

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-506922

(P2021-506922A)

(43) 公表日 令和3年2月22日 (2021.2.22)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 T	4 C 0 7 6
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 Z N A E	4 C 0 8 5
A 6 1 K 9/08 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 U	4 H 0 4 5
A 6 1 K 47/12 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 47/22 (2006.01)	A 6 1 K 9/08	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 75 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2020-534482 (P2020-534482)	(71) 出願人	516174219
(86) (22) 出願日	平成30年12月21日 (2018.12.21)		江蘇恒瑞医薬股▲ふん▼有限公司
(85) 翻訳文提出日	令和2年8月18日 (2020.8.18)		中華人民共和国222047江蘇省連雲港市經濟技術開發区昆侖山路7号
(86) 国際出願番号	PCT/CN2018/122534	(71) 出願人	516174208
(87) 国際公開番号	W02019/120269		上海恒瑞医薬有限公司
(87) 国際公開日	令和1年6月27日 (2019.6.27)		SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD
(31) 優先権主張番号	201711408330.4		中華人民共和国200245上海市閘行区文井路279号
(32) 優先日	平成29年12月22日 (2017.12.22)		NO. 279 WENJING ROAD, MINHANG DISTRICT, SHANGHAI 200245, CHINA
(33) 優先権主張国・地域又は機関	中国 (CN)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 LAG-3抗体医薬組成物およびその使用

(57) 【要約】

開示されるのは、リンパ球 - 活性化遺伝子 3 (LAG-3) 抗体医薬組成物およびその使用である。医薬組成物は酢酸緩衝液またはヒスチジン塩緩衝液中にLAG-3抗体またはその抗原結合フラグメントを含む。医薬組成物はまた糖類、非イオン性界面活性剤および他の添加物も含み得る。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

L A G - 3 抗体またはその抗原結合フラグメントおよび緩衝液を含む医薬組成物であって、ここで緩衝液が酢酸緩衝液、ヒスチジン緩衝液、クエン酸緩衝液、コハク酸緩衝液および T r i s 緩衝液からなる群から選択される、医薬組成物。

【請求項 2】

酢酸緩衝液が酢酸 - 酢酸ナトリウム緩衝液から選択され、ヒスチジン緩衝液がヒスチジン - 塩酸緩衝液およびヒスチジン - 酢酸緩衝液からなる群から選択され、クエン酸緩衝液がクエン酸 - クエン酸ナトリウム緩衝液であり、コハク酸緩衝液がコハク酸 - コハク酸ナトリウム緩衝液であり、好ましくは、緩衝液がヒスチジン - 塩酸緩衝液または酢酸 - 酢酸ナトリウム緩衝液である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 3】

L A G - 3 抗体またはその抗原結合フラグメントの濃度が 1 mg / ml ~ 9 0 mg / ml、好ましくは 4 0 mg / ml ~ 6 0 mg / ml、より好ましくは 5 0 mg / ml である、請求項 1 または 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

緩衝液が約 5 . 0 ~ 6 . 5、好ましくは約 5 . 0 ~ 6 . 0 の p H を有する、請求項 1 ~ 3 の何れかに記載の医薬組成物。

【請求項 5】

緩衝液の濃度が 5 mM ~ 3 0 mM、好ましくは 1 0 mM ~ 3 0 mM である、請求項 1 ~ 4 の何れかに記載の医薬組成物。

20

【請求項 6】

さらにアジュバントを含み、該アジュバントが糖類および界面活性剤からなる群から選択される 1 以上である、請求項 1 ~ 5 の何れかに記載の医薬組成物。

【請求項 7】

糖類が二糖、好ましくはトレハロース、スクロース、マンニトールまたはソルビトール、より好ましくはスクロースである、請求項 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

スクロースの濃度が 3 0 mg / ml ~ 9 0 mg / ml、好ましくは 6 0 mg / ml ~ 9 0 mg / ml、より好ましくは 7 5 mg / ml である、請求項 7 に記載の医薬組成物。

30

【請求項 9】

界面活性剤がポリソルベートであり、ここで、ポリソルベートがポリソルベート 8 0 およびポリソルベート 2 0 からなる群から選択される、好ましくはポリソルベート 8 0 である、請求項 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

界面活性剤の濃度が 0 . 0 2 mg / ml ~ 0 . 8 mg / ml、好ましくは 0 . 2 mg / ml ~ 0 . 6 mg / ml、より好ましくは 0 . 3 mg / ml ~ 0 . 5 mg / ml である、請求項 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

次の i) または ii) に示す成分を含む、請求項 1 ~ 10 の何れかに記載の医薬組成物：

i) (a) 1 mg / ml ~ 9 0 mg / ml L A G - 3 抗体またはその抗原結合フラグメント、(b) 5 mM ~ 3 0 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム緩衝液、p H は約 5 . 0 ~ 6 . 5、(c) 3 0 mg / ml ~ 9 0 mg / ml スクロースおよび(d) 0 . 0 2 mg / ml ~ 0 . 8 mg / ml ポリソルベート 8 0 ; または

40

ii) (a) 1 mg / ml ~ 9 0 mg / ml L A G - 3 抗体またはその抗原結合フラグメント、(b) 5 mM ~ 3 0 mM ヒスチジン - 塩酸緩衝液、p H は約 5 . 0 ~ 6 . 5、(c) 3 0 mg / ml ~ 9 0 mg / ml スクロースまたはトレハロースおよび(d) 0 . 0 5 mg / ml ~ 0 . 6 mg / ml ポリソルベート 8 0、

好ましくは(e) 4 0 mg / ml ~ 8 0 mg / ml L A G - 3 抗体またはその抗原結合フラグメント、(f) 1 0 mM ~ 3 0 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム緩衝液、p H は約 5 . 2 ~ 5 . 8、(g) 7 0 mg / ml ~ 8 0 mg / ml スクロースおよび(h) 0 . 4 mg / ml ~ 0 . 5 mg / ml ポリソルベート

50

ト 8 0

を含む；または

(e) 4 5 mg / ml ~ 6 0 mg / ml L A G - 3 抗体またはその抗原結合フラグメント、(f) 1 0 mM ~ 3 0 mM ヒスチジン - 塩酸緩衝液、p H は約 5 . 5 ~ 6 . 0、(g) 6 0 mg / ml ~ 9 0 mg / ml スクロースまたはトレハロースおよび(h) 0 . 2 mg / ml ~ 0 . 6 mg / ml ポリソルベート 8 0

を含む、医薬組成物。

【請求項 1 2】

ヒト化 L A G - 3 抗体は、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含み、ここで、重鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号 2 1、配列番号 2 3、配列番号 2 4 または配列番号 2 5 の何れかに示すとおりであるかまたは該配列が配列番号 2 1、配列番号 2 3、配列番号 2 4 または配列番号 2 5 と少なくとも 8 5 % 配列同一性を有する；および軽鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号 2 2、配列番号 2 6、配列番号 2 7 または配列番号 2 8 の何れかに示すとおりであるかまたは該配列が配列番号 2 2、配列番号 2 6、配列番号 2 7 または配列番号 2 8 と少なくとも 8 5 % 配列同一性を有する、請求項 1 ~ 1 1 の何れかに記載の医薬組成物。

10

【請求項 1 3】

(a) 1 ~ 9 0 mg / ml L A G - 3 抗体またはその抗原結合フラグメント、(b) 5 mM ~ 3 0 mM 酢酸 - 酢酸緩衝液、p H は約 5 . 0 ~ 6 . 5、(c) 3 0 mg / ml ~ 9 0 mg / ml スクロースおよび(d) 0 . 0 2 mg / ml ~ 0 . 8 mg / ml ポリソルベート 8 0；

20

好ましくは：

(e) 4 0 mg / ml ~ 8 0 mg / ml L A G - 3 抗体またはその抗原結合フラグメント、(f) 1 0 mM ~ 3 0 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム緩衝液、p H は約 5 . 2 ~ 5 . 8、(g) 7 0 mg / ml ~ 8 0 mg / ml のスクロースおよび(h) 0 . 4 mg / ml ~ 0 . 5 mg / ml ポリソルベート 8 0；

より好ましくは：

(i) 約 5 0 mg / ml L A G - 3 抗体またはその抗原結合フラグメント、(j) 1 0 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム緩衝液、p H は約 5 . 5、(k) 約 7 5 mg / ml スクロースおよび(l) 約 0 . 4 mg / ml ポリソルベート 8 0

を含む、請求項 1 2 に記載の医薬組成物。

30

【請求項 1 4】

ヒト化 L A G - 3 抗体が次に示す重鎖可変領域および軽鎖可変領域の組み合わせ：

- 1) 配列番号 2 1 の重鎖可変領域および配列番号 2 2 の軽鎖可変領域；
- 2) 配列番号 2 1 の重鎖可変領域および配列番号 2 6 の軽鎖可変領域；
- 3) 配列番号 2 1 の重鎖可変領域および配列番号 2 7 の軽鎖可変領域；
- 4) 配列番号 2 1 の重鎖可変領域および配列番号 2 8 の軽鎖可変領域；
- 5) 配列番号 2 3 の重鎖可変領域および配列番号 2 2 の軽鎖可変領域；
- 6) 配列番号 2 3 の重鎖可変領域および配列番号 2 6 の軽鎖可変領域；
- 7) 配列番号 2 3 の重鎖可変領域および配列番号 2 7 の軽鎖可変領域；
- 8) 配列番号 2 3 の重鎖可変領域および配列番号 2 8 の軽鎖可変領域；
- 9) 配列番号 2 4 の重鎖可変領域および配列番号 2 2 の軽鎖可変領域；
- 1 0) 配列番号 2 4 の重鎖可変領域および配列番号 2 6 の軽鎖可変領域；
- 1 1) 配列番号 2 4 の重鎖可変領域および配列番号 2 7 の軽鎖可変領域；
- 1 2) 配列番号 2 4 の重鎖可変領域および配列番号 2 8 の軽鎖可変領域；
- 1 3) 配列番号 2 5 の重鎖可変領域および配列番号 2 2 の軽鎖可変領域；
- 1 4) 配列番号 2 5 の重鎖可変領域および配列番号 2 6 の軽鎖可変領域；
- 1 5) 配列番号 2 5 の重鎖可変領域および配列番号 2 7 の軽鎖可変領域；および
- 1 6) 配列番号 2 5 の重鎖可変領域および配列番号 2 8 の軽鎖可変領域

40

を含む、請求項 1 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 5】

ヒト化 L A G - 3 抗体が重鎖定常領域および軽鎖定常領域を含み、ここで、重鎖定常領

50

域は好ましくは配列番号 38 に示され、軽鎖定常領域が好ましくは配列番号 39 に示される、請求項 12 ~ 14 の何れかに記載の医薬組成物。

【請求項 16】

ヒト化 LAG-3 抗体の重鎖アミノ酸配列が配列番号 40 に示すとおりであるかまたは該配列が配列番号 40 と少なくとも 95 % 配列同一性を有し、軽鎖アミノ酸配列が配列番号 41 に示すとおりであるかまたは該配列が配列番号 41 と少なくとも 95 % 配列同一性を有する、請求項 15 に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

ヒト化 LAG-3 抗体が重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含み、ここで、重鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号 29、配列番号 31、配列番号 32 または配列番号 33 の何れかに示すとおりであるかまたは該配列が配列番号 29、配列番号 31、配列番号 32 または配列番号 33 と少なくとも 85 % 配列同一性を有する；および軽鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号 30、配列番号 34、配列番号 35、配列番号 36 または配列番号 37 の何れかに示すとおりであるかまたは該配列が配列番号 30、配列番号 34、配列番号 35、配列番号 36 または配列番号 37 と少なくとも 85 % 配列同一性を有する、請求項 1 ~ 11 の何れかに記載の医薬組成物。

【請求項 18】

(a) 1 mg/ml ~ 90 mg/ml LAG-3 抗体またはその抗原結合フラグメント、(b) 5 mM ~ 30 mM ヒスチジン - 塩酸緩衝液、pH は約 5.0 ~ 6.5、(c) 30 mg/ml ~ 90 mg/ml スクロースまたはトレハロースおよび (d) 0.05 mg/ml ~ 0.6 mg/ml ポリソルベート 80

を含む；好ましくは

(e) 4.5 mg/ml ~ 60 mg/ml LAG-3 抗体またはその抗原結合フラグメント、(f) 約 1.0 mM ~ 3.0 mM ヒスチジン - 塩酸緩衝液、pH は約 5.5 ~ 6.0、(g) 60 mg/ml ~ 90 mg/ml スクロースまたはトレハロースおよび (h) 0.2 mg/ml ~ 0.6 mg/ml ポリソルベート 80

を含む；より好ましくは：

(i) 約 50 mg/ml LAG-3 抗体またはその抗原結合フラグメント、(j) 1.0 mM ヒスチジン - 塩酸緩衝液、pH は約 6.0、(k) 約 75 mg/ml スクロース、(l) 約 0.3 mg/ml ポリソルベート 80

を含む、請求項 17 に記載の医薬組成物。

【請求項 19】

ヒト化 LAG-3 抗体が次に示す重鎖可変領域および軽鎖可変領域の組み合わせ：

- 1) 配列番号 29 の重鎖可変領域および配列番号 30 の軽鎖可変領域；
- 2) 配列番号 29 の重鎖可変領域および配列番号 34 の軽鎖可変領域；
- 3) 配列番号 29 の重鎖可変領域および配列番号 35 の軽鎖可変領域；
- 4) 配列番号 29 の重鎖可変領域および配列番号 36 の軽鎖可変領域；
- 5) 配列番号 29 の重鎖可変領域および配列番号 37 の軽鎖可変領域；
- 6) 配列番号 31 の重鎖可変領域および配列番号 30 の軽鎖可変領域；
- 7) 配列番号 31 の重鎖可変領域および配列番号 34 の軽鎖可変領域；
- 8) 配列番号 31 の重鎖可変領域および配列番号 35 の軽鎖可変領域；
- 9) 配列番号 31 の重鎖可変領域および配列番号 36 の軽鎖可変領域；
- 10) 配列番号 31 の重鎖可変領域および配列番号 37 の軽鎖可変領域；
- 11) 配列番号 32 の重鎖可変領域および配列番号 30 の軽鎖可変領域；
- 12) 配列番号 32 の重鎖可変領域および配列番号 34 の軽鎖可変領域；
- 13) 配列番号 32 の重鎖可変領域および配列番号 35 の軽鎖可変領域；
- 14) 配列番号 32 の重鎖可変領域および配列番号 36 の軽鎖可変領域；
- 15) 配列番号 32 の重鎖可変領域および配列番号 37 の軽鎖可変領域；
- 16) 配列番号 33 の重鎖可変領域および配列番号 30 の軽鎖可変領域；
- 17) 配列番号 33 の重鎖可変領域および配列番号 34 の軽鎖可変領域；

18) 配列番号33の重鎖可変領域および配列番号35の軽鎖可変領域；
 19) 配列番号33の重鎖可変領域および配列番号36の軽鎖可変領域；および
 20) 配列番号33の重鎖可変領域および配列番号37の軽鎖可変領域
 を含む、請求項18に記載の医薬組成物。

【請求項20】

ヒト化LAG-3抗体が重鎖定常領域および軽鎖定常領域を含み、ここで、重鎖定常領域が好ましくは配列番号38に示され、軽鎖定常領域が好ましくは配列番号39に示される、請求項17～19の何れかに記載の医薬組成物。

【請求項21】

ヒト化LAG-3抗体の重鎖アミノ酸配列が配列番号42に示すとおりであるかまたは該配列が配列番号42と少なくとも95%配列同一性を有するおよび軽鎖アミノ酸配列が配列番号43に示すとおりであるかまたは該配列が配列番号43と少なくとも95%配列同一性を有する、請求項20に記載の医薬組成物。

【請求項22】

LAG-3抗体またはその抗原結合フラグメントと緩衝液を混合することを含み、ここで、該緩衝液が酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液、ヒスチジン-塩酸緩衝液、クエン酸-クエン酸ナトリウム緩衝液、コハク酸-コハク酸ナトリウム緩衝液およびTris緩衝液、好ましくは酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液またはヒスチジン-塩酸緩衝液からなる群から選択される、請求項1～21の何れかに記載の医薬組成物を製造する方法。

【請求項23】

請求項1～21の何れかに記載の医薬組成物を凍結乾燥する工程を含む、LAG-3抗体またはその抗原結合フラグメントを含む凍結乾燥製剤を製造する方法。

【請求項24】

凍結乾燥が前凍結、一次乾燥および二次乾燥の工程を順次含む、請求項23に記載のLAG-3抗体を含む凍結乾燥製剤またはその抗原結合フラグメントを製造する方法。

【請求項25】

一次乾燥が-5～-20、好ましくは-10の温度で実施される、請求項24に記載のLAG-3抗体またはその抗原結合フラグメントを含む凍結乾燥製剤を製造する方法。

【請求項26】

請求項23～25の何れかに記載の方法により製造された、LAG-3抗体またはその抗原結合フラグメントを含む凍結乾燥製剤。

【請求項27】

凍結乾燥製剤が請求項1～21の何れかに記載の医薬組成物を得るために再構成され得ることを特徴とする、LAG-3抗体またはその抗原結合フラグメントを含む凍結乾燥製剤。

【請求項28】

請求項26または27に記載の凍結乾燥製剤を再構成する工程を含み、ここで、再構成のための溶媒が好ましくは注射用水である、LAG-3抗体またはその抗原結合フラグメントを含む再構成溶液を製造する方法。

【請求項29】

請求項28に記載の方法により製造される、LAG-3抗体またはその抗原結合フラグメントを含む、再構成溶液。

【請求項30】

次の成分：

i)(a) 40mg/ml～80mg/ml LAG-3抗体またはその抗原結合フラグメント、(b) 10mM～30mM 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液、pHは約5.2～5.8、(c) 70mg/ml～80mg/ml スクロースおよび(d) 0.4mg/ml～0.5mg/ml ポリソルベート80；または

ii)(a) 45mg/ml～60mg/ml LAG-3抗体またはその抗原結合フラグメント、(b

10

20

30

40

50

) 1 0 mM ~ 3 0 mM ヒスチジン - 塩酸緩衝液、p H は約 5 . 5 ~ 6 . 0 、 (c) 6 0 mg / ml ~ 9 0 mg / ml スクロースまたはトレハロースおよび (d) 0 . 2 mg / ml ~ 0 . 6 mg / ml ポリソルベート 8 0

を含む、請求項 2 9 に記載の L A G - 3 抗体または抗原結合フラグメントを含む、再構成溶液。

【請求項 3 1】

医薬として使用するための、請求項 1 ~ 2 1 の何れかに記載の医薬組成物または請求項 2 6 または 2 7 に記載の凍結乾燥製剤または請求項 2 9 または 3 0 に記載の再構成溶液。

【請求項 3 2】

L A G - 3 と関連する疾患または状態の処置用医薬の製造のための請求項 1 ~ 2 1 の何れかに記載の医薬組成物または請求項 2 6 または 2 7 に記載の凍結乾燥製剤または請求項 2 9 または 3 0 に記載の再構成溶液の使用であって、ここで、該疾患または状態が病原性 T 細胞が関与する疾患または状態、好ましくは癌であり、該癌が卵巣癌、黒色腫、前立腺癌、腸癌、胃癌、食道癌、乳癌、肺癌、腎臓癌、膵臓癌、子宮癌、肝臓癌、膀胱癌、子宮頸癌、口腔癌、脳癌、精巣癌、皮膚癌、甲状腺癌ならびに骨髄腫、慢性および急性白血病を含む血液系腫瘍からなる群から選択される、使用。

【請求項 3 3】

治療有効量の請求項 1 ~ 2 1 の何れかに記載の医薬組成物または請求項 2 6 または 2 7 に記載の凍結乾燥製剤または請求項 2 9 または 3 0 に記載の再構成溶液を、それを必要とする患者に投与することを含む、L A G - 3 と関連する疾患または状態を処置または予防する方法であって、ここで、疾患または状態が病原性 T 細胞が関与する疾患または状態、好ましくは癌であり、該癌が卵巣癌、黒色腫、前立腺癌、腸癌、胃癌、食道癌、乳癌、肺癌、腎臓癌、膵臓癌、子宮癌、肝臓癌、膀胱癌、子宮頸癌、口腔癌、脳癌、精巣癌、皮膚癌、甲状腺癌ならびに骨髄腫、慢性および急性白血病を含む血液系腫瘍からなる群から選択される、方法。

【請求項 3 4】

請求項 1 ~ 2 1 の何れかに記載の医薬組成物または請求項 2 6 または 2 7 に記載の凍結乾燥製剤または請求項 2 9 または 3 0 に記載の再構成溶液を含む容器を含む、製品。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

発明の分野

本発明は医薬製剤の分野に属し、特に、本発明は、L A G - 3 抗体およびその抗原結合フラグメントを含む医薬組成物および医薬としてのその使用に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

発明の背景

リンパ球活性化遺伝子 - 3 は L A G - 3 または C D 2 1 5 としても知られ、免疫細胞の種々の機能および生存サイクルを負に制御できる免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーである。研究により、L A G - 3 がウイルス感染、自己免疫性疾患および腫瘍誘導免疫系機能不全に重要な役割を有することが示されている。L A G - 3 の機能に影響することは、これら疾患の進展中の免疫機能不全状態を改善し、その疾病の予後を改善する。

【0 0 0 3】

免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーとして、L A G - 3 は細胞外ドメイン、膜貫通領域および細胞質ドメインの 3 領域からなる。Triebel et al., in 1990 (J Exp Med, 1990, 171 (5): 1393-405) により最初に発見された成熟 L A G - 3 分子は、4 7 0 アミノ酸からなり、相対的分子量は 7 0 kDa である。研究者らは、L A G - 3 が、C T L A - 4 および P D - 1 と同様、負の共刺激分子であり、その活性化がリンパ球の機能を負に制御できることを発見した。構造的に、L A G - 3 は C D 4 と密接に関係するが、その機能は C D 4 のものと逆である。具体的に、L A G - 3 分子は C D 4 分子と高い類似性を有

し、両者ともMHC-II(主要組織適合遺伝子複合体)クラス分子に結合できる。しかしながら、LAG-3のMHC-II分子への結合親和力はCD4のものより高い。故に、LAG-3はCD4+Tリンパ球により誘導されるTCR活性化を妨害し、Tリンパ球の活性化を阻害する(Curr Opin Immunol, 2009, 21(2):179-86; Eur J Immunol, 2003, 33 (4): 970-9)。インビトロ研究で、LAG-3はTリンパ球の抗原誘発増殖を阻害できることが示されている。LAG-3遮断は、Tリンパ球の活性化および増殖を改善し、1型Tヘルパー細胞(Th1)により分泌されるサイトカインを改善する。Huang et al.は、LAG-3のレベルが活性化CD4+Treg細胞表面で顕著に増加しており、LAG-3がCD4+Tregが最大免疫抑制性効果の発揮を可能にする必須条件であったことを示している(Immunity, 2004, 21 (4): 503-13)。さらに、抗LAG-3抗体はまたCD4+およびCD8+Tリンパ球のホメオスタシスを維持し、LAG-3遮断は、CD8+Tリンパ球の殺腫瘍細胞能を顕著に増加させる(J Clin Invest, 2007, 117 (11): 3383-92)。疾患におけるいくつかの研究で、LAG-3が疾患の発症および進行制御に重要な役割を有することも判明している。Gandhi et al.は、ヒトリンパ腫組織のTリンパ球におけるLAG-3発現レベルがTリンパ球機能不全と相関し、LAG-3+Tリンパ球のクリアランスが、リンパ球による腫瘍細胞排除の能力を顕著に増加できることを確認した(Blood, 2006, 108 (7): 2280-9)。この結果は、LAG-3が免疫細胞表面の重要な阻害性分子であり、Tリンパ球に顕著な負の制御効果を有することを示す。

10

【0004】

LAG-3は主にTリンパ球、Bリンパ球、NK細胞、Treg細胞およびDC細胞で発現される(Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94 (11): 5744-9. Eur J Immunol, 2005, 35 (7): 2081-8; J Immunol, 2009, 182 (4): 1885-91)。LAG-3は、免疫抑制性分子のクラスであり、TCRの共受容体を構成する要素の一つである。それは、Tリンパ球により誘導されるTCR活性化を阻害し、Tリンパ球活性化に負の制御性の役割を有する。ある疾患において、LAG-3の発現が増加し、対応する免疫抑制が観察された。Gandhi et al.は、LAG-3がホジキンリンパ腫を有する患者の血液および腫瘍組織からのリンパ球で高度に発現され、特異的CD8+T細胞の機能が腫瘍組織で明らかに障害され、LAG-3陽性T細胞が除かれたら、抗腫瘍機能が回復し、サイトカイン分泌が増加したことを発見した。著者らは、LAG-3発現が特定のT細胞による免疫機能の抑制と関係し、LAG-3分子機能阻害が、T細胞の抗腫瘍効果を増強でき、よって、LAG-3分子が腫瘍免疫療法の潜在的標的であり得ると考えた(血液, 2006, 108 (7): 2280-9)。

20

30

【0005】

現在、BMSおよびNovartisなどのいくつかの多国籍製薬企業が、T細胞の抗腫瘍効果を増大し、抗原特異的T細胞応答の刺激により患者自身の腫瘍に対する免疫応答を最大化し、さらに腫瘍細胞を致死させる目的を達成する、LAG-3に対するモノクローナル抗体の研究を続けている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

しかしながら、抗体薬物は、その大きな分子量、複雑な構造、分解され易さ、重合化し易さまたは好ましくない化学修飾のために、不安定である。抗体薬物の安定な製剤の研究は、抗体を投与に適するようにするため、貯蔵およびその後の使用までの安定性を維持するために特に重要である。

40

【0007】

多数の企業がLAG3抗体およびその製剤を現在開発しているが(例えば、WO2018204374、WO2010019570、WO2014008218、WO9530750、WO2004078928、WO2008132601、WO2014140180、WO2015138920など)、新規LAG-3抗体製剤に絞った研究はほとんどない。投与により適するLAG-3を含む医薬組成物(製剤)を開発する必要がある。

【課題を解決するための手段】

50

【 0 0 0 8 】

発明の要約

本発明は、LAG-3抗体またはその抗原結合フラグメントおよび緩衝液を含む医薬組成物を提供し、該緩衝液は酢酸緩衝液、ヒスチジン緩衝液、クエン酸緩衝液、コハク酸緩衝液またはTris緩衝液からなる群から選択される。

【 0 0 0 9 】

別の実施態様において、医薬組成物に含まれる酢酸緩衝液は酢酸 - 酢酸ナトリウム緩衝液、酢酸 - 酢酸カリウム緩衝液、酢酸 - ヒスチジン塩緩衝液、酢酸 - 酢酸カルシウム緩衝液および酢酸 - 酢酸マグネシウム緩衝液から選択され、好ましくは酢酸 - 酢酸ナトリウム緩衝液である。

10

【 0 0 1 0 】

別の実施態様において、医薬組成物に含まれるヒスチジン緩衝液はヒスチジン - 塩酸緩衝液、ヒスチジン - 酢酸緩衝液、ヒスチジン - リン酸緩衝液、ヒスチジン - 硫酸緩衝液から選択され、好ましくはヒスチジン - 塩酸緩衝液である。

【 0 0 1 1 】

別の実施態様において、医薬組成物に含まれるクエン酸緩衝液はクエン酸 - クエン酸ナトリウム緩衝液であり、コハク酸緩衝液はコハク酸 - コハク酸ナトリウム緩衝液である。

【 0 0 1 2 】

別の実施態様において、医薬組成物に含まれるLAG-3抗体またはその抗原結合フラグメントの濃度は約1mg/ml～90mg/ml、好ましくは約10mg/ml～90mg/ml、好ましくは約20mg/ml～90mg/ml、好ましくは約30mg/ml～90mg/ml、好ましくは約40mg/ml～90mg/ml、好ましくは約50mg/ml～90mg/ml、好ましくは約60mg/ml～90mg/ml、好ましくは約70mg/ml～90mg/ml、好ましくは約80mg/ml～90mg/ml、好ましくは約10mg/ml～80mg/ml、好ましくは約20mg/ml～80mg/ml、好ましくは約30mg/ml～80mg/ml、好ましくは約40mg/ml～80mg/ml、好ましくは約50mg/ml～80mg/ml、好ましくは約60mg/ml～80mg/ml、好ましくは約70mg/ml～80mg/ml、好ましくは約10mg/ml～70mg/ml、好ましくは約20mg/ml～70mg/ml、好ましくは約30mg/ml～70mg/ml、好ましくは約40mg/ml～70mg/ml、好ましくは約50mg/ml～70mg/ml、好ましくは約60mg/ml～70mg/ml、好ましくは約10mg/ml～60mg/ml、好ましくは約20mg/ml～60mg/ml、好ましくは約30mg/ml～60mg/ml、好ましくは約40mg/ml～60mg/ml、好ましくは約50mg/ml～60mg/ml、好ましくは約10mg/ml～50mg/ml、好ましくは約20mg/ml～50mg/ml、好ましくは約30mg/ml～50mg/ml、好ましくは約40mg/ml～50mg/ml、好ましくは約10mg/ml～40mg/ml、好ましくは約20mg/ml～40mg/ml、好ましくは約30mg/ml～40mg/ml、好ましくは約10mg/ml～30mg/ml、好ましくは約20mg/ml～30mg/mlである。非限定的例として、LAG-3抗体またはその抗原結合フラグメントの濃度は約40mg/ml、41mg/ml、42mg/ml、43mg/ml、44mg/ml、45mg/ml、46mg/ml、47mg/ml、48mg/ml、49mg/ml、50mg/ml、51mg/ml、52mg/ml、53mg/ml、54mg/ml、55mg/ml、56mg/ml、57mg/ml、58mg/ml、59mg/mlまたは60mg/ml、最も好ましくは50mg/mlである。

20

30

40

【 0 0 1 3 】

別の実施態様において、緩衝液の濃度は約5mM～30mM、好ましくは約10mM～30mM、好ましくは約15mM～30mM、好ましくは約20mM～30mM、好ましくは約25mM～30mM、好ましくは約5mM～25mM、好ましくは約10mM～25mM、好ましくは約15mM～25mM、好ましくは約20mM～25mM、好ましくは約5mM～20mM、好ましくは約10mM～15mMであり、非限定的例として、緩衝液の濃度は約10mM、12mM、14mM、16mM、18mM、20mM、22mM、24mM、26mM、28mMまたは30mM、最も好ましくは10mMである。

【 0 0 1 4 】

別の実施態様において、医薬組成物に含まれる緩衝液のpH値は約5.0～7.5、好ま

50

しくは約 5.5 ~ 7.5、好ましくは約 6.0 ~ 7.5、好ましくは約 6.5 ~ 7.5、好ましくは約 7.0 ~ 7.5、好ましくは約 5.0 ~ 7.0、好ましくは約 5.5 ~ 7.0、好ましくは約 6.0 ~ 7.0、好ましくは約 6.5 ~ 7.0、好ましくは約 5.0 ~ 6.5、好ましくは約 5.5 ~ 6.5、好ましくは約 6.0 ~ 6.5、好ましくは約 5.0 ~ 6.0、好ましくは約 5.5 ~ 6.0、好ましくは約 5.0 ~ 5.5 である。非限定的例として、緩衝液の pH 値はあるいは約 5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、より好ましくは約 5.5 ~ 6.0、なおさらに好ましくは 5.5 または 6.0 である。

【0015】

さらに、別の実施態様において、医薬組成物は、糖類および界面活性剤の 1 以上から選択されるアジュバントをさらに含む。

10

【0016】

別の実施態様において、糖類は二糖、好ましくはトレハロース、スクロース、マンニトールまたはソルビトール、より好ましくはスクロースである。別の実施態様において、医薬組成物に含まれる糖類の濃度は、約 30 mg/ml ~ 90 mg/ml、好ましくは約 60 mg/ml ~ 90 mg/ml、35 mg/ml ~ 90 mg/ml、好ましくは約 40 mg/ml ~ 90 mg/ml、好ましくは約 45 mg/ml ~ 90 mg/ml、好ましくは約 50 mg/ml ~ 90 mg/ml、好ましくは約 55 mg/ml ~ 90 mg/ml、好ましくは約 60 mg/ml ~ 90 mg/ml、好ましくは約 65 mg/ml ~ 90 mg/ml、好ましくは約 70 mg/ml ~ 90 mg/ml、好ましくは約 75 mg/ml ~ 90 mg/ml、好ましくは約 80 mg/ml ~ 90 mg/ml、好ましくは約 85 mg/ml ~ 90 mg/ml、好ましくは約 30 mg/ml ~ 85 mg/ml、好ましくは約 35 mg/ml ~ 85 mg/ml、好ましくは約 40 mg/ml ~ 85 mg/ml、好ましくは約 45 mg/ml ~ 85 mg/ml、好ましくは約 50 mg/ml ~ 85 mg/ml、好ましくは約 55 mg/ml ~ 85 mg/ml、好ましくは約 60 mg/ml ~ 85 mg/ml、好ましくは約 65 mg/ml ~ 85 mg/ml、好ましくは約 70 mg/ml ~ 85 mg/ml、好ましくは約 75 mg/ml ~ 85 mg/ml、好ましくは約 80 mg/ml ~ 85 mg/ml、好ましくは約 30 mg/ml ~ 80 mg/ml、好ましくは約 35 mg/ml ~ 80 mg/ml、好ましくは約 40 mg/ml ~ 80 mg/ml、好ましくは約 45 mg/ml ~ 80 mg/ml、好ましくは約 50 mg/ml ~ 80 mg/ml、好ましくは約 55 mg/ml ~ 80 mg/ml、好ましくは約 60 mg/ml ~ 80 mg/ml、好ましくは約 65 mg/ml ~ 80 mg/ml、好ましくは約 70 mg/ml ~ 80 mg/ml、好ましくは約 75 mg/ml ~ 80 mg/ml、好ましくは約 30 mg/ml ~ 75 mg/ml、好ましくは約 35 mg/ml ~ 75 mg/ml、好ましくは約 40 mg/ml ~ 75 mg/ml、好ましくは約 45 mg/ml ~ 75 mg/ml、好ましくは約 50 mg/ml ~ 75 mg/ml、好ましくは約 55 mg/ml ~ 75 mg/ml、好ましくは約 60 mg/ml ~ 75 mg/ml、好ましくは約 65 mg/ml ~ 75 mg/ml、好ましくは約 70 mg/ml ~ 75 mg/ml、好ましくは約 30 mg/ml ~ 70 mg/ml、好ましくは約 35 mg/ml ~ 70 mg/ml、好ましくは約 40 mg/ml ~ 70 mg/ml、好ましくは約 45 mg/ml ~ 70 mg/ml、好ましくは約 50 mg/ml ~ 70 mg/ml、好ましくは約 55 mg/ml ~ 70 mg/ml、好ましくは約 60 mg/ml ~ 70 mg/ml、好ましくは約 65 mg/ml ~ 70 mg/ml、好ましくは約 30 mg/ml ~ 65 mg/ml、好ましくは約 35 mg/ml ~ 65 mg/ml、好ましくは約 40 mg/ml ~ 65 mg/ml、好ましくは約 45 mg/ml ~ 65 mg/ml、好ましくは約 50 mg/ml ~ 65 mg/ml、好ましくは約 55 mg/ml ~ 65 mg/ml、好ましくは約 60 mg/ml ~ 65 mg/ml、好ましくは約 30 mg/ml ~ 60 mg/ml、好ましくは約 35 mg/ml ~ 60 mg/ml、好ましくは約 40 mg/ml ~ 60 mg/ml、好ましくは約 45 mg/ml ~ 60 mg/ml、好ましくは約 50 mg/ml ~ 60 mg/ml、好ましくは約 55 mg/ml ~ 60 mg/ml、好ましくは約 30 mg/ml ~ 55 mg/ml、好ましくは約 35 mg/ml ~ 55 mg/ml、好ましくは約 40 mg/ml ~ 55 mg/ml、好ましくは約 45 mg/ml ~ 55 mg/ml、好ましくは約 50 mg/ml ~ 55 mg/ml、好ましくは約 30 mg/ml ~ 50 mg/ml、好ましくは約 35 mg/ml ~ 50 mg/ml、好ましくは約 40 mg/ml ~ 50 mg/ml、好ましくは約 45 mg/ml ~ 50 mg/ml、好ましくは約 30 mg/ml ~ 45 mg/ml、好ましくは約 35 mg/ml ~ 45 mg/ml、好ましくは約 40 mg/ml ~ 45 mg/ml、好ましくは約 30 mg/ml ~ 40 mg/ml、好ましくは約 35 mg/ml ~ 40 mg/ml、好ましくは約 30 mg/ml ~ 35 mg/ml であり、非限定的例として、医

20

30

40

50

薬組成物に含まれる糖類の濃度は約 60 mg/ml、65 mg/ml、70 mg/ml、75 mg/ml、80 mg/ml、85 mg/ml または 90 mg/ml、より好ましくは約 70 mg/ml ~ 80 mg/ml、最も好ましくは 75 mg/ml である。

【0017】

別の実施態様において、医薬組成物界面活性剤をさらに含む。界面活性剤は、ポリソルベート 20、ポリソルベート 80、ポリヒドロキシ炭化水素、Triton、ドデシルスルホン酸ナトリウム、ラウリルスルホン酸ナトリウム、ナトリウムオクチルグリコシド、ラウリル - スルホベタイン、ミリスチル - スルホベタイン、リノレイル - スルホベタイン、ステアリル - スルホベタイン、ラウリル - サルコシン、ミリスチル - サルコシン、リノレイル - サルコシン、ステアリル - サルコシン、リノレイル - ベタイン、ミリスチル - ベタイン、セチル - ベタイン、ラウロアミドプロピル - ベタイン、ココアミドプロピル - ベタイン、リノールアミドプロピル - ベタイン、ミリストアミドプロピル - ベタイン、パルミトイルプロピル - ベタイン、イソステアロアミドプロピル - ベタイン、ミリストアミドプロピル - ジメチルアミン、パルミトイルプロピル - ジメチルアミン、イソステアロアミドプロピル - ジメチルアミン、ナトリウムメチルココシル、ナトリウムメチルオレイルタウリン、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、エチレンおよびプロピレングリコールのコポリマーなどからなる群から選択され得る。好ましい界面活性剤はポリソルベート 80 またはポリソルベート 20、より好ましくはポリソルベート 80 である。

10

20

【0018】

別の実施態様において、医薬組成物に含まれる界面活性剤の濃度は、約 0.02 mg/ml ~ 0.8 mg/ml、好ましくは約 0.1 mg/ml ~ 0.8 mg/ml、好ましくは約 0.2 mg/ml ~ 0.8 mg/ml、好ましくは約 0.3 mg/ml ~ 0.8 mg/ml、好ましくは約 0.4 mg/ml ~ 0.8 mg/ml、好ましくは約 0.5 mg/ml ~ 0.8 mg/ml、好ましくは約 0.6 mg/ml ~ 0.8 mg/ml、好ましくは約 0.7 mg/ml ~ 0.8 mg/ml、好ましくは約 0.02 mg/ml ~ 0.7 mg/ml、好ましくは約 0.1 mg/ml ~ 0.7 mg/ml、好ましくは約 0.2 mg/ml ~ 0.7 mg/ml、好ましくは約 0.3 mg/ml ~ 0.7 mg/ml、好ましくは約 0.4 mg/ml ~ 0.7 mg/ml、好ましくは約 0.5 mg/ml ~ 0.7 mg/ml、好ましくは約 0.6 mg/ml ~ 0.7 mg/ml、好ましくは約 0.02 mg/ml ~ 0.6 mg/ml、好ましくは約 0.1 mg/ml ~ 0.6 mg/ml、好ましくは約 0.2 mg/ml ~ 0.6 mg/ml、好ましくは約 0.3 mg/ml ~ 0.6 mg/ml、好ましくは約 0.4 mg/ml ~ 0.6 mg/ml、好ましくは約 0.5 mg/ml ~ 0.6 mg/ml、好ましくは約 0.02 mg/ml ~ 0.5 mg/ml、好ましくは約 0.1 mg/ml ~ 0.5 mg/ml、好ましくは約 0.2 mg/ml ~ 0.5 mg/ml、好ましくは約 0.3 mg/ml ~ 0.5 mg/ml、好ましくは約 0.4 mg/ml ~ 0.5 mg/ml、好ましくは約 0.02 mg/ml ~ 0.4 mg/ml、好ましくは約 0.1 mg/ml ~ 0.4 mg/ml、好ましくは約 0.2 mg/ml ~ 0.4 mg/ml、好ましくは約 0.3 mg/ml ~ 0.4 mg/ml、好ましくは約 0.02 mg/ml ~ 0.3 mg/ml、好ましくは約 0.1 mg/ml ~ 0.3 mg/ml、好ましくは約 0.2 mg/ml ~ 0.3 mg/ml、好ましくは約 0.02 mg/ml ~ 0.2 mg/ml、好ましくは約 0.1 mg/ml ~ 0.2 mg/ml、好ましくは約 0.02 mg/ml ~ 0.1 mg/ml である。非限定的例として、医薬組成物に含まれる界面活性剤の濃度は約 0.2 mg/ml、0.25 mg/ml、0.3 mg/ml、0.35 mg/ml、0.4 mg/ml、0.45 mg/ml または 0.5 mg/ml、より好ましくは約 0.3 mg/ml ~ 0.5 mg/ml である。

30

40

【0019】

ある実施態様において、医薬組成物は下記 i) または ii) の成分を含む。

i) (a) 1 mg/ml ~ 90 mg/ml LAG-3 抗体またはその抗原結合フラグメント、(b) 5 mM ~ 30 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム緩衝液、pH は約 5.0 ~ 6.5、(c) 30 mg/ml ~ 90 mg/ml スクロースおよび (d) 0.02 mg/ml ~ 0.8 mg/ml ポリソルベート 80；好ましくは、医薬組成物は：

(e) 40 mg/ml ~ 80 mg/ml LAG-3 抗体またはその抗原結合フラグメント、(f) 10 mM ~ 30 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム緩衝液、pH は約 5.2 ~ 5.8、(g) 70 mg/ml ~ 80 mg/ml スクロースおよび (h) 0.4 mg/ml ~ 0.5 mg/ml ポリソルベート 80 を含

50

む；または

iii) (a) 1 mg/ml ~ 90 mg/ml L A G - 3 抗体またはその抗原結合フラグメント、(b) 5 mM ~ 30 mM ヒスチジン - 塩酸緩衝液、pH は約 5.0 ~ 6.5、(c) 30 mg/ml ~ 90 mg/ml スクロースまたはトレハロースおよび (d) 0.05 mg/ml ~ 0.6 mg/ml ポリソルベート 80 を含む；好ましくは、医薬組成物は；

(e) 45 mg/ml ~ 60 mg/ml L A G - 3 抗体またはその抗原結合フラグメント、(f) 10 mM ~ 30 mM ヒスチジン - 塩酸緩衝液、pH は約 5.5 ~ 6.0、(g) 60 mg/ml ~ 90 mg/ml スクロースおよび (h) 0.2 mg/ml ~ 0.6 mg/ml ポリソルベート 80 を含む。

【0020】

ある実施態様において、医薬組成物に含まれる L A G - 3 抗体またはその抗原結合フラグメントは、それぞれ配列番号 9、配列番号 10 および配列番号 11 に示す重鎖 HCDR1、HCDR2 および HCDR3；およびそれぞれ配列番号 15、配列番号 16 および配列番号 17 に示す軽鎖 LCDR1、LCDR2 および LCDR3 を含む。

【0021】

別の実施態様において、医薬組成物は；

(a) 1 mg/ml ~ 90 mg/ml L A G - 3 抗体またはその抗原結合フラグメント、(b) 5 mM ~ 30 mM 酢酸緩衝液、好ましくは pH は 5.0 ~ 6.5、(c) 30 mg/ml ~ 90 mg/ml スクロースおよび (d) 0.02 mg/ml ~ 0.8 mg/ml ポリソルベート 80 を含む。

【0022】

別の実施態様において、医薬組成物は；

(a) 40 mg/ml ~ 80 mg/ml L A G - 3 抗体またはその抗原結合フラグメント、(b) 10 mM ~ 30 mM 酢酸緩衝液、pH は約 5.0 ~ 6.0、(c) 60 mg/ml ~ 90 mg/ml スクロースおよび (d) 0.1 mg/ml ~ 0.5 mg/ml ポリソルベート 80 を含む。

【0023】

別の実施態様において、医薬組成物は；

(a) 50 mg/ml ~ 60 mg/ml L A G - 3 抗体またはその抗原結合フラグメント、(b) 10 mM ~ 30 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム緩衝液および pH は約 5.2 ~ 5.8、(c) 70 mg ~ 80 mg/ml スクロースおよび (d) 0.4 mg/ml ~ 0.5 mg/ml ポリソルベート 80 を含む。

【0024】

別の実施態様において、医薬組成物は；

(a) 約 50 mg/ml L A G - 3 抗体またはその抗原結合フラグメント、(b) 10 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム緩衝液、pH は約 5.5、(c) 約 75 mg/ml スクロースおよび (d) 約 0.4 mg/ml ポリソルベート 80 を含む。

【0025】

別の実施態様において、上記医薬組成物に含まれる L A G - 3 抗体またはその抗原結合フラグメントは、マウス抗体またはその抗原結合フラグメント、キメラ抗体またはその抗原結合フラグメント、ヒト化抗体またはその抗原結合フラグメントである。

【0026】

別の実施態様において、上記医薬組成物に含まれるマウス L A G - 3 抗体は、配列番号 5 に示す重鎖可変領域および配列番号 6 に示す軽鎖可変領域を含む。

【0027】

別の実施態様において、上記医薬組成物に含まれるヒト化 L A G - 3 抗体は、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含み、ここで、重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号 21、配列番号 23、配列番号 24 または配列番号 25 の何れかに示すとおりであるかまたはそれと少なくとも 85 % 配列同一性を有する；そして

軽鎖可変領域は配列番号 22、配列番号 26、配列番号 27 または配列番号 28 の何れか

10

20

30

40

50

に示すとおりであるかまたはそれと少なくとも 85% 配列同一性を有する。

【0028】

別の実施態様において、医薬組成物に含まれるLAG-3抗体の軽鎖可変領域は、配列番号22、配列番号26、配列番号27または配列番号28に示す軽鎖可変領域アミノ酸配列と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%配列同一性を有し、LAG-3抗体の重鎖可変領域アミノ酸配列は、配列番号21、配列番号23、配列番号24または配列番号25に示す重鎖可変領域アミノ酸配列と少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%配列同一性を有する。

10

【0029】

別の実施態様において、上記医薬組成物に含まれるLAG-3ヒト化抗体は、次に示す群から選択される重鎖可変領域と軽鎖可変領域の組み合わせを含む：

- 1) 配列番号21の重鎖可変領域および配列番号22の軽鎖可変領域；
- 2) 配列番号21の重鎖可変領域および配列番号26の軽鎖可変領域；
- 3) 配列番号21の重鎖可変領域および配列番号27の軽鎖可変領域；
- 4) 配列番号21の重鎖可変領域および配列番号28の軽鎖可変領域；
- 5) 配列番号23の重鎖可変領域および配列番号22の軽鎖可変領域；
- 6) 配列番号23の重鎖可変領域および配列番号26の軽鎖可変領域；
- 7) 配列番号23の重鎖可変領域および配列番号27の軽鎖可変領域；
- 8) 配列番号23の重鎖可変領域および配列番号28の軽鎖可変領域；
- 9) 配列番号24の重鎖可変領域および配列番号22の軽鎖可変領域；
- 10) 配列番号24の重鎖可変領域および配列番号26の軽鎖可変領域；
- 11) 配列番号24の重鎖可変領域および配列番号27の軽鎖可変領域；
- 12) 配列番号24の重鎖可変領域および配列番号28の軽鎖可変領域；
- 13) 配列番号25の重鎖可変領域および配列番号22の軽鎖可変領域；
- 14) 配列番号25の重鎖可変領域および配列番号26の軽鎖可変領域；
- 15) 配列番号25の重鎖可変領域および配列番号27の軽鎖可変領域；および
- 16) 配列番号25の重鎖可変領域および配列番号28の軽鎖可変領域。

20

【0030】

別の実施態様において、上記医薬組成物に含まれるヒト化LAG-3抗体は重鎖定常領域および軽鎖定常領域を含み、ここで、重鎖定常領域は好ましくは配列番号38に示され、軽鎖定常領域は好ましくは配列番号39に示される。

30

【0031】

別の実施態様において、上記医薬組成物に含まれるヒト化LAG-3抗体の重鎖は配列番号40に記載されるまたは配列番号40と少なくとも95%配列同一性を有し、軽鎖は配列番号41に記載されるまたは配列番号41と少なくとも95%配列同一性を有する。

【0032】

別の実施態様において、医薬組成物に含まれるLAG-3抗体の重鎖は、配列番号40に示す重鎖アミノ酸配列と95%、96%、97%、98%、99%または100%配列同一性を有し、LAG-3抗体の軽鎖アミノ酸配列は配列番号41に示す抗体軽鎖と少なくとも95%、96%、97%、98%、99%または100%配列同一性を有する。

40

【0033】

ある実施態様において、医薬組成物は50mg/ml LAG-3抗体Hu229-013および10mM 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液、pH5.5を含む。

【0034】

さらに他の実施態様において、医薬組成物は50mg/ml LAG-3抗体Hu229-013および10mM コハク酸-コハク酸ナトリウム緩衝液、pH6.0を含む。

【0035】

さらに他の実施態様において、医薬組成物は50mg/ml LAG-3抗体Hu229-

50

0 1 3 および 1 0 mM ヒスチジン - 塩酸緩衝液、p H 6 . 0 を含む。

【 0 0 3 6 】

さらに他の実施態様において、医薬組成物は 5 0 mg / ml L A G - 3 抗体 H u 2 2 9 - 0 1 3、1 0 mM コハク酸 - コハク酸ナトリウム、p H 6 . 0 および 0 . 1 mg / ml ポリソルベート 8 0 を含む。

【 0 0 3 7 】

さらに他の実施態様において、医薬組成物は 5 0 mg / ml L A G - 3 抗体 H u 2 2 9 - 0 1 3、1 0 mM コハク酸 - コハク酸ナトリウム、p H 6 . 0 および 7 0 mg / ml スクロースを含む。

【 0 0 3 8 】

さらに他の実施態様において、医薬組成物は 5 0 mg / ml L A G - 3 抗体 H u 2 2 9 - 0 1 3、1 0 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム、p H 5 . 5、6 0 mg / ml スクロースおよび 0 . 4 mg / ml ポリソルベート 8 0 を含む。

【 0 0 3 9 】

さらに他の実施態様において、医薬組成物は 5 0 mg / ml L A G - 3 抗体 H u 2 2 9 - 0 1 3、1 0 mM ヒスチジン - 酢酸、p H 6 . 0、6 0 mg / ml スクロースおよび 0 . 4 mg / ml ポリソルベート 8 0 を含む。

【 0 0 4 0 】

ある実施態様において、医薬組成物は 1 mg / ml L A G - 3 抗体 H u 2 2 9 - 0 1 3、1 0 ~ 3 0 mM ヒスチジン - 酢酸、p H 5 . 5、7 5 mg / ml スクロースおよび 0 . 2 mg / ml ポリソルベート 8 0 を含む。

【 0 0 4 1 】

さらに別の実施態様において、医薬組成物は 5 0 mg / ml L A G - 3 抗体 H u 2 2 9 - 0 1 3、1 0 ~ 3 0 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム、p H 5 . 2 ~ 5 . 8、7 5 mg / ml スクロースおよび 0 . 2 mg / ml ポリソルベート 8 0 を含む。

【 0 0 4 2 】

さらに他の実施態様において、医薬組成物は 6 0 mg / ml L A G - 3 抗体 H u 2 2 9 - 0 1 3、1 0 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム、p H 5 . 5、6 0 mg / ml スクロースおよび 0 . 4 mg / ml ポリソルベート 8 0 を含む。

【 0 0 4 3 】

さらに他の実施態様において、医薬組成物は 5 0 - 6 0 mg / ml L A - G 3 抗体 H u 2 2 9 - 0 1 3、1 0 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム、p H 5 . 5、3 0 ~ 9 0 mg / ml スクロースおよび 0 . 4 ~ 0 . 5 mg / ml ポリソルベート 8 0 を含む。

【 0 0 4 4 】

さらに他の実施態様において、医薬組成物は 5 0 mg / ml L A G - 3 抗体 H u 2 2 9 - 0 1 3、1 0 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム、p H 5 . 5、7 5 mg / ml スクロースおよび 0 . 4 mg / ml ポリソルベート 8 0 を含む。

【 0 0 4 5 】

他の実施態様において、医薬組成物に含まれる L A G - 3 抗体またはその抗原結合フラグメントはそれぞれ配列番号 1 2、配列番号 1 3 および配列番号 1 4 に示す H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3；およびそれぞれ配列番号 1 8、配列番号 1 9 および配列番号 2 0 に示す L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3 を含む。

【 0 0 4 6 】

別の実施態様において、医薬組成物は：

(a) 1 mg / ml ~ 9 0 mg / ml L A G - 3 抗体またはその抗原結合フラグメント、(b) 5 mM ~ 3 0 mM ヒスチジン - 塩酸緩衝液、p H は約 5 . 0 ~ 6 . 5、(c) 3 0 mg / ml ~ 9 0 mg / ml スクロースまたはトレハロースおよび (d) 0 . 0 5 mg / ml ~ 0 . 6 mg / ml ポリソルベート 8 0 を含む。

【 0 0 4 7 】

10

20

30

40

50

別の実施態様において、医薬組成物は：

(a) 45 mg/ml ~ 60 mg/ml LAG-3 抗体またはその抗原結合フラグメント、(b) 約 10 mM ~ 30 mM のヒスチジン - 塩酸ナトリウム緩衝液、pH は約 5.0 ~ 6.0、(c) 60 mg ~ 90 mg/ml スクロースまたはトレハロースおよび (d) 0.2 mg/ml ~ 0.6 mg/ml ポリソルベート 80 を含む。

【0048】

別の実施態様において、医薬組成物は：

(a) 約 50 mg/ml LAG-3 抗体またはその抗原結合フラグメント、(b) 10 mM ヒスチジン - 塩酸緩衝液、pH は約 5.0、(c) 約 75 mg/ml スクロースまたはトレハロースおよび (d) 約 0.3 mg/ml ポリソルベート 80 を含む。

10

【0049】

別の実施態様において、上記医薬組成物に含まれる LAG-3 抗体またはその抗原結合フラグメントはマウス抗体もしくはその抗原結合フラグメント、キメラ抗体もしくはその抗原結合フラグメントまたはヒト化抗体もしくはその抗原結合フラグメントである。

【0050】

別の実施態様において、上記医薬組成物に含まれるマウス LAG-3 抗体は、配列番号 7 に示す重鎖可変領域および配列番号 8 に示す軽鎖可変領域を含む。

【0051】

20

別の実施態様において、上記医薬組成物に含まれるヒト化 LAG-3 抗体は：配列番号 29、配列番号 31、配列番号 32 または配列番号 33 の一つまたはそれと少なくとも 85 % 配列同一性を有するアミノ酸配列から選択される重鎖可変領域配列および配列番号 30、配列番号 34、配列番号 35、配列番号 36 または配列番号 37 の一つまたはそれと少なくとも 85 % 配列同一性を有するアミノ酸配列から選択される軽鎖可変領域配列を含む。

【0052】

別の実施態様において、医薬組成物に含まれる LAG-3 抗体の軽鎖可変領域は配列番号 30、配列番号 34、配列番号 35、配列番号 36 または配列番号 37 に示す軽鎖可変領域アミノ酸配列と少なくとも 85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % 配列同一性を有し、LAG-3 抗体の重鎖可変領域は配列番号 29、配列番号 31、配列番号 32 または配列番号 33 に示す重鎖可変領域と少なくとも 85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % 配列同一性を有する。

30

【0053】

別の実施態様において、上記医薬組成物に含まれるヒト化 LAG-3 抗体は、次に示す群から選択される重鎖可変領域と軽鎖可変領域の組み合わせを含む：

- 1) 配列番号 29 の重鎖可変領域および配列番号 30 の軽鎖可変領域；
- 2) 配列番号 29 の重鎖可変領域および配列番号 34 の軽鎖可変領域；
- 3) 配列番号 29 の重鎖可変領域および配列番号 35 の軽鎖可変領域；
- 4) 配列番号 29 の重鎖可変領域および配列番号 36 の軽鎖可変領域；
- 5) 配列番号 29 の重鎖可変領域および配列番号 37 の軽鎖可変領域；
- 6) 配列番号 31 の重鎖可変領域および配列番号 30 の軽鎖可変領域；
- 7) 配列番号 31 の重鎖可変領域および配列番号 34 の軽鎖可変領域；
- 8) 配列番号 31 の重鎖可変領域および配列番号 35 の軽鎖可変領域；
- 9) 配列番号 31 の重鎖可変領域および配列番号 36 の軽鎖可変領域；
- 10) 配列番号 31 の重鎖可変領域および配列番号 37 の軽鎖可変領域；
- 11) 配列番号 32 の重鎖可変領域および配列番号 30 の軽鎖可変領域；

40

50

- 1 2) 配列番号 3 2 の重鎖可変領域および配列番号 3 4 の軽鎖可変領域；
- 1 3) 配列番号 3 2 の重鎖可変領域および配列番号 3 5 の軽鎖可変領域；
- 1 4) 配列番号 3 2 の重鎖可変領域および配列番号 3 6 の軽鎖可変領域；
- 1 5) 配列番号 3 2 の重鎖可変領域および配列番号 3 7 の軽鎖可変領域；
- 1 6) 配列番号 3 3 の重鎖可変領域および配列番号 3 0 の軽鎖可変領域；
- 1 7) 配列番号 3 3 の重鎖可変領域および配列番号 3 4 の軽鎖可変領域；
- 1 8) 配列番号 3 3 の重鎖可変領域および配列番号 3 5 の軽鎖可変領域；
- 1 9) 配列番号 3 3 の重鎖可変領域および配列番号 3 6 の軽鎖可変領域；および
- 2 0) 配列番号 3 3 の重鎖可変領域および配列番号 3 7 の軽鎖可変領域。

【 0 0 5 4 】

10

別の実施態様において、上記医薬組成物に含まれるキメラ抗体またはヒト化抗体の重鎖は、さらにヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3 または I g G 4 由来の重鎖定常領域またはそのバリエーションを含み、好ましくはヒト I g G 4 由来の重鎖定常領域またはそのバリエーションを含み、最も好ましくは配列番号 3 8 に示す重鎖定常領域からなり；そしてキメラ抗体またはヒト化抗体の軽鎖はヒト、鎖由来の軽鎖定常領域またはそのバリエーションを含み、好ましくは配列番号 3 9 に示す軽鎖定常領域からなる。

【 0 0 5 5 】

別の実施態様において、上記医薬組成物に含まれるヒト化 L A G - 3 抗体の重鎖は配列番号 4 2 に示すまたはそれと少なくとも 9 5 % 配列同一性を有し、軽鎖は配列番号 4 3 に示すまたはそれと少なくとも 9 5 % 配列同一性を有する。

20

【 0 0 5 6 】

別の実施態様において、医薬組成物に含まれる L A G - 3 抗体の重鎖は、配列番号 4 2 に示す重鎖アミノ酸配列と 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % 配列同一性を有し、L A G - 3 抗体の軽鎖アミノ酸配列は配列番号 4 3 に示す抗体軽鎖と少なくとも 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % または 1 0 0 % 配列同一性を有する。

【 0 0 5 7 】

ある実施態様において、医薬組成物は 5 0 mg / ml L A - G 3 抗体 H u 3 0 3 - 0 0 5 および 1 0 mM ヒスチジン - 塩酸緩衝液、p H 6 . 0 を含む。

【 0 0 5 8 】

ある実施態様において、医薬組成物は 5 0 mg / ml L A G - 3 抗体 H u 3 0 3 - 0 0 5 および 1 0 mM ヒスチジン - 塩酸緩衝液、p H 5 . 0 を含む。

30

【 0 0 5 9 】

ある実施態様において、医薬組成物は 5 0 mg / ml L A G - 3 抗体 H u 3 0 3 - 0 0 5 および 1 0 mM ヒスチジン - 塩酸緩衝液、p H 6 . 5 を含む。

【 0 0 6 0 】

さらに他の実施態様において、医薬組成物は 5 0 mg / ml L A G - 3 抗体 H u 3 0 3 - 0 0 5 および 1 0 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム緩衝液、p H 5 . 5 を含む。

【 0 0 6 1 】

さらに他の実施態様において、医薬組成物は 5 0 mg / ml L A G - 3 抗体 H u 3 0 3 - 0 0 5、1 0 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム緩衝液、p H 5 . 5、7 5 mg / ml スクロースおよび 0 . 2 mg / ml ポリソルベート 8 0 を含む。

40

【 0 0 6 2 】

さらに他の実施態様において、医薬組成物は 5 0 mg / ml L A G - 3 抗体 H u 3 0 3 - 0 0 5、1 0 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム緩衝液、p H 5 . 5、7 5 mg / ml トレハロースおよび 0 . 2 mg / ml ポリソルベート 8 0 を含む。

【 0 0 6 3 】

さらに他の実施態様において、医薬組成物は 5 0 mg / ml L A G - 3 抗体 H u 3 0 3 - 0 0 5、1 0 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム緩衝液、p H 5 . 5 および 0 . 4 mg / ml ポリソルベート 8 0 を含む。

【 0 0 6 4 】

50

さらに他の実施態様において、医薬組成物は 50 mg/ml LAG-3 抗体 Hu303-005、10 mM ヒスチジン - 塩酸緩衝液、pH 6.0、75 mg/ml スクロースおよび 0.4 mg/ml ポリソルベート 80 を含む。

【0065】

さらに他の実施態様において、医薬組成物は 50 mg/ml LAG-3 抗体 Hu303-005、10 mM ヒスチジン - 塩酸緩衝液、pH 6.5、75 mg/ml スクロースおよび 0.4 mg/ml ポリソルベート 80 を含む。

【0066】

さらに他の実施態様において、医薬組成物は 50 mg/ml LAG-3 抗体 Hu303-005、10 mM ヒスチジン - 塩酸緩衝液、pH 5.5、75 mg/ml スクロースおよび 0.4 mg/ml ポリソルベート 80 を含む。

10

【0067】

ある実施態様において、医薬組成物は 45 - 60 mg/ml LAG-3 抗体 Hu303-005、10 mM ヒスチジン - 塩酸緩衝液、pH 5.5、75 mg/ml スクロースおよび 0.2 - 0.6 mg/ml ポリソルベート 80 を含む。

【0068】

さらに他の実施態様において、医薬組成物は約 50 mg/ml LAG-3 抗体 Hu303-005、約 10 mM ヒスチジン - 塩酸緩衝液、約 pH 6.0、約 75 mg/ml スクロースおよび約 0.3 mg/ml ポリソルベート 80 を含む。

【0069】

20

本発明はまた、LAG-3 抗体または抗原結合フラグメントと薬学的に許容される添加物を混合することを含む、LAG-3 抗体を含む医薬組成物の製造方法も提供する。

【0070】

本発明はまた上記医薬組成物を凍結乾燥する工程を含む、LAG-3 抗体を含む凍結乾燥剤の製造方法を提供する。

【0071】

LAG-3 抗体を含む凍結乾燥剤を製造する方法の別の実施態様において、凍結乾燥は、前凍結、一次乾燥および二次乾燥の工程を含む。

【0072】

LAG-3 抗体を含む凍結乾燥剤を製造する方法の別の実施態様において、一次乾燥は、-5 乃至 -20、好ましくは -10 の温度で実施される。

30

【0073】

本発明はまた、LAG-3 抗体を含む凍結乾燥剤の前記製造方法により製造された LAG-3 抗体を含む凍結乾燥剤を提供する。

【0074】

ある実施態様において、凍結乾燥剤は、その安定性を 2 ~ 8 で少なくとも 3 か月、少なくとも 6 か月、少なくとも 12 か月、少なくとも 18 か月または少なくとも 24 か月維持する。ある実施態様において、凍結乾燥剤は、その安定性を 40 で少なくとも 7 日、少なくとも 14 日または少なくとも 28 日維持する。

【0075】

40

本発明はまた、上記凍結乾燥方法により製造した LAG-3 抗体を含む凍結乾燥剤を提供する。

【0076】

本発明はまた、凍結乾燥剤が上記医薬組成物を得るために再構成され得ることを特徴とする、LAG-3 抗体を含む凍結乾燥剤を提供する。

【0077】

本発明はまた、上記凍結乾燥剤を再構成する工程を含む、LAG-3 抗体を含む凍結乾燥剤から再構成された溶液を調製する方法であって、ここで、再構成のための溶媒が、注射用水、生理食塩水またはグルコース溶液から選択されるが、これらに限定されない方法を提供する。

50

【0078】

本発明はまた、LAG-3抗体を含む凍結乾燥製剤から再構成溶液を調製する方法により製造される、LAG-3抗体を含む凍結乾燥製剤から得られる再構成溶液を提供する。

【0079】

本発明はまたLAG-3抗体を含む再構成溶液も提供し、これは、次の成分をさらに含む：

(a) 1 ~ 90 mg/ml LAG-3抗体またはその抗原結合フラグメント、(b) 5 ~ 30 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム緩衝液、pHは約5.0 ~ 6.5、(c) 30 ~ 90 mg/ml スクロースおよび(d) 0.02 ~ 0.8 mg/ml ポリソルベート80。

【0080】

本発明はまたLAG-3抗体を含む再構成溶液も提供し、これは、次の成分をさらに含む：

(a) 40 ~ 80 mg/ml LAG-3抗体またはその抗原結合フラグメント、(b) 10 ~ 30 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム緩衝液、pHは約5.2 ~ 5.8、(c) 70 ~ 80 mg/ml スクロースおよび(d) 0.4 ~ 0.5 mg/ml ポリソルベート80。

【0081】

本発明はまたLAG-3抗体を含む再構成溶液も提供し、これは、次の成分をさらに含む：

(a) 50 mg/ml LAG-3抗体またはその抗原結合フラグメント、(b) 10 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム緩衝液、pHは約5.5、(c) 75 mg/ml スクロースおよび(d) 0.4 mg/ml ポリソルベート80。

【0082】

(a) 1 ~ 90 mg/ml LAG-3抗体またはその抗原結合フラグメント、(b) 5 ~ 30 mM ヒスチジン - 塩酸緩衝液、pHは約5.0 ~ 6.5、(c) 30 ~ 90 mg/ml スクロースおよび(d) 0.05 ~ 0.6 mg/ml ポリソルベート80。

【0083】

本発明はまたLAG-3抗体を含む再構成溶液も提供し、これは、次の成分をさらに含む：

(a) 45 ~ 60 mg/ml LAG-3抗体またはその抗原結合フラグメント、(b) 10 ~ 30 mM ヒスチジン - 塩酸緩衝液、pHは約5.5 ~ 6.0、(c) 60 ~ 80 mg/ml スクロースおよび(d) 0.2 ~ 0.6 mg/ml ポリソルベート80。

【0084】

本発明はまたLAG-3抗体を含む再構成溶液も提供し、これは、次の成分をさらに含む：

(a) 50 mg/ml LAG-3抗体またはその抗原結合フラグメント、(b) 10 mM ヒスチジン - 塩酸緩衝液、pHは約6.0、(c) 75 mg/ml スクロースおよび(d) 0.3 mg/ml ポリソルベート80。

【0085】

本発明は、さらにここに記載する安定な医薬組成物の何れかを含む容器を含む、製品またはキットを提供する。ある実施態様において、バイアルは中性硼珪酸ガラス製の注射用バイアルである。

【0086】

本発明の上記医薬組成物または凍結乾燥製剤または凍結乾燥製剤の再構成溶液は、医薬として使用され得る。

【0087】

本発明はまた、LAG-3と関連する疾患または状態の処置用医薬の製造のための上記医薬組成物または凍結乾燥製剤または凍結乾燥製剤の再構成溶液の使用であって、ここで、疾患または状態は病原性T細胞が関与する疾患または状態、好ましくは癌である使用を提供する。癌は、卵巣癌、黒色腫、前立腺癌、腸癌、胃癌、食道癌、乳癌、肺癌、腎臓癌、膵臓癌、子宮癌、肝臓癌、膀胱癌、子宮頸癌、口腔癌、脳癌、精巣癌、皮膚癌、甲状腺

10

20

30

40

50

癌ならびに骨髄腫および慢性および急性白血病を含む血液系腫瘍を含むが、これらに限定されない。

【0088】

本発明はまた処置を必要とする対象に治療有効量の上記医薬組成物または凍結乾燥製剤または凍結乾燥製剤の再構成溶液を投与することを含む、LAG-3と関連する疾患または状態を処置または予防する方法であって、ここで、疾患または状態は病原性T細胞が関与する疾患または状態、好ましくは癌である、方法を提供する。癌は、卵巣癌、黒色腫、前立腺癌、腸癌、胃癌、食道癌、乳癌、肺癌、腎臓癌、膵臓癌、子宮癌、肝臓癌、膀胱癌、子宮頸癌、口腔癌、脳癌、精巣癌、皮膚癌、甲状腺癌ならびに骨髄腫および慢性および急性白血病を含む血液系腫瘍を含むが、これらに限定されない。

10

【0089】

本発明はまた、上記医薬組成物または凍結乾燥製剤または凍結乾燥製剤の再構成溶液を含む容器を含む製品を提供する。

【0090】

当業者に周知のとおり、本明細書に記載する種々の実施態様の特性の一つ、一部またはすべてを、組み合わせて、本発明のさらなる実施態様を形成できる本発明の。上記実施態様および組み合わせにより得られる他の実施態様を、次の詳細な記載によりさらに説明する。

【図面の簡単な説明】

【0091】

20

【図1】ヒト化抗LAG-3抗体は、SEBにより活性化されたTリンパ球からのIL-2サイトカイン分泌を増強する。結果は、ヒト化LAG-3抗体候補、Hu229-013およびHu303-005が活性化Tリンパ球からのサイトカインIL-2の分泌を異なる程度で増強でき、薬物濃度に対して用量-効果依存性を示す。

【0092】

【図2】U-87MG腫瘍担持マウスにおける腫瘍体積に対するヒト化抗LAG-3抗体の効果。結果は、投与14日目、LAG-3抗体Hu229-013 6mpkおよびHu303-005 6mpkは腫瘍阻害に一定効果を有し、腫瘍阻害率はそれぞれ27.25% ($p < 0.05$)および34.94% ($p < 0.01$)であり、対照群と比較して有意差があった($p < 0.001$ 対hIGg)ことを示す。

30

【0093】

【図3】40 で抗体Hu229-013のCE純度を示す傾向図。

【0094】

【図4】40 で抗体Hu229-013のIEC中性ピークを示す傾向図。

【0095】

【図5】40 で抗体Hu303-005の非還元CEを示す傾向図。

【0096】

【図6】40 で抗体Hu303-005のiCE主ピークを示す傾向図。

【0097】

【図7】Hu303-005の振盪SEC結果を示す傾向図。

40

【0098】

【図8】0 での抗体Hu303-005のIECと40 でのそのIECの差値を示すフィッティング結果。

【0099】

【図9】0 での抗体Hu303-005のCE純度と40 でのそのCE純度の差値を示す。

【0100】

【図10】25 および40 での抗体Hu303-005製剤のiCE/CE/DLSを示すフィッティング結果。

【発明を実施するための形態】

50

【 0 1 0 1 】

用語

本発明がより容易に理解されるように、ある技術的および科学的用語を下に具体的に定義する。本明細書で異なって特別に定義されない限り、ここで使用するその他のすべての技術的および科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者に一般に理解されるのと同じ意味を有する。

【 0 1 0 2 】

「緩衝液」は、その共役酸 - 塩基成分により pH 変化に耐性である、緩衝液をいう。適切な範囲に pH を制御する緩衝液の例は、酢酸緩衝液、コハク酸緩衝液、グルコン酸緩衝液、ヒスチジン緩衝液、シュウ酸緩衝液、乳酸緩衝液、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、酒石酸緩衝液、フマル酸緩衝液、グリシルグリシンおよび他の有機酸緩衝液を含む。

10

【 0 1 0 3 】

「ヒスチジン緩衝液」は、ヒスチジンイオンを含む緩衝液をいう。ヒスチジン緩衝液の例は、ヒスチジン - 塩酸緩衝液、ヒスチジン - 酢酸緩衝液、ヒスチジン - リン酸緩衝液、ヒスチジン - 硫酸緩衝液など、好ましくはヒスチジン - 塩酸緩衝液を含む。ヒスチジン - 塩酸緩衝液はヒスチジンと塩酸またはヒスチジンと塩酸ヒスチジンにより製造される。

【 0 1 0 4 】

「クエン酸緩衝液」は、クエン酸イオンを含む緩衝液をいう。クエン酸緩衝液の例は、クエン酸 - クエン酸ナトリウム緩衝液、クエン酸 - クエン酸カリウム緩衝液、クエン酸 - クエン酸カルシウム緩衝液、クエン酸 - クエン酸マグネシウム緩衝液などを含む。好ましいクエン酸緩衝液はクエン酸 - クエン酸ナトリウムである。

20

【 0 1 0 5 】

「コハク酸緩衝液」は、コハク酸イオンを含む緩衝液をいう。コハク酸緩衝液の例は、コハク酸 - コハク酸ナトリウム緩衝液、コハク酸 - コハク酸カリウム緩衝液、コハク酸 - コハク酸カルシウム緩衝液などを含む。好ましいコハク酸緩衝液はコハク酸 - コハク酸ナトリウム緩衝液である。

【 0 1 0 6 】

「リン酸緩衝液」は、リン酸イオンを含む緩衝液をいう。リン酸緩衝液の例は、リン酸水素二ナトリウム - リン酸二水素ナトリウム緩衝液およびリン酸水素二ナトリウム - リン酸二水素カリウム緩衝液などを含む。好ましいリン酸緩衝液はリン酸水素二ナトリウム - リン酸二水素ナトリウム緩衝液である。

30

【 0 1 0 7 】

「酢酸緩衝液」は、酢酸イオンを含む緩衝液をいう。酢酸緩衝液の例は、酢酸 - 酢酸ナトリウム緩衝液、酢酸 - ヒスチジン緩衝液、酢酸 - 酢酸カリウム緩衝液、酢酸 - 酢酸カルシウム緩衝液、酢酸 - 酢酸マグネシウム緩衝液などを含む。好ましい酢酸緩衝液は酢酸 - 酢酸ナトリウム緩衝液である。

【 0 1 0 8 】

「Tris 緩衝液」は、Tris 塩基、Trizma、Trisamine、THAM、トロメタミンおよびトロメタモールとしても知られるトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンを含む、緩衝溶液をいう。Tris 緩衝液の有効な緩衝範囲は pH 7.0 ~ 9.2 であり、Tris 塩基水溶液の pH は約 10.5 である。一般に、該 pH を有する緩衝液を得るために、pH を所望の値に調節するために塩酸が加えられる。

40

【 0 1 0 9 】

本発明の「糖類」は、慣用の組成物(C₆H₁₂O₆)_n およびその誘導体を含み、単糖、二糖、三糖類、多糖、糖類アルコール、還元糖類、非還元糖類などを含む。グルコース、スクロース、トレハロース、ラクトース、フルクトース、マルトース、デキストラン、グリセロール、エリスリトール、グリセロール、アラビトール、シリトール、ソルビトール、マンニトール、メリジオース、メレジトース、メリトリオース、マンノトリオース、スタキオース、マルトース、ラクツロース、マルトース、ソルビトール、マルチトール、ラクチトール、イソ - マルトースなどからなる群から選択され得る。好ましくは、糖類は非還元

50

二糖、より好ましくはスクロースである。

【0110】

「粘性修飾剤」は、製剤の粘性を調節するために加えられる、慣用の医薬物質である。ここでいう粘性修飾剤は、主に無機塩およびアミノ酸塩をいい、ここで、無機塩は好ましくは塩化ナトリウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウムおよび酢酸カルシウムからなる群から選択され、アミノ酸塩は好ましくは塩酸アルギニン、塩酸ヒスチジン、塩酸グリシンおよび酢酸ヒスチジンなどからなる群から選択される。

【0111】

「医薬組成物」は、1以上のここに記載する化合物またはその生理学/薬学的に許容される塩またはそのプロドラッグおよび他の化学成分を含む混合物をいい、ここで、他の化学成分は、例えば、生理学/薬学的に許容される担体および添加物である。医薬組成物の目的は、生物への投与を補助し、それは活性成分の吸収を促進し、それにより生物学的活性を発揮する。ここで使用する「医薬組成物」および「製剤」は、相互排他的ではない。

10

【0112】

本発明において、溶液形態の医薬組成物について、特に断らない限り、それに含まる溶媒は水である。

【0113】

「凍結乾燥製剤」は、液体形態または溶液形態の医薬組成物または製剤の減圧凍結乾燥により得られる製剤または医薬組成物をいう。

【0114】

本発明の凍結乾燥は、前凍結、一次乾燥および二次乾燥を含む。前凍結の目的は、結晶性固体を得るための製品の凍結である。前凍結の温度および速度は、二つの重要なプロセスパラメータである。本発明において、前凍結の温度は -45°C として設定され、前凍結の速度は1/分として設定される。一次乾燥は主乾燥としても知られ、凍結乾燥の主段階である。目的は、製品の形を維持し、製品への損傷を最小化しながら、製品から氷を除くことである。一次凍結の温度および減圧程度が適切でないならば、製品の崩壊が起こる。高温および高減圧は、凍結乾燥の効率を上げるが、同時に製品が崩壊する危険性を高める。本発明の一次乾燥の温度は当分野で慣用の温度、例えば、 -30°C ~ 0°C であってよい。二次乾燥は分析乾燥としても知られ、最終減圧(0.01 mbar)および昇温(20°C ~ 40°C)により製品から結合水を除去するための二次工程である。大部分の生物学的製品が温度感受性であるため、二次乾燥の温度は、温度範囲の低い方であるように、すなわち 25°C であるように選択される。凍結乾燥の時間は、冷凍機、凍結乾燥製剤の用量および凍結乾燥剤の容器による。凍結乾燥時間の調整方法は当業者に周知である。

20

30

【0115】

本明細書で使用する用語「約」は、当業者により決定される特定の値の許容される誤差範囲内である値であり、これは、一部、数値がどのように測定または決定されるか(すなわち、測定系の限界)に依存する。例えば、「約」は、当分野の各実施で、1または1を超える標準偏差を示し得る。あるいは、「約」または「実質的に含む」は、最大20%の範囲をいう。例えば、約5.5のpHは $\text{pH } 5.5 \pm 1.1$ を意味する。さらに、特に生物学的系または過程について、本用語は、数値の最大一桁または最大5倍をいい得る。特定の値が本明細書および特許請求の範囲で記載されるとき、特に断らない限り、「約」または「実質的に含む」の意味は、その特定の数値について許容される誤差範囲内であると推定すべきである。

40

【0116】

本発明の医薬組成物は、安定な効果を達成でき、抗体は、貯蔵後その物理的安定性および/または化学的安定性および/または生物学的活性を実質的に維持でき、好ましくは、医薬組成物は貯蔵後、その物理的安定性、化学的安定性および生物学的活性を実質的に維持する。貯蔵寿命は、一般に医薬組成物の予測される貯蔵寿命に基づき選択される。現在では、一定期間、一定温度で貯蔵した後の安定性を計測できる、タンパク質の安定性を調べる多数の分析方法がある。

50

【0117】

安定な抗体医薬製剤は、次の条件で、顕著な変化が観察されないものである：冷蔵温度（2～8℃）で少なくとも3か月、好ましくは6か月、より好ましくは1年およびさらにより好ましくは最大2年貯蔵。さらに、安定な液体製剤は、例えば、25℃の温度で1か月、3か月および6か月の期間または40℃で1か月貯蔵後、所望の特徴を発揮する、液体製剤を含む。一般に、安定性について許容される基準は次のとおりである：一般に、SEC-HPLCにより評価して、約5%を超えない、好ましくは約5%を超えない抗体モノマーが分解される。医薬抗体製剤は、目視で無色または透明ないし僅かに乳白光性白色である。製剤の濃度、pHおよび浸透圧は±5%を超えて変わらない。一般に、約5%を超えない、好ましくは約5%を超えない短縮物が観察される。一般に、約5%を超えない、好ましくは約5%を超えない凝集が形成される。

10

【0118】

抗体は、色および/または透明性の目視でまたはUV光散乱、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）および動的光散乱（DLS）により測定して、凝集、沈殿および/または変性の顕著な増加が示されなければ医薬製剤中で「その物理的安定性を維持する」。タンパク質高次構造変化は、蛍光スペクトロスコピー（タンパク質三次構造を決定する）およびFTIRスペクトロスコピー（タンパク質二次構造を決定する）により評価され得る。

【0119】

抗体は、顕著な化学的改変を示さないならば、医薬製剤で「その化学的安定性を保持する」と考えられる。化学的安定性は、タンパク質の化学的に改変された形態の検出および定量により評価され得る。タンパク質の化学構造をしばしば変える分解過程は、加水分解または短縮化（サイズ排除クロマトグラフィーおよびSDS-PAGEなどの方法により評価）、酸化（質量分析またはMALDI/TOF/MSと組み合わせたペプチドマッピングなどの方法により評価）、脱アミド化（イオン交換クロマトグラフィー、毛管等電点電気泳動、ペプチドマッピング、イソアスパラギン酸測定などの方法により評価）および異性化（イソアスパラギン酸含量測定、ペプチドマッピングなどの方法により評価）を含む。

20

【0120】

抗体は、ある時点での抗体の生物学的活性が、医薬製剤を調製した時点で示された生物学的活性の予定された範囲内であるならば、医薬製剤で「その生物学的活性を保持する」と考えられる。抗体の生物学的活性は、例えば、抗原結合アッセイにより決定され得る。

30

【0121】

用語「LAG-3」は、リンパ球活性化遺伝子-3をいう。用語「LAG-3」は、バリエーション、アイソフォーム、ホモログ、オルソログおよびパラログを含む。用語「ヒトLAG-3」は、Uniprot No. P18627のヒトLAG-3の完全アミノ酸配列などのヒトLAG-3の配列をいう。LAG-3はまた、例えば、CD215として、当分野で知られる。ヒトLAG-3配列はUniprot No. P18627のヒトLAG-3と異なってよく、例えば、ヒトLAG-3は、保存的変異または非保存領域での変異を有し、Uniprot No. P18627のヒトLAG-3と実質的に同一の生物学的機能を有する。例えば、ヒトLAG-3の生物学的機能は、LAG-3の細胞外ドメインにおけるエピトープを有する点にあり、当該エピトープはここに開示する抗体と特異的に結合するものであり、あるいはヒトLAG-3の生物学的機能は、MHCクラスII分子に結合する点にある。

40

【0122】

特定のヒトLAG-3配列は、一般にUniprot No. P18627のヒトLAG-3と少なくとも90%同一性であるアミノ酸配列を有し、他の種（例えば、マウス）からのLAG-3アミノ酸配列と比較して、ヒトアミノ酸配列であるとして同定されるアミノ酸残基を有する。ある場合、ヒトLAG-3は、Uniprot No. P18627のLAG-3と少なくとも85%または少なくとも95%、96%、97%、98%または99%同一性であるアミノ酸配列を有する。ある実施態様において、ヒトLAG-3配列は、Uniprot No. P18627のLAG-3配列と10以下のアミノ酸差異を示す。ある実施態様において、ヒトLAG-3は、Uniprot No. P18627のヒトLAG-3配列と5以下または4、3、2または1以下のアミ

50

ノ酸差異を示し得る。パーセント同一性は、ここに記載するとおり決定され得る。

【 0 1 2 3 】

ここで使用するアミノ酸残基の三文字表記および一文字表記はJ. Biol. Chem. 243, p. 3558 (1968)に記載されている。

【 0 1 2 4 】

本発明で使用する「抗体」は、2つの同一重鎖と2つの同一軽鎖間の鎖間ジスルフィド結合により一体に接続されたテトラ - ペプチド鎖構造である、免疫グロブリンをいう。

【 0 1 2 5 】

本発明において、本発明の抗体軽鎖は、ヒトまたはマウス、鎖またはそのバリエーションを含む軽鎖定常領域をさらに含み得る。

【 0 1 2 6 】

本発明において、本発明の抗体重鎖は、ヒトまたはマウス I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4 またはそのバリエーションを含む重鎖定常領域をさらに含み得る。

【 0 1 2 7 】

抗体重鎖および軽鎖のN末端に隣接する約15アミノ酸配列は高度に可変であり、可変領域(Fv領域)として知られ、C末端に近い残りのアミノ酸配列は比較的安定であり、定常領域として知られる。可変領域は、3つの超可変領域(HVR)および4つの比較的保存されたフレームワーク領域(FR)を含む。抗体の特異性を決定する3つの超可変領域は、相補性決定領域(CDR)としても知られる。各軽鎖可変領域(LCVR)および各重鎖可変領域(HCVR)は3つのCDR領域および4つのFR領域からなり、アミノ末端からカルボキシル末端へ向けて次の順番である: FR 1、CDR 1、FR 2、CDR 2、FR 3、CDR 3 および FR 4。軽鎖の3つのCDR領域はLCDR 1、LCDR 2 および LCDR 3 と称され、重鎖の3つのCDR領域はHCDR 1、HCDR 2 および HCDR 3 と称する。

【 0 1 2 8 】

本発明の抗体は、マウス抗体、キメラ抗体またはヒト化抗体、好ましくはヒト化抗体を含む。

【 0 1 2 9 】

本発明における用語「マウス抗体」は、本分野での知識および技術により製造されるLAG-3に対するモノクローナル抗体をいう。この方法においては、試験対象にLAG-3抗原を注射し、次いで所望の配列または機能的性質を有する抗体を発現するハイブリドーマが分離される。

【 0 1 3 0 】

用語「キメラ抗体」は、マウス抗体の可変領域とヒト抗体の定常領域により形成される抗体であり、キメラ抗体は、マウス抗体により誘導される免疫応答を軽減できる。キメラ抗体を構築するために、特定のマウスモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを構築し、次いで可変領域遺伝子をマウスハイブリドーマ細胞からクローン化する。その後、ヒト抗体の定常領域遺伝子が、所望によりクローン化される。マウス可変領域遺伝子をヒト定常領域遺伝子とライゲートしてキメラ遺伝子を形成し、これをヒトベクターに挿入でき、最後にキメラ抗体分子は、真核生物または原核生物の生産系で発現される。本発明の好ましい実施態様において、LAG-3キメラ抗体の軽鎖は、ヒト、鎖の軽鎖定常領域またはそのバリエーションをさらに含む。LAG-3キメラ抗体の重鎖は、ヒトI g G 1、I g G 2、I g G 3 または I g G 4 の重鎖定常領域またはそのバリエーションをさらに含む。

【 0 1 3 1 】

用語「ヒト化抗体」は、CDR移植抗体としても知られ、マウスCDR配列のヒト抗体の可変領域フレームワークへの移植により産生された抗体、すなわち、種々のタイプのヒト生殖系列抗体フレームワーク配列から製造される抗体をいう。ヒト化抗体は、多くのマウスタンパク質成分を担持するキメラ抗体により誘発される強い抗体応答の欠点を克服する。このようなフレームワーク配列は、生殖系列抗体遺伝子配列をカバーする公開されたDNAデータベースまたは公開された参考文献から得られ得る。例えば、ヒト重鎖および

10

20

30

40

50

軽鎖可変領域遺伝子の生殖系列DNA配列は、「V B a s e」ヒト生殖系列配列データベース(ウェルのwww.mrccpe.com.ac.uk/vbaseから入手可能)に見ることができ、Kabat, E A, et al, 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Edに見ることもできる。免疫原性同時の活性の減少を避けるために、ヒト抗体の可変領域のフレームワーク配列は、活性を維持するために最小の逆変異または戻し変異に付される。本発明のヒト化抗体はまた、ファージディスプレイによりCDR親和性成熟が実施される、ヒト化抗体も含む。

【0132】

本発明における用語「抗LAG-3抗体」、「抗LAG-3」、「LAG-3抗体」および「LAG-3に結合する抗体」は、抗体がLAG-3を標的とする診断剤および/または治療剤として使用できるように、十分な親和性でLAG-3と結合できる抗体をいう。

10

【0133】

本発明における用語「LAG-3に結合」は、ヒトLAG-3と相互作用可能であることをいう。

【0134】

用語「特異的に結合」は、競合的ELISA、BIACORE(登録商標)アッセイまたはKINEXA(登録商標)アッセイなどの当分野で利用可能な技術により決定される。例えば、本用語はまた本発明の抗体の抗原結合ドメインが、多くの抗原に担持される特定のエピトープに特異的である場合にも適用される。このような場合、抗原結合ドメインを担持する抗体は、このようなエピトープを担持する多様な抗原に特異的に結合する。

20

【0135】

用語「競合的結合」は、本発明の抗体が認識するのと同じヒトLAG-3細胞外領域エピトープ(抗原決定基とも称する)またはその一部を認識し、該抗原に結合する抗体抗原をいう。本発明のモノクローナル抗体が認識するのと同じエピトープに結合する抗体は、本発明のモノクローナル抗体により認識されるヒトLAG-3のアミノ酸配列を認識し、結合する抗体をいう。

【0136】

用語「KD」または「Kd」は、特定の抗体-抗原相互作用の解離平衡定数をいう。一般に、本発明の抗体は、例えば、BIACORE装置で表面プラズモン共鳴(SPR)技術を使用して決定して、約 10^{-7} M未満、例えば約 10^{-8} M、 10^{-9} Mまたは 10^{-10} M未満またはそれより低い解離平衡定数(KD)でLAG-3に結合する。

30

【0137】

本発明において記載する「抗原結合フラグメント」は、抗原結合活性を有するFabフラグメント、Fab'フラグメントまたはF(ab')₂フラグメントならびにヒトLAG-3に結合するscFvフラグメントおよび抗LAG-3抗体VHおよびVLにより形成されるヒトLAG-3に結合できる他のフラグメントを含み、それは、配列番号9、10、11、15、16、17および12、13、14、18、19および20からなる群から選択される、本明細書に記載の抗体の1以上のCDR領域を含む。Fvフラグメントは、定常領域を伴わずに重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含み、全抗原結合部位を有する最小抗体フラグメントである。一般に、Fv抗体は、VHおよびVLドメイン間にポリペプチドリンカーをさらに含み、抗原結合に必要な構造を形成できる。また、異なるリンカーを使用して、ポリペプチド鎖を形成するように2つの抗体の可変領域を連結でき、一本鎖抗体または一本鎖Fv(scFv)と称される。

40

【0138】

用語「エピトープ」は、1以上の抗体により認識および結合され得る、抗原に位置する部位をいう。

【0139】

「保存的修飾」または「保存的置き換えまたは置換」は、タンパク質のアミノ酸の、しばしばタンパク質の生物学的活性を変えことなく変更できる、類似特徴(例えば荷電、

50

側鎖サイズ、疎水性／親水性、主鎖高次構造および硬直性など)を有する他のアミノ酸への置換をいう。本分野の当業者は、一般に、ポリペプチドの非必須領域の一アミノ酸置換は、生物学的活性を実質的に変えないことを認識する(例えば、Watson et al., (1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4th Ed.)参照)。さらに、構造的にまたは機能的に類似するアミノ酸への置換は、生物学的活性を妨害する可能性が低い。

【0140】

「アミノ酸同一性」は、2タンパク質間または2ポリペプチド間の配列類似性をいう。比較する2配列の両者におけるある位置が同じアミノ酸残基で占拠されていたら、例えば、2ポリペプチドの各々におけるある位置が同一アミノ酸残基で占拠されたいたら、これら分子は、その位置で同一である。パーセント配列同一性およびパーセント配列類似性の決定に適するアルゴリズムの例は、B L A S TおよびB L A S T 2.0アルゴリズムであり、これらはそれぞれAltschul et al., (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-45およびAltschul et al., (1977) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402に記載される。B L A S T分析を実施するソフトウェアは、National Center of Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov/)で一般に入手可能である。

【0141】

抗体および抗原結合フラグメントを製造および精製する方法は当分野で周知であり、例えば、*Antibody Experimental Technology Guide of Cold Spring Harbor*, Chapters 5-8 and 15に見ることができる。本発明の抗体または抗原結合フラグメントは、1以上のヒトフレームワーク領域(FR)の非ヒト由来CDR領域への導入により遺伝子改変される。ヒトFR生殖系列配列は、IMGTヒト抗体可変領域生殖系列遺伝子データベースと比較することにより、およびウェブサイト[http://imgt.cines.fr/ImMunoGeneTics\(IMGT\)](http://imgt.cines.fr/ImMunoGeneTics(IMGT))からまたはThe Immunoglobulin FactsBook, 2001 ISBN012441351からMOEソフトウェアを使用して、得ることができる。

【0142】

本発明の改変抗体または抗原結合フラグメントは、慣用法により製造および精製され得る。例えば、重鎖および軽鎖をコードするcDNA配列をクローン化し、GS発現ベクターに組み換えることができる。次いで、組み換えた免疫グロブリン発現ベクターは、CHO細胞に安定にトランスフェクトされ得る。より推奨される当分野で周知の組み換え方法として、哺乳動物発現系は、一般にFc領域の高度に保存されたN末端で、抗体のグリコシル化をもたらすであろう。安定なクローンを、ヒトLAG-3に特異的に結合する抗体の発現により得ることができる。陽性クローンを、バイオリアクターでの抗体産生のために無血清培養培地で拡大できる。抗体が分泌されている培養培地を、慣用技術により精製し得る。例えば、精製は、調整緩衝液で平衡化されているプロテインAまたはGセファロースFFカラムで好都合に実施され得る。カラムを洗浄して、非特異的に結合する成分を除去し得る。結合抗体をpH勾配により溶出し、抗体フラグメントをSDS-PAGEにより検出し、次いで回収する。抗体を、一般的技術を使用して、濾過および濃縮できる。可溶性混合物および多量体も、分子篩またはイオン交換を含む一般的技術により効率的に除去できる。得られた生産物を、直ぐに、例えば-70℃で凍結してよくまたは凍結乾燥してよい。

【0143】

「投与」および「処置」は、動物、ヒト、実験対象、細胞、組織、臓器または生物学的流体に適応されるとき、外因性医薬、治療剤、診断剤または組成物と動物、ヒト、対象、細胞、組織、臓器または生物学的溶液との接触をいう。「投与」および「処置」は、例えば、治療、薬物動態、診断、研究および実験方法をいい得る。細胞の処置は、薬剤と細胞の接触、ならびに薬剤と溶液との接触を含み、ここで、該溶液は細胞と接触している。「投与」および「処置」はまた、例えば、細胞の、薬剤、診断、結合化合物または他の細胞による、インビトロおよびエクスピボ処置も意味する。「処置」は、ヒト、動物または研究対象に適用されるならば、治療処置、予防または防止手段、研究および診断適用をいう

。

【 0 1 4 4 】

「処置」は、本発明の結合化合物の何れかを含む組成物などの治療剤の、該薬剤が治療剤活性を有することが知られる 1 以上の疾患症状を有する患者への内的または外的投与を含む。一般に、治療剤は、処置患者または集団における 1 以上の疾患症状の軽減に有効な量で、そのような症状の何らかの臨床的に測定可能な程度までの退行または進行阻止を誘発するように、投与される。何らかの特定の疾患症状の軽減に有効な治療剤の量(「治療有効量」とも称される)は、疾患状態、患者の年齢および体重、健康状態、行動、患者の食習慣、投与時間、投与方法、排泄速度、薬物組み合わせ等々および薬物が患者で所望の応答を発揮する能力などの因子により変わり得る。疾患症状が軽減されているか否かは、医師または他の熟練した医療従事者が、その症状の重症度または進行状態を評価するのに一般に使用する何らかの臨床的測定により評価される。本発明の実施態様(例えば、処置方法または製造品)は、目的の各疾患症状の軽減に有効でないこともあり得るが、スチューデントの t 検定、カイ二乗検定、マン・ホイットニーの U 検定、クラスカル・ウォリス検定(H 検定)、ボンフェローニ・タブストラ検定およびウィルコクソン検定の同分野で知られる何らかの統計学的検定により決定して、統計学的に有意な数の患者で、目的の標的疾患症状を軽減する。

10

【 0 1 4 5 】

「有効量」は、医学的状态の症状または徴候の回復または予防に十分な量も意味する。有効量はまた、診断を可能とするまたは容易にするのに十分な量も意味する。特定の患者または獣医対象の有効量は、処置する状態、患者の一般的健康状態、投与経路および用量ならびに副作用の重症度などの因子により変わり得る。有効量は、顕著な副作用または毒性効果を避ける、最大用量または投与プロトコルであり得る。

20

【 0 1 4 6 】

「T_m値」は、タンパク質の熱変性温度、すなわち、タンパク質の半分が折りたたみが解除され、タンパク質の空間的構造が破壊される温度をいう。それ故に、T_m値が高いほど、タンパク質の熱安定性は高い。

【 0 1 4 7 】

発明の詳細な記載

本発明は、LAG-3 抗体またはその抗原結合フラグメント、酢酸緩衝液またはヒスチジン塩、スクロースおよびポリソルベート 80 を含む安定な医薬組成物(製剤)を提供し、医薬組成物(製剤)は投与により適する。

30

【実施例】

【 0 1 4 8 】

本発明を次の実施例によりさらに詳細に説明する。これらの実施例は説明目的でのみ提供し、本発明の範囲を制限する意図はない。

【 0 1 4 9 】

本発明の実施例において、特定の条件が記載されていないならば、実験は、一般に慣用の条件下でまたは物質または製品の製造業者により提案される条件下で実施される。試薬の供給源が具体的に記載されていないとき、試薬は市販されている常用試薬である。

40

【 0 1 5 0 】

実施例 1. LAG-3 抗原および抗体の製造

1. タンパク質設計および発現

UniProt リンパ球活性化遺伝子 3 タンパク質(ヒト LAG-3、UniProt: P18627)をここで LAG-3 の鋳型として使用し、抗原および検出に使用するタンパク質のアミノ酸配列を設計し、所望により LAG-3 タンパク質に種々の標識を融合させ、次いで pHr ベクター(社内製造)または pTT5 ベクター(Biovector, Cat#: 102762)または p 標的ベクター(Promega, A1410)と融合させた。本発明の抗原タンパク質および検出タンパク質は 293 細胞で一過性に発現されまたは CHO-S で安定に発現され、精製され、得られた。次の LAG-3 抗原を、特に断らない限り、ヒト LAG-3 という。

50

【 0 1 5 1 】

F l a g 標識を伴う L A G - 3 細胞外ドメイン：マウスの免疫化に使用、 L A G - 3 - F l a g 。

【 化 1 】

MWEAQFLGLLFLQPLWVAPVKPLQPGAEVVVWAQEGAPAQLPCSPTIPLQ
 DLSLLRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRRYTVLS
 VGPGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLR
 DRALSCRLRLRLGQASMTASPPGSLRASDWVILNCSFSRPDRPASVHWFRNR
 GQGRVPVRESPPHHHLAESFLFLPQVSPMDSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNLT
 VLGLEPPTPLTVYAGAGSRVGLPCRLPAGVGTRSFLTAKWTPPGGGPDLLVT
 GDNGDFTLRLEDVSQAQAGTYTCHIHLEQQQLNATVTLAIITVTPKSFGSPGS
 LGKLLCEVTPVSGQERFVWSSLDTPSQRFSFGPWLEAQEAQLLSQPWQCQLY
 QGERLLGAAVYFTELSSPGDYKDDDDK

10

配列番号 1

注：下線部分はシグナルペプチドを表し、斜体部分は F l a g 標識配列を表す。

【 0 1 5 2 】

完全長の L A G - 3 : マウスの免疫化および検出のため、 L A G - 3 過発現細胞株の構築に使用

20

【 化 2 】

MWEAQFLGLLFLQPLWVAPVKPLQPGAEVVVWAQEGAPAQLPCSPTIPLQ
 DLSLLRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRRYTVLS
 VGPGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLR
 DRALSCRLRLRLGQASMTASPPGSLRASDWVILNCSFSRPDRPASVHWFRNR
 GQGRVPVRESPPHHHLAESFLFLPQVSPMDSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNLT
 VLGLEPPTPLTVYAGAGSRVGLPCRLPAGVGTRSFLTAKWTPPGGGPDLLVT
 GDNGDFTLRLEDVSQAQAGTYTCHIHLEQQQLNATVTLAIITVTPKSFGSPGS
 LGKLLCEVTPVSGQERFVWSSLDTPSQRFSFGPWLEAQEAQLLSQPWQCQLY
 QGERLLGAAVYFTELSSPGAQRSGRAPGALPAGHLLFLILGVLSLLLLVTGA
FGFHLWRRQWRPRRFSALEQGIHPPQAQSKIEELEQEPEPEPEPEPEPEPEPEPE
QL

30

配列番号 2

【 化 3 】

注：シグナルペプチド + 細胞外領域 + 膜貫通領域 + 細胞内領域

【 0 1 5 3 】

L A G - 3 細胞外領域と h I g G 1 F c の融合タンパク質：検出用 L A G - 3 - F c

40

【化 4】

MWEAQFLGLLFLQPLWVAPVKPLQPGAEVPVVWAQEGAPAQLPCSPTIPLQD
 LSLRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGHPAAPSSWGPRPRRYTVLSV
 GPGGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDR
 ALSCRLRLRLGQASMTASPPGSLRASDWVILNCSFSRPDRPASVHWFRNRGQ
 GRVPVRESPIHHHLAESFLFLPQVSPMDSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLG
 LEPTPLTVYAGAGSRVGLPCRLPAGVGTRSFLLTAKWTPPGGGPDLLVTGDNG
 DFTLRLEDVSQAQAGTYTCHIHLEQQQLNATVTLAIIITVTPKSFGSPGSLGKLL
 CEVTPVSGQERFVWSSLDTPSQRSFSGPWLEAQEAQLLSQPWQCQLYQGERL
 LGAAVYFTELSSPGDDDDKSGSGEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
 KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
 RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE
 EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

10

配列番号 3

注：下線部分はシグナルペプチドを表し、二重下線部分はリンカーを表し、斜体部分は F c を表す。

【 0 1 5 4】

20

L A G - 3 細胞外領域と m I g G 2 a F c の融合タンパク質：検出のための L A G - 3 - m F c

【化 5】

MWEAQFLGLLFLQPLWVAPVKPLQPGAEVPVVWAQEGAPAQLPCSPTIPLQD
 LSLRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGHPAAPSSWGPRPRRYTVLSV
 GPGGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDR
 ALSCRLRLRLGQASMTASPPGSLRASDWVILNCSFSRPDRPASVHWFRNRGQ
 GRVPVRESPIHHHLAESFLFLPQVSPMDSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLG
 LEPTPLTVYAGAGSRVGLPCRLPAGVGTRSFLLTAKWTPPGGGPDLLVTGDNG
 DFTLRLEDVSQAQAGTYTCHIHLEQQQLNATVTLAIIITVTPKSFGSPGSLGKLL
 CEVTPVSGQERFVWSSLDTPSQRSFSGPWLEAQEAQLLSQPWQCQLYQGERL
 LGAAVYFTELSSPGDDDDKSGSGEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
 KIKDVLMSLSPIVTCVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRV
 VSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSRAPQVYVLPPEEEM
 TKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVE
 KKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

30

配列番号 4

注：下線部分はシグナルペプチドを表し、二重下線部分はリンカーを表し、斜体部分は m F c を表す。

【 0 1 5 5】

40

2. L A G - 3 関連組み換えタンパク質、ならびにハイブリドーマ抗体および組み換え抗体の精製

1). F l a g 標識を伴う L A G - 3 - F l a g 組み換えタンパク質の精製工程

サンプルを高速で遠心分離して不純物を除去し、適切な体積に濃縮した。f l a g 親和性カラムを、5 × P B S で平衡化し、2 ~ 5 カラム体積で洗浄した。細胞により発現された上清を、不純物の除去後カラムに載せた。カラムを、A 2 8 0 読み取り値がベースラインまで減少するまで 0.5 × P B S で洗浄した。カラムを P B S で洗浄して、不純タンパク質を洗い流し、次いで標的タンパク質を回収した。標的タンパク質を 1 0 0 mM グリシ

50

ン、pH 3.0で溶出し、インビトロでのさらなる活性化および精製のために集めた。

【0156】

2). ハイブリドーマ、組み換え抗体およびFc融合タンパク質の精製

細胞により発現された上清を高速で遠心分離して不純物を除去し、ハイブリドーマ発現上清をプロテインGカラムで精製し、組み換え抗体およびFc融合タンパク質発現上清をプロテインAカラムで精製した。カラムを、A280読み取り値がベースラインまで減少するまでPBSで洗浄した。標的タンパク質を100mM 酢酸(pH 3.0)で溶出し、1M Tris-HCl、pH 8.0で中和した。溶出サンプルを適切に濃縮し、PBSで平衡化されたゲルクロマトグラフィーSuperdex200(GE)を使用してさらに精製し、凝縮物を表すピークを除き、サンプルを集め、使用のために等分した。

10

【0157】

実施例2. 抗ヒトLAG-3ハイブリドーマモノクローナル抗体の製造

1. 免疫化

抗ヒトLAG-3モノクローナル抗体をマウスの免疫化により製造した。実験S J L白色マウス、雌、6週齢(Beijing Charles River Lab Animal Technology Co., Ltd., animal production license number: SCXK (Beijing) 2012-0001)。飼育環境：SPFレベル。マウス購入後、動物を、12/12時間明/暗サイクル、温度20~25 および湿度40~60%で1週間研究室に維持した。本環境に順化したマウスを、次のスキームにより免疫化した。免疫抗原は、Fla g標識を有するLAG-3の細胞外領域(配列番号1)であった。

20

【0158】

スキームA：マウスをTiterMax(登録商標)Gold Adjuvant(Sigma Cat No: T2684)およびThermo Imject(登録商標)Alum(Thermo Cat No: 77161)で交差免疫した。抗原対アジュバント(TiterMax(登録商標)Gold Adjuvant)比は1:1であり、抗原対アジュバント(Thermo Imject(登録商標)Alum)比は3:1であり、50µg/マウス(最初の免疫化)および25µg/マウス(ブースター免疫化)であった。抗原乳化後、マウスに0日目、7日目、14日目、21日目、28日目、35日目および42日目に接種した。0日目、マウスに、数か所、50µg/マウスで乳化抗原を皮下(s.c.)注射した。7日目、マウスに、25µg/マウスで腹腔内(i.p.)注射した。14日目、28日目、35日目および42日目、抗原の背面または腹腔内注射を、背面の塊および腹部の腫脹状態により選択した。血液サンプルを21日目、35日目、49日目に集め、マウス血清の抗体力価をELISAにより決定した。7回免疫化後、プラットフォームである傾向のあった高血清抗体力価を有するマウスを脾臓細胞融合のために選択した。ブースター免疫化を、脾臓細胞融合3日前、食塩水で製剤した抗原溶液の50µg/マウスのi.p.注射により、実施した。

30

【0159】

スキームB：マウスをQuickAntibody-Mouse5W(KX0210041)で免疫化した。抗原対アジュバント比は、1:1であり、25µg/マウス1回(最初の免疫化/ブースター免疫化)であった。抗原およびアジュバントを迅速に混合し、0日目、21日目および35日目の接種に使用した。0日目、マウスに抗原を後部腓腹筋(i.m.)に、25µg/マウスで注射し、21日目および35日目、注射を同じ方法で、25µg/マウスで繰り返した(三回目の免疫化を実施するか否かは、抗体力価による)。血液サンプルを28日目および42日目にアルメタ。マウス血清の抗体力価をELISAにより決定した。プラットフォームである傾向のあった高血清抗体力価を有するマウスを脾臓細胞融合のために選択した。ブースター免疫化を、脾臓細胞融合3日前、食塩水で製剤した抗原溶液の50µg/マウスのi.p.注射により、実施した。

40

【0160】

2. 脾臓細胞融合

ハイブリドーマ細胞を、最適化PEG介在融合方法を使用することにより、脾臓リンパ球と骨髓腫Sp2/0細胞(ATCC(登録商標)CRL-8287^{T^M})を融合して得た。得た融合ハイブリドーマ細胞を、完全培地(20%FBS、1×HATおよび1×OPI

50

含有DMEM培地)に $0.5 \sim 1 \times 10^6$ / ml密度で再懸濁し、96ウェル細胞培養プレートに、100 μ l / ウェルで播種した。37℃、5%CO₂でインキュベーション後、100 μ l / ウェルのHAT完全培地を補い、3～4日間培養を維持して針様クローンを形成させた。上清を除去し、200 μ l / ウェルのHT完全培地(20%FBS、1×HAT、1×OPIC含有RPMI-1640培地)を加え、5%CO₂、37℃で3日間培養し、次いでELISAアッセイにより検出した。

【0161】

3. ハイブリドーマ細胞スクリーニング

ハイブリドーマ培養上清を、ハイブリドーマ細胞の増殖密度により結合ELISAで検出した。細胞遮断実験を、結合ELISAにより検出された陽性ウェルの細胞上清で実施した。結合および遮断実験両者で陽性であった細胞を増殖させ、直ぐに凍結保存し、細胞を、単一細胞クローンが得られるまで2～3回サブクローン化した。

各サブクローニング方法の後、細胞をLAG-3結合ELISAおよび細胞遮断アッセイに付した。ハイブリドーマクローンが上記スクリーニング実験により得られ、抗体をさらに無血清細胞培養方法により調製し、次いで試験実施例において使用するために精製実施例により精製した。

【0162】

4. 陽性ハイブリドーマクローンのシーケンシング

陽性ハイブリドーマの配列のクローニング方法は次の通りであった：対数増殖期のハイブリドーマ細胞を集め、製造業者の指示によりTrizol(Invitrogen Cat No. 15596-018)でRNAを抽出し、次いでPrimeScript™ Reverse Transcriptaseキット(Takara, Cat No. 2680A)で逆転写を実施した。逆転写により得たcDNAを、マウスIg-Primer Set(Novagen, TB326 Rev.B 0503)を使用するPCRにより増幅し、シーケンシングを、シーケンシング業者により実施した。ハイブリドーマクローンmAb229のDNA配列に対応する重鎖および軽鎖アミノ酸配列を、それぞれ配列番号5、6および配列番号7、8に示す。

【0163】

mAb229 - VH

QIQLVQSGPELKPKGETVKISCKASGYTFTTSGMSWVKQAPGKGLKWMGWINTYSGVPTYADDFKGRFAFSLETSASTAY
LQINNLIKNETATYFCARDNYDARDVYYYAMDYWGQGTSTVTVSS

配列番号5

mAb229 - VL

DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENIYSNLAWYQQKQKSPQLLVYAATNLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGSYYCQHFWITPWTFGGGTKLEIK

配列番号6

mAb303 - VH

EVQLQQSGPVLVKPGASVKMSCKASGYTLTDYYMNWVKQSHGKSLEWIGVINPYNGDTAYNQKFKGKATLTVDKSSNTAY
MEINSLTSEDSAVYYCTRDDGYDYFDVWGTGTTVTVSS

配列番号7

mAb303 - VL

DIQMTQSPSSLSASLGERVILTCRASQDIGSRLNWLQQGPDGTFKRLIYATSTLDSGVPKRFSGSRSGSDFSLTSSLES
EDFVDYYCLQLASSPPTFGGGTKLEIK

配列番号8。

【0164】

10

20

30

40

【表 1】

表 1. 各重鎖および軽鎖のCDR領域配列

	重鎖		軽鎖	
mAb 229	HCDR1	TSGMS 配列番号9	LCDR 1	RASENIYSNLA 配列番号15
	HCDR2	WINTYSGVPTYADDF KG 配列番号10	LCDR 2	AATNLAD 配列番号16
	HCDR3	DNYDARDVYYAMDY 配列番号11	LCDR 3	QHFWITPWT 配列番号17
mAb 303	HCDR1	DYYMN 配列番号12	LCDR 1	RASQDIGSRLN 配列番号18
	HCDR2	VINPYNGDTAYNQKF KG 配列番号13	LCDR 2	ATSTLDS 配列番号19
	HCDR3	DDGYDYDFDV 配列番号14	LCDR 3	LQLASSPPT 配列番号20

10

20

【0165】

得られた陽性クローンを、ヒトLAG-3への結合についてELISAアッセイ(タンパク質結合活性のEC₅₀値の結果は表2に示す)、ヒトLAG-3過発現CHO-s細胞への結合についてELISAアッセイ(タンパク質結合活性のEC₅₀値の結果は表2に示す)およびLAG-3抗原とDauid細胞の結合の遮断についてのアッセイ(遮断活性のEC₅₀値の結果は表2に示す)およびヒトLAG-3タンパク質に対する親和性についてのアッセイ(結果は表3に示す)に付す。

【0166】

【表 2】

表 2. マウスLAG-3抗体のインビトロ活性

候補抗体	タンパク質結合 活性EC ₅₀ (nM)	細胞結合活性EC ₅₀ (nM)	遮断活性IC ₅₀ (nM)
mAb 229	0.129	0.191	1.327
mAb 303	0.172	0.279	0.596

30

【0167】

【表 3】

表 3. マウスLAG-3抗体の親和性

固定相	移動相	親和性(M)
mAb 229	LAG-3-Flag	4.26E-10
mAb 303	LAG-3-Flag	4.70E-10

40

【0168】

表2に示す結果は、LAG-3抗体mAb 229およびmAb 303両者が、ヒトLAG-3タンパク質への優れた結合活性を示したことを示す。LAG-3抗体mAb 229およびmAb 303はまたヒトLAG-3タンパク質のCHO-S細胞過発現完全長に優

50

れた結合活性も示した。L A G - 3 抗体 m A b 2 2 9 および m A b 3 0 3 両者は、ヒト L A G - 3 抗原と D a u d i 細胞の結合を顕著に遮断した。

表 3 に示す結果は、本発明の L A G - 3 抗体 m A b 2 2 9 および m A b 3 0 3 は、ヒト L A G - 3 タンパク質に対する強い結合活性および親和性を示したことを示す。

【 0 1 6 9 】

実施例 3 . マウス抗ヒト L A G - 3 ハイブリドーマモノクローナル抗体 m A b 2 2 9 のヒト化

I M G T ヒト抗体重鎖および軽鎖可変領域生殖系列遺伝子データベースの M O E ソフトウェアに対するアラインメントを介して、m A b 2 2 9 に対する高相同性を有する重鎖および軽鎖可変領域生殖系列遺伝子を鋳型として選択し、マウス抗体由来 C D R を、対応するヒト源鋳型に移植して、F R 1 - C D R 1 - F R 2 - C D R 2 - F R 3 - C D R 3 - F R 4 順で可変領域配列を形成させた。アミノ酸残基を同定し、K a b a t ナンバリングシステムによりアノテートした。

【 0 1 7 0 】

1 . ハイブリドーマクローン m A b 2 2 9 のヒト化のためのフレームワーク選択

マウス抗体 m A b 2 2 9 のヒト化のための軽鎖鋳型は I G K V 1 - 3 9 * 0 1 および h j k 4 . 1 であり、ヒト化のための重鎖鋳型は I G H V 7 - 4 - 1 * 0 1 および h j h 6 . 1 であり、ヒト化可変領域の配列は次のとおりである：

H u 2 2 9 V H - C D R 移植片

【 化 6 】

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTTSGMSWVRQAPGQGLEWMGWINT
YSGVPTYADDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDNVDARDVYY
YAMDYWGQGTTVTVSS

配列番号 2 1

【 化 7 】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYAATNLAD
GVPSRFSSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQHFWITPWTFGGGTKVEIK

配列番号 2 2

注：順番は F R 1 - C D R 1 - F R 2 - C D R 2 - F R 3 - C D R 3 - F R 4 であり、斜体配列は F R 配列を表し、下線配列は C D R 配列を表す。

【 0 1 7 1 】

2 . ハイブリドーマクローン m A b 2 2 9 のための鋳型選択および復帰変異設計、下記表 4 参照：

【 表 4 】

表 4 . m A b 2 2 9 のための鋳型選択および復帰変異設計

Hu229_VL		Hu229_VH	
Hu229_VL.1	移植	Hu229_VH.1	移植
Hu229_VL.1A	I48V, F71Y	Hu229_VH.1A	E46K
Hu229_VL.1B	D70Q, F71Y, I48V	Hu229_VH.1B	E46K, R38K, V93T
Hu229_VL.1C	D70Q, F71Y, I48V, A43S	Hu229_VH.1C	E46K, R38K, V93T, Y95F

注：例えば、I 4 8 V は、K a b a t ナンバリングシステムによる 4 8 位での I から V への復帰変異を意味する。移植は、マウス抗体 C D R がヒト生殖系列 F R 配列にインプラントされたことを示す。

【 0 1 7 2 】

【 表 5 】

表 5 : マウス抗体 m A b 2 2 9 のヒト化のための配列組み合わせ

	Hu229_VL.1	Hu229_VL.1A	Hu229_VL.1B	Hu229_VL.1C
Hu229_VH.1	Hu229-004	LF 229-005	Hu229-006	Hu229-007
Hu229_VH.1A	Hu229-008	Hu229-009	Hu229-010	Hu229-011
Hu229_VH.1B	Hu229-012	Hu229-013	Hu229-014	Hu229-015
Hu229_VH.1C	Hu229-016	Hu229-017	Hu229-018	Hu229-019

10

注：この表は、種々の変異の種々の配列組み合わせを示す。例えば、H u 2 2 9 - 0 0 5 は、2 配列変異(軽鎖 H u m A b 2 2 9 _ _ V L . 1 A および重鎖 H u m A b 2 2 9 _ _ V H . 1) がヒト化マウス抗体 H u 2 2 9 - 0 0 5 に存在し、残りを同じ方法で説明し得ることを示す。

【 0 1 7 3 】

ヒト化抗体 m A b 2 2 9 の配列は次のとおりである：

Hu229VH.1(Hu229VH-CDR移植片と同一)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTTSGMSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYADDFKGRFVFSLDTSVSTAY
LQISSLKAEDTAVYYCARDNYDARDVYYYAMDYWGQGTITVTVSS

20

配列番号 2 1

H u 2 2 9 V H . 1 A

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTTSGMSWVRQAPGQGLKWMGWINTYSGVPTYADDFKGRFVFSLDTSVSTAY
LQISSLKAEDTAVYYCARDNYDARDVYYYAMDYWGQGTITVTVSS

配列番号 2 3

H u 2 2 9 V H . 1 B

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTTSGMSWVRQAPGQGLKWMGWINTYSGVPTYADDFKGRFVFSLDTSVSTAY
LQISSLKAEDTATYYCARDNYDARDVYYYAMDYWGQGTITVTVSS

配列番号 2 4

H u 2 2 9 V H . 1 C

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTTSGMSWVRQAPGQGLKWMGWINTYSGVPTYADDFKGRFVFSLDTSVSTAY
LQISSLKAEDTATYFCARDNYDARDVYYYAMDYWGQGTITVTVSS

30

配列番号 2 5

H u 2 2 9 V L . 1 (H u 2 2 9 V L - C D R 移植片と同一)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYAATNLADGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE
EDFATYYCQHFNIPTWTFGGGTKVEIK

配列番号 2 2

H u 2 2 9 V L . 1 A

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLVYAATNLADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPE
EDFATYYCQHFNIPTWTFGGGTKVEIK

40

配列番号 2 6

H u 2 2 9 V L . 1 B

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLVYAATNLADGVPSRFSGSGSGTQYTLTISLQPE
EDFATYYCQHFNIPTWTFGGGTKVEIK

配列番号 2 7

H u 2 2 9 V L . 1 C

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSNLAWYQQKPGKSPKLLVYAATNLADGVPSRFSGSGSGTQYTLTISLQPE
EDFATYYCQHFNIPTWTFGGGTKVEIK

配列番号 2 8

50

【 0 1 7 4 】

実施例 4. マウス抗ヒト L A G - 3 ハイブリドーマモノクローナル抗体 m A b 3 0 3 のヒト化

I M G T ヒト抗体重鎖および軽鎖可変領域生殖系列遺伝子データベースの M O E ソフトウェアに対するアラインメントを介して、m A b 3 0 3 に対する高相同性を有する重鎖および軽鎖可変領域生殖系列遺伝子を鋳型として選択し、マウス抗体由来 C D R を、対応するヒト源鋳型に移植して、F R 1 - C D R 1 - F R 2 - C D R 2 - F R 3 - C D R 3 - F R 4 順で可変領域配列を形成させた。アミノ酸残基を同定し、K a b a t ナンバリングシステムによりアノテートした。

【 0 1 7 5 】

1. ハイブリドーマクローン m A b 3 0 3 のヒト化のためのフレームワーク選択

マウス抗体 m A b 3 0 3 のヒト化のための軽鎖鋳型は I G K V 1 - 3 9 * 0 1 および h j k 4 . 1 であり、ヒト化のための重鎖鋳型は I G H V 1 - 3 * 0 1 および h j h 6 . 1 であり、ヒト化可変領域の配列は次のとおりである：

H u 3 0 3 V H - C D R 移植片

【 化 8 】

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTDYYMNWVRQAPGQRLEWMGVINP
YNGDTAYNQKFQKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDDGYDYDYFD
VWGQGTTVTVSS

配列番号 2 9

H u 3 0 3 V L - C D R 移植片

【 化 9 】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGSRLNHWYQQKPGKAPKLLIYATSTLDS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQLASSPPTFGGGTKVEIK

配列番号 3 0

注：順番は F R 1 - C D R 1 - F R 2 - C D R 2 - F R 3 - C D R 3 - F R 4 であり、斜体配列は F R 配列を表し、下線配列は C D R 配列を表す。

【 0 1 7 6 】

2. ハイブリドーマクローン m A b 3 0 3 の鋳型選択および復帰変異設計、下記表 6 参照：

【 表 6 】

表 6. ハイブリドーマクローン m A b 3 0 3 のヒト化のための復帰変異

Hu303_VL		Hu303_VH	
Hu303_VL.1	移植	Hu303_VH.1	移植
Hu303_VL.1A	L46R, G66R	Hu303_VH.1A	R72V, T74K, A97T
Hu303_VL.1B	L46R, G66R, S60K	Hu303_VH.1B	R72V, T74K, A97T, F29L
Hu303_VL.1C	L46R, G66R, S60K, P44F, Y36L	Hu303_VH.1C	R72V, T74K, F29L, A97T, M48I, V68A, I70L
Hu303_VL.1D	L46R, G66R, S60K, P44F, Y36L, K42G, I21L, T85D		

注：例えば、L 4 6 R は、K a b a t ナンバリングシステムによる 4 6 位での L から R へ

の復帰変異を意味する。移植は、マウス抗体 C D R がヒト生殖系列 F R 配列にインプラントされたことを示す。

【 0 1 7 7 】

種々の変異の配列組み合わせは次のとおりである：

【表 7】

表 7：マウス抗体 m A b 3 0 3 のヒト化のための配列組み合わせ

	Hu303_VL.1	Hu303_VL.1 A	Hu303_VL.1 B	Hu303_VL.1 C	Hu303_VL.1 D
Hu303_VH.1	Hu303-004	Hu303-005	Hu303-006	Hu303-007	Hu303-008
Hu303_VH.1 A	Hu303-009	Hu303-010	Hu303-011	Hu303-012	Hu303-013
Hu303_VH.1 B	Hu303-014	Hu303-015	Hu303-016	Hu303-017	Hu303-018
Hu303_VH.1 C	Hu303-019	Hu303-020	Hu303-021	Hu303-022	Hu303-023

10

注：この表は、種々の変異の種々の配列組み合わせを示す。例えば、H u 3 0 3 - 0 0 5、2 配列変異(軽鎖 H u m A b 3 0 3 __ V L . 1 A および重鎖 H u m A b 3 0 3 __ V H . 1) がヒト化マウス抗体 H u 3 0 3 - 0 0 5 に存在し、残りを同じ方法で説明し得ることを示す。

20

【 0 1 7 8 】

ヒト化抗体 m A b 3 0 3 の配列は次のとおりである：

H u 3 0 3 __ V H . 1 (H u 3 0 3 V H - C D R 移植片と同一)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQRLEWMGVINPYNGDTAYNQKFGRVTITRDTASTAY
MELSSLRSEDTAVYYCARDDGYDYDFDVGQGTITVTVSS

配列番号 2 9

H u 3 0 3 __ V H . 1 A

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQRLEWMGVINPYNGDTAYNQKFGRVTITVDKASTAY
MELSSLRSEDTAVYYCTRDDGYDYDFDVGQGTITVTVSS

配列番号 3 1

H u 3 0 3 __ V H . 1 B

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTLTDYYMNWVRQAPGQRLEWMGVINPYNGDTAYNQKFGRVTITVDKASTAY
MELSSLRSEDTAVYYCTRDDGYDYDFDVGQGTITVTVSS

配列番号 3 2

H u 3 0 3 __ V H . 1 C

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTLTDYYMNWVRQAPGQRLEWIGVINPYNGDTAYNQKFGRATLTVDKASTAY
MELSSLRSEDTAVYYCTRDDGYDYDFDVGQGTITVTVSS

配列番号 3 3

H u 3 0 3 __ V L . 1 (H u 3 0 3 V L - C D R 移植片と同一)

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDIGSRLNWWYQQKPGKAPKLLIYATSTLD SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE
EDFATYYCLQLASSPPTFGGGTKVEIK

配列番号 3 0

H u 3 0 3 __ V L . 1 A

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDIGSRLNWWYQQKPGKAPKRLIYATSTLD SGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPE
EDFATYYCLQLASSPPTFGGGTKVEIK

配列番号 3 4

H u 3 0 3 __ V L . 1 B

50

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDIGSRLNWWYQQKPGKAPKRLIYATSTLDSGVPKRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQLASSPPTFGGGTKVEIK

配列番号 3 5

H u 3 0 3 _ V L . 1 C

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDIGSRLNWLQQKPGKAFKRLIYATSTLDSGVPKRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQLASSPPTFGGGTKVEIK

配列番号 3 6

H u 3 0 3 _ V L . 1 D

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDIGSRLNWLQQKPGGAFKRLIYATSTLDSGVPKRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFADYYCLQLASSPPTFGGGTKVEIK

配列番号 3 7

【 0 1 7 9 】

実施例 5 . ヒト化抗体の組み換えおよび製造

抗体を、各可変領域と組み合わせたヒト重鎖 I g G 4 / 軽鎖 カ ッ パ 由来定常領域で構築し、I g G 4 抗体の安定性を高めるために、F c に S 2 2 8 P 変異を行った。当分野で知られる他の変異も、その性能を高めるために使用し得る。

【 0 1 8 0 】

重鎖定常領域：

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKT
YTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKS
LSLSLGK

配列番号 3 8

軽鎖定常領域：

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYE
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号 3 9

H u 2 2 9 - 0 1 3 の重鎖アミノ酸配列：

QVQLVQSGSELKPGASVKVSKASGYTFTTSGMSWVKAPGQGLKWMGWINITYSGVPTYADDFKGRFVFSLDTSVSTAY
LQISLKAEDTATYYCARDNYDARDVYYYAMDYWGQGTITVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTITCNDVHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV
VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

配列番号 4 0

H u 2 2 9 - 0 1 3 の軽鎖アミノ酸配列：

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASENITYSNLAWYQQKPGKAPKLLVYAATNLADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCQHF
WITPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号 4 1

H u 3 0 3 - 0 0 5 の重鎖アミノ酸配列：

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYMNWVRQAPGQRLEWMGVINPYNGDTAYNQKFGRVTITRDTASASTAY
MELSSLRSEDTAVYYCARDGYYDYFDVWGQGTITVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTITCNDVHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTV
DKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

配列番号 4 2

H u 3 0 3 - 0 0 5 の軽鎖アミノ酸配列：

10

20

30

40

50

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIGSRLNWWYQQKPGKAPKRLIYATSTLD SGVPSRFSGSRS GTDFTLTISLQPE
EDFATYYCLQLASSPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号 4 3

【0181】

1. 組み換え抗体の分子クローニング

可変領域コード遺伝子の配列を、ハイブリドーマスクリーニングから得た陽性抗体分子のシーケンシングにより得た。プライマーを得られた配列に従い設計し、シーケンシング遺伝子を鋳型として使用し、種々の抗体VH/VK遺伝子フラグメントをPCRにより構築し、次いで相同組み換えにより発現ベクターpHr(シグナルペプチドおよびhIgG4/h kappa定常領域(CH1-FC/CL)フラグメントと共に)に再構成して、完全長組み換え抗体のための発現プラスミドVH-CH1-FC-pHr/VL-CL-pHrを構築した。

10

【0182】

2. ヒト化抗体の分子クローニング

設計ヒト化抗体配列をコドン最適化に付し、ヒトコドン優先を有するコード配列を産生した。プライマーを設計し、抗体の種々のVH/VK遺伝子フラグメントをPCRにより構築し、相同組み換えにより発現ベクターpHr(シグナルペプチドおよびhIgG4/h kappa定常領域(CH1-FC/CL)フラグメントと共に)で再構成して、完全長ヒト化抗体のための発現プラスミドVH-CH1-FC-pHr/VL-CL-pHrを構築した。

20

【0183】

3. 組み換え、ヒト化抗体の発現および精製

抗体軽鎖および重鎖の別々の発現のためのプラスミドを、1:1.2比でHEK293E細胞に共トランスフェクトした。発現上清を6日後に集め、不純物を高速遠心分離により除去し、次いでプロテインAカラムにより精製した。カラムを、A280読み取り値がベースラインまで減少するまでPBSで洗浄した。標的タンパク質を酸性溶出緩衝液、pH3.0~pH3.5で溶出し、1M Tris-HCl、pH8.0~9.0で中和した。溶離剤を適切に濃縮し、PBSで平衡化されたゲルクロマトグラフィーSuperdex200(GE)を使用してさらに精製した。凝縮物を表すピークを除き、単一ピークを集め、使用のために等分した。

30

本発明の抗体の性能および利益を、下記生化学的試験法により検証した。

【0184】

実施例6. LAG-3抗体のヒトLAG-3タンパク質への結合についてのELISAアッセイ

抗LAG-3抗体のヒトLAG-3タンパク質への結合能をELISAアッセイにより検出した。FcまたはmFc標識を有するLAG-3融合タンパク質を、マイクロタイタープレートに被覆した抗Fcまたは抗mFc抗体への結合により96ウェルマイクロタイタープレートに固定し、抗体添加後のシグナル強度を、抗体のLAG-3への結合活性の決定に使用し、具体的実験法は次のとおりである。

40

ヤギ抗ヒトFc抗体(Jackson Immuno Research, Cat No. 109-005-008)またはヤギ抗マウスFc抗体(Sigma, Cat No. M3534-1ML)を、pH7.4のPBS緩衝液(Sigma, Cat No. P4417-100TAB)で2 µg/ml濃度に希釈し、96ウェルプレートに50 µl/ウェルの体積で加え、次いで、プレートをインキュベーターで37 °Cで2時間インキュベートした。液体廃棄後、プレートをPBS中5%スキムミルク(Bright Dairy、脱脂粉乳)を含む200 µl/ウェルの遮断溶液で遮断し、インキュベーターで37 °Cで2.5時間または一夜、4で(16~18時間)インキュベートした。遮断後、遮断溶液を廃棄し、プレートをPBST緩衝液(0.05% tween-20含有pH7.4 PBS)で5回洗浄した。LAG-3-Fc融合タンパク質(配列番号3、社内製造)またはLAG-3-mFc融合タンパク質(配列番号4、社内製造)をサンプル希釈剤(1% BSA含有pH7.4 PBS)で1

50

$\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈し、各ウェルに、 $50\mu\text{l}$ /ウェルで加えた。次いでプレートをインキュベーターで 37°C で1時間または一夜、 4°C でインキュベートした。インキュベーション後、プレートの反応溶液を廃棄し、プレートをPBSTで6回洗浄し、次いでサンプル希釈剤で希釈されている $50\mu\text{l}$ /ウェルの種々の濃度の試験抗体(ハイブリドーマ精製抗体またはヒト化抗体)と共に加え、プレートを 37°C で1時間インキュベートした。プレートを、インキュベーション後PBSTで5回洗浄し、HRPで標識し、サンプル希釈剤で希釈した $100\mu\text{l}$ /ウェルのヤギ抗マウス(Jackson Immuno Research, Cat No. 115-035-003)またはヤギ抗ヒト二次抗体(Jackson Immuno Research, Cat No. 109-035-003)と共に加え、プレートを 37°C で1時間インキュベートした。プレートをPBSTで6回洗浄後、 $50\mu\text{l}$ /ウェルのTMB色素原基質(KPL, Cat No. 52-00-03)を各ウェルに加え、室温で5～15分インキュベートし、各ウェルに $50\mu\text{l}$ /ウェル 1M H_2SO_4 を加えて反応停止させた。 450nm 波長のOD値をNOVOSTARマイクロプレートリーダーで読み、次いでLAG-3抗体のヒトLAG-3への結合の EC_{50} 値を計算した。結果は表8に示す。データは、本発明のスクリーニング方法により得た全ヒト化抗体が、ヒトLAG-3タンパク質への優れた結合活性を示したことを示した。

10

【0185】

【表 8】

表 8. 結合アッセイにおける候補抗体の EC_{50} 値の決定

候補抗体	結合 ELISA EC_{50} (nM)
mAb 229	0.129
Hu 229-008	0.506
Hu 229-009	0.152
Hu 229-010	0.174
Hu 229-011	0.201
Hu 229-012	0.268
Hu 229-013	0.106
Hu 229-014	0.153
Hu 229-015	0.156
Hu 229-016	0.154
Hu 229-017	0.048
Hu 229-019	0.068
mAb 303	0.172
Hu 303-004	0.278
Hu 303-005	0.309
Hu 303-006	0.288
Hu 303-007	0.135
Hu 303-008	0.140
Hu 303-009	0.316
Hu 303-010	0.137
Hu 303-011	0.314
Hu 303-012	0.164
Hu 303-013	0.166
Hu 303-014	0.232
Hu 303-015	0.172
Hu 303-016	0.161
Hu 303-017	0.168
Hu 303-018	0.244
Hu 303-019	0.277
Hu 303-020	0.140
Hu 303-021	0.170
Hu 303-022	0.145
Hu 303-023	0.152

【0186】

実施例 7. LAG-3 抗体とヒト LAG-3 過発現 CHO-S 細胞の結合アッセイ

抗 LAG-3 抗体の LAG-3 タンパク質過発現 CHO-S 細胞への結合能を結合アッセイにより検出した。完全長 LAG-3 プラスミド(社内製造、配列番号 2)をエレクトロポレーションにより CHO-S 細胞にトランスフェクトし、LAG-3 の発現レベルを、負荷下の 2 週間のスクリーニング後検出した。LAG-3 過発現細胞を 96 ウェルプレートの底に固定し、抗体添加後のシグナル強度を、抗体の LAG-3 への結合活性の決定に使用し過発現 CHO-S 細胞、具体的実験法は次のとおりである。

100 μ l / ウェルの細胞を、 4×10^5 / ml の密度で 96 ウェルプレートに播種し、

一夜インキュベートした。上清を廃棄し、プレートをPBSで3回洗浄し、4% PFA (100 μ l/ウェル)で半時間、室温で固定し、次いでプレートをPBSで3回洗浄した。液体廃棄後、プレートを、PBSで希釈した5%スキムミルク(Bright Dairy、脱脂粉乳)を含む200 μ l/ウェルの遮断溶液で遮断し、37℃で2.5時間インキュベートした。遮断後、遮断溶液を廃棄し、プレートをPBST緩衝液(0.05% tween-20含有pH 7.4 PBS)で5回洗浄し、サンプル希釈剤で希釈されている50 μ l/ウェルの種々の濃度の試験抗体(ハイブリドーマ精製抗体またはヒト化抗体)と共に加え、次いでインキュベーターで、37℃で1時間インキュベートした。プレートをインキュベート後5回PBSTで洗浄し、HRPで標識し、サンプル希釈剤で希釈した100 μ l/ウェルのヤギ抗マウス(Jackson Immuno Research, Cat No. 115-035-003)またはヤギ抗ヒト二次抗体(Jackson Immuno Research, Cat No. 109-035-003)と共に加え、プレートを37℃で1時間インキュベートした。プレートをPBSTで6回洗浄後、50 μ lのTMB色素原基質(KPL, Cat No. 52-00-03)を各ウェルに加え、室温で5~15分インキュベートし、反各ウェルに50 μ l 1M H_2SO_4 を加えることにより反応停止させた。450nm波長のOD値をNOVOSTARマイクロプレートリーダーで読み、次いでLAG-3抗体のLAG-3過発現CHO-S細胞への結合の EC_{50} 値を計算した。

10

【0187】

実施例8. LAG-3抗原のDauidi細胞への結合遮断における抗LAG-3抗体のアッセイ

Dauidi細胞(ヒト白血病細胞、Chinese Academy of Sciencesの細胞銀行から購入)を、 3×10^5 /ウェル密度で96ウェルプレートに播種した。1000rpmで遠心分離後、上清を廃棄し、次いでプレートを4% PFAで30分間、室温で固定した。プレートを、固定溶液排気後PBSで4回洗浄し、プレートをPBSで希釈した5%スキムミルク(Bright Dairy、脱脂粉乳)を含む200 μ l/ウェルの遮断溶液で遮断し、37℃で2.5時間インキュベートした。遮断後、遮断溶液を廃棄し、プレートをPBST緩衝液(0.05% tween-20含有pH 7.4 PBS)で5回洗浄し、ビオチン標識(ビオチン標識キット、Dojindo Chemical, Cat No. LK03)LAG-3-Fc融合タンパク質(社内製造、配列番号3)および試験抗体の勾配濃度の50 μ l/ウェル混合物と共に加え(ここで、ビオチン標識LAG-3-Fc融合タンパク質は、サンプル希釈剤(1% BSA含有pH 7.4 PBS)で最終濃度0.4 μ g/mlに希釈されている)、1時間前混合され、次いでプレートを37℃で1時間インキュベートした。反応溶液を廃棄し、プレートをインキュベート後5回PBSTで洗浄し、サンプル希釈剤で希釈した50 μ l/ウェルのHRP標識ストレプトアビジン(Sigma, Cat No. S2438)を加え、プレートを37℃で1時間インキュベートした。プレートをPBSTで5回洗浄後、50 μ l/ウェルのTMB色素原基質(KPL, Cat No. 52-00-03)を各ウェルに加え、室温で5~15分インキュベートし、反各ウェルに50 μ l 1M H_2SO_4 を加えることにより反応停止させた。450nm波長のOD値をNOVOSTARマイクロプレートリーダーで読み、次いで抗原のDauidi細胞への結合遮断におけるLAG-3抗体の活性を計算した。結果は表9に示す。データは、本発明のスクリーニング方法により得た全ヒト化抗体が、ヒトLAG-3抗原のDauidi細胞への結合を顕著に遮断したことを示す。

20

30

40

【0188】

【表 9】

表9 遮断アッセイにおける候補抗体の IC_{50} 値決定

候補抗体	結合アッセイ IC_{50} (nM)
mAb 229	1.327
Hu 229-009	0.559
Hu 229-010	0.453
Hu 229-011	0.566
Hu 229-013	0.39
Hu 229-014	0.718
Hu 229-015	0.808
Hu 229-016	0.875
Hu 229-017	0.239
Hu 229-019	0.289
mAb 303	0.596
Hu 303-004	0.502
Hu 303-005	0.622
Hu 303-006	0.821
Hu 303-007	0.343
Hu 303-008	0.346
Hu 303-009	0.417
Hu 303-010	0.346
Hu 303-011	0.728
Hu 303-012	0.361
Hu 303-013	0.347
Hu 303-014	0.467
Hu 303-015	0.398
Hu 303-016	0.395
Hu 303-017	0.398
Hu 303-018	0.608
Hu 303-019	0.471
Hu 303-020	0.345
Hu 303-021	0.456
Hu 303-022	0.360
Hu 303-023	0.369

10

20

30

【0189】

40

実施例 9. LAG-3 抗体の親和性についての B i a c o r e アッセイ

1. マウス抗捕捉用抗体をマウス抗捕捉用キット (Cat. #BR-1008-38, GE) の指示に従う方法により C M 5 バイオチップ (Cat. # BR-1000-12, GE) に共有結合させ、試験抗体を親和性により捕捉させた。次いで、LAG-3 - F l a g 抗原 (社内製造、配列番号 1) をバイオチップ表面を流し、反応シグナルを B i a c o r e 装置を使用してリアルタイムで検出して、結合および解離曲線を得て、親和性の値をフィッティングにより得た (上記表 2 参照)。実験で解離の各サイクルが完了した後、バイオチップを洗浄し、マウス抗捕捉用キットに備えられた再生溶液で再生した。結果は、LAG-3 抗体 mAb 229 および mAb 303 がヒト LAG-3 タンパク質に優れた結合活性および親和性を示すことを示す。

【0190】

50

2. ヒト抗捕捉用抗体をヒト抗捕捉用キット(Cat. # BR-1008-39, GE)の指示に従う方法によりC M 5 バイオチップ(Cat. # BR-1000-12, GE)に共有結合させ、試験抗体を親和性により捕捉させた。次いで、L A G - 3 - F l a g 抗原(社内製造、配列番号1)をバイオチップ表面を流し、反応シグナルをB i a c o r e 装置を使用してリアルタイムで検出して、結合および解離曲線を得て、親和性の値をフィッティングにより得た(下記表10参照)。実験で解離の各サイクルが完了した後、バイオチップを洗浄し、ヒト抗捕捉用キットに備えられた再生溶液で再生した。結果は、本発明のスクリーニング方法により得た抗体がヒトL A G - 3 タンパク質への優れた結合活性および親和性を示したことを示す。

【0191】

【表10】

表10. 抗L A G - 3 抗体の親和性

固定相	移動相	親和性(M)
m A b 2 2 9	L A G - 3 - F l a g	1.72E-11
H u 2 2 9 - 0 0 9		4.88E-11
H u 2 2 9 - 0 1 0		3.82E-11
H u 2 2 9 - 0 1 3		2.81E-11
H u 2 2 9 - 0 1 4		3.74E-11
H u 2 2 9 - 0 1 5		4.59E-11
H u 2 2 9 - 0 1 7		6.71E-11
H u 2 2 9 - 0 1 9		7.29E-11
m A b 3 0 3		7.49E-11
H u 3 0 3 - 0 0 4		1.06E-09
H u 3 0 3 - 0 0 5		7.15E-11
H u 3 0 3 - 0 0 6		7.53E-11
H u 3 0 3 - 0 0 9		9.43E-10
H u 3 0 3 - 0 1 0		1.47E-10
H u 3 0 3 - 0 1 4		4.91E-10
H u 3 0 3 - 0 1 6		7.48E-11

【0192】

実施例10. P B M C - T リンパ球の活性化

T リンパ球の活性化におけるL A G - 3 抗体の効果を試験するために、ヒト末梢血単核細胞(P B M C)を採取し、精製した。I L - 2 サイトカインの分泌レベルを、インビトロでブドウ球菌腸毒素B(S E B)のスーパー抗原で72時間刺激後測定した。実験方法を下に簡潔に記載する。

新たに単離し、精製したP B M Cを、96ウェル細胞培養プレートに約 1×10^5 /ウェルの細胞密度で播種し、100ng/ml S E Bスーパー抗原刺激を加、勾配希釈抗体サンプル(培地で希釈)またはブランク対照としての培地を同時に加えた。プレートを37、5%CO₂で72時間インキュベートし、細胞培養上清を回収した。培養上清中の分泌I L - 2 レベルを、E L I S A (B D、CAT # 550611)により測定した。詳細な方法は、製造業者のマニュアルに示されている。

結果を図1に示した。ヒト化L A G - 3 抗体H u 2 2 9 - 0 1 3 およびH u 3 0 3 - 0 0 5 両者は、活性化T リンパ球により分泌されるサイトカインI L - 2 レベルを種々の程度で増加でき、薬物濃度に用量-効果依存性がある。

【0193】

実施例11. L A G - 3 抗体による皮下接種U - 8 7 M G 腫瘍の阻害

この試験において、U - 8 7 M G 腫瘍担持マウスの腫瘍体積に対するヒト化抗L A G -

3 抗体の効果を測定した。

100 μ l のヒト神経腫 U87MG 細胞 (3.5×10^6 細胞) を、NOD-SCID マウス (Changzhou Cavion Experimental Animal Co., Ltd. から購入) の右肋骨に皮下摂取した。腫瘍が 10 ~ 14 日後に 40 mm³ まで増殖したら、体重または腫瘍体積が大きすぎるまたは小さすぎるものを除くマウスを、腫瘍体積 (グループ分けおよび投与は表 11 に示す) により、各群 8 マウス (D0) でアイソタイプマッチ h I g G の対照群、ヒト化 L A G - 3 候補抗体 H u 2 2 9 - 0 1 3 群およびヒト化 L A G - 3 候補抗体 H u 3 0 3 - 0 0 5 群の 3 群に無作為化した。C D 3 抗体で刺激された P B M C を腫瘍組織に 5×10^5 細胞 / 60 μ l で注射し、試験抗体の注射を i . p . 注射で、週 3 回、計 6 回で開始した。マウスの腫瘍体積を週 2 回測定し、データを記録した。腫瘍体積 (V) を：

腫瘍体積 (TV) = $1/2 \times L_{\text{長}} \times L_{\text{短}}^2$
として計算した。

各群の腫瘍体積を平均 \pm 標準誤差 (平均 \pm S E M) で表し、G r a p h p a d P r i s m 5 ソフトウェアでプロットし、二元配置 A N O V A 統計解析により分析し、腫瘍阻害率を次の式により計算した：

腫瘍増殖率 (T / C %) = $(T - T_0 / C - C_0) \times 100 \%$

腫瘍阻害率 % T G I = $1 - T / C \%$

結果を表 11 および図 2 に示した。L A G - 3 抗体 H u 2 2 9 - 0 1 3 6 mpk および H u 3 0 3 - 0 0 5 6 mpk 両者は、投与後 14 日間一定の抗腫瘍効果を有し、腫瘍阻害率はそれぞれ 27.25 % ($p < 0.05$) および 34.94 % ($p < 0.01$) であった。対照群と比較して、有意差があった ($p < 0.001$ 対 h I G g)。

【0194】

【表 11】

表 11. マウスにおける皮下接種 U-87MG 腫瘍に対するヒト化抗 L A G - 3 抗体の効果

群	用量(mpk)	0 日目平均 \pm S E M(mm ³)	14 日目平均 \pm S E M(mm ³)	P(対 h I g G)	14 日目の % T G I
h I g G 対 照	6	37.9 \pm 2.6	247.1 \pm 26.5	—	—
H u 2 2 9 - 0 1 3	6	37.9 \pm 2.5	190.1 \pm 26.2*	< 0.05	27.25%
H u 3 0 3 - 0 0 5	6	37.7 \pm 2.4	173.5 \pm 26.5**	< 0.01	34.94%

注：D0：最初の投与；二元配置 A N O V A で * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 対 h I G g。

【0195】

実施例 12. マウスにおけるヒト化抗 L A G - 3 抗体 H u 2 2 9 - 0 1 3 および H u 3 0 3 - 0 0 5 の P K アッセイ

18 匹の I C R 雄マウス、体重 18 ~ 22 g を、Sippr-BK Lab Animal Co., Ltd. から購入した。飼育期間中、マウスは水および餌を自由に利用し、マウスを 12 / 12 時間明 / 暗サイクル制御、温度 16 ~ 26 °C および相対湿度 40 ~ 70 % の実験室環境に 3 日以上適応させた。I C R マウスを番号付けし、実験 1 日前に各群 3 マウスで、種々の群に無作為に分けた。実験の日、2 群のマウスに、ヒト化候補抗体 (H u 2 2 9 - 0 1 3) をそれぞれ 3 mg / kg および 10 mg / kg の用量で静脈内注射した；他の 2 群のマウスに、ヒト化候補抗体 (H u 3 0 3 - 0 0 5) をそれぞれ 3 mg / kg および 10 mg / kg の用量で静脈内注射した。静脈注射の体積は 20 ml / kg である。

血液サンプルを投与 15 分、8 時間、1 日、2 日、4 日、7 日、10 日、14 日、21 日、28 日および 35 日後の時点で採取した。各時点約 0.1 ml の全血を、抗凝固剤不含遠沈管に採り、4 で 30 分間置き、次いで 1000 g で 15 分間遠心分離した。上清を EP チューブにピペットで移し、-80 で貯蔵した。

【0196】

薬物の血清濃度を ELISA により測定し、T1/2 および他の主パラメータを WinnoLin ソフトウェアで計算した。主薬物動態パラメータを表 12 に示す。

【表 12】

表 12. マウスにおける Hu229-013 および Hu303-005 の薬物動態パラメータ

	Hu229-013		Hu303-005	
投与(mg/kg)	3 mg/kg	10 mg/kg	3 mg/kg	10 mg/kg
t_{max} (時間)	0.25	0.25	0.25	0.25
C_{max} (μ g/ml)	51.6 \pm 1.2	130 \pm 20.2	68.2 \pm 8.4	243.2 \pm 19.9
AUC_{0-t} (μ g/ml \cdot h)	5556 \pm 891	17120 \pm 4177	6386 \pm 453	22609 \pm 1567
$AUC_{0-\infty}$ (μ g/ml \cdot h)	5871 \pm 1036	19736 \pm 6142	7124 \pm 581	27061 \pm 5154
$t_{1/2}$ (h)	183 \pm 54	276 \pm 193	232 \pm 24	330 \pm 194
CL_z/F (ml/分/kg)	0.0087 \pm 0.0015	0.0092 \pm 0.0034	0.007 \pm 0.0006	0.0063 \pm 0.0011
V_z/F (ml/kg)	134 \pm 16	186 \pm 107	141 \pm 14	168 \pm 66
$MRT_{0-\infty}$ (h)	241 \pm 59	353 \pm 191	324 \pm 37	411 \pm 181

ヒト化 LAG-3 抗体 Hu229-013 および Hu303-005 のマウスへのインビボ暴露は類似し、3 mg/kg および 10 mg/kg 用量のこれら 2 抗体の暴露量およびピーク濃度は用量増加と直線的に比例し、直線的薬物動態特徴を示した。

【0197】

抗体医薬組成物(製剤)の製剤方法の例

工程 1: LAG-3 抗体を含む製剤の原液を 0.22 μ m PVDF フィルターを通し、濾液を無菌試験のためにサンプリングし、濾液を取得した。

工程 2: 充填体積を 5.3 ml に調節し、濾液を 6 ml ストッパー付きバイアルに充填し、充填方法の開始時、中途および終了時にそれぞれサンプリングして、体積差異を検出した。

工程 3: キャッピング機を使用してアルミニウムキャップで施蓋した。

工程 4: 不正確な充填など何らかの不備がないかを確認するため目視を実施した。ラベルを印刷し、バイアルに貼った。紙トレイ用ラベルを印刷し、紙トレイを折り畳み、バイアルを紙トレイに入れ、紙トレイにラベルを貼った。

【0198】

抗体医薬組成物の製剤方法例

工程 1: Hu303-005 を含む製剤の原液を 0.22 μ m PVDF フィルターを通し、濾液を無菌試験のためにサンプリングし、濾液を取得した。

工程 2: 充填体積を 5.3 ml に調節し、濾液を 20 ml バイアルに充填し、プラグをバイアルに半分押し込み、原液を凍結乾燥し、ゴム栓でバイアルを密封した。

工程 3: キャッピング機を使用してアルミニウムキャップで施蓋した。

工程 4: 凍結中の崩壊など何らかの不備がないかを確認するため目視検査を実施した。ラベルを印刷し、バイアルに貼った。紙トレイ用ラベルを印刷し、紙トレイを折り畳み、バイアルを紙トレイに入れ、紙トレイにラベルを貼付した。

【 0 1 9 9 】

実施例 13. L A G - 3 抗体製剤のための緩衝系スクリーニング

L A G - 3 抗体 H u 2 2 9 - 0 1 3 または H u 3 0 3 - 0 0 5 製剤を、一連の 1 0 m M 緩衝液、p H 5 . 0 ~ 7 . 5 で、タンパク質濃度 5 0 m g / m L で調製し、各製剤を濾過し、ストッパー付きバイアルに入れ、バイアルに施蓋し、密封した。サンプルを、4 0 高温などの過酷分解試験に付し、振盪し、見かけ、サイズ排除クロマトグラフィー (S E C)、非還元ドレシル硫酸ナトリウム (C E - S D S) キャピラリー電気泳動およびイオン交換クロマトグラフィー (I E C) または画像化キャピラリー等電点電気泳動 (i C I E F) により評価した。結果を表 1 3 - 1 および表 1 3 - 2 に示し、統計分析の結果を図 3 ~ 図 6 に示す。

【 0 2 0 0 】

【 表 1 3 - 1 】

表 1 3 - 1. H u 2 2 9 - 0 1 3 緩衝系のスクリーニング結果

緩衝液/ p H	条件	見かけ	S E C % 単量体	非還元 C E %	I E C %		
					酸	中性	アルカリ 性
酢酸-酢 酸ナトリ ウム(AA) ／5.0	D 0	透明、数粒 子含有	9 9 . 3	9 7 . 1	1 0 . 4	7 8 . 2	1 1 . 4
	4 0 ° C D 1 2	透明、数糸 状粒子含有	9 9 . 1	9 4 . 9	1 3 . 9	6 3 . 4	2 2 . 8
	4 0 ° C D 3 1	N / A	9 8 . 5	8 7 . 2	2 0 . 6	5 0 . 5	2 8 . 9
	振盪 D 6	濁った	9 9 . 0	9 6 . 7	1 0 . 9	7 5 . 8	1 3 . 3
酢酸-酢 酸ナトリ ウム／5. 5	振盪 D 1 2	透明、数小 粒子含有	9 8 . 8	9 7 . 0	1 1 . 0	7 5 . 0	1 3 . 9
	D 0	透明、数粒 子含有	9 9 . 3	9 7 . 2	1 0 . 5	7 8 . 4	1 1 . 1
	4 0 ° C D 1 2	透明、数糸 状粒子含有	9 9 . 1	9 5 . 5	1 5 . 4	6 6 . 5	1 8 . 1
	4 0 ° C D 3 1	N / A	9 8 . 6	9 1 . 7	2 4 . 6	5 5 . 0	2 0 . 4
	振盪 D 6	濁った	9 9 . 0	9 6 . 6	1 0 . 9	7 6 . 2	1 2 . 8
	振盪 D 1 2	乳色、数小 粒子含有	9 9 . 0	9 7 . 0	1 1 . 2	7 5 . 7	1 3 . 1

10

20

30

【表 1 3 - 2】

コハク酸 -コハク 酸ナトリ ウム(SA) ／5.5	D 0	透明、数粒 子含有	9 9.3	9 7.1	1 2.6	7 6.3	1 1.2
	4 0℃D 1 2	相当な糸状 粒子	9 9.0	9 5.5	1 5.5	6 5.2	1 9.3
	4 0℃D 3 1	N/A	9 8.5	8 6.6	2 4.1	5 3.4	2 2.5
	振盪D 6	濁った、糸 状大粒子含 有または沈 殿	9 9.1	9 6.6	1 1.0	7 6.1	1 2.8
	振盪D 1 2	透明、数小 粒子含有	9 9.1	9 7.0	1 1.3	7 5.1	1 3.7
コハク酸 -コハク 酸ナトリ ウム／6. 0	D 0	透明、数粒 子含有	9 9.3	9 7.2	1 3.0	7 6.2	1 0.8
	4 0℃D 1 2	透明、数糸 状粒子含有	9 9.0	9 6.0	1 5.6	7 0.2	1 4.3
	4 0℃D 3 1	N/A	9 8.4	9 2.4	2 7.5	5 7.2	1 5.3
	振盪D 6	濁った、糸 状大粒子含 有または沈 殿	9 9.0	9 6.6	1 1.2	7 6.3	1 2.6
	振盪D 1 2	相当な小粒 子	9 9.2	9 7.0	1 1.3	7 6.4	1 2.3

10

20

30

【表 1 3 - 3】

クエン酸 -クエン 酸ナトリ ウム(CA) ／5.5	D 0	透明、数粒 子含有	9 9 . 3	9 7 . 1	1 3 . 1	7 6 . 3	1 0 . 6
	4 0℃D 1 2	相当な糸状 粒子	9 9 . 0	9 5 . 2	1 5 . 4	6 4 . 9	1 9 . 7
	4 0℃D 3 1	N/A	9 8 . 2	9 0 . 4	2 4 . 2	5 1 . 7	2 4 . 1
	振盪D 6	濁った、糸 状大粒子含 有または沈 殿	9 9 . 2	9 6 . 7	1 1 . 0	7 6 . 0	1 3 . 0
	振盪D 1 2	濁った、小 粒子沈殿	9 9 . 2	9 6 . 9	1 1 . 2	7 5 . 1	1 3 . 7
クエン酸 -クエン 酸ナトリ ウム／6. 0	D 0	透明、数粒 子含有	9 9 . 3	9 7 . 3	1 2 . 8	7 6 . 8	1 0 . 4
	4 0℃D 1 2	相当な糸状 粒子	9 9 . 0	9 5 . 9	1 4 . 6	6 3 . 0	2 2 . 3
	4 0℃D 3 1	N/A	9 8 . 7	9 2 . 1	2 5 . 7	5 8 . 2	1 6 . 0
	振盪D 6	濁った、糸 状大粒子含 有または沈 殿	9 9 . 0	9 6 . 8	1 1 . 1	7 6 . 3	1 2 . 5
	振盪D 1 2	濁った、小 粒子沈殿	9 9 . 0	9 7 . 0	1 4 . 0	7 3 . 8	1 2 . 1

10

20

30

【表 1 3 - 4】

ヒスチジン-塩酸(His-HCl)/5.5	D 0	透明、数粒子含有	99.3	96.7	10.5	78.3	11.1
	40℃D 12	相当な糸状粒子	99.1	95.1	16.9	66.6	16.5
	40℃D 31	N/A	98.7	90.2	21.7	51.4	26.9
	振盪D 6	濁った	99.0	96.7	10.7	76.3	12.9
	振盪D 12	相当な小粒子	99.2	96.9	11.0	75.7	13.3
ヒスチジン-塩酸/6.0	D 0	透明、数粒子含有	99.3	96.4	10.3	79.2	10.5
	40℃D 12	相当な糸状粒子	99.1	95.7	16.6	65.8	17.6
	40℃D 31	N/A	98.8	92.0	25.7	57.0	17.3
	振盪D 6	濁った、糸状大粒子含有または沈殿	99.1	96.8	10.9	77.2	11.9
	振盪D 12	相当な小粒子	99.2	96.9	11.5	76.3	12.2
Tris 7.5	D 0	透明、数粒子含有	99.1	96.4	11.0	79.8	9.2
	40℃D 12	相当な糸状粒子 98.8	95.6	27.9	62.0	10.1	
	40℃D 31	N/A	98.0	92.0	45.9	45.9	8.3
	振盪D 6	濁った、糸状大粒子含有または沈殿	99.1	96.7	12.7	77.6	9.7
	振盪D 12	濁った、小粒子沈殿	99.0	97.0	14.0	76.7	9.3

10

20

30

40

注：0.01 mg/ml ポリソルベート 80 を加えて振盪 D 12 サンプルを調製し、他のサンプルはポリソルベート 80 を含まなかった；D は日数を示す。

【0201】

【表 13 - 5】

表 13-2. Hu 303-005 緩衝系のスクリーニング結果				
緩衝液／pH	条件	見かけ	i C I E F 中性 ピーク%	非還元 C E - S D S %
酢酸－酢酸ナトリウム(AA)5.0	D 0	透明	55.7	97.28
	40℃D 1 1	N/A	26.0	92.57
	振盪D 3	透明	N/A	N/A
酢酸－酢酸ナトリウム5.5	D 0	透明	57.0	97.63
	40℃D 1 1	N/A	32.9	94.27
	振盪D 3	数粒子	N/A	N/A
コハク酸－コハク酸ナトリウム(SA)5.0	D 0	透明	56.9	97.48
	40℃D 1 1	N/A	19.6	90.11
	振盪D 3	透明、乳色	N/A	N/A
コハク酸－コハク酸ナトリウム5.5	D 0	透明、乳色	55.2	97.23
	40℃D 1 1	N/A	29.0	92.11
	振盪D 3	多数の粒子	N/A	N/A
コハク酸－コハク酸ナトリウム6.0	D 0	透明	59.1	97.41
	40℃D 1 1	N/A	37.7	94.55
	振盪D 3	多数の粒子	N/A	N/A
ヒスチジン－塩酸(His-HCl)5.5	D 0	透明	55.8	97.11
	40℃D 1 1	N/A	25.5	91.31
	振盪D 3	透明	N/A	N/A
ヒスチジン－塩酸6.0	D 0	透明	59.9	97.41
	40℃D 1 1	N/A	37.3	95.38
	振盪D 3	多数の微粒子	N/A	N/A
ヒスチジン－塩酸6.5	D 0	透明	57.0	97.63
	40℃D 1 1	N/A	45.9	94.38
	振盪D 3	多数の微粒子	N/A	N/A
クエン酸－クエン酸ナトリウム(CA)5.5	D 0	透明、乳色	55.2	97.64
	40℃D 1 1	N/A	24.5	90.57
	振盪D 3	透明細糸、タンパク質沈殿	N/A	N/A

10

20

30

【表 13 - 6】

クエン酸-クエン酸ナトリウム 6.0	D 0	透明、乳色	5 6.6	9 7.0 5
	4 0℃D 1 1	N/A	3 6.4	9 3.5 3
	振盪D 3	数粒子	N/A	N/A
クエン酸-クエン酸ナトリウム 6.5	D 0	透明、乳色	5 5.4	9 7.4 8
	4 0℃D 1 1	N/A	4 3.3	9 4.6 4
	振盪D 3	数粒子	N/A	N/A
リン酸水素ナトリウム-リン酸水素二ナトリウム(PB)6.0	D 0	多数の粒子	5 4.9	9 7.3 0
	4 0℃D 1 1	N/A	3 6.8	9 5.1 6
	振盪D 3	多数の微粒子	N/A	N/A
リン酸水素ナトリウム-リン酸水素二ナトリウム6.5	D 0	多数の粒子	5 5.2	9 7.2 8
	4 0℃D 1 1	N/A	4 7.0	9 4.0 7
	振盪D 3	多数の微粒子	N/A	N/A
リン酸水素ナトリウム-リン酸水素二ナトリウム7.0	D 0	多数の粒子	5 6.4	9 7.6 9
	4 0℃D 1 1	N/A	4 6.5	9 3.7 1
	振盪D 3	多数の微粒子	N/A	N/A

10

20

注：D は日数を示す；N/A は実施せず。

【0202】

結果は次のことを示した。

(1) 抗体Hu229-013は酢酸-酢酸ナトリウム(AA)系で最良の見かけを有し、コハク酸-コハク酸ナトリウム(SA)およびヒスチジン-塩酸(His-HCl)系が続いた。40℃CEで、IEC純度は酢酸-酢酸ナトリウム(AA)、pH5.5、コハク酸-コハク酸ナトリウム(SA)、pH6.0、クエン酸-クエン酸ナトリウム(CA)、pH6.0、ヒスチジン-塩酸(His)、pH6.0系で高かった。見かけおよびCE、IEC結果を考慮して、LAG-3抗体Hu229-013はAA(pH5.5)、SA(pH6.0)、His-HCl(pH6.0)系で比較的安定であった(図3および図4参照)。

30

【0203】

(2) 抗体Hu303-005の振盪見かけデータは、pHが低いほど見かけが良好であり、緩衝系ヒスチジン-塩酸(His-HCl)および酢酸-酢酸ナトリウム(AA)が優れたことを示した。CE-SDS(非還元)およびiCIEFは40℃の加速条件下で顕著な分解を示し、一方CE-SDSデータはpH6.0が優れ、緩衝系酢酸-酢酸ナトリウム、ヒスチジン-塩酸(His-HCl)およびリン酸系が優れたことを示した。iCEデータは、中性ピークの減少がpH高いほど少ないことを示した(図5および図6参照)。全体的考察後、好ましい緩衝系は10mM His-HCl pH6.0である。

40

【0204】

実施例14. スLAG-3抗体製剤のアジュバントクリーニング

(1) LAG-3 Hu229-013製剤を、10mM コハク酸-コハク酸ナトリウム緩衝液、pH6.0で、タンパク質濃度50mg/mLで、下に示す種々の濃度の界面活性剤および糖類と共に調製した。結果を表14-1に示した。

- 1) 0.1mg/mL ポリソルベート20(PS20)
- 2) 0.1mg/mL ポリソルベート80(PS80)
- 3) 70mg/mL スクロース

50

- 4) 70 mg/mL トレハロース
- 5) 50 mg/mL マンニトール
- 6) 50 mg/mL ソルビトール

【0205】

(2) 抗体 Hu303-005 製剤を 10 mM 酢酸(ナトリウム)、pH 5.5 で、抗体濃度 50 mg/mL で、下に示す種々の濃度の界面活性剤および糖類と共に調製した。結果を図 7 および表 14-2 に示した。

- 1) 75 mg/mL スクロース + 0.2 mg/mL PS80
- 2) 75 mg/mL トレハロース + 0.2 mg/mL PS80
- 3) 0.05 mg/mL ポリソルベート 20 (PS20)
- 4) 0.05 mg/mL ポリソルベート 80 (PS80)
- 5) 0.2 mg/mL PS20
- 6) 0.2 mg/mL PS80
- 7) 0.4 mg/mL PS20
- 8) 0.4 mg/mL PS80

10

【0206】

各製剤を濾過し、ストッパー付きバイアルに加え、バイアルを蓋し、密封した。サンプルを、40 高温、反復凍結 - 融解、振盪などの過酷分解試験に付した。結果を表 14 および図 7 に示した

【0207】

20

【表 14 - 1】

表 14-1. Hu 229-013 の安定性に対する種々のアジュバントの効果

製剤アジュバント	条件	見かけ	SEC%	IEC%	非還元C E-SD S%
			単量体	中性	
0.1 mg/ml PS 20	D 0	透明	99.2	73.5	97.0
	1回凍結-融解	透明	N/A	N/A	N/A
	40℃ D 1 4	透明、数小粒子	98.9	68.3	95.2
	振盪D 9	乳色、多数の大粒子含有	98.9	74.6	96.2
0.1 mg/ml PS 80	D 0	透明	99.2	74.1	96.9
	1回凍結-融解	透明	N/A	N/A	N/A
	40℃ D 1 4	透明、数小粒子	99.0	68.7	95.4
	振盪D 9	透明	99.2	74.3	96.5
70 mg/ml スクロース	D 0	透明、数粒子含有	99.2	74.9	96.7
	1回凍結-融解	数粒子	N/A	N/A	N/A
	40℃ D 1 4	透明、多数の小粒子	98.9	68.9	95.2
	振盪D 9	乳色、大羊毛状沈殿	98.9	74.0	96.6
70 mg/ml トレハロース	D 0	透明、数粒子含有	99.2	74.0	96.5
	1回凍結-融解	多数の粒子	N/A	N/A	N/A
	40℃ D 1 4	透明、多数の小粒子	98.9	69.1	95.3
	振盪D 9	乳色、大羊毛状沈殿	99.1	73.9	96.7
50 mg/ml マンニトール	D 0	透明、数粒子含有	99.2	74.3	96.3
	1回凍結-融解	粒子含有	N/A	N/A	N/A
	40℃ D 1 4	透明、多数の小粒子	98.9	68.3	95.1
	振盪D 9	大羊毛状沈殿	99.1	74.5	96.6
50 mg/ml ソルビトール	D 0	透明、数粒子含有	99.1	74.1	95.9
	1回凍結-融解	粒子含有	N/A	N/A	N/A
	40℃ D 1 4	透明、多数の小粒子	99.0	67.7	94.6
	振盪D 9	大羊毛状沈殿	99.2	74.1	96.7

10

20

30

40

50

注：Dは日数を示す。

【0208】

【表14-2】

表14-2. Hu303-005の安定性に対する種々のアジュバントの効果

製剤アジュバント	条件	見かけ	SEC 単量体%
7.5mg/mL スクロース +0.2mg/mL PS80	D0	透明	99.2
	振盪D9	極めて少ない粒子	96.0
7.5mg/mL トレハロース +0.2mg/mL PS80	D0	透明	99.3
	振盪D9	透明	94.8
0.05mg/mL ポリソルベート20(PS20)	D0	透明	99.3
	振盪D9	透明、深い乳色	17.5
0.05mg/mL ポリソルベート80(PS80)	D0	透明	99.2
	振盪D9	透明、浅い乳色	19.7
0.2mg/mL PS20	D0	透明	99.1
	振盪D9	透明	89.3
0.2mg/mL PS80	D0	透明	98.9
	振盪D9	透明	94.4
0.4mg/mL PS20	D0	透明	99.1
	振盪D9	透明	98.4
0.4mg/mL PS80	D0	透明	99.2
	振盪D9	透明	98.3

10

20

注：Dは日数を示す。

30

【0209】

結果は次のことを示した。

(1) PS80振盪群の抗体Hu229-013製剤の見かけはPS20振盪群のものより優れた；1回凍結および融解後、数粒子がスクロース群に出現し、多数の粒子がトレハロース群に出現した；他の群間で差異はなかった；それ故に、アジュバントは好ましくはポリソルベート80およびスクロースであった。

【0210】

(2) 抗体Hu303-005製剤の見かけはトレハロース群でわずかに良かったが、SEC結果はスクロース群が僅かに良いことを示した；全体として、スクロース群とトレハロース群に明白な差異はなかった。見かけおよびSECデータは、PS80がPS20より優れ、図7に示すとおり、ポリソルベート含量増加が見かけおよびSEC安定性を顕著に改善できることを示す。それ故に、PS80が好ましく、PS濃度は0.2mg/mlより高濃度とすべきである。

40

【0211】

実施例15. LAG-3抗体の安定性評価

(1) LAG-3抗体Hu229-013製剤を、下に示す種々の緩衝液で、タンパク質濃度50mg/mLで、60mg/ml スクロースおよび0.4mg/mL ポリソルベート80を含んで調製した：

- 1) 10mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム(AA)pH5.5；
- 2) 10mM ヒスチジン - 酢酸(His-AA)pH6.0；

50

- 3) 10 mM ヒスチジン - 塩酸 (His - HCl) pH 6.0 ;
 4) 10 mM コハク酸 - コハク酸ナトリウム (SA) pH 6.0。

【0212】

(2) Hu303 - 005 製剤、下に示す種々の緩衝液で、タンパク質含量 50 mg / mL で、
 75 mg / mL スクロースおよび 0.4 mg / mL P S 80 を含んで調製した：

- 1) 10 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム (AA) pH 5.5
 2) 10 mM ヒスチジン - 塩酸 (His - HCl) pH 6.0
 3) 10 mM ヒスチジン - 塩酸 (His - HCl) pH 6.5。

【0213】

各製剤を濾過し、ストッパー付きバイアルに充填し、バイアルを施蓋し、密封した。調
 製サンプルを 25 または 4 において、安定性を観察した。検出項目は見かけ、SEC
 、IEC または iCE、CE - SDS (非還元) であった。

【0214】

【表15 - 1】

表15 - 1. Hu229 - 013 の安定性結果

緩衝液 / pH	時間	見かけ	SEC 単 量体 %	IEC 中性 ピーク %	CE 純度 %
AA 5.5	M0	透明	99.2	75.0	97.0
	4℃M3.5	明澄透明	99.2	75.1	96.7
	25℃M3.5	明澄透明	98.8	65.4	95.0
His - A A 6.0	M0	透明	99.1	75.4	97.2
	4℃M3.5	明澄透明	99.2	76.9	96.9
	25℃M3.5	明澄透明	99.0	68.6	95.3
His - H C1 6.0	M0	透明	99.3	75.4	97.3
	4℃M3.5	明澄透明	99.2	75.7	96.7
	25℃M3.5	数粒子	99.0	67.9	95.2
SA 6.0	M0	透明	99.2	74.9	97.2
	4℃M3.5	明澄透明	99.2	76.7	96.9
	25℃M3.5	数粒子	98.8	68.1	96.5

注：M3.5 は 3.5 か月を意味する

【0215】

【表 15 - 2】

表 15-2 Hu303-005の4℃での安定性結果

緩衝液/ pH	時間(M)	見かけ	SEC 単量体%	非還元C E-SD S%	i C I E F %		
					酸	中性	アルカリ 性
AA 5. 5	0	透明	99.1	97.1	22.9	55.9	21.2
	1	透明	99.1	97.0	23.6	59.6	16.8
	3	N/A	99.2	97.0	20.2	57.5	22.2
His- HCl 6.0	0	透明	99.1	97.6	23.3	58.2	18.5
	1	透明	99.1	97.1	23.4	60.7	15.9
	3	N/A	99.1	97.2	22.1	59.4	18.6
His- HCl 6 .5	0	透明	99.2	97.5	22.9	57.8	19.3
	1	透明	98.9	96.9	23.2	63.3	13.5
	3	N/A	99.1	96.3	23.8	61.4	14.9

10

注：Mは月数を示し、N/Aは実施せず。

【0216】

20

結果は次のことを示した。

(1) LAG-3抗体Hu229-013は10mM AA pH5.5、10mM His-AA pH6.0系でより安定である。

【0217】

(2) 4で3か月置いた後、抗体Hu303-005のCEはHis-HCl(pH6.5)群でわずかに減少し、抗体のiCEはAA pH5.5およびHis-HCl pH6.5群でわずかに代わり、抗体はHis-HCl(pH6.0)で最も安定であった。

【0218】

実施例16. LAG-3抗体製剤の最適化

緩衝液のタイプ、pHおよびイオン強度をさらに最適化するために、抗体Hu229-013の濃度を50mg/mlに設定し、DOE実験をJMPソフトウェアで設計した。一連の製剤をRSMモデルを使用して得た。IEC、CE(非還元)およびマイクロ流体イメージング(MFI)を、過酷分解法の評価指標として使用した。結果を最小二乗法により統計解析した。DOEパラメータを表16に示した。試験製剤および結果を表17および表18に示した。

30

【0219】

【表 16】

表 16. DOE設計因子およびレベル

因子	レベル	観察
緩衝系	AA/His-AA	高温25/40℃、振盪、凍結-融解 #
pH	5.0~5.8	
イオン強度	10~30mM	

40

【0220】

【表 17】

表 17. Hu 229-013 の DOE 設計製剤

バッチ番号	緩衝系	イオン強度	pH	他のアジュバント
1	ヒスチジン-酢酸(His-AA)	20	5.5	75mg/ml スクロース、0.2mg/ml PS80
2	His-AA	10	5.8	
3	酢酸-酢酸ナトリウム(AA)	20	5.8	
4	His-AA	10	5.2	
5	His-AA	30	5.8	
6	AA	10	5.5	
7	AA	20	5.2	
8	AA	30	5.5	
9	His-AA	30	5.2	
10	His-AA	20	5.5	

10

【0221】

20

【表 18】

表 18. DOE 製剤のスクリーニング結果

バッチ番号	MFI (> 2 μ m 粒子/ml)			IEC - 中性ピーク%			非還元 CE-SDS %		
	D0	凍結-融解 5 回	振盪	D0	25 $^{\circ}$ C 1 D2 1	40 $^{\circ}$ C 1 D2 1	D0	25 $^{\circ}$ C 1 D2 1	40 $^{\circ}$ C 1 D2 1
1	7594	7589	264	72.7	70.9	57.2	96.8	96.8	93.0
2	9184	7213	2422	73.1	70.9	59.7	96.9	96.9	93.7
3	10136	11806	274	76.5	68.4	59.1	96.7	96.8	94.1
4	16711	8399	474	76.0	70.2	56.7	96.6	96.6	92.8
5	32780	2975	604	75.6	67.6	56.9	96.6	96.7	93.5
6	11503	4013	1751	75.5	67.7	57.4	96.6	96.5	93.8
7	5973	11522	790	75.9	67.4	55.6	96.6	96.5	92.5
8	29206	10532	159	74.9	67.6	57.4	96.5	96.5	93.2
9	5625	4878	660	75.9	67.9	53.8	96.8	96.6	91.6
10	12970	3588	1464	76.1	69.2	56.9	96.7	96.7	93.1

30

40

注：M1 は 1 か月を意味し、D は日数を意味する。

【0222】

過酷分解で得たデータをフィッティングに付し、結果はLAG-3 抗体Hu229-013 が 10 ~ 30 mM 酢酸-酢酸ナトリウム(AA) 緩衝液またはヒスチジン-酢酸緩衝液(His-AA) 系、pH 5.2 ~ 5.8 で良好な安定性を示すことを示した。好ましくは、緩衝系は 10 ~ 30 mM 酢酸-酢酸ナトリウム(AA)、pH 5.5 である。

【0223】

実施例 17. LAG-3 抗体製剤の安定性試験

50

LAG-3 Hu229-013 製剤を、10mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム pH 5.5 緩衝液で、タンパク質濃度 60mg/mL で、60mg/ml スクロースおよび 0.4mg/mL ポリソルベート 80 を含んで調製した。

製剤を濾過し、ストッパー付きバイアルに加え、バイアルを蓋し、密封した。調製サンプルを 4 に置いて、安定性を観察した。検出項目は見かけ、SEC、IEC、CE-SDS (非還元) を含む。

【0224】

【表19】

表19. Hu229-013の安定性結果

温度	時間 (M)	見かけ	SEC%			非還元CE-SDS%	IEC%		
			凝集	単量体	フラグメント		酸	中性	アルカリ性
4℃	0	透明	1.1	98.9	0.0	97.6	14.4	72.0	13.6
	1	透明	1.0	98.9	0.1	96.2	14.5	71.8	13.6
	3	透明	1.0	98.8	0.1	96.8	16.2	68.4	15.5
	6	透明	1.2	98.7	0.1	96.9	14.0	73.0	13.0
	9	透明	1.2	98.8	0.1	97.3	13.8	71.4	14.9

10

20

結果は、Hu229-013 製剤が 4 で 9 か月間その安定性を保持することを示した。

【0225】

実施例18. LAG-3 抗体製剤の最適化

(1) Hu229-013 製剤に含まれる成分の最適化

タンパク質、スクロースおよびポリソルベート 80 の濃度をさらに最適化するために、緩衝液を 10mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム、pH 5.5 に設定した。DOE 実験設計を JMP ソフトウェアを使用して実施した。一連の製剤を RSM モデルを使用して得て、IEC および CE (非還元) を、過酷分解法の評価指標として使用した。結果を最小二乗法により統計解析した。DOE パラメータを表 20 に示した。試験結果を表 21 に示した。統計解析結果を図 8、図 9 および表 21 に示した。

30

【0226】

【表20】

表20. DOE 設計因子およびレベル

因子	レベル	観察
タンパク質濃度	40-80mg/ml	高温 40℃
スクロース濃度	30-90mg/ml	
PS80濃度	0.1-0.5mg/ml	

40

【0227】

【表 2 1】

表 2 1. DOE 設計製剤およびスクリーニング結果

番号	タンパク 質濃度m g/ml	スクロー ス濃度m g/ml	P S 8 0 濃度 mg/ml	I E C 中性ピーク%		非還元CE-SDS 純度%	
				D 0	4 0℃ D 1 6	D 0	4 0℃ D 1 6
1	6 0	6 0	0.1	7 8.0	6 0.6	9 5.1	9 4.4
2	4 0	3 0	0.1	7 7.2	6 0.7	9 6.4	9 4.3
3	4 0	6 0	0.3	7 7.8	6 0.5	9 6.1	9 4.2
4	6 0	9 0	0.5	7 4.6	5 9.8	9 4.6	9 4.5
5	6 0	3 0	0.3	7 7.4	6 0.0	9 4.6	9 4.5
6	4 0	9 0	0.1	7 7.5	5 9.8	9 6.0	9 4.3
7	4 0	6 0	0.3	7 7.6	5 9.9	9 6.1	9 4.2
8	8 0	3 0	0.1	7 5.8	5 9.6	9 4.8	9 4.4
9	8 0	9 0	0.3	7 7.6	5 8.9	9 5.1	9 4.4
1 0	6 0	6 0	0.3	7 7.7	5 9.6	9 4.6	9 4.2
1 1	8 0	6 0	0.5	7 7.6	5 9.6	9 5.2	9 4.1
1 2	4 0	3 0	0.5	7 7.5	6 0.0	9 5.6	9 4.0

10

20

【0 2 2 8】

種々の過酷分解から得たデータをフィッティングに付し、結果は次のとおりであった。

D 0 での I E C 値および 4 0 での I C E 値の差値をフィッティングに付した。 $R^2 > 0.98$ 、 $P < 0.06$ 、モデルを検証し、結果を図 8 に示した。D 0 での C E 純度値とおよび 4 0 での C E 純度値の差値をフィッティングに付した。 $R^2 > 0.99$ 、 $P < 0.05$ 、モデルを検証し、結果を図 9 に示した。4 0 I E C のフィッティング結果はより好ましい製剤が 4 0 ~ 6 0 mg/ml タンパク質濃度、3 0 ~ 9 0 mg/ml 糖類濃度および 0.4 ~ 0.5 mg/ml P S 8 0 濃度であることを示し、4 0 C E のフィッティング結果はより好ましい製剤が 5 0 ~ 8 0 mg/ml タンパク質濃度、3 0 ~ 9 0 mg/ml 糖類濃度および 0.1 ~ 0.5 mg/ml P S 8 0 濃度であることを示した。それ故に、最も好ましい範囲は 5 0 ~ 6 0 mg/ml タンパク質濃度、3 0 ~ 9 0 mg/ml スクロース濃度および 0.4 ~ 0.5 mg/ml P S 8 0 濃度である。

30

【0 2 2 9】

(2) H u 3 0 3 - 0 0 5 抗体製剤に含まれる成分の最適化

スクロース濃度を 7 5 mg/ml に設定し、D O E 実験を 1 0 mM H i s 緩衝液 pH 値で設計し、タンパク質濃度およびポリソルベート濃度を変数として使用した。R S M モデルを使用して一連の製剤を得た。製剤を表 2 2 に示した。i C I E F、C E (非還元)および D L S を、過酷分解法の評価指標として使用した。結果を最小二乗法により統計解析した。結果を表 2 3 および図 1 0 に示した。

40

【0 2 3 0】

【表 2 2】

表 2 2. 抗体H u 3 0 3 - 0 0 5 製剤のためのDOE製剤のスクリーニング

番号	p H	P S 8 0 mg/mL	タンパク質濃度mg/mL
1	5.5	0.1	5 0
2	6.5	0.3 5	4 0
3	5.5	0.6	6 0
4	5.5	0.3 5	4 0
5	6	0.3 5	6 0
6	6.5	0.6	6 0
7	6	0.3 5	5 0
8	6.5	0.1	5 0
9	6	0.1	4 0
1 0	6	0.1	6 0
1 1	6	0.6	4 0
1 2	6	0.3 5	5 0

【 0 2 3 1】

【表 2 3】

表 2 3. Hu 3 0 3 - 0 0 5 抗体製剤の D O E 製剤のスクリーニング結果				
番号	条件	D L S	i C I E F 中性	非還元 C E - S
		平均粒子径nm	ピーク(%)	D S %
1	D 0	N / A	5 8.3	9 7.6 0
	2 5℃-D 1 3	N / A	4 6.8	9 7.4 6
	4 0℃-D 1 3	1 1.5	2 2.4	9 6.5 5
2	D 0	N / A	5 7.3	9 8.4 7
	2 5℃-D 1 3	N / A	5 4.8	9 6.9 2
	4 0℃-D 1 3	1 2.2	4 0.8	9 6.1 2
3	D 0	N / A	5 7.5	9 7.5 4
	2 5℃-D 1 3	N / A	4 7.1	9 7.3 5
	4 0℃-D 1 3	1 1.6	2 3.5	9 6.7 9
4	D 0	N / A	5 6.1	9 8.4 6
	2 5℃-D 1 3	N / A	4 7.7	9 7.1 9
	4 0℃-D 1 3	1 1.7	2 2.9	9 6.2 3
5	D 0	N / A	5 9.3	9 7.8 2
	2 5℃-D 1 3	N / A	5 1.9	9 7.5 8
	4 0℃-D 1 3	1 2.0	3 2.7	9 6.8 6
6	D 0	N / A	5 8.5	9 7.6 1
	2 5℃-D 1 3	N / A	5 5.3	9 7.3 7
	4 0℃-D 1 3	1 3.0	4 2.6	9 6.5 7
7	D 0	N / A	5 9.1	9 7.6 5
	2 5℃-D 1 3	N / A	5 1.4	9 7.5 1
	4 0℃-D 1 3	1 1.9	3 2.3	9 6.6 9
8	D 0	N / A	5 7.0	9 7.4 3
	2 5℃-D 1 3	N / A	5 5.0	9 7.3 8
	4 0℃-D 1 3	1 2.5	4 2.1	9 5.8 9
9	D 0	N / A	5 7.0	9 7.3 1
	2 5℃-D 1 3	N / A	5 2.8	9 7.7 5
	4 0℃-D 1 3	1 1.8	3 1.4	9 6.3 8
1 0	D 0	N / A	5 6.4	9 7.3 0
	2 5℃-D 1 3	N / A	5 0.5	9 7.5 6
	4 0℃-D 1 3	1 2.1	3 2.3	9 6.8 8
1 1	D 0	N / A	5 7.1	9 7.0 7
	2 5℃-D 1 3	N / A	5 1.2	9 7.3 0
	4 0℃-D 1 3	1 1.9	3 1.9	9 6.3 4
1 2	D 0	N / A	5 8.7	9 7.3 6
	2 5℃-D 1 3	N / A	5 0.7	9 7.0 9
	4 0℃-D 1 3	1 2.1	3 2.3	9 6.8 8

過酷分解から得たデータをフィッティングに付し、2 5 および 4 0 での i C I E F / C E / D L S データもフィッティングに付し、モデルを検証した。結果を図 1 0 に示した。

【 0 2 3 2 】

結果は、高温条件下、pH上昇は粒子径および中性ピーク増加となる。i C I E F の変化速度は、温度が下がると減速する。C E データはpH 6.0で最も優れた。先の実験結果と組み合わせて(10mM His pH 6.0でより安定)、最も好ましいpHは6.0と決定し、40 で得られたC E データは、45 ~ 60mg/mlのタンパク質濃度がより好ましいことを示し、故に、最も好ましくは、濃度は50mg/mlであり、他の実験における種々の条件下のタンパク質安定性に対するポリソルベート濃度の効果を示す結果およびポリソルベート濃度のスクリーニング結果(0.2mg/mlを超える濃度がより好ましかった)と組み合わせて、P S 80濃度を0.3mg/mlと設定し、このおよび他の実施例におけるH u 3 0 3 - 0 0 5 抗体液体製剤で、i C I E F は高温条件下で有意な分解を示し、凍結乾燥製剤として製剤すべきと結論付けた。凍結乾燥製剤の良好な成形性および適当な浸透圧を確実にするために、スクロース濃度は75mg/mlであると設定した。

10

【0233】

実施例19. L A G - 3 抗体製剤の凍結乾燥

H u 3 0 3 - 0 0 5 の凍結乾燥製剤を、10mM ヒスチジン - 塩酸、pH 5.5または6.0で、タンパク質含量50mg/mlで、75mg/ml スクロースおよび0.4mg/ml P S 80を含んで調製した。凍結乾燥方法は次のとおりであった。

【表24】

表24. 凍結乾燥方法

方法	設定温度℃	設定時間(分)	セクション時間	減圧程度(mBar)
前凍結	5℃	10	60分	N/A
	-45℃	50	120分	N/A
一次乾燥	-20℃	120	36時間	0.1
二次乾燥	25℃	60	5時間	0.01

20

【0234】

サンプルを4 および25 において、安定性を観察した。サンプルを種々の時点で採り、適切な量の注射用水で再構成した。結果を表25および表26に示した。結果は、4 でM3長期貯蔵中25 で加速試験の間H u 3 0 3 - 0 0 5 製剤の種々の指標に顕著な変化はなく、安定性が良好であったことを示す。

30

【表25】

表25. 4℃でのH u 3 0 3 - 0 0 5 凍結乾燥製剤の安定性の結果

バッチ番号	時間(M)	再構成溶液の見かけ	SEC 単量体%	非還元 CE-SD S%	i C I E F 中性ピーク %
pH 5.5	0	透明	99.9	98.2	68.5
	3	透明	99.8	97.5	69.0
pH 6.0	0	透明	99.9	98.1	69.8
	3	透明	99.9	97.5	70.1

40

【0235】

【表 2 6】

表 2 6. 25℃でのHu303-005凍結乾燥製剤の安定性結果

バッチ番号	時間(M)	再構成溶液 の見かけ	SEC単 量体%	非還元CE- SDS%	iCIEF中 性ピーク%
pH5.5	0	透明	99.9	98.2	68.5
	1	透明	99.8	97.8	68.1
	3	透明	99.8	97.7	68.1
pH6.0	0	透明	99.9	98.1	69.8
	1	透明	99.8	97.7	69.4
	3	透明	99.7	97.2	69.4

10

【0236】

同時に、凍結乾燥抗体Hu229-013の再構成溶液の安定性を決定した。LAG-3抗体製剤を10mM 酢酸-酢酸ナトリウムpH5.5で、タンパク質濃度50mg/mlで、75mg/ml スクロースおよび0.4mg/ml ポリソルベート80を含んで調製した。抗体を2mL バイアル、1.1mL/バイアルに入れ、凍結乾燥箱に入れ、凍結乾燥した。安定性を観察するため、凍結乾燥前後のサンプルを比較した。結果は、凍結乾燥前後で抗体Hu229-013の品質に変化はなく、凍結乾燥製剤が貯蔵中、良好な安定性を有したことを示す。

20

【0237】

実施例20. 凍結乾燥方法でのパラメータ最適化

50mg/ml抗体Hu303-005、10mM ヒスチジン-塩酸、pH6.0、75mg/ml スクロースおよび0.4mg/ml PS80を含む製剤を調製し、凍結乾燥した。Hu303-005崩壊が起きた温度は、凍結乾燥顕微鏡で測定して、約-19であった。一次乾燥温度は凍結乾燥方法の重要なパラメータである。それ故に、一次乾燥方法中の棚温度を注意深く最適化した。凍結乾燥パラメータを表27に示した。結果を表28に示した。各温度での凍結乾燥粉末の見かけは要件を満たした。しかしながら、-5で再構成後数粒子が見かけ試験で出現した。それ故に、一次乾燥のための棚温度を-10と設定した。

30

【0238】

【表 2 7】

表 2 7. 一次乾燥中の棚温度スクリーニングのための凍結乾燥パラメータ

スクリーニング項目		一次乾燥温度			
パラメータ		設定温度	設定時間	セクション時間	減圧程度
前凍結		+5℃	10分	60分	N/A
		-45℃	50分	120分	N/A
一次乾燥	1	-20℃	120分	1000~3000分	0.10mbar
	2	-10℃			
	3	-5℃			
二次乾燥		+25℃	60分	300~540分	0.01mbar

40

【0239】

【表 28】

表 28. 種々の方法で得た凍結乾燥サンプルの再構成前後の見かけの比較

群	一次乾燥温度	凍結乾燥粉末の見かけ	再構成後の見かけ
1	-20℃	白色粉末、完全な見かけ、崩壊無	透明
2	-10℃	白色粉末、完全な見かけ、崩壊無	透明
3	-5℃	白色粉末、完全な見かけ、崩壊無	数粒子

10

【0240】

最終凍結乾燥は次のとおりであった。

【表 29】

表 29. 凍結乾燥方法

	設定温度	設定時間(分)	セクション時間(分)	減圧程度(mBar)
前凍結	5℃	10	60	N/A
	-45℃	50	120	N/A
一次乾燥	-10℃	120	2000*	0.10
二次乾燥	25℃	60	300*	0.01

20

* 一次乾燥および二次乾燥時間は特定のバッチおよび昇圧試験による。

【0241】

実施例 21. 他の代替製剤

本発明はまた次のものからなる群から選択される何れかを含む、次音安定な医薬製剤も提供する。

- (1) 90mg/ml LAG-3 抗体 Hu229-013、80mg/ml スクロース、0.4mg/ml ポリソルベート 80、15mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 5.5；
- (2) 90mg/ml LAG-3 抗体 Hu229-013、80mg/ml スクロース、0.4mg/ml ポリソルベート 80、15mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 6.5；
- (3) 90mg/ml LAG-3 抗体 Hu229-013、50mg/ml スクロース、0.4mg/ml ポリソルベート 80、25mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 5.5；
- (4) 70mg/ml LAG-3 抗体 Hu229-013、50mg/ml スクロース、0.3mg/ml ポリソルベート 80、10mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 5.5；
- (5) 70mg/ml LAG-3 抗体 Hu229-013、80mg/ml スクロース、0.3mg/ml ポリソルベート 80、15mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 5.2；
- (6) 40mg/ml LAG-3 抗体 Hu229-013、75mg/ml スクロース、0.4mg/ml ポリソルベート 80、10mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 6.0；
- (7) 55mg/ml LAG-3 抗体 Hu229-013、75mg/ml スクロース、0.4mg/ml ポリソルベート 80、10mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 5.7；
- (8) 30mg/ml LAG-3 抗体 Hu229-013、70mg/ml スクロース、0.5mg/ml ポリソルベート 80、10mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 5.5；
- (9) 20mg/ml LAG-3 抗体 Hu229-013、70mg/ml スクロース、0.2mg/ml ポリソルベート 80、10mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 5.4；
- (5) 15mg/ml LAG-3 抗体 Hu229-013、85mg/ml スクロース、0.1m

40

50

g/ml ポリソルベート 80、2.5 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 5.6 ;
 (11) 50 mg/ml LAG-3 抗体 Hu229-013、85 mg/ml スクロース、0.3 mg/ml ポリソルベート 80、2.5 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 5.8 ;
 (12) 50 mg/ml LAG-3 抗体 Hu229-013、75 mg/ml スクロース、0.4 mg/ml ポリソルベート 80、2.5 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 6.0 ;
 (13) 55 mg/ml LAG-3 抗体 Hu229-013、90 mg/ml スクロース、0.4 mg/ml ポリソルベート 80、1.0 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 5.3 ;
 (14) 50 mg/ml LAG-3 抗体 Hu229-013、90 mg/ml スクロース、0.4 mg/ml ポリソルベート 80、1.0 mM 酢酸 - 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 5.0 ;
 (15) 90 mg/ml LAG-3 抗体 Hu303-005、75 mg/ml スクロース、0.3 mg/ml ポリソルベート 80、3.0 mM ヒスチジン - 塩酸緩衝液、pH 6.0 ;
 (16) 90 mg/ml LAG-3 抗体 Hu303-005、75 mg/ml スクロース、0.3 mg/ml ポリソルベート 80、3.0 mM ヒスチジン - 塩酸緩衝液、pH 5.5 ;
 (17) 75 mg/ml LAG-3 抗体 Hu303-005、75 mg/ml スクロース、0.3 mg/ml ポリソルベート 80、3.0 mM ヒスチジン - 塩酸緩衝液、pH 5.0 ;
 (18) 1 mg/ml LAG-3 抗体 Hu303-005、75 mg/ml スクロース、0.3 mg/ml ポリソルベート 80、5 mM ヒスチジン - 塩酸緩衝液、pH 6.0 ;
 (19) 70 mg/ml LAG-3 抗体 Hu303-005、30 mg/ml スクロース、0.3 mg/ml ポリソルベート 80、5 mM ヒスチジン - 塩酸緩衝液、pH 6.0 ;
 (20) 50 mg/ml LAG-3 抗体 Hu303-005、60 mg/ml トレハロース、0.3 mg/ml ポリソルベート 80、1.0 mM ヒスチジン - 塩酸緩衝液、pH 6.0 ;
 (21) 50 mg/ml LAG-3 抗体 Hu303-005、90 mg/ml トレハロース、0.3 mg/ml ポリソルベート 80、1.0 mM ヒスチジン - 塩酸緩衝液、pH 6.0 。

10

20

【図 1】

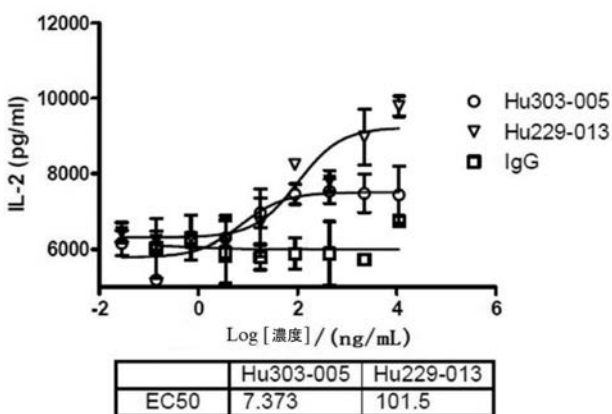


Fig 1

【図 2】

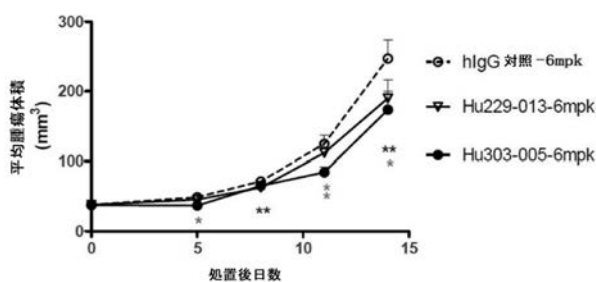


Fig 2

【図 3】

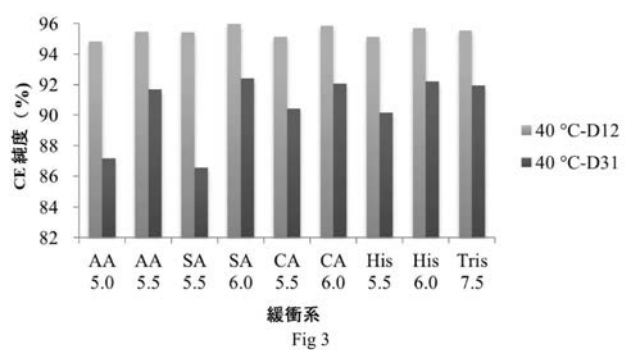


Fig 3

【図 4】

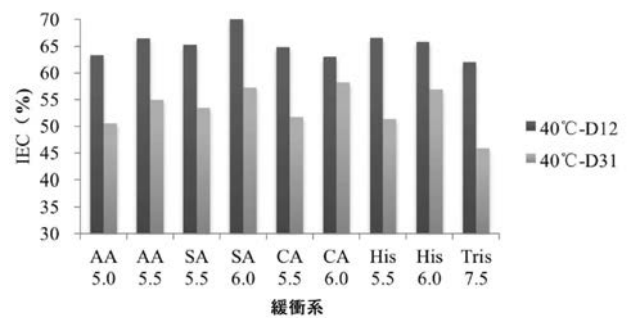
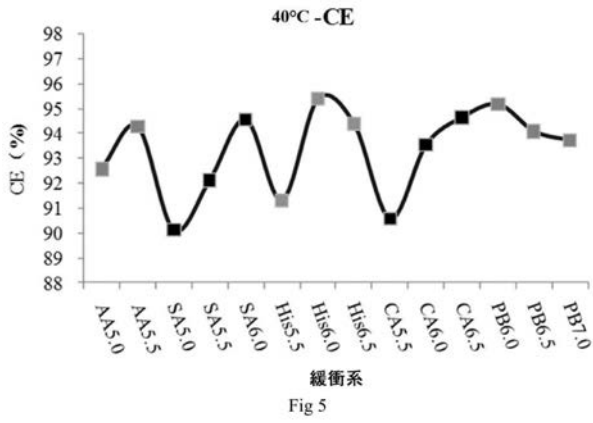
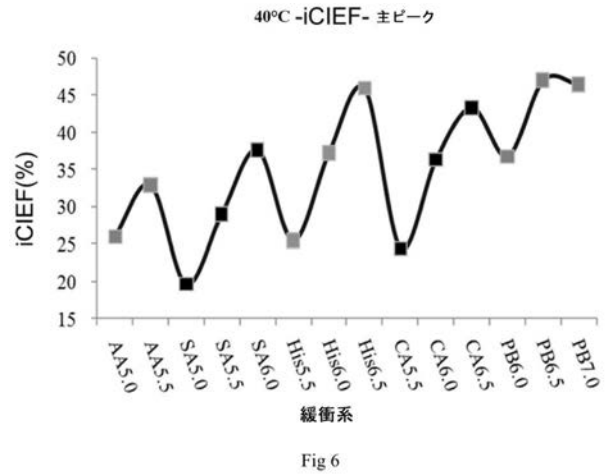


Fig 4

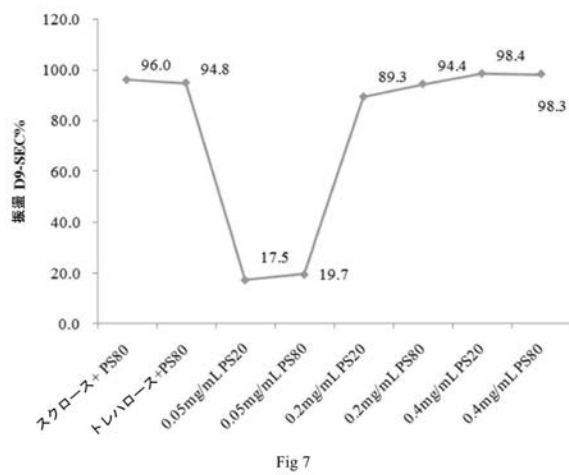
【 図 5 】



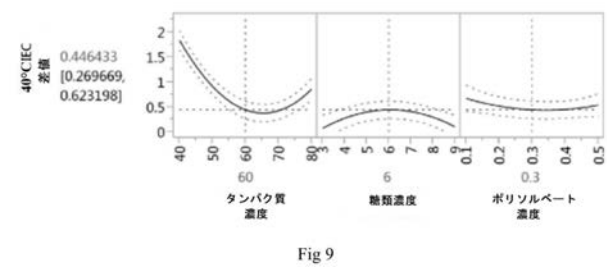
【 図 6 】



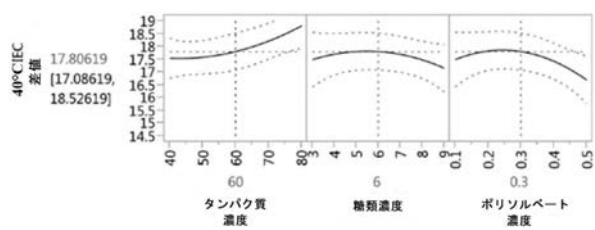
【 図 7 】



【 図 9 】



【 図 8 】



【図 10】

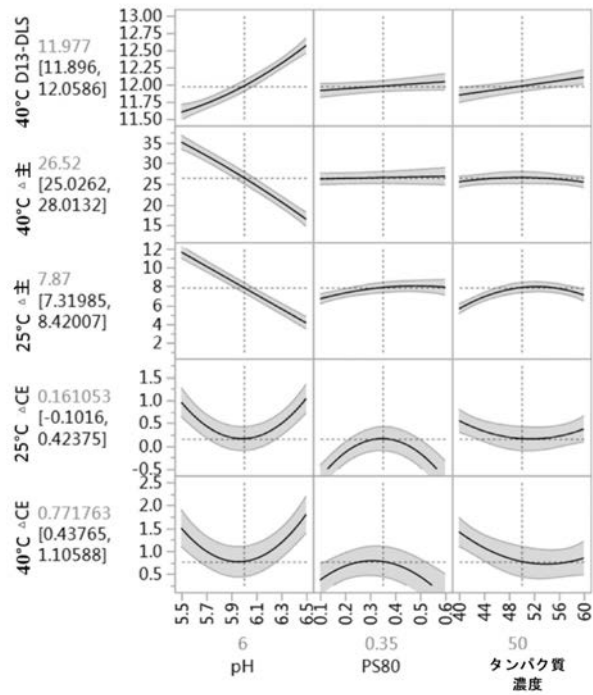


Fig10

【配列表】

2021506922000001.app

【 国际调查报告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/122534

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K; A61P Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) TWTXT; GBTXT; CATXT; EPTXT; DWPI; KRTXT; CPRSABS; USTXT; WOTXT; JPTXT; CNABS; CNTXT; NCBI, CNKI, ISI Web of Science, Elsevier, Google scholar: LAG-3, LAG3, 抗体, 单抗, 单克隆抗体, mAb229, Hu229, Hu303, mAb303, 柠檬酸盐, 组氨酸, 乙酸盐, 琥珀酸盐, 醋酸盐, 缓冲, 恒瑞, antibody, buffer, histidine, citrate, succinate, acetate, Tris, 相关序列检索, related sequence search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2017037203 A1 (IMMUTEP S.A.S.) 09 March 2017 (2017-03-09) see claims 1, 11, 24-29, 42-46, and description, pages 74-76, 85 and 86, and sequence list	1-11, 22-30, 32, 34
Y	WO 2017037203 A1 (IMMUTEP S.A.S.) 09 March 2017 (2017-03-09) see claims 1, 11, 24-29, 42-46, and description, pages 74-76, 85 and 86, and sequence list	12-21
PY	CN 108472349 A (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.; SHANGHAI HENGRUI MEDICINE CO., LTD.) 31 August 2018 (2018-08-31) see claims 1-28, and sequence list	12-21
A	CN 107474137 A (MEDAREX, INC.) 15 December 2017 (2017-12-15) see entire document, especially description, paragraphs [0016]-[0023], [0057], [0058], [0450], [0471], and [0473], and sequence list	1-30, 32, 34
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 March 2019		Date of mailing of the international search report 26 March 2019
Name and mailing address of the ISA/CN National Intellectual Property Administration, PRC (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088 China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/122534

Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)
1.	<p>With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:</p> <p>a. <input checked="" type="checkbox"/> forming part of the international application as filed:</p> <p style="margin-left: 40px;"><input checked="" type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file.</p> <p style="margin-left: 40px;"><input type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file.</p> <p>b. <input type="checkbox"/> furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.</p> <p>c. <input type="checkbox"/> furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:</p> <p style="margin-left: 40px;"><input type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).</p> <p style="margin-left: 40px;"><input type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).</p>
2.	<p><input type="checkbox"/> In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.</p>
3.	<p>Additional comments:</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/122534**Box No. II** Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **31,33**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] Claims 31 and 33 relate to a method of treatment of human or animal body by therapy set out in PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/122534

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2017037203	A1	09 March 2017	BR	112018004181	A2	25 September 2018
				PH	12018500369	A1	03 September 2018
				MX	2018002610	A	27 September 2018
				AU	2016316730	A1	22 March 2018
				JP	2018537400	A	20 December 2018
				CN	108699145	A	23 October 2018
				EP	3344654	A1	11 July 2018
				KR	20180042412	A	25 April 2018
				CA	2995639	A1	09 March 2017
CN	108472349	A	31 August 2018	TW	201800419	A	01 January 2018
				CA	3024359	A1	28 December 2017
				WO	2017219995	A1	28 December 2017
				AU	2017282892	A1	24 January 2019
CN	107474137	A	15 December 2017	HK	1212911	A1	24 June 2016
				TW	1491408	B	11 July 2015
				AU	2014221286	A1	02 October 2014
				KR	101700459	B1	26 January 2017
				SI	2320940	T1	31 July 2015
				AR	072999	A1	06 October 2010
				JP	2017052765	A	16 March 2017
				DK	2320940	T3	26 May 2015
				CN	103923213	A	16 July 2014
				JP	2015096503	A	21 May 2015
				SM	T201500125	B	09 July 2015
				EP	2320940	B1	04 March 2015
				SG	10201706497Q	A	28 September 2017
				TW	201019958	A	01 June 2010
				PT	2320940	E	19 June 2015
				KR	20110050507	A	13 May 2011
				JP	5647981	B2	07 January 2015
				MX	2011001250	A	29 March 2011
				PE	03062011	A1	21 May 2011
				HK	1151985	A1	11 December 2015
				HR	P20150453	T1	19 June 2015
				ES	2537203	T3	03 June 2015
				NZ	623319	A	28 August 2015
				IL	210731	A	31 August 2017
				EP	2905030	A1	12 August 2015
				EP	2320940	A4	23 January 2013
				CL	2016002624	A1	09 June 2017
				SI	EP2320940	T1	31 July 2015
				CA	2734335	C	16 January 2018
				PE	16582014	A1	08 November 2014
				CN	102176921	B	07 May 2014
				CN	102176921	A	07 September 2011
				CY	1116582	T1	15 March 2017
				CL	2013002062	A1	10 January 2014
				EA	023032	B1	29 April 2016
				IL	210731	D0	31 March 2011
				AU	2009282134	A1	18 February 2010

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/122534

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		IL 261718 D0	31 October 2018
		HU E025250 T2	29 February 2016
		WO 2010019570 A2	18 February 2010
		EP 2320940 A2	18 May 2011
		NZ 590991 A	30 November 2012
		KR 20190000922 A	03 January 2019
		IL 253868 D0	31 October 2017
		KR 20170010901 A	01 February 2017
		WO 2010019570 A3	17 June 2010
		US 2011150892 A1	23 June 2011
		CO 6351751 A2	20 December 2011
		CA 2734335 A1	18 February 2010
<hr/>			

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/122534

A. 主题的分类

A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

A61K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

TWXT;GBTXT;CATXT;EPTXT;DWPI;KRTXT;CPRSABS;USTXT;WOTXT;JPTXT;CNABS;CNTXT;NCBI;CNKI; ISI-WEB OF SCIENCE, ELSEVIER, GOOGLE SCHOLAR; LAG-3, LAG3, 抗体, 单抗, 单克隆抗体, mAb229, Hu229, Hu303, mAb303, 柠檬酸盐, 组氨酸, 乙酸盐, 琥珀酸盐, 醋酸盐, 缓冲, 恒瑞, antibody, buffer, histidine, citrate, succinate, acetate, Tris, 相关序列检索

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	WO 2017037203 A1 (IMMUTEP S.A.S) 2017年 3月 9日 (2017-03-09) 参见权利要求1、11、24-29、42-46、说明书第74-76、85-86页和序列表	1-11, 22-30, 32, 34
Y	WO 2017037203 A1 (IMMUTEP S.A.S) 2017年 3月 9日 (2017-03-09) 参见权利要求1、11、24-29、42-46、说明书第74-76、85-86页和序列表	12-21
PY	CN 108472349 A (江苏恒瑞医药股份有限公司 上海恒瑞医药有限公司) 2018年 8月 31日 (2018-08-31) 参见权利要求1-28和序列表	12-21
A	CN 107474137 A (施贵宝有限责任公司) 2017年 12月 15日 (2017-12-15) 参见全文, 特别是说明书第16-23、57-58、450、472-473段和序列表	1-30, 32, 34

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类型文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2019年 3月 15日

国际检索报告邮寄日期

2019年 3月 26日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

受权官员

田园

传真号 (86-10)62019451

电话号码 62411047

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2015年1月)

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/122534

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 31, 33
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求31和33属于PCT实施细则Rule 39 (iv) 规定的在人或动物体上进行治疗的方法。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/122534

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2017037203	A1	2017年 3月 9日	BR	112018004181	A2	2018年 9月 25日
				PH	12018500369	A1	2018年 9月 3日
				MX	2018002610	A	2018年 9月 27日
				AU	2016316730	A1	2018年 3月 22日
				JP	2018537400	A	2018年 12月 20日
				CN	108699145	A	2018年 10月 23日
				EP	3344654	A1	2018年 7月 11日
				KR	20180042412	A	2018年 4月 25日
				CA	2995639	A1	2017年 3月 9日
CN	108472349	A	2018年 8月 31日	TW	201800419	A	2018年 1月 1日
				CA	3024359	A1	2017年 12月 28日
				WO	2017219995	A1	2017年 12月 28日
				AU	2017282892	A1	2019年 1月 24日
CN	107474137	A	2017年 12月 15日	HK	1212911	A1	2016年 6月 24日
				TW	1491408	B	2015年 7月 11日
				AU	2014221286	A1	2014年 10月 2日
				KR	101700459	B1	2017年 1月 26日
				SI	2320940	T1	2015年 7月 31日
				AR	072999	A1	2010年 10月 6日
				JP	2017052765	A	2017年 3月 16日
				DK	2320940	T3	2015年 5月 26日
				CN	103923213	A	2014年 7月 16日
				JP	2015096503	A	2015年 5月 21日
				SM	T201500125	B	2015年 7月 9日
				EP	2320940	B1	2015年 3月 4日
				SG	10201706497Q	A	2017年 9月 28日
				TW	201019958	A	2010年 6月 1日
				PT	2320940	E	2015年 6月 19日
				KR	20110050507	A	2011年 5月 13日
				JP	5647981	B2	2015年 1月 7日
				MX	2011001250	A	2011年 3月 29日
				PE	03062011	A1	2011年 5月 21日
				HK	1151985	A1	2015年 12月 11日
				HR	P20150453	T1	2015年 6月 19日
				ES	2537203	T3	2015年 6月 3日
				NZ	623319	A	2015年 8月 28日
				IL	210731	A	2017年 8月 31日
				EP	2905030	A1	2015年 8月 12日
				EP	2320940	A4	2013年 1月 23日
				CL	2016002624	A1	2017年 6月 9日
				SI	EP2320940	T1	2015年 7月 31日
				CA	2734335	C	2018年 1月 16日
				PE	16582014	A1	2014年 11月 8日
				CN	102176921	B	2014年 5月 7日
				CN	102176921	A	2011年 9月 7日
				CY	1116582	T1	2017年 3月 15日
				CL	2013002062	A1	2014年 1月 10日
				EA	023032	B1	2016年 4月 29日
				IL	210731	D0	2011年 3月 31日
				AU	2009282134	A1	2010年 2月 18日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/122534

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		IL 261718 D0	2018年 10月 31日
		HU E025250 T2	2016年 2月 29日
		WO 2010019570 A2	2010年 2月 18日
		EP 2320940 A2	2011年 5月 18日
		NZ 590991 A	2012年 11月 30日
		KR 20190000922 A	2019年 1月 3日
		IL 253868 D0	2017年 10月 31日
		KR 20170010901 A	2017年 2月 1日
		WO 2010019570 A3	2010年 6月 17日
		US 2011150892 A1	2011年 6月 23日
		CO 6351751 A2	2011年 12月 20日
		CA 2734335 A1	2010年 2月 18日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)

フロントページの続き

(51) Int.Cl.

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K	47/26	(2006.01)	A 6 1 K	47/12
A 6 1 K	9/19	(2006.01)	A 6 1 K	47/22
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 K	47/26
C 0 7 K	16/28	(2006.01)	A 6 1 K	9/19
C 0 7 K	16/46	(2006.01)	A 6 1 P	35/02
C 1 2 N	15/13	(2006.01)	C 0 7 K	16/28
			C 0 7 K	16/46
			C 1 2 N	15/13

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(特許庁注: 以下のものは登録商標)

1. T R I T O N

2. T W E E N

(74) 代理人 100101454

弁理士 山田 卓二

(74) 代理人 100106518

弁理士 松谷 道子

(74) 代理人 100138911

弁理士 櫻井 陽子

(74) 代理人 100165892

弁理士 坂田 啓司

(72) 発明者 呉 ティン ティン

中華人民共和国 2 0 0 2 4 5 上海市閔行区文井路 2 7 9 号

(72) 発明者 李 皓

中華人民共和国 2 0 0 2 4 5 上海市閔行区文井路 2 7 9 号

(72) 発明者 劉 洵

中華人民共和国 2 0 0 2 4 5 上海市閔行区文井路 2 7 9 号

(72) 発明者 付 雅媛

中華人民共和国 2 0 0 2 4 5 上海市閔行区文井路 2 7 9 号

F ターム (参考) 4C076 AA12 AA29 BB11 CC07 CC27 DD41Z DD42Z DD43Z DD60Z DD67

EE23F FF16 FF61 FF63

4C085 AA13 AA14 BB01 BB11 BB18 BB41 BB43 CC21 DD62 EE01

EE07 GG01

4H045 AA11 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 EA20 FA74 GA45