

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-523600

(P2023-523600A)

(43)公表日 令和5年6月6日(2023.6.6)

(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 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 7 6
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C 0 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全55頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2022-564470(P2022-564470)	(71)出願人	519187241 マブウェル(シャanghai) バイオサイエンスカンパニー リミテッド 中華人民共和国シャanghai、プドン、ニュー、ディストリクト、リピン、ロード、ナンバー576、ビルディング、ナンバー3、オブ、チャンチアン、クリエイティブ、パーク、フロアー4
(86)(22)出願日	令和3年4月21日(2021.4.21)	(74)代理人	100120031 弁理士 宮嶋 学
(85)翻訳文提出日	令和4年12月21日(2022.12.21)	(74)代理人	100120617 弁理士 浅野 真理
(86)国際出願番号	PCT/CN2021/088674	(74)代理人	100126099 弁理士 反町 洋
(87)国際公開番号	WO2021/213435	(72)発明者	ワン、ショアン
(87)国際公開日	令和3年10月28日(2021.10.28)		
(31)優先権主張番号	202010324761.8		
(32)優先日	令和2年4月22日(2020.4.22)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)		
(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		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒトプログラム細胞死リガンド1(PD-L1)を標的とする単一可変ドメイン抗体およびその誘導体

(57)【要約】

ヒトプログラム細胞死リガンド1(PD-L1)およびその誘導体を標的とする単一可変ドメイン抗体が提供される。ヒトPD-L1で免疫したラクダからPBMCを抽出し、ファージ表面ディスプレイVHH抗体ライブラリーを構築し、前記VHH抗体ライブラリーをスクリーニングすることによって、ヒトPD-L1に特異的な単一可変ドメイン抗体2-2F2が同定および取得され、これをもとにキメラ抗体chF2およびヒト化改変抗体hzF2変異体が作製される。hzF2変異体は、元の単一可変ドメイン抗体2-2F2の親和性と同等またはさらにはそれより優れた親和性を有し、in vitroではPD-1のPD-L1への結合をブロックし、担癌マウスでのin vivo試験では腫瘍成長を阻害することができる。

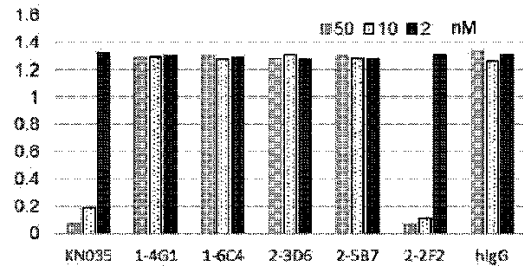


図1

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

単一可変ドメイン抗体の可変領域の C D R 1 ~ C D R 3 がそれぞれ配列番号 4 3 ~ 4 5 として示されることを特徴とする、抗 P D - L 1 単一可変ドメイン抗体。

## 【請求項 2】

単一可変ドメイン抗体が定常領域を有さないかまたは 1 ~ 3 の重鎖定常領域を有する、請求項 1 に記載の抗 P D - L 1 単一可変ドメイン抗体。

## 【請求項 3】

単一可変ドメイン抗体の可変領域のアミノ酸配列が配列番号 1 として示される、請求項 1 または 2 に記載の抗 P D - L 1 単一可変ドメイン抗体。

10

## 【請求項 4】

単一可変ドメイン抗体が請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の単一可変ドメイン抗体の可変領域およびヒト重鎖定常領域を含んでなる、ヒト - ラクダキメラ単一可変ドメイン抗体である、抗 P D - L 1 単一可変ドメイン抗体。

## 【請求項 5】

キメラ単一可変ドメイン抗体が配列番号 3 として示されるアミノ酸配列を有する、請求項 4 に記載の抗 P D - L 1 単一可変ドメイン抗体。

## 【請求項 6】

単一可変ドメイン抗体がヒト化され、単一可変ドメイン抗体の可変領域が、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の単一可変ドメインの可変領域をヒト化することによって得られる、抗 P D - L 1 単一可変ドメイン抗体。

20

## 【請求項 7】

単一可変ドメイン抗体の可変領域が配列番号 7 として示されるアミノ酸配列を有する、請求項 6 に記載の抗 P D - L 1 単一可変ドメイン抗体。

## 【請求項 8】

単一可変ドメイン抗体が配列番号 9 として示されるアミノ酸配列を有する、請求項 6 または 7 に記載の抗 P D - L 1 単一可変ドメイン抗体。

## 【請求項 9】

単一可変ドメイン抗体が、請求項 6 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗 P D - L 1 単一可変ドメイン抗体の可変領域の C D R を 1、2、3 または 4 個のアミノ酸残基で変異させることにより作出される変異型抗 P D - L 1 ヒト化単一可変ドメイン抗体であり、前記変異型抗 P D - L 1 ヒト化単一可変ドメイン抗体は P D - L 1 への特異的結合能を少なくとも部分的に保持する、抗 P D - L 1 単一可変ドメイン抗体。

30

## 【請求項 10】

単一可変ドメイン抗体の可変領域が配列番号 1 1 ~ 2 6 からなる群から選択される、請求項 9 に記載の抗 P D - L 1 単一可変ドメイン抗体。

## 【請求項 11】

請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の抗 P D - L 1 単一可変ドメイン抗体からなる群から選択される 1 以上の抗 P D - L 1 を含んでなる組成物。

## 【請求項 12】

薬学上許容可能な担体をさらに含んでなり、医薬組成物として使用され、好ましくは、前記医薬組成物は液体製剤、注射製剤、または粉末注射製剤の形態である、請求項 1 1 に記載の組成物。

40

## 【請求項 13】

異常増殖性疾患の治療のための薬剤の製造のための抗体またはそのフラグメントの使用であって、前記抗体が請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の抗 P D - L 1 単一可変ドメイン抗体からなる群から選択される、使用。

## 【請求項 14】

異常増殖性疾患が腫瘍、好ましくは、黒色腫、非小細胞肺癌、頭頸部扁平上皮癌、腎臓癌、大腸癌などを含んでなる、請求項 1 3 に記載の使用。

50

## 【請求項 15】

多重特異性抗体または標的化抗体 - 薬物の製造のための抗体またはそのフラグメントの使用であって、前記抗体が請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の抗 PD - L 1 単一可変ドメイン抗体からなる群から選択される、使用。

## 【請求項 16】

請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の抗 PD - L 1 単一可変ドメイン抗体をコードするポリヌクレオチド。

## 【請求項 17】

請求項 16 に記載のポリヌクレオチドを含んでなるベクター。

## 【請求項 18】

請求項 16 に記載のポリヌクレオチドまたは請求項 17 に記載のベクターを含んでなる宿主細胞。

## 【請求項 19】

抗 PD - L 1 単一可変ドメイン抗体を作製するための方法であって、

(1) 請求項 18 に記載の宿主細胞を、組換え抗 PD - L 1 単一可変ドメイン抗体を発現するために適した条件下で培養する工程；および

(2) 細胞培養物から抗 PD - L 1 単一可変ドメイン抗体を単離および精製する工程を含んでなる、方法。

## 【請求項 20】

異常増殖性疾患を予防または治療するための方法であって、それを必要とする対象に有効量の請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の抗 PD - L 1 単一可変ドメイン抗体、請求項 11 または 12 に記載の組成物、請求項 15 に記載の多重特異性抗体または標的化抗体 - 薬物を投与することを特徴とする、方法。

## 【請求項 21】

対象において異常増殖性疾患の発症および進行を診断または評価するための方法であって、被検出対象由来のサンプルを請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の抗 PD - L 1 単一可変ドメイン抗体、請求項 11 または 12 に記載の組成物、請求項 15 に記載の多重特異性抗体または標的化抗体 - 薬物と接触させることを特徴とする、方法。

## 【請求項 22】

異常増殖性疾患に罹患している対象に対する PD - 1 / PD - L 1 アンタゴニストの治療効果を予測または評価するための方法であって、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の抗 PD - L 1 単一可変ドメイン抗体、請求項 11 または 12 に記載の組成物、請求項 15 に記載の多重特異性抗体または標的化抗体 - 薬物からなる群から選択される薬剤を使用することにより、前記対象の PD - L 1 の発現状態を検出することを特徴とする、方法。

## 【請求項 23】

異常増殖性疾患が腫瘍、特に、PD - 1 / PD - L 1 シグナル伝達経路に関連する腫瘍を含んでなる、請求項 20 ~ 22 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 24】

前記腫瘍が黒色腫、非小細胞肺癌、頭頸部扁平上皮癌、腎臓癌、大腸癌などを含んでなる、請求項 24 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本願は、2020年4月22日に出願された中国発明特許出願第CN202010324761.8号の優先権を主張するものであり、その全内容が参照により本願の一部とされる。

## 【0002】

## 技術分野

本発明は、抗体薬の分野に関する。特に、本発明は、ヒトプログラム細胞死リガンド1 (human programmed death ligand 1) (PD - L 1) を標的とする単一可変ドメイ

10

20

30

40

50

ン抗体、それに由来するタンパク質および薬剤を調製するためのその使用、特に腫瘍などのPD-L1関連疾患の治療および/または予防、または診断のための使用に関する。

【背景技術】

【0003】

背景技術

PD-1およびそのリガンドPD-L1は、腫瘍免疫の重要な標的である。PD-1とPD-L1は、1対の免疫抑制分子であり、自己免疫応答の過剰反応を防ぐための免疫系の重要な成分である。PD-1およびPD-L1経路の活性化は、腫瘍特異的T細胞アポトーシスを誘導する腫瘍免疫応答を阻害する機能を有し、これは腫瘍の発生に密接に関連する。PD-1(CD279)は、主として活性化されたCD4+T細胞、CD8+T細胞およびB細胞およびその他の免疫細胞で発現される免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーであるI型膜貫通タンパク質である。そのリガンドPD-L1(B7-H1、CD274としても知られる)はB7ファミリーのメンバーに属し、腫瘍浸潤免疫細胞(TIC)ならびに悪性黒色腫、非小細胞肺癌、頭頸部扁平上皮癌などの多様な悪性腫瘍細胞で発現が高い。腫瘍の治療におけるPD-1およびPD-L1経路のブロックのためのモノクローナル抗体の使用は、良好な臨床的有効性および安全性が示されている。多くの抗体薬が承認を受けて上市され、適応症には、黒色腫、非小細胞肺癌、進行性腎細胞癌などの多くの悪性腫瘍が含まれる。また、多くの進行中の臨床試験で、さらに新しい適応の開発が試みられている。

10

【0004】

PD-1/PD-L1モノクローナル抗体は、様々な悪性腫瘍の臨床治療において良好な治療効果を示しているが、投与量が多い、および全奏率が低いなどの問題がある。その主な原因として、PD-L1の発現が低い、および腫瘍微小環境におけるT細胞の枯渇等が挙げられる。従って、PD-1/PD-L1標的をさらに深く開発し、より良い臨床効果を有する治療薬を開発することが必要である。標的に対する薬剤開発に関しては、以下のような方法で、臨床患者の利益を高めることができる。(1)より親和性が高く、より活性の高い抗体分子をさらに開発すること、(2)標的に基づいて二重特異性抗体または類似体を提供すること、(3)予備的研究により、PD-L1陽性腫瘍患者のPD-L1阻害剤への応答率はPD-L1陰性腫瘍患者の応答率よりもはるかに高いことが示されており、治療費および重篤な副作用の可能性を低減するために、PD-L1陽性腫瘍患者の予測または患者の事前スクリーニングに有効なバイオマーカーが必要である、(4)応答率を向上させるために、他の腫瘍免疫薬との併用、標的薬との併用、化学療法または放射線療法など、薬物の併用が腫瘍免疫療法のトレンドとなっている。

20

30

【0005】

単一可変ドメイン抗体は、現在最も小さい抗体分子であり、その分子量は従来の抗体の1/10である。この抗体は、ベルギーの科学者Hamers, Rがラクダの血中で初めて発見した。この抗体は、操作された抗体製品の中でも最も注目される種である。単一可変ドメイン抗体は、モノクローナル抗体の抗原反応性を備えていることに加え、低分子量、強い安定性、良好な溶解度、発現の容易さ、強い標的化活性、およびヒト化の容易さなどのユニークな機能特性も有している。特に、単一可変ドメイン抗体は、二重特異性/多重特異性治療抗体の開発またはCar-T/M/NKなどの療法の開発に適している。現在、単一可変ドメイン抗体および/または単一可変ドメイン抗体に基づく二重特異性/多重特異性抗体の開発が研究開発のホットスポットとなっている。国際的には、Ablynxが単一可変ドメイン抗体の分野で大規模なレイアウトを行っている。同社が開発したカブラシズマブは、後天性血栓性血小板減少性紫斑病(aTTP)という希少疾患の治療薬として、2019年2月にFDAが承認したものである。後天性血栓性血小板減少性紫斑病は、細い血管で血液が過剰に凝固することが特徴で、カブラシズマブは同疾患で初めて承認された薬剤である。また、カブラシズマブはフォンウィルブランド因子(vWF)を標的とする最初の薬剤であり、vWFは、血液凝固カスケードにおける重要なタンパク質である。同時に、カブラシズマブは、FDAが承認した最初の単一可変ドメイン抗体でも

40

50

ある。カブラシズマブの承認は、単一可変ドメイン抗体薬の分野が、正式にヒト疾患治療のステージに入るための画期的な出来事である。また、中国には、Shenzhen Guochuang Single Variable Domain Antibody Technology Co., Ltd., Shenzhen Prekin Biopharmaceutical Co., Ltd., Suzhou Boshengji (Anke) Company、および Suzhou Corning Jerry Company などをはじめ、単一可変ドメイン抗体の開発を活発に行う企業が存在する。中でも、Corning Jerry Company は、国内で初めて単一可変ドメイン抗体の分野に参入している。Corning Jerry Company が開発した PD-L1 単一可変ドメイン抗体 (KN035、皮下投与) は、2016年にCFDA およびFDA から臨床試験開始の承認を受け、2017年6月末に日本医薬品医療機器総合機構 (PMDA) から臨床承認を得た。KN035は、世界初のPD-L1単一可変ドメイン抗体である。

10

#### 【0006】

現在、PD-1/PD-L1モノクローナル抗体は、様々な悪性腫瘍の臨床治療において良好な治療効果を示しているが、投与量が多い、および全奏率が低いなどの問題点がある。その主な原因として、PD-L1の発現の低さおよび腫瘍微小環境におけるT細胞の枯渇などが挙げられる。そのため、新たな抗PD-L1抗体薬の開発が必要とされている。候補分子の開発に関しては、以下のような方法で、より良好な治療効果を備えた抗体分子を得ることができる：(1)より親和性が高く、より活性の高い抗体分子をさらに開発すること、(2)標的に基づいて二重特異性抗体または類似体を提供すること、(3)治療費および重篤副作用の可能性を低減するための、より有効な診断用抗体の開発によるPD-L1陽性腫瘍患者の予測またはPD-L1発現の検出による患者の事前スクリーニング。ラクダ由来単一可変ドメイン抗体は、そのユニークな特性から、上記の課題を効率的に解決するために使用されることが期待される。

20

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0007】

#### 発明の概要

上記の問題を解決するために、本開示は、ヒトプログラム細胞死リガンド1 (PD-L1) を標的とする単一可変ドメイン抗体、およびその誘導体を提供する。ファージ表面ディスプレイVHH抗体ライブラリーは、ヒトPD-L1で免疫されたラクダからPBMCを抽出することにより構築され、抗ヒトPD-L1特異的単一可変ドメイン抗体2-2F2は、スクリーニングおよび同定により得られる。これをもとに、キメラ抗体chF2およびヒト化改変抗体hzF2変異体が作製される。hzF2変異体は、元の単一可変ドメイン抗体2-2F2の親和性と同等またはさらにはより優れた親和性を有し、*in vitro*ではPD-1のPD-L1への結合をブロックし、担癌マウスでの*in vivo*試験では腫瘍成長を阻害することができる。

30

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0008】

特に、第1の側面において、本発明は、単一可変ドメイン抗体の可変領域のCDR1-CDR3がそれぞれ配列番号43~45として示されることを特徴とする抗PD-L1単一可変ドメイン抗体を提供する。

40

#### 【0009】

さらに、本発明の抗PD-L1単一可変ドメイン抗体は、単一可変ドメイン抗体が定常領域を有さないか、または1~3の重鎖定常領域を有することを特徴とする。

#### 【0010】

さらに、本発明の抗PD-L1単一可変ドメイン抗体は、単一可変ドメイン抗体の可変領域のアミノ酸配列が配列番号1として示されることを特徴とする。

#### 【0011】

50

第2の側面において、本発明は、単一可変ドメイン抗体が本発明の第1の側面に記載の単一可変ドメイン抗体の可変領域とヒト重鎖定常領域を含んでなるヒト-ラクダキメラ単一可変ドメイン抗体であることを特徴とする抗PD-L1単一可変ドメイン抗体を提供する。

【0012】

さらに、本発明の抗PD-L1単一可変ドメイン抗体は、キメラ単一可変ドメイン抗体が配列番号3として示されるアミノ酸配列を有することを特徴とする。

【0013】

第3の側面において、本発明は、単一可変ドメイン抗体がヒト化され、単一可変ドメイン抗体の可変領域が、本発明の第1の側面に記載の単一可変ドメインの可変領域をヒト化することにより得られることを特徴とする抗PD-L1単一可変ドメイン抗体を提供する。

10

【0014】

さらに、本発明の抗PD-L1単一可変ドメイン抗体は、単一可変ドメイン抗体の可変領域が配列番号7として示されるアミノ酸配列を有することを特徴とする。

【0015】

さらに、本発明の抗PD-L1単一可変ドメイン抗体は、単一可変ドメイン抗体が配列番号9として示されるアミノ酸配列を有することを特徴とする。

【0016】

第4の側面において、本発明は、単一可変ドメイン抗体が変異型抗PD-L1ヒト化単一可変ドメイン抗体であり、これは本発明の第3の側面に記載の抗PD-L1単一可変ドメイン抗体の可変領域のCDRを1、2、3または4つのアミノ酸残基で変異させることによって作製され、変異型抗PD-L1ヒト化単一可変ドメイン抗体は、PD-L1に対する特異的結合能を少なくとも部分的に保持することを特徴とする抗PD-L1単一可変ドメイン抗体を提供する。

20

【0017】

さらに、本発明の抗PD-L1単一可変ドメイン抗体は、その可変領域が配列番号11~26からなる群から選択されることを特徴とする。

【0018】

第5の側面において、本発明は、本発明の第1~第4の側面のいずれかに記載の抗PD-L1単一可変ドメイン抗体からなる群から選択される1以上の抗PD-L1を含んでなる組成物を提供する。

30

【0019】

さらに、本発明の組成物は、薬学上許容可能な担体をさらに含んでなり、医薬組成物として使用されることを特徴とし、好ましくは、医薬組成物は液体製剤、注射製剤、または粉末注射製剤の形態である。

【0020】

第6の側面において、本発明は、異常増殖性疾患の治療のための薬剤の製造のための抗体またはそのフラグメントの使用であって、抗体が本発明の第1~第4の側面のいずれかに記載の抗PD-L1単一可変ドメイン抗体からなる群から選択されることを特徴とする使用を提供する。

40

【0021】

さらに、本発明の使用は、異常増殖性疾患が腫瘍、好ましくは、黒色腫、非小細胞肺癌、頭頸部扁平上皮癌、腎臓癌、大腸癌などを含んでなることを特徴とする。

【0022】

第7の側面において、本発明は、多重特異性抗体または標的化抗体-薬物の製造のための抗体またはそのフラグメントの使用であって、の抗体が本発明の第1~第4の側面のいずれかに記載の抗PD-L1単一可変ドメイン抗体からなる群から選択されることを特徴とする使用を提供する。

【0023】

50

第 8 の側面において、本発明は、本発明の第 1 ~ 第 4 の側面のいずれかに記載の抗 PD - L 1 単一可変ドメイン抗体をコードするポリヌクレオチドを提供する。

【 0 0 2 4 】

第 9 の側面において、本発明は、本発明の第 8 の側面に記載のポリヌクレオチドを含んでなるベクターを提供する。

【 0 0 2 5 】

第 1 0 の側面において、本発明は、本発明の第 7 の側面に記載のポリヌクレオチドまたは本発明の第 8 の側面に記載のベクターを含んでなる宿主細胞を提供する。

【 0 0 2 6 】

第 1 1 の側面において、本発明は、抗 PD - L 1 単一可変ドメイン抗体を作製するための方法であって、 10

( 1 ) 本発明の第 1 0 の側面に記載の主細胞を、組換え抗 PD - L 1 単一可変ドメイン抗体を発現するために適した条件下で培養する工程 ; および

( 2 ) 細胞培養物から抗 PD - L 1 単一可変ドメイン抗体を単離および精製する工程を含んでなる方法を提供する。

【 0 0 2 7 】

第 1 2 の側面において、本発明は、異常増殖性疾患を予防または治療するための方法であって、それを必要とする対象に有効量の、以上のいずれか 1 つに記載の抗 PD - L 1 単一可変ドメイン抗体、以上のいずれか 1 つに記載の組成物、前述の第 6 の側面に記載の使用における多重特異性抗体または標的化抗体 - 薬物を投与することを特徴とする方法を提供する。 20

【 0 0 2 8 】

さらに、本発明の方法は、異常増殖性疾患が腫瘍、特に、PD - 1 / PD - L 1 シグナル伝達経路に関連する腫瘍を含んでなることを特徴とする。

【 0 0 2 9 】

さらに、本発明の方法は、腫瘍が黒色腫、非小細胞肺癌、頭頸部扁平上皮癌、腎臓癌、大腸癌などを含んでなることを特徴とする。

【 0 0 3 0 】

第 1 3 の側面において、本発明は、対象において異常増殖性疾患の発症および進行を診断または評価するための方法であって、被検出対象由来のサンプルを上記のいずれか 1 つに記載の抗 PD - L 1 単一可変ドメイン抗体、上記のいずれか 1 つに記載の組成物、前述の第 6 の側面に記載の使用における多重特異性抗体または標的化抗体 - 薬物と接触させることを特徴とする方法を提供する。 30

【 0 0 3 1 】

さらに、本発明の方法は、異常増殖性疾患が腫瘍、特に、PD - 1 / PD - L 1 シグナル伝達経路に関連する腫瘍を含んでなることを特徴とする。

【 0 0 3 2 】

さらに、本発明の方法は、腫瘍が黒色腫、非小細胞肺癌、頭頸部扁平上皮癌、腎臓癌、大腸癌などを含んでなることを特徴とする。

【 0 0 3 3 】

第 1 4 の側面において、本発明は、異常増殖性疾患に罹患している対象に対する PD - 1 / PD - L 1 アンタゴニストの治療効果を予測または評価するための方法であって、上記のいずれか 1 つに記載の抗 PD - L 1 単一可変ドメイン抗体、上記のいずれか 1 つに記載の組成物、前述の第 6 の側面に記載の使用における多重特異性抗体または標的化抗体 - 薬物からなる群から選択される薬剤を使用することにより、対象における PD - L 1 の発現状態を検出することを特徴とする方法を提供する。 40

【 0 0 3 4 】

さらに、本発明の方法は、異常増殖性疾患が腫瘍、特に、PD - 1 / PD - L 1 シグナル伝達経路に関連する腫瘍を含んでなることを特徴とする。

【 0 0 3 5 】

さらに、本発明の方法は、腫瘍が黒色腫、非小細胞肺癌、頭頸部扁平上皮癌、腎臓癌、大腸癌などを含んでなることを特徴とする。

【0036】

特に断りのない限り、本明細書において重鎖抗体を指すために使用されるか従来の4鎖抗体を指すために使用されるかにかかわらず、「免疫グロブリン配列」という用語は、フルサイズの抗体、その個々の鎖、およびその総ての部分、ドメインまたはフラグメント（限定するものではないが、それぞれVHHドメインまたはVH/VLドメインなどの抗原結合ドメインまたはフラグメントが含まれる）を含む一般用語として使用される。さらに、「配列」という用語は、本明細書で使用される場合（例えば、「免疫グロブリン配列」、「抗体配列」、「可変ドメイン配列」、「VHH配列」または「タンパク質配列」などの用語で使用）は、文脈がより制限的な解釈を必要としない限り、関連するアミノ酸配列およびそれをコードする核酸またはヌクレオチド配列の両方を含んでなると一般的に理解されるべきである。

10

【0037】

免疫グロブリン単一可変ドメインは、ポリペプチドの「結合単位」、「結合ドメイン」または「構築単位」（これらの用語は互換的に使用することができる）として働くことができ、結合単位（すなわち、同じ標的上の同じもしくは異なるエピトープに対するおよび/または1以上の異なる標的に対する）として1以上の付加的な免疫グロブリン単一可変ドメインを含んでなるポリペプチドを作製するために使用することができる。

【0038】

「免疫グロブリン単一可変ドメイン」（「ISVD」）という用語は、「単一可変ドメイン」（「SVD」）と互換的に使用することができ、抗原結合部位が単一の免疫グロブリンドメイン上に存在し、単一の免疫グロブリンドメインからなる分子を定義する。このために免疫グロブリン単一可変ドメインは、2つのドメイン、特に「従来の」免疫グロブリンの2つの可変ドメインが相互作用して抗原結合部位を形成する、「従来の」免疫グロブリンまたはそのフラグメントとは異なっている。一般に、従来の免疫グロブリンでは、重鎖可変ドメイン（VH）および軽鎖可変ドメイン（VL）が相互作用して、抗原結合部位を形成する。この場合、VHとVLの両方から相補性決定領域（CDR）が抗原結合部位に好都合である、すなわち、合計6つのCDRが抗原結合部位の形成に関与することになる。

20

30

【0039】

これに対して、免疫グロブリン単一可変ドメインの結合部位は、単一のVHドメインまたはVLドメインにより形成される。よって、免疫グロブリン単一可変ドメインの抗原結合部位は、3つ以下のCDRにより形成される。

【0040】

よって、相互作用して抗原結合部位を形成するために少なくとも2つの可変ドメインを必要とする従来の免疫グロブリンまたはそのフラグメントには、「免疫グロブリン単一可変ドメイン」および「単一可変ドメイン」は含まれない。しかしながら、これらの用語は、抗原結合部位が単一可変ドメインにより形成される従来の免疫グロブリンのフラグメントには含まれる。

40

【0041】

一般に、単一可変ドメインは、4つのフレームワーク領域（それぞれFR1~FR4）および3つの相補性決定領域（それぞれCDR1~CDR3）から実質的になるアミノ酸配列である。このような単一可変ドメインおよびフラグメントは、免疫グロブリンフォールドを含んでなるか、または適した条件下で免疫グロブリンフォールドを形成し得るものが最も好ましい。よって、単一可変ドメインは、例えば、軽鎖可変ドメイン配列（例えば、VL配列）もしくはその好適なフラグメント；または重鎖可変ドメイン配列（例えば、VH配列もしくはVHH配列、例えば、VH/VL相互作用を必要とする、従って、別の可変ドメインと相互作用して機能的抗原結合ドメインを形成する例えば従来の抗体およびscFvフラグメントに見られる可変ドメインがそうである）またはその好適なフラグメ

50

ントを含んでなり得るが、ただし、それらが単一の抗原結合単位（すなわち、単一の抗原結合単位が、機能的抗原結合単位を形成するために別の可変ドメインと相互作用する必要のないように、単一の可変ドメインから本質的になる機能的抗原結合単位）を形成できることが条件である。

【0042】

本発明の1つの実施形態では、免疫グロブリン単一可変ドメインは、軽鎖可変ドメイン配列（例えば、VL配列）または重鎖可変ドメイン配列（例えば、VH配列）であり；より具体的には、免疫グロブリン単一可変ドメインは、従来の4鎖抗体に由来する重鎖可変ドメイン配列または重鎖抗体に由来する重鎖可変ドメイン配列であり得る。

【0043】

例えば、単一可変ドメインまたは免疫グロブリン単一可変ドメイン（または免疫グロブリン単一可変ドメインとして使用するのに適したアミノ酸）は、（単一）ドメイン抗体（または（単一）ドメイン抗体として使用するのに適したアミノ酸）、「dAb」またはdAb（またはdAbとして使用するのに適したアミノ酸）またはナノボディー（本明細書で定義される通り、限定するものではないがVHHを含む）；その他の単一可変ドメイン、またはそれらのいずれかの任意の好適なフラグメントであり得る。

【0044】

（単一）ドメイン抗体の一般的な説明としては、本明細書に引用される従来技術およびEP0368684も参照のこと。「dAb」という用語については、例えば、Ward et al., 1989 (Nature 341: 544-546)、Holt et al., 2003 (Trends Biotechnol., 21: 484-490)；および例えば、WO04/068820、WO06/030220、WO06/003388、WO06/059108、WO07/049017、WO07/085815、およびDomantis Ltdのその他の公開特許出願を参照のこと。単一可変ドメインはある種のサメに由来し得るが（例えば、いわゆる「IgNARDメイン」、例えば、WO05/18629参照）、哺乳類起源ではないので本発明の文脈ではあまり好ましくないことにも留意されたい。

【0045】

特に、免疫グロブリン単一可変ドメインは、NANOBODY（登録商標）（本明細書に定義される通り）またはその好適なフラグメント〔注：NANOBODY（登録商標）、NANOBODIES（登録商標）、NANOCKONE（登録商標）は、Ablynx N.V.の登録商標である〕。ナノボディーの一般的な説明については、以下のさらなる説明ならびに本明細書に引用されている従来技術、例えば、WO08/020079（第16頁）などの記載を参照されたい。

【0046】

VHHおよびナノボディーのさらなる説明については、Muyldermans 2001 (Reviews in Molecular Biotechnology 74: 277-302)による総説ならびに一般的背景技術として述べられている以下の特許出願：Vrije Universiteit BrusselのWO94/04678、WO95/04079、およびWO96/34103；UnileverのWO94/25591、WO99/37681、WO00/40968、WO00/43507、WO0/65057、WO01/40310、WO01/44301、EP1134231、およびWO02/48193；Vlaams Instituut voor Biotechnologie (VIB)のWO97/49805、WO01/21817、WO03/035694、WO03/054016、およびWO03/055527；Algonomics N.V.およびEbolinx, Inc.のWO03/050531；National Research Council of CanadaのWO01/90190；Institute of AntibodiesのWO03/025020；ならびにEbolinx, Inc.のWO04/041867、WO04/041862、WO04/041865、WO04/041863、WO04/062551、WO05/044858、WO06/40153、WO06/079372、WO06/122786、WO06/122787、およびWO

10

20

30

40

50

06/122825；ならびにEbolinx, Inc.のその他の公開特許出願を参照されたい。また、これらの出願に述べられているその他の従来技術、特に、その一覽および参照文献が参照により本明細書の一部とされる国際出願WO06/040153の第41～43頁も参照のこと。これらの参照文献に記載されるように、ナノボディー（特に、VHH配列およびヒト化ナノボディーの一部）は、とりわけ、1以上のフレームワーク配列における1以上の「マーカ残基」の存在により特徴付けることができる。ヒト化および/またはラクダ化ナノボディー、ならびに他のその改変、一部もしくはフラグメント、誘導体、または「ナノボディー融合物」、多価構築物（いくつかの限定されない例はリンカー配列を含んでなる）およびナノボディーの半減期を延長するための異なる改変を含むナノボディーならびにそれらの製造の説明は、例えば、WO08/101985およびWO08/142164に見出すことができる。

【0047】

よって、本発明の意味において、「免疫グロブリン単一可変ドメイン」または「単一可変ドメイン」は、非ヒト供給源に由来するポリペプチド、好ましくは、ラクダ科、好ましくは、ラクダ科重鎖抗体を含んでなる。上記のように、それらはヒト化することができる。さらに、この用語は、例えばDavies and Riechmann 1994 (FEBS 339: 285-290), 1995 (Biotechnol. 13: 475-479), 1996 (Prot. Eng. 9:531-537)、およびRiechmann and Muyldermans 1999 (J. Immunol. Methods 231: 25-38)に記載の「ラクダ化」されたものなど、マウスまたはヒトなどの非ラクダ科供給源に由来するポリペプチドを含んでなる。

【0048】

「免疫グロブリン単一可変ドメイン」という用語は、マウス、ラット、ウサギ、ロバ、ヒトおよびラクダ科免疫グロブリン配列を含む異なる起源の免疫グロブリン配列を含んでなる。この用語はまた、完全ヒト、ヒト化またはキメラ免疫グロブリン配列を含んでなる。例えば、この用語は、ラクダ科免疫グロブリン配列およびヒト化ラクダ科免疫グロブリン配列、またはラクダ化免疫グロブリン単一可変ドメイン、例えば、Ward et al., 1989（例えば、WO94/04678およびDavies and Riechmann 1994, 1995および1996参照）に記載されているラクダ化dAbおよびラクダ化VHを含んでなる。

【0049】

同様に、このような免疫グロブリン単一可変ドメインは、任意の好適な供給源から任意の好適な様式で誘導されてよく、例えば、天然に存在するVHH配列（すなわち、好適なラクダ科の種に由来）または合成もしくは半合成アミノ酸配列であり得、限定されるものではないが、部分的または完全「ヒト化」VHH、「ラクダ化」免疫グロブリン配列（特に、ラクダ化VH）、ならびに以下の技術：例えば、親和性成熟（例えば、合成、ランダムまたは天然免疫グロブリン配列、例えば、VHH配列から出発する）、CDRグラフトイング、ベニヤリング、異なる免疫グロブリン配列に由来するフラグメントの組合せ、オーバーラッピングプライマーを用いたPCRアセンブリ、および免疫グロブリン配列を操作するために当業者に公知の類似の技術によって得られるナノボディーおよび/もしくはVHH；または以上のいずれかの任意の好適な組合せが含まれる。

【0050】

免疫グロブリン単一可変ドメインのアミノ酸配列および構造は、限定されるものではないが、当技術分野でおよび本明細書でそれぞれ「フレームワーク領域1」または「FR1」；「フレームワーク領域2」または「FR2」；「フレームワーク領域3」または「FR3」；および「フレームワーク領域4」または「FR4」と呼ばれる4つのフレームワーク領域または「FR」からなり、それぞれ当技術分野で「相補性決定領域1」または「CDR1」；「相補性決定領域2」または「CDR2」；および「相補性決定領域3」または「CDR3」と呼ばれる3つの相補性決定領域または「CDR」が挿入されていると考えることができる。

【0051】

免疫グロブリン単一可変ドメインのアミノ酸残基総数は、110～120、好ましくは

10

20

30

40

50

112 ~ 115 の範囲、最も好ましくは 113 であり得る。

【0052】

WO08/020079 (参照により本明細書の一部とされる)の段落q)第58および59頁にさらに記載されているように、免疫グロブリン単一可変ドメイン中のアミノ酸残基のナンバリングは、Kabataら(「Kabataナンバリング」("Sequence of proteins of immunological interest", US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Publication No. 91)により示されるVHドメインの一般ナンバリングに従う。Riechmann and Muyldermans 2000 (J. Immunol. Methods 240: 185-195;例えばこの刊行物の図2参照)の文献に開示されているようなアミノ酸残基のナンバリングは、ラクダ科動物のVHHドメインに適用され、それに対応して、免疫グロブリン単一可変ドメインのFR1は、1~30番のアミノ酸残基を含んでなり、免疫グロブリン単一可変ドメインのCDR1は、31~35番のアミノ酸残基を含んでなり、免疫グロブリン単一可変ドメインのFR2は、36~49番のアミノ酸残基を含んでなり、免疫グロブリン単一可変ドメインのCDR2は、50~65番のアミノ酸残基を含んでなり、免疫グロブリン単一可変ドメインのFR3は、66~94番のアミノ酸残基を含んでなり、免疫グロブリン単一可変ドメインのCDR3は、95~102番のアミノ酸残基を含んでなり、免疫グロブリン単一可変ドメインのFR4は、103~113番のアミノ酸残基を含んでなる。

10

【0053】

本明細書およびWO08/020079、WO06/040153および免疫グロブリン単一可変ドメインに関してそこに引用されている他の参照文献に示されている免疫グロブリン単一可変ドメイン配列の例に基づいて、アミノ酸残基の正確な数はまた、免疫グロブリン単一可変ドメイン中に存在する特定のCDRの長さによって異なることは明らかである。CDRに関して、当技術分野でよく知られているように、VHまたはVHHフラグメントにおけるCDRを記述するための様々な定義および慣例、例えばKabata定義(これは配列変動に基づいており、最もよく用いられる)およびChothia定義(これは構造リング領域の位置に基づいている)が存在する。例えば、ウェブサイト(<http://www.bioinf.org.uk/abs/>)を参照することができる。本明細書および特許請求の範囲の目的のために、Kabataに従ったCDRへの言及があっても、Abm定義がKabata定義とChothia定義の最良の妥協点であると考えられるので、Abm定義(Oxford MolecularのAbM抗体モデリングソフトウェアに基づく)に従ってCDRを定義することが最も好ましい。ここでもウェブサイト<http://www.bioinf.org.uk/abs/>を参照することができる。

20

30

【0054】

1つの実施形態では、FR4は、C末端アミノ酸配列VTVSS(すなわち、109、110、111、112および113番の残基に相当する)を含んでなる。本発明はまた、109、110、111または112番で終わるISVDを含んでなる。本発明の1つの側面において、FR4はC末端アミノ酸配列VTVS(109~112番)で終わるか、FR4はC末端アミノ酸配列VTV(109~111番)で終わるか、FR4はC末端アミノ酸配列VT(109~110番)で終わるか、またはFR4はC末端アミノ酸V(109番)で終わる。ISVDのFR4の最後のアミノ酸残基のC末端(最もC末端)、例えば、FR4のV109、T110、V111、S112またはS113などの最後のアミノ酸残基のC末端にはC末端延長が存在してもよく、本発明のシステイン部分は、好ましくは、C末端延長のC末端に存在する、または位置する。1つの実施形態では、FR4はC末端アミノ酸配列VTVSSを含んでなり、C末端延長はシステインである(例えば、本発明のポリペプチドはVTVSSCで終わる)。1つの実施形態では、FR4はC末端アミノ酸配列VTVSを含んでなり、C末端延長はシステイン(例えば、本発明のポリペプチドはVTVSCで終わる)。1つの実施形態では、FR4はC末端アミノ酸配列VTVを含んでなり、C末端延長はシステインである(例えば、本発明のポリペプチドはVTVCで終わる)。1つの実施形態では、FR4はC末端アミノ酸配列VTを含んでな

40

50

り、C末端延長はシステインである（例えば、本発明のポリペプチドはVTCで終わる）。1つの実施形態では、FR4はC末端アミノ酸Vを含んでなり、C末端延長はシステインである（例えば、本発明のポリペプチドはVCで終わる）。

【0055】

1つの実施形態では、本発明は、ISVDが軽鎖可変ドメイン配列（VL）、重鎖可変ドメイン配列（VH）、従来の4鎖抗体に由来するまたは重鎖抗体に由来する配列である本明細書に記載されるような二量体に関する。

【0056】

1つの実施形態では、本発明は、ISVDがシングルドメイン抗体、ドメイン抗体、シングルドメイン抗体として使用するために好適なアミノ酸配列、ドメイン抗体として使用するために好適なアミノ酸配列、dAb、dAbとして使用するために好適なアミノ酸配列、ナノボディ、VHH、ヒト化VHH、およびラクダ化VHからなる群から選択される本明細書に記載されるような二量体に関する。好ましくは、ISVDは、100～140のアミノ酸残基、例えば、110～130のアミノ酸残基を含んでなる。

10

【0057】

従来技術に比べて、本発明の技術的解決策は以下の利点を有する。

第1に、本発明の抗体は、高い親和性を有するヒト化抗PD-L1単一可変ドメイン抗体である。ヒト化抗PD-L1単一可変ドメイン抗体hzF2は、ヒトPD-L1タンパク質と高い親和性で特異的に結合し、親和性（KD）は、対照抗体KN035に匹敵する1.1nMである。高い親和性および良好な特異性の基本特性は、PD-1/PD-L1シグナル伝達経路に対するhzF2の阻害効果の理論的基礎を与え；単一可変ドメイン抗体は、従来のモノクローナル抗体に比べて、より柔軟な適用パターンを有し、二重特異性/多重特異性治療抗体の開発により好適である。

20

【0058】

第2に、本発明の抗体は、良好な生物活性を有する。hzF2は、細胞表面に組換え的に発現されるヒトPD-L1に効果的に結合し、CHO細胞上に組換え的に発現されるヒトPD-L1（CHO-PD-L1）との結合に関するEC50は1.01nMであり；hzF2は、組換えヒトPD-L1のその受容体PD-1への結合をIC50 4.3nMで効果的にブロックすることができ；hzF2は、PD-1/PD-L1シグナル伝達経路をブロックすることができ、EC50の活性は、Jurkat-PD1-NFAT細胞およびCHO-PD-L1-CD3L細胞リポーター遺伝子アッセイを用いて検出した場合に5.45nMであり；hzF2は良好なin vivo安定性を有し、免疫系ヒト化および黒色腫A375皮下異種移植モデルにおける腫瘍成長を効果的に阻害することができる。

30

【0059】

第3に、本発明は、hzF2に基づく複数の変異体を提供する。いくつかの変異体は、特異性、親和性などの性能パラメーターにおいて元の抗体hzF2よりも良好な性能を示す。これらの異なる単一可変ドメイン抗体変異体は、PD-L1に基づく腫瘍検出、標的化療法、薬物送達などに関してより多くの選択肢を提供し、さらにhzF2の適用能を豊富にし、拡大する。

40

【0060】

図面の説明

様々な他の利点および利益は、以下の好ましい実施形態の詳細な説明を読めば当業者には明らかとなる。これらの図面は単に好ましい実施形態を説明するためのものであり、本発明の限定と見なされるべきではない。また、これらの図面では、同じ成分は同じ参照記号で示される。

【図面の簡単な説明】

【0061】

【図1】図1：ELISAアッセイによるヒトPD-L1のその受容体PD-1への結合に対する単一可変ドメイン抗体の阻害効果

50

【図2】図2：chF2の細胞表面抗原への結合活性のFACS分析

【図3】図3：組換えPD-L1に対するchF2の結合特異性のELISA分析

【図4】図4：細胞表面のPD-L1に対するchF2の結合特異性の分析

【図5】図5：ヒトPD-L1のその受容体PD-1への結合に対するhzF2の阻害効果の分析結果

【図6】図6：リポーター遺伝子系を使用することによる抗PD-L1 VHH抗体-Fc融合タンパク質のin vitroブロック活性の評価

【図7】図7：単一用量でのBalb/CマウスにおけるhzF2の薬物-時間曲線

【図8】図8：MC38-hPDL1を皮下に同種移植したヒトPD-L1トランスジェニックマウスを用いたマウス大腸癌モデルにおけるhzF2の抗腫瘍有効性の試験結果(腫瘍体積)

【図9】図9：MC38-hPDL1を皮下に同種移植したヒトPD-L1トランスジェニックマウスを用いたマウス大腸癌モデルにおけるhzF2の抗腫瘍有効性の試験結果(腫瘍重量)

【発明を実施するための形態】

【0062】

#### 実施形態の詳細な説明

以下、本開示の例示的な実施形態を、添付の図面を参照しながら、より詳細に説明する。本開示の例示的な実施形態が図面に示されているが、本開示は様々な形態で達成することができ、本明細書に示される実施形態によって限定されるべきでないことを理解されたい。むしろ、これらの実施形態は、本開示をより深く理解し、本開示の範囲を当業者に十分に伝えるために提供される。

【実施例】

【0063】

#### 実施例1 フェージディスプレイによる免疫ラクダ単一可変ドメイン抗体ライブラリーの構築

抗原を用いてラクダを免疫した。末梢血単核細胞(PBMC)を単離し、逆転写のために全RNAを抽出した。逆転写からの産物を鋳型として用いて、重鎖抗体(VHH)の重鎖可変ドメインを増幅した。重鎖可変ドメインをフェージディスプレイベクターに連結し、得られたベクターを大腸菌TG1コンピテント細胞にエレクトロトランスフェクトしてラクダ免疫化ライブラリーを構築した。特に、ラクダを2週間に1回、計4回免疫した。免疫はフロイントの不完全アジュバント(Sigma, Cat.: F5506-10ml)をアジュバントとする0.8mg PD-L1細胞外領域組換えタンパク質(所内発現および精製、遺伝子配列ID番号: NP\_054862.1、19aa-238aa)の注射によって行った。各注射は、複数点方式で皮下に行った。各免疫の2週間後、血清を分離するために1mLの血液を採取した。血清中の完全抗体(IgG)および重鎖抗体(HcAb)の力価をELISAにより測定するために免疫原を検出抗原として使用した。血清力価がライブラリー構築の要件を満たす場合、100mLのラクダ末梢血を採取し、単離キット(Tianjin Haoyang, Cat.: TBD2011CM)を用いてPBMCを単離し、PBMCの全RNAを抽出し、逆転写してcDNAを得た。得られたcDNAを続いてのVHHフラグメントの増幅のための鋳型として使用した。VHH抗体ライブラリー構築のためのプライマーは、関連の文献およびデータベースから取得したラクダ由来VHH抗体の遺伝子に基づいて設計し、合成した。抗体可変領域の遺伝子配列は、PCRによって増幅した。次に、フェージディスプレイベクターおよび増幅した抗体フラグメントをそれぞれエンドヌクレアーゼで消化し、T4リガーゼを用いて連結し、連結産物を構築した。これらの連結産物をエレクトロトランスフェクション技術によってTG1株に導入した。最後に、濃度 $1.8 \times 10^8$ /ミリリットルの免疫ラクダ抗ヒトPD-L1 VHH抗体ライブラリーを特異的抗ヒトPD-L1単一可変ドメイン抗体のスクリーニングのために構築した。ライブラリーの正当性を検出するために、コロニーPCRのために50のクローンを無作為に選択し、それらの結果は、挿入パーセンテージが10

0%に達したことを示した。

【0064】

実施例2 特異的抗ヒトPD-L1単一可変ドメイン抗体のスクリーニング

構築したラクダ免疫ライブラリーを固相スクリーニング法によりスクリーニングして、ファージによりディスプレイされる特異的単一可変ドメイン抗体を得た。

【0065】

(1) オリジナルライブラリーのディスプレイ。ラクダ免疫ライブラリーを、アンピシリンおよびテトラサイクリンを含有する2YT培地に植え込み、対数増殖期まで増殖させ、次いで、そこにM13ヘルパーファージを加えた後にカナマイシンを加え、より低温条件で一晩置き、オリジナルライブラリーをディスプレイさせた。翌日、培養上清を回収し、PEG沈降によりファージを濃縮して、続いてのスクリーニングのための高力価抗体ライブラリーを含むディスプレイ産物を得た。

10

【0066】

(2) スクリーニング。特異的抗体を固相法によりスクリーニングした。特異的抗原を免疫チューブの表面にコーティングした。この免疫チューブと抗体ライブラリーをそれぞれブロッキング剤でブロックし、次いで、抗体ライブラリーを免疫チューブに加え、インキュベートした後、繰り返し洗浄し、最後にpH2.2の酸を用いて溶出した。溶出液を中性まで中和し、次いで、感染のために対数増殖期においてXL-Blueとともにインキュベートし、さらなるファージディスプレイを行った。特異的ファージ粒子を回収した。スクリーニング2~3回目の後、モノクローンを同定することとなった。

20

【0067】

(3) 同定。回収した特異的ファージ粒子に感染させたXL-Blueをプレートに植え込み、個々のクローンをコロニーに増殖させた後に同定した。個々のクローンを採取し、対数増殖期まで培養し、次いで、M13ヘルパーファージを加えて感染させた後、カナマイシンを添加し、その後、30で一晩置いた。翌日、培養上清を回収し、PD-L1でコーティングした酵素結合プレートに加えてELISA反応を行った。ファージミド(抗体遺伝子を含んでなるファージディスプレイベクター)を反応陽性クローンから抽出し、配列決定を行ってVHH抗体遺伝子配列を決定した。ヒトPD-L1組換えタンパク質に結合することができる、ファージによりディスプレイされた5つの単一可変ドメイン抗体(VHHs)、すなわち、1-4G1、1-6C4、2-3D6、2-5B7、2-2F2をスクリーニングにより取得した。

30

【0068】

実施例3 特異的抗ヒトPD-L1単一可変ドメイン抗体の予備的同定

得られた5つのシングルドメインVHH抗体を大腸菌TG1誘導により発現させた。なお、この誘導条件は1mM IPTG、30、150rpmで一晩の培養であった。誘導発現の際に細菌サンプルを音波処理により破碎し、濾過し、次いで、ニッケルカラムを用いて親和性により精製し、限外濾過を行ってシングルドメインVHH抗体を得た。次に、ヒトPD-L1のその受容体PD-1への結合に対するシングルドメインVHH抗体の阻害効果をELISAにより試験した。特に、ヒトPD-1細胞外領域とヒトFc(PD-1-hFcの融合タンパク質、PD-1配列ID番号: NP\_005009.2、21aa-167aa)をELISAプレートに0.5μg/mLの濃度でコーティングした。次に、このプレートを4で一晩置き、恒温インキュベーターにて37で60分間、5%BSAでブロックした。シングルドメインVHH抗体(濃度50、10、2nM)および1μg/mL PD-L1-mFcを共インキュベートし、恒温インキュベーターにて37で60分間反応させた。このプレートをPBSTで4回洗浄し、その後、1:5000希釈したHRP-抗マウスFc(Jackson Immuno Research, Cat.: 115-035-071)を加え、45分間反応させ、TMB(Beijing Taitianhe Biology, Cat.: ME142)基質を加えて15分間発色させた。2MHClを加えて反応を停止させた後、このプレートについて、630nmを参照波長とし、450nmを検出波長としてリーダーでウェルプレートのA

40

50

450 nm - 630 nmの吸光度値を読み取って記録した。これらの結果は、2 - 2 F 2 が組換えヒトPD - L 1のその受容体PD - 1への結合を効果的にブロックし得ることを示し、2 - 2 F 2は良好なブロック活性を有することが示唆された(図1)。V H H - F 2と略されるこの分子を、以降の開発のための原型分子として選択した。単一可変ドメイン抗体の可変領域のアミノ酸配列を配列番号1として示し、可変領域のヌクレオチド配列を配列番号2として示した。

【0069】

特異的プライマーを設計し、陽性クローンファージミドを鋳型として用い、ラクダ由来抗体V H H - F 2の可変領域遺伝子をPCRによって取得した。次に、可変領域遺伝子を酵素消化および連結により、ヒトFc(IgG1、hFc)コード遺伝子を含んでなる真核生物発現ベクターにクローニングした。適正な配列を有する発現プラスミドを得た後、それを一過性発現のために293F細胞にトランスフェクトし、その後、発現産物をプロテインAにより精製し、最後にヒト - ラクダキメラ単一可変ドメイン抗体の融合タンパク質(V H H - F 2 - ヒト - Fcキメラ抗体、「chF2」と略される)を得た。chF2抗体分子の全長アミノ酸配列を配列番号3として示し、ヌクレオチド配列を配列番号4として示した。

10

【0070】

WHOが公開しているEnvafolimab抗体配列(WHO Drug Information, Vol. 33, No. 3, 2019, Page634-635, Envafolimab)を参照して、KN035可変領域遺伝子を完全に合成し、KN035可変領域のアミノ酸配列を配列番号5として示し、ヌクレオチド配列を配列番号6として示した。chF2の構築に関して上記と同じ戦略を用いてKN035可変領域およびFcを有する融合タンパク質を得、KN035と略した。

20

【0071】

実施例4 抗ヒトPD - L 1キメラ単一可変ドメイン抗体の結合活性分析

方法1 結合活性に関するBLIアッセイ

Fortebio社のOctet QKeシステム装置を用い、ヒト抗体のFcフラグメントに対する捕捉抗体(AHC)生体プローブを用いて、chF2の対応する組換え抗原への結合能を測定した。測定時には、chF2をPBSバッファで4 µg/mLに希釈し、AHCプローブ(Cat.: 18-0015, PALL)表面に120秒間流した。移動相としてヒトPD - L 1組換えタンパク質を用いてチップ表面に捕捉した抗体と相互作用させた。組換えPD - L 1タンパク質濃度は60 nMとした。各抗原に対する結合時間は300秒であり、最終解離時間は300秒であった。その結果(表1)、本実験条件下では、chF2が組換えヒトPD - L 1タンパク質と高い親和性で結合したことを示し、これは対照抗体KN035と同等であった。

30

【0072】

【表1】

表 1. ヒト PD-L1 組換えタンパク質に対する chF2 および KN035 の親和性の測定

	KD 値(M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
chF2	1.11E-09	2.24E+05	2.48E-04
KN035	1.50E-09	2.33E+05	3.50E-04

40

【0073】

方法2 FACSによる結合活性分析

細胞(CHO - PD - L 1 - CD3L細胞)を遠心分離後に採取し、 $5 \times 10^5$ 細胞/サンプル/100 µLに分割した。勾配希釈した単一可変ドメイン抗体を最高濃度として

50

終濃度 66 nM で細胞に加え、3 倍連続希釈を行って 10 勾配を作製し、次いで、氷上で 2 時間インキュベートした。細胞を氷冷 PBS (0.05% Tween 含有) で 2 回洗浄した。FITC 標識抗ヒト Fc 二次抗体 (Cat.: F9512、Sigma) を加え、氷上で 1 時間インキュベートした。細胞を氷冷 PBS (0.05% Tween 含有) で 2 回洗浄し、200 μL のフローサイトメトリーバッファーに再懸濁させ、細胞の平均蛍光強度 (MFI) をフローサイトメーター (モデル B49007AD、SNAW31211、BECKMAN COULTER) により検出した。検出結果は、chF2 および KN035 は細胞表面に発現する PD-L1 に対して同等の結合活性を有することを示し、50% 有効結合濃度 (EC50) 値はそれぞれ 1.04 nM および 1.27 nM であった (図 2)。

10

## 【0074】

実施例 5 抗ヒト PD-L1 キメラ単一可変ドメイン抗体の特異性の分析方法 1 ELISA による組換え抗原に対するキメラ抗体の特異性の同定

組換えヒトタンパク質 (PD-L1、PD-1、B7H3、B7H4、CTLA4、CD28、ICOS など) を PBS で 1 μg/mL に希釈した後、100 μL/ウェルを用いて酵素結合プレートを 1 晩コーティングした。このプレートを恒温インキュベーターにて 37 °C で 60 分、5% BSA ブロッキング溶液でブロックした後、PBST で 3 回洗浄し、1 μg/mL に希釈した chF2 を加え、37 °C で 60 分間反応させ、PBST で 4 回洗浄し、1:5000 希釈した HRP-抗ヒト IgG を加えて 45 分間反応させ、PBST で 4 回洗浄し、最後に、TMB 基質を加えて発色させた。恒温インキュベーターにて 37 °C で 15 分間、反応を行い、2M HCl で停止させた。このプレートについて、630 nm を参照波長とし、450 nm を検出波長としてリーダーでウェルプレートの A450 nm - 630 nm の吸光度値を読み取って記録した。これらの結果 (図 3) は、chF2 は PD-L1 に特異的に結合するが、他の組換えタンパク質には結合しないことを示した。

20

## 【0075】

方法 2 種特異性を同定するための BLI アッセイ

Fortebio 社の Octet QKe システム装置を用い、抗ヒト抗体 Fc セグメントの捕捉抗体 (AHC) 生体プローブを用いて抗体の Fc セグメントを捕捉することにより、chF2 が組換えサル PD-L1 および組換えマウス PD-L1 に結合できるかどうかを決定した。測定時には、chF2 を PBS バッファーで 4 μg/mL に希釈し、AHC プローブ (PALL、Cat.: 18-0015) 表面に 120 秒間流した。移動相としてサル PD-L1 組換えタンパク質およびマウス PD-L1 組換えタンパク質を用いてチップ表面に捕捉した抗体と相互作用させた。PD-L1 組換えタンパク質濃度は 60 nM とした。各抗原の結合時間は 300 秒であり、最終解離時間は 300 秒であった。これらの結果は、chF2 および KN035 の両方が組換えサル PD-L1 タンパク質に同等の親和性で結合したが、組換えマウス PD-L1 タンパク質には結合しなかったことを示した (表 2)。

30

## 【0076】

40

50

## 【表 2】

表 2. サルおよびマウス PD-L1 組換えタンパク質に対する chF2 および KN035 の

## 結合活性の分析

		KD 値(M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
hzF2	サル PD-L1	1.40E-09	2.18E+05	3.05E-04
	マウス PD-L1	結合シグナル無し		
KN035	サル PD-L1	1.32E-09	2.13E+05	2.81E-04
	マウス PD-L1	結合シグナル無し		

10

## 【0077】

## 方法 3 FACS によるキメラ抗体特異性の同定

細胞を遠心分離の後に回収し、 $3 \times 10^5$  細胞 / サンプル /  $100 \mu\text{L}$  に分割し、 $20 \mu\text{g} / \text{ml}$  の単一可変ドメイン抗体を細胞に加えた。細胞を氷上で 2 時間インキュベートし、氷冷 PBS (0.05% Tween 含有) で 2 回洗浄した。FITC 標識抗ヒト Fc 二次抗体 (Sigma, Cat.: F9512) を加え、氷上で 1 時間インキュベートした。細胞を氷冷 PBS (0.05% Tween 含有) で 2 回洗浄し、 $200 \mu\text{L}$  のフローサイトメトリーバッファーに再懸濁させ、フローサイトメーターにより検出した。検出結果 (図 4) は、腫瘍細胞種のそれぞれに対する chF2 の反応性は、対照抗体 KN035 の反応性と全く同じであり、両方ともヒト PD-L1 を発現する細胞株には特異的に結合したが、非 PD-L1 発現細胞株には結合しなかったことを示した。

20

## 【0078】

## 実施例 6 chF2 のヒト化

ラクダ由来抗体 VHH-F2 の可変領域と最高の相同性を有するヒト重鎖可変領域を、ヒト重鎖可変領域のフレームワークのために選択した。VHH-F2 の可変領域は、CD R グラフィティングおよび部分的アミノ酸保持による支持構造の提供によってヒト化した。配列番号 7 として示される可変領域アミノ酸配列および配列番号 9 として示される全長アミノ酸配列を有するヒト化単一可変ドメイン抗体の融合タンパク質 (VHH-F2-ヒト-Fc ヒト化抗体、hzF2 と略される) を設計した。配列番号 8 として示される hzF2 可変領域のヌクレオチド配列を合成し、hzF2 の組換え発現ベクターを構築した。構築した全長 hzF2 可変領域ヌクレオチド配列を配列番号 10 として示した。真核生物発現の後、hzF2 の親和性を BLI 法により決定し、相関分析を行った。

30

## 【0079】

抗体クローン hzF2 をさらに変異させて多数の変異体抗体を得た。これらの変異体の CDR 領域のアミノ酸配列を表 3 に示し、変異体の可変領域のアミノ酸配列を表 4 (配列番号 11 ~ 配列番号 26) に示し、変異体の可変領域のヌクレオチド配列を配列番号 27 ~ 配列番号 42 として示し、いくつかの変異体の結合定数および解離定数の変化を表 5 に示した。

40

## 【0080】

50

【表 3】

表 3. hzF2 変異体の CDR 領域のアミノ酸配列および親和性の変化

変異体	変異配列			親和性 KD
	CDR1	CDR2	CDR3	
hzF2	RDSDDGASCMG	IIFNAGERTDYGDSVKG	VWCGSWVARS	1.47nM
hzF2-m1	RDSDDGASCMG	IIFNAGERTDYGDSVKG	VWCGSWVARS	2.80nM
hzF2-m2	GDSDDGASCMG	IIFNAGERTDYGDSVKG	VWCGSWVARS	1.26nM
hzF2-m3	RDSGGASCMG	IIFNAGERTDYGDSVKG	VWCGSWVARS	7.80nM
hzF2-m4	RDSNDGASCMG	IIFNAGERTDYGDSVKG	VWCGSWVARS	9.36nM
hzF2-m5	RSSSAASCMG	IIFNAGERTDYGDSVKG	VWCGSWVARS	5.05nM
hzF2-m6	RDSDEGASCMG	IIFQAGERTDYGDSVKG	VWCGSWVARS	1.10nM
hzF2-m7	RSDDSASCMG	IIFNAGERTDYGDSVKG	VWCGSWVARS	4.59nM
hzF2-m8	RSDDDGASCMG	IIFNVGERTDYGDSVKG	VWCGSWVARS	1.18nM
hzF2-m9	RSDDEGASCMG	IIFNAGERTDYGDSVKG	VWCGSWVARS	1.34nM
hzF2-m10	RSDDDGASCMG	IIFNAGERTDYGDSVKG	VYCGSWVARS	4.31nM
hzF2-m11	RSDDDGASCMG	IIFNAGERTDYGDSVKG	VYCGSYVARS	3.24nM
hzF2-m12	RSDDEGASCMG	IIFNVGERTDYGDSVKG	VWCGSWVARS	1.54nM
hzF2-m13	RSDDDGASCMG	IIFNAGERTDYGDSVKG	VFCGSFVARS	4.26nM
hzF2-m14	RSDDEGASCMG	IIFNVGERTDYGDSVKG	VYCGSYVARS	3.81nM
hzF2-m15	RSDDEGASCMG	IIFNVGERTDYGDSVKG	VFCGSYVARS	4.75nM
hzF2-m16	RSDDEGASCMG	IIFNVGERTDYGDSVKG	VFCGSFVARS	3.18nM

【 0 0 8 1 】

10

20

30

40

50

【表 4 - 1】

表 4. hzF2 変異体の可変領域のアミノ酸配列

変異体名	可変アミノ酸配列
hzF2-m1 配列番号 11	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRDSDDGASSMGWFRQAPGKGLGVAIIFNAGER</u> <u>TDYGDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATVWSGSWVARSWGQGT</u> VTVSS
hzF2-m2 配列番号 12	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSDSDDGASCMGWFRQAPGKGLGVAIIFNAGER</u> <u>TDYGDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATVWCGSWVARSWGQGT</u> VTVSS
hzF2-m3 配列番号 13	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRDSSSGASCMGWFRQAPGKGLGVAIIFNAGERT</u> <u>DYGDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATVWCGSWVARSWGQGLV</u> TVSS
hzF2-m4 配列番号 14	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRDSDGASCMGWFRQAPGKGLGVAIIFNAGER</u> <u>TDYGDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATVWCGSWVARSWGQGT</u> VTVSS
hzF2-m5 配列番号 15	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRDSDDAASCMGWFRQAPGKGLGVAIIFNAGER</u> <u>TDYGDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATVWCGSWVARSWGQGT</u> VTVSS
hzF2-m6 配列番号 16	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRDSDGASCMGWFRQAPGKGLGVAIIFNAGER</u> <u>TDYGDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATVWCGSWVARSWGQGT</u> VTVSS
hzF2-m7 配列番号 17	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRDSDSASCMGWFRQAPGKGLGVAIIFNAGERT</u> <u>DYGDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATVWCGSWVARSWGQGLV</u> TVSS
hzF2-m8 配列番号 18	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRDSDDGASCMGWFRQAPGKREGVAIIFNVGER</u> <u>TDYGDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATVWCGSWVARSWGQGT</u> VTVSS
hzF2-m9 配列番号 19	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRDSDGASCMGWFRQAPGKREGVAIIFNAGERT</u> <u>DYGDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATVWCGSWVARSWGQGLVT</u> VSS
hzF2-m10 配列番号 20	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAARDSDDGASCMGWFRQAPGKREGVIIIFNAGERTDY</u> <u>GDSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATVYCGSWVARSWGQGLVTVSS</u>

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

hzF2-m11 配列番号 21	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAARDSDDGASCMGWFRQAPGKEREGVIFNAGERTDY GDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATVYCGSYVARSWGQGLTVTVSS	
hzF2-m12 配列番号 22	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAARDSDEGASCMGWFRQAPGKEREGVIFNVGERTDY GDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATVWCGSWVARSWGQGLTVTVSS S	
hzF2-m13 配列番号 23	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAARDSDDGASCMGWFRQAPGKEREGVIFNAGERTDY GDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATVFCGSFVARSWGQGLTVTVSS	10
hzF2-m14 配列番号 24	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAARDSDEGASCMGWFRQAPGKEREGVIFNVGERTDY GDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATVYCGSYVARSWGQGLTVTVSS	
hzF2-m15 配列番号 25	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAARDSDEGASCMGWFRQAPGKEREGVIFNVGERTDY GDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATVFCGSYVARSWGQGLTVTVSS	
hzF2-m16 配列番号 26	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAARDSDEGASCMGWFRQAPGKEREGVIFNVGERTDY GDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATVFCGSFVARSWGQGLTVTVSS	20

【 0 0 8 2 】

【表 5】

表 5. ヒト PD-L1 組換えタンパク質に対する hzF2 変異体の親和性の検出結果

	<b>KD 値(M)</b>	<b>kon(1/Ms)</b>	<b>kdis(1/s)</b>
HZF2	1.40E-09	2.18E+05	3.05E-04
hzF2-m1	2.80E-09	6.79E+05	1.90E-03
hzF2-m2	1.26E-09	5.62E+05	7.09E-04
hzF2-m3	7.80E-09	6.24E+05	4.87E-03
hzF2-m4	9.36E-09	6.95E+05	6.50E-03
hzF2-m5	5.05E-09	3.36E+05	1.70E-03
hzF2-m6	1.10E-09	3.15E+05	3.45E-04
hzF2-m7	4.59E-09	3.41E+05	1.57E-03
hzF2-m8	1.18E-09	3.56E+05	4.19E-04
hzF2-m9	1.34E-09	3.24E+05	4.34E-04

【 0 0 8 3 】

実施例 7 E L I S A アッセイによるヒト PD - L 1 のその受容体 PD - 1 への結合に対する h z F 2 の阻害効果

ヒト PD - 1 - h F c ( PD - 1 配列番号 NP \_ 0 0 5 0 0 9 . 2 、 2 1 a a - 1 6 7 50

aa) を PBS で  $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$  に希釈し、ELISA プレートにて 4 で一晩コーティングした。次に、プレートを恒温インキュベーターにて  $37^\circ\text{C}$  で 60 分間、5% BSA でブロックした。h z F 2 および対照抗体 KN035、およびアイソタイプ対照 NC-h IgG1 の勾配希釈 (初期実施濃度  $50 \text{ nM}$ 、1.5 倍希釈で  $10 \text{ nM}$  濃度勾配) を加え、次いで、PD-L1-mFc (PD-L1 配列番号 NP\_054862.1、19aa-238aa) を実施濃度  $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$  で加え、恒温インキュベーターにて  $37^\circ\text{C}$  で 60 分間、共インキュベートし、反応させた。プレートを PBST で 4 回洗浄し、次いで、そこに 1:5000 希釈した HRP-抗マウス Fc (Cat.: 115-035-071、Jackson Immuno Research) を加え、45 分間反応させ、TMB (Beijing Taitianhe Biology, Cat.: ME142) 基質を加えて 15 分間発色させた。2M HCl を加えて反応を停止させた後、このプレートについて、 $630 \text{ nm}$  を参照波長とし、 $450 \text{ nm}$  を検出波長としてリーダーでウェルプレートの  $A_{450 \text{ nm}} - A_{630 \text{ nm}}$  の吸光度値を読み取って記録した。これらの結果 (図 5) は、h z F 2 が組換えヒト PD-L1 のその受容体 PD-1 への結合を効果的にブロックできることを示し、50% 有効結合濃度 (EC50) 値は  $4.3 \text{ nM}$  であった。

10

【0084】

実施例 8 PD-1 および PD-L1 リポーター遺伝子法による細胞ブロック活性の評価

PD-1 および PD-L1 経路に対する h z F 2 のブロック効果を、Jurkat-PD1-NFAT 細胞および CHO-PD-L1-CD3L 細胞を用いるリポーター遺伝子アッセイ (RGA) によってアッセイした。詳細を以下に示した：対数増殖期の CHO-PD-L1-CD3L 細胞を  $5 \times 10^5$  細胞/mL の細胞密度に調整し、 $100 \mu\text{l}$ /ウェルで播種し、一晩置いた。抗体サンプルを培養培地で  $20 \mu\text{g}/\text{mL}$  まで段階的に予備希釈し、次いで、2 倍勾配で合計 10 点として希釈した。希釈サンプルを一晩培養した細胞に  $50 \mu\text{l}$ /ウェルで添加した。同時に、 $2 \times 10^6$  細胞/mL 濃度の Jurkat-PD1-NFAT 細胞を  $50 \mu\text{l}$ /ウェルで加えた。このプレートを細胞インキュベーターにて 6 時間インキュベートした。1~2 時間前に適切な量の Bio-Glo (商標) ルシフェラーゼ基質を取り出して解凍した後、暗所、室温に置いた。インキュベーターから細胞プレートを取り出し、室温に平衡化し (約 10~15 分)、Bio-Glo (商標) ルシフェラーゼ基質を  $100 \mu\text{l}$ /ウェルで加えた。細胞プレートをマイクロプレート恒温シェーカーに入れ、暗所、 $800 \text{ rpm}$  で 20 分間インキュベートした。多機能マイクロプレートリーダーを発光モードに設定し、組込みおよび RLU の読み取りのために 500 (この装置の規定値) を選択した。SoftMax ソフトウェアを用い、サンプル濃度を X 軸とし、RLU 平均検出値を Y 軸とし、標準曲線を作成するために 4 パラメーター方程式を選択してデータを解析した。参照サンプルおよび試験サンプルの曲線フィッティング結果の EC50 値によれば、試験サンプルの相対生物活性を計算した。結果を図 6 に示した。PD-L1 および PD-1 に対する h z F 2 のブロック活性は、KN035 のブロック活性と実質的に同等であり、それぞれ h z F 2 の EC50 は  $5.45 \text{ nM}$  であり、KN035 の EC50 は  $4.90 \text{ nM}$  であった。

20

30

【0085】

実施例 9：マウスにおける h z F 2 の半減期の決定

1 群 3 匹に分けた健常な雌 5 週齢ヌードマウスに尾静脈から単回用量  $15 \text{ mg}/\text{kg}$  の抗体を注射した。投与 2 時間、4 時間、8 時間、24 時間、48 時間、96 時間、144 時間、196 時間後に、それぞれ尾静脈血液サンプルを採取し、遠心分離して血清を分離し、抗体の薬物動態特性を試験するために  $-20^\circ\text{C}$  で保存した。総ての血液サンプルの採取が完了した後、以下の手順を行った。96 ウェル酵素結合プレートを  $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $100 \mu\text{l}$ /ウェルとして PD-L1-His (配列番号 NP\_054862.1、19aa-238aa) でコーティングし、一晩  $4^\circ\text{C}$  で置いた後、PBS で 3 回洗浄した。このプレートに 5% BSA PBS を加え、 $37^\circ\text{C}$  で 60 分間ブロックし、PBST で 3 回洗浄し、次いで、供試血清サンプル ( $10,000$  倍希釈、 $20,000$  倍希釈) と標準品を加えて h z F 2 標準曲線ウェル (初期濃度  $0.05 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、2 倍連続希釈、1

40

50

2希釈勾配)とし、37で60分間インキュベートし、PBSTで4回洗浄し、1:5000希釈したHRP-ヤギ抗ヒトIgG(Fcr)(Cat.:109-035-098、Jackson Immuno Research)を加え、37で40分間インキュベートし、PBSTで4回洗浄し、TMB基質(Cat.:ME142、Beijing Taitianhe Biotechnology Co., Ltd.)を加えて発色させた。37で10分間インキュベートした後、プレートに2M HClを加えて反応を停止させ、次いで、630nmを参照波長として、450nmを検出波長としてリーダーでウェルプレートのA450nm-630nmの吸光度値を読み取って記録した。標準抗体の濃度をY軸とし、OD値をX軸として時間-抗体濃度曲線をプロットし、直線フィッティングを行った。薬物半減期 $T_{1/2}$ は $T_{1/2} = 0.693 / k$ であり、式に従って計算した。

10

## 【0086】

最終結果(図7)は、本条件下でマウスにおけるhZF2のin vivo半減期は83.1時間であることを示し、hZF2は良好なin-vivo半減期および安定性を有していたことが示唆された。

## 【0087】

実施例10: MC38-hPDL1を皮下に同種移植したヒトPD-L1トランスジェニックマウスを用いてマウス大腸癌モデルでのhZF2の抗腫瘍有効性の検出

ヒトPD-L1を高発現するマウス大腸癌細胞株MC38-hPDL1を雌B6-hPDL1マウス(C57の遺伝子背景を有するPD-L1ヒト化マウス)の右前肋骨皮下部位に接種した。腫瘍が約100mm<sup>3</sup>に成長した際に、マウスをhZF2群、KN035群またはアイソタイプ対照IgG群に群分けし、前記薬剤を10mg/kgの用量で週2回、計6回投与した。投与の度に腫瘍体積および体重を測定し、担癌マウスの体重および腫瘍体積の変化と投与時間の間の関係を記録した。試験終了時に、担癌マウスを安楽死させ、腫瘍を摘出し、重量を測定し、写真撮影を行った。対照群に対する処置群の腫瘍体積比(T/C)および腫瘍増殖阻害率(1-T/C)を算出し、統計学的に解析した。これらの結果は、被験薬であるhZF2が腫瘍の増殖を効果的に阻害したことを示した(図8、図9)。

20

## 【0088】

## [配列表]

本願に関連するアミノ酸配列およびヌクレオチド配列は以下の通りである。

配列番号1: ラクダ由来単一可変ドメイン抗体VHH-F2の可変領域アミノ酸配列

## 【化1】

QVQLQESGGGSVQTGGSLRLACAVSRDSDDGASCMGWFRQAPGKGREGVA

IIFNAGERTDYGDSVKGRFTISQDNAKNTLFLQMNSLKPEDSAMYYCATVW

CGSWVARSFQGTQVTVSS

40

配列中;

重鎖CDR1アミノ酸(配列番号43):

## 【化2】

RDSDDGASCMG

重鎖CDR2アミノ酸(配列番号44):

50

【化 3】

IIFNAGERTDYGDSVKG

重鎖 C D R 3 アミノ酸 ( 配列番号 4 5 ) :

【化 4】

VWCGSWVARS

配列番号 2 : ラクダ由来単一可変ドメイン抗体 V H H - F 2 の可変領域ヌクレオチド配列 10

【化 5】

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGGAGGCTCGGTGCAGACTGGAGGGT  
 CTCTGAGACTCGCCTGTGCAGTCTCTAGAGACAGTGACGACGGTGCCAG  
CTGTATGGGGTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCGCGAGGGGGTTC  
 GCAATCATTTTTAATGCTGGTGAACGTACCGACTATGGCGACTCCGTGAAG  
GGCCGATTCACCATCTCCCAAGACAACGCCAAGAACACGCTGTTTCTACA 20  
 AATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACAGTGCCATGTACTATTGTGCGACAG  
TTTGGTGTGGTTCTTGGGTCGCGCGTTCTTTCGGCCAGGGGACCCAGGTC  
 ACCGTCTCCTCA

配列中 :

重鎖 C D R 1 ヌクレオチド :

【化 6】

AGAGACAGTGACGACGGTGCCAGCTGTATGGGG

30

重鎖 C D R 2 ヌクレオチド :

【化 7】

ATCATTTTTAATGCTGGTGAACGTACCGACTATGGCGACTCCGTGAAGGGC

重鎖 C D R 3 ヌクレオチド :

【化 8】

GTTTGGTGTGGTTCTTGGGTCGCGCGTTCT

40

配列番号 3 : キメラ単一可変ドメイン抗体 c h F 2 の全長アミノ酸配列

50

【化 9】

QVQLQESGGGSVQTGGSLRLACAVSRDSDDGASCMGWFRQAPGKGREGVA  
 IIFNAGERTDYGDSVKGRFTISQDNAKNTLFLQMNSLKPEDSAMYYCATVW  
 CGSWVARSFQGQTQVTVSSASEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK  
 DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV  
 VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL  
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD  
 KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

10

配列中：

重鎖 C D R 1 アミノ酸：

【化 1 0】

RDSDDGASCMG

20

重鎖 C D R 2 アミノ酸：

【化 1 1】

IIFNAGERTDYGDSVKG

重鎖 C D R 3 アミノ酸：

【化 1 2】

VWCGSWVARS

30

配列番号 4：キメラ単一可変ドメイン抗体 c h F 2 の全長ヌクレオチド配列

40

50

## 【化 1 3】

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGGAGGCTCGGTGCAGACTGGAGGGT  
 CTCTGAGACTCGCCTGTGCAGTCTCTAGAGACAGTGACGACGGTGCCAG  
CTGTATGGGGTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGGCGCGAGGGGGTTC  
GCAATCATTTTTAATGCTGGTGAACGTACCGACTATGGCGACTCCGTGAAG  
GGCCGATTCACCATCTCCCAAGACAACGCCAAGAACACGCTGTTTCTACA 10  
 AATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACAGTGCCATGTACTATTGTGCGACAG  
TTTGGTGTGGTTCTTGGGTCGCGCGTTCCTTTCGGCCAGGGGACCCAGGTC  
 ACCGTCTCCTCAGCTAGCGAGCCCAAATCTAGCGACAAAACCTCACACATGCC  
 CACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCC  
 CCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGGTCACATGC  
 GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACG 20  
 TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTA  
 CAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG  
 CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCC  
 CCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT  
 GTACACCCTGCCTCCATCTCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTG  
 ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA 30  
 GCAATGGGCAGCCGGAGAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTC  
 CGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC  
 AGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC  
 TACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGT

配列中：

重鎖 C D R 1 ヌクレオチド：

## 【化 1 4】

AGAGACAGTGACGACGGTGCCAGCTGTATGGGG

重鎖 C D R 2 ヌクレオチド：

## 【化 1 5】

ATCATTTTTAATGCTGGTGAACGTACCGACTATGGCGACTCCGTGAAGGGC

10

20

30

40

50

重鎖 C D R 3 ヌクレオチド :

【化 1 6】

GTTTGGTGTGGTTCTTGGGGTCGCGCGTTCT

配列番号 5 : K N 0 3 5 可変領域のアミノ酸配列

【化 1 7】

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGKMSSRRCMAWFRQAPGKERERVAK

LLTTSGSTYLADSVKGRFTISRDNSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCAADSFE

DPTCTLVTSSGAFQYWGQTLVTVSS

10

配列中 :

重鎖 C D R 1 アミノ酸 :

【化 1 8】

RRCMA

20

重鎖 C D R 2 アミノ酸 :

【化 1 9】

KLLTTSGSTYLADSVKG

重鎖 C D R 3 アミノ酸 :

【化 2 0】

DSFEDPTCTLVTSSGAFQY

30

配列番号 6 : K N 0 3 5 可変領域のヌクレオチド配列

【化 2 1】

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCCTGGTGCAGCCTGGAGGCT

CCCTGAGGCTGTCCTGCGCTGCCTCTGGCAAGATGTCCTCCAGACGGTGC

ATGGCCTGGTTCGACAGGCTCCTGGCAAGGAGCGAGAGCGGGTGGCCA

AGCTGCTGACCACCTCCGGCTCCACCTACCTGGCCGACTCCGTGAAGGGA

CGGTTACCATCTCCAGGGACAACCTCCAAGAACACCGTGTACCTGCAGAT

GAACCTCCCTGCGAGCTGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCTGCAGACT

CCTTCGAGGACCCACCTGCACCCTGGTGACCTCCTCTGGAGCCTTCCAG

TACTGGGGACAGGGCACCTGGTGACCGTGTCTCC

40

配列中 :

重鎖 C D R 1 ヌクレオチド :

50

【化 2 2】

AGACGGTGCATGGCC

重鎖 C D R 2 ヌクレオチド :

【化 2 3】

AAGCTGCTGACCACCTCCGGCTCCACCTACCTGGCCGACTCCGTGAAGGG

A

10

重鎖 C D R 3 ヌクレオチド :

【化 2 4】

GACTCCTTCGAGGACCCACCTGCACCCTGGTGACCTCCTCTGGAGCCTT

CCAGTAC

配列番号 7 : ヒト化単一可変ドメイン抗体 h z F 2 の可変領域アミノ酸配列

【化 2 5】

20

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRDSDDGASCMGWFRQAPGKGLEGVAIIFNAGERTDYGDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATVWCGSWVARSWGQGLTVTVSS

配列中 :

重鎖 C D R 1 アミノ酸 :

【化 2 6】

30

RDSDDGASCMG

重鎖 C D R 2 アミノ酸 :

【化 2 7】

IIFNAGERTDYGDSVKG

重鎖 C D R 3 アミノ酸 :

【化 2 8】

40

VWCGSWVAR

配列番号 8 : ヒト化単一可変ドメイン抗体 h z F 2 の可変領域ヌクレオチド配列

50

## 【化 2 9】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGTGGCCTGGTGCAGCCTGGAGGCT  
 CCCTGAGGCTGTCCTGCGCTGCCTCTCGGGACTCCGACGACGGAGCCTCC  
TGCATGGGCTGGTTCAGGCAGGCTCCTGGCAAGGGCCTGGAGGGAGTGG  
CCATCATCTTCAACGCTGGCGAGCGGACCGACTACGGCGACTCCGTGAAG  
GGACGGTTCACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAACACCCTGTACCTGC 10  
 AGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACAGCCGTGTACTACTGCGCTACC  
GTGTGGTGTGGCTCCTGGGTGGCTCGGTCCTGGGGACAGGGCACCCCTGGT  
 GACCGTGTCTCC

配列中：

重鎖 C D R 1 ヌクレオチド：

## 【化 3 0】

CGGGACTCCGACGACGGAGCCTCCTGCATGGGC

重鎖 C D R 2 ヌクレオチド：

## 【化 3 1】

ATCATCTTCAACGCTGGCGAGCGGACCGACTACGGCGACTCCGTGAAGGG  
 A

重鎖 C D R 3 ヌクレオチド：

## 【化 3 2】

GTGTGGTGTGGCTCCTGGGTGGCTCGGTCC

配列番号 9：ヒト化単一可変ドメイン抗体 h z F 2 の全長アミノ酸配列

## 【化 3 3】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRDSDDGASCMGWFRQAPGKGLGVAI  
 IFNAGERTDYGDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATVWC 40  
 GSWVARSWGQGLTVTVSSASEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK  
 DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV  
 VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL  
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD  
 KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

配列中：

重鎖 C D R 1 アミノ酸：

【化 3 4】

RDSDDGASCMG

重鎖 C D R 2 アミノ酸：

【化 3 5】

IIFNAGERTDYGDSVKG

10

重鎖 C D R 3 アミノ酸：

【化 3 6】

VWCGSWVARS

配列番号 1 0 : ヒト化単一可変ドメイン抗体 h z F 2 の全長ヌクレオチド配列

20

30

40

50

## 【化 3 7】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGTGGCCTGGTGCAGCCTGGAGGCT  
 CCCTGAGGCTGTCCTGCGCTGCCTCTCGGGACTCCGACGACGGAGCCTCC  
 TGCATGGGCTGGTTCAGGCAGGCTCCTGGCAAGGGCCTGGAGGGAGTGG  
 CCATCATCTTCAACGCTGGCGAGCGGACCGACTACGGCGACTCCGTGAAG  
 GGACGGTTCACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAACACCCTGTACCTGC  
 AGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACAGCCGTGTACTACTGCGCTACC  
 GTGTGGTGTGGCTCCTGGGTGGCTCGGTCCCTGGGGACAGGGCACCCCTGGT  
 GACCGTGTCTCCGCTAGCGAGCCCAAATCTAGCGACAAAACCTCACACATGC  
 CCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCC  
 CCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATG  
 CGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC  
 GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG  
 TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACT  
 GGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGC  
 CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG  
 GTGTACACCCTGCCTCCATCTCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCC  
 TGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA  
 GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAACAAGACCACGCCTCCCGTGTCTGGAC  
 TCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG  
 GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC  
 CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGT

10

20

30

配列中：

重鎖 C D R 1 ヌクレオチド：

40

## 【化 3 8】

CGGGACTCCGACGACGGAGCCTCCTGCATGGGC

重鎖 C D R 2 ヌクレオチド：

50

【化 3 9】

ATCATCTTCAACGCTGGCGAGCGGACCGACTACGGCGACTCCGTGAAGGG  
A

重鎖 C D R 3 ヌクレオチド :

【化 4 0】

GTGTGGTGTGGCTCCTGGGTGGCTCGGTCC

10

配列番号 1 1 : ヒト化単一可変ドメイン抗体 h z F 2 - m 1 の可変領域アミノ酸配列

【化 4 1】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRDSDDGASSMGWFRQAPGKGLEGVAI  
IFNAGERTDYGDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATVWS  
GSWVARSWGQGTLVTVSS

20

配列番号 1 2 : ヒト化単一可変ドメイン抗体 h z F 2 - m 2 の可変領域アミノ酸配列

【化 4 2】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGDSDDGASCMGWFRQAPGKGLEGVA  
IIFNAGERTDYGDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATVW  
CGSWVARSWGQGTLVTVSS

30

配列番号 1 3 : ヒト化単一可変ドメイン抗体 h z F 2 - m 3 の可変領域アミノ酸配列

【化 4 3】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRDSSSGASCMGWFRQAPGKGLEGVAI  
IFNAGERTDYGDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATVW  
CGSWVARSWGQGTLVTVSS

配列番号 1 4 : ヒト化単一可変ドメイン抗体 h z F 2 - m 4 の可変領域アミノ酸配列

【化 4 4】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRDSDNDGASCMGWFRQAPGKGLEGVA  
IIFNAGERTDYGDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATVW  
CGSWVARSWGQGTLVTVSS

40

配列番号 1 5 : ヒト化単一可変ドメイン抗体 h z F 2 - m 5 の可変領域アミノ酸配列

50

## 【化 4 5】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASSRDSDDAASCMGWFRQAPGKGLEGVA  
IIFNAGERTDYGDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATVW  
CGSWVARSWGQGLTVTVSS

配列番号 16 : ヒト化単一可変ドメイン抗体 h z F 2 - m 6 の可変領域アミノ酸配列  
 【化 4 6】

10

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASSRDSDEGASCMGWFRQAPGKGLEGVAI  
IFNAGERTDYGDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATVW  
CGSWVARSWGQGLTVTVSS

配列番号 17 : ヒト化単一可変ドメイン抗体 h z F 2 - m 7 の可変領域アミノ酸配列  
 【化 4 7】

20

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASSRDSDDASCMGWFRQAPGKGLEGVAI  
IFNAGERTDYGDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATVW  
CGSWVARSWGQGLTVTVSS

配列番号 18 : ヒト化単一可変ドメイン抗体 h z F 2 - m 8 の可変領域アミノ酸配列  
 【化 4 8】

30

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASSRDSDDGASCMGWFRQAPGKEREGVAI  
IFNVGERTDYGDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATVW  
CGSWVARSWGQGLTVTVSS

配列番号 19 : ヒト化単一可変ドメイン抗体 h z F 2 - m 9 の可変領域アミノ酸配列  
 【化 4 9】

40

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASSRDSDEGASCMGWFRQAPGKEREGVAI  
FNAGERTDYGDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATVWCG  
SWVARSWGQGLTVTVSS

配列番号 20 : ヒト化単一可変ドメイン抗体 h z F 2 - m 10 の可変領域アミノ酸配列

50

【化 5 0】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASSRDSDDGASCMGWFRQAPGKEREGVAI  
IFNAGERTDYGDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATVYIC  
GSWVARSWGQGLTVTVSS

配列番号 2 1 : ヒト化単一可変ドメイン抗体 h z F 2 - m 1 1 の可変領域アミノ酸配列  
 【化 5 1】

10

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASSRDSDDGASCMGWFRQAPGKEREGVAI  
IFNAGERTDYGDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATVYIC  
GSYVARSWGQGLTVTVSS

配列番号 2 2 : ヒト化単一可変ドメイン抗体 h z F 2 - m 1 2 の可変領域アミノ酸配列  
 【化 5 2】

20

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASSRDSDEGASCMGWFRQAPGKEREGVAI  
FNVGERTDYGDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATVWCG  
SWVARSWGQGLTVTVSS

配列番号 2 3 : ヒト化単一可変ドメイン抗体 h z F 2 - m 1 3 の可変領域アミノ酸配列  
 【化 5 3】

30

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASSRDSDDGASCMGWFRQAPGKEREGVAI  
IFNAGERTDYGDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATVFCG  
SFVARSWGQGLTVTVSS

配列番号 2 4 : ヒト化単一可変ドメイン抗体 h z F 2 - m 1 4 の可変領域アミノ酸配列  
 【化 5 4】

40

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASSRDSDEGASCMGWFRQAPGKEREGVAI  
NVGERTDYGDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATVYCGSY  
VARSWGQGLTVTVSS

配列番号 2 5 : ヒト化単一可変ドメイン抗体 h z F 2 - m 1 5 の可変領域アミノ酸配列

50

## 【化 5 5】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRDSDEGASCMGWFRQAPGKEREGVAIIF  
NVGERTDYGDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATVFCGSY  
VARSWGQGLTVTVSS

配列番号 26 : ヒト化単一可変ドメイン抗体 h z F 2 - m 1 6 の可変領域アミノ酸配列  
 【化 5 6】

10

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRDSDEGASCMGWFRQAPGKEREGVAIIF  
NVGERTDYGDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATVFCGSF  
VARSWGQGLTVTVSS

配列番号 27 : ヒト化単一可変ドメイン抗体 h z F 2 - m 1 の可変領域ヌクレオチド配列  
 【化 5 7】

20

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGTGGCCTGGTGCAGCCTGGAGGCT  
 CCCTGAGGCTGTCCTGCGCTGCCTCTCGGGACTCCGACGACGGAGCCTCC  
 AGCATGGGCTGGTTCAGGCAGGCTCCTGGCAAGGGCCTGGAGGGAGTGG  
 CCATCATCTTCAACGCTGGCGAGCGGACCGACTACGGCGACTCCGTGAAG  
 GGACGGTTCACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAACACCCTGTACCTGC  
 AGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACAGCCGTGTACTACTGCGCTACC  
 GTGTGGTCCGGCTCCTGGGTGGCTCGGTCCTGGGGACAGGGCACCCCTGGT  
 GACCGTGTCTCC

30

配列番号 28 : ヒト化単一可変ドメイン抗体 h z F 2 - m 2 の可変領域ヌクレオチド配列

40

50

## 【化 5 8】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGTGGCCTGGTGCAGCCTGGAGGCT  
 CCCTGAGGCTGTCCTGCGCTGCCTCTGGAGACTCCGACGACGGAGCCTCC  
 TGCATGGGCTGGTTCAGGCAGGCTCCTGGCAAGGGCCTGGAGGGAGTGG  
 CCATCATCTTCAACGCTGGCGAGCGGACCGACTACGGCGACTCCGTGAAG  
 GGACGGTTCACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAACACCCTGTACCTGC 10  
 AGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACAGCCGTGTACTACTGCGCTACC  
 GTGTGGTGTGGCTCCTGGGTGGCTCGGTCCTGGGGACAGGGCACCCCTGGT  
 GACCGTGTCTCC

配列番号 29 : ヒト化単一可変ドメイン抗体 h z F 2 - m 3 の可変領域ヌクレオチド配列  
 【化 5 9】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGTGGCCTGGTGCAGCCTGGAGGCT 20  
 CCCTGAGGCTGTCCTGCGCTGCCTCTCGGGACTCCAGCAGCGGAGCCTCC  
 TGCATGGGCTGGTTCAGGCAGGCTCCTGGCAAGGGCCTGGAGGGAGTGG  
 CCATCATCTTCAACGCTGGCGAGCGGACCGACTACGGCGACTCCGTGAAG  
 GGACGGTTCACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAACACCCTGTACCTGC  
 AGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACAGCCGTGTACTACTGCGCTACC 30  
 GTGTGGTGTGGCTCCTGGGTGGCTCGGTCCTGGGGACAGGGCACCCCTGGT  
 GACCGTGTCTCC

配列番号 30 : ヒト化単一可変ドメイン抗体 h z F 2 - m 4 の可変領域ヌクレオチド配列

40

50

## 【化 6 0】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGTGGCCTGGTGCAGCCTGGAGGCT  
 CCCTGAGGCTGTCCTGCGCTGCCTCTCGGGACTCCAACGACGGAGCCTCC  
 TGCATGGGCTGGTTCAGGCAGGCTCCTGGCAAGGGCCTGGAGGGAGTGG  
 CCATCATCTTCAACGCTGGCGAGCGGACCGACTACGGCGACTCCGTGAAG  
 GGACGGTTCACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAACACCCTGTACCTGC  
 AGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACAGCCGTGTACTACTGCGCTACC  
 GTGTGGTGTGGCTCCTGGGTGGCTCGGTCCTGGGGACAGGGCACCCCTGGT  
 GACCGTGTCTCC

10

配列番号 3 1 : ヒト化単一可変ドメイン抗体 h z F 2 - m 5 の可変領域ヌクレオチド配列  
 【化 6 1】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGTGGCCTGGTGCAGCCTGGAGGCT  
 CCCTGAGGCTGTCCTGCGCTGCCTCTCGGGACTCCGACGACGCTGCCTCC  
 TGCATGGGCTGGTTCAGGCAGGCTCCTGGCAAGGGCCTGGAGGGAGTGG  
 CCATCATCTTCAACGCTGGCGAGCGGACCGACTACGGCGACTCCGTGAAG  
 GGACGGTTCACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAACACCCTGTACCTGC  
 AGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACAGCCGTGTACTACTGCGCTACC  
 GTGTGGTGTGGCTCCTGGGTGGCTCGGTCCTGGGGACAGGGCACCCCTGGT  
 GACCGTGTCTCC

20

30

配列番号 3 2 : ヒト化単一可変ドメイン抗体 h z F 2 - m 6 の可変領域ヌクレオチド配列

40

50

## 【化 6 2】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGTGGCCTGGTGCAGCCTGGAGGCT  
 CCCTGAGGCTGTCCTGCGCTGCCTCTCGGGACTCCGACGAGGGAGCCTCC  
TGCATGGGCTGGTTCAGGCAGGCTCCTGGCAAGGGCCTGGAGGGAGTGG  
 CCATCATCTTCAACGCTGGCGAGCGGACCGACTACGGCGACTCCGTGAAG  
GGACGGTTCACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAACACCCTGTACCTGC 10  
 AGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACAGCCGTGTACTACTGCGCTACC  
GTGTGGTGTGGCTCCTGGGTGGCTCGGTCCTGGGGACAGGGCACCCCTGGT  
 GACCGTGTCCCTCC

配列番号 3 3 : ヒト化単一可変ドメイン抗体 h z F 2 - m 7 の可変領域ヌクレオチド配列  
 【化 6 3】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGTGGCCTGGTGCAGCCTGGAGGCT 20  
 CCCTGAGGCTGTCCTGCGCTGCCTCTCGGGACTCCGACGACTCTGCCTCC  
TGCATGGGCTGGTTCAGGCAGGCTCCTGGCAAGGGCCTGGAGGGAGTGG  
 CCATCATCTTCAACGCTGGCGAGCGGACCGACTACGGCGACTCCGTGAAG  
GGACGGTTCACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAACACCCTGTACCTGC  
 AGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACAGCCGTGTACTACTGCGCTACC 30  
GTGTGGTGTGGCTCCTGGGTGGCTCGGTCCTGGGGACAGGGCACCCCTGGT  
 GACCGTGTCCCTCC

配列番号 3 4 : ヒト化単一可変ドメイン抗体 h z F 2 - m 8 の可変領域ヌクレオチド配列

40

50

## 【化 6 4】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGTGGCCTGGTGCAGCCTGGAGGCT  
 CCCTGAGGCTGTCCTGCGCTGCCTCTCGGGACTCCGACGACGGAGCCTCC  
TGCATGGGCTGGTTCAGGCAGGCTCCTGGCAAGGAGAGAGAGGGAGTGG  
CCATCATCTTCAACGTGGGCGAGCGGACCGACTACGGCGACTCCGTGAAG  
GGACGGTTCACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAACACCCTGTACCTGC 10  
 AGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACAGCCGTGTACTACTGCGCTACC  
GTGTGGTGTGGCTCCTGGGTGGCTCGGTCCTGGGGACAGGGCACCTGGT  
 GACCGTGTCTCTCC

配列番号 35 : ヒト化単一可変ドメイン抗体 h z F 2 - m 9 の可変領域ヌクレオチド配列  
 【化 6 5】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGTGGCCTGGTGCAGCCTGGAGGCT 20  
 CCCTGAGGCTGTCCTGCGCTGCCTCTCGGGACTCCGACGAGGGAGCCTCC  
TGCATGGGCTGGTTCAGGCAGGCTCCTGGCAAGGAGAGAGAGGGAGTGG  
CCATCATCTTCAACGCTGGGCGAGCGGACCGACTACGGCGACTCCGTGAAG  
GGACGGTTCACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAACACCCTGTACCTGC  
 AGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACAGCCGTGTACTACTGCGCTACC  
GTGTGGTGTGGCTCCTGGGTGGCTCGGTCCTGGGGACAGGGCACCTGGT 30  
 GACCGTGTCTCTCC

配列番号 36 : ヒト化単一可変ドメイン抗体 h z F 2 - m 1 0 の可変領域ヌクレオチド配列

10

20

30

40

50

## 【化 6 6】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGTGGCCTGGTGCAGCCTGGAGGCT  
 CCCTGAGGCTGTCCTGCGCTGCCTCTCGGGACTCCGACGACGGAGCCTCC  
TGCATGGGCTGGTTCAGGCAGGCTCCTGGCAAGGAGAGAGAGGGAGTGG  
 CCATCATCTTCAACGCTGGCGAGCGGACCGACTACGGCGACTCCGTGAAG  
GGACGGTTCACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAACACCCTGTACCTGC 10  
 AGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACAGCCGTGTACTACTGCGCTACC  
GTGTACTGTGGCTCCTGGGTGGCTCGGTCCTGGGGACAGGGCACCCCTGGT  
 GACCGTGTCTCC

配列番号 37 : ヒト化単一可変ドメイン抗体 h z F 2 - m 1 1 の可変領域ヌクレオチド配列

## 【化 6 7】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGTGGCCTGGTGCAGCCTGGAGGCT 20  
 CCCTGAGGCTGTCCTGCGCTGCCTCTCGGGACTCCGACGACGGAGCCTCC  
TGCATGGGCTGGTTCAGGCAGGCTCCTGGCAAGGAGAGAGAGGGAGTGG  
 CCATCATCTTCAACGCTGGCGAGCGGACCGACTACGGCGACTCCGTGAAG  
GGACGGTTCACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAACACCCTGTACCTGC  
 AGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACAGCCGTGTACTACTGCGCTACC 30  
GTGTACTGTGGCTCCTACGTGGCTCGGTCCTGGGGACAGGGCACCCCTGGT  
 GACCGTGTCTCC

配列番号 38 : ヒト化単一可変ドメイン抗体 h z F 2 - m 1 2 の可変領域ヌクレオチド配列

40

50

## 【化 6 8】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGTGGCCTGGTGCAGCCTGGAGGCT  
 CCCTGAGGCTGTCCTGCGCTGCCTCTCGGGACTCCGACGAGGGAGCCTCC  
TGCATGGGCTGGTTCAGGCAGGCTCCTGGCAAGGAGAGAGAGGGAGTGG  
CCATCATCTTCAACGTGGGCGAGCGGACCGACTACGGCGACTCCGTGAAG  
GGACGGTTCACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAACACCCTGTACCTGC 10  
 AGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACAGCCGTGTACTACTGCGCTACC  
GTGTGGTGTGGCTCCTGGGTGGCTCGGTCCTGGGGACAGGGCACCCCTGGT  
 GACCGTGTCTCC

配列番号 39 : ヒト化単一可変ドメイン抗体 h z F 2 - m 1 3 の可変領域ヌクレオチド配列

## 【化 6 9】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGTGGCCTGGTGCAGCCTGGAGGCT  
 CCCTGAGGCTGTCCTGCGCTGCCTCTCGGGACTCCGACGACGGAGCCTCC  
TGCATGGGCTGGTTCAGGCAGGCTCCTGGCAAGGAGAGAGAGGGAGTGG  
CCATCATCTTCAACGCTGGGCGAGCGGACCGACTACGGCGACTCCGTGAAG  
GGACGGTTCACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAACACCCTGTACCTGC 30  
 AGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACAGCCGTGTACTACTGCGCTACC  
GTGTTCTGTGGCTCCTTCGTGGCTCGGTCCTGGGGACAGGGCACCCCTGGT  
 GACCGTGTCTCC

配列番号 40 : ヒト化単一可変ドメイン抗体 h z F 2 - m 1 4 の可変領域ヌクレオチド配列

10

20

30

40

50

## 【化 7 0】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGTGGCCTGGTGCAGCCTGGAGGCT  
 CCCTGAGGCTGTCCTGCGCTGCCTCTCGGGACTCCGACGAGGGAGCCTCC  
TGCATGGGCTGGTTCAGGCAGGCTCCTGGCAAGGAGAGAGAGGGAGTGG  
CCATCATCTTCAACGTGGGCGAGCGGACCGACTACGGCGACTCCGTGAAG  
GGACGGTTCACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAACACCCTGTACCTGC 10  
 AGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACAGCCGTGTACTACTGCGCTACC  
GTGTTCTGTGGCTCCTACGTGGCTCGGTCCTGGGGACAGGGCACCCCTGGT  
 GACCGTGTCTCC

配列番号 4 1 : ヒト化単一可変ドメイン抗体 h z F 2 - m 1 5 の可変領域ヌクレオチド配列

## 【化 7 1】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGTGGCCTGGTGCAGCCTGGAGGCT  
 CCCTGAGGCTGTCCTGCGCTGCCTCTCGGGACTCCGACGAGGGAGCCTCC  
TGCATGGGCTGGTTCAGGCAGGCTCCTGGCAAGGAGAGAGAGGGAGTGG  
CCATCATCTTCAACGTGGGCGAGCGGACCGACTACGGCGACTCCGTGAAG  
GGACGGTTCACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAACACCCTGTACCTGC  
 AGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACAGCCGTGTACTACTGCGCTACC 30  
GTGTTCTGTGGCTCCTACGTGGCTCGGTCCTGGGGACAGGGCACCCCTGGT  
 GACCGTGTCTCC

配列番号 4 2 : ヒト化単一可変ドメイン抗体 h z F 2 - m 1 6 の可変領域ヌクレオチド配列

10

20

30

40

50

【化 7 2】

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGTGGCCTGGTGCAGCCTGGAGGCT  
 CCCTGAGGCTGTCCTGCGCTGCCTCTCGGGACTCCGACGAGGGAGCCTCC  
TGCATGGGCTGGTTCAGGCAGGCTCCTGGCAAGGAGAGAGAGGGAGTGG  
CCATCATCTTCAACGTGGGCGAGCGGACCGACTACGGCGACTCCGTGAAG  
GGACGGTTCACCATCTCCAGGGACAACGCCAAGAACACCCTGTACCTGC  
 AGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACACAGCCGTGTACTACTGCGCTACC  
GTGTTCTGTGGCTCCTTCGTGGCTCGGTCTCGGGACAGGGCACCTGGT  
 GACCGTGTCTCTCC

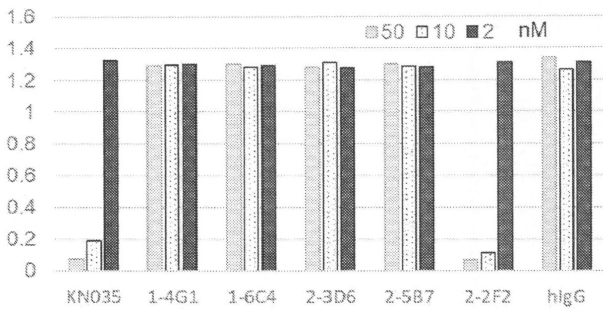
10

以上の説明は、本発明の好ましい実施形態に過ぎないが、本発明の保護範囲はこれらに限定されるものではない。当業者が容易に想到し得る、本発明が開示する技術的範囲内の変更または変形は、本発明の保護範囲に含まれるものとする。従って、本発明の保護範囲は、特許請求の範囲で主張されるものであるものとする。

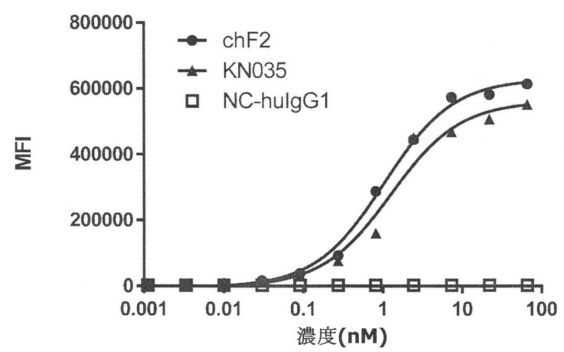
20

【図面】

【図 1】



【図 2】

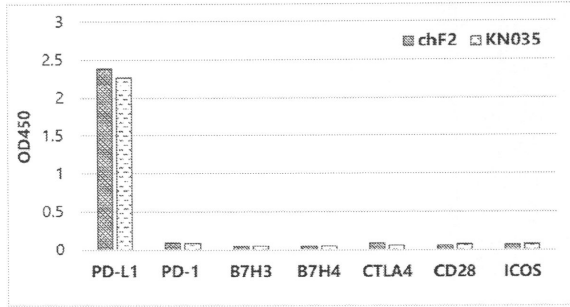


30

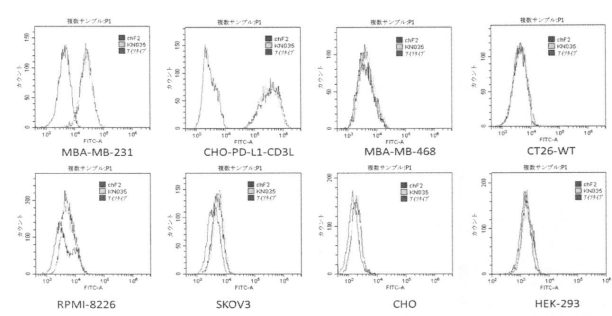
40

50

【 図 3 】

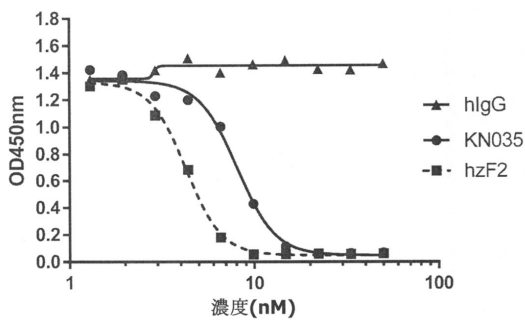


【 図 4 】

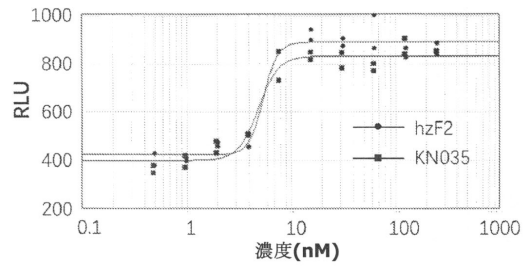


10

【 図 5 】

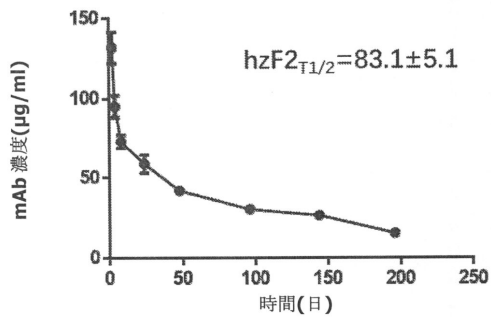


【 図 6 】

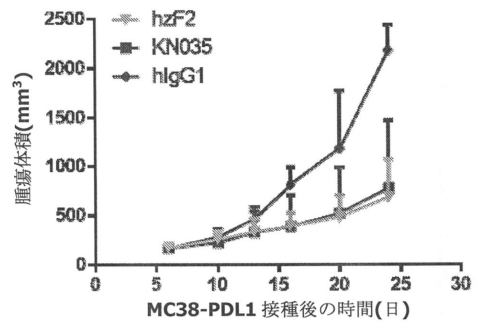


20

【 図 7 】



【 図 8 】

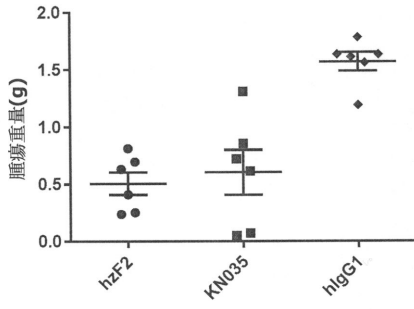


30

40

50

【 図 9 】



10

【 配列表 】

2023523600000001.app

20

30

40

50

## 【 国际调查报告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. <b>PCT/CN2021/088674</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> C07K 16/28(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K; A61K; A61P Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) VEN; CNABS, CNTXT, 万方, WANFANG, CNKI, NCBI, ISI web of science, EMBL, STN: MABWELL, 单可变域, VHH, pd-L1, 康宁杰瑞, vhh, pd-1, PD1, 迈威(上海)生物科技股份有限公司, 王双, 曾大地, 焦莎莎, 张畅, 王荣娟, 序列检索, nanobodies, binding, programmed death 1, blocking, tumor, anti-cancer, VHH fragment, single-domain		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2019158113 A1 (SHANGHAI NOVAMAB BIOPHARMACEUTICALS CO., LTD.) 22 August 2019 (2019-08-22) entire document	1-24
A	WO 2017198212 A1 (SUZHOU ALPHAMAB CO., LTD. et al.) 23 November 2017 (2017-11-23) entire document	1-24
A	CN 109485726 A (NANOMAB TECHNOLOGY LIMITED) 19 March 2019 (2019-03-19) entire document	1-24
A	CN 107636013 A (SUZHOU ALPHAMAB CO., LTD.) 26 January 2018 (2018-01-26) entire document	1-24
A	CN 109265548 A (SOUTHEAST UNIVERSITY) 25 January 2019 (2019-01-25) entire document	1-24
A	KALIM, M. et al. "Efficient Development and Expression of scFv Recombinant Proteins against PD-L1 Surface Domain and Potency in Cancer Therapy" <i>Cytotechnology</i> , Vol. 71, No. 3, 16 May 2019 (2019-05-16), pp. 705-722	1-24
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"I" 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 <p style="text-align: center;"><b>16 July 2021</b></p>		Date of mailing of the international search report <p style="text-align: center;"><b>27 July 2021</b></p>
Name and mailing address of the ISA/CN <p style="text-align: center;"><b>China National Intellectual Property Administration (ISA/ CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088 China</b></p> Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer          Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

10

20

30

40

50



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/088674

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

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

a.  forming part of the international application as filed:

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

on paper or in the form of an image file.

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

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

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

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

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

3. Additional comments:

10

20

30

40

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

**PCT/CN2021/088674**

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1.  Claims Nos.: **20-24**  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
[1] Claims 20, 23 and 24 (in part) relate to methods for the prevention or treatment of diseases, and a search is made on the basis of the use of anti-PD-L1 single variable domain antibodies in the preparation of prevention or treatment of diseases.
- 2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
- 3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

30

40

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2021/088674**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2019158113	A1	22 August 2019	EP	3786184	A1	03 March 2021
				CN	110144010	A	20 August 2019
				CN	110144010	B9	05 January 2021
				CN	110144010	B	14 January 2020
WO	2017198212	A1	23 November 2017	US	2019315864	A1	17 October 2019
				JP	2019522489	A	15 August 2019
				EP	3459597	A1	27 March 2019
				CN	109195665	A	11 January 2019
				EP	3459597	A4	15 April 2020
				CN	107400166	A	28 November 2017
CN	109485726	A	19 March 2019	EP	3682907	A1	22 July 2020
				WO	2019052508	A1	21 March 2019
				JP	2020533370	A	19 November 2020
				US	2020276330	A1	03 September 2020
				EP	3682907	A4	02 December 2020
CN	107636013	A	26 January 2018	HK	1252955	A1	06 June 2019
				RU	2018107427	A	28 August 2019
				CN	111116747	A	08 May 2020
				HK	1251591	A1	01 February 2019
				CA	2994339	A1	09 February 2017
				AU	2016302951	B2	10 October 2019
				KR	20180033582	A	03 April 2018
				CN	107849130	A	27 March 2018
				RU	2018107427	A3	28 August 2019
				CN	107849130	B	31 December 2019
				WO	2017020802	A1	09 February 2017
				KR	102138447	B1	28 July 2020
				MX	2018001387	A	15 August 2018
				EP	3330290	A4	28 August 2019
				US	2018291103	A1	11 October 2018
				EP	3348571	A4	10 April 2019
				PH	12018500233	A1	13 August 2018
				WO	2017020801	A1	09 February 2017
				EP	3330290	A1	06 June 2018
				CN	107636013	B	31 December 2019
				CN	106397592	A	15 February 2017
				RU	2715595	C2	02 March 2020
				EP	3348571	A1	18 July 2018
AU	2016302951	A1	22 February 2018				
JP	2018531039	A	25 October 2018				
BR	112018002130	A2	11 September 2018				
NZ	739499	A	25 October 2019				
US	2018327494	A1	15 November 2018				
JP	2018529375	A	11 October 2018				
CN	109265548	A	25 January 2019	None			

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

10

20

30

40

50

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/088674

<b>A. 主题的分类</b>		
C07K 16/28(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
<b>B. 检索领域</b>		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
C07K; A61K; A61P		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
VEN;CNABS, CNTXT, 万方, CNKI, NCBI, ISI web of science, EMBL, STN:MABWELL, 单可变域, VHH, pd-L1, 康宁杰瑞, vhh, pd-1, PDI, 迈威(上海)生物科技股份有限公司, 王双, 曾大地, 焦莎莎, 张畅, 王荣娟, 序列检索, nanobodies, binding, programmed death 1, blocking, tumor, anti-cancer, VHH fragment, single-domain		
<b>C. 相关文件</b>		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	WO 2019158113 A1 (上海洛启生物医药技术有限公司) 2019年 8月 22日 (2019 - 08 - 22) 全文	1-24
A	WO 2017198212 A1 (苏州康宁杰瑞生物科技有限公司 等) 2017年 11月 23日 (2017 - 11 - 23) 全文	1-24
A	CN 109485726 A (和迈生物科技有限公司) 2019年 3月 19日 (2019 - 03 - 19) 全文	1-24
A	CN 107636013 A (苏州康宁杰瑞生物科技有限公司) 2018年 1月 26日 (2018 - 01 - 26) 全文	1-24
A	CN 109265548 A (东南大学) 2019年 1月 25日 (2019 - 01 - 25) 全文	1-24
A	KALIM, M. 等. "Efficient development and expression of scFv recombinant proteins against PD-L1 surface domain and potency in cancer therapy" Cytotechnology, 第71卷, 第3期, 2019年 5月 16日 (2019 - 05 - 16), 第705-722页	1-24
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。		<input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件		"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件
国际检索实际完成的日期	2021年 7月 16日	国际检索报告邮寄日期 2021年 7月 27日
ISA/CN的名称和邮寄地址	中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	授权官员 黄蕊 电话号码 86-(10)-53961958

PCT/ISA/210 表(第2页) (2015年1月)

10

20

30

40

50

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/088674

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	范利华, “中国优秀硕士学位论文全文数据库 医药卫生科技辑” 抗体PD-1纳米抗体的筛选鉴定及功能分析, 第12期, 2019年 1月 15日 (2019 - 01 - 15), E072-44	1-24

10

20

30

40

50

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/088674

第I栏	核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)
	<p>1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:</p> <p>a. <input checked="" type="checkbox"/> 作为国际申请的一部分提交的:</p> <p style="padding-left: 20px;"><input checked="" type="checkbox"/> 附件C/ST. 25文本文件形式</p> <p style="padding-left: 20px;"><input type="checkbox"/> 纸件或图形文件形式</p> <p>b. <input type="checkbox"/> 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:</p> <p>c. <input type="checkbox"/> 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:</p> <p style="padding-left: 20px;"><input type="checkbox"/> 附件C/ST. 25文本文件形式 (细则13之三. 1(a))</p> <p style="padding-left: 20px;"><input type="checkbox"/> 纸件或图形文件形式 (细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)</p> <p>2. <input type="checkbox"/> 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围 (如适用) 的所需声明。</p> <p>3. 补充意见:</p>

10

20

30

40

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/088674

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a),对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:

- 1.  权利要求: 20-24  
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题,即:  
[1] 权利要求20,23-24(部分)涉及预防或治疗疾病的方法,基于抗PD-L1单可变域抗体在制备预防或治疗疾病的用途进行了检索。
- 2.  权利要求:  
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分,以致不能进行任何有意义的国际检索,具体地说:
- 3.  权利要求:  
因为它们是从属权利要求,并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

10

20

30

40

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/088674

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2019158113	A1	2019年 8月 22日	EP	3786184	A1	2021年 3月 3日
				CN	110144010	A	2019年 8月 20日
				CN	110144010	B9	2021年 1月 5日
				CN	110144010	B	2020年 1月 14日
WO	2017198212	A1	2017年 11月 23日	US	2019315864	A1	2019年 10月 17日
				JP	2019522489	A	2019年 8月 15日
				EP	3459597	A1	2019年 3月 27日
				CN	109195665	A	2019年 1月 11日
				EP	3459597	A4	2020年 4月 15日
				CN	107400166	A	2017年 11月 28日
CN	109485726	A	2019年 3月 19日	EP	3682907	A1	2020年 7月 22日
				WO	2019052508	A1	2019年 3月 21日
				JP	2020533370	A	2020年 11月 19日
				US	2020276330	A1	2020年 9月 3日
				EP	3682907	A4	2020年 12月 2日
CN	107636013	A	2018年 1月 26日	HK	1252955	A1	2019年 6月 6日
				RU	2018107427	A	2019年 8月 28日
				CN	111116747	A	2020年 5月 8日
				HK	1251591	A1	2019年 2月 1日
				CA	2994339	A1	2017年 2月 9日
				AU	2016302951	B2	2019年 10月 10日
				KR	20180033582	A	2018年 4月 3日
				CN	107849130	A	2018年 3月 27日
				RU	2018107427	A3	2019年 8月 28日
				CN	107849130	B	2019年 12月 31日
				WO	2017020802	A1	2017年 2月 9日
				KR	102138447	B1	2020年 7月 28日
				MX	2018001387	A	2018年 8月 15日
				EP	3330290	A4	2019年 8月 28日
				US	2018291103	A1	2018年 10月 11日
				EP	3348571	A4	2019年 4月 10日
				PH	12018500233	A1	2018年 8月 13日
				WO	2017020801	A1	2017年 2月 9日
				EP	3330290	A1	2018年 6月 6日
				CN	107636013	B	2019年 12月 31日
CN	106397592	A	2017年 2月 15日				
RU	2715595	C2	2020年 3月 2日				
EP	3348571	A1	2018年 7月 18日				
AU	2016302951	A1	2018年 2月 22日				
JP	2018531039	A	2018年 10月 25日				
BR	112018002130	A2	2018年 9月 11日				
NZ	739499	A	2019年 10月 25日				
US	2018327494	A1	2018年 11月 15日				
JP	2018529375	A	2018年 10月 11日				
CN	109265548	A	2019年 1月 25日	无			

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2015年1月)

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)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 H 0 4 5
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z
A 6 1 K 9/08 (2006.01)	A 6 1 K 9/08	
A 6 1 K 9/14 (2006.01)	A 6 1 K 9/14	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	E
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 1/00 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/00	
	A 6 1 K 48/00	

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

- 中華人民共和国シャンハイ、プードン、ニュー、ディストリクト、リビン、ロード、ナンバー 5 7  
6、ビルディング、ナンバー 3、オブ、チャンチアン、クリエイティブ、パーク、フロア 4
- (72)発明者 ツォン、ターティ  
中華人民共和国シャンハイ、プードン、ニュー、ディストリクト、リビン、ロード、ナンバー 5 7  
6、ビルディング、ナンバー 3、オブ、チャンチアン、クリエイティブ、パーク、フロア 4
- (72)発明者 チアオ、シャーシャー  
中華人民共和国シャンハイ、プードン、ニュー、ディストリクト、リビン、ロード、ナンバー 5 7  
6、ビルディング、ナンバー 3、オブ、チャンチアン、クリエイティブ、パーク、フロア 4
- (72)発明者 チャン、チャン  
中華人民共和国シャンハイ、プードン、ニュー、ディストリクト、リビン、ロード、ナンバー 5 7  
6、ビルディング、ナンバー 3、オブ、チャンチアン、クリエイティブ、パーク、フロア 4
- (72)発明者 ワン、ロンチュアン  
中華人民共和国シャンハイ、プードン、ニュー、ディストリクト、リビン、ロード、ナンバー 5 7  
6、ビルディング、ナンバー 3、オブ、チャンチアン、クリエイティブ、パーク、フロア 4

F ターム (参考) 4B064 AG27 CA19 CC24 DA01  
4B065 AA26X AA98X AB01 AC14 BA02 CA25 CA44  
4C076 AA11 AA29 BB11 CC27 FF11  
4C084 AA13 MA16 MA43 MA66 NA14 ZA591 ZA592 ZA661 ZA662 ZA811  
ZA812 ZA891 ZA892 ZB261 ZB262  
4C085 AA13 AA14 BB36 BB42 CC22 CC23 DD62 EE01 GG01  
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA42 DA76 EA28 FA74