

# ラクダ科動物重鎖抗体由来の抗原結合ドメイン VHH の医療技術への応用

Therapeutic applications of antigen binding domain VHH derived from heavy chain antibodies of *Camelidae*

岸本 聡 Satoshi Kishimoto<sup>\*1</sup>・伊東 祐二 Yuji Ito<sup>\*2</sup>

## 〔SUMMARY〕

抗体医薬の新たなフォーマットとして、ラクダ科の重鎖抗体由来の抗原結合ドメイン (VHH, Nanobody) を使った医薬品開発が進められている。この VHH は、高い安定性、バクテリアにおける高い発現効率、抗体工学の容易さといった優れた特性をもつ一方で、投与後の血中半減期の短さといった弱点もあわせもつ。臨床試験の結果を通して、このような VHH 医薬品の課題と今後の展開について考えてみたい。さらに、ファージディスプレイライブラリーと網羅的配列解析手法を使った新しい VHH の開発手法、ならびに、VHH を使った新しい抗体医薬品の形として、抗体特異的修飾法 (CCAP: Chemical conjugation by affinity peptide) による IgG-VHH コンジュゲートについて紹介する。

VHH domain therapeutics derived from heavy chain antibodies of *Camelidae* are currently being developed as novel antibody therapeutics. Advantageous properties of this VHH include high stability, efficient bacterial expression, and ease of antibody engineering; however, it has a short blood half-life. Through examples from previous clinical studies, we would like to consider the issues and the prospects of the development of VHH therapeutics. Furthermore, we describe a new method of VHH development by combining a phage display library and high-throughput sequencing, and introduce the IgG-VHH conjugate as a novel antibody therapeutic prepared by antibody-specific modifications (CCAP: Chemical conjugation by affinity peptide).

Keyword ● VHH, nanobody, domain antibody, antibody therapeutic, chemical conjugation

## 1. はじめに

ラクダ科の動物には、哺乳類のもつ通常の IgG 抗体とは異なる、2本の重鎖のみから構成される抗体、いわゆる重鎖抗体が存在することが、ベルギーのブリュッセル自由大学 (Vrije Universiteit Brussel) の Hamers 教授らのグループによって報告された<sup>1)</sup>。また同時に、この重鎖抗体の抗原結合ドメインである VHH (別名: ナノボディ) の医薬利用を含めた、広範囲にわたる世界特許、いわゆる Hamers 特許 (Immunoglobulins devoid of light chains: WO 1994004678) が出され、この特許の医薬への独占実施権をもつ Ablynx が、長く医薬開発における優位な地位を占めることになる。しかし、2013年8月に基本特許は期限切れとなったことから、近年、世界的にも、この VHH を使った新たな医薬品開発の機運が高まっている。

本稿では、VHH の基本的な構造と特性を説明し、現

在までに行われてきた VHH の医薬品研究開発の状況を振り返るとともに、今後の VHH を使った新たな医薬品開発研究について、筆者らの現在の研究を含め、紹介したい。

## 2. 重鎖抗体由来の VHH の基本的な構造と特性

図 1A に、ラクダ科のもつ通常抗体と重鎖抗体の模式的な構造を示した。ラクダ科の動物 (ラクダ、アルパカ、リヤマなど世界で6種) は、2本の重鎖と2本の軽鎖からなる通常抗体 IgG1 と、重鎖2本のみからなる2種類の重鎖抗体、すなわち、Pro-Gln の繰り返し配列を含む長いヒンジ領域をもった IgG2 と短い IgG3 をもつ。重鎖抗体は、CH1 ドメインが欠損しており、また、その可変領域は、VHH と呼ばれ、単一のドメインで抗原結合活性を有する。重鎖抗体は、動物種によって異なるが、おおよそ IgG 全体の半分程度を占めており、そのコンパクトな構造的特徴から、生理学的な役割として、VHH が隠れた標的部位、例えばウイルスキャプシドの内部に結合することで、高い抗ウイルス活性を示すことが報告されているが<sup>2)</sup>、明確な優位性は確定していない。

\*1 鹿児島大学 大学院理工学研究科 プロジェクト研究員  
Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University, Project researcher

\*2 鹿児島大学 大学院理工学研究科 教授  
Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University, Professor

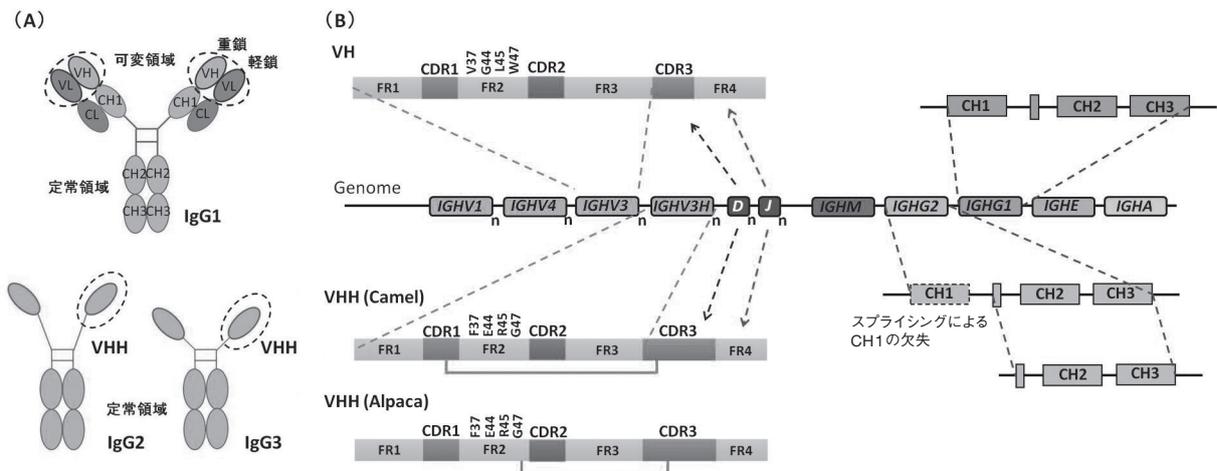


図1 ラクダ科由来の重鎖抗体の構造 (A) とそれらを生み出す抗体遺伝子 (B)

類似の重鎖のみによる抗体の誕生は、サメの進化系統でも独自に起こっている<sup>3)</sup>。サメ抗体Ig-NAR (New antigen receptor) は、同様に軽鎖を欠損し、抗原結合機能は、抗原結合ドメインV-NARによる。ラクダ科の重鎖抗体のゲノム遺伝子構造の模式図を、図1Bに示した。抗体の可変部位VHとVHHをつくり出しているV遺伝子の数は、ラクダでそれぞれ約50と40<sup>4)</sup>、アルパカで71と17とされており<sup>5)</sup>、VH遺伝子と同様に、VHH遺伝子も、V (IGHV3H)、D、J遺伝子の再構成によって構築され、これがクラススイッチによって重鎖抗体H鎖定常領域の遺伝子 (IGHG2) に連結されると、重鎖抗体 (IgG2-H鎖) の遺伝子が形成される。さらに、この重鎖抗体H鎖遺伝子のCH1ドメイン部分は、スプライシングによって除去され、CH1領域が欠失した成熟型の重鎖抗体mRNAが生成する。

単ドメインで抗原との結合活性を有するVHHは、医薬品などの開発における優位性として、①比較的高い安定性と可溶性をもち、取り扱いが容易であること<sup>6)</sup>、②バクテリアにおける発現性が高く安価に生産できること<sup>7)</sup>、③多量体化などによる高機能化などのタンパク質工学が容易<sup>8)</sup> といったことがあげられる。このようなVHHの特徴は、ヒトVHドメインのdomain antibodies<sup>9)</sup> やFibronectin type III domainを骨格とするmonobodyもしくはadnectin<sup>10)</sup> と共通するものがあるが、VHHの場合には、動物免疫により目的の抗体を獲得できるという利点がある。

VHと比べた場合のVHHの構造的な特徴としては、長いCDR3ループによる抗原認識と、その構造を安定化させるためのCDR3とCDR1間、もしくはCDR3とフ

レーム2間でのジスルフィド結合の出現があげられる<sup>11)</sup>。ただし、この特徴は、すべてのVHHに見られるのではなく、短いCDR3やCDR3に架橋構造を含まないVHHも頻繁に見られる。もう1つのVHHの配列上の特徴として、フレーム2 (FR2) の疎水性残基から親水性残基への置換、典型的には、Val37Phe/Tyr、Gly44Glu、Leu45Arg/Cys、Trp47Gly/Phe (Kabat numbering) が見られる<sup>12, 13)</sup>。これは、VHHでは、本来VHとVLとの結合に必要な疎水性残基が親水性に置き換わったと解釈できる。しかし、アルパカを使った筆者らの研究では、IgG2、IgG3由来のVHHライブラリーからも、FR2に疎水性残基をもつ (VHタイプの) VHHが得られ、おそらく、これらのVHHは、通常抗体V遺伝子 (IGHV3) からつくられていると考えられる。このVHタイプのVHHは、バクテリアでの十分な発現量と安定性を有することから、このFR2の特徴的配列は必ずしもVHHの特性に必須というわけではないようである。

VHHは、さまざまな研究用試薬として、例えば、アフィニティ精製のリガンド、細胞イメージング<sup>14)</sup> や結晶化シャペロン<sup>15)</sup>、あるいはバイオセンサー<sup>16)</sup> やin vivo イメージング<sup>17)</sup> として用いられているが、本稿では、医薬品開発研究に絞って紹介する。

### 3. VHH 医薬品の開発動向

VHHは、上述したように抗体工学が容易なこと、また、ヒトのVH3との相同性も高くヒト化も可能なことから<sup>18)</sup>、VHHを使ったさまざまな医薬品用のフォーマットが開発されており、VHHを使った医薬品の前臨

床、臨床研究が進められている<sup>19)</sup>。

臨床研究にあがっているVHHを使った医薬品の開発状況を表1に示した。多岐にわたる疾患分野への適用が見られるが、薬剤フォーマットで目につくのは、すべてのフォーマットが、VHHのみをベースに、単独かマルチドメイン(2、3、4量体)を使っていること、もう1つは、弱点である短い血中半減期を補強するため、HSA結合VHHやPEG修飾の使用が見られる点である。以下、各開発品を適用分野ごとに見ていくことにする。

### 3-1. 炎症性、自己免疫疾患

・ALX-0061、ALX-0962：前者は、炎症性サイトカインIL-6の受容体に対するVHH、後者はIgE (Fc) に対するVHHに、血中半減期延長のため抗HSA-VHHを連結したものであり、それぞれ適用はリウマチ(RA)と喘息である。ALX-0061での半減期は6.6日と、VHH本来の半減期(1時間以内)に比べると圧倒的な延長が見られ<sup>20)</sup>、RAを対象とした第II相試験と、追加で全身性エリテマトーデス(SLE)を対象とした第II相試験が進められている。一方、ALX-0962も同様に、喘息への適用を目指し開発が進められてきたが<sup>21)</sup>、既承認の喘息治療薬omalizumab(抗IgE抗体)との差別化がで

きないという理由で第I相試験は開始されていない。

・ATN-103 (Ozoralizumab)：関節リウマチ治療薬Ozoralizumabも、半減期延長のため、2つのヒト化抗TNF-VHHに抗HSA-VHHを組み合わせた3量体のVHH医薬品であり、多発性関節炎のトランスジェニックマウスでの実験ではinfliximabより良好な結果を示した。第I/II相試験では、メトトレキサート併用のRA患者に対して良好な治療効果を示し、重篤な副作用も現れていない。さらなる半減期延長を示すPEG化ATN-192も、第I相試験に入った。

・ALX-0761：炎症性サイトカインIL17A、IL17Fをそれぞれ中和する2種類のVHHと抗HSA-VHHからなる三価のVHH医薬品であり、カンイクザルRA(関節リウマチ)モデルで有意な効果が確認され、現在、第I相試験中である。

### 3-2. がん領域

・ALX-0651：CXCR4の2つの異なるエピトープに対し結合するVHHからなる2価のVHH医薬品、いわゆる2価パラトープ抗体で、CXCR4をブロックすることで骨髄からの造血幹細胞の末梢への放出を促し、リンフォーマ患者への移植のための造血幹細胞の収集を容易にす

表1 臨床開発段階のVHH医薬品(文献19より改変)

標的疾患	標的分子	開発名	薬剤フォーマット	開発企業	開発段階	
炎症/ 自己免疫疾患	関節リウマチ(RA) 全身性エリテマトーデス(SLE)	IL-6R	Vobarilizumab (ALX-0061)		Ablynx	Phase II 開始 (NCT02287922, NCT02518620, NCT02437890)
	喘息	IgE	ALX-0962		Ablynx	前臨床試験終了
	関節リウマチ(RA)	TNFα	Ozoralizumab (ATN-103)		Eddingpharm/ Taisho	Phase II 終了 (NCT01063803)
	自己免疫疾患	IL-17A/F	ALX-0761		Merck KGaA	Phase I 終了 (NCT02156466)
腫瘍	腫瘍	CXCR4	ALX-0651		Ablynx	Phase I 終了 (NCT01374503) 開発中止
	腫瘍	DR5	TAS266		Novartis Pharmaceuticals	Phase I 終了 (NCT01529307) 開発中止
骨代謝	骨粗しょう症	RANKL	ALX-0141		Eddingpharm	Phase I 終了
神経変性疾患	アルツハイマー病	Aβ	BI 1034020		Boehringer Ingelheim	Phase I 終了 (NCT01958060) 開発中止
血液疾患	血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP)	vWF	Caplacizumab (ALX-0081)		Ablynx	Phase III 開始 (NCT02553317)
ウイルス疾患	RSウイルス疾患 (RSV)	RSV	ALX-0171		Ablynx	Phase I/IIa 終了 (NCT02309320)
	ロタウイルス疾患 (RV)	RV	ARP1		Unilever Nederland	Phase II 終了 (NCT01259765)
診断薬	乳がん	Her2	2Rs15d		Vrije Universiteit Brussel	Phase I 開始 (EudraCT2012-001135-31)

…標的抗原特異的VHH (Nb)   
 …HSA 特異的VHH (Nb)   
 …同一抗原の異なるエピトープ特異的VHH (Nb)

る。第 I 相試験の臨床試験の結果、CXCR4 に対する低分子アンタゴニストを使った標準的治療より良い効果を達成する可能性が低いことが示されたため、開発は中止された。

・TAS266：細胞死受容体 DR5 (TRAILR2) に結合し、DR5 のクラスター化による細胞死シグナルを送ることで、抗腫瘍活性をもつアゴニスト抗体である。従来の抗体では、この受容体のクラスター化が不十分であったため臨床試験で失敗していたが、4 価の抗 DR5-VHH からなるこの VHH 医薬品は、より効果的な DR5 のクラスター化を促した。In vivo モデルでは強い抗腫瘍効果が見られたが、第 I 相臨床試験で肝毒性が見られたため開発は中止された。

### 3-3. 骨代謝

・ALX-0141：破骨細胞の重要な活性化因子である RANKL の阻害による骨粗しょう症の治療薬として開発された。2 つの抗 RANKL-VHH と抗 HSA-VHH を連結した 3 価の構造をもつ。閉経女性に対する第 I 相試験では、骨再吸収マーカーを阻害し、良好な効果を示した。

### 3-4. 神経疾患

・BI 1034020：アルツハイマーの原因物質である A $\beta$  ペプチドに対する 2 価パラトープ抗体であり、半減期延長のための PEG 修飾を有している。前臨床の結果では、血中の A $\beta$  ペプチドの量を有意に減少させ、脳でのアミロイドプラーク量の減弱が期待されたが、第 I 相試験で、薬物投与による重篤な有害事象 (Drug-related SAE) が起こったため、開発は中止された。

### 3-5. 血液

・ALX-0081 (Caplacizumab)：凝固因子である vWF (フォン・ヴィレブランド因子) の A1 ドメインに結合する 2 価の VHH 抗体である。第 I 相試験では、安全性と有効性が実証され、第 II 相に移ったが、すでに抗凝血薬として使用されている Abciximab (レオプロ) との比較で、出血リスクを有意に減少させないという理由で、抗凝血薬としての開発は中断された。しかし、血小板減少性紫斑病 (TTP) に対する治療薬としての開発は継続され、現在、この VHH タイプの医薬品としては最初の第 III 相試験が開始され、2018 年にも上市される予定である。

### 3-6. ウイルス疾患

・ALX-0171：Respiratory syncytial virus (RSV) の表面 F タンパク質を標的とする 3 価の VHH 医薬品であり、幼児、入院患者を対象に開発された。吸入剤として肺への吸引投与により、ウイルスの細胞内取り込みおよび複製を阻害する。第 I 相試験では、肺機能への有害な事象は観察されず、幼児を対象とした第 I/II a 試験が終了している。

・ARP1：ロタウイルス (RV) 表面タンパク質 1 に結合する VHH であり、バングラデシュでの第 II 相試験 (NCT01259765) にて、RV 誘発性下痢への経口投与で症状の緩和が確認された。一方、別のアプローチとして、抗 RV-VHH を発現するラクトバシルス (ラクトボディ) の投与による RV 誘発性下痢の予防・治療も研究されているが<sup>22)</sup>、臨床試験に至っていない。

### 3-7. 診断薬

・2Rs15d：HER2 陽性の乳がんの患者に対する <sup>68</sup>Ga 標識した抗 HER2 VHH の PET/CT イメージングの第 I 相試験の結果では、腎、肝、小腸に集積が見られるものの、短時間での血中からの消失と、低いバックグラウンドによる原発・転移がんのイメージングに成功したことが報告されている<sup>23)</sup>。これは、VHH の高い組織浸透性と本来、弱点とされる短い血中半減期を利用したものである。

以上は、臨床試験にあがっている VHH 医薬品の例を中心に示したが、基礎研究レベルでは、例えば、イムノリポソームの標的素子としてや、T 細胞療法での CAR (Chimeric Antigen Receptor) としての利用が行われており、近々に実用化される可能性も高い。VHH の特性を最大限に活かし、また弱点をいかにカバーするかが、今後の VHH 医薬品開発における鍵となる。

## 4. 網羅的配列解析手法を用いたファージライブラリーによる VHH 抗体の獲得

このような機能的 VHH の単離手法として、ほとんどの場合に用いられるのが、ファージディスプレイ技術である<sup>24, 25)</sup>。ラマやアルパカなどの動物を抗原免疫し、抗原に対する抗体結合価の上昇が確認されたところで、末梢血リンパ球由来 mRNA をもとに、VHH 抗体ファージライブラリーを構築する (図 2A)。VHH の場合、ヒト

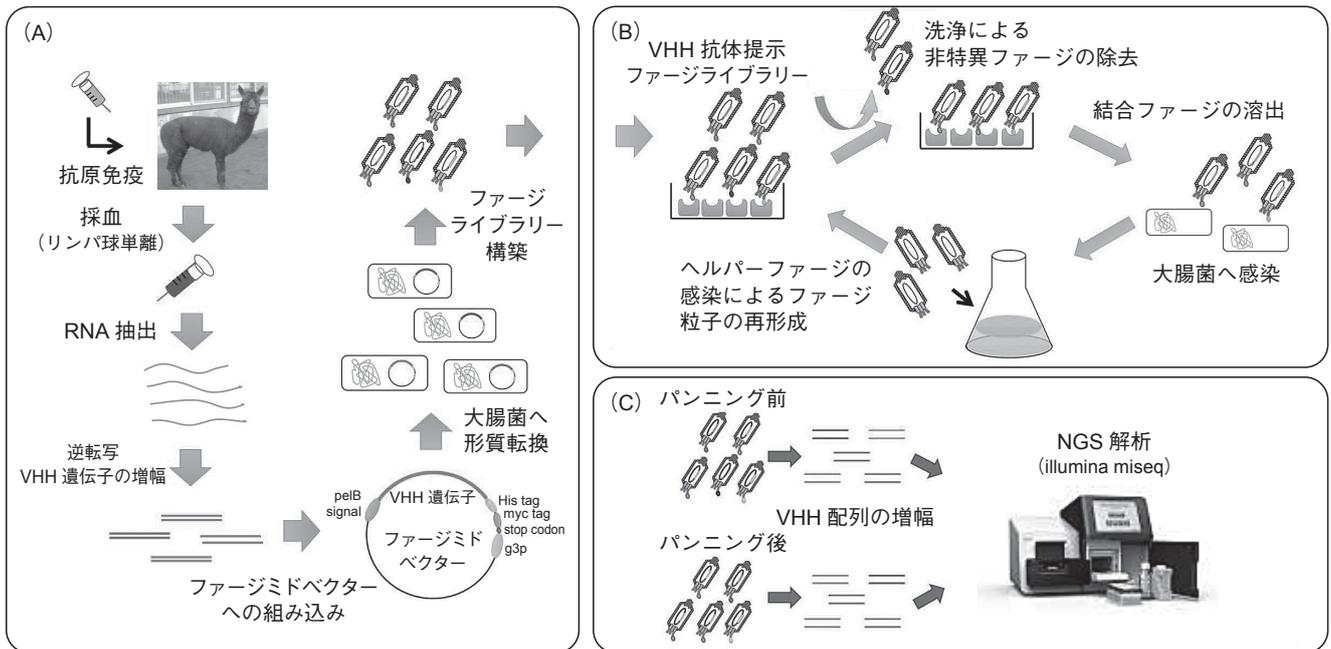


図2 ファージライブラリーを使ったVHH抗体の単離：VHH抗体ライブラリー構築 (A)、バイオパンニング (B)、NGSを使った網羅的配列解析による特異的抗体の同定 (C)

の抗原結合ドメイン由来の単鎖F<sub>v</sub>のようにVHとVLの連結といった必要性がなく、PCRで増幅したVH遺伝子をそのままファージミドベクターに挿入、大腸菌に形質転換後、ヘルパーファージを感染させ、培養後の上清からファージを回収することで、ファージライブラリーを構築することができる。

目的の抗原に対するVHH抗体の単離には、通常バイオパンニングと呼ばれる選別システムが用いられる (図2B)。例えば、プラスチックプレートに固定化した抗原にファージライブラリーを反応させ、非特異ファージを洗浄によって除去し、結合ファージを酸性溶液などによって溶出後、大腸菌を使って再度ファージを回収することで、標的抗原に対するVHH抗体をディスプレイしたファージを濃縮することができる。通常、このバイオパンニングを数回繰り返す。抗原に対する特異的なファージの濃縮を確認後、ファージのクローン化と結合スクリーニングによって結合ファージを同定する。しかし、この手法では、クローニングに供するクローン数 (通常100~500程度) に限界があり、繰り返しのパンニングやクローニング/スクリーニングでの労力は小さい。筆者らは、効率的に抗原特異的VHH抗体を同定するため、バイオパンニングと次世代シーケンサー (NGS) を組み合わせた網羅的配列解析による特異的抗体のスクリーニング法を用いている (図2C)<sup>26)</sup>。これは、

パンニング前後のライブラリー中に含まれるVHH配列をNGSによって網羅的に解析し、得られた数十万のリードデータをもとに、各VHH配列の存在率のバイオパンニング後の変化 (増幅率) を算出することによって、その増幅率の高さから特異的クローンを特定するものである。この手法では、得られるほぼすべての配列を解析対象とできるので、従来に比べ、効率よく、またもれなく特異配列を見つけ出すことができる<sup>27)</sup>。

## 5. CCAP法を用いた抗体のVHHコンジュゲート

このようなVHH抗体の医薬品開発への応用を図る1つの手法として、筆者らは、IgG-Fcを特異的に認識するペプチド (IgG結合ペプチド) を用いた新規の部位特異的抗体修飾技術CCAP (Chemical conjugation by affinity peptide) 法を開発した<sup>28)</sup>。この方法は、IgG結合ペプチドをDSG (disuccinimidyl glutarate) によって修飾し、ヒトIgG抗体と温和な条件で混合させることで、FcのLys248とペプチド間での共有結合による架橋を可能にする (図3A)。現在、この修飾技術を使った一群の新規の抗体医薬品の開発をAMED (日本医療研究開発機構) の革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業により行っている。

この手法では、抗がん剤や放射性核種を連結すること

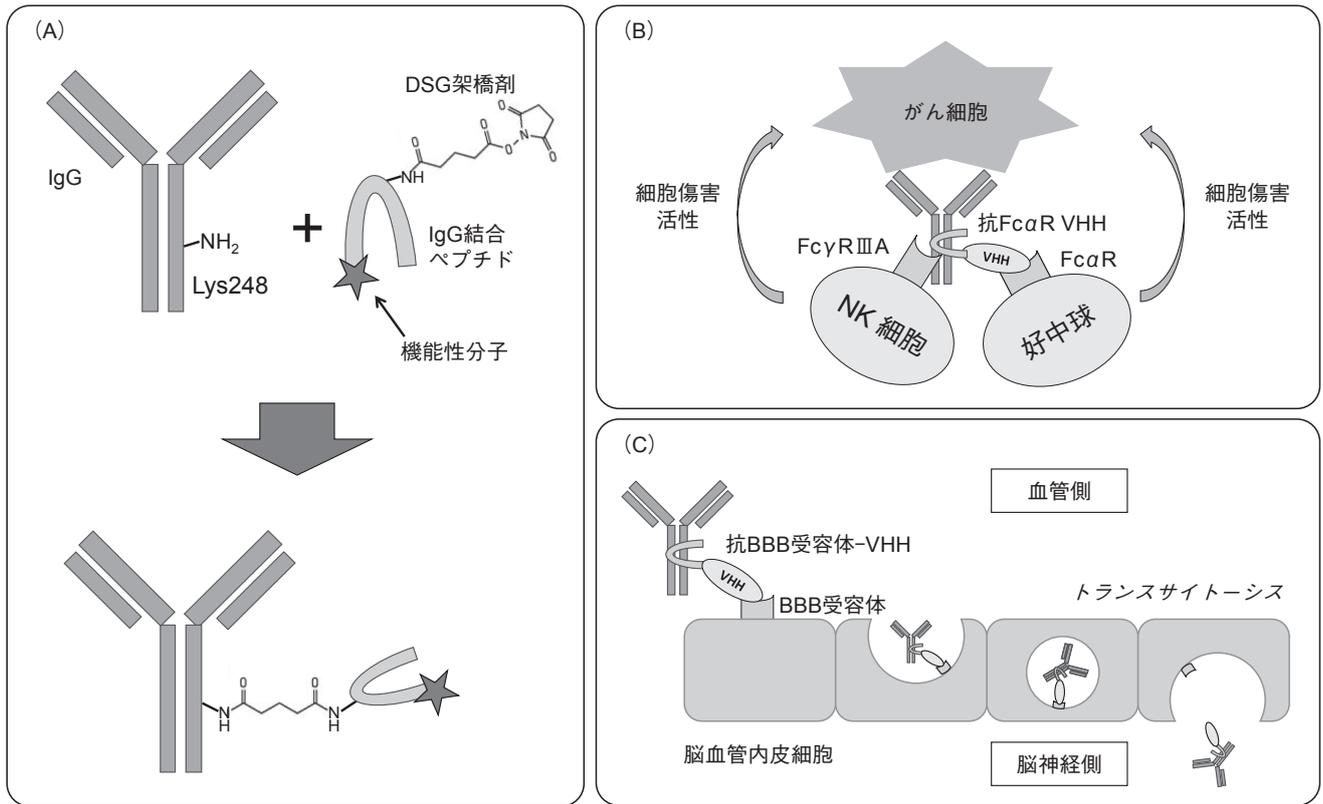


図3 CCAP法によるIgG-VHHコンジュゲートの作製(A)とその応用利用としての好中球を利用できるIgG様機能を持つIgG抗体(B)と中枢機能を持つIgG抗体(C)

で、抗体薬物複合体 (ADC) やPET/SPECT用診断薬の作製も可能であるが、ペプチドを介してVHHとIgG抗体を連結させ、VHHの機能を付加したIgG抗体医薬品を創出することもできる。例えば、IgA受容体特異的VHHを連結させ、IgA様の好中球をエフェクター細胞として利用できる抗体への変換(図3B)や、抗BBB受容体特異的VHHを連結させ、IgG抗体に中枢移行性を付与する研究(図3C)を行っている。このCCAP法による修飾では、IgG本体の抗原結合への影響がほとんどなく、また、付加されたVHHの機能も損なわれない。この新しいタイプの二重特異性抗体の作製手法は、IgG抗体そのもののエンジニアリングの必要がなく、さまざまなIgG抗体とVHHの組み合わせを通して、新規の高機能型抗体医薬の創製が期待できる。

## 6. 終わりに

本稿では、VHHの基本的な特性とともに、医薬品開発への応用について見てきた。今後の抗体医薬品の開発では、通常抗体やVHHのような低分子抗体の次に何を

考えるかが問われている。本稿では、その次の可能性をもつフォーマットの1つとしてCCAP法による抗体-VHHコンジュゲートを紹介した。CCAP法は、IgGの抗体工学を必要とせず、手軽にVHHをFcに連結できる技術であり、医薬品にとどまらず、種々の研究開発ツールとしての利用も、是非、研究機関、製薬企業には検討いただければ願っている。

## 謝辞

本稿で紹介した研究の一部は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) 革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業の支援による成果です。

## 参考文献

- 1) Hamers-Casterman, C., *et al.* Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* **363**, 446-448 (1993)
- 2) Daley, L.P., *et al.* Effector functions of camelid heavy-chain antibodies in immunity to West Nile virus. *Clin Vaccine Immunol* **17**, 239-246 (2010)
- 3) Flajnik, M.F. & Kasahara, M. Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nat Rev Genet* **11**, 47-59 (2010)

- 4) Nguyen, V.K., *et al.* Camel heavy-chain antibodies: diverse germline V(H)H and specific mechanisms enlarge the antigen-binding repertoire. *EMBO J* **19**, 921–930 (2000)
- 5) Achour, I., *et al.* Tetrameric and homodimeric camelid IgGs originate from the same IgH locus. *J Immunol* **181**, 2001–2009 (2008)
- 6) van der Linden, R.H.J., *et al.* Comparison of physical chemical properties of llama V-HH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies. *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* **1431**, 37–46 (1999)
- 7) Mizukami, M., *et al.* Highly efficient production of VHH antibody fragments in *Brevibacillus choshinensis* expression system. *Protein Expr Purif* **105**, 23–32 (2015)
- 8) Kolkman, J.A. & Law, D.A. Nanobodies—from llamas to therapeutic proteins. *Drug Discovery Today: Technologies* **7**, e139–e146 (2010)
- 9) Ward, E.S., *et al.* Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature* **341**, 544–546 (1989)
- 10) Koide, A., *et al.* The fibronectin type III domain as a scaffold for novel binding proteins. *J Mol Biol* **284**, 1141–1151 (1998)
- 11) Govaert, J., *et al.* Dual beneficial effect of interloop disulfide bond for single domain antibody fragments. *J Biol Chem* **287**, 1970–1979 (2012)
- 12) Maass, D.R., *et al.* Alpaca (*Lama pacos*) as a convenient source of recombinant camelid heavy chain antibodies (VHHs). *J Immunol Methods* **324**, 13–25 (2007)
- 13) Vu, K.B., *et al.* Comparison of llama V-H sequences from conventional and heavy chain antibodies. *Molecular Immunology* **34**, 1121–1131 (1997)
- 14) Ries, J., *et al.* A simple, versatile method for GFP-based super-resolution microscopy via nanobodies. *Nat Methods* **9**, 582–584 (2012)
- 15) Koide, S. Engineering of recombinant crystallization chaperones. *Curr Opin Struct Biol* **19**, 449–457 (2009)
- 16) Saerens, D., *et al.* Engineering camel single-domain antibodies and immobilization chemistry for human prostate-specific antigen sensing. *Anal Chem* **77**, 7547–7555 (2005)
- 17) Vaneycken, L., *et al.* Immuno-imaging using nanobodies. *Current Opinion in Biotechnology* **22**, 877–881 (2011)
- 18) Vincke, C., *et al.* General Strategy to Humanize a Camelid Single-domain Antibody and Identification of a Universal Humanized Nanobody Scaffold. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 3273–3284 (2009)
- 19) Steeland, S., *et al.* Nanobodies as therapeutics: big opportunities for small antibodies. *Drug Discov Today* **21**, 1076–1113 (2016)
- 20) Van Roy, M., *et al.* The preclinical pharmacology of the high affinity anti-IL-6R Nanobody® ALX-0061 supports its clinical development in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* **17**, 135 (2015)
- 21) Rinaldi, M., *et al.* ALX-0962, an anti-IgE Nanobody (R) with a dual mode of action. *European Respiratory Journal* **42** (2013)
- 22) Pant, N., *et al.* Lactobacilli producing bispecific llama-derived anti-rotavirus proteins in vivo for rotavirus-induced diarrhea. *Future Microbiol* **6**, 583–593 (2011)
- 23) Keyaerts, M., *et al.* Phase I Study of 68Ga-HER2-Nanobody for PET/CT Assessment of HER2 Expression in Breast Carcinoma. *J Nucl Med* **57**, 27–33 (2016)
- 24) Hashiguchi, S., *et al.* Phage display in design of molecular-targeting ligands. *Seibutsukogaku* **93**, 289–292 (2015)
- 25) Hashiguchi, S., *et al.* [Beyond antibody using phage display: molecular targeting by novel designed molecule]. *Seikagaku* **82**, 710–726 (2010)
- 26) Ito, Y. High-throughput sequencing on a next generation sequencer to identify specific binders from a phage library. *Asia-Pacific Biotech News* **20**, 17–19 (2016)
- 27) Miyazaki, N., *et al.* Isolation and characterization of antigen-specific alpaca (*Lama pacos*) VHH antibodies by biopanning followed by high-throughput sequencing. *J Biochem* **158**, 205–215 (2015)
- 28) Ito, Y. Development of advanced functional antibody drugs using techniques of specific chemical modification to human IgG antibody. *Saibo* **48**, 172–176 (2016)

## AUTHOR



## 岸本 聡 (きしもと さとし)

学位：修士（理学）  
 所属：鹿児島大学大学院理工学研究科 プロジェクト研究員  
 略歴：  
 2016年 鹿児島大学理工学研究科 博士前期課程 修了（修士）  
 2016年より、AMED革新的バイオ医薬：伊東プロジェクト研究員



## 伊東 祐二 (いとう ゆうじ)

学位：博士（薬学）  
 所属：鹿児島大学大学院理工学研究科生命化学専攻  
 専門分野：ペプチド科学、タンパク質工学、ファージディスプレイ  
 E-mail：yito@sci.kagoshima-u.ac.jp  
 略歴：  
 1985年 九州大学薬学部卒業  
 1990年 九州大学大学院薬学研究科博士課程退学、薬学部助手  
 1997年 鹿児島大学工学部助教授、理工学研究科准教授  
 2010年 鹿児島大学大学院理工学研究科（理学系）教授  
 2014年より、AMED革新的バイオ医薬：伊東プロジェクト代表

