

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-544562
(P2024-544562A)

(43)公表日 令和6年12月3日(2024.12.3)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28	Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13		4 C 0 7 6
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46		4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z	4 C 0 8 5
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	4 H 0 4 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全53頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-528532(P2024-528532)			(71)出願人	513229439
(86)(22)出願日	令和4年11月15日(2022.11.15)				バーシテック リミテッド
(85)翻訳文提出日	令和6年7月12日(2024.7.12)				Versitech Limited
(86)国際出願番号	PCT/CN2022/132000				中華人民共和国香港特別行政区ボクフラ
(87)国際公開番号	WO2023/083377				ム、ザ・ユニバーシティ・オブ・ホンコ
(87)国際公開日	令和5年5月19日(2023.5.19)				ン、ケイケイ・レオン・ビルディング1
(31)優先権主張番号	63/264,061				5フロア
(32)優先日	令和3年11月15日(2021.11.15)			(74)代理人	100145403
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				弁理士 山尾 憲人
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く			(74)代理人	100106518
					弁理士 松谷 道子
				(74)代理人	100138911
					弁理士 櫻井 陽子
				(72)発明者	チェン, ジーウェイ
					中華人民共和国香港特別行政区ボクフラ 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 癌およびウイルス感染に対し機能不全であるヒトT細胞およびB細胞の回復のためのヒト化モノクローナル抗体

(57)【要約】
【要約】

本発明は、2種類の完全ヒト化Δ42PD1特異的mAb、具体的にはhuCH101とhuCH34に関するもので、CDRグラフトによるヒト化率は97.0%である。対象発明はさらに、癌および／または感染症を有する対象を含め、Δ42PD1特異的mAbを必要とする対象を処置するためにhuCH101および／またはhuCH34を使用する方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト化 $\Delta 42PD1$ 特異的モノクローナル抗体 (mAb)。

【請求項 2】

可変重鎖が配列番号 3 と少なくとも 80% の配列同一性を含み、かつ

可変軽鎖が配列番号 4 と少なくとも 80% の配列同一性を含む、

請求項 1 に記載のヒト化 $\Delta 42PD1$ 特異的 mAb。

【請求項 3】

重鎖および軽鎖の定常領域が、

配列番号 19 であるかまたは配列番号 19 と少なくとも 80% の同一性を有する配列であるヒト IgG1 定常重鎖フラグメント、および

配列番号 18 であるかまたは配列番号 18 と少なくとも 80% の同一性を有する配列であるヒト IgG1 軽鎖フラグメントである、請求項 1 に記載のヒト化 $\Delta 42PD1$ 特異的 mAb。

【請求項 4】

請求項 1 に記載のヒト化 $\Delta 42PD1$ 特異的 mAb を含む組成物。

【請求項 5】

医薬上許容される担体および／または賦形剤をさらに含む、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 6】

ヒト化 $\Delta 42PD1$ 特異的 mAb をコードする核酸分子。

【請求項 7】

プラスミドである、請求項 6 に記載の核酸分子。

【請求項 8】

ヒト化 $\Delta 42PD1$ 特異的 mAb の可変重鎖をコードする核酸配列が配列番号 7 と少なくとも 80% の配列同一性を含み、かつ

ヒト化 $\Delta 42PD1$ 特異的 mAb の可変軽鎖をコードする核酸配列が配列番号 8 と少なくとも 80% の配列同一性を含む、請求項 6 に記載の核酸分子。

【請求項 9】

重鎖および軽鎖の定常領域をコードする核酸配列が、

配列番号 20 であるかまたは配列番号 20 と少なくとも 80% の配列同一性を有する配列であるヒト IgG1 定常重鎖フラグメント、および

配列番号 17 であるかまたは配列番号 17 と少なくとも 80% の配列同一性を有する配列であるヒト定常軽鎖フラグメント、をコードする核酸配列である、請求項 6 に記載の核酸分子。

【請求項 10】

ヒト化 $\Delta 42PD1$ 特異的モノクローナル抗体 (mAb) を対象に投与することを含む、対象における癌細胞増殖を阻害する方法。

【請求項 11】

ヒト化 $\Delta 42PD1$ 特異的 mAb の可変重鎖が配列番号 3 と少なくとも 80% の配列同一性を含み、かつ

ヒト化 $\Delta 42PD1$ 特異的 mAb の可変軽鎖が配列番号 4 と少なくとも 80% の配列同一性を含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

ヒト化 $\Delta 42PD1$ 特異的モノクローナル抗体の重鎖および軽鎖の定常領域がヒト IgG1 定常重鎖フラグメントおよび定常軽鎖フラグメントである、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

ヒト IgG1 定常重鎖が配列番号 19 の配列または配列番号 19 と少なくとも 80% の同一性を有する配列を有し、かつ

ヒト IgG1 軽鎖フラグメントが配列番号 18 の配列または配列番号 18 と少なくとも

10

20

30

40

50

80%の同一性を有する配列を有する、
、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

重鎖可変領域（VH）および軽鎖可変領域（VL）を含む、 $\Delta 42PD1$ 特異的抗体またはその抗原結合フラグメントであって、

（i）VHは、配列番号23～25にそれぞれ示されるアミノ酸配列を有するHCDR1～3を含み、VLは、配列番号26～28にそれぞれ示されるアミノ酸配列を有するHCDR1～3を含む；または

（ii）VHは、配列番号29～31にそれぞれ示されるアミノ酸配列を有するHCDR1～3を含み、VLは、配列番号32～34にそれぞれ示されるアミノ酸配列を有するLCDR1～3を含む、

$\Delta 42PD1$ 特異的抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項15】

請求項14に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントであって、

（i）VHは、配列番号1と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、VLは、配列番号2と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む；または

（ii）VHは、配列番号3と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、VLは、配列番号4と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む；または

（iii）VHは、配列番号35と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、VLは、配列番号36と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む；または

（iv）VHは配列番号37と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、VLは配列番号38と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、

抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項16】

抗体がIgG、IgA、IgM、IgE、およびIgDよりなる群から選択されるアイソタイプである、請求項14から15のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項17】

抗体が、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4よりなる群から選択されるサブタイプの抗体である、請求項14から15のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項18】

抗体が、配列番号19または21と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖定常領域、および／または配列番号18と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖定常領域を含む、請求項14から17のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合フラグ

10

20

30

40

50

メント。

【請求項 19】

抗原結合フラグメントが、F a b、F a b'、F (a b')₂、F d、F d'、F v、s c F v、d s - s c F v、および d A b よりなる群から選択される、請求項 14 から 18 のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 20】

抗体がマウス、ヒト、またはヒト化抗体である、請求項 14 から 19 のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 21】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項 14 から 20 のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

10

【請求項 22】

抗体が、配列番号 40 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号 41 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む、請求項 21 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 23】

抗体が二重特異性抗体または多重特異性抗体である、請求項 14 から 20 のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

20

【請求項 24】

抗体が、第 2 抗原に結合する第 2 抗原結合領域をさらに含む二重特異性抗体である、請求項 23 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 25】

第 2 抗原が腫瘍関連抗原または免疫細胞抗原、例えば T 細胞抗原である、請求項 24 に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 26】

請求項 14 から 25 のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合フラグメントをコードするヌクレオチド配列を含む核酸。

30

【請求項 27】

請求項 26 に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 28】

請求項 26 に記載の核酸または請求項 27 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 29】

(i) 請求項 14 から 25 のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合フラグメントと

、

(ii) 医薬上許容できる担体またはアジュバントと、を含む医薬組成物。

【請求項 30】

請求項 14 から 25 のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合フラグメントを含む抗体薬物複合体。

40

【請求項 31】

有効量の請求項 14 から 25 のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合フラグメント、請求項 29 に記載の医薬組成物、または請求項 30 に記載の抗体薬物複合体を対象に投与することを含む、対象における疾患を処置する方法。

【請求項 32】

疾患が癌（例えば肝細胞癌）またはウイルス感染によって引き起こされる疾患または状態（例えば H I V 感染によって引き起こされる疾患または状態）である、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

50

第 2 の治療薬を対象に投与することをさらに含む、請求項 3 1 または 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

第 2 の治療薬が抗体、化学療法薬、および低分子薬から選択される、請求項 3 3 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

プログラム死-1 (PD-1、CD279) は CD28 スーパーファミリーのメンバーであり、2つのネイティブリガンドである PD-L1 (CD274) および PD-L2 (CD273) との相互作用を介して T 細胞の機能を負に制御する。PD-1 は、単一の免疫グロブリン (Ig) 可変様ドメイン、細胞質ドメイン、および 2つのチロシンベースのシグナル伝達モチーフから構成される I 型膜貫通型受容体タンパク質である。PD-1 は、静止 T 細胞では低レベルで恒常的に発現し、活性化すると T 細胞、ナチュラルキラー T (NKT) 細胞、B 細胞、およびマクロファージで発現上昇する。

10

【0002】

いくつかのマウスモデルにおいて PD-1 が欠損していると、自然免疫を介して細菌感染に対して有意な抵抗性が得られることから、病原体感染に対する PD-1 の制御的役割の重要性が示された。さらに PD-1 は、全身性エリテマトーデス (SLE) および関節リウマチを含む多くの自己免疫疾患において重要な役割を果たしている。

20

【0003】

ヒト化プログラム細胞死 1 (PD-1) 特異的 mAb などの免疫チェックポイント阻害薬は、癌免疫療法に広く用いられてきた。PD-1 のほか、選択的にスプライシングされた PD-1 のアイソフォーム、すなわち Δ42PD1 が発見されている。さらに、ハイブリドーマ技術を用いて Δ42PD1 特異的 mAb である CH101 と CH34 が作製された。また、Δ42PD1 の免疫調節作用も実証されており、Δ42PD1 がヒトの疾患を処置するための治療抗体開発のターゲットとなる可能性を示唆している。多くの癌患者は抗 PD1 免疫療法に反応しない。

【0004】

したがって、有効な抗 PD1 免疫療法、特にヒト使用に対する必要性が存在している。

30

【発明の概要】

【0005】

対象発明は、PD-1 タンパク質アイソフォーム Δ42PD1 に特異的に結合する抗体に関する。いくつかの実施形態では、抗体はモノクローナル抗体である。ある実施形態では、対象発明は、CDR グラフトにより約 97.0% のヒト度で完全にヒト化された CH101 抗体および CH34 抗体、すなわち huCH101 抗体および huCH34 抗体である。また、Δ42PD1 との相互作用の特異性、結合親和性、および感度 (sensitivity) を測定した。

【0006】

本発明の別の態様は、癌およびウイルス感染の予防、処置、または寛解のための方法を提供する。本方法は、このような予防および処置を必要とする対象に、本発明の PD1 タンパク質アイソフォーム (Δ42PD1 タンパク質など) を標的とする抗体、その抗体をコードする核酸分子 (例えば、プラスミド) の有効量を投与することを含む。ある実施形態では、huCH101 および huCH34 は、肝細胞癌に対する抗体薬として治療効果を示す。

40

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図 1】 CDR グラフトによる CH101 のヒト化の戦略。

【図 2】 CDR グラフト後のマウス CH101、生殖細胞系列配列、およびヒト化 CH101 の可変領域を比較するためのアミノ酸配列アラインメント。CH101 または生殖細胞

50

胞系列の可変カッパ (V K) (図 2 A) および重鎖 (V H) (図 2 B) のアミノ酸配列を表示した。フレームワーク領域のアミノ酸は黒く、CDR 領域は赤く着色した。生殖細胞系列配列のフレームワーク領域における相違するアミノ酸は緑色に着色し、親 CH101 のフレームワーク + CDR 領域における変異は下線で示した。

【図 3】ヒト化 CH101 抗体パネルによる $\Delta 42PD1$ の FACS 染色。一連のヒト化 CH101 抗体を用いて、フローサイトメトリーにより 293T 細胞表面の $\Delta 42PD1$ と PD1 を区別した。異なる抗体結合の活性を、293T- $\Delta 42PD1$ 細胞は水色、293T-PD1 細胞はオレンジ色、293T 細胞は赤色でそれぞれ色分けした。293T- $\Delta 42PD1$ 結合の陽性対照として、親マウス CH101 を用いた。陰性対照としてヒト IgG1 アイソタイプを用いた。抗ヒト CD279 (PD-1) - APC を 293T-PD1 結合の陽性対照として用いた。

【図 4】インビボでのヒト化 CH101 抗体半減期の評価。抗体半減期を評価するための動物スケジュール (図 4 A)。CH101-huIgG1 (図 4 B)、CH101-IgG4 (図 4 C)、および hufrCH101-IgG1 (図 4 D) のインビボ動態を ELISA で測定し、分析した。個々の抗体の半減期を分析に応じて表示した。

【図 5】HCC モデルマウスにおける CH101-huIgG1 (キメラ) の免疫療法効果のインビボ評価。(図 5 A) 実験スケジュール。(図 5 B) エンドポイントにおける各動物の Hu h7 腫瘍。(図 5 C) 腫瘍増殖の時間経過を記録した。(図 5 D) エンドポイントにおける各動物の腫瘍重量を測定し、群間で比較した。(図 5 E-5 G) エンドポイントにおける血漿中の炎症性サイトカインのプロファイルを測定した (CH101-huIgG1 群の 2 匹およびマウス CH101 群の 1 匹は評価不能のため除く)。統計解析には、多重比較検定のほか一般的な一元配置分散分析を用いた。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ 。

【図 6】HCC マウスモデルにおける免疫療法効果のための hufrCH101-huIgG1 のインビボ評価。(図 6 A) 実験スケジュール。(図 6 B) エンドポイントにおける各動物から採取した Hu h7 腫瘍の画像。(図 6 C) 腫瘍増殖の時間経過を毎週記録した。(図 6 D) エンドポイントにおける各動物の腫瘍重量を測定した。(図 6 E-6 G) エンドポイントにおける血漿中の炎症性サイトカインのプロファイルを測定した。統計解析には、多重比較検定のほか一般的な一元配置分散分析を用いた。*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ 。

【図 7】HCC 患者における、異なる T 細胞サブセットでの $\Delta 42PD-1$ の高発現。(図 7 A-7 B) HCC 患者 38 人と健常人 43 人の PBMC における $\Delta 42PD-1^+$ T 細胞および PD-1⁺ T 細胞の代表的なドットプロットと定量結果 (平均値 $\pm$ SEM)。(図 7 C-7 D) これらの HCC 患者の PBMC における $\Delta 42PD-1^+$ CD4⁺ T 細胞および $\Delta 42PD-1^+$ CD8⁺ T 細胞の代表的なドットプロットと定量結果 (平均値 $\pm$ SEM)。(図 7 E-7 F) 25 人の HCC 患者由来の腫瘍組織と隣接する非腫瘍組織における $\Delta 42PD-1^+$ T 細胞または PD-1⁺ T 細胞の代表的なドットプロットと定量結果 (平均値 $\pm$ SEM)。(図 7 G) 同じ患者から採取した腫瘍組織および隣接する非腫瘍組織における $\Delta 42PD-1^+$ CD4⁺ T 細胞または $\Delta 42PD-1^+$ CD8⁺ T 細胞の頻度 ($n = 25$)。(図 7 H) HCC 患者の同じコホートにおける PBMC ($n = 38$) および腫瘍 ($n = 25$) それぞれにおける $\Delta 42PD-1^+$ T 細胞および PD-1⁺ T 細胞の頻度間の相関。(図 7 I) UICC 8 ステージ群に層別化した HCC 患者の PBMC および腫瘍における PD-1⁺ T 細胞および $\Delta 42PD-1^+$ T 細胞の頻度 (平均値 $\pm$ SEM) (PBMC: ステージ I ($n = 15$)、ステージ II ($n = 11$)、およびステージ III ($n = 9$) ならびに腫瘍: ステージ I ($n = 7$)、ステージ II ($n = 9$)、およびステージ III ($n = 7$))。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ 。

【図 8】抗 $\Delta 42PD-1$ 抗体はマウスモデルにおいて HCC の発生を抑制する。(図 8 A) NSG-huPBL マウスにおける Hu h7 および PLC5 の増殖曲線 ($n = 6$ / 群)。(図 8 B-8 C) NSG-huPBL マウスおよび Hu h7-NSG-huPBL マ

10

20

30

40

50

ウスにおいて、脾臓またはTMEにおける全ヒトCD45⁺CD3⁺T細胞のうち、PD-1⁺Δ42PD1⁻T細胞およびPD-1⁺Δ42PD-1⁺T細胞の代表的なドットプロットと頻度を測定した。(図8D)処置スケジュールの模式図。Huh7細胞を皮下接種し、1週間増殖させ、200μgのCH101、抗PD-1抗体(ニボルマブ)、またはアイソタイプをそれぞれ5回、毎日腹腔内注射した。(図8E)CH101、抗PD-1ニボルマブまたはアイソタイプ処置後のHuh7-NSG-HuPBLマウスの腫瘍増殖曲線。示した結果は、一貫した所見の2つの独立した実験の代表的なものである(n=4/群)。(図8F)NSGマウスのHuh7、またはNSG-HuPBLマウスのHuh7-TLR4KOについて、腫瘍増殖曲線(平均値±SEM)を測定した(n=4/群)。(図8G-8H)同所性MHCC-97L腫瘍の増殖を生物発光イメージングにより測定し、平均S/S0値で表した(H)。ここで、Sは評価日の生物発光シグナルであり、S0は処置前の生物発光シグナルである(n=9/群)。結果は2つの独立した実験からの累積データである。(図8I)エンドポイントにおける1つの代表的な肝臓画像を示す。矢印は肝内腫瘍を示す。(図8J)HCC患者におけるΔ42PD-1⁺T細胞およびIL-6強度のスピアマンの相関。破線は線形回帰を示す。(図8K)ある患者の腫瘍サンプルの代表的な画像(40倍)は、Δ42PD-1⁺TIL細胞とIL-6産生TLR4⁺HCC細胞の共局在を示した。(図8L)エンドポイントにおけるHuh7-NSG-huPBLマウスのPBMC、脾臓、および腫瘍におけるΔ42PD-1⁺T細胞およびPD-1⁺T細胞の定量(平均値±SEM)。(図8M)エンドポイントにおける血漿中のIL-6およびIL-8の定量(平均値±SEM)。(図8N)Huh7-NSG-huPBLマウス由来の腫瘍組織における代表的な免疫蛍光染色(×20)を、IL-6、TLR4、およびCD3それぞれの細胞発現の色分けとともに示す。p<0.05を有意とした:*p<0.05、**p<0.01、および***p<0.001である。

【図9】マウスΔ42PD-1特異的CH34モノクローナル抗体の軽鎖および重鎖配列および、色分けしたヒト化モノクローナル抗体の作製に必須のCDR領域。

【図10】ヒト化Δ42PD-1特異的CH34モノクローナル抗体の軽鎖可変領域(VL)および重鎖可変領域(VH)の配列と、色分けしたヒト化モノクローナル抗体の作製に必須のCDR領域。

【図11】ヒト293T細胞に発現するPD-1には結合しないが、Δ42PD1に結合するクローニングされた抗体(上)およびハイブリドーマ由来の抗Δ42PD1抗体CH34の特異性。

【図12】ヒトB細胞に発現するPD-1には結合しないが、Δ42PD1に結合するクローニングされた抗Δ42PD1抗体CH34の特異性。

【図13】Δ42PD-1発現の増加は、CHPにおけるB細胞の消耗を伴う。(図13A)BD(n=14)および未処理CHP(n=42)由来のCD19⁺B細胞の代表的フローサイトメトリー分析。数字は、ゲーティングされた集団のパーセンテージを表す。

(図13B)図13Aのデータの要約であり、BDおよびCHPにおけるΔ42PD-1の平均蛍光強度(MFI)とΔ42PD-1⁺B細胞の頻度を示す。(図13C)CD21⁻CD27⁺活性化メモリー(AM)、CD21⁻CD27⁺静止メモリー(RM)、CD27⁻CD21⁻組織様メモリーアネルギーナイーブB細胞(tissue like memory and anergic naive B cell)(TLM/aN)、およびCD27⁻CD21⁺静止ナイーブプラス中間メモリーB細胞(resting naive plus intermediated memory B cell)(IM/rN)を識別するために代表的なBDおよびCHPのCD21/CD27染色B細胞で色分けしたゲーティング。(図13D)図13Cのデータの要約で、BDと比較してCHPではAMおよびTLM/aNB細胞の頻度が増加している。(図13E)代表的なBDとCHPの、色分けされたAM、TLM/aN、RM、およびIM/rNB細胞におけるΔ42PD-1の発現。数字は細胞上のΔ42PD-1のMFIを示す。

(図13F)BDとCHPのB細胞サブセットにおけるΔ42PD-1のMFIを示す図13Eのデータの要約。(図13G)BDとCHP由来の、PD-1⁺およびΔ42PD

10

20

30

40

50

-1^{+} のAM、TLM/aN、RM、およびIM/rN B細胞の代表的フローサイトメトリー分析。(図13H) BDおよびCHPにおける $\Delta 42PD-1^{+}$ のAM、TLM/aN、RM、およびIM/rN B細胞の頻度を示す図13Gのデータの要約。データは各サンプルの1回の測定を表す。図13B、図13D、図13F、図13Hの各ドットは1個体を表す。統計的有意性は、図13Bについては一般的な一元配置分散分析およびBenjamini, Krieger and Yekutieliの2段階線形ステップアップ手順と単一プール分散を、図13Dについては対応のないt検定を、図13Fと図13Hについては一般的な二元配置分散分析およびBenjamini, Krieger and Yekutieliの2段階線形ステップアップ手順と単一プール分散を用いて決定した。*, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$; ***, $P \leq 0.001$ 、および****, $P \leq 0.0001$ 。平均データは平均値 $\pm$ SEMで示した。

10

【図14】抗 $\Delta 42PD-1$ 抗体はSHP1のリクルートメントを減少させ、AKT1/FOXO1経路とB細胞増殖を促進する。(図14A) 代表的なフローサイトメトリー分析。(図14B) 図14Aのデータの要約。BD由来の初代B細胞($n=6$)をFITC-CFSEで前標識し、 α -IgM/G F(ab')₂ ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) とmsIgG2b対照抗体またはCH34で刺激する。細胞は5日目にフローサイトメトリーで分析される。(図14C) CH34は $\Delta 42PD-1$ によるSHP1のリクルートメントを減少させる。BD由来の初代B細胞を α -IgM/G F(ab')₂ ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) とmsIgG2b対照抗体またはCH34で刺激し、2日目に溶解し、それぞれ $\Delta 42PD-1$ とSHP1に対する抗体を用いて免疫沈降とウェスタンブロットを行う。(図14D) CH34処理はKi67⁺B細胞集団を拡大した。(図14E) CH34処理は、phosph-AKT1-S473およびphosph-FOXO1-S256レベルを増加させ、P27タンパク質の発現を減少させる。(図14F) CH34処理は、B細胞においてFOXO1およびP27のmRNAを増加させる($n=3$)。図14D-Fにおいて、 α -IgM/G F(ab')₂ ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) とmsIgG2b対照抗体 ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) またはCH34 ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$)、あるいはSHP1阻害薬NSC87877 ($10 \mu\text{M}$) を添加した完全RPMI1640培地で初代B細胞を培養する。48時間後、細胞をフローサイトメトリー分析のために染色するか(図14D)、AKT1、FOXO1、およびP27のウェスタンブロットング検出(図14E)、またはFOXO1およびP27のmRNAのqPCR(図14F)のために溶解する。統計的有意性は対応のあるt検定を用いて決定される。*, $p < 0.05$ 、および***, $p < 0.001$ である。平均データは平均値 $\pm$ SEMで示した。

20

30

【図15】CH34はHIV患者におけるBCR刺激後のB細胞増殖を促進する。(図15A-B) CH34は、BCR刺激後のナイーブB細胞(IgD⁺) およびメモリーB細胞(IgD⁻) の増殖反応を増加させる($n=20$)。 (図15A) 代表的なフローサイトメトリー分析。(図15B) 図15Aのデータの要約。(図15C-D) CH34は、BCR刺激によりナイーブB細胞およびメモリーB細胞のCHPにおけるCD86発現を増加させる($n=20$)。 (図15C) 代表的なフローサイトメトリー分析。(図15D) 図15Cのデータの要約。(図15E-F) CH34はTD刺激後のCHPからのB細胞の増殖反応を増加させる($n=10$)。 (図15E) 代表的なフローサイトメトリー分析。(図15F) 図15Eのデータの要約。(図15G-H) CH34はTI刺激後のCHPからのナイーブB細胞の増殖反応を増加させる($n=10$)。 (図15G) 代表的なフローサイトメトリー分析。(図15H) 図15Gのデータの要約。CHPのPBMCから単離したIgD⁺B細胞およびIgD⁻B細胞をCFSEで前標識し、 α -IgM/G F(ab')₂ ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$)、TD、またはTI刺激+CH34 ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$)、またはmsIgG2b対照 ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) を加えたRPMI1640培地で5日間培養し、フローサイトメトリーで分析する。統計的有意性は、一般的な一元配置分散分析と、Benjamini, Krieger and Yekutieliの2段階線形ステップアップ手順と単一プール分散を用いて決定した。*, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$; ***, $P \leq 0.001$ 、および****, $P \leq 0.0001$ 。平均データ

40

50

は平均値±SEMで示した。

【図16】B細胞はBCR刺激後およびHIV-1感染時に高いΔ42PD-1を発現する。Δ42PD-1はSHP1のリクルートメントを通じてBCRトリガーの細胞周期の進行を阻害する。SHP1はAKT1と結合してAKT1の活性化を阻害し、AKT1/FOXO1経路を抑制する。Δ42PD-1特異的抗体はHIV-1患者のB細胞の増殖を回復させる。

【0008】

配列の簡単な説明

配列番号1: CH101	VHアミノ酸配列	
配列番号2: CH101	VKアミノ酸配列	10
配列番号3: huf rCH101	VHアミノ酸配列	
配列番号4: huf rCH101	VKアミノ酸配列	
配列番号5: CH101	VHをコードするヌクレオチド配列	
配列番号6: CH101	VKをコードするヌクレオチド配列	
配列番号7: huf rCH101	VHをコードするヌクレオチド配列	
配列番号8: huf rCH101	VKをコードするヌクレオチド配列	
配列番号9: ヒト生殖細胞系列可変重鎖アミノ酸配列		
配列番号10: ヒト生殖細胞系列可変カップ鎖アミノ酸配列		
配列番号11: ヒト重鎖J領域アミノ酸配列		
配列番号12: ヒトカップ鎖J領域アミノ酸配列		20
配列番号13: ヒト生殖細胞系列可変重鎖をコードするヌクレオチド配列		
配列番号14: ヒト生殖細胞系列可変カップ鎖をコードするヌクレオチド配列		
配列番号15: ヒト重鎖J領域をコードするヌクレオチド配列		
配列番号16: ヒトカップ鎖J領域をコードするヌクレオチド配列		
配列番号17: ヒトカップ鎖定常フラグメント(constant fragment)核酸配列 (IgG1およびIgG4)		
配列番号18: ヒトカップ鎖定常フラグメントアミノ酸配列 (IgG1およびIgG4)		
配列番号19: ヒト重鎖定常フラグメントアミノ酸配列 (IgG1)		
配列番号20: ヒト重鎖定常フラグメント核酸配列 (IgG1)		
配列番号21: ヒト重鎖定常フラグメントアミノ酸配列 (IgG4)		30
配列番号22: ヒト重鎖定常フラグメント核酸配列 (IgG4)		
配列番号23: CH101	VH CDR1アミノ酸配列	
配列番号24: CH101	VH CDR2アミノ酸配列	
配列番号25: CH101	VH CDR3アミノ酸配列	
配列番号26: CH101	VL CDR1アミノ酸配列	
配列番号27: CH101	VL CDR2アミノ酸配列	
配列番号28: CH101	VL CDR3アミノ酸配列	
配列番号29: CH34	VH CDR1アミノ酸配列	
配列番号30: CH34	VH CDR2アミノ酸配列	
配列番号31: CH34	VH CDR3アミノ酸配列	40
配列番号32: CH34	VL CDR1アミノ酸配列	
配列番号33: CH34	VL CDR2アミノ酸配列	
配列番号34: CH34	VL CDR3アミノ酸配列	
配列番号35: マウスCH34	VHアミノ酸配列	
配列番号36: マウスCH34	VLアミノ酸配列	
配列番号37: ヒト化CH34	VHアミノ酸配列	
配列番号38: ヒト化CH34	VLアミノ酸配列	
配列番号39: シグナルペプチド配列		
配列番号40: マウスCH34重鎖アミノ酸配列		
配列番号41: マウスCH34カップ鎖アミノ酸配列		50

【発明を実施するための形態】

【0009】

定義

本明細書において、単数形の「1つ(a)」、「1つ(an)」、「the」は、文脈上明らかにそうでない場合を除き、複数形も含むことを意図している。さらに、詳細な説明および／または特許請求の範囲のいずれかに、「含んでいる(including)」、「含む(includes)」、「有している(having)」、「有する(has)」、「有する(with)」、またはそれらの変形が使用されている限りにおいて、このような用語は、用語「含む(comprising)」と同様の様式で包括的であることを意図している。過渡的な用語／語句（およびその文法的変形）である「含んでいる(comprising)」、「含む(comp

10

【0010】

「実質的にからなる(consisting essentially of)」または「実質的にからなる(consists essentially of)」という表現は、特許請求の範囲が、指定された材料またはステップを含む実施形態を包含すること、およびクレームの基本的かつ新規な特徴（複数可）に重大な影響を与えないものを包含することを示す。

【0011】

「約」なる用語は、当業者によって決定される特定の値に対して許容可能な誤差範囲内であることを意味し、これは値の測定方法、すなわち測定システムの限界に部分的に依存する。「約」なる用語が使用されている成分の量を含む組成物の文脈では、これらの組成物は、値の周りに0～10%の変動($X \pm 10\%$)（誤差範囲）を有する成分の記載された量を含む。他の文脈では、「約」なる用語は、与えられた値の周りに0～10%の変動($X \pm 10\%$)（誤差範囲）を提供する。明らかなように、この変動は、例えば $X \pm 1\%$ 、 $X \pm 2\%$ 、 $X \pm 3\%$ 、 $X \pm 4\%$ 、 $X \pm 5\%$ 、 $X \pm 6\%$ 、 $X \pm 7\%$ 、 $X \pm 8\%$ 、 $X \pm 9\%$ 、または $X \pm 10\%$ といった、所定の値の上下10%までの範囲を示す。

20

【0012】

本開示では、範囲内の各値について冗長に説明することを避けるため、範囲は省略記法で記載されている。適切な場合には、範囲内の任意の適切な値を、範囲の上限値、下限値、または終端値として選択できる。例えば、0.1～1.0の範囲は、0.1および1.0の終端値、ならびに0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9の中間値、および0.2～0.5、0.2～0.8、0.7～1.0など、0.1～1.0に包含されるすべての中間範囲を示す。範囲内に少なくとも2桁の有効数字を持つ値が想定され、例えば、5～10の範囲は、終端値を含む5.00～10.00の間だけでなく、5.0～10.0の間のすべての値を示す。本明細書において範囲が使用される場合、範囲の組合せおよびサブコンビネーション（例えば、開示された範囲内の下位範囲）ならびにその中のある実施形態が明示的に含まれる。

30

【0013】

本明細書で使用される場合、「対象」なる用語は、治療用組成物によって提供される利益の送達を必要とするまたは望む動物を意味する。動物としては、例えば、ヒト、ブタ、ウマ、ヤギ、ネコ、マウス、ラット、イヌ、類人猿、魚、チンパンジー、オランウータン、モルモット、ハムスター、ウシ、ヒツジ、トリ、ニワトリ、ならびに脊椎動物や無脊椎動物であってもよい。これらの利益には、健康状態、疾患、または障害の処置；健康状態、疾患、または障害の予防；免疫の健康；エナメル質、器官、組織、または体内システムの機能強化が含まれるが、これらに限定されるものではない。本発明の文脈で好ましい対象はヒトである。乳児、幼児、青少年、成人、高齢者を含むあらゆる年齢や発達段階であってもよい。

40

【0014】

本明細書で使用する場合、「治療有効量(therapeutically-effective amount)

50

」、「治療有効用量 (therapeutically-effective dose)」、「有効量 (effective amount)」、および「有効用量 (effective dose)」なる用語は、対象に投与した場合に、対象の状態、疾患、または障害を処置または改善できる、あるいは臓器、組織、または体内システムに健康または機能の増強を提供できる、抗体または組成物の量または用量を意味するために使用される。言い換えれば、対象に投与した場合、その量は「治療上有効」である。実際の投与量は、処置または改善される特定の状態、疾患、または障害；状態の重症度；健康または機能の向上が望まれる特定の臓器、組織、または体内システム；患者の体重、身長、年齢、および健康；および投与経路を含むがこれらに限定されない多くの要因によって変化する。

【0015】

本明細書において、「処置 (treatment)」なる用語は、健康状態、疾患、または障害の徴候または症状を根絶、軽減、改善、または任意の程度まで逆転させることを指し、状態、疾患または障害の完全治癒を含むが、その必要はない。処置とは、障害を治すこと、改善すること、部分的に改善することである。「処置」には、例えば、体内の特定のシステムの機能を健康状態や恒常性の高い状態にすることなど、状態や特徴を改善または向上させることも含まれる。

【0016】

本明細書において、健康状態、疾患、または障害の「予防」とは、その状態、疾患、または障害の特定の徴候または症状の発症を回避、遅延、予防、または最小化すること意味する。つまり、徴候や症状が後日発症する可能性がある。予防には、そのような状態、疾患、または障害の発症の重症度を軽減すること、および／または状態、疾患、または障害がより重症の状態、疾患、または障害に進行するのを抑制することが含まれ得る。

【0017】

「減少 (reduces)」とは、少なくとも 1 %、5 %、10 %、25 %、50 %、75 %、または 100 % の負の変化を意味する。

【0018】

「増加 (increases)」とは、少なくとも 1 %、5 %、10 %、25 %、50 %、75 %、または 100 % の正の変化を意味する。

【0019】

本発明のいくつかの実施形態では、本方法は、対象発明の抗体組成物の複数用量の投与を含む。本方法は、本明細書に記載の対象発明の抗体を含む組成物の 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、またはそれ以上の治療有効量の投与を含むことができる。いくつかの実施形態では、用量は、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、10日、14日、21日、30日、または30日を超える期間にわたって投与される。さらに、治療有効量の本発明の抗体による対象の処置は、1回の処置を含むこともできるし、一連の処置を含むこともできる。また、処置に使用される抗体の有効量は、特定の処置の過程で増減する可能性があることも理解されるであろう。投与量の変化は、当該技術分野で知られている腫瘍の大きさを検出するための診断アッセイまたは画像化技術の結果から生じ、明らかになる可能性がある。本発明のいくつかの実施態様において、本方法は、1日2回、1日3回、および1日4回を含むがこれらに限定

【0020】

本開示には、本明細書に記載されているすべてのアミノ酸配列、およびそのアミノ酸配列をコードするすべてのポリヌクレオチドが含まれる。また、本開示には、本明細書に記載のアミノ酸配列と少なくとも 80 % の類似性を有するすべてのアミノ酸配列も含まれる。パーセントアミノ酸配列は、本明細書に記載されている任意のアミノ酸配列の全長にわたって、または h u C H 1 0 1 のような機能性抗体を構成する任意の連続したアミノ酸配列にわたって決定でき、その非限定的な例を以下に示す。このように、本開示には、本明細書に記載される任意のアミノ酸配列またはヌクレオチド配列と同一である配列、およびそのような配列と、80 から、81、82、83、84、85、86、87、88、89

10

20

30

40

50

、 90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 % 同一である配列が含まれる。

【0021】

本明細書で使用する「ヒト化」なる用語は、例えばマウスなどの非ヒト種由来の抗体を、ヒトで天然に産生される抗体変異体との類似性を高めるために改変したものを意味する。

【0022】

本明細書における変数の定義における化学基のリストの記載は、その変数が単一の基またはリストされた基の組み合わせとして定義されることを含む。本明細書における変数または態様に関する実施形態の記載は、その実施形態を、単一の実施形態として、または他の実施形態もしくはその一部と組み合わせて含む。

【0023】

ヒト化 $\Delta 42PD1$ 特異的 mAb

本発明は、PD-1の選択的にスプライシングされたアイソフォーム（本明細書では「 $\Delta 42PD1$ 」と呼ぶ）を標的とする抗体を提供する。ある実施形態では、抗体はモノクローナル抗体である。ある実施形態では、 $\Delta 42PD1$ を標的とする抗体の重鎖および／または軽鎖の可変領域を含む可変領域を、例えばヒトIgG4定常フラグメント（配列番号21）、好ましくはヒトIgG1定常フラグメント（配列番号19）を含むヒト抗体定常フラグメントに連結できる。ある実施形態では、 $\Delta 42PD1$ を標的とする抗体はマウスCH101またはマウスCH34である。CH101およびCH34については、以前に記載されている：（米国特許第10,047,137号および米国特許出願16/030,180を参照のこと。これらは参照によりその全体が本明細書に援用される）。対象発明の抗体の相補性決定領域はマウスCH101またはCH34ハイブリドーマ由来とでき、フレームワーク領域はヒト生殖細胞系由来である。

【0024】

CH101の可変領域はヒトIgG1定常フラグメントと連結でき、構築したキメラCH101は約66.1%（437／661）のヒト化率を示すことができる。場合により、抗体をさらにヒト化することができる。具体的には、キメラCH101の可変領域を改変して、ヒト化部分を約97.0%（641／661）まで高めることができ、ヒト化CH101抗体（huCH101）が得られる。CH34の可変領域は、ヒト定常フラグメント、例えばヒトIgG1またはIgG4の定常フラグメントおよび／またはヒトκ定常フラグメントと連結できる。ある実施形態では、相補性決定領域（CDR）グラフトを、免疫原性を緩和するために利用できる。CDRグラフトを実行するためのアプローチは、第1に非ヒト抗体のCDR領域を決定することである。第2に、ヒトの生殖細胞系から、レセプターとして適した最も相同性の高いものを探ることができる。最後に、マウスのCDRをヒトのフレームワーク領域（FR）にグラフトできる。

【0025】

したがって、本開示は、重鎖可変領域（VH）および軽鎖可変領域（VL）を含む、 $\Delta 42PD1$ 特異的抗体またはその抗原結合フラグメントであって、

（i）VHは、配列番号23～25にそれぞれ示されるアミノ酸配列を有するHCDR1～3を含み、VLは、配列番号26～28にそれぞれ示されるアミノ酸配列を有するLCDR1～3を含む；または

（ii）VHは、配列番号29～31にそれぞれ示されるアミノ酸配列を有するHCDR1～3を含み、VLは、配列番号32～34にそれぞれ示されるアミノ酸配列を有するLCDR1～3を含む、

$\Delta 42PD1$ 特異的抗体またはその抗原結合フラグメント、を提供する。

【0026】

本開示は、これらの番号付けシステムのいずれかに従って定義されたCDRを使用できるが、好ましい実施形態はKabataまたはChothiaの定義のCDRを使用する。

【0027】

C D R 配列が K a b a t の番号付けシステムに従って定義される場合、本明細書に開示される抗体の V H は、それぞれ配列番号 23 (G Y S I T S G F)、配列番号 24 (H Y S G S)、および配列番号 25 (S D F) に示されるアミノ酸配列を有する H C D R 1、H C D R 2、および H C D R 3 を含み、本明細書に開示される抗体の V L は、配列番号 26 (T S S Q S L L D R D G E T F M N)、配列番号 27 (L V S K L D F)、および配列番号 28 (W Q G T H F P L) にそれぞれ示されるアミノ酸配列を有する L C D R 1、L C D R 2、および L C D R 3 を含む；または

本明細書に開示される抗体の V H は、配列番号 29 (G F T F S D Y G)、配列番号 30 (I S S L A Y T I)、および配列番号 31 (A R G G A G F A Y) にそれぞれ示されるアミノ酸配列を有する H C D R 1、H C D R 2、および H C D R 3 を含み、本明細書に開示される抗体の V L は、配列番号 32 (D H I N N W)、配列番号 33 (G A T)、および配列番号 34 (Q Q Y W S T P W T) にそれぞれ示されるアミノ酸配列を有する L C D R 1、L C D R 2、および L C D R 3 を含む。

10

【0028】

いくつかの実施形態では、V H は配列番号 1 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、V L は配列番号 2 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。または

【0029】

いくつかの実施形態では、V H は配列番号 3 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、V L は配列番号 4 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

20

【0030】

いくつかの実施形態では、V H は配列番号 35 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、V L は配列番号 36 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

30

【0031】

いくつかの実施形態では、V H は配列番号 37 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、V L は配列番号 38 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0032】

好ましい実施形態では、V H は配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を含み、V L は配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含む。別の好ましい実施形態では、V H は配列番号 3 に示されるアミノ酸配列を含み、V L は配列番号 4 に示されるアミノ酸配列を含む。別の好ましい実施形態では、V H は配列番号 35 に示されるアミノ酸配列を含み、V L は配列番号 36 に示されるアミノ酸配列を含む。別の好ましい実施形態では、V H は配列番号 37 に示されるアミノ酸配列を含み、V L は配列番号 38 に示されるアミノ酸配列を含む。

40

【0033】

いくつかの実施形態では、抗体は I g G、I g A、I g M、I g E、および I g D よりなる群から選択されるアイソタイプである。いくつかの実施形態では、抗体は、I g G 1、I g G 2、I g G 3、および I g G 4 よりなる群から選択されるサブタイプである。

【0034】

いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号 19 または 21 と少なくとも 80 %、少な

50

くとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖定常領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号 18 と少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖定常領域を含む。

【0035】

いくつかの実施形態では、抗原結合フラグメントは、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fd'、Fv、scFv、ds-scFv、および dAb よりなる群から選択される。

【0036】

いくつかの実施形態では、抗体はマウス、ヒト、またはヒト化抗体である。好ましい実施形態では、抗体はヒト化抗体である。

【0037】

いくつかの実施形態では、抗体はモノクローナル抗体である。

【0038】

いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号 40 と少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号 41 と少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む。

【0039】

ある実施形態では、抗体は二重特異性抗体または多重特異性抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は、第 2 抗原に結合する第 2 抗原結合領域をさらに含む二重特異性抗体である。いくつかの実施形態では、第 2 抗原は腫瘍関連抗原または免疫細胞抗原、例えば T 細胞抗原である。

【0040】

ある実施形態では、ヒト化 Δ42PD1 特異的抗体は、配列番号 3 または配列番号 3 と少なくとも 70%、80%、90%、95%、97%、98%、もしくは 99% の配列同一性を有する配列を有する可変重鎖、および配列番号 4 または配列番号 4 と少なくとも 70%、80%、90%、95%、97%、98%、もしくは 99% の配列同一性を有する配列を有する可変軽鎖を含む。ある実施形態では、軽鎖はカッパ軽鎖である。ある実施形態では、ヒト化 Δ42PD1 特異的 mAb は、配列番号 19 または配列番号 19 と少なくとも 70%、80%、90%、95%、97%、98%、もしくは 99% の同一性を有する配列によるヒト IgG1 定常重鎖フラグメント、および配列番号 18 または配列番号 18 と少なくとも 70%、80%、90%、95%、97%、98%、もしくは 99% の同一性を有する配列によるヒト IgG1 軽鎖フラグメントを含む。

【0041】

ある実施形態では、ヒト化 Δ42PD1 特異的抗体は、配列番号 7 または配列番号 7 と少なくとも 70%、80%、90%、95%、97%、98%、もしくは 99% の配列同一性を有する配列によってコードされる可変重鎖、および配列番号 8 または配列番号 8 と少なくとも 70%、80%、90%、95%、97%、98%、もしくは 99% の配列同一性を有する配列によってコードされる可変軽鎖を含む。ある実施形態では、軽鎖はカッパ軽鎖である。ある実施形態では、ヒト化 Δ42PD1 特異的 mAb は、配列番号 20 または配列番号 20 と少なくとも 70%、80%、90%、95%、97%、98%、もしくは 99% の同一性を有する配列によってコードされるヒト IgG1 定常重鎖フラグメント、および配列番号 17 または配列番号 17 と少なくとも 70%、80%、90%、95%、97%、98%、もしくは 99% の同一性を有する配列によってコードされるヒト IgG1 軽鎖フラグメントを含む。

【0042】

10

20

30

40

50

重鎖または軽鎖のいずれの可変領域も、3つのCDRおよび4つのFRを含む。CDRは抗原との主要な接触領域であり、抗体の主要な機能を保持している。ある実施形態では、例えば配列番号9および／または配列番号10によるFR領域における配列変異のパーセンテージは約10%に達することがあり、 $\Delta 42PD1$ に結合する能力を保持できる。ヒト化CH101の場合、親CH101のCDRをすべて残し、ヒト化後の機能変化を試験した。その結果、huf rCH101は親マウスCH101の機能を76.79%保持していた(表1)。huf rCH101-IgG1の平均感度は293T- $\Delta 42PD1$ 細胞に対して約45.46%であり、親マウスCH101の平均感度は293T- $\Delta 42PD1$ 細胞に対して約59.2%である。この関連は、huf rCH101-IgG1が親マウスCH101の機能を約76.79%保持していると解釈できる。

10

【0043】

好ましい実施形態では、対象発明による組成物および方法は、ヒト化 $\Delta 42PD1$ 特異的mAbを利用する。ヒト化 $\Delta 42PD1$ 特異的mAbは、0.01~90重量%(wt%)、好ましくは0.1~50wt%、より好ましくは0.1~20wt%の濃度で組成物に添加しうる。別の実施形態では、精製されたヒト化 $\Delta 42PD1$ 特異的mAbは、許容される担体と組み合わせてもよく、そのとき、ヒト化 $\Delta 42PD1$ 特異的mAbは、0.001~50%(v/v)、好ましくは、0.01~20%(v/v)、より好ましくは、0.02~10%(v/v)の濃度で存在しうる。ある実施形態では、ヒト化 $\Delta 42PD1$ 特異的mAbは、約1mg/kg~約100mg/kgの用量で対象に投与される。

20

【0044】

一実施形態では、対象組成物は、例えば食品、カプセル、錠剤、または飲用液体などの経口摂取可能な製品として製剤化される。経口送達可能な医薬品とは、胃腸管または口腔粘膜への初期吸収を介して送達される生理学的に活性な物質である。局所用組成物も、例えば、静脈内、腹腔内、筋肉内、髄腔内、または皮下を含む注射を介して投与できる溶液として製剤化できる。他の実施形態では、対象組成物は、局所的または全身的な効果を得るために、パッチを通して皮膚を介して、または直接皮膚上に投与されるように製剤化される。組成物は、舌下、頬側、直腸、または膣から投与できる。さらに、組成物を鼻にスプレーして鼻膜から吸収させたり、噴霧したり、口または鼻を介して吸入したり、目または耳に投与したりすることもできる。

30

【0045】

本発明による経口摂取可能な製品は、摂取、栄養補給、口腔衛生、または嗜好に適した調製物または組成物であり、ヒトまたは動物の口腔内に導入され、一定期間そこに留まり、その後嚥下されるか(例えば、摂取容易な食品または錠剤)、または再び口腔から取り除かれる(例えば、チューインガム、または口腔衛生用品、または医療用洗口液)ことを意図した製品である。経口送達可能な医薬品は経口摂取可能な製品に製剤化でき、経口摂取可能な製品は経口送達可能な医薬品を含むことができるが、この2つの用語は本明細書で互換的に使用されることを意図していない。

【0046】

経口摂取可能な製品には、加工、半加工、または未加工の状態でヒトまたは動物が摂取することを意図したすべての物質または製品が含まれる。また、これには経口摂取可能な製品(特に食品および医薬品)の製造、処理、または加工時に添加され、ヒトや動物の口腔内に導入されることを意図した物質も含まれる。

40

【0047】

経口摂取可能な製品には、ヒトまたは動物が嚥下し、その後、そのままの、調製された、または加工された状態で消化されることを意図した物質も含まれ得る。したがって、本発明による経口摂取可能な製品には、製品とともに嚥下されることを意図した、または嚥下が予測されるケーシング、コーティング、または他のカプセル剤も含まれる。

【0048】

一実施形態では、経口摂取可能な製品は、所望の経口送達可能な物質を含むカプセル、

50

錠剤、シロップ、エマルション、または液体懸濁液である。一実施形態では、経口摂取可能な製品は、粉末形態の経口送達可能な物質を含むことができ、これを水または他の液体と混合して、飲用可能で経口摂取可能な製品を製造できる。

【0049】

いくつかの実施形態では、本発明による経口摂取可能な製品は、栄養または嗜好を目的とした1つ以上の製剤を含むことができる。これらには特に、製パン製品（例えば、パン、ドライビスケット、ケーキ、その他ペイストリー）、菓子類（例えば、チョコレート、チョコレート・バー製品、その他のバー製品、果実ガム、コーティングタブレット、ハードキャラメル、トフィー、およびキャラメル、およびチューインガム）、アルコール飲料または非アルコール飲料（例えば、ココア、コーヒー、緑茶、紅茶、緑茶または紅茶の抽出物で濃縮した紅茶または緑茶飲料、ルイボスティ、その他のハーブティー、果実含有レモネード、アイソトニック飲料、清涼飲料水、ネクター、果実または野菜ジュース、および果実または野菜ジュース調製飲料）、インスタント飲料（例えば、インスタントココア飲料、インスタント茶飲料、インスタントコーヒー飲料などである）、肉製品（例えば、ハム、未加工または生のソーセージ調理品、味付けまたはマリネした生肉または塩漬肉製品）、卵または卵製品（例えば、乾燥全卵、卵白、卵黄）、穀類製品（例えば、朝食用シリアル、ミューズリーバー、調理済みインスタントライス製品）、乳製品（例えば、全脂肪または低脂肪乳飲料、無脂肪乳飲料、ラispディング、ヨーグルト、ケフィア、クリームチーズ、ソフトチーズ、ハードチーズ、乾燥粉乳、乳清、バター、バターミルク、および乳タンパク質を含む一部または全部を加水分解した製品などである）、大豆タンパク質またはその他の大豆画分を原料とする製品（例えば、豆乳およびその調製品、分離または酵素処理された大豆タンパク質を含む飲料、大豆粉を含む飲料、大豆レシチンを含む調製品、豆腐またはテンペなどの発酵製品、その調製品、および果実調製品および場合により香味物質との混合物などである）、果物調製品（例えば、ジャム、フルーツアイスクリーム、フルーツソース、およびフルーツフィリングなど）、野菜調製品（例えば、ケチャップ、ソース、乾燥野菜、冷凍野菜、調理済み野菜、および茹で野菜）、スナック菓子（例えば、焼きポテトチップスまたは揚げポテトチップス（クリスプ）、ポテト生地製品、およびトウモロコシまたはピーナッツを原料とする押出製品）、油脂またはその乳化物を原料とする製品（例えば、マヨネーズ、レムラード、およびドレッシング）、その他の調理済み食品およびスープ（例えば、ドライスープ、インスタントスープ、調理済みスープ）、調味料（例えば、ふりかけ調味料）、甘味料組成物（例えば、タブレット、サシェ、および飲料または他の食品を甘くまたは白くするための他の調製物）。本発明の組成物はまた、栄養または嗜好を目的とする他の組成物の製造のための半製品として機能する。

【0050】

対象組成物は、1つ以上の医薬上許容される担体、および／または賦形剤をさらに含むことができ、例えば、錠剤、カプセル剤、粉末剤、顆粒剤、軟膏剤、溶液剤、坐剤、注射剤、吸入剤、およびエアロゾル剤などの固体、半固体、液体、または気体の形態の製剤に製剤化できる。

【0051】

本明細書で使用される「医薬上許容される」なる用語は、医薬組成物の他の成分と適合性があり、そのレシピエントに有害でないことを意味する。

【0052】

対象発明による担体および／または賦形剤は、あらゆるおよびすべての溶媒、希釈剤、緩衝剤（例えば、中性緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、または場合により Tris-HCl 緩衝液、酢酸緩衝液、リン酸緩衝液など）、水中油型または油中水型エマルション、例えば静脈内使用に適した有機共溶媒を含むかまたは含まない水性組成物、可溶性剤（例えば、ポリソルベート65、ポリソルベート80）、コロイド、分散媒体、ビヒクル、充填剤、キレート剤（例えば、EDTAまたはグルタチオン）、アミノ酸（例えば、グリシン）、タンパク質、崩壊剤、結合剤、滑沢剤、湿潤剤、乳化剤、甘味剤、着色剤、

香料、芳香剤、増粘剤（例えば、カルボマー、ゼラチン、またはアルギン酸ナトリウム）、コーティング剤、保存剤（例えば、チメロサル、ベンジルアルコール、ポリクオタニウム）、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸、ピロ亜硫酸ナトリウム）、強壮剤、吸収遅延剤、アジュバント、増量剤（例えば、ラクトース、マンニトール）を含み得る。医薬品やサプリメントの分野における担体および／または賦形剤の使用はよく知られている。対象となる健康促進物質または組成物と不適合な従来の媒体または薬剤を除き、対象組成物における担体または賦形剤の使用が考えられる。

【0053】

一実施形態では、対象発明の組成物は、例えば、噴霧または吸入できるように、エアロゾル製剤にできる。エアロゾルまたはスプレーの形態で投与するのに適した医薬製剤は、例えば、粉末、粒子、溶液、懸濁液またはエマルジョンである。経口または鼻腔エアロゾルまたは吸入投与用の製剤は、例えば生理食塩水、ポリエチレングリコールまたはグリコール、DPPC、メチルセルロースなどの担体を用いて、または粉末分散剤またはフルオロカーボンとの混合物で製剤化することもできる。エアロゾル製剤は、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素、フルオロカーボン、および／または当技術分野で知られている他の可溶化剤または分散剤などの加圧された推進剤に入れることができる。例示的に、送達は、単回使用送達デバイス、ミスト噴霧、呼吸活性化粉末吸入器、エアロゾル定量吸入器（MDI）、または当該技術分野で利用可能な多数の噴霧送達デバイスの他のあらゆるものの使用によることができる。さらに、ミストテントまたは気管内チューブを介した直接投与も行われる。

【0054】

一実施形態では、対象発明の組成物は、例えば、溶液または懸濁液として、注射を介した投与のために製剤化できる。溶液または懸濁液は、マンニトール、1,3-ブタンジオール、水、リンゲル液、または等張塩化ナトリウム溶液などの適切な非毒性で非経口的に許容される希釈剤または溶媒、または合成モノグリセリドまたはジグリセリドを含む滅菌された非刺激性の固定油、およびオレイン酸を含む脂肪酸などの適切な分散剤または湿潤剤および懸濁剤を含むことができる。静脈内使用のための例示的担体には、10% USP エタノール、40% USP プロピレングリコール、またはポリエチレングリコール 600、および平衡 USP 注射用水（WFI）の混合物が含まれる。静脈内使用のための他の例示的担体には、10% USP エタノールおよび USP WFI；USP WFI 中の 0.01-0.1% トリエタノールアミン；または USP WFI 中の 0.01-0.2% ジパルミトイルジホスファチジルコリン；および 1-10% スクアレンまたは非経口植物油中水型エマルジョンが含まれる。水または生理食塩水、デキストロースおよびグリセロールの水溶液が、特に注射液用の担体として好ましくは使用される。皮下または筋肉内使用のための担体の例示には、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）溶液、WFI 中の 5% ブドウ糖、USP WFI 中の 5% ブドウ糖、5% ブドウ糖中の 0.01%-0.1% トリエタノールアミン、または USP WFI 中の 0.9% 塩化ナトリウム、あるいは 1対2 または 1対4 の USP エタノールの混合物、40% プロピレングリコールおよび 5% ブドウ糖または 0.9% 塩化ナトリウムなどの許容される等張溶液；または 0.01-0.2% ジパルミトイルジホスファチジルコリンの USP WFI 溶液および 1-10% スクアレンまたは非経口植物油中水型エマルジョンが含まれる。

【0055】

一実施形態では、対象発明の組成物は、例えば、リンス、スプレー、またはドロップ、ローション、ゲル、軟膏、クリーム、泡、粉末、固体、スポンジ、テープ、蒸気、ペースト、チンキ、または経皮パッチ使用を含む局所用組成物として、皮膚への局所適用を介して投与するために製剤化できる。局所適用の好適な製剤は、医薬上活性な担体のいずれかに加えて、例えば、カルナウバワックス、セチルアルコール、セチルエステルワックス、乳化ワックス、加水ラノリン、ラノリン、ラノリンアルコール、マイクロクリスタリンワックス、パラフィン、ペトロラタム、ポリエチレングリコール、ステアリン酸、ステアリルアルコール、白色蜜蝋、または黄色蜜蝋などのエモリエント剤を含むことができる。さ

らに、組成物は、グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ソルビトール溶液、および1, 2, 6ヘキサントリオールなどの保湿剤、またはエタノール、イソプロピルアルコール、オレイン酸などの浸透促進剤を含み得る。

【0056】

ヒト化 $\Delta 42PD1$ 特異的mAbの投与

ある実施形態では、ヒト化 $\Delta 42PD1$ 特異的mAbを対象に投与できる。例えば、経口投与、静脈内投与、腹腔内投与、筋肉内投与、皮内投与、または皮下投与などを含む、阻害薬を対象内の細胞に接触させることができるあらゆる投与手段が、対象方法において想定される。好ましい実施形態では、ヒト化 $\Delta 42PD1$ 特異的mAbを静脈内投与できる。

【0057】

ある実施形態では、ヒト化 $\Delta 42PD1$ 特異的mAbは、対象の健常細胞および／または腫瘍細胞または癌細胞と接触できる。ある実施形態では、ヒト化 $\Delta 42PD1$ 特異的mAbは、癌性肝細胞を含む肝臓の細胞と接触できる。ある実施形態では、ヒト化 $\Delta 42PD1$ 特異的mAbは肝細胞癌および他の固形癌を阻害できる。ヒト化 $\Delta 42PD1$ 特異的mAbは、例えば癌細胞を含む対象の細胞に浸透できる。ある実施形態では、ヒト化 $\Delta 42PD1$ 特異的mAbは腫瘍細胞の増殖を阻害できる。ヒト化 $\Delta 42PD1$ 特異的mAbは、 $\Delta 42PD1$ の発現および／または $\Delta 42PD1-TLR4$ 系の機能を調節することにより、腫瘍細胞の増殖を阻害できる。

【0058】

材料と方法

プラスミド構築

発現プラスミドの構築には、NEBuilder (登録商標) HiFi DNA Assembly Master Mix (New England BioLabs, Ipswich, MA) を用いて、抗体の可変重鎖をAbVec2.0-IGHG1プラスミド (Addgene, Watertown, MA) のバックボーンで組み立てた。そして抗体の可変カッパ鎖はAbVec1.1-IGKCプラスミド (Addgene) のバックボーンで組み立てた。

【0059】

抗体検出

マウス血漿をPBSで1:1に希釈し、LEGENDplex (商標) ヒト炎症パネル1 (13-plex) (Biolegend, San Diego, CA) を製品マニュアルに従って使用し、炎症性サイトカインプロファイルを測定した。BioLegendのLEGENDplex (商標) アッセイは、サンドイッチイムノアッセイと同じ基本原理を用いたビーズベースのイムノアッセイである。特定の分析物の濃度は、同じアッセイで作成された標準曲線を用いて決定される (ワールドワイドウェブサイト: [biolegend.com/en-us/products/legendplex-human-inflammation-panel-1-13-plex-with-v-bottom-plate-16929?GroupID=GROUP25](https://www.biolegend.com/en-us/products/legendplex-human-inflammation-panel-1-13-plex-with-v-bottom-plate-16929?GroupID=GROUP25) を参照のこと。参照により、現行のマニュアルとともに本明細書に援用される)。

【0060】

統計分析

統計解析にはGraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) を用いた。一元配置分散分析ならびに多重比較は、3群以上が関与している場合に、群の平均値を比較するために行われた。2群内の群平均の差は、対応のないt検定によってのみ評価した。p値<0.05を有意とした。統計学的検定に関する具体的な詳細は、図のレジェンドに記した。

【0061】

患者、処置、およびサンプル採取

香港赤十字から、年齢中央値31歳 (四分位範囲22-67歳; 男性62.16%対女性37.84%; HBV/HCV陰性) の健康なヒト血液バフィーコートを手に入れた。適格な患者は18歳以上で、組織学的または細胞学的分析により診断が確定され、米国肝疾

10

20

30

40

50

患学会に準拠した臨床的特徴を有する患者である。すべての患者は登録前に肝臓に対する全身療法を受けていない。2016年7月から2019年11月まで、香港のクイーン・メアリー病院外科で、標準治療として根治切除術を受けた41人の患者が管理された。サンプルは2つの時点で採取された：末梢全血は外科的切除前に採取され、一対の腫瘍および隣接する非腫瘍サンプルは切除後に採取された。

【0062】

フローサイトメトリーおよび免疫蛍光分析

フローサイトメトリー分析と免疫蛍光分析は、前述したように実施および分析した。細胞を染色バッファ(2%FBSを含むPBS)中のFc Block(Biolegend)で10分間インキュベートした後、表示の抗体(補足表2)で4℃にて30分間染色した。細胞内染色では、細胞をBD Cytotfix/Cytoperm(BD Biosciences)で固定および透過処理した後、Perm/Washバッファ(BD Biosciences)中で、4℃にて30分間mAbで染色を行い、1mlの染色用バッファで洗浄した。すべてのサンプルはFACS Aria IIIフローサイトメーター(BD Biosciences)を用いて取得し、結果はFlowJoソフトウェア(v10.6)(BD Biosciences)を用いて分析した。

【0063】

以下の抗体をBioLegend社から購入し、フローサイトメトリーに使用した：CD3(クローンHIT3a)、CD4(クローンA161A1)、CD8a(クローンHIT8a)、CD45(クローン2D1)、CD19(クローンHIB19)、CD16(クローン3G8)、CD14(クローンHCD14)、CD11c(クローンS-HCL-3)、HLA-DR(クローンLN3)、CD45RA(クローンHI100)、CCR7(クローンG043H7)、CD27(クローンM-T271)、IFN-γ(クローンB27)、TNF-α(MAb11)、IL-2(クローンMQ1-17H12)、PD-1(クローンEH12.2H7、NAT105、およびA17188B)、Tim-3(クローンF38-2E2)、およびLAG3(クローン11C3C65)。以下の抗体はBD Biosciences社から購入し、フローサイトメトリーに使用した：CD56(NCAM-1)、VISTA(クローンMIH65)、およびCD244(クローン2-69)。Δ42PD-1抗体(クローンCH101)をフローサイトメトリーに関して前述したようにAntibody Labeling Kit(Invitrogen)を用いてAlexa Fluor 568/647で標識した。死細胞はZombie Aqua Fixable Viability Kit(BioLegend)で染色した。細胞表面および細胞内の免疫染色は、前述の方法で行った。アネキシンV染色(BD Bioscience)は、製品マニュアルに従って行った。フローサイトメトリーデータ分析は、FlowJoソフトウェア(Tree Star, v10)を用いて行った。

【0064】

免疫蛍光染色および免疫組織化学染色は、抗ヒトCD3(クローンCD3-12、AbD Serotec; #A0452, DAKO)、抗ヒトTLR4(#ab150583, Abcam)、抗Δ42PD-1(クローンCH101)、抗IL6(クローンM-19, Santa Cruz)および抗PD-1(クローンNAT105, Abcam)抗体を用い、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 568またはAlexa Fluor 647(Invitrogen)で標識した二次抗体を用いて行った。カウンター染色はHoechst 33258で行い、染色した切片は蛍光封入剤(DAKO)を用いてマウントした。その後、共焦点顕微鏡(LSM710/780/800, Carl Zeiss, 対物レンズ20倍および40倍)を用い、ZENソフトウェアで画像を取得した。免疫染色シグナルの積算強度と細胞数は、ソフトウェアImageJで定量化した。

【0065】

ヒト化マウスモデル

免疫不全NOD.Cg-Prkdcscid Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ(NSG, Jackson Laboratories)を、HKU実験動物ユニット(LAU)の最小疾患エリアで繁

10

20

30

40

50

殖および飼育した。すべての動物実験は、香港大学実験動物ユニットの「教育および研究における生きた動物の使用に関する委員会」によって承認された（ライセンス番号3883-16）。雌雄両方のマウスを盲検化せずに無作為に選んだ。6～8週齢のマウスに、 $1.0 \sim 1.5 \times 10^7$ 個の健常ヒトPBMCを0.5 mLのPBSで腹腔内注射した。10日目に動物の血液を採取し、フローサイトメトリーでヒトリンパ球のレベルを調べた。血液サンプル中の赤血球は、染色前に赤血球溶解バッファ（BD PharmLyse）で溶解した。生着に成功したマウス（NSG-huPBL）をHCCモデルの樹立に使用した。皮下注射HCCモデルでは、 2×10^6 個のHuh7またはPLC5細胞を、NSG-huPBLマウスの右後脇腹に皮下注射した。腫瘍体積はノギスで測定した（腫瘍体積 = $1/2$ （長さ×幅²））。同所性HCCモデルでは、皮下注射したMHCC-97L腫瘍は直径1 cmに達した時点でNSGマウスから採取し、無菌状態で切り分けた。その後、 1 mm^3 の大きさの無傷のピースを各NSG-huPBLマウスの左肝葉にグラフトした。ルシフェラーゼ発現腫瘍をIVISスペクトル（PerkinElmer）で測定し、前述したようにLiving Imageソフトウェア（version 4.0, PerkinElmer）を用いて関心領域（ROI）内のphotons/s/cm²/srとして表示した。標本はホルマリン亜鉛固定液（sigma）で固定し、パラフィンブロックに包埋した。

10

【0066】

エクスピボ細胞調製

マウスPBMCおよび脾臓細胞を前述の方法で単離した。新鮮なPBMCは、健常人またはHCC患者の末梢血から勾配遠心分離（Ficoll-Paque, GE Healthcare）によって単離した。腫瘍または隣接する非腫瘍組織をフラグメントに切断し、Tumor Dissociation Kit（Miltenyi Biotec）を用いて、製品マニュアルに従って、gentleMACS Octo Dissociator（Miltenyi Biotec）の下で消化した。細胞は70 μmのストレーナーに通した後、40% / 80% パーコール勾配（Sigma）にかけた。間期の白血球を、800 g、20分間の遠心分離で回収した。CD3⁺T細胞を、Pan T Cell Isolation Kit（Miltenyi Biotec）を用いて単離した。Δ42PD-1⁺T細胞およびΔ42PD-1⁻T細胞を、特異的抗体染色後、セルソーター（BD Aria III）で単離した。

20

【0067】

インビトロT細胞培養、増殖アッセイ、および細胞毒性アッセイ

細胞を、10% FBS（ギブコ）と抗生物質を添加したRPMI 1640（gibco）を用い、96ウェルUボトムプレートで37℃、5% CO₂の条件下で培養した。増殖アッセイでは、精製T細胞を培養前にカルボキシフルオレセイン6スクシンイミジルエステル（CFSE, Thermo Scientific）で染色し、フローサイトメトリー（BD Aria III）で分析する前に、T細胞活性化／拡大キット（Miltenyi Biotec）をビーズ対T細胞比1：4で4～5日間インキュベートした。サイトカイン産生を分析するために培養上清を採取した。Huh7細胞に対する精製T細胞の細胞傷害性効果は、製品マニュアルに従ってNon Radioactive Cytotoxicity Assay（Promega）を用いて測定した。血漿、培養上清または腫瘍溶解液中のすべてのサイトカイン濃度を、LEGENDplex ヒトパネル（13-plex, BioLegend）によって測定した。腫瘍を切り刻み、プロテアーゼ阻害薬カクテル（Roche）を加えたT-PER組織タンパク質抽出試薬（Thermo Scientific）でホモジナイズしてから分析した。

30

40

【0068】

HIV-1 感染対象

中国広東省深セン市の深セン第三人民病院で募集した、12人のART患者と74人の未処置患者を含む合計86人のHIV-1感染患者を調査した。本研究は、香港大学／病院局香港ウエストクラスター研究倫理委員会、香港イーストクラスター研究倫理委員会、九龍ウエストクラスター研究倫理委員会の承認を得て実施した（UW 19-834）。血液サンプルは、各参加者から書面によるインフォームドコンセントを得た後に採取した。すべての患者はB型肝炎およびC型肝炎に対して血清陰性であり、活動性結核の徴候を

50

示した患者はいなかった。

【0069】

末梢血単核球 (P B M C) の単離

P B M Cを、患者および健康なドナーから採取した新鮮な血液サンプルから、B S L-3の実験室でF i c o l l-P a q u e密度勾配遠心法を用いて分離した。精製したP B M Cを、免疫細胞の表現型分析およびB細胞の単離に用いた。残りの細胞を、凍結培地 (90% F B S + 10% D M S O) 中で、 -150°C で $5 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ の密度で凍結保存した。)

【0070】

抗体の精製

$\Delta 42 \text{PD1}$ 特異的モノクローナル抗体C H 1 0 1およびC H 3 4は、以前に記載されたように精製される(Chengら, 2015; Cheungら, 2017)。簡単に説明すると、C H 3 4またはC H 1 0 1産生ハイブリドーマ細胞を、不完全フロイントアジュバント刺激を受けた6-8週齢のB A L B/cマウスに腹腔内注射する。1~2週間後、腹水を腹腔から取り出し、37度で1時間、その後4度で一晩インキュベートする。その後、腹水を4000 x g、4度で30分間遠心分離し、P i e r c e (商標) タンパク質Gアガロースを用いて抗体を精製するために1~2部のP B Sで希釈する。抗 $\Delta 42 \text{PD1}$ 抗体C H 3 4は、A n t i b o d y L a b e l i n g K i t (Invitrogen)を用いてA l e x a F l u o r 647で標識した。

【0071】

免疫細胞化学アッセイ

細胞を回収し、 3×10^6 細胞/mLに濃縮した。10 μL の細胞懸濁液を清潔なスライドガラス上に滴下し、その後フード内で1時間乾燥させた。サンプルは低温のメタノールまたは10%中性緩衝ホルマリン中のいずれかで10分間R Tで固定し、0.5% T r i t o n X-100で10分間透過処理した。その後、サンプルを一次抗体で1時間、R Tで染色し、P B Sで洗浄後、フルオレセイン結合二次抗体で1時間、R Tで染色した。細胞を1:10,000に希釈したH o e c h s t 33258 (Cat. No. H3569, Life Technologies)を用いて、10分間R Tで処理した。洗浄後、C a r l Z e i s s L S M 780共焦点顕微鏡 (Oberkochen, Germany)を用いて顕微鏡画像を得た。

【0072】

B細胞の単離

全B細胞は、抗I g Dマイクロビーズ (Miltenyi Biotec)を用いて、製品マニュアルに従ってI g D陽性選択を行うことにより、汎B細胞単離キット(Miltenyi Biotec)を用いてヒトP B M Cから単離した。

【0073】

B細胞培養

B細胞は、 $\alpha\text{-I g M/G F (a b')}_2$ (10 $\mu\text{g/mL}$, Thermofisher) 単独存在下、または $\alpha\text{-I g M/G F (a b')}_2 + \text{C p G}$ (1 μM , Invitrogen)、または $\alpha\text{-I g M/G F (a b')}_2$ (10 $\mu\text{g/mL}$) + I L-2 (20 U/mL, R&D Systems)、I L-10 (100 ng/mL, R&D Systems) およびC D 40 L (500 ng/mL, PeproTech) の存在下で10% F B Sおよび1%ストレプトマイシン/ペニシリン (いずれもGibco) を含むR P M I 1640培地で5日間培養した。B細胞の増殖を測定するため、カルボキシフルオレセイン-6-スクシンイミジルエステル (C F S E、P B S中5 μM , Biolegend) で標識したB細胞を96ウェルU底プレートで4~5日間培養した。増殖しているB細胞は、低C F S E細胞のパーセンテージを計算することによって決定した。免疫沈降/C o-I Pおよびウェスタンブロットアッセイでは、B細胞を2日間培養した。C H 3 4処理をした実験では、0日目に10 $\mu\text{g/mL}$ のC H 3 4またはアイソタイプ対照のm s I g G 2 bをB細胞に添加した。

【0074】

免疫沈降／C o - I P およびウェスタンブロットアッセイ

細胞溶解には、プロテアーゼおよびホスファターゼ阻害薬(Thermo Fisher Scientific)を含む1% SDS溶解バッファ(50mM Tris、pH 8.0、1mM EDTA、100mM NaCl、5mM DTT、および1% SDS)を使用した。調製したタンパク質溶解サンプルを、関連する免疫沈降抗体とともに4℃で一晩振盪した後、プロテインGアガロースビーズとインキュベートし、さらに3～4時間振盪した。沈殿物を溶解バッファで4～5回洗浄した。最後に、SDSローディングバッファを加え、5分間ボイルし、SDS-PAGE電気泳動にかけた。免疫沈殿液またはタンパク質溶解液を、8%または12%ポリアクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEで分離し(80V、～30分、120V、～1.2時間)、ポリビニリデンジフルオライド(PVDF)膜に転写した(0.3A、1.2時間)。その後、転写した膜を5%スキムミルク(TBSTに溶解)で室温で1時間ブロッキングした。ブロッキング後、一次抗体溶液(5%BSA TBSTバッファで1/1000に希釈)とともに一晩、4℃でインキュベートした。その後、メンブレンをTBSTで3×10分間洗浄した。洗浄後、メンブレンを蛍光標識二次抗体と室温で1.5時間振盪インキュベートした。その後、再度メンブレンをTBSTで3×10分洗浄した。その後メンブレンを乾燥させ、Li-COR Odysseyでスキャンした。

10

【0075】

RNA単離、PCR、およびRT-PCR

全細胞RNAをRNAiso plusまたはAll Prep DNA/RNA mini kitを用いて、製品マニュアルに従って抽出した。RNA抽出は、Prime Script RT reagent Kitを用いてcDNAを合成するために行った。cDNAは、PCRによる特定の遺伝子の増幅、またはqPCRによる関連遺伝子の発現レベルの定量に用いた。qPCR反応は、SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa)を用いて調製し、AB VIIA7 RUOソフトウェア(Applied Biosystems)を用いて行った。Gapdhをハウスキーピング遺伝子として使用した。

20

【0076】

本明細書で言及または引用されるすべての特許、特許出願、仮出願、および刊行物は、本明細書の明示的な教示と矛盾しない限り、すべての図および表を含め、参照によりその全体が援用される。

30

【実施例】

【0077】

以下は本発明を実施するための手順を例示する実施例である。これらの実施例は限定的に解釈されるべきではない。すべてのパーセンテージは重量比であり、すべての溶媒混合比率は特に断りのない限り体積比である。

【0078】

実施例1-huCH101の増幅と構築

ヒト化CH101抗体およびその変異体を作製するために、マウスCH101の可変重鎖および可変軽鎖を、前述のように特定のプライマーセットを用いて、CH101の選択されたハイブリドーマクローンから増幅した。クローン化された配列は、IMGTおよびV-BASEのデータベースで検索し、CDRグラフトのために選択された最も適合性の高いヒト生殖細胞系列と、図1および図2A-2Bに示されるようにアライメントした。ヒトIgG1の可変重鎖またはκ鎖には合計112個のアミノ酸、定常フラグメントには330個のアミノ酸、κ鎖の定常領域には107個のアミノ酸がある。CH101の可変領域をヒトIgG1定常フラグメントと連結させると、構築したキメラCH101は66.1%(437/661)のヒト化率を示した。続いて、キメラCH101の可変領域をさらにヒト化し、huCH101(またはヒトフレームワークhufRCH101と呼ぶ)においてヒト化部分を97.0%(641/661)まで高めた(図1)。

40

【0079】

実施例2-ヒト化CH101とその変異体の作製

50

CH101変異体の治療活性を利用するために、CH101のキメラバージョンまたはヒト化バージョンの定常領域に様々な改変を加え、CH101-huIgG1(N297A)、CH101-huIgG1(L/S)、CH101-huIgG4、huCH101-IgG1、huCH101-IgG4、CH101-huIgG1(キメラCH101)を含む一連のCH101ヒト化抗体を得た。オリジナルのCH101(親、完全マウス)を、これらのヒト化バージョンの陽性対照として含めた。CH101は細胞表面に発現するΔ42PD1のコンフォメーション構造に特異的に結合するため、フローサイトメトリーによってヒト化CH101抗体の様々なバージョンを評価するために、293T-Δ42PD1および293T-PD1細胞株を実験室で樹立した。すべてのヒト化抗体は、細胞表面に発現するΔ42PD1を認識できたが、異なる特異性であった(図3A-3I)。詳細な統計解析により、Δ42PD1との相互作用におけるヒト化抗体の各バージョンの活性が、異なる特異性および感度で明らかになった(表1)。データが示すように、親マウスCH101は平均59.20%の293T-Δ42PD1細胞を検出でき、キメラIgG1バージョンでは感度は70.08%に上昇するが、hufrCH101-IgG1では45.46%まで低下する。しかし、CH101-huIgG1と293T-PD1細胞との交差反応率は平均7.68%であり、親マウスCH101では3.15%であった。対照的に、huCH101-IgG1と293T-PD1細胞との間にはほとんど交差反応が見られなかった。CH101-huIgG1(N297A)、CH101-huIgG1(L/S)、およびCH101-huIgG4を含む、Fcエンジニアリングを用いたCH101のキメラバージョンの発現が限られているため、これらの抗体の量は蛍光標識には不十分であった。第2の抗ヒトFc抗体を用いてFACS染色を行ったところ、高い頻度で非特異的染色が観察され、293T-PD1細胞との非特異的交差反応につながった。これらの抗体は、それゆえ、より良い生産のためにさらなる最適化が必要であった。

10

20

30

40

50

【0080】

【表1】

表1. フローサイトメトリーで測定したヒト化CH101抗体のΔ42PD1の結合

抗体 (10 μg/ml)	293T-Δ42PD1 (%)	293T-PD1 (%)
CH101-huIgG1(N297A)	68.29	36.09
CH101-huIgG1(L/S)	65.69	38.49
CH101-huIgG4	62.79	32.89
hufrCH101-IgG4	54.59	1.58
hufrCH101-IgG1	(45.46±18.70)	(0.04±0.07)
CH101-huIgG1	(70.08±17.02)	(7.68±6.08)
マウス CH101	(59.20±19.84)	(3.15±6.18)
ヒト IgG1 アイソタイプ	-	-
抗 PD1-APC	-	(81.68±14.25)

【0081】

実施例3-NSG-PBLマウスにおけるCH101のヒト化バージョンの半減期

次に、3種類のヒト化CH101抗体、CH101-huIgG1、CH101-IgG4、およびhufrCH101-IgG1をNSG-PBLマウスで評価した。各抗体をマウスあたり200μgの用量で1回注射した後、異なる時間間隔で得られたマウスの血漿サンプルを分析した。続いて、各抗体の半減期の詳細値を算出するために、各抗体の末梢量をELISAで測定した。調査対象となった3種類すべての抗体の血漿中濃度は、

いずれも注射後72時間以内に経時的に低下し、その後5日後には低レベルでプラトーとなった。図4A-4Dに示すように、CH101-IgG4の半減期は45.35hrであり、CH101-huIgG1(44.55hr)およびhufrCH101-IgG1(36.44hr)と比較して他よりわずかに長かった。

【0082】

実施例4-HCCマウスモデルで試験した治療介入としてのキメラCH101

ヒト化NSG-huCD34マウスモデルは、HIV-1抗体試験のために十分に確立されていないため、まず、CH101のキメラバージョンであるCH101-IgG1(ヒト化率66.1%)について、HCCマウスモデルでの免疫療法としての可能性を評価した。NSG-PBLマウスは、前述したように樹立した。その後、Hu h7細胞を皮下接種した(図5A)。Hu h7細胞は、抗体介入の1週間前からNSG-PBLマウスで増殖させた。抗体処置後、エンドポイントまでHu h7腫瘍の経時的増殖を週単位で観察した(図5B)。腫瘍誘発後14日目および28日目(エンドポイント)では、主にCH101-huIgG1群および対照群で、抗体処置群と対照群の間に有意差があった(図5Cおよび表2)。具体的には、CH101-huIgG1群は14日目にhu-IgG1対照群より平均3.83mm³小さい腫瘍を示した。同時に、親マウスCH101群は、マウスIgG1対照群と比較して、4.12mm³の同等の減少を示した。エンドポイントでは、CH101-huIgG1群において腫瘍体積の有意な減少が一貫して観察され、平均38.94mm³であった(表2)。しかし、1/5マウスのエスケープによる腫瘍重量(図5D)にも、血漿中に放出された炎症性サイトカインにも有意差はなかった(図5E-5G)。

【0083】

【表2】

表2. NSG-PBLマウスにおけるCH101-huIgG1処理後の腫瘍増殖(mm³)

抗体	7日目	14日目	21日目	28日目
CH101-huIgG1	11.68±1.22	14.30±2.48	16.82±6.34	24.96±11.12
ヒトIgG1対照	12.72±0.96	18.13±2.72	25.79±5.07	63.90±2.68
マウスCH101	11.55±0.49	12.40±0.61	17.83±4.88	20.64±4.70
マウスIgG1対照	12.39±0.67	16.52±0.66	28.02±10.55	62.13±39.26
CH101-huIgG1対ヒトIgG1対照	p=0.2244	p=0.0168	p=0.1892	p=0.0256
マウスCH101対マウスIgG1対照	p=0.3836	p=0.0100	p=0.1908	p=0.0517
CH101-huIgG1対マウスCH101	p=0.9934	p=0.3468	p=0.9946	p=0.9847

各群の平均体積は平均±SDで示した。群間の腫瘍体積の多重比較を行い、P値を示した。

【0084】

実施例5-HCCマウスモデルにおけるhufrCH101-IgG1の処置介入試験

次に、SG-PBLマウスにおける肝細胞癌抑制効果について、CH101の97.0%ヒト化バージョンであるhufrCH101-IgG1Nを評価した。同様に、NSG-PBLマウスをセットアップし、皮下にHu h7腫瘍細胞をチャレンジした(図6A)。腫瘍接種1週間後から5日間、毎日抗体処置を行った。マウスの腫瘍増殖を測定し、腫瘍の体積を人道的エンドポイントまで1週間ごとに記録した(図6B-6C)。心強いことに、腫瘍サイズは対照群と比較して、主にhufrCH101-IgG1群で有意に減少した(図6Cおよび表3)。HufrCH101-IgG1群は、14日目のhu-IgG1対照群の11.55mm³と比べて、CH101-huIgG1群の7.90mm³と同様に平均7.82mm³の腫瘍サイズを示した。腫瘍の大きさは、2つのヒト化CH101抗体群で進行が遅く、21日目にそれぞれhufrCH101-IgG1で13.33mm³、CH101-huIgG1で14.56mm³を示し、対照群の23.96mm³と対照的であった。その後、hufrCH101-IgG1は、対照群の27.

27 mm³ に比べ、平均 14.26 mm³ と、エンドポイントでの腫瘍サイズの比較的良好な制御を示した（表 3）。腫瘍重量（図 6 D）にも血漿中の炎症性サイトカインレベルにも有意な減少は認められず（図 6 E - 6 G）、さらなる分析の必要があった。

【0085】

実施例 6 - HCC の腫瘍形成および IC B に対する耐性における Δ 4 2 P D - 1 の役割

免疫チェックポイント遮断薬（IC B）は癌処置を改善したが、肝細胞癌（HCC）患者の多くが P D - 1 IC B に抵抗性を示す理由はまだわかっていない。ここで、肝細胞癌の腫瘍形成とニボルマブ IC B に対する抵抗性におけるプログラム細胞死タンパク質 1（P D - 1）のアイソフォームである Δ 4 2 P D - 1 の役割を明らかにした。HCC 患者における異なる T 細胞サブセット上の Δ 4 2 P D - 1 発現を、上記の「材料と方法」に記載された方法で検出した。38 人の HCC 患者と 43 人の健常人の P B M C における Δ 4 2 P D - 1 + T 細胞および P D - 1 + T 細胞（図 7 A - 7 B）、これらの HCC 患者の P B M C における Δ 4 2 P D - 1 + C D 4 + T 細胞および C D 8 + T 細胞（図 7 C - 7 D）、25 人の HCC 患者由来の腫瘍組織と隣接する非腫瘍組織における Δ 4 2 P D - 1 + T 細胞または P D - 1 + T 細胞（図 7 E - 7 F）、および同じ患者から採取した腫瘍組織および隣接する非腫瘍組織における Δ 4 2 P D - 1 + C D 4 + T 細胞または Δ 4 2 P D - 1 + C D 8 + T 細胞の頻度（図 7 G）を測定した。HCC 患者の同じコホートにおいて、P B M C（n = 38）および腫瘍（n = 25）それぞれの Δ 4 2 P D - 1 + T 細胞と P D - 1 + T 細胞の頻度間の相関を評価した（図 7 H）。U I C C 8 ステージ群に層別化した肝細胞癌患者の P B M C と腫瘍における P D - 1 + T 細胞と Δ 4 2 P D - 1 + T 細胞の頻度も測定し、図 7 I に示した。

【0086】

未処置の HCC 患者において異なる T 細胞サブセットを発見したが、これは P D - 1 を発現しないが、アイソフォーム Δ 4 2 P D - 1 を発現し、細胞傷害性 T リンパ球の最大 71 % を占めていた。Δ 4 2 P D - 1 + T 細胞は腫瘍に浸潤しており、HCC の重症度と正の相関を示した。さらに、P D - 1 + T 細胞は、単一 T 細胞機能分析によれば、P D - 1 + T 細胞よりも消耗していた。

【0087】

実施例 7 - マウスモデルにおける抗 Δ 4 2 P D - 1 抗体 C H 1 0 1 の抗腫瘍効果

未処置、ニボルマブ処置、およびアイソタイプ対照処置の 3 つのコホートで HCC 患者を調査した。免疫表現型分析のために、血液サンプルから末梢血単核球（P B M C）、腫瘍組織から腫瘍浸潤リンパ球（T I L）を単離した。Δ 4 2 P D - 1 の機能的意義を、シングルセル R N A シーケンシング（s c R N A - s e q）分析によって探索し、機能的実験および機序の実験により検証した。Δ 4 2 P D - 1 モノクローナル抗体の効果を HCC ヒト化マウスモデルで検討した。詳細な実験手順は、上記の「材料と方法」に記載されているとおりである。

【0088】

脾臓または T M E における全ヒト C D 4 5 + C D 3 + T 細胞のうち、P D - 1 + Δ 4 2 P D 1 - T 細胞および P D - 1 + Δ 4 2 P D - 1 + T 細胞の代表的なドットプロットと頻度を測定した。（図 8 B - 8 C）。C H 1 0 1、抗 P D - 1 ニボルマブ、またはアイソタイプ処置後の H u h 7 - N S G - H u P B L マウスの腫瘍増殖曲線を図 8 E に示した。N S G マウスの H u h 7、または N S G - H u P B L マウスの H u h 7 - T L R 4 K O について、腫瘍増殖曲線を図 8 F に示した。同所性 M H C C - 9 7 L 腫瘍の増殖を生物発光イメージングにより測定し、図 8 H - 8 G に示した。エンドポイントにおける代表的な肝臓画像を 1 つ示す（図 8 I）。HCC 患者における Δ 4 2 P D - 1 + T 細胞および I L - 6 強度のスピアマンの相関を評価し、図 8 J に示した。ある患者の腫瘍サンプルの代表的な画像（40 倍）は、Δ 4 2 P D - 1 + T I L 細胞と I L - 6 産生 T L R 4 + H C C 細胞との共局在を示した（図 8 K）。エンドポイントにおける H u h 7 - N S G - h u P B L マウスの P B M C、脾臓、および腫瘍における Δ 4 2 P D - 1 + T 細胞および P D - 1 + T 細胞の定量結果を図 8 L に示した。エンドポイントでの血漿中の I L - 6 および I L - 8

の定量結果を図 8 M に示した。Hu h 7 - N S G - h u P B L マウス由来の腫瘍組織について、代表的な免疫蛍光染色（20 倍）を、I L - 6、T L R 4、および C D 3 それぞれの細胞発現の色分けとともに示した（図 8 N）。

【0089】

その結果、抗 P D - 1 I C B で処置された H C C 患者では、効果的な P D - 1 遮断を示したが、 $\Delta 42$ P D - 1⁺ T 細胞の頻度は、特に進行性疾患の患者で経時的に増加した。腫瘍に浸潤した $\Delta 42$ P D - 1⁺ T 細胞はおそらく、T L R 4 シグナリングを介して腫瘍形成に関与し H C C を維持した。ニボルマブではなく、抗 $\Delta 42$ P D - 1 抗体 C H 1 0 1 は、マウス H C C モデルにおいて腫瘍増殖を抑制した。

【0090】

この知見は、P D - 1 I C B に対する抵抗性の根底にあるメカニズムを明らかにしただけでなく、H C C の免疫療法のための抗 $\Delta 42$ P D - 1 抗体 C H 1 0 1 を同定した。

【0091】

実施例 8 - h u C H 3 4 の増幅と構造

ヒト化 C H 3 4 抗体およびその変異体を作製するために、マウス C H 3 4 の可変重鎖および可変軽鎖を、実施例 1 に記載したのと同様の方法を用いて、選択した C H 3 4 のハイブリドマクロンから増幅した。

【0092】

マウス C H 3 4 m A b の重鎖および軽鎖のアミノ酸配列を図 9 に示した。ヒト化 C H 3 4 m A b の重鎖可変領域（V H）および軽鎖可変領域（V L）のアミノ酸配列を図 10 に示した。

【0093】

実施例 9 - ヒト 2 9 3 T 細胞に発現した $\Delta 42$ P D - 1 に結合する抗 $\Delta 42$ P D 1 抗体 C H 3 4 の特異性

抗 $\Delta 42$ P D 1 抗体 C H 3 4 および抗 P D 1 抗体（E H 1 2、2 H 7）の特異性を調べるため、2 9 3 T 細胞を $\Delta 42$ P D - 1、P D - 1 を発現するプラスミド P C D H、またはベクター単独でトランスフェクトした。未トランスフェクト細胞は対照として含まれている。トランスフェクションの 2 日後、抗 $\Delta 42$ P D 1 抗体 C H 3 4 および抗 P D 1 抗体 E H 1 2、2 H 7 の特異性を、P D - 1 および $\Delta 42$ P D 1 の発現に関する分析によって測定する。

【0094】

その結果を図 11 に示した。結果は、抗 $\Delta 42$ P D 1 抗体 C H 3 4 は $\Delta 42$ P D 1 に特異的に結合するが、ヒト 2 9 3 T 細胞に発現する P D - 1 には結合しないことを示す。

【0095】

実施例 10 - ヒト B 細胞に発現する $\Delta 42$ P D - 1 に対する抗 $\Delta 42$ P D 1 抗体 C H 3 4 の特異性

抗 $\Delta 42$ P D 1 抗体 C H 3 4 の特異性を抗 P D 1 抗体（E H 1 2、2 H 7）と比較して試験するために、R P M I 8 8 6 6 B 細胞にネオンエレクトロポレーションシステムにより $\Delta 42$ P D - 1 - G F P、P D - 1 - G F P、または G F P を発現するプラスミド P C D H をトランスフェクトした。未トランスフェクションの R P M I 8 8 6 6 B 細胞を対照として含む。トランスフェクションの 2 日後、トランスフェクション効率を G F P のフローサイトメトリー分析によって決定した（上部パネル）。抗 $\Delta 42$ P D 1 抗体 C H 3 4 と抗 P D 1 抗体 E H 1 2、2 H 7 の特異性は、P D - 1 と $\Delta 42$ P D 1 の発現を分析することで測定した（下部パネル）。

【0096】

その結果を図 12 に示した。結果は、抗 $\Delta 42$ P D 1 抗体 C H 3 4 は $\Delta 42$ P D 1 に特異的に結合するが、ヒト B 細胞に発現する P D - 1 には結合しないことを示す。

【0097】

実施例 11 - C H P における B 細胞の消耗に伴う $\Delta 42$ P D - 1 発現の増加

B C R を媒介したヒト B 細胞の活性化および運命を制御する分子メカニズムは、理解が

10

20

30

40

50

不完全のままである。また、H I V - 1 抗体応答は消耗した B 細胞に排出される (drain) が、B 細胞受容体 (B C R) 刺激後の B 細胞活性化の抑制因子は、まだ理解が不完全のままである。これらのメカニズムを探るため、B D および慢性 H I V - 1 患者 (C H P) において $\Delta 4 2 P D - 1$ の発現および B 細胞の消耗を測定した。B D と未処理の C H P 由来の $C D 1 9^{+}$ B 細胞の代表的なフローサイトメトリー分析を図 1 3 A に示した。図 1 3 B は、図 1 3 A のデータを要約したもので、B D と C H P における $\Delta 4 2 P D - 1$ の蛍光強度 (M F I) と $\Delta 4 2 P D - 1^{+}$ B 細胞の頻度を示している。 $C D 2 1^{-} C D 2 7^{+}$ 活性化メモリー (A M)、 $C D 2 1^{-} C D 2 7^{+}$ 静止メモリー (R M)、 $C D 2 7^{-} C D 2 1^{-}$ 組織様メモリーおよびアネルギーナイーブ B (T L M / a N)、および $C D 2 7^{-} C D 2 1^{+}$ 静止ナイーブプラス中間メモリー B 細胞 (I M / r N) を同定するために、代表的な B D および C H P の $C D 2 1 / C D 2 7$ 染色 B 細胞に対するゲーティングを行い、その結果を図 1 3 C に示した。図 1 3 D は、図 1 3 C のデータを要約したもので、B D と比較して、C H P では A M および T L M / a N B 細胞の頻度が増加していることを示している。代表的な B D および C H P の A M、T L M / a N、R M、および I M / r N B 細胞における $\Delta 4 2 P D - 1$ の発現を図 1 3 E に示した。図 1 3 F は、図 1 3 E のデータを要約したもので、B D と C H P の B 細胞サブセットにおける $\Delta 4 2 P D - 1$ の M F I を示している。 $P D - 1^{+}$ および $\Delta 4 2 P D - 1^{+}$ の B D および C H P 由来の A M、T L M / a N、R M および I M / r N B 細胞の代表的なフローサイトメトリー分析を図 1 3 G に示した。図 1 3 H は、図 1 3 G のデータを要約したもので、B D と C H P における $\Delta 4 2 P D - 1^{+}$ の A M、T L M / a N、R M、および I M / r N B 細胞の頻度を示している。

10

20

【0098】

これらの結果は、 $\Delta 4 2 P D - 1$ が、C H P の $P D - 1$ や F c R L 4 と比較して、活性化メモリー B 細胞、アネルギーナイーブ B 細胞、組織様メモリー B 細胞で優位に発現上昇していることを示している。

【0099】

実施例 1 2 - 抗 $\Delta 4 2 P D - 1$ 抗体は S H P 1 のリクルートメントを減少させ、A K T 1 / F O X O 1 経路および B 細胞増殖を促進する

C H 3 4 が B C R 刺激によって B 細胞の増殖を促進するかどうかを調べるために、フローサイトメトリーを行った。B D 由来の初代 B 細胞 ($n = 6$) を F I T C - C F S E で前標識し、 $\alpha - I g M / G F (a b') 2 (10 \mu g / m l)$ と m s I g G 2 b 対照抗体、または C H 3 4 で刺激する。細胞を 5 日目にフローサイトメトリーで分析する。結果を図 1 4 A - 1 4 B に示した。

30

【0100】

C H 3 4 が $\Delta 4 2 P D - 1$ による S H P 1 のリクルートメントを減少させるかどうかを決定するために、B D 由来の初代 B 細胞を $\alpha - I g M / G F (a b') 2 (10 \mu g / m l)$ と m s I g G 2 b 対照抗体または C H 3 4 で刺激し、2 日目に溶解して、それぞれ $\Delta 4 2 P D - 1$ および S H P 1 に対する抗体を用いて免疫沈降およびウェスタンブロットを行った。その結果を図 1 4 C に示した。

【0101】

K i 6 7 + B 細胞増殖、p h o p h - A K T 1 - S 4 7 3 および p h o s p h - F O X O 1 - S 2 5 6 レベル、および P 2 7 タンパク質発現、ならびに B 細胞における F O X O 1 および P 2 7 m R N A 発現、に対する C H 3 4 処理の影響を調べるために、初代 B 細胞を、 $\alpha - I g M / G F (a b') 2 (10 \mu g / m l)$ および m s I g G 2 b 対照抗体 ($10 \mu g / m l$) または C H 3 4 ($10 \mu g / m l$)、あるいは S H P 1 阻害薬 N S C 8 7 8 7 7 ($10 \mu M$) を添加した完全 R P M I 1 6 4 0 培地で培養した。48 時間後、細胞を染色しフローサイトメトリー分析を行い、または溶解し A K T 1、F O X O 1、および P 2 7 のウェスタンブロットティング検出を行い、あるいは F O X O 1 および P 2 7 の m R N A の q P C R を行った。結果を図 1 4 D - 1 4 F に示した。

40

【0102】

その結果は、C H 3 4 は、B C R 刺激による B 細胞の増殖を促進し、C H 3 4 は $\Delta 4 2$

50

P D - 1 による S H P 1 のリクルートメントを減少させ、C H 3 4 処理は K i 6 7 + B 細胞集団を拡大し、C H 3 4 処理は p h o p h - A K T 1 - S 4 7 3 および p h o s p h - F O X O 1 - S 2 5 6 レベルを増加させ、および P 2 7 タンパク質の発現を減少させ、および C H 3 4 処理は B 細胞における F O X O 1 および P 2 7 m R N A を増加させることを示す。

【0103】

実施例 13 - C H 3 4 は H I V 患者における B C R 刺激後の B 細胞増殖を促進する

H I V 患者における B C R 刺激後の B 細胞増殖に対する C H 3 4 の影響を調べるため、フローサイトメトリーを行った。C H P の P B M C から単離した I g D + B 細胞および I g D - B 細胞を C F S E で前標識し、 α -I g M / G F (a b ') 2 (10 μ g / m l)、T D または T I 刺激 + C H 3 4 (10 μ g / m l)、または m s I g G 2 b 対照 (10 μ g / m l) を加えた R P M I 1 6 4 0 培地で 5 日間培養し、フローサイトメトリーで分析した。統計的有意性は、一般的な一元配置分散分析と、B e n j a m i n i , K r i e g e r a n d Y e k u t i e l i の 2 段階線形ステップアップ手順と単一プール分散を用いて決定した。結果を図 15 A - 15 H に示した。

10

【0104】

その結果は、C H 3 4 は B C R 刺激後のナイーブ B 細胞 (I g D +) およびメモリー B 細胞 (I g D -) の増殖反応を増加させる (図 15 A - 15 B)、B C R 刺激により C H P 由来のナイーブ B 細胞およびメモリー B 細胞における C D 8 6 発現を増加させる (図 15 C - 15 D)、T D 刺激後の C H P からの B 細胞の増殖反応を増加させる (図 15 E - 15 F)、および T I 刺激後の C H P 由来のナイーブ B 細胞の増殖反応を増加させることを示す。

20

【0105】

この結果は、B C R 刺激が $\Delta 42$ P D - 1 を発現上昇し、その結果 B 細胞が消耗し、細胞周期が停止し、死滅することを示唆している。メカニズム的には、 $\Delta 42$ P D - 1 は細胞内免疫受容体チロシンベースのスイッチモチーフ (I T S M) を介して、S r c 相同性領域 2 ドメイン含有ホスファターゼ 1 (S H P 1) をリクルートする。S H P 1 は次に A K T 1 と結合し、A K T 1 の活性化を阻害することで、A K T 1 / F O X O 1 経路を抑制する。しかし、 $\Delta 42$ P D - 1 特異的抗体 C H 3 4 は、S H P 1 のリクルートメントを減少させ、A K T 1 / F O X O 1 の活性化と C H P 由来の B 細胞の増殖を増加させる (図 16)。

30

【0106】

この知見は、 $\Delta 42$ P D - 1 が B C R 媒介 B 細胞活性化のこれまで認識されていなかった抑制因子であり、B 細胞の機能を回復させるための免疫療法の標的となりうることを示している。

【0107】

配列

配列番号 1

タンパク質

人工配列: C H 1 0 1 V H アミノ酸配列

EVQLEESGPD LVKPSQSLSLTCTVTGYSITSGFAWHWLRQFPGNRLEWMGYIHYSGS
TNYNPSLKSRSITRDT SKNQFFLQLNSVTTEDTATFYCARSDFWGQGTFVTVSS

40

【0108】

配列番号 2

タンパク質

人工配列: C H 1 0 1 V K アミノ酸配列

DVVM TQTPLNLSVTFGQPVSISCTSSQSLLDRDGETFMNWLFQRPQGQSPKRLIYLV
SKLDFGV PDRFTGSGSGTDFTL KISRVEAEDLGIYYCWQGT HFLTFGGG TKLEIKRGQ
AG

【0109】

50

配列番号 3

タンパク質

人工配列：h u f r C H 1 0 1 V H アミノ酸配列

QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGYSITSGFAWHWIRQPPGKGLEWIGYIHYSGS
TNYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSDFWGQGLTVTVSS
【0110】

配列番号 4

タンパク質

人工配列：h u f r C H 1 0 1 V K アミノ酸配列

DVVMQTQSPLSLPVTLGQPASISCTSSQSLLDRDGETFMNWFQQRPGQSPRRLIYLV
KLDGFGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPLTFGGGKVEIKRG
QAG
【0111】

配列番号 5

DNA

人工配列：C H 1 0 1 V H 核酸配列

GAGGTGCAGCTCGAGGAGTCAGGACCTGACCTGGTGAAACCTTCTCAGTCACTTTC
ACTCACCTGCAGTGTCACTGGCTATTCATCACCAGTGGTTTTGCCTGGCACTGGCT
CCGGCAGTTTTCCAGGAAACAGACTGGAATGGATGGGCTACATACACTATAGTGGAA
GCACTAACTACAACCCATCTCTCAAAGTCGAATCTCTATCACTCGAGACACATCC
AAGAATCAGTTCTTCTGTCAGTTGAATTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACTTT
TACTGTGCAAGGTCTGACTTCTGGGGCCAAGGCACCTTTGTCACAGTCTCCTCA
【0112】

配列番号 6

DNA

人工配列：C H 1 0 1 V K 核酸配列

GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCAATTTGTCGGTCACCTTTGGACAACCAGT
CTCCATCTCTTGCACGTCTAGTCAGAGCCTCTTAGATCGTGATGGAGAGACATTCA
TGAATTGGTTGTTCCAGCGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTATCTGGTG
TCTAAACTGGACTTTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGA
TTTCACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAATTTATTATTGCT
GGCAAGGTACACATTTTCTCTCACGTTTCGGTGGTGGGACCAAGCTGGAAATAAAA
CGCGGCCAGGCCGGC
【0113】

配列番号 7

DNA

人工配列：h u f r C H 1 0 1 V H 核酸配列

CAGGTTTCAGCTCCAGGAGTCAGGACCCGGTCTGGTGAAACCTTCAGAGACACTGAG
TCTGACATGTACGGTAAGTGGGTACTCCATTACTTCCGGTTTTGCTTGGCATTGGA
TACGGCAACCGCCTGGGAAGGGGTGGAGTGGATAGGTTATATTCAATTATAGCGGG
TCAACAAATTATAACCCATCACTCAAGTCCCGCGTCACGATAAGCGTTGATACCTC
CAAGAATCAGTTCAGCTTGAAATTGTCAAGCGTAACAGCCGCCGATACCGCAGTGT
ATTATTGCGCAAGGAGTGACTTTTGGGGCCAAGGTACGCTTGTCACCGTAAGTTCC
【0114】

配列番号 8

DNA

人工配列：h u f r C H 1 0 1 V K 核酸配列

GACGTAGTCATGACCCAGTCCCCACTGTCATTGCCGGTAACGCTTGGACAGCCTGC
TAGTATCTCATGCACATCCAGCCAATCCCTCCTTGACCGCGACGGTGAGACGTTTA
TGAATTGGTTCCAGCAGAGACCAGGACAGTCACCGAGGAGACTTATTTACCTTGTT

10

20

30

40

50

TCAAAGCTCGACTTCGGTGTCCCCGACAGATTTAGCGGTAGTGGTTCTGGGACAGA
TTTCACCCTTAAATCAGTAGGGTTCGAAGCGGAGGACGTGGGTGTCTACTATTGTT
GGCAAGGCACGCACCTTTCCATTGACCTTTGGCGGGGGGACAAAGGTGGAAATTAAA
CGGGGCCAGGCGGGG

【0115】

配列番号 9

タンパク質

ホモサピエンス：CDRグラフトに関する生殖系列細胞可変重鎖のアミノ酸配列(GenBank: BAA75026.1, アクセス番号: AB019437.1)

QVQLQESGPGSLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGGYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSG
STNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR

10

【0116】

配列番号 10

タンパク質

ホモサピエンス：CDRグラフトに関する生殖系列細胞可変カッパ鎖のアミノ酸配列(GeneBank: BAC01687.1, アクセス番号: AB064059.1)

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYKVS
NRDSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHWPP

【0117】

配列番号 11

タンパク質

ホモサピエンス：ヒト重鎖のJ領域のアミノ酸 (IGHJ4*01)

YFDYWGGQGLVTVSS

20

【0118】

配列番号 12

タンパク質

ホモサピエンス：ヒトカッパ鎖のJ領域のアミノ酸 (IGKJ4*01)

TFGGGTVKEIK

【0119】

配列番号 13

DNA

ホモサピエンス：CDRグラフトに関する生殖系列細胞可変重鎖の核酸配列(GenBank: BAA75026.1, アクセス番号: AB019437.1)

CAGGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCCCGGCCTGGTGAAGCCCAGCGAGACCCTGAG
CCTGACCTGCACCGTGAGCGGCGGCAGCGTGAGCAGCGGCGGCTACTACTGGAGCT
GGATCAGGCAGCCCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGCTACATCTACTACAGC
GGCAGCACCAACTACAACCCAGCCTGAAGAGCAGGGTGACCATCAGCGTGGACAC
CAGCAAGAACCAGTTTCAGCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACCGCCGCCGACACCGCCG
TGTAATACTGCGCCAGG

【0120】

配列番号 14

DNA

ホモサピエンス：CDRグラフトに関する生殖系列細胞可変カッパ鎖の核酸配列(GeneBank: BAC01687.1, アクセス番号: AB064059.1)

GACGTGGTGTATGACCCAGAGCCCCCTGAGCCTGCCCGTGACCTGGGCCAGCCCGC
CAGCATCAGCTGCAGGAGCAGCCAGAGCCTGGTGTACAGCGACGGCAACACCTACC
TGAAGTGGTTCCAGCAGAGGCCCGGCCAGAGCCCCAGGAGGCTGATCTACAAGGTG
AGCAACAGGGACAGCGGCGTGCCCGACAGGTTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGA
CTTCACCCCTGAAGATCAGCAGGGTGGAGGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTGCA
TGCAGGGCACCCACTGGCCCCC

30

40

50

【 0 1 2 1 】

配列番号 1 5

D N A

ホモサピエンス：ヒト重鎖の J 領域の核酸配列 (I G H J 4 * 0 1)

TACTTTGACTACTGGGGCCCAAGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCA

【 0 1 2 2 】

配列番号 1 6

D N A

ホモサピエンス：ヒトカッパ鎖の J 領域の核酸配列 (I G K J 4 * 0 1)

ACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

【 0 1 2 3 】

配列番号 1 7

D N A

ホモサピエンス：ヒトカッパ鎖定常フラグメント核酸配列

CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAA
ATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCA
AAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTC
ACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAG
CAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCC
TGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

【 0 1 2 4 】

配列番号 1 8

タンパク質：

ホモサピエンス：ヒトカッパ鎖定常フラグメント核酸配列アミノ酸配列

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKIDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【 0 1 2 5 】

配列番号 1 9

タンパク質

ホモサピエンス：ヒト重鎖定常フラグメントアミノ酸配列 (I g G 1)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDL
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【 0 1 2 6 】

配列番号 2 0

D N A

ホモサピエンス：ヒト重鎖定常フラグメント核酸配列 (I g G 1)

GCGTCGACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTC
TGGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCTGTGA
CGGTCTCGTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTC
CTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAG
CTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGG
TGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTG
CCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTCTTCCCCCAAACCCAA
GGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGA
GCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT
AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG

10

20

30

40

50

CGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG
TCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGG
CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAA
GAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCG
TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTG
CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAG
GTGGCAGCAGGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC
ACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAA

【0127】

配列番号 2 1

10

タンパク質

ホモサピエンス：ヒト重鎖定常フラグメントアミノ酸配列（I g G 4）

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPEF
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF
FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

【0128】

配列番号 2 2

20

D N A

ホモサピエンス：ヒト重鎖定常フラグメント核酸配列（I g G 4）

GCGTCGACCAAGGGACCAAGCGTATTCCCGCTTGCGCCATGTAGCAGATCAACAAG
TGAGTCCACGGCGGCCCTTGGGTGCTTGGTAAAGGATTACTTTCTCTGAGCCAGTAA
CCGTGTCTTGGAATTCAGGAGCTCTCACGTCAGGGGTACACACCTTCCCTGCCGTC
CTTCAATCTTCTGGCCTCTATAGCCTCTCAAGCGTCGTTACTGTGCCATCCTCCTCA
CTCGGAACTAAAACATATACTTGCAACGTAGACCACAAGCCCTCAAATACAAAAGT
TGACAAACGAGTTGAATCTAAGTACGGCCCGCCATGTCCGCCATGTCCAGCCCCCG
AATTCTTGGGGGGACCATCCGTATTTCTTTTCCCGCCGAAACCCAAAGACACCTTG
ATGATAAGCCGAACACCAGAGGTTACATGTGTGCTTGTGATGTCTCTCAGGAAGA
TCCTGAGGTCCAGTTTAACTGGTACGTAGATGGGGTGGAAAGTTCACAACGCAAAAA
CCAAGCCGAGAGAGGAACAGTTCAACTCAACCTATCGGGTTGTTTCCGTTCTCACA
GTTCTGCATCAGGACTGGCTTAATGGAAAAGAATACAAGTGTAAGTGTCAAATAA
GGGCCTCCCATCAAGCATTGAAAAGACCATATCTAAGGCCAAAGGCCAACCTCGCG
AGCCTCAAGTCTACACCTTGCCCTCCTAGCCAAGAAGAAATGACAAAGAACCAAGTA
TCTCTCACATGTCTTGTTAAAGGGTTCTATCCAAGCGATATCGCTGTTGAGTGGGA
AAGCAATGGCCAACCTGAAAATAACTACAAAACCACTCCTCCCGTGCTTGACTCAG
ATGGTTCTTTCTTCTCTATTACGATTGACTGTGGACAAAAGTCGCTGGCAGGAA
GGGAACGTTTTCTCCTGTAGCGTGATGCACGAGGCGCTCCACAATCATTATACCCA
AAAGTCACTCTCTCTTAGCCTTGGCAAG

30

40

【0129】

配列番号 2 3

タンパク質

人工配列：CH101 VH CDR1（Kabatの番号付けシステム）

GYSITSGF

【0130】

配列番号 2 4

タンパク質

人工配列：CH101 VH CDR2（Kabatの番号付けシステム）

HYSGS

50

【0131】

配列番号25

タンパク質

人工配列：CH101 VH CDR3 (Kabattの番号付けシステム)

SDF

【0132】

配列番号26

タンパク質

人工配列：CH101 VL CDR1 (Kabattの番号付けシステム)

TSSQSLLDRDGETFMN

10

【0133】

配列番号27

タンパク質

人工配列：CH101 VL CDR2 (Kabattの番号付けシステム)

LVS KLDF

【0134】

配列番号28

タンパク質

人工配列：CH101 VH CDR3 (Kabattの番号付けシステム)

WQGTHFPL

20

【0135】

配列番号29

タンパク質

人工配列：CH34 VH CDR1 (Kabattの番号付けシステム)

GFTFSDYG

【0136】

配列番号30

タンパク質

人工配列：CH34 VH CDR2 (Kabattの番号付けシステム)

ISSLAYTI

30

【0137】

配列番号31

タンパク質

人工配列：CH34 VH CDR3 (Kabattの番号付けシステム)

ARGGAGFAY

【0138】

配列番号32

タンパク質

人工配列：CH34 VL CDR1 (Kabattの番号付けシステム)

DHINNW

40

【0139】

配列番号33

タンパク質

人工配列：CH34 VL CDR2 (Kabattの番号付けシステム)

GAT

【0140】

配列番号34

タンパク質

人工配列：CH34 VL CDR3 (Kabattの番号付けシステム)

QQYWSTPWT

50

【 0 1 4 1 】

配列番号 3 5

タンパク質

人工配列：マウス C H 3 4 V H

EVKLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSDYGMWVRQAPGKGPEWVAFISSLAY
TIYYADTVTGRFTISRENAKNTLYLEMSSLRSEDAMYYCARGGAGFAYWGQGT LVT
VS

【 0 1 4 2 】

配列番号 3 6

タンパク質

人工配列：マウス C H 3 4 V L

DIQMTQSSSYLSVSLGGRVTITCKASDHINNWLAWYQQKPGNAPRLLISGATSLETG
VPSRFSGSGSGKDYTLISITSLQTEDVATYYCQQYWSTPWTFTGGGTKLEIK

【 0 1 4 3 】

配列番号 3 7

タンパク質

人工配列：ヒト化 C H 3 4 V H

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMWIRQAPGKGLEWVSYISSLAYT
IYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGAGFAYWGQGT LVT
VS

【 0 1 4 4 】

配列番号 3 8

タンパク質

人工配列：ヒト化 C H 3 4 V L

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASDHINNWLAWYQQKPGKAPKLLLYGATRLESG
VPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYWSTPWTFTGGGTKVEIK

【 0 1 4 5 】

配列番号 3 9

タンパク質

人工配列：シグナルペプチド

MGWSCIIILFLVATATGVHS

【 0 1 4 6 】

配列番号 4 0

タンパク質

人工配列：マウス C H 3 4 重鎖

EVKLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSDYGMWVRQAPGKGPEWVAFISSLAY
TIYYADTVTGRFTISRENAKNTLYLEMSSLRSEDAMYYCARGGAGFAYWGQGT LVT
VSAAKTTPPSVYPLAPGCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPESVTVTWNSGSLSSSVHTFP
ALLQSGLYTMSSSVTVPSSTWPSQTVTCSVAHPASSTTVDDKKLEPSGPISTINPCPPC
KECHKCPAPNLEGGPSVFIFPPNIKDVLMLSLTPKVTCVVVDVSEDDPDVQISWQFN
NVEVHTAQTQTHREDYNSTIRVVSTLPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPSPIERTIS
KIKGLVRAPQVYILPPPAEQLSRKDVSLTCLVVGFPNGDISVEWTSNGHTEENYKDT
APVLDSDGSYFIYSKLNMTSKWEKTDTSFSCNVRHEGLKNYYLKKTISRSPGK

【 0 1 4 7 】

配列番号 4 1

タンパク質

人工配列：マウス C H 3 4 カップ鎖

DIQMTQSSSYLSVSLGGRVTITCKASDHINNWLAWYQQKPGNAPRLLISGATSLETG
VPSRFSGSGSGKDYTLISITSLQTEDVATYYCQQYWSTPWTFTGGGTKLEIKRADAAPT
VSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDS

10

20

30

40

50

TYSMSSTLTLTKEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

【 0 1 4 8 】

本明細書に記載された実施例および実施形態は、例示を目的とするものであり、当業者にはそれを考慮した様々な修正または変更が示唆され、本出願の精神および範囲、ならびに添付の特許請求の範囲に含まれることを理解されたい。加えて、本明細書に開示されたあらゆる発明またはその実施形態のあらゆる要素または制限は、本明細書に開示されたあらゆるおよび／またはすべての他の要素または制限（個々に、またはあらゆる組み合わせで）、またはあらゆる他の発明またはその実施形態と組み合わせることができ、そのような組み合わせはすべて、それに限定されることなく本発明の範囲内で企図される。

【図面】

【図 1】

【圖 2】

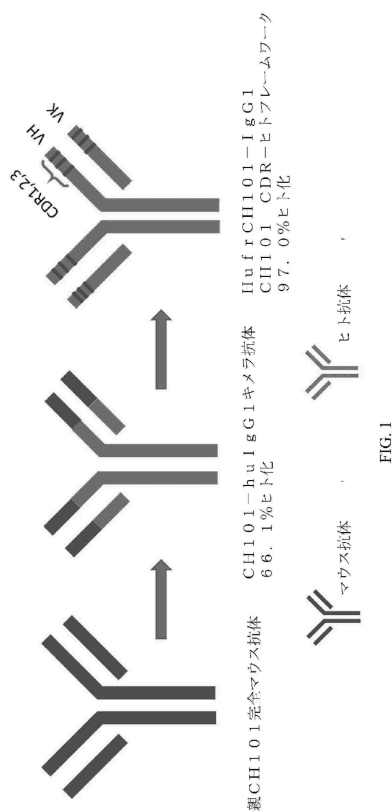


FIG. 1

[illegible]

FIG. 2A

CH101VH	CDR1	CDR2	CDR3
EVNLESGSPALWPGSSLSVCTVYVQVLTGSG--FAMNHQQFVPMLEKMTYVIGSGSTNNPSKSNLSVTDYDSKQPHVGLASVSTVPTVPTFCARDING 生細胞系別配列VH ID: BAA75026.1			
QVQLVDSPPALWPGSSVSGGVSSGGTWNWVQIPQKLEMTGVITYSGSTNNPSKLSRVTVSDTSKQSFILGLSVTAUTVAYCAR CH101VHの生細胞系別(huFCCH101 VH) フレームワークにグラフト			
QVQLVDSPPALWPGSSVSGGVSSGGTWNWVQIPQKLEMTGVITYSGSTNNPSKLSRVTVSDTSKQSFILGLSVTAUTVAYCARING 生細胞系別配列VH ID: BAA75026.1			
EVNLESGSPALWPGSSLSVCTVYVQVLTGSG--FAMNHQQFVPMLEKMTYVIGSGSTNNPSKSNLSVTDYDSKQPHVGLASVSTVPTVPTFCARDING 生細胞系別配列VH ID: BAA75026.1			

FIG. 2B

10

20

30

40

50

【 図 3 - 1 】

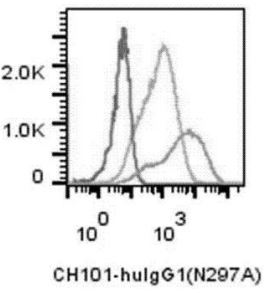


FIG. 3A

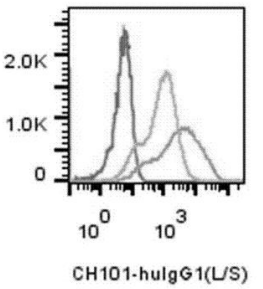


FIG. 3B

【 図 3 - 2 】

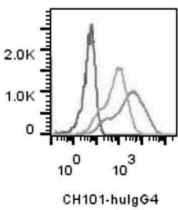


FIG. 3C

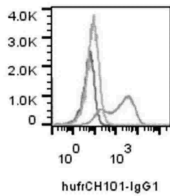


FIG. 3D

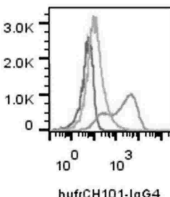


FIG. 3E

【 図 3 - 3 】

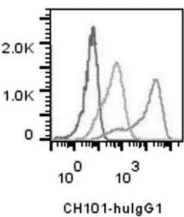


FIG. 3F

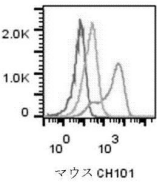


FIG. 3G

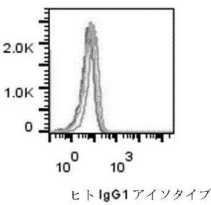


FIG. 3H

【 図 3 - 4 】

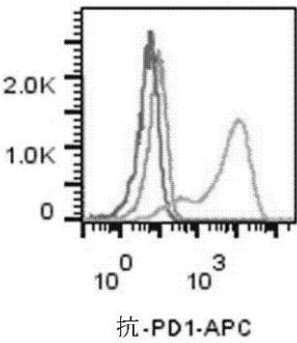


FIG. 3I

10

20

30

40

50

【図 4 - 1】

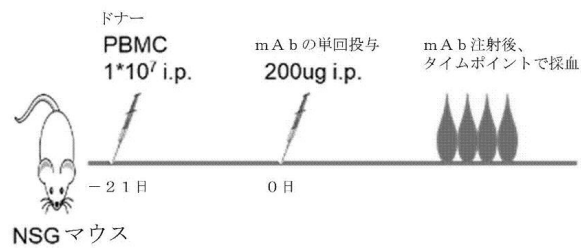


FIG. 4A

【図 4 - 2】

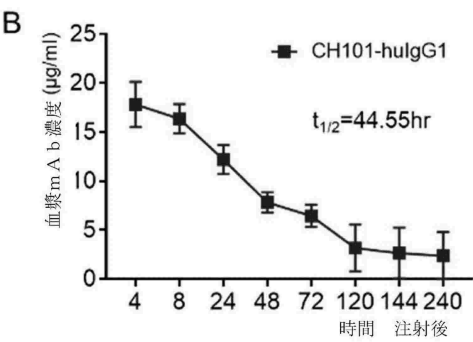


FIG. 4B

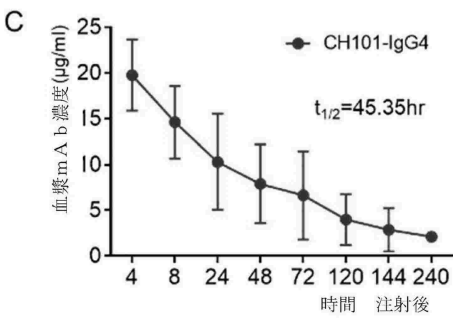


FIG. 4C

【図 4 - 3】

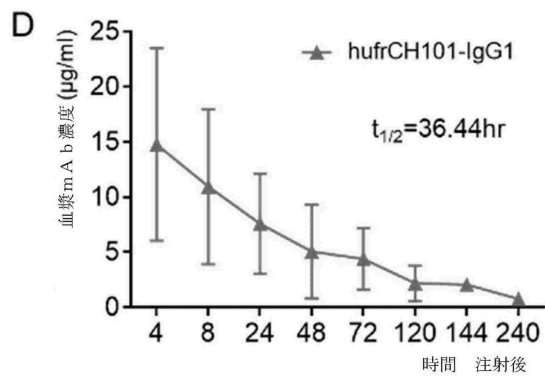


FIG. 4D

【図 5 - 1】

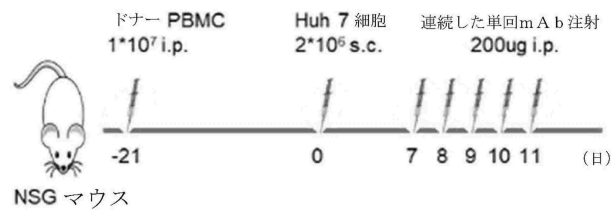


FIG. 5A

10

20

30

40

50

【図 5 - 2】

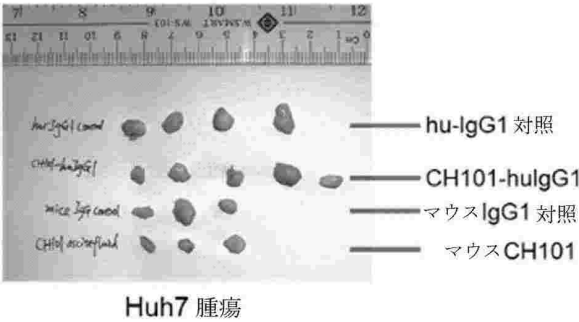


FIG. 5B

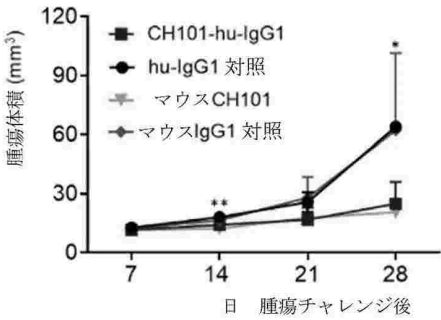


FIG. 5C

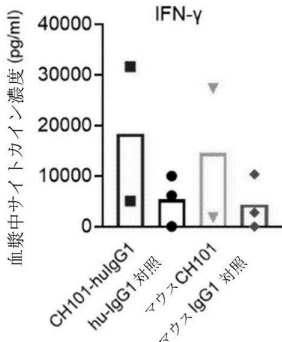


FIG. 5E

【図 5 - 4】

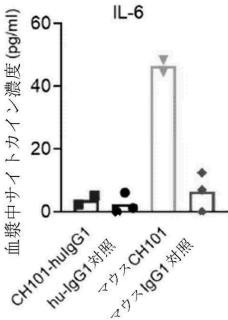


FIG. 5F

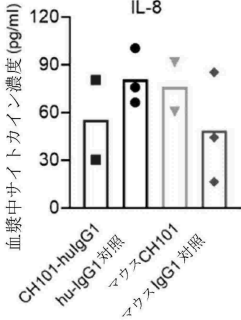


FIG. 5G

【図 6 - 1】

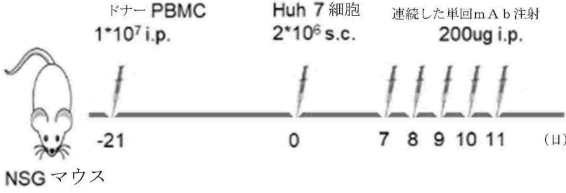


FIG. 6A

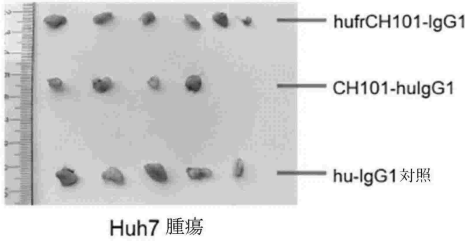


FIG. 6B

10

20

30

40

50

【図 6 - 2】

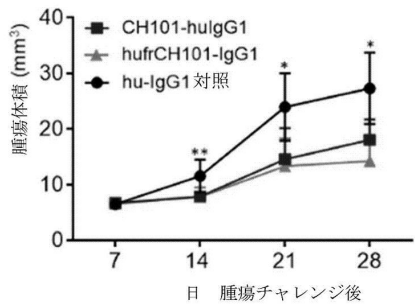


FIG. 6C

【図 6 - 3】

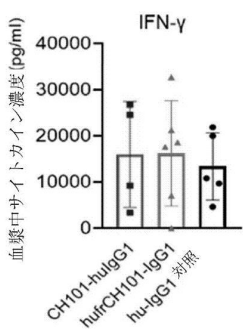


FIG. 6E

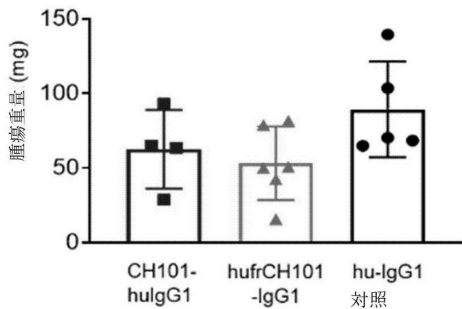


FIG. 6D

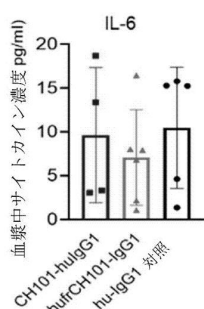


FIG. 6F

【図 6 - 4】

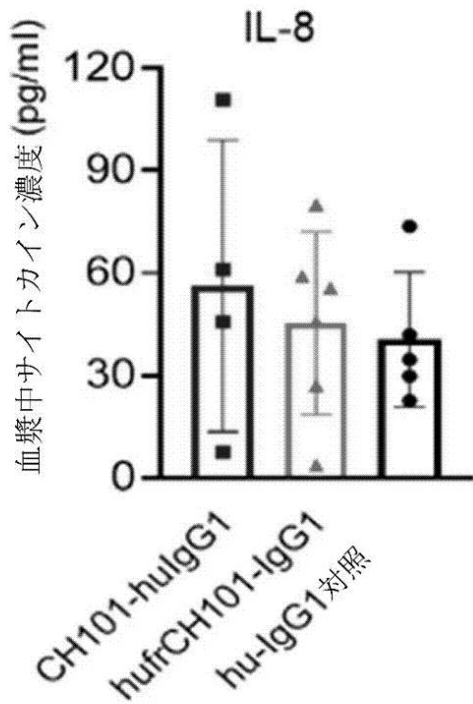


FIG. 6G

【図 7 - 1】

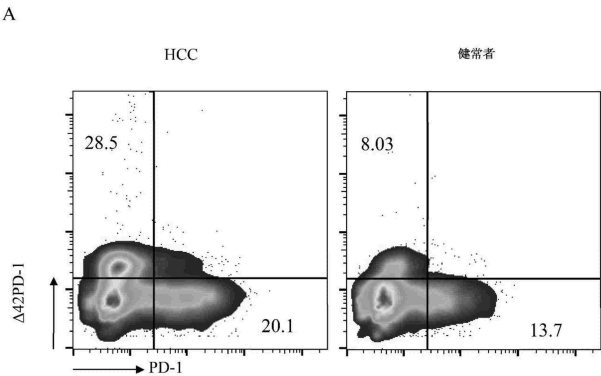


FIG. 7

10

20

30

40

50

【図 7 - 2】
B

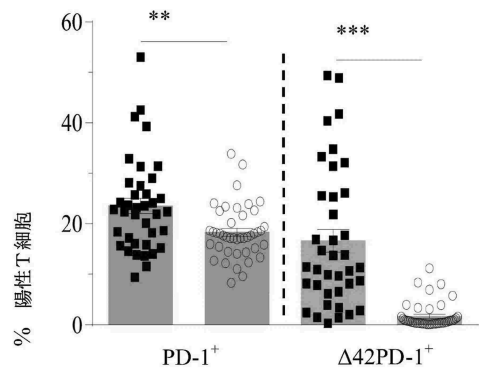


FIG. 7 (続き)

【図 7 - 3】
C

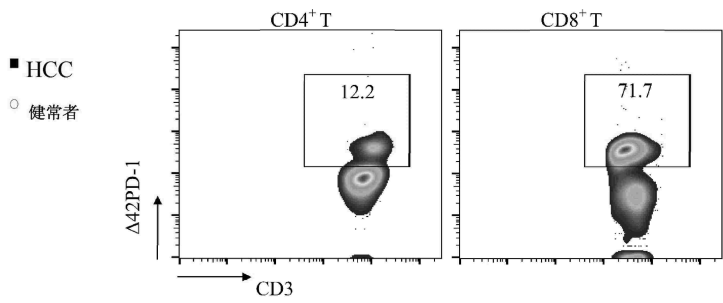


FIG. 7 (続き)

【図 7 - 4】
D

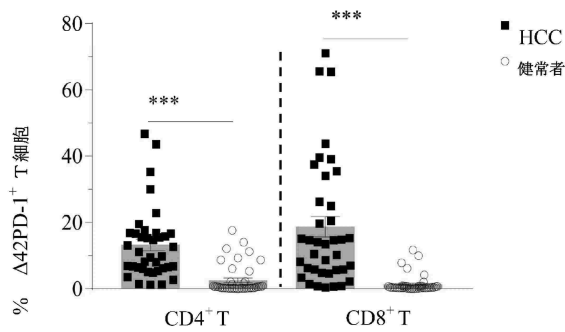


FIG. 7 (続き)

【図 7 - 5】
E

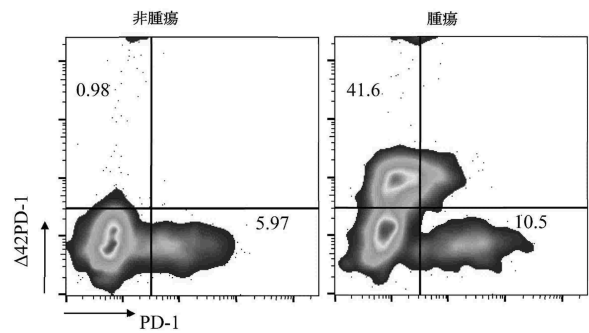


FIG. 7 (続き)

10

20

30

40

50

【図 7 - 6】

F

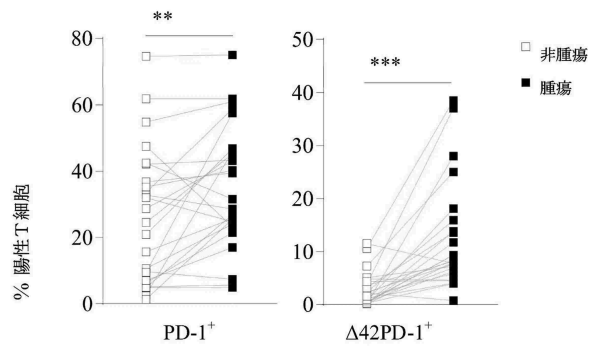


FIG. 7 (続き)

【図 7 - 7】

G

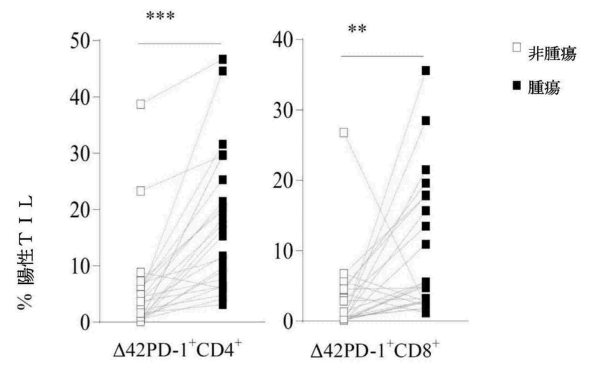


FIG. 7 (続き)

【図 7 - 8】

H

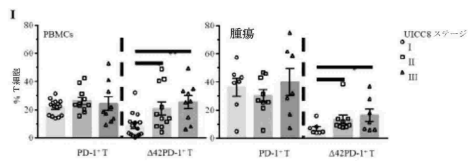
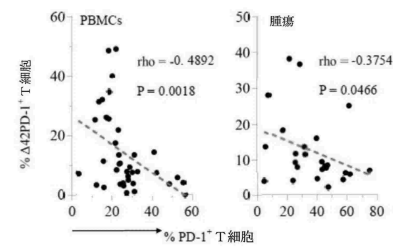


FIG. 7 (続き)

【図 8 - 1】

A

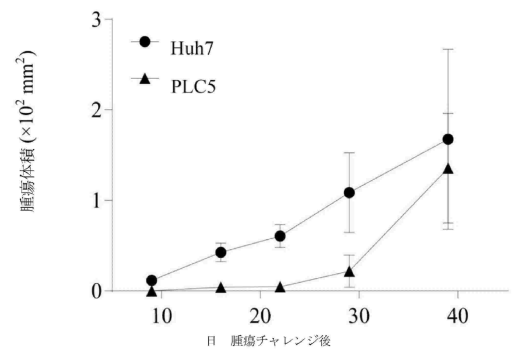


FIG. 8

10

20

30

40

50

【図 8 - 2】

B

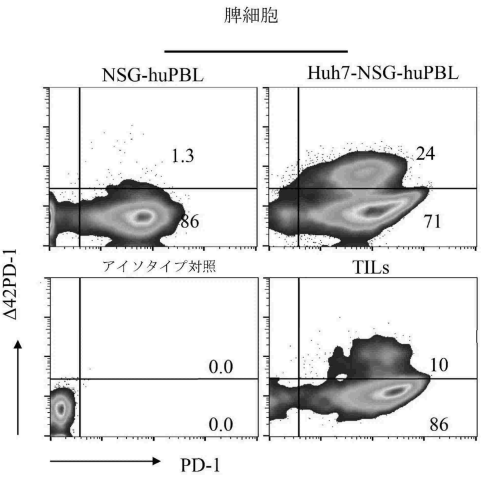


FIG. 8 (続き)

【図 8 - 3】

C

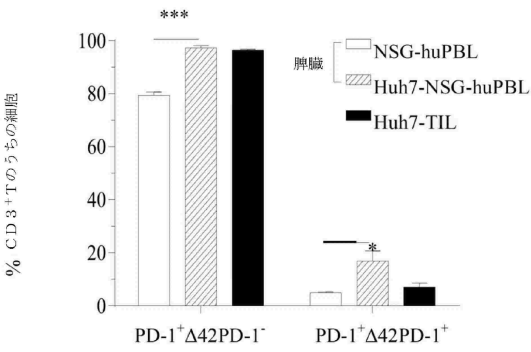
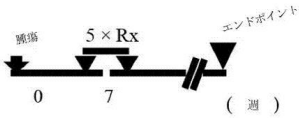


FIG. 8 (続き)

【図 8 - 4】

D



E

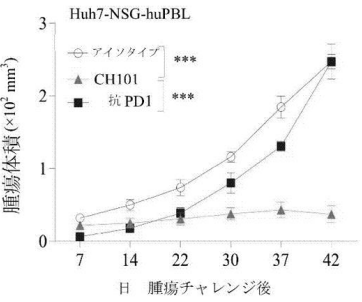


FIG. 8 (続き)

【図 8 - 5】

F

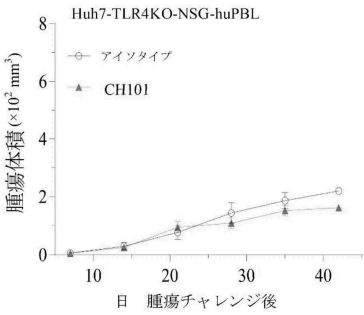
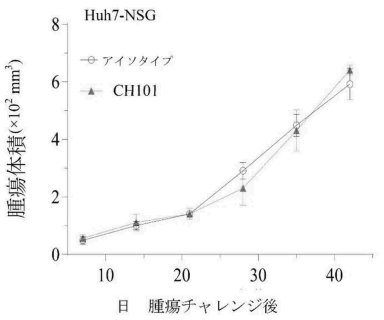


FIG. 8 (続き)

【図 8 - 6】

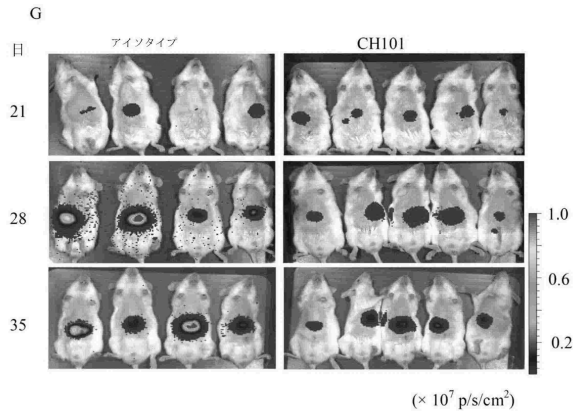


FIG. 8 (続き)

【図 8 - 7】

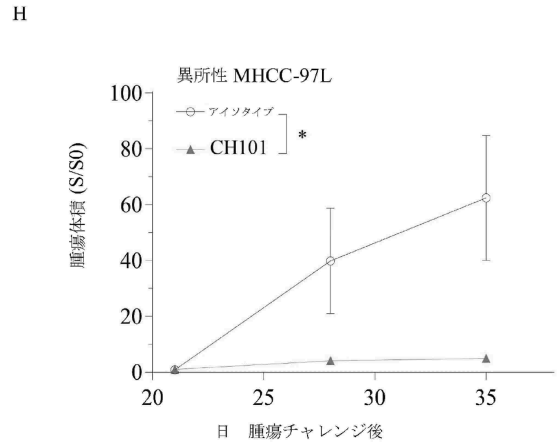


FIG. 8 (続き)

【図 8 - 8】

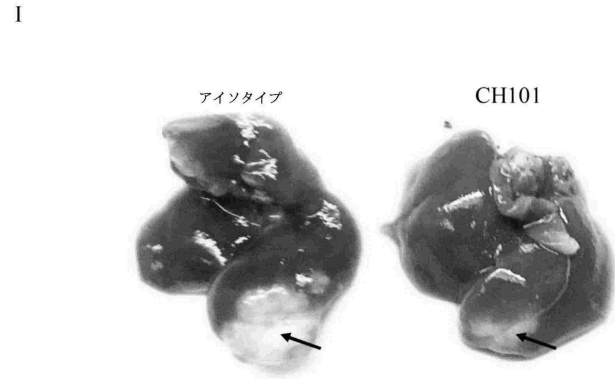


FIG. 8 (続き)

【図 8 - 9】

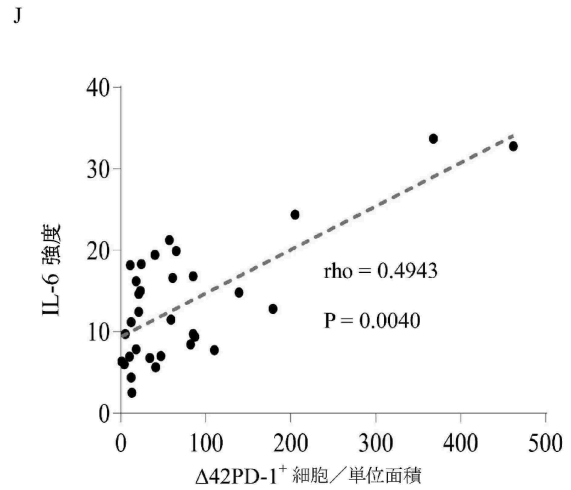


FIG. 8 (続き)

10

20

30

40

50

【図 8 - 1 0】

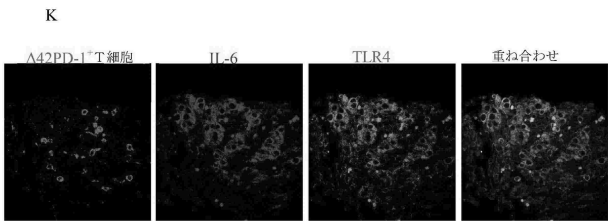


FIG. 8 (続き)

【図 8 - 1 1】

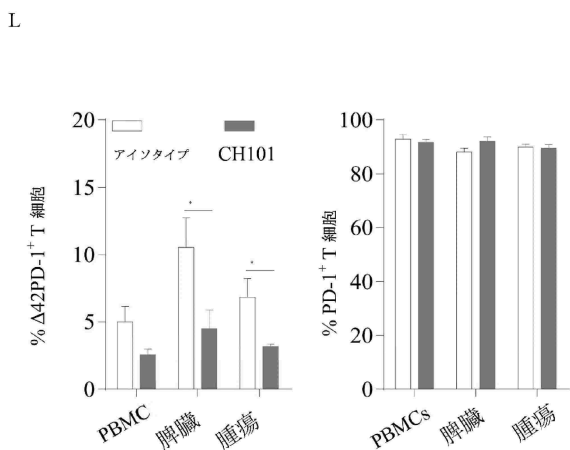


FIG. 8 (続き)

【図 8 - 1 2】

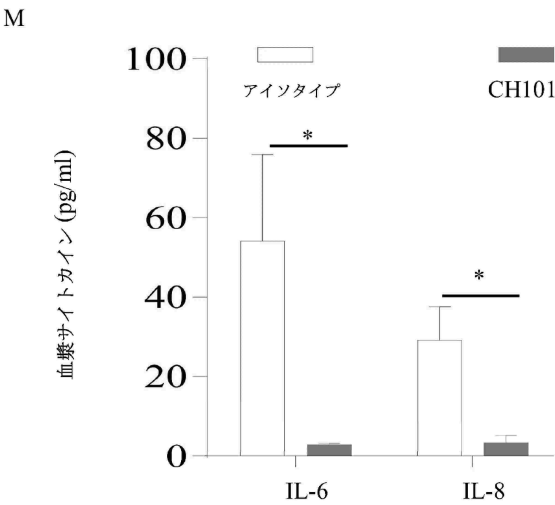


FIG. 8 (続き)

【図 8 - 1 3】

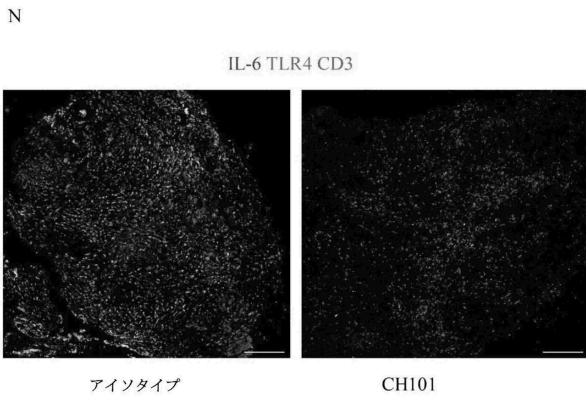


FIG. 8 (続き)

10

20

30

40

50

【図 9】

マウス CH34 K 系

マウスシグナルペプチド

FR1 CDR1 FR2 CDR2 FR3 CDR3

MDNSCIIILFLVATATOVHSDIQMTQSSYLVSIGGRVITCKASDHINHLAWQKQKGNAPALLISATLSLETQVPSRFSGSGSGKDITLISLTQTEQVATYTCQQTWSTPWT

FR4

FGGQTKLEIKADAAFTVSIFFPSSSEQLTSGGASVVCFLNFFPDINVMKIDGSRQNGVHNTDQSDSTTMSSTLTLEDEYERHNTTCEATHTSTSTPVRSPHNSC*

マウス CH34 産物

マウスシグナルペプチド

FR1 CDR1 FR2 CDR2 FR3 CDR3

MDNSCIIILFLVATATOVHSEVLVESGGGLVPGGSGKLSCAASGTFSDYGMHWVQAPQKGFENVAFTSSLAITYYADTVTGKPTISRNANKNTLYLMSGLASEDTMYTC

CDR3

FR4

ANGGAGATWGGQTLVTVSAAKTPPSVYPLAPGCDTPGSSVTLGLVNGYFPESVTVWNSSGLSSVHTFPALLQSGLYTMSSTVTPSSTWPSQVTCVVARPASSTVDKLE

PSGPISTINCPCKCKCPAPLEGGGSEVTFIPPKIKDVLMSLTPTKVTCTVVDVSEDDPQVLSHFVNVEVETAQTQTHREDYHSTIRVSTLPIQKQNMSSGKEPKCKVNNKD

LSPPIRTISIKIGLVAPQVYILLPPFAQLSKNDVSLCTLVGPNPDISEVMTSNGHTEENYDAPVLSDSGSTFIYSLLNMTSSEKETSDFSCVNRHGLKNTLYLKTTSASP

GR*

FIG. 9

【図 10】

ヒト化 CH34 K 系

シグナルペプチド

FR1 CDR1 FR2 CDR2 FR3 CDR3

MDNSCIIILFLVATATOVHSEVLVESGGGLVPGGSLSCAASGTFSDYGMHWVQAPQKGLSEWVSYSISLAITYYADTVIGKPTISRNAKNTLYLMSGLASEDTMYTC

FR4

FGGQTKLEIK*

ヒト化 CH34 産物

シグナルペプチド

FR1 CDR1 FR2 CDR2 FR3 CDR3

MDNSCIIILFLVATATOVHSEVLVESGGGLVPGGSLSCAASGTFSDYGMHWVQAPQKGLSEWVSYSISLAITYYADTVIGKPTISRNAKNTLYLMSGLASEDTMYTC

CDR3

FR4

ANGGAGATWGGQTLVTVS*

FIG. 10

【図 11】

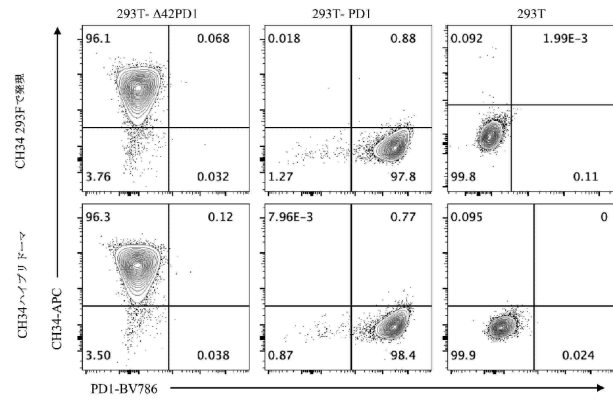


FIG. 11

【図 12】

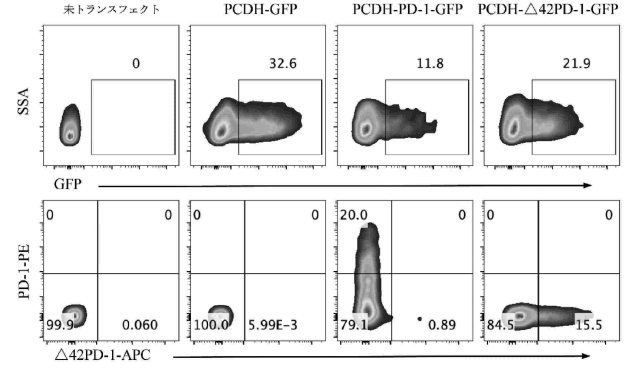


FIG. 12

10

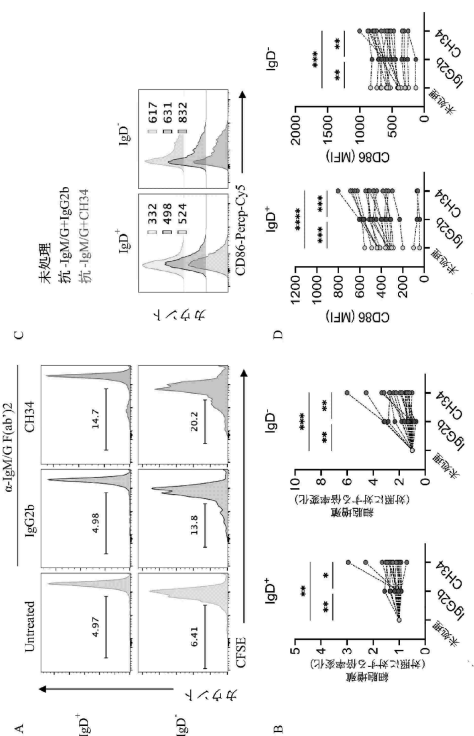
20

30

40

50

【図 15-1】



【圖 15-2】

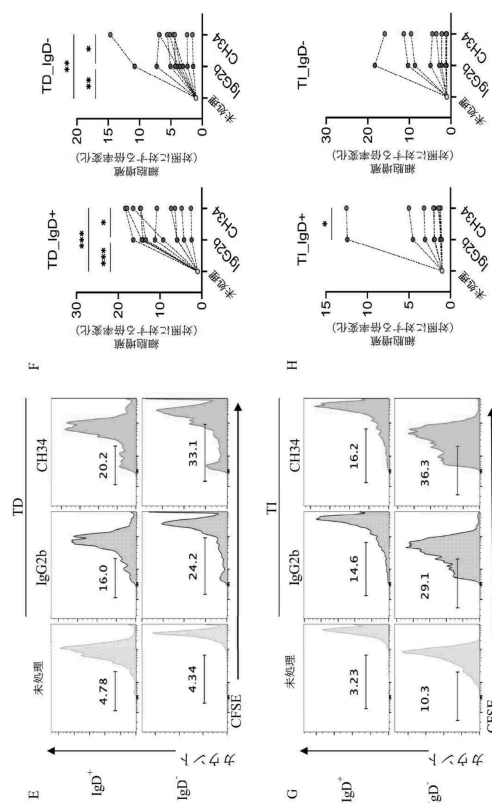


FIG. 15

FIG. 15 (続き)

10

20

【図 16】

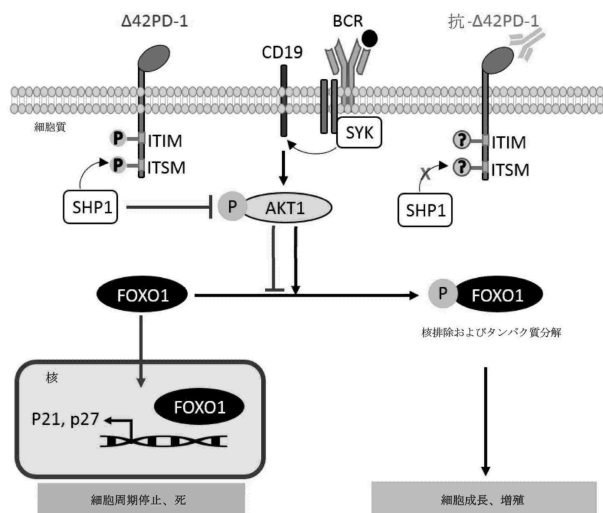


FIG. 16

【配列表】

2024544562000001.xml

30

40

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2022/132000															
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K16/28(2006.01)i;A61K39/395(2006.01)i;A61P35/00(2006.01)i;C12N15/13(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																	
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K 16/-; A61K 39/-; A61P/-; C12N 15/- Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CJFD; CNTXT; DWPI; VEN; CNABS; USTXT; WOTXT; PUBMED; ISI Web of knowledge; baidu; STN; CNKI;Retrieving System for Biological Sequence of Chinese patent and searched sequence:A42PD1, mAb,antibody,isoform,pd-1, humanized,variable, antigen binding fragment, SEQ ID NO:1-41																	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>CN 105431449 A (UNIV HONG KONG) 23 March 2016 (2016-03-23) see the whole document</td> <td>1-34</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 105950715 A (THIRD PEOPLES HOSPITAL SHENZHEN) 21 September 2016 (2016-09-21) see the whole document</td> <td>1-34</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CHENG, L. et al. "Generation of anti-human Delta-42PD1 monoclonal antibodies and preliminary study on immune function of Delta-42PD1" <i>Chinese Doctoral Dissertations Full-text Database(Medical and Health Science)</i>, 15 August 2016 (2016-08-15), Article:E059-54, pages 1-94</td> <td>1-34</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CHENG, L. et al. "Monoclonal antibodies specific to human A42PD1: A novel immunoregulator potentially involved in HIV-1 and tumor pathogenesis" <i>mAbs No.3 Vol.7</i>, 01 May 2015 (2015-05-01), pages 620-629</td> <td>1-34</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	A	CN 105431449 A (UNIV HONG KONG) 23 March 2016 (2016-03-23) see the whole document	1-34	A	CN 105950715 A (THIRD PEOPLES HOSPITAL SHENZHEN) 21 September 2016 (2016-09-21) see the whole document	1-34	X	CHENG, L. et al. "Generation of anti-human Delta-42PD1 monoclonal antibodies and preliminary study on immune function of Delta-42PD1" <i>Chinese Doctoral Dissertations Full-text Database(Medical and Health Science)</i> , 15 August 2016 (2016-08-15), Article:E059-54, pages 1-94	1-34	X	CHENG, L. et al. "Monoclonal antibodies specific to human A42PD1: A novel immunoregulator potentially involved in HIV-1 and tumor pathogenesis" <i>mAbs No.3 Vol.7</i> , 01 May 2015 (2015-05-01), pages 620-629	1-34
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
A	CN 105431449 A (UNIV HONG KONG) 23 March 2016 (2016-03-23) see the whole document	1-34															
A	CN 105950715 A (THIRD PEOPLES HOSPITAL SHENZHEN) 21 September 2016 (2016-09-21) see the whole document	1-34															
X	CHENG, L. et al. "Generation of anti-human Delta-42PD1 monoclonal antibodies and preliminary study on immune function of Delta-42PD1" <i>Chinese Doctoral Dissertations Full-text Database(Medical and Health Science)</i> , 15 August 2016 (2016-08-15), Article:E059-54, pages 1-94	1-34															
X	CHENG, L. et al. "Monoclonal antibodies specific to human A42PD1: A novel immunoregulator potentially involved in HIV-1 and tumor pathogenesis" <i>mAbs No.3 Vol.7</i> , 01 May 2015 (2015-05-01), pages 620-629	1-34															
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.																	
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family																	
Date of the actual completion of the international search 09 February 2023		Date of mailing of the international search report 13 February 2023															
Name and mailing address of the ISA/CN CHINA NATIONAL INTELLECTUAL PROPERTY ADMINISTRATION 6, Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer XIA, Ying Telephone No. (+86) 010-53962033															

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/132000

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHENG, L.et al. "Analysis of immunogenicity of Δ42PD1 via yeast surface displaying peptide fragments" <i>Chinese journal of immunology</i> , No.9, 20 September 2016 (2016-09-20), pages 1333-1337	1-34
A	ZHOU,J.Y.et al. "Potentiating functional antigen-specific CD8+ T cell immunity by a novel PD1 Isoform-based fusion DNA vaccine" <i>Molecular Therapy</i> ,No.7 Vol.21, 16 April 2013 (2013-04-16), pages 1445-1455	1-34

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2022/132000
Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)	
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☒ forming part of the international application as filed. b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)), ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed. 2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing. 3. Additional comments:		

10

20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/132000

Box No. II	Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons: 1. ☒ Claims Nos.: 10-13,31-34 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Claims 10-13,31-34 relate to a method of treating a disease or condition in a subject in need of thereof and therefore they do not warrant an international search according to the criteria set out in PCT Rule 39.1(iv).An international search is still carried out on the basis of the use of the manufacturing of a medicament. 2. ☐ Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: 3. ☐ Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT						International application No.	
Information on patent family members						PCT/CN2022/132000	
Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	105431449	A	23 March 2016	WO	2014161509	A1	09 October 2014
				US	2018312564	A1	01 November 2018
				US	11236144	B2	01 February 2022
				US	2014302070	A1	09 October 2014
				US	10047137	B2	14 August 2018
CN	105950715	A	21 September 2016	CN	105950715	B	26 April 2019

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 39/395	L
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 K 47/68	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/18	
	A 6 1 K 45/00	

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T R I T O N

ム・ロード

(72)発明者 ジョウ、ドンヤン

中華人民共和国香港特別行政区クイーンズ・ロード・ウエスト402-404、4／フロア、ルー
ム・ビー

(72)発明者 リウ、リー

中華人民共和国香港特別行政区ポクフラム、ポクフラム・ロード、ポクフラム・ガーデン、ブロッ
ク3、16シー

F ターム (参考)	4B065	AA90X AB01 AC14 BA02 BA08 CA25 CA44
	4C076	CC16 CC27 CC35 EE41 EE59 FF34
	4C084	AA19 NA05 ZB262
	4C085	AA14 AA16 AA25 BB33 BB34 BB35 BB36 BB37 BB41 BB43
		CC23 DD62 EE01 EE03
	4H045	AA11 AA30 BA10 BA41 BA72 CA40 DA76 EA20 FA74