(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-512865
(P2025-512865A)
(43)公表日　令和7年4月22日(2025.4.22)

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）	
C07K	*16/18*	*(2006.01)*	C07K	16/18		ZNA	4B064
C12N	*15/13*	*(2006.01)*	C12N	15/13			4B065
C07K	*19/00*	*(2006.01)*	C07K	19/00			4C076
C12N	*15/62*	*(2006.01)*	C12N	15/62		Z	4C085
C12N	*15/63*	*(2006.01)*	C12N	15/63		Z	4H045

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全66頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-557727(P2024-557727)
(86)(22)出願日　令和5年3月31日(2023.3.31)
(85)翻訳文提出日　令和6年11月26日(2024.11.26)
(86)国際出願番号　PCT/CN2023/085559
(87)国際公開番号　WO2023/186120
(87)国際公開日　令和5年10月5日(2023.10.5)
(31)優先権主張番号　202210337315.X
(32)優先日　令和4年3月31日(2022.3.31)
(33)優先権主張国・地域又は機関
中国(CN)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV
最終頁に続く

(71)出願人　521530738
普米斯生物技術（珠海）有限公司
ＢＩＯＴＨＥＵＳ ＩＮＣ．
中華人民共和国５１９０８０広東省珠海市香洲区唐家湾鎮科技七路１号４棟１０－Ｂ単元
１０Ｂ，ＢＵＩＬＤＩＮＧ ４，ＮＯ １ ＫＥＪＩ ７ＴＨ ＲＯＡＤ，ＴＡＮＧＪＩＡＷＡＮ ＴＯＷＮ，ＸＩＡＮＧＺＨＯＵ ＤＩＳＴＲＩＣＴ，ＺＨＵＨＡＩ，ＧＵＡＮＧＤＯＮＧ ５１９０８０，ＰＥＯＰＬＥ’Ｓ ＲＥＰＵＢＬＩＣ ＯＦ ＣＨＩＮＡ
(74)代理人　100145403
弁理士　山尾 憲人
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　抗血清アルブミンナノボディおよびその誘導体

(57)【要約】
本発明は、血清アルブミンに特異的に結合するナノ抗体またはその抗原結合断片、このナノボディまたはその抗原結合断片を含む誘導体、この抗体またはその抗原結合断片をコードする核酸、これらを含む宿主細胞、および関連する使用に関する。さらに、本発明は、抗体もしくはその抗原結合断片または誘導体の治療的使用に関する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
血清アルブミンに特異的に結合することができるナノボディまたはその抗原結合断片であって、前記ナノボディまたはその抗原結合断片が以下を含み：
（ａ）以下からなる群より選択される構造を有するＣＤＲ１：$X_1X_2X_3LX_4YYX_5$（式Ｉ，配列番号７２）、ＳＧＦＴＬＤＹＹＡ（配列番号３０）、ＧＳＩＷＧＩＹＨ（配列番号３７）、ＧＦＴＦＳＩＹＳ（配列番号３１）、ＧＳＩＦＴＦＹＲ（配列番号３３）；
（ｂ）以下からなる群より選択される構造を有するＣＤＲ２：$IX_6SSGGX_7X_8$（式ＩＩ、配列番号７３）、ＩＴＶＤＧＳＴ（配列番号４６）、ＩＳＳＧＧＳＰ（配列番号４０）、ＩＴＴＤＴＳＴ（配列番号４２）；
（ｃ）以下からなる群より選択される構造を有するＣＤＲ３：$AAAX_9LECRTX_{10}X_{11}X_{12}X_{13}YX_{14}Y$（式ＩＩＩ，配列番号７４）、$AAATX_{15}ECRGRSSSYDY$（式ＩＶ，配列番号７５）、ＡＡＡＬＬＥＣＲＶＲＳＷＰＳＤＮ（配列番号４９）、ＡＡＡＶＬＥＣＲＡＡＥＹＶＮＳ（配列番号５４）、ＤＩＲＮＶＧＧＤＹ（配列番号５７）、ＳＰＩＴＳＩＦＫＡ（配列番号４８）、ＮＶＲＮＶＥＲＤＹ（配列番号５０）；
ここで、
X_1が、（ｉ）アミノ酸残基Ｇ、Ｒ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；
X_2が、（ｉ）アミノ酸残基Ｆ、Ａ、Ｓ、Ｅ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；
X_3が、（ｉ）アミノ酸残基Ｔ、Ｑ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；
X_4が、（ｉ）アミノ酸残基Ｄ、Ｅ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；
X_5が、（ｉ）アミノ酸残基Ａ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；
X_6が、（ｉ）アミノ酸残基Ａ、Ｓ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；
X_7が、（ｉ）アミノ酸残基Ａ、Ｓ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；
X_8が、（ｉ）アミノ酸残基Ｔ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；
X_9が、（ｉ）アミノ酸残基Ｔ、Ｖ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；
X_{10}が、（ｉ）アミノ酸残基Ｔ、Ｖ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；
X_{11}が、（ｉ）アミノ酸残基Ｖ、Ｉ、Ｌ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；
X_{12}が、（ｉ）アミノ酸残基Ｒ、Ｖ、Ｔ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；
X_{13}が、（ｉ）アミノ酸残基Ｇ、Ｅ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；
X_{14}が、（ｉ）アミノ酸残基Ｄ、Ａ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；
X_{15}が、（ｉ）アミノ酸残基Ｌ、Ｆ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；
好ましくは、前記ナノボディまたはその抗原結合断片が、配列番号３０～３８のいずれか１個に記載のＣＤＲ１；配列番号３９～４６のいずれか１個に記載のＣＤＲ２；および

配列番号４７～５９のいずれか１個に記載のＣＤＲ３を含む、ナノボディまたはその抗原結合断片。

【請求項２】

前記ナノボディまたはその抗原結合断片が以下を含み：

（ａ）ＣＤＲ１であって、$X_1X_2X_3LX_4YYX_5$（式Ｉ，配列番号７２）またはＳＧＦＴＬＤＹＹＡ（配列番号３０）で示される配列を有するもの；

（ｂ）ＣＤＲ２であって、$IX_6SSGGX_7X_8$（式ＩＩ，配列番号７３）で示される構造を有するもの；

（ｃ）ＣＤＲ３であって、$AAAX_9LECRTX_{10}X_{11}X_{12}X_{13}YX_{14}Y$（式ＩＩＩ，配列番号７４）、$AAATX_{15}ECRGRSSSYDY$（式ＩＶ，配列番号７５）、ＡＡＡＬＬＥＣＲＶＲＳＷＰＳＤＮ（配列番号４９），ＡＡＡＶＬＥＣＲＡＡＥＹＶＮＳ（配列番号５４）からなる群より選択される構造を有するもの；

ここで、

X_1が、（ｉ）アミノ酸残基Ｇ、Ｒ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；

X_2が、（ｉ）アミノ酸残基Ｆ、Ａ、Ｓ、Ｅ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；

X_3が、（ｉ）アミノ酸残基Ｔ、Ｑ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；

X_4が、（ｉ）アミノ酸残基Ｄ、Ｅ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；

X_5が、（ｉ）アミノ酸残基Ａ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；

X_6が、（ｉ）アミノ酸残基Ａ、Ｓ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され（.Base）；

X_7が、（ｉ）アミノ酸残基Ａ、Ｓ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；

X_8が、（ｉ）アミノ酸残基Ｔ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；

X_9が、（ｉ）アミノ酸残基Ｔ、Ｖ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；

X_{10}が、（ｉ）アミノ酸残基Ｔ、Ｖ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；

X_{11}が、（ｉ）アミノ酸残基Ｖ、Ｉ、Ｌ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；

X_{12}が、（ｉ）アミノ酸残基Ｒ、Ｖ、Ｔ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；

X_{13}が、（ｉ）アミノ酸残基Ｇ、Ｅ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；

X_{14}が、（ｉ）アミノ酸残基Ｄ、Ａ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；

X_{15}が、（ｉ）アミノ酸残基Ｌ、Ｆ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；

好ましくは、X_1が、アミノ酸残基ＧおよびＲからなる群より選択され；X_2が、アミノ酸残基Ｆ、Ａ、ＳおよびＥからなる群より選択され；X_3が、アミノ酸残基ＴおよびＱからなる群より選択され；X_4が、アミノ酸残基ＤおよびＥからなる群より選択され；X_5が、アミノ酸残基Ａであり；X_6が、アミノ酸残基ＡおよびＳからなる群より選択され；X_7が、アミノ酸残基ＡおよびＳから選択され、；X_8が、アミノ酸残基Ｔであり；X_9が、アミノ酸残基ＴおよびＶからなる群より選択され；X_{10}が、アミノ酸残基ＴおよびＶからなる群より選択され；X_{11}が、アミノ酸残基Ｖ、ＩおよびＬからなる群より選

択され；X_{12}が、アミノ酸残基Ｒ、ＶおよびＴからなる群より選択され；X_{13}が、アミノ酸残基ＧおよびＥからなる群より選択され；X_{14}が、アミノ酸残基ＤおよびＡからなる群より選択され；X_{15}が、アミノ酸残基ＬおよびＦからなる群より選択され；

好ましくは、前記ナノボディまたはその抗原結合断片が、配列番号３０、３２、３４～３６、３８のいずれか１個に記載のＣＤＲ１；配列番号３９、４１、４３～４５のいずれか１個に記載のＣＤＲ２；および配列番号４７、４９、５１～５６、５８～５９のいずれかに記載のＣＤＲ３を含む、請求項１に記載のナノボディまたはその抗原結合断片。

【請求項３】

前記ナノボディまたはその抗原結合断片が、以下を含み：

（ａ）ＣＤＲ１であって、$X_1X_2X_3LX_4YYX_5$（式Ｉ、配列番号７２）またはＳＧＦＴＬＤＹＹＡ（配列番号３０）で示される構造を有するもの；

（ｂ）ＣＤＲ２であって、$IX_6SSGGX_7X_8$（式ＩＩ、配列番号７３）で示される構造を有するもの；

（ｃ）ＣＤＲ３であって、$AAAX_9LECRTX_{10}X_{11}X_{12}X_{13}YX_{14}Y$（式ＩＩＩ、配列番号７４），$AAATX_{15}ECRGRSSSYDY$（式ＩＶ、配列番号７５）、ＡＡＡＬＬＥＣＲＶＲＳＷＰＳＤＮ（配列番号４９）、ＡＡＡＶＬＥＣＲＡＡＥＹＶＮＳ（配列番号５４）からなる群より選択される構造を有するもの；

ここで、

X_1が、（ｉ）アミノ酸残基Ｇ、Ｒ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；

X_2が、（ｉ）アミノ酸残基Ｆ、Ｅ、Ｓ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；

X_3が、（ｉ）アミノ酸残基Ｔ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；

X_4が、（ｉ）アミノ酸残基Ｄ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；

X_5が、（ｉ）アミノ酸残基Ａ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；

X_6が、（ｉ）アミノ酸残基Ａ、Ｓ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；

X_7が、（ｉ）アミノ酸残基Ａ、Ｓ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；

X_8が、（ｉ）アミノ酸残基Ｔ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；

X_9が、（ｉ）アミノ酸残基Ｔ、Ｖ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；

X_{10}が、（ｉ）アミノ酸残基Ｖ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；

X_{11}が、（ｉ）アミノ酸残基Ｖ、Ｉ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；

X_{12}が、（ｉ）アミノ酸残基Ｒ、Ｖ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；

X_{13}が、（ｉ）アミノ酸残基Ｇ、Ｅ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；

X_{14}が、（ｉ）アミノ酸残基Ｄ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；

X_{15}が、（ｉ）アミノ酸残基Ｌ、Ｆ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；

好ましくは、X_1が、アミノ酸残基ＧおよびＲからなる群より選択され；X_2が、アミノ酸残基Ｆ、ＳおよびＥからなる群より選択され；X_3が、アミノ酸残基Ｔであり；X_4

が、アミノ酸残基Ｄであり；X_5が、アミノ酸残基Ａであり；X_6が、アミノ酸残基ＡおよびＳからなる群より選択され；X_7が、アミノ酸残基ＡおよびＳからなる群より選択され；X_8が、アミノ酸残基Ｔであり；X_9が、アミノ酸残基ＴおよびＶからなる群より選択され；X_{10}が、アミノ酸残基Ｖであり；X_{11}が、アミノ酸残基ＶおよびＩからなる群より選択され；X_{12}が、アミノ酸残基ＲおよびＶからなる群より選択され；X_{13}が、アミノ酸残基ＧおよびＥからなる群より選択され；X_{14}が、アミノ酸残基Ｄであり；X_{15}が、アミノ酸残基ＬおよびＦからなる群より選択され；

好ましくは、前記ナノボディまたはその抗原結合断片が、配列番号３０、３２、３４～３６のいずれか１個に記載のＣＤＲ１；配列番号３９、４１、４３～４５のいずれか１個に記載のＣＤＲ２；および配列番号４７、４９、５１、５２、５４～５６、５８のいずれか１個に記載のＣＤＲ３を含む、請求項１または２に記載のナノボディまたはその抗原結合断片。

【請求項４】

前記ナノボディまたはその抗原結合断片が、以下を含み：

（ａ）ＣＤＲ１であって、配列番号３２に記載の配列、または配列番号３２に記載の配列と比較して、１個もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加（例えば、１個、２個もしくは３個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加）を有する配列、を有するもの；

（ｂ）ＣＤＲ２であって、配列番号４１に記載の配列、または配列番号４１に記載の配列と比較して１個もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加（例えば、１個、２個もしくは３個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加）を有する配列、を有するもの；および

（ｃ）ＣＤＲ３であって、配列番号４９に記載の配列、または配列番号４９に記載の配列と比較して１個もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加（例えば、１個、２個もしくは３個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加）を有する配列、を有するもの；

好ましくは、前記置換が同類置換であり；

好ましくは、前記ナノボディまたはその抗原結合断片が、配列番号３２に記載のＣＤＲ１、配列番号４１に記載のＣＤＲ２、および配列番号４９に記載のＣＤＲ３を含む、請求項１に記載のナノボディまたはその抗原結合断片。

【請求項５】

前記ナノボディまたはその抗原結合断片が、以下を含み：

（ａ）ＣＤＲ１であって、配列番号３２もしくは３４に記載の配列、または配列番号３２もしくは３４に記載の配列と比較して、１個もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加（例えば、１個、２個もしくは３個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加）を有する配列、を有するもの；

（ｂ）ＣＤＲ２であって、配列番号４３に記載の配列、または配列番号４３に記載の配列と比較して、１個もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加（例えば、１個、２個もしくは３個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加）を有する配列、を有するもの；および

（ｃ）ＣＤＲ３であって、配列番号５２に記載の配列、または配列番号５２に記載の配列と比較して１個もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加（例えば、１個、２個もしくは３個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加）を有する配列、を有するもの；

好ましくは、前記置換が同類置換であり；

好ましくは、前記ナノボディまたはその抗原結合断片は、以下を含む：

（ａ）ＣＤＲ１であって、$X_1X_2X_3LX_4YYX_5$（式Ｉ，配列番号７２）で示される構造を有し、ここで、X_1が、アミノ酸残基Ｇであり；X_2が、（ｉ）アミノ酸残基Ｆ、Ｅ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；X_3が、アミノ酸残基Ｔであり；X_4が、アミノ酸残基Ｄであり；X_5がアミノ酸残基Ａであるもの；

（ｂ）ＣＤＲ２であって、ＩＡＳＳＧＧＳＴ（配列番号４３）で示される構造を有す

るもの；
（ｃ）ＣＤＲ３であって、ＡＡＡＶＬＥＣＲＴＶＶＲＧＹＤＹ（配列番号５２）で示される構造を有するもの；
好ましくは、前記ナノボディまたはその抗原結合断片が、配列番号３２または３４に記載のＣＤＲ１；配列番号４３に記載のＣＤＲ２；および配列番号５２に記載のＣＤＲ３を含む、請求項１に記載のナノボディまたはその抗原結合断片。
【請求項６】
前記ナノボディまたはその抗原結合断片が、以下を含み：
（ａ）ＣＤＲ１であって、配列番号３７に記載の配列、または配列番号３７に記載の配列と比較して、１個もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加（例えば、１個、２個もしくは３個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加）を有する配列、を有するもの；
（ｂ）ＣＤＲ２であって、配列番号４６に記載の配列、または配列番号４６に記載の配列と比較して、１個もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加（例えば、１個、２個もしくは３個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加）を有する配列、を有するもの；および
（ｃ）ＣＤＲ３であって、配列番号５７に記載の配列、または配列番号５７に記載の配列と比較して、１個もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加（例えば、１個、２個もしくは３個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加）を有する配列、を有するもの；
好ましくは、前記置換が同類置換であり；
好ましくは、前記ナノボディまたはその抗原結合断片が、配列番号３７に記載のＣＤＲ１、配列番号４６に記載のＣＤＲ２、および配列番号５７に記載のＣＤＲ３を含む、請求項１に記載のナノボディまたはその抗原結合断片。
【請求項７】
前記ナノボディまたはその抗原結合断片が、以下を含み：
（ａ）ＣＤＲ１であって、配列番号３１に記載の配列、または配列番号３１に記載の配列と比較して、１個もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加（例えば、１個、２個もしくは３個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加）を有する配列、を有するもの；
（ｂ）ＣＤＲ２であって、配列番号４０に記載の配列、または配列番号４０に記載の配列と比較して、１個もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加（例えば、１個、２個もしくは３個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加）を有する配列、を有するもの；および
（ｃ）ＣＤＲ３であって、配列番号４８に記載の配列、または配列番号４８に記載の配列と比較して、１個もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加（例えば、１個、２個もしくは３個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加）を有する配列、を有するもの；
好ましくは、前記置換が同類置換であり；
好ましくは、ナノボディまたはその抗原結合断片は、配列番号３１に記載のＣＤＲ１、配列番号４０に記載のＣＤＲ２、および配列番号４８に記載のＣＤＲ３を含む、請求項１に記載のナノボディまたはその抗原結合断片。
【請求項８】
前記ナノボディまたはその抗原結合断片が、以下を含み：
（ａ）ＣＤＲ１であって、配列番号３３に記載の配列、または配列番号３３に記載の配列と比較して、１個もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加（例えば、１個、２個もしくは３個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加）を有する配列、を有するもの；
（ｂ）ＣＤＲ２であって、配列番号４２に記載の配列、または配列番号４２に記載の配列と比較して、１個もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加（例えば、１個

、２個もしくは３個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加）を有する配列、を有するもの；および
（ｃ）ＣＤＲ３であって、配列番号５０に記載の配列、または配列番号５０に記載の配列と比較して、１個もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加（例えば、１個、２個もしくは３個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加）を有する配列、を有するもの；
好ましくは、前記置換が同類置換であり；
好ましくは、前記ナノボディまたはその抗原結合断片は、配列番号３３に記載のＣＤＲ１、配列番号４２に記載のＣＤＲ２、および配列番号５０に記載のＣＤＲ３を含む、請求項１に記載のナノボディまたはその抗原結合断片。
【請求項９】
（１）配列番号３２に記載のＣＤＲ１；配列番号４１に記載のＣＤＲ２；および配列番号４９に記載のＣＤＲ３；
（２）配列番号３２もしくは３４に記載のＣＤＲ１；配列番号４３に記載のＣＤＲ２；および配列番号５２に記載のＣＤＲ３；
（３）配列番号３７に記載のＣＤＲ１；配列番号４６に記載のＣＤＲ２；および配列番号５７に記載のＣＤＲ３；
（４）配列番号３０に記載のＣＤＲ１；配列番号３９に記載のＣＤＲ２；および配列番号４７に記載のＣＤＲ３；
（５）配列番号３１に記載のＣＤＲ１；配列番号４０に記載のＣＤＲ２；および配列番号４８に記載のＣＤＲ３；
（６）配列番号３３に記載のＣＤＲ１；配列番号４２に記載のＣＤＲ２；および配列番号５０に記載のＣＤＲ３；
（７）配列番号３２に記載のＣＤＲ１；配列番号４３に記載のＣＤＲ２；および配列番号５１に記載のＣＤＲ３；
（８）配列番号３５に記載のＣＤＲ１；配列番号４３に記載のＣＤＲ２；および配列番号５２に記載のＣＤＲ３；
（９）配列番号３２に記載のＣＤＲ１；配列番号４３に記載のＣＤＲ２；および配列番号５３に記載のＣＤＲ３；
（１０）配列番号３６に記載のＣＤＲ１；配列番号４１に記載のＣＤＲ２；および配列番号５４に記載のＣＤＲ３；
（１１）配列番号３５に記載のＣＤＲ１；配列番号４４に記載のＣＤＲ２；および配列番号５５に記載のＣＤＲ３；
（１２）配列番号３２に記載のＣＤＲ１；配列番号４５に記載のＣＤＲ２；および配列番号５６に記載のＣＤＲ３；
（１３）配列番号３２に記載のＣＤＲ１；配列番号４１に記載のＣＤＲ２；および配列番号５２に記載のＣＤＲ３；
（１４）配列番号３２に記載のＣＤＲ１；配列番号４１に記載のＣＤＲ２；および配列番号５８に記載のＣＤＲ３；または
（１５）配列番号３８に記載のＣＤＲ１；配列番号４１に記載のＣＤＲ２；および配列番号５９に記載のＣＤＲ３、を含む、請求項１から８のいずれか一項に記載のナノボディまたはその抗原結合断片。
【請求項１０】
以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を含み：
（ｉ）配列番号３、９、２４、１～２、７～８、１４～２３、２８～２９のいずれか１個に記載の配列；
（ｉｉ）配列番号３、９、２４、１～２、７～８、１４～２３、２８～２９のいずれか１個に記載の配列と比較して、１個または数個のアミノ酸の置換、欠失または付加（例えば、１個、２個、３個、４個または５個のアミノ酸の置換、欠失または付加）を有する配列；および

（ｉｉｉ）配列番号：３、９、２４、１～２、７～８、１４～２３、２８～２９のいずれか１個に記載の配列と比較して、少なくとも８０％、少なくとも８５％、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％、または１００％の配列同一性を有する配列；

好ましくは、前記置換が同類置換である、

請求項１から９のいずれか一項に記載のナノボディまたはその抗原結合断片。

【請求項１１】

前記ナノボディまたはその抗原結合断片がヒト化され；

好ましくは、前記ナノボディまたはその抗原結合断片が、ヒト免疫グロブリンの重鎖フレームワーク領域（例えば、ヒト重鎖生殖細胞系列抗体遺伝子によってコードされるアミノ酸配列に含有される重鎖フレームワーク領域）をさらに含み、ここで、前記重鎖フレームワーク領域は、ヒト残基からラクダ類残基への１個または複数個（例えば、１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個または１０個）の逆突然変異を含んでもよい、請求項１から９のいずれか一項に記載のナノボディまたはその抗原結合断片。

【請求項１２】

前記ナノボディまたはその抗原結合断片が、以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を含み：

（ｉ）配列番号：４～６、１０～１３、２５～２７、７８のいずれか１個に記載の配列；

（ｉｉ）配列番号４～６、１０～１３、２５～２７、７８のいずれか１個に記載の配列と比較して、１個または数個のアミノ酸の置換、欠失または付加（例えば、１個、２個、３個、４個または５個のアミノ酸の置換、欠失または付加）を有する配列；および

（ｉｉｉ）配列番号４～６、１０～１３、２５～２７、７８のいずれか１個に記載の配列と比較して、少なくとも８０％、少なくとも８５％、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％、または１００％の配列同一性を有する配列；

好ましくは、前記置換が同類置換である、請求項１１に記載のナノボディまたはその抗原結合断片。

【請求項１３】

前記血清アルブミンが、ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）、マウス血清アルブミン（ＭＳＡ）および／またはカニクイザル血清アルブミン（ＣＳＡ）からなる群より選択され；

好ましくは、前記ナノボディまたはその抗原結合断片の血清アルブミンへの結合が、ｐＨ非依存性であり；

好ましくは、前記ナノボディまたはその抗原結合断片が、ｐＨ５～８（例えば、５．５～７．４）の範囲で血清アルブミンに特異的に結合できる、請求項１から１２のいずれか一項に記載のナノボディまたはその抗原結合断片。

【請求項１４】

血清アルブミンに特異的に結合できるポリペプチドコンストラクトであって、請求項１から１３のいずれか一項に記載のナノボディまたはその抗原結合断片と、免疫グロブリンＦｃドメインとを含み；

好ましくは、前記免疫グロブリンＦｃドメインが、適宜ペプチドリンカーを介して、前記ナノボディまたはその抗原結合断片のＮ末端および／またはＣ末端（例えば、Ｃ末端）に連結され；

好ましくは、前記免疫グロブリンＦｃドメインがＩｇＧのＦｃドメイン（例えば、ＩｇＧ１のＦｃドメイン）であり；

好ましくは、免疫グロブリンＦｃドメインが、配列番号６８に記載の配列、またはそれと比較して、少なくとも８０％、少なくとも８５％、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％、もしくは１００％の配列同一性を有する配列、または、それと比較して、１個もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失、もしくは付加を有する配列（例えば、１個、２個、３個、４個、もしくは５個のアミノ酸の置換、欠失、もしくは付加）を有する配列、を含む、ポリペプチドコンストラクト。

【請求項１５】

前記血清アルブミンが、ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）、マウス血清アルブミン（ＭＳＡ）および／またはカニクイザル血清アルブミン（ＣＳＡ）からなる群より選択され；

好ましくは、ポリペプチドコンストラクトと血清アルブミンとの結合が、ｐＨ非依存性であり；

好ましくは、ポリペプチドコンストラクトはｐＨ５～８（例えば、５．５～７．４）の範囲で血清アルブミンに特異的に結合できる、請求項１４に記載のポリペプチドコンストラクト。

【請求項１６】

請求項１から１３のいずれか一項に記載のナノボディもしくはその抗原結合断片、または請求項１３もしくは１４に記載のポリペプチドコンストラクトと、追加ペプチドドメインと、を含み；

好ましくは、前記追加ペプチドドメインが、治療効果を有するポリペプチドドメインから選択され；

好ましくは、前記追加ペプチドドメインが、ナノボディもしくはその抗原結合断片またはポリペプチドコンストラクトのＮ末端および／またはＣ末端に、適宜ペプチドリンカーを介して連結される、融合タンパク質。

【請求項１７】

請求項１から１３のいずれか一項に記載のナノボディもしくはその抗原結合断片、請求項１４もしくは１５に記載のポリペプチドコンストラクト、または請求項１６に記載の融合タンパク質をコードする、単離された核酸分子。

【請求項１８】

請求項１７に記載の核酸分子を含むベクターであって、好ましくは、前記ベクターがクローニングベクターまたは発現ベクターである、ベクター。

【請求項１９】

請求項１７に記載の核酸分子または請求項１８に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項２０】

請求項１から１３のいずれか一項に記載のナノボディもしくはその抗原結合断片、請求項１４もしくは１５に記載のポリペプチドコンストラクト、または請求項１６に記載の融合タンパク質を調製する方法であって、請求項１９に記載の宿主細胞を、タンパク質の発現が可能な条件下で培養することと、前記培養された宿主細胞の培養物から、前記ナノボディもしくはその抗原結合断片、または前記ポリペプチドコンストラクト、または前記融合タンパク質を回収することと、を含む、方法。

【請求項２１】

二重特異性抗体または多重特異性抗体であって、請求項１から１３のいずれか一項に記載のナノボディもしくはその抗原結合断片、または請求項１４もしくは１５に記載のポリペプチドコンストラクトを含み；

好ましくは、前記二重特異性抗体または多重特異性抗体が、血清アルブミンに特異的に結合でき、それに加えて１種または複数種の別の標的に特異的に結合でき；

好ましくは、前記二重特異性抗体または多重特異性抗体が、第２の標的に対する結合特異性を有する少なくとも１種の第２の抗体をさらに含み；

好ましくは、前記二重特異性抗体または多重特異性抗体が、以下を含み：

（ｉ）第１の抗原特異的結合ドメインとして、請求項１から１３のいずれか一項に記載のナノボディもしくはその抗原結合断片、または請求項１４もしくは１５に記載のポリペプチドコンストラクト（例えば、配列番号１０、４、７８のいずれか１個に記載の配列

を含むナノボディもしくはその抗原結合断片またはポリペプチドコンストラクト）；
（ｉｉ）配列番号７９に記載の軽鎖および配列番号８０に記載の重鎖を含む第２の抗原特異的結合ドメイン（例えば、Ｆａｂ）；
および、
（ｉｉｉ）配列番号８１に記載の第３の抗原特異的結合ドメイン（例えば、ナノボディＶＨＨ）；
好ましくは、二重特異性抗体または多重特異性抗体が、第１のポリペプチド鎖および第２のポリペプチド鎖を含み、ここで、前記第１のポリペプチド鎖が（例えば、Ｎ末端からＣ末端まで）：前記第２の抗原特異的結合ドメイン、前記第３の抗原特異的結合ドメイン、前記第１の抗原特異的結合ドメインの軽鎖または重鎖（例えば、ＶＨおよびＣＨ１）を含み；および前記第２のポリペプチド鎖が、（例えば、Ｎ末端からＣ末端まで）：第２の抗原特異的結合ドメインおよび第３の抗原特異的結合ドメインの重鎖（例えば、ＶＨおよびＣＨ１）または軽鎖を含み；ここで、前記第１のポリペプチド鎖が、前記第２のポリペプチド鎖と対になって、完全な第２の抗原特異的結合ドメインを形成し；
好ましくは、前記第１のポリペプチド鎖および／または第２のポリペプチド鎖の各ドメインが、リンカー（例えば、１個または複数個のグリシンおよび／または１個または複数個のセリンを含むペプチドリンカー）によって連結され；
好ましくは、二重特異性抗体または多重特異性抗体が、以下を含み：
（１）配列番号６９に記載の配列を有する第１のペプチド、および、配列番号７６に記載の配列を有する第２のペプチド；
（２）配列番号７０に記載の配列を有する第１のペプチド、および、配列番号７６に記載の配列を有する第２のペプチド；
または、
（３）配列番号７１に記載の配列を有する第１のペプチド、および、配列番号７６に記載の配列を有する第２のペプチド；
好ましくは、前記第１のペプチドは前記第１のペプチド鎖中に存在し、前記第２のペプチドは前記第２のペプチド鎖中に存在し；好ましくは、前記第１のペプチド鎖と前記第２のペプチド鎖は複合体を形成する、二重特異性抗体または多重特異性抗体。
【請求項２２】
コンジュゲートであって、請求項１から１３のいずれか一項に記載のナノボディもしくはその抗原結合断片または請求項１４もしくは１５に記載のポリペプチドコンストラクトと、前記ナノボディもしくはその抗原結合断片または前記ポリペプチドコンストラクトに連結された治療薬と、を含み；
好ましくは、前記治療薬は、細胞毒性薬、ホルモン薬、生物学的応答修飾薬、別の抗体またはその抗原結合断片などの抗腫瘍薬からなる群より選択される、コンジュゲート。
【請求項２３】
医薬組成物であって、請求項１から１３のいずれか一項に記載のナノボディもしくはその抗原結合断片、請求項１４もしくは１５に記載のポリペプチドコンストラクト、請求項１６に記載の融合タンパク質、請求項１７に記載の単離された核酸分子、請求項１８に記載のベクター、請求項１９に記載の宿主細胞、請求項２１に記載の二重特異性抗体もしくは多重特異性抗体、または請求項２２に記載のコンジュゲートを含み；
好ましくは、前記医薬組成物は、薬学的に許容される担体および／または賦形剤をさらに含み；
好ましくは、前記医薬組成物は、請求項１から１３のいずれか一項に記載のナノボディもしくはその抗原結合断片、請求項１４もしくは１５に記載のポリペプチドコンストラクト、または前記ナノボディもしくは抗原結合断片もしくはポリペプチドコンストラクトをコードする核酸分子、ベクターもしくは宿主細胞を含み；
好ましくは、前記医薬組成物は、請求項１６に記載の融合タンパク質、または前記融合タンパク質をコードする核酸分子、ベクターもしくは宿主細胞を含み；
好ましくは、前記医薬組成物は、請求項２１に記載の二重特異性抗体もしくは多重特異

性抗体、または前記二重特異性抗体もしくは多重特異性抗体をコードする核酸分子、ベクターもしくは宿主細胞を含み；
好ましくは、前記医薬組成物は請求項２２に記載のコンジュゲートを含む、医薬組成物。
【請求項２４】
医薬の製造における、請求項１～１３のいずれか一項に記載のナノボディもしくはその抗原結合断片、請求項１４もしくは１５に記載のポリペプチドコンストラクト、請求項１６に記載の融合タンパク質、請求項１７に記載の単離された核酸分子、請求項１８に記載のベクター、請求項１９に記載の宿主細胞、請求項２１に記載の二重特異性抗体もしくは多重特異性抗体、または請求項２２に記載のコンジュゲート、または請求項２３に記載の医薬組成物の使用であって；
好ましくは、前記医薬が、対象におけるＦｃＲｎ媒介血清アルブミン循環に直接的または間接的に関与でき；
好ましくは、前記医薬が、ナノボディまたはその抗原結合断片を欠いた前記対応する薬剤と比較して、インビボ半減期の延長を示し；
好ましくは、医薬がタンパク質薬剤であり；
好ましくは、対象がヒト、マウス、カニクイザルなどの哺乳類である、使用。
【請求項２５】
薬剤のインビボ半減期を延長する方法であって、請求項１～１３のいずれか一項に記載のナノボディもしくはその抗原結合断片または請求項１４もしくは１５に記載のポリペプチドコンストラクトを前記薬剤に連結することを含む方法であり；
好ましくは、前記インビボ半減期の延長は、前記ナノボディまたはその抗原結合断片が存在しない場合の前記薬剤のインビボ半減期に対するものであり；
好ましくは、前記薬物が高分子薬物（例えば、ポリペプチド薬物）からなる群より選択され；
好ましくは、前記対象がヒト、マウス、カニクイザルなどの哺乳類である、方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、血清アルブミンに特異的に結合できるナノボディまたはその抗原結合断片、このナノボディまたはその抗原結合断片を含む誘導体、このナノボディまたはその抗原結合断片をコードする核酸、この核酸を含有する宿主細胞、およびこれらの関連する用途に関する。加えて、本出願は、ナノボディもしくはその抗原結合断片、または誘導体の治療的な使用に関する。
【背景技術】
【０００２】
技術の発展に伴って、抗体医薬が化学製品、細胞療法などに依存しない重要な疾患治療薬となって久しい。抗体医薬の開発において、薬物動態学（ＰＫ）は、吸収、分布、クリアランスなど抗体に対する体内作用を記述する重要な分野であり、中でも半減期はＰＫの重要なパラメータである。一般に、インビボ（ｉｎ　ｖｉｖｏ）での半減期が長いほど抗体の有効性が向上するが、毒性が増加する可能性もあり、また、特定のターゲットに強固に結合すると、抗体が細胞内で急速に内在化・分解され、インビボでの半減期が短くなる可能性がある。
【０００３】
インビボでの高分子薬物の半減期を延長することによって、薬物自体の作用時間を長くして投与回数を減らし、それによって、患者の医療的な負担を軽減できる。現在、薬物の長時間作用性を改善するための設計として、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）修飾、トランスフェリン融合などがあるが、これらの化学的方法にはいくつかの欠点がある。例えば、ＰＥＧは抗体の抗原結合部位を遮蔽または塞ぐ可能性があり、抗体や治療用タンパク質の有効性を低下させ、抗体活性を失わせる可能性さえある。
【０００４】

ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）は、ヒト血漿中に最も多く含まれるタンパク質で、血清タンパク質の約半分を占める。それは、水に溶けやすく、主に単量体の形で存在する。血清アルブミンの体内での半減期は、約２１日である。それは、５８５個のアミノ酸から構成され、その分子量は約６６．５ＫＤである。ヒト血清アルブミンは、体内で安定、安全、無毒であり、免疫原性が低いため、理想的な薬物担体である。抗体医薬の場合、ヒト血清アルブミンを利用した修飾により、薬剤の半減期を延長し、患者の薬剤服用順守を向上できる。

【０００５】

ＨＳＡの回収メカニズムはＩｇＧのそれと似ており、ＦｃＲｎによって媒介される。ＨＳＡとＩｇＧは、ピノサイトーシスを介して、血管内皮細胞に内在化される。エンドソーム内では、膜結合型ＦｃＲｎとＨＳＡとの結合は、エンドソームのｐＨ約６．０で促進された後、結合複合体は内皮細胞の上部または下部にリサイクルされ、膜結合型ＦｃＲｎとＨＳＡとは、エキソサイトーシスを介して、血液のｐＨ７．４の条件下で速やかに解離し、リサイクルされる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００６】

本出願の発明者らは、広範な研究の結果、一連の抗血清アルブミンナノボディをスクリーニングして獲得した。このナノボディは、血清アルブミンに対して高い結合活性を有し、ヒト、サルおよび／またはマウスの血清アルブミンと交差反応性を有する。特に、本出願のナノ抗体の血清アルブミンへの結合は、非ｐＨ依存性であり、ＦｃＲｎを媒介した血清アルブミン循環に効果的に関与することができ、それによりナノ抗体のインビボ半減期を延長できる。したがって、本出願のナノボディを薬物分子（例えば、ポリペプチド薬物）に結合（例えば、融合）させて、この薬物分子のインビボ半減期を延長できる。

【０００７】

加えて、ナノボディは分子量が小さく、安定性が高いという特徴も持っている。従来からある一般的な抗体と比べ、ナノボディは、組織への浸透性がよく、投与方法が柔軟で、ヒト化度が高く、組換えタンパク質への変換が容易であるなど、薬剤開発において多くの利点がある。

【０００８】

これに基づいて、本出願は、このナノボディまたはその抗原結合断片を含有する組成物、このナノボディまたはその抗原結合断片をコードする核酸、およびこの核酸を含有する宿主細胞、ならびにそれらの関連する使用も提供する。

【課題を解決するための手段】

【０００９】

ナノボディおよびその抗原結合断片

したがって、一態様において、本出願は、血清アルブミンに特異的に結合することができるナノボディまたはその抗原結合断片を提供し、ここで、このナノボディまたはその抗原結合断片が、以下を含み：

（ａ）以下からなる群より選択される構造を有するＣＤＲ１：$X_1X_2X_3LX_4YYX_5$（式Ｉ，配列番号７２）、ＳＧＦＴＬＤＹＹＡ（配列番号３０）、ＧＳＩＷＧＩＹＨ（配列番号３７）、ＧＦＴＦＳＩＹＳ（配列番号３１）、ＧＳＩＦＴＦＹＲ（配列番号３３）；

（ｂ）以下からなる群より選択される構造を有するＣＤＲ２：$IX_6SSGGX_7X_8$（式ＩＩ、配列番号７３）、ＩＴＶＤＧＳＴ（配列番号４６）、ＩＳＳＧＧＳＰ（配列番号４０）、ＩＴＴＤＴＳＴ（配列番号４２）；

（ｃ）以下からなる群より選択される構造を有するＣＤＲ３：$AAAX_9LECRTX_{10}X_{11}X_{12}X_{13}YX_{14}Y$（式ＩＩＩ，配列番号７４）、$AAATX_{15}ECRGRSSSYDY$（式ＩＶ，配列番号７５）、ＡＡＡＬＬＥＣＲＶＲＳＷＰＳＤＮ（配列番号４９）、ＡＡＡＶＬＥＣＲＡＡＥＹＶＮＳ（配列番号５４）、ＤＩＲＮＶＧＧＤＹ（

配列番号５７）、ＳＰＩＴＳＩＦＫＡ（配列番号４８）、ＮＶＲＮＶＥＲＤＹ（配列番号５０）；

ここで、

X_1が、（ｉ）アミノ酸残基Ｇ、Ｒ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；

X_2が、（ｉ）アミノ酸残基Ｆ、Ａ、Ｓ、Ｅ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；

X_3が、（ｉ）アミノ酸残基Ｔ、Ｑ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；

X_4が、（ｉ）アミノ酸残基Ｄ、Ｅ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；

X_5が、（ｉ）アミノ酸残基Ａ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；

X_6が、（ｉ）アミノ酸残基Ａ、Ｓ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；

X_7が、（ｉ）アミノ酸残基Ａ、Ｓ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；

X_8が、（ｉ）アミノ酸残基Ｔ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；

X_9が、（ｉ）アミノ酸残基Ｔ、Ｖ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；

X_{10}が、（ｉ）アミノ酸残基Ｔ、Ｖ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；

X_{11}が、（ｉ）アミノ酸残基Ｖ、Ｉ、Ｌ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；

X_{12}が、（ｉ）アミノ酸残基Ｒ、Ｖ、Ｔ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；

X_{13}が、（ｉ）アミノ酸残基Ｇ、Ｅ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；

X_{14}が、（ｉ）アミノ酸残基Ｄ、Ａ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；

X_{15}が、（ｉ）アミノ酸残基Ｌ、Ｆ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択される。

【００１０】

特定の実施形態において、ナノボディまたはその抗原結合断片が、配列番号３０～３８のいずれか１個に記載のＣＤＲ１；配列番号３９～４６のいずれか１個に記載のＣＤＲ２；および配列番号４７～５９のいずれか１個に記載のＣＤＲ３を含む。

【００１１】

特定の実施形態において、ナノボディまたはその抗原結合断片が、以下を含み：

（ａ）$X_1X_2X_3LX_4YYX_5$（式Ｉ，配列番号７２）またはＳＧＦＴＬＤＹＹＡ（配列番号３０）で示される配列を有するＣＤＲ１；

（ｂ）$IX_6SSGGX_7X_8$（式ＩＩ，配列番号７３）で示される構造を有するＣＤＲ２；

（ｃ）$AAAX_9LECRTX_{10}X_{11}X_{12}X_{13}YX_{14}Y$（式ＩＩＩ，配列番号７４）、$AAATX_{15}ECRGRSSSYDY$（式ＩＶ，配列番号７５）、ＡＡＡＬＬＥＣＲＶＲＳＷＰＳＤＮ（配列番号４９），ＡＡＡＶＬＥＣＲＡＡＥＹＶＮＳ（配列番号５４）からなる群より選択される構造を有するＣＤＲ３；

ここで、

X_1が、（ｉ）アミノ酸残基Ｇ、Ｒ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；

X_2が、（ｉ）アミノ酸残基Ｆ、Ａ、Ｓ、Ｅ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；
X_3が、（ｉ）アミノ酸残基Ｔ、Ｑ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；
X_4が、（ｉ）アミノ酸残基Ｄ、Ｅ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；
X_5が、（ｉ）アミノ酸残基Ａ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；
X_6が、（ｉ）アミノ酸残基Ａ、Ｓ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；
X_7が、（ｉ）アミノ酸残基Ａ、Ｓ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；
X_8が、（ｉ）アミノ酸残基Ｔ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；
X_9が、（ｉ）アミノ酸残基Ｔ、Ｖ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；
X_{10}が、（ｉ）アミノ酸残基Ｔ、Ｖ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；
X_{11}が、（ｉ）アミノ酸残基Ｖ、Ｉ、Ｌ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；
X_{12}が、（ｉ）アミノ酸残基Ｒ、Ｖ、Ｔ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；
X_{13}が、（ｉ）アミノ酸残基Ｇ、Ｅ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；
X_{14}が、（ｉ）アミノ酸残基Ｄ、Ａ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；
X_{15}が、（ｉ）アミノ酸残基Ｌ、Ｆ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択される。

【００１２】

特定の実施形態において、X_1が、アミノ酸残基ＧおよびＲからなる群より選択され；X_2が、アミノ酸残基Ｆ、Ａ、ＳおよびＥからなる群より選択され；X_3が、アミノ酸残基ＴおよびＱからなる群より選択され；X_4が、アミノ酸残基ＤおよびＥからなる群より選択され；X_5が、アミノ酸残基Ａであり；X_6が、アミノ酸残基ＡおよびＳからなる群より選択され；X_7が、アミノ酸残基ＡおよびＳからなる群より選択され、；X_8が、アミノ酸残基Ｔであり；X_9が、アミノ酸残基ＴおよびＶからなる群より選択され；X_{10}が、アミノ酸残基ＴおよびＶからなる群より選択され；X_{11}が、アミノ酸残基Ｖ、ＩおよびＬからなる群より選択され；X_{12}が、アミノ酸残基Ｒ、ＶおよびＴからなる群より選択され；X_{13}が、アミノ酸残基ＧおよびＥからなる群より選択され；X_{14}が、アミノ酸残基ＤおよびＡからなる群より選択され；X_{15}が、アミノ酸残基ＬおよびＦからなる群より選択される。

【００１３】

特定の実施形態において、前記ナノボディまたはその抗原結合断片が、配列番号３０、３２、３４～３６、３８のいずれか１個に記載のＣＤＲ１；配列番号３９、４１、４３～４５のいずれか１個に記載のＣＤＲ２；および配列番号４７、４９、５１～５６、５８～５９のいずれか１個に記載のＣＤＲ３を含む。

【００１４】

特定の実施形態において、ナノボディまたはその抗原結合断片が、以下を含み：

（ａ）ＣＤＲ１であって、$X_1X_2X_3LX_4YYX_5$（式Ｉ、配列番号７２）またはＳＧＦＴＬＤＹＹＡ（配列番号３０）で示される構造を有するもの；

（ｂ）ＣＤＲ２であって、ＩX_6ＳＳＧＧX_7X_8（式ＩＩ、配列番号７３）で示さ

れる構造を有するもの；
（ｃ）ＣＤＲ３であって、ＡＡＡＸ$_9$ＬＥＣＲＴＸ$_{10}$Ｘ$_{11}$Ｘ$_{12}$Ｘ$_{13}$ＹＸ$_{14}$Ｙ（式ＩＩＩ、配列番号７４），ＡＡＡＴＸ$_{15}$ＥＣＲＧＲＳＳＳＹＤＹ（式ＩＶ、配列番号７５）、ＡＡＡＬＬＥＣＲＶＲＳＷＰＳＤＮ（配列番号４９）、ＡＡＡＶＬＥＣＲＡＡＥＹＶＮＳ（配列番号５４）からなる群より選択される構造を有するもの；
ここで、
Ｘ$_1$が、（ｉ）アミノ酸残基Ｇ、Ｒ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；
Ｘ$_2$が、（ｉ）アミノ酸残基Ｆ、Ｅ、Ｓ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；
Ｘ$_3$が、（ｉ）アミノ酸残基Ｔ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；
Ｘ$_4$が、（ｉ）アミノ酸残基Ｄ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；
Ｘ$_5$が、（ｉ）アミノ酸残基Ａ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；
Ｘ$_6$が、（ｉ）アミノ酸残基Ａ、Ｓ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；
Ｘ$_7$が、（ｉ）アミノ酸残基Ａ、Ｓ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；
Ｘ$_8$が、（ｉ）アミノ酸残基Ｔ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；
Ｘ$_9$が、（ｉ）アミノ酸残基Ｔ、Ｖ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；
Ｘ$_{10}$が、（ｉ）アミノ酸残基Ｖ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；
Ｘ$_{11}$が、（ｉ）アミノ酸残基Ｖ、Ｉ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；
Ｘ$_{12}$が、（ｉ）アミノ酸残基Ｒ、Ｖ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；
Ｘ$_{13}$が、（ｉ）アミノ酸残基Ｇ、Ｅ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；
Ｘ$_{14}$が、（ｉ）アミノ酸残基Ｄ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；
Ｘ$_{15}$が、（ｉ）アミノ酸残基Ｌ、Ｆ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択される。
【００１５】
特定の実施形態において、Ｘ$_1$が、アミノ酸残基ＧおよびＲからなる群より選択され；Ｘ$_2$が、アミノ酸残基Ｆ、ＳおよびＥからなる群より選択され；Ｘ$_3$が、アミノ酸残基Ｔであり；Ｘ$_4$が、アミノ酸残基Ｄであり；Ｘ$_5$が、アミノ酸残基Ａであり；Ｘ$_6$が、アミノ酸残基ＡおよびＳからなる群より選択され；Ｘ$_7$が、アミノ酸残基ＡおよびＳからなる群より選択され；Ｘ$_8$が、アミノ酸残基Ｔであり；Ｘ$_9$が、アミノ酸残基ＴおよびＶからなる群より選択され；Ｘ$_{10}$が、アミノ酸残基Ｖであり；Ｘ$_{11}$が、アミノ酸残基ＶおよびＩからなる群より選択され；Ｘ$_{12}$が、アミノ酸残基ＲおよびＶからなる群より選択され；Ｘ$_{13}$が、アミノ酸残基ＧおよびＥからなる群より選択され；Ｘ$_{14}$が、アミノ酸残基Ｄであり；Ｘ$_{15}$が、アミノ酸残基ＬおよびＦからなる群より選択される。
【００１６】
特定の実施形態において、ナノボディまたはその抗原結合断片が、配列番号３０、３２、３４～３６のいずれか１個に記載のＣＤＲ１；配列番号３９、４１、４３～４５のいずれか１個に記載のＣＤＲ２；および配列番号４７、４９、５１、５２、５４～５６、５８

のいずれか１個に記載のＣＤＲ３を含む。
【００１７】
特定の実施形態において、ナノボディまたはその抗原結合断片が、以下を含み：
（ａ）ＣＤＲ１であって、配列番号３２に記載の配列、または配列番号３２に記載の配列と比較して、１個もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加（例えば、１個、２個もしくは３個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加）を有する配列、を有するもの；
（ｂ）ＣＤＲ２であって、配列番号４１に記載の配列、または配列番号４１に記載の配列と比較して、１個もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加（例えば、１個、２個もしくは３個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加）を有する配列、を有するもの；および
（ｃ）ＣＤＲ３であって、配列番号４９に記載の配列、または配列番号４９に記載の配列と比較して、１個もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加（例えば、１個、２個もしくは３個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加）を有する配列、を有するもの。
【００１８】
特定の実施形態において、置換が同類置換である。
【００１９】
特定の実施形態において、このナノボディまたはその抗原結合断片が、配列番号３２に記載のＣＤＲ１、配列番号４１に記載のＣＤＲ２、および配列番号４９に記載のＣＤＲ３を含む。
【００２０】
特定の実施形態において、ナノボディまたはその抗原結合断片が、以下を含む：
（ａ）ＣＤＲ１であって、配列番号３２もしくは３４に記載の配列、または配列番号３２もしくは３４に記載の配列と比較して、１個もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加（例えば、１個、２個もしくは３個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加）を有する配列、を有するもの；
（ｂ）ＣＤＲ２であって、配列番号４３に記載の配列、または配列番号４３に記載の配列と比較して、１個もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加（例えば、１個、２個もしくは３個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加）を有する配列、を有するもの；および
（ｃ）ＣＤＲ３であって、配列番号５２に記載の配列、または配列番号５２に記載の配列と比較して１個もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加（例えば、１個、２個もしくは３個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加）を有する配列、を有するもの。
【００２１】
特定の実施形態において、置換が同類置換である。
【００２２】
特定の実施形態において、ナノボディまたはその抗原結合断片が、以下を含む：
（ａ）$X_1X_2X_3LX_4YYX_5$（式Ｉ，配列番号７２）で示される構造を有し、ここで、X_1が、アミノ酸残基Ｇであり；X_2が、（ｉ）アミノ酸残基Ｆ、Ｅ、および（ｉｉ）（ｉ）に対する同類置換であるアミノ酸残基からなる群より選択され；X_3が、アミノ酸残基Ｔであり；X_4が、アミノ酸残基Ｄであり；X_5がアミノ酸残基ＡであるＣＤＲ１；
（ｂ）ＩＡＳＳＧＧＳＴ（配列番号４３）で示される構造を有するＣＤＲ２；
（ｃ）ＡＡＡＶＬＥＣＲＴＶＶＲＧＹＤＹ（配列番号５２）で示される構造を有するＣＤＲ３。
【００２３】
特定の実施形態において、ナノボディまたはその抗原結合断片が、配列番号３２または３４に記載のＣＤＲ１；配列番号４３に記載のＣＤＲ２；および配列番号５２に記載のＣＤＲ３を含む。

【００２４】
特定の実施形態において、ナノボディまたはその抗原結合断片が、以下を含む：
（ａ）ＣＤＲ１であって、配列番号３７に記載の配列、または配列番号３７に記載の配列と比較して、１個もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加（例えば、１個、２個もしくは３個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加）を有する配列、を有するもの；
（ｂ）ＣＤＲ２であって、配列番号４６に記載の配列、または配列番号４６に記載の配列と比較して、１個もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加（例えば、１個、２個もしくは３個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加）を有する配列、を有するもの；および
（ｃ）ＣＤＲ３であって、配列番号５７に記載の配列、または配列番号５７に記載の配列と比較して１個もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加（例えば、１個、２個もしくは３個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加）を有する配列、を有するもの。
【００２５】
特定の実施形態において、置換が同類置換である。
【００２６】
特定の実施形態において、ナノボディまたはその抗原結合断片が、配列番号３７に記載のＣＤＲ１、配列番号４６に記載のＣＤＲ２、および配列番号５７に記載のＣＤＲ３を含む。
【００２７】
特定の実施形態において、ナノボディまたはその抗原結合断片が、以下を含む：
（ａ）ＣＤＲ１であって、配列番号３１に記載の配列、または配列番号３１に記載の配列と比較して、１個もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加（例えば、１個、２個もしくは３個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加）を有する配列、を有するもの；
（ｂ）ＣＤＲ２であって、配列番号４０に記載の配列、または配列番号４０に記載の配列と比較して１個もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加（例えば、１個、２個もしくは３個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加）を有する配列、を有するもの；および
（ｃ）ＣＤＲ３であって、配列番号４８に記載の配列、または配列番号４８に記載の配列と比較して、１個もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加（例えば、１個、２個もしくは３個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加）を有する配列、を有するもの。
【００２８】
特定の実施形態において、置換が同類置換である。
【００２９】
特定の実施形態において、ナノボディまたはその抗原結合断片は、配列番号３１に記載のＣＤＲ１、配列番号４０に記載のＣＤＲ２、および配列番号４８に記載のＣＤＲ３を含む。
【００３０】
特定の実施形態において、ナノボディまたはその抗原結合断片が、以下を含む：
（ａ）ＣＤＲ１であって、配列番号３３に記載の配列、または配列番号３３に記載の配列と比較して、１個もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加（例えば、１個、２個もしくは３個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加）を有する配列、を有するもの；
（ｂ）ＣＤＲ２であって、配列番号４２に記載の配列、または配列番号４２に記載の配列と比較して１個もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加（例えば、１個、２個もしくは３個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加）を有する配列、を有するもの；および
（ｃ）ＣＤＲ３であって、配列番号５０に記載の配列、または配列番号５０に記載の

配列と比較して１個もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加（例えば、１個、２個もしくは３個のアミノ酸の置換、欠失もしくは付加）を有する配列、を有するもの。

【００３１】

特定の実施形態において、置換が同類置換である。

【００３２】

特定の実施形態において、前記ナノボディまたはその抗原結合断片は、配列番号３３に記載のＣＤＲ１、配列番号４２に記載のＣＤＲ２、および配列番号５０に記載のＣＤＲ３を含む。

【００３３】

特定の実施形態において、ナノボディまたはその抗原結合断片は、以下を含む：

（１）配列番号３０に記載のＣＤＲ１；配列番号３９に記載のＣＤＲ２；および配列番号４７に記載のＣＤＲ３；

（２）配列番号３１に記載のＣＤＲ１；配列番号４０に記載のＣＤＲ２；および配列番号４８に記載のＣＤＲ３；

（３）配列番号３２に記載のＣＤＲ１；配列番号４１に記載のＣＤＲ２；および配列番号４９に記載のＣＤＲ３；

（４）配列番号３３に記載のＣＤＲ１；配列番号４２に記載のＣＤＲ２；および配列番号５０に記載のＣＤＲ３；

（５）配列番号３２に記載のＣＤＲ１；配列番号４３に記載のＣＤＲ２；および配列番号５１に記載のＣＤＲ３；

（６）配列番号３２または３４に記載のＣＤＲ１；配列番号４３に記載のＣＤＲ２；および配列番号５２に記載のＣＤＲ３；

（７）配列番号３５に記載のＣＤＲ１；配列番号４３に記載のＣＤＲ２；および配列番号５２に記載のＣＤＲ３；

（８）配列番号３２に記載のＣＤＲ１；配列番号４３に記載のＣＤＲ２；および配列番号５３に記載のＣＤＲ３；

（９）配列番号３６に記載のＣＤＲ１；配列番号４１に記載のＣＤＲ２；および配列番号５４に記載のＣＤＲ３；

（１０）配列番号３５に記載のＣＤＲ１；配列番号４４に記載のＣＤＲ２；および配列番号５５に記載のＣＤＲ３；

（１１）配列番号３２に記載のＣＤＲ１；配列番号４５に記載のＣＤＲ２；および配列番号５６に記載のＣＤＲ３；

（１２）配列番号３２に記載のＣＤＲ１；配列番号４１に記載のＣＤＲ２；および配列番号５２に記載のＣＤＲ３；

（１３）配列番号３７に記載のＣＤＲ１；配列番号４６に記載のＣＤＲ２；および配列番号５７に記載のＣＤＲ３；

（１４）配列番号３２に記載のＣＤＲ１；配列番号４１に記載のＣＤＲ２；および配列番号５８に記載のＣＤＲ３；または

（１５）配列番号３８に記載のＣＤＲ１；配列番号４１に記載のＣＤＲ２；および配列番号５９に記載のＣＤＲ３。

【００３４】

特定の実施形態において、ナノボディまたはその抗原結合断片が、以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む：

（ｉ）配列番号１～３、７～９、１４～２４、２８～２９のいずれか１個に記載の配列；

（ｉｉ）配列番号１～３、７～９、１４～２４、２８～２９のいずれか１個に記載の配列と比較して、１個または数個のアミノ酸の置換、欠失または付加（例えば、１個、２個、３個、４個または５個のアミノ酸の置換、欠失または付加）を有する配列；および

（ｉｉｉ）配列番号１～３、７～９、１４～２４、２８～２９のいずれか１個に記載の配列と比較して、少なくとも８０％、少なくとも８５％、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％、または１００％の配列同一性を有する配列。

【００３５】

特定の実施形態において、置換が同類置換である。

【００３６】

特定の実施形態において、ナノボディまたはその抗原結合断片が、ヒト化されている。

【００３７】

特定の実施形態において、前記ナノボディまたはその抗原結合断片が、ヒト免疫グロブリンの重鎖フレームワーク領域（例えば、ヒト重鎖生殖細胞系列抗体遺伝子によってコードされるアミノ酸配列に含有される重鎖フレームワーク領域）をさらに含み、この重鎖フレームワーク領域は、ヒト残基からラクダ類残基への１個または複数個（例えば、１個、２個、３個、４個、５個、６個、７個、８個、９個または１０個）の逆突然変異を含んでもよい。

【００３８】

特定の実施形態において、ナノボディまたはその抗原結合断片が、以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む：

（ｉ）配列番号：４～６、１０～１３、２５～２７、７８のいずれか１つに記載の配列；

（ｉｉ）配列番号４～６、１０～１３、２５～２７、７８のいずれか１個に記載の配列と比較して、１個または数個のアミノ酸の置換、欠失または付加（例えば、１個、２個、３個、４個または５個のアミノ酸の置換、欠失または付加）を有する配列；および

（ｉｉｉ）配列番号４～６、１０～１３、２５～２７、７８のいずれか１個に記載の配列と比較して、少なくとも８０％、少なくとも８５％、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％、または１００％の配列同一性を有する配列。

【００３９】

特定の実施形態において、置換が同類置換である。

【００４０】

特定の実施形態において、血清アルブミンが、ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）、マウス血清アルブミン（ＭＳＡ）および／またはカニクイザル血清アルブミン（ＣＳＡ）からなる群より選択される。

【００４１】

特定の実施形態において、ナノボディまたはその抗原結合断片の血清アルブミンへの結合が、ｐＨ非依存性である。

【００４２】

特定の実施形態において、ナノボディまたはその抗原結合断片が、ｐＨ５～８（例えば、５．５～７．４）の範囲で血清アルブミンに特異的に結合できる。

【００４３】

ポリペプチドコンストラクト

別の態様において、本出願は、血清アルブミンに特異的に結合できるポリペプチドコンストラクトも提供し、このコンストラクトは、上述のナノボディまたはその抗原結合断片と、免疫グロブリンＦｃドメインとを含む。

【００４４】

本明細書で使用される場合、Ｆｃドメインは、Ｆｃ領域とも呼ばれ、ＣＨ２およびＣＨ３を含む重鎖定常領域の一部を指す。いくつかの実施形態において、Ｆｃドメインが、ヒンジ、ＣＨ２およびＣＨ３を含む。Ｆｃドメインがヒンジを含む場合、ヒンジが２個のＦｃ含有ポリペプチド間の二量体化を調節する。Ｆｃドメインが、抗体重鎖定常領域の任意のアイソタイプであってよい。いくつかの実施形態において、Ｆｃドメインが、ＩｇＧ１

、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４のものである。
【００４５】
特定の実施形態において、本出願のポリペプチドコンストラクトに含有されるＦｃドメインが、天然のＦｃ領域であり、天然に見出されるＦｃ領域のアミノ酸配列と一致するアミノ酸配列を含む。例えば、Ｆｃドメインが、天然の配列を有するヒトＩｇＧ１のＦｃ領域、天然の配列を有するヒトＩｇＧ２のＦｃ領域、天然の配列を有するヒトＩｇＧ３のＦｃ領域、または天然の配列を有するヒトＩｇＧ４のＦｃ領域であってよい。天然のＦｃ領域が、エフェクター機能を有していてもよい。例示的な「エフェクター機能」としては、Ｆｃレセプターへの結合；Ｃｌｑ結合、および補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）；抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ＡＤＣＣ）；食作用；細胞表面レセプター（例えば、Ｂ細胞レセプター）の下方制御；およびＢ細胞の活性化などが挙げられる。天然のＦｃ領域の少なくとも１個のアミノ酸残基を異なる残基で置換すること、または少なくとも１個のアミノ酸残基を化学修飾することによって、エフェクターリガンド（例えば、ＦｃＲまたは補体Ｃ１ｑ）に対する抗体の親和性の変化などの機能的変化を生じさせることができ、それによりエフェクター機能を変化（例えば、低下または増強）させることができる。
【００４６】
したがって、特定の実施形態において、本出願のポリペプチドコンストラクトに含有されるＦｃドメインが、変異型Ｆｃ領域であってもよく、Ｆｃレセプター結合、抗体のグリコシル化、システイン残基数、エフェクター細胞機能または補体機能などの本出願の抗体の特性を１種または複数種変更するため、天然のＦｃ領域と比較して、１個または複数個（例えば、１～１０個、例えば１～５個）のアミノ酸突然変異または化学修飾を含んでもよい。
【００４７】
特定の実施形態において、本出願のポリペプチドコンストラクトに含まれるＦｃドメインが、ＡＤＣＣ活性を有する。特定の実施形態において、本出願のポリペプチドコンストラクトに含まれるＦｃドメインが、ＡＤＣＣ活性を有さない。
【００４８】
特定の実施形態において、免疫グロブリンＦｃドメインが、ナノボディまたはその抗原結合断片のＮ末端および／またはＣ末端（例えば、Ｃ末端）に、適宜ペプチドリンカーを介して、連結される。
【００４９】
特定の実施形態において、免疫グロブリンＦｃドメインが、ＩｇＧのＦｃドメイン（例えば、ＩｇＧ１のＦｃドメイン）である。
【００５０】
特定の実施形態において、免疫グロブリンＦｃドメインは、配列番号６８に記載の配列、またはそれと比較して、少なくとも８０％、少なくとも８５％、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％、もしくは１００％の配列同一性を有する配列、またはそれと比較して、１個もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失、もしくは付加を有する配列（例えば、１個、２個、３個、４個、または５個のアミノ酸の置換、欠失、または付加）を有する配列、を含む。
【００５１】
特定の実施形態において、血清アルブミンは、ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）、マウス血清アルブミン（ＭＳＡ）および／またはカニクイザル血清アルブミン（ＣＳＡ）からなる群より選択される。
【００５２】
特定の実施形態において、ポリペプチドコンストラクトと血清アルブミンとの結合は、ｐＨ非依存性である。
【００５３】
特定の実施形態において、ポリペプチドコンストラクトは、ｐＨ５～８（例えば、５．

５～７．４）の範囲で血清アルブミンに特異的に結合できる。
【００５４】
融合タンパク質
別の態様において、本出願は、融合タンパク質も提供し、この融合タンパク質は、上述のナノボディもしくはその抗原結合断片、または上述のポリペプチドコンストラクトと、追加ペプチドドメインとを含む。
【００５５】
特定の実施形態において、追加ペプチドドメインは、治療効果を伴うポリペプチドドメインからなる群より選択される。
【００５６】
特定の実施形態において、追加ポリペプチドドメインは、ナノボディもしくはその抗原結合断片またはポリペプチドコンストラクトのＮ末端および／またはＣ末端に、適宜ペプチドリンカーを介して、連結される。
【００５７】
単離された核酸分子
別の態様において、本出願は、単離された核酸分子も提供し、この核酸分子は、上述のナノボディまたはその抗原結合断片、上述のポリペプチドコンストラクト、または上述の融合タンパク質をコードする。
【００５８】
ベクター
別の態様において、本出願は、ベクターも提供し、このベクターは、上述の核酸分子を含む。特定の実施形態において、ベクターはクローニングベクターまたは発現ベクターである。
【００５９】
宿主細胞
別の態様において、本出願は、宿主細胞も提供し、この宿主細胞は上述の核酸分子または上述のベクターを含む。このような宿主細胞としては、細菌細胞（例えば、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）細胞）などの原核細胞、および真菌細胞（例えば、酵母細胞）、昆虫細胞、植物細胞、および動物細胞（例えば、マウス細胞、ヒト細胞などの哺乳動物細胞）などの真核細胞が挙げられるが、これらに限定されない。
【００６０】
調製方法
本出願のナノボディまたはポリペプチドコンストラクトまたは融合タンパク質は、遺伝子工学的組換え技術など、当技術分野で公知の様々な方法によって調製することができる。例えば、本出願のナノボディまたはポリペプチドコンストラクトまたは融合タンパク質をコードするＤＮＡ分子は、化学合成またはＰＣＲ増幅によって得られる。得られたＤＮＡ分子を発現ベクターに挿入した後、宿主細胞にトランスフェクトする。次いで、トランスフェクトされた宿主細胞を一定の条件下で培養し、本出願のナノボディもしくはポリペプチドコンストラクトまたは融合タンパク質を発現させる。
【００６１】
本出願の抗原結合断片は、完全なナノボディ分子を加水分解することによって得られる（Morimoto et al., J. Biochem. Biophys. Methods 24:107-117 (1992) and Brennan et al., Science 229:81 (1985)を参照）。加えて、これらの抗原結合断片は、組換え宿主細胞によって直接産生することもできる（Hudson, Curr.Opin. Immunol.11:548-557(1999); Little et al., Immunol.Today,21:364-370(2000)に総説がある）。この分野の普通の技術者は、これらの抗原結合断片を調製するための別の技術を十分に知っている。
【００６２】
別の態様において、本出願は、上述のナノボディもしくはその抗原結合断片、上述のポリペプチドコンストラクト、または上述の融合タンパク質を調製するための方法も提供し

、この方法は、タンパク質の発現が可能な条件下で上述の宿主細胞を培養すること、および培養された宿主細胞の培養物からナノボディもしくはその抗原結合断片、またはポリペプチドコンストラクト、または融合タンパク質を回収することを含む。

【００６３】

二特異性または多重特異性抗体

別の態様において、本出願は、二重特異性抗体または多重特異性抗体も提供し、これらは、上述のナノボディもしくはその抗原結合断片、または上述のポリペプチドコンストラクトを含む。

【００６４】

特定の実施形態において、二重特異性抗体または多重特異性抗体は、血清アルブミンに特異的に結合でき、それに加えて１種または複数種の別の標的に特異的に結合できる。

【００６５】

特定の実施形態において、二重特異性抗体または多重特異性抗体は、第二の標的に対する結合特異性を有する少なくとも１個の第二の抗体またはその抗原結合断片をさらに含む。

【００６６】

特定の実施形態において、二重特異性抗体または多重特異性抗体は、以下を含む：

（ｉ）第１の抗原特異的結合ドメインとして、上述のナノボディもしくはその抗原結合断片、または上述のポリペプチドコンストラクト（例えば、配列番号１０、４、７８のいずれか１個に記載の配列を含有するナノボディもしくはその抗原結合断片またはポリペプチドコンストラクト）；

（ｉｉ）配列番号７９に記載の軽鎖および配列番号８０に記載の重鎖を含む第２の抗原特異的結合ドメイン（例えば、Ｆａｂ）；

および、

（ｉｉｉ）配列番号８１に記載の第３の抗原特異的結合ドメイン（例えば、ナノボディＶＨＨ）。

【００６７】

特定の実施形態において、二重特異性抗体または多重特異性抗体が、第１のポリペプチド鎖および第２のポリペプチド鎖を含み、ここで、第１のポリペプチド鎖が（例えば、Ｎ末端からＣ末端まで）：第２の抗原特異的結合ドメイン、第３の抗原特異的結合ドメイン、第１の抗原特異的結合ドメインの軽鎖または重鎖（例えば、ＶＨおよびＣＨ１）を含み；および第２のポリペプチド鎖が、（例えば、Ｎ末端からＣ末端まで）：第２の抗原特異的結合ドメインおよび第３の抗原特異的結合ドメインの重鎖（例えば、ＶＨおよびＣＨ１）または軽鎖を含み；ここで、第１のポリペプチド鎖が、第２のポリペプチド鎖と対になって、完全な第２の抗原特異的結合ドメインを形成する。特定の実施形態において、好ましくは、前記第１のポリペプチド鎖および／または第２のポリペプチド鎖の各ドメインは、リンカー（例えば、１個または複数個のグリシンおよび／または１個または複数個のセリンを含むペプチドリンカー）によって連結される。

【００６８】

特定の実施形態において、二重特異性抗体または多重特異性抗体は、以下を含む：

（１）配列番号６９に記載の配列を有する第１のペプチド、および配列番号７６に記載の配列を有する第２のペプチド；

（２）配列番号７０に記載の配列を有する第１のペプチド、および配列番号７６に記載の配列を有する第２のペプチド；

または、

（３）配列番号７１に記載の配列を有する第１のペプチド、および配列番号７６に記載の配列を有する第２のペプチド。

【００６９】

特定の実施形態において、第１のペプチドは、第１のペプチド鎖中に存在し、第２のペプチドは、第２のペプチド鎖中に存在する。特定の実施形態において、第１のペプチド鎖

および第２のペプチド鎖は複合体を形成する。
【００７０】
コンジュゲート
別の態様において、本出願は、コンジュゲートも提供し、このコンジュゲートは、上述のナノボディもしくはその抗原結合断片または上述のポリペプチドコンストラクトと、このナノボディもしくはその抗原結合断片またはポリペプチドコンストラクトに連結された治療薬と、を含む。
【００７１】
特定の実施形態において、治療薬は、細胞毒性薬、ホルモン薬、生物学的応答修飾薬、別の抗体またはその抗原結合断片などの抗腫瘍薬からなる群より選択される。
【００７２】
医薬組成物
別の態様において、本出願は、医薬組成物も提供し、この医薬組成物は、上述の、ナノボディもしくはその抗原結合断片、ポリペプチドコンストラクト、融合タンパク質、単離された核酸分子、ベクター、宿主細胞、二重特異性抗体もしくは多重特異性抗体またはコンジュゲートを含む。
【００７３】
特定の実施形態において、医薬組成物は、薬学的に許容される担体および／または賦形剤をさらに含む。
【００７４】
特定の例示的な実施形態において、薬学的に受容可能な担体および／または賦形剤は、無菌の注射用液体（例えば、水性または非水性の懸濁液または溶液）を含む。特定の例示的な実施形態において、このような滅菌注射可能液体は、注射用水（ＷＦＩ）、注射用静菌水（ＢＷＦＩ）、塩化ナトリウム溶液（例えば、０．９％（ｗ／ｖ）ＮａＣｌ）、グルコース溶液（例えば、５％グルコース）、界面活性剤含有溶液（例えば、０．０１％ポリソルベート２０含有溶液）、ｐＨ緩衝液（例えば、リン酸緩衝液）、リンゲル液、およびこれらの任意の組み合わせからなる群より選択される。
【００７５】
特定の実施形態において、医薬組成物は、上述のナノボディもしくはその抗原結合断片もしくはポリペプチドコンストラクト、またはナノボディもしくはその抗原結合断片もしくはポリペプチドコンストラクトをコードする核酸分子、ベクターもしくは宿主細胞を含む。
【００７６】
特定の実施形態において、医薬組成物は、上述の融合タンパク質、または融合タンパク質をコードする核酸分子、ベクターもしくは宿主細胞を含む。
【００７７】
特定の実施形態において、医薬組成物は、上述の二重特異性抗体もしくは多重特異性抗体、または二重特異性抗体もしくは多重特異性抗体をコードする核酸分子、ベクターもしくは宿主細胞を含む。
【００７８】
特定の実施形態において、医薬組成物は、上述のコンジュゲートを含む。
【００７９】
使用
別の態様において、本出願は、医薬の製造における、上述の、ナノボディもしくはその抗原結合断片、ポリペプチドコンストラクト、融合タンパク質、単離された核酸分子、ベクター、宿主細胞、二特異性もしくは多重特異性抗体もしくはコンジュゲート、または医薬組成物の使用も提供する。
【００８０】
特定の実施形態において、医薬品は、対象におけるＦｃＲｎ媒介血清アルブミン循環に直接的または間接的に関与できる。

【００８１】
特定の実施形態において、医薬品は、ナノボディまたはその抗原結合断片を欠いた対応する医薬品と比較して、インビボ半減期の延長を示す。
【００８２】
特定の実施形態において、医薬品はタンパク質医薬品である。
【００８３】
特定の実施形態において、対象はヒト、マウス、カニクイザルなどの哺乳動物である。
【００８４】
薬物のインビボ半減期を延長する方法
別の態様において、本出願は、薬物のインビボ半減期を延長する方法も提供し、この方法は、上述のナノボディもしくはその抗原結合断片、または上述のポリペプチドコンストラクトを薬物に連結することを含む。
【００８５】
特定の実施形態において、インビボ半減期の延長は、ナノボディまたはその抗原結合断片が存在しない場合の薬剤のインビボ半減期に対するものである。
【００８６】
特定の実施形態において、薬物は、高分子薬物（例えば、ポリペプチド薬物）からなる群より選択される。
【００８７】
特定の実施形態において、対象は、ヒト、マウス、カニクイザルなどの哺乳動物である。
【００８８】
用語の定義
本出願において、特に指定しない限り、本明細書で使用される科学用語および技術用語は、当業者に一般的に理解される意味を有する。加えて、本明細書で使用するウイルス学、生化学および免疫学の実験の操作手順は、いずれも対応する分野で広く使用されている日常的な工程である。同時に、本出願をよりよく理解するために、関連用語の定義および説明を以下に示す。
【００８９】
本明細書において、用語「例えば（ｆｏｒ　ｅｘａｍｐｌｅ）」、「例えば（ｅ．ｇ．）」、「例えば（ｓｕｃｈ　ａｓ）」、「を含有する（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」、「を含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」またはそれらの変形が使用される場合、これらの用語は制限用語とはみなされず、「しかし、これらに限定されない」または「これらに限定されない」という意味に解釈される。
【００９０】
本明細書において別段の指示がない限り、または文脈によって明らかに矛盾しない限り、「ａ」および「ａｎ」および「ｔｈｅ」という用語ならびに同様の呼称は、本出願を説明する文脈において（特に、以下の特許請求の範囲の文脈において）、単数形および複数形の両方をカバーすると解釈されるべきである。
【００９１】
本明細書で使用する場合、「ナノボディ」という用語は、当業者に一般的に理解される意味を有し、これは、通常、重鎖抗体（例えば、ラクダ類抗体またはサメ抗体）の可変領域から誘導される、単一の単量体可変抗体ドメイン（例えば、単一の重鎖可変領域）からなる抗体断片を指す。通常、ナノボディは４個のフレームワーク領域と３個の相補性決定領域から構成され、ＦＲ１－ＣＤＲ１－ＦＲ２－ＣＤＲ２－ＦＲ３－ＣＤＲ３－ＦＲ４の構造を有する。ナノボディは、実質的に抗原結合能および特異性を保持する限り、ＦＲ１および／またはＦＲ４の一部のみを含むように、または、これらのフレームワーク領域の１個または２個を欠くように、Ｎ末端またはＣ末端を切断してもよい。ナノボディはシングルドメイン抗体（ｓｄＡｂ）とも呼ばれ、両者は互換的に使用される。
【００９２】

本明細書で使用する場合、ナノボディの「抗原結合断片」という用語は、ナノボディの断片を含むポリペプチドを指し、これは、ナノボディが結合するのと同じ抗原に特異的に結合する能力を保持し、および／または抗原への特異的結合についてナノボディと競合し、「抗原結合部分」とも呼ばれる。一般的には、Fundamental Immunology, Ch.7 (Paul, W., ed., 2nd edition, Raven Press, N.Y.(1989))を参照、これはあらゆる目的のために参照により本明細書に完全に組み込まれる。本出願のナノボディの抗原結合断片は、組換えＤＮＡ技術により、または本出願のナノボディの酵素的もしくは化学的切断により産生できる。いくつかの実施形態において、ナノボディの「抗原結合断片」は、実質的に抗原結合能および特異性を保持する限り、全長ナノボディと比較して、ＦＲ１および／またはＦＲ４の一部のみを含むように、またはこれらのフレームワーク領域の１個または２個を欠くように、Ｎ末端またはＣ末端を切断できる。

【００９３】

ナノボディの抗原結合断片は、当業者に公知の従来技術（例えば、組換えＤＮＡ技術または酵素的もしくは化学的切断法）を使用して、所定のナノボディ（例えば、本出願により提供されるナノボディ）から得られ、ナノボディの抗原結合断片は、完全なナノボディと同様の方法で特異性についてスクリーニングされる。

【００９４】

本明細書で使用される場合、文脈が明確にそうでないことを示さない限り、「ナノボディ」という用語が言及される場合、それは完全なナノボディだけでなく、ナノボディの抗原結合断片も含有する。

【００９５】

本明細書において、「相補性決定領域」または「ＣＤＲ」という用語は、抗体の可変領域において抗原結合を担うアミノ酸残基を指す。ナノボディには、３個のＣＤＲが存在し、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２およびＣＤＲ３と名付けられる。これらのＣＤＲの正確な境界は、当該技術分野において周知の様々な番号付けシステムに従って定義することができ、例えば、Ｋａｂａｔ番号付けシステム（Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991）、Ｃｈｏｔｈｉａ番号付けシステム（Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al. (1989) Nature 342:878-883）またはＩＭＧＴ番号付けシステム（Lefranc et al., Dev. Comparat. Immunol. 27:55-77, 2003）による定義に従う。所与のナノボディについて、当業者は、各ナンバリングシステムによって定義されるＣＤＲを容易に同定することができる。さらに、異なる番号付けシステム間の対応は当業者に周知である（例えば、Lefranc et al., Dev. Comparat. Immunol. 27:55-77, 2003を参照）。本明細書で使用する場合、ナノボディのＣＤＲは、好ましくはＩＭＧＴ番号付けシステムによって決定される。

【００９６】

本明細書において、「フレームワーク領域」または「ＦＲ」残基という用語は、上記で定義したＣＤＲ残基以外の抗体可変領域のアミノ酸残基を指す。

【００９７】

本明細書では、「Ｆｃドメイン」または「Ｆｃ領域」という用語は、ＣＨ２およびＣＨ３を含有する重鎖定常領域の一部を指す。抗体のＦｃ断片は様々な異なる機能を有するが、抗原結合には関与しない。Ｆｃ領域によって媒介される「エフェクター機能」としては、Ｆｃ受容体結合；Ｃｌｑ結合および補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）；抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ＡＤＣＣ）；食作用；細胞表面受容体（例えば、Ｂ細胞受容体）の下方制御；およびＢ細胞活性化などが挙げられる。いくつかの実施形態において、Ｆｃ領域は、ヒンジ、ＣＨ２およびＣＨ３を含む。Ｆｃ領域がヒンジを含む場合、このヒンジは２つのＦｃ含有ポリペプチド間の二量体化を媒介する。Ｆｃ領域は、例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４のような、抗体重鎖定常領域の任意のアイソタイプであってよい。

【００９８】
ＦｃドメインＦｃ領域Ｆｃ領域
【００９９】
ヒト化抗体ＣＤＲＣＤＲＦＲＦＲＦＲＨＨＨ

本明細書において、「特異的結合」という用語は、抗体とそれが指向する抗原との反応のような、２個の分子間の非ランダム結合反応を指す。特異的結合相互作用の強さまたは親和性は、相互作用の平衡解離定数（K_D）によって表せる。本出願において、「K_D」という用語は、特異的な抗体－抗原相互作用の平衡解離定数（dissociation equilibrium constant）を指し、抗体と抗原間の結合親和性を表すために使用される。平衡解離定数が小さいほど、抗体と抗原の結合は強固であり、抗体と抗原の親和性は高い。

【０１０３】

２分子間の特異的結合特性は、当該技術分野で公知の方法を使用して、決定できる。抗原結合部位／抗原複合体の形成と解離の速度を測定する方法がある。「結合速度定数」（k_aまたはk_{on}）と「解離速度定数」（k_{dis}またはk_{off}）は、濃度と実際の結合および解離速度から計算できる（Malmqvist M, Nature, 1993, 361:186-187を参照）。k_{dis}／k_{on}の比は解離定数K_Dに等しい（Davies et al., Annual Rev Biochem, 1990; 59:439-473を参照）。K_D、k_{on}およびk_{dis}の値は、任意の有効な方法によって測定できる。特定の実施形態において、解離定数は、Ｂｉａｃｏｒｅ装置を使用する表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）によって測定できる。加えて、解離定数は、生物発光干渉分光法（ｂｉｏｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｃｅ ｉｎｔｅｒｆｅｒｏｍｅｔｒｙ）またはキネクサ（Ｋｉｎｅｘａ）法によって測定できる。

【０１０４】

本明細書において、「ベクター」という用語は、ポリヌクレオチドを挿入できる核酸担体を指す。ベクターが、挿入されたポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質を発現することができる場合、このベクターは発現ベクターと呼ばれる。ベクターは、形質転換、形質導入、トランスフェクションによって宿主細胞に導入され、ベクターが運ぶ遺伝物質要素が宿主細胞で発現される。ベクターは当業者によく知られており、プラスミド；ファージミド；コスミド；酵母人工染色体（ＹＡＣ）、細菌人工染色体（ＢＡＣ）、Ｐ１由来人工染色体（ＰＡＣ）などの人工染色体；λファージおよびＭ１３ファージなどのバクテリオファージ、動物ウイルスなどが挙げられるが、これらに限定されない。ベクターとして使用できる動物ウイルスとしては、レトロウイルス（レンチウイルスを含有する）、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス（例えば、単純ヘルペスウイルス）、ポックスウイルス、バキュロウイルス、パピローマウイルス、パポウイルス（例えば、ＳＶ４０）などが挙げられるが、これらに限定されない。ベクターは、発現を制御する種々の要素を含有してよく、要素としては、プロモーター配列、転写開始配列、エンハンサー配列、選択エレメント、およびレポーター遺伝子が挙げられるが、これらに限定されない。加えて、ベクターは複製起点を含有してよい。

【０１０５】

本明細書で使用する場合、「宿主細胞」という用語は、ベクターの導入に使用できる細胞を指し、これには、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）または枯草菌（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ）などの原核細胞、酵母細胞またはアスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）属などの真菌細胞、Ｓ２ショウジョウバエ細胞やＳｆ９などの昆虫細胞、線維芽細胞、ＣＨＯ細胞、ＣＯＳ細胞、ＮＳＯ細胞、ＨｅＬａ細胞、ＢＨＫ細胞、ＨＥＫ２９３細胞、またはヒト細胞などの動物細胞が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１０６】

本明細書で使用する場合、「同類置換」という用語は、アミノ酸配列を含有するタンパク質／ポリペプチドの期待される特性に悪影響を及ぼさない、または特性を変化させないアミノ酸置換を指す。例えば、同類置換は、部位特異的突然変異誘発やＰＣＲを媒介した突然変異誘発など、当技術分野で知られている標準的な技術によって導入できる。同類アミノ酸置換としては、類似の側鎖を有するアミノ酸残基によるアミノ酸残基の置換、例えば、対応するアミノ酸残基と物理的または機能的に類似する残基（例えば、類似のサイズ、形状、電荷、共有結合または水素結合を形成する能力を含有する化学的性質などを有する）による置換が挙げられる。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当技術分

野で定義されている。これらのファミリーとしては、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニンおよびヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、β－分岐側鎖を有するアミノ酸（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が挙げられる。したがって、対応するアミノ酸残基を同じ側鎖ファミリーの別のアミノ酸残基で置換することが好ましい。アミノ酸の同類置換を同定する方法は、当技術分野で周知である（例えば、Brummell et al., Biochem. 32:1180-1187 (1993); Kobayashi et al. Protein Eng. 12(10):879-884 (1999);およびBurks et al. Proc. Natl Acad. Set USA 94:412-417(1997)を参照、これらは参照により本明細書に組み込まれる）。

【０１０７】

本明細書に関与する２０種の従来のアミノ酸の編集は、従来の用法に従う。例えば、Immunology-A Synthesis (2nd Edition, E.S.Golub and D.R.Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass.(1991))を参照、これらは参照により本明細書に組み込まれる。本出願において、「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は、同じ意味を有し、互換的に使用される。そして、本出願において、アミノ酸は、一般に、当該分野で公知の１文字および３文字の略号で表される。例えば、アラニンは、ＡまたはＡｌａで表せる。

【０１０８】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体および／または賦形剤」という用語は、対象および有効成分と薬理学的および／または生理学的に適合する担体および／または賦形剤を指し、これは当技術分野で周知であり（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995を参照）、ｐＨ調整剤、界面活性剤、アジュバント、イオン強度増強剤、希釈剤、浸透圧維持剤、吸収遅延剤、保存剤が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、ｐＨ調整剤としては、リン酸緩衝液が挙げられるが、これに限定されない。

界面活性剤としては、Ｔｗｅｅｎ－８０のような、カチオン性、アニオン性または非イオン性の界面活性剤が挙げられるが、これらに限定されない。イオン強度増強剤としては、塩化ナトリウムが挙げられるが、これに限定されない。防腐剤としては、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸などの、各種抗菌剤、防かび剤などが挙げられるが、これらに限定されない。浸透圧維持剤としては、糖類、ＮａＣｌ等が挙げられるが、これらに限定されない。吸収遅延剤としては、モノステアリン酸塩、ゼラチン等が挙げられるが、これらに限定されない。希釈剤としては、水、水性緩衝液（緩衝生理食塩水など）、アルコール、ポリオール（グリセロールなど）などが挙げられるが、これらに限定されない。保存剤としては、種々の抗菌剤および抗真菌剤、例えばチメロサール、２－フェノキシエタノール、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸などが挙げられるが、これらに限定されない。安定剤は、当業者に一般的に理解される意味を有し、薬剤中の活性成分の所望の活性を安定化することができ、安定剤としては、グルタミン酸ナトリウム、ゼラチン、ＳＰＧＡ、糖類（例えば、ソルビトール、マンニトール、デンプン、スクロース、ラクトース、デキストラン、またはグルコース）、アミノ酸（例えば、グルタミン酸、グリシン）、タンパク質（例えば、乾燥ホエイ、アルブミン、またはカゼイン）、またはその分解産物（例えば、ラクトアルブミン加水分解物）などが挙げられるが、これらに限定されない。特定の例示的な実施形態において、薬学的に許容される担体または賦形剤は、滅菌済みの注射可能な液体（例えば、水性または非水性の懸濁液または溶液）を含有する。特定の例示的な実施形態において、このような滅菌済みの注射可能な液体は、注射用水（ＷＦＩ）、注射用静菌水（ＢＷＦＩ）、塩化ナトリウム溶液（例えば、

０．９％（ｗ／ｖ）ＮａＣｌ）、グルコース溶液（例えば、５％グルコース）、界面活性剤含有溶液（例えば、０．０１％ポリソルベート２０を含有する溶液）、ｐＨ緩衝液（例えば、リン酸緩衝液）、リンゲル液およびこれらの任意の組み合わせからなる群より選択される。

【０１０９】

本明細書において、「インビボ半減期」という用語は、当業者に公知の意味を有し、一般に、インビボにおける分子の血清濃度が５０％減少するのに要する時間（例えば、自然機構による、リガンドの分解および／またはリガンドのクリアランスもしくはキレート）として定義できる。インビボ半減期を決定する方法は、当業者に周知であり、例えば、薬物動態学的分析による。

【０１１０】

本出願の有益な効果

本出願は、血清アルブミンへの高い結合活性を有するナノボディであって、ヒト、サルおよび／またはマウスの血清アルブミンと交差反応性を有するナノボディを提供する。特に、本出願のナノボディの血清アルブミンへの結合は、ｐＨ非依存性であり、ＦｃＲｎ媒介血清アルブミン循環に効果的に関与することができ、それによりナノボディのインビボ半減期を延長できる。したがって、本出願のナノボディは、薬物分子（例えば、ポリペプチド薬物）と連結（例えば、融合）させて、インビボでの薬物分子の半減期を延長できる。

【０１１１】

加えて、このナノボディは分子量が小さく、安定性が高いという特徴も持っている。従来からある一般的な抗体と比較すると、組織への浸透性がよく、投与が柔軟で、ヒト化度が高く、組換えタンパク質への変換が容易であるなど、医薬品開発において多くの利点がある。

【０１１２】

以下、図面および実施例を参照して、本出願の実施形態を詳細に説明するが、当業者であれば、以下の図面および実施例は、本出願を説明するために使用されているに過ぎず、本出願の範囲を限定するものでないことを理解するであろう。以下の図面および好ましい実施形態の詳細な説明によれば、本出願の様々な目的および利点が当業者には明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【０１１３】

【図１】図１は、マウス血清中のＢｉ－３４０－３５２、Ｂｉ－３４０－３５３、Ｂｉ－３４０－３５４およびＢｉ－３４０－３５６の濃度の経時変化を示す。

【発明を実施するための形態】

【０１１４】

本発明を実施するための具体的なモデル

次に、以下の実施例を参照して本発明を説明するが、以下の実施例は本発明を説明するために意図されたものである（ただし、本発明を限定するものではない）。

【０１１５】

本発明で使用する分子生物学的実験方法およびイムノアッセイは、特に断らない限り、基本的にJ. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989,およびF. M. Ausubel et al., A Compendium of Molecular Biology Experimental Guide, 3rd edition, John Wiley & Sons, Inc., 1995に記載の方法に従って行った；制限酵素の使用は、製品製造者が推奨する条件に従った。以下の実施例は、例として本発明を説明するものであり、請求された本発明の範囲を限定することを意図するものではないことは、当業者に周知である。

【実施例】

【０１１６】

［実施例１］
【０１１７】
抗ＨＳＡナノボディのスクリーニング
１．１　ナノボディライブラリーの構築
動物の免疫
１ｍｇのヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）抗原（ＡｃｒｏＢｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社より購入）を等量のフロイントアジュバントと混合し、２頭のアルパカに週１回、計４回免疫し、Ｂ細胞を刺激して抗原特異的ナノ抗体を発現させた。４回の免疫後、アルパカ末梢血５０ｍｌを抽出し、リンパ球分離液を使用してリンパ球を分離した。全ＲＮＡを、ＲＮＡ抽出試薬Ｔｒｉｚｏｌ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社より購入）を使用して、抽出した。アルパカリンパ球の全ｃＤＮＡを、ｃＤＮＡ合成キット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社より購入）を使用して、逆転写することにより得た。
【０１１８】
ナノボディ遺伝子の増幅
第１回目のＰＣＲを行って、前の工程で得られたｃＤＮＡからＩｇＧ２とＩｇＧ３の配列を増幅した。増幅に用いたプライマーを表１に示した：
【０１１９】
【表１】

表 1. 第 1 回目の PCR プライマー

名称	配列番号	配列(5’から 3’へ)
上流側プライマー	配列番号 60	GTCCTGGCTGCTCTTCTACAAGG
下流側プライマー	配列番号 61	GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC

【０１２０】
第１回目のＰＣＲ産物をアガロースゲル電気泳動にかけ、７５０ｂｐの目的のバンドをゲルから切り出し、ＶＨＨ配列の第２回目の増幅のために回収した。第２回目のＰＣＲ増幅プライマーを表２に示した：
【０１２１】
【表２】

表 2. 第 2 回目の PCR プライマー

名称	配列番号	配列(5’から 3’へ)
上流側プライマー	配列番号 62	CTAGTGCGGCCGCCTGGAGACGGTG ACCTGGGT
下流側プライマー	配列番号 63	CGCGGATCCCAGGTGCAGCTGCAGG AGTCTGGRGGAGG

【０１２２】
２回目のＰＣＲ産物を鋳型として使用し、３回目のＰＣＲを行って、ディスプレイベクターと相同なホモロジーアーム配列をＶＨＨ遺伝子に付加した。第３回目のＰＣＲ増幅プライマーを表３に示した：
【０１２３】

【表３】

表3. 第3回目のPCRプライマー

名称	配列番号	配列(5'から3'へ)
上流側プライマー	配列番号64	ATTTTTACTGCTGTTTTATTCGCAGC ATCCTCCGCATTAGCTAAAAGAGAG GCTGAAGCACAGGTGCAGCTGCAGG AGTCTGGRGGAGG
下流側プライマー	配列番号65	AGTTGTCAGTTCCTGTGCCCCCCCTC CTCCCGCGCCACCTCCGCCCGCACCT CCGCCACCAcTGGAGACGGTGACCTG GGT
上流側相同性アームプライマー	配列番号66	ATTTTTACTGCTGTTTTATTCGCAGC ATCCTCCGCATTAGCTAAAAGAGAG GCTGAAGCA
下流側相同性アームプライマー	配列番号67	AGTTGTCAGTTCCTGTGCCCCCCCTC CTCCCGCGCCACCTCCGCCCGCACCT CCGCCACC

PCR精製キット(QIAGENより購入)を使用して標的断片を回収した。

【０１２４】

ライブラリーの構築

線状化酵母ディスプレイベクター（人工合成）と３回目のＰＣＲ産物を混合し、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ（ＡＴＣＣより購入）に電気的に形質転換して、２匹の動物から抗ＨＳＡナノボディライブラリーを構築し、ライブラリーサイズを測定したところ、それぞれ2.1×10^{7}と3.2×10^{7}であった。

【０１２５】

１．２　ＨＳＡナノボディのスクリーニング

ＨＳＡタンパク質のビオチン化

ＨＳＡタンパク質（ＡｃｒｏＢｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社より購入、カタログ番号：ＨＳＡ－Ｈ５２２０）を溶解するために適量の二回蒸留水を取り、ビオチン標識キット（Ｔｈｅｒｍｏ社より購入）の製品説明書に従って、ビオチンを溶解し、タンパク質溶液と混合し、４℃で２時間インキュベートした。脱塩カラム（Ｔｈｅｒｍｏ社より購入）を使用して余分なビオチンを除去し、脱塩カラムの前処理、試料回収操作はすべて製品説明書に従って行った。

【０１２６】

ＨＳＡに特異的に結合できる酵母のＭＡＣＳによる濃縮

工程１．１で構築したＶＨＨライブラリーをＳＤ－ＣＡＡ展開培地（ＹＮＢ　６．７ｇ、チロシン　５ｇ、$Na_2HPO_4\cdot12H_2O$　１３．６２ｇ、NaH_2PO_4　７．４４ｇ、グルコース　２％を含むＳＤ－ＣＡＡ展開培地１Ｌ）に接種し、３０℃、２２５ｒｐｍで一晩培養した。酵母細胞を適量採取し、３０００ｒｐｍ×５分間遠心して培地を除去し（以下の遠心操作のパラメータはここと同じ）、酵母細胞をＳＤ－ＣＡＡ誘導培地で再懸濁し、一晩誘導した。誘導後のライブラリー濃度を測定して、酵母細胞を適量採取し、遠心分離して培地を除去した。酵母細胞を５０ｍｌのＰＢＳで懸濁し、遠心して上清を除去した。酵母細胞を１０ｍｌのＰＢＳで懸濁した。

【０１２７】
上述の工程で得られたビオチン標識ＨＳＡタンパク質（最終濃度は１００ｎＭ）を加えて、室温で３０分間インキュベートした後、酵母細胞を遠心分離により回収し、５０ｍｌのＰＢＳで３回洗浄した。酵母細胞を５ｍｌの洗浄液で再懸濁し、２００μｌのＳＡ磁性ビーズ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ社より購入）を加え、１０分間インキュベートした。酵母細胞と磁気ビーズの混合物をＰＢＳで３回洗浄し、ＬＳ精製カラム（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ社より購入）に加えた。ＬＳ精製カラムを磁気格子上に置き、ＰＢＳで洗浄して非特異的に結合した酵母細胞を除去した。カラムを磁気格子から取り出し、ＰＢＳを加えて酵母細胞を溶出した。遠心後、溶出した酵母細胞をＳＤ－ＣＡＡ展開培地に移し、展開した。

【０１２８】
高親和性酵母細胞を得るためのフローサイトメトリーソーティング
ＭＡＣＳで濃縮した酵母細胞をＳＤ－ＣＡＡ展開培地に接種し、３０℃、２２５ｒｐｍで一晩振盪培養した。酵母細胞をＳＤ－ＣＡＡ誘導培地で再懸濁し、一晩誘導した。抗ｃ－Ｍｙｃマウス抗体（Ｔｈｅｒｍｏ社より購入、カタログ番号：ＭＡ１－９８０）と１００ｎＭビオチン標識ＨＳＡ抗原とを加え、１０分間インキュベートした。酵母細胞をＰＢＳで３回洗浄した後、ヤギ抗マウスＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ Ｐｌｕｓ４８８蛍光抗体（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社より購入、カタログ番号：Ａ３２７２３）およびストレプトアビジン－ＡＰＣコンジュゲート蛍光抗体（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎより購入、カタログ番号：ＳＡ１００５）を加え、１５分間インキュベートした。細胞をＰＢＳで再懸濁し、ＢＤ ＦＡＣＳＡｒｉａＩＩ装置を使用してソートし、ＨＳＡ抗原との結合能の高い酵母細胞を得た。

【０１２９】
ｖＨＨ候補の配列決定
ＭＡＣＳおよびＦＡＣＳ濃縮により得られたＨＳＡ抗原との結合能の高い酵母産物をＳＤ－ＣＡＡ展開培地で３０℃、２２５ｒｐｍで一晩培養し、酵母プラスミド抽出キット（Ｔｉａｎｇｅｎ社より購入）の操作に従って酵母プラスミドを抽出した。このプラスミドをエレクトロポレーションによりＴｏｐ１０コンピテントセル（Ｔｉａｎｇｅｎ社より購入）に形質転換して、アンピシリンを含むプレートに塗布し、３７℃で一晩培養した。モノクローナル細胞をシークエンシングのために採取し、ＶＨＨ配列を得て、ＣＤＲ配列をＩＭＧＴ番号付けシステムに従って決定した。得られたモノクローナルナノボディの配列情報を表４に示した。

【０１３０】

【表４－１】

表4: 抗HSAナノボディ候補のVHHおよびCDR配列情報

番号	VHH	CDR1	CDR2	CDR3
HSA-8	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAASGFTLDYYAIGWFRQAPGKEREGVSCISSSGGSTNSADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAATLECRTVVVGYDYWGQGTQVTVSS	SGFTLDYYA	ISSSGGST	AAATLECRTVVVGYDY
	配列番号1	配列番号30	配列番号39	配列番号47
HSA-30	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCKASGFTFSIYSMGWYRQVPGKEREAVATISSGGSPFYANSASGRFTISRDNAKSTVYLQMNNLKPEDTGVYSCSPITSIFKAQGQGTQVTVSS	GFTFSIYS	ISSGGSP	SPITSIFKA
	配列番号2	配列番号31	配列番号40	配列番号48
HSA-59	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTLDYYAIGWFRQAPGKEREEVSCISSSGGSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCAAALLECRVRSWPSDNWGQGTQVTVSS	GFTLDYYA	ISSSGGST	AAALLECRVRSWPSDN
	配列番号3	配列番号32	配列番号41	配列番号49
HSA-76	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFTFYRMAWYRRAPGKERELVALITTDTSTNYADSVKGRFTISRDYAKNTVYLQMDSLKPEDTAAYYCNVRNVERDYWGQGTQVTVSS	GSIFTFYR	ITTDTST	NVRNVERDY
	配列番号7	配列番号33	配列番号42	配列番号50

【表４－２】

番号	VHH	CDR1	CDR2	CDR3
HSA-M-16	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYAIGWFRQAPGKEREGVSCIASSGGSTNYADYVKGRFTISRDNAKNTVYLLMNKLKPEDTAVYYCAAAVLECRTVVREYDYWGQGTQVTVSS	GFTLDYYA	IASSGGST	AAAVLECRTVVREYDY
	配列番号8	配列番号32	配列番号43	配列番号51
HSA-M-27	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYAIGWFRQAPGKEREGVSCIASSGGSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNKLKPEDTAVYYCAAAVLECRTVVRGYDYWGQGTQVTVSS	GFTLDYYA	IASSGGST	AAAVLECRTVVRGYDY
	配列番号9	配列番号32	配列番号43	配列番号52
HSA-M-29	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCVASRFTLDYYAIGWFRQAPGKEREGVSCIASSGGSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNKLKPEDTAVYYCAAAVLECRTVVRGYDYWGQGTQVTVSS	RFTLDYYA	IASSGGST	AAAVLECRTVVRGYDY
	配列番号14	配列番号35	配列番号43	配列番号52
HSA-W-5	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYAIGWFRQAPGKEREGVSCIASSGGSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAATLECRTTLTGYAYWGQGTQVTVSS	GFTLDYYA	IASSGGST	AAATLECRTTLTGYAY
	配列番号15	配列番号32	配列番号43	配列番号53
HSA-W-7	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEAASGFTLDYYAIGWFRQAPGKEREGVSCISSSGGSTNSADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAATLECRTVVVGYDYWGQGTQVTVSS	SGFTLDYYA	ISSSGGST	AAATLECRTVVVGYDY

【表４－３】

番号	VHH	CDR1	CDR2	CDR3
	配列番号16	配列番号30	配列番号39	配列番号47
HSA-W-14	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGSTLDYYAIGWFRQAPGKEREGVSCISSSGGSTIYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAAVLECRAAEYVNSWGQGTQVTVSS	GSTLDYYA	ISSSGGST	AAAVLECRAAEYVNS
	配列番号17	配列番号36	配列番号41	配列番号54
HSA-W-15	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASRFTLDYYAIAWFRQAPGKDLEEVSCISSSGGATNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEETAVYYCAAATLECRGRSSSYDYWGQGTQVTVSS	RFTLDYYA	ISSSGGAT	AAATLECRGRSSSYDY
	配列番号18	配列番号35	配列番号44	配列番号55
HSA-W-17	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYAIAWFRQAPGKDLEGVSCIASSGGATNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNKLKPEETAVYYCAAATFECRGRSSSYDYWGQGTQVTVSS	GFTLDYYA	IASSGGAT	AAATFECRGRSSSYDY
	配列番号19	配列番号32	配列番号45	配列番号56
HSA-W-18	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASRFTLDYYAIGWFRQAPGKEREGVSCIASSGGSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNKLKPEDTAVYYCAAAVLECRTVVRGYDYWGQGTQVTVSS	RFTLDYYA	IASSGGST	AAAVLECRTVVRGYDY
	配列番号20	配列番号35	配列番号43	配列番号52

【表４－４】

番号	VHH	CDR1	CDR2	CDR3
HSA-W-19	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYAIGWFRQAPGKEREGVSCISSSGGSTNNADSVKGRFTISRDNAENTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAAVLECRTVVRGYDYWGQGTQVTVSS	GFTLDYYA	ISSSGGST	AAAVLECRTVVRGYDY
	配列番号21	配列番号32	配列番号41	配列番号52
HSA-W-20	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYAIGWFRQAPGKEREGVSCIASSGGSTNYADSVKGRFTISRDNAENTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAAVLECRTVVRGYDYWGQGTQVTVSS	GFTLDYYA	IASSGGST	AAAVLECRTVVRGYDY
	配列番号22	配列番号32	配列番号43	配列番号52
HSA-W-21	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTLDYYAIGWFRQAPGKEREGVSCISSSGGSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAAVLECRTVVRGYDYWGQGTQVTVSS	GFTLDYYA	ISSSGGST	AAAVLECRTVVRGYDY
	配列番号23	配列番号32	配列番号41	配列番号52
HSA-PH-8	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCVASGSIWGIYHMGWYRQAPGKQRELVASITVDGSTHYADTVKGRFTISKDNAANMVYLQMNALEPEDTAVYYCDIRNVGGDYWGQGTQVTVSS	GSIWGIYH	ITVDGST	DIRNVGGDY
	配列番号24	配列番号37	配列番号46	配列番号57
HSA-PH-10	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYAIGWFRQAPGKEREGVSCISSSGGSTNYADSVKGRFTISKDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAATLECRTVIRGYDYWGQGTQVTVSS	GFTLDYYA	ISSSGGST	AAATLECRTVIRGYDY

【表４－５】

番号	VHH	CDR1	CDR2	CDR3
	配列番号28	配列番号32	配列番号41	配列番号58
HSA-PH-11	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCTASGAQLEYYAIGWFRQAPGKEREGVSCISSSGGSTNNADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAATLECRTVLTGYDYWGQGTQVTVSS	GAQLEYYA	ISSSGGST	AAATLECRTVLTGYDY
	配列番号29	配列番号38	配列番号41	配列番号59

［実施例２］
【０１３１】
重鎖抗体の構築、発現および精製
２．１．抗体遺伝子を挿入したｐＣＤＮＡ３．１発現ベクターの構築
ＶＨＨ遺伝子配列をヒトＩｇＧ１（ＬＡＬＡ突然変異）のＦｃフラグメントのコード配列（アミノ酸配列は配列番号６８に記載）にライゲーションし、相同組換えを触媒するリコンビナーゼ（Ｖａｚｙｍｅ社より購入、カタログ番号：ｃ１１５－０２）を使用して、ＥｃｏＲＩ／ＮｏｔＩ二重酵素消化により直鎖化したｐＣＤＮＡ３．１ベクターに挿入した。なお、処理は製品マニュアルに従って行った。相同組換え産物をＴｏｐ１０コンピテントセルに移して、アンピシリンを含むプレートに塗布し、３７℃で一晩培養した。シークエンシングのために単一クローンを採取し、プラスミドを抽出した。
【０１３２】
配列番号６８の配列は、以下のとおりであった：
ＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＡＡＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧ。
【０１３３】
２．２．細胞のトランスフェクションとタンパク質の精製
上述の工程で得られた抽出プラスミドを、ＥｘｐｉＣＨＯ（登録商標）発現システムキット（Ｔｈｅｒｍｏ社より購入）を使用して、Ｅｘｐｉ－ＣＨＯ細胞に導入した。なお、トランスフェクション方法は、製品マニュアルに従った。細胞培養５日後、上清を回収し、プロテインＡ磁性ビーズ（ＧｅｎＳｃｒｉｐｔ社より購入）を使用して、ソーティング法によりタンパク質を精製した。磁性ビーズを適当量（磁性ビーズの１～４倍量）の結合バッファー（ＰＢＳ＋０．１％Ｔｗｅｅｎ２０、ｐＨ７．４）に再懸濁した後、精製する試料に加えて、室温で穏やかに振とうしながら１時間インキュベートした。試料を磁気格子（Ｂｅａｖｅｒ社から購入）上に置き、上清を捨て、磁気ビーズを結合バッファーで３回洗浄した。溶出バッファー（０．１Ｍクエン酸ナトリウム、ｐＨ３．２）を磁気ビーズの３～５倍量加え、室温で５～１０分間振とうした。磁気格子上に戻した後、溶出バッファーを回収して、中和バッファー（１Ｍ　Ｔｒｉｓ、ｐＨ８．５４）を入れた回収チューブに移し、よく混合することにより、標的タンパク質を得た。
［実施例３］
【０１３４】
親和性の決定
ＦｏｒｔｅＢｉｏ親和性の測定は、既存の方法（Estep, P et al., Determination of antibody-antigen affinity and epitope binding based on high-throughput methods. MAbs, 2013.5(2):p.270-8）に従って行った。簡単に説明すると、センサーをアッセイバッファー中において３０分間オフラインで平衡化し、その後６０秒間オンラインで試験してベースラインを確立し、上述のようにして得られた精製抗体をＡＨＱセンサーにオンラインでロードした。その後、センサーを１００ｎＭのＨＳＡ抗原（ＡｃｒｏＢｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社から購入、カタログ番号：ＨＳＡ－Ｈ５２２０）に５分間曝露し、センサーをＰＢＳに移して５分間解離させた。速度論的解析は、１：１結合モデルを使用して行った。親和性データを表５に示した。
【０１３５】

【表５】

表 5. HSA に対する候補分子の親和性

番号	K_D(M)	Kon(1/Ms)	Koff(1/s)
HSA-30	1.54E-09	1.40E+05	2.15E-04
HSA-59	2.91E-08	5.55E+04	1.62E-03
HSA-76	7.97E-07	8.73E+03	6.96E-03
HSA-M-16	3.81E-08	1.65E+05	6.28E-03
HSA-M-27	1.61E-08	2.44E+05	3.93E-03
HSA-M-29	2.33E-08	2.51E+05	5.85E-03
HSA-W-20	2.24E-08	1.93E+05	4.31E-03
HSA-PH-8	2.152E-08	1.23E+05	2.65E-03
HSA-PH-11	4.43E-08	2.21E+05	9.79E-03

【０１３６】
この実施例において、候補分子と異なる種の血清アルブミンとの交差反応をさらに検出した。この血清アルブミンには、マウス血清アルブミン（ＭＳＡ、ＡｃｒｏＢｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社から購入、カタログ番号：ＭＳＡ－Ｍ５２Ｈ８）、およびカニクイザル血清アルブミン（ＣＳＡ、ＡｃｒｏＢｉｏｓｙｓｔｅｍｓ社から購入、カタログ番号：ＣＳＡ－Ｃ５２Ｈ４）が挙げられる。親和性データを表６に示した。
【０１３７】

【表６】

表 6. 候補分子と MSA/CSA との親和性

番号		MSA	CSA
HSA-30	KD(M)	2.584E-08	1.202E-09
	Kon(1/Ms)	1.37E+05	3.25E+05
	Koff(1/s)	3.54E-03	3.90E-04
HSA-59	KD(M)	3.107E-08	7.732E-08
	Kon(1/Ms)	1.09E+05	1.43E+05
	Koff(1/s)	3.40E-03	1.11E-02
HSA-76	KD(M)	3.134E-08	2.567E-08
	Kon(1/Ms)	1.30E+05	2.14E+05
	Koff(1/s)	4.07E-03	5.49E-03
HSA-M-16	KD(M)	1.22E-08	7.07E-08
	Kon(1/Ms)	4.47E+05	2.84E+05
	Koff(1/s)	5.46E-03	2.01E-02
HSA-M-27	KD(M)	1.74E-08	7.16E-08
	Kon(1/Ms)	4.33E+05	2.80E+05
	Koff(1/s)	7.52E-03	2.01E-02
HSA-M-29	KD(M)	1.77E-08	7.43E-08
	Kon(1/Ms)	4.08E+05	2.74E+05
	Koff(1/s)	7.22E-03	2.04E-02
HSA-W-20	KD(M)	4.39E-09	1.66E-08
	Kon(1/Ms)	5.40E+05	4.73E+05
	Koff(1/s)	2.37E-03	7.85E-03
HSA-PH-8	KD(M)	1.05E-08	6.64E-09
	Kon(1/Ms)	2.74E+05	2.71E+05
	Koff(1/s)	2.88E-03	1.80E-03
HSA-PH-11	KD(M)	6.32E-09	9.07E-09
	Kon(1/Ms)	4.68E+05	5.91E+05
	Koff(1/s)	2.96E-03	5.37E-03

［実施例４］

【０１３８】

ヒト化抗ＨＳＡ抗体の構築

ヒト体内におけるモノクローナル抗体の免疫原性を低減するため、ＨＳＡ－５９、ＨＳＡ－Ｍ－２７、およびＨＳＡ－ＰＨ－８の３抗体をヒト化した。ヒト化方法には、ＶＨＨヒト化ユニバーサルフレームワーク移植法を採用し、同時に抗体フレームワーク２のいくつかのアミノ酸を文献で報告されている方法に従って変異させた（Vincke, C., et al., General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold. J Biol Chem 28

4(5): 3273-3284）。ヒト化抗体の配列情報を表７に示した。

【０１３９】

【表７－１】

表 7. ヒト化抗体の VHH および CDR 配列情報

番号	VHH	CDR1	CDR2	CDR3
Hu-HSA-59-1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYAIGWFRQAP GKEREEVSCISSSGGSTNYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQM NSLKPEDTAVYYCAAALLECRVRSWPSDNWGQGTQVTVSS	GFTLDYYA	ISSSGGST	AAALLECRVRSW PSDN
	配列番号 4	配列番号 32	配列番号 41	配列番号 49
Hu-HSA-59-2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYAIGWFRQAP GKGLEEVSCISSSGGSTNYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQM NSLKPEDTAVYYCAAALLECRVRSWPSDNWGQGTQVTVSS	GFTLDYYA	ISSSGGST	AAALLECRVRSW PSDN
	配列番号 5	配列番号 32	配列番号 41	配列番号 49
Hu-HSA-59-3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYAIGWFRQAP GKEREEVSCISSSGGSTNYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQM NSLRAEDTAVYYCAAALLECRVRSWPSDNWGQGTQVTVSS	GFTLDYYA	ISSSGGST	AAALLECRVRSW PSDN
	配列番号 6	配列番号 32	配列番号 41	配列番号 49
Hu-HSA-M-27-1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYAIGWFRQAP GKEREGVSCIASSGGSTNYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCAAAVLECRTVVRGYDYWGQGTQVTV SS	GFTLDYYA	IASSGGST	AAAVLECRTVVR GYDY
	配列番号 10	配列番号 32	配列番号 43	配列番号 52
Hu-HSA-M-27-1-2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGETLDYYAIGWFRQAP GKEREGVSCIASSGGSTNYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCAAAVLECRTVVRGYDYWGQGTQVTV SS	GETLDYYA	IASSGGST	AAAVLECRTVVR GYDY
	配列番号 11	配列番号 34	配列番号 43	配列番号 52

【表７－２】

番号	VHH	CDR1	CDR2	CDR3
Hu-HSA-M-27-2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYAIGWFRQAP GKGLEGVSCIASSGGSTNYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCAAAVLECRTVVRGYDYWGQGTQVTV SS	GFTLDYYA	IASSGGST	AAAVLECRTVVR GYDY
	配列番号 12	配列番号 32	配列番号 43	配列番号 52
Hu-HSA-M-27-3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYAIGWFRQAP GKEREGVSCIASSGGSTNYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQ MNSLRAEDTAVYYCAAAVLECRTVVRGYDYWGQGTQVTV SS	GFTLDYYA	IASSGGST	AAAVLECRTVVR GYDY
	配列番号 13	配列番号 32	配列番号 43	配列番号 52
Hu-HSA-PH-8-1	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGSIWGIYHMGWYRQAP GKQRELVASITVDGSTHYADTVKGRFTISRDNSKNMVYLQM NSLEPEDTAVYYCDIRNVGGDYWGQGTQVTVSS	GSIWGIYH	ITVDGST	DIRNVGGDY
	配列番号 25	配列番号 37	配列番号 46	配列番号 57
Hu-HSA-PH-8-2	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGSIWGIYHMGWYRQAP GKGLELVASITVDGSTHYADTVKGRFTISRDNSKNMVYLQM NSLEPEDTAVYYCDIRNVGGDYWGQGTQVTVSS	GSIWGIYH	ITVDGST	DIRNVGGDY
	配列番号 26	配列番号 37	配列番号 46	配列番号 57
Hu-HSA-PH-8-3	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGSIWGIYHMGWYRQAP GKQRELVASITVDGSTHYADTVKGRFTISRDNSKNMVYLQM NSLRAEDTAVYYCDIRNVGGDYWGQGTQVTVSS	GSIWGIYH	ITVDGST	DIRNVGGDY
	配列番号 27	配列番号 37	配列番号 46	配列番号 57

【表７－３】

番号	VHH	CDR1	CDR2	CDR3
Hu-HSA-PH-8-5	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGSIWGIYHMGWYRQAP GKQRELVASITVDGSTHYADTVKGRFTISRDNSKNTLYLQM NSLEPEDTAVYYCDIRNVGGDYWGQGTQVTVSS	GSIWGIYH	ITVDGST	DIRNVGGDY
	配列番号 78	配列番号 37	配列番号 46	配列番号 57

【０１４０】
本研究では、ＩＭＧＴ（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｉｍｇｔ．ｏｒｇ）を使用して、ＨＳＡ－５９、ＨＳＡ－Ｍ－２７、ＨＳＡ－ＰＨ－８およびヒト化配列のヒト化レベルを評価した。結果を表８に示した。すべてのヒト化試料のヒト化レベルは向上しており、後期医薬品開発の要件を満たしていた。
【０１４１】
【表８】

表 8. ヒト化抗 HSA 配列とヒト配列との相同性

番号	生殖細胞系列	相同性
HSA-59	GHV3-23*04	79.4%
HSA-M-27	IGHV3-23*01	79.4%
HSA-PH-8	IGHV3-64*04	69.8%
Hu-HSA-59-1	IGHV3-23*04	83.5%
Hu-HSA-59-2	IGHV3-23*04	85.6%
Hu-HSA-59-3	IGHV3-23*04	85.6%
Hu-HSA-M-27-1	IGHV3-23*01	83.5%
Hu-HSA-M-27-2	IGHV3-23*01	85.6%
Hu-HSA-M-27-3	IGHV3-23*01	85.6%
Hu-HSA-PH-8-1	IGHV3-64*04	76%
Hu-HSA-PH-8-2	IGHV3-64*04	78.1%
Hu-HSA-PH-8-3	IGHV3-64*04	78.1%
Hu-HSA-PH-8-5	IGHV3-64*04	78.1%
Hu-HSA-M-27-1-2	IGHV3-23*01	82.5%

【０１４２】
タンパク質の構築、発現、精製方法は実施例２と同じであった。タンパク質の純度をＨＰＬＣ検出により求め、純度検出結果を表９に示した。ＨＰＬＣは以下のように実施した、移動相：１５０ｍＭ　Na_2HPO_4・$12H_2O$、ｐＨ７．０；クロマトグラフィー条件：検出波長：２８０ｎｍ；カラム温度：２５℃；流速：０．３５ｍｌ／分；検出時間：２０分；Ｚｅｎｉｘ－Ｃ　ＳＥＣ－３００カラム（ＳＥＰＡＸ社製　４．６×３００ｍｍ、３μｍ）。
【０１４３】

【表９】

表 9. ヒト化抗 HSA 抗体の純度検出の結果

番号	単量体比(%)
Hu-HSA-59-1	98.30
Hu-HSA-59-2	98.60
Hu-HSA-59-3	99.50
Hu-HSA-M-27-1	97.60
Hu-HSA-M-27-2	97.90
Hu-HSA-M-27-3	98.60
Hu-HSA-PH-8-1	97.30
Hu-HSA-PH-8-2	80.10
Hu-HSA-PH-8-3	97.40
Hu-HSA-PH-8-5	96.40
Hu-HSA-M-27-1-2	98.10

［実施例５］

【０１４４】

ヒト化抗ＨＳＡ抗体の親和性の決定

５．１．ヒト化抗体の親和性決定

この実施例においては、精製したヒト化抗ＨＳＡ抗体のＨＳＡとの結合親和性を検出した。実験方法は実施例３と同じであった。結果を表１０に示した。その結果、ヒト化抗ＨＳＡ抗体はＨＳＡタンパク質に対する良好な結合活性を有していた。

【０１４５】

【表１０】

表 10. HSA に対するヒト化分子の親和性

番号	KD(M)	Kon(1/Ms)	Koff(1/s)
Hu-HSA-59-1	1.59E-07	8.22E+04	1.30E-02
Hu-HSA-59-2	1.74E-06	1.24E+04	2.15E-02
Hu-HSA-59-3	4.54E-07	3.29E+04	1.49E-02
Hu-HSA-M-27-1	5.20E-08	1.38E+05	7.15E-03
Hu-HSA-M-27-2	4.23E-08	1.34E+05	5.66E-03
Hu-HSA-M-27-3	4.09E-08	1.69E+05	6.92E-03
Hu-HSA-PH-8-1	7.28E-08	1.02E+05	7.44E-03
Hu-HSA-PH-8-2	2.13E-07	5.32E+04	1.13E-02
Hu-HSA-PH-8-3	6.06E-08	1.26E+05	7.64E-03
Hu-HSA-PH-8-5	5.28E-08	1.19E+05	6.27E-03
Hu-HSA-M-27-1-2	3.48E-08	1.92E+05	6.66E-03

【０１４６】

この実施例では、精製したヒト化抗ＨＳＡ抗体のＭＳＡ／ＣＳＡに対する結合親和性も検出した。実験方法は実施例３と同じであった。実験結果を表１１に示した。

【０１４７】

【表１１】

表 11. MSA/CSA に対するヒト化分子の親和性

番号	MSA			CSA		
	KD(M)	Kon(1/Ms)	Koff(1/s)	KD(M)	Kon(1/Ms)	Koff(1/s)
Hu-HSA-59-1	1.04E-08	3.73E+05	3.86E-03	6.62E-08	2.80E+05	1.85E-02
Hu-HSA-59-2	1.30E-08	3.54E+05	4.59E-03	8.04E-08	2.89E+05	2.33E-02
Hu-HSA-59-3	1.17E-08	3.57E+05	4.19E-03	7.14E-08	2.73E+05	1.95E-02
Hu-HSA-M-27-1	7.79E-09	5.05E+05	3.93E-03	4.04E-08	3.78E+05	1.53E-02
Hu-HSA-M-27-2	8.21E-09	4.36E+05	3.58E-03	4.36E-08	2.99E+05	1.30E-02
Hu-HSA-M-27-3	7.62E-09	5.17E+05	3.94E-03	3.77E-08	4.07E+05	1.53E-02
Hu-HSA-PH-8-1	2.55E-08	2.68E+05	6.85E-03	1.62E-08	2.76E+05	4.46E-03
Hu-HSA-PH-8-2	4.20E-08	1.99E+05	8.35E-03	3.28E-08	1.69E+05	5.54E-03
Hu-HSA-PH-8-3	2.56E-08	2.56E+05	6.53E-03	1.78E-08	2.61E+05	4.64E-03
Hu-HSA-PH-8-5	2.95E-08	2.41E+05	7.11E-03	1.25E-08	2.98E+05	3.73E-03
Hu-HSA-M-27-1-2	6.22E-09	6.12E+05	3.81E-03	4.78E-08	3.14E+05	1.50E-02

【０１４８】

５．２．異なるｐＨ値におけるヒト化抗体の親和性の決定

ＨＳＡのリサイクリング機構は、ＩｇＧのそれと似ている。ＨＳＡは、ピノサイトーシスを介して、血管内皮細胞に内在化される。エンドソーム内では、膜結合型ＦｃＲｎとＨＳＡとの結合は、エンドソームのｐＨ約６．０で促進される；その後、エンドソーム内の複合体は血液中にリサイクルされ；およびｐＨ７．４では、膜結合型ＦｃＲｎとＨＳＡとは速やかに解離し、ＨＳＡの再循環が可能になる。

【０１４９】

この実施例において、精製ヒト化抗ＨＳＡ抗体のＨＳＡに対する親和性を異なるｐＨ条件下において検出した。実験方法は実施例３と同じであった。実験結果を表１２に示した。その結果、ヒト化抗ＨＳＡ抗体のＨＳＡタンパク質に対する親和性は、異なるｐＨ条件下で良好であった。

【０１５０】

【表１２】

表 12. 異なる pH 条件下におけるヒト化分子の HSA に対する親和性

番号	Hu-HSA-M-27-1		
	KD(M)	Kon(1/Ms)	Koff(1/s)
pH5.5	2.99E-08	1.83E+05	5.47E-03
pH6.5	1.43E-08	1.96E+05	2.81E-03
pH7.4	5.04E-08	1.66E+05	8.36E-03
番号	Hu-HSA-59-1		
pH5.5	4.44E-08	1.08E+05	4.78E-03
pH6.5	9.15E-08	8.60E+04	7.86E-03
pH7.4	1.63E-07	6.93E+04	1.13E-02
番号	Hu-HSA-PH-8-5		
pH5.5	9.53E-09	1.74E+05	1.66E-03
pH6.5	1.437E-08	1.39E+05	2.00E-03
pH7.4	2.30E-08	1.32E+05	3.03E-03

［実施例６］

【０１５１】

抗ＨＳＡナノボディの半減期延長効果の検出

６．１．分子構築とタンパク質調製

抗ＨＳＡナノボディの半減期延長効果を確認するため、本実施例では、多重特異性抗体を構築した。多重特異性抗体Ｂｉ－３４０－３５２、Ｂｉ－３４０－３５３およびＢｉ－３４０－３５４は、それぞれ独立して、ペプチド鎖＃１とペプチド鎖＃２とから構成され、３つの抗原結合ドメイン、すなわち、第１の抗原を標的とするＦａｂ、第２の抗原を標的とするナノボディ（ＶＨＨ１）、および第３の抗原を標的とするナノボディ（ＶＨＨ２）を含有し、ＶＨＨ２は、Ｈｕ－ＨＳＡ－Ｍ－２７－１、Ｈｕ－ＨＳＡ－５９－１（.）、Ｈｕ－ＨＳＡ－ＰＨ－８－５またはコントロールとしての非ＨＳＡ関連ＶＨＨであった。多重特異性抗体の構造および配列を表１３－１および表１３－２に示し、ペプチド鎖＃１およびペプチド鎖＃２のドメインはＧＧＧＧＳを含有するリンカーによって連結されていた。

【０１５２】

【表１３】

表 13-1. 多重特異性抗体の構造

名称	ペプチド鎖#1(Bi-352/353/354/356)				ペプチド鎖#2(Bi-340)		
	Fab 軽鎖	VHH1	VHH2	完全長	Fab 重鎖	VHH1	完全長
Bi-340-352	配列番号 79	配列番号 81	Hu-HSA-M-27-1	配列番号 69	配列番号 80	配列番号 81	配列番号 76
Bi-340-353			Hu-HSA-59-1	配列番号 70			
Bi-340-354			Hu-HSA-PH-8-5	配列番号 71			
Bi-340-356			非 HSA 関連 VHH (コントロール)	配列番号 77			

【０１５３】

【表１４－１】

表 13-2. 多重特異性抗体の関連配列

番号	アミノ酸配列
Bi-352	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNARTGKNYLAWYQQKP GQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYY CKQSYSRRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGNSANIFSFASV AWYRQAPGKGLELVSVITSAGGTKYSDSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCNVDYLQDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYAIG WFRQAPGKEREGVSCIASSGGSTNYADSVKGRFTISRDNSKNTVYL QMNSLKPEDTAVYYCAAAVLECRTVVRGYDYWGQGTQVTVSS
	配列番号 69
Bi-353	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNARTGKNYLAWYQQKP GQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYY CKQSYSRRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGNSANIFSFASV AWYRQAPGKGLELVSVITSAGGTKYSDSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCNVDYLQDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYAIG WFRQAPGKEREEVSCISSSGGSTNYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCAAALLECRVRSWPSDNWGQGTQVTVSS
	配列番号 70
Bi-354	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNARTGKNYLAWYQQKP GQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYY CKQSYSRRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGNSANIFSFASV AWYRQAPGKGLELVSVITSAGGTKYSDSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCNVDYLQDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSGQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGSIWGIYHM GWYRQAPGKQRELVASITVDGSTHYADTVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLEPEDTAVYYCDIRNVGGDYWGQGTQVTVSS
	配列番号 71
Bi-340	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYYMHWVRQAPGQR LEWMGWIDLEEGNTIYDAKFQGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSED TAVYYCARDAYGRYFYDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASG

【表１４－２】

	NSANIFSFASVAWYRQAPGKGLELVSVITSAGGTKYSDSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNVDYLQDYWGQGTLVTVSS
	配列番号 76
Bi-356	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNARTGKNYLAWYQQKP GQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYY CKQSYSRRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSGQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGNSANIFSFASV AWYRQAPGKGLELVSVITSAGGTKYSDSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCNVDYLQDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSGEVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWM YWLRQAPGKGLEWVSSINSDSSSTYYRDSVKGRFTISRDNAKNTLY LQMNSLKSEDTAVYYCAKDPGGYAKGQGTQVTVSS
	配列番号 77
抗第２抗原 Fab 軽鎖	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNARTGKNYLAWYQQKP GQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYY CKQSYSRRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	配列番号 79
抗第２抗原 Fab 重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDYYMHWVRQAPGQR LEWMGWIDLEEGNTIYDAKFQGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSED TAVYYCARDAYGRYFYDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
	配列番号 80
抗第３抗原ナノボディ VHH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGNSANIFSFASVAWYRQAPGK GLELVSVITSAGGTKYSDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCNVDYLQDYWGQGTLVTVSS
	配列番号 81
Hu-HSA-M-27-1 VHH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYAIGWFRQAPGKERE GVSCIASSGGSTNYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLKPEDTA VYYCAAAVLECRTVVRGYDYWGQGTQVTVSS
	配列番号 10
Hu-HSA-59-1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYAIGWFRQAPGKERE EVSCISSSGGSTNYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLKPEDTAV YYCAAALLECRVRSWPSDNWGQGTQVTVSS

【表１４－３】

	配列番号 4
Hu-HSA-PH-8-5	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGSIWGIYHMGWYRQAPGKQRELVASITVDGSTHYADTVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLEPEDTAVYYCDIRNVGGDYWGQGTQVTVSS
	配列番号 78
非 HAS 関連ナノボディ VHH	EVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYWLRQAPGKGLEWVSSINSDSSSTYYRDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKDPGGYAKGQGTQVTVSS
	配列番号 82

【０１５４】

Ｂｉ－３４０－３５２、Ｂｉ－３４０－３５３、Ｂｉ－３４０－３５４およびＢｉ－３４０－３５６のペプチド鎖＃１およびペプチド鎖＃２をコードする遺伝子配列は、ＧＥＮＥＷＩＺ社が合成した。相同組換えを触媒するリコンビナーゼ（Ｖａｚｙｍｅ社より購入）を使用して、コードする遺伝子配列をそれぞれＥｃｏＲＩ／ＮｏｔＩ二重酵素消化により直鎖化したｐＣＤＮＡ３．１ベクターに構築した。なお、構築プロセスは製品の説明書に従って行った。各多重特異性抗体のペプチド鎖＃１の相同組換え産物およびペプチド鎖＃２の相同組換え産物をＴｏｐ１０コンピテントセルに同時形質転換して、アンピシリンを含むプレートに塗布し、３７℃で一晩培養し、配列決定のために単一クローンを採取した。

【０１５５】

プラスミドを、ＥｘｐｉＣＨＯ（登録商標）発現システムキット（Ｔｈｅｒｍｏ社から購入）を使用して、Ｅｘｐｉ－ＣＨＯ細胞にトランスフェクションした。なお、トランスフェクションプロセスは製品の説明書に従って行った。５日間の細胞培養後、上清を回収し、ＫａｐｐａＳｅｌｅｃｔ（ＧＥ社製）アフィニティークロマトグラフィーカラムを使用して精製した。具体的な方法は以下のように行った：シリンジを有する０．２ｕｍ滅菌シリンジフィルターＰＥＳで、試料を濾過した。カラムを５カラム容量の平衡バッファー（２０ｍＭ　ＰＢ＋０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、ｐＨ７．４）で、流出液の導電率とｐＨが変化しなくなるまで平衡化した。試料は０．５ｍｌ／分の流速でロードした。ロード後、浸透が完了しＵＶ値が低下しなくなるまで、カラムを平衡バッファーで連続的に洗浄した。溶出には溶出バッファー（０．１Ｍ　グリシン－塩酸、ｐＨ３．０）を使用し、流出液を回収した。溶出後、回収した抗体溶液は直ちにアルカリ性緩衝液（例えば、１Ｍ　Ｔｒｉｓ／ＨＣｌ、ｐＨ８．０）で中和し、抗体が安定するｐＨにしなければならない。

【０１５６】

得られたタンパク質の純度はＨＰＬＣで検出した。ＨＰＬＣは以下のように行った、移動相：１５０ｍＭ　Na_2HPO_4・１２H_2O、ｐＨ７．０；クロマトグラフィー条件：検出波長：２８０ｎｍ，カラム温度：２５℃，流速：０．３５ｍｌ／分、検出時間：２０分、Ｚｅｎｉｘ－Ｃ　ＳＥＣ－３００カラム（ＳＥＰＡＸ社製　４．６×３００ｍｍ、３μｍ）。

【０１５７】

６．２．タンパク質半減期の検出

マウスの注射用量は１０ｍｇ／ｋｇであった。血液試料採取時点：投与後、３分、３０分、２時間、６時間、２４時間、４８時間、９６時間、１６８時間。全血試料を２～８℃

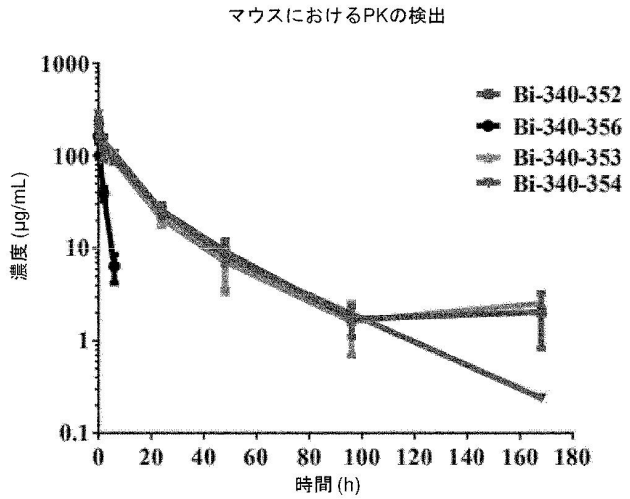
で３０分間静置して、１２０００ｒｐｍで５分間遠心分離して血清を採取し、得られた血清を２～８℃、１２０００ｒｐｍで５分間遠心分離し、－８０℃で保存した。血清中の遊離抗体濃度をＥＬＩＳＡ法により検出した。その結果を図１に示した。その結果、マウスにおける抗ＨＳＡナノボディを有する分子の半減期は、それぞれ約２３．７時間（Ｂｉ－３４０－３５２）、２４．２時間（Ｂｉ－３４０－３５３）、および１０．９時間（Ｂｉ－３４０－３５４）であり、非ＨＳＡ関連ナノボディを有する分子（Ｂｉ－３４０－３５６）の半減期は、約１．４時間であった。その結果、抗ＨＳＡナノボディが、この分子のインビボ半減期を有意に延長できることを示した。

【０１５８】

本出願の具体的な実施形態を詳細に説明したが、当業者であれば、開示したすべての教示に基づいて細部に様々な修正および変更を加えることができ、これらの変更はすべて本出願の保護範囲内であることを理解するであろう。本出願の全体は、添付の特許請求の範囲およびその均等物によって定められる。

【図面】

【図１】



【配列表】

2025512865000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/085559

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K16/18(2006.01)i; C12N15/13(2006.01)i; C07K16/46(2006.01)i; C07K19/00(2006.01)i; C12N5/10(2006.01)i; C12N15/63(2006.01)i; A61K47/68(2017.01)i; A61K39/395(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)

IPC: C07K, C12N, A61K

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)

CNABS; CNTXT; DWPI; WPABS; ENTXT; OETXT; CNKI; 百度学术, BAIDU SCHOLAR; PubMED; WEB OF SCIENCE and key words: 血清白蛋白, 纳米抗体, 抗体, 半衰期, 长效, Human serum albumin, HSA, antibody, nanobody, sdAb, VHH, Half-life, long lasting, long acting; 中国专利生物序列检索系统, China Patent Biological Sequence Search System; Genbank and retrieved sequences: SEQ ID NOs: 1-49.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 112409480 A (SICHUAN KELUN-BIOTECH BIOPHARMACEUTICAL CO., LTD.) 26 February 2021 (2021-02-26) see claims 1-29	1-25 (in part)
A	CN 111057148 A (NANJING RONGJIEKANG BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 24 April 2020 (2020-04-24) see claims 1-10	1-25 (in part)
A	EP 1888641 A1 (ABLYNX N.V.) 20 February 2008 (2008-02-20) see claims 1-15	1-25 (in part)
A	WO 2014111550 A1 (GLAXOSMITHKLINE INTELLECTUAL PROPERTY DEVELOPMENT LIMITED) 24 July 2014 (2014-07-24) see claims 1-23	1-25 (in part)
A	WO 2018121473 A1 (TIMMUNE BIOTECH INC.) 05 July 2018 (2018-07-05) see claims 1-16	1-25 (in part)

☑ 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
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
25 June 2023	**09 July 2023**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)** **China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088**	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/085559

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 111138537 A (REYOUNG (SUZHOU) BIOPHARMACEUTICAL CO., LTD.) 12 May 2020 (2020-05-12) see claims 1-12	1-25 (in part)

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/085559

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.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/085559

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Invention 1: Claims 1-25 (in part) relate to a nanobody specifically binding to serum albumin or an antigen-binding fragment of the nanobody, comprising CDR1, CDR2 and CDR3, the amino acid sequences of CDR1, CDR2 and CDR3 being respectively: SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 41 and SEQ ID NO: 49; and a polypeptide construct comprising the antibody or the antigen-binding fragment thereof, a fusion protein, an encoding nucleic acid molecule, a vector, a host cell, a bispecific or multi-specific antibody, a conjugate, a pharmaceutical composition and a pharmaceutical use thereof, a preparation method, and a method for prolonging the half-life in vivo of a drug.

Invention 2: Claims 1-25 (in part) relate to a nanobody specifically binding to serum albumin or an antigen-binding fragment of the nanobody, comprising CDR1, CDR2 and CDR3, the amino acid sequences of CDR1, CDR2 and CDR3 being respectively: SEQ ID NO: 32 or 34, SEQ ID NO: 43 and SEQ ID NO: 52; and a polypeptide construct comprising the antibody or the antigen-binding fragment thereof, a fusion protein, an encoding nucleic acid molecule, a vector, a host cell, a bispecific or multi-specific antibody, a conjugate, a pharmaceutical composition and a pharmaceutical use thereof, a preparation method, and a method for prolonging the half-life in vivo of a drug.

Invention 3: Claims 1-25 (in part) relate to a nanobody specifically binding to serum albumin or an antigen-binding fragment of the nanobody, comprising CDR1, CDR2 and CDR3, the amino acid sequences of CDR1, CDR2 and CDR3 being respectively: SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 46 and SEQ ID NO: 57; and a polypeptide construct comprising the antibody or the antigen-binding fragment thereof, a fusion protein, an encoding nucleic acid molecule, a vector, a host cell, a bispecific or multi-specific antibody, a conjugate, a pharmaceutical composition and a pharmaceutical use thereof, a preparation method, and a method for prolonging the half-life in vivo of a drug.

Invention 4: Claims 1-25 (in part) relate to a nanobody specifically binding to serum albumin or an antigen-binding fragment of the nanobody, comprising CDR1, CDR2 and CDR3, the amino acid sequences of CDR1, CDR2 and CDR3 being respectively: SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 39 and SEQ ID NO: 47; and a polypeptide construct comprising the antibody or the antigen-binding fragment thereof, a fusion protein, an encoding nucleic acid molecule, a vector, a host cell, a bispecific or multi-specific antibody, a conjugate, a pharmaceutical composition and a pharmaceutical use thereof, a preparation method, and a method for prolonging the half-life in vivo of a drug.

Invention 5: Claims 1-25 (in part) relate to a nanobody specifically binding to serum albumin or an antigen-binding fragment of the nanobody, comprising CDR1, CDR2 and CDR3, the amino acid sequences of CDR1, CDR2 and CDR3 being respectively: SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 40 and SEQ ID NO: 48; and a polypeptide construct comprising the antibody or the antigen-binding fragment thereof, a fusion protein, an encoding nucleic acid molecule, a vector, a host cell, a bispecific or multi-specific antibody, a conjugate, a pharmaceutical composition and a pharmaceutical use thereof, a preparation method, and a method for prolonging the half-life in vivo of a drug.

Invention 6: Claims 1-25 (in part) relate to a nanobody specifically binding to serum albumin or an antigen-binding fragment of the nanobody, comprising CDR1, CDR2 and CDR3, the amino acid sequences of CDR1, CDR2 and CDR3 being respectively: SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 42 and SEQ ID NO: 50; and a polypeptide construct comprising the antibody or the antigen-binding fragment thereof, a fusion protein, an encoding nucleic acid molecule, a vector, a host cell, a bispecific or multi-specific antibody, a conjugate, a pharmaceutical composition and a pharmaceutical use thereof, a preparation method, and a method for prolonging the half-life in vivo of a drug.

Invention 7: Claims 1-25 (in part) relate to a nanobody specifically binding to serum albumin or an antigen-binding fragment of the nanobody, comprising CDR1, CDR2 and CDR3, the amino acid sequences of CDR1, CDR2 and CDR3 being respectively: SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 43 and SEQ ID NO: 51; and a polypeptide construct comprising the antibody or the antigen-binding fragment thereof, a fusion protein, an encoding nucleic acid molecule, a vector, a host cell, a bispecific or multi-specific antibody, a conjugate, a pharmaceutical composition and a pharmaceutical use thereof, a preparation method, and a method for prolonging the half-life in vivo of a drug.

Invention 8: Claims 1-25 (in part) relate to a nanobody specifically binding to serum albumin or an antigen-binding fragment of the nanobody, comprising CDR1, CDR2 and CDR3, the amino acid sequences of CDR1, CDR2 and CDR3 being respectively: SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 43 and SEQ ID NO: 52; and a polypeptide construct comprising the antibody or the antigen-binding fragment thereof, a fusion protein, an encoding nucleic acid molecule, a vector, a host cell, a bispecific or multi-specific antibody, a conjugate, a pharmaceutical composition and a pharmaceutical use thereof, a preparation method, and a method for prolonging the half-life in vivo of a drug.

Invention 9: Claims 1-25 (in part) relate to a nanobody specifically binding to serum albumin or an antigen-binding fragment of the nanobody, comprising CDR1, CDR2 and CDR3, the amino acid sequences of CDR1, CDR2 and CDR3 being respectively: SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 43 and SEQ ID NO: 53; and a polypeptide construct comprising the antibody or the antigen-binding fragment thereof, a fusion protein, an encoding nucleic acid

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/085559

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

molecule, a vector, a host cell, a bispecific or multi-specific antibody, a conjugate, a pharmaceutical composition and a pharmaceutical use thereof, a preparation method, and a method for prolonging the half-life in vivo of a drug.

Invention 10: Claims 1-25 (in part) relate to a nanobody specifically binding to serum albumin or an antigen-binding fragment of the nanobody, comprising CDR1, CDR2 and CDR3, the amino acid sequences of CDR1, CDR2 and CDR3 being respectively: SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 41 and SEQ ID NO: 54; and a polypeptide construct comprising the antibody or the antigen-binding fragment thereof, a fusion protein, an encoding nucleic acid molecule, a vector, a host cell, a bispecific or multi-specific antibody, a conjugate, a pharmaceutical composition and a pharmaceutical use thereof, a preparation method, and a method for prolonging the half-life in vivo of a drug.

Invention 11: Claims 1-25 (in part) relate to a nanobody specifically binding to serum albumin or an antigen-binding fragment of the nanobody, comprising CDR1, CDR2 and CDR3, the amino acid sequences of CDR1, CDR2 and CDR3 being respectively: SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 44 and SEQ ID NO: 55; and a polypeptide construct comprising the antibody or the antigen-binding fragment thereof, a fusion protein, an encoding nucleic acid molecule, a vector, a host cell, a bispecific or multi-specific antibody, a conjugate, a pharmaceutical composition and a pharmaceutical use thereof, a preparation method, and a method for prolonging the half-life in vivo of a drug.

Invention 12: Claims 1-25 (in part) relate to a nanobody specifically binding to serum albumin or an antigen-binding fragment of the nanobody, comprising CDR1, CDR2 and CDR3, the amino acid sequences of CDR1, CDR2 and CDR3 being respectively: SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 45 and SEQ ID NO: 56; and a polypeptide construct comprising the antibody or the antigen-binding fragment thereof, a fusion protein, an encoding nucleic acid molecule, a vector, a host cell, a bispecific or multi-specific antibody, a conjugate, a pharmaceutical composition and a pharmaceutical use thereof, a preparation method, and a method for prolonging the half-life in vivo of a drug.

Invention 13: Claims 1-25 (in part) relate to a nanobody specifically binding to serum albumin or an antigen-binding fragment of the nanobody, comprising CDR1, CDR2 and CDR3, the amino acid sequences of CDR1, CDR2 and CDR3 being respectively: SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 41 and SEQ ID NO: 52; and a polypeptide construct comprising the antibody or the antigen-binding fragment thereof, a fusion protein, an encoding nucleic acid molecule, a vector, a host cell, a bispecific or multi-specific antibody, a conjugate, a pharmaceutical composition and a pharmaceutical use thereof, a preparation method, and a method for prolonging the half-life in vivo of a drug.

Invention 14: Claims 1-25 (in part) relate to a nanobody specifically binding to serum albumin or an antigen-binding fragment of the nanobody, comprising CDR1, CDR2 and CDR3, the amino acid sequences of CDR1, CDR2 and CDR3 being respectively: SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 41 and SEQ ID NO: 58; and a polypeptide construct comprising the antibody or the antigen-binding fragment thereof, a fusion protein, an encoding nucleic acid molecule, a vector, a host cell, a bispecific or multi-specific antibody, a conjugate, a pharmaceutical composition and a pharmaceutical use thereof, a preparation method, and a method for prolonging the half-life in vivo of a drug.

Invention 15: Claims 1-25 (in part) relate to a nanobody specifically binding to serum albumin or an antigen-binding fragment of the nanobody, comprising CDR1, CDR2 and CDR3, the amino acid sequences of CDR1, CDR2 and CDR3 being respectively: SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 41 and SEQ ID NO: 59; and a polypeptide construct comprising the antibody or the antigen-binding fragment thereof, a fusion protein, an encoding nucleic acid molecule, a vector, a host cell, a bispecific or multi-specific antibody, a conjugate, a pharmaceutical composition and a pharmaceutical use thereof, a preparation method, and a method for prolonging the half-life in vivo of a drug.

Inventions 16-38052: Claims 1-25 (in part) relate to a nanobody specifically binding to serum albumin or an antigen-binding fragment of the nanobody, comprising CDR1, CDR2 and CDR3, the amino acid sequences of CDR1, CDR2 and CDR3 being sequences, apart from the CDR1-3 sequences in inventions 1-15, in the CDR1-3 sequences of claim 1; and a polypeptide construct comprising the antibody or the antigen-binding fragment thereof, a fusion protein, an encoding nucleic acid molecule, a vector, a host cell, a bispecific or multi-specific antibody, a conjugate, a pharmaceutical composition and a pharmaceutical use thereof, a preparation method, and a method for prolonging the half-life in vivo of a drug.

The same or corresponding technical feature of the 38052 inventions is "nanobody specifically binding to serum albumin", which is disclosed in the prior art (see, for example, CN 112409480 A, publication date: 26 February 2021, which discloses a single-domain antibody binding to serum albumin and a multi-specific antibody containing the single-domain antibody, a fusion protein and a conjugate). Therefore, the same or corresponding technical feature among inventions 1-38052 do not make a contribution over the prior art, and cannot be considered to be a specific technical feature (PCT Rule 13.2). Therefore, the present application does not comply with the requirement of unity of invention (PCT Rule 13.1).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/085559

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☑ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: **Invention 1: Claims 1-25 (in part)**

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2023/085559

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	112409480	A	26 February 2021	None			
CN	111057148	A	24 April 2020	None			
EP	1888641	A1	20 February 2008	RU	2007142444	A	27 June 2009
				RU	2464276	C2	20 October 2012
				IL	186941	A0	09 February 2008
				IL	186941	A	28 May 2014
				IL	250946	A0	30 April 2017
				IL	250946	B	30 August 2018
				ES	2778123	T3	07 August 2020
				EP	2365000	A2	14 September 2011
				EP	2365000	A3	16 January 2013
				KR	20080011395	A	04 February 2008
				KR	101308771	B1	23 September 2013
				US	2015353635	A1	10 December 2015
				EP	2949668	A1	02 December 2015
				EP	2949668	B1	14 August 2019
				NZ	562695	A	27 May 2011
				RU	2012126722	A	10 January 2014
				RU	2634381	C2	26 October 2017
				BRPI	0609224	A2	18 October 2011
				BRPI	0609224	B1	17 August 2021
				SI	1888640	T1	31 July 2012
				DK	1888640	T3	18 June 2012
				PL	1888640	T3	31 August 2012
				US	2014335101	A1	13 November 2014
				US	9067991	B2	30 June 2015
				EP	2479191	A2	25 July 2012
				EP	2479191	A3	13 March 2013
				TW	200716671	A	01 May 2007
				TWI	395755	B	11 May 2013
				NI	200700291	A	12 May 2008
				NO	20161028	A1	19 November 2007
				NO	345340	B1	21 December 2020
				US	2023031229	A1	02 February 2023
				BR	122013001996	B1	01 February 2022
				MX	342271	B	21 September 2016
				TW	201321410	A	01 June 2013
				TWI	439467	B	01 June 2014
				DK	2949668	T3	11 November 2019
				SI	2949668	T1	29 November 2019
				WO	2006122787	A1	23 November 2006
				ECSP	077910	A	26 March 2008
				PT	2949668	T	24 October 2019
				AT	549357	T	15 March 2012
				SG	10201708038	QA	30 October 2017
				WO	2006122786	A2	23 November 2006
				WO	2006122786	A3	22 March 2007
				ES	2379283	T3	24 April 2012
				EP	1888641	B1	14 December 2011
				IL	225347	A0	27 June 2013

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2023/085559

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
		IL	225347	A	29 May 2017
		MX	363423	B	22 March 2019
		SG	184709	A1	30 October 2012
		ZA	200901011	B	28 April 2010
		NO	20075853	L	19 December 2007
		NO	338568	B1	05 September 2016
		CY	1122672	T1	12 March 2021
		CA	2962819	A1	23 November 2006
		CA	2962819	C	27 July 2021
		JP	2015157850	A	03 September 2015
		JP	6420200	B2	07 November 2018
		PL	1888641	T3	31 May 2012
		US	2017342146	A1	30 November 2017
		EP	2172484	A2	07 April 2010
		EP	2172484	A3	19 May 2010
		DK	1888641	T3	23 April 2012
		JP	2017186318	A	12 October 2017
		JP	6484660	B2	13 March 2019
		LT	2949668	T	11 November 2019
		SI	1888641	T1	31 May 2012
		ZA	200709867	B	29 October 2008
		ZA	201100385	B	26 September 2012
		JP	2008539772	A	20 November 2008
		JP	5047950	B2	10 October 2012
		RU	2017133794	A	28 March 2019
		RU	2017133794	A3	23 December 2020
		EP	3613767	A1	26 February 2020
		MX	2007014359	A	06 February 2008
		AT	537188	T	15 December 2011
		ES	2384164	T3	02 July 2012
		HUE	045710	T2	28 January 2020
		JP	2012167112	A	06 September 2012
		JP	5788359	B2	30 September 2015
		US	2009028880	A1	29 January 2009
		US	8188223	B2	29 May 2012
		HK	1215953	A1	30 September 2016
		EP	1888640	A2	20 February 2008
		EP	1888640	B1	14 March 2012
		HK	1113685	A1	10 October 2008
		US	2020079844	A1	12 March 2020
		US	11472871	B2	18 October 2022
		AU	2006249144	A1	23 November 2006
		AU	2006249144	B2	17 November 2011
		CR	9519	A	17 October 2008
		PL	2949668	T3	31 March 2020
		CA	2608770	A1	23 November 2006
		CA	2608770	C	30 May 2017
		PT	1888641	E	19 March 2012
WO 2014111550	A1	24 July 2014		None	
WO 2018121473	A1	05 July 2018		None	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2023/085559

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN 111138537 A	12 May 2020	None	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2022)

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2023/085559

A. 主题的分类

C07K16/18(2006.01)i；C12N15/13(2006.01)i；C07K16/46(2006.01)i；C07K19/00(2006.01)i；C12N5/10(2006.01)i；C12N15/63(2006.01)i；A61K47/68(2017.01)i；A61K39/395(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)

IPC: C07K, C12N, A61K

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））

CNABS;CNTXT;DWPI;WPABS;ENTXT;OETXT;CNKI;百度学术;PubMED;WEB OF SCIENCE和关键词：血清白蛋白，纳米抗体，抗体，半衰期，长效，Human serum albumin, HSA, antibody, nanobody, sdAb, VHH, Half-life, long lasting, long acting;中国专利生物序列检索系统；Genbank和检索的序列：SEQ ID NOs:1-49。

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 112409480 A (四川科伦博泰生物医药股份有限公司) 2021年2月26日 (2021-02-26) 参见权利要求1-29	1-25（部分）
A	CN 111057148 A (南京融捷康生物科技有限公司) 2020年4月24日 (2020-04-24) 参见权利要求1-10	1-25（部分）
A	EP 1888641 A1 (ABLYNX NV) 2008年2月20日 (2008-02-20) 参见权利要求1-15	1-25（部分）
A	WO 2014111550 A1 (GLAXOSMITHKLINE IP DEV LTD) 2014年7月24日 (2014-07-24) 参见权利要求1-23	1-25（部分）
A	WO 2018121473 A1 (TIMMUNE BIOTECH INC) 2018年7月5日 (2018-07-05) 参见权利要求1-16	1-25（部分）
A	CN 111138537 A (瑞阳（苏州）生物科技有限公司) 2020年5月12日 (2020-05-12) 参见权利要求1-12	1-25（部分）

☐ 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
“D” 申请人在国际申请中引证的文件
“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	国际检索报告邮寄日期
2023年6月25日	2023年7月9日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	受权官员 王颖 电话号码 (+86) 010-62412197

PCT/ISA/210 表(第2页) (2022年7月)

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2023/085559

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

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:
b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)),
☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。

2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列表的情况下,考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列,在可进行有意义检索的范围内做出的。

3. 补充意见:

PCT/ISA/210 表(第1页续页) (2022年7月)

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2023/085559

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

发明1：权利要求1-25（部分），涉及一种特异性结合血清白蛋白的纳米抗体或其抗原结合片段，包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列分别为：SEQ ID NO：32、SEQ ID NO：41和SEQ ID NO：49；以及包含所述抗体或其抗原结合片段的多肽构建体、融合蛋白、编码核酸分子、载体、宿主细胞、双特异性或多特异性抗体、缀合物、药物组合物及其制药用途、制备方法以及延长药物的体内半衰期的方法；

发明2：权利要求1-25（部分），涉及一种特异性结合血清白蛋白的纳米抗体或其抗原结合片段，包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列分别为：SEQ ID NO：32或34、SEQ ID NO：43和SEQ ID NO：52；以及包含所述抗体或其抗原结合片段的多肽构建体、融合蛋白、编码核酸分子、载体、宿主细胞、双特异性或多特异性抗体、缀合物、药物组合物及其制药用途、制备方法以及延长药物的体内半衰期的方法；

发明3：权利要求1-25（部分），涉及一种特异性结合血清白蛋白的纳米抗体或其抗原结合片段，包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列分别为：SEQ ID NO：37、SEQ ID NO：46和SEQ ID NO：57；以及包含所述抗体或其抗原结合片段的多肽构建体、融合蛋白、编码核酸分子、载体、宿主细胞、双特异性或多特异性抗体、缀合物、药物组合物及其制药用途、制备方法以及延长药物的体内半衰期的方法；

发明4：权利要求1-25（部分），涉及一种特异性结合血清白蛋白的纳米抗体或其抗原结合片段，包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列分别为：SEQ ID NO：30、SEQ ID NO：39和SEQ ID NO：47；以及包含所述抗体或其抗原结合片段的多肽构建体、融合蛋白、编码核酸分子、载体、宿主细胞、双特异性或多特异性抗体、缀合物、药物组合物及其制药用途、制备方法以及延长药物的体内半衰期的方法；

发明5：权利要求1-25（部分），涉及一种特异性结合血清白蛋白的纳米抗体或其抗原结合片段，包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列分别为：SEQ ID NO：31、SEQ ID NO：40和SEQ ID NO：48；以及包含所述抗体或其抗原结合片段的多肽构建体、融合蛋白、编码核酸分子、载体、宿主细胞、双特异性或多特异性抗体、缀合物、药物组合物及其制药用途、制备方法以及延长药物的体内半衰期的方法；

发明6：权利要求1-25（部分），涉及一种特异性结合血清白蛋白的纳米抗体或其抗原结合片段，包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列分别为：SEQ ID NO：33、SEQ ID NO：42和SEQ ID NO：50；以及包含所述抗体或其抗原结合片段的多肽构建体、融合蛋白、编码核酸分子、载体、宿主细胞、双特异性或多特异性抗体、缀合物、药物组合物及其制药用途、制备方法以及延长药物的体内半衰期的方法；

发明7：权利要求1-25（部分），涉及一种特异性结合血清白蛋白的纳米抗体或其抗原结合片段，包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列分别为：SEQ ID NO：32、SEQ ID NO：43和SEQ ID NO：51；以及包含所述抗体或其抗原结合片段的多肽构建体、融合蛋白、编码核酸分子、载体、宿主细胞、双特异性或多特异性抗体、缀合物、药物组合物及其制药用途、制备方法以及延长药物的体内半衰期的方法；

发明8：权利要求1-25（部分），涉及一种特异性结合血清白蛋白的纳米抗体或其抗原结合片段，包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列分别为：SEQ ID NO：35、SEQ ID NO：43和SEQ ID NO：52；以及包含所述抗体或其抗原结合片段的多肽构建体、融合蛋白、编码核酸分子、载体、宿主细胞、双特异性或多特异性抗体、缀合物、药物组合物及其制药用途、制备方法以及延长药物的体内半衰期的方法；

发明9：权利要求1-25（部分），涉及一种特异性结合血清白蛋白的纳米抗体或其抗原结合片段，包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列分别为：SEQ ID NO：32、SEQ ID NO：43和SEQ ID NO：53；以及包含所述抗体或其抗原结合片段的多肽构建体、融合蛋白、编码核酸分子、载体、宿主细胞、双特异性或多特异性抗体、缀合物、药物组合物及其制药用途、制备方法以及延长药物的体内半衰期的方法；

发明10：权利要求1-25（部分），涉及一种特异性结合血清白蛋白的纳米抗体或其抗原结合片段，包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列分别为：SEQ ID NO：36、SEQ ID NO：41和SEQ ID NO：54；以及包含所述抗体或其抗原结合片段的多肽构建体、融合蛋白、编码核酸分子、载体、宿主细胞、双特异性或多特异性抗体、缀合物、药物组合物及其制药用途、制备方法以及延长药物的体内半衰期的方法；

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2023/085559

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

发明11：权利要求1-25（部分），涉及一种特异性结合血清白蛋白的纳米抗体或其抗原结合片段，包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列分别为：SEQ ID NO：35、SEQ ID NO：44和SEQ ID NO：55；以及包含所述抗体或其抗原结合片段的多肽构建体、融合蛋白、编码核酸分子、载体、宿主细胞、双特异性或多特异性抗体、缀合物、药物组合物及其制药用途、制备方法以及延长药物的体内半衰期的方法；

发明12：权利要求1-25（部分），涉及一种特异性结合血清白蛋白的纳米抗体或其抗原结合片段，包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列分别为：SEQ ID NO：32、SEQ ID NO：45和SEQ ID NO：56；以及包含所述抗体或其抗原结合片段的多肽构建体、融合蛋白、编码核酸分子、载体、宿主细胞、双特异性或多特异性抗体、缀合物、药物组合物及其制药用途、制备方法以及延长药物的体内半衰期的方法；

发明13：权利要求1-25（部分），涉及一种特异性结合血清白蛋白的纳米抗体或其抗原结合片段，包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列分别为：SEQ ID NO：32、SEQ ID NO：41和SEQ ID NO：52；以及包含所述抗体或其抗原结合片段的多肽构建体、融合蛋白、编码核酸分子、载体、宿主细胞、双特异性或多特异性抗体、缀合物、药物组合物及其制药用途、制备方法以及延长药物的体内半衰期的方法；

发明14：权利要求1-25（部分），涉及一种特异性结合血清白蛋白的纳米抗体或其抗原结合片段，包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列分别为：SEQ ID NO：32、SEQ ID NO：41和SEQ ID NO：58；以及包含所述抗体或其抗原结合片段的多肽构建体、融合蛋白、编码核酸分子、载体、宿主细胞、双特异性或多特异性抗体、缀合物、药物组合物及其制药用途、制备方法以及延长药物的体内半衰期的方法；

发明15：权利要求1-25（部分），涉及一种特异性结合血清白蛋白的纳米抗体或其抗原结合片段，包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列分别为：SEQ ID NO：38、SEQ ID NO：41和SEQ ID NO：59；以及包含所述抗体或其抗原结合片段的多肽构建体、融合蛋白、编码核酸分子、载体、宿主细胞、双特异性或多特异性抗体、缀合物、药物组合物及其制药用途、制备方法以及延长药物的体内半衰期的方法；

发明16-38052：权利要求1-25（部分），涉及一种特异性结合血清白蛋白的纳米抗体或其抗原结合片段，包含CDR1、CDR2和CDR3，所述CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列为权利要求1所述CDR1-3序列中除去发明1-15中所述的CDR1-3序列之外的序列；以及包含所述抗体或其抗原结合片段的多肽构建体、融合蛋白、编码核酸分子、载体、宿主细胞、双特异性或多特异性抗体、缀合物、药物组合物及其制药用途、制备方法以及延长药物的体内半衰期的方法。

这38052项发明的相同或相应的技术特征为“特异性结合血清白蛋白的纳米抗体”，这一技术特征已经被现有技术公开（参见，例如CN112409480A，公开日2021年2月26日，其公开了一种结合血清白蛋白的单域抗体以及包含所述单域抗体的多特异性抗体、融合蛋白和缀合物）。因此发明1-38052之间相同或相应的技术特征没有对现有技术作出贡献，不能被认为是PCT细则13.2意义上的特定技术特征。因此，本申请不满足PCT细则13.1中规定的发明单一性的要求。

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2023/085559

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。

2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何加费。

3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求，具体地说，是权利要求：

4. ☑ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是： 发明1：权利要求1-25（部分）

对异议的意见

☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。
☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2023/085559

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	112409480	A	2021年2月26日	无			
CN	111057148	A	2020年4月24日	无			
EP	1888641	A1	2008年2月20日	RU	2007142444	A	2009年6月27日
				RU	2464276	C2	2012年10月20日
				IL	186941	A0	2008年2月9日
				IL	186941	A	2014年5月28日
				IL	250946	A0	2017年4月30日
				IL	250946	B	2018年8月30日
				ES	2778123	T3	2020年8月7日
				EP	2365000	A2	2011年9月14日
				EP	2365000	A3	2013年1月16日
				KR	20080011395	A	2008年2月4日
				KR	101308771	B1	2013年9月23日
				US	2015353635	A1	2015年12月10日
				EP	2949668	A1	2015年12月2日
				EP	2949668	B1	2019年8月14日
				NZ	562695	A	2011年5月27日
				RU	2012126722	A	2014年1月10日
				RU	2634381	C2	2017年10月26日
				BR-PI	0609224	A2	2011年10月18日
				BR-PI	0609224	B1	2021年8月17日
				SI	1888640	T1	2012年7月31日
				DK	1888640	T3	2012年6月18日
				PL	1888640	T3	2012年8月31日
				US	2014335101	A1	2014年11月13日
				US	9067991	B2	2015年6月30日
				EP	2479191	A2	2012年7月25日
				EP	2479191	A3	2013年3月13日
				TW	200716671	A	2007年5月1日
				TWI	395755	B	2013年5月11日
				NI	200700291	A	2008年5月12日
				NO	20161028	A1	2007年11月19日
				NO	345340	B1	2020年12月21日
				US	2023031229	A1	2023年2月2日
				BR	122013001996	B1	2022年2月1日
				MX	342271	B	2016年9月21日
				TW	201321410	A	2013年6月1日
				TWI	439467	B	2014年6月1日
				DK	2949668	T3	2019年11月11日
				SI	2949668	T1	2019年11月29日
				WO	2006122787	A1	2006年11月23日
				ECSP	077910	A	2008年3月26日
				PT	2949668	T	2019年10月24日
				AT	549357	T	2012年3月15日
				SG	10201708038	QA	2017年10月30日
				WO	2006122786	A2	2006年11月23日
				WO	2006122786	A3	2007年3月22日
				ES	2379283	T3	2012年4月24日

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2022年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2023/085559

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 1888641	B1	2011年12月14日
		IL 225347	A0	2013年6月27日
		IL 225347	A	2017年5月29日
		MX 363423	B	2019年3月22日
		SG 184709	A1	2012年10月30日
		ZA 200901011	B	2010年4月28日
		NO 20075853	L	2007年12月19日
		NO 338568	B1	2016年9月5日
		CY 1122672	T1	2021年3月12日
		CA 2962819	A1	2006年11月23日
		CA 2962819	C	2021年7月27日
		JP 2015157850	A	2015年9月3日
		JP 6420200	B2	2018年11月7日
		PL 1888641	T3	2012年5月31日
		US 2017342146	A1	2017年11月30日
		EP 2172484	A2	2010年4月7日
		EP 2172484	A3	2010年5月19日
		DK 1888641	T3	2012年4月23日
		JP 2017186318	A	2017年10月12日
		JP 6484660	B2	2019年3月13日
		LT 2949668	T	2019年11月11日
		SI 1888641	T1	2012年5月31日
		ZA 200709867	B	2008年10月29日
		ZA 201100385	B	2012年9月26日
		JP 2008539772	A	2008年11月20日
		JP 5047950	B2	2012年10月10日
		RU 2017133794	A	2019年3月28日
		RU 2017133794	A3	2020年12月23日
		EP 3613767	A1	2020年2月26日
		MX 2007014359	A	2008年2月6日
		AT 537188	T	2011年12月15日
		ES 2384164	T3	2012年7月2日
		HUE 045710	T2	2020年1月28日
		JP 2012167112	A	2012年9月6日
		JP 5788359	B2	2015年9月30日
		US 2009028880	A1	2009年1月29日
		US 8188223	B2	2012年5月29日
		HK 1215953	A1	2016年9月30日
		EP 1888640	A2	2008年2月20日
		EP 1888640	B1	2012年3月14日
		HK 1113685	A1	2008年10月10日
		US 2020079844	A1	2020年3月12日
		US 11472871	B2	2022年10月18日
		AU 2006249144	A1	2006年11月23日
		AU 2006249144	B2	2011年11月17日
		CR 9519	A	2008年10月17日
		PL 2949668	T3	2020年3月31日
		CA 2608770	A1	2006年11月23日
		CA 2608770	C	2017年5月30日
		PT 1888641	E	2012年3月19日

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2022年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2023/085559

检索报告引用的专利文件	公布日（年/月/日）	同族专利	公布日（年/月/日）
WO 2014111550 A1	2014年7月24日	无	
WO 2018121473 A1	2018年7月5日	无	
CN 111138537 A	2020年5月12日	无	

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2022年7月)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
C12N 1/15 (2006.01)		C12N	1/15	
C12N 1/19 (2006.01)		C12N	1/19	
C12N 1/21 (2006.01)		C12N	1/21	
C12N 5/10 (2006.01)		C12N	5/10	
C12P 21/08 (2006.01)		C12P	21/08	
C12P 21/02 (2006.01)		C12P	21/02	C
C07K 16/46 (2006.01)		C07K	16/46	
A61K 39/395 (2006.01)		A61K	39/395	D
A61K 47/68 (2017.01)		A61K	39/395	N
C07K 14/47 (2006.01)		A61K	47/68	
C12N 15/12 (2006.01)		A61K	39/395	M
		C07K	14/47	
		C12N	15/12	

,MC,ME,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,NE,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,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,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＷＥＥＮ

(74)代理人 100170520
弁理士 笹倉 真奈美
(74)代理人 100221545
弁理士 白江 雄介
(72)発明者 呉 凡
中華人民共和国５１９０８０広東省珠海市香洲区唐家湾鎮科技七路１号４棟１０－Ｂ単元
(72)発明者 繆 小牛
中華人民共和国５１９０８０広東省珠海市香洲区唐家湾鎮科技七路１号４棟１０－Ｂ単元
(72)発明者 羅 ▲イー▼
中華人民共和国５１９０８０広東省珠海市香洲区唐家湾鎮科技七路１号４棟１０－Ｂ単元
(72)発明者 陳 連▲ディ▼
中華人民共和国５１９０８０広東省珠海市香洲区唐家湾鎮科技七路１号４棟１０－Ｂ単元
(72)発明者 許 英達
中華人民共和国５１９０８０広東省珠海市香洲区唐家湾鎮科技七路１号４棟１０－Ｂ単元

Ｆターム（参考） 4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 CE09 DA01
4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 BC01 CA24 CA25 CA44
4C076 AA95 CC41 EE59 FF31 FF36 FF63
4C085 AA13 AA14 AA21 BB15 BB36 BB42 EE01
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 EA20 FA74 GA20