

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6974311号

(P6974311)

(45) 発行日 令和3年12月1日(2021.12.1)

(24) 登録日 令和3年11月8日(2021.11.8)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 K 16/28 (2006.01)

C O 7 K 16/28 Z N A

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 N

A 6 1 K 31/7088 (2006.01)

A 6 1 K 31/7088

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 48/00

A 6 1 P 37/04 (2006.01)

A 6 1 P 37/04

請求項の数 24 (全 48 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-519261 (P2018-519261)
 (86) (22) 出願日 平成28年6月23日(2016.6.23)
 (65) 公表番号 特表2018-518540 (P2018-518540A)
 (43) 公表日 平成30年7月12日(2018.7.12)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/039015
 (87) 国際公開番号 W02016/210129
 (87) 国際公開日 平成28年12月29日(2016.12.29)
 審査請求日 令和1年6月24日(2019.6.24)
 (31) 優先権主張番号 62/183,297
 (32) 優先日 平成27年6月23日(2015.6.23)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/266,398
 (32) 優先日 平成27年12月11日(2015.12.11)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(73) 特許権者 500213834
 メモリアル スローン ケタリング キャ
 ンサー センター
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 1006
 5, ニューヨーク, ヨーク アベニュー
 1275
 (73) 特許権者 517449268
 ユリーカ セラピューティクス インコー
 ポレイテッド
 EUREKA THERAPEUTICS
 , INC.
 アメリカ合衆国, 94608 カリフォル
 ニア州, エメリービル, ホールトン スト
 リート 5858, スイート 370

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規PD-1免疫調節剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(A) 配列番号53のアミノ酸配列を含む抗原結合領域；

(B) 配列番号49および51のアミノ酸配列をそれぞれ有する可変軽鎖(VL)および可変重鎖(VH)を含む抗原結合領域；

(C) アミノ酸配列NIGSKS(配列番号34)、YDSおよびQVWDS SSDYV(配列番号45)をそれぞれ有するLCCDR1、LCCDR2およびLCCDR3を含む軽鎖(LC)ならびにアミノ酸配列GFTFSSYA(配列番号46)、ISGSGGST(配列番号47)およびARNYISMFD(配列番号48)をそれぞれ有するHCCDR1、HCCDR2およびHCCDR3を含む重鎖(HC)を含む抗原結合領域；

の1つを含む組換え抗原結合性タンパク質であって、

前記抗原結合性タンパク質は分泌可能scFvを含み、前記分泌可能scFvはプログラム細胞死(PD-1)に特異的に結合し、PD-1とそのリガンドであるPD-L1との結合を阻害する、前記組換え抗原結合性タンパク質。

【請求項2】

前記抗原結合性タンパク質がPD-1アンタゴニストである、請求項1に記載の抗原結合性タンパク質。

【請求項3】

前記抗原結合性タンパク質がキメラ抗原受容体(CAR)である、請求項1に記載の抗

10

20

原結合性タンパク質。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗原結合性タンパク質をコードする核酸。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗原結合性タンパク質、請求項 4 に記載の核酸または請求項 5 に記載のベクターを含む細胞。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗原結合性タンパク質、請求項 4 に記載の核酸、請求項 5 に記載のベクター、又は請求項 6 に記載の細胞を含む、医薬組成物。

10

【請求項 8】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の組換え抗 P D 1 抗原結合性タンパク質、請求項 4 に記載の核酸、請求項 5 に記載のベクター、請求項 6 に記載の細胞、または請求項 7 に記載の医薬組成物の、P D 1 リガンドへの P D 1 結合を阻害することによる、P D 1 - 陽性疾患の治療のための医薬の製造への、使用。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の組換え抗 P D 1 抗原結合性タンパク質、請求項 4 に記載の核酸、請求項 5 に記載のベクター、請求項 6 に記載の細胞、または請求項 7 に記載の医薬組成物の、P D - 1 シグナル経路を阻害することによる、免疫調節のための医薬の製造への、使用。

20

【請求項 10】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の組換え抗 P D - 1 抗原結合性タンパク質をコードする核酸およびキメラ抗原受容体をコードする核酸を含むベクターであって、前記組換え抗 P D - 1 抗原結合性タンパク質が、前記キメラ抗原受容体と同一ではない、ベクター。

【請求項 11】

請求項 10 に記載のベクターを含む細胞。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の組換え抗 P D - 1 抗原結合性タンパク質をコードする核酸およびキメラ抗原受容体をコードする核酸を含む細胞であって、前記組換え抗 P D - 1 抗原結合性タンパク質が、前記キメラ抗原受容体と同一ではない、細胞。

30

【請求項 13】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の組換え抗 P D - 1 抗原結合性タンパク質およびキメラ抗原受容体を含む細胞であって、前記組換え抗 P D - 1 抗原結合性タンパク質が、前記キメラ抗原受容体と同一ではない、細胞。

【請求項 14】

前記キメラ抗原受容体が P D - 1 に特異的に結合するものではない、請求項 10 ~ 13 のいずれか一項に記載のベクターまたは細胞。

【請求項 15】

前記組換え抗 P D - 1 抗原結合性タンパク質が抗体である、請求項 10 ~ 14 のいずれか一項に記載のベクターまたは細胞。

40

【請求項 16】

前記組換え抗 P D - 1 抗原結合性タンパク質がヒト抗体である、請求項 10 ~ 15 のいずれか一項に記載のベクターまたは細胞。

【請求項 17】

前記組換え抗 P D - 1 抗原結合性タンパク質が P D - 1 アンタゴニストである、請求項 10 ~ 16 のいずれか一項に記載のベクターまたは細胞。

【請求項 18】

前記組換え抗 P D - 1 抗原結合性タンパク質が、請求項 1 に記載の抗原結合領域を含む、請求項 10 ~ 17 のいずれか一項に記載のベクターまたは細胞。

50

【請求項 19】

前記キメラ抗原受容体が C D - 19 に特異的に結合する、請求項 10 ~ 18 のいずれか一項に記載のベクターまたは細胞。

【請求項 20】

前記キメラ抗原受容体が、ヒト T 細胞膜に挿入されることができる、請求項 10 ~ 19 のいずれか一項に記載のベクターまたは細胞。

【請求項 21】

前記細胞が T 細胞である、請求項 11 ~ 20 のいずれか一項に記載の細胞。

【請求項 22】

請求項 10 ~ 21 のいずれか一項に記載のベクターまたは細胞を含む、医薬組成物。

10

【請求項 23】

請求項 10 ~ 21 のいずれか一項に記載のベクターまたは細胞、または請求項 22 に記載の医薬組成物の、P D 1 リガンドへの P D 1 結合を阻害することによる、P D 1 - 陽性疾患の治療のための医薬の製造への、使用。

【請求項 24】

請求項 10 ~ 21 のいずれか一項に記載のベクターまたは細胞、または請求項 22 に記載の医薬組成物の、P D - 1 シグナル経路を阻害することによる、免疫調節のための医薬の製造への、使用。

【発明の詳細な説明】**【関連出願の相互参照】**

20

【0001】

本出願は、それぞれの内容が本開示に引用により組み込まれる、2015年6月23日出願の米国仮出願第 62 / 183 , 297 号および 2015 年 12 月 11 日出願の米国仮出願第 62 / 266 , 398 号からの優先権を主張する。

【0002】**配列表**

本出願は、2016 年 6 月 16 日に作成された配列表を包含し、A S C I I フォーマットにおけるそのファイルは、3314070 A W O _ S e q u e n c e L i s t i n g _ S T 25 . t x t と命名され、そのサイズは 104 キロバイトである。そのファイルは、引用によりその全体が本出願に組み込まれる。

30

【技術分野】**【0003】**

本開示は一般に、免疫機能に関与する抗原結合性タンパク質に関する。より具体的には、本開示は、P D - 1 に対する特異性を有する、組換え抗体、キメラ抗原受容体およびそれらの断片に関する。

【背景技術】**【0004】**

癌免疫療法の目的は、癌特異的免疫応答を調節することにより悪性疾患を治療することである。主要な標的は、活性化 T 細胞の表面に発現し、そのリガンドである、P D - L 1 および P D - L 2 の 1 つに結合すると細胞内抑制性シグナルを導く、プログラム細胞死 (P D - 1) 受容体である。

40

【0005】

P D - 1 は、癌において役割を果たしていることが示されている。ヒトにおいて、P D - 1 および / または P D - L 1 の発現は、免疫組織化学により評価して、多数の原発腫瘍生検において見られている。かかる組織としては、肺、肝臓、卵巣、子宮頸部、皮膚、結腸、神経膠腫、膀胱、乳房、腎臓、食道、胃、口腔扁平細胞、尿路上皮細胞、および脾臓の癌ならびに頭頸部の腫瘍が挙げられる。さらに、腫瘍細胞上の P D - リガンド発現は、複数の腫瘍タイプにわたって癌患者の予後不良と相関している。

【0006】

P D - 1 を標的とし、P D - 1 のアゴニストまたはそのアンタゴニストのいずれかとし

50

て機能する、抗体およびその他の抗原結合性タンパク質を含む、新しい治療法が現在必要とされている。

【発明の概要】

【0007】

本開示は、T細胞上の、プログラム細胞死に関連するタンパク質受容体である、PD-1に特異的に結合することができ、それによりT細胞による免疫応答を調節する、抗体およびキメラ抗原受容体などの抗原結合性タンパク質を記載する。PD-1のそのリガンドであるPD-L1との結合を阻害することにより、PD-1シグナル経路の遮断がT細胞のアポトーシスを阻害する。

【0008】

1つの態様において、それゆえ、本開示は、PD-1に特異的に結合し、そのリガンドとの結合を妨げる、組換え抗原結合性タンパク質、抗体およびキメラ抗原受容体またはこれらの抗原結合部分に関する。

【0009】

1つの態様において、それゆえ、本開示は、以下の1つを含む組換え抗原結合性タンパク質またはその抗原結合性断片に関する：

(A) 配列番号10、配列番号21、配列番号32、配列番号43、配列番号53、配列番号61、配列番号72、配列番号83、配列番号94、配列番号103、配列番号114、配列番号125、配列番号133、配列番号142；その断片、およびその相同配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する抗原結合領域；

(B) 配列番号6および8；配列番号17および19；配列番号28および30；配列番号39および41；配列番号49および51；配列番号57および59；配列番号68および70；配列番号79および81；配列番号90および92；配列番号99および101；配列番号110および112；配列番号121および123；配列番号129および131；配列番号138および140；それらの断片、ならびにそれらの相同配列から選択されるアミノ酸配列をそれぞれ有する可変軽鎖(VL)および可変重鎖(VH)を含む抗原結合領域；または

(C) 以下を含む抗原結合領域：

(i) アミノ酸配列QSSSY(配列番号1)、AASおよびQQSYSTPLT(配列番号2)をそれぞれ有する軽鎖相補性決定領域(LCCDR) LCCDR1、LCCDR2およびLCCDR3を含む軽鎖(LC)ならびにアミノ酸配列GFTSSSYW(配列番号4)、IKQDGSEK(配列番号5)およびARGGWSYDM(配列番号6)をそれぞれ有する重鎖相補性決定領域(HCCDR) HCCDR1、HCCDR2およびHCCDR3を含む重鎖(HC)；それらの断片またはそれらの相同配列；

(ii) アミノ酸配列SSNIGAGYA(配列番号12)、TNNおよびQSYDSSL SGVI(配列番号13)をそれぞれ有するLCCDR1、LCCDR2およびLCCDR3を含む軽鎖(LC)ならびにアミノ酸配列GYTLTELS(配列番号14)、FDPEDGET(配列番号15)およびARAYYGFDQ(配列番号16)をそれぞれ有するHCCDR1、HCCDR2およびHCCDR3を含む重鎖(HC)；それらの断片またはそれらの相同配列；

(iii) アミノ酸配列SSNIGNNA(配列番号23)、YNDおよびAAWDDSVNGYV(配列番号24)をそれぞれ有するLCCDR1、LCCDR2およびLCCDR3を含む軽鎖(LC)ならびにアミノ酸配列GYTFTRFG(配列番号25)、ISVNNGNT(配列番号26)およびARYMYGRDSD(配列番号27)をそれぞれ有するHCCDR1、HCCDR2およびHCCDR3を含む重鎖(HC)；それらの断片またはそれらの相同配列；

(iv) アミノ酸配列NIGSKS(配列番号34)、YDSおよびQVWDNHSDVV(配列番号35)をそれぞれ有するLCCDR1、LCCDR2およびLCCDR3を含む軽鎖(LC)ならびにアミノ酸配列RNKFS SYA(配列番号36)、ISGSGGTT(配列番号37)およびARWYSSYYDV(配列番号38)をそれぞれ有す

10

20

30

40

50

るHCCDR1、HCCDR2およびHCCDR3を含む重鎖(HC)；それらの断片またはそれらの相同配列；

(v) アミノ酸配列NIGSKS(配列番号34)、YDSおよびQVWDSSSDYV(配列番号45)をそれぞれ有するLCCDR1、LCCDR2およびLCCDR3を含む軽鎖(LC)ならびにアミノ酸配列GFTFSSYA(配列番号46)、ISGSGGST(配列番号47)およびARNYISMFDs(配列番号48)をそれぞれ有するHCCDR1、HCCDR2およびHCCDR3を含む重鎖(HC)；それらの断片またはそれらの相同配列；

(vi) アミノ酸配列NIGSKS(配列番号34)、YDSおよびQVWDSSSDHV(配列番号55)をそれぞれ有するLCCDR1、LCCDR2およびLCCDR3を含む軽鎖(LC)ならびにアミノ酸配列GFTFSSYA(配列番号46)、ISGSGGST(配列番号47)およびARGYSSYYDA(配列番号56)をそれぞれ有するHCCDR1、HCCDR2およびHCCDR3を含む重鎖(HC)；それらの断片またはそれらの相同配列；

(vii) アミノ酸配列RSNIGENT(配列番号63)、SNNおよびAAWDDR LNGYV(配列番号64)をそれぞれ有するLCCDR1、LCCDR2およびLCCDR3を含む軽鎖(LC)ならびにアミノ酸配列GYTF TNYG(配列番号65)、IGA QK GDT(配列番号66)およびARS QGV P FDS(配列番号67)をそれぞれ有するHCCDR1、HCCDR2およびHCCDR3を含む重鎖(HC)；それらの断片またはそれらの相同配列；

(viii) アミノ酸配列RSNIGSNT(配列番号74)、NNNおよびATWDDSLNEYV(配列番号75)をそれぞれ有するLCCDR1、LCCDR2およびLCCDR3を含む軽鎖(LC)ならびにアミノ酸配列GYTFTRYG(配列番号76)、ISGYNGNT(配列番号77)およびARHG YGYHGD(配列番号78)をそれぞれ有するHCCDR1、HCCDR2およびHCCDR3を含む重鎖(HC)；それらの断片またはそれらの相同配列；

(ix) アミノ酸配列SSNIGAGYV(配列番号85)、HNNおよびQSYDSSL SGWV(配列番号86)をそれぞれ有するLCCDR1、LCCDR2およびLCCDR3を含む軽鎖(LC)ならびにアミノ酸配列GFTFKDYY(配列番号87)、ISTSGNSV(配列番号88)およびARSPGHSDYDS(配列番号89)をそれぞれ有するHCCDR1、HCCDR2およびHCCDR3を含む重鎖(HC)；それらの断片またはそれらの相同配列；

(x) アミノ酸配列NIGDKS(配列番号96)、YDSおよびQVWASGTDHPYVI(配列番号97)をそれぞれ有するLCCDR1、LCCDR2およびLCCDR3を含む軽鎖(LC)ならびにアミノ酸配列GFTFSSYA(配列番号46)、ISGSGGST(配列番号47)およびARMYGSYTDM(配列番号98)をそれぞれ有するHCCDR1、HCCDR2およびHCCDR3を含む重鎖(HC)；およびそれらの断片または相同配列；

(xi) アミノ酸配列SSNIGYNY(配列番号105)、RNNおよびTSWDDSLSGYV(配列番号106)をそれぞれ有するLCCDR1、LCCDR2およびLCCDR3を含む軽鎖(LC)ならびにアミノ酸配列GNAFTNFY(配列番号107)、INPSGTDLT(配列番号108)およびARQYAYGYS GFDM(配列番号109)をそれぞれ有するHCCDR1、HCCDR2およびHCCDR3を含む重鎖(HC)；それらの断片またはそれらの相同配列；

(xii) アミノ酸配列QSVSNW(配列番号116)、AASおよびQQSYSTPIT(配列番号117)をそれぞれ有するLCCDR1、LCCDR2およびLCCDR3を含む軽鎖(LC)ならびにアミノ酸配列GYTF TSY Y(配列番号118)、INPNTGGS(配列番号119)およびARGDV TYDE(配列番号120)をそれぞれ有するHCCDR1、HCCDR2およびHCCDR3を含む重鎖(HC)；それらの断片またはそれらの相同配列；

10

20

30

40

50

(x i i i) アミノ酸配列 N I G S K S (配列番号 3 4)、Y D D および Q V W D I N D H Y V (配列番号 1 2 7) をそれぞれ有する L C C D R 1、L C C D R 2 および L C C D R 3 を含む軽鎖 (L C) ならびにアミノ酸配列 G F T F S S Y A (配列番号 4 6)、I S G S G G S T (配列番号 4 7) および A R S Q A S F M D I (配列番号 1 2 8) をそれぞれ有する H C C D R 1、H C C D R 2 および H C C D R 3 を含む重鎖 (H C) ; それらの断片またはそれらの相同配列 ; または

(x i v) アミノ酸配列 N I G S K S (配列番号 3 4)、D D S および Q V W D S S S D Q G V (配列番号 1 3 5) をそれぞれ有する L C C D R 1、L C C D R 2 および L C C D R 3 を含む軽鎖 (L C) ならびにアミノ酸配列 G F T F S S Y A (配列番号 4 6)、I G T G G G T (配列番号 1 3 6) および A R G T G Y D G D Q (配列番号 1 3 7) をそれぞれ有する H C C D R 1、H C C D R 2 および H C C D R 3 を含む重鎖 (H C) およびそれらの断片またはそれらの相同配列。

10

【 0 0 1 0 】

ある実施形態において、組換え抗原結合性タンパク質またはその抗原結合性断片は、少なくとも 1 つの上記の配列番号の全長の少なくとも 4 0 %、4 5 %、5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % である上記の配列番号の少なくとも 1 つの断片を含む。ある実施形態において、組換え抗原結合性タンパク質またはその抗原結合性断片は、少なくとも 1 つの上記の配列番号に対して少なくとも 6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、9 9 . 5 %、または 9 9 . 9 % の同一性を有する、上記の配列番号の少なくとも 1 つに相同的な配列を含む。

20

【 0 0 1 1 】

関連する態様において、本開示は、組換え抗原結合性タンパク質またはそれらの抗原結合性断片に関し、ここで、組換え抗原結合性タンパク質は、抗体、キメラ抗原受容体 (C A R)、融合タンパク質またはその接合体である。1 つの実施形態において、組換え抗原結合性タンパク質またはその抗原結合性断片は、治療薬、例えば、薬物、毒素もしくは細胞毒性部分、放射性同位元素、タンパク質またはペプチドに接合している。

【 0 0 1 2 】

本開示の抗体は、全長抗体、インタクトな抗体、それらの断片および相同配列であり、これらに限定されないが、F a b 断片、F (a b ')₂ 断片または単鎖可変断片 (s c F v) が含まれる。

30

【 0 0 1 3 】

組換え抗原結合性タンパク質において、抗原結合領域は、ヒト P D - 1 のエピトープに特異的に結合し、P D - 1 のその (1 つまたは複数の) リガンドへの結合をブロックする。

【 0 0 1 4 】

関連する態様において、本開示は、本開示の抗原結合性タンパク質をコードする核酸ならびにかかる核酸または抗原結合性タンパク質を含むベクターおよび細胞に関する。

【 0 0 1 5 】

40

さらに別の態様において、本開示は、治療上有効量の抗原結合性タンパク質またはその抗原結合性断片を投与することを含む、対象における T 細胞応答を上昇させる方法に関する。治療上有効量の抗原結合性タンパク質またはその抗原結合性断片の投与は、P D - 1 によって媒介されるシグナル伝達を、阻害するか、低下させるか、調節するかまたは消失させる。

【 0 0 1 6 】

さらに別の関連する態様において、本開示は、対象に治療上有効量の抗原結合性タンパク質またはその抗原結合性断片を投与することを含む、P D 1 - 陽性疾患を有する対象を治療する方法に関する。1 つの実施形態において、抗原結合性タンパク質またはその抗原結合性断片を含む医薬組成物が投与される。

50

【0017】

本発明の別の態様において、本開示は、組換え抗PD-1抗原結合性タンパク質をコードする核酸およびキメラ抗原受容体をコードする核酸を含むベクターに関し、ここで、前記組換え抗PD-1抗原結合性タンパク質は、前記キメラ抗原受容体と同一ではない。

【0018】

さらに別の態様において、本開示は、本明細書に記載するベクターを含む細胞に関する。関連する態様において、本開示は、組換え抗PD-1抗原結合性タンパク質をコードする核酸およびキメラ抗原受容体をコードする核酸を含む細胞に関し、ここで、前記組換え抗PD-1抗原結合性タンパク質は、前記キメラ抗原受容体と同一ではない。別の関連する態様において、本開示は、組換え抗PD-1抗原結合性タンパク質およびキメラ抗原受容体を含む細胞に関し、ここで、前記組換え抗PD-1抗原結合性タンパク質は、前記キメラ抗原受容体と同一ではない。

10

【0019】

本明細書に記載するベクターまたは細胞のある実施形態において、キメラ抗原受容体はPD-1に特異的に結合するものではない。

【0020】

本発明の別の態様において、本開示は、対象に治療上有効量の、本明細書に記載する組換え抗PD-1抗原結合性タンパク質、ベクター、細胞、または医薬組成物を投与することを含む、対象におけるT細胞応答を上昇させる方法を提供し、ここで、組換え抗PD-1抗原結合性タンパク質はPD-1アンタゴニストである。

20

【0021】

本発明のさらに別の態様において、本開示は、対象に治療上有効量の、本明細書に記載する組換え抗PD-1抗原結合性タンパク質、ベクター、細胞、または医薬組成物を投与することを含む、対象におけるT細胞応答を低下させる方法を提供し、ここで、組換え抗PD-1抗原結合性タンパク質はPD-1アゴニストである。

【0022】

本発明の別の態様において、本開示は、対象に、治療上有効量の本明細書に記載する組換え抗PD-1抗原結合性タンパク質、ベクター、細胞、または医薬組成物を投与することを含む、PD-1陽性疾患を有する対象を治療する方法を提供する。

【0023】

関連する態様において、本開示は、対象の少なくとも1つのT細胞に、組換え抗PD-1抗原結合性タンパク質をコードする核酸およびキメラ抗原受容体をコードする核酸を形質導入することを含む、PD-1陽性疾患を有する対象を治療する方法を提供し、ここで、前記組換え抗PD-1抗原結合性タンパク質は、前記キメラ抗原受容体と同一ではない。

30

【0024】

本明細書に記載する方法のある実施形態において、キメラ抗原受容体は、PD-1に特異的に結合するものではない。ある実施形態において、PD-1陽性疾患は癌である。ある実施形態において、PD-1陽性疾患は自己免疫疾患である。

【図面の簡単な説明】

40

【0025】

【図1】PD-1単量体に対するscFv-Fcクローンの相対的結合親和性を示す。scFv-FcクローンがPD-1に結合する能力を、PD-1単量体への結合のレベルを検出することによって決定した。scFv-Fcクローンの結合親和性を、クローン31が弱く結合し、クローン26および27が最も結合したとして順位付けした(31<23<40<18<16=27<26)。

【0026】

【図2A-2B】PD-1とそのリガンドであるPD-L1との相互作用の破壊を示す。Aは、scFv-FcがPD-1/PD-L1相互作用を破壊する能力を測定するために使用した競合的結合アッセイの模式図である。(1)ビオチン化PD-1-Fcを、段

50

階希釈した E T 9 0 1 S c F v - F c (陰性対照) または抗 P D 1 S c F v - F c と混合し ; (2) 次いで P D - L 1 - F c コートプレートに添加した。工程 (3) において、コート P D - L 1 に対する P D - 1 - F c 結合を、H R P - 接合ストレプトアビジンを介して可視化した。B . 競合的結合アッセイの結果を比較するために、s c F v の濃度が $1 . 7 \sim 5 . 2 5 \mu \text{g} / \text{ml}$ であった点を丸で囲む。クローン 4 0 および 2 3 が相互作用を破壊する最も弱い能力を有しており、クローン 2 6 が最も強い能力を有していた ($2 6 > 2 7 = 1 6 > 1 8 > 3 1 > 2 3 = 4 0$) 。

【 0 0 2 7 】

【図 3】使用したコンストラクトの模式図である。分泌可能 s c F v を、細胞からの s c F v の移出を可能にするマウスカッパーリーダー配列を含むように設計した。セリングリシンリンカー (G ₄ S) は、可変重鎖と可変軽鎖とを連結するために用いた。H I S / H A タグを、s c F v の検出を可能にするよう含めた。5 ' および 3 ' 末端反復配列 (L T R)、スプライスドナー (S D)、スプライスアクセプター (S A)、パッケージングエレメント ()、C D 8 リーダー配列 (C D 8)、単鎖可変断片 (s c F v) の可変重 (V H) および可変軽 (V L) 鎖、膜貫通ドメイン (T M)、ヒト C D 2 8 シグナル伝達ドメイン (h C D 2 8)、ヒトゼータ鎖シグナル伝達ドメイン (h 鎖) および抗 P D - 1 s c F v の位置を示す S F G - 1 9 2 8 z / s c F v レトロウイルスコンストラクトの模式図。

【 0 0 2 8 】

【図 4】1 9 2 8 z C A R のみまたは P D - 1 s c F v とともに発現するよう改変されたヒト末梢血 T 細胞の増殖。形質導入された T 細胞を、5 0 I U / m l の組換えヒト I L - 2 中で培養し、増殖をモニターした。C A R を発現し、抗 P D - 1 s c F v クローン 2 3 または 2 7 を分泌するよう改変された T 細胞は、C A R のみを発現する T 細胞と少なくとも同等の増殖を示した。1 9 2 8 z C A R を発現し、抗 P D - 1 s c F v クローン 1 6、1 8、2 6、3 1 または 4 0 を分泌するよう改変された細胞は、インビトロで増殖しなかった。示したデータは、2 回の独立した実験の代表である。

【 0 0 2 9 】

【図 5】抗 P D - 1 s c F v を分泌する腫瘍標的化 T 細胞からの I N F - 分泌 (p g / m l)。C A R を発現する T 細胞または C A R を発現し、抗 P D - 1 s c F v を分泌する T 細胞を、C D 1 9 + R a j i 腫瘍細胞と共培養した。上清を L u m i n e x 技術により分析し、T 細胞から分泌されたサイトカインのレベルを検出した。1 9 2 8 z C A R を発現し、抗 P D - 1 s c F v クローン 2 3 および 2 7 を分泌するよう改変された T 細胞は、C A R のみを発現するよう改変された細胞と比較して、上昇した I F N - の分泌を示した。1 9 2 8 z C A R を発現し、抗 P D - 1 s c F v クローン 1 6、1 8、2 6、3 1 または 4 0 を分泌するよう改変された細胞は、C A R のみにより改変された細胞と比較してより少ない I F N - を分泌した。

【 0 0 3 0 】

【図 6】1 9 2 8 z C A R および E u r e k a 抗 P D - 1 s c F v によるヒト T 細胞の形質導入の結果を示す。(上側パネル) 形質導入の後、ヒト T 細胞をフローサイトメトリにより評価して、1 9 2 8 z C A R に対して特異的な抗体 (1 9 E 3) を用いて C A R 発現を検出した。形質導入効率は、試験したすべてのコンストラクトについて 5 5 % を上回り、再現性があった。(下側パネル) E u r e k a 抗 P D - 1 s c F v クローン 2 6、2 7 および 4 0 を含有するコンストラクトは、有意により低い形質導入効率を示し、* p < 0 . 0 5 であった。4 回の独立した実験からの形質導入効率であり、示されたデータは平均 + / - S E M である。

【 0 0 3 1 】

【図 7】1 9 2 8 z C A R および E u r e k a 抗 P D - 1 s c F v を発現するよう改変された T 細胞における抗 P D - 1 s c F v の存在の効果を示す。C A R および E u r e k a 抗 P D - 1 s c F v を発現するよう形質導入されたヒト T 細胞を、ウェスタンブロット可溶化液の調製に先立って 4 時間ゴルジ阻害剤とともにインキュベートした。ウェ

10

20

30

40

50

スタンプロット分析を用いて、メンブレンを抗H A抗体によりプローブすることにより、抗PD - 1 s c F vを検出した。メンブレンを、ローディング対照として抗G A P D H抗体によりプローブした。

【0032】

【図8】1928z C A Rおよび抗PD - 1 s c F vを発現するよう改変されたヒトT細胞の、PD - L 1 / L 2の存在下 / 非存在下における増殖を示す。C A Rを発現し、抗PD - 1 s c F vクローン23、26、27および40を分泌するよう改変されたヒトT細胞を、ヒトPD - 1 L 1 / L 2を発現するか、または発現しない、人工抗原提示細胞(a A P C、マウス3 T 3線維芽細胞)上に置いた。a A P Cとの24時間のインキュベーションの後、C D 3 / C D 2 8活性化ビーズを細胞に添加して、増殖を刺激した(1 : 2のビーズ : T細胞比)。3日後、T細胞を、トリパンブルー排除を用いて数え上げた。1928z C A Rおよび抗PD - 1 s c F vクローン26および23を発現するよう改変されたT細胞は、抑制性リガンドを発現しないa A P Cと比べてPD - L 1 / L 2を発現するa A P C上で低下した増殖を示した。一方、1928z C A Rおよび抗PD - 1 s c F vクローン27を発現するよう改変されたT細胞は、PD - L 1 / L 2を発現するa A P C上で上昇した増殖を示した。示したデータは1回の実験の代表である。

10

【0033】

【図9】本開示のいくつかの抗原結合性タンパク質の軽および重可変鎖についての相補性決定領域(C D R)のアミノ酸配列を示す。

【0034】

20

【図10】抗PD - 1特異的s c F vから作成したモノクローナル抗体は、ヒトT細胞上のPD - 1に結合することを示す。PD - 1特異的s c F vからヒトモノクローナル抗体を作成し、ヒトPD - 1(1 μ g / m l)を過剰発現するよう改変されたヒトT細胞とともにインキュベートした。フローサイトメトリーを使用して、ヤギ抗ヒトI g F I T C接合抗体を用いて結合した抗体を検出した。クローン23、26および27モノクローナル抗体は、それぞれ51%、78%および67%にてPD - 1ヒトT細胞に結合した。対照抗体(クローン901)はT細胞上のヒトPD - 1に結合しなかった。示したデータは1回の実験の代表である。

【0035】

【図11】PD - L 1 / L 2を発現するa A P C上でインキュベートした第1世代C A Rを発現するよう改変されたT細胞は、抗PD - 1クローン27モノクローナル抗体が存在する場合に増殖することを示す。第1世代C D 1 9 - 特異的C A R(19z1)を発現するよう改変されたヒトT細胞を、抗PD - 1モノクローナル抗体とともに24時間インキュベートし、次いでPD - L 1 / L 2を発現するか、または発現しないa A P C上に置いた。a A P Cによる24時間の刺激の後、細胞を次いでC D 3 / C D 2 8ビーズにより刺激した。3日後、細胞を数え上げた。モノクローナル抗体なし(点刻バー)で、対照抗体、901(格子バー)およびクローン23(水平縞バー)および26(垂直縞バー)モノクローナル抗体とともにインキュベートした19z1 T細胞は、抑制性リガンドを発現しないa A P Cと比較して、PD - 1リガンドを発現するa A P C(対応する白色バー)上での増殖がより少なかった。しかしながら、抗PD - 1クローン27モノクローナル抗体とともにインキュベートした19z1 T細胞(斜線縞バー)は、PD - L 1 / L 2 a A P C上でより高い程度に増殖した。示したデータは1回の実験の代表である。

30

40

【0036】

【図12A - 12D】PD - 1ブロッキングs c F vである、E 2 7を分泌するようさらに改変されたC A R T細胞の作成を示す。A . 2シストロン性レトロウイルスコンストラクトを、C D 1 9 - 特異的C A R(1928zと命名した)または卵巣腫瘍抗原特異的C A R(4H1128zと命名した)およびPD - 1ブロッキングs c F vである、E 2 7をコードするように作成した。E 2 7は、s c F vの分泌を可能にするように、シグナルペプチドである、マウスI g Kにより先行された。T細胞からいったん分泌されたs c F vを検出するために、H A / H i s タグもまた含めた。B . ヒト末梢血T細胞を、C A

50

R、1928z、またはCARおよびE27 PD-1ブロッキングscFv、1928z-E27をコードするレトロウイルスコンストラクトにより形質導入した。形質導入の後、フローサイトメトリーを使用して、19E3と命名されたCD19-標的化CARに特異的に結合する抗体を用いて、CARの発現を検出した。C. 形質導入されたヒトT細胞からの上清のウェスタンブロット分析を利用して、抗HA抗体によりPD-1ブロッキングscFvを検出した。本発明者らはまた、CARおよび対照scFvである、B6を発現するよう改変されたT細胞からのscFv分泌を調べ、これは抗c-mycタグ抗体を用いて検出した。D. 2つのCD19⁺腫瘍標的に対する標準的⁵¹Cr放出アッセイを行って、scFvの分泌が、CARがT細胞の細胞溶解能力を再指示する能力を妨げないことを確認した。CARのみ(1928zまたは4H1128z対照CAR)、CARおよびE27 scFv(1928z-E27または4H1128z-E27)、またはCARおよび対照scFv(1928z-B6H12.2または4H1128z-B6H12.2)のいずれかを発現するCAR T細胞を、⁵¹Cr標識化腫瘍細胞(RajiまたはNa1m6)とともに4時間インキュベートした。CD19特異的CARを発現するT細胞は、腫瘍標的を同等のレベルで溶解することができ、卵巣-標的化CAR T細胞は、RajiもNa1m6も溶解することができなかった。それゆえ、本発明者らは、scFvの分泌は、CARがT細胞溶解能力を再指示する能力を妨げなかったと結論する。

10

【0037】

【図13A-13D】CARを発現し、PD-1ブロッキングscFvを分泌するよう改変されたT細胞は、インビトロでPD-L1-PD-1相互作用からの阻害に耐えることを示す。A. CARのみ(1928z)、またはCARおよびPD-1ブロッキングscFv(1928z-E27)を発現するT細胞を、3T3空細胞またはヒトPD-L1を発現するよう改変された3T3細胞上で培養した。3T3フィーダー細胞上での24時間の後、細胞を、1:3のビーズ:T細胞比にて培養物に添加したCD3/CD28ビーズにより刺激した。T細胞の増殖をトリパンブルーでの数え上げにより決定し、新しいビーズを2回培養物に添加した(矢印によって示す)。1928z T細胞は、3T3空フィーダー細胞上で増殖したが、しかし、3T3-PD-L1フィーダー細胞上では増殖しなかった。一方、1928z-E27 T細胞は、3T3空および3T3-PD-L1フィーダー細胞の両方の上で増殖し、PD-L1-PD-1に媒介される抑制に対する抵抗性を示した。B. 図13Aに示されるように3T3空または3T3-PD-L1細胞上でインキュベートしたT細胞をフローサイトメトリーにより分析して、抑制性受容体である、PD-1、2B4およびLAG3についての発現を検出した。1928z細胞は、1928z-E27細胞よりも上昇したレベルのPD-1を発現した(示さず)。PD-1⁺細胞でゲートをかけた場合、2B4およびLAG3の分析により、1928z細胞は1928z-E27細胞と比較してPD-1⁺、2B4⁺およびLAG3⁺細胞のより高い割合を有していたことが明らかになった。C. 形質導入されたT細胞を、Raji-PDL1またはNa1m6-PDL1腫瘍細胞とともに、様々なエフェクター対標的(E:T)比(1:1、1:3、1:5)で72時間培養した。抗CD3および抗CD19抗体での染色後のフローサイトメトリーおよびビーズの数え上げを使用して、腫瘍標的の溶解およびT細胞の増殖を経時的にモニターした。PDL1⁺腫瘍細胞とともに培養された場合、1928z-E27細胞(上側の曲線)は、1928z T細胞(下側の曲線)と比較してより高レベルに増殖し続けた。D. 形質導入されたT細胞を図13Cに示すようにNa1m6-PDL1腫瘍細胞で刺激し、Na1m6-PDL1腫瘍細胞で1:5のT:E:T比にて再刺激した。48時間の共培養の後、フローサイトメトリーを使用して腫瘍標的の溶解を決定した。1928z-E27は、1928z細胞と比較して、再刺激の際にPD-L1腫瘍標的を溶解する能力を保持していた。

20

30

40

【0038】

【図14】CARを発現し、PD-1ブロッキングscFvを分泌するよう改変されたT細胞のインビボでの抗腫瘍効力を示す。A. SCID-ベージュマウスに、0日目に静脈

50

内注入を介してR a j i - P D - L 1腫瘍細胞を接種した。1日目に、マウスに 10^6 のC A R + T細胞を静脈内に注入し、生存を臨床的にモニターした。後肢麻痺が生じるとマウスを安楽死させた。

【0039】

【図15A - 15D】P D - 1ブロッキングs c F vである、E 2 7の選択に関する。A . P D - 1ブロッキングm A b候補であるE 2 7、E 2 6およびE 2 3を競合的結合アッセイにおいて使用して、ヒトには存在しないハプテンを標的とする対照m A bと比較して、P D - 1のP D - L 1への結合の妨害を様々な濃度にて検出した。E 2 3、E 2 6およびE 2 7 m A bはすべてP D - 1のP D - L 1への結合を妨げた。B . Aにおいて使用したE 2 3、E 2 6およびE 2 7 m A bから設計したP D - 1ブロッキングs c F vの設計の模式図であり、ここで、シグナルペプチドを可変重配列およびセリングリシンリンカーおよび可変軽配列に連結した。このH I S / H A タグをs c F vの検出のために含めた。C . 1 9 2 8 z C A Rとともに分泌可能s c F vを発現するように形質導入された2 9 3 G 1 v 9パッケージング細胞からのS Nに対する、抗H A抗体により染色したウェスタンブロット。E 2 7 s c F vは最高のレベルで検出され、それゆえ、本明細書の残りの部分において使用した。D . 抗H A m A bで染色した、P B M C s + 4 H 1 1 2 8 zおよびP B M C s + 4 H 1 1 2 8 z E 2 7からのS Nに対するウェスタンブロット。

【0040】

【図16A - 16E】T細胞は、C A Rを発現し、P D - 1ブロッキングs c F vである、E 2 7を分泌するよう共改変できることを示す。A . 1 9 2 8 z C A Rのみ(1 9 2 8 z)または1 9 2 8 z C A RおよびE 2 7 P D - 1ブロッキングs c F v(1 9 2 8 z - E 2 7)による形質導入後、1 9 2 8 z C A Rに特異的に結合する1 9 E 3 m A bによる染色後の同等のC A R発現を実証する代表的フローサイトメトリーブロット。B . 1 9 2 8 z - E 2 7細胞においてのみの約3 0 k D aタンパク質を示す、抗H A m A bにより染色した1 9 2 8 zおよび1 9 2 8 z - E 2 7 T細胞からのS Nについてのウェスタンブロットであり、E 2 7 s c F vは、1 9 2 8 z - E 2 7により形質導入されたT細胞から分泌され、C A Rのみにより形質導入されたT細胞からは分泌されないことを実証している。C . 形質導入の後、1 9 2 8 z T細胞と比較して1 9 2 8 z - E 2 7 T細胞上のより低いレベルのP D - 1発現を実証する、代表的フローサイトメトリー。D . P D - 1の発現は、1 9 2 8 z T細胞と比較して1 9 2 8 z - E 2 7 T細胞上で統計的に有意により低かった。示されたデータは、4回の独立した実験からの平均+/- S E Mである。E . R a j i腫瘍細胞の溶解は、E 2 7 s c F vの分泌によって影響されなかったことを実証する4時間⁵ 1 C r放出アッセイ。1 9 2 8 zおよび1 9 2 8 z - E 2 7 T細胞はR a j i腫瘍細胞を同等に溶解した。対照4 H 1 1 2 8 z - E 2 7 T細胞は、4 H 1 1 2 8 z T細胞と比較してR a j i細胞の溶解の上昇を媒介しなかった。示したデータは、2回の独立した実験の代表である。

【0041】

【図17A - 17G】C A RおよびE 2 7の発現は、C D 1 9 + P D - L 1 +腫瘍細胞の場合においてT細胞の増殖および溶解能力を保護することを示す。A . R a j i腫瘍細胞をヒトP D - L 1を発現するようにレトロウイルスにより改変し(R a j i - P D L 1)、P D - L 1に特異的なm A bで染色した。親R a j i腫瘍(R a j i)はP D - L 1を発現せず、R a j i - P D L 1腫瘍細胞は高レベルのP D - L 1を発現した。B . 1 9 2 8 z - E 2 7 T細胞は、72時間の共培養の後のフローサイトメトリーにより決定して、1 9 2 8 z T細胞と比較してR a j i - P D L 1腫瘍細胞をより多く溶解することを示す代表的フローサイトメトリーブロット。C . 1 9 2 8 z - E 2 7 T細胞は、1 9 2 8 z T細胞と比較して統計的に有意により多くのR a j i - P D L 1腫瘍細胞を溶解する。示されたデータは、4回の独立した実験からの平均+/- S E Mである。D . 1 9 2 8 z - E 2 7 T細胞は、フローサイトメトリーおよびビーズの数え上げにより決定してR a j i - P D L 1腫瘍細胞との共培養の後により多数増殖する。示されたデータは4回の独立した実験からのT細胞の平均総数+/- S E Mである。E . R a j i - P D L 1腫

10

20

30

40

50

瘍細胞との7日間の共培養の後に、1928z-E27 T細胞と比較して1928z T細胞上で、上昇したPD-1発現を示す代表的フローサイトメトリープロットである。F. 1928z T細胞は、パーセンテージ陽性細胞およびPD-1染色の平均蛍光強度(MFI)に関して、1928z-E27 T細胞と比較して有意により多くのPD-1を発現する。データは4回の独立した実験からの平均+/-SEMにて示す。G. Raji-PDL1との7日間の共培養の後に1928z-E27細胞と比較して2B4+PD-1+1928z T細胞のパーセンテージの上昇を示す代表的フローサイトメトリープロットである。1928z-E27 T細胞はまた、2B4+PD-1+集団について、より少ないBTLAおよびTIM3を発現する。示したデータは、3回の独立した実験の代表である。

10

【0042】

【図18A-18C】E27は、PD-L1に関してCD3/CD28刺激T細胞の増殖能力を保護することを示す。A. NIH3T3細胞をヒトPD-L1を発現するようレトロウイルスにより改変し(3T3-PDL1)、PD-L1に特異的なmAbで染色した。親NIH3T3(3T3-空)はPD-L1を発現せず、3T3-PDL1腫瘍細胞は高レベルのPD-L1を発現した。B. 1928zおよび1928z-E27 T細胞を3T3-空または3T3-PDL1細胞とともに培養し、CD3/CD28ビーズで刺激した。細胞を数え上げ、3、6、9および12日目に新しい3T3細胞上に再び蒔いた。1928z T細胞は3T3-空細胞と比較して3T3-PDL1細胞とともに培養した場合に増殖の低下を示した。1928z-E27細胞は、3T3-空または3T3-PDL1細胞上で培養した場合に同等の増殖を示した。示したデータは、4回の独立した実験からの平均倍数増殖+/-SEMである。C. 3T3-空細胞上で培養した1928z T細胞と比較して、3T3-PDL1とともに培養した1928z T細胞上の2B4、PD-1、BTLAおよびTIM3の発現の上昇を示す代表的フローサイトメトリープロットである。1928z-E27細胞は、3T3-空および3T3-PDL1とともに培養した場合、2B4、PD-1、BTLA-4およびTIM3の同等の発現を示した。示したデータは、3回の独立した実験の代表である。

20

【0043】

【図19】E27 scFvを分泌するCAR T細胞はインビボで上昇した抗腫瘍機能を有することを示す。SCID-ベージュマウスにRaji-PDL1腫瘍細胞を静脈内に接種し、翌日にCAR T細胞を静脈内に注入した。1928z-E27 T細胞で処理したマウスは、1928z T細胞で処理したマウスと比較して向上した生存を示した。1928z T細胞で処理したマウスは非処理マウスおよび無関係の抗原を標的としたCAR T細胞である、4H1128zおよび4H1128z-E27 T細胞で処理したマウスよりも長く生存した。示したデータは2回の独立した実験からのものである。

30

【0044】

【図20】抗PD-1抗体である、ET130-23、ET130-26およびET130-27を用いたPD1/PDL1ブロッキングELISAの結果を示す。ET901(陰性対照)は結合を示さず、一方ET130-23、ET130-26およびET130-27は、0.031と10μg/mlとの間の濃度範囲にわたってPD1/PDL1結合に対するブロッキング効果を示した。

40

【0045】

【図21】抗PD-1抗体である、ET130-23、ET130-26およびET130-27を用いたPD1/PDL2ブロッキングELISAの結果を示す。ET901(陰性対照)は結合を示さず、一方ET130-23、ET130-26およびET130-27は、0.031と10μg/mlとの間の濃度範囲にわたってPD1/PDL1結合に対するブロッキング効果を示した。

【発明の詳細な説明】

【0046】

本明細書において言及するすべての刊行物、特許およびその他の引用文献は、それら全

50

体が本開示に引用により組み込まれる。

【0047】

本開示を実施するにあたり、分子生物学、微生物学、細胞生物学、生化学および免疫学の多くの従来技術が使用され、それらは当業者の技術範囲内である。これらの技術は、より詳細に、例えば、Molecular Cloning: a Laboratory Manual 3rd edition, J. F. SambrookおよびD. W. Russell, ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001; Recombinant Antibodies for Immunotherapy, Melvyn Little, ed. Cambridge University Press 2009; 「Oligonucleotide Synthesis」(M. J. Gait, ed., 1984); 「Animal Cell Culture」(R. I. Freshney, ed., 1987); 「Methods in Enzymology」(Academic Press, Inc.); 「Current Protocols in Molecular Biology」(F. M. Ausubel et al, eds., 1987, および定期的アップデート); 「PCR: The Polymerase Chain Reaction」, (Mullis et al, ed., 1994); 「A Practical Guide to Molecular Cloning」(Perbal Bernard V., 1988); 「Phage Display: A Laboratory Manual」(Barbas et al, 2001)において記載される。製造業者らの指示書を含む、当業者に広く知られ、信頼されている標準的プロトコールを含むこれらの引用文献およびその他の引用文献の内容は、本開示の一部として引用により本明細書に組み込まれる。

10

20

【0048】

以下の記載において、用語の使用に関してはいくつかの慣習にしたがう。一般に、本明細書に使用される用語は、当業者に知られているその用語の意味と一致するように解釈されることが意図される。

【0049】

「抗原結合性タンパク質」は、抗原結合領域または抗原結合部分を含むタンパク質またはポリペプチド、即ち、それが結合するその他の分子に対して強い親和性を有するタンパク質またはポリペプチドである。抗原結合性タンパク質は、抗体、キメラ抗原受容体および融合タンパク質を包含する。

30

【0050】

「抗体」および「複数の抗体」はそれらの用語が当該技術分野において知られている通り、免疫系の抗原結合性タンパク質のことをいう。本明細書において言及される「抗体」という用語は、全体の、全長抗体および「抗原結合部分」または「抗原結合領域」が保持されているその任意の断片、またはその鎖を含む。天然の「抗体」は、ジスルフィド結合により相互接続された少なくとも2つの重(H)鎖および2つの軽(L)鎖を含む糖タンパク質である。各重鎖は、重鎖可変領域(本明細書において、VHと略称する)および重鎖定常(CH)領域から構成される。重鎖定常領域は、3つのドメイン、CH1、CH2およびCH3から構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域(本明細書において、VLと略称する)および軽鎖定常CL領域から構成される。軽鎖定常領域は1つのドメイン、CLから構成される。VHおよびVL領域はさらに、より保存された、フレームワーク領域(FR)と称される領域により分散された、相補性決定領域(CDR)と称される超可変性の領域に細分することができる。各VHおよびVLは、3つのCDRおよび4つのFRから構成され、これらはアミノ末端からカルボキシ末端の順に以下の順序で配列される: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は、免疫系の様々な細胞(例えば、エフェクター細胞)および古典的補体系の第1成分(C1q)を含む宿主組織または因子への免疫グロブリンの結合を媒介することができる。

40

50

【0051】

抗体の「抗原結合部分」または「抗原結合領域」という用語は、本明細書において用いる場合、抗原特異性を付与する抗体の領域または部分をいい；抗原結合性タンパク質の断片、例えば、抗体は、それゆえ抗原（例えば、HLA - ペプチド複合体）に特異的に結合する能力を保持する抗体の1以上の断片を含む。抗体の抗原結合機能は、全長抗体の断片によって実行され得ることが示されている。抗体の「抗体断片」という用語に包含される抗原結合性断片の例としては、Fab断片、VL、VH、CLおよびCH1ドメインからなる一価断片；F(ab)2断片、ヒンジ領域にてジスルフィド結合によって連結された2つのFab断片を含む二価断片；VHおよびCH1ドメインからなるFd断片；抗体の単腕のVLおよびVHドメインからなるFv断片；VHドメインからなるFab断片（Ward et al, 1989 Nature 341: 544 ~ 546）；および単離相補性決定領域（CDR）が挙げられる。

10

【0052】

さらに、Fv断片の2つのドメインである、VLおよびVHは、別々の遺伝子にコードされているが、それらは、それらをVLおよびVH領域が対となって一価分子を形成している一本のタンパク質鎖として作ることを可能とする合成リンカーによって、組換え方法を用いて連結することができる。これらは単鎖Fv（scFv）として知られている；例えば、Bird et al, 1988 Science 242: 423 ~ 426；およびHuston et al, 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 5879 ~ 5883を参照されたい。かかる単鎖抗体もまた抗体の「抗原結合部分」という用語の範囲内に含まれる意図である。これらの抗体断片は当業者に知られた常套技術を用いて得られ、これら断片はインタクトな抗体と同様にして有用性についてスクリーニングされる。

20

【0053】

「組換え抗体」または「組換え抗原結合性タンパク質」は、組換えにより作成された抗原結合性タンパク質、例えば、抗体への包含について、結合特性に基づいて同定され、選択された抗原結合部分を有するものである。

【0054】

「その相同配列」という用語は、表1 ~ 14に示される配列に対して60 ~ 99.9%同一であるアミノ酸およびヌクレオチド配列をいう。ある実施形態において、相同配列は、少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、または99.9%の同一性を有する。1つの実施形態において、相同配列は95 ~ 99.9%の同一性を有し；別の実施形態において、相同配列は98 ~ 99.9%の同一性を有する。

30

【0055】

1つの実施形態において、ヒトPD-1に特異的に結合する単鎖可変断片（scFv）を選択し、試験した。scFvは、独占の（proprietary）完全にヒト抗体scFvファージライブラリー（Eureka Therapeutics、Emeryville CA）であるファージディスプレイライブラリーから単離した。このライブラリーは、100名を超える白人およびアジア人の健康ドナー、および自己免疫疾患、例えば全身性エリテマトーデス、強皮症等を有するドナーからのヒト抗体レパートリーから構成される。

40

【0056】

抗体ファージパニングに使用した抗原は、組換え融合タンパク質である、ヒトIgG1 Fcに融合させたPD-1細胞外ドメイン（PD-1 ECD - Fcドメイン）であった。PD-1 ECDおよびhIgG1 FcをコードするDNA配列は、Genewiz, Inc.（South Plainfield, NJ）により合成された。DNA配列を次いでEurekaの所有する哺乳類発現ベクターにサブクロニングし、これを次いで融合タンパク質発現のためにHEK293細胞にトランスフェクトした。PD-1 ECD - Fc融合タンパク質を細胞が死滅した後にHEK293細胞培地から標準的FP

50

LC方法によって精製した。

【0057】

ヒトscFv抗体ファージディスプレイライブラリーをmAbクローンの選択のために使用する。簡単に説明すると、ピオチン化抗原(PD-1 ECD-Fc融合タンパク質)をまずヒトscFvファージライブラリーと混合することができ、次いで抗原-scFv抗体複合体を、ストレプトアビジン-接合Dynabeads M-280により磁気ラックを介してプルダウンすることができる。結合したクローンを次いで溶出し、大腸菌XL1-Blueに感染させるのに使用することができる。細菌中で発現したscFvファージクローンを精製することができる(Yasmina NA, et al. *Probing the binding mechanism and affinity of tanezumab, a recombinant humanized anti-NGF monoclonal antibody, using a repertoire of biosensors*. *Protein Science* 2008; 17(8): 1326~1335; Roberts WK, et al. *Vaccination with CD20 peptides induces a biologically active, specific immune response in mice*. *Blood* 2002; 99(10): 3748~3755)。パニングを3~4サイクル行って、PD-1に特異的に結合するscFvファージクローンを濃縮することができる。陽性クローンは、ピオチン化単鎖PD-1に対する標準的ELISA方法によって決定することができる。陽性クローンは、生細胞表面上のPD-1へのそれらの結合について、PD-1⁺細胞株、例えば、3T3細胞株を用いてフローサイトメトリーによってさらに試験することができる。

【0058】

本開示により包含されるいくつかのクローンを、本明細書においてクローン14、16、18、19、23、26、27、31、36、37、40、42、46、および47と称する。これらの実施形態をコードする可変軽(VL)および可変重(VH)鎖アミノ酸配列およびヌクレオチド配列を以下の表1~14に示す。ある実施形態において、VLおよびVH配列をセリングリシンリンカーによって連結してscFvを形成した。ある実施形態において、HA/Hisタグを、scFvの検出を可能とするために含めることができる。

【0059】

ある実施形態において、本開示は、二価タンパク質が生じるようにヒト免疫グロブリンのFc領域を有する抗体を形成するよう、重鎖の1以上の定常ドメインと融合させたscFv配列を有する抗体を含み、これにより、抗体の全体の結合活性(avidity)および安定性が上昇する。さらに、例えば、抗原定量研究における使用のために、親和性測定のために抗体を固定化するために、治療薬の標的化送達のために、免疫エフェクター細胞を用いてFc-媒介細胞毒性を試験するために、およびその他の多くの用途のために、Fc部分は、これらに限定されないが、蛍光色素、細胞毒素、放射性同位元素等が含まれる他の分子の抗体との直接の接合を可能とする。

【0060】

ある実施形態において、抗PD-1抗原結合性タンパク質は、タンパク質安定性、抗体結合、発現レベルを改良するよう、または治療薬の接合のための部位を導入するよう、設計された1以上のフレームワーク領域アミノ酸置換を含み得る。これらのscFvは次いで、当業者に知られた方法にしたがって組換えヒトモノクローナルIgを産生するために使用される。

【0061】

ある実施形態において、抗原結合性タンパク質は、キメラ抗原受容体(CAR)である。キメラ抗原受容体療法(CAR-T療法)は、標的化免疫療法の新しい形態である。それは、モノクローナル抗体の精巧な標的化特異性と、細胞傷害性T細胞によって提供される強力な細胞傷害性および長期間持続性とを組み合わせたものである。この技術は、T細胞

10

20

30

40

50

胞が内因性TCRとは独立した長期間新規抗原特異性を獲得することを可能とする。臨床試験により、神経芽細胞腫(Louis C.U. et al, Blood 118(23):6050~6056)、B-ALL(Maude S.L. et al, N. Engl. J. Med. 371(16):1507~1517, 2014)、CLL(Brentjens R.J. et al, Blood 118(18):4817~4828, 2011)およびB細胞リンパ腫(Kochenderfer J.N. et al, Blood 116(20):4099~4102, 2010)においてCAR-T療法の臨床的に有意な抗腫瘍活性が示されている。1つの研究において、CD19-CAR-T療法で治療したB-ALLを有する30名の患者における90%の完全寛解率が報告された(Maude S.L. et al, 前掲)。

10

【0062】

ある実施形態において、キメラ抗原受容体は、抗体部分を含む細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内シグナル伝達ドメインを含む。ある実施形態において、細胞内シグナル伝達ドメインは、CD3細胞内シグナル伝達配列および同時刺激シグナル伝達配列を含む。ある実施形態において、同時刺激シグナル伝達配列は、CD28細胞内シグナル伝達配列である。

【0063】

本開示のその他の態様には、限定されないが、PD1関連疾患の治療のため、診断および予後判定用途ならびに細胞および組織におけるPD1の検出のためのリサーチツールとしての使用のための、抗原結合性タンパク質およびそれらをコードする核酸の使用が含まれる。開示された抗原結合性タンパク質および核酸を含む医薬組成物が本開示に包含される。ベクター化免疫療法による抗体に基づく治療のための本開示の核酸を含むベクターもまた、本開示により意図される。ベクターは、抗体の発現および分泌を可能とする発現ベクター、ならびにキメラ抗原受容体(CAR)などの抗原結合性タンパク質の細胞表面発現に向けられたベクターを含む。

20

【0064】

核酸を含む細胞、例えば、本開示のベクターによりトランスフェクトされた細胞もまた本開示に包含される。

【0065】

診断および研究用途における使用のための、本開示のPD1抗体または核酸、アッセイ試薬、バッファーなどを含有するキットもまた提供される。

30

PD1-16

30

【表 2】

PD1-18			
抗原	PD1 ECD-hlgG1 Fc 融合		
CDRs:	1	2	3
VL	SSNIGAGYA (SEQ ID NO: 12)	TNN	QSYDSSLGVI (SEQ ID NO: 13)
VH	GYTLTELS (SEQ ID NO: 14)	FDPEDGET (SEQ ID NO: 15)	ARAYYGFDQ (SEQ ID NO: 16)
Full VL	QSVLTQPPSVSGAPGQRTISCTGSSSNIGAGYAVNWWYQLLPGTAPKLLISTNNNR PSGVPDRFSGSQFGASASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLGVIFFGGGTKLTVLG (SEQ ID NO: 17)		
DNA	cagtctgtgtgacgcagccgccctcagtgtctggggccccagggcagagggtcaccatctcctgcactgggagcag ctccaacatcggggcagggttatgctgtaaatgggtaccagcttctccaggaacagccccaaactcctcatctacta acaacaatcgccctcaggggtccctgaccgattctctggctcccagttggcgctctgcctcctggccatcactgg actccaggctgaggatgaggctgattactgcccagtcctatgacagtagctgagtggtgtgatattcgccggaggg accaagctgaccgtcctaggt (SEQ ID NO: 18)		
Full VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDP EDGETIYAQKFQGRVTMTEDTSTDYAMELSSLRSEDTAVYYCARAYYGFDQWG QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 19)		
DNA	gaagtgcagctggtgcagtctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaaggtttccgg atacacccctcactgaattatccatgcactgggtgacagggctcctggaaaagggcttgagtgatgggaggtttgat cctgaagatggtgaaacaatctacgcacagaagttccagggcagagtcaccatgaccgaggacacatctacagac acagcctacatggagctgagcagcctgaggtctgaggacactgccgtgtattactgtgcgcgcgttactacggtttcg atcagtggggtaaggtactctggtgaccgtctcctca (SEQ ID NO: 20)		
scFv PD-1-18	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQKPKGKAPKLLIYAASSLQSG VPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEIKR GGGGSGGGSGGGGS EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLTELSMHWVRQAPGKGLEWMGGFDP EDGETIYAQKFQGRVTMTEDTSTDYAMELSSLRSEDTAVYYCARAYYGFDQWG QGTLVTVSSHHHHHHGAYPYDVPDYAS* (SEQ ID NO: 21)		
DNA (5' -3')	cagtctgtgtgacgcagccgccctcagtgtctggggccccagggcagagggtcaccatctcctgcactgggagcag ctccaacatcggggcagggttatgctgtaaatgggtaccagcttctccaggaacagccccaaactcctcatctacta acaacaatcgccctcaggggtccctgaccgattctctggctcccagttggcgctctgcctcctggccatcactgg actccaggctgaggatgaggctgattactgcccagtcctatgacagtagctgagtggtgtgatattcgccggaggg accaagctgaccgtcctaggtggtggtggtgtagcggcggcggcgtcgtggtggtggtggtatcc gaagtgcagctggtgcagtctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaaggtttccgg atacacccctcactgaattatccatgcactgggtgacagggctcctggaaaagggcttgagtgatgggaggtttgat cctgaagatggtgaaacaatctacgcacagaagttccagggcagagtcaccatgaccgaggacacatctacagac acagcctacatggagctgagcagcctgaggtctgaggacactgccgtgtattactgtgcgcgcgttactacggtttcg atcagtggggtaaggtactctggtgaccgtctcctca (SEQ ID NO: 22)		

10

20

30

PD1-23

抗原	PD1 ECD-hlgG1 Fc 融合		
CDRs:	1	2	3
VL	SSNIGNNA (SEQ ID NO: 23)	YND	AAWDDSVNGYV (SEQ ID NO: 24)
VH	GYTFTRFG (SEQ ID NO: 25)	ISVNNGNT (SEQ ID NO: 26)	ARYMYGRRDS (SEQ ID NO: 27)
Full VL	QAVLTQPPSMSEAPRQRVTISCSGSSSNIGNNAVNWYQQLPGKAPKLLIYYNDLLSS GVSDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSVNGYVFGTGTKVTVLG (SEQ ID NO: 28)		
DNA	caggctgtgctgactcagccaccctcgatgtctgaagccccaggcagaggggtcacatctctgttctggaagcagc tccaacatcggaaataatgctgtaaactggtaccagcagctcccaggaaaggctcccaaactctcatctattataatg atctgctgtcctcaggggtctctgaccgattctctggctccaagctggcacctcagcctccctggccatcagtgggtcc agtctgaggatgaggctgattattactgtgcagcatgggatgacagtgatgaatggtatgtcttcggaactgggaccaag gtcaccgtcctaggt (SEQ ID NO: 29)		
Full VH	EVQLVQSGAEVKKPGDSVKVSCKASGYTFTRFGFSWVRQAPGQGLEWMGWISVN NGNTKYAQKYQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARYMYGRRDSWG QGTLTVSS (SEQ ID NO: 30)		
DNA	Gaggtccagctggtgcagctcggagctgaggtgaagaagcctggggactcagtgaaggctcctgcaaggcttctgg ttacacctttaccagatttggttcagctgggtgcgacaggccctggacaagggctgagtggtggatggatcagc gtaataatgtaacacaaagtatgcacagaagtaccagggcagagtcaccatgaccacagacacatccacgagc acagcctacatggagctgaggagcctgaggtctgacgacactgccgtgtattactgtgcgcgtacatgtacggtcgtc gtgattctgggggtcaagggtactctggtgaccgtctctca (SEQ ID NO: 31)		
scFv PD-1- 23	QAVLTQPPSMSEAPRQRVTISCSGSSSNIGNNAVNWYQQLPGKAPKLLIYYNDLLSS GVSDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSVNGYVFGTGTKVTVLG GSRGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVQSGAEVKKPGDSVKVSCKASGYTFTRFGFSWVRQAPGQGLEWMGWISVN NGNTKYAQKYQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARYMYGRRDSWG QGTLTVSS GQHSHHHHHGAYPYDVPDYAS* (SEQ ID NO: 32)		
DNA (5' -3')	caggctgtgctgactcagccaccctcgatgtctgaagccccaggcagaggggtcacatctctgttctggaagcagc tccaacatcggaaataatgctgtaaactggtaccagcagctcccaggaaaggctcccaaactctcatctattataatg atctgctgtcctcaggggtctctgaccgattctctggctccaagctggcacctcagcctccctggccatcagtgggtcc agtctgaggatgaggctgattattactgtgcagcatgggatgacagtgatgaatggtatgtcttcggaactgggaccaag gtcaccgtcctaggtggttctagaggtggtggtgtagcggcgcgcggtctggtggtggtggtacgaggtccag ctggtgctctgagctgaggtgaagaagcctgggactcagtgaaaggctcctgcaaggcttctggttacacactttac cagatttggttctagctgggtgcagacaggccctggacaaggcctgagtgatggatggatgacgcgttaataatggt aacacaaagtatgcacagaagtaccagggcagagtcaccatgaccacagacacatccacgagcacagcctacat ggagctgaggagcctgaggtctgacgacactgccgtgtattactgtgcgcgtacatgtacggtcgtcgtgattctggg gtcaagggtactctggtgaccgtctcctcagccggccagcaccatcaccatcaccatggcgcataccggtacgagcttc cggactacgcttcttag (SEQ ID NO: 33)		

30

【表 4】

PD1-26			
抗原	PD1 ECD-hlgG1 Fc 融合		
CDRs:	1	2	3
VL	NIGSKS (SEQ ID NO: 34)	YDS	QVWDNHSDVV (SEQ ID NO: 35)
VH	RNKFSSYA (SEQ ID NO: 36)	ISGSGGTT (SEQ ID NO: 37)	ARWYSSYYDV (SEQ ID NO: 38)
Full VL	QSVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLIYYDSDRPSG IPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDNHSDVVFVGGGTCLTVLG (SEQ ID NO: 39)		
DNA	Cagtctgtgctgactcagccaccctcagtgctcagtggtgccccaggaaagacggccaggattacctgtgggggaaaca acattggaagtaaaagtgtgactggtaccagcagaagccaggccaggcccctgtgctggtcatctattatgatagcg accggccctcagggtaccctgagcgattctctggctccaactctgggaacacggccaccctgaccatcagcagggtc gaagccggggatgaggccgactattactgtcaggtctgggataatcatagtgatgtgtattcggcggagggaaccaag ctgaccgtcctaggt (SEQ ID NO: 40)		
Full VH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTRNKFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGI SGSGGTTYADSVKGRFTISRDNKNTQYLQLDSLRAEDTAVYYCARWYSSYYDV WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 41)		
DNA	Caggtgcagctggtgagtgctgggggaggtggtgacagcctggggggtccctgagactctctgtgcagcctctgga tacaccgtaacaaaatttagcagctatgcatgagctgggtccgcccaggctccagggaagggcctggaatgggtctc aggtattagtggtagtggtggtactacatactatgcagactccgtgaagggcgggttcaccatctccagagacaattcca agaacacgcagtatctgcaattggacagcctgagagccgaggacacggcggatattactgtgcgcgtggtactctt cttactacgatgtttgggtcaagggtactctggtgaccgtctcctca (SEQ ID NO: 42)		
scFv PD1-26	QSVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLIYYDSDRPSG IPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDNHSDVVFVGGGTCLTVLGGGG GSGGGGSGGGGS QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTRNKFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGI SGSGGTTYADSVKGRFTISRDNKNTQYLQLDSLRAEDTAVYYCARWYSSYYDV WGQGTLLTVSS HHHHHHGAYPYDVPDYAS* (SEQ ID NO: 43)		
DNA (5' -3')	cagtctgtgctgactcagccaccctcagtgctcagtggtgccccaggaaagacggccaggattacctgtgggggaaaca acattggaagtaaaagtgtgactggtaccagcagaagccaggccaggcccctgtgctggtcatctattatgatagcg accggccctcagggtaccctgagcgattctctggctccaactctgggaacacggccaccctgaccatcagcagggtc gaagccggggatgaggccgactattactgtcaggtctgggataatcatagtgatgtgtattcggcggagggaaccaag ctgaccgtcctaggtggtggtggtgtagcggcggcggcggctctggtggtggtggtatcccagggtgcagctggtggag tctgggggagggtggtgacagcctgggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggatacaccgtaacaaattta gcagctatgcatgagctgggtccgcccagggtccagggaagggcctggaatgggtctcagggtattagtggtggtg gtactacatactatgcagactccgtgaagggcgggttcaccatctccagagacaattccaagaacacgcagtatctgc aattggacagcctgagagccgaggacacggcggatattactgtgcgcgtggtactcttcttactacgatgtttgggtc aagggtactctggtgaccgtctcctcacaccatcaccatcaccatggcgcataccgtacgacgttccggactacgttct tag (SEQ ID NO: 44)		

10

20

30

PD-1-27

30

【表 6】

PD-1-31

抗原	PD1 ECD hlgG1 Fc 融合		
CDRs:	1	2	3
VL	NIGSKS (SEQ ID NO: 34)	YDS	QVWDSSSDHV (SEQ ID NO: 55)
VH	GFTFSSYA (SEQ ID NO: 46)	ISGSGGST (SEQ ID NO: 47)	ARGYSSYYDA (SEQ ID NO: 56)
Full VL	QAVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVIYYDSRPS GIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVFGTGKVTVLG (SEQ ID NO: 57)		
DNA	caggctgtgctgactcagccaccctcagtgctcagtggtgccccaggaaagacggccaggattacctgtgggggaaac aacattggaagtaaaagtgtgactggtaccagcagaagccaggccaggccctgtgctggtcatctattatgatag cgaccggccctcagggatccctgagcgattctctggtccaactctgggaacacggccaccctgaccatcagcagg gtcgaagccgggatgaggccgactattactgtcaggtgtgggatagtagtagtgatcatgtcttcggaactgggacc aaggtcaccgtcctaggt (SEQ ID NO: 58)		
Full VH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGS GGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYSSYYDAWG QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 59)		
DNA	caggtgcagctggtgagctctgggggaggcttggtacagcctggggggtccctgagactctcctgtgcagcctctgg attcacctttagcagctatgccatgagctgggtccaggctccagggaaggggctggagtggtctcagctattag tggtagtgggtgtagcacatactacgcagactccgtgaaggccgggtcaccatctccagagacaattccaagaaca cgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtatattactgtgcgcggttactcttctacta cgatgctgggggcaagggtactctggtgaccgtctctca (SEQ ID NO: 60)		
scFv PD-1- 31	QAVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVIYYDSRPS GIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVFGTGKVTVLGGG GGSGGGGSGGGGS QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGS GGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYSSYYDAWG QGTLVTVSS HHHHHHGAYPYDVPDYAS* (SEQ ID NO: 61)		
DNA (5' -3')	caggctgtgctgactcagccaccctcagtgctcagtggtgccccaggaaagacggccaggattacctgtgggggaaac aacattggaagtaaaagtgtgactggtaccagcagaagccaggccaggccctgtgctggtcatctattatgatag cgaccggccctcagggatccctgagcgattctctggtccaactctgggaacacggccaccctgaccatcagcagg gtcgaagccgggatgaggccgactattactgtcaggtgtgggatagtagtagtgatcatgtcttcggaactgggacc aaggtcaccgtcctaggtggtggtggtgtagcggcgccggcgtctggtggtggtgatccagggtcagctggt ggagctggtgggaggcttggtacagcctggggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttagcagc tatgccatgagctgggtccgaggtccagggaaggggctggagtggtctcagctattagtggtagtgggtgtagc acatactacgcagactccgtgaaggccggtcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaat gaacagcctgagagccgaggacacggcgtatattactgtgcgcggttactcttctactacgatgctgggggtaa gggtactctggtgaccgtctctcacaccatcaccatcaccatggcgcataccgtacgacgttccggactacgcttcta g (SEQ ID NO: 62)		

10

20

30

PD-1-40

抗原	PD1 ECD-hlgG1 Fc 融合		
CDRs:	1	2	3
VL	RSNIGENT (SEQ ID NO: 63)	SNN	AAWDDRLNGYV (SEQ ID NO: 64)
VH	GYTFTNYG (SEQ ID NO: 65)	IGAQKGD (SEQ ID NO: 66)	ARSQGVPFDS (SEQ ID NO: 67)
Full VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSRNIGENTVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRP SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLHSDDEADYFCAAWDDRLNGYVFGTGKVTVLG (SEQ ID NO: 68)		
DNA	Cagtcgtgttgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggcagagagtcaccatctctgttctggaagcaggt ccaacatcggagaaaaatactgtcaactggtaccagcagctcccaggaacggccccaaactcctcatctacagtaat aatcagcggccctcaggggtccctgaccgattctctggctccaagctggcacctcagcctccctggccatcagtggc ttcactctgacgatgaggctgactattttgtgcagcatgggatgaccgcctcaatggtatgtcttcggaactgggaccaa ggtcaccgtcctaggt (SEQ ID NO: 69)		
Full VH	QVQLVQSGPEVKKPGASVKV/SCKASGYTFTNYGFTWVRQAPGQGLEWMGWIGAQ KGDTEYAQKFQGRVTMTTDTSTSTVYLELRLSLRSDDTAVYYCARSQGVPFDSWGQ GTLTVSS (SEQ ID NO: 70)		
DNA	Caggtgcagctggtgcaatctggacctgaggtgaagaagcctggggcctcggtgaaggctcctgcaaggctctggt tacacctttaccaactatggttcacctgggtgcgacaggccccctggacaaggctctgagtggtggtggtggtggtg ctcaaaagggtagacacagagatgacacaaaaattccagggcagagtcaccatgacgacagacacatccacgagc acagctacttgaggtgaggagcctgaggtctgacgacacggcgtgtattactgtgcgcgtctcaggggtgtccgttc gattcttgggtcaaggctactctggtgaccgtcctca (SEQ ID NO: 71)		
scFv PD-1-40	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSRNIGENTVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRP SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLHSDDEADYFCAAWDDRLNGYVFGTGKVTVLG GGGGSGGGSGGGGS QVQLVQSGPEVKKPGASVKV/SCKASGYTFTNYGFTWVRQAPGQGLEWMGWIGAQ KGDTEYAQKFQGRVTMTTDTSTSTVYLELRLSLRSDDTAVYYCARSQGVPFDSWGQ GTLTVSSHHHHHHGAYPYDVPDYAS* (SEQ ID NO: 72)		
DNA (5' -3')	cagtcgtgttgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggcagagagtcaccatctctgttctggaagcaggt ccaacatcggagaaaaatactgtcaactggtaccagcagctcccaggaacggccccaaactcctcatctacagtaat aatcagcggccctcaggggtccctgaccgattctctggctccaagctggcacctcagcctccctggccatcagtggc ttcactctgacgatgaggctgactattttgtgcagcatgggatgaccgcctcaatggtatgtcttcggaactgggaccaa ggtcaccgtcctaggtggtggtggtggtgtagcggcgcgcggtctggtggtggtggtggtggtggtggtggtggtgca atctggacctgaggtgaagaagcctggggcctcggtgaaggctcctgcaaggctctggttacacctttaccaactatg gttcacctgggtgcgacaggccccctggacaaggctctgagtggtggtggtggtggtggtggtggtggtggtggtgca gagtatgcacaaaaattccagggcagagtcaccatgacgacagacacatccacgagcacagctacttgaggtga ggagcctgaggctgacgacacggcgtgtattactgtgcgcgtctcagggtgttcggttcgattcttggggcgaaggta ctctggtgacgtctcctcacaccatcaccatcaccatggcgcataccggtacgacgttcggactacgctcttag (SEQ ID NO: 73)		

PD-1-36

30

【表 9】

PD-1-37

抗原	PD1 ECD hlgG1 Fc 融合		
CDRs:	1	2	3
VL	SSNIGAGYV (SEQ ID NO: 85)	HNN	QSYDSSLGWW (SEQ ID NO: 86)
VH	GFTFKDYY (SEQ ID NO: 87)	ISTGNSV (SEQ ID NO: 88)	ARSPGHSDYDS (SEQ ID NO: 89)
Full VL	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYVVQWYQQLPGTAPKLLIYHNDR PSGVYPYRFGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLGWWVFGGGTKLTVLG (SEQ ID NO: 90)		
DNA	Cagtctgtgctgacgcagccgcctcagtgtctggggccccagggcagagggtcaccatctcctgtactgggagcag ctccaacatcggggcaggttatgtgtacagtggatcagcagctccaggaacagccccaaactcctcatatcata acaacgatcgccctcaggggtcccttaccgattctctggctccaagtctggcacctcagcctccctggccatcactgg gctccaggctgaggatgaggctgattattactgccagtcctatgacagcagcctgagtgggtgggtgttcggcggaggg accaagctgaccgtcctaggt (SEQ ID NO: 91)		
Full VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFKDYYMNWIRQAPGKGLEWISHISTSGN SVDYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSPGHSDYDSWGQG TLVTVSS (SEQ ID NO: 92)		
DNA	gagggtcagctgggtgagctctggggaggcctagtcaggcctggagggctcctgagactctcctgtgcagcctctgga ttcacctttaaagactactacatgaactggatccgccaggctccaggaaggcctggagtggttccacacattagta ccagcggtaatagtgtagattatgcagactctgtcaaggccgggttcacatctccagggaacgccaagaattcac tgtacctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtatattactgtgcgcgctctccgggtcattctgacta cgattctggggtaagggtactctggtgaccgtctcctca (SEQ ID NO: 93)		
scFv PD-1- 37	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYVVQWYQQLPGTAPKLLIYHNDR PSGVYPYRFGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLGWWVFGGGTKLTVLG GGGGSGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFKDYYMNWIRQAPGKGLEWISHISTSGN SVDYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSPGHSDYDSWGQG TLVTVSS HHHHHHGAYPYDVPDYAS*(SEQ ID NO: 94)		
DNA (5' -3')	cagtctgtgctgacgcagccgcctcagtgtctggggccccagggcagagggtcaccatctcctgtactgggagcag ctccaacatcggggcaggttatgtgtacagtggatcagcagctccaggaacagccccaaactcctcatatcata acaacgatcgccctcaggggtcccttaccgattctctggctccaagtctggcacctcagcctccctggccatcactgg gctccaggctgaggatgaggctgattattactgccagtcctatgacagcagcctgagtgggtgggtgttcggcggaggg accaagctgaccgtcctaggtggtggtggtgtagcggcggcggcgtctggtggtggtgatcc gagggtcagctgggtgagctctggggaggcctagtcaggcctggagggctcctgagactctcctgtgcagcctctgga ttcacctttaaagactactacatgaactggatccgccaggctccaggaaggcctggagtggttccacacattagta ccagcggtaatagtgtagattatgcagactctgtcaaggccgggttcacatctccagggaacgccaagaattcac tgtacctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtatattactgtgcgcgctctccgggtcattctgacta cgattctggggtaagggtactctggtgaccgtctcctca caccatcaccatcaccatggcgcataccgtacgagctccggactacgcttcttag (SEQ ID NO: 95)		

10

20

30

PD-1-19

30

【表 1 1】

PD-1-14

抗原	PD1 ECD hIgG1 Fc 融合		
CDRs:	1	2	3
VL	SSNIGYNY (SEQ ID NO: 105)	RNN	TSWDDSLSGYV (SEQ ID NO: 106)
VH	GNAFTNFY (SEQ ID NO: 107)	INPSGTDLT (SEQ ID NO: 108)	ARQYAYGYSGFDM (SEQ ID NO: 109)
Full VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSSSNIGYNYVYWYQQLPGTAPKLLISRNNQRP SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCTSWDDSLSGYVFGPGTKVTVLG (SEQ ID NO: 110)		
DNA	cagtctgtgctgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggcagagggcaccatctctgttctggaagcagct ccaacatcggtatataattatgtatactggtaccagcagctcccaggaacggccccaaactcctcatctctagaaataa tcagcgccctcaggggtccctgaccgattctctggctccaagtctggcacctcagcctccctggccatcagtggtgctc cggctccgaggatgaggctgactattactgtacatcggtggatgacagcctgagtggtatgtctcggacctgggacca aggtcaccgtcctaggt (SEQ ID NO: 111)		
Full VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGNAFTNFYIHWVRQAPGQGLEWMGLINPSG TDLTRYAQKFQGRVTMTRDPTSTVYMESSLRSDDTAVYYCARQYAYGYSGFDM WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 112)		
DNA	Gaagtgcagctggtcagctctgggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggttctgcaaggcatctgg aaacgccttcaccaacttctatatactgggtgcgacaggccccctggacaagggcttgagtgatgggattaatcaa ccctagtgtgactgacctcacaaggtacgcacagaagttccagggcagagtcaccatgaccaggacacgcccac gagcacagtctacatggagctgagcagcctgaggtctgacgacacggctgtgtattactgtgcgcgcagctacgctta cggttactctggttcgatatgtgggtcaaggtactctggtgaccgtctcctca (SEQ ID NO: 113)		
scFv PD-1- 14	QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSSSNIGYNYVYWYQQLPGTAPKLLISRNNQRP SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCTSWDDSLSGYVFGPGTKVTVLGG GGGSGGGSGGGGS EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGNAFTNFYIHWVRQAPGQGLEWMGLINPSG TDLTRYAQKFQGRVTMTRDPTSTVYMESSLRSDDTAVYYCARQYAYGYSGFDM WGQGLTVTVSS HHHHHHGAIPYDVPDYAS*(SEQ ID NO: 114)		
DNA (5' -3')	cagtctgtgctgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggcagagggcaccatctctgttctggaagcagct ccaacatcggtatataattatgtatactggtaccagcagctcccaggaacggccccaaactcctcatctctagaaataa tcagcgccctcaggggtccctgaccgattctctggctccaagtctggcacctcagcctccctggccatcagtggtgctc cggctccgaggatgaggctgactattactgtacatcggtggatgacagcctgagtggtatgtctcggacctgggacca aggtcaccgtcctaggtggtggtggtgtagcggcgccggcggtctggtggtggtggtatccgaagtgcagctggtgc agtctggggtgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggttctgcaaggcatctggaacgccttcaccaact tctatatactgggtgcgacaggccccctggacaagggcttgagtgatgggattaatcaaccctagtgtgactgacct cacaaggtacgcacagaagttccagggcagagtcaccatgaccaggacacgcccacgagcacagtctacatgg agctgagcagcctgaggtctgacgacacggctgtgtattactgtgcgcgcagctacgcttacggtactctggttcgata tgtgggtcaaggtactctggtgaccgtctcctca caccatcaccatcaccatggcgcataccgtacgagctccggactacgcttcttag (SEQ ID NO: 115)		

10

20

30

PD-1-47

抗原	PD1 ECD hlgG1 Fc 融合		
CDRs:	1	2	3
VL	QSVSNW (SEQ ID NO: 116)	AAS	QQSYSTPIT (SEQ ID NO: 117)
VH	GYTFTSYY (SEQ ID NO: 118)	INPNTGGS (SEQ ID NO: 119)	ARGDVTYDE (SEQ ID NO: 120)
Full VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQSVSNWLAWYQLKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPITFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 121)		
DNA	Gacatccagatgaccagctctccatcttccgtgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcactgtcgggcgagtcagagtgttagcaactggtagcctggatcaactgaaaccagggaagcccctaagctcctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtgggtcccatcaagggtcagtggcagtggaatctgggacagatttactctcaccatcagcagctctgcaacctgaagatttgcacttactactgtcaacagagttacagtaccccgatcaccttcggcggagggaaccaaggtggagatcaaactg (SEQ ID NO: 122)		
Full VH	QVQLVQSGAEVKKPGTSTVKVSKASGYTFTSYYIHVVRQAPGQGLEWMGWINPNTGGSNFAQKFQGRVTMTTRDTSISTAYMELNRLRSDDTAVYYCARGDVTYDEWGQGT LTVVSS (SEQ ID NO: 123)		
DNA	Caggtccagctggtacagctctggggctgaggtgaagaagcctgggacctcagtgaaaggtctcctgcaaggcttctggatacaccttcacctcctactatatacactgggtgcgacaggcccctggacaagggtcagtggaatgggatggaatcaaccctaacactggtggtctaaacttgcacagaagttcagggcagggtcaccatgaccagggaacacgtccatcagcacagcctacatggagctgaacagggtgaggtctgacgacagcgccgtgtattactgtgcgcgcgggtgacgttacttacgatgaatggggtcaagggtactctggtgaccgtctcctca (SEQ ID NO: 124)		
scFv PD-1-47	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQSVSNWLAWYQLKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPITFGGGTKVEIKRGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGTSTVKVSKASGYTFTSYYIHVVRQAPGQGLEWMGWINPNTGGSNFAQKFQGRVTMTTRDTSISTAYMELNRLRSDDTAVYYCARGDVTYDEWGQGT LTVVSSHHHHHHGAYPYDVPDYAS*(SEQ ID NO: 125)		
DNA (5' -3')	gacatccagatgaccagctctccatcttccgtgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcactgtcgggcgagtcagagtgttagcaactggtagcctggatcaactgaaaccagggaagcccctaagctcctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtgggtcccatcaagggtcagtggcagtggaatctgggacagatttactctcaccatcagcagctctgcaacctgaagatttgcacttactactgtcaacagagttacagtaccccgatcaccttcggcggagggaaccaaggtggagatcaaacgtgggtggtggtgtagcggcggcggcggctctggtggtggtggaatccagggtccagctggtacagctctggggctgaggtgaagaagcctgggacctcagtgaaaggtctcctgcaaggcttctggatacaccttcacctcctactatatacactgggtgcgacaggcccctggacaagggtcagtggaatgggatggaatcaaccctaacactgggtggtctaaacttgcacagaagttcagggcagggtcaccatgaccagggaacacgtccatcagcacagcctacatggagctgaacagggtgaggtctgacgacagcgccgtgtattactgtgcgcgcgggtgacgttacttacgatgaatggggtcaagggtactctggtgaccgtctcctcacaccatcaccatcaccatggcgcataccgtacgacgttcgggactacgctttag (SEQ ID NO: 126)		

20

30

【表 13】

PD-1-46

抗原	PD1 ECD hlgG1 Fc 融合		
CDRs:	1	2	3
VL	NIGSKS (SEQ ID NO: 34)	YDD	QVWDINDHYV (SEQ ID NO: 127)
VH	GFTFSSYA (SEQ ID NO: 46)	ISGSGGST (SEQ ID NO: 47)	ARSQASFMDI (SEQ ID NO: 128)
Full VL	SYELTQPPSVSVAPGKTASITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVIYYDDMRPSG IPERFSGSSSGNTATLTISPVEAGDEADYYCQVWDINDHYVFASGTKVTVLG (SEQ ID NO: 129)		
DNA	Tcctatgagctgactcagccaccctcagtgctcagtggtgccccaggaaagacggccagcattacctgtgggggaaaca acattggaagtaaaagtgtgactggtaccagcagaagccaggccaggcccctgtgctgtgcatctattatgatgacat gcggccctcaggtatccctgagcgattctctggtccagctctgggaacacggccaccctgaccatcagcccgtcgaa agccggggatgaggccgactattactgtcaggtgtgggatattaatgatcattatgtcttcgcatcggggaccaaggtca ccgtcctaggt (SEQ ID NO: 130)		
Full VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSG GSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSQASFMDIWGQGT LTVVSS (SEQ ID NO: 131)		
DNA	Gaggtgcagctggtgagctctggggaggcttggtacagcctggggggtccctgagactctcctgtgcagcctctgga ttcaccttagcagctatgccatgagctgggtccgcccaggctccagggaaggggctggagtggtctcagctattagtg gtagtggtgtagcacatactacgcagactccgtgaagggccggttcaccatctccagagacaattccaagaacacg ctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacagggcgtatattactgtgcgcgtctcaggctctttcatgga tatctggggcaaggtactctggtgaccgtctcctca (SEQ ID NO: 132)		
scFv PD-1- 46	SYELTQPPSVSVAPGKTASITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVIYYDDMRPSG IPERFSGSSSGNTATLTISPVEAGDEADYYCQVWDINDHYVFASGTKVTVLGSGGGG SGGGGSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSG GSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSQASFMDIWGQGT LTVVSS HHHHHHGAYPYDVPDYAS* (SEQ ID NO: 133)		
DNA (5' -3')	tcctatgagctgactcagccaccctcagtgctcagtggtgccccaggaaagacggccagcattacctgtgggggaaaca cattggaagtaaaagtgtgactggtaccagcagaagccaggccaggcccctgtgctgtgcatctattatgatgacatg cgggccctcaggtatccctgagcgattctctggtccagctctgggaacacggccaccctgaccatcagcccgtcgaa gcccgggatgaggccgactattactgtcaggtgtgggatattaatgatcattatgtcttcgcatcggggaccaaggtcac cgctcctaggtggtggtggtgtagcggcgggcggtctggtggtggtggtatccgaggtgcagctggtgagctctgg gggaggcttggtacagcctggggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttagcagctatgccatga gctgggtccgcccaggctccagggaaggggctggagtggtctcagctattagtggtagtggtgtagcacatactacg cagactccgtgaagggccggttcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctg agagccgaggacacggcgtatattactgtgcgcgtctcaggctctttcatggatatctggggcaaggtactctggtg accgtctcctca caccatcaccatcaccatggcgcataccgtacgacgttccggactacgctcttag (SEQ ID NO: 134)		

10

20

30

【 0 0 6 7 】

組換え免疫グロブリンの構築において、様々な免疫グロブリンアイソタイプの定常領域についての適当なアミノ酸配列および広範な抗体を産生する方法は当業者に知られている。

【 0 0 6 8 】

本明細書において同定された抗原結合性タンパク質をコードする核酸は、組換え免疫エフェクター細胞を操作するために利用することができる。遺伝子操作された T - 細胞を作成するための方法およびベクターは、例えば、当該技術分野において知られている (B r e n t j e n s e t a l , S a f e t y a n d p e r s i s t e n c e o f a d o p t i v e l y t r a n s f e r r e d a u t o l o g o u s C D 1 9 - t a r g e t e d T c e l l s i n p a t i e n t s w i t h r e l a p s e d o r c h e m o t h e r a p y r e f r a c t o r y B - c e l l l e u k e m i a s , B l o o d 1 1 8 (1 8) : 4 8 1 7 ~ 4 8 2 8 , 2 0 1 1 年 1 1 月 を 参 照 されたい) 。

【 0 0 6 9 】

本開示のその他の実施形態には、本開示の抗原結合性タンパク質またはそれらの抗原結合性断片をコードする核酸を含む細胞および発現ベクターが含まれる。細胞は、本開示にしたがって抗原結合領域を含むキメラ抗原受容体を発現するよう遺伝子操作された T - 細胞などの組換え免疫エフェクター細胞であり得る。本開示にしたがって抗体を産生するよう操作された細胞もまた本開示に包含される。

【 0 0 7 0 】

さらに、本開示は、以下を含む本開示の抗体または抗体断片の産生方法を含む： (a) 核酸配列が発現され、それにより軽および重鎖可変領域を含むポリペプチドが産生される条件下で培地中で本開示の抗体または抗体断片をコードする核酸を含む組換え細胞を培養すること；および (b) 宿主細胞または培地からポリペプチドを回収すること。

【 0 0 7 1 】

本開示の抗原結合性タンパク質のいくつかの実施形態は、アンタゴニスト性抗 P D 1 抗体ならびに P D 1 のアゴニストとして機能する抗 P D 1 抗体を包含する。いくつかの抗 P D 1 抗体はアンタゴニストであり、即ち、それはそのリガンドによる P D 1 の結合をブロックするが、他の抗 P D 1 抗体はアゴニスト、即ち、P D - 1 の免疫抑制シグナルを増強する効果を有し、例えば、自己免疫の治療に有用なものとする抗体である。アンタゴニスト活性を示す本開示の抗体にはクローン 2 3 および 2 7 が含まれるが、クローン 1 6 、 1 8 、 2 6 、 3 1 および 4 0 はアゴニストとして機能するようである。

【 0 0 7 2 】

本開示はまた、本開示の抗 P D - 1 抗体または抗体断片の免疫応答を上昇させる医薬の調製のための使用ならびに本開示の抗 P D - 1 抗体または抗体断片の癌を治療する医薬の調製のための使用も含む。

【 0 0 7 3 】

本明細書に開示する抗原結合性タンパク質、抗体、核酸、ベクターまたは核酸または抗原結合性タンパク質を含む細胞を、医薬上許容され得る担体とともに含む医薬組成物もまた本開示に含まれる。

【 0 0 7 4 】

本開示は、本開示の抗 P D - 1 抗体または抗体断片のワクチンアジュバントとしての使用もまた含む。

【 0 0 7 5 】

別の態様において、本開示は、本明細書に開示する抗原結合性タンパク質、抗体またはその抗原結合性断片である第 1 成分を含む免疫接合体に関する。免疫接合体は、細胞毒素、検出可能標識、放射性同位元素、治療薬、第 2 のアミノ酸配列を有する結合性タンパク質または分子である第 2 成分を含む。第 2 成分が結合性タンパク質または第 2 抗体である場合、結合性タンパク質または第 2 抗体は、第 1 成分が特異的である H L A - ペプチド複

合体とは異なる標的に対する結合特異性を有する。

【0076】

本開示はまた、対象に、治療上有効量の、本明細書に開示する抗原結合性タンパク質、抗体またはその抗原結合性断片、キメラ抗原受容体(CAR)、抗原結合性タンパク質をコードする核酸または核酸もしくはタンパク質を含む細胞を投与することを含む、PD-1関連疾患を有する対象の治療方法に関する。

【0077】

当業者であれば、いくつかの実施形態が本発明の範囲と精神の枠内で可能であることを認識するであろう。ここで、本発明を以下の非限定的な実施例に言及することにより、より詳細に記載する。以下の実施例は本発明をさらに例証するが、もちろん、その範囲をな

10

【実施例】

【0078】

実施例1

s c F v がPD-1 連結を阻害する能力を試験するために、s c F v - F c ドメイン(s c F v - F c) 融合タンパク質を作成し、ここで、s c F v をマウスF c (マウスI g G 1 a) ドメインに連結させた。s c F v - F c クローンを次いで、E L I S A プレートにヒトPD-1 単量体でコーティングすることにより、PD-1 に結合する能力について分析した。s c F v のPD-1 への結合をH R P - 接合抗マウスI g G 1 F c 二次抗体を用いて定量した。7つのすべての抗体は、用量依存的にPD-1 単量体に関して結合活性を示した(図1)。E T 9 0 1 S c F v - F c (マウスI g G 1 F c) を陰性対照として用いた。s c F v - F c クローンの結合親和性を順位付けしたところ、クローン31が弱く結合し、クローン26および27が最も強く結合した(31 < 23 < 40 < 18 < 16 = 27 < 26)。

20

【0079】

実施例2

PD-L1 と相互作用するPD-1 を阻害するs c F v - F c の能力を試験するために、模式的に図2Aに示す競合的リガンド-結合アッセイを行った。このアッセイにおいて、PD-L1 - F c をE L I S A プレート上にコーティングした。ビオチン化-PD1 - F c を段階希釈したE T 9 0 1 S c F v - F c (陰性対照)または抗PD1 S c F v - F c と混合し、次いでPD-L1 - F c コートプレート中に添加した。プレート上にコーティングされたPD-L1 へのPD-1 - F c の結合をH R P - 接合ストレプトアビジンを介して可視化した(図2B)。同様の濃度のs c F v - F c を比較した場合(丸で囲む)、PD-1 - PD-L1 相互作用を破壊する能力を順位付けしたところ、クローン40および23が最も弱く、クローン26が最も強い破壊能力を有していた(26 > 27 = 16 > 18 > 31 > 23 = 40、図2B)。

30

【0080】

実施例3

これらのクローンを次いで特異的T細胞機能を制御するそれらの能力について調べた。本発明者らは以前に、T細胞が腫瘍-特異的キメラ抗原受容体(CAR)を発現するようレトロウイルスにより形質導入されている、腫瘍-標的化T細胞を作成している。本発明者らは以前に、CARの発現が所与の抗原を標的化するT細胞機能を再指示したことを実証している(Brentjens, Santos et al, 2007)。本発明者らの研究室において、本発明者らは、1928zと称するCD19に特異的なCARを用いてB細胞悪性腫瘍を標的とする(Brentjens, Santosら, 2007)。本発明者らは以前に、CAR改変T細胞がインビトロおよびインビボおよび臨床研究において有意な抗腫瘍活性を示したことを実証している(Brentjens, Latouch eら, 2003; Brentjens, Davilaら, 2013; Davila, Riviereら, 2014)。7つのs c F v クローンが、アゴニスト性であるか(PD-1 を刺激する)、アンタゴニスト性であるか(PD-1 をブロックする)またはPD-1

40

50

に対して有意な効果を有さないかを決定するために、本発明者らは、抗PD-1 s c F v遺伝子の近位にマウスカッパーリーダー配列を含めることにより分泌可能s c F vを作成した(図3)。本発明者らは次いで、1928z CARの発現および形質導入されたヒト末梢血T細胞からの抗PD-1 s c F vの分泌を誘導するために2シストロン性レトロウイルスベクターを作成した。

【0081】

実施例4

PD-1刺激がT細胞の増殖および機能を阻害する能力があるので、本発明者らは引き続いてT細胞増殖に対する抗PD-1 s c F vの効果を特徴決定する探索を行った。これを達成するために、ヒトT細胞を健康ドナーの末梢血から単離し、以前に記載されている方法を用いて、CARを発現し、PD-1-特異的s c F vを分泌するようレトロウイルス形質導入を介して改変した(Brentjens、Santosら、2007)。形質導入の後、改変されたT細胞をインビトロでの増殖についてモニターした(図4)。1928z CARを発現し、PD-1特異的s c F vクローン23および27を分泌するT細胞は、1928z CARのみを発現するよう改変されたT細胞と同様に増殖した。CARを発現し、PD-1-特異的s c F vクローン16、18、26、31または40を分泌するよう改変された細胞は増殖せず、これらのPD-1-特異的s c F vクローンがアゴニスト性であり、潜在的にPD-1を刺激し、そしてT細胞増殖の低下をもたらしたことが示唆された。

【0082】

実施例5

増殖研究に加えて、本発明者らは、(CARを発現する、またはCARを発現し、PD-1-特異的s c F vを分泌する)T細胞を、CD19⁺パーキットリンパ腫腫瘍細胞株、Rajiと共培養し、T細胞からのサイトカイン分泌のレベルを決定した。図5に示されるように、1928z CARを発現し、PD-1-特異的s c F vクローン23または27を分泌するよう改変されたT細胞は、CARのみを発現するよう改変された細胞と比較してIFN- γ の分泌の上昇を示し、これらのs c F vクローンがPD-1シグナル伝達に関してアンタゴニスト性であったことが示唆された。1928z CARを発現し、PD-1-特異的s c F vクローン16、18、26、31または40を分泌するよう改変された細胞は、CARのみにより改変された細胞と比較してより少ないIFN- γ を分泌し、これらのs c F vがPD-1に関してアゴニスト性であり、T細胞機能を阻害したことが示唆された。

【0083】

実施例6

1928 CARおよびPD-1ブロッキングs c F vを発現するよう改変されたヒトT細胞をフローサイトメトリーによって分析した。CARの発現の検証(図6)の後、s c F vの存在を、細胞可溶化液における検出を可能とするようにゴルジ阻害剤で処理されたヒトT細胞から調製した可溶化液についての(s c F v設計において組み込まれたHAタグに対して特異的な抗体を使用する)ウェスタンブロットを使用して決定した。1928z CARおよびクローン23を発現するよう改変されたヒトT細胞では、その他のクローンと比較してs c F vタンパク質が有意に少なかった(図7)。これらの細胞を次いで、PD-1リガンドである、PD-L1/L2を発現するか、または発現しない、3T3マウス線維芽細胞(人工抗原提示細胞、aAPC)上に蒔いた。aAPCとの24時間の培養の後、ヒトT細胞を活性化させるために培養物にCD3/CD28ビーズを添加した。ヒトT細胞、aAPCおよびビーズの培養の3日後、ヒトT細胞を数え上げて、PD-1リガンドの存在がヒトT細胞のビーズに駆動される増殖を阻害したか、または抗PD-1 s c F vがT細胞増殖のPD-1リガンドに媒介される阻害を妨げたかを、決定した。1928z CARおよび抗PD-1 s c F vクローン26および23を発現するよう改変されたT細胞では、抑制性リガンドを発現しないaAPCと比較してPD-L1/L2を発現するaAPC上での増殖が低下していた(図8)。一方、1928z CAR

および抗PD-1 s c F v クローン27を発現するよう改変されたT細胞は、PD-L1/L2を発現するaAPC上での増殖が上昇していた。

【0084】

実施例7

当該技術分野において知られている組換え技術を使用して、PD-1特異的s c F vから組換えヒトモノクローナル抗体を作成し、即ち、対応するs c F vにおいてみられるものと同じ可変重および軽鎖を有する完全にヒトのIg分子を作った（上記表1～14および図9を参照されたい）。これらのモノクローナル抗体のPD-1への結合をフローサイトメトリーを使用して実証した（図10を参照されたい）。

【0085】

ヒトT細胞を、ヒトPD-1を過剰発現するように改変し、次いで1 μg/mlの抗体とともにインキュベートした。クローン27 mAbはPD-1 T細胞に最も結合し、次いでクローン26であり、そして次にクローン23であった（図9）。対照モノクローナル抗体である、901は、PD-1 T細胞に結合しなかった。これらの抗体とともにインキュベートしたT細胞を次いで、PD-1リガンドの、T細胞の増殖およびモノクローナル抗体がこの相互作用を妨げる能力に対する影響を決定するために、ビーズとともに人工抗原提示細胞（aAPC）上に蒔いた。抗PD-1クローン27モノクローナル抗体とともにインキュベートされた19z1 T細胞は、PD-L1/L2 aAPC上でより高い程度に増殖した。

【0086】

実施例8

PD-L1/L2を発現するaAPC上でインキュベートされた、第1世代CARを発現するよう改変されたT細胞は、抗PD-1クローン27モノクローナル抗体が存在する場合、増殖する。第1世代CD19-特異的CAR（19z1）を発現するよう改変されたヒトT細胞を、抗PD-1モノクローナル抗体とともに24時間インキュベートし、次いでPD-L1/L2を発現するか、または発現しないaAPC上に置いた。aAPCによる24時間の刺激の後、細胞を次いでCD3/CD28ビーズにより刺激した。3日後、細胞を数え上げた。モノクローナル抗体なしでインキュベートした19z1 T細胞、対照抗体（901）およびクローン23および26モノクローナル抗体とともにインキュベートした19z1 T細胞は、抑制性リガンドなしのaAPC上（図11黒色バー）と比較して、PD-1リガンドを発現するaAPC上での増殖（図11白色バー）がより低かった。しかしながら、抗PD-1クローン27モノクローナル抗体とともにインキュベートした19z1 T細胞はPD-L1/L2 aAPC上でより高い程度に増殖した。示したデータは1回の実験の代表である。

【0087】

実施例9

PD-1ブロッキングs c F vである、E27を分泌するようさらに改変されたCAR T細胞の作成。CD19-特異的CAR（1928zと称する）または卵巢腫瘍抗原特異的CAR（4H1128zと称する）およびPD-1ブロッキングs c F vである、E27をコードする2シストロン性レトロウイルスコンストラクトを作成した（図12A）。E27は、s c F vの分泌を可能にするように、シグナルペプチドである、マウスIgKにより先行された。T細胞からいったん分泌されたs c F vを検出するために、HA/Histタグもまた含めた。ヒト末梢血T細胞に、CAR、1928z、またはCARおよびE27 PD-1ブロッキングs c F v、1928z-E27をコードするレトロウイルスコンストラクトを形質導入した。形質導入の後、フローサイトメトリーを使用して、CD19-標的化CARに特異的に結合する、19E3と称する抗体を用いて、CARの発現を検出した（図12B）。形質導入されたヒトT細胞からの上清のウェスタンブロット分析を利用して、抗HA抗体を用いてPD-1ブロッキングs c F vを検出した（図12C）。本発明者らはまた、CARおよび対照s c F vである、B6を発現するよう改変されたT細胞からのs c F v分泌を調べ、これは抗c-mycタグ抗体を用いて検出した

10

20

30

40

50

。2つのCD19⁺腫瘍標的に対する標準的⁵¹Cr放出アッセイを行って、scFvの分泌が、CARがT細胞の細胞溶解能力を再指示する能力を妨げないことを確認した。CARのみ(1928zまたは4H1128z対照CAR)、CARおよびE27 scFv(1928z-E27または4H1128z-E27)、またはCARおよび対照scFv(1928z-B6H12.2または4H1128z-B6H12.2)のいずれかを発現するCAR⁺T細胞を、⁵¹Cr標識化腫瘍細胞(RajiまたはNa1m6)とともに4時間インキュベートした。CD19特異的CARを発現するT細胞は、腫瘍標的を同等のレベルで溶解することができ、卵巣-標的化CAR⁺T細胞はRajiもNa1m6も溶解することができなかった(図12D)。それゆえ、本発明者らは、scFvの分泌は、CARがT細胞溶解能力を再指示する能力を妨げなかったと結論する。

10

【0088】

実施例10

CARを発現し、PD-1ブロッキングscFvを分泌するよう改変されたT細胞は、PD-L1-PD-1相互作用からの阻害に、インビトロで耐える。CARのみ(1928z)、またはCARおよびPD-1ブロッキングscFv(1928z-E27)を発現するT細胞を3T3空細胞またはヒトPD-L1を発現するよう改変された3T3細胞上で培養した。3T3フィーダー細胞上での24時間の後、細胞を、1:3のビーズ:T細胞比にて培養物に添加したCD3/CD28ビーズにより刺激した。T細胞の増殖をトリパンブルーでの数え上げにより決定し、新しいビーズを2回培養物に添加した(矢印によって示す)。1928z⁺T細胞は、3T3空フィーダー細胞上で増殖したが、しかし、3T3-PD-L1フィーダー細胞上では増殖しなかった。一方、1928z-E27⁺T細胞は、3T3空および3T3-PD-L1フィーダー細胞の両方の上で増殖し、PD-L1-PD-1に媒介される抑制に対する抵抗性が示された(図13A)。図13Aに示すように3T3空または3T3-PD-L1細胞上でインキュベートしたT細胞をフローサイトメトリーによって分析して、抑制性受容体である、PD-1、2B4およびLAG3についての発現を検出した。1928z細胞は、1928z-E27細胞よりも上昇したレベルのPD-1を発現した(示さず)。PD-1⁺細胞でゲートをかけた場合、2B4およびLAG3の分析により、1928z細胞は、1928z-E27細胞と比較してPD-1⁺、2B4⁺およびLAG3⁺細胞のより高い割合を有していたことが明らかになった(図13B)。形質導入されたT細胞を、様々なエフェクター対標的(E:T)比(1:1、1:3、1:5)で72時間、Raji-PDL1またはNa1m6-PDL1腫瘍細胞とともに培養した。抗CD3および抗CD19抗体での染色後のフローサイトメトリーおよびビーズの数え上げを使用して、腫瘍標的の溶解およびT細胞の増殖を経時的にモニターした。1928z-E27細胞は、PDL1⁺腫瘍細胞とともに培養した場合、1928z⁺T細胞と比較してより高いレベルで増殖し続けた(図13C)。形質導入されたT細胞を図13Cに示すようにNa1m6-PDL1腫瘍細胞で刺激し、Na1m6-PDL1腫瘍細胞で1:5のE:T比で再刺激した。48時間の共培養の後、フローサイトメトリーを使用して腫瘍標的の溶解を決定した。1928z-E27は、1928z細胞と比較して再刺激の際にPD-L1腫瘍標的を溶解する能力を保持していた(図13D)。

20

30

40

【0089】

実施例11

CARを発現し、PD-1ブロッキングscFvを分泌するよう改変されたT細胞のインビボ抗腫瘍効力を図14に示す。SCID-ベージュマウスに静脈内注入により0日目にRaji-PD-L1腫瘍細胞を接種した。1日目に、マウスに10⁶のCAR⁺T細胞を静脈内に注入し、生存を臨床的にモニターした。後肢麻痺が生じるとマウスを安楽死させた。

【0090】

実施例12

PD-1ブロッキングmAb候補である、E27、E26およびE23を競合的結合ア

50

ッセイにおいて使用して、様々な濃度で、ヒトには存在しないハブテンを標的とする対照 mAb と比較しての PD - 1 の PD - L 1 への結合の妨害を検出した。E 2 3、E 2 6 および E 2 7 mAb はすべて PD - 1 の PD - L 1 への結合を妨げた (図 1 5 A)。1 9 2 8 z CAR とともに分泌可能 scFv を発現するよう形質導入された 2 9 3 G 1 v 9 パッケージング細胞からの SN についての、抗 HA 抗体により染色したウェスタンブロット。E 2 7 scFv が最高レベルで検出され、それゆえ残りの研究において使用した (図 1 5 C)。

【 0 0 9 1 】

実施例 1 3

T 細胞を、CAR を発現し、PD - 1 ブロッキング scFv である、E 2 7 を分泌するよう共改変することができる。図 1 6 A は、1 9 2 8 z CAR のみ (1 9 2 8 z) または 1 9 2 8 z CAR および E 2 7 PD - 1 ブロッキング scFv (1 9 2 8 z - E 2 7) を形質導入した後の、1 9 2 8 z CAR に特異的に結合する 1 9 E 3 mAb による染色の後での、同等の CAR 発現を実証する代表的フローサイトメトリープロットである。図 1 6 B は、抗 HA mAb で染色した、1 9 2 8 z および 1 9 2 8 z - E 2 7 T 細胞からの SN についてのウェスタンブロットを示し、約 3 0 kDa タンパク質が 1 9 2 8 z - E 2 7 細胞においてのみ示され、E 2 7 scFv が、1 9 2 8 z - E 2 7 を形質導入された T 細胞から分泌されるが、CAR のみを形質導入された T 細胞からは分泌されないことを実証している。図 1 6 C は、形質導入の後に、1 9 2 8 z T 細胞と比較して 1 9 2 8 z - E 2 7 T 細胞上でのより低いレベルの PD - 1 発現を実証する代表的フローサイトメトリーである。PD - 1 の発現は、1 9 2 8 z T 細胞と比較して 1 9 2 8 z - E 2 7 T 細胞上で統計的に有意により低かった。示されたデータは、4 回の独立した実験からの平均 + / - SEM である (図 1 6 D)。Raji 腫瘍細胞の溶解は E 2 7 scFv の分泌によって影響を受けなかったことを実証する 4 時間 ⁵ ¹ Cr 放出アッセイ。1 9 2 8 z および 1 9 2 8 z - E 2 7 T 細胞は Raji 腫瘍細胞を同等に溶解した。対照 4 H 1 1 2 8 z - E 2 7 T 細胞は、4 H 1 1 2 8 z T 細胞と比較して Raji 細胞の溶解の上昇を媒介しなかった (図 1 6 E)。示したデータは、2 回の独立した実験の代表である。

【 0 0 9 2 】

実施例 1 4

CAR および E 2 7 の発現は、CD 1 9 + PD - L 1 + 腫瘍細胞に関して、T 細胞の増殖および溶解能力を保護する。Raji 腫瘍細胞を、ヒト PD - L 1 を発現するようレトロウイルスにより改変し (Raji - PDL 1)、PD - L 1 に対して特異的な mAb により染色した。親 Raji 腫瘍 (Raji) は PD - L 1 を発現せず、Raji - PDL 1 腫瘍細胞は高レベルの PD - L 1 を発現した (図 1 7 A)。図 1 7 B は、1 9 2 8 z - E 2 7 T 細胞は、7 2 時間の共培養の後のフローサイトメトリーにより決定して、1 9 2 8 z T 細胞と比較してより多くの Raji - PDL 1 腫瘍細胞を溶解することを示す代表的フローサイトメトリープロットを示す。1 9 2 8 z - E 2 7 T 細胞は、1 9 2 8 z T 細胞と比較して統計的に有意により多くの Raji - PDL 1 腫瘍細胞を溶解し、示されたデータは 4 回の独立した実験からの平均 + / - SEM である (図 1 7 C)。1 9 2 8 z - E 2 7 T 細胞は、フローサイトメトリーおよびビーズの数え上げにより決定して、Raji - PDL 1 腫瘍細胞との共培養の後により多くの数に増殖し、示されたデータは 4 回の独立した実験からの T 細胞の平均総数 + / - SEM である (図 1 7 D)。図 1 7 E は、Raji - PDL 1 腫瘍細胞との 7 日間の共培養の後の、1 9 2 8 z - E 2 7 T 細胞と比較して 1 9 2 8 z T 細胞上での上昇した PD - 1 発現を示す、代表的フローサイトメトリープロットを示す。1 9 2 8 z T 細胞は、パーセンテージ陽性細胞および PD - 1 染色の平均蛍光強度 (MFI) に関して、1 9 2 8 z - E 2 7 T 細胞と比較して有意により多くの PD - 1 を発現する。示されたデータは、4 回の独立した実験からの平均 + / - SEM である (図 1 7 F)。図 1 7 G は、7 日間の Raji - PDL 1 との共培養の後に、1 9 2 8 z - E 2 7 細胞と比較して上昇したパーセンテージの 2 B 4 + PD

- 1 + 1928z T細胞を示す、代表的フローサイトメトリプロットを示す。1928z - E27 T細胞はまた、2B4 + PD - 1 + 集団について、より少ないBTLAおよびTIM3を発現する。示したデータは、3回の独立した実験の代表である。

【0093】

実施例15

E27は、PD - L1に関してCD3 / CD28刺激T細胞の増殖能力を保護する。NIH3T3細胞をヒトPD - L1を発現するようレトロウイルスにより改変し(3T3 - PDL1)、PD - L1に特異的なmAbにより染色した。親NIH3T3(3T3 - 空)は、PD - L1を発現せず、3T3 - PDL1腫瘍細胞は、高レベルのPD - L1を発現した(図18A)。1928zおよび1928z - E27 T細胞を3T3 - 空または3T3 - PDL1細胞とともに培養し、CD3 / CD28ビーズにより刺激した。細胞を数え上げ、3、6、9および12日目に新しい3T3細胞上に再び蒔いた。1928z T細胞は3T3 - 空細胞と比較して3T3 - PDL1細胞とともに培養した場合に増殖の低下を示した。1928z - E27細胞は、3T3 - 空または3T3 - PDL1細胞上で培養した場合、同等の増殖を示した(図18B)。示したデータは、4回の独立した実験からの平均倍数増殖 + / - SEMである。図18Cは、3T3 - 空細胞上で培養した1928z T細胞と比較して3T3 - PDL1とともに培養した1928z T細胞上で2B4、PD - 1、BTLAおよびTIM3の発現の上昇を示す、代表的フローサイトメトリプロットである。1928z - E27細胞は、3T3 - 空および3T3 - PDL1とともに培養した場合、2B4、PD - 1、BTLA - 4およびTIM3の同等の発現を示した。示したデータは、3回の独立した実験の代表である。

【0094】

実施例16

E27 scFvを分泌するCAR T細胞は、抗腫瘍機能のインビボでの上昇を示す。SCID - ベージュマウスにRaji - PDL1腫瘍細胞を静脈内に接種し、翌日にCAR T細胞を静脈内に注入した。図19に示すように、1928z - E27 T細胞で処理されたマウスは1928z T細胞で処理されたマウスと比較して生存の向上を示した。1928z T細胞で処理したマウスは非処理マウスおよび無関係の抗原を標的としたCAR T細胞である、4H1128zおよび4H1128z - E27 T細胞で処理したマウスよりも長く生存した。示したデータは2回の独立した実験からのものである。

【0095】

実施例17

PD1 / PDL1結合に対するブロッキング効果を確認するために、抗PD - 1抗体ET130 - 23、ET130 - 26およびET130 - 27をELISAにより試験した。図20に示すように、ET901(陰性対照)は結合を示さず、一方、ET130 - 23、ET130 - 26およびET130 - 27は、0.031 ~ 10 μg / mlの濃度範囲にわたってPD1 / PDL1結合に対してブロッキング効果を示した。

【0096】

同様に、PD1 / PDL2結合に対するブロッキング効果を確認するために、ET130 - 23、ET130 - 26およびET130 - 27をELISAにより試験した。図21に示すように、ET901(陰性対照)は結合を示さず、一方、ET130 - 23、ET130 - 26およびET130 - 27は同じ濃度範囲にわたってPD1 / PDL2結合に対するブロッキング効果を示した。ET130 - 26はPD1 / PDL2に対して最高のブロッキング効果を示し、一方、ET130 - 23は最低の効果を示した。ブロッキングパターンは、PD1 / PDL1結合に対応している。

【0097】

実施例18

抗PD - 1 scFvまたはモノクローナル抗体の適用を、scFvまたはモノクローナル抗体が免疫応答を弱め、自己免疫疾患を消失させる能力について調べる。これはまた、GVHDのマウスモデルを用いて調べることができる。ヒトT細胞の照射したNOD .

SCID・IL-2R^{-/-}への注入の結果、ヒト細胞が生着し、ヒトT細胞がマウス組織を攻撃する重篤なGVHDが起こった。抗PD-1 s c F vを分泌するT細胞（またはモノクローナル抗体の注入により増強されたT細胞）を対象に注入し、GVHDの発生を評価する。抗PD-1 s c F v / m A bがアゴニスト性である場合、GVHD応答はヒトT細胞の抑制により阻害される。

例示的实施形態

1. 以下の1つを含む組換え抗原結合性タンパク質またはその抗原結合性断片：

(A) 配列番号10、配列番号21、配列番号32、配列番号43、配列番号53、配列番号61、配列番号72、配列番号83、配列番号94、配列番号103、配列番号114、配列番号125、配列番号133、配列番号142；その断片およびその相同配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む抗原結合領域；

10

(B) 配列番号6および8；配列番号17および19；配列番号28および30；配列番号39および41；配列番号49および51；配列番号57および59；配列番号68および70；配列番号79および81；配列番号90および92；配列番号99および101；配列番号110および112；配列番号121および123；配列番号129および131；配列番号138および140；それらの断片ならびにそれらの相同配列から選択されるアミノ酸配列をそれぞれ有する可変軽鎖（VL）および可変重鎖（VH）を含む抗原結合領域；

(C) 以下を含む抗原結合領域：

(i) アミノ酸配列Q S I S S Y（配列番号1）、A A SおよびQ Q S Y S T P L T（配列番号2）をそれぞれ有する軽鎖相補性決定領域（L C C D R）L C C D R 1、L C C D R 2およびL C C D R 3を含む軽鎖（LC）ならびにアミノ酸配列G F T S S S Y W（配列番号4）、I K Q D G S E K（配列番号5）およびA R G G W S Y D M（配列番号6）をそれぞれ有する重鎖相補性決定領域（H C C D R）H C C D R 1、H C C D R 2およびH C C D R 3を含む重鎖（HC）；それらの断片ならびにそれらの相同配列；

20

(i i) アミノ酸配列S S N I G A G Y A（配列番号12）、T N NおよびQ S Y D S S L S G V I（配列番号13）をそれぞれ有するL C C D R 1、L C C D R 2およびL C C D R 3を含む軽鎖（LC）ならびにアミノ酸配列G Y T L T E L S（配列番号14）、F D P E D G E T（配列番号15）およびA R A Y Y G F D Q（配列番号16）をそれぞれ有するH C C D R 1、H C C D R 2およびH C C D R 3を含む重鎖（HC）；それらの断片ならびにそれらの相同配列；

30

(i i i) アミノ酸配列S S N I G N N A（配列番号23）、Y N DおよびA A W D D S V N G Y V（配列番号24）をそれぞれ有するL C C D R 1、L C C D R 2およびL C C D R 3を含む軽鎖（LC）ならびにアミノ酸配列G Y T F T R F G（配列番号25）、I S V N N G N T（配列番号26）およびA R Y M Y G R R D S（配列番号27）をそれぞれ有するH C C D R 1、H C C D R 2およびH C C D R 3を含む重鎖（HC）；それらの断片ならびにそれらの相同配列；

(i v) アミノ酸配列N I G S K S（配列番号34）、Y D SおよびQ V W D N H S D V V（配列番号35）をそれぞれ有するL C C D R 1、L C C D R 2およびL C C D R 3を含む軽鎖（LC）ならびにアミノ酸配列R N K F S S Y A（配列番号36）、I S G S G G T T（配列番号37）およびA R W Y S S Y Y D V（配列番号38）をそれぞれ有するH C C D R 1、H C C D R 2およびH C C D R 3を含む重鎖（HC）；それらの断片ならびにそれらの相同配列；

40

(v) アミノ酸配列N I G S K S（配列番号34）、Y D SおよびQ V W D S S S D Y V（配列番号45）をそれぞれ有するL C C D R 1、L C C D R 2およびL C C D R 3を含む軽鎖（LC）ならびにアミノ酸配列G F T F S S Y A（配列番号46）、I S G S G G S T（配列番号47）およびA R N Y I S M F D S（配列番号48）をそれぞれ有するH C C D R 1、H C C D R 2およびH C C D R 3を含む重鎖（HC）；それらの断片ならびにそれらの相同配列；

(v i) アミノ酸配列N I G S K S（配列番号34）、Y D SおよびQ V W D S S S D

50

H V (配列番号 55) をそれぞれ有する L C C D R 1、L C C D R 2 および L C C D R 3 を含む軽鎖 (L C) ならびにアミノ酸配列 G F T F S S Y A (配列番号 46)、I S G S G G S T (配列番号 47) および A R G Y S S Y Y D A (配列番号 56) をそれぞれ有する H C C D R 1、H C C D R 2 および H C C D R 3 を含む重鎖 (H C) ; それらの断片ならびにそれらの相同配列 ;

(v i i) アミノ酸配列 R S N I G E N T (配列番号 63)、S N N および A A W D D R L N G Y V (配列番号 64) をそれぞれ有する L C C D R 1、L C C D R 2 および L C C D R 3 を含む軽鎖 (L C) ならびにアミノ酸配列 G Y T F T N Y G (配列番号 65)、I G A Q K G D T (配列番号 66) および A R S Q G V P F D S (配列番号 67) をそれぞれ有する H C C D R 1、H C C D R 2 および H C C D R 3 を含む重鎖 (H C) ; それらの断片ならびにそれらの相同配列 ;

10

(v i i i) アミノ酸配列 R S N I G S N T (配列番号 74)、N N N および A T W D D S L N E Y V (配列番号 75) をそれぞれ有する L C C D R 1、L C C D R 2 および L C C D R 3 を含む軽鎖 (L C) ならびにアミノ酸配列 G Y T F T R Y G (配列番号 76)、I S G Y N G N T (配列番号 77) および A R H G Y G Y H G D (配列番号 78) をそれぞれ有する H C C D R 1、H C C D R 2 および H C C D R 3 を含む重鎖 (H C) ; それらの断片ならびにそれらの相同配列 ;

(i x) アミノ酸配列 S S N I G A G Y V (配列番号 85)、H N N および Q S Y D S S L S G W V (配列番号 86) をそれぞれ有する L C C D R 1、L C C D R 2 および L C C D R 3 を含む軽鎖 (L C) ならびにアミノ酸配列 G F T F K D Y Y (配列番号 87)、I S T S G N S V (配列番号 88) および A R S P G H S D Y D S (配列番号 89) をそれぞれ有する H C C D R 1、H C C D R 2 および H C C D R 3 を含む重鎖 (H C) ; それらの断片ならびにそれらの相同配列 ;

20

(x) アミノ酸配列 N I G D K S (配列番号 96)、Y D S および Q V W A S G T D H P Y V I (配列番号 97) をそれぞれ有する L C C D R 1、L C C D R 2 および L C C D R 3 を含む軽鎖 (L C) ならびにアミノ酸配列 G F T F S S Y A (配列番号 46)、I S G S G G S T (配列番号 47) および A R M Y G S Y T D M (配列番号 98) をそれぞれ有する H C C D R 1、H C C D R 2 および H C C D R 3 を含む重鎖 (H C) ; それらの断片ならびにそれらの相同配列 ;

(x i) アミノ酸配列 S S N I G Y N Y (配列番号 105)、R N N および T S W D D S L S G Y V (配列番号 106) をそれぞれ有する L C C D R 1、L C C D R 2 および L C C D R 3 を含む軽鎖 (L C) ならびにアミノ酸配列 G N A F T N F Y (配列番号 107)、I N P S G T D L T (配列番号 108) および A R Q Y A Y G Y S G F D M (配列番号 109) をそれぞれ有する H C C D R 1、H C C D R 2 および H C C D R 3 を含む重鎖 (H C) ; それらの断片ならびにそれらの相同配列 ;

30

(x i i) アミノ酸配列 Q S V S N W (配列番号 116)、A A S および Q Q S Y S T P I T (配列番号 117) をそれぞれ有する L C C D R 1、L C C D R 2 および L C C D R 3 を含む軽鎖 (L C) ならびにアミノ酸配列 G Y T F T S Y Y (配列番号 118)、I N P N T G G S (配列番号 119) および A R G D V T Y D E (配列番号 120) をそれぞれ有する H C C D R 1、H C C D R 2 および H C C D R 3 を含む重鎖 (H C) ; それらの断片ならびにそれらの相同配列 ;

40

(x i i i) アミノ酸配列 N I G S K S (配列番号 34)、Y D D および Q V W D I N D H Y V (配列番号 127) をそれぞれ有する L C C D R 1、L C C D R 2 および L C C D R 3 を含む軽鎖 (L C) ならびにアミノ酸配列 G F T F S S Y A (配列番号 46)、I S G S G G S T (配列番号 47) および A R S Q A S F M D I (配列番号 128) をそれぞれ有する H C C D R 1、H C C D R 2 および H C C D R 3 を含む重鎖 (H C) ; それらの断片ならびにそれらの相同配列 ; または

(x i v) アミノ酸配列 N I G S K S (配列番号 34)、D D S および Q V W D S S S D Q G V (配列番号 135) をそれぞれ有する L C C D R 1、L C C D R 2 および L C C D R 3 を含む軽鎖 (L C) ならびにアミノ酸配列 G F T F S S Y A (配列番号 46)、I

50

G T G G G T (配列番号 1 3 6) および A R G T G Y D G D Q (配列番号 1 3 7) をそれぞれ有する H C C D R 1、H C C D R 2 および H C C D R 3 を含む重鎖 (H C) ; それらの断片ならびにそれらの相同配列。

2 . 前記タンパク質が抗体である、実施形態 1 に記載の組換え抗原結合性タンパク質。

3 . 前記抗体がヒト抗体である、実施形態 2 に記載の組換え抗原結合性タンパク質。

4 . 前記抗体またはその抗原結合性断片がインタクトな I g、F a b、F (a b ')₂、F v、または s c F v である、実施形態 2 に記載の組換え抗原結合性タンパク質。

5 . 前記抗原結合性タンパク質が P D - 1 アゴニストである、実施形態 1 に記載の抗原結合性タンパク質。

6 . 前記抗原結合性タンパク質が P D - 1 アンタゴニストである、実施形態 1 に記載の抗原結合性タンパク質。

7 . 前記抗原結合性タンパク質がキメラ抗原受容体 (C A R) である、実施形態 1 に記載の抗原結合性タンパク質。

8 . 実施形態 1 から 7 のいずれか一項に記載の抗原結合性タンパク質をコードする核酸

。

9 . 実施形態 8 に記載の核酸を含むベクター。

1 0 . 実施形態 1 から 7 のいずれか一項に記載の抗原結合性タンパク質、実施形態 8 に記載の核酸または実施形態 9 に記載のベクターを含む細胞。

1 1 . 治療薬に接合した実施形態 1 から 7 のいずれか一項に記載の抗原結合性タンパク質。

1 2 . 前記治療薬が、薬物、毒素、放射性同位元素、タンパク質、またはペプチドである、実施形態 1 1 に記載の抗原結合性タンパク質。

1 3 . 実施形態 1 から 7 のいずれか一項に記載の抗原結合性タンパク質、実施形態 8 に記載の核酸、実施形態 9 に記載のベクター、実施形態 1 0 に記載の細胞または実施形態 1 1 もしくは 1 2 に記載の抗原結合性タンパク質を含む、医薬組成物。

1 4 . 医薬上許容され得る担体をさらに含む、実施形態 1 3 に記載の医薬組成物。

1 5 . 対象における T 細胞応答を上昇させる方法であって、治療上有効量の、実施形態 1 から 7 のいずれか一項に記載の抗原結合性タンパク質またはその抗原結合性断片、実施形態 8 に記載の核酸、実施形態 9 に記載のベクター、実施形態 1 0 に記載の細胞、実施形態 1 1 もしくは 1 2 のいずれかに記載の抗原結合性タンパク質または実施形態 1 3 もしくは 1 4 のいずれかに記載の医薬組成物を、前記対象に投与することを含む、方法。

1 6 . 前記抗原結合性タンパク質またはその抗原結合性断片が、P D - 1 によって媒介されるシグナル伝達を阻害する、低下させる、調節する、または消失させる、実施形態 1 5 に記載の方法。

1 7 . P D 1 - 陽性疾患を有する対象を治療する方法であって、治療上有効量の、実施形態 1 から 7 のいずれか一項に記載の抗原結合性タンパク質またはその抗原結合性断片、実施形態 8 に記載の核酸、実施形態 9 に記載のベクター、実施形態 1 0 に記載の細胞、実施形態 1 1 もしくは 1 2 のいずれかに記載の抗原結合性タンパク質または実施形態 1 3 もしくは 1 4 のいずれかに記載の医薬組成物を、前記対象に投与することを含む、方法。

1 8 . 前記抗原結合性タンパク質またはその抗原結合性断片が、それに連結した細胞毒性部分を有する接合体である、実施形態 1 7 に記載の方法。

1 9 . 前記 P D - 1 陽性疾患が癌である、実施形態 1 7 または 1 8 に記載の方法。

2 0 . 実施形態 1 から 7 のいずれか一項に記載の組換え抗 P D 1 抗原結合性タンパク質またはその抗原結合性断片、実施形態 8 に記載の核酸、実施形態 9 に記載のベクター、実施形態 1 0 に記載の細胞、実施形態 1 1 もしくは 1 2 のいずれかに記載の抗原結合性タンパク質または実施形態 1 3 もしくは 1 4 のいずれかに記載の医薬組成物の、P D 1 リガンドに対する P D 1 の結合を阻害することによる P D 1 - 陽性疾患の治療のための、使用。

2 1 . 前記 P D 1 - 陽性疾患が癌である、実施形態 2 0 に記載の使用。

2 2 . 実施形態 1 から 7 のいずれか一項に記載の組換え抗 P D 1 抗原結合性タンパク質またはその抗原結合性断片、実施形態 8 に記載の核酸、実施形態 9 に記載のベクター、実

10

20

30

40

50

施形態 10 に記載の細胞、実施形態 11 もしくは 12 のいずれかに記載の抗原結合性タンパク質または実施形態 13 もしくは 14 のいずれかに記載の医薬組成物の、PD-1 シグナル経路を阻害することによる免疫調節のための、使用。

23. 組換え抗 PD-1 抗原結合性タンパク質をコードする核酸およびキメラ抗原受容体をコードする核酸を含むベクターであって、前記組換え抗 PD-1 抗原結合性タンパク質が、前記キメラ抗原受容体と同一ではない、ベクター。

24. 実施形態 23 に記載のベクターを含む、細胞。

25. 組換え抗 PD-1 抗原結合性タンパク質をコードする核酸およびキメラ抗原受容体をコードする核酸を含む細胞であって、前記組換え抗 PD-1 抗原結合性タンパク質が、前記キメラ抗原受容体と同一ではない、細胞。

10

26. 組換え抗 PD-1 抗原結合性タンパク質およびキメラ抗原受容体を含む細胞であって、前記組換え抗 PD-1 抗原結合性タンパク質が、前記キメラ抗原受容体と同一ではない、細胞。

27. 前記キメラ抗原受容体が PD-1 に特異的に結合するものではない、実施形態 23 から 26 のいずれか一項に記載のベクターまたは細胞。

28. 前記組換え抗 PD-1 抗原結合性タンパク質が抗体である、実施形態 23 から 27 のいずれか一項に記載のベクターまたは細胞。

29. 前記組換え抗 PD-1 抗原結合性タンパク質がヒト抗体である、実施形態 23 から 28 のいずれか一項に記載のベクターまたは細胞。

30. 前記組換え抗 PD-1 抗原結合性タンパク質が、インタクトな Ig、Fab、F(ab')₂、Fv、または scFv である、実施形態 23 から 29 のいずれか一項に記載のベクターまたは細胞。

20

31. 前記組換え抗 PD-1 抗原結合性タンパク質が PD-1 アゴニストである、実施形態 23 から 30 のいずれか一項に記載のベクターまたは細胞。

32. 前記組換え抗 PD-1 抗原結合性タンパク質が PD-1 アンタゴニストである、実施形態 23 から 30 のいずれか一項に記載のベクターまたは細胞。

33. 前記組換え抗 PD-1 抗原結合性タンパク質が分泌可能タンパク質である、実施形態 23 から 32 のいずれか一項に記載のベクターまたは細胞。

34. 前記組換え抗 PD-1 抗原結合性タンパク質が、実施形態 1 に記載の抗原結合領域を含む、実施形態 23 から 33 のいずれか一項に記載のベクターまたは細胞。

30

35. 前記キメラ抗原受容体が CD-19 に特異的に結合する、実施形態 23 から 34 のいずれか一項に記載のベクターまたは細胞。

36. 前記キメラ抗原受容体がヒト T 細胞膜に挿入されることができる、実施形態 23 から 35 のいずれか一項に記載のベクターまたは細胞。

37. 前記細胞が T 細胞である、実施形態 24 から 36 のいずれか一項に記載の細胞。

38. 実施形態 23 から 37 のいずれか一項に記載のベクターまたは細胞を含む、医薬組成物。

39. 医薬上許容され得る担体をさらに含む、実施形態 38 に記載の医薬組成物。

40. 対象における T 細胞応答を上昇させる方法であって、治療上有効量の、実施形態 23 から 37 のいずれか一項に記載のベクターまたは細胞、または実施形態 38 もしくは 39 の医薬組成物を前記対象に投与することを含み、前記組換え抗 PD-1 抗原結合性タンパク質が PD-1 アンタゴニストである、方法。

40

41. 前記組換え抗 PD-1 抗原結合性タンパク質が、PD-1 によって媒介されるシグナル伝達を阻害する、低下させる、調節する、または消失させる、実施形態 40 に記載の方法。

42. 対象における T 細胞応答を低下させる方法であって、治療上有効量の実施形態 23 から 37 のいずれか一項に記載のベクターまたは細胞、または実施形態 38 もしくは 39 に記載の医薬組成物を、前記対象に投与することを含み、前記組換え抗 PD-1 抗原結合性タンパク質が PD-1 アゴニストである、方法。

43. PD-1 - 陽性疾患を有する対象を治療する方法であって、治療上有効量の、実施

50

形態 2 3 から 3 7 のいずれか一項に記載のベクターまたは細胞、または実施形態 3 8 もしくは 3 9 に記載の医薬組成物を、前記対象に投与することを含む、方法。

4 4 . P D 1 - 陽性疾患を有する対象を治療する方法であって、前記対象の少なくとも 1 つの T 細胞に、組換え抗 P D - 1 抗原結合性タンパク質をコードする核酸およびキメラ抗原受容体をコードする核酸を形質導入することを含み、前記組換え抗 P D - 1 抗原結合性タンパク質が、前記キメラ抗原受容体と同一ではない、方法。

4 5 . 前記キメラ抗原受容体が P D - 1 に特異的に結合するものではない、実施形態 4 4 に記載の方法。

4 6 . 前記 P D 1 - 陽性疾患が癌である、実施形態 4 2 から 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

4 7 . 実施形態 2 3 から 3 7 のいずれか一項に記載のベクターまたは細胞、または実施形態 3 8 もしくは 3 9 に記載の医薬組成物の、P D 1 リガンドへの P D 1 の結合を阻害することによる P D 1 - 陽性疾患の治療のための、使用。

4 8 . 前記 P D 1 - 陽性疾患が癌である、実施形態 4 7 に記載の使用。

4 9 . 実施形態 2 3 から 3 7 のいずれか一項に記載のベクターまたは細胞、または実施形態 3 8 もしくは 3 9 に記載の医薬組成物の、P D - 1 シグナル経路を阻害することによる免疫調節のための、使用。

5 0 . 実施形態 5 に記載の抗原結合性タンパク質、実施形態 2 3 から 3 7 のいずれか一項に記載のベクターまたは細胞、または実施形態 3 8 もしくは 3 9 に記載の医薬組成物の、自己免疫疾患の治療のための使用であって、前記組換え抗 P D - 1 抗原結合性タンパク質が P D - 1 アゴニストである、使用。

5 1 . 前記抗 P D - 1 抗原結合性タンパク質およびキメラ抗原受容体の少なくとも 1 つが治療薬と接合している、実施形態 2 3 から 3 7 のいずれか一項に記載のベクターまたは細胞。

5 2 . 前記治療薬が、薬物、毒素、放射性同位元素、タンパク質、またはペプチドである、実施形態 5 1 に記載のベクターまたは細胞。

5 3 . 前記抗原結合性タンパク質または前記組換え抗 P D - 1 抗原結合性タンパク質が P D - 1 アゴニストであり、前記 P D 1 - 陽性疾患が自己免疫疾患である、実施形態 1 7 および 4 2 から 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

参考文献

Brentjens, R. J., M. L. Davila, et al. (2013). "CD19-targeted T cells rapidly induce molecular remissions in adults with chemotherapy-refractory acute lymphoblastic leukemia." Sci Transl Med 5(177): 177ra138.

Brentjens, R. J., J. B. Latouche, et al. (2003). "Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15." Nat Med 9(3): 279-286.

Brentjens, R. J., E. Santos, et al. (2007). "Genetically targeted T cells eradicate systemic acute lymphoblastic leukemia xenografts." Clin Cancer Res 13 (18 Pt 1): 5426-5435.

Davila, M. L., I. Riviere, et al. (2014). "Efficacy and toxicity management of 19-28z CAR T cell therapy in B cell acute lymphoblastic leukemia." Sci Transl Med 6(224): 224ra225.

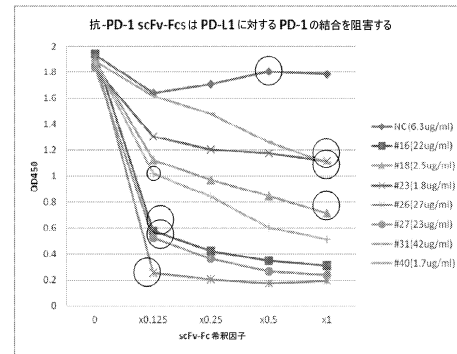
10

20

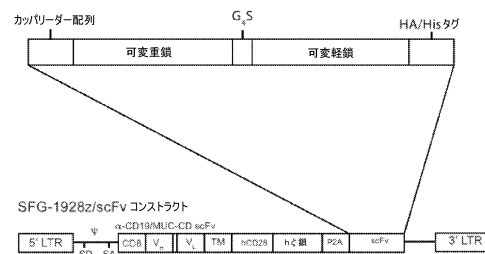
30

40

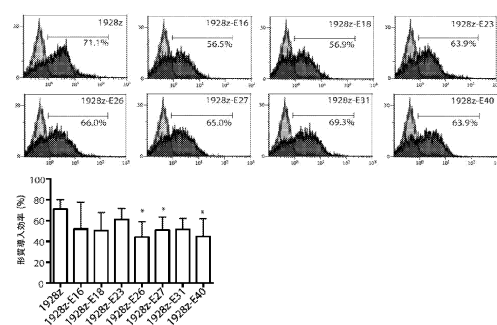
【 図 2 B 】



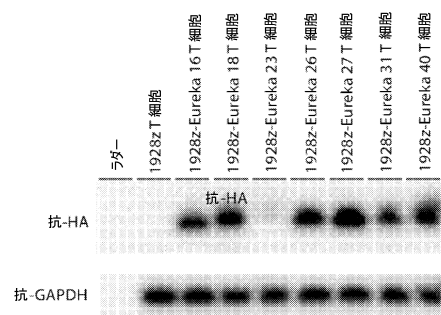
【圖 3】



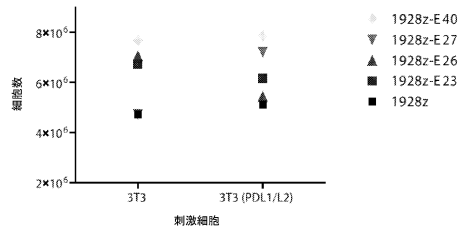
【 図 6 】



【圖 7】



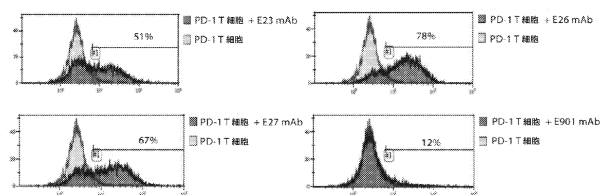
【図 8】



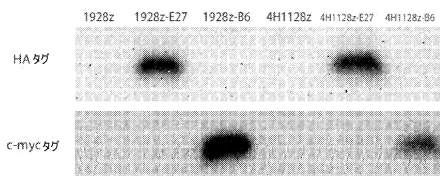
【図 9】

	LV						HV					
	CDR1	CDR2	CDR3				CDR1	CDR2	CDR3			
#16	QSISSY	1	AAS	QQSYSTPLT	2	GFTSSSYW	3	IKQDGSEK	4	ARIGGWSYDM	5	
#18	SSNIGAGYA	12	TNN	QSYDSSLGVI	13	GYTLLEL	14	FDPEDGET	15	ARAYMGFDQ	16	
#23	SSNIGNNA	23	YND	AAWDDSVNGYV	24	GYTFRFG	25	ISVNNNT	26	ARVMYGRADQ	27	
#26	NIGSKS	34	YDS	QVVDNNSGVV	35	RNFSSYA	36	ISGSGT	37	ARVYSSYYOV	38	
#27	NIGSKS	34	YDS	QVWDSSDYV	45	GFTSSYA	46	ISGSGST	47	ARVYSSMFDS	48	
#31	NIGSKS	34	YDS	QVWDSSDHYV	55	GFTSSYA	46	ISGSGST	47	ARVYSSYDIA	56	
#40	RSNIGENT	63	SNH	AAWDDRLNGYV	64	GYTFNTY	65	IGACKGDT	66	ARSQGVFDQ	67	
#36	RBNIGSNT	74	RNN	ATWDDSLNEIV	75	GYTFTRYG	76	ISGYNGNT	77	ARHGYGYHGD	78	
#37	SSNIGAGYV	85	HNN	QSYDSSLGQWV	86	GFTFKDY	87	ISTSGNSV	88	ARSPQHSYDQ	89	
#19	NIGSKS	96	YDS	QVWASDTHPYVI	97	GFTSSYA	46	ISGSGST	47	ARVYSSYTDV	98	
#14	SSNIGYNY	105	RNN	TSWDDSLGQV	106	GNAFTNY	107	INPBGDTLT	108	ARGYAYGSGFDM	109	
#47	QSVSNW	116	AAS	QGSYSTPIT	117	GYTFSSY	118	INPNTGGS	119	ARGDVYDDE	120	
#46	NIGSKS	34	YDS	QVWDINDHYV	127	GFTSSYA	46	ISGSGST	47	ARSQASFMID	128	
#42	NIGSKS	34	YDS	QVWDSSSDQGV	135	GFTSSYA	46	IOTGGGT	136	ARGTGYDGDQ	137	

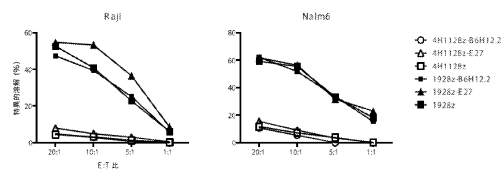
【図 10】



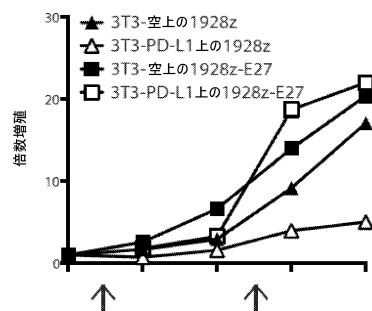
【図 12 C】



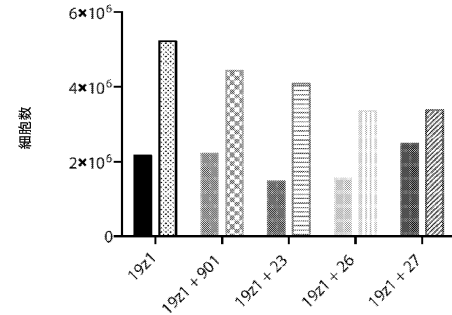
【図 12 D】



【図 13 A】



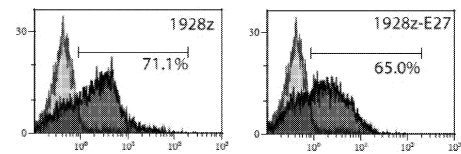
【図 11】



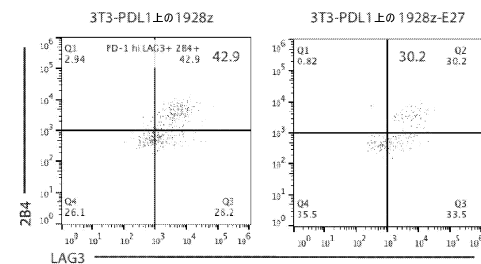
【図 12 A】



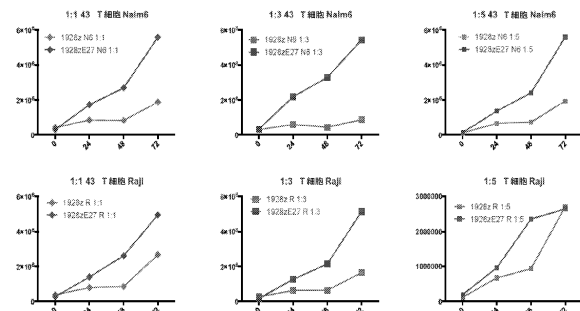
【図 12 B】



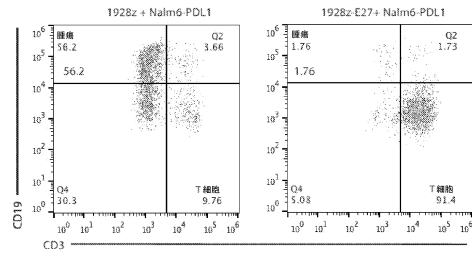
【図 13 B】



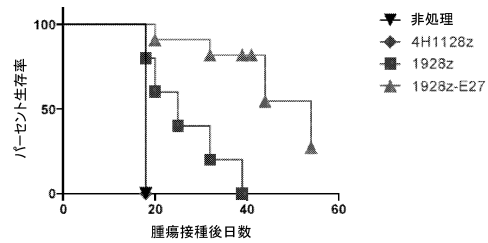
【図 13 C】



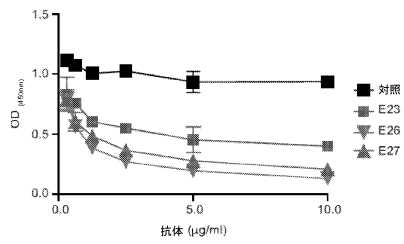
【図13D】



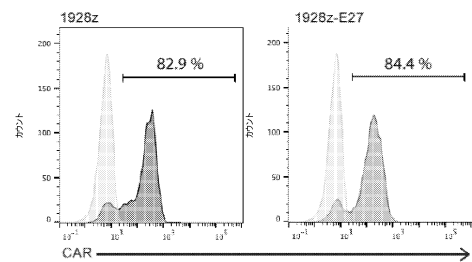
【図14】



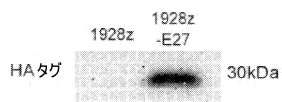
【図15A】



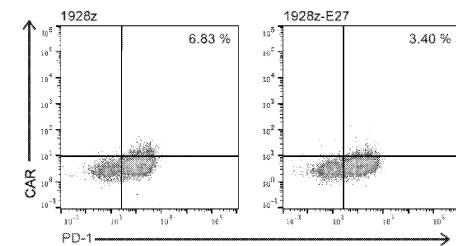
【図16A】



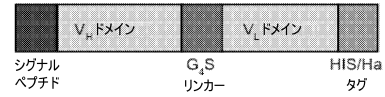
【図16B】



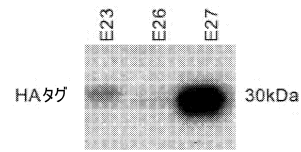
【図16C】



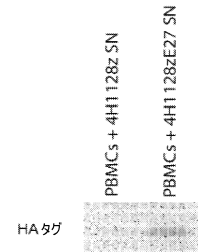
【図15B】



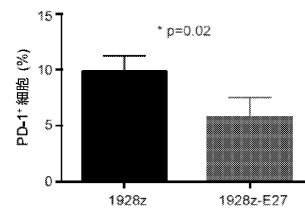
【図15C】



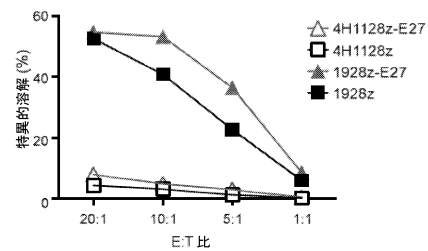
【図15D】



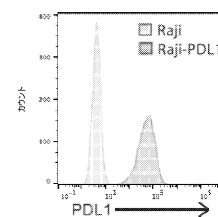
【図16D】



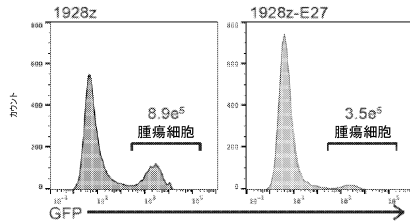
【図16E】



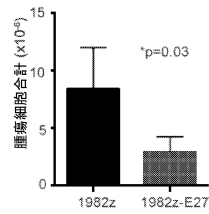
【図17A】



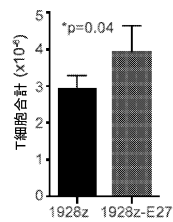
【図17B】



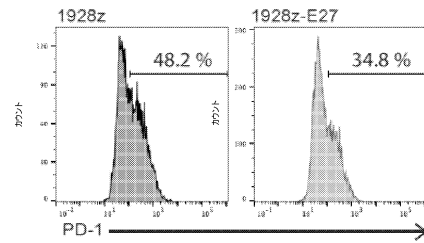
【図17C】



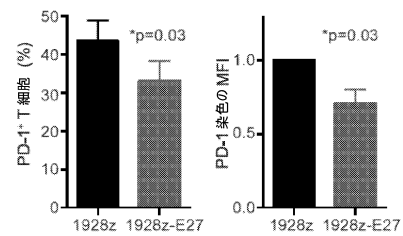
【図17D】



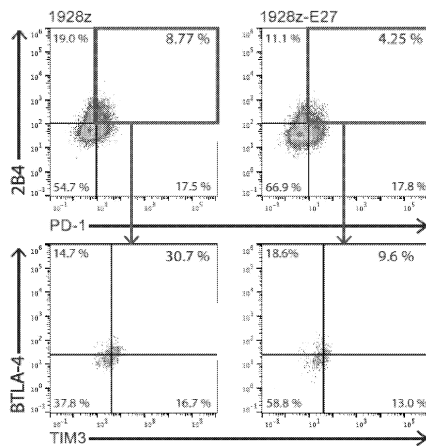
【図17E】



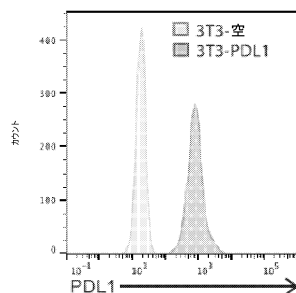
【図17F】



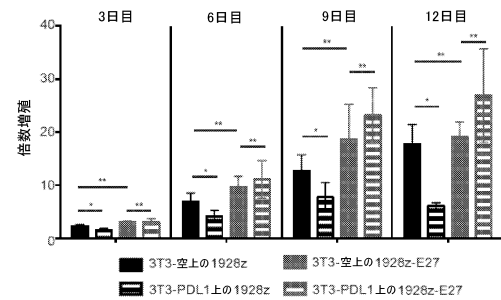
【図17G】



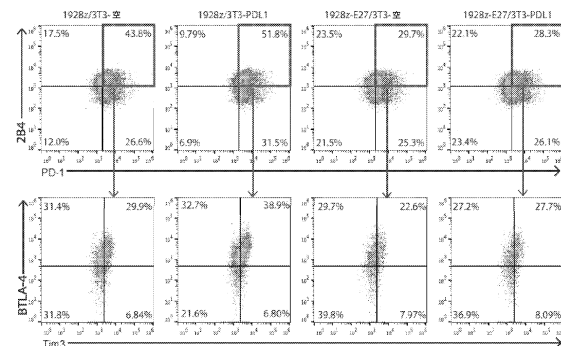
【図18A】



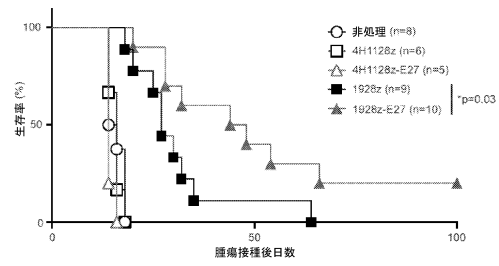
【図18B】



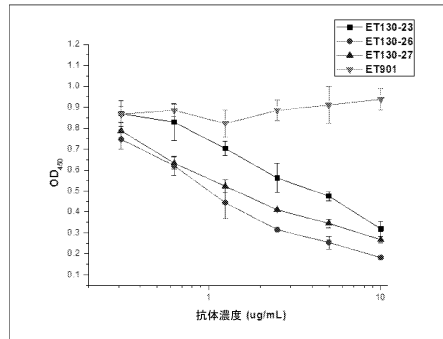
【図18C】



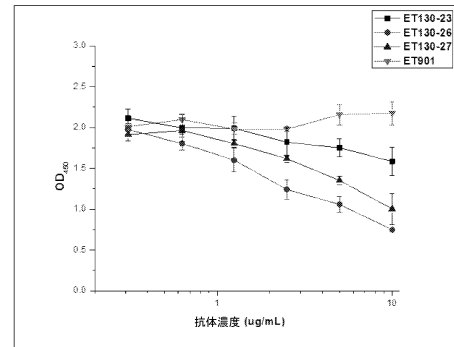
【図 19】



【図 20】



【図 21】



【配列表】

0006974311000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)		C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)		C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)		C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)		C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)		C 1 2 N 5/10	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)		C 1 2 N 15/13	
C 1 2 N 15/62 (2006.01)		C 1 2 N 15/62	Z
C 1 2 N 15/63 (2006.01)		C 1 2 N 15/63	Z

前置審査

- (74)代理人 100139594
弁理士 山口 健次郎
- (74)代理人 100090251
弁理士 森田 憲一
- (72)発明者 プレンチェンス, レニエ ジェイ .
アメリカ合衆国, 0 7 0 7 8 ニュージャージー州, ショート ヒルズ, オールド ショート ヒルズ ロード 1 4 0
- (72)発明者 ジャクソン, ホリー ジェイン
アメリカ合衆国, 0 7 0 3 0 ニュージャージー州, ホーボーケン, グランド ストリート 1 3 3, アpartment 4
- (72)発明者 リュー, チェン
アメリカ合衆国, 9 4 6 0 8 カリフォルニア州, エメリービル, コモドア ドライブ 4, # D 3 3 4

審査官 白井 美香保

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 1 4 / 1 3 4 1 6 5 (WO, A 1)
CLINICAL CANCER RESEARCH, 2013年, Vol.19, No.20, pp.5636-5646
BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY, 2010年, Vol.151, pp.37-46

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 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 / B I O S I S / M E D L I N E / W P I D S / E M B A S E (S T N)