

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-515235  
(P2020-515235A)

(43) 公表日 令和2年5月28日(2020.5.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13 Z N A	4 B 0 6 4
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C 0 7 6
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 C 0 8 4
C 1 2 N 7/01 (2006.01)	C 1 2 N 7/01	4 C 0 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 81 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-536937 (P2019-536937)  
 (86) (22) 出願日 平成30年1月8日 (2018.1.8)  
 (85) 翻訳文提出日 令和1年9月4日 (2019.9.4)  
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2018/050035  
 (87) 国際公開番号 W02018/127709  
 (87) 国際公開日 平成30年7月12日 (2018.7.12)  
 (31) 優先権主張番号 1700207.2  
 (32) 優先日 平成29年1月6日 (2017.1.6)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 英国 (GB)  
 (31) 優先権主張番号 1700208.0  
 (32) 優先日 平成29年1月6日 (2017.1.6)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 英国 (GB)

(71) 出願人 517142462  
 クレシェンド・バイオロジックス・リミテッド  
 イギリス・ケンブリッジシャー・CB22  
 ・3AT・ケンブリッジ・(番地なし)・  
 バブラハム・リサーチ・キャンパス・メ  
 イトリーナ・ビルディング  
 (74) 代理人 100108453  
 弁理士 村山 靖彦  
 (74) 代理人 100110364  
 弁理士 実広 信哉  
 (74) 代理人 100133400  
 弁理士 阿部 達彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プログラム細胞死 (PD-1) に対するシングルドメイン抗体

(57) 【要約】

本発明は、PD-1とそのリガンドとの相互作用を遮断しないPD-1結合剤、並びに疾患の処置、予防、及び検出におけるそのような結合剤の使用に関する。

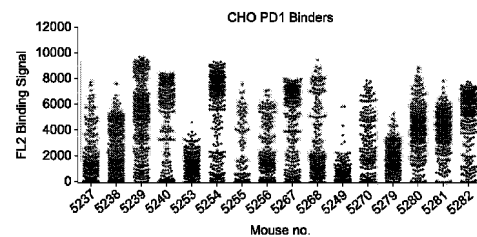


FIG. 1a

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ヒトPD-1に結合するが、ヒトPD-1とヒトPD-L1及び/又はPD-L2との相互作用を遮断しない単離されたシングルドメイン抗体。

## 【請求項 2】

前記シングルドメイン抗体が、ヒトPD-1のR<sup>104</sup>、D<sup>105</sup>、F<sup>106</sup>、H<sup>107</sup>、M<sup>108</sup>、S<sup>109</sup>、及びV<sup>110</sup>から選択される1つ又は複数の残基を含むエピトープに結合する、請求項1に記載の単離されたシングルドメイン抗体。

## 【請求項 3】

前記シングルドメイン抗体が、ヒトPD-1のG<sup>103</sup>、V<sup>111</sup>、R<sup>112</sup>、及びA<sup>113</sup>から選択される1つ又は複数の残基を更に含むエピトープに結合する、請求項1又は2に記載の単離されたシングルドメイン抗体。

10

## 【請求項 4】

前記エピトープが、N<sup>102</sup>、D<sup>105</sup>、F<sup>106</sup>、H<sup>107</sup>、M<sup>108</sup>、R<sup>114</sup>、及びR<sup>115</sup>から選択される1つ、1つ超、又は全ての残基を更に含む、請求項1から3のいずれか一項に記載の単離されたシングルドメイン抗体。

## 【請求項 5】

前記エピトープが、N<sup>33</sup>、P<sup>34</sup>、P<sup>35</sup>、T<sup>36</sup>、F<sup>37</sup>、S<sup>38</sup>、C<sup>54</sup>、F<sup>55</sup>、S<sup>56</sup>、N<sup>57</sup>、T<sup>58</sup>、S<sup>59</sup>、E<sup>60</sup>、S<sup>61</sup>、F<sup>62</sup>、V<sup>63</sup>、L<sup>64</sup>、N<sup>65</sup>、W<sup>66</sup>、P<sup>101</sup>、N<sup>102</sup>、及びG<sup>103</sup>から選択される1つ、複数、又は全ての残基を更に含む、請求項1から4のいずれか一項に記載の単離されたシングルドメイン抗体。

20

## 【請求項 6】

前記エピトープが、S<sup>60</sup>、E<sup>61</sup>、S<sup>62</sup>、F<sup>63</sup>、V<sup>64</sup>、L<sup>65</sup>、N<sup>66</sup>、W<sup>67</sup>、Y<sup>68</sup>、R<sup>69</sup>、M<sup>70</sup>、S<sup>71</sup>、G<sup>90</sup>、Q<sup>91</sup>、D<sup>92</sup>、C<sup>93</sup>、R<sup>94</sup>、F<sup>95</sup>、R<sup>96</sup>、V<sup>97</sup>、T<sup>98</sup>、V<sup>111</sup>、R<sup>112</sup>、A<sup>113</sup>、及びR<sup>114</sup>から選択される1つ、1つ超、又は全ての残基を更に含む、請求項1から4のいずれか一項に記載の単離されたシングルドメイン抗体。

## 【請求項 7】

前記シングルドメインが、ヒト重鎖可変ドメイン(V<sub>H</sub>)である、請求項1から6のいずれか一項に記載の単離されたシングルドメイン抗体。

## 【請求項 8】

配列番号1又は1若しくは2個のアミノ酸置換を有する配列番号1に示されるCDR1、配列番号2又は1から5個のアミノ酸置換を有する配列番号2に示されるCDR2、及び配列番号3又は1から5個のアミノ酸置換を有する配列番号3に示されるCDR3を含む、請求項1から7のいずれか一項に記載の単離されたシングルドメイン抗体。

30

## 【請求項 9】

以下のV<sub>H</sub>配列、配列番号4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76、80、104、108、112、116、120、124、128、132、136、140、144、148、152、156、160、164、168、172、176、180、184、188、192、196、200、204、208、212、216、又は220のCDR1から3から選択されるCDR1、CDR2、及びCDR3を含む、請求項1から8のいずれか一項に記載の単離されたシングルドメイン抗体。

40

## 【請求項 10】

配列番号4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76、80、104、108、112、116、120、124、128、132、136、140、144、148、152、156、160、164、168、172、176、180、184、188、192、196、200、204、208、212、216、若しくは220から選択される配列、又はそれと少なくとも60%、70%、80%、若しくは90%の相同性を有する配列を含む、請求項1から9のいずれか一項に記載の単離されたシングルドメイン抗体。

## 【請求項 11】

配列番号251又は1若しくは2個のアミノ酸置換を有する配列番号251に示されるCDR1、配列番号252又は1から5個のアミノ酸置換を有する配列番号252に示されるCDR2、及び配列番

50

号253又は1から5個のアミノ酸置換を有する配列番号253に示されるCDR3を含む、請求項1から7のいずれか一項に記載の単離されたシングルドメイン抗体。

【請求項12】

以下のV<sub>H</sub>配列、配列番号254、258、262、266、270、274、278、282、286、290、294、298、302、306、310、314、318、322、326、330、334、338、342、346、350、354、358、362、366、370、374、378、382、386、390、394、398、402、406、410、414、418、422、426、430、434、438、442、446、450、454、458、又は462のCDR1～3から選択されるCDR1、CDR2、及びCDR3を含む、請求項11に記載の単離されたシングルドメイン抗体。

【請求項13】

配列番号254、258、262、266、270、274、278、282、286、290、294、298、302、306、310、314、318、322、326、330、334、338、342、346、350、354、358、362、366、370、374、378、382、386、390、394、398、402、406、410、414、418、422、426、430、434、438、442、446、450、454、458、若しくは462から選択される配列、又はそれと少なくとも60%、70%、80%、若しくは90%の相同性を有する配列を含む、請求項12に記載のシングルドメイン抗体。

10

【請求項14】

毒素、酵素、放射性同位体、半減期延長部分、標識、治療分子、又は他の化学部分にコンジュゲートされている、請求項1から13のいずれか一項に記載の単離されたシングルドメイン抗体。

【請求項15】

前記半減期延長部分が、アルブミン結合部分、トランスフェリン結合部分、ポリエチレングリコール分子、組換えポリエチレングリコール分子、ヒト血清アルブミン、ヒト血清アルブミンの断片、及びアルブミン結合ペプチド又はヒト血清アルブミンに結合するシングルドメイン抗体からなる群から選択される、請求項14に記載の単離されたシングルドメイン抗体。

20

【請求項16】

PD-1とPD-L1との相互作用及び/又はPD-1とPD-L2との相互作用を遮断する抗体と競合しない、請求項1から15のいずれか一項に記載の単離されたシングルドメイン抗体。

【請求項17】

ヒトV、D、及びJ領域を含むトランスジーンを発現するトランスジェニック齧歯類から得られた又は得ることができる、請求項1から16のいずれか一項に記載の単離されたシングルドメイン抗体。

30

【請求項18】

前記齧歯類が、いかなる機能的な内因性の軽鎖及び重鎖も産生しない、請求項17に記載の単離されたV<sub>H</sub>シングルドメイン抗体。

【請求項19】

請求項1から18のいずれか一項に記載のシングルドメイン抗体と本質的に同じエピトープに結合する、単離された結合剤。

【請求項20】

請求項1から18のいずれか一項に記載のシングルドメイン抗体とヒトPD-1に対する結合に関して競合する、単離された結合剤。

40

【請求項21】

抗体又はその断片である、請求項19又は20に記載の単離された結合剤。

【請求項22】

前記断片が、ヒト重鎖可変ドメイン(V<sub>H</sub>)である、請求項21に記載の単離された結合剤。

【請求項23】

請求項1から18のいずれか一項に記載のシングルドメイン抗体を含む単離された結合剤。

【請求項24】

前記シングルドメイン抗体が、PD-1に結合しない第2の結合分子に連結される、請求項2

50

3に記載の単離された結合剤。

【請求項 2 5】

前記第2のシングルドメイン抗体が、免疫腫瘍学標的に結合する、請求項24に記載の単離された結合剤。

【請求項 2 6】

前記シングルドメイン抗体が、PD-1に結合する第2の結合分子に連結される、請求項23に記載の単離された結合剤。

【請求項 2 7】

前記結合分子が、PD-1とPDL-1及び/又はPDL-2との相互作用を遮断する、請求項26に記載の単離された結合剤。

【請求項 2 8】

前記結合分子が抗体又はその断片である、請求項23から27のいずれか一項に記載の単離された結合剤。

【請求項 2 9】

前記結合分子がヒト重鎖可変ドメイン(V<sub>H</sub>)である、請求項28に記載の単離された結合剤。

【請求項 3 0】

毒素、酵素、放射性同位体、半減期延長部分、治療分子、又は他の化学部分にコンジュゲートされている、請求項19から29のいずれか一項に記載の単離された結合剤。

【請求項 3 1】

前記半減期延長部分が、アルブミン結合部分、トランスフェリン結合部分、ポリエチレングリコール分子、組換えポリエチレングリコール分子、ヒト血清アルブミン、ヒト血清アルブミンの断片、及びアルブミン結合ペプチド又はヒト血清アルブミンに結合するシングルドメイン抗体からなる群から選択される、請求項30に記載の単離された結合剤。

【請求項 3 2】

多特異性結合剤又は多価結合剤における請求項1から18のいずれか一項に記載のシングルドメイン抗体の使用。

【請求項 3 3】

治療剤に連結された、請求項1から18のいずれか一項に記載のシングルドメイン抗体又は請求項19から31のいずれか一項に記載の結合剤を含む免疫コンジュゲート。

【請求項 3 4】

前記治療剤が、毒素、酵素、放射性同位体、又は他の化学部分である、請求項33に記載の免疫コンジュゲート。

【請求項 3 5】

請求項1から18のいずれか一項に記載のシングルドメイン抗体、請求項19から31のいずれか一項に記載の結合剤、又は請求項33又は34に記載の免疫コンジュゲート、並びに薬学的担体を含む、医薬組成物。

【請求項 3 6】

がん、免疫障害、神経疾患、炎症障害、アレルギー、移植拒絶反応、ウイルス感染症、免疫不全、又は他の免疫系関連障害を処置する方法であって、請求項1から18のいずれか一項に記載のシングルドメイン抗体、請求項19から31のいずれか一項に記載の結合剤、又は請求項33及び34に記載の免疫コンジュゲート、又は請求項35に記載の医薬組成物の治療有効量を投与する工程を含む、方法。

【請求項 3 7】

がん、免疫障害、神経疾患、炎症障害、アレルギー、移植拒絶反応、ウイルス感染症、免疫不全、又は他の免疫系関連障害を処置するための医薬の製造における、請求項1から18のいずれか一項に記載のシングルドメイン抗体、請求項19から31のいずれか一項に記載の結合剤、又は請求項33若しくは34に記載の免疫コンジュゲート、又は請求項35に記載の医薬組成物の使用。

【請求項 3 8】

10

20

30

40

50

医薬として使用するための、請求項1から18のいずれか一項に記載のシングルドメイン抗体、請求項19から31のいずれか一項に記載の結合剤、又は請求項33若しくは34に記載の免疫コンジュゲート、又は請求項35に記載の医薬組成物。

【請求項39】

がん、免疫障害、神経疾患、炎症障害、アレルギー、移植拒絶反応、ウイルス感染症、免疫不全、及び他の免疫系関連障害の処置に使用するための、請求項1から18のいずれか一項に記載のシングルドメイン抗体、請求項19から31のいずれか一項に記載の結合剤、又は請求項33若しくは34に記載の免疫コンジュゲート、又は請求項35に記載の医薬組成物。

【請求項40】

前記がんが、骨がん、膵臓がん、皮膚がん、頭頸部がん、皮膚又は眼内悪性黒色腫、子宮がん、卵巣がん、直腸がん、肛門領域のがん、胃がん、精巣がん、乳がん、脳がん、卵管癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、膣癌、外陰癌、食道がん、小腸がん、内分泌系のがん、甲状腺がん、副甲状腺がん、副腎がん、腎臓がん、軟部組織肉腫、尿道がん、膀胱がん、腎臓がん、肺がん、非小細胞肺がん、胸腺腫、尿路上皮癌、白血病、前立腺がん、中皮腫、副腎皮質癌、リンパ腫、例えばホジキン病、非ホジキンリンパ腫、胃がん、及び多発性骨髄腫から選択される、請求項36に記載の方法、請求項37に記載の使用、又は請求項35に記載のシングルドメイン抗体、結合剤、若しくは医薬組成物。

10

【請求項41】

請求項1から18のいずれか一項に記載のシングルドメイン抗体、請求項19から31のいずれか一項に記載の結合剤、請求項33若しくは34に記載の免疫コンジュゲート、又は請求項35に記載の医薬組成物を投与する工程を含む、免疫応答を調節する方法。

20

【請求項42】

請求項1から18のいずれか一項に記載のシングルドメイン抗体をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子。

【請求項43】

配列番号81から100、221から250、又は463から515から選択される、請求項42に記載の単離された核酸分子。

【請求項44】

請求項42又は43に記載の核酸を含むベクター。

【請求項45】

請求項42若しくは43に記載の核酸、又は請求項44に記載のベクターを含む宿主細胞。

30

【請求項46】

細菌、昆虫、植物、ウイルス、又は哺乳動物細胞である、請求項45に記載の宿主細胞。

【請求項47】

請求項1から18のいずれか一項に記載のシングルドメイン抗体を産生する方法であって、宿主細胞において前記結合分子をコードする核酸を発現させる工程及び宿主細胞から結合分子を単離する工程を含む、方法。

【請求項48】

請求項1から18のいずれか一項に記載のシングルドメイン抗体、請求項19から31のいずれか一項に記載の結合剤、請求項33若しくは34に記載の免疫コンジュゲート、又は請求項35に記載の医薬組成物を含むキット。

40

【請求項49】

試験試料中のヒトPD-1の存在を検出する方法であって、前記試料を請求項1から18のいずれか一項に記載のシングルドメイン抗体及び少なくとも1つの検出可能な標識と接触させる工程、並びにヒトPD-1に対する前記シングルドメイン抗体の結合を検出する工程を含む、方法。

【請求項50】

ヒトPD-1に結合するが、PD-1とPD-L1及び/又はPD-L2との相互作用を遮断しないシングルV<sub>H</sub>ドメイン抗体を産生する方法であって：

a) ヒト重鎖V遺伝子を含む核酸構築物を発現し、機能的な内因性の軽鎖又は重鎖を作製す

50

ることができないトランスジェニック動物を、PD-1抗原によって免疫する工程、  
 b)前記動物からライブラリを生成する工程  
 c)前記ライブラリからシングルV<sub>H</sub>ドメイン抗体を単離する工程  
 d)ヒトPD-1に結合するが、PD-1とPD-L1及び/又はPD-L2との相互作用を遮断しないシングルV<sub>H</sub>ドメイン抗体を同定する工程、及び  
 e)前記抗体を単離する工程  
 を含む方法。

【請求項51】

請求項50に記載の方法によって得られた又は得ることができるシングルV<sub>H</sub>ドメイン抗体。

10

【請求項52】

ヒトPD-1に結合するが、PD-1とPD-L1及び/又はPD-L2との相互作用を遮断しない、V<sub>H</sub>ドメインを含む単離された重鎖のみの抗体。

【請求項53】

請求項52に記載の重鎖のみの抗体を産生するトランスジェニック齧歯類。

【請求項54】

前記シングルドメイン抗体とは異なる結合特異性を有する第2の機能的部分に連結されている、請求項1から18のいずれか一項に記載のシングルドメイン抗体を含む二特異性分子。

【請求項55】

前記第2の部分が、抗体、抗体断片、又は抗体模倣体である、請求項54に記載の二特異性分子。

20

【請求項56】

前記第2の部分が免疫腫瘍学標的に結合する、請求項54又は55に記載の二特異性分子。

【請求項57】

アゴニストとして使用するための、請求項1から18のいずれか一項に記載のシングルドメイン抗体を含む多価結合剤。

【請求項58】

前記結合分子が、請求項1から18のいずれか一項に記載の2つ又はそれより多くのシングルドメイン抗体を含む、請求項57に記載の多価結合剤。

30

【請求項59】

前記結合分子が、請求項1から18のいずれか一項に記載のシングルドメイン抗体、及びPD-1に結合し、PD-L1及び/又はPD-L2との相互作用を遮断するシングルドメイン抗体を含む、請求項57に記載の多価結合剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、PD-1結合剤、特にPD-1結合V<sub>H</sub>シングルドメイン抗体(sdAb)、並びに疾患の処置、予防、及び検出におけるそのような結合剤の使用に関する。

【背景技術】

40

【0002】

抗体に基づく治療薬は、腫瘍学、炎症、及び感染疾患等の分野において増加しつつあるヒト疾患に対する治療の重要な構成要素として出現している。実際に、抗体は、今日最もよく売れているクラスの薬物の1つであり、最もよく売れている上位10種の薬物のうち5種が抗体である。

【0003】

プログラム細胞死1(PD-1)タンパク質は、PDCD1遺伝子によってコードされ、55kDaのI型膜貫通タンパク質として発現される(Agata 1996 Int Immunol 8(5):765~72頁)。PD-1は、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーであり(Ishida 1992 EMBO 11(11):3887~95頁)、これはT細胞制御因子の広いCD28/CTLA-4ファミリーの阻害性メンバーである。

50

このファミリーの他のメンバーには、CD28、CTLA-4、ICOS、及びBTLAが挙げられる。PD-1は、単量体として存在し、他のCD28ファミリーメンバーの特徴である不對システイン残基を欠如する(Zhang 2004 *Immunity* 20:337~47頁)。その細胞質ドメインは、シグナル伝達の際にリン酸化される免疫受容体チロシンベース阻害性モチーフ(ITIM)及び免疫受容体チロシンベーススイッチモチーフ(ITSM)を含む(Riley 2009 *Immunol Rev* 229(1):114~25頁)。

#### 【0004】

PD-1は、B細胞、T細胞、及び単球において発現される(Agata 1996)。免疫学的自己寛容の維持におけるPD-1の役割は、自己免疫障害を発症するPDCD1-/-マウスにおいて証明された(Nishimura 1999 *Immunity* 11:141~51頁, Nishimura 2001 *Science* 291(5502):319~22頁)。したがって、PD-1経路は、自己免疫と寛容のバランスをとりながら抗原応答を調節する。

10

#### 【0005】

PD-1には、その調節機能を媒介する2つのリガンドが存在する。PD-L1(B7-H1)は通常、樹状細胞、マクロファージ、休止B細胞、骨髄由来肥満細胞及びT細胞、並びに非造血細胞系列において発現される(Francisco 2010 *Immunol Rev* 236:219~42頁における論評)。PD-L2(B7-DC)は、主に樹状細胞及びマクロファージにおいて発現される(Tseng 2001 *J Exp Med* 193(7):839~45頁)。リガンド発現は、局所メディエータによって影響を受け、炎症性サイトカインによってアップレギュレートされうる。

#### 【0006】

PD-1は、TCRシグナルを負に調節する免疫阻害性タンパク質として知られている。PD-1とPD-L1との間の相互作用は、免疫チェックポイントとして作用することができ、これによって例えば腫瘍浸潤リンパ球の減少、T細胞受容体媒介増殖の減少、及び/又はがん様細胞による免疫の回避が起こりうる。免疫抑制は、PD-1とPD-L1又はPD-L2との局所相互作用を阻害することによって逆転させることができる;PD-1とPD-L1及びPD-L2の両方との相互作用が遮断される場合、作用は相加的である。

20

#### 【0007】

T細胞が、抗原提示細胞(APC)によって活性化されて同時刺激されるようになると、PD-1のT細胞発現が誘導される。PD-1がAPC上のリガンドと会合すると、PD-1を架橋し、これを免疫学的シナプス内でT細胞受容体(TCR)複合体へと集合させる(Yokosuka 2012 *J Exp Med* 209(9):1201~17頁)。T細胞の細胞質内で、PD-1シグナル伝達ドメインITIM及びITSMはリン酸化される。これは、T細胞受容体(TCR)シグナル伝達の様々な構成要素を減弱させるSrc-homology-2ドメイン含有チロシンホスファターゼ(SHP1/2)を誘導する。T細胞活性化が抑制されると、それによってサイトカイン応答、増殖、及び細胞溶解活性の低減が起こる。T細胞機能のこのダウンレギュレーションは、過剰刺激を防止し、弱い免疫原性の自己抗原に対して細胞を寛容化するために役立つ。

30

#### 【0008】

がん又は感染症では、PD-1経路を利用することができ、それによって腫瘍又はウイルスは、有効な免疫認識を回避することができ、T細胞は「消耗した」表現型を示す。PD-L1はまた、尿路上皮、卵巣、乳房、子宮頸部、結腸、膵臓、胃、黒色腫、神経膠芽腫、及び非小細胞肺癌を含む多くの腫瘍タイプにおいて発現されることも示されている(Callahan 2014 *J Leukoc Biol* 94(1):41~53頁による論評)。がん間質細胞によって産生されるサイトカインは、腫瘍の微小環境においてPD-L1を更にアップレギュレートすることができる(He 2015 *Nature Scientific Reports* 5:13110頁)。その結果、腫瘍特異的T細胞は、PD-1シグナル伝達の際に非応答性となり、したがってその標的を除去することができない。制御性T細胞(T reg)もまた、高レベルのPD-1を発現することが示されており、それらは抗腫瘍応答を更に抑制する(Lowther 2016 *JCI Insight* 1(5):85935頁)。

40

#### 【0009】

PD-1:PD-L1相互作用の破壊は、T細胞活性を増強する。抗PD-1モノクローナル抗体は、PD-1とそのリガンドの間の相互作用の遮断を証明している(Wang 2014 *Cancer Immunol Res*

50

2(9):846~56頁)。In-vitroでのT細胞機能は、T細胞と樹状細胞とのリンパ球混合反応における増殖及びサイトカイン応答の改善によって証明されるように、PD-1遮断によって増強することができる。黒色腫患者に由来する細胞傷害性リンパ球(CTL)もまた、抗体OPDIV0(ニボルマブ)を使用するin vitroでのPD-1遮断によって増強されることが示されており、Treg抑制に対して抵抗性となりうる(Wang 2009 Int Immunol 21(9):1065~1077頁)。この抗体は、黒色腫、非小細胞肺癌(NSCLC)、腎細胞がん(RCC)及びその他における臨床での用量漸増試験において試験されている。これは、NSCLC患者における化学療法と比較して改善された全生存率を示す。別のPD-1遮断抗体であるKEYTRUDA(登録商標)(ペンプロリズマブ)は、CTLA-4遮断に対して不応性であるNSCLC患者において応答を証明する。OPDIV0(登録商標)及びKEYTRUDA(登録商標)はいずれも、ヒトPD-1とそのリガンドとの相互作用を機能的に遮断する。

10

【0010】

抗PD-1と抗CD3抗体との組合せによって、PD-1を膜上で架橋することによってPD-1シグナル伝達を誘導することが可能である(Bennett 2003 J Immunol 170:711~18頁, Keir 2005 J Immunol 175:7372~7379頁)。この機能は、T細胞活性が抑制されることから、抗腫瘍応答の際に有害でありうる。T細胞応答の抑制が望ましい場合、アゴニスト性の抗PD-1抗体又はエフェクター機能を有する抗体を、リウマチ性関節炎等の免疫関連疾患を処置するために使用することができるであろう。

【先行技術文献】

【特許文献】

20

【0011】

【特許文献1】国際公開第2016/062990号

【特許文献2】国際公開第2003/000737号

【特許文献3】国際公開第2004/076618号

【非特許文献】

【0012】

【非特許文献1】Agata 1996 Int Immunol 8(5):765~72頁

【非特許文献2】Ishida 1992 EMBO 11(11):3887~95頁

【非特許文献3】Zhang 2004 Immunity 20:337~47頁

【非特許文献4】Riley 2009 Immunol Rev 229(1):114~25頁

30

【非特許文献5】Nishimura 1999 Immunity 11:141~51頁

【非特許文献6】Nishimura 2001 Science 291(5502):319~22頁

【非特許文献7】Francisco 2010 Immunol Rev 236:219~42頁

【非特許文献8】Tseng 2001 J Exp Med 193(7):839~45頁

【非特許文献9】Yokosuka 2012 J Exp Med 209(9):1201~17頁

【非特許文献10】Callahan 2014 J Leukoc Biol 94(1):41~53頁

【非特許文献11】He 2015 Nature Scientific Reports 5:13110頁

【非特許文献12】Lowther 2016 JCI Insight 1(5):85935頁

【非特許文献13】Wang 2014 Cancer Immunol Res 2(9):846~56頁

【非特許文献14】Wang 2009 Int Immunol 21(9):1065~1077頁

40

【非特許文献15】Bennett 2003 J Immunol 170:711~18頁

【非特許文献16】Keir 2005 J Immunol 175:7372~7379頁

【非特許文献17】Green及びSambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第4版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2012)

【非特許文献18】Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic, Zhiqiang An (Editor), Wiley, (2009)

【非特許文献19】Antibody Engineering, 第2版、1及び2巻、Ontermann及びDubel編、Springer-Verlag, Heidelberg (2010)

【非特許文献20】Kabatら、(1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382-391

【非特許文献21】Kabatら、(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest

50

t、第5版、U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242

【非特許文献22】Chothia及びLesk J. Mol. Biol. 196:901~917頁(1987)

【非特許文献23】Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual, Academic Press;第1版(10月28日、1996年) Brian K. Kay, Jill Winter, John McCafferty

【非特許文献24】Bruschi, C.V.及びGjuracic, K. Yeast Artificial Chromosomes, Encyclopedia of Life Sciences, 2002 Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group

【非特許文献25】Renら、Genomics, 84, 686, 2004;Zouら、J. Immunol., 170, 1354, 2003

【非特許文献26】Bruschi, C.V.及びGjuracic, K. Yeast Artificial Chromosomes, Encyclopedia of Life Sciences, 2002, Macmillan Publishers Ltd., Nature Publishing Group/www.els.net

【非特許文献27】Antibody Engineering, Benny Lo編、8章、161~176頁、2004

【非特許文献28】Antibody Engineering, Benny Lo編、19章、327~343頁、2004

【非特許文献29】Dietzら、Cytometry 23:177~186頁(1996)

【非特許文献30】Miragliaら、J. Biomol. Screening 4:193~204頁(1999)

【非特許文献31】Posthumusら、J. Virology, 1990, 64:3304~3309頁

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

本発明の目的は、疾患の処置、特にがんの処置に使用するための代替の抗体ベースの処置の必要性に取り組むことである。

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明は、ヒトPD-1に結合する単離されたヒト可変シングルドメイン抗体又は単離されたヒト重鎖のみの抗体、並びに疾患を処置するための関連する方法に関する。

【0015】

本発明者らは、意外にも、トランスジェニックマウスにおいてin vivoで生成された、ヒトPD-1に結合するが、ヒトPD-1とそのリガンドとの間の機能的相互作用を遮断しないヒト可変シングルドメイン抗体を同定した。

【0016】

このように、本発明の抗PD-1 V<sub>H</sub>シングルドメイン抗体は、そのリガンドであるPD-L1及びPD-L2と相互作用するPD-1タンパク質の部分とは離れており、したがってPD-1を標的とする公知の治療薬の結合領域外であるエピトープに結合する。以下に更に説明するように、これによって、本発明のヒト可変シングルドメイン抗体は、他の結合ドメインと組み合わせて使用する場合に、ヒトPD-1に結合分子を固定するために特に有用となる。例えば、ヒト可変シングルドメイン抗体は、ヒトPD-1に結合して、PD-1とそのリガンドPD-L1及びPD-L2との相互作用を遮断する抗体又は抗体断片との組合せ治療において使用することができる。更に、ヒト可変シングルドメイン抗体はまた、他の免疫チェックポイント阻害剤を標的とする抗体又は抗体断片との組合せ治療においても使用することができる。

【0017】

V<sub>H</sub>ドメインのサイズが小さいことにより、例えば本明細書に記載されるV<sub>H</sub>シングルドメイン抗体を、別の結合剤、例えば別のV<sub>H</sub>シングルドメイン抗体に連結することによって、V<sub>H</sub>ドメインを多価フォーマットにフォーマット化することが可能である。第2の結合剤、例えば別のV<sub>H</sub>シングルドメイン抗体は、PD-1上の別のエピトープに結合してもよく、PD-1とPD-L1及び/又はPD-L2との機能的相互作用を遮断してもよい。或いは、第2の結合剤、例えば別のV<sub>H</sub>シングルドメイン抗体は、機能的リガンド相互作用を遮断することなくPD-1上の別のエピトープに結合してもよく、複数のPD-1単量体に架橋するか又はそれらをクラスター形成させて、PD-1シグナル伝達及び機能をもたらしてもよい。

10

20

30

40

50

## 【0018】

本明細書において証明されるように、ヒトPD-1に結合するが、ヒトPD-1とヒトPD-L1及び/又はPD-L2との相互作用を遮断しない単離されたシングルドメイン抗体を、ヒトPD-1とヒトPD-L1及び/又はPD-L2との相互作用を遮断する阻害剤シングルドメイン抗体と共に二価のフォーマットで提供することは、有利である。このフォーマットでは、阻害効果は、一価のフォーマットの遮断剤と比較して10から25倍増加する。

## 【0019】

一態様では、本発明は、ヒトPD-1に結合するが、ヒトPD-1とヒトPD-L1及び/又はPD-L2との相互作用を遮断しない単離されたシングルドメイン抗体に関する。

## 【0020】

一態様では、本発明は、ヒトPD-1のR<sup>104</sup>、D<sup>105</sup>、F<sup>106</sup>、H<sup>107</sup>、M<sup>108</sup>、S<sup>109</sup>、及びV<sup>110</sup>から選択される1つ又は複数の残基を含むエピトープに結合する単離されたV<sub>H</sub>シングルドメイン抗体に関する。

## 【0021】

一態様では、本発明は、以下のTable 1(表1)若しくはTable 2(表2)に示されるCDR3配列を含むヒトPD-1に結合する単離されたシングルV<sub>H</sub>ドメイン抗体、又はそれと少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、若しくはそれより高い配列同一性を有する配列に関する。

## 【0022】

一態様では、本発明は、配列番号4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76、80、104、108、112、116、120、124、128、132、136、140、144、148、152、156、160、164、168、172、176、180、184、188、192、196、200、204、208、212、216、220、254、258、262、266、270、274、278、282、286、290、294、298、302、306、310、314、318、322、326、330、334、338、342、346、350、354、358、362、366、370、374、378、382、386、390、394、398、402、406、410、414、418、422、426、430、434、438、442、446、450、454、458、若しくは462から選択される配列、又はそれと少なくとも60%、70%、80%、若しくは90%の相同性を有する配列を含む、単離されたシングルドメイン抗体に関する。

## 【0023】

好ましい実施形態では、シングルドメインは、ヒト重鎖可変ドメインである。ヒト重鎖可変ドメインは、一般的にV<sub>H</sub>と呼ばれる。

## 【0024】

一実施形態では、毒素、酵素、放射性同位体、半減期延長部分、標識、治療分子、又は他の化学部分にコンジュゲートされている、単離されたシングルドメイン抗体である。

## 【0025】

別の態様では、本発明は、PD-1とPD-L1との機能的相互作用及び/又はPD-1とPD-L2との相互作用を遮断する抗体と競合しない単離されたシングルドメイン抗体に関する。

## 【0026】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載されるシングルドメイン抗体と本質的に同じエピトープに結合する結合剤に関する。

## 【0027】

別の態様では、本発明は、ヒトPD-1に対する結合に関して、本明細書に記載されるシングルドメイン抗体と競合する単離された結合剤に関する。

## 【0028】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載されるシングルドメイン抗体を含む単離された結合剤に関する。一実施形態では、前記シングルドメイン抗体は、PD-1に結合しない第2の結合分子に連結される。一実施形態では、前記第2のシングルドメイン抗体は、免疫腫瘍学標的に結合する。一実施形態では、前記シングルドメイン抗体は、PD-1に結合する第2の結合分子に連結される。一実施形態では、前記結合分子は、PD-1とPD-L1及び/又はPD-L2との相互作用を遮断する。

## 【0029】

10

20

30

40

50

一実施形態では、単離された結合剤は、毒素、酵素、放射性同位体、半減期延長部分、治療分子、又は他の化学部分にコンジュゲートされている。

【0030】

別の態様では、本発明は、多特異性結合剤又は多価結合剤における本明細書に記載されるシングルドメイン抗体の使用に関する。

【0031】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載されるシングルドメイン抗体を含む免疫コンジュゲート、又は治療剤に連結された本明細書に記載される結合分子に関する。

【0032】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載されるシングルドメイン抗体、結合剤、又は免疫コンジュゲート、及び薬学的担体を含む医薬組成物に関する。

10

【0033】

別の態様では、本発明は、がん、免疫障害、神経疾患、炎症障害、アレルギー、移植拒絶反応、ウイルス感染症、免疫不全、又は他の免疫系関連障害を処置する方法であって、本明細書に記載されるシングルドメイン、結合剤、免疫コンジュゲート、又は医薬組成物の治療有効量を投与する工程を含む方法に関する。

【0034】

別の態様では、本発明は、がん、免疫障害、神経疾患、炎症障害、アレルギー、移植拒絶反応、ウイルス感染症、免疫不全、又は他の免疫系関連障害を処置するための医薬の製造における、本明細書に記載されるシングルドメイン抗体、結合剤、免疫コンジュゲート、又は医薬組成物の使用に関する。

20

【0035】

別の態様では、本発明は、医薬として使用するための、本明細書に記載されるシングルドメイン、結合剤、免疫コンジュゲート、又は医薬組成物に関する。

【0036】

別の態様では、本発明は、がん、免疫障害、神経疾患、炎症障害、アレルギー、移植拒絶反応、ウイルス感染症、免疫不全、及び他の免疫系関連障害の処置に使用するための、本明細書に記載されるシングルドメイン抗体、結合剤、免疫コンジュゲート、又は医薬組成物に関する。

【0037】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載されるシングルドメイン抗体、結合剤、免疫コンジュゲート、又は医薬組成物を投与する工程を含む、免疫応答を調節する方法に関する。

30

【0038】

別の態様では、本発明は、配列番号81から100、221から250、又は463から515から選択されるヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子に関する。

【0039】

別の態様では、本発明は、配列番号81から100、221から250、又は463から515から選択される核酸配列を含むベクターに関する。

【0040】

別の態様では、本発明は、配列番号81から100、221から250、又は463から515から選択される核酸配列を含むベクターを含む宿主細胞に関する。

40

【0041】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載されるシングルドメイン抗体を産生する方法であって、宿主細胞において前記結合分子をコードする核酸を発現させる工程、及び宿主細胞から結合分子を単離する工程を含む方法に関する。

【0042】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載されるシングルドメイン抗体、結合剤、免疫コンジュゲート、又は医薬組成物を含むキットに関する。

【0043】

50

別の態様では、本発明は、試験試料中のヒトPD-1の存在を検出する方法であって、前記試料を、本明細書に記載されるシングルドメイン抗体及び少なくとも1つの検出可能な標識と接触させる工程、並びにヒトPD-1に対する前記シングルドメイン抗体の結合を検出する工程を含む方法に関する。

【0044】

別の態様では、本発明は、ヒトPD-1に結合するが、PD-1とPD-L1及び/又はPD-L2との相互作用を遮断しないV<sub>H</sub>シングルドメイン抗体を産生する方法であって：

- a) ヒト重鎖V遺伝子を含む核酸構築物を発現し、機能的な内因性の軽鎖又は重鎖を作製することができないトランスジェニック動物を、PD-1抗原によって免疫する工程、
  - b) 前記動物からライブラリを生成する工程
  - c) 前記ライブラリからV<sub>H</sub>シングルドメイン抗体を単離する工程
  - d) ヒトPD-1に結合するが、PD-1とPD-L1及び/又はPD-L2との相互作用を遮断しないV<sub>H</sub>シングルドメイン抗体を同定する工程、及び
  - e) 前記抗体を単離する工程
- を含む方法に関する。

10

【0045】

別の態様では、本発明は、上記の方法によって得られる又は得ることができるV<sub>H</sub>シングルドメイン抗体に関する。

【0046】

別の態様では、本発明は、以下の特性のうちの1つ又は複数を示すヒトV<sub>H</sub>シングルドメイン抗体に関する：

- (a) 実施例に示されるKDでヒトPD-1に結合する；
- (b) PD-1とそのリガンドとの機能的相互作用を遮断しない；
- (c) ヒトPD-1及びカニクイザルPD-1に結合する；
- (d) マウスPD-1に結合しない；
- (e) そのような抗体に連結された場合に、アンタゴニスト性のヒトV<sub>H</sub>シングルドメイン抗体のアンタゴニスト作用を増強することができる；
- (f) T細胞活性化を増強しない；
- (g) 実施例に示されるEC50又はIC50値を有する。

20

【0047】

別の態様では、本発明は、ヒトPD-1に結合するが、PD-1とPD-L1及び/又はPD-L2との相互作用を遮断しないV<sub>H</sub>ドメインを含む単離された重鎖のみの抗体に関する。

30

【0048】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載される重鎖のみの抗体を産生するトランスジェニック齧歯類に関する。

【0049】

別の態様では、本発明は、ヒトV、D、及びJ座を発現するが、機能的な内因性のラムダ及びカッパ軽鎖並びに重鎖を産生しないトランスジェニックマウスから得られる又は得ることができる、ヒトPD-1に結合するがPD-1とPD-L1及び/又はPD-L2との相互作用を遮断しないV<sub>H</sub>ドメインを含む重鎖のみの抗体に関する。

40

【0050】

別の態様は、アゴニストとして使用するための、ヒトPD-1に結合するが、PD-1とPD-L1及び/又はPD-L2との相互作用を遮断しないV<sub>H</sub>ドメインを含む単離された重鎖のみの抗体に関する。

【0051】

本発明を、以下の非制限的な図面において更に説明する。

【図面の簡単な説明】

【0052】

【図1】 a) 結合アッセイ及びb) 阻害アッセイ。

【図2 - 1】 a) ヒト組換えPD-1タンパク質に対するV<sub>H</sub>シングルドメイン抗体1.2及び1.1の

50

結合。b) カニクイザルPD-1組換えタンパク質に対するV<sub>H</sub>シングルドメイン抗体1.2及び1.1の結合。

【図2 - 2】c) V<sub>H</sub>シングルドメイン抗体1.2及び1.1は、マウスPD-1に結合しない。

【図3】HTRFアッセイにおけるV<sub>H</sub>ドメイン抗体1.2及び1.1を使用する組換えヒトPD-1タンパク質に対するヒトPD-L1(3a)及びPD-L2(3b)結合の阻害。

【図4】CHOヒトPD-1細胞に対するV<sub>H</sub>の結合及び結合がPD-L1相互作用を阻害するか否かの試験。a) CHO-PD-1結合、b) CHO-PD-1 PD-L1阻害。

【図5 - 1】機能的レポーター遺伝子アッセイ。異なるシングルドメイン抗体並びにニパラトープ性フォーマットを、機能的レポーターアッセイにおいて対照V<sub>H</sub>と共に試験した。

【図5 - 2】図5 - 1の続き。

【図6】V<sub>H</sub>シングルドメイン抗体1.1の40℃で0~14日間の安定性。

【図7】V<sub>H</sub>シングルドメイン抗体1.1は、同種異系樹状細胞/T細胞培養からのIL-2分泌に影響を及ぼさない。陽性対照(POS)は、PD-1:PD-L1相互作用を機能的に遮断するHumabody(登録商標)V<sub>H</sub>である。陰性対照(NEG)は、無関係なHumabody(登録商標)V<sub>H</sub>である。IL-2レベルを、ホモジニアス時間分解蛍光アッセイ(HTRF)によって2日後に決定した。

【図8】a) Pepsin分析に基づくヒトPD-1(PDBコード:4ZQK)上の1.1及び2.1の共通のエピトープ残基。1.1及び2.1エピトープの両方に共通する残基を黒色で示す。b) V<sub>H</sub>シングルドメイン抗体1.1の結合に関係するヒトPD-1の残基とPD-1マウス配列とのアライメント。

【図9】a) V<sub>H</sub>シングルドメイン抗体2.12のマウス血清中安定性、及びb) V<sub>H</sub>シングルドメイン抗体2.12のヒト血清中安定性。

【発明を実施するための形態】

【0053】

様々な態様及び実施形態を以下に更に詳しく説明する。以下の節では、本発明の異なる態様をより詳細に定義する。明らかに反対であることを示していない限り、そのように定義された各々の態様を、他の任意の態様又は複数の態様と組み合わせてもよい。特に、好ましいか又は有利であることが示された任意の特色を、好ましいか又は有利であることが示された他の任意の特色又は複数の特色と組み合わせてもよい。

【0054】

一般的に、本明細書に記載される細胞及び組織培養、病理学、腫瘍学、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学並びにタンパク質化学及び核酸化学及びハイブリダイゼーションに関連して使用される命名法、並びにそれらの技術は、当技術分野で周知であり、当技術分野で一般的に使用される。本開示の方法及び技術は、それ以外であることを示していない限り、当技術分野で周知の、並びに本明細書を通して引用及び考察される様々な一般的な及びより特定の参考文献に記載される通常の方法に従って実施される。例えば、Green及びSambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第4版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2012); Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic, Zhiqiang An (Editor), Wiley, (2009);及びAntibody Engineering、第2版、1及び2巻、Ontermann及びDubel編、Springer-Verlag, Heidelberg (2010)を参照されたい。

【0055】

酵素反応及び精製技術は、当技術分野で一般的に実施されているように、又は本明細書に記載されているように製造元の説明書に従って実施される。本明細書に記載される分析化学、合成有機化学、並びに医薬品化学及び薬化学に関連して使用される命名法、並びにその実験手順及び技術は、当技術分野で周知であり、一般的に使用されるものである。化学合成、化学分析、薬学的調製、製剤、及び送達、並びに患者の処置に関しては、標準的な技術を使用する。

【0056】

本発明者らは、意外にも、実施例における機能的アッセイにおいて証明されるように、ヒトPD-1に結合するが、ヒトPD-1とそのリガンドとの間の機能的相互作用を遮断しないヒトV<sub>H</sub>シングルドメイン抗体を同定した(同様に図5及び図7を参照されたい)。本発明者らは

10

20

30

40

50

、本発明のヒトV<sub>H</sub>シングルドメイン抗体が、PDL-1又はPDL-2に対するヒトPD-1の結合部位とは異なるエピトープに結合することを更に示している。

【0057】

このように、本発明は、ヒトPD-1に結合するが、PD-1とPD-L1との相互作用及び/又はPD-1とPD-L2との相互作用を遮断しない単離されたシングルドメイン抗体、そのような結合分子を含む医薬組成物、並びにそのような結合タンパク質を作製するための単離された核酸、単離された組換え発現ベクター及び単離された宿主細胞を提供する。同様に、ヒトPD-1を検出するために本明細書に開示されるシングルドメイン抗体を使用する方法、及び疾患を処置する方法も提供される。別の態様では、本発明は、本明細書に記載される、ヒトPD-1に結合するが、PD-1とPD-L1との相互作用及び/又はPD-1とPD-L2との相互作用を遮断しないシングルドメイン抗体を含む結合分子を提供する。別の態様では、本発明は、本明細書に定義されるヒトPD-1上のエピトープに結合するシングルドメイン抗体を含む結合分子を提供する。

10

【0058】

好ましい実施形態では、シングルドメイン抗体は、ドメインがヒト可変重鎖(V<sub>H</sub>)ドメインであるシングルドメイン抗体である。このように、ある特定の実施形態では、本発明者らは、ヒトPD-1に結合する単離されたシングルドメイン抗体であって、ドメインが可変重鎖ドメイン、好ましくはV<sub>H</sub>ドメインであり、前記シングルドメイン抗体がヒトPD-1に結合し、PD-1とPD-L1との相互作用及び/又はPD-1とPD-L2との相互作用を遮断しない、単離されたシングルドメイン抗体を提供する。

20

【0059】

本明細書において使用される場合、「ヒトPD-1とそのリガンドとの相互作用を遮断しない又は阻害しない」という用語は、ヒトPD-1とそのリガンドとの機能的相互作用を指す。言い換えれば、本発明のシングルドメイン抗体が結合しても、ヒトPD-1とそのリガンドとの機能的相互作用は消滅しないか、又は低減しない。これは、例えばPD-1シグナル伝達アッセイにおいて測定することができ、リガンド結合の遮断として定義されない。このように、本発明のシングルドメイン抗体のヒトPD-1に対する結合は、ヒトPD-1とそのリガンドとの相互作用の生物機能に影響を及ぼさない。一実施形態では、リガンドはPD-L1である。一実施形態では、リガンドはPD-L2である。

【0060】

本発明のシングルドメイン抗体は、高い親和性及び特異性でPD-1に結合する。

30

【0061】

上記の本発明のシングルドメイン抗体の特性は、治療方法及び使用に利用することができる。本発明の化合物は、治療分子をヒトPD-1に固定する、会合させる、又はその近位にもたすために、例えば標的化治療において、治療化合物を目的の細胞若しくは組織に、又はPD-1局在に関連する細胞の領域に動員するために特に有用である。これによって、本発明の化合物は、他の化合物、例えばPD-1とそのリガンド又は他の免疫調節剤との相互作用を遮断する化合物と共に送達するために特に適するようになる。例えば、本発明のシングルドメイン抗体を、例えばペプチドリンカーを使用して、ヒトPD-1のそのリガンドPD-L1及び/又はPD-L2に対する結合に拮抗して、それによって免疫応答をアップモジュレートする化合物に連結することができる。そのような化合物は、V<sub>H</sub>シングルドメイン抗体を含む抗体又はその断片から選択することができる。

40

【0062】

このように、一態様は、例えば、PD-1のそのリガンドPD-L1及び/又はPD-L2に対する結合を遮断するV<sub>H</sub>シングルドメイン抗体と組み合わせた、多価結合剤における本明細書に開示のシングルドメイン抗体の使用に関する。一実施形態では、これは、mAb、又は抗体のFc領域、例えばHumabody(登録商標)mAb融合体と組み合わせることができる。これにより、自己免疫疾患の処置での応用のために、より長い半減期が可能となり、及び/又はFcエフェクター機能がPD-1陽性細胞を枯渇することができる。一実施形態では、多価分子は、アンタゴニストとして有用である。一実施形態では、多価分子は、アゴニストとして有用で

50

ある。

【0063】

別の実施形態では、シングルドメイン抗体を、PD-1とそのリガンドとの相互作用を遮断する化合物又は他の免疫調節剤と共に共投与することができる。これは、同じ医薬中で、又は個別の組成物の連続投与によって行うことができる。別の態様では、シングルドメイン抗体をまた、免疫応答をダウンレギュレートする別の化合物と組み合わせることができる。

【0064】

本発明のシングルドメイン抗体は更に、例えば、NK細胞による枯渇のための細胞の標的化のための、又は毒性物質のペイロードの送達を介する、枯渇抗体として使用することができる。更に、本発明のシングルドメイン抗体は、例えばがんを診断する方法、又は他のバイオマーカー関連方法において、造影剤として使用することができる。適用には、がん罹患した患者の、例えば免疫チェックポイント経路阻害剤による処置に対する臨床応答を予測する方法が挙げられる。

【0065】

特に、以下に説明するように、本発明のシングルドメイン抗体は、多価フォーマット又は多特異的フォーマットで使用することができる。このように、本発明はまた、本明細書に記載されるシングルドメイン抗体を含む多機能結合剤にも関する。

【0066】

本発明の分子は、野生型ヒトPD-1(UniProt受託番号Q15116、GenBank受託番号U64863、配列番号518)に特異的に結合する。残基1~20はプレ配列に対応し、残基171及びそれ以降は、PD-1の膜貫通ヘリックス及び細胞内ドメインを構成する。

【0067】

それ以外であることを明記していない限り、本明細書において使用される用語PD-1は、ヒトPD-1を指す。用語「プログラム細胞死1」、「プログラムされた細胞死1」、「タンパク質PD-1」、「PD-1」、「PD1」、「PDCD1」、「hPD-1」及び「hPD-1」は、互換的に使用され、ヒトPD-1の多様体、アイソフォーム、種相同体を含む。

【0068】

用語「PD-1結合分子/タンパク質/ポリペプチド/剤」、「PD-1抗原結合分子タンパク質/ポリペプチド/剤」、「抗PD-1シングルドメイン抗体」、「抗PD-1シングル免疫グロブリン可変ドメイン」、「抗PD1重鎖のみの抗体」、又は「抗PD-1抗体」は全て、ヒトPD-1抗原に特異的に結合することができる分子を指す。結合反応は、例えば無関係な特異性の抗体を使用する陰性対照試験を基準とする標準的な方法によって示されうる。用語「PD-1結合分子/剤」は、PD-1結合タンパク質を含む。

【0069】

目的の抗原、例えばPD-1に「結合する」又は「結合することができる」、本明細書に記載されるシングルドメイン抗体及び多価又は多特異性結合剤を含む本発明の抗体又は結合分子は、抗体が、抗原を発現する細胞又は組織の標的化において治療剤として有用であるように十分な親和性で抗原に結合する抗体又は結合分子である。

【0070】

本明細書に記載されるシングルドメイン抗体及び多価又は多特異性結合剤を含む本発明の結合分子は、ヒトPD-1に特異的に結合する。言い換えれば、PD-1抗原に対する結合は、非特異的相互作用とは測定可能に異なる。実施例に証明されているように、本発明のシングルドメイン抗体は、マウスPD-1と交叉反応しない。好ましくは、本発明のシングルドメイン抗体は、ヒトPD-1に結合し、同様にカニクイザルPD-1にも結合する。

【0071】

本明細書に使用される特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド標的上のエピトープに「特異的結合」又は「特異的に結合する」、又は「特異的である」という用語は、例えば、標的に対するKDが少なくとも約 $10^{-4}$  M、或いは少なくとも約 $10^{-5}$  M、或いは少なくとも約 $10^{-6}$  M、或いは少なくとも約 $10^{-7}$  M、或いは少なくとも約 $10^{-8}$  M、或いは少なくとも

10

20

30

40

50

約 $10^{-9}$  M、或いは少なくとも約 $10^{-10}$  M、或いは少なくとも約 $10^{-11}$  M、或いは少なくとも約 $10^{-12}$  M、又はそれより高い分子によって示されうる。一実施形態では、用語「特異的結合」は、分子が、他の任意のポリペプチド又はポリペプチドエピトープに実質的に結合することなく、特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド上のエピトープに結合する場合の結合を指す。

【0072】

用語「抗体」は、4つのポリペプチド鎖、すなわち2つの重(H)鎖及び2つの軽(L)鎖で構成される任意の免疫グロブリン(Ig)分子若しくはその抗原結合部分、又はIg分子の本質的なエピトープ結合特徴を保持するその任意の機能的断片、変異体、多様体、若しくは誘導体を指す。そのような変異体、多様体、又は誘導体抗体フォーマットは、当技術分野で公知である。

10

【0073】

完全長の抗体では、各々の重鎖は、重鎖可変領域又はドメイン(本明細書においてHCVRと省略される)及び重鎖定常領域で構成される。重鎖定常領域は、3つのドメイン、すなわち $C_{H1}$ 、 $C_{H2}$ 、及び $C_{H3}$ で構成される。各々の軽鎖は、軽鎖可変領域又はドメイン(本明細書においてLCVRと省略される)及び軽鎖定常領域で構成される。軽鎖定常領域は、1つのドメイン $C_L$ で構成される。

【0074】

重鎖及び軽鎖可変領域は、相補性決定領域(CDR)と呼ばれる超可変領域に更に細分することができ、それらの領域の間にはより保存されたフレームワーク領域(FR)と呼ばれる領域が介在する。各々の重鎖及び軽鎖可変領域は、3つのCDRと4つのFRで構成され、これらはアミノ末端からカルボキシ末端へと以下の順序:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4で整列する。免疫グロブリン分子は、任意のタイプ(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、及びIgY)、クラス(例えば、IgG 1、IgG2、IgG 3、IgG4、IgA1、及びIgA2)又はサブクラスの分子でありうる。

20

【0075】

用語「CDR」は、抗体可変配列内の相補性決定領域を指す。重鎖及び軽鎖の可変領域の各々には、可変領域の各々に関してCDR1、CDR2、及びCDR3と呼ばれる3つのCDRが存在する。用語「CDRの組」は、抗原に結合することができる単一の可変領域に存在する3つのCDRの群を指す。これらのCDRの正確な境界は、当技術分野で公知の異なるシステムに従って異なるように定義することができる。

30

【0076】

Kabatの相補性決定領域(CDR)は、配列多様性に基づいており、最も一般的に使用される(Kabatら、(1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382-391、及びKabatら、(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)。Chothiaは、代わりに構造ループの位置を指している(Chothia及びLesk J. Mol. Biol. 196:901~917頁(1987))。Kabatの付番システムは、可変ドメインにおける残基(軽鎖のおよそ1~107位の残基及び重鎖の1~113位の残基)を指す場合に一般的に使用される。

【0077】

本明細書において特に明記していない限り、Kabatによって記載されるシステムを使用する。用語「Kabat付番」、「Kabat定義」及び「Kabat表記」は、本明細書において互換的に使用される。これらの用語は、当技術分野で認識されるように、抗体の重鎖及び軽鎖可変領域又は抗原結合部分における他のアミノ酸残基より可変(すなわち、超可変)であるアミノ酸残基の付番システムを指す。

40

【0078】

キメラ抗体は、1つの種に由来する抗体、好ましくは齧歯類抗体の相補性決定領域(CDR)を含む可変ドメインを含み、抗体分子の定常ドメインがヒト抗体の定常ドメインに由来する組換えタンパク質である。獣医学応用の場合、キメラ抗体の定常ドメインは、ネコ又はイヌ等の他の種のドメインに由来しうる。

50

## 【0079】

ヒト化抗体は、1つの種の抗体、例えば齧歯類抗体のCDRが、齧歯類抗体の重鎖及び軽鎖可変鎖からヒト重鎖及び軽鎖可変ドメイン(例えば、フレームワーク領域配列)に移植されている組換えタンパク質である。抗体分子の定常ドメインは、ヒト抗体のそれに由来する。ある特定の実施形態では、親(齧歯類)抗体からの限定数のフレームワーク領域アミノ酸残基を、ヒト抗体フレームワーク領域配列に置換してもよい。

## 【0080】

用語「抗原結合部位」は、抗原に特異的に結合する領域を含む抗体の一部又は抗体断片を指す。抗原結合部位は、1つ又は複数の抗体可変ドメインによって提供されうる。好ましくは、抗原結合部位は、抗体又は抗体断片の会合した $V_H$ 及び $V_L$ 内に含まれる。

10

## 【0081】

抗体断片は、抗体の一部、例えば、 $F(ab')_2$ 、Fab、Fv、sFv、及びその他である。完全長の抗体の機能的断片は、完全長の抗体の標的特異性を保持する。したがって、組換えの機能的抗体断片、例えばFab(断片、抗体)、scFv(一本鎖可変鎖断片)、及びシングルドメイン抗体(dAb)は、mAbに基づく治療薬の代替として治療薬を開発するために使用されている。

## 【0082】

scFv断片(約25kDa)は、2つの可変ドメイン、 $V_H$ 及び $V_L$ からなる。天然において、 $V_H$ 及び $V_L$ ドメインは、疎水性相互作用を介して非共有結合により会合し、解離する傾向がある。しかし、ドメインを親水性のフレキシブルリンカーに連結して一本鎖Fv(scFv)を作製することによって、安定な断片を工学操作することができる。

20

## 【0083】

最小の抗原結合断片は、単一の可変断片、すなわち $V_H$ 又は $V_L$ ドメインである。軽鎖/重鎖パートナーに対する結合はそれぞれ、標的結合にとって必要ではない。そのような断片は、シングルドメイン抗体において使用される。したがって、シングルドメイン抗体(約12~15kDa)は、 $V_H$ 又は $V_L$ ドメインのいずれかからなるか、又はいずれかを含む。

## 【0084】

一態様では、本発明は、ヒトPD-1に結合するが、PD-1とPD-L1又はPD-L2との相互作用を遮断しない、単離されたシングルドメイン抗体、単離された可変シングルドメイン、又は単離された免疫グロブリンシングル可変ドメインに関する。

30

## 【0085】

用語「シングルドメイン抗体、可変シングルドメイン、又は免疫グロブリンシングル可変ドメイン(ISV)」は、全て当技術分野で周知であり、標的抗原に結合する抗体の単一の可変断片を記載する。これらの用語は、本明細書において互換的に使用される。以下に説明するように、一部の実施形態は、軽鎖の非存在下でPD-1抗原に結合する単一の重鎖可変ドメイン抗体/免疫グロブリン重鎖シングル可変ドメインに関する。一部の実施形態は、ヒト重鎖可変ドメイン抗体に関する。そのような結合分子はまた、本明細書においてHumabody(登録商標)と呼ばれる。Humabody(登録商標)は、Crescendo Biologics Ltd社の登録商標である。

## 【0086】

このように、一部の実施形態では、本発明の単離された結合剤/分子は、前記ドメインがヒト重鎖可変ドメインである少なくとも1つのシングルドメイン抗体を含むか、又はそれからなる。このように、一態様では、本発明の結合剤は、 $V_H$ ドメインを有するが、 $V_L$ ドメインを欠如する、少なくとも1つの免疫グロブリンシングル可変重鎖ドメインを含むか、又はからなる。

40

## 【0087】

用語「単離された」シングルドメイン抗体は、他のシングルドメイン抗体、異なる抗原特異性を有する抗体又は抗体断片を実質的に含まないシングルドメイン抗体を指す。その上、単離されたシングルドメイン抗体は、他の細胞材料及び/又は化学物質を実質的に含まなくてもよい。

50

## 【0088】

各々のシングルV<sub>H</sub>ドメイン抗体は、3つのCDRと4つのFRとを含み、これらはアミノ末端からカルボキシ末端へと以下の順序:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4で整列した。このように、本発明の一実施形態では、ドメインは、以下の式:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4を有するヒト可変重鎖(V<sub>H</sub>)ドメインである。

## 【0089】

本発明のシングルドメイン抗体に対して、その特性を改善するためにC末端又はN末端V<sub>H</sub>フレームワーク配列に対する修飾を行ってもよい。例えば、V<sub>H</sub>ドメインは、C末端又はN末端の伸長又は欠失を含みうる。C末端伸長は、残基VTVSS(配列番号516)で終止するV<sub>H</sub>ドメインのC末端に付加することができる。

10

## 【0090】

一実施形態では、本発明のシングルドメイン抗体は、1から50又はそれより多くの残基、例えば1から25、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10個の追加のアミノ酸のC末端伸長又は欠失を含む。一実施形態では、本発明のシングルドメイン抗体は、ヒトC<sub>H</sub>1ドメインの追加のアミノ酸を含み、このためC末端はC<sub>H</sub>1ドメイン内に伸長する。一実施形態では、前記伸長は、少なくとも1つのアラニン残基、例えば単一のアラニン残基、一対のアラニン残基、又は3つのアラニン残基を含む。

## 【0091】

更なるC末端又はN末端残基は、本発明のシングルドメイン抗体を、分子の検出を助ける別の部分又はタグにコンジュゲートするために使用されるリンカーでありうる。そのようなタグは当技術分野で周知であり、例えばリンカー-Hisタグ、例えばヘキサHis(HHHHHH、配列番号517)又はmycタグを含む。

20

## 【0092】

本明細書に使用される場合、用語「相同性」は一般的に、配列を整列させた後に、及び一部の実施形態では最大のパーセント相同性を達成するために必要に応じてギャップを導入した後に、いかなる保存的置換も配列同一性の一部として考慮することなく比較される参照ポリペプチドの残基と同一である配列におけるアミノ酸残基の百分率を指す。このように、2つのアミノ酸配列間のパーセント相同性は、2つの配列間のパーセント同一性と同等である。N末端若しくはC末端の伸長、タグ、又は挿入はいずれも、同一性又は相同性を低減させると解釈すべきではない。アライメントのための方法及びコンピュータープログラムは周知である。2つのアミノ酸配列間のパーセント同一性は、周知の数学的アルゴリズムを使用して決定することができる。

30

## 【0093】

本発明の様々な態様及び実施形態に従って、本発明のシングルドメイン抗体の可変ドメインは、好ましくはヒト可変ドメイン(V<sub>H</sub>)である。本明細書に使用される場合、ヒトV<sub>H</sub>ドメインは、完全にヒトの又は実質的に完全にヒトのV<sub>H</sub>ドメインを含む。本明細書に使用される場合、用語ヒトV<sub>H</sub>ドメインはまた、例えば、国際公開第2016/062990号及び実施例に記載されるように、特に目的の抗原による免疫に应答して完全にヒトの免疫グロブリン重鎖座を発現するトランスジェニックマウスによって作製される重鎖のみの抗体から単離されるV<sub>H</sub>ドメインも含む。一実施形態では、ヒトV<sub>H</sub>ドメインはまた、ヒトV<sub>H</sub>ドメインアミノ酸又はそのようなV<sub>H</sub>ドメインをコードする核酸配列に由来する又は基づくV<sub>H</sub>ドメインも含む。このため、用語は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する又はそれによってコードされる可変重鎖領域を含む。実質的にヒトのV<sub>H</sub>ドメイン、又はヒトV<sub>H</sub>ドメインに由来する若しくは基づくV<sub>H</sub>ドメインは、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基(例えば、in vitroで、例えばランダム若しくは部位特異的変異誘発によって導入された変異、又はin vivoで体細胞変異によって導入された変異)を含みうる。したがって、用語「ヒトV<sub>H</sub>ドメイン」は、1つ又は複数のアミノ酸残基が改変されている実質的にヒトのV<sub>H</sub>ドメインも含む。例えば、実質的にヒトのV<sub>H</sub>ドメインは、完全にヒトの配列と比較して最大10個、例えば、1、2、3、4、若しくは5又は最大20個のアミノ酸改変を含みうる。

40

50

## 【0094】

しかし、本明細書に使用される場合の用語「ヒトV<sub>H</sub>ドメイン」又は「実質的にヒトのV<sub>H</sub>ドメイン」は、マウス等の別の哺乳動物種の生殖系列に由来するCDR配列がヒトフレームワーク配列に移植されている抗体を含まないと意図される。好ましくは、本明細書に使用される場合の用語「ヒトV<sub>H</sub>ドメイン」は、1つ又は複数の既定の残基をラクダ化V<sub>HH</sub>ドメインにおいて見出されうる特定の残基へと変化させるために、V<sub>H</sub>ドメイン配列における既定の位置を選択して既定の位置で1つ又は複数の点突然変異を導入するように、例えば通常の変異誘発法によって *in vitro* で特に改変されているヒトV<sub>H</sub>ドメインであるラクダ化V<sub>H</sub>ドメインを含まないと意図される。

## 【0095】

実施例に示すように、本発明者らは、PD-1の一般的な残基、すなわちヒトPD-1のR<sup>104</sup>、D<sup>105</sup>、F<sup>106</sup>、H<sup>107</sup>、M<sup>108</sup>、S<sup>109</sup>、及びV<sup>110</sup>でPD-1に結合するV<sub>H</sub>ドメインを同定した。したがって、一実施形態では、本発明は、ヒトPD-1のR<sup>104</sup>、D<sup>105</sup>、F<sup>106</sup>、H<sup>107</sup>、M<sup>108</sup>、S<sup>109</sup>、及びV<sup>110</sup>から選択される残基のうちの1つ又は複数又は全てを含む、ヒトPD-1のエピトープ、エピトープ部分、ドメイン、サブユニット、又はコンフォメーションに結合する単離されたシングルドメイン抗体に関する。

## 【0096】

一実施形態では、前記エピトープ、エピトープ部分、ドメイン、サブユニット、又はコンフォメーションは、G<sup>103</sup>、V<sup>111</sup>、R<sup>112</sup>、及びA<sup>113</sup>のうちの1つ又は複数又は全てを更に含む。一実施形態では、前記エピトープ、エピトープ部分、ドメイン、サブユニット、又はコンフォメーションは、G<sup>103</sup>を含む。一実施形態では、前記エピトープ、エピトープ部分、ドメイン、サブユニット、又はコンフォメーションは、R<sup>104</sup>を含む。一実施形態では、前記エピトープ、エピトープ部分、ドメイン、サブユニット、又はコンフォメーションは、S<sup>109</sup>を含む。一実施形態では、前記エピトープ、エピトープ部分、ドメイン、サブユニット、又はコンフォメーションは、V<sup>110</sup>を含む。一実施形態では、前記エピトープ、エピトープ部分、ドメイン、サブユニット、又はコンフォメーションは、V<sup>111</sup>を含む。一実施形態では、前記エピトープ、エピトープ部分、ドメイン、サブユニット、又はコンフォメーションは、R<sup>112</sup>を含む。一実施形態では、前記エピトープ、エピトープ部分、ドメイン、サブユニット、又はコンフォメーションは、A<sup>113</sup>を含む。実施例に示すように、本明細書に記載されるシングルドメイン抗体は、これらの共通の残基に対する結合を有する。一実施形態では、前記エピトープ、エピトープ部分、ドメイン、サブユニット、又はコンフォメーションは、ヒトPD-1のG<sup>103</sup>、R<sup>104</sup>、S<sup>109</sup>、V<sup>110</sup>、V<sup>111</sup>、R<sup>112</sup>、及びA<sup>113</sup>の全てを含む。

## 【0097】

一実施形態では、上記の前記エピトープ、エピトープ部分、ドメイン、サブユニット、又はコンフォメーションは、ヒトPD-1の残基N<sup>102</sup>、D<sup>105</sup>、F<sup>106</sup>、H<sup>107</sup>、M<sup>108</sup>、R<sup>114</sup>、及びR<sup>115</sup>のうちの1つ又は複数又は全てを更に含む。前記エピトープは、N<sup>33</sup>、P<sup>34</sup>、P<sup>35</sup>、T<sup>36</sup>、F<sup>37</sup>、S<sup>38</sup>、C<sup>54</sup>、F<sup>55</sup>、S<sup>56</sup>、N<sup>57</sup>、T<sup>58</sup>、S<sup>59</sup>、E<sup>60</sup>、S<sup>61</sup>、F<sup>62</sup>、V<sup>63</sup>、L<sup>64</sup>、N<sup>65</sup>、W<sup>66</sup>、P<sup>101</sup>、及びG<sup>103</sup>から選択される残基のうちの1つ又は複数又は全てを更に含む。一実施形態では、前記エピトープ、エピトープ部分、ドメイン、サブユニット、又はコンフォメーションは、N<sup>102</sup>を含む。一実施形態では、前記エピトープ、エピトープ部分、ドメイン、サブユニット、又はコンフォメーションは、D<sup>105</sup>を含む。一実施形態では、前記エピトープ、エピトープ部分、ドメイン、サブユニット、又はコンフォメーションは、F<sup>106</sup>を含む。一実施形態では、前記エピトープ、エピトープ部分、ドメイン、サブユニット、又はコンフォメーションは、H<sup>107</sup>を含む。一実施形態では、前記エピトープ、エピトープ部分、ドメイン、サブユニット、又はコンフォメーションは、M<sup>108</sup>を更に含む。一実施形態では、前記エピトープ、エピトープ部分、ドメイン、サブユニット、又はコンフォメーションは、R<sup>114</sup>を含む。一実施形態では、前記エピトープ、エピトープ部分、ドメイン、サブユニット、又はコンフォメーションは、R<sup>115</sup>を含む。

## 【0098】

10

20

30

40

50

別の実施形態では、シングルドメイン抗体は、ヒトPD-1のR<sup>104</sup>、D<sup>105</sup>、F<sup>106</sup>、H<sup>107</sup>、M<sup>108</sup>、S<sup>109</sup>、及びV<sup>110</sup>から選択される1つ又は複数又は全ての残基、並びに更にS<sup>60</sup>、E<sup>61</sup>、S<sup>62</sup>、F<sup>63</sup>、V<sup>64</sup>、L<sup>65</sup>、N<sup>66</sup>、W<sup>67</sup>、Y<sup>68</sup>、R<sup>69</sup>、M<sup>70</sup>、S<sup>71</sup>、G<sup>90</sup>、Q<sup>91</sup>、D<sup>92</sup>、C<sup>93</sup>、R<sup>94</sup>、F<sup>95</sup>、R<sup>96</sup>、V<sup>97</sup>、T<sup>98</sup>、V<sup>111</sup>、R<sup>112</sup>、A<sup>113</sup>、及びR<sup>11</sup>のうちの1つ又は複数又は全てを含むエピトープに結合する。実施例に示すように、ファミリー2のVHは、これらの残基に結合する。

#### 【0099】

用語「エピトープ」、又は「抗原性決定基」は、それに対してV<sub>H</sub>シングルドメイン抗体を含む、免疫グロブリン、抗体、抗体断片が特異的に結合する、抗原(例えば、PD-1)の表面上の部位を指す。一般的に、抗原は複数の又は多くの異なるエピトープを有し、多くの異なる抗体と反応する。特異的という用語は、線形エピトープ及びコンフォメーション

10

#### 【0100】

タンパク質抗原内のエピトープは、連続するアミノ酸(通常、線形エピトープ)、又はタンパク質の三次元フォールディングによって近位となる不連続なアミノ酸(通常、コンフォメーションエピトープ)の両方によって形成されうる。連続するアミノ酸から形成されたエピトープは、必ずしも常ではないが典型的に、変性溶媒に曝露されても保持されるが、三次元フォールディングによって形成されたエピトープは、変性溶媒による処置によって典型的に失われる。エピトープは典型的に、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、又は15アミノ酸をユニークな空間的コンフォメーションで含む。どのエピトープが所定の抗体又は抗体断片に結合しているかを決定する方法(すなわち、エピトープマッピング)は、当技術分野で周知であり、例えばイムノプロットティング、及び免疫沈降アッセイを含み、重複する又は連続するペプチドを、所定の抗体又は抗体断片との反応性に関して試験する。

20

#### 【0101】

2つの抗体が同一又は立体的に重複するエピトープを認識する場合、抗体は、参照抗体と「本質的に同じエピトープ」に結合する。2つのエピトープが同一又は立体的に重複するエピトープに結合するか否かを決定するための最も広く使用され、迅速な方法は、競合アッセイであり、これは、標識抗原又は標識抗体のいずれかを使用して、異なるフォーマットに構成することができる。

#### 【0102】

一実施形態では、本発明は、以下のTable 1(表1)に示されるCDR3配列、又はそれと少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、若しくはそれより高い配列同一性を有する配列を含む、ヒトPD-1に結合する単離されたシングルV<sub>H</sub>ドメイン抗体に関する。一実施形態では、前記配列同一性は、少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%である。一実施形態では、前記配列同一性は、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%である。

30

#### 【0103】

一実施形態では、V<sub>H</sub>シングルドメイン抗体は、配列番号3を含むCDR3配列、又は配列番号3と少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、若しくは少なくとも95%の同一性を有する配列を有する。一実施形態では、前記配列同一性は、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%である。

40

#### 【0104】

一実施形態では、V<sub>H</sub>シングルドメイン抗体は、配列番号1又は1若しくは2個のアミノ酸置換を有する配列番号1に示されるCDR1、配列番号2又は1から5個のアミノ酸置換を有する配列番号2に示されるCDR2、及び配列番号3又は1から5個のアミノ酸置換を有する配列番号3に示されるCDR3を有する。

#### 【0105】

一実施形態では、V<sub>H</sub>シングルドメイン抗体は、Table 1(表1)のCDR1、2、及び3配列、又

50

はその組合せから選択されるCDR1、2、及び3配列の組合せを含む。一実施形態では、 $V_H$ シングルドメイン抗体は、Table 1(表1)におけるクローンのいずれかに関して示されるCDR1、2、及び3配列の組から選択される一組のCDR1、2、及び3配列を含む。このように、一態様では、単離されたシングルドメイン抗体は、完全長の配列である配列番号4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76、80、104、108、112、116、120、124、128、132、136、140、144、148、152、156、160、164、168、172、176、180、184、188、192、196、200、204、208、212、216、又は220のCDR1~3から選択されるCDR1、CDR2、及びCDR3を含む。したがって、一実施形態では、 $V_H$ シングルドメイン抗体は、配列番号1を有するCDR1、配列番号2を有するCDR2、及び配列番号3を有するCDR3(配列番号4のCDR)、配列番号5を有するCDR1、配列番号6を有するCDR2、及び配列番号7を有するCDR3(配列番号8のCDR)等々を含む。このように $V_H$ シングルドメイン抗体は、以下のCDRの組合せ:配列番号1、2、3;配列番号5、6、7;配列番号9、10、11;配列番号13、14、15;配列番号17、18、19;配列番号21、22、23;配列番号25、26、27;配列番号29、30、31;配列番号333、34、35;配列番号37、38、39;配列番号41、42、43;配列番号45、46、47;配列番号49、50、51;配列番号53、54、55;配列番号57、58、59;配列番号61、62、63;配列番号65、66、67;配列番号69、70、71;配列番号73、74、75;配列番号77、78、79;配列番号101、102、103;配列番号105、106、107;配列番号109、110、111;配列番号113、114、115;配列番号117、118、119;配列番号121、122、123;配列番号125、126、127;配列番号129、130、131;配列番号133、134、15;配列番号137、18、139;配列番号141、142、143;配列番号145、146、147;配列番号149、150、151;配列番号153、154、155;配列番号157、158、159;配列番号161、162、163;配列番号165、166、167;配列番号169、170、171;配列番号173、174、175;配列番号177、178、179;配列番号181、182、183;配列番号185、186、187;配列番号189、190、191;配列番号193、194、195;配列番号197、198、199;配列番号201、202、203;配列番号205、206、207;配列番号209、210、211;配列番号213、214、215;配列番号217、218、219のうちの1つを含む。

10

20

#### 【0106】

別の実施形態では、前記CDR1は、配列番号1のアミノ酸配列、又はそれと少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%の同一性を有する配列を含むか、又はからなる。一実施形態では、前記CDR2は、配列番号2のアミノ酸配列、又はそれと少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%の同一性を有する配列を含むか、又はからなる。一実施形態では、前記CDR3は、配列番号3のアミノ酸配列、又はそれと少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%の同一性を有する配列を含むか、又はからなる。

30

#### 【0107】

別の実施形態では、 $V_H$ シングルドメイン抗体は、Table 1(表1)に示される $V_H$ シングルドメイン抗体1.1~1.50のいずれか1つに示されるポリペプチド配列、又はそれと少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、若しくはそれより高い配列同一性を有する配列を含むか、又はからなる。このように、 $V_H$ シングルドメイン抗体は、配列番号4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76、80、104、108、112、116、120、124、128、132、136、140、144、148、152、156、160、164、168、172、176、180、184、188、192、196、200、204、208、212、216、若しくは220から選択されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、若しくはそれより高い配列同一性を有する配列を含むか、又はからなる。一実施形態では、 $V_H$ シングルドメイン抗体は、配列番号104、108、112、116、120、124、128、132、136、140、144、148、152、156、160、164、168、172、176、180、184、188、192、196、200、204、208、212、216、若しくは220、又はそれと少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、若しくはそれより高い配列同一性を

40

50

有する配列を含むか、又はからなる。一実施形態では、 $V_H$ シングルドメイン抗体は、配列番号4若しくは配列番号176、又はそれと少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、若しくはそれより高い配列相同性を有する配列を含むか、又はからなる。一実施形態では、前記配列相同性は、少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%である。

【 0 1 0 8 】

【表 1 A】

Table 1 V<sub>H</sub>シングルドメイン抗体の完全長の配列及びCDR配列

名称	V <sub>H</sub> の CDR1配列	V <sub>H</sub> の CDR2配列	V <sub>H</sub> のCDR3 配列	式1: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3- FR4を有する完全長のV <sub>H</sub> 配列
1.1	配列番号1 DHAMH	配列番号2 GISWNS GSMGYA DSVKD	配列番号3 EKGPGLTG STADYYGL DV	配列番号4 EVQLLES <sup>GGGS</sup> VQPGRSLRLS <sup>CAASG</sup> FTFDDHAMHWVRQAPGK <sup>GLEWVSGI</sup> SWNSGSMGYADSVKDRFTISR <sup>DNAKS</sup> SLYLQMNSLRAEDTALYYCVREKGPGL TGSTADYYGLDVWGQGTMTV <sup>VSS</sup>
1.2	配列番号5 DYAMH	配列番号6 GISWNG GSMGYA ASVKG	配列番号7 DKGPGLIG STADYYGL DV	配列番号8 EVQLVES <sup>GGGLV</sup> QPGRSLRLS <sup>CAASG</sup> FTFDDYAMHWVRQAPGK <sup>DLEWVSGIS</sup> WNGGSMGYAASVKGRFTISR <sup>DNAKNS</sup> LYLQMNSLRAEDTALYYCVKDKGPGLI GSTADYYGLDVWGQGT <sup>TVTSS</sup>
1.3	配列番号9 DYAMH	配列番号 10 GISWNS GSMGYA DSVKD	配列番号11 DKGPGLIG STADYHGL DV	配列番号12 EVQLLES <sup>GGGLV</sup> QPGRSLRLS <sup>CAASG</sup> FTFDDYAMHWVRQAPGK <sup>GREWVSGI</sup> SWNSGSMGYADSVKDRFTISR <sup>DNAKN</sup> SLYLQMNSLRAEDTALYYCVKDKGPGLI IGSTADYHGLDVWGQGT <sup>TVTSS</sup>
1.4	配列番号 13 DYAMH	配列番号 14 GISWNG GSMGYA ESVKG	配列番号15 DKGPGLT GTTADYYG MDV	SEQ IS NO: 16 EVQLLES <sup>GGGLV</sup> QPGRSLRLS <sup>CAASG</sup> FTFADYAMHWVRQAPGK <sup>GREWVSGI</sup> SWNGGSMGYAESVKGRFTISR <sup>DNAKN</sup> SLYLQMNSLRAEDSALYYCVKDKGPGLI TGTTADYYGMDVWGQGT <sup>TVTSS</sup>
1.5	配列番号 17 DYAMH	配列番号 18 GISWNG GSMGYA DSVKD	配列番号19 DKGPGLIG STADYHGL DV	配列番号20 EVQLVES <sup>GGGLV</sup> QPGRSLRLS <sup>CAASG</sup> FTFDDYAMHWVRQAPGK <sup>GLEWVSGIS</sup> WNGGSMGYADSVKDRFTISR <sup>DNAKNS</sup> LYLQMNRLRAEDTALYYCVKDKGPGLI GSTADYHGLDVWGQGT <sup>TVTSS</sup>
1.6	配列番号 21 SYAMH	配列番号 22 GISWNS GSMGYA ESVKG	配列番号23 DKGPGLT GTTADYYG MDV	配列番号24 EVQLVES <sup>GGGV</sup> VQPGRSLRLS <sup>CAASG</sup> FTFSSYAMHWVRQAPGK <sup>GREWVSGI</sup> SWNSGSMGYAESVKGRFTISR <sup>DNAKN</sup> SLYLQMNSLRAEDSALYYCVKDKGPGLI TGTTADYYGMDVWGQGT <sup>TVTSS</sup>
1.7	配列番号 25 DYAMH	配列番号 26 GISWNG GSMGYA ESVKG	配列番号27 DKGPGLT GTTADYYG MDV	配列番号28 EVQLVES <sup>GGGVI</sup> QPGRSLRLS <sup>CAASG</sup> FTFDDYAMHWVRQAPGK <sup>GREWVSGI</sup> SWNGGSMGYAESVKGRFTISR <sup>DNAQ</sup> NSLYLQMNSLRAEDSALYYCVKDKGP GLTGTTADYYGMDVWGQGT <sup>TVTSS</sup>

10

20

30

40

【表 1 B】

1.8	配列番号 29 DYAMH	配列番号 30 GISWNS GSMGYA DSVKD	配列番号31 DKGPGLIG STADYHGL DV	配列番号32 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASG FTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGIS WNSGSMGYADSVKDRFTISRDNAKNS LYLQMNSLRAEDTALYYCVKDKGPGLI GSTADYHGLDVWGQGTDTVSS	
1.9	配列番号 33 DYAMH	配列番号 34 GISWNG GSMGYA ESVKG	配列番号35 DKGPGLIG STADYYG MDV	配列番号36 EVQLVESGGGCVQPGRSLRISCAASG FTFDDYAMHWVRQAPGKGREWVSGI SWNGGSMGYAESVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDSALYYCVKDKGPG LIGSTADYYGMDVWGQGTDTVSS	10
1.10	配列番号 37 DYAMH	配列番号 38 GISWNG GSMGYA ESVKG	配列番号39 DKGPGLT GTTADYYG MDV	配列番号40 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASG FTFADYAMHWVRQAPGKGREWVSGI SWNGGSMGYAESVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDSALYYCVKDKGPGL TGTTADYYGMDVWGQGTDTVSS	20
1.11	配列番号 41 DYAMH	配列番号 42 GISWNG GSMGYA ESVKG	配列番号43 DKGPGLIG STADYYGL DV	配列番号44 EVQLLESGGGFVQPGRSLRISCAASG FTFDDYAMHWVRQAPGKDLEWVSGIS WNGGSMGYAESVKGRFTISRDNAKNS LYLKMNSLRVEDTALYYCVKDKGPGLI GSTADYYGLDVWGQGTDTVSS	
1.12	配列番号 45 DYAMH	配列番号 46 GISWNG GSMGYA DSVKD	配列番号47 DKGPGLT GSTADYH GMDV	配列番号48 QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASG FTFDDYAMHWVRQAPGKGREWVSGI SWNGGSMGYADSVKDRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTALYYCVKDKGPGL TGSTADYHGMDVWGQGTDTVSS	30
1.13	配列番号 49 DYAMH	配列番号 50 GISWNG GSMGYA ASVKG	配列番号51 DKGPGLIG STADYYGL DV	配列番号52 QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASG FTFDDYAMHWVRQAPGKDLEWVSGIS WNGGSMGYAASVKGRFTISRDNAQN SLYLQMNSLRAEDTALYYCVKDKGPGL IGSTADYYGLDVWGQGTDTVSS	
1.14	配列番号 53 GYAMH	配列番号 54 GISWNS GSMGYA ESVKG	配列番号55 DKGPGLT GSTADYY GMDV	配列番号56 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASG FTFDGYAMHWVRQAPGKGREWVSGI SWNSGSMGYAESVKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDSALYYCVKDKGPGL TGSTADYYGMDVWGQGTDTVSS	40

【表 1 C】

1.15	配列番号 57 DYAMH	配列番号 58 GISWNS GSMGYA ESVKG	配列番号 59 DKGPGLIG STADYYG MDV	配列番号60 EVQLLES GGGLVQPGRSLRLSCTASG FTFDDYAMHWVRQAPGKGREWVSGI SWNSGSMGYAESVKGRFTISRDNACKN SLYLQMNSLRAEDSALYYCVKDKGPG LIGSTADYYGMDVWGQGT TVTVSS	
1.16	配列番号 61 DYAMH	配列番号 62 GISWNG GSMGYA ESVKG	配列番号63 DKGPGLIG STADYYG MDV	配列番号64 QVQLVES GGGLVQPGRSLRLS CAASG FTFDDYAMHWVRQAPGKGREWVSGI SWNGGSMGYAESVKGRFTISRDNACKN SLYLQMNSLRAEDSALYYCVKDKGPG LIGSTADYYGMDVWGQGT TVTVSS	10
1.17	配列番号 65 DYAMH	配列番号 66 GISWNS GSMGYA ASVKD	配列番号 67 DKGPGLIG STADYHGL DV	配列番号68 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASG FTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGIS WNSGSMGYAASVKDRFTISRDNACKNS LYLQMNSLT TEDTALYYCVKDKGPGLI GSTADYHGLDVWGQGT TVTVSS	20
1.18	配列番号 69 DYAMH	配列番号 70 GISWNG GSMGYA ASVKG	配列番号 71 DKGPGLIG STADYYGL DV	配列番号72 QVQLVES GGGLVQPGRSLRLS CAASG FTFDDYAMHWVRQAPGKDLEWVSGIS WNGGSMGYAASVKGRFTISRDNACKNS LYLQMNSLRAEDTALYYCVKDKGPGLI GSTADYYGLDVWGQGT TVTVSS	
1.19	配列番号 73 DYAMH	配列番号 74 GISWNG GSMGYA DSVKG	配列番号 75 EKGPGLTG STADYYGL DV	配列番号76 EVQLVES GGGLVQPGRSLRLS CAASG FTFDDYAMHWVRQAPGKDLEWVSGIS WNGGSMGYADSVKGRFTISRDNACKN SLYLQMNSLRAEDTALYYCVREKGPGL TGSTADYYGLDVWGQGT MVTVSS	30
1.20	配列番号 77 DYAMH	配列番号 78 GISWNG GSMGYA DSVKG	配列番号 79 EKGPGLTG STADYYGL DV	配列番号80 EVQLVES GGGLVQPGRSLRLS CAASG FTFDDYAMHWVRQAPGKDLEWVSGIS WNGGSMGYADSVKGRFTISRDNACKN SLYLQMNSLRAEDTALYYCVREKGPGL TGSTADYYGLDVWGQGT MVTVSS	
1.21	配列番号 101 DYAMH	配列番号 102 GISWNG GSMGYA ASVKG	配列番号 103 EKGPGLTG STADYYGL DV	配列番号104 EVQLVES GGGLVQPGRSLRLS CAASG FTFDDYAMHWVRQAPGKDLEWVSGIS WNGGSMGYAASVKGRFTISRDNACKNS LYLQMNSLRAEDTALYYCVREKGPGLT GSTADYYGLDVWGQGT MVTVSS	40

【表 1 D】

1.22	配列番号 105 DYAMH	配列番号 106 GISWNG GSMGYA ASVKG	配列番号 107 EKGPGLTG STADYYGL DA	配列番号108 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASG FTFDDYAMHWVRQAPGKDLEWVSGIS WNGGSMGYAASVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTALYYCVREKGPGLT GSTADYYGLDAWGQGTMTVSS	
1.23	配列番号 109 DYAMH	配列番号 110 GISWNS GSMGYA ASVKG	配列番号 111 EKGPGLTG STADYYGL DV	配列番号112 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASG FTFDDYAMHWVRQAPGKDLEWVSGIS WNSGSMGYAASVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTALYYCVREKGPGLT GSTADYYGLDVWGQGTMTVSS	10
1.24	配列番号 113 DYAMH	配列番号 114 GISWNS GSMGYA ASVKG	配列番号 115 EKGPGLTG STADYYGL DA	配列番号116 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASG FTFDDYAMHWVRQAPGKDLEWVSGIS WNSGSMGYAASVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTALYYCVREKGPGLT GSTADYYGLDAWGQGTMTVSS	20
1.25	配列番号 117 DYAMH	配列番号 118 GISWNG GSQGYA ASVKG	配列番号 119 EKGPGLTG STADYYGL DA	配列番号120 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASG FTFDDYAMHWVRQAPGKDLEWVSGIS WNGGSQGYAASVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTALYYCVREKGPGLT GSTADYYGLDAWGQGTMTVSS	
1.26	配列番号 121 DYAMH	配列番号 122 GISWNG GSMGYA DSVKG	配列番号 123 EKGPGLTG STADYYGL DA	配列番号124 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASG FTFDDYAMHWVRQAPGKDLEWVSGIS WNGGSMGYADSVKGRFTISRDNKNS SLYLQMNSLRAEDTALYYCVREKGPGLT TGSTADYYGLDAWGQGTMTVSS	30
1.27	配列番号 125 DYAMH	配列番号 126 GISWNG GSRGYA ASVKG	配列番号 127 EKGPGLTG STADYYGL DA	配列番号128 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASG FTFDDYAMHWVRQAPGKDLEWVSGIS WNGGSRGYAASVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTALYYCVREKGPGLT GSTADYYGLDAWGQGTMTVSS	
1.28	配列番号 129 DYAMH	配列番号 130 GISWNA GSMGYA ASVKG	配列番号 131 EKGPGLTG STADYYGL DA	配列番号132 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASG FTFDDYAMHWVRQAPGKDLEWVSGIS WNAGSMGYAASVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTALYYCVREKGPGLT GSTADYYGLDAWGQGTMTVSS	40

【表 1 E】

1.29	配列番号 133 DYAMH	配列番号 134 GISWNS GSMGYA DSVKG	配列番号 135 EKGPGLTG STADYYGL DV	配列番号136 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASG FTFDDYAMHWVRQAPGKDLEWVSGIS WNSGSMGYADSVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTALYYCVREKGPGLT GSTADYYGLDWWGQGTMTVSS	
1.30	配列番号 137 DYAGH	配列番号 138 GISWNG GSMGYA ASVKG	配列番号 139 EKGPGLTG STADYYGL DA	配列番号140 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASG FTFDDYAGHWVRQAPGKDLEWVSGIS WNGGSMGYAASVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTALYYCVREKGPGLT GSTADYYGLDAWGQGTMTVSS	10
1.31	配列番号 141 DYALH	配列番号 142 GISWNG GSMGYA ASVKG	配列番号 143 EKGPGLTG STADYYGL DA	配列番号144 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASG FTFDDYALHWVRQAPGKDLEWVSGIS WNGGSMGYAASVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTALYYCVREKGPGLT GSTADYYGLDAWGQGTMTVSS	20
1.32	配列番号 145 DYAMH	配列番号 146 GISWNS GSMGYA DSVKG	配列番号 147 EKGPGLTG STADYYGL DA	配列番号148 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASG FTFDDYAMHWVRQAPGKDLEWVSGIS WNSGSMGYADSVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTALYYCVREKGPGLT GSTADYYGLDAWGQGTMTVSS	
1.33	配列番号 149 DYAMH	配列番号 150 GISWNG GSYGYA DSVKG	配列番号 151 EKGPGLTG STADYYGL DA	配列番号152 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASG FTFDDYAMHWVRQAPGKDLEWVSGIS WNGGSYGYADSVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTALYYCVREKGPGLT GSTADYYGLDAWGQGTMTVSS	30
1.34	配列番号 153 DYAMH	配列番号 154 GISWNG GSQGYA DSVKG	配列番号 155 EKGPGLTG STADYYGL DA	配列番号156 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASG FTFDDYAMHWVRQAPGKDLEWVSGIS WNGGSQGYADSVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTALYYCVREKGPGLT GSTADYYGLDAWGQGTMTVSS	
1.35	配列番号 157 DYAMH	配列番号 158 GISWNG GSKGYA DSVKG	配列番号 159 EKGPGLTG STADYYGL DA	配列番号160 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASG FTFDDYAMHWVRQAPGKDLEWVSGIS WNGGSKGYADSVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTALYYCVREKGPGLT GSTADYYGLDAWGQGTMTVSS	40

【表 1 F】

1.36	配列番号 161 DYAMH	配列番号 162 GISWNA GSMGYA DSVKG	配列番号 163 EKGPGLTG STADYYGL DA	配列番号164 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASG FTFDDYAMHWVRQAPGKDLEWVSGIS WNAGSMGYADSVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTALYYCVREKGPGLT GSTADYYGLDAWGQGTMTVSS	
1.37	配列番号 165 DYAFH	配列番号 166 GISWNG GSMGYA DSVKG	配列番号 167 EKGPGLTG STADYYGL DA	配列番号168 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASG FTFDDYAFHWVRQAPGKDLEWVSGIS WNGGSMGYADSVKGRFTISRDNKN SLYLQMNSLRAEDTALYYCVREKGPGL TGSTADYYGLDAWGQGTMTVSS	10
1.38	配列番号 169 DYALH	配列番号 170 GISWNG GSMGYA DSVKG	配列番号 171 EKGPGLTG STADYYGL DA	配列番号172 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASG FTFDDYALHWVRQAPGKDLEWVSGIS WNGGSMGYADSVKGRFTISRDNKN SLYLQMNSLRAEDTALYYCVREKGPGL TGSTADYYGLDAWGQGTMTVSS	20
1.39	配列番号 173 DYALH	配列番号 174 GISWNG GSYGYA DSVKG	配列番号 175 EKGPGLTG STADYYGL DA	配列番号176 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASG FTFDDYALHWVRQAPGKDLEWVSGIS WNGGSYGYADSVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTALYYCVREKGPGLT GSTADYYGLDAWGQGTMTVSS	
1.40	配列番号 177 DYALH	配列番号 178 GISWNG GSQGYA DSVKG	配列番号 179 EKGPGLTG STADYYGL DA	配列番号180 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASG FTFDDYALHWVRQAPGKDLEWVSGIS WNGGSQGYADSVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTALYYCVREKGPGLT GSTADYYGLDAWGQGTMTVSS	30
1.41	配列番号 181 DYAFH	配列番号 182 GISWNG GSYGYA DSVKG	配列番号 183 EKGPGLTG STADYYGL DA	配列番号184 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASG FTFDDYAFHWVRQAPGKDLEWVSGIS WNGGSYGYADSVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTALYYCVREKGPGLT GSTADYYGLDAWGQGTMTVSS	
1.42	配列番号 185 DYAFH	配列番号 186 GISWNG GSQGYA DSVKG	配列番号 187 EKGPGLTG STADYYGL DA	配列番号188 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASG FTFDDYAFHWVRQAPGKDLEWVSGIS WNGGSQGYADSVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTALYYCVREKGPGLT GSTADYYGLDAWGQGTMTVSS	40

【表 1 G】

1.43	配列番号 189 DYAFH	配列番号 190 GISWNA GSYGYA DSVKG	配列番号 191 EKGPGLTG STADYYGL DA	配列番号192 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASG FTFDDYAFHWVRQAPGKDLEWVSGIS WNAGSYGYADSVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTALYYCVREKGPGLT GSTADYYGLDAWGQGTMTVSS	10
1.44	配列番号 193 DYALH	配列番号 194 GISWNS GSYGYA DSVKG	配列番号 195 EKGPGLTG STADYYGL DA	配列番号196 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASG FTFDDYALHWVRQAPGKDLEWVSGIS WNSGSYGYADSVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTALYYCVREKGPGLT GSTADYYGLDAWGQGTMTVSS	20
1.45	配列番号 197 DYALH	配列番号 198 GISWNA GSQGYA DSVKG	配列番号 199 EKGPGLTG STADYYGL DA	配列番号200 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASG FTFDDYALHWVRQAPGKDLEWVSGIS WNAGSQGYADSVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTALYYCVREKGPGLT GSTADYYGLDAWGQGTMTVSS	30
1.46	配列番号 201 DYALH	配列番号 202 GISWNA GSYGYA DSVKG	配列番号 203 EKGPGLTG STADYYGL DA	配列番号204 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASG FTFDDYALHWVRQAPGKDLEWVSGIS WNAGSYGYADSVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTALYYCVREKGPGLT GSTADYYGLDAWGQGTMTVSS	40
1.47	配列番号 205 DYAFH	配列番号 206 GISWNS GSYGYA DSVKG	配列番号 207 EKGPGLTG STADYYGL DA	配列番号208 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASG FTFDDYAFHWVRQAPGKDLEWVSGIS WNSGSYGYADSVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTALYYCVREKGPGLT GSTADYYGLDAWGQGTMTVSS	
1.48	配列番号 209 DYALH	配列番号 210 GISWNS GSQGYA DSVKG	配列番号 211 EKGPGLTG STADYYGL DA	配列番号212 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASG FTFDDYALHWVRQAPGKDLEWVSGIS WNSGSQGYADSVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTALYYCVREKGPGLT GSTADYYGLDAWGQGTMTVSS	
1.49	配列番号 213 DYAFH	配列番号 214 GISWNS GSQGYA DSVKG	配列番号 215 EKGPGLTG STADYYGL DA	配列番号216 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASG FTFDDYAFHWVRQAPGKDLEWVSGIS WNSGSQGYADSVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTALYYCVREKGPGLT GSTADYYGLDAWGQGTMTVSS	

【表 1 H】

1.50	配列番号 217 DYAFH	配列番号 218 GISWNA GSQGYA DSVKG	配列番号 219 EKGPGLTG STADYYGL DA	配列番号220 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASG FTFDDYAFHWVRQAPGKDLWVSGIS WNAGSQGYADSVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTALYYCVREKGPGLT GSTADYYGLDAWGQGTMTVSS
------	----------------------	------------------------------------------	-------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

10

## 【0116】

一実施形態では、本発明は、以下のTable 2(表2)に示されるCDR3配列、又はそれと少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、若しくはそれより高い配列同一性を有する配列を含むヒトPD-1に結合する単離されたシングルV<sub>H</sub>ドメイン抗体に関する。一実施形態では、前記配列同一性は、少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%である。一実施形態では、前記配列同一性は、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%である。一実施形態では、V<sub>H</sub>シングルドメイン抗体は、配列番号253、又は配列番号253と少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、又は少なくとも95%の同一性を有する配列を含むCDR3を有する。一実施形態では、前記配列同一性は、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%である。

20

## 【0117】

一実施形態では、V<sub>H</sub>シングルドメイン抗体は、配列番号251又は1若しくは2個のアミノ酸置換を有する配列番号251に示されるCDR1、配列番号252又は1から5個のアミノ酸置換を有する配列番号252に示されるCDR2、及び配列番号253又は1から5個のアミノ酸置換を有する配列番号253に示されるCDR3を有する。

## 【0118】

一実施形態では、V<sub>H</sub>シングルドメイン抗体は、Table 2(表2)のCDR1、2、及び3配列、又はその組合せから選択されるCDR1、2、及び3配列の組合せを含む。一実施形態では、V<sub>H</sub>シングルドメイン抗体は、Table 2(表2)におけるクローンのいずれかに関して示されるCDR1、2、及び3配列の組から選択される一組のCDR1、2、及び3配列を含む。このように、一態様では、単離されたシングルドメイン抗体は、完全長の配列である配列番号254、258、262、266、270、274、278、282、286、290、294、298、302、306、310、314、318、322、326、330、334、338、342、346、350、354、358、362、366、370、374、378、382、386、390、394、398、402、406、410、414、418、422、426、430、434、438、442、446、450、454、458、又は462のCDR1~3から選択されるCDR1、CDR2、及びCDR3を含む。

30

## 【0119】

したがって、一実施形態では、V<sub>H</sub>シングルドメイン抗体は、配列番号251を有するCDR1、配列番号252を有するCDR2、及び配列番号253を有するCDR3(配列番号254のCDR)等々を含む。このように、V<sub>H</sub>シングルドメイン抗体は、以下のCDRの組合せ:配列番号251、252、253;配列番号255、256、257;配列番号259、260、261;配列番号263、264、265;配列番号267、268、269;配列番号271、272、273;配列番号275、276、277;配列番号279、280、281;配列番号283、284、285;配列番号287、288、289;配列番号291、292、293;配列番号295、296、297;配列番号299、300、301;配列番号303、304、305;配列番号307、308、309;配列番号311、312、313;配列番号315、316、317;配列番号319、320、321;配列番号323、324、325;配列番号327、328、329;配列番号331、332、333;配列番号335、336、337;配列番号339、340、341;配列番号343、344、345;配列番号347、348、349;配列番号351、352、353;配列番号355、356、357;配列番号359、360、361;配列番号363、364、365;配列番号367、368、369;配列番号371、372、373;配列番号275、376、377;配列番号379、380、381;配列番号383

40

50

、384、385;配列番号387、388、389;配列番号391、392、393;配列番号395、396、397;配列番号399、400、401;配列番号403、404、405;配列番号407、408、409;配列番号411、412、413;配列番号415、416、417;配列番号419、420、421;配列番号423、424、425;配列番号427、428、429;配列番号431、432、433;配列番号435、436、437;配列番号439、440、441;配列番号443、444、445;配列番号447、448、449;配列番号451、452、453;配列番号455、456、457、又は配列番号459、460、461のうちの一つを含む。

【0120】

別の実施形態では、前記CDR1は、配列番号251のアミノ酸配列、又はそれと少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%の相同性を有する配列を含むか、又はからなる。一実施形態では、前記CDR2は、配列番号252のアミノ酸配列、又はそれと少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%の相同性を有する配列を含むか、又はからなる。一実施形態では、前記CDR3は、配列番号253のアミノ酸配列、又はそれと少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは99%の相同性を有する配列を含むか、又はからなる。

10

【0121】

別の実施形態では、 $V_H$ シングルドメイン抗体は、Table 2(表2)に示される $V_H$ シングルドメイン抗体2.1~2.53のうちいずれか一つに関して示されるポリペプチド配列、又はそれと少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、若しくはそれより高い配列相同性を有する配列を含むか、又はからなる。このように、 $V_H$ シングルドメイン抗体は、配列番号254、258、262、266、270、274、278、282、286、290、294、298、302、306、310、314、318、322、326、330、334、338、342、346、350、354、358、362、366、370、374、378、382、386、390、394、398、402、406、410、414、418、422、426、430、434、438、442、446、450、454、458、若しくは462から選択されるアミノ酸配列、又はそれと少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、若しくはそれより高い配列相同性を有する配列を含むか、又はからなる。一実施形態では、 $V_H$ シングルドメイン抗体は、配列番号298、302、306、310、314、318、322、326、330、334、338、342、346、350、354、358、362、366、370、374、378、382、386、390、394、398、402、406、410、414、418、422、426、430、434、438、442、446、450、454、458、若しくは462、又はそれと少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、若しくはそれより高い配列相同性を有する配列を含むか、又はからなる。一実施形態では、 $V_H$ シングルドメイン抗体は、254若しくは298、又はそれと少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、若しくはそれより高い配列相同性を有する配列を含むか、又はからなる。一実施形態では、前記配列相同性は、少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%である。

20

30

【0122】

40

【表 2 A】

Table 2 V<sub>H</sub>シングルドメイン抗体の完全長の配列及びCDR配列

名称	V <sub>H</sub> の CDR1配 列	V <sub>H</sub> の CDR2配列	V <sub>H</sub> の CDR3配列	完全長のVH配列
2.1	配列番号 251 DYAMS	配列番号 252 GITWNG GSTGYAD SVKD	配列番号 253 DKYSYA WSYDGF DI	配列番号254 EVQLVESGGGVWRPGGSLRLSCAASGFTF DDYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITWNGGS TGYADSVKDRFTISRDNKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCVRDKYSYAWSYDGFDIWGQG TMVTVSS
2.2	配列番号 255 DYGMS	配列番号 256 GISRNGG SAGYSD SAKD	配列番号 257 EKYSSG WSYDDF DI	配列番号258 EVQLLESGGGVWRPGGSLRLSCAASGFTF DDYGMSWVRQPPGKGLEWVSGISRNGGS AGYSDSAKDRFTISRDNKNSLYLQMNSL RADDTAMYYCAREKYSSGWSYDDFDIWG QGTMTVSS
2.3	配列番号 259 DYGMS	配列番号 260 GISRNGG SAGYSD SAKD	配列番号 261 EKYSSG WSYDDF DI	配列番号262 QVQLVESGGGVWRPGGSLRLSCAASGFTF DDYGMSWVRQSPGKGLEWVSGISRNGGS AGYSDSAKDRFTISRDNKNSLYLQMNSL RADDTAMYYCAREKYSSGWSYDDFDIWG QGTMTVSS
2.4	配列番号 263 DYGMS	配列番号 264 GISRNGG SAGYSD SAKD	配列番号 265 EKYSSG WSYDDF DI	配列番号266 QVQLVESGGGVWRPGGSLRLSCAASGFTF DDYGMSWVRQPPGKGLEWVSGISRNGGS AGYSDSAKDRFTISRDNKNSLYLQMNSL RADDTAMYYCAREKYSSGWSYDDFDIWG QGTMTVSS
2.5	配列番号 267 DYGMS	配列番号 268 GISRNGG SAGYSD SAKD	配列番号 269 EKYSSG WSYDDF DI	配列番号270 EVQLVESGGGVWRPGGSLRLSCAASGFTF DDYGMSWVRQPPGKGLEWVSGISRNGGS AGYSDSAKDRFTISRDNKNSLYLQMNSL RADDTAMYYCAREKYSSGWSYDDFDIWG QGTMTVSS
2.6	配列番号 271 DYGMS	配列番号 272 GISRNGG STGYADS VKD	配列番号 273 DPYSSG WSYDSF DI	配列番号274 QVQLVESGGGVVRLGGSLRLSCAASGFSS VDYGMSWVRQAPGQGLEWVSGISRNGG STGYADSVKDRFTISRDNKNTLYLQMNSL RAEDTALYYCARDPYSSGWSYDSFDIWGQ GTMVTVSS

10

20

30

40

【表 2 B】

2.7	配列番号 275 DYGMS	配列番号 276 GISRNGG STGYTAS VKD	配列番号 277 EKYSSG WSYDDF DI	配列番号278 QVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTF DDYGMSWVRQAPGKGLEWVSGISRNGGS TGYTASVKDRFTISRDNANKNSLYLQMNSLR ADDTAMYCCAREKYSSGWSYDDFDIWGQ GTMVTVSS	
2.8	配列番号 279 DYAMS	配列番号 280 GISWNG GSAGYA DSVKD	配列番号 281 DPHSSA WSYDAF DI	配列番号282 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF DDYAMSWVRQAPGKGLEWVSGISWNGG SAGYADSVKDRFTISRDNANKNSLYLQMNSL RAEDTALYYCARDPHSSAWSYDAFDIWGQ GTMVTVSS	10
2.9	配列番号 283 DYAMS	配列番号 284 GISWNG GSKGYA DSVKD	配列番号 285 DPYSGA WSYDAF DI	配列番号286 QVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTF DDYAMSWVRQAPGKGLEWVSGISWNGG SKGYADSVKDRFTISRDNANKNSLYLQMNSL RAEDTALYYCARDPYSGAWSYDAFDIWGQ GTMVTVSS	20
2.10	配列番号 287 DYAMS	配列番号 288 GISWNG GSTGYAD SVKD	配列番号 289 DPYSGA WSYDAF DI	配列番号290 QVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTF DDYAMSWVRQAPGKGLEWVSGISWNGG STGYADSVKDRFTISRDNANKNSLYLQMNSL RAEDTALYYCARDPYSGAWSYDAFDIWGQ GTMVTVSS	
2.11	配列番号 291 NYAMS	配列番号 292 GITWNG GSTGYAD SVKD	配列番号 293 DKYSYA WSYDTF DI	配列番号294 QVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTF DNYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITWNGGS TGYADSVKDRFTISRDNANKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCARDKYSYAWSYDTDFIRGQG TMVTVSS	30
2.12	配列番号 295 DYAMS	配列番号 296 GITWNAG STGYADS VKG	配列番号 297 DKYSYA WSYDDF DI	配列番号298 EVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTF DDYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITWNAGS TGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCVRDKYSYAWSYDDFDIWGQG TMVTVSS	
2.13	配列番号 299 DYAMS	配列番号 300 GITWNR GSTGYAD SVKG	配列番号 301 DKYSYA WSYDDF DI	配列番号302 EVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTF DDYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITWNRGS TGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCVRDKYSYAWSYDDFDIWGQG TMVTVSS	40

【表 2 C】

2.14	配列番号 303 DYAFS	配列番号 304 GITWNG GSTGYAD SVKG	配列番号 305 DKYSYA WSYDGF DI	配列番号306 EVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTF DDYAFSWVRQAPGKGLEWVSGITWNGGS TGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCVRDKYSYAWSYDGFDIWGQG TMVTVSS	
2.15	配列番号 307 DYAQS	配列番号 308 GITWNG GSTGYAD SVKG	配列番号 309 DKYSYA WSYDGF DI	配列番号310 EVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTF DDYAQSWVRQAPGKGLEWVSGITWNGGS TGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCVRDKYSYAWSYDGFDIWGQG TMVTVSS	10
2.16	配列番号 311 DYANS	配列番号 312 GITWNG GSTGYAD SVKG	配列番号 313 DKYSYA WSYDGF DI	配列番号314 EVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTF DDYANSWVRQAPGKGLEWVSGITWNGGS TGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCVRDKYSYAWSYDGFDIWGQG TMVTVSS	20
2.17	配列番号 315 DYAGS	配列番号 316 GITWNG GSTGYAD SVKG	配列番号 317 DKYSYA WSYDGF DI	配列番号318 EVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTF DDYAGSWVRQAPGKGLEWVSGITWNGGS TGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCVRDKYSYAWSYDGFDIWGQG TMVTVSS	
2.18	配列番号 319 DYAES	配列番号 320 GITWNG GSTGYAD SVKG	配列番号 321 DKYSYA WSYDGF DI	配列番号322 EVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTF DDYAESWVRQAPGKGLEWVSGITWNGGS TGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCVRDKYSYAWSYDGFDIWGQG TMVTVSS	30
2.19	配列番号 323 DYAWS	配列番号 324 GITWNG GSTGYAD SVKG	配列番号 325 DKYSYA WSYDGF DI	配列番号326 EVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTF DDYAWSWVRQAPGKGLEWVSGITWNGG STGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSL RAEDTALYYCVRDKYSYAWSYDGFDIWGQ GTMVTVSS	
2.20	配列番号 327 DYAVS	配列番号 328 GITWNG GSTGYAD SVKG	配列番号 329 DKYSYA WSYDGF DI	配列番号330 EVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTF DDYAVSWVRQAPGKGLEWVSGITWNGGS TGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCVRDKYSYAWSYDGFDIWGQG TMVTVSS	40

【表 2 D】

2.21	配列番号 331 DYALS	配列番号 332 GITWNG GSTGYAD SVKG	配列番号 333 DKYSYA WSYDGF DI	配列番号334 EVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTF DDYALSWVRQAPGKGLEWVSGITWNGGS TGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCVRDKYSYAWSYDGFDIWGQG TMVTVSS	
2.22	配列番号 335 DYASS	配列番号 336 GITWNG GSTGYAD SVKG	配列番号 337 DKYSYA WSYDGF DI	配列番号338 EVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTF DDYASSWVRQAPGKGLEWVSGITWNGGS TGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCVRDKYSYAWSYDGFDIWGQG TMVTVSS	10
2.23	配列番号 339 DYARS	配列番号 340 GITWNG GSTGYAD SVKG	配列番号 341 DKYSYA WSYDGF DI	配列番号342 EVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTF DDYARSWVRQAPGKGLEWVSGITWNGGS TGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCVRDKYSYAWSYDGFDIWGQG TMVTVSS	20
2.24	配列番号 343 DYAMS	配列番号 344 GITWNSG STGYADS VKD	配列番号 345 DKYSYA WSYDDF DI	配列番号346 EVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTF DDYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITWNSGS TGYADSVKDRFTISRDNANKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCVRDKYSYAWSYDDFDIWGQG TMVTVSS	
2.25	配列番号 347 DYAMS	配列番号 348 GITWNQ GSTGYAD SVKD	配列番号 349 DKYSYA WSYDDF DI	配列番号350 EVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTF DDYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITWNQGS TGYADSVKDRFTISRDNANKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCVRDKYSYAWSYDDFDIWGQG TMVTVSS	30
2.26	配列番号 351 DYAMS	配列番号 352 GITWNH GSTGYAD SVKD	配列番号 353 DKYSYA WSYDVF DI	配列番号354 EVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTF DDYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITWNHGS TGYADSVKDRFTISRDNANKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCVRDKYSYAWSYDVFDIWGQG TMVTVSS	
2.27	配列番号 355 DYAMS	配列番号 356 GITWNAG STGYADS VKD	配列番号 357 DKYSYA WSYDDF DI	配列番号358 EVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTF DDYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITWNAGS TGYADSVKDRFTISRDNANKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCVRDKYSYAWSYDDFDIWGQG TMVTVSS	40

【表 2 E】

2.28	配列番号 359 DYAMS	配列番号 360 GITWNG GSTGYAD SVKG	配列番号 361 DKYSYA WSYDVF DI	配列番号362 EVQLVESGGGVWRP GGSLRLS CAASGFTF DDYAMSWVRQAPGK GLEWVSGITWNGGS TGYADSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCVRDKYS YAWSYDVF DIWGQG TMVTVSS	
2.29	配列番号 363 DYAMS	配列番号 364 GITWNG GSTGYAD SVKG	配列番号 365 DKYSYA WSYDDF DI	配列番号366 EVQLVESGGGVWRP GGSLRLS CAASGFTF DDYAMSWVRQAPGK GLEWVSGITWNGGS TGYADSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCVRDKYS YAWSYDDF DIWGQG TMVTVSS	10
2.30	配列番号 367 DYAMS	配列番号 368 GITWNGK STGYADS VKD	配列番号 369 DKYSYA WSYDDF DI	配列番号370 EVQLVESGGGVWRP GGSLRLS CAASGFTF DDYAMSWVRQAPGK GLEWVSGITWNGKS TGYADSVKDRFTISR DNAKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCVRDKYS YAWSYDDF DIWGQG TMVTVSS	20
2.31	配列番号 371 DYAMS	配列番号 372 GITWNR GSTGYAD SVKD	配列番号 373 DKYSYA WSYDDF DI	配列番号374 EVQLVESGGGVWRP GGSLRLS CAASGFTF DDYAMSWVRQAPGK GLEWVSGITWNRGS TGYADSVKDRFTISR DNAKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCVRDKYS YAWSYDDF DIWGQG TMVTVSS	
2.32	配列番号 375 DYAIS	配列番号 376 GITWNG GSTGYAD SVKD	配列番号 377 DKYSYA WSYDGF DI	配列番号378 EVQLVESGGGVWRP GGSLRLS CAASGFTF DDYAISWVRQAPGK GLEWVSGITWNGGS TGYADSVKDRFTISR DNAKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCVRDKYS YAWSYDGF DIWGQG TMVTVSS	30
2.33	配列番号 379 DYATS	配列番号 380 GITWNG GSTGYAD SVKD	配列番号 381 DKYSYA WSYDGF DI	配列番号382 EVQLVESGGGVWRP GGSLRLS CAASGFTF DDYATSWVRQAPGK GLEWVSGITWNGGS TGYADSVKDRFTISR DNAKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCVRDKYS YAWSYDGF DIWGQG TMVTVSS	
2.34	配列番号 383 DYANS	配列番号 384 GITWNG GSTGYAD SVKD	配列番号 385 DKYSYA WSYDGF DI	配列番号386 EVQLVESGGGVWRP GGSLRLS CAASGFTF DDYANSWVRQAPGK GLEWVSGITWNGGS TGYADSVKDRFTISR DNAKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCVRDKYS YAWSYDGF DIWGQG TMVTVSS	40

【表 2 F】

2.35	配列番号 387 DYADS	配列番号 388 GITWNG GSTGYAD SVKD	配列番号 389 DKYSYA WSYDGF DI	配列番号390 EVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTF DDYADSWVRQAPGKGLEWVSGITWNGGS TGYADSVKDRFTISRDNKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCVRDKYSYAWSYDGFDIWGQG TMVTVSS	
2.36	配列番号 391 DYASS	配列番号 392 GITWNG GSTGYAD SVKD	配列番号 393 DKYSYA WSYDGF DI	配列番号394 EVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTF DDYASSWVRQAPGKGLEWVSGITWNGGS TGYADSVKDRFTISRDNKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCVRDKYSYAWSYDGFDIWGQG TMVTVSS	10
2.37	配列番号 395 DYALS	配列番号 396 GITWNG GSTGYAD SVKD	配列番号 397 DKYSYA WSYDGF DI	配列番号398 EVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTF DDYALSWVRQAPGKGLEWVSGITWNGGS TGYADSVKDRFTISRDNKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCVRDKYSYAWSYDGFDIWGQG TMVTVSS	20
2.38	配列番号 399 DYAGS	配列番号 400 GITWNG GSTGYAD SVKD	配列番号 401 DKYSYA WSYDGF DI	配列番号402 EVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTF DDYAGSWVRQAPGKGLEWVSGITWNGGS TGYADSVKDRFTISRDNKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCVRDKYSYAWSYDGFDIWGQG TMVTVSS	
2.39	配列番号 403 DYAES	配列番号 404 GITWNG GSTGYAD SVKD	配列番号 405 DKYSYA WSYDGF DI	配列番号406 EVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTF DDYAESWVRQAPGKGLEWVSGITWNGGS TGYADSVKDRFTISRDNKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCVRDKYSYAWSYDGFDIWGQG TMVTVSS	30
2.40	配列番号 407 DYAWS	配列番号 408 GITWNG GSTGYAD SVKD	配列番号 409 DKYSYA WSYDGF DI	配列番号410 EVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTF DDYAWSWVRQAPGKGLEWVSGITWNGG STGYADSVKDRFTISRDNKNSLYLQMNSL RAEDTALYYCVRDKYSYAWSYDGFDIWGQ GTMVTVSS	
2.41	配列番号 411 DYARS	配列番号 412 GITWNG GSTGYAD SVKD	配列番号 413 DKYSYA WSYDGF DI	配列番号414 EVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTF DDYARSWVRQAPGKGLEWVSGITWNGGS TGYADSVKDRFTISRDNKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCVRDKYSYAWSYDGFDIWGQG TMVTVSS	40

【表 2 G】

2.42	配列番号 415 DYAFS	配列番号 416 GITWNG GSTGYAD SVKD	配列番号 417 DKYSYA WSYDGF DI	配列番号418 EVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTF DDYAFSWVRQAPGKGLEWVSGITWNGGS TGYADSVKDRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCVRDKYSYAWSYDGFDIWGQG TMVTVSS	
2.43	配列番号 419 DYAVS	配列番号 420 GITWNG GSTGYAD SVKD	配列番号 421 DKYSYA WSYDGF DI	配列番号422 EVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTF DDYAVSWVRQAPGKGLEWVSGITWNGGS TGYADSVKDRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCVRDKYSYAWSYDGFDIWGQG TMVTVSS	10
2.44	配列番号 423 DYAMS	配列番号 424 GITWTGG STGYADS VKD	配列番号 425 DKYSYA WSYDGF DI	配列番号426 EVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTF DDYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITWTGGS TGYADSVKDRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCVRDKYSYAWSYDGFDIWGQG TMVTVSS	20
2.45	配列番号 427 DYAMS	配列番号 428 GITWSG GSTGYAD SVKD	配列番号 429 DKYSYA WSYDGF DI	配列番号430 EVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTF DDYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITWSGGS TGYADSVKDRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCVRDKYSYAWSYDGFDIWGQG TMVTVSS	
2.46	配列番号 431 DYAMS	配列番号 432 GITWPG GSTGYAD SVKD	配列番号 433 DKYSYA WSYDGF DI	配列番号434 EVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTF DDYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITWPGGS TGYADSVKDRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCVRDKYSYAWSYDGFDIWGQG TMVTVSS	30
2.47	配列番号 435 DYAMS	配列番号 436 GITWIGG STGYADS VKD	配列番号 437 DKYSYA WSYDGF DI	配列番号438 EVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTF DDYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITWIGGS TGYADSVKDRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCVRDKYSYAWSYDGFDIWGQG TMVTVSS	
2.48	配列番号 439 DYAMS	配列番号 440 GITWLGG STGYADS VKD	配列番号 441 DKYSYA WSYDGF DI	配列番号442 EVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTF DDYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITWLGGGS TGYADSVKDRFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCVRDKYSYAWSYDGFDIWGQG TMVTVSS	40

【表 2 H】

2.49	配列番号 443 DYAMS	配列番号 444 GITWNG GSTGYAD SVKG	配列番号 445 DKYSYA WSYDGF DI	配列番号446 EVQLVESGGGVVRRPGGSLRLSCAASGFTF DDYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITWNGGS TGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCVRDKYSYAWSYDGFDIWGQG TMVTVSS	
2.50	配列番号 447 DYAMS	配列番号 448 GITWKG GSTGYAD SVKD	配列番号 449 DKYSYA WSYDGF DI	配列番号450 EVQLVESGGGVVRRPGGSLRLSCAASGFTF DDYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITWKGGS TGYADSVKDRFTISRDNKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCVRDKYSYAWSYDGFDIWGQG TMVTVSS	10
2.51	配列番号 451 DYAMS	配列番号 452 GITWRG GSTGYAD SVKD	配列番号 453 DKYSYA WSYDGF DI	配列番号454 EVQLVESGGGVVRRPGGSLRLSCAASGFTF DDYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITWRGGS TGYADSVKDRFTISRDNKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCVRDKYSYAWSYDGFDIWGQG TMVTVSS	20
2.52	配列番号 455 DYAMS	配列番号 456 GITWNG GSTGYAD SVKD	配列番号 457 DKYSYA WSYDVF DI	配列番号458 EVQLVESGGGVVRRPGGSLRLSCAASGFTF DDYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITWNGGS TGYADSVKDRFTISRDNKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCVRDKYSYAWSYDVFDIWGQG TMVTVSS	
2.53	配列番号 459 DYAMS	配列番号 460 GITWNG GSTGYAD SVKD	配列番号 461 DKYSYA WSYDDF DI	配列番号462 EVQLVESGGGVVRRPGGSLRLSCAASGFTF DDYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITWNGGS TGYADSVKDRFTISRDNKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCVRDKYSYAWSYDDFDIWGQG TMVTVSS	30

## 【0130】

一部の実施形態では、本発明は、1つ又は複数のアミノ酸置換、欠失、挿入、又は他の改変を有する上記のシングルV<sub>H</sub>ドメイン抗体のいずれかの多様体であり、シングルドメイン抗体の生物機能を保持しているV<sub>H</sub>シングルドメイン抗体を提供する。このように、多様体V<sub>H</sub>シングルドメイン抗体の配列を、操作することができる。改変は、ネイティブ配列のV<sub>H</sub>ドメイン抗体又はポリペプチドと比較してアミノ酸配列に変化が起こる少なくとも1つ

の置換、欠失、又は挿入を含む。アミノ酸置換は、1つのアミノ酸の、類似の構造及び/又は化学特性を有する別のアミノ酸への交換、例えばロイシンのセリンへの交換、すなわち保存的アミノ酸交換の結果でありうる。挿入又は欠失は、任意選択で約1から10、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、若しくは10アミノ酸、又は1から20アミノ酸の範囲でありうる。配列においてアミノ酸の挿入、欠失、又は置換を系統的に作製すること、及び得られた多様体を、完全長又は成熟ネイティブ配列によって示される活性に関して試験することによって、許容される多様性を決定してもよい。本明細書に記載されるV<sub>H</sub>シングルドメイン抗体の多様体は、非多様体分子と少なくとも75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の配列相同性を有し、好ましくは少なくとも95%、96%、97%、98%、又は99%の

10

20

30

40

50

配列相同性を有する。

【0131】

一実施形態では、改変は、保存的配列改変である。本明細書において使用される場合、用語「保存的配列改変」は、アミノ酸配列を含む抗体の結合特徴に有意に影響を及ぼさない又は変化させないアミノ酸改変を指すと意図される。そのような保存的改変は、アミノ酸置換、付加、及び欠失を含む。改変は、当技術分野で公知の標準的な技術、例えば部位特異的変異誘発及びPCR媒介変異誘発によって本発明の抗体に導入することができる。保存的アミノ酸置換は、アミノ酸残基を、類似の側鎖を有するアミノ酸残基と交換する置換である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーが当技術分野で定義されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖(例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電極性側鎖(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(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)、ベータ分岐側鎖(例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン)、及び芳香族側鎖(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)を有するアミノ酸が挙げられる。このように、本発明のシングルドメイン抗体のCDR領域内の1つ又は複数のアミノ酸残基を、同じ側鎖ファミリーからの他のアミノ酸残基と交換することができ、変化した抗体を、本明細書に記載される機能的アッセイを使用して機能(すなわち、上記の(c)から(i)に記載の機能)の保持に関して試験することができる。

10

20

【0132】

一実施形態では、本発明は、非改変のシングルドメイン抗体と比較して、1つ又は複数の配列改変を含み、結合親和性、特異性、熱安定性、発現レベル、エフェクター機能、グリコシル化、低減された免疫原性、又は溶解性等の特性の1つ又は複数が改善されている、Table 1又はTable 2(表1又は表2)に示される抗体から選択されるシングルドメイン抗体の多様体であるV<sub>H</sub>シングルドメイン抗体を提供する。

【0133】

一実施形態では、シングルドメイン抗体の免疫原性を減少させる改変を行うことができる。例えば、1つのアプローチは、1つ又は複数のフレームワーク残基を、対応するヒト生殖系列配列に復帰させることである。より具体的には、体細胞変異を受けたシングルドメイン抗体は、シングルドメイン抗体が由来する生殖系列配列とは異なるフレームワーク残基を含んでもよい。そのような残基は、シングルドメイン抗体フレームワーク配列を、シングルドメイン抗体が由来する生殖系列配列と比較することによって同定することができる。

30

【0134】

フレームワーク領域配列におけるアミノ酸残基の1つ又は複数、その生殖系列構成に戻すために、例えば部位特異的変異誘発又はPCR媒介変異誘発によって、体細胞変異を生殖系列配列に「逆変異」させることができる。

【0135】

別のタイプのフレームワーク改変は、T細胞エピトープを除去するために、フレームワーク領域内の、又は更に1つ若しくは複数のCDR領域内の1つ又は複数の残基を変異させ、それによって抗体の潜在的免疫原性を低減させることを伴う。

40

【0136】

なお別の実施形態では、抗体のグリコシル化を改変する。例えば、無グリコシル化抗体(すなわち、抗体はグリコシル化を欠如する)を作製することができる。グリコシル化を、例えば、抗原に対する抗体の親和性を増加させるように変化させることができる。そのような炭水化物改変は、例えば抗体配列内のグリコシル化の1つ又は複数の部位を変化させることによって行うことができる。例えば、それによって1つ又は複数の可変領域フレームワークグリコシル化部位が除去され、それによってその部位でのグリコシル化が除去される1つ又は複数のアミノ酸置換を行うことができる。そのような無グリコシル化は、抗原に対する抗体の親和性を増加させうる。

50

## 【 0 1 3 7 】

当業者は、本明細書に記載される抗原結合分子を同定する、得る、及び最適化するために、*in vitro*及び*in vivo*発現ライブラリを含む異なる方法が存在することを承知しているであろう。これを実施例において更に説明する。ディスプレイ(例えば、リボソーム及び/又はファージディスプレイ)及び/又は変異誘発(例えば、誤りがちな変異誘発)等の、当技術分野で公知の最適化技術を使用することができる。したがって、本発明はまた、本明細書に記載のシングルドメイン抗体の配列最適化多様体も含む。

## 【 0 1 3 8 】

一実施形態では、多様体 $V_H$ シングルドメイン抗体は、配列番号4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48、52、56、60、64、68、72、76、80、104、108、112、116、120、124、128、132、136、140、144、148、152、156、160、164、168、172、176、180、184、188、192、196、200、204、208、212、216、220、又は254、258、262、266、270、274、278、282、286、290、294、298、302、306、310、314、318、322、326、330、334、338、342、346、350、354、358、362、366、370、374、378、382、386、390、394、398、402、406、410、414、418、422、426、430、434、438、442、446、450、454、458又は462のうちのいずれか1つから選択されるが、これらの配列と比較して1つ又は複数のアミノ酸置換、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10個のアミノ酸置換を含む。一実施形態では、1つ又は複数のアミノ酸置換は、フレームワーク領域の1つ又は複数に存在する。別の実施形態では、1つ又は複数のアミノ酸置換はCDRの1つ又は複数に存在する。一実施形態では、アミノ酸置換は、フレームワークに及びCDR配列に存在する。一実施形態では、シングルドメイン抗体は、配列番号4、若しくは136、又は1つ若しくは複数のアミノ酸置換、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、若しくは10個のアミノ酸置換を含む配列を含む、又はからなる。

## 【 0 1 3 9 】

一実施形態では、 $V_H$ シングルドメイン抗体は、以下の位置:5L、32H、44G、55S、66D、77S及び/又は105Tのうちの1つ又は複数又は全てでアミノ酸置換を有する配列番号4を含む。一実施形態では、 $V_H$ シングルドメイン抗体は、以下:

- a) 5L V、11S L、32H Y、44G D、55S G、62D A、66D G、及び77S N、又は
- b) 5L V、11S L、32H Y、44G D、55S G、66D G、及び77S N、又は
- c) 1E Q、5L V、11S L、32H Y、44G D、55S G、66D G、77S N、98R K、99E D、105T I、及び102M T

のうちの1つから選択されるアミノ酸置換を有する配列番号4を含む。

## 【 0 1 4 0 】

一実施形態では、 $V_H$ シングルドメイン抗体は、以下の位置:M34、M58、V102、V116のうちの1つ又は複数又は全てでアミノ酸置換を有する配列番号136を含む。一実施形態では、 $V_H$ シングルドメイン抗体は、以下:

- a) M34 L、M58 Y、V116A(Humabody(登録商標)1.39);
- b) M34 F、G54 A、M58 Q、V102A(Humabody(登録商標)1.50);
- c) V116A(Humabody(登録商標)1.26);
- d) M34 L、M58 Q、V116A(Humabody(登録商標)1.40)

のうちの1つから選択されるアミノ酸置換を有する配列番号136を含む。

## 【 0 1 4 1 】

一実施形態では、 $V_H$ シングルドメイン抗体は、以下の位置:G109、D66、G55のうちの1つ又は複数又は全てでアミノ酸置換を有する配列番号254を含む。一実施形態では、 $V_H$ シングルドメイン抗体は、以下:

- a) G109 D、D66 G、G55 A(Humabody(登録商標)2.12);
- b) G109 D、G55 A(Humabody(登録商標)2.27);
- c) G109 D(Humabody(登録商標)2.53);
- d) G109 D、D66 G(Humabody(登録商標)2.29);
- e) G109 V、D66 G(Humabody(登録商標)2.28)

のうちの1つから選択されるアミノ酸置換を有する配列番号254を含む。

【0142】

一実施形態では、Qが1位で見出される場合、これをE、又は別の残基に変更する。

【0143】

上記で使用した付番は、分子における残基の実際の位置に基づく。

【0144】

このように、これらのアミノ酸変化は、典型的に、ポリペプチドの生物活性、機能、又は他の所望の特性、例えば抗原に対するその親和性又はその特異性を変化させることなく作製することができる。一般的に、ポリペプチドの非必須領域における一アミノ酸置換は、生物活性を実質的に変化させない。更に、構造又は機能が類似であるアミノ酸の置換は、ポリペプチドの生物活性を破壊する可能性がより低い。本明細書に記載されるポリペプチド及びペプチドを構成するアミノ酸残基の略語、及びこれらのアミノ酸残基の保存的置換を、以下のTable(表3)に示す。

10

【0145】

【表 3】

## アミノ酸残基及び保存的アミノ酸置換の例

当初の残基、三文字表記、一文字表記	保存的置換
アラニン, Ala, A	Gly, Ser
アルギニン, Arg, R	Lys, His
アスパラギン, Asn, N	Gln, His
アスパラギン酸 Asp, D	Glu, Asn
システイン, Cys, C	Ser, Ala
グルタミン, Gln, Q	Asn
グルタミン酸, Glu, E	Asp, Gln
グリシン, Gly, G	Ala
ヒスチジン, His, H	Asn, Gln
イソロイシン, Ile, I	Leu, Val
ロイシン, Leu, L	Ile, Val
リシン, lys, K	Ar, His
メチオニン, Met, M	Leu, Ile, Tyr
フェニルアラニン, Phe, F	Tyr, Met, Leu
プロリン, Pro, P	Ala
セリン, Ser, S	Thr
スレオニン, Thr, T	Ser
トリプトファン, Trp, W	Tyr, Phe
チロシン, Tyr, Y	Try, Phe
バリン, Val, V	Ile, Leu

10

20

30

## 【0146】

本発明のV<sub>H</sub>シングルドメイン抗体は、優れた安定性を示す。更に、本発明のV<sub>H</sub>シングルドメイン抗体はまた、ヒトPD-1に対して高い特異性を示し、速いオンレート(on rate)を有する(実施例を参照されたい)。

40

## 【0147】

本発明のV<sub>H</sub>シングルドメイン抗体は、好ましくは本明細書において詳しく説明し、実施例で示されるKD、及びEC<sub>50</sub>値を有する。一実施形態では、V<sub>H</sub>シングルドメイン抗体は、KD 10<sup>-8</sup> ~ 10<sup>-10</sup>の結合親和性でヒトPD-1に特異的に結合する。別の実施形態では、シングルドメイン抗体は、CHO-PD-1細胞株に対する結合において決定した場合にナノモル濃度以下の範囲のEC50値を有する。

## 【0148】

用語「KD」は、「平衡解離定数」を指し、平衡時の滴定測定で得た値、又は解離速度定

50

数(Koff)を結合速度定数(Kon)で除算することによって得た値を指す。「KA」は、親和性定数を指す。結合速度定数、解離速度定数、及び平衡解離定数は、抗原に対する抗体の結合親和性を表すために使用される。結合及び解離速度定数を決定する方法は、当技術分野で周知である。蛍光ベースの技術を使用することにより、高い感度を得られ、平衡時に生理的緩衝液中で試料を調べることができる。他の実験アプローチ及び機器、例えばBIAcore(登録商標)(生体分子相互作用解析)アッセイを使用することができる。一実施形態では、シングルドメイン抗体は、ナノモル濃度又はナノモル濃度以下の範囲のKD値を有する。

【0149】

本発明は更に、本発明のシングルドメイン抗体をコードする単離された核酸を提供する。核酸は、DNA及び/又はRNAを含みうる。一態様では、本発明は、CDR、例えばCDR3、2つ又は3つのCDRの組、又はTable 1又はTable 2(表1又は表2)に示される本発明のV<sub>H</sub>シングルドメイン抗体をコードする核酸を提供する。

10

【0150】

一態様では、本発明はこのように、配列番号81~100、若しくは221~250から選択される配列を含むか、又はからなる核酸配列にも関する。これらは、Table 1(表1)に示されるV<sub>H</sub>シングルドメイン抗体をコードする。

【0151】

一態様では、このように本発明は、配列番号463から515から選択される配列を含むか、又はからなる核酸配列にも関する。これらは、Table 2(表2)に示されるV<sub>H</sub>シングルドメイン抗体をコードする。

20

【0152】

一実施形態では、核酸配列は、Table 2(表2)から選択される上記の核酸配列のうちの1つと少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、又はそれより高い配列相同性を有する。一実施形態では、前記配列相同性は、少なくとも60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%である。

【0153】

本発明に従う核酸は、DNA又はRNAを含んでもよく、完全又は部分的に合成又は組換えによって産生されてもよい。本明細書に記載されるヌクレオチド配列という言葉は、明記された配列を有するDNA分子を包含し、本文がそれ以外であることを必要としない限り、UがTの代わりに置換されている明記された配列を有するRNA分子を包含する。

30

【0154】

更に、本発明は、上記の少なくとも1つの核酸を含む核酸構築物に関する。構築物は、プラスミド、ベクター、転写又は発現カセットの形態でありうる。

【0155】

本発明はまた、上記の1つ又は複数の核酸構築物を含む単離された組換え宿主細胞にも関する。宿主細胞は、細菌、ウイルス、昆虫、植物、哺乳動物又は他の適した宿主細胞でありうる。一実施形態では、細胞は、大腸菌(E. coli)細胞である。別の実施形態では、細胞は酵母細胞である。別の実施形態では、細胞は、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞である。

40

【0156】

一実施形態では、本明細書に記載される抗PD-1シングルドメイン抗体を作製する方法が提供され、方法は、シングルドメイン抗体をコードするポリヌクレオチドの発現にとって適した条件で宿主細胞を培養する工程、及びシングルドメイン抗体を単離する工程を含む。

【0157】

別の態様では、本発明は、本発明のPD-1シングルドメイン抗体のいずれかと、ヒトPD-1上の同じエピトープに結合する抗体又はその断片を提供する(すなわち、PD-1に対する結合に関して本発明のシングルドメイン抗体のいずれかと交叉競合する能力を有する抗体。

50

)。好ましい実施形態では、交叉競合試験のための参照抗体は、シングルドメイン抗体1.1(配列番号4)、又は2.1(配列番号254)でありうる。

【0158】

そのような交叉競合抗体は、標準的なPD-1結合アッセイにおいてシングルドメイン抗体1.1~1.50又は2.1~2.53のいずれかと交叉競合するその能力に基づいて同定することができる。例えば、BIAcore分析、ELISAアッセイ、又はフローサイトメトリーを使用して、本発明のシングルドメイン抗体との交叉競合を証明してもよい。

【0159】

一実施形態では、本発明は、上記のシングルドメイン抗体のいずれか1つが、競合アッセイにおいて結合剤を置換する、ヒトPD-1に結合することができる結合剤を提供する。一実施形態では、前記シングルドメイン抗体は、配列番号4である。一部の実施形態では、結合剤は、抗体、その機能的断片、例えばシングルドメイン抗体、又は抗体模倣タンパク質である。別の態様では、本発明は、結合剤が、競合アッセイにおいて上記のシングルドメイン抗体のいずれか1つを置換する、ヒトPD-1に結合することができる結合剤を提供する。一実施形態では、前記シングルドメイン抗体は、配列番号4、176、254、又は298を含む。別の態様では、本発明は、結合剤が、本発明のシングルドメイン抗体と本質的に同じエピトープに結合する、ヒトPD-1に結合することができる結合剤を提供する。

10

【0160】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載される及びTable 1又はTable 2(表1又は表2)に記載されるV<sub>H</sub>ドメインを含む単離された重鎖のみの抗体を提供する。

20

【0161】

一態様では、本発明は、本発明に従うシングルドメイン抗体と少なくとも第2の部分とを含む結合剤に関する。このように、本発明は、多機能分子を提供する。一実施形態では、少なくとも第2の部分は、例えば抗体、又は抗体断片(例えば、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、一本鎖Fv断片(scFv)、又はシングルドメイン抗体、例えばV<sub>H</sub>ドメイン)、又は抗体模倣タンパク質から選択される結合分子である。一実施形態では、少なくとも第2の部分は、V<sub>H</sub>ドメインである。一実施形態では、本発明のシングルドメイン抗体は、C<sub>H</sub>2及びC<sub>H</sub>3ドメインの1つ又は両方、及び任意選択でヒンジ領域を含む、抗体Fc領域又はその断片に連結させることができる。

30

【0162】

結合剤は、多価、例えば二価、又はマルチパラトープ性、例えば二パラトープ性でありうる。このように、結合分子は、第1のV<sub>H</sub>シングルドメイン抗体及びV<sub>H</sub>(A)、並びに第2のV<sub>H</sub>シングルドメイン抗体及びV<sub>H</sub>(B)を含んでもよく、このように、以下の式:V<sub>H</sub>(A)-V<sub>H</sub>(B)を有する。

【0163】

各々のV<sub>H</sub>は、CDR及びFR領域を含む。このように、結合分子は、以下の式:FR1(A)-CDR1(A)-FR2(A)-CDR2(A)-FR3(A)-CDR3(A)-FR4(A)-FR1(B)-CDR1(B)-FR2(B)-CDR2(BA)-FR3(B)-CDR3(B)-FR4(B)を有する。免疫グロブリンシングル可変ドメインA及びBの順序は特に限定されず、そのため、本発明のポリペプチドにおいて、免疫グロブリンシングル可変ドメインAはN末端に位置してもよく、免疫グロブリンシングル可変ドメインBはC末端に位置してもよく、又はその逆であってもよい。V<sub>H</sub>ドメイン抗体は、典型的にリンカーを介して接続される。

40

【0164】

一実施形態では、結合分子は、二パラトープ性である。一実施形態では、結合分子は二特異性である。このように一態様では、本発明は、前記シングルドメイン抗体とは異なる結合特異性を有する第2の機能的部分に連結された本明細書に記載されるシングルドメイン抗体を含む二特異性分子に関する。

【0165】

一実施形態では、標的タンパク質PD-1に結合するが、異なる又は重複する部位に存在する第1及び第2の結合分子を含む、二パラトープ性結合分子が提供される。エピトープビニ

50

ング試験では、完全な又は部分的なブロッキングが見出されうる。第1の結合分子は、本発明に従うシングルドメイン抗体である。一実施形態では、第2の結合分子は、ヒトPD-1とそのリガンドの1つとの相互作用を遮断するPD-1阻害剤である。一実施形態では、第2の結合分子は、PD-1とPD-L1との相互作用を遮断する。一実施形態では、第2の結合分子は、PD-1とPD-L2との相互作用を遮断する。一実施形態では、第2の結合分子は、PD-1とPD-L1及びPD-L2との相互作用を遮断する。第1の結合分子と第2の結合分子の順序は特に限定されず、逆にすることができる。

【0166】

一実施形態では、PD-1阻害剤は、Nivolumab(登録商標)、Pembrolizumab(登録商標)、又はPidilizumab(登録商標)から選択される抗PD-1抗体である。一部の実施形態では、抗PD-1抗体は、Nivolumab(登録商標)である。Nivolumab(登録商標)の代替名には、MDX-1106、MDX-1106-04、ONO-4538、又はBMS-936558が挙げられる。他の実施形態では、抗PD-1抗体は、Pembrolizumab(登録商標)である。Pembrolizumab(登録商標)(商品名KEYTRUDA(登録商標)、過去の名称Lambrolizumab(登録商標)、同様にMerck3745、MK-3475、又はSCH-900475としても知られる)は、PD-1に結合するヒト化IgG4モノクローナル抗体である。一部の実施形態では、抗PD-1抗体は、Pidilizumab(登録商標)である。Pidilizumab(登録商標)(CT-011;Cure Tech)は、PD-1に結合するヒト化IgG1kモノクローナル抗体である。

【0167】

一実施形態では、PD-1阻害剤は、 $V_H$ シングルドメイン抗体である。このように、別の態様は、以下の式: $V_H(A)-L-V_H(B)$ 又は $V_H(B)-L-V_H(A)$ を有する結合分子に関し、式中 $V_H(A)$ は、本明細書に開示される $V_H$ シングルドメイン抗体であり、 $V_H(B)$ は、PD-L1及び/又はPD-L2に対するPD-1の結合を遮断する $V_H$ シングルドメイン抗体である。Lはリンカーである。適したリンカーには、例えばGS残基を有するリンカー、例えば $(Gly_4Ser)_n$ が挙げられ、式中 $n=1\sim 20$ 、例えば、 $1\sim 10$ 、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10である。一実施形態では、リンカーは、 $(Gly_4Ser)_n$ であり、式中 $n=4$ 又はそれより多い。

【0168】

実施例に示すように、本発明者らは、意外にも、以下の式:上記の $V_H(A)-L-V_H(B)$ を有する結合分子が、PD-L1及び/又はPD-L2に対するPD-1の結合を遮断するが、非ブロッキング $V_H$ シングルドメイン抗体に連結していない $V_H$ シングルドメイン抗体と比較して増強された阻害効果を提供することを示した。このように、本明細書に記載される $V_H$ シングルドメイン抗体は、PD-L1及び/若しくはPD-L2に対するPD-1の結合を遮断する、又は二パラトープ性分子において別のエピトープに結合する $V_H$ シングルドメイン抗体との組合せに関して特に有用である。別の実施形態では、方向は $V_H(B)-L-V_H(A)$ である。一実施形態では、Lは、 $(Gly_4Ser)_n$ であり、式中 $n$ は4又はそれより多い。

【0169】

一実施形態では、結合分子は多価、例えば二価である。二価の結合分子は、同じ部位で同じ標的タンパク質、例えばヒトPD-1に結合する2つの $V_H$ シングルドメイン抗体を含む。一実施形態では、そのような分子は、同じHumabody(登録商標) $V_H$ を含みうる。別の実施形態では、そのような分子は、同じファミリーの一部である、すなわちTable 1又はTable 2(表1又は表2)に示される配列から選択される2つの $V_H$ シングルドメイン抗体を含みうる。別の実施形態では、そのような分子は、同じファミリーの一部ではないが、ヒトPD-1上の同じ部位に結合する2つの $V_H$ シングルドメイン抗体、例えば、Table 2(表2)に示される $V_H$ シングルドメイン抗体に連結されたTable 1(表1)に示される $V_H$ シングルドメイン抗体を含みうる。

【0170】

本発明の二パラトープ性及び二価の結合分子は、当技術分野で公知の方法を使用して構築することができる。

【0171】

ある特定の実施形態では、結合剤は、多特異性、例えば複数の機能を提供する二特異性の結合剤の形態である。そのような多特異性結合剤は、PD-1に対して第1の結合特異性を

有する本発明に従うシングルドメイン抗体と、第2の結合特異性を有する少なくとも1つの更なる結合分子とを含む。前記の更なる結合分子は、抗体、抗体断片、又は抗体模倣体から選択することができる。一実施形態では、前記抗体断片は、F(ab')<sub>2</sub>、Fab、Fv、sFv、又はドメイン抗体から選択される。一実施形態では、前記抗体断片は、V<sub>H</sub>シングルドメイン抗体である。

**【0172】**

一実施形態では、結合剤は二特異性であり、PD-1に対して第1の結合特異性を有する本発明に従うシングルドメイン抗体と、第2の結合特異性を有する第2の結合分子とを含む。一実施形態では、第2の結合分子は、免疫調節剤、チェックポイント調節剤、T細胞活性化に関係する薬剤、腫瘍微小環境調節剤(TME)、又は腫瘍特異的標的に結合する。

10

**【0173】**

例えば、免疫調節剤は、PD-L1、PD-L2、CTLA-4、TIM-3、LAG-3、CEACAM、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、又はTGFRベータのうちの1つ又は複数の阻害剤から選択される免疫チェックポイント分子の阻害剤でありうる。別の実施形態では、免疫調節剤は、IL-2、IL-12、OX40、OX40L、CD2、CD3、CD27、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、ICOS(CD278)、4-1BB(CD137)、GITR、CD30、CD40、BAFFR、HVEM、CD7、LIGHT、NKG2C、SLAMF7、N Kp80、CD160、B7-H3、B7-H4、又はCD83リガンド、CD3、CD8、CD28、CD4、又はICAM-1のうちの1つ又は複数のアゴニストから選択される共刺激分子の活性化剤である。

**【0174】**

一実施形態では、上記の結合剤は、更なる結合分子を含む。このように、結合剤は、三特異性又は四特異性でありうる。更なる特異性も同様に想像される。上記の分子の任意の組合せを、多特異性結合剤、例えば本発明のシングルドメイン抗体と第2及び第3の結合特異性とを含む三特異性結合剤において作製することができる。

20

**【0175】**

別の実施形態では、少なくとも第2の部分は、結合分子の半減期を延長させるように作用しうる。第2の部分は、血清アルブミン、例えばヒト血清アルブミン(HAS)又はマウス血清アルブミン(MSA)に結合するタンパク質、例えば抗体又はその一部を含みうる。第2の部分は、血清アルブミン、例えばヒト血清アルブミン(HAS)又はマウス血清アルブミン(MSA)に結合するV<sub>H</sub>ドメインを含みうる。

**【0176】**

第2の部分は、血清アルブミン、例えばヒト血清アルブミン(HSA)又はその多様体、例えばHSA C34Sを含みうる。更に、例えばV<sub>H</sub>ドメインがFcドメインに融合されている、V<sub>H</sub>ドメインとFcドメインとを含む本明細書に記載される結合分子も提供される。更に、第2の抗原に特異的に結合する第2の可変ドメインを含む結合分子も提供され、第2の抗原はヒトPD-1以外の抗原である。第2の抗原は、白血球分化抗原(CD)分子又は主要組織適合遺伝子複合体(MHC)クラスII分子でありうる。

30

**【0177】**

一実施形態では、本発明の抗PD-1シングルドメイン抗体又は多価結合剤は、検出可能な標識又は機能的標識によって標識される。標識は、フルオロフォア、蛍光剤、放射標識、酵素、化学発光剤、核磁気共鳴活性標識、又は光感作剤を含むがこれらに限定されない、シグナルを産生する又は産生するように誘導することができる任意の分子でありうる。このように、結合剤は、蛍光若しくは発光、放射活性、酵素活性、又は吸光を検出することによって検出及び/又は測定してもよい。

40

**【0178】**

なお他の実施形態では、本発明の抗PD-1シングルドメイン抗体又は多価結合剤は、少なくとも1つの治療部分、例えば薬物、酵素、又は毒素にカップリングされる。一実施形態では、治療部分は、毒素、例えば細胞傷害性放射性核種、化学毒素、又はタンパク質毒素である。

**【0179】**

別の態様では、本発明の抗PD-1シングルドメイン抗体又は多価結合剤は、例えば化学改

50

変、特にPEG化によって、又はリポソームへの取り込みによって、又は血清アルブミンタンパク質を使用することによって、半減期を増加させるように改変される。

【0180】

半減期は、本発明の対応する $V_H$ シングルドメイン抗体の半減期より少なくとも1.5倍、好ましくは少なくとも2倍、例えば少なくとも5倍、例えば少なくとも10倍、又は20倍超増加させてもよい。例えば、半減期の増加は、本発明の対応する $V_H$ シングルドメイン抗体と比較して1時間超、好ましくは2時間超、より好ましくは6時間超、例えば12時間超、又は更に24、48、又は72時間超でありうる。

【0181】

上記の多価結合剤を生成するために、2つの結合分子をリンカー、例えばポリペプチドリンカーによって接続する。適したリンカーには、例えばGS残基を有するリンカー、例えば $(Gly_4Ser)_n$ が挙げられ、式中 $n=1\sim 20$ 、例えば $1\sim 10$ 、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10である。

10

【0182】

一実施形態では、抗PD1シングルドメイン抗体はまた、例えば二価又は二パラトープ性フォーマットでPD-1アゴニズムを誘導するようにフォーマット化することができる。PD-1シグナル伝達は、PD-L1によって誘導され、T細胞活性のダウンレギュレーションをもたらす。PD-1シグナル伝達を誘導するものは「PD1アゴニスト」であると言えることができるが、これはT細胞アゴニストに対して対照的な効果を有する。本発明者らは、CD3又はT細胞受容体をクラスタ形成する抗体の非存在下でPD-1アゴニズムを引き起こすことができるPD-1係合体の証拠を提供する。

20

【0183】

PD-1アゴニズムを測定するための例示的なシステムは、PD-1シグナル伝達が起こる場合に応答を示すレポーター細胞株である。リガンドはこの応答を促進する(PD-L1)。多価Humabody(登録商標) $V_H$ は、軽度のアゴニズムを行うことができ、二パラトープ性フォーマットは、これを増強する。このように、Table 1(表1)から選択される $V_H$ シングルドメイン抗体を、Table 1(表1)から選択される別の $V_H$ シングルドメイン抗体と組み合わせて、アゴニスト機能を提供することができる。別の実施形態では、Table 2(表2)から選択される $V_H$ シングルドメイン抗体を、Table 2(表2)から選択される別の $V_H$ シングルドメイン抗体と組み合わせて、アゴニスト機能を提供することができる。別の実施形態では、Table 1(表1)から選択される $V_H$ シングルドメイン抗体を、Table 2(表2)から選択される別の $V_H$ シングルドメイン抗体と組み合わせて、アゴニスト機能を提供することができる。

30

【0184】

二パラトープ性フォーマットは、式: $V_H(A)-L-V_H(B)$ 、又は $V_H(B)-L-V_H(A)$ を有し、式中 $V_H(A)-$ は、本明細書に開示される $V_H$ シングルドメイン抗体であり(すなわち、Table 1(表1)又はTable 2(表2)から選択され)、 $V_H(B)$ は、PD-L1及び/又はPD-L2に対するPD-1の結合を遮断する $V_H$ シングルドメイン抗体である。別の実施形態では、方向は、 $V_H(B)-L-V_H(A)$ である。Lはリンカーである。適したリンカーには、例えばGS残基を有するリンカー、例えば $(Gly_4Ser)_n$ が挙げられ、式中 $n=1\sim 10$ 、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10である。一実施形態では、リンカーは、 $(Gly_4Ser)_n$ であり、式中 $n=4$ 未満、例えば1、2、又は3である。

40

【0185】

二パラトープ性分子は、受容体の架橋を増強することができる。二パラトープ性分子は、単一のPD1単量体上の2つのエピトープに結合する。或いは、1つのアームが1つのPD1分子と係合することができ、他方のアームが第2の分子に係合することができる。第2の分子はなおも更なる二パラトープ性分子に係合のために利用できるエピトープを有し、そのためPD1分子の「鎖」を、共にクラスタ形成することができる。 $(Gly_4Ser)_4$ より短いリンカーは、単一の分子に対する結合を防止することができ、架橋を促進し、それによってPD1アゴニズムを可能にする。この機能の好ましい実施形態は、理想的には非アンタゴニスト機能を有し、 $(Gly_4Ser)_4$ より短いリンカーによって連結され、好ましくは少なくとも2つ

50

のエピトープを有する多価分子である。一実施形態では、 $L(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$ であり、式中 $n$ は1、2、3、又は4である。

【0186】

本発明者らのデータは、アンタゴニスト及びアンカーを含む二パラトープ性フォーマットを示す。これは、PD1シグナル伝達を誘導することができるが、リガンド誘発性シグナル伝達を遮断して、アンタゴニスト機能を有することができるために十分なリガンド結合エピトープのマスキングが存在する。

【0187】

上記のPD-1アゴニストは、自己免疫及び/又は炎症及び/又は感染疾患の処置において有用である。このように、別の態様は、自己免疫及び/又は炎症及び/又は感染疾患の処置に使用するための上記のPD-1アゴニスト、並びに上記のPD-1アゴニストの投与を含む自己免疫及び/又は炎症及び/又は感染疾患の処置に使用するための方法に関する。このように、別の態様は、本明細書に記載される別のシングルドメイン抗体(例えば、Table 1(表1)の別のシングルドメイン抗体と組み合わせたTable 1(表1)のシングルドメイン抗体の1つ)、又はPD-1遮断剤と組み合わせた、本明細書に記載されるシングルドメイン抗体を含むアゴニスト性の多価分子又はマルチパラトープ性分子に関する。

10

【0188】

本明細書に記載されるシングルドメイン抗体は、PD-1抗原による刺激時に重鎖のみの抗体を発現するトランスジェニック齧歯類から得ることができる。トランスジェニック齧歯類、例えばマウスは、好ましくは内因性の抗体遺伝子を発現する許容量が低減されている。このように、一実施形態では、齧歯類は、内因性の軽鎖及び/又は重鎖抗体遺伝子を発現する許容量が低減されている。したがって、齧歯類は、例えば以下に詳しく説明するように、機能的な軽鎖及び/又は重鎖が産生されないように、内因性のカップ及びラムダ軽鎖並びに/又は重鎖抗体遺伝子の発現を妨害する改変を含みうる。

20

【0189】

本発明はまた、PD-1とPD-L1及び/又はPD-L2との相互作用を遮断しない、ヒトPD-1に結合することができるヒト重鎖のみの抗体を産生する方法であって、

- a) トランスジェニック齧歯類をPD-1抗原によって免疫する工程であって、前記齧歯類が、再構成されていないヒト重鎖V遺伝子を含む核酸構築物を発現し、機能的な内因性の軽鎖又は重鎖を作製することができない工程、
- b) ヒト重鎖のみの抗体を単離する工程、
- c) ヒトPD-1に結合するが、PD-1とPD-L1及び/又はPD-L2との相互作用を遮断しない重鎖のみの抗体を同定する工程を含む方法にも関する。

30

【0190】

更なる工程は、前記ヒト重鎖のみの抗体から $V_H$ ドメインを単離する工程、又は前記マウスから $V_H$ ドメイン配列を含む配列のライブラリを生成する工程、及び前記ライブラリから $V_H$ ドメイン配列を含む配列を単離する工程を含みうる。

【0191】

本発明はまた、ヒトPD-1に結合することができるシングル $V_H$ ドメイン抗体を産生する方法であって、

- a) トランスジェニック齧歯類をPD-1抗原によって免疫する工程であって、前記齧歯類が、再構成されていないヒト重鎖V遺伝子を含む核酸構築物を発現し、機能的な内因性の軽鎖又は重鎖を作製することができない工程、
- b) 前記マウスから $V_H$ ドメイン配列を含む配列のライブラリを生成する工程、
- c) 前記ライブラリから $V_H$ ドメイン配列を含む配列を単離する工程、
- d) ヒトPD-1に結合するが、PD-1とPD-L1及び/又はPD-L2との相互作用を遮断しない $V_H$ ドメインを同定する工程を含む方法にも関する。

40

【0192】

50

実施例に示される例としての機能的アッセイを使用して、重鎖のみの抗体又はV<sub>H</sub>ドメインが、PD-1に結合するが、PD-1とPD-L1及び/又はPD-L2との相互作用を遮断しないか否かを評価してもよい。

【0193】

本明細書に記載されるポリペプチド、核酸、宿主細胞、産物、及び組成物を、in vitro 発現ライブラリを使用して調製又は生成する方法は、以下の工程：

a) アミノ酸配列をコードする核酸配列の組、コレクション、又はライブラリを提供する工程；及び

b) PD-1に結合することができる/PD-1に対して親和性を有するが、PD-1とPD-L1及び/又はPD-L2との相互作用を遮断しないアミノ酸配列に関して、前記組、コレクション、又はライブラリをスクリーニングする工程；及び

c) PD-1に結合することができる/PD-1に対して親和性を有するアミノ酸配列(複数)を単離する工程

を含みうる。

【0194】

上記の方法において、アミノ酸配列の組、コレクション、又はライブラリは、例えばスクリーニングを容易にするために、ファージ、ファージミド、リボソーム、又は適した微生物(例えば、酵母)上に提示されうる。アミノ酸配列(の組、コレクション、又はライブラリ)を提示及びスクリーニングするための適した方法、技術、及び宿主生物は、当業者に明らかである(例えば、Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual, Academic Press; 第1版(10月28日、1996年) Brian K. Kay, Jill Winter, John McCaffertyを参照されたい)。

【0195】

ライブラリ、例えばファージライブラリは、抗原特異的な重鎖のみの抗体を発現する細胞又は組織を単離する工程、単離された細胞又は組織に由来するmRNAからV<sub>H</sub>ドメイン(複数)をコードする配列をクローニングする工程、及びライブラリを使用してコードされるタンパク質を提示する工程によって生成される。V<sub>H</sub>ドメインは、細菌、酵母、昆虫、植物、哺乳動物、又は他の発現系において発現させることができる。

【0196】

本発明はまた、単離されたV<sub>H</sub>シングルドメイン抗体、又はヒトV<sub>H</sub>生殖系列配列のアミノ酸産物を含む、若しくはヒトV<sub>H</sub>生殖系列配列に由来する、PD-1に結合するV<sub>H</sub>ドメインを含む単離された重鎖のみの抗体にも関する。重鎖のみの抗体は、完全なヒト配列であってもよく、又はマウス配列を含んでもよい。

【0197】

本明細書に記載の本発明の様々な態様及び実施形態では、齧歯類という用語は、マウス又はラットに関連しうる。

【0198】

一実施形態では、齧歯類はマウスである。マウスは、非機能的な内因性のラムダ軽鎖座を含みうる。このように、マウスは、機能的な内因性のラムダ軽鎖を作製しない。一実施形態では、ラムダ軽鎖座を、部分的若しくは完全に欠失させるか、又は挿入、逆位、組換え事象、遺伝子編集、若しくは遺伝子沈黙化を通して非機能的にする。例えば、少なくとも定常領域遺伝子C1、C2、及びC3を欠失させてもよく、又は上記の挿入若しくは他の改変を通して非機能的にしてもよい。一実施形態では、マウスが機能的なラムダ軽鎖を作製しないように、座を機能的に沈黙化させる。

【0199】

更に、マウスは、非機能的な内因性のカッパ軽鎖座を含みうる。このように、マウスは、機能的な内因性のカッパ軽鎖を作製しない。一実施形態では、カッパ軽鎖座を、部分的若しくは完全に欠失させるか、又は挿入、逆位、組換え事象、遺伝子編集、若しくは遺伝子沈黙化を通して非機能的にする。一実施形態では、マウスが機能的なカッパ軽鎖を作製しないように、座を機能的に沈黙化させる。

10

20

30

40

50

## 【0200】

機能的に沈黙化した内因性のラムダ及びカッパL鎖座を有するマウスは、例えばその全体が参照により本明細書に組み込まれている国際公開第2003/000737号に開示されるように作製してもよい。

## 【0201】

更に、マウスは、非機能的な内因性の重鎖座を含みうる。このように、マウスは、機能的な内因性の重鎖を作製しない。一実施形態では、重鎖座を、部分的若しくは完全に欠失させるか、又は挿入、逆位、組換え事象、遺伝子編集、若しくは遺伝子沈黙化を通して非機能的にする。一実施形態では、マウスが機能的な重鎖を作製しないように、座を機能的に沈黙化させる。

10

## 【0202】

例えば、国際公開第2004/076618号(その全体が参照により本明細書に組み込まれている)に記載されているように、8個全ての内因性の重鎖定常領域免疫グロブリン遺伝子( $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$ 、 $\epsilon$ 、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\kappa$ 、及び $\lambda$ )がマウスにおいて存在しないか、若しくはそれらが非機能的となる程度に部分的に存在せず、又は遺伝子 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$ 、 $\epsilon$ 、 $\alpha$ 、 $\beta$ 及び $\kappa$ は存在しないが、隣接する遺伝子 $\lambda$ 及び $\mu$ は、それらが非機能的となる程度に部分的に存在せず、又は遺伝子 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$ 、 $\epsilon$ 、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、及び $\lambda$ は存在しないが、 $\lambda$ はそれが非機能的となる程度に部分的に存在せず、又は $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\gamma$ 、 $\epsilon$ 、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\kappa$ 、及び $\lambda$ は存在しないが、 $\mu$ はそれが非機能的となる程度に部分的に存在しない。部分的に欠失させるとは、内因性の座の遺伝子配列が、機能的な内因性の遺伝子産物が座によってコードされない程度に、すなわち機能的産物が座から発現されないように、欠失しているか又は例えば挿入によって破壊されていることを意味する。別の実施形態では、座は機能的に沈黙化している。

20

## 【0203】

一実施形態では、マウスは、非機能的な内因性の重鎖座、非機能的な内因性のラムダ軽鎖座、及び非機能的な内因性のカッパ軽鎖座を含む。したがって、マウスは、いかなる機能的な内因性の軽鎖又は重鎖も産生しない。このように、マウスはトリプルノックアウト(TKO)マウスである。

## 【0204】

トランスジェニックマウスは、異種の、好ましくはヒトの重鎖座を発現させるためのベクター、例えば酵母人工染色体(YAC)を含みうる。YACは、酵母において非常に大きいDNAインサートをクローニングするために使用することができるベクターである。天然の酵母染色体のような挙動を示すために必須の3つ全てのシス作用型構造エレメント(自律複製配列(ARS)、セントロメア(CEN)、及び2つのテロメア(TEL))を含むことに加えて、大きいDNAインサートを許容することにより、それらは、染色体様の安定性にとって、及び酵母細胞における伝播の正確性にとって必要な最小サイズ(150kb)に到達することができる。YACの構築及び使用は、当技術分野で周知である(例えば、Bruschi, C.V.及びGjuracic, K. Yeast Artificial Chromosomes, Encyclopedia of Life Sciences, 2002 Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group)。

30

## 【0205】

例えば、YACは、 $C_H1$ ドメイン、マウスエンハンサー、及び調節領域を欠如するマウス免疫グロブリン定常領域遺伝子と組み合わせて、再構成されていない過剰なヒト $V_H$ 、D、及びJ遺伝子を含みうる。ヒト $V_H$ 、D、及びJ遺伝子は、ヒト $V_H$ 、D、及びJ座であり、それらは完全にヒトである再構成されていない遺伝子である。そのようなYACの例を、以下の実施例に提供する。

40

## 【0206】

当技術分野で公知の代替方法を、内因性のマウス又はラット免疫グロブリン遺伝子の欠失又は不活化のために、及び $C_H1$ ドメイン、マウスエンハンサー、及び調節領域を欠如するマウス免疫グロブリン定常領域遺伝子と組み合わせて、ヒト $V_H$ 、D、及びJ遺伝子の導入のために使用してもよい。

50

## 【0207】

トランスジェニックマウスは、実施例に例証するように標準的な技術に従って作製することができる。トランスジェニックマウスを作製するための2つの最も特徴付けられた経路は、新鮮な受精卵母細胞の前核への遺伝子材料のマイクロインジェクションを介して、又は安定にトランスフェクトした胚性幹細胞を桑実胚若しくは胚盤胞期の胚に導入することを介して行われる。遺伝子材料を導入する方法にかかわらず、操作された胚は、偽妊娠雌性レシピエントに移入され、そこで妊娠を継続させて、候補となるトランスジェニック子孫を産まれさせる。

## 【0208】

これらの広範な方法の間の主な差は、ESクローンを、使用前に広範にスクリーニングして、トランスジェニック動物を作製することができる点である。これに対し、前核マイクロインジェクションは、その導入後の宿主ゲノムに遺伝子材料が組み込まれることに依存しており、一般的に、トランスジーンの取り込みの成功は、子孫が産まれるまで確認することができない。

10

## 【0209】

トランスジーンの取り込みの成功が起こるか否かを補助及び決定するために当技術分野で公知の多くの方法が存在する。トランスジェニック動物は、ゲノムへの構築物のランダムな組み込み、部位特異的組み込み、又は相同組換えを含む複数の手段によって作製することができる。薬物抵抗性マーカー(ポジティブ選択)、リコンビナーゼ、組換え媒介カセット交換、ネガティブ選択技術、及び組換え効率を改善するためのヌクレアーゼの使用を含む、トランスジーンを組み込み及びその後の改変を促進及び選択するために使用することができる様々なツール及び技術が存在する。これらの方法のほとんどがES細胞の改変において一般的に使用されている。しかし、技術の一部は、前核注射を介して媒介される遺伝子導入を増強するために有用性を有しうる。

20

## 【0210】

更なる精密化を使用して、所望のバックグラウンド内でトランスジェニック系統をより効率的に生成することができる。上記のように、好ましい実施形態では、内因性のマウス免疫グロブリン発現を沈黙化させて、薬物探索のために利用することができる重鎖のみのレパートリーを発現させるために、導入されたトランスジーンのみを使用することができるようにする。遺伝子操作されたマウス、例えば全ての内因性の免疫グロブリン座(マウス重鎖、マウスカッパ鎖、及びマウスラムダ鎖)を沈黙化させたTKOマウスを、上記のように使用することができる。導入された任意のトランスジーンはこのTKOバックグラウンドへの移入は、通常の交配、又はプロセスを効率的に拡大させるためにIVF工程を含めることによる交配のいずれかによって行うことができる。しかし、同様に、遺伝子導入手順の際にTKOバックグラウンドを含めることも可能である。例えば、マイクロインジェクションの場合、卵母細胞はTKOドナーに由来してもよい。同様に、TKO胚からのES細胞を、遺伝子導入において使用するために誘導することができる。

30

## 【0211】

免疫グロブリン座を発現するようにトランスジーンが導入されているトリプルノックアウトマウスを、本明細書においてTKO/Tgと呼ぶ。

40

## 【0212】

一実施形態では、マウスは国際公開第2016/062990号に記載されているとおりである。

## 【0213】

本発明はまた、齧歯類、好ましくはヒト重鎖座を発現し、PD-1抗原によって免疫されているマウスにも関する。本発明はまた、上記の齧歯類、好ましくはヒトPD-1に結合するヒトV<sub>H</sub>ドメインを含む重鎖のみの抗体を発現するマウスにも関する。好ましくは、前記齧歯類は、機能的な内因性のカッパ及びラムダ軽鎖並びに/又は重鎖を作製することができない。ヒト重鎖座は、上記のとおりでありうるトランスジーン上に位置する。

## 【0214】

本発明はまた、ヒトPD-1抗原によって免疫し、ヒト重鎖座を発現する齧歯類、好ましく

50

はマウスから得られる又は得ることができるヒトV<sub>H</sub>ドメイン、又は抗ヒトPD-1シングルV<sub>H</sub>ドメイン抗体を含む抗ヒトPD-1重鎖のみの抗体にも関する。好ましくは、前記齧歯類は、機能的な内因性のカップ及びラムダ軽鎖並びに/又は重鎖を作製することができない。ヒト重鎖座は、上記のとおりでありうるトランスジーンに位置する。

【0215】

本発明の別の態様では、本発明に従うシングルドメイン抗体と、任意選択で薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物が提供される。本発明のシングルドメイン抗体又は本発明の医薬組成物は、経口、局所表面、非経口、舌下、直腸、膺、眼、鼻腔内、肺、皮内、硝子体内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、脳内、経皮、経粘膜、吸入、又は特に耳、鼻、眼、若しくは皮膚への局所表面、又は吸入を含むがこれらに限定されない任意の通常の経路によって投与することができる。

10

【0216】

非経口投与には、例えば、静脈内、筋肉内、動脈内、腹腔内、鼻腔内、直腸内小胞内、皮内、局所表面、又は皮下投与が挙げられる。好ましくは、組成物は非経口投与される。

【0217】

薬学的に許容される担体又は媒体は、微粒子であり得て、そのため、組成物は例えば錠剤又は散剤形態である。用語「担体」は、それと共に本発明の薬物抗体コンジュゲートが投与される希釈剤、アジュバント、又は賦形剤を指す。そのような薬学的担体は、液体、例えば水、並びに石油、動物、植物、若しくは合成起源の油を含む油、例えば、落花生油、ダイズ油、鉱油、ゴマ油、及びその他でありうる。担体は、食塩水、アカシアゴム、ゼラチン、デンプンペースト、タルク、ケラチン、コロイド状シリカ、尿素、及びその他でありうる。加えて、補助剤、安定剤、濃化剤、潤滑剤、及び着色剤を使用することができる。一実施形態では、動物に投与する場合、本発明のシングルドメイン抗体又は組成物及び薬学的に許容される担体は無菌的である。水は、本発明の薬物抗体コンジュゲートを静脈内投与する場合の好ましい担体である。食塩水溶液及びデキストロス水溶液及びグリセロール溶液もまた、液体担体として、特に注射可能溶液として使用することができる。適した薬学的担体はまた、賦形剤、例えばデンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、コメ、小麦粉、チョコク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレングリコール、水、エタノール、及びその他を含む。本発明の組成物は、望ましければ、微量の湿潤剤若しくは乳化剤、又はpH緩衝剤を含みうる。

20

30

【0218】

本発明の医薬組成物は、液体、例えば溶液、乳剤、又は懸濁剤の形態でありうる。液体は、注射、輸注(例えば、IV輸注)、又は皮下による送達にとって有用でありうる。

【0219】

経口投与のために意図される場合、組成物は好ましくは固体又は液体形態であり、半固体、半液体、懸濁剤、及びゲル形態は、本明細書において固体又は液体のいずれかであると考えられる形態に含まれる。

【0220】

経口投与のための固体組成物として、組成物を、散剤、顆粒剤、圧縮錠、丸剤、カプセル剤、チューインガム、水、又は類似の形態に製剤化することができる。そのような固体組成物は典型的に、1つ又は複数の不活性な希釈剤を含む。加えて、以下のうちの1つ又は複数が存在しうる:結合剤、例えばカルボキシメチルセルロース、エチルセルロース、結晶セルロース、又はゼラチン;賦形剤、例えばデンプン、ラクトース、又はデキストリン;崩壊剤、例えばアルギン酸、アルギン酸ナトリウム、コーンスターチ、及びその他;潤滑剤、例えばステアリン酸マグネシウム;滑剤、例えばコロイド状二酸化ケイ素;甘味料、例えばスクロース又はサッカリン;香味料、例えばペパーミント、サリチル酸メチル、又はオレンジ香料;並びに着色剤。組成物がカプセル剤(例えば、ゼラチンカプセル)の形態である場合、これは、上記のタイプの材料に加えて、液体担体、例えばポリエチレングリコール、シクロデキストリン、又は脂肪油を含みうる。

40

50

## 【0221】

組成物は、液体、例えばエリキシル剤、シロップ剤、液剤、乳剤、又は懸濁剤の形態でありうる。液体は、経口投与又は注射による送達にとって有用でありうる。経口投与が意図される場合、組成物は、甘味料、保存剤、色素/着色剤、及び香味増強剤のうちの1つ又は複数を含みうる。注射による投与のための組成物では、界面活性剤、保存剤、湿潤剤、分散剤、懸濁剤、緩衝液、安定剤、及び等張剤のうちの1つ又は複数も同様に含めることができる。

## 【0222】

組成物は、1つ又は複数の投与単位の形態をとりうる。

## 【0223】

特定の実施形態では、処置を必要とする領域に組成物を局所投与するか、又は静脈内注射若しくは輸注によって組成物を投与することが望ましい場合がある。

## 【0224】

特定の障害又は状態の処置において有効/活性である本発明のシングルドメイン抗体の量は、障害又は状態の性質に依存し、標準的な臨床技術によって決定することができる。加えて、最適な投与量範囲を同定するために役立つように、*in vitro*又は*in vivo*アッセイを任意選択で使用することができる。組成物に使用される正確な用量もまた、投与経路及び疾患又は障害の重症度に依存し、医師の判断及び各々の患者の状況に従って決定すべきである。年齢、体重、性別、食事、投与時間、排泄速度、宿主の状態、薬物の組合せ、反応感度、及び疾患の重症度のような要因を考慮に入れるべきである。

## 【0225】

典型的に、量は、組成物の少なくとも約0.01重量%の本発明のシングルドメイン抗体である。経口投与が意図される場合、この量は、組成物の約0.1重量%～約80重量%の範囲に変化する。好ましい経口組成物は、組成物の約4重量%～約50重量%の本発明のシングルドメイン抗体を含みうる。

## 【0226】

本発明の好ましい組成物は、非経口用量単位が本発明のシングルドメイン抗体の約0.01重量%～約2重量%を含むように調製される。

## 【0227】

注射による投与に関して、組成物は、典型的に動物の体重の約0.1mg/kg～約250mg/kg、好ましくは動物の体重の約0.1mg/kgと約20mg/kgとの間、及びより好ましくは動物の体重の約1mg/kg～約10mg/kgを含みうる。一実施形態では、組成物は、約1～30mg/kg、例えば約5～25mg/kg、約10～20mg/kg、約1～5mg/kg、又は約3mg/kgの用量で投与される。投与スケジュールは、例えば1週間に1回から2、3、又は4週間に1回まで異なりうる。

## 【0228】

本発明は、哺乳動物、例えばヒト患者におけるPD-1媒介疾患又は障害を処置する方法であって、それを必要とする哺乳動物に本発明の抗体の有効量を投与する工程を含む方法を提供する。特に、本発明は更に、がん、免疫障害、神経疾患、炎症障害、アレルギー、移植拒絶反応、ウイルス感染症、免疫不全、及び他の免疫系関連障害から選択される障害の予防及び/又は処置のための方法であって、それを必要とする対象に、本発明のシングルドメイン抗体若しくは医薬組成物、又は本発明の医薬組成物の薬学的有効量を投与する工程を含む方法に関する。

## 【0229】

本明細書において使用される場合、「処置する」、「処置している」、又は「処置」は、疾患又は障害を阻害又は軽減することを意味する。例えば、処置は、疾患又は障害に関連する症状の発生の延期、及び/又は前記疾患と共に発生する又は発生すると予想されるそのような症状の重症度の低減を含みうる。用語は、既存の症状を改善する、更なる症状を予防する、及びそのような症状の基礎となる原因を改善又は予防することを含む。このように、用語は、処置される哺乳動物、例えばヒト患者の少なくとも一部に有益な結果が付与されることを表す。多くの医学的処置は、処置を受ける患者の全てではないが一部に

10

20

30

40

50

とって有効である。

【0230】

用語「対象」、又は「患者」は、処置、観察、又は実験の対象である動物を指す。単なる例に過ぎないが、対象は、ヒト又は非ヒト哺乳動物を含むがこれらに限定されない哺乳動物、例えば、非ヒト霊長類、マウス、ウシ、ウマ、イヌ、ヒツジ、又はネコを含むがこれらに限定されない。

【0231】

本明細書に使用される場合、用語「有効量」は、細胞、組織、又は対象に単独で投与される場合、又は追加の治療剤と組み合わせて投与される場合に、投与の条件下で所望の治療効果又は予防効果を達成するために有効である抗PD-1抗体の量を意味する。

10

【0232】

本発明はまた、疾患の処置又は予防に使用するための本発明のシングルドメイン抗体、又は医薬組成物にも関連する。

【0233】

別の態様では、本発明は、がん、免疫障害、神経疾患、炎症障害、アレルギー、移植拒絶反応、ウイルス感染症、免疫不全、及び他の免疫系関連障害の処置又は予防に使用するための本発明のシングルドメイン抗体又は医薬組成物を指す。

【0234】

別の態様では、本発明は、疾患の処置又は予防における本発明のシングルドメイン抗体、又は医薬組成物の使用に関する。

20

【0235】

別の態様では、本発明は、がん、免疫障害、神経疾患、炎症障害、アレルギー、移植拒絶反応、ウイルス感染症、免疫不全、及び他の免疫系関連障害の処置又は予防のための医薬の製造における本発明のシングルドメイン抗体又は医薬組成物の使用に関する。

【0236】

がんは、固形腫瘍又は非固形腫瘍から選択されうる。例えば、がんは、骨がん、膵臓がん、皮膚がん、頭頸部がん、皮膚又は眼内悪性黒色腫、子宮がん、卵巣がん、直腸がん、肛門領域のがん、胃がん、精巣がん、乳がん、脳がん、卵管癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、膣癌、外陰癌、食道がん、小腸がん、内分泌系のがん、甲状腺がん、副甲状腺がん、副腎がん、腎臓がん、軟部組織肉腫、尿道がん、膀胱がん、腎臓がん、肺がん、非小細胞肺がん、胸腺腫、尿路上皮癌、白血病、前立腺がん、中皮腫、副腎皮質癌、リンパ腫、例えばホジキン病、非ホジキンリンパ腫、胃がん、及び多発性骨髄腫から選択されうる。

30

【0237】

一実施形態では、腫瘍は固形腫瘍である。したがって処置されうる固形腫瘍の例には、乳癌、肺癌、結腸直腸癌、膵臓癌、神経膠腫及びリンパ腫が挙げられる。そのような腫瘍の一部の例には、類上皮腫瘍、扁平上皮腫瘍、例えば頭頸部腫瘍、結腸直腸腫瘍、前立腺腫瘍、乳房腫瘍、小細胞及び非小細胞肺腫瘍を含む肺腫瘍、膵腫瘍、甲状腺腫瘍、卵巣腫瘍、及び肝腫瘍が挙げられる。他の例には、カボジ肉腫、CNS新生物、神経芽腫、毛細管性血管芽腫、髄膜腫及び脳転移、黒色腫、消化管及び腎臓癌、及び肉腫、横紋筋肉腫、神経膠芽腫、好ましくは多型神経膠芽腫、及び平滑筋肉腫が挙げられる。本発明のアンタゴニストが有効である血管形成皮膚がんの例には、扁平上皮癌、基底細胞癌、及び悪性のケラチノサイト、例えばヒト悪性ケラチノサイトの成長を抑制することによって処置することができる皮膚がんが挙げられる。

40

【0238】

一実施形態では、腫瘍は非固形腫瘍である。非固形腫瘍の例には、白血病、多発性骨髄腫、及びリンパ腫が挙げられる。

【0239】

一態様では、がんは、PD-L1陽性がんであると同定される。一態様では、がんは、局所進行切除不能、転移性、又は再発性がんである。

【0240】

50

その成長が本発明の抗体を使用して阻害されうる、好ましいがんには、典型的に免疫療法に応答するがんが挙げられる。処置するために好ましいがんの非制限的な例には、黒色腫(例えば、転移性悪性黒色腫)、腎臓がん(例えば、明細胞癌)、前立腺がん(例えば、ホルモン不応性前立腺癌)、乳がん、結腸がん、及び肺がん(例えば、非小細胞肺癌)が挙げられる。

【0241】

一実施形態では、がんは、別の処置、例えば化学療法後に進行している。

【0242】

本発明のシングルドメイン抗体及び医薬組成物は、異常に高レベルのPD-1を発現する細胞(例えば、消耗したT細胞、B細胞、単球等)に関連するがんの処置にとって特に有用である。他の好ましいがんには、PD-1並びに/又はそのリガンドであるPD-L1及び/又はPD-L2の発現の上昇によって特徴付けられるがんが挙げられる。一実施形態では、がんは、高レベルのがん関連遺伝子変異及び/又は高レベルの腫瘍抗原発現を有するがんから選択される。別の実施形態では、がんは、免疫原性であることが公知であるか、又は他のがん治療による処置時に免疫原性となることができるがんから選択される。

10

【0243】

免疫障害は、自己免疫疾患、移植対宿主病、関節炎、円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質症候群、自己免疫性アジソン病、副腎の自己免疫疾患、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性卵巣炎及び睾丸炎、自己免疫性血小板減少症、ベーチェット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、セリアックスブルー皮膚炎、慢性疲労性免疫機能障害症候群(CFIDS)、慢性炎症性脱髄性多発神経障害、チャグストラウス症候群、瘢痕性類天疱瘡、CREST症候群、寒冷凝集素症、クローン病、円板状エリテマトーデス、本態性混合型クリオグロブリン血症、線維筋痛症線維筋炎、糸球体腎炎、グレーブス病、ギランバレー、橋本甲状腺炎、特発性肺線維症、特発性血小板減少性紫斑病(ITP)、IgA腎症、若年性関節炎、扁平苔癬、エリテマトーデス、メニエール病、混合結合組織病、多発性硬化症、視神経脊髄炎(NMO)、1型又は免疫媒介性糖尿病、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、再生不良性貧血、結節性多発動脈炎、多発軟骨炎、多腺性症候群、リウマチ性多発筋痛症、多発筋炎及び皮膚筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、乾癬性関節炎、レイノー現象、ライター症候群、リウマチ性関節炎、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、スティフマン症候群、全身性エリテマトーデス、エリテマトーデス、高安動脈炎、側頭動脈炎/巨細胞動脈炎、横断性脊髄炎、潰瘍性大腸炎、ぶどう膜炎、血管炎、例えば疱疹状皮膚炎性血管炎、白斑、及びウェゲナー肉芽腫症から選択されうる。

20

30

【0244】

神経疾患は、アルツハイマー病、てんかん、パーキンソン病、認知症、多発性硬化症、末梢神経障害、又は帯状疱疹後神経痛から選択されうる。

【0245】

本発明のシングルドメイン抗体又は医薬組成物は、唯一の活性成分として、又は1つ若しくは複数の他の治療剤と組み合わせて投与してもよい。治療剤は、疾患の処置において有用である化合物又は分子である。治療剤の例には、抗体、抗体断片、薬物、毒素、ヌクレアーゼ、ホルモン、免疫調節剤、アポトーシス促進剤、抗血管新生剤、ホウ素化合物、光活性剤又は色素、及び放射性同位体が挙げられる。抗体分子には、完全な抗体又はその断片(例えば、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、一本鎖Fv断片(scFv)、又はシングルドメイン抗体、例えばV<sub>H</sub>ドメイン、又は抗体模倣タンパク質)が挙げられる。

40

【0246】

一実施形態では、シングルドメイン抗体は、既存の治療又は治療剤、例えば抗がん治療と組み合わせて使用される。このように、別の態様では、本発明はまた、本発明のシングルドメイン抗体又は医薬組成物及び抗がん治療の投与を含む組合せ治療にも関する。抗がん治療は、治療剤又は放射線治療を含んでもよく、これには、遺伝子治療、ウイルス治療、RNA治療、骨髄移植、ナノ治療、標的化抗がん治療、又は腫瘍溶解薬が挙げられる。他の治療剤の例には、他のチェックポイント阻害剤、抗新生物剤、免疫原性剤、減弱化がん

50

様細胞、腫瘍抗原、抗原提示細胞、例えば腫瘍由来抗原若しくは核酸をパルスした樹状細胞、免疫刺激サイトカイン(例えば、IL-2、IFN $\alpha$ 2、GM-CSF)、標的化低分子及び生物学的分子(例えば、シグナル伝達経路の構成要素、例えばチロシンキナーゼの調節剤、及び受容体チロシンキナーゼの阻害剤、及びEGFRアンタゴニストを含む腫瘍特異的抗原に結合する薬剤)、抗炎症剤、細胞傷害剤、放射性毒素剤、又は免疫抑制剤及び免疫刺激サイトカイン(例えば、GM-CSF)をコードする遺伝子をトランスフェクトした細胞、化学療法が挙げられる。一実施形態では、シングルドメイン抗体は手術と組み合わせて使用される。

【0247】

一実施形態では、本発明のシングルドメイン抗体又は医薬組成物は、免疫調節剤、チェックポイント調節剤、T細胞活性化に関係する薬剤、腫瘍微小環境調節剤(TME)、又は腫瘍特異的標的と共に投与される。例えば、免疫調節剤は、PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4、TIM-3、LAG-3、CEACAM、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、又はTGFRベータのうちの1つ又は複数の阻害剤から選択される免疫チェックポイント分子の阻害剤でありうる。別の実施形態では、免疫調節剤は、OX40、OX40L、CD2、CD27、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278)、4-1BB (CD137)、GITR、CD30、CD40、BAFFR、HVEM、CD7、LIGHT、NKG2C、SLAMF7、NKp80、CD160、B7-H3若しくはCD83リガンド、CD3、CD8、CD28、CD4、又はICAM-1のうちの1つ又は複数のアゴニストから選択される共刺激分子の活性化剤でありうる。

10

【0248】

一実施形態では、PD-1阻害剤は、Nivolumab(登録商標)、Pembrolizumab(登録商標)、又はPidilizumab(登録商標)から選択される抗PD-1抗体である。

20

【0249】

本発明の特定の実施形態では、組成物は、化学療法剤又は放射線療法と同時に投与される。別の特定の実施形態では、化学療法剤又は放射線療法は、本発明の組成物の投与の、好ましくは少なくとも1時間、5時間、12時間、1日、1週間、1カ月前又は後に、より好ましくは本発明の組成物の投与の数カ月(例えば、最大3カ月)前又は後に投与される。

【0250】

一部の実施形態では、本発明のシングルドメイン抗体は、2つ又はそれより多くの治療剤と共に投与されうる。一部の実施形態では、本発明の結合剤は、2つ又はそれより多くの治療剤と共に投与されうる。

30

【0251】

本発明のシングルドメイン抗体又は医薬組成物は、他の治療又は治療化合物又は治療と同時に又は異なる時期に、例えば、同時、個別に、又は連続的に投与されうる。

【0252】

別の態様では、本発明は、少なくとも1つの治療剤及び/又は診断剤にコンジュゲートされた本発明のシングルドメイン抗体を含む免疫コンジュゲートに関する。

【0253】

別の態様では、本発明は、疾患若しくは免疫応答を処置若しくは予防するため、及び/又は本発明のシングルドメイン抗体を含む疾患を診断する、予後を判定する、若しくはモニターするためにPD-1を検出するためのキットを提供する。そのようなキットは、PD-1タンパク質の検出を補助する他の構成要素、包装、説明書、又は材料を含みうる。キットは、上記の本発明の標識されたシングルドメイン抗体及び標識を検出するための1つ又は複数の化合物を含みうる。

40

【0254】

別の態様では、本発明は、凍結乾燥型で包装された、又は水性媒体中で包装された本発明のシングルドメイン抗体を提供する。

【0255】

本発明はまた、図面、実施例並びに/又はTable 1(表1)及びTable 2(表2)を参照して本明細書に記載されるシングルドメイン抗体にも関する。

【0256】

50

別の態様では、本発明の抗体は、診断試験及びアッセイ等の非治療目的のために使用される。試験試料中のヒトPD-1の存在を検出する方法は、前記試料を、本発明に従うシングルドメイン抗体、及び少なくとも1つの検出可能な標識と接触させる工程、並びにヒトPD-1に対する前記シングルドメイン抗体の結合を検出する工程を含む。

【0257】

一実施形態では、本発明は、がんを有する患者におけるPD-1媒介適応免疫抵抗を診断する方法に関する。方法は、試料を、検出可能な部分によって標識されている本明細書に開示される化合物と接触させる工程、及び免疫細胞、例えばCD8+T細胞、B細胞、及びマクロファージにおけるPD-1の発現を検出する工程を含む。試料は腫瘍組織でありうる。

【0258】

診断目的のための抗体の改変は当技術分野で周知である。例えば、抗体を、ビオチン等のリガンド基、又は蛍光基、放射性同位体、若しくは酵素等の検出可能なマーカ基によって改変してもよい。本発明の化合物は、通常の技術を使用して標識することができる。適した検出可能な標識には、フルオロフォア、クロモフォア、放射活性原子、電子密度の高い試薬、酵素、及び特異的結合パートナーを有するリガンドが挙げられるがこれらに限定されない。

【0259】

本明細書において特に定義していない限り、本開示に関連して使用した科学技術用語は、当業者によって一般的に理解される意味を有する。前述の開示は、本発明を作製及び使用するための方法、並びにその最善の様式を含む本発明の範囲に包含される主題の一般的説明を提供するが、当業者が本発明を實踐することができるように、及びその完全な書面での説明を提供するために、以下の実施例を提供する。しかし、当業者はこれらの実施例の細部が本発明を制限すると解釈すべきではなく、その範囲は、本開示に添付される特許請求の範囲及びその同等物から認識すべきである。本発明の様々な更なる態様及び実施形態は、本開示を考慮すれば業者に明らかであろう。

【0260】

本明細書において言及した全ての文書は、遺伝子受託番号の参照及び特許刊行物の参照を含む、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。

【0261】

本明細書において使用される場合の「及び/又は」は、他方の存在下又は非存在下での2つの明記された特色又は構成要素の具体的開示であると解釈すべきである。例えば、「A及び/又はB」は、各々が本明細書において個々に記載されているかのよう、(i)A、(ii)B、並びに(iii)A及びBの各々の具体的開示であると解釈すべきである。本文がそれ以外であることを指示していない限り、上記の特色の説明及び定義は、本発明の任意の特定の態様又は実施形態に限定されず、記載の全ての態様及び実施形態に等しく適用される。

【0262】

本発明を非制限的な実施例において更に説明する。

【実施例】

【0263】

(実施例1)

Tg/TKOマウスの構築

内因性の重鎖及び軽鎖抗体発現に関して沈黙化されているバックグラウンド内の生殖系列構成にヒト重鎖抗体トランスジェニック座を有するマウス(トリプルノックアウト、又はTKO)を、既に記述されているとおりに作製した(国際公開第2004/076618号、国際公開第2003/000737号、Renら、Genomics, 84, 686, 2004;Zouら、J. Immunol., 170, 1354, 2003、及び国際公開第2016/062990号)。簡単に説明すると、トランスジェニックマウスを、C<sub>H</sub>1ドメイン、マウスエンハンサー、及び調節領域を欠如するマウス免疫グロブリン定常領域遺伝子と組み合わせて過剰なヒトV<sub>H</sub>、D、及びJ遺伝子を含む酵母人工染色体(YAC)を、新鮮な受精卵母細胞の前核にマイクロインジェクション後に誘導した。酵母人工染色体(YAC)は、酵母における非常に大きいDNAインサートのクローニングのために使用することが

10

20

30

40

50

できるベクターである。天然の酵母染色体のように挙動するために必須である3つ全てのシス作用構造エレメント(自律複製配列(ARS)、セントロメア(CEN)、及び2つのテロメア(TEL))を含むことに加えて、大きいDNAインサートを受容するその許容量によって、それらは酵母細胞における染色体様安定性、及び伝播の正確性にとって必要な最小のサイズ(150 kb)に達することができる。YACの構築及び使用は当技術分野で周知である(例えば、Bruschi, C.V.及びGjuracic, K. Yeast Artificial Chromosomes, Encyclopedia of Life Sciences, 2002, Macmillan Publishers Ltd., Nature Publishing Group/www.els.net)。

**【0264】**

使用したYACは、複数のヒト重鎖V遺伝子、複数のヒト重鎖D及びJ遺伝子、マウスC<sub>H</sub>1遺伝子、及びマウス3'エンハンサー遺伝子を含んだ。これはC<sub>H</sub>1エクソンを欠如する。

10

**【0265】**

トランスジェニック創始マウスを、内因性の免疫グロブリン発現を欠如する動物と戻し交配して、記載の免疫試験に使用するTg/TKO系統を作製した。

**【0266】**

(実施例2)

免疫のための抗原

免疫は、R&D社から購入した組換えヒトPD-1 Fcキメラ、カタログ番号1086-PD、ロット番号FVQ081502Bを使用した。

**【0267】**

(実施例3)

免疫プロトコール

8~12週齢のTg/TKOマウスの各々に、フロイント完全アジュバント中で乳化した組換え精製ヒトPD-1タンパク質の50 µg又は10 µgのいずれかの初回プライミング用量を投与し、皮下に送達した後、フロイントの不完全アジュバント中で乳化した組換えタンパク質10 µgの3回の追加免疫も同様に最初のプライミング後の様々な間隔で皮下投与した。組換え精製ヒトPD-1タンパク質抗原10 µgの最終用量を、リン酸緩衝食塩水中、アジュバントの非存在下で腹腔内に投与した。

20

**【0268】**

(実施例4)

血清のELISA

血清を免疫の前後にマウスから収集し、組換えhuPD-1-FcのPBS中の溶液によって一晚コーティングしたNunc Maxisorpプレート(Nunc社、カタログ番号443404)を使用してPD-1/Fc免疫に応答した血清中PD-1/Fc反応性重鎖抗体の存在に関してELISAによってチェックした。プレートを、PBSを使用して洗浄した。非特異的タンパク質相互作用を遮断するために、3%(重量/体積)スキムミルク粉末(Marvel(登録商標))のPBS溶液をウェルに添加し、プレートを室温で少なくとも1時間インキュベートした後、不要物を捨てた。

30

**【0269】**

全血試料を13000rpmで5分間遠心分離して、血液から血清を分離した。血清の希釈液をポリプロピレンチューブ又はプレートにおいて3% Marvel(商標)/PBS中で調製し、室温で少なくとも1時間プレインキュベートした後、ブロックしたELISAプレートに移し、少なくとも1時間インキュベートした。非結合タンパク質を、PBS/Tween 20の後にPBSによる繰り返し洗浄によって除去した。PBS/3% Marvel中で調製したビオチンコンジュゲートヤギ抗マウスIgG、Fcガンマサブクラス1特異的抗体(Jackson社、カタログ番号115-065-205)の1:10,000の溶液を各ウェルに添加して、室温で少なくとも1時間インキュベートした。非結合検出抗体を、PBS/Tween20及びPBSによる繰り返し洗浄によって除去した。ニュートラアビジン-HRP溶液(Pierce社、カタログ番号31030)の3%Marvel/PBS中の溶液をELISAプレートに添加し、30分間結合させた後、上記のように洗浄した。

40

**【0270】**

マウスを、血清中の抗体の存在に関してELISAによってチェックした。マウスは全て、強い免疫応答を示した。

50

## 【0271】

## (実施例5)

免疫したマウスからのライブラリの生成

上記の免疫したマウスからのライブラリの生成は、以下に概要するライブラリ生成の標準プロトコールに従った。

## 【0272】

組織収集及びホモジナイゼーション

脾臓全体、鼠径部及び上腕リンパ節を、標準的なプロトコールに従って使用した。

## 【0273】

RNA抽出及びRT-PCR

脾臓: 上清400  $\mu$ l を、総RNAの調製のために使用した。RNAを、Qiagen RNeasy(登録商標)キット(カタログ番号74104)を使用して、製造元のプロトコールに従って脾臓全体から抽出した。

## 【0274】

リンパ節: Kingfisher と本質的に同じプロセスによって調製した。

## 【0275】

$V_H$ 配列を、Superscript III RT-PCR高正確性キット(Invitrogen社、カタログ番号12574-035)を使用して、製造元のプロトコールに従ってRNA試料から得た。各々の脾臓及びLN RNA試料に関して、 $V_H1$ 、 $V_H2$ 、 $V_H3$ 、 $V_H4$ 、又は $V_H6$ ファミリーのプライマーと組み合わせた単一の $J_H$ プライマーを使用して、RT-PCR反応を実施した。

## 【0276】

370bpの範囲の産物を、ゲル電気泳動によって確認した。

## 【0277】

RT-PCR産物をプールして、リンパ節及び脾臓からの産物を組み合わせた。増幅した材料を、GeneJet(商標)精製キット(カタログ番号K0702)を使用して、製造元のプロトコールに従って精製した。

## 【0278】

ファージミドベクターへのクローニング

これらの試験においてファージミドベクター-pUCG3を使用した。通常のPCRに基づく方法を使用して、増幅した $V_H$ 配列から $V_H$ ファージミドライブラリを構築した。精製した $V_H$  RT-PCR産物を使用して、線形pUCG3からPCR反応をプライミングし、それによって $V_H$ の異種集団をpUCG3にクローニングした。

## 【0279】

PCR産物を1%(重量/体積)アガロースゲルにおいて分析した。

## 【0280】

ファージミドライブラリの生成

$V_H$ /ファージミドPCR産物を、動物起源毎にプールし、Fermentas PCR精製キット(カタログ番号K0702)を使用して製造元の説明書に従って精製した。溶出したDNAを使用してTG1大腸菌(Lucigen社、カタログ番号60502-2)を、Bio-Rad GenePulser Xcellを使用する電気穿孔によって形質転換した。電気穿孔した細胞をプールした。

## 【0281】

形質転換体の10倍希釈シリーズを、2%(重量/体積)グルコース及び100  $\mu$ /mlアンピシリンを有する2xTY寒天ペトリプレートに播種した。これらの皿で得られたコロニーを使用して、ライブラリサイズを推定した。形質転換体の残りを、2%(重量/体積)グルコース及び100  $\mu$ /mlアンピシリンを補充した大きいフォーマットの2xTY寒天バイオアッセイ皿に播種した。全ての寒天プレートを30  $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。

## 【0282】

2xTYブロス10mlを大きいフォーマットのバイオアッセイ皿に添加することによって、ライブラリを回収した。細菌コロニーを丁寧にこすり取り、OD600を記録した。アリコート

を、50%(体積/体積)グリセロール溶液の等量を添加後、凍結バイアル中で-80  $^{\circ}$ Cで保存す

10

20

30

40

50

るか、又はファージ選択プロセスに直接使用した。

【0283】

(実施例6)

PD-1結合 $V_H$ の単離のための選択戦略

ライブラリファージストックの調製及びファージディスプレイ選択は、公表された方法 (Antibody Engineering、Benny Lo編、8章、161~176頁、2004)に従って実施した。ほとんどの場合、パニングアプローチと組み合わせたファージディスプレイを使用して、結合 $V_H$ ドメインを単離した。しかし、可溶性選択及びストレス(例えば、熱)下で実施する選択を含む、多様な異なる選択方法が当技術分野において十分に記載されている。

【0284】

(実施例7)

CHOヒトPD-1細胞に対する結合及びPD-L1結合PD-1の阻害に関するペリプラズム抽出物のスクリーニング

ライブラリの選択後、ヒトPD-1を発現するCHO細胞に結合し、組換えヒトPD-1タンパク質と組換えヒトPD-L1タンパク質との間の相互作用を部分的に阻害するか、又は阻害しない特定の $V_H$ を、細菌ペリプラズム抽出物のシングルポイントスクリーニングによって同定した。小規模細菌ペリプラズム抽出物を、深型ウェルプレートにおいて成長させた1ml培養物から調製した。開始培養物を使用して、0.1%(重量/体積)グルコース及び100 µg/mlアンピシリンを補充した2×TYブロス(Melford社、カタログ番号M2130)を含む96ウェル深型プレート(Fisher社、カタログ番号MPA-600-030X)に接種し、37 °C、250rpmで振とうさせた。OD<sub>600</sub>が、0.6~1に達すると、 $V_H$ 産生を、0.5mM IPTG及びアンピシリンを補充した2×TY 100 µlを添加することによって誘導し、培養物を、220rpmで振とうさせながら30 °Cで一晩成長させた。大腸菌を、3200rpmで10分間の遠心分離によって沈降させ、上清を捨てた。細胞沈降物を、氷冷抽出緩衝液(50mM MOP、0.5mM EDTA、0.5Mスクロース)120 µlに再懸濁した後、1:5希釈した氷冷抽出緩衝液180 µlを添加した。細胞を氷中で30分間インキュベートした後、4500rpm、4 °Cで15分間遠心分離した。上清を、アッセイで試験するためにポリプロピレンプレートに移した。

【0285】

上清中のHisタグ $V_H$ のCHO細胞発現ヒトPD-1に対する結合を、マイクロウェルの底に沈降したビーズ又は細胞に局在する蛍光を検出する蛍光ベースのプラットフォームである蛍光マイクロボリュームアッセイ技術(FMAT)(Dietzら、Cytometry 23:177~186頁(1996)、Miragliaら、J. Biomol. Screening 4:193~204頁(1999)を使用して評価した。CHO TREXヒトPD1細胞株を、標準的な手順によって完全長のヒトPD-1配列を使用して施設内で生成した。試薬は全て、PBS、0.1%ウシ血清アルブミン、0.01%アジ化ナトリウムを含むFMATアッセイ緩衝液(pH7.4)中で調製した。ペリプラズム調製物を、384ウェル黒色透明ボトムアッセイプレート(Costar社、カタログ番号3655)に移し、1.5nM抗His(Millipore社、カタログ番号05-949)/3nMヤギ抗マウスAlexa Fluor-488(Jackson Immunolabs社、カタログ番号115-545-071)及びDRAQ5(Thermo Scientific社、カタログ番号62251)によって予め染色した2000個のCHOヒトPD-1細胞と共に室温で少なくとも2時間インキュベートした。プレートを、TP Mirrorballプレートリーダーにおいて488nm及び640nmで励起後、FL2(502nm~537nm)及びFL5(677~800nm)チャンネルで読み取った。データを、FL5の境界及びピーク強度でゲートを設定し、ゲート設定したデータのFL2平均蛍光強度の中央値を、 $V_H$ 結合の決定のために使用した。

【0286】

CHO PD-1結合アッセイと並行して、ペリプラズム抽出物を、HTRF阻害アッセイにおけるシングルポイントスクリーニングによるPD-L1タンパク質とPD-1タンパク質との相互作用の阻害に関して試験した。試料及び試薬は全て、PBS、0.1%(重量/体積)BSA、及び0.4Mフッ化カリウムを含むHTRFアッセイ緩衝液中で調製した。ペリプラズム抽出物を、25nM Strepタグ付きヒトPD-L1(Acro Biosystems社、カタログ番号PD1-H5282)、1.5nM抗ヒトFcクリプテートPAb(Cisbio社、カタログ番号61HFCKLB)、10nM StrepMAB-Oyster 645コンジュゲ

10

20

30

40

50

ートと共に黒色384ウェル浅型プレート(Costar社、カタログ番号3676)において室温で少なくとも3時間インキュベートした。ペリプラズム抽出物試料緩衝液を含む総結合対照及び過剰量の非タグ付き競合物質を含む非特異的結合対照を、データ正規化のために各々のプレートに設定した。620nm及び665nmでの時間分解蛍光発光を、BMG PHERAstarプレートリーダーにおいて337nmで励起後に測定した。データを、非特異的結合対照ウェルから決定したバックグラウンドシグナルを差し引いた後の総結合対照の(%対照)として表記した。FL2蛍光>1000でCHOヒトPD-1細胞に結合し、PD-L1に対するPD-1結合の部分的阻害を示すか又は阻害を示さないV<sub>H</sub>を同定した(図1a及び図1b)。

【0287】

(実施例8)

シーケンシング

上記のように同定した各々の個々のV<sub>H</sub>クローンをファージミドからシーケンシングし、V<sub>H</sub>生殖系列及びCDR3アミノ酸類似性に基づいて群分けした。代表的なクローンを更に特徴付けした。更なるクローンを、クローン1.1又は2.1の配列最適化によって生成した。最適化のために標準的な方法を使用した。Table 1(表1)に示されるクローン1.1~1.18を上記のように単離して、単一のファミリーに群分けした。クローン1.19~1.50は、クローン1.1の配列最適化クローンである。Table 2(表2)に示されるクローン2.1~2.11を上記のように単離して、単一のファミリーに群分けした。クローン2.12~2.53は、クローン2.1の配列最適化クローンである。

【0288】

(実施例9)

精製V<sub>H</sub>シングルドメイン抗体の調製及び特徴付け

a) 精製V<sub>H</sub>の調製

精製V<sub>H</sub>を、ペリプラズム抽出物のニックル-アガロースアフィニティクロマトグラフィー精製のために、V<sub>H</sub> C末端6xHISタグを使用することによって得た。各V<sub>H</sub>の開始培養物を、2%(重量/体積)グルコース及び100 µg/mlアンピシリンを補充した2xTY培地(2xTYプロス(Melford社、カタログ番号M2103)中、250rpmで振とうさせながら30 で一晚成長させた。次いでこの一晚培養物を使用して2xTY培地50ml~200mlを接種し、250rpmで振とうさせながら37 でおよそ6~8時間(OD<sub>600</sub>=0.6~1.0となるまで)インキュベートした。培養物を3200rpmで10分間遠心分離し、細胞ペレットを100 µg/mlアンピシリン/1mM IPTGを含む新鮮な2xTYプロス中に再懸濁した。振とうフラスコを30 及び250rpmで一晩インキュベートした。培養物を再度、3200rpmで10分間遠心分離し、上清を捨てた。細胞ペレットを、氷冷抽出緩衝液(20%(重量/体積)スクロース、1mM EDTA、50mM Tris-HCl pH8.0、又は50mM MOPS)中で軽くピペティングして再懸濁した後、1:5希釈した氷冷抽出緩衝液で更に希釈した。細胞を氷中で30分間インキュベートした後、4500rpm、4 で15分間遠心分離させた。上清を、10mMイミダゾール(Sigma社、カタログ番号I2399)及び予め平衡にしたニックルアガロースビーズ(Qiagen社、Ni-NTA 50%溶液、カタログ番号30210)を含むチューブに移した。V<sub>H</sub>結合を軽く振とうさせながら4 で2時間進行させた。ビーズをpolyprepカラム(BioRad社、カタログ番号731-1550)に移し、上清を重力流によって捨てた。カラムをPBS/0.05% Tween(登録商標)によって3回洗浄後、PBS/20mMイミダゾール5mlによって3回洗浄した。V<sub>H</sub>を、PBS/250mMイミダゾールを使用してカラムから溶出した。イミダゾールを、NAP-5カラム(GE Healthcare社、17-0853-01)による緩衝液交換及びPBSによる溶出によって精製V<sub>H</sub>調製物から除去した。精製V<sub>H</sub>の収率を、分光光度法によって推定し、SDS PAGEを使用して純度を評価した。

【0289】

或いは、V<sub>H</sub>を、pJExpressベクターを有するW3110大腸菌の上清から精製した。この手順に関して、培養物の最大400mlをTB培地中250rpmで振とうさせながら37 で成長させた後、1mM IPTGによって一晚誘導した。得られた上清を回収し、V<sub>H</sub>を、Ni-セファロースエクセルカラム(HiScale 16、GE Healthcare社)を使用してAKTA Pure上で精製した。精製したV<sub>H</sub>の収率を分光光度法によって推定し、SDS PAGEを使用して純度を評価した。

10

20

30

40

50

## 【 0 2 9 0 】

## b) 種交叉反応性試験

精製 $V_H$ を、HTRF結合アッセイフォーマットにおいて、ヒトPD-1(R&D Systems社、カタログ番号1086-PD)、カニクイザルPD-1(Acro Biosystems社、カタログ番号PD1-C5254)及びマウスPD1(R&D Systems社、カタログ番号1021-PD)に対するその結合能に関して試験した。全ての試薬及び連続希釈した $V_H$ を、PBS、0.1% BSA、及び0.4Mフッ化カリウムを含むアッセイ緩衝液中で調製した。試料又はアッセイ緩衝液(非特異的結合)を、黒色384ウェル浅型アッセイプレートにおいて、2nMヒト/カニクイザル又はマウスPD-1、1nM抗ヒト-FcクリプテートPAb(Cisbio社、カタログ番号61HFCKLB)、及び30nM抗His-D2(CisBio社、カタログ番号61HISDLA)と共に室温で少なくとも3時間インキュベートした。620nm及び665nmでの時間分解蛍光発光をBMG PHERAstarプレートリーダーにおいて337nmで励起後に測定した。HTRF比((665nm発光/620nm発光) × 10000)を計算し、データを(非特異的結合)に関して補正し、特異的結合シグナルを生じた。

10

## 【 0 2 9 1 】

上記で説明したように生成した $V_H$ シングルドメイン抗体は、ヒト(図2a)及びカニクイザルPD-1(図2b)組換えタンパク質に対する結合を示したが、マウスPD-1タンパク質(図2c)に対しては結合を示さなかった。

## 【 0 2 9 2 】

## 【表 4】

20

Table 3 得られた EC50 値を示す

$V_H$ シングルドメイン抗体	ヒトPD-1 EC <sub>50</sub> (M)	カニクイザルPD-1 EC <sub>50</sub> (M)	マウスPD-1 EC <sub>50</sub> (M)
1.2	9.0E-10	1.1E-9	結合なし
1.1	5.0E-10	6.0E-10	結合なし
2.1	3.3E-09	6.3E-09	結合なし
1.39	2.6E-09	6.0E-09	結合なし
2.12	1.3E-08	1.8E-08	結合なし

30

40

## 【 0 2 9 3 】

## c) 組換えヒトPD-1タンパク質に対するヒトPD-L1及びPD-L2結合の阻害

精製 $V_H$ をHTRFアッセイ緩衝液によって連続希釈し、上記に記述されているようにHTRF PD-1:PD-L1阻害アッセイにおいて試験した。

## 【 0 2 9 4 】

PD-L2阻害アッセイに関して、組換えヒトPD-1タンパク質を、製造元のプロトコールに従ってユーロピウムトリスピリジニクリプテート(Cisbio社、カタログ番号62EUSPEA)によって標識し、PD-L2-Fc(Acro Biosystems社、カタログ番号PD2-H882R)を、EZ-リンクキットプロトコール(Thermo 21327)に従ってビオチン化した。 $V_H$ の連続希釈液を、10nMストレプトアビジンAlexaFluor-647(Life Technologies社、カタログ番号S32357)、3nMビオチ

50

ン化PD-L2-Fc、及びユーロピウムクリプテート標識PD-1-Fc(167倍希釈)と共に、室温で少なくとも3時間インキュベートした。V<sub>H</sub>は、PD-L1阻害アッセイにおいて部分的阻害プロファイルを示したが、ヒトPD-1タンパク質に対するPD-L2の結合を阻害しなかった(図3は、V<sub>H</sub>シングルドメイン抗体1.1及び1.2を示す)。

【0295】

d)CHOヒトPD-1細胞に対するヒトPD-L1及びヒトPD-L2の阻害

精製V<sub>H</sub>をFMATアッセイ緩衝液中で連続希釈し、上記のようにCHOヒトPD-1細胞に対する結合に関して、及びCHOヒトPD-1細胞に対するヒトPD-L1結合の阻害に関して試験した。

【0296】

阻害アッセイに関して、全ての試薬をFMATアッセイ緩衝液中で調製した。V<sub>H</sub>、緩衝液(総結合対照)、又は過剰量の競合剤(非特異的結合対照)を、400pMヒトFcタグ付きヒトPDL-1(又は100pMヒトFcタグ付きヒトPD-L2)、4nM抗ヒトFc-Alexa Fluor-488、及びウェルあたり2000個のCHOヒトPD1 DRAQ5染色細胞と共に、384ウェル黒色透明ボトムアッセイプレートにおいてインキュベートした。プレートを室温で2時間インキュベートした後、Mirrorballプレートリーダー(TTP)において488nm及び640nmで励起後、FL2(502nm~537nm)及びFL5(677~800nm)チャンネルで蛍光を測定した。データを、非特異的結合対照ウェルから決定したバックグラウンドシグナルを差し引いた後の総結合対照の%(すなわち、%対照)として表記した。

【0297】

CHOヒトPD-1細胞に対する結合及びCHOヒトPD-1細胞に対するヒトPDL-1の結合の阻害に関する例示的なデータをそれぞれ、図4a及び図4bに示す。Humabody(登録商標)1.1及び1.20は、CHOヒトPD1細胞(図4a)に対して濃度依存的結合を示したが、CHOヒトPD-1細胞に対するPD-L1(図4b)及びPD-L2結合を阻害しなかった(Table 4(表5))。

【0298】

【表4】

Table 4

Humabody (登録商標) V <sub>H</sub>	CHO PD-1結合のEC50	CHO PD-1:PD-L1 IC <sub>50</sub> (M)	CHO PD-1:PD-L2 IC <sub>50</sub> (M)
1.39	0.6E-09	阻害なし	阻害なし
2.12	1.3E-09	阻害なし	阻害なし
2.1	0.7E-09	阻害なし	

【0299】

e)レポーター遺伝子アッセイ

V<sub>H</sub>シングルドメイン抗体が、PD-1:PD-L1遮断の結果としてトランスフェクトJurkat細胞における機能的応答を阻害する能力を、NFAT-ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイを使用して評価した。NFAT応答エレメントと共にプロモーターの制御下でヒトPD-1及びルシフェラーゼレポーター遺伝子を発現するJurkatレポーター細胞株、並びにテトラサイクリン誘導プロモーターの制御下でT細胞受容体活性化因子及びヒトPD-L1を発現するCHO細胞株を、標準的な方法によって生成した。細胞をバルクで調製した後、液体窒素中で凍結

保存した。

【0300】

CHOヒトPD-L1/TCR活性化因子細胞を、37 °Cの水浴中で融解し、(Hams F12/10% FBS/1 μg/mlテトラサイクリン)に再懸濁し、96ウェル白色TC処理アッセイプレートに10000個/ウェルで播種した。プレートを37 °CのCO<sub>2</sub>インキュベータ内で一晩インキュベートした。

【0301】

試料を、アッセイ培地(RPMI+2% FBS)中で連続希釈した。Jurkat PD-1レポーター細胞を、37 °Cの水浴中で融解し、培地で1回洗浄後、アッセイ培地中で5e<sup>5</sup>個/mlに希釈した。培地をCHO細胞から除去し、希釈した試料又はアッセイ培地(バックグラウンド対照)50 μlを、プレートに添加した後、希釈したJurkatレポーター細胞50 μlを添加した。プレートを37 °CのCO<sub>2</sub>インキュベータ内で6時間一晩インキュベートした後、インキュベータから外し、室温で20分間平衡にした。NanoGlo基質(NanGlo緩衝液中で1:50に希釈した基質100 μl、(Promega社、カタログ番号N1120)を添加し、プレートを室温で20分間インキュベートした後、発光シグナル(RLU)を測定した。データを倍率/バックグラウンドシグナルとして表記した。Humabody(登録商標)V<sub>H</sub> 1.39、2.12、2.1、及び1.1を、対照PD-1シングルブロッキングV<sub>H</sub> VH(A)(配列番号528)及びニパラトープ性分子(ブロッキングVH(A)-4GS-1.39、ブロッキングVH(A)-4GS-2.12)(PD-1アンタゴニスト)と共に試験した。

10

【0302】

レポーターアッセイにおけるV<sub>H</sub>の活性に関する例示的なデータを図5a、図5b、及び図5cに示す。試験したHumabody(登録商標)V<sub>H</sub>は、アッセイにおいて活性を示さず、Humabody(登録商標)V<sub>H</sub> 1.39、2.12、及び1.1が、PD-1:PD-L1機能的相互作用を遮断しないことを証明した。ニパラトープ性分子は、増加したブロッキング活性を示す(一価の遮断剤と比較して10~25倍)。

20

【0303】

f) Octetを使用した結合速度論の測定

ヒトPD-1-huFcに対するクローンの結合速度論を、リアルタイムバイオレイヤー干渉計に基づくバイオセンサーOctet(ForteBio社)において測定した。組換えヒトPD-1-huFcを、標準的なアミンカップリングによってpH 5.0の10mM酢酸ナトリウム中のアミン反応性バイオセンサーに固定したか、又はプロテインGバイオセンサー(ForteBio社)によって捕捉した。結合試験は全て、HBS-ET Octet速度論緩衝液中で実施した。バイオセンサーは、異なる工程の間にOctet速度論緩衝液中で常に洗浄した。各々のHumabody(登録商標)V<sub>H</sub>の2倍希釈シリーズを、100~30nM範囲の最高濃度から7点濃度で作製した。結合工程の各々の接触時間は、180~300秒まで異なり、解離工程は400~600秒まで異なった。速度論の結合速度定数(k<sub>a</sub>)及び解離速度定数(k<sub>d</sub>)を、ForteBio社の分析ソフトウェアを使用してデータを処理し、1:1結合モデルにフィットさせることによって決定した。計算した親和性及び速度論定数をTable 5(表6)に示し、KDはナノモル濃度範囲である。

30

【0304】

## 【表 6】

Table 5

Humabody (登録商標) V <sub>H</sub>	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
1.1	4.5E+05	9.01E-04	1.9E-9
2.1	5.9E+05	1.5E-03	2.6E-9
2.39	3.7E+5	5.9E-04	1.6E-9
2.52	6.7E+05	2.2E-03	3.3E-09
2.53	1.0E+06	1.7E-02	1.6E-08
2.13	1.3E+06	3.5E-02	2.5E-08
2.37	4.5E+05	1.5E-03	3.4E-09
1.34	1.9E+05	7E-04	3.6E-09
1.33	3.7E+05	7.4E-04	2.0E-09
1.37	2.4E+05	1.3E-05	5.5E-09

10

20

## 【0305】

## g) 表面プラズモン共鳴を使用したヒトPD-1に対する結合速度論

ヒトPD-1-huFcに対するある特定のV<sub>H</sub>シングルドメイン抗体結合の結合速度論を、Biacore T200機器(GE Healthcare社)を使用して表面プラズモン共鳴(SPR)技術によって測定した。組換えヒトPD-1-huFcを、pH5.5の10mM酢酸ナトリウム中で0.01mg/ml溶液の抗原を使用して、標準的なアミンカップリングによってCM5センサーチップ(GE Healthcare社)に固定した。参照フローセルでは、ブランク固定を実施した。単一サイクル速度論アッセイを使用して、相互作用を調べ、各Humabody(登録商標)の3倍希釈シリーズを最高濃度30nMから5点濃度で作製した。結合速度論は、Humabody(登録商標)をHBS EP+緩衝液中でチップ表面に流速30 μl/分で流すことによって追跡した。結合工程の各々の接触時間は180秒間であり、解離工程は1200~3600秒まで変化した。データを、Biacore T200評価ソフトウェアを使用してダブルリファレンスを差し引いた後に、1:1結合モデルにフィットさせた。計算した親和性及び速度論定数を以下のTable 6(表7)に示す。

30

## 【0306】

## 【表 7】

Table 6

Humabody (登録商標) V <sub>H</sub>	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
1.48	1.80E+05	2.91E-03	1.62E-08
1.39	3.16E+05	1.34E-03	4.24E-09
1.40	2.43E+05	1.45E-03	5.98E-09
1.44	2.24E+05	2.04E-03	9.10E-09
1.26	2.65E+05	2.11E-03	7.94E-09
1.47	2.48E+05	2.54E-03	1.02E-08
1.50	1.60E+05	2.29E-03	1.43E-08
2.12	5.5E+6	0.03848	6.89E-9

10

## 【0307】

20

## h) 血清中安定性

V<sub>H</sub>の血清中安定性を、ヒト及びマウス血清(Sigma社、M5905)の両方において0、1、4、又は7日間インキュベーション後のその活性の測定によって評価した。プレインキュベートした試料を、連続希釈し、2.1エピトープ競合アッセイにおいて試験した。マウス又はヒト血清のいずれかの存在下、37℃でインキュベーション後、活性の有意な変化は認められなかった(Table 7)(表8)。例示的な結合曲線データを図9a及び図9bに示す。

## 【0308】

## 【表 8】

30

Table 7

構築物	IC 50 (M)							
	0日目		1日目		4日目		7日目	
	ヒト	マウス	ヒト	マウス	ヒト	マウス	ヒト	マウス
1.39	12.9E-09	8.7E-09	10.1E-09	9.3E-09	10.2E-09	11.1E-09	9.3E-09	11.6E-09

## 【0309】

40

i) V<sub>H</sub>シングルドメイン抗体は、良好な安定性を証明する

精製V<sub>H</sub>をサイズ排除クロマトグラフィーに供した。簡単に説明すると、精製V<sub>H</sub>を、PBS緩衝液中の1又は5mg/mlで、4℃又は40℃のいずれかで0~14日間保存した後、Waters ACQUITY BEH 125 SECカラム上での分離のために、PDA検出器(280nmでの検出)を含むWaters H-Class Bio UPLCを使用して様々な時点で分析した。試料を、10µl体積で注入し、200mM NaCl、100mMリン酸ナトリウム、pH7.4+5%プロパン-1-オールを含む移動相によって流速0.4ml/分で実行した。データを6分間収集し、開始時(T=0)に存在している量と比較して貯蔵後に残っている単量体ピークの面積を計算した。40℃で14日間インキュベートした抗PD-1 V<sub>H</sub>シングルドメイン抗体1.1の例を図6及びTable 8(表9)に例証する。4℃で14日間インキュベーション後、有意な変化は認められなかった。

## 【0310】

50

## 【表9】

**Table 8:** V<sub>H</sub>シングルドメイン抗体の安定性。これは0、1、3、7、及び14日後に存在する単量体の百分率を示す。

名称	0日目	1日目	4日目	7日目	14日目
1.1	100	90.19	87.04	94.93	100.10
1.1	100	95.01	91.79	92.55	90.46
1.21	100.00	100.44	104.46	106.95	111.95
1.29	100.00	99.20	101.18	108.35	115.06
1.39	100.00	102.25	101.71	104.41	96.61
2.12	100.00	99.26	99.10	93.94	90.35
2.1	100.00	99.20	100.15	100.40	100.78
2.29	100.00	99.99	101.03	93.96	96.03
2.52	100.00	100.80	100.79	96.70	99.58
2.28	100.00	101.41	101.04	99.40	100.46
2.53	100.00	99.79	101.12	100.00	101.06

10

20

## 【0311】

## J)1.1及び2.1エピトープ競合アッセイ

親の(非最適化)シングルドメイン抗体と比較して改善された活性及び/又は発現レベルを有する配列最適化シングルドメイン抗体を、最初に、FMATエピトープ競合アッセイにおいてCHOヒトPD-1細胞に対する親クローン1.1又は2.1の結合と競合することができるか否かに関して細菌ペリプラズム抽出物を試験することによって同定した。

## 【0312】

Humabody(登録商標)1.1又は2.1 V<sub>H</sub>配列を、PCRによって増幅し、C末端に融合したStrepタグと共に発現を可能にするベクターにサブクローニングした。発現ベクターによって形質転換したTG1細菌培養物を培養し、ペリプラズム抽出物を、抽出緩衝液(20重量/体積%スクロース、1mM EDTA、50mM Tris-HCl pH8.0)を使用して調製した後に、Strepタグ付きV<sub>H</sub>を、Strep-Tactinアフィニティ樹脂(Qiagen社、30002)を使用してペリプラズムから精製した。

30

## 【0313】

エピトープ競合アッセイに関して、試薬をFMATアッセイ緩衝液中で調製した。細菌のペリプラズム抽出物、緩衝液(総結合対照)、又は過剰量のHisタグV<sub>H</sub>競合剤(非特異的結合対照)を、2nM 1.1-Strepタグ付きタンパク質又は2nM 2.1-Strepタグ付きタンパク質、1.5nM Strep-Tag(登録商標)IIモノクローナル抗体(Millipore社、71590)、2.5nMヤギ抗マウスFc-Alexa Fluor 488、及びウェルあたり2000個のCHOヒトPD-1 DRAQ5染色細胞と共に、384ウェル黒色透明ボトムアッセイプレートにおいてインキュベートした。プレートを室温で少なくとも1.5時間インキュベートした後、Mirrorballプレートリーダー(TTP)において488nm及び640nmで励起後、FL2(502nm~537nm)及びFL5(677~800nm)チャンネルにおいて蛍光を測定した。データを、非特異的結合対照ウェルから決定されたバックグラウンドシグナルを差し引いた後の総結合対照の%(すなわち、%対照)として表記した。親V<sub>H</sub>と比較して改善された活性を示すクローンを精製し、IC<sub>50</sub>決定のためにエピトープ競合アッセイにおいてマルチポイントで試験したが、又は以下に記載のレポーター遺伝子アッセイにおいて直接試験した(Table 10(表10)に示すデータ)。

40

## 【0314】

50

【表 10】

Table 10

名称	1.1 EC IC50 (M)	2.1 EC IC50 (M)
1.39	8.9E-09	9.7E-09
1.34	6.5E-09	
1.26	8E-09	
1.33	2.5E-09	
1.37	7.5E-09	
2.27	9E-09	1.3E-08
2.53	7E-09	1.4E-08
2.52	6.5E-09	2.1E-08
1.1	3.5E-09	3.6E-09
2.1	9.2E-09	9.4E-09

10

20

## 【0315】

k) リンパ球混合反応におけるヒトT細胞活性化に及ぼすPD-1特異的V<sub>H</sub>シングルドメイン抗体の効果

PD-1特異的V<sub>H</sub>シングルドメイン抗体V<sub>H</sub> 1.1は、PD-1とPD-L1との機能的相互作用を遮断せず、したがってリンパ球混合反応におけるT細胞活性化に影響を及ぼさない。単球をヒト末梢血単核球(PBMC)から単離し、GM-CSF及びIL-4を使用して樹状細胞に7日間分化させた。樹状細胞を、同種異系CD4+ T細胞と共に培養し、磁気分離を介してPBMCから単離した。共培養物を、PD-1特異的V<sub>H</sub>シングルドメイン抗体又は対照の存在下で2~7日間インキュベートした。T細胞刺激を、増殖アッセイ又は細胞上清からのサイトカイン定量によって測定した。IL-2レベルを、ホモジニアス時間分解蛍光アッセイ(HTRF、CisBio社)によって3日後に決定した。

30

## 【0316】

V<sub>H</sub>シングルドメイン抗体1.1は、T細胞活性化を増強しない(図7)。

## 【0317】

(実施例10)

V<sub>H</sub>シングルドメイン抗体のエピトープマッピング

V<sub>H</sub>シングルドメイン抗体1.1及び2.1のPD-1に及ぼす結合エピトープを、ペプチドスキャン分析(PepScan)を使用して決定した。一価フォーマットの1.1を、PD-1線形ペプチド並びにループ及び鎖を模倣するように拘束されたPD-1ペプチドのアレイに対して、各セットにおけるペプチド間の1残基オフセットでスクリーニングした。二価フォーマットの1.1及び2.1は、不連続なペプチドを組み合わせるアレイに対してスクリーニングした。

40

## 【0318】

ペプチドの合成: huPD-1細胞外ドメインの連続するエピトープを再構築するために、ペプチドのライブラリを合成した。アミノ官能化ポリプロピレン支持体は、固有の親水性ポリマー処方移植した後、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)をNヒドロキシルベンゾトリアゾール(HOBt)と共に使用して、t-ブチルオキシカルボニル-ヘキサメチレンジアミン(BocHMDA)と反応させ、その後トリフルオロ酢酸(TFA)を使用してBoc基を切断することによって得た。標準的なFmoc-ペプチド合成を使用して、アミノ官能化固相支持体上で、

50

カスタム改変したJANUS液体分注ステーション(Perkin Elmer社)によってペプチドを合成した。構造模倣体の合成は、Pepsan社固有の足場に化学的に連結させたペプチド(Chemically Linked Peptides on Scaffolds:CLIPS)技術を使用して実施した。CLIPS技術により、ペプチドを、単一のループ、2本ループ、3本ループ、シート様フォールド、ヘリックス様フォールド、及びその組合せに構造化することが可能である。CLIPSテンプレートをシステイン残基にカップリングさせる。ペプチド中の複数のシステインの側鎖を1つ又は2つのCLIPSテンプレートにカップリングさせる。例えば、P2 CLIPS(2,6-ビス(プロモメチル)ピリジン)の0.5mM溶液を、重炭酸アンモニウム(20mM、pH 7.8)/アセトニトリル(1:3(容積/容積))に溶解する。この溶液を、ペプチドアレイに添加する。CLIPSテンプレートは、ペプチドアレイ(3µlウェルを有する455ウェルプレート)の固相結合ペプチドに存在する2つのシステインの側鎖に結合する。ペプチドアレイを、溶液を完全に覆って溶液中で30~60分間軽く振とうさせる。最後に、ペプチドアレイを過剰量のH2Oによって十分に洗浄し、PBS(pH 7.2)中に1%SDS/0.1%β-メルカプトエタノールを含む溶解緩衝液中、70℃で30分間超音波処理し、H2O中で更に45分間超音波処理する。T3 CLIPSを有するペプチドを、類似の方法で、しかし3個のシステインによって作製した。

10

20

30

40

50

#### 【0319】

ELISAスクリーニング:合成したペプチドの各々に対する抗体の結合を、PEPSCANに基づくELISAにおいて試験した。ペプチドアレイを、抗Hisタグモノクローナル抗体(R&D社)と共にインキュベートした(4℃で一晩)。洗浄後、ペプチドアレイを、ウサギ抗マウスIgG(H+L)HRPコンジュゲート(Southern Biotech社)の1/1000倍希釈液と共に25℃で1時間インキュベートした。洗浄後、ペルオキシダーゼ基質2,2'-アジノ-ジ-3-エチルベンズチアゾリンスルホネート(ABTS)及び20µl/mlの3% H2O2を添加した。1時間後、発色を測定した。発色を、電荷結合素子(CCD)カメラ及び画像処理システムによって定量した。

#### 【0320】

データ処理:CCDカメラから得た値は0~3000mAUの範囲であり、標準的な96ウェルプレートELISAリーダーと類似であった。結果を定量し、Peplabデータベースに保存した。時に、ウェルは気泡を含み、偽陽性値をもたらすことから、カードを手動で検査し、気泡によって生じたいかなる値も0のスコアをつける。

#### 【0321】

合成の品質管理:合成ペプチドの品質を確認するために、陽性対照及び陰性対照ペプチドの個別の組を並行して合成した。これらを、抗体57.9(Posthumusら、J. Virology, 1990, 64:3304~3309頁)によってスクリーニングした。

#### 【0322】

線形のペプチド並びにループ及び鎖ペプチドを模倣するように拘束されたペプチドに対してスクリーニングすると、1.1は、モチーフ102-NGRDFHMSVVRARR-115(配列番号519)を含むペプチドのサブセットに対して一貫した結合を示す。このエピトープに対する結合は、試験したペプチドの全ての組に対して観察され、ペプチドに課された構造的拘束とは無関係であった。

#### 【0323】

不連続なペプチドに対してスクリーニングすると、1.1は、モチーフ33-NPPTFS-38(配列番号520)、54-CSFSNTSESVLW-67(配列番号521)、及び101-PNGRDFHMSV-110(配列番号522)を含むペプチドのサブセットに対する結合を示す。データは、線形のペプチドにおいて同定されたエピトープに対する結合と一貫し、同様に三次構造において線形のエピトープに近位となる追加の残基も同定する。

#### 【0324】

2.1は、モチーフ60-SESVLWYRMS-71(配列番号523)、90-GQDCRFRTV-98(配列番号524)、及び104-RDFHMSVVRAR-114(配列番号525)を含む不連続なペプチドの組に対して親和性を示した。同定された配列は、不連続なエピトープと一貫して三次構造において近位である。

#### 【0325】

huPD-1構造(PDBコード:4ZQK)の分析は、1.1及び2.1の両方に関して同定されたエピトー

ブが、PD-L1結合界面の面に対してhuPD-1細胞外ドメインの反対面に位置し、介在するネイティブリガンドの結合がなく、huPD-1に対する結合と一貫することを示している(図8Aを参照されたい)。

【0326】

配列104-RDFHMSV-110(配列番号526)(図8Aを参照されたい)は、両方のHumabody(登録商標)VHに関して同定されたエピトープ内で一貫する。エピトープの部分的重複は、競合的結合を示す2つのHumabody(登録商標)VHと一貫する。

【0327】

(実施例11)

PD-1刺激

PD-1シグナル伝達を測定するDiscoverX PathHunterチェックポイントアッセイを使用して実験を行った。PD-1を発現する細胞を細胞内酵素断片に連結し、ホスファターゼを含むSH2ドメインを別の酵素断片に連結した。受容体が二量体形成すると、酵素の相補化が起こる。基質を添加すると、化学発光シグナルを生じる。PD-1二量体形成は、PD-L1+細胞株に反応して起こる。リガンドの非存在下では、この二量体形成は抗体によって誘導される。PD-1+細胞をHumabody(登録商標)VHの希釈シリーズと共に3時間インキュベートした後、検出試薬を添加した。化学発光を相対光単位として読み取り、EC50をカーブフィットから計算した。最大反応は基礎反応を超えたRLUのパーセント増加として計算した。Table 11(表11)ニパラトープ性Humabody(1GS)はPD-1シグナル伝達を増強する。

【0328】

二価1.1は、PD1アゴニズムを行うことができるニパラトープ性としてフォーマット化する場合、低レベルPD-1シグナル伝達を誘導する。より短いリンカーはこれを更に増加させ、これは架橋の増強によって引き起こされる可能性がある。V<sub>H</sub>(B)は、リガンドの結合を遮断するブロッキングシングルV<sub>H</sub>ドメインである(配列番号529)。このアッセイにおいて測定した場合、2.1を使用する二価分子は、アゴニスト作用を示さない。

【0329】

【表11】

Table 11

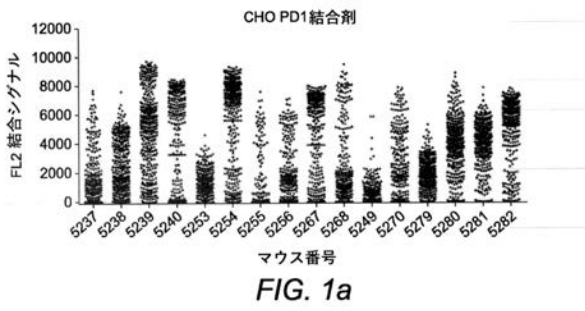
	EC50 uM	ベースラインを超えた反応の最大%増加
VH (B)-1GS-1.21	0.00059	1332
VH (B)-4GS-1.21	0.0005	253.2
1.1a-4GS-1.1a	0.001	57.77

10

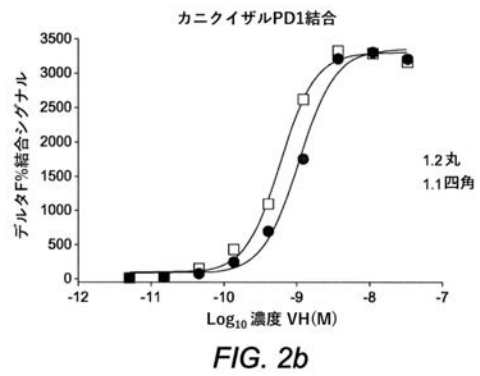
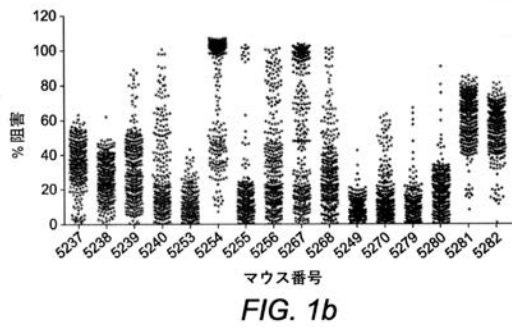
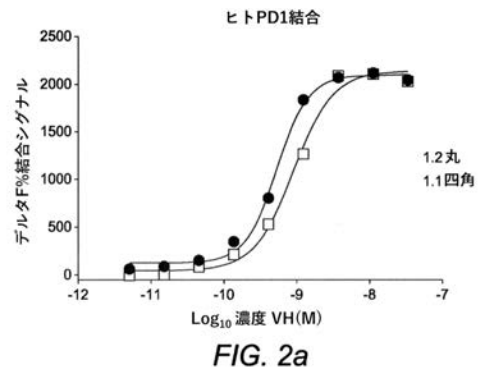
20

30

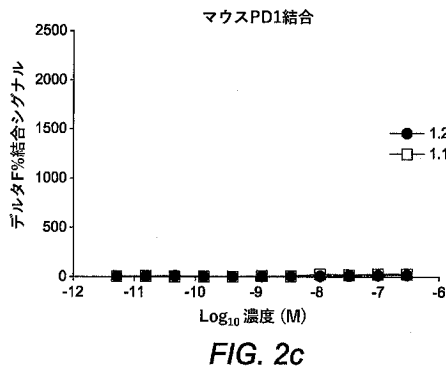
【 図 1 】



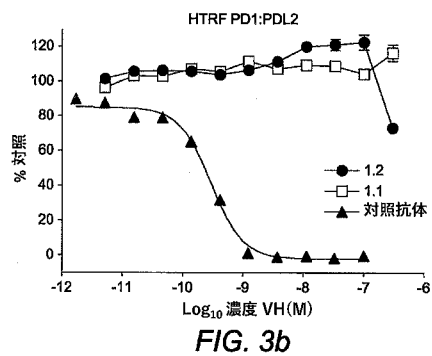
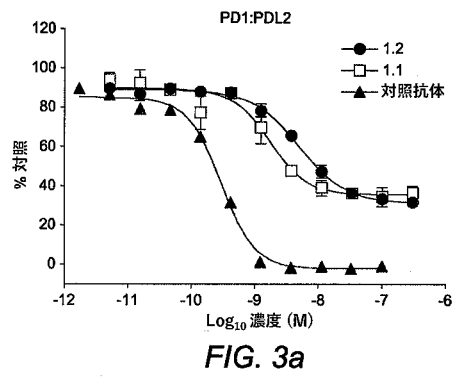
【 図 2 - 1 】



【 図 2 - 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】

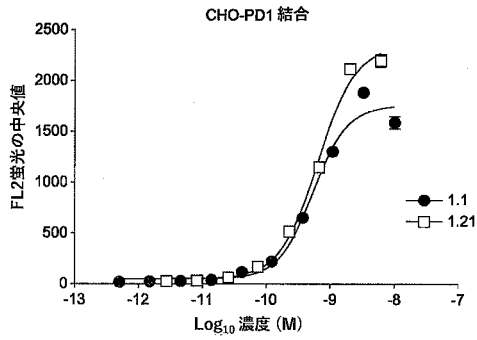


FIG. 4a

【 図 5 - 1 】

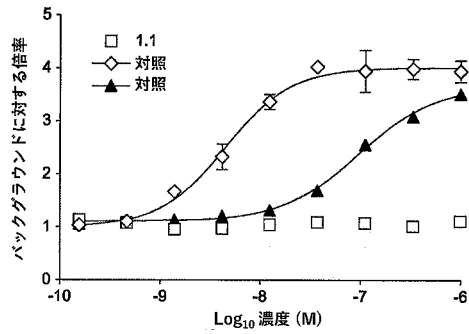


FIG. 5a

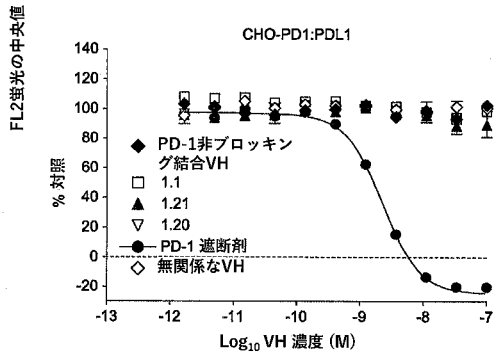


FIG. 4b

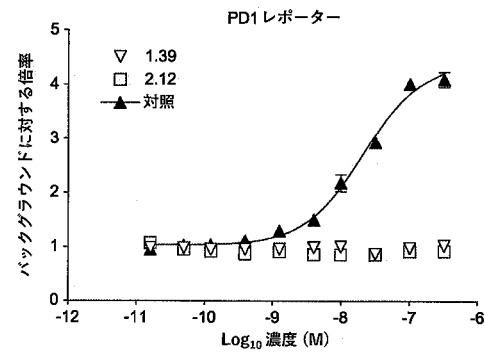


FIG. 5b

【 図 5 - 2 】

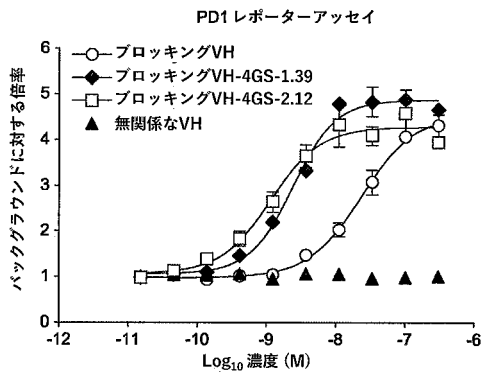


FIG. 5c

【 図 6 】

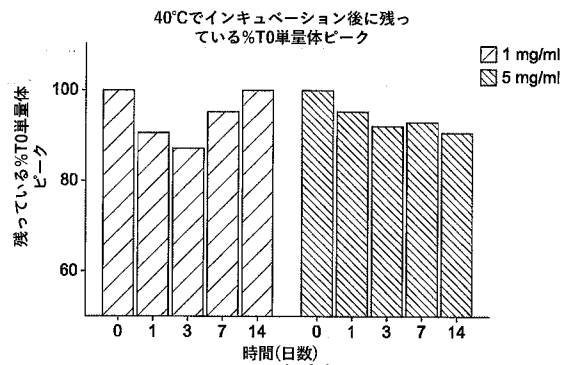


FIG. 6

【 図 7 】

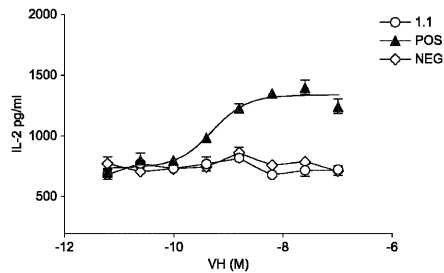


FIG. 7

【 図 8 a 】

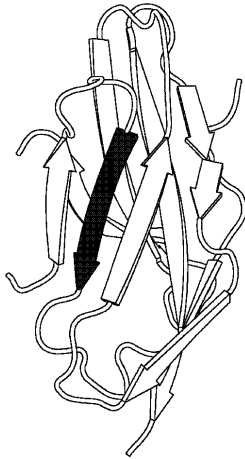


FIG. 8a

【 図 8 b 】

Human: NGRDFHMSVVRARR  
 | | | | | | | | |  
 Mouse: NRHDFHMNILDTRR

FIG. 8b

【 配列表 】

2020515235000001.app

【 図 9 】

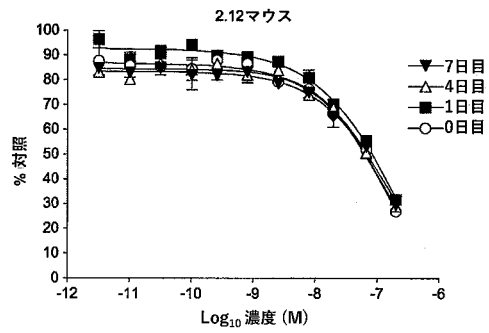


FIG. 9a

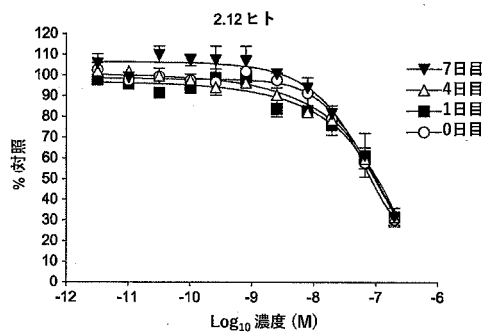


FIG. 9b

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2018/050035
---------------------------------------------------

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C07K16/28 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
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) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/110621 A1 (UCB PHARMA SA [BE]; TYSON KERRY LOUISE [GB]) 15 September 2011 (2011-09-15)	1-10, 14-59
Y	page 12, paragraphs 3,4; example 2	1-10, 14-59
	-----	
X	WO 2009/114335 A2 (MERCK & CO INC [US]; FINNEFROCK ADAM C [US]; FU TONG-MING [US]; FREED) 17 September 2009 (2009-09-17)	1-10, 14-59
Y	page 3, paragraph 6	1-10, 14-59
	-----	
X	WO 2016/106159 A1 (ENUMERAL BIOMEDICAL HOLDING INC [US]) 30 June 2016 (2016-06-30)	1-10, 14-59
Y	paragraphs [0062], [0063]; table 43	1-10, 14-59
	-----	
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "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 <b>7 February 2018</b>		Date of mailing of the international search report <b>25/04/2018</b>
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  <b>Fellows, Edward</b>

3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2018/050035

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	W0 2016/020856 A2 (MABQUEST SA [CH]) 11 February 2016 (2016-02-11)	1-10, 14-59
Y	paragraphs [0017], [0020]	1-10, 14-59
	-----	
Y	YU GENG, ANDY LEE AND XIN WANG: "Single doman antibodies against immune checkpoint targets PD-1 and PD-L1", ANTIBODES AND THERAPEUTICS CONFERANCE 2016, December 2016 (2016-12), XP055447941, DOI: 10.4172/1745-7580.C1.005 abstract	1-10, 14-59
	-----	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/GB2018/050035

<b>Box No. II</b>	<b>Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)</b>
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <p>1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>	
<b>Box No. III</b>	<b>Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)</b>
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</p> <p style="text-align: center;">see additional sheet</p> <p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 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.:</p> <p>4. <input checked="" type="checkbox"/> 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.:</p> <p style="text-align: center;">1-10, 14-59(all partially)</p> <p><b>Remark on Protest</b></p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</p> <p><input type="checkbox"/> 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.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>	

International Application No. PCT/ GB2018/ 050035

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-10, 14-59(all partially)

VH sdAb 1.1 defined by its SEQ ID number as seen in present claim 9 and related subject-matter.

---

2-50. claims: 1-7, 11-59(all partially)

VH sdAb 1.2-1.50 defined respectively by their SEQ ID numbers as seen in present claim 9 and related subject-matter.

---

51-103. claims: 1-10, 14-59(all partially)

VH sdAb 2.1-2.53 defined respectively by their SEQ ID numbers as seen in present claim 12 and related subject-matter.

---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2018/050035

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
WO 2011110621 A1	15-09-2011	AR 080501 A1	11-04-2012		
		CA 2791944 A1	15-09-2011		
		CN 102892785 A	23-01-2013		
		EP 2545076 A1	16-01-2013		
		JP 6174321 B2	02-08-2017		
		JP 2013521769 A	13-06-2013		
		JP 2016155827 A	01-09-2016		
		TW 201134488 A	16-10-2011		
		US 2011229461 A1	22-09-2011		
		US 2016068586 A1	10-03-2016		
		WO 2011110621 A1	15-09-2011		
		WO 2009114335 A2	17-09-2009	EP 2262837 A2	22-12-2010
				US 2011008369 A1	13-01-2011
WO 2009114335 A2	17-09-2009				
WO 2016106159 A1	30-06-2016	CA 2971734 A1	30-06-2016		
		EP 3237446 A1	01-11-2017		
		US 2016251436 A1	01-09-2016		
		US 2016319019 A1	03-11-2016		
		WO 2016106159 A1	30-06-2016		
WO 2016020856 A2	11-02-2016	AU 2015298356 A1	16-02-2017		
		CA 2957258 A1	11-02-2016		
		CN 107074947 A	18-08-2017		
		EP 3177644 A2	14-06-2017		
		JP 2017531028 A	19-10-2017		
		KR 20170069996 A	21-06-2017		
		SG 11201700672Y A	27-02-2017		
		US 2017166642 A1	15-06-2017		
		US 2017226210 A1	10-08-2017		
		WO 2016020856 A2	11-02-2016		

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	4 H 0 4 5
A 0 1 K	67/027 (2006.01)	A 0 1 K	67/027	
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46	
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	E
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	L
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	C
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	37/08 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 P	31/12 (2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	37/08	
A 6 1 K	47/68 (2017.01)	A 6 1 P	37/06	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	A 6 1 P	37/04	
		A 6 1 P	31/12	
		A 6 1 K	45/00	
		A 6 1 P	29/00	
		A 6 1 K	47/68	
		G 0 1 N	33/53	D

(31)優先権主張番号 1700210.6

(32)優先日 平成29年1月6日(2017.1.6)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
英国(GB)

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, 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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(72)発明者 ブライアン・エドワーズ  
イギリス・ケンブリッジシャー・C B 2 2・3 A T・ケンブリッジ・(番地なし)・バブラハム・リサーチ・キャンパス・メディトリーナ・ビルディング・2 6 0・クレシェンド・バイオロジックス・リミテッド内

(72)発明者 キャロリン・エドワーズ  
イギリス・ケンブリッジシャー・C B 2 2・3 A T・ケンブリッジ・(番地なし)・バブラハム・リサーチ・キャンパス・メディトリーナ・ビルディング・2 6 0・クレシェンド・バイオロジックス・リミテッド内

(72)発明者 ジェームズ・レグ  
イギリス・ケンブリッジシャー・C B 2 2・3 A T・ケンブリッジ・(番地なし)・バブラハム・リサーチ・キャンパス・メディトリーナ・ビルディング・2 6 0・クレシェンド・バイオロジックス

- ス・リミテッド内  
 (72)発明者 マルティナ・レヴァンドフスカ  
 イギリス・ケンブリッジシャー・C B 2 2・3 A T・ケンブリッジ・(番地なし)・バブラハム・  
 リサーチ・キャンパス・メディトリーナ・ビルディング・2 6 0・クレシェンド・バイオロジック  
 ス・リミテッド内  
 (72)発明者 ダニエラ・シドレク  
 イギリス・ケンブリッジシャー・C B 2 2・3 A T・ケンブリッジ・(番地なし)・バブラハム・  
 リサーチ・キャンパス・メディトリーナ・ビルディング・2 6 0・クレシェンド・バイオロジック  
 ス・リミテッド内  
 (72)発明者 コレット・ジョンストン  
 イギリス・ケンブリッジシャー・C B 2 2・3 A T・ケンブリッジ・(番地なし)・バブラハム・  
 リサーチ・キャンパス・メディトリーナ・ビルディング・2 6 0・クレシェンド・バイオロジック  
 ス・リミテッド内  
 (72)発明者 クリスティーン・ロサント  
 イギリス・ケンブリッジシャー・C B 2 2・3 A T・ケンブリッジ・(番地なし)・バブラハム・  
 リサーチ・キャンパス・メディトリーナ・ビルディング・2 6 0・クレシェンド・バイオロジック  
 ス・リミテッド内  
 (72)発明者 ユミン・テン  
 イギリス・ケンブリッジシャー・C B 2 2・3 A T・ケンブリッジ・(番地なし)・バブラハム・  
 リサーチ・キャンパス・メディトリーナ・ビルディング・2 6 0・クレシェンド・バイオロジック  
 ス・リミテッド内

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA19 DA01 DA13  
 4B065 AA01X AA87X AA95X AB01 BA02 CA25 CA44 CA46  
 4C076 AA95 BB01 BB02 BB11 BB13 BB14 BB15 BB16 BB21 BB24  
 BB25 BB26 BB29 BB30 BB31 CC01 CC03 CC04 CC07 CC27  
 CC35 EE41 EE59 FF02 FF04 FF09 FF13 FF14 FF15 FF16  
 FF36 FF39 FF43 FF52 FF53 FF57 FF61 FF63  
 4C084 AA17 MA17 MA22 MA23 MA28 MA35 MA37 MA41 MA43 MA47  
 MA52 MA55 MA56 MA57 MA58 MA59 MA60 MA63 MA66 NA14  
 ZA021 ZA022 ZB071 ZB072 ZB081 ZB082 ZB091 ZB092 ZB111 ZB112  
 ZB131 ZB132 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272 ZB331 ZB332  
 4C085 AA13 AA14 AA21 BB01 BB11 BB33 BB34 BB35 BB36 BB37  
 BB41 BB42 BB43 CC01 CC05 CC07 CC08 DD62 EE01 GG01  
 GG02 GG03 GG04 GG05 GG06 GG08 GG10  
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 BA71 DA76 DA83 DA89 EA20  
 EA21 EA22 EA28 EA29 EA50 FA71 FA74

专利名称(译)	针对程序性细胞死亡的单域抗体 ( PD-1 )		
公开(公告)号	<a href="#">JP2020515235A</a>	公开(公告)日	2020-05-28
申请号	JP2019536937	申请日	2018-01-08
[标]发明人	ブライアンエドワーズ ユミンテン		
发明人	ブライアン・エドワーズ キャロリン・エドワーズ ジェームズ・レッジ マルティナ・レヴァンドフスカ ダニエラ・シドレク コレット・ジョンストン クリスティーナ・ロサント ユミン・テン		
IPC分类号	C12N15/13 C12N15/63 C12N1/21 C12N5/10 C12N7/01 C12P21/08 A01K67/027 C07K16/46 C07K16/28 A61K39/395 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P25/00 A61P37/08 A61P37/06 A61P37/04 A61P31/12 A61K45/00 A61P29/00 A61K47/68 G01N33/53		
CPC分类号	A61P35/00 A61P37/04 C07K16/2818 C07K2317/33 C07K2317/56 C07K2317/569 C07K2317/76 C07K2317/92 C07K2317/94 C12N15/85		
FI分类号	C12N15/13.ZNA C12N15/63.Z C12N1/21 C12N5/10 C12N7/01 C12P21/08 A01K67/027 C07K16/46 C07K16/28 A61K39/395.D A61K39/395.E A61K39/395.L A61K39/395.C A61K39/395.N A61K39/395.T A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P25/00 A61P37/08 A61P37/06 A61P37/04 A61P31/12 A61K45/00 A61P29/00 A61K47/68 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA87X 4B065/AA95X 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C076/AA95 4C076/BB01 4C076/BB02 4C076/BB11 4C076/BB13 4C076/BB14 4C076/BB15 4C076/BB16 4C076/BB21 4C076/BB24 4C076/BB25 4C076/BB26 4C076/BB29 4C076/BB30 4C076/BB31 4C076/CC01 4C076/CC03 4C076/CC04 4C076/CC07 4C076/CC27 4C076/CC35 4C076/EE41 4C076/EE59 4C076/FF02 4C076/FF04 4C076/FF09 4C076/FF13 4C076/FF14 4C076/FF15 4C076/FF16 4C076/FF36 4C076/FF39 4C076/FF43 4C076/FF52 4C076/FF53 4C076/FF57 4C076/FF61 4C076/FF63 4C084/AA17 4C084/MA17 4C084/MA22 4C084/MA23 4C084/MA28 4C084/MA35 4C084/MA37 4C084/MA41 4C084/MA43 4C084/MA47 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084/MA56 4C084/MA57 4C084/MA58 4C084/MA59 4C084/MA60 4C084/MA63 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA021 4C084/ZA022 4C084/ZB071 4C084/ZB072 4C084/ZB081 4C084/ZB082 4C084/ZB091 4C084/ZB092 4C084/ZB111 4C084/ZB112 4C084/ZB131 4C084/ZB132 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C084/ZB271 4C084/ZB272 4C084/ZB331 4C084/ZB332 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA21 4C085/BB01 4C085/BB11 4C085/BB33 4C085/BB34 4C085/BB35 4C085/BB36 4C085/BB37 4C085/BB41 4C085/BB42 4C085/BB43 4C085/CC01 4C085/CC05 4C085/CC07 4C085/CC08 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG05 4C085/GG06 4C085/GG08 4C085/GG10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/BA71 4H045/DA76 4H045/DA83 4H045/DA89 4H045/EA20 4H045/EA21 4H045/EA22 4H045/EA28 4H045/EA29 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/FA74		
代理人(译)	村山彦 安倍晋三龙彦		
優先权	2017000207 2017-01-06 GB 2017000208 2017-01-06 GB 2017000210 2017-01-06 GB		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及不阻碍PD-1与其配体之间相互作用的PD-1结合剂，以及这种结合剂在治疗，预防和检测疾病中的用途。

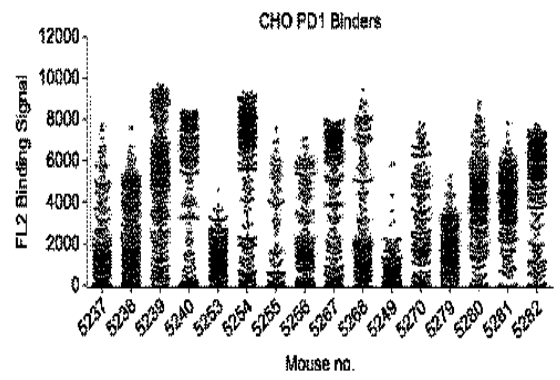


FIG. 1a