

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6670935号
(P6670935)

(45) 発行日 令和2年3月25日(2020.3.25)

(24) 登録日 令和2年3月4日(2020.3.4)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13 Z N A
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19

請求項の数 10 (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-527234 (P2018-527234)	(73) 特許権者	518179483
(86) (22) 出願日	平成29年8月3日(2017.8.3)		イノベント バイオロジックス (スチョウ)
(65) 公表番号	特表2019-528033 (P2019-528033A)) カンパニー リミテッド
(43) 公表日	令和1年10月10日(2019.10.10)		中華人民共和国 215123 ジェンス
(86) 国際出願番号	PCT/CN2017/095884		ー, スーチョウ インダストリアル パ
(87) 国際公開番号	W02018/024237		ーク スーチョウ, トンピン ストリー
(87) 国際公開日	平成30年2月8日(2018.2.8)		ト 168
審査請求日	平成30年11月20日(2018.11.20)	(74) 代理人	110002077
(31) 優先権主張番号	201610634596.X		園田・小林特許業務法人
(32) 優先日	平成28年8月4日(2016.8.4)	(72) 発明者	シェン, シアオニン
(33) 優先権主張国・地域又は機関	中国 (CN)		中華人民共和国 215123 ジェンス
早期審査対象出願			ー, スーチョウ インダストリアル パ
			ーク スーチョウ, トンピン ストリー
			ト 168

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗PD-1ナノ抗体およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗PD-L1ナノ抗体のVHH鎖であって、前記VHH鎖はフレームワーク領域FRおよび相補性決定領域CDRを含み、前記相補性決定領域CDRは配列番号5で示されるCDR1、配列番号6で示されるCDR2、配列番号7で示されるCDR3からなることを特徴とするVHH鎖。

【請求項2】

前記フレームワーク領域FRは、

(a) 配列番号1で示されるFR1、配列番号2で示されるFR2、配列番号3で示されるFR3、配列番号4で示されるFR4からなるか、あるいは

(b) 配列番号10で示されるFR1、配列番号11で示されるFR2、配列番号12で示されるFR3、配列番号13で示されるFR4からなる、

ことを特徴とする請求項1に記載の抗PD-L1ナノ抗体のVHH鎖。

【請求項3】

PD-L1エピトープに対するナノ抗体で、配列番号8または配列番号14で示されるアミノ酸配列のVHH鎖を有することを特徴とする抗PD-L1ナノ抗体。

【請求項4】

請求項1に記載の抗PD-L1ナノ抗体のVHH鎖、または請求項3に記載の抗PD-L1ナノ抗体からなる群から選ばれるタンパク質をコードすることを特徴とするポリヌクレオチド。

【請求項 5】

配列番号 9 または 15 で示されるヌクレオチド配列を有することを特徴とする請求項 4 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 6】

請求項 4 に記載のポリヌクレオチドを含有することを特徴とする発現ベクター。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の発現ベクターを含有するか、あるいはゲノムに請求項 4 に記載のポリヌクレオチドが組み込まれていることを特徴とする宿主細胞。

【請求項 8】

抗 PD-L1 ナノ抗体を生成する方法であって、

(a) ナノ抗体の生成に適する条件において、請求項 7 に記載の宿主細胞を培養することによって、前記抗 PD-L1 ナノ抗体を含む培養物を得る工程と、

(b) 前記培養物から前記抗 PD-L1 ナノ抗体を単離または回収する工程と、を含むことを特徴とする方法。

10

【請求項 9】

(a) 請求項 1 に記載の抗 PD-L1 ナノ抗体の VHH 鎖、または請求項 3 に記載の抗 PD-L1 ナノ抗体と、

(b) 検出可能なマーカー、薬物、毒素、サイトカイン、放射性核種、または酵素からなる群から選ばれる抱合部分と、

を含有することを特徴とする免疫抱合体。

20

【請求項 10】

請求項 3 に記載の抗 PD-L1 ナノ抗体の使用であって、(a) PD-L1 分子を検出する試薬製造、または (b) 腫瘍を治療する薬物の製造に用いられることを特徴とする使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生物医学または生物製薬の技術分野に関し、より具体的に、PD-L1 に対するナノ抗体およびそのコード配列と使用に関する。

【背景技術】

30

【0002】

プログラム細胞死1リガンド1(programmed death 1 ligand 1、PD-L1)はCD274とも呼ばれ、B7ファミリーの一員で、PD-1のリガンドである。PD-L1は1型膜貫通タンパク質で、合計290個のアミノ酸で、1つのIgV様領域、1つのIgC様領域、1つの膜貫通疎水領域および1つの30個のアミノ酸からなる細胞内領域を含む。

【0003】

ほかのB7ファミリーの分子と異なるのは、PD-L1が免疫応答を負に制御する作用を有することである。研究では、PD-L1は主に活性化したT細胞、B細胞、マクロファージや樹状細胞などで発現され、リンパ球以外、ほかの多くの組織、たとえば胸腺、心臓、胎盤などの内皮細胞、および様々な非リンパ系、たとえば黒色腫、肝臓癌、胃癌、腎細胞癌、卵巣癌、結腸癌、乳癌、食道癌、頭頸部癌などでも発現されることが見出された。PD-L1は自己反応性T細胞、B細胞および免疫耐性を調節する面である程度の汎用性があり、かつ外周組織におけるT細胞およびB細胞の応答で作用を果たす。PD-L1の腫瘍細胞における高発現は癌患者の予後不良に関連する。

40

【0004】

PD-L1と結合するプログラム細胞死1(programmed death-1、PD-1)はCD279とも呼ばれ、CD28ファミリーの一員で、その細胞質領域には2つのチロシン残基が含まれ、N末端に近いほうは免疫受容体チロシン依存性抑制モチーフ(immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif、ITIM)に、C末端に近いほうは免疫受容体チロシン依存性スイッチモチーフ(immunoreceptor tyrosine-based switch motif、ITSM)に位置する。PD-1は主に活性化したT

50

細胞、B細胞、マクロファージの表面に発現される。正常の場合、PD-1はT細胞の機能を抑制し、Tregの機能を促進することで、自己免疫応答を抑制し、自己免疫性疾患の発生を防止することができる。しかし、腫瘍の発生では、腫瘍細胞によって発現されるPD-L1がPD-1と結合すると、リンパ球に対する抑制性作用によって腫瘍の免疫逃避が促進される。PD-L1とPD-1の結合は多くの生物学的変化につながり、免疫制御を引き起こすことができるが、たとえばリンパ球の増殖と活性化に対する抑制、CD4+ T細胞のTh1とTh17細胞への分化に対する抑制、炎症性細胞因子の放出に対する抑制などが挙げられる。

【0005】

モノクローナル抗体は癌の検出および生物標的治療における応用が成功し、腫瘍治療の変革を引き起こした。しかしながら、従来のモノクローナル抗体(150 kD)分子は質量が
10
大きすぎ、組織に透過しにくいため、腫瘍領域における有効濃度が低く、治療効果が不十分である。従来の抗体は高い免疫原性を有するが、改良された抗体は従来の親和力に達することが難しい。また、完全ヒト化の従来の抗体は臨床における応用および普及が開発周期が長い、生産コストが高い、安定性が不十分といった多くの原因によって制限される。

【0006】

ナノ抗体は現在最も小さい抗体分子で、分子量が通常の抗体の1/10である。ナノ抗体は、モノクローナル抗体の抗原反応性以外、分子質量が小さい、安定性が強い、溶解性が良い、発現しやすい、免疫原性が弱い、透過性が強い、標的性が強い、ヒト化が簡単、製造コストが低いといった独特な機能特性を有し、従来の抗体の開発周期が長い、安定性が低い、保存条件が過酷といった欠点をほとんど克服した。
20

しかしながら、現在、本分野では、満足できるPD-L1に対するナノ抗体がまだ欠けている。そのため、本分野では、新しいPD-L1に対して有効な特異性ナノ抗体の開発が切望されている。

【発明の概要】

【0007】

本発明の目的は、PD-L1に対して有効な特異性ナノ抗体を提供することである。

【0008】

本発明の第一の側面では、抗PD-L1ナノ抗体のVHH鎖の相補性決定領域CDR領域であって、前記VHH鎖の相補性決定領域CDRは配列番号5で示されるCDR1、配列番号6で示されるCDR2、配列番号7で示されるCDR3からなるCDR領域を提供する。
30

【0009】

もう一つの好適な例において、前記のCDR1、CDR2およびCDR3はVHH鎖のフレームワーク領域FR1、FR2、FR3およびFR4によって隔てられる。

【0010】

本発明の第二の側面では、抗PD-L1ナノ抗体のVHH鎖であって、前記VHH鎖はフレームワーク領域FRおよび本発明の第一の側面に記載の相補性決定領域CDRを含み、前記のフレームワーク領域FRは、

(a) 配列番号1で示されるFR1、配列番号2で示されるFR2、配列番号3で示されるFR3、配列番号4で示されるFR4からなるか、あるいは

(b) 配列番号10で示されるFR1、配列番号11で示されるFR2、配列番号12で示されるFR3、配列番号13で示されるFR4からなる、
40
VHH鎖を提供する。

【0011】

もう一つの好適な例において、抗PD-L1ナノ抗体のVHH鎖は配列番号8または14で示されるものである。

【0012】

本発明の第三の側面では、PD-L1エピトープに対するナノ抗体で、配列番号8または配列番号14で示されるアミノ酸配列のVHH鎖を有する抗PD-L1ナノ抗体を提供する。

【0013】

本発明の第四の側面では、本発明の第一の側面に記載の抗PD-L1ナノ抗体のVHH鎖のCDR
50

領域、本発明の第二の側面に記載の抗PD-L1ナノ抗体のVHH鎖、または本発明の第三の側面に記載の抗PD-L1ナノ抗体からなる群から選ばれるタンパク質をコードするポリヌクレオチドを提供する。

【0014】

もう一つの好適な例において、前記ポリヌクレオチドは配列番号9または15で示されるヌクレオチド配列を有する。

【0015】

もう一つの好適な例において、前記のポリヌクレオチドはDNAまたはRNAを含む。

本発明の第五の側面では、本発明の第四の側面に記載のポリヌクレオチドを含有する発現ベクターを提供する。

【0016】

本発明の第六の側面では、本発明の第五の側面に記載の発現ベクターを含むか、あるいはゲノムに本発明の第四の側面に記載のポリヌクレオチドが組み込まれた宿主細胞を提供する。

もう一つの好適な例において、前記の宿主細胞は原核細胞または真核細胞を含む。

もう一つの好適な例において、前記の宿主細胞は大腸菌、酵母細胞からなる群から選ばれる。

【0017】

本発明の第七の側面では、抗PD-L1ナノ抗体を生成する方法であって、

(a) ナノ抗体の生成に適する条件において、本発明の第六の側面に記載の宿主細胞を培養することによって、前記抗PD-L1ナノ抗体を含む培養物を得る工程と、

(b) 前記培養物から前記の抗PD-L1ナノ抗体を単離または回収する工程と、を含む方法を提供する。

【0018】

もう一つの好適な例において、前記の抗PD-L1ナノ抗体は配列番号8または14で示されるアミノ配列を有する。

【0019】

本発明の第八の側面では、

(a) 本発明の第二の側面に記載の抗PD-L1ナノ抗体のVHH鎖、または本発明の第三の側面に記載の抗PD-L1ナノ抗体と、

(b) 検出可能なマーカー、薬物、毒素、サイトカイン、放射性核種、または酵素からなる群から選ばれる抱合部分と、

を含有する免疫抱合体 (immunoconjugate) を提供する。

【0020】

もう一つの好適な例において、前記抱合部分は薬物または毒素である。

もう一つの好適な例において、前記抱合部分は検出可能なマーカーである。

【0021】

もう一つの好適な例において、前記抱合体は、蛍光または発光マーカー、放射性マーカー、MRI (磁気共鳴画像) またはCT (コンピューターX線断層撮影技術) 造影剤、または検出可能な生成物を生成させる酵素、放射性核種、生物毒素、サイトカイン (たとえばIL-2 など)、抗体、抗体Fc断片、抗体scFv断片、金ナノ粒子/ナノロッド、ウイルス粒子、リポソーム、磁性ナノ粒子、プロドラッグ活性化酵素 (たとえば、DT-ジアホラーゼ (DTD) またはピフェニルヒドロラーゼ様蛋白質 (BPHL))、化学治療剤 (たとえば、シスプラチン) または任意の様態のナノ粒子などから選ばれる。

【0022】

もう一つの好適な例において、前記免疫抱合体は、多価 (たとえば2価) の本発明の第二の側面に記載の抗PD-L1ナノ抗体のVHH鎖、または本発明の第三の側面に記載の抗PD-L1ナノ抗体を含有する。

【0023】

もう一つの好適な例において、前記多価とは、前記免疫抱合体のアミノ酸配列に複数の

10

20

30

40

50

繰り返しの本発明の第二の側面に記載の抗PD-L1ナノ抗体のVHH鎖、本発明の第三の側面に記載の抗PD-L1ナノ抗体が含まれる。

【0024】

本発明の第九の側面では、本発明の第三の側面に記載の抗PD-L1ナノ抗体の使用であって、(a) PD-L1分子を検出する試薬、(b) 腫瘍を治療する薬物の製造における使用を提供する。

【0025】

もう一つの好適な例において、前記の検出はフローサイトメトリーによる検出、細胞免疫蛍光による検出を含む。

【0026】

本発明の第十の側面では、

(i) 本発明の第一の側面に記載の抗PD-L1ナノ抗体のVHH鎖の相補性決定領域CDR、本発明の第二の側面に記載の抗PD-L1ナノ抗体のVHH鎖、または本発明の第三の側面に記載の抗PD-L1ナノ抗体、または本発明の第八の側面に記載の免疫抱合体と、

(ii) 薬学的に許容される担体と、
を含有する薬物組成物を提供する。

【0027】

もう一つの好適な例において、前記の薬物組成物は注射剤形である。

【0028】

もう一つの好適な例において、前記の薬物組成物は腫瘍を治療する薬物の製造に使用され、前記の腫瘍は胃癌、肝臓癌、白血病、腎臓腫瘍、肺癌、小腸癌、骨癌、前立腺癌、結直腸癌、乳癌、大腸癌、前立腺癌、子宮頸癌、リンパ癌、副腎腫瘍、または膀胱腫瘍からなる群から選ばれる。

【0029】

本発明の第十一の側面では、本発明の第三の側面に記載の抗PD-L1ナノ抗体の使用であって、

- (i) ヒトPD-L1分子の検出、
- (ii) フローサイトメトリーによる検出、
- (iii) 細胞免疫蛍光による検出、
- (iv) 腫瘍の治療、
- (v) 腫瘍の診断、

のうちの一つまたは複数における使用を提供する。

【0030】

もう一つの好適な例において、前記使用は非診断的で非治療的なものである。

【0031】

本発明の第十二の側面では、

(i) 本発明の第二の側面に記載の重鎖可変領域VHHの配列または本発明の第三の側面に記載のナノ抗体の配列と、

(ii) 任意の発現および/または精製を補助するタグ配列と、
を有する組換えタンパク質を提供する。

もう一つの好適な例において、前記のタグ配列は6HisタグおよびHAタグを含む。

もう一つの好適な例において、前記の組換えタンパク質は特異的にPD-L1タンパク質と結合するものである。

【0032】

本発明の第十三の側面では、本発明の第二の側面に記載のVHH鎖、本発明の第三の側面に記載のナノ抗体、または本発明の第八の側面に記載の免疫抱合体の使用であって、薬剤、試薬、カセットまたはキットの製造における使用で、

ここで、前記試薬、カセットまたはキットはサンプルにおけるPD-L1タンパク質の検出に使用され、

ここで、前記薬剤はPD-L1タンパク質を発現する(すなわちPD-L1陽性の)腫瘍の治療ま

10

20

30

40

50

たは予防に使用される、
使用を提供する。

【0033】

もう一つの好適な例において、前記腫瘍は胃癌、リンパ癌、肝臓癌、白血病、腎臓腫瘍、肺癌、小腸癌、骨癌、前立腺癌、結直腸癌、乳癌、大腸癌、前立腺癌、または副腎腫瘍を含む。

【0034】

本発明の第十四の側面では、サンプルにおけるPD-L1タンパク質を検出する方法であって、

- (1) サンプルを本発明の第三の側面に記載のナノ抗体と接触させる工程と、
 - (2) 抗原-抗体複合体が形成したか検出し、ここで、複合体が形成したというのはサンプルにPD-L1タンパク質が存在することを意味する工程と、
- を含む方法を提供する。

10

【0035】

本発明の第十五の側面では、疾患を治療する方法であって、必要な対象に本発明の第三の側面に記載のナノ抗体または本発明の第八の側面に記載の免疫抱合体を施用することを含む方法を提供する。

もう一つの好適な例において、前記の対象は、哺乳動物、たとえばヒトを含む。

【0036】

本発明の第十六の側面では、抗PD-L1ナノ抗体のVHH鎖のフレームワーク領域FRであって、前記のVHH鎖のフレームワーク領域FRは配列番号1で示されるFR1、配列番号2で示されるFR2、配列番号3で示されるFR3、配列番号4で示されるFR4からなる。

20

【0037】

もちろん、本発明の範囲内において、本発明の上記の各技術特徴および下記（たとえば実施例）の具体的に記述された各技術特徴は互いに組合せ、新しい、または好適な技術方案を構成できることが理解される。紙数に限りがあるため、ここで逐一説明しない。

【図面の簡単な説明】

【0038】

【図1】図1は、抗原タンパク質およびナノ抗体の精製SDS-PAGE像で、図において、Aは核酸分子基準で、Bは精製されたhPD-L1(ECD)-Fcタンパク質で、CはTEV酵素でFcタグタンパク質を切り出された後精製されたhPD-L1(ECD)タンパク質で、Dは発現・精製されたPD-L1 Nb-Fcタンパク質で、Eはビオチン化されたPD-1-Fcタンパク質で、以上のタンパク質はいずれもHEK293F細胞によって発現されたものである。

30

【図2】図2は、ライブラリー構築のライブラリーサイズ検出図で、構築されたライブラリーは勾配希釈後プレートに塗布され、図に1/5を取って104倍、105倍、106倍に勾配希釈されたクローン数が示され、単一クローン数を計算してライブラリーサイズを確認した。

【図3】図3は、ライブラリー構築の挿入率検出図で、構築されたナノ抗体ライブラリーの挿入率検出の結果で、ゲル孔のDNAバンドは左から右へそれぞれ、一つ目のレーンはDNA分子マーカで、ほかのレーンは挿入断片を検出するPCR産物で、PCR産物バンドは約500 bpで、検出したところ、当該ライブラリーの挿入率が95.8%に達した。

40

【図4】図4は、PD-L1ナノ抗体の選別・濃縮過程で、1回目の選別後濃縮は見られず、2回目の選別で4倍に濃縮し、3回目の選別で210倍に濃縮した。

【図5】図5は、1株の大腸菌によって発現されたPD-L1ナノ抗体の精製図で、配列番号8のアミノ酸配列に相応するナノ抗体が、ニッケルカラム樹脂ゲルアフィニティークロマトグラフィーによって精製された後のPD-L1ナノ抗体のSDS-PAGEの電気泳動像である。結果から、PD-L1ナノ抗体は当該精製過程を経て、純度が90%以上に達したことが示された。

【図6】図6は、FACSによって検出されたPD-L1ナノ抗体の遮断効果で、ヒト全長PD-L1タンパク質を一過性発現するHEK293F細胞で各群のナノ抗体およびビオチン化されたhPD-1-Fcタンパク質と共反応させた。

【図7】図7は、真核発現されたヒト化PD-L1ナノ抗体の精製図で、HEK293F細胞によって

50

発現された4種類のヒト化PD-L1ナノ抗体で、ここで、Aはタンパク質分子基準で、Bは配列番号10のアミノ酸配列によってコードされるヒト化PD-L1 Nbタンパク質で、発現された当該抗体はFcタグタンパク質を含有し、タンパク質の純度が90%以上に達した。

【図8】図8は、FACSによって検出されたヒト化PD-L1ナノ抗体の遮断効果で、天然にPD-L1タンパク質を発現するEBC-1細胞でヒト化ナノ抗体およびビオチン化されたhPD-1-Fcタンパク質と共反応させたところ、ブランク群および陰性対照群ではPD-1-Fc-ビオチンとEBC-1細胞の結合率が90%以上で、PD-L1ナノ抗体およびヒト化ナノ抗体を入れた後、PD-1-Fc-ビオチンとEBC-1細胞の結合率が10%以下だけであったことがわかるが、これは入れられたナノ抗体が顕著にPD-1とPD-L1の相互作用を遮断することができることを示す。

【図9】図9は、PD-L1ナノ抗体の親和力の測定結果で、BiaCore T200によってPD-L1ナノ抗体の親和力を測定したところ、ヒト化前のナノ抗体の親和力が $2.34 \times 10^{-9} \text{M}$ で、ヒト化後のナノ抗体の親和力が $2.26 \times 10^{-9} \text{M}$ であった。ヒト化の改造は抗体の親和力に影響しなかった。

【図10】図10は、ELISAによって検出されたPD-L1ナノ抗体の特異性の結果で、ヒト化前後のPD-L1ナノ抗体がヒト由来およびサル由来のPD-L1だけと相互作用し、ネズミ由来のものおよびPD-L1ファミリーのほかのメンバーと相互作用せず、2株のナノ抗体が良い特異性を有することがわかる。

【図11】図11は、MOA法によるナノ抗体のPD-1/PD-L1相互作用に対する抑制作用の検出を示すが、ここで、ヒト化前のナノ抗体は基本的にいずれも陽性対照群の抗体よりも活性が強く、ヒト化後の本発明のナノ抗体は活性が陽性対照群に相当する。

【図12】図12は、本発明のナノ抗体およびヒト化改造後の抗体はいずれも有効にT細胞を活性化させることができ、かつ活性化効果が陽性対照群の抗体に相当することを示す。

【図13】図13は、本発明のナノ粒子の腫瘍抑制活性の研究における投与形態を示す。

【図14】図14は、ヒト化Nb-Fcを接種されたマウスを示し、その腫瘍体積は対照群に対して良く抑えられ、かつ顕著に増加した状況が現れず、ヒト化Nb-Fcが顕著な腫瘍抑制作用を有することが説明された。

【図15】図15は、本発明のヒト化Nb-Fcが対照の抗体よりも優れた可溶性を有することを示す。

【図16】図16は、ヒト化Nb-Fcの純度が顕著に変化しなかったことを示す。

【図17】図17は、ヒト化Nb-FcとCHO-PDL1細胞の結合に顕著な変化がなかったことを示す。

【0039】

具体的な実施形態

本発明者は幅広く深く研究し、大量の選別によって、1種類の抗PD-L1ナノ抗体を得ることに成功し、実験結果から、本発明で得られたPD-L1ナノ抗体が有効にPD-L1とPD-1の間の相互作用を遮断することができ、意外なことに、本発明のヒト化後のPD-L1ナノ抗体がより有効にPD-L1とPD-1の結合を遮断することができ、かつBiaCore T200によって同定されたところ、ヒト化後のPD-L1ナノ抗体の親和力が高く、安定性が良く、かつ腫瘍抑制作用が顕著である。これに基づき、本発明を完成させた。

【0040】

具体的に、本発明では、ヒト化されたPD-L1抗原タンパク質でラクダを免疫させ、高品質の免疫ナノ抗体の遺伝子ライブラリーを得る。その後、PD-L1タンパク質分子をマイクロプレートにカップリングさせ、PD-L1タンパク質の正確な空間構造をディスプレイし、この形態の抗原でファージディスプレイ技術によって免疫ナノ抗体遺伝子ライブラリー（ラクダ重鎖抗体ファージディスプレイ遺伝子ライブラリー）を選別することによって、PD-L1特異的ナノ抗体の遺伝子を得る。さらに、この遺伝子を大腸菌に導入することによって、大腸菌で効率的に発現され、かつ特異性が高いナノ抗体株を得る。

【0041】

本明細書で用いられるように、用語「本発明のナノ抗体」、「本発明の抗PD-L1ナノ抗体」、「本発明のPD-L1ナノ抗体」は入れ替えて使用することができ、いずれも特異的にP

10

20

30

40

50

D-L1 (ヒトPD-L1を含む)を認識してそれと結合するナノ抗体をいう。VHH鎖のアミノ酸配列が配列番号8または14で示されるナノ抗体が特に好ましい。

【0042】

本明細書で用いられるように、用語「抗体」または「免疫グロブリン」は同様な構造特徴を持つ約150000ダルトンのヘテロテトラマーの糖タンパクで、2つの同じ軽鎖(L)と2つの同じ重鎖(H)からなるものである。各軽鎖は、重鎖に1つの共有ジスルフィド結合によって結合しているが、重鎖間のジスルフィド結合の数は、免疫グロブリンのアイソタイプによるものである。各重鎖および軽鎖も、それぞれ一定の間隔の鎖内ジスルフィド結合を有する。各重鎖は、1つの末端に可変領域(VH)を有し、その先に多数の定常領域を有する。各軽鎖は、一方の末端に可変領域(VL)を有し、他方の末端に定常領域を有する。軽鎖の定常領域は重鎖の一つ目の定常領域と、軽鎖の可変領域は重鎖の可変領域と対向している。特殊なアミノ酸残基が軽鎖と重鎖の可変領域の間に界面を形成している。

10

【0043】

本明細書で用いられるように、用語「単ドメイン抗体(VHH)」、「ナノ抗体(nanobody)」は同様の意味を有し、クローン抗体の重鎖の可変領域をいうが、1つの重鎖可変領域だけからなる単ドメイン抗体(VHH)を構築し、完全な機能を有する最小の抗原結合断片である。通常、まず天然の軽鎖および重鎖の定常領域1(CH1)が欠けた抗体を得た後、さらに抗体の重鎖の可変領域をクローンし、1つの重鎖可変領域だけからなる単ドメイン抗体(VHH)を構築する。

【0044】

20

本明細書で用いられるように、用語の「可変」とは、抗体において可変領域のある部分が配列で異なっており、これによって各特定の抗体のその特定の抗原に対する結合および特異性が構成されることを指す。しかし、可変性は、均一に抗体の可変領域全体に分布しているわけではない。軽鎖と重鎖の可変領域における相補性決定領域(CDR)または超可変領域と呼ばれる3つの断片に集中している。可変領域において、比較的保存的な部分は、フレームワーク領域(FR)FRと呼ばれる。天然の重鎖及び軽鎖の可変領域に、それぞれ、基本的にシート構造となっており、連結ループを形成する3つのCDRで連結され、場合によって部分シート構造となる4つのFR領域が含まれる。各鎖におけるCDRは、FR領域で密接し、かつ他方の鎖のCDRと一緒に抗体の抗原結合部位(Kabatら、NIH Publ. No. 91-3242, 巻1, 647-669頁(1991)を参照する)を形成している。定常領域は、抗体と抗原との結合には直接関与しないが、例えば抗体の抗体依存細胞毒性に参与するなどの異なるエフェクター機能を示す。

30

【0045】

当業者に知られるように、免疫抱合体および融合発現産物は、薬物、毒素、サイトカイン(cytokine)、放射性核種、酵素およびほかの診断または治療分子と本発明の抗体またはその断片が結合してなる抱合体を含む。さらに、本発明は、前記の抗PD-L1タンパク質抗体またはその断片と結合した細胞表面マーカーあるいは抗原を含む。

【0046】

本明細書で用いられるように、用語「重鎖可変領域」と「V_H」は入れ替えて使用することができる。

40

【0047】

本明細書で用いられるように、用語「可変領域」と「相補性決定領域(complementarity determining region, CDR)」は入れ替えて使用することができる。

【0048】

本発明の一つの好適な実施形態において、前記抗体の重鎖可変領域はCDR1、CDR2、およびCDR3という3つの相補性決定領域を含む。

【0049】

本発明の一つの好適な実施形態において、前記抗体の重鎖は上記重鎖可変領域および重鎖定常領域を含む。

【0050】

50

本発明において、用語「本発明の抗体」、「本発明のタンパク質」、または「本発明のポリペプチド」は入れ替えて使用することができ、いずれも特異的にPD-L1タンパク質と結合するポリペプチド、たとえば重鎖可変領域を有するタンパク質またはポリペプチドをいう。これらは、開始のメチオニンを含有してもよく、含有しなくてもよい。

【0051】

また、本発明は、本発明の抗体のほかのタンパク質あるいは融合発現産物を提供する。具体的に、本発明は、可変領域が本発明の抗体の重鎖可変領域と同様であるか、あるいは少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%の相同性を持つものであれば、この可変領域を含有する重鎖を有する任意のタンパク質またはタンパク質抱合体と融合発現産物（すなわち免疫抱合体と融合発現産物）を含む。

10

【0052】

一般的に、抗体の抗原結合特性は、重鎖可変領域に位置する3つの特定の領域によって特徴付けられ、可変領域（CDR）と呼ばれ、4つのフレームワーク領域（FR）に分かれ、4つのFRのアミノ酸配列が比較的保存され、直接結合反応に関与しない。これらのCDRは環状構造を形成し、その中のFRで形成されるシートによって空間構造上で近づき、重鎖におけるCDRおよび相応の軽鎖におけるCDRが抗体の抗原結合部位を構成する。同類の抗体のアミノ酸配列の比較によってどのアミノ酸がFR或いはCDR領域を構成するか確認することが出来る。

【0053】

本発明の抗体の重鎖の可変領域は、その少なくとも一部が抗原結合に関与するため、特に注目されている。そのため、CDR含有モノクローナル抗体の重鎖可変領域鎖を有する分子は、そのCDRはここで同定されるCDRと90%以上（好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上）の相同性を持つものであれば、本発明に含まれる。

20

【0054】

本発明は、完全の抗体だけではなく、免疫活性を有する抗体の断片または抗体とほかの配列からなる融合タンパク質も含む。そのため、本発明は、さらに、前記抗体の断片、誘導体および類似物を含む。

【0055】

本明細書で用いられるように、用語「断片」、「誘導体」および「類似物」とは、基本的に本発明の抗体と同じ生物学的機能または活性を維持するポリペプチドをいう。本発明のポリペプチドの断片、誘導体や類似物は、(i) 1個または複数個の保存的または非保存的なアミノ酸残基（好ましくは保存的なアミノ酸残基）が置換されたポリペプチドでもよく、このような置換されたアミノ酸残基が遺伝コードでコードされてもされていなくてもよく、あるいは(ii) 1個または複数個のアミノ酸残基に置換基があるポリペプチドでもよく、あるいは(iii) 成熟のポリペプチドと別の化合物（たとえば、ポリエチレングリコールのようなポリペプチドの半減期を延ばす化合物）と融合したポリペプチドでもよく、あるいは(iv) 付加のアミノ酸配列がこのポリペプチドに融合したポリペプチド（たとえばリーダー配列または分泌配列またはこのポリペプチドを精製するための配列または蛋白質前駆体配列、あるいは6Hisタグと形成した融合蛋白質）でもよい。本明細書の開示に基づき、これらの断片、誘導体および類似物は当業者に公知の範囲に入っている。

30

40

【0056】

本発明の抗体とは、PD-L1タンパク質と結合する活性を有する、上記CDR領域を含むポリペプチドをいう。当該用語は、さらに、本発明の抗体と同じ機能を有する、上記CDR領域を含むポリペプチドの変異の様態を含む。これらの変異の様態は、1個または複数個（通常は1~50個、好ましくは1~30個、より好ましくは1~20個、最も好ましくは1~10個）のアミノ酸の欠失、挿入および/または置換、ならびにC末端および/またはN末端への1個または複数個（通常は20個以内、好ましくは10個以内、より好ましくは5個以内）のアミノ酸の付加を含むが、これらに限定されない。たとえば、本分野において、機能が近い、または類似のアミノ酸で置換する場合、通常、蛋白質の機能を変えない。また、C末端および/またはN末端への一つまたは複数のアミノ酸の付加も、通常、蛋白質の機能を

50

変えることはない。この用語は、さらに、本発明の抗体の活性断片と活性誘導体を含む。

【0057】

当該ポリペプチドの変異の様態は、相同配列、保存的変異体、対立遺伝子変異体、天然突然変異体、誘導突然変異体、高いまたは低い厳格さの条件において本発明の抗体のコードDNAと交雑が可能なDNAがコードするタンパク質、および抗本発明の抗体の抗血清で得られるポリペプチドまたはタンパク質を含む。

【0058】

本発明は、さらに、ほかのポリペプチド、たとえばナノ抗体またはその断片の融合タンパク質を含む。ほとんど全長のポリペプチドのほか、本発明は、さらに、本発明のナノ抗体の断片を含む。通常、当該断片は本発明の抗体の少なくとも約50個の連続のアミノ酸、好ましくは少なくとも約50個の連続のアミノ酸、より好ましくは少なくとも約80個の連続のアミノ酸、最も好ましくは少なくとも約100個の連続のアミノ酸を有する。

【0059】

本発明において、「本発明の抗体の保存的変異体」とは、本発明の抗体のアミノ酸配列と比較すると、10個以下、好ましくは8個以下、より好ましくは5個以下、最も好ましくは3個以下のアミノ酸が類似または近い性質を持つアミノ酸で置換されてなるポリペプチドをいう。これらの保存的変異ポリペプチドは、表1のようにアミノ酸の置換を行って生成することが好ましい。

【0060】

表 1

元の残基	代表的な置換	好適な置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro; Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe	Leu
Leu (L)	Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala	Leu

【0061】

さらに、本発明は、上記抗体またはその断片またはその融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド分子を提供する。本発明のポリヌクレオチドは、DNA形態でもRNA形態でもよい。DNA形態は、cDNA、ゲノムDNAまたは人工合成のDNAを含む。DNAは、一本鎖でも二本鎖でもよい。DNAは、コード鎖でも非コード鎖でもよい。

【0062】

本発明の成熟ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、成熟ポリペプチドだけを

コードするコード配列、成熟ポリペプチドのコード配列および様々な付加コード配列、成熟ポリペプチドのコード配列（および任意の付加コード配列）および非コード配列を含む。

【0063】

用語「ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド」は、このポリペプチドをコードするポリヌクレオチドでもよく、さらに付加のコードおよび/または非コード配列を含むポリヌクレオチドでもよい。

【0064】

本発明は、さらに、上記の配列とハイブリダイズし、かつ2つの配列の間に少なくとも50%、好ましくは少なくとも70%、より好ましくは少なくとも80%の相同性を有するポリヌクレオチドに関する。本発明は、特に、厳格な条件で本発明に係るポリヌクレオチドとハイブリダイズできるポリヌクレオチドに関する。本発明において、「厳格な条件」とは、(1)低いイオン強度および高い温度、例えば0.2×SSC、0.1%SDS、60℃でのハイブリダイズおよび溶離、あるいは(2)ハイブリダイズ時変性剤、たとえば42℃で50%(v/v)ホルムアミド、0.1%ウシ胎児血清/0.1% Ficollなどを入れること、あるいは(3)2つの配列の間の相同性が少なくとも90%以上、好ましくは95%以上の時だけハイブリダイズすることである。そして、ハイブリダイズできるポリヌクレオチドがコードするポリペプチドは、成熟ポリペプチドと同じ生物学的機能および活性を有する。

【0065】

本発明の抗体のヌクレオチド全長配列あるいはの断片は、通常、PCR増幅法、組換え法または人工合成の方法で得られる。適用できる方法として、特に断片の長さが短い場合、人工合成の方法で関連配列を合成する。通常、まず多数の小さい断片を合成し、そして連接させることにより、配列の長い断片を得ることができる。また、重鎖のコード配列を発現タグ（たとえば6His）一体に融合させ、融合タンパク質を形成してもよい。

【0066】

関連の配列を獲得すれば、組換え法で大量に関連配列を獲得することができる。この場合、通常、その配列をベクターにクローンした後、細胞に導入し、さらに通常の方法で増殖させた宿主細胞から関連配列を単離して得る。本発明に係る生物分子（核酸、タンパク質など）は単離の形態で存在する生物分子を含む。

【0067】

現在、本発明のタンパク質（またはその断片、あるいはその誘導体）をコードするDNA配列は全部化学合成で獲得することがすでに可能である。さらに、このDNA配列を本分野で周知の各種の既知のDNA分子（或いはベクターなど）や細胞に導入してもよい。また、化学合成で本発明のタンパク質配列に変異を導入することもできる。

【0068】

さらに、本発明は、上記の適当なDNA配列および適当なプロモーターあるいは制御配列を含むベクターに関する。これらのベクターは、タンパク質を発現するように、適当な宿主細胞の形質転換に用いることができる。

【0069】

宿主細胞は、原核細胞、たとえば細菌細胞、あるいは、低等真核細胞、たとえば酵母細胞、あるいは、高等真核細胞、たとえば哺乳動物細胞でもよい。代表例として、大腸菌、ストレプトマイセス属、ネズミチフス菌のような細菌細胞、酵母のような真菌細胞、ミバエS2若しくはSf9のような昆虫細胞、CHO、COS7、293細胞のような動物細胞などがある。

【0070】

DNA組換えによる宿主細胞の形質転換は当業者に熟知の通常の方法で行ってもよい。宿主が原核細胞、たとえば大腸菌である場合、DNAを吸収できるコンピテントセルは指数成長期後収集でき、CaCl₂法で処理し、用いられる工程は本分野では周知のものである。もう一つの方法は、MgCl₂を使用する。必要により、形質転換はエレクトロポレーションの方法でもよい。宿主が真核生物の場合、リン酸カルシウム沈殿法、マイクロインジェクション、エレクトロポレーションのような通常の方法、リポフェクションなどのDNAト

10

20

30

40

50

ランスフェクションの方法が用いられる。

【0071】

得られる形質転換体は通常の方法で培養し、本発明の遺伝子がコードするポリペプチドを発現することができる。用いられる宿主細胞によって、培養に用いられる培地は通常の培地を選んでもよい。宿主細胞の成長に適する条件で培養する。宿主細胞が適当の細胞密度に成長したら、適切な方法（たとえば温度転換もしくは化学誘導）で選んだプロモーターを誘導し、さらに細胞を培養する。

【0072】

上記の方法における組換えポリペプチドは細胞内または細胞膜で発現し、或いは細胞外に分泌することができる。必要であれば、その物理・化学的特性及び他の特性を利用して各種の分離方法で組換えタンパク質を分離・精製することができる。これらの方法は、本分野の技術者に熟知である。これらの方法の例として、通用の再生処理、タンパク質沈殿剤による処理（塩析法）、遠心、浸透圧ショック、超音波処理、超遠心、分子篩クロマトグラフィー（ゲルろ過）、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）及び他の各種の液体クロマトグラフィー技術、並びにこれらの方法の組合せを含むが、これらに限定されない。

【0073】

本発明の抗体は単独に使用してもよく、検出可能なマーカー（診断目的）、治療剤、PK（タンパク質キナーゼ）修飾部分またはこれらの任意の組み合わせと結合または抱合してもよい。

診断の目的に使用される検出可能なマーカーは、蛍光または発光マーカー、放射性マーカー、MRI（磁気共鳴画像）またはCT（コンピュータX線断層撮影技術）造影剤、または検出可能な生成物を生成させる酵素を含むが、これらに限定されない。

【0074】

本発明の抗体と結合または抱合することができる治療剤は、1．放射性核種、2．生物毒素、3．サイトカイン、たとえばIL-2など、4．金ナノ粒子/ナノロッド、5．ウイルス粒子、6．リボソーム、7．磁性ナノ粒子、8．プロドラッグ活性化酵素（たとえば、DT-ジアホラーゼ(DTD)またはピフェニルヒドロラーゼ様蛋白質(BPHL)）、10．化学治療剤（たとえば、シスプラチン）または任意の様態のナノ粒子などを含むが、これらに限定されない。

【0075】

薬物組成物

さらに、本発明は組成物を提供する。好ましくは、前記の組成物は薬物組成物で、上記の抗体またはその活性断片あるいはその融合タンパク質と、薬学的に許容される担体とを含有する。通常、これらの物質を無毒で不活性で薬学的に許容される水系担体で配合し、ここで、pH値は配合される物質の性質および治療しようとする疾患にもよるが、pH値は通常5~8程度、好ましくは6~8程度である。配合された薬物組成物は通常の経路で与与することができる、腫瘍内、腹膜内、静脈内、あるいは局部給与が含まれるが、これらに限定されない。

【0076】

本発明の薬物組成物は直接PD-L1タンパク質分子との結合に使用することができるため、腫瘍の治療に有用である。また、他の治療剤と併用してもよい。

【0077】

本発明の薬物組成物は、安全有効量（たとえば0.001~99wt%、好ましくは0.01~90wt%、より好ましくは0.1~80wt%）の本発明の上記のナノ抗体（またはその抱合体）と、薬学的に許容される担体または賦形剤とを含有する。このような担体は、食塩水、緩衝液、ブドウ糖、水、グリセリン、エタノール、およびその組み合わせを含むが、これらに限定されない。薬物の製剤は給与様態に相応する。本発明の薬物組成物は、注射剤としてもよく、たとえば生理食塩水またはブドウ糖およびほかの助剤を含有する水溶液で通常の方法によって製造することができる。薬物組成物は、注射剤、溶液の場合、無菌条件で製造す

10

20

30

40

50

る。活性成分の投与量は治療有効量、たとえば毎日約10 μ g/kg体重～約50mg/kg体重である。また、本発明のポリペプチドはほかの治療剤と併用することが出来る。

【0078】

薬物組成物の使用時、安全有効量の免疫抱合体を哺乳動物に施用するが、その安全有効量は、通常、少なくとも約10 μ g/kg体重で、かつ多くの場合、約50mg/kg体重未満で、好ましくは当該投与量が約10 μ g/kg体重～約10mg/kg体重である。勿論、具体的な投与量は、さらに投与の様態、患者の健康状況などの要素を考えるべきで、すべて熟練の医師の技能範囲以内である。

【0079】

標識されたナノ抗体

本発明の一つの好適な例において、前記ナノ抗体は検出可能なマーカーを持つものである。より好ましくは、前記のマーカーは、同位元素、コロイド金マーカー、有色マーカーまたは蛍光マーカーからなる群から選ばれる。

【0080】

コロイド金マーカーは当業者に既知の方法によって行ってもよい。本発明の一つの好適な形態において、抗PD-L1のナノ抗体をコロイド金で標識し、金コロイドで標識されたナノ抗体を得る。

本発明の抗PD-L1ナノ抗体は良い特異性を有し、高い力価を持つ。

【0081】

検出方法

また、本発明は、PD-L1タンパク質を検出する方法にも関する。当該方法は、基本的に、細胞および/または組織のサンプルを得る工程と、サンプルを媒体に溶解させる工程と、前記溶解されたサンプルにおけるPD-L1タンパク質のレベルを検出する工程とを含む。

【0082】

本発明の検出方法において、使用されるサンプルは特に限定されず、代表的な例は細胞保存液に存在する細胞を含有するサンプルである。

【0083】

キット

また、本発明は、本発明の抗体（またはその断片）あるいはカセットを含有するキットを提供するが、本発明の一つの好適な例において、前記のキットはさらに容器、使用説明書、緩衝液などを含む。

【0084】

また、本発明は、PD-L1レベルを検出する検出キットであって、PD-L1タンパク質を認識する抗体と、サンプルを溶解させる分解媒体と、検出に必要な汎用の試薬および緩衝液、たとえば様々な緩衝液、検出マーカー、検出基質などを含む。当該検出キットは体外診断装置でもよい。

【0085】

応用

上記のように、本発明のナノ抗体は幅広い生物応用価値および臨床応用価値を有し、その応用はPD-L1に関連する疾患の診断と治療、基礎医療研究、生物学研究などの多くの分野にわたる。一つの好適な応用はPD-L1に対する臨床診断および標的治療に使用されることである。

【0086】

本発明の主な利点は以下の通りである。

(a) 本発明のナノ抗体の高特異性はヒトの正確な空間構造を有するPD-L1タンパク質に対するものである。

(b) 本発明のナノ抗体は親和力が強い。

(c) 本発明のナノ抗体は生産が簡単である。

【0087】

以下、具体的な実施例によって、さらに本発明を説明する。これらの実施例は本発明を

10

20

30

40

50

説明するために用いられるものだけで、本発明の範囲の制限にはならないと理解されるものである。以下の実施例で具体的な条件が示されていない実験方法は、通常、たとえば Sambrookら、「モレキュラー・クローニング：研究室マニュアル」(ニューヨーク、コールド・スプリング・ハーバー研究所出版社、1989)に記載の条件などの通常の条件に、あるいは、メーカーのお薦めの条件に従う。特に説明しない限り、百分率および部は重量百分率および重量部である。

【0088】

実施例1：ヒトPD-L1タンパク質の発現・精製

(1)ヒトPD-L1のヌクレオチド配列をpCDNA3.1(-)ベクター(Invivogenから購入)に合成した後、その細胞外領域の配列をpFUSE-IgG1ベクター(Invitrogenから購入)にサブクローンし、ここで、Fcタグ無しのhPD-L1(ECD)タンパク質が製造しやすいように、hPD-L1(ECD)のC末端に1つのTEV酵素切断部位を導入した。

10

(2)Omegaプラスミドマキシキットで構築できたpFUSE-IgG1-hPD-L1(ECD)プラスミドを抽出した。

(3)ODが 2.0×10^6 個/mLになるまでHEK293F細胞を培養した。

(4)プラスミドを形質移入試薬PEIと1:3で均一に混合した後20min静置し、さらにHEK293F細胞に入れ、37℃、6% CO₂のシェーカーインキュベーターで5~6日培養した。

(5)細胞上清を収集し、Protein Aビーズと室温で1時間結合させた。

(6)リン酸塩緩衝液pH7.0でビーズを洗浄した後、さらに0.1M pH3.0 グリシンでタンパク質を溶離させた。

20

(7)溶離されたタンパク質をPBSに限外ろ過し、収量を測定した後サンプリングしてSDS-PAGE検出を行い(検出結果を図1Bに示す)、残ったタンパク質を-80℃の冷蔵庫に保存した。

(8)発現されたhPD-L1(ECD)-Fcタンパク質を酵素切断し、0.1mgのTEV酵素で1mgのhPD-L1(ECD)-Fcタンパク質を切断し、4℃で16時間酵素切断し、タンパク質液にニッケルカラムを通させ、さらにProtein Aカラムを通させ、流出液を収集し、サンプリングしてSDS-PAGE検出を行った(検出結果を図1Cに示す)。

【0089】

実施例2：PD-L1ナノ抗体ライブラリーの構築

(1)1mgのhPD-L1(ECD)-Fc抗原をフロイントアジュバントと等体積で混合させ、1頭の新疆フタコブラクダを、毎週1回で、合計7回免疫させ、B細胞を刺激して抗原特異的ナノ抗体を発現させた。

30

(2)7回の免疫が終了した後、100 mLのラクダの末梢血のリンパ球を取って全RNAを抽出した。

(3)cDNAを合成してネステッドPCRによってVHHを増幅した。

(4)制限酵素PstIおよびNotIで20 μgのpMECSファージディスプレイベクター(Biovectorから購入)および10 μgのVHHを酵素切断して2つの断片を連結した。

(5)連結産物を電気的形質転換感受性細胞TG1に形質転換させ、PD-L1ナノ抗体ライブラリーを構築してライブラリーサイズを測定したところ、ライブラリーサイズが 1.3×10^9 CFであった(結果を図2に示す)。

40

それと同時に、ランダムに24個のクローンを取って集落PCR検出を行い、結果から構築されたライブラリーの挿入率が100%であったことが示され、集落PCRの結果を図3に示す。

【0090】

実施例3：PD-L1ナノ抗体の選別および同定

抗体の選別：

(1)100 mM NaHCO₃、pH 8.2に溶解させた10 μgのhPD-L1(ECD)抗原をNUNCマイクロプレートにカップリングさせ、4℃で一晩置いた。

(2)2日目に、100 μLの0.1%BSAを入れ、室温で2 hブロッキングした。

(3)2 h後、100 μLのファージ(2×10^{11} CFU)免疫ラクダナノ抗体ファージディスプレイ

50

遺伝子ライブラリー)を入れ、室温で1 h作用させた。

(4)0.05% PBS+Tween 20で5回洗浄し、非特異的なファージを除去した。

(5)100 mMのトリエタノールアミンでPD-L1と特異的に結合したファージを解離させ、そして生長対数期にある大腸菌TG1細胞に感染させ、37 °Cで1 h培養し、ファージを生成させて精製して次の選別に使用し、同じ選別過程を3回繰り返し、その濃縮結果を図4に示す。

ファージの酵素結合免疫法(ELISA)によって特異的な単一の陽性クローンを選別した。

(1)2~3回の上記選別後のファージを含有する細胞シャーレから、96個の単一集落を取って100 µg/mLのアンプシリンを含有するTB培地(1LのTB培地に2.3g KH₂PO₄、12.52g K₂HPO₄、12g ペプトン、24g酵母エキス、4mLグリセリンを含有する)に接種し、対数期に生長したら、最終濃度1mMのIPTGを入れ、28 °Cで一晩培養した。

(2)浸透法によって粗抽出抗体を得、そして抗体を抗原で被覆されたELISAプレートに移し、室温で1時間置いた。

(3)PBSTで結合しなかった抗体を洗浄し、抗ネズミ抗HA抗体(北京康為世紀生物科技有限公司から購入)を入れ、室温で1時間置いた。

(4)PBSTで結合しなかった抗体を洗浄し、ヤギ抗マウスアルカリホスファターゼ標識抗体を入れ、室温で1時間置いた。

(5)PBSTで結合しなかった抗体を洗浄し、アルカリホスファターゼ呈色液を入れ、ELISA装置で、405 nmの波長で、吸収値を読み取った。

(6)サンプルウェルのOD値が対照ウェルのOD値の3倍以上よりも大きい場合(Ratio+/- > 3)、陽性クローンウェルと判定した。

(7)陽性クローンウェルの菌を100 µg/mLのLB含有液に移してプラスミドを抽出して配列決定を行った。

【 0 0 9 1 】

実施例4：ナノ抗体の宿主菌である大腸菌における発現、精製：

(1)上記配列決定で得られたクローン株のプラスミドを大腸菌WK6に電気的形質転換し、そしてそれをLA+Glucose、すなわちアンプシリンとブドウ糖を含有する培養プレートに塗布し、37 °Cで一晩培養した。

(2)単一集落を取って5 mLのアンプシリン含有LB培養液に接種し、37 °Cのシェーカーで一晩培養した。

(3)1 mLの一晩培養された菌種を330 mLのTB培養液に接種し、37 °CのシェーカーでOD値が0.6~1に達するまで培養し、IPTGを入れ、28 °Cのシェーカーで一晩培養した。

(4)遠心し、菌を収集した。

(5)浸透法によって抗体粗抽出液を得た。

(6)ニッケルカラムイオンアフィニティークロマトグラフィーによって純度が90%以上に達したナノ抗体を製造し、精製結果を図5に示す。

【 0 0 9 2 】

実施例5：フローサイトメトリーによるナノ抗体の遮断機能の検出

(1)hPD-1-Fc-ピオチンタンパク質(hPD-1-Fcの製造方法は実施例1と同様で、SDS-PAGE検出結果を図1Eに示す)を製造し、タンパク質のピオチン化の方法はピオチン試薬の説明書を参照した。

(2)各サンプルは1×10⁶個のヒトPD-L1全長タンパク質を一過性発現するHEK293F細胞を取って0.5% BSA-PBS緩衝液に再懸濁させ、上記精製されたPD-L1ナノ抗体を10 µg入れ、同時に陰性対照(hIgG1)およびブランク群(PBS)を設け、すべてのサンプルに5 µgのhPD-1-Fc-ピオチンを入れ、4 °Cで20minインキュベートした。

(3)PBSで2回細胞を洗浄し、eBioscienceのSA-PEを入れ、4 °Cで20minインキュベートし、PBSで細胞を2回洗浄した後、フローサイトメーター流式細胞計(BD FACS Calibur)によって検出し、検出結果を図6に示す。

PD-L1ナノ抗体のヒト化改造

(1)まず配列番号8で示されるPD-L1ナノ抗体の配列を鋳型として構造データベースで相同構造の検索を行ったところ、1306個の構造が見つかり、中からE value=0.0で配列相同

10

20

30

40

50

性 70%の34個の構造を選択した。

(2)この34個の構造を比較し、結晶構造の解像力の大きさおよび構築された系統樹から、最終的に3dwtを含む9つのタンパク質を選び、配列番号8で示されるPD-L1ナノ抗体の配列のマルチプレートホモロジーモデリングを行い、最終的に10個の構造を得、さらに採点関数の点数ランキングから、molpdfが最低の構造を選び、以下の操作を続けた。

(3)モデリングによる最適な構造に対し、ProtSAサーバーで残基の溶媒接触性を計算し、すなわち残基のアンフォールディング状態に対するフォールディング状態の溶媒に接触可能な面積の比に準じて判断し、40%超の残基を溶媒に露出する残基とした。

(4)モデリングによる最適な構造およびDP-47に対して配列アラインメントを行い、相応する溶媒に露出する残基を入れ替えた。最終的に配列番号14で示されるアミノ酸配列によってコードされるヒト化PD-L1ナノ抗体を決めた。ヒト化前後の抗体の配列は下記表2に示す。

【0093】

表 2

抗体領域	配列番号	
	ヒト化前	ヒト化後
FR1	1	10
CDR1	5	5
FR2	2	11
CDR2	6	6
FR3	3	12
CDR3	7	7
FR4	4	13
完全なアミノ酸配列	8	14
完全なヌクレオチド配列	9	15

【0094】

ヒト化前後の抗体の骨格領域とDP-47の骨格領域の相同性の比較は下記表3に示す。

表 3

抗体領域	DP-47との相同性	
	ヒト化前	ヒト化後
FR1	80%	92%
FR2	66.67%	80%
FR3	76.32%	89.47%
FR4	90.91%	100%

【0095】

実施例6：MOA法による抗PD-L1ナノ抗体の活性の検出

本実験は既に2種類の市販の抗PD-L1抗体(アテゾリズマブ(Atezolizumab), ATEおよびデュルバルマブ(Durvalumab), DUR)を陽性対照抗体として使用し、MOA検出細胞株(Pro-mega)を使用し、蛍光レポーター遺伝子の発現を検出することによってNFATシグナルの活性化状況を反映することで、抗体(配列は実施例5を参照する)のPD-1/PD-L1結合に対する抑制作用を検出した。工程は以下の通りである。

(1)活性検出の1日前のCHOK1-PDL1細胞の用意：CHOK1-PDL1は1~2日前に継代した。培養上清を捨て、PBSで洗浄した。適量のトリプシンを入れて37 /5% CO₂で3~5 min消化した。4倍のトリプシン体積の培地を入れ、細胞を50 ml遠心管に移して計数した。必要な体積の細胞を取って、230 gで10 min遠心した。培地を入れ、細胞を4 × 10⁵個細胞/mLになるように再懸濁させた。細胞を96ウェル白色細胞培養プレートに100 μl/ウェルで入れた。サイドウェルにPBSを200 μl/ウェルで入れた。細胞を37、5%CO₂のインキュベーター

で一晩培養した。

(2) Jurkat-PD1細胞の処理：活性検出の2日前に細胞の継代を行った。計数後、必要な体積の細胞を取って、170 gで5 min遠心した。アッセイ緩衝液で細胞を 1.25×10^6 個細胞/mlになるように再懸濁させた。

(3) サンプルおよびJurkat-PD1細胞の検出プレートへの仕込み：95 μ l/ウェルのCHOK1-PDL1細胞上清を捨てた。40 μ lのサンプル(ハイブリドーマ上清または勾配希釈されたハイブリドーマ上清精製抗体)および陽性対照、陰性対照を入れた。40 μ lのJurkat-PD1細胞を入れた。37 $^{\circ}$ C/5%CO₂のインキュベーターで6時間培養した。

(4) 検出：事前にBio-GloTM緩衝液を融解させ、Bio-GloTM基質を入れ、均一に混合した。6時間後、Bio-GloTM試薬を80 μ l/ウェルで入れた。室温で5~10 min置いた。数値を読み取った。

10

実験結果は、表4および図11に示すように、各濃度において、本発明のヒト化前のナノ抗体は基本的にいずれも陽性対照群の抗体よりも活性が強く、ヒト化後の本発明のナノ抗体は活性が陽性対照群に相当する。そのため、Nb-Fcおよびヒト化Nb-Fc抗体がいずれも有効にPD1/PD-L1の相互作用を遮断することができる。

【0096】

表4

濃度 (nm)	Nb-Fc	ヒト化 Nb-Fc	ATE	DUR	IgG1	細胞
100.000	89222	89341	94006	94061	15659.5	23860
33.333	95361	92060	97992	102218		
11.111	95122	92012	96453	97936		
3.704	97307	74598	96932	102944		
1.235	96119	68937	70803	89708		
0.412	95249	43734	29286	53071		
0.137	85291	23035	19240	23210		
0.046	60302	19080	17246	20308		
0.015	36885	19016	18355	17757		
0.005	26336	17079	16927	18243		

20

30

【0097】

実施例7：ヒト化PD-L1ナノ抗体の真核細胞HEK293における発現および精製

(1) ヒト化前およびヒト化後のPD-L1 Nbの配列をpFUSE-IgG1ベクター(Invivogenから購入)に合成し、OmegaプラスミドマキシキットでpFUSE-IgG1-Nb(ヒト化)プラスミドを抽出した。

(2) ODが 2.0×10^6 個/mlになるまでHEK293F細胞を培養した。

(3) プラスミドを形質移入試薬PEIと1:3で均一に混合した後20min静置し、さらにHEK293F細胞に入れ、37 $^{\circ}$ C、6% CO₂のシェーカーインキュベーターで5~6日培養した。

(4) 細胞上清を収集し、Protein Aビーズと室温で1時間結合させた。

40

(5) リン酸塩緩衝液pH7.0でビーズを洗浄した後、さらに0.1M pH3.0 グリシンでタンパク質を溶離させた。

(6) 溶離されたタンパク質をPBSに限外ろ過し、収量を測定した後サンプリングしてSDS-PAGE検出を行い(検出結果を図1Dおよび図7に示す)、残ったタンパク質を-80 $^{\circ}$ Cの冷蔵庫に保存した。図7から精製後のヒト化ナノ抗体の純度が90%以上に達したことがわかる。

【0098】

実施例8：フローサイトメトリーによるヒト化PD-L1ナノ抗体の遮断機能の検出

方法は実施例5と同様である。

(1) 各サンプルは 2×10^5 個の天然にPD-L1を発現するヒト肺癌細胞系EBC-1を取って0.5% BSA-PBS緩衝液に再懸濁させ、10 μ gの精製されたヒト化PD-L1ナノ抗体を入れ、同時に陰

50

性対照(hIgG1)およびブランク群(PBS)を設け、すべてのサンプルに5 µgのhPD-1-Fc-ビオチンを入れ、4℃で20minインキュベートした。

(2)PBSで細胞を2回洗浄し、eBioscienceのSA-PEを入れ、4℃で20minインキュベートし、PBSで細胞を2回洗浄した後、セットして検出したが、検出結果は図8に示すように、ブランク群および陰性対照群ではPD-1-Fc-ビオチンとEBC-1細胞の結合率が90%以上であったが、PD-L1ナノ抗体およびヒト化ナノ抗体を入れた後、PD-1-Fc-ビオチンとEBC-1細胞の結合率が10%以下で、これは入れられたナノ抗体が顕著にPD-1とPD-L1の相互作用を遮断することができることを示す。

【0099】

実施例9：ナノ抗体の親和力の測定

BiaCore T200によって検出した。(1)固定化：カルボキシ基とアミノ基の反応を利用して固定相の抗原をCM-5センサーチップの表面に固定化した。

(2)結合：抗体をHBS緩衝液で適当の濃度(5つの濃度勾配)に希釈し、抗原と抗体の結合過程を観察した。

(3)チップの再生：次の抗体の測定時10mMのグリシンで洗浄して再生させた。

(4)実験結果の分析：測定結果は図9に示すように、ヒト化前のナノ抗体の親和力が 2.34×10^{-9} Mで、ヒト化後のナノ抗体の親和力が 2.26×10^{-9} Mであった。ヒト化の改造は抗体の親和力に影響しなかった。

【0100】

実施例10：酵素結合免疫法(ELISA)による精製されたナノ抗体の特異性の同定

(1)通常の方法によってヒト化前およびヒト化後のナノ抗体をビオチン化させた。

(2)抗原タンパク質のPD-L1(ヒト)、PD-L1(ネズミ)、PD-L1(サル)、PD-L2(ヒト)、B7H4(ヒト)、B7H3(ヒト)の被覆：各ウェルに0.5 µg(5 µg/mL、100 µL)、IgG1を対照として、4℃で一晩被覆させた。

(3)2日目にPBSTで3回洗浄し、200 µLの1%BSAを入れて室温で2時間ブロッキングした。

(4)各株のビオチン化されたナノ抗体を10 µg/mLに希釈し、それぞれ各ウェルに100 µL取ってインキュベートし、室温で1時間反応させた。

(5)PBSTで結合しなかった抗体を洗浄し、100 µLのストレプトアビジン-HRP(1:1000で希釈)を入れ、室温で1時間置いた。

(6)呈色液を入れ、ELISA装置で、450 nmの波長で、吸収値を読み取った。吸収値からナノ抗体の特異性を判断し、検出結果は図10に示すように、ヒト化前後のナノ抗体はいずれもヒト由来およびサル由来のPD-L1と相互作用することができたが、ネズミ由来のPD-L1と相互作用せず、2株の抗体は優れた種属特異性を有し、かつヒト化前後のナノ抗体はいずれもPD-L1ファミリーのメンバーと相互作用せず、優れたファミリー特異性を有する。

【0101】

実施例11：混合リンパ球実験

本実験は、抗体を体外で培養された、異なるドナー由来の成熟DC細胞およびCD4+ T細胞とともにインキュベートし、培養系におけるIL2およびIFN- γ の相対発現量を検出することによって、異なる抗体のT細胞に対する活性化作用を反映した。工程は以下の通りである。

(1)PBMCの単離：ドナーから新鮮な血液を50 ml取り、2.5倍のPBSを添加し、軽くFiCoII(Thermo) 12.5 mlに入れて4管に分け、400 gで30 min遠心し、0減速度で停止させた。そのうちの白色バンドを吸ってPBS(Gibco)に入れ、PBSで2回洗浄した。

(2)DC細胞の単離：単離されたPBMC細胞を取って5 mlのT細胞培地に入れ、37℃、6% CO₂で2 h付着培養し、懸濁細胞液を吸い取ってCD4+細胞を単離し、残った細胞を3 mlのDC培地に添加し、2日培養した後3 mlのDC培地を添加し、さらに5日培養した後、rTNFa(R&D Systems)(1000 U/ml)、IL-1b(R&D Systems)(5 ng/ml)、IL-6(R&D Systems)(10 ng/ml)および1 µM PGE2(Tocris)を入れて2日培養し、リンパ球混合反応(MLR)のDC細胞とした。

10

20

30

40

50

(3)CD4+細胞の単離：PBMCを2 h静置培養し、懸濁細胞液を15 ml遠心管に吸い取り、200 gで10 min遠心し、沈殿に加入500 μ lの単離液、100 μ lのAB型血清、100 μ lの精製抗体を入れて再懸濁させ、4℃で20 minインキュベートし、単離液で1回洗浄し、さらに500 μ lのビーズ緩衝液を入れて15 minインキュベートし、磁場でビーズを除去し、T細胞培地で1回洗浄し、8 mlの培地で再懸濁させ、37℃、6% CO₂で培養した。「ヒトCD4+ T細胞濃縮キット (Human CD4+ T cell Enrichment Kit)」（19052、Stemcell)の説明書に従って操作した。

(3)MLR実験：成熟したDC細胞をCD4+細胞と混合し、各ウェルに体積200 μ l、DC細胞10000個、CD4+細胞100000個で、抗体を入れ、DC、T細胞、MLRを陰性対照とし、DC+T細胞+anti-CD3/CD28ビーズを陽性対照とし、混合して5日培養し、cisbioキット (ヒトIL2キット1000 Test、ヒトIFN- γ 1000test) によってIL2、IFN- γ の濃度を検出した。

実験結果は図12に示すように、本発明のナノ抗体 (配列は実施例5を参照する) がドナーを刺激して生成したサイトカインはいずれも陽性対照よりも高く、ヒト化後、生成したサイトカインは陽性対照に相当するため、本発明のナノ抗体およびヒト化改造後の抗体はいずれも有効にT細胞を活性化させることができ、かつ活性化効果が陽性対照群の抗体に相当することを示す。

【0102】

実施例12：抗PD-L1ナノ抗体の腫瘍抑制活性の研究

本実験は、ヒトPD-L1を発現するMC38細胞 (MC38-PDL1) (南京銀河公司) でPD-L1遺伝子組換えマウスにおいてヒト化Nb-Fcの抗腫瘍作用を測定した。まず、皮下接種の手段によってMC38-PDL1腫瘍担持マウスモデルを構築し、腫瘍形成後群分けを行い、異なる抗体 (配列は実施例5を参照する) で異なる投与量の治療を与え、投与期間における各群のマウスの腫瘍体積および体重の変化をモニタリングし、投与頻度は2回/週で、モニタリングの頻度はいずれも2回/週で、連続5週でモニタリングし、投与量および投与形態は表5および図13に示す。

【0103】

表5

群	被験品	投与量	投与体積	濃度	投与形態
h-IgG	IgG 対照	20 mg/kg	10 ml/kg	2.0 mg/ml	腹腔注射
ヒト化 Nb-Fc	ヒト化 Nb-Fc	10 mg/kg	10 ml/kg	1.0mg/ml	腹腔注射

【0104】

工程は以下の通りである。

1) MC38/PD-L1細胞懸濁液の調製：PBS (1 \times) でMC38細胞を分散させ、細胞密度が1 \times 10⁷個/mlで、MC38細胞懸濁液を調製した。

2) 接種：25匹のC57Bl/6背景のPD-L1マウスの右側の背部の毛を剃り、MC38/PD-L1細胞を1 \times 10⁶個/0.1 ml/匹で皮下注射した。腫瘍細胞の接種の6日後、各マウスの腫瘍体積を検出し、腫瘍体積が87.4 mm³ ~ 228.4 mm³の範囲内にある25匹のマウスを選んで腫瘍体積で平均に群分けを行った。

3) 投与：図13を参照する。

4) 検出：毎回の投与前に、体重と腫瘍体積を測定し、重量を記録した。電子天秤で体重を週に2回測定した。

5) 腫瘍体積の測定：ノギスで腫瘍の最大長さ (L) および最大幅 (W) を測定し、腫瘍体積はV=L \times W²/2という公式で計算した。

実験結果は図14に示すように、時間の経過につれ、ヒト化Nb-Fcを接種されたマウスを示し、その腫瘍体積は対照群に対して良く抑えられ、かつ顕著に増加した状況が現れず、ヒト化Nb-Fcが顕著な腫瘍抑制作用を有することが説明された。

【0105】

実施例13：PEG沈殿法による抗体の可溶性の検出

本実験は、PEG沈殿の方法によって、候補の抗体 (配列は実施例5を参照) の異なる濃度の

PEGにおける溶解状況を検出することによって、抗体の可溶性を反映した。工程は以下の通りである。

1) 抗体のサンプルを5 mg/mlに濃縮させた。

2) 96ウェル細胞培養プレートにサンプルを仕込み、各ウェルに40 μ lずつ抗体のサンプルを入れ、最終濃度が1 mg/mlであった。1~12列目にそれぞれ30% PEG を26.7 μ l、40 μ l、46.7 μ l、53.3 μ l、60 μ l、66.7 μ l、73.3 μ l、80 μ l、86.7 μ l、93.3 μ l、100 μ l、106.7 μ lで入れ、IBI301緩衝液で合計体積が200 μ lになるまで補充した。PEGの濃度勾配はそれぞれ4%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%であった。

3) 室温で1 h置いて、OD500 nmを測定した。

研究結果は表6および図15に示すように、ヒト化Nb-Fcはいずれも8% (w/v) PEGで混濁したが、対照抗体は(すでに市販の薬物ヒュミラ (Humira)) 6% (w/v) PEGで混濁したことで、本発明のヒト化Nb-Fcが対照抗体よりも優れた可溶性を有することが示された。

【0106】

表 6

OD500 nm	4%	6%	7%	8%	9%	10%
ヒト化 Nb-Fc	0.0352	0.0356	0.0354	0.0602	0.0411	0.1792
ヒュミラ	0.0365	0.0367	0.0387	0.2144	0.3627	0.6293
OD500 nm	11%	12%	13%	14%	15%	16%
ヒト化 Nb-Fc	0.4778	0.5807	0.8418	0.8687	0.928	1.0514
ヒュミラ	0.8409	0.7891	0.9194	0.9589	0.9086	0.9444

【0107】

実施例14：加速安定性実験の測定

本実験は、抗体(配列は実施例5を参照する)の40 で30日置いた後の純度および生物学的活性の変化を検出することによって、当該抗体の長期間熱安定性を評価した。SECの方法によって目的抗体の40 で0、14および30日置いた後の純度を測定したが、実験結果は表7および図16に示すように、ヒト化Nb-Fcの純度が顕著に変化しなかった。本実験は、FACS方法によって加速安定性実験のサンプルとCHO-PDL1細胞の結合状況を検出したが、工程は以下の通りである。

1) 細胞の準備：CHO-PDL1細胞を計数し、そして 2×10^6 個細胞/mlに希釈し、U底96ウェルプレートに100 μ l/ウェルで入れ、1列目のウェルに50 μ l追加した。

2) 検出工程：1つ目のウェルに抗体を最終濃度が200 nMになるように入れ、均一に混合し、50 μ lを2つ目のウェルに吸い取り、同様に順に操作し、陰性対照はIgG対照であった。氷浴で20 min処理した。PBSを100 μ l/ウェル入れ、400 gで5 min遠心して上清を除去し、PBSで細胞を1回洗浄した。1:100で希釈されたヤギ抗ヒトIgG-PE(eBioscience)を100 μ l/ウェル入れ、氷浴で20 min処理し、400 gで5 min遠心して上清を除去し、PBSを100 μ l/ウェル入れて1回洗浄し、100 μ l PBSで再懸濁させ、FACSによって検出した。

実験結果は図17に示すように、ヒト化Nb-FcとCHO-PDL1細胞の結合に顕著な変化がなかった。研究結果から、ヒト化Nb-Fcが優れた熱安定性を有することがわかる。

【0108】

表 7

SEC(%)	0日目	14日目	30日目
ヒト化 Nb-Fc	99.55	99.68	99.71

10

20

30

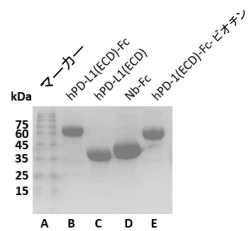
40

50

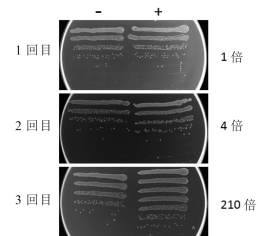
【 0 1 0 9 】

各文献がそれぞれ単独に引用されるように、本発明に係るすべての文献は本出願で参考として引用する。また、本発明の上記の内容を読み終わった後、当業者が本発明を各種の変動や修正をすることができるが、それらの等価の様態のものは本発明の請求の範囲に含まれることが理解されるはずである。

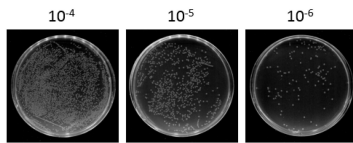
【 図 1 】



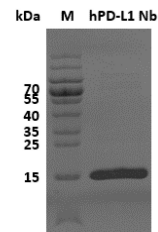
【 図 4 】



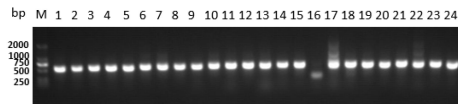
【 図 2 】



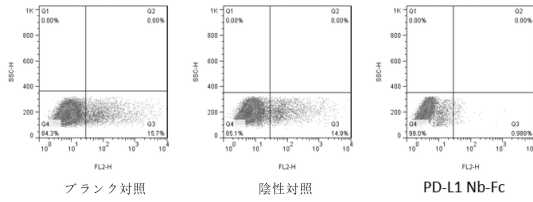
【 図 5 】



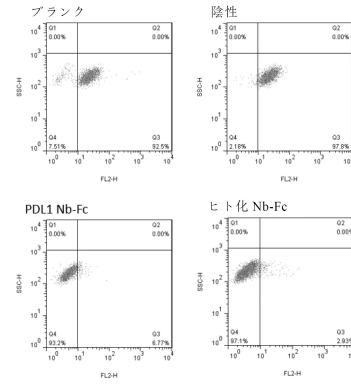
【 図 3 】



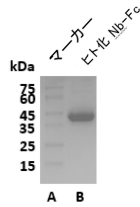
【図 6】



【図 8】



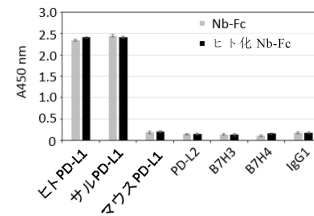
【図 7】



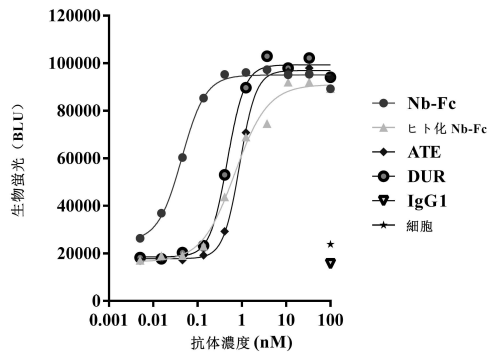
【図 9】

サンプル	Kon(M ⁻¹ s ⁻¹)	Koff(s ⁻¹)	KD(M)
Nb-Fc	2.33×10 ⁵	5.47×10 ⁻⁴	2.34×10 ⁻⁹
ヒト化 Nb-Fc	1.82×10 ⁵	4.12×10 ⁻⁴	2.26×10 ⁻⁹

【図 10】

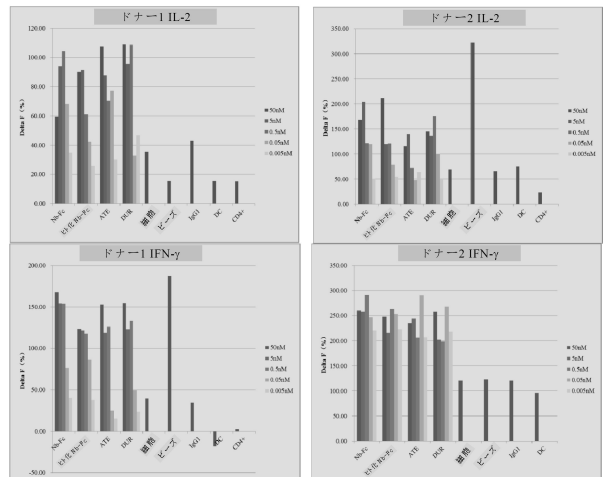


【図 11】

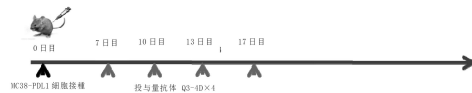


Nb-Fc	ヒト化 Nb-Fc	ATE	DUR
0.04415	0.6977	0.8976	0.4722

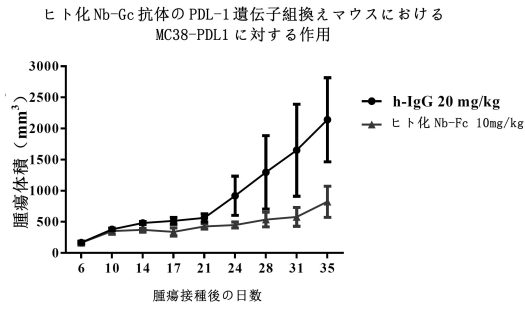
【図 12】



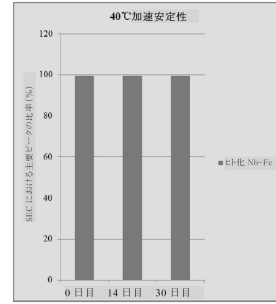
【図 13】



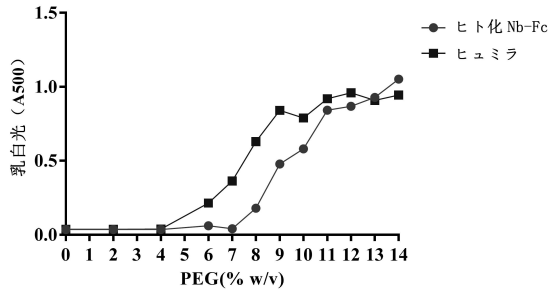
【 図 1 4 】



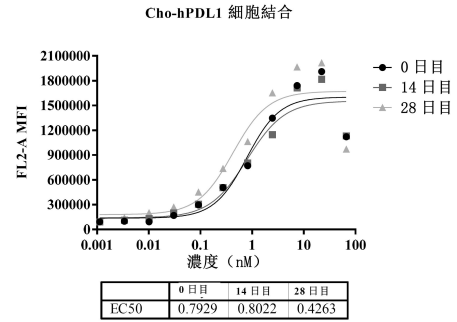
【 図 1 6 】



【 図 1 5 】



【 図 1 7 】



【 配列表 】

0006670935000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 0 7 K	16/18 (2006.01)	C 0 7 K	16/18
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 K	38/19 (2006.01)	A 6 1 K	38/19
A 6 1 K	38/43 (2006.01)	A 6 1 K	38/43
A 6 1 K	47/55 (2017.01)	A 6 1 K	47/55
A 6 1 K	47/52 (2017.01)	A 6 1 K	47/52
A 6 1 K	47/64 (2017.01)	A 6 1 K	47/64
A 6 1 K	47/68 (2017.01)	A 6 1 K	47/68
A 6 1 K	51/10 (2006.01)	A 6 1 K	51/10 1 0 0
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 Y
G 0 1 N	33/531 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 T
		A 6 1 K	39/395 L
		G 0 1 N	33/531 A

(72)発明者 ミャオ, シアオニウ
 中華人民共和国 2 1 5 1 2 3 ジャンスー, スーヂョウ インダストリアル パーク スーヂ
 ヨウ, トンピン ストリート 1 6 8

(72)発明者 リウ, シアオリン
 中華人民共和国 2 1 5 1 2 3 ジャンスー, スーヂョウ インダストリアル パーク スーヂ
 ヨウ, トンピン ストリート 1 6 8

審査官 白井 美香保

(56)参考文献 特表2015-527342(JP,A)
 国際公開第2015/112805(WO,A1)
 国際公開第2016/050721(WO,A1)
 Annu. Rev. Biochem., 2013年, Vol. 82, pp. 775-797

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S / W P I D S / R E G I S T R Y (S T N)

专利名称(译)	抗pd-1纳米抗体及其用途		
公开(公告)号	JP6670935B2	公开(公告)日	2020-03-25
申请号	JP2018527234	申请日	2017-08-03
发明人	シェン, シアオニン ミャオ, シアオニウ リウ, シアオリン		
IPC分类号	C12N15/13 C12N15/63 C12N1/15 C12N1/21 C12N1/19 C12N5/10 C07K16/18 C12P21/08 A61P35/00 A61K38/19 A61K38/43 A61K47/55 A61K47/52 A61K47/64 A61K47/68 A61K51/10 A61K39/395 G01N33/531		
CPC分类号	C07K16/2827 C07K2317/24 C07K2317/565 C07K2317/567 C07K2317/569 C07K2317/92 A61K2039/505 A61P35/00 A61K39/395 A61K51/10 C07K2317/22 C07K2317/76 C07K2317/94 C07K16/28 C12N15/85 G01N33/68 G01N2333/70596 A61K47/6849 A61K51/1027 C07K2319/30 C07K2319/61 G01N33/574		
FI分类号	C12N15/13.ZNA C12N15/63.Z C12N1/15 C12N1/21 C12N1/19 C12N5/10 C07K16/18 C12P21/08 A61P35/00 A61K38/19 A61K38/43 A61K47/55 A61K47/52 A61K47/64 A61K47/68 A61K51/10.100 A61K39/395.Y A61K39/395.T A61K39/395.L G01N33/531.A		
优先权	201610634596.X 2016-08-04 CN		
其他公开文献	JP2019528033A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了一种针对人类程序性死亡因子PD-L1的纳米抗体。该抗体具有阻断PD-L1与受体PD-1的结合的功能。公开了纳米抗体和编码该纳米抗体的基因序列，相应的表达载体和能够表达该纳米抗体的宿主细胞，以及制备该纳米抗体的方法。同时，还公开了人源化PD-L1纳米抗体的序列。人源化纳米抗体仍然具有阻断PD-L1与PD-1结合的功能，并且具有相对较高的亲和力和相对较好的特异性。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6670935号 (P6670935)
(45) 発行日 令和2年3月25日(2020.3.25)	(24) 登録日 令和2年3月4日(2020.3.4)	
(51) Int. Cl.	F I	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	Z N A
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
請求項の数 10 (全 24 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 特願2018-527234 (P2018-527234)	(73) 特許権者 518179483 イノバント バイオロジックス(スチョウカンパニー) リミテッド 中華人民共和国 215123 ジャンスー、スーチョウ インダストリアル パーク スーチョウ、トンピン ストリート 168	
(86) (22) 出願日 平成29年8月3日(2017.8.3)	(74) 代理人 110002077 園田・小林特許業務法人	
(65) 公表番号 特表2019-528033 (P2019-528033A)	(72) 発明者 シェン、シアオニン 中華人民共和国 215123 ジャンスー、スーチョウ インダストリアル パーク スーチョウ、トンピン ストリート 168	
(43) 公表日 令和1年10月10日(2019.10.10)		
(88) 国際出願番号 PCT/CN2017/095884		
(87) 国際公開番号 W02018/024237		
(87) 国際公開日 平成30年2月8日(2018.2.8)		
審査請求日 平成30年11月20日(2018.11.20)		
(31) 優先権主張番号 201610634596.X		
(32) 優先日 平成28年8月4日(2016.8.4)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関 中国(CN)		
早期審査対象出願		最終頁に続く
(54) 【発明の名称】 抗PD-1 ナノ抗体およびその使用		