

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7641910号

(P7641910)

(45)発行日 令和7年3月7日(2025.3.7)

(24)登録日 令和7年2月27日(2025.2.27)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K 16/28 (2006.01)

C 0 7 K 16/28

Z N A

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10

請求項の数 15 (全34頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2021-560586(P2021-560586)

(86)(22)出願日 令和2年4月9日(2020.4.9)

(65)公表番号 特表2022-538375(P2022-538375
A)

(43)公表日 令和4年9月2日(2022.9.2)

(86)国際出願番号 PCT/CN2020/083954

(87)国際公開番号 WO2020/207432

(87)国際公開日 令和2年10月15日(2020.10.15)

審査請求日 令和5年3月27日(2023.3.27)

(31)優先権主張番号 201910286677.9

(32)優先日 平成31年4月10日(2019.4.10)

(33)優先権主張国・地域又は機関
中国(CN)

(73)特許権者 519102107

バイオ－テラ ソリューションズ、リ
ミテッド中華人民共和国, 5 1 0 5 3 0 カント
ン, グアンジョウ, ハイ－テック イン
ダストリアル デヴェロップメント ゾー
ン, サイエンス シティー, カイユエン
ロード 11, エー6－5エフエル

(74)代理人 110000338

弁理士法人 HARAKENZO WOR
LD PATENT & TRADEMA
RK

(72)発明者 ユエ, ハイタオ

中華人民共和国, 5 1 0 5 3 0 カント
ン, グアンジョウ, ハイ－テック イン
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 P D－1 と結合する抗体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗 P D－1 抗体又はその抗体フラグメントであって、

前記抗 P D－1 抗体又はその抗体フラグメントは、SEQ ID NO：13，14及び15に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖CDRと、SEQ ID NO：16，17及び18に示されるアミノ酸配列を有する重鎖CDRと、を含む、ことを特徴とする抗 P D－1 抗体又はその抗体フラグメント。

【請求項2】

前記抗 P D－1 抗体又はその抗体フラグメントは、単離した抗 P D－1 抗体又はその抗体フラグメントである、ことを特徴とする請求項1に記載の抗 P D－1 抗体又はその抗体フラグメント。

【請求項3】

前記抗 P D－1 抗体又はその抗体フラグメントは、

SEQ ID NO：7に示されるアミノ酸配列、又は、SEQ ID NO：7に示されるアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性をもつアミノ酸配列、又は、SEQ ID NO：7に示されるアミノ酸配列と比べて1つ又は複数の保存的アミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含有する重鎖可変領域、及び／又は、

SEQ ID NO：8に示されるアミノ酸配列、又は、SEQ ID NO：8に示されるアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性をもつアミノ酸配列、又は、SEQ ID NO：8に示されるアミノ酸配列と比べて1つ又は複数の保存的アミノ酸置換を有するア

ミノ酸配列を含有する軽鎖可変領域、を含む、ことを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の抗 PD-1 抗体又はその抗体フラグメント。

【請求項 4】

重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む抗 PD-1 抗体又はその抗体フラグメントであって、

前記重鎖可変領域は、SEQ ID NO: 7 に示されるアミノ酸配列を含み、

前記軽鎖可変領域は、SEQ ID NO: 8 に示されるアミノ酸配列を含む、ことを特徴とする抗 PD-1 抗体又はその抗体フラグメント。

【請求項 5】

前記抗 PD-1 抗体又はその抗体フラグメントは、ヒト γ 4 重鎖定常領域又はその変異体、及び／又は、ヒト κ 軽鎖定常領域又はその変異体をさらに含む、ことを特徴とする請求項 1 から 4 の何れか 1 項に記載の抗 PD-1 抗体又はその抗体フラグメント。

【請求項 6】

SEQ ID NO: 7 1 に示されるアミノ酸配列、又は SEQ ID NO: 7 1 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 90% の同一性をもつアミノ酸配列、又は、SEQ ID NO: 7 1 に示されるアミノ酸配列と比べて 1 つ又は複数の保存的アミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含む重鎖と、SEQ ID NO: 7 2 に示されるアミノ酸配列、又は SEQ ID NO: 7 2 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 90% の同一性をもつアミノ酸配列、又は、SEQ ID NO: 7 2 に示されるアミノ酸配列と比べて 1 つ又は複数の保存的アミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含む軽鎖と、を含む、請求項 1 に記載の抗 PD-1 抗体又はその抗体フラグメント。

【請求項 7】

重鎖及び軽鎖を含む抗 PD-1 抗体又はその抗体フラグメントであって、

前記重鎖は、SEQ ID NO: 7 1 に示されるアミノ酸配列を含み、

前記軽鎖は、SEQ ID NO: 7 2 に示されるアミノ酸配列を含む、ことを特徴とする抗 PD-1 抗体又はその抗体フラグメント。

【請求項 8】

B 1) 請求項 1 から 7 の何れか 1 項に記載の抗 PD-1 抗体又はその抗体フラグメントをコード化する核酸分子、又は、

B 2) B 1) に記載の核酸分子を含む発現カセット、組換えベクター、組換え細胞又は組換え微生物、である、請求項 1 から 7 の何れか 1 項に記載の抗 PD-1 抗体又はその抗体フラグメントに関連する生体材料。

【請求項 9】

B 1) に記載の核酸分子は、

1) 下記のような DNA 分子：

SEQ ID NO: 1 の 91-108 位に示される核酸フラグメント、

SEQ ID NO: 1 の 148-192 位に示される核酸フラグメント、

SEQ ID NO: 1 の 292-327 位に示される核酸フラグメント、

SEQ ID NO: 2 の 73-114 位に示される核酸フラグメント、

SEQ ID NO: 2 の 160-177 位に示される核酸フラグメント、

SEQ ID NO: 2 の 271-303 位に示される核酸フラグメント、

SEQ ID NO: 1 に示される核酸フラグメント、

SEQ ID NO: 2 に示される核酸フラグメント、

SEQ ID NO: 7 3 に示される核酸フラグメント、又は

SEQ ID NO: 7 4 に示される核酸フラグメント、

2) 1) に限定される核酸フラグメントと交雑し、請求項 1 から 7 の何れか 1 項に記載の抗 PD-1 抗体又はその抗体フラグメントをコード化する核酸フラグメント、

3) 1) 又は 2) に限定される DNA 分子と 90% 以上の同一性を持ち、請求項 1 から 7 の何れか 1 項に記載の抗 PD-1 抗体又はその抗体フラグメントをコード化する核酸フラグメント、

上記 1) 又は 2) 又は 3) に示される核酸フラグメントを含む、ことを特徴とする請求項 8 に記載の生体材料。

【請求項 10】

請求項 1 から 7 の何れか 1 項に記載の抗 PD-1 抗体又はその抗体フラグメントを調製する方法であって、

請求項 9 における B 1) に記載の核酸分子を発現させることができる条件下で、培地において前記核酸分子を含む組換え細胞を培養することにより、前記抗 PD-1 抗体又はその抗体フラグメントを調製すること、を含む方法。

【請求項 11】

請求項 1 から 7 の何れか 1 項に記載の抗 PD-1 抗体又はその抗体フラグメント、及び薬学的に許容可能な賦形剤、希釈剤若しくは担体、又はそれらの混合物を含む医薬組成物。

10

【請求項 12】

- (1) PD-1 を検出する製品、
- (2) 免疫応答を刺激する又は向上させる製品、
- (3) がんを治療する製品、

上記製品の何れか 1 つの調製における、請求項 1 から 7 の何れか 1 項に記載の抗 PD-1 抗体又はその抗体フラグメントの使用。

【請求項 13】

前記医薬組成物は、がんを治療するために用いられる、請求項 11 に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

前記がんは、黒色腫、腎臓がん、前立腺がん、膵臓腺がん、乳がん、結腸がん、肺がん、食道がん、頭頸部扁平上皮がん、肝がん、卵巣がん、子宮頸がん、甲状腺がん、海綿芽細胞腫、神経膠腫、白血病又はリンパ腫である、請求項 13 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 15】

前記がんは、悪性転移性黒色腫、明細胞がん、ホルモンで制御し難い前立腺腺がん、又は、非小細胞肺がんである、請求項 13 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【技術分野】

本発明は、バイオテクノロジー分野に属し、PD-1 と結合する抗体に関する。

30

【背景技術】

プログラム死受容体-1 (PD-1) は、活性化した T 細胞、B 細胞と骨髄細胞において発現する免疫阻害受容体であり、CD28 免疫グロブリンスーパーファミリーに属する。PD-1 は、55 kDa の I 型膜貫通糖タンパク質であり、リガンドと結合する Ig 可変型構造ドメインと、シグナル伝達分子と結合するための細胞質尾部とを含む。PD-1 細胞質尾部は、2 つのチロシンベースのシグナル伝達モジュールである ITIM (免疫受容体チロシン阻害性モチーフ) と ITSM (免疫受容体チロシンスイッチモチーフ) を含む。

【0002】

PD-1 の 2 種類のリガンドである PD-L1 と PD-L2 が構成的発現であり、又は、非造血組織及び各種の腫瘍を含む種々の細胞型において誘導されることができるとが検定されている。PD-L1 は、B 細胞、T 細胞、骨髄細胞と樹状細胞において発現されるが、末梢細胞 (例えば、微小血管内皮細胞) と非リンパ器官 (例えば、心臓、肺など) においても発現される。それに対して、PD-L2 は、マクロファージと樹状細胞にのみ存在する。

40

【0003】

文献において、がんにおける PD-1 の作用が確定されている。PD-1 とそのリガンドの相互作用は、抗原受容体シグナル伝達に負の調節を行い、T 細胞応答を低減することが示されている。PD-1 により T 細胞応答を弱く調節するメカニズムは、CTLA-4 と似ているが、相違点もあり、この 2 つの分子は何れも、重なった一連のシグナル伝達タ

50

ンパク質を調節するからである。PD-L1は、種々のヒト腫瘍において豊かである（大部分のPD-1陰性腫瘍細胞系では、IFN γ により誘導可能である）。今までの多くの研究によると、PD-1とPD-L1との相互作用により、腫瘍に侵入するリンパ球が低減され、T細胞受容体を介した増殖が低減され、がん細胞の免疫が回避されることが示されている。PD-1とPD-L1との相互作用を遮断すると、T細胞の増殖と細胞因子の生成を増加し、腫瘍特異性CD8+T細胞の免疫性を向上させることができることが示されているため、免疫系による腫瘍細胞の除去に寄与する。

【0004】

免疫組織により生物組織を化学的に評価する検査は、既に、多くのヒト原発性腫瘍においてPD-1（腫瘍浸潤リンパ球で）及び／又はPD-L1（腫瘍細胞で）を発見した。このような組織は、肺がん、肝がん、卵巣がん、子宮頸がん、皮膚がん、結腸がん、神経膠腫、膀胱がん、乳がん、腎臓がん、食道がん、胃がん、口腔扁平上皮がん、尿道上皮がん、膵がん、及び頭頸部腫瘍の病変組織を含む。様々な腫瘍種類の腫瘍細胞におけるPD-1リガンドの発現は、がん患者の予後不良に関連する。

【0005】

要するに、PD-1／PD-L1経路は、がんを治療する抗体療法の開発において十分に実証された標的である。従って、PD-1の試薬、このような試薬を使用する方法を認識しなければならない。

〔発明の概要〕

本発明は、PD-1と結合する抗体又はそのフラグメントを提供する。

【0006】

上記技術的問題を解決するために、本発明の一態様では、SEQ ID NO: 13, 14, 15, 16, 17及び18に示されるアミノ酸配列、又は、それと比べて1つ、2つ又は3つの保存的置換をしたアミノ酸置換を有するCDRから選ばれる1つ、2つ、3つ、4つ、5つ又は6つを含む抗体又は抗体フラグメントを提供する。

【0007】

ある実施形態において、前記抗体又は抗体フラグメントは、PD-1と結合する。

【0008】

ある実施形態において、前記抗体又は抗体フラグメントは、ヒトPD-1（hPD-1）と結合する。

【0009】

ある実施形態において、前記抗体又は抗体フラグメントは、hPD-L1（ヒトPD-L1）とhPD-1の結合を遮断し、及び／又は、hPD-1／hPD-L1を介した下流シグナル経路を破壊する。

【0010】

ある実施形態において、上記の抗体又は抗体フラグメントでは、SEQ ID NO: 2の73-114位に示されるようにSEQ ID NO: 13のヌクレオチド配列をコード化する。

【0011】

ある実施形態において、上記の何れか1つに記載の抗体又は抗体フラグメントでは、SEQ ID NO: 2の160-177位に示されるようにSEQ ID NO: 14のヌクレオチド配列をコード化する。

【0012】

ある実施形態において、上記の何れか1つに記載の抗体又は抗体フラグメントでは、SEQ ID NO: 2の271-303位に示されるようにSEQ ID NO: 15のヌクレオチド配列をコード化する。

【0013】

ある実施形態において、上記の何れか1つに記載の抗体又は抗体フラグメントでは、SEQ ID NO: 1の91-108位に示されるようにSEQ ID NO: 16のヌクレオチド配列をコード化する。

10

20

30

40

50

【0014】

ある実施形態において、上記の何れか1つに記載の抗体又は抗体フラグメントでは、SEQ ID NO: 1の148-192位に示されるようにSEQ ID NO: 17のヌクレオチド配列をコード化する。

【0015】

ある実施形態において、上記の何れか1つに記載の抗体又は抗体フラグメントでは、SEQ ID NO: 1の292-327位に示されるようにSEQ ID NO: 18のヌクレオチド配列をコード化する。

【0016】

ある実施形態において、上記の何れか1つに記載の抗体又は抗体フラグメントでは、前記抗体又は抗体フラグメントは、SEQ ID NO: 16, 17及び18に示されるアミノ酸配列を有する重鎖CDRから選ばれる1つ、2つ又は3つを含み、及び／又は、

前記抗体又は抗体フラグメントは、SEQ ID NO: 13, 14及び15に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖CDRから選ばれる1つ、2つ又は3つを含む。

【0017】

ある実施形態において、上記の何れか1つに記載の抗体又は抗体フラグメントでは、前記抗体又は抗体フラグメントは、SEQ ID NO: 13, 14及び15に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖CDRと、SEQ ID NO: 16, 17及び18に示されるアミノ酸配列を有する重鎖CDRと、を含む。

【0018】

ある実施形態において、前記抗体又は抗体フラグメントは、単離した抗体又は抗体フラグメントである。

【0019】

ある実施形態において、上記の何れか1つに記載の抗体又は抗体フラグメントでは、前記抗体又は抗体フラグメントは、SEQ ID NO: 7に示されるアミノ酸配列、又は、SEQ ID NO: 7に示されるアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の同一性をもつアミノ酸配列、又は、SEQ ID NO: 7に示されるアミノ酸配列と比べて1つ又は複数の保存的アミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含有する重鎖可変領域、及び／又は、SEQ ID NO: 8に示されるアミノ酸配列、又は、SEQ ID NO: 8に示されるアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、若しくは少なくとも99%の同一性をもつアミノ酸配列、又は、SEQ ID NO: 8に示されるアミノ酸配列と比べて1つ又は複数の保存的アミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含有する軽鎖可変領域を含む。

【0020】

ある実施形態において、上記の何れか1つに記載の抗体又は抗体フラグメントでは、前記抗体又は抗体フラグメントは、SEQ ID NO: 7に示されるアミノ酸配列を含有する重鎖可変領域と、SEQ ID NO: 8に示されるアミノ酸配列を含有する軽鎖可変領域と、を含む。

【0021】

ある実施形態において、上記の何れか1つに記載の抗体又は抗体フラグメントでは、SEQ ID NO: 1に示されるようにSEQ ID NO: 7のヌクレオチド配列をコード化し、SEQ ID NO: 2に示されるようにSEQ ID NO: 8のヌクレオチド配列をコード化する。

【0022】

ある実施形態において、上記の何れか1つに記載の抗体又は抗体フラグメントでは、前記抗体又は抗体フラグメントは、ヒトγ4重鎖定常領域又はその変異体、及び／又はヒトκ軽鎖定常領域又はその変異体をさらに含む。

【0023】

上記技術的問題を解決するために、本発明は、SEQ ID NO: 71に示されるアミノ酸配列、SEQ ID NO: 71に示されるアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性

10

20

30

40

50

をもつアミノ酸配列、又は、SEQ ID NO: 71に示されるアミノ酸配列と比べて1つ又は複数の保存的アミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含む重鎖と、SEQ ID NO: 72に示されるアミノ酸配列、SEQ ID NO: 72に示されるアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性をもつアミノ酸配列、又は、SEQ ID NO: 72に示されるアミノ酸配列と比べて1つ又は複数の保存的アミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含む軽鎖と、を含む抗体又は抗体フラグメントをさらに提供する。

【0024】

ある実施形態において、上記の何れか1つに記載の抗体又は抗体フラグメントでは、前記抗体又は抗体フラグメントは、SEQ ID NO: 71に示される重鎖、及び／又は、SEQ ID NO: 72に示される軽鎖を含む。

【0025】

ある実施形態において、上記の何れか1つに記載の抗体又は抗体フラグメントでは、前記抗体又は抗体フラグメントは、SEQ ID NO: 71に示される重鎖と、SEQ ID NO: 72に示される軽鎖と、を含む。

【0026】

ある実施形態において、上記の何れか1つに記載の抗体又は抗体フラグメントでは、SEQ ID NO: 73に示されるようにSEQ ID NO: 71のヌクレオチド配列をコード化し、SEQ ID NO: 74に示されるようにSEQ ID NO: 72のヌクレオチド配列をコード化する。

【0027】

ある実施形態において、上記の何れか1つに記載の抗体又は抗体フラグメントでは、前記抗体又は抗体フラグメントは、ヒト抗体又はヒト抗体フラグメントである。

【0028】

ある実施形態において、上記の何れか1つに記載の抗体又は抗体フラグメントでは、前記抗体フラグメントは、Fab、Fv又はscFv抗体である。

【0029】

ある実施形態において、上記の何れか1つに記載の抗体又は抗体フラグメントでは、前記抗体又は抗体フラグメントは、モノクローナル抗体（完全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体又は多特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）である。

【0030】

ある実施形態において、上記の何れか1つに記載の抗体又は抗体フラグメントでは、前記変異体は、多くとも20個、多くとも10個、多くとも5個、又は多くとも3個の保存的置換をしたアミノ酸置換を含む。

【0031】

上記技術的問題を解決するために、本発明の他の態様では、1つ、2つ又は、3つの保存的置換をしたアミノ酸置換を含むとともに、前記抗体又は抗体フラグメントと同様の機能をもつ、上記の何れか1つに記載の抗体又は抗体フラグメントの変異体をさらに提供する。

【0032】

上記技術的問題を解決するために、本発明の他の態様では、下記のようなB1)又はB2)である生体材料をさらに提供する：

B1) 上記の何れか1項に記載の抗体又は抗体フラグメント又は変異体をコード化する核酸分子、

(前記核酸分子は、cDNA、ゲノムDNAや組換えDNAのようなDNAであってもよいし、mRNAやhnRNAなどのRNAであってもよい)

B2) B1)に記載の核酸分子を含む発現カセット、組換えベクター、組換え細胞又は組換え微生物。

【0033】

この生体材料は、上述した抗体又は抗体フラグメント又は変異体に関連し、例えば、上述した抗体又は抗体フラグメント又は変異体の生成に適用できる。

10

20

30

40

50

【0034】

ある実施形態において、本発明は、下記の1)又は2)又は3)に示されるものを含む分子を提供する：

1) 下記のような核酸フラグメント：

SEQ ID NO：1の91－108位に示される核酸フラグメント、

SEQ ID NO：1の148－192位に示される核酸フラグメント、

SEQ ID NO：1の292－327位に示される核酸フラグメント、

SEQ ID NO：2の73－114位に示される核酸フラグメント、

SEQ ID NO：2の160－177位に示される核酸フラグメント、

SEQ ID NO：2の271－303位に示される核酸フラグメント、

SEQ ID NO：1に示される核酸フラグメント、

SEQ ID NO：2に示される核酸フラグメント、

SEQ ID NO：73に示される核酸フラグメント、又は

SEQ ID NO：74に示される核酸フラグメント、

2) 1)に限定される核酸フラグメントと交雑し、上記の何れか1項に記載の抗体又は抗体フラグメント又は変異体をコード化する核酸フラグメント、

3) 1)又は2)に限定される核酸フラグメントと90%以上の同一性をもち、上記の何れか1項に記載の抗体又は抗体フラグメント又は変異体をコード化する核酸フラグメント。

【0035】

上記の核酸分子は、上記の生体材料の一部に適用できる。

【0036】

ここで用いられる「同一性」という用語は、肉眼又はコンピュータソフトウェア（例えば、Ausubel et al. eds. (2007)によりCurrent Protocols in Molecular Biologyにおいて記載されているソフトウェアプログラム）により評価することができる。比較対象配列におけるサイトが同じ塩基又はアミノ酸に占められている場合、分子は当該サイトで同一である。2つ又は多数の配列間の同一性は、百分率(%)で示すことができ、それは関連する配列間の同一性の評価に適用できる。ポリヌクレオチド配列又はアミノ酸配列が別の配列と特定の百分率（例えば、90%、95%、98%又は99%）の「配列同一性」を有することは、配列を比較する時に、比較される2つの配列において当該百分率の塩基又はアミノ酸が同じであることを意味する。

【0037】

ある実施形態において、抗PD-1抗体又は抗体フラグメントによる治療は、放射線治療と組み合わせることができる。放射線治療は、がん細胞の死亡を誘導し、免疫細胞を提示して活性化するための腫瘍抗原の有効性を向上させる。

【0038】

他の実施形態において、抗PD-1抗体又は抗体フラグメントによる治療は、治療対象のがん細胞を除去するために、手術と組み合わせることができる。

【0039】

他の実施形態において、抗PD-1抗体又は抗体フラグメントは、PD-1遮断と相乗効果が発生可能な治療法と組み合わせることができ、前記治療法は、ホルモンを取り除く又は血管新生を阻害するための標的薬物、腫瘍細胞において活性を有するタンパク質を標的とする標的薬物を含み、それらは何れも、腫瘍細胞の死亡を増加し、免疫刺激性腫瘍抗原の有効性を向上させる。抗PD-1抗体又は抗体フラグメントと併用する場合に、T細胞活性化作用の向上により、がんへの免疫による制御を長続きさせることができる。

【0040】

ある実施形態において、抗PD-1抗体又は抗体フラグメントは、がん又は感染性疾患を治療するための別の治療用抗体と併用することができる。非制限的な形態として、抗PD-1と、Her2/neuを標的とする、又は、EGF受容体を標的とする抗体との組

10

20

30

40

50

み合わせが提供される。他の非制限的な形態において、抗PD-1抗体又は抗体フラグメントは、VEGF又はその受容体を標的とする治療と組み合わせる。他の実施形態において、抗PD-1抗体又は抗体フラグメントは、抗CTLA-4抗体と組み合わせる。さらなる他の非制限的な形態において、抗PD-1抗体は、RSVを標的とする抗体と組み合わせる。

【0041】

本発明の他の態様では、上記の何れか1つに記載の抗体又は抗体フラグメント又は変異体を調製する方法をさらに提供し、前記方法は、

a. 上記の何れか1つの抗体又は抗体フラグメント又はその変異体をコード化する核酸分子を発現させることができる条件下で、培地において前記核酸分子を含む組換え細胞を培養することにより、前記抗体又は抗体フラグメント又は変異体を調製することを含む。

10

【0042】

ある実施形態において、前記方法は、

b. 前記組換え細胞又は培地から前記抗体又は抗体フラグメント又は変異体を回収することをさらに含む。

【0043】

本発明の他の態様では、下記のような製品の何れか1つの調製における、上記の何れか1項に記載の抗体又は抗体フラグメント又は変異体の応用をさらに提供する：

- (1) PD-1を検出する製品、
- (2) 免疫応答を刺激する又は向上させる製品、
- (3) がんを治療する製品。

20

【0044】

ある実施形態において、PD-1を検出する製品は、hPD-1を検出する製品であり、例えば、特定の細胞、組織又は血清におけるhPD-1の発現をインビトロで検出する製品や、hPD-1をインビボで検出する製品である。

【0045】

ある実施形態において、免疫応答を刺激する又は向上させる製品では、免疫細胞は、抗原及び前記抗体又は抗体フラグメント又は変異体と接触することにより、抗原への免疫応答を刺激する又は向上させる。

【0046】

ある実施形態において、前記免疫応答は、T細胞を介した免疫応答である。

30

【0047】

ある実施形態において、がんを治療する製品では、前記がんは、黒色腫（例えば、悪性転移性黒色腫）、腎臓がん（例えば、明細胞がん）、前立腺がん（例えば、ホルモンで制御し難い前立腺腺がん）、膵臓腺がん、乳がん、結腸がん、肺がん（例えば、非小細胞肺がん）、食道がん、頭頸部扁平上皮がん、肝がん、卵巣がん、子宮頸がん、甲状腺がん、海綿芽細胞腫、神経膠腫、白血病、リンパ腫及び他の悪性腫瘍である。

【0048】

本発明の他の態様において、治療活性成分となる上記の何れか1項に記載の抗体又は抗体フラグメント又は変異体、及び薬学的に許容可能な賦形剤、希釈剤若しくは担体、又はそれらの混合物を含む医薬組成物をさらに提供する。

40

【0049】

本発明の他の態様において、上述したがんのようながんを治療する方法をさらに提供し、当該方法は、それを必要とする個体に有効量の本発明に記載される抗体又は抗体フラグメント又は変異体又は医薬組成物を投与することを含み、前記個体は、（例えば）齧歯目動物、イヌ科の動物、豚、霊長類又は人であってもよい。

【0050】

ある実施形態において、本発明により提供される抗体又は抗体フラグメントは、hPD-1と結合し、以下を含む良い特性が多く示されている。

【0051】

50

1、本発明により提供される抗体又は抗体フラグメントは、hPD-1と高親和的に結合し、免疫応答を調節することができる。具体的に、本発明の抗体又は抗体フラグメントは、約20pM又はそれ以下のKDでhPD-1と結合することができる。

【0052】

2、本発明により提供される抗体又は抗体フラグメントは、約 1.98×10^6 1/Ms又はそれ以上のk結合でhPD-1と結合することができる。

【0053】

3、本発明により提供される抗体又は抗体フラグメントは、約 4.11×10^{-5} 1/s又はそれ以下のk解離でhPD-1と結合することができる。バイオレイヤー光干渉計測法（例えば、ForteBio Octet法）により解離定数を計測してもよいし、表面プラズモン共鳴技術（例えば、Biacore）により解離定数を計測してもよい。

【0054】

4、本発明により提供される抗体又は抗体フラグメントは、約1nM又はそれ以下のIC₅₀でhPD-L1とhPD-1の結合を遮断することもできる。当該分野における任意の既知の方法、例えば、FACS法により、リガンド結合の遮断状況を計測してIC₅₀を算出することができる。

【0055】

5、本発明により提供される抗体又は抗体フラグメントは、hPD-1とhPD-L1の結合を遮断することで、hPD-1/hPD-L1を介した下流シグナル経路を破壊することができる。

〔図面の簡単な説明〕

〔図1〕タンパク質ELISAにおける抗hPD-1抗体と精製されたhPD-1との用量依存的結合のグラフである。

【0056】

〔図2〕バイオレイヤー光干渉計測法（Biolayer Interferometry）により測定されたCL1抗体のk結合とk解離を示すグラフである。そのうち、各曲線は、様々な濃度のCL1抗体とhPD-1との結合の動的過程を表す。

【0057】

〔図3〕フローサイトメトリー法による、CL1抗体のhPD-1/hPD-L1結合への遮断の検出である。

【0058】

〔図4〕PD-1/PD-L1 Blockade Bioassayによる、抗hPD-1抗体の機能活性の検出である。

〔発明を実施するための形態〕

後述する実施例に用いられる実験方法は、特に説明しない限り、何れも従来の方法である。

【0059】

後述する実施例に用いられる材料、試薬などは、特に説明しない限り、何れも商業的供給源から入手することができる。

【0060】

以下、具体的な実施例と合わせて、本発明をさらに説明する。下記の実施例は、本発明の範囲を限定するものではなく、単に本発明を説明するものであると理解すべきである。

〔略語と定義〕

別段の説明がなければ、下記の用語は、後述するような意味をもつべきである。他の用語や略語は、当該分野において広く知られている意味をもつ。

【0061】

「抗体」とは、必要な生物学的活性（例えば、リガンドとその受容体の結合を阻害すること、又は、リガンドの阻害による受容体シグナル伝達）を示す抗体の任意の形態を指す。従って、「抗体」は、その最も広い意味で用いられ、モノクローナル抗体（完全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体と多特異性抗体（例えば、二重特異性抗体

10

20

30

40

50

）、完全ヒト・ヒト化・霊長類化・キメラ抗体、一本鎖抗体などを明らかに含むが、これらに限定されない。

【0062】

「抗体フラグメント」とは、抗体の一部、例えば、 $F(ab')_2$ 、 $F(ab)_2$ 、 Fab' 、 Fab 、 Fv 、 $scFv$ などである。その構造に関係なく、抗体フラグメントは、完全な抗体により認識される同一の抗原と結合する。「抗体フラグメント」という用語は、アプタマー、鏡像異性体及び2価抗体を含む。「抗体フラグメント」という用語は、特定の抗原と結合して複合物を形成して抗体作用を果たす任意の合成された又は遺伝子工学によってなされたタンパク質をさらに含む。

【0063】

「 Fab フラグメント」は、1本の軽鎖と1本の重鎖の $CH1$ 及び可変領域から構成される。 Fab 分子の重鎖は、他の重鎖分子とジスルフィド結合を形成することができない。

【0064】

「 Fc 領域」は、抗体の $CH2$ と $CH3$ 構造ドメインを含む2つの重鎖フラグメントを含有する。2つの重鎖フラグメントは、2つ又は多数のジスルフィド結合により $CH3$ 構造ドメインの疎水作用で一緒にされている。

【0065】

「 Fv 領域」は、重鎖と軽鎖の両方からの可変領域を含むが、定常領域が無い。

【0066】

「単鎖 Fv 抗体」（又は、「 $scFv$ 抗体」）とは、抗体の VH と VL 構造ドメインを含む抗体フラグメントであり、これらの構造ドメインは、単一のポリペプチド鎖に存在する。一般的に、 Fv ポリペプチドは、さらに、 VH と VL 構造ドメインの間にポリペプチドリンカーを含み、このリンカーにより、 $scFv$ は、抗原結合のために必要な構造を形成することができる。 $scFv$ についての概説は、アメリカ特許第6423538号を参照できる。

【0067】

当業者であれば、抗体重鎖の種類は、 γ 、 μ 、 α 、 δ 、 ϵ 又は ϵ （ γ 、 μ 、 α 、 δ 、 ϵ ）を含み、さらに幾つかのサブクラス（例えば、 $\gamma 1-\gamma 4$ ）も含むことが理解される。当該鎖の性質によって、抗体の「種類」は、それぞれ IgG 、 IgM 、 IgA 、 IgD 又は IgE と決定される。例えば、 $IgG1$ 、 $IgG2$ 、 $IgG3$ 、 $IgG4$ 、 $IgG5$ などの免疫グロブリンサブクラス（アイソタイプ）は、既に十分に特徴づけられ、付与された機能特異性も知られている。何れの免疫グロブリンの種類も、本発明の請求範囲に保護されている。ある実施形態において、免疫グロブリン分子の種類は IgG である。 IgG は一般的に、分子量約23,000ダルトンの2本の同じ軽鎖ポリペプチド、及び分子量約53,000-70,000の2本の同じ重鎖ポリペプチドを含む。この4本の鎖は、ジスルフィド結合により「Y」配置で接続され、そのうち軽鎖は「Y」の口部から始め、可変領域を通じ続けて重鎖を取り囲む。 $IgG4$ 形態の抗体は、 IgG のサブクラスであり、その重鎖は $\gamma 4$ サブタイプである。ある実施形態において、本発明に係る抗体は、 $IgG4$ である。

【0068】

「超可変領域」とは、抗原結合を担う抗体アミノ酸残基である。超可変領域は、配列アラインメントで定義された「相補性決定領域」又は「 CDR 」からのアミノ酸残基を含む。「骨格」残基又は「 FR 」残基は、本明細書に定義される超可変領域残基以外の可変構造ドメイン残基である。

【0069】

本発明に係る抗体は、鳥類と哺乳類を含む任意の動物から由来してもよい。好ましくは、抗体は、ヒト、マウス、ロバ、ウサギ、ヤギ、ラクダ、ラマ、ウマ又はニワトリ由来の抗体である。他の実施形態において、可変領域は、軟骨魚綱（*condrictoid*）由来（例えば、サメ由来）であってもよい。「ヒト抗体」は、そのアミノ酸配列が、ヒトによる抗体のアミノ酸配列に対応する抗体、及び／又は、本明細書に示されるヒト抗体

10

20

30

40

50

を調製するための何れかの技術により調製された抗体である。この定義は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を明らかに除外している。

【0070】

「単離した抗体」は、自然環境成分の全て又は一部から分離した抗体である。その自然環境の汚染成分は、酵素、ホルモン及び他のタンパク質溶質又は非タンパク質溶質を含む、前記抗体の診断的又は治療的応用を干渉する物質である。ある実施形態において、前記抗体を以下の程度に精製する：（１）Lowry法により測定されて、重量の95%を超える、例えば、重量の99%を超える抗体、（２）回転カップ型シークエネーターによりN末端又は内部アミノ酸配列の少なくとも15個の残基が得られることに十分な程度、又は（３）還元又は非還元条件でクマシーブルー又は銀染色したSDS-PAGEにより同質と確定されること。単離した抗体は、抗体自然環境における少なくとも1種の成分がなくなるため、組換え細胞内の原サイトの抗体を含む。単離した抗体は、一般的に、少なくとも1つの精製工程で調製される。ある実施形態において、単離した抗体の純度は、少なくとも約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、約99%、又は、これらの数値のうちの何れか2つの値の間の範囲（終点を含む）又はそのうちの任意の値である。

10

【0071】

「核酸」又は「ポリヌクレオチド」とは、アデニン（a）、シトシン（c）、グアニン（g）、チミン（t）（又は、RNAにおけるウラシル（u））という単一のヌクレオチドから構成されるポリマー分子であり、例えば、DNA、RNA又はその修飾である。核酸分子は、天然の核酸分子、又は合成された核酸分子、又は1種若しくは複数の天然の核酸分子と1種若しくは複数の合成された核酸分子との組み合わせであってもよい。核酸の実施例は、遺伝子又は遺伝子フラグメント（例えば、プローブ、プライマ、ESTやSAGEラベル）、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA（mRNA）、転移RNA、リボソームRNA、リボザイム、cDNA、dsRNA、siRNA、miRNA、組換えポリヌクレオチド、分岐したポリヌクレオチド、プラスミド、担体、任意配列の単離したDNA、任意配列の単離したRNA、核酸プローブ及びプライマを含むが、これらに限定されない。

20

【0072】

「単離した核酸分子」は、同定されているとともに、少なくとも1種の汚染性核酸分子から分離した核酸分子である。単離した核酸分子は、その天然に存在する形態や環境とは異なる。従って、単離した核酸分子は、その天然細胞に存在する核酸分子とは違う。しかし、単離した核酸分子は、通常の通り抗体を発現する細胞に含まれる核酸分子を含み、例えば、前記核酸分子の所在する染色体のサイトは、天然細胞の染色体のサイトとは異なる。

30

【0073】

「モノクローナル抗体」とは、基本的に同種の抗体グループから得られた抗体であり、前記グループを構成する各抗体が一致している。モノクローナル抗体は特異性が高く、単一の抗原部位を標的にすることができる。なお、一般的に複数の異なる決定基（エピトープ）に対する複数の異なる抗体を含む従来の（ポリクローナル）抗体調製品とは逆であり、各種のモノクローナル抗体のそれぞれは、抗原における単一の決定基のみを標的にする。

40

【0074】

「免疫細胞」は、造血に繋がり、免疫応答において機能する細胞を含む。免疫細胞は、Bリンパ球とTリンパ球、ナチュラルキラー細胞、単球、マクロファージ、好酸性細胞、マスト細胞、好塩基球及び顆粒球を含む。

【0075】

本明細書に用いられる配列の「変異体」とは、1つ又は複数のアミノ酸残基において、示される配列とは異なっているが、得られる分子の生物学的活性が保持されている配列である。

【0076】

「アミノ酸」とは、 α -アミノ酸のような、アミノ基とカルボキシル基を同時に含む有機

50

化合物であり、そのまま又は前駆体の形式で核酸によりコード化することができる。単一のアミノ酸は、3つのヌクレオチド（いわゆるコドン又は塩基トリプレット）から構成される核酸によりコード化される。同じアミノ酸が異なるコドンによりコード化できることは、「遺伝暗号の縮退」と呼ばれている。アミノ酸は、天然アミノ酸と非天然アミノ酸を含む。天然アミノ酸は、アラニン（3文字コード：a l a、1文字コード：A）、アルギニン（a r g、R）、アスパラギン（a s n、N）、アスパラギン酸（a s p、D）、システイン（c y s、C）、グルタミン（g l n、Q）、グルタミン酸（g l u、E）、グリシン（g l y、G）、ヒスチジン（h i s、H）、イソロイシン（i l e、I）、ロイシン（l e u、L）、リシン（l y s、K）、メチオニン（m e t、M）、フェニルアラニン（p h e、F）、プロリン（p r o、P）、セリン（s e r、S）、トレオニン（t h r、T）、トリプトファン（t r p、W）、チロシン（t y r、Y）及びバリン（v a l、V）を含む。

【0077】

「保存的置換をした変異体」又は「保存的置換をしたアミノ酸置換」とは、当業者に知られているアミノ酸置換であり、このような置換を行ったとしても、通常、得られる分子の生物学的活性は変化しない。一般的に、当業者は、ポリペプチド非必要領域における単一のアミノ酸置換が基本的に生物学的活性を変化させないと認めている。保存的置換は、化学的性質が似ている側鎖を含むアミノ酸で置換してもよく、例えば、1）脂肪族側鎖：グリシン、アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシン、2）脂肪族ヒドロキシ基側鎖：セリンとトレオニン、3）アミドを含む側鎖：アスパラギンとグルタミン、4）芳香族側鎖：フェニルアラニン、チロシン及びトリプトファン、5）アルカリ性側鎖：リシン、アルギニン及びヒスチジン、6）酸性側鎖：アスパラギン酸とグルタミン酸である。

【0078】

本明細書に用いられる「約」という用語とは、数値が当業者により測定される具体値の許容可能な誤差範囲内に存在することであり、前記数値部分は、いかに計測又は測定するか（即ち、計測システムの限度）によって決定される。或いは、「約」は、多くとも±20%の範囲、例えば、±10%、±5%又は±1%の範囲を意味してもよい。別段の説明がなければ、具体値が本願と特許請求の範囲に現れる場合に、「約」の意味は、当該具体値の許容可能な誤差範囲内にあるとすべきである。

【0079】

リガンド／受容体、抗体／抗原又は他の結合対に言及する場合に、「特異的」結合とは、タンパク質及び／又は他の生物試薬の不均一集団において、PD-1のような前記タンパク質があるか否かを決定する結合反応である。従って、所定の条件で、特定のリガンド／抗原は、特定の受容体／抗体と結合しており、顕著な量で試料にある他のタンパク質と結合することはしない。特異的結合は、平衡解離定数（KD）で記載することができ、KDが小さいほど、結合がより緊密であることを意味する。2つの分子が特異的結合であるか否かを決定する方法は、例えば、平衡透析、表面プラズモン共鳴、バイオレイヤー光干渉計測法などを含み、当該分野で周知されるものであるPD-1と「特異的結合」する抗体は、PD-1との平衡解離定数KDが約100 nM以下、約10 nM以下、約5 nM以下、又は約1 nM以下の抗体を含む。

【0080】

本明細書に用いられる「生体材料」という用語は、核酸分子、発現カセット、組換えベクター、組換え細胞又は組換え微生物を含むが、これらに限定されない。

【0081】

「投与」と「治療」で動物、ヒト、実験対象、細胞、組織、器官又は生体液に言及する場合は、外因性薬物、治療剤、診断薬又は組成物を動物、ヒト、被治療者、細胞、組織、器官又は生体液と接触することを指す。「投与」と「治療」は、例えば、治療方法、薬物動態方法、診断方法、研究方法及び実験方法を指してもよい。細胞治療は、試薬を細胞と接触することと、試薬を流動液体と接触することとを含み、ここで、前記流動液体は細胞と接触する。「投与」と「治療」は、例えば、試薬、診断薬、結合組成物により、又は、

10

20

30

40

50

他の細胞により、細胞をインビトロとエキスピボで治療することをさらに意味する。

【0082】

本明細書に用いられる「阻害」又は「治療」(treat又はtreatment)という用語は、疾患に関連する症状の進行を緩和すること、及び／又は、間もなく発生される又は予想される前記疾患の症状の重症度を軽減することを含む。前記用語は、既存の症状を軽減すること、別の症状を防止すること、これらの症状の潜在的原因を軽減又は防止することをさらに含む。従って、前記用語は、有益な結果を、疾患にかかっているヒトなどの脊椎動物対象に既に付与したことを示す。

【0083】

本明細書に用いられる「治療有効量」又は「有効量」という用語とは、抗PD-1抗体又はそのフラグメントを、細胞、組織又は被治療者へ単独で投与する又は他の治療剤と併用投与する時に、治療対象疾患又は病症を効果的に防止又は軽減する量である。治療有効量は、さらに、症状の軽減に十分な前記抗体又はそのフラグメントの量を指し、前記症状を軽減することは、例えば、関連する医学的状态を治療、治癒、防止又は軽減すること、又は、前記病症への治療率、治癒率、防止率又は軽減率を向上させることである。具体的な被治療者への有効量は、例えば、治療対象疾患、患者の全体的な体調、投薬の方法経路と用量、及び副作用の重症度といった種々の要因によって変更することができる。有効量は、明らかな副作用又は毒性作用を回避するための最大用量又は投薬計画であってもよい。個体へ単独で投与される活性成分を投与する場合には、治療有効量は、当該単独の成分を指す。組み合わせて投与する場合には、併用投与、連続投与又は同時投与に関係なく、治療有効量とは、治療効果を生じさせる活性成分の併用量である。治療有効量は、症状を少なくとも10%、一般的に少なくとも20%、好ましくは少なくとも30%、さらに好ましくは少なくとも40%、最も好ましくは少なくとも50%軽減する。ある実施形態において、抗PD-1抗体又はそのフラグメントの有効量は、0.01mg~1gとする。ある実施形態において、抗PD-1抗体又はそのフラグメントの有効量は、10mg~750mgとする。本明細書に記載される抗体は、静脈や皮下注射のような通常の方法経路で投与することができる。

【0084】

モノクローナル抗体

当該分野の知識とスキルによってPD-1に対するモノクローナル抗体を調製することができ、抗体又は抗体フラグメントは、scFv酵母ディスプレイライブラリーから分離することができる。

【0085】

従来の方法によれば、モノクローナル抗体をコード化するDNAを容易に分離してその配列を決定することができる。前記DNAは分離されると、発現担体中に置かれ、そして、組換え宿主細胞においてモノクローナル抗体の合成が達成されるように、当該担体を宿主細胞にトランスフェクトすることができ、前記宿主細胞は、例えば、大腸菌細胞、サルCOS細胞、中国ハムスター卵巣(CHO)細胞や、別途に免疫グロブリンが生成されない骨髓腫細胞がある。抗体の組換え調製については、以下、さらに詳しく説明する。

【0086】

キメラ抗体

抗体DNAは、例えば、ヒト重鎖と軽鎖定常構造ドメインのコード配列で相同性マウス配列を置換することにより、又は、免疫グロブリンをコード化する配列と、非免疫グロブリン物質(例えば、タンパク質構造ドメイン)をコード化する配列の全体又は一部とを共有結合することにより、修飾されることもできる。一般的に、前記非免疫グロブリン物質で抗体の定常構造ドメイン、又は、置換される抗体の1つの抗原結合部位の変換構造ドメインを置換することにより、2価キメラ抗体が生成されるが、前記2価キメラ抗体は、抗原に対して特異性を有する1つの抗原結合部位と、別の抗原に対して特異性を有するもう1つの抗原結合部位を含む。

【0087】

抗体の精製

組換え技術が用いられる場合、抗体は細胞内、ペリプラズム空間に生成され、又は培地に直接分泌されることができる。抗体は細胞内、ペリプラズム空間に生成されると、酢酸ナトリウム (pH 3.5)、EDTA とフッ化フェニルメチルスルホニル (PMSF) の存在下で約 30 分間で細胞をスラリー凍結融解し、遠心分離により細胞破片を除去する。抗体は培地に分泌される場合、まず、市販のタンパク質濃縮フィルタ (例えば、Amicon や Millipore Pellicon 限外ろ過ユニット) により前記発現系からの上清液を濃縮することができる。前記工程の何れにおいても、タンパク質の加水分解を阻害するために、プロテアーゼ阻害剤 (例えば、PMSF) を使用することができ、外部からの汚染物の増殖を防ぐために、抗生物質を使用することができる。

【0088】

例えば、水酸化リン灰石、ゲル電気泳動、透析と親和性クロマトグラフィーにより細胞から抗体組成物を調製することができ、精製技術として、好ましくは親和性クロマトグラフィーである。タンパク質 A が親和性リガンドとして適用されるかは、抗体に存在する免疫グロブリン Fc 領域の種類とアイソタイプによって決まる。タンパク質 A は、ヒト $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 又は $\gamma 4$ 重鎖に基づく抗体 (Lindmark など、1983、J. Immunol. Meth. 62: 1-13) の精製に適用できる。親和性リガンドの依存する基質は、一般的にアガロースであるが、他の基質を利用してもよい。コントロールド・ポア・ガラスやポリ (スチレンジビニルベンゼン) のような機械的に安定な基質は、アガロースと比べると、取得可能な流速がより早く、処理時間がより短い。抗体は CH3 構造ドメインを含む場合、Bakerbond ABXTM 樹脂により精製することができる。回収対象抗体によって、例えば、イオン交換カラムでの分離、エタノール沈殿、逆相 HPLC、アニオン又はカチオン交換樹脂 (例えば、ポリアスパラギン酸カラム) クロマトグラフィー、クロマトグラフィーフォーカシング及び SDS-PAGE のような他のタンパク質精製技術を利用してもよい。

【0089】

本発明の抗体及び抗体フラグメントの治療的応用

PD-1 と特異的に結合する本発明の抗体又は抗原結合フラグメントは、免疫応答の刺激又は向上に適用できる。本発明の抗体及び抗体フラグメントは、特に、T 細胞を介した免疫応答を向上させることにより治療可能な疾患にかかった被治療者の治療に適用できる。ある実施形態において、被治療者は、免疫応答の向上を必要とするヒト患者を含む。

【0090】

ある実施形態において、本発明は、T 細胞を介した免疫応答を向上させることにより疾患を治療する方法をさらに提供する。前記方法は、必要がある患者に、本発明に記載される有効治療量の抗体又は抗原結合フラグメントを投与することを含む。ある実施形態において、上記の T 細胞を介した免疫応答を向上させることにより治療される疾患は、がんである。

【0091】

がん

本発明の抗体又は抗原結合フラグメントは、がんの治療 (即ち、腫瘍細胞の増殖又は生存への阻害) に適用できる。ある実施形態において、本発明の抗体によりその増殖が阻害可能ながんは、一般的に、免疫療法に敏感ながんを含むが、今まで免疫療法とは関わっていないがんも含む。ある実施形態において、がんを治療するための非制限的な形態は、黒色腫 (例えば、悪性転移性黒色腫)、腎臓がん (例えば、明細胞がん)、前立腺がん (例えば、ホルモンで制御し難い前立腺腺がん)、膵臓腺がん、乳がん、結腸がん、肺がん (例えば、非小細胞肺がん)、食道がん、頭頸部扁平上皮がん、肝がん、卵巣がん、子宮頸がん、甲状腺がん、海綿芽細胞腫、神経膠腫、白血病、リンパ腫及びその他の悪性腫瘍を含む。さらに、本発明は、本発明の抗体又は抗原結合フラグメントによりその増殖が阻害可能な難治性又は再発性のがんを含む。

【0092】

本発明の抗体及び抗体フラグメントの非治療的応用

非治療的応用の抗PD-1抗体の商品は既に存在しており、例えば、R & D Systems of Minneapolis, MN, USAにより販売されているMab1086抗hPD-1モノクローナル抗体であり、それはフローサイトメトリー、Western BlotとELISAに適用できる。本発明の抗体は、Mab1086により提供される任意の非治療的目的に適用できる。

【0093】

本発明の抗体は、診断測定に適用でき、例えば、特定の細胞、組織又は血清におけるPD-1の発現を検出することに適用できる。診断的応用のために、一般的に、検出可能な部分で抗体を（直接又は間接的に）マークする。一般的に、ビオチン、蛍光色素、放射性ヌクレオチド、酵素、ヨウ素及び生物合成マーカーに分けられている多くのマーカーは利用可能である。

10

【0094】

本発明の抗体は、さらに、インビボの診断測定に適用できる。免疫シンチグラフィ（immunoscintigraphy）又はポジトロン放出断層撮影により抗原、又は抗体を発現する細胞の位置を特定することができるように、一般的に、放射性核種（例如 ^{111}In 、 ^{99}Tc 、 ^4C 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{18}F ）で抗体をマークする。

【0095】

医薬組成物

本発明は、医薬組成物をさらに提供する。このような組成物は、有効量の抗体又は抗体フラグメント、及び薬学的に許容可能な担体を含む。

20

【0096】

ある実施形態において、「薬学的に許容可能な担体」という用語は、政府の規制機関により承認された、又は他の広く認められている薬局方に挙げられた動物用（特にヒト用）の物質を指す。さらに、「薬学的に許容可能な担体」は、一般的に、任意種類の無毒な固体、半固体又は液体充填剤、希釈剤、封入材料や製剤添加物である。

【0097】

「担体」という用語は、活性成分とともに使用される治療用の希釈剤、補助剤、賦形剤又は担体を指す。このような薬物担体は、滅菌液体であってもよく、例えば、水、及び石油、動植物又は合成由来の油を含む油、例えば、落花生油、大豆油、鉱油、ごま油などである。ある実施形態において、医薬組成物が静脈内に投与される場合に、担体は水であってもよい。生理食塩水溶液とグルコース水溶液とグリセリン溶液は、液体担体として用いられてもよく、特に注射用溶液に用いられる。好適な薬物担体の例は、E. W. MartinのRemington's Pharmaceutical Sciencesにおいて記載されており、ここで引用により本発明に組み込まれる。このような組成物は、臨床有効量の抗体又は抗体フラグメントを、適当な担体と合わせることによって、患者に適する投与形式を提供する。当該製剤は、投与モードに適用すべきである。製剤は、アンプル、使い捨て注射器、又は、ガラスやプラスチックで作製される多量のバイアルにパッケージされてもよい。

30

【0098】

ある実施形態において、従来の工程により、組成物を、ヒトへの静脈内注射に適する医薬組成物に調製する。静脈内投与用の組成物は、一般的に、滅菌などの透水性緩衝液における溶液である。医薬組成物は、さらに可溶化剤と、リドカインのような局所麻酔薬を含んでもよく、これにより、注射部位の痛みが緩和される。一般的に、有効成分は、単位用量の形式で単独で供給され、又は混合して供給され、例えば、乾燥した凍結乾燥粉末又は無水濃縮物の形式で活性剤量を指示可能な密封容器（例えば、アンプル又は小袋）に入れられる。輸液で組成物を投与する場合は、滅菌医療用水又は生理食塩水を含有する点滴ボトルで組成物を分割包装してもよい。注射で組成物を投与する場合は、投与する前に有効成分が混合できるように、注射用の滅菌水又は生理食塩水のアンプルを使用してもよい。

40

【0099】

50

本発明の抗体又は抗体フラグメントは、その塩の形態を含む。薬学的に許容可能な塩は、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などのアニオンと形成される塩から誘導されるもの、及びナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどのカチオンと形成される塩から誘導されるものを含む。

〔試薬又は材料〕

hPD-1は、北京義翹神州科技有限公司の製品であり、カタログ番号が10377-H03H-Bである。

〔0100〕

hIgGは、ジェンスクリプトバイオテック (Genscript Biotech) 10
有限公司の製品であり、カタログ番号がA01006である。

〔0101〕

hPD-1を発現するJurkat細胞は、Promega社の製品であり、カタログ
番号が
J1252である。

〔0102〕

マークされていないhPD-1は、北京義翹神州科技有限公司の製品であり、カタログ
番号が10084-HNAHである。

〔0103〕

PEでマークされたヤギ抗ヒトFcは、ThermoFisher社の製品であり、カ
タログ番号が12-4998-82である。 20

〔0104〕

CHO-K1細胞は、Promega社の製品であり、カタログ番号がJ1252であ
る。

〔0105〕

F-12は、ThermoFisher社の製品であり、カタログ番号が117650
62である。

〔0106〕

Bio-Glo Luciferase Assay Systemは、Promega
社の製品であり、カタログ番号がG7940である。 30

実施例1：抗hPD-1抗体の調製及びその配列決定

まず、ヒトリンパ球mRNAによってヒトVLとVH cDNAを調製し、そして、こ
れによってscFv酵母ディスプレイライブラリーを調製し、このライブラリーをスク
リーニングすることにより、本明細書に係るCL1とCL1関連抗体を分離した。当該分野
では、このようなライブラリーを調製とスクリーニングする方法論が既に知られている。
例えば、Wittropなどのアメリカ特許6423538号のような文献において、抗
体ディスプレイライブラリーの調製とスクリーニングに特に適用される方法と試薬を見つ
けることができる。

〔0107〕

遺伝子配列決定法により、酵母で発現されるscFv可変領域をコード化するDNA配
列を決定した。Seqmanにより、それぞれのクローニングに用いられるそれぞれの配
列決定反応結果を解析した。配列は、配列表に開示されているとともに、表1に挙げられ
ている。 40

〔0108〕

【表 1】

表1 本発明の抗hPD-1抗体のDNA又はアミノ酸配列

SEQ ID NO:	説明	配列
1	CL1重鎖 可変領域(DNA)	cagggtgcagctgggtgcagtcggcggtggaggtgaagaagcctggcgccagcgtaaggtgt cctgtaaggccagcgggtacaccttcaccaattactatatgtattgggtgcggcaggccccgg ccagggtgactggagtggtgggagggcatcaatcccagcaacggcgccaccaactcaatgag aagttaagaaccgggtgacctgaccaccgatagcagcaccaccaccgttacatggagctg aagagcctgcagttgacgataccgtgtgtactattgcgtgcccgggatcaggctggacatg ggcttcgagttctggggccagggcaccaccgtgaccgtgtccagc
2	CL1軽鎖 可変領域(DNA)	gagatcgtgctgaccagtcctcccgctaccctgagcctgtccccggagagcgggtaccct gtcttgcgggctccaaggcggtgagcaccagcgggatactcctatctgcactggtaccagca gaagccccggcaggctcccagggtgctgatctacctggcttctacctggagagcggcggtgc ccgctaggtttagcggcagcggcagcggaaccgatttcacctgacctcagctccctggagc ccgaggattttgccgtgtactactgccagcacgttacgacctgccctgacctttggcggcgg caccaagggtggagatcaag
3	CL5重鎖 可変領域(DNA)	caagttcaattagtcctaaagtgtgtcgaagtaaagaagccagggtgcctcagtcctcaagtgcgtt gtaaagcctcaggttatacttatacaactactacatgtactgggttagacaagccccagggtcaa ggtttggaatggatgggtggtatcaatccttcaaacgggtggcaccacttcaacgaaaagtcaa gaacagagtaactttgactacagattcttcaaccactacagcatacatggaattgaaatcttataca ttcgatgacacagctgtttactactgtgcagcgcgtgattacagattcgacatgggtttcgaatact gggtgcaagggtaccactgttactgtctcctct
4	CL5軽鎖 可変領域(DNA)	gaaattgtctgactcaatctccagctacattgtccttaagtctggtgaaagagccacattgtcat gcagagcttccaagggtgtatctacctcaggttactcttacttcattggtatcaacaaaagccag gtcaagcacctagattgttgatctacttgccagttacttggaatctggtgtccagtagattttcc ggtagtgggtctggtactgacttcacattgaccatatcttcattagaacctgaagatttcgagctca ttactgccaacattcttatgaccttccacttacattcgagggtggtacaaaggtagaaataaaa
5	CL9重鎖 可変領域(DNA)	caagttcaattagtcctaaagtgtgtcgaagtaaagaagccagggtgcctcagtcctcaagtgcgtt gtaaagcctcaggttatacttatacaactactacatgtactgggttagacaagccccagggtcaa ggtttggaatggatgggtggtatcaatccttcaaacgggtggcaccacttcaacgaaaagtcaa gaacagagtaactttgactacagattcttcaaccactacagcatacatggaattgaaatcttataca ttcgatgacacagctgtttactactgtgcagcacgtgattacaaattcgacatgggtttcgaattct

10

20

30

40

50

SEQ ID NO:	説明	配列
		ggggtcaaggtaccactgttactgtctcctct
6	CL9軽鎖 可変領域(DNA)	gaaattgtcttgactcaatctccagctacattgtccttaagtcctgggtgaaagagccacattgtcat gcagagcttccaaaggttatctacctcaggttactcttacttgcattgggtatcaacaaaagccag gtcaagcacctagattgttgatctacttgccagttacttggaaatctgggtgtccagctagattttcc ggtagtgggtctgttactgacttcacattgaccatatcttcattagaacctgaagattcgcagtcta ttattgccaacattcctatggccttcagttacattcgggtgggtggtacaaaggtagaaataaaa
7	CL1重鎖 可変領域(AA)	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYYMYWVRQ APGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTDSSTTTAY MELKSLQFDDTAVYYCAARDYRLDMGFEEFWGQGTTVTVSS
8	CL1軽鎖 可変領域(AA)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQ KPGQAPRLLIYLAstyleSGVparfsgsgsgtdftltisslepe DFAVYYCQHAYDLPLTFGGGTKVEIK
9	CL5重鎖 可変領域(AA)	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYYMYWVRQ APGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTDSSTTTAY MELKSLQFDDTAVYYCAARDYRFDMGFEYWGQGTTVTVSS
10	CL5軽鎖 可変領域(AA)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQ KPGQAPRLLIYLAstyleSGVparfsgsgsgtdftltisslepe DFAVYYCQHSYDLPLTFGGGTKVEIK
11	CL9重鎖 可変領域(AA)	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYYMYWVRQ APGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTDSSTTTAY MELKSLQFDDTAVYYCAARDYKFDMGFEFWGQGTTVTVSS
12	CL9軽鎖 可変領域(AA)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQ KPGQAPRLLIYLAstyleSGVparfsgsgsgtdftltisslepe DFAVYYCQHSYGLPVTFGGGTKVEIK
13	CL1軽鎖 CDR1 (AA)	ASKGVSTSGYSYLH
14	CL1軽鎖 CDR2 (AA)	LASYLE

10

20

30

40

50

SEQ ID NO:	説明	配列
15	CL1軽鎖 CDR3 (AA)	YCQHAYDLPLT
16	CL1重鎖 CDR1 (AA)	NYYMYW
17	CL1重鎖 CDR2 (AA)	GINPSNGGTNFNEKF
18	CL1重鎖 CDR3 (AA)	ARDYRLDMGFEF
19	CL5軽鎖 CDR1 (AA)	ASKGVSTSGYSYLH
20	CL5軽鎖 CDR2 (AA)	LASYLE
21	CL5軽鎖 CDR3 (AA)	YCQHSYDLPLT
22	CL5重鎖 CDR1 (AA)	NYYMYW
23	CL5重鎖 CDR2 (AA)	GINPSNGGTNFNEKF
24	CL5重鎖 CDR3 (AA)	ARDYRFDMGFEY

10

20

30

40

50

SEQ ID NO:	説明	配列
25	CL9軽鎖 CDR1 (AA)	ASKGVSTSGYSYLH
26	CL9軽鎖 CDR2 (AA)	LASYLE
27	CL9軽鎖 CDR3 (AA)	YCQHSYGLPVT
28	CL9重鎖 CDR1 (AA)	NYMYW
29	CL9重鎖 CDR2 (AA)	GINPSNGGTNFNEKF
30	CL9重鎖 CDR3 (AA)	ARDYKFDMGFEF
31	CL2重鎖 可変領域(DNA)	caagttcaattagtcctcaagtggtgtcgaagtaagaagccaggtgcctcagtcctcaagtcagtt gtaaagcctcaggtatatacattacaaactactacatgtactgggttagacaagccccaggtcaa ggtttggaatggatgggtgtatcaatcctcaaacgggtggcaccacttcaacgaaaagttcaa gaacagagtaactttgactacagattcttcaaccactacagcatacatggaattgaaatctttacaa ttcgatgacacagctgtttactactgtgcagcccggtattacaattcgacatgggtttcagttact gggtgcaaggtaccactgttactgtctcctct
32	CL2軽鎖 可変領域(DNA)	gaaattgtcttgactcaatctcagctacattgtccttaagtcctgggtgaaagagccacattgtcat gcagagcttcaaaggtgtatctacctcaggttactcttacttgcatgggtatcaacaaaagccag gtcaagcacctagattgtgatctacttgccagttacttggaatctggtgtccagctagattttcc ggtagtgggtctggtactgacttcacattgacatatcttcattagaacctgaagatttcgcagctta ttattgccaacattcctatgggtctccacttacattcgggtgggtgacaaaggtagaataaaaa
33	CL7重鎖	caagttcaattagtcctcaagtggtgtcgaagtaagaagccaggtgcctcagtcctcaagtcagtt

10

20

30

40

50

SEQ ID NO:	説明	配列
	可変領域(DNA)	gtaaagcctcaggttatacatttacaactactacatgtactgggttagacaagccccaggtcaa ggtttggaatggatgggtggtatcaatccttcaaacgggtggcaccaactcaacgaaaagttcaa gaacagagtaactttgactacagattcttcaaccactacagcatacatggaattgaaatctttacaa ttcgatgacacagctgtttactactgtgcagcccgtgattaccgattcgacatgggtttcagtttt ggggtcaaggtaggactgttactgtctcctct
34	CL7軽鎖 可変領域(DNA)	gaaattgtcttgactcaatctccagctacattgtccttaagtcctgggtgaaagagccacattgtcat gcagagcttcaaagggtgatctacctcaggttactcttactgcattggtatcaaaaaagccag gtcaagcacctagattgttgatctacttggccagtacttgaatctggtgtccagctagattttcc ggtagtgggtctggtactgacttcacattgaccatacttcattagaacctgaagatttcgagctcta ttattgccaaattcctatagtttccactcacattcggtggtgtacaaaggtagaaataaaa
35	CL6重鎖 可変領域(DNA)	caagttcaattagtccaaagtggtgtcgaagtaaagaagccaggtgcctcagtcaaagtcagtt gtaaagcctcaggttatacatttacaactactacatgtactgggttacacaagccccaggtcaa ggtttggaatggatgggtggtatcaatccttcaaacgggtggcaccaactcaacgaaaagttcaa gaacagagtaactttgactacagattcttcaaccactacagcatacatggaattgaaatctttacaa ttcgatgacacagctgtttactactgtgcagcccgtgattacagatttgacatgggtttcagttct ggggtcaaggtaggactgttactgtctcctct
36	CL6軽鎖 可変領域(DNA)	gaaattgtcttgactcaatctccagctacattgtccttaagtcctgggtgaaagagccacattgtcat gcagagcttcaaagggtgatctacctcaggttactcttactgcattggtatcaaaaaagccag gtcaagcacctagattgttgatctacttggccagtacttgaatctggtgtccagctagatgttc cggtagtgggtctggtactgacttcacattgaccatacttcattagaacctgaagatgtcgcagtc tattattgccaaattcctatgaccttccacttacattcggtggtgtacaaaggtagagataaaa
37	CL2重鎖 可変領域(AA)	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYYMYWVRQ APGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVLTITDSSTTTAY MELKSLQFDDTAVYYCAARDYKFDMGFEYWGQGTITVTS S
38	CL2軽鎖 可変領域(AA)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQ KPGQAPRLLIYLAstyleSGVparfsgsgsgtdftltisslepe DFAVYYCQHSYGLPLTFGGGTKVEIK
39	CL7重鎖 可変領域(AA)	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYYMYWVRQ APGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVLTITDSSTTTAY

10

20

30

40

50

SEQ ID NO:	説明	配列
	AA)	MELKSLQFDDTAVYYCAARDYRFDMGFEFWGQTTTVTVSS
40	CL7軽鎖 可変領域(AA)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQ KPGQAPRLLIYLAstyleSGVparfsgsgsgtdftltisslepe DFAVYYCQHSYSFPLTFGGGTKVEIK
41	CL6重鎖 可変領域(AA)	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMYWVRQ APGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTDSSTTTAY MELKSLQFDDTAVYYCAARDYRFDMGFEFWGQTTTVTVSS
42	CL6軽鎖 可変領域(AA)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQ KPGQAPRLLIYLAstyleSGVparfsgsgsgtdftltisslepe DFAVYYCQHSYDLPLTFGGGTKVEIK
43	CL2軽鎖 CDR1 (AA)	ASKGVSTSGYSYLH
44	CL2軽鎖 CDR2 (AA)	LASYLE
45	CL2軽鎖 CDR3 (AA)	YCQHSYGLPLT
46	CL2重鎖 CDR1 (AA)	NYYMYW
47	CL2重鎖 CDR2 (AA)	GINPSNGGTNFNEKF
48	CL2重鎖 CDR3 (AA)	ARDYKFDMGFEY
49	CL7軽鎖 CDR1	ASKGVSTSGYSYLH

10

20

30

40

50

SEQ ID NO:	説明	配列
	(AA)	
50	CL7軽鎖 CDR2 (AA)	LASYLE
51	CL7軽鎖 CDR3 (AA)	YCQHSYSFPLT
52	CL7重鎖 CDR1 (AA)	NYMYW
53	CL7重鎖 CDR2 (AA)	GINPSNGGTNFNEKF
54	CL7重鎖 CDR3 (AA)	ARDYRFDMGFEF
55	CL6軽鎖 CDR1 (AA)	ASKGVSTSGYSYLH
56	CL6軽鎖 CDR2 (AA)	LASYLE
57	CL6軽鎖 CDR3 (AA)	YCQHSYDLPLT
58	CL6重鎖 CDR1 (AA)	NYMYW
59	CL6重鎖 CDR2	GINPSNGGTNFNEKF

10

20

30

40

50

SEQ ID NO:	説明	配列
	(AA)	
60	CL6重鎖 CDR3 (AA)	ARDYRFDMGFEF
61	CL20重鎖 可変領域(DNA)	cagggtgcagctgggtcagtcaggggtggaggtcaaaagcccggtgcctcagtc aaagtgtc ttgtaaagcctctggatatacatttactactatatagtactgggtgaggcaggcaccaggaca gggtctggagtgatgggcggaatcaaccctctaattgggggtaccaactcaacgaaaagttt aaaaaccgggtgacactgaccacagattccagcactaccacagcctatatggagctgaagtcc ctgcagttcgacgatacagcagtgactattgcgcaggcgggactacagattcgatatgggct ttgactattggggccagggaactaccgtcaccgtgtctagt
62	CL20軽鎖 可変領域(DNA)	gaaattgtgctgacccagagcccgccactctgtctctgagtcaggagagaggccaccctg tcatgccgagcttccaaggcggtgtccacctccggctacagtattctgcactggtaccagcaga aaccgggacaggcacctagactgctgatctacctggccagctatctggaatctggcgtgccag ctaggttcagcggctctggaagtgggaccgactttaccctgacaattccagcctggagcccga agatttcgagcttactattgccagcattctctgacctgccctgacattcggcggtggaacaa aagtggaaatcaag
63	CL20重鎖 可変領域(AA)	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYYMYWVRQ APGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTDSSTTTAY MELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGTTVTVS S
64	CL20軽鎖 可変領域(AA)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQ KPGQAPRLLIYLAstyleSGVparfsgsgsgtdftltisslepe DFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEIK
65	CL20軽鎖 CDR1 (AA)	RASKGVSTSGYSYLH
66	CL20軽鎖 CDR2 (AA)	LASYLEs
67	CL20軽鎖	QHSRDLPLT

10

20

30

40

SEQ ID NO:	説明	配列
	CDR3 (AA)	
68	CL20重鎖 CDR1 (AA)	NYMY
69	CL20重鎖 CDR2 (AA)	GINPSNGGTNFNEKFKN
70	CL20重鎖 CDR3 (AA)	RDYRFDMGFDY
71	CL1重鎖 完全長 (AA)	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYYMYWVRQ APGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTDSSTTTAY MELKSLQFDDTAVYYCAARDYRLDMGFEFWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTC NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSR LTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK
72	CL1軽鎖 完全長 (AA)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQ KPGQAPRLLIYLAstyleSGVPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPE DFAVYYCQHAYDLPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
73	CL1重鎖 完全長	caggtgcagctggtgcagtcggtgagggtgaagaagcctggcgccagcgtgaaggtgt cctgtaaggccagcggtacaccttcaccaattactatatgtattgggtgcggcaggccccgg

10

20

30

40

50

SEQ ID NO:	説明	配列
	(DNA)	ccagggactggagtgatggaggcatcaatcccagcaacggcggcaccaacttaatgag aagtttaagaaccgggtgacctgaccaccgatagcagcaccaccaccgcttacatggagctg aagagcctgcagtttgacgataccgctgtgtactattgcgctcccgggattacaggctggaca tgggcttcgagttctggggccagggcaccaccgtgacctgtccagcgctagcaccaagggc ccttcggtgtccccctggccccctgtagccgggtccacctctgagagcaccgctgctctgggct gtctgggtgaaggattactttcccgaaccgggtgacctgtcatggaactccgggctctgacatc cgggtgtccacactttctcgcagtgctgcagtcacccggcctgtacagcctgagctctgtgtgca cagtcaccaagttcatccctgggaaccaagacatatactgcaacgtggatcataaaccagcaa tactaaggctcacaacagagtgaggtaagtacggaccacctgtcccacctgtccagcacct gagttcctgggaggaccaagcgtgttctgtttcctccaaagcctaaagataccctgatgatcag tcggactcccagggtcacctgcgtgtgtgacgtgtccaggaggacctgaagtccagtt caactggtagctggacggcgtcgaagtgcacaatgctaagacaaaacctcgagaggaaactg ttaactccacataccgtgtcgtgagcgtcctgactgtgctgcatcaggattggctgaacggcaag gagtataagtgcaaaagtgaagcaataagggaactgccaagctctatcgagaaaactatttctaagg ctaaaggacagcctaggggaaccacaggtgtacacctgccccctagtcaggaggaaatgact aagaaccagggtctcactgacctgtctgtgaaagggttctatcctcagatattgcagtgagggtg ggaaatccaatggtagccagagaacaattacaagacaactccacctgctggagacgcgatg ggctttctttctgtattctagactgacctggacaaaagtcgctggcaggagggtaatgtctttct tgtagtgtgatgcacgaagccctgcacaaccactacactcagaaaagcctgtcactgtccctgg gtaaa
74	CL1軽鎖 完全長 (DNA)	gagatcgtgctgaccagtcctcccgctaccctgagcctgtccccggagagcgggctaccct gtcttgcggcctccaaggcgtgagcaccagcggatactctatctgcactggtaccagca gaagcccggccaggtcccaggctgctgatctacctggcttctacctggagagcggcgtgc ccgctaggtttagcggcagcggcagcgggaaccgatttcacctgacatcagctccctggagc ccgaggattttgccgtgtactactgccagcacgttacgacctgccccgacctttggcgccgg caccaagggtggagatcaagcgtacgggtggctgcacctctgtcttcatcttcccgcactgtatg agcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggcca aagtacagtggagggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgctcacagag caggacagcaaggacagcacctacgcctcagcagcacctgacgctgagcaaaagcagact acgagaacacaaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctgccccgtcaca

SEQ ID NO:	説明	配列
		aagagcttcaacaggggagagtggt

注:表中の括弧におけるDNAは、ヌクレオチドであり、AAはアミノ酸である。

【0109】

SEQ ID NO: 2の73-114位に示されるようにSEQ ID NO: 13のヌクレオチド配列をコード化する。

10

20

30

40

50

【0110】

SEQ ID NO: 2の160-177位に示されるようにSEQ ID NO: 14のヌクレオチド配列をコード化する。

【0111】

SEQ ID NO: 2の271-303位に示されるようにSEQ ID NO: 15のヌクレオチド配列をコード化する。

【0112】

SEQ ID NO: 1の91-108位に示されるようにSEQ ID NO: 16のヌクレオチド配列をコード化する。

【0113】

SEQ ID NO: 1の148-192位に示されるようにSEQ ID NO: 17のヌクレオチド配列をコード化する。

【0114】

SEQ ID NO: 1の292-327位に示されるようにSEQ ID NO: 18のヌクレオチド配列をコード化する。

【0115】

実施例2: CL1抗体及び関連抗体の作製と発現

PCRクローニングしたCL1抗体のVLとVH領域DNAを、それぞれヒトκ軽鎖定常領域とIgG4定常領域(γ4重鎖定常領域)に接続することにより、軽鎖と重鎖DNA配列を作製した。各鎖に適当なリーダー配列が増加されるように設計されたPCRプライマで、配列の5'と3'端を修飾し、そして、既存の組換え抗体の発現担体にクローニングし、配列解析により、担体の正確な作製を明らかにした。40 μgの発現プラスミドを、700 μLの総細胞数 10^7 のCHOと均一に混合し、0.4 cmのエレクトロポレーションカップに入れて、エレクトロポレーターに置き、エレクトロポレーションパラメータ(電圧300 V、電気パルス時間17 ms、方形波)を設定してエレクトロポレーションを完了させた。エレクトロポレーションを完了させた後、8 mLの増殖培地においてこれらの細胞を3日間培養した。ELISAにより、上清液をトランスフェクトした抗体濃度を計測し、発現が高くて細胞増殖の状況が良い工学的細胞株を最終的に決定した。

【0116】

細胞は、振とうフラスコでCD-CHO (Gibco)において12日間増殖した。タンパク質A親和性クロマトグラフィーを行い、洗浄し、1 Mの酢酸で溶離して3 M Trisで中和することにより、細胞上清液における抗体を精製した。最後に、緩衝液を、1 M TrisでpH 5.5に調整した100 mMの酢酸に変更し、CL1抗体を得た。

【0117】

CL5、CL9、CL2、CL7、CL6及びCL20の作製と発現は、同様に、上記と類似する方法を採用した。

【0118】

精製して得られたCL1、CL5、CL9、CL2、CL7、CL6及びCL20抗体のアミノ酸配列は、所期通りである。

【0119】

実施例3: 抗hPD-1抗体のhPD-1との親和力の解析

酵素結合免疫吸着測定(ELISA)は、抗体とhPD-1の結合を測定することに用いられた。4℃で一晩インキュベートすることで、hPD-1を96ウェルプレートに固定した。被覆した後、PBSTでプレートを5回洗った。PBSTにより抗体CL1、CL5、CL9、CL2、CL7、CL6、CL20及びhIgGの異なる濃度の希釈液を調製し、それを固定されたhPD-1とともに室温で1時間インキュベートした。結合した後、

PBSTでプレートを5回洗い、室温で、1/10000まで希釈したペルオキシダーゼ(HRP)でマークしたヤギ抗マウスIgGを含むPBSTにより1時間インキュベートし、再び洗浄し、TMBで発色させた。

10

20

30

40

50

【0120】

ELISAの結果は、図1の通りである。半最大有効濃度 (EC_{50}) で結合親和力を表し、結果を表2に示す。

【0121】

実験結果から明らかなように、抗hPD-1抗体CL1、CL5、CL9、CL2、CL7、CL6及びCL20は、何れもhPD-1と結合しており、そのうち、CL1のhPD-1と結合した EC_{50} は約0.208nMであり、親和力が最も強く、CL5、CL9、CL2、CL7、CL6及びCL20より明らかに優れている。

10

【0122】

実施例4：抗体CL1のhPD-1と結合する動力的解析

抗体の結合特性をさらに特徴づけるために、Octetシステム (FortéBio, メンローパーク, カリフォルニア州) においてバイオレイヤー光干渉計測法により抗体CL1の概況を解析することで、結合動力学を明らかにして平衡結合定数を算出した。この測定は、ビオチンでhPD-1融合タンパク質をストレプトアビジンバイオセンサとカップリングすることによって実施された。

【0123】

hPD-1をストレプトアビジンバイオセンサの基質に固定するために、hPD-1をビオチン化しなければならない。まず、1.0mgのビオチンを100 μ Lのジメチルスルホキシドに溶解することで、10mg/mLのビオチン溶液を調製し、そして、1ミリリットルのhPD-1 (1.8mg/mL) ごとに10 μ Lのビオチン溶液を加え、反応物を軽く攪拌し、暗所において室温で2時間保温し、hPD-1-ビオチンを得た。25mLの冷たいPBSにより、Sephadex G-25M (Pharmacia、カタログ番号17-0851-01) を入れたPD-10カラムを平衡し、そして、カラムごとに2mLのhPD-1-ビオチンをロードした。10 $\times$ 1mLの冷たいPBSを用いてこのカラムから溶離した。溶離液を収集し、OD280で数値を読み、精製されたhPD-1-ビオチンを得て、使用されるまでそれを-80 $^{\circ}$ Cで貯蔵した。

20

【0124】

ストレプトアビジンバイオセンサを、予備湿潤されるように、PBSを含有したウェルに10分間浸入し、そしてPBSでバイオセンサを2分間平衡し、バイオセンサを20 μ g/mLのhPD-1-ビオチンのPBS溶液に5分間浸入することにより、hPD-1-ビオチンとカップリングし、PBSでバイオセンサを2分間平衡した。バイオセンサを、様々な濃度の抗体 (0.125-2nM、SDS-PAGE純度>99%の抗体) を含有するウェルに置いて抗PD-1抗体との結合状況を観察し、30分間監視計測した。バイオセンサをPBSに転移した後、解離を計測し、90分間監視計測した。全ての試験濃度を含む1:1の結合球形フィットモデル (binding global fit model) により、観察された結合と解離速度 ($k_{\text{結合}}$ と $k_{\text{解離}}$) をフィッティングし、平衡結合定数KDを算出した。

30

【0125】

動力的研究の結果は、表2及び図2に示されている。

40

【0126】

実験結果から明らかなように、CL1抗体のhPD-1と結合したKDは、約0.0207nMであり、親和力がこれほど強いのは、結合速度が普通の抗体より遥かに高く、解離速度が遅いからである。

【0127】

実施例5：抗体CL1のhPD-1/hPD-L1結合への遮断の研究

フローサイトメトリーにより、リガンド結合への遮断を研究する。hPD-1を発現するJurkat細胞を96ウェルプレートに敷き、様々な濃度の抗体 (CL1又はhIgG (陰性対照として)) 及び濃度1 μ g/mLのマークされていないhPD-L1を加え

50

た。混合物を氷上に30分間置き、FACS緩衝液（0.3%BSAを含むPBS）で3回洗浄し、PEでマークしたヤギ抗ヒトFcを氷上においてさらに30分間インキュベートした。FACS緩衝液で再び細胞を3回洗浄し、フローサイトメーターにより解析した。Prismソフトウェアの非線形回帰法によりデータを解析してIC₅₀値を算出した。結果は、表2及び図3を参照する。

【0128】

実験結果から明らかなように、抗PD-1抗体CL1は、用量依存性によりhPD-1とJurkat細胞のhPD-1との結合を完全に阻害することができ、IC₅₀値は約0.77nMである。

【0129】

【表2】

表2 抗hPD-1抗体の親和力、動力学、リガンド結合遮断と機能活性

	CL1	CL5	CL9	CL2	CL7	CL6	CL20
ELISA親和力の解析 EC ₅₀ (nM)	0.208	0.399	0.594	0.451	0.346	1.336	0.242
ForteBio動力的解析 k _{結合} (1/Ms) k _{解離} (1/s) KD(nM)	1.98×10 ⁶ 4.11×10 ⁻⁵ 0.0207	NA	NA	NA	NA	NA	NA
リガンド結合遮断の研究 IC ₅₀ (nM)	0.77	NA	NA	NA	NA	NA	NA
機能活性の解析 EC ₅₀ (μg/ml)	0.269	0.932	NA	NA	NA	NA	NA

NA:関連実験が行われておらず、そのデータが無い。

【0130】

実施例6：CL1関連抗体の動力的解析

実施例4に記載されるように、バイオレイヤー光干渉計測法により、CL1抗体に関連する一連の抗体を解析した。関連抗体のVLとVH領域のアミノ酸配列は、配列表を参照する。各関連抗体の平衡結合定数KDは、表3に示されている。

【0131】

10

20

30

40

50

【表 3】

表3 CL1関連抗体のhPD-1との結合

VH	VL	形式	KD (nM)
CL1 VH (SEQ ID NO:7)	CL1 VL (SEQ ID NO:8)	IgG4	0.0207
)	)		
CL1 VH (SEQ ID NO:7)	CL1 VL (SEQ ID NO:8)	scFv	0.082
)	)		
CL1 VH (SEQ ID NO:7)	CL5 VL (SEQ ID NO:10)	IgG4	0.076
)	)		
CL1 VH (SEQ ID NO:7)	CL5 VL (SEQ ID NO:10)	scFv	0.143
)	)		
CL1 VH (SEQ ID NO:7)	CL9 VL (SEQ ID NO:12)	IgG4	0.229
)	)		
CL1 VH (SEQ ID NO:7)	CL9 VL (SEQ ID NO:12)	scFv	0.518
)	)		
CL1 VH (SEQ ID NO:7)	CL2 VL (SEQ ID NO:38)	IgG4	0.189
)	)		
CL1 VH (SEQ ID NO:7)	CL2 VL (SEQ ID NO:38)	scFv	0.447
)	)		
CL1 VH (SEQ ID NO:7)	CL7 VL (SEQ ID NO:40)	IgG4	0.061
)	)		
CL1 VH (SEQ ID NO:7)	CL7 VL (SEQ ID NO:40)	scFv	0.149
)	)		

【0132】

表3中の結果から明らかなように、同じVHとVLである場合に、scFv形式の抗体のhPD-1との親和力はIgG4形式の抗体の親和力よりも低い。同じ抗体形式である場合に、即ち、何れもIgG4又はscFvである場合に、抗体CL1のVHアミノ酸配列をそのままにするが、抗体CL1のVLを置換（抗体CL5のVL、抗体CL9のVL、抗体CL2のVL又は抗体CL7のVLに置換）した後、親和力は何れも低減され、しかもCL9のVLに置換した後、親和力が最も多く低減された。抗体CL1のVLは、CL1とhPD-1の結合において重要な役割を果たしており、アミノ酸配列が変更されると、配座が変更され、hPD-1との結合が影響される可能性があることが明らかになる。

【0133】

実施例7：抗hPD-1抗体の機能活性の解析

抗hPD-1抗体の機能活性を検出するために、当該抗体のhPD-1活性への阻害能力のインビトロ検出が行われた。

【0134】

抗hPD-1抗体は、hPD-1/hPD-L1の相互作用を遮断し、Jurkat細胞の

TCR下流免疫シグナル経路を活性化する。

【0135】

レポーター遺伝子は、その発現産物が非常に検出され易い遺伝子であり、そのコード配列と遺伝子発現調節配列とを融合してキメラ遺伝子を形成し、調節配列の制御下において発現することにより、その発現産物の検出によって上流シグナルが間接的に検出される。PD-1/PD-L1 Blockade Bioassayシステムは、抗hPD-1モノクローナル抗体の生物学的活性検出に適用される。その主な原理としては、CHO-K1細胞株の細胞膜において安定的に発現したPD-L1とT細胞受容体活性化タンパク質(TCR activator)、模擬抗原提示細胞(APCs)が作製されており、Jurkatは、細胞膜にPD-1発現があり、NFATをプロモータとするLuciferaseレポーター遺伝子担体がトランスフェクトされているヒトTリンパ球系である。2種の細胞がともにインキュベートされる場合、CHO-K1細胞のTCR activatorはJurkat細胞表面TCRと結合し、下流シグナル経路を誘導し、レポーター遺伝子の発現を最終的に活性化するが、同時にPD-1/PD-L1の相互作用はこのような活性化作用を遮断することになり、抗PD-1モノクローナル抗体を加えた後、PD-1/PD-L1の相互作用は遮断され、Luciferaseレポーター遺伝子の発現は回復され、蛍光シグナルが発生され、シグナル値と加えられた抗PD-1モノクローナル抗体量とは、正の相関関係になる。

【0136】

後述するように、抗体と前記細胞をともにインキュベートすることにより、抗hPD-1抗体を検出・評価した。CHO-K1細胞は、F-12+10%FBS培地(200µg/mlのHygromycin B、250µg/mlのG418を含む)で再懸濁し、細胞密度を 4.0×10^5 細胞/mlに調整し、ウェルごとに100µlで96ウェル細胞プレートに接種し、96ウェルプレートを37℃、5%CO₂のインキュベータに置いて一晚培養した。125µlの抗体(CL1、CL5とhIgG)を含む96ウェルマイクロタイタープレートを検出希釈液(1%ウシ胎児血清(FBS)を含むRPMI培地)によりこのプレートに沿って3つに分けて2.5倍連続希釈した。Jurkat細胞は、検出希釈液で再懸濁し、細胞密度を 1.25×10^6 細胞/mlに調整した。96ウェルプレートを取り出し、培地を廃棄した後、40µlの調製された対照品(hIgG)及び検出対象試料(CL1、CL5)を96ウェルプレートに加えて、40µlのJurkat細胞を96ウェルプレートに加えた。96ウェルプレートを37℃、5%CO₂のインキュベータに6h置いた後、室温で10min置いてから、ウェルごとに80µlのBio-Glo Luciferase Assay System試薬を加え、室温で光を避けて30min置いた。多機能マイクロプレートリーダーにおける自己蛍光検出機能により、96ウェルプレートの各ウェルの蛍光値を読み出した。SoftMax Pro 6.5.1ソフトウェアにより、4-parameterモデルで対照品及び検出対象試料のデータを曲線フィッティングし、標準方法によりEC₅₀を決定した。結果は、表2及び図4に示されている。

【0137】

表2及び図4の結果から明らかなように、抗hPD-1抗体の存在下で、PD-1/PD-L1の相互作用は遮断され、阻害されたJurkat細胞のTCR下流シグナル経路は改めて活性化され、Luciferaseレポーター遺伝子の発現は回復され、蛍光シグナルが発生され、そしてPD-1/PD-L1の相互作用への抗hPD-1抗体の阻害は用量依存性を有する。さらに、抗体CL1及びCL5のhPD-1活性への阻害能力EC₅₀は、それぞれ約0.269µg/ml及び0.932µg/mlであるため、CL1のhPD-1活性への阻害能力がより強いことが示され、細胞レベルから、抗体CL1の機能活性がCL5より優れていることは再び証明され、これは実施例3の結果にも合致

している。

【0138】

実施例8：抗体CL1及び抗体CL20のhPD-1との結合動力学的解析・比較

Biacoreシステム（GE, Boston, MA）において表面プラズモン共鳴技術により抗体CL1及び抗体CL20のhPD-1との結合動力学を解析・比較した。

【0139】

Protein Aチップを用いて検出を行い、濃度 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗体CL1又は抗体CL20が $10\mu\text{l}/\text{min}$ の流速で実験流路を通過し、捕捉量が約200RUになるように10s捕捉し、そして流速を $30\mu\text{l}/\text{min}$ に調整し、順番に異なる濃度のPD-1（0.625nM、1.25nM、2.5nM、5nM、10nM）を入れ、結合時間180s、解離時間1200sにした。1:1 Langmuir結合モデルでフィッティングして結合と解離曲線を得て、抗体CL1及び抗体CL20のhPD-1との結合動力学的パラメータ（k結合：結合速度、k解離：解離速度、KD：結合解離平衡定数）を得た。動力学的研究の結果は、表4に示されている。抗体CL1のhPD-1と結合したKDは約0.606nMであり、抗体CL20のhPD-1と結合したKDは約4.434nMであり、抗体CL1のhPD-1との親和力は、抗体CL20よりも約7倍高くなる。

【0140】

【表4】

表4 抗体CL1及びCL20のhPD-1との結合動力学的数据

	CL1	CL20
k結合(1/Ms)	8.252×10^5	1.025×10^6
k解離(1/s)	4.999×10^{-4}	4.544×10^{-3}
KD(nM)	0.606	4.434

【図面の簡単な説明】

【0141】

【図1】タンパク質ELISAにおける抗hPD-1抗体と精製されたhPD-1との用量依存的結合のグラフである。

【図2】バイオレイヤー光干渉計測法（Biolayer Interferometry）により測定されたCL1抗体のk結合とk解離を示すグラフである。そのうち、各曲線は、様々な濃度のCL1抗体とhPD-1との結合の動的過程を表す。

【図3】フローサイトメトリー法による、CL1抗体のhPD-1/hPD-L1結合への遮断の検出である。

【図4】PD-1/PD-L1 Blockade Bioassayによる、抗hPD-1抗体の機能活性の検出である。

10

20

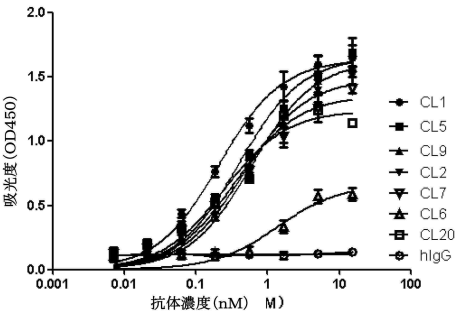
30

40

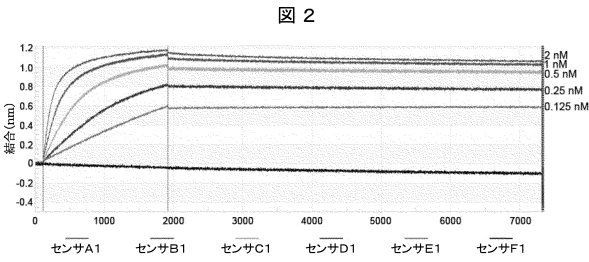
50

【図面】

【図 1】

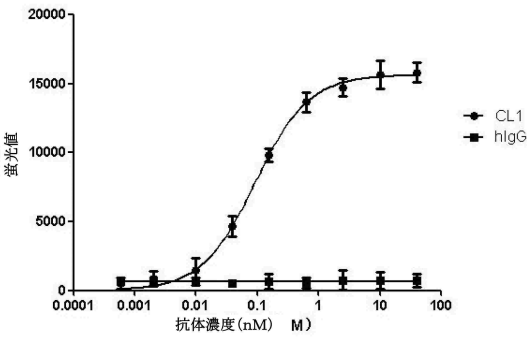


【図 2】

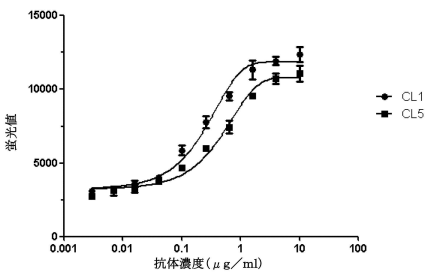


10

【図 3】



【図 4】



20

【配列表】

0007641910000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 P 21/08 (2006.01)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)
A 6 1 P 37/04 (2006.01)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)

F I

C 1 2 P 21/08
A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 37/04
A 6 1 K 39/395 T
A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 K 39/395 D
A 6 1 K 39/395 E
C 1 2 N 15/13 Z N A

ダストリアル デヴェロップメント ゾーン, サイエンス シティ, カイユエン ロード 11, エー6-5エフエル.

(72)発明者

リン, ジアン

中華人民共和国, 510530 カントン, グアンジョウ, ハイテク インダストリアル デヴェロップメント ゾーン, サイエンス シティ, カイユエン ロード 11, エー6-5エフエル.

(72)発明者

ペイ, シュジュン

中華人民共和国, 510530 カントン, グアンジョウ, ハイテク インダストリアル デヴェロップメント ゾーン, サイエンス シティ, カイユエン ロード 11, エー6-5エフエル.

(72)発明者

リアン, シゾン

中華人民共和国, 510530 カントン, グアンジョウ, ハイテク インダストリアル デヴェロップメント ゾーン, サイエンス シティ, カイユエン ロード 11, エー6-5エフエル.

(72)発明者

リ, シェンフェン

中華人民共和国, 510530 カントン, グアンジョウ, ハイテク インダストリアル デヴェロップメント ゾーン, サイエンス シティ, カイユエン ロード 11, エー6-5エフエル.

審査官 松原 寛子

(56)参考文献 特表2010-530753 (JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 15/00-15/90

C 1 2 N 1/00

C 1 2 N 5/10

C 1 2 P 21/08

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 37/04

A 6 1 K 39/395

C 0 7 K 16/28

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq