

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2024-543134

(P2024-543134A)

(43)公表日 令和6年11月19日(2024.11.19)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28	Z N A	4 C 0 8 4
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46		4 C 0 8 5
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13		4 C 0 8 6
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z	4 C 0 8 7
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	4 H 0 4 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全61頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-531051(P2024-531051)		(71)出願人	516174219	
(86)(22)出願日	令和4年11月29日(2022.11.29)			江蘇恒瑞医薬股▲ふん▼有限公司	
(85)翻訳文提出日	令和6年5月23日(2024.5.23)			中華人民共和國 2 2 2 0 4 7 江蘇省連雲	
(86)国際出願番号	PCT/CN2022/134923			港市経済技術開発区昆侖山路 7 号	
(87)国際公開番号	WO2023/093899		(71)出願人	520392096	
(87)国際公開日	令和5年6月1日(2023.6.1)			上海盛迪医薬有限公司	
(31)優先権主張番号	202111429892.3			SHANGHAI SHENGDI PH	
(32)優先日	令和3年11月29日(2021.11.29)			ARMACEUTICAL CO., L	
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)			T D	
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA			中華人民共和國 2 0 1 2 1 0 上海市浦東	
	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(			新区張江鎮海科路 1 2 8 8 号	
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A			No. 1 2 8 8 Ha i k e R o a d ,	
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR			Z h a n g j i a n g T o w n , P u	
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,			d o n g N e w D i s t r i c t ,	
	最終頁に続く			S h a n g h a i 2 0 1 2 1 0 , C h	
				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 修飾されたタンパク質又はポリペプチド

(57)【要約】

予備の抗薬物抗体への結合が低減された、修飾された免疫グロブリン単一可変ドメイン及び上記免疫グロブリン単一可変ドメインを含むタンパク質又はポリペプチドを提供する。具体的に、上記免疫グロブリン単一可変ドメインのC末端は、アミノ酸修飾を含む。さらに、上記免疫グロブリン単一可変ドメイン、上記免疫グロブリン単一可変ドメインを含むタンパク質又はポリペプチドの製薬的使用、医薬組成物、コード核酸及び調製方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

修飾された免疫グロブリン単一可変ドメインであって、 $X_1 X_2 (X_3)_n$ 又は $V T V X_1 X_2 (X_3)_n$ で示されるアミノ酸配列の C 末端を含み、そのうち、 X_1 は S、F 及び R から選ばれ、 X_2 は A、P、S から選ばれ、 X_3 は A であるか又は存在せず、 n は 0 ～ 5 の整数であり、

n が 0 である場合、 X_3 は存在せず、

n が 1 ～ 5 である場合、 X_3 は A であり、

好ましくは、前記修飾された免疫グロブリン単一可変ドメインは、下記の (a) ～ (e)、即ち、

(a) S A A 又は V T V S A A、

(b) F P 又は V T V F P、

(c) F P A 又は V T V F P A、

(d) R S 又は V T V R S、及び

(e) R S A 又は V T V R S A

の何れか 1 つからなる C 末端を含む、修飾された免疫グロブリン単一可変ドメイン。

【請求項 2】

修飾された免疫グロブリン単一可変ドメインであって、ヒト生殖細胞系列に由来する重鎖フレームワーク配列を含み、ヒト生殖細胞系列重鎖フレームワーク配列に対する 1 1 2 位に 1 1 2 F 又は 1 1 2 R のアミノ酸修飾が存在し、

選択的に、前記免疫グロブリン単一可変ドメインは、さらにヒト生殖細胞系列重鎖フレームワーク配列に対する 1 1 3 位に 1 1 3 P のアミノ酸修飾が存在し、又は 1 1 3 位は S であり、

好ましくは、前記免疫グロブリン単一可変ドメインは、ヒト生殖細胞系列フレームワーク配列に対する 1 1 2 位と 1 1 3 位には、下記の (f) ～ (h)、即ち、

(f) 1 1 2 F と 1 1 3 P、

(g) 1 1 2 R と 1 1 3 S、及び

(h) 1 1 2 F と 1 1 3 S

の何れか 1 つのアミノ酸残基の組み合わせが存在する、修飾された免疫グロブリン単一可変ドメイン。

【請求項 3】

修飾された免疫グロブリン単一可変ドメインであって、ヒト生殖細胞系列に由来する重鎖フレームワーク配列を含み、ヒト生殖細胞系列重鎖フレームワーク配列に対する 1 1 2 位は S であり、ヒト生殖細胞系列重鎖フレームワーク配列に対する 1 1 3 位に 1 1 3 A、1 1 3 P のアミノ酸修飾が存在し、かつ 1 1 3 位の後にさらに 1 ～ 5 個のアミノ酸残基のアミノ酸伸長があり、前記アミノ酸伸長は、A、A A 又は A A A が好ましい、修飾された免疫グロブリン単一可変ドメイン。

【請求項 4】

V H 単一ドメイン抗体又はナノボディから選ばれ、前記 V H 単一ドメイン抗体は、ヒト由来のものが好ましく、ナノボディはラクダ由来又はヒト化のものが好ましい、前記請求項の何れか一項に記載の修飾された免疫グロブリン単一可変ドメイン。

【請求項 5】

未修飾の免疫グロブリン単一可変ドメインに比べて、前記修飾された免疫グロブリン単一可変ドメインは、予備の抗薬物抗体 (pre-ADA) 又は抗薬物抗体 (ADA) への結合が低減され、前記未修飾の免疫グロブリン単一可変ドメインは、アミノ酸配列 V T V S S (配列番号 1 8 9) の C 末端を有する、前記請求項の何れか一項に記載の修飾された免疫グロブリン単一可変ドメイン。

【請求項 6】

標的抗原に特異的に結合し、かつ、

a) 前記標的抗原に特異性を有する 3 つの相補性決定 (CDR) 領域と、

10

20

30

40

50

b) 4つのフレームワーク (FR) 領域と、
を含む、前記請求項の何れか一項に記載の修飾された免疫グロブリン単一可変ドメイン。

【請求項 7】

a) ヒト生殖細胞系列重鎖フレームワーク配列に対する 14 位、41 位、108 位における 1 つ又は複数のアミノ酸修飾、好ましくは、14A、14K、14Q 若しくは 14T、及び／又は 41A、及び／又は 108A 若しくは 108Q、及び／又は、

b) ヒト生殖細胞系列重鎖フレームワーク配列に対する 11 位及び／又は 88 位におけるアミノ酸修飾、好ましくは、11K、11R、11D 若しくは 11E、及び／又は 88E、88D、88R 若しくは 88K、

を含む、前記請求項の何れか一項に記載の修飾された免疫グロブリン単一可変ドメイン。

【請求項 8】

前記免疫グロブリン単一可変ドメインは、4-1BB に特異的に結合し、

好ましくは、前記免疫グロブリン単一可変ドメインは、配列番号 6 及び 15～18 の何れか 1 つのアミノ酸配列における CDR1、CDR2 及び CDR3 を含み、前記 CDR1、CDR2 及び CDR3 は、Kabatat、IMGT、Chothia、AbM 又は Contact 番号付けシステムによって定義され、

より好ましくは、前記免疫グロブリン単一可変ドメインは、それぞれ配列番号 7、8 及び 9 で示される CDR1、CDR2 及び CDR3、又はそれぞれ配列番号 7、8 及び 19 で示される CDR1、CDR2 及び CDR3 を含み、

最も好ましくは、前記 4-1BB に特異的に結合する免疫グロブリン単一可変ドメインのアミノ酸配列は、配列番号 21、30～35 の何れか 1 つで示されるか又はそれに対して少なくとも 90%、任意選択的に少なくとも 95% の同一性を有する、

前記請求項の何れか一項に記載の修飾された免疫グロブリン単一可変ドメイン。

【請求項 9】

C 末端に請求項 1～8 の何れか一項に記載の修飾された免疫グロブリン単一可変ドメインが含まれる、タンパク質又はポリペプチド。

【請求項 10】

抗体であり、好ましくは、一価、二価、多価、単一特異性、二重特異性、多重特異性抗体である、請求項 9 に記載のタンパク質又はポリペプチド。

【請求項 11】

少なくとも 2 つの異なる抗原を標的とするか、又は同じ抗原の少なくとも 2 つの異なるドメイン若しくはエピトープを標的とし、

好ましくは、前記少なくとも 2 つの抗原の中の少なくとも 1 つ又は前記同じ抗原は 4-1BB である、

請求項 9 又は 10 に記載のタンパク質又はポリペプチド。

【請求項 12】

免疫グロブリンFc 領域、好ましくは、ヒトIgG1、ヒトIgG2、ヒトIgG3、ヒトIgG4 のFc 領域をさらに含む、請求項 9～11 の何れか一項に記載のタンパク質又はポリペプチド。

【請求項 13】

前記修飾された免疫グロブリン単一可変ドメインのN末端は、直接的に又はリンカーを介して前記Fc 領域のC末端に連結される、請求項 12 に記載のタンパク質又はポリペプチド。

【請求項 14】

治療又は予防用抗体である、請求項 9～13 の何れか一項に記載のタンパク質又はポリペプチド。

【請求項 15】

請求項 1～8 の何れか一項に記載の修飾された免疫グロブリン単一可変ドメイン、請求項 9～14 の何れか一項に記載のタンパク質又はポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド。

10

20

30

40

50

【請求項 16】

請求項 15 に記載のポリヌクレオチドを包含又は発現する、ベクター。

【請求項 17】

請求項 1 ～ 8 の何れか一項に記載の修飾された免疫グロブリン単一可変ドメイン、請求項 9 ～ 14 の何れか一項に記載のタンパク質又はポリペプチド、請求項 15 に記載のポリヌクレオチド、請求項 16 に記載のベクター、及び少なくとも 1 種の薬学的に許容される賦形剤、希釈剤又はベクターを含む、医薬組成物。

【請求項 18】

対象の体内における $pre-ADA$ 又は ADA への結合が低減された薬剤を調製するための請求項 1 ～ 8 の何れか一項に記載の修飾された免疫グロブリン単一可変ドメイン、請求項 9 ～ 14 の何れか一項に記載のタンパク質又はポリペプチドの使用。

10

【請求項 19】

疾患を予防又は治療する方法であって、それを必要とする対象に予防又は治療有効量の請求項 1 ～ 8 の何れか一項に記載の修飾された免疫グロブリン単一可変ドメイン、請求項 9 ～ 14 の何れか一項に記載のタンパク質又はポリペプチドを投与することを含み、好ましくは、前記疾患は、細胞増殖性疾患、代謝性疾患、自己免疫疾患又は感染性疾患であり、より好ましくは、前記細胞増殖性疾患はがんである、方法。

【請求項 20】

免疫グロブリン単一可変ドメインの $pre-ADA$ 又は ADA への結合を低減する方法であって、前記方法は、前記免疫グロブリン単一可変ドメインの C 末端が $X_1 X_2 (X_3)_n$ 又は $VTVX_1 X_2 (X_3)_n$ で示されるアミノ酸配列の C 末端を含むようにすることを含み、そのうち、 X_1 は S、F 及び R から選ばれ、 X_2 は A、P、S から選ばれ、 X_3 は A であるか又は存在せず、 n は 0 ～ 5 の整数であり、

20

n が 0 である場合、 X_3 は存在せず、

n が 1 ～ 5 である場合、 X_3 は A であり、

好ましくは、前記修飾された免疫グロブリン単一可変ドメインは、下記の (a) ～ (e)、即ち、

(a) SAA 又は $VTVSAA$ 、

(b) FP 又は $VTVFP$ 、

(c) FPA 又は $VTVFPA$ 、

(d) RS 又は $VTVRS$ 、及び

(e) RSA 又は $VTVRSA$

30

の何れか 1 つからなる C 末端を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、2021 年 11 月 29 日に提出された中国特許出願（出願番号 CN 2021 11429892.3）に基づく優先権を主張する。

【0002】

40

本開示は、バイオ医薬分野に関し、具体的に、予備の抗薬物抗体への結合が低減された、修飾された免疫グロブリン単一可変ドメイン及び上記免疫グロブリン単一可変ドメインを含むタンパク質又はポリペプチドに関する。上記免疫グロブリン単一可変ドメインの C 末端は、アミノ酸修飾を含む。本開示は、さらに、上記免疫グロブリン単一可変ドメイン、上記免疫グロブリン単一可変ドメインを含むタンパク質又はポリペプチドの製薬的使用、医薬組成物、コード核酸及び調製方法に関する。

【背景技術】

【0003】

抗体薬物の免疫原性は一般的な現象である。前臨床試験と臨床試験に関する報告によると、市販又は開発中の種々の抗体薬物は、動物の体内で抗薬物抗体 ($anti-drug$

50

a n t i b o d y、A D A) を誘発するようになるが、産生された A D A は、抗体薬物の治療効果及び体内代謝などの特性に影響を及ぼす可能性がある。当該現象に対して、キメラ抗体の調製、抗体のヒト化改変、完全ヒト抗体の開発などを含む、回避又は緩和するための様々な技術及び方法が長年にわたって開発されてきた。

【0004】

しかし、完全ヒト抗体であっても、免疫原性の産生を完全に回避することができず、その原因の一つは、ヒトの体内に天然の免疫グロブリン又は免疫グロブリンの断片に結合可能な自己抗体、即ち、予備の抗薬物抗体 (p r e - a n t i - d r u g a n t i b o d y、p r e - A D A) が存在することである。これらの p r e - A D A は、ヒトの体内にわたって存在する様々な免疫グロブリンにエпитープ特異性を有し、エпитープは、F c 領域内のエпитープ、可変領域／C D R 領域内のエпитープ、重鎖中のヒンジ領域内のエピトープなどを含む。機能的には、現在の研究によれば、これらの p r e - A D A は、感染症、生体の免疫系の恒常性維持などに関連しているが、多くの具体的な機能がまだ十分に認識されていない。

【0005】

p r e - A D A は、内因性免疫グロブリンに加え、治療用のタンパク質又はポリペプチド (モノクローナル抗体を含む) 若しくはポリペプチド分子に結合することができる。治療用のタンパク質又はポリペプチド分子に結合する p r e - A D A は、当該分子を維持、消失、中和して、その機能と代謝に影響を与えることで、臨床応答及び生物学的利用能の変化を引き起こし、さらに過敏反応などの副作用及び特殊な現象の発生を招くことになる。

【0006】

単ドメイン抗体 (s i n g l e - d o m a i n a n t i b o d y、s d A b) は、ヒトと非ヒト霊長類に由来する I g G 分子の重鎖可変領域 (V H) の s d A b 及びラクダ／アルパカに由来する重鎖 (V H H) の s d A b を含み、臨床開発に入る前に、A D A が低減されるように、免疫原性に関連する検出及び最適化を行うことが一般的である。しかし、ヒト化改変が行われても、これらの分子は、依然として p r e - A D A に結合する可能性がある。s d A b 及びその誘導体の構造に基づく薬物分子は、臨床開発中に強い免疫関連の副作用を生じさせ、かつ副作用が p r e - A D A の結合と密接に関係していることが報告されている。

【0007】

従って、s d A b 及びその誘導体の p r e - A D A への結合程度を低減可能な改変方法を提供することは、対応する薬剤のより良い開発、その臨床的価値の活用のために非常に有益である。本開示では、s d A b の p r e - A D A への結合を低減するための一連の改変方法が試験され、かつ望ましい候補分子を得ることに成功した。それらの改変方法及びそれらにより産生された候補分子は、今後、s d A b ベースの治療用生体高分子の p r e - A D A への結合を低減し、さらに薬剤の臨床的治療効果を最適化するために広く使用されることが期待される。

【発明の概要】

【0008】

本開示は、抗薬物抗体 (a n t i - d r u g a n t i b o d y、A D A)、予備の抗薬物抗体 (p r e - A D A) への結合が低減された免疫グロブリン単一可変ドメインを提供する。また、本開示は、上記免疫グロブリン単一可変ドメイン、上記免疫グロブリン単一可変ドメインを含むタンパク質又はポリペプチド、関連製品のコード核酸、調製方法、医薬組成物、製薬的使用、検出的使用を提供する。

【0009】

免疫グロブリン単一可変ドメイン

第1の態様において、本開示の幾つかの実施形態は免疫グロブリン単一可変ドメインを提供し、それは、

$X_1 X_2 (X_3)_n$ 又は $V T V X_1 X_2 (X_3)_n$ で示されるアミノ酸配列のC末端を含

10

20

30

40

50

み、そのうち、 X_1 は S、F 及び R から選ばれ、 X_2 は A、P、S から選ばれ、 X_3 は A であるか又は存在せず、 n は 0～5 の整数であり、

n が 0 である場合、 X_3 は存在せず、

n が 1～5 である場合、 X_3 は A であり、

幾つかの具体的な実施形態において、上記修飾された免疫グロブリン単一可変ドメインは、下記の (a)～(e)、即ち、

- (a) S A A 又は V T V S A A (配列番号 37)、
- (b) F P 又は V T V F P (配列番号 38)、
- (c) F P A 又は V T V F P A (配列番号 39)、
- (d) R S 又は V T V R S (配列番号 45)、及び
- (e) R S A 又は V T V R S A (配列番号 46)

10

の何れか 1 つからなる C 末端を含む。

【0010】

幾つかの実施形態において、免疫グロブリン単一可変ドメインを提供し、その C 末端は、 $X_1 X_2 X_3$ 若しくは V T V $X_1 X_2 X_3$ で示されるアミノ酸配列を含むか又は上記アミノ酸配列で終結され、そのうち、 X_1 は S、F、R から選ばれ、 X_2 は A、P、S から選ばれ、又は X_2 は存在せず、 X_3 は A から選ばれ、又は X_3 は存在しない。

【0011】

幾つかの実施形態において、上記 $X_1 X_2 X_3$ 若しくは V T V $X_1 X_2 X_3$ は、下記の (1)～(10)、即ち、

20

- (1) S A A 若しくは V T V S A A (配列番号 37)、
- (2) F P 若しくは V T V F P (配列番号 38)、
- (3) F P A 若しくは V T V F P A (配列番号 39)、
- (4) R P 若しくは V T V R P (配列番号 40)、
- (5) R 若しくは V T V R (配列番号 41)、
- (6) R A 若しくは V T V R A (配列番号 42)、
- (7) F S 若しくは V T V F S (配列番号 43)、
- (8) S P 若しくは V T V S P (配列番号 44)、
- (9) R S 若しくは V T V R S (配列番号 45)、及び
- (10) R S A 若しくは V T V R S A (配列番号 46)

30

から選ばれる何れか 1 つである。

【0012】

幾つかの実施形態において、C 末端が下記の何れか 1 つで示されるアミノ酸配列を含むか又は上記アミノ酸配列で終結される免疫グロブリン単一可変ドメインを提供する：S A、S A S、S A S T (配列番号 47)、S A S T K (配列番号 48)、S A S T K G (配列番号 49)、S A S T K G P (配列番号 50)、S A T、S A T V (配列番号 51)、S A A S (配列番号 52)、S A A S T (配列番号 53)、S A A S T K (配列番号 54)、S A A S T K G (配列番号 55)、S A A S T K G P (配列番号 56)、F S、F S A、F S A S (配列番号 57)、F S A S T (配列番号 58)、F S A S T K (配列番号 59)、F S A S T K G (配列番号 60)、F S A S T K G P (配列番号 61)、F S T、F S T V (配列番号 62)、F P A S (配列番号 63)、F P A S T (配列番号 64)、F P A S T K (配列番号 65)、F P A S T K G (配列番号 66)、F P A S T K G P (配列番号 67)、R P A、R P A A (配列番号 68)、R P A S T (配列番号 69)、R P A S T K (配列番号 70)、R P A S T K G (配列番号 71)、R P A S T K G P (配列番号 72)、R P T、R P T V (配列番号 73)、R P A A S T (配列番号 74)、R P A A S T K (配列番号 75)、R P A A S T K G (配列番号 76)、R P A A S T K G P (配列番号 77)、R A A、R A S T (配列番号 78)、R A S T K (配列番号 79)、R A S T K G (配列番号 80)、R A S T K G P (配列番号 81)、R A A S T (配列番号 82)、R A A S T K (配列番号 83)、R A A S T K G (配列番号 84)、R A A S T K G P (配列番号 85)、R A T、R A T V (配列番号 86)、S A A G (配列番

40

50

号 87)、SAAGG (配列番号 88)、FPG、FPGG (配列番号 89)、FPAG
 (配列番号 90)、FPAGG (配列番号 91)、RAG、RAGG (配列番号 92)、
 RS、RSA、RSAA (配列番号 93)、RSAAA (配列番号 94)、RSAS (配
 列番号 95)、RSAST (配列番号 96)、RSASTK (配列番号 97)、RSAS
 TKG (配列番号 98)、RSASTKGP (配列番号 99)、RSG又はRSGG (配
 列番号 100)、VTVSA (配列番号 101)、VTVSAS (配列番号 102)、V
 TVSAST (配列番号 103)、VTVSASTK (配列番号 104)、VTVSAS
 TKG (配列番号 105)、VTVSASTKGP (配列番号 106)、VTVSAT (配
 列番号 107)、VTVSATV (配列番号 108)、VTVSAAS (配列番号 10
 9)、VTVSAAST (配列番号 110)、VTVSAASTK (配列番号 111)、
 VTVSAASTKG (配列番号 112)、VTVSAASTKGP (配列番号 113)
 、VTVSAT (配列番号 114)、VTVSATV (配列番号 115)、VTVFS (配
 列番号 116)、VTVFSAS (配列番号 117)、VTVFSAS (配列番号 118
)、VTVFSAST (配列番号 119)、VTVFSASTK (配列番号 120)、V
 TVFSASTKG (配列番号 121)、VTVFSASTKGP (配列番号 122)、
 VTVFST (配列番号 123)、VTVFSTV (配列番号 124)、VTVFPAS
 (配列番号 125)、VTVFPAST (配列番号 126)、VTVFPASTK (配列
 番号 127)、VTVFPASTKG (配列番号 128)、VTVFPASTKGP (配
 列番号 129)、VTVRPA (配列番号 130)、VTVRPAA (配列番号 131)
 、VTVRPAST (配列番号 132)、VTVRPASTK (配列番号 133)、VT
 VRPASTKG (配列番号 134)、VTVRPASTKGP (配列番号 135)、V
 TVRPAA (配列番号 136)、VTVRPT (配列番号 137)、VTVRPTV (配
 列番号 138)、VTVRPAAST (配列番号 139)、VTVRPAASTK (配
 列番号 140)、VTVRPAASTKG (配列番号 141)、VTVRPAASTKG
 P (配列番号 142)、VTVRAA (配列番号 143)、VTVRAST (配列番号 1
 44)、VTVRASTK (配列番号 145)、VTVRASTKG (配列番号 146)
 、VTVRASTKGP (配列番号 147)、VTVRAAST (配列番号 148)、V
 TVRAASTK (配列番号 149)、VTVRAASTKG (配列番号 150)、VT
 VRAASTKGP (配列番号 151)、VTVRAT (配列番号 152)、VTVRA
 TV (配列番号 153)、VTVSAAG (配列番号 154)、VTVSAAGG (配列
 番号 155)、VTVFPG (配列番号 156)、VTVFPGG (配列番号 157)、
 VTVFPAG (配列番号 158)、VTVFPAGG (配列番号 159)、VTVRA
 G (配列番号 160)、VTVRAGG (配列番号 161)、VTVRS (配列番号 16
 2)、VTVRSA (配列番号 163)、VTVRSAA (配列番号 164)、VTVR
 SAAA (配列番号 165)、VTVRSAS (配列番号 166)、VTVRSAST (配
 列番号 167)、VTVRSASTK (配列番号 168)、VTVRSASTKG (配
 列番号 169)、VTVRSASTKGP (配列番号 170)、VTVRSG (配列番号
 171)又はVTVRSGG (配列番号 172)。

【0013】

第2の態様において、本開示の幾つかの実施形態は免疫グロブリン単一可変ドメインを
 提供し、そのC末端は、 X_4X_5 若しくは $VTVX_4X_5$ で示されるアミノ酸配列を含む
 か又は上記アミノ酸配列で終結され、そのうち、

X_4 はF又はRから選ばれ、 X_5 は存在してもしなくてもよく、 X_5 は存在する場合、
 1~10個 (例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、また、例えば、1
 ~3、1~4、1~5、1~6、1~7、1~8、1~9個) のアミノ酸残基のアミノ酸
 伸長を表し、上記アミノ酸伸長は、例えば、P、PA、A、AA、AAA、AAAA (配
 列番号 173)、PAA、PAAA (配列番号 174)、AS、AST、ASTK (配列
 番号 175)、ASTKG (配列番号 176)、ASTKGP (配列番号 177)、PA
 S、PAST (配列番号 178)、PASTK (配列番号 179)、PASTKG (配列
 番号 180)、PASTKGP (配列番号 181)、PT、PTV、PG、PGG、PA

G、S、SA、SAA、SAAA（配列番号182）、SAS、SSAST（配列番号183）、SSASTK（配列番号184）、SSASTKG（配列番号185）、SSASTKGP（配列番号186）、SRSG（配列番号187）又はSRSGG（配列番号188）であり、或いは

X₄はSであり、X₅は1～10個（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、また、例えば、1～3、1～4、1～5、1～6、1～7、1～8、1～9個）のアミノ酸残基のアミノ酸伸長を表し、上記アミノ酸伸長は、例えば、A、AA、AAA、AAAA、AS、AST、ASTK、ASTKG、ASTKGP、T、TV、G、GGである。

【0014】

幾つかの実施形態において、免疫グロブリン単一可変ドメインを提供し、そのC末端は、X₄X₅若しくはVTVX₄X₅で示されるアミノ酸配列を含むか又は上記アミノ酸配列で終結され、そのうち、

X₄はF又はRから選ばれ、X₅は1～5個のアミノ酸残基のアミノ酸伸長を表し、上記アミノ酸伸長はP、PA、S、SAが好ましく、又は

X₄はSであり、X₅は1～5個のアミノ酸残基のアミノ酸伸長を表し、上記アミノ酸伸長はAAが好ましく、

例えば、上記X₄X₅若しくはVTVX₄X₅は、

SA若しくはVTVSA、

FP若しくはVTVFP、

FPA若しくはVTVFP A、

RS若しくはVTVRS、又は

RSA若しくはVTVRSA

から選ばれる何れか1つである。

【0015】

第3の態様において、本開示の幾つかの実施形態は、ヒト生殖細胞系列に由来するフレームワーク配列を含む免疫グロブリン単一可変ドメインを提供する。

【0016】

幾つかの実施形態において、それは、ヒト生殖細胞系列フレームワーク配列に対する112位に、例えば、112F、112R又は112Aから選ばれるアミノ酸修飾が存在する。

【0017】

幾つかの実施形態において、それは、ヒト生殖細胞系列フレームワーク配列に対する113位に、例えば、113P、113A又は113Sであるアミノ酸修飾が存在する。

【0018】

幾つかの実施形態において、112Fのアミノ酸修飾が存在する場合、113位に113P、113A又は113Sのアミノ酸修飾が同時に存在し、或いは、112Rのアミノ酸修飾が存在する場合、及び／又は113位に113P又は113Aのアミノ酸修飾が存在する。

【0019】

幾つかの実施形態において、上記免疫グロブリン単一可変ドメインは、112位と113位に、112Fと113P、112Fと113A、112Fと113S、112Rと113P、112Rと113A、112Rと113S、112Aと113P、112Aと113A、112Aと113S、112Sと113Pから選ばれる何れか1つのアミノ酸修飾の組み合わせが存在する。

【0020】

幾つかの実施形態において、免疫グロブリン単一可変ドメインを提供し、それは、ヒト生殖細胞系列フレームワーク配列に対する112位に112F又は112Rのアミノ酸修飾が存在し、

選択的に、さらにヒト生殖細胞系列フレームワーク配列に対する113位に113Pの

10

20

30

40

50

アミノ酸修飾が存在し、又は113位はSであり、

幾つかの具体的な実施形態において、上記ヒト生殖細胞系列フレームワーク配列に対する112位と113位には、

112Fと113P、

112Rと113S、及び

112Fと113S

の何れか1つのアミノ酸残基の組み合わせが存在する。

【0021】

第4の態様において、本開示の幾つかの実施形態は、ヒト生殖細胞系列に由来するフレームワーク配列を含む免疫グロブリン単一可変ドメインを提供する。

10

【0022】

幾つかの実施形態において、ヒト生殖細胞系列重鎖フレームワーク配列に対する112位は、ヒト生殖細胞系列重鎖フレームワーク配列に対する113位におけるアミノ酸修飾を含むSであり、上記修飾は113A、113Pから選ばれる。

【0023】

幾つかの実施形態において、113位の後に、さらに1~10個（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、また、例えば、1~3、1~4、1~5、1~6、1~7、1~8、1~9個）のアミノ酸残基のアミノ酸伸長があり、上記アミノ酸伸長は、例えば、A、AA、AAA、AAAA、AS、AST、ASTK、ASTKG、ASTKGP、TV、T、G、GGである。

20

【0024】

幾つかの実施形態において、上記C末端は、上記免疫グロブリン単一可変ドメインが上記アミノ酸修飾を含むように、アミノ酸修飾（例えば、置換又は取替、欠失、付加）により産生することができる。

【0025】

幾つかの実施形態において、上記免疫グロブリン単一可変ドメインは、以下のものをさらに含んでもよい：

1) ヒト生殖細胞系列フレームワーク配列に対する14位、41位、108位における1つ又は複数のアミノ酸修飾である。幾つかの具体的な実施形態において、14位の修飾は、14A、14K、14Q、14T（例えば、P14A、P14K、P14Q、P14T）を含むが、これらに限定されず、41位の修飾は41A（例えば、P41A）を含むが、これらに限定されず、108位の修飾は108A、108Q（例えば、L108A、L108Q）を含むが、これらに限定されない。ここにWO2013024059Aにおける関連変異が全体として組み込まれている。

30

【0026】

2) ヒト生殖細胞系列フレームワーク配列に対する11位、13位、14位、15位、82位、82a又は82b位、83位、84位、107位、108位における1つ又は複数のアミノ酸修飾である。ここにWO2012175741Aにおける関連変異が全体として組み込まれている。

【0027】

3) ヒト生殖細胞系列フレームワーク配列に対する11位及び／又は88位にあるアミノ酸修飾である。幾つかの具体的な形態において、11位の修飾は、11K、11R、11D、11E（例えば、L11K、L11R、L11D、L11E）を含むが、これらに限定されず、88位の修飾は、88E、88D、88R、A8K（例えば、A88E、A88D、A88R、A88K）を含むが、これらに限定されない。幾つかの具体的な形態において、上記免疫グロブリン単一可変ドメインは、11E／88E、11E／88D、11E／88K、11E／88R、11D／88E、11D／88D、11D／88K、11D／88R、11K／88E、11K／88D、11K／88K、11K／88R、11R／88E、11R／88D、11R／88K又は11R／88R（例えば、L11E／A88E、L11E／A88D、L11E／A88K、L11E／A88R、L11

40

50

D/A88E、L11D/A88D、L11D/A88K、L11D/A88R、L11K/A88E、L11K/A88D、L11K/A88K、L11K/A88R、L11R/A88E、L11R/A88D、L11R/A88K又はL11R/A88R)から選ばれる組み合わせを有する。ここにWO2016118733における関連変異が全体として組み込まれている。

【0028】

幾つかの実施形態において、上記ヒト生殖細胞系列フレームワーク配列は、ヒト生殖細胞系列重鎖フレームワーク配列であってもよい。

【0029】

幾つかの実施形態において、未修飾の免疫グロブリン単一可変ドメインに比べて、上記本開示に提供される修飾された免疫グロブリン単一可変ドメインは、低減された副作用、及び／又は向上した安全性を有する。例えば、低減された免疫原性を有する。

【0030】

幾つかの具体的な実施形態において、未修飾の免疫グロブリン単一可変ドメインに比べて、上記本開示に提供される修飾された免疫グロブリン単一可変ドメインは、例えば、血清に存在するpre-ADA又はADAへの結合が低減されている。低減された結合能は、当該分子が、低減された親和性 (affinity) 又は低減された親和力 (avidity) でpre-ADA (又はADA) に結合することを意味する。例えば、上記本開示に提供される修飾された免疫グロブリン単一可変ドメインのpre-ADA (又はADA) への K_D は、未修飾のsdAbのpre-ADA (又はADA) への K_D の1.5倍又はそれ以上 (例えば、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、8倍) である。また、例えば、上記本開示に提供される修飾された免疫グロブリン単一可変ドメインのpre-ADA (又はADA) への結合は、未修飾のsdAbのpre-ADA (又はADA) への結合に比べて、10%以上 (例えば、20%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、80%、90%) 低減されており、採用可能な検出方法は、この分野で通常のもの、例えば、本開示の実施例1に示されるELISAである。 K_D は平衡解離定数を指し、当業者には、 K_D の値が小さいほど、結合が強くなることが理解される。

【0031】

幾つかの実施形態において、上記本開示に提供される免疫グロブリン単一可変ドメインは、単一ドメイン抗体 (single domain antibody, sdAb) 又はナノボディであってもよい。例えば、VH sdAb又はVHHである。上記免疫グロブリン単一可変ドメインは、ヒト又は非ヒトのもの、例えば、ヒトVH sdAb又はヒト化したラクダVHHであってもよい。上記免疫グロブリン単一可変ドメイン (例えば、sdAb、ナノボディ) は、ファージディスプレイで得られたもの、又はキメラの、ラクダの、ヒト化のものであってもよい。上記免疫グロブリン単一可変ドメイン (例えば、sdAb、ナノボディ) は、配列が最適化されたもの、例えば、ヒト化、親和性成熟、T細胞エピトープの除去、抗体脱アミドの低減及び／又は抗体異性化の低下によって配列が改変されたものであってもよい。上記免疫グロブリン単一可変ドメイン (例えば、sdAb) は、翻訳後修飾されたもの、例えば、リーダー配列の切断、様々なグリコシル化とリン酸化モードにおける様々な糖部分の添加、脱アミド、酸化、ジスルフィド結合の混在 (disulfide bond scrambling)、異性化、C末端リジンの切断及びN末端グルタミンの環化が行われたものであってもよい。

【0032】

幾つかの実施形態において、上記本開示に提供される免疫グロブリン単一可変ドメインの標的抗原への結合 (例えば、一価結合) は、標的抗原のCDR領域 (例えば、CDR1、CDR2、CDR3を含む) への特異的結合を含み、上記sdAbは、例えば、約5 μ M ~ 約1 p Mの範囲内の K_D で標的抗原に結合し、また、例えば、約500 n M ~ 約10 p M、約200 n M ~ 約10 p M、約50 n M ~ 約10 p M、約10 n M ~ 約10 p Mの範囲内の K_D で上記標的抗原に結合する。

【0033】

幾つかの実施形態において、上記本開示に提供される免疫グロブリン単一可変ドメインは、その変異体を含み、上記変異体は、親免疫グロブリン単一可変ドメインに比べて1つ又は複数（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個）のアミノ酸変異を有し、上記アミノ酸変異は、保存的な取替、置換若しくは修飾、及び／又は機能に影響を及ぼさない欠失、付加であってもよく、上記アミノ酸変異はCDR領域及び／又はFR領域に発生されてもよく、上記変異体は、親免疫グロブリン単一可変ドメインに比べて、同様又は非常に類似の生物学的機能、pre-ADA又はADAへの結合親和性を有する。幾つかの具体的な実施形態において、上記変異体は、例えば、上記免疫グロブリン単一可変ドメインのアミノ酸保存的置換変異体である。

10

【0034】

幾つかの実施形態において、上記本開示の免疫グロブリン単一可変ドメインは、別の分子と融合するか又は複合し、融合物又は複合体の形態で存在する。上記別の分子は、別の免疫グロブリン単一可変ドメイン、タンパク質又はポリペプチド、ポリペプチド、抗体又はその抗原結合断片、免疫グロブリンのFc領域、PEG分子を含むが、これらに限定されない。幾つかの具体的な実施形態において、上記本開示の免疫グロブリン単一可変ドメインは上記融合物又は複合体のC末端に位置又は暴露し、例えば、当該融合物又は複合体が1つのポリペプチド鎖からなる場合、本開示の免疫グロブリン単一可変ドメインは当該ポリペプチド鎖のC末端に位置又は暴露し、当該融合物又は複合体が2つ又は複数のポリペプチド鎖で重合されてなる場合、本開示の免疫グロブリン単一可変ドメインは、少なく

20

【0035】

タンパク質又はポリペプチド

本開示は、上記本開示の免疫グロブリン単一可変ドメインの少なくとも1つ（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8個）を含むタンパク質又はポリペプチドを提供する。

【0036】

幾つかの実施形態において、上記タンパク質又はポリペプチドは、本開示の免疫グロブリン単一可変ドメインと他のポリペプチド（例えば、治療用ポリペプチド）との融合タンパク質又はポリペプチドである。

30

【0037】

幾つかの実施形態において、上記少なくとも1つの免疫グロブリン単一可変ドメインは、上記タンパク質又はポリペプチドのC末端に位置する。

【0038】

幾つかの実施形態において、上記タンパク質又はポリペプチドは、抗体（その抗原結合断片を含む）である。

【0039】

幾つかの実施形態において、上記抗体は、単一特異性抗体（モノクローナル抗体）又は二重特異性抗体（二重抗体）、多重特異性抗体（例えば、三重抗体、四重抗体）である。

【0040】

幾つかの実施形態において、上記抗体は、一価、二価、三価、四価、五価又は六価のものである。

40

【0041】

幾つかの実施形態において、上記抗体は重鎖及び軽鎖を含み、上記少なくとも1つの免疫グロブリン単一可変ドメインは、上記重鎖のC末端及び／又は上記軽鎖のC末端に位置する。

【0042】

幾つかの実施形態において、上記タンパク質又はポリペプチド（例えば、抗体）が1つのポリペプチド鎖で構成される場合、本開示の免疫グロブリン単一可変ドメインは、当該ポリペプチド鎖のC末端に位置し、上記タンパク質又はポリペプチド（例えば、抗体）が

50

2つのポリペプチド鎖で構成／重合されてなる場合、本開示の免疫グロブリン単一可変ドメインは、2つのポリペプチド鎖の1つ又は2つのC末端に位置してもよく、上記タンパク質又はポリペプチド（例えば、抗体）が3つ、4つ又はそれ以上のポリペプチド鎖で構成／重合されてなる場合、本開示の免疫グロブリン単一可変ドメインは、その中の1つ、2つ、それ以上又は全てのポリペプチド鎖のC末端に位置してもよい。本開示において、上記ポリペプチド鎖のN末端に対する他の免疫グロブリン可変ドメイン、F a b、F a b'、F (a b ') 2、F v、F a b - F v、F a b - d s F v、単ドメイン抗体（例えば、V H s d A b 又は V L s d A b 又は V H H）、s c F v、ポリペプチドの連結を排斥しない。

【0043】

幾つかの実施形態において、上記タンパク質又はポリペプチド（例えば、抗体）は免疫グロブリンF c領域を含み、例えば、上記F c領域はヒトI g G 1、I g G 2、I g G 3又はI g G 4のF c領域である。幾つかの具体的な実施形態において、上記F c領域は、エフェクター機能が増加又は減少されたものであり、上記エフェクター機能は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（A D C C）、抗体依存性細胞貪食（A D C P）又は補体依存性細胞傷害（C D C）である。幾つかの具体的な実施形態において、上記F c領域は、F c γ Rへの結合が増強又は減弱されたものである。幾つかの具体的な実施形態において、上記F c領域は、重鎖ミスマッチ防止変異を含むもの、例えば、K n o b - i n t o - h o l e（K I H）である。幾つかの具体的な実施形態において、エフェクター機能が増強された例示的なI g G 1 F c領域は、S 2 3 9 D、S 2 3 9 E、S 2 3 9 K、F 2 4 1 A、V 2 6 2 A、V 2 6 4 D、V 2 6 4 L、V 2 6 4 A、V 2 6 4 S、D 2 6 5 A、D 2 6 5 S、D 2 6 5 V、F 2 9 6 A、Y 2 9 6 A、R 3 0 1 A、I 3 3 2 Eという置換又はその任意の組み合わせを含み、例えば、S 2 3 9 D / I 3 3 2 E、S 2 3 9 D / A 3 3 0 S / I 3 3 2 E、S 2 3 9 D / A 3 3 0 L / I 3 3 2 E、S 2 9 8 A / D 3 3 3 A / K 3 3 4 A、P 2 4 7 I / A 3 3 9 D、P 2 4 7 I / A 3 3 9 Q、D 2 8 0 H / K 2 9 0 S、D 2 8 0 H / K 2 9 0 S / S 2 9 8 D、D 2 8 0 H / K 2 9 0 S / S 2 9 8 V、F 2 4 3 L / R 2 9 2 P / Y 3 0 0 L、F 2 4 3 L / R 2 9 2 P / Y 3 0 0 L / P 3 9 6 L、F 2 4 3 L / R 2 9 2 P / Y 3 0 0 L / V 3 0 5 I / P 3 9 6 L、G 2 3 6 A / S 2 3 9 D / I 3 3 2 E、K 3 2 6 A / E 3 3 3 A、K 3 2 6 W / E 3 3 3 S、K 2 9 0 E / S 2 9 8 G / T 2 9 9 A、K 2 9 0 N / S 2 9 8 G / T 2 9 9 A、K 2 9 0 E / S 2 9 8 G / T 2 9 9 A / K 3 2 6 E 又は K 2 9 0 N / S 2 9 8 G / T 2 9 9 A / K 3 2 6 E である。幾つかの実施形態において、エフェクター機能が低減された例示的なI g G F c領域は、I g G 1上のL 2 3 4 A / L 2 3 5 A、L 2 3 4 F / L 2 3 5 E / D 2 6 5 A、又はL 2 3 4 A / L 2 3 5 A / G 2 3 7 A / P 2 3 8 S / H 2 6 8 A / A 3 3 0 S / P 3 3 1 S、K 2 1 4 T / E 2 3 3 P / L 2 3 4 V / L 2 3 5 A / G 2 3 6 欠失 / A 3 2 7 G / P 3 3 1 A / D 3 6 5 E / L 3 5 8 M、I g G 2上のV 2 3 4 A / G 2 3 7 A、V 2 3 4 A / G 2 3 7 A / P 2 3 8 S / H 2 6 8 A / V 3 0 9 L / A 3 3 0 S / P 3 3 1 S、H 2 6 8 Q / V 3 0 9 L / A 3 3 0 S / P 3 3 1 S、S 2 6 7 E / L 3 2 8 F、I g G 4上のF 2 3 4 A / L 2 3 5 A、S 2 2 8 P / F 2 3 4 A / L 2 3 5 A、S 2 2 8 P / F 2 3 4 A / L 2 3 5 A / G 2 3 6 欠失 / G 2 3 7 A / P 2 3 8 S、S 2 2 8 P / F 2 3 4 A / L 2 3 5 A / G 2 3 7 A / P 2 3 8 S、I g G 1、I g G 2、I g G 3又はI g G 4上のN 2 9 7 Aという置換を含み、さらに、ハイブリッドI g G 2 / 4 F cドメイン、例えば、I g G 2由来の残基117～260及びI g G 4由来の残基261～447を有するF cを使用してもよい。

【0044】

幾つかの実施形態において、上記タンパク質又はポリペプチド（例えば、抗体）では、本開示の免疫グロブリン可変ドメインのN末端がF c領域（例えば、そのC H 3）のC末端に直接的に又はリンカー（l i n k e r）を介して連結される。幾つかの実施形態において、上記抗体では、本開示の免疫グロブリン可変ドメインのN末端が抗体の軽鎖（例えば、そのC L）のC末端に直接的に又はリンカー（l i n k e r）を介して連結される。

本開示において、重鎖及び／又は軽鎖のN末端に対する他の免疫グロブリン可変ドメイン、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、Fab-Fv、Fab-dsFv、単ドメイン抗体（例えば、VHsdAb又はVLsdAb又はVHH）、scFv、ポリペプチドの連結を排斥しない。幾つかの実施形態において、上記リンカーは通常のものであり、例えば、(G_mS_n)_h又は(GNGT)_h又は(YNGT)_h又は(EPKSS)_hを含むが、これらに限定されず、そのうち、m、nはそれぞれ独立的に1～8の整数（例えば、1、2、3、4、5、6、7又は8）から選ばれ、hは独立的に1～20の整数（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20）から選ばれる。例えば、リンカーは、G₄S、GS、GAP、(G₄S)₂、(G₄S)₃、(G₄S)₄、(G₄S)₅又はASGSである。

10

【0045】

幾つかの実施形態において、上記タンパク質又はポリペプチド（例えば、抗体）は、少なくとも2つ（例えば、2、3、4、5、6、7、8個）の抗原結合ドメインを含み、幾つかの具体的な形態において、上記少なくとも2つ（例えば、2、3、4、5、6、7、8個）の抗原結合ドメインは、2つの異なる抗原を標的とするか、又は複数（例えば、3、4個）の異なる抗原を標的とし、或いは同じ抗原の2つ又は複数（例えば、3、4、5、6個）の異なるドメイン又はエピトープを標的とする。

【0046】

幾つかの実施形態において、上記抗原は、PD-1、PD-L1、CTLA4、TIGIT、CD40、TNFα、TNFR（TNFR1を含む）、VEGF、IL-1R、IL-6R、IL-4、IL-5、IL-13、DC-SIGN、ASGPR、HSA、TGFβR2及び4-1BBを含むが、これらに限定されない。

20

【0047】

幾つかの実施形態において、上記タンパク質又はポリペプチド（例えば、抗体）は、疾患／病状を治療又は予防するための治療又は予防用のものであり、上記疾患／病状は、細胞増殖性疾患（例えば、腫瘍）、代謝性疾患、自己免疫疾患又は感染性疾患を含むが、これらに限定されない。

【0048】

幾つかの実施形態において、上記タンパク質又はポリペプチド（例えば、抗体）は、アルブミン又はポリペプチド（HSA）、HSA結合ドメイン（例えば、抗HSA抗体、抗HSA単ドメイン抗体）、PEG分子又は免疫グロブリンFc領域などの半減期延長ドメインをさらに含む。

30

【0049】

本開示は、上記本開示に係るsdAbを含み、又は上記本開示に係るタンパク質又はポリペプチドを含む複合体又は誘導体をさらに提供する。上記複合体は、例えば、任意の検出可能な標識を含んでもよい。

【0050】

例示的な免疫グロブリン単一可変ドメイン

上記本開示に係る免疫グロブリン単一可変ドメインの例として、本開示は、4-1BBに特異的に結合する免疫グロブリン単一可変ドメインを含む4-1BBタンパク質又はポリペプチドをさらに提供する。

40

【0051】

幾つかの実施形態において、上記4-1BBに特異的に結合する免疫グロブリン単一可変ドメインは、CDR1、CDR2、CDR3を含み、上記CDR1、CDR2、CDR3は、配列番号6、15～18の何れか1つで示されるアミノ酸配列におけるCDR1、CDR2及びCDR3であり、上記CDR1、CDR2及びCDR3は、Kabatt、IMGT、Chothia、AbM又はContact番号付けシステムによって定義される。

【0052】

50

幾つかの実施形態において、上記 4-1 B B に特異的に結合する免疫グロブリン単一可変ドメインは、上記 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 の何れか 1 つ又はその任意の組み合わせを含む。

【0053】

幾つかの実施形態において、上記 4-1 B B に特異的に結合する免疫グロブリン単一可変ドメインの C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号 7、8、9 で示され、又は配列番号 7、8、18 で示される。それは、K a b a t 番号付けシステムによって定義される C D R である。

【0054】

幾つかの実施形態において、上記 4-1 B B に特異的に結合する免疫グロブリン単一可変ドメインは、ヒト化、親和性成熟、T 細胞エпитープ (T C E) の除去/低減、抗体脱アミドの低減及び/又は抗体異性化の低下によって改変されたものである。幾つかの具体的な実施形態において、上記ヒト化に使用されるヒト生殖細胞系列テンプレートの重鎖フレームワーク領域 (F R) は、I G H V 3-64*04、I G H V 3-23*03 及び/又は I G H V 3-74*01 に由来する。幾つかの実施形態において、F R 1 は I G H V 3-64*04、F R 2 は I G H V 3-23*03、F R 3 は I G H V 3-74*01 に由来する。

【0055】

幾つかの実施形態において、上記 4-1 B B に特異的に結合する免疫グロブリン単一可変ドメインのアミノ酸配列は、それぞれ配列番号 6、15~18、20~35 の何れか 1 つで示されるか、又はそれに対して少なくとも 90%、少なくとも 95% の同一性を有する。

【0056】

本開示において、「少なくとも 80% の (配列) 同一性」は、少なくとも 80%、少なくとも 81%、少なくとも 82%、少なくとも 83%、少なくとも 84%、少なくとも 85%、少なくとも 86%、少なくとも 87%、少なくとも 88%、少なくとも 89%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99% 又は 100% の (配列) 同一性をカバーし、「少なくとも 90% の (配列) 同一性」は、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99% 又は 100% の (配列) 同一性をカバーし、「少なくとも 95% の (配列) 同一性」は、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99% 又は 100% の (配列) 同一性をカバーする。

【0057】

幾つかの実施形態において、アミノ酸配列が配列番号 21、30~35 の何れか 1 つで示され、配列番号 20、22~29 の何れか 1 つで示される 4-1 B B に特異的に結合する s d A b に比べて p r e -A D A (又は A D A) への結合が低減された、4-1 B B に特異的に結合する免疫グロブリン単一可変ドメインを提供する。

【0058】

幾つかの実施形態において、上記 4-1 B B に特異的に結合する免疫グロブリン単一可変ドメインを含むタンパク質又はポリペプチド (抗体を含む) を提供する。上記 4-1 B B に特異的に結合する免疫グロブリン単一可変ドメインは、1 つ又は複数 (例えば、1、2、3、4、5、6 個) であってもよく、同一でも異なってもよい。上記抗体は、例えば、単一、二重又は多重特異性抗体である。

【0059】

幾つかの実施形態において、上記タンパク質又はポリペプチド (抗体を含む) は、ヒト免疫グロブリン F c 領域をさらに含み、例えば、上記 F c 領域はヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3 又は I g G 4 の F c 領域である。幾つかの実施形態において、上記 F c 領域は

10

20

30

40

50

、エフェクター機能が低下した、例えば、A D C C、A D C P、C D Cが低減された F c 領域である。幾つかの実施形態において、上記 F c 領域は、配列番号 10～12 の何れか 1 つで示されるか、又はそれに対して少なくとも 80 %、少なくとも 90 % の配列同一性を有する。

【0060】

幾つかの実施形態において、上記 4-1 B B に特異的に結合する免疫グロブリン単一可変ドメインは、以下から選ばれる少なくとも 1 つの活性を有する：

- (a) $\leq 10^{-7}$ の K_D 値でヒト 4-1 B B 又はそのエピトープに結合すること、
- (b) F c γ R I I b (即ち、C D 3 2 b) で架橋されていない場合、4-1 B B シグナル伝達経路を弱く活性化するか又は活性化せず、例えば、100 n の抗体濃度で、F c γ R I I b で架橋されていない場合の活性化の程度が、F c γ R I I b で架橋された場合の飽和抗体濃度条件下での活性の 10 % 以下であること、
- (c) F c γ R I I b で架橋された場合、4-1 B B シグナル伝達経路を比較的強く活性化するか又は強く活性化し、例えば、E C 50 が 1 n M 未満であること、
- (d) T 細胞を活性化し、及び／又は T 細胞の増殖を促進すること、及び
- (e) 腫瘍の増殖を阻害すること。

【0061】

そのうち、(b)、(c) における 4-1 B B シグナル伝達経路の活性化検出については、例えば、実施例 5 の 4-1 B B / N F - κ B ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイが参照される。

【0062】

幾つかの実施形態において、上記 4-1 B B に特異的に結合する免疫グロブリン単一可変ドメイン結合 4-1 B B の K_D 値は、 $\leq 1 \times 10^{-7}$ M、例えば、 $\leq 1 \times 10^{-8}$ M、又は $\leq 1 \times 10^{-9}$ M、又は $\leq 1 \times 10^{-10}$ M であってもよい。

【0063】

幾つかの実施形態において、上記 4-1 B B に特異的に結合する免疫グロブリン単一可変ドメインは、腫瘍の増殖を少なくとも約 10 %、例えば、少なくとも約 20 %、約 30 %、約 40 %、約 50 %、約 60 %、約 70 %、約 80 % 阻害することができる。

【0064】

幾つかの実施形態において、上記本開示に係る 4-1 B B に特異的に結合する s d A b と同じエピトープに結合するか又は競合的に結合し、或いは、上記本開示に係る 4-1 B B に特異的に結合する s d A b の 4-1 B B への結合を遮断し、或いは、4-1 B B への結合が上記本開示に係る 4-1 B B に特異的に結合する s d A b により遮断されるタンパク質又はポリペプチド (例えば、抗体) を提供する。

【0065】

ポリヌクレオチド及びベクター

上記本開示に係る免疫グロブリン単一可変ドメイン、上記免疫グロブリン単一可変ドメインを含むタンパク質又はポリペプチド (抗体を含む) をコードする核酸分子を提供する。上記核酸は、RNA、DNA 又は cDNA であってもよい。本開示の幾つかの実施形態によれば、上記核酸は、基本的に単離した核酸である。

【0066】

本開示に係る核酸は、ベクターの形態であってもよく、ベクター中に存在してもよく、及び／又はベクターの一部であってもよく、当該ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、YAC 又はウイルスベクターである。ベクターは、特に発現ベクターであってもよく、即ち、PD-1 結合タンパク質又はポリペプチドのインビトロ及び／又はインビボで (即ち、適切な宿主細胞、宿主有機体及び／又は発現系で) の発現を可能にするベクターであってもよい。当該発現ベクターは一般的に、少なくとも 1 つの本開示の核酸を含み、1 つ又は複数の適切な発現調節要素 (例えば、プロモーター、エンハンサー、ターミネーターなど) に操作可能に連結される。特定の宿主における発現に対して上記要素及びその配列を選択することは、当業者の常識である。本開示の s d A b、上記 s d A b を含むタ

10

20

30

40

50

ンパク質又はポリペプチド（抗体を含む）の発現に有用又は必要な調節要素及び他の要素は、例えば、プロモーター、エンハンサー、ターミネーター、組み込み因子、選択マーカー、リーダー配列、レポーター遺伝子である。

【0067】

本開示に係る核酸は、本開示に係るポリペプチドのアミノ酸配列についての情報に基づき、既知の方法（例えば、自動DNA合成及び／又は組換えDNA技術）により調製又は取得されてもよく、及び／又は適切な天然源から単離されてもよい。

【0068】

宿主細胞

上記本開示に係る免疫グロブリン単一可変ドメイン、上記免疫グロブリン単一可変ドメインを含むタンパク質又はポリペプチド（抗体を含む）を発現するか又は発現できる、及び／又は本開示の核酸若しくはベクターを含む組換え宿主細胞を提供する。幾つかの実施形態において、宿主細胞は、細菌細胞、真菌細胞又は哺乳動物細胞である。

【0069】

細菌細胞は、例えば、グラム陰性菌株（例えば、大腸菌（*Escherichia coli*）菌株、プロテウス属（*Proteus*）菌株及びシュードモナス属（*Pseudomonas*）菌株）及びグラム陽性菌株（例えば、バシラス属（*Bacillus*）菌株、ストレプトミセス属（*Streptomyces*）菌株、ブドウ球菌属（*Staphylococcus*）菌株及びラクトコッカス属（*Lactococcus*）菌株）の細胞を含む。

【0070】

真菌細胞は、例えば、トリコデルマ属（*Trichoderma*）、アカパンカビ属（*Neurospora*）及びアスペルギルス属（*Aspergillus*）の種の細胞を含み、又はサッカロミセス属（*Saccharomyces*）（例えば、サッカロミセスセレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*））、シゾサッカロミセス属（*Schizosaccharomyces*）（例えば、シゾサッカロミセスポンベ（*Schizosaccharomyces pombe*））、ピキア属（*Pichia*）（例えば、ピキアパストリス（*Pichia pastoris*）とピキアメタノリカ（*Pichia methanolica*））及びハンゼヌラ属（*Hansenula*）の種の細胞を含む。

【0071】

哺乳動物細胞は、例えば、HEK293細胞、CHO細胞、BHK細胞、HeLa細胞、COS細胞などを含む。

【0072】

しかしながら、本開示は、両生類細胞、昆虫細胞、植物細胞及びこの分野における異種タンパク質又はポリペプチドを発現するための任意の他の細胞を使用してもよい。

【0073】

調製方法

上記本開示に係る免疫グロブリン単一可変ドメイン、上記免疫グロブリン単一可変ドメインを含むタンパク質又はポリペプチド（抗体を含む）を調製するための方法であって、上記の宿主細胞において上記目的タンパク質又はポリペプチドを発現し、かつ当該宿主細胞から目的タンパク質又はポリペプチドを単離する方法を提供する。選択的に、精製工程を含んでもよく、例えば、調整された緩衝液を含むA又はG Sepharose FFカラムで精製し、非特異的に結合した成分を洗い流し、さらにPH勾配法により、結合した抗体を溶離し、SDS-PAGEにより検出して収集する。選択的に、通常の方法によりろ過して濃縮する。可溶性の混合物及びポリマーは、分子ふるい、イオン交換などの通常の方法により除去されてもよい。得られた生成物は、直ちに-70℃などで冷凍し、又は凍結乾燥しなければならない。

【0074】

本開示に係る工学的な抗体又は抗原結合断片は、通常の方法により調製・精製すること

10

20

30

40

50

ができる。例えば、重鎖及び軽鎖をコードするcDNA配列は、クローニングして発現ベクターに組換えることができる。組換えた免疫グロブリン発現ベクターは、CHO細胞を安定的にトランスフェクションすることができる。哺乳動物類の発現系は、特にFc領域の高度に保存的なN末端において、抗体のグリコシル化を引き起こすことになる。ヒト抗原に特異的に結合する抗体を発現することにより、安定的なクローンが得られる。陽性のクローンは、バイオリアクターの無血清培地において拡大培養することで、抗体を産生する。抗体が分泌された培養液は、通常の技術により精製して収集することができる。抗体は、通常の方法によりろ過して濃縮することができる。可溶性の混合物及びポリマーは、分子ふるい、イオン交換などの通常の方法により除去されてもよい。

【0075】

10

組成物

上記本開示に係る免疫グロブリン単一可変ドメイン、上記免疫グロブリン単一可変ドメインを含むタンパク質又はポリペプチド（抗体を含む）を含む組成物を提供する。例えば、疾患（例えば、がん）への治療、緩和又は予防有効量の本開示に係る免疫グロブリン単一可変ドメイン、上記免疫グロブリン単一可変ドメインを含むタンパク質又はポリペプチド（抗体を含む）、及び少なくとも1種の薬学的に許容される賦形剤、希釈剤又はベクターを含む医薬組成物を提供する。

【0076】

幾つかの具体的な実施形態において、上記医薬組成物の単位用量には、本開示に係る免疫グロブリン単一可変ドメイン、上記免疫グロブリン単一可変ドメインを含むタンパク質又はポリペプチド（抗体を含む）が0.01～99重量%含まれてもよく、或いは医薬組成物の単位用量における本開示に係る免疫グロブリン単一可変ドメイン、上記免疫グロブリン単一可変ドメインを含むタンパク質又はポリペプチド（抗体を含む）の含有量は0.1～2000mgであり、幾つかの具体的な実施形態では1～1000mgである。

20

【0077】

幾つかの実施形態において、上記本開示に係る免疫グロブリン単一可変ドメイン、上記免疫グロブリン単一可変ドメインを含むタンパク質又はポリペプチド（抗体を含む）を含む製品又は生産品を提供する。選択的に、製品は、容器及びラベルを含む。容器は、例えば、バイアル、注射器及び試験管である。容器には、病状（例えば、がん、自己免疫疾患、代謝性疾患）の治療に有効な組成物が収容される。容器における、又は容器に接続されるラベルは、上記組成物が、選択された病状（例えば、がん、自己免疫疾患、代謝性疾患）の治療に用いられることを示す。

30

【0078】

幾つかの実施形態において、上記本開示に係る免疫グロブリン単一可変ドメイン、上記免疫グロブリン単一可変ドメインを含むタンパク質又はポリペプチド（抗体を含む）を含む医薬組成物を提供する。上記免疫グロブリン単一可変ドメイン、上記免疫グロブリン単一可変ドメインを含むタンパク質又はポリペプチド（抗体を含む）は、疾患（例えば、がん、自己免疫疾患、代謝性疾患）を治療又は緩和する有効量であってもよく、医薬組成物には、少なくとも1種の薬学的に許容される賦形剤、希釈剤又はベクターがさらに含まれてもよい。

40

【0079】

上記免疫グロブリン単一可変ドメインが4-1BBに特異的に結合する免疫グロブリン単一可変ドメインである場合、上記病状は、例えば、肺がん、前立腺がん、乳がん、頭頸部がん、食道がん、胃がん、結腸がん、直腸がん、膀胱がん、子宮頸がん、子宮がん、卵巣がん、肝がん、黒色腫、腎がん、扁平上皮がん、血液系がん又はその任意の組み合わせから選ばれるがんなどである。

【0080】

治療方法及び製薬的使用

上記本開示に係る免疫グロブリン単一可変ドメイン、上記免疫グロブリン単一可変ドメインを含むタンパク質又はポリペプチド（抗体を含む）及びその医薬組成物を疾患又は病

50

状の治療・緩和・予防・診断に使用する方法を提供する。

【0081】

幾つかの実施形態において、疾患を改善、緩和、治療又は予防する方法であって、対象に改善、緩和、治療又は予防有効量の本開示に係る免疫グロブリン単一可変ドメイン、上記免疫グロブリン単一可変ドメインを含むタンパク質又はポリペプチド（抗体を含む）及びその医薬組成物を投与することを含む方法を提供する。

【0082】

幾つかの実施形態において、疾患を改善、緩和、治療又は予防する薬剤の調製に用いられる本開示に係る免疫グロブリン単一可変ドメイン、上記免疫グロブリン単一可変ドメインを含むタンパク質又はポリペプチド（抗体を含む）及びその医薬組成物の使用を提供する。

10

【0083】

幾つかの実施形態において、上記疾患は、増殖性病状、又は制御不能な細胞増殖を特徴とする任意の他の疾患や病状である（例えば、がんであり、本開示において、がんは腫瘍は入れ替えて使用されてもよい）。幾つかの実施形態において、上記がんは固形腫瘍又は血液腫瘍である。幾つかの実施形態において、上記がんは進行性又は転移性である。幾つかの実施形態において、上記がんは、肺がん、前立腺がん、乳がん、頭頸部がん、食道がん、胃がん、結腸がん、直腸がん、膀胱がん、子宮頸がん、子宮がん、卵巣がん、肝がん、黒色腫、腎がん、扁平上皮がん、血液系がん又はその任意の組み合わせから選ばれる。

【0084】

幾つかの実施形態において、対象の感染症又は自己免疫疾患を治療又は予防する方法であって、上記対象に治療又は予防有効量の本開示に係る免疫グロブリン単一可変ドメイン、上記免疫グロブリン単一可変ドメインを含むタンパク質又はポリペプチド（抗体を含む）及びその医薬組成物を投与することを含む方法を提供する。幾つかの実施形態において、上記感染症は、ウイルス特異的T細胞応答の異なる程度の機能障害を特徴とする、HIV、HCV、HBVなどの病原体感染である。幾つかの実施形態において、上記自己免疫疾患は、全身性エリテマトーデス、重症筋無力症、多発性硬化症、インスリン依存型糖尿病、クローン病、関節リウマチ、多関節型若年性関節リウマチ及び乾癬性関節炎から選ばれる。

20

【0085】

検出

インビボ又はインビトロで使用可能な本開示に係る免疫グロブリン単一可変ドメイン、上記免疫グロブリン単一可変ドメインを含むタンパク質又はポリペプチド（抗体を含む）の検出的使用を提供する。

30

【0086】

さらに、上記免疫グロブリン単一可変ドメイン、上記免疫グロブリン単一可変ドメインを含むタンパク質又はポリペプチド（抗体を含む）による副作用（免疫原性、ADA又はpre-ADAへの結合を含む）を検出する方法、システム又は装置を提供し、それは、本開示に係る免疫グロブリン単一可変ドメイン、上記免疫グロブリン単一可変ドメインを含むタンパク質又はポリペプチド（抗体を含む）により試料、例えば、対象からの血清試料を処理することを含み、上記対象は、疾患の治療又は予防のために本開示に係る免疫グロブリン単一可変ドメイン、上記免疫グロブリン単一可変ドメインを含むタンパク質又はポリペプチド（抗体を含む）が投与される対象であり得る。

40

【0087】

幾つかの実施形態において、本開示に係る免疫グロブリン単一可変ドメイン、上記免疫グロブリン単一可変ドメインを含むタンパク質又はポリペプチド（抗体を含む）は、それがタンパク質又はポリペプチド干渉を発生するか否かを予測する方法に使用される。例えば、上記免疫グロブリン単一可変ドメイン、上記免疫グロブリン単一可変ドメインを含むタンパク質又はポリペプチド（抗体を含む）には、タンパク質若しくはポリペプチド干渉が発生されるか、或いはヒト血液若しくは血清にある干渉因子（例えば、pre-ADA

50

）に結合する高い又は増加したリスクがあるか否かを確認することに使用される。

【0088】

幾つかの実施形態において、免疫グロブリン単一可変ドメイン、上記免疫グロブリン単一可変ドメインを含むタンパク質又はポリペプチド（抗体を含む）が免疫アッセイ（例えば、ADA又はpre-ADAアッセイ）においてタンパク質又はポリペプチド干渉を発生するか否かを測定するための方法を提供し、上記方法は、

（i）上記任意の免疫グロブリン単一可変ドメイン、上記免疫グロブリン単一可変ドメインを含むタンパク質又はポリペプチド（抗体を含む）を、ヒト対象から得られ、かつC末端がアミノ酸配列VTVSSで終結される免疫グロブリン単一可変ドメイン（本開示における「未修飾の免疫グロブリン単一可変ドメイン」）のC末端を認識及び／又は結合するその能力によって選択／単離された抗体と接触させるステップと、

（ii）上記任意の免疫グロブリン単一可変ドメイン、上記免疫グロブリン単一可変ドメインを含むタンパク質又はポリペプチド（抗体を含む）が上記免疫アッセイにおいて上記抗体に結合するか否かを確認するステップと、
を少なくとも含む免疫アッセイを行うことを含む。ステップ（ii）における上記抗体への結合は、上記任意の免疫グロブリン単一可変ドメイン、上記免疫グロブリン単一可変ドメインを含むタンパク質又はポリペプチド（抗体を含む）がそのようなタンパク質又はポリペプチド干渉を発生することができる（或いは発生するリスクが高い又は増加される）ことを意味する。

【0089】

幾つかの実施形態において、免疫グロブリン単一可変ドメイン、免疫グロブリン単一可変ドメインを含むタンパク質若しくはポリペプチド又は抗体が免疫アッセイにおいてタンパク質又はポリペプチド干渉を発生する程度を予測するための方法を提供し、上記方法は、

（i）本開示に係る任意の免疫グロブリン単一可変ドメイン、上記免疫グロブリン単一可変ドメインを含むタンパク質又はポリペプチド（抗体を含む）を、ヒト対象から得られ、かつそのC末端がアミノ酸配列VTVSSで終結される免疫グロブリン単一可変ドメインのC末端を認識及び／又は結合するその能力によって選択／単離された抗体と接触させるステップと、

（ii）上記免疫グロブリン単一可変ドメイン、上記免疫グロブリン単一可変ドメインを含むタンパク質又はポリペプチド（抗体を含む）が上記免疫アッセイにおいて上記抗体に結合するか否か、及び結合程度の強さ（幾つかの実施形態では、上記結合程度の強さは、同一の実験又は同等の検出条件下で、C末端がアミノ酸配列VTVSSで終結される免疫グロブリン単一可変ドメインの上記抗体への結合程度と比較される）を確認するステップと、
を少なくとも含む免疫アッセイを行うことを含む、

ここで、ステップ（ii）において結合が発生され、又は結合程度が強いことは、上記免疫グロブリン単一可変ドメイン、上記免疫グロブリン単一可変ドメインを含むタンパク質又はポリペプチド（抗体を含む）がタンパク質又はポリペプチド干渉を発生することができ、或いはタンパク質又はポリペプチド干渉を発生するリスクが高い又は増加されることを意味し、ステップ（ii）において結合が発生されず、又は結合程度が弱いことは、上記免疫グロブリン単一可変ドメイン、上記免疫グロブリン単一可変ドメインを含むタンパク質又はポリペプチド（抗体を含む）がタンパク質又はポリペプチド干渉を発生せず、或いはタンパク質又はポリペプチド干渉を発生するリスクが低いことを意味し、例えば、上記免疫アッセイはELISAアッセイである。

【0090】

幾つかの具体的な実施形態において、上記抗体はポリクローナル抗体である。幾つかの形態において、上記抗体は、対象から得られ、かつポリクローナル抗体を得る原材料として適用される生体試料から、少なくとも1つの免疫親和性クロマトグラフィーステップと、任意選択的に、上記試料からポリクローナル抗体を単離及び／又は精製するための1つ

又は複数の他のステップとを含む方法により取得可能なポリクローナル抗体であり、上記免疫親和性クロマトグラフィーでは、免疫グロブリン単一可変ドメイン、上記免疫グロブリン単一可変ドメインを含むタンパク質又はポリペプチド（抗体を含む）を親和性構造部分又は抗原として使用し、ここで、上記親和性構造部分又は抗原として使用される上記免疫グロブリン単一可変ドメインは、そのC末端がアミノ酸配列V T V S Sで終結される。

【0091】

幾つかの実施形態において、そのC末端が配列V T V S Sで終結される免疫グロブリン単一可変ドメイン（即ち、本開示における「未修飾の免疫グロブリン単一可変ドメイン」）、上記s d A bを含むタンパク質又はポリペプチド（抗体を含む）が抗薬物抗体アッセイにおいてタンパク質又はポリペプチド干渉を発生する傾向を低減するための方法を提供し、或いは免疫グロブリン単一可変ドメイン、上記s d A bを含むタンパク質又はポリペプチド（抗体を含む）がタンパク質又はポリペプチド干渉を発生する傾向を低減するためのC末端修飾の使用であって、その末端に配列V T V S Sがある免疫グロブリン単一可変ドメイン（即ち、本開示における「未修飾の免疫グロブリン単一可変ドメイン」）に比べて、タンパク質又はポリペプチド干渉を発生する傾向が低減されるか又は基本的に低減されるように、上記本開示に提供される方法により免疫グロブリン単一可変ドメインのC末端を修飾することを含む使用を提供する。

【0092】

幾つかの実施形態において、インビトロ検出方法、システム又は装置は、例えば、

（i）試料を本開示に係る免疫グロブリン単一可変ドメイン、上記免疫グロブリン単一可変ドメインを含むタンパク質又はポリペプチド（抗体を含む）と接触させること、

（i i）任意の免疫グロブリン単一可変ドメイン、上記免疫グロブリン単一可変ドメインを含むタンパク質又はポリペプチド（抗体を含む）と試料との間で形成された複合物を検出すること、及び／又は

（i i i）参照試料（例えば、対照試料）を任意の免疫グロブリン単一可変ドメイン、上記免疫グロブリン単一可変ドメインを含むタンパク質又はポリペプチド（抗体を含む）と接触させること、及び

（i v）参照試料と比較することにより、複合物形成の程度を確認することであって、対照試料又は対象中と比較して、試料又は対象における複合物に形成された変化（例えば、統計的に有意な変化）が、試料における上記任意の免疫グロブリン単一可変ドメイン、上記免疫グロブリン単一可変ドメインを含むタンパク質又はポリペプチド（抗体を含む）の、試料からの対象のインビボでのp r e - A D A（又はA D A）への結合程度を示すこと、

を含み得る。

【0093】

検出は、複合物を形成する位置又は時間を確認することを含んでもよい。免疫グロブリン単一可変ドメイン、上記免疫グロブリン単一可変ドメインを含むタンパク質又はポリペプチド（抗体を含む）も、検出可能な物質で標識し、上記標識により検出が達成される。好適な検出可能な物質は、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質及び放射性物質を含む。例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ（E L I S A）、ラジオイムノアッセイ（R I A）又は組織免疫組織化学などの通常の検出アッセイを使用することができる。検出の目的のために、本開示に係るs d A b、上記免疫グロブリン単一可変ドメインを含むタンパク質又はポリペプチド（抗体を含む）は、フルオロフォア発色団で標識することができる。

【0094】

幾つかの実施形態において、試薬キットをさらに提供し、上記試薬キットは、上記結合タンパク質又はポリペプチド、ポリヌクレオチドを含み、さらに診断マニュアルを含んでもよい。試薬キットは、少なくとも1つの付加的な試薬、例えば、マーカーや付加的な診断剤をさらに含んでもよい。インビボでの使用に対して、抗体は、医薬組成物として調製することができる。

【0095】

本開示は、WO2012175741Aの検出方法を全体として援用している。

【0096】

用語の定義

本開示がさらに容易に理解されるように、以下、幾つかの技術・科学用語を具体的に定義する。本開示で別途明確に定義しない限り、本開示に使用される他の技術・科学用語の全ては、当業者に通常理解されている意味を持っている。

【0097】

文脈で特に明記のない限り、明細書及び特許請求の範囲の全体において、「含む」、「有する」、「含有する」などの言葉は、排他的又は網羅的な意味ではなく、包括的な意味、即ち、「含むが、これらに限定されない」という意味を持っていると理解すべきである。

10

【0098】

本開示に使用されるアミノ酸の3文字コードと1文字コードは、J. biol. chem, 243, p 3558 (1968)に記載された通りである。

【0099】

「4-1BBタンパク質又はポリペプチド」又は「4-1BB」は、CD137、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー9とも呼ばれ、TNF受容体スーパーファミリー(TNFRSF)のメンバーであり、CD8⁺及びCD4⁺T細胞、制御性T細胞(Tregs)、NK細胞及びNKT細胞、B細胞及び好中球などの細胞表面に発現される共刺激分子である。4-1BBは共刺激分子に属し、免疫細胞が活性化された後に発現される。ヒト4-1BBタンパク質又はポリペプチドは、NCBI登録番号がNP_001552.2である。本開示において、「4-1BB」は、本開示に記載される既知又は野生型の4-1BB、及び任意の天然に産生されたスプライス変異体、アミノ酸変異体又はアイソフォームを含む(が、これらに限定されない)ようなタンパク質又はポリペプチド若しくはその断片、変異体の何れかを任意選択的に含んでもよい。

20

【0100】

「抗体」又は「免疫グロブリン」は、所望の抗原結合活性を示せば、最も広い意味で使用され、種々の抗体構造をカバーしており、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、単一特異性抗体、多重特異性抗体(例えば、二重特異性抗体)、全長抗体及び抗体断片(又は抗原結合断片、又は抗原結合部分)を含むが、これらに限定されない。「抗原結合断片」は、単鎖抗体(即ち、全長重鎖と軽鎖)、Fab、修飾されたFab、Fab'、修飾されたFab'、F(ab')₂、Fv、Fab-Fv、Fab-dsFv、単一ドメイン抗体(例えば、VH/VL又はVHH)、scFv、二価又は三価又は四価抗体、Bis-scFv、diabody、tribody、triabody、tetrabody及び上記の何れか1つのエピトープ結合断片を含むが、これらに限定されない(例えば、Holliger and Hudson, 2005、Nature Biotech. 23(9):1126-1136、Adair and Lawson, 2005、Drug Design Reviews-Online 2(3)、209-217を参照)。

30

40

【0101】

「免疫グロブリン単一可変ドメイン」は、一般的に、他の可変ドメインと相互作用しない場合(例えば、通常の4本鎖モノクローナル抗体のVHとVLドメインの間に必要なVH/VL相互作用がない場合)に機能的抗原結合部位を形成することができる免疫グロブリン可変ドメイン(重鎖又は軽鎖ドメインであってもよく、VH、VHH又はVLドメインを含む)を指すために使用される。「免疫グロブリン単一可変ドメイン」の実例は、ナノボディ(VHH、ヒト化VHH、ラクダ化VH(例えば、ラクダ化ヒトVH)を含む)、IgNAR、ドメイン、VHドメインとしての又はVHドメインに由来する(単一ドメイン)抗体(例えば、dAbsTM)及びVLドメインとしての又はVLドメインに由来する(単一ドメイン)抗体(例えば、dAbsTM)を含む。重鎖可変ドメイン(例えば

50

、VH又はVHHドメイン)に基づく及び／又は由来する免疫グロブリン単一可変ドメインは、一般的に好ましい。免疫グロブリン単一可変ドメインの一具体的な実例としては、以下に定義されるような「VHHドメイン」(又は、「VHH」と略称)である。本開示において、ドメイン抗体(dAb)、単ドメイン抗体、単ドメイン抗体(s dAb)は、互換的に使用されてもよい。

【0102】

「VHH」は、ナノボディ、VHH抗体、VHH抗体断片、VHHドメイン、重鎖単一ドメイン抗体とも呼ばれ(単一ドメイン抗体と呼ばれることもある)、重鎖抗体の可変領域を指す(Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R.:「Naturally occurring antibodies devoid of light chains」, Nature 363, 446-448 (1993))。「VHH」は、通常のテトラペプチド鎖抗体における重鎖可変領域(VH)と区別するために使用される。VHHは、そのドメイン特異性により、他の抗原結合ドメインを必要とせずに、単独でエピトープに結合することができる。通常のテトラペプチド鎖抗体では、VHドメインとVLドメインの両方が共にエピトープを認識するが必要である。VHHドメインは、単一の免疫グロブリンドメインで形成された小さくて安定的かつ効率的な抗原認識ユニットである。幾つかの実施形態において、4-1BBを例とする、「抗4-1BB単一ドメイン抗体」、「4-1BB VHH」、「4-1BB VHH抗体」及び「4-1BBナノボディ」は、互換的に使用されてもよい。

【0103】

VHHは、一般的に、110~120個、例えば112~115個のアミノ酸からなる。しかし、より長い及びより短い配列も、本開示に記載の目的に適用されると留意すべきである。VHH及びVHH含有ポリペプチドの他の構造特性と機能特性について、次のようにまとめることができる：VLが存在しないと共にVLと相互作用しない場合に、VHHは抗原と機能的に結合する。通常のテトラペプチド鎖抗体のVH及びVLドメイン自体は、単独で抗原結合分子又は免疫グロブリン単一可変ドメインとして実用化することに適しておらず、VH及びVLドメインは、機能的抗原結合ユニットが提供されるように、ある形態によるか又は組み合わせる必要がある(例えば、Fab又はscFvの形態による)。VHHは、単一でかつ比較的小さい機能的抗原結合ユニット、ドメイン又はポリペプチドとして使用することができる。それらのユニークな特性のために、VHHドメイン(単独で、又は大きなポリペプチドの一部としてもよい)を使用することで、通常のVH及びVLドメイン、scFv又は通常の抗体断片(例えば、Fab又はF(ab')₂断片)を使用する場合よりも優れた顕著な利点が多く提供される：

—単一のドメインによって高親和性及び高選択性で抗原に結合するだけでよく、これにより、2つの単独なドメインが存在する必要がなく、当該2つのドメインが適切な空間配置及び配置で存在することを確保する必要もない(例えば、scFvは、一般的に特に設計されたリンカーを使用する必要がある)こと、

—VHHドメインは、単一の遺伝子によって発現可能であり、かつ翻訳後に折り畳みや修飾を必要としないこと、

—VHHドメインは、多価及び多特異的フォーマットに容易に改変することができること、

—VHHドメインは、可溶性が高く凝集傾向がないこと、

—VHHドメインは、熱、pH、タンパク質又はポリペプチダーゼ及び他の変性剤又は条件に対して非常に安定的であり、かつそれで、調製、貯蔵又は輸送中に冷凍機器を使用しなくてもよく、コストや時間の節約及び環境保全が達成されること、

—VHHドメインは、調製されやすく比較的安価で、さらに生産に必要な規模においても同様であること、

—VHHドメインは、通常のテトラペプチド鎖抗体及びその抗原結合断片に比べて比較

的小さい（約15 kDa又はサイズが通常のIgGの1/10である）ので、高い組織浸透性を示すと共に、高用量で投与することができること、及び

－VHHドメインは、いわゆるキャビティ（cavity）結合特性を示すことができること（通常のVHドメインに比べて、VHHは、延長したCDR3ループを有するので、通常のテトラペプチド鎖構造抗体及びその抗原結合断片が到達できない標的エピトープに到達することができる）。

【0104】

標的抗原又はエピトープに結合するVHHを得る方法は、この前、既にR. van der Linden et al., Journal of Immunological Methods, 240 (2000) 185-195、Li et al., J Biol Chem., 287 (2012) 13713-13721、Deffar et al., African Journal of Biotechnology Vol. 8 (12), pp. 2645-2652, 17 June, 2009及びWO94/04678という文献に開示された。

10

【0105】

ヒトの通常のテトラペプチド鎖抗体のVHドメインにおける対応する位置における1つ又は複数のアミノ酸残基で元のVHH（例えば、ラクダ科由来のVHH）のアミノ酸配列における1つ又は複数のアミノ酸残基を置換することにより、VHHドメインを「ヒト化」することができる（本開示では「配列最適化」とも呼ばれ、「配列最適化」は、ヒト化の他に、潜在的な翻訳後修飾部位の除去など、改良した特性をVHHに付与する他の修飾をカバーしてもよい）。ヒト化VHHドメインは、1つ又は複数の完全ヒトフレームワーク領域配列を含んでもよく、かつ一具体的な実施形態において、IGHV3のヒトフレームワーク領域配列を含んでもよい。ヒト化の方法としては、例えば、リサーフェシング法（resurfacing）、CDRユニバーサルフレームワークグラフト法（CDR grafting to a universal framework）、フレームワークシャッフリング法（Framework shuffling）などである。ヒトFR生殖細胞系列配列は、例えば、ImmunoGenetics（IMGT）のホームページから取得可能である。

20

【0106】

（タンパク質又はポリペプチドの）「ドメイン」は、折り畳まれたタンパク質又はポリペプチド構造を指す。一般的に、ドメインは、タンパク質又はポリペプチドの単一の機能を担う。多くの場合には、タンパク質又はポリペプチドの他の部分及び／又はドメインの機能を失うことなく、付加され、除去され、又は他のタンパク質に移転されてもよい。本開示における幾つかの実施形態において、「ドメイン」は、抗体と抗原の結合部位として使用されてもよい。

30

【0107】

「可変ドメイン」は、基本的にこの分野及び下記でそれぞれ「フレームワーク領域1」（FR1）、「フレームワーク領域2」（FR2）、「フレームワーク領域3」（FR3）及び「フレームワーク領域4」（FR4）という4つの「フレームワーク領域」からなるドメインを指し、ここで、上記フレームワーク領域は、この分野及び下記でそれぞれ「相補性決定領域1」（CDR1）、「相補性決定領域2」（CDR2）及び「相補性決定領域3」（CDR3）という3つの「相補性決定領域」で離間される。従って、可変ドメインの一般的な構造（又は配列）は、FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4と示されてもよい。可変ドメインは、抗原結合部位を有するため、抗原に対する特異性が付与される。

40

【0108】

「フレームワーク領域（FR）」又は「フレームワーク」は、CDRのステントとして使用される可変ドメインにおける一部を指す。

【0109】

例えば、Riechmann及びMuyldermans、J. Immunol. M

50

ethods 231, 25-38 (1999) の図 2 に示すように、VHHドメインに使用されるアミノ酸残基は、KabatらによるVHドメインの一般的な番号付け方法に従って番号付けされる(「Sequence of proteins of immunological interest」、US Public Health Services、NIH Bethesda、MD、公開案第91号)。ところが、この分野でVHドメイン及びVHHドメインについて公知されているように、各CDRにおけるアミノ酸残基の総数は、異なる可能性があり、かつKabat番号で示されるアミノ酸残基の総数に対応しない可能性がある(即ち、Kabat番号に基づく1つ又は複数の位置は、実際の配列において占められていない可能性があり、又は実際の配列はKabat番号の許容する数よりも多いアミノ酸残基を含む可能性がある)と留意すべきである。これは、一般的に、Kabatに基づく番号は、実際の配列におけるアミノ酸残基の実際の番号に対応するか又は対応しない可能性があることを意味する。

10

【0110】

当業者は、多くの既知の番号付け案の何れか1つによって抗体CDRのアミノ酸配列境界を決定することができ、既知の番号付け案は、Kabat et al., 上記参照(「Kabat」番号付け案)、Al-Lazikani et al., 1997, J. Mol. Biol., 273:927-948(「Chothia」番号付け案)、MacCallum et al., 1996, J. Mol. Biol., 262:732-745(「Contact」番号付け案)、Lefran et al., Dev. Comp. Immunol., 2003, 27:55-77(「IMGT」番号付け案)及びHonegge&Pluckthun, J. Mol. Biol., 2001, 309:657-70(「AHO」番号付け案)という文献に記載された番号付け案を含み、それらは、それぞれ援用により全体として組み込まれている。この分野ではVHドメインのアミノ酸残基を番号付けする代替的な方法が知られており、上記代替的な方法は同様にVHHドメインにも使用可能である。しかしながら、特に明記のない限り、本開示の明細書、特許請求の範囲及び図面においては、上記のようなKabatによるVHHドメインに適した番号に従う。

20

【0111】

「ヒト化」抗体は、非ヒト抗体の反応性を保持すると共に、ヒトにおいて低い免疫原性を有する抗体である。例えば、非ヒトCDR領域を保持すると共に、そのヒト対応物(即ち、定常領域及び可変領域のフレームワーク領域部分)で抗体の残りの部分を置き換えることにより達成してもよい。

30

【0112】

「親和性成熟」の抗体、特にVHH又はドメイン抗体は、1つ又は複数のCDRにおいて1つ又は複数の変化を有し、上記変化により、標的抗原への親和性がその親抗体に比べて増加される。親和性成熟の抗体は、この分野で既知の方法によって調製することができる。

【0113】

「Fc領域」又は「断片結晶化可能領域」は、抗体重鎖のC末端領域を定義するためであり、天然Fc領域及び改変されたFc領域を含む。幾つかの実施形態において、Fc領域は、同一又は異なる2つのサブユニットを含む。幾つかの実施形態において、ヒトIgG重鎖のFc領域は、Cys226位置におけるアミノ酸残基から、又はPro230からそのカルボキシ末端へ延びると定義される。本明細書に記載の抗体に用いられる好適なFc領域は、ヒトIgG1、IgG2(IgG2A、IgG2B)、IgG3及びIgG4のFc領域を含む。幾つかの実施形態において、Fc領域の境界は変化してもよく、例えば、Fc領域のC末端リジン(EU番号付けシステムによる残基447)の欠失、又はFc領域のC末端グリシンとリジン(EU番号付けシステムによる残基446と447)の欠失である。特に説明のない限り、Fc領域の番号付け規則はEU番号付けシステムであり、EUインデックスとも呼ばれる。

40

【0114】

50

「未修飾の免疫グロブリン単一可変ドメイン」、例えば、標的抗原に結合する免疫グロブリン単一可変ドメインは、フレームワーク構造における3つの相補性決定領域（CDR）を含む。天然に存在する免疫グロブリン鎖の遺伝学において、V領域がCDR3の始まりで終結され、かつCDR3の残部がD及びJ領域によって提供される（V-D-J融合物をもたらす）ことに鑑みて、本開示に係る免疫グロブリン単一可変ドメインは、CDR3の全てを含むと共に、そのC末端がFR4残基で終結される。VH sdAbは、そのC末端が残基LVTVSSで終結される。VHH sdAbは、そのC末端が残基VTVSSで終結される。VL sdAbは、そのC末端がVEIKRで終結される。「修飾された免疫グロブリン単一可変ドメイン」は、本開示に記載されたような免疫グロブリン単一可変ドメインであり、免疫グロブリン単一可変ドメインのC末端の3次元配座を改変する修飾をさらに有する。修飾された免疫グロブリン単一可変ドメインは、本開示のようなC末端付加、伸長又はタグ及び／又はあるアミノ酸置換を含む免疫グロブリン単一可変ドメインを含む。

10

【0115】

「予備の抗薬物抗体」又は「pre-ADA」は、薬剤（例えば、タンパク質又はポリペプチド系薬剤、さらに例えば、抗体薬）が施用又は投与される対象又は個体に既に存在しているADAである。予備の抗薬物抗体は、初めて実験に使用される対象又は個体（即ち、この前に薬剤が投与されたことのない対象又は個体）にあり得る。

【0116】

「抗原」とは、抗原を認識する抗体が産生され、又は発現ライブラリー（例えば、特にファージ、酵母又はリボソームディスプレイライブラリー）がスクリーニングされるように、免疫適格性脊椎動物を免疫化するための分子である。本開示において、抗原はより広義に定義されており、抗体により特異的に認識される標的分子を含み、かつ抗体を産生するための免疫化プロセス又は抗体を選択するためのライブラリースクリーニングに使用される分子の一部又は模倣体を含む。

20

【0117】

「エピトープ」又は互換的に使用可能な「抗原決定基」は、抗体が結合する抗原における任意の抗原決定基を指す。抗原決定基は、一般的に、例えばアミノ酸又は糖側鎖などの分子の化学的活性表面基を含み、かつ、一般的に、特定の3次元構造特性及び／又は特定の電荷特性を有する。エピトープは、「線状」エピトープ又は「配座」エピトープであってもよい。線状エピトープにおいて、抗原と相互作用分子（例えば、抗体）との間の相互作用部位の全ては、抗原の一次アミノ酸配列に沿って線状に存在する。配座エピトープにおいて、相互作用部位は、互いに分離したアミノ酸残基に跨って存在する。

30

【0118】

「特異性」は、標的抗原結合分子又は抗原結合分子の結合可能な異なるタイプの抗原又はエピトープの数を指す。その特異性は、抗原結合分子の親和性（*affinity*）及び／又は親和力（*avidity*）に基づいて確認することができる。抗原と抗原結合分子との解離平衡定数（ K_D ）で示される親和性は、エピトープと抗原結合分子上の抗原結合部位との結合強度の目安であり、 K_D 値が小さいほど、エピトープと抗原結合分子との結合強度が強くなる（又は、親和性は、 $1/K_D$ である会合定数（ K_A ）で示されてもよい）。当業者に知られるように、具体的な関心抗原によっては、既知の方法で親和性を測定することができる。親和力は、抗原結合分子（例えば、免疫グロブリン、抗体、免疫グロブリン単一可変ドメイン又はそれを含むポリペプチド）と関連抗原との結合強度の目安である。親和力は、その抗原結合分子上の抗原結合部位との親和性、及び抗原結合分子に存在する関連結合部位の数に関係している。

40

【0119】

「結合親和性」又は「親和性」は、本開示において、2つの分子（例えば、抗体又はその一部と抗原）間の非共有相互作用の強度の目安として使用される。2つの分子間の結合親和性は、解離定数（ K_D ）を決定することにより定量化することができる。例えば表面プラズモン共鳴（SPR）方法（*Biacore*）を使用して複合物の形成及び解離の動

50

態を測定することで K_D を決定することができる。一価複合物の結合及び解離に対応する速度定数は、それぞれ結合速度定数 k_a （又は k_{on} ）及び解離速度定数 k_d （又は k_{off} ）と呼ばれる。 K_D は、 $K_D = k_d / k_a$ という方程式により k_a 及び k_d に関連する。解離定数の値は、周知の方法により直接決定することができ、かつ、例えばCacciet al.（1984, Byte 9:340-362）に記載されたような方法により、複雑な混合物に対しても算出することができる。例えば、Wong & Lohman（1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5428-5432）に開示されたような二重過ニトロセルロースフィルター結合アッセイにより、 K_D を決定することができる。標的抗原に対する抗体の結合能を評価する他の標準的なアッセイは、この分野で既知のものであり、例えば、ELISA、ウエスタンブロット、RIAとフローサイトメトリー分析、及び本開示の他所で例示された他のアッセイを含む。抗体の結合動態と結合親和性は、この分野で知られている標準的なアッセイ、例えば、表面プラズモン共鳴（SPR）により、例えばBiacoreTMシステム又はKinExAにより評価されてもよい。各抗体／抗原複合物の K_D 値を比較することにより、異なる分子との相互作用に関連する結合親和性を比較し、例えば、異なる抗体による所定の抗原への結合親和性を比較することができる。同様に、相互作用の特異性は、目的相互作用（例えば、抗体と抗原の間の特異的相互作用）の K_D 値と非目的相互作用（例えば、標的抗原に結合しない既知の対照抗体）の K_D 値を決定して比較することで評価することができる。

10

20

30

40

50

【0120】

「相同性」、「同一性」は、2つのポリヌクレオチド配列間又は2つのポリペプチド間の配列類似性である。2つの比較される配列における位置が何れも同じ塩基又はアミノ酸モノマーサブユニットに占められる場合、例えば、2つのDNA分子のそれぞれの位置がアデニンに占められる場合、上記分子は当該位置で相同である。2つの配列間の相同性百分率は、2つの配列の共有するマッチング又は相同位置数を比較される位置数で割って100をかける関数である。例えば、配列の最適アラインメントを行う際に、2つの配列中の10個の位置のうち、6個がマッチングしており、又は相同である場合は、2つの配列が60%相同であり、2つの配列中の100個の位置のうち、95個がマッチングしており、又は相同である場合は、2つの配列が95%相同である。

【0121】

「変異体」は、本開示に係るヌクレオチド配列及びアミノ酸配列に適当な置換、挿入や欠失などの変異修飾を行った場合に得られた、本開示に係るヌクレオチド配列及びアミノ酸配列に対して異なる百分率の配列同一性レベルを有するヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を指す。上記配列同一性は、少なくとも85%、90%又は95%であってもよく、非限定的な実施例として、少なくとも70%、少なくとも71%、少なくとも72%、少なくとも73%、少なくとも74%、少なくとも75%、少なくとも76%、少なくとも77%、少なくとも78%、少なくとも79%、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又は100%を含む。2つの配列間の配列比較及び同一性の百分率測定は、National Center For Biotechnology Instituteのホームページから取得可能なBLASTN/BLASTPアルゴリズムのデフォルト設定により行うことができる。

【0122】

「保存的置換」は、元のアミノ酸残基と類似の特性を有する別のアミノ酸残基に置換されることを指す。それは、ポリペプチドの機能、活性又は他の生物学的特性に影響が少ないか又は実質的にない。上記保存的アミノ酸置換は、この分野で公知のものであり、例えば、保存的アミノ酸置換は、下記の群（i）～（v）における1つのアミノ酸が同一の群

における別のアミノ酸残基で置換されることが好ましい：

- (i) 小さい脂肪族非極性又は弱極性残基：A l a、S e r、T h r、P r o及びG l y、
- (i i) 極性負電荷残基及びその（非帯電）アミド：A s p、A s n、G l u及びG l n、
- (i i i) 極性正電荷残基：H i s、A r g及びL y s、
- (i v) 大きい脂肪族非極性残基：M e t、L e u、I l e、V a l及びC y s、並びに
- (v) 芳香族残基：P h e、T y r及びT r p。

【0123】

特に好ましくは、保存的アミノ酸置換は、A l aがG l y又はS e rで置換され、A r gがL y sで置換され、A s nがG l n又はH i sで置換され、A s pがG l uで置換され、C y sがS e rで置換され、G l nがA s nで置換され、G l uがA s pで置換され、G l yがA l a又はP r oで置換され、H i sがA s n又はG l nで置換され、I l eがL e u又はV a lで置換され、L e uがI l e又はV a lで置換され、L y sがA r g、G l n又はG l uで置換され、M e tがL e u、T y r又はI l eで置換され、P h eがM e t、L e u又はT y rで置換され、S e rがT h rで置換され、T h rがS e rで置換され、T r pがT y rで置換され、T y rがT r p又はP h eで置換され、V a lがI l e又はL e uで置換されることである。

【0124】

「復帰変異」とは、ヒト抗体由来のフレームワーク領域のアミノ酸残基を、元の抗体の対応する位置におけるアミノ酸残基に変異させることを意味し、一般的に、ヒト化抗体による免疫原性の低下と共に引き起こされる活性の低減を回避するために、上記ヒト化抗体の可変領域に対して最も少ない逆変異を行うことで、抗体の活性を維持することができる。本開示において、「復帰変異」は、C D Rにおける変異も含む。

【0125】

「ポリヌクレオチド」、「核酸分子」は、D N A及びR N Aをカバーしており、単鎖又は二本鎖であってもよいが、二本鎖D N Aが好ましい。核酸が別の核酸配列と共に機能的関係に置かれる場合、核酸は「効果的に連結されている」。例えば、プロモーター又はエンハンサーがコード配列の転写に影響を与えると、プロモーター又はエンハンサーは、上記コード配列に効果的に連結されている。

【0126】

「ベクター」は、それに連結された別の核酸を輸送可能な核酸分子を指す。一実施形態において、ベクターは「プラスミド」であり、他のD N Aセグメントをそれに連結可能な環状二本鎖D N A環を指す。別の実施形態において、ベクターはウイルスベクターであり、ここで、別のD N Aセグメントをウイルスゲノムに連結することができる。本開示におけるベクターは、それらを導入した宿主細胞において自己複製することができ（例えば、細菌の複製起点を有する細菌ベクター及びエピソーマル哺乳動物ベクター）、又は、宿主細胞に導入された後、宿主細胞のゲノムに整合されることで、宿主ゲノムと共に複製することができる（例えば、非エピソーマル哺乳動物ベクター）。

【0127】

「細胞」、「細胞株」及び「細胞培養物」は、互換的に使用されてもよく、かつそのような名称は何れも子孫を含む。従って、「形質転換体」及び「形質転換細胞」は、移転数を考慮せずに、初代被験細胞及びそれより誘導された培養物を含む。また、意図するかわいかなる変異のために、あらゆる子孫は、D N A含有量において精確に同じであり得ないと理解すべきである。最初の形質転換細胞からスクリーニングされたものと同様の機能又は生物学的活性を有する変異子孫が含まれる。異なる名称を指す場合は、文脈から明らかになる。

【0128】

「宿主細胞」は、その中に発現ベクターが導入された細胞を指す。宿主細胞は、微生物

10

20

30

40

50

(例えば、細菌)、植物又は動物細胞を含んでもよい。形質転換しやすい細菌は、大腸菌 (*Escherichia coli*) やサルモネラ菌 (*Salmonella*) の菌株などの腸内細菌科 (*enterobacteriaceae*) のメンバー、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) などのバシラス科 (*Bacillaceae*)、肺炎球菌 (*Pneumococcus*)、連鎖球菌 (*Streptococcus*) 及びインフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) を含む。好適な微生物は、サッカロミセスセレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 及びピキア酵母 (*Pichia pastoris*) を含む。好適な動物宿主細胞株は、CHO (中国ハムスター卵巣細胞株)、NS0細胞、293細胞を含む。

【0129】

「医薬組成物」は、1種又は複数種の本開示に記載される化合物又はその生理学的／薬学的に許容される塩又はプロドラッグと、生理学的／薬学的に許容されるベクター及び賦形剤などの他の化学成分とを含む混合物を示す。医薬組成物は、生体への投与を促進し、活性成分の吸収に寄与してさらに生物活性を発揮するためのものである。

【0130】

「薬学的に許容されるベクター」又は「薬学的に許容される賦形剤」は、活性成分と組み合わせる場合に、当該成分が生物学的活性を保つことを許容すると共に、対象の免疫系と反応しない任意の材料を含む。例としては、任意の標準的な薬剤ベクター、例えば、リン酸塩緩衝生理食塩水溶液、水、油／水エマルジョンなどのエマルジョン、及び種々の湿潤剤などを含むが、これらに限定されない。幾つかの実施例において、エアロゾル又は非経口投与に用いられる希釈剤は、リン酸塩緩衝生理食塩水 (PBS) 又は生理 (0.9%) 食塩水である。このようなベクターを含む組成物は、周知の通常方法により調製される (例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, edited by A. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990、及びR Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, Mack Publishing, 2000を参照)。

【0131】

「与える」、「投与」及び「処理」は、動物、ヒト、対象、細胞、組織、臓器や生物流体に使用される場合に、外因性薬剤、治療剤、診断薬又は組成物の、動物、ヒト、対象、細胞、組織、臓器や生物流体との接触を意味する。「与える」、「投与」及び「処理」は、例えば、治療、薬物動態、診断、研究及び実験方法を意味してもよい。細胞の処理は、試薬の細胞との接触、及び試薬の流体との接触を含み、ここで、上記流体は細胞と接触する。「与える」、「投与」及び「処理」は、また、試薬、診断、結合組成物により、又は別種の細胞を通じて、体外及びインビトロで細胞を処理することを意味する。「処理」はヒト、獣医学又は研究対象に使用される場合に、治療的処理、予防又は予防的措置、研究及び診断的使用を意味する。

【0132】

「有効量」は、医学的病状の症状又は病状を改善又は予防するために十分な量を含む。有効量は、さらに、診断の許容又は促進に十分な量を指す。対象に使用される有効量は、治療される病状、対象の全体的健康状態、投与の方法経路と用量、及び副作用の重症度といった要因によって変化することができる。有効量は、顕著な副作用又は毒性作用が回避される最大用量又は投与計画であってもよい。本開示の対象は、動物又はヒト対象であってもよい。

【0133】

「対象」、「患者」は、哺乳動物、特に霊長類、特にヒトを意味する。

【0134】

「治療」とは、対象に経口又は外用治療剤、例えば、本開示に係る何れか1つの抗体又はその抗原結合断片を含む組成物、或いは抗体又はその抗原結合断片をコードする核酸分子を投与することを意味し、上記患者は1つ又は複数の疾患症状を有し、そして上記治療

10

20

30

40

50

剤がそれらの症状に治療作用を有することが知られている。通常、治療される患者又は集団には、1つ又は複数の疾患症状を効果的に緩和する量で治療剤を与えることにより、これらの症状の解消を誘導し、又は臨床的に測定可能な任意の程度まで進行しないようにこれらの症状を阻害する。何れかの具体的な疾患症状を効果的に緩和する治療剤の量（「治療有効量」ともいう）は、患者の疾患状態、年齢と体重、及び薬剤の患者において必要な治療効果を発生させる能力など、種々の要因により変化することができる。当該症状の重症度又は進行状況の評価に医者又は他のプロのヘルスケアプロバイダによく用いられる任意の臨床的検出方法により、疾患症状が軽減されたか否かを評価することができる。本開示の実施形態（例えば、治療方法又は製品）は、それぞれの目標疾患症状の緩和において無効な可能性があるが、この分野で知られている任意の統計学的検定方法、例えば、S t u d e n t t検定、カイ二乗検定、M a n nとW h i t n e yによるU検定、K r u s k a l - W a l l i s検定（H検定）、J o n c k h e e r e - T e r p s t r a検定及びW i l c o x o n検定により、統計学的に有意な数の患者において目標疾患症状を軽減するはずであることが確認された。

10

【0135】

「配列」（例えば、「免疫グロブリン配列」、「抗体配列」、「単一可変ドメイン配列」、「V H H配列」又は「タンパク質又はポリペプチド配列」などにおいて）は、本開示においてさらに限定的に解釈する必要がない限り、一般的に、関連するアミノ酸配列を含むだけでなく、上記配列をコードする核酸配列又はヌクレオチド配列も含むと理解すべきである。

20

【0136】

「任意選択的」又は「任意選択的に」は、その後に説明される事象又は状況が生じててもよいが、必ずしも生じなくてもよいことを意味し、この説明は、当該事象又は状況が生じる場合と生じない場合を含む。

【図面の簡単な説明】

【0137】

【図1】健常な個体の血清にp r e - A D Aを有する頻度検出結果である。

【図2】s d A bのp r e - A D Aへの結合に対する異なるアミノ酸修飾方法の影響検出結果である。

【図3】健常な個体の血清にアミノ酸修飾されたs d A bに対するp r e - A D Aを有する頻度検出結果である。

30

【図4】測定待ちの抗体のヒト4-1 B B抗原へのF A C S結合試験結果である。

【図5】測定待ちの抗体のF c γ R I I b架橋前（図5のA）及び架橋後（図5のB）の4-1 B B / N F - κ B ルシフェラーゼレポーター遺伝子検出結果である。

【図6】抗4-1 B B単ドメイン抗体C 5及びそのヒト化した抗体C 5 __ V 1、C 5 __ V 2、C 5 __ V 3のH E K 2 9 3細胞表面ヒト4-1 B Bに結合するF A C S検出結果であり、U r e l u m a bが対照として使用されている。

【図7】抗4-1 B B単ドメイン抗体C 5及びそのヒト化した抗体C 5 __ V 1、C 5 __ V 2、C 5 __ V 3のN F - κ Bシグナル伝達経路への活性化作用の検出結果であり、U r e l u m a b、アイソタイプI g G 1抗体が対照として使用されている。

40

【図8】C 5 __ V 2及びC 5 __ V 2 - Y T IのH E K 2 9 3細胞表面ヒト4-1 B Bへの結合のF A C S検出結果であり、U r e l u m a b、アイソタイプI g G 1抗体が対照として使用されている。

【図9】異なるC 5 __ V 2 - Y T Iアミノ酸修飾変異体のp r e - A D Aへの結合の検出結果である。

【図10】健常な個体の血清にC 5 __ V 2 - Y T Iアミノ酸修飾変異体に対するp r e - A D Aを有する頻度の検出結果である。

【発明を実施するための形態】

【0138】

以下、実施例に合わせて本開示をさらに説明するが、これらの実施例は、本開示の範囲

50

を制限するものではない。

【0139】

本開示の実施例又は試験例において具体的な条件が明記されていない実験方法は、一般的に通常の条件、又は原料や商品のメーカーにより推奨された条件に従う。Sambrookら、分子クローニング、実験室マニュアル、コールド・スプリング・ハーバー研究所、及び現代分子生物学方法、Ausubelら著、Greene出版協会、Wiley Interscience、NYが参照される。具体的な供給源が明示されていない試薬は、市販される通常の試薬である。

【0140】

実施例1．単ドメイン抗体 (sdAb) に対する pre-ADA の検出

10

本開示は、単ドメイン抗体に対して pre-ADA の測定を行い、酵素結合免疫吸着 (ELISA) の方法を採用し、ELISA は、抗体 pre-ADA の効果を測定するためによく使用される検出方法である。本実験に用いられた血清は、健常人の1人分の血清 (上海信帆生物科技有限公司) であり、二次抗体は抗ヒト抗体鎖のHRP標識抗体である (Southern Biotech、2070-05)。

【0141】

先の研究によれば、GSK特許WO2013024059A中のsdAb (配列1及び配列16) に由来するP2-1、P2-2の抗体配列が合成されたが、そのうち、P2-1はWO2013024059Aにおける配列1のN末端融合His6タグであり、P2-2はWO2013024059Aにおける配列16のN末端融合His6タグである。P2-1、P2-2は、本開示において対応する配列番号が配列番号1及び配列番号2である。また、Cetuximabと同じアミノ酸配列を有するIgG1分子が合成されたが、上記IgG1分子は、重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列がそれぞれ配列番号3及び配列番号4で示される。

20

【0142】

上記ELISAアッセイは、以下の通りである：

1) 抗原の被覆：PBSによりP2-1とP2-2を含む測定待ちの抗体試料をそれぞれ2 ng / μ Lの有効最終濃度に希釈し、96ウェルプレートに加え、50 μ L / ウェルで、室温で1 h インキュベートし、

2) ブロッキング：上清を捨て、PBSTで1回洗浄し、4%のM-PBSTブロッキング液を加え、150 μ L / ウェルで、室温で1 h インキュベートし、

30

3) 血清によるインキュベート：PBSTで1回洗浄し、30 μ L / ウェルの1人分の血清 (PBSにより1 : 5の比率で希釈) を加え、室温で1 h インキュベートし、

4) 洗浄：上清を捨て、PBSTで8回洗浄し、

5) 二次抗体インキュベート：希釈した二次抗体 (4%のM-PBSTで希釈し、希釈比率は対応する明細書を参照) を加え、50 μ L / ウェルで、室温で1 h インキュベートした。

6) 洗浄：上清を捨て、PBSTで8回洗浄し、

7) 発色：50 μ Lの基質ABTSを加え、暗所で20 min程度インキュベートし、その後SpectraMax iD3 (Molecular Devices) によりOD415を検出した。

40

【0143】

今回の実験では、合計40人の健常ドナーの血清試料の各抗体試料に対するバックグラウンド反応性を検出し、陰性対照PBS群、P2-1群、P2-2群、IgG1群に分け、結果を図1に示している。その結果、陰性対照PBS群に比べて、P2-1群は、血清試料の約57.5%が検出可能なsdAb反応性pre-ADAを有するが、免疫原性が低減されるように改変されたP2-2群は、血清試料の約12.5%が検出可能なsdAb反応性pre-ADAを有することが示され、それは、GSK文献に報告されたデータと基本的に一致している。本開示のpre-ADA陽性は、測定待ちの試料群のIgG1群に対応する一点シグナルの差異が+50%以上である試料が陽性試料と見なされること

50

を意味し、その逆は陰性試料であり、以下同様である。

【0144】

> P2-1 (配列番号1)

【化1】

HHHHHHHGGGGGSEVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGF
TFAHETMVWVRQAPGKGLEWVSHIPP DGQDPFYADSVKG
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYHCALLPKRGPW
FDYWGQGGLVTVSS

> P2-2 (配列番号2)

【化2】

HHHHHHHGGGGGSEVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGF
TFAHETMVWVRQAPGKGLEWVSHIPP DGQDPFYADSVKG
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYHCALLPKRGPW
FDYWGQGGLVTVSSA

> IgG1分子の重鎖 (配列番号3)

【化3】

QVQLKQSGPGLVQPSSQLSITCTVSGFSLTNYGVHWVR
QSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPTFTSRLSINKDNSKSQ
VFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGGLVTV
VSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> IgG1分子の軽鎖 (配列番号4)

【化4】

DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQ
RTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINS
VESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC
EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【0145】

実施例2. 単ドメイン抗体のVHフレームワーク (FR) のアミノ酸改変

pre-ADAの単ドメイン抗体フレームワークへの結合が低減できるか否かを研究するために、単ドメイン抗体P2-42を親クローンとして選択し、部位特異的変異導入技術によりP2-42のフレームワーク領域に対してアミノ酸修飾 (付加、置換、欠失を含む) を行い、各修飾変異体を得て、構造が表1を参照する。表1及び表2中のクローンの親クローンは、何れもP2-42である。

【0146】

上記P2-42は、C末端がVTVSSで終結されたVHH抗体であり、クローンP2-43~P2-58は、P2-42のみに対するC末端修飾の変異体であり、表1で行われたC末端修飾 (付加、置換を含む) のアミノ酸残基以外、他の配列が変更されなかった

10

20

30

40

50

。上記位置は、何れもヒト生殖細胞系列フレームワーク配列に基づいて番号付けされた。

【0147】

実施例1中のELISA方法により上記修飾変異体を測定・検証し、使用された血清は、実施例1中の検出が行われてかつ結果としてpre-ADA陽性を示した8つの1人分の血清試料であり、結果は図2と表1を参照する。表1の結果により、親クローンに対する各修飾変異体の平均シグナル低減百分率(%)及び陽性個体数が示されている。平均シグナルの低減(%)が大きいほど、当該修飾変異体は、pre-ADAへの結合能が低くなり、ヒト体内における予備のpre-ADAにより中和される可能性も低くなることを意味する。

【0148】

本開示の平均シグナル低減%の算出式は、以下の通りである：

平均シグナル低減% = (対応する試料群の算術平均シグナル値 - P2-42群の算術平均シグナル値) / P2-42群の算術平均シグナル値 × 100%

その結果、P2-53、P2-54、P2-55、P2-56、P2-57及びP2-58という6つの分子のpre-ADA結合シグナルは、明らかに低減された。

【0149】

【表1】

表1. 各修飾変異体のpre-ADA結合シグナルの低減状況

番号	配列修飾 (C末端配列)	平均シグナル低減 (%)	pre-ADA陽性個体数*
P2-42	未修飾 (VTVSS)	—	8
P2-43	C末端プラスA (VTVSSA)	43.5%	4
P2-44	S113A (VTVSA)	1.2%	8
P2-46	S113F (VTVSF)	-0.9%	8
P2-47	S113G (VTVSG)	3.1%	8
P2-48	S113L (VTVSL)	-3.3%	8
P2-49	S113P (VTVSP)	8.0%	6
P2-50	S113R (VTVSR)	-4.0%	8
P2-51	S113T (VTVST)	2.5%	8
P2-52	S113V (VTVSV)	4.4%	8
P2-53	S113A、C末端プラスA (VTVSAA)	38.2%	4
P2-54	S112F、S113P (VTVFP)	49.5%	2
P2-55	S112F、S113P、C末端プラスA (VTVFPA)	56.7%	2
P2-56	S112R、S113P (VTVRP)	50.7%	2
P2-57	S112R (VTVRS)	48.0%	3
P2-58	S112R、C末端プラスA (VTVRSA)	67.9%	0

(*表1の実験に用いられた血清は、実施例1の検出でpre-ADA陽性を示した8つの1人分のヒト血清試料である。)

【0150】

ここで、VTVSS、VTVSSA、VTVSF、VTVSG、VTVSL、VTVSR、VTVST、VTVSVは、それぞれ、配列番号189～196で示される。

【0151】

実施例3. 単ドメイン抗体の修飾変異体に対するpre-ADAの検出

P2-53、P2-54、P2-55、P2-56、P2-57及びP2-58という6つの分子について、本実施例は、さらに40個の健常ドナーの血清試料における各修飾変異体に対するpre-ADAの頻度を検出することで、変異の効果を検証し、使用され

た血清は健常人の1人分の血清である（実施例1中の40個の試料と同様）。

【0152】

実施例1中のELISA方法により上記修飾変異体を測定・検証し、図3は各変異体のシグナル阻害レベルを示し、表2は各変異体の平均シグナル阻害（%）及びpre-ADA陽性の頻度を示す。

【0153】

その結果、何れのクローンも平均シグナル低減が40%近く又はそれを超えたので、何れの修飾も単一ドメイン抗体のpre-ADAへの結合を明らかに低減することができる。

【0154】

【表2】

表2. 各修飾変異体のpre-ADA結合シグナルの低減状況

番号	平均シグナル低減 (%)	pre-ADA 陽性個体数*
P2-42	—	21
P2-53	41.0%	6
P2-54	39.3%	6
P2-55	49.5%	3
P2-56	41.5%	6
P2-57	42.8%	5
P2-58	51.6%	1

（*表2の実験に用いられた血清は、実施例1中の40個の1人分の血清試料である）

【0155】

実施例4. 抗4-1BB単一ドメイン抗体のスクリーニング及び準備

本開示に使用されたタンパク質又はポリペプチドは、ヒト4-1BBタンパク質又はポリペプチド（Human 4-1BB/TNFSF9 Protein、His Tag、Acrobiosystemsから購入、製品番号41B-H5227）、ヒト4-1BBタンパク質又はポリペプチド（ビオチン/Hisタグ）（Biotinylated Human 4-1BB/TNFRSF9 Protein、Avitag（商標）、His Tag、Acrobiosystemsから購入、製品番号41B-H82E3）、及びサル4-1BBタンパク質又はポリペプチド（Cynomolgus/Rhesus macaque 4-1BB/TNFRSF9 Protein、His Tag、Acrobiosystemsから購入、製品番号41B-C52H4）であり、アミノ酸配列は、始まりも終わりもLeu24-Gln186である。

【0156】

1. アルパカ免疫、力価検出及びファージライブラリーの親和性パニング

Hisタグ付きのヒト4-1BB組換えタンパク質又はポリペプチド（Acrobiosystems、41B-H5227）でアルパカを免疫し、2週間に1回、合計4回免疫した。初回免疫時に、0.5mgの抗原と1mLの完全フロイントアジュバント（CFA）を均一に混合して皮下注射し、後の3回の免疫では、0.25mgの抗原と1mLの不完全フロイントアジュバント（IFA）を均一に混合して皮下注射した。免疫前にブラunk血清を採取し、3回目の免疫後の1週間と4回目の免疫後の1週間にそれぞれ末梢血50mLを採取し、PBMCを単離し、全RNAを抽出し、純度を検出し、DNAに逆転写し、2ラウンドのネステッドPCR後に、ナノボディの標的断片をファージディスプレイベクターに連結した。エレクトロポレーションして、ファージライブラリーを得た。

【0157】

>ヒト4-1BBタンパク質又はポリペプチド配列（配列番号5）

10

20

30

40

50

【化 5】

LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRT
CDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHC LGAGCS
MCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNC
SLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPA
REPGHSPQ

【0158】

ヒトとサルを同時に認識する抗4-1BBナノボディを得るために、2ラウンドのヒト、サル抗原のクロススクリーニングの戦略を用いた。第1及び第2ラウンドのスクリーニングの抗原は、それぞれ、ヒト4-1BBとサル4-1BB、又はサル4-1BBとヒト4-1BBを使用した。各ラウンドのスクリーニングは、何れもGly-HCl酸溶離方法を使用し、4-1BBに特異的に結合するファージを溶離した。第1及び第2ラウンドの力価測定プレートから、それぞれ96個のクローン（合計192個のクローン）をランダムに選択し、ファージELISAを用いて陽性クローンをスクリーニングし、450nmでの光学密度を検出した。陽性クローンをシーケンシングした。シーケンシングの結果に基づき、配列アラインメント及び系統樹解析を行い、H27、H170、C3、C5、C145などを含む14本のユニークな配列をスクリーニングし、そのうち、C5の配列は以下の通りであり、H27、H170、C3、C145などの配列は示されていない。

【0159】

> C5（配列番号6）

【化 6】

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFTTFSSSYAMSWVR
QAPGKGLEWVSDDINSGGESTFYEDSVKGRFTISRDNAKN
TLYLQMNSLKPEDTAVYYCAKHPLTFTIATMNDYDYWGQ
GTQVTVSS

（注：下線部はCDR領域である）

【表 3】

表3. 抗4-1BB単ドメイン抗体C5のCDR（Kabat番号付け規則）

抗体番号	CDR配列		配列番号
C5	CDR1	SYAMS	配列番号7
	CDR2	DINSGGESTFYEDSVKG	配列番号8
	CDR3	HPLTFTIATMNDYDY	配列番号9

【0160】

2. VHH-Fc融合タンパク質又はポリペプチドの発現・精製

C5の配列をC220A、S267E及びL328F変異（Euシステムによって番号付けされた）付きのヒトIgG1-Fc（配列番号10で、下線部が変異である）に連結した。連結されたVHH-Fc融合タンパク質又はポリペプチドの配列は、以下の通りである。また、ヒトIgG1のFcにL234A、L235A及びN297A（Eu番号付けシステムによる）などの変異を導入することにより、抗体FcγR媒介性のエフェクター機能（例えば、配列番号10で示される）を完全に除去し、ヒトIgG4のFcにS228P（Eu番号付けシステムによる）を導入することにより、抗体分子を安定化して半分子の形成（例えば、配列番号11で示される）を阻止し、それらは何れも選択可能なIgG Fcである。配列番号10～12において、下線部はFc変異である。

【0161】

> ヒト Ig G1 - Fc (C220A、S267E、L328F 変異を含む) (配列番号 10)

【化7】

EPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAFAPAP
IEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

(配列番号 10)

> ヒト Ig G1 - Fc (C220A、L234A、L235A、N297A 変異を含む)
(配列番号 11)

【化8】

EPKSADKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

20

> ヒト Ig G4 - Fc (S228P 変異を含む) (配列番号 12)

【化9】

ESKYGPPCPPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRT
PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSRLTV
DKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

30

> ヒト Ig G1 Fc (配列番号 13)

【化10】

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

配列番号 14 で示される、C5 が配列番号 10 に連結された抗体配列を例として挙げる。
。

40

> C5 - Fc (配列番号 14)

50

【化 1 1】

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFTFSSYAMSWVR
QAPGKGLEWVSDINSGGESTFYEDSVKGRFTISRDN
AKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAKHPLTFTIATMNDYDYWGQ
GTQVTVSSEPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKAFPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG
SFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSL
SLSPGA

10

(注：イタリック体部はFcである)

プラスミドを構築し、細胞に一過性トランスフェクションし、抗体を発現して精製した。検出により、標的抗体を得た。

【0162】

実施例 5. 抗 4-1BB 単ドメイン抗体の抗原結合活性及びそのアゴニスト活性の検出

1、4-1BB 抗原への結合能の検出

フローサイトメーターにより、抗 4-1BB 単ドメイン抗体のヒト 4-1BB タンパク質又はポリペプチドへの結合活性を検出した。

20

【0163】

HEK293-Hu4-1BB 細胞は、HEK293 細胞 (ATCC CRL-1573) にヒト 4-1BB タンパク質又はポリペプチドを発現する遺伝子 (CD137 cDNA ORF Clone、Human、C-OFPSpark tag、Sino Biological から購入、Cat#HG10041-ACR) を一過性トランスフェクションすることにより得られ、細胞培地は、10% のウシ胎児血清を含む DMEM (Gibco、Cat#11995065) である。実験培地は、2% のウシ胎児血清を含む滅菌 PBS (リン酸塩緩衝液、pH 7.40) である。実験培地で HEK293-Hu4-1BB 細胞を 2 回洗浄し、 1×10^5 個/ウェルで HEK293-Hu4-1BB 細胞を 96 ウェル U 底プレートに接種し、異なる濃度の測定待ちの抗 4-1BB 単ドメイン抗体 VHH-Fc 試料を加え、細胞を 4℃ で 1 h インキュベートした後、実験培地で 2 回洗浄し、そしてヒツジ抗ヒト IgG (H+L) Alexa Fluor 488 抗体 (Thermo、Cat#A11013) を加えて 2 回洗浄した後、フローサイトメーターにより蛍光シグナル値を読み取った。Urelumab モノクローナル抗体を陽性対照として使用し、各抗体の MFI 値を図 4 に示している。

30

【0164】

その結果、かかる抗 4-1BB 単ドメイン抗体は、HEK293-Hu4-1BB 細胞表面の 4-1BB に対して異なる程度の結合能を有し、そのうち、C5 は良好な細胞膜表面抗原結合活性を有する。

【0165】

40

2、4-1BB シグナル伝達経路に対するアゴニスト活性の検出

4-1BB/NF-κB レポーター遺伝子を使用して抗 4-1BB 単ドメイン抗体のアゴニスト活性を評価した。

【0166】

HEK293 細胞 (ATCC CRL-1573) にヒト 4-1BB を発現する遺伝子 (CD137 cDNA ORF Clone、Human、C-OFPSpark tag、Sino Biological から購入、Cat#HG10041-ACR) 及び NF-κB レポーター遺伝子 (pGL4.32 [luc2P/NF-κB-RE/Hygro] Vector、Promega から購入、Cat#E849A) を一過性トランスフェクションし、HEK293-Hu4-1BB/NF-κB ダブルトランスフェクシ

50

オン細胞を取得し、4-1BBの活性化は、NF-κBシグナル伝達経路の活性化レベルで特徴付けることができる。FcγRIIbプラスミド（CD32B/Fcgr2b c DNA ORF Clone、Human、N-His tag、Sino Biologicalから購入、Cat#HG10259-NH）をHEK293細胞に一過性トランスフェクションして、FcγRIIb高発現HEK293細胞を得た。細胞培地は、10%のウシ胎児血清を含むDMEM（Gibco、Cat#11995065）である。HEK293-Hu4-1BB/NF-κB細胞（2×10⁶/mL）を50μLで96ウェル細胞培養プレートに播種し、40μLの培地又はFcγRIIbを発現するHEK293細胞（2.5×10⁶/mL）を加え、10×勾配希釈された測定待ちの抗4-1BB単ドメイン抗体を10μL/ウェルに加え、37℃で6h培養した。細胞を取り出し、各ウェルに等体積のBio-Glo Luciferase Assay System試薬（Promega、Cat#G7940）を加え、暗所で5minインキュベートし、Envisionプレートリーダー（PerkinElmer、2150）で蛍光シグナルを測定し、EC₅₀値及びE_{max}値（対照無抗体群の蛍光強度）を算出し、EC₅₀値で抗4-1BB単ドメイン抗体のインビトロ細胞アゴニスト活性を評価した。結果を図5及び表4に示している。

【0167】

その結果、FcγRIIb（即ち、CD32b）陽性架橋が付加されていない場合、かかる抗4-1BB単ドメイン抗体は、4-1BB/NF-κBルシフェラーゼレポーター遺伝子シグナル伝達経路への活性化が何れもUrelumab対照よりも弱いことが示され、本開示に係る抗4-1BB単ドメイン抗体は安全性がより高いことが示唆され、FcγRIIb架橋が付加された後、かかる抗4-1BB単ドメイン抗体は、4-1BB/NF-κBルシフェラーゼレポーター遺伝子シグナル伝達経路への顕著な活性化を示し、C5は、活性化能力が最も強くかつUrelumab対照に相当している。活性の結果をまとめて、FcγRIIb架橋前に低いバックグラウンド活性化を有すると共に、FcγRIIb架橋後にさらに強い活性化活性を有する配列C5をスクリーニングし、ヒト化した。

【0168】

【表4】

表4. 抗4-1BB単ドメイン抗体の4-1BB/NF-κBルシフェラーゼレポーター遺伝子に対するアゴニスト活性EC₅₀値

番号	FcγRIIb架橋		FcγRIIb未架橋	
	E _{max}	EC ₅₀ (nM)	E _{max}	EC ₅₀ (nM)
IgG	1.12	—	1.10	—
Urelumab	9.39	0.027	4.30	2.185
C5	10.04	~0.8144	2.26	—

(注:「—」は、検出値が検出限界を超えたことを示す)

【0169】

実施例6. 抗4-1BB単ドメイン抗体の改変

1. ヒト化改変

Kabat番号付けシステムによってC5配列のCDR及びFR領域（ヒトフレームワーク領域、framework）のアミノ酸番号を標識し、FR1+CDR1配列、FR2+CDR2配列、FR3+CDR3配列をそれぞれ抗体生殖細胞系列データベースとアラインメントし、それぞれ相同性の高いFRヒト生殖細胞系列テンプレートを得た。FR1はIGHV3-64*04、FR2はIGHV3-23*03、FR3はIGHV3-74*01に由来する。ヒト体内に生じる免疫原性が低減されるように、上記各ヒト生殖細胞系列FR領域をそれぞれ原配列に置換挿入した。抗体の構造及び機能に影響を及ぼす重要なアミノ酸に対して復帰変異を行うことで、結合力及び活性を回復させた。各ヒト化配列は、以下の通りである。

【0170】

> C5__V1 (配列番号15)

【化12】

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFTFSSYAMSWVR
QAPGKGLEWVSDDINSGGESTFYEDSVKGRFTISRDNAKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHPLTFTIATMNDYDYWGQ
GTLVTVSS

> C5__V2 (配列番号16)

【化13】

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFTFSSYAMSWVR
QAPGKGLEWVSDDINSGGESTFYEDSVKGRFTISRDNAKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHPLTFTIATMNDYDYWGQ
GTLVTVSS

10

> C5__V3 (配列番号17)

【化14】

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFTFSSYAMSWVR
QAPGKGLEWVSDDINSGGESTFYEDSVKGRFTISRDNAKN
TLYLQMNSLKPEDTAVYYCAKHPLTFTIATMNDYDYWGQ
GTLVTVSS

20

(注：下線部はCDR領域である)

上記3つのヒト化配列をそれぞれヒトIgG1-Fc (配列番号10) に連結した。プラスミドを構築し、一過性トランスフェクションし、発現して精製した。具体的な過程は以下の通りである：培養液をトランスフェクション試薬60μLに希釈した後にプラスミド15μgと均一に混合し、37℃で15minインキュベートした後、混合トランスフェクション溶液を細胞液30mLに1滴ずつ滴下し、シェーカーに置いて1週間培養して発現させ、上清を収集した。次に、それに対してProteinA親和性精製を行い、クエン酸緩衝液(pH3.4)で溶離し、最後に1×PBS緩衝液で透析し、凍結保存した。

30

【0171】

2、TCE部位の除去

その後、C5__V2配列に対してT細胞エピトープ予測(T-cell Epitope、TCE)を行い、TCEの数が低減されるように、予測結果に基づいてC5__V2のCDR3配列を改変した。CDR3領域のF変異をYに変異させて(F99Y、Kabata番号付けシステムによる)TCE最適化版のC5__V2配列を取得し、C5__V2-YTIと命名し、その配列は以下の通りである：

> C5__V2-YTI (配列番号18)

【化15】

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFTFSSYAMSWVR
QAPGKGLEWVSDDINSGGESTFYEDSVKGRFTISRDNAKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHPLTYTIATMNDYDYWGQ
GTLVTVSS

40

即ち、Kabata番号付けシステムに従って、C5__V2-YTI中のCDR1のアミノ酸配列は配列番号7で示され、CDR2のアミノ酸配列は配列番号8で示され、CDR3のアミノ酸配列はHPLTYTIATMNDYDY (配列番号19) で示される。

【0172】

上記C5__V2-YTI、C5、C5__V1、C5__V2、C5__V3の配列をヒトI

50

g G 1 - F c (配列番号 10) に連結した。プラスミドを構築し、一過性トランスフェクションし、発現して精製し、後の検出に用いた。

【0173】

実施例 7. 改変された抗 4 - 1 B B 単ドメイン抗体の抗原結合活性、アゴニスト活性の検出

1、4 - 1 B B 抗原への結合能の検出

ヒト化抗体は、実施例 2 に記載されたような F A C S 検出方法により抗原結合活性を検出した。結果を図 6、表 5 に示している。

【0174】

その結果、かかるヒト化抗 4 - 1 B B 単ドメイン抗体は、H E K 2 9 3 - H u 4 - 1 B B 細胞表面の 4 - 1 B B に対して異なる程度の結合能を有し、C 5 __ V 1、C 5 __ V 2、C 5 __ V 3 は、何れも良好な結合活性を維持している。

【0175】

【表 5】

表 5. ヒト化前／後の抗 4 - 1 B B 単ドメイン抗体のヒト 4 - 1 B B 高発現細胞株に対する親和性 E C ₅₀ 値

抗体番号	E C ₅₀ (nM)	最大蛍光値
C 5	3. 1 9 6	1 1 0 1
C 5 __ V 1	3. 7 8 9	1 0 3 6
C 5 __ V 2	1. 6 2 4	1 0 3 1
C 5 __ V 3	1. 6 5 1	1 0 9 6
U r e l u m a b	1. 1 8 4	1 0 0 5

【0176】

2、4 - 1 B B シグナル伝達経路に対するアゴニスト活性の検出

実施例 2 に記載されたような N F - κ B ルシフェラーゼレポーター遺伝子実験により、ヒト化抗体の 4 - 1 B B / N F - κ B シグナルへの活性化を検出し、結果を図 7、表 6 に示している。

【0177】

その結果、F c γ R I I b 架橋が付加された後、かかるヒト化抗 4 - 1 B B 単ドメイン抗体は、4 - 1 B B / N F - κ B ルシフェラーゼレポーター遺伝子シグナル伝達経路への活性化を示し、C 5、C 5 __ V 1、C 5 __ V 2、C 5 __ V 3 の活性化能力は、U r e l u m a b (W O 2 0 0 5 0 3 5 5 8 4 A による) 対照に相当する。

【0178】

【表 6】

表 6. ヒト化前／後の抗 4 - 1 B B 単ドメイン抗体の N F - κ B シグナル伝達経路への活性化作用

抗体番号	H E K 2 9 3 - 4 - 1 B B 細胞の活性化		F c γ R I I b 媒介性の H E K 2 9 3 - 4 - 1 B B 細胞の活性化	
	活性	E m a x 変化倍率	活性	E m a x 変化倍率
C 5	—	1. 0 8	+++	2. 7 1
C 5 __ V 1	—	1. 1 4	++	2. 2 8
C 5 __ V 2	—	1. 3 7	++	2. 0 2
C 5 __ V 3	—	1. 0 1	+	1. 8 3
U r e l u m a b	+	1. 7 0	+++	2. 6 1

(注：活性は、E m a x 変化倍率 < 1. 5 の場合に「—」と定義され、1. 5 ~ 2 の場合に「+」と定義され、2 ~ 2. 5 の場合に「++」と定義され、2. 5 ~ 3 の場合に「+++」と定義され、> 3 の場合に「++++」と定義される)

10

20

30

40

50

【0179】

実施例5に記載されたようなFACS検出方法により、C5__V2とC5__V2-YTIの抗原への結合活性を比較し、結果を図8、表7に示している。その結果、かかるC5__V2-YTIは、HEK293-Hu4-1BB細胞表面の4-1BBに対して良好な結合活性を維持し、C5__V2に相当する。

【0180】

【表7】

表7. C5__V2、C5__V2-YTIのヒト4-1BB高発現細胞株への親和性EC₅₀値

抗体番号	EC ₅₀ (nM)	最大蛍光値
C5__V2	0.98	53669
C5__V2-YTI	0.62	53825
Urelumab	1.64	39666
IgG1	—	67

10

【0181】

実施例8. 抗4-1BB単ドメイン抗体のVHフレームワーク(FR)に対するアミノ酸改変及びpre-ADAの検出

本開示に係る抗4-1BB単ドメイン抗体C5__V2-YTIに対して表8に示すようにC末端改変を行った。

20

【0182】

【表8】

表8. C5__V2-YTIのC末端改変した各変異体

番号	配列修飾 (C末端配列)
C5__V2-YTI-42	未修飾 (VTVSS)
C5__V2-YTI-43	C末端プラスA (VTVSSA)
C5__V2-YTI-44	S113A (VTVSA)
C5__V2-YTI-46	S113F (VTVSF)
C5__V2-YTI-47	S113G (VTVSG)
C5__V2-YTI-48	S113L (VTVSL)
C5__V2-YTI-49	S113P (VTVSP)
C5__V2-YTI-50	S113R (VTVSR)
C5__V2-YTI-51	S113T (VTVST)
C5__V2-YTI-52	S113V (VTVSV)
C5__V2-YTI-53	S113A、C末端プラスA (VTVSAA)
C5__V2-YTI-54	S112F, S113P (VTVFP)
C5__V2-YTI-55	S112F, S113P、C末端プラスA (VTVFPA)
C5__V2-YTI-56	S112R, S113P (VTVRP)
C5__V2-YTI-57	S112R (VTVRS)
C5__V2-YTI-58	S112R、C末端プラスA (VTVRSA)

30

40

> C5__V2-YTI-42 (配列番号20)

【化16】

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFTFSYAMSWVR
QAPGKGLEWVSDINSGGESTFYEDSVKGRFTISRDN
AKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHPLTYTIATMNDYDYWGQ
GTLVTVSS

50

> C 5 _ V 2 - Y T I - 4 3 (配列番号 2 1)

【化 1 7】

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFTFSYAMSWVR
QAPGKGLEWVSDINSGGESTFYEDSVKGRFTISRDNANK
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHPLTYTIATMNDYDYWGQ
GTLVTVSSA

> C 5 _ V 2 - Y T I - 4 4 (配列番号 2 2)

【化 1 8】

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFTFSYAMSWVR
QAPGKGLEWVSDINSGGESTFYEDSVKGRFTISRDNANK
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHPLTYTIATMNDYDYWGQ
GTLVTVSA

10

> C 5 _ V 2 - Y T I - 4 6 (配列番号 2 3)

【化 1 9】

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFTFSYAMSWVR
QAPGKGLEWVSDINSGGESTFYEDSVKGRFTISRDNANK
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHPLTYTIATMNDYDYWGQ
GTLVTVSF

20

> C 5 _ V 2 - Y T I - 4 7 (配列番号 2 4)

【化 2 0】

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFTFSYAMSWVR
QAPGKGLEWVSDINSGGESTFYEDSVKGRFTISRDNANK
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHPLTYTIATMNDYDYWGQ
GTLVTVSG

> C 5 _ V 2 - Y T I - 4 8 (配列番号 2 5)

【化 2 1】

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFTFSYAMSWVR
QAPGKGLEWVSDINSGGESTFYEDSVKGRFTISRDNANK
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHPLTYTIATMNDYDYWGQ
GTLVTVSL

30

> C 5 _ V 2 - Y T I - 4 9 (配列番号 2 6)

【化 2 2】

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFTFSYAMSWVR
QAPGKGLEWVSDINSGGESTFYEDSVKGRFTISRDNANK
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHPLTYTIATMNDYDYWGQ
GTLVTVSP

40

> C 5 _ V 2 - Y T I - 5 0 (配列番号 2 7)

【化 2 3】

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFTFSYAMSWVR
QAPGKGLEWVSDINSGGESTFYEDSVKGRFTISRDNANK
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHPLTYTIATMNDYDYWGQ
GTLVTVSR

> C 5 _ V 2 - Y T I - 5 1 (配列番号 2 8)

50

【化 2 4】

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFTTFSSYAMSWVR
QAPGKGLEWVSDINSGGESTFYEDSVKGRFTISRDNANKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHPLTYTIATMNDYDYWGQ
GTLVTVST

> C 5 _ V 2 - Y T I - 5 2 (配列番号 2 9)

【化 2 5】

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFTTFSSYAMSWVR
QAPGKGLEWVSDINSGGESTFYEDSVKGRFTISRDNANKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKIIPLTYYTIATMNDYDYWGQ
GTLVTVSV

10

> C 5 _ V 2 - Y T I - 5 3 (配列番号 3 0)

【化 2 6】

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFTTFSSYAMSWVR
QAPGKGLEWVSDINSGGESTFYEDSVKGRFTISRDNANKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHPLTYTIATMNDYDYWGQ
GTLVTVSAA

20

> C 5 _ V 2 - Y T I - 5 4 (配列番号 3 1)

【化 2 7】

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFTTFSSYAMSWVR
QAPGKGLEWVSDINSGGESTFYEDSVKGRFTISRDNANKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHPLTYTIATMNDYDYWGQ
GTLVTVFP

> C 5 _ V 2 - Y T I - 5 5 (配列番号 3 2)

【化 2 8】

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFTTFSSYAMSWVR
QAPGKGLEWVSDINSGGESTFYEDSVKGRFTISRDNANKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHPLTYTIATMNDYDYWGQ
GTLVTVFPA

30

> C 5 _ V 2 - Y T I - 5 6 (配列番号 3 3)

【化 2 9】

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFTTFSSYAMSWVR
QAPGKGLEWVSDINSGGESTFYEDSVKGRFTISRDNANKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHPLTYTIATMNDYDYWGQ
GTLVTVRP

40

> C 5 _ V 2 - Y T I - 5 7 (配列番号 3 4)

【化 3 0】

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFTTFSSYAMSWVR
QAPGKGLEWVSDINSGGESTFYEDSVKGRFTISRDNANKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHPLTYTIATMNDYDYWGQ
GTLVTVRS

> C 5 _ V 2 - Y T I - 5 8 (配列番号 3 5)

50

【化 3 1】

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFTFSSYAMSWVR
QAPGKGLEWVSDINSGGESTFYEDSVKGRFTISRDNAKN
TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHPLTYTIATMNDYDYWGQ
GTLVTVRSA

配列番号 20～35 で示される配列の N 末端及び I g G 1 の F c（配列番号 13）の C 末端を G G G G（配列番号 197）リンカーで連結し、表 9 及び表 10 の検出を行った。例示的な配列は以下の通りであり、ここで、イタリック体部は I g G 1 の F c、下線部はリンカーである。

【0183】

> C5_V2-YTI-42（配列番号 36）

【化 3 2】

DKTHITCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGQV
QLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFTFSSYAMSWVRQAP
GKGLEWVSDINSGGESTFYEDSVKGRFTISRDNAKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAKHPLTYTIATMNDYDYWGQGTL
VTVSS

実施例 2 の実験方法に従って C5_V2-YTI の C 末端改変した各変異体に E L I S A 検出を行い、結果を表 9 に示している。その結果、C5_V2-YTI-53、C5_V2-YTI-54、C5_V2-YTI-55、C5_V2-YTI-56、C5_V2-YTI-57 及び C5_V2-YTI-58 という 6 つの分子は、p r e - A D A 結合シグナルが明らかに低減された。

【0184】

【表 9】

表 9. C5_V2-YTI の C 末端改変した各修飾変異体の p r e - A D A 結合シグナルの低減状況

番号	配列修飾 (C 末端配列)	平均シグナル 低減 (%)	p r e - A D A 陽性 個体数*
C5_V2-YTI-42	未修飾 (VTVSS)	—	8
C5_V2-YTI-43	C 末端プラス A (VTVSSA)	75.1%	1
C5_V2-YTI-44	S113A (VTVSA)	6.2%	7
C5_V2-YTI-46	S113F (VTVSF)	13.4%	7
C5_V2-YTI-53	S113A、C 末端プラス A (VTVSAA)	73.1%	2
C5_V2-YTI-54	S112F、S113P (VTVFP)	55.7%	4
C5_V2-YTI-55	S112F、S113P、C 末端 プラス A (VTVFPA)	79.5%	0
C5_V2-YTI-56	S112R、S113P (VTVRP)	66.6%	4
C5_V2-YTI-57	S112R (VTVRS)	61.4%	4
C5_V2-YTI-58	S112R、C 末端プラス A (VTVRSA)	81.4%	0

（*表 9 の実験に用いられた血清は、実施例 1 の検出で p r e - A D A 陽性を示した 8 つの 1 人分の血清試料である）

実施例 3 の実験方法に従って C 5 _ V 2 - Y T I の C 末端改変した各変異体に E L I S A 検出を行い、結果を表 1 0 に示している。その結果、何れのクローンも平均シグナル低減が 4 0 % 近く又はそれを超えたので、何れの修飾も単一ドメイン抗体の p r e - A D A への結合を明らかに低減することができる。

【 0 1 8 5 】

【表 1 0】

表 1 0 . C 5 _ V 2 - Y T I の C 末端改変した各修飾変異体の p r e - A D A 結合シグナルの低減状況

番号	平均シグナル 低減 (%)	p r e - A D A 陽性個体数*
C 5 _ V 2 - Y T I - 4 2	—	2 1
C 5 _ V 2 - Y T I - 5 3	5 0 . 8 %	7
C 5 _ V 2 - Y T I - 5 4	4 0 . 9 %	7
C 5 _ V 2 - Y T I - 5 5	5 7 . 0 %	3
C 5 _ V 2 - Y T I - 5 6	4 6 . 5 %	7
C 5 _ V 2 - Y T I - 5 7	4 5 . 2 %	8
C 5 _ V 2 - Y T I - 5 8	5 9 . 5 %	2

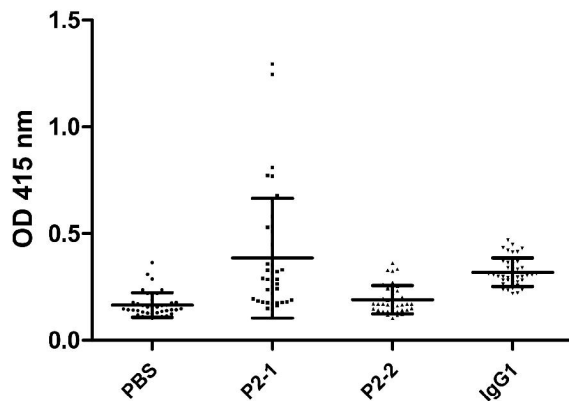
(* 表 1 0 の実験に用いられた血清は、実施例 1 中の 4 0 個の 1 人分の血清試料である)

【 0 1 8 6 】

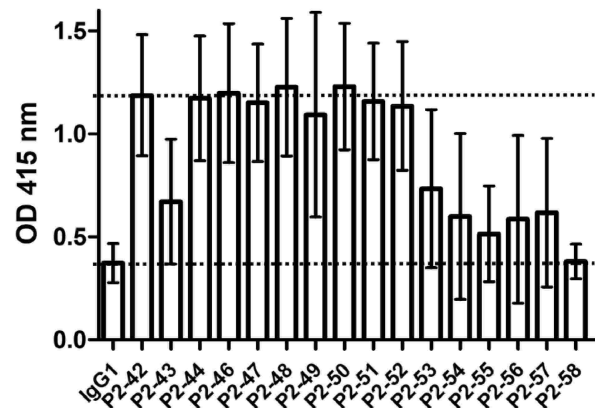
以上、本開示の具体的な実施形態を説明したが、当業者は、それらが単に例示的な説明であり、本開示の原理及び主旨から逸脱することなく、これらの実施形態に種々の変更や修正を行うことができると理解すべきである。従って、本開示の請求範囲は、添付される特許請求の範囲によって限定される。

【図面】

【図 1】



【図 2】



10

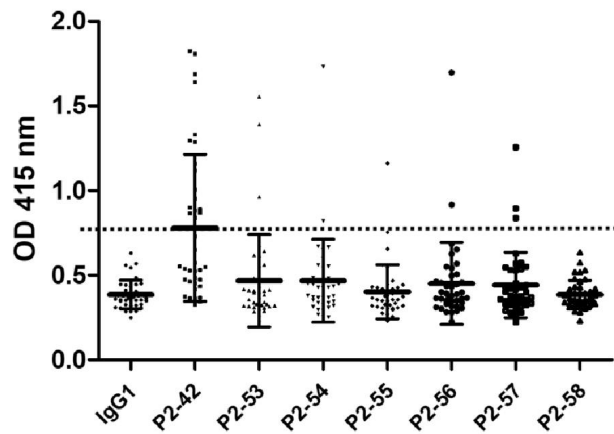
20

30

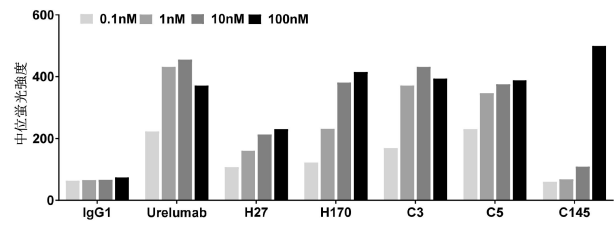
40

50

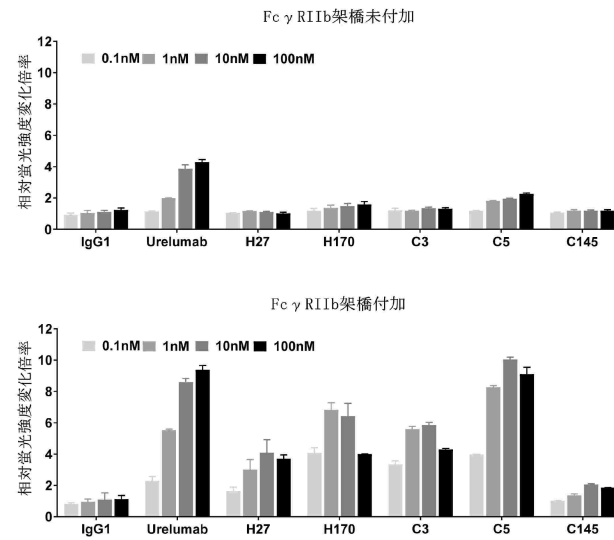
【図 3】



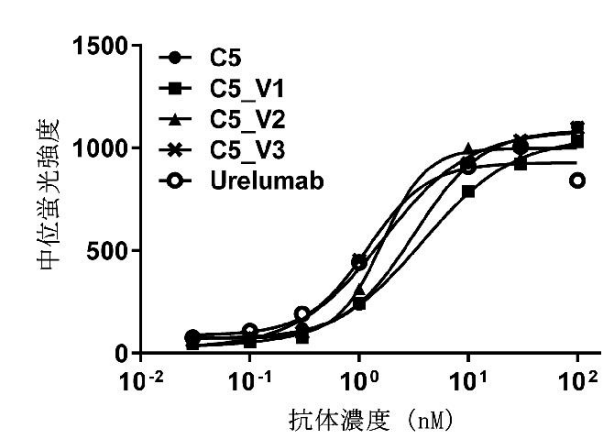
【図 4】



【図 5】



【図 6】



10

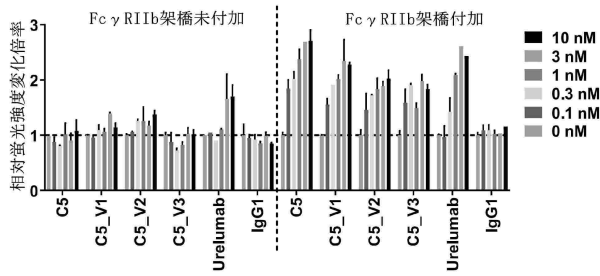
20

30

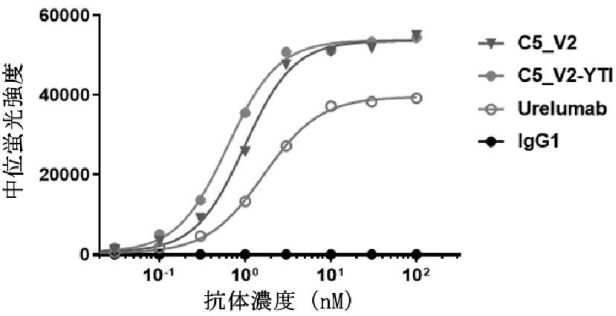
40

50

【図 7】

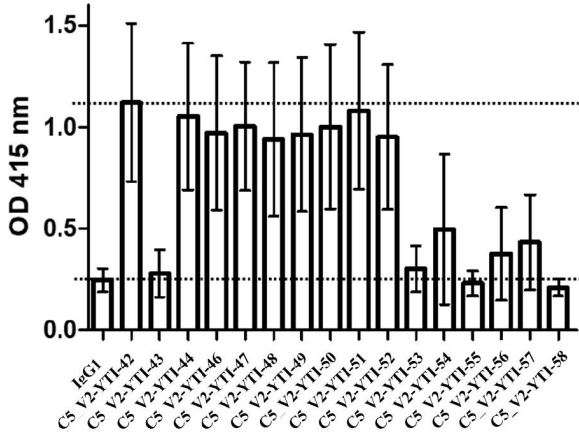


【図 8】

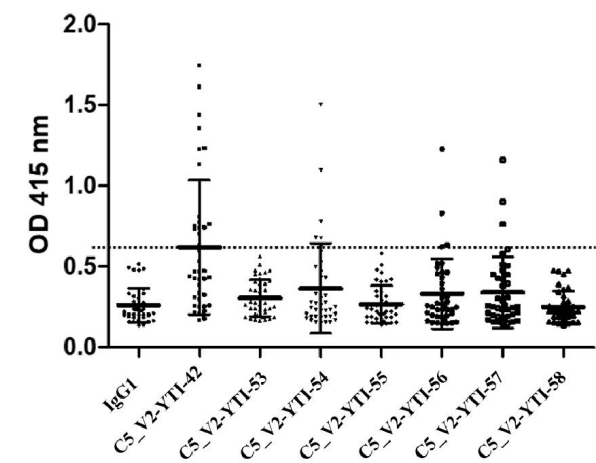


10

【図 9】



【図 10】



20

【配列表】

2024543134000001.xml

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/134923

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K 16/00(2006.01)i; C07K 16/18(2006.01)i; C07K 16/42(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K; 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) CNTXT; WPABS; ENTXTC; DWPI; VEN; CJFD; CNK; Genbank; 中国专利生物序列检索, China Patents Biological Sequence Search; 万方, WANFANG; Pubmed; ISI web of Science; 免疫球蛋白单可变结构域, 单域抗体, 纳米抗体, VHH, sdAb, 抗药物抗体, 预存抗体, 免疫性, 融合蛋白, 突变, C末端, 降低, 人源化, 修饰, 申请人/发明人, anti-drug antibody, nanobody, single-domain antibody, pre-ADA, immunogenicity, fusion, mutation, modified, C-terminal, reduce, humanization, 112F, 112R, 113P, vtss, SEQ ID NOs: 6-9, 15-19		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 103917557 A (GLAXO GROUP LTD.) 09 July 2014 (2014-07-09) claims 6-57, and description, paragraph 11	1, 3-7, 9-20
Y	CN 103917557 A (GLAXO GROUP LTD.) 09 July 2014 (2014-07-09) claims 6-57, and description, paragraph 11	7, 9-20
X	CN 104203975 A (ABLYNX NV) 10 December 2014 (2014-12-10) claims 1-5 and 29-36, and description, paragraphs 88-90	1, 3-6, 9-20
X	WO 2014111550 A1 (GLAXOSMITHKLINE INTELLECTUAL PROPERTY DEVELOPMENT LIMITED) 24 July 2014 (2014-07-24) claims 1-4 and 12-23	1, 3-6, 9-20
X	EP 2944653 A1 (ABLYNX N.V.) 18 November 2015 (2015-11-18) claims 1-12	1, 3-6, 9-20
X	CN 107531777 A (YIZISTEIN LIMITED PARTNERSHIP INC.) 02 January 2018 (2018-01-02) claims 1-20, and description, paragraphs 6-16	1-2, 4-7, 9-20
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 09 January 2023		Date of mailing of the international search report 19 January 2023
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China 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/CN2022/134923

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 107531777 A (INHIBRX BIOPHARMA, LLC) 02 January 2018 (2018-01-02) claims 1-20, and description, paragraphs 6-16	7, 9-20
A	CN 113621065 A (WUHAN HSA BIND BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 09 November 2021 (2021-11-09) entire document	1-20
A	US 2013336973 A1 (ZYMEWORKS INC.) 19 December 2013 (2013-12-19) entire document	1-20
A	WO 2015173325 A2 (ABLYNX NV) 19 November 2015 (2015-11-19) claims 1-7, and description, pp. 40-46	1-20
A	ROSSOTTI, M. A. et al. "Immunogenicity and humanization of single-domain antibodies" <i>THE FEBS JOURNAL</i> , Vol. 289, No. 14, 09 March 2021 (2021-03-09), pp. 4304-4327	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2022/134923
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: [1] The actually submitted sequence table is an XML file in Standard ST.26.		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2022/134923
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.: 19 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: [1] Claim 19 relates to a method for preventing or treating a disease, which belongs to a method for treating a disease as defined in PCT Rule 39.1(iv). The present report was made on the basis of a modified immunoglobulin single variable domain or a protein thereof, and a pharmaceutical use of a polypeptide.	10
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).	20
		30
		40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/134923

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	103917557	A	09 July 2014	JP	2020054374	A	09 April 2020
				ES	2813432	T3	23 March 2021
				EP	2744822	A2	25 June 2014
				CN	108178800	A	19 June 2018
				SG	10201605891 T	A	29 September 2016
				CO	7020851	A2	11 August 2014
				MA	35428	B1	01 September 2014
				DO	P2014000029	A	31 October 2014
				TW	201321405	A	01 June 2013
				US	2021017293	A1	21 January 2021
				IL	230918	D0	31 March 2014
				NZ	621203	A	31 March 2016
				HK	1214281	A1	22 July 2016
				AU	2019201505	A1	28 March 2019
				UA	118833	C2	25 March 2019
				BR	112014003679	A2	07 March 2017
				JP	2018117623	A	02 August 2018
				SG	2014010482	A	28 April 2014
				EA	201490262	A1	30 September 2014
				EP	3339322	A2	27 June 2018
				KR	20190113996	A	08 October 2019
				MX	2014001883	A	27 May 2014
				AR	087521	A1	26 March 2014
				EP	2987806	A2	24 February 2016
				US	2014227259	A1	14 August 2014
				MY	167125	A	13 August 2018
				WO	2013024059	A2	21 February 2013
				UY	34254	A	05 April 2013
				AU	2016277685	A1	19 January 2017
				JP	2014525752	A	02 October 2014
				AU	2012296961	A1	13 March 2014
				PE	20141522	A1	17 November 2014
				KR	20140054262	A	08 May 2014
				CA	2845029	A1	21 February 2013
CN	104203975	A	10 December 2014	RU	2019128430	A	25 October 2019
				CA	3142288	A1	27 December 2012
				CA	2837998	A1	27 December 2012
				SG	10201707604 S	A	29 November 2017
				BR	122017005075	A2	03 September 2019
				US	2017275361	A1	28 September 2017
				US	2017275360	A1	28 September 2017
				SG	10201805064 S	A	30 July 2018
				CN	108659120	A	16 October 2018
				US	2021388061	A1	16 December 2021
				NZ	716279	A	28 July 2017
				US	2021403536	A1	30 December 2021
				US	2021388062	A1	16 December 2021
				BR	122018012485	B1	20 September 2022
				CN	108653728	A	16 October 2018
				KR	20220114104	A	17 August 2022

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

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/134923

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		IL 293155 A	01 July 2022
		CN 108659121 A	16 October 2018
		AU 2012273929 B2	27 April 2017
		KR 20190041513 A	22 April 2019
		KR 20140040779 A	03 April 2014
		IL 293163 A	01 July 2022
		CN 108663504 A	16 October 2018
		LT 2723769 T	10 April 2017
		IL 229503 D0	30 January 2014
		JP 2014520134 A	21 August 2014
		NZ 617995 A	24 June 2016
		US 2022119497 A1	21 April 2022
		PL 2723769 T3	31 July 2017
		DK 2723769 T3	03 April 2017
		AU 2021201506 A1	25 March 2021
		US 2014199295 A1	17 July 2014
		IN 373CHN2014 A	03 April 2015
		AU 2020230299 A1	01 October 2020
		KR 20180086280 A	30 July 2018
		JP 2022031790 A	22 February 2022
		HU E031828 T2	28 August 2017
		AU 2017204339 A1	13 July 2017
		SG 194982 A1	30 December 2013
		IL 250396 D0	30 March 2017
		MX 2013014614 A	01 August 2014
		AU 2019201606 A1	04 April 2019
		ZA 201309295 B	28 January 2015
		US 2020325221 A1	15 October 2020
		ES 2622006 T3	05 July 2017
		CA 3141978 A1	27 December 2012
		EP 2723769 A2	30 April 2014
		RU 2014102007 A	27 November 2015
		KR 20190107200 A	18 September 2019
WO	2014111550	A1	24 July 2014
None			
EP	2944653	A1	18 November 2015
		EP 3363813 A1	22 August 2018
		EP 3020728 A1	18 May 2016
		SI 2723769 T1	31 May 2017
		RS 55775 B1	31 July 2017
		EP 2944654 A1	18 November 2015
		EP 2974737 A1	20 January 2016
		EP 3363812 A1	22 August 2018
CN	107531777	A	02 January 2018
		JP 2018504410 A	15 February 2018
		CA 2974192 A1	28 July 2016
		US 2016207981 A1	21 July 2016
		JP 2022034038 A	02 March 2022
		WO 2016118733 A1	28 July 2016
		AU 2021202314 A1	13 May 2021
		AU 2016209247 A1	10 August 2017
		US 2020140525 A1	07 May 2020
		CN 114478753 A	13 May 2022

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

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/134923

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
				EP	3247407	A1	29 November 2017
CN	113621065	A	09 November 2021	None			
US	2013336973	A1	19 December 2013	WO	2013166594	A1	14 November 2013
				JP	2015522525	A	06 August 2015
				CA	2872540	A1	14 November 2013
				US	2016257763	A1	08 September 2016
				AU	2013258834	A1	27 November 2014
				EP	2847230	A1	18 March 2015
				ES	2843054	T3	15 July 2021
WO	2015173325	A2	19 November 2015	RS	63085	B1	29 April 2022
				BR	112016026773	A2	12 December 2017
				CA	2948076	A1	19 November 2015
				HR	P20220400	T1	27 May 2022
				AU	2020202570	A1	07 May 2020
				PT	3248986	T	05 April 2022
				AU	2018204226	A1	05 July 2018
				LT	3248986	T	25 March 2022
				LT	3143042	T	27 July 2020
				EP	3143042	A2	22 March 2017
				PL	3248986	T3	16 May 2022
				DK	3248986	T3	04 April 2022
				HU	E058008	T2	28 June 2022
				RS	60717	B1	30 September 2020
				AU	2015261536	A1	17 November 2016
				ES	2815572	T3	30 March 2021
				EP	3702369	A1	02 September 2020
				EP	3693386	A1	12 August 2020
				ES	2912069	T3	24 May 2022
				HU	E050007	T2	30 November 2020
				SI	3248986	T1	29 April 2022
				CN	113717280	A	30 November 2021
				EP	3248986	A2	29 November 2017
				SI	3143042	T1	31 August 2020
				PT	3143042	T	01 September 2020
				DK	3143042	T3	31 August 2020
				PL	3143042	T3	16 November 2020
				HR	P20200966	T1	16 October 2020
				AU	2020202855	A1	21 May 2020
				CN	106661100	A	10 May 2017

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/CN2022/134923
A. 主题的分类 C07K 16/00(2006.01)i; C07K 16/18(2006.01)i; C07K 16/42(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. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C07K; 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)) CNTXT;WPABS;ENTXTC;DWPI;VEN;CJFD;CNK;Genbank;中国专利生物序列检索;万方; Pubmed;ISI web of Science;免疫球蛋白单可变结构域, 单域抗体, 纳米抗体, VHH, sdAb, 抗药物抗体, 预存抗体, 免疫性, 融合蛋白, 突变, C末端, 降低, 人源化, 修饰, 申请人/发明人, anti-drug antibody, nanobody, single-domain antibody, pre-ADA, immunogenicity, fusion, mutation, modified, C-terminal, reduce, humanization, I12F, I12R, I13P, vtvs, SEQ ID NOs:6-9, 15-19		
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
X	CN 103917557 A (葛兰素集团有限公司) 2014年7月9日 (2014 - 07 - 09) 权利要求6-57, 说明书第11段	1, 3-7, 9-20
Y	CN 103917557 A (葛兰素集团有限公司) 2014年7月9日 (2014 - 07 - 09) 权利要求6-57, 说明书第11段	7, 9-20
X	CN 104203975 A (埃博灵克斯股份有限公司) 2014年12月10日 (2014 - 12 - 10) 权利要求1-5, 29-36, 说明书第88-90段	1, 3-6, 9-20
X	W0 2014111550 A1 (GLAXOSMITHKLINE INTELLECTUAL PROPERTY DEVELOPMENT LIMITED) 2014年7月24日 (2014 - 07 - 24) 权利要求1-4, 12-23	1, 3-6, 9-20
X	EP 2944653 A1 (ABLYNX N.V.) 2015年11月18日 (2015 - 11 - 18) 权利要求1-12	1, 3-6, 9-20
X	CN 107531777 A (英伊布里斯克斯有限合伙公司) 2018年1月2日 (2018 - 01 - 02) 权利要求1-20, 说明书第6-16段	1-2, 4-7, 9-20
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 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 2023年1月9日		国际检索报告邮寄日期 2023年1月19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		受权官员 毛颖 电话号码 86-(10)-53961979

PCT/ISA/210 表(第2页) (2015年1月)

10

20

30

40

50

国际申请号

PCT/CN2022/134923

类型*

引用文件，必要时，指明相关段落

相关的权利要求

Y

CN 107531777 A (英伊布里克斯有限合伙公司) 2018年1月2日 (2018 - 01 - 02)
权利要求1-20, 说明书第6-16段

7, 9-20

A

CN 113621065 A (武汉海沙百得生物技术有限公司) 2021年11月9日 (2021 - 11 - 09)
全文

1-20

A

US 2013336973 A1 (ZYMEWORKS INC.) 2013年12月19日 (2013 - 12 - 19)
全文

1-20

WO 2015173325 A2 (ABLYNX NV) 2015年11月19日 (2015 - 11 - 19)
权利要求1-7, 说明书第40-46页

1-20

ROSSOTTI, M. A. 等. "Immunogenicity and humanization of single-domain antibodies"
THE FEBS JOURNAL, 第289卷, 第14期, 2021年3月9日 (2021 - 03 - 09),
第4304-4327页

1-20

PCT/ISA/210 表(第2页) (2015年1月)

国际申请号

PCT/CN2022/134923

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表进行的:

- a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的：
 ☒ 附件C/ST. 25文本文件形式
 ☐ 纸件或图形文件形式
- b. ☐ 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：
- c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的：
 ☐ 附件C/ST. 25文本文件形式（细则13之三. 1(a)）
 ☐ 纸件或图形文件形式（细则13之三. 1(b)和行政规程第713段）

2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，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。

3. 补充意见:

[1] 实际提交的序列列表是ST.26标准的XML文件。

PCT/ISA/210 表(第1页续页) (2015年1月)

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2022/134923
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： 19 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19涉及预防或治疗疾病的方法，属于PCT细则39.1(iv)规定的疾病的治疗方法。本报告基于经修饰的免疫球蛋白单可变结构域或其蛋白、多肽的药物制备用途作出。	10
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。	20
		30
		40
		50

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/134923

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)
CN	103917557	A	2014年7月9日	JP	2020054374	A	2020年4月9日
				ES	2813432	T3	2021年3月23日
				EP	2744822	A2	2014年6月25日
				CN	108178800	A	2018年6月19日
				SG	10201605891T	A	2016年9月29日
				CO	7020851	A2	2014年8月11日
				MA	35428	B1	2014年9月1日
				DO	P2014000029	A	2014年10月31日
				TW	201321405	A	2013年6月1日
				US	2021017293	A1	2021年1月21日
				IL	230918	DO	2014年3月31日
				NZ	621203	A	2016年3月31日
				HK	1214281	A1	2016年7月22日
				AU	2019201505	A1	2019年3月28日
				UA	118833	C2	2019年3月25日
				BR	112014003679	A2	2017年3月7日
				JP	2018117623	A	2018年8月2日
				SG	2014010482	A	2014年4月28日
				EA	201490262	A1	2014年9月30日
				EP	3339322	A2	2018年6月27日
				KR	20190113996	A	2019年10月8日
				MX	2014001883	A	2014年5月27日
				AR	087521	A1	2014年3月26日
				EP	2987806	A2	2016年2月24日
				US	2014227259	A1	2014年8月14日
				MY	167125	A	2018年8月13日
				WO	2013024059	A2	2013年2月21日
				UY	34254	A	2013年4月5日
				AU	2016277685	A1	2017年1月19日
				JP	2014525752	A	2014年10月2日
				AU	2012296961	A1	2014年3月13日
				PE	20141522	A1	2014年11月17日
				KR	20140054262	A	2014年5月8日
				CA	2845029	A1	2013年2月21日
CN	104203975	A	2014年12月10日	RU	2019128430	A	2019年10月25日
				CA	3142288	A1	2012年12月27日
				CA	2837998	A1	2012年12月27日
				SG	10201707604S	A	2017年11月29日
				BR	122017005075	A2	2019年9月3日
				US	2017275361	A1	2017年9月28日
				US	2017275360	A1	2017年9月28日
				SG	10201805064S	A	2018年7月30日
				CN	108659120	A	2018年10月16日
				US	2021388061	A1	2021年12月16日
				NZ	716279	A	2017年7月28日
				US	2021403536	A1	2021年12月30日
				US	2021388062	A1	2021年12月16日
				BR	122018012485	B1	2022年9月20日
				CN	108653728	A	2018年10月16日
				KR	20220114104	A	2022年8月17日

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2015年1月)

10

20

30

40

50

国际检索报告 关于同族专利的信息				国际申请号 PCT/CN2022/134923			
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)	
				IL	293155	A	2022年7月1日
				CN	108659121	A	2018年10月16日
				AU	2012273929	B2	2017年4月27日
				KR	20190041513	A	2019年4月22日
				KR	20140040779	A	2014年4月3日
				IL	293163	A	2022年7月1日
				CN	108663504	A	2018年10月16日
				LT	2723769	T	2017年4月10日
				IL	229503	D0	2014年1月30日
				JP	2014520134	A	2014年8月21日
				NZ	617995	A	2016年6月24日
				US	2022119497	A1	2022年4月21日
				PL	2723769	T3	2017年7月31日
				DK	2723769	T3	2017年4月3日
				AU	2021201506	A1	2021年3月25日
				US	2014199295	A1	2014年7月17日
				IN	373CHN2014	A	2015年4月3日
				AU	2020230299	A1	2020年10月1日
				KR	20180086280	A	2018年7月30日
				JP	2022031790	A	2022年2月22日
				HU	E031828	T2	2017年8月28日
				AU	2017204339	A1	2017年7月13日
				SG	194982	A1	2013年12月30日
				IL	250396	D0	2017年3月30日
				MX	2013014614	A	2014年8月1日
				AU	2019201606	A1	2019年4月4日
				ZA	201309295	B	2015年1月28日
				US	2020325221	A1	2020年10月15日
				ES	2622006	T3	2017年7月5日
				CA	3141978	A1	2012年12月27日
				EP	2723769	A2	2014年4月30日
				RU	2014102007	A	2015年11月27日
				KR	20190107200	A	2019年9月18日
WO	2014111550	A1	2014年7月24日	无			
EP	2944653	A1	2015年11月18日	EP	3363813	A1	2018年8月22日
				EP	3020728	A1	2016年5月18日
				SI	2723769	T1	2017年5月31日
				RS	55775	B1	2017年7月31日
				EP	2944654	A1	2015年11月18日
				EP	2974737	A1	2016年1月20日
				EP	3363812	A1	2018年8月22日
CN	107531777	A	2018年1月2日	JP	2018504410	A	2018年2月15日
				CA	2974192	A1	2016年7月28日
				US	2016207981	A1	2016年7月21日
				JP	2022034038	A	2022年3月2日
				WO	2016118733	A1	2016年7月28日
				AU	2021202314	A1	2021年5月13日
				AU	2016209247	A1	2017年8月10日
				US	2020140525	A1	2020年5月7日
				CN	114478753	A	2022年5月13日

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2015年1月)

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/CN2022/134923			
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)	
				EP	3247407	A1	2017年11月29日
CN	113621065	A	2021年11月9日	无			
US	2013336973	A1	2013年12月19日	WO	2013166594	A1	2013年11月14日
				JP	2015522525	A	2015年8月6日
				CA	2872540	A1	2013年11月14日
				US	2016257763	A1	2016年9月8日
				AU	2013258834	A1	2014年11月27日
				EP	2847230	A1	2015年3月18日
				ES	2843054	T3	2021年7月15日
WO	2015173325	A2	2015年11月19日	RS	63085	B1	2022年4月29日
				BR	112016026773	A2	2017年12月12日
				CA	2948076	A1	2015年11月19日
				HR	P20220400	T1	2022年5月27日
				AU	2020202570	A1	2020年5月7日
				PT	3248986	T	2022年4月5日
				AU	2018204226	A1	2018年7月5日
				LT	3248986	T	2022年3月25日
				LT	3143042	T	2020年7月27日
				EP	3143042	A2	2017年3月22日
				PL	3248986	T3	2022年5月16日
				DK	3248986	T3	2022年4月4日
				HU	E058008	T2	2022年6月28日
				RS	60717	B1	2020年9月30日
				AU	2015261536	A1	2016年11月17日
				ES	2815572	T3	2021年3月30日
				EP	3702369	A1	2020年9月2日
				EP	3693386	A1	2020年8月12日
				ES	2912069	T3	2022年5月24日
				HU	E050007	T2	2020年11月30日
				SI	3248986	T1	2022年4月29日
				CN	113717280	A	2021年11月30日
				EP	3248986	A2	2017年11月29日
				SI	3143042	T1	2020年8月31日
				PT	3143042	T	2020年9月1日
				DK	3143042	T3	2020年8月31日
				PL	3143042	T3	2020年11月16日
				HR	P20200966	T1	2020年10月16日
				AU	2020202855	A1	2020年5月21日
				CN	106661100	A	2017年5月10日

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2015年1月)

10

20

30

40

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)

A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	3/00 (2006.01)	A 6 1 P	3/00	
A 6 1 P	37/00 (2006.01)	A 6 1 P	37/00	
A 6 1 P	31/00 (2006.01)	A 6 1 P	31/00	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 K	31/7088 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	E
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	39/395	T
		A 6 1 K	39/395	Q
		A 6 1 K	39/395	U
		A 6 1 K	31/7088	
		A 6 1 K	48/00	
		A 6 1 K	35/76	

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,
CV,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,I
T,JM,JO,JP,KE,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,NG,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

i n a

- (74)代理人 100145403
弁理士 山尾 憲人
- (74)代理人 100106518
弁理士 松谷 道子
- (74)代理人 100138911
弁理士 櫻井 陽子
- (72)発明者 王 楠
中華人民共和国 2 0 1 2 1 0 上海市浦東新区張江鎮海科路 1 2 8 8 号
- (72)発明者 楊 曉峰
中華人民共和国 2 0 1 2 1 0 上海市浦東新区張江鎮海科路 1 2 8 8 号
- (72)発明者 張 偉
中華人民共和国 2 0 1 2 1 0 上海市浦東新区張江鎮海科路 1 2 8 8 号
- (72)発明者 曹 志亮
中華人民共和国 2 0 1 2 1 0 上海市浦東新区張江鎮海科路 1 2 8 8 号
- (72)発明者 葉 浩
中華人民共和国 2 0 1 2 1 0 上海市浦東新区張江鎮海科路 1 2 8 8 号
- (72)発明者 沈 余紅
中華人民共和国 2 0 1 2 1 0 上海市浦東新区張江鎮海科路 1 2 8 8 号
- (72)発明者 廖 成
中華人民共和国 2 0 1 2 1 0 上海市浦東新区張江鎮海科路 1 2 8 8 号

F ターム (参考)

4C084 AA13 NA05 NA13 ZB07 ZB26 ZB32 ZC21
4C085 AA13 AA14 BB31 BB36 BB42 CC22 CC23 EE01
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA13 NA14 ZB07 ZB26 ZB32
ZC21
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 NA05 NA13 ZB07 ZB26 ZB32 ZC21
4H045 AA11 AA30 BA41 CA40 DA76 EA22 EA28 FA72 FA74