

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7680967号

(P7680967)

(45)発行日 令和7年5月21日(2025.5.21)

(24)登録日 令和7年5月13日(2025.5.13)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K 16/28 (2006.01)

C 0 7 K 16/28

Z N A

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

N

C 0 7 K 16/46 (2006.01)

C 0 7 K 16/46

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

請求項の数 15 (全91頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2021-573797(P2021-573797)

(86)(22)出願日 令和2年6月15日(2020.6.15)

(65)公表番号 特表2022-536370(P2022-536370
A)

(43)公表日 令和4年8月15日(2022.8.15)

(86)国際出願番号 PCT/US2020/037781

(87)国際公開番号 WO2020/252471

(87)国際公開日 令和2年12月17日(2020.12.17)

審査請求日 令和5年6月13日(2023.6.13)

(31)優先権主張番号 62/861,643

(32)優先日 令和1年6月14日(2019.6.14)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 399052796

デyna ファーバー キャンサー インス
ティテュート, インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02
215, ボストン, ブルックライン ア
ベニュー 450

(74)代理人 100102978

弁理士 清水 初志

(74)代理人 100160923

弁理士 山口 裕孝

(74)代理人 100119507

弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 PD-1に対する抗体およびその使用方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒトプログラム細胞死1 (PD-1) タンパク質に結合する単離された抗体またはその抗原結合断片であって、

(a) 配列番号17のアミノ酸配列を含むVH CDR1、配列番号19のアミノ酸配列を含むVH CDR2、配列番号21のアミノ酸配列を含むVH CDR3、配列番号24のアミノ酸配列を含むVL CDR1、配列番号26のアミノ酸配列を含むVL CDR2、および配列番号28のアミノ酸配列を含むVL CDR3、または、

(b) 配列番号17のアミノ酸配列を含むVH CDR1、配列番号19のアミノ酸配列を含むVH CDR2、配列番号21のアミノ酸配列を含むVH CDR3、配列番号24のアミノ酸配列を含むVL CDR1、配列番号80のアミノ酸配列を含むVL CDR2、および配列番号28のアミノ酸配列を含むVL CDR3、または、

(c) 配列番号17のアミノ酸配列を含むVH CDR1、配列番号19のアミノ酸配列を含むVH CDR2、配列番号79のアミノ酸配列を含むVH CDR3、配列番号24のアミノ酸配列を含むVL CDR1、配列番号26のアミノ酸配列を含むVL CDR2、および配列番号28のアミノ酸配列を含むVL CDR3、または、

(d) 配列番号78のアミノ酸配列を含むVH CDR1、配列番号19のアミノ酸配列を含むVH CDR2、配列番号21のアミノ酸配列を含むVH CDR3、配列番号24のアミノ酸配列を含むVL CDR1、配列番号26のアミノ酸配列を含むVL CDR2、および配列番号28のアミノ酸配列を含むVL CDR3、または、

(f) 配列番号 78 のアミノ酸配列を含む V H C D R 1、配列番号 19 のアミノ酸配列を含む V H C D R 2、配列番号 79 のアミノ酸配列を含む V H C D R 3、配列番号 24 のアミノ酸配列を含む V L C D R 1、配列番号 80 のアミノ酸配列を含む V L C D R 2、および配列番号 28 のアミノ酸配列を含む V L C D R 3 を含む、単離された抗体またはその抗原結合断片。

10

重鎖および軽鎖を含む、PD-1に結合する単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、前記重鎖は、配列番号17のアミノ酸配列を含むVH CDR1、配列番号19のアミノ酸配列を含むVH CDR2、および配列番号21のアミノ酸配列を含むVH CDR3を含み、かつ、配列番号1と95%以上同一のアミノ酸配列を含み、かつ前記軽鎖は、配列番号24のアミノ酸配列を含むVL CDR1、配列番号80のアミノ酸配列を含むVL CDR2、および配列番号28のアミノ酸配列を含むVL CDR3を含み、かつ、配列番号11と95%以上同一のアミノ酸配列を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片、または

30

40

50

重鎖および軽鎖を含む、PD-1に結合する単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、前記重鎖は、配列番号78のアミノ酸配列を含むVH CDR1、配列番号19のアミノ酸配列を含むVH CDR2、および配列番号79のアミノ酸配列を含むVH CDR3を含み、かつ、配列番号15と95%以上同一のアミノ酸配列を含み、かつ前記軽鎖は、配列番号24のアミノ酸配列を含むVL CDR1、配列番号80のアミノ酸配列を含むVL CDR2、および配列番号28のアミノ酸配列を含むVL CDR3を含み、かつ、配列番号11と95%以上同一のアミノ酸配列を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項3】

請求項1または2に記載の抗原結合断片と、免疫細胞上の分子に対する特異性を有する第2の抗原結合断片とを含む、単離された二重特異性抗体。

10

【請求項4】

前記分子は、B7H3、B7H4、CD27、CD28、CD40、CD40L、CD47、CD122、CTLA-4、GITR、GITRL、ICOS、ICOSL、LAG-3、LIGHT、OX-40、OX40L、PD-1、TIM3、4-1BB、TIGIT、VISTA、HEVM、BTLA、およびKIRからなる群から選択される、または

前記抗原結合断片および第2の抗原結合断片のそれぞれは、Fab断片、単鎖可変断片(scFv)、または単ドメイン抗体から独立して選択される、または

Fc断片をさらに含む、

20

請求項3に記載の二重特異性抗体。

【請求項5】

請求項1または2に記載の抗体をコードする、または請求項3または4に記載の二重特異性抗体をコードする、核酸。

【請求項6】

i) 請求項1または2に記載の抗体またはその抗原結合断片、および薬学的に許容される担体または賦形剤を含む、または、ii) 請求項3または4に記載の二重特異性抗体、および薬学的に許容される担体または賦形剤を含む、医薬組成物。

【請求項7】

少なくとも1つの追加の治療剤をさらに含む、請求項6に記載の医薬組成物。

30

【請求項8】

i) 請求項1または2に記載の抗体またはその抗原結合断片をコードする1つ以上のポリヌクレオチド、または

ii) 請求項3または4に記載の二重特異性抗体をコードする1つ以上のポリヌクレオチドを含む、単離された細胞。

【請求項9】

請求項5に記載の核酸を含む、ベクター。

【請求項10】

請求項9に記載のベクターを含む、細胞。

40

【請求項11】

請求項6に記載の医薬組成物、対象に少なくとも1つの抗体を投与するための注射器、針、またはアプリケーター、および使用説明書を含む、キット。

【請求項12】

キメラ抗原受容体を含む操作された細胞であって、前記キメラ抗原受容体は、癌細胞の表面上の抗原に特異的な細胞外リガンド結合ドメインを含み、前記抗原はPD-1を含み、前記細胞外リガンド結合ドメインは請求項1または2に記載の抗体またはその抗原結合断片を含む、操作された細胞。

【請求項13】

前記操作された細胞は、T細胞、NK細胞、またはNKT細胞を含む、請求項12に記

50

載の操作された細胞。

【請求項 14】

前記治療剤が、毒素、放射性標識、s i R N A、小分子、またはサイトカインである、請求項 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

前記 T 細胞が、C D 4 +、C D 8 +、C D 3 + p a n T 細胞、またはそれらの任意の組み合わせである、請求項 13 に記載の操作された細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2019年6月14日に出願された米国仮特許出願第62／861，643号からの優先権の利益を主張する国際出願であり、その内容全体は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

本明細書に引用される全ての特許、特許出願、および刊行物は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。本明細書に記載され特許請求される本発明の日付の当業者に既知の最新技術をより完全に記載するために、これらの刊行物の開示は、参照により本出願に組み込まれる。

【0003】

本特許開示は、著作権保護の対象となる、材料を含む。著作権所有者は、米国特許商標局の特許ファイルまたは記録に表れているように、特許文書または特許開示のいずれかによってファクシミリ複製に異議はないが、それ以外では、何であれ全ての著作権を留保する。

【0004】

発明の分野

本発明は、P D - 1 に対する抗体およびその使用方法に関する。

【背景技術】

【0005】

発明の背景

プログラム細胞死-1 (P D - 1) は、免疫グロブリンスーパーファミリーの細胞表面膜タンパク質である。このタンパク質は、プロB細胞において発現され、それらの分化において役割を果たすと考えられている。C D 2 8 ファミリーのメンバーであるP D - 1 は、活性化T細胞、B細胞、および単球上で上方調節される。P D - 1 は、B 7 ファミリー中に2つの同定されたリガンド、P D - L 1 (プログラム細胞死-1リガンド1；表面抗原分類274 (C D 2 7 4) またはB 7 相同体1 (B 7 - H 1) としても知られる) およびP D - L 2 を有する。P D - L 1 は、40kDaのI型膜貫通タンパク質である。P D - 1 またはB 7 . 1 へのP D - L 1 の結合は、リンパ節におけるC D 8 + T 細胞の増殖を減少させる阻害シグナルを伝達し、その補足として、P D - 1 はまた、遺伝子B c l - 2 のより低い調節によってさらに媒介されるアポトーシスを介して、リンパ節における外来抗原特異的T細胞の蓄積を制御することができる。P D - L 2 発現はより制限される傾向があり、主に活性化抗原提示細胞 (A P C) 上に見出されるが、造血系細胞 (活性化T細胞、B細胞、単球、樹状細胞およびマクロファージなど) および末梢非リンパ系組織 (心臓、骨格、筋肉、胎盤、肺、腎臓および肝臓組織など) を含むP D - L 1 発現はより広範である。P D - L 1 の広範な発現は、P D - 1 / P D - L 1 媒介性末梢寛容の調節において有意な役割を示す。

【発明の概要】

【0006】

本発明は、P D - 1 抗体組成物およびその使用方法を提供する。

【0007】

本発明の1つの態様は、ヒトプログラム細胞死1 (P D - 1) タンパク質に結合する単

10

20

30

40

50

離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片に関する。1つの実施形態では、単離されたモノクローナルPD-1抗体またはその抗原結合断片は、重鎖、軽鎖、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、重鎖は、 $G-(X_1)-TF-(X_2X_3)-Y-(X_4)$ (配列番号81)、 $G-(X_5)-TF-(X_6X_7X_8)-A$ (配列番号82)、 $GDSVSSDNYF$ (配列番号43)、または $GYTFNRF G$ (配列番号55)を含むCDR1； $ISWNSGSI$ (配列番号19)、 $IYPDDSDT$ (配列番号33)、 $VYYNGNT$ (配列番号45)、 $TNPYNGNT$ (配列番号57)、または $ISYDGSNK$ (配列番号69)を含むCDR2； $ASDYGDKYYYYGMDV$ (配列番号21)、 $AFWGASGAPVNGFDI$ (配列番号35)、 $ATETPTSYFNSGPFDS$ (配列番号47)、 $ARVVAVNGMDV$ (配列番号59)、 $ASQTVAGSDY$ (配列番号71)、または $ASDYGDKYSYYGMDV$ (配列番号79)を含むCDR3；またはそれらのCDRの組み合わせを含む。他の実施形態では、軽鎖は、 $SSNIGSNT$ (配列番号24)、 $SSNIGAGYV$ (配列番号37)、 $SNNVGAHG$ (配列番号49)、 $SGSIAAAYY$ (配列番号61)もしくは $NI GSKS$ (配列番号73)を含むCDR1； $(X_9)-DN$ (配列番号83)、 $(X_{10})-NN$ (配列番号84)もしくは DDS (配列番号75)を含むCDR2； $AAWDGGLNGRGV$ (配列番号28)、 $AAWDDSLNAPV$ (配列番号41)、 $SSWDSLSGYV$ (配列番号53)、 $QSYDSSNLWV$ (配列番号65)もしくは $QVWHSVSDQGV$ (配列番号77)を含むCDR3；またはそれらのCDRの組合せを含む。いくつかの実施形態では、単離されたモノクローナルPD-1抗体またはその抗原結合断片は、本明細書に記載のCDRを含む重鎖および軽鎖を含む。さらなる実施形態では、単離されたモノクローナルPD-1抗体またはその抗原結合断片は、完全ヒトであるか、またはヒト化されている。さらなる実施形態では、単離されたモノクローナルPD-1抗体またはその抗原結合断片は、単一特異性、二重特異性、または多重特異性である。さらなる実施形態では、単離されたモノクローナルPD-1抗体またはその抗原結合断片は、単鎖抗体である。他の実施形態では、単離されたモノクローナルPD-1抗体またはその抗原結合断片は、少なくとも $1.0 \times 10^{-9} M$ の結合親和性を有する。他の実施形態では、単離されたモノクローナルPD-1抗体またはその抗原結合断片は、重鎖定常領域、軽鎖定常領域、Fc領域、またはそれらの組み合わせをさらに含む。いくつかの実施形態では、単離されたモノクローナルPD-1抗体またはその抗原結合断片に由来するCDRの X_1 、 X_4 、 X_5 、または X_8 アミノ酸残基は、非極性アミノ酸残基である。いくつかの実施形態では、単離されたモノクローナルPD-1抗体またはその抗原結合断片に由来するCDRの X_1 、 X_4 、 X_5 、または X_8 アミノ酸残基は、チロシン(Y)、フェニルアラニン(F)、またはアラニン(A)である。いくつかの実施形態では、単離されたモノクローナルPD-1抗体またはその抗原結合断片に由来するCDRの X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_6 、 X_7 または X_8 アミノ酸残基は、極性アミノ酸残基である。いくつかの実施形態では、単離されたモノクローナルPD-1抗体またはその抗原結合断片に由来するCDRの X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_6 、 X_7 、または X_8 アミノ酸残基は、アスパラギン酸(D)、スレオニン(T)、セリン(S)、またはトリプトファン(W)である。他の実施形態では、単離されたモノクローナルPD-1抗体またはその抗原結合断片に由来するCDRの X_1 アミノ酸残基は、チロシン(Y)またはフェニルアラニン(F)である。他の実施形態では、単離されたモノクローナルPD-1抗体またはその抗原結合断片に由来するCDRの X_2 アミノ酸残基は、アスパラギン酸(D)、スレオニン(T)、またはセリン(S)である。他の実施形態では、単離されたモノクローナルPD-1抗体またはその抗原結合断片に由来するCDRの X_3 アミノ酸残基は、アスパラギン酸(D)、スレオニン(T)、またはセリン(S)である。他の実施形態では、単離されたモノクローナルPD-1抗体またはその抗原結合断片に由来するCDRの X_4 アミノ酸残基は、アラニン(A)、またはトリプトファン(W)である。他の実施形態では、単離されたモノクローナルPD-1抗体またはその抗原結合断片に由来するCDRの X_5 アミノ酸残基は、フェニルアラニン(F)、またはチロシン(Y)である。他の実施形態では、単離されたモノクローナルPD

10

20

30

40

50

ー1抗体またはその抗原結合断片に由来するCDRのX₆アミノ酸残基は、アスパラギン酸(D)、またはセリン(S)である。他の実施形態では、単離されたモノクローナルPD-1抗体またはその抗原結合断片に由来するCDRのX₇アミノ酸残基は、アスパラギン酸(D)、またはセリン(S)である。他の実施形態では、単離されたモノクローナルPD-1抗体またはその抗原結合断片に由来するCDRのX₈アミノ酸残基は、フェニルアラニン(F)またはチロシン(Y)である。他の実施形態では、単離されたモノクローナルPD-1抗体またはその抗原結合断片に由来するCDRのX₉アミノ酸残基は、極性親水性アミノ酸残基である。他の実施形態では、単離されたモノクローナルPD-1抗体またはその抗原結合断片に由来するCDRのX₉アミノ酸残基は、グルタミン酸(E)、アスパラギン(N)、またはアスパラギン酸(D)である。他の実施形態では、単離されたモノクローナルPD-1抗体またはその抗原結合断片に由来するCDRのX₁₀アミノ酸残基は、極性親水性アミノ酸残基である。他の実施形態では、単離されたモノクローナルPD-1抗体またはその抗原結合断片に由来するCDRのX₁₀アミノ酸残基は、セリン(S)またはアルギニン(R)である。

【0008】

本発明の1つの態様は、少なくとも1つの抗体を含む抗体組成物に関し、この少なくとも1つの抗体は、2つの重鎖および2つの軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、重鎖CDRは、配列番号1のIMGTナンバリングによる残基27~38、残基56~65、および残基105~119；または配列番号3のIMGTナンバリングによる残基27~38、残基56~65、および残基105~119；または配列番号5のIMGTナンバリングによる残基27~38、残基56~65、および残基105~121；または配列番号7のIMGTナンバリングによる残基27~38、残基56~65、および残基105~115；または配列番号9のIMGTナンバリングによる残基27~38、残基56~65、および残基105~114；または配列番号12のIMGTナンバリングによる残基27~38、残基56~65、および残基105~119（例えば、本明細書に記載のHL-14変異体）；または配列番号13のIMGTナンバリングによる残基27~38、残基56~65、および残基105~119（例えば、本明細書に記載のHLkin-1変異体）；または配列番号15のIMGTナンバリングによる残基27~38、残基56~65、および残基105~119（例えば、本明細書に記載のmut-3変異体）に見出される参照生殖系列CDRと同一であるが、重鎖CDRの少なくとも1つは、その参照CDRと比較して単一アミノ酸の置換が異なる。いくつかの実施形態では、軽鎖CDRは、配列番号2のIMGTナンバリングによる残基27~38、残基56~65、および残基105~116；または配列番号4のIMGTナンバリングによる残基27~38、残基56~65、および残基105~115；または配列番号6のIMGTナンバリングによる残基27~38、残基56~65、および残基105~115；または配列番号8のIMGTナンバリングによる残基27~38、残基56~65、および残基105~114；または配列番号10のIMGTナンバリングによる残基27~38、残基56~65、および残基105~115；または配列番号11のIMGTナンバリングによる残基27~38、残基56~65、および残基105~116（例えば、本明細書に記載のHL-7変異体）に見出される参照生殖系列CDRと同一であるが、軽鎖CDRの少なくとも1つは、その参照CDRと比較して単一アミノ酸置換が異なる。いくつかの実施形態では、抗体組成物は、FCC'鎖によって生成されるPD-1面内のアミノ残基を含むエピトープに結合するが、配列番号XX中の非隣接アミノ酸を含むPD-1のC'Dループと接触しない。

【0009】

本発明の1つの態様は、ヒトプログラム細胞死1(PD-1)タンパク質に結合する単離された抗体またはその断片に関する。1つの実施形態では、PD-1に結合する単離された抗体またはその断片は、配列番号17のアミノ酸配列を含むVH CDR1、配列番号19のアミノ酸配列を含むVH CDR2、配列番号21のアミノ酸配列を含むVH CDR3、配列番号24のアミノ酸配列を含むVL CDR1、配列番号26のアミノ酸配

列を含むV L C D R 2、および配列番号28のアミノ酸配列を含むV L C D R 3を含む。1つの実施形態では、P D - 1に結合する単離された抗体またはその断片は、配列番号31のアミノ酸配列を含むV H C D R 1、配列番号33のアミノ酸配列を含むV H C D R 2、配列番号35のアミノ酸配列を含むV H C D R 3、配列番号37のアミノ酸配列を含むV L C D R 1、配列番号39のアミノ酸配列を含むV L C D R 2、および配列番号41のアミノ酸配列を含むV L C D R 3を含む。1つの実施形態では、P D - 1に結合する単離された抗体またはその断片は、配列番号43のアミノ酸配列を含むV H C D R 1、配列番号45のアミノ酸配列を含むV H C D R 2、配列番号47のアミノ酸配列を含むV H C D R 3、配列番号49のアミノ酸配列を含むV L C D R 1、配列番号51のアミノ酸配列を含むV L C D R 2、および配列番号53のアミノ酸配列を含むV L C D R 3を含む。1つの実施形態では、P D - 1に結合する単離された抗体またはその断片は、配列番号55のアミノ酸配列を含むV H C D R 1、配列番号57のアミノ酸配列を含むV H C D R 2、配列番号59のアミノ酸配列を含むV H C D R 3、配列番号61のアミノ酸配列を含むV L C D R 1、配列番号63のアミノ酸配列を含むV L C D R 2、および配列番号65のアミノ酸配列を含むV L C D R 3を含む。1つの実施形態では、P D - 1に結合する単離された抗体またはその断片は、配列番号67のアミノ酸配列を含むV H C D R 1、配列番号69のアミノ酸配列を含むV H C D R 2、配列番号71のアミノ酸配列を含むV H C D R 3、配列番号73のアミノ酸配列を含むV L C D R 1、配列番号75のアミノ酸配列を含むV L C D R 2、および配列番号77のアミノ酸配列を含むV L C D R 3を含む。1つの実施形態では、P D - 1に結合する単離された抗体またはその断片は、配列番号17のアミノ酸配列を含むV H C D R 1、配列番号19のアミノ酸配列を含むV H C D R 2、配列番号21のアミノ酸配列を含むV H C D R 3、配列番号24のアミノ酸配列を含むV L C D R 1、配列番号80のアミノ酸配列を含むV L C D R 2、および配列番号28のアミノ酸配列を含むV L C D R 3を含む（例えば、本明細書に記載のH L - 7変異体）。1つの実施形態では、P D - 1に結合する単離された抗体またはその断片は、配列番号17のアミノ酸配列を含むV H C D R 1、配列番号19のアミノ酸配列を含むV H C D R 2、配列番号79のアミノ酸配列を含むV H C D R 3、配列番号24のアミノ酸配列を含むV L C D R 1、配列番号26のアミノ酸配列を含むV L C D R 2、および配列番号28のアミノ酸配列を含むV L C D R 3を含む（例えば、本明細書に記載されるH L - 14変異体）。1つの実施形態では、P D - 1に結合する単離された抗体またはその断片は、配列番号78のアミノ酸配列を含むV H C D R 1、配列番号19のアミノ酸配列を含むV H C D R 2、配列番号21のアミノ酸配列を含むV H C D R 3、配列番号24のアミノ酸配列を含むV L C D R 1、配列番号26のアミノ酸配列を含むV L C D R 2、および配列番号28のアミノ酸配列を含むV L C D R 3を含む（例えば、本明細書に記載のH L k i n - 1変異体）。1つの実施形態では、P D - 1に結合する単離された抗体またはその断片は、配列番号78のアミノ酸配列を含むV H C D R 1、配列番号19のアミノ酸配列を含むV H C D R 2、配列番号21のアミノ酸配列を含むV H C D R 3、配列番号24のアミノ酸配列を含むV L C D R 1、配列番号80のアミノ酸配列を含むV L C D R 2、および配列番号28のアミノ酸配列を含むV L C D R 3を含む（例えば、本明細書に記載のH L k i n - 1 H L - 7 m u t 2変異体）。1つの実施形態では、P D - 1に結合する単離された抗体またはその断片は、配列番号78のアミノ酸配列を含むV H C D R 1、配列番号19のアミノ酸配列を含むV H C D R 2、配列番号79のアミノ酸配列を含むV H C D R 3、配列番号24のアミノ酸配列を含むV L C D R 1、配列番号80のアミノ酸配列を含むV L C D R 2、および配列番号28のアミノ酸配列を含むV L C D R 3を含む（例えば、本明細書に記載のH L k i n - 1 H L - 7 H L - 14 m u t 3変異体）。

【0010】

本発明の1つの態様は、ヒトプログラム細胞死1（P D - 1）タンパク質に結合する単離された抗体またはその断片に関する。1つの実施形態では、ヒトP D - 1タンパク質に結合する単離された抗体またはその断片は、配列番号1、3、5、7、9、12、13、および15からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号2、

10

20

30

40

50

4、6、8、10、および11からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。

【0011】

他の実施形態において、ヒトPD-1タンパク質に結合する単離された抗体またはその断片は、以下を含む。

【0012】

他の実施形態では、ヒトPD-1タンパク質に結合する単離された抗体またはその断片は、以下を含む。他の実施形態では、ヒトPD-1タンパク質に結合する単離された抗体またはその断片は、重鎖、軽鎖、またはそれらの組み合わせを含み、重鎖は、配列番号1と約95%同一のアミノ酸配列を含み、軽鎖は、配列番号2と約95%同一のアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、ヒトPD-1タンパク質に結合する単離された抗体またはその断片は、重鎖、軽鎖、またはそれらの組み合わせを含み、ここで、重鎖は、配列番号3と約95%同一のアミノ酸配列を含み、軽鎖は、配列番号4と約95%同一のアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、ヒトPD-1タンパク質に結合する単離された抗体またはその断片は、重鎖、軽鎖、またはそれらの組み合わせを含み、ここで、重鎖は、配列番号5と約95%同一のアミノ酸配列を含み、軽鎖は、配列番号6と約95%同一のアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、ヒトPD-1タンパク質に結合する単離された抗体またはその断片は、重鎖、軽鎖、またはそれらの組み合わせを含み、ここで、重鎖は、配列番号7と約95%同一のアミノ酸配列を含み、軽鎖は、配列番号8と約95%同一のアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、ヒトPD-1タンパク質に結合する単離された抗体またはその断片は、重鎖、軽鎖、またはそれらの組み合わせを含み、ここで、重鎖は、配列番号9と約95%同一のアミノ酸配列を含み、軽鎖は、配列番号10と約95%同一のアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、ヒトPD-1タンパク質に結合する単離された抗体またはその断片は、重鎖、軽鎖、またはそれらの組み合わせを含み、ここで、重鎖は、配列番号1と約95%同一のアミノ酸配列を含み、軽鎖は、配列番号11と約95%同一のアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、ヒトPD-1タンパク質に結合する単離された抗体またはその断片は、重鎖、軽鎖、またはそれらの組み合わせを含み、ここで、重鎖は、配列番号12と約95%同一のアミノ酸配列を含み、軽鎖は、配列番号2と約95%同一のアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、ヒトPD-1タンパク質に結合する単離された抗体またはその断片は、重鎖、軽鎖、またはそれらの組み合わせを含み、ここで、重鎖は、配列番号13と約95%同一のアミノ酸配列を含み、軽鎖は、配列番号2と約95%同一のアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、ヒトPD-1タンパク質に結合する単離された抗体またはその断片は、重鎖、軽鎖、またはそれらの組み合わせを含み、ここで、重鎖は、配列番号13と約95%同一のアミノ酸配列を含み、軽鎖は、配列番号11と約95%同一のアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、ヒトPD-1タンパク質に結合する単離された抗体またはその断片は、重鎖、軽鎖、またはそれらの組み合わせを含み、ここで、重鎖は、配列番号15と約95%同一のアミノ酸配列を含み、軽鎖は、配列番号11と約95%同一のアミノ酸配列を含む。

【0013】

本発明の1つの態様は、ヒトPD-1タンパク質に結合する第1の抗体断片と、免疫細胞上の分子に対する特異性を有する第2の抗原結合断片とを含む、単離された二重特異性抗体に関する。1つの実施形態では、単離された二重特異性抗体は、本明細書に記載されるPD-1タンパク質に対するヒト抗体の断片を含む。いくつかの実施形態では、免疫細胞上の分子は、B7H3、B7H4、CD27、CD28、CD40、CD40L、CD47、CD122、CTLA-4、GITR、GITRL、ICOS、ICOSL、LAG-3、LIGHT、OX-40、OX40L、PD-1、TIM3、4-1BB、TIGIT、VISTA、HEVM、BTLA、またはKIRを含む。いくつかの実施形態では、ヒトPD-1タンパク質に結合する抗体断片は、Fab断片、単鎖可変断片(scFv)、または単ドメイン抗体を含む。他の実施形態では、免疫細胞上の分子に対して特異性を有する第2の抗原結合断片は、Fab断片、単鎖可変断片(scFv)、または単

10

20

30

40

50

ードメイン抗体を含む。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体は、F c断片を含む。

【0014】

本発明の1つの態様は、ヒトPD-1タンパク質に結合する第1の抗体断片、ならびに免疫細胞上の分子に対する特異性を有する第2および第3の抗原結合断片を含む、単離された多重特異性抗体に関する。1つの実施形態では、単離された多重特異性抗体は、本明細書に記載されるPD-1タンパク質に対するヒト抗体の断片を含む。いくつかの実施形態では、免疫細胞上の分子は、B7H3、B7H4、CD27、CD28、CD40、CD40L、CD47、CD122、CTLA-4、GITR、GITRL、ICOS、ICOSL、LAG-3、LIGHT、OX-40、OX40L、PD-1、TIM3、4-1BB、TIGIT、VISTA、HEVM、BTLA、またはKIRを含む。いくつかの実施形態では、ヒトPD-1タンパク質に結合する抗体断片は、Fab断片、単鎖可変断片(scfv)、または単ドメイン抗体を含む。他の実施形態では、免疫細胞上の分子に対して特異性を有する第2および第3の抗原結合断片は、Fab断片、単鎖可変断片(scfv)、または単ドメイン抗体を含む。いくつかの実施形態では、多重特異性抗体は、Fc断片を含む。いくつかの実施形態では、多重特異性抗体は、免疫細胞上の分子に対して特異性を有する第4および/または第5の抗原結合断片をさらに含む。

10

【0015】

本発明の1つの態様は、本明細書に記載されるヒトプログラム細胞死1(PD-1)タンパク質に結合する、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片をコードする核酸に関する。本発明の1つの態様は、本明細書に記載されるヒトPD-1タンパク質に結合する単離された抗体またはその断片をコードする核酸に関する。本発明の1つの態様は、本明細書に記載の二重特異性抗体をコードする核酸に関する。本発明の1つの態様は、本明細書に記載の多重特異性抗体をコードする核酸に関する。いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書に記載の核酸を含むベクターに関する。いくつかの実施形態では、本発明は、本明細書に記載のベクターを含む細胞に関する。

20

【0016】

本発明の1つの態様は、本明細書に記載のヒトPD-1タンパク質に結合する抗体または断片、および薬学的に許容される担体または賦形剤を含む医薬組成物に関する。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、少なくとも1つの追加の治療剤をさらに含む。他の実施形態では、治療剤は、毒素、放射性標識、siRNA、小分子、またはサイトカインである。

30

【0017】

本発明の1つの態様は、ヒトPD-1タンパク質に結合する二重特異性抗体または断片、ならびに本明細書に記載される免疫細胞上の分子に特異性を有する第2の抗原結合断片、および薬学的に許容される担体または賦形剤を含む医薬組成物に関する。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、少なくとも1つの追加の治療剤をさらに含む。他の実施形態では、治療剤は、毒素、放射性標識、siRNA、小分子、またはサイトカインである。

【0018】

本発明の1つの態様は、本明細書に記載される免疫細胞上の分子に対する特異性を有する第2、第3、第4または第5の抗原結合断片に加えて、ヒトPD-1タンパク質に結合する二重特異性抗体または断片、および薬学的に許容される担体または賦形剤を含む医薬組成物に関する。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、少なくとも1つの追加の治療剤をさらに含む。他の実施形態では、治療剤は、毒素、放射性標識、siRNA、小分子、またはサイトカインである。

40

【0019】

本発明の1つの態様は、本明細書に記載のPD-1抗体または断片をコードする1つ以上のポリヌクレオチドを含む単離された細胞に関する。本発明の1つの態様は、本明細書に記載の二重特異性抗体またはその断片をコードする1つ以上のポリヌクレオチドを含む単離された細胞に関する。本発明の1つの態様は、本明細書に記載の多重特異性抗体またはその断片をコードする1つ以上のポリヌクレオチドを含む単離された細胞に関する。

50

【0020】

本発明の1つの態様は、本明細書に記載の医薬組成物；対象への医薬組成物の投与のための注射器、針、またはアプリーケーター；および使用説明書を含むキットに関する。

【0021】

本発明の1つの態様は、キメラ抗原受容体を含む操作された細胞に関し、このキメラ抗原受容体は、癌細胞の表面上の抗原に特異的な細胞外リガンド結合ドメインを含み、抗原はPD-1を含む。本発明の他の態様は、キメラ抗原受容体を含む操作された細胞に関し、このキメラ抗原受容体は、癌細胞の表面上の第1の抗原および第2の抗原に特異的な細胞外リガンド結合ドメインを含み、第1の抗原はPD-1を含み、第2の抗原は本明細書に記載の腫瘍特異的表面抗原を含む。1つの実施形態では、細胞外リガンド結合ドメインは、抗体またはその断片を含む。別の実施形態では、抗体は、表1～11によるVHおよび／またはVL、あるいは本明細書に記載の重鎖または軽鎖の任意の組み合わせを含む。1つの実施形態では、抗体は、表12のCDR1、CDR2、および／またはCDR3、または本明細書に記載のCDRの任意の組み合わせを含む。1つの実施形態では、操作された細胞は、T細胞、NK細胞、またはNKT細胞である。1つの実施形態では、T細胞は、CD4+、CD8+、CD3+panT細胞、またはそれらの任意の組み合わせである。

【0022】

本発明の1つの態様は、対象の癌を治療する方法に関する。いくつかの実施形態では、この方法は、それを必要とする対象に、本明細書に記載のPD-1抗体を含む治療有効量の組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態では、この方法は、それを必要とする対象に、本明細書に記載の医薬組成物を含む治療有効量の組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態では、この方法は、それを必要とする対象に、本明細書に記載のCAR組成物を含む治療有効量の組成物を投与することを含む。1つの実施形態では、癌はPD-1を発現する。別の実施形態では、癌は、非小細胞肺癌、黒色腫、卵巣癌、リンパ腫、または腎細胞癌を含む。いくつかの実施形態では、この方法は、対象に化学療法剤を投与することをさらに含む。

【0023】

[本発明1001]

重鎖、軽鎖、またはそれらの組み合わせを含む、ヒトプログラム細胞死1 (PD-1) タンパク質に結合する単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、

前記重鎖は、

G-(X₁)-TF-(X₂X₃)-Y-(X₄) (配列番号81)、G-(X₅)-TF-(X₆X₇X₈)-A (配列番号82)、GDSVSSDNYF (配列番号43)、またはGYTFNRF G (配列番号55) を含む、CDR1、

ISWNSGSI (配列番号19)、IYPDDSDT (配列番号33)、VYYNGNT (配列番号45)、TNPYNGNT (配列番号57)、またはISYDGSNK (配列番号69) を含む、CDR2、

ASDYGDKYYYYGMDV (配列番号21)、AFWGASGAPVNGFDI (配列番号35)、ATETPPTSYFNSGPFDS (配列番号47)、ARVVAVNGMDV (配列番号59)、ASQTVAGSDY (配列番号71)、またはASDYGDKYSYYGMDV (配列番号79) を含む、CDR3、

またはそれらのCDRの組み合わせ

を含み、かつ

前記軽鎖は、

SSNIGSNT (配列番号24)、SSNIGAGYV (配列番号37)、SNNVG AHG (配列番号49)、SGSIAAAYY (配列番号61)、またはNIGSKS (配列番号73) を含む、CDR1、

(X₉)-DN (配列番号83)、(X₁₀)-NN (配列番号84)、またはDDS (配列番号75) を含む、CDR2、

10

20

30

40

50

AAWDGGLNGRGV (配列番号28)、AAWDDSLNAPV (配列番号41)、SSWDSLSGYV (配列番号53)、QSYDSSNLWV (配列番号65)、またはQVWHSVSDQGV (配列番号77)を含む、CDR3、またはそれらのCDRの組み合わせを含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

[本発明1002]

完全ヒトであるか、またはヒト化されている、本発明1001の抗体。

[本発明1003]

単一特異性、二重特異性、または多重特異性である、本発明1001の抗体。

[本発明1004]

単鎖抗体である、本発明1001の抗体。

[本発明1005]

少なくとも 1.0×10^{-6} Mの結合親和性を有する、本発明1001の抗体。

[本発明1006]

重鎖定常領域、軽鎖定常領域、Fc領域、またはそれらの組み合わせをさらに含む、本発明1001の抗体または断片。

[本発明1007]

X₁、X₄、X₅、またはX₈は、非極性アミノ酸残基である、本発明1001の抗体。

[本発明1008]

X₁、X₄、X₅、またはX₈は、チロシン (Y)、フェニルアラニン (F)、またはアラニン (A) である、本発明1007の抗体。

[本発明1009]

X₂、X₃、X₄、X₆、X₇、またはX₈は、極性アミノ酸残基である、本発明1001の抗体。

[本発明1010]

X₂、X₃、X₄、X₆、X₇、またはX₈は、アスパラギン酸 (D)、スレオニン (T)、セリン (S)、またはトリプトファン (W) である、本発明1009の抗体。

[本発明1011]

X₁は、フェニルアラニン (F) またはチロシン (Y) である、本発明1001の抗体。

[本発明1012]

X₂は、アスパラギン酸 (D)、スレオニン (T)、セリン (S) である、本発明1001の抗体。

[本発明1013]

X₃は、アスパラギン酸 (D)、スレオニン (T)、セリン (S) である、本発明1001の抗体。

[本発明1014]

X₄は、アラニン (A) またはトリプトファン (W) である、本発明1001の抗体。

[本発明1015]

X₅は、フェニルアラニン (F) またはチロシン (Y) である、本発明1001の抗体。

[本発明1016]

X₆は、アスパラギン酸 (D) またはセリン (S) である、本発明1001の抗体。

[本発明1017]

X₇は、アスパラギン酸 (D) またはセリン (S) である、本発明1001の抗体。

[本発明1018]

X₈は、フェニルアラニン (F) またはチロシン (Y) である、本発明1001の抗体。

[本発明1019]

X₉は、極性親水性アミノ酸残基である、本発明1001の抗体。

[本発明1020]

X₉は、グルタミン酸 (E)、アスパラギン (N)、またはアスパラギン酸 (D) である

10

20

30

40

50

、本発明1019の抗体。

[本発明1021]

X₁₀は、極性親水性アミノ酸残基である、本発明1001の抗体。

[本発明1022]

X₁₀は、セリン（S）またはアルギニン（R）である、本発明1021の抗体。

[本発明1023]

少なくとも1つの抗体を含む抗体組成物であって、前記少なくとも1つの抗体は、2つの重鎖および2つの軽鎖を含み、

前記重鎖のCDRは、配列番号1のIMGTナンバリングによる残基27～38、残基56～65、および残基105～119；または配列番号3のIMGTナンバリングによる残基27～38、残基56～65、および残基105～119；または配列番号5のIMGTナンバリングによる残基27～38、残基56～65、および残基105～121；または配列番号7のIMGTナンバリングによる残基27～38、残基56～65、および残基105～115；または配列番号9のIMGTナンバリングによる残基27～38、残基56～65、および残基105～114；または配列番号12のIMGTナンバリングによる残基27～38、残基56～65、および残基105～119；または配列番号13のIMGTナンバリングによる残基27～38、残基56～65、および残基105～119；または配列番号15のIMGTナンバリングによる残基27～38、残基56～65、および残基105～119に見出される参照生殖系列CDRと同一であるが、前記重鎖CDRの少なくとも1つは、その参照CDRと比較して単一アミノ酸置換によって異なり、かつ

前記軽鎖のCDRは、配列番号2のIMGTナンバリングによる残基27～38、残基56～65、および残基105～116；または配列番号4のIMGTナンバリングによる残基27～38、残基56～65、および残基105～115；または配列番号6のIMGTナンバリングによる残基27～38、残基56～65、および残基105～115；または配列番号8のIMGTナンバリングによる残基27～38、残基56～65、および残基105～114；または配列番号10のIMGTナンバリングによる残基27～38、残基56～65、および残基105～115；または配列番号11のIMGTナンバリングによる残基27～38、残基56～65、および残基105～116に見出される参照生殖系列CDRと同一であるが、前記軽鎖CDRの少なくとも1つは、その参照CDRと比較して単一アミノ酸置換によって異なり、かつ

前記抗体組成物は、FCC'鎖によって生成されるPD-1面内のアミノ残基を含むエピートープに結合するが、配列番号XX中の非隣接アミノ酸を含むPD-1のC'Dループと接触しない、

抗体組成物。

[本発明1024]

ヒトプログラム細胞死1（PD-1）タンパク質に結合する単離された抗体またはその断片であって、

（a）配列番号17のアミノ酸配列を含むVH CDR1、配列番号19のアミノ酸配列を含むVH CDR2、配列番号21のアミノ酸配列を含むVH CDR3、配列番号24のアミノ酸配列を含むVL CDR1、配列番号26のアミノ酸配列を含むVL CDR2、および配列番号28のアミノ酸配列を含むVL CDR3、または、

（b）配列番号31のアミノ酸配列を含むVH CDR1、配列番号33のアミノ酸配列を含むVH CDR2、配列番号35のアミノ酸配列を含むVH CDR3、配列番号37のアミノ酸配列を含むVL CDR1、配列番号39のアミノ酸配列を含むVL CDR2、および配列番号41のアミノ酸配列を含むVL CDR3、または、

（c）配列番号43のアミノ酸配列を含むVH CDR1、配列番号45のアミノ酸配列を含むVH CDR2、配列番号47のアミノ酸配列を含むVH CDR3、配列番号49のアミノ酸配列を含むVL CDR1、配列番号51のアミノ酸配列を含むVL CDR2、および配列番号53のアミノ酸配列を含むVL CDR3、または、

（d）配列番号55のアミノ酸配列を含むVH CDR1、配列番号57のアミノ酸配列を含むVH CDR2、配列番号59のアミノ酸配列を含むVH CDR3、配列番号61のアミ

ノ酸配列を含むV L C D R 1、配列番号63のアミノ酸配列を含むV L C D R 2、および配列番号65のアミノ酸配列を含むV L C D R 3、または、

(e) 配列番号67のアミノ酸配列を含むV H C D R 1、配列番号69のアミノ酸配列を含むV H C D R 2、配列番号71のアミノ酸配列を含むV H C D R 3、配列番号73のアミノ酸配列を含むV L C D R 1、配列番号75のアミノ酸配列を含むV L C D R 2、および配列番号77のアミノ酸配列を含むV L C D R 3、または、

(f) 配列番号17のアミノ酸配列を含むV H C D R 1、配列番号19のアミノ酸配列を含むV H C D R 2、配列番号21のアミノ酸配列を含むV H C D R 3、配列番号24のアミノ酸配列を含むV L C D R 1、配列番号80のアミノ酸配列を含むV L C D R 2、および配列番号28のアミノ酸配列を含むV L C D R 3、または、

(g) 配列番号17のアミノ酸配列を含むV H C D R 1、配列番号19のアミノ酸配列を含むV H C D R 2、配列番号79のアミノ酸配列を含むV H C D R 3、配列番号24のアミノ酸配列を含むV L C D R 1、配列番号26のアミノ酸配列を含むV L C D R 2、および配列番号28のアミノ酸配列を含むV L C D R 3、または、

(h) 配列番号78のアミノ酸配列を含むV H C D R 1、配列番号19のアミノ酸配列を含むV H C D R 2、配列番号21のアミノ酸配列を含むV H C D R 3、配列番号24のアミノ酸配列を含むV L C D R 1、配列番号26のアミノ酸配列を含むV L C D R 2、および配列番号28のアミノ酸配列を含むV L C D R 3、または、

(i) 配列番号78のアミノ酸配列を含むV H C D R 1、配列番号19のアミノ酸配列を含むV H C D R 2、配列番号21のアミノ酸配列を含むV H C D R 3、配列番号24のアミノ酸配列を含むV L C D R 1、配列番号80のアミノ酸配列を含むV L C D R 2、および配列番号28のアミノ酸配列を含むV L C D R 3、または、

(j) 配列番号78のアミノ酸配列を含むV H C D R 1、配列番号19のアミノ酸配列を含むV H C D R 2、配列番号79のアミノ酸配列を含むV H C D R 3、配列番号24のアミノ酸配列を含むV L C D R 1、配列番号80のアミノ酸配列を含むV L C D R 2、および配列番号28のアミノ酸配列を含むV L C D R 3

を含む、単離された抗体またはその断片。

[本発明1025]

配列番号1、3、5、7、9、12、13、および15からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号2、4、6、8、10、および11からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む、ヒトP D - 1タンパク質に結合する単離された抗体またはその断片。

[本発明1026]

重鎖、軽鎖、またはそれらの組み合わせを含む、P D - 1に結合する単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、前記重鎖は、配列番号1と約95%同一のアミノ酸配列を含み、かつ前記軽鎖は、配列番号2と約95%同一のアミノ酸配列を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

[本発明1027]

重鎖、軽鎖、またはそれらの組み合わせを含む、P D - 1に結合する単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、前記重鎖は、配列番号3と約95%同一のアミノ酸配列を含み、かつ前記軽鎖は、配列番号4と約95%同一のアミノ酸配列を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

[本発明1028]

重鎖、軽鎖、またはそれらの組み合わせを含む、P D - 1に結合する単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、前記重鎖は、配列番号5と約95%同一のアミノ酸配列を含み、かつ前記軽鎖は、配列番号6と約95%同一のアミノ酸配列を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

[本発明1029]

重鎖、軽鎖、またはそれらの組み合わせを含む、P D - 1に結合する単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、前記重鎖は、配列番号7と約95%同一のア

10

20

30

40

50

ミノ酸配列を含み、かつ前記軽鎖は、配列番号8と約95%同一のアミノ酸配列を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

[本発明1030]

重鎖、軽鎖、またはそれらの組み合わせを含む、PD-1に結合する単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、前記重鎖は、配列番号9と約95%同一のアミノ酸配列を含み、かつ前記軽鎖は、配列番号10と約95%同一のアミノ酸配列を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

[本発明1031]

重鎖、軽鎖、またはそれらの組み合わせを含む、PD-1に結合する単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、前記重鎖は、配列番号1と約95%同一のアミノ酸配列を含み、かつ前記軽鎖は、配列番号11と約95%同一のアミノ酸配列を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

10

[本発明1032]

重鎖、軽鎖、またはそれらの組み合わせを含む、PD-1に結合する単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、前記重鎖は、配列番号12と約95%同一のアミノ酸配列を含み、かつ前記軽鎖は、配列番号2と約95%同一のアミノ酸配列を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

[本発明1033]

重鎖、軽鎖、またはそれらの組み合わせを含む、PD-1に結合する単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、前記重鎖は、配列番号13と約95%同一のアミノ酸配列を含み、かつ前記軽鎖は、配列番号2と約95%同一のアミノ酸配列を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

20

[本発明1034]

重鎖、軽鎖、またはそれらの組み合わせを含む、PD-1に結合する単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、前記重鎖は、配列番号13と約95%同一のアミノ酸配列を含み、かつ前記軽鎖は、配列番号11と約95%同一のアミノ酸配列を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

[本発明1035]

重鎖、軽鎖、またはそれらの組み合わせを含む、PD-1に結合する単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、前記重鎖は、配列番号15と約95%同一のアミノ酸配列を含み、かつ前記軽鎖は、配列番号11と約95%同一のアミノ酸配列を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

30

[本発明1036]

本発明1001、1023、1024、1025、1026、1027、1028、1029、1030、1031、1032、1033、1034、または1035の断片と、免疫細胞上の分子に対する特異性を有する第2の抗原結合断片とを含む、単離された二重特異性抗体。

[本発明1037]

前記分子は、B7H3、B7H4、CD27、CD28、CD40、CD40L、CD47、CD122、CTLA-4、GITR、GITRL、ICOS、ICOSL、LAG-3、LIGHT、OX-40、OX40L、PD-1、TIM3、4-1BB、TIGIT、VISTA、HEVM、BTLA、およびKIRからなる群から選択される、本発明1036の二重特異性抗体。

40

[本発明1038]

前記断片および第2の断片のそれぞれは、Fab断片、単鎖可変断片(scfv)、または単ドメイン抗体から独立して選択される、本発明1036の二重特異性抗体。

[本発明1039]

Fc断片をさらに含む、本発明1036の二重特異性抗体。

[本発明1040]

本発明1001~1035のいずれかの抗体をコードする、核酸。

[本発明1041]

50

本発明1036～1039のいずれかに記載二重特異性抗体をコードする、核酸。

[本発明1042]

本発明1001～1035のいずれかの抗体またはその断片、および薬学的に許容される担体または賦形剤を含む、医薬組成物。

[本発明1043]

少なくとも1つの追加の治療剤をさらに含む、本発明1042の医薬組成物。

[本発明1044]

前記治療剤は、毒素、放射性標識、s i R N A、小分子、またはサイトカインである、本発明1043の医薬組成物。

[本発明1045]

本発明1036～1039のいずれかの二重特異性抗体、および薬学的に許容される担体または賦形剤を含む、医薬組成物。

[本発明1046]

少なくとも1つの追加の治療剤をさらに含む、本発明1045の医薬組成物。

[本発明1047]

前記治療剤は、毒素、放射性標識、s i R N A、小分子、またはサイトカインである、本発明1046の医薬組成物。

[本発明1048]

本発明1001～1035のいずれかの抗体またはその断片をコードする1つ以上のポリヌクレオチドを含む、単離された細胞。

[本発明1049]

本発明1036～1039のいずれかの二重特異性抗体またはその断片をコードする1つ以上のポリヌクレオチドを含む、単離された細胞。

[本発明1050]

本発明1040または1041の核酸を含む、ベクター。

[本発明1051]

本発明1050のベクターを含む、細胞。

[本発明1052]

本発明1042または1045の少なくとも1つの抗体組成物、対象に少なくとも1つの抗体を投与するための注射器、針、またはアプリケーター、および使用説明書を含む、キット。

[本発明1053]

キメラ抗原受容体を含む操作された細胞であって、前記キメラ抗原受容体は、癌細胞の表面上の抗原に特異的な細胞外リガンド結合ドメインを含み、前記抗原はP D - 1を含む、操作された細胞。

[本発明1054]

前記細胞外リガンド結合ドメインは、抗体またはその断片を含む、本発明1053の操作された細胞。

[本発明1055]

前記抗体は、表1～11によるV Hおよび／またはV L、またはそれらの任意の組み合わせを含む、本発明1053の操作された細胞。

[本発明1056]

前記抗体は、表12のC D R 1、C D R 2、および／またはC D R 3、またはそれらの任意の組み合わせを含む、本発明1054の操作された細胞。

[本発明1057]

前記操作された細胞は、T細胞、NK細胞、またはNK T細胞を含む、本発明1053の操作された細胞。

[本発明1058]

前記T細胞は、C D 4 +、C D 8 +、C D 3 + p a n T細胞、またはそれらの任意の組み合わせである、本発明1057の操作された細胞。

[本発明1059]

10

20

30

40

50

対象における癌を治療する方法であって、それを必要とする対象に、治療有効量の、本発明1001～1039のいずれかの抗体、本発明1042～1046のいずれかの医薬組成物、または本発明1053～1058のいずれかのCAR組成物を含む組成物を投与することを含む、方法。

[本発明1060]

前記癌はPD-1を発現する、本発明1059の方法。

[本発明1061]

前記癌は、非小細胞肺癌、黒色腫、卵巣癌、リンパ腫、または腎細胞癌を含む、本発明1059の方法。

[本発明1062]

化学療法剤を対象に投与することをさらに含む、本発明1059の方法。

本発明の他の目的および利点は、以下の記載から容易に明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0024】

本特許または出願書類は、カラーで作成された少なくとも1つの図面を含む。カラー図面を含む本特許または特許出願公報の写しは、特許庁に請求して必要な手数料を支払うことで得られる。

【0025】

【図1】抗体発見のためのPMPLパニング戦略（例えば、本発明のPD-1抗体）の概略図を示している。

【図2-1】図2は、抗PD-1抗体、P4-B3のVHおよびVL配列の概略図である。

【図2-2】図2-1の説明を参照のこと。

【図3-1】図3は、ヒトPD-1の3Dタンパク質構造の図であり、ヒトとカニクイザルPD-1との間の差異が赤色で強調している。対応するアミノ酸配列を下に整列させる。高度の類似性がヒトとカニクイザルPD-1との間で観察される。ニボルマブと結合するPD-1の3Dタンパク質構造も示している。

【図3-2】図3-1の説明を参照のこと。

【図4】ヒトおよびカニクイザルPD-1に対するP4-B3ミニボディの結合曲線を示すグラフである。

【図5】P4-B3の異なる型におけるオクテット結合曲線のグラフを示している。

【図6】PD-1抗体を使用したPD-L1競合アッセイの結合曲線を示している。

【図7】IgG ELISAの結合曲線を示している。

【図8-1】図8は、抗PD1 IgGを用いて行ったPD1 FACSについてのFACS分析プロットを示している。

【図8-2】図8-1の説明を参照のこと。

【図9】PD1-PDL1バイオアッセイの概略図である。

【図10A】図10は、市販のPD1-PDL1バイオアッセイからの誘導曲線のグラフを示している。(A) P4-B3のIgG1 野生型モノマーバージョン対pembroおよびniv o。図に示されるように、P4-B3抗PD1抗体は、pembroおよびniv oのシグナルの約1/2を達成している。

【図10B】図10は、市販のPD1-PDL1バイオアッセイからの誘導曲線のグラフを示している。(B) IgG1 LALA構成のヘキサマー比較。ヘキサマー構成は、用量応答曲線において約2～3倍のシフトを示している。

【図10C】図10は、市販のPD1-PDL1バイオアッセイからの誘導曲線のグラフを示している。(C) IgG4構築物（モノマーおよびヘキサマー）とniv oとの直接比較。ここでは、図10Aおよび図10Bと同様の傾向が観察される。市販の抗体はP4-B3より2倍強力であり、ヘキサマーはモノマーと比較して約2～3倍のシフトを有する。

【図11】ヒトPD-1のリボン図の概略図である（Cheng, X et al., (2013). JBC doi.org/10.1074/jbc.M112.448126

10

20

30

40

50

を参照のこと)。PD-1は、逆平行β-サンドイッチである。逆平行β-サンドイッチが示されている。PD-1リボン図の前面シートは、G、F、C、C'を含み、PD-1リボン図の後面シートは、A、B、E、Dを含む。PD-1は、ストーク領域中にシステインを欠き、これによって、PD-1がホモ二量体化するのが妨げられる。

【図12-1】図12は、PD-1とそのリガンドであるPDL-1またはPDL-2との相互作用を示すタンパク質構造の概略図である。Cheng et al, Structure and Interactions of the Human Programmed Cell Death 1 Receptor, JBC 2013; Tan et al. (2016) Protein Cell DOI:10.1007/s13238-016-0337-7; およびYan et al, (2008) PNAS, DPO:10.1073/pnas.0804453105を参照のこと。

10

【図12-2】図12-1の説明を参照のこと。

【図13-1】図13は、市販の抗体に結合するPD-1のリボン図を示している。(A) NivoはFGループに結合することでPD-L1を遮断する。(B) Pembroは、CおよびC'鎖に結合することにより遮断する。Fessas et al, Seminars in Oncology, 2017を参照のこと。

【図13-2】図13-1の説明を参照のこと。

【図14】ヒト対マウスPD-1のタンパク質モデルオーバーレイおよびアミノ酸配列比較である。ヒトおよびマウスPD-1の類似性の程度：約64%。Cheng, X et al., (2013). JBC doi.org/10.1074/jbc.M112.448126.を参照のこと。

20

【図15】ヒト対マウスPD-1のタンパク質モデルオーバーレイおよびアミノ酸配列比較である。アミノ酸残基P110（紫色）は、FGループにねじれをもたらす。マウスPD-1において、この残基は、Arg83とTrp39との疎水性相互作用に起因して、BCループをDEループに向かわせる。ヒトPD-1におけるアミノ酸残基P63（青色）は、ループをC'鎖から離れさせ、可撓性の高いループを作製する。理論に束縛されることを望まないが、これらの2つの構造的差異は、PembroおよびNivoのマウスPD-1との交差反応性の欠如において役割を果たす。Cheng, X et al., (2013). JBC doi.org/10.1074/jbc.M112.448126.を参照のこと。

30

【図16】マウスPD-1へのP4-B3結合を示すグラフである。P4-B3は、マウスPD-1に対して適度な親和性を有し、PembroおよびNivoとは一線を画している。

【図17】FACSによるスクリーニングの前にディスプレイされた酵母ライブラリを差次的に標識するために使用することができる染色戦略の概略図である。Cherf and Cochran, 2015, Methods Mol Biol.を参照のこと。

【図18】FACS分析のプロットを示している。青色ゲートが陽性ヒットであり、緑色ゲートが陰性である標準的な染色選別を示している。青色ゲートは、x=y軸に沿って上方にシフトしている。理論に束縛されることを望まないが、PD-1抗体クローンは、より高い親和性でPD-1に結合する。

40

【図19】動的染色のFACS分析のプロットを示している。収集された細胞は青色のゲートにあり、対象の例は赤色の円内にある。より多くのサンプルが得られるように収集ゲートを広く維持した。

【図20】P4-B3変異体の結合曲線のグラフである。

【図21】P4-B3変異体の結合曲線のグラフである。

【図22-1】図22は、P4-B3（抗PD1）生殖系列アラインメントの概略図であり、生成されたP4-B3変異体において変化したアミノ酸残基の図である。

【図22-2】図22-1の説明を参照のこと。

【図22-3】図22-1の説明を参照のこと。

【図23】異なるP4-B3変異体のオクテット結合曲線のグラフを示している。SAセ

50

ンサを $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ のビオチン化 PD-1 でコーティングした。

【図 24】PD-1 抗体 (様々な P4-B3 変異体) を使用する PD-L1 競合アッセイの結合曲線を示している。

【図 25】生成された P4-B3 変異体において変化したアミノ酸残基の概略図である。

【図 26-1】図 26 は、抗 PD1 抗体クローンの生殖系列アラインメントの概略図である。これらの候補は、可溶性タンパク質パニング (PD1-hFc) によって見出された。

【図 26-2】図 26-1 の説明を参照のこと。

【図 26-3】図 26-1 の説明を参照のこと。

【図 26-4】図 26-1 の説明を参照のこと。

【図 27】オクテット結合曲線のグラフを示している。PD1 と PDL1 の両方がタグ付けされている。センサ H4 から分かるように、センサは、PDL1 を付加する前に飽和していなかった。さらなる配列決定により、PD1 #5 が抗体ではないことが確認された。A4: R&D 抗 PD1 (AF1086); B4: PD1 ミニ3; C4: PD1 ミニ4; D4: PD1 ミニ5; E4: PD1 ミニ7; F4: PD1 ミニ13; G4: TIG1 (対照 ab) + PDL1; H4: センサが飽和しているかどうかを見るため抗体 + PD1 なし。

10

【図 28】オクテット結合曲線のグラフを示している。センサ H4 から分かるように、PD1 と PDL1 の両方がタグ付けされている。センサは、PDL1 を付加する前に飽和していなかった。PD1 および PDL1 を $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ で使用した。抗体は $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ で使用した。全てのサンプルを $1 \times \text{PBST}$ で希釈した。新規 PD-1 抗体を scFv-Fc 型で使用し、Nivo および Pembro は市販の調製物である。A6: Nivo; B6: Pembro; C6: PD1 #3; D6: PD1 #4; E6: PD1 #5; F6: PD1 #7; G6: PD1 #13; H6: TIG1 (-)。

20

【図 29】オクテット結合曲線のグラフを示している。SA センサ、 $2.5 \mu\text{g}$ の expi293 発現可溶性 PD1-avi をロードし、Avidity 社のビオチン化キットを介してビオチン化した。PD1 #3 は、高いオフ速度を示した。

【図 30-1】図 30 は、抗 PD1 抗体クローン、P4-B7 の生殖系列アラインメントの概略図である。

【図 30-2】図 30-1 の説明を参照のこと。

【図 31】P4-B7 のヒトおよびカニクイザル PD-1 へのミニボディ結合曲線のグラフを示している。トランスフェクションの 48 時間後に expi293 細胞を用いて曲線を作成した。ヒト変異体は、市販の抗体を介して発現レベルに正規化したが、カニクイザル変異体は正規化しなかった。カニクイザル変異体は、使用した市販の抗体がカニクイザル PD #1 に結合することが報告されていないため、正規化しなかった。

30

【図 32】P4-B7 を使用する IgG ELISA の結合曲線のグラフを示している。P4-B7 は、反応速度が進行するのに適切でないほど右にシフトしている。上図、ELISA プレートを $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の可溶性 PD1 で 37°C で 2 時間コーティングした。次にプレートを洗浄し、2% BSA/PBS で 37°C で 1 時間ブロッキングした。ブロッキング溶液を除去し、抗体の 3×段階希釈物を、 $6 \mu\text{g}/\text{ml}$ で開始して、2% ミルク-PBST 中の各ウェル ($100 \mu\text{l}$) に加えた。次いで、プレートを穏やかに振盪しながら室温でインキュベートし、PBS-T で 6 回洗浄し、二次抗ヒト Fc-HRP (1:150 k、Bethyl) を加えた。プレートを再度、穏やかに振盪しながら室温で 1 時間インキュベートし、その後、PBS-T で 6 回洗浄した。TMB 基質を加え、プレートを 30°C で 10 分間インキュベートして、HRP 反応を加速させた。次いで、シグナルを TMB 停止溶液でクエンチし、 450 nm で読み取った。下図、得られたデータのプロトコルは、プレートを $6 \mu\text{g}/\text{ml}$ で開始する抗原の 3×段階希釈物でコーティングしたことを除いて、上のグラフで得られたデータのプロトコルと同じであった。次いで、抗体を $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の一定濃度で全てのウェルに加えた。

40

【図 33】市販の PD1-PDL1 バイオアッセイからの誘導曲線のグラフを示している。

【図 34】Promega PD1-PDL1 バイオアッセイ (J1250) の概略図を

50

示している。Promega PD1-PDL1 バイオアッセイ (J1250) を、野生型 aPD-1 scFv-Fc (P4-B3) ならびにランダム変異誘発酵母ライブラリから生成された変異体単一およびコンボ変異体を用いて行った。ニボルマブをベンチマーク対照として使用した。

【図35】P4-B3 変異体 Promega バイオアッセイ (scFv-Fc 型 バイオアッセイ) を示している。Nivo (黒丸) は約6の誘導倍率に達し、これは本発明者らの以前の実験と同様である。単一変異体 HLkin-1、HL-7 およびコンボ変異体 Mut+2、Mut+3 は、Nivo と比較してより高いまたは等しいレベルの PD-1 / PDL1 遮断を示している。これは EC50 値にも反映されており、Mut+2 は Nivo の約半分の EC50 値を有する。P4-B3 野生型はより低い遮断レベルを示し、Nivo より1.75倍高い EC50 値も有する。本発明者らのランダム変異誘発酵母ディスプレイライブラリによって同定された点変異は、結合およびチェックポイント遮断能力に対して有意な効果を有するようである。このアッセイで使用した全ての P4-B3 サンプルは、scFv-Fc 型であった。Nivo および F10 のみを完全 IgG として使用した。

【図36】P4-B3 野生型 / 変異体 IgG におけるオクテット結合曲線を示している。SA センサをビオチン化 PD-1 でコーティングし、次いで、様々な濃度の抗 PD1 抗体に浸漬した。ベースライン後の第1の工程は抗体の結合を示し、第2の工程は解離を示している。この図から分かるように、P4-B3 野生型は、迅速なオフ速度を有するが、変異体および Pembro ははるかに遅いオフ速度を有する。

【図37】マウス PD-1 (mPD-1) との P4-B3 単一对コンボ変異体における結合曲線を示している (scFv-Fc 型)。

【図38】hPD1 との P4-B3 単一对コンボ変異体における結合曲線を示している (特に明記されていない限り、scFv-Fc 型)。

【図39】hPD1 との P4-B3 単一对コンボ変異体における結合曲線を示している (pembro / nivo / 野生型 IgG1 を除いて scFv-Fc 型)。

【図40】生成された P4-B3 変異体において変化したアミノ酸残基の概略図である。

【図41】混合リンパ球反応 (MLR) アッセイの概略図である。CD4+T 細胞は、活性化の際に高レベルの PD-1 を発現する。DC は、体内での自己寛容を改善するために高レベルの PDL1 を発現する。MHC ミスマッチによる T 細胞活性化は、PD-1 / PDL1 阻害に起因して制限される。抗 PD-1 抗体の付加は、この阻害シグナルを除去し、T 細胞活性化の増加をもたらす (サイトカイン放出によって測定される)。

【図42-1】図42 は、グラフの表題に示されるように、サイトカイン産生を示す MLR アッセイのグラフを示している。

【図42-2】図42-1 の説明を参照のこと。

【図43-1】図43 は、グラフの表題に示されるように、サイトカイン産生を示す MLR アッセイのグラフを示している。

【図43-2】図43-1 の説明を参照のこと。

【図44-1】図44 は、Pembro 対 P4B3mut+3 IgG4 における MLR アッセイの統計データ表を示している。

【図44-2】図44-1 の説明を参照のこと。

【図45-1】図45 は、Pembro 対 P4B3mut+3 IgG4 における MLR アッセイの統計データ表を示している。

【図45-2】図45-1 の説明を参照のこと。

【図46-1】図46 は、Pembro 対 P4B3mut+3 IgG4 における MLR アッセイの統計データ表を示している。

【図46-2】図46-1 の説明を参照のこと。

【図47-1】図47 は、Pembro 対 P4B3mut+3 IgG4 における MLR アッセイの統計データ表を示している。

【図47-2】図47-1 の説明を参照のこと。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための形態】

【0026】

発明の詳細な説明

略語および定義

1つ以上の実施形態の詳細な説明が本明細書に提供される。しかしながら、本発明が、様々な形式で具現化され得ることが、理解される。したがって、本明細書に開示された特定の詳細は、限定として解釈されるべきではなく、特許請求の範囲の根拠として、および当業者に本発明を任意の適切な方法で用いるように教示するための代表的な根拠として解釈されるべきである。

【0027】

単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」は、文脈が明確に他のことを指示しない限り、複数の参照を含む。特許請求の範囲および／または明細書において「備える」という用語とともに使用されるとき「1つの(a)」または「1つの(an)」という単語の使用は、「1つ」を意味し得るが、「1つ以上」、「少なくとも1つ」および「1つ以上」の意味とも一致する。

【0028】

句「例えば」、「など」、「含む」などが本明細書で使用される場合は常に、他に明確に明記されない限り、句「限定することなく」が付随することが理解される。同様に、「一例」、「例示的」などは、非限定的であると理解される。

【0029】

用語「実質的に」は、意図した目的に悪影響を与えない記述語からの逸脱を可能にする。記述用語は、単語「実質的に」が明確に列挙されていなくても、用語「実質的に」によって修正されることが理解される。

【0030】

用語「備えている(comprising)」および「含んでいる(including)」、ならびに「有している(having)」および「伴っている(involving)」(および同様に「備える(comprises)」、「含む(includes)」、「有する(has)」、および「伴う(involves)」)などは、交換可能に使用され、同じ意味を有している。具体的には、用語それぞれは、「含んでいる(comprising)」の一般的な米国特許法の定義と一致して定義され、それ故、非限定用語(open term)の意味「少なくとも以下の(at least the following)」であると解釈され、追加の特徴、限定、態様などを除外しないとも解釈される。したがって、例えば、「工程a、b、およびcを伴うプロセス」は、プロセスが少なくとも工程a、bおよびcを含むことを意味している。用語「1つ(a)」、「1つ(an)」が使用される場合は常に、そのような解釈が文脈において無意味でない限り、「1以上」と理解される。

【0031】

「約」という用語は、本明細書では、おおよそ、大まかに、およそ、またはその領域内を意味するために使用される。「約」という用語が数値範囲とともに使用される場合、それは、記載された数値の上および下の境界を拡張することによってその範囲を変更する。一般に、用語「約」は、本明細書では、数値を、記載された値の上下に20パーセントの変動(上下)で変更するために使用される。

【0032】

PD-1

プログラムT細胞死1(PD-1)は、T細胞の表面上に見出される膜貫通タンパク質であり、これは、腫瘍細胞上のプログラムT細胞死リガンド1(PD-L1)に結合すると、T細胞活性の抑制およびT細胞媒介性細胞傷害の低減をもたらす。したがって、PD-1およびPD-L1は、免疫下方制御因子または免疫チェックポイント「オフスイッチ」である。PD-1阻害剤の例としては、ニボルマブ、(オブジーボ)(BMS-936558)、ペムブロリズマブ(キイトルーダ)、ピジリズマブ、AMP-224、MED

10

20

30

40

50

I 0 6 8 0 (A M P - 5 1 4)、P D R 0 0 1、M P D L 3 2 8 0 A、M E D I 4 7 3 6、B M S - 9 3 6 5 5 9 および M S B 0 0 1 0 7 1 8 C が挙げられるが、これらに限定されない。

【0033】

免疫系は、病原体を排除するための有効な応答と、自己免疫疾患を予防するための耐性の維持との間のバランスを達成しなければならない。T細胞は、このバランスを維持するために中心的な役割を果たしており、それらの適切な調節は、主にB7-CD28ファミリーの分子によって調整される。リガンドとして機能するB7ファミリーメンバーと、受容体として機能するCD28ファミリーメンバーとの間の相互作用は、T細胞応答を開始、増大および維持するだけでなく、適切な場合にT細胞応答を制限、終結および／または減弱する重要な負のシグナルにも寄与する重要な正のシグナルを提供する。PD-1はCD28ファミリーのメンバーである。

10

【0034】

PD-L1とPD-1との間の結合は、T細胞応答の調節に対して顕著な効果を有する。具体的には、PD-L1/PD-1相互作用は、T細胞増殖、ならびにT細胞活性および免疫応答を仲介するエフェクターサイトカイン、例えばIL-2およびIFN- γ の産生を阻害する。この負の調節機能は、T細胞媒介性自己免疫および免疫病理を予防するために重要である。しかしながら、PD-1/PD-L1軸はまた、T細胞疲弊において役割を果たすことが示されており、それにより、負の調節機能は、宿主の損傷に対するT細胞応答を阻害する。T細胞の長期または慢性抗原刺激は、抗原特異的応答を阻害し、病原体の免疫回避をもたらす負の免疫学的フィードバック機構を誘導し得る。T細胞疲弊はまた、抗原特異的T細胞自体の進行性の物理的欠失をもたらす。PD-1のT細胞発現は、慢性抗原刺激中に上方制御され、PD-L1への結合により、CD4+（Tヘルパー細胞）とCD8+（細胞傷害性Tリンパ球またはCTL）T細胞の両方におけるエフェクター機能の遮断をもたらすため、T細胞疲弊の誘導におけるPD-1/PD-L1相互作用に関与する。

20

【0035】

最近では、いくつかの慢性ウイルス感染および癌が、PD-1/PD-L1媒介性T細胞疲弊を引き起こすことによってPD-1/PD-L1軸を特異的に利用する免疫回避戦略を開発したことが研究により示された。多くのヒト腫瘍細胞および腫瘍関連抗原提示細胞は、高レベルのPD-L1を発現し、これは、腫瘍がT細胞疲弊を誘導して抗腫瘍免疫応答を回避することを示唆している。例えば、慢性HIV感染時には、HIV特異的CD8+T細胞は機能的に損なわれ、サイトカインおよびエフェクター分子を産生する能力が低下し、増殖能力の低下を示す。研究は、PD-1がHIV感染個体のHIV特異的CD8+T細胞上で高度に発現されることを示しており、PD-1/PD-L1経路を遮断することが、HIV感染およびAIDS患者の治療のための治療可能性を有し得ることを示している。まとめると、PD-1/PD-L1経路を遮断する薬剤は、様々な癌、HIV感染、および／またはT細胞疲弊に関連する他の疾患および状態のための新たな治療アプローチを提供するであろう。したがって、PD-1/PD-L1相互作用を遮断または防止することができる薬剤が緊急に必要とされている。

30

40

【0036】

PD-L1の過剰発現は、様々な癌で検出されている。例えば、乳癌では、PD-L1が過剰発現しており、高リスク予後因子と関連している。腎細胞癌において、PD-L1は上方調節されており、PD-1の発現の増加が腫瘍浸潤白血球においても見出されている。抗PD-L1および抗PD-1抗体は、腎細胞癌についての第I相試験においていくつかの臨床的有効性を実証している。PD-1またはPD-L1に結合することができる治療剤は、腫瘍細胞を特異的に標的とするのに有用であり得る。PD-1/PD-L1相互作用を遮断することができる薬剤は、T細胞疲弊を誘導して抗腫瘍T細胞活性を回避する癌の治療にさらに有用であり得る。そのような薬剤を単独でまたは他の抗癌治療薬と組み合わせて使用することにより、PD-L1を過剰発現する腫瘍細胞を効果的に標的

50

とし、抗腫瘍T細胞活性を増加させ、それにより、標的腫瘍細胞に対する免疫応答を増強することができる。

【0037】

PD-1およびPD-L1はまた、例えば、慢性感染による慢性抗原刺激後にT細胞によって上方制御され得る。慢性HIV感染時には、HIV特異的CD8+T細胞は機能的に損なわれ、サイトカインおよびエフェクター分子を産生する能力が低下し、増殖能力の低下を示す。PD-1は、HIV感染個体のHIV特異的CD8+T細胞上で高度に発現される。したがって、この経路を遮断することにより、HIVペプチドによる刺激に応答してHIV特異的T細胞が増殖してサイトカインを産生する能力が増強され、それによってHIVに対する免疫応答が増強され得る。他の慢性感染、例えば慢性ウイルス、細菌または寄生虫感染も、PD-1/PD-L1ブロック剤の使用から利益を得ることができる。

【0038】

本発明の態様は、PD-1に対して特異的な単離されたモノクローナル抗体を提供する。細胞、核酸（例えば、DNAまたはRNA）に関して、本明細書中で使用される場合、「単離された」という用語は、高分子の天然源中に存在する他のDNAまたはRNAからそれぞれ分離された分子を指す。「単離された」という用語はまた、組換えDNA技術によって産生される場合、細胞物質、ウイルス物質、または培養培地、または化学的に合成される場合、化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まない核酸またはペプチドを指すことができる。例えば、「単離された核酸」は、断片として天然に存在せず、天然状態では見出されないであろう核酸断片を含み得る。「単離された」はまた、他の細胞タンパク質または組織から単離された細胞またはポリペプチドを指すこともある。単離されたポリペプチドは、精製されたポリペプチドと組換えポリペプチドの両方を含み得る。単離された抗体は、PD-1をライブラリ選択標的として使用することにより、常磁性プロテオリポソームを介した270億のヒト単鎖抗体（scFv）ファージディスプレイライブラリーの使用によって同定された。これらの抗体は、PD-L1、ペムブロリズマブおよびニボルマブ結合と競合し得るPD-1に対する新規クラスのものクローナル抗体を表す。さらに、本明細書で論じられるモノクローナルPD-1抗体は、カニクイザル（Macaca fascicularis）PD-1タンパク質と交差反応する。本明細書で論じられるモノクローナルPD-1抗体はまた、多重特異性抗体の構築において、またはCAR-T細胞のためのペイロードとして使用することもできる。

【0039】

10種の固有の組換えモノクローナルPD-1抗体が本明細書に記載されている。これらには、P4-B3、P4-B7、PD1#2、PD1#3、PD1#13、P4-B3-HLkin1、P4-B3-HL-7、P4-B3-HL-14、P4-B3 HLkin-1 HL-7 mut2、およびP4-B3 HLkin-1 HL-7 HL-14 mut3が含まれる。ポリペプチド（抗体など）またはポリヌクレオチドに関する用語「組換え」は、天然に存在しないポリペプチドまたはポリヌクレオチドの形態を指し、その非限定的な例は、通常は一緒に存在しないポリヌクレオチドまたはポリペプチドを組み合わせることによって作製することができる。

【0040】

本明細書で提供されるVHおよびVL配列との組み合わせにおいて有用な例示的な野生型IgG定常領域（表2を参照のこと）に加えて、モノクローナルPD-1抗体の核酸およびアミノ酸配列を以下に提供する。

PD-1抗体の重鎖および軽鎖の相補性決定領域CDRのアミノ酸配列には、以下のとおり、下線（CDR1）、下線および太字（CDR2）、または下線、斜体、および太字（CDR3）が付されている。

【0041】

(表 1 A) A b P 4 - B 3 可変領域核酸配列

Ab P4-B3 VH の V _H 鎖 (IGHV3-9*01)
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGAC TCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTGATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAG CTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGGTAGCATAGG CTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCGTCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCA CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGA GTGACTACGGTGACAAATACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCAAAGGGACCAC GGTCACCGTCTCCTCA (配列番号 94)
Ab P4-B3 VL の V _L 鎖 (IGLV1-44*01)
CAGCCTGGGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCA TCTCTTGTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATACTGTCAACTGGTATCAGCAA TTCCCCGGAAGGCCCCCAAACCTCCTCATCTTTAATGATAATCAGCGGCCCTCAGGGGT CCCTGACCGCTTCTCTGCTTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATTAGTGGCCT CCAGTCTGAGGCTGAGGCTGACTATTACTGTGCGGCATGGGATGGCGGTCTGAATGGTC GAGGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAACCTGACCGTCCTA (配列番号 95)

10

【 0 0 4 2 】

(表 1 B) A b P 4 - B 3 可変領域アミノ酸配列

20

Ab P4-B3 VH の V _H 鎖 (IGHV3-9*01)
QVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIG YADSVKGRFTVSRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA <u>ASDYGDKYYYYGMDI</u> WGKGTTV TVSS (配列番号 1)
Ab P4-B3 VL の V _L 鎖 (IGLV1-44*01)
QPGLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQFPGKAPKLLIF <u>NDN</u> QRPSGVPDRF SASKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCA <u>AWDGGLNGRGV</u> FGGGTKLTVL (配列番号 2)

30

【 0 0 4 3 】

(表 2 A) A b P 4 - B 3 定常領域核酸配列 - 野生型 I g G モノマー

40

50

CH1 ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCAC AGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGA ACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGA CTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTA CATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAA (配列番号 116)	
ヒンジ GCAGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCA (配列番号 117)	
CH2 GCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACAC CCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAG ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTC CTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC TCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAA (配列番号 118)	10
CH3 GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCA AGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACATAAGACCACGCCTCCCGTGCTGG ACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (配列番号 119)	20
C _L GGTCAGCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCA AGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACA GTGGCCTGGAAGGCAGATGGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACACCCCT CCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTGAGCA GTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAG AAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTTCATGA (配列番号 120)	30

【 0 0 4 4 】

(表 2 B) A b P 4 - B 3 定常領域アミノ酸配列 - 野生型 I g G モノマー

10

20

30

40

50

CHI ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK (配列番号 111)
ヒンジ AEPKSCDKTHTCPPCP (配列番号 112)
CH2 APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK (配列番号 113)
CH3 GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 114)
C _L GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTPSKQ SNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (配列番号 115)

10

【 0 0 4 5 】

(表 3 A) A b P 4 - B 7 可変領域核酸配列

20

Ab P4-B7 VH の V _H 鎖 (IGHV5-51*01) CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAGAAGCCCCGGGGAGTCTCTGAAGA TCTCCTGTAAGGATTCTGGATACACCTTTACCACCTACTGGATCGGCTGGGTGCGCCAG CTGCCCCGGGAAAGGCCTGGAGTTGATGGGGATCATCTATCCTGATGACTCTGATACCAC ATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCATGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAACACCG CCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGTTT TGGGGTGCGAGTGGAGCGCCAGTGAATGGTTTGTATATCTGGGGCCAAGGCACCTGG TCACCGTCTCCTCA (配列番号 96)
Ab P4-B7 VL の V _L 鎖 (IGLV1-44*01) CTGCCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCAT CTCCTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTTATGTTGTACACTGGTACCAGC AGCTCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATAGTAATAATCAGCGGCCCTCAGGG GTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGG GCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATGGGATGACAGCCTGAATG CTCCGGTGTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA (配列番号 97)

30

【 0 0 4 6 】

(表 3 B) A b P 4 - B 7 可変領域アミノ酸配列

40

Ab P4-B7 VH の V _H 鎖 (IGHV5-51*01) QVQLVQSGAEVKKPGESLKISKDSGYTFTTYWIGWVRQLPGKGLELMGIIYPDDSDITYS PSFQGHVTISADKSINTAYLQWSSLKASDTAMYYCAFWGASGAPVNGFDIWGQGLVTVS S (配列番号 3)
Ab P4-B7 VL の V _L 鎖 (IGLV1-44*01) LPVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYVVHWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPD RFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNAPVFGGGTKLTVLL (配列番号 4)

【 0 0 4 7 】

50

(表 4 A) P D 1 # 2 可変領域核酸配列

Ab PD1#2 VH の V _H 鎖 (IGHV4-61*01)
CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGCCAGGACTGGTGAGGCCTTCGGCGACCCTGTCCCT CACCTGCACTGTCTCTGGTGACTCCGTCAGCAGTGATAATTACTTCTGGAGTTGGATTCTG GCAGCCCCCAGGGAAGCCACTGGAGTGGATTGGCTATGTCTATTACAATGGGAACACC AACTACAACCCCTCCTTCAACAGTCGAGTCACCATGTCACTTGACACGTCCAAGAACCA GTTCTCCTTGAAGCTGAGGTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCCTTTTATTACTGTGCGA CAGAGACGCCCCCAACCAGCTATTTTAATAGTGACCCCTTTGACTCCTGGGGCCAGGGC ACCCTGGTCACCGTCTCCTCG (配列番号 98)
Ab PD1#2 VL の V _L 鎖 (IGLV10-54*01)
CAGCCTGGGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGTCCAAGGGCTTGAGACAGACCGCCACACT CACCTGCACTGGGAGCAGCAACAATGTAGGCGCCACGGAGCAGCTTGGCTGCAGCAG CACCAGGGCCACCCTCCCAAACCTCCTTGCTACAGGAATAACAACCGGCCCTCAGGGAT CTCAGAGAGATTCTCTGCATCCAGGTCAGGAAACACAGCCTCCCTGACCATTATTGGAC TCCAGCCTGAGGACGAGGGTGACTATTACTGCTCATCATGGGACAGCAGCCTCAGTGGT TATGTCTTCGGACCTGGGACCAAAGTCACCGTCCTA (配列番号 99)

10

【 0 0 4 8 】

(表 4 B) A b P D 1 # 2 可変領域アミノ酸配列

20

Ab PD1#2 VH の V _H 鎖 (IGHV4-61*01)
QVQLQQSGPGLVRPSATLSLTCTVSGDSVSSDNYFWSWIRQPPGKPLEWIGYVYYNGNTN YNPSFNSRVMTSLDTSKNQFSLKLRSVTAADTAFFYYCAATETPPTSYFNSGPFDSWGQGLV TVSS (配列番号 5)
Ab PD1#2 VL の V _L 鎖 (IGLV10-54*01)
QPGLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGSSNNVGAHGAAWLQQHQGHPPKLLAYRNNNRPSGISE RFSASRSGNTASLTIIIGLQPEDEGDYYCSSWDSSLSGYVFGPGTKVTVL (配列番号 6)

30

【 0 0 4 9 】

(表 5 A) P D 1 # 3 可変領域核酸配列

Ab PD1#3 VH の V _H 鎖 (IGHV1-18*01)
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCAGTGAAGG TCTCCTGCAAGACTTCTGGCTACACCTTTAACAGGTTTGGTCTCACCTGGGTGCGACAG GCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGACCAACCCTTACAATGGTAACACAA GGTATGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCAC AGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCATGTATTTCTGTGCGA GAGTCGTAGCCGTAAACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC CTCA (配列番号 100)
Ab PD1#3 VL の V _L 鎖 (IGLV6-57*01)
AATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTGCGGAGTCTCCGGGGAAGACGGTTACCAT CTCCTGCACCCGCAACAGTGGCAGCATTGCCGCCTACTATGTGCAGTGGTACCAGCAGC GCCCCGGGCAGTCCCCCACCCTGTGATCTATGAAGATAACCAAAGACCCCTCTGGGGTC CCTGATCGGTTCTCTGGCTCCATCGACAGCTCCTCCAACCTCTGCCTCCCTCACCATCTCT GGACTGAAGACTGAGGACGAGGCTGACTACTACTGTGAGTCTTATGATAGCAGCAATCT TTGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA (配列番号 101)

40

【 0 0 5 0 】

50

(表 5 B) A b P D 1 # 3 可変領域アミノ酸配列

Ab PD1#3 VH の V _H 鎖 (IGHV1-18*01)
QVQLVQSGAEVVKPGSSVKVSCCKTSGYTFNRFGLTWVRQAPGQGLEWMGW TNPYNGNT RYAQKFQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAMYFC <u>ARVVAVNGMDV</u> WGQGTTVTVS S (配列番号 7)
Ab PD1#3 VL の V _L 鎖 (IGLV6-57*01)
NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRN <u>SGSIAAYYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDN</u> QRPSGVPDR FSGSIDSSNSASLTISGLKTEDEADYYC <u>OSYDSSNLWV</u> FGGGTKLTVL (配列番号 8)

10

【 0 0 5 1 】

(表 6 A) A b P D 1 # 1 3 可変領域核酸配列

Ab PD1#13 VH の V _H 鎖 (IGHV3-30*01)
GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGAC TCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGCTATGCACTGGGTCCGCCAGG CTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGCAATAAATA CTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG CTGTATCTGCAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAG CCAAACAGTGGCTGGAAGTGAAGTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTCTCCTCA (配列番号 102)
Ab PD1#13 VL の V _L 鎖 (IGLV1-44*01)
CAGCCTGGGCTGACTCAGCCACCCTCGGTGCCAGTGGCCCCAGGACAGACGGCCAGGA TTACCTGTGGGGGAAACAACATTGGAAGTAAAGTGTGCACTGGTACCAGCAGAAGCC AGGCCAGGCCCTGTGCTGGTCTGCTATGATGATAGCGACCGGCCCTCAGGGATCCCTG AGCGATTCTCTGGCTCCAACCTCTGGGAACACGGCCACCCTGACCATCAGCAGGGTCGAA GCCGGGGATGAGGCCGACTATTACTGTCAGGTGTGGCATAGTGTTAGTGATCAAGGGG TCTTCGGAACCTGGGACCAAGTCACCGTCCTA (配列番号 103)

20

【 0 0 5 2 】

(表 6 B) A b P D 1 # 1 3 可変領域アミノ酸配列

Ab PD1#13 VH の V _H 鎖 (IGHV3-30*01)
EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAV ISYDGSNKY YADSVKGRFTISRDNSTNTLYLQMNSLRRAEDTAVYYC <u>ASQTVAGSDY</u> WGQGTTLTVSS (配列番号 9)
Ab PD1#13 VL の V _L 鎖 (IGLV1-44*01)
QPGLTQPPSVVPAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVY DDSD DRPSGIPERFS GSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYC <u>QVWHSVSDOGV</u> FGTGTKVTVL (配列番号 10)

40

【 0 0 5 3 】

P 4 - B 3 エラープロン (e r r o r p r o n e) 変異体 (P 4 - B 3 からの変異を赤色で強調表示し、サイレント変異を青色で強調表示する)。

【 0 0 5 4 】

(表 7 A) A b P 4 - B 3 - H L k i n 1 可変領域核酸配列

50

Ab HLkin1 VH の V _H 鎖
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGAC TCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTGATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAG CTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGGTAGCATAGG CTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCGTCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCA CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGA GTGACTACGGTGACAAATACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCAAAGGGACCAC GGTCACCGTCTCCTCA (配列番号104)
Ab HLkin1 VL の V _L 鎖
CAGCCTGGGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCA TCTCTTGTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATACTGTCAACTGGTATCAGCAA TTCCCCGGAAGGGCCCCAACTCCTCATCTTTAATGATAATCAGCGGCCCTCAGGGGT CCCTGACCGCTTCTCTGCTTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATTAGTGGCCT CCAGTCTGAGGATGAGGCTGACTATTACTGTGCGGCATGGGATGGCGGTCTGAATGGTC GAGGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAACTGACCGTCCTA (配列番号105)

10

【 0 0 5 5 】

(表 7 B) A b H L K i n 1 可変領域アミノ酸配列

Ab HLKin1 VH の V _H 鎖
QVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDFAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIG YADSVKGRFTVSRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>ASDYGDKYYYYGMDV</u> WGKGTTV TVSS (配列番号13)
Ab HLKin1 の V _L 鎖
QPGLTQPPSASGTPGQRTVISCSSSSNIGSNTVNWYQQFPGKAPKLLIF <u>NDN</u> QRPSPGVPDRF SASKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC <u>AAWDGGLNGRGV</u> FGGGTKLTVL (配列番号2)

20

【 0 0 5 6 】

(表 8 A) A b P 4 - B 3 - H L - 7 可変領域核酸配列

Ab HL-7 VH の V _H 鎖
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGAC TCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTGATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAG CTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGGTAGCATAGG CTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCGTCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCA CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGA GTGACTACGGTGACAAATACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCAAAGGGACCAC GGTCACCGTCTCCTCA (配列番号106)
Ab HL-7 VL の V _L 鎖
CAGCCTGGGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCAGGGCAGAGGGTCACCA TCTCTTGTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATACTGTCAACTGGTATCAGCAA TTCCCCGGAAGGGCCCCAACTCCTCATCTTTATGATAATCAGCGGCCCTCAGGGGT CCCTGACCGCTTCTCTGCTTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATTAGTGGCCT CCAGTCTGAGGATGAGGCTGACTATTACTGTGCGGCATGGGATGGCGGTCTGAATGGTC GAGGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAACTGACCGTCCTA (配列番号107)

40

【 0 0 5 7 】

50

(表 8 B) A b H L - 7 可変領域アミノ酸配列

Ab HL-7 VH の V _H 鎖
QVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIG YADSVKGRFTVSRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>ASDYGDY</u> <u>YYYGMDV</u> WGKGTTV TVSS (配列番号1)
Ab HL-7 の V _L 鎖
QPGLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQFPGKAPKLLIF <u>NDN</u> QRPSPGVPDRF SASKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC <u>AAWDGGLNGRGV</u> FGGGTKLTVL (配列番号11)

10

【 0 0 5 8 】

(表 9 A) A b P 4 - B 3 - H L - 1 4 可変領域核酸配列

Ab HL-14 VH の V _H 鎖
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGAC TCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTGATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAG CTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGGTAGCATAGG CTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCGTCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCA CTGTATCTGCAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGA GTGACTACGGTGACAAATACTCTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCAAAGGGACCAC GGTCACCGTCTCCTCA (配列番号108)
Ab HL-14 VL の V _L 鎖
CAGCCTGGGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCGGGCAGAGGGTCACCA TCTCTTGTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATACTGTCAACTGGTATCAGCAA TTCCCCGGAAGGCCCCCAAACCTCCTCATCTTTAATGATAATCAGCGGCCCTCAGGGGT CCCTGACCGCTTCTCTGCTTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATTAGTGGCCT CCAGTCTGAGGATGAGGCTGACTATTACTGTGCGGCATGGGATGGCGGTCTGAATGGTC GAGGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAACCTGACCGTCCTA (配列番号109)

20

【 0 0 5 9 】

(表 9 B) A b H L - 1 4 可変領域アミノ酸配列

Ab HL-14 VH の V _H 鎖
QVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIG YADSVKGRFTVSRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>ASDYGDY</u> <u>YYYGMDV</u> WGKGTTV TVSS (配列番号12)
Ab HL-14 の V _L 鎖
QPGLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQFPGKAPKLLIF <u>NDN</u> QRPSPGVPDRF SASKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC <u>AAWDGGLNGRGV</u> FGGGTKLTVL (配列番号2)

40

【 0 0 6 0 】

(表 10 A) A b H L k i n - 1 H L - 7 m u t 2 可変領域核酸配列

50

Ab HLkin-1 HL-7 mut2 VH の V _H 鎖
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGAC TCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTGATGATTGTGCCATGCACTGGGTCCGGCAAG CTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGGTAGCATAGG CTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCGTCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCA CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGA GTGACTACGGTGACAAATACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCAAAGGGACCAC GGTCACCGTCTCCTCA (配列番号104)
Ab HLkin-1 HL-7 mut2 VL の V _L 鎖
CAGCCTGGGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCA TCTCTTGTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATACTGTCAACTGGTATCAGCAA TTCCCCGGAAGGGCCCCAACTCCTCATCTTTGATGATAATCAGCGGCCCTCAGGGGT CCCTGACCGCTTCTCTGCTTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATTAGTGGCCT CCAGTCTGAGGATGAGGCTGACTATTACTGTGCGGCATGGGATGGCGGTCTGAATGGTC GAGGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAACTGACCGTCCTA (配列番号86)

10

【 0 0 6 1 】

(表 1 0 B) A b H L k i n - 1 H L - 7 m u t 2 可変領域アミノ酸配列

Ab HLkin-1 HL-7 mut2 VH の V _H 鎖
QVQLVQSGGGLVQPGSRSLRLSCAASGFTFDDFAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIG YADSVKGRFTVSRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>ASDYGDKYYYYGMDV</u> WGKGTTV TVSS (配列番号13)
Ab HLkin-1 HL-7 mut2 の V _L 鎖
QPGLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQFPGKAPKLLIF <u>DN</u> QRPSGVPDRF SASKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC <u>AAWDGGLNGRGV</u> FGGGTKLTVL (配列番号11)

20

【 0 0 6 2 】

(表 1 1 A) A b H L k i n - 1 H L - 7 H L - 1 4 m u t 3 可変領域核酸配列

Ab HLkin-1 HL-7 HL-14 mut3 VH の V _H 鎖
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGAC TCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTGATGATTGTGCCATGCACTGGGTCCGGCAAG CTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGGTAGCATAGG CTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCGTCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCA CTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGA GTGACTACGGTGACAAATACTCTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCAAAGGGACCAC GGTCACCGTCTCCTCA (配列番号110)
Ab HLkin-1 HL-7 HL-14 mut3 VL の V _L 鎖
CAGCCTGGGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCA TCTCTTGTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATACTGTCAACTGGTATCAGCAA TTCCCCGGAAGGGCCCCAACTCCTCATCTTTGATGATAATCAGCGGCCCTCAGGGGT CCCTGACCGCTTCTCTGCTTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATTAGTGGCCT CCAGTCTGAGGATGAGGCTGACTATTACTGTGCGGCATGGGATGGCGGTCTGAATGGTC GAGGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAAACTGACCGTCCTA (配列番号86)

40

【 0 0 6 3 】

(表 1 1 B) A b H L k i n - 1 H L - 7 H L - 1 4 m u t 3 可変領域アミノ酸配列

50

Ab HLkin-1 HL-7 HL-14 mut3 の V _H 鎖
QVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDFAAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIG YADSVKGRFTVSRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA <u>ASDYGDKY\$YYGMDV</u> WGKGTTV TVSS (配列番号15)
Ab HLkin-1 HL-7 HL-14 mut3 の V _L 鎖
QPGLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQFPGKAPKLLIFD <u>DN</u> QRPSGVPDRF SASKSGTSASLAISGLQSEADYYCA <u>AWDGGGLNGRGV</u> FGGGTKLTVL (配列番号11)

10

【0064】

PD-1 抗体の重鎖および軽鎖の相補性決定領域のアミノ酸配列を以下の表12A～Bに示す。

【0065】

(表12A) PD-1 抗体の重鎖 (V_H) の相補性決定領域 (CDR)

配列 ID	V _H CDR1	V _H CDR2	V _H CDR3
P4-B3	GFTFDDYA (配列番号 17)	ISWNSGSI (配列番号 19)	ASDYGDKYYYYGMDV (配列番号 21)
P4-B7	GYTFTTYW (配列番号 31)	IYPDDSDT (配列番号 33)	AFWGASGAPVNGFDI (配列番号 35)
PD1#2	GDSVSSDNYF (配列番号 43)	VYYNGNT (配列番号 45)	ATETPPTSYPFNSGPFDS (配列番号 47)
PD1#3	GYTFNRFG (配列番号 55)	TNPYNGNT (配列番号 57)	ARVVAVNGMDV (配列番号 59)
PD1#13	GFTFSSYA (配列番号 67)	ISYDGSNK (配列番号 69)	ASQTVAGSDY (配列番号 71)
HL-7	GFTFDDYA (配列番号 17)	ISWNSGSI (配列番号 19)	ASDYGDKYYYYGMDV (配列番号 21)
HL-14	GFTFDDYA (配列番号 17)	ISWNSGSI (配列番号 19)	ASDYGDKY\$YYGMDV (配列番号 79)
HLkin-1	GFTFDDFA (配列番号 78)	ISWNSGSI (配列番号 19)	ASDYGDKYYYYGMDV (配列番号 21)
HLkin-1 HL-7 mut2	GFTFDDFA (配列番号 78)	ISWNSGSI (配列番号 19)	ASDYGDKYYYYGMDV (配列番号 21)
HLkin-1 HL-7 HL-14 mut3	GFTFDDFA (配列番号 78)	ISWNSGSI (配列番号 19)	ASDYGDKY\$YYGMDV (配列番号 79)

20

30

【0066】

(表12B) PD-1 抗体の軽鎖 (V_L) の相補性決定領域 (CDR)

40

50

配列 ID	V _L CDR1	V _L CDR2	V _L CDR3
P4-B3	SSNIGSNT (配列番号 24)	NDN (配列番号 26)	AAWDGGLNGRGV (配列番号 28)
P4-B7	SSNIGAGYV (配列番号 37)	SNN (配列番号 39)	AAWDDSLNAPV (配列番号 41)
PD1#2	SNNVGAHG (配列番号 49)	RNN (配列番号 51)	SSWDSSLGGYV (配列番号 53)
PD1#3	SGSIAAAY (配列番号 61)	EDN (配列番号 63)	QSYDSSNLWV (配列番号 65)
PD1#13	NIGSKS (配列番号 73)	DDS (配列番号 75)	QVWHSVSDQGV (配列番号 77)
HL-7	SSNIGSNT (配列番号 24)	NDN (配列番号 80)	AAWDGGLNGRGV (配列番号 28)
HL-14	SSNIGSNT (配列番号 24)	NDN (配列番号 26)	AAWDGGLNGRGV (配列番号 28)
HLkin-1	SSNIGSNT (配列番号 24)	NDN (配列番号 26)	AAWDGGLNGRGV (配列番号 28)
HLkin-1 HL-7 mut2	SSNIGSNT (配列番号 24)	NDN (配列番号 80)	AAWDGGLNGRGV (配列番号 28)
HLkin-1 HL-7 HL-14 mut3	SSNIGSNT (配列番号 24)	NDN (配列番号 80)	AAWDGGLNGRGV (配列番号 28)

10

20

【0067】

PD-1 抗体の重鎖および軽鎖フレームワーク領域のアミノ酸配列を、以下の表 13A～B に示す。

【0068】

(表 13A) PD-1 抗体の重鎖 (V_H) フレームワーク領域 (FR)

30

40

50

配列ID	VH FR1	VH FR2	VH FR3	VH FR4
P4-B3	QVQLVQSGGGLVQ PGRSLRLSCAAS (配列番号 16)	MHWVRQAPGK GLEWVSG (配列番号 18)	GYADSVKGRFTVSRDN AKNSLYLQMNSLRAED TAVYYC (配列番号 20)	WGKGTTVTVSS (配列番号 22)
P4-B7	QVQLVQSGAEVKK PGESLKISCKDS (配列番号 30)	IGWVRQLPGKGL ELMGI (配列番号 32)	TYSPTSFGHVTISADKS INTAYLQWSSLKASDT AMYYC (配列番号 34)	WGQGTTLTVSS (配列番号 14)
PD1#2	QVQLQQSGPGLVR PSATLSLTCTVS (配列番号 42)	WSWIRQPPGKPL EWIGY (配列番号 44)	NYNPSFNSRVMTSLDT SKNQFSLKLRSVTAAD TAFYYC (配列番号 46)	WGQGTTLTVSS (配列番号 14)
PD1#3	QVQLVQSGAEVKK PGSSVKVCKTS (配列番号 54)	LTWVRQAPGQG LEWMGW (配列番号 56)	RYAQKFQGRVTMTTD TSTSTAYMELRSLRSD DTAMYFC (配列番号 58)	WGQGTTLTVSS (配列番号 23)
PD1#13	EVQLVQSGGGVVQ PGRSLRLSCAAS (配列番号 66)	MHWVRQAPGK GLEWVAV (配列番号 68)	YYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDT AVYYC (配列番号 70)	WGQGTTLTVSS (配列番号 14)
HL-7	QVQLVQSGGGLVQ PGRSLRLSCAAS (配列番号 16)	MHWVRQAPGK GLEWVSG (配列番号 18)	GYADSVKGRFTVSRDN AKNSLYLQMNSLRAED TAVYYC (配列番号 20)	WGKGTTVTVSS (配列番号 22)
HL-14	QVQLVQSGGGLVQ PGRSLRLSCAAS (配列番号 16)	MHWVRQAPGK GLEWVSG (配列番号 18)	GYADSVKGRFTVSRDN AKNSLYLQMNSLRAED TAVYYC (配列番号 20)	WGKGTTVTVSS (配列番号 22)
HLkin-1	QVQLVQSGGGLVQ PGRSLRLSCAAS (配列番号 16)	MHWVRQAPGK GLEWVSG (配列番号 18)	GYADSVKGRFTVSRDN AKNSLYLQMNSLRAED TAVYYC (配列番号 20)	WGKGTTVTVSS (配列番号 22)
HLkin-1 HL-7 mut2	QVQLVQSGGGLVQ PGRSLRLSCAAS (配列番号 16)	MHWVRQAPGK GLEWVSG (配列番号 18)	GYADSVKGRFTVSRDN AKNSLYLQMNSLRAED TAVYYC (配列番号 20)	WGKGTTVTVSS (配列番号 22)
HLkin-1 HL-7 HL- 14 mut3	QVQLVQSGGGLVQ PGRSLRLSCAAS (配列番号 16)	MHWVRQAPGK GLEWVSG (配列番号 18)	GYADSVKGRFTVSRDN AKNSLYLQMNSLRAED TAVYYC (配列番号 20)	WGKGTTVTVSS (配列番号 22)

【 0 0 6 9 】

(表 1 3 B) P D - 1 抗体の軽鎖 (V_L) フレームワーク領域 (F R)

10

20

30

40

配列ID	VL FR1	VL FR2	VL FR3	VL FR4
P4-B3	QPGLTQPPSASGTP GQRTVISCSGS (配列番号 25)	VNWKYQQFPGKA PKLLIF (配列番号 27)	QRPSGVPDRFSASKSG TSASLAISGLQSEDEAD YYC (配列番号 85)	FGGGTKLTVL (配列番号 29)
P4-B7	LPVLTQPPSASGTP GQRTVISCTGS FGGGTKLTVL (配列番号 36)	VHWYQQLPGTA PKLLIY (配列番号 38)	QRPSGVPDRFSGSKSG TSASLAISGLQSEDEAD YYC (配列番号 40)	FGGGTKLTVL (配列番号 29)
PD1#2	QPGLTQPPSVSKGL RQTATLTCTGS (配列番号 48)	AAWLQQHQGHP PKLLAY (配列番号 50)	NRPSGISERFSASRSGN TASLTIIGLQPEDEGDY YC (配列番号 52)	FGGGTKLTVL (配列番号 29)
PD1#3	NFMLTQPHSVSESP GKTVTISCTRN (配列番号 60)	VQWYQQRPGSS PTTVIY (配列番号 62)	QRPSGVPDRFSGSIDS SSNSASLTISGLKTEDE ADYYC (配列番号 64)	FGGGTKLTVL (配列番号 29)
PD1#13	QPGLTQPPSVPVAP GQTARITCGGN (配列番号 72)	VHWYQQKPGQA PVLVVY (配列番号 74)	DRPSGIPERFSGSNSG NTATLTISRVEAGDEA DYYC (配列番号 76)	FGGGTKLTVL (配列番号 29)
HL-7	QPGLTQPPSASGTP GQRTVISCSGS (配列番号 25)	VNWKYQQFPGKA PKLLIF (配列番号 27)	QRPSGVPDRFSASKSG TSASLAISGLQSEDEAD YYC (配列番号 85)	FGGGTKLTVL (配列番号 29)
HL-14	QPGLTQPPSASGTP GQRTVISCSGS (配列番号 25)	VNWKYQQFPGKA PKLLIF (配列番号 27)	QRPSGVPDRFSASKSG TSASLAISGLQSEDEAD YYC (配列番号 85)	FGGGTKLTVL (配列番号 29)
HLkin-1	QPGLTQPPSASGTP GQRTVISCSGS (配列番号 25)	VNWKYQQFPGKA PKLLIF (配列番号 27)	QRPSGVPDRFSASKSG TSASLAISGLQSEDEAD YYC (配列番号 85)	FGGGTKLTVL (配列番号 29)
HLkin-1 HL-7 mut2	QPGLTQPPSASGTP GQRTVISCSGS (配列番号 25)	VNWKYQQFPGKA PKLLIF (配列番号 27)	QRPSGVPDRFSASKSG TSASLAISGLQSEDEAD YYC (配列番号 85)	FGGGTKLTVL (配列番号 29)
HLkin-1 HL-7 HL- 14 mut3	QPGLTQPPSASGTP GQRTVISCSGS (配列番号 25)	VNWKYQQFPGKA PKLLIF (配列番号 27)	QRPSGVPDRFSASKSG TSASLAISGLQSEDEAD YYC (配列番号 85)	FGGGTKLTVL (配列番号 29)

【 0 0 7 0 】

本明細書に記載のPD-1抗体は、PD-1に結合する。1つの実施形態では、PD-1抗体は、PD-1に対して高い親和性および高い特異性を有する。いくつかの実施形態はまた、本明細書に記載の抗PD-1抗体のアミノ酸またはヌクレオチド配列に対して特定のパーセンテージの同一性または類似性を有する抗体を特徴とする。例えば、「相同性」または「同一性」または「類似性」は、2つのペプチド間または2つの核酸分子間の配列類似性を指す。相同性は、比較のために整列され得る各配列中の位置を比較することによって決定することができる。比較される配列中の位置が同じ塩基またはアミノ酸によって占有されている場合、分子はその位置で相同である。配列間の相同性の程度は、配列に

10

20

30

40

50

よって共有される一致する位置または相同な位置の数の関数である。例えば、抗体は、本明細書に記載の抗PD-1抗体のいずれか1つの特定の領域または全長と比較した場合に、60%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上のアミノ酸配列同一性を有し得る。例えば、抗体は、本明細書に記載される抗PD-1抗体のいずれか1つの特定の領域または全長と比較した場合、60%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の核酸同一性を有し得る。本発明の核酸およびタンパク質に対する配列同一性または類似性は、例えば、Ausubel et al. 編(2007) Current Protocols in Molecular Biologyに記載されているような、当該技術分野で既知のソフトウェアプログラムを使用する、当該技術分野で既知の方法による配列比較および／またはアラインメントによって決定することができる。例えば、配列比較アルゴリズム(すなわち、BLASTまたはBLAST 2.0)、手動アラインメントまたは目視検査を利用して、本発明の核酸およびタンパク質についてのパーセント配列同一性または類似性を決定し得る。

【0071】

本明細書で使用される場合、「ポリペプチド」は、単一の「ポリペプチド」ならびに複数の「ポリペプチド」を包含することができ、アミド結合(ペプチド結合としても知られる)によって直線的に結合されたモノマー(アミノ酸)から構成される分子を指す。「ポリペプチド」という用語は、2つ以上のアミノ酸の任意の1つ以上の鎖を指し、生成物の特定の長さを指すものではない。したがって、ペプチド、ジペプチド、トリペプチド、オリゴペプチド、「タンパク質」、「アミノ酸鎖」、または2つ以上のアミノ酸の鎖を指すために使用される任意の他の用語は、本明細書では「ポリペプチド」を指すことができ、用語「ポリペプチド」は、これらの用語の代わりに、またはこれらの用語のいずれかと交換可能に使用することができる。「ポリペプチド」はまた、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、既知の保護／遮断基による誘導体化、タンパク質分解切断、または天然に存在しないアミノ酸による修飾を含むがこれらに限定されない、ポリペプチドの発現後修飾の産物を指すことができる。ポリペプチドは、天然の生物学的供給源に由来するか、または組換え技術によって産生され得るが、必ずしも指定された核酸配列から翻訳されるとは限らない。これは、化学合成を含む任意の様式で生成され得る。アミノ酸配列に関して、当業者は、コードされる配列中の単一のアミノ酸またはわずかな割合のアミノ酸を改変、付加、欠失または置換する核酸、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質配列に対する個々の置換、欠失または付加が、本明細書中で集合的に「保存的に改変された変異体」と呼ばれることを容易に認識している。いくつかの実施形態では、改変は、化学的に類似したアミノ酸によるアミノ酸の置換をもたらす。機能的に類似したアミノ酸を提供する保存的置換表は、当該技術分野において周知である。本明細書に開示される抗PD-1抗体のそのような保存的に修飾された変異体は、未修飾PD-1抗体と比較して、PD-1に対して増大した交差反応性を示し得る。

【0072】

例えば、「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられているものである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該技術分野で定義されており、塩基性側鎖(例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電極性側鎖(例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン)、非極性側鎖(例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、ベータ分岐側鎖(例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン)、および芳香族側鎖(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)が挙げられる。したがって、免疫グロブリンポリペプチドの非必須アミノ酸残基は、同じ側鎖ファミリーからの別のアミノ酸残基で置き換えられる。別の実施形態では、アミノ酸のストリングは、側鎖ファミリーメンバーの順序および／または組

成が異なる構造的に類似したストリングで置き換えることができる。

【0073】

抗体

本明細書で使用される場合、「抗体」または「抗原結合ポリペプチド」は、抗原を特異的に認識して結合するポリペプチドまたはポリペプチド複合体を指すことができる。抗体は、抗体全体および任意の抗原結合断片またはその単鎖であり得る。例えば、「抗体」は、抗原に結合する生物学的活性を有する免疫グロブリン分子の少なくとも一部を含む任意のタンパク質またはペプチド含有分子を含み得る。非限定的な例としては、重鎖もしくは軽鎖またはそのリガンド結合部分の相補性決定領域（CDR）、重鎖もしくは軽鎖可変領域、重鎖もしくは軽鎖定常領域、フレームワーク（FR）領域もしくはその任意の部分、または結合タンパク質の少なくとも1つの部分が挙げられる。本明細書で使用される場合、「抗体」という用語は、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン（Ig）分子の免疫学的に活性な部分、すなわち、抗原に特異的に結合する（免疫反応する）抗原結合部位を含む分子を指すことができる。「特異的に結合する」または「免疫反応する」とは、抗体が所望の抗原の1つ以上の抗原決定基と反応し、他のポリペプチドとは反応しない抗体を意味する。

【0074】

本明細書中で使用される場合、「抗体断片」または「抗原結合断片」という用語は、 $F(ab)_2$ 、 $F(ab)_2$ 、 Fab' 、 Fab 、 Fv 、 $scFv$ などの抗体の一部分である。構造にかかわらず、抗体断片は、インタクトな抗体によって認識される同じ抗原と結合する。用語「抗体断片」としては、アプタマー（例えば、スピーゲル）、ミニボディ、およびダイアボディが挙げられる。用語「抗体断片」はまた、特定の抗原に結合して複合体を形成することによって抗体のように作用する任意の合成または遺伝子操作されたタンパク質を含み得る。本明細書に記載の抗体、抗原結合ポリペプチド、変異体、または誘導体としては、ポリクローナル、モノクローナル、多重特異性、ヒト、ヒト化またはキメラ抗体、単鎖抗体、エピトープ結合断片、例えば、 Fab 、 Fab' および $F(ab')_2$ 、 Fd 、 Fvs 、単鎖 Fv （ $scFv$ ）、単鎖抗体、 dAb （ドメイン抗体）、ミニボディ、ジスルフィド結合 Fv （ $sdFv$ ）、 VL または VH ドメインのいずれかを含む断片、 Fab 発現ライブラリ、および抗イディオタイプ（抗 Id ）抗体によって産生される断片が挙げられるが、これらに限定されない。

【0075】

「単鎖可変断片」または「 $scFv$ 」は、免疫グロブリンの重鎖（ VH ）および軽鎖（ VL ）の可変領域の融合タンパク質を指す。単鎖 Fv （「 $scFv$ 」）ポリペプチド分子は、共有結合した $VH:VL$ ヘテロダイマーであり、ペプチドをコード化するリンカーによって結合された、 VH をコード化する遺伝子および VL をコード化する遺伝子を含む遺伝子融合体から発現できる。（Huston et al. (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85 (16): 5879-5883を参照のこと）。いくつかの態様では、領域は、10～約25アミノ酸の短いリンカーペプチドで結合されている。リンカーは、柔軟性のためにグリシン、ならびに溶解性のためにセリンまたはスレオニンが豊富であってよく、 VH のN末端を VL のC末端と連結するか、またはその逆のいずれかであり得る。このタンパク質は、定常領域の除去およびリンカーの導入にもかかわらず、元の免疫グロブリンの特異性を保持する。自然に凝集しているが化学的に分離された、軽鎖および重鎖ポリペプチド鎖を、抗体V領域から、抗原結合部位の構造と実質的に同様の三次元構造に折り畳まれる $scFv$ 分子に変換するための化学構造を識別するための多くの方法が記載されている。例えば、米国特許第5,091,513号；第5,892,019号；第5,132,405号；および第4,946,778号を参照されたく、これらの各々は、参照によりその全体が組み込まれる。

【0076】

多くの標的分子に対する再構成された抗体遺伝子の大きな供給源を提供するために、非常に大きなナイーブヒト $scFv$ ライブラリが作製されておりかつ作製され得る。疾患特

10

20

30

40

50

異的抗体を単離するために、感染性疾患を有する個体からより小さなライブラリを構築することができる。(Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9339-43 (1992); Zebedee et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3175-79 (1992)を参照のこと)。

【0077】

ヒトから得られる抗体分子は、分子中に存在する重鎖の性質が互いに異なる、IgG、IgM、IgA、IgE、およびIgDの5クラスのいずれかに関連する。当業者は、重鎖がガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、またはイプシロン(γ 、 μ 、 α 、 δ 、 ϵ)に分類され、それらの中にいくつかのサブクラス(例えば、 $\gamma 1 \sim \gamma 4$)があることを理解するであろう。特定のクラスは、例えばIgG₁、IgG₂、IgG₃およびIgG₄などのサブクラスも有する。免疫グロブリンサブクラス(アイソタイプ)、例えばIgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgG₅などは、十分に特徴付けられており、機能的特殊化を付与することが知られている。IgGに関して、標準的な免疫グロブリン分子は、分子量が約23,000ダルトンの2つの同一の軽鎖ポリペプチド、および分子量が53,000~70,000の2つの同一の重鎖ポリペプチドを含む。4つの鎖は、典型的には、「Y」構成でジスルフィド結合によって結合され、軽鎖は、「Y」の口から始まり、可変領域を通して続く重鎖を囲む。本明細書に記載の免疫グロブリンまたは抗体分子は、免疫グロブリン分子の任意のタイプ(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、およびIgY)、クラス(例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁およびIgA₂)またはサブクラスであり得る。

【0078】

軽鎖はカッパまたはラムダ(κ 、 λ)のいずれかに分類される。各重鎖クラスは、カッパまたはラムダ軽鎖のいずれかと結合され得る。一般に、軽鎖および重鎖は互いに共有結合しており、免疫グロブリンがハイブリドーマ、B細胞、または遺伝子操作された宿主細胞のいずれかによって生成される場合、2つの重鎖の「テール」部分は、共有ジスルフィド結合または非共有結合によって互いに結合している。重鎖において、アミノ酸配列は、Y構成フォーク状端部におけるN末端から各鎖の底部におけるC末端に及ぶ。

【0079】

軽鎖と重鎖の両方が、構造的および機能的相同性の領域に分けられる。「定常」および「可変」という用語は、機能的に使用される。軽(VL)および重(VH)鎖部分の両方の可変ドメインは、抗原認識および特異性を決定する。逆に、軽(CL)および重(CH₁、CH₂またはCH₃)の定常ドメインは、分泌、経胎盤移動性、Fc受容体結合、補体結合などの重要な生物学的特性を付与する。「抗原結合部位」または「結合部分」という用語は、抗原結合に関与する免疫グロブリン分子の部分の指すことができる。抗原結合部位は、重(「H」)鎖および軽(「L」)鎖のN末端可変(「V」)領域のアミノ酸残基によって形成される。「超可変領域」と呼ばれる重鎖および軽鎖のV領域内の3つの高度に分岐したストレッチは、「フレームワーク領域」または「FR」として知られるより保存された隣接ストレッチの間に挿入される。したがって、「FR」という用語は、免疫グロブリンの超可変領域の間、およびそれに隣接して天然に見出されるアミノ酸配列を指すことができる。抗体分子において、軽鎖の3つの超可変領域および重鎖の3つの超可変領域は、三次元空間で互いに対して配置されて、抗原結合表面を形成する。抗原結合表面は、結合した抗原の三次元表面に対して相補的であり、重鎖および軽鎖のそれぞれの3つの超可変領域は、「相補性決定領域」または「CDR」と呼ばれる。CDRを含むVHおよびVL領域、ならびにPD-1抗体のフレームワーク(FR)を表1A~表15Bに示す。

【0080】

各抗原結合ドメイン中に存在する6つのCDRは、抗体が水性環境中でその三次元構成をとるため、抗原結合ドメインを形成するように特異的に配置されたアミノ酸の短い非隣接配列である。抗原結合ドメイン中の残りのアミノ酸であるFR領域は、分子間変動が少

10

20

30

40

50

ないことを示している。フレームワーク領域は主にβシート構造をとり、CDRはループを形成してβシート構造に結合し、場合によってはその一部を形成する。フレームワーク領域は、鎖間の非共有結合的相互作用によってCDRを正しい向きに配置する足場を形成するように作用する。配置されたCDRによって形成される抗原結合ドメインは、免疫反応性抗原上のエピトープに相補的な表面を提供し、同族のエピトープへの抗体の非共有結合を促進する。CDRおよびフレームワーク領域を含むアミノ酸は、それぞれ、それらが以前に定義されているので、当業者によって重鎖または軽鎖可変領域について容易に同定され得る（「Sequences of Proteins of Immunological Interest」, Kabat, E. et al., U. S. Department of Health and Human Services, (1983) ; および Chothia および Lesk, J. Mol. Biol., 196:901~917 (1987) を参照のこと）。

【0081】

当該技術分野において使用および／または受け入れられている用語の定義が2つ以上ある場合、本明細書で使用される用語の定義は、そうではないと明示的に述べられていない限り、全てのそのような意味を含むことが意図される。具体的な例は、重鎖および軽鎖ポリペプチドの両方の可変領域内に見出される非隣接抗原結合部位を記載するための用語「相補性決定領域」（「CDR」）の使用である。この特定の領域は、Kabat et al., U. S. Dept. of Health and Human Services, 「Sequences of Proteins of Immunological Interest」 (1983) および Chothia et al., Mol. Biol. 196:901~917 (1987年) によって記載されており、これらは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。Kabat および Chothia による CDR 定義には、互いに比較した場合のアミノ酸残基の重複またはサブセットが含まれる。それにもかかわらず、抗体またはその変異体の CDR を指すためのいずれかの定義の適用は、本明細書において定義および使用される用語の範囲内であることが意図される。上記の引用文献のそれぞれによって定義される CDR を包含する適切なアミノ酸残基を、比較として以下の表に記載する。特定の CDR を包含する正確な残基数は、CDR の配列およびサイズによって異なる。当業者は、抗体の可変領域アミノ酸配列を考慮して、どの残基が特定の CDR を含むかを日常的に決定することができる。

CDR	Kabatナンバリング	Chothiaナンバリング
VH CDR1	31-35	26-32
VH CDR2	50-65	52-58
VH CDR3	95-102	95-102
VL CDR1	24-34	26-32
VL CDR2	50-56	50-52
VL CDR3	89-97	91-96

【0082】

Kabatらは、任意の抗体に適用可能な可変ドメイン配列のナンバリングシステムを定義した。当業者は、配列自体以外のいかなる実験データにも依存することなく、任意の可変ドメイン配列にこの「Kabatナンバリング」システムを明確に割り当てることができる。本明細書で使用される場合、「Kabatナンバリング」は、Kabat et al., U. S. Dept. of Health and Human Services, 「Sequence of Proteins of Immunological Interest」 (1983) によって示されるナンバリングシステムを指す。

【0083】

上記の表に加えて、K a b a t 番号システムは、以下のようにC D R領域を記載する：C D R－H 1は、約アミノ酸31（すなわち、最初のシステイン残基のおよそ9残基後）で始まり、およそ5～7個のアミノ酸を含み、次のトリプトファン残基で終わる。C D R－H 2は、C D R－H 1の末端後の15番目の残基で始まり、約16～19個のアミノ酸を含み、次のアルギニンまたはリジン残基で終わる。C D R－H 3は、C D R－H 2の末端後の約33番目のアミノ酸残基で始まり、3～25個のアミノ酸を含み、配列W－G－X－Gで終わる（ここで、Xは任意のアミノ酸である）。C D R－L 1は、約24番目の残基（すなわち、システイン残基に続く）で始まり、約10～17個の残基を含み、次のトリプトファン残基で終わる。C D R－L 2は、C D R－L 1の末端後の約16番目の残基で始まり、約7個の残基を含む。C D R－L 3は、C D R－L 2の末端後の約33番目の残基（すなわち、システイン残基に続く）で始まり、約7～11個の残基を含み、配列FまたはW－G－X－Gで終わる（ここで、Xは任意のアミノ酸である）。

【0084】

本明細書で使用される場合、「エピトープ」という用語は、免疫グロブリン、s c F v、またはT細胞受容体に特異的に結合することができる任意のタンパク質決定基を含むことができる。可変領域により、抗体は抗原上のエピトープを選択的に認識し、特異的に結合することができる。例えば、抗体のV LドメインおよびV Hドメイン、または相補性決定領域（C D R）のサブセットが組み合わさって、三次元抗原結合部位を規定する可変領域を形成する。この四次抗体構造は、Yの各アームの末端に存在する抗原結合部位を形成する。エピトープ決定基は通常、アミノ酸または糖側鎖などの分子の化学的に活性な表面基からなり、通常、特異的な三次元構造特性ならびに特異的な電荷特性を有する。例えば、抗体は、ポリペプチドのN末端またはC末端ペプチドに対して産生され得る。より具体的には、抗原結合部位は、V HおよびV L鎖の各々上の3つのC D R（すなわち、C D R－H 1、C D R－H 2、C D R－H 3、C D R－L 1、C D R－L 2およびC D R－L 3）によって定義される。1つの実施形態では、抗体は、配列番号X Xのアミノ酸配列を含むP D－1（G e n b a n k 受託番号N P _ 0 0 5 0 0 9；長さが288アミノ酸残基を有する）に向けられ得る。

```
1 MQIPQAPWPV VWAVLQLGWR PGWFLDSPDR PWNPPTFSPA LLVVTEGDNA TFTCSFSNTS
61 ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRTVL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT
121 YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE VPTAHPSPSP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS
181 LVLLVWVLAV ICSRAARGTI GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPVP
241 CVPEQTEYAT IVFPSGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL
```

【0085】

本明細書で使用される場合、「免疫学的結合」および「免疫学的結合特性」という用語は、免疫グロブリン分子と免疫グロブリンが特異的である抗原との間で生じるタイプの非共有結合相互作用を指すことができる。免疫学的結合相互作用の強度または親和性は、相互作用の平衡結合定数（ K_D ）に関して表すことができ、 K_D が小さいほど親和性が大きいことを表す。選択されたポリペプチドの免疫学的結合特性は、当該技術分野で周知の方法を使用して定量化することができる。かかる方法の1つは、抗原結合部位／抗原複合体の形成および解離の速度を測定することを必要とし、これらの速度は、複合体パートナーの濃度、相互作用の親和性、および両方向の速度に等しく影響する幾何学的パラメーターに依存する。従って、「オン速度定数」（ K_{on} ）および「オフ速度定数」（ K_{off} ）の両方は、濃度ならびに会合および解離の実際の速度の計算によって決定され得る。（N a t u r e 361：186－87（1993）を参照のこと）。 K_{off}/K_{on} の比は、親和性に関連しない全てのパラメーターの相殺を可能にし、平衡結合定数 K_D に等しい。

（一般に、D a v i e s e t a l .（1990）A n n u a l R e v B i o c h e m 59：439－473を参照のこと）。本発明の抗体は、平衡結合定数（ K_D ）が $\leq 1 \mu M$ 、 $\leq 10 \mu M$ 、 $\leq 10 nM$ 、 $\leq 10 pM$ 、または $\leq 100 pM \sim 約 1 pM$ である場合に、P D－1エピトープに特異的に結合することができ、これは、放射性リガンド結合アッセイなどの動的アッセイ、またはB I A c o r eもしくはO c t e t（B L I）など

の当業者に公知の同様のアッセイによって測定される。例えば、いくつかの実施形態では、 K_D は、約 $1E-12M$ ～約 $1E-11M$ の K_D である。いくつかの実施形態では、 K_D は、約 $1E-11M$ ～約 $1E-10M$ の K_D である。いくつかの実施形態では、 K_D は、約 $1E-10M$ ～約 $1E-9M$ の K_D である。いくつかの実施形態では、 K_D は、約 $1E-9M$ ～約 $1E-8M$ の K_D である。いくつかの実施形態では、 K_D は、約 $1E-8M$ ～約 $1E-7M$ の K_D である。いくつかの実施形態では、 K_D は、約 $1E-7M$ ～約 $1E-6M$ の K_D である。例えば、いくつかの実施形態では、 K_D は約 $1E-12M$ であるが、他の実施形態では K_D は約 $1E-11M$ である。いくつかの実施形態では、 K_D は約 $1E-10M$ であるが、他の実施形態では K_D は約 $1E-9M$ である。いくつかの実施形態では、 K_D は約 $1E-8M$ であるが、他の実施形態では K_D は約 $1E-7M$ である。いくつかの実施形態では、 K_D は約 $1E-6M$ であるが、他の実施形態では K_D は約 $1E-5M$ である。いくつかの実施形態では、例えば K_D は約 $3E-11M$ であるが、他の実施形態では K_D は約 $3E-12M$ である。いくつかの実施形態では、 K_D は約 $6E-11M$ である。「特異的に結合する」または「特異性を有する」は、その抗原結合ドメインを介してエピトープに結合し、その結合が抗原結合ドメインとエピトープとの間のある程度の相補性を伴う抗体を指すことができる。例えば、抗体は、その抗原結合ドメインを介して、ランダムな無関係のエピトープに結合するよりも容易にそのエピトープに結合する場合、「特異的に結合する」と言われる。

【0086】

例えば、PD-1抗体は一価または二価であってよく、単鎖または二本鎖を含む。機能的には、PD-1抗体の結合親和性は、 $10^{-5}M$ ～ $10^{-12}M$ の範囲内である。例えば、PD-1抗体の結合親和性は、 $10^{-6}M$ ～ $10^{-12}M$ 、 $10^{-7}M$ ～ $10^{-12}M$ 、 $10^{-8}M$ ～ $10^{-12}M$ 、 $10^{-9}M$ ～ $10^{-12}M$ 、 $10^{-5}M$ ～ $10^{-11}M$ 、 $10^{-6}M$ ～ $10^{-11}M$ 、 $10^{-7}M$ ～ $10^{-11}M$ 、 $10^{-8}M$ ～ $10^{-11}M$ 、 $10^{-9}M$ ～ $10^{-11}M$ 、 $10^{-10}M$ ～ $10^{-11}M$ 、 $10^{-5}M$ ～ $10^{-10}M$ 、 $10^{-6}M$ ～ $10^{-10}M$ 、 $10^{-7}M$ ～ $10^{-10}M$ 、 $10^{-8}M$ ～ $10^{-10}M$ 、 $10^{-9}M$ ～ $10^{-10}M$ 、 $10^{-5}M$ ～ $10^{-9}M$ 、 $10^{-6}M$ ～ $10^{-9}M$ 、 $10^{-7}M$ ～ $10^{-9}M$ 、 $10^{-8}M$ ～ $10^{-9}M$ 、 $10^{-5}M$ ～ $10^{-8}M$ 、 $10^{-6}M$ ～ $10^{-8}M$ 、 $10^{-7}M$ ～ $10^{-8}M$ 、 $10^{-5}M$ ～ $10^{-7}M$ 、 $10^{-6}M$ ～ $10^{-7}M$ 、 $10^{-5}M$ ～ $10^{-6}M$ である。

【0087】

本発明のPD-1タンパク質またはその誘導体、断片、類似体、相同体またはオースログは、これらのタンパク質成分、例えば配列番号Xを含むアミノ酸残基に免疫特異的に結合する抗体の生成において免疫原として利用することができる。プロテオリポソームに結合されたPD-1タンパク質またはその誘導体、断片、類似体、相同体またはオースログは、これらのタンパク質成分に免疫特異的にカップリングする抗体の生成において免疫原として利用することができる。

【0088】

当業者は、過度の実験なしに、ヒトモノクローナル抗体が本発明のヒトモノクローナル抗体と同じ特異性を有するかどうかを、前者が後者のPD-1への結合を妨げるかどうかを確認することによって決定することが可能であることを認識するであろう。例えば、本発明のヒトモノクローナル抗体による結合の減少によって示されるように、試験されるヒトモノクローナル抗体が本発明のヒトモノクローナル抗体と競合する場合、2つのモノクローナル抗体は、同じエピトープまたは密接に関連するエピトープに結合する可能性が高い。

【0089】

ヒトモノクローナル抗体が本発明のヒトモノクローナル抗体の特異性を有するかどうかを決定するための別の方法は、本発明のヒトモノクローナル抗体を、それが通常反応性であるPD-1タンパク質とプレインキュベートし、次いで試験されるヒトモノクローナル抗体を付加して、試験されるヒトモノクローナル抗体がPD-1に結合するその能力において阻害されるかどうかを決定することである。試験されるヒトモノクローナル抗体が阻

害される場合、おそらく、それは、本発明のモノクローナル抗体と同じ、または機能的に同等のエピトープ特異性を有する。本発明のヒトモノクローナル抗体のスクリーニングはまた、PD-1を利用し、試験モノクローナル抗体がPD-1を中和することができるかどうかを決定することによって実施することができる。

【0090】

当該技術分野で既知の様々な手順を、本発明のタンパク質、またはその誘導体、断片、類似体、相同体若しくはオーソログに対するポリクローナルまたはモノクローナル抗体の産生に使用することができる。（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow E, and Lane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NYを参照のこと）。

10

【0091】

抗体は、主に免疫血清のIgG画分を提供するプロテインAまたはプロテインGを使用するアフィニティークロマトグラフィーなどの周知の技術によって精製することができる。続いて、または代わりに、求められる免疫グロブリンの標的である特異的抗原またはそのエピトープをカラム上に固定化して、免疫親和性クロマトグラフィーによって免疫特異的抗体を精製することができる。免疫グロブリンの精製は、例えば、D. Wilkins on (The Scientist, published by The Scientist, Inc., Philadelphia PA, Vol. 14, No. 8 (April 17, 2000), pp. 25-28) によって論じられている。

20

【0092】

本明細書で使用される「モノクローナル抗体」または「mAb」または「Mab」または「モノクローナル抗体組成物」という用語は、固有の軽鎖遺伝子産物および固有の重鎖遺伝子産物からなる抗体分子の1つの分子種のみを含む抗体分子の集団を指すことができる。特に、モノクローナル抗体の相補性決定領域(CDR)は、母集団の全ての分子で同一である。MAbは、それに対する独特の結合親和性を特徴とする抗原の特定のエピトープと免疫反応することができる抗原結合部位を含む。

【0093】

モノクローナル抗体は、Kohler and Milstein, Nature, 256: 495 (1975) によって記載されているようなハイブリドーマ法を使用して調製することができる。ハイブリドーマ法では、マウス、ハムスター、または他の適切な宿主動物を通常、免疫剤で免疫して、免疫剤に特異的に結合する抗体を産生する、または産生することができるリンパ球を誘発する。あるいは、リンパ球はインビトロで免疫化され得る。

30

【0094】

免疫剤は、タンパク質抗原、その断片またはその融合タンパク質を含むことができる。例えば、ヒト起源の細胞が所望される場合、末梢血リンパ球を使用することができ、またはヒト以外の哺乳動物源が所望される場合、脾臓細胞またはリンパ節細胞を使用することができる。次いで、ポリエチレングリコールなどの適切な融合剤を用いてリンパ球を不死化細胞系と融合させて、ハイブリドーマ細胞を形成する(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103を参照されたい)。不死化細胞株は、形質転換された哺乳動物細胞、特にげっ歯類、ウシおよびヒト起源の骨髄腫細胞であり得る。例えば、ラットまたはマウスの骨髄腫細胞株が使用される。ハイブリドーマ細胞は、融合していない不死化細胞の増殖または生存を阻害する1つ以上の物質を含む適切な培養培地中で培養され得る。例えば、親細胞が酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRTまたはHPRT)を欠く場合、ハイブリドーマのための培養培地は、代表的には、ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジンを含み(「HAT培地」)、これらの物質は、HGPRT欠損細胞の増殖を防止する。

40

【0095】

50

有用な不死化細胞株は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定した高レベル発現を支持し、HAT培地などの培地に感受性であるものである。例えば、不死化細胞株は、例えば、Salk Institute Cell Distribution Center (San Diego, California) および American Type Culture Collection (Manassas, Virginia) から入手され得るマウス骨髄腫株であってもよい。ヒト骨髄腫およびマウス-ヒトヘテロ骨髄腫細胞株もまた、ヒトモノクローナル抗体の産生について記載されている。(Kozbor, J. Immunol, 133:3001 (1984); Brodeur et al, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63を参照のこと)。

10

【0096】

次いで、ハイブリドーマ細胞が培養される培養培地を、抗原に対するモノクローナル抗体の存在についてアッセイすることができる。例えば、ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降によって、またはラジオイムノアッセイ (RIA) もしくは酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) などのインビトロ結合アッセイによって決定される。このような技術およびアッセイは、当該分野で既知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、Munson and Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980) の Scatchard 分析によって決定することができる。さらに、モノクローナル抗体の治療的用途において、標的抗原に対して高度の特異性および高い結合親和性を有する抗体を同定することが重要である。

20

【0097】

所望のハイブリドーマ細胞が同定された後、クローンを限界希釈手順によってサブクローニングし、標準的な方法によって増殖させることができる。(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103を参照のこと)。この目的のための適切な培養培地としては、例えば、ダルベッコ改変イーグル培地および RPMI-1640 培地が挙げられる。あるいは、ハイブリドーマ細胞は、哺乳動物において腹水としてインビボで増殖され得る。

30

【0098】

サブクローンによって分泌されるモノクローナル抗体は、例えば、プロテインA-セファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティークロマトグラフィーなどの従来の免疫グロブリン精製手順によって、培養培地または腹水から単離または精製することができる。

【0099】

モノクローナル抗体はまた、米国特許第4,816,567号(参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)に記載されているような組換えDNA法によって作製することができる。本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の手順を使用して(例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって)容易に単離および配列決定することができる。本発明のハイブリドーマ細胞は、そのようなDNAの供給源として役立つ。単離されると、DNAは、発現ベクター中に配置され得、次いで、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、または免疫グロブリンタンパク質を産生しない骨髄腫細胞のような宿主細胞にトランスフェクトされて、組換え宿主細胞中でモノクローナル抗体の合成を得る。DNAはまた、例えば、相同マウス配列の代わりにヒト重鎖および軽鎖定常ドメインのコード配列を置換することによって(米国特許第4,816,567号; Morrison, Nature 368, 812-13 (1994)を参照のこと)、または非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の全てもしくは一部を免疫グロブリンコード配列に共有結合することによって、改変され得る。このような非免疫グロ

40

50

ブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常ドメインに対して置換され得るか、または本発明の抗体の1つの抗原結合部位の可変ドメインに対して置換されて、キメラ二価抗体を作製し得る。

【0100】

完全ヒト抗体は、例えば、CDRを含む軽鎖および重鎖の両方の全配列がヒト遺伝子から生じる抗体分子である。かかる抗体は、「ヒト抗体」または「完全ヒト抗体」と呼ばれる。「ヒト化抗体」は、軽鎖および重鎖タンパク質配列が、ヒトにおいて産生される抗体変異体との類似性を増加させるように改変されている非ヒト種由来の抗体であり得る。ヒト化抗体は、非ヒト種由来の1つ以上の相補性決定領域（CDR）およびヒト免疫グロブリン分子由来のフレームワーク領域を有する、所望の抗原に結合する非ヒト種抗体に由来する抗体分子である。しばしば、ヒトフレームワーク領域中のフレームワーク残基は、抗原結合を改変する（例えば、改善する）ために、CDRドナー抗体由来の対応する残基で置換される。これらのフレームワーク置換は、当該技術分野において周知の方法によって、例えば、抗原結合に重要なフレームワーク残基を同定するためのCDRとフレームワーク残基との相互作用のモデリング、および特定の位置における異常なフレームワーク残基を同定するための配列比較によって同定される。（例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Queen et al., 米国特許第5585089号；Riechmann et al., Nature 332:323 (1988)を参照のこと）。例えば、抗体の非ヒト部分（軽鎖、軽鎖および／または重鎖のCDR）は、標的抗原に結合され得る。ヒト化モノクローナル抗体は、本明細書では「ヒトモノクローナル抗体」と呼ばれることもある。

【0101】

抗体は、例えば、CDR移植（EP 239,400号；PCT公開WO91/09967号；米国特許第5,225,539号；同第5,530,101号；および同第5,585,089号）、ベニアリングまたはリサーフェシング（EP592,106号；EP519,596号；Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991)；Studnicka et al., Protein Engineering 7(6):805-814 (1994)；Roguska et al., Proc. Natl. Sci. USA 91:969-973 (1994)）、および鎖シャッフリング（参照によりその全体が組み込まれる米国特許第5,565,332号）などの、当該技術分野で既知の種々の技術を用いてヒト化することができる。「ヒト化」（リシェイプまたはCDR移植とも呼ばれる）は、異種源（一般にげっ歯類）由来のモノクローナル抗体（mAb）の免疫原性を低下させ、ヒト免疫系の活性化を改善するために、当業者によって理解される十分に確立された技術である（例えば、Hou S, Li B, Wang L, Qian W, Zhang D, Hong X, Wang H, Guo Y (2008年7月). 「Humanization of an anti-CD34 monoclonal antibody by complementarity-determining region grafting based on computer-assisted molecular modeling」. J Biochem. 144 (1):115-20)を参照のこと）。

【0102】

ヒトモノクローナル抗体（例えば、完全ヒト抗体およびヒト化抗体）は、トリオーマ技術；ヒトB細胞ハイブリドーマ技術（Kozbor, et al, 1983 Immunol Today 4:72を参照のこと）；およびヒトモノクローナル抗体を産生するためのEBVハイブリドーマ技術（Cole, et al, 1985「MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY」, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96を参照のこと）を使用することによって調製することができる。ヒトモノクローナル抗体を用いることができ、ヒトハイブリドーマを使用するか（Cote, et al, 1983. Proc Natl Acad Sci USA 80:2026-2030を参照のこと）またはインビトロでエプスタインバーウイルスでヒ

トB細胞を形質転換すること (Cole, et al., 1985 「MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY」, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96を参照のこと) によって産生することができる。

【0103】

さらに、抗体は、ファージディスプレイライブラリーを含む他の技術を使用して産生することもできる。(Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)を参照のこと)。同様に、ヒト抗体は、トランスジェニック動物、例えば、内因性免疫グロブリン遺伝子が部分的または完全に不活性化されているマウスにヒト免疫グロブリン遺伝子座を導入することによって作製することができる。攻撃の際に、ヒト抗体産生が観察され、これは、遺伝子再構成、アセンブリ、および抗体レパートリーを含む全ての点でヒトにおいて見られるものと非常に類似している。このアプローチは、例えば、米国特許第5,545,807号;同第5,545,806号;同第5,569,825号;同第5,625,126号;同第5,633,425号;同第5,661,016号;およびMarks et al., Bio/Technology 10, 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368, 856-859 (1994); Morrison, Nature 368, 812-13 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826 (1996); ならびにLonbergおよびHuszar, Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995)に記載されている。

【0104】

ヒト抗体はさらに、抗原による攻撃に応答して動物の内因性抗体ではなく完全ヒト抗体を産生するように改変されたトランスジェニック非ヒト動物を使用して産生することができる。(PCT公開WO94/02602号および米国特許第6,673,986号を参照のこと)。非ヒト宿主中の重鎖および軽鎖免疫グロブリン鎖をコードする内因性遺伝子は無力化されており、ヒト重鎖および軽鎖免疫グロブリンをコードする活性遺伝子座が宿主のゲノムに挿入されている。ヒト遺伝子は、例えば、必要なヒトDNA断片を含む酵母人工染色体を使用して組み込まれる。次いで、全ての所望の改変を提供する動物は、改変の完全な相補体よりも少ない相補体を含む中間トランスジェニック動物を交配することによって子孫として得られる。そのような非ヒト動物の非限定的な例はマウスであり、PCT公開WO96/33735号およびWO96/34096号に開示されているようにXenomouse (商標)と呼ばれる。この動物は、完全ヒト免疫グロブリンを分泌するB細胞を産生する。抗体は、例えば、ポリクローナル抗体の調製物として、目的の免疫原での免疫化後に動物から直接的に得られ得るか、あるいは、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマのような動物由来の不死化B細胞から得られ得る。さらに、ヒト可変領域を有する免疫グロブリンをコードする遺伝子を回収し、発現させて、抗体を直接得ることができ、またはさらに改変して、例えば、単鎖Fv (scFv) 分子などの抗体の類似体を得ることができる。したがって、そのような技術を使用して、治療的に有用なIgG、IgA、IgMおよびIgE抗体を産生することができる。ヒト抗体を産生するためのこの技術の概要については、Lonberg and Huszar Int. Rev. Immunol. 73:65-93 (1995)を参照のこと。ヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体を産生するためのこの技術、およびそのような抗体を産生するためのプロトコルの詳細な議論については、例えば、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれているPCT公開WO98/24893号、WO96/34096号;WO96/33735号;米国特許第5,413,923号;同第5,625,126号;同第5,633,425号;同第5,569,825号;同第5,661,016号;同第5,545,806号;同第5,814,318号;および同第5,939,598号を参照のこと。さらに、Creative BioLabs (Shirley, NY)などの企業は、上

10

20

30

40

50

記と同様の技術を使用して、選択された抗原に対するヒト抗体を提供することに従事し得る。

【0105】

内因性免疫グロブリン重鎖の発現を欠く、マウスとして例示される非ヒト宿主を産生する方法の例は、米国特許第5,939,598号に開示されている。これは、胚性幹細胞中の少なくとも1つの内因性重鎖遺伝子座からJセグメント遺伝子を欠失させて、遺伝子座の再構成を防止し、再構成された免疫グロブリン重鎖遺伝子座の転写物の形成を防止すること（この欠失は、選択マーカをコードする遺伝子を含む標的指向ベクターによってもたらされる）；ならびにその体細胞および生殖細胞が選択マーカをコードする遺伝子を含むトランスジェニックマウスを胚性幹細胞から産生すること、を含む方法によって得られ得る。

10

【0106】

ヒト抗体などの目的の抗体を産生するための1つの方法は、米国特許第5,916,771号に開示されている。この方法は、重鎖をコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを、培養中の1つの哺乳動物宿主細胞に導入すること、軽鎖をコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを別の哺乳動物宿主細胞に導入すること、および2つの細胞を融合させてハイブリッド細胞を形成することを含む。ハイブリッド細胞は、重鎖と軽鎖を含む抗体を発現する。

【0107】

この手順のさらなる改善において、免疫原上の臨床的に関連するエピトープを同定するための方法、および関連するエピトープに高い親和性で免疫特異的に結合する抗体を選択するための相関的方法が、PCT公開WO99/53049号に開示されている。

20

【0108】

目的の抗体は、上記の単鎖抗体をコードするDNA断片を含むベクターによっても発現させることができる。ベクターとしては、標的指向部分（例えば、細胞表面レセプターに対するリガンド）および核酸結合部分（例えば、ポリリン）を有するWO93/64701号に記載されるような化学的結合体、ウイルスベクター（例えば、DNAまたはRNAウイルスベクター）、標的部分（例えば、標的細胞に特異的な抗体）および核酸結合部分（例えば、プロタミン）を含む融合タンパク質であるPCT/US95/02140号（WO95/22618号）に記載されるような融合タンパク質、プラスミド、ファージ、ウイルスベクターなどが挙げられるが、これらに限定されない。ベクターは染色体性、非染色体性、または合成であってもよい。レトロウイルスベクターも使用されてよく、モロニーマウス白血病ウイルスが含まれる。DNAウイルスベクターも使用されてよく、オルソボックスまたはアピボックスベクターなどのボックスベクター、単純ヘルペスウイルスI型（HSV）ベクターなどのヘルペスウイルスベクターが含まれる（Geller, A. I. et al, J. Neurochem, 64:487 (1995); Lim, F., et al, 「DNA Cloning: Mammalian Systems」, D. Glover, Ed. (Oxford Univ. Press, Oxford England) (1995); Geller, A. I. et al, Proc Natl. Acad. Sci.: U. S. A. 90:7603 (1993); Geller, A. I., et al, Proc Natl. Acad. Sci USA 87:1149 (1990), Adenovirus Vectors (see LeGal LaSalle et al, Science, 259:988 (1993); Davidson, et al, Nat. Genet 3:219 (1993); Yang, et al, J. Virol. 69:2004 (1995) and Adeno-associated Virus Vectors (see Kaplitt, M. G., et al, Nat. Genet. 8:148 (1994) を参照のこと）。

30

40

【0109】

ボックスウイルスベクターは遺伝子を細胞質に導入する。アピボックスウイルスベクターは、核酸の短期間の発現のみをもたらす。アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイル

50

スベクターおよび単純ヘルペスウイルス（HSV）ベクターは、核酸を神経細胞に導入するために使用することができる。アデノウイルスベクターは、アデノ随伴ウイルス（約4ヶ月）よりも短期間（約2ヶ月）の発現をもたらす、アデノ随伴ウイルスはHSVベクターよりも短い。選択される特定のベクターは、標的細胞および治療される状態に依存する。導入は、標準的な技術（例えば、感染、トランスフェクション、形質導入または形質転換）によるものであり得る。遺伝子導入の様式の例としては、例えば、裸のDNA、CaP₀₄沈殿、DEAEデキストラン、エレクトロポレーション、プロトプラスト融合、リポフェクション、細胞マイクロインジェクション、およびウイルスベクターが挙げられる。

【0110】

ベクターを使用して、本質的に任意の所望の標的細胞を標的とすることができる。例えば、定位注入を使用して、ベクター（例えば、アデノウイルス、HSV）を所望の位置に方向付けることができる。さらに、粒子は、ミニポンプ注入システム（例えば、SynchroMed Infusion System）を使用して脳室内（icv）注入によって送達され得る。対流と呼ばれるバルクフローに基づく方法もまた、大きな分子を脳の広範な領域に送達するのに有効であることが証明されており、ベクターを標的細胞に送達するのに有用であり得る。（Bobo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 2076-2080 (1994); Morrison et al., Am. J. Physiol. 266: 292-305 (1994) を参照のこと）。使用され得る他の方法としては、カテーテル、静脈内、非経口、腹腔内および皮下注射、ならびに経口または他の公知の投与経路が挙げられる。

【0111】

これらのベクターを使用して、様々な方法で使用する大量の抗体を発現させることができる。例えば、サンプル中のPD-1の存在を検出するためである。抗体はまた、PD-1活性に結合し、破壊することを試みるために使用することができる。

【0112】

本発明の抗原発明の抗原性タンパク質に特異的な単鎖抗体の産生のために技術を適合させ得る（例えば、米国特許第4,946,778号を参照のこと）。加えて、方法は、タンパク質またはその誘導体、断片、類似体もしくは相同体に対する所望の特異性を有するモノクローナルFab断片の迅速かつ効果的な同定を可能にするために、Fab発現ライブラリの構築に方法を適合させ得る（例えば、Huse, et al., 1989 Science 246: 1275~1281を参照のこと）。タンパク質抗原に対するイディオタイプを含む抗体断片は、(i) 抗体分子のペプシン消化によって産生されるF(ab)₂断片；(ii) F(ab)₂断片のジスルフィド架橋を還元することによって生成されるFab断片；(iii) パパインおよび還元剤による抗体分子の処理によって生成されるFab断片、ならびに(iv) Fv断片を含むがこれらに限定されない、当該技術分野において既知の技術によって産生することができる。

【0113】

ヘテロ結合体抗体も本発明の範囲内である。ヘテロ結合体抗体は、2つの共有結合した抗体で構成されている。そのような抗体は、例えば、免疫系細胞を、望ましくない細胞へと標的指向させることができ（米国特許第4,676,980号を参照のこと）、HIV感染の治療のためのものであり得る（PCT公開第WO91/00360号；同第WO92/20373号を参照のこと）。抗体は、架橋剤を含むものを含む合成タンパク質化学における既知の方法を使用してインビトロで調製することができる。例えば、免疫毒素は、ジスルフィド交換反応を使用して、またはチオエーテル結合を形成することによって構築され得る。この目的のための好適な試薬の例としては、イミノチオレートおよびメチル-4-メルカプトブチルイミデート、ならびに例えば、米国特許第4,676,980号に開示されるものが挙げられる。

【0114】

本発明の抗体は、例えば、癌の治療における抗体の有効性を高めるように、エフェクター機能に関して改変することができる。例えば、システイン残基をFc領域に導入するこ

とができ、それにより、この領域における鎖間ジスルフィド結合の形成が可能になる。このように生成されたホモ二量体抗体は、改善された内在化能力および／または増加した補体媒介性細胞死滅および抗体依存性細胞傷害（ADCC）を有し得る。（Caron et al., J. Exp. Med., 176:1191-1195 (1992) および Shoppes, J. Immunol., 148:2918-2922 (1992) を参照のこと）。あるいは、二重Fc領域を有し、それによって増強された補体溶解およびADCC能力を有することができる抗体を操作することができる。（Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design, 3:219-230 (1989) を参照のこと）。

【0115】

特定の実施形態では、本発明の抗体は、抗体の抗原非依存性エフェクター機能、特に抗体の循環半減期を改変するアミノ酸置換を含むFc変異体を含むことができる。そのような抗体は、これらの置換を欠く抗体と比較した場合、FcRnへの結合の増加または減少を示し、したがって、血清中の半減期がそれぞれ増加または減少する。FcRnに対する親和性が改善されたFc変異体は、より長い血清半減期を有すると予想され、そのような分子は、例えば、慢性疾患または障害を治療するために、投与された抗体の長い半減期が望まれる哺乳動物を治療する方法において有用な用途を有する。それとは対照的に、減少したFcRn結合親和性を有するFc変異体は、より短い休止期間を有することが予想され、そのような分子はまた、例えば、短縮された循環時間が有利であり得る哺乳動物への投与のために、例えば、インビボ画像診断において、または出発抗体が、長期間にわたって循環中に存在する場合に毒性副作用を有する状況において有用であり得る。減少したFcRn結合親和性を有するFc変異体はまた、胎盤を通過する可能性が低いため、妊婦における疾患または障害の治療においても有用である。さらに、減少したFcRn結合親和性が所望され得る他の用途としては、脳、腎臓、および／または肝臓への局在化が所望される用途が挙げられる。1つの実施形態では、Fc変異体含有抗体は、血管系から腎糸球体の上皮を通過する輸送の減少を示し得る。別の実施形態では、Fc変異体含有抗体は、脳から血管腔への血液脳関門（BBB）を通過する輸送の減少を示し得る。1つの実施形態では、改変されたFcRn結合を有する抗体は、Fcドメインの「FcRn結合ループ」内に1つ以上のアミノ酸置換を有するFcドメインを含む。FcRn結合ループは、アミノ酸残基280～299（EUナンバリングによる）から構成される。FcRn結合活性が改変された例示的なアミノ酸置換は、参照により本明細書に組み込まれるPCT公開WO05/047327号に開示されている。特定の例示的な実施形態では、本発明の抗体またはその断片は、以下の置換：V284E、H285E、N286D、K290EおよびS304D（EUナンバリング）のうちの1つ以上を有するFcドメインを含む。

【0116】

いくつかの実施形態では、mAbの抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）活性が改変されるように、mAbの定常領域に変異が導入される。例えば、変異は、CH2ドメイン内のLALA変異である。1つの実施形態では、抗体（例えば、ヒトmAbまたは二重特異性Ab）は、ADCC活性を低下させるヘテロ二量体mAbの1つのscFv単位上に変異を含む。別の実施形態では、mAbは、ADCC活性を完全に除去するヘテロ二量体mAbの両方の鎖上に変異を含む。例えば、mAbの一方または両方のscFv単位に導入される変異は、CH2ドメイン内のLALA変異である。可変ADCC活性を有するこれらのmAbは、mAbが、mAbによって認識される1つの抗原を発現する細胞に対して最大の選択的殺傷を示すが、mAbによって認識される第2の抗原に対して最小の殺傷を示すように最適化することができる。

【0117】

他の実施形態では、本明細書に記載される診断方法および治療方法において使用するための本発明の抗体は、グリコシル化を低減または排除するように改変することができる定常領域、例えば、IgG₁またはIgG₄重鎖定常領域を有する。例えば、本発明の抗体はまた、抗体のグリコシル化を改変させるアミノ酸置換を含むFc変異体を含み得る。例

10

20

30

40

50

例えば、Fc変異体は、低減されたグリコシル化（例えば、NまたはO結合型グリコシル化）を有し得る。いくつかの実施形態では、Fc変異体は、アミノ酸位置297（EUナンバリング）に通常見出されるN結合型グリカンのグリコシル化の低減を含む。別の実施形態では、抗体は、グリコシル化モチーフ、例えば、アミノ酸配列NXTまたはNXSを含むN結合型グリコシル化モチーフの近傍またはその中にアミノ酸置換を有する。特定の実施形態では、抗体は、アミノ酸位置228または299（EUナンバリング）にアミノ酸置換を有するFc変異体を含む。より特定の実施形態では、抗体は、S228PおよびT299A変異（EUナンバリング）を含むIgG1またはIgG4定常領域を含む。

【0118】

低減されたまたは改変されたグリコシル化を付与する例示的なアミノ酸置換は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるPCT公開WO05/018572号に記載されている。いくつかの実施形態では、本発明の抗体またはその断片は、グリコシル化を排除するように改変される。そのような抗体またはその断片は、「agly」抗体またはその断片（例えば、「agly」抗体）と呼ばれ得る。理論に束縛されることを望むものではないが、「agly」抗体またはその断片は、インビボで改善された安全性および安定性プロファイルを有することができる。例示的なagly抗体またはその断片は、Fcエフェクター機能を欠いているIgG₄抗体の非グリコシル化Fc領域を含むため、PD-1を発現する正常な重要組織および細胞に対するFc媒介性毒性の可能性を排除する。さらに他の実施形態では、本発明の抗体またはその断片は、改変されたグリカンを含む。例えば、抗体は、Fc領域のAsn297においてN-グリカン上のフコース残基の数が低減され、すなわち、脱フコシル化される。別の実施形態では、抗体は、Fc領域のAsn297においてN-グリカン上に改変された数のシアル酸残基を有し得る。

【0119】

本発明はまた、毒素（例えば、細菌、真菌、植物、もしくは動物起源の酵素的に活性な毒素、またはその断片）、または放射性同位体（すなわち、放射性結合体）などの細胞毒性薬剤に結合された抗体を含むイムノ結合体を対象とする。

【0120】

使用することができる酵素的に活性な毒素およびその断片としては、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、外毒素A鎖（シュードモナス・エルジノーサ（*Pseudomonas aeruginosa*）由来）、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、 α -サルシン、シナアブラギリ（*Aleurites fordii*）タンパク質、ジアンチンタンパク質、ヨウシュヤマゴボウ（*Phytolacca americana*）タンパク質（PAPI、PAPII、およびPAP-S）、ツルレイシ（*Momordica charantia*）阻害剤、クルシン、クロチン、サボンソウ（*Saponaire officinalis*）阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、およびトリコテセンが挙げられる。様々な放射性核種が、放射性結合体化抗体の産生のために利用可能である。非限定的な例としては、 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 、および ^{186}Re が挙げられる。

【0121】

抗体および細胞毒性薬剤の結合体は、N-スクシンイミジル-3-（2-ピリジルジチオール）プロピオナート（SPDP）、イミノチオラン（IT）、イミドエステルの二官能性誘導体（ジメチルアジピミデートHCLなど）、活性エステル（ジスクシンイミジルスベリン酸など）、アルデヒド（グルタルアルデヒドなど）、ビス-アジド化合物（ビス（p-アジドベンゾイル）ヘキサンジアミンなど）、ビス-ジアゾニウム誘導体（ビス（p-ジアゾニウムベンゾイル）エチレンジアミンなど）、ジイソシアナート（トリメチレン2,6-ジイソシアナートなど）、およびビス-活性フッ素化合物（1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼンなど）などの様々な二官能性タンパク質カップリング剤を使用して作製される。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta et al, Science 238:1098 (1987)に記載されるように調製することができる。炭素-14標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸（M

X-DTPA)は、放射性ヌクレオチドを抗体に結合するための例示的なキレート剤である。(PCT公開WO94/11026号および米国特許第5,736,137号を参照のこと)。

【0122】

当業者は、多種多様な可能な部分を、得られた抗体または本発明の他の分子に結合させることができることを理解している。(例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる「Conjugate Vaccines」, Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse and R. E. Lewis, Jr (eds), Carger Press, New York, (1989)を参照のこと。

【0123】

カップリングは、抗体および他の部分がそれぞれの活性を保持する限り、2つの分子を結合する任意の化学反応によって達成することができる。この結合には、多くの化学的機構、例えば、共有結合、親和性結合、インターカレーション、配位結合、および複合体形成が含まれる。1つの実施形態では、結合は共有結合である。共有結合は、存在する側鎖の直接縮合または外部架橋分子の組み込みのいずれかによって達成することができる。多くの二価または多価連結剤が、タンパク質分子(例えば、本発明の抗体)を他の分子にカップリングする際に有用である。例えば、代表的なカップリング剤としては、有機化合物(例えば、チオエステル、カルボジイミド、スクシンイミドエステル、ジイソシアネート、グルタルアルデヒド、ジアゾベンゼンおよびヘキサメチレンジアミン)が挙げられる。このリストは、当該技術分野で既知の様々なクラスのカップリング剤を網羅することを意図するものではなく、むしろ、より一般的なカップリング剤の例示である。(Killen and Lindstrom, Jour. Immun. 133:1335-2549 (1984); Jansen et al., Immunological Reviews 62:185-216 (1982); および Vitetta et al., Science 238:1098 (1987)を参照のこと)。リンカーの非限定的な例は、文献に記載されている。(例えば、例えば、MBS (M-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル)の使用を記載する Ramakrishnan, S. et al., Cancer Res. 44:201-208 (1984)を参照のこと)。オリゴペプチドリンカーを介して抗体にカップリングされたハロゲン化アセチルヒドラジド誘導体の使用を記載する米国特許第5,030,719号も参照のこと。本発明の抗体とともに使用され得る有用なリンカーの非限定的な例としては、以下が挙げられる: (i) EDC (1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドヒドロクロリド; (ii) SMPT (4-スクシンイミジルオキシカルボニル- α -メチル- α -(2-ピリジルジチオ)-トルエン (Pierce Chem. Co., カタログ番号21558G); (iii) SPDP (スクシンイミジル-6-[3-(2-ピリジルジチオ)プロピオンアミド]ヘキサノエート (Pierce Chem. Co., カタログ番号21651G); (iv) スルホ-LC-SPDP (スルホスクシンイミジル6-[3-(2-ピリジルジチオ)-プロピオンアミド]ヘキサノエート (Pierce Chem. Co., カタログ番号2165-G); および (v) EDCに結合されたスルホ-NHS (N-ヒドロキシスルホスクシンイミド: Pierce Chem. Co., カタログ番号24510)が挙げられる。

【0124】

本明細書に記載されるリンカーは、異なる属性を有する成分を含有し、従って、異なる物理化学的特性を有する結合体をもたらす。例えば、アルキルカルボキシレートのスルホ-NHSエステルは、芳香族カルボキシレートのスルホ-NHSエステルよりも安定である。NHS-エステル含有リンカーは、スルホ-NHSエステルよりも可溶性が低い。さらに、リンカーSMPTは、立体障害ジスルフィド結合を含み、安定性が増加した結合体を形成することができる。ジスルフィド結合は、一般に、ジスルフィド結合がインビトロで切断され、利用可能な結合体が少なくなるため、他の結合よりも安定性が低い。特にス

ルホーNHSは、カルボジイミドカップリングの安定性を高めることができる。カルボジイミドカップリング（EDCなど）は、スルホーNHSと共に使用される場合、カルボジイミドカップリング反応のみよりも加水分解に対してより耐性であるエステルを形成する。
【0125】

本明細書に開示される抗体は、免疫リボソームとして製剤化することもできる。抗体を含有するリボソームは、Epstein et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985); Hwang et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030 (1980); および米国特許第4,485,045号および同第4,544,545号に記載されているようなに記載されているような、当該技術分野で既知の方法によって調製される。増強された循環時間を有するリボソームは、米国特許第5,013,556号に開示されている。

10

【0126】

有用なリボソームの非限定的な例は、ホスファチジルコリン、コレステロール、およびPEG誘導体化ホスファチジルエタノールアミン（PEG-PE）を含む脂質組成物を用いた逆相蒸発法によって生成することができる。リボソームは、規定された孔径のフィルターを通して押し出され、所望の直径を有するリボソームを生成する。本発明の抗体のFab'断片は、Martin et al, J. Biol. Chem., 257:286-288 (1982)に記載されるように、ジスルフィド交換反応を介してリボソームに結合することができる。

【0127】

二重特異性抗体

二重特異性抗体（bsAb）は、2つの可変ドメインまたはscFvユニットを含む抗体であり、結果として得られる抗体は2つの異なる抗原を認識する。本発明は、PD-1および第2の抗原を認識する二重特異性抗体を提供する。例示的な第2の抗原としては、腫瘍関連抗原（例えば、LINGO1）、サイトカイン、および細胞表面受容体が挙げられる。第2の抗原の非限定的な例としては、CTLA-4、LAG-3、CD28、CD122、4-1BB、TIM3、OX-40、OX40L、CD40、CD40L、LIGHT、ICOS、ICOSL、GITR、GITRL、TIGIT、CD27、VISTA、B7H3、B7H4、HEVM（またはBTLA）、CD47、およびCD73が挙げられる。異なる型の二重特異性抗体も本明細書において提供される。いくつかの実施形態では、抗PD1断片および第2の断片のそれぞれは、Fab断片、単鎖可変断片（scFv）、または単ドメイン抗体からそれぞれ独立して選択される。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体は、Fc断片をさらに含む。本発明の二重特異性抗体は、本明細書に開示されるPD-1抗体の重鎖および軽鎖の組合せまたはscFvを含む。

20

30

【0128】

本発明の二重特異性抗体は、当該技術分野で既知の方法を使用して構築することができる。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体は、2つのscFv断片が、2つのscFv単位間の分子内会合を可能にして抗体を形成するのに十分な長さの長いリンカーポリペプチドによって連結されている、単一のポリペプチドである。他の実施形態では、二重特異性抗体は、共有結合または非共有結合によって結合された2つ以上のポリペプチドである。

40

【0129】

別の実施形態では、二重特異性抗体は、「ノブ・イントゥ・ホール」法（Ridgway et al., Protein Eng 7:617-621 (1996)）を使用して構築される。この方法では、2つの異なる可変ドメインのIg重鎖が還元されて、重鎖-軽鎖対合を保持しながら重鎖対合が選択的に破壊される。2つの異なる抗原を認識する2つの重鎖-軽鎖ヘテロ二量体が混合されて、CH3ドメインの操作された「ノブ・イントゥ・ホール」を介して媒介されるヘテロライゲーション対合が促進される。

【0130】

別の実施形態では、二重特異性抗体は、2つ以上の異なる抗体から重鎖-軽鎖二量体を

50

交換してハイブリッド抗体を生成することによって構築することができ、第1の重-軽鎖二量体はPD-1を認識し、第2の重-軽鎖二量体は第2の抗原を認識する。重鎖-軽鎖二量体の機構は、二重特異性分子としても機能するヒトIgG₄の形成と同様である。IgG重鎖の二量体化は、各重鎖のCH3ドメインとジスルフィド架橋との対合などの分子内力によって促進される。CH3ドメインにおける特定のアミノ酸(R409)の存在は、二量体交換およびIgG₄分子の構築を促進することが示されている。重鎖対合はまた、抗体のヒンジ領域における重鎖間ジスルフィド架橋によってさらに安定化される。具体的には、IgG₄において、ヒンジ領域は、(配列Cys-Pro-Pro-Cysを含む安定なIgG₁ヒンジ領域と比較して)アミノ酸配列Cys-Pro-Ser-Cysをアミノ酸226~230に含む。229位のセリンのこの配列の差異は、IgG₄がヒンジ領域において鎖内ジスルフィドを形成する傾向に関連している(Van der Neut Kolf schoten, M. et al., 2007, Science 317: 1554-1557およびLabrijn, A. F. et al., 2011, Journal of Immunol 187: 3238-3246)。

【0131】

したがって、本発明の二重特異性抗体は、PD-1または第2の抗原を認識する抗体のCH3ドメイン中のR409残基およびヒンジ領域中のCys-Pro-Ser-Cys配列の導入によって作製することができ、その結果、重-軽鎖二量体が交換されて、PD-1を認識する1つの重-軽鎖二量体および第2の抗原を認識する第2の重-軽鎖二量体を有する抗体分子を生成する(ここで、第2の抗原は本明細書に開示される任意の抗原である)。公知のIgG₄分子はまた、本明細書中に開示されるように、重鎖および軽鎖がPD-1または第2の抗原を認識するように改変され得る。本発明の二重特異性抗体を構築するためのこの方法の使用は、IgG₄分子の固有の特徴に起因して有益であってよく、ここで、Fc領域は、免疫応答のエフェクター系(例えば、特定の白血球によって発現される補体およびFcレセプター)とほとんど相互作用しない点で、他のIgGサブタイプと異なる。この特異的特性により、これらのIgG₄ベースの二重特異性抗体は、抗体が標的に結合し、標的に関連するシグナル伝達経路を機能的に改変させる必要があるが、エフェクター活性を誘発しない治療用途において魅力的なものとなる。

【0132】

いくつかの実施形態では、bsAbの抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)活性が改変されるように、bsAbの定常領域に変異が導入される。例えば、変異は、CH2ドメイン内のLALA変異である。1つの態様では、bsAbは、ADCC活性を低下させるヘテロ二量体bsAbの1つのscFv単位上に変異を含む。別の態様では、bsAbは、ADCC活性を完全に除去するヘテロ二量体bsAbの両方の鎖上に変異を含む。例えば、bsAbの一方または両方のscFv単位に導入される変異は、CH2ドメイン内のLALA変異である。可変ADCC活性を有するこれらbsAbは、bsAbが、bsAbによって認識される1つの抗原を発現する細胞に対して最大の選択的殺傷を示すが、bsAbによって認識される第2の抗原に対して最小の殺傷を示すように最適化することができる。

【0133】

本明細書に開示される二重特異性抗体は、慢性感染症、疾患、または医学的状態、例えば癌の治療において有用であり得る。

【0134】

PD-1に対する抗体の使用

PD-1タンパク質またはその断片に特異的に結合する本発明の抗体は、PD-1関連疾患または障害の治療のために投与することができる。「PD-1関連疾患または障害」は、PD-1のレベルの上昇および/またはPD-1が関与する細胞シグナル伝達経路の活性化が見られる、病状および/または病状に関連する症状が含まれる。例示的なPD-1関連疾患または障害には、癌および感染性疾患など、T細胞が抑制される疾患が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、感染性疾患は、DNAウイルス

、RNAウイルス、または逆転写ウイルスなどの微生物によって引き起こされ得る。ウイルスの非限定的な例としては、アデノウイルス、コクサッキーウイルス、エプスタインバーウイルス、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、単純ヘルペスウイルス1型、単純ヘルペスウイルス2型、サイトメガロウイルス、ヒトヘルペスウイルス8型、HIV、インフルエンザウイルス、麻疹ウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、ヒトパピローマウイルス、パラインフルエンザウイルス、ポリオウイルス、狂犬病ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、風疹ウイルス、水痘帯状疱疹ウイルスが挙げられる。いくつかの実施形態では、感染性疾患は、グラム陽性細菌、グラム陰性細菌、原生動物、または真菌などの微生物によって引き起こされ得る。

【0135】

疾患を引き起こす菌の非限定的な例としては、炭疽菌 (*Bacillus anthracis*)、セレウス菌 (*Bacillus cereus*)、バルトネラ・ヘンセラ (*Bartonella henselae*)、バルトネラ・クインタナ (*Bartonella Quintana*)、百日咳菌 (*Bordetella pertussis*)、ボレリア・ブルグドルフェリ (*Borrelia burgdorferi*)、ボレリア・ガリニ (*Borrelia garinii*)、ボレリア・アフゼリ (*Borrelia afzelii*)、ボレリア・リカレンチス (*Borrelia recurrentis*)、ブルセラ・アボルトス (*Brucella abortus*)、ブルセラ・カニス (*Brucella canis*)、ブルセラ・メリテンシス (*Brucella melitensis*)、ブルセラ・スイス (*Brucella suis*)、カンピロバクター・ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*)、クラミジア・ニューモニエ (*Chlamydia pneumoniae*)、クラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)、クラミドフィラ・シタッシ (*Chlamydophila psittaci*)、クロストリジウム・ボツリヌム (*Clostridium botulinum*)、クロストリジウム・ディフィシル (*Clostridium difficile*)、クロストリジウム・パーフリンジエンス (*Clostridium perfringens*)、破傷風菌 (*Clostridium tetani*)、コリネバクテリウム・ジフテリア (*Corynebacterium diphtheria*)、エンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*)、エンテロコッカス・フェシウム (*Enterococcus faecium*)、大腸菌 (*Escherichia coli*)、野兔病菌 (*Francisella tularensis*)、インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenza*)、ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*)、レジオネラ・ニューモフィラ (*Legionella pneumophila*)、レプトスピラ・インターロガンズ (*Leptospira interrogans*)、レプトスピラ・サンタロサイ (*Leptospira santarosai*)、レプトスピラ・ウェイリイ (*Leptospira weilii*)、レプトスピラ・ノグチ (*Leptospira noguchii*)、リステリア菌 (*Listeria monocytogenes*)、ライ菌 (*Mycobacterium leprae*)、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、マイコバクテリウム・ウルセランス (*Mycobacterium ulcerans*)、マイコプラズマ・ニューモニエ (*Mycoplasma pneumoniae*)、淋菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitides*)、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、リケッチア・リケッチア (*Rickettsia rickettsia*)、チフス菌 (*Salmonella typhi*)、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*)、シゲラ・ソネイ (*Shigella sonnei*)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)、スタフィロコッカス・サブロフィチカス (*Staphylococcus saprophyticus*)、ストレプトコッカス・アガラクチア (*Streptococcus*

10

20

30

40

50

occus agalactiae)、ストレプトコッカス・ニューモニエ (*Streptococcus pneumoniae*)、ストレプトコッカス・ピオゲネス (*Streptococcus pyogenes*)、梅毒トレポネーマ (*Treponema pallidum*)、ウレアプラズマ・ウレアリチカム (*Ureaplasma urealyticum*)、コレラ菌 (*Vibrio cholera*)、ペスト菌 (*Yersinia pestis*)、エルシニア・エンテロコリチカ (*Yersinia enterocolitica*)、エルシニア・シュードツベルクローシス (*Yersinia pseudotuberculosis*) が挙げられる。

【0136】

疾患を引き起こす原生動物の非限定的な例としては、熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) (マラリア)、トキソプラズマ原虫 (*Toxoplasma gondii*) (トキソプラズマ症)、リーシュマニア属 (*Leishmania*) の種 (リーシュマニア症)、トリパノソーマ・ブルセイ (*Trypanosoma brucei*) (アフリカ睡眠病)、トリパノソーマ・クルージ (*Trypanosoma cruzi*) (シャーガス病)、およびランブル鞭毛虫 (*Giardia intestinalis*) (ジアルジア症) が挙げられる。

【0137】

疾患を引き起こす真菌の非限定的な例としては、カンジダ・アルビカンズ (*Candida albicans*)、アスペルギルス・フミガーツス (*Aspergillus fumigatus*)、アスペルギルス・フラバス (*Aspergillus flavus*)、クリプトコッカス・ネオフォルマンズ (*Cryptococcus neoformans*)、クリプトコッカス・ガッティ (*Cryptococcus gattii*)、ヒストプラズマ・カプスラーツム (*Histoplasma capsulatum*)、ニューモシスチス・カリニ (*Pneumocystis carinii*)、スタキボトリス・チャータルム (*Stachybotrys chartarum*) が挙げられる。

【0138】

二重特異性、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化および完全ヒト抗体を含む本発明の抗体は、治療剤として使用することができる。このような薬剤は、一般に、対象の癌を治療するため、ワクチンの効率を高めるため、または自然免疫応答を増強するために使用される。抗体調製物 (例えば、その標的抗原に対して高い特異性および高い親和性を有するもの) は、対象に投与され、一般に、標的との結合に起因する効果を有する。抗体の投与によって、PD-1タンパク質の活性が無効になるか、阻害されるか、または妨害され得る。

【0139】

PD-1タンパク質またはその断片に特異的に結合する本発明の抗体は、医薬組成物の形態で癌の治療のために投与することができる。抗体を含む治療用医薬組成物の調製に関連する原理および考慮事項、ならびに成分の選択に関するガイダンスは、例えば、以下に提供されている: Remington: The Science And Practice Of Pharmacy 20th ed. (Alfonso R. Gennaro, et al., editors). Mack Pub. Co., Easton, Pa., 2000; Drug Absorption Enhancement: Concepts, Possibilities, Limitations, And Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994; および Peptide And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, Vol. 4), 1991, M. Dekker, New York.

【0140】

任意の特定の患者に対する具体的な用量および治療レジメンは、使用される特定の抗体、その変異体または誘導体、患者の年齢、体重、一般的な健康状態、性別、および食事、ならびに投与時間、排泄速度、薬物の組み合わせ、および治療される特定の疾患の重症度

10

20

30

40

50

などの、様々な要因に依存する。医療介護者によるそのような要因の判断は、当業者の範囲内である。この量はまた、治療される個々の患者、投与経路、製剤の型、使用される化合物の特徴、疾患の重篤度、および所望の効果に依存する。使用される量は、当該技術分野で周知の薬理学的および薬物動態学の原理によって決定することができる。

【0141】

本発明の抗体の治療有効量は、治療目的を達成するために必要な量であり得る。本明細書に記載されるように、これは、抗体とその標的抗原との間の結合相互作用であってよく、これは、特定の場において、標的の機能を妨害する。投与されるのに必要な量はさらに、その特異的抗原に対する抗体の結合親和性に依存し、投与された抗体が、それが投与される他の対象の自由体積から枯渇する速度にも依存する。本明細書に記載される抗原結合ポリペプチドの対象（例えば、患者）に投与される投薬量は、典型的には、患者の体重の $0.1 \text{ mg/kg} \sim 100 \text{ mg/kg}$ 、患者の体重の $0.1 \text{ mg/kg} \sim 20 \text{ mg/kg}$ 、または患者の体重の $1 \text{ mg/kg} \sim 10 \text{ mg/kg}$ である。ヒト抗体は、外来ポリペプチドに対する免疫応答に起因して、他の種由来の抗体よりもヒト体内で長い半減期を有する。したがって、ヒト抗体のより低い投薬量およびより少ない頻度の投与がしばしば可能である。さらに、本開示の抗体の投与の投薬量および頻度は、例えば、脂質化などの改変によって抗体の取り込みおよび組織浸透（例えば、脳内への）を増強することによって低減され得る。本発明の抗体または抗体断片の治療有効用量の一般的な範囲は、非限定的な例として、約 0.1 mg/kg （体重） $\sim$ 約 50 mg/kg （体重）であり得る。一般的な投与頻度は、例えば、1日2回 $\sim$ 1週間に1回の範囲であり得る。

【0142】

抗体断片が使用される場合、標的タンパク質の結合ドメインに特異的に結合する最小の阻害性断片が好ましい。例えば、抗体の可変領域配列に基づいて、標的タンパク質配列に結合する能力を保持するペプチド分子を設計することができる。そのようなペプチドは、化学的に合成することができ、および／または組換えDNA技術によって生成することができる。（例えば、Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993) を参照のこと）。製剤はまた、治療される特定の適応症に必要な1つを超える活性化化合物、例えば、互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を有するものを含有することができる。あるいは、またはさらに、組成物は、その機能を増強する薬剤（例えば、細胞毒性薬剤、サイトカイン（例えば、IL-15）、化学療法剤または増殖阻害剤など）を含み得る。そのような分子は、意図される目的に有効な量で組み合わせて適切に存在する。

【0143】

活性成分はまた、例えば、コアセルベーション技術または界面重合によって調製されたマイクロカプセル（例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン-マイクロカプセルおよびポリ（メチルメタクリレート）マイクロカプセル）中に、コロイド状薬物送達系（例えば、リボソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、およびナノカプセル）中に、またはマクロエマルジョン中に封入され得る。

【0144】

インビボ投与に使用される製剤は、無菌でなければならない。これは、無菌濾過膜による濾過によって容易に達成される。

【0145】

徐放性調製物が調製され得る。持続放出調製物の適切な例としては、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが挙げられ、このマトリックスは、成形物品（例えば、フィルムまたはマイクロカプセル）の形態である。持続放出マトリックスの例としては、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（2-ヒドロキシエチルメタクリレート）、またはポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号）、L-グルタミン酸および γ -エチル-L-グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、例えばLUPRON DEPOT（商標）（乳酸-グリコール酸コポリマーおよび酢酸ロイプロリドから構成される

注射可能なミクロスフェア)、およびポリ-D-(1)-3-ヒドロキシ酪酸が挙げられる。エチレン-酢酸ビニルおよび乳酸-グリコール酸などのポリマーは、100日間にわたる分子の放出を可能にするが、特定のヒドロゲルは、より短い期間にわたってタンパク質を放出する。

【0146】

本発明による抗体は、サンプル中のPD-1(またはそのタンパク質断片)の存在を検出するための薬剤として使用することができる。例えば、抗体は、検出可能な標識を含有することができる。抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナルであり得る。インタクトな抗体またはその断片(例えば、Fab、scFv、またはF(ab)₂)が使用され得る。プローブまたは抗体に関して、「標識された」という用語は、検出可能な物質をプローブまたは抗体にカップリングする(すなわち、物理的に結合する)ことによるプローブまたは抗体の直接標識、ならびに直接標識される別の試薬との反応性によるプローブまたは抗体の間接標識を包含し得る。間接標識の例としては、蛍光標識された二次抗体を使用する一次抗体の検出、および蛍光標識されたストレプトアビジンで検出され得るようなビオチンでのDNAプローブの末端標識が挙げられる。「生物学的サンプル」という用語は、対象から単離された組織、細胞、および体液、ならびに対象内に存在する組織、細胞、および体液を含み得る。したがって、用語「生物学的サンプル」の使用に含まれるのは、血液ならびに、血清、血漿またはリンパなどの血液の画分または成分である。すなわち、本発明の検出方法は、インビトロおよびインビボで生物学的サンプル中の被検体mRNA、タンパク質またはゲノムDNAを検出するために使用され得る。例えば、被検体mRNAの検出のためのインビトロ技術としては、ノーザンハイブリダイゼーションおよびインサイチュハイブリダイゼーションが挙げられる。被検体タンパク質の検出のためのインビトロ技術としては、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、ウェスタンブロット、免疫沈降、および免疫蛍光が挙げられる。被検体ゲノムDNAの検出のためのインビトロ技術としては、サザンハイブリダイゼーションが挙げられる。

【0147】

イムノアッセイを実施するための手順は、例えば、「ELISA: Theory and Practice: Methods in Molecular Biology」, Vol. 42, J. R. Crowther (Ed.) Human Press, Totowa, NJ, 1995; 「Immunoassay」, E. DiamandisおよびT. Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996; および「Practice and Theory of Enzyme Immunoassays」, P. Tijssen, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985に記載されている。さらに、被検体タンパク質を検出するためのインビボ技術は、標識された抗被検体タンパク質抗体を対象に導入することを含む。例えば、抗体は、対象におけるその存在および位置が標準的な画像化技術によって検出され得る放射性マーカーで標識され得る。

【0148】

PD-1タンパク質(またはその断片)に対する抗体は、PD-1タンパク質の局在化および/または定量化に関する当該技術分野で既知の方法において使用することができる(例えば、適切な生理学的サンプル内のPD-1タンパク質のレベルの測定における使用、診断方法における使用、タンパク質の画像化における使用など)。所与の実施形態では、抗体由来抗原結合ドメインを含む、PD-1タンパク質、またはその誘導体、断片、類似体もしくは相同体に特異的な抗体は、薬理学的に活性な化合物(本明細書では「治療剤」と称される)として利用される。

【0149】

PD-1タンパク質に特異的な本発明の抗体を使用して、免疫親和性、クロマトグラフィーまたは免疫沈降などの標準的な技術によってPD-1ポリペプチドを単離することができる。PD-1タンパク質(またはその断片)に対する抗体は、例えば、所与の治療レジメンの効力を決定するために、臨床試験手順の一部として、組織中のタンパク質レベル

を監視するために診断的に使用することができる。

【0150】

抗体を検出可能な物質にカップリング（すなわち、物理的に結合）することにより、検出を容易にすることができる。検出可能な物質の例としては、様々な酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、および放射性物質が挙げられるが、これらに限定されない。好適な酵素の非限定的な例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが挙げられ；好適な補欠分子族複合体の例としては、ストレプトアビジン／ビオチンおよびアビジン／ビオチンが挙げられ；好適な蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシルまたはフィコエリトリンが挙げられ；発光物質の例としてはルミノールが挙げられ；生物発光物質の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエウオリンが挙げられ、好適な放射性物質の例としては、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、 ^{32}P 、または ^3H が挙げられる。

【0151】

本発明の抗体または薬剤（本明細書では「活性化化合物」とも呼ばれる）、ならびにその誘導体、断片、類似体および相同体は、投与に適した医薬組成物に組み込むことができる。そのような医薬組成物は、抗体または薬剤および薬学的に許容される担体を含むことができる。本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」という用語は、薬学的投与に適合する任意のおよび全ての溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などを含むことができる。好適な担体は、参照により本明細書に組み込まれる、当該技術分野において標準的な参考文献である Remington's Pharmaceutical Sciences の最新版に記載されている。そのような担体または希釈剤の非限定的な例としては、水、生理食塩水、リンゲル液、デキストロース溶液、および5%ヒト血清アルブミンが挙げられる。リボソームおよび不揮発性油などの非水性ビヒクルも使用することができる。薬学的な活性物質のためのそのような媒体および薬剤の使用は、当該技術分野において周知である。いずれかの従来の媒体または薬剤が活性化化合物と不適合である場合を除いて、組成物におけるその使用が企図される。補助的な活性化化合物も、組成物中に組み込むことができる。

【0152】

本発明の医薬組成物は、その意図された投与経路に適合するように製剤化することができる。投与経路の例は、非経口、例えば、静脈内、皮内、皮下、経口（例えば、吸入）、経皮（すなわち、局所）、経粘膜、および直腸投与を含む。非経口、皮内、または皮下適用のために使用される溶液または懸濁液は、以下の成分を含み得る：滅菌希釈剤（例えば、注射用水、生理食塩水、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒）；抗菌剤（例えば、ベンジルアルコールまたはメチルパラベン）；抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸または重亜硫酸ナトリウム）；キレート剤（例えば、エチレンジアミン四酢酸（EDTA））；緩衝液（例えば、酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩）、および張性を調節するための薬剤（例えば、塩化ナトリウムまたはデキストロース）。pHは、塩酸または水酸化ナトリウムなどの酸または塩基で調整することができる。非経口調製物は、ガラスまたはプラスチックで作製されたアンプル、使い捨てシリンジまたは複数回投与用バイアル中に封入され得る。

【0153】

注射可能な使用に適した医薬組成物としては、無菌水溶液（水溶性の場合）または分散液、および無菌注射可能溶液または分散液の即時調製のための無菌粉末が挙げられる。静脈内投与について、好適な担体は、生理食塩水、静菌水、Cremophor EL（商標）（BASF, Parsippany, N. J.）、またはリン酸緩衝生理食塩水（PBS）を含む。実施形態では、組成物は無菌であり、容易な注射可能性が存在する程度に流体である。それは、製造および貯蔵の条件下で安定であってよく、細菌および真菌などの微生物の汚染作用に対して保存され得る。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオー

ル（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、ならびにそれらの好適な混合物を含有する溶媒または分散媒であり得る。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、およびそれらの好適な混合物を含む溶媒または分散媒であることができる。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散液の場合における必要な粒子サイズの維持によって、および界面活性剤の使用によって、維持することができる。微生物の作用の防止は、様々な抗細菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどによって達成することができる。多くの場合、等張剤としては、例えば、糖、マンニトール、ソルビトールなどの多価アルコール、塩化ナトリウムを含めることが有用であり得る。注射可能な組成物の持続的吸収は、組成物において、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを含めることによって達成することができる。

【0154】

無菌注射可能溶液は、必要量の活性化合物を、必要に応じて、上記で列挙される成分の1つまたは組み合わせを有する適切な溶媒に組み込み、続いて濾過滅菌することによって調製することができる。例えば、分散液は、活性化合物を、基本的な分散媒および上記で列挙されるものからの必要な他の成分を含有する無菌ビヒクル中に組み込むことによって調製される。滅菌注射用液剤の調製のための無菌粉末の場合、調製方法は、活性成分の粉末と、その前に無菌濾過した溶液からの任意の追加の所望の成分の粉末を生じる真空乾燥および凍結乾燥である。

【0155】

経口組成物としては、不活性希釈剤または可食性担体が挙げられる。それらはゼラチンカプセルに封入するか、または錠剤に圧縮することができる。経口治療投与の目的のために、活性化合物は、賦形剤とともに組み込まれ、錠剤、トローチ、またはカプセルの形態で使用され得る。経口組成物はまた、うがい薬として使用するための流体担体を使用して調製され得、ここで、流体担体中の化合物は、経口的に適用され、口内で転がして吐き出されるか、または飲み込まれる。薬学的に適合性の結合剤および／またはアジュバント物質は、組成物の一部として含まれ得る。錠剤、丸剤、カプセル、トローチなどは、以下の成分または同様の性質の化合物のいずれかを含有し得る：微結晶性セルロース、トラガカントゴムまたはゼラチンなどの結合剤；デンプンまたはラクトースなどの賦形剤、アルギン酸、Primogelまたはコーンスターチなどの崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムまたはSterotesなどの滑沢剤；コロイド状二酸化ケイ素などの流動促進剤；スクロースまたはサッカリンなどの甘味剤；またはペパーミント、サリチル酸メチルまたはオレンジ香料などの香味剤。

【0156】

吸入による投与において、化合物は、好適な噴射剤、例えば、二酸化炭素などのガスを含有する加圧容器もしくはディスペンサー、またはネブライザーからのエアロゾルスプレーの形態で送達される。

【0157】

全身投与はまた、経粘膜的または経皮的手段によるものであり得る。経粘膜または経皮投与について、浸透させる障壁に適した浸透剤が製剤に使用される。そのような浸透剤は、当該技術分野で一般に知られており、例えば、経粘膜投与について、洗浄剤、胆汁塩、およびフシジン酸誘導体を含む。経粘膜投与は、鼻腔スプレーまたは坐剤の使用を通して達成することができる。経皮投与について、活性化合物は、当該技術分野で一般に知られる軟膏、膏薬、ゲル、またはクリームに製剤化される。

【0158】

化合物はまた、坐剤（例えば、カカオバターおよび他のグリセリドなどの従来の坐剤ベースを用いて）または直腸送達のための停留浣腸の形態で調製することができる。

【0159】

1つの実施形態では、活性化合物は、インプラントおよびマイクロカプセル化送達系を含む制御放出製剤のような、身体からの迅速な排除に対して化合物を保護する担体を用いて調製される。エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステルおよびポリ乳酸などの生分解性、生体適合性ポリマーを使用することができる。そのような製剤の調製方法は、当業者に明らかである。材料はまた、Alza CorporationおよびNova Pharmaceuticals, Inc. から市販されている。リポソーム懸濁液（ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体で感染細胞に標的化されたリポソームを含む）もまた、薬学的に許容される担体として使用することができる。これらは、例えば、米国特許第4,522,811号に記載されているように、当業者に既知の方法に従って調製することができる。

10

【0160】

経口または非経口組成物は、投与を容易にし、投与量を均一にするために、投与単位形態で処方することができる。本明細書で使用される投与単位形態は、治療される対象に対する単位投与量として適した物理的に別個の単位を指し、各単位は、必要とされる薬学的担体と関連して所望の治療効果をもたらすように計算された所定量の活性化合物を含有する。本発明の投与単位形態の仕様は、活性化合物の固有の特性および達成されるべき特定の治療効果、ならびに個体の治療のためにそのような活性化合物を配合する技術分野に固有の制限によって決定され、それらに直接依存する。

【0161】

医薬組成物は、投与説明書とともに、容器、パック、またはディスペンサーに含めることができる。

20

【0162】

治療法

本明細書で使用される場合、「治療」または「治療」という用語は、治療的処置と予防的または防止的手段の両方を指し、その目的は、癌の進行などの望ましくない生理学的変化または障害を予防または減速（軽減）することである。有益なまたは望ましい臨床結果としては、検出可能か検出不可能かに関わらず、症状の緩和、疾患の程度の減少、疾患の安定した（すなわち、悪化しない）状態、疾患の進行の遅延または減速、病状の改善または緩和、および寛解（部分的または全体的）が挙げられるが、これらに限定されない。「治療」とは、治療を受けない場合に予想される生存率と比較して、生存期間を延長することを指す。治療を必要とするものとしては、既に状態または障害を有するもの、ならびに状態もしくは障害を有する傾向があるもの、または状態もしくは障害が予防されるべきものが挙げられる。

30

【0163】

本発明は、癌（例えば、早期検出癌バイオマーカーがそのような対象において同定される場合）または他の細胞増殖関連疾患もしくは障害のリスクがある（またはそれらに感受性である）対象を治療する予防的方法および治療的方法の両方を提供する。そのような疾患または障害としては、例えば、PD-1の異常な発現に関連する疾患または障害が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、これらの方法は、癌の症状を治療、予防、または緩和するために使用される。1つの実施形態では、本方法は、固形腫瘍の症状を治療、予防、または緩和するために使用される。本明細書の実施形態によって治療することができる他の腫瘍の非限定的な例としては、肺癌、卵巣癌、前立腺癌、結腸癌、子宮頸癌、脳癌、皮膚癌、肝臓癌、膵臓癌または胃癌が挙げられる。さらに、本発明の方法は、白血病およびリンパ腫などの血液癌を治療するために使用することができる。あるいは、これらの方法を使用して、転移した癌の症状を治療、予防、または緩和することができる。例えば、治療もしくは予防できる、または症状を緩和できる癌としては、B細胞慢性リンパ性白血病（CLL）、非小細胞肺癌、黒色腫、卵巣癌、リンパ腫、または腎細胞癌が挙げられる。治療もしくは予防することもできる、または症状を緩和することができる癌には、変異負荷が高く濾液中のWBCを有する固形腫瘍が挙げられる。治療もしくは予防できる、または症状を緩和することができる癌としては、PD-1/PD-L1軸におけるシ

40

50

グナルが調節されている癌、乳癌、肺癌（例えば、非小細胞肺癌または肺腺癌）、胃癌、結腸直腸癌、膀胱癌、膵臓癌、前立腺癌、食道扁平上皮癌、鼻咽頭癌、およびPD1/PDL1軸が活性である液性腫瘍（例えば、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）およびB細胞慢性リンパ性白血病（B-CLL））が挙げられる（これらに限定されない）癌が挙げられる（例えば、Han et al., PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer, Am J Cancer Res 2020; 10 (3): 727-742を参照のこと）。

【0164】

したがって、1つの態様では、本発明は、本発明のモノクローナル抗体、scFv抗体または二重特異性抗体を対象に投与することにより、対象の癌または細胞増殖性疾患または障害の症状を予防、治療または緩和するための方法を提供する。例えば、抗PD-1抗体は、治療有効量で投与することができる。

10

【0165】

癌または細胞増殖関連の疾患または障害のリスクがある対象には、癌の家族歴がある患者、または既知または疑われる癌の原因物質に曝露された対象が含まれ得る。予防薬の投与は、疾患が予防されるか、あるいはその進行が遅延されるように、癌の発現前に行うことができる。

【0166】

別の態様では、腫瘍細胞の増殖は、細胞を本発明の抗PD-1抗体と接触させることによって阻害される。細胞は、PD-1を発現する任意の細胞であり得る。

20

【0167】

本発明はさらに、慢性または急性のウイルス、細菌または寄生虫感染のリスクがある（または感受性がある）対象を治療する予防的および治療的方法の両方を提供する。本発明はまた、T細胞疲弊に関連する疾患もしくは障害または状態のリスク、またはT細胞疲弊を発症するリスクのある対象を治療する予防的および治療的方法の両方のための治療方法を提供する。本発明はまた、T細胞疲弊に関連する疾患もしくは障害または状態のリスク、またはT細胞疲弊を発症するリスクのある対象を治療する予防的および治療的方法の両方のための治療方法を提供する。このような疾患または障害としては、HIV、AIDS、および慢性または急性の細菌、ウイルス、または寄生虫感染が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、他のそのような慢性感染としては、例えば、B型肝炎ウイルス（HBV）、C型肝炎ウイルス（HCV）、単純ヘルペスウイルス1型（HSV-1）、H.ピロリ（H. pylori）、またはトキソプラズマ原虫（Toxoplasma gondii）によって引き起こされるものが挙げられる。他の急性感染としては、例えば、本明細書に記載されるようなグラム陽性細菌、グラム陰性細菌、原生動物、または真菌などの微生物によって引き起こされるものが挙げられる。

30

【0168】

抗原に対する免疫応答を増加または増強する方法も本発明に含まれる。免疫応答は、本発明のモノクローナル抗体、scFv抗体、または二重特異性抗体を対象に投与することによって増加または増強される。免疫応答は、例えば、抗原特異的Tエフェクター機能を増強することによって増強される。抗原は、ウイルス（例えば、HIV）、細菌、寄生虫または腫瘍抗原である。免疫応答は、自然免疫応答である。自然免疫応答とは、感染の結果である免疫応答を意味する。感染は、慢性感染である。抗原に対する免疫応答の増加または増強は、当該技術分野で既知の多くの方法によって測定され得る。例えば、免疫応答は、T細胞活性、T細胞増殖、T細胞活性化、エフェクターサイトカインの産生、およびT細胞転写プロファイルのいずれか1つを測定することによって測定され得る。あるいは、免疫応答は、ワクチン接種によって誘導される応答である。

40

【0169】

したがって、別の態様では、本発明は、本発明のモノクローナル抗体またはscFv抗体およびワクチンを対象に投与することによってワクチン効率を高める方法を提供する。抗体およびワクチンは、逐次的にまたは同時に投与される。ワクチンは腫瘍ワクチン、細

50

菌ワクチンまたはウイルスワクチンである。

【0170】

組み合わせ方法

本明細書に記載される本発明の組成物は、化学療法剤と組み合わせ投与することができる。本開示の組成物と共に投与され得る化学療法剤としては、限定されるわけではないが、抗生物質誘導体（例えば、ドキソルビシン、ブレオマイシン、ダウノルビシン、およびダクチノマイシン）；抗エストロゲン（例えば、タモキシフェン）；代謝拮抗薬（例えば、フルオロウラシル、5-FU、メトトレキセート、フロクスウリジン、インターフェロン α -2b、グルタミン酸、プリカマイシン、メルカプトプリン、および6-チオグアニン）；細胞毒性薬剤（例えば、カルムスチン、BCNU、ロムスチン、CCNU、シトシンアラビノシド、シクロホスファミド、エストラムスチン、ヒドロキシウレア、プロカルバジン、マイトマイシン、ブスルファン、シスプラチン、および硫酸ビンクリスチン）；ホルモン（例えば、メドロキシプロゲステロン、エストラムスチンリン酸ナトリウム、エチニルエストラジオール、エストラジオール、酢酸メゲストロール、メチルテストステロン、ジエチルスチルベストロールニリン酸、クロロトリアニセン、およびテストトラクトン）；ナイトロジェンマスタード誘導体（例えば、メファレン、クロラムブシル、メクロレタミン（ナイトロジェンマスタード）およびチオテパ）；ステロイドおよび組合せ（例えば、ベタメタソンリン酸ナトリウム）；およびその他（例えば、ジカルバジン、アスパラギナーゼ、ミトタン、硫酸ビンクリスチン、硫酸ビンブラスチン、およびエトポシド）が挙げられる。

【0171】

さらなる実施形態では、本明細書に記載される本発明の組成物は、サイトカインと組み合わせ投与することができる。組成物と共に投与することができるサイトカインとしては、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-10、IL-13、IL-15、抗CD40、CD40L、TNF- α が挙げられるが、これらに限定されない。

【0172】

さらなる実施形態では、本明細書に記載の組成物は、例えば、放射線療法などの他の治療または予防レジメンと組み合わせ投与することができる。

【0173】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物は、他の免疫療法剤と組み合わせ投与することができる。免疫療法剤の非限定的な例としては、シムツズマブ（simtuzumab）、アバゴボマブ（abagovomab）、アデカツマブ（adecatumumab）、アフツズマブ（afutuzumab）、アレムツズマブ（alemtuzumab）、アルツモマブ（altumomab）、アマツキシマブ（amatuximab）、アナツモマブ（anatumomab）、アルシツモマブ（arcitumomab）、バビツキシマブ（bavituximab）、ベクツモマブ（bectumomab）、ベバシズマブ（bevacizumab）、ビバツズマブ（bivatuzumab）、ブリナツモマブ（blinatumomab）、ブレンツキシマブ（brentuximab）、カンツズマブ（cantuzumab）、カツマキシマブ（catumaxomab）、セツキシマブ（cetuximab）、シタツズマブ（citatumuzumab）、シクスツムマブ（cixutumumab）、クリバツズマブ（clivatuzumab）、コナツムマブ（conatumumab）、ダラツムマブ（daratumumab）、ドロジツマブ（drositumab）、デュリゴツマブ（duligotumab）、デュシジツマブ（dusigitumab）、デツモマブ（detumomab）、ダセツズマブ（dacetuzumab）、ダロツズマブ（dalotuzumab）、エクロメキシマブ（ecromeximab）、エロツズマブ（elotuzumab）、エンシツキシマブ（ensituximab）、エルツマキシマブ（ertumaxomab）、エタラシズマブ（etaracizumab）、ファルレツズマブ（farletuzumab）、フィクラツズマブ（ficlatuzumab）

)、フィギツムマブ (f i g i t u m u m a b)、フランボツムマブ (f l a n v o t u m a b)、フツキシマブ (f u t u x i m a b)、ガニツムマブ (g a n i t u m a b)、ゲムツズマブ (g e m t u z u m a b)、ギレンツキシマブ (g i r e n t u x i m a b)、グレムバツムマブ (g l e m b a t u m u m a b)、イブリツムマブ (i b r i t u m o m a b)、イゴボマブ (i g o v o m a b)、イムガツズマブ (i m g a t u z u m a b)、インダツキシマブ (i n d a t u x i m a b)、イノツズマブ (i n o t u z u m a b)、インテツムマブ (i n t e t u m u m a b)、イピリウムマブ (i p i l i m u m a b)、イラツムマブ (i r a t u m u m a b)、ラベツズマブ (l a b e t u z u m a b)、レキサツムマブ (l e x a t u m u m a b)、リンツズマブ (l i n t u z u m a b)、ロルボツズマブ (l o r v o t u z u m a b)、ルカツムマブ (l u c a t u m u m a b)、マパツムマブ (m a p a t u m u m a b)、マツズマブ (m a t u z u m a b)、ミラツズマブ (m i l a t u z u m a b)、ミンレツモマブ (m i n r e t u m o m a b)、ミツモマブ (m i t u m o m a b)、モキセツモマブ (m o x e t u m o m a b)、ナルナツムマブ (n a r n a t u m a b)、ナプツモマブ (n a p t u m o m a b)、ネシツムマブ (n e c i t u m u m a b)、ニモツズマブ (n i m o t u z u m a b)、ノフェツモマブ (n o f e t u m o m a b)、オカラツズマブ (o c a r a t u z u m a b)、オフアツムマブ (o f a t u m u m a b)、オララツムマブ (o l a r a t u m a b)、オナルツズマブ (o n a r t u z u m a b)、オポルツズマブ (o p o r t u z u m a b)、オレゴボマブ (o r e g o v o m a b)、パニツムマブ (p a n i t u m u m a b)、パルサツズマブ (p a r s a t u z u m a b)、パトリツムマブ (p a t r i t u m a b)、ペムツモマブ (p e m t u m o m a b)、ペルツズマブ (p e r t u z u m a b)、ピンツモマブ (p i n t u m o m a b)、ブリツムマブ (p r i t u m u m a b)、ラコツモマブ (r a c o t u m o m a b)、ラドレツムマブ (r a d r e t u m a b)、リロツムマブ (r i l o t u m u m a b)、リツキシマブ (r i t u x i m a b)、ロバツムマブ (r o b a t u m u m a b)、サツモマブ (s a t u m o m a b)、シブロツズマブ (s i b r o t u z u m a b)、シルツキシマブ (s i l t u x i m a b)、ソリトマブ (s o l i t o m a b)、タカツズマブ (t a c a t u z u m a b)、タブリツムマブ (t a p l i t u m o m a b)、テナツモマブ (t e n a t u m o m a b)、テプロツムマブ (t e p r o t u m u m a b)、チガツズマブ (t i g a t u z u m a b)、トシツモマブ (t o s i t u m o m a b)、トラストツズマブ (t r a s t u z u m a b)、ツコツズマブ (t u c o t u z u m a b)、ウブリツキシマブ (u b l i t u x i m a b)、ベルツズマブ (v e l t u z u m a b)、ボルセツズマブ (v o r s e t u z u m a b)、ボツムマブ (v o t u m u m a b)、ザルツムマブ (z a l u t u m u m a b)、C C 49、および3 F8が挙げられる。

【0174】

本発明は、PD-1タンパク質の同じエピトープ、あるいは、PD-1タンパク質の2つの異なるエピトープに結合する2つの抗体を投与することによって、患者の癌を治療する方法を提供する。あるいは、癌は、PD-1に結合する第1の抗体およびPD-1以外のタンパク質に結合する第2の抗体を投与することによって治療することができる。他の実施形態では、癌は、PD-1に結合し、かつPD-1以外のタンパク質に結合する二重特異性抗体を投与することによって治療することができる。例えば、PD-1以外の他のタンパク質としては、IL-2、IL-2R、IL-15、IL-15R、IL-7、IL-7R、IL-21、またはIL-21Rが挙げられるが、これらに限定されない。例えば、PD-1以外の他のタンパク質は、腫瘍関連抗原であり；PD-1以外の他のタンパク質は、サイトカインであってもよい。

【0175】

いくつかの実施形態では、本発明は、抗PD-1抗体を単独で、またはPD-1以外の別のタンパク質を認識する追加の抗体と組み合わせて、免疫応答を達成または増強することができる細胞とともに投与することを提供する。例えば、これらの細胞は、末梢血単核細胞(PBMC)、またはPBMC中に見出される任意の細胞型、例えば、細胞傷害性T

細胞、マクロファージ、およびナチュラルキラー（NK）細胞であり得る。

【0176】

さらに、本発明は、PD-1タンパク質に結合する抗体および抗新生物剤、例えば、小分子、成長因子、サイトカインまたはペプチド、ペプチド模倣体、ペプチド、ポリヌクレオチド、脂質由来メディエーター、低分子生体アミン、ホルモン、神経ペプチドおよびプロテアーゼなどの生体分子を含む他の治療剤の投与を提供する。小分子としては、無機分子および有機小分子が挙げられるが、これらに限定されない。好適な成長因子またはサイトカインとしては、IL-2、GM-CSF、およびTNF- α が挙げられる。小分子ライブラリは、当該技術分野で既知である。（Lam, Anticancer Drug Des., 12:145, 1997を参照のこと）。

10

【0177】

キメラ抗原受容体（CAR）T細胞療法

キメラ抗原受容体（CAR）T細胞療法などの細胞療法もまた、本明細書で提供される。CAR T細胞療法は、例えば、T細胞上でのCARの外因性発現によって患者のT細胞を、腫瘍細胞を殺傷するように向け直す。CARは、抗体の抗原認識ドメインをT細胞受容体および共受容体の細胞内シグナル伝達ドメインに連結する、膜貫通型融合タンパク質であり得る。本発明の抗PD-1抗体を分泌することができる（あるいは、分泌されるように本明細書に記載されるように抗PD-1抗体を発現するように操作される）好適な細胞を使用することができる。分泌される抗PD-1「ペイロード」は、例えば、ミニボディ、ScFv、IgG分子、二重特異性融合分子、および本明細書に記載される他の抗体断片であり得る。

20

【0178】

固形腫瘍は、CAR-T療法に特有の課題を提供する。固形腫瘍におけるCAR-T有効性に対するいくつかの障壁としては、不均質な抗原発現、不十分な組織ホーミング、活性化、持続性、および免疫抑制腫瘍微小環境が挙げられる。血液癌とは異なり、腫瘍関連標的タンパク質は腫瘍と健常組織との間で過剰発現され、健常組織のオンターゲット／オフ腫瘍T細胞殺傷をもたらす。さらに、腫瘍微小環境（TME）における免疫抑制は、腫瘍の殺傷に向けてCAR-T細胞の活性化を制限する。そのような接触または操作により、次いで、細胞は、治療を必要とする癌患者に導入され得る。癌患者は、本明細書中に開示されるようなタイプのいずれかの癌を有し得る。細胞（例えば、T細胞）は、例えば、腫瘍浸潤性Tリンパ球、CD4+T細胞、CD8+T細胞、またはそれらの組み合わせであり得るが、これらに限定されない。

30

【0179】

本発明の態様において有用な例示的なCARおよびCARファクトリーとしては、例えば、PCT/US2015/067225号およびPCT/US2019/022272号に開示されているものが挙げられ、これらはそれぞれ参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。例えば、CAR-T細胞は、レンチウイルス系（形質導入による）、レトロウイルス系（トランスフェクション（電気穿孔法）による）、およびトランスポゾン系（PiggyBacによる）を使用して、当該技術分野で既知の方法に従って生成することができる。CAR-Tの生成に使用することができるペイロードのプロモーターに有用なものとしては、例えば、構成的プロモーター（プロモーターは、EF1 α 、次いでIRESまたは2AなどのCAR-Tと同じである）；誘導性プロモーター（プロモーターは、NFAT、IL-2 promなどのCAR-Tのプロモーターとは異なる）；および遺伝子操作されたプロモーター（サイトカインのPD-1遺伝子座「ノックイン」および／または内因性プロモーターの制御下にあるプロモーターなど）が挙げられる。1つの実施形態では、本明細書で論じられるPD-1抗体は、多重特異性抗体の構築において、またはCAR-T細胞のペイロードとして使用することができる。例えば、1つの実施形態では、本明細書で論じられる抗PD-1抗体は、CAR-Sの標的指向化のために（すなわち、標的指向部分として）使用することができる。1つの実施形態では、本明細書で論じられる抗PD-1抗体は、CAR-T細胞によって分泌されるペイロードとして使用するこ

40

50

とができる。別の実施形態では、本明細書で論じられる抗PD-1抗体は、標的指向部分として使用することができ、異なるエピトープを標的とする異なるPD-1抗体をペイロードとして使用することができる。別の実施形態では、ペイロードは、免疫調節抗体ペイロードであり得る。いくつかの実施形態では、CAR-T組成物での使用において、本明細書に記載されるPD-1抗体は、高親和性PD-1抗体ではない（例えば、抗体は、そのため、PD-1標的に強く結合しない）。例えば、本明細書に記載されるPD-1抗体は、特定の癌（すなわち、卵巣癌においてはMSLNおよびMUC1）について選択された2つの標的指向部分（例えば、腫瘍関連表面抗原）と共に、CAR-T細胞によって分泌されるペイロードとして使用することができる。腫瘍関連表面抗原の非限定的な例としては、ErbB2（HER2/neu）、癌胎児性抗原（CEA）、上皮細胞接着分子（EpCAM）、上皮成長因子受容体（EGFR）、MUC1、MSLN、CD19、CD20、CD30、CD40、CD22、RAGE-1、MN-CAIX、RET1、RET2（AS）、前立腺特異的抗原（PSA）、TAG-72、PAP、p53、Ras、プロステイン、PSMA、サバイビン、9D7、前立腺癌腫瘍抗原-1（PCTA-1）、GAGE、MAGE、メソテリン、ベタイン-カテニン、TGF-ベタインRII、BRCA1/2、SAP-1、HPV-E6、HPV-E7が挙げられる（さらなる腫瘍関連表面抗原については、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるPCT/US2015/067225号およびPCT/US2019/022272号もまた参照のこと）。

10

【0180】

20

診断アッセイ

抗PD-1抗体は、例えば、所与の治療および／または予防レジメンの有効性を決定するための臨床試験手順の一部として、例えば、癌の発生または進行を監視するために診断的に使用することができる。

【0181】

いくつかの態様では、診断目的のために、本発明の抗PD-1抗体は、例えば、癌のリスクがあるかまたは癌に罹患している対象において癌細胞を検出するための方法を提供するように、検出可能な部分に結合される。

【0182】

検出可能な部分は、抗体または断片に直接結合するか、または、例えば、蛍光二次抗体を使用することによって間接的に結合することができる。直接結合は、例えば、フルオロフォアの抗体もしくは抗体断片への標準的な化学的カップリングによって、または遺伝子操作を介して達成することができる。蛍光または生物発光タンパク質にカップリングされた抗体または抗体断片を含有するキメラまたは融合タンパク質を構築することができる。例えば、Casadei, et al., (Proc Natl Acad Sci USA. 1990 Mar; 87 (6): 2047-51) は、哺乳動物細胞においてエクオリンおよび抗体遺伝子の融合タンパク質を発現することができるベクター構築物を作製する方法を記載している。

30

【0183】

本明細書で使用される場合、プローブまたは抗体に関して「標識された」という用語は、検出可能な物質をプローブまたは抗体にカップリングする（すなわち、物理的に結合することによるプローブまたは抗体の直接標識、ならびに直接標識された別の試薬との反応性によるプローブまたは抗体の間接標識を包含し得る。間接標識の例としては、蛍光標識された二次抗体を使用する一次抗体の検出、および蛍光標識されたストレプトアビジンで検出され得るようなビオチンでのDNAプローブの末端標識が挙げられる。「生物学的サンプル」という用語は、対象から単離された組織、細胞、および体液（生検など）、ならびに対象内に存在する組織、細胞、および体液を含むことを意図している。すなわち、本発明の検出方法は、インビトロおよびインビボで、生物学的サンプルにおいてPD-1を発現する細胞を検出するために使用され得る。例えば、PD-1の検出のためのインビトロ技術としては、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、ウェスタンブロット、免

40

50

疫沈降、および免疫蛍光が挙げられる。さらに、PD-1を検出するためのインビボ技術は、標識された抗PD-1抗体を対象に導入することを含む。例えば、抗体は、対象におけるその存在および位置が標準的な画像化技術によって検出され得る放射性マーカーで標識され得る。

【0184】

「標的化された」結合体、すなわち特定の部位または複数の部位で対象または動物内の結合体を局在化するように設計された分子または特徴である標的指向部分を含む結合体の場合、局所化は、対象内の結合された「局所化された」実体と、結合されていない「遊離した」実体の間の平衡が本質的に達成された状態を指すことができる。そのような平衡が達成される速度は、投与経路に依存する。例えば、静脈内注射によって投与される結合体は、注射の数分以内に局在化を達成し得る。一方、経口投与される結合体は、局在化を達成するのに数時間かかり得る。あるいは、局在化は、実体が投与された後の選択された期間における対象または動物内の実体の位置を単に指し得る。別の例として、局在化は、その部分が投与後に分布するようになる場合に達成される。

【0185】

局在化を達成するための時間の合理的な推定は、当業者によって行われ得ることが理解される。さらに、時間の関数としての局在化の状態は、本発明の方法に従って、例えば光検出器デバイスを用いて、検出可能な部分（例えば、発光結合体）を画像化することによって追跡され得る。使用される「光検出器デバイス」は、妥当な時間量で哺乳動物内からの微弱な光の画像化を可能にし、そのようなデバイスからの信号を使用して画像を構築するの十分に高い感度を有するべきである。

【0186】

非常に明るい光生成部分を使用すること、および／または画像化される対象もしくは動物の表面付近に局在する光生成融合タンパク質を検出することが可能である場合、一对の「暗視」ゴーグルまたは標準的な高感度ビデオカメラ（例えば、Silicon Intensified Tube (SIT) カメラ（例えば、Hamamatsu Photonic Systems, Bridgewater, NJ））が使用され得る。しかしながら、より典型的には、より高感度な光検出方法が必要とされる。

【0187】

極端に低い光レベルでは、単位面積あたりの光子束が非常に低くなり、画像化されているシーンが連続的に見えなくなる。代わりに、それは、時間的にも空間的にも互いに異なる個々の光子によって表される。モニタ上で見ると、そのような画像は、それぞれが単一の検出された光子を表す光のシンチレーション点として現れる。これらの検出された光子をデジタル画像プロセッサ内で経時的に蓄積することによって、画像を取得して構築することができる。各画像点における信号に強度値が割り当てられる従来のカメラとは対照的に、光子計数撮像では、信号の振幅は重要ではない。目的は、信号（光子）の存在を単純に検出し、経時的にその位置に関して信号の発生を計数することである。

【0188】

以下で説明される少なくとも2つのタイプの光検出器デバイスは、個々の光子を検出し、画像プロセッサによって分析され得る信号を生成することができる。ノイズ低減光検出デバイスは、光子信号を増幅するのではなく、光子検出器のバックグラウンドノイズを低減することで感度を達成する。ノイズは、主に検出器アレイを冷却することによって低減される。このデバイスには、「背面薄化」冷却CCDカメラと呼ばれる電荷結合デバイス(CCD)カメラが含まれる。より高感度の機器において、冷却は、例えば、CCDアレイの温度を約-120℃にする液体窒素を使用して達成される。「裏薄化された」とは、光子が検出されるまでの経路長を減少させ、それによって量子効率を増加させる超薄型のバックプレートを指す。特に感度の高い裏薄化低温CCDカメラは、Photometries, Ltd. (Tucson, Ariz.) から入手可能なシリーズ200カメラである「TECH 512」である。

【0189】

「光子増幅デバイス」は、光子が検出画面に当たる前に光子を増幅する。このクラスには、マイクロチャンネル増強装置などの増強装置を備えたCCDカメラが含まれる。マイクロチャンネル増強装置は、典型的には、カメラの検出画面に対して垂直であり、かつそれと同一の広がりを持つチャンネルの金属アレイを含む。マイクロチャンネルアレイは、画像化されるサンプル、対象、または動物とカメラの間に配置される。アレイのチャンネルに入る光子の大部分は、出る前にチャンネルの側面に接触する。アレイに電圧を印加すると、各光子の衝突から多くの電子が放出される。そのような衝突からの電子は、「ショットガン」パターンでそれらの起点チャンネルを出て、カメラによって検出される。

【0190】

増強マイクロチャンネルアレイを直列に配置して、第1段階で発生した電子が第2段階で電子の増幅信号を生じるようにすることによって、さらに高い感度を達成することができる。しかし、感度の増加は空間分解能を犠牲にして達成され、それは増幅の各追加段階と共に減少する。例示的なマイクロチャンネル増強装置に基づく単一光子検出デバイスは、C2400シリーズであり、Hamamatsuから入手可能である。

【0191】

画像プロセッサは、光子を計数する光検出器デバイスによって生成された信号を処理して、例えば、モニタ上に表示され得るか、またはビデオプリンタ上に印刷され得る画像を構築する。このような画像プロセッサは、典型的には、上述の高感度光子計数カメラを含むシステムの一部として販売されており、したがって、同じ供給源から入手可能である。画像プロセッサは、通常、IBM互換PCまたはApple Macintosh (Apple Computer, Cupertino, CA) などのパーソナルコンピュータに接続され、購入した画像システムの一部として含まれてもよいし、含まなくてもよい。画像がデジタルファイルの形態になると、様々な画像処理プログラム（例えば、「ADOBE PHOTOSHOP」, Adobe Systems, Adobe System s, Mt. View, CA）によって操作し、印刷することができる。

【0192】

1つの実施形態では、生物学的サンプルは、試験対象由来のタンパク質分子を含む。1つの例示的な生物学的サンプルは、従来の手段によって対象から単離された末梢白血球サンプルである。

【0193】

本発明はまた、生物学的サンプル中のPD-1またはPD-1発現細胞の存在を検出するためのキットを包含する。例えば、キットは、生物学的サンプル中の癌または腫瘍細胞を検出することができる標識された化合物または薬剤（例えば、抗PD-1 scFvまたはモノクローナル抗体）；サンプル中のPD-1の量を決定するための手段；およびサンプル中のPD-1の量を標準と比較するための手段を含むことができる。標準は、いくつかの実施形態では、非癌細胞またはその細胞抽出物である。化合物または薬剤は、適切な容器に包装することができる。キットは、サンプル中の癌を検出するためにキットを使用するための説明書をさらに含むことができる。

【0194】

他の実施形態

本発明は、その詳細な説明とともに記載されたが、前述の説明は、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲を例示することを意図しており、限定することを意図していない。他の態様、利点、および変更は、添付の特許請求の範囲内である。

【0195】

本発明は、特許請求の範囲に記載される本発明の範囲を限定しない以下の実施例においてさらに記載される。

【実施例】

【0196】

実施例は、本発明のより完全な理解を促進するために以下に提供される。以下の実施例は、本発明を作製および実施する例示的な様式を例示する。しかしながら、本発明の範囲

10

20

30

40

50

は、これらの実施例に開示されている特定の実施形態に限定されず、代わりの方法を使用して同様の結果を得ることができるため、例示のみを目的としている。

【0197】

実施例1－PMPLパニング

本発明のPD-1抗体（例えば、P4-B3およびP4-B7）を、PMPLパニングによって見出した。簡潔に述べると、PD-1を、C末端C9タグ（TETSQVAPA）に遺伝子的に融合させて発現させた。Exp i 2 9 3細胞の一過的トランスフェクションを行い、その後溶解させた。溶解物を清澄化し、1D4（抗C9タグ）結合磁気ビーズを使用してPD-1タンパク質を捕捉した。次いで、ビーズを脂質溶液中で透析し、これにより、細胞膜をシミュレートし、タンパク質の安定性を補助する脂質二重層をビーズの周囲に形成した。次いで、これらのビーズをパニングに使用した。

10

【0198】

実施例2－ミニボディ結合曲線

ミニボディ結合曲線を、トランスフェクトした細胞を用いて行った（図4を参照のこと）。ヒトまたはカニクイザルPD1をトランスフェクトした細胞を使用して、P4-B3ミニボディの結合曲線を作成した。ヒト変異体は2回実施したが、陰性およびカニクイザルは1回実施した。トランスフェクションの48時間後にExp i 2 9 3細胞を用いて曲線を作成した。ヒト変異体曲線を、市販の抗体染色による発現レベルに基づいて正規化した。カニクイザル変異体は正規化しなかった。カニクイザル変異体は、使用した市販の抗体がカニクイザルPD-1に結合することが報告されていないため、正規化しなかった。

20

【0199】

実施例3－P4-B3の異なる抗体型のオクテット結合曲線

ストレプトアビジンセンサに3ug/mlのビオチン化PD-1をロードした。P4-B3の全ての型の最高濃度は50nMであり、3/4段階希釈を行った。Octet Redソフトウェアを使用して動的計算を行い、図5に示す。EMEA Assessment Report (EMEA/H/C/003820/0000)によれば、PembroのKDは 2.9×10^{-11} Mであると報告されており、これは、実験からPembroについて得られた結果に匹敵する。

【0200】

実施例4－PD-L1競合アッセイ

SAセンサに3ug/mlのPD-1をロードし、次いで、様々な濃度（50～0nM）のPembro（IgG）またはP4-B3（IgGまたはミニボディ）のいずれかとインキュベートし、続いて5ug/mlのPD-L1とインキュベートした。図6において、赤色の曲線は、抗体がロードされておらず、PD-1機能化センサに結合するPD-L1の最大量を表す。図6に示されるように、P4-B3抗体は、PD-L1の付加によりわずかなシフトを有するが、PD-L1結合のかなりの部分を遮断するようである。曲線は、抗体のロード工程を含まず、代わりにPD-L1結合工程のみを示している。元の抗体結合工程は、図5に詳述する。

30

【0201】

実施例5－IgG ELISA

ELISAプレートを1ug/mlの可溶性PD1で37℃で2時間コーティングした。次にプレートを洗浄し、2%BSA/PBSで37℃で1時間遮断した。ブロッキング溶液を除去し、抗体の3×段階希釈物を、6ug/mlで開始して、2%ミルク-PBS-T中の各ウェル（100ul）に加えた。次いで、プレートを穏やかに振盪しながら室温でインキュベートし、PBS-Tで6回洗浄し、二次抗ヒトFc-HRP（1:150k、Bethyl）を加えた。プレートを再度、穏やかに振盪しながら室温で1時間インキュベートし、その後、PBS-Tで6回洗浄した。TMB基質を加え、プレートを30℃で10分間インキュベートして、HRP反応を促進させた。次いで、シグナルをTMB停止溶液でクエンチし、450nmで読み取った。図7の上のグラフを参照のこと。

40

【0202】

50

プレートを $6 \mu\text{g}/\text{ml}$ で開始する抗原の $3 \times$ 段階希釈物でコーティングしたことを除いて、本明細書に記載されるものと同じプロトコルを図 7 の下のグラフに対して実行した。次いで、抗体を $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の一定濃度で全てのウェルに加えた。

【0203】

実施例 6 – 抗 PD1 IgG を用いた PD1 FACS

T 細胞を、完全 DMEM (293FT 培地) 中で $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の PHA を用いるか、または用いずに 48 時間培養した。ペムブロリズマブおよび P4-B3 抗体を、Biolegend 社の抗ヒト IgG Fc APC (カタログ番号 409306) で検出した。図 8 に示すように、P4-B3 PD-1 抗体は、ペムブロリズマブおよび対照抗 PD1 抗体の結合パターンと同様の結合パターンを示す。

10

【0204】

実施例 7 – PD1-PDL1 バイオアッセイ

Promega PD1-PDL1 バイオアッセイ (J1250) を、本発明の PD-1 抗体 (P4-B3) ならびに市販の抗体ペムブロリズマブおよびニボルマブを用いて実施した (図 9)。

【0205】

試験した構築物は、(a) IgG1: 野生型モノマー; (b) LALA: モノマー、ヘキサマー、および変異体 3; (c) sIgG4: モノマーおよびヘキサマー; 対照: mAb11 LALA モノマーを含むものであった。

【0206】

mAb11 を除いて、全てのサンプルを 3 回行った。

20

【0207】

誘導倍率: RLU 刺激 / RLU 非刺激 (Ab なし) (図 10)。

【0208】

実施例 8 – 抗 PD-1 交差反応性

多くの抗 PD-1 抗体は、マウスおよびヒト PD-1 と交差反応することができない (Pembro および Nivo は交差反応性ではない)。Fessas, Petros et al. 「A molecular and preclinical comparison of the PD-1-targeted T-cell checkpoint inhibitors nivolumab and pembrolizumab」Seminars in oncology vol. 44, 2 (2017): 136-140. を参照のこと。また、Tan JBL, Chen C, Chen K, Preclinical Characterization of GLS-010 (AB122): 「A Fully Human Clinical-Stage anti-PD-1 Antibody」Poster, Arcus Biosciences を参照のこと; Burova, Elena et al. 「Characterization of the Anti-PD-1 Antibody REGN2810 and Its Antitumor Activity in Human PD-1 Knock-In Mice」Large Molecule Therapeutics, 2017 を参照のこと。さらに、Li, Dong et al. 「Epitope mapping reveals the binding mechanism of a functional antibody cross-reactive to both human and murine programmed death1」mAbs vol. 9, 4 (2017): 628-637 を参照のこと。

30

40

【0209】

本発明の抗体 (例えば、P4-B3) は交差反応性である。

【0210】

3E5 を一過的にトランスフェクトした Expi293 細胞を $100 \mu\text{l}$ の MACS 緩衝液に懸濁し、各ウェルに添加した。次に、 $50 \mu\text{l}$ の各抗体希釈液を細胞と混合し、プレートを 4°C で 30 分間インキュベートした。インキュベーション後、プレートを MAC

50

S緩衝液で2回洗浄し、1 μ l/ウェルの抗ヒトFc-APC (Biolegend # 409306) とインキュベートした。プレートを4℃で25分間インキュベートし、サンプルを分析する前に3回洗浄した。

【0211】

図16に示されるように、P4-B3は、マウスPD-1に対して適度な親和性を有し、PembroおよびNivoとは一線を画している。

【0212】

実施例9－親和性成熟

酵母ライブラリの生成

最初に、pFarberベクター（ファージディスプレイ）由来のP4-B3 scFvを切断し、pCTCON2ベクター（酵母ディスプレイ）にペーストする。次いで、当該技術分野で実施される2つの方法に従ってライブラリを作製する：（1）細菌における消化／ライゲーションおよびインタクトなプラスミドの酵母への形質転換；ならびに（2）酵母中の相同組換えのための線状化ベクター＋PCR断片。消化／ライゲーション法（本明細書中に記載される方法（1））は、ライブラリーサイズが非常に低くなり、ライゲーション／細菌の形質転換の効率が低くなり、酵母への形質転換の効率が非常に低くなった。しかしながら、相同組換え（本明細書中に記載される方法（2））は、約 $10^6 \sim 10^7$ 個の変異体を有するライブラリを生じた。

【0213】

エラープローン変異誘発

Agilent GeneMorph IIランダム変異誘発キットを使用した。このキットは、最初の鋳型DNAに基づいて変異率を変化させるように設計されている。

変異率	変異頻度 (変異/kb)	初期標的量 (ng)
低	0-4.5	500-1000
中	4.5-9	100-500
高	9-16	0.1-100

【0214】

外部プライマー（pCTCON2ベクターと約50～60bp重複）：

(a) pCTCON2-HR-Fwd：

GAGGAGGCTCTGGTGGAGGCGGTAGCGGAGGCGGAGGGTCT
GGCTAGCTGGGCCCCAGCCGG

(b) pCTCON2-HR-Rev：

ACACTGTTGTTATCAGATCTCGAGCTATTACAAGTCCTCT
TCAGAAATAAGCTTTTGTTC

【0215】

内部プライマー（重鎖または軽鎖断片と45bp重複）：

(a) G4S-Fwd：

GGTGGCGGCGGTTCCGGAGGTGGTGGTTCTGGCGGTGGTG
GCAGC

(b) G4S-Rev：

GCTGCCACCAACCGCCAGAACCAACCACTCCGGAACCGCCG
CCACC

【0216】

エラープローン変異誘発戦略

(a) 外部プライマーを用いた s c F v 断片全体の P C R。この戦略は、リンカー領域における変異を可能にする（これは望ましくない）。(b) 外部プライマーおよび G 4 S プライマーを別々に使用する重鎖および軽鎖の P C R であって、3 ピース相同組換えのための第 3 の重複点として G 4 S リンカーを使用する。この戦略は、変異からリンカーを保護するが、2 ピースよりも効率が低い可能性がある 3 ピース相同組換えを必要とする。

【0217】

両方の技術を様々な量の鋳型 DNA で使用した。全 s c F v P C R の鋳型は、P 4 - B 3 がクローニングされた p C T C O N 4 ベクターである（約 1 / 10 の鋳型が標的配列である）。重鎖／軽鎖の別々の P C R の鋳型は、P 4 - B 3 P C R 断片である（約 1 / 2 鋳型が標的配列である）。

【0218】

使用した鋳型 - 全 s c F v の P C R : 4 u g , 2 u g , 1 u g , 0 . 5 u g ; 重鎖／軽鎖の別々の P C R : 4 5 0 n g , 5 0 n g （各 2 回反応）。

【0219】

* P C R を 3 3 サイクル実行して、DNA 収量を増加させた。

【0220】

ライブラリの生成

Benatuil et al, 「An improved yeast transformation method for the generation of very large human antibody libraries」, Protein Eng Des Sel. 2010 Apr ; 23 (4) : 155 - 9 . に記載されているプロトコルに従った。

【0221】

一般的なプロトコル : E B Y 1 0 0 酵母細胞を 1 0 0 m l の Y P D 培地に O D 6 0 0 = 0 . 3 で接種し、O D 6 0 0 = 1 . 6 になるまで 3 0 ° C で約 5 ~ 6 時間増殖させた。細胞を遠心分離によって収集し、5 0 m l の冷 d d H 2 O で 2 回洗浄し、5 0 m l の冷エレクトロポレーション緩衝液（1 M ソルビトール / 1 m M C a C l 2 ）で 1 回洗浄した。次いで、2 0 m l の 0 . 1 M L i A c / 1 0 m M D T T 中、3 0 ° C で 3 0 分間振盪することによって、細胞を馴化させた。細胞を回収し、5 0 m l の冷エレクトロポレーション緩衝液で洗浄した。ペレット化した後、細胞を再懸濁して、2 回の形質転換に適した最終容量 1 m l とした。

【0222】

全 s c F v P C R : 4 . 8 u g のインサートが得られ、4 u g の線状化ベクター（N c o I / B a m H I ）と混合した。

【0223】

H / L 鎖 P C R : 4 . 1 u g の H C と 3 . 5 u g の L C が得られ、3 u g の線状化ベクター（N c o I / B a m H I ）に減少した。

【0224】

ベクターおよび所望の断片を混合し、次いで E t O H 沈殿させて体積を減少させた（5 0 u l 未満）。4 0 0 u l のエレクトロコンピテント酵母細胞を、B i o r a d を 2 . 5 k V および 2 5 u F で使用して形質転換した。細胞を 1 : 1 の Y P D : 1 M ソルビトール中で 1 時間回収した後、細胞をスピンドウンし、S D C A A で洗浄し、各形質転換について 2 5 0 m l の S D C A A 中に再懸濁した。

【0225】

力価 : (a) 全 s c F v ライブラリ : 約 5 . 2 E 6 メンバー ; (b) 別々の H / L 鎖 : 約 5 . 8 E 6 メンバー。

【0226】

2 継代後、コロニーを配列決定のために平板培養した（ライブラリ当たり 9 6 コロニー）。全 s c F v ライブラリ : 5 6 / 9 6 (5 8 . 3 3 %) は、少なくとも 1 つの変異を有していた。別々の H / L 鎖ライブラリ : 4 2 / 9 6 (4 3 . 7 5 %) は、少なくとも 1 つ

10

20

30

40

50

の突然変異を有していた。

【0227】

有効ライブラリーサイズ：(a) 全 s c F v ライブラリ：約 2.9×10^6 メンバー；(b) 別々の H / L 鎖：約 2.1×10^6 メンバー。

【0228】

ライブラリの選別戦略

2つの染色方法を使用した：(1) 改善された結合を探す標準染色（FACS分析中の右上四分円へのシフト）；および(2) 改善されたオフ速度を探す動的戦略。

【0229】

動的染色において、ライブラリを K_d の10倍の濃度の標識抗原で染色し、洗浄してから、容量を増やして K_d の100倍の濃度の非標識抗原でインキュベートする。サンプルを大量にインキュベートすると、解離する抗原が酵母と再結合できなくなる。さらに、より高い濃度の非標識抗原を付加することは、遊離した任意の標識抗原が非標識抗原で置換されることを意味する。

【0230】

動的染色において、染色時間は時定数 (τ) に依存する。

$$\tau = (k_{on} [Ag]_0 + k_{off})^{-1}$$

【0231】

式中、 k_{on} = オン速度 ($M^{-1} s^{-1}$)； k_{off} = オフ速度 (s^{-1})；および $[Ag]_0$ = 初期抗原濃度 (M) である。

【0232】

オクテット測定から、P4-B3 s c f v は、 $k_{on} = 6.85 \times 10^4$ 、 $k_{off} = 6.45 \times 10^{-5}$ 、 $K_d = 9.4 \times 10$ を有する。

【0233】

平衡結合の95%での結合は 3τ であり、99%での結合は 5τ である。

【0234】

染色プロトコルは、Cherf and Cochran, 「Applications of Yeast Surface Display for Protein Engineering」, Methods Mol Biol. 2015; 1319: 155-75 に従って実施した。

【0235】

簡潔には、高親和性タンパク質変異体を、FACSによって酵母ディスプレイライブラリーから単離した。遺伝子ライブラリーでの酵母細胞の形質転換および表面発現の誘導に続いて、2つの主要な戦略を使用して、スクリーニングの前にディスプレイされたライブラリを差次的に標識する：(1) 平衡結合戦略（ここで、ライブラリは、最も高い親和性の変異体の予想される K_D 値よりも5~10倍高いリガンド濃度でインキュベートして、密接な結合変異体がほぼ飽和し、より弱い親和性の変異体が平衡で部分的に標識される）、および(2) 動的結合戦略（ここで、ライブラリは、平衡結合戦略について記載されるようにリガンドとともにインキュベートされるが、結合していないリガンドは、洗浄によって除去され、次いで、ライブラリは、100倍過剰の非標識リガンドとともにインキュベートされるか、または解離したリガンドの再結合を防止するために十分に大量の緩衝液中でインキュベートされる。

【0236】

この第2のインキュベーション工程中、過剰な非標識リガンドまたは大きなインキュベーション体積は、解離した標識リガンドが再結合するのを防止する。したがって、タンパク質は、それらの解離速度定数 (k_{off}) に基づいて区別され、最も遅い k_{off} を有する変異体が、予め結合した標識リガンドの最大パーセンテージを保持する。蛍光標識された抗エピトープタグ抗体の添加により、結合による酵母表面発現レベルの正規化が可能になり、FACSによって最も親和性の高い変異体を単離できるようになる。酵母クローンの選別されたプールは、分析またはその後の選別のいずれかのために培養中に拡大する

10

20

30

40

50

ことができ、またはこれらのクローンからのDNAを単離し、変異誘発に供し、さらなるタンパク質進化のために酵母の新しいバッチを形質転換するために使用することができる。Aga1p、Aga2p、HAおよびc-mycエピトープタグ、ならびに図17に示される検出抗体などの酵母ディスプレイプラットフォームの構成要素は、明確にするために省略される。

【0237】

ライブラリ選別

ライブラリをSony SH800上で選別し、サンプル当たり約1000個のクローンを回収した。結合が増加したクローンと減少したクローンについて、サンプルを選別した（重要な残基はマッピングされている）。選別された細胞を平板培養し、数ダースのみが増殖し、その全てを配列決定した。標準および動的染色を用いて別々のH/L鎖ライブラリに焦点を合わせた。

クローン	変異点
HL 動的-1	CDRH1
HL-2	FW3/CDRL3
HL-7	CDRL2
HL-10	CDRL2
HL-14	CDRH3

【0238】

選別した細胞をSDCAAプレート上に播種し、30℃で3日間インキュベートした。次にコロニーを採取し、新鮮なSDCAA培地中で増殖させ、配列決定して重要な変異を同定した。次に配列決定からの固有のクローンを新鮮なSGCAA中に接種し（ガラクトースによる誘導）、36時間後にサンプルを染色して結合曲線を作成した。

【0239】

EBY100酵母培養物を30℃で1.5日間誘導した。1E6細胞を遠心沈降させ、PBS中の様々な希釈度の抗原を含むウェルに入れた。プレートを振盪しながら室温で2時間インキュベートした。プレートをPBSで洗浄し、0.1ug/mlのストレプトアビジン-APC（biolegend）を各ウェルに付加した。プレートを振盪しながら室温で25分間インキュベートし、次いで洗浄し、FACSキャリバーで読み取った。

【0240】

クローン2、7、10、14は、P4-B3（抗PD1）のランダム変異誘発ライブラリに由来し、より高い結合について選別した（y=x軸上にシフトさせた）。HLクローンを、リンカー配列を介した相同組換えによって組換えられる前に、H鎖およびL鎖のエラープローンによって別々に生成した。HL 動的1は、ライブラリを10×Kdの標識抗原と共にインキュベートした後、元の染色体積の10倍の100倍過剰の非標識抗原と共に長時間インキュベートする、動的染色アプローチに由来した。P4-B3 野生型は、この段階で陽性ではなかったが、ポップアップしたライブラリ中のクローンはわずかであった（図20を参照のこと）。適切な濃度で実験を繰り返し、曲線を左にシフトさせたクローンのみを使用した（図21を参照のこと）。

【0241】

同定されたがまだ特徴付けられていない他のクローン

10

20

30

40

50

s c F v	陽性	1	なし
s c F v	陽性	2	終止コドン
s c F v	陽性	3	CDRH1、FWL3、リンカー
s c F v	陽性	6	CDRL1、FWL3
s c F v	陰性	1	CDRH2
s c F v	陰性	2	FWH3
s c F v	陰性	3	CDRL3のins、CDRH3のmut
s c F v	陰性	4	CDRH3/CDRL3
s c F v	陰性	6	FWL3

10

【0242】

s c F v 陽性は、主により少ない量の c M y c を発現するが、より多い量の P D - 1 を結合することによって、いくらか増加した結合を示したクローンである（いずれも x = y 軸上で上方にシフトしなかった）。

【0243】

s c F v 陰性は、野生型と比較して結合の減少を示したクローンである。

【0244】

ミニボディベクターへの H L k i n 1、H L - 7、H L - 14 のクローニングに加えて、2重 (M u t + 2 : H L k i n 1 + H L - 7) および3重 (M u t + 3 : H L k i n 1 + H L - 7 + H L - 14) 組合せ変異体を作製して、相加的効果が観察されるかどうかを確認した (図23および図24を参照のこと)。

20

【0245】

例えば、以下の K_D が測定されている：

P D 1 # 3 約 1 E - 10 M

P 4 - B 3 野生型 約 1 E - 9 M

M u t + 2 (H L k i n 1 + H L - 7) 約 3 E - 11 M

M u t + 3 (H L k i n 1 + H L - 7 + H L - 14) 約 3 E - 12 M

H L k i n - 1 約 6 E - 11 M

30

【0246】

実施例10-I g Gを用いたP D 1バイオアッセイ

P r o m e g a P D 1 - P D L 1 バイオアッセイ (J 1 2 5 0) を、本発明の P D - 1 抗体 (例えば、P 4 - B 3 および本明細書に記載される変異体) ならびに市販の抗体ペムブロリズマブおよびニボルマブを用いて行った (図33)。

【0247】

N i v o (緑色三角形) は、約5～6の誘導倍率に達し、これは以前の実験と同様である。s c F v - F c 実験において、M u t + 2、M u t + 3、H L k i n - 1 および H L - 7 は全て、N i v o と比較して増加した誘導を示した。I g G に変換された場合、コンボ変異体 (M u t + 2 / M u t + 3) は、N i v o よりも良好に、かつ P e m b r o と同等のレベルで機能し続け、一方、単一 (H L k i n - 1 / H L - 7) は、わずかに減少した活性を示す。元の P 4 - B 3 I g G は、全ての抗体のものより有意に低い。クローン s c F v - 6 は、酵母ライブラリから得られた二重変異体であり、2つの軽鎖変異を有する。見られるように、これは P 4 - B 3 野生型に対する改善であるが、市販の抗体および他の変異体抗体よりも有意に悪い。

40

【0248】

実施例11-混合リンパ球反応 (M L R) プロトコル

C D 14 + 単球を、M i l t e n y i C D 14 + マイクロビーズを使用して単離した。細胞を、M i l t e n y i M o - D C 培地 (G M - C S F + I L 4 を含む予め調製し

50

た培地) 中で培養した。細胞を5日間培養した後、 $\text{TNF-}\alpha$ (1000 U/ml)、 $\text{IL-1}\beta$ (5 ng/ml)、 IL-6 (10 ng/ml)、およびプロスタグランジン E_2 (PGE_2) ($1\text{ }\mu\text{M}$) を付加し、細胞を2日間培養してDCを成熟させた。T細胞をMLR実験の日に単離した($\text{CD4}+$ 陰性選択キット StemCell)。MLRにおいて、1ウェル当たり100,000個のT細胞および10,000個のMoDC細胞を使用した。抗体を様々な濃度で添加し、培養物を5日間インキュベートした。

【0249】

上清をELISAスクリーニング(例えば、 IL2 および $\text{IFN}\gamma$)のために保存した。FACS分析のために、細胞を CD4-FITC 、 PD1-PE 、 LAG3-BV421 、 TIM3-APCCy7 で染色した。

10

【0250】

MLR Pembro対 $\text{P4-B3mut}+3$ IgG4 。2つのT細胞ドナーおよび2つのDCドナーを使用した。図42および43のグラフの表題は、測定されたサイトカイン、T細胞ドナー、およびDCドナーを示す。 IL2 T2 DCV 未処理は、 IL2 アッセイ、T細胞ドナー2、DCドナーVに対応する。

【0251】

sIgG4 型の $\text{P4-B3mut}+3$ 抗体を、ペムブロリズマブおよび F10-sIgG4 の市販の調製物(陰性対照)に対して試験した。図42および43に示されるように、 $\text{P4-B3mut}+3$ またはペムブロリズマブのいずれかの付加は、 F10 のものと比較してサイトカイン産生の有意な増加をもたらす。

20

【0252】

同等物

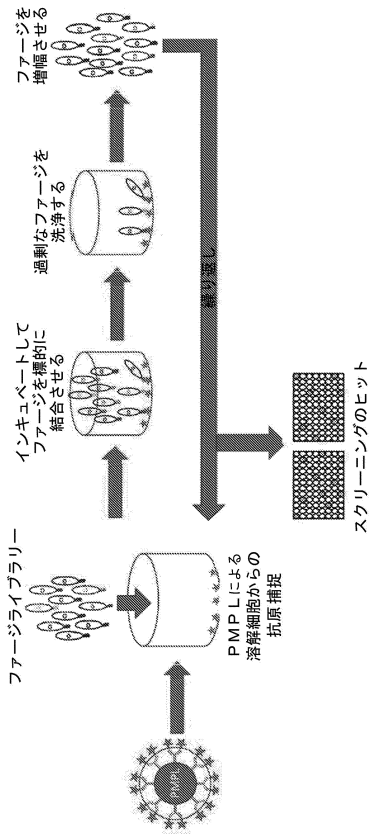
当業者であれば、ルーチンの実験以上のものを使用せずに、本明細書に具体的に記載された特定の物質および手順に対する多数の同等物を認識するであろう、または確認できるであろう。そのような同等物は、本発明の範囲内であると考えられ、以下の請求項によってカバーされる。

30

40

50

【図面】
【図 1】



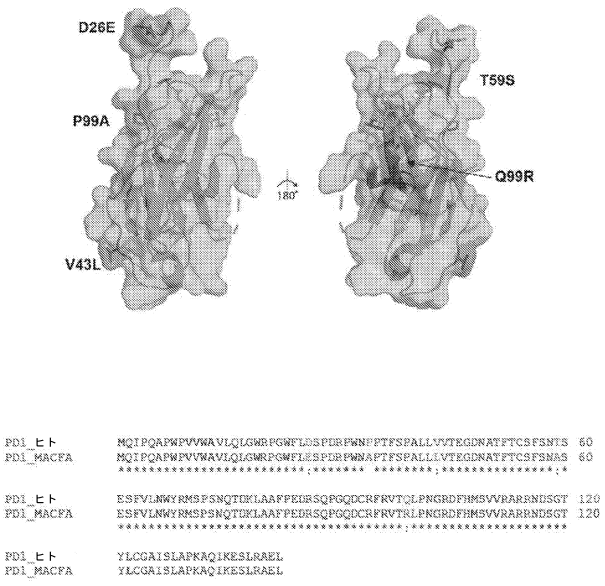
【図 2 - 2】

FR3-IMGT (66-104)	CD3-IMGT	FW4-IMGT
70 80 90 100		
..... GYADSVK.GFTTISRDNAKNSLYIQNSIRREDTALTYICAKD GYADSVK.GFTVSDNAKNSLYIQNSIRREDTAVVYC ASDYGDYKYVYGMV NCKGTITVYSS		
FR3-IMGT (66-104)	CD3-IMGT	FW4-IMGT
70 80 90 100		
..... QRESGVP.DFESGK..SGTSASISGLQSEDEADYYC AAWDSING QRESGVP.DFESGK..SGTSASISGLQSEDEADYYC AAWDSINGVFGGKTIIVL		

【図 2 - 1】

P4B3 (抗PD1)									
重鎖					軽鎖				
V-遺伝子	J-遺伝子	D-遺伝子	V-遺伝子	J-遺伝子	V-遺伝子	J-遺伝子	D-遺伝子	V-遺伝子	J-遺伝子
HV3-9*01 F	HJ04 F	HD4-17*01 F	LV14*01 F	L13*02 F					
1	10	20	30	40	50	60			
M99651 Homsap IGHV3-9*01 F	FRL-IMGT (1-26)	CDRL-IMGT (27-38)	FR2-IMGT (39-55)	CDR2-IMGT (56-65)					
P4-B3 HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGTFE...DDYA MHVRQAPGKGLWVSG ISWN..SGSI	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCLASGTFE...DDYA MHVRQAPGKGLWVSG ISWN..SGSI							
1	10	20	30	40	50	60			
Z73654 Homsap IGHV1-4*01 F	FRL-IMGT (1-26)	CDRL-IMGT (27-38)	FR2-IMGT (39-55)	CDR2-IMGT (56-65)					
P4-B3	QSVLTQPPS.ASGTPQQRVITISCSGSSNI...GSNT VNVYQQLPGTAPKLIY SN.....N	QVQLTQPPS.ASGTPQQRVITISCSGSSNI...GSNT VNVYQQLPGTAPKLIY SN.....N							

【図 3 - 1】



10

20

30

40

50

【図 3 - 2】

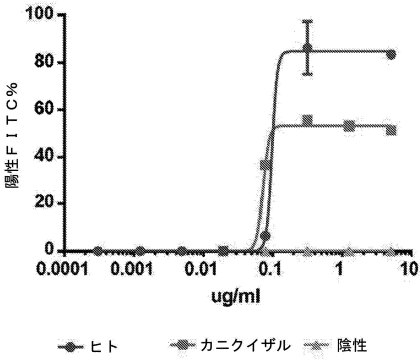


【図 4】

EC50 (ug/ml)	対ヒト PD1	対カニクイザル PD1
P4#B3	0.097	0.072

PD1

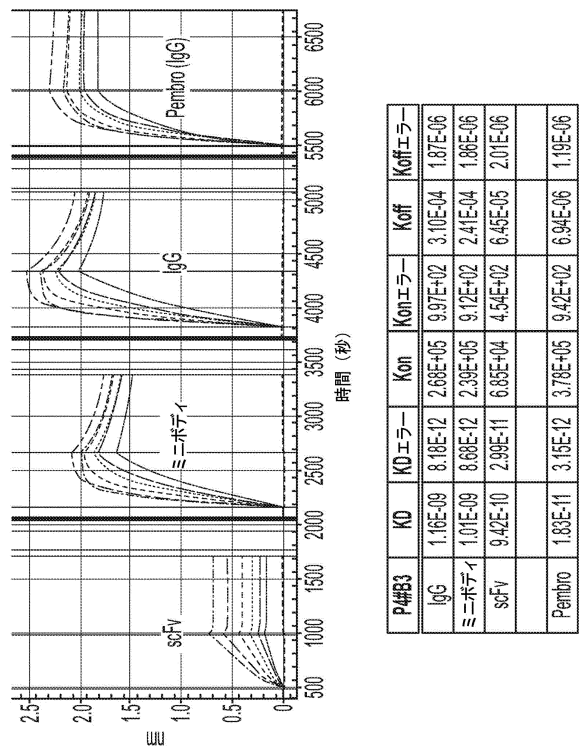
P4-B3



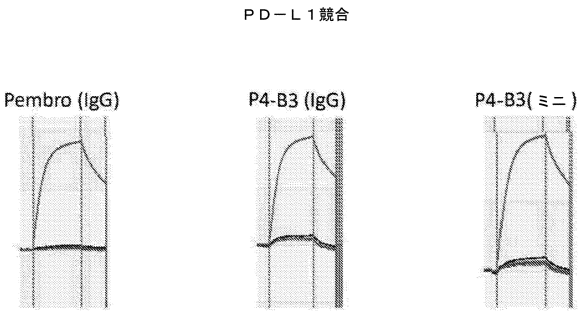
10

20

【図 5】



【図 6】

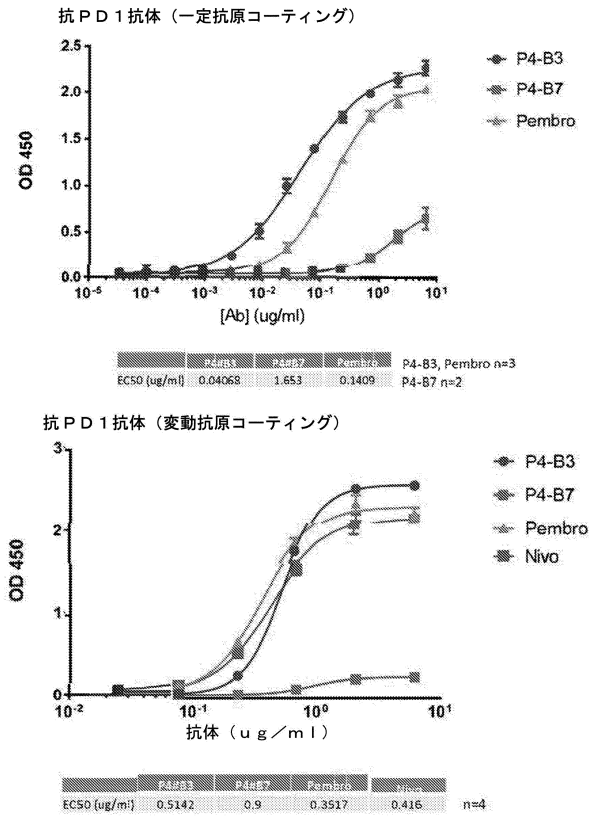


30

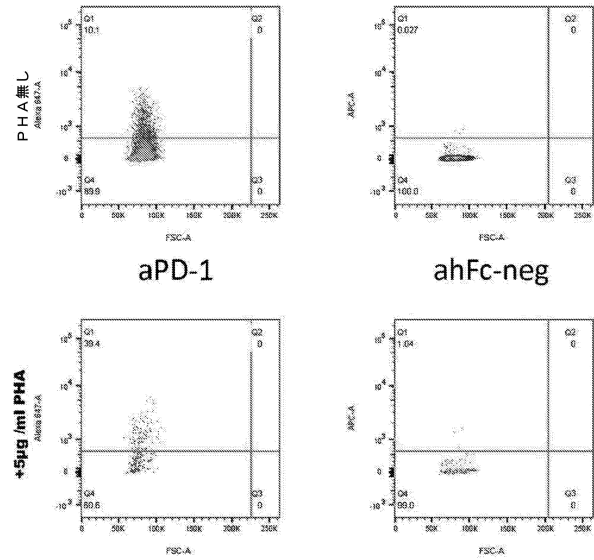
40

50

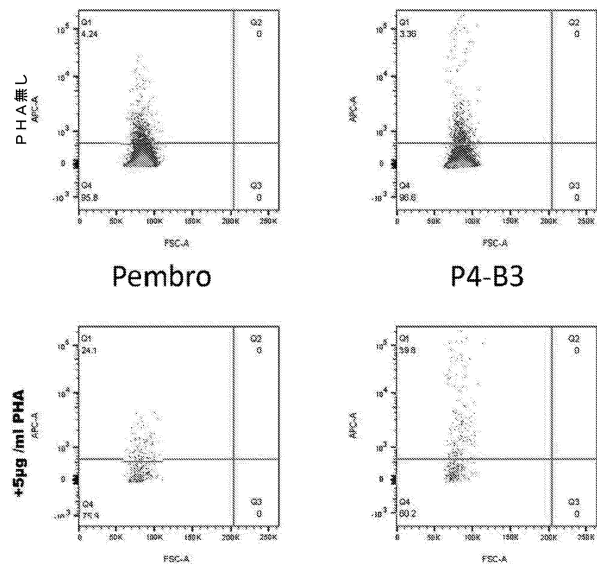
【図 7】



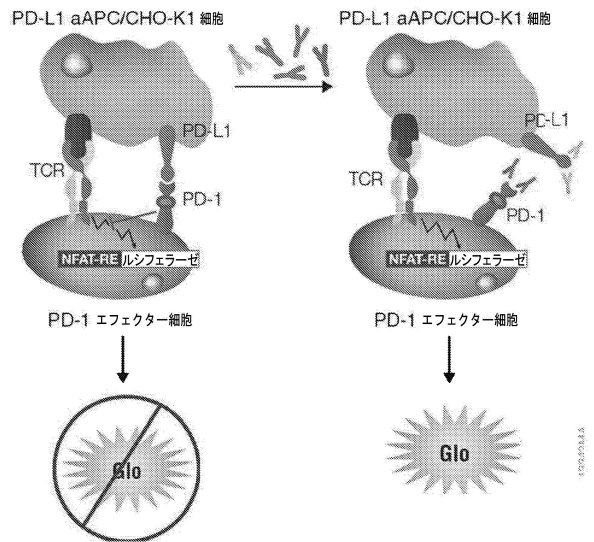
【図 8 - 1】



【図 8 - 2】



【図 9】



10

20

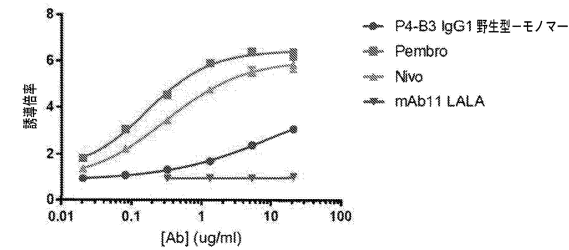
30

40

50

【図 10 A】

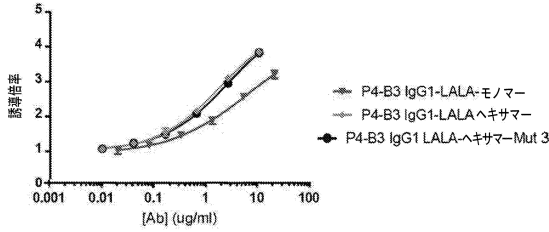
P4-B3対PembroおよびNivo（誘導倍率）



(ug/ml)	P4-B3 IgG1野生型-モノマー	Pembro	Nivo
EC50	8.688	0.1622	0.2973

【図 10 B】

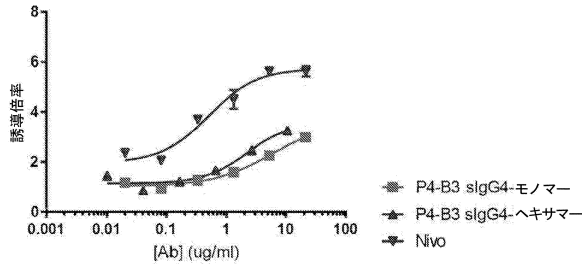
ヘキサマー比較（誘導倍率）



(ug/ml)	P4-B3 IgG1-LALA-モノマー	P4-B3 IgG1-LALAヘキサマー	P4-B3 IgG1 LALAヘキサマー-Mut 3
EC50	5.718	1.596	2.499

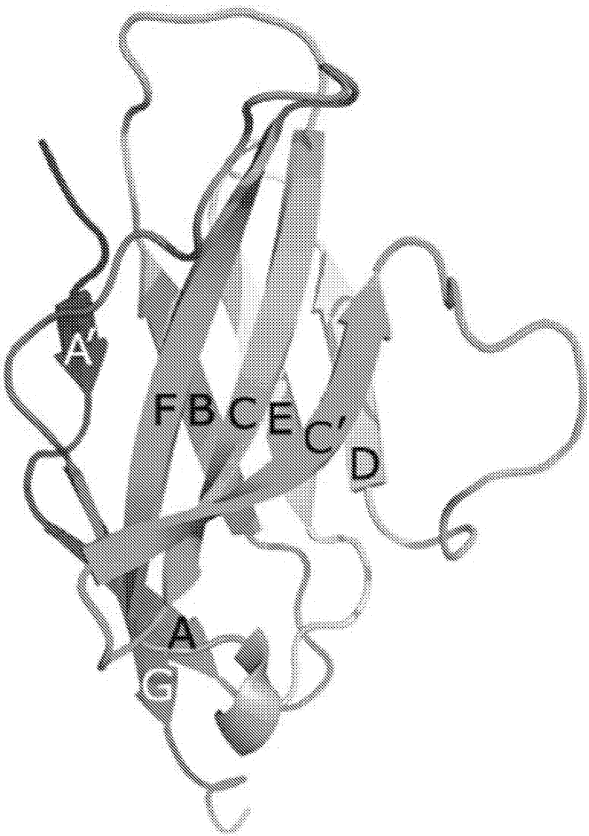
【図 10 C】

I g G 4 比較（誘導倍率）



(ug/ml)	P4-B3 sIgG4-モノマー	P4-B3 sIgG4-ヘキサマー	Nivo
EC50	5.173	2.051	0.483

【図 11】



10

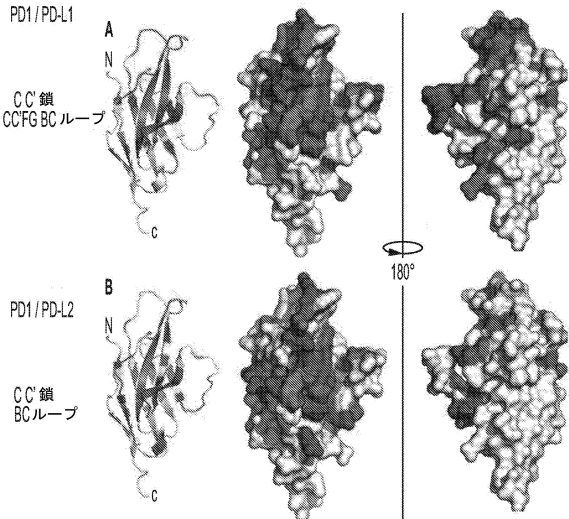
20

30

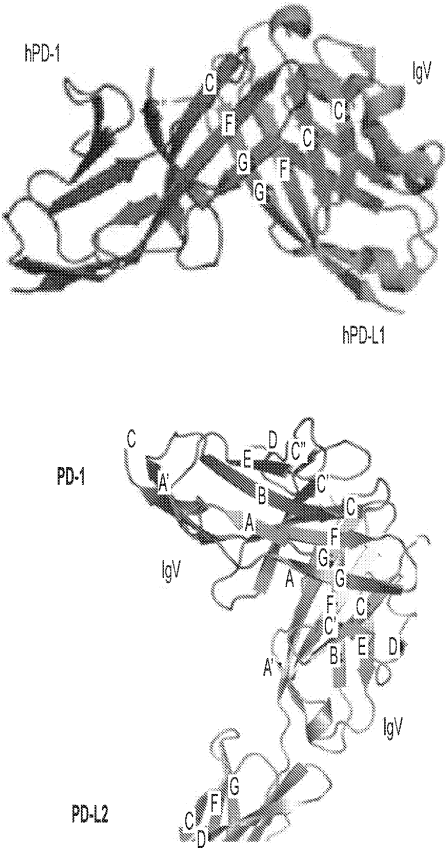
40

50

【図 1 2 - 1】



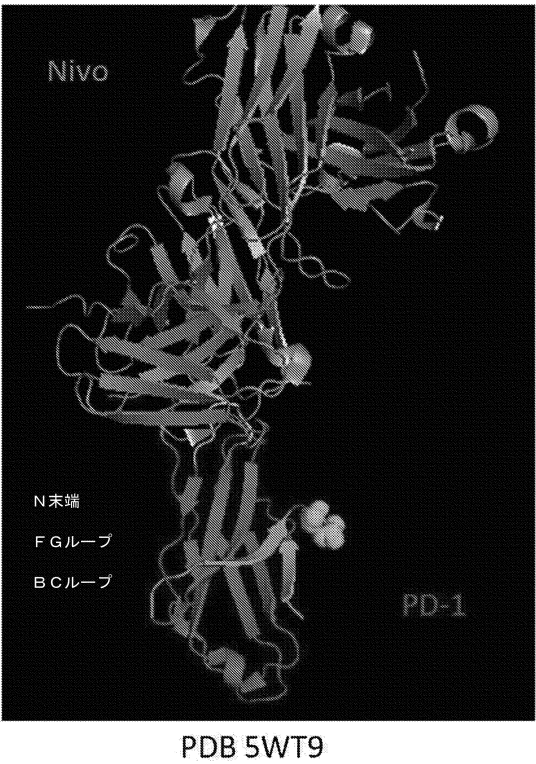
【図 1 2 - 2】



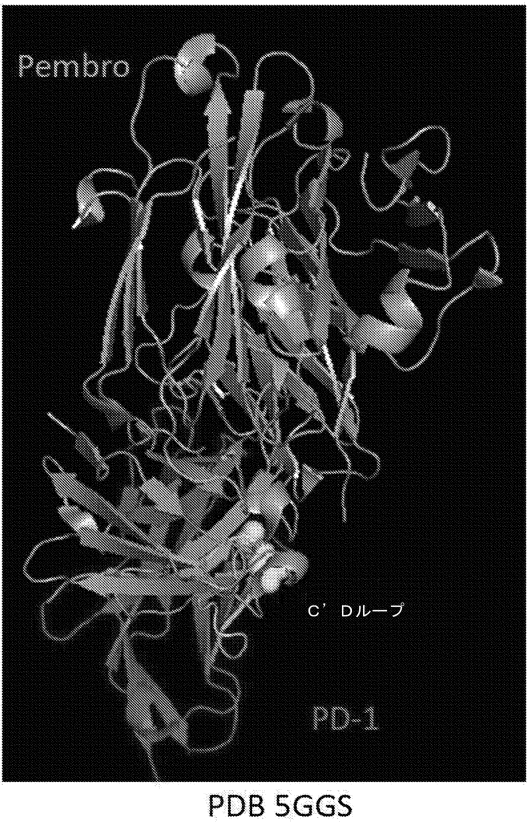
10

20

【図 1 3 - 1】



【図 1 3 - 2】

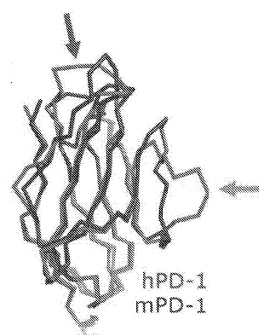


30

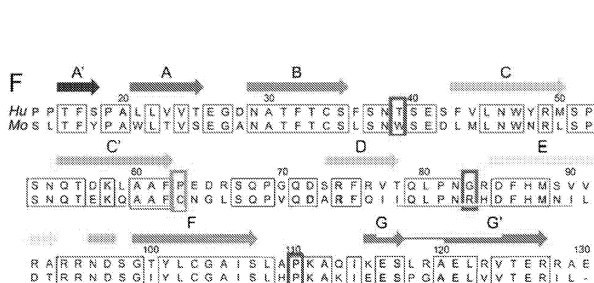
40

50

【図 15】

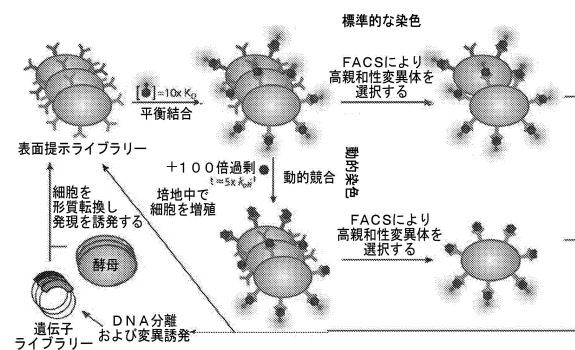


10



20

【図 17】

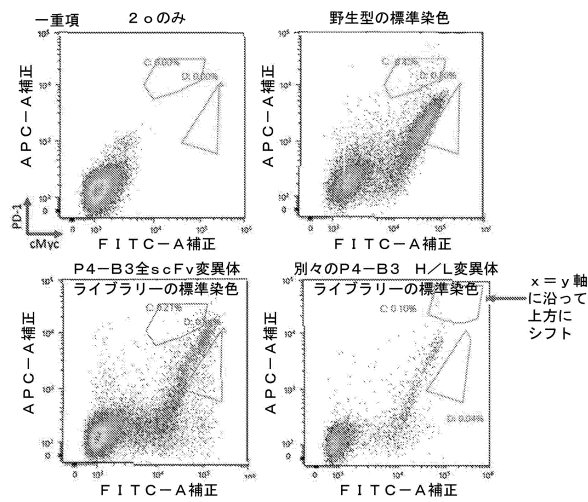


30

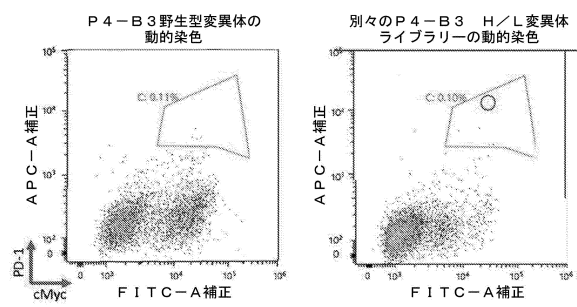
40

50

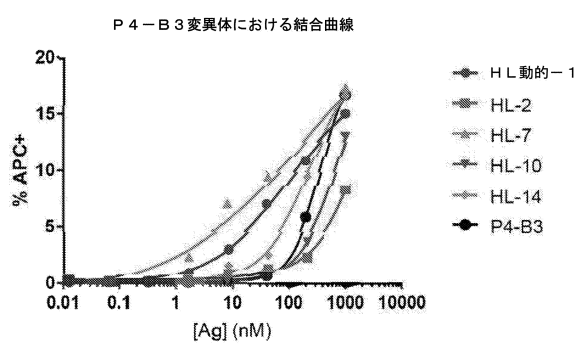
【図 18】



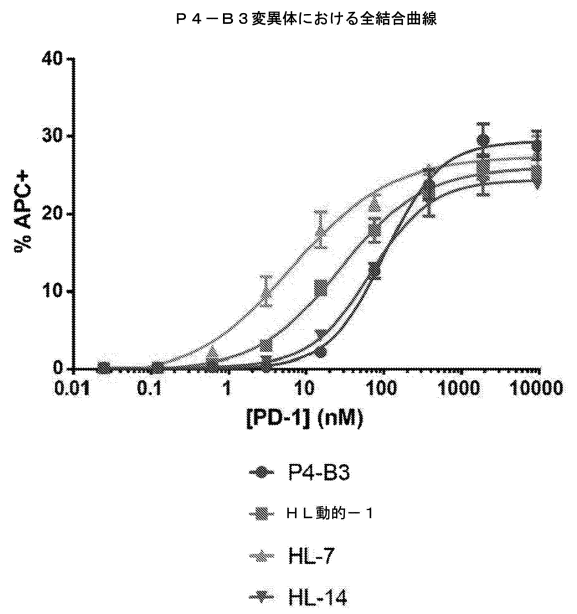
【図 19】



【図 20】



【図 21】



nM	P4-B3	HL 動的-1	HL-7	HL-14
EC50	101.4	26.97	6.555	67.04

10

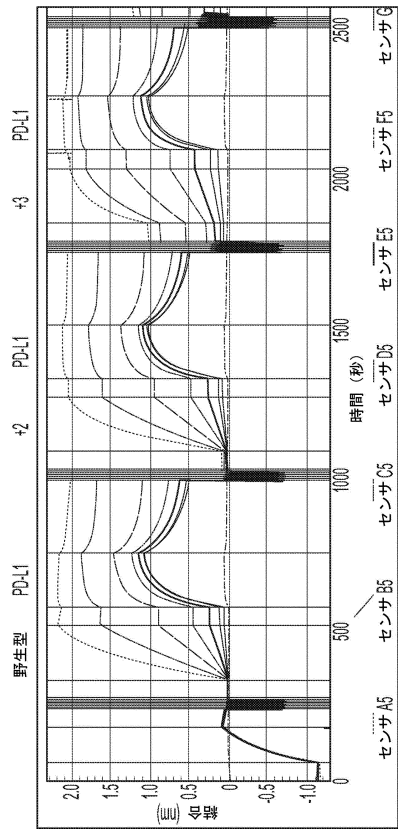
20

30

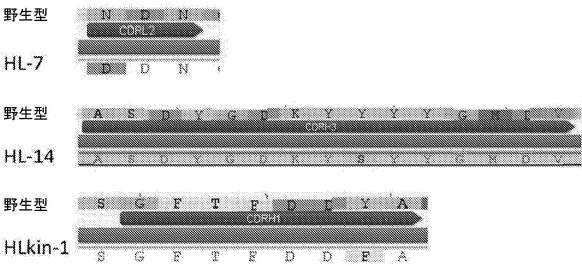
40

50

【図 2 4】



【図 2 5】



【図 2 6 - 1】

重鎖:	FR1-IMGT (1-26)	CDR1-IMGT (27-38)	FR2-IMGT (39-55)	CDR2-IMGT (56-65)
M29811 Homsap IGHV4-01*01 F PD1#2	1 10 20 30 40 50 60 QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTWS GGSYS..SGSY NSMIRPPGKGLIEWIGY IYYS...GST QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTWS GGSYS..SGSY NSMIRPPGKGLIEWIGY VYIN...GNT			
M99641 Homsap IGHV1-18*01 F PD1#3	1 10 20 30 40 50 60 QVQLVQSGA.EVKPQGSIVKVSCTAS GTTF...TSYG ISWIRQAPGGLIEWMGN ISAY...NGNT QVQLVQSGA.EVKPQGSIVKVSCTAS GTTF... NRFG LITWIRQAPGGLIEWMGN INPY...NGNT			
AC244456 Homsap IGHV3-30*01 F PD1#13	1 10 20 30 40 50 60 QVQLVESGG.GVQPGSRISLSCAAS GTTF...SSYA MHWIRQAPGGLIEWAV ISYD.GSNK EVQLVQSGG.GVQPGSRISLSCAAS GTTF...SSYA MHWIRQAPGGLIEWAV ISYD.GSNK			

【図 2 6 - 2】

FR3-IMGT (66-104)	CDR3	FW4
70 80 90 100 NNPESLK.SRVTISVDTSKNQPSLKLSSVTAADFAVYIC AR NNPESLN.SRVTISVDTSKNQPSLKLSSVTAADFAVYIC ATETPTSYNSPDS WGGGTLVTVSS		
70 80 90 100 NNPESLN.SRVTISVDTSKNQPSLKLSSVTAADFAVYIC AR NNPESLN.SRVTISVDTSKNQPSLKLSSVTAADFAVYIC ATETPTSYNSPDS WGGGTLVTVSS		
70 80 90 100 NNPESLN.SRVTISVDTSKNQPSLKLSSVTAADFAVYIC AR NNPESLN.SRVTISVDTSKNQPSLKLSSVTAADFAVYIC ATETPTSYNSPDS WGGGTLVTVSS		
70 80 90 100 NNPESLN.SRVTISVDTSKNQPSLKLSSVTAADFAVYIC AR NNPESLN.SRVTISVDTSKNQPSLKLSSVTAADFAVYIC ATETPTSYNSPDS WGGGTLVTVSS		

10

20

30

40

50

【圖 26-3】

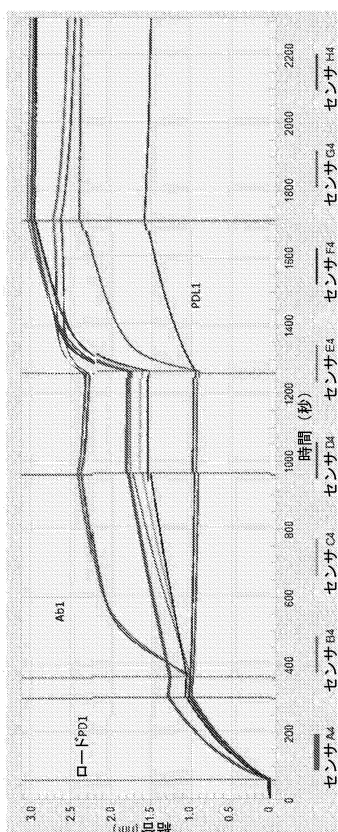
輕鎖：..

Z73676 Homsap IGLV10-54*01 F
PDI#2

Z73673 Homsap IGLV6-57*01 F
PD1#3

DD87007 Homsap IGLV3-21*02 F
PD1#13

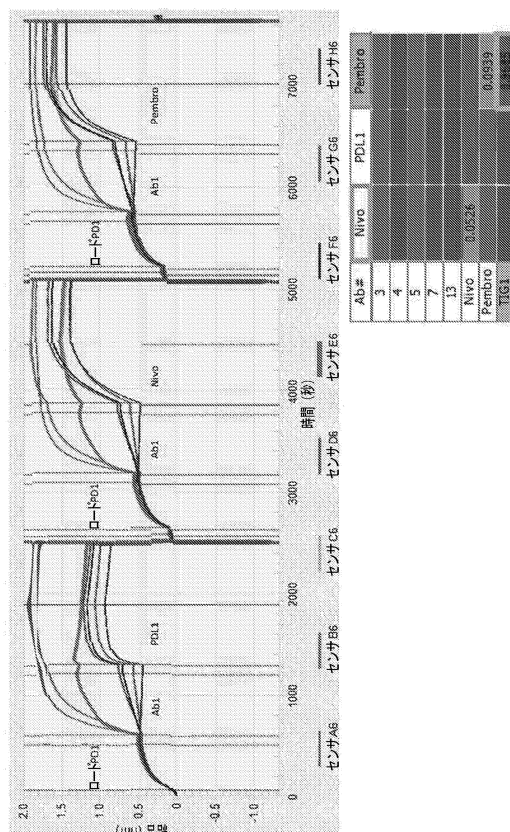
【図 27】



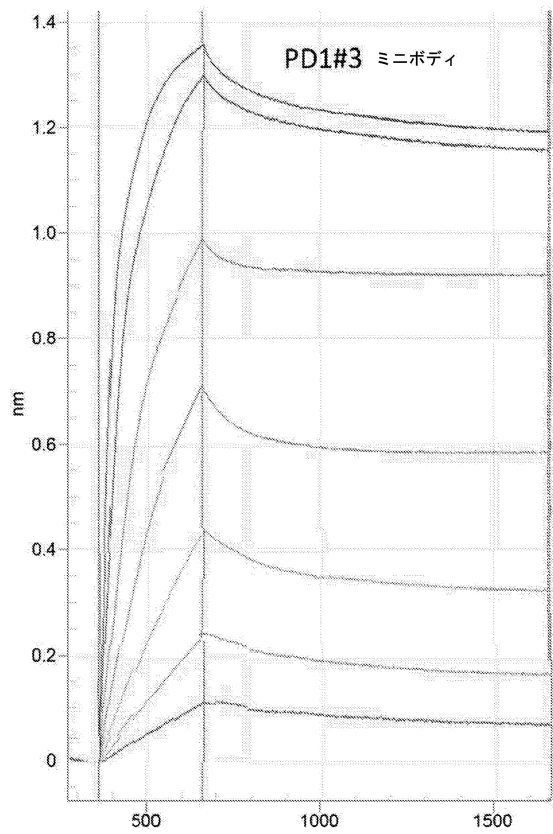
【圖 26-4】

[illegible]

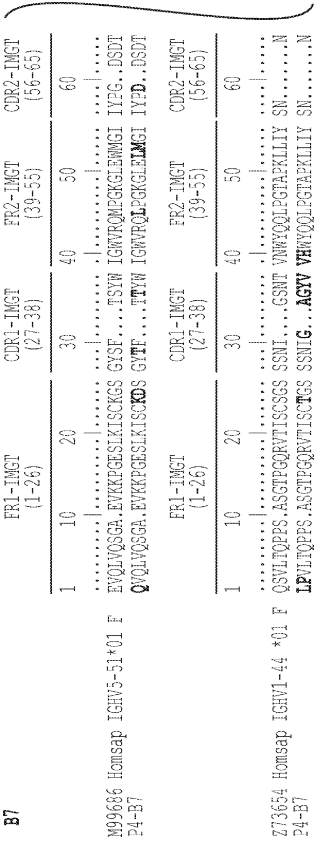
【圖 28】



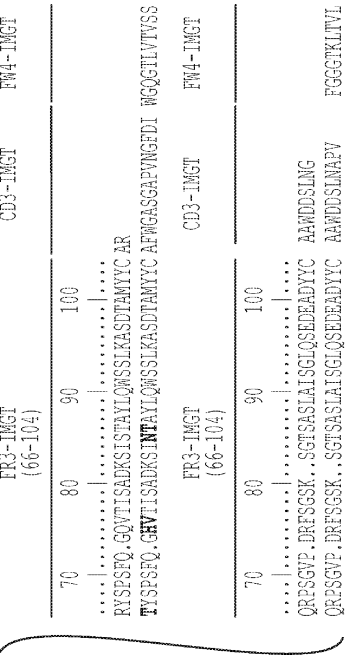
【図 2 9】



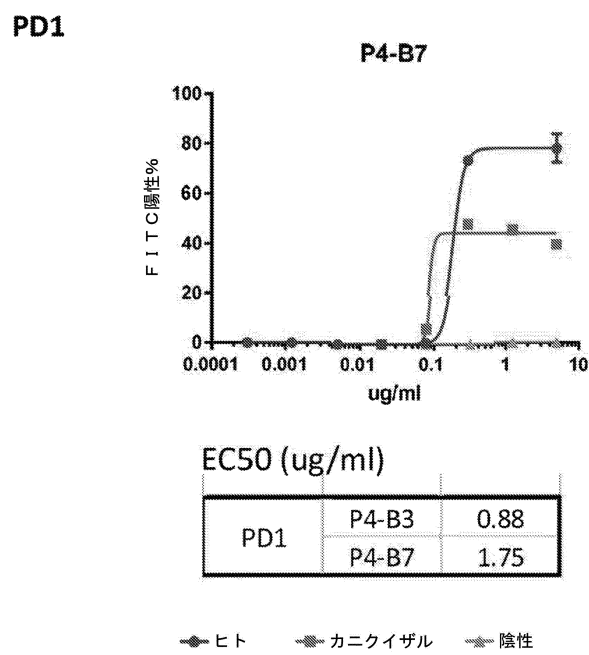
【図 3 0 - 1】



【図 3 0 - 2】



【図 3 1】



10

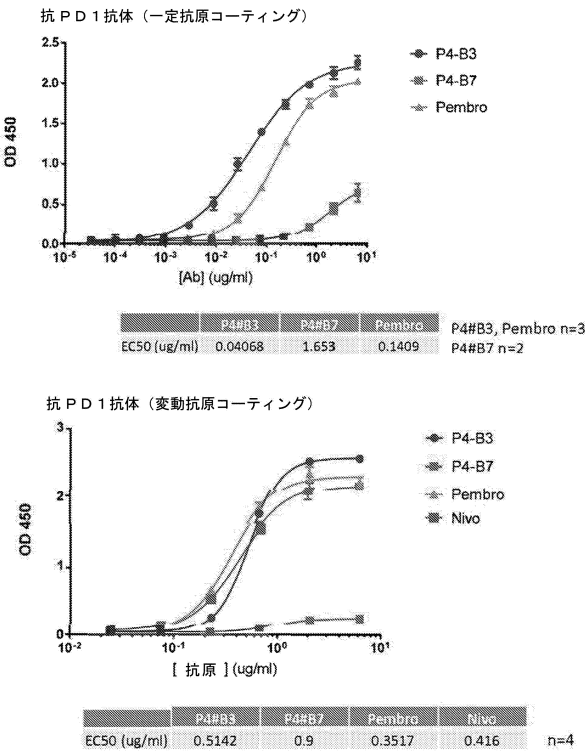
20

30

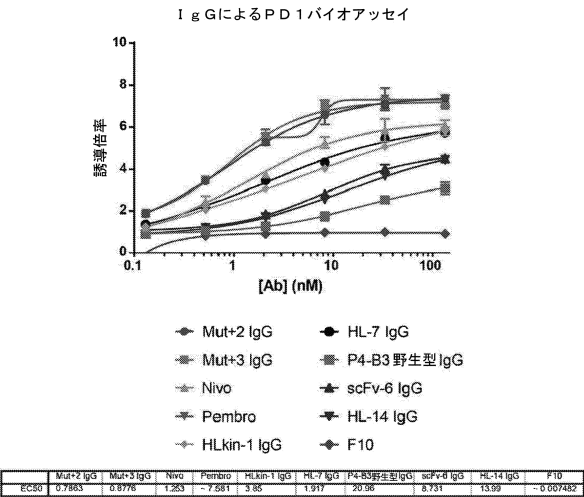
40

50

【図 3 2】



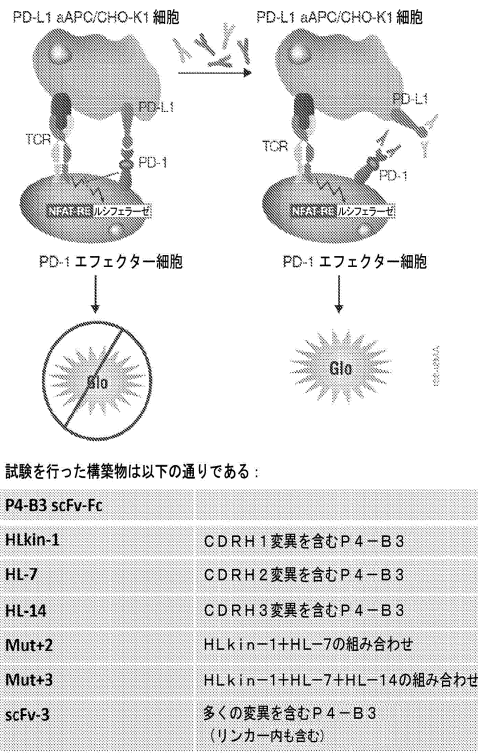
【図 3 3】



10

20

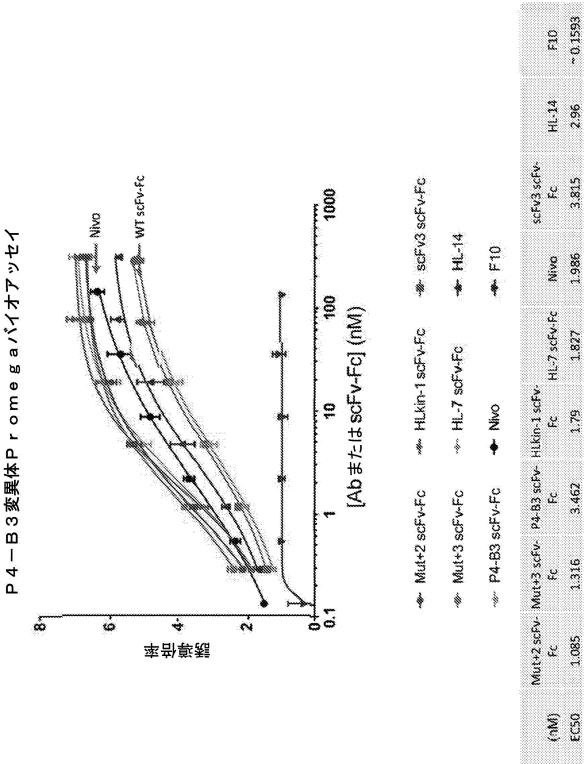
【図 3 4】



対照: F10 IgG1

誘導倍率: RLU (刺激-バックグラウンド) / RLU (Abなし-バックグラウンド)

【図 3 5】

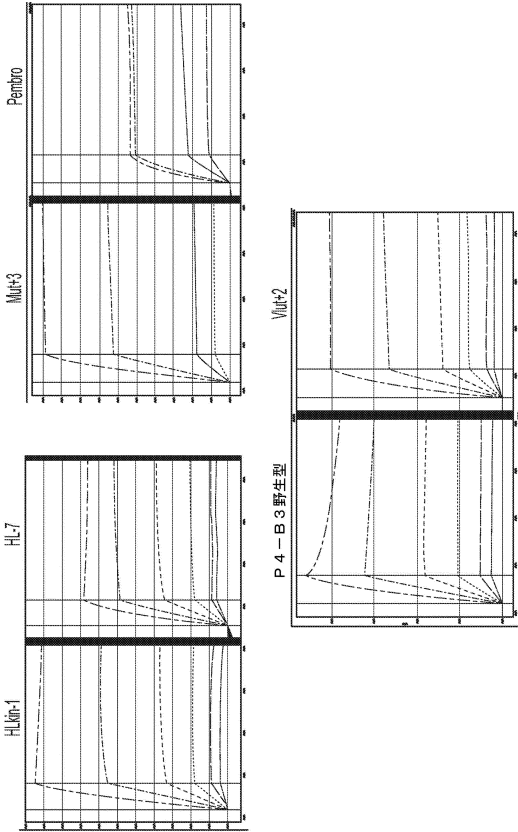


30

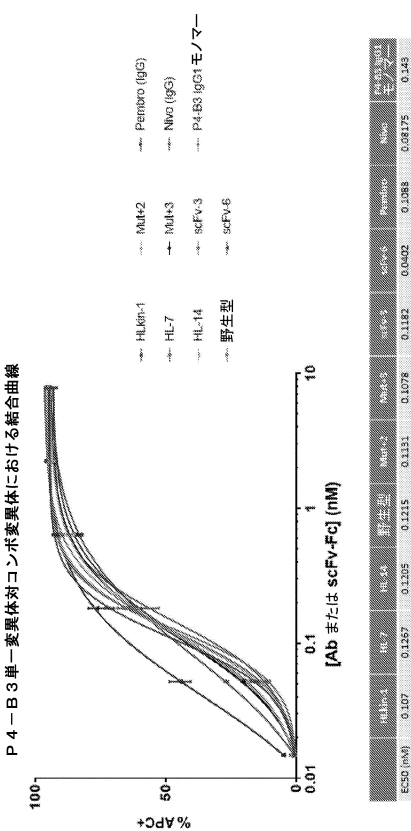
40

50

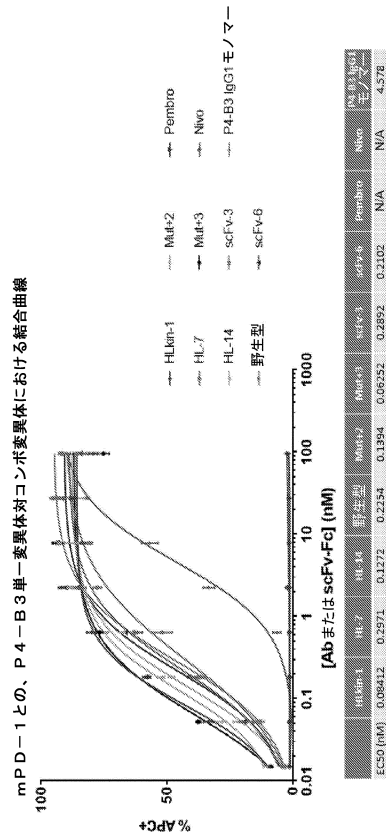
【図 3 6】



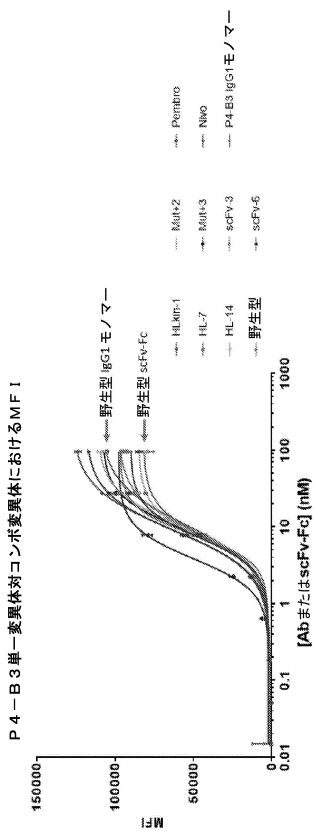
【図 3 8】



【図 3 7】



【図 3 9】



10

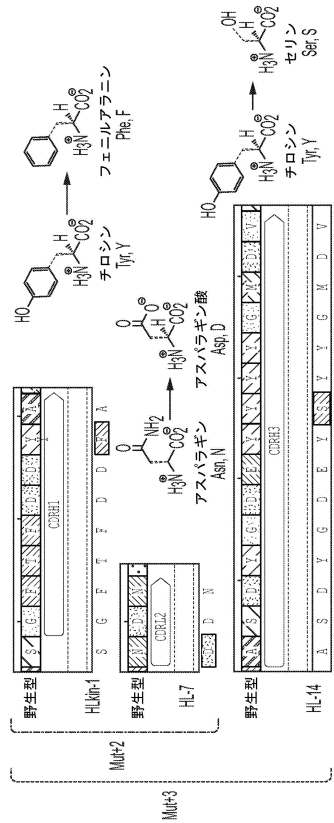
20

30

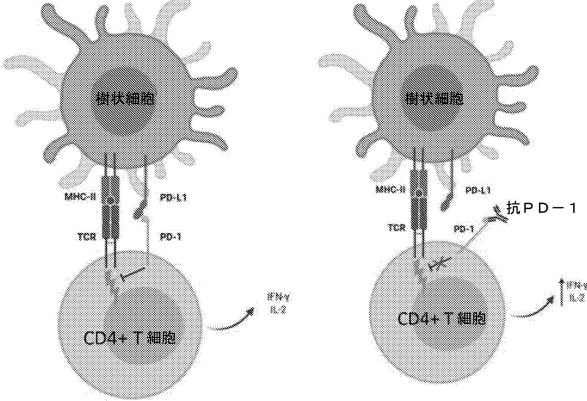
40

50

【図 4 0】



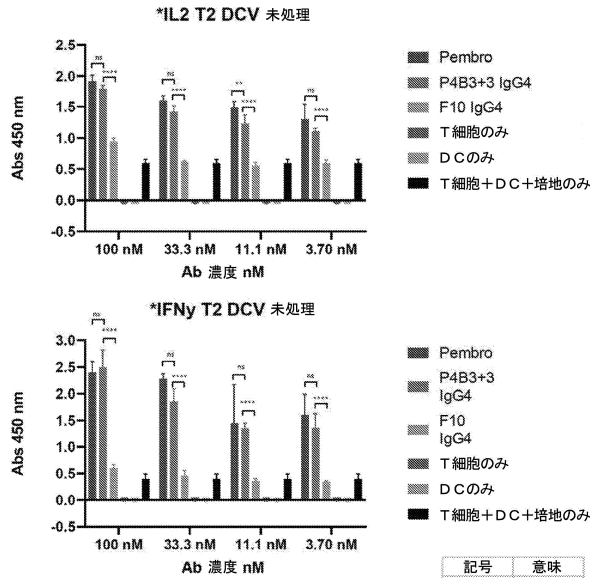
【図 4 1】



10

20

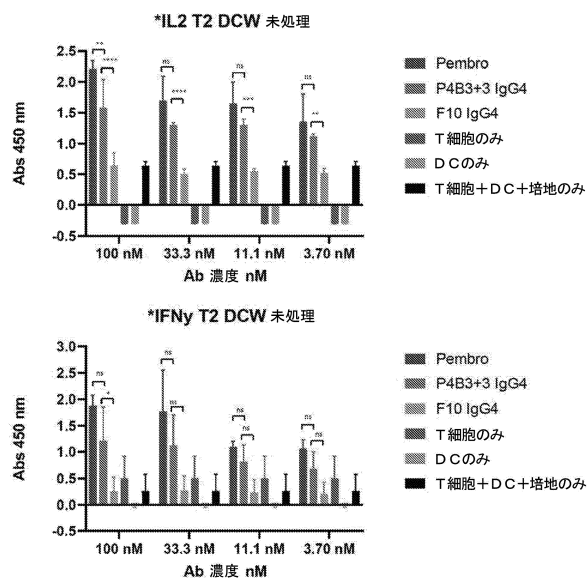
【図 4 2 - 1】



P4B3mut+3 IgG4およびF10 IgG4、並びにPembroおよびP4B3mut+3の統計的有意差を示す

記号	意味
有意でない	$p > 0.05$
*	$p \leq 0.05$
**	$p \leq 0.01$
***	$p \leq 0.001$
****	$p \leq 0.0001$

【図 4 2 - 2】

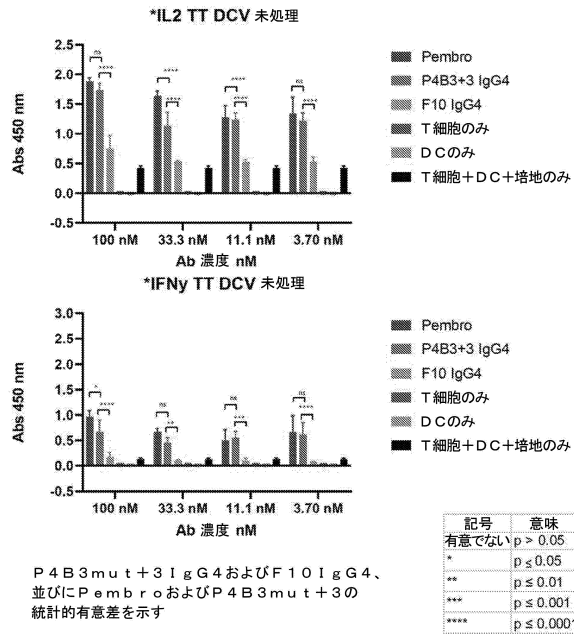


30

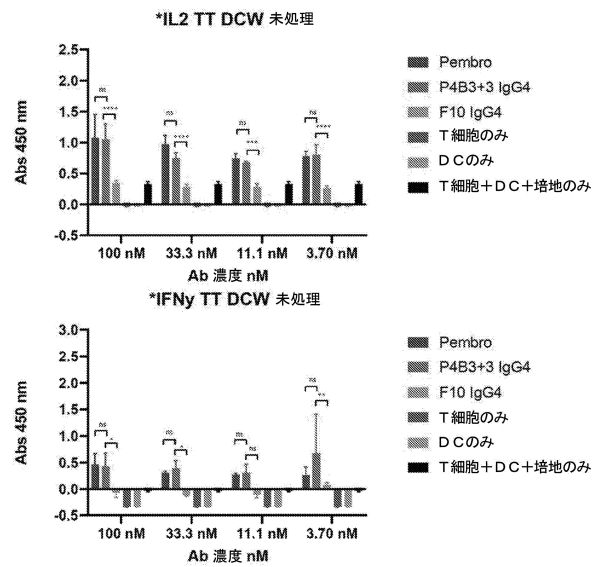
40

50

【図 4 3 - 1】



【図 4 3 - 2】



【図 4 4 - 1】

T2 DCW IL2 未処理						
100 nM	Pembro	P4B3+3IgG4	F10IgG4	T細胞のみ	DCのみ	T+DC+培地
Pembro						
P4B3+3IgG4	**					
F10IgG4	****	****				
T細胞のみ	****	****	****			
DCのみ	****	****	****	有意でない		
T+DC+培地	****	****	有意でない	****	****	
33.3 nM	Pembro	P4B3+3IgG4	F10IgG4	T細胞のみ	DCのみ	T+DC+培地
Pembro						
P4B3+3IgG4	有意でない					
F10IgG4	****	****				
T細胞のみ	****	****	****			
DCのみ	****	****	****	有意でない		
T+DC+培地	****	****	有意でない	****	****	
11.1 nM	Pembro	P4B3+3IgG4	F10IgG4	T細胞のみ	DCのみ	T+DC+培地
Pembro						
P4B3+3IgG4	有意でない					
F10IgG4	****	****				
T細胞のみ	****	****	****			
DCのみ	****	****	****	有意でない		
T+DC+培地	****	****	有意でない	****	****	
3.70 nM	Pembro	P4B3+3IgG4	F10IgG4	T細胞のみ	DCのみ	T+DC+培地
Pembro						
P4B3+3IgG4	有意でない					
F10IgG4	****	****				
T細胞のみ	****	****	****			
DCのみ	****	****	****	有意でない		
T+DC+培地	****	****	有意でない	****	****	

【図 4 4 - 2】

T2 DCW IFNy 未処理						
100 nM	Pembro	P4B3+3IgG4	F10IgG4	T細胞のみ	DCのみ	T+DC+培地
Pembro						
P4B3+3IgG4	有意でない					
F10IgG4	****	*				
T細胞のみ	****	有意でない	有意でない			
DCのみ	****	**	有意でない	有意でない		
T+DC+培地	****	*	有意でない	有意でない	有意でない	
33.3 nM	Pembro	P4B3+3IgG4	F10IgG4	T細胞のみ	DCのみ	T+DC+培地
Pembro						
P4B3+3IgG4	有意でない					
F10IgG4	****	有意でない				
T細胞のみ	****	有意でない	有意でない			
DCのみ	****	**	有意でない	有意でない		
T+DC+培地	****	有意でない	有意でない	有意でない	有意でない	
11.1 nM	Pembro	P4B3+3IgG4	F10IgG4	T細胞のみ	DCのみ	T+DC+培地
Pembro						
P4B3+3IgG4	有意でない					
F10IgG4	有意でない	有意でない				
T細胞のみ	有意でない	有意でない	有意でない			
DCのみ	**	有意でない	有意でない	有意でない		
T+DC+培地	有意でない	有意でない	有意でない	有意でない	有意でない	
3.70 nM	Pembro	P4B3+3IgG4	F10IgG4	T細胞のみ	DCのみ	T+DC+培地
Pembro						
P4B3+3IgG4	有意でない					
F10IgG4	有意でない	有意でない				
T細胞のみ	有意でない	有意でない	有意でない			
DCのみ	**	有意でない	有意でない	有意でない		
T+DC+培地	有意でない	有意でない	有意でない	有意でない	有意でない	

記号	意味
	有意でない $p > 0.05$
*	$p \leq 0.05$
**	$p \leq 0.01$
***	$p \leq 0.001$
****	$p \leq 0.0001$

10

20

30

40

50

【図 4 5 - 1】

T2 DCV IL2 未处理

100 nM	Pembro	P4B3+3IgG4	F10IgG4	T細胞のみ	DCのみ	T+DC+培地
Pembro						
P4B3+3IgG4	有意でない					
F10IgG4	***	***				
T細胞のみ	***	***	***			
DCのみ	***	***	***	有意でない		
T+DC+培地	***	***	***	***	***	
Pembro	Pembro	P4B3+3IgG4	F10IgG4	T細胞のみ	DCのみ	T+DC+培地
P4B3+3IgG4	有意でない					
F10IgG4	***	***				
T細胞のみ	***	***	***			
DCのみ	***	***	***	有意でない		
T+DC+培地	***	***	有意でない	***	***	
11.1 nM	Pembro	P4B3+3IgG4	F10IgG4	T細胞のみ	DCのみ	T+DC+培地
Pembro	**					
P4B3+3IgG4	***	***				
F10IgG4	***	***				
T細胞のみ	***	***	***			
DCのみ	***	***	***	有意でない		
T+DC+培地	***	***	有意でない	***	***	
3.70 nM	Pembro	P4B3+3IgG4	F10IgG4	T細胞のみ	DCのみ	T+DC+培地
Pembro						
P4B3+3IgG4	有意でない					
F10IgG4	***	***				
T細胞のみ	***	***	***			
DCのみ	***	***	***	有意でない		
T+DC+培地	***	***	有意でない	***	***	
Pembro	Pembro	P4B3+3IgG4	F10IgG4	T細胞のみ	DCのみ	T+DC+培地
P4B3+3IgG4	有意でない					
F10IgG4	***	***				
T細胞のみ	***	***	***			
DCのみ	***	***	***	有意でない		
T+DC+培地	***	***	有意でない	***	***	

【図 4 5 - 2】

T2 DCV IFN γ 未处理

100 nM Pembro	Pembro	P4B3+3IgG4	F10IgG4	T細胞のみ	DCのみ	T+DC+培地
P4B3+3IgG4	有意でない					
F10IgG4	*****	*****				
T細胞のみ	*****	*****	*			
DCのみ	*****	*****	**	有意でない		
T+DC+培地	*****	*****	有意でない	有意でない	有意でない	
33.3 nM Pembro	Pembro	P4B3+3IgG4	F10IgG4	T細胞のみ	DCのみ	T+DC+培地
P4B3+3IgG4	有意でない					
F10IgG4	*****	*****				
T細胞のみ	*****	*****	有意でない			
DCのみ	*****	*****	有意でない	有意でない		
T+DC+培地	*****	*****	有意でない	有意でない	有意でない	
11.1 nM Pembro	Pembro	P4B3+3IgG4	F10IgG4	T細胞のみ	DCのみ	T+DC+培地
P4B3+3IgG4	有意でない					
F10IgG4	*****	*****				
T細胞のみ	*****	*****	有意でない			
DCのみ	*****	*****	有意でない	有意でない		
T+DC+培地	*****	*****	有意でない	有意でない	有意でない	
3.70 nM Pembro	Pembro	P4B3+3IgG4	F10IgG4	T細胞のみ	DCのみ	T+DC+培地
P4B3+3IgG4	有意でない					
F10IgG4	*****	*****				
T細胞のみ	*****	*****	有意でない			
DCのみ	*****	*****	有意でない	有意でない		
T+DC+培地	*****	*****	有意でない	有意でない	有意でない	
3.70 nM Pembro	Pembro	P4B3+3IgG4	F10IgG4	T細胞のみ	DCのみ	T+DC+培地
P4B3+3IgG4	有意でない					
F10IgG4	*****	*****				
T細胞のみ	*****	*****	有意でない			
DCのみ	*****	*****	有意でない	有意でない		
T+DC+培地	*****	*****	有意でない	有意でない	有意でない	

記号	意味
有意でない	$p > 0.05$
*	$p \leq 0.05$
**	$p \leq 0.01$
***	$p \leq 0.001$
****	$p \leq 0.000$

【図 46-1】

TT DCW IL2 未处理

100 nM Pembro	Pembro	P4B3+3IgG4	F10IgG4	T細胞のみ	D Cのみ	T+D+C+増地
P4B3+3IgG4	有意でない					
F10IgG4	***	***				
T細胞のみ	***	***	*			
D Cのみ	***	***	*	有意でない		
T+D+C+増地	***	***	有意でない	*	*	

33.3 nM Pembro	Pembro	P4B3+3IgG4	F10IgG4	T細胞のみ	D Cのみ	T+D+C+増地
P4B3+3IgG4	有意でない					
F10IgG4	***	***				
T細胞のみ	***	***	*			
D Cのみ	***	***	*	有意でない		
T+D+C+増地	***	***	有意でない	*	*	

11.1 nM Pembro	Pembro	P4B3+3IgG4	F10IgG4	T細胞のみ	D Cのみ	T+D+C+増地
P4B3+3IgG4	有意でない					
F10IgG4	***	***				
T細胞のみ	***	***	*			
D Cのみ	***	***	*	有意でない		
T+D+C+増地	***	***	有意でない	*	*	

3.70 nM Pembro	Pembro	P4B3+3IgG4	F10IgG4	T細胞のみ	D Cのみ	T+D+C+増地
P4B3+3IgG4	有意でない					
F10IgG4	***	***				
T細胞のみ	***	***	*			
D Cのみ	***	***	*	有意でない		
T+D+C+増地	***	***	有意でない	*	*	

【圖 4 6 - 2】

TT DCW IFN γ 未处理

100nM	Pembro	P4B3+3lgG4	F10lgG4	T細胞のみ	DCのみ	T+DC+増地
Pembro						
P4B3+3lgG4	有意でない					
F10lgG4	**	*				
T細胞のみ	****	****	有意でない			
DCのみ	****	****	有意でない	有意でない		
T+DC+増地	*	*	有意でない	有意でない	有意でない	
33.3 nM	Pembro	P4B3+3lgG4	F10lgG4	T細胞のみ	DCのみ	T+DC+増地
Pembro						
P4B3+3lgG4	有意でない					
F10lgG4	有意でない	*				
T細胞のみ	****	****	有意でない			
DCのみ	****	****	有意でない	有意でない		
T+DC+増地	有意でない	有意でない	有意でない	有意でない	有意でない	
11.1 nM	Pembro	P4B3+3lgG4	F10lgG4	T細胞のみ	DCのみ	T+DC+増地
Pembro						
P4B3+3lgG4	有意でない					
F10lgG4	有意でない	有意でない				
T細胞のみ	**	****	有意でない			
DCのみ	**	****	有意でない	有意でない		
T+DC+増地	有意でない	有意でない	有意でない	有意でない	有意でない	
3.70 nM	Pembro	P4B3+3lgG4	F10lgG4	T細胞のみ	DCのみ	T+DC+増地
Pembro						
P4B3+3lgG4	有意でない					
F10lgG4	有意でない	**				
T細胞のみ	**	****	有意でない			
DCのみ	**	****	有意でない	有意でない		
T+DC+増地	有意でない	有意でない	有意でない	有意でない	有意でない	

記号	意味
有意でない	$p > 0.05$
*	$p \leq 0.05$
**	$p \leq 0.01$
***	$p \leq 0.001$
****	$p \leq 0.0001$

【図 4 7 - 1】

TT DCV IL2 未処理						
100 nM	Pembro	P4B3+3IgG4	F10IgG4	T細胞のみ	D Cのみ	T+DC+培地
Pembro						
P4B3+3IgG4	有意でない					
F10IgG4	***	***				
T細胞のみ	***	***	***			
D Cのみ	***	***	***	有意でない		
T+DC+培地	***	***	***	***	***	
33.3 nM	Pembro	P4B3+3IgG4	F10IgG4	T細胞のみ	D Cのみ	T+DC+培地
Pembro						
P4B3+3IgG4	***					
F10IgG4	***	***				
T細胞のみ	***	***	***			
D Cのみ	***	***	***	有意でない		
T+DC+培地	***	***	有意でない	***	***	
11.1 nM	Pembro	P4B3+3IgG4	F10IgG4	T細胞のみ	D Cのみ	T+DC+培地
Pembro						
P4B3+3IgG4	有意でない					
F10IgG4	***	***				
T細胞のみ	***	***	***			
D Cのみ	***	***	***	有意でない		
T+DC+培地	***	***	有意でない	***	***	
3.70 nM	Pembro	P4B3+3IgG4	F10IgG4	T細胞のみ	D Cのみ	T+DC+培地
Pembro						
P4B3+3IgG4	有意でない					
F10IgG4	***	***				
T細胞のみ	***	***	***			
D Cのみ	***	***	***	有意でない		
T+DC+培地	***	***	有意でない	***	***	

【図 4 7 - 2】

TT DCV IFNy 未処理						
100 nM	Pembro	P4B3+3IgG4	F10IgG4	T細胞のみ	D Cのみ	T+DC+培地
Pembro						
P4B3+3IgG4	*					
F10IgG4	***	***				
T細胞のみ	***	***	有意でない			
D Cのみ	***	***	有意でない	有意でない		
T+DC+培地	***	***	有意でない	有意でない	有意でない	
33.3 nM	Pembro	P4B3+3IgG4	F10IgG4	T細胞のみ	D Cのみ	T+DC+培地
Pembro						
P4B3+3IgG4	有意でない					
F10IgG4	***	***				
T細胞のみ	***	***	有意でない			
D Cのみ	***	***	有意でない	有意でない		
T+DC+培地	***	***	有意でない	有意でない	有意でない	
11.1 nM	Pembro	P4B3+3IgG4	F10IgG4	T細胞のみ	D Cのみ	T+DC+培地
Pembro						
P4B3+3IgG4	有意でない					
F10IgG4	***	***				
T細胞のみ	***	***	有意でない			
D Cのみ	***	***	有意でない	有意でない		
T+DC+培地	***	***	有意でない	有意でない	有意でない	
3.70 nM	Pembro	P4B3+3IgG4	F10IgG4	T細胞のみ	D Cのみ	T+DC+培地
Pembro						
P4B3+3IgG4	有意でない					
F10IgG4	***	***				
T細胞のみ	***	***	有意でない			
D Cのみ	***	***	有意でない	有意でない		
T+DC+培地	***	***	有意でない	有意でない	有意でない	

記号	意味
有意でない	p > 0.05
*	p ≤ 0.05
**	p ≤ 0.01
***	p ≤ 0.001
****	p ≤ 0.0001

【配列表】

0007680967000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 1/21 (2006.01)
 C 1 2 N 5/0783(2010.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 C 1 2 N 15/13 (2006.01)
 C 1 2 N 15/63 (2006.01)

C 1 2 N 1/21
 C 1 2 N 5/0783
 C 1 2 N 5/10
 C 1 2 N 15/13
 C 1 2 N 15/63

Z

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 マラスコ ウェイン エイ.

アメリカ合衆国 0 2 4 8 1 マサチューセッツ州 ウェルズリー ライス ストリート 4 3

(72)発明者 チャン マシュー

アメリカ合衆国 0 2 1 3 5 マサチューセッツ州 ブルックライン ヴァーノン ストリート 3 5

(72)発明者 チュー クアン カレン

アメリカ合衆国 0 1 7 7 2 マサチューセッツ州 サウスボロー キャリッジ ヒル サークル 9

審査官 長谷川 強

(56)参考文献 医薬・生活衛生局医薬品審査管理課[online], 審議結果報告書 [販売名] キイトルーダ点滴静注20mg、同点滴静注100mg, 2018年11月30日[検索日: 2024年5月20日], <https://www.pmda.go.jp/drugs/2019/P20190115001/170050000_22800AMX00696000_A100_1.pdf>

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

C 0 7 K 1 6 / 2 8

A 6 1 K 3 9 / 3 9 5

C 0 7 K 1 6 / 4 6

C 1 2 N 1 / 1 5

C 1 2 N 1 / 1 9

C 1 2 N 1 / 2 1

C 1 2 N 5 / 0 7 8 3

C 1 2 N 5 / 1 0

C 1 2 N 1 5 / 1 3

C 1 2 N 1 5 / 6 3

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)