンタ リオ, オタワ, サマーウィンド クレセ 最終頁に続く		

(54) 【発明の名称】 抗CD22シングルドメイン抗体および治療用コンストラクト

(57) 【要約】

本明細書では、優勢なヒトCD22アイソフォームの細胞外ドメインでラマを免疫化することによって調製された抗CD22シングルドメイン抗体 (sdAb) が提供される。作製された重鎖レパートリーのライブラリーを構築することによって、該免疫原に特異的なVHH抗体ドメインが単離された。最初に作製された27種の例示的な抗体は、SEQ ID NO: 1~3、4~6、7~9、10~12、13~15、16~18、19~21、22~24、25~27、28~30、31~33、34~36、37~39、40~42、43~45、46~48、49~51、52~54、55~57、58~60、61~63、64~66、67~69、70~72、73~75、75~78、および79~81にそれぞれ対応するCDR1、CDR2、およびCDR3配列；ならびに関連配列を含む。また、該sdAbのいずれか1つを含む多価抗体、例えば、二重特異性T細胞エンゲージャー、二重特異性キラー細胞エンゲージャー (BiKE)、三重特異性キラー細胞エンゲージャー (TriKE) などとも提供される。さらに、前述のsdAbのいずれか1つを含む、CAR-T療法のためのキメラ抗原受容体 (CAR) が記載される。がんの治療におけるこれらの分子の使用



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトCD22に特異的に結合する、単離されたシングルドメイン抗体 (sdAb) であって、以下の配列：

a) CDR1アミノ酸配列GX₁X₂X₃DX₄YX₅ (SEQ ID NO: 126)、ここで、

X₁は、FまたはVであり、

X₂は、TまたはSであり、

X₃は、L、F、またはSであり、

X₄は、Y、D、またはSであり、

X₅は、VまたはAである；

10

CDR2アミノ酸配列X₆X₇X₈X₉X₁₀GX₁₁T (SEQ ID NO: 127)、ここで、

X₆は、IまたはMであり、

X₇は、T、R、G、またはSであり、

X₈は、SまたはNであり、

X₉は、DまたはSであり、

X₁₀は、Dであるか、または存在せず、

X₁₁は、VまたはAである；および

CDR3アミノ酸配列AVDKPFYDGGX₁₂X₁₃YTCPVDFX₁₄S (SEQ ID NO: 128)、ここで、

X₁₂は、I、N、Y、またはSであり、

20

X₁₃は、Q、Y、R、またはLであり、

X₁₄は、DまたはGである；

b) CDR1アミノ酸配列GSX₁FX₂X₃X₄X₅V (SEQ ID NO: 129)、ここで、

X₁は、IまたはTであり、

X₂は、Rであるか、または存在せず、

X₃は、R、S、またはIであり、

X₄は、I、S、またはTであり、

X₅は、A、S、またはTである；

CDR2アミノ酸配列ITSX₆GX₇X₈ (SEQ ID NO: 130)、ここで、

X₆は、G、S、またはAであり、

30

X₇は、E、D、またはSであり、

X₈は、TまたはSである；および

CDR3アミノ酸配列NAX₉X₁₀GX₁₁X₁₂X₁₃X₁₄ (SEQ ID NO: 131)、ここで、

X₉は、KまたはQであり、

X₁₀は、WまたはYであり、

X₁₁は、Q、R、またはGであり、

X₁₂は、Y、D、またはRであり、

X₁₃は、EまたはSであり、

X₁₄は、Y、D、またはHである；

c) CDR1アミノ酸配列GRIX₁RSYV (SEQ ID NO: 132)、ここで、

40

X₁は、FまたはSである；

CDR2アミノ酸配列IGX₂SDT (SEQ ID NO: 133)、ここで、

X₂は、WまたはCである；および

CDR3アミノ酸配列AX₃X₄SPPYGPQRDEFX₅Y (SEQ ID NO: 134)、ここで、

X₃は、AまたはEであり、

X₄は、NまたはYであり、

X₅は、GまたはDである；

d) CDR1アミノ酸配列GX₁TX₂SVYX₃ (SEQ ID NO: 135)、ここで、

X₁は、RまたはGであり、

X₂は、SまたはFであり、

50

X_3 は、G または T である；
 CDR2 アミノ酸配列 $X_4X_5X_6SX_7GX_8T$ (SEQ ID NO: 136)、ここで、
 X_4 は、M または I であり、
 X_5 は、S または R であり、
 X_6 は、W または G であり、
 X_7 は、G であるか、または存在せず、
 X_8 は、P または G である；および
 CDR3 アミノ酸配列 AVRIRRTL X_9 EPLTKETLYDY (SEQ ID NO: 137)、ここで、
 X_9 は、L または V である；

e) SEQ ID NO: 49 に記載の CDR1 アミノ酸配列、
 SEQ ID NO: 50 に記載の CDR2 アミノ酸配列、および
 SEQ ID NO: 51 に記載の CDR3 アミノ酸配列 (hCD22pas-16)；

f) SEQ ID NO: 4 に記載の CDR1 アミノ酸配列、
 SEQ ID NO: 5 に記載の CDR2 アミノ酸配列、および
 SEQ ID NO: 6 に記載の CDR3 アミノ酸配列 (hCD221ug-10)；

g) SEQ ID NO: 7 に記載の CDR1 アミノ酸配列、
 SEQ ID NO: 8 に記載の CDR2 アミノ酸配列、および
 SEQ ID NO: 9 に記載の CDR3 アミノ酸配列 (hCD221ug-13)；

h) SEQ ID NO: 13 に記載の CDR1 アミノ酸配列、
 SEQ ID NO: 14 に記載の CDR2 アミノ酸配列、および
 SEQ ID NO: 15 に記載の CDR3 アミノ酸配列 (hCD221ug-36)；

i) SEQ ID NO: 16 に記載の CDR1 アミノ酸配列、
 SEQ ID NO: 17 に記載の CDR2 アミノ酸配列、および
 SEQ ID NO: 18 に記載の CDR3 アミノ酸配列 (hCD221ug-61)；

j) SEQ ID NO: 40 に記載の CDR1 アミノ酸配列、
 SEQ ID NO: 41 に記載の CDR2 アミノ酸配列、および
 SEQ ID NO: 42 に記載の CDR3 アミノ酸配列 (hCD22100ug-62)；

k) SEQ ID NO: 55 に記載の CDR1 アミノ酸配列、
 SEQ ID NO: 56 に記載の CDR2 アミノ酸配列、および
 SEQ ID NO: 57 に記載の CDR3 アミノ酸配列 (hCD22pas-24)；

l) SEQ ID NO: 64 に記載の CDR1 アミノ酸配列、
 SEQ ID NO: 65 に記載の CDR2 アミノ酸配列、および
 SEQ ID NO: 66 に記載の CDR3 アミノ酸配列 (hCD22pas-48)；

または

m) SEQ ID NO: 70 に記載の CDR1 アミノ酸配列、
 SEQ ID NO: 71 に記載の CDR2 アミノ酸配列、および
 SEQ ID NO: 72 に記載の CDR3 アミノ酸配列 (hCD22pas-64)；

を含む、単離された sdAb。

【請求項 2】

ヒト CD22 に特異的に結合する、単離されたシングルドメイン抗体 (sdAb) であって、以下の配列：

A)

i) SEQ ID NO: 1 に記載の CDR1 アミノ酸配列、SEQ ID NO: 2 に記載の CDR2 アミノ酸配列、および SEQ ID NO: 3 に記載の CDR3 アミノ酸配列 (hCD221ug-6)；

ii) SEQ ID NO: 4 に記載の CDR1 アミノ酸配列、SEQ ID NO: 5 に記載の CDR2 アミノ酸配列、および SEQ ID NO: 6 に記載の CDR3 アミノ酸配列 (hCD221ug-10)；

iii) SEQ ID NO: 7 に記載の CDR1 アミノ酸配列、SEQ ID NO: 8 に記載の CDR2 アミノ酸配列、および SEQ ID NO: 9 に記載の CDR3 アミノ酸配列 (hCD221ug-13)；

iv) SEQ ID NO: 10 に記載の CDR1 アミノ酸配列、SEQ ID NO: 11 に記載の CDR2 アミノ酸配列、および SEQ ID NO: 12 に記載の CDR3 アミノ酸配列 (hCD221ug-14)；

10

20

30

40

50

- v) SEQ ID NO: 13に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 14に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 15に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-36) ;
- vi) SEQ ID NO: 16に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 17に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 18に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-61) ;
- vii) SEQ ID NO: 19に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 20に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 21に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-74) ;
- viii) SEQ ID NO: 22に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 23に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 24に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-75) ;
- ix) SEQ ID NO: 25に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 26に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 27に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-77) ;
- x) SEQ ID NO: 28に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 29に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 30に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-80) ;
- xi) SEQ ID NO: 31に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 32に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 33に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-87) ;
- xii) SEQ ID NO: 34に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 35に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 36に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-93) ;
- xiii) SEQ ID NO: 37に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 38に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 39に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22100ug-2) ;
- xiv) SEQ ID NO: 40に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 41に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 42に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22100ug-62) ;
- xv) SEQ ID NO: 43に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 44に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 45に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22100ug-66) ;
- xvi) SEQ ID NO: 46に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 47に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 48に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-10) ;
- xvii) SEQ ID NO: 49に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 50に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 51に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-16) ;
- xviii) SEQ ID NO: 52に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 53に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 54に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-23) ;
- xix) SEQ ID NO: 55に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 56に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 57に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-24) ;
- xx) SEQ ID NO: 58に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 59に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 60に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-32) ;
- xxi) SEQ ID NO: 61に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 62に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 63に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-33) ;
- xxii) SEQ ID NO: 64に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 65に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 66に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-48) ;
- xxiii) SEQ ID NO: 67に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 68に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 69に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-5

10

20

30

40

50

5) ;

xxiv) SEQ ID NO: 70に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 71に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 72に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-64) ;

xxv) SEQ ID NO: 73に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 74に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 75に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-72) ;

xxvi) SEQ ID NO: 76に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 77に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 78に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-79) ; または

xxvii) SEQ ID NO: 79に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 80に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 81に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-82) ;

を含む、単離されたsdAb。

【請求項3】

ヒトCD22に特異的に結合する、単離されたシングルドメイン抗体 (sdAb) であって、以下の配列:

A)

i) SEQ ID NO: 1に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 2に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 3に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-6) ;

ii) SEQ ID NO: 4に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 5に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 6に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-10) ;

iii) SEQ ID NO: 7に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 8に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 9に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-13) ;

iv) SEQ ID NO: 10に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 11に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 12に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-14) ;

v) SEQ ID NO: 13に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 14に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 15に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-36) ;

vi) SEQ ID NO: 16に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 17に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 18に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-61) ;

vii) SEQ ID NO: 19に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 20に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 21に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-74) ;

viii) SEQ ID NO: 22に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 23に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 24に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-75) ;

ix) SEQ ID NO: 25に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 26に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 27に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-77) ;

x) SEQ ID NO: 28に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 29に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 30に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-80) ;

xi) SEQ ID NO: 31に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 32に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 33に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-87) ;

xii) SEQ ID NO: 34に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 35に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 36に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-93) ;

xiii) SEQ ID NO: 37に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 38に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 39に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22100ug-2) ;

xiv) SEQ ID NO: 40に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 41に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 42に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22100ug-

10

20

30

40

50

62) ;

xv) SEQ ID NO: 43に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 44に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 45に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22100ug-66) ;

xvi) SEQ ID NO: 46に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 47に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 48に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-10) ;

xvii) SEQ ID NO: 49に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 50に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 51に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-16) ;

xviii) SEQ ID NO: 52に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 53に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 54に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-23) ;

xix) SEQ ID NO: 55に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 56に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 57に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-24) ;

xx) SEQ ID NO: 58に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 59に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 60に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-32) ;

xxi) SEQ ID NO: 61に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 62に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 63に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-33) ;

xxii) SEQ ID NO: 64に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 65に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 66に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-48) ;

xxiii) SEQ ID NO: 67に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 68に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 69に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-55) ;

xxiv) SEQ ID NO: 70に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 71に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 72に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-64) ;

xxv) SEQ ID NO: 73に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 74に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 75に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-72) ;

xxvi) SEQ ID NO: 76に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 77に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 78に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-79) ; または

xxvii) SEQ ID NO: 79に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 80に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 81に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-82) ; あるいは

B)

パートA)のi)~xxviii)のいずれか1つにおいて定義されたCDR1、CDR2、およびCDR3配列と少なくとも80%同一であるCDR1、CDR2、およびCDR3アミノ酸配列を含む、単離されたsdAb。

【請求項4】

ヒトCD22に特異的に結合する、単離されたシングルドメイン抗体 (sdAb) であって、以下の配列：

A)

i) SEQ ID NO: 3に記載のCDR3アミノ酸配列；

ii) SEQ ID NO: 6に記載のCDR3アミノ酸配列；

iii) SEQ ID NO: 9に記載のCDR3アミノ酸配列；

- iv) SEQ ID NO: 12に記載のCDR3アミノ酸配列；
- v) SEQ ID NO: 15に記載のCDR3アミノ酸配列；
- vi) SEQ ID NO: 18に記載のCDR3アミノ酸配列；
- vii) SEQ ID NO: 21に記載のCDR3アミノ酸配列；
- viii) SEQ ID NO: 24に記載のCDR3アミノ酸配列；
- ix) SEQ ID NO: 27に記載のCDR3アミノ酸配列；
- x) SEQ ID NO: 30に記載のCDR3アミノ酸配列；
- xi) SEQ ID NO: 33に記載のCDR3アミノ酸配列；
- xii) SEQ ID NO: 36に記載のCDR3アミノ酸配列；
- xiii) SEQ ID NO: 39に記載のCDR3アミノ酸配列；
- xiv) SEQ ID NO: 42に記載のCDR3アミノ酸配列；
- xv) SEQ ID NO: 45に記載のCDR3アミノ酸配列；
- xvi) SEQ ID NO: 48に記載のCDR3アミノ酸配列；
- xvii) SEQ ID NO: 51に記載のCDR3アミノ酸配列；
- xviii) SEQ ID NO: 54に記載のCDR3アミノ酸配列；
- xix) SEQ ID NO: 57に記載のCDR3アミノ酸配列；
- xx) SEQ ID NO: 60に記載のCDR3アミノ酸配列；
- xxi) SEQ ID NO: 63に記載のCDR3アミノ酸配列；
- xxii) SEQ ID NO: 66に記載のCDR3アミノ酸配列；
- xxiii) SEQ ID NO: 69に記載のCDR3アミノ酸配列；
- xxiv) SEQ ID NO: 72に記載のCDR3アミノ酸配列；
- xxv) SEQ ID NO: 75に記載のCDR3アミノ酸配列；
- xxvi) SEQ ID NO: 79に記載のCDR3アミノ酸配列；または
- xxvii) SEQ ID NO: 81に記載のCDR3アミノ酸配列；

を含む、単離されたsdAb。

【請求項5】

以下の配列：

A)

- i) SEQ ID NO: 1に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 3に記載のCDR3アミノ酸配列；
- ii) SEQ ID NO: 4に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 6に記載のCDR3アミノ酸配列；
- iii) SEQ ID NO: 7に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 9に記載のCDR3アミノ酸配列；
- iv) SEQ ID NO: 10に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 12に記載のCDR3アミノ酸配列；
- v) SEQ ID NO: 13に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 15に記載のCDR3アミノ酸配列；
- vi) SEQ ID NO: 16に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 18に記載のCDR3アミノ酸配列；
- vii) SEQ ID NO: 19に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 21に記載のCDR3アミノ酸配列；
- viii) SEQ ID NO: 22に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 24に記載のCDR3アミノ酸配列；
- ix) SEQ ID NO: 25に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 27に記載のCDR3アミノ酸配列；
- x) SEQ ID NO: 28に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 30に記載のCDR3アミノ酸配列；
- xi) SEQ ID NO: 31に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 33に記載のCDR3アミノ酸配列；

xii) SEQ ID NO: 34に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 36に記載のCDR3アミノ酸配列；

xiii) SEQ ID NO: 37に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 39に記載のCDR3アミノ酸配列；

xiv) SEQ ID NO: 40に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 42に記載のCDR3アミノ酸配列；

xv) SEQ ID NO: 43に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 45に記載のCDR3アミノ酸配列；

xvi) SEQ ID NO: 46に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 48に記載のCDR3アミノ酸配列；

xvii) SEQ ID NO: 49に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 51に記載のCDR3アミノ酸配列；

xviii) SEQ ID NO: 52に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 54に記載のCDR3アミノ酸配列；

xix) SEQ ID NO: 55に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 57に記載のCDR3アミノ酸配列；

xx) SEQ ID NO: 58に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 60に記載のCDR3アミノ酸配列；

xxi) SEQ ID NO: 61に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 63に記載のCDR3アミノ酸配列；

xxii) SEQ ID NO: 64に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 66に記載のCDR3アミノ酸配列；

xxiii) SEQ ID NO: 67に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 69に記載のCDR3アミノ酸配列；

xxiv) SEQ ID NO: 70に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 72に記載のCDR3アミノ酸配列；

xxv) SEQ ID NO: 73に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 75に記載のCDR3アミノ酸配列；

xxvi) SEQ ID NO: 76に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 78に記載のCDR3アミノ酸配列；または

xxvii) SEQ ID NO: 79に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 81に記載のCDR3アミノ酸配列；

を含む、請求項4に記載の単離されたシングルドメイン抗体 (sdAb)。

10

20

30

40

【請求項6】

A) SEQ ID NO: 85～112および120～125のいずれか1つのアミノ酸配列、またはB) その全長にわたってSEQ ID NO: 82～108および120～125のいずれか1つと少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含む、請求項2または3に記載の単離されたsdAb。

【請求項7】

A) SEQ ID NO: 82～108および120～125のいずれか1つのアミノ酸配列を含む、請求項1または2に記載の単離されたsdAb。

【請求項8】

ラクダ科sdAbである、請求項1～5のいずれか一つに記載の単離されたsdAb。

【請求項9】

ラマsdAbである、請求項8に記載の単離されたsdAb。

【請求項10】

ヒト化されている、請求項1～5のいずれか一つに記載の単離されたsdAb。

【請求項11】

2.5×10^{-7} nm以下のヒトCD22に対する親和性を有する、請求項1～10のいずれか一つに記載の単離されたsdAb。

【請求項12】

50

3×10^{-8} nm以下のヒトCD22に対する親和性を有する、請求項1～10のいずれか一つに記載の単離されたsdAb。

【請求項13】

9.6×10^{-9} nm以下のヒトCD22に対する親和性を有する、請求項1～10のいずれか一つに記載の単離されたsdAb。

【請求項14】

9.3×10^{-10} nm以下のヒトCD22に対する親和性を有する、請求項1～10のいずれか一つに記載の単離されたsdAb。

【請求項15】

7×10^{-12} nm以下のヒトCD22に対する親和性を有する、請求項1～10のいずれか一つに記載の単離されたsdAb。

【請求項16】

ヒトCD22の第1のIg様ドメインに結合する、請求項1～15のいずれか一つに記載の単離されたsdAb。

【請求項17】

該抗体がSEQ ID NO: 91 (hCD221ug-80)を含む、請求項16に記載の単離されたsdAb。

【請求項18】

ヒトCD22の第4のIg様ドメインに結合する、請求項1～15のいずれか一つに記載の単離されたsdAb。

【請求項19】

該抗体がSEQ ID NO: 84 (hCD221ug-13)を含む、請求項18に記載の単離されたsdAb。

【請求項20】

ヒトCD22の第6のIg様ドメインに結合する、請求項1～15のいずれか一つに記載の単離されたsdAb。

【請求項21】

該抗体がSEQ ID NO: 84 (hCD221ug-13)、SEQ ID NO: 91 (hCD221ug-80)、SEQ ID NO: 86 (hCD221ug-36)、またはSEQ ID NO: 105 (hCD221pas-64)を含む、請求項20に記載の単離されたsdAb。

【請求項22】

ヒトCD22の第7のIg様ドメインに結合する、請求項1～15のいずれか一つに記載の単離されたsdAb。

【請求項23】

該抗体がSEQ ID NO: 87 (hCD221ug-61)、SEQ ID NO: 83 (hCD221ug-10)、またはSEQ ID NO: 100 (hCD22pas-24)を含む、請求項22に記載の単離されたsdAb。

【請求項24】

CD22への特異的結合について請求項3または7に記載の単離されたsdAbと競合する、シングルドメイン抗体 (sdAb)。

【請求項25】

ラクダ科sdAbである、請求項24に記載のsdAb。

【請求項26】

ラマsdAbである、請求項25に記載のsdAb。

【請求項27】

ヒト化されている、請求項24～26のいずれか一つに記載のsdAb。

【請求項28】

請求項1～27のいずれか一つに記載の1つまたは複数のsdAbを含む組換えポリペプチド。

【請求項29】

10

20

30

40

50

請求項1～27のいずれか一つに記載のsdAbを含む第1の抗原結合部分；および第2の抗原結合部分；を含む多価抗体。

【請求項30】

第2の抗原結合部分が、免疫細胞の細胞表面マーカーに特異的に結合する、請求項29に記載の多価抗体。

【請求項31】

免疫細胞の細胞表面マーカーがT細胞マーカーを含む、請求項30に記載の多価抗体。

【請求項32】

T細胞マーカーがヒトCD3を含む、請求項31に記載の多価抗体。

10

【請求項33】

N末端からC末端の方向に、

- 第1の抗原結合部分；
- アミノ酸リンカー；および
- 第2の抗原結合部分；

を含む、請求項29～32のいずれか一つに記載の多価抗体。

【請求項34】

N末端のシグナルペプチドをさらに含む、請求項33に記載の多価抗体。

【請求項35】

シグナルペプチドがヒトCD28由来のシグナルペプチドであり、好ましくはSEQ ID NO: 110を含む、請求項34に記載の多価抗体。

20

【請求項36】

アミノ酸リンカーがヒトCD8由来のポリペプチドヒンジを含む、請求項33～35のいずれか一つに記載の多価抗体。

【請求項37】

ヒトCD8由来のポリペプチドヒンジがSEQ ID NO: 112を含む、請求項36に記載の多価抗体。

【請求項38】

アミノ酸リンカーが、N末端からC末端の方向に、SEQ ID NO: 111、112、および118を含む、請求項36または37に記載の多価抗体。

30

【請求項39】

SEQ ID NO: 119によりコードされる、請求項33～38のいずれか一つに記載の多価抗体。

【請求項40】

免疫細胞マーカーの細胞表面マーカーがナチュラルキラー（NK）細胞マーカーを含む、請求項30に記載の多価抗体。

【請求項41】

NK細胞マーカーがヒトCD16を含む、請求項40に記載の多価抗体。

【請求項42】

NK細胞の活性化、増殖、および/または生存を刺激するためのサイトカインをさらに含む、請求項40または41に記載の多価抗体。

40

【請求項43】

NK細胞の増殖を刺激するためのサイトカインがインターロイキン15（IL15）である、請求項42に記載の多価抗体。

【請求項44】

第2のNK細胞マーカーに結合する第3の抗原結合部分をさらに含む、請求項40～43のいずれか一つに記載の多価抗体。

【請求項45】

第2のNK細胞マーカーがヒトNKp46である、請求項44に記載の多価抗体。

【請求項46】

50

腫瘍関連抗原に結合する少なくとも第3の抗原結合部分をさらに含み、好ましくは、腫瘍関連抗原がヒトCD22とは異なる、請求項40～43のいずれか一つに記載の多価抗体。

【請求項47】

腫瘍関連抗原に結合する少なくとも第3の抗原結合部分をさらに含み、好ましくは、腫瘍関連抗原がヒトCD22とは異なる、請求項29～39のいずれか一つに記載の多価抗体。

【請求項48】

第3の抗原結合部分がV_HH、V_{NAR}、またはscVFを含む、請求項46または47のいずれか一つに記載の多価抗体。

【請求項49】

第2の抗原結合部分がV_HH、V_{NAR}、またはscVFを含む、請求項29～47のいずれか一つに記載の多価抗体。

【請求項50】

ヒト血清アルブミンに結合する抗原結合部分を含む、請求項29～49のいずれか一つに記載の多価抗体。

【請求項51】

二重特異性T細胞エンゲージャーである、請求項31～39のいずれか一つに記載の多価抗体。

【請求項52】

二重特異性キラー細胞エンゲージャー（BiKE）である、請求項40または41に記載の多価抗体。

【請求項53】

三重特異性キラー細胞エンゲージャー（TriKE）である、請求項42～48のいずれか一つに記載の多価抗体。

【請求項54】

sdAbが、

SEQ ID NO: 13に記載のCDR1アミノ酸配列、

SEQ ID NO: 14に記載のCDR2アミノ酸配列、および

SEQ ID NO: 15に記載のCDR3アミノ酸配列（hCD221ug36）；または

SEQ ID NO: 7に記載のCDR1アミノ酸配列、

SEQ ID NO: 8に記載のCDR2アミノ酸配列、および

SEQ ID NO: 9に記載のCDR3アミノ酸配列（hCD221ug13）；

を含む、請求項29～53のいずれか一つに記載の多価抗体。

【請求項55】

sdAbがSEQ ID NO: 86（hCD221ug36）またはSEQ ID NO: 84（hCD221ug13）を含む、請求項29～53のいずれか一つに記載の多価抗体。

【請求項56】

請求項28に記載の組換えポリペプチド、または請求項29～55のいずれか一つに記載の多価抗体をコードする組換え核酸分子。

【請求項57】

がんまたは自己免疫疾患を治療するための、請求項29～55のいずれか一つに記載の多価抗体の使用。

【請求項58】

がんまたは自己免疫疾患の治療方法であって、請求項29～55のいずれか一つに記載の多価抗体を対象に投与することを含む、方法。

【請求項59】

請求項1～27のいずれか一つに記載のV_HH sdAbを含む、ヒトCD22に結合するキメラ抗体受容体（CAR）。

【請求項60】

N末端からC末端の方向に、

- 請求項1～27のいずれか一つに記載のsdAbを含むCD22結合ドメイン；

10

20

30

40

50

- ポリペプチドヒンジ；
- 膜貫通ドメイン；および
- シグナル伝達ドメインを含み、好ましくは共刺激ドメインをさらに含む、細胞質ドメイン；

を含む、請求項59に記載のCAR。

【請求項61】

ポリペプチドヒンジがCD8ヒンジドメインである、請求項60に記載のCAR。

【請求項62】

CD8ヒンジドメインがSEQ ID NO: 112を含む、請求項61に記載のCAR。

【請求項63】

膜貫通ドメインがCD28膜貫通ドメインである、請求項60～62のいずれか一つに記載のCAR。

【請求項64】

CD28膜貫通ドメインがSEQ ID NO: 113を含む、請求項63に記載のCAR。

【請求項65】

シグナル伝達ドメインがCD3ζシグナル伝達ドメインである、請求項60～64のいずれか一つに記載のCAR。

【請求項66】

CD3ζシグナル伝達ドメインがSEQ ID NO: 115を含む、請求項65に記載のCAR。

【請求項67】

共刺激ドメインが4-1BB共刺激ドメインである、請求項60～66のいずれか一つに記載のCAR。

【請求項68】

4-1BBシグナル伝達ドメインがSEQ ID NO: 114を含む、請求項67に記載のCAR。

【請求項69】

sdAbとポリペプチドヒンジの間に柔軟なアミノ酸リンカーをさらに含む、請求項60～68のいずれか一つに記載のCAR。

【請求項70】

柔軟なアミノ酸リンカーがSEQ ID NO: 111を含む、請求項69に記載のCAR。

【請求項71】

シグナルペプチドをさらに含む、請求項59～70のいずれか一つに記載のCAR。

【請求項72】

シグナルペプチドがヒトCD28由来のシグナルペプチドであり、好ましくは、ヒトCD28由来のシグナルペプチドがSEQ ID NO: 110を含む、請求項71に記載のCAR。

【請求項73】

SEQ ID NO: 119によってコードされる、請求項59～72のいずれか一つに記載のCAR。

【請求項74】

sdAbが、SEQ ID NO: 86 (hCD221ug-36)、SEQ ID NO: 83 (hCD221ug-10)、SEQ ID NO: 87 (hCD221ug-61)、SEQ ID NO: 82 (hCD221ug-6)、SEQ ID NO: 88 (hCD221ug-74)、SEQ ID NO: 85 (hCD221ug-14)、SEQ ID NO: 102 (hCD22pos-33)、またはSEQ ID NO: 84 (hCD221ug-13)を含む、請求項58～72のいずれか一つに記載のCAR。

【請求項75】

VHH sdAbが、

SEQ ID NO: 4に記載のCDR1アミノ酸配列、

SEQ ID NO: 5に記載のCDR2アミノ酸配列、および

SEQ ID NO: 6に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-10)

を含む、請求項59～72のいずれか一つに記載のCAR。

【請求項76】

10

20

30

40

50

VHH sdAbが、

SEQ ID NO: 13に記載のCDR1アミノ酸配列、

SEQ ID NO: 14に記載のCDR2アミノ酸配列、および

SEQ ID NO: 15に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-36)

を含む、請求項59～72のいずれか一つに記載のCAR。

【請求項77】

VHH sdAbが、

SEQ ID NO: 19に記載のCDR1アミノ酸配列、

SEQ ID NO: 20に記載のCDR2アミノ酸配列、および

SEQ ID NO: 21に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-74)

を含む、請求項59～72のいずれか一つに記載のCAR。

【請求項78】

VHH sdAbが、

SEQ ID NO: 61に記載のCDR1アミノ酸配列、

SEQ ID NO: 62に記載のCDR2アミノ酸配列、および

SEQ ID NO: 63に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221pas-33)

を含む、請求項59～72のいずれか一つに記載のCAR。

【請求項79】

VHH sdAbが、

SEQ ID NO: 1に記載のCDR1アミノ酸配列、

SEQ ID NO: 2に記載のCDR2アミノ酸配列、および

SEQ ID NO: 3に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-6)

を含む、請求項59～72のいずれか一つに記載のCAR。

【請求項80】

CD22結合ドメインに対してN末端またはC末端に位置しかつアミノ酸リンカーによってCD22結合ドメインに連結された、追加の結合ドメインをさらに含む、請求項59～79のいずれか一つに記載のCAR。

【請求項81】

追加の結合ドメインがCD22に結合する、請求項80に記載のCAR。

【請求項82】

追加の結合ドメインが、CD22結合ドメインのsdAbとは異なる第2のsdAbを含む、請求項81に記載のCAR。

【請求項83】

第2のsdAbが、CD22結合ドメインのsdAbと比較して、CD22の異なるエピトープに結合する、請求項82に記載のCAR。

【請求項84】

追加の結合ドメインが、CD22結合ドメインの同じCDR1、CDR2、およびCDR3 sdAbを含む第2のsdAbを含み、好ましくは第2のsdAbがCD22結合ドメインのsdAbと同一である、請求項81に記載のCAR。

【請求項85】

追加の結合ドメインがCD22とは異なる分子に結合する、請求項80に記載のCAR。

【請求項86】

追加の結合ドメインが第2のsdAbを含む、請求項80に記載のCAR。

【請求項87】

CD22と異なる分子とCD22とが同じ標的細胞によって発現される、請求項85または86に記載のCAR。

【請求項88】

請求項59～87のいずれか一つに記載のCARをコードする組換え核酸分子。

【請求項89】

請求項88に記載の組換え核酸分子を含むベクター。

10

20

30

40

50

- 【請求項 90】
ウイルスベクターである、請求項89に記載のベクター。
- 【請求項 91】
ウイルスベクターがレンチウイルスベクターである、請求項90に記載のベクター。
- 【請求項 92】
請求項88に記載の組換え核酸分子を含む、組換えウイルス粒子。
- 【請求項 93】
組換えレンチウイルス粒子である、請求項92に記載の組換えウイルス粒子。
- 【請求項 94】
請求項88に記載の組換え核酸分子を含む細胞。 10
- 【請求項 95】
請求項59～87のいずれか一つに記載のCARを細胞表面膜に発現している、遺伝子改変細胞。
- 【請求項 96】
免疫細胞である、請求項95に記載の遺伝子改変細胞。
- 【請求項 97】
免疫細胞がTリンパ球に由来する、請求項96に記載の遺伝子改変細胞。
- 【請求項 98】
がんまたは自己免疫疾患を治療するための、請求項95～97のいずれか一つに記載の遺伝子改変細胞の使用。 20
- 【請求項 99】
がんが血液学的悪性腫瘍である、請求項57または98に記載の使用。
- 【請求項 100】
血液学的悪性腫瘍が、白血病、リンパ腫、または骨髓異形成症候群である、請求項99に記載の使用。
- 【請求項 101】
白血病が、急性骨髄性白血病（AML）、慢性骨髄性白血病（CML）、急性リンパ性白血病（ALL）、および慢性リンパ性白血病（CLL）からなる群より選択される、請求項100に記載の使用。
- 【請求項 102】
リンパ腫が、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、小細胞濾胞性リンパ腫、および大細胞濾胞性リンパ腫からなる群より選択される、請求項100に記載の使用。 30
- 【請求項 103】
対象におけるがんの治療方法であって、請求項92～97のいずれか一つに記載の遺伝子改変細胞を対象に投与することを含む、方法。
- 【請求項 104】
がんが血液学的悪性腫瘍である、請求項58または103に記載の方法。
- 【請求項 105】
血液学的悪性腫瘍が、白血病、リンパ腫、または骨髓異形成症候群である、請求項104に記載の方法。 40
- 【請求項 106】
白血病が、急性リンパ性白血病（ALL）または慢性リンパ性白血病（CLL）である、請求項105に記載の方法。
- 【請求項 107】
リンパ腫が、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、小細胞濾胞性リンパ腫、および大細胞濾胞性リンパ腫からなる群より選択される、請求項105に記載の方法。
- 【請求項 108】
- 第1の抗原結合部分； 50

- ヒトCD8由来のポリペプチドヒンジを含むアミノ酸リンカー；および
- 第2の抗原結合部分；

を含む多価抗体。

【請求項109】

ヒトCD8由来のポリペプチドヒンジがSEQ ID NO: 112を含む、請求項108に記載の多価抗体。

【請求項110】

アミノ酸リンカーが、ヒトCD8由来のポリペプチドヒンジのN末端に少なくとも1つのG4Sと、ヒトCD8由来のポリペプチドヒンジのC末端に少なくとも1つのG4Sをさらに含む、請求項108または109に記載の多価抗体。

【請求項111】

アミノ酸リンカーが、少なくとも47残基の長さであり、好ましくは少なくとも52残基の長さ、好ましくは少なくとも57残基の長さ、より好ましくは少なくとも62残基の長さ、さらにより好ましくは少なくとも67残基の長さである、請求項108～110のいずれか一つに記載の多価抗体。

【請求項112】

アミノ酸リンカーが、N末端からC末端の方向に、SEQ ID NO: 111、112、および118を含む、請求項108～111のいずれか一つに記載の多価抗体。

【請求項113】

第1の抗原結合部分がヒトCD22に特異的に結合する、請求項108～112のいずれか一つに記載の多価抗体。

【請求項114】

第1の抗原結合部分が、V_HH、V_{NAR}、またはscVFである、請求項113に記載の多価抗体。

【請求項115】

第1の抗原結合部分が、請求項1～27のいずれか一つに記載のsdAbである、請求項108～111のいずれか一つに記載の多価抗体。

【請求項116】

第2の抗原結合部分が、免疫細胞の細胞表面マーカーに特異的に結合する、請求項108～115のいずれか一つに記載の多価抗体。

【請求項117】

免疫細胞の細胞表面マーカーがT細胞マーカーを含む、請求項116に記載の多価抗体。

【請求項118】

T細胞マーカーがヒトCD3を含む、請求項117に記載の多価抗体。

【請求項119】

第2の抗原結合部分が、V_HH、V_{NAR}、またはscVFである、請求項108～118のいずれか一つに記載の多価抗体。

【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、2020年7月29日に出願された「ANTI-CD22 SINGLE DOMAIN ANTIBODIES AND THERAPEUTIC CONSTRUCTS」（抗CD22シングルドメイン抗体および治療用コンストラクト）と題する米国仮出願第63/058,203号の優先権の恩典を主張するものであり、その内容は参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

分野

本開示は、一般に、抗CD22抗体に関する。さらに特定すると、本開示は、抗CD22シングルドメイン抗体に関する。

【背景技術】

【0003】

背景

がんは、公衆衛生上の主要な問題であり、世界における死因の第2位を占めている。従来のがん治療としては、手術、放射線および化学療法が挙げられる。これらは、一部のがん、特に早期に診断されたがんの治療において、ある程度の成功を収めている。しかし、多くの侵襲性の強いがんには効果的な治療法が存在していない。最近の技術革新からは、免疫療法（患者自身の免疫系を刺激または回復させて、がんと闘うようにすること）が、治療の困難な侵襲性がんを含む多くのがんに対して、強力かつ長期的な奏効（応答）をもたらし得ることが示唆されている。

【0004】

免疫療法は、血液がんの治療において驚異的な成功を収めており、こうした療法の多くの形態が規制当局の承認を受けることにつながった；治療用抗体（すなわち、CD20、CD30、CD33、およびCD52を標的とする複数の承認済みモノクローナル抗体）、CD22およびCD33を標的とする抗体-薬物コンジュゲート、ならびに二重特異性T細胞エンゲージャー（B細胞上のCD19を標的とするブリナツモマブ）などの多価抗体。

【0005】

このような抗体はまた、治療用コンストラクトにおいても使用されてきた。

【0006】

例えば、二重特異性T細胞エンゲージャー、ならびに単鎖可変フラグメント（scFv）を組み込んだ二重特異性および三重特異性キラー細胞エンゲージャー（BiKEおよびTriKE）は、がん細胞を標的とするように宿主の免疫系を誘導するために開発されてきた。

【0007】

キメラ抗原受容体（CAR）コンストラクトは、T細胞活性化の複数の面（facet）を単一のタンパク質にまとめるために作製されてきた。これらの分子は、細胞外抗原認識ドメインを細胞内シグナル伝達ドメインに結び付けており、抗原が結合したときにT細胞を活性化させる。

【0008】

キメラ抗原受容体（CAR）改変型の免疫細胞療法は、がん細胞の細胞表面タンパク質を特異的に標的とする抗体の単一または複数の抗原結合ドメインを、免疫細胞活性化ドメインと組み合わせ、標的抗原をもつ特定の細胞を探し出して殺傷する「武装化」（armed）免疫細胞を作り出す、がん免疫療法の新たに出現した形態である。CAR改変型T細胞療法（CAR-T）は、不治で侵襲性の強い形態のB細胞白血病およびリンパ腫に苦しむ患者に前例のない奏効をもたらし、CD19標的CAR-T細胞製品、例えばチサゲンレクルユーセル（Tisagenlecleucel）（キムリア（Kymriah：登録商標））およびアキシカブタゲン シロルユーセル（axicabtagene ciloleucel）（イエスカルタ（Yescarta：登録商標））のFDAおよびカナダ保健省による承認につながった；これらの製品は、再発または難治性のB細胞性ALLを有する小児・若年成人患者、特定不能のびまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）、原発性縦隔大細胞型B細胞リンパ腫、高悪性度B細胞リンパ腫、および濾胞性リンパ腫から生じたDLBCLなどの、再発または難治性のB細胞型B細胞リンパ腫を有する成人患者の治療に使用される。これらのCD19標的CAR療法は臨床的に大きな価値があるものの、奏効は必ずしも長く続くわけではなく、CAR-T後の再発が依然として問題となっており、CAR-T後の再発症例の約3分の1で白血病細胞上のCD19抗原の明らかな消失が生じている。CD19以外の白血病抗原を標的とする新しいCAR受容体の開発は、活発に研究されている分野であり、CD22やCD20などの同様のB細胞限定抗原がCAR-T療法の代替標的として大いに期待されている。さらに、CD22標的CAR-T受容体のシグナル伝達特性の分子最適化は、治療奏効率の向上につながる可能性が高く、また、異なるB細胞限定抗原を標的とする複数のCAR治療薬の使用は、治療成果を向上させるのに有効な戦略であることが示されている。

【0009】

例えば、現在、再発性および化学療法抵抗性のB細胞悪性腫瘍（様々な形態の白血病お

10

20

30

40

50

よびリンパ腫を含む疾患群)の患者は、CD19標的CAR-T療法の候補である。CAR-T療法の具体的な臨床応用によって奏効(応答)統計は異なってくるが、平均して成人患者の半数以上がCD19を標的とした治療後に再発している。

【0010】

したがって、がんに関連する治療標的に対して親和性がある免疫応答誘導性分子を提供することが望まれている。

【発明の概要】

【0011】

概要

本開示の目的は、以前のアプローチの少なくとも1つの欠点を回避または軽減することである。

【0012】

一態様では、ヒトCD22に特異的に結合する、単離されたシングルドメイン抗体(sdAb)が提供され、そのsdAbは、以下の配列を含む：

a) CDR1アミノ酸配列GX₁X₂X₃DX₄YX₅(SEQ ID NO: 126)、ここで、

X₁は、FまたはVであり、

X₂は、TまたはSであり、

X₃は、L、F、またはSであり、

X₄は、Y、D、またはSであり、

X₅は、VまたはAである；

CDR2アミノ酸配列X₆X₇X₈X₉X₁₀GX₁₁T(SEQ ID NO: 127)、ここで、

X₆は、IまたはMであり、

X₇は、T、R、G、またはSであり、

X₈は、SまたはNであり、

X₉は、DまたはSであり、

X₁₀は、Dであるか、または存在せず、

X₁₁は、VまたはAである；および

CDR3アミノ酸配列AVDKPFYDGGX₁₂X₁₃YTCPVDFX₁₄S(SEQ ID NO: 128)、ここで、

X₁₂は、I、N、Y、またはSであり、

X₁₃は、Q、Y、R、またはLであり、

X₁₄は、DまたはGである；

b) CDR1アミノ酸配列GSX₁FX₂X₃X₄X₅V(SEQ ID NO: 129)、ここで、

X₁は、IまたはTであり、

X₂は、Rであるか、または存在せず、

X₃は、R、S、またはIであり、

X₄は、I、S、またはTであり、

X₅は、A、S、またはTである；

CDR2アミノ酸配列ITSX₆GX₇X₈(SEQ ID NO: 130)、ここで、

X₆は、G、S、またはAであり、

X₇は、E、D、またはSであり、

X₈は、TまたはSである；および

CDR3アミノ酸配列NAX₉X₁₀GX₁₁X₁₂X₁₃X₁₄(SEQ ID NO: 131)、ここで、

X₉は、KまたはQであり、

X₁₀は、WまたはYであり、

X₁₁は、Q、R、またはGであり、

X₁₂は、Y、D、またはRであり、

X₁₃は、EまたはSであり、

X₁₄は、Y、D、またはHである；

c) CDR1アミノ酸配列GRIX₁RSYV(SEQ ID NO: 132)、ここで、

- X_1 は、FまたはSである；
 CDR2アミノ酸配列IG X_2 SDT (SEQ ID NO: 133)、ここで、
 X_2 は、WまたはCである；および
 CDR3アミノ酸配列AX X_3 X X_4 SPPYGPQRDEFX X_5 Y (SEQ ID NO: 134)、ここで、
 X_3 は、AまたはEであり、
 X_4 は、NまたはYであり、
 X_5 は、GまたはDである；
- d) CDR1アミノ酸配列GX X_1 TX X_2 SVYX X_3 (SEQ ID NO: 135)、ここで、
 X_1 は、RまたはGであり、
 X_2 は、SまたはFであり、
 X_3 は、GまたはTである；
 CDR2アミノ酸配列X X_4 X X_5 X X_6 SX X_7 GX X_8 T (SEQ ID NO: 136)、ここで、
 X_4 は、MまたはIであり、
 X_5 は、SまたはRであり、
 X_6 は、WまたはGであり、
 X_7 は、Gであるか、または存在せず、
 X_8 は、PまたはGである；および
 CDR3アミノ酸配列AVRIRRTLX X_9 EPLTKETLYDY (SEQ ID NO: 137)、ここで、
 X_9 は、LまたはVである；
- e) SEQ ID NO: 49に記載のCDR1アミノ酸配列、
 SEQ ID NO: 50に記載のCDR2アミノ酸配列、および
 SEQ ID NO: 51に記載のCDR3アミノ酸配列；
- f) SEQ ID NO: 4に記載のCDR1アミノ酸配列、
 SEQ ID NO: 5に記載のCDR2アミノ酸配列、および
 SEQ ID NO: 6に記載のCDR3アミノ酸配列；
- g) SEQ ID NO: 7に記載のCDR1アミノ酸配列、
 SEQ ID NO: 8に記載のCDR2アミノ酸配列、および
 SEQ ID NO: 9に記載のCDR3アミノ酸配列；
- h) SEQ ID NO: 13に記載のCDR1アミノ酸配列、
 SEQ ID NO: 14に記載のCDR2アミノ酸配列、および
 SEQ ID NO: 15に記載のCDR3アミノ酸配列；
- i) SEQ ID NO: 16に記載のCDR1アミノ酸配列、
 SEQ ID NO: 17に記載のCDR2アミノ酸配列、および
 SEQ ID NO: 18に記載のCDR3アミノ酸配列；
- j) SEQ ID NO: 40に記載のCDR1アミノ酸配列、
 SEQ ID NO: 41に記載のCDR2アミノ酸配列、および
 SEQ ID NO: 42に記載のCDR3アミノ酸配列；
- k) SEQ ID NO: 55に記載のCDR1アミノ酸配列、
 SEQ ID NO: 56に記載のCDR2アミノ酸配列、および
 SEQ ID NO: 57に記載のCDR3アミノ酸配列；
- l) SEQ ID NO: 64に記載のCDR1アミノ酸配列、
 SEQ ID NO: 65に記載のCDR2アミノ酸配列、および
 SEQ ID NO: 66に記載のCDR3アミノ酸配列；または
- m) SEQ ID NO: 70に記載のCDR1アミノ酸配列、
 SEQ ID NO: 71に記載のCDR2アミノ酸配列、および
 SEQ ID NO: 72に記載のCDR3アミノ酸配列。

【0013】

上記において：

グループa)は、本明細書でhCD221ug-80、hCD22100ng-2、hCD221ug-74、hCD22100ng-66、hCD221ug-6、hCD22pas-10、hCD22pass-33と呼ばれる抗体

により定義されるコンセンサス配列を提供する；

グループb)は、本明細書でhCD221ug-77、hCD221ug-87、hCD221ug-75、hCD221ug-93、hCD22pas-82、およびhCD22pas-23と呼ばれる抗体により定義されるコンセンサス配列を提供する；

グループc)は、本明細書でhCD22pas-32、hCD221ug-14、およびhCD22pas-55と呼ばれる抗体により定義されるコンセンサス配列を提供する；

グループd)は、本明細書でhCD22pas-79およびhCD22pas-72と呼ばれる抗体により定義されるコンセンサス配列を提供する；

グループf)は、hCD22pas-16と呼ばれる抗体からのCDRにより定義される；

グループf)は、hCD221ug-10と呼ばれる抗体からのCDRにより定義される；

グループg)は、hCD221ug-13と呼ばれる抗体からのCDRにより定義される；

グループh)は、hCD221ug-36と呼ばれる抗体からのCDRにより定義される；

グループi)は、hCD221ug-61と呼ばれる抗体からのCDRにより定義される；

グループj)は、hCD22100ug-62と呼ばれる抗体からのCDRにより定義される；

グループk)は、hCD22pas-24と呼ばれる抗体からのCDRにより定義される；

グループl)は、hCD22pas-48と呼ばれる抗体からのCDRにより定義される；および

グループm)は、hCD22pas-64と呼ばれる抗体からのCDRにより定義される。

【0014】

別の態様では、ヒトCD22に特異的に結合する、単離されたVHHシングルドメイン抗体 (sdAb) が提供され、そのsdAbは、以下の配列を含む：

A)

SEQ ID NO: 1に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 2に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 3に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-6)；

SEQ ID NO: 4に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 5に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 6に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-10)；

SEQ ID NO: 7に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 8に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 9に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-13)；

SEQ ID NO: 10に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 11に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 12に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-14)；

SEQ ID NO: 13に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 14に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 15に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-36)；

SEQ ID NO: 16に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 17に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 18に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-61)；

SEQ ID NO: 19に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 20に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 21に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-74)；

SEQ ID NO: 22に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 23に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 24に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-75)；

SEQ ID NO: 25に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 26に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 27に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-77)；

SEQ ID NO: 28に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 29に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 30に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-80)；

SEQ ID NO: 31に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 32に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 33に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-87)；

SEQ ID NO: 34に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 35に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 36に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-93)；

SEQ ID NO: 37に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 38に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 39に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22100ug-2)；

SEQ ID NO: 40に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 41に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 42に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22100ug-62)；

SEQ ID NO: 43に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 44に記載のCDR2アミ

10

20

30

40

50

ノ酸配列、およびSEQ ID NO: 45に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22100ug-66) ;
SEQ ID NO: 46に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 47に記載のCDR2アミ
ノ酸配列、およびSEQ ID NO: 48に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-10) ;
SEQ ID NO: 49に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 50に記載のCDR2アミ
ノ酸配列、およびSEQ ID NO: 51に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-16) ;
SEQ ID NO: 52に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 53に記載のCDR2アミ
ノ酸配列、およびSEQ ID NO: 54に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-23) ;
SEQ ID NO: 55に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 56に記載のCDR2アミ
ノ酸配列、およびSEQ ID NO: 57に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-24) ;
SEQ ID NO: 58に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 59に記載のCDR2アミ
ノ酸配列、およびSEQ ID NO: 60に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-32) ;
SEQ ID NO: 61に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 62に記載のCDR2アミ
ノ酸配列、およびSEQ ID NO: 63に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-33) ;
SEQ ID NO: 64に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 65に記載のCDR2アミ
ノ酸配列、およびSEQ ID NO: 66に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-48) ;
SEQ ID NO: 67に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 68に記載のCDR2アミ
ノ酸配列、およびSEQ ID NO: 69に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-55) ;
SEQ ID NO: 70に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 71に記載のCDR2アミ
ノ酸配列、およびSEQ ID NO: 72に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-64) ;
SEQ ID NO: 73に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 74に記載のCDR2アミ
ノ酸配列、およびSEQ ID NO: 75に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-72) ;
SEQ ID NO: 76に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 77に記載のCDR2アミ
ノ酸配列、およびSEQ ID NO: 78に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-79) ; ま
たは

10

20

SEQ ID NO: 79に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 80に記載のCDR2アミ
ノ酸配列、およびSEQ ID NO: 81に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-82) 。

【0015】

別の態様では、ヒトCD22に特異的に結合する、単離されたVHHシングルドメイン抗
体 (sdAb) が提供され、そのsdAbは、以下の配列を含む：

A)

SEQ ID NO: 1に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 2に記載のCDR2アミノ酸
配列、およびSEQ ID NO: 3に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-6) ;
SEQ ID NO: 4に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 5に記載のCDR2アミノ酸
配列、およびSEQ ID NO: 6に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-10) ;
SEQ ID NO: 7に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 8に記載のCDR2アミノ酸
配列、およびSEQ ID NO: 9に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-13) ;
SEQ ID NO: 10に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 11に記載のCDR2アミ
ノ酸配列、およびSEQ ID NO: 12に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-14) ;
SEQ ID NO: 13に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 14に記載のCDR2アミ
ノ酸配列、およびSEQ ID NO: 15に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-36) ;
SEQ ID NO: 16に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 17に記載のCDR2アミ
ノ酸配列、およびSEQ ID NO: 18に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-61) ;
SEQ ID NO: 19に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 20に記載のCDR2アミ
ノ酸配列、およびSEQ ID NO: 21に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-74) ;
SEQ ID NO: 22に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 23に記載のCDR2アミ
ノ酸配列、およびSEQ ID NO: 24に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-75) ;
SEQ ID NO: 25に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 26に記載のCDR2アミ
ノ酸配列、およびSEQ ID NO: 27に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-77) ;
SEQ ID NO: 28に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 29に記載のCDR2アミ
ノ酸配列、およびSEQ ID NO: 30に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-80) ;

30

40

50

SEQ ID NO: 31に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 32に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 33に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-87) ;
SEQ ID NO: 34に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 35に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 36に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-93) ;
SEQ ID NO: 37に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 38に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 39に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22100ug-2) ;
SEQ ID NO: 40に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 41に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 42に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22100ug-62) ;
SEQ ID NO: 43に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 44に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 45に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22100ug-66) ;
SEQ ID NO: 46に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 47に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 48に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-10) ;
SEQ ID NO: 49に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 50に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 51に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-16) ;
SEQ ID NO: 52に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 53に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 54に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-23) ;
SEQ ID NO: 55に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 56に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 57に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-24) ;
SEQ ID NO: 58に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 59に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 60に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-32) ;
SEQ ID NO: 61に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 62に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 63に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-33) ;
SEQ ID NO: 64に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 65に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 66に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-48) ;
SEQ ID NO: 67に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 68に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 69に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-55) ;
SEQ ID NO: 70に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 71に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 72に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-64) ;
SEQ ID NO: 73に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 74に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 75に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-72) ;
SEQ ID NO: 76に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 77に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 78に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-79) ; または

SEQ ID NO: 79に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 80に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 81に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-82) ; あるいは

B)

パートA)のi)~xxviii) のいずれか1つにおいて定義されたCDR1、CDR2、およびCDR3配列と少なくとも80% 同一であるCDR1、CDR2、およびCDR3アミノ酸配列。

【0016】

別の態様では、ヒトCD22に特異的に結合する、単離されたVHHシングルドメイン抗体 (sdAb) が提供され、そのsdAbは、以下の配列を含む：

A)

SEQ ID NO: 3に記載のCDR3アミノ酸配列 ;
SEQ ID NO: 6に記載のCDR3アミノ酸配列 ;
SEQ ID NO: 9に記載のCDR3アミノ酸配列 ;
SEQ ID NO: 12に記載のCDR3アミノ酸配列 ;
SEQ ID NO: 15に記載のCDR3アミノ酸配列 ;
SEQ ID NO: 18に記載のCDR3アミノ酸配列 ;
SEQ ID NO: 21に記載のCDR3アミノ酸配列 ;

SEQ ID NO: 24に記載のCDR3アミノ酸配列；
SEQ ID NO: 27に記載のCDR3アミノ酸配列；
SEQ ID NO: 30に記載のCDR3アミノ酸配列；
SEQ ID NO: 33に記載のCDR3アミノ酸配列；
SEQ ID NO: 36に記載のCDR3アミノ酸配列；
SEQ ID NO: 39に記載のCDR3アミノ酸配列；
SEQ ID NO: 42に記載のCDR3アミノ酸配列；
SEQ ID NO: 45に記載のCDR3アミノ酸配列；
SEQ ID NO: 48に記載のCDR3アミノ酸配列；
SEQ ID NO: 51に記載のCDR3アミノ酸配列；
SEQ ID NO: 54に記載のCDR3アミノ酸配列；
SEQ ID NO: 57に記載のCDR3アミノ酸配列；
SEQ ID NO: 60に記載のCDR3アミノ酸配列；
SEQ ID NO: 63に記載のCDR3アミノ酸配列；
SEQ ID NO: 66に記載のCDR3アミノ酸配列；
SEQ ID NO: 69に記載のCDR3アミノ酸配列；
SEQ ID NO: 72に記載のCDR3アミノ酸配列；
SEQ ID NO: 75に記載のCDR3アミノ酸配列；
SEQ ID NO: 79に記載のCDR3アミノ酸配列；または
SEQ ID NO: 81に記載のCDR3アミノ酸配列。

10

20

【0017】

一実施形態では、単離されたsdAbは、以下の配列を含む：

SEQ ID NO: 1に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 3に記載のCDR3アミノ酸配列；
SEQ ID NO: 4に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 6に記載のCDR3アミノ酸配列；
SEQ ID NO: 7に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 9に記載のCDR3アミノ酸配列；
SEQ ID NO: 10に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 12に記載のCDR3アミノ酸配列；
SEQ ID NO: 13に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 15に記載のCDR3アミノ酸配列；
SEQ ID NO: 16に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 18に記載のCDR3アミノ酸配列；
SEQ ID NO: 19に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 21に記載のCDR3アミノ酸配列；
SEQ ID NO: 22に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 24に記載のCDR3アミノ酸配列；
SEQ ID NO: 25に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 27に記載のCDR3アミノ酸配列；
SEQ ID NO: 28に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 30に記載のCDR3アミノ酸配列；
SEQ ID NO: 31に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 33に記載のCDR3アミノ酸配列；
SEQ ID NO: 34に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 36に記載のCDR3アミノ酸配列；
SEQ ID NO: 37に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 39に記載のCDR3アミノ酸配列；
SEQ ID NO: 40に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 42に記載のCDR3アミノ酸配列；

30

40

50

SEQ ID NO: 43に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 45に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 46に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 48に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 49に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 51に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 52に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 54に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 55に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 57に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 58に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 60に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 61に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 63に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 64に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 66に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 67に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 69に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 70に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 72に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 73に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 75に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 76に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 78に記載のCDR3アミノ酸配列；または

SEQ ID NO: 79に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 81に記載のCDR3アミノ酸配列。

【0018】

一態様では、CD22への特異的結合について本明細書に記載の単離されたsdAbと競合するVHHシングルドメイン抗体（sdAb）が提供される。

【0019】

一態様では、本明細書で定義されるsdAbを含む組換えポリペプチドが提供される。

【0020】

さらなる態様では、本開示は、カーゴ（cargo）分子に連結された本明細書で定義される抗CD22 sdAbを提供する。

【0021】

一態様では、本明細書で定義されるsdAb、組換えポリペプチド、またはV_HH：F_c融合体をコードする組換え核酸分子が提供される。

【0022】

一態様では、本明細書で定義されるsdAb、またはそのようなsdAbを含むポリペプチドを、許容される賦形剤、希釈剤または担体と一緒に含む組成物が提供される。

【0023】

一態様では、がんまたは自己免疫疾患を治療するための、本明細書で定義されるsdAbの、または本明細書で定義される1つ以上のV_HH：F_c融合体を含む抗体の使用が提供される。

【0024】

一態様では、がんまたは自己免疫疾患の治療用の医薬を調製するための、本明細書で定義されるsdAbの、または本明細書で定義される1つ以上のV_HH：F_c融合体を含む抗体の使用が提供される。

【0025】

一態様では、がんまたは自己免疫疾患の治療に使用するための、本明細書で定義される

10

20

30

40

50

sdAb、または本明細書で定義される1つ以上のV_HH:F_C融合体を含む抗体が提供される。

【0026】

一態様では、本明細書で定義されるsdAb、または本明細書で定義される1つ以上のV_HH:F_C融合体を含む抗体を対象に投与することを含む、対象におけるがんまたは自己免疫疾患の治療方法が提供される。

【0027】

一態様では、本明細書で定義されるsdAbを含む多価抗体が提供される。

【0028】

一態様では、第1の抗原結合部分、ヒトCD8由来のポリペプチドヒンジを含むアミノ酸リンカー、および第2の抗原結合部分を含む多価抗体が提供される：。

【0029】

一態様では、本明細書で定義される多価抗体をコードする組換え核酸分子が提供される。

【0030】

一態様では、本明細書で定義される多価抗体を、許容される賦形剤、希釈剤または担体と一緒に含む組成物が提供される。

【0031】

一態様では、がんまたは自己免疫疾患を治療するための、本明細書で定義される多価抗体の使用が提供される。一実施形態では、がんは、血液学的悪性腫瘍である。

【0032】

一態様では、がんまたは自己免疫疾患の治療用の医薬を調製するための、本明細書で定義される多価抗体の使用が提供される。

【0033】

一態様では、がんまたは自己免疫疾患の治療に使用するための、本明細書で定義される多価抗体が提供される。一実施形態では、がんは、血液学的悪性腫瘍である。

【0034】

一態様では、本明細書で定義される多価抗体を対象に投与することを含む、対象におけるがんまたは自己免疫疾患の治療方法が提供される。

【0035】

一態様では、本明細書で定義されるV_HH sdAbを含む、ヒトCD22に結合するキメラ抗体受容体(CAR)が提供される。

【0036】

一態様では、本明細書で定義されるCARをコードする組換え核酸分子が提供される。

【0037】

一態様では、本明細書で定義される組換え核酸分子を含むベクターが提供される。

【0038】

一態様では、本明細書で定義される組換え核酸を含む組換えウイルス粒子が提供される。

【0039】

一態様では、本明細書で定義される組換え核酸分子を含む細胞が提供される。

【0040】

一態様では、CAR-Tのための細胞を作製するための、本明細書に記載の核酸、ベクター、またはウイルス粒子の使用が提供される。

【0041】

一態様では、本明細書に記載のウイルス粒子をT細胞に接触させることを含む、CAR-Tのための細胞の作製方法が提供される。

【0042】

一態様では、本明細書に記載の核酸またはベクターをT細胞に導入することを含む、CAR-Tのための細胞の作製方法が提供される。

【0043】

一態様では、がんまたは自己免疫疾患を治療するための、本明細書に記載のCARまたは遺伝子改変細胞 (engineered cell) の使用が提供される。

【0044】

一態様では、がんまたは自己免疫疾患の治療用の医薬を調製するための、本明細書に記載のCARまたは遺伝子改変細胞の使用が提供される。

【0045】

一態様では、がんまたは自己免疫疾患の治療に使用するための、本明細書に記載のCARまたは遺伝子改変細胞が提供される。

【0046】

一態様では、本明細書に記載の遺伝子改変細胞を対象に投与することを含む、対象におけるがんまたは自己免疫疾患の治療方法が提供される。

【0047】

本開示の他の態様および特徴は、添付の図面と併せて、具体的な実施形態の以下の説明を検討することにより、当業者には明らかになるであろう。

【0048】

次に、添付の図面を参照しながら、本開示の実施形態を、単なる例として、説明することにする。

【図面の簡単な説明】

【0049】

【図1】図1は、染色体19q13.12に位置するCD22遺伝子によりコードされるヒトCD22分子の構造を示す。

【図2】図2は、2つの異なる発現バッチからのIMAC精製済みCD22細胞外ドメイン (CD22-ECD) の、非還元および還元条件下でのSDS-PAGEを示す。

【図3】図3は、CD22-ECDに対する最終採血からのラマ重鎖免疫応答を、陰性対照としての免疫前血清と共に示す。

【図4A】図4Aは、27種のVHHのアミノ酸配列のアラインメントの最初の部分を示す。CDR間で識別可能な配列類似性を有するCDR配列VHHがボックスで囲まれている。

【図4B】図4Bは、図4Aから続く、27種のVHHの配列アラインメントの第2の部分を示す。

【図5】図5は、TG1大腸菌 (E. coli) で発現させ、IMACで精製した14種の抗CD22 VHH抗体のSDS-PAGEを示す。

【図6】図6は、CD22を発現する腫瘍細胞Raji (左のパネル)、Ramos細胞 (中央のパネル)、またはCRISPR遺伝子ノックアウトによりCD22発現を欠くように操作されたRamos細胞 (右のパネル) へのビオチン結合抗CD22 VHHの結合を示す。

【図7】図7は、表5および6のエピトープマッピング/ビニングの結果による、細胞表面位置に対するCD22エクストドメインのサブドメインへの、実施例1に記載のsdAbの知覚的結合 (perceptive binding) を示す概略図である。

【図8】図8は、Jurkat細胞を様々なCD22シングルドメイン抗体CARプラスミドで一過性にエレクトロポレーションし、単独で培養した、またはCD22陽性 (Ramos) もしくはCD22陰性 (Ramos-CD22ko) 細胞株と共培養した場合の、CAR-Jurkatアッセイの結果を示す。

【図9】図9は、ドナー血液由来の初代T細胞に様々なCARコンストラクトを導入し、標的非依存性増殖を調べた、CAR-Tトニック (tonic) 活性化アッセイの結果を示す。

【図10】図10は、様々なCD22シングルドメイン抗体または対照 (FMC63) CARコンストラクトを導入したドナー血液由来T細胞を用いて実施した、CAR-T標的の特異的活性化アッセイの結果を示す。

【図11】図11は、本明細書に記載される様々なCD22シングルドメイン抗体または対照 (FMC63) CARコンストラクトを導入したドナー血液由来T細胞を用いて実施した、CAR-T抗原特異的な標的細胞成長抑制アッセイの結果を示す。モックは、同様の処理条

10

20

30

40

50

件にさらされた、CAR発現のない未改変のドナー由来T細胞を指す。CAR-T細胞を、CD22+標的細胞（左のグラフ - Raji標的、中央のグラフ - Ramos標的）、またはCD22陰性標的細胞（右のグラフ - Ramos-CD22ko標的）と共培養し、ライブ（live）蛍光顕微鏡で観察した。

【図12】図12は、本明細書に記載されるように作製された様々なCD22シングルドメイン抗体CARコンストラクトを導入したドナー血液由来T細胞を用いて実施した、CAR-T標的的特異的連続殺傷アッセイの結果を示す。モックは、同様の処理条件にさらされた、CAR発現のない未改変のドナー由来T細胞を指す。

【図13】図13は、本明細書に記載されるように2人の別々のドナーから作製されたシングルドメイン抗体標的CAR-T細胞についての一貫性解析（consistency analysis）およびベンチマークCD22標的scFv CARとの比較の結果を示す。

【図14】図14は、放射性クロム（ ^{51}Cr ）放出アッセイを用いた直接腫瘍溶解測定の結果を示す。

【図15】図15は、クロム放出アッセイを用いた、異なるエフェクター：標的比でのCAR-T細胞により誘発された直接腫瘍溶解の結果を示す。

【図16】図16は、CD22担持腫瘍細胞で再刺激した後のCAR-T細胞からのクロム放出アッセイを用いた直接腫瘍溶解測定の結果を示す。

【図17】図17は、in vivoモデルのための実験プロトコルのスキーマを示す。

【図18】図18は、Ramos-Lucを接種し、続いて様々なCAR-T細胞で処置したNSGマウスの生存率分析の結果を示す。

【図19】図19は、Ramos-FLUCを接種し、様々なCAR-T細胞で処置したマウスの腫瘍負荷量（tumor burden）の結果を示す。

【図20】図20は、Ramos-FLUCを接種し、様々なCAR-T細胞で処置したマウスの腫瘍負荷量、総CAR-T細胞集団、および末梢血中の循環CAR-T細胞集団の異なった表現型の結果を示す。

【図21】図21は、CD22特異的シングルドメイン抗体二重特異性T細胞エンゲージータンパク質の分子構造を示す；DNAコンストラクトの5'末端にCD22-sdAb配列があり、その後に様々な組成であり得るリンカー配列が続く、その後にCD3特異的単鎖可変フラグメントが続いている。

【図22】図22は、様々な二重特異性T細胞エンゲージータンパク質を含むHEK293T上清を、Jurkat細胞およびCD22陽性（Ramos）またはCD22陰性（U87vIII）標的細胞を含む共培養物の上に置いた場合の、Jurkat細胞二重特異性T細胞エンゲージータンパク質活性化アッセイの結果を示す。

【図23】図23は、CD22陽性標的細胞（Ramos）と共培養した初代ヒトT細胞を用いた二重特異性T細胞エンゲージータンパク質活性化アッセイの結果を示す。

【図24】図24は、CAR-Tコンストラクトのin vivo研究における処置および試験のタイミングを示す図である。

【図25】図25は、図24に示した処置および試験におけるマウスの生存率を示す。

【図26】図26は、図24の処置および試験においてマウスの末梢血で計数されたCAR-T細胞を示す。

【図27】図27は、最初の腫瘍チャレンジおよびCAR-T処置を行った後のマウスの生存率を示す。

【図28】図28は、再チャレンジ後のマウスの生存率を示す。

【図29】図29は、チャレンジ後の腫瘍成長のグラフを示す。

【図30】図30は、CD22特異的CAR分子を含むマルチバインダー（multi-binder）ドメインの分子構造を示す。

【図31】図31は、Jurkat細胞を、シングルおよびマルチバインダーを含む様々なCARプラスミドで一過性にエレクトロポレーションした場合のCAR-Jurkatアッセイの結果を示す。

【図32】図32は、マルチsdAb含有CARコンストラクトをコードするレンチウイルス

10

20

30

40

50

ベクターを導入したヒト血液由来の初代T細胞を用いた、同様のCAR活性化試験の結果を示す。

【図33】図33は、CD22特異的CAR（左）、BCMA特異的CAR（右）、またはタンデムCD22-BCMA-CAR分子（中央）の分子構造を示す。

【図34】図34は、Jurkat細胞を、様々なCD22、BCMA、またはCD22/BCMA特異的CARプラスミドで一過性にエレクトロポレーションし、単独で培養するか、またはBCMA+/CD22+（Ramos）、BCMA^{low}/CD22+（NALM6）、もしくはBCMA+/CD22-（Ramos-CD22ko）標的細胞株と共培養して、活性化状態（CD69発現）について検討した、CAR-Jurkatアッセイの結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0050】

詳細な説明

一般に、本開示は、優勢なヒトCD22アイソフォームの細胞外ドメインでラマを免疫化することによって作製された抗CD22シングルドメイン抗体（sdAb）を提供する。重鎖レパートリーのライブラリーを構築することにより、この免疫原に特異的なVHH抗体ドメインがファージパニング（phage panning）によって単離された。最初に作製された27種の例示的な抗体は、SEQ ID NO: 1～3、4～6、7～9、10～12、13～15、16～18、19～21、22～24、25～27、28～30、31～33、34～36、37～39、40～42、43～45、46～48、49～51、52～54、55～57、58～60、61～63、64～66、67～69、70～72、73～75、75～78、および79～81にそれぞれ対応するCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含んでなり、関連配列を有する抗体も記載され、包含される。また、該sdAbのいずれか1つを含む多価抗体、例えば、二重特異性T細胞エンゲージャー、二重特異性キラー細胞エンゲージャー（BiKE）、三重特異性キラー細胞エンゲージャー（TriKE）なども提供される。さらに、前述のsdAbのいずれか1つを含むCAR-T療法のためのキメラ抗原受容体（CAR）も記載される。

【0051】

シングルドメイン抗体およびそれらを含むポリペプチド

シングルドメイン抗体（sdAb）は、ナノボディとも呼ばれ、単一の単量体の可変抗体ドメインからなる抗体フラグメントである。sdAbは、ラクダ科（Camelidae）種（ラクダ、ラマ、ヒトコブラクダ、アルパカ、グアナコなど）に見られる重鎖抗体から分子生物学的手法により誘導されたもので、VHHフラグメント（本明細書では「VHH」または「VHH」ともいう）としても知られている。他の例には、サメなどの軟骨魚類に見られる重鎖抗体に由来するV_{NAR}フラグメントが含まれる。sdAbはまた、従来型免疫グロブリンG（IgG）の重鎖/軽鎖から工学的的手法により作製されている。

【0052】

VHH分子は、IgG分子の大きさの約10分の1である。これらの単一ポリペプチドは一般的に非常に安定していて、従来型の抗体および抗体フラグメントでは問題となり得る極端なpH・温度条件にしばしば耐えることができる。さらに、VHHはプロテアーゼの作用に対してより耐性である傾向がある。その上、VHHをin vitroで発現させると、適切に折りたたまれた/機能的なVHHが高収率で得られる傾向がある。さらに、ラクダ科種で生成された重鎖抗体とその改変フラグメント（すなわちVHH）は、抗体ライブラリーの使用を介してin vitroで作製された、または他の哺乳動物の免疫化によって得られた、より大きな従来型抗体および抗体フラグメントでは接近できない、潜在的（cryptic）または隠れたエピトープを認識する可能性がある。

【0053】

一態様では、ヒトCD22に特異的に結合する、単離されたシングルドメイン抗体（sdAb）が提供され、そのsdAbは、以下の配列を含む：

a) CDR1アミノ酸配列GX₁X₂X₃DX₄YX₅（SEQ ID NO: 126）、ここで、

X₁は、FまたはVであり、

X₂は、TまたはSであり、

10

20

30

40

50

X₃は、L、F、またはSであり、
X₄は、Y、D、またはSであり、
X₅は、VまたはAである；

CDR2アミノ酸配列X₆X₇X₈X₉X₁₀GX₁₁T (SEQ ID NO: 127)、ここで、

X₆は、IまたはMであり、
X₇は、T、R、G、またはSであり、
X₈は、SまたはNであり、
X₉は、DまたはSであり、
X₁₀は、Dであるか、または存在せず、
X₁₁は、VまたはAである；および

10

CDR3アミノ酸配列AVDKPFYDGGX₁₂X₁₃YTCPVDFX₁₄S (SEQ ID NO: 128)
)、ここで、

X₁₂は、I、N、Y、またはSであり、
X₁₃は、Q、Y、R、またはLであり、
X₁₄は、DまたはGである；

b) CDR1アミノ酸配列GSX₁FX₂X₃X₄X₅V (SEQ ID NO: 129)、ここで、

X₁は、IまたはTであり、
X₂は、Rであるか、または存在せず、
X₃は、R、S、またはIであり、
X₄は、I、S、またはTであり、
X₅は、A、S、またはTである；

20

CDR2アミノ酸配列ITSX₆GX₇X₈ (SEQ ID NO: 130)、ここで、

X₆は、G、S、またはAであり、
X₇は、E、D、またはSであり、
X₈は、TまたはSである；および

CDR3アミノ酸配列NAX₉X₁₀GX₁₁X₁₂X₁₃X₁₄ (SEQ ID NO: 131)、ここで、

X₉は、KまたはQであり、
X₁₀は、WまたはYであり、
X₁₁は、Q、R、またはGであり、
X₁₂は、Y、D、またはRであり、
X₁₃は、EまたはSであり、
X₁₄は、Y、D、またはHである；

30

c) CDR1アミノ酸配列GRIX₁RSYV (SEQ ID NO: 132)、ここで、

X₁は、FまたはSである；

CDR2アミノ酸配列IGX₂SDT (SEQ ID NO: 133)、ここで、

X₂は、WまたはCである；および

CDR3アミノ酸配列AX₃X₄SPPYGPQRDEFX₅Y (SEQ ID NO: 134)、ここで、

X₃は、AまたはEであり、
X₄は、NまたはYであり、
X₅は、GまたはDである；

40

d) CDR1アミノ酸配列GX₁TX₂SVYX₃ (SEQ ID NO: 135)、ここで、

X₁は、RまたはGであり、
X₂は、SまたはFであり、
X₃は、GまたはTである；

CDR2アミノ酸配列X₄X₅X₆SX₇GX₈T (SEQ ID NO: 136)、ここで、

X₄は、MまたはIであり、
X₅は、SまたはRであり、
X₆は、WまたはGであり、
X₇は、Gであるか、または存在せず、
X₈は、PまたはGである；および

50

CDR3アミノ酸配列AVRIRRTLX₉EPLTKETLYDY (SEQ ID NO: 137)、ここで、
X₉は、LまたはVである；

- e) SEQ ID NO: 49に記載のCDR1アミノ酸配列、
SEQ ID NO: 50に記載のCDR2アミノ酸配列、および
SEQ ID NO: 51に記載のCDR3アミノ酸配列；
- f) SEQ ID NO: 4に記載のCDR1アミノ酸配列、
SEQ ID NO: 5に記載のCDR2アミノ酸配列、および
SEQ ID NO: 6に記載のCDR3アミノ酸配列；
- g) SEQ ID NO: 7に記載のCDR1アミノ酸配列、
SEQ ID NO: 8に記載のCDR2アミノ酸配列、および
SEQ ID NO: 9に記載のCDR3アミノ酸配列；
- h) SEQ ID NO: 13に記載のCDR1アミノ酸配列、
SEQ ID NO: 14に記載のCDR2アミノ酸配列、および
SEQ ID NO: 15に記載のCDR3アミノ酸配列；
- i) SEQ ID NO: 16に記載のCDR1アミノ酸配列、
SEQ ID NO: 17に記載のCDR2アミノ酸配列、および
SEQ ID NO: 18に記載のCDR3アミノ酸配列；
- j) SEQ ID NO: 40に記載のCDR1アミノ酸配列、
SEQ ID NO: 41に記載のCDR2アミノ酸配列、および
SEQ ID NO: 42に記載のCDR3アミノ酸配列；
- k) SEQ ID NO: 55に記載のCDR1アミノ酸配列、
SEQ ID NO: 56に記載のCDR2アミノ酸配列、および
SEQ ID NO: 57に記載のCDR3アミノ酸配列；
- l) SEQ ID NO: 64に記載のCDR1アミノ酸配列、
SEQ ID NO: 65に記載のCDR2アミノ酸配列、および
SEQ ID NO: 66に記載のCDR3アミノ酸配列；または
- m) SEQ ID NO: 70に記載のCDR1アミノ酸配列、
SEQ ID NO: 71に記載のCDR2アミノ酸配列、および
SEQ ID NO: 72に記載のCDR3アミノ酸配列。

10

20

【0054】

30

上記において：

グループa)は、本明細書でhCD221ug-80、hCD22100ng-2、hCD221ug-74、hCD22100ng-66、hCD221ug-6、hCD22pas-10、hCD22pass-33と呼ばれる抗体により定義されるコンセンサス配列を提供する；

グループb)は、本明細書でhCD221ug-77、hCD221ug-87、hCD221ug-75、hCD221ug-93、hCD22pas-82、およびhCD22pas-23と呼ばれる抗体により定義されるコンセンサス配列を提供する；

グループc)は、本明細書でhCD22pas-32、hCD221ug-14、およびhCD22pas-55と呼ばれる抗体により定義されるコンセンサス配列を提供する；

グループd)は、本明細書でhCD22pas-79およびhCD22pas-72と呼ばれる抗体により定義されるコンセンサス配列を提供する；

40

グループf)は、hCD22pas-16と呼ばれる抗体からのCDRにより定義される；

グループf)は、hCD221ug-10と呼ばれる抗体からのCDRにより定義される；

グループg)は、hCD221ug-13と呼ばれる抗体からのCDRにより定義される；

グループh)は、hCD221ug-36と呼ばれる抗体からのCDRにより定義される；

グループi)は、hCD221ug-61と呼ばれる抗体からのCDRにより定義される；

グループj)は、hCD22100ug-62と呼ばれる抗体からのCDRにより定義される；

グループk)は、hCD22pas-24と呼ばれる抗体からのCDRにより定義される；

グループl)は、hCD22pas-48と呼ばれる抗体からのCDRにより定義される；および

グループm)は、hCD22pas-64と呼ばれる抗体からのCDRにより定義される。

50

【0055】

「CDR」または「相補性決定領域」は、免疫グロブリンの可変鎖の部分であり、それらが集合してパラトープを構成し、それによって抗体に結合特異性と親和性を付与する。本明細書で使用する時、この用語は、IMGT（商標）（国際ImMunoGeneTics情報システム）によって定められた基準または規則に従って、sdAbにマッピングされたCDRを指す。

【0056】

本明細書に記載の抗体は、優勢なヒトCD22βアイソフォームの組換え細胞外ドメイン(ECD)に対して産生されたものである。このアイソフォームのmRNA配列の例は、GenBankエントリーNM_001771.4に見いだすことができ、コードされたタンパク質のアミノ酸1~19はリーダー配列に対応し、アミノ酸20~687がECDに対応する（UniProtエントリーP20273も参照）。

【0057】

別の態様では、ヒトCD22に特異的に結合する、単離されたVHHシングルドメイン抗体(sdAb)が提供され、そのsdAbは、以下の配列を含む：

A)

SEQ ID NO: 1に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 2に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 3に記載のCDR3アミノ酸配列(hCD221ug-6)；

SEQ ID NO: 4に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 5に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 6に記載のCDR3アミノ酸配列(hCD221ug-10)；

SEQ ID NO: 7に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 8に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 9に記載のCDR3アミノ酸配列(hCD221ug-13)；

SEQ ID NO: 10に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 11に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 12に記載のCDR3アミノ酸配列(hCD221ug-14)；

SEQ ID NO: 13に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 14に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 15に記載のCDR3アミノ酸配列(hCD221ug-36)；

SEQ ID NO: 16に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 17に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 18に記載のCDR3アミノ酸配列(hCD221ug-61)；

SEQ ID NO: 19に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 20に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 21に記載のCDR3アミノ酸配列(hCD221ug-74)；

SEQ ID NO: 22に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 23に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 24に記載のCDR3アミノ酸配列(hCD221ug-75)；

SEQ ID NO: 25に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 26に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 27に記載のCDR3アミノ酸配列(hCD221ug-77)；

SEQ ID NO: 28に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 29に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 30に記載のCDR3アミノ酸配列(hCD221ug-80)；

SEQ ID NO: 31に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 32に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 33に記載のCDR3アミノ酸配列(hCD221ug-87)；

SEQ ID NO: 34に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 35に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 36に記載のCDR3アミノ酸配列(hCD221ug-93)；

SEQ ID NO: 37に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 38に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 39に記載のCDR3アミノ酸配列(hCD22100ug-2)；

SEQ ID NO: 40に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 41に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 42に記載のCDR3アミノ酸配列(hCD22100ug-62)；

SEQ ID NO: 43に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 44に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 45に記載のCDR3アミノ酸配列(hCD22100ug-66)；

SEQ ID NO: 46に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 47に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 48に記載のCDR3アミノ酸配列(hCD22pas-10)；

SEQ ID NO: 49に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 50に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 51に記載のCDR3アミノ酸配列(hCD22pas-16)；

SEQ ID NO: 52に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 53に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 54に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-23) ;
SEQ ID NO: 55に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 56に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 57に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-24) ;
SEQ ID NO: 58に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 59に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 60に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-32) ;
SEQ ID NO: 61に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 62に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 63に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-33) ;
SEQ ID NO: 64に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 65に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 66に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-48) ;
SEQ ID NO: 67に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 68に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 69に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-55) ;
SEQ ID NO: 70に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 71に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 72に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-64) ;
SEQ ID NO: 73に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 74に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 75に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-72) ;
SEQ ID NO: 76に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 77に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 78に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-79) ; または

10

SEQ ID NO: 79に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 80に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 81に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-82) 。

20

【0058】

一実施形態では、該抗体は、SEQ ID NO: 1に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 2に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 3に記載のCDR3アミノ酸配列を含む (hCD221ug-6) 。

【0059】

一実施形態では、該抗体は、SEQ ID NO: 4に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 5に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 6に記載のCDR3アミノ酸配列を含む (hCD221ug-10) 。

【0060】

一実施形態では、該抗体は、SEQ ID NO: 7に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 8に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 9に記載のCDR3アミノ酸配列を含む (hCD221ug-13) 。

30

【0061】

一実施形態では、該抗体は、SEQ ID NO: 10に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 11に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 12に記載のCDR3アミノ酸配列を含む (hCD221ug-14) 。

【0062】

一実施形態では、該抗体は、SEQ ID NO: 13に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 14に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 15に記載のCDR3アミノ酸配列を含む (hCD221ug-36) 。

40

【0063】

一実施形態では、該抗体は、SEQ ID NO: 16に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 17に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 18に記載のCDR3アミノ酸配列を含む (hCD221ug-61) 。

【0064】

一実施形態では、該抗体は、SEQ ID NO: 19に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 20に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 21に記載のCDR3アミノ酸配列を含む (hCD221ug-74) 。

【0065】

50

一実施形態では、該抗体は、SEQ ID NO: 22に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 23に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 24に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD221ug-75)。

【0066】

一実施形態では、該抗体は、SEQ ID NO: 25に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 26に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 27に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD221ug-77)。

【0067】

一実施形態では、該抗体は、SEQ ID NO: 28に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 29に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 30に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD221ug-80)。

【0068】

一実施形態では、該抗体は、SEQ ID NO: 31に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 32に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 33に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD221ug-87)。

【0069】

一実施形態では、該抗体は、SEQ ID NO: 34に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 35に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 36に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD221ug-93)。

【0070】

一実施形態では、該抗体は、SEQ ID NO: 37に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 38に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 39に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22100ug-2)。

【0071】

一実施形態では、該抗体は、SEQ ID NO: 40に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 41に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 42に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22100ug-62)。

【0072】

一実施形態では、該抗体は、SEQ ID NO: 43に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 44に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 45に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22100ug-66)。

【0073】

一実施形態では、該抗体は、SEQ ID NO: 46に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 47に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 48に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22pas-10)。

【0074】

一実施形態では、該抗体は、SEQ ID NO: 49に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 50に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 51に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22pas-16)。

【0075】

一実施形態では、該抗体は、SEQ ID NO: 52に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 53に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 54に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22pas-23)。

【0076】

一実施形態では、該抗体は、SEQ ID NO: 55に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 56に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 57に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22pas-24)。

【0077】

一実施形態では、該抗体は、SEQ ID NO: 58に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 59に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 60に記載のCDR3アミノ酸

10

20

30

40

50

配列を含む (hCD22pas-32)。

【0078】

一実施形態では、該抗体は、SEQ ID NO: 61に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 62に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 63に記載のCDR3アミノ酸配列を含む (hCD22pas-33)。

【0079】

一実施形態では、該抗体は、SEQ ID NO: 64に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 65に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 66に記載のCDR3アミノ酸配列を含む (hCD22pas-48)。

【0080】

一実施形態では、該抗体は、SEQ ID NO: 67に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 68に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 69に記載のCDR3アミノ酸配列を含む (hCD22pas-55)。

【0081】

一実施形態では、該抗体は、SEQ ID NO: 70に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 71に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 72に記載のCDR3アミノ酸配列を含む (hCD22pas-64)。

【0082】

一実施形態では、該抗体は、SEQ ID NO: 73に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 74に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 75に記載のCDR3アミノ酸配列を含む (hCD22pas-72)。

【0083】

一実施形態では、該抗体は、SEQ ID NO: 76に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 77に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 78に記載のCDR3アミノ酸配列を含む (hCD22pas-79)。

【0084】

一実施形態では、該抗体は、SEQ ID NO: 79に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 80に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 81に記載のCDR3アミノ酸配列を含む (hCD22pas-82)。

【0085】

別の態様では、ヒトCD22に特異的に結合する、単離されたVHHシングルドメイン抗体 (sdAb) が提供され、そのsdAbは、以下の配列を含む：

A)

SEQ ID NO: 1に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 2に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 3に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-6)；

SEQ ID NO: 4に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 5に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 6に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-10)；

SEQ ID NO: 7に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 8に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 9に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-13)；

SEQ ID NO: 10に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 11に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 12に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-14)；

SEQ ID NO: 13に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 14に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 15に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-36)；

SEQ ID NO: 16に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 17に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 18に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-61)；

SEQ ID NO: 19に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 20に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 21に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-74)；

SEQ ID NO: 22に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 23に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 24に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-75)；

SEQ ID NO: 25に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 26に記載のCDR2アミ

10

20

30

40

50

ノ酸配列、およびSEQ ID NO: 27に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-77) ;
 SEQ ID NO: 28に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 29に記載のCDR2アミ
 ノ酸配列、およびSEQ ID NO: 30に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-80) ;
 SEQ ID NO: 31に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 32に記載のCDR2アミ
 ノ酸配列、およびSEQ ID NO: 33に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-87) ;
 SEQ ID NO: 34に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 35に記載のCDR2アミ
 ノ酸配列、およびSEQ ID NO: 36に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD221ug-93) ;
 SEQ ID NO: 37に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 38に記載のCDR2アミ
 ノ酸配列、およびSEQ ID NO: 39に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22100ug-2) ;
 SEQ ID NO: 40に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 41に記載のCDR2アミ
 ノ酸配列、およびSEQ ID NO: 42に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22100ug-62) ;
 SEQ ID NO: 43に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 44に記載のCDR2アミ
 ノ酸配列、およびSEQ ID NO: 45に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22100ug-66) ;
 SEQ ID NO: 46に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 47に記載のCDR2アミ
 ノ酸配列、およびSEQ ID NO: 48に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-10) ;
 SEQ ID NO: 49に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 50に記載のCDR2アミ
 ノ酸配列、およびSEQ ID NO: 51に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-16) ;
 SEQ ID NO: 52に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 53に記載のCDR2アミ
 ノ酸配列、およびSEQ ID NO: 54に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-23) ;
 SEQ ID NO: 55に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 56に記載のCDR2アミ
 ノ酸配列、およびSEQ ID NO: 57に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-24) ;
 SEQ ID NO: 58に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 59に記載のCDR2アミ
 ノ酸配列、およびSEQ ID NO: 60に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-32) ;
 SEQ ID NO: 61に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 62に記載のCDR2アミ
 ノ酸配列、およびSEQ ID NO: 63に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-33) ;
 SEQ ID NO: 64に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 65に記載のCDR2アミ
 ノ酸配列、およびSEQ ID NO: 66に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-48) ;
 SEQ ID NO: 67に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 68に記載のCDR2アミ
 ノ酸配列、およびSEQ ID NO: 69に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-55) ;
 SEQ ID NO: 70に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 71に記載のCDR2アミ
 ノ酸配列、およびSEQ ID NO: 72に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-64) ;
 SEQ ID NO: 73に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 74に記載のCDR2アミ
 ノ酸配列、およびSEQ ID NO: 75に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-72) ;
 SEQ ID NO: 76に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 77に記載のCDR2アミ
 ノ酸配列、およびSEQ ID NO: 78に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-79) ; ま
 たは

SEQ ID NO: 79に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 80に記載のCDR2アミ
 ノ酸配列、およびSEQ ID NO: 81に記載のCDR3アミノ酸配列 (hCD22pas-82) ; あ
 るいは

B)

パートA)のi)~xxviii)のいずれか1つで定義されたCDR1、CDR2、およびCDR3配列
 と少なくとも80%同一であるCDR1、CDR2、およびCDR3アミノ酸配列。

【0086】

一実施形態では、B)において、CDR1、CDR2、およびCDR3アミノ酸配列は、パート
 A)のi)~xxviii)のいずれか1つで定義されたCDR1、CDR2、およびCDR3配列と少なく
 とも90%同一である。一実施形態では、B)において、CDR1、CDR2、およびCDR3ア
 ミノ酸配列は、パートA)のi)~xxviii)のいずれか1つで定義されたCDR1、CDR2、お
 よびCDR3配列と少なくとも95%同一である。一実施形態では、B)において、CDR1、C
 DR2、およびCDR3アミノ酸配列は、パートA)のi)~xxviii)のいずれか1つで定義され
 たCDR1、CDR2、およびCDR3配列と比較して、最大3つの置換を有する。一実施形態

では、B)において、CDR1、CDR2、およびCDR3アミノ酸配列は、パートA)のi)～xxviii)のいずれか1つで定義されたCDR1、CDR2、およびCDR3配列と比較して、最大2つの置換を有する。一実施形態では、B)において、CDR1、CDR2、およびCDR3アミノ酸配列は、パートA)のi)～xxviii)のいずれか1つで定義されたCDR1、CDR2、およびCDR3配列と比較して、最大1つの置換を有する。ある実施形態では、A)に記載された配列に対する配列の相違は、保存的配列置換である。

【0087】

用語「保存的アミノ酸置換」は、当技術分野で知られており、本明細書では以下のように定義される（保存的置換可能な候補アミノ酸を括弧内に示す）：Ala (Gly, Ser); Arg (Gly, Gln); Asn (Gln; His); Asp (Glu); Cys (Ser); Gln (Asn, Lys); Glu (Asp); Gly (Ala, Pro); His (Asn; Gln); Ile (Leu; Val); Leu (Ile; Val); Lys (Arg; Gln); Met (Leu, Ile); Phe (Met, Leu, Tyr); Ser (Thr; Gly); Thr (Ser; Val); Trp (Tyr); Tyr (Trp; Phe); Val (Ile; Leu)。

10

【0088】

特定の実施形態による配列バリエーションは、それが由来する親分子と比べて、結合親和性および/または特異性が実質的に変化していない分子を包含する、ことが意図される。そのようなパラメータは、例えば、本明細書に記載される技術および当技術分野で知られる技術を用いて、容易に試験することができる。そのような実施形態は、配列の置換、挿入、または欠失を包含し得る。

【0089】

別の態様では、ヒトCD22に特異的に結合する、単離されたVHHシングルドメイン抗体 (sdAb) が提供され、そのsdAbは、以下の配列を含む：

20

A)

SEQ ID NO: 3に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 6に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 9に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 12に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 15に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 18に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 21に記載のCDR3アミノ酸配列；

30

SEQ ID NO: 24に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 27に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 30に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 33に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 36に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 39に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 42に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 45に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 48に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 51に記載のCDR3アミノ酸配列；

40

SEQ ID NO: 54に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 57に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 60に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 63に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 66に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 69に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 72に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 75に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 79に記載のCDR3アミノ酸配列；または

SEQ ID NO: 81に記載のCDR3アミノ酸配列。

50

【0090】

CDR3が、多くの場合、V_HH sdAbの結合の主要な決定因子であることを認識すると、他のCDRを変異誘発させるか、または他の方法で多様化し、得られたライブラリー（または候補分子）をスクリーニングして、CD22に結合しかつ/またはCD22への結合について親分子と交差競合する抗体を探すことができる、ことが理解されよう。これらの実施形態は、とりわけ、この方法で同定された分子をカバーすることが意図される。

【0091】

一実施形態では、単離されたsdAbは、以下の配列を含む：

SEQ ID NO: 1に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 3に記載のCDR3アミノ酸配列；

10

SEQ ID NO: 4に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 6に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 7に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 9に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 10に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 12に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 13に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 15に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 16に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 18に記載のCDR3アミノ酸配列；

20

SEQ ID NO: 19に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 21に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 22に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 24に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 25に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 27に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 28に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 30に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 31に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 33に記載のCDR3アミノ酸配列；

30

SEQ ID NO: 34に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 36に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 37に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 39に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 40に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 42に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 43に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 45に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 46に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 48に記載のCDR3アミノ酸配列；

40

SEQ ID NO: 49に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 51に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 52に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 54に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 55に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 57に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 58に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 60に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 61に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 63に記載のCDR3アミノ酸配列；

50

SEQ ID NO: 64に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 66に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 67に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 69に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 70に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 72に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 73に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 75に記載のCDR3アミノ酸配列；

SEQ ID NO: 76に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 78に記載のCDR3アミノ酸配列；または

SEQ ID NO: 79に記載のCDR1アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 81に記載のCDR3アミノ酸配列。

【0092】

これらの実施形態は、とりわけ、CDR2の変異誘発/多様化と、CD22に結合しかつ/またはCD22への結合について親分子と交差競合するバリエーション分子（親分子から定義される）のスクリーニングの後に分子が回収される実施形態を包含する、ことが意図される。上記のように、ライブラリーをスクリーニングしたり、個々の候補分子を試験したりすることも可能である。

【0093】

一実施形態では、sdAbは、A) SEQ ID NO: 85~112および120~125のいずれか1つのアミノ酸配列、またはB) その全長にわたってSEQ ID NO: 82~108および120~125のいずれか1つと少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を含む。一実施形態では、B) のアミノ酸配列は、その全長にわたってA) のアミノ酸配列の1つと少なくとも85%同一である。一実施形態では、B) のアミノ酸配列は、その全長にわたってA) のアミノ酸配列の1つと少なくとも90%同一である。一実施形態では、B) のアミノ酸配列は、その全長にわたってA) のアミノ酸配列の1つと少なくとも95%同一である。一実施形態では、B) のアミノ酸配列は、その全長にわたってA) のアミノ酸配列の1つと少なくとも98%同一である。これらの実施形態のいくつかでは、A) の配列に対する配列の相違は、CDR配列の外側にある。

【0094】

一実施形態では、sdAbは、A) SEQ ID NO: 82~108および120~125のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 82に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 83に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 84に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 85に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 86に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 87に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 88に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 89に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 90に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、お

10

20

30

40

50

よびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 91に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 92に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 93に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 94に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 95に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

10

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 96に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 97に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 98に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 99に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 100に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

20

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 101に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 102に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 103に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 104に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 105に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

30

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 106に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 107に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 108に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 120に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 121に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

40

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 122に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 123に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 124に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 125に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

【0095】

50

- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 82を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 83を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 84を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 85を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 86を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 87を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 88を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 89を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 90を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 91を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 92を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 93を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 94を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 95を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 96を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 97を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 98を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 99を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 100を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 101を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 102を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 103を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 104を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 105を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 106を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 107を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 108を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 120を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 121を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 122を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 123を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 124を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 125を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、ラクダ科V_HH sdAbである。
- 一実施形態では、sdAbは、ラマV_HH sdAbである。
- 一実施形態では、sdAbは、ヒト化されたラクダ科V_HHである。

10

20

30

40

50

【0096】

本明細書で使用する「ヒト化」という用語は、ヒト患者に投与したときの免疫原性がわずかであるか、存在しないように変異されたことを意味する。本発明に従ってポリペプチドをヒト化することは、そのポリペプチドがその典型的な性質を失うことなく、すなわち、ヒト化が得られるポリペプチドの抗原結合能力に大きな影響を与えることなく、1つまたは複数のラクダ科アミノ酸を、ヒトコンセンサス配列に見られるそれらのヒト対応物で置き換えるステップを含む。ヒト化抗体は、CDRグラフトイング (grafting)、ベニアリング (veneering) またはリサーフェイシング (resurfacing,)、チェーンシャuffling (chain shuffling) などを含むがこれらに限定されない、当技術分野で知られた様々な技術を用いて作製することができる。

【0097】

- 一実施形態では、sdAbは、 2.5×10^{-7} nm以下のヒトCD22に対する親和性を有する。
- 一実施形態では、sdAbは、 3×10^{-8} nm以下のヒトCD22に対する親和性を有する。
- 一実施形態では、sdAbは、 9.6×10^{-9} nm以下のヒトCD22に対する親和性を有する。

一実施形態では、sdAbは、 9.3×10^{-10} nm以下のヒトCD22に対する親和性を有する。
一実施形態では、sdAbは、 7×10^{-12} nm以下のヒトCD22に対する親和性を有する。結合親和性は、例えば本明細書に記載されるアッセイに従って、決定することができる。

【0098】

CD22は、本明細書では膜遠位から膜近位へ1~7と番号付けされた、7つのIg様ドメインを含むことが理解されよう（参考のため図7参照）。いくつかの実施形態では、sdAbは、これらのIg様ドメインの1つまたは複数への選択的または優先的な結合を示す。成熟型ヒトCD22 ECDは、UniProtエントリーP20273のアミノ酸20から687まで広がっている。この部分配列内で、7つのIg様ドメインは一般に、アミノ酸1~119（1）、124~216（2）、223~302（3）、312~397（4）、400~481（5）、486~563（6）、および574~657（7）の領域に対応する。そのほかの所では、本明細書で1~7と名付けたドメインを、それぞれIgL-VおよびIgL-1からIgL-6と呼ぶのが一般的である。単純にするため、本明細書では、ドメインを1（「第1」）から7（「第7」）までの順序で番号付けしている。エピトープマッピングでは、7つの断片は、それぞれのIg様ドメインをビン（bin）1~7として含み、アミノ酸1~135（ビン1）、111~230（ビン2）、（211~317）（ビン3）、303~405（ビン4）、391~490（ビン5）、476~575（ビン6）、および561~668（ビン7）の領域に対応する。

【0099】

一実施形態では、sdAbは、ヒトCD22の第1のIg様ドメインに結合する。そのような特定の一実施形態では、第1のIg様ドメインに結合するsdAbは、SEQ ID NO: 91（hCD221ug-80）を含む。一実施形態では、sdAbは、ヒトCD22の第4のIg様ドメインに結合する。そのような特定の一実施形態では、第4のIg様ドメインに結合するsdAbは、SEQ ID NO: 84（hCD221ug-13）を含む。一実施形態では、sdAbは、ヒトCD22の第6のIg様ドメインに結合する。そのような特定の一実施形態では、第6のIg様ドメインに結合するsdAbは、SEQ ID NO: 84（hCD221ug-13）、SEQ ID NO: 91（hCD221ug-80）、SEQ ID NO: 86（hCD221ug-36）、またはSEQ ID NO: 105（hCD221pas-64）を含む。一実施形態では、sdAbは、ヒトCD22の第7のIg様ドメインに結合する。そのような特定の一実施形態では、第7のIg様ドメインに結合するsdAbは、SEQ ID NO: 87（hCD221ug-61）、SEQ ID NO: 83（hCD221ug-10）、またはSEQ ID NO: 100（hCD22pas-24）を含む。

【0100】

一態様では、CD22への特異的結合について上記の単離されたsdAbと競合するVHHシングルドメイン抗体（sdAb）が提供される。本発明のsdAbは、試験抗体が標的分子上の結合部位について本発明の既知抗体と交差競合できるか否かを評価する結合アッセイを含む方法によって同定され得る。例えば、本明細書で上述された抗体を参照抗体として使用することができる。競合結合アッセイを実施するための方法は、当技術分野で周知である。例えば、それらは、本発明の既知抗体と標的分子とを、該抗体が標的分子に結合できる条件下で一緒に接触させることを含む。その後、抗体/標的複合体を試験抗体と接触させ、その試験抗体が抗体/標的複合体から本発明の抗体を追い出すことができる程度を評価する。別の方法は、試験抗体と標的分子とを、抗体結合が可能な条件下で接触させ、次いで、その標的分子に結合可能な本発明の抗体を加え、本発明の抗体が抗体/標的複合体から試験抗体を追い出すことができる程度を評価することを含み得る。そのような抗体は、CD22に対する新しいsdAbを作製し、得られたライブラリーを交差競合についてスクリーニングすることにより、同定することができる。あるいは、本明細書に記載の抗体の1つを、多様化、ライブラリー作製、およびスクリーニングの出発点として使用することもできる。さらなる代替法は、本明細書に記載の抗体の個々のバリエーションを試験することを含み得る。

【0101】

一実施形態では、本明細書で定義されるsdAbは、ラクダ科sdAbである。

【0102】

一実施形態では、本明細書で定義されるsdAbは、ラマsdAbである。

【0103】

一実施形態では、本明細書で定義されるsdAbは、ラクダ科sdAbのヒト化形態である。

【0104】

表1は、本明細書に開示される様々なsdAbの全長配列を示す。CDR1、CDR2、およびCDR3配列には下線が引かれている。本明細書で使用するCDRの識別および番号付けは、IMGT（商標）規則に従うものである。

【0105】

【表1】

表1:VHH配列

VHH #	名称	アミノ酸配列 (CDR1、CDR2、およびCDR3はIMGT規則に従って 下線が引かれ、順番に表示される)
VHH # 1	hCD221ug-80	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGFTLDYYVMVWFRQAPGKE REAVSCITSDGVTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNRVKPE DTAVYYCAVDKPFYDGGIQTCPVDFDSWGQGAQVTVSS
VHH # 2	hCD22100ng-2	QVKLEESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGVTFDYYVMGWFRQAPGKE REVVSCMRNSDGVTYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKP DDTAIYYCAVDKPFYDGGNYITCPVDFDSWGQGTQVTVSS
VHH # 3	hCD221ug-74	QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAGSGFTFDDYAMGWFRQAPGKE REVVSCMGSSDGATYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKP EDTAIYYCAVDKPFYDGGYRITCPVDFGSWGQGTQVTVSS
VHH # 4	hCD22100ng-66	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGFSLDYYVMGWFRQAPGKE REVVSCISSSDGATYYPD SVKGRFTISRDNAKKTVYLQMNALKP EDTAIYYCAVDKPFYDGGSYITCPVDFGSWGQGTQVTVSS
VHH # 5	hCD221ug-6	QVQLVESGGGVVRPGDSLRLSCTVSGFTLDYYVMGWFRQAPGKE REVVSCISSSDGVTYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKP EDTAIYYCAVDKPFYDGGYYITCPVDFDSWGQGTQVTVSS
VHH # 6	hCD22pas-10	QVQLVESGGGLVQPGDSLRLSCTVSGFTSDYYAMGWFRQAPGKE REAVSCISSSDGVTYADSVRGRFTISRDNAKNTVYLEMNSLKP EDTAIYYCAVDKPFYDGGYLYTCPVDFDSWGQGTQVTVSS
VHH # 7	hCD22pas-33	QVKLEESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGFTLDSYVMGWFRQAPGKE REAVSCISSSDGVTYADSVKGRFTISRDNAKNTYLQMNSLKPE DTAIYYCAVDKPFYDGGYLYTCPVDFDSWGQGIQVTVSS
VHH # 8	hCD221ug-77	QVKLEESGGGLVQPGGSLRLSCADSGSIFRIAMNWRQAPGKE RELVAVITSGGETHYAASVKGRFTISRDNAKNTMYLQMNSLKPE DTAVYYCNAKWGQYEWGQGTQVTVSS
VHH # 9	hCD221ug-87	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCADSGSIFRIAMNWRQAPGKE RELVAVITSGGETHYAASVKGRFTISRDNAKNTMYLQMNSLKPE DTAVYYCNAKWGRDEYWGQGTQVTVSS

10

20

30

40

50

VHH # 10	hCD221ug-75	QVKLEESGGGLVQPGGSLRLSCAGSGSIFRIAVMNWYRQAPGKE RELVAVITSSGDTHYAASVKGRFTISRDNANTMYLQINSLKPE DTAVYYCNAKYGRDEYWGQGAQVTVSS
VHH # 11	hCD221ug-93	QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSTFSSSVMNWYRQAPGKQ RELVAVITSSGSTHYADSVKGRFTISRDNANTVNLQMNLSLKPE DTAVYYCNAQYGRSDWGQGTQVTVSS
VHH # 12	hCD22pas-82	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFRITVMNWHRQAPGKE RELSGVITSSGDSHYAASVKGRFTIYRDNTKNTMYLQMNRLKPE DTDYYCNAKWGGDEYWGQGTHTDTGSS
VHH # 13	hCD22pas-23	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFRITAVMNWYRQAPGK ERELVAVITSAGETHYAESVKGRFTISRDNANTMYLQMNLSLKPE EDTAVYYCNAKWGQYEHWGQGTQGTVSS
VHH # 14	hCD221ug-61	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASMSSFSQYVMYWRQAPGKQ RELVAITISYNTNYADSVKGRFTISRDNAKSIAYLQMDLSLKPE DTAVYYCNAQYGSTFIRNHWDWGQGTQVTVSS
VHH # 15	hCD22pas-32	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGRIFRSYVLGWFRQAPGKE RELVARIGWSDTYADSVKGRFTISRDNANTVDLQMNLSLKPED TAVYYCAANSPPYGPQRDEFGYWGQGTQVTVSS
VHH # 16	hCD221ug-14	QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGRIFRSYVLGWFRQAPGKE RELVARIGWSDTYADSVKGRFTISRDNANTVDLQMNLSLKPED TAVYYCAANSPPYGPQRDEFDYWGQGTQVTVSS
VHH # 17	hCD22pas-55	QVKLEESGGGLGQAGGSLRLSCAVSGRISRSYVLGWFRQAPGKE RELVARIGCSDTYYADSAKGRFTISRNNADNTVDLQMNLSLKPED TAVYYCAEYSPPYGPQRDEFDYWGQGTQVTVSS
VHH # 18	hCD22pas-79	QVKLEESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGRTSSVYGMWFRQTPGKE REFVAAMSWGGPTYFADSVKGRFGSSRDNAKNTVYLQMNGLRP EDTAVYYCAVRIRRTLLEPLTKETLYDYWGQGTQVTVSS
VHH # 19	hCD22pas-72	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSVYTMWFRQAPGKE REFVAAIRGSGGTYYRDSVKGRFTISRDNANTVYLQMNLSLKPE DTAVYYCAVRIRRTLVEPLTKETLYDYWGQGTQVTVSS
VHH # 20	hCD22pas-16	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSTFSLKAMAWYRQAPGKQ RERVGVINSDGSYTTDAASVQGRFTISRDNANTVYLQMNLSLKPE EDTAVYYCNTMPFPWPGQGTQVTVSS
VHH # 21	hCD221ug-13	QVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAGSGGSFSSVTMAWFRQAPGKD REFVAAITWSSPSTYYADSVKGRFTISRDNANTVYLQMNLSLKPE EDTAVYYCAGGRTGRGTSADTDEYNYWGQGTQVTVSS

10

20

30

40

50

VHH # 22	hCD221ug-36	EVQLVDSGGGLVQAGGSLRVSC EA SGITFSRAAMGWYRQRP GE RERVAVVNSDSSTIYADSVKGRFTISRDN AKNTVYLQ MNSLEPE DTAVYYC WSPGFGSYWGQGTQ VTVSS
VHH #23	hCD221ug-10	QVQLVESGGGLVQAGGSLSVSCTASESTFSIMMGWFRQAPGKQR EMVAV INSAGSTNYADSAE GRFTISRDLAKKTVSLQMN SLK PED TAVYYCY VDGYFGQGTQ VTVSS
VHH # 24	hCD22100ng-62	QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGS SISSINAMGWYRQ VPGKQ RELVAI ITTAGNTRYGDSVKGRFTISRDNARKTVYLQ MNSLKPE DTAVYYC AGKLYVNKEYTYWGQGTQ VTVSS
VHH # 25	hCD22pas-64	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGS TFS LN TMAWYRQ APGNQ REYVAA ASSDGYTNYADSVRGRFTISRDN DKN TMYLQ MNSLRPE DTAVYYC TWGTGRFADYIYWGQGTQ VTVSS
VHH #26	hCD22pas-24	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCSASG ITSSINSMGWHRQ APGKQ RELVAS IGRGGSGSTKYADSGKGRFLISRDN NKNILFLEM NSLK PEDTADYYC LEVTTDLSSYWGRGTQ VTVSS
VHH # 27	hCD22pas-48	QVKLEESGGGLGQAGGAVRLSCADSGS IFRI AVMNWYRQAPGKE RELVA VITIAGETHYAYS VKGQFTISR YNAKNTMYLQ MNRLKPE DTAVYYC YANGGRDEYWGRGTQ VTVSS

10

20

【 0 1 0 6 】

表2は、本明細書で使用される抗体の名称と、VHH #と、各sdAbのCDR1、CDR2、CDR3、および全長配列のSEQ ID NOとの対応関係を提供する。

【 0 1 0 7 】

【 表 2 】

表2: VHH配列ID番号

名称	VHH #	配列ID番号			
		CDR1	CDR2	CDR3	全長
hCD221ug-6	VHH #5	1	2	3	82
hCD221ug-10	VHH #23	4	5	6	83
hCD221ug-13	VHH #21	7	8	9	84
hCD221ug-14	VHH #16	10	11	12	85
hCD221ug-36	VHH #22	13	14	15	86
hCD221ug-61	VHH #14	16	17	18	87
hCD221ug-74	VHH #3	19	20	21	88
hCD221ug-75	VHH #10	22	23	24	89
hCD221ug-77	VHH #8	25	26	27	90
hCD221ug-80	VHH #1	28	29	30	91

30

40

50

hCD221ug-87	VHH #9	31	32	33	92
hCD221ug-93	VHH #11	34	35	36	93
hCD22100ng-2	VHH #2	37	38	39	94
hCD22100ng-62	VHH #24	40	41	42	95
hCD22100ng-66	VHH #4	43	44	45	96
hCD22pas-10	VHH #6	46	47	48	97
hCD22pas-16	VHH #20	49	50	51	98
hCD22pas-23	VHH #13	52	53	54	99
hCD22pas-24	VHH #26	55	56	57	100
hCD22pas-32	VHH #15	58	59	60	101
hCD22pas-33	VHH #7	61	62	63	102
hCD22pas-48	VHH #27	64	65	66	103
hCD22pas-55	VHH #17	67	68	69	104
hCD22pas-64	VHH #25	70	71	72	105
hCD22pas-72	VHH #19	73	74	75	106
hCD22pas-79	VHH #18	76	77	78	107
hCD22pas-82	VHH #12	79	80	81	108

10

20

【0108】

組換えポリペプチド

一態様では、本明細書で定義されるsdAbを含む組換えポリペプチドが提供される。一実施形態では、本明細書で定義される1つまたは複数のsdAbを含む組換えポリペプチドが提供される。一実施形態では、本明細書で定義される2つ以上のsdAbを含む組換えポリペプチドが提供される。一実施形態では、本明細書で定義される2つ以上のsdAbを含む組換えポリペプチドが提供される。

【0109】

V_HH：F_c融合体

一実施形態では、ヒトF_cに融合された本明細書で定義されるsdAb（「V_HH：F_c融合体」という）が提供される。例えば、V_HH：F_c融合体は、IgG、IgA、またはIgDアイソタイプの少なくともCH2およびCH3を含むことができる。V_HH：F_c融合体は、IgMまたはIgEアイソタイプの少なくともCH2、CH3、およびCH4を含んでもよい。このような実施形態は、高次の組換え分子で免疫系を活性化するのに有用であり得る。例えば、ある実施形態によれば、2つのこのようなF_c含有V_HH：F_c融合体をアセンブルして、単量体の組換え抗体を形成することができる。いくつかの実施形態では、このような単量体の抗体は、免疫系を活性化する能力がある。このような単量体の抗体は、IgG、IgA、IgD、IgE、またはIgMアイソタイプであってよい。一実施形態では、IgA F_c含有V_HH：F_c融合体を組換え2量体（分泌型）へとアセンブルさせることもできる。また、いくつかの実施形態では、多量体も想定される。例えば、5つのIgM単量体をアセンブルさせると、5量体の組換え抗体が形成され得る。

30

40

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の多価抗体は、同じV_HH：F_c融合体のアセンブリ（assembly）であり得る。

【0110】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の多価抗体は、同じ結合標的を有する異なるV_HH：F_c融合体のアセンブリであり得る。例えば、これらは、同じ標的分子上の異なるエピトープに結合可能である。例としては、異なるV_HH：F_c融合体のアセンブリであって、それぞれが本明細書で定義される異なる抗CD22 sdAbを含むものが含まれる。

【0111】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の多価抗体は、本明細書で定義されるV_HH

50

：Fc融合体（本明細書で定義される抗CD22 sdAbを含む）と、異なる標的に向けられたパレートを含む別のVHH：Fc融合体とのアセンブリであり得る。

カーゴ分子への融合

【0112】

さらなる態様では、本開示は、カーゴ分子に連結された本明細書で定義される抗CD22 sdAbを提供する。カーゴ分子は、例えば、細胞毒性剤、細胞増殖抑制剤、抗がん剤または放射線治療剤などの、治療用成分（therapeutic moiety）を含み得る。本開示の特定の実施形態では、抗体薬物コンジュゲートが細胞毒性剤を含むことができる。本開示の別の特定の実施形態は、放射線治療剤を含む抗体薬物コンジュゲートに関する。

【0113】

組換え核酸分子

一態様では、本明細書で定義されるsdAb、組換えポリペプチド、またはVHH：Fc融合体をコードする組換え核酸分子が提供される。

【0114】

組成物

一態様では、本明細書で定義されるsdAb、またはそのようなsdAbを含むポリペプチドを、許容される賦形剤、希釈剤または担体と一緒に含む組成物が提供される。一実施形態では、該組成物は医薬組成物であり、賦形剤、希釈剤または担体は、薬学的に許容される賦形剤、希釈剤または担体である。

【0115】

使用および方法

一態様では、がんまたは自己免疫疾患を治療するための、本明細書で定義されるsdAbの、または本明細書で定義される1つ以上のVHH：Fc融合体を含む抗体の使用が提供される。一実施形態では、がんは、血液学的悪性腫瘍である。一実施形態では、血液学的悪性腫瘍は、白血病、リンパ腫、または骨髄異形成症候群である。一実施形態では、白血病は、急性リンパ性白血病（ALL）または慢性リンパ性白血病（CLL）である。一実施形態では、リンパ腫は、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、小細胞濾胞性リンパ腫、および大細胞濾胞性リンパ腫からなる群より選択される。一実施形態では、自己免疫疾患は炎症性疾患である。一実施形態では、自己免疫疾患はループス（lupus）である。一実施形態では、自己免疫疾患は多発性硬化症である。一実施形態では、自己免疫疾患は自己免疫性糖尿病である。

【0116】

一態様では、がんまたは自己免疫疾患の治療用の医薬を調製するための、本明細書で定義されるsdAbの、または本明細書で定義される1つ以上のVHH：Fc融合体を含む抗体の使用が提供される。一実施形態では、がんは、血液学的悪性腫瘍である。一実施形態では、血液学的悪性腫瘍は、白血病、リンパ腫、または骨髄異形成症候群である。一実施形態では、白血病は、急性リンパ性白血病（ALL）または慢性リンパ性白血病（CLL）である。一実施形態では、リンパ腫は、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、小細胞濾胞性リンパ腫、および大細胞濾胞性リンパ腫からなる群より選択される。一実施形態では、自己免疫疾患は炎症性疾患である。一実施形態では、自己免疫疾患はループスである。一実施形態では、自己免疫疾患は多発性硬化症である。一実施形態では、自己免疫疾患は自己免疫性糖尿病である。

【0117】

一態様では、がんまたは自己免疫疾患の治療に使用するための、本明細書で定義されるsdAb、または本明細書で定義される1つ以上のVHH：Fc融合体を含む抗体が提供される。一実施形態では、がんは、血液学的悪性腫瘍である。一実施形態では、血液学的悪性腫瘍は、白血病、リンパ腫、または骨髄異形成症候群である。一実施形態では、白血病は、急性リンパ性白血病（ALL）または慢性リンパ性白血病（CLL）である。一実施形態では、リンパ腫は、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、小細胞濾胞性リンパ腫、および大細胞濾胞性リンパ腫からなる群より選択される。一実施形態では、

10

20

30

40

50

自己免疫疾患は炎症性疾患である。一実施形態では、自己免疫疾患はループスである。一実施形態では、自己免疫疾患は多発性硬化症である。一実施形態では、自己免疫疾患は自己免疫性糖尿病である。

【0118】

一態様では、本明細書で定義されるsdAb、または本明細書で定義される1つ以上のV_HH:F_c融合体を含む抗体を対象に投与することを含む、対象におけるがんまたは自己免疫疾患の治療方法が提供される。一実施形態では、がんは、血液学的悪性腫瘍である。一実施形態では、血液学的悪性腫瘍は、白血病、リンパ腫、または骨髄異形成症候群である。一実施形態では、白血病は、急性リンパ性白血病（ALL）または慢性リンパ性白血病（CLL）である。一実施形態では、リンパ腫は、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、小細胞濾胞性リンパ腫、および大細胞濾胞性リンパ腫からなる群より選択される。一実施形態では、自己免疫疾患は炎症性疾患である。一実施形態では、自己免疫疾患はループスである。一実施形態では、自己免疫疾患は多発性硬化症である。一実施形態では、自己免疫疾患は自己免疫性糖尿病である。

10

【0119】

多価抗体および関連する実施形態

一態様では、上記で定義されるsdAbを含む多価抗体が提供される。

【0120】

「多価抗体」とは、本明細書では、同じまたは異なる標的分子内の1つまたは複数の抗原に結合するための、2つ以上の可変領域またはパラトープを含む分子を意味するために使用される。

20

【0121】

いくつかの実施形態では、該パラトープは、同じ標的分子上の異なるエピトープに結合することができる。いくつかの実施形態では、該パラトープは、異なる標的分子に結合することができる。これらの実施形態では、多価抗体は、異なる特異性のパラトープが存在する数に応じて、二重特異性、三重特異性、または多重特異性と呼ばれる。多価抗体は、本明細書で定義される抗CD22 sdAbの1つを含むので、その多価抗体はCD22結合親和性を有する。

【0122】

例えば、上記で説明したように、いくつかの実施形態では、多価抗体は、本明細書で定義されるV_HH:F_c融合体（本明細書で定義されるsdAbを含む）と、異なる特異性を付与する異なるパラトープを含む別のV_HH:F_c融合体とのアセンブリであり得る。

30

【0123】

一実施形態では、上記で定義されたsdAbと第2の抗原結合部分とを含む、二重特異性抗体が提供される。いくつかの実施形態では、第2の抗原結合部分は、モノクローナル抗体、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv、またはsdAb、例えばV_HHまたはV_{NAR}、を含むことができる。

【0124】

「抗原結合部分」は、抗原結合活性を有する抗体またはその抗原結合フラグメント、例えば、工学的に操作された抗体（engineered antibody）またはそのフラグメント、を含むポリペプチドを意味する。

40

【0125】

いくつかの実施形態では、第2の抗原結合部分は、例えば、安定化/半減期延長を目的として、ヒト血清アルブミンに結合することができる。

【0126】

一実施形態では、上記で定義されたsdAbと、第2の抗原結合部分と、第3の抗原結合部分とを含む、三重特異性抗体が提供される。いくつかの実施形態では、第2の抗原結合部分は、モノクローナル抗体、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv、またはsdAb、例えばV_HHまたはV_{NAR}、を含む。いくつかの実施形態では、第3の抗原結合部分は、独立して、モノクローナル抗体、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv、またはsdAb、例えばV_HHまたはV_N

50

AR、を含む。

【0127】

第2および/または第3の抗原結合部分は、例えば、安定化/半減期延長を目的として、ヒト血清アルブミンに結合することができる。

【0128】

いくつかの実施形態では、三重特異性抗体は多重特異性とすることができ、該抗体は1つまたは複数の追加の抗原結合部分を含むことができる。そのような実施形態では、追加の抗原結合部分は、独立して、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv、またはsdAb、例えばV_HHまたはV_{NAR}、であり得る。

【0129】

一実施形態では、多重特異性抗体は、本明細書で定義されるsdAbを含む第1の抗原結合部分と、第2の抗原結合部分とを含む。一実施形態では、第2の抗原結合部分は、免疫細胞の細胞表面マーカーに特異的に結合する。

【0130】

「細胞表面マーカー」は、細胞の表面に発現される分子であって、ある細胞種に特有であり（または豊富に存在し）、抗原結合部分によって結合または認識され得る。

二重特異性T細胞エンゲージャー

【0131】

一実施形態では、多価抗体は、本明細書で定義されるsdAbと、T細胞の細胞表面マーカーに特異的に結合する第2の抗原結合部分とを含む、二重特異性T細胞エンゲージャーである。一実施形態では、そのT細胞マーカーは、ヒトCD3を含む。

【0132】

ヒトCD3は、認識されるように、マルチサブユニット抗原であり、その様々なサブユニットがCD3活性化に関与し得る。そのようなサブユニットの1つがCD3εである（例えば、GenBank NP_000724.1参照）。他の非限定的な例には、CD3γ（例えば、GenBank NP_000064.1参照）およびCD3δ（δアイソフォームAについては、例えばGenBank NP_000723.1、δアイソフォームBについては、例えばGenBank NP_001035741.1参照）が含まれる。

【0133】

いくつかの実施形態では、T細胞マーカーは、CD3ε、CD3γ、またはCD3δを含む。特定の一実施形態では、T細胞マーカーは、CD3εを含む。

【0134】

本明細書で使用される「二重特異性T細胞エンゲージャー」という用語は、2つの異なる抗体からの2つの連結された可変領域を有する組換え二重特異性タンパク質を指し、一方はT細胞上の細胞表面分子（例えば、CD3ε）を標的とし、他方は疾患細胞（典型的には悪性細胞）の表面上の抗原を標的とする。例えば、二重特異性T細胞エンゲージャーは、本明細書で定義されるsdAbと、scFvとを含み得る。二重特異性T細胞エンゲージャーは、本明細書で定義されるsdAbと、第2のVHH/sdAbとを含んでもよい。2つの可変領域は、通常、GlySerリンカーのような短い柔軟なリンカーによって一緒に連結される。腫瘍抗原とT細胞に同時に結合することによって、二重特異性T細胞エンゲージャーはT細胞応答と腫瘍細胞の殺傷を仲介する。二重特異性T細胞エンゲージャーによって促進されるT細胞/標的細胞への接着は、MHCハプロタイプと無関係である。

【0135】

一実施形態では、二重特異性T細胞エンゲージャーは、N末端からC末端の方向に、

- 第1の抗原結合部分；
- アミノ酸リンカー；および
- 第2の抗原結合部分；

を含む。

一実施形態では、シグナルペプチドが第1の抗原結合部分のN末端にさらに含まれる。

【0136】

10

20

30

40

50

本明細書で言及される「シグナルペプチド」は、新生タンパク質を小胞体に向かわせ、続いて細胞表面に向かわせることができ、そこで新生タンパク質が発現される。シグナルペプチドのコアは、単一の α ヘリックスを形成する傾向がある疎水性アミノ酸の長いストレッチを含み得る。シグナルペプチドは、正に荷電したアミノ酸の短いストレッチから始まることができ、これは輸送 (translocation) 中にポリペプチドの適切なトポロジーを強化するのに役立つ。シグナルペプチドの末端には、通常、シグナルペプチダーゼによって認識・切断されるアミノ酸のストレッチが存在する。シグナルペプチダーゼは、輸送中または輸送の完了後に切断して、遊離シグナルペプチドと成熟タンパク質を生成することができる。その後、遊離シグナルペプチドは、特定のプロテアーゼによって消化される。シグナルペプチドは、分子のアミノ末端に存在し得る。

10

【0137】

一実施形態では、シグナルペプチドは、ヒトCD28由来のシグナルペプチドである。一実施形態では、ヒトCD28由来のシグナルペプチドは、SEQ ID NO: 110を含む。一実施形態では、シグナルペプチドは、SEQ ID NO: 110と少なくとも80%同一である。一実施形態では、シグナルペプチドは、SEQ ID NO: 110と少なくとも90%同一である。一実施形態では、シグナルペプチドは、SEQ ID NO: 110と少なくとも95%同一である。一実施形態では、シグナルペプチドは、SEQ ID NO: 110と少なくとも98%同一である。

【0138】

「アミノ酸リンカー」とは、この文脈では、二重特異性T細胞エンゲージャーが適切に機能し、両方の標的とかみ合う (engage) ことを可能にする、十分な長さ、柔軟性、および組成の配列であると理解される。

20

アミノ酸リンカーは、ヒンジを含むことができる。ヒンジは、例えばSEQ ID NO: 12に示されるような、ヒトCD8由来のものであり得る。

【0139】

一実施形態では、アミノ酸リンカーは、(N末端からC末端の方向に) SEQ ID NO: 111 - SEQ ID NO: 112 - SEQ ID NO: 118; またはSEQ ID NO: 111 - SEQ ID NO: 112 - SEQ ID NO: 118と少なくとも80%同一の配列を含む。一実施形態では、アミノ酸リンカーは、SEQ ID NO: 111と少なくとも80%同一である配列を含む。一実施形態では、アミノ酸リンカーは、SEQ ID NO: 111と少なくとも90%同一である配列を含む。一実施形態では、アミノ酸リンカーは、SEQ ID NO: 111と少なくとも95%同一である配列を含む。一実施形態では、アミノ酸リンカーは、SEQ ID NO: 111と少なくとも98%同一である配列を含む。一実施形態では、アミノ酸リンカーは、SEQ ID NO: 112と少なくとも80%同一である配列を含む。一実施形態では、アミノ酸リンカーは、SEQ ID NO: 112と少なくとも90%同一である配列を含む。一実施形態では、アミノ酸リンカーは、SEQ ID NO: 112と少なくとも95%同一である配列を含む。一実施形態では、アミノ酸リンカーは、SEQ ID NO: 112と少なくとも98%同一である配列を含む。一実施形態では、アミノ酸リンカーは、SEQ ID NO: 118と少なくとも80%同一である配列を含む。一実施形態では、アミノ酸リンカーは、SEQ ID NO: 118と少なくとも90%同一である配列を含む。一実施形態では、アミノ酸リンカーは、SEQ ID NO: 118と少なくとも95%同一である配列を含む。一実施形態では、アミノ酸リンカーは、SEQ ID NO: 118と少なくとも98%同一である配列を含む。

30

40

【0140】

一実施形態では、多価抗体は、SEQ ID NO: 119によってコードされる。

【0141】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 1に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 2に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 3に記載のCDR3アミノ酸配列を含む (hCD221ug-6)。

【0142】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 4に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID N

50

O: 5に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 6に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD221ug-10)。

【0143】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 7に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 8に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 9に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD221ug-13)。

【0144】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 10に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 11に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 12に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD221ug-14)。

【0145】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 13に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 14に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 15に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD221ug-36)。

【0146】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 16に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 17に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 18に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD221ug-61)。

【0147】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 19に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 20に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 21に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD221ug-74)。

【0148】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 22に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 23に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 24に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD221ug-75)。

【0149】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 25に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 26に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 27に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD221ug-77)。

【0150】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 28に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 29に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 30に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD221ug-80)。

【0151】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 31に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 32に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 33に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD221ug-87)。

【0152】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 34に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 35に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 36に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD221ug-93)。

【0153】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 37に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 38に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 39に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22100ug-2)。

【0154】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 40に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 41に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 42に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22100ug-62)。

10

20

30

40

50

【0155】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 43に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 44に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 45に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22100ug-66)。

【0156】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 46に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 47に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 48に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22pas-10)。

【0157】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 49に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 50に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 51に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22pas-16)。

10

【0158】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 52に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 53に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 54に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22pas-23)。

【0159】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 55に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 56に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 57に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22pas-24)。

20

【0160】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 58に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 59に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 60に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22pas-32)。

【0161】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 61に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 62に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 63に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22pas-33)。

【0162】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 64に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 65に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 66に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22pas-48)。

30

【0163】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 67に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 68に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 69に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22pas-55)。

【0164】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 70に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 71に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 72に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22pas-64)。

40

【0165】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 73に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 74に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 75に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22pas-72)。

【0166】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 76に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 77に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 78に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22pas-79)。

【0167】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 79に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID

50

NO: 80に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 81に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22pas-82)。

【0168】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 82に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 83に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 84に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 85に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

10

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 86に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 87に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 88に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 89に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 90に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

20

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 91に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 92に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 93に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 94に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 95に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

30

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 96に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 97に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 98に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 99に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 100に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

40

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 101に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 102に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 103に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 104に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 105に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、

50

およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 106に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 107に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 108に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 120に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 121に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 122に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 123に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 124に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 125に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

【0169】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 82を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 83を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 84を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 85を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 86を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 87を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 88を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 89を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 90を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 91を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 92を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 93を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 94を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 95を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 96を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 97を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 98を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 99を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 100を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 101を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 102を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 103を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 104を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 105を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 106を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 107を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 108を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 120を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 121を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 122を含む。

10

20

30

40

50

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 123を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 124を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 125を含む。

【0170】

いくつかの実施形態では、BiKEは、上記BiKEの1つに対して80%、90%、95%、98%、または99%の同一性を有する上記BiKEの配列バリエーションである。いくつかの実施形態では、該バリエーションは、それが由来する親分子と実質的に同じ結合特異性を保持する。いくつかの実施形態では、該バリエーションは、それが由来する親分子と実質的に同じ結合親和性を保持する。

【0171】

BiKEおよびTriKE

一実施形態では、多価抗体は、二重特異性キラー細胞エンゲージャーである。

【0172】

「BiKE」という用語は、2つの異なる抗体からの2つの可変領域が連結されている組換え二重特異性タンパク質を指し、一方はナチュラルキラー（NK）細胞上の細胞表面分子（例えば、CD16）を標的とし、他方は疾患細胞（典型的には悪性細胞）の表面上の抗原を標的とする。例えば、BiKEは、2つのscFv、2つのVHH、またはこれらの組み合わせを含み得る。これらの2つは、通常、短い柔軟なリンカーと一緒に連結される。腫瘍抗原とNK細胞に同時に結合することによって、BiKEはNK細胞応答と腫瘍細胞の殺傷を仲介する。

【0173】

一実施形態では、免疫細胞の細胞表面マーカーは、ナチュラルキラー（NK）細胞のマーカーを含む。一実施形態では、NK細胞のマーカーは、ヒトCD16を含む。

【0174】

一実施形態では、多価抗体は、三重特異性キラー細胞エンゲージャー（BiKE）である。

【0175】

用語「TriKE」は、もう一つの機能性を持たせるようにさらに改変されたBiKEを示す。この用語は、様々なアプローチを包含するために使用されている。1つのアプローチは、NK細胞の活性化、増殖、および/または生存を促進するために、介在する免疫調節分子（改変型ヒトIL-15架橋剤）を挿入することを含む（Vallera et al. IL-15 Trispecific Killer Engagers (TriKEs) Make Natural Killer Cells Specific to CD33+ Targets While Also Inducing In Vivo Expansion, and Enhanced Function. Clinical Cancer Research. 2012; 22(14): 3440-50）。他のTriKEアプローチは、3つの抗体可変領域を含む三重特異性分子である：1つはNK細胞受容体を標的とし、2つは腫瘍関連抗原を標的とする（Gleason et al. Bispecific and Trispecific Killer Cell Engagers Directly Activate Human NK Cells Through CD16 Signaling and Induce Cytotoxicity and Cytokine Production. Mol Cancer Ther. 2012; 11(12): 2674-84）。さらに他のTriKEアプローチは、2つのNK細胞受容体（例えば、CD16およびNKP46）と1つの腫瘍関連抗原を標的とする（Gauthier et al. Multifunctional Natural Killer Cell Engagers Targeting NKP46 Trigger Protective Tumor Immunity. Cell. 2019; 177(7): 1701-13）。

【0176】

一実施形態では、多価抗体は、NK細胞の活性化、増殖、および/または生存を刺激するためのサイトカインをさらに含む。一実施形態では、NK細胞の増殖を刺激するためのサイトカインは、インターロイキン-15（IL-15）、そのバリエーション、またはその機能性断片である。

【0177】

一実施形態では、多価抗体は、第2のNK細胞マーカーに結合する少なくとも第3の抗原結合部分をさらに含む。一実施形態では、第2のNK細胞マーカーは、ヒトNKP46である

10

20

30

40

50

。

【0178】

一実施形態では、多価抗体は、腫瘍関連抗原に結合する少なくとも第3の抗原結合部分をさらに含む。いくつかの実施形態では、腫瘍関連抗原は、ヒトCD22とは異なる。

【0179】

一実施形態では、第3の抗原結合部分は、 V_{HH} 、 V_{NAR} 、またはscVFを含む。

【0180】

一実施形態では、第2の抗原結合部分は、 V_{HH} を含む。

【0181】

一実施形態では、第3の抗原結合部分は、ヒト血清アルブミンに結合する。このような実施形態では、ヒト血清アルブミンに対する親和性は、安定化/半減期の増加に寄与し得る。

10

【0182】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 1に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 2に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 3に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD221ug-6)。

【0183】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 4に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 5に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 6に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD221ug-10)。

20

【0184】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 7に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 8に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 9に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD221ug-13)。

【0185】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 10に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 11に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 12に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD221ug-14)。

【0186】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 13に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 14に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 15に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD221ug-36)。

30

【0187】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 16に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 17に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 18に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD221ug-61)。

【0188】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 19に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 20に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 21に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD221ug-74)。

40

【0189】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 22に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 23に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 24に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD221ug-75)。

【0190】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 25に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 26に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 27に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD221ug-77)。

【0191】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 28に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID

50

NO: 29に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 30に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD221ug-80)。

【0192】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 31に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 32に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 33に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD221ug-87)。

【0193】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 34に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 35に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 36に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD221ug-93)。

【0194】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 37に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 38に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 39に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22100ug-2)。

【0195】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 40に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 41に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 42に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22100ug-62)。

【0196】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 43に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 44に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 45に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22100ug-66)。

【0197】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 46に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 47に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 48に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22pas-10)。

【0198】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 49に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 50に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 51に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22pas-16)。

【0199】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 52に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 53に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 54に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22pas-23)。

【0200】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 55に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 56に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 57に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22pas-24)。

【0201】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 58に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 59に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 60に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22pas-32)。

【0202】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 61に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 62に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 63に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22pas-33)。

【0203】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 64に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 65に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 66に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22pas-48)。

10

20

30

40

50

【0204】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 67に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 68に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 69に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22pas-55)。

【0205】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 70に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 71に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 72に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22pas-64)。

【0206】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 73に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 74に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 75に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22pas-72)。

【0207】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 76に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 77に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 78に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22pas-79)。

【0208】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 79に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 80に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 81に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22pas-82)。

【0209】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 82に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 83に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 84に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 85に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 86に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 87に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 88に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 89に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 90に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 91に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 92に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 93に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 94に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 95に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 96に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、お

10

20

30

40

50

よびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 97に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 98に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 99に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 100に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 101に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 102に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 103に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 104に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 105に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 106に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 107に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 108に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 120に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 121に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 122に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 123に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 124に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 125に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

【0210】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 82を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 83を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 84を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 85を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 86を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 87を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 88を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 89を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 90を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 91を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 92を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 93を含む。

10

20

30

40

50

- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 94を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 95を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 96を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 97を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 98を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 99を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 100を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 101を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 102を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 103を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 104を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 105を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 106を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 107を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 108を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 120を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 121を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 122を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 123を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 124を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 125を含む。

10

20

【0211】

いくつかの実施形態では、BiKEまたはTriKEは、上記のBiKEおよびTriKEの1つに対して80%、90%、95%、98%、または99%の同一性を有する、その配列バリエーションである。いくつかの実施形態では、該バリエーションは、それが由来する親分子と実質的に同じ結合特異性を保持する。いくつかの実施形態では、該バリエーションは、それが由来する親分子と実質的に同じ結合親和性を保持する。

【0212】

一態様では、第1の抗原結合部分、ヒトCD8由来のポリペプチドヒンジを含むアミノ酸リンカー、および第2の抗原結合部分を含む、多価抗体が提供される。一実施形態では、ヒトCD8由来のポリペプチドヒンジは、SEQ ID NO: 112を含む。一実施形態では、該アミノ酸リンカーは、ヒトCD8由来のポリペプチドヒンジのN末端に少なくとも1つのG4Sと、ヒトCD8由来のポリペプチドヒンジのC末端に少なくとも1つのG4Sをさらに含む。一実施形態では、該アミノ酸リンカーは、少なくとも47アミノ酸(aa)の長さであり、好ましくは少なくとも52残基の長さ、好ましくは少なくとも57残基の長さ、より好ましくは少なくとも62残基の長さ、さらにより好ましくは少なくとも67残基の長さである。一実施形態では、該アミノ酸リンカーは、N末端からC末端の方向に、SEQ ID NO: 111、112、および118を含む。一実施形態では、第1の抗原結合部分は、ヒトCD22に特異的に結合する。一実施形態では、第1の抗原結合部分は、V_HH、V_{NAR}、またはscV_Fである。一実施形態では、第1の抗原結合部分は、本明細書に記載される抗CD22 sdAbのうちの1つである。一実施形態では、第2の抗原結合部分は、免疫細胞の細胞表面マーカーに特異的に結合する。一実施形態では、免疫細胞の細胞表面マーカーは、T細胞のマーカーを含む。一実施形態では、T細胞マーカーは、ヒトCD3を含む。一実施形態では、第2の抗原結合部分は、V_HH、V_{NAR}、またはscV_Fである。

30

40

組換え核酸分子

一態様では、本明細書で定義される多価抗体をコードする組換え核酸分子が提供される。一実施形態では、核酸はベクターである。

【0213】

組成物

一態様では、本明細書で定義される多価抗体を、許容される賦形剤、希釈剤または担体

50

と一緒に含む、組成物が提供される。一実施形態では、該組成物は、本明細書で定義される二重特異性T細胞エンゲージャーを含む。一実施形態では、該組成物は、本明細書で定義されるBiKEを含む。一実施形態では、該組成物は、本明細書で定義されるTriKEを含む。一実施形態では、該組成物は医薬組成物であり、賦形剤、希釈剤または担体は、薬学的に許容される賦形剤、希釈剤または担体である。

【0214】

使用および方法

一態様では、がんまたは自己免疫疾患を治療するための、本明細書で定義される多価抗体の使用が提供される。一実施形態では、がんは、血液学的悪性腫瘍である。一実施形態では、血液学的悪性腫瘍は、白血病、リンパ腫、または骨髄異形成症候群である。一実施形態では、白血病は、急性リンパ性白血病（ALL）または慢性リンパ性白血病（CLL）である。一実施形態では、リンパ腫は、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、小細胞濾胞性リンパ腫、および大細胞濾胞性リンパ腫からなる群より選択される。一実施形態では、自己免疫疾患は炎症性疾患である。一実施形態では、自己免疫疾患はループスである。一実施形態では、自己免疫疾患は多発性硬化症である。一実施形態では、自己免疫疾患は自己免疫性糖尿病である。

10

【0215】

一態様では、がんまたは自己免疫疾患の治療用の医薬を調製するための、本明細書で定義される多価抗体の使用が提供される。一実施形態では、がんは、血液学的悪性腫瘍である。一実施形態では、血液学的悪性腫瘍は、白血病、リンパ腫、または骨髄異形成症候群である。一実施形態では、白血病は、急性リンパ性白血病（ALL）または慢性リンパ性白血病（CLL）である。一実施形態では、リンパ腫は、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、小細胞濾胞性リンパ腫、および大細胞濾胞性リンパ腫からなる群より選択される。一実施形態では、自己免疫疾患は炎症性疾患である。一実施形態では、自己免疫疾患はループスである。一実施形態では、自己免疫疾患は多発性硬化症である。一実施形態では、自己免疫疾患は自己免疫性糖尿病である。

20

【0216】

一態様では、がんまたは自己免疫疾患の治療に使用するための、本明細書で定義される多価抗体が提供される。一実施形態では、がんは、血液学的悪性腫瘍である。一実施形態では、血液学的悪性腫瘍は、白血病、リンパ腫、または骨髄異形成症候群である。一実施形態では、白血病は、急性リンパ性白血病（ALL）または慢性リンパ性白血病（CLL）である。一実施形態では、リンパ腫は、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、小細胞濾胞性リンパ腫、および大細胞濾胞性リンパ腫からなる群より選択される。一実施形態では、自己免疫疾患は炎症性疾患である。一実施形態では、自己免疫疾患はループスである。一実施形態では、自己免疫疾患は多発性硬化症である。一実施形態では、自己免疫疾患は自己免疫性糖尿病である。

30

【0217】

一態様では、本明細書で定義される多価抗体を対象に投与することを含む、対象におけるがんまたは自己免疫疾患の治療方法が提供される。一実施形態では、がんは、血液学的悪性腫瘍である。一実施形態では、血液学的悪性腫瘍は、白血病、リンパ腫、または骨髄異形成症候群である。一実施形態では、白血病は、急性リンパ性白血病（ALL）または慢性リンパ性白血病（CLL）である。一実施形態では、リンパ腫は、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、小細胞濾胞性リンパ腫、および大細胞濾胞性リンパ腫からなる群より選択される。一実施形態では、自己免疫疾患は炎症性疾患である。一実施形態では、自己免疫疾患はループスである。一実施形態では、自己免疫疾患は多発性硬化症である。一実施形態では、自己免疫疾患は自己免疫性糖尿病である。

40

【0218】

表3は、特定の態様および実施形態による、本明細書に記載される多価抗体とCARの例示的な配列およびモジュールを示す。

【0219】

50

【表 3】

表3:コンストラクトの配列および構成要素

配列 ID	説明	配列
109	CARモジュラー コンストラクト DNA配列 太字は制限部位	ATGCTCAGGCTGCTCTTGGCTCTCAACTTATTCCCTTCAATTCAAGTAAC AGGAG GGTCTTC [sdAb配列] GAAGACTTCCTTTGCGAGACGAC GGTGGCGGGGGATCAGGTGGTGGAGGTAGCGGGGGAGGGGGCTCAGGCGG TACAACTACGCCTGCACCTCGCCACCGACCCAGCACCAACCATCGCTT CACAGCCTTTGAGCCTGCGACCAGAGGCATGTCGCCCTGCTGCGGGCGGT GCCGTTTCATACTCGCGGACTTGATTTTTCGTGTGAC GTCGTCTCGCCTTC TAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATA GCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAAACGGGGC AGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGCGACCAGTACA AACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAG AAGGAGGATGTGAACTGCTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCC CCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGG ACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGCGACGTGGCCGGGACCCTG AGATGGGGGGAAAGCCGCAGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTAC AATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGAT GAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGAC TCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTG CCCCCTCGCGCTAGCGCCACGAACTTCTCTCTGTTAAAGCAAGCAGGCGA CGTGGAAGAAAACCCCGGTCCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGACAACA TGGCCAGCCTGCCCCGCCACCCACGAGCTGCACATCTTCGGCAGCATCAAC GGCGTGGACTTCGACATGGTGGGCCAGGGCACCGGCAACCCCAACGACGG CTACGAGGAGCTGAACCTGAAGAGCACCAAGGGCGACCTGCAGTTCAGCC CCTGGATTCTGGTGCCCCACATCGGCTACGGCTTCCACCAGTACCTGCCC

10

20

30

40

50

		TACCCCGACGGCATGAGCCCCTTCCAGGCCGCCATGGTGGACGGCAGCGG CTACCAGGTGCACAGGACCATGCAGTTCGAGGACGGCGCCAGCCTGACCG TGAACTACAGGTACACCTACGAGGGCAGCCACATCAAGGGCGAGGCCCAG GTGAAGGGCACC GGCTTCCCCGCCGACGGCCCCGTGATGACCAACAGCCT GACCGCCGCCGACTGGTGCAGGAGCAAAAAGACCTACCCCAACGACAAGA CCATCATCAGCACCTTCAAGTGGAGCTACACCACCGGCAACGGCAAGAGG TACAGGAGCACCGCCAGGACCACCTACACCTTCGCCAAGCCCATGGCCGC CAACTACCTGAAGAACCAGCCCATGTACGTGTTTCAAAAAGACCGAGCTGA AGCACAGCAAGACCGAGCTGAACTTCAAGGAGTGGCAGAAGGCCTTCACC GACGTGATGGGCATGGACGAGCTGTACAAGCCCAAGAAGAAGAGGAAGGT GGAGGACCCCCCGCCGCCAAGAGGGTGAAGCTGGACTAA	10
110	ヒトCD28 シグナルペプチド	MLRLLLALNLFPSIQVTG	
111	柔軟な合成 リンカードメイン	GGGSGGGSGGGSGG	20
112	ヒトCD8 ヒンジドメイン	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD	
113	ヒトCD28 膜貫通ドメイン	PSKPFWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVR	
114	ヒト4-1BB 共刺激ドメイン	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	30
115	ヒトCD3ζ シグナル 伝達ドメイン	LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKP QRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDLGLYQGLSTATK DTYDALHMQALPPR	
116	M971 scFV	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWL GRYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCA REVTGDLEDAFDIWGGTMTVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTI	40

		TCRASQTIWSYLNWYQQRPGKAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGRGSGTDF TLTISSLQAEDFATYYCQQSYSIPQTFGQGTKLEIK	
117	FMC63 scFV	DYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKDIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQD ISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNL EQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVK LQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWG SETTYYNLSALKSRLTIIDKNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGG SYAMDYWGQGTSTVTVSS	10
118	短い柔軟な リンカーアミノ酸 配列	GGGGS	
119	二重特異性 T細胞 エンゲージャー モジュラー コンストラクト DNA配列 太字は制限部位	ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCCTCGTTGCTCTTTTATAGAGGTGT CCAGTGTACAGGAGGG GTCTTCG [sdAb配列] GAAGACTTCCTTG GAGGAGGCGGAAGT [抗CD3 Mab重鎖] GGCGGTGGTG GGTCAGGCGGCGGTGGGAGCGGAGGAGGTGGAAGC [抗CD3 Mab軽鎖] CACCACCACCACCACCACTAG	20
120	hCD221ug-36 クローン化 セグメント	QVQLVESGGGLVQAGGSLRVSCEASGITFSRAAMGWYRQRPGRKERVAV VNSDSSTIYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLEPEDTAVYYCWSPGF GSYWGQGTQVTVSS	
121	hCD221ug-93 クローン化 セグメント	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASMSSFSQYVMYWYRQAPGRQRELVA ITSASSTSYADSVKGRFTISRDNKSIIVYLQMNSLKPEDTAVYYCNAQYG STFIRKPYDTWGQGTQVTVSS	30
122	hCD221ug-10 クローン化 セグメント	QVQLVESGGGLVQAGGSLSVCTASESTFSIMMGWFRQAPGKQREMAVI NSAGSTNYADSAEGRFTISRDIAKKTIVSLQMNSLKPEDTAVYYCYVDGYF GGGTQVTVSS	

123	hCD221ug-61 クローン化 セグメント	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASMSSFSQYVMYWYRQAPGKQRELVAT ITSYSNTNYADSVKGRFTISRDNAKSIAYLQMDSLKPEDTAVYYCNAQYG STFIRNHWDWGGGTQVTVSS
124	hCD22pas-16 クローン化 セグメント	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSTFSLKAMAWYRQAPGKQRERVGV INSDGSYTTDAASVQGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNTMP PWPWGQGTQVTVSS
125	hCD221ug-80 クローン化 セグメント	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGFTLDYVMGWFRQAPGKEREAVSC ITSDGVITYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNVRVKPEDTAVYYCAVDKP FYDGGIQYTCPVDFDSWGQGTQVTVSS
138	hCD221ug36 例示的なCAR	ATGCTCAGGCTGCTCTTGGCTCTCAACTTATTCCTTCAATTCAAGTAAC AGGACAGGTACAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGCAGGCTGGGG GGTCTCTGAGAGTCTCCTGTGAAGCCTCTGGAATCACGTTTCAGTCGCGCG GCCATGGGCTGGTACCGCCAGCGTCCAGGCAAGGAGCGCAACGAGTCGC AGTTGTTAATAGTGATAGCAGTACAATATATGCAGACTCCGTGAAGGGCC GGTTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACAGTGTATCTGCAATG AACAGCCTGGAACCTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTTGGTCCCCAGG GTTTCGGGTCCTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTTTCTCACCTT TGCGAGACGACGGTGGCGGGGGATCAGGTGGTGGAGGTAGCGGGGAGGG GGCTCAGGCGGTACAACCTACGCCTGCACCTCGCCACCGACCCAGCACC AACCATCGCTTCACAGCCTTTGAGCCTGCGACCAGAGGCATGTCGCCCTG CTGCGGGCGGTGCCGTTCACTCGCGGACTTGATTTTGCGTGTGACGTC GTCTCGCCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGAGTCCT GGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTCTGGGTGA GGAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATG CGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCC AGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGCTGAGAGTGAAGTTCAGCAGGA GCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAG CTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGCGACGTGG CCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGCAGAGAAGGAAGAACCCTCAGG

10

20

30

40

		AAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGT GAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCT TTACCAGGGACTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACA TGCAGGCCCTGCCCCCTCGC [任意のP2A-GFPマーカ－]
139	hCD221ug36 例示的な 二重特異性 T細胞 エンゲージャー	ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTTTAGAGGTGT CCAGTGTACAGGACAGGTACAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTGC AGGCTGGGGGGTCTCTGAGAGTCTCCTGTGAAGCCTCTGGAATCACGTTT AGTCGCGCGGCCATGGGCTGGTACCGCCAGCGTCCAGGCAAGGAGCGCGA ACGAGTCGCAGTTGTTAATAGTGATAGCAGTACAATATATGCAGACTCCG TGAAGGGCCGGTTTACCATTCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACAGTGTAT CTGCAAATGAACAGCCTGGAACCTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTTG GTCCCCAGGGTTCGGGTCTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTTT CCTCACCTTTGCGAGACGACGGTGGCGGGGGATCAGGTGGTGGAGGTAGC GGGGGAGGGGGCTCAGGCGGTACAACCTACGCCTGCACCTCGCCACCGAC CCCAGCACCAACCATCGCTTCACAGCCTTTGAGCCTGCGACCAGAGGCAT GTCGCCCTGCTGCGGGCGGTGCCGTTTCTACTCGCGGACTTGATTTTGCG TGTGACGTCGTCTCGCTTGGAGGAGGCGGAAGT [CD3特異的scFV重鎖] GCGGTTGGTGGGTTCAGGCGGCGGTGGGAGCGGAGGA GGTGAAGC [CD3特異的scFV軽鎖] CACCACCACC ACCACCACTAG

10

20

30

【 0 2 2 0 】

抗体hCD221ug36を含む例示的なCARコンストラクト（SEQ ID NO: 138）について：

- 位置1～54は、シグナルペプチドに対応する；
- 位置55～396は、抗体1ug36 ABDに対応する（しかし、代替的に、本明細書に記載される他の任意の抗CD22 sdAbであり得る）；
- 位置397～606は、(G4S)3-ヒトCD8aヒンジおよび制限scarに対応する；
- 位置607～702は、ヒトCD28膜貫通ドメインに対応する；
- 位置703～828は、ヒト41BB共刺激ドメインに対応する；
- 位置829～1170は、ヒトCD3ζシグナル伝達ドメインに対応する。

40

【 0 2 2 1 】

実験および試験の目的で、該コンストラクトはその後、任意のインフレームP2A-GFPマーカ－を含む。

【 0 2 2 2 】

抗体hCD221ug36を含む例示的な二重特異性T細胞エンゲージャーコンストラクト（SEQ ID NO: 139）について：

- 位置1～72は、シグナルペプチドおよび制限scarに対応する；
- 位置64～405は、抗体hCD221ug36に対応する（しかし、代替的に、本明細書に記載される他の任意の抗CD22 sdAbであり得る）；
- 位置406～633は、(G4S)3-hCD8a-(G4S)リンカードメインに対応する（モジュラ

50

ーヒンジの制限部位も含む) ;

- 位置633および634は、CD3特異的マウスscFvの重鎖によって分離される ;
- 位置634～678は、(G4S)3リンカーに対応する ;
- 位置678～679は、CD3特異的マウスscFvの軽鎖によって分離される。

【0223】

実験および試験の目的で、該コンストラクトはその後、6xHisタグおよび終止コドンに対応する位置679～699を含む。

【0224】

表3に示されるSEQ ID NO: 120～125に対応する例示的な抗体配列について、特にアミノ末端に向かって、配列の相違があることに留意されたい。具体的には、1位、3位、5位がそれぞれQ、Q、Vである(表3のSEQ ID NO: 120および121と、表1および3のVHH#22 (SEQ ID NO: 86) およびVHH#11 (SEQ ID NO: 93) とを比較されたい)。理論に束縛されるものではないが、これらの配列の相違は安定性および/またはプロテアーゼ耐性に寄与する可能性がある(Hussack G et al. Protein Engineering Design & Selection. 2014; 27(6); 191-198参照)。したがって、本明細書に開示される実施形態の多価抗体およびCARは、1位、3位、5位にそれぞれQ、Q、Vを含むように改変された本明細書に開示されるsdAbのいずれか1つを含むバリエーションを包含する。

10

【0225】

キメラ抗体受容体および関連する実施形態

20

一態様では、本明細書で定義されるVHH sdAbを含む、ヒトCD22に結合するキメラ抗体受容体(CAR)が提供される。

【0226】

「キメラ抗原受容体」は、特定のタンパク質を標的とする新しい能力をT細胞に付与するように操作された受容体タンパク質である。この受容体は、抗原結合機能とT細胞活性化機能の両方を組み合わせて単一の受容体としているため、キメラである(Stoiber et al. Limitations in the Design of Chimeric Antigen Receptors for Cancer Therapy. Cells. 2012; 8(5): 472およびvan der Stegen et al. The pharmacology of second-generation chimeric antigen receptors. Nat Rev Drug Discov. 2019; 14(7): 499-509参照)。

30

【0227】

一実施形態では、CARは、N末端からC末端の方向に、

- 請求項1～27のいずれか一つに定義されるsdAbを含むCD22結合ドメイン ;
- ポリペプチドヒンジ ;
- 膜貫通ドメイン ; および
- 共刺激ドメインとシグナル伝達ドメインを含む細胞質ドメイン ;

を含む。

【0228】

本明細書で使用される「ポリペプチドヒンジ」という用語は、一般に、細胞外リガンド結合ドメインを膜貫通ドメインに連結するように機能する、任意のオリゴペプチドまたはポリペプチドを意味する。特に、ヒンジ領域は、細胞外リガンド結合ドメインにより多くの柔軟性とアクセシビリティ(近づきやすさ)を与えるために使用される。ヒンジ領域は、最大300アミノ酸、好ましくは10～100アミノ酸、最も好ましくは25～50アミノ酸を含み得る。ヒンジ領域は、天然に存在する分子の全部もしくは一部、例えば、CD8、CD4、またはCD28の細胞外領域の全部もしくは一部、抗体定常領域の全部もしくは一部など、に由来し得る。あるいは、ヒンジ領域は、天然に存在するヒンジ配列に相当する合成配列、または完全に合成のヒンジ配列であってもよい。

40

【0229】

一実施形態では、ポリペプチドヒンジは、CD8ヒンジドメインである。一実施形態では、CD8ヒンジドメインは、SEQ ID NO: 112を含む。一実施形態では、CD8ヒンジド

50

メインは、SEQ ID NO: 112と少なくとも80%同一である。一実施形態では、該ヒンジドメインは、SEQ ID NO: 112と少なくとも90%同一である。一実施形態では、該ヒンジドメインは、SEQ ID NO: 112と少なくとも95%同一である。一実施形態では、該ヒンジドメインは、SEQ ID NO: 112と少なくとも98%同一である。

【0230】

「膜貫通ドメイン」という用語は、細胞膜にまたがり、それによってCARの細胞外部分（CD22結合部分を含む）とシグナル伝達に参与する細胞内部分とを結びつける機能を有するポリペプチドを指す。CARによく使われる膜貫通ドメインは、CD4、CD8 α 、CD28、およびCD3 ζ に由来するものである。

【0231】

一実施形態では、膜貫通ドメインは、CD28膜貫通ドメインである。一実施形態では、CD28膜貫通ドメインは、SEQ ID NO: 113を含む。一実施形態では、膜貫通ドメインは、SEQ ID NO: 113と少なくとも80%同一である。一実施形態では、膜貫通ドメインは、SEQ ID NO: 113と少なくとも90%同一である。一実施形態では、膜貫通ドメインは、SEQ ID NO: 113と少なくとも95%同一である。一実施形態では、膜貫通ドメインは、SEQ ID NO: 113と少なくとも98%同一である。

【0232】

用語「細胞質ドメイン」（「シグナル伝達ドメイン」ともいう）は、細胞外リガンド結合ドメインが標的に結合した後に細胞内シグナル伝達を担うCARの細胞内部分を指し、免疫細胞の活性化と免疫応答をもたらす。言い換えれば、細胞質ドメインは、CARが発現される免疫細胞の正常なエフェクター機能の少なくとも1つの活性化に参与している。例えば、T細胞のエフェクター機能は、細胞溶解活性、またはサイトカインの分泌を含むヘルパー活性であり得る。こうして、「細胞質ドメイン」という用語は、エフェクターシグナルを伝達して、細胞に特殊化した機能を実行させるタンパク質の部分を指す。このような細胞質ドメインは、シグナル伝達ドメインに加えて、共刺激ドメインを含むことが一般的である。

【0233】

用語「シグナル伝達ドメイン」は、エフェクターシグナルを伝達して、細胞に特殊化した機能を実行させるタンパク質の部分を指す。CARに使用するためのシグナル伝達ドメインの例は、抗原受容体のかみ合い（engagement）に続いてシグナル伝達を開始するために協調的に作用するT細胞受容体および共受容体の細胞質配列、ならびに同じ機能を有するこれらの配列の任意の誘導体またはバリエーションおよび任意の合成配列であり得る。シグナル伝達ドメインは、抗原依存的な一次活性化を開始するものと、抗原非依存的に作用して二次シグナルまたは共刺激シグナルをもたらすものという、2つの異なるクラスの細胞質シグナル伝達配列を含む。一次細胞質シグナル伝達配列は、免疫受容体チロシンベース活性化モチーフまたはITAMとして知られるシグナル伝達モチーフを含むことができる。ITAMは、様々な受容体の細胞質内尾部に見られる明確に定義されたシグナル伝達モチーフであって、syk/zap70クラスのプロテインチロシンキナーゼの結合部位として機能する。本発明で使用するシグナル伝達ドメインの非限定的な例には、TCR ζ 、共通FcR γ （FCERIG）、Fc γ R1a、FcR β （Fc ϵ Rib）、FcR ϵ 、CD3 ζ 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD66d、DAP10、またはDAP12に由来するものが含まれる。好ましい実施形態では、CARのシグナル伝達ドメインは、CD3 ζ シグナル伝達ドメインを含み得る。

【0234】

一実施形態では、シグナル伝達ドメインは、CD3 ζ シグナル伝達ドメインである。一実施形態では、CD3 ζ シグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO: 115を含む。一実施形態では、シグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO: 115と少なくとも80%同一である。一実施形態では、シグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO: 115と少なくとも90%同一である。一実施形態では、シグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO: 115と少なくとも95%同一である。一実施形態では、シグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO: 115と少なくとも98%同一である。

% 同一である。

【0235】

用語「共刺激ドメイン」は、共刺激リガンドと特異的に結合し、それによってT細胞による共刺激応答（増殖などであるがこれに限定されない）を仲介する、T細胞上のコグネイト（cognate）結合パートナーを指す。共刺激分子には、MHCクラスI分子、BTLAおよびTollリガンド受容体が含まれるが、これらに限定されない。共刺激分子の例としては、以下が挙げられる：CD27、CD28、4-1BB（CD137）、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原1（LFA-1）、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、およびCD83と特異的に結合するリガンド、CDS、ICAM-1、GITR、BAFFR、HVEM（LIGHTR）、SLAMF7、NKp80（KLRP1）、CD160、CD19、CD4、CD8α、CD8β、IL2Rβ、IL2Rγ、IL7Rα、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1（CD226）、SLAMF4（CD244、2B4）、CD84、CD96（Tactile）、CEACAM1、CRTAM、Ly9（CD229）、CD160（BY55）、PSGL1、CD100（SEMA4D）、CD69、SLAMF6（NTB-A、Ly108）、SLAM（SLAMF1、CD150、IPO-3）、BLAME（SLAMF8）、SELPLG（CD162）、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、NKp44、NKp30、NKp46、NKG2D、またはこれらの組み合わせ。

10

【0236】

一実施形態では、共刺激ドメインは、4-1BB共刺激ドメインである。一実施形態では、4-1BBシグナル伝達ドメインは、SEQ ID NO: 114を含む。一実施形態では、共刺激ドメインは、SEQ ID NO: 114と少なくとも80%同一である。一実施形態では、共刺激ドメインは、SEQ ID NO: 114と少なくとも90%同一である。一実施形態では、共刺激ドメインは、SEQ ID NO: 114と少なくとも95%同一である。一実施形態では、共刺激ドメインは、SEQ ID NO: 114と少なくとも98%同一である。

20

【0237】

一実施形態では、CARは、sdAbとポリペプチドヒンジとの間に柔軟なアミノ酸リンカーをさらに含む。一実施形態では、アミノ酸リンカーは、SEQ ID NO: 111を含む。一実施形態では、アミノ酸リンカーは、SEQ ID NO: 111と少なくとも80%同一である。一実施形態では、アミノ酸リンカーは、SEQ ID NO: 111と少なくとも90%同一である。一実施形態では、アミノ酸リンカーは、SEQ ID NO: 111と少なくとも95%同一である。一実施形態では、アミノ酸リンカーは、SEQ ID NO: 111と少なくとも98%同一である。

30

【0238】

一実施形態では、CARは、シグナルペプチドをさらに含む。

【0239】

一実施形態では、シグナルペプチドは、ヒトCD28由来のシグナルペプチドである。一実施形態では、ヒトCD28由来のシグナルペプチドは、SEQ ID NO: 110を含む。一実施形態では、シグナルペプチドは、SEQ ID NO: 110と少なくとも80%同一である。一実施形態では、シグナルペプチドは、SEQ ID NO: 110と少なくとも90%同一である。一実施形態では、シグナルペプチドは、SEQ ID NO: 110と少なくとも95%同一である。一実施形態では、シグナルペプチドは、SEQ ID NO: 110と少なくとも98%同一である。

40

【0240】

一実施形態では、CARは、SEQ ID NO: 119によってコードされる。

【0241】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 86（hCD221ug-36）、SEQ ID NO: 83（hCD221ug-10）、SEQ ID NO: 87（hCD221ug-61）、SEQ ID NO: 82（hCD221ug-6）、SEQ ID NO: 88（hCD221ug-74）、SEQ ID NO: 85（hCD221ug-

50

14)、SEQ ID NO: 102 (hCD22pos-33)、またはSEQ ID NO: 84 (hCD221ug-13)を含む。

【0242】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 1に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 2に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 3に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD221ug-6)。

【0243】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 4に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 5に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 6に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD221ug-10)。

【0244】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 7に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 8に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 9に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD221ug-13)。

【0245】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 10に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 11に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 12に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD221ug-14)。

【0246】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 13に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 14に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 15に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD221ug-36)。

【0247】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 16に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 17に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 18に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD221ug-61)。

【0248】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 19に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 20に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 21に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD221ug-74)。

【0249】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 22に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 23に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 24に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD221ug-75)。

【0250】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 25に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 26に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 27に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD221ug-77)。

【0251】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 28に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 29に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 30に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD221ug-80)。

【0252】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 31に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 32に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 33に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD221ug-87)。

【0253】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 34に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 35に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 36に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD221ug-93)。

10

20

30

40

50

【0254】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 37に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 38に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 39に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22100ug-2)。

【0255】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 40に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 41に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 42に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22100ug-62)。

【0256】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 43に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 44に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 45に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22100ug-66)。

【0257】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 46に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 47に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 48に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22pas-10)。

【0258】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 49に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 50に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 51に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22pas-16)。

【0259】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 52に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 53に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 54に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22pas-23)。

【0260】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 55に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 56に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 57に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22pas-24)。

【0261】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 58に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 59に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 60に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22pas-32)。

【0262】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 61に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 62に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 63に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22pas-33)。

【0263】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 64に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 65に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 66に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22pas-48)。

【0264】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 67に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 68に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 69に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22pas-55)。

【0265】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 70に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 71に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 72に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22pas-64)。

【0266】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 73に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID

10

20

30

40

50

NO: 74に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 75に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22pas-72)。

【0267】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 76に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 77に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 78に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22pas-79)。

【0268】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 79に記載のCDR1アミノ酸配列、SEQ ID NO: 80に記載のCDR2アミノ酸配列、およびSEQ ID NO: 81に記載のCDR3アミノ酸配列を含む(hCD22pas-82)。

【0269】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 82に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 83に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 84に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 85に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 86に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 87に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 88に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 89に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 90に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 91に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 92に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 93に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 94に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 95に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 96に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 97に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 98に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 99に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 100に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 101に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、

10

20

30

40

50

およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 102に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 103に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 104に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 105に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 106に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

10

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 107に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 108に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 120に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 121に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 122に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

20

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 123に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 124に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 125に記載のsdAb配列のCDR1、CDR2、およびCDR2を含む。

【0270】

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 82を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 83を含む。

30

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 84を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 85を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 86を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 87を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 88を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 89を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 90を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 91を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 92を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 93を含む。

40

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 94を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 95を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 96を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 97を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 98を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 99を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 100を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 101を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 102を含む。

一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 103を含む。

50

- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 104を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 105を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 106を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 107を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 108を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 120を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 121を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 122を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 123を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 124を含む。
- 一実施形態では、sdAbは、SEQ ID NO: 125を含む。

10

【0271】

一実施形態では、CARは、第1のCD22結合ドメインに対してN末端またはC末端に位置する第2のCD22結合ドメインをさらに含み、第2のCD22結合ドメインは、アミノ酸リンカーによって第1のCD22結合ドメインから離れて配置されてもよい。

【0272】

一実施形態では、第2のCD22結合ドメインは、第1のCD22結合ドメインのsdAbと同じsdAbを含む。これらの実施形態は、本明細書では「ダブルバインダー」(double binder)と呼ばれる。例えば、第1および第2のCD22結合ドメインは、両方とも、抗体1ug36を含み得る。

20

【0273】

別の実施形態では、第2のCD22結合ドメインは、第1のCD22結合ドメインのsdAbと異なるsdAbを含む。これらの実施形態は、本明細書では「バイパラトピック」(bi-paratopic)と呼ばれる。この実施形態では、第2のCD22結合ドメインのsdAbは、第1のCD22結合ドメインのsdAbによって結合されるものとは異なるCD22のエピトープに結合することができる。例えば、CARは、sdAb 1ug36を含む第1のCD22結合ドメインと、sdAb 1ug74を含む第2のCD22結合ドメインとを含み得る。例えば、1ug36は、1ug74のN末端に位置し得る(例えば、図30の概略図を参照)。「異なるエピトープ」は、代替的に、第1のCD22結合ドメインのsdAbによって結合されるエピトープに重複するエピトープであってもよい。あるいは、sdAbは、第1のCD22結合ドメインのsdAbによって結合されるエピトープと同じエピトープに結合してもよい。

30

【0274】

一実施形態では、CARは、CD22以外の標的分子に結合する追加の結合ドメインをさらに含む。これらの実施形態は、本明細書では「タンデムコンストラクト」(tandem construct)と呼ばれる。追加の結合ドメインは、追加のsdAbを含み得る。追加の結合ドメインは、CD22結合ドメインに対してN末端またはC末端に位置し得る。追加の結合ドメインは、アミノ酸リンカーによってCD22結合ドメインから分離されてもよい。一実施形態では、追加の結合ドメインによって結合される標的分子は、CD22をも発現している標的細胞によって発現され、それによって、同じ標的細胞に対して二重の親和性を有するCARが提供される。例えば、CD22以外の標的分子は、B細胞成熟抗原(BCMA)であり得る。CD22結合ドメインは、例えば、sdAb 1ug36を含むことができ、追加の結合ドメインは、抗BCMA sdAbを含むことができる(例えば、図33に示した概略図を参照)。

40

【0275】

いくつかの実施形態では、タンデムコンストラクトは、CD22とは異なりかつ追加の結合ドメインによって結合されるものとは異なるさらに別の標的分子を標的とする、第3の結合ドメインを含んでもよい。このようなコンストラクトは、本明細書では「マルチバインダー」(multi-binder)と呼ばれる。

【0276】

いくつかの実施形態では、CARは、上記CARに対して80%、90%、95%、98%、または99%の同一性を有する、上記CARのうちの1つの配列バリエーションである。いくつか

50

の実施形態では、該バリエーションは、それが由来する親分子と実質的に同じ結合特異性を保持する。いくつかの実施形態では、該バリエーションは、それが由来する親分子と実質的に同じ結合親和性を保持する。

【0277】

核酸およびベクター

一態様では、本明細書で定義されるCARをコードする組換え核酸分子が提供される。

【0278】

一態様では、本明細書で定義される組換え核酸分子を含むベクターが提供される。一実施形態では、ベクターは、ウイルスベクターである。一実施形態では、ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。

【0279】

ウイルス粒子

一態様では、本明細書で定義される組換え核酸を含む組換えウイルス粒子が提供される。一実施形態では、組換えウイルス粒子は、組換えレンチウイルス粒子である。

【0280】

細胞

一態様では、本明細書で定義される組換え核酸分子を含む細胞が提供される。

【0281】

一態様では、本明細書で定義されるCARを細胞表面膜に発現している遺伝子改変細胞が提供される。一実施形態では、遺伝子改変細胞は、免疫細胞である。一実施形態では、免疫細胞は、Tリンパ球であるか、またはTリンパ球に由来するものである。

【0282】

使用および方法

「CAR-T」細胞療法は、がん治療のために、CARで改変されたT細胞を使用する。CAR-T免疫療法の前提は、疾患細胞（通常はがん細胞）をより効果的に標的として破壊するために、T細胞を改変して疾患細胞を認識させることである。一般に、T細胞はCARを発現するように遺伝子改変され、これらの細胞が患者に注入されて腫瘍を攻撃する。CAR-T細胞は、患者自身の血液中のT細胞に由来するもの（自己細胞）、または他の健康なドナーのT細胞に由来するもの（同種異系細胞）のいずれであってもよい。

【0283】

一態様では、CAR-T用の細胞を作製するための、本明細書に記載の核酸、ベクター、またはウイルス粒子の使用が提供される。

【0284】

一態様では、本明細書に記載のウイルス粒子をT細胞に接触させることを含む、CAR-T用の細胞を作製する方法が提供される。一実施形態では、T細胞はドナー由来である。一実施形態では、T細胞は患者由来である。

【0285】

一態様では、本明細書に記載の核酸またはベクターをT細胞に導入することを含む、CAR-T用の細胞を作製する方法が提供される。一実施形態では、T細胞はドナー由来である。一実施形態では、T細胞は患者由来である。

【0286】

一態様では、がんまたは自己免疫疾患を治療するための、本明細書に記載のCARまたは遺伝子改変細胞の使用が提供される。一実施形態では、がんは、血液学的悪性腫瘍である。一実施形態では、血液学的悪性腫瘍は、白血病、リンパ腫、または骨髄異形成症候群である。一実施形態では、白血病は、急性リンパ性白血病（ALL）または慢性リンパ性白血病（CLL）である。一実施形態では、リンパ腫は、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、小細胞濾胞性リンパ腫、および大細胞濾胞性リンパ腫からなる群より選択される。一実施形態では、自己免疫疾患は炎症性疾患である。一実施形態では、自己免疫疾患はループスである。一実施形態では、自己免疫疾患は多発性硬化症である。一実施形態では、自己免疫疾患は自己免疫性糖尿病である。

10

20

30

40

50

【0287】

一実施形態では、前記方法は、患者またはドナーから細胞を取得し、本明細書に記載のCARをコードする組換え核酸分子またはベクターを導入する初期段階をさらに含む。

一実施形態では、前記方法は、患者またはドナーから細胞を取得し、本明細書に記載のウイルス粒子を該細胞に接触させる初期段階をさらに含む。

【0288】

一態様では、がんまたは自己免疫疾患の治療用の医薬を調製するための、本明細書に記載のCARまたは遺伝子改変細胞の使用が提供される。一実施形態では、がんは、血液学的悪性腫瘍である。一実施形態では、血液学的悪性腫瘍は、白血病、リンパ腫、または骨髓異形成症候群である。一実施形態では、白血病は、急性リンパ性白血病（ALL）または慢性リンパ性白血病（CLL）である。一実施形態では、リンパ腫は、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、小細胞濾胞性リンパ腫、および大細胞濾胞性リンパ腫からなる群より選択される。一実施形態では、自己免疫疾患は炎症性疾患である。一実施形態では、自己免疫疾患はループスである。一実施形態では、自己免疫疾患は多発性硬化症である。一実施形態では、自己免疫疾患は自己免疫性糖尿病である。

【0289】

一態様では、がんまたは自己免疫疾患の治療に使用するための、本明細書に記載のCARまたは遺伝子改変細胞が提供される。一実施形態では、がんは、血液学的悪性腫瘍である。一実施形態では、血液学的悪性腫瘍は、白血病、リンパ腫、または骨髓異形成症候群である。一実施形態では、白血病は、急性リンパ性白血病（ALL）または慢性リンパ性白血病（CLL）である。一実施形態では、リンパ腫は、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、小細胞濾胞性リンパ腫、および大細胞濾胞性リンパ腫からなる群より選択される。一実施形態では、自己免疫疾患は炎症性疾患である。一実施形態では、自己免疫疾患はループスである。一実施形態では、自己免疫疾患は多発性硬化症である。一実施形態では、自己免疫疾患は自己免疫性糖尿病である。

【0290】

一態様では、本明細書で定義される遺伝子改変細胞を対象に投与することを含む、対象におけるがんまたは自己免疫疾患の治療方法が提供される。一実施形態では、血液学的悪性腫瘍は、白血病、リンパ腫、または骨髓異形成症候群である。一実施形態では、白血病は、急性リンパ性白血病（ALL）または慢性リンパ性白血病（CLL）である。一実施形態では、リンパ腫は、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、小細胞濾胞性リンパ腫、および大細胞濾胞性リンパ腫からなる群より選択される。一実施形態では、自己免疫疾患は炎症性疾患である。一実施形態では、自己免疫疾患はループスである。一実施形態では、自己免疫疾患は多発性硬化症である。一実施形態では、自己免疫疾患は自己免疫性糖尿病である。

【実施例】

【0291】

以下の実施例は、本発明の実施形態および/または本発明に関して実施した研究の概要を説明するものである。実施例は例示であり、本発明は、以下の例示的な実施形態に限定されるものではない。

【0292】

実施例概論

CD22を標的としたCAR-Tを用いた以前の治験では、全てがマウスモノクローナル抗体をベースにした単鎖可変フラグメント（scFv）を使用してきたが、これは、発現レベル、安定性といった、ドメインペアリング（VH：VLペアリング）の多くの複雑な問題をもたらした。このことは、最終CAR-Tコンストラクトの生産性と有効性を最終的に制限する可能性がある。本明細書に記載のアプローチは、scFv抗体ドメインに代わるものとして、CARターゲティングにラクダ科のシングルドメイン抗体（ナノボディ）を利用するものである。可溶性の、安定したモジュラードメインとしてのラクダ科シングルドメイン抗体の多くの治療用途への応用可能性は、2018年に最初にFDA承認された2価ナノボ

ディによって十分に確立されている。したがって、ナノボディはCAR-T分子の優れたビルディングブロックを提供し、機能的なCAR-Tコンストラクトのプールを構築できるようにする；そのため、非固形腫瘍細胞の治療用の、より一層効果的なCAR-T細胞をスクリーニングする機会が増えることになる。

【0293】

さらに、これらのナノボディは、裸抗体 (naked antibody) または薬物コンジュゲート化抗体療法および二重特異性免疫細胞エンゲージャーを含むがこれらに限定されない、追加の安全で有効な免疫療法レジメンを開発するためにも利用できる可能性がある。

【0294】

本明細書に記載のアプローチは、免疫化したラマに由来するシングルドメイン抗体 (sdAb) を使用する。これらのsdAb配列は、ヒトB細胞とB細胞白血病に特異的に発現しているCD22抗原に特異的に結合する。このsdAb配列を用いて、CD22特異的sdAbをT細胞シグナル伝達分子と組み合わせた新規キメラ受容体配列が、(41BB、CD28または他の共刺激ドメインおよびCD3シグナル伝達ドメインの形態で) 作製された。キメラ抗原受容体への応用に加えて、これらのCD22を標的とする抗体は、二重特異性/三重特異性TもしくはNK細胞エンゲージャーへの応用、抗体-薬物コンジュゲート、または裸抗体を含むがこれらに限定されない、他の形態の免疫療法を開発するために有用であり得る。

【0295】

実施例1: sdAb抗体の作製

はじめに

シングルドメイン抗体 (sdAb) (VHHまたはナノボディともいう) は、ラクダ科重鎖の可変ドメインに由来するもので、抗原結合能が十分にある機能性N末端ドメインを伴って特徴的に安定している。サイズが小さいことに加えて、sdAbは、高い親和性、溶解性、ヒトVH3ファミリーとの高い相同性によるヒトでの低い免疫原性、大腸菌などの微生物での高い発現レベル、および高温、極端なpH、高塩濃度での優れた安定性を保有している。sdAbは、その優れた抗体工学の可能性から、二重および多重特異性治療試薬の理想的なビルディングブロックと考えられている。注目すべき例には、最初にFDA承認された2価抗vWFナノボディ (カプラシズマブ (Caplacizumab), 2019) と、2価/多価または二重/多重特異性フォーマットの他の10種の治療用ナノボディが含まれる；これらは、これまでにAbllynx/Sanofi社や他のバイオ医薬品企業が前臨床および臨床開発へと進めてきたものである。

【0296】

sdAbはまた、キメラ抗原受容体 (CAR) を作製するのに理想的なビルディングブロックである；この場合、標的抗原をもつ特定の細胞を探し出して殺傷する「武装化」免疫Tリンパ球 (CAR-T) を作製するために、従来型IgGのがん特異的な抗原結合ドメイン (scFv、Fab) が免疫細胞活性化ドメインと遺伝子操作により融合される。CAR-TコンストラクトにsdAbを適用することで、scFv/Fabフラグメントのドメイン複雑性が軽減し、かつ最終CAR-Tコンストラクトの生産性と有効性が大いに向上する。それはまた、CAR-Tコンストラクトにさらなる特異性 (第2のがんバイオマーカーに対する特異性) を追加すること (すなわち、二重特異性CAR-T細胞を作製すること) を可能にし、そのため、血液学的腫瘍を治療するための、より一層効果的なCAR-T細胞をスクリーニングする機会を増やすことになる。同様に、これらのsdAbは、二重、三重および多重特異性の免疫細胞エンゲージャーなどの、他の形態の免疫療法の開発にも理想的な候補である。

【0297】

この研究は、B細胞限定白血病抗原であるCD22のエクトドメインに対する機能性ラクダ科sdAbを作製して、CAR-T療法、二重、三重および多重特異性の免疫エンゲージャー療法、適切なヒトIgG融合を伴う裸の治療用抗体を含むがこれらに限定されない、免疫療法を開発することを目的としていた。これらの療法は、がん、自己免疫疾患、および炎症性疾患の治療法として使用することが意図される。これらのsdAb配列を用いて、効果的な抗腫瘍活性を有するCAR-Tおよび二重特異性免疫エンゲージャーを開発するための実

施例が提示される。

【0298】

材料および方法

CD22-ECDのクローニングと発現

優勢なヒトCD22βアイソフォームの細胞外ドメインをコードする遺伝子を、プロプライエタリー（proprietary）pTT5：NRC哺乳動物発現ベクターにクローニングした。NRC CHO-3E7細胞にトランスフェクションした後、該細胞を1Lフラスコで培養し、C末端に6xHisタグを含む発現されたタンパク質を、イムノアフィニティクロマトグラフィー（IMAC）と、その後のサイズ排除クロマトグラフィーにより精製して、SDS-PAGEで分析した。

10

【0299】

ラマの免疫化

CD22抗原の組換えECDドメインでラマを免疫化した。各注射では、総容量0.5mL中の組換えヒトCD22タンパク質100μgを、等量の完全フロイントアジュバント（最初の注射）および不完全フロイントアジュバント（後続の注射）と混合し、皮下に注射した。約2週間の間隔で5回の注射を行い、3回目の注射後と最後の注射から7日後に血液を採取した。

【0300】

RNAの単離とPCR増幅

QIAamp RNA血液ミニキット（QIAGEN Sciences社, Mississauga, ON）をキットの説明書に従って用いて、免疫プロトコルの49日目に採取した約 1×10^7 個のリンパ球からトータルRNAを単離した。第一鎖cDNA合成キット（Amersham Biosciences社, 米国）を用いたオリゴdTプライマーによる第一鎖cDNA合成のための鑄型として、約5μgのトータルRNAを使用した。ラクダ科およびラマ免疫グロブリンのデータベースに基づいて、3つの可変ドメインセンスプライマー（MJ1～3）と2つのCH2ドメインアンチセンスプライマー（CH2およびCH2b3）を設計した（Baral TN et al 2013）。最初のPCRはcDNAを鑄型として行い、従来型抗体（IgG1）と重鎖抗体（IgG2およびIgG3）の両方の可変領域を、2回の別々の反応においてMJ1～3/CH2およびMJ1～3/CH2bプライマーの組み合わせで増幅させた。PCR反応混合物は、以下の成分を含んでいた：2μLのcDNA、5pmolのMJ1～3プライマー混合物、5pmolのCH2またはCH2bプライマー、5μLの10X反応バッファー、3μLの2.5mM dNTP、2.5単位のTaq DNAポリメラーゼ（Roche Applied Science社, Indianapolis, IN）、および最終容量50μLまでの水。PCRプロトコルは、94℃で3分の初期段階と、それに続く94℃で30秒、55℃で30秒、72℃で1分の30サイクルと、72℃で7分の最終伸長段階から成っていた。増幅されたPCR産物は、2%アガロースゲルにかけたところ、従来型IgG1に対応する約850bpと、重鎖抗体に対応する約600bp（550～650bp）との2つの主要なバンドから成っていた。小さい方のバンドをゲルから切り出し、QIAquickゲル抽出キット（QIAGEN社）で精製し、2回目のPCR反応で再増幅させた；このPCR反応は、1μLの精製DNA鑄型、5pmolずつのMJ7（下線を引いたSfiI制限部位を有するVHセンスプライマー；5'-CAT GTG TAG ACT CGC GGC CCA GCC GGC CAT GGC C-3'）およびMJ8（下線を引いたSfiI制限酵素部位を有するアンチセンスプライマー；5'-CAT GTG TAG ATT CCT GGC CGG CCT GGC CTG AGG AGA CGG TGA CCT GG）、5μLの10X反応バッファー、3μLの2.5mM dNTP、2.5単位のTaq DNAポリメラーゼ（Roche Applied Science社, Indianapolis, IN）、および最終容量50μLまでの水を含んでいた。PCRプロトコルは、94℃で3分の初期段階と、それに続く94℃で30秒、55℃で30秒、72℃で1分の30サイクルと、72℃で7分の最終伸長段階から成っていた。重鎖抗体のVH Hフラグメントに対応する増幅PCR産物（約400～450bp）をQIAquick PCR精製キット（QIAGEN社）で精製し、SfiI（New England BioLabs社）を用いて消化し、同じキットで再度精製した。

20

30

40

【0301】

50

ライブラリーの構築

30 µgのpMED1 (Arbabi-Ghahroudi et al. 2009) DNAをSfiIにより50℃で一晩消化した。セルフライゲーション (self-ligation) の機会を最小限にするため、XhoIとPstIの両制限酵素を20単位ずつ加えて、37℃でさらに2時間消化を続けた。ライブラリーの構築では、10 µgのファージミドDNAを1.75 µgのVHHフラグメントとライゲーションし、LigaFast DNAライゲーションシステム (Promega社, Madison, WI) を推奨プロトコルに従って用いて室温で2時間インキュベートした。ライゲーション産物をコンピテント大腸菌TG1細胞 (Stratagene社, Cedar Creek, TX) にエレクトロポレーションした。形質転換した細菌細胞をSOC培地で希釈し、37℃でゆっくり振盪しながら1時間インキュベートした。LB-Amp上のアリコートプレーティングすることで、ライブラリーのサイズを算出した。96個のコロニーからのVHHフラグメントをPCR増幅し、多様性解析のための配列決定を行った。このライブラリーを分注して、-80℃で保存した。

10

【0302】

ライブラリーのパニングとスクリーニング

CD22免疫ライブラリーのパニングには、ビオチン化および受動的吸着の2つの戦略を使用した：

【0303】

a) ビオチン化CD22 ECDのパニング：

構築したサイズ 3.3×10^7 のLPAR1ライブラリー2をファージレスキューし、 1.4×10^9 cfu/µLのファージ力価を用いて、EZ-link sulfo-NHS-LC-LC-Biotin (Thermoscientific社 カタログ#21338) で前もってビオチン化したCD22 ECD抗原に対してパニングした。4ラウンドのパニングを、ブロッキングバッファーを交互に用いて行った [例えば、ラウンド1、3にはStarter Block (Thermo Fisher社 カタログ#37559) を、ラウンド2、4にはビオチンフリーカゼインを使用した]。パニングは、Pierce (商標) ストレプトアビジンコートウェル (ラウンド1、3) (Thermoscientific社 カタログ#15501; ロット#TF252884) とPierce (商標) ニュートラアビジンコートウェル (ラウンド2、4) (Thermoscientific社 カタログ#15508; ロット#SK253835) の両ウェル間で交互に行った。最初に、2つのウェルおよび1つまたは2つのマイクロチューブ (microfuge tube) を適切なブロッキングバッファー中で4℃にて一晩インキュベートした。

20

30

【0304】

翌日、ライブラリーインプットファージ (約 3×10^{11}) を、適切なブロッキングバッファーでブロックしたストレプトアビジンウェルの1つに室温で1時間加え、その後ブロックしたマイクロチューブに移して、ビオチン化CD22抗原と混合した。後続のラウンドでは、増幅したファージの各ラウンドからの約 3×10^{11} のインプットファージを使用した。最初のラウンドでは、1 µgのビオチン化CD22抗原を用いた。後続のラウンドでは、1 µgと100 ngの両方の抗原を使用した。室温で1時間インキュベートした後、インプットファージ/ビオチン化CD22混合物を他のブロックしたストレプトアビジンウェルに移して、室温で30分インキュベートした。これに続いて、洗浄段階 { 3×300 µLのPBS-T (PBS+0.05% Tween 20) (クイック) ; 2×300 µLのPBS-T+(PBS+0.05% Tween 20) (洗浄ごとに5分インキュベート) ; 3×300 µLのPBS (クイック) ; 2×300 µLのPBS (洗浄ごとに5分インキュベート) } および100 µLの100 mM TEAによる溶出を行った。その後、ウェルからファージを取り出し、新しいチューブで50 µLの1 M Tris-HCl pH7.4を用いて中和した。15 mL Falconチューブ内で2YT+2%グルコースにてOD₆₀₀=0.5まで37℃、250 rpmで事前に培養しておいた、指数関数的に増殖しているTG1大腸菌培養物3 mLに、溶出したファージを感染させた。未感染のTG1大腸菌細胞の100 µLアリコートを対照として取っておいた。溶出したファージを振盪せずに37℃で30分インキュベートした後、アリコートを力価測定 ($10^2 \sim 10^8$ の希釈率) に使用し、2YTプレートに32℃で一晩プレーティングした。感染したTG1培養物の残りの3 mL

40

50

は、M13K07ヘルパーファージ（約 1×10^{10} cfu）を用いて一晚のファージ増幅を進行させた。

【0305】

翌日、溶出された力価を計算して、後続のラウンドのためのインプットファージの量を決定した。増幅されたファージを含む細胞培養物を5000rpmで30分遠心分離し、上清を0.22 μ M フィルターユニット（Millipore社）でろ過し、20% PEG/2.5M 塩化ナトリウム（NaCl）で沈殿させた後、遠心分離し、PBS（pH7.5）で再可溶化した。増幅されたファージの力価を、事前に培養したTG1大腸菌細胞で測定した（ $10^4 \sim 10^{12}$ の希釈率）。4ラウンドのパニング後、ファージELISAからの陽性コロニーの配列を解析した。

【0306】

b) CD22-ECDの受動的パニング

レスキューされた同じファージを使用し、CD22 ECD抗原に対してパニングを行った。ブロッキングバッファーを交互に使用して、4ラウンドのパニングを実施した〔例えば、ラウンド1、3にはStarter Block（Thermo Fisher社 カタログ#37559）を、ラウンド2、4には4%ミルクPBSを使用した〕。Nuncウェルに受動的に吸着されたCD22 ECDの量は、4ラウンドのパニングで40 μ gから10 μ gに減らした（ラウンド1：40 μ g、ラウンド2：30 μ g、ラウンド3：20 μ g、ラウンド4：10 μ g）。最初に、ウェルを適切なバッファーで室温にて2時間ブロッキングし、次いでインプットファージ（約 3×10^{11} ）を添加した。後続のラウンドでは、各ラウンドの増幅ファージからの約 3×10^{11} のインプットファージを使用した。インキュベーションの後、洗浄段階 {R1：5×PBS-T；2×PBS；R2：5×PBS-T；5×PBS；R3：7×PBS-T；5×PBS；R4：10×PBS-T；10×PBS} および100 μ Lの100mM TEAによる溶出を行った。その後、ウェルからファージを取り出し、新しいチューブで50 μ Lの1M Tris-HCl pH7.4を用いて中和した。15mL Falconチューブ内で2YT+2%グルコースにてOD₆₀₀=0.5まで37℃、250rpmで事前に培養しておいた、指数関数的に増殖しているTG1大腸菌培養物2mLに、溶出したファージを感染させた。未感染のTG1大腸菌細胞の100 μ Lアリコートに対照として取っておいた。溶出したファージを振盪せずに37℃で30分インキュベートした後、アリコートを力価測定（ $10^2 \sim 10^8$ の希釈率）に使用し、2YTプレートに32℃で一晩プレーティングした。M13K07ヘルパーファージ（約 1×10^{10} cfu）を用いて一晚のファージ増幅を進行させた。翌日、溶出された力価を計算して、後続のラウンドのためのインプットファージの量を決定した。増幅されたファージを含む細胞培養物を5000rpmで30分遠心分離し、上清を0.22 μ M フィルターユニット（Millipore社）でろ過し、20% PEG/2.5M NaClで沈殿させた後、遠心分離し、PBS（pH7.5）で再可溶化した。増幅されたファージの力価を、事前に培養したTG1大腸菌細胞で測定した（ $10^4 \sim 10^{12}$ の希釈率）。4ラウンドのパニング後、ファージELISAからの陽性コロニーの配列を解析した。

【0307】

結果

組換えCD22-ECDを用いてラマを免疫化し、血清力価をモニタリングして、ELISAで解析した。図3に示すように、CD22はラマにおいて強い重鎖免疫応答を惹起した。血清での重鎖免疫応答は、ラマIgG2bのヒンジ-CH2境界およびラマIgG2cのFcにそれぞれ特異的に結合する、2種モノクローナル抗体を用いて測定された（Henry KA et al. Llama Peripheral B-cell Populations Producing Conventional and Heavy Chain-Only IgG Subtypes Are Phenotypically Indistinguishable but Immunogenetically Distinct. Immunogenetics 2019 Apr;71(4):307-320）。

【0308】

ラマ免疫グロブリンの重鎖レパートリーを遺伝子特異的プライマーで増幅し、ファージミドベクター（pMED1）にクローニングした。中規模のサイズのライブラリー（ 3.3×10^7 ）を構築し、96個のコロニーをシーケンシングに送ることによってその複雑性を解析した。シーケンシングのデータから、全てのVHH配列が繰り返し配列のない完全長で

10

20

30

40

50

あることから、このライブラリーは高い複雑性を持つことが示された。このライブラリーを、他に記載されるように (Baral TN, MacKenzie R, Arbabi Ghahroudi M. Single-domain antibodies and their utility. Curr Protoc Immunol. 2013 Nov 18;103:2.17.1-2.17.57)、M13ヘルパーファージを用いてファージレスキューし、ファージ抗体を2つの別々のパニング実験で使用した。4ラウンドのパニング後、各パニング戦略からの96個のコロニーを培養し、他に記載されるように (Baral TN et al 2013)、M13ヘルパーファージを重感染させ、このファージをELISAにおいて使用した。陽性コロニーをシーケンシングに送り、シーケンシングデータを解析した。配列のアライメントにはOPIGソフトウェア (<http://opig.stats.ox.ac.uk/webapps/newsab-dab/sabpred/anarci/>) とIMGT番号付けを使用した (図4Aおよび4B参照)。遺伝子合成および発現ベクター (pMRO) へのクローニングのため、27種のユニークなVHH配列を選択した。

10

【0309】

図1は、染色体19q13.12に位置するCD22遺伝子によりコードされるヒトCD22分子の構造を示す。CD22βが優勢なアイソフォームである (7つのドメインを持つ; 847aa)。4つの免疫受容体モチーフがある細胞質尾部 (140aa) は、膜貫通領域 (18aa) によって細胞外ドメイン (669aa) に接続されている。

【0310】

図2は、2つの異なる発現バッチからのIMAC精製済みCD22細胞外ドメイン (CD22-ECD) の、非還元および還元条件下でのSDS-PAGEを示す。精製されたタンパク質は、約75kDaの予想された分子量を有する。

20

【0311】

図3は、CD22-ECDに対する最終採血 (8月3日) からのラマ重鎖免疫応答を示す。対照として、ラマ免疫前血清を使用した。重鎖抗体の結合は、抗ラマmAb (自社NRC)、次いでロバ抗マウスHRPにより検出した。示されるように、強力かつ特異的な抗CD22-ECD重鎖免疫応答が存在する。

【0312】

考察

優勢なヒトCD22アイソフォームの細胞外ドメインは哺乳動物CHO系での発現に成功し、組換えCD22-ECDは全ての下流解析アッセイで良好な結果を示した (データは示していない)。組換えCD22-ECDでラマを免疫化した後、重鎖特異的mAbを用いたELISAで確認されるように、強力な重鎖免疫応答が生じた。重鎖レパートリーのライブラリーを構築することによって、免疫原 (CD22-ECD) に特異的なVHHドメイン抗体が単離された。

30

【0313】

実施例2: sdAb抗体の特性評価

はじめに

ヒトCD22-ECDに対する陽性免疫応答が得られた後に、免疫化したラマの重鎖レパートリーのライブラリー構築を行った。続いて、ビオチン化および非ビオチン化ヒトCD22-ECDタンパク質を用いて2つの異なるパニング戦略を行った後に、ファージELISAによって200個を超える個々のコロニーをスクリーニングした。各VHHクローンを配列決定し、それらのCDR1~3の配列に基づいてグループ分けした結果、27種のユニークなVHH配列が得られた。これらのVHHをコードする遺伝子をNRC細菌発現ベクターにクローニングし、精製したタンパク質の特性評価を行った。

40

【0314】

材料および方法

可溶性VHHの発現

ファージELISAでOD₄₅₀ > 0.8を示した最も繰り返されたクローンのDNA配列を、遺伝子合成のためにTWIST Bioscience社に送り、その後pMRO (pET28a誘導体, Novagen社) 発現ベクターにクローニングした。大腸菌TG1細胞をVHHコンストラクトで形

50

質転換し、それぞれのクローンを、0.1%グルコースを含む2×YT培地+アンピシリン（100mg・mL⁻¹）培養液0.25L中でOD600が0.8になるまで培養した。培養物を1mM IPTGで誘導し、ロータリーシェーカー上で37℃にて一晩培養した。SDS-PAGEとウェスタンブロッティングで発現を確認した後、組換えVHHタンパク質を標準的な溶解法で細菌細胞から抽出し、固定化金属アフィニティークロマトグラフィー（IMAC）により精製し、他に記載されるとおりに定量化した（Baral TN, Arbabi-Ghahroudi M. Expression of single-domain antibodies in bacterial systems. *Methods Mol Biol.* 2012;911:257-75）。VHHタンパク質をSupdex 75サイズ排除クロマトグラフィーにかけて、単量体の画分を回収した。

【0315】

SPR解析

表面プラズモン共鳴（SPR）では、21種の選択されたVHHを、150mM NaCl、3mM EDTAを含む10mM HEPES、pH7.4で、サイズ排除カラムsuperdex 75（GE Healthcare社）にそれぞれ通過させた；単量体sdAb画分を集め、280nmでの吸光度（A280）を測定することによりタンパク質濃度を決定した。解析は、Biacore T200装置（GE Healthcare社）で実施した。全ての測定は、150mM NaCl、3mM EDTAおよび0.005%サーファクタントP20を含む10mM HEPES、pH7.4中で25℃にて行った（GE Healthcare社）。約1919 RUの組換え単量体CD22-ECD（CD22-ECDのSEC精製後に取得した）を流量5μL/minでSAセンサーチップ（GE Healthcare社）上に捕捉した。様々な濃度の単量体VHHを、流量40μL/minで、それぞれSA表面を基準として用いて、CD22-ECD表面に注入した。ランニングバッファーで洗浄することによって表面を生み出した。データは、BIAevaluation 4.1ソフトウェアで解析した。

【0316】

SPRによるエピトープマッピング

結合反応速度データを得ることに加えて、Biacore同時注入（co-injection）実験を11種の選択されたVHHにも行って、これらの抗CD22 VHHがCD22-ECDタンパク質表面のユニークなまたは重複するエピトープに結合できるかどうかを調べた。簡単に説明すると、80μLの最初のVHHを、そのKD値の5倍の濃度にHBS-EPバッファーで希釈し、1919 RUの固定化CD22-ECD上に40μL/minで注入した。最初のVHHの注入後、バッファーまたは2番目のVHH（総容量80μL、5×KD）を、最初のVHHですでに飽和させたCD22-ECD表面上に40μL/minで注入した。11種のVHHの全ての可能なペアの組み合わせに関して、両方の順序付け（orientation）で（つまり、各VHHを最初のVHHおよび2番目のVHHとして用いて）、データを収集し、上記のように評価した。

【0317】

酵母表面ディスプレイを用いたエピトープマッピング

hCD22エクストドメイン（ECD）およびそれに由来するフラグメントを発現させ、酵母表面ディスプレイを用いて酵母細胞の表面に共有結合で表示させた（Feldhaus et al., 2003, *Nat. Biotechnol.* Vol. 21, 163-170）。YSDベクター（pPNL6）を米国のPacific Northwest National Laboratoryから入手した。重複する末端（15～25aa）を有する、ピン1～7と名付けられた7つのhCD22フラグメント（hCD22-ECD全体（668aa）をカバーする）を、全長hCD22-ECDと共にクローニングして、融合タンパク質（Aga2-HA-(hAXL)-MYC）として酵母細胞表面に発現させた。表示されたhCD22フラグメントを使用して、実施例1の抗hCD22 sdAbが結合するhCD22のドメインをマッピングした。酵母細胞上のCD22フラグメントへの（ビオチン化）sdAbの結合は、HRP標識ストレプトアビジンでプロービングされる全酵母（whole yeast）細胞ELISAを用いて実施した。表示された融合タンパク質の相対量を、抗MYC抗体で、次にHRP標識二次抗体でプロービングして測定し、sdAbの結合シグナルを正規化するために使用した。HRP活性は、基質TMB（テトラメチルベンジジン）を製造元の条件に従って用いてアッセイし、OD₄₅₀で読み取った。エピトープの性質、線形か立体構造かを調べるために、CD22フラグメントが表示された酵母細胞を80℃で30分間加熱し、次いで氷上で20

10

20

30

40

50

分間冷やしてから抗体で標識化した。

【0318】

sdCD22 VHHの標的特異性の評価

ビオチン化VHHを用いて、sdCD22 Abの標的特異性をフローサイトメトリーにより評価した。CD22を発現するヒトバークリットリンパ腫細胞株RajiおよびRamosと、CRISPR遺伝子ノックアウトを用いてCD22発現を欠失させたRamos細胞を、7.5~0.06 µg/mLの5倍希釈のビオチン標識sdCD22 VHHと共にインキュベートした。CD22標的VHHの細胞表面CD22への結合は、蛍光色素標識ストレプトアビジンを用いたフローサイトメトリーで検出した。

【0319】

結果

遺伝子の合成とサブクローニングをTWIST Bioscience社（米国）で行い、タンパク質の発現のためにTG1大腸菌をプラスミドDNAで形質転換した。pMROベクターにヒスチジンタグとビオチン化（biotinylation）シグナル配列が存在するため、IMACカラムによる容易な精製だけでなく、VHH C末端でのビオチン部分の特異的付加が可能である。単一のビオチン付加は、今後のエピトープマッピングアッセイでのVHHの検出を容易にする。IMAC精製済みVHHタンパク質をSDS-PAGEにかけた（図5；14種のVHHのみを示す）。示されるように、VHH抗体は約15~17 kDaの予想された分子量を示す。

【0320】

精製したタンパク質の凝集状態をサイズ排除クロマトグラフィーで確認したところ、予想どおりに全てが非凝集性の単量体であった（データは示していない）。個々のVHHタンパク質の反応性はELISAでも確認され、この場合には、固定化CD22-ECDへのVHH結合の検出のために、HRPに結合したウサギ抗His₆抗体を用いた（データは示していない）。

【0321】

全部で21種のVHHの単量体画分をSPR実験に使用し、ここでは、ヒトCD22-ECDをCM5デキストランチップに固定化し、様々な濃度（0.6~400 nM）のVHHをセンサーチップ上に通過させた。SPR解析から、21種のVHHは全て、hCD22 pas-64の場合の250 nMからhCD22 1 µg-14の場合の6 pMまでの範囲の平衡定数で、CD22-ECDに特異的に結合したことが明らかになった。収集されたデータは、全てが1:1の結合モデルに適合する。

【0322】

抗CD22 VHHのエピトープマッピングでは、同時注入SPR実験を、VHHのペアを両方の順序付けで用いて実施し、抗体がCD22-ECDに同時に結合できるかどうかを調べた。任意の2つのVHHを同時注入した際に応答の増加がある場合、これは、最初のVHHの結合（飽和濃度）が2番目のVHHの結合を妨げないため、これらの抗体が独立したエピトープを認識する、ことを示すであろう。しかし、2つのVHHを同時注入した際に応答が大きく変わらない場合、これは、2つのVHHが同じ領域に同時に結合できないため、それらが重複する/同一のエピトープを認識する、ことを示すであろう。同時注入SPR実験を11種の抗CD22 VHHに対して実施し、表5に示すように7つの結合を特定した。残りの10種のVHHは、SPRによりマッピングされた前記11種のVHHとCDR領域で高い配列類似性を示した。したがって、これら10種のVHHは、表5に示すように、最も近いアミノ酸類似性を有するビン（bin）に入れた。

【0323】

図4Aおよび4Bは、27種のVHHのアミノ酸配列のアラインメントを示す。

【0324】

表1（上記）は、27種のVHHのアミノ酸配列を示す。CDR領域（下線部）とフレームワーク領域は、IMGTナンバリングシステム（www.imgt.com）に従って番号付けされている。

【0325】

表2（上記）は、VHHの名称と番号とSEQ ID NOとの対応関係を提供する。

【0326】

図5は、TG1大腸菌で発現させ、IMACで精製した14種の抗CD22 VHH抗体のSDS-PAGEを示す。精製したタンパク質は、予想された分子量15～17kDaを示し、全てのタンパク質サンプルに分解の兆候は見られなかった。

【0327】

表4は、本文で説明した全27種のVHHの測定された親和性を示す。親和性のデータは、pM（hCD221ug-14の場合に6pM）から高nM（hCD22pas-64の場合の250nM）までの範囲である。

【0328】

【表4】

10

表4: 表面プラズモン共鳴(SPR)によるsdCD22 VHHの親和性

VHH #	名称	標的	ka(1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
VHH # 1	hCD221ug-80	CD22-ECD	2.09E+04	6.33E-04	3.028E-08
VHH # 2	hCD22100ng-2	CD22-ECD	4.68E+04	1.30E-04	2.779E-09
VHH # 3	hCD221ug-74	CD22-ECD	9.25E+04	6.55E-04	7.081E-09
VHH # 4	hCD22100ng-66	CD22-ECD	1.45E+05	1.34E-04	9.24E-10
VHH # 5	hCD221ug-6	CD22-ECD	5.36E+04	1.29E-04	2.408E-09
VHH # 6	hCD22pas-10	CD22-ECD	1.52E+05	2.89E-03	1.901E-08
VHH # 7	hCD22pas-33	CD22-ECD	5.40E+04	1.40E-04	2.6E-09
VHH # 8	hCD221ug-77	CD22-ECD	5.50E+05	2.62E-03	4.771E-09
VHH # 9	hCD221ug-87	CD22-ECD	1.23E+06	7.97E-04	6.475E-10

20

VHH # 10	hCD221ug-75	CD22-ECD	1.40E+06	1.21E-03	8.647E-10
VHH # 11	hCD221ug-93	CD22-ECD	1.36E+06	1.05E-02	7.7E-09
VHH # 12	hCD22pas-82				ND
VHH # 13	hCD22pas-23				ND
VHH # 14	hCD221ug-61	CD22-ECD	1.25E+06	6.81E-04	5.465E-10
VHH # 15	hCD22pas-32	CD22-ECD	1.58E+05	3.69E-03	2.335E-08
VHH # 16	hCD221ug-14	CD22-ECD	3.07E+06	2.10E-05	6.844E-12
VHH # 17	hCD22pas-55				ND
VHH # 18	hCD22pas-79	CD22-ECD	5.14E+05	3.97E-03	7.723E-09
VHH # 19	hCD22pas-72				ND
VHH # 20	hCD22pas-16	CD22-ECD	3.65E+05	1.00E-03	2.75E-09
VHH # 21	hCD221ug-13	CD22-ECD	2.32E+05	6.75E-04	2.914E-09
VHH # 22	hCD221ug-36	CD22-ECD	1.19E+05	1.14E-03	9.593E-09
VHH # 23	hCD221ug-10	CD22-ECD	4.77E+05	1.76E-03	3.682E-09
VHH # 24	hCD22100ng-62				ND
VHH # 25	hCD22pas-64	CD22-ECD	1.08E+05	2.71E-02	2.504E-07
VHH # 26	hCD22pas-24	CD22-ECD	1.48E+05	3.86E-03	2.602E-08
VHH # 27	hCD22pas-48				ND

30

40

50

【0329】

表5は、同時注入SPR実験によるエピトープビニングを示す。VHHのペアを両方の順序付けで同時注入し、11種の抗CD22 VHHについて応答単位の増加を測定した。示されるように、7つのピンが1～4つのメンバーにより確認された。残りの10種のVHHは、SPRでビニングされた11種のVHHと高いアミノ酸配列類似性を示したため、それぞれのピンに入れた。

【0330】

【表5】

表5:SPR競合結合によるビニング

VHH #	名称	ビニングのために選択	ピン
VHH # 6	hCD22pas-10		ピン 6
VHH # 7	hCD22pas-33		ピン 6
VHH # 3	hCD221ug-74		ピン 6
VHH # 1	hCD221ug-80		ピン 6
VHH # 5	hCD22100ng-64		ピン 6
VHH # 4	hCD22100ng-66	hCD22100ng-66	ピン 6
VHH # 2	hCD22100ng-2		ピン 6
VHH # 15	hCD22pas-32		ピン 5
VHH # 16	hCD221ug-14	hCD221ug-14	ピン 5
VHH # 3	hCD221ug-77		ピン 3
VHH # 9	hCD221ug-87		ピン 3
VHH # 10	hCD221ug-75	hCD221ug-75	ピン 3
VHH # 11	hCD221ug-93		ピン 3
VHH # 18	hCD22pas-79	hCD22pas-79	ピン 3
VHH # 20	hCD22pas-16	hCD22pas-16	ピン 2
VHH # 25	hCD22pas-64	hCD22pas-64	ピン 7
VHH # 26	hCD22pas-24	hCD22pas-24	ピン 4
VHH # 21	hCD221ug-13	hCD221ug-13	ピン 1
VHH # 14	hCD221ug-61	hCD221ug-61	ピン 3
VHH # 22	hCD221ug-36	hCD221ug-36	ピン 2
VHH # 23	hCD221ug-10	hCD221ug-10	ピン 3

【0331】

図6は、CD22を発現する腫瘍細胞Raji（左のパネル）、Ramos細胞（中央のパネル）、またはCRISPR遺伝子ノックアウトによりCD22発現を欠くように操作されたRamos細胞（右のパネル）へのビオチン標識抗CD22 VHHの結合を示す。細胞結合解析には代表的なパネルの9種のVHH配列が含まれていた；この解析からは、CD22陽性RajiおよびRamos細胞への様々な程度の用量依存的結合が示される。全ての場合に、CD22陰性Ramos細胞で試験した場合には、結合強度が著しく低下または消失した。

【0332】

表6は、細胞ELISAを用いた、酵母表面に表示されたhCD22エクトドメイン断片に対する、実施例1に示したCD22 sdAbの物理的ビニングを示す。表示されたCD22断片は、成熟CD22のカバー範囲が（前記番号付けに従うアミノ酸残基で）示された物理的ピンとして定義される。酵母細胞表面上の特定のCD22断片（複数可）への250nMでの各sdAb（ビオチン化されたもの）の結合は、ストレプトアビジン結合HRPの酵素活性によっ

て明らかにされた。0.25を超えるOD₄₅₀を生じたウェルが強調表示され、顕著な抗体-抗原相互作用を示している。hCD22_{1ug-14}を除く試験した全てのsdAbが特定のピンに割り当てられた。hCD22_{1ug-13}とhCD22_{1ug-80}の両方は2つのピンに割り当てられ、これらのsdAbはCD22上の複数の箇所で共有されるエピトープを認識することが示唆された。

【0333】

【表6】

表6:酵母表面ディスプレイライブラリーを用いたCD22 sdAbのビニング

サンプル名	ピン	ピン1	ピン2	ピン3	ピン4	ピン5	ピン6	ピン7	ピン8	ピン9
		IVR1 (aa1-135)	IVR2 (aa111-230)	IVR3 (aa211-317)	IVR4 (aa303-405)	IVR5 (aa391-490)	IVR6 (aa476-575)	IVR7 (aa561-668)	(CD22-ECD 全長)	陰性 対照
1-hCD22 1ug-13	4, 6	0.036	0.043	0.000	0.752	0.000	0.433	0.090	1.189	0.011
2-hCD22 1ug-80	1, 6	2.030	0.025	0.000	0.017	0.068	2.254	0.196	1.814	0.038
3-hCD22 1ug-61	7	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.006	2.842	1.477	0.000
4-hCD22 1ug-36	6	0.000	0.000	0.038	0.000	0.000	2.974	0.001	1.422	0.000
5-hCD22 1ug-10	7	0.128	0.118	0.122	0.103	0.124	0.151	0.750	0.332	0.112
6-hCD22 pas-32	8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.060	0.008	0.289	0.000
7-hCD22 pas-64	6	0.000	0.014	0.012	0.019	0.009	1.381	0.005	0.079	0.046
8-hCD22 pas-24	7	0.008	0.013	0.062	0.046	0.064	0.115	2.893	1.178	0.030
9-hCD22 1ug-14	なし	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

10

20

【0334】

表7は、CD22 sdAbのエピトープが連続的（線形）であるか非連続的（立体構造）であるかを確認するための、CD22 sdAbエピトープの性質の評価を示す。CD22ドメインの様々な断片を酵母細胞上に発現・表示させ、記載したように天然（ND）または熱変性（D）のいずれかのYSD細胞を用いた表6に記載の細胞ELISAを使用して、sdAbへの結合についてアッセイした。天然および変性CD22断片への各sdAbの結合をOD₄₅₀として測定し、変性CD22と非変性CD22との結合比率を算出した；比率 ≥ 0.5 は線形（L）のエピトープを示し、比率 < 0.5 は立体構造（C）のエピトープを示す。

【0335】

【表7】

表7:実施例1からのsdAbのエピトープの性質の評価

サンプル名	CD22 サブドメイン	非変性 CD22 OD	非変性 Myc OD	熱不活性化 CD22 OD	熱変性 Myc OD	Myc 比率 (D/ND)	CD22 比率 (D/ND)	エピトープ の性質
1-hCD22 1 ug -13	4	1.232	1.291	0.686	1.226	0.949	0.557	L
	6	0.453	1.978	0.272	1.536	0.776	0.600	L
2-hCD22 1 ug -80	1	2.323	0.487	1.771	0.815	1.674	0.762	L
	6	2.570	1.978	2.623	1.536	0.776	1.021	L
3-hCD22 1 ug -61	7	3.500	1.082	2.327	0.783	0.723	0.665	L
4-hCD22 1 ug -36	6	3.500	1.978	3.500	1.536	0.776	1.000	L
5-hCD22 1 ug -10	7	3.500	1.082	0.320	0.783	0.723	0.091	C
6-hCD22 pas-32	8 (ECD)	0.789	0.165	0.000	0.100	0.603	0.000	C
7-hCD22 pas -64	6	2.982	1.978	2.040	1.536	0.776	0.684	L
8-hCD22 pas-24	7	3.500	1.082	2.110	0.783	0.723	0.603	L
9-hCD22 1ug-14	なし	ND	ND	ND	ND			

40

【0336】

図7は、表5および表6のエピトープマッピング/ビニング結果による、細胞表面位置に対するCD22エクストドメインのサブドメインへの実施例1のsdAbの知覚的結合を示す概

50

略図である。各サブドメイン/ピンは、表6と同様に定義・番号付けされ、ピン1が細胞膜に対して遠位にあり、ピン7が近位にある楕円として表された。sdAb（特定の形状と名称で示される）のサブドメイン/ピンへの結合は、それがピンングするサブドメイン/ピンへの近接によって示される。

【0337】

考察

抗CD22-ECD VHHを大腸菌で発現させ、そのタンパク質を精製してビオチン化した。該抗体は、サイズ排除クロマトグラフィーで確認したとき、非集合性で単量体の挙動を示した。21種のVHHの結合速度反応をSPRで測定したところ、抗体は、6ピコモルの親和性を有する1つのVHHを除き、低ナノモルから高ナノモルの範囲の親和性でヒトCD22-ECDに特異的に結合することが示された。この多様な親和性の集合により、CAR-Tコンストラクトの生産性における親和性の影響を調べることが可能になる。SPRによる11種のVHHのエピトープピンングは、一部のVHHが重複するエピトープに結合する一方で、他のVHHはユニークなエピトープに結合することを示している。これは、ヒトCD22エクドメイン断片の酵母表面ディスプレイライブラリーを用いた抗体のエピトープピンングを通して、また、細胞ELISAを使用することによって確認された。1ug-14を除き、試験した全てのsdCD22 Abは、特定のピンに割り当てられた。1ug-13と1ug-80の両方は2つのピンに割り当てることができ、これらのsdAbはCD22上の複数の箇所で共有されるエピトープを認識することが示唆された。これらのエピトープピンング情報は、複数のsdCD22 VHH配列を含むバイパラトピック治療薬の設計に利用することができる。

【0338】

実施例3： CAR-Tのin vitro試験

はじめに

上記の新規CD22結合性シングルドメイン抗体（sdAb）配列を同定した後、キメラ抗原受容体（CAR）分子という背景においてその活性を検証することが望まれた；このキメラ抗原受容体（CAR）分子は、ヒトT細胞応答を、特定の表面抗原をもつ細胞の方に向けてするために使用できるものである。したがって、以前に記載されたハイスループット技術（Bloemberg, et. al. 2020）を用いて、新規CD22-sdAb標的CARコンストラクトを作製し、以下に記載する様々なアッセイによってそれらの相対的T細胞活性化活性を試験した。

【0339】

材料および方法

シングルドメイン抗体の抗原結合配列を、効率的な組換えを可能にする制限部位を含むモジュラーCARプラスミドバックボーン [SEQ ID No: 119] に移した；この場合、その抗原結合ドメインが除かれて、新規CD22抗原結合ドメイン（ABD）配列で置き換えられる。使用した具体的なCAR設計は以下の通りであった：ヒトCD28シグナルペプチド [SEQ ID NO: 110]、VHH抗体（ABD） [SEQ ID NO: 82~108] のいずれか1つ、柔軟なリンカードメイン [SEQ ID NO: 111]、ヒトCD8ヒンジドメイン [SEQ ID NO: 112]、ヒトCD28膜貫通ドメイン [SEQ ID NO: 113]、ヒト4-1BB共刺激ドメイン [SEQ ID NO: 114]、およびヒトCD3ζシグナル伝達ドメイン [SEQ ID NO: 115]。対照コンストラクトもまた、以前に示されたCD19特異的CAR配列（この場合のABDはFMC63-scFv配列 [SEQ ID NO: 117] である）、またはCD22特異的CAR配列（この場合のABDはM971-scFv配列 [SEQ ID NO: 116] である）に由来する配列を用いて作製した。

【0340】

その後、新規CD22標的CARコンストラクトを、Bloemberg et al 2020に記載されるのと同様に、不死化ヒトT細胞株（Jurkat）で活性について試験した。簡単に述べると、プラスミドをJurkat T細胞にエレクトロポレーションし、数時間回復させた。次に、Jurkat-CAR細胞を、様々な用量で、ヒトCD22の異なる発現レベルを示す標的細胞株と混合した。この研究では、Jurkat細胞におけるCAR活性化活性を確認するために、C

D22を高発現している標的細胞株（Ramos）を利用した。また、CRISPR-ゲノム編集を用いてCD22発現を取り除いた細胞も、ヒトCD22抗原に対する新規CARコンストラクトの特異性を確認するために使用した。その後、CARを発現するJurkat細胞と標的細胞の共培養物を、標準的な哺乳動物細胞培養条件下で一晩インキュベートして、CAR活性化が起こるようにした。CAR媒介Jurkat細胞の活性化を定量化するために、特異的抗体染色とフローサイトメトリーを用いてCD69の発現を測定した。GFPマーカの発現を用いてCAR発現細胞をゲーティングし、CD69表面マーカを用いてT細胞活性化のレベルを測定した。CD22-sdAb標的CARコンストラクトを発現する様々なJurkat細胞において、該細胞をCD22発現Ramos細胞と共培養した場合にCD69マーカが明らかに上昇したが、CD22ノックアウト細胞と共培養した場合は上昇しなかった（図8）。

10

【0341】

このCAR-J試験の後、初代ヒトT細胞での試験のために、いくつかのCD22-CARコンストラクトが選択された。これを達成するために、CARプラスミドとレンチウイルスパッケージング細胞株との同時トランスフェクションによってレンチウイルスを作製した。細胞上清中のレンチウイルス粒子を回収し、超遠心分離を用いて濃縮した。次に、ドナー血液サンプルから磁気ビーズ分離法を用いて初代ヒトT細胞を分離し、抗CD3および抗CD28ビーズを用いてポリクローナルに活性化した。次に、活性化したヒトT細胞に、様々なCD22標的CARコンストラクトを含む濃縮レンチウイルスを、10を超える感染多重度で導入した。ウイルス導入後、GFPマーカのフローサイトメトリー解析を用いて、細胞がCARを発現することを確認した。その後、ウイルス導入したT細胞（CAR-T細胞）をCAR活性の試験前に9日間増殖させた。

20

【0342】

ウイルス導入したCAR-T細胞におけるCAR活性を調べるために、いくつかのアッセイを利用した。最初に、細胞を、追加の刺激なしで制御された細胞培養条件下に置き、さらに6日間にわたる非特異的細胞増殖について、Incucyte（登録商標）S3装置（Sartorius社、米国）を用いてライブ顕微鏡により観察した。自動細胞計数を用いて総細胞数を測定した。様々なCD22-sdAb標的CARコンストラクトを安定的に導入した初代ヒトT細胞は、ポリクローナル活性化後9日目～15日目に非刺激状態で放置した場合、有意な細胞増殖を示さなかった（図9）。これらの結果は、試験したCD22-sdAb標的CARコンストラクトが、標的非依存的なトニックT細胞活性化を初代ヒトT細胞に付与しないことを示している。

30

【0343】

これに続いて、初代CAR-T細胞は、CD22発現ありおよびなしの細胞に応答する抗原特異的活性化と標的細胞殺傷について試験された。CAR-T細胞を、赤色蛍光タンパク質タグNuclight-Lenti（Sartorius社、米国）を発現する様々な標的細胞と共培養し、Incucyte S3ライブ顕微鏡装置を用いて6日間モニタリングした。GFP標識CAR-T細胞の数を調べると、2つのCARコンストラクト（1ug36と1ug10）は、CD22+細胞株（Raji、Ramos）に応答してGFP+細胞の明らかな増殖を示したが、CD22ノックアウト細胞（Ramos-CD22ko）には応答せず、抗原特異的活性化と増殖が実証された（図10）。最も活性の高いCD22-CARコンストラクト（1ug36）と共培養したNuclight標識標的細胞の数を調べると、CD22+標的細胞の成長の明らかな抑制が確認されたが、CD22ノックアウト細胞への影響はほとんどなかった（図11）。これらの結果に基づいて、リード分子（1ug36）がさらなる試験のために選択された。

40

【0344】

次に、新規CD22-sdAb標的初代CAR-T細胞における連続殺傷能力を実証するための実験を行った。上述したように、レンチウイルス形質導入を用いてドナー血液由来のT細胞からCAR-T細胞を作製し、細胞培養で9日間増殖させた。次に、CAR-T細胞を蛍光標識Ramos細胞と共培養して、標的細胞の増殖を調べた。上述と同様に、リードコンストラクトは、試験したコンストラクトの中で最も効果的な標的細胞抑制を示した（図12上）。1週間の共培養後、CAR-T細胞を新鮮なRamos標的細胞で再チャレンジして、標的

50

細胞を殺傷し続ける能力を調べた（図12下）。この場合も、1ug36-CARコンストラクトが、試験したコンストラクトの中で標的細胞増殖の最も明らかな抑制を示したため、さらなる解析のために1ug36-CARコンストラクトを選択した。

【0345】

新規CD22-sdAb標的CARコンストラクトのドナー内およびドナー間のばらつきを調べるために、2つの異なるドナー血液サンプルから上記のように追加のCAR-T細胞を作製した。この実験では、新規CAR-Tコンストラクトは、ベンチマークCD22標的CAR（本明細書に記載した新規sdAbコンストラクトの試験に使用されたものと同様のCARコンストラクト内の、ヒトCD22特異的単鎖可変フラグメント [SEQ ID NO: 116] からなる以前に実証されたCARコンストラクト）とも比較された。その後、CAR-T細胞をCD22発現標的細胞（Raji）と共培養し、腫瘍細胞の成長抑制（図13上）およびCAR-T細胞の増殖（図13下）を調べた。結果は、リードCARコンストラクトが、様々なドナー間でベンチマークCAR応答と同様の一貫した応答を示すことを実証している。

【0346】

次に、2人のドナーからのCD22-sdAb標的CAR-T細胞を、CD22発現標的細胞（Raji）とCD22陰性標的細胞（MCF7）の特異的溶解について調べた。上記のようにして作製した様々なCAR-T細胞を、標準的な細胞培養条件下で、放射性クロム負荷標的細胞と4.5時間共培養した。共培養に続いて、細胞上清を取り出し、シンチレーションカウンターを用いてクロム含量を数えた。実験は、2人のドナーに由来するCAR-T細胞の様々なCARコンストラクトを用いて、単一のエフェクター：標的比で行われたか（図14）、または上記で同定されたリードCD22-sdAb CARコンストラクトを用いて、様々なエフェクター：標的比で行われた（図15）。結果は、特異的な標的細胞溶解が新規CD22-sdAb CARコンストラクトを導入したCAR-T細胞によって誘導されることを実証している。

【0347】

最後に、CD22-sdAb標的CAR-T細胞は、CD22発現腫瘍細胞（Ramos）で再刺激される能力について評価された。リード1ug36-CARコンストラクトを含む様々なCAR-T細胞を上記のように作製し、9日目の増殖拡大期から17日目の増殖静止期まで培養した。その後、CAR-T細胞を、照射したCD22発現Ramos細胞でさらに5日間刺激し、この時点で、クロム負荷したCD22発現標的細胞（Raji）およびCD22陰性標的細胞（MCF7）に対するそれらの細胞傷害性の可能性について評価した。様々なエフェクター：標的比で4.5時間共培養した後、放出されたクロムをシンチレーションカウンターで定量化した（図16）。結果は、リード1ug36-CARコンストラクトを含む静止期CD22標的CAR-T細胞を、CD22担持Ramos細胞で再刺激すると、scFv CARベンチマークと同様のレベルで、CD22発現Raji標的細胞に対する特異的溶解活性の保持がもたらされた、ことを示している。

【0348】

結果

図8は、Jurkat細胞を様々なCARプラスミドで一過性にエレクトロポレーションし、単独で培養した、またはCD22陽性（Ramos）もしくはCD22陰性（Ramos-CD22ko）細胞株と共培養した場合の、CAR-Jurkatアッセイの結果を示す。T細胞活性化のレベルは、ヒトCD69特異的抗体染色およびフローサイトメトリーで測定した。グラフは、標的細胞なし（白棒）、Ramos標的細胞（黒棒）、またはRamos-CD22ko細胞（灰色棒）のいずれかと培養して、1回の実験を2つ組で実施した、それぞれ28種のシングルドメイン抗体標的CARコンストラクトについてのCD69染色の平均蛍光強度を示す。エラーバーは、2つ組のウェルの平均値の標準誤差を示す。結果は、試験した新規CARコンストラクトの約半数（15/28）による抗原特異的応答を実証している。

【0349】

図9は、ドナー血液由来の初代T細胞に様々なCARコンストラクトを導入して、標的非依存的増殖について調べた場合の、CAR-Tトニック活性化アッセイの結果を示す。モックは、CARを発現するレンチウイルスの非存在下で同様の処理条件にさらされた、ドナ

ー由来のT細胞を指す。方法に記載されるように、CAR-T細胞は、ポリクローナル活性化後9日目～15日目に、細胞培養下での増殖をライブ顕微鏡により観察された。グラフは、自動細胞計数を用いて測定された、このアッセイの開始時の細胞数に対する細胞数の倍率変化を示す。結果は、試験したCARコンストラクトでは、抗原非依存的T細胞の増殖がないことを実証している。

【0350】

図10は、様々なCD22シングルドメイン抗体または対照（FMC63）のCARコンストラクトを導入したドナー血液由来T細胞を用いて実施した、CAR-T標的特異的活性化アッセイの結果を示す。モックは、同様の処理条件にさらされた、CAR発現のない未改変のドナー由来T細胞を指す。上述したように、CAR-T細胞を、CD22+標的細胞（左のグラフ - Raji、中央のグラフ - Ramos標的）、またはCD22陰性標的細胞（右のグラフ - Ramos-CD22ko標的）と共培養して、ポリクローナル活性化後9日目～15日目にライブ蛍光顕微鏡で増殖について観察した。グラフは、自動細胞計数を用いて測定された、緑色蛍光タンパク質でマークしたCAR発現細胞の増殖倍率を示す。結果は、CD22発現標的細胞に応答したCAR-T細胞の特異的増殖を実証しており、ここでは、1ug36-BBz CARコンストラクトが、試験した他のコンストラクトと比べて最大の活性を示す。

10

【0351】

図11は、上記の様々なCD22シングルドメイン抗体または対照（FMC63）のCARコンストラクトを導入したドナー血液由来T細胞を用いて実施した、CAR-T抗原特異的な標的細胞成長抑制アッセイの結果を示す。モックは、同様の処理条件にさらされた、CAR発現のない未改変のドナー由来T細胞を指す。CAR-T細胞を、CD22+標的細胞（左のグラフ - Raji、中央のグラフ - Ramos標的）、またはCD22陰性標的細胞（右のグラフ - Ramos-CD22ko標的）と共培養し、ライブ蛍光顕微鏡で観察した。グラフは、自動細胞計数を用いて測定された、赤色蛍光タンパク質（Nuclight）でマークした標的細胞の増殖倍率を示す。結果は、CD22発現標的細胞の成長のCAR-T特異的抑制を実証しており、ここでは、1ug36-BBz CARコンストラクトが、試験した他のコンストラクトと比べて最大の活性を示す。

20

【0352】

図12は、上記のように作製された、様々なCD22シングルドメイン抗体CARコンストラクトを導入したドナー血液由来T細胞を用いて実施した、CAR-T標的特異的連続殺傷アッセイの結果を示す。モックは、同様の処理条件にさらされた、CAR発現のない未改変のドナー由来T細胞を指す。CAR-T細胞またはモックT細胞をCD22+標的細胞と共培養した（上のグラフ - Ramos標的）。最初のチャレンジから6日後、細胞を新鮮な培地で5分の1に分け、追加のCD22+標的細胞でチャレンジした（下のグラフ - Ramos標的）。グラフは、自動細胞計数を用いて測定された、赤色蛍光タンパク質（Nuclight）でマークした標的細胞の増殖倍率を示す。結果は、CD22発現標的細胞の成長のCAR-T特異的連続抑制を実証しており、ここでは、1ug36-BBz CARコンストラクトが、試験した他のコンストラクトと比べて最大の活性を示す。

30

【0353】

図13は、上述したように2人の別々のドナーから作製されたシングルドメイン抗体標的CAR-T細胞についての一貫性（consistency）解析およびベンチマークCD22標的scFv CARとの比較の結果を示す。モックは、CARを発現するレンチウイルスの非存在下で同様の処理条件にさらされた、ドナー由来のT細胞を指す。CAR-T細胞をCD22+標的細胞（Raji）と2つ組のウェルで共培養し、ライブ蛍光顕微鏡で観察した。グラフは、自動細胞計数を用いて測定された、赤色蛍光タンパク質（Nuclight）でマークした標的細胞の増殖倍率（上のグラフ）、または緑色蛍光タンパク質でマークしたCAR細胞の増殖倍率（下のグラフ）を示す。結果は、CD22+標的細胞の成長のCAR-T特異的抑制と、ベンチマークCD22-scFv CARと同様のCAR-T細胞の標的誘導性増殖についての、ドナー内およびドナー間での一貫性を実証している。

40

【0354】

50

図14は、放射性クロム (^{51}Cr) 放出アッセイを用いた直接腫瘍溶解測定の結果を示す。上述したように、様々なCD22シングルドメイン抗体および対照のCAR-T細胞を作製した。モックは、CARを発現するレンチウイルスの非存在下で同様の処理条件にさらされた、ドナー由来のT細胞を指す。レンチウイルス導入後9日目に、CAR-T細胞を、放射性クロムを負荷したCD22陽性 (Raji) またはCD22陰性 (MCF7) 標的細胞と共培養した。グラフは、上清へのクロム放出の定量化に基づいた、単一のエフェクター：標的比での標的細胞の相対的溶解を示す。エラーバーは、2つ組のウェルからの測定値の標準偏差を示す。結果は、ベンチマークCD22-scFv CARと比較して、リードCD22-sdAb CAR分子の同等の直接溶解を実証している。

【0355】

10

図15は、クロム放出アッセイを用いた、異なるエフェクター：標的比でのCAR-T細胞により誘発された直接腫瘍溶解の結果を示す。CD22-CARコンストラクトlug36 CAR-T細胞と、scFvベンチマークのM971 CAR-T細胞およびCD19 CARコンストラクトFM C-63 CAR-T細胞を、上記のように作製した。モックは、CARを発現するレンチウイルスの非存在下で同様の処理条件にさらされた、ドナー由来のT細胞を指す。CAR-T細胞を9日間増殖させた後、該細胞と、クロムを負荷したCD22陽性RajiまたはCD22陰性MCF7標的細胞とを、エフェクター：標的比を次第に下げて4.5時間共培養した。シンチレーションカウンターで測定された放出クロムに基づいて、特異的溶解を算出した。結果は、1ug36-CAR-T細胞が、scFvベンチマークと同様のレベルで用量依存的に、CD22を発現するRaji標的を特異的に溶解することを実証している。これらのCARコンストラクトをCD22またはCD19陰性MCF-7腫瘍細胞と共培養した場合、バックグラウンド（モック対照）を超える標的細胞殺傷は見られなかった。

20

【0356】

図16は、CD22担持腫瘍細胞で再刺激した後のCAR-T細胞からのクロム放出アッセイを用いた直接腫瘍溶解測定の結果を示す。上述したように、様々なCD22シングルドメイン抗体および対照のCAR-T細胞を作製した。モックは、CARを発現するレンチウイルスの非存在下で同様の処理条件にさらされた、ドナー由来のT細胞を指す。CAR-T細胞を増殖停止（17日目）まで培養した後、照射したCD22発現Ramos細胞で刺激して、標的、特異的な活性化を誘導した。5日間の共培養後、活性化されたCAR-T細胞を、放射性クロムを負荷したCD22陽性 (Raji) またはCD22陰性 (MCF7) 標的細胞と、エフェクター：標的比を次第に下げて混合した。グラフは、上清へのクロム放出の定量化に基づいた、標的細胞の相対的溶解を示す。結果は、特定のCD22抗原による静止期CAR-T細胞の効率的な再活性化と、ベンチマークCD22-scFv CARと比較して同等のリードCD22-sdAb CAR分子の用量依存的Raji腫瘍溶解（CD22陽性）を実証している。

30

【0357】

考察

全体として、これらの結果は、CD22特異的シングルドメインバインダーが強力な抗原駆動型T細胞活性化シグナル伝達を引き出し、標的細胞の殺傷および連続殺傷、長期の腫瘍細胞の成長抑制、CAR-T増殖、ならびに直接的な標的細胞溶解を促進できることを例証している。ここに提供された例示的なデータでは1つのリード分子が同定されたが、高度に機能的なCAR分子を作製するために、さらなるCD22特異的シングルドメイン抗体配列を用いて分子の最適化を行うことが可能である。さらに、複数のCD22特異的シングルドメイン抗体配列を1つの分子にまとめることは、標的、特異的なCAR活性化活性を高めるための有効な戦略となる可能性がある。

40

【0358】

実施例4： CAR-Tのin vivo試験

はじめに

CD22結合性シングルドメインCAR-T細胞のin vitroでの抗腫瘍効果をさらに確認するために、CD22結合性シングルドメインCAR-T細胞の注入に先立ってNOD/SCID/IL2ry 鎖^{null} (NSG) マウスに、ホタルルシフェラーゼをレポーターとして発現するRamo

50

s腫瘍細胞を静脈内接種することで、異種移植モデルを確立した。

材料および方法

【0359】

in vivo研究では、野生型腫瘍株にホタルルシフェラーゼ（FLUC）をコードするレンチウイルスベクターを安定的に導入し、続いてピューロマイシン耐性を選択マーカーとして用いてルシフェラーゼ陽性細胞を選択することにより、ルシフェラーゼ発現細胞株を作製した。Ramos-FLUCは、10%熱不活性化ウシ胎児血清、2mM L-グルタミンおよび1mMピルビン酸ナトリウムを添加したRPMI 1640中に維持した。全ての細胞培養試薬はGibco社から購入した。細胞株は、マイコプラズマ汚染がないことをPCRにより確認した。

10

【0360】

6~8週齢の雌NOD/SCID/IL2Ry^{-/-}（NSG）マウスをJackson Laboratoriesから入手し、カナダ国立研究機構（National Research Council of Canada）の動物資源グループ（Animal Resource Group）で維持した。マウスを病原体フリーの個別換気式ケージに入れ、条件下のバリアシステムで飼育した。動物には、認証済みのげっ歯類用飼料を自由に与え、滅菌水を水ボトルから与えた。NSGマウスは成熟したT細胞、B細胞およびナチュラルキラー細胞を持たない；したがって、それらはnu/nuマウスよりも研究にとって優れている。8週齢のNSGマウスに、100μL HBSS中の5×10⁴個のRamos-FLUC細胞を尾静脈から静脈内注入した。腫瘍細胞の注入後4日目に、マウスに、CD22標的シングルドメインCAR-T細胞、CD19標的CAR-T細胞（標的指向性ドメインが、臨床的に確証されたCD19 CARコンストラクトKymriahおよびYescartaと同様である）、またはCAR発現のないモックCAR-T細胞を後眼窩静脈叢（retro orbital plexus）から静脈内注入した。マウスの腫瘍成長を生物発光（IVISイメージャー；PerkinElmer社）によりモニタリングし、循環CAR-T細胞と腫瘍細胞のモニタリングのために週1回採血した。マウスを病気の兆候について毎日監視し、研究センターの動物管理委員会によって承認された後肢麻痺、呼吸困難、または20%体重減少を含むがこれらに限定されない、事前に指定された人道的エンドポイントを満たした場合には、マウスを直ちに犠牲にした。

20

【0361】

マウス由来の血液サンプルをPBS/0.1%BSAで洗浄し、50μlのBrilliantバッファー（BD Biosciences社、米国）に再懸濁した。細胞を、以下に対する抗体蛍光色素コンジュゲート（特に断りのない限り、全て米国のBD Biosciences社製）を用いて染色した：hCD45-APC-H7、hCD45RA-BV650、hCD45RO-PE-CF594、hCD27-BUV737、hCCR7-PE、hCD4-BUV395、およびhCD8-PerCP-Cy5.5。

30

【0362】

CD45は、srcファミリーのキナーゼを調節するプロテインチロシンホスファターゼであり、全ての造血細胞に発現している。かくして、マウスでヒト造血細胞を検出するために、抗ヒトCD45抗体が使用された。CD45は、細胞外ドメインを含むエクソンの選択的スプライシング（alternative splicing）により、数種のアイソフォームの1つとして発現され得る；様々なアイソフォームの発現は、T細胞の分化状態を示している。CD45RAは、ナイーブT細胞と、CD4およびCD8の両エフェクター細胞にも発現している。抗原を経験した後、セントラルメモリーT細胞とエフェクターメモリーT細胞はCD45ROの発現を獲得し、CD45RAの発現を喪失する。したがって、ナイーブT細胞集団とメモリーT細胞集団を区別するために、ヒトCD45RAおよびCD45ROに対する抗体が使用された。セントラルメモリー集団とエフェクターメモリー集団との区別、およびナイーブ集団とエフェクター集団との区別は、第2のマーカーを追加することによって達成され得る。この目的のために使用されたことのあるマーカーがいくつかあり、これらのマーカーは、T細胞がセントラルメモリー細胞からエフェクターメモリー細胞へと変化する際にT細胞に現れると考えられる分化経路のわずかに異なる段階で、これらの集団をマークする傾向がある。ケモカイン受容体CCR7はこれらの2つの集団を識別する；したがって、この目的

40

50

のために、この研究ではヒトCCR7に対する抗体を使用した。CARの発現は、プラスミドに組み込まれたGFPにより検出した。疲弊 (exhaustion) を評価するために、hPD-1-BV421に対する抗体 (BioLegend社, 米国) を適用した。T細胞の活性化は、hCD25-PE-Cy7とhCD69-BV786に対する蛍光標識抗体により検出した。in vivo研究では、マウスCD45-BV711を用いてマウス細胞をゲーティングし、抗ヒトCD19-BUV496抗体によりヒトCD19発現を用いて白血病細胞を同定した。サンプルを暗所で4℃にて30分間インキュベートした。その後、RBC溶解バッファー (Sigma-Aldrich社, 米国) を加えて血液を溶解した。サンプルを短時間混合して細胞を再懸濁させ、室温で10分間インキュベートした。その後、細胞をPBS/0.1%BSAで洗浄して、PBS/0.1%BSA中に再懸濁させた。データは、BD Fortessaサイトメーター (BD Biosciences社) で取得した。補正 (compensation) のためにUltraComp (商標) eBeads (eBiosciences社, 米国) を使用した。解析は、FlowJoソフトウェア (FloJo社, 米国) を用いて行った。

10

【0363】

マウスの腫瘍成長をモニタリングするためのin vivo生物発光イメージングは、IVIS Lumina IIIイメージングシステム (PerkinElmer社, Waltham, MA, 米国) を用いて実施した。繰り返し、イソフルラン (誘導時3.0%、維持時2.0%に減量) を用いてマウスに麻酔をかけ、毛を取り除いた。時間0に、マウスに150mg/kgのRedi-Ject D-ルシフェリン (Perkin Elmer社, Waltham, MA, 米国) を皮下注射した。その後、動物を維持麻酔下でイメージングシステムに移し、D-ルシフェリンが均一に分布しかつシグナルがプラトーに達するようにD-ルシフェリン後20分で、オープンフィルターを用いてイメージングを行った。画像からルシフェラーゼ遺伝子発現の相対量を算出するために、Living Imageソフトウェア (Perkin Elmer社, Waltham, MA, 米国) を利用して、全身の関心領域 (ROI: region of interest) における光子/秒/平方センチメートル/ステラジアン (p/s/cm²/sr) として表される総放射輝度 (radiance) を求めた。

20

結果

【0364】

図17は、このin vivoモデルのための実験プロトコルのスキーマを示す。異種移植モデルにおけるCD22結合性シングルドメインCAR-Tの活性を評価するために、8週齢のNOD/SCIDマウスに、0日目に50,000個のRamos-FLUC細胞を静脈内接種し、続いて4日目に 1×10^7 個のCD22標的シングルドメインCAR-T (1 μ g13または1 μ g36)、FMC63-CAR-T (臨床的に確証されたCARコンストラクトと同じ抗原結合ドメインを用いたCD19標的CAR-T)、またはCAR発現のないモックT細胞の後眼窩注入により処置した。マウスを生物発光in vivoイメージングによって画像化し、血液をマウスから毎週採取した。

30

【0365】

図18は、Ramos-Lucを接種し、続いて様々なCAR-T細胞で処置したNSGマウスの生存率解析の結果を示す。モックは、CARを発現するレンチウイルスの非存在下で同様の処理条件にさらされた、ドナー由来のT細胞を指す。動物実験のセットアップは上記の通りである。グラフは、この研究におけるマウスの生存期間を日数で示す。結果は、FMC63およびモックT細胞で処置したものと比較して、CD22を標的とするシングルドメイン抗体1 μ g13および1 μ g36 CAR-T細胞で処置したマウスで観察された長期生存を実証している。

40

【0366】

図19は、Ramos-FLUCを接種し、様々なCAR-T細胞で処置したマウスの腫瘍負荷量の結果を示す。IVIS Lumina IIIを用いて生物発光を定量化することにより腫瘍負荷量についてマウスをモニタリングした。グラフは、全グループからのマウスが生存していた最終実験時点である腫瘍細胞注入後18日目の、各処置グループ内の個々の動物の全光束 (total flux) (光子/秒) (黒丸) と、グループあたりの平均全光束 (水平バー) を示す。1 μ g36 CAR-T細胞またはFMC63 CAR-T細胞で処置したマウスは、モックT細胞を投与したマウスと比較して、腫瘍負荷量の有意な減少を示した (それぞれ $p < 0.001$ お

50

よび $p = 0.0004$)。

【0367】

図20は、Ramos-FLUCを接種し、様々なCAR-T細胞で処置したマウスの腫瘍負荷量、総CAR-T細胞集団、および末梢血中の循環CAR-T細胞集団の異なった表現型の結果を示す。腫瘍細胞チャレンジ後23日目に血液を採取し、赤血球を溶解し、残った細胞を上記のように様々な蛍光標識抗体で染色した。左のグラフは、フローサイトメトリーで解析した100万個の総血液細胞イベントあたりのヒトCD19+白血病細胞の数を示す。中央のグラフは、フローサイトメトリーで解析した100万個の血液細胞あたりに検出されたCD45+/GFP+ CAR-T細胞の数を示す。右側のグラフは、T細胞表面マーカーCD45RAおよびCCR7の発現に基づく、ゲーティングされたCAR-T細胞の分化状態、またはモックT細胞群のゲーティングされないCD45+細胞の分化状態を示す。まとめると、結果は、1ug 36-sdAb標的CAR-T細胞で処置したマウスの白血病負荷量の全体的な減少、CAR-Tで処置した全グループでのCAR-T細胞の増殖（処置したマウスでは明らかな増殖を示した）、およびsdCD22 CAR-T細胞で処置したグループではセントラルメモリーT細胞を優先するバランスのとれた分化プロファイルを実証している。

【0368】

考察

NSGマウスは、ヒト免疫系とがんとの相互作用を研究するために広く用いられており、ヒト免疫細胞とヒト腫瘍という状況下で免疫治療薬を評価するための実用的なプラットフォームとなっている。全体として、これらの結果は、*in vitro*と同様に、*in vivo*でCD22標的シングルドメインCAR改変T細胞の抗白血病活性を明らかに実証しており、また、CD22標的シングルドメインCAR-T細胞の有効性が、臨床の場ですでに臨床応答を示しているCD19 (FMC63)-CAR-T細胞の有効性と同等かそれ以上であることを実証している。

【0369】

実施例5： 二重特異性T細胞エンゲージャーコンストラクト

はじめに

キメラ抗原受容体技術と同様に、新規抗原結合要素を、CD3とかみ合う抗体要素に連結させることで、T細胞と細胞性標的分子に同時に結合して、抗原特異的なT細胞活性化シグナルをもたらすことができる可溶性分子を作製することも可能である。このタイプの分子は、二重特異性T細胞エンゲージャーと呼ばれるもので、ブリナツモマブ (Blinatumomab) により例示される；ブリナツモマブは、単一の分子がヒトCD19とヒトCD3に同時にかみ合い、CD19を発現するB細胞ファミリーの悪性腫瘍の治療薬として使用される。本明細書で作製されたヒトCD22特異的シングルドメイン抗体が、このような二重特異性T細胞エンゲージャー分子に使用できるかどうかを評価するために、分子の一端がCD22特異的シングルドメイン抗体配列からなり、他端がCD3エンゲージャー分子からなる分子を作製した。その後、これらの新規二重特異性T細胞エンゲージャーを、T細胞活性化の非特異的および抗原特異的誘導および標的細胞のT細胞殺傷についてスクリーニングした。

【0370】

材料および方法

シングルドメイン抗体の抗原結合配列を、プラスミドバックボーン内のモジュラー二重特異性T細胞エンゲージャーDNA配列 [SEQ ID NO: 119] に移した；使用したDNA配列は効率的な組換えを可能にする制限部位を含み、そこでは、抗原結合ドメインを新規CD22抗原結合ドメイン (ABD) 配列に置き換えることができる。使用した具体的な二重特異性T細胞エンゲージャーの設計は、以下の通りである：ヒトCD28シグナルペプチド [SEQ ID NO: 110]、VHH抗体 (ABD) (SEQ ID NO: 82~108のいずれか1つ)、柔軟なリンカードメイン [SEQ ID NO: 111]、ヒトCD8ヒンジドメイン [SEQ ID NO: 112]、短い柔軟なリンカードメイン [SEQ ID NO: 118]、およびCD3特異性単鎖可変フラグメント配列。CD22-CD3二重特異性T細胞エンゲージャー分子のモデル

が提供される（図21）。ゴールデンゲート（golden gate）アセンブリーを用いてコンストラクトを作製し、下流試験に進む前にサンガーシーケンシングを用いて確認した。

【0371】

二重特異性T細胞エンゲージャー分子の精製タンパク質形態を得るために、様々なコンストラクトを含むプラスミドDNAを、標準プロセスによりポリエチレンジオキサンを用いてHEK293T細胞にトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞を培養下に置き、数日間にわたって上清を回収した。次に、上清を二重特異性T細胞エンゲージャー活性について試験するために、上清をJurkat細胞単独の上に、またはJurkat細胞とCD22陽性（Ramos）もしくはCD22陰性（U87vIII）標的細胞との共培養物の上に直接置いて、標準条件下で一晩インキュベートした。その後、Jurkat細胞を、ヒトCD69マーカーに

10

【0372】

これらの結果が、初代ヒトT細胞における特異的な抗腫瘍応答の誘導にまで及ぶかどうかを検証するために、上記で作製された新規二重特異性T細胞エンゲージャーを含む上清を、初代T細胞を用いたアッセイに使用した。具体的には、ヒトドナー血液からT細胞を分離して、10日間ポリクロール増殖させた。ポリクロール増殖後、T細胞を、様々な二重特異性T細胞エンゲージャーを含む上清または対照上清（モック）の存在下で、安定した蛍光タンパク質（Nuclight；Sartorius社、米国）を発現するCD22発現標的細胞（Ramos）と共培養した。その後、共培養物を、IncuCyte（Sartorius社、米国）ライブ顕微鏡装置で標的細胞の成長についてモニタリングした。蛍光標識した標的細胞の自動細胞計数を用いて、標的細胞の相対的成長を3日間にわたって定量化した（図25）。

20

【0373】

結果

図21は、CD22特異的シングルドメイン抗体二重特異性T細胞エンゲージャータンパク質の分子構造を示す；DNAコンストラクトの5'末端にCD22-sdAb配列があり、その後には様々な組成であってよいリンカー配列が続く、その後にはCD3特異的単鎖可変フラグメントが続いている。

30

【0374】

図22は、Jurkat細胞二重特異性T細胞エンゲージャー活性化活性アッセイの結果を示す；このアッセイでは、様々な二重特異性T細胞エンゲージャー分子を含むHEK293T上清を、Jurkat細胞とCD22陽性（Ramos）またはCD22陰性（U87vIII）標的細胞とを含む共培養物の上に置いた。グラフは、フローサイトメトリーで測定されたJurkat細胞のCD69特異的抗体染色の平均値を示す。エラーバーは、2つ組の共培養ウェルの平均値の標準誤差を示す。結果は、新規CD22-sdAb二重特異性T細胞エンゲージャー分子の存在下でのT細胞のCD22抗原特異的活性化を実証している。

40

【0375】

図23は、CD22陽性標的細胞（Ramos）と共培養した初代ヒトT細胞を用いた二重特異性T細胞エンゲージャー活性化活性アッセイの結果を示す。上述したように、ドナー血液由来のT細胞を、対照上清（モック）またはCD22特異的二重特異性T細胞エンゲージャー含有上清の存在下で、蛍光標識した標的細胞と共培養し、ライブ蛍光顕微鏡で3日間にわたり1時間ごとに観察した。グラフは、自動細胞計数を用いて測定された、蛍光標識した標的細胞の成長倍率を示す。エラーバーは、2つ組の共培養ウェルの平均値の標準誤差を示す。結果は、CD22-sdAb標的二重特異性T細胞エンゲージャー分子の存在下でのT細胞媒介による腫瘍成長抑制を実証している。

50

【0376】

注目すべきことに、SEQ ID NO: 111、SEQ ID NO: 112（ヒトCD8ヒンジドメイン）、およびSEQ ID NO: 118を含む拡張リンカーを有するこのコンストラクトは、より短いG4Sリンカーのみを含む同様のコンストラクトよりも高い活性を示した（データは示していない）。

【0377】

考察

全体として、これらの結果は、CD22特異的シングルドメインバインダーが、二重特異性T細胞エンゲージャー分子に組み込まれた場合、強力な抗原駆動型T細胞活性化シグナル伝達を生成できることを例証している。CD22-sdAb標的の二重特異性T細胞エンゲージャー分子は、標的特異的T細胞活性化および初代ヒトT細胞による直接標的細胞殺傷を促進することが実証される。2種のCD22特異的シングルドメイン抗体についての例示的データが提供されているが、このデータは、さらなる高親和性CD22バインダーが同様の活性をもつ可能性があることを示している。さらに、二重特異性T細胞エンゲージャー分子の機能性をさらに高めるために、分子の最適化を行うことができる。さらに、複数のCD22特異的シングルドメイン抗体配列を1つの分子にまとめることは、標的特異的活性化活性を高めるための有効な戦略となる可能性がある。

【0378】

実施例6： CAR-Tコンストラクトのin vivo研究

1×10^5 個のRamos-Luc腫瘍細胞を接種した後、 2.5×10^6 個のsdCD22（1ug13または1ug36）CAR-T細胞またはベンチマークscFvCD22 CAR-T細胞で処置したNSGマウスについて、生存率解析および循環CAR-T細胞の測定を行った。モックは、CARを発現するレンチウイルスの非存在下で同様の処理条件にさらされた、ドナー由来のT細胞を指す。Txなしのマウスにはビヒクル（ハンクス平衡塩溶液）を投与した。

【0379】

図24は、処置と試験の概略図である。

【0380】

図25は、マウスの生存率を示す。

【0381】

図26は、マウスの末梢血で計数されたCAR-T細胞を示す。

【0382】

結果は、モックT細胞で処置されたマウスまたは未処置のままのマウスと比較して、CD22-CAR-T細胞で処置されたマウスではCAR-T細胞の生存延長と持続性が観察されたことを実証している。sdCD22-1ug36 CAR-T細胞で処置されたマウスは、ベンチマークscFv CAR-TまたはsdCD22-1ug13 CAR-Tと比較して、生存率の向上および循環CAR-T細胞の増殖/持続性を示した。

【0383】

また、 0.5×10^5 個のRamos-Luc腫瘍細胞を接種した後、様々な用量のsdCD22-1ug36 CAR-TまたはベンチマークscFvCD22-m971 CAR-T細胞で処置したNSGマウスについて、生存率解析および腫瘍成長動態を調べた。モックは、CARを発現するレンチウイルスの非存在下で同様の処理条件にさらされた、ドナー由来のT細胞を指す。Txなしのマウスにはビヒクル（ハンクス平衡塩溶液）を投与した。

【0384】

図27は、最初の腫瘍チャレンジおよびCAR-T処置の後のマウスの生存率を示す。モックT細胞またはビヒクル対照を投与したマウスと比べて、CAR-Tで処置されたマウスでは生存期間の用量依存的増加が見られた。最高用量のCAR-T細胞で処置されたマウスの50%以上は長期間生存した；それらを最初の腫瘍チャレンジ後88日目に 0.5×10^5 個のRamos-Luc腫瘍細胞で再チャレンジして、生存率と腫瘍成長についてモニタリングした。

【0385】

図28は、再チャレンジ後のマウスの生存率を示す。未処置（ビヒクル対照）の動物は

全てが病気で死亡したが、CAR-T処置マウスの全て（sdCD22-1ug36）または大部分（ベンチマークscFvCD22-m971）は2度目の腫瘍チャレンジを生き延びた。

【0386】

図29は、チャレンジ後の腫瘍成長のグラフを示す。未処置の対照マウスは全てが腫瘍を発症したが、CAR-Tで処置したマウスは再チャレンジを退けることができ、CAR-T細胞の長期持続性、それゆえに抗腫瘍応答の永続性を実証している。

【0387】

実施例7： バイパルトピックおよびマルチパルトピックCARコンストラクト

図30は、CD22特異的CAR分子を含むマルチバインダードメインの分子構造を示し、（左）N末端のCD22-sdAb配列を含み、その後リンカー配列が続く、該リンカー配列には（中央）同じsdAbバインダー配列のもう1つのコピー、または（右）異なるsdAbバインダーが続くことができる。これは、より高い親和性および/またはより高い活性を示すCAR分子をもたらす可能性がある。

【0388】

図31は、Jurkat細胞を様々なCARプラスミド（シングルバインダーおよびマルチバインダーをコードする）で一過性にエレクトロポレーションし、単独で培養するか、またはCD22陽性（Ramos）標的細胞株と共培養した場合の、CAR-Jurkatアッセイの結果を示す。

【0389】

図32は、マルチsdAb含有CARコンストラクトをコードするレンチウイルスベクターを導入したヒト血液由来の初代T細胞を用いた、同様のCAR活性化試験の結果を示す。これらのデータは、マルチCD22 sdAb含有CAR分子が、CD22発現標的細胞に対してより高い分子応答性を示すことができることを実証している。

【0390】

図33は、CD22特異的CAR分子（左）、BCMA特異的CAR分子（右）、またはタンデムCD22-BCMA-CAR分子（中央）の分子構造を示す。タンデムコンストラクトは、N末端のCD22-sdAb配列と、これに続くリンカー配列を含み、該リンカー配列には別の抗原特異的sdAb、例えばここに示すようなBCMAを標的とするsdAbが続くことができる。

【0391】

図34は、Jurkat細胞を、様々なCD22、BCMA、またはCD22/BCMA特異的CARプラスミドで一過性にエレクトロポレーションし、単独で培養するか、またはBCMA+/CD22+（Ramos）、BCMA^{low}/CD22+（NALM6）、もしくはBCMA+/CD22-（Ramos-CD22ko）標的細胞株と共培養して、活性化状態（CD69発現）について検討した、CAR-Jurkatアッセイの結果を示す。これらのデータは、マルチCD22 sdAb含有CAR分子が、両方の標的抗原に対する応答性を維持し、かつ抗原性の低い標的細胞に対する応答性を高めることができることを実証している。

【0392】

実施例の考察

これは、CD22を標的とするCAR-T治療に応用するためのシングルドメイン抗体の最初の実証実験である。シングルドメイン抗体は、CARコンストラクトの抗原認識ドメインとして通常使用される単鎖可変フラグメント抗体と比較して、サイズが非常に小さい、ヒト抗体配列との相関性が高い、モジュラー性が高い、scFvが接近できない可能性のあるエピトープを標的にできる、などの大きな利点を提供する。本発明は、複数のB細胞特異的抗原を標的とした単一のCARコンストラクトを作製するために、後で、CD20、CD19またはBCMAを標的とするシングルドメイン抗体と組み合わせることが可能である。

【0393】

前述の説明では、説明を目的として、実施形態の完全な理解を提供するために、多数の詳細が記載されている。しかし、これらの具体的詳細は必要とされないことが、当業者には明らかであろう。

【0394】

上述した実施形態は、単なる例示であることが意図される。当業者であれば、特定の実施形態に対して変更、修正および変形を加えることができる。特許請求の範囲は、本明細書に記載された特定の実施形態によって限定されるべきではなく、全体として本明細書に一致するように解釈されるべきである。

【0395】

参考文献

1. Fry, T. J. et al. CD22-targeted CAR T cells induce remission in B-ALL that is naive or resistant to CD19-targeted CAR immunotherapy. *Nature Medicine* 24, 20-28 (2018).
2. Pan, J. et al. CD22 CAR T-cell therapy in refractory or relapsed B acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1-13 (2019) doi:10.1038/s41375-019-0488-7.
3. 米国特許公開番号 US 2015/0299317 A1.
4. Arbabi-Ghahroudi et al. Aggregation-resistant VHs selected by in vitro evolution tend to have disulfide-bonded loops and acidic isoelectric points *Protein Engineering, Design and Selection* 2009 Vol. 22, 59-66.
5. Feldhaus et al., 2003, *Nat. Biotechnol.* Vol. 21, 163-170.
6. Baral TN, Arbabi-Ghahroudi M. Expression of single-domain antibodies in bacterial systems. *Methods Mol Biol.* 2012;911:257 -75.
7. Bloembergen et al. A High-Throughput Method for Characterizing Novel Chimeric Antigen Receptors in Jurkat Cells. *Molecular Therapy: Methods & Clinical Development.* 2020; 16: P238-254.
8. Hussack G et al. *Protein Engineering Design & Selection.* 2014; 27(6); 191-198.
9. Valleria et al. IL-15 Trispecific Killer Engagers (TriKEs) Make Natural Killer Cells Specific to CD33+ Targets While Also Inducing In Vivo Expansion, and Enhanced Function. *Clinical Cancer Research.* 2012 ;22(14): 3440-50
10. Gleason et al. Bispecific and Trispecific Killer Cell Engagers Directly Activate Human NK Cells Through CD16 Signaling and Induce Cytotoxicity and Cytokine Production. *Mol Cancer Ther.* 2012; 11(12): 2674-84
11. Gauthier et al. Multifunctional Natural Killer Cell Engagers Targeting NKp46 Trigger Protective Tumor Immunity. *Cell.* 2019; 177(7): 1701-13.
12. Stoiber et al. Limitations in the Design of Chimeric Antigen Receptors for Cancer Therapy. *Cells.* 2012; 8(5): 472.
13. van der Stegen et al. The pharmacology of second-generation chimeric antigen receptors. *Nat Rev Drug Discov.* 2019; 14(7): 499-509.
14. Henry KA et al. Llama Peripheral B-cell Populations Producing Conventional and Heavy Chain-Only IgG Subtypes Are Phenotypically Indistinguishable but Immunogenetically Distinct. *Immunogenetics* 2019 Apr;71(4):307-320.

10

20

30

本明細書で言及される全ての参考文献は、その全体が参照により本明細書に明示的に組み込まれる。

【0396】

40

50

【表 8】

表8:配列の表

配列#	説明		配列
1	hCD221ug-6	CDR1	GFTLDYYV
2	hCD221ug-6	CDR2	ISSSDGVT
3	hCD221ug-6	CDR3	AVDKPFYDGGYYTCTPVDFDS
4	hCD221ug-10	CDR1	ESTFSIM
5	hCD221ug-10	CDR2	INSAGST
6	hCD221ug-10	CDR3	YVDGY
7	hCD221ug-13	CDR1	GGSFSSVT
8	hCD221ug-13	CDR2	ITWSSPST
9	hCD221ug-13	CDR3	AGGRTGRGTSADTDEYNY
10	hCD221ug-14	CDR1	GRIFRSYV
11	hCD221ug-14	CDR2	IGWSDT
12	hCD221ug-14	CDR3	AANSPPYGPQRDEFDY
13	hCD221ug-36	CDR1	GITFSRAA
14	hCD221ug-36	CDR2	VNSDSST
15	hCD221ug-36	CDR3	WSPGFGSY
16	hCD221ug-61	CDR1	MSSFSQYV
17	hCD221ug-61	CDR2	ITSYSNT
18	hCD221ug-61	CDR3	NAQYGSTFIRNHWD
19	hCD221ug-74	CDR1	GFTFDDYA
20	hCD221ug-74	CDR2	MGSSDGAT
21	hCD221ug-74	CDR3	AVDKPFYDGGYRYTCTPVDFGS
22	hCD221ug-75	CDR1	GSIFRIAV
23	hCD221ug-75	CDR2	ITSGGDT
24	hCD221ug-75	CDR3	NAKYGRDEY
25	hCD221ug-77	CDR1	GSIFRIAV
26	hCD221ug-77	CDR2	ITSGGET
27	hCD221ug-77	CDR3	NAKWGQYFY
28	hCD221ug-80	CDR1	GFTLDYYV

10

20

30

40

50

29	hCD221ug-80	CDR2	ITSDGVT
30	hCD221ug-80	CDR3	AVDKPFYDGGIQYTCPVDFDS
31	hCD221ug-87	CDR1	GSIFRIAV
32	hCD221ug-87	CDR2	ITSGGET
33	hCD221ug-87	CDR3	NAKWGRDEY
34	hCD221ug-93	CDR1	GSTFSSSV
35	hCD221ug-93	CDR2	ITSSGST
36	hCD221ug-93	CDR3	NAQYGRRSD
37	hCD22100ng-2	CDR1	GVTFDYYV
38	hCD22100ng-2	CDR2	MRNSDGV
39	hCD22100ng-2	CDR3	AVDKPFYDGGNYYTCPVDFDS
40	hCD22100ng-62	CDR1	GSISSINA
41	hCD22100ng-62	CDR2	ITTAGNT
42	hCD22100ng-62	CDR3	AGKLYVNKEYTY
43	hCD22100ng-66	CDR1	GFSLDYYV
44	hCD22100ng-66	CDR2	ISSSDGAT
45	hCD22100ng-66	CDR3	AVDKPFYDGGSYTCPVDFGS
46	hCD22pas-10	CDR1	GFTSDYYA
47	hCD22pas-10	CDR2	ISSSDGV
48	hCD22pas-10	CDR3	AVDKPFYDGGYLYTCPVDFDS
49	hCD22pas-16	CDR1	GSTFSLKA
50	hCD22pas-16	CDR2	INSDGSYT
51	hCD22pas-16	CDR3	NTMPPWP
52	hCD22pas-23	CDR1	GSIFRITAV
53	hCD22pas-23	CDR2	ITSAGET
54	hCD22pas-23	CDR3	NAKWGQYEH
55	hCD22pas-24	CDR1	GITSSINS
56	hCD22pas-24	CDR2	IGRGGSGST
57	hCD22pas-24	CDR3	LEVTTDLSSY
58	hCD22pas-32	CDR1	GRIFRSYV

10

20

30

40

50

59	hCD22pas-32	CDR2	IGWSDT
60	hCD22pas-32	CDR3	AANSPPYGPPQRDEFGY
61	hCD22pas-33	CDR1	GFTLDSYV
62	hCD22pas-33	CDR2	ISSSDGVT
63	hCD22pas-33	CDR3	AVDKPFYDGGYLYTCPVDFDS
64	hCD22pas-48	CDR1	GSIFRIAV
65	hCD22pas-48	CDR2	ITIAGET
66	hCD22pas-48	CDR3	YANGGRDEY
67	hCD22pas-55	CDR1	GRISRSYV
68	hCD22pas-55	CDR2	IGCSDT
69	hCD22pas-55	CDR3	AEYSPPYGPPQRDEFDY
70	hCD22pas-64	CDR1	GSTFSLNT
71	hCD22pas-64	CDR2	ASSDGYT
72	hCD22pas-64	CDR3	TWGTGRFADYIY
73	hCD22pas-72	CDR1	GGTFSVYT
74	hCD22pas-72	CDR2	IRGSGGT
75	hCD22pas-72	CDR3	AVRIRRTLVEPLTKETLYDY
76	hCD22pas-79	CDR1	GRTSSVYG
77	hCD22pas-79	CDR2	MSWSGGPT
78	hCD22pas-79	CDR3	AVRIRRTLLEPLTKETLYDY
79	hCD22pas-82	CDR1	GSIFRITV
80	hCD22pas-82	CDR2	ITSGGDS
81	hCD22pas-82	CDR3	NAKWGGDEY
82	hCD221ug-6	全長	QVQLVESGGGVVRPGDSLRLSCTVSGFTLDYYVMGWFRA PGKEREVVSCLISSSDGVTYYADSVKGRFTISRDNKNTVY LQMNSLKPEDTAIYYCAVDKPFYDGGYYTCPVDFDSWGQ GTQVTVSS
83	hCD221ug-10	全長	QVQLVESGGGLVQAGGSLSVSCTASESTFSIMMGWFRQAP GKQREMVAVINSAGSTNYADSAEGRFTISRDLAKKTVSLQ MNSLKPEDTAVYYCYVDGYFGGTQVTVSS

10

20

30

40

50

84	hCD221ug-13	全長	QVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAGSGGSFSSVTMAWFRQA PGKDREFVAAITWSSPSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVY LQMNSLKPEDTAVYYCAGGRTGRGTSADTDEYNYWGQGTQ VTVSS
85	hCD221ug-14	全長	QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGRIFRSYVLGWFRQA PGKERELVARIGWSDTYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQ MNSLKPEDTAVYYCAANSPPYGPQRDEFDYGQGTQVTVS S
86	hCD221ug-36	全長	EVQLVDSGGGLVQAGGSLRVSCASGITFSRAAMGWYRQR PGKERERVAVVNSDSSTIYADSVKGRFTISRDNAKNTVYL QMNSLEPEDTAVYYCWSPGFGSYWGQGTQVTVSS
87	hCD221ug-61	全長	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASMSSFSQYVMYWRQA PGKQRELVAITISYSNTNYADSVKGRFTISRDNAKSIAYL QMDSLKPEDTAVYYCNAQYGSTFIRNHWDWQGTQVTVS S
88	hCD221ug-74	全長	QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAGSGFTFDDYAMGWFRQA PGKEREVVS CMGSSDGATYYADSVKGRFTISRDNAKNTVY LQMNSLKPEDTAIYYCAVDKPFYDGGYRYTCPVDFGSWGQ GTQVTVSS
89	hCD221ug-75	全長	QVKLEESGGGLVQPGGSLRLSCAGSGSIFRIAMNMYRQA PGKERELVAVITSGGDTHYAASVKGRFTISRDNAKNTMYL QINSLKPEDTAVYYCNAKYGRDEYWGQGAQVTVSS
90	hCD221ug-77	全長	QVKLEESGGGLVQPGGSLRLSCADSGSIFRIAMNMYRQA PGKERELVAVITSGGETHYAASVKGRFTISRDNAKNTMYL QMNSLKPEDTAVYYCNAKWGQYEYWGQGTQVTVSS
91	hCD221ug-80	全長	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGFTLDYVMVWFRQA PGKEREAVSCITSDGVTTYADSVKGRFTISRDNAKNTVYL QMN RVKPEDTAVYYCAVDKPFYDGGIQYTCPVDFDSWGQG AQVTVSS
92	hCD221ug-87	全長	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCADSGSIFRIAMNMYRQA PGKERELVAVITSGGETHYAASVKGRFTISRDNAKNTMYL QMNSLKPEDTAVYYCNAKWGRDEYWGQGTQVTVSS

10

20

30

40

50

93	hCD221ug-93	全長	QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAAS <u>SGSTFSSSV</u> MNWYRQA PGKQRELVA <u>VITSSG</u> STHYADSVKGRFTISRDNAKNTVNL QMNSLKPEDTAVYYC <u>NAQYGR</u> SDWGQGTQVTVSS
94	hCD22100ng-2	全長	QVKLEESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGVTFDYYVMGWFRQA PGKEREVVS <u>CMRNSD</u> GVITYADSVKGRFTISRDNAKNTVY LQMNSLKPDDTAIYYCAVDKPFYDGGNYT <u>CPVDFDS</u> WGQ GTQVTVSS
95	hCD22100ng-62	全長	QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAAS <u>SGSISSINAM</u> GWYRQV PGKQRELVAIITTAGNTRYGDSVKGRFTISRDNARKTVYL QMNSLKPEDTAVYYCAGKLYVNKEYTYWGQGTQVTVSS
96	hCD22100ng-66	全長	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGFSLDYVMGWFRQA PGKEREVVS <u>CISSSD</u> GATYYPDSVKGRFTISRDNAKKTVY LQMNALKPEDTAIYYCAVDKPFYDGGSYT <u>CPVDFGS</u> WGQ GTQVTVSS
97	hCD22pas-10	全長	QVQLVESGGGLVQPGDSLRLSCTVSGFTSDYYAMGWFRQA PGKEREAVS <u>CISSSD</u> GVITYADSVRGRFTISRDNAKNTVY LEMNSLKPEDTAIYYCAVDKPFYDGGYLYT <u>CPVDFDS</u> WGQ GTQVTVSS
98	hCD22pas-16	全長	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS <u>SGSTFSLKAM</u> AWYRQA PGKQRERVGVINSDGSYTDAASVQGRFTISRDNAKNTVY LQMNSLKPEDTAVYYC <u>NTMPPWP</u> WGQGTQVTVSS
99	hCD22pas-23	全長	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>SGSIFRITAV</u> MNWYRQ APGKERELVA <u>VITSAGETH</u> YAESVKGRFTISRDNAKNTMY LQMNSLKPEDTAVYYCNAKWGQYEHWGQGTQGTVSS
100	hCD22pas-24	全長	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCSASGITSSINSMGWHRQA PGKQRELVASIGRGGSGSTKYADSGKGRFLISRDNKNIL FLEMNSLKPEDTADYYC <u>LEVTTDLSS</u> WGRGTQVTVSS
101	hCD22pas-32	全長	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGRIFRSYVLGWFRQA PGKERELVARIGWSDTYADSVKGRFTISRDNAKNTVDLQ MNSLKPEDTAVYYCAANSPPYGPQRDEFYWGQGTQVTVS S
102	hCD22pas-33	全長	QVKLEESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGFTLDSYVMGWFRQA PGKEREAVS <u>CISSSD</u> GVITYADSVKGRFTISRDNAKNTYL

10

20

30

40

50

			QMNSLKPEDTAIYYCAVDKPFYDGGYLYTCPVDFDSWGQG IQVTVSS
103	hCD22pas-48	全長	QVKLEESGGGLGQAGGAVRLSCADSGSIFRIAMNWRQA PGKERELVAVIT ¹⁰ AGETHYAYSVKGQFTISR ¹⁰ NAKNTMYL QMNRLKPEDTAVYYCYANGGRDEYWGRGTQVTVSS
104	hCD22pas-55	全長	QVKLEESGGGLGQAGGSLRLSCAVSGRISRSYVLGWFRQA PGKERELVARIGCSDTYADSAKGRFTISRNNADNTVDLQ MNSLKPEDTAVYYCAEYSPPYGPQRDEFD ¹⁰ YWGQGTQVTVSS
105	hCD22pas-64	全長	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSTFSLNTMAWYRQA PGNQREYVAAASSDGYTNYADSVRGRFTISRNDKNTMYL QMNSLRPEDTAVYYCTWGTGRFADYIYWGQGTQVTVSS
106	hCD22pas-72	全長	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSVYTMWFRQA PGKEREFVAAIRGSGGTYRDSVKGRFTISRDNKNTVYL QMNSLKPEDTAVYYCAVRI ²⁰ RRTLVEPLTKETLYDYWGQGT QVTVSS
107	hCD22pas-79	全長	QVKLEESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGRTSSVYGMWFRQT PGKEREFVAA ²⁰ MSWSGGPTYFADSVKGRFGSSRDNAKNTVY LQMNGLRPEDTAVYYCAVRI ²⁰ RRTLLEPLTKETLYDYWGQG TQVTVSS
108	hCD22pas-82	全長	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFRITVMNWHRQA PGKERELSGVITSGGDSHYAASVKGRFTIYRDNTKNTMYL QMNRLKPEDTDY ²⁰ YCN ²⁰ AKWGGDEYWGQGTHTDGSS
109	CARモジュラーコンストラクト		ATGCTCAGGCTGCTCTTGGCTCTCAACTTATCCCTTCAA TTCAAGTAACAGGAGGGTCTTC [抗CD22 sdAb] GA AGACTTCCTTTGCGAGACGACGGTGGCGGGGGATCAGGTG GTGGAGGTAGCGGGGAGGGGGCTCAGGCGGTACAACACTAC GCCTGCACCTCGCCACCGACCCAGCACCAACCATCGCT TCACAGCCTTTGAGCCTGCGACCAGAGGCATGTCGCCCTG CTGCGGGCGGTGCCGTTCATACTCGCGGACTTGATTTTGC GTGTGACGTCGTCTCGCCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTG GTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAG TAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAAACGGGG CAGAAAGAACTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATG

10

20

30

40

		CGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCT GCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGCT GAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTAC CAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAG GACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGCGACGTGG CCGGGACCCCTGAGATGGGGGGAAGCCGCAGAGAAGGAAG AACCCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAAGATA AGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGA GCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGA CTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACA TGCAGGGCCCTGCCCCCTCGCGCTAGCGCCACGAACCTCTC TCTGTAAAGCAAGCAGGCGACGTGGAAGAAAACCCCGGT CCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGACAACATGGCCAGCC TGCCCGCCACCCACGAGCTGCACATCTTCGGCAGCATCAA CGGCGTGGACTTCGACATGGTGGGCCAGGGCACCGGCAAC CCCAACGACGGCTACGAGGAGCTGAACCTGAAGAGCACCA AGGGCGACCTGCAGTTCAGCCCCCTGGATTCTGGTGCCCCA CATCGGCTACGGCTTCCACCAGTACCTGCCCTACCCCGAC GGCATGAGCCCCCTCCAGGCCGCCATGGTGGACGGCAGCG GCTACCAGGTGCACAGGACCATGCAGTTCGAGGACGGCGC CAGCCTGACCGTGAACCTACAGGTACACCTACGAGGGCAGC CACATCAAGGGCGAGGCCCAGGTGAAGGGCACCGGCTTCC CCGCCGACGGCCCCGTGATGACCAACAGCCTGACCGCCGC CGACTGGTGCAGGAGCAAAAAGACCTACCCCAACGACAAG ACCATCATCAGCACCTTCAAGTGGAGCTACACCACCGGCA ACGGCAAGAGGTACAGGAGCACCGCCAGGACCACCTACAC CTTGCGCAAGCCCATGGCCGCCAACTACCTGAAGAACCAG CCCATGTACGTGTTCAAGAAAGACCGAGCTGAAGCACAGCA AGACCGAGCTGAACTTCAAGGAGTGGCAGAAGGCCTTCAC CGACGTGATGGGCATGGACGAGCTGTACAAGCCCAAGAAG AAGAGGAAGGTGGAGGACCCCCCGCCGCAAGAGGGTGA AGCTGGACTAA	10
110	ヒトCD28シグナルペプチド	MLRLLALNLFPSIQVTG	20
111	柔軟な合成リンカードメイン	GGGGSGGGSGGGSGG	30
			40

112	ヒトCD8ヒンジドメイン	TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL DFACD
113	ヒトCD28膜貫通ドメイン	PSKPFWVLVVVGVLACYSLVTVAFIIFWVR
114	ヒト4-1BB共刺激ドメイン	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGC EL
115	ヒトCD3ζシグナル伝達ドメイン	LRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRR GRDPEMGGKPKQRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKG ERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
116	M971 scFV	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIR QSPSRGLEWLGRITYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKN QFSLQLNSVTPEDTAVYYCAREVTGDLEDAFDIWGQGTMTV TVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQTIWS YLNWYQQRPKGAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGRSGTDF TLTISSLQAEDFATYYCQQSYSIPQTFGQGTKLEIK
117	FMC63 scFV	DYKDHGDGYKDHDIIDYKDDDDKDIQMTQTSSLSASLGDR VTISCRASQDISKYLWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGV PSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTF GGGTKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLVA PSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWIG SETTYYNLSALKSRLTIIDKNSKSKQVFLKMNSLQTDITAIY YCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSS
118	短い柔軟なリンカーアミノ酸配列	GGGGS
119	二重特異性T細胞エンゲージャー モジュラーコンストラクトDNA配列	ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCCTCGTTGCTCTTT TTAGAGGTGTCCAGTGACAGGAGGGTCTTCG [抗CD22 sdAb] GAAGACTTCCTTGGAGGAGGCGGAAGT [抗CD3 scFv重鎖] GGCGGTGGTGGGTGAGGC GGCGGTGGGAGCGGAGGAGGTGGAAGC [抗CD3 scFv軽鎖] CACCACCACCACCACCACTAG
120	hCD221ug-36 クローン化セグメント	QVQLVESGGGLVQAGGSLRVSCASGITFSRAAMGWYRQR PGKERERVAVVNSDSSTIYADSVKGRFTISRDNKNTVYL QMNSLEPEDTAVYYCWSPGFGSYWGQGTQVTVSS

10

20

30

40

50

121	hCD221ug-93 クローン化セグメント	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASMSSFSQYVMYWRQA PGRQRELVAITTSASSTSYADSVKGRFTISRDNAKSIVYL QMNSLKPEDTAVYYCNAQYGSTFIRKPYDTWGQGTQVTVS S
122	hCD221ug-10 クローン化セグメント	QVQLVESGGGLVQAGGSLSVSCTASESTFSIMMGWFRQAP GKQREMVAVINSAGSTNYADSAEGRFTISRDLAKKTVSLQ MNSLKPEDTAVYYCYVDGYFGQGTQVTVSS
123	hCD221ug-61 クローン化セグメント	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASMSSFSQYVMYWRQA PGKQRELVAITTSYSNTNYADSVKGRFTISRDNAKSIAYL QMDSLKPEDTAVYYCNAQYGSTFIRNHWDWQGTQVTVS S
124	hCD22pas-16 クローン化セグメント	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSTFSLKAMAWYRQA PGKQREVRGVINS DGSYTTDAASVQGRFTISRDNAKNTVY LQMNSLKPEDTAVYYCNTMPWPWPWGQGTQVTVSS
125	hCD221ug-80 クローン化セグメント	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTFSGFTLDYYVMGWFRQA PGKEREAVSCITSDGVTTYADSVKGRFTISRDNAKNTVYL QMN RVKPEDTAVYYCAVDKPFYDGGIQYTCPVDFDSWGQG TQVTVSS
126	グループ 1 CDR1 コンセンサス	GXXXDXYY
127	グループ 1 CDR2 コンセンサス	XXXXXGXT
128	グループ 1 CDR3 コンセンサス	AVDKPFYDGGXXYTCPVDFXS
129	グループ 2 CDR1 コンセンサス	GSXFXXXXV
130	グループ 2 CDR2 コンセンサス	ITSXGXX
131	グループ 2 CDR3 コンセンサス	NAXXGXXXX
132	グループ 3 CDR1 コンセンサス	GRIXRSYV
133	グループ 3 CDR2 コンセンサス	IGXSDT
134	グループ 3 CDR3 コンセンサス	AXXSPPYGPQRDEFXY
135	グループ 4 CDR1 コンセンサス	GXTXSVYX
136	グループ 4 CDR2 コンセンサス	XXXSXGXT
137	グループ 4 CDR3 コンセンサス	AVRIRRTLXEPLTKETLYDY
138	hCD221ug36 例示的CAR コンストラクト(DNA)	ATGCTCAGGCTGCTCTTGGCTCTCAACTTATTCCTTCAA TTCAAGTAACAGGACAGGTACAGCTGGTGGAGTCTGGGGG AGGCTTGGTGCAGGCTGGGGGGTCTCTGAGAGTCTCCTGT GAAGCCTCTGGAATCACGTTTCAGTCGCGCGGCCATGGGCT

10

20

30

40

50

		GGTACCGCCAGCGTCCAGGCAAGGAGCGCGAACGAGTCGC AGTTGTTAATAGTGATAGCAGTACAATATATGCAGACTCC GTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGA ACACAGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGGAACCTGAGGA CACGGCCGTCTATTACTGTTGGTCCCCAGGGTTCGGGTCC TACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTTTCCTCACCTT TGCGAGACGACGGTGGCGGGGATCAGGTGGTGGAGGTAG CGGGGGAGGGGGCTCAGGCGGTACAACACGCCTGCACCT CGCCCACCGACCCAGCACCAACCATCGCTTCACAGCCTT TGAGCCTGCGACCAGAGGCATGTCGCCCTGCTCGGGCGG TGCCGTTCTACTCGCGGACTTGATTTTTCGTGTGACGTC GTCTCGCCTTCTAAGCCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTG GTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGC CTTTATTATTTCTGGGTGAGGAAACGGGGCAGAAAGAAA CTCCTGTATATATTCAAACAACCATTTATGCGACCAGTAC AAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCTGCCGATTTCC AGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAAGTCTGAGAGTGAAG TTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCC AGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGA GGAGTACGATGTTTTGGACAAGCGACGTGGCCGGGACCTT GAGATGGGGGAAAGCCGCAGAGAAGGAAGAACCCTCAGG AAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGA GGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGG GGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGACTCAGTACAG CCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCT GCCCCCTCGC [任意のP2A-GFPマーカー]	10
			20
			30
139	hCD221ug36 例示的二重特異性T細胞 エンゲージャーコンストラクト (DNA)	ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCGTTGCTCTTT TTAGAGGTGTCCAGTGTACAGGACAGGTACAGCTGGTGGA GTCTGGGGGAGGCTTGCTGCAGGCTGGGGGTCTCTGAGA GTCTCCTGTGAAGCCTCTGGAATCACGTTCACTCGCGCGG CCATGGGCTGGTACCGCCAGCGTCCAGGCAAGGAGCGCGA ACGAGTCGCAGTTGTTAATAGTGATAGCAGTACAATATAT GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACA ATGCCAAGAACACAGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGGA ACCTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTTGGTCCCCAGGG	40

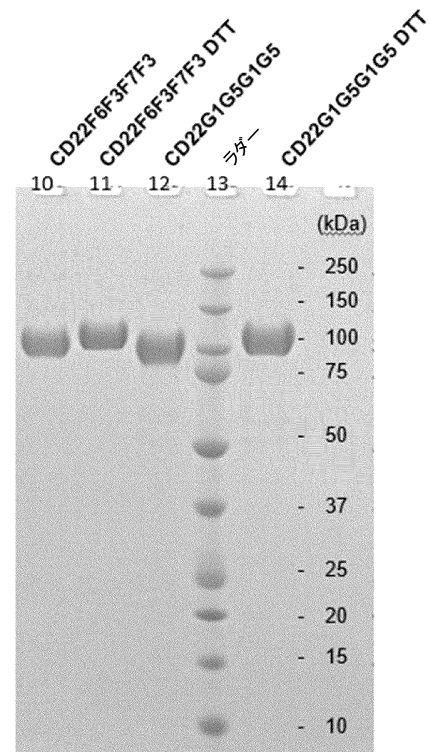
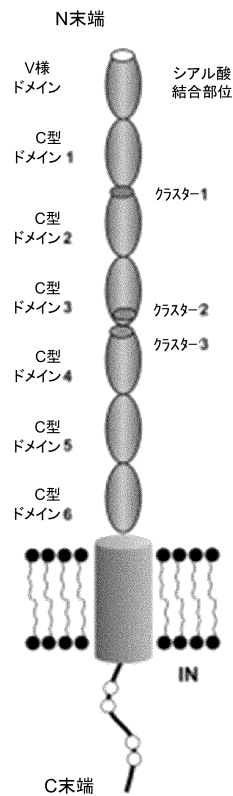
		TTCGGGTCTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTTT CCTCACCTTTGCGAGACGACGGTGGCGGGGGATCAGGTGG TGGAGGTAGCGGGGAGGGGGCTCAGGCGGTACAACCTACG CCTGCACCTCGCCACCGACCCCAGCACCAACCATCGCTT CACAGCCTTTGAGCCTGCGACCAGAGGCATGTCGCCCTGC TGCGGGCGGTGCCGTTTCATACTCGCGGACTTGATTTTGCG TGTGACGTCGTCTCGCTTGGAGGAGGCGGAAGT [抗CD3 scFv重鎖] GGCGGTGGTGGGTGAGGCGG CGGTGGGAGCGGAGGAGGTGGAAGC [抗CD3 scFv軽鎖] CACCACCACCACCACCTAG
--	--	---

10

【図面】

【図 1】

【図 2】



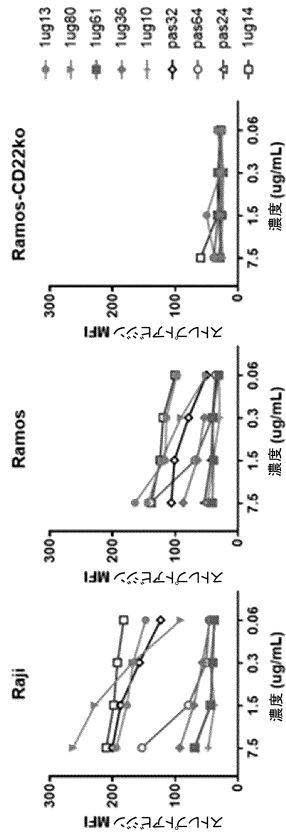
20

30

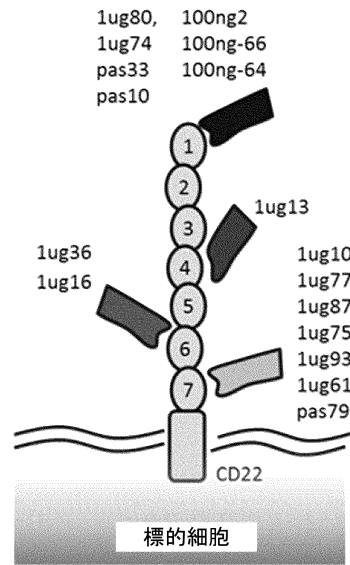
40

50

【図 6】



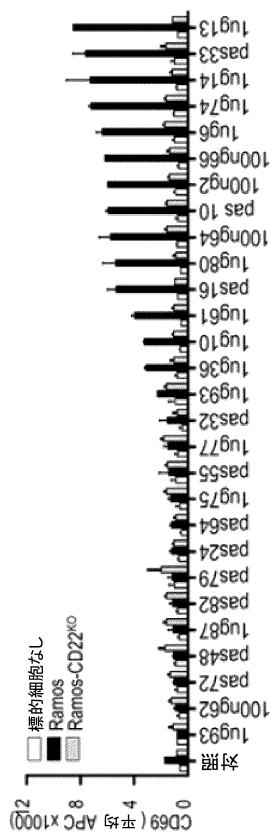
【図 7】



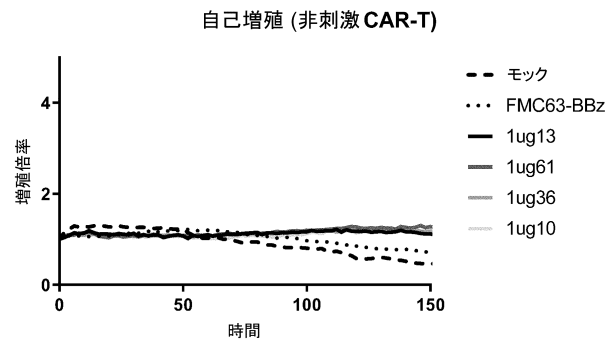
10

20

【図 8】



【図 9】

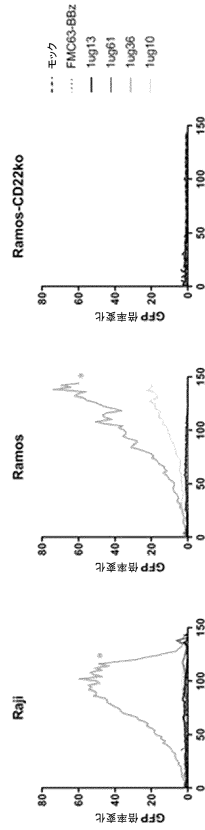


30

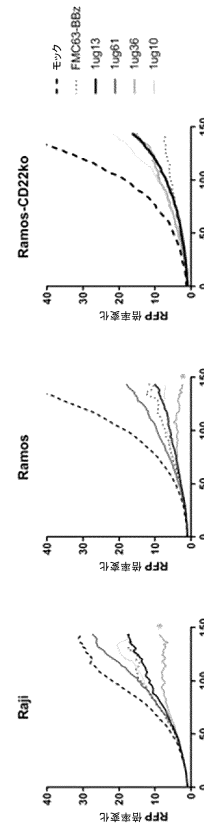
40

50

【図 10】



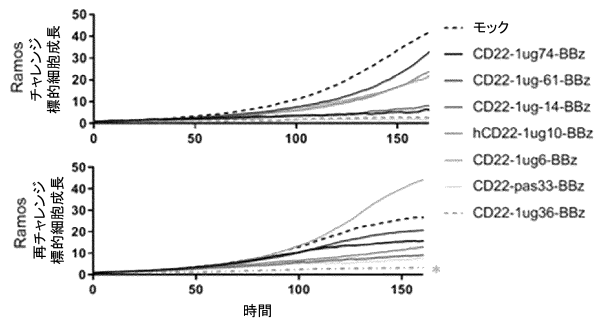
【図 11】



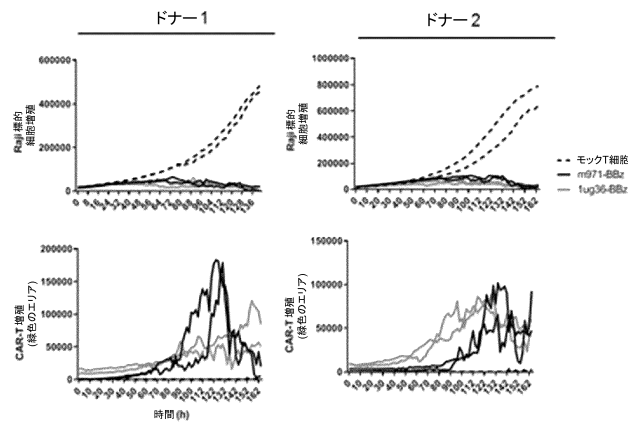
10

20

【図 12】



【図 13】

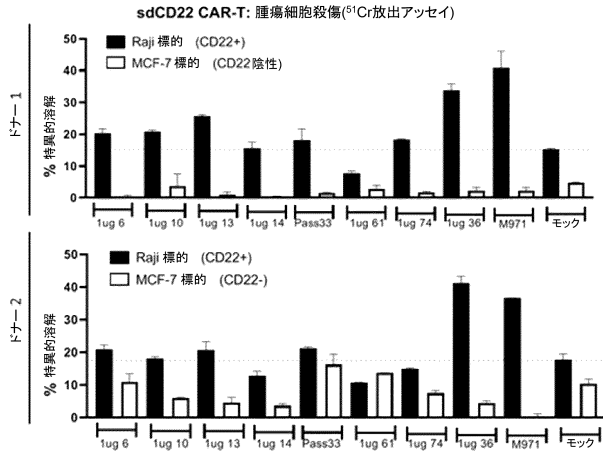


30

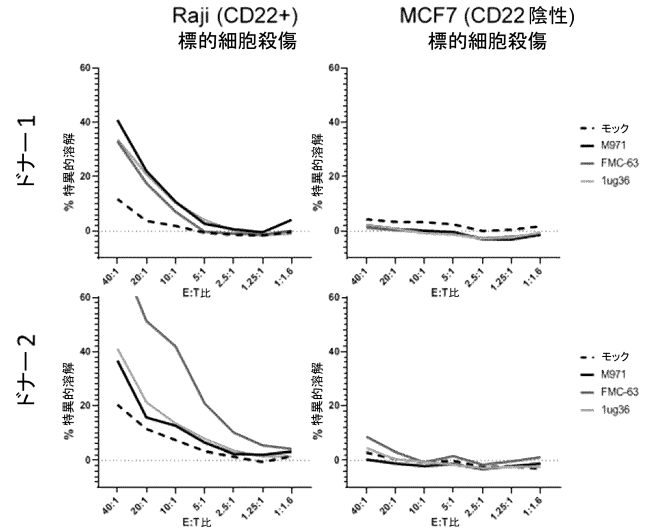
40

50

【図 1 4】

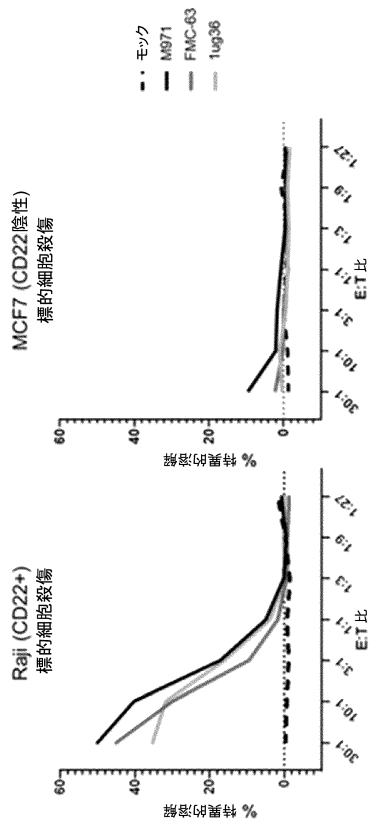


【図 1 5】

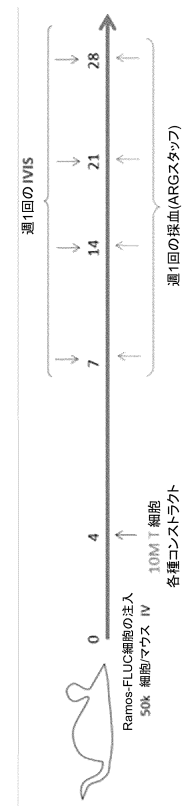


10

【図 1 6】



【図 1 7】



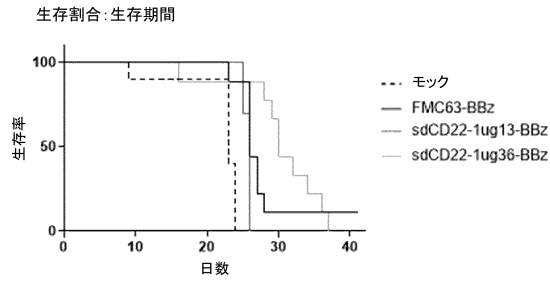
20

30

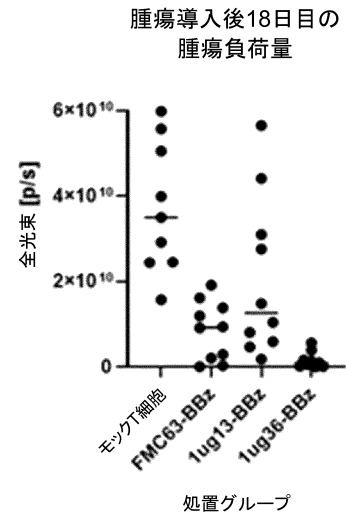
40

50

【図 18】

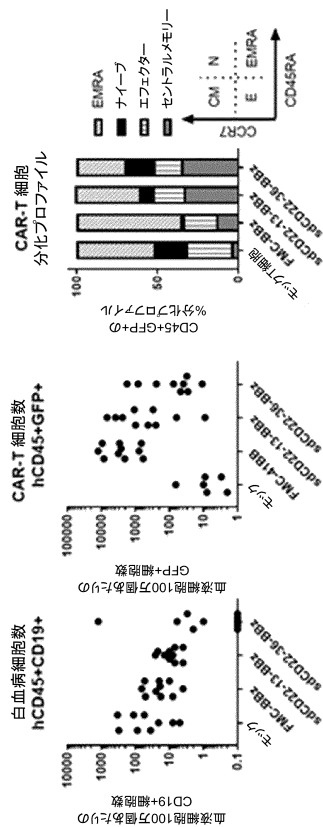


【図 19】

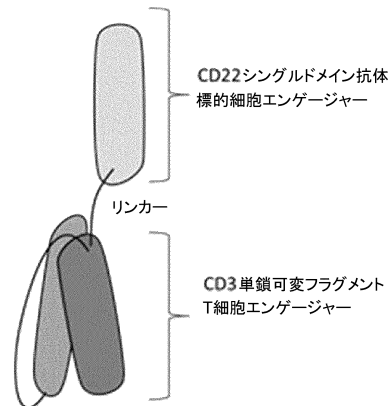


10

【図 20】



【図 21】



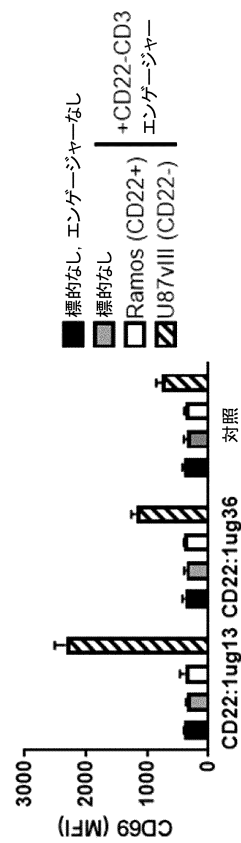
20

30

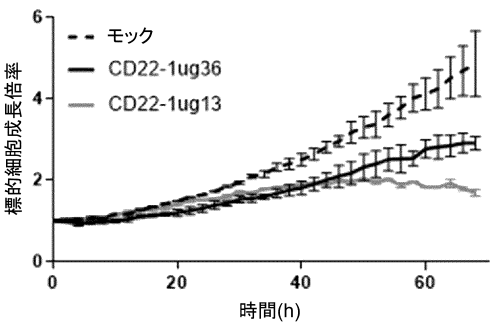
40

50

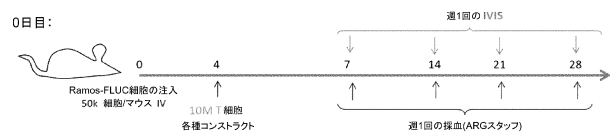
【図 2 2】



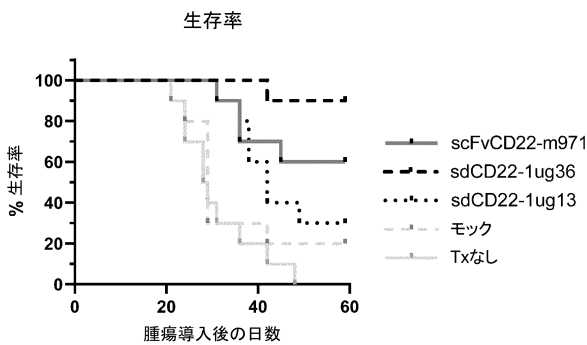
【図 2 3】



【図 2 4】



【図 2 5】



10

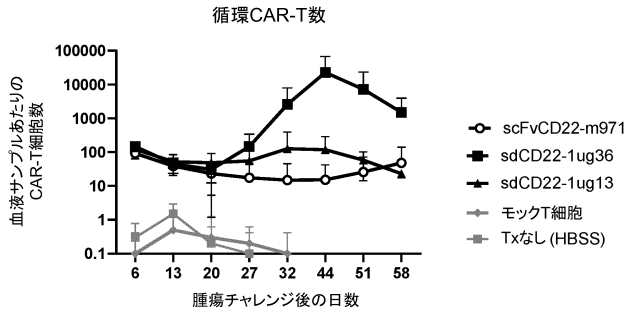
20

30

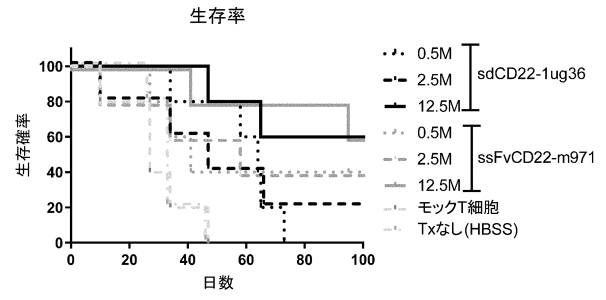
40

50

【図 2 6】

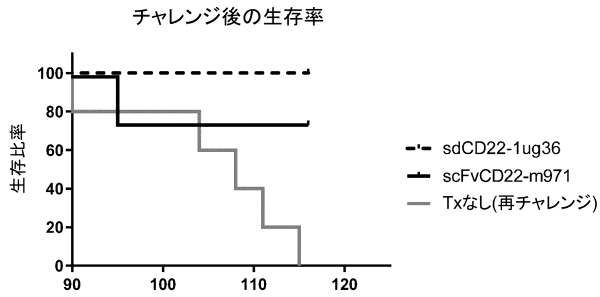


【図 2 7】

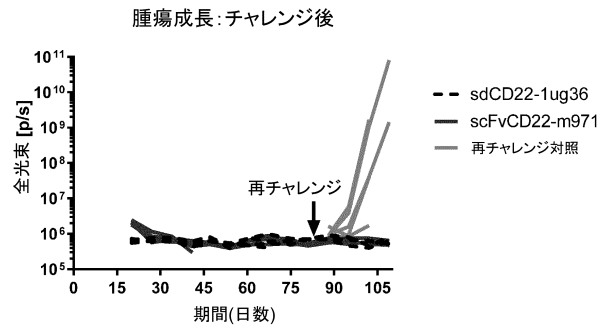


10

【図 2 8】



【図 2 9】



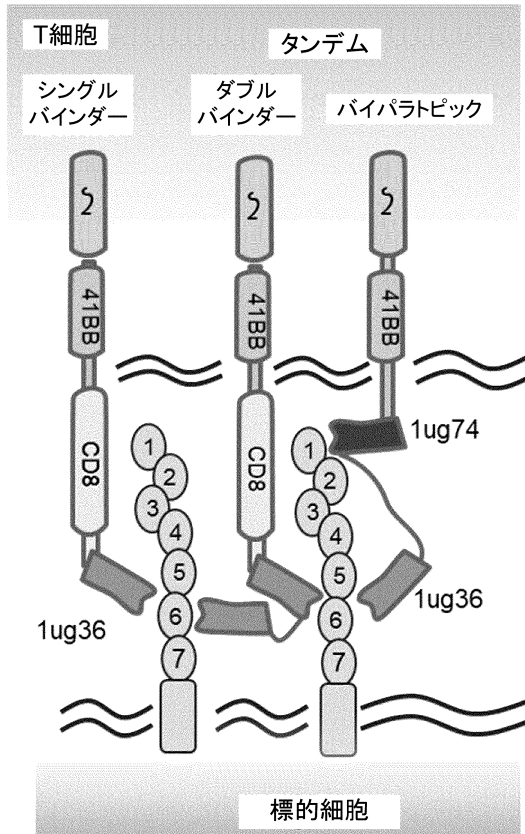
20

30

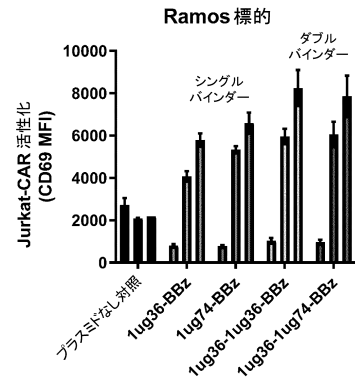
40

50

【図 3 0】



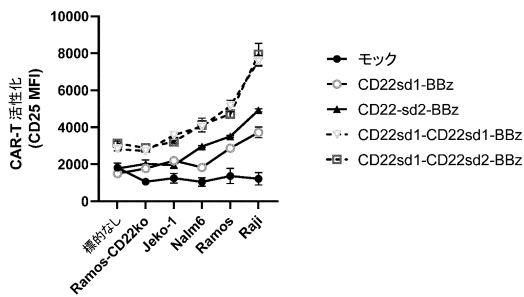
【図 3 1】



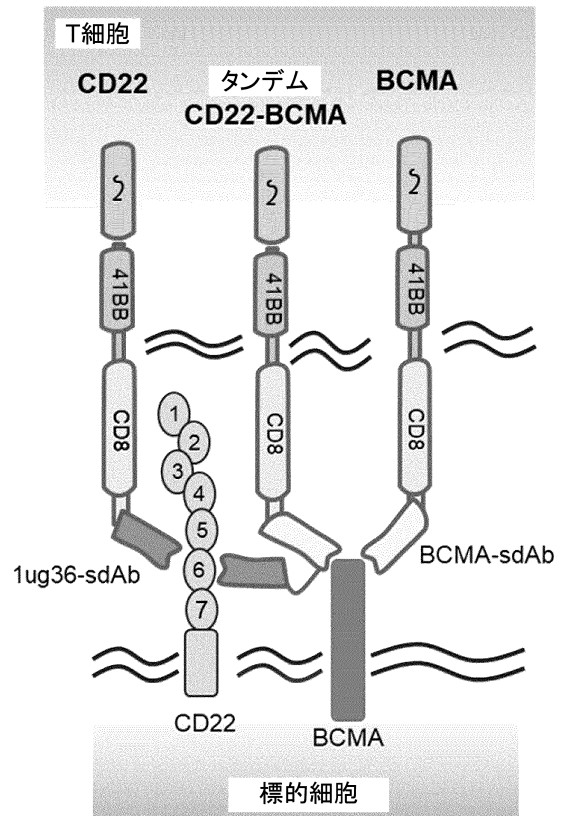
10

20

【図 3 2】



【図 3 3】

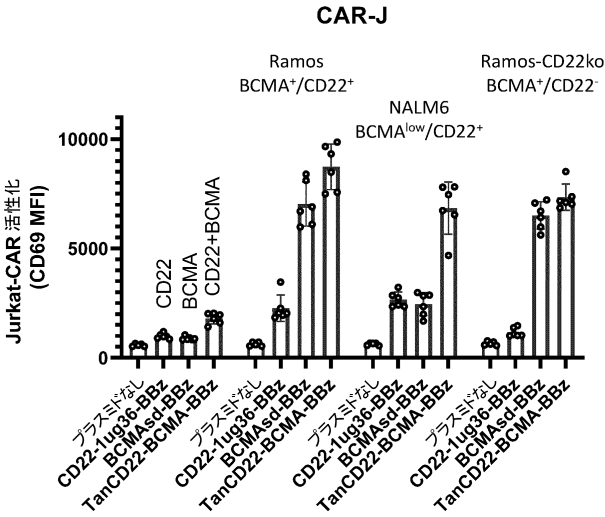


30

40

50

【図 3 4】



10

【配列表】

2 0 2 3 5 3 5 4 8 5 0 0 0 0 1 . a p p

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CA2021/051046
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: <i>C07K 16/22</i> (2006.01), <i>A61K 35/17</i> (2015.01), <i>A61K 39/395</i> (2006.01), <i>A61P 35/00</i> (2006.01), <i>A61P 35/02</i> (2006.01), <i>A61P 37/06</i> (2006.01) (more IPCs on the last page) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Keywords searched across entire IPC		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used) Genomequest, Questel Orbit, Scopus, Google. Keywords: CART, BiTE, bispecific, CD8, hinge, linker, camelid, single domain, vhh, CD3, CD22, siglec2		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO2019126464 A2 (Anthony-Gonda et al.) 27 June 2019 (27-06-2019) *entire document*	108-112, 119
X	De Munter et al., "Nanobody based dual specific CARs" INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES volume 19, article 403, 11 pages. 30 January 2018 (30-01-2018), https://doi.org/10.3390/ijms21030883	108-112, 116, 119
Y	*entire document*	113, 114, 117, 118
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* "A" "D" "E" "L" "O" "P"	Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 19 October 2021 (19-10-2021)		Date of mailing of the international search report 09 November 2021 (09-11-2021)
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 819-953-2476		Authorized officer Mary Murphy (819) 639-6853

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2021/051046

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Rangaswamy et al., "A novel T-cell bispecific antibody platform for efficient T-cell mediated killing of tumor cells with minimal cytokine release" JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY 36(5 suppl) abstract 209, 26 February 2018 (26-02-2018) < https://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2018.36.5_suppl.209 > *entire document*	113, 114, 117, 118
Y	Barosone et al., "Bispecific anti-CD22 T-cell engager efficiently promotes cell-mediated cytotoxicity of lymphoma, leukemia and sarcoma targets" JOURNAL OF IMMUNOLOGY 204(1 suppl) 239.27 1 May 2020 (01-05-2020) < https://www.jimmunol.org/content/204/1_Supplement/239.27 > *entire document*	113, 114, 117, 118

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2021/051046

Box No. 1**Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

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

- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

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

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2021/051046

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of the first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claim Nos.: 1 (parts a-d) and 24-27
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
The scope of claim 1 parts (a)-(d) encompasses a considerable number of variant CDRs which are not fully supported. The search has been limited to parts (e)-(m) of claim 1. The scope of claims 24-27 is also impossible to search over its entirety, since the exact epitopes to which the antibodies in question bind are not disclosed. Experimentation would be required to determine which prior art antibodies might "compete for specific binding" with the antibodies in question.

3. ☐ Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claim Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim Nos.:

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CA2021/051046

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
WO2019126464A2	27 June 2019 (27-06-2019)	WO2019126464A3	08 August 2019 (08-08-2019)
		AU2018388997A1	09 July 2020 (09-07-2020)
		CA3086612A1	27 June 2019 (27-06-2019)
		CN111954677A	17 November 2020 (17-11-2020)
		EP3728307A2	28 October 2020 (28-10-2020)
		EP3728307A4	19 May 2021 (19-05-2021)
		JP2021506306A	22 February 2021 (22-02-2021)
		US2019202895A1	04 July 2019 (04-07-2019)
		US10894819B2	19 January 2021 (19-01-2021)
		US2021206839A1	08 July 2021 (08-07-2021)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CA2021/051046

C07K 14/705 (2006.01), *C07K 16/46* (2006.01), *C07K 19/00* (2006.01), *C12N 15/13* (2006.01),
C12N 15/62 (2006.01), *C12N 15/867* (2006.01), *C12N 5/10* (2006.01), *C12N 7/01* (2006.01)

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

4 H 0 4 5

C 1 2 N 1/21 (2006.01)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)
C 1 2 N 7/01 (2006.01)
C 0 7 K 19/00 (2006.01)
C 0 7 K 16/46 (2006.01)
C 0 7 K 16/28 (2006.01)
A 6 1 K 38/19 (2006.01)
A 6 1 K 38/20 (2006.01)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)
A 6 1 P 37/02 (2006.01)
A 6 1 P 35/02 (2006.01)
A 6 1 K 35/17 (2015.01)
C 1 2 N 5/0783(2010.01)
C 0 7 K 14/54 (2006.01)
C 1 2 P 21/08 (2006.01)

C 1 2 N 1/21
C 1 2 N 5/10
C 1 2 N 7/01
C 0 7 K 19/00
C 0 7 K 16/46
C 0 7 K 16/28
A 6 1 K 38/19
A 6 1 K 38/20
A 6 1 K 39/395
A 6 1 K 39/395
A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 37/02
A 6 1 K 39/395
A 6 1 P 35/02
A 6 1 K 35/17
C 1 2 N 5/0783
C 0 7 K 14/54
C 1 2 P 21/08

D

N

T

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

ント 4 1

(72)発明者 アルバビーガーロウディ, メフディ

カナダ国 ケー4エー 4ピー2 オンタリオ, オタワ, ヘザーストーン クレセント 1 7 9 1

(72)発明者 グエン, ティナ

カナダ国 ケー1ジー 6エヌ6 オンタリオ, オタワ, ブローム ドライブ 1 6 - 1 7 0 1

(72)発明者 ウー, クンレ

カナダ国 エイチ4ビー 1ケー9 ケベック, モントリオール, ノートル ダム ド グラス 6 1 9 5

F ターム (参考)

4B064 AG27 CA19 CC24 CE12 DA01

 4B065 AA01X AA57X AA72X AA89X AA90X AA90Y AA97X AB01 AC14 BA02
 CA24 CA25 CA44

4C084 AA02 DA01 DA12 NA14 ZB07 ZB26 ZB27

4C085 AA14 AA16 BB44 CC22 DD62 EE01 EE03

4C087 AA01 AA02 BB37 BB65 NA14 ZB07 ZB26 ZB27

4H045 AA10 AA11 BA41 CA40 DA02 DA76 EA20 FA74 GA26

【要約の続き】

用も記載される。

【選択図】 図 8