

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-516590
(P2025-516590A)

(43)公表日 令和7年5月30日(2025.5.30)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13		4 B 0 6 4
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	5/12 (2006.01)	C 1 2 N	5/12		4 C 0 7 6
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/88 (2006.01)	C 1 2 N	15/88	Z	4 C 0 8 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全149頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-566333(P2024-566333)			(71)出願人	522021206
(86)(22)出願日	令和5年5月11日(2023.5.11)				ビオンテック・ソシエタス・エウロパエ
(85)翻訳文提出日	令和7年1月7日(2025.1.7)				ア
(86)国際出願番号	PCT/EP2023/062651				B i o N T e c h S E
(87)国際公開番号	WO2023/217987				ドイツ55131マインツ、アン・デア
(87)国際公開日	令和5年11月16日(2023.11.16)				・ゴルトグルーベ12
(31)優先権主張番号	63/364,595			(71)出願人	507316398
(32)優先日	令和4年5月12日(2022.5.12)				ジェンマブ エー／エス
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				デンマーク王国 2500 バルビュー
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV			(74)代理人	100145403
	最終頁に続く				弁理士 山尾 憲人
				(74)代理人	100170520
					弁理士 笹倉 真奈美
				(74)代理人	100221545
					最終頁に続く

(54)【発明の名称】 プログラム死-1タンパク質に対するモノクローナル抗体および医薬におけるその使用

(57)【要約】

本開示は、免疫チェックポイントタンパク質プログラム死-1（PD-1）、例えばヒトPD-1に結合する能力を有する抗体、またはこのような抗体をコードする核酸であって、抗体が、抗体のFc媒介性エフェクター機能を排除するかまたは低下させるFc領域における改変を含む、抗体または核酸に関する。本開示はまた、前記抗体または核酸を含む組成物またはキット、および医学の分野、好ましくは免疫療法の分野、例えば、がんの処置のための免疫療法の分野におけるこれらの抗体または核酸または組成物の使用に関する。本発明はさらに、対象において免疫応答を誘導するための方法であって、対象に、本開示の抗体またはこのような抗体をコードする1つ以上の核酸、または前記抗体もしくは核酸を含む組成物を提供することを含む、方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

P D - 1 に結合する能力を有する抗体であって、重鎖定常領域（C H）および重鎖可変領域（V H）を有する重鎖を含み、前記重鎖定常領域が、E U 番号付けに従いヒト I g G 1 重鎖の 2 3 4 位に対応する位置に芳香族アミノ酸または非極性アミノ酸、および E U 番号付けに従いヒト I g G 1 重鎖の 2 3 6 位に対応する位置にグリシン以外のアミノ酸を含む、抗体。

【請求項 2】

低下または枯渇した F c 媒介性エフェクター機能を有する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

2 3 6 位に対応する位置のアミノ酸が塩基性アミノ酸である、請求項 1 または 2 に記載の抗体。

【請求項 4】

塩基性アミノ酸が、リシン、アルギニンおよびヒスチジンからなる群から選択される、請求項 2 または 3 に記載の抗体。

【請求項 5】

塩基性アミノ酸がアルギニン（G 2 3 6 R）である、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 6】

2 3 4 位に対応する位置のアミノ酸が芳香族アミノ酸である、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 7】

芳香族アミノ酸が、フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンからなる群から選択される、請求項 6 に記載の抗体。

【請求項 8】

2 3 4 位に対応する位置のアミノ酸が非極性アミノ酸である、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 9】

非極性アミノ酸が、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、メチオニンおよびトリプトファンからなる群から選択される、請求項 8 に記載の抗体。

【請求項 10】

非極性アミノ酸が、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニンおよびトリプトファンからなる群から選択される、請求項 8 または 9 に記載の抗体。

【請求項 11】

2 3 4 位に対応する位置のアミノ酸がフェニルアラニン（L 2 3 4 F）である、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 12】

前記重鎖定常領域において、E U 番号付けに従いヒト I g G 1 重鎖の 2 3 5 位に対応する位置のアミノ酸が、酸性アミノ酸である、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 13】

酸性アミノ酸がアスパラギン酸またはグルタミン酸である、請求項 12 に記載の抗体。

【請求項 14】

2 3 5 位に対応する位置のアミノ酸がグルタミン酸（L 2 3 5 E）である、請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 15】

前記重鎖定常領域において、2 3 4、2 3 5 および 2 3 6 位に対応する位置のアミノ酸が、2 3 4 位が非極性アミノ酸または芳香族アミノ酸、2 3 5 位が酸性アミノ酸、2 3 6 位が塩基性アミノ酸である、請求項 1 から 14 のいずれか一項に記載の抗体。

10

20

30

40

50

【請求項 16】

234 位に対応するアミノ酸がフェニルアラニンであり、235 位に対応するアミノ酸がグルタミン酸であり、236 位に対応するアミノ酸がアルギニンである（L234F／L235E／G236R）、請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 17】

前記重鎖定常領域が、配列番号 2 に記載された重鎖定常領域配列のアミノ酸配列に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、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 97 %、少なくとも 99 %、または 100 % の同一性を有する配列を含む、請求項 1 から 16 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 18】

前記重鎖定常領域が、配列番号 2 または 55 に記載された配列を含む、請求項 1 から 17 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 19】

前記重鎖定常領域のアイソタイプが IgG1 である、請求項 1 から 18 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 20】

前記重鎖可変領域（VH）が、配列番号 8 に記載された配列を有するかまたはそれを含む相補性決定領域 3（HCDR3）を含む、請求項 1 から 19 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 21】

前記重鎖可変領域（VH）の前記 HCDR3 が、配列番号 9 に記載された配列を有するかまたはそれを含む、請求項 1 から 20 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 22】

前記重鎖可変領域（VH）が、配列番号 10 に記載された配列を有するかまたはそれを含む相補性決定領域 2（HCDR2）を含む、請求項 1 から 21 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 23】

前記重鎖可変領域（VH）の前記 HCDR2 が、配列番号 11 に記載された配列を有するかまたはそれを含む、請求項 22 に記載の抗体。

【請求項 24】

前記重鎖可変領域（VH）が、SYN から選択される配列を有するかまたはそれを含む相補性決定領域 1（HCDR1）を含む、請求項 1 から 23 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 25】

前記重鎖可変領域（VH）の前記 HCDR1 が、配列番号 12 に記載された配列を有するかまたはそれを含む、請求項 24 に記載の抗体。

【請求項 26】

前記重鎖可変領域（VH）の前記 HCDR1 が、配列番号 13 に記載された配列を有するかまたはそれを含む、請求項 24 に記載の抗体。

【請求項 27】

HCDR1、HCDR2 および HCDR3 配列を含む重鎖可変領域（VH）を含み、前記 HCDR1 配列が、SYN、配列番号 12 または配列番号 13 を有するかまたはそれを含む配列から選択され、前記 HCDR2 配列が、配列番号 10 または配列番号 11 を有するかまたはそれを含む配列から選択され、前記 HCDR3 配列が、配列番号 8 または配列番号 9 を有するかまたはそれを含む配列から選択される、請求項 1 から 26 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 28】

HCDR1、HCDR2 および HCDR3 配列を含む重鎖可変領域（VH）を含み、前記 HCDR1、HCDR2 および HCDR3 配列が、それぞれ、SYN、配列番号 10 および配列番号 8 であるかまたはそれを含む、請求項 1 から 27 のいずれか一項に記載の抗

10

20

30

40

50

体。

【請求項 29】

HCDR1、HCDR2 および HCDR3 配列を含む重鎖可変領域 (VH) を含み、前記 HCDR1、HCDR2 および HCDR3 配列が、それぞれ、配列番号 12、配列番号 11 および配列番号 8 であるかまたはそれを含む、請求項 1 から 28 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 30】

HCDR1、HCDR2、および HCDR3 配列を含む重鎖可変領域 (VH) を含み、前記 HCDR1、HCDR2、および HCDR3 配列が、それぞれ、配列番号 13、配列番号 10 および配列番号 9 であるかまたはそれを含む、請求項 1 から 28 のいずれか一項に記載の抗体。

10

【請求項 31】

軽鎖可変領域 (VL) を有する軽鎖を含む、請求項 1 から 30 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 32】

— 配列番号 14 に記載された配列を有するかもしくはそれを含む相補性決定領域 3 (LCDR3) ;

— QAS もしくは配列番号 15 に記載された配列から選択された配列を有するかもしくはそれを含む相補性決定領域 2 (LCDR2) ; および / または

— 配列番号 16 または配列番号 17 に記載された配列を有するかもしくはそれを含む相補性決定領域 1 (LCDR1)

20

のうちの少なくとも 1 つを含む軽鎖可変領域 (VL) を含む、請求項 1 から 31 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 33】

LCDR1、LCDR2 および LCDR3 配列を含む軽鎖可変領域 (VL) を含み、前記 LCDR1 配列が、配列番号 16 または配列番号 17 を有するかまたはそれを含む配列から選択され、前記 LCDR2 配列が、QAS または配列番号 15 を有するかまたはそれを含む配列から選択され、前記 LCDR3 配列が、配列番号 14 を有するかまたはそれを含む配列である、請求項 32 に記載の抗体。

【請求項 34】

30

LCDR1、LCDR2 および LCDR3 配列を含む軽鎖可変領域 (VL) を含み、前記 LCDR1、LCDR2 および LCDR3 配列が、それぞれ、配列番号 16、QAS、および配列番号 14 であるかまたはそれを含む、請求項 31 から 33 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 35】

LCDR1、LCDR2 および LCDR3 配列を含む軽鎖可変領域 (VL) を含み、前記 LCDR1、LCDR2 および LCDR3 配列が、それぞれ、配列番号 17、配列番号 15、および配列番号 14 であるかまたはそれを含む、請求項 31 から 34 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 36】

40

請求項 20 から 30 のいずれか一項に明示されている重鎖可変領域 (VH) および請求項 31 から 35 のいずれか一項に明示されている軽鎖可変領域 (VL) を含む、請求項 1 から 19 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 37】

HCDR1、HCDR2 および HCDR3 配列を含む重鎖可変領域 (VH) ならびに LCDR1、LCDR2 および LCDR3 配列を含む軽鎖可変領域 (VL) を含み、前記 HCDR1、HCDR2 および HCDR3 配列が、それぞれ、配列番号 10 および配列番号 8 に記載された配列 SYN を含むかまたはそれを有し、前記 LCDR1、LCDR2 および LCDR3 配列が、それぞれ、配列番号 16、QAS および配列番号 14 に記載された配列を含むかまたはそれを有する、請求項 1 から 36 のいずれか一項に記載の抗体。

50

【請求項 38】

HCDR1、HCDR2およびHCDR3配列を含む重鎖可変領域（VH）ならびにLCDR1、LCDR2およびLCDR3配列を含む軽鎖可変領域（VL）を含み、前記HCDR1、HCDR2およびHCDR3配列が、それぞれ、配列番号12、配列番号11および配列番号8に記載された配列を含むかまたはそれを有し、前記LCDR1、LCDR2およびLCDR3配列が、それぞれ、配列番号17、配列番号15および配列番号14に記載された配列を含むかまたはそれを有する、請求項1から36のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 39】

HCDR1、HCDR2およびHCDR3配列を含む重鎖可変領域（VH）ならびにLCDR1、LCDR2およびLCDR3配列を含む軽鎖可変領域（VL）を含み、前記HCDR1、HCDR2およびHCDR3配列が、それぞれ、配列番号13、配列番号10および配列番号9に記載された配列を含むかまたはそれを有し、前記LCDR1、LCDR2およびLCDR3配列が、それぞれ、配列番号16、QASおよび配列番号14に記載された配列を含むかまたはそれを有する、請求項1から36のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 40】

配列番号18に記載された重鎖可変領域（VH）配列のアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、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97%、少なくとも99%、または100%の同一性を有する配列を含む重鎖可変領域（VH）を含む、請求項1から39のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 41】

重鎖可変領域（VH）を含み、前記VHが、配列番号18に記載された配列を含む、請求項1から39のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 42】

配列番号19に記載された軽鎖可変領域（VL）配列のアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、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97%、少なくとも99%、または100%の同一性を有する配列を含む軽鎖可変領域（VL）を含む、請求項1から41のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 43】

軽鎖可変領域（VL）を含み、前記VLが、配列番号19に記載された配列を含む、請求項1から42のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 44】

重鎖可変領域（VH）および軽鎖可変領域（VL）を含み、前記VHが配列番号18に記載された配列を含むかまたはそれを有し、前記VLが配列番号19に記載された配列を含むかまたはそれを有する、請求項1から43のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 45】

配列番号20に記載された重鎖可変領域（VH）配列のアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、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97%、少なくとも99%、または100%の同一性を有する配列を含む重鎖可変領域（VH）を含む、請求項1から39のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 46】

重鎖可変領域（VH）を含み、前記VHが、配列番号20に記載された配列を含む、請求項45に記載の抗体。

【請求項 47】

配列番号20に記載された配列を含む前記VH、および配列番号2または配列番号55に記載された配列を含む前記重鎖定常領域を含む重鎖を含む、請求項45に記載の抗体。

【請求項 48】

配列番号 56 に記載された配列を含む重鎖を含む、請求項 45 に記載の抗体。

【請求項 49】

配列番号 21 に記載された軽鎖可変領域（V L）配列のアミノ酸配列に対して少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、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 97 %、少なくとも 99 %、または 100 % の同一性を有する配列を含む軽鎖可変領域（V L）を含む、請求項 1 から 48 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 50】

軽鎖可変領域（V L）を含み、前記 V L が、配列番号 21 に記載された配列を含む、請求項 49 に記載の抗体。

10

【請求項 51】

配列番号 21 に記載された配列を含む前記 V L、および配列番号 6 に記載された配列を含む軽鎖定常領域を含む軽鎖を含む、項目 49 に記載の抗体。

【請求項 52】

配列番号 57 に記載された配列を含む軽鎖を含む、項目 49 に記載の抗体。

【請求項 53】

重鎖可変領域（V H）および軽鎖可変領域（V L）を含み、前記 V H が配列番号 20 に記載された配列を含むかまたはそれを有し、前記 V L が配列番号 21 に記載された配列を含むかまたはそれを有する、請求項 1 から 48 のいずれか一項に記載の抗体。

20

【請求項 54】

（i）配列番号 2 または 55 に記載された配列を含む重鎖定常領域（C H）、および配列番号 20 に記載された配列を含む重鎖可変領域（V H）を有する重鎖、ならびに

（i i）配列番号 6 に記載された配列を含む軽鎖定常領域（C L）、および配列番号 21 に記載された配列を含む軽鎖可変領域（V L）を有する軽鎖を含む、請求項 1 から 53 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 55】

配列番号 56 に記載された配列を有する重鎖、および配列番号 57 に記載された配列を有する軽鎖を含む、請求項 1 から 53 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 56】

モノクローナル抗体、キメラ抗体もしくはヒト化抗体、またはこのような抗体の断片である、請求項 1 から 55 のいずれか一項に記載の抗体。

30

【請求項 57】

前記抗体の定常領域への補体タンパク質 C 1 q の結合が、対応する野生型抗体と比較して低下しており、好ましくは少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 % または 100 % 低下している、請求項 1 から 56 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 58】

前記抗体への 1 つ以上の I g G F c ガンマ受容体への結合が、対応する野生型抗体と比較して低下しており、好ましくは少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 97 % または 100 % 低下している、請求項 1 から 57 のいずれか一項に記載の抗体。

40

【請求項 59】

前記 1 つ以上の I g G F c - ガンマ受容体が、F c - ガンマ R I、F c - ガンマ R I I、および F c - ガンマ R I I I のうちの少なくとも 1 つから選択される、請求項 58 に記載の抗体。

【請求項 60】

前記 I g G F c ガンマ受容体が、F c - ガンマ R I である、請求項 58 に記載の抗体。

【請求項 61】

F c - ガンマ R I 媒介性エフェクター機能を誘導することができないか、または誘導さ

50

れたFc-γRII 媒介性エフェクター機能が、対応する野生型抗体と比較して低下しており、好ましくは少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%または100%低下している、請求項1から60のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項62】

補体依存性細胞傷害(CDC)媒介性溶解、抗体依存性細胞傷害(ADCC)媒介性溶解、アポトーシス、ホモ型接着および／もしくは貪食のうちの少なくとも1つを誘導することができないか、または補体依存性細胞傷害(CDC)媒介性溶解、抗体依存性細胞傷害(ADCC)媒介性溶解、アポトーシス、ホモ型接着および／もしくは貪食のうちの少なくとも1つが、低下した程度で、好ましくは少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%または100%低下して誘導される、請求項1から61のいずれか一項に記載の抗体。

10

【請求項63】

前記抗体に対する新生児Fc受容体(FcRn)の結合が、対応する野生型抗体と比較して、影響を受けない、請求項1から62のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項64】

PD-1がヒトPD-1である、請求項1から63のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項65】

前記PD-1が、配列番号22もしくは配列番号23に記載されたアミノ酸配列を有するもしくはそれを含み、またはPD-1のアミノ酸配列が、配列番号22もしくは配列番号23に記載されたアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、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97%、少なくとも99%、もしくは100%の同一性を有するか、またはその免疫原性断片である、請求項64に記載の抗体。

20

【請求項66】

生細胞表面に存在するPD-1のネイティブエピトープに結合する、請求項1から65のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項67】

PD-1に結合する第1の抗原結合領域、および別の抗原に結合する少なくとも1つのさらなる抗原結合領域を含む多特異性抗体である、請求項1から66のいずれか一項に記載の抗体。

30

【請求項68】

PD-1に結合する第1の抗原結合領域、および別の抗原に結合する第2の抗原結合領域を含む二特異性抗体である、請求項67に記載の抗体。

【請求項69】

PD-1に結合する前記第1の抗原結合領域が、請求項1から60のいずれか一項に記載された重鎖可変領域(VH)および／または軽鎖可変領域(VL)を含む、請求項67または68に記載の抗体。

【請求項70】

請求項1から69のいずれか一項に記載の抗体を産生することが可能なハイブリドーマ。

40

【請求項71】

部分または薬剤に連結された請求項1から69のいずれか一項に記載の抗体を含むコンジュゲート。

【請求項72】

前記部分または薬剤が、放射性同位体、酵素、色素、薬物、毒素および細胞毒性剤からなる群から選択される、請求項71に記載のコンジュゲート。

【請求項73】

請求項1から69のいずれか一項に記載の少なくとも2つの抗体、または請求項71もしくは72に記載の少なくとも2つのコンジュゲート、または請求項1から69のいずれ

50

か一項に記載の１つ以上の抗体と請求項 7 1 もしくは 7 2 に記載の１つ以上のコンジュゲートとの混合物を含む多量体。

【請求項 7 4】

請求項 1 から 6 9 のいずれか一項に記載の 4 ～ 8 個の抗体、または請求項 7 1 もしくは 7 2 に記載のコンジュゲートを含む、請求項 7 3 に記載の多量体。

【請求項 7 5】

請求項 1 から 6 9 のいずれか 1 つに記載の抗体をコードするか、または請求項 1 から 3 0 もしくは 3 7 から 6 6 のいずれか一項に明示されている抗体重鎖をコードする、および／または請求項 3 1 から 3 9、4 2、4 3、もしくは 4 9 から 6 6 のいずれか一項に明示されている抗体軽鎖をコードする核酸配列、またはその断片を含む核酸。

10

【請求項 7 6】

前記核酸が RNA である、請求項 7 5 に記載の核酸。

【請求項 7 7】

請求項 7 5 または 7 6 に記載の核酸のうちの 1 つ以上を含むベクター。

【請求項 7 8】

多層ベシクル、単層ベシクル、またはそれらの混合物である、請求項 7 7 に記載のベクター。

【請求項 7 9】

リポソームである、請求項 7 7 または 7 8 に記載のベクター。

【請求項 8 0】

20

前記リポソームがカチオン性リポソームである、請求項 7 9 に記載のベクター。

【請求項 8 1】

前記リポソームが、約 5 0 n m ～ 約 2 0 0 n m の範囲の粒径を有する、請求項 7 9 または 8 0 に記載のベクター。

【請求項 8 2】

請求項 7 5 または 7 6 に記載の核酸を含むか、または請求項 7 7 から 8 1 のいずれか一項に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 8 3】

請求項 7 5 または 7 6 に記載の核酸を含むか、または請求項 7 7 から 8 1 のいずれか一項に記載のベクターを含むウイルス。

30

【請求項 8 4】

活性剤および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物であって、前記活性剤が、

(i) 請求項 1 から 6 9 のいずれか一項に記載の抗体；

(i i) 請求項 7 1 もしくは 7 2 に記載のコンジュゲート；

(i i i) 請求項 7 3 もしくは 7 4 に記載の多量体；

(i v) 請求項 7 5 もしくは 7 6 に記載の核酸もしくはその組合せ；

(v) 請求項 7 7 から 8 1 のいずれか一項に記載のベクターもしくはその組合せ；

(v i) 請求項 8 2 に記載の宿主細胞もしくはその組合せ；および／または

(v i i) 請求項 8 3 に記載のウイルスもしくはその組合せ

から選択される少なくとも 1 つである、医薬組成物。

40

【請求項 8 5】

非経口投与用に製剤化される、請求項 8 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 8 6】

心血管投与用、特に静脈内または動脈内投与用に製剤化される、請求項 8 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 8 7】

疾患の予防的および／または治療的処置において使用するための請求項 8 4 から 8 6 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 8 8】

前記疾患が、がん成長および／またはがん転移である、請求項 8 7 に記載の医薬組成物

50

。

【請求項 89】

前記疾患が、PD-L1を発現することによって特徴付けられる、および／またはPD-L1がその表面と会合することによって特徴付けられる異常細胞またはがん細胞を含むことによって特徴付けられる、請求項87または88に記載の医薬組成物。

【請求項 90】

がんを防止または処置する方法において使用するための請求項84から89のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 91】

前記がんが、黒色腫、肺がん、腎細胞癌、膀胱がん、乳がん、胃がんおよび胃食道接合部がん、膵腺癌、卵巣がんおよびリンパ腫からなる群から選択される、請求項88から90のいずれか一項に記載の医薬組成物。

10

【請求項 92】

標的器官または組織に特異的にデリバリーされ、蓄積され、および／または保持される、請求項84から91のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 93】

前記ベクターまたは前記ウイルスが、標的器官もしくは組織で核酸を放出し、および／または標的器官もしくは組織の細胞に侵入する、請求項84から92のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 94】

前記抗体が、標的器官または組織の細胞において発現される、請求項84から93のいずれか一項に記載の医薬組成物。

20

【請求項 95】

前記処置が、単剤療法または併用療法である、請求項84から94のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 96】

前記併用処置が、化学療法、分子標的療法、放射線療法、および他の形態の免疫療法からなる群から選択される少なくとも1つの処置である、請求項95に記載の医薬組成物。

【請求項 97】

前記対象がヒトである、請求項84から96のいずれか一項に記載の医薬組成物。

30

【請求項 98】

対象における疾患を処置または防止する方法であって、対象に、少なくとも1つの活性剤を投与することを含み、前記活性剤が、

(i) 請求項1から69のいずれか一項に記載の抗体；

(ii) 請求項71もしくは72に記載のコンジュゲート；

(iii) 請求項73もしくは74に記載の多量体；

(iv) 請求項75もしくは76に記載の核酸もしくはその組合せ；

(v) 請求項77から81のいずれか一項に記載のベクターもしくはその組合せ；

(vi) 請求項82に記載の宿主細胞もしくはその組合せ；および／または

(vii) 請求項83に記載のウイルスもしくはその組合せ

40

から選択される少なくとも1つである、方法。

【請求項 99】

請求項84から86のいずれか一項に記載の医薬組成物が前記対象に投与される、請求項98に記載の方法。

【請求項 100】

前記対象が、PD-L1を発現する細胞によって特徴付けられ、および／またはPD-L1がその表面に会合することによって特徴付けられる罹患した器官または組織を有する、請求項98または99に記載の方法。

【請求項 101】

前記疾患が、がん成長および／またはがん転移である、請求項98から100のいずれ

50

か一項に記載の方法。

【請求項 102】

前記がんが、黒色腫、肺がん、腎細胞癌、膀胱がん、乳がん、胃がんおよび胃食道接合部がん、膵腺癌、卵巣がんおよびリンパ腫からなる群から選択される、請求項 101 に記載の方法。

【請求項 103】

前記活性剤または前記医薬組成物が、心血管系へと投与される、請求項 98 から 102 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 104】

前記活性剤または前記医薬組成物が、末梢静脈への投与などの静脈内投与または動脈内投与によって投与される、請求項 103 に記載の方法。

【請求項 105】

前記活性剤または前記医薬組成物が、標的器官または組織に特異的にデリバリーされ、蓄積され、および／または保持される、請求項 98 から 104 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 106】

前記ベクター、前記宿主細胞または前記ウイルスが、前記標的器官もしくは組織で核酸を放出し、および／または前記標的器官もしくは組織の細胞に侵入する、請求項 98 から 105 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 107】

前記抗体が、前記標的器官または組織の細胞において発現される、請求項 106 に記載の方法。

【請求項 108】

前記処置が、単剤療法または併用療法である、請求項 98 から 107 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 109】

前記併用処置が、化学療法、分子標的療法、放射線療法、および他の形態の免疫療法からなる群から選択される少なくとも 1 つの処置である、請求項 108 に記載の方法。

【請求項 110】

前記対象がヒトである、請求項 98 から 109 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 111】

試料中の PD-1 の定性的または定量的検出のためのキットであって、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の抗体または請求項 71 もしくは 72 に記載のコンジュゲートまたは請求項 73 もしくは 74 に記載の多量体を含む、キット。

【請求項 112】

試料中で発現される PD-1 の存在または量を決定する方法における、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の抗体、または請求項 71 もしくは 72 に記載のコンジュゲート、または請求項 73 もしくは 74 に記載の多量体、または請求項 111 に記載のキットの使用であって、前記方法が、

(i) 試料を前記抗体または前記コンジュゲートまたは前記多量体と接触させる工程と、

(ii) 前記抗体または前記コンジュゲートまたは前記多量体と PD-1 との間の複合体の形成を検出する工程および／またはその量を決定する工程とを含む、使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫チェックポイントタンパク質プログラム死-1 (PD-1)、例えばヒト PD-1 に結合する、好ましくは特異的に結合する能力を有する抗体、またはこのような抗体をコードする核酸であって、抗体が、抗体の Fc 媒介性エフェクター機能を排除するかまたは低下させる Fc 領域における改変を含む、抗体または核酸に関する。本発明は

10

20

30

40

50

また、前記抗体または核酸を含む組成物またはキット、および医学の分野、好ましくはがんの処置のための免疫療法の分野におけるこれらの抗体または核酸または組成物の使用に関する。本発明はさらに、対象において免疫応答を誘導するための方法であって、免疫チェックポイントタンパク質PD-1、例えばヒトPD-1に結合する能力を有する抗体、またはこのような抗体をコードする核酸、または前記抗体もしくは核酸を含む組成物を対象に提供することを含む、方法に関する。

【背景技術】

【0002】

免疫療法は、感染症または悪性疾患を制御するために、患者において特異的な免疫応答を増強または誘導することを目的とする。ますます多くの病原体関連抗原および腫瘍関連抗原（TAA）が同定されると、免疫療法に適した標的が広く集められた。これらの抗原に由来する免疫原性ペプチド（エピトープ）を提示する細胞は、能動的免疫戦略または受動的免疫戦略のいずれかによって特異的に標的とされ得る。能動免疫化により、患者において、罹患細胞を特異的に認識および殺滅することができる抗原特異的T細胞が誘導および拡大され易い。これとは対照的に、受動免疫は、インビトロ（*in vitro*）で拡大され、適宜、遺伝子操作されたT細胞の養子移入に依拠し得る（養子T細胞療法）。

10

【0003】

脊椎動物では、免疫系の進化により、自然免疫および養子免疫という2種類の防御に基づく非常に効果的なネットワークがもたらされた。病原体に関連する共通の分子パターンを認識する不変の受容体に依拠する進化的に古い自然免疫系とは対照的に、養子免疫はB細胞（Bリンパ球）およびT細胞（Tリンパ球）上の高度に特異的な抗原受容体およびクローン選択に基づく。免疫系はがんの発生、進行および療法において重要な役割を果たす。CD8⁺ T細胞およびNK細胞は腫瘍細胞を直接溶解することができ、これらの細胞の高度な腫瘍浸潤は、一般に様々な腫瘍疾患の転帰に対して有利であると考えられている。CD4⁺ T細胞は、IFN γ の分泌または抗原提示樹状細胞（DC）のライセンスングによって抗腫瘍免疫応答に寄与し、次に、CD8⁺ T細胞をプライムし活性化する [Kreiter S. et al. Nature 520, 692-6 (2015)]。CD8⁺ T細胞による腫瘍細胞の認識および排除は、主要組織適合性複合体（MHC）クラスIを介した抗原提示に依存している。抗原特異的T細胞応答はワクチン接種によって惹起され得る。ワクチン接種は、ワクチンRNA、すなわち免疫応答が誘導されるべき抗原またはエピトープをコードするRNAを投与することによって達成することができる。

20

30

【0004】

T細胞の活性化には、抗原受容体（TCR）を介した刺激だけでなく、コンジュゲートした刺激性分子群（例えばCD28）を介した追加的な刺激誘導も必要であり得る。がん細胞は、阻害性免疫チェックポイントタンパク質、例えば、T細胞上のPD-1およびCTLA-4、または腫瘍細胞、腫瘍間質もしくは腫瘍微小環境内の他の細胞上のPD-L1の上方調節により免疫応答を回避および抑制することができる。CTLA4およびPD-1は、T細胞の活性化を抑制するシグナルを伝達することが知られている。モノクローナル抗体によりこれらのタンパク質の活性をブロックすることにより、T細胞の機能を回復させることで、がんに対する画期的な療法がもたらされている。

40

【0005】

PD-1（CD279としても知られる）は、活性化T細胞、B細胞、および単球の表面に発現する免疫調節受容体である。PD-1タンパク質は、PD-L1（CD274とも呼ばれる）およびPD-L2（CD273としても知られる）として知られる2つの天然に存在するリガンドを有する。黒色腫、肺がん、腎がん、膀胱がん、食道がん、胃がんおよび他のがんを含む、ありとあらゆるがんがPD-L1を発現する。よって、がんにおいて、PD-1/PD-L1系は、PD-L1とPD-1との相互作用に関して、Tリンパ球の増殖、サイトカインの放出、および細胞傷害性を阻害し、それによって、がん細胞にT細胞に媒介される免疫応答を回避する機会を与え得る。

【0006】

50

P D - 1 / P D - L 1 軸の活性を調節するのに適したモノクローナル抗体が知られている。P D - 1 / P D - L 1 相互作用は、ペムブロリズマブ (M K - 3 4 7 5、ラムプロリズマブまたは K e y t r u d a とともに命名されている) によって阻害され得る。この目的に適した別のモノクローナル抗体は、ニボルマブ (O N O - 4 5 3 8、B M S - 9 3 6 5 5 8 または O p d i v o とともに命名されている) である。

【0007】

がんに対する抗体ベースの療法は、従来の薬剤と比較して特異性が高く、副作用プロファイルが低く、したがって、従来の療法よりも有利であり得る。しかし、免疫系を活性化することによって、免疫チェックポイント阻害剤は、患者によっては自己免疫性の副作用を引き起こし得る。他の患者は、処置に対して応答することができない場合がある。

【0008】

さらに、抗 P D - 1 抗体は、正常な免疫を付随的に抑制することなく、自己免疫疾患を和らげる可能性がある。例えば、免疫毒素に連結した抗 P D - 1 結合断片は、自己免疫性糖尿病の疾患発症を遅延させることができ、マウスにおける自己免疫性脳脊髄炎モデルの症状を改善する [Zhao P. et al. Nat Biomed Eng. 3(4): 292-305 (2019)]。

【0009】

抗体の F c 領域の改変により、例えば F c - ガンマ受容体と C 1 q との相互作用が阻害される F c 領域が生じることは当技術分野で知られている。例えば、I g G 1 アイソタイプ抗体において改変され得るアミノ酸位置の例としては、L 2 3 4 位、L 2 3 5 位および P 3 3 1 位が挙げられる。それらの組合せ、例えば、L 2 3 4 F / L 2 3 5 E / P 3 3 1 S は、ヒト C D 6 4、C D 3 2、C D 1 6 および C 1 q への結合の大幅な減少を引き起こす可能性がある [Xu et al., 2000, Cell Immunol. 200(1):16-26; Oganessian et al., 2008, Acta Cryst. (D64):700-4]。また、L 2 3 4 F および L 2 3 5 E のアミノ酸置換は、F c - ガンマ受容体と C 1 q との相互作用が阻害された F c 領域をもたらす可能性がある [Canfield et al., 1991, J. Exp. Med. (173):1483-91; Duncan et al., 1988, Nature (332):738-40]。D 2 6 5 A のアミノ酸置換は、すべての F c γ 受容体への結合を減少させ、A D C C を防止し得る [Shields et al., 2001, J. Biol. Chem. (276):6591-604]。C 1 q への結合は、位置 D 2 7 0、K 3 2 2、P 3 2 9 および P 3 3 1 を変異させることによって阻害され得る。これらの位置を D 2 7 0 A もしくは K 3 2 2 A、または P 3 2 9 A もしくは P 3 3 1 A のいずれかに変異させることによって、抗体の C D C 活性が欠損する (Idusogie EE, et al., 2000, J Immunol. 164: 4178-84)。

【0010】

よって、免疫チェックポイント阻害剤療法に関連する目覚ましい利益にもかかわらず、これらのチェックポイントを標的とし、免疫療法、特にがん免疫療法にさらなる利益をもたらすための改善された抗体の開発に対するアンメット・ニーズが依然として存在する。

【発明の概要】

【0011】

本開示は、概して、疾患、例えば、がんまたは感染性疾患を処置および／または防止するための治療薬として有用な抗体を提供する。処置は、免疫系を活性化することおよび／または免疫応答を誘導することを目的とする。

【0012】

本開示の抗体は、P D - 1、好ましくはヒト P D - 1 に対する結合特性および P D - 1 / P D - L 1 相互作用を遮断する能力を示し、その結果、免疫応答を誘導することができる。

【0013】

本開示の抗体は、以下の特性のうちの1つ以上を有し得る：本開示の抗体は、(i) P D - 1 に結合、好ましくは特異的に結合する；(i i) 免疫細胞上の P D - 1 に対する結合特性を有し得る；(i i i) P D - 1 エピトープに対する結合特性を有し得る；(i v) 非ヒト P D - 1 変異体、特にマウス、ラット、ウサギおよび霊長類由来の P D - 1 変異

10

20

30

40

50

体に対する結合特性を有し得る；（v）PD-1による阻害性シグナルの誘導を防止もしくは低減し得る；（vi）PD-1とPD-L1のリガンド、好ましくはリガンドPD-L1との相互作用／結合を阻害し、それによって、阻害性PD-1／PD-L1軸をブロックし得る、例えばそれらはヒトPD-L1とヒトPD-1との結合を阻害し得る；（vii）PD-L1もしくはPD-L2の免疫抑制シグナルを阻害し得る；（viii）好ましくはT細胞に媒介される免疫応答を増強もしくは開始することによって、好ましくはCD8⁺細胞増殖を誘導することによって、免疫機能を増強もしくは開始し得る；（ix）がんの増殖を阻害し得る；（x）腫瘍細胞を枯渇させ得るおよび／もしくはがん転移を抑制し得る；ならびに／または（xi）免疫細胞を枯渇させ得るおよび／もしくは自己免疫疾患を改善させ得る。よって、PD-1に結合する能力を有する本開示の抗体は、PD-1の免疫抑制シグナルを阻害し得る、および／または免疫細胞の活性化を枯渇させ得ることによって、自己免疫疾患を改善させ得る。

10

【0014】

本開示の抗PD-1抗体は、Fc媒介性エフェクター機能を低下または枯渇させる。抗体のFc領域のFc-ガンマ受容体への結合を排除または低減することは、治療用抗体に対する望ましくない炎症性応答を回避するための望ましい可能性がある。例えば、Fc媒介性エフェクター機能の低下または枯渇は、例えばPD-1を通常発現するT細胞に対する潜在的な毒性を回避するのに役立つ可能性がある。Fc-ガンマ受容体の結合が、抗体のscFv o d Fab断片を使用することによって排除または低減され得るとしても、治療目的のために抗体の半減期の増加という形で薬物動態活性が必要とされる場合には、完全長抗体が望ましい場合がある。よって、Fc媒介性エフェクター機能を低下または枯渇させる改変されたFc領域を含む抗体が望ましい場合がある。

20

【0015】

第1の態様では、PD-1に結合する能力を有する抗体であって、重鎖定常領域（CH）および重鎖可変領域（VH）を有する重鎖を含み、重鎖定常領域が、EU番号付けに従いヒトIgG1重鎖の234位に対応する位置に芳香族アミノ酸または非極性アミノ酸、およびEU番号付けに従いヒトIgG1重鎖の236位に対応する位置にグリシン以外のアミノ酸を含む、抗体が提供される。

【0016】

第1の態様の抗体は、Fc領域に少なくとも2つの改変を含む。抗体がこのような改変を含む場合、不活性抗体または非活性化抗体になる場合がある。「不活性」、「不活性化」または「非活性化」という用語は、本明細書で使用される場合、少なくとも、いかなるFc-ガンマ受容体とも結合することができないか、FcRのFc媒介性架橋を誘導することができないか、または個々の抗体の2つのFc領域を介して標的抗原のFcR媒介性架橋を誘導することができないか、またはC1qと結合することができないFc領域を指す。

30

【0017】

第1の態様の一実施形態では、PD-1に結合する能力を有する抗体であって、重鎖定常領域（CH）および重鎖可変領域（VH）を有する重鎖を含み、重鎖定常領域が、EU番号付けに従いヒトIgG1重鎖の234位に対応する位置に芳香族アミノ酸または非極性アミノ酸、およびEU番号付けに従いヒトIgG1重鎖の236位に対応する位置にグリシン以外のアミノ酸を含み、重鎖可変領域（VH）が、HCDR1、HCDR2およびHCDR3配列を含み、HCDR1配列が、SYN、配列番号12または配列番号13を有するかまたはそれを含む配列から選択され、HCDR2配列が、配列番号10または配列番号11を有するかまたはそれを含む配列から選択され、HCDR3配列が、配列番号8または配列番号9を有するかまたはそれを含む配列から選択される、抗体が提供される。

40

【0018】

第1の態様の一実施形態では、PD-1に結合する能力を有する抗体であって、重鎖定常領域（CH）および重鎖可変領域（VH）を有する重鎖を含み、重鎖定常領域が、EU

50

番号付けに従いヒトIgG1重鎖の234位に対応する位置に芳香族アミノ酸または非極性アミノ酸、およびEU番号付けに従いヒトIgG1重鎖の236位に対応する位置にグリシン以外のアミノ酸を含み、LCDR1、LCDR2およびLCDR3配列を含む軽鎖可変領域(VL)を有する軽鎖を含み、LCDR1配列が、配列番号16または配列番号17を有するかまたはそれを含む配列から選択され、LCDR2配列が、QASまたは配列番号15を有するかまたはそれを含む配列から選択され、LCDR3配列が、配列番号14を有するかまたはそれを含む配列である、抗体が提供される。

【0019】

第1の態様の一実施形態では、PD-1に結合する能力を有する抗体であって、重鎖定常領域(CH)および重鎖可変領域(VH)を有する重鎖ならびに軽鎖可変領域(VL)を有する軽鎖を含み、重鎖定常領域が、EU番号付けに従いヒトIgG1重鎖の234位に対応する位置に芳香族アミノ酸または非極性アミノ酸、およびEU番号付けに従いヒトIgG1重鎖の236位に対応する位置にグリシン以外のアミノ酸を含み、重鎖可変領域(VH)が、HCDR1、HCDR2およびHCDR3配列を含み、HCDR1配列が、SYN、配列番号12または配列番号13を有するかまたはそれを含む配列から選択され、HCDR2配列が、配列番号10または配列番号11を有するかまたはそれを含む配列から選択され、HCDR3配列が、配列番号8または配列番号9を有するかまたはそれを含む配列から選択され、軽鎖可変領域(VL)が、LCDR1、LCDR2およびLCDR3配列を含み、LCDR1配列が、配列番号16または配列番号17を有するかまたはそれを含む配列から選択され、LCDR2配列が、QASまたは配列番号15を有するかまたはそれを含む配列から選択され、LCDR3配列が配列番号14を有するかまたはそれを含む配列である、抗体が提供される。

【0020】

例えば、第1の態様のPD-1に結合する能力を有する抗体は、重鎖定常領域(CH)および重鎖可変領域(VH)を有する重鎖ならびに軽鎖可変領域(VH)を有する軽鎖を含むことができ、重鎖定常領域は、EU番号付けに従いヒトIgG1重鎖の234位に対応する位置に芳香族アミノ酸または非極性アミノ酸、例えばフェニルアラニン(F)、適宜、EU番号付けに従いヒトIgG1重鎖の235位に酸性アミノ酸、例えばグルタミン酸(E)、およびEU番号付けに従いヒトIgG1重鎖の236位に対応する位置にグリシン以外のアミノ酸、例えばアルギニン(R)を含み、重鎖可変領域(VH)は、HCDR1、HCDR2およびHCDR3配列を含み、HCDR1配列は、SYN、配列番号12もしくは配列番号13を有するかもしくはそれを含む配列から選択され、HCDR2配列は、配列番号10もしくは配列番号11を有するかもしくはそれを含む配列から選択され、HCDR3配列は、配列番号8もしくは配列番号9を有するかもしくはそれを含む配列から選択される、ならびに／または軽鎖可変領域(VL)は、LCDR1、LCDR2およびLCDR3配列を含み、LCDR1配列は、配列番号16もしくは配列番号17を有するかもしくはそれを含む配列から選択され、LCDR2配列は、QASもしくは配列番号15を有するかもしくはそれを含む配列から選択され、LCDR3配列は配列番号14を有するかもしくはそれを含む配列である。

【0021】

第2の態様では、第1の態様の抗体を産生することができるハイブリドーマが提供される。

【0022】

第3の態様では、部分または薬剤に連結された第1の態様の抗体を含むコンジュゲートが提供される。

【0023】

第4の態様では、第1の態様の少なくとも2つの抗体、または第3の態様の少なくとも2つのコンジュゲート、または第1の態様の1つ以上の抗体と第3の態様の1つ以上のコンジュゲートとの混合物を含む多量体が提供される。

【0024】

第 5 の態様では、

- － 第 1 の態様の抗体もしくはその断片；
- － 第 1 の態様の抗体の抗体重鎖もしくはその断片；または
- － 第 1 の態様の抗体の抗体軽鎖もしくはその断片

をコードする遺伝子または核酸配列を含む核酸が提供される。

コードされた抗体および／またはコードされた抗体重鎖もしくは軽鎖はそれぞれ、本明細書に記載されている、例えば、第 1 の態様の実施形態に沿って記載されている鎖であってもよい。

【 0 0 2 5 】

第 6 の態様では、第 5 の態様の核酸のうちの 1 つ以上を含むベクターが提供される。

10

【 0 0 2 6 】

第 7 の態様では、第 5 の態様の核酸または第 6 の態様のベクターを含む宿主細胞が提供される。

【 0 0 2 7 】

第 8 の態様では、第 5 の態様の核酸または第 6 の態様のベクターを含むウイルスが提供される。

【 0 0 2 8 】

第 9 の態様では、組成物、好ましくは医薬組成物であって、活性剤および薬学的に許容される担体を含み、活性剤が、

20

- (i) 第 1 の態様の抗体；
- (i i) 第 3 の態様のコンジュゲート；
- (i i i) 第 4 の態様の多量体；
- (i v) 第 5 の態様の核酸もしくは第 5 の態様の核酸の組合せ；
- (v) 第 6 の態様のベクターもしくは第 6 の態様のベクターの組合せ；
- (v i) 第 7 の態様の宿主細胞もしくは第 7 の態様の宿主細胞の組合せ；および／または

(v i i) 第 8 の態様のウイルスもしくは第 8 の態様のウイルスの組合せから選択される少なくとも 1 つである、組成物、好ましくは医薬組成物が提供される。

【 0 0 2 9 】

第 1 0 の態様では、疾患の予防的および／または治療的処置において使用するための第 9 の態様の医薬組成物が提供される。

30

【 0 0 3 0 】

第 1 1 の態様では、対象における疾患を処置または防止する方法であって、対象に、少なくとも 1 つの活性剤を投与することを含み、活性剤が、

- (i) 第 1 の態様の抗体；
- (i i) 第 3 の態様のコンジュゲート；
- (i i i) 第 4 の態様の多量体；
- (i v) 第 5 の態様の核酸もしくは第 5 の態様の核酸の組合せ；
- (v) 第 6 の態様のベクターもしくは第 6 の態様のベクターの組合せ；
- (v i) 第 7 の態様の宿主細胞もしくは第 7 の態様の宿主細胞の組合せ；および／または

40

(v i i) 第 8 の態様のウイルスもしくは第 8 の態様のウイルスの組合せから選択される少なくとも 1 つである、方法が提供される。

【 0 0 3 1 】

第 1 2 の態様では、試料中の P D - 1 の定性的または定量的検出のためのキットであって、第 1 の態様の抗体または第 3 の態様のコンジュゲートまたは第 4 の態様の多量体を含む、キットが提供される。

【 0 0 3 2 】

第 1 3 の態様では、試料中で発現される P D - 1 の存在または量を決定する方法における、第 1 の態様の抗体または第 3 の態様のコンジュゲートまたは第 4 の態様の多量体また

50

は第12の態様のキットの使用であって、方法が、

【0033】

(i) 試料を抗体またはコンジュゲートまたは多量体と接触させる工程と、

(ii) 抗体またはコンジュゲートまたは多量体とPD-1との間の複合体の形成を検出する工程および／またはその量を決定する工程とを含む、使用が提供される。

【0034】

上記態様の実施形態、本開示の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかであろう。1つの態様に関する実施形態は、本明細書に記載の他の態様のいずれかと任意の様式および任意の数で組み合わせることができる。本出願において記載されたすべての要素および特徴の任意の順列および組合せは、文脈がそうでないことを示さない限り、本出願の記載によって開示されたと考えられるべきである。

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図1】図1は、様々な種のPD-1に対するIgG1-PD1の結合を示す。様々な種のPD-1を一過的にトランスフェクトしたCHO-S細胞を、IgG1-PD1、ペムプロリズマブ、または非結合対照抗体IgG1-control-FERRおよびIgG4-controlとインキュベートし、フローサイトメトリーを使用して結合を解析した。IgG1-PD1とインキュベートしたトランスフェクトされていないCHO-S細胞を陰性対照として含めた。A～B. 示されたデータは、4つの実験のうちの代表的な1つの実験からの二連のウェルの幾何平均蛍光強度 (gMFI) $\pm$ SDである。C～D. 示されたデータは、2つの実験のうちの代表的な1つの実験からの二連のウェルのgMFI $\pm$ SDである。E. 示されたデータは、4つの実験のうちの代表的な1つの実験からの二連のウェルの幾何平均蛍光強度 (gMFI) $\pm$ SDである。略語：gMFI = 幾何平均蛍光強度；PD-1 = プログラム細胞死タンパク質1；PE = R-フィコエリトリン。

【図2】図2は、ヒトPD-1に対するIgG1-PD1のPD-L1およびPD-L2との競合的結合を示す。ヒトPD-1を一過的にトランスフェクトしたCHO-S細胞を、IgG1-PD1またはペムプロリズマブの存在下で、1 μ g/mLのビオチン化組換えヒトPD-L1 (A) またはPD-L2 (B) とインキュベートした。IgG1-control-FERRは陰性対照として含めた。細胞をストレプトアビジン-アロフィコシアニンで染色し、ビオチン化PD-L1またはPD-L2に結合する細胞のパーセンテージを、フローサイトメトリーを使用してストレプトアビジン-アロフィコシアニン⁺細胞のパーセンテージを測定することによって決定した。抗体なしの対照およびトランスフェクトされていない試料におけるストレプトアビジン-アロフィコシアニン⁺細胞のパーセンテージを破線で示す。示されたデータは、3つの別々の実験のうちの代表的な1つの実験の単一の複製から得られたものである。略語：Ab = 抗体；CHO-S = チャイニーズハムスター卵巣、懸濁液；control = 対照；FERR = L234F / L235E / G236R-K409R；PD1 = プログラム細胞死タンパク質1；PD-L1 = プログラム細胞死1リガンド1；PD-L2 = プログラム細胞死1リガンド2。

【図3】図3は、IgG1-PD1によるPD-1 / PD-L1チェックポイントの機能阻害を示す。PD-1 / PD-L1軸の遮断を、細胞ベースの生物発光PD-1 / PD-L1遮断レポーターアッセイを使用して試験した。示されたデータは、5つの実験（ペムプロリズマブおよびIgG1-PD1）、3つの実験（IgG1-control-FERR）、または2つの実験（ニボルマブ）のうちの代表的な1つの実験における二連のウェルの平均発光 $\pm$ SDである。略語：FERR = L234F / L235E / G236R-K409R；PD1 = プログラム細胞死タンパク質1；PD-L1 = プログラム細胞死1リガンド1；RLU = 相対発光量；SD = 標準偏差。

【図4】図4は、抗原特異的T細胞増殖アッセイにおけるIgG1-PD1によるCD8⁺ T細胞増殖の増強を示す。ヒトCD8⁺ T細胞にCLDN6特異的TCRをコードするRNAおよびPD-1をコードするRNAを電気穿孔し、CFSEで標識した。次いで、T細胞を、IgG1-PD1、ペムプロリズマブ、ニボルマブ、またはIgG1-c

ctrl-FERRの存在下で、CLDN6をコードするRNAを電気穿孔したiDCと共培養した。T細胞におけるCFSE希釈を4日後にフローサイトメトリーによって解析し、拡大指数を算出するために使用した。3回の独立した実験において評価した4名のドナーのうち、代表的な1名のドナー(26268__B)からのデータが示されている。エラーバーは二連のウェルのSDを表す。曲線をGraphPad Prismを使用する4パラメータ対数フィットによりフィッティングした。略語：CFSE=カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル；FERR=L234F/L235E/G236R-K409R；PD1=プログラム細胞死タンパク質1；SD=標準偏差。

【図5】図5は、同種異系MLRアッセイにおけるIgG1-PD1に誘導されるIFN γ 分泌を示す。同種異系ヒトmDCおよびCD8⁺T細胞の3組の固有のドナーのペアを、IgG1-PD1またはペムブロリズマブの存在下で5日間共培養した。IgG1-ctrl-FERRおよびIgG4アイソタイプ対照を陰性対照として含めた。IFN γ 特異的イムノアッセイを使用して、上清中のIFN γ 分泌を解析した。示されたデータは、3組の固有の同種異系ドナーのペアの平均±平均値の標準誤差(SEM)濃度である。略語：FERR=L234F/L235E/G236R-K409R；IFN=インターフェロン；IgG=免疫グロブリンG；mDC=成熟樹状細胞；MLR=混合リンパ球反応；SEM=平均値の標準誤差。

【図6】図6は、同種異系MLRアッセイにおけるIgG1-PD1に誘導されるサイトカイン分泌を示す。同種異系ヒトmDCおよびCD8⁺T細胞の3組の固有のドナーのペアを、1 μ g/mLのIgG1-PD1またはペムブロリズマブの存在下で5日間共培養した。IgG1-ctrl-FERRを陰性対照として含めた。サイトカイン分泌を、Luminexを使用して上清中で解析した。(A)サイトカインレベルは、未処置の共培養で測定したサイトカインレベルに対する平均倍数変化として表した。(B)3組の固有の同種異系ドナーのペアのサイトカイン産生レベルが示されており、横線は平均値、上限値、下限値を示す。略語：FC=倍数変化；FERR=L234F/L235E/G236R-K409R；GM-CSF=顆粒球マクロファージコロニー刺激因子；IgG=免疫グロブリンG；IL=インターロイキン；MCP-1=単球走化性タンパク質1；mDC=成熟樹状細胞；MLR=混合リンパ球反応；TNF=腫瘍壊死因子。

【図7】図7は、C1qの膜結合IgG1-PD1への結合を示す。C1qのIgG1-PD1への結合は、刺激したヒトCD8⁺T細胞を使用して解析した。IgG1-PD1、IgG1-ctrl-FERR、IgG1-ctrl、または陽性対照抗体IgG1-CD52-E430G(不活性変異なし、および六量体化増強変異あり)とのインキュベーション後に、細胞をC1qの供給源としてのヒト血清と共にインキュベートした。C1qの結合はFITCがコンジュゲートしたウサギ抗C1q抗体を用いて検出した。示されたデータは、3つの比較実験にわたり、7名のドナーのうちの代表的な1名のドナーの二連のウェルからの幾何平均蛍光強度(gMFI)±標準偏差(SD)である。略語：FITC=フルオレセインイソチオシアネート；gMFI=幾何平均蛍光強度；PE=R-フィコエリスロシアニン。

【図8】図8は、IgG1-PD1のFc γ Rへの結合を示す。IgG1-PD1の固定化ヒト組換えFc γ R構築物への結合を、適格アッセイ(qualified assay)(n=1)におけるSPRで解析した。IgG1-PD1の、Fc γ RIIa(A)、Fc γ RIIa-H131(B)、Fc γ RIIa-R131(C)、Fc γ RIIb(D)、Fc γ RIIa-F158(E)、およびFc γ RIIa-V158(F)への結合。抗体IgG1-ctrl(FER不活性変異なし)を結合に関する陽性対照として含めた。略語：ctrl=対照；Fc γ R=Fcガンマ受容体；IgG=免疫グロブリンG；PD-1=プログラム細胞死タンパク質1；RU=共鳴単位。

【図9】図9は、IgG1-PD1およびいくつかの他の抗PD-1抗体のFc γ Rへの結合を示す。IgG1-PD1、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、ドスタリマブ、およびセンプリマブの固定化ヒト組換えFc γ R構築物への結合をSPRで解析した(n=3)。試験抗体のFc γ RIa(A)、Fc γ RIIa-H131(B)、Fc γ RIIa

10

20

30

40

50

－R131 (C)、FcγRIIb (D)、FcγRIIIa－F158 (E)、および FcγRIIIa－V158 (F) への結合。IgG1－ctrl および IgG4－ctrl 抗体を、野生型 Fc 領域を有する IgG1 および IgG4 分子の FcγR への結合の陽性対照として含めた。示されているのは、3つの別々の実験の結合応答±SDである。略語：ctrl＝対照；FcγR＝Fcガンマ受容体；IgG＝免疫グロブリンG；PD－1＝プログラム細胞死タンパク質1；RU＝共鳴単位。

【図10】図10は、IgG1－PD1 およびいくつかの他の抗PD－1抗体のFcγRIIIaへの結合を示す。ヒトFcγRIIIaを一過的に発現するCHO－S細胞に対するIgG1－PD1、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、ドスタリマブ、およびセミプリマブの結合をフローサイトメトリーによって解析した。IgG1－ctrl および IgG1－ctrl－FERRをそれぞれ陽性対照および陰性対照として含めた。略語：ctrl＝対照；FcγR＝Fcガンマ受容体；FERR＝L234F／L235E／G236R－K409R；huIgG＝ヒト免疫グロブリンG；PD－1＝プログラム細胞死タンパク質1；PE＝R－フィコエリトリン。

【図11】図11は、マウス血漿試料中の総ヒトIgGを示す。マウスに1または10mg／kgのIgG1－PD1をt＝0で静脈内注射し、注射後10分、4時間、1日、2日、8日、14日、21日に連続血漿試料を採取した。血漿試料中の総huIgGは、各マウスについてELIAで決定した。データは、3匹の個々のマウスの平均huIgG濃度±SDとして表す。破線は、ヒトにおけるIgGクリアランスに基づく2コンパートメントモデルによって予測される野生型(wt) huIgGの血漿中濃度を示す[Bleeker et al., 2001, Blood. 98(10):3136-42]。点線はLLOQおよびULOQを示す。略語：huIgG＝ヒトIgG；IgG＝免疫グロブリンG；LLOQ＝定量下限；PD－1＝プログラム細胞死タンパク質1；SD＝標準偏差；ULOQ＝定量上限。

【図12】図12は、ヒトPD－1ノックインマウスにおけるIgG1－PD1の抗腫瘍活性を示す。hPD－1 KIマウスにおけるSC移植により、MC38結腸がん同系腫瘍モデルを確立した。マウスに、0.5、2、もしくは10mg／kgのIgG1－PD1もしくはペムブロリズマブ、または10mg／kgのIgG1－ctrl－FERRを2QW×3で投与した(各群9匹)。(A)各群が完了する最終時点までの各群における平均腫瘍体積±SEM。(B)全群が完了した最終日(11日目)の様々な群の腫瘍体積。データは、各処置群における個々のマウスの腫瘍体積、および処置群ごとの平均腫瘍体積±SEMである。Mann－Whitney解析を使用して、IgG1－ctrl－FERR処置群に対する処置群の腫瘍体積を比較し、*p<0.05、**p<0.01、および***p<0.001とした。C. 腫瘍体積が500mm³より小さいマウスのパーセンテージとして定義される無増悪生存期間をカプラン－マイヤー曲線として示す。腫瘍体積が500mm³を超える前の16日目に原因不明のため死亡が確認された、2mg／kgのIgG1－PD1群のマウス1匹を解析から除外した。略語：2QW×3＝週2回を3週間；ctrl＝対照；FERR＝L234F／L235E／G236R／K409R変異；IgG＝免疫グロブリンG；KI＝ノックイン；PD－1＝プログラム細胞死タンパク質1；SC＝皮下；SEM＝平均値の標準誤差。

【図13】図13は、IgG1－PD1を用いて処置したヒトPD－1ノックインマウスにおける末梢T細胞数の動態を示す。hPD－1 KIマウスにおけるSC移植により、MC38結腸がん同系腫瘍モデルを確立した。マウスに、0.5、もしくは10mg／kgのIgG1－PD1、10mg／kgのペムブロリズマブ、または10mg／kgのIgG1－ctrl－FERRを0、3、および7日目に投与した(各群12匹)。2、4、および8日目に各群4匹のマウスから安楽死後に末梢血試料を採取し、フローサイトメトリーによって解析した。生存CD45⁺白血球亜集団内の血液1μLあたりのCD3⁺(A)、CD4⁺(B)、CD8⁺(C) T細胞数の平均±SDを示す。Mann－Whitney解析を使用して、処置群を、IgG1－ctrl－FERR処置群、および10mg／kgのIgG1－PD1群、10mg／kgのペムブロリズマブ群と比較し、*p<0.05とした。略語：ctrl＝対照；FERR＝L234F／L235E／G2

10

20

30

40

50

36R/K409R変異；IgG=免疫グロブリンG；KI=ノックイン；PD-1=プログラム細胞死タンパク質1；SC=皮下；SD=標準偏差。

【図14】図14は、IgG1-PD1を用いて処置したヒトPD-1ノックインマウスにおける脾臓T細胞サブセットに関するPDマーカーを示す。hPD-1 KIマウスにおけるSC移植により、MC38結腸がん同系腫瘍モデルを確立した。マウスに、0.5、もしくは10mg/kgのIgG1-PD1、10mg/kgのペムブロリズマブ、または10mg/kgのIgG1-ctrl-FERRを0、3、および7日目に投与した（各群12匹）。2、4、および8日目に脾臓を回収し（各群および各時点でn=4のマウス）、フローサイトメトリーによって解析した。8日目の脾臓におけるエフェクターメモリー（CD44⁺ CD62L⁻）、セントラルメモリー（CD44⁺ CD62L⁺）、およびナイーブ（CD44⁻ CD62L⁺）CD8⁺ T細胞のパーセンテージ（A）、ならびに全CD8⁺ T細胞集団中のMHCクラスII⁺細胞のパーセンテージ（B）の平均±SDを示す。Mann-Whitney解析を使用して、処置群を、IgG1-ctrl-FERR処置群、および10mg/kgのIgG1-PD1群、10mg/kgのペムブロリズマブ群と比較し、*p<0.05とした。略語：ctrl=対照；FERR=L234F/L235E/G236R/K409R変異；IgG=免疫グロブリンG；KI=ノックイン；PD-1=プログラム細胞死タンパク質1；SC=皮下；SD=標準偏差。

【図15】図15は、IgG1-PD1を用いて処置したヒトPD-1ノックインマウスにおける腫瘍内細胞の変化を示す。hPD-1 KIマウスにおけるSC移植により、MC38結腸がん同系腫瘍モデルを確立した。マウスに、0.5、もしくは10mg/kgのIgG1-PD1、10mg/kgのペムブロリズマブ、または10mg/kgのIgG1-ctrl-FERRを0、3、および7日目に投与した（各群12匹）。異種移植片腫瘍を8日目に切除し（各群n=4のマウス）、IHCによって解析した。8日目の全有核細胞のうちのCD3⁺ T細胞（A）、CD4⁺ T細胞（B）、CD8⁺ T細胞（C）、およびGZMB⁺ 細胞（D）のパーセンテージの平均±SDを示す。Mann-Whitney解析を使用して、処置群を、IgG1-ctrl-FERR処置群、および10mg/kgのIgG1-PD1群、10mg/kgのペムブロリズマブ群と比較し、*p<0.05とした。略語：ctrl=対照；FERR=L234F/L235E/G236R/K409R変異；GZMB=グランザイムB；IgG=免疫グロブリンG；KI=ノックイン；PD-1=プログラム細胞死タンパク質1；SC=皮下；SD=標準偏差。

【図16】図16は、ヒト単球由来FcγR+ M2c様マクロファージに対するIgG1-PD1および他の抗PD-1抗体の結合を示す。（A）試験した3名のドナーのうち代表的なドナー1名の、関連するアイソタイプ対照および未染色M2c様マクロファージに対するFcγRIa、FcγRII、FcγRIIIa、およびPD-1の発現を、正規化データのオーバーレイヒストグラムにおいて可視化した。（B）24時間のインキュベーション後に、IgG1-PD1、ペムブロリズマブ、ニボルマブ、および対照抗体のヒト単球由来FcγR+ M2c様マクロファージへの結合をフローサイトメトリーによって解析した。結合はバックグラウンド対照のものと比較して示されている（黒色の点線で示された二次抗体のみとの結合）。点は2つの独立した実験で測定された3名の個々のドナーを表し、棒グラフおよびエラーバーはそれぞれ3名のドナーの平均±SDを表す。略語：ctrl=対照；FERR=L234F/L235E/G236R/K409R変異；PD-1=プログラム細胞死タンパク質1；SD=標準偏差。

【図17】図17は、膜結合IgG1-PD1および他の抗PD-1抗体によって誘導されるFcγRシグナル伝達を示す。膜結合IgG1-PD1およびいくつかの他の抗PD-1抗体によって誘導されるFcγRシグナル伝達は、細胞ベースの生物発光FcγRI（A）、FcγRIIIa-R131（B）、FcγRIIIa-H131（C）、およびFcγRIIIb（D）レポーターアッセイを使用して試験した。六量体化を増強するE430G変異を有するIgG1-CD52-E430Gを陽性対照として含めた。示されるデ

ータは、3つの実験のうちの代表的な1つの実験における二連のウェルの平均相対光単位 $\pm$ SDである。略語：Ab＝抗体；FERR＝L234F／L235E／G236R／K409R 変異；PD-1＝プログラム細胞死タンパク質1；RLU＝相対光単位；SD＝標準偏差。

【発明を実施するための形態】

【0036】

以下では、配列表に特に示されている配列および配列番号が参照される。また、本開示を限定することなく、本明細書に記載の第1の態様の抗体の具体例が参照される：MAB-19-0202、およびMAB-19-0618。これらの例示的な、しかし限定されない第1の態様の抗体は、抗体の呼称を参照することにより本明細書で指定される。

10

【0037】

20

30

40

50

【表 1 - 1】

表 1-配列

配列 番号	名称	配列
1	定常領域ヒト HC IgG1m(f)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQK SLSLSPG
2	定常領域ヒト HC IgG1m(f) - L234F- L235E- G236R およ び変異体	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCTPPCPAPEX ₁ X ₂ X ₃ GPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYT QKSLSLSPG 配列中： X ₁ は、A、V、L、I、P、F、M または W、好ましくは I、P、 F、M または W、より好ましくは F であり； X ₂ は、L、D または E、好ましくは D または E、より好ましく は E であり； X ₃ は、G ではなく、好ましくは K、R または H、より好ましく は R であり； 最も好ましくは X ₁ X ₂ X ₃ は、FER である
3	定常領域ヒト HC IgG1m(f) - L234F- L235E- G236R- K409R	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCTPPCPAPEFERGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQK SLSLSPG
4	定常領域ヒト HC IgG1m(f) - E430G	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHGLAHNNHYTQK SLSLSPG
5	定常領域ヒト HC IgG4	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNT KVDKRVESKYGPCCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP ETC VVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCSCVMHEALHNNHYTQK SLSLGK

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

6	定常領域ヒト カッパ LC	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
7	重鎖ヒト IgG1-LALA	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCTPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQK SLSLSPG
8	HCDR 3 Kabat と IMGT の共通 部分 (= Kabat)	AFYDDYDYNV
9	HCDR 3 IMGT	ARAFYDDYDYNV
10	HCDR 2 Kabat と IMGT の共通 部分 (= IMGT)	ISGGTIG
11	HCDR 2 Kabat	IISGGTIGHYASWAKG
	HCDR 1 Kabat と IMGT の共通 部分	SYN
12	HCDR 1 Kabat	SYNMG
13	HCDR 1 IMGT	GFSLYSYN
14	LCDR 3 共 通部分 = Kabat = IMGT	AGGYSSSSDTT
	LCDR2 Kabat と IMGT の共通 部分 (= IMGT)	QAS
15	LCDR2 Kabat	QASKLET
16	LCDR1 Kabat と IMGT の共通 部分 (= IMGT)	QSVYGNNQ
17	LCDR1 Kabat	QSSQSVYGNNQLS
18	VH MAB-19- 0202	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLYSYNGWVRQAPGKGLEY IGIISGGTIGHYASWAKGRFTISKTSSTTVDLKMTSLTTEDTATYF CARAFYDDYDYNVWGPGTLVTVSS

10

20

30

40

50

10

20

30

40

【表 1 - 4】

		ggctgtggtgggcagggcaggaacccctccacctttacacatgcc caggcagcacctcagggccctttgtggggcagggaaagctgaggcagt aagcggggcaggcagagctggaggccctttcagggcccagccagcactc tggcctcctgcgcgcgcatccaccccagccctcacaccactcgg gagagggacatcctacggtcccaaggtcaggagggcagggctgggg ttgactcagggccctcccagctgtggccacotgggtgttgggaggg cagaagtgcaggcacctagggcccccatgtgccaccctgggagc tctccttggaaccattcctgaaattatttaaaggggttggccggg ctccaccagggcctgggtgggaaggtacagggcgttccccggggc ctagtaccccgccgtggcctatccactcctcacatccacacactg caccccaactcctggggcagggccaccagcatccaggcggccagca ggcacctgagtggctgggacaagggatecccccttccctgtggttct attatattataattataattaaatatgagagcatgctaaggaaaa
25	VH CD52- CAMPATH-1H	QVQLQESGPGLVPRPSQTLSTCTVS GFTFTDFY MNWVRQPPGRGLE WIGF IRDKAKGYTT EYNFNVKGRVTMLVDTSKNQFSLRLSSVTAAD TAVYYC AREGHTAAPFDY WGQGS�TVSS
26	VH CD52- CAMPATH-1H CDR1	GFTFTDFY
27	VH CD52- CAMPATH-1H CDR2	IRDKAKGYTT
28	VH CD52- CAMPATH-1H CDR3	AREGHTAAPFDY
29	VL CD52- CAMPATH-1H	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKAS QNIDKY LNWYQQKPGKAPKL LIY NTN NLQGTGVPSTRFSGSGTDFTFITISLQPEDATYYC LQHI SRPRT FGQGTKVEIK
30	VL CD52- CAMPATH-1H CDR1	QNIDKY
	VL CD52- CAMPATH-1H CDR2	NTN
31	VL CD52- CAMPATH-1H CDR3	LQHISRPR
32	VH gp120- b12	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQAS GYRFSNFV IHWVRQAPGQRFE WMGW INPYNGNKE FSAKFQDRVTFTADTSANTAYMELRSLRSADTA VYYC ARVGPYSWDDSPQDNYYMDV WGKGTTIVVSS
33	VH gp120- b12 CDR1	GYRFSNFV
34	VH gp120- b12 CDR2	INPYNGNK
35	VH gp120- b12 CDR3	ARVGPYSWDDSPQDNYYMDV
36	VL gp120- b12	EIVLTQSPGTLSTLSPGERATFSCRSS HSIRSRR VAWYQHKGQAPR LVIH GVS NRASGISDRFSGSGTDFTLITRVEPEDFALYYC QVY GASSYT FGQGTKLERK
37	VL gp120- b12 CDR1	HSIRSRR
	VL gp120- b12 CDR2	GVS
38	VL gp120- b12-CDR3	QVYGASSYT

10

20

30

40

50

【表 1 - 5】

39	MAB-19-0202-HC FR1	QSVESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLY
40	MAB-19-0202-HC FR2	WVRQAPGKGLEYIG
41	MAB-19-0202-HC FR3	RFTISKTSSTTVDLKMTSLTTEDTATYFCAR
42	MAB-19-0202-HC FR4	WGPGTLVTVSS
43	MAB-19-0202-LC FR1	AAVLTQTPSPVSAAVGGTVTISC
44	MAB-19-0202-LC FR2	WYQQKPGQPPKLLIY
45	MAB-19-0202-LC FR3	GVPSRFGSGSGTQFTLTISDLESDDAATYYC
46	MAB-19-0202-LC FR4	FGGGTEVVVK
47	MAB-19-0202-H5 FR1	QVQLVESGGGLVQPGTSLRLSCSVSGFSLY
48	MAB-19-0202-H5 FR2	WVRQAPGKGLEYIG
49	MAB-19-0202-H5 FR3	RFTISRDTSKTTLYLQMNSLTTEDTATYFCAR
50	MAB-19-0202-H5 FR4	WGPGTLVTVSS
51	MAB-19-0202-L4 FR1	AIQLTQSPSSLSASVGGTVTITC
52	MAB-19-0202-L4 FR2	WYQQKPGQPPKLLIY
53	MAB-19-0202-L4 FR3	GVPSRFRGSGSGTQFTLTISLQSEDFATYYC
54	MAB-19-0202-L4 FR4	FGGGTEVVVK
55	定常領域ヒト HC IgG1m(f)- L234F- L235E- G236R	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE FER GPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYTQK SLSLSPG

10

20

30

40

50

【表 1 - 6】

56	完全長重鎖	QVQLVESGGGLVQPGTSLRLSCSVS <u>GFSLYSYN</u> MGWVRQAPGKGLE YIGI <u>ISGGTIGHYASWAKGRFTISRDTSKTTLYLQMN</u> SLTTEDTAT YFC <u>ARAFYDDYDYNV</u> WGPGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKCDKHTCTPPC PAPE <u>FER</u> GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
57	完全長軽鎖	AIQLTQSPSSLASVGGTVTITCQSS <u>QSVYGN</u> NQLSWYQQKPGQPP KLLIY <u>QAS</u> KLETGVPSPRFRGSGSGTQFTLTISLQSEDFATYYC <u>AG</u> <u>GYSSSDTT</u> FGGGTEVTVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

10

【0038】

本開示は以下に詳細に記載されるが、本開示は、本明細書に記載の特定の方法論、プロトコルおよび試薬に限定されず、変更可能であることを理解されたい。また、本明細書で使用される用語は、特定の実施形態のみを説明するものであり、添付の特許請求の範囲によってのみ限定される本開示の範囲を限定することを意図するものではないことを理解されたい。別途定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術的および科学的用語は、当業者に通常理解される意味と同じ意味を有する。

20

【0039】

以下では、本開示の要素について説明する。これらの要素は、特定の実施形態と共に列挙されているが、追加の実施形態を作成するために、任意の方法および任意の数で組み合わせることを理解されたい。様々に記載された実施例および好ましい実施形態は、本開示を明示的に記載された実施形態のみに限定するように解釈されるべきではない。本明細書は、明示的に記載された実施形態を任意の数の開示された要素および／または好ましい要素と組み合わせた実施形態を支持および包含すると理解されるべきである。さらに、本出願において記載されたすべての要素の任意の順列および組合せは、文脈がそうでないことを示さない限り、本出願の記載によって開示されたと考えられるべきである。

30

【0040】

好ましくは、本明細書で使用される用語は、"A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", H.G.W. Leuenberger, B. Nagel, and H. Kolbl, Eds., (1995) Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Switzerlandに記載されているように定義される。

【0041】

本開示の実践については、別段に示されていない限り、当技術分野の文献に説明されている生化学、細胞生物学、免疫学、および組換えDNA技術の従来の方法が説明される（例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, J. Sambrook et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989）。

40

【0042】

本明細書およびその後続く特許請求の範囲を通じて、文脈上別段に必要とされない限り、「含む (comprise)」という語、および「含む (comprises)」または「含むこと (comprising)」などの変形は、記載されたメンバー、整数もしくはは工程、またはメンバー、整数もしくはは工程の群を含むことを意味するが、他のメンバー、整数もしくはは工程、またはメンバー、整数もしくはは工程の群を除外することを意味しないと理解されるが、一部の実施形態では、このような他のメンバー、整数もしくはは工程、またはメンバー、整数もしくはは工程の群は除外されてもよく、すなわち、主題は、記

50

載されたメンバー、整数もしくは工程、またはメンバー、整数もしくは工程の群を含むことにある。本発明を説明する文脈で（特に特許請求の範囲の文脈で）使用される用語「1つの（a）」、「1つの（an）」、「その（the）」および同様の参照は、本明細書において別段に示されていない限り、または文脈によって明らかに矛盾しない限り、単数形および複数形の両方を網羅するものと解釈される。本明細書における値の範囲の記載は、単に、範囲内に入る各個別の値に個別に言及するための略記法としての役割を果たすことを意図している。本明細書において別段に示されていない限り、個々の値は、本明細書に個別に記載されているかのように本明細書に組み込まれる。

【0043】

本明細書に記載のすべての方法は、本明細書において別段に示されていない限り、または文脈によって明らかに矛盾しない限り、任意の適切な順序で実施され得る。本明細書で提供されるあらゆる例、または例示的な表現（例えば、「などの」）の使用は、単に本発明をより良く説明することを意図しており、他の請求項に記載の本発明の範囲に限定をもたらすものではない。本明細書中のいかなる文言も、本発明の実践に不可欠な非請求要素を示すものとして解釈されるべきではない。

10

【0044】

本明細書の本文全体を通して、いくつかの文書が引用される。本明細書で引用した各文書（すべての特許、特許出願、科学刊行物、製造者の仕様書、説明書などを含む）は、上述または下述にかかわらず、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。本明細書のいかなる内容も、本発明が先行発明によりこのような開示に先行する権利がないことの自認として解釈されるべきではない。

20

【0045】

「低減させること」または「阻害すること」などの用語は、好ましくは5%以上、10%以上、20%以上、より好ましくは50%以上、最も好ましくは75%以上のレベルの全体的な減少を引き起こす能力に関する。用語「阻害する」または同様の表現は、完全または本質的に完全な阻害、すなわちゼロまたは本質的にゼロへの低減を含む。

【0046】

「増加させること」、「増強すること」、「促進すること」または「延長させること」などの用語は、好ましくは、およそ少なくとも10%、好ましくは少なくとも20%、好ましくは少なくとも30%、好ましくは少なくとも40%、好ましくは少なくとも50%、好ましくは少なくとも80%、好ましくは少なくとも100%、好ましくは少なくとも200%、特に少なくとも300%の増加、増強、促進または延長に関する。これらの用語はまた、ゼロまたは測定不可能もしくは検出不可能なレベルから、ゼロを超えるレベルまたは測定可能もしくは検出可能なレベルへの増加、増強、促進または延長に関する場合もある。

30

【0047】

用語「PD-1」は、プログラム細胞死-1に関し、細胞によって天然に発現されるか、またはPD-1遺伝子をトランスフェクトされた細胞によって発現されるPD-1の任意の変異体、立体構造、アイソフォームおよび種ホモログを含む。好ましくは、「PD-1」はヒトPD-1に関し、特に、配列表の配列番号22に記載されたアミノ酸配列（NCBI参照配列：NP_005009.2）を有するタンパク質、または好ましくは配列表の配列番号24に記載された核酸配列（NCBI参照配列：NM_005018.2）によってコードされているタンパク質に関する。「PD-1」の代替名としては、CD279およびSLEB2が挙げられる。

40

【0048】

用語「PD-1」は、細胞によって天然に発現されるか、PD-1遺伝子をトランスフェクトした細胞中／上で発現される、ヒトPD-1の翻訳後修飾変異体、アイソフォーム、および種ホモログを含む。

【0049】

用語「PD-1変異体」は、（i）PD-1スプライス変異体、（ii）PD-1翻訳

50

後修飾変異体、特に異なる N-グリコシル化状態を有する変異体を含む、(iii) PD-1 立体構造変異体を包含するものとする。このような変異体には PD-1 の可溶性形態が含まれることがある。

【0050】

PD-1 は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する I 型膜タンパク質である [The EMBO Journal (1992), vol.11, issue 11, p.3887-3895]。ヒト PD-1 タンパク質は、配列表の配列番号 22 に記載された配列の 24～170 位のアミノ酸から構成される細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン（配列番号 22 に記載されている配列の 171～191 位のアミノ酸）および細胞質ドメイン（配列番号 22 に記載された配列の 192～288 位のアミノ酸）を含む。用語「PD-1 断片」は、本明細書で使用される場合、PD-1 タンパク質の任意の断片、好ましくは免疫原性断片を包含するものとする。この用語はまた、例えば、全長タンパク質の上述のドメインまたはこれらのドメインの任意の断片、特に免疫原性断片を包含する。ヒト PD-1 タンパク質の好ましい細胞外ドメインのアミノ酸配列は、配列表の配列番号 23 に記載されている。

10

【0051】

この文脈における用語「細胞外部分」または「細胞外ドメイン」は、本明細書で使用される場合、好ましくは、細胞の細胞外空間に面しており、好ましくは、例えば細胞外に位置する抗体などの結合分子によって、前記細胞の外部からアクセス可能であるタンパク質などの分子の一部を指す。好ましくは、この用語は、1 つ以上の細胞外ループもしくはドメイン、またはそれらの断片を指す。

20

【0052】

第 1 の態様では、PD-1 に結合する能力を有する抗体であって、重鎖定常領域を含み、重鎖定常領域が、EU 番号付けに従いヒト IgG1 重鎖の 234 位に対応する位置に芳香族アミノ酸または非極性アミノ酸、および EU 番号付けに従いヒト IgG1 重鎖の 236 位に対応する位置にグリシン以外のアミノ酸を含む、抗体が提供される。

【0053】

用語「抗体」(Ab) は、本明細書で使用される場合、免疫グロブリン分子、免疫グロブリン分子の断片、またはそのいずれかの誘導体を指し、典型的な生理学的条件下で抗原（特に抗原上のエピトープ）に特異的に結合する能力を有し、好ましくは、少なくとも約 30 分、少なくとも約 45 分、少なくとも約 1 時間、少なくとも約 2 時間、少なくとも約 4 時間、少なくとも約 8 時間、少なくとも約 12 時間、約 24 時間以上、約 48 時間以上、約 3 日、4 日、5 日、6 日、7 日以上など、または任意の他の関連する機能的に定義された期間（例えば、抗原への抗体の結合に関連する生理学的応答を誘導、促進、増強、および／もしくは調節するのに十分な時間、ならびに／または抗体がエフェクター活性を動員するのに十分な時間）の半減期を有する。特に、「抗体」という用語は、ジスルフィド結合によって相互に接続された少なくとも 2 つの重 (H) 鎖と 2 つの軽 (L) 鎖を含む糖タンパク質を指す。「抗体」という用語には、モノクローナル抗体、組換え抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、および前述のいずれかの組合せが含まれる。各重鎖は、重鎖可変領域 (VH) および重鎖定常領域 (CH) から構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域 (VL) および軽鎖定常領域 (CL) から構成される。可変領域および定常領域は、本明細書において、それぞれ可変ドメインおよび定常ドメインとも呼ばれる。VH 領域および VL 領域は、フレームワーク領域 (FR) と呼ばれる保存性の高い領域が点在した相補性決定領域 (CDR) と呼ばれる超可変性の領域にさらに細分することができる。各 VH および VL は、3 つの CDR および 4 つの FR から構成されており、アミノ末端からカルボキシ末端に向かって以下の順序で配置されている：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。VH の CDR は、HC DR1、HC DR2 および HC DR3（または CDR-H1、CDR-H2 および CDR-H3）と呼ばれ、VL の CDR は、LC DR1、LC DR2 および LC DR3（または CDR-L1、CDR-L2 および CDR-L3）と呼ばれる。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗体の定常領域は、重鎖定常領域 (CH) および軽鎖定常領域 (CL

30

40

50

）を含み、C Hは定常ドメインC H 1、ヒンジ領域、ならびに定常ドメインC H 2およびC H 3（アミノ末端からカルボキシ末端に向かって以下の順序で配置されている：C H 1、C H 2、C H 3）にさらに細分することができる。抗体の定常領域は、免疫系の様々な細胞（例えば、エフェクター細胞）およびC 1 qなどの補体系の構成要素を含む宿主組織または因子への免疫グロブリンの結合を媒介し得る。抗体は、天然供給源に由来するかまたは組換え供給源に由来するインタクト免疫グロブリンであり得、インタクト免疫グロブリンの免疫活性部分であり得る。抗体は、典型的には、免疫グロブリン分子の4量体である。抗体は、例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、F v、F a b、F（a b）₂、ならびに一本鎖抗体およびヒト化抗体を含む種々の形態で存在し得る。

【0054】

10

免疫グロブリン分子の重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。「結合領域」、「抗原結合領域」および「抗原結合部分」という用語は、本明細書において互換的に使用され、抗原と相互作用する領域を指し、V H領域とV L領域の両方を含む。抗体は、本明細書で使用される場合、単一特異性抗体だけでなく、複数、例えば2つ以上、例えば3つ以上の異なる抗原結合領域を含む多特異性抗体も含む。

【0055】

ある実施形態では、抗体は、完全長抗体であり得る。抗体の文脈で使用される場合、「全長」という用語は、抗体が、断片ではなく、自然界でそのアイソタイプに通見出される特定のアイソタイプのドメイン、例えばI g G 1抗体のV H、C H 1、C H 2、C H 3、ヒンジ、V LおよびC Lドメインのすべてを含有することを示す。

20

【0056】

「ヒト化抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、非ヒト種からの免疫グロブリンに実質的に由来する抗原結合部位を有する分子を指し、分子の残りの免疫グロブリン構造はヒト免疫グロブリンの構造および／または配列に基づいている。抗原結合部位は、定常ドメイン上に融合した完全な可変ドメインを含むか、または可変ドメイン中の適切なフレームワーク領域上にグラフトされた相補性決定領域（C D R）のみを含んでもよい。抗原結合部位は、野生型であっても、1つ以上のアミノ酸置換によって改変されていてもよく、例えば、ヒト免疫グロブリンにより酷似するように改変されてもよい。ヒト化抗体のいくつかの形態は、すべてのC D R配列を保存する（例えば、マウス抗体の6つのC D Rすべてを含むヒト化マウス抗体）。他の形態は、元の抗体に対して変更された1つ以上のC D Rを有する。

30

【0057】

「キメラ抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、重鎖および軽鎖の各アミノ酸配列の一部が、特定の種由来の抗体または特定のクラスに属する抗体の対応する配列と相同であり、一方、鎖の残りのセグメントが別の抗体の対応する配列と相同である抗体を指す。典型的には、軽鎖と重鎖の両方の可変領域は、ある種の哺乳動物に由来する抗体の可変領域を模倣し、一方、定常部分は別の種に由来する抗体の配列と相同である。このようなキメラ形態の明確な利点の一つは、例えば、ヒト細胞調製物由来の定常領域と組み合わせ、可変領域を、容易に入手可能な非ヒト宿主生物由来のB細胞またはハイブリドーマを使用して、現在知られている供給源から簡便に誘導できることである。可変領域は調製が容易であるという利点を有し、特異性は供給源によって影響されないが、定常領域はヒトであるため、抗体を注射した場合にヒト対象からの免疫応答を誘発する可能性は、非ヒト供給源由来の定常領域よりも低い。しかし、定義はこの特定の例に限定されるものではない。

40

【0058】

抗体の「抗原結合部分」（または単に「結合部分」）という用語は、本明細書で使用される場合、抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体の1つ以上の断片を指す。抗体の抗原結合機能は、完全長抗体の断片によって実施され得ることが示されている。抗体の「抗原結合部分」という用語に包含される結合断片の例としては、（i）V L、V H、C LおよびC Hドメインからなる一価の断片、（i i）V HおよびC HドメインからなるF d

50

断片が挙げられる。さらなる例は、(i) 免疫グロブリンヒンジ領域ポリペプチドに融合した結合ドメインポリペプチド、(ii) ヒンジ領域に融合した免疫グロブリン重鎖CH2定常領域、および(iii) CH2定常領域に融合した免疫グロブリン重鎖CH3定常領域を含む結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質である。結合ドメインポリペプチドは、重鎖可変領域または軽鎖可変領域であり得る。結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質は、米国特許出願第2003/0118592号および同第2003/0133939号にさらに開示されている。これらの抗体断片は、当業者に知られている従来の技術を使用して得られ、断片はインタクト抗体と同様に有用性についてスクリーニングされる。

【0059】

「エピトープ」という用語は、抗体に結合可能なタンパク質決定基を意味し、ここで、「結合する」という用語は、好ましくは特異的結合に関する。エピトープは通常、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(chemically active surface grouping)からなり、通常、特異的な三次元構造特性および特異的な荷電特性を有する。構造的エピトープと非構造的エピトープは、変性溶媒の存在下で前者への結合は失われるが後者への結合は失われないという点で区別される。「エピトープ」という用語は、好ましくは、分子中の抗原決定基、すなわち免疫系によって認識される抗原などの分子の一部または断片を指す。例えば、エピトープはT細胞、B細胞または抗体によって認識され得る。抗原のエピトープは、抗原の連続部分または非連続部分を含んでもよく、約5～約100、例えば約5～約50、より好ましくは約8～約30、最も好ましくは約10～約25個のアミノ酸の長さであってもよく、例えば、エピトープは、好ましくは、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25個のアミノ酸の長さであってもよい。一実施形態では、エピトープは、約10～約25個のアミノ酸の長さである。「エピトープ」という用語には、B細胞エピトープおよびT細胞エピトープが含まれる。

【0060】

「T細胞エピトープ」という用語は、MHC分子の文脈で提示された場合にT細胞によって認識されるタンパク質の一部または断片を指す。「主要組織適合性複合体」という用語および「MHC」という略語は、MHCクラスIおよびMHCクラスII分子を含み、すべての脊椎動物に存在する遺伝子の複合体に関する。MHCタンパク質または分子は、免疫反応においてリンパ球と抗原提示細胞または異常細胞(diseased cell)との間のシグナル伝達に重要であり、MHCタンパク質または分子はペプチドエピトープに結合し、T細胞上のT細胞受容体による認識のためにそれらを提示する。MHCがコードするタンパク質は細胞表面に発現され、自己抗原(細胞自体に由来するペプチド断片)と非自己抗原(例えば、侵入した微生物の断片)の両方をT細胞に提示する。クラスI MHC/ペプチド複合体の場合には、結合ペプチドは、典型的には、約8～約10個のアミノ酸の長さであるが、より長いまたはより短いペプチドも有効であり得る。クラスII MHC/ペプチド複合体の場合には、結合ペプチドは、典型的には、約10～約25個のアミノ酸の長さであり、特に約13～約18個のアミノ酸の長さであるが、より長いまたはより短いペプチドも有効であり得る。

【0061】

用語「...の位置に対応するアミノ酸」および類似の表現は、本明細書で使用される場合、ヒトIgG1重鎖におけるアミノ酸の位置番号を指す。他の免疫グロブリンにおける対応するアミノ酸位置は、ヒトIgG1とのアライメントによって見出され得る。よって、ある配列中のアミノ酸またはセグメントが別の配列中のアミノ酸またはセグメントに「対応する」とは、例えばALIGN、CLUSTALWなどの標準配列アライメントプログラムを使用して、典型的にはデフォルト設定で他のアミノ酸またはセグメントと整列させ、ヒトIgG1重鎖に対して少なくとも50%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%の同一性を有するものをいう。配列または配列中のセグメントを整列させ、それによって、本開示によるアミノ酸位置に対して配列中の対応する位置

10

20

30

40

50

を決定する方法は、当技術分野において周知であると考えられる。

【0062】

例えば、本開示の配列表の配列番号2によるアミノ酸配列に関して、E U番号付けによるヒトIgG1重鎖の234～236位に対応するアミノ酸位置は、配列番号2のアミノ酸位置117～119位であり、Fは117位（E U番号付けによるヒトIgG1重鎖の234位に対応する）に位置し、Eは118位（E U番号付けによるヒトIgG1重鎖の235位に対応する）に位置し、Rは119位（E U番号付けによるヒトIgG1重鎖の236位に対応する）に位置する。以下に示されている配列において、FERアミノ酸配列には下線を引き、太字で示す。

【化1】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS	60
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE <u>FERG</u>	120
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN	180
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE	240
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW	300
QQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	329

10

【0063】

本明細書において別段に示されていない限り、またはそうでなければ、文脈によって明らかに矛盾していない限り、本開示全体を通してアミノ酸位置について言及したものはすべて、E Uの番号付けによるヒトIgG1重鎖のそれぞれの位置に対応する位置を指す。

20

【0064】

第1の態様の一実施形態では、抗体は、同じ抗原結合領域ならびにヒトIgG1ヒンジ、CH2およびCH3領域を含む重鎖定常領域（CH）を含む別の抗体と比較して、Fc媒介性エフェクター機能が低下もしくは枯渇しているか、またはFc媒介性エフェクター機能をより低い程度に誘導する重鎖定常領域を含む。

【0065】

第1の態様による抗体の特定の一実施形態では、前記重鎖定常領域（CH）は、改変されていない重鎖定常領域（CH）を含むことを除いて同一である抗体と比較して、抗体がFc媒介性エフェクター機能をより低い程度に誘導するように改変される。

30

【0066】

「Fc媒介性エフェクター機能」という用語は、本明細書で使用される場合、特に、IgG Fc受容体（FcガンマR、FcγR）結合、C1q結合、ADCC、CDC、およびそれらの組合せのリストから選択されるこのような機能を指す。

【0067】

本開示の文脈において、多特異性抗体を含む抗体に関連して使用される「Fc媒介性エフェクター機能が低下または枯渇している」という用語は、抗体が、（i）前記抗体と同じCDR配列、特に同じ第1および第2の抗原結合領域を含む同じCDR配列、ならびに（ii）ヒトIgG1ヒンジ、CH2およびCH3領域を含む2つの重鎖を含むヒトIgG1抗体と比較して、Fc媒介性エフェクター機能［このような機能は特に、IgG Fc受容体（FcガンマR、FcγR）結合、C1q結合、ADCCまたはCDCのリストから選択される］の全体的な低下を、好ましくは5%以上、10%以上、20%以上、より好ましくは50%以上、最も好ましくは75%以上のレベルで引き起こすことを意味する。「枯渇したFc媒介性エフェクター機能」または同様の表現は、完全または本質的に完全な阻害、すなわちゼロまたは本質的にゼロへの低下を含む。

40

【0068】

本開示の文脈において、多特異性抗体を含む抗体に関連して使用される「Fc媒介性エフェクター機能をより低い程度に誘導する」という用語は、抗体が、（i）前記抗体と同じCDR配列、特に同じ第1および第2の抗原結合領域を含む同じCDR配列、ならびに

50

(i i) ヒト I g G 1 ヒンジ、C H 2 および C H 3 領域を含む 2 つの重鎖を含むヒト I g G 1 抗体と比較して、F c 媒介性エフェクター機能 [このような機能は特に、I g G F c 受容体 (F c ガンマ R、F c γ R) 結合、C 1 q 結合、A D C C または C D C のリストから選択される] をより低い程度に誘導することを意味する。

【0069】

F c 媒介性エフェクター機能は、結合剤の F c γ 受容体への結合、C 1 q への結合、または F c γ 受容体の F c 媒介性架橋の誘導を測定することによって決定され得る。特に、F c 媒介性エフェクター機能は、結合剤の C 1 q および / または I g G F C - ガンマ R I への結合を測定することによって決定され得る。

【0070】

第 1 の態様の抗体の一実施形態では、E U 番号付けによるヒト I g G 1 重鎖の 2 3 6 位に対応する位置のアミノ酸は塩基性アミノ酸である。

【0071】

「アミノ酸」および「アミノ酸残基」という用語は、本明細書において互換的に使用されることがあり、限定的に理解されるものではない。アミノ酸は、各アミノ酸に特有の側鎖 (R 基) とともに、アミン ($-NH_2$) およびカルボキシル ($-COOH$) 官能基を含有する有機化合物である。本開示の文脈において、アミノ酸は、構造および化学的特性に基づいて分類され得る。

【0072】

本開示において、アミノ酸残基は以下の略記を使用して表される。また、別段に明示しない限り、ペプチドおよびタンパク質のアミノ酸配列は、N 末端から C 末端に向かって (左端から右端に向かって) 特定され、N 末端は第 1 の残基として特定される。アミノ酸は、以下のように 3 文字の略記、1 文字の略記、またはフルネームで指定される。A l a : A : アラニン; A s p : D : アスパラギン酸; G l u : E : グルタミン酸; P h e : F : フェニルアラニン; G l y : G : グリシン; H i s : H : ヒスチジン; I l e : I : イソロイシン; L y s : K : リジン; L e u : L : ロイシン; M e t : M : メチオニン; A s n : N : アスパラギン; P r o : P : プロリン; G l n : Q : グルタミン; A r g : R : アルギニン; S e r : S : セリン; T h r : T : スレオニン; V a l : V : バリン; T r p : W : トリプトファン; T y r : Y : チロシン; C y s : C : システイン。

【0073】

天然に存在するアミノ酸はまた、一般に以下の 4 つのファミリーに分けられてもよい: 酸性アミノ酸 (アスパラギン酸、グルタミン酸)、塩基性アミノ酸 (リシン、アルギニン、ヒスチジン)、非極性アミノ酸 (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)、および非荷電極性アミノ酸 (グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、チロシン)。フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシンは、芳香族アミノ酸としてまとめて分類されることもある。

【0074】

第 1 の態様の抗体の一実施形態では、E U 番号付けによるヒト I g G 1 重鎖の 2 3 6 位に対応する位置の塩基性アミノ酸は、リシン、アルギニンおよびヒスチジンからなる群から選択される。一実施形態では、E U 番号付けによるヒト I g G 1 重鎖の 2 3 6 位に対応する位置の塩基性アミノ酸は、アルギニン (G 2 3 6 R) である。このようなアミノ酸置換 (s u b s i t i t u t i o n) は、本明細書において G 2 3 6 R と呼ばれる。「G 2 3 6 R」という用語は、E U 番号付けによるヒト I g G 1 重鎖の 2 3 6 位において、アミノ酸のグリシン (G) がアルギニン (R) で置換されていることを示す。本開示内では、他のアミノ酸位置およびアミノ酸について、同様の用語が使用される。反対の指示がない限り、これらの用語において参照されるアミノ酸位置は、E U 番号付けによるヒト I g G 1 重鎖におけるアミノ酸位置である。

【0075】

第 1 の態様の抗体の一実施形態では、E U 番号付けによるヒト I g G 1 重鎖の 2 3 4 位

10

20

30

40

50

に対応する位置のアミノ酸は芳香族アミノ酸である。一実施形態では、この位置の芳香族アミノ酸は、フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンからなる群から選択される。

【0076】

第1の態様の抗体の一実施形態では、EU番号付けによるヒトIgG1重鎖の234位に対応する位置のアミノ酸は非極性アミノ酸である。一実施形態では、この位置の非極性アミノ酸は、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、メチオニンおよびトリプトファンからなる群から選択される。一実施形態では、この位置の非極性アミノ酸は、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニンおよびトリプトファンからなる群から選択される。

10

【0077】

第1の態様の抗体の一実施形態では、EU番号付けによるヒトIgG1重鎖の234位に対応する位置のアミノ酸はフェニルアラニン（L234F）である。

【0078】

EU番号付けによるヒトIgG1重鎖の234および236位に対応する位置の可能なアミノ酸の例示的な組合せを以下の表に示す：

【0079】

20

30

40

50

【表 2】

表 2:

アミノ酸位置 234	アミノ酸位置 236
フェニルアラニン(F)	アルギニン(R)
トリプトファン(W)	アルギニン(R)
チロシン(Y)	アルギニン(R)
アラニン(A)	アルギニン(R)
バリン(V)	アルギニン(R)
ロイシン(L)	アルギニン(R)
イソロイシン(I)	アルギニン(R)
プロリン(P)	アルギニン(R)
メチオニン(M)	アルギニン(R)
フェニルアラニン(F)	リシン(K)
トリプトファン(W)	リシン(K)
チロシン(Y)	リシン(K)
アラニン(A)	リシン(K)
バリン(V)	リシン(K)
ロイシン(L)	リシン(K)
イソロイシン(I)	リシン(K)
プロリン(P)	リシン(K)
メチオニン(M)	リシン(K)
フェニルアラニン(F)	ヒスチジン(H)
トリプトファン(W)	ヒスチジン(H)
チロシン(Y)	ヒスチジン(H)
アラニン(A)	ヒスチジン(H)
バリン(V)	ヒスチジン(H)
ロイシン(L)	ヒスチジン(H)
イソロイシン(I)	ヒスチジン(H)
プロリン(P)	ヒスチジン(H)
メチオニン(M)	ヒスチジン(H)

10

20

30

40

【0080】

例えば、EU番号付けによるヒトIgG1重鎖における234および236位に対応する位置には、特に以下のアミノ酸が第1の態様の抗体の重鎖定常領域に存在し得る：234 F / 236 R、234 W / 236 R、234 Y / 236 R、234 A / 236 R、234 L / 236 R、234 F / 236 K、234 W / 236 K、234 Y / 236 K、234 A / 236 K、234 L / 236 K、234 F / 236 H、234 W / 236 H、234 Y / 236 H、234 A / 236 H、または234 L / 236 H。

【0081】

前述の234および236位のアミノ酸またはアミノ酸置換は、抗体の一方の重鎖にの

50

み存在してもよく、または抗体の両方の重鎖に存在してもよい。抗体の第 1 および第 2 の重鎖に存在するそれぞれのアミノ酸は、互いに独立して選択され得る。

【0082】

例えば、第 1 の態様の抗体の少なくとも 1 つの重鎖は、以下の配列（配列番号 2）を含むことができる：

【化 2】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS	60
GLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE <u>FLRG</u>	120
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN	180
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE	240
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW	300
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	329

10

【0083】

第 1 の態様の抗体の一実施形態における、EU 番号付けによるヒト IgG1 重鎖における 234 および 236 位に対応する位置のアミノ酸が上記で明示した通りであり、さらに EU 番号付けによるヒト IgG1 重鎖の 235 位に対応する位置のアミノ酸が酸性アミノ酸である前記重鎖。一実施形態では、この位置の酸性アミノ酸は、アスパラギン酸またはグルタミン酸から選択される。一実施形態では、EU 番号付けによるヒト IgG1 重鎖の 235 位に対応する位置のアミノ酸は、グルタミン酸（L235E）である。

20

【0084】

第 1 の態様の抗体の一実施形態では、重鎖定常領域において、EU 番号付けによるヒト IgG1 重鎖における 234、235 および 236 位に対応する位置のアミノ酸は、234 位が非極性または芳香族アミノ酸、235 位が酸性アミノ酸、236 位が塩基性アミノ酸である。

【0085】

EU 番号付けによるヒト IgG1 重鎖の 234、235 および 236 位に対応する位置の可能なアミノ酸の例示的な組合せを以下の表に示す：

【0086】

30

40

50

【表 3】

表 3:

アミノ酸位置 234	アミノ酸位置 235	アミノ酸位置 236
フェニルアラニン(F)	アスパラギン酸(D)またはグルタミン酸(E)	アルギニン(R)
トリプトファン(W)	アスパラギン酸(D)またはグルタミン酸(E)	アルギニン(R)
チロシン(Y)	アスパラギン酸(D)またはグルタミン酸(E)	アルギニン(R)
アラニン(A)	アスパラギン酸(D)またはグルタミン酸(E)	アルギニン(R)
バリン(V)	アスパラギン酸(D)またはグルタミン酸(E)	アルギニン(R)
ロイシン(L)	アスパラギン酸(D)またはグルタミン酸(E)	アルギニン(R)
イソロイシン(I)	アスパラギン酸(D)またはグルタミン酸(E)	アルギニン(R)
プロリン(P)	アスパラギン酸(D)またはグルタミン酸(E)	アルギニン(R)
メチオニン(M)	アスパラギン酸(D)またはグルタミン酸(E)	アルギニン(R)
フェニルアラニン(F)	アスパラギン酸(D)またはグルタミン酸(E)	リシン(K)
トリプトファン(W)	アスパラギン酸(D)またはグルタミン酸(E)	リシン(K)
チロシン(Y)	アスパラギン酸(D)またはグルタミン酸(E)	リシン(K)
アラニン(A)	アスパラギン酸(D)またはグルタミン酸(E)	リシン(K)
バリン(V)	アスパラギン酸(D)またはグルタミン酸(E)	リシン(K)
ロイシン(L)	アスパラギン酸(D)またはグルタミン酸(E)	リシン(K)
イソロイシン(I)	アスパラギン酸(D)またはグルタミン酸(E)	リシン(K)
プロリン(P)	アスパラギン酸(D)またはグルタミン酸(E)	リシン(K)
メチオニン(M)	アスパラギン酸(D)またはグルタミン酸(E)	リシン(K)
フェニルアラニン(F)	アスパラギン酸(D)またはグルタミン酸(E)	ヒスチジン(H)
トリプトファン(W)	アスパラギン酸(D)またはグルタミン酸(E)	ヒスチジン(H)
チロシン(Y)	アスパラギン酸(D)またはグルタミン酸(E)	ヒスチジン(H)
アラニン(A)	アスパラギン酸(D)またはグルタミン酸(E)	ヒスチジン(H)
バリン(V)	アスパラギン酸(D)またはグルタミン酸(E)	ヒスチジン(H)
ロイシン(L)	アスパラギン酸(D)またはグルタミン酸(E)	ヒスチジン(H)
イソロイシン(I)	アスパラギン酸(D)またはグルタミン酸(E)	ヒスチジン(H)
プロリン(P)	アスパラギン酸(D)またはグルタミン酸(E)	ヒスチジン(H)
メチオニン(M)	アスパラギン酸(D)またはグルタミン酸(E)	ヒスチジン(H)

【0087】

例えば、EU番号付けによるヒトIgG1重鎖における234、235および236位に対応する位置に、特に以下のアミノ酸は第1の態様の抗体の重鎖定常領域に存在し得る：
 234 F / 235 E / 236 R、234 W / 235 E / 236 R、234 Y / 235 E / 236 R、234 A / 235 E / 236 R、234 L / 235 E / 236 R、234 F / 235 D / 236 R、234 W / 235 D / 236 R、234 Y / 235 D / 236 R、
 234 A / 235 D / 236 R、234 L / 235 D / 236 R、234 F / 235 L / 236 R、234 W / 235 L / 236 R、234 Y / 235 L / 236 R、234 A / 235 L / 236 R、234 L / 235 L / 236 R、234 F / 235 A / 236 R、
 234 W / 235 A / 236 R、234 Y / 235 A / 236 R、234 A / 235 A / 236 R、234 L / 235 A / 236 R、234 F / 235 E / 236 K、234 W / 235 E / 236 K、234 Y / 235 E / 236 K、234 A / 235 E / 236 K、
 234 L / 235 E / 236 K、234 F / 235 D / 236 K、234 W / 235 D / 236 K、234 Y / 235 D / 236 K、234 A / 235 D / 236 K、234 L / 235 D / 236 K、234 F / 235 L / 236 K、234 W / 235 L / 236 K、
 234 Y / 235 L / 236 K、234 A / 235 L / 236 K、234 L / 235 L

／ 2 3 6 K、2 3 4 F／ 2 3 5 A／ 2 3 6 K、2 3 4 W／ 2 3 5 A／ 2 3 6 K、2 3 4 Y
 ／ 2 3 5 A／ 2 3 6 K、2 3 4 A／ 2 3 5 A／ 2 3 6 K、2 3 4 L／ 2 3 5 A／ 2 3 6 K
 、2 3 4 F／ 2 3 5 E／ 2 3 6 H、2 3 4 W／ 2 3 5 E／ 2 3 6 H、2 3 4 Y／ 2 3 5 E
 ／ 2 3 6 H、2 3 4 A／ 2 3 5 E／ 2 3 6 H、2 3 4 L／ 2 3 5 E／ 2 3 6 H、2 3 4 F
 ／ 2 3 5 D／ 2 3 6 H、2 3 4 W／ 2 3 5 D／ 2 3 6 H、2 3 4 Y／ 2 3 5 D／ 2 3 6 H
 、2 3 4 A／ 2 3 5 D／ 2 3 6 H、2 3 4 L／ 2 3 5 D／ 2 3 6 H、2 3 4 F／ 2 3 5 L
 ／ 2 3 6 H、2 3 4 W／ 2 3 5 L／ 2 3 6 H、2 3 4 Y／ 2 3 5 L／ 2 3 6 H、2 3 4 A
 ／ 2 3 5 L／ 2 3 6 H、2 3 4 L／ 2 3 5 L／ 2 3 6 H、2 3 4 F／ 2 3 5 A／ 2 3 6 H
 、2 3 4 W／ 2 3 5 A／ 2 3 6 H、2 3 4 Y／ 2 3 5 A／ 2 3 6 H、2 3 4 A／ 2 3 5 A
 ／ 2 3 6 H、または 2 3 4 L／ 2 3 5 A／ 2 3 6 H。

10

【0088】

前述の 2 3 4、2 3 5 および 2 3 6 位の アミノ酸 または アミノ酸置換は、抗体の一方の重鎖にのみ存在してもよく、または抗体の両方の重鎖に存在してもよい。抗体の第 1 および第 2 の重鎖に存在するそれぞれの アミノ酸 は、互いに独立して選択され得る。

【0089】

例えば、第 1 の態様の抗体の少なくとも 1 つの重鎖は、以下の配列（配列番号 2 または配列番号 5 5）を含むことができる：

【化 3】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS	60
GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE <u>FERG</u>	120
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN	180
STYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE	240
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW	300
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	329

20

【0090】

本出願において、該当する場合、2 3 4、2 3 6 および 2 3 5 位のすべての記載されたアミノ酸置換の任意の順列および組合せ、例えば、表 2 および表 3 に示されるような順列および組合せは、文脈が別段に示さない限り、本出願の記載により開示されたと考えられるべきである。例えば、抗体の一実施形態では、第 1 の重鎖は、E U 番号付けによるヒト I g G 1 重鎖における 2 3 4～2 3 6 位に対応する位置にアミノ酸 F E R を含むか、または第 1 の重鎖は、配列番号 2 に記載されるアミノ酸配列を含むか、またはそれから本質的になるか、またはそれからなり、前記抗体の第 2 の重鎖は、他のアミノ酸、例えば、E U 番号付けによるヒト I g G 1 重鎖の 2 3 4～2 3 6 位に対応する位置のアミノ酸 A A G または L L G を含むか、または前記抗体の第 2 重鎖が配列番号 1 または 7 に記載されるアミノ酸配列を含むか、それから本質的になるか、またはそれらからなる。抗体の別の実施形態では、第 1 および第 2 の重鎖は、E U 番号付けによるヒト I g G 1 重鎖の 2 3 4～2 3 6 位に対応する位置に同じアミノ酸を含む、すなわち E U 番号付けによるヒト I g G 1 重鎖の 2 3 4 位に対応する位置の同じ芳香族アミノ酸または非極性アミノ酸、例えば F、お

30

40

【0091】

第 1 の態様の抗体の一実施形態では、抗体は、少なくとも 1 つまたは 2 つの重鎖定常領域を含み、2 3 4 位に対応するアミノ酸はフェニルアラニンであり、2 3 5 位に対応するアミノ酸はグルタミン酸であり、2 3 6 位に対応するアミノ酸はアルギニンである（L 2 3 4 F／L 2 3 5 E／G 2 3 6 R＝F E R）。

【0092】

第 1 の態様の抗体のさらなる実施形態では、少なくとも 1 方または両方の重鎖定常領域は、E U 番号付けによるヒト I g G 1 重鎖の 2 3 6 位に対応する位置のアミノ酸の置換に

50

加えて、定常領域、例えば E U 番号付けによるヒト I g G 1 重鎖における L 2 3 4、L 2 3 5、G 2 3 7、D 2 6 5、D 2 7 0、K 3 2 2、P 3 2 9、および P 3 3 1 位に対応する位置の 1 つ以上のアミノ酸に、1 つ以上のさらなる変異を含み得る。

【0093】

一実施形態では、E U 番号付けによるヒト I g G 1 重鎖における 2 3 4 位に対応するアミノ酸は L ではなく、例えば F または A から選択され、および／または E U 番号付けによるヒト I g G 1 重鎖における 2 3 5 位に対応するアミノ酸は L ではなく、E または A から選択される。

【0094】

一実施形態では、E U 番号付けによるヒト I g G 1 重鎖における 2 3 7 位に対応するアミノ酸は G ではなく、例えば A であり、すなわち、抗体の少なくとも一方または両方の重鎖定常領域は、例えばアミノ酸置換 G 2 3 6 R / G 2 3 7 A を含み得る。

10

【0095】

一実施形態では、E U 番号付けによるヒト I g G 1 重鎖における 2 6 5 位に対応するアミノ酸は D ではなく、例えば A であり、すなわち、抗体の少なくとも一方または両方の重鎖定常領域は、例えばアミノ酸置換 G 2 3 6 R / D 2 6 5 A を含み得る。

【0096】

一実施形態では、E U 番号付けによるヒト I g G 1 重鎖における 2 7 0 位に対応するアミノ酸は D ではなく、例えば A であり、すなわち、抗体の少なくとも一方または両方の重鎖定常領域は、例えばアミノ酸置換 G 2 3 6 R / D 2 7 0 A を含み得る。

20

【0097】

一実施形態では、E U 番号付けによるヒト I g G 1 重鎖における 3 2 2 位に対応するアミノ酸は K ではなく、例えば A であり、すなわち、抗体の少なくとも一方または両方の重鎖定常領域は、例えばアミノ酸置換 G 2 3 6 R / K 3 2 2 A を含み得る。

【0098】

一実施形態では、E U 番号付けによるヒト I g G 1 重鎖における 3 2 9 位に対応するアミノ酸は P ではなく、例えば A であり、すなわち、抗体の少なくとも一方または両方の重鎖定常領域は、例えばアミノ酸置換 G 2 3 6 R / P 3 2 9 A を含み得る。

【0099】

一実施形態では、E U 番号付けによるヒト I g G 1 重鎖における 3 3 1 位に対応するアミノ酸は P ではなく、例えば A または S であり、すなわち、抗体の少なくとも一方または両方の重鎖定常領域は、例えばアミノ酸置換 G 2 3 6 R / P 3 3 1 A または G 2 3 6 R / P 3 3 1 S を含み得る。

30

【0100】

第 1 の態様の抗体の一実施形態では、E U 番号付けによるヒト I g G 1 重鎖における 2 3 4、2 3 6 および G 3 2 7 位に対応する位置は置換されており、抗体の少なくとも一方または両方の重鎖定常領域は、例えば、アミノ酸置換 L 2 3 4 F / G 2 3 6 R / G 2 3 7 A を含み得る。

【0101】

第 1 の態様の抗体の一実施形態では、E U 番号付けによるヒト I g G 1 重鎖における 2 3 4、2 3 6 および 2 6 5 位に対応する位置は置換されており、抗体の少なくとも一方または両方の重鎖定常領域は、例えば、アミノ酸置換 L 2 3 4 F / G 2 3 6 R / D 2 6 5 A を含み得る。

40

【0102】

第 1 の態様の抗体の一実施形態では、E U 番号付けによるヒト I g G 1 重鎖における 2 3 4、2 3 6 および 2 7 0 位に対応する位置は置換されており、抗体の少なくとも一方または両方の重鎖定常領域は、例えば、アミノ酸置換 L 2 3 4 F / G 2 3 6 R / D 2 7 0 A を含み得る。

【0103】

第 1 の態様の抗体の一実施形態では、E U 番号付けによるヒト I g G 1 重鎖における 2

50

3 4、2 3 6 および 3 2 2 位に対応する位置は置換されており、抗体の少なくとも一方または両方の重鎖定常領域は、例えば、アミノ酸置換 L 2 3 4 F / G 2 3 6 R / K 3 2 2 A を含み得る。

【0104】

第1の態様の抗体の一実施形態では、EU番号付けによるヒトIgG1重鎖における2 3 4、2 3 6 および 3 2 9 位に対応する位置は置換されており、抗体の少なくとも一方または両方の重鎖定常領域は、例えば、アミノ酸置換 L 2 3 4 F / G 2 3 6 R / P 3 2 9 A を含み得る。

【0105】

第1の態様の抗体の一実施形態では、EU番号付けによるヒトIgG1重鎖における2 3 4、2 3 6 および 3 3 1 位に対応する位置は置換されており、抗体の少なくとも一方または両方の重鎖定常領域は、例えば、アミノ酸置換 L 2 3 4 F / G 2 3 6 R / P 3 3 1 A または L 2 3 4 F / G 2 3 6 R / P 3 3 1 S を含み得る。

【0106】

第1の態様の抗体の一実施形態では、抗体は、配列番号2に記載されたCH配列のアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、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97%、少なくとも99%、または100%の同一性を有する配列を含む1つ以上の重鎖定常領域(CH)を含む。

【0107】

特定のアミノ酸配列、例えば配列表に示されているアミノ酸配列に関して本明細書において与えられる教示は、前記特定の配列と機能的に等価な配列、例えば特定のアミノ酸配列と同一または類似の特性を示すアミノ酸配列をもたらす、前記特定の配列の変異体にも関連するように解釈される。

【0108】

本開示の目的のために、アミノ酸配列(ペプチド、タンパク質またはポリペプチド)の「変異体」は、アミノ酸挿入変異体、アミノ酸付加変異体、アミノ酸欠失変異体および/またはアミノ酸置換変異体を含む。「変異体」という用語は、すべての突然変異体、スプライス変異体、翻訳後修飾された変異体、立体構造、アイソフォーム、対立遺伝子変異体、種変異体、および種ホモログ、特に天然に存在するものを含む。「変異体」という用語は、特にアミノ酸配列の断片を含む。

【0109】

一実施形態では、重鎖定常領域のアミノ酸変異体は、本明細書および添付の特許請求の範囲において明示される、2 3 4 および 2 3 6 位、ならびに適宜、2 3 5 位のそれぞれのアミノ酸を含む。

【0110】

第1の態様の抗体の一実施形態では、抗体は1つ以上の、例えば2つの重鎖定常領域(CH)を含み、重鎖定常領域は配列番号2または配列番号55に記載された配列を含む。

【0111】

第1の態様の抗体は、免疫グロブリン分子の任意のアイソタイプ(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。

【0112】

本明細書で使用される場合、「アイソタイプ」という用語は、重鎖定常領域遺伝子によってコードされる免疫グロブリンのクラス[例えば、IgG(例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgD、IgA(例えば、IgA1、IgA2)、IgE、IgM、またはIgY]を指す。特定のアイソタイプ、例えばIgG1が本明細書で言及される場合、この用語は特定のアイソタイプ配列、例えば特定のIgG1配列に限定されるものではなく、抗体が他のアイソタイプよりもそのアイソタイプ、例えばIgG1に近い配列であることを示すために使用される。よって、例えば、本明細書に開示されるIgG1抗体は、定常領域の変異を含む、天然に存在するIgG1抗体の配列変異体であっても

10

20

30

40

50

よい。

【0113】

I g G 1 抗体は、アロタイプと呼ばれる複数の多型変異体 (Jefferis and Lefranc 2009, mAbs Vol 1 Issue 4 1-7において総説される) に存在する可能性があり、そのいずれもが本明細書のいくつかの実施形態における使用に適している。ヒト集団における一般的なアロタイプ変異体は、文字 a、f、n、z またはそれらの組合せで指定されるものである。本明細書における実施形態のいずれかでは、抗体は、ヒト I g G F c 領域を含む重鎖 F c 領域を含み得る。さらなる実施形態では、ヒト I g G F c 領域は、ヒト I g G 1 を含む。

【0114】

哺乳類の免疫グロブリン重鎖には5つのタイプ、すなわち α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、および μ があり、これらは抗体の異なるアイソタイプ、すなわち I g A、I g D、I g E、I g G、および I g M を構成している。可溶性免疫グロブリンの重鎖とは対照的に、膜または表面免疫グロブリンの重鎖は、カルボキシ末端に膜貫通ドメインと短い細胞質ドメインを含む。

【0115】

哺乳類には、2種類の軽鎖、すなわちラムダおよびカッパがある。免疫グロブリン鎖は可変領域および定常領域を含む。定常領域は免疫グロブリンの異なるアイソタイプ内で本質的に保存されており、可変部は高度に多様化し、抗原認識に関与する。

【0116】

例えばまたは実施形態では、本発明の抗体、好ましくはモノクローナル抗体は、I g G 1、 κ アイソタイプまたは λ アイソタイプであり、好ましくはヒト I g G 1 / κ またはヒト I g G 1 / λ 定常部分を含むか、または抗体、好ましくはモノクローナル抗体は、I g G 1、 λ (ラムダ) または I g G 1、 κ (カッパ) 抗体、好ましくはヒト I g G 1、 λ (ラムダ) またはヒト I g G 1、 κ (カッパ) 抗体に由来する。

【0117】

第1の態様の一実施形態では、抗体は、配列番号6に記載された L C 配列のアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、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97%、少なくとも99%、または100%の同一性を有する配列を含む軽鎖定常領域を有する軽鎖を含む。一実施形態では、抗体は、配列番号6に記載された配列を含む軽鎖定常領域を有する軽鎖を含む。

【0118】

本発明の一実施形態では、結合剤は、完全長 I g G 1 抗体、例えば、I g G 1、 κ である。本発明の一実施形態では、結合剤は、完全長ヒト I g G 1 抗体、例えば、I g G 1、 κ である。

【0119】

他のアイソタイプはアイソタイプスイッチングによって得ることができる。本明細書で使用される場合、「アイソタイプスイッチング」は、抗体のクラス、またはアイソタイプが、1つの I g クラスから他の I g クラスの1つに変化する現象を指す。

【0120】

第1の態様の抗体の一実施形態では、第1の態様の抗体は、他の結合特異性に対して誘導体化、連結、または共発現され得る。別の実施形態では、第1の態様の抗体は、別の機能性分子、例えば、別のペプチドまたはタンパク質 (例えば、F a b ' 断片) と誘導体化、連結または共発現され得る。例えば、第1の態様の抗体は、機能的に (例えば、化学的カップリング、遺伝子融合、非共有結合などにより)、1つ以上の他の分子実体、例えば別の抗体に連結され得る (例えば、二特異性抗体または多特異性抗体を生成するために)。

【0121】

「抗体誘導体」という用語は、抗体の任意の改変形態、例えば抗体と別の薬剤または抗体とのコンジュゲートを指す。本明細書で使用される場合、抗体が動物を免疫することに

10

20

30

40

50

よって、または免疫グロブリン遺伝子ライブラリーをスクリーニングすることによって系から得られ、選択された抗体が生殖細胞系列の免疫グロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列に対して、アミノ酸配列において少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらに好ましくは少なくとも96%、97%、98%、または99%同一である場合、抗体は特定の生殖細胞系列の配列に「由来する」。典型的には、特定の生殖細胞系列の配列に由来する抗体は、生殖細胞系列の免疫グロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列と10個以下のアミノ酸の相違、より好ましくは5個以下、さらに好ましくは4、3、2、または1個以下のアミノ酸の相違を示す。

【0122】

第1の態様の抗体はヒト抗体であってもよい。「ヒト抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、ヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する抗体を含むことが意図される。第1の態様のヒト抗体は、ヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン配列によってコードされていないアミノ酸残基〔例えば、インビトロ (*in vitro*) でのランダム変異誘発もしくは部位特異的変異誘発、またはインビボ (*in vivo*) での体細胞変異によって導入された変異〕を含んでもよい。

【0123】

「モノクローナル抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、単一分子組成の抗体分子の調製物を指す。モノクローナル抗体は、特定のエピトープに対して単一の結合特異性および親和性を示す。一実施形態では、モノクローナル抗体は、非ヒト動物、例えばマウスから得られたB細胞を不死化細胞と融合させたハイブリドーマによって産生される。

【0124】

第1の態様の抗体は組換え抗体であってもよい。「組換え抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、組み換え手段および／または遺伝子工学によって調製、発現、作成または単離されたすべての抗体を含み、例えば、(a) 免疫グロブリン遺伝子に関してトランスジェニックまたはトランス染色体である動物（例えば、マウス）から単離された抗体、またはそこから調製されたハイブリドーマ、(b) 抗体を発現するように形質転換された宿主細胞、例えばトランスフェクトーマから単離された抗体、(c) 組み換え、コンビナトリアル抗体ライブラリーから単離された抗体、および(d) 免疫グロブリン遺伝子配列を他のDNA配列へとスプライシングすることに関与する任意の他の手段によって調製、発現、作成、または単離された抗体を含む。好ましくは、本開示の文脈における組換え細胞などの「組換え体」は、天然には存在しない。本明細書に記載のアミノ酸変異体は、当業者によって、例えば組換えDNA操作によって容易に調製され得る。置換、付加、挿入または欠失を有するタンパク質およびペプチドを調製するためのヌクレオチド配列の操作は、例えば、Sambrook et al. (1989) に詳細に記載されている。

【0125】

本明細書で使用される場合、「異種抗体」とは、このような抗体を産生するトランスジェニック生物に関連して定義される。この用語は、トランスジェニック生物から構成されない生物に見出されるものに対応するアミノ酸配列またはコードする核酸配列を有し、一般にトランスジェニック生物以外の種に由来する抗体を指す。

【0126】

本明細書で使用される場合、「ヘテロハイブリッド抗体」は、異なる生物起源の軽鎖および重鎖を有する抗体を指す。例えば、マウス軽鎖に結合したヒト重鎖を有する抗体はヘテロハイブリッド抗体である。

【0127】

第1の態様の抗体は、好ましくは単離されている。「単離された抗体」は、本明細書で使用される場合、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体（例えば、PD-1に特異的に結合する単離された抗体は、PD-1以外の抗原に特異的に結合する抗体を実質的に含まない）を指すことが意図される。しかしながら、ヒトPD-1のエピトープ、アイソフォームまたは変異体に特異的に結合する単離された抗体は、他の関連抗

原、例えば、他の種由来の抗原（例えば、PD-1種ホモログ）に対して交差反応性を有し得る。さらに、単離された抗体は、他の細胞物質および／または化学物質を実質的に含まない場合がある。第1の態様の一実施形態では、「単離された」モノクローナル抗体の組合せは、異なる特異性を有し、十分に定義された組成物中で組み合わされる抗体に関する。

【0128】

本明細書で使用される場合、ある物体に適用される「天然に存在する」という用語は、その物体が自然界に見出される事実を指す。例えば、自然界の供給源から単離され得る生物（ウイルスを含む）中に存在し、実験室で人により意図的に改変されていないポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列は、天然に存在する。

10

【0129】

「再配列された」という用語は、本明細書で使用される場合、重鎖または軽鎖免疫グロブリン遺伝子座の配置を指し、Vセグメントが、それぞれ本質的に完全なVHまたはVLドメインをコードする構造において、D-JまたはJセグメントのすぐ隣に配置されている。再配列された免疫グロブリン（抗体）遺伝子の遺伝子座は、生殖細胞系列のDNAと比較することにより同定することができ；再配列された遺伝子座は、少なくとも1つの組み換えヘプタマー／ノナマー相同性エレメントを有することになる。

【0130】

Vセグメントに関して「再配列されない」または「生殖細胞系列配置」という用語は、本明細書で使用される場合、VセグメントがDまたはJセグメントにすぐに隣接するように組み替えられない配置を指す。

20

【0131】

I. 抗体作用のメカニズム

以下は、第1の態様の抗体の治療有効性の基礎となるメカニズムに関する考察を提供するものであるが、いかなる意味においても本発明を限定するものとはみなされるべきではない。

【0132】

本明細書に記載の抗体は、好ましくは免疫チェックポイントPD-1と相互作用する。PD-1に結合することによって、PD-1とそのリガンド（PD-L1およびPD-L2）との相互作用が阻害される。PD-L1は、例えば腫瘍細胞および腫瘍微小環境の抗原提示細胞上に発現される。PD-1とPD-L1との相互作用は、免疫応答、好ましくはT細胞媒介性免疫応答の抑止をもたらすため、第1の態様の抗体によりPD-1を遮断することにより、免疫応答のそのような抑止が防止されるか、または少なくとも低下し、言い換えれば免疫応答が誘導される。

30

【0133】

PD-1とそのリガンドは、免疫応答を防止するかまたは低下させる際に相互に作用し合うが、この効果を得るためには、PD-1の遮断がリガンドの遮断よりも有利である場合がある。これは、PD-L2を発現する異常細胞とPD-1を発現するリンパ球との間の阻害性シグナル伝達が、免疫系による免疫応答の阻害に役立つ可能性があるため、例えば、PD-L1の遮断が免疫応答の低下を依然としてもたらすためである。

40

【0134】

免疫系は、自然免疫と適応免疫という2つの異なるモダリティーによって、異常細胞を認識し、破壊する能力を有する。先天的な構成要素は、マクロファージ、ナチュラルキラー（NK）細胞、単球、および顆粒球である。これらの細胞は、細胞の形質転換に関与する分子パターンを特定し、様々なサイトカインおよび炎症性メディエーターを放出する。自然免疫反応には、適応免疫反応に存在する特徴である、外来抗原に対するメモリー能力がない。免疫系の後者の構成要素は、リンパ球上の受容体の存在によって付与される、外来抗原に対する特異性も特徴とする。抗原提示細胞（APC）もまた、外来抗原を取り込み、主要組織適合性複合体に関連してリンパ球に対してそれらを提示するという役割を適応応答において果たす。CD4⁺ T細胞は、MHCクラスII分子に関連して抗原を認

50

識する受容体を有し、サイトカインを放出し、さらに $CD8^+$ リンパ球（CTL）またはB細胞を活性化することを可能にする。CTLは細胞媒介性免疫の一部であり、MHCクラスI分子に関連して提示された抗原を認識した後、アポトーシスまたはパーフォリン媒介性細胞溶解によって細胞を排除することができる。T細胞媒介性免疫が抗腫瘍応答において重要な役割を果たしていることは広く認められている。B細胞は免疫グロブリンの放出に関与しており、それ自体、体液性免疫系の一部である。

【0135】

「免疫応答」という用語は、抗原または抗原を発現する細胞などの標的に対する統合的な身体応答を指し、好ましくは細胞免疫応答、または体液性免疫応答と同様に細胞免疫応答を指す。免疫応答は、防御的／防止的／予防的および／または治療的であり得る。

10

【0136】

「免疫応答を誘導する」とは、誘導前には免疫応答がなかったことを意味し得るが、誘導前には一定レベルの免疫応答があり、誘導後に前記免疫応答が増強されることも意味し得る。よって、「免疫応答を誘導する」には、「免疫応答を増強する」も含まれる。好ましくは、対象において免疫応答を誘導した後、前記対象は、免疫応答を誘導することにより、がん疾患などの疾患の発症から保護されるか、または疾患状態が改善される。この場合、免疫応答を誘導することは、対象の疾患状態が改善されること、対象が転移を発症しないこと、またはがん疾患を発症するリスクを有する対象ががん疾患を発症しないことを意味し得る。

【0137】

「細胞免疫反応」および「細胞応答」などの用語は、細胞に向けられた免疫応答を指す。自然細胞免疫応答は、マクロファージ、ナチュラルキラー（NK）細胞、単球、および顆粒球によって駆動される。適応細胞免疫応答は、T細胞またはTリンパ球に関与するMHCクラスIまたはクラスIIに関連した抗原提示を特徴とし、「ヘルパー」または「キラー」として作用する。ヘルパーT細胞（ $CD4^+$ T細胞とも呼ばれる）は、免疫応答を調節することによって中心的な役割を果たし、キラー細胞（細胞傷害性T細胞、細胞溶解性T細胞、 $CD8^+$ T細胞またはCTLとも呼ばれる）は、がん細胞などの異常細胞を殺滅し、より多くの異常細胞の産生を防止する。実施形態では、本開示は、1つ以上の腫瘍抗原を発現し、好ましくはこのような腫瘍抗原をMHCクラスI上に提示する腫瘍細胞に対する抗腫瘍CTL応答の刺激を含む。

20

30

【0138】

「腫瘍抗原」は、本明細書で使用される場合、抗体またはTリンパ球（T細胞）との特異的反応などの免疫応答を標的とする、および／または誘導する任意の物質、好ましくはペプチドまたはタンパク質を網羅する。好ましくは、抗原はT細胞エピトープなどの少なくとも1つのエピトープを含む。腫瘍抗原またはそのT細胞エピトープは、好ましくは、細胞、好ましくは、異常細胞、特にがん細胞を含む抗原提示細胞によって、MHC分子に関連して提示され、抗原（抗原を発現する細胞を含む）に対する免疫応答をもたらす。

【0139】

第1の態様の抗体は、PD-1に対する結合特性、好ましくはPD-1の免疫抑制シグナルを阻害する能力を特徴とする。

40

【0140】

本開示によれば、「結合すること」という用語は、好ましくは「特異的結合」に関する。本明細書で使用される場合、所定の抗原またはエピトープへの抗体の結合の文脈における「結合すること」または「結合可能」または「結合する能力を有する」という用語は、典型的には、Bio-Layer Interferometry（BLI）を使用して決定した場合、または例えば、抗原をリガンドとして、および抗体を分析物として使用して、BIAcore 3000機器において表面プラズモン共鳴（SPR）技術を用いて決定した場合、約 10^{-7} M以下、例えば約 10^{-8} M以下、例えば約 10^{-9} M以下、約 10^{-10} M以下またはさらには約 10^{-11} M以下の K_D に対応する親和性を有する結合である。抗体は、所定の抗原または近縁の抗原以外の非特異的抗原（例えば、BSA

50

、カゼイン）に結合する際の K_D よりも少なくとも10分の1低い、例えば少なくとも100分の1低い、例えば少なくとも1,000分の1低い、例えば少なくとも10,000分の1低い、例えば少なくとも100,000分の1低い K_D に相当する親和性で所定の抗原に結合する。親和性が高くなる量は抗体の K_D に依存するため、抗体の K_D が非常に低い（すなわち、抗体の高度に特異性である）場合、抗原に対する親和性は非特異的抗原に対する親和性よりも低くなる程度は少なくとも10,000分の1になる場合がある。

【0141】

用語「 k_d 」（ 秒^{-1} ）は、本明細書で使用される場合、特定の抗体－抗原相互作用の解離速度定数を意味する。前記値は、 k_{off} 値とも呼ばれる。

10

【0142】

用語「 K_D 」（M）は、本明細書で使用される場合、特定の抗体－抗原相互作用の解離平衡定数を指す。

【0143】

2つの抗体が同じ抗原および同じエピトープに結合する場合、2つの抗体は「同じ特異性」を有する。検査される抗体がある特定の抗原結合抗体と同じエピトープを認識するかどうか、すなわち、抗体が同じエピトープに結合するかどうかは、当業者に周知の様々な方法によって検査され得る。

【0144】

抗体間の競合は、交差遮断アッセイ（cross-blocking assay）によって検出することができる。例えば、競合ELISAアッセイが交差遮断アッセイとして使用され得る。例えば、標的抗原はマイクロタイタープレートのウェルにコーティングされてもよく、抗原結合抗体および試験抗体と競合する候補物質が添加されてもよい。ウェル中の抗原に結合した抗原結合抗体の量は、同じエピトープに結合するために競合する試験抗体と競合する候補物質の結合能と間接的に相関する。具体的には、同じエピトープに対する試験抗体と競合する候補物質の親和性が大きければ大きいほど、抗原をコーティングしたウェルに結合する抗原結合抗体の量は少なくなる。ウェルに結合した抗原結合抗体の量は、検出可能または測定可能な標識物質で抗体を標識することによって測定することができる。

20

【0145】

別の抗体、例えば本明細書に記載されている重鎖および軽鎖可変領域を含む抗体と抗原への結合を競合する抗体、または別の抗体、例えば本明細書に記載されている重鎖および軽鎖可変領域を含む抗体の抗原に対する特異性を有する抗体は、本明細書に記載されている前記重鎖および／または軽鎖可変領域の変異体、例えば本明細書に記載されているCDRにおける改変および／またはある程度の同一性を含む抗体であってもよい。

30

【0146】

第1の態様の抗体の一実施形態では、PD-1に結合する能力を有する抗体が提供され、抗体は、配列番号8のいずれか1つに記載された配列を有するか、またはそれを含む相補性決定領域3（HCDR3）を含む重鎖可変領域（VH）を含む。第1の態様の抗体の一実施形態では、PD-1に結合する能力を有する抗体が提供され、抗体は、配列番号9のいずれか1つに記載された配列を有するか、またはそれを含む相補性決定領域3（HCDR3）を含む重鎖可変領域（VH）を含む。

40

【0147】

第1の態様の抗体の一実施形態では、前記抗体の重鎖可変領域（VH）は、配列番号10のいずれか1つに記載された配列を有するか、またはそれを含む相補性決定領域2（HCDR2）を含む。一実施形態では、重鎖可変領域（VH）のHCDR2は、配列番号11のいずれか1つに記載された配列を有するか、またはそれを含む。

【0148】

第1の態様の抗体の一実施形態では、前記抗体の重鎖可変領域（VH）は、SYNから選択される配列を有するか、またはそれを含む相補性決定領域1（HCDR1）を含む。

50

一実施形態では、重鎖可変領域（VH）のHCDR1は、配列番号12のいずれか1つに記載の配列を有するか、またはそれを含む。一実施形態では、重鎖可変領域（VH）のHCDR1は、配列番号13のいずれか1つに記載された配列を有するか、またはそれを含む。

【0149】

第1の態様の抗体の一実施形態では、抗体は、配列番号8または配列番号9に記載された配列を有するかまたはそれを含むHCDR3配列を含み、好ましくは、SYN、配列番号12もしくは配列番号13に記載された配列を有するかもしくはそれを含むHCDR1配列、および／または配列番号10もしくは配列番号11に記載された配列を有するかもしくはそれを含むHCDR2配列をさらに含む重鎖可変領域（VH）を含む。

10

【0150】

第1の態様の抗体の一実施形態では、抗体は、HCDR1、HCDR2およびHCDR3配列を含む重鎖可変領域（VH）を含み、HCDR1配列は、SYN、配列番号12または配列番号13を有するかまたはそれを含む配列から選択され、HCDR2配列は、配列番号10または配列番号11を有するかまたはそれを含む配列から選択され、HCDR3配列は、配列番号8または配列番号9を有するかまたはそれを含む配列から選択される。

【0151】

第1の態様の抗体の一実施形態では、抗体は、HCDR1、HCDR2、およびHCDR3配列を含む重鎖可変領域（VH）を含み、HCDR1、HCDR2、およびHCDR3配列は、それぞれ、SYN、配列番号10、および配列番号8であるか、またはそれを含む。

20

【0152】

第1の態様の抗体の一実施形態では、抗体は、HCDR1、HCDR2、およびHCDR3配列を含む重鎖可変領域（VH）を含み、HCDR1、HCDR2、およびHCDR3配列は、それぞれ配列番号12、配列番号11、および配列番号8であるか、またはそれを含む。

【0153】

第1の態様の抗体の一実施形態では、抗体は、HCDR1、HCDR2、およびHCDR3配列を含む重鎖可変領域（VH）を含み、HCDR1、HCDR2、およびHCDR3配列は、それぞれ配列番号13、配列番号10、および配列番号9であるか、またはそれを含む。

30

【0154】

第1の態様の抗体の一実施形態では、抗体は軽鎖可変領域（VL）を有する軽鎖を含む。

【0155】

第1の態様の抗体は、好ましくは、本明細書に記載された配列を有するかまたはそれを含む相補性決定領域3（HCDR3）を含む重鎖可変領域（VH）を含むことを特徴とする。好ましい実施形態では、VHの相補性決定領域1および2がさらに明示される。一実施形態では、第1の態様のこれらの抗体は、以下のうちの少なくとも1つを含む軽鎖可変領域（VL）をさらに含む：

40

【0156】

— 配列番号14のいずれか1つに記載された配列を有するかもしくはそれを含む相補性決定領域3（LCDR3）；

— 配列QASを有するかもしくは配列QASを含む相補性決定領域2（LCDR2）。一実施形態では、軽鎖可変領域（VL）は、配列番号15のいずれか1つに記載された配列を有するかもしくはそれを含む相補性決定領域2（LCDR2）、および／または

— 配列番号16のいずれか1つに記載された配列を有するかもしくはそれを含む相補性決定領域1（LCDR1）を含む。一実施形態では、軽鎖可変領域（VL）は、配列番号17のいずれか1つに記載された配列を有するかまたはそれを含む相補性決定領域1（LCDR1）を含む。

50

【0157】

第1の態様の前記抗体の一実施形態では、抗体は、配列番号14を有するかまたはそれを含むLCDR3配列を含み、好ましくは、配列番号16もしくは配列番号17を有するかもしくはそれを含むLCDR1配列、および／または配列番号15を有するかもしくはそれを含むLCDR2配列をさらに含む軽鎖可変領域（VL）を含む。

【0158】

一実施形態では、第1の態様の抗体は、LCDR1、LCDR2およびLCDR3配列を含む軽鎖可変領域（VL）を含み、LCDR1配列は、配列番号16または配列番号17を有するかまたはそれを含む配列から選択され、LCDR2配列は、QASまたは配列番号15を有するかまたはそれを含む配列から選択され、LCDR3配列は、配列番号14を有するかまたはそれを含む配列である。

10

【0159】

一実施形態では、第1の態様の抗体は、LCDR1、LCDR2、およびLCDR3配列を含む軽鎖可変領域（VL）を含み、LCDR1、LCDR2、およびLCDR3配列は、それぞれ配列番号16、QAS、および配列番号14であるか、またはそれを含む。

【0160】

一実施形態では、第1の態様の抗体は、LCDR1、LCDR2、およびLCDR3配列を含む軽鎖可変領域（VL）を含み、LCDR1、LCDR2、およびLCDR3配列は、それぞれ配列番号17、配列番号15、および配列番号14であるか、またはそれを含む。

20

【0161】

第1の態様の抗体の一実施形態では、抗体は、HCDR1、HCDR2およびHCDR3配列を含む重鎖可変領域（VH）ならびにLCDR1、LCDR2およびLCDR3配列を含む軽鎖可変領域（VL）を含み、HCDR1、HCDR2およびHCDR3配列は、それぞれ、配列番号10および配列番号8に記載された配列SYNを含むかまたはそれを有し、LCDR1、LCDR2およびLCDR3配列は、それぞれ、配列番号16、QASおよび配列番号14に記載された配列を含むかまたはそれを有する。このような抗体の具体例としては、MAB-19-0202が挙げられるが、これらに限定されない。

【0162】

第1の態様の抗体の一実施形態では、抗体は、HCDR1、HCDR2およびHCDR3配列を含む重鎖可変領域（VH）ならびにLCDR1、LCDR2およびLCDR3配列を含む軽鎖可変領域（VL）を含み、HCDR1、HCDR2およびHCDR3配列は、それぞれ、配列番号12、配列番号11および配列番号8に記載された配列を含むかまたはそれを有し、LCDR1、LCDR2およびLCDR3配列は、それぞれ、配列番号17、配列番号15および配列番号14に記載された配列を含むかまたはそれを有する。このような抗体の具体例としては、MAB-19-0202が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0163】

第1の態様の抗体の一実施形態では、抗体は、HCDR1、HCDR2およびHCDR3配列を含む重鎖可変領域（VH）ならびにLCDR1、LCDR2およびLCDR3配列を含む軽鎖可変領域（VL）を含み、HCDR1、HCDR2およびHCDR3配列は、それぞれ、配列番号13、配列番号10および配列番号9に記載された配列を含むかまたはそれを有し、LCDR1、LCDR2およびLCDR3配列は、それぞれ、配列番号16、QASおよび配列番号14に記載された配列を含むかまたはそれを有する。このような抗体の具体例としては、MAB-19-0202が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0164】

「重鎖可変領域」（「VH」とも呼ばれる）および「軽鎖可変領域」（「VL」とも呼ばれる）という用語は、本明細書において、最も一般的な意味で使用され、フレームワーク領域（FR）とも呼ばれる他の領域が点在した相補性決定領域（CDR）を含むことが

50

できる任意の配列を含む。フレームワーク領域は、特に、V HとV Lのフォールディングおよび対合の後に、抗原結合部位を形成することができるように、とりわけ、C D Rを配置する。好ましくは、各V HおよびV Lは、3つのC D Rおよび4つのF Rから構成されており、アミノ末端からカルボキシ末端に向かって以下の順序で並んでいる：F R 1、C D R 1、F R 2、C D R 2、F R 3、C D R 3、F R 4。すなわち、「重鎖可変領域」および「軽鎖可変領域」という用語は、ネイティブ抗体または本明細書において例示されたV HおよびV L配列（配列表の配列番号18～21）に見出すことができるような配列に限定して解釈されるべきではない。これらの用語は、C D Rを含み、適切に配置することができる任意の配列、例えば、ネイティブ抗体のV LおよびV H領域に由来するような、または配列表の配列番号18～21に記載された配列に由来するような配列を含む。特に、フレームワーク領域の配列は、それぞれV HおよびV Lの特徴を失うことなく改変され得る（アミノ酸置換に関する変異体と配列長に関する変異体、すなわち挿入または欠失変異体との両方を含む）ことが当業者に理解されるであろう。好ましい実施形態では、いずれの改変もフレームワーク領域に限定される。しかし、C D R領域、超可変領域および可変領域もP D-1に結合する能力を失うことなく改変され得るという事実を当業者はよく知っている。例えば、C D R領域は、本明細書で明示される領域と同一であるか、または高度に相同である。「高度に相同な」によって、C D Rにおいて1～5個、好ましくは1～4個、例えば1～3個または1～2個の置換がなされ得ることが企図される。さらに、超可変領域および可変領域は、本明細書で具体的に開示される領域と実質的な相同性を示すように改変されてもよい。

10

20

【0165】

本明細書で明示されるC D Rは、2つの異なるC D R特定法を使用して特定される。本明細書で使用される第1の番号付けスキームはKabat (Wu and Kabat, 1970; Kabat et al., 1991) によるものであり、第2のスキームはI M G T番号付け (Lefranc, 1997; Lefranc et al., 2005) である。第3のアプローチでは、両方の特定スキームの共通部分が使用されている。

【0166】

第1の態様の抗体の一実施形態では、抗体は、1つ以上のC D Rを含み、本明細書に記載されているC D RのセットまたはC D Rのセットの組合せは、それらの介在するフレームワーク領域（本明細書においてフレーミング領域またはF Rとも呼ばれる）と共に、または前記フレームワーク領域の一部と共に前記C D Rを含む。好ましくは、その部分は、第1のフレームワーク領域と第4フレームワーク領域のいずれかまたは両方の少なくとも約50%を含み、その50%は、第1フレームワーク領域のC末端の50%および第4フレームワーク領域のN末端の50%である。組換えD N A技術によって作製される第1の態様の抗体の構築は、クローニングまたは他の操作工程を容易にするために導入されるリンカーによってコードされる可変領域へのN末端またはC末端の残基の導入をもたらす可能性があり、これには、本開示の可変領域を、免疫グロブリン重鎖、他の可変ドメイン（例えば、ダイアボディの生成において）またはタンパク質標識を含むさらなるタンパク質配列に接合するためのリンカーの導入が含まれる。

30

【0167】

第1の態様の抗体の一実施形態では、抗体は、配列番号18のいずれか1つに記載されたV H配列のアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、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97%、少なくとも99%、または100%の同一性を有する配列を含む重鎖可変領域（V H）を含む。

40

【0168】

重鎖可変領域（V H）は、好ましくは、それぞれ、配列番号8～13のいずれか1つに記載された配列を有するかもしくはそれを含む、または配列S Y Nを有する抗体重鎖可変領域のC D R配列のうちの少なくとも1つ、より好ましくは2つ、さらにより好ましくは3つすべてを含む。

50

【0169】

第1の態様の抗体の一実施形態では、抗体は、重鎖可変領域（VH）を含み、VHは、配列番号18のいずれか1つに記載された配列を含む。

【0170】

第1の態様の抗体の一実施形態では、抗体は、配列番号19のいずれか1つに記載されたVL配列のアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、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97%、少なくとも99%、または100%の同一性を有する配列を含む軽鎖可変領域（VL）を含む。

【0171】

軽鎖可変領域（VL）は、好ましくは、それぞれ、配列番号14～17のいずれか1つに記載された配列を有するかもしくはそれを含む、または配列QASを有する抗体軽鎖可変領域のCDR配列の少なくとも1つ、より好ましくは2つ、さらにより好ましくは3つすべてを含む。

【0172】

第1の態様の抗体の一実施形態では、抗体は、軽鎖可変領域（VL）を含み、VLは、配列番号19のいずれか1つに記載された配列を含む。

【0173】

第1の態様の抗体の一実施形態では、抗体は重鎖可変領域（VH）および軽鎖可変領域（VL）を含み、VHは配列番号18に記載された配列を含むかまたはそれを有し、VLは配列番号19に記載された配列を含むかまたはそれを有する。このような抗体の具体例としては、MAB-19-0202が挙げられるが、これらに限定されない。また、本開示に包含されるのは、前記重鎖可変領域（VH）および前記軽鎖可変領域（VL）の変異体、ならびにこれらの変異体VHおよびVLのそれぞれの組合せである。

【0174】

第1の態様の抗体は、ウサギ、マウス、ラット、モルモットおよびヒトを含むがこれらに限定されない様々な種に由来し得る。抗体は、ポリクローナルであってもモノクローナルであってもよい。一実施形態または好ましい実施形態では、第1の態様の抗体はモノクローナルである。第1の態様の抗体は、一実施形態では、1つの種、好ましくはヒトに由来する抗体定常領域が、別の種に由来する抗原結合部位と組み合わせられる、キメラ分子を含んでもよい。一実施形態では、抗体はモノクローナルキメラ抗体であり、定常領域は、好ましくは、ヒト免疫グロビン（immunoglobulin）定常部分、例えば、ヒトIgG1/κ定常部分である。さらに、一実施形態では、第1の態様の抗体はヒト化分子、好ましくはモノクローナルヒト化分子を含み、ここで、非ヒト種に由来する抗体の抗原結合部位は、ヒト起源の定常領域およびフレームワーク領域と組み合わせられている。一実施形態では、第1の態様の抗体は、1つ以上のCDRを含み、本明細書に記載されているCDRのセットまたはCDRのセットの組合せは、ヒト抗体フレームワーク中に前記CDRを含む。一実施形態または好ましい実施形態では、第1の態様の抗体はモノクローナルヒト化抗体であり、定常領域は、好ましくはヒト免疫グロビン定常部分、例えばヒトIgG1/κ定常部分である。

【0175】

第1の態様の抗体の一実施形態では、抗体は、配列番号20のいずれか1つに記載されたVH配列のアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、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97%、少なくとも99%、または100%の同一性を有する配列を含む重鎖可変領域（VH）を含む。一実施形態では、抗体は、重鎖可変領域（VH）を含み、VHは、配列番号20のいずれか1つに記載された配列を含む。一実施形態では、抗体は、配列番号21のいずれか1つに記載されたVL配列のアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、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97%、少なくとも99%、または100%の同一性を有する配列を含む軽鎖可変領

10

20

30

40

50

域（V L）を含む。一実施形態では、抗体は、軽鎖可変領域（V L）を含み、V Lは、配列番号21のいずれか1つに記載された配列を含む。

【0176】

第1の態様の抗体の一実施形態では、抗体は重鎖可変領域（V H）および軽鎖可変領域（V L）を含み、V Hは配列番号20に記載された配列を含むかもしくはそれを有し、V Lは配列番号21に記載された配列を含むかもしくはそれを有し、またはこれらの配列のそれぞれの変異体を含むかもしくは有する。第1の態様の抗体の別の例は、配列番号20に記載された配列、またはその変異体を含むかまたはそれを有するV H、および配列番号21に記載された配列、またはその変異体を含むかまたはそれを有するV Lを含み得る。このような抗体の具体例としては、M A B - 1 9 - 0 6 1 8が挙げられるが、これらに限定されない。抗体M A B - 1 9 - 0 6 1 8は、M A B - 1 9 - 0 2 0 2に由来している。また、本開示に包含されるのは、前記重鎖可変領域（V H）および前記軽鎖可変領域（V L）の変異体、ならびにこれらの変異体V HおよびV Lのそれぞれの組合せである。

10

【0177】

第1の態様の抗体の一実施形態では、抗体は重鎖および軽鎖を含み、その重鎖は、配列番号2または55に記載された配列を含むかまたはそれを有する重鎖定常領域、および配列番号20に記載された配列を含むかまたはそれを有する重鎖可変領域（V H）を含み、その軽鎖は、配列番号6に記載された配列を含むかまたはそれを有する軽鎖定常領域、および配列番号21に記載された配列を含むかまたはそれを有する軽鎖可変領域（V L）を含む。

20

【0178】

第1の態様の抗体の一実施形態では、抗体は重鎖および軽鎖を含み、その重鎖は、配列番号2または55に記載された配列を含むかまたはそれを有する重鎖定常領域、ならびに配列番号20に記載された配列のC D R 1、C D R 2およびC D R 3配列を含む重鎖可変領域（V H）を含み、その軽鎖は、配列番号6に記載された配列を含むかまたはそれを有する軽鎖定常領域、ならびに配列番号21に記載された配列のC D R 1、C D R 2およびC D R 3配列を含む軽鎖可変領域を含む。例えば、C D R 1、C D R 2およびC D R 3配列は、本明細書に明示されている通りである。

【0179】

第1の態様のモノクローナルキメラ抗体（M A B - 1 9 - 0 2 0 2）およびモノクローナルヒト化抗体の具体例を参照すると、それぞれの配列は実施例の表3、4、6および7に示されている。例示的なヒト化抗体M A B - 1 9 - 0 6 1 8は、M A B - 1 9 - 0 2 0 2のヒト化変異体である。

30

【0180】

第1の態様の抗体の一実施形態では、抗体はモノクローナルキメラ抗体、モノクローナルヒト化抗体、またはこのような抗体の断片である。抗体は、例えば二特異性抗体を含む全抗体またはその抗原結合断片であり得る。さらに、抗原結合断片は、（i）免疫グロブリンヒンジ領域ポリペプチドに融合した結合ドメインポリペプチド（重鎖可変領域または軽鎖可変領域など）、（i i）ヒンジ領域に融合した免疫グロブリン重鎖C H 2定常領域、および（i i i）C H 2定常領域に融合した免疫グロブリン重鎖C H 3定常領域を含む結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質を含み得る。このような結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質は、米国特許出願第2003/0118592号および同第2003/0133939号にさらに開示されている。

40

【0181】

第1の態様の抗体の一実施形態では、抗体またはその抗原結合部分は、少なくとも2つの重鎖および少なくとも2つの軽鎖を含み、抗体は、同じ重鎖および／または同じ軽鎖、例えば、本明細書において上記または以下に明示されている重鎖および／または軽鎖を含む。例えば、第1の態様の抗体は、配列番号20および配列番号2もしくは55、またはこれらの配列のそれぞれの変異体に記載された配列を有する2つの重鎖、ならびに配列番号21および配列番号6、またはこれらの配列のそれぞれの変異体に記載された配列を有

50

する2つの軽鎖を含み得る。

【0182】

第1の態様の抗体の一実施形態では、前記抗体へのC1qの結合が野生型抗体と比較して低下するように、好ましくは少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、または100%低下するように、1つ以上の、好ましくは両方の重鎖定常領域が改変されている。一実施形態では、C1q結合はELISAによって決定することができる。

【0183】

本明細書において「野生型」または「WT」または「ネイティブ」とは、対立遺伝子変異体を含め、自然界に見出されるアミノ酸配列を意味する。野生型アミノ酸配列、ペプチドまたはタンパク質は、意図的に改変されていないアミノ酸配列を有する。

【0184】

第1の態様の抗体の一実施形態では、抗体へのIgG Fc-ガンマ受容体のうちの1つ以上への結合が野生型抗体と比較して低下するように、好ましくは少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、または100%低下するように、1つ以上の、好ましくは両方の重鎖定常領域が改変されている。一実施形態では、1つ以上のIgG Fc-ガンマ受容体は、Fc-ガンマRI、Fc-ガンマRII、およびFc-ガンマRIIIのうちの少なくとも1つから選択される。一実施形態では、IgG Fc-ガンマ受容体は、Fc-ガンマRIである。

【0185】

第1の態様の抗体の一実施形態では、抗体は、Fc-ガンマRI媒介性エフェクター機能を誘導することができないか、または誘導されたFc-ガンマRI媒介性エフェクター機能は、野生型抗体と比較して低下しており、好ましくは少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%または100%低下している。

【0186】

第1の態様の抗体の一実施形態では、抗体は、補体依存性細胞傷害(CDC)媒介性溶解、抗体依存性細胞傷害(ADCC)媒介性溶解、アポトーシス、ホモ型接着および／もしくは貪食のうちの少なくとも1つを誘導することができないか、または補体依存性細胞傷害(CDC)媒介性溶解、抗体依存性細胞傷害(ADCC)媒介性溶解、アポトーシス、ホモ型接着および／もしくは貪食のうちの少なくとも1つが、低下した程度で、好ましくは少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%または100%低下して誘導される。

【0187】

抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性は、本明細書において「ADCC」とも呼ばれる。ADCCは、本明細書に記載されているエフェクター細胞、特にリンパ球の殺細胞能力を表し、好ましくは標的細胞が抗体によってマークされることを必要とする。

【0188】

ADCCは、抗体が腫瘍細胞上の抗原に結合し、抗体のFcドメインが免疫エフェクター細胞表面のFc受容体(FcR)に係合する場合に起こる。Fc受容体のいくつかのファミリーが特定されており、特定の細胞集団が定義されたFc受容体を発現するのが特徴的である。ADCCは、抗原提示および腫瘍指向性T細胞応答の誘導につながる、種々の即時的腫瘍破壊を直接誘導するメカニズムと考えることができる。好ましくは、ADCCのインビボ誘導は、腫瘍指向性T細胞応答と宿主由来の抗体応答をもたらす。

【0189】

補体依存性細胞傷害性は、本明細書において「CDC」とも呼ばれる。CDCは、抗体によって導かれる別の細胞殺傷法である。IgMは補体活性化に最も効果的なアイソタイプである。IgG1およびIgG3もまた、古典的補体活性化経路を介してCDCを導くに非常に有効である。好ましくは、このカスケードでは、抗原抗体複合体の形成により、IgG分子などの関与する抗体分子のCH2ドメイン上の近接した複数のC1q結合部

10

20

30

40

50

位のアンクローキング (uncloaking) をもたらす (C1q は補体 C1 の 3 つのサブコンポーネントの 1 つである)。好ましくは、これらのアンクローキング C1q 結合部位は、以前の低親和性 C1q-IgG 相互作用を高アビディティのものに変換し、これが一連の他の補体タンパク質に關与する事象のカスケードを誘因し、エフェクター細胞活性化／活性化作用因子 C3a および C5a のタンパク質分解性放出をもたらす。好ましくは、補体カスケードは、膜攻撃複合体の形成で終わり、この複合体は細胞膜に孔を作出し、水および溶質の細胞内外への自由な通過を容易にし、アポトーシスを引き起こし得る。

【0190】

第 1 の態様の抗体の一実施形態では、抗体は、エフェクター機能が低下または枯渇している。一実施形態では、抗体は ADCc もしくは CDC、またはその両方を媒介しない。

10

【0191】

第 1 の態様の抗体の一実施形態では、抗体の 1 つ以上、好ましくは両方の重鎖定常領域は、野生型抗体と比較して、抗体への新生児 Fc 受容体 (FcRn) の結合が影響を受けないように改変されている。

【0192】

第 1 の態様の抗体の一実施形態では、抗体が結合できる PD-1 はヒト PD-1 である。一実施形態では、PD-1 は、配列番号 22 もしくは配列番号 23 に記載されたアミノ酸配列を有するかもしくはそれを含み、または PD-1 のアミノ酸配列は、配列番号 22 もしくは配列番号 23 に記載されたアミノ酸配列に対して少なくとも 70%、少なくとも 75%、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 97%、少なくとも 99%、もしくは 100% の同一性を有するか、またはその免疫原性断片である。一実施形態では、抗体は、生細胞表面に存在する PD-1 のネイティブエピトープに結合する能力を有する。

20

【0193】

第 1 の態様の抗体は、従来の化学療法剤、あるいは例えば、腫瘍抗原を標的とする他の抗体を用い、それによって、これらの腫瘍細胞に対する免疫応答を誘導するか、または他のチェックポイント阻害剤もしくは活性化剤または血管新生阻害剤を用いることによって、腫瘍を攻撃する他の免疫療法と相乗的に使用することができる。

【0194】

II. 抗体の産生

30

第 1 の態様の抗体は、従来のモノクローナル抗体の方法論、例えば、Kohler and Milstein, Nature 256: 495 (1975) の標準的な体細胞ハイブリダイゼーション技法を含む種々の技法によって産生され得る。体細胞ハイブリダイゼーションの手順が好ましいが、原理的には、モノクローナル抗体を産生するための他の技法、例えば、B リンパ球のウイルスもしくはがん原性形質転換または抗体遺伝子のライブラリーを使用するファージディスプレイ技法を用いることができる。

【0195】

モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマの調製に好ましい動物系はマウス系である。マウスにおけるハイブリドーマ産生は非常に確立された手順である。免疫化プロトコールおよび免疫化脾細胞を融合用に単離する技術は当技術分野で公知である。融合パートナー (例えば、マウス骨髄腫細胞) および融合手順も公知である。

40

【0196】

モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを調製するための他の好ましい動物系は、ラットおよびウサギ系である [例えば、Spieker-Polet et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:9348 (1995) に記載されており、また Rossi et al., Am. J. Clin. Pathol. 124: 295 (2005) も参照されたい]。

【0197】

さらに別の好ましい実施形態では、PD-1 に対するヒトモノクローナル抗体は、マウス系ではなくヒト免疫系の一部を有するトランスジェニックマウスまたはトランス染色体マウスを使用して生成することができる。これらのトランスジェニックマウスおよびトラ

50

ンス染色体マウスには、それぞれHuMAbマウスおよびKMマウスとして知られるマウスが含まれ、本明細書においてこれらを総称して「トランスジェニックマウス」と呼ぶ。このようなトランスジェニックマウスにおけるヒト抗体の産生は、国際公開第2004/035607号にCD20について詳細に記載されているように行うことができる。

【0198】

モノクローナル抗体を生成するためのまた別の戦略は、定義された戦略の抗体を産生するリンパ球から抗体をコードする遺伝子を直接単離することであり、例えば、Babcock et al., 1996; A novel strategy for generating monoclonal antibodies from single, isolated lymphocytes producing antibodies of defined strategyを参照されたい。組換え抗体工学の詳細についてはWelschof and Kraus, Recombinant antibodies for cancer therapy ISBN-0-89603-918-8およびBenny K.C. Lo Antibody Engineering ISBN 1-58829-092-1も参照されたい。

10

【0199】

免疫化

PD-1に対する抗体を生成するために、動物、例えばウサギまたはマウスを、PD-1配列に由来する担体がコンジュゲートしたペプチド、組換え発現PD-1抗原もしくははその断片の濃縮調製物、および／またはPD-1を発現する細胞で、記載したように免疫化することができる。あるいは、ウサギまたはマウスを、全長ヒトPD-1またはその断片をコードするDNAで免疫化することもできる。PD-1抗原の精製調製物または濃縮調製物を使用する免疫化によって抗体が得られない事象では、免疫応答を促進するために、ウサギまたはマウスをPD-1を発現する細胞、例えば細胞系で免疫化することもできる。

20

【0200】

尾静脈または後眼窩出血により血漿および血清試料を採取して、免疫化プロトコールの経過にわたり免疫応答をモニターすることができる。十分な抗PD-1免疫グロブリン力価を有するウサギまたはマウスを融合に使用することができる。ウサギまたはマウスを、

殺して脾臓を摘出する3日前に、PD-1発現細胞を用いて腹腔内または静脈内にブーストすることにより、特異性抗体を分泌するハイブリドーマの割合を増加させることができる。

【0201】

30

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの生成

PD-1に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを生成するために、免疫化した動物、例えばウサギまたはマウスから脾臓細胞およびリンパ節細胞を単離し、適切な不死化細胞系、例えばマウスまたはウサギの骨髓腫細胞系と融合させることができる。次いで、得られたハイブリドーマを抗原特異性抗体の産生についてスクリーニングすることができる。次いで、抗体を分泌するハイブリドーマについて、個々のウェルをELISAでスクリーニングすることができる。PD-1発現細胞を使用する免疫蛍光法およびFACS解析により、PD-1に対する特異性を有する抗体を特定することができる。抗体分泌ハイブリドーマを複製し、再度スクリーニングし、それでも抗PD-1モノクローナル抗体が陽性であれば、限界希釈によりサブクロニングすることができる。次いで、安定なサブクローンをインビトロで培養し、組織培養媒体中で抗体を生成し、特徴付けることができる。

40

【0202】

モノクローナル抗体を産生するトランスフェクトーマの生成

第1の態様の抗体はまた、例えば、当技術分野で周知である組換えDNA技法および遺伝子トランスフェクション法の組合せを使用して、宿主細胞トランスフェクトーマにおいて産生することができる[Morrison, S. (1985) Science 229: 1202]。

【0203】

「トランスフェクトーマ」という用語には、本明細書で使用される場合、抗体を発現する組換え真核宿主細胞、例えばCHO細胞、NS/O細胞、HEK293細胞、HEK2

50

93T細胞、HEK293T/17植物細胞、または酵母細胞を含む真菌類が含まれる。
【0204】

例えば、一実施形態では、目的の遺伝子、例えば抗体遺伝子を、発現ベクター、例えば、国際公開第87/04462号、同第89/01036号および欧州特許第338841号に開示されたGS遺伝子発現系または当技術分野で周知の他の発現系において使用されるような真核生物発現プラスミドにライゲーションすることができる。クローニングされた抗体遺伝子を有する精製プラスミドは、CHO細胞、NS/O細胞、Sp2/O細胞、COS細胞、Vero細胞、HeLa細胞、HEK293T細胞、HEK293T/17細胞もしくはHEK293細胞などの真核宿主細胞、または植物由来細胞、真菌細胞もしくは酵母細胞などの他の真核細胞に導入することができる。これらの遺伝子を導入するために使用される方法は、エレクトロポレーション、リポフェクション、リポフェクタミンなどの当技術分野で記載されている方法であり得る。これらの抗体遺伝子を宿主細胞に導入した後、抗体を発現する細胞を特定し、選択することができる。これらの細胞はトランスフェクターであり、発現レベルに関して増幅され、抗体を産生するためにスケールアップされ得る。組換え抗体は、これらの培養上清および／または細胞から単離および精製され得る。

10

【0205】

あるいは、クローニングされた抗体遺伝子は、微生物、例えば大腸菌（*E. coli*）などの原核細胞を含む他の発現系で発現させることもできる。さらに、抗体はトランスジェニック非ヒト動物、例えばヒツジおよびウサギの乳中もしくは雌鶏の卵中、またはトランスジェニック植物中で産生することができる；例えば、Verma, R., et al. (1998) *J. Immunol. Meth.* 216: 165-181; Pollock, et al. (1999) *J. Immunol. Meth.* 231: 147-157; およびFischer, R., et al. (1999) *Biol. Chem.* 380: 825-839を参照されたい。

20

【0206】

本明細書に記載のアミノ酸配列の変異体は、当業者によって、例えば組換えDNA操作によって容易に調製され得る。置換、付加、挿入または欠失を有するタンパク質およびペプチドを調製するためのDNA配列の操作は、例えば、Sambrook et al. (1989)に詳細に記載されている。

【0207】

第1の態様の抗体はまた、当業者に周知の組換えDNA技法を使用して、RNAウイルスなどの遺伝子改変ウイルス中で産生することもできる。抗体またはその断片を発現するウイルス粒子のレスキューに使用することができる組換えウイルスゲノムは、例えば「リバースジェネティクス」と呼ばれる方法によって得ることができる。

30

【0208】

インタクト抗体を発現させるための部分抗体配列の使用（すなわち、ヒト化およびキメラ化）。

a) キメラ化

マウスまたはウサギのモノクローナル抗体は、ヒトの治療用抗体として使用することができるが、これらの抗体はヒトにおいて繰り返し適用すると免疫原性が高くなり、治療効果の低下につながる可能性がある。主な免疫原性は重鎖定常領域によって媒介される。マウス抗体またはウサギ抗体のヒトにおける免疫原性は、それぞれの抗体がキメラ化またはヒト化されていれば、低下し得るかまたは完全に回避され得る。キメラ抗体とは、この異なる部分が異なる動物種に由来する抗体であり、例えば、マウスまたはウサギの抗体に由来する可変領域およびヒト免疫グロブリン定常領域を有する抗体である。抗体のキメラ化は、マウスまたはウサギの抗体重鎖および軽鎖の可変領域とヒトの重鎖および軽鎖の定常領域との接合によって達成される（例えば、Kraus et al., in *Methods in Molecular Biology series, Recombinant antibodies for cancer therapy*, ISBN-0-89603-918-8に記載されている）。好ましい実施形態では、キメラ抗体はヒトカップー軽鎖定常領域をマウスまたはウサギ軽鎖可変領域に接合させることによって作成される。

40

50

またさらに好ましい実施形態では、キメラ抗体は、ヒトラムダー軽鎖定常領域をマウスまたはウサギの軽鎖可変領域に接合させることによって作成することができる。キメラ抗体の作成に好ましい重鎖定常領域は、I g G 1、I g G 3およびI g G 4である。キメラ抗体の作成に好ましい他の重鎖定常領域は、I g G 2、I g A、I g DおよびI g Mである。

【0209】

b) ヒト化

抗体は、主に6つの重鎖および軽鎖の相補性決定領域(CDR)に位置するアミノ酸残基を介して標的抗原と相互作用する。このため、CDR内のアミノ酸配列は、CDR外の配列よりも、個々の抗体間でより多様である。CDR配列はほとんどの抗体-抗原相互作用を担っているため、特定の天然に存在する抗体由来のCDR配列を、異なる特性を有する異なる抗体由来のフレームワーク配列にグラフトした発現ベクターを構築することによって、特定の天然に存在する抗体の特性を模倣した組換え抗体を発現させることが可能である[例えば、Riechmann, L. et al. (1998) *Nature* 332: 323-327; Jones, P. et al. (1986) *Nature* 321: 522-525; および Queen, C. et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86: 10029-10033を参照されたい]。このようなフレームワーク配列は、生殖細胞系列の抗体遺伝子配列を含む公共のDNAデータベースから得ることができる。これらの生殖細胞系列の配列は、B細胞の成熟過程でV(D)J接合によって形成される、完全にアセンブルされた可変遺伝子を含まないため、成熟抗体遺伝子配列とは異なる。生殖細胞系列遺伝子配列はまた、高親和性二次レパートリー抗体の配列とは、可変領域にわたって均等に異なる。例えば、体細胞突然変異はフレームワーク領域1のアミノ末端部分およびフレームワーク領域4のカルボキシ末端部分には比較的少ない。さらに、多くの体細胞変異は抗体の結合特性を大きく変化させない。このため、元の抗体と同様の結合特性を有するインタクト組換え抗体を再現するために、特定の抗体のDNA配列全体を入手する必要はない(国際公開第99/45962号を参照されたい)。CDR領域にまたがる重鎖および軽鎖の部分配列は、典型的には、この目的に十分である。部分配列を使用して、どの生殖細胞系列の可変遺伝子セグメントおよび接合遺伝子セグメントが組み換え抗体可変遺伝子に寄与したかを決定する。その後、生殖細胞系列の配列は可変領域の欠損部分を埋めるために使用される。重鎖および軽鎖のリーダー配列はタンパク質の成熟過程で切断され、最終的な抗体の特性には寄与しない。欠損した配列を付加するために、クローニングしたcDNA配列をライゲーションまたはPCR増幅によって合成オリゴヌクレオチドと組み合わせることができる。あるいは、可変領域全体を、重複する短いオリゴヌクレオチドのセットとして合成し、PCR増幅によって組み合わせ、完全に合成された可変領域クローンを作成することができる。このプロセスは、特定の制限部位の排除もしくは包含、または特定のコドンの最適化などのある特定の利点を有する。

【0210】

ハイブリドーマからの重鎖および軽鎖転写物のヌクレオチド配列は、天然配列と同一のアミノ酸コード能を有する合成V配列を作成するために、合成オリゴヌクレオチドの重複セットを設計するために使用される。合成重鎖および軽鎖配列は3つの点で天然配列と異なる可能性がある: 反復ヌクレオチド塩基の文字列はオリゴヌクレオチド合成およびPCR増幅を容易にするために中断される; 最適翻訳開始部位はKozakの規則に従って組み込まれる(Kozak, 1991, *J. Biol. Chem.* 266: 19867-19870); ならびにHindIII部位は翻訳開始部位の上流で操作される。

【0211】

重鎖可変領域と軽鎖可変領域の両方について、最適化されたコード鎖配列および対応する非コード配列は、対応する非コードオリゴヌクレオチドのほぼ中間点で30~50ヌクレオチドに分解される。こうして、各鎖について、オリゴヌクレオチドは150~400ヌクレオチドのセグメントにまたがる重複する二本鎖セットにアセンブルされ得る。このプールは、150~400ヌクレオチドのPCR増幅産物を産生するための鋳型として使用される。典型的には、単一の可変領域オリゴヌクレオチドのセットは2つのプールに分

解され、これらは別々に増幅され、2つの重複するPCR産物が生成される。次いで、これらの重複する産物はPCR増幅によって組み合わせられ、完全な可変領域を形成する。発現ベクター構築物に容易にクローニングできる断片を生成するために、重鎖または軽鎖の定常領域の重複断片をPCR増幅に含めることも望ましい場合がある。

【0212】

次いで、再構築されたキメラ化またはヒト化重鎖および軽鎖の可変領域は、クローニングされたプロモーター配列、リーダー配列、翻訳開始配列、定常領域配列、3'非翻訳配列、ポリアデニル化配列、および転写終結配列と組み合わせられ、発現ベクター構築物を形成する。重鎖および軽鎖の発現構築物は、単一のベクターに組み合わせられ、宿主細胞中にコトランスフェクト、連続トランスフェクト、または別々にトランスフェクトされた後、融合して両鎖を発現する宿主細胞を形成することができる。ヒトIgGκの発現ベクターの構築に使用するプラスミドは当業者に入手可能である。プラスミドは、PCRで増幅されたV重鎖およびVカッパ軽鎖のcDNA配列を使用して完全な重鎖および軽鎖ミニジーンを再構築するように構築することができる。これらのプラスミドを使用して、完全なヒト抗体、またはキメラIgG1カッパ抗体、またはIgG4カッパ抗体を発現させることができる。同様のプラスミドは、他の重鎖アイソタイプの発現、またはラムダ軽鎖を含む抗体の発現のために構築され得る。

【0213】

よって、本開示によれば、第1の態様の抗PD-1抗体の構造的特徴を使用して、PD-1への結合など、第1の態様の抗体の少なくとも1つの機能的特性を保持する、構造的に関連するヒト化抗PD-1抗体を作成することができる。より詳細には、本明細書で開示されている1つ以上のCDR領域を、既知のヒトフレームワーク領域およびCDRと組換えによって組み合わせ、第1の態様の、さらなる組換えにより操作されたヒト化抗PD-1抗体を作成することができる。

【0214】

第1の態様の抗体は、動物、例えばトランスジェニックマウスを、配列番号22もしくは配列番号23に記載されたアミノ酸配列を有するタンパク質もしくはペプチド、またはそれらの免疫原性断片、または前記タンパク質もしくはペプチド、またはそれらの免疫原性断片を発現する核酸もしくは宿主細胞もしくはウイルスで免疫化する工程を含む方法によって得ることができる。好ましくは、このようにして得られた抗体は、前述のタンパク質、ペプチドまたはそれらの免疫原性断片に対して特異的である。核酸または宿主細胞またはウイルスは、本明細書で開示されている核酸または宿主細胞またはウイルスであってよい。

【0215】

本開示はまた、上記のように非ヒト動物から単離されたB細胞を提供する。次いで、単離されたB細胞は、不死化細胞との融合によって不死化され、第1の態様の抗体の供給源（例えば、ハイブリドーマ）を提供することができる。このようなハイブリドーマ（すなわち、第1の態様の抗体を産生する）も本開示の範囲に含まれる。

【0216】

よって、第2の態様では、第1の態様の抗体を産生することが可能なハイブリドーマが提供される。本明細書で例示するように、第1の態様の抗体は、抗体を発現するハイブリドーマから直接得ることも、クローン化して宿主細胞（例えば、CHO細胞、またはリンパ球細胞）において組換え発現させることもできる。あるいは、トランスジェニック非ヒト動物または植物において組換え生産することもできる。

【0217】

III. 抗体の特徴付け
抗原発現細胞への結合

PD-1に結合する、および／またはPD-1／リガンド相互作用を遮断する抗体の能力は、実施例に記載されたものなどの標準的な結合アッセイ、レポーター遺伝子遮断アッセイ、T細胞増殖アッセイなどを使用して決定することができる。

【0218】

抗体の結合の特徴付け

抗PD-1抗体を精製するために、選択されたハイブリドーマをモノクローナル抗体精製の2リットルスピナーフラスコにおいて成長させることができる。あるいは、透析ベースのバイオリアクターにおいて抗PD-1抗体を産生することができる。上清をろ過し、必要に応じて濃縮した後、プロテインG-セファロースまたはプロテインA-セファロースを用いるアフィニティークロマトグラフィーにかけることができる。溶出したIgGは、ゲル電気泳動および高速液体クロマトグラフィーによってチェックし、純度を確認することができる。緩衝溶液をPBSに交換し、1.43の消光係数を使用してOD280で濃度を決定することができる。モノクローナル抗体をアリコートし、-80℃で保存することができる。選択された抗PD-1モノクローナル抗体が固有のエピトープに結合するかどうかを決定するために、部位特異的または多部位特異的突然変異誘発を使用することができる。

10

【0219】

PD-1結合特異性の決定

抗PD-1抗体のPD-1に対する結合効力はELISA技法によって決定することができる。例えば、PD-1/Fcキメラをマイクロタイタープレートにコーティングすることができる。ブロッキング後、試験される抗PD-1抗体を加えてインキュベートすることができる。その後、洗浄手順を行った後、検出のために、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼにカップリングした抗ヒトIgGを添加することができる。

20

【0220】

細胞表面に発現したPD-1に対する抗PD-1抗体の結合能力は、PD-1を異所的に発現しているHEK-293細胞を使用して解析することができる。抗PD-1抗体を様々な濃度でこれらの細胞に添加し、インキュベートすることができる。次いで、蛍光タグをコンジュゲートさせた抗Ig抗体を添加し、細胞関連の免疫蛍光シグナルを記録することができる。

【0221】

遮断能力の決定

PD-1/PD-L1相互作用を遮断する抗PD-1抗体の効力は、PD-1/PD-L1遮断バイオアッセイを使用して解析することができる。PD-L1を発現する細胞を、試験される抗体と様々な濃度でインキュベートすることができる。PD-1発現エフェクター細胞を添加し、こうして得られた混合物をインキュベートした後、例えば、ルシフェラーゼアッセイ試薬を添加し、ルミネセンスを決定することができる。PD-1/PD-L1遮断バイオアッセイ(Promega、カタログ番号J12150)、または同等のキットを、製造業者が説明した通り使用してよい。

30

【0222】

PD-1/PD-L1軸が活性な抗原特異的アッセイにおいてT細胞増殖を誘導する抗PD-1抗体の能力を特徴付けるために、腫瘍抗原を発現する樹状細胞(DC)が実施され得る。このようなアッセイは、非限定的な方法で、以下の実施例5に詳述されている。

【0223】

フローサイトメトリー解析および免疫蛍光顕微鏡法

免疫動物の血清中に抗PD-1抗体が存在すること、またはPD-1を発現する生細胞にモノクローナル抗体が結合することを実証するために、フローサイトメトリーまたは免疫蛍光顕微鏡解析を当業者に周知の方法でを使用することができる。

40

【0224】

エピトープマッピング

第1の態様の抗体によって認識されるエピトープのマッピングは、"Epitope Mapping Protocols", Methods in Molecular Biology by Glenn E. Morris ISBN-0 89603-375-9および"Epitope Mapping: A Practical Approach", Practical Approach Series, 248 by Olwyn M. R. Westwood, Frank C. Hayに詳細に記載

50

されているように実施することができる。

【0225】

IV. PD-1に結合する二特異性／多特異性抗体

第1の態様の抗体の一実施形態では、PD-1に対する抗体を別の機能性分子、例えば別のペプチドまたはタンパク質（例えばFab'断片）に誘導体化または連結させて、複数の結合部位または標的エピトープに結合する二特異性または多特異性分子を生成することができる。例えば、第1の態様の抗体は、機能的に（例えば、化学的カップリング、遺伝子融合、非共有結合による会合などによって）、1つ以上の他の結合分子、例えば別の抗体、ペプチドまたは結合模倣体に連結させることができる。

【0226】

したがって、本開示には、PD-1に対する少なくとも1つの第1の結合特異性および第2の標的エピトープ（またはさらなる標的エピトープ）に対する第2の結合特異性（またはさらなる結合特異性）を含む二特異性および多特異性分子が含まれる。

【0227】

第1の態様の抗体の一実施形態では、抗体は、PD-1に結合する第1の抗原結合領域、および別の抗原に結合する少なくとも1つのさらなる抗原結合領域を含む多特異性抗体である。一実施形態では、抗体は、PD-1に結合する第1の抗原結合領域、および別の抗原に結合する第2の抗原結合領域を含む二特異性抗体である。

【0228】

「二特異性分子」という用語は、2つの異なる結合特異性を有する任意の薬剤、例えばタンパク質、ペプチド、タンパク質またはペプチドの複合体を含むことが意図される。例えば、分子は、(a)細胞表面抗原、および(b)エフェクター細胞表面上のFc受容体に結合するか、またはそれと相互作用する場合がある。「多特異性分子」または「異種特異性分子」という用語は、2つより多い異なる結合特異性を有する任意の薬剤、例えば、タンパク質、ペプチド、またはタンパク質もしくはペプチドの複合体を含むことが意図される。例えば、分子は、(a)細胞表面抗原、(b)エフェクター細胞表面上のFc受容体、および(c)少なくとも1つの他の構成要素に結合するか、またはそれと相互作用する場合がある。したがって、本開示は、PD-1、およびエフェクター細胞上のFc受容体などの他の標的に向けられる二特異性、三特異性、四特異性、および他の多特異性分子を含むが、これらに限定されない。「二特異性抗体」という用語には、ダイアボディも含まれる。ダイアボディとは、VHドメインおよびVLドメインが単一のポリペプチド鎖上に発現しているが、同一鎖上の2つのドメイン間を対合させるには短すぎるリンカーを使用することにより、ドメインを別の鎖の相補的なドメインと対合させ、2つの抗原結合部位を形成する二価の二特異性抗体である[例えば、Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994) Structure 2: 1121-1123を参照されたい]。

【0229】

本明細書で使用される場合、「ヘテロ抗体」という用語は、2つ以上の抗体、その誘導体、または抗原結合領域が連結したものを指し、そのうちの少なくとも2つは異なる特異性を有する。これらの異なる特異性には、エフェクター細胞上のFc受容体に対する結合特異性、および標的細胞、例えば腫瘍細胞上の抗原またはエピトープに対する結合特異性が含まれる。

【0230】

第1の態様の抗体の一実施形態では、PD-1に結合する多特異性抗体の第1の抗原結合領域は、本明細書に記載された重鎖可変領域(VH)および／または軽鎖可変領域(VL)を含む。

【0231】

第1の態様の抗体の一実施形態では、多特異性抗体の第1および第2の結合アームは、完全長抗体、例えば、上述のような完全長IgG1、λ(ラムダ)抗体またはIgG1、κ(カッパ)抗体に由来する。一実施形態では、第1および第2の結合アームはモノクロ

10

20

30

40

50

ーナル抗体に由来する。例えば、または好ましい実施形態では、第1および／または第2の結合アームは、IgG1、κアイソタイプまたはλアイソタイプに由来し、好ましくはヒトIgG1／κまたはヒトIgG1／λ定常部分を含む。

【0232】

本発明の多特異性または二特異性抗体のPD-1に結合する前記第1の抗原結合領域は、PD-L1および／またはPD-L2とPD-1結合を競合する抗体の重鎖および軽鎖可変領域を含み得る。多特異性抗体または二特異性抗体の一実施形態では、PD-1に結合する第1の抗原結合領域は、本明細書に記載された重鎖可変領域(VH)および／または軽鎖可変領域(VL)を含む。

【0233】

多特異性または二特異性抗体の一実施形態では、第2の結合特異性を別の免疫チェックポイントに向け、それによってそれぞれのチェックポイントを阻害または活性化／刺激することができる。標的となりうる他のチェックポイント阻害剤としては、CTLA4、PD-L1、TIM-3、KIRまたはLAG-3が挙げられるが、これらに限定されない。第2の結合特異性によって標的とされ得るチェックポイント活性化因子としては、CD27、CD28、CD40、CD122、CD137、OX40、GITR、またはICOSが挙げられるが、これらに限定されない。したがって、少なくとも1つの他のチェックポイントに結合し、それぞれの結合によってPD-1を阻害することができる二特異性分子および多特異性分子が含まれる。第2の結合特異性は、抗CTLA4、抗PD-L1、抗TIM-3、抗KIRもしくは抗LAG-3のように拮抗的であってもよく、または抗CD27、抗CD28、抗CD40、抗CD122、抗CD137、抗OX40、抗GITRもしくは抗ICOSのように作動的であってもよい。また、PD-1に結合し、さらに少なくとも1つの他の免疫チェックポイントに結合可能である多特異性分子も包含される。結合特異性の好ましい組合せとしては、抗PD1と抗PD-L1、または抗PD-1と抗CTLA4が挙げられる。

【0234】

例えば、CD28はT細胞の活性化に必要な刺激的誘導を提供する。例えば、CD137も同様である。CD137(4-1BB、TNFRSF9)は腫瘍壊死因子(TNF)受容体(TNFR)スーパーファミリーのメンバーである。CD137は、CD8+ およびCD4+ T細胞、調節性T細胞(Treg)、ナチュラルキラー(NK)細胞およびNK細胞、B細胞および好中球上の共刺激分子である。T細胞上では、CD137は構成的に発現されているのではなく、T細胞受容体(TCR)の活性化によって誘導される。天然のリガンドである4-1BBLまたはアゴニスト抗体を介した刺激により、TNFR関連因子(TRAF)-2およびTRAF-1をアダプターとして使用してシグナル伝達が行われる。CD137による初期のシグナル伝達は、K-63ポリユビキチン化反応を伴い、最終的に核因子(NF)-κBおよびマイトジェン活性化タンパク質(MAP)-キナーゼ経路の活性化をもたらす。シグナル伝達は、T細胞の共刺激の増加、増殖、サイトカイン産生、成熟およびCD8+ T細胞の生存期間の延長をもたらす。CD137に対するアゴニスト抗体は、様々な前臨床モデルにおいて、T細胞による抗腫瘍制御を促進することが示されている[Murillo et al. 2008 Clin. Cancer Res. 14(21): 6895-6906]。CD137を刺激する抗体は、T細胞の生存および増殖を誘導し、それによって抗腫瘍免疫応答を増強することができる。CD137を刺激する抗体は先行技術に開示されており、ヒトIgG4抗体であるウレルマブ(国際公開第2005/035584号)、およびヒトIgG2抗体であるウトミルマブ(Fisher et al. 2012 Cancer Immunol. Immunother. 61: 1721-1733)を含む。

【0235】

多特異性または二特異性抗体の一実施形態では、第2の結合特異性は血管新生阻害活性をもたらす。よって、第2の結合特異性は、血管内皮成長因子(VEGF)またはその受容体VEGFR(例えばVEGFR1、2、3)を標的とすることが可能である。あるいはまたはさらに、第2の結合特異性はPDGFR、c-Kit、Rafおよび／また

10

20

30

40

50

はRETを標的とすることが可能である。

【0236】

多特異性または二特異性抗体の一実施形態では、第1の態様の二特異性または多特異性分子の第2の、またはさらなる結合特異性は、腫瘍抗原に向けられ、腫瘍抗原に結合することが可能であり、これによりがん細胞に対する抗体の特異性を可能にする。一実施形態では、がん細胞は、黒色腫、肺がん、腎細胞癌、膀胱がん、乳がん、胃がんおよび胃食道接合部がん、膵腺癌、卵巣がんおよびリンパ腫からなる群から選択され得る。腫瘍抗原は、表面抗原であっても、MHCの文脈で提示される抗原であってもよい。結合特異性は、例えばB細胞受容体（抗体）またはT細胞受容体に基づくことができる。

【0237】

「腫瘍抗原」という用語は、本明細書で使用される場合、細胞質、細胞表面および細胞核に由来する可能性のあるがん細胞の構成成分を指す。特に、細胞内で、または腫瘍細胞の表面抗原として産生される抗原を指す。腫瘍抗原は、典型的には、がん細胞によって優先的に発現され（例えば、がん細胞では非がん細胞よりも高レベルで発現され）、場合によってはがん細胞のみによって発現される。腫瘍抗原の例としては、限定されないが、p53、ART-4、BAGE、ベータ-カテニン/m、Bcr-abl CAMEL、CAP-1、CASP-8、CDC27/m、CDK4/m、CEA、クローディンファミリーの細胞表面タンパク質、例えばCLAUDIN-6、CLAUDIN-18、2およびCLAUDIN-12、c-MYC、CT、Cyp-B、DAM、ELF2M、ETV6-AML1、G250、GAGE、GnT-V、Gap100、HAGE、HER-2/neu、HPV-E7、HPV-E6、HAST-2、hTERT（またはhTRT）、LAGE、LDLR/FUT、MAGE-A、好ましくはMAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、またはMAGE-A12、MAGE-B、MAGE-C、MART-1/Melan-A、MC1R、Myosin/m、MUC1、MUM-1、MUM-2、MUM-3、NA88-A、NF1、NY-ESO-1、NY-BR-1、p190マイナーBCR-abl、Pml/RARa、PRAME、プロテイナーゼ3、PSA、PSM、RAGE、RU1またはRU2、SAGE、SART-1またはSART-3、SCGB3A2、SCP1、SCP2、SCP3、SSX、SURVIVIN、TEL/AML1、TPI/m、TRP-1、TRP-2、TRP-2/INT2、TPTE、WT、およびWT-1が挙げられる。

【0238】

一実施形態では、標的化される第2の抗原は、NY-ESO-1（UniProt P78358）、チロシナーゼ（UniProt P14679）、MAGE-A3（UniProt P43357）、TPTE（UniProt P56180）、KLK2（UniProt P20151）、PSA（KLK3）（UniProt P07288）、PAP（ACPP、UniProt P15309）、HOXB13（UniProt Q92826）、NKX3-1（UniProt Q99801）、HPV16 E6/E7（UniProt P03126/P03129）；HPV18 E6/E7（UniProt P06463/P06788）；HPV31 E6/E7（UniProt P17386/P17387）；HPV33 E6/E7（UniProt P06427/P06429）；HPV45 E6/E7（UniProt P21735/P21736）；HPV58 E6/E7（UniProt P26555/P26557）、PRAME（UniProt P78395）、ACTL8（UniProt Q9H568）、CXorf61（KKLC1、UniProt Q5H943）、MAGE-A9B（UniProt P43362）、CLDN6（UniProt P56747）、PLAC1（UniProt Q9HBJ0）、およびp53（UniProt P04637）を含む群から選択される。

【0239】

これらの抗原に關与する処置方法は、がんの治療を目的とし得、ここでもがん細胞は、それぞれの抗原の発現によって特徴付けられる。本明細書に記載の抗原、特にNY-ESO-1、チロシナーゼ、MAGE-A3、TPTE、KLK2、PSA (KLK3)、PAP (ACPP)、HOXB13、NKX3-1、HPV16 E6/E7; HPV18 E6/E7、HPV31 E6/E7、HPV33 E6/E7、HPV45 E6/E7、HPV58 E6/E7、PRAME、ACTL8、CXorf61 (KKLC1)、MAGE-A9B、CLDN6、PLAC1、およびp53の組合せを使用することも可能である。このような抗原の組合せに關与する処置方法は、がんの処置を目的とし得、がん細胞は、抗原のそれぞれの組合せのうちの2つ以上の抗原の発現によって特徴付けられるか、または処置されるある特定のがんを有する患者の大部分（例えば、少なくとも80%、少なくとも90%またはさらにそれより多く）のがん細胞が、組合せのそれぞれの抗原の1つ以上を発現する。このような組合せは、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、または少なくとも6つの抗原の組合せを含んでもよい。よって、組合せは、3、4、5、6、7、または8個の抗原を含んでもよい。

10

【0240】

皮膚黒色腫の処置のために、さらなる結合特異性（単数／複数）は、以下の抗原のうちの1つを少なくとも標的とし得る：NY-ESO-1、チロシナーゼ、MAGE-A3、および／またはTPTE。

【0241】

前立腺がんの処置のために、さらなる結合特異性（単数／複数）は、以下の抗原のうちの1つを少なくとも標的とし得る：KLK2、PSA (KLK3)、PAP (ACPP)、HOXB13、および／またはNKX3-1。

20

【0242】

乳がんの処置のために、さらなる結合特異性（単数／複数）は、以下の抗原のうちの1つを少なくとも標的とし得る：PRAME、ACTL8、CXorf61 (KKLC1)、MAGEA3、MAGE-A9B、CLDN6、NY-ESO-1、および／またはPLAC1。

【0243】

卵巣がんの処置のために、さらなる結合特異性（単数／複数）は、以下の抗原のうちの1つを少なくとも標的とし得る：CLDN6、p53、および／またはPRAME。

30

【0244】

本明細書で使用される場合、「エフェクター細胞」という用語は、免疫応答の認知相および活性化相とは対照的に、免疫応答のエフェクター相に關与する免疫細胞を指す。例示的な免疫細胞としては、骨髄系またはリンパ系起源の細胞、例えば、リンパ球（例えば、細胞溶解性T細胞 (CTL) を含むB細胞およびT細胞、キラー細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、単球、好酸球、好中球、多形核細胞、顆粒球、マスト細胞、好塩基球などが挙げられる。

【0245】

「標的細胞」は、第1の態様の抗体によって標的化され得る、対象（例えば、ヒトまたは動物）中の任意の望ましくない細胞を意味するものとする。好ましい実施形態では、標的細胞は腫瘍細胞である。

40

【0246】

第1の態様の二特異性分子および多特異性分子は、化学的技法（例えば、D. M. Kranz et al. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:5807を参照されたい）、「ポリドーマ」技法（米国特許第4,474,893号、Readingを参照されたい）、または組換えDNA技法を使用して作製され得る。

【0247】

特に、第1の態様の二特異性分子および多特異性分子は、構成結合特異性、例えば抗CTLA4結合特異性および抗PD-1結合特異性を、当技術分野で公知の方法を使用してコンジュゲートすることによって調製することができる。例えば、二特異性分子および多

50

特異性分子の各結合特異性は別々に生じ、互いにコンジュゲートされ得る。結合特異性がタンパク質またはペプチドである場合、共有結合によるコンジュゲーションのために種々のカップリング剤または架橋剤を使用することができる。架橋剤の例としては、プロテインA、カルボジイミド、N-スクシンイミジル-S-アセチルチオアセテート (SATA)、5, 5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸) (DTNB)、o-フェニレンジマレイミド (oPDM)、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート (SPDP)、およびスルホスクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート (スルホ-SMCC) が挙げられる [例えば、Karpovsky et al. (1984) J. Exp. Med. 160: 1686; Liu, MA et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 8648を参照されたい]。他の方法としては、Paulus [Behring Ins. Mitt. (1985) No. 78, 118-132; Brennan et al. [Science (1985) 229: 81-83]、およびGlennie et al. [J. Immunol. (1987) 139: 2367-2375] に記載された方法が挙げられる。好ましいコンジュゲート剤は、Pierce Chemical Co. (Rockford, IL) から入手可能なSATAおよびスルホ-SMCCである。

10

【0248】

結合特異性が抗体である場合、これらは2つの重鎖のC末端ヒンジ領域のスルフヒドリル結合を介してコンジュゲートされ得る。特に好ましい実施形態では、ヒンジ領域は、コンジュゲーションの前に、奇数、好ましくは1個のスルフヒドリル残基を含有するように改変される。

20

【0249】

あるいは、両方の結合特異性は、同じベクターにコードされ、同じ宿主細胞で発現およびアセンブルされてもよい。この方法は、二特異性および多特異性分子が $mAb \times mAb$ 、 $mAb \times Fab$ 、 $Fab \times F(ab')_2$ 、またはリガンド $\times Fab$ 融合タンパク質である場合に特に有用である。第1の態様の二特異性分子および多特異性分子、例えば二特異性分子は、一本鎖二特異性抗体、1つの一本鎖抗体と結合決定基を含む一本鎖二特異性分子、または2つの結合決定基を含む一本鎖二特異性分子などの一本鎖分子であり得る。二特異性分子および多特異性分子はまた、一本鎖分子であってもよく、少なくとも2つの単鎖分子を含んでもよい。二特異性分子および多特異性分子を調製するための方法は、例えば、米国特許第5,260,203号;同第5,455,030号;同第4,881,175号;同第5,132,405号;同第5,091,513号;同第5,476,786号;同第5,013,653号;同第5,258,498号;および同第5,482,858号に記載されている。したがって、本開示はこれらすべての抗体形式を包含する。

30

【0250】

二特異性分子および多特異性分子の特異的標的への結合は、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)、ラジオイムノアッセイ (RIA)、FACS解析、バイオアッセイ (例えば、成長阻害)、またはウェスタンブロットアッセイによって確認することができる。これらのアッセイのそれぞれは、一般に、目的の複合体に特異的な標識試薬 (例えば、抗体) を用いることにより、特に目的のタンパク質-抗体複合体の存在を検出する。例えば、FcR-抗体複合体は、例えば、抗体-FcR複合体を認識して特異的に結合する酵素結合抗体または抗体断片を使用して検出することができる。あるいは、複合体は他の種々のイムノアッセイのいずれかを使用して検出することができる。例えば、抗体を放射性標識し、ラジオイムノアッセイ (RIA) において使用することができる (例えば、Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986を参照されたい)。放射性同位体は、 γ -カウンターまたはシンチレーションカウンターまたはオートラジオグラフィーの使用などの手段によって検出され得る。

40

【0251】

V. イムノコンジュゲート

50

第1の態様の抗PD-1抗体は、部分または薬剤にコンジュゲートすることができる。このようなコンジュゲートは、本明細書において、「イムノコンジュゲート」とも呼ばれる。

【0252】

第3の態様では、部分または薬剤に連結された第1の態様の抗体を含むコンジュゲートが提供される。第3の態様の一実施形態では、部分または薬剤は、放射性同位体、酵素、色素、薬物、毒素および細胞毒性剤からなる群から選択される。色素は、例えば、蛍光色素または蛍光タグであり得る。一実施形態では、部分または薬剤は、免疫細胞の活性化を達成することが可能である。例えば、部分または薬剤は、T細胞のCD28と相互作用するCD80であり得る。

10

【0253】

第1の態様の抗体は、PD-1に対する結合特異性を有する他の抗体などの1つ以上の他の分子実体に連結されるか、または機能的に連結させることができる（例えば、化学的カップリング、遺伝子融合、共有結合によらない会合などによって）。1つ以上の他の抗体は、好ましくは第1の態様の抗体である。

【0254】

部分または薬剤は、抗体に結合した酵素であり得る。このような抗体は、例えば酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）もしくは酵素増幅イムノアッセイ技法（EMIT）などの酵素イムノアッセイ、またはウェスタンブロットなどに使用され得る。

【0255】

あるいはまたはさらに、放射性核種（放射性同位体）を、部分または薬剤として抗体に結合させることができる。このようなコンジュゲートは、治療だけでなく、診断目的（ラジオイムノアッセイ、ポジトロン断層撮影（「immuno-PET」））において使用されてもよい。放射性核種は錯化剤を介して抗体にコンジュゲートされてもよい。第1の態様の抗体はまた、放射性同位体、例えばヨウ素131、イットリウム90またはインジウム111にコンジュゲートされ、がんなどの障害を処置するための細胞毒性放射性医薬品を生成することができる。第1の態様による抗体は、抗体を放射性同位体にコンジュゲートさせることができるリンカー・キレーター、例えばチウキセタンに結合させてもよい。

20

【0256】

あるいはまたはさらに、部分または薬剤は、タグ、例えば、蛍光タグであってもよく、蛍光標識または蛍光プローブとしても知られている。臭化エチジウム、フルオレセインおよび緑色蛍光タンパク質が一般的なタグである。

30

【0257】

また、第3の態様に包含されるのは、治療部分または治療剤を含むコンジュゲートである。治療部分または治療剤は、サイトカインまたはCD80であってもよく、CD28に結合してT細胞応答における共刺激シグナルをもたらす。治療部分または治療剤はまた、細胞毒素または薬物（例えば、免疫抑制剤）であってもよい。1つ以上の細胞毒素を含むイムノコンジュゲートは「免疫毒素」と呼ばれる。細胞毒素または細胞毒性剤には、細胞に有害で、特に細胞を死滅させる任意の薬剤が含まれる。例としては、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ピンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミスラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピューロマイシン、ならびにそれらの類似体または同族体が挙げられる。

40

【0258】

第3の態様の免疫コンジュゲートを形成するのに適した治療剤としては、代謝拮抗剤（例えば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、フルダラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン）、アルキル化剤（例えば、メクロレタ

50

ミン、チオエパクロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（BSNU）およびロムスチン（CCNU）、シクロホスファミド、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、およびシスージクロロジアミンプラチナ（II）（DDP）シスプラチン）、アントラサイクリン系薬剤（例えば、ダウノルビシン（以前のダウノマイシン）およびドキソルビシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（以前のアクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミスラマイシン、およびアントラマイシン（AMC））、ならびに抗有糸分裂剤（例えば、ビンクリスチンおよびビンブラスチン）が挙げられるがこれに限定されない。好ましい実施形態では、治療剤は細胞毒性剤または放射線毒性剤である。別の実施形態では、治療剤は免疫抑制剤である。さらに別の実施形態では、治療剤はGM-CSFである。好ましい実施形態では、治療剤は、ドキソルビシン、シスプラチン、ブレオマイシン、スルフェート、カルムスチン、クロラムブシル、シクロホスファミドまたはリシンAである。

10

【0259】

第3の態様の抗体コンジュゲートは、所与の生物学的応答を改変するために使用することができ、薬物部分は古典的な化学治療剤に限定して解釈されるべきではない。例えば、薬物部分は、所望の生物活性を有するタンパク質またはポリペプチドであってもよい。このようなタンパク質としては、例えば、アブリン、リシンA、シュードモナス外毒素、ジフテリア毒素などの酵素活性毒素またはその活性断片；腫瘍壊死因子またはインターフェロン- γ などのタンパク質；または、例えば、リンホカイン、インターロイキン-1（「IL-1」）、インターロイキン-2（「IL-2」）、インターロイキン-6（「IL-6」）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（「GM-CSF」）、顆粒球コロニー刺激因子（「G-CSF」）、または他の成長因子などの生体応答修飾物質が挙げられる。

20

【0260】

このような治療部分を抗体にコンジュゲートするための技法は周知であり、例えば、Monoclonal Antibodies And Cancer TherapyにおけるArnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", Controlled Drug Delivery (2nd Ed.)におけるReisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical ApplicationsにおけるRobinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And TherapyにおけるPinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985)、およびThorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62: 119-58 (1982)を参照されたい。コンジュゲートの部分、例えば治療部分、または薬剤は、リンカー配列によって抗体にコンジュゲートされ得る。適切なリンカー配列は当業者に知られている。

30

40

【0261】

第4の態様では、第1の態様の少なくとも2つの抗体、または第3の態様の少なくとも2つのコンジュゲート、または第1の態様の1つ以上の抗体と第3の態様の1つ以上のコンジュゲートとの混合物を含む多量体が提供される。一実施形態では、多量体は、第1の態様の4~8個の抗体または第3の態様の4~8個のコンジュゲートを含む。これらの態様の多量体の抗体またはコンジュゲートは、ペプチドによって互いに連結されていてもよい。第4の態様の多量体は、PD-1に対する抗原結合部位の数が増加することの特徴とする。

【0262】

したがって、多種多様な抗体コンジュゲート、二特異性および多特異性分子、ならびに

50

融合タンパク質が包含され、これらはすべてPD-1発現細胞に結合し、他の分子をこのような細胞に標的化するために使用することができる。

【0263】

VI. 抗体をコードする核酸

第5の態様では、本開示はまた、本明細書に記載されている抗体またはその一部、例えば抗体鎖、例えば第1の態様に関して本明細書に記載されているPD-1に結合する能力を有する抗体の抗体重鎖、および／または第1の態様に関して本明細書に記載されているPD-1に結合する能力を有する抗体の抗体軽鎖をコードする遺伝子または核酸配列を含む核酸または核酸分子に関する。

【0264】

「核酸分子」または「核酸」という用語は、本明細書で使用される場合、デオキシリボ核酸(DNA)またはリボ核酸(RNA)分子、例えば、インビトロ転写RNA(IVT RNA)を含むことを意図している。核酸には、本明細書で使用される場合、ゲノムDNA、cDNA、mRNA、組換え産生分子および化学合成分子が含まれる。第4の態様によれば、核酸は、一本鎖または二本鎖の、直鎖状または共有結合により環状に閉じた分子として存在し得る。例えば、核酸は二本鎖DNAである。核酸は、例えば、DNA鋳型からインビトロ転写によって調製することができるRNAの形態で、細胞への導入、すなわちトランスフェクションに用いることができる。RNAはさらに、安定化配列、キャッピング、ポリアデニル化によって、適用前に改変され得る。

【0265】

本明細書で使用される場合、「核酸をコードする」という用語は、核酸が適切な環境、好ましくは細胞内に存在する場合、それがコードするタンパク質またはペプチドを産生するために発現され得ることを意味する。

【0266】

第5の態様による核酸は単離され得る。「単離された核酸」という用語は、本明細書で使用される場合、核酸が、(i)例えばポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によってインビトロで増幅されること、(ii)クローニングによって組換え産生されること、(iii)例えば切断およびゲル電気泳動分画化によって精製されること、または(iv)例えば化学合成によって合成されることを意味する。単離された核酸は、組換えDNA技法による操作に利用可能な核酸である。

【0267】

第5の態様の一実施形態では、核酸、例えばRNAは、核酸に対する安定化効果を有する少なくとも1つの薬剤と関連している。安定化効果は、RNA分解からの保護を含み得る。この態様の一実施形態では、少なくとも1つの薬剤は、前記RNAと複合体を形成し、および／またはそれを包囲する。一実施形態では、少なくとも1つの薬剤は、RNA複合化脂質、RNA複合化ポリマー、およびRNA複合化ペプチドもしくはタンパク質からなる群から選択される少なくとも1つの薬剤を含む。例えば、ポリエチレンジアミン、プロタミン、ポリ-L-リシン、ポリ-L-アルギニンおよびヒストンからなる群のうちの少なくとも1つから選択される少なくとも1つの薬剤である。

【0268】

核酸は、第5の態様によれば、単独でまたは他の核酸と組み合わせて存在し得、これらは相同性または異種性であり得る。好ましい実施形態では、核酸は、前記核酸に関して相同または異種であり得る発現制御配列に機能的に連結されている。「相同性の」という用語は、核酸が発現制御配列にも天然に機能的に連結されていることを意味し、「異種性の」という用語は、核酸が発現制御配列に天然に機能的に連結していないことを意味する。

【0269】

RNAおよび／またはタンパク質もしくはペプチドを発現する核酸などの核酸、ならびに発現制御配列は、前記核酸の発現または転写が前記発現制御配列の制御下または影響下にあるような方法で互いに共有結合により連結されている場合、互いに「機能的に」連結されている。核酸が機能的タンパク質に翻訳されるのであれば、コード配列に機能的に連

10

20

30

40

50

結された発現制御配列により、コード配列のフレームシフトまたはコード配列が所望のタンパク質もしくはペプチドに翻訳不可能になることなく、前記発現制御配列の誘導により前記核酸の転写が起こる。

【0270】

「発現制御配列」という用語は、本明細書で使用される場合、遺伝子の転写またはmRNAの翻訳を調節するプロモーター、リボソーム結合部位、エンハンサーおよび他の制御エレメントを含む。特定の実施形態では、発現制御配列は調節され得る。発現制御配列の正確な構造は、種または細胞型の機能として変化し得るが、一般に、TATAボックス、キャッピング配列、CAAT配列などの、それぞれ転写および翻訳の開始に関与する5' - 非転写配列、ならびに5' - および3' - 非翻訳配列（5' - UTR；3' - UTR）を含む。より詳細には、5' - 非転写発現制御配列は、機能的に連結された核酸の転写制御のためのプロモーター配列を含むプロモーター領域を含む。発現制御配列はまた、エンハンサー配列または上流アクチベーター配列を含み得る。発現制御配列または調節配列は、核酸に関して相同または異種であり得る。

【0271】

「プロモーター」または「プロモーター領域」という用語は、本明細書で使用される場合、発現される核酸配列の上流（5'）に位置し、RNAポリメラーゼの認識および結合部位を提供することによって配列の発現を制御する核酸配列に関する。「プロモーター領域」は、遺伝子の転写調節に関与するさらなる因子のためのさらなる認識および結合部位を含み得る。プロモーターは、原核生物または真核生物の遺伝子の転写を制御し得る。さらに、プロモーターは、「誘導性」であってもよく、および誘導剤に応答して転写を開始してもよく、または誘導剤によって転写が制御されない場合には「構成的」であってもよい。誘導性プロモーターの制御下にある遺伝子は、誘導剤が存在しない場合、発現されないか、またはわずかな程度しか発現されない。誘導剤が存在すると、遺伝子のスイッチが入るか、転写レベルが上昇する。これは一般に、特定の転写因子の結合によって媒介される。

【0272】

第5の態様に従って好ましいプロモーターとしては、SP6、T3およびT7ポリメラーゼのプロモーター、ヒトU6 RNAプロモーター、CMVプロモーター、およびその一部（複数可）が例えばヒトGAPDH（グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ）などの他の細胞タンパク質の遺伝子のプロモーターの一部（複数可）と融合している人工ハイブリッドプロモーター（例えばCMV）が挙げられ、付加的なイントロン（複数可）を含むかまたは含まない。

【0273】

「発現」という用語は、本明細書において、その最も一般的な意味で使用され、RNAの産生、またはRNAおよびタンパク質／ペプチドの産生を含む。また、核酸の部分的発現も含む。さらに、発現は一過的に行われても、安定的に行われてもよい。

【0274】

第5の態様の一実施形態では、核酸はRNAであり、より好ましくはインビトロ転写RNA（IVT RNA）または合成RNAである。

【0275】

RNAなどの核酸は、特に、DNA鋳型からインビトロ転写によって調製され得るRNAの形態で、細胞への導入、すなわちトランスフェクションに用いることができる。RNAはさらに、安定化配列、キャッピング、ポリアデニル化によって、適用前に改変される。

【0276】

本明細書で使用される場合、「RNA」という用語は、リボヌクレオチド残基を含み、好ましくはリボヌクレオチド残基から全体的にまたは実質的に構成されている分子に関する。「リボヌクレオチド」とは、β-D-リボフラノシル基の2'-位にヒドロキシル基を有するヌクレオチドに関する。「RNA」という用語は、二本鎖RNA、一本鎖RNA

0

20

30

40

50

、部分的または完全に精製されたRNAなどの単離されたRNA、本質的に純粋なRNA、合成RNA、ならびに1つ以上のヌクレオチドの付加、欠失、置換および／または変更によって天然に存在するRNAとは異なる改変RNAなどの組換えによって生成されたRNAを含む。このような変更には、RNAの末端または内部などに対する、例えばRNAの1つ以上のヌクレオチドへの非ヌクレオチド物質の付加が含まれ得る。RNA分子のヌクレオチドはまた、非標準的ヌクレオチド、例えば、天然に存在しないヌクレオチドまたは化学的に合成されたヌクレオチドもしくはデオキシヌクレオチドを含み得る。これらの変更されたRNAは、類似体または天然に存在するRNAの類似体と呼ぶことができる。

【0277】

「RNA」という用語は、本明細書で使用される場合、「mRNA」を含み、好ましくはそれに関する。「mRNA」という用語は「メッセンジャーRNA」を意味し、DNA鋳型を使用して生成され、ペプチドまたはポリペプチドをコードする「転写物」に関する。転写を制御するためのプロモーターは、任意のRNAポリメラーゼに対する任意のプロモーターであり得る。インビトロ転写用のDNA鋳型は、核酸、特にcDNAをクローニングし、それをインビトロ転写用の適切なベクターに導入することによって得られてもよい。cDNAは、RNAの逆転写によって得られてもよい。典型的には、mRNAは、5'-UTR、タンパク質コード領域、および3'-UTRを含む。mRNAは、細胞内およびインビトロで限定された半減期しか有さない。mRNAは、DNA鋳型からのインビトロ転写によって生成され得る。インビトロ転写の方法は当業者に公知である。例えば、種々のインビトロ転写キットが市販されている。本明細書で使用される場合、「転写」という用語は、DNA配列中の遺伝暗号がRNAに転写されるプロセスに関する。

【0278】

RNAの安定性および翻訳効率は、必要に応じて修正され得る。安定性が向上し、翻訳効率が改善されたRNA分子は、例えば、本開示のRNAコード化抗体に有利であり得る。例えば、RNAは、RNAの安定化効果を有する、および／または翻訳効率を増加させる1つ以上の改変によって安定化され、その翻訳が増加し得る。このような改変は、例えば、参照により本明細書に組み込まれるPCT/EP2006/009448に記載されている。本開示に従って使用されるRNAの発現を増加させるために、発現されるペプチドまたはタンパク質をコードする配列は、コード領域内で、好ましくは発現されるペプチドまたはタンパク質の配列を変更することなく、mRNAの安定性を増加させるためにGC含有量を増加させ、コドンの最適化を行うことによって、細胞内での翻訳を増強するように改変され得る。

【0279】

RNAの文脈における「改変」という用語には、本明細書で使用される場合、前記RNAにおいて天然には存在しないRNAのいずれかの改変が含まれる。

【0280】

第5の態様によるRNAは、その安定性を高め、および／または細胞傷害性を低下させるために、改変されたりボヌクレオチドを有していてもよい。例えば、一実施形態では、RNAは、シチジンのために部分的または完全に、好ましくは完全に置換された5-メチルシチジンを含む。

【0281】

一部の実施形態では、本明細書に記載のRNA中の1つ以上のウリジンは、改変ヌクレオシドで置き換えられる。一部の実施形態では、改変ヌクレオシドは、改変ウリジンである。一部の実施形態では、ウリジンを置き換える改変ウリジンは、プソイドウリジン(ψ)、N1-メチルプソイドウリジン(m1ψ)、または5-メチルウリジン(m5U)から独立して選択される。RNAのウリジンは、部分的または完全に、好ましくは完全に置換され得る。

【0282】

一部の実施形態では、少なくとも1つのRNAは、少なくとも1つのウリジンの代わりに改変ヌクレオシドを含む。一部の実施形態では、少なくとも1つのRNAは、各ウリジ

ンの代わりに改変ヌクレオシドを含む。一部の実施形態では、各RNAは、少なくとも1つのウリジンの代わりに改変ヌクレオシドを含む。一部の実施形態では、各RNAは、各ウリジンの代わりに改変ヌクレオシドを含む。

【0283】

一実施形態では、RNAは他の改変ヌクレオシドを含むか、またはさらなる改変ヌクレオシド、例えば改変シチジンを含む。例えば、一実施形態では、RNAにおいて、5-メチルシチジンは、部分的または完全に、好ましくは完全にシチジンに置換されている。一実施形態では、RNAは、5-メチルシチジン、ならびにプソイドウリジン (ψ)、N1-メチルプソイドウリジン ($m^1\psi$)、および5-メチルウリジン (m^5U) から選択される1つ以上とを含む。一実施形態では、RNAは、5-メチルシチジンおよびN1-メチルプソイドウリジン ($m^1\psi$) を含む。一部の実施形態では、RNAは、各シチジンの代わりに5-メチルシチジンを含み、各ウリジンの代わりにN1-メチルプソイドウリジン ($m^1\psi$) を含む。

10

【0284】

一実施形態では、「改変」という用語は、5'-キャップまたは5'-キャップ類似体をRNAに提供することに関する。「5'-cap」という用語は、mRNA分子の5'-末端に見出されるキャップ構造を指し、一般に、異常な5'~5'三リン酸連結を介してmRNAに接続されたグアノシンヌクレオチドからなる。

【0285】

5'-キャップまたは5'-キャップ類似体を有するRNAを提供することは、前記5'-キャップまたは5'-キャップ類似体の存在下でのDNA鋳型のインビトロ転写によって達成されてもよく、ここで、前記5'-キャップは、生成されたRNA鎖に共転写によって組み込まれるか、またはRNAは、例えば、インビトロ転写によって生成されてもよく、5'-キャップは、キャッピング酵素、例えば、ワクシニアウイルスのキャッピング酵素を使用して転写後にRNAに結合されてもよい。

20

【0286】

一部の実施形態では、第5の態様によるRNAは、5'-UTRおよび／または3'-UTRを含む。

【0287】

「非翻訳領域」または「UTR」という用語は、転写されるがアミノ酸配列に翻訳されないDNA分子中の領域、またはmRNA分子などのRNA分子中の対応する領域に関する。非翻訳領域(UTR)は、オープンリーディングフレーム(5'-UTR)の5' (上流) および／またはオープンリーディングフレーム(3'-UTR)の3' (下流) に存在し得る。5'-UTRは、存在する場合、タンパク質コード領域の開始コドンの上流の5'-末端に位置する。5'-UTRは、5'-キャップ (存在する場合) の下流、例えば、5'-キャップに直接隣接する。3'-UTRは、存在する場合、タンパク質コード領域の終止コドンの下流の3'-末端に位置するが、「3'-UTR」という用語は、好ましくはポリA配列を含まない。よって、3'-UTRはポリA配列 (存在する場合) の上流にあり、例えばポリA配列に直接的に隣接している。

30

【0288】

RNA分子の3'-非翻訳領域に3'-UTRを組み込むと、翻訳効率の上昇がもたらされ得る。このような3'-非翻訳領域を2つ以上組み込むことによって、相乗効果が得られ得る。3'-非翻訳領域は、それらが導入されるRNAに対して自己であっても異種であってもよい。特定の一実施形態では、3'-非翻訳領域はヒトβ-グロビン遺伝子由来する。

40

【0289】

第5の態様によるRNAの安定性および／または発現を増加させるために、好ましくは10~500、より好ましくは30~300、さらに好ましくは65~200、特に100~150個のアデノシン残基の長さを有するポリA配列と併せて存在するように改変されてもよい。ポリA配列はマスクされていなくてもよい。

50

【0290】

「ポリ（Ａ）テール」または「ポリＡ配列」という用語は、本明細書で使用される場合、典型的にはRNA分子の3' -末端に位置するアデニル（Ａ）残基の中断されていないかまたは中断された配列に関し、「マスクされていないポリＡ配列」は、RNA分子の3' -末端のポリＡ配列がポリＡ配列のＡで終わり、ポリＡ配列の3' -末端、すなわち下流に位置するＡ以外のヌクレオチドが続いていないことを意味する。

【0291】

一部の実施形態では、ポリＡテールは、コード鎖に対して相補的な鎖中に反復dTヌクレオチド（デオキシチミジル酸）を含むDNA鋳型に基づいて、RNA転写中、例えば、インビトロ転写RNAの調製中に結合される。ポリＡテール（コード鎖）をコードするDNA配列はポリ（Ａ）カセットと呼ばれる。

10

【0292】

一部の実施形態では、DNAのコード鎖に存在するポリ（Ａ）カセットは、dAヌクレオチドから本質的になるが、4つのヌクレオチド（dA、dC、dG、およびdT）のランダム配列によって中断されている。このようなランダム配列は、長さが5～50、10～30、または10～20ヌクレオチドであってもよい。このようなカセットは、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2016/005324号に開示されている。国際公開第2016/005324号に開示される任意のポリ（Ａ）カセットが、本開示において使用され得る。dAヌクレオチドから本質的になるが、4つのヌクレオチド（dA、dC、dG、dT）の均等な分布を有するランダム配列によって中断されており、例えば、5～50ヌクレオチドの長さを有するポリ（Ａ）カセットは、DNAレベルでは、大腸菌におけるプラスミドDNAの一定の増殖を示し、RNAレベルでは、RNA安定性および翻訳効率を支持することに関して有益な性質と依然として関連しており、包含される。結果として、一部の実施形態では、本明細書に記載のRNA分子に含有されるポリＡテールは、Aヌクレオチドから本質的になるが、4つのヌクレオチド（A、C、G、U）のランダム配列によって中断されている。このようなランダム配列は、長さが5～50、10～30、または10～20ヌクレオチドであってもよい。

20

【0293】

この文脈において、「から本質的になる」とは、ポリＡテール中のほとんどのヌクレオチド、典型的にはポリＡテール中のヌクレオチド数の少なくとも75%、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96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%がAヌクレオチドであるが、残りのヌクレオチドがAヌクレオチド以外のヌクレオチド、例えばUヌクレオチド（ウリジル酸）、Gヌクレオチド（グアニル酸）、またはCヌクレオチド（シチジル酸）であることを許容することを意味する。この文脈において、「からなる」とは、ポリＡテール中のすべてのヌクレオチド、すなわち、ポリＡテール中のヌクレオチド数の100%が、Aヌクレオチドであることを意味する。「Aヌクレオチド」または「A」という用語は、アデニル酸を指す。

30

【0294】

一部の実施形態では、Aヌクレオチド以外のヌクレオチドは、その3' -末端においてポリＡテールを挟まない、すなわち、ポリＡテールは、その3' -末端において、A以外のヌクレオチドによってマスクされないか、またはそれが続かない。

40

【0295】

上記改変、すなわちポリＡ配列の組み込み、ポリＡ配列のアンマスキング、および1つ以上の3' -非翻訳領域の組み込みの組合せは、RNAの安定性および翻訳効率の向上に相乗的な影響を及ぼす。

【0296】

RNAの「安定性」という用語は、RNAの「半減期」に関する。「半減期」は、分子の活性、量、または数の半分を排除するのに必要な期間に関する。本明細書で使用される文脈では、RNAの半減期は前記RNAの安定性を示す。RNAの半減期は、RNAの「

50

発現期間」に影響を及ぼし得る。半減期が長いRNAは、長期間発現されることが期待され得る。

【0297】

当然のことながら、本開示に従って、RNAの安定性および／または翻訳効率を低下させることが望まれる場合には、RNAの安定性および／または翻訳効率を増加させる上記のようなエレメントの機能を妨害するようにRNAを改変することが可能である。

【0298】

「発現」という用語は、本明細書において、その最も一般的な意味で使用され、RNAの産生、ならびに／または例えば、転写および／もしくは翻訳によるペプチド、ポリペプチドもしくはタンパク質の産生を含む。RNAに関して、用語「発現」または「翻訳」は、特にペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の産生に関する。また、核酸の部分的発現も含む。さらに、発現は一過的であっても安定的であってもよい。本開示によれば、PD-1抗体に特異的に結合する抗体を使用する技術など、タンパク質検出のための従来の技術によって、細胞またはその溶解物において抗体を検出することができる場合、抗体は細胞内で発現されている。

【0299】

本明細書で使用される文脈において、「転写」という用語は、DNA配列中の遺伝暗号がRNAに転写されるプロセスに関する。その後、RNAはタンパク質に翻訳され得る。本明細書で使用される場合、「転写」という用語は「インビトロ転写」を含み、「インビトロ転写」という用語は、RNA、特にmRNAが無細胞系で、好ましくは適切な細胞抽出物を使用してインビトロで合成されるプロセスに関する。好ましくは、転写物の生成にはクローニングベクターが適用される。これらのクローニングベクターは一般に転写ベクターと呼ばれ、「ベクター」という用語に包含される。本開示によれば、好ましくは使用されるRNAはインビトロ転写RNA（IVT-RNA）であり、適切なDNA鋳型のインビトロ転写によって得られ得る。転写を制御するためのプロモーターは、任意のRNAポリメラーゼに対する任意のプロモーターであり得る。RNAポリメラーゼの特定の例は、T7、T3、およびSP6 RNAポリメラーゼである。好ましくは、インビトロ転写はT7またはSP6プロモーターによって制御される。インビトロ転写のためのDNA鋳型は、核酸、特にcDNAをクローニングし、それをインビトロ転写のための適切なベクターに導入することによって得られ得る。cDNAは、RNAの逆転写によって得られてもよい。

【0300】

「翻訳」という用語は、本明細書で使用される場合、細胞のリボソームにおいて、メッセンジャーRNAの鎖がアミノ酸配列のアセンブリーを指示し、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質を作製するプロセスに関する。

【0301】

「発現可能なRNA」および「RNAをコードする」などの用語は本明細書において互換的に使用され、および特定のペプチドまたはポリペプチドに関して、RNAが、適切な環境、好ましくは細胞内に存在する場合、前記ペプチドまたはポリペプチドを産生するために発現可能であることを意味する。好ましくは、第5の態様によるRNAは、発現可能なペプチドまたはポリペプチドを提供するために、細胞翻訳機構と相互作用することができる。

【0302】

「移入すること」、「導入すること」または「トランスフェクトすること」などの用語は、本明細書において互換的に使用され、核酸、特に外因性または異種核酸、特にRNAの細胞への導入に関する。本開示によれば、細胞は、器官、組織および／または生物の一部を形成し得る。本開示によれば、核酸の投与は、ネイキッド核酸として、または投与試薬と組み合わせて達成される。好ましくは、核酸の投与は、ネイキッド核酸の形態である。好ましくは、RNAは、RNAase阻害剤などの安定化物質と組み合わせて投与される。本開示はまた、核酸を細胞内に繰り返し導入し、長期間持続発現させることも想定して

いる。

【0303】

第6の態様では、本開示は、第5の態様の核酸のうちの1つ以上を含むベクターを提供する。

【0304】

適切な場合、第6の態様のベクターは、核酸の発現を制御するプロモーターをさらに含み得る。用語「ベクター」は、本明細書において最も一般的な意味で使用され、例えば、前記核酸を原核細胞および／または真核細胞に導入し、適切な場合にはゲノムへと組み込むことを可能にする、核酸のための任意の中間媒体を含む。この種のベクターは、好ましくは細胞内で複製および／または発現される。ベクターは、プラスミド、ファージミド、バクテリオファージ、またはアデノウイルスもしくはバキュロウイルスベクターなどのウイルスゲノム、コスミド、または例えば遺伝子工学において従来からの他のベクター、さらにはリボソームを含む。前記ベクターには、発現ベクターおよびクローニングベクターが含まれる。発現ベクターは、ウイルスベクターと同様にプラスミドを含み、一般に、所望のコード配列および特定の宿主生物（例えば、細菌、酵母、植物、昆虫、または哺乳動物）またはインビトロ発現系における作動可能に連結されたコード配列の発現に必要な適切なDNA配列を含有する。クローニングベクターは一般に、ある特定の所望のDNA断片を操作および増幅するために使用され、所望のDNA断片の発現に必要な機能的配列を欠くことがある。「プラスミド」という用語は、本明細書で使用される場合、一般に染色体外遺伝物質の構築物に関し、通常は環状DNA二重鎖であり、染色体DNAとは独立して複製し得る。

【0305】

第6の態様のベクターは、適切な宿主細胞において、および適当な条件下で、ベクターの選択を可能にするマーカー遺伝子などの遺伝子をさらに含んでもよい。さらに、ベクターは、適切な宿主におけるコード領域の適当な発現を可能にする発現制御エレメントを含んでもよい。このような制御エレメントは当業者に公知であり、プロモーター、スプライスカセット、および翻訳開始コドンを含み得る。例えば、第5の態様の核酸は、真核細胞または原核細胞における発現を可能にする上記の発現制御配列に機能的に連結されている。真核細胞または原核細胞における発現を確実にする制御エレメントは、当業者に周知である。第5の態様による核酸分子の構築のための方法、上記核酸分子を含むベクターの構築のための方法、適切に選択された宿主細胞へのベクターの導入のための方法、発現をもたらしまたは発現を達成するための方法は、当技術分野で周知である。

【0306】

組換え技法を使用するクローニングまたは発現のためのベクターは、当技術分野で公知であり、例えば、プラスミドベースの発現ベクター、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクターまたはバキュロウイルスベクターを含む。ベクターの例は、pGEX、pET、pLexA、pBI、pVITRO、pVIVO、およびpST4などのpSTを含む。

【0307】

第1の態様の抗体の発現のためのベクターの種類は、抗体の重鎖および軽鎖が異なるベクターに存在するベクターの種類でも、重鎖および軽鎖が同じベクターに存在するベクターの種類でもよい。

【0308】

第6の態様の一実施形態では、ベクターは多層ベシクル、単層ベシクル、またはそれらの混合物である。

【0309】

第6の態様の一実施形態では、ベクターはリボソームである。一実施形態では、ベクターはカチオン性リボソームである。リボソームまたはカチオン性リボソームは、ホスファチジルコリンなどのリン脂質および／またはコレステロールなどのステロールを含み得る。一実施形態では、リボソームまたはカチオン性リボソームは、約50nm～約200nm

mの範囲の粒径を有する。

【0310】

第6の態様の一実施形態では、ベシクル、リポソームまたはカチオン性リポソームは、部位特異的標的化のためのリガンドをさらに含む。前記リガンドは、例えば抗体である。一実施形態では、リガンド、例えば抗体は、がん細胞、特に本明細書に記載されているがん細胞に結合可能である。一実施形態では、ベクターは、腫瘍細胞でRNAを放出する、および／または腫瘍細胞に侵入する。一実施形態では、リガンド、例えば抗体は、腫瘍細胞などの異常細胞の表面に関連するタンパク質に結合する。例えば、リガンドまたは抗体は、疾患関連抗原の細胞外部分に結合し得る。

【0311】

第6の態様の一実施形態では、第5の態様のRNAは、RNAリポプレックス粒子中に存在し得る。本明細書に記載のRNAリポプレックス粒子およびRNAリポプレックス粒子を含む組成物は、非経口投与後、特に静脈内投与後の標的組織へのRNAのデリバリーに有用である。RNAリポプレックス粒子は、リポソームを使用し、リポソームをRNAと混合して調製され得る。RNAリポプレックス粒子は、例えば、RNAをリポソームまたは少なくとも1種のカチオン性脂質と、例えばエタノール注入技法を使用して混合することによって得ることができる。

【0312】

「エタノール注入技法」という用語は、脂質を含むエタノール溶液を、針を通して水溶液中に急速に注入するプロセスを指す。この作用により、脂質が溶液全体に分散され、脂質構造形成、例えばリポソーム形成などの脂質ベシクル形成が促進される。一般に、本明細書に記載のRNAリポプレックス粒子は、コロイド状リポソーム分散液にRNAを添加することにより入手可能である。エタノール注入技法を使用して、このようなコロイド状リポソーム分散液は、一実施形態では、以下のように形成される：DOTMAなどのカチオン性脂質およびさらなる脂質などの脂質を含むエタノール溶液を、攪拌下で水溶液に注入する。一実施形態では、本明細書に記載のRNAリポプレックス粒子は、押出成形の工程なしで入手可能である。

【0313】

用語「押し出しすること」または「押し出し」は、一定の断面プロファイルを有する粒子の作成を指す。特に、粒子を小型化することで、粒子を既定の孔を有するフィルターに通すことを指す。

【0314】

RNAリポプレックス粒子は、一実施形態では、約200nm～約1000nm、約200nm～約800nm、約250nm～約700nm、約400nm～約600nm、約300nm～約500nm、または約350nm～約400nmの範囲の平均直径を有し得る。一実施形態では、RNAリポプレックス粒子は、約250nm～約700nmの範囲の平均直径を有する。別の実施形態では、RNAリポプレックス粒子は、約300nm～約500nmの範囲の平均直径を有する。例示的な実施形態では、RNAリポプレックス粒子は約400nmの平均直径を有する。

【0315】

RNAリポプレックス粒子は、約0.5未満、約0.4未満、または約0.3未満の多分散性指数を示し得る。例として、RNAリポプレックス粒子は、約0.1～約0.3の範囲の多分散性指数を示し得る。

【0316】

「多分散性指数」という用語は、粒子の集合、例えばナノ粒子の粒径分布の尺度として本明細書において使用される。多分散性指数は、いわゆるキュムラント解析による動的光散乱測定に基づいて計算される。

【0317】

RNAリポプレックス粒子を含む組成物は、少なくとも1つの緩衝剤および／または安定剤および／またはキレート剤を含んでもよい。例えば、安定剤は、凍結、凍結乾燥、噴

10

20

30

40

50

霧乾燥または凍結、凍結乾燥もしくは噴霧乾燥した組成物の保存などの保存中に、製品品質の実質的な損失、特にRNA活性の実質的な損失を回避し得る。キレート剤とは、金属イオンと少なくとも2つの配位共有結合を形成し、それによって安定な水溶性錯体を生成することが可能な化学化合物を指す。理論に束縛されることを望むものではないが、キレート剤は遊離の2価イオンの濃度を低下させ、そうでなければRNAの分解を促進させる場合がある。適切なキレート剤の例としては、限定されないが、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、EDTAの塩、デスフェリオキサミンB、デフェロキサミン、ジチオカルブナトリウム、ペニシラミン、ペント酸カルシウム、ペント酸のナトリウム塩、サクシマー、トリエンチン、ニトリロ三酢酸、trans-ジアミノシクロヘキサン四酢酸(DCTA)、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)、ビス(アミノエチル)グリコールエーテル-N, N, N', N'-四酢酸、イミノ二酢酸、クエン酸、酒石酸、フマル酸、またはそれらの塩が挙げられる。

10

【0318】

凍結乾燥または噴霧乾燥した組成物は、使用前に再構成することができる。ある実施形態では、安定剤は炭水化物である。「炭水化物」という用語は、本明細書で使用される場合、単糖、二糖、三糖、オリゴ糖、および多糖を指し、それらを包含する。本開示の実施形態では、安定剤は、マンノース、グルコース、スクロースまたはトレハロースである。本開示によれば、RNAリポプレックス粒子組成物は、組成物の安定性、特にRNAリポプレックス粒子の安定性およびRNAの安定性に適した安定剤濃度を有し得る。

【0319】

20

「凍結させること(freezing)」という用語は、通常、熱を奪って液体が固化することに関する。

【0320】

「凍結乾燥させること(lyophilizing)」または「凍結乾燥(lyophilization)」という用語は、物質を凍結させた後、周囲の圧力を下げて物質中の凍結媒体を固相から気相に直接昇華させることによって、物質を凍結乾燥させること(freeze-drying)を指す。

【0321】

「噴霧乾燥すること(spray-drying)」という用語は、容器(噴霧乾燥器)内で霧化(噴霧)された流体に(加熱された)気体を混合することによって物質を噴霧乾燥することを指し、形成された液滴から溶媒が蒸発し、乾燥粉末になる。

30

【0322】

「再構成する(reconstitute)」という用語は、乾燥した製品に水などの溶媒を加えて、元の液状などの液体状態に戻すことに関する。

【0323】

RNAリポプレックス粒子を含む組成物は、液体であっても固体であってもよい。固体の非限定的な例としては、凍結形態または凍結乾燥形態が挙げられる。

【0324】

本開示の文脈において、「粒子」という用語は、分子または分子複合体によって形成される構造化実体に関する。一実施形態では、「粒子」という用語は、マイクロサイズまたはナノサイズの構造体、例えば、マイクロサイズまたはナノサイズのコンパクト構造体に関する。

40

【0325】

「RNAリポプレックス粒子」という用語は、本明細書で使用される場合、脂質、特にカチオン性脂質およびRNAを含有する粒子に関する。プラスに荷電したリポソームとマイナスに荷電したRNAとの間の静電的相互作用により、複合体が形成され、RNAリポプレックス粒子が自発的に形成される。プラスに荷電したリポソームは、一般にDOTMAなどのカチオン性脂質およびDOPEなどの付加的脂質を使用して合成され得る。一実施形態では、RNAリポプレックス粒子はナノ粒子である。

【0326】

50

本開示で使用される場合、「ナノ粒子」は、RNAおよび少なくとも1つのカチオン性脂質を含み、静脈内投与に適した平均直径を有する粒子を指す。

【0327】

「平均直径」という用語は、いわゆるキュムラントアルゴリズムを使用するデータ解析により動的光散乱(DLS)によって測定される粒子の平均流体力学的直径を指し、このアルゴリズムは、結果として、長さの寸法を有するいわゆるZ平均、および無次元である多分散性指数(PI)を提供する(Koppel, D., J. Chem. Phys. 57, 1972, pp 4814-4820, ISO 13321)。ここでは、粒子の「平均直径」、「直径」または「サイズ」は、このZ平均の値と同義に使用される。

【0328】

一実施形態では、第5の態様の核酸または第6の態様のベクターは、第1および態様に記載されている抗体鎖をコードする核酸配列を含む。例えば、抗体または抗体鎖をコードする核酸配列は、本明細書に記載されている抗体、例えば、MAB-19-0202、MAB-19-0618)、またはこれらの抗体のうちの1つの重鎖もしくは軽鎖をコードする核酸配列を含み得る。

【0329】

抗体鎖は重鎖(H鎖=HC)または軽鎖(L鎖=LC)であり得、それぞれ好ましくは本明細書に記載されている。一実施形態では、H鎖は、重鎖可変領域(VH)および重鎖定常領域を含み、重鎖定常領域は、重鎖CH₁定常領域、または重鎖CH₁定常領域、重鎖CH₂定常領域および重鎖CH₃定常領域の組合せを含み得る。一実施形態では、CH₁定常ドメインおよびCH₂定常ドメインは、CH₁定常ドメインとCH₂定常ドメインとの間に位置するヒンジ領域によって接続され得る。

【0330】

一実施形態では、L鎖は、軽鎖可変領域(VL)および軽鎖定常領域を含み、軽鎖定常領域は、CLカッパ定常ドメインまたはCLラムダ定常ドメインであり得る。例えば、軽鎖定常領域は、配列番号6に記載された配列を有し得るか、もしくはそれを含み得るか、またはそれらの変異体である。

【0331】

一実施形態では、第1の態様の抗体または抗体鎖をコードする核酸は、本明細書で例示されているHC_{DR1}、HC_{DR2}、およびHC_{DR3}配列(配列表の配列番号8~13、SYN)の少なくとも1つを含む重鎖可変領域(VH)をコードする核酸配列を含む。すなわち、第5の態様の核酸は、本明細書で例示されているHC_{DR1}、HC_{DR2}、もしくはHC_{DR3}配列をコードする核酸配列を含み得るか、または核酸は、本明細書で定義されているHC_{DR1}、HC_{DR2}、およびHC_{DR3}配列の組合せのいずれかを含む重鎖可変領域(VH)をコードする核酸配列を含み得る。個々のHC_{DR1}~HC_{DR3}配列の好ましい組合せは、第1の態様のそれぞれのアミノ酸配列に関して上記で明示した通りである。この教示は、第5の態様の核酸配列にも適宜適用される。

【0332】

一実施形態では、第5の態様の核酸は、本明細書で例示されているLC_{DR1}、LC_{DR2}、およびLC_{DR3}配列(配列表の配列番号14~17、QAS)の少なくとも1つを含む軽鎖可変領域(VL)をコードする核酸配列を含む。すなわち、核酸は、本明細書で例示されているLC_{DR1}、LC_{DR2}、もしくはLC_{DR3}配列をコードする核酸配列を含み得るか、または核酸は、本明細書で定義されているLC_{DR1}、LC_{DR2}、およびLC_{DR3}配列の組合せのいずれかを含む軽鎖可変領域(VL)をコードする核酸配列を含み得る。個々のLC_{DR1}~LC_{DR3}配列の好ましい組合せは、第1の態様のそれぞれのアミノ酸配列に関して上記で明示した通りである。この教示は、第5の態様の核酸配列にも適宜適用される。

【0333】

一実施形態では、第5の態様の核酸は、本明細書で例示されているVHおよびVL配列(配列表の配列番号18~21)をコードする核酸配列を含む。

【0334】

一実施形態では、第1の態様によるPD-1に結合する抗体の重鎖可変領域（VH）および／または軽鎖可変領域（VL）をコードする核酸配列を含む、核酸、または核酸を含むベクター、例えば、RNAまたはRNAベースのベクター、またはインビトロ転写に適したベクターが提供される。

【0335】

一実施形態では、変異体核酸配列は、本明細書で明示されているそれぞれのCDR1、CDR2およびCDR3アミノ酸配列の1つ以上を含む／コードする。すなわち、重鎖可変領域（VH）をコードする変異体核酸配列は、本明細書で明示されているHCDR1、HCDR2およびHCDR3アミノ酸配列のうちの1つ以上を含む／コードすることができる。CDR配列の特定の組合せについては、本明細書におけるそれぞれの開示が参照される。例えば、変異体核酸配列は、本明細書で明示されているHCDR1、HCDR2、およびHCDR3アミノ酸配列を含む／それをコードすることができる。

10

【0336】

軽鎖可変領域（VL）をコードする変異体核酸配列は、本明細書で明示されているLCDR1、LCDR2およびLCDR3アミノ酸配列のうちの1つ以上を含む／コードする場合があります。CDR配列の特定の組合せについては、本明細書のそれぞれの開示が参照される。例えば、変異体核酸配列は、本明細書で明示されているLCDR1、LCDR2、およびLCDR3アミノ酸配列を含む／それをコードすることができる。

【0337】

変異体核酸配列は、親配列の重鎖可変領域（VH）または軽鎖可変領域（VL）によって提供されるのと同じ結合特異性および／または機能性を提供することが可能な重鎖可変領域（VH）または軽鎖可変領域（VL）をそれぞれコードし得る。

20

【0338】

第5の態様の核酸、または抗PD-1抗体を生成するための第6の態様のベクター（例えば、RNAまたはRNAベースのベクター）は、インビトロ転写法によって産生され得る。

【0339】

このような方法は、本明細書の上記で定義されている重鎖可変領域（VH）または軽鎖可変領域（VL）のDNA配列を、標準的なクローニング技法を使用してIVTベクター（例えば、pST4ベクター）に挿入する工程を含む。ベクターは、本明細書で定義されている5'-UTR、本明細書で定義されている3'-UTR、本明細書の上記で定義されているポリ（A）テール、例えば、30個のアデニンヌクレオチドを含むポリ（A）テール、リンカー（L）およびさらに（A30LA70）を含んでもよい。さらに、IVTベクターは、分泌シグナルペプチド、例えば、本明細書で定義されている分泌シグナルペプチドをコードする核酸配列を適宜含んでもよい。

30

【0340】

インビトロ転写のための鋳型を作成するために、プラスミドDNAは、例えば制限エンドヌクレアーゼを使用して、ポリ（A）テールコード領域の下流で線状化され、それによって、例えばT7 RNAポリメラーゼを使用することによって、mRNAを転写するための鋳型を作成することができる。

40

【0341】

インビトロ転写の際、RNAは、免疫原性を最小化するように改変され、その5'末端でキャップされ得る。

【0342】

このようにして得られた、適宜キャップされたRNAは、宿主細胞、例えばNS0細胞、Sp2/0細胞、HEK293細胞またはその誘導体、例えばHEK293T、HEK293T/17および／またはHEK293F、COS細胞、Vero細胞および／またはHeLa細胞をトランスフェクトするために使用される。一実施形態では、哺乳動物宿主細胞は、HEK293、HEK293Tおよび／またはHEK293T/17細胞から

50

選択される。トランスフェクションのために、例えば本明細書の上記に記載されているリポソームが使用されてもよい。

【0343】

トランスフェクトされた細胞は、抗体もしくは抗体鎖またはその断片を発現させるために使用される。抗PD-1抗体のH鎖とL鎖の両方を発現させるために、宿主細胞は好ましくは両方のタイプのRNA、すなわち抗PD-1抗体のH鎖とL鎖をそれぞれコードする個々のRNAでトランスフェクトされる。

【0344】

抗PD-1抗体は、細胞内、ペリプラズム空間で産生され得るか、または培地中に直接分泌され得る。抗体が細胞内で産生される場合、細胞はその後溶解され、例えば遠心分離または限外ろ過によって細胞デブリが除去される。当業者は、細胞内で産生された抗体を単離するための適切な方法を熟知している。ペリプラズム空間に分泌された抗体を単離する方法も同様である。抗体が培地中に分泌される場合、例えば分泌型シグナルペプチドを使用することにより、このような発現系からの上清は、例えば市販のタンパク質濃縮フィルターを使用することにより、最初に濃縮され得る。プロテアーゼ阻害剤、例えばPMSEは、タンパク質分解を阻害するために前述のステップのいずれかに含まれてもよく、抗生物質は夾雑物の成長を防ぐために含まれてもよい。トランスフェクトされた宿主細胞から調製された抗PD-1抗体は、例えば、アフィニティークロマトグラフィーなどのクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、フローサイトメトリーおよび／または透析を使用することによって精製することができる。

【0345】

特定の核酸配列およびアミノ酸配列、例えば配列表に示されている配列に関して本明細書で与えられる教示は、前記特定の配列と機能的に等価な配列をもたらす前記特定の配列の改変、例えば、特定のアミノ酸配列と同一または類似の特性を示すアミノ酸配列、および特定の核酸配列によってコードされるアミノ酸配列と同一または類似の特性を示すアミノ酸配列をコードする核酸配列にも関連するように解釈される。1つの重要な特性は、抗体の標的への結合を保持すること、または抗体の所望のエフェクター機能を持続させることである。好ましくは、特定の配列に関して改変された配列は、抗体中の特定の配列に置き換わる場合、PD-1に対する前記抗体の結合を保持し、好ましくは、本明細書に記載されている前記抗体の機能、例えば、PD-1を発現する細胞上でのPD-1の免疫抑制、CDC媒介溶解またはADCC媒介溶解の阻害を保持する。

【0346】

例えば、核酸配列およびアミノ酸配列の変異体は、本明細書に記載されているように、抗体または抗原結合断片をコードまたは提供し、これらは以下の特性のうちの少なくとも1つを提供する：

(i) PD-1、例えばヒトPD-1に結合可能、好ましくは特異的に結合可能であること；

(ii) PD-1とそのリガンドとの結合を遮断可能であること；

(iii) 親抗体が結合するのと同じ抗原に、好ましくは診断および／もしくは治療的使用に十分な親和性で結合可能であること；ならびに／または

(iv) エフェクター機能を低下または枯渇させることが可能であること。

【0347】

特にCDR、超可変領域および可変領域の配列は、PD-1と結合する能力を失うことなく改変され得ることが当業者に認識されるであろう。例えば、CDR領域は、本明細書で明示される領域と同一であるか、または高度に相同である。「高度に相同な」によって、CDRにおいて1～5個、好ましくは1～4個、例えば1～3個または1～2個の置換がなされ得ることが企図される。さらに、超可変領域および可変領域は、本明細書で具体的に開示される領域と実質的な相同性を示すように改変されてもよい。

【0348】

「変異体」という用語は、本明細書で使用される場合、突然変異体、スプライス変異体

、立体構造、アイソフォーム、対立遺伝子変異体、種変異体、および種ホモログ、特に天然に存在するものを指す。対立遺伝子変異体は、遺伝子の正常な配列における変化に関するものであり、その意義はしばしば不明である。完全な遺伝子シーケンシングにより、所与の遺伝子について多数の対立遺伝子変異体が特定されることが多い。種ホモログとは、所与の核酸またはアミノ酸配列の起源とは異なる種を有する核酸またはアミノ酸配列である。「変異体」という用語は、任意の翻訳後改変変異体および立体構造変異体を包含するものとする。

【0349】

本開示の目的のために、アミノ酸配列（ペプチド、タンパク質またはポリペプチド）の「変異体」は、アミノ酸挿入変異体、アミノ酸付加変異体、アミノ酸欠失変異体および／またはアミノ酸置換変異体を含む。「変異体」という用語は、すべての突然変異体、スプライス変異体、翻訳後改変変異体、立体構造、アイソフォーム、対立遺伝子変異体、種変異体、および種ホモログ、特に天然に存在するものを含む。「変異体」という用語は、特にアミノ酸配列の断片を含む。

【0350】

アミノ酸挿入変異体は、特定のアミノ酸配列における単一または2つ以上のアミノ酸の挿入を含む。挿入を有するアミノ酸配列変異体の場合には、1つ以上のアミノ酸残基がアミノ酸配列の特定の部位に挿入されるが、得られた産物を適切にスクリーニングしながらランダムに挿入することも可能である。

【0351】

アミノ酸付加変異体は、1つ以上のアミノ酸、例えば1、2、3、5、10、20、30、50個、またはそれより多いアミノ酸のアミノ末端および／またはカルボキシ末端の融合体を含む。

【0352】

アミノ酸欠失変異体は、1、2、3、5、10、20、30、50個、またはそれより多いアミノ酸の除去などによって、配列からの1つ以上のアミノ酸の除去によって特徴づけられる。欠失はタンパク質のどの位置にあってもよい。タンパク質のN末端および／またはC末端での欠失を含むアミノ酸欠失変異体は、N末端および／またはC末端切断変異体とも呼ばれる。

【0353】

アミノ酸置換変異体は、配列中の少なくとも1つの残基が除去され、その代わりに別の残基が挿入されることを特徴とする。1つのアミノ酸を別のアミノ酸に置き換えることは、保存的置換または非保存的置換に分類され得る。相同タンパク質もしくはペプチド間で保存されていないアミノ酸配列の位置での改変、および／または類似の特性を有する他のアミノ酸によるアミノ酸の置き換えが優先される。好ましくは、ペプチドおよびタンパク質の変異体におけるアミノ酸変化は、保存的アミノ酸変化、すなわち、同様に荷電したまたは荷電していないアミノ酸の置換である。保存的アミノ酸変化は、側鎖に関連するアミノ酸ファミリーの1つの置換を含む。本開示の文脈において、「保存的置換」とは、1つのアミノ酸を、類似の構造的および／または化学的特性を有する別のアミノ酸で置換することであり、このような置換は、1つのアミノ酸残基を、上記の2つの表のいずれかで定義されているのと同じクラスの別のアミノ酸残基で置換することであり：例えば、ロイシンは、両方とも脂肪族の、分岐状の疎水性であるので、イソロイシンで置換されてもよい。同様に、アスパラギン酸はグルタミン酸と置換されてもよく、なぜなら、これらは両方とも小さく、マイナスに荷電した残基だからである。一実施形態では、保存的アミノ酸置換には、以下の群内の置換が含まれる：

- グリシン、アラニン；
- バリン、イソロイシン、ロイシン；
- アスパラギン酸、グルタミン酸；
- アスパラギン、グルタミン；
- セリン、スレオニン；

10

20

30

40

50

- ー リシン、アルギニン；および
- ー フェニルアラニン、チロシン。

【0354】

好ましくは、所与のアミノ酸配列と前記所与のアミノ酸配列の変異体であるアミノ酸配列との間の類似性の程度、好ましくは同一性の程度は、少なくとも約60%、65%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%であろう。類似性または同一性の程度は、好ましくは、参照アミノ酸配列の全長の少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%または約100%であるアミノ酸領域について与えられる。例えば、参照アミノ酸配列が200個のアミノ酸からなる場合、類似性または同一性の程度は、好ましくは少なくとも約20、少なくとも約40、少なくとも約60、少なくとも約80、少なくとも約100、少なくとも約120、少なくとも約140、少なくとも約160、少なくとも約180、または約200個のアミノ酸、好ましくは連続アミノ酸について与えられる。好ましい実施形態では、類似性または同一性の程度は、参照アミノ酸配列の全長について与えられる。配列類似性、好ましくは配列同一性を決定するためのアライメントは、技術的に公知のツールを用いて行うことができ、好ましくは、最良の配列アライメントを使用して、例えば、Alignを使用して、標準的な設定、好ましくは、EMBOSS::needle、Matrix:Blosum62、Gap Open 10.0、Gap Extend 0.5を使用して行うことができる。

10

20

【0355】

「配列類似性」は、同一であるか、または保存的アミノ酸置換を表すアミノ酸のパーセンテージを示す。2つのアミノ酸配列間の「配列同一性」は、配列間で同一であるアミノ酸のパーセンテージを示す。

【0356】

「同一性パーセンテージ」という用語は、最良のアライメントの後に得られる、比較される2つの配列間で同一であるアミノ酸残基のパーセンテージを示すことを意図しており、このパーセンテージは、純粹に統計的であり、2つの配列間の差異は、その全長にわたってランダムに分布する。2つのアミノ酸配列間の配列比較は、従来、最適にアラインされた後にこれらの配列を比較することによって行われ、前記比較は、配列類似性の局所領域を同定して比較するために、セグメントごとまたは「比較の窓」ごとに行われる。比較のための配列の最適アライメントは、手作業の他に、Smith and Waterman, 1981, Ads App. Math. 2, 482の局所相同性アルゴリズムによって、Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48, 443の局所相同性アルゴリズムによって、Pearson and Lipman, 1988, Proc. Natl Acad. Sci. USA 85, 2444の類似する検索方法によって、またはこれらのアルゴリズムを使用するコンピュータープログラム（Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.のGAP、BESTFIT、FASTA、BLAST P、BLAST NおよびTFASTA）によって生成され得る。

30

40

【0357】

同一性パーセンテージは、比較される2つの配列間の同一位置の数を決定し、この数を比較された位置の数で割り、得られた結果に100を乗じて、これら2つの配列間の同一性パーセンテージを得ることによって計算される。

【0358】

核酸分子に関して、「変異体」という用語は、変性した核酸配列を含み、変性した核酸は、本明細書で使用される場合、遺伝暗号の変性によりコドン配列が参照核酸と異なる核酸である。

【0359】

さらに、所与の核酸配列の「変異体」には、本明細書で使用される場合、単一または複

50

数、例えば、少なくとも2、少なくとも4、または少なくとも6、好ましくは最大3、最大4、最大5、最大6、最大10、最大15、または最大20個のヌクレオチドの置換、欠失、および／または付加を含む核酸配列が含まれる。

【0360】

好ましくは、所与の核酸配列と前記所与の核酸配列の変異体である核酸配列との間の同一性の程度は、少なくとも70%、好ましくは少なくとも75%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%、または最も好ましくは少なくとも95%、96%、97%、98%または99%であろう。同一性の程度は、好ましくは、少なくとも約30、少なくとも約50、少なくとも約70、少なくとも約90、少なくとも約100、少なくとも約150、少なくとも約200、少なくとも約250、少なくとも約300、または少なくとも約400個のヌクレオチドの領域に対して与えられる。好ましい実施形態では、同一性の程度は、参照核酸配列の全長に対して与えられる。

10

【0361】

2つの核酸配列間の「配列同一性」は、配列間で同一であるヌクレオチドのパーセンテージを示す。

【0362】

「同一性パーセンテージ」という用語は、最良のアライメントの後に得られる、比較される2つの配列間で同一であるヌクレオチドのパーセンテージを示すことを意図しており、このパーセンテージは、純粹に統計的であり、2つの配列間の差異は、その全長にわたってランダムに分布する。2つのヌクレオチド間の配列比較は、従来、最適にアラインされた後にこれらの配列を比較することによって行われ、前記比較は、配列類似性の局所領域を同定して比較するために、セグメントごとまたは「比較の窓」ごとに行われる。比較のための配列の最適アライメントは、手作業の他に、Smith and Waterman, 1981, *Ads App. Math.* 2, 482の局所相同性アルゴリズムによって、Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443の局所相同性アルゴリズムによって、Pearson and Lipman, 1988, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 2444の類似する検索方法によって、またはこれらのアルゴリズムを使用するコンピュータープログラム（Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.のGAP、BESTFIT、FASTA、BLAST P、BLAST NおよびTFASTA）によって生成され得る。

20

30

【0363】

同一性パーセンテージは、比較される2つの配列間の同一位置の数を決定し、この数を比較された位置の数で割り、得られた結果に100を乗じて、これら2つの配列間の同一性パーセンテージを得ることによって計算される。

【0364】

「部分（part）」、「断片（fragment）」および「部分（portion）」という用語は、本明細書において互換的に使用され、構造の連続的または不連続的な画分を指す。アミノ酸配列またはタンパク質または核酸配列などの特定の構造に関して、その「部分（part）」、「断片（fragment）」および「部分（portion）」という用語は、前記構造の連続的または不連続的な画分を指定し得る。好ましくは、アミノ酸配列または核酸配列などの構造の「一部（a part）」、「断片（a fragment）」および「一部（a portion）」は、全体的な構造またはアミノ酸配列または核酸配列の少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも94%、少なくとも96%、少なくとも98%、少なくとも99%を含むことが好ましく、それからなることが好ましい。構造の一部（a portion）、一部（a part）または断片（a fragment）は、好ましくは、前記構造の1つ以上の機能的特性を構成する。例えば、エピトープ、ペプチドまたはタンパク質の一部（a portion）

40

50

、一部 (a part) または断片 (a fragment) は、好ましくは、それが由来するエピトープ、ペプチドまたはタンパク質と免疫学的に等価である。「部分 (portion)」、「部分 (part)」、または「断片 (fragment)」が不連続画分である場合、前記不連続画分は、好ましくは、構造の 2、3、4、5、6、7、8 またはそれより多い部分から構成され、各部分は構造の連続的要素である。例えば、アミノ酸配列の不連続画分は、前記アミノ酸配列の 2、3、4、5、6、7、8、またはそれより多い、好ましくは 4 つ以下の部分から構成されてもよく、各部分は、好ましくはアミノ酸配列の少なくとも 5 個の連続アミノ酸、少なくとも 10 個の連続アミノ酸、好ましくは少なくとも 20 個の連続アミノ酸、好ましくは少なくとも 30 個の連続アミノ酸を含む。

【0365】

本明細書に記載の核酸には、特定の宿主細胞または生物におけるコドン使用法を最適化するために改変された核酸も含まれることを理解されたい。生物間のコドン使用法の相違は、異種遺伝子発現に関する種々の問題を引き起こし得る。元の配列の 1 つ以上のヌクレオチドを変化させることによるコドン最適化は、前記核酸が発現されるべき同種または異種の宿主において、核酸の発現の最適化、特に翻訳効率の最適化をもたらし得る。例えば、ヒトに由来し、抗体の定常領域および／またはフレームワーク領域をコードする核酸を、例えばキメラ抗体またはヒト化抗体を調製するために使用する場合、コドン使用法の最適化のために、特に、本明細書に記載されている他の生物に由来する核酸などの異種核酸に融合されてもよい前記核酸を、マウスまたはハムスターなどのヒトとは異なる生物の細胞で発現させる場合には、前記核酸を改変することが好ましい場合がある。例えば、ヒト軽鎖および重鎖定常領域をコードする核酸配列は、1 つ以上、好ましくは少なくとも 1、2、3、4、5、10、15、20、好ましくは最大 10、15、20、25、30、50、70 もしくは 100 個またはそれより多いヌクレオチドの置き換えを含むように改変することができ、その結果、コドン使用法は最適化されるが、アミノ酸配列の変化は生じない。

【0366】

「遺伝物質」という用語には、単離された核酸、DNA または RNA、二重らせんのセクション、染色体のセクション、または生物もしくは細胞の全ゲノム、特にそのエクソームもしくはトランスクリプトームが含まれる。

【0367】

「突然変異」という用語は、参照配列と比較した、核酸配列の変化または差異（ヌクレオチドの置換、付加または欠失）を指す。「体細胞突然変異」は、生殖細胞（精子および卵子）を除く身体のある細胞で起こりうるため、子供に遺伝することはない。これらの変更は、がんやその他の疾患を引き起こし得る（しかし、必ずしもそうとは限らない）。好ましくは、突然変異は非同義的突然変異である。「非同義的突然変異」という用語は、突然変異、好ましくはヌクレオチド置換を指し、翻訳産物におけるアミノ酸置換などのアミノ酸変化をもたらす。

【0368】

「突然変異」という用語は、本明細書で使用される場合、点突然変異、インデル、融合、クロモスリプシスおよび RNA エディットを含む。「インデル」という用語は、本明細書で使用される場合、特殊な突然変異の分類を記載し、挿入と欠失が共局在し、ヌクレオチドが純増または純減する変異として定義される。ゲノムのコード領域では、インデルの長さが 3 の倍数でない限り、フレームシフト変異を生じる。インデルは、ヌクレオチドを挿入および配列から欠失させる点突然変異と対比することができ、点突然変異はヌクレオチドの 1 つを置き換える置換の形態である。「クロモスリプシス」という用語は、本明細書で使用される場合、ゲノムの特定の領域が破壊され、単一の破壊的な事象によってつなが合わされる遺伝現象を指す。「RNA 編集 (RNA edit)」または「RNA 編集 (RNA editing)」という用語は、本明細書で使用される場合、塩基構造の化学的变化を通じて RNA 分子の情報内容が変化する分子プロセスを指す。RNA 編集には、シチジン (C) からウリジン (U) への脱アミノ化、およびアデノシン (A) からイノ

10

20

30

40

50

シン（I）への脱アミノ化などのヌクレオシド改変、ならびに非鋳型ヌクレオチドの付加および挿入が含まれる。mRNAにおけるRNA編集は、コードされるタンパク質のアミノ酸配列を効果的に変化させ、ゲノムDNA配列から予測されるものとは異なるようにする。

【0369】

本開示によれば、腫瘍検体から得られた結果を相関させ比較するために、「参照」が使用され得る。典型的には、「参照」は、患者または1以上の異なる個体、好ましくは健康な個体、特に同じ種の個体から得られた1つ以上の正常検体、特にがん疾患に罹患していない検体に基づいて得られ得る。「参照」は、十分に多数の正常検体を検査することによって経験的に決定することができる。

10

【0370】

第7の態様では、第5の態様の核酸または第6の態様のベクターを含む細胞または宿主細胞が提供される。

【0371】

細胞は、第5の態様の核酸、例えばRNAが、例えばRNAと複合体を形成することによって、またはRNAが封入またはカプセル化されたベシクルを形成することによって会合され得る任意の担体でトランスフェクトされ得、その結果、ネイキッドRNAと比較してRNAの安定性が増大する。本開示による有用な担体には、例えば、カチオン性脂質、リポソーム、特にカチオン性リポソーム、およびミセルなどの脂質含有担体、およびリポブレンクス粒子などのナノ粒子が含まれる。カチオン性脂質は、マイナスに荷電した核酸と複合体を形成し得る。いかなるカチオン性脂質も本開示に従って使用され得る。

20

【0372】

トランスフェクトされ得る細胞は、組換え体となる宿主細胞も含む。「組換え宿主細胞」という用語は、本明細書で使用される場合、組換え発現ベクターが導入された細胞を指すことを意図する。このような用語は、特定の対象細胞だけでなく、このような細胞の子孫を指すことを意図していることを理解すべきである。突然変異または環境の影響のいずれかにより、ある特定の改変が後代に起こる可能性があるため、このような子孫は実際には親細胞と同一ではないかもしれないが、それでも本明細書で使用される場合、「組換え宿主細胞」という用語の範囲に含まれる。宿主細胞は、原核および／または真核宿主細胞であり得る。これらの宿主細胞に、外因性核酸および／またはベクターを導入することができる。一実施形態では、宿主細胞は真核宿主細胞であり、好ましくは哺乳動物宿主細胞である。一実施形態では、哺乳動物宿主細胞は、CHO（チャイニーズハムスター卵巣）細胞、CHO-K1およびCHO pr o-3などのCHO細胞系の誘導体、またはリンパ球細胞である。一実施形態では、哺乳動物宿主細胞は、NS0およびSp2/0などのマウス骨髄腫細胞、HEK293（ヒト胚性腎臓）細胞またはその誘導体、例えばHEK293T、HEK293T/17および／もしくはHEK293F、COS細胞およびVero細胞（いずれもミドリザルの腎臓）、ならびに／またはHeLa（ヒト子宮頸がん）細胞から選択される。一実施形態では、哺乳動物宿主細胞は、HEK293、HEK293Tおよび／またはHEK293T/17細胞から選択される。宿主細胞のさらなる例は、微生物、例えば大腸菌、および真菌、例えば酵母、例えば出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）または糸状菌、例えばニューロスポーラ（*Neurospora*）宿主およびアスペルギルス（*Aspergillus*）宿主である。宿主細胞および組換え宿主細胞としては、例えば、CHO細胞、NS/0細胞、Sp2/0細胞、COS細胞、Vero細胞、HeLa細胞、HEK293細胞、HEK293T細胞、HEK293T/17細胞、およびリンパ球細胞などのトランスフェクトーマが挙げられる。

30

40

【0373】

本明細書で定義されている抗体を産生するために使用される宿主細胞は、市販されており、当業者によく知られている種々の培地で培養され得る。これらの培地はいずれも、必要に応じてホルモンおよび／または他の成長因子を補充され得る。

50

【0374】

第8の態様では、第5の態様の核酸または第6の態様のベクターを含むウイルスが提供される。

【0375】

本開示によれば、例えば、カチオン性脂質、リポソーム、特にカチオン性リポソーム、ミセルなどの脂質含有担体、およびリポプレックス粒子などのナノ粒子を含むような担体を使用することによって、核酸を提供／投与する代わりに、組換え宿主細胞、好ましくは上記で明示したような細胞、または抗体もしくは抗体由来の抗体断片をコードする組換えウイルスを使用することによって、目的の核酸が提供／投与され得る。

【0376】

これらのウイルスはDNAまたはRNAウイルスであり得る。悪性疾患の免疫療法を強化する可能性に関して、いくつかのウイルスベクターが有望な結果を示している。複製能のあるウイルスと複製能のないウイルスが使用され得るが、後者の群が好ましい。ヘルペスウイルス、アデノウイルス、ワクシニア、レオウイルス、およびニューキャッスル病ウイルスは、本開示に従って有用な好ましいウイルスの例である。一実施形態では、ウイルスまたはウイルスベクターは、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ワクシニアウイルスおよび弱毒化ポックスウイルスを含むポックスウイルス、セムリキフォレストウイルス、レオウイルス、レトロウイルス、ニューキャッスル病ウイルス、シンドビスウイルスおよびTyウイルス様粒子からなる群から選択される。特にアデノウイルスおよびレトロウイルスが好ましい。レトロウイルスは、典型的には、複製欠損型である（すなわち、感染性粒子を生成できない）。

【0377】

インビトロまたはインビボで細胞に核酸を導入する方法は、核酸リン酸カルシウム沈殿物のトランスフェクション、DEAEに関連する核酸のトランスフェクション、目的の核酸を有する上記ウイルスのトランスフェクションまたは感染、リポソーム媒介性トランスフェクションなどを含む。特定の実施形態では、核酸を特定の細胞に誘導することが優先される。このような実施形態では、核酸を細胞に投与するために使用される担体（例えば、レトロウイルスまたはリポソーム）は、結合した標的制御分子を有し得る。例えば、標的細胞上の表面膜タンパク質に特異的な抗体または標的細胞上の受容体に対するリガンドなどの分子を、核酸担体に組み込むか、またはそれに結合させてもよい。好ましい抗体は、腫瘍抗原に選択的に結合する抗体を含む。リポソームを介した核酸の投与が望まれる場合、エンドサイトーシスに関連する表面膜タンパク質に結合するタンパク質を、標的の制御および／または取り込みを可能にするために、リポソーム製剤に組み込んでもよい。このようなタンパク質は、特定の細胞型に特異的なカプシドタンパク質またはその断片、内在化するタンパク質に対する抗体、細胞内部位に対応するタンパク質などを含む。

【0378】

好ましくは、ペプチドまたはポリペプチドをコードするRNAの細胞への導入、特にインビボで存在する細胞への導入は、細胞における前記ペプチドまたはポリペプチドの発現をもたらす。特定の実施形態では、特定の細胞への核酸の標的化が好ましい。このような実施形態では、細胞への核酸の投与のために適用される担体（例えば、レトロウイルスまたはリポソーム）は、標的化分子を示す。例えば、標的細胞上の表面膜タンパク質に特異的な抗体または標的細胞上の受容体に対するリガンドなどの分子を、核酸担体に組み込むか、またはそれに結合させてもよい。核酸がリポソームによって投与される場合、エンドサイトーシスに関連する表面膜タンパク質に結合するタンパク質を、標的化および／または取り込みを可能にするために、リポソーム製剤に組み込んでもよい。このようなタンパク質は、特定の細胞型に特異的なその断片のカプシドタンパク質または、内在化するタンパク質に対する抗体、細胞内の位置を標的とするタンパク質などを包含する。

【0379】

本明細書において別段の指示がない限り、または文脈によって明らかに矛盾しない限り、本明細書の第VI項で抗体をコードする核酸に関して与えられた教示は、抗原のエピト

10

20

30

40

50

ープを含むペプチドまたはタンパク質をコードする核酸／ポリヌクレオチドにも適宜適用可能であることを理解されたい。抗原提示細胞におけるRNAの発現に有益に使用され得る脾臓標的化RNAリボプレックス粒子は、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2013／143683号に記載されている。

【0380】

VII. 医薬組成物

第9の態様では、本開示は、第1、第3および／もしくは第4の態様のコンジュゲートおよび／もしくは多量体を含む抗体の1つもしくは組合せを含む、ならびに／または第5、第6および／もしくは第7の態様の前記核酸を含む宿主細胞もしくはベクターを含む、抗体をコードする核酸配列を含む核酸の1つもしくは組合せを含む、組成物、例えば医薬組成物を提供する。医薬組成物は、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995に開示されているものなどの従来の技術に従って、薬学的に許容される担体または希釈剤、ならびに任意の他の公知のアジュバントおよび賦形剤と共に製剤化され得る。一実施形態では、組成物は、複数（例えば、2つ以上）の単離された抗体の組合せを含む。別の実施形態では、組成物は、複数（例えば、2つ以上）の核酸、ベクターまたは宿主細胞の組合せを含む。

10

【0381】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」は、生理学的に適合性の、ありとあらゆる溶媒、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。好ましくは、担体は、心血管系（例えば、静脈内または動脈内）、筋肉内、皮下、非経口、脊髄または表皮投与（例えば、注射または注入による）に適している。投与経路に応じて、活性化合物、すなわち抗体、二特異性および多特異性分子、核酸、ベクターは、化合物を不活性化し得る酸および他の自然条件の作用から化合物を保護する材料でコーティングされ得る。

20

【0382】

「薬学的に許容される物質」とは、親化合物の所望の生物活性を保持し、望ましくない毒物学的作用を付与しない物質を指す〔例えば、Berge, S. M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66: 1-19を参照されたい〕。

30

【0383】

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、および液状ポリエチレングリコールなど）、生理食塩水および緩衝水溶液、オリーブ油などの植物油、オレイン酸エチルなどの注射用有機エステルおよびそれらの適当な混合物を含む溶媒または分散媒であり得る。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、分散液の場合には必要な粒径の維持、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。

【0384】

第9の態様の担体または組成物はまた、薬学的に許容される塩を含み得る。含まれてもよい薬学的に許容される塩の例には、酸付加塩および塩基付加塩が含まれる。酸付加塩としては、塩酸、硝酸、リン酸、硫酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、リン酸などの無毒性無機酸から誘導されるもの、ならびに脂肪族モノーおよびジカルボン酸、フェニル置換アルカン酸、ヒドロキシアルカン酸、芳香族酸、脂肪族および芳香族スルホン酸などの無毒性有機酸から誘導されるものが挙げられる。塩基付加塩としては、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムなどのアルカリ土類金属由来のもの、N, N'-ジベンジルエチレンジアミン、N-メチルグルカミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、プロカインなどの無毒性有機アミン由来のものが挙げられる。

40

【0385】

第9の態様の組成物はまた、酸化防止剤を含んでもよい。薬学的に許容される酸化防止剤の例としては、以下が挙げられる：（1）水溶性酸化防止剤、例えば、アスコルビン酸、塩酸システイン、重硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなど

50

；（２）油溶性酸化防止剤、例えば、パルミチン酸アスコルビル、ブチル化ヒドロキシアニソール（ＢＨＡ）、ブチル化ヒドロキシトルエン（ＢＨＴ）、レシチン、没食子酸プロピル、アルファートコフェロールなど；および（３）金属キレート剤、例えばクエン酸、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、ソルビトール、酒石酸、リン酸など。

【０３８６】

第９の態様の組成物はまた、防腐剤、湿潤剤、乳化剤および分散剤などのアジュバントを含んでもよい。微生物の存在の防止は、滅菌手順、および様々な抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノールソルビン酸などを含むことの両方によって確保され得る。また、等張剤、例えば、糖類、マンニトール、ソルビトールなどの多価アルコール、または塩化ナトリウムを組成物に含めることが望ましい場合もある。さらに、吸収を遅延させる薬剤、例えばモノステアリン酸塩およびゼラチンを含むことにより、注射用医薬形態の吸収の延長がもたらされ得る。

10

【０３８７】

薬学的に許容される担体には、滅菌した水溶液または分散液、および滅菌した注射用溶液または分散液を即座に調製するための滅菌粉末が含まれる。薬学的に活性な物質に対するそのような媒体および薬剤の使用は、当技術分野において公知である。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き、第９の態様の医薬組成物におけるそれらの使用が企図される。補足的な活性化化合物も組成物に組み込むことができる。

【０３８８】

薬学的組成物は、典型的には滅菌されており、製造および保存の条件下で安定でなければならない。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、リポソーム、または高濃度の薬物に適した他の秩序構造として製剤化することができる。

20

【０３８９】

第９の態様の一実施形態では、医薬組成物は、非経口投与用、好ましくは心血管用、特に静脈内または動脈内投与用に製剤化される。

【０３９０】

第９の態様の組成物は、当技術分野で公知の種々の方法によって投与することができる。当業者には理解されるように、投与の経路および／または様式は、所望の結果に応じて変化する。活性化化合物は、インプラント、経皮パッチ、およびマイクロカプセル化デリバリー系を含む制御放出製剤などの、化合物を急速放出から保護する担体と共に調製することができる。生分解性で生体適合性のポリマーとして、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を使用することができる。このような製剤を調製するための方法は、一般に当業者に知られている。例えば、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978を参照されたい。

30

【０３９１】

ある特定の投与経路で化合物（例えば、前述の態様の抗体または核酸またはベクターまたは核酸もしくはベクターの組合せ）を投与するために、化合物を不活性化を防ぐための物質でコーティングするか、またはそれと共に共投与することが必要な場合がある。例えば、化合物は、適切な担体、例えばリポソーム、または希釈剤中で対象に投与されてもよい。薬学的に許容される希釈剤としては、生理食塩水および緩衝水溶液が挙げられる。リポソームには、従来のリポソームと同様に、水中油中水型ＣＧＦエマルジョンが含まれる

40

[Strejan et al. (1984) J. Neuroimmunol. 7: 27]。

【０３９２】

滅菌注射溶液は、必要な量の活性化化合物を適切な溶媒に、必要に応じて上記に列挙した成分の１つまたは組合せで投入し、次いで滅菌精密ろ過を行うことにより調製することができる。

【０３９３】

一般的に、分散液は、基本的な分散媒を含有する滅菌媒体および上記に列記されたものからの必要とされる他の成分へと活性化化合物を組み込むことにより、調製される。滅菌注

50

射用溶液の調製のための滅菌粉末の場合には、好ましい調製方法は、真空乾燥および凍結乾燥 (freeze-drying) [凍結乾燥 (lyophilization)] であり、これにより、事前に滅菌ろ過されたその溶液から有効成分プラスいずれかの追加の所望の成分の粉末が得られる。

【0394】

投与レジメンは、最適な所望の応答（例えば、治療応答）が得られるように調整される。例えば、単一のボラスを投与してもよく、数回に分割した用量を経時的に投与してもよく、または治療状況の緊急性によって示されるように用量を比例的に減量もしくは増量してもよい。投与の容易性および投薬量の均一性のために、単一剤形で非経口組成物を処方することが特に有利である。単一剤形とは、本明細書で使用される場合、処置される対象に対する単位投薬量として適した物理的に不連続な単位を指し、各単位は、必要な医薬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。本開示の単一剤形の仕様は、(a) 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 (b) 個体の過敏症の処置のためにこのような活性化合物を配合する技術に固有の制限によって規定され、直接これに依存する。

10

【0395】

第9の態様の医薬製剤または組成物には、経口、経鼻、局所（頬側および舌下を含む）、直腸、膣内および／または非経口投与に適したものが含まれる。製剤は、単一剤形で提示されるのが都合がよい場合があり、薬学の技術分野で公知の任意の方法によって調製され得る。単一剤形を製造するための有効成分の量は、処置される対象、および特定の投与様式に応じて変化する。単一剤形を製造するための有効成分の量は、一般に、治療効果をもたらす組成物の量である。

20

【0396】

第9の態様の組成物の局所投与または経皮投与のための剤形には、散剤、スプレー剤、軟膏剤、ペースト剤、クリーム剤、ローション剤、ゲル剤、溶液剤、パッチおよび吸入剤が含まれる。活性化合物は、滅菌条件下で、薬学的に許容される担体、および必要とされ得る防腐剤、他のアジュバントまたは賦形剤と混合され得る。

【0397】

「非経口投与」および「非経口的に投与される」という語句は、本明細書で使用される場合、経腸投与および局所投与以外の投与様式を意味し、通常は注射によるものであり、限定されないが、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、脊髄内、硬膜外および胸骨内注射および注入が含まれる。

30

【0398】

一実施形態では、抗PD-1抗体はタンパク質として投与され、抗体は、本明細書に記載されているハイブリドーマ、トランスフェクトーマから、またはインビトロ転写によって得ることができる。一実施形態では、抗PD-1抗体は、本明細書で定義されている1つ以上の核酸または1つ以上のベクターとして、例えば、抗体もしくは抗体の鎖、またはこのような抗体もしくは鎖の断片をコードするRNAまたは1つ以上のRNAを含むRNAまたはリボソームとして投与される。

40

【0399】

一実施形態では、第1の態様の抗体は、皮下注射により結晶形態で投与され、Yang et al. (2003) PNAS, 100 (12): 6934-6939を参照されたい。

【0400】

本開示の化合物を医薬として、ヒトおよび動物に投与する場合、それらは単独で、または例えば、有効成分の約0.01パーセント～約99パーセント、好ましくは約0.1パーセント～約90パーセント、最も好ましくは約1パーセント～約50パーセントを含む医薬組成物として、薬学的に許容される担体、好ましくは上記で明示されている薬学的に許容される担体と組み合わせて投与することができる。さらに、酸化防止剤または防腐剤などのアジュバントおよび／または賦形剤をさらに含んでもよい。

50

【0401】

選択される投与経路にかかわらず、適切な水和形態で使用され得る本開示の化合物、および／または第9の態様の医薬組成物は、当業者に公知の従来の方法によって、薬学的に許容される剤形に製剤化される。

【0402】

医薬組成物は、当技術分野で公知の医療器具を用いて投与することができる。例えば、好ましい実施形態では、第9の態様の医薬組成物は、米国特許第5,399,163号；同第5,383,851号；同第5,312,335号；同第5,064,413号；同第4,941,880号；同第4,790,824号；または同第4,596,556号に開示された機器などの無針皮下注射機器を用いて投与することができる。本開示において有用な周知のインプラントおよびモジュールの例には、以下に記載されているものが含まれる：米国特許第4,487,603号は、制御された速度で医薬を注入するための移植可能な微量注入ポンプを開示しており、米国特許第4,486,194号は、皮膚を通して医薬を投与するための治療機器を開示しており、米国特許第4,447,233号は、正確な注入速度で医薬をデリバリーするための医薬注入ポンプを開示し、米国特許第4,447,224号は、連続的な薬物デリバリーのための可変流量の埋め込み式注入装置を開示し、米国特許第4,439,196号は、マルチチャンバーコンパートメントを有する浸透圧薬物デリバリー系を開示し、および米国特許第4,475,196号は、浸透圧薬物デリバリー系を開示する。

【0403】

このような他の多くのインプラント、デリバリー系、およびモジュールが当業者に知られている。ある特定の実施形態では、上記態様の抗体は、インビボでの適切な分布を確実にするように製剤化することができる。例えば、血液脳関門（BBB）は多くの親水性の高い化合物を排除する。本開示の治療用化合物がBBBを確実に通過するために（所望により）、例えばリポソーム中に製剤化することができる。リポソームの製造方法については、例えば米国特許第4,522,811号；同第5,374,548号；および同第5,399,331号を参照されたい。リポソームは、特定の細胞または器官に選択的に輸送され、よって標的薬物デリバリーを増強する1つ以上の部分を含んでもよい〔例えば、V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29: 685を参照されたい〕。例示的な標的化部分としては、葉酸またはビオチン（例えば、Low et al.に対する米国特許第5,416,016号を参照されたい）；マンノシド [Umezawa et al., (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153: 1038]；抗体 [P.G. Bloeman et al. (1995) *FEBS Lett.* 357: 140；M. Owais et al. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 180]；および界面活性剤プロテインA受容体 [Briscoe et al. (1995) *Am. J. Physiol.* 1233: 134] が挙げられる。

【0404】

一実施形態では、本開示の治療用化合物はリポソーム中に製剤化される。より好ましい実施形態では、リポソームは、標的化部分を含む。最も好ましい実施形態では、リポソーム中の治療用化合物は、所望の領域、例えば腫瘍の部位に近接する部位にボーラス注射によってデリバリーされる。組成物は、容易に注射できる程度に流動性でなければならない。また、製造および保存の条件下で安定でなければならない、細菌および真菌などの微生物の夾雑作用に対して保存されなければならない。

【0405】

さらなる実施態様では、上記の態様の抗体は、胎盤を横切って輸送されるのを防止または低減するように製剤化することができる。これは、当技術分野で公知の方法、例えば、抗体のPEG化またはF(ab)₂'断片の使用によって行うことができる。さらに、Cunningham-Rundles C, Zhuo Z, Griffith B, Keenan J. (1992), "Biological activities of polyethylene-glycol immunoglobulin conjugates. Resistance to enzymatic degradation." *J. Immunol. Methods*, 152: 177-190；および Landor M. (1995), "Maternal-fetal transfer of immunoglobulins", *Ann. Al*

lergy Asthma Immunol. 74: 279-283が参照され得る。

【0406】

組成物は滅菌されていなければならない、シリンジでデリバリー可能な程度に流動性でなければならない。水に加えて、担体は、等張緩衝生理食塩水、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）、およびそれらの適切な混合物であり得る。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、分散液の場合には必要な粒径の維持、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。多くの場合、等張剤、例えば糖類、マンニトールまたはソルビトールなどの多価アルコール、および塩化ナトリウムを組成物に含めることが好ましい。注射用組成物の長期吸収は、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またはゼラチンを組成物中に含めることによってもたすことができる。

10

【0407】

活性化化合物が上記のように適切に保護されている場合、化合物は、例えば、不活性希釈剤または同化可能な食用担体と共に経口投与され得る。

【0408】

V I I I . 本発明の使用および方法

上記態様の抗体、コンジュゲート、多量体、核酸、ベクター、宿主細胞およびウイルスは、PD-1またはそのリガンド（PD-L1および／またはPD-L2）を発現する細胞に関与する疾患の処置に関わる数多くの治療的有用性を有する。

【0409】

したがって、さらなる態様では、本開示は、上記態様の抗体、コンジュゲート、多量体、核酸、ベクター、宿主細胞、ウイルスまたは組成物の医学的使用に関する。この点に関して、本開示は、疾患の処置、例えば腫瘍／がんの処置における使用のための、抗体、コンジュゲート、多量体、核酸、ベクター、宿主細胞、ウイルスまたは組成物、好ましくは医薬組成物を提供する。「疾患の処置、例えば腫瘍／がんの処置における使用のための」という表現は、本明細書において、「医薬品、特にがんの処置方法における使用のための」；またはヒト（またはより一般的にはそれを必要とする対象）における前記処置方法における使用のための医薬製剤の調製における前記生成物の使用とも置き換え可能に使用される。

20

【0410】

以下では、本開示の好ましい使用および方法を記載する場合、第1の態様の抗体が参照される。しかし、本明細書において他に示されない限り、または文脈によって明らかに矛盾しない限り、この教示は、抗体を含むかまたはそれをコードする他の活性剤、すなわち、第3の態様のコンジュゲート、第4の態様の多量体（multimer）、第5の態様の核酸、第6の態様のベクター、第7の態様の宿主細胞、第8の態様のウイルスまたは第9の態様の組成物にも適用可能であることを理解されたい。

30

【0411】

例えば、抗体または核酸は、培養中の細胞、例えばインビトロもしくはエクスピボ（ex vivo）、または対象、好ましくはヒト対象、例えばインビボで投与されて、本明細書に記載のものなどの種々の疾患を処置または予防することができる。

40

【0412】

第10の態様では、疾患の予防的および／または治療的処置において使用するための第9の態様の医薬組成物が提供される。

【0413】

「疾患」という用語は、本明細書で使用される場合、がんまたは腫瘍、特に本明細書に記載の腫瘍もしくはがん、または自己免疫疾患の形態を含む、任意の病理学的状態を指す。

【0414】

「腫瘍」または「がん」とは、急速で制御不能な細胞増殖によって成長し、新たな成長を開始した刺激が停止した後も成長を続ける異常な細胞群または組織を意味する。腫瘍は

50

、部分的または完全に正常組織との構造的組織化および機能的連携の欠如を示し、通常、良性または悪性のいずれかであり得る組織の明確な塊を形成する。これらの用語は、本明細書で使用される場合、転移も含む。本明細書で使用される場合、「がん」および「がん疾患」という用語は、「腫瘍」および「腫瘍疾患」という用語と互換的に使用される。

【0415】

「転移」とは、がん細胞が元の部位から体の別の部位に広がることを意味する。転移の形成は非常に複雑なプロセスであり、原発腫瘍からの悪性細胞の剥離、細胞外マトリックスへの侵襲、内皮基底膜を貫通した体腔および血管への侵入、次いで、血液によって輸送された後の標的器官への浸潤に依存する。最後に、標的部位での新たな腫瘍の成長は血管新生に依存する。腫瘍細胞または成分が残存し、転移能を生じる可能性があるため、腫瘍転移は原発腫瘍の除去後にも起こることが多い。一実施形態では、「転移」という用語は、原発腫瘍および局所性リンパ節系から離れた転移に関する「遠隔転移」に関する。

10

【0416】

「処置する」とは、対象における腫瘍の大きさまたは腫瘍の数を低減することを含む疾患を防止または排除するために、対象に化合物もしくは組成物を投与すること、対象における疾患を停止もしくは遅らせること、対象における新たな疾患の発生を阻害もしくは遅らせること、現在疾患に罹患しているかもしくは以前に疾患に罹患していた対象における症状および／もしくは再発の頻度もしくは重症度を低下させること、ならびに／または対象の寿命を延長、すなわち増加させることを意味する。

【0417】

特に、「疾患の処置」という用語には、疾患またはその症状の治癒、持続期間の短縮、軽快、防止、進行もしくは悪化の遅滞もしくは抑制、またはその発症の防止もしくは遅延が含まれる。

20

【0418】

「リスクがある」とは、一般集団と比較して、疾患、特にがんを発症する可能性が通常より高いと特定された対象、すなわち患者を意味する。さらに、疾患、特にがんに罹患したことがある、または現在罹患している対象は、このような対象が引き続き疾患を発症し得るため、疾患を発症するリスクが高い対象である。現在、がんに罹患しているか、または罹患したことがある対象は、がん転移のリスクも高い。

【0419】

第10の態様の一実施形態では、疾患は、がん成長および／またはがん転移である。一実施形態では、疾患は、PD-L1を発現することによって特徴付けられる、および／またはPD-L1がその表面と会合することによって特徴付けられる異常細胞またはがん細胞を含むことによって特徴付けられる。

30

【0420】

第10の態様の一実施形態では、第9の態様の医薬組成物は、がんまたは腫瘍疾患を防止または処置する方法において使用するためのものである。

【0421】

これらの腫瘍には、固形腫瘍および／または血液学的悪性腫瘍が含まれる。処置および／または防止され得る腫瘍疾患の例は、癌腫、リンパ腫、胚腫、肉腫、および白血病を含むがこれらに限定されない、すべてのがんおよび腫瘍実体を包含する。より詳細には、このようながんの例としては、骨がん、血液がん、肺がん、肝臓がん、膵臓がん、皮膚がん、頭頸部のがん、皮膚黒色腫または眼内黒色腫、子宮がん、卵巣がん、直腸がん、肛門部のがん、胃がん、結腸がん、乳がん、前立腺がん、子宮がん、性器および生殖器の癌、ホジキン病（ホジキンリンパ腫）、食道のがん、小腸のがん、内分泌系のがん、甲状腺のがん、副甲状腺のがん、副腎がん、軟組織の肉腫、膀胱のがん、腎臓のがん、腎細胞癌、腎盂の癌、中枢神経系（CNS）の新生物、神経外胚葉がん、脊髄軸腫瘍、神経膠腫、髄膜腫、および下垂体腺腫が挙げられる。これらのがんは、初期、中間期、または進行期、例えば転移期であってもよい。一実施形態では、処置されるがんは進行期である。

40

【0422】

50

P D - 1 経路遮断療法に特に感受性が高いがんの例としては、転移性黒色腫を含む黒色腫、ホジキンリンパ腫を含むリンパ腫、非小細胞肺癌（NSCLC）、例えば、進行性NSCLC、および小細胞肺癌を含む肺癌、腎細胞癌、膀胱がん、進行トリプルネガティブ乳がんを含む乳がん、胃がんおよび胃食道接合部がん、膵腺癌ならびに卵巣がんが挙げられるが、これらに限定されない。第10の態様の一実施形態では、がんは、黒色腫、肺癌、腎細胞癌、膀胱がん、乳がん、胃がんおよび胃食道接合部がん、膵腺癌、卵巣がん、腎腫瘍、膠芽腫およびリンパ腫、好ましくはホジキンリンパ腫からなる群から選択される。

【0423】

第10の態様の一実施形態では、第9の態様の医薬組成物は、標的器官または組織に特異的にデリバリーされ、蓄積され、および／または保持される。一実施形態では、ベクターまたはウイルスは、標的器官もしくは組織で核酸を放出し、および／または標的器官もしくは組織の細胞に侵入する。一実施形態では、抗体は標的器官または組織の細胞で発現される。

【0424】

第10の態様の一実施形態では、処置は単剤療法または併用療法である。好ましくは、併用療法は、化学療法、分子標的療法、放射線療法、および他の形態の免疫療法からなる群から選択される少なくとも1つの処置である。「免疫療法」という用語は、特定の免疫反応を伴う処置に関する。

【0425】

第1の態様の抗体、第3の態様のコンジュゲート、第4の態様の多量体、第5の態様の核酸、第6の態様のベクター、第7の態様の宿主細胞、第8の態様のウイルス、または第9の態様の組成物、好ましくは医薬組成物は、それを必要とする対象における疾患の処置における使用が意図される。

【0426】

本明細書で使用される場合、「対象」という用語は、P D - 1 に対する抗体に応答するヒトおよび非ヒト動物を含むことが意図される。「非ヒト動物」という用語は、すべての脊椎動物、例えば、非ヒト霊長類などの哺乳動物および非哺乳動物、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヤギ、ニワトリ、両生類、爬虫類などの家畜化動物、マウス、ラット、ウサギ、モルモットなどの実験動物を含む。好ましい対象としては、異常細胞を死滅させることにより正されるか、もしくは軽減し得る障害を有するヒト患者、および／または疾患、好ましくは本明細書に記載されている疾患を有するヒト患者が挙げられる。用語「対象」、「個体」、「生物」または「患者」は、互換的に使用される。

【0427】

「インビボ」という用語は、対象の状況に関する。

【0428】

第10の態様の一実施形態では、対象はヒト対象である。

【0429】

第11の態様では、対象における疾患を処置または防止する方法であって、対象に、少なくとも1つの活性剤を投与することを含み、活性剤が、

(i) 第1の態様の抗体；

(ii) 第3の態様のコンジュゲート；

(iii) 第4の態様の多量体；

(iv) 第5の態様の核酸もしくは第5の態様の核酸の組合せ；

(v) 第6の態様のベクターもしくは第6の態様のベクターの組合せ；

(vi) 第7の態様の宿主細胞もしくは第7の態様の宿主細胞の組合せ；および／または

(vii) 第8の態様のウイルスもしくは第8の態様のウイルスの組合せから選択される少なくとも1つである、方法が提供される。

【0430】

10

20

30

40

50

第11の態様の方法の一実施形態では、第1の態様の抗体の重鎖をコードする核酸、ベクター、宿主細胞またはウイルスは、第1の態様の抗体の軽鎖をコードする別の核酸、ベクター宿主細胞またはウイルスと組み合わせて投与される。

【0431】

第11の態様の方法の一実施形態では、投与される核酸、ベクター、宿主細胞またはウイルスは、第1の態様の抗体の重鎖と軽鎖の両方をコードすることができる。

【0432】

第11の態様の方法の一実施形態では、第10の態様の医薬組成物が対象に投与される。

【0433】

第11の態様の方法の一実施形態では、対象は、PD-L1を発現する細胞によって特徴付けられ、および／またはPD-L1がその表面に会合することによって特徴付けられる罹患した器官または組織を有する。

【0434】

第11の態様の方法の一実施形態では、疾患は、がん成長および／またはがん転移である。

【0435】

第11の態様の方法の一実施形態では、本方法は、がんおよび／またはがん転移を発症しているか、または発症するリスクを有する対象において、がん成長および／またはがん転移を処置または防止するためのものである。

【0436】

第11の態様の方法の一実施形態では、有効量の活性剤が提供される。好ましくは、抗体は0.1～20mg/kgの範囲、より好ましくは0.3～10mg/kgの範囲の用量で、1回または複数回用量で提供される。前記用量は、例えば1週間から4週間ごと、さらにより好ましくは2週間から3週間ごと、例えば非常に2週間または3週間ごとに提供され得る。

【0437】

第11の態様の方法の一実施形態では、がんは、黒色腫、肺がん、腎細胞癌、膀胱がん、乳がん、胃がんおよび胃食道接合部がん、膵腺癌、卵巣がん、腎腫瘍、膠芽腫およびリンパ腫、好ましくはホジキンリンパ腫からなる群から選択される。

【0438】

第11の態様の方法の一実施形態では、活性剤または医薬組成物は、心臓血管系に投与され、好ましくは、活性剤または医薬組成物は、末梢静脈への投与などの静脈内投与または動脈内投与によって投与される。本方法の一実施形態では、活性剤または医薬組成物は、標的器官または組織に特異的にデリバリーされ、蓄積され、および／または保持される。本方法の一実施形態では、標的器官または組織は、がん組織、特に本明細書で明示されるがん組織である。例えば、罹患した器官または組織は、疾患関連抗原を発現する細胞によって特徴付けることができる、および／または疾患関連抗原がその表面に会合することによって特徴付けることができる。疾患関連抗原は、腫瘍関連抗原であり得る。疾患関連抗原は、腫瘍細胞などの異常細胞の表面と会合することができる。本方法の一実施形態では、ベクター、宿主細胞またはウイルスは、標的器官もしくは組織で核酸を放出する、および／または標的器官もしくは組織の細胞に侵入し、好ましくは、抗体が標的器官または組織の細胞において発現される。

【0439】

第11の態様の方法の一実施形態では、処置は単剤療法または併用療法である。好ましくは、併用処置は、化学療法、分子標的療法、放射線療法、および他の形態の免疫療法からなる群から選択される少なくとも1つの処置である。他の形態の免疫療法には、ワクチン接種、例えばRNAワクチン接種が含まれ、および／または他のチェックポイント阻害剤を標的とし、それによってそれぞれの他のチェックポイントを阻害（アンタゴニスト）または活性化／刺激（アゴニスト）し得る。標的となりうる他のチェックポイント阻害剤

10

20

30

40

50

としては、CTLA4、PD-L1、TIM-3、KIRまたはLAG-3が挙げられるが、これらに限定されない。第2の結合特異性によって標的とされ得るチェックポイント活性化因子としては、CD27、CD28、CD40、CD122、CD137、OX40、GITR、またはICOSが挙げられるが、これらに限定されない。例えば：結合特異性の好ましい組合せとしては、抗PD1と抗PD-L1、または抗PD-1と抗CTLA4が挙げられる。あるいはまたはさらに、免疫療法は血管新生阻害活性を提供することができる。例えば、血管内皮成長因子（VEGF）またはその受容体VEGFR（例えばVEGFR1、2、3）を標的とすることによる。あるいはまたはさらに、PDGFR、c-Kit、Rafおよび／またはRETを標的とすることも可能である。

【0440】

第11の態様の方法の一実施形態では、処置は併用療法であり、処置は、対象に、以下を投与することを含む：

（i）対象において抗原に対する免疫応答を誘導するためのエピトープを含むペプチドもしくはタンパク質、または該ペプチドもしくはタンパク質をコードするポリヌクレオチド；および

（ii）第1の態様の抗体、第3の態様のコンジュゲート、第4の態様の多量体、第5の態様の核酸、第6の態様のベクター、第7の態様の宿主細胞、および／または第7の態様のウイルスから選択される少なくとも1つ。

【0441】

一実施形態では、対象において抗原に対する免疫応答を誘導するためのエピトープを含むペプチドもしくはタンパク質、または該ペプチドもしくはタンパク質をコードするポリヌクレオチド、および（ii）において明示されている少なくとも1つの活性化合物は、逐次的に投与される。一実施形態では、（ii）において明示されている少なくとも1つの活性化合物は、対象において抗原に対する免疫応答を誘導するためのエピトープを含むペプチドもしくはタンパク質または該ペプチドもしくはタンパク質をコードするポリヌクレオチドの投与後に投与される。一実施形態では、（ii）において明示されている少なくとも1つの活性化合物は、対象において抗原に対する免疫応答を誘導するためのエピトープを含むペプチドもしくはタンパク質または該ペプチドもしくはタンパク質をコードするポリヌクレオチドの投与の6時間以降、12時間以降、または24時間以降に投与される。一実施形態では、（ii）において明示されている少なくとも1つの活性化合物は、対象において抗原に対する免疫応答を誘導するためのエピトープを含むペプチドもしくはタンパク質または該ペプチドもしくはタンパク質をコードするポリヌクレオチドの投与の12時間～48時間後に投与される。

【0442】

第11の態様の方法の一実施形態では、本方法は、対象に、対象において抗原に対する免疫応答を誘導するためのエピトープを含むペプチドまたはタンパク質をコードするRNAを投与することを含む。

【0443】

本明細書で使用される場合、試料は、本開示に従って有用な任意の試料、特に、体液を含む組織試料、および／または細胞試料などの生体試料であってよく、パンチ生検を含む組織生検、血液、気管支吸引液、喀痰、尿、糞便または他の体液を採取することなどによる従来の方法で得られ得る。「生体試料」という用語には、本明細書で使用される場合、生体試料の分画も含まれる。

【0444】

本明細書で議論される処置および使用における治療効果は、好ましくは、例えば、PD-1を発現する細胞上のPD-1の免疫抑制シグナルを阻害することによって、好ましくは、抗体とPD-1との複合体を形成することによって、および／または免疫応答、より好ましくはT細胞媒介性免疫応答を誘導することによって、細胞の殺傷を媒介する第1の態様の抗体の機能的特性により達成される。

【0445】

一実施形態では、抗PD-1抗体はタンパク質として投与され、抗体は、本明細書に記載されているハイブリドーマ、トランスフェクトーマから、またはインビトロ転写によって得ることができる。一実施形態では、抗PD-1抗体は、本明細書で定義されている1つ以上の核酸または1つ以上のベクターとして、例えば、RNAあるいは抗体もしくは抗体の鎖、またはこのような抗体もしくは鎖の断片をコードするRNAもしくは1つ以上のRNAを含むリボソームとして投与される。

【0446】

第1の態様の抗体は、インビトロでの治療または診断用途に関連する結合活性について最初に試験することができる。例えば、抗体は、本明細書に記載されている、結合アッセイ、レポーター遺伝子遮断アッセイ、および／またはT細胞増殖アッセイを使用して試験することができる。

10

【0447】

第1の態様の抗体は、インビボまたはインビトロで以下の生物活性のうちの1つ以上を惹起するために使用することができる：PD-1に結合する、好ましくはPD-1に特異的に結合すること；がん細胞もしくは正常細胞上のPD-1に対する結合特性を有すること；PD-1エピトープに対する結合特性を有すること；非ヒトPD-1変異体、特にマウス、ラット、ウサギおよび霊長類由来のPD-1変異体に結合特性を有すること；PD-1による阻害シグナルの誘導を防止もしくは低減すること；PD-1のリガンド、好ましくはリガンドPD-L1とPD-1との相互作用／結合を阻害すること、例えば、ヒトPD-L1とヒトPD-1との結合を阻害すること；PD-L1もしくはPD-L2の免疫抑制シグナルを阻害すること；免疫機能を増強もしくは開始すること（このメカニズムにより）、好ましくはT細胞媒介性免疫応答を増強もしくは開始すること；がん増殖を阻害すること；および／または腫瘍細胞を枯渇させること、および／またはがん転移を抑制すること。

20

【0448】

がん処置における併用戦略は、結果として得られる相乗効果により、単剤療法アプローチの影響よりもかなり強い可能性があるため、望ましいと考えられる。したがって、第1の態様の抗体、第3の態様のコンジュゲート、第4の態様の多量体、第5の態様の核酸、第6の態様のベクター、第7の態様の宿主細胞、第8の態様のウイルス、および／または第9の態様の医薬組成物も、併用療法、すなわち他の薬剤と組み合わせて投与され得ることがまた、本開示に包含される。

30

【0449】

例えば、第1の態様の抗PD-1抗体は、第1の態様の抗体に対する免疫応答の誘導を低減するために、1つ以上の治療剤、例えば、細胞毒性剤、放射性毒性剤、血管新生剤または／および免疫抑制剤と共投与することができる。抗体は薬剤と連結され得るか（免疫複合体として）、または薬剤と分離して投与され得る。後者（分離投与）の場合、抗体は薬剤の前、後、それと同時に投与することができ、または他の既知の治療薬、例えば抗がん治療薬、例えば放射線と共投与することができる。このような治療剤としては、とりわけ、上記に列挙された抗新生物剤が挙げられる。第1の態様の抗PD-1抗体と化学療法剤との共投与は、腫瘍細胞に対する細胞毒性効果をもたらす異なるメカニズムを介して作用する2つの抗がん剤を提供する。このような共投与により、薬物に対する耐性の発現、または抗体と反応しなくなるような腫瘍細胞の抗原性の変化による問題を解決することができる。

40

【0450】

上記態様の抗体または組成物は、化学療法と併せて使用することができる。化学療法のための治療剤としては、1つ以上の化学療法薬、例えば、タキソール誘導体、タキソテール、ゲムシタビン、代謝拮抗剤（例えば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、フルダラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン）、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオエパクロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（BSNU）およびロムスチン（CCNU）、シクロホスファミド、ブスルファン

50

、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、およびシスージクロロジアミンプラチナ（II）（DDP）シスプラチン）、アントラサイクリン系薬剤（例えば、ダウノルビシン（以前のダウノマイシン）およびドキソルビシン（Adriamycin））、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（以前のアクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミスラマイシン、およびアントラマイシン（AMC））、ならびに抗有糸分裂剤（例えば、ビンクリスチンおよびビンブラスチン）が挙げられるがこれらに限定されない。好ましい実施形態では、治療剤は細胞毒性剤または放射線毒性剤である。別の実施形態では、治療剤は免疫抑制剤である。さらに別の実施形態では、治療剤はGM-CSFである。好ましい実施形態では、治療剤は、ドキソルビシン、シスプラチン（Platinol）、ブレオマイシン、スルフェート、カルムスチン、クロラムブシル、シクロホスファミド（Cytosan、Procytos、Neosar）またはリシンAである。

10

【0451】

別の実施形態では、第1の態様の抗体は、化学療法剤と組み合わせて投与されてもよく、好ましくは、転移性黒色腫を含む黒色腫、ホジキンリンパ腫、非小細胞肺癌（NSCLC）、例えば進行性NSCLC、および小細胞肺癌を含む肺癌、腎細胞癌、膀胱がん、進行トリプルネガティブ乳がんを含む進行トリプルネガティブ乳がん、胃がんおよび胃食道接合部がん、膵腺癌、または卵巣がんなどなどのPD-1経路の遮断を特に受けやすいがん罹患している患者において治療有効性を示す。

【0452】

一実施形態では、抗体または上記態様の医薬組成物は、免疫治療剤と共に投与される。本明細書で使用される場合、「免疫療法剤」は、特定の免疫応答および／または免疫エフェクター機能の活性化に関与し得る任意の薬剤に関する。本開示は、免疫療法剤としての抗体の使用を企図する。理論に束縛されることを望むものではないが、抗体は、アポトーシスの誘導、シグナル伝達経路の構成要素の遮断、または腫瘍細胞の増殖の阻害を含む様々なメカニズムにより、がん細胞に対する治療効果を達成することが可能である。ある特定の実施形態では、抗体はモノクローナル抗体である。本開示と組み合わせて使用され得る抗がん抗体および潜在的抗体標的（括弧内）の非限定的な例としては、以下が挙げられる：Abagovomab（CA-125）、Abciximab（CD41）、Adecatumumab（EpCAM）、Afutuzumab（CD20）、Alacizumabペゴル（VEGFR2）、Altumomabペンテテート（CEA）、Amatuximab（MORAb-009）、Anatumomabマフェナトックス（TAG-72）、Apolizumab（HLA-DR）、Arcitumomab（CEA）、Atezolizumab（PD-L1）、Bavituximab（ホスファチジルセリン）、Bectumomab（CD22）、Belimumab（BAFF）、Bevacizumab（VEGF-A）、Bivatuzumabメルタンシン（CD44 v6）、Blinatumomab（CD 19）、Brentuximabベドチン（CD30 TNFRSF8）、Cantuzumabメルタンシン（ムチンCanAg）、Cantuzumabラブタンシン（MUC1）、Capromabペンデチド（前立腺癌細胞）、Carlumab（CNT0888）、Catumaxomab（EpCAM、CD3）、Cetuximab（EGFR）、Citatumumabボガトックス（EpCAM）、Cixutumumab（IGF-1受容体）、Claudiximab（Claudin）、Clivatuzumabテトラキセタン（MUC1）、Conatumumab（TRAIL-R2）、Dacetuzumab（CD40）、Dalotuzumab（インスリン様成長因子I受容体）、Denosumab（RANKL）、Detumomab（B-リンパ腫細胞）、Drozitumab（DR5）、Echromeximab（GD3ガングリオシド）、Edrecolomab（EpCAM）、Elotuzumab（SLAMF7）、Enavatuzumab（PDL192）、Ensituximab（NPC-1C）、Epratuzumab（CD22）、Ertumaxomab（HER2/neu、CD3）、Etaracizumab（インテグリン $\alpha v \beta 3$ ）、Farletuzumab（葉酸受容体1）、FBTA05（

20

30

40

50

CD20)、Ficlatuzumab (SCH 900105)、Figitumumab (IGF-1受容体)、Flanvotumab (糖タンパク質75)、Fresolimumab (TGF- β)、Galiximab (CD80)、Ganitumab (IGF-I)、Gemtuzumab オゾガマイシン (CD33)、Gevokizumab (IL1 β)、Girentuximab [炭酸脱水素酵素9 (CA-IX)]、Glembatumumab ベドチン (GPNMB)、Ibritumomab チウキセタン (CD20)、Icrucumab (VEGFR-1)、Igovoma (CA-125)、Indatuximab ラブタンシン (SDC1)、Intetumumab (CD51)、Inotuzumab オゾガマイシン (CD22)、Ipilimumab (CD 152)、Iratumumab (CD30)、Labetuzumab (CEA)、Lexatumumab (TRAIL-R2)、Libivirumab (B型肝炎表面抗原)、Lintuzumab (CD33)、Lorvotuzumab メルタンシン (CD56)、Lucatumumab (CD40)、Lumiliximab (CD23)、Mapatumumab (TRAIL-R1)、Matuzumab (EGFR)、Mepolizumab (IL5)、Milatuzumab (CD74)、Mitumomab (GD3ガングリオシド)、Mogamulizumab (CCR4)、Moxetumomab パストトクス (CD22)、Nacolomab タフェナトクス (tafenatox) (C242抗原)、Naptumomab エスタフェナトクス (5T4)、Namatumab (RON)、Necitumumab (EGFR)、Nimotuzumab (EGFR)、Nivolumab (IgG4)、Ofatumumab (CD20)、Olaratumab (PDGFR- α)、Onartuzumab [ヒト散乱因子受容体キナーゼ (human scatter factor receptor kinase)]、Oportuzumab モナトクス (EpCAM)、Oregovomab (CA-125)、Oxelumab (OX-40)、Panitumumab (EGFR)、Patrimumab (HER3)、Pemtumoma (MUC1)、Pertuzuma (HER2/neu)、Pintumomab (腺癌抗原)、Pritumumab (ビメンチン)、Racotumomab (N-グリコリルノイラミン酸)、Radretumab (フィブロネクチンエクストラドメイン-B)、Rafivirumab (狂犬病ウイルス糖タンパク質)、Ramucirumab (VEGFR2)、Rilotumumab (HGF)、Rituximab (CD20)、Robatumumab (IGF-1受容体)、Samalizumab (CD200)、Sibrotuzumab (FAP)、Siltuximab (IL6)、Tabalumab (BAFF)、Tacatuzumab テトラキセタン (アルファ-フェトプロテイン)、Taplitumomab パプトクス (paptox) (CD19)、Tenatumomab (テナシンC)、Tepro tumumab (CD221)、Ticilimumab (CTLA4)、Tigatuzumab (TRAIL-R2)、TNX-650 (IL13)、Tositumomab (CD20)、Trastuzumab (HER2/neu)、TRBS07 (GD2)、Tremelimumab (CTLA4)、Tucotuzumab セルモロイキン (EpCAM)、Ublituximab (MS4A1)、Urelumab (4-1 BB)、Volociximab (インテグリン $\alpha 5 \beta 1$)、Votumumab (腫瘍抗原CTAA 16.88)、Zalutumumab (EGFR)、および Zanolimumab (CD4)。

【0453】

例えば、第10または第11の態様によれば、第1の態様の抗体を投与される対象は、別の免疫チェックポイントを標的とする1つ以上の抗体でさらに処置される。抗原提示細胞とTリンパ球との間の阻害性相互作用を中断させることにより腫瘍防御を活性化する免疫チェックポイント阻害剤としては、抗PD-L1、抗CTLA4、抗TIM-3、抗KIRおよび／または抗LAG-3が挙げられるが、これらに限定されない。CD27、CD28、CD40、CD122、CD137、OX40、GITR、またはICOSなどの活性化チェックポイントを刺激する免疫療法剤、すなわち、例えば抗CD27、抗CD

10

20

30

40

50

28、抗CD40、抗CD122、抗CD137、抗OX40、抗GITR、および／または抗ICOSも包含される。特に好ましい併用療法としては、以下に限定されないが、抗PD1と抗PD-L1との組合せが挙げられ、それによって、両成分を標的とすることによりPD1経路の効率および遮断を高めるか、またはPD1経路とCTLA4経路との両方の遮断を防ぐために抗PD-1と抗CTLA4との組合せが挙げられる。例えば、結合特異性の組合せとしては、抗PD1と抗PD-L1、または抗PD-1と抗CTLA4が挙げられる。あるいはまたはさらに、免疫療法は血管新生阻害活性を提供することができる。例えば、血管内皮成長因子(VEGF)またはその受容体VEGFR(例えばVEGFR1、2、3)を標的とすることによる。あるいはまたはさらに、PDGFR、c-Kit、Rafおよび／またはRETを標的とすることも可能である。

10

【0454】

第10または11の態様の別の実施形態では、抗体を投与される対象は、血管内皮成長因子(VEGF)またはその受容体VEGFRを標的とする抗体を含む血管新生阻害剤、および血管新生を阻害する1つ以上の化学化合物でさらに処置される。これらの薬物の前処置または並行適用により、腫瘍塊への抗体の浸透が改善される可能性がある。

【0455】

例えば、血管新生阻害剤はVEGFを標的とし得る。適切なVEGF阻害剤はBevacizumabである。他の例としては、VEGFR1、2、3、PDGFR、c-Kit、Rafおよび／またはRETを阻害するマルチキナーゼ阻害剤(例えば、Sunitinib、Sorafenib、Pazopanib)が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0456】

第10または第11の態様の別の実施形態では、抗体を投与される対象は、EGFR受容体に結合するモノクローナル抗体を含む成長因子受容体シグナル伝達を阻害する化合物、およびEGFR受容体によって開始されるシグナル伝達を阻害する化学化合物でさらに処置される。

【0457】

第10または第11の態様の別の実施形態では、このような治療剤には、低用量シクロホスファミドなどの調節性T細胞の枯渇または機能不活性化につながる薬剤、および／または抗IL2抗体もしくは抗IL2受容体抗体が含まれる。

30

【0458】

第10または第11の態様のまた別の実施形態では、第1または第2の態様の抗体は、抗CD25抗体、抗EPCAM抗体、および抗CD40抗体から選択される1つ以上の抗体と組み合わせて投与され得る。

【0459】

第10または第11の態様のまたさらなる実施形態では、第1の態様の抗体は、補体活性化を増強するために、抗C3b(i)抗体と組み合わせて投与され得る。

【0460】

第1の態様の抗体は、1つ以上のワクチンと組み合わせて使用することもでき、ワクチンは腫瘍細胞などの異常細胞によって発現される抗原に対して免疫系を刺激するためのものである。例えば、抗原は、本明細書で明示されている腫瘍抗原の1つ以上であり得る。ワクチン接種は、ワクチンRNA、すなわち免疫応答が誘導される抗原またはエピトープをコードするRNAを投与することによって達成することができる。あるいは、抗原に対する免疫応答を誘導するためのエピトープを含むペプチドまたはタンパク質が投与され得る。

40

【0461】

よって、第10または第11の態様の別の実施形態では、第1の態様の抗体は、ワクチン療法と組み合わせて、すなわち、対象において抗原に対する免疫応答を誘導するためのエピトープを含む少なくとも1つのペプチドもしくはタンパク質、または該ペプチドもしくはタンパク質をコードする少なくとも1つのポリヌクレオチド／核酸と組み合わせて投

50

与され得る。

【0462】

したがって、本開示はまた、(i) 対象において抗原に対する免疫応答を誘導するためのエピトープを含むペプチドもしくはタンパク質、または該ペプチドもしくはタンパク質をコードするポリヌクレオチド；ならびに(ii) 第1の態様の抗体、第3の態様のコンジュゲート、第4の態様の多量体、第5の態様の核酸、第6の態様のベクター、第7の態様の宿主細胞、および／または第8の態様のウイルスから選択される少なくとも1つを含む、組成物、好ましくは医薬組成物を提供する。一実施形態では、組成物は、対象において抗原に対する免疫応答を誘導するためのエピトープを含むペプチドまたはタンパク質をコードするRNAを含む。

10

【0463】

「抗原」という用語は、免疫応答または抗体などの免疫エフェクター分子が対象とするおよび／または対象とすべきエピトープを含む薬剤に関する。「抗原」という用語は、特に、タンパク質およびペプチドを含む。一実施形態では、抗原は、腫瘍抗原などの疾患関連抗原である。

【0464】

「疾患関連抗原」という用語は、その最も広い意味で使用され、好ましくは、宿主の免疫系を刺激して疾患に対する細胞性抗原特異的免疫応答および／または体液性抗体応答を起こさせるエピトープを含有する疾患に関連する任意の抗原を指す。したがって、疾患関連抗原、そのエピトープ、または疾患関連抗原もしくはエピトープを標的とする免疫応答を誘導するペプチドもしくはタンパク質などの薬剤は、治療目的、特にワクチン接種に使用され得る。疾患関連抗原は、微生物による感染、典型的には微生物抗原に関連するか、またはがん、典型的には腫瘍に関連する場合がある。

20

【0465】

一実施形態では、免疫応答が対象とする抗原（すなわち、疾患関連抗原）は、腫瘍抗原であり、好ましくは、本明細書において明示されている。より好ましくは、少なくとも1つの腫瘍抗原は、NY-ESO-1 (UniProt P78358)、Tyrosinase (UniProt P14679)、MAGE-A3 (UniProt P43357)、TPTE (UniProt P56180)、KLK2 (UniProt P20151)、PSA (KLK3) (UniProt P07288)、PAP (ACPP, UniProt P15309)、HOXB13 (UniProt Q92826)、NKX3-1 (UniProt Q99801)、HPV16 E6/E7 (UniProt P03126/P03129)；HPV18 E6/E7 (UniProt P06463/P06788)；HPV31 E6/E7 (UniProt P17386/P17387)；HPV33 E6/E7 (UniProt P06427/P06429)；HPV45 E6/E7 (UniProt P21735/P21736)；HPV58 E6/E7 (UniProt P26555/P26557)、PRAME (UniProt P78395)、ACTL8 (UniProt Q9H568)、CXorf61 (KKLC1, UniProt Q5H943)、MAGE-A9B (UniProt P43362)、CLDN6 (UniProt P56747)、PLAC1 (UniProt Q9HBJ0)、およびp53 (UniProt P04637) からの群から選択される。ワクチン接種に使用されるペプチドまたはタンパク質（すなわち、ワクチン抗原）は、前記抗原またはそのエピトープを含み得る。ワクチン抗原は、一実施形態では、ワクチン抗原をコードするRNAの形態で投与される。これらの抗原に関する処置方法は、がんの処置を目的とし得、ここでがん細胞は、それぞれの抗原の発現によって特徴付けられる。本明細書に記載の抗原、特にNY-ESO-1、Tyrosinase、MAGE-A3、TPTE、KLK2、PSA (KLK3)、PAP (ACPP)、HOXB13、NKX3-1、HPV16 E6/E7；HPV18 E6/E7、HPV31 E6/E7、HPV33 E6/E7、HPV45 E6/E7、HPV58 E6/E7、PRAME、ACTL8、CXorf61 (KKLC1)、MAGE-

30

40

50

A 9 B、C L D N 6、P L A C 1、および p 5 3 の組合せを使用することも可能である。このような抗原の組合せに關与する処置方法は、がんの処置を目的とし得、がん細胞は、2つ以上の抗原の抗原のそれぞれの組合せの発現によって特徴付けられるか、または処置されるある特定のがんを有する患者の大部分（例えば、少なくとも80%、少なくとも90%またはさらにそれより多く）のがん細胞が、組合せのそれぞれの抗原の1つ以上を発現する。このような組合せは、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、または少なくとも6つの抗原の組合せを含んでもよい。よって、組合せは、3、4、5、6、7、または8個の抗原を含んでもよい。この場合、組合せの各抗原は、前記抗原もしくはそのエピトープを含むペプチドもしくはタンパク質（すなわち、ワクチン抗原）、または該ペプチドもしくはタンパク質をコードするRNAを投与することによって対処され得る。特に好ましい一実施形態では、組合せの各抗原は、抗原を含むペプチドまたはタンパク質をコードするRNAを投与することによって対処される。よって、ワクチン接種は、異なるRNA分子の投与を包含し得、前記異なるRNA分子の各々は、抗原の組合せの抗原を含むペプチドまたはタンパク質をコードする。異なるワクチン抗原または組合せの異なるワクチン抗原をコードするRNAは、混合物、逐次的、またはそれらの組合せで投与され得る。

10

【0466】

一実施形態では、抗原の組合せは、NY-ESO-1、Tyrosinase、MAGE-A3、およびTPT Eを含み、好ましくはこれらからなる。この組合せは、皮膚黒色腫の処置に使用され得る。

20

【0467】

一実施形態では、抗原の組合せは、KLK2、PSA（KLK3）、PAP（ACPP）、HOXB13、およびNKX3-1を含み、好ましくはこれらからなる。この組合せは、前立腺がんの処置に使用され得る。

【0468】

一実施形態では、抗原の組合せは、PRAME、ACTL8、CXorf61（KKLC1）、MAGEA3、MAGE-A9B、CLDN6、NY-ESO-1、およびPLAC1を含み、好ましくはこれらからなる。この組合せは、トリプルネガティブ乳がん、特にエストロゲン受容体ネガティブおよびプロゲステロン受容体ネガティブおよびHER2ネガティブ乳がんなどの乳がんの処置に使用され得る。

30

【0469】

一実施形態では、抗原の組合せは、CLDN6、p53、およびPRAMEを含み、好ましくはこれらからなる。この組合せは、上皮性卵巣がんなどの卵巣がんの処置に使用され得る。

【0470】

本明細書に記載のワクチンは、がんなどの疾患において発現する1つ以上の抗原を標的とする1つ以上のRNAからなってもよい。活性原理は、抗原提示細胞（APC）に侵入するとそれぞれのタンパク質に翻訳される一本鎖mRNAであり得る。抗原配列をコードする野生型またはコドン最適化配列に加えて、RNAは、安定性および翻訳効率に関してRNAの最大限の有効性を発揮するように最適化された1つ以上の構造エレメント（5'-cap、5'-UTR、3'-UTR、ポリ（A）-テール）を含有し得る。一実施形態では、RNAはこれらのエレメントをすべて含有する。一実施形態では、ベクターSARCA（D1）は、RNA薬物物質の5'-末端における特異的キャッピング構造として利用され得る。5'-UTR配列として、ヒトアルファグロビンmRNAの5'-UTR配列、適宜、翻訳効率を高めるために最適化された「Kozak配列」が使用され得る。3'-UTR配列としては、より高い最大タンパク質レベルおよびmRNAの長期持続性を保証するために、コード配列とポリ（A）-テールとの間に配置されたヒトベータグロビンmRNAの2つの反復3'-UTRが使用されてもよい。あるいは、3'-UTRは、「スプリットのアミノ末端エンハンサー」（AES）mRNA（Fと呼ばれる）およびミトコンドリアにコードされた12SリボソームRNA（Iと呼ばれる）に由来する2つの

40

50

配列エレメント（F Iエレメント）の組合せであってもよい。これらは、RNA安定性を付与し、全タンパク質発現を増強する配列のエキスピボ選択プロセスによって特定された（参照により本明細書に組み込まれる、国際公開第2017/060314号を参照されたい）。さらに、30個のアデノシン残基のストレッチ、それに続く10個のヌクレオチドのリンカー配列（ランダムヌクレオチドの）および別の70個のアデノシン残基からなる、長さ110ヌクレオチドを測定するポリ（A）-テールが使用され得る。このポリ（A）テール配列は、樹状細胞におけるRNAの安定性および翻訳効率を高めるために設計された。

【0471】

さらに、sec（分泌シグナルペプチド）および／またはMITD [MHCクラスIトラフィックドメイン（trafficking domain）]を、それぞれのエレメントがそれぞれN末端またはC末端タグとして翻訳されるように、抗原コード領域に融合させてもよい。ヒトMHCクラスI複合体（HLA-B51、ハプロタイプA2、B27／B51、Cw2／Cw3）をコードする配列に由来する融合タンパク質タグは、抗原のプロセッシングおよび提示を改善することが示されている。secは分泌シグナルペプチドをコードする78bpの断片に相当すると思われ、このペプチドは新生ポリペプチド鎖の小胞体への転座を誘導する。MITDはMHCクラスI分子の膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインに相当し、MHCクラスIトラフィックドメインとも呼ばれる。分泌シグナルペプチドおよび膜貫通ドメインを有するCLDN6などの抗原は、融合タグの付加を必要としない場合がある。一般的に融合タンパク質に使用されるような、アミノ酸グリシン（G）およびセリン（S）から主になる短いリンカーペプチドをコードする配列がGS／Linkerとして使用され得る。

【0472】

抗原は、免疫寛容を破壊するためにヘルパーエпитープと組み合わせて投与されてもよい。ヘルパーエピトープは破傷風トキソイド由来、例えば破傷風菌（Clostridium tetani）の破傷風トキソイド（TT）由来のP2P16アミノ酸配列であってもよい。これらの配列は、プライミング中に腫瘍非特異的なT細胞の助けを提供することにより、自己抗原に対する免疫応答を効率的に誘導するための自己寛容メカニズムを克服するのに役立つ場合がある。破傷風トキソイド重鎖は、MHCクラスII対立遺伝子に無差別に結合し得るエピトープを含み、ほとんどすべての破傷風ワクチンを接種した個体においてCD4⁺メモリーT細胞を誘導することができる。さらに、TTヘルパーエピトープと腫瘍関連抗原との組合せは、プライミング中にCD4⁺媒介性T細胞の助けを提供することにより、腫瘍関連抗原のみの適用と比較して免疫刺激を改善することが知られている。CD8⁺T細胞を刺激するリスクを低減するために、できるだけ多くのMHCクラスII対立遺伝子、例えばP2およびP16に結合することを確実にするように、無差別に結合するヘルパーエピトープを含有することが知られている2つのペプチド配列が使用されてもよい。

【0473】

一実施形態では、ワクチン抗原は、免疫寛容を破壊するアミノ酸配列を含む。一実施形態では、免疫寛容を破壊するアミノ酸配列は、ヘルパーエピトープ、好ましくは破傷風トキソイド由来のヘルパーエピトープを含む。免疫寛容を破壊するアミノ酸配列は、ワクチン配列、例えば抗原配列のC末端に、直接融合されているかまたはリンカーによって分離されていてもよい。適宜、免疫寛容を破壊するアミノ酸配列は、ワクチン配列とMITDを連結してもよい。ワクチン抗原がワクチン抗原をコードするRNAの形態で投与される場合、免疫寛容を破壊するアミノ酸配列はRNAにコードされていてもよい。一実施形態では、抗原標的化RNAは、結果として生じる免疫応答を高めるために、ヘルパーエピトープをコードするRNAと共に適用される。このヘルパーエピトープをコードするRNAは、抗原をコードするRNAについて上記の安定性および翻訳効率に関して、RNAの有効性を最大にするために最適化された構造エレメント（5'-cap、5'-UTR、3'-UTR、ポリ（A）-テール）を含有し得る。さらに、sec（分泌シグナルペプチド

10

20

30

40

50

）および／またはM I T D（M H CクラスIトラフィックドメイン）を、抗原コードRNAについて上記したように、それぞれのエレメントがそれぞれN末端またはC末端タグとして翻訳されるように、ヘルパーエピトープコード領域に融合させてもよい。一実施形態では、RNAは、結果として生じる免疫応答を高めるために、破傷風トキシイド（T T）由来のヘルパーエピトープP 2およびP 1 6（P 2 P 1 6）をコードする追加のRNAと共投与される。

【0 4 7 4】

ワクチンRNAをリボソームと複合化し、血清安定性RNAーリボプレックス[RNA（L I P）]を作成し、静脈内（i . v .）投与してもよい。異なるRNAの組合せが使用される場合、RNAをリボソームと別々に複合化し、血清安定性RNAーリボプレックス[RNA（L I P）]を作成し、静脈内（i . v .）投与してもよい。RNA（L I P）はリンパ系器官の抗原提示細胞（A P C）を標的とし、免疫系を効率的に刺激する。

【0 4 7 5】

一実施形態では、ワクチンRNAは、免疫寛容を破壊するアミノ酸配列をコードするRNAと共にリボプレックス粒子として共製剤化される。

【0 4 7 6】

本明細書で使用される場合、「腫瘍抗原」または「がん抗原」は、（i）腫瘍特異的抗原、（i i）腫瘍関連抗原、（i i i）腫瘍上の胚性抗原、（i v）腫瘍特異的膜抗原、（v）腫瘍関連膜抗原、（v i）成長因子受容体、および（x i）がんに関連する任意の他の種類の抗原または物質を含む。

【0 4 7 7】

任意の腫瘍抗原（好ましくは腫瘍細胞によって発現される）は、本明細書に開示されるワクチン接種によって標的化され得る。一実施形態では、腫瘍抗原は腫瘍細胞によって提示されるので、T細胞によって標的化され得る。本明細書に開示されているワクチン接種は、好ましくは、M H C提示腫瘍抗原に対して特異的なT細胞を活性化する。腫瘍抗原は、腫瘍特異的抗原（T S A）または腫瘍関連抗原（T A A）であってもよい。T S Aは腫瘍細胞に特有であり、体内の他の細胞には存在しない。T A Aは腫瘍細胞に特有ではなく、抗原に対する免疫学的寛容状態を誘導できない条件下で正常細胞上にも発現する。腫瘍上での抗原の発現は、免疫系が抗原に応答することができる条件下で起こり得る。T A Aは、免疫系が未熟で応答することができない場合に、胎児の発育期に正常細胞上に発現する抗原である場合もあれば、正常細胞上には通常極めて低レベルで存在するが、腫瘍細胞上でははるかに高レベルで発現される抗原である場合もある。

【0 4 7 8】

ペプチドおよびタンパク質抗原は、例えば、少なくとも5個のアミノ酸、少なくとも10個のアミノ酸、少なくとも15個のアミノ酸、少なくとも20個のアミノ酸、少なくとも25個のアミノ酸、少なくとも30個のアミノ酸、少なくとも35個のアミノ酸、少なくとも40個のアミノ酸、少なくとも45個のアミノ酸、または少なくとも50個のアミノ酸の長さを含む、2～100個のアミノ酸の長さであり得る。一部の実施形態では、ペプチドは50個を超えるアミノ酸であり得る。一部の実施形態では、ペプチドは100個を超えるアミノ酸であり得る。

【0 4 7 9】

ペプチドまたはタンパク質抗原は、標的抗原、例えば疾患関連抗原に対する抗体およびT細胞応答を発現する免疫系の能力を誘導または増大させることができる任意のペプチドまたはタンパク質であり得る。

【0 4 8 0】

さらに別の実施形態では、第1の態様の抗体は、放射線療法および／または自家末梢幹細胞もしくは骨髓移植と併用して投与されてもよい。

【0 4 8 1】

また、本開示に包含されるのは、第9の態様の組成物と、少なくとも1つの抗炎症剤または少なくとも1つの免疫抑制剤とを含む併用療法である。一実施形態では、このような

10

20

30

40

50

治療剤は、ステロイド薬またはNSAID（非ステロイド性抗炎症薬）などの1つ以上の抗炎症剤を含む。好ましい薬剤としては、例えば、アスピリンおよび他のサリチレート、ロフェコキシブ（Vioxx）およびセレコキシブ（Celebrex）などのCox-2阻害剤、イブプロフェン（Motrin、Advil）、フェノプロフェン（Nalfon）、ナプロキセン（Naprosyn）、スリンダク（Clinoril）、ジクロフェナク（Voltaren）、ピロキシカム（Feldene）、ケトプロフェン（Orudis）、ジフルニサル（Dolobid）、ナブメトン（Relafen）、エトドラク（Lodine）、オキサプロジン（Daypro）、およびインドメタシン（Indocin）などのNSAIDが挙げられる。本開示による併用療法はまた、（i）第1の態様の抗体と、（ii）上記で明示されているワクチン接種処置／療法と、（iii）少なくとも1つの抗炎症剤または少なくとも1つの免疫抑制剤との組合せを含み得る。

10

【0482】

上記態様の二特異性分子および多特異性分子は、別の免疫チェックポイントと相互作用するために使用することができる。それによって、それぞれ他のチェックポイントを阻害するか、または活性化／刺激する。標的化され得る他のチェックポイント阻害剤としては、CTLA4、PD-L1、TIM-3、KIRまたはLAG-3が挙げられるが、これらに限定されず、第2の結合特異性によって標的化され得るチェックポイント活性化剤としては、CD27、CD28、CD40、CD122、CD137、OX40、GITRまたはICOSが挙げられるが、これらに限定されない。結合特異性の好ましい組合せとしては、抗PD1と抗PD-L1、または抗PD-1と抗CTLA4が挙げられる。

20

【0483】

あるいはまたはさらに、上記の態様の二特異性分子または多特異性分子を使用して、例えば血管内皮成長因子（VEGF）またはその受容体VEGFR（例えばVEGFR1、2、3）を標的とすることにより、血管新生阻害活性をもたらすことができる。第2の結合特異性は、PDGFR、c-Kit、Rafおよび／またはRETを標的とすることも可能であり得る。

【0484】

あるいはまたはさらに、上記の態様の二特異性分子または多特異性分子は、腫瘍抗原、好ましくは上記で明示されている腫瘍抗原を標的とするために使用することができ、これによって第1の態様の抗体のがん細胞に対する特異性が可能となる。

30

【0485】

第10および第11の態様の使用および方法については、医薬組成物、好ましくは上記のような医薬組成物中にふくまれてもよい有効成分の実際の投薬量レベルは、特定の患者、組成物、および投与様式に対して所望の治療応答を達成するのに有効であり、患者に毒性でない有効成分の量を得るように変化され得る。選択される投薬量レベルは、採用される本開示の特定の組成物の活性、投与経路、投与時間、採用される特定の化合物の排出速度、処置期間、採用される特定の組成物と組み合わせて使用される他の薬物、化合物および／または材料、処置される患者の年齢、性別、体重、状態、一般的な健康状態および以前の病歴、ならびに医学技術において周知の同様の要因を含む、種々の薬物動態学的要因に依存する。

40

【0486】

当技術分野における通常の技術を有する医師または獣医師は、必要とされる医薬組成物の有効量を容易に決定し、処方することができる。例えば、医師または獣医師は、所望の治療効果を達成するために必要なレベルよりも低いレベルで、医薬組成物中に採用される本開示の化合物の用量を開始し、所望の効果が達成されるまで投薬量を徐々に増加させることができる。一般に、本開示の組成物の好適な1日用量は、治療効果をもたらすのに有効な最低用量である化合物の量である。このような有効量は、一般に、上記の要因に依存する。投与は、静脈内、筋肉内、腹腔内、または皮下であることが好ましく、好ましくは、標的部位の近位に投与される。所望により、治療用組成物の1日の有効用量は、1日を通して適切な間隔で別々に投与される2、3、4、5、6またはそれを超える部分用量と

50

して、任意に、単位剤形で投与されてもよい。本開示の化合物を単独で投与することも可能であるが、医薬組成物（製剤）としてその化合物を投与することが好ましい。

【0487】

一実施形態では、第1の態様の抗体は、毒性副作用を低減するために、注入により、好ましくは24時間を超えるような長期間にわたる緩徐連続注入により投与されてもよい。投与はまた、2～24時間、例えば2～12時間にわたる連続注入によって行われてもよい。このようなレジメンは、必要に応じて1回以上、例えば6ヶ月後または12ヶ月後に繰り返されてもよい。投薬量は、抗PD-1抗体を標的とする抗イディオタイプ抗体を使用することによって、生体試料中の投与時の抗PD-1抗体の循環量を測定することにより決定または調整することができる。

10

【0488】

さらに別の実施形態では、抗体は、例えば週に1回、6ヶ月以上の期間、維持療法によって投与される。

【0489】

腫瘍治療に関する「治療有効投薬量」は、完全奏効または部分奏効となり得る客観的な腫瘍応答によって測定することができる。完全奏効（CR）とは、臨床的、放射線学的、またはその他の病徴が認められないことと定義される。部分奏効（PR）とは、集合的な腫瘍サイズが50%を超えて縮小することである。進行までの時間の中央値は、客観的腫瘍応答の持続性を特徴付ける尺度である。

【0490】

腫瘍治療における「治療有効投薬量」は、疾患の進行を安定化させる能力によっても測定することができる。がんを阻害する化合物の能力は、ヒト腫瘍における有効性を予測できる動物モデル系において評価することができる。あるいは、組成物のこの特性は、当業者に公知のインビトロアッセイにより、細胞成長またはアポトーシスを阻害する化合物の能力を調べることによって評価することができる。治療有効量の治療用化合物は、腫瘍サイズを減少させるか、またはそうでなければ対象における症状を軽快させることができる。当業者であれば、対象のサイズ、対象の症状の重症度、および選択される特定の組成物または投与経路などの要因に基づいて、このような量を決定することができるであろう。

20

【0491】

「疾患の処置、例えば腫瘍／がんの処置における使用のための」という表現は、本明細書において、「医薬品、特にがんの処置方法における使用のための」；またはヒト（またはより一般的にはそれを必要とする対象）における前記処置方法における使用のための医薬製剤の調製における前記生成物の使用とも置き換え可能に使用される。

30

【0492】

腫瘍／がん処置における上記態様の抗体、コンジュゲート、多量体、核酸、ベクター、宿主細胞、ウイルスまたは組成物の使用に代えて、上記態様の抗体、コンジュゲート、多量体、核酸、ベクター、宿主細胞、ウイルスまたは組成物は、免疫応答の誘導が必要とされる他の疾患の処置において使用することができる。したがって、上記態様の抗体、コンジュゲート、多量体、核酸、ベクター、宿主細胞、ウイルスまたは組成物は、感染処置に有効である場合がある。感染症処置には、例えば、ヒト肝炎ウイルス（B型肝炎、C型肝炎、A型肝炎、またはE型肝炎）、ヒトレトロウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（HIV1、HIV2）、ヒトT白血病ウイルス（HTLV1、HTLV2）、またはヒトリンパ球細胞型ウイルス、単純ヘルペスウイルス1型または2型、エプスタインバーウイルス、サイトメガロウイルス、水痘・帯状疱疹ウイルス、ヒトヘルペスウイルス6を含むヒトヘルペスウイルス、ポリオウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、日本脳炎ウイルス、ムンプスウイルス、インフルエンザウイルス、アデノウイルス、エンテロウイルス、ライノウイルス、重症急性呼吸器症候群（SARS）を発症するウイルス、エボラウイルス、西ナイルウイルス、またはこれらのウイルスを人工的に改変したものによる感染が含まれる。

40

【0493】

50

腫瘍／がん処置における上記態様の抗体、コンジュゲート、多量体、核酸、ベクター、宿主細胞、ウイルスまたは組成物の使用にまたさらに代えて、上記態様の抗体、コンジュゲート、多量体、核酸、ベクター、宿主細胞、ウイルスまたは組成物は、活性化免疫細胞の枯渇が必要とされる他の疾患の処置において使用することができる。したがって、上記態様の抗体、コンジュゲート、多量体、核酸、ベクター、宿主細胞、ウイルスまたは組成物は、自己免疫疾患の処置に有効である場合がある。自己免疫疾患としては、例えば、セリアック病、炎症性腸疾患、多発性硬化症、関節リウマチおよび全身性エリテマトーデスが挙げられ得る。

【0494】

文脈が他に示さない限り、がんの処置に関する上記に開示された本開示の使用および方法の好ましい実施形態に関する開示は、感染症または自己免疫疾患の処置にも適用される。

10

【0495】

また、本開示の範囲内には、上記の態様の抗体、コンジュゲートまたは多量体および使用説明書を含むキットもある。キットは、第1の態様の抗PD-1抗体を標的とする抗体、酵素基質または他の基質、発色を得るための酵素などの1つ以上の追加試薬をさらに含有することができる。

【0496】

よって、第12の態様では、試料中のPD-1の定性的または定量的検出のためのキットであって、第1もしくは第2の態様の抗体または第4の態様のコンジュゲートまたは第5の態様の多量体を含む、キットが提供される。

20

【0497】

第12の態様のキットは、試料中のPD-1を定性的または定量的に検出するために使用され得る。

【0498】

一実施形態では、試料中のPD-1抗原の存在を検出する、またはPD-1抗原の量を測定するための方法であって、試料および対照試料を、抗体またはその一部とPD-1との間の複合体の形成を可能にする条件下で、PD-1に特異的に結合する抗体と接触させることを含み、抗体が、好ましくは、本明細書に開示されている抗体である、方法が提供される。次いで、複合体の形成が検出され、対照試料と比較した試料間の複合体形成の差は、試料中のPD-1抗原の存在を示す。

30

【0499】

また別の実施形態では、インビボまたはインビトロでPD-1発現細胞の存在を検出するか、またはその量を定量するための方法が提供される。本方法は、(i)対象に、検出可能なマーカーにコンジュゲートした第1の態様の抗体を投与することと；(ii)対象を、前記検出可能なマーカーを検出する手段に曝して、PD-1発現細胞を含有する領域を特定することを含む。

【0500】

上記のような方法は、特に、PD-1関連疾患の診断および／またはPD-1関連疾患の局在化に有用である。好ましくは、試料中のPD-1の量が対照試料中のPD-1の量よりも多いことは、その試料が由来する対象、特にヒトにおけるPD-1関連疾患の存在を示す。

40

【0501】

さらに別の実施形態では、第3の態様のコンジュゲートは、このような化合物を抗体に連結させることによって、PD-1をその表面に発現している細胞に化合物（例えば、治療剤、標識など）を標的化するために使用することができる。よって、本開示は、PD-1を発現する細胞をエクスピボまたはインビトロで局在化させるための方法も提供する。

【0502】

上記の態様は、以下の図および実施例によって詳細に説明されるが、これらは説明のためにのみ使用され、本発明の範囲を限定するものとして解釈されるものではない。本明細

50

書および実施例のおかげで、同様に本発明に含まれるさらなる実施形態が当業者に利用可能である。

【0503】

本開示は特に以下の項目に関する：

【0504】

1. PD-1に結合する能力を有する抗体であって、重鎖定常領域（CH）および重鎖可変領域（VH）を有する重鎖を含み、重鎖定常領域が、EU番号付けに従いヒトIgG1重鎖の234位に対応する位置に芳香族アミノ酸または非極性アミノ酸、およびEU番号付けに従いヒトIgG1重鎖の236位に対応する位置にグリシン以外のアミノ酸を含む、抗体。

10

【0505】

2. 低下または枯渇したFc媒介性エフェクター機能を有する、項目1に記載の抗体。

【0506】

3. 236位に対応する位置のアミノ酸が塩基性アミノ酸である、項目1または2に記載の抗体。

【0507】

4. 塩基性アミノ酸が、リシン、アルギニンおよびヒスチジンからなる群から選択される、項目2または3に記載の抗体。

【0508】

5. 塩基性アミノ酸がアルギニン（G236R）である、項目1から4のいずれか1つに記載の抗体。

20

【0509】

6. 234位に対応する位置のアミノ酸が芳香族アミノ酸である、項目1から5のいずれか1つに記載の抗体。

【0510】

7. 芳香族アミノ酸が、フェニルアラニン、トリプトファンおよびチロシンからなる群から選択される、項目6に記載の抗体。

【0511】

8. 234位に対応する位置のアミノ酸が非極性アミノ酸である、項目1から5のいずれか1つに記載の抗体。

30

【0512】

9. 非極性アミノ酸が、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、メチオニンおよびトリプトファンからなる群から選択される、項目8に記載の抗体。

【0513】

10. 非極性アミノ酸が、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニンおよびトリプトファンからなる群から選択される、項目8または9に記載の抗体。

【0514】

11. 234位に対応する位置のアミノ酸がフェニルアラニン（L234F）である、項目1から10のいずれか1つに記載の抗体。

40

【0515】

12. 前記重鎖定常領域において、EU番号付けに従いヒトIgG1重鎖の235位に対応する位置のアミノ酸が、酸性アミノ酸である、項目1から11のいずれか1つに記載の抗体。

【0516】

13. 酸性アミノ酸がアスパラギン酸またはグルタミン酸である、項目12に記載の抗体。

【0517】

14. 235位に対応する位置のアミノ酸がグルタミン酸（L235E）である、項目1から13のいずれか1つに記載の抗体。

50

【0518】

15. 重鎖定常領域において、234、235および236位に対応する位置のアミノ酸が、234位が非極性アミノ酸または芳香族アミノ酸、235位が酸性アミノ酸、236位が塩基性アミノ酸である、項目1から14のいずれか1つに記載の抗体。

【0519】

16. 234位に対応するアミノ酸がフェニルアラニンであり、235位に対応するアミノ酸がグルタミン酸であり、236位に対応するアミノ酸がアルギニンである（L234F／L235E／G236R）、項目1から15のいずれか1つに記載の抗体。

【0520】

17. 重鎖定常領域が、配列番号2に記載された重鎖定常領域配列のアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、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97%、少なくとも99%、または100%の同一性を有する配列を含む、項目1から16のいずれか1つに記載の抗体。

10

【0521】

18. 重鎖定常領域が、配列番号2または55に記載された配列を含む、項目1から17のいずれか1つに記載の抗体。

【0522】

19. 重鎖定常領域のアイソタイプがIgG1である、項目1から18のいずれか1つに記載の抗体。

【0523】

20. 重鎖可変領域（VH）が、配列番号8に記載された配列を有するかまたはそれを含む相補性決定領域3（HCDR3）を含む、項目1から19のいずれか1つに記載の抗体。

20

【0524】

21. 重鎖可変領域（VH）のHCDR3が、配列番号9に記載された配列を有するかまたはそれを含む、項目1から20のいずれか1つに記載の抗体。

【0525】

22. 重鎖可変領域（VH）が、配列番号10に記載された配列を有するかまたは含む相補性決定領域2（HCDR2）を含む、項目1から21のいずれか1つに記載の抗体。

【0526】

23. 重鎖可変領域（VH）のHCDR2が、配列番号11に記載された配列を有するかまたはそれを含む、項目22に記載の抗体。

30

【0527】

24. 重鎖可変領域（VH）が、SYNから選択される配列を有するかまたはそれを含む相補性決定領域1（HCDR1）を含む、項目1から23のいずれか1つに記載の抗体。

【0528】

25. 重鎖可変領域（VH）のHCDR1が、配列番号12に記載された配列を有するかまたはそれを含む、項目24に記載の抗体。

【0529】

26. 重鎖可変領域（VH）のHCDR1が、配列番号13に記載された配列を有するかまたはそれを含む、項目24に記載の抗体。

40

【0530】

27. HCDR1、HCDR2およびHCDR3配列を含む重鎖可変領域（VH）を含み、HCDR1配列が、SYN、配列番号12または配列番号13を有するかまたはそれを含む配列から選択され、HCDR2配列が、配列番号10または配列番号11を有するかまたはそれを含む配列から選択され、HCDR3配列が、配列番号8または配列番号9を有するかまたはそれを含む配列から選択される、項目1から26のいずれか1つに記載の抗体。

【0531】

28. HCDR1、HCDR2およびHCDR3配列を含む重鎖可変領域（VH）を含み

50

、HCDR1、HCDR2およびHCDR3配列が、それぞれ、SYN、配列番号10および配列番号8であるかまたはそれを含む、項目1から27のいずれか1つに記載の抗体。

【0532】

29. HCDR1、HCDR2およびHCDR3配列を含む重鎖可変領域（VH）を含み、HCDR1、HCDR2およびHCDR3配列が、それぞれ、配列番号12、配列番号11および配列番号8であるかまたはそれを含む、項目1から28のいずれか1つに記載の抗体。

【0533】

30. HCDR1、HCDR2、およびHCDR3配列を含む重鎖可変領域（VH）を含み、HCDR1、HCDR2、およびHCDR3配列が、それぞれ、配列番号13、配列番号10および配列番号9であるかまたはそれを含む、項目1から28のいずれか1つに記載の抗体。

【0534】

31. 軽鎖可変領域（VL）を有する軽鎖を含む、項目1から30のいずれか1つに記載の抗体。

【0535】

32.

— 配列番号14に記載された配列を有するかもしくはそれを含む相補性決定領域3（LCDR3）；

— QASもしくは配列番号15に記載された配列から選択された配列を有するかもしくはそれを含む相補性決定領域2（LCDR2）；および／または

— 配列番号16もしくは配列番号17に記載された配列を有するかもしくはそれを含む相補性決定領域1（LCDR1）

のうちの少なくとも1つを含む軽鎖可変領域（VL）を含む、項目1から31のいずれか1つに記載の抗体。

【0536】

33. LCDR1、LCDR2およびLCDR3配列を含む軽鎖可変領域（VL）を含み、LCDR1配列が、配列番号16または配列番号17を有するかまたはそれを含む配列から選択され、LCDR2配列が、QASまたは配列番号15を有するかまたはそれを含む配列から選択され、LCDR3配列が、配列番号14を有するかまたはそれを含む配列である、項目32に記載の抗体。

【0537】

34. LCDR1、LCDR2およびLCDR3配列を含む軽鎖可変領域（VL）を含み、LCDR1、LCDR2およびLCDR3配列が、それぞれ、配列番号16、QAS、および配列番号14であるかまたはそれを含む、項目31から33のいずれか1つに記載の抗体。

【0538】

35. LCDR1、LCDR2およびLCDR3配列を含む軽鎖可変領域（VL）を含み、LCDR1、LCDR2およびLCDR3配列が、それぞれ、配列番号17、配列番号15、および配列番号14であるかまたはそれを含む、項目31から34のいずれか1つに記載の抗体。

【0539】

36. 項目20から30のいずれか1つに明示されている重鎖可変領域（VH）および項目31から35のいずれか1つに明示されている軽鎖可変領域（VL）を含む、項目1から19のいずれか1つに記載の抗体。

【0540】

37. HCDR1、HCDR2およびHCDR3配列を含む重鎖可変領域（VH）ならびにLCDR1、LCDR2およびLCDR3配列を含む軽鎖可変領域（VL）を含み、HCDR1、HCDR2およびHCDR3配列が、それぞれ、配列番号10および配列番号

8に記載された配列SYNを含むかまたはそれを有し、LCDR1、LCDR2およびLCDR3配列が、それぞれ、配列番号16、QASおよび配列番号14に記載された配列を含むかまたはそれを有する、項目1から36のいずれか1つに記載の抗体。

【0541】

38. HCDR1、HCDR2およびHCDR3配列を含む重鎖可変領域(VH)ならびにLCDR1、LCDR2およびLCDR3配列を含む軽鎖可変領域(VL)を含み、HCDR1、HCDR2およびHCDR3配列が、それぞれ、配列番号12、配列番号11および配列番号8に記載された配列を含むかまたはそれを有し、LCDR1、LCDR2およびLCDR3配列が、それぞれ、配列番号17、配列番号15および配列番号14に記載された配列を含むかまたはそれを有する、項目1から36のいずれか1つに記載の抗体。

10

【0542】

39. HCDR1、HCDR2およびHCDR3配列を含む重鎖可変領域(VH)ならびにLCDR1、LCDR2およびLCDR3配列を含む軽鎖可変領域(VL)を含み、HCDR1、HCDR2およびHCDR3配列が、それぞれ、配列番号13、配列番号10および配列番号9に記載された配列を含むかまたはそれを有し、LCDR1、LCDR2およびLCDR3配列が、それぞれ、配列番号16、QASおよび配列番号14に記載された配列を含むかまたはそれを有する、項目1から36のいずれか1つに記載の抗体。

【0543】

40. 配列番号18に記載された重鎖可変領域(VH)配列のアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、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97%、少なくとも99%、または100%の同一性を有する配列を含む重鎖可変領域(VH)を含む、項目1から39のいずれか1つに記載の抗体。

20

【0544】

41. 重鎖可変領域(VH)を含み、VHが、配列番号18に記載された配列を含む、項目1から39のいずれか1つに記載の抗体。

【0545】

42. 配列番号19に記載された軽鎖可変領域(VL)配列のアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、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97%、少なくとも99%、または100%の同一性を有する配列を含む軽鎖可変領域(VL)を含む、項目1から41のいずれか1つに記載の抗体。

30

【0546】

43. 軽鎖可変領域(VL)を含み、VLが、配列番号19に記載された配列を含む、項目1から42のいずれか1つに記載の抗体。

【0547】

44. 重鎖可変領域(VH)および軽鎖可変領域(VL)を含み、VHが配列番号18に記載された配列を含むかまたはそれを有し、VLが配列番号19に記載された配列を含むかまたはそれを有する、項目1から43のいずれか1つに記載の抗体。

40

【0548】

45. 配列番号20に記載された重鎖可変領域(VH)配列のアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、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97%、少なくとも99%、または100%の同一性を有する配列を含む重鎖可変領域(VH)を含む、項目1から39のいずれか1つに記載の抗体。

【0549】

46. 重鎖可変領域(VH)を含み、VHが、配列番号20に記載された配列を含む、項目45に記載の抗体。

【0550】

50

47. 配列番号20に記載された配列を含むVH、および配列番号2または配列番号55に記載された配列を含む重鎖定常領域を含む重鎖を含む、項目45に記載の抗体。

【0551】

48. 配列番号56に記載された配列を含む重鎖を含む、項目45に記載の抗体。

【0552】

49. 配列番号21に記載された軽鎖可変領域(VL)配列のアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、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97%、少なくとも99%、または100%の同一性を有する配列を含む軽鎖可変領域(VL)を含む、項目1から48のいずれか1つに記載の抗体。

【0553】

50. 軽鎖可変領域(VL)を含み、VLが、配列番号21に記載された配列を含む、項目49に記載の抗体。

【0554】

51. 配列番号21に記載された配列を含むVL、および配列番号6に記載された配列を含む軽鎖定常領域を含む軽鎖を含む、項目49に記載の抗体。

【0555】

52. 配列番号57に記載された配列を含む軽鎖を含む、項目49に記載の抗体。

【0556】

53. 重鎖可変領域(VH)および軽鎖可変領域(VL)を含み、VHが配列番号20に記載された配列を含むかまたはそれを有し、VLが配列番号21に記載された配列を含むかまたはそれを有する、項目1から48のいずれか1つに記載の抗体。

【0557】

54.

(i) 配列番号2または55に記載された配列を含む重鎖定常領域(CH)、および配列番号20に記載された配列を含む重鎖可変領域(VH)を有する重鎖、ならびに

(ii) 配列番号6に記載された配列を含む軽鎖定常領域(CL)、および配列番号21に記載された配列を含む軽鎖可変領域(VL)を有する軽鎖を含む、項目1から53のいずれか1つに記載の抗体。

【0558】

55. 配列番号56に記載された配列を有する重鎖、および配列番号57に記載された配列を有する軽鎖を含む、項目1から53のいずれか1つに記載の抗体。

【0559】

56. モノクローナル抗体、キメラ抗体もしくはヒト化抗体、またはこのような抗体の断片である、項目1から55のいずれか1つに記載の抗体。

【0560】

57. 抗体の定常領域への補体タンパク質C1qの結合が、対応する野生型抗体と比較して低下しており、好ましくは少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%または100%低下している、項目1から56のいずれか1つに記載の抗体。

【0561】

58. 抗体への1つ以上のIgG Fcガンマ受容体への結合が、対応する野生型抗体と比較して低下しており、好ましくは少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%または100%低下している、項目1から57のいずれか1つに記載の抗体。

【0562】

59. 1つ以上のIgG Fc-ガンマ受容体が、Fc-ガンマRI、Fc-ガンマRII、およびFc-ガンマRIIIのうちの少なくとも1つから選択される、項目58に記載の抗体。

【0563】

10

20

30

40

50

60. IgG Fc ガンマ受容体が、Fc-ガンマRI である、項目58に記載の抗体。

【0564】

61. Fc-ガンマRI 媒介性エフェクター機能を誘導することができないか、または誘導されたFc-ガンマRI 媒介性エフェクター機能が、対応する野生型抗体と比較して低下しており、好ましくは少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%または100%低下している、項目1から60のいずれか1つに記載の抗体。

【0565】

62. 補体依存性細胞傷害(CDC)媒介性溶解、抗体依存性細胞傷害(ADCC)媒介性溶解、アポトーシス、ホモ型接着および／もしくは貪食のうちの少なくとも1つを誘導することができないか、または補体依存性細胞傷害(CDC)媒介性溶解、抗体依存性細胞傷害(ADCC)媒介性溶解、アポトーシス、ホモ型接着および／もしくは貪食のうちの少なくとも1つが、低下した程度で、好ましくは少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%または100%低下して誘導される、項目1から61のいずれか1つに記載の抗体。

【0566】

63. 抗体に対する新生児Fc受容体(FcRn)の結合が、対応する野生型抗体と比較して、影響を受けない、項目1から62のいずれか1つに記載の抗体。

【0567】

64. PD-1 がヒトPD-1 である、項目1から63のいずれか1つに記載の抗体。

【0568】

65. PD-1 が、配列番号22もしくは配列番号23に記載されたアミノ酸配列を有するかもしくはそれを含み、またはPD-1 のアミノ酸配列が、配列番号22もしくは配列番号23に記載されたアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも75%、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97%、少なくとも99%、もしくは100%の同一性を有するか、またはその免疫原性断片である、項目64に記載の抗体。

【0569】

66. 生細胞表面に存在するPD-1 のネイティブエピトープに結合する、項目1から65のいずれか1つに記載の抗体。

【0570】

67. PD-1 に結合する第1の抗原結合領域、および別の抗原に結合する少なくとも1つのさらなる抗原結合領域を含む多特異性抗体である、項目1から66のいずれか1つに記載の抗体。

【0571】

68. PD-1 に結合する第1の抗原結合領域、および別の抗原に結合する第2の抗原結合領域を含む二特異性抗体である、項目67に記載の抗体。

【0572】

69. PD-1 に結合する第1の抗原結合領域が、項目1から60のいずれか1つに記載された重鎖可変領域(VH)および／または軽鎖可変領域(VL)を含む、項目67または68に記載の抗体。

【0573】

70. 項目1から69のいずれか1つに記載の抗体を産生することが可能なハイブリドーマ。

【0574】

71. 部分または薬剤に連結された項目1から69のいずれか1つに記載の抗体を含むコンジュゲート。

【0575】

72. 部分または薬剤が、放射性同位体、酵素、色素、薬物、毒素および細胞毒性剤からなる群から選択される、項目71に記載のコンジュゲート。

10

20

30

40

50

【0576】

73. 項目1から69のいずれか1つに記載の少なくとも2つの抗体、または項目71もしくは72に記載の少なくとも2つのコンジュゲート、または項目1から69のいずれか1つに記載の1つ以上の抗体と項目71もしくは72に記載の1つ以上のコンジュゲートとの混合物を含む多量体。

【0577】

74. 項目1から69のいずれか1つに記載の4～8個の抗体、または項目71もしくは72に記載のコンジュゲートを含む、項目73に記載の多量体。

【0578】

75. 項目1から69のいずれか1つに記載の抗体をコードするか、または項目1から30もしくは37から66のいずれか1つに明示されている抗体重鎖をコードする、および／または項目31から39、42、43、もしくは49から66のいずれか1つに明示されている抗体軽鎖をコードする核酸配列、またはその断片を含む核酸。

10

【0579】

76. 核酸がRNAである、項目75に記載の核酸。

【0580】

77. 項目75または76に記載の核酸のうちの1つ以上を含むベクター。

【0581】

78. 多層ベシクル、単層ベシクル、またはそれらの混合物である、項目77に記載のベクター。

20

【0582】

79. リポソームである、項目77または78に記載のベクター。

【0583】

80. リポソームがカチオン性リポソームである、項目79に記載のベクター。

【0584】

81. リポソームが、約50nm～約200nmの範囲の粒径を有する、項目79または80に記載のベクター。

【0585】

82. 項目75または76に記載の核酸を含むか、または項目77から81のいずれか1つに記載のベクターを含む宿主細胞。

30

【0586】

83. 項目75または76に記載の核酸を含むか、または項目77から81のいずれか1つに記載のベクターを含むウイルス。

【0587】

84. 活性剤および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物であって、活性剤が、

(i) 項目1から69のいずれか1つに記載の抗体；

(ii) 項目71もしくは72に記載のコンジュゲート；

(iii) 項目73もしくは74に記載の多量体；

(iv) 項目75もしくは76に記載の核酸もしくはその組合せ；

(v) 項目77から81のいずれか1つに記載のベクターもしくはその組合せ；

40

(vi) 項目82に記載の宿主細胞もしくはその組合せ；および／または

(vii) 項目83に記載のウイルスもしくはその組合せ

から選択される少なくとも1つである、医薬組成物。

【0588】

85. 非経口投与用に製剤化される、項目84に記載の医薬組成物。

【0589】

86. 心血管投与用、特に静脈内または動脈内投与用に製剤化される、項目85に記載の医薬組成物。

【0590】

87. 疾患の予防的および／または治療的処置において使用するための項目84から86

50

のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

【0591】

88. 疾患が、がん成長および／またはがん転移である、項目 87 に記載の医薬組成物。

【0592】

89. 疾患が、PD-L1 を発現することによって特徴付けられる、および／または PD-L1 がその表面と会合することによって特徴付けられる異常細胞またはがん細胞を含むことによって特徴付けられる、項目 87 または 88 に記載の医薬組成物。

【0593】

90. がんを防止または処置する方法において使用するための項目 84 から 89 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

【0594】

91. がんが、黒色腫、肺がん、腎細胞癌、膀胱がん、乳がん、胃がんおよび胃食道接合部がん、膵腺癌、卵巣がんおよびリンパ腫からなる群から選択される、項目 88 から 90 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

【0595】

92. 標的器官または組織に特異的にデリバリーされ、蓄積され、および／または保持される、項目 84 から 91 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

【0596】

93. ベクターまたはウイルスが、標的器官もしくは組織で核酸を放出し、および／または標的器官もしくは組織の細胞に侵入する、項目 84 から 92 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

【0597】

94. 抗体が、標的器官または組織の細胞において発現される、項目 84 から 93 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

【0598】

95. 処置が、単剤療法または併用療法である、項目 84 から 94 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

【0599】

96. 併用処置が、化学療法、分子標的療法、放射線療法、および他の形態の免疫療法からなる群から選択される少なくとも 1 つの処置である、項目 95 に記載の医薬組成物。

【0600】

97. 対象がヒトである、項目 84 から 96 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物。

【0601】

98. 対象における疾患を処置または防止する方法であって、対象に、少なくとも 1 つの活性剤を投与することを含み、活性剤が、

(i) 項目 1 から 69 のいずれか 1 つに記載の抗体；

(ii) 項目 71 もしくは 72 に記載のコンジュゲート；

(iii) 項目 73 もしくは 74 に記載の多量体；

(iv) 項目 75 もしくは 76 に記載の核酸もしくはその組合せ；

(v) 項目 77 から 81 のいずれか 1 つに記載のベクターもしくはその組合せ；

(vi) 項目 82 に記載の宿主細胞もしくはその組合せ；および／または

(vii) 項目 83 に記載のウイルスもしくはその組合せ

から選択される少なくとも 1 つである、方法。

【0602】

99. 項目 84 から 86 のいずれか 1 つに記載の医薬組成物が対象に投与される、項目 98 に記載の方法。

【0603】

100. 対象が、PD-L1 を発現する細胞によって特徴付けられ、および／または PD-L1 がその表面に会合することによって特徴付けられる罹患した器官または組織を有する、項目 98 または 99 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【0604】

101. 疾患が、がん成長および／またはがん転移である、項目98から100のいずれか1つに記載の方法。

【0605】

102. がんが、黒色腫、肺がん、腎細胞癌、膀胱がん、乳がん、胃がんおよび胃食道接合部がん、膵腺癌、卵巣がんおよびリンパ腫からなる群から選択される、項目101に記載の方法。

【0606】

103. 活性剤または医薬組成物が、心血管系へと投与される、項目98から102のいずれか1つに記載の方法。

【0607】

104. 活性剤または医薬組成物が、末梢静脈への投与などの静脈内投与または動脈内投与によって投与される、項目103に記載の方法。

【0608】

105. 活性剤または医薬組成物が、標的器官または組織に特異的にデリバリーされ、蓄積され、および／または保持される、項目98から104のいずれか1つに記載の方法。

【0609】

106. ベクター、宿主細胞またはウイルスが、標的器官もしくは組織で核酸を放出し、および／または標的器官もしくは組織の細胞に侵入する、項目98から105のいずれか1つに記載の方法。

【0610】

107. 抗体が、標的器官または組織の細胞において発現される、項目106に記載の方法。

【0611】

108. 処置が、単剤療法または併用療法である、項目98から107のいずれか1つに記載の方法。

【0612】

109. 併用処置が、化学療法、分子標的療法、放射線療法、および他の形態の免疫療法からなる群から選択される少なくとも1つの処置である、項目108に記載の方法。

【0613】

110. 対象がヒトである、項目98から109のいずれか1つに記載の方法。

【0614】

111. 試料中のPD-1の定性的または定量的検出のためのキットであって、項目1から69のいずれか1つに記載の抗体または項目71もしくは72に記載のコンジュゲートまたは項目73もしくは74に記載の多量体を含む、キット。

【0615】

112. 試料中で発現されるPD-1の存在または量を決定する方法における、項目1から69のいずれか1つに記載の抗体、または項目71もしくは72に記載のコンジュゲート、または項目73もしくは74に記載の多量体、または項目111に記載のキットの使用であって、方法が、

(i) 試料を抗体またはコンジュゲートまたは多量体と接触させる工程と、

(ii) 抗体またはコンジュゲートまたは多量体とPD-1との間の複合体の形成を検出する工程および／またはその量を決定する工程とを含む、使用。

【実施例】

【0616】

本明細書で使用される技法および方法は、本明細書に記載されるか、またはそれ自体公知の方法で、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.に記載されているように行われる。キットおよび試薬の使用を含むすべての方法は、特に示さない限り、製造業者の情報に従って行われる。

10

20

30

40

50

[実施例 1]

【0617】

I g G 1 - P D 1 の作成およびスクリーニング材料

P D - 1 および F c y R の構築物

様々な完全長 P D - 1 変異体をコードするプラスミドを作成した：ヒト（ホモサピエンス（Homo sapiens）；UniProtKB ID：Q15116）、カニクイザル（カニクイザル（Macaca fascicularis）；UniProtKB ID：B0LAJ3）、イヌ（イヌ（Canis familiaris）；UniProtKB ID：E2RPS2）、ウサギ（ウサギ（Oryctolagus cuniculus）；UniProtKB ID：G1SUF0）、ブタ（イノシシ（Sus scrofa）；UniProtKB ID：A0A287A1C3）、ラット（ドブネズミ（Rattus norvegicus）；UniProtKB ID：D3ZIN8）、マウス（ハツカネズミ（Mus musculus）；UniProtKB ID：Q02242）、およびヒト F c y R I a をコードするプラスミド（UniProtKB ID：P12314）。

10

【0618】

完全長 P D - 1 または F c y R 変異体を一過的に発現する C H O - S 細胞系の作成

製造評者の使用説明書に従って、C H O - S 細胞（懸濁成長に適応した C H O 細胞のサブクローン；ThermoFisher Scientific、カタログ番号 R800-07）に、FreeStyle（商標）MAX Reagent（ThermoFisher Scientific、カタログ番号 16447100）および OptiPRO（商標）無血清培地（ThermoFisher Scientific、カタログ番号 12309019）を使用して、P D - 1 または F c y R プラスミドをトランスフェクトした。

20

【0619】

抗体変異体の産生

I g G 1 - P D 1

3 匹の New Zealand White ウサギに組換えヒト H i s タグ付 P D - 1 タンパク質（R&D Systems、カタログ番号 8986-PD）を免疫した。血液由来の単一 B 細胞を選別し、上清をヒト P D - 1 酵素結合免疫吸着アッセイ（E L I S A）、細胞性ヒト P D - 1 結合アッセイおよびヒト P D - 1 / P D - L 1 遮断バイオアッセイにより P D - 1 特異性抗体の産生についてスクリーニングした。スクリーニング陽性 B 細胞から R N A を抽出し、シーケンシングを実施した。重鎖および軽鎖の可変領域を遺伝子合成し、F c y 受容体との相互作用を最小化するために、アミノ酸位置番号が E u 番号付け（配列番号 7）に従う突然変異 L 234A および L 235A（L A L A）を含有するヒト免疫グロブリン定常部分（I g G 1 / κ）の N 末端にクローニングした。

30

【0620】

293-free トランスフェクション試薬（Novagen/Merck）を使用する H E K 293-FreeStyle 細胞の一過的トランスフェクションは、Tecan Freedom Evo デバイスによって実行した。産生されたキメラ抗体を、プレートオートサンプラーを備えた Dionex Ultimate 3000 HPLC で、プロテイン A アフィニティークロマトグラフィーを使用して細胞上清から精製した。精製された抗体は、さらなる解析、特にヒト P D - 1 E L I S A、細胞性ヒト P D - 1 結合アッセイ、ヒト P D - 1 / P D - L 1 遮断バイオアッセイ、および T 細胞増殖アッセイによる再試験に使用した。キメラウサギ抗体 M A B - 19-0202（配列番号 18 および 19）が最も良好なクローンとして特定され、その後ヒト化した。

40

【0621】

キメラ P D - 1 抗体 M A B - 19-0202 の可変領域配列を以下の表に示す。表 4 は重鎖の可変領域を示し、表 5 は軽鎖の可変領域を示す。どちらの場合も、K a b a t 番号付けによる相補性決定領域（C D R）と同様にフレーミング領域（F R）が定義されてい

50

る。下線を引いたアミノ酸は I M G T 番号付けによる C D R を示す。太字は K a b a t 番号付けと I M G T 番号付けの共通部分を示す。

【 0 6 2 2 】

【 表 4 】

表 4:

重鎖										
配列番号	FR1	CDR 1	配列番号	FR 2	CDR 2	配列番号	FR3	CDR 3	配列番号	FR 4
MAB-19-0202-HC 配列番号 18	QSVEE SGGRL VTPGT PLTLT CTVSG FSLY	<u>SYN</u> MG	12	WV RQ AP GK GL EY IG	<u>IIS</u> <u>GGT</u> <u>IGH</u> YAS WAK G	11	RFTIS KTSST TVDLK MTSLT TEDTA TYFCA R	<u>AFY</u> <u>DDY</u> <u>DYN</u> V	8	WG PG TL VT VS S

10

【 0 6 2 3 】

【 表 5 】

表 5:

軽鎖										
配列番号	FR1	CDR 1	配列番号	FR 2	CDR 2	配列番号	FR3	CDR 3	配列番号	FR 4
MAB-19-0202-LC 配列番号 19	AAVLT QTPSP VSAAV GGTVT ISC	QSS <u>QSV</u> <u>YGN</u> <u>NQL</u> S	17	WY QQ KP GQ PP KL LI Y	<u>QAS</u> KLE T	15	GVPSR FKGSG SGTQF TLTIS DLESD DAATY YC	<u>AGG</u> <u>YSS</u> <u>SSD</u> <u>TT</u>	14	FG GG TE VV VK

20

30

【 0 6 2 4 】

293-free トランスフェクション試薬 (Novagen/Merck) を使用する HEK293-FreeStyle 細胞の一過的トランスフェクションは、Tecan Freedom Evo デバイスによって実行した。産生されたキメラ抗体を、プレートオートサンプラーを備えた Dionex Ultimate 3000 HPLC で、プロテイン A アフィニティークロマトグラフィーを使用して細胞上清から精製した。精製された抗体は、さらなる解析、特にヒト PD-1 ELISA、細胞性ヒト PD-1 結合アッセイ、ヒト PD-1/PD-L1 遮断バイオアッセイ、および T 細胞増殖アッセイによる再試験に使用した。キメラウサギ抗体 MAB-19-0202 (配列番号 18 および 19) が最も良好なクローンとして特定され、その後ヒト化した。

40

【 0 6 2 5 】

ヒト化重鎖および軽鎖可変領域抗体配列を、構造モデリング支援 CDR 移植によって作成し、遺伝子合成し、ヒト免疫グロブリン定常部分 (LALA 突然変異を有する IgG1/κ) の N 末端にクローニングした。ヒト化抗体は、さらなる解析、特にヒト PD-1 ELISA、細胞性ヒト PD-1 結合アッセイ、ヒト PD-1/PD-L1 遮断バイオアッセイ、および T 細胞増殖アッセイによる再試験に使用した。ヒト化抗体 MAB-19-0618 (配列番号 20 および 21) が最も良好なクローンとして特定された。

50

【 0 6 2 6 】

組換えヒト化配列の抗体 I D に対するヒト化軽鎖および重鎖の割り当てを表 6 に列挙する。ヒト化軽鎖および重鎖の可変領域配列を表 7 および表 8 に示す。表 7 は重鎖の可変領域を示し、表 8 は軽鎖の可変領域を示す。どちらの場合も、K a b a t 番号付けによる相補性決定領域 (C D R) と同様にフレーミング領域 (F R) が定義されている。下線を引いたアミノ酸は I M G T 番号付けによる C D R を示す。

【 0 6 2 7 】

【表 6】

表 6:

抗体 ID	軽鎖		重鎖	
	ヒト化変異体	軽鎖 配列番号	ヒト化変異体	重鎖 配列番号
MAB-19-0618	MAB-19-0202-L4	21	MAB-19-0202-H5	20

【 0 6 2 8 】

【表 7】

表 7:

重鎖							
配列番号	FR1	CDR 1	FR 2	CDR 2	FR3	CDR 3	FR 4
MAB-19-0202-H5 配列番号 20	QVQLV ESGGG LVQPG TSLRL SCSVS GFSLY	<u>SYN</u> MG	WV RQ AP GK GL EY IG	<u>IIS</u> GGT <u>IGH</u> YAS WAK G	RFTIS RDTSK TTLYL QMNSL TTEDT ATYFC <u>AR</u>	<u>AFY</u> <u>DDY</u> <u>DYN</u> V	WG PG TL VT VS S

【 0 6 2 9 】

【表 8】

表 8:

軽鎖							
配列番号	FR1	CDR 1	FR 2	CDR 2	FR3	CDR 3	FR 4
MAB-19-0202-L4 配列番号 21	AIQLT QSPSS LSASV GGTVT ITC	QSS <u>QSV</u> <u>YGN</u> <u>NQL</u> S	WY QQ KP GQ PP KL LI Y	<u>QAS</u> KLE T	GVPSR FRGSG SGTQF TLTIS SLQSE DFATY YC	<u>AGG</u> <u>YSS</u> <u>SSD</u> <u>TT</u>	FG GG TE VV VK

【0630】

M A B - 1 9 - 0 6 1 8 の重鎖および軽鎖の可変領域の配列を遺伝子合成し、ライゲーション非依存性クローニング (L I C) により、アミノ酸位置番号が E u 番号付けに従う F c サイレンシング突然変異 L 2 3 4 F、L 2 3 5 E および G 2 3 6 R (F E R) を含有するヒト I g G 1 m (f) 重鎖定常ドメイン (配列番号 2 または配列番号 5 5) およびヒトカップ軽鎖定常ドメイン (配列番号 6) をコードするコドン最適化配列を有する発現ベクターにクローニングした。得られた抗体を I g G 1 - P D 1 と命名した。

【0631】

G S X c e e d (登録商標) E x p r e s s i o n S y s t e m (L o n z a) を使用して、I g G 1 - P D 1 を発現する安定な細胞系を作成した。I g G 1 - P D 1 の重鎖および軽鎖をコードする配列を、L o n z a B i o l o g i c s p l c により発現ベクター p X C - 1 8 . 4 および p X C - K a p p a (グルタミン合成酵素 [G S] 遺伝子を含有する) にそれぞれクローニングした。次に、I g G 1 - P D 1 の重鎖と軽鎖の両方をコードする二重遺伝子ベクター (D G V、double gene vector) を、重鎖ベクターからの完全な発現カセットを軽鎖ベクターにライゲーションすることによって構築した。この D G V の DNA を制限酵素 P v u I - H F (New E n g l a n d B i o l a b s、R 3 1 5 0 L) で線状化し、C H O K 1 S V (登録商標) G S - K O (登録商標) 細胞の安定トランスフェクションに使用した。I g G 1 - P D 1 は機能的特徴付けのために精製した。

【0632】

I g G 1 - C D 5 2 - E 4 3 0 G

F c ドメイン (配列番号 4) に E 4 3 0 G 六量体化増強突然変異 (国際公開第 2 0 1 3 / 0 0 4 8 4 2 号) を有し、C D 5 2 特異性抗体である C A M P A T H - 1 H と同一の抗原結合ドメインを有するヒト I g G 1 抗体を、C 1 q 結合および F c γ R シグナル伝達実験における陽性対照として使用した [Crowe et al., 1992 Clin Exp Immunol. 87(1):105-110] (配列番号 2 5 および 2 9)。

【0633】

対照抗体

H I V 1 g p 1 2 0 特異性抗体である b 1 2 と同一の抗原結合ドメインを有するヒト I g G 1 抗体を、いくつかの実験において陰性対照として使用した [Barbas et al., J Mol Biol. 1993 Apr 5;230(3):812-2]。b 1 2 (配列番号 3 2 および 3 6) の V_H および V_L ドメインを、デノボ (de novo) 遺伝子合成 (Gene Art Gene Synthesis; ThermoFisher Scientific, Germany) によって調製し、選択される結合ドメインとして適宜、ヒト I g G 1 m (f) アロタイプ (配列番号 1) のヒト I g G 1 重鎖定常領域 (すなわち、C H 1、ヒンジ、C H 2 および C H 3 領域) もしくはその変異体 (L 2 3 4 F / L 2 3 5 E / G 2 3 6 R 突然変異および F E R R 突然変異と略される F c ドメインにおける付加的な、この研究の文脈では機能的に無関係な K 4 0 9 R 突然変異を含有する) (配列番号 3) を含有するか、またはヒト I g G 4 重鎖定常領域 (配列番号 5) ; もしくはヒトカップ軽鎖 (L C) の定常領域 (配列番号 6) を含有する発現ベクターにクローニングした。抗体は、産生細胞系における重鎖および軽鎖発現ベクターのトランスフェクションによって得られ、機能的特徴付けのために精製した。

【実施例 2】

【0634】

様々な種由来の P D - 1 への I g G 1 - P D 1 の結合

非臨床毒性試験に通常使用される種の P D - 1 への I g G 1 - P D 1 の結合を、異なる動物種由来の P D - 1 を一過的に発現する C H O - S 細胞を使用して、フローサイトメトリにより評価した。

【0635】

C H O - S 細胞 (5 × 1 0⁴ 個の細胞 / ウェル) を丸底 9 6 ウェルプレートに播種した

。IgG1-PD1、IgG1-ctrl-FERR、およびペムブロリズマブの抗体希釈液 (1.7×10^{-4} 個 $- 30 \mu\text{g}/\text{mL}$ または 5.6×10^{-5} 個 $- 10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、3 倍希釈液) を、0.1% [w/v] のウシ血清アルブミン [BSA; Roche、カタログ番号 10735086001] および 0.02% [w/v] のアジ化ナトリウム [NaN₃; bioWORLD、カタログ番号 41920044-3] を補充した Genmab (GMB) 蛍光活性化細胞選別 (FACS) 緩衝液 (リン酸緩衝生理食塩水 [PBS; Lonza、カタログ番号 BE17-517Q、蒸留水中 1×PBS に希釈] 中で調製した。ペムブロリズマブの IgG4 アイソタイプ対照 (BioLegend、カタログ番号 403702) は、試験した最高濃度 ($30 \mu\text{g}/\text{mL}$ または $10 \mu\text{g}/\text{mL}$) のみに含まれた。細胞を遠心分離し、上清を除去し、細胞を $50 \mu\text{L}$ の抗体希釈液中 4°C で 30 分間インキュベートした。細胞を GMB FACS 緩衝液で 2 回洗浄し、 $50 \mu\text{L}$ の二次抗体 R-フィコエリトリン (PE) がコンジュゲートしたヤギ抗ヒト IgG F(ab')₂ (Jackson ImmunoResearch、カタログ番号 109-116-098、GMB FACS 緩衝液で 1:500 に希釈) と共に 4°C で 30 分間、遮光してインキュベートした。細胞を GMB FACS 緩衝液で 2 回洗浄し、2 mM のエチレンジアミン四酢酸 (EDTA; Sigma-Aldrich、カタログ番号 03690) および 4', 6-ジアミノ-2-フェニルインドール (DAPI) 生存率マーカー (1:5, 000; BD Pharmingen、カタログ番号 564907) を補充した GMB FACS 緩衝液に再懸濁した。生存細胞 (DAPI 排除により特定される) への抗体結合は、FlowJo ソフトウェアを使用して、Intellicyt (登録商標) iQue PLUS Screener (Intellicyt Corporation) においてフローサイトメトリーにより解析した。結合曲線は、GraphPad Prism の非線形回帰解析 (4 パラメータ用量応答曲線フィット) を使用して解析した。

10

20

30

40

50

【0636】

ヒト、カニクイザル、イヌ、ウサギ、ブタ、ラット、またはマウスの PD-1 タンパク質が細胞表面に発現するように一過的にトランスフェクトした CHO-S 細胞を使用して、異なる種の PD-1 への IgG1-PD1 の結合をフローサイトメトリーで評価した。IgG1-PD1 の用量依存的結合をヒトおよびカニクイザルの PD-1 について観察した (図 1A~B)。ペムブロリズマブは同等の結合を示した。げっ歯類の PD-1 (マウス、ラット; 図 1C~D) に対しては、IgG1-PD1 の交差反応性は実質的に低下し、高濃度でのみ観察され、毒性学的研究において使用される頻度の高い他の種 (ウサギ、イヌ、ブタ; 図 1E) の PD-1 に対しては、結合は観察されなかった。IgG1-PD1 の非トランスフェクト対照細胞への結合は観察されず (図 1E)、陰性対照として含まれる IgG1-ctrl-FERR の PD-1 への結合も試験した種のいずれについても観察されなかった (図 1)。

【0637】

結論として、IgG1-PD1 は膜で発現されるヒトおよびカニクイザルの PD-1 に対して同程度の結合を示し、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、およびブタの PD-1 に対しては有意に低いか、結合しなかった。

【実施例 3】

【0638】

表面プラズモン共鳴により決定したヒトおよびカニクイザルの PD-1 への結合

固定化した IgG1-PD1、ペムブロリズマブ、ニボルマブのヒトおよびカニクイザルの PD-1 への結合を、Biacore 8K SPR システムを使用して表面プラズモン共鳴 (SPR) により解析した。C 末端に His タグを有する組換えヒトおよびカニクイザル PD-1 細胞外ドメイン (ECD) は、Sino Biological から入手した (カタログ番号はそれぞれ HPLC10377-H08H および 90311-C08H)。

【0639】

Biacore Series S Sensor Chips CM5 (Cytiv

a、カタログ番号29149603)を、アミンカップリングおよび製造業者の使用説明書に従って、Human Antibody Capture Kit、Type 2 (Cytiva、カタログ番号BR100050およびBR100839)を使用して、抗Fc抗体で共有結合的にコーティングした。

【0640】

その後、IgG1-PD1 (2 nM)、ニボルマブ (Bristol-Myers Squibb、ロット番号ABP6534; 1.25 nM)、およびペムブロリズマブ (Merck Sharp & Dohme、ロット番号T019263; 1.25 nM)をHBS-EP+緩衝液 (Cytiva、カタログ番号BR100669; 蒸留水 [BBraun、カタログ番号00182479E] 中で1×に希釈) で希釈したものを、25℃にて、流速10 μL/分、接触時間60秒で表面に捕捉した。これにより、およそ50レゾナンスユニット (RU) の捕捉レベルが得られた。

10

【0641】

HBS-EP+緩衝液のスタートアップを3サイクル行った後、ヒトまたはカニクイザルのPD-1 ECD試料 (0.19~200 nM; HBS-EP+緩衝液で2倍希釈; 12サイクル) を注入し、結合曲線を作成した。抗体を塗布した表面 (活性表面) において解析した各試料を、抗体を有さないパラレルフローセル (参照表面) でも解析し、バックグラウンド補正に使用した。

【0642】

各サイクルの最後に、10 mMのGlycine-HCl pH1.5 (Cytiva、カタログ番号BR100354) を使用して表面を再生した。データは、Biacore Insight Evaluationソフトウェア (Cytiva) においてあらかじめ定義された「Multi-cycle kinetics using capture」評価法を使用して解析した。ヒトまたはカニクイザルのPD-1の濃度が最も高い試料 (200 nM) は、データの曲線フィットをより良好にするために解析から除外した。

20

【0643】

固定化したIgG1-PD1は、 1.45 ± 0.05 nMの結合親和性 (K_D) でヒトPD-1 ECDと結合した (表9)。ニボルマブおよびペムブロリズマブは、IgG1-PD1の K_D に匹敵する結合親和性、すなわち低ナノモル範囲の K_D 値 (それぞれ 4.43 ± 0.08 nMおよび 3.59 ± 0.10 nM) でヒトPD-1 ECDに結合した (表9)。

30

【0644】

固定化したIgG1-PD1は、ヒトPD-1に対するIgG1-PD1の親和性に匹敵する 2.74 ± 0.58 nMの K_D で、カニクイザルPD-1 ECDに結合した (表10)。ニボルマブおよびペムブロリズマブは、カニクイザルPD-1 ECDに対するIgG1-PD1の K_D に匹敵し、ヒトPD-1 ECDに対するニボルマブおよびペムブロリズマブの K_D に匹敵する結合親和性で、すなわち低ナノモル範囲の K_D 値 (それぞれ 2.93 ± 0.58 nMおよび 0.90 ± 0.06 nM) で、カニクイザルPD-1 ECDに結合した (表10)。

40

【0645】

50

【表 9】

表 9. 表面プラズモン共鳴法により決定したヒト PD-1 の細胞外ドメインに対する PD-1 抗体の結合親和性。

IgG1-PD1、ニボルマブ、およびペムブロリズマブのヒト PD-1 の ECD に対する結合速度定数 k_a (1/Ms)、解離速度定数 k_d (1/s)および平衡解離定数 K_D (M)を SPR により決定した。

抗体	K_D (M)		k_a (1/M×s)		k_d (1/s)	
	平均	SD	平均	SD	平均	SD
IgG1-PD1 ^a	1.45×10^{-9}	4.51×10^{-11}	5.17×10^5	2.03×10^4	7.51×10^{-4}	9.61×10^{-6}
ニボルマブ ^b	4.43×10^{-9}	8.49×10^{-11}	4.06×10^5	3.54×10^3	1.80×10^{-3}	2.12×10^{-5}
ペムブロリズマブ ^b	3.59×10^{-9}	9.90×10^{-11}	2.12×10^6	1.36×10^6	7.57×10^{-3}	4.71×10^{-3}

^a 3 回の独立した実験からの平均および SD。

^b 2 回の独立した実験からの平均および SD。

略語: K_D =平衡解離定数; k_a =結合速度定数; k_d =解離速度定数または解離速度(off-rate);SD=標準偏差。

【 0 6 4 6 】

【表 10】

表 10. 表面プラズモン共鳴法により決定したカニクイザル PD-1 の細胞外ドメインに対する PD-1 抗体の結合親和性。

IgG1-PD1、ニボルマブ、およびペムブロリズマブのカニクイザル PD-1 の ECD に対する結合速度定数 k_a (1/Ms)、解離速度定数 k_d (1/s)および平衡解離定数 K_D (M)を SPR により決定した。

抗体	K_D (M)		k_a (1/M×s)		k_d (1/s)	
	平均	SD	平均	SD	平均	SD
IgG1-PD1 ^a	2.74×10^{-9}	5.79×10^{-10}	5.34×10^5	9.39×10^4	1.43×10^{-3}	7.23×10^{-5}
ニボルマブ ^a	2.93×10^{-9}	5.81×10^{-10}	3.28×10^5	5.07×10^4	9.43×10^{-4}	9.07×10^{-5}
ペムブロリズマブ ^b	8.99×10^{-10}	5.73×10^{-11}	7.14×10^5	3.04×10^4	6.42×10^{-4}	6.86×10^{-5}

^a 3 回の独立した実験からの平均および SD。

^b 2 回の独立した実験からの平均および SD。

略語: K_D =平衡解離定数; k_a =結合速度定数; k_d =解離速度定数または解離速度(off-rate);SD=標準偏差。

【実施例 4】

【0647】

PD-1 リガンド結合および PD-1 / PD-L1 シグナル伝達への IgG1-PD1 の効果

IgG1-PD1 が古典的な免疫チェックポイント阻害剤として機能することを確認するために、PD-1 リガンド結合および PD-1 チェックポイント機能を崩壊させる IgG1-PD1 の能力をインビトロで評価した。

【0648】

組換えヒト PD-L1 および PD-L2 を有する IgG1-PD1 の、膜発現ヒト PD-1 に対する競合的結合をフローサイトメトリーで評価した。ヒト PD-1 で一過的にトランスフェクトした CHO-S 細胞（実施例 1 を参照されたい； 5×10^4 個の細胞／ウェル）を丸底 96 ウェルプレート（Greiner、カタログ番号 650180）のウェルに加え、ペレット化し、氷上に置いた。PBS（Cytiva、カタログ番号 SH3A3830.03）で希釈したビオチン化組換えヒト PD-L1（R&D Systems、カタログ番号 AVI156）または PD-L2（R&D Systems、カタログ番号 AVI1224）を細胞に添加し（最終濃度： $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ）、その直後に一定の濃度範囲の PBS で希釈した IgG1-PD1、ペムブロリズマブ（MSD、ロット番号 T019263 および T036998）、または IgG1-ctrl-FERR を添加した（最終濃度：3 倍希釈ステップにおいて $30 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 0.5 \text{ ng}/\text{mL}$ ）。その後、細胞を RT で 45 分間インキュベートした。細胞を PBS で 2 回洗浄し、 $50 \mu\text{L}$ のストレプトアビジン-アロフィコシアニン（R&D Systems、カタログ番号 F0050；PBS で 1：20 に希釈）と共に、遮光下、 4°C で 30 分間インキュベートした。細胞を PBS で 2 回洗浄し、 $20 \mu\text{L}$ の GMB FACS 緩衝液に再懸濁した。ストレプトア

ビジン-アロフィコシアニン結合は、FlowJoソフトウェアを使用するIntelliCyt（登録商標）iQue Screener PLUS（Sartorius）においてフローサイトメトリーによって解析した。

【0649】

PD-1とPD-L1との機能的相互作用へのIgG1-PD1の効果は、生物発光細胞ベースのPD-1/PD-L1遮断レポーターアッセイ（Promega、カタログ番号J1255）を使用して、基本的に製造業者の説明に従って決定した。簡単に言えば、PD-L1 aAPC/CHO-K1 CellとPD-1 Effector Cellとの共培養物を、連続希釈したIgG1-PD1、ペムブロリズマブ（MSD、ロット番号10749880またはT019263）、ニボルマブ（Bristol-Myers Squibb、ロット番号11024601）、またはIgG1-ctrl-FERR（最終アッセイ濃度：15~0.0008 µg/mL（3倍希釈）または10~0.0032 µg/mL（5倍希釈））と共に37℃、5% CO₂で6時間インキュベートした。その後、細胞を再構成したBio-Glo（商標）と共にRTで5~30分間インキュベートした後、Infinite（登録商標）F200 PRO Reader（Tecan）またはEnVision Multilabel Plate Reader（PerkinElmer）を使用してルミネセンス（相対発光量 [RLU]）を測定した。

10

【0650】

用量応答曲線を、GraphPad Prismソフトウェアを使用する非線形回帰解析（4パラメータ用量反応曲線フィット）により解析し、最大（阻害）効果の50%が観察される濃度（EC₅₀/IC₅₀）をフィットした曲線から導き出した。

20

IgG1-PD1は用量依存的にヒトPD-L1およびPD-L2と膜発現ヒトPD-1との結合を崩壊させ（図2）、PD-L1結合阻害のIC₅₀値は2.059±0.653 µg/mL（13.9±4.4 nM）であり、PD-L2結合阻害のIC₅₀値は1.659±0.721 µg/mL（11.2±4.9 nM）であり、すなわちナノモル範囲であった（表11）。ペムブロリズマブは、PD-L1およびPD-L2結合阻害を同等の効力、すなわちナノモル範囲のIC₅₀値で示した。

【0651】

PD-1/PD-L1軸の機能的遮断は、細胞ベースの生物発光PD-1/PD-L1遮断レポーターアッセイを使用して試験した。ヒトPD-1を発現し、NFAT-RE駆動ルシフェラーゼを保有するレポーターJurkat T細胞と、ヒトPD-L1および抗原非依存性TCR活性化因子を発現するPD-L1 aAPC/CHO-K1細胞との共培養物を、IgG1-PD1、ペムブロリズマブ、またはニボルマブの濃度希釈系列の非存在下および存在下でインキュベートした。IgG1-ctrl-FERRは陰性対照として含めた。PD-1/PD-L1相互作用の遮断により、PD1/PDL1媒介性阻害シグナルが放出され、TCR活性化およびNFAT-RE媒介性ルシフェラーゼ発現が導かれる（ルミネセンス測定）。IgG1-PD1は、PD-1+リポーターT細胞において、TCRシグナル伝達の用量依存的増加を誘導した（図3）。EC₅₀は、0.165±0.056 µg/mL（1.12±0.38 nM；表12）であった。ペムブロリズマブも同様にPD-1媒介性TCRシグナル伝達の阻害を緩和し、EC₅₀は0.129±0.051 µg/mL（0.86±0.34 nM）であり、すなわち効力は同等であった。ニボルマブはTCRシグナル伝達の阻害を緩和し、EC₅₀は0.479±0.198 µg/mL（3.28±1.36 nM）であり、すなわち効力はわずかに低かった。

30

40

【0652】

まとめると、IgG1-PD1はインビトロで、PD-1リガンド結合を遮断し、PD-1免疫チェックポイント機能を崩壊させることにより、古典的な免疫チェックポイント阻害剤として作用する。

【0653】

【表 1 1】

表 11. PD-1 リガンド結合の IgG1-PD1 に媒介される阻害の IC₅₀ 値

IC₅₀ 値は競合的結合曲線から算出した。

ヒト PD-L1 との競合的結合 (IC ₅₀ の平均[± SD])				ヒト PD-L2 との競合的結合 (IC ₅₀ の平均[± SD])			
IgG1-PD1		ペムブロリズマブ		IgG1-PD1		ペムブロリズマブ	
μg/mL	nM	μg/mL	nM	μg/mL	nM	μg/mL	nM
2.059 [± 0.653]	13.9 [± 4.4]	1.134 [± 0.493]	7.6 [± 3.3]	1.659 [± 0.721]	11.2 [± 4.9]	1.186 [± 0.770]	8.0 [± 5.2]

略語:IC₅₀=50%の阻害効果が観察された濃度;PD-1=プログラム細胞死タンパク質1;PD-L1=プログラム細胞死1リガンド1;PD-L2=プログラム細胞死1リガンド2;SD=標準偏差。

【0 6 5 4】

【表 1 2】

表 12. PD-1/PD-L1 チェックポイント遮断の EC₅₀

PD-1⁺レポーターT細胞と PD-L1 aAPC/CHO-K細胞の共培養物を、PD-1/PD-L1 遮断レポーターアッセイにおいて IgG1-PD1、ペムブロリズマブ、またはニボルマブの濃度系列とともにインキュベートした。レポーターT細胞における下流の TCR シグナル伝達およびルシフェラーゼ発現をもたらす PD-1/PD-L1 チェックポイント機能の阻害を、ルミネッセンスの測定によって決定した。得られた用量応答曲線から、EC₅₀ 値が算出した。

EC ₅₀ の平均[± SD]					
IgG1-PD1		ペムブロリズマブ		ニボルマブ	
μg/mL	nM	μg/mL	nM	μg/mL	nM
0.165 [± 0.056]	1.12 [± 0.38]	0.129 [± 0.051]	0.86 [± 0.34]	0.479 [± 0.198]	3.28 [± 1.36]

略語:aAPC=人工抗原提示細胞;CHO=チャイニーズハムスター卵巣;EC₅₀=最大効果の50%が観察される濃度;PD-1=プログラム細胞死タンパク質1;PD-L1=プログラム細胞死1リガンド1;SD=標準偏差;TCR=T細胞受容体。

【実施例 5】

【0 6 5 5】

活性化T細胞の増殖を増強する IgG1-PD1 の能力を決定するための抗原特異的増殖アッセイ

IgG1-PD1 のT細胞増殖増強能を決定するために、PD-1を過剰発現するヒトCD8⁺ T細胞を使用して抗原特異的増殖アッセイを行った。

【0656】

HLA-A*02⁺末梢血単核細胞（PBMC）は、健康なドナー（Transfusionszentrale, University Hospital, Mainz, Germany）から入手した。単球は、抗CD14 MicroBeads（Miltenyi；カタログ番号130-050-201）を使用する磁気活性化細胞選別（MACS）技術により、製造業者の使用説明書に従ってPBMCから単離した。末梢血リンパ球（PBL、CD14陰性画分）を、T細胞単離のために凍結保存した。未成熟DC（iDC）への分化のために、 1×10^6 個の単球/mLを、5%のプールしたヒト血清（One Lambda Inc、カタログ番号A25761）、1mMのピルビン酸ナトリウム（Life Technologies GmbH、カタログ番号11360-039）、 $1 \times$ 非必須アミノ酸（Life Technologies GmbH、カタログ番号11140-035）、100IU/mLのペニシリン-ストレプトマイシン（Life Technologies GmbH、カタログ番号15140-122）、100ng/mLの顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF；Miltenyi、カタログ番号130-093-868）および50ng/mLのインターロイキン-4（IL-4；Miltenyi、カタログ番号130-093-924）を含有するRPMI 1640（Life Technologies GmbH、カタログ番号61870-010）中で5日間培養した。この5日間に一度、培地の半分を新鮮な培地と置き換えた。iDCを非接着細胞を回収することによって回収し、接着細胞は2mMのEDTAを含有するDulbeccoのリン酸緩衝生理食塩水（DPBS）と共に37°で10分間インキュベートすることによって剥離させた。DPBSで洗浄後、iDCを10%のDMSO（AppliChem GmbH、カタログ番号A3672, 0050）および10%のヒトアルブミン（CSL Behring、PZN 00504775）を含有するRPMI 1640中で、将来、抗原特異的T細胞アッセイにおいて使用するために凍結保存した。

【0657】

抗原特異的CD8⁺T細胞増殖アッセイを開始する1日前に、同ドナーの凍結PBLとiDCを解凍した。CD8⁺T細胞は、抗CD8 MicroBeads（Miltenyi、カタログ番号130-045-201）を使用するMACS技術により、製造業者の使用説明書に従ってPBLから単離した。約 $10 \times 10^6 \sim 15 \times 10^6$ 個のCD8⁺T細胞を、250μLのX-Vivo15培地（Lonza、カタログ番号BE02-060Q）中で、それぞれ、ヒトクローディン-6（CLDN6；HLA-A*02により拘束；国際公開第2015150327号に記載される）に特異的なマウスTCRのアルファ鎖およびベータ鎖をコードするインビトロ翻訳（IVT）-RNA10μgとPD-1（UniProt Q15116）をコードするIVT-RNA10μgを用いて、エレクトロポレーションした。細胞を4-mmのエレクトロポレーションキュベット（VWR International GmbH、カタログ番号732-0023）に移し、BTX ECM（登録商標）830 Electroporation System（BTX、500 V、 1×3 msパルス）を使用してエレクトロポレーションした。エレクトロポレーションの直後に、細胞を、5%のプールしたヒト血清を含有する新鮮なIMDM GlutaMAX培地（Life Technologies GmbH、カタログ番号319800-030）に移し、37°C、5%CO₂で少なくとも1時間静置した。T細胞は、製造業者の使用説明書に従って、PBS中1.6μMのカルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル（CFSE；Life Technologies GmbH、カタログ番号V12883）を使用して標識し、5%のヒトAB血清を補充したIMDM培地で一晩インキュベートした。

【0658】

最大 5×10^6 個の解凍したiDCを、250μLのX-Vivo15培地中で、完全長ヒトCLDN6をコードする2μgのIVT-RNA（国際公開第2015150327号）と共に、上述のエレクトロポレーションシステム（300V、 1×12 msパルス

10

20

30

40

50

）を使用してエレクトロポレーションし、5%のプールしたヒト血清を補充したIMDM培地中で一晚インキュベートした。

【0659】

翌日、細胞を回収した。iDC上のCLDN6の細胞表面発現、ならびにT細胞上のCLDN6特異的TCRおよびPD-1の細胞表面発現をフローサイトメトリーで確認した。この目的のために、iDCをDyLight650がコンジュゲートしたCLDN6特異性抗体（市販されていない；自社製造）で染色した。T細胞は、ブリリアントバイオレット（BV）421がコンジュゲートした抗マウスTCR-β鎖抗体（Becton Dickinson GmbH、カタログ番号562839）およびアロフィコシアニン（APC）がコンジュゲートした抗ヒトPD-1抗体（Thermo Fisher Scientific、カタログ番号17-2799-42）で染色した。

10

【0660】

エレクトロポレーションしたiDCを、96ウェル丸底プレート中5%のプールしたヒト血清を含有するIMDM培地中で4倍連続希釈した（範囲0.00005~0.8 μg/mL）IgG1-PD1、ペムプロリズマブ [Keytruda（登録商標）、MSD Sharp & Dohme GmbH、PZN 10749897]、またはニボルマブ [Opdivo（登録商標）、Bristol-Myers Squibb、PZN 11024601] の存在下で、1:10の比でエレクトロポレーションしたCFSE標識T細胞と共にインキュベートした。陰性対照抗体IgG1-ctrl-FERRを、0.8 μg/mLの単一濃度で使用した。4日間の培養後に、細胞をAPCがコンジュゲートした抗ヒトCD8抗体で染色した。T細胞増殖を、BD FACSCelesta（商標）フローサイトメーター（Becton Dickinson GmbH）を使用して、CD8⁺ T細胞のCFSE希釈液のフローサイトメトリー解析によって評価した。

20

【0661】

フローサイトメトリーデータを、FlowJoソフトウェアバージョン10.7.1を使用して解析した。CD8⁺ T細胞のCFSE標識希釈液を、FlowJoの増殖モデリングツールを使用して評価し、拡大指数を積分式を使用して算出した。用量応答曲線を、GraphPad Prismバージョン9（GraphPad Software, Inc.）において4パラメータ対数フィットを使用して作成した。統計的有意差は、GraphPad Prismバージョン9を使用して、Friedman検定およびDunnの多重比較検定により決定した。

30

【0662】

CD8⁺ T細胞の抗原特異的増殖はIgG1-PD1によって用量依存的に増強され（図4）、EC₅₀値はピコモルの範囲であった（表13）。ペムプロリズマブまたはニボルマブによる処置も、用量依存的にT細胞増殖を増強させた。ペンプロリズマブの平均EC₅₀はIgG1-PD1と同程度であったが、ニボルマブのEC₅₀はIgG1-PD1よりも有意に（P=0.0267）高かった。

【0663】

40

【表 13】

表 13:抗原特異的増殖アッセイにおける EC₅₀ 値

IgG1-PD1、ペムプロリズマブ、およびニボルマブの EC₅₀ 値は、抗原特異的 T 細胞増殖アッセイによって測定した CD8⁺ T 細胞拡大指数を使用して決定した。示されているデータは、4-パラメータ対数適合に基づいて算出した値である。略語:EC₅₀=半数効果濃度;FERR=L234F/L235E/G236R-K409R;PD1=プログラム細胞死タンパク質 1;SD=標準偏差。

EC ₅₀ の平均[± SD]					
IgG1-PD1		ペムプロリズマブ		ニボルマブ	
μg/mL	nM	μg/mL	nM	μg/mL	nM
0.0124 [± 0.0018]	0.0837 [± 0.0123]	0.0152 [± 0.0049]	0.1018 [± 0.0333]	0.0701 [± 0.0238]	0.4802 [± 0.1632]

10

【実施例 6】

【0664】

20

同種異系 MLR アッセイにおけるサイトカイン分泌への IgG1-PD1 の効果

混合リンパ球反応 (MLR) アッセイにおける IgG1-PD1 のサイトカイン分泌増強能を調査するために、ヒト成熟樹状細胞 (mDC) と CD8⁺ T 細胞との 3 組の固有の同種異系対を IgG1-PD1 の存在下で共培養した。IFN γ のレベルを IFN γ 特異的イムノアッセイを使用して測定し、単球走化性タンパク質-1 (MCP-1)、GM-CSF、インターロイキン (IL)-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL12-p40、IL-15、IL-17 α 、および腫瘍壊死因子 (TNF α) のレベルをカスタマイズした Lumine x マルチプレックスイムノアッセイを使用して決定した。

【0665】

30

ヒト CD14⁺ 単球は健康なドナーから得た (BioIVT)。未熟樹状細胞 (iDC) への分化のために、単球を、10% 熱不活性化ウシ胎仔血清 (FBS; Gibco、カタログ番号 16140071)、100 ng/mL の GM-CSF および 300 ng/mL の IL-4 (BioLegend、カタログ番号 766206) を補充した RPMI-1640 完全培地 (ATCC 改変式; Thermo Fisher、カタログ番号 A1049101) 中で、37℃ で 6 日間培養した。4 日目に、培地を補充物を含む新鮮な培地で置き換えた。iDC を成熟させるため、MLR アッセイを開始する前に、細胞を 10% の FBS、100 ng/mL の GM-CSF、300 ng/mL の IL-4、および 5 μg/mL のリポ多糖 (LPS; Thermo Fisher Scientific、カタログ番号 00497693) を補充した RPMI-1640 完全培地中で、37℃ で 24 時間インキュベートした。並行して、同種異系の健康なドナーから得た精製 CD8⁺ T 細胞 (BioIVT) を解凍し、10% の FBS および 10 ng/mL の IL-2 (BioLegend、カタログ番号 589106) を補充した RPMI-1640 完全培地中で、37℃ O/N でインキュベートした。

40

【0666】

翌日、LPS 成熟樹状細胞 (mDC) および同種異系 CD8⁺ T 細胞を回収し、あらかじめ加温した AIM-V 培地 (Thermo Fisher Scientific、カタログ番号 12055091) にそれぞれ 4 × 10⁵ 個の細胞/mL および 4 × 10⁶ 個の細胞/mL を再懸濁した。mDC (20,000 個の細胞/ウェル) を、抗体濃度範囲 (0.001 ~ 30 μg/mL) の IgG1-PD1、IgG1-ctrl-FERR

50

、またはペムプロリズマブ（MSD、カタログ番号T019263）の存在下、または30 µg/mLのIgG4アイソタイプ対照（BioLegend、カタログ番号403702）の存在下で、同種異系ナイーブCD8⁺ T細胞（200,000個の細胞/ウェル）と共に、96ウェル丸底プレート中AIM-V培地中で、37℃でインキュベートした。

【0667】

5日後に、細胞を含まない上清を各ウェルから新しい96ウェルプレートに移し、サイトカイン濃度をさらに解析するまで-80℃で保存した。

【0668】

IFNγレベルは、Envision機器においてIFNγ特異的イムノアッセイ（Alpha Lisa IFNγキット；Perkin Elmer、カタログ番号AL217）を使用して、製造業者の使用説明書に従って決定した。

【0669】

MCP-1、GM-CSF、IL-1β、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL12-p40、IL-15、IL-17αおよびTNFαのレベルは、Human TH17 Magnetic Bead Panel [MILLIPLEX（登録商標）]に基づいてカスタマイズされたLuminex（登録商標）マルチプレックスイムノアッセイ（Millipore、注文番号SPR1526）を使用して決定した。簡単に説明すると、細胞を含まない上清を解凍し、1×Wash Bufferであらかじめ洗浄した384ウェルプレート（Greiner Bio-One、カタログ番号781096）のウェル中の10 µLのAssay Bufferに10 µLの各試料を加えた。並行して、Assay Buffer中10 µLのStandardまたはControlをウェルに添加し、その後10 µLのアッセイ培地を添加した。異なるサイトカインに対する磁気ビーズを混合し、Bead Diluent中1×濃度に希釈した後、10 µLの混合ビーズを各ウェルに添加した。プレートを密封し、4℃で振盪し、O/Nでインキュベートした。ウェルを60 µLの1×Wash Bufferで3回洗浄した。その後、各ウェルに10 µLのCustom Detection Antibodyを添加し、プレートを密封し、RTで1時間、振盪しながらインキュベートした。次に、10 µLのストレプトアビジン-PEを各ウェルに添加し、プレートを密封し、RTで30分間、振盪しながらインキュベートした。ウェルを、上記の60 µLの1×Wash Bufferで3回洗浄し、その後、ビーズを75 µLのLuminex Sheath FluidでRTで5分間、振盪しながら再懸濁した。試料をLuminex FlexMap 3Dシステムにランした。

【0670】

MLRアッセイの開始時と終了時に、CD8⁺ T細胞上のPD-1の発現およびmDC上のPD-L1の発現を、PE-Cy7がコンジュゲートした抗PD-1（BioLegend、カタログ番号329918；1：20）、アロフィコシアニンがコンジュゲートした抗PD-L1（BioLegend、カタログ番号329708；1：80）、BUV496がコンジュゲートした抗CD3（BD Biosciences、カタログ番号612940；1：20）、BUV395がコンジュゲートした抗CD8（BD Biosciences、カタログ番号563795；1：20）を使用してフローサイトメトリーで確認した。

【0671】

IgG1-PD1は、用量依存的にIFNγの分泌を一貫して増強した（図5）。IgG1-PD1は、MCP-1、GM-CSF、IL-2、IL-6、IL-12p40、IL-17α、IL-10、およびTNFαの分泌も増強した（図6）。ペムプロリズマブはサイトカイン分泌に同等の効果を有した。

【実施例7】

【0672】

IgG1-PD1へのC1q結合の評価

定常重鎖領域に F E R F c サイレンシング突然変異を保有する I g G 1 - P D 1 への補体タンパク質 C 1 q の結合を、活性化ヒト C D 8 + T 細胞を使用して評価した。陽性対照として、I g G 1 - C D 5 2 - E 4 3 0 G が含まれ、I g G 1 - C D 5 2 - E 4 3 0 G は、C D 5 2 抗体 C A M P A T H - 1 H に基づく V_H および V_L ドメインを有し、細胞表面に結合した場合に C 1 q と効率的に結合することが知られている F c 増強骨格を有する。非結合の陰性対照抗体として、I g G 1 - c t r l - F E R R および I g G 1 - c t r l が含まれた。

【0673】

いずれも製造業者の使用説明書に従って、R o s e t t e S e p (商標) H u m a n C D 8 + T C e l l E n r i c h m e n t C o c k t a i l (S t e m c e l l T e c h n o l o g i e s、カタログ番号 1 5 0 2 3 C. 2) を使用するネガティブ選択、または C D 8 M i c r o B e a d s (M i l t e n y i B i o t e c、カタログ番号 1 3 0 - 0 4 5 - 2 0 1) および L S カラム (M i l t e n y i B i o t e c、カタログ番号 1 3 0 - 0 4 2 - 4 0 1) を使用する磁気活性化細胞選別 (M A C S) によるポジティブ選択により、健康なボランティア (S a n q u i n) から得たバフィーコートからヒト C D 8 + T 細胞を精製 (濃縮) した。精製した T 細胞を T 細胞培地 (25 mM の H E P E S および L - グルタミン [L o n z a、カタログ番号 B E 1 2 - 1 1 5 F] を含み、10% の鉄を含む熱不活性化ドナーウシ血清 [D B S I ; G i b c o、カタログ番号 2 0 7 3 1 - 0 3 0] およびペニシリン / ストレプトマイシン [p e n / s t r e p ; L o n z a、カタログ番号 D E 1 7 - 6 0 3 E] を補充した R o s w e l l P a r k M e m o r i a l I n s t i t u t e [R P M I] - 1 6 4 0 培地) に再懸濁した。

【0674】

抗 C D 3 / C D 2 8 ビーズ (D y n a b e a d s (商標) H u m a n T - A c t i v a t o r C D 3 / C D 2 8 ; T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c、カタログ番号 1 1 1 3 2 D) を P B S で洗浄し、T 細胞培地に再懸濁した。このビーズを濃縮したヒト C D 8 + T 細胞に 1 : 1 の割合で加え、37℃、5% C O₂ で 48 時間インキュベートした。次に、磁石を使用してビーズを除去し、細胞を P B S 中で 2 回洗浄し、再度カウントした。

【0675】

活性化 C D 8 + T 細胞上の P D - 1 発現は、I g G 1 - P D 1 (30 μg / mL) および R - フィコエリトリン (P E) がコンジュゲートしたヤギ抗ヒト I g G F (a b ,)₂ (G M B F A C S 緩衝液で 1 : 200 に希釈した ; J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h、カタログ番号 1 0 9 - 1 1 6 - 0 9 8)、または市販の P E がコンジュゲートした P D - 1 抗体 (B i o L e g e n d、カタログ番号 3 2 9 9 0 6 ; 1 : 50 に希釈した) を使用して、フローサイトメトリーによって確認した。

【0676】

活性化 C D 8 + T 細胞を丸底 96 ウェルプレートに播種し (30,000 または 50,000 個の細胞 / ウェル)、ペレット化し、30 μL のアッセイ培地 (25 mM の H E P E S および L - グルタミンを含み、0.1% [w / v] のウシ血清アルブミン画分 V [B S A ; R o c h e、カタログ番号 1 0 7 3 5 0 8 6 0 0 1] およびペニシリン / ストレプトマイシンを補充した R P M I - 1 6 4 0) に再懸濁した。その後、50 μL の I g G 1 - P D 1、I g G 1 - c t r l - F E R R、I g G 1 - C D 5 2 - E 4 3 0 G、または I g G 1 - c t r l (アッセイ培地中 3 倍希釈工程において最終濃度が 1.7 × 10⁻⁴ ~ 30 μg / mL) を各ウェルに添加し、37℃で 15 分間インキュベートして抗体を細胞に結合させた。

【0677】

C 1 q の供給源としてヒト血清 (20 μL / ウェル ; S a n q u i n、ロット 2 0 L 1 5 - 0 2) を最終濃度 20% になるように添加した。細胞を氷上で 45 分間インキュベートした後、冷 G M B F A C S 緩衝液で 2 回洗浄し、50 μL のフルオレセインイソチオシアネート (F I T C) がコンジュゲートしたウサギ抗ヒト C 1 q (最終濃度が 20 μg

／mL [DAKO、カタログ番号F0254]；GMB FACS緩衝液中で1：75に希釈した）と共に、アロフィコシアニンがコンジュゲートしたマウス抗CD8（BD Biosciences、カタログ番号555369；GMB FACS緩衝液中で1：50に希釈した）の存在下または非存在下で、暗所において、4℃で30分間インキュベートした。細胞を冷GMB FACS緩衝液で2回洗浄し、2mMのエチレンジアミン四酢酸（EDTA；Sigma-Aldrich、カタログ番号03690）および4'，6-ジアミジノ-2-フェニルインドール（DAPI）生存率色素（1：5，000；BD Pharmingen、カタログ番号564907）を補充した20μLのGMB FACS緩衝液に再懸濁した。生存細胞（DAPI排除により特定される）へのC1q結合は、Intellicyt（登録商標）iQue Screener PLUS（Sartorius）またはiQue3（Sartorius）においてフローサイトメトリーにより解析した。結合曲線は、GraphPad Prism ソフトウェアを使用する非線形回帰解析（勾配が変化するシグモイド用量応答）を使用して解析した。

10

【0678】

膜結合IgG1-CD52-E430Gには用量依存的なC1q結合が観察されたのに対し、膜結合IgG1-PD1または非結合対照抗体にはC1q結合は観察されなかった（図7）。

【0679】

これらの結果は、IgG1-PD1の機能的に不活性な骨格はC1qに結合しないことを示す。

20

【実施例8】

【0680】

SPRによって決定されるIgG1-PD1のFcγ受容体への結合

固定化したFcγR（FcγRIa、FcγRIIa、FcγRIIbおよびFcγRIIIa）へのIgG1-PD1の結合をインビトロでSPRによって評価した。FcγRIIa（H131およびR131）およびFcγRIIIa（V158およびF158）については、両方の多型変異体が含まれた。FcγR結合の陽性対照として、野生型Fc領域を有するIgG1-ctrlが含まれた。

【0681】

最初の実験では、固定化したヒト組み換えFcγR変異体（FcγRIa、FcγRIIa、FcγRIIb、およびFcγRIIIa）へのIgG1-PD1、またはIgG1-ctrlの結合を、Biacore 8K SPRシステムを使用して解析した。同じ方法を使用する2セット目の実験では、IgG1-PD1、ニボルマブ（Bristol-Meyers Squibb、ロット番号ABP6534）、ペムプロリズマブ（Merck Sharp & Dohme、ロット番号U013442）、ドスタリマブ（GlaxoSmithKline、ロット番号1822049）、セミプリマブ（Regeneron、ロット番号1F006A）、IgG1-ctrl、またはIgG4-ctrlの結合について解析した。

30

【0682】

Biacore Series S Sensor Chips CM5（Cytiva、カタログ番号29104988）を、製造業者の使用説明書に従って、アミン-カップリングキットおよびHis捕捉キット（Cytiva、カタログ番号BR100050およびカタログ番号29234602）を使用して、抗ヒスチジン（His）抗体で共有結合的にコーティングした。HBS-EP+（Cytiva、カタログ番号BR100669）中で希釈したFcγRIa、FcγRIIa（H131およびR131）、FcγRIIbおよびFcγRIIIa（V158およびF158）（SinoBiological、それぞれカタログ番号10256-H08S-B、10374-H08H1、10374-H27H、10259-H27H、10389-H27H1、および10389-H27H）を、流速10μL／分、接触時間60秒で抗Hisコーティングセンサーチップ表面に捕捉させ、およそ350～600レゾナンスユニット（RU）の捕捉レベル

40

50

が得られた。

【0683】

HBS-E P + 緩衝液のスタートアップを3サイクル行った後、表14に示されているような抗体範囲を使用して、試験抗体（IgG1-PD1、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、ドスタリマブ、セミプリマブ、IgG1-ctrl、またはIgG4-ctrl）を注入して、結合曲線を作成した。捕捉されたFcγRを有する表面（活性表面）で解析された各試料は、捕捉されたFcγRを有さない並行フローセル（参照表面）でも解析され、バックグラウンド補正に使用した。（モック）解析物としてHBS-E P + を含有する3サイクルのスタートアップを、二重参照データを得るために他のセンサーグラムから差し引いた。

10

【0684】

各サイクルの最後に、10mMのGlycine-HCl pH1.5（Cytiva、カタログ番号BR100354）を使用して表面を再生した。センサーグラムはBiacore Insight Evaluationソフトウェア（Cytiva）を使用して作成し、4パラメータロジスティックフィットをエンドポイント測定に適用した（結合プラトー対捕捉後ベースライン）。最初の実験のデータ（n=1；適格SPRアッセイ）を図8に、2セット目の実験のデータ（n=3）を図9に示す。

【0685】

【表14】

表 14. 個々のFcγRへの結合に関する試験条件

20

FcγR	試験した抗PD-1抗体濃度範囲		
	開始濃度(nM)	倍数希釈	最低濃度(nM)
FcγRIa	3,000	1:3	0.02
FcγRIIa-H131	10,000	1:2.5	0.42
FcγRIIa-R131	10,000	1:2.5	0.42
FcγRIIb	10,000	1:2	4.9
FcγRIIIa-V158	10,000	1:3	0.06
FcγRIIIa-F158	10,000	1:2.5	0.42

【0686】

30

最初の実験の結果は、IgG1-ctrlが、すべてのFcγRに結合したが、IgG1-PD1では、FcγRIa、FcγRIIa（H131およびR131）、FcγRIIb、およびFcγRIIIa（V158およびF158）への結合が観察されなかったことを示した（図8）。

【0687】

2セット目の実験結果から、IgG1-PD1に対するFcγR結合の欠如が確認された（図9）。IgG4-ctrlおよび試験した他の抗PD-1抗体（ニボルマブ、ペムブロリズマブ、ドスタリマブ、およびセミプリマブ；すべてIgG4サブクラス）は、FcγRIa、FcγRIIa-H131、FcγRIIa-R131、およびFcγRIIbに対する明確な結合を示し、FcγRIIIa-F158およびFcγRIIIa-V158に対する結合は最小からごくわずかであった。

40

【0688】

これらのデータは、IgG1-PD1のFcドメインに対するFcγR結合の欠如を確認し、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、ドスタリマブ、およびセミプリマブに対するFcγR結合を実証する。総合すると、これらのデータは、IgG1-PD1のFcドメインはFcγR媒介性エフェクター機能（ADCC、ADCP）を誘導できないことを示唆する。

【実施例9】

【0689】

フローサイトメトリーにより決定された細胞表面に発現したFcγRIaへのIgG1-

50

PD1の結合

ヒト細胞表面に発現されたFcγRIaに対するIgG1-PD1、ニボルマブ、ペムプロリズマブ、ドスタリマブ、およびセミプリマブの結合をフローサイトメトリーを使用して解析した。

【0690】

FcγRIaを一過的にトランスフェクトCHO-S細胞において発現させ、FITCがコンジュゲートした抗FcγRI抗体(BioLegend、カタログ番号305006; 1:25)を使用するフローサイトメトリーにより細胞表面発現を確認した。トランスフェクトCHO-S細胞への抗PD-1抗体の結合は、実施例2に記載されたように評価した。簡単に説明すると、IgG1-PD1、ニボルマブ(Bristol-Meyers Squibb、ロット番号ABP6534)、ペムプロリズマブ(Merck Sharp & Dohme、ロット番号U013442)、ドスタリマブ(Glaxo SmithKline、ロット番号1822049)、セミプリマブ(Regeneron、ロット番号1F006A)、IgG1-ctrl、およびIgG1-ctrl-FERRRの抗体希釈液(最終濃度: $1.69 \times 10^{-4} \sim 10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、3倍希釈液)をGMB FACS緩衝液中で調製した。細胞を遠心分離し、上清を除去し、細胞(50μL中30,000個の細胞)を50μLの抗体希釈液と共に4℃で30分間、遮光してインキュベートした。細胞をGMB FACS緩衝液で2回洗浄し、50μLの二次抗体(PEがコンジュゲートしたヤギ抗ヒトIgG F(ab')₂; 1:500)と共に、4℃で30分間インキュベートした。細胞をGMB FACS緩衝液で2回洗浄し、2mMのEDTAおよびDAPI生存率マーカー(1:5,000)を補充したGMB FACS緩衝液に再懸濁した。

10

20

【0691】

生存細胞への抗体結合は、PE陽性、DAPI陰性細胞でゲーティングすることによりFlowJoソフトウェアを使用して、Intellicyt iQue PLUS Screener(Intellicyt Corporation)においてフローサイトメトリーにより解析した。結合曲線は、GraphPad Prismの非線形回帰解析(4パラメータ用量応答曲線フィット)を使用して解析した。

【0692】

フローサイトメトリー結合アッセイでは、陽性対照抗体IgG1-ctrl(野生型Fc領域を有する)は、FcγRIaを一過的に発現する細胞への結合を示したが、陰性対照抗体IgG1-ctrl-FERRR(FER不活性化突然変異および付加的な、本研究の文脈では機能的に無関係なK409R突然変異を含有するFc領域を有する)では結合は観察されなかった(図10)。IgG1-PD1では結合は観察されなかったが、ペムプロリズマブ、ニボルマブ、セミプリマブ、およびドスタリマブでは濃度依存的結合が観察された。

30

【0693】

これらのデータにより、IgG1-PD1のFcドメインに対するFcγRIa結合の欠如が確認され、ニボルマブ、ペムプロリズマブ、ドスタリマブ、およびセミプリマブに対するFcγRIa結合を実証する。総合すると、これらのデータは、IgG1-PD1のFcドメインはFcγRIa媒介性エフェクター機能を誘導できないことを示唆する。

40

【実施例10】

【0694】

IgG1-PD1による新生児Fc受容体への結合

新生児Fc受容体(FcRn)は、IgGを分解から保護することにより、IgGの長い血漿中半減期を担っている。IgGは酸性(pH6.0)のエンドソーム環境ではFcRnに結合するが、中性pH(pH7.4)ではFcRnから解離する。このpHに依存した抗体のFcRnへの結合は、FcRnと共に抗体のリサイクルを引き起こし、細胞内での抗体の分解を防ぐため、その抗体のインビボでの薬物動態の指標となる。固定化した

50

FcRnへのIgG1-PD1の結合は、表面プラズモン共鳴（SPR）によって、pH 6.0およびpH 7.4でインビトロで評価した。

【0695】

固定化したヒトFcRnへのIgG1-PD1の結合を、Biacore 8K SPRシステムを使用して解析した。Biacore Series S Sensor Chips CM5（Cytiva、カタログ番号29104988）を、製造業者の使用説明書に従って、アミンカップリングキットおよびHis捕捉キット（Cytiva、カタログ番号BR100050およびカタログ番号29234602）を使用して、抗Hisチジン（His）抗体で共有結合的にコーティングした。PBS-P+緩衝液pH 7.4（Cytiva、カタログ番号28995084）またはpHを6.0に調整したPBS-P+緩衝液（塩酸〔Sigma-Aldrich、カタログ番号07102〕の添加による）中5 nMのコーティング濃度に希釈したFcRn（SinoBiological、カタログ番号CT071-H27H-B）を、流速10 μ L/分、接触時間60秒で抗Hisコーティングセンサーチップ表面に捕捉した。これにより、およそ50 RUの捕捉レベルが得られた。pH 6.0またはpH 7.4のPBS-P+緩衝液のスタートアップを3サイクル行った後、試験抗体（pH 6.0またはpH 7.4のPBS-P+緩衝液中のIgG1-PD1、ペムプロリズマブ（MSD、ロット番号T019263）、またはニボルマブ（Bristol-Myers Squibb、ロット番号ABP6534）の6.25~100 nMの2倍希釈系列）を注入して結合曲線を作成した。捕捉されたFcRnを有する表面（活性表面）で解析された各試料は、捕捉されたFcRnを有さない並行フローセル（参照表面）でも解析され、バックグラウンド補正に使用した。（モック）解析物としてHBS-EP+を含有する3サイクルのスタートアップを、二重参照データを得るために他のセンサーグラムから差し引いた。各サイクルの最後に、10 mMのGlycine-HCl pH 1.5（Cytiva、カタログ番号BR100354）を使用して表面を再生した。データは、Biacore Insight Evaluationソフトウェア（Cytiva）においてあらかじめ定義された「Multi-cycle kinetics using capture」評価法を使用して解析した。データは、技術的反復による3回の別々の実験に基づく。

【0696】

pH 6.0において、IgG1-PD1は50 nMの平均親和性（ K_D ）でFcRnに結合し（表15）、これは、野生型Fc領域を有するIgG1-ctrl抗体に匹敵する（文献では、野生型IgG1分子について広い範囲の親和性が報告されており；同じアッセイセット設定を用いた以前の社内実験では、IgG1-ctrlについて12データポイントにわたって平均34 nMの K_D が測定された）。ペムプロリズマブおよびニボルマブの親和性はおおよそ2分の1に低下した（ K_D はそれぞれ116 nMおよび133 nM）。pH 7.4ではFcRnの結合は観察されなかった（示さず）。総合すると、これらの結果は、IgG1-PD1 Fc領域のFER不活性突然変異がFcRn結合に影響を及ぼさないことを実証し、IgG1-PD1がインビボで典型的なIgG薬物動態特性を保持することを示唆する。

【0697】

10

20

30

40

50

【表 15】

表 15. SPR によって決定された FcRn に対する親和性

ヒト FcRn でコーティングしたセンサーチップへの IgG1-PD1、ペムプロリズマブおよびニボルマブの結合を SPR で分析した。平均親和性および SD は、技術的反復を含む 3 回の独立した測定に基づく。

抗体	K_D (M)		k_a (1/M×s)		k_d (1/s)	
	平均	SD	平均	SD	平均	SD
IgG1-PD1	4.99×10^{-8}	6.85×10^{-9}	8.65×10^5	6.79×10^4	4.29×10^{-2}	4.88×10^{-3}
ニボルマブ	1.33×10^{-7}	2.01×10^{-8}	5.18×10^5	4.70×10^4	6.89×10^{-2}	1.19×10^{-2}
ペムプロリズマブ	1.16×10^{-7}	1.69×10^{-8}	5.46×10^5	4.42×10^4	6.36×10^{-2}	1.15×10^{-2}

略語: K_D =平衡解離定数; k_a =結合速度定数; k_d =解離速度定数または解離速度(off-rate); SD=標準偏差。

【実施例 11】

【0698】

標的との結合がない場合の IgG1-PD1 の薬物動態解析

IgG1-PD1 の薬物動態特性をマウスにおいて解析した。PD-1 は主に活性化 B 細胞および T 細胞で発現されることから、成熟 B 細胞および T 細胞を欠く腫瘍を有さない SCID マウスでは発現が制限されることが予想される。さらに、IgG1-PD1 は、マウス PD-1 を一過的に過剰発現している細胞に対する交差反応性が実質的に低下したことを示す（実施例 2）。したがって、腫瘍を有さない SCID マウスにおける IgG1-PD1 の薬物動態（PK）特性は、標的結合がない場合の IgG1-PD1 の PK 特性を反映すると予想される。

【0699】

本研究のマウスは Central Laboratory Animal Facility (Utrecht, the Netherlands) で飼育された。すべてのマウスは個々に換気されたケージで飼われ、餌と水は自由摂取とした。すべての実験は、指令 (2010/63/EU) を翻訳したオランダ動物保護法 (WoD) を遵守し、オランダ動物実験中央委員会 (Dutch Central Commission for animal experiments) および地元の倫理委員会の承認を得た。SCID マウス (C.B-17/IcrHan (登録商標) Hsd-Prkdc^{scid}, Envigo) に、1 群あたり 3 匹のマウスを使用して、1 または 10 mg/kg の IgG1-PD1 を静脈内注射した。抗体投与の 10 分、4 時間、1 日、2 日、8 日、14 日、および 21 日後に、伏在静脈または頬静脈から血液試料 (40 μL) を採取した。血液は K₂-エチレンジアミン四酢酸を含有するバイアルに採取し、抗体濃度を決定するまで -65 °C で保存した。

【0700】

全ヒト IgG (hIgG) 電気化学発光イムノアッセイ (ECLIA) により、特異的 hIgG 濃度を決定した。Meso Scale Discovery (MSD) 標準プレート (96 ウェル MULTI-ARRAY プレート、カタログ番号 L15XA-

3) を、PBS (Lonza、カタログ番号BE17-156Q) 中で希釈したマウス抗 hIgG 捕捉抗体 (IgG2amm-1015-6A05) で、2~8℃で16~24時間コーティングした。PBS-Tween (PBS-T; 0.05% (w/v) のTween-20 [Sigma、カタログ番号P1379] を補充したPBS) でプレートを洗浄して、非結合抗体を除去し、非占有表面をRTで60±5分間遮断 [3% (w/v) のBlocker-A [MSD、カタログ番号R93AA-1] を補充したPBS-T) した後、PBS-Tで洗浄した。マウス血漿試料をアッセイ緩衝液 (1% (w/v) のBlocker-Aを補充したPBS-T) 中で最初に50倍希釈した (2%のマウス血漿)。参照曲線を作成するために、IgG1-PD1 (注射に使用した材料と同じバッチ) をCalibrator Diluent (アッセイ緩衝液中2%のマウス血漿 [K2EDTA、プールした血漿、BIOIVT、カタログ番号MSE00PLK2PNN]) 中で希釈した (測定範囲: 0.156~20.0 µg/mL、アンカーポイント: 0.0781および40.0 µg/mL)。試料中に存在すると予想される広範囲の抗体濃度に対応するために、試料をSample Diluent (アッセイ緩衝液中2%のマウス血漿) 中で1:10または1:50にさらに希釈した。コーティングおよびブロックしたプレートを、50 µLの希釈マウス試料、参照曲線、および適切な品質管理試料 (参照曲線の範囲を網羅する、IgG1-PD1をスパイクしたプールしたマウス血漿) と共に、RTで90±5分間インキュベートした。PBS-Tで洗浄した後、プレートをSULFO-TAGがコンジュゲートしたマウス抗hIgG検出抗体IgG2amm-1015-4A01と共にRTで90±5分間インキュベートした。PBS-Tで洗浄した後、固定した抗体を、Read Buffer (MSD GOLD Read Buffer、カタログ番号R92TG-2) を添加することによって可視化し、MSD Sector S600 プレートリーダーを使用して約620 nm で発光を測定した。解析データの処理は、SoftMax Pro GxP Software v7.1を使用して行った。実行定量下限 (LLOQ) 未満または定量上限 (ULOQ) を超える外挿は許されなかった。

10

20

30

40

50

【0701】

標的結合がない場合のIgG1-PD1の血漿クリアランスプロファイルは、ヒトにおけるIgG1クリアランスに基づく2コンパートメントモデルによって予測されたSCIDマウスにおける野生型ヒトIgG1抗体のクリアランスプロファイルと同等であった [Bleeker et al., 2001, Blood. 98(10):3136-42] (図11)。臨床所見は認められず、体重減少も観察されなかった。

【0702】

結論として、これらのデータは、IgG1-PD1のPK特性が、標的結合がない場合に、通常のヒトIgG抗体と同等であることを示す。

【実施例12】

【0703】

ヒトPD-1ノックインマウスにおけるIgG1-PD1の抗腫瘍活性

IgG1-PD1は、マウスPD-1を一過的に過剰発現している細胞には限られた結合しか示さない (実施例2)。したがって、IgG1-PD1の抗腫瘍活性をインビボで評価するために、マウスPD-1遺伝子座においてヒトPD-1細胞外ドメイン (ECD) を発現するように操作したC57BL/6マウス (hPD-1ノックイン [KI] マウス) を使用した。

【0704】

すべての動物実験は、Crown Bioscience Inc. で実施され、実行前にInstitutional Animal Care and Use Committee (IACUC) によって承認された。動物は、Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC) の規則によって規定されるgood animal practiceに従って飼育され、取り扱われた。7~9週齢の、C5

7BL/6バックグラウンドでの雌性ホモ接合性ヒトPD-1ノックインマウス(hPD-1 KIマウス; Beijing Biocytogen Co., Ltd; C57BL/6-Pdcd1^{tm1}(PDCD1)/Bcgen、ストック番号110003)に、右脇腹下部にシンジェニックMC38結腸がん細胞(1×10^6 個の細胞)を皮下(SC)注射した。腫瘍の成長はノギスを使用して評価し(無作為化後、週3回)、腫瘍体積(mm^3)はノギスの測定値から次のように算出した: 腫瘍体積 = $0.5 \times (\text{長さ} \times \text{幅}^2)$ 、ここで、長さは腫瘍の最長寸法であり、幅は長さに垂直な腫瘍の最長寸法である。腫瘍が平均体積およそ 60 mm^3 に達した場合に、腫瘍体積および体重に基づいてマウスを無作為化した(各群9匹のマウス)(0日目と表記した)。処置開始時に、マウスに 0.5 、 2 、 10 mg/kg のIgG1-PD1またはペムブロリズマブ(Crown Bioscience Inc. によりMerckから入手、ロット番号T042260)、または 10 mg/kg のアイソタイプ対照抗体IgG1-ctrl-FERRを静脈内注射した(IV; PBS中 10 mL/kg の投与体積)。その後の用量は腹腔内(IP)投与した。毎週2回、3週間(2QW $\times$ 3)の投与レジメンを使用した。動物を罹患率および死亡率について毎日モニターし、その他の臨床的観察についても日常的にモニターした。個々のマウスについて、腫瘍体積が $1,500 \text{ mm}^3$ を超えた場合、または動物が他の人道的エンドポイントに達した場合に実験を終了した。

10

【0705】

群間の無増悪生存期間を比較するために、個々の腫瘍成長グラフに曲線フィットを適用し、各マウスの腫瘍体積 500 mm^3 を超えて進行した日を確定した。これらの日数を Kaplan-Meier生存曲線にプロットし、SPSSソフトウェアを使用して個々の曲線間でMantel-Cox解析を行った。群間の腫瘍体積の差を、全群がまだインタクトであった最終日(すなわち、試験における最初の腫瘍関連死まで、すなわち11日目)にノンパラメトリックMann-Whitney解析(GraphPad Prismにおける)を使用して比較した。p値は、中央値の差の95%信頼区間(Hodges-Lehmann)を含む中央値(群ごと)を伴って示されている。

20

【0706】

マウスに病気の徴候は認められなかったが、2匹のマウスが死亡しているのが発見された(1匹は 2 mg/kg のIgG1-PD1群、1匹は 2 mg/kg のペムブロリズマブ処置群)。これらの死亡の原因は不明であった。

30

【0707】

IgG1-PD1およびペムブロリズマブによる処置は、試験したすべての用量で腫瘍成長を阻害した(図12A)。すべての処置群が完了した最終日である11日目に、IgG1-PD1またはペムブロリズマブで処置したマウスの腫瘍は、試験したすべての用量で、 10 mg/kg のIgG1-ctrl-FERRで処置したマウスの腫瘍よりも有意に小さかった(図12B)。さらに、 10 mg/kg では、IgG1-PD1で処置したマウスの腫瘍体積は、同用量のペムブロリズマブで処置したマウスよりも有意に小さかった(Mann-Whitney検定、 $p = 0.0188$)。

【0708】

IgG1-PD1またはペムブロリズマブによる処置は、 10 mg/kg のIgG1-ctrl-FERRで処置したマウスと比較して、試験したすべての用量で無増悪生存期間(PFS)を有意に延長した(図12C)。 10 mg/kg では、IgG1-PD1で処置したマウスの無増悪生存期間は、ペムブロリズマブで処置したマウスと比較して有意に延長された(PFSの中央値 10 mg/kg のIgG1-PD1: 20.56 日、PFS中央値 10 mg/kg のペムブロリズマブ: 13.94 日; P 値 = 0.0021)。

40

【0709】

結論として、IgG1-PD1はMC38腫瘍を有するhPD-1 KIマウスにおいて強力な抗腫瘍活性を示した。

【実施例13】

【0710】

50

ヒトPD-1ノックインマウスにおけるIgG1-PD1のPD活性

IgG1-PD1はMC38腫瘍を有するhPD-1 KIマウスにおいて強力な抗腫瘍活性を示した（実施例12）。IgG1-PD1処置の薬力学的効果を探るために、MC38腫瘍を有するhPD-1 KIマウスをIgG1-PD1で処置し、血液、脾臓、および腫瘍試料を所定の時点で採取した。免疫細胞へのIgG1-PD1処置の効果は、フローサイトメトリーおよび免疫組織化学（IHC）を使用して決定した。

【0711】

MC38腫瘍を有するhPD-1 KIマウスモデルを、実施例12に記載されるように確立した。腫瘍が平均体積およそ60mm³に達した場合に、腫瘍体積に基づいてマウスを無作為化した（各群12匹のマウス）（0日目と表記した）。処置開始時に、マウスに、0.5または10mg/kgのIgG1-PD1、10mg/kgのペムブロリズマブ（Crown Bioscience Inc. によりMerckから入手、ロット番号U036695）、または10mg/kgのアイソタイプ対照抗体IgG1-ctrl-FERRを、0、3および7日目にIV注射した（PBS中10mL/kgの投与体積）。動物を罹患率および死亡率について毎日モニターし、その他の臨床的観察についても日常的にモニターした。マウスは病気の徴候を示さなかった。2、4、および8日目に動物を安楽死させ、末梢血細胞の免疫表現型分類のために心臓穿刺により血液を採取した（各時点で各処置群につき4匹のマウス）。さらに、脾臓および腫瘍を回収した。腫瘍はIHC解析のためにホルマリン固定およびパラフィン包埋した。

【0712】

脾臓を、gentleMACS（商標）Dissociator（130-096-427、Miltenyi）を使用し、製造業者の使用説明書に従って、酵素的に分離させた。得られた細胞懸濁液を70μmのセルストレーナー（Falcon、カタログ番号352350）でろ過し、5mLのFACS洗浄緩衝液（PBS中10%のFBS [Gibco、カタログ番号10099-141]、40mMのEDTA [Boston Bio Products、カタログ番号BM-711-K]）で洗浄した。RBC Lysing Buffer（Bio-gems、カタログ番号64010-00-100）を使用して赤血球を溶解した。細胞をFACS洗浄緩衝液で2回洗浄し、細胞計数のためにPBS中に再懸濁した。

【0713】

血液試料および分離した脾臓試料を、Mouse BD Fc Block（商標）（BD Biosciences、カタログ番号553141）と共に、暗所で、4℃で10分間インキュベートした後、細胞をFcブロッキング緩衝液で希釈した表16に記載の抗体パネルで4℃で30分間染色した。その後、血液試料をRBC Lysing緩衝液とインキュベートし、さらにRTで10分間インキュベートした。次に、血液試料と分離した脾臓試料の両方の細胞を洗浄緩衝液で3回洗浄した。各試料に123counte Beads（eBioscience、カタログ番号01-1234-42）を100μL加えた後、フローサイトメトリーによって試料を解析した。フローサイトメトリーデータは、Kaluzza Analysis Softwareを使用して解析した。

【0714】

【表 16】

表 16. 免疫表現型検査の抗体パネル

マーカー	フルオロフォア	クローン	供給業者	カタログ番号	アイソタイプ	希釈率
CD45	PerCP-Cy5.5	30-F11	BioLegend	103132	Rat IgG2b, κ	1:50
CD3	BUV395	17A2	BD Biosciences	740268	Rat IgG2b, κ	1:50
CD4	BV510	GK1.5	BioLegend	100449	Rat IgG2b, κ	1:40
CD8	PE-eF610	53-6.7	eBioscience	61-0081-82	Rat IgG2a, κ	1:50
CD44	AF700	IM7	BioLegend	103026	Rat IgG2b, κ	1:50
CD62L	BV785	MEL-14	BioLegend	104440	Rat IgG2a, κ	1:50
CD19 ^a	FITC	6D5	BioLegend	115506	Rat IgG2a, κ	1:50
CD11b ^a	FITC	M1/70	BioLegend	101206	Rat IgG2b, κ	1:50
I-A/I-E (MHC II)	BV711	M5/114.15.2	BioLegend	107643	Rat IgG2b, κ	1:50
固定可能な生存率色素	eF780	N.A.	eBioscience	65-0865-14	N.A.	1:100

^a CD19およびCD11bを単一チャンネルで組み合わせ、CD19および/またはCD11bを発現する細胞を除外した。略語:BUV=Brilliant Ultra Violet;BV=Brilliant Violet;CD=分化抗原群;Cy=シアニン;eF=eFluor;FITC=フルオレセインイソチオシアネート;IgG=免疫グロブリンG;MHC=主要組織適合性複合体;N.A.=該当なし;PE=フィコエリトリン;PerCP=ペリジニン-クロロフィル-タンパク質。

【0715】

異種移植腫瘍組織におけるCD3、CD4、CD8およびグランザイムB (GZMB) の発現は、ウサギ抗CD3ε (Ventana、クローン2GV6、カタログ番号790-4341;最終濃度0.4 μg/mL)、ウサギ抗CD4 (Abcam、クローンEP R19514、カタログ番号ab183685;最終濃度5 μg/mL)、ウサギ抗CD8 (Cell Signaling、クローンD4W2Z、カタログ番号98941;1:200に希釈した)、およびウサギ抗GZMB抗体 (Abcam、クローンEP R22645-206、カタログ番号ab255598;最終濃度5 μg/mL) に続いて、抗ウサギ特異的検出プロトコール (OmniMap DAB 抗Rb検出キット、Roche、カタログ番号05269679001、HQシグナル増幅キット、Roche、カタログ番号06472320001と組み合わせたCD8 IHCアッセイ用) を使用するIHCにおいて評価し、残存する可能性のあるマウスIgGとの結合を回避した。生存腫瘍領域内の細胞定量は、HALOソフトウェア (Indica Labs) を使用するテラーメイドの画像解析アルゴリズムにより、デジタル画像上で行った。細胞定量の読み出しは、生存可能な(壊死していない)腫瘍領域内の全有核細胞のうちの、マーカー陽性細胞のパーセンテージを計算することによって作成した。

【0716】

非結合性対照抗体IgG1-ctrl-FERRと比較して、10 mg/kgのIgG1-PD1による処置により、8日目に末梢血中のT細胞数(CD3⁺、CD4⁺、およびCD8⁺) が明らかに増加する傾向が見られたが、10 mg/kgのペムブロリズマブによる処置では、末梢血T細胞数が統計学的に有意に減少した(図13)。並行して、エフェクターメモリー(CD44⁺ CD62L⁻) CD8⁺ T細胞のパーセンテージは、対照処置と比較した場合、10 mg/kgのIgG1-PD1で処置したマウスの脾臓では8日目に有意に増加したが、10 mg/kg ペムブロリズマブで処置したマウスの脾臓では増加しなかった(図14A)。対照マウスおよび10 mg/kgのペムブロリズマブで処置したマウスと比較した場合、ナイーブ(CD44⁻ CD62L⁺) CD8⁺

T細胞のパーセンテージの付随する有意な減少が、 10 mg/kg のIgG1-PD1で処置したマウスの脾臓で観察された。 10 mg/kg のIgG1-PD1による処置により、8日目の脾臓におけるMHCクラスII⁺ CD8⁺ T細胞のパーセンテージが有意に増加し、T細胞の活性化の増加が示唆された（図14B）。MHCクラスII⁺ CD8⁺ T細胞のパーセンテージの同程度の増加が、 10 mg/kg のペムブロリズマブで処置したマウスの脾臓において観察された。

【0717】

8日目に、腫瘍内のCD3⁺およびCD8⁺ T細胞の数は、 10 mg/kg のペムブロリズマブで処置したマウスでは対照マウスよりも有意に少なかった（図15A～C）。さらに、8日目に、細胞傷害性エフェクター分子GZMBを発現する腫瘍内細胞のパーセンテージは、 10 mg/kg のIgG1-PD1で処置したマウスでは、 10 mg/kg のペムブロリズマブで処置したマウスおよび対照マウスよりも有意に高かった（図15D）。

10

【0718】

結論として、IgG1-PD1のインビボ抗腫瘍活性は、末梢血および腫瘍内T細胞数の増加、脾臓におけるエフェクターメモリーおよび活性化（MHCクラスII⁺）CD8⁺ T細胞のパーセンテージの増加、および腫瘍内GZMB⁺細胞のパーセンテージの増加と関連していた。対照的に、ペムブロリズマブで処置したマウスは限定的な薬力学的変化しか示さなかった。

20

【実施例14】

【0719】

IgG1-PD1によるマクロファージ結合

IgG1-PD1はFcγRへの結合を示さなかったが、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、ドスタリマブ、およびセミプリマブは結合した（実施例8）。これらの抗体のFcγR発現M2c様マクロファージへの結合能を、フローサイトメトリーを使用してインビトロで評価した。

【0720】

ヒト末梢血単核細胞（PBMC）は、Lymphocyte Separation Medium（Promocell、カタログ番号C-44010）に対する密度勾配遠心分離（ $800\times g$ で20分間、低ブレーキ）により、LeucoSep（商標）チューブ（Greiner、カタログ番号227290）中で、3人の健康なヒトドナー（Sanguin blood supply foundation、the Netherlands）のバフィーコートから、製造業者の使用説明書に従って精製した。ヒト単球を、抗CD14 MicroBeads（Miltenyi；カタログ番号130-050-201）を使用するMACS技術により、製造業者の使用説明書に従って、PBMCから精製した。CD14⁺単球を、 50 ng/mL のM-CSF（Gibco、カタログ番号PHC9501）を補充したCellGenix（登録商標）GMP DC培地（CellGenix、カタログ番号20801-0500）中 1.0×10^6 個の細胞/mLの密度で再懸濁した。単球をM2c様マクロファージに偏極させるために、精製単球を、M-CSFを補充したCellGenix GMP DC培地中UpCell（商標）Surfaceを有する 100 mm^2 のNunc（商標）ディッシュ（ 1.0×10^6 個の細胞/mLの密度の 8×10^6 個の細胞/ディッシュ；Thermo Fisher Scientific、カタログ番号174902）にプレーティングし、7日間培養し（ 37°C 、 $5\%\text{ CO}_2$ ）、その後、 50 ng/mL のM-CSF、 50 ng/mL のIL-4（R&D Systems、カタログ番号204-IL）、および 50 ng/mL のIL-10（R&D Systems、カタログ番号1064-IL/CF）を補充したCellGenix GMP DC培地中で3日間培養した。次に、ディッシュをRTで40～60分間静置することによって、マクロファージを培養ディッシュ表面から剥離した。剥離したマクロファージを遠心分離（ $300\times g$ で5分）でペレット化し、カウントし、CellGenix GMP DC培地に 1.5×10^6 個の細胞/mLの密度で再懸

30

40

50

濁した。単球由来マクロファージのM2c様表現型を、Brilliant Violet (BV) 421がコンジュゲートした抗ヒトCD163 (BioLegend、カタログ番号333612; 1:200で希釈した) とBV711がコンジュゲートした抗ヒトCD206 (BioLegend、カタログ番号321136; 1:200で希釈した) との混合物を使用するフローサイトメトリーによって確認した。M2c様マクロファージ上でのFcγRおよびPD-1の発現は、FITCがコンジュゲートした抗ヒトCD64 (FcγRIa; BioLegend、カタログ番号305006; 1:25で希釈した)、FITCがコンジュゲートした抗ヒトCD32 (FcγRII; BD Pharmingen、カタログ番号552883; 1:50で希釈した)、PEがコンジュゲートした抗ヒトCD16a (FcγRIIIa; BD Pharmingen、カタログ番号555407; 1:50で希釈した)、PEがコンジュゲートした抗PD-1抗体 (BioLegend; カタログ番号329906; 1:50で希釈した)、FITCがコンジュゲートしたIgG1アイソタイプ対照 (BioLegend、カタログ番号400108; 1:25で希釈した)、およびPEがコンジュゲートしたIgG1アイソタイプ対照 (BD Pharmingen、カタログ番号555749; 1:50で希釈した) を使用して評価した。M2c様マクロファージを、IgG1-PD1、ペムブロリズマブ (MSD、ロット番号U013442)、ニボルマブ (Bristol-Myers Squibb、ロット番号ABP6534)、IgG4アイソタイプ対照 (BioLegend、カタログ番号403702)、IgG1-ctrl、およびIgG1-ctrl-FERRと共に24時間インキュベートし、FACS緩衝液で2回洗浄した。FACS緩衝液で希釈したPEがコンジュゲートしたヤギ抗ヒトIgG F(ab')₂ (Jackson ImmunoResearch、カタログ番号109-116-097; 1:200で希釈した) を用いて、細胞を4℃で30分間インキュベートした。FACS緩衝液で2回洗浄した後、細胞を、生存率色素4', 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI; BD Pharmingen、カタログ番号564907; 1:5,000で希釈した) を補充したFACS緩衝液に再懸濁し、その後、BD LSRFortessa (商標) Cell Analyzerで測定し、FlowJoで解析した。

10

20

30

40

[0721]

細胞膜上に発現したFcγRに対するIgG1-PD1、ペムブロリズマブ、およびニボルマブの結合を、ヒト単球由来M2c様マクロファージ (3人の健康なドナーに由来する) を使用して評価した。FcγRIa、FcγRII、およびFcγRIIIaの発現ならびにPD-1の発現がないことを、フローサイトメトリーによって最初に確認した (図16A)。野生型IgG1 Fcドメインを有するIgG1-ctrl、Fc不活性IgG1-ctrl-FERR、およびIgG4アイソタイプ対照を対照として含めた。IgG1-ctrlは24時間のインキュベーション後に、M2c様マクロファージへの効率的な結合を示したが、IgG1-PD1またはIgG1-ctrl-FERRでは、試験したドナーのいずれに対しても結合は観察されなかった (図16B)。逆に、ペムブロリズマブ、ニボルマブ、およびIgG4アイソタイプ対照抗体はすべて、バックグラウンド対照を超える結合を示した。まとめると、これらのデータは、IgG1-PD1がFcγRを発現するM2c様マクロファージに結合しないが、ペムブロリズマブおよびニボルマブは結合することを実証する。

[実施例15]

[0722]

IgG1-PD1によって誘導されるFcγRシグナル伝達

IgG1-PD1はFcγRにもM2c様マクロファージにも結合を示さなかったが、IgG4骨格を有する抗PD-1抗体は結合を示した (実施例8および14)。FcγRシグナル伝達を誘導するこれらの抗体の能力を、細胞ベースのFcエフェクター活性レポートアッセイを使用してインビトロで評価した。

[0723]

IgG1-PD1、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、ドスタリマブ、およびセミプリ

50

マブによって誘導されるFcγRI、FcγRIIa-H131、FcγRIIa-R131、およびFcγRIIbのシグナル伝達を、生物発光細胞ベースレポーターアッセイ（Promega、それぞれカタログ番号GA1341、G988A、CS178B11、およびG988ACS1781E01）を使用し、基本的には製造業者の使用説明書に従って、評価した。簡単に説明すると、PD-1をトランスフェクトしたCHO細胞（社内で作成；実施例1）を、連続希釈したIgG1-PD1、ペムブロリズマブ（MSD、ロット番号W003098）、ニボルマブ（Bristol-Myers Squibb、ロット番号8006768）、ドスタリマブ（GlaxoSmithKline、ロット番号1822049）、センプリマブ（Regeneron、ロット番号1F006A）、IgG1-ctrl-FERR、またはIgG4アイソタイプ（BioLegend、カタログ番号403702）と、37℃、5%CO₂で15分間ブレインキュベートした（FcγRIアッセイにおける最終インアッセイ濃度：25倍希釈で30~1.23×10⁻⁷ μg/mL；他のFcγRアッセイにおける最終アッセイ濃度：5倍希釈で30~0.00192 μg/mL）。陽性対照として、六量体化を増強するE430G突然変異を有するIgG1-CD52-E430Gを含めた。遺伝子操作したFcγRI、FcγRIIa-H（FcγRIIa-H131）、FcγRIIa-R（FcγRIIa-R131）、およびFcγRIIbエフェクター細胞を、1：1の比で培養物に添加した後、試料を37℃、5%CO₂で5時間インキュベートした。次に、試料を再構成したBio-Glo（商標）と共にRTで10分間インキュベートした後、EnVision Multilabel Plate Reader（PerkinElmer）を使用してルミネセンス（RLU）を測定した。

10

20

【0724】

E430G六量体化を増強する突然変異を有する膜結合IgG1-CD52-E430Gは、強いFcγRI、FcγRIIa-R131、FcγRIIa-H131、およびFcγRIIbシグナル伝達を誘導した。膜結合ペムブロリズマブ、ニボルマブ、センプリマブ、およびドスタリマブ（すべてIgG4サブクラス）も、FcγRI、FcγRIIa-R131、FcγRIIa-H131、およびFcγRIIbシグナル伝達を誘導したが、その程度は小さく、膜結合IgG1-PD1および非結合対照抗体（IgG1-ctrl-FERR、IgG4アイソタイプ）は誘導しなかった（図17）。

【0725】

30

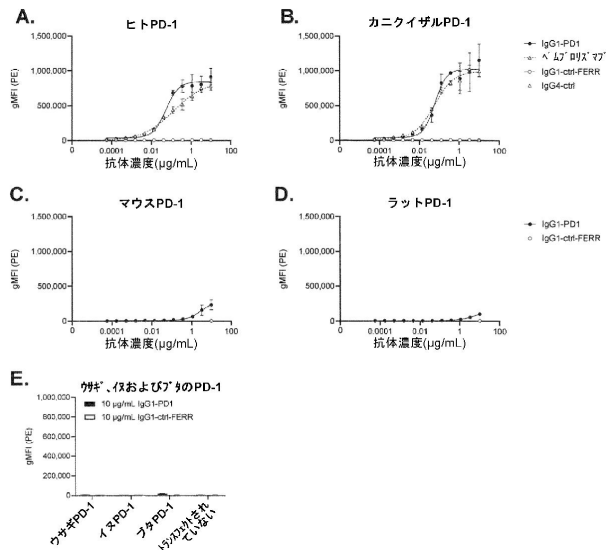
総合すると、これらのデータは、膜結合ニボルマブ、ペムブロリズマブ、ドスタリマブ、およびセンプリマブが、FcγRI、FcγRIIa-R131、FcγRIIa-H131、およびFcγRIIbシグナル伝達を誘導することを実証する。対照的に、膜結合IgG1-PD1は、FcγR媒介性シグナル伝達を誘導することができず、IgG1-PD1のFcドメインが機能的に不活性であることが確認される。

40

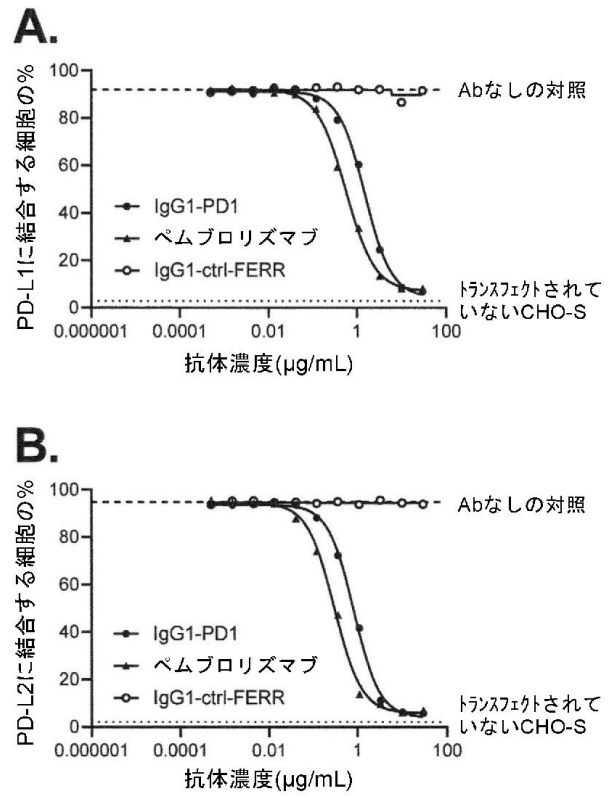
50

【図面】

【図 1】



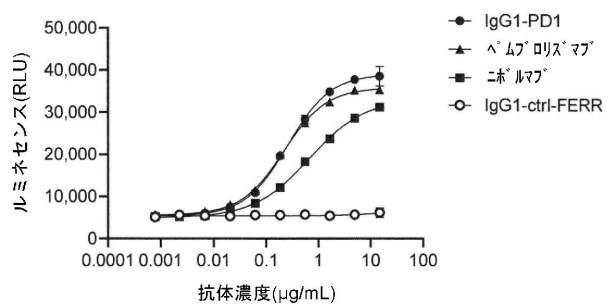
【図 2】



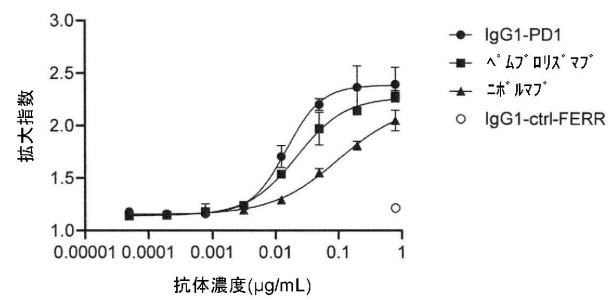
10

20

【図 3】



【図 4】

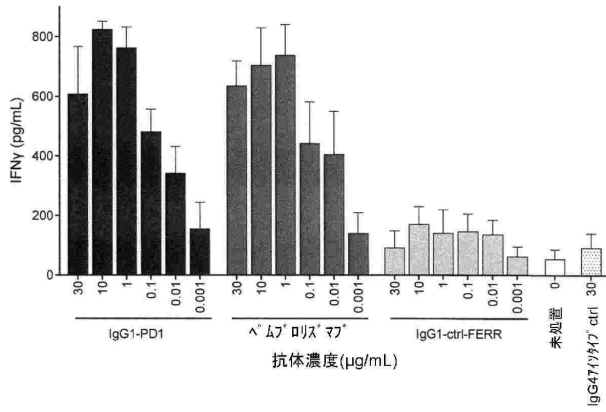


30

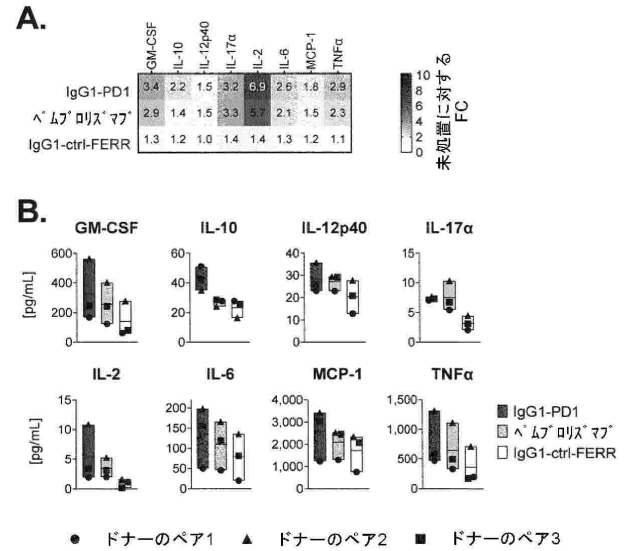
40

50

【図 5】

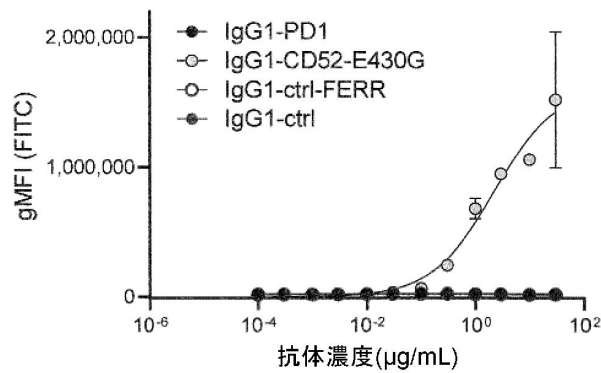


【図 6】

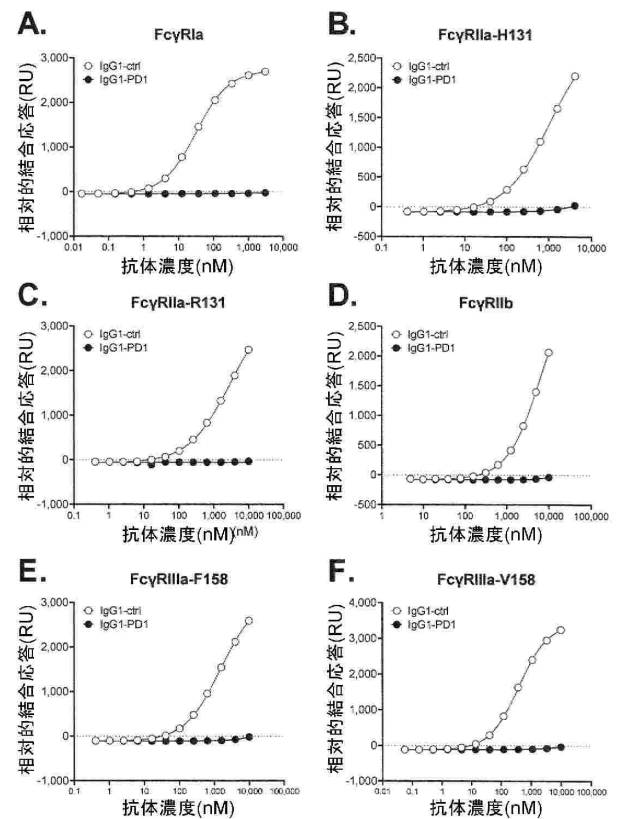


10

【図 7】



【図 8】



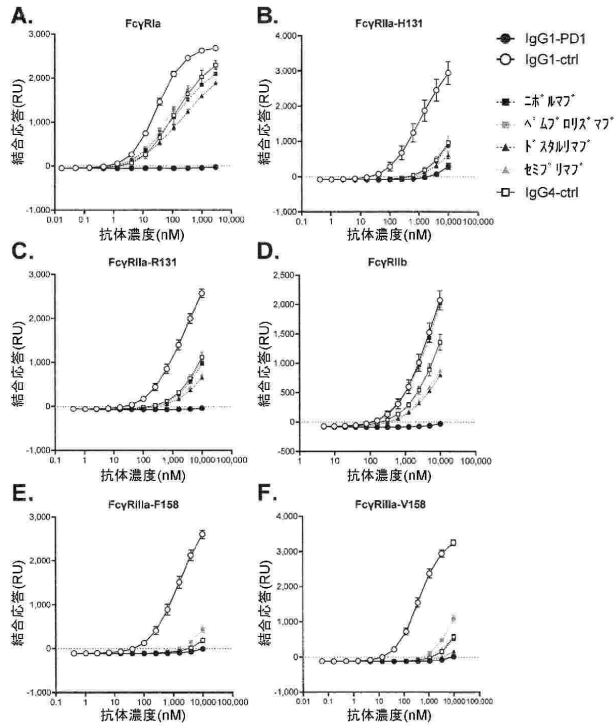
20

30

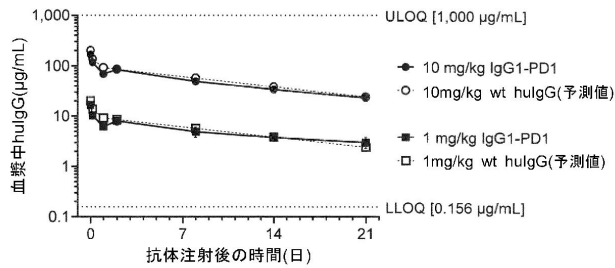
40

50

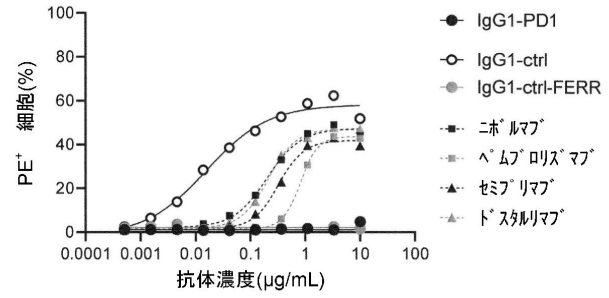
【図 9】



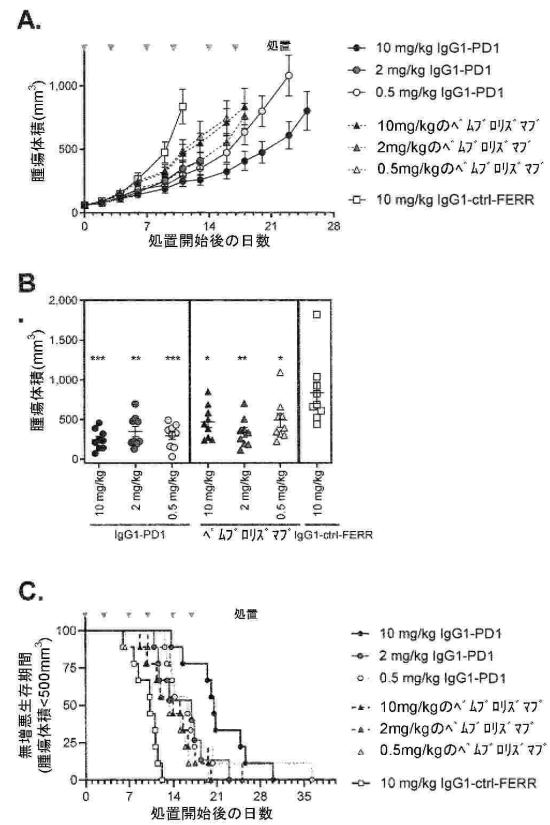
【図 11】



【図 10】



【図 12】



10

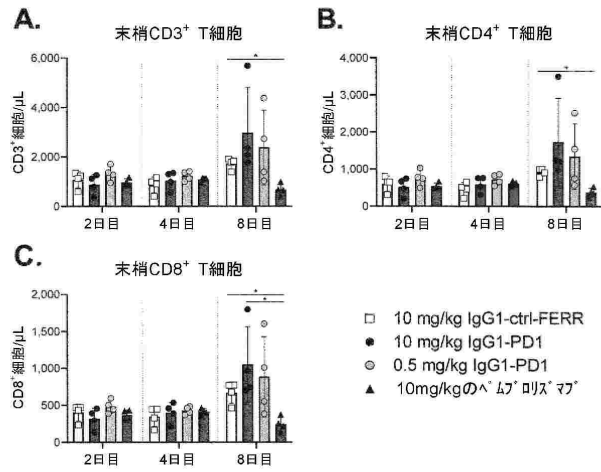
20

30

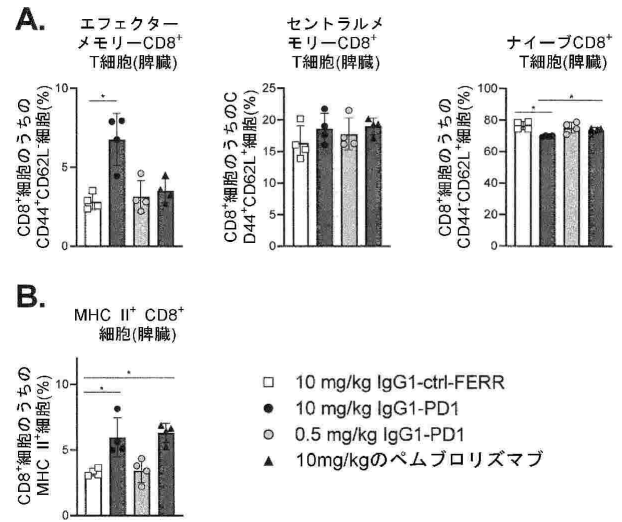
40

50

【図 13】

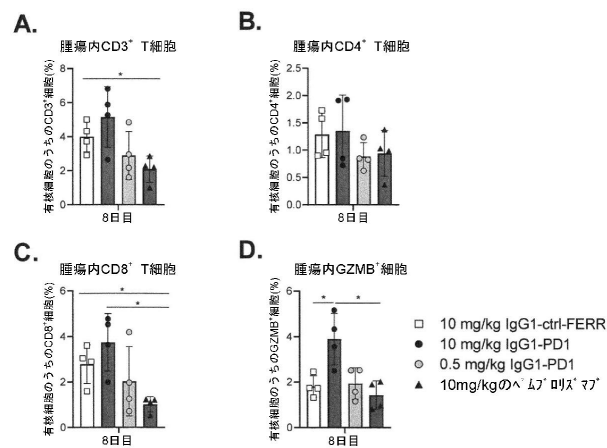


【図 14】

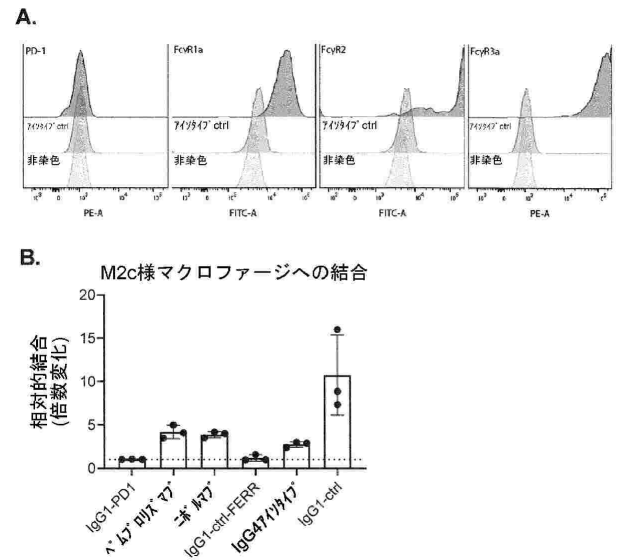


10

【図 15】



【図 16】



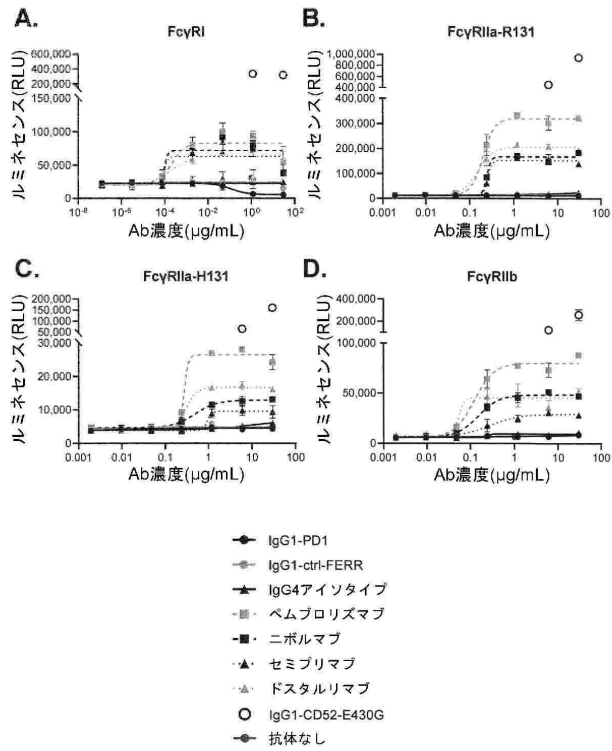
20

30

40

50

【図 17】



10

20

30

40

50

【配列表】

2025516590000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/062651

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/28 A61P35/00
ADD.

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 A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, SCISEARCH, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2021/234402 A2 (MABSOLVE LTD [GB]) 25 November 2021 (2021-11-25) example 2 pages 78-79, paragraph bridging page 85, line 22 - line 25 page 91, line 19 - line 22 page 93, line 10 - line 14 tables 17,20,21 ----- -/--	1-112

☒ 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

"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

28 June 2023

Date of mailing of the international search report

10/07/2023

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Domingues, Helena

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/062651

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WILKINSON IAN ET AL: "Fc-engineered antibodies with immune effector functions completely abolished", PLOS ONE, vol. 16, no. 12, 21 December 2021 (2021-12-21), page e0260954, XP093016187, DOI: 10.1371/journal.pone.0260954 Retrieved from the Internet: URL:https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34932587/> page 12 - page 13 table 4 and 5 -----	1-112
Y	EP 3 505 535 A1 (AKESO BIOPHARMA INC [CN]) 3 July 2019 (2019-07-03) example 12 figure 12 -----	1-112
Y	LI B. ET AL: "Penpulimab, an IgG1 anti-PD-1 antibody with Fc-engineering to eliminate effector functions and with unique epitope and binding properties", ANNALS OF ONCOLOGY, vol. 32, no. 5, 1 September 2021 (2021-09-01), XP055964899, DOI: 10.1016/j.annonc.2021.08.280 the whole document -----	1-112
Y	DAHAN RONY ET AL: "Fc[gamma]Rs Modulate the Anti-tumor Activity of Antibodies Targeting the PD-1/PD-L1", CANCER CELL, CELL PRESS, US, vol. 28, no. 3, 14 September 2015 (2015-09-14), pages 285-295, XP029268952, ISSN: 1535-6108, DOI: 10.1016/J.CCELL.2015.08.004 page 290, left-hand column - page 291, right-hand column page 293, left-hand column, paragraph figures 3,4 ----- -/--	1-112

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/062651

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MORENO-VICENTE JULIA ET AL: "Fc-null anti-PD-1 monoclonal antibodies deliver optimal checkpoint blockade in diverse immune environments", JOURNAL FOR IMMUNOTHERAPY OF CANCER, vol. 10, no. 1, 1 January 2022 (2022-01-01), page e003735, XP093058582, DOI: 10.1136/jitc-2021-003735 page 5 figures 1,2,3,5 page 11, left-hand column -----	1-112
Y,P	WO 2023/057534 A1 (GENMAB AS [DK]; BIONTECH SE [DE]) 13 April 2023 (2023-04-13) examples 1-16 -----	1-112
Y,P	WO 2022/189667 A1 (GENMAB AS [DK]) 15 September 2022 (2022-09-15) examples 1-18 -----	1-112
Y,P	HUANG ZHAOLIANG ET AL: "Penpulimab, an Fc-Engineered IgG1 Anti-PD-1 Antibody, With Improved Efficacy and Low Incidence of Immune-Related Adverse Events", FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, vol. 13, 27 June 2022 (2022-06-27), XP093058585, DOI: 10.3389/fimmu.2022.924542 the whole document -----	1-112

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2023/062651

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

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2023/062651

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2021234402 A2	25-11-2021	AU 2021277578 A1	08-12-2022
		CA 3179582 A1	25-11-2021
		CN 115667305 A	31-01-2023
		EP 4153629 A2	29-03-2023
		GB 2595299 A	24-11-2021
		JP 2023524905 A	13-06-2023
		KR 20230004674 A	06-01-2023
		WO 2021234402 A2	25-11-2021

EP 3505535 A1	03-07-2019	AU 2017316255 A1	11-04-2019
		BR 112019003775 A2	25-06-2019
		CA 3034849 A1	01-03-2018
		CN 106977602 A	25-07-2017
		EA 201990570 A1	30-08-2019
		EP 3505535 A1	03-07-2019
		IL 264956 A	01-12-2022
		JP 7082620 B2	08-06-2022
		JP 2019534034 A	28-11-2019
		KR 20190050994 A	14-05-2019
		NZ 751902 A	27-05-2022
		SG 11201901584U A	28-03-2019
		US 2019321466 A1	24-10-2019
		WO 2018036472 A1	01-03-2018

WO 2023057534 A1	13-04-2023	NONE	

WO 2022189667 A1	15-09-2022	NONE	

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 5/10 (2006.01)
 C 1 2 N 7/01 (2006.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)
 A 6 1 K 47/68 (2017.01)
 A 6 1 K 31/7088 (2006.01)
 A 6 1 K 48/00 (2006.01)
 A 6 1 K 35/76 (2015.01)
 G 0 1 N 33/574 (2006.01)
 C 1 2 P 21/08 (2006.01)

C 1 2 N 5/10
 C 1 2 N 7/01
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 K 39/395 T
 A 6 1 K 47/68
 A 6 1 K 31/7088
 A 6 1 K 48/00
 A 6 1 K 35/76
 G 0 1 N 33/574 A
 C 1 2 P 21/08

4 C 0 8 6
 4 C 0 8 7
 4 H 0 4 5

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,
 ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,C
 O,CR,CU,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,I
 R,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,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

弁理士 白江 雄介

(72)発明者

シャヒン, ウール

ドイツ5 5 1 3 1 マインツ、アン・デア・ゴルトグルーベ1 2、ピオンテック・ソシエタス・エウ
 ロペア内

(72)発明者

フェラーメイアー・コップ, ジーナ

ドイツ5 5 1 3 1 マインツ、アン・デア・ゴルトグルーベ1 2、ピオンテック・ソシエタス・エウ
 ロペア内

(72)発明者

ギーゼケ, フリーデリケ

ドイツ5 5 1 3 1 マインツ、アン・デア・ゴルトグルーベ1 2、ピオンテック・ソシエタス・エウ
 ロペア内

(72)発明者

ベックマン, カルステン

ドイツ5 5 1 3 1 マインツ、アン・デア・ゴルトグルーベ1 2、ピオンテック・ソシエタス・エウ
 ロペア内

(72)発明者

パウルマン, クラウディア

ドイツ5 5 1 3 1 マインツ、アン・デア・ゴルトグルーベ1 2、ピオンテック・ソシエタス・エウ
 ロペア内

(72)発明者

ムイク, アレクサンダー

ドイツ5 5 1 3 1 マインツ、アン・デア・ゴルトグルーベ1 2、ピオンテック・ソシエタス・エウ
 ロペア内

(72)発明者

クズマノフ, イヴァン

ドイツ5 5 1 3 1 マインツ、アン・デア・ゴルトグルーベ1 2、ピオンテック・ソシエタス・エウ
 ロペア内

(72)発明者

ブレイ, エステル コルネリア ウィルヘルミナ

オランダ3 5 8 4セーテ・ユトレヒト、ウブサララーン1 5、ジェンマブ・ベスローテン・フェ
 ンノーツハップ内

(72)発明者

ガルリド カストロ, パトリシア

オランダ3 5 8 4セーテ・ユトレヒト、ウブサララーン1 5、ジェンマブ・ベスローテン・フェ
 ンノーツハップ内

(72)発明者

ブルム, ジョーダン

オランダ3 5 8 4セーテ・ユトレヒト、ウブサララーン1 5、ジェンマブ・ベスローテン・フェ
 ンノーツハップ内

(72)発明者

ギュレン, ラルス

オランダ3 5 8 4セーテ・ユトレヒト、ウブサララーン1 5、ジェンマブ・ベスローテン・フェ

-
- ンノーツハップ内
- (72)発明者 ネイセン, ヨースト
オランダ 3 5 8 4 セーテール・ユトレヒト、ウプサララーン 1 5、ジェンマブ・ベスローテン・フェ
ンノーツハップ内
- (72)発明者 デ クルーク, バルトーヤン
オランダ 3 5 8 4 セーテール・ユトレヒト、ウプサララーン 1 5、ジェンマブ・ベスローテン・フェ
ンノーツハップ内
- (72)発明者 ヒベルト, リシャルト
オランダ 3 5 8 4 セーテール・ユトレヒト、ウプサララーン 1 5、ジェンマブ・ベスローテン・フェ
ンノーツハップ内
- (72)発明者 シュールマン, ヤニネ
オランダ 3 5 8 4 セーテール・ユトレヒト、ウプサララーン 1 5、ジェンマブ・ベスローテン・フェ
ンノーツハップ内
- (72)発明者 ラブレイン, アラン フランク
オランダ 3 5 8 4 セーテール・ユトレヒト、ウプサララーン 1 5、ジェンマブ・ベスローテン・フェ
ンノーツハップ内
- F ターム (参考) 4B064 AG27 CA10 CA12 CA19 CC24 DA01 DA13
4B065 AA90X AA90Y AA95X AB01 AC14 AC20 BA02 CA25 CA44 CA46
4C076 AA95 CC27 CC41 EE41 EE59
4C084 AA13 NA13 ZB26
4C085 AA14 CC23 DD61 EE01
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA13 ZB26
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 NA13 ZB26
4H045 AA11 AA30 BA10 BA50 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74