

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7519985号
(P7519985)

(45)発行日 令和6年7月22日(2024.7.22)

(24)登録日 令和6年7月11日(2024.7.11)

(51)国際特許分類		F I		
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	U Z N A
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	31/00 (2006.01)	A 6 1 P	31/00	
A 6 1 P	37/00 (2006.01)	A 6 1 P	37/00	
請求項の数 16 (全70頁)				
(21)出願番号	特願2021-501327(P2021-501327)	(73)特許権者	520470257	
(86)(22)出願日	令和1年7月19日(2019.7.19)		タユー ファシャ バイオテック メディ	
(65)公表番号	特表2021-530511(P2021-530511 A)		カル グループ カンパニー, リミテッド	
(43)公表日	令和3年11月11日(2021.11.11)		中華人民共和国 1 0 2 6 2 9 ベイジン	
(86)国際出願番号	PCT/CN2019/096679		, ダシン ディストリクト, ベイザン	
(87)国際公開番号	WO2020/015722		チュン タウン, ヨンワン シールー 2	
(87)国際公開日	令和2年1月23日(2020.1.23)		6 ユアン, ジョングアンチュン イー	
審査請求日	令和4年7月13日(2022.7.13)	(74)代理人	リャオチーシェ ユアン, 1 2 - 2 ロウ	
(31)優先権主張番号	PCT/CN2018/096206		100078282	
(32)優先日	平成30年7月19日(2018.7.19)	(74)代理人	弁理士 山本 秀策	
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)	(74)代理人	100113413	
			弁理士 森下 夏樹	
		(74)代理人	100181674	
			弁理士 飯田 貴敏	
		(74)代理人	100181641	
				最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗PD-1抗体、投薬量、およびその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

がん、感染症、または免疫障害の処置を必要とする患者におけるがん、感染症、または免疫障害を処置するための組成物であって、前記組成物が、1つまたは複数の用量の、ヒトプログラム細胞死タンパク質1（PD-1）に対して特異性を有する単離された抗体またはその抗原結合断片を含み、各用量が約1mg/kg～約10mg/kgであり、前記抗体またはその抗原結合断片が、

重鎖相補性決定領域HCDR1、HCDR2、およびHCDR3を含む重鎖可変領域、ならびに軽鎖相補性決定領域LCDR1、LCDR2、およびLCDR3を含む軽鎖可変領域を含み、前記HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、およびLCDR3が、

HCDR1：GFTTFSSYT（配列番号1）、HCDR2：ISHGGGDT（配列番号2）、HCDR3：ARHSGYERGYYYVMDY（配列番号3）、LCDR1：ESVDYYGFSF（配列番号4）、LCDR2：AAS（配列番号5）、LCDR3：QQSKEVPW（配列番号6）

である、組成物。

【請求項2】

疾患の処置を必要とする患者における疾患を処置するための組成物であって、前記組成物が、1つまたは複数の用量の、ヒトプログラム細胞死タンパク質1（PD-1）に対して特異性を有する単離された抗体またはその抗原結合断片を含み、各用量が約1mg/kg

g ～約 10 mg / k g であり、前記抗体またはその抗原結合断片が、重鎖相補性決定領域 H C D R 1、H C D R 2、および H C D R 3 を含む重鎖可変領域、ならびに軽鎖相補性決定領域 L C D R 1、L C D R 2、および L C D R 3 を含む軽鎖可変領域を含み、前記 H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、および L C D R 3 が、

H C D R 1 : G F T F S S Y T (配列番号 1)、H C D R 2 : I S H G G G D T (配列番号 2)、H C D R 3 : A R H S G Y E R G Y Y Y V M D Y (配列番号 3)、L C D R 1 : E S V D Y Y G F S F (配列番号 4)、L C D R 2 : A A S (配列番号 5)、L C D R 3 : Q Q S K E V P W (配列番号 6)

であり、前記疾患が、感染症に関連するエンドトキシンショック、関節炎、関節リウマチ、喘息、C O P D、骨盤腹膜炎、アルツハイマー病、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、ペロニー病、セリアック病、胆嚢疾患、毛巣病、腹膜炎、乾癬、血管炎、外科的癒着、卒中、I 型糖尿病、ライム病、関節炎、髄膜脳炎、自己免疫性ぶどう膜炎、中枢および末梢神経系の免疫媒介性炎症障害、多発性硬化症、狼瘡およびギラン・バレー症候群、アトピー性皮膚炎、自己免疫性肝炎、線維化肺肺炎、グレーブス病、I g A 腎症、特発性血小板減少性紫斑病、メニエール病、天疱瘡、原発性胆汁性肝硬変、サルコイドーシス、強皮症、ウェゲナー肉芽腫症、膵炎、外傷、移植片対宿主病、移植片の拒絶、虚血疾患、心筋梗塞、アテローム性動脈硬化症、血管内凝固、骨吸収、骨粗鬆症、変形性関節炎、歯周炎、低塩酸症、および母子間免疫寛容の欠如に関連する不妊症からなる群より選択される、組成物。

【請求項 3】

各用量が、約 1 mg / k g、約 3 mg / k g、または約 10 mg / k g である、請求項 1 または請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

各用量が 3 mg / k g である、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記抗体またはその抗原結合断片が、重鎖定常領域、軽鎖定常領域、F c 領域、またはその組合せをさらに含む、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 6】

前記抗体またはその抗原結合断片が、軽鎖定常領域を含み、前記軽鎖定常領域がカッパまたはラムダ鎖定常領域である、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記抗体またはその抗原結合断片が、I g G、I g M、I g A、I g E、または I g D のアイソタイプのものである、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 8】

前記アイソタイプが、I g G 1、I g G 2、I g G 3、または I g G 4 である、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 9】

前記抗体またはその抗原結合断片が、キメラ抗体、またはヒト化抗体である、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 10】

前記抗体またはその抗原結合断片が、ヒト化抗体である、請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 11】

前記抗体またはその抗原結合断片が、配列番号 35、配列番号 37、配列番号 39 のアミノ酸配列、または配列番号 35、配列番号 37、もしくは配列番号 39 と少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 12】

前記抗体またはその抗原結合断片が、配列番号 41、配列番号 43、配列番号 45 のアミノ酸配列、または配列番号 41、配列番号 43、もしくは配列番号 45 と少なくとも 9

10

20

30

40

50

5 %の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 ～ 1 0 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 3】

前記組成物ががんを処置するためであることを特徴とし、前記がんが、膀胱がん、肝臓がん、結腸がん、直腸がん、子宮内膜がん、白血病、リンパ腫、膵臓がん、小細胞肺がん、非小細胞肺がん、乳がん、尿道がん、頭頸部がん、消化器がん、胃がん、食道がん、卵巣がん、腎臓がん、黒色腫、前立腺がん、および甲状腺がんからなる群より選択される、請求項 1 または 3 ～ 1 2 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 4】

前記組成物が感染症を処置するためであることを特徴とし、前記感染症が、ウイルス感染症、細菌感染症、真菌感染症、または寄生生物による感染症である、請求項 1 または 3 ～ 1 2 のいずれか一項に記載の組成物。

10

【請求項 1 5】

前記組成物が感染症を処置するためであることを特徴とし、前記感染症が肝炎である、請求項 1 または 3 ～ 1 2 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 6】

前記肝炎が、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、D型肝炎、およびE型肝炎から選択される、請求項 1 5 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

関連出願

本出願は、2018年7月19日に出願されたPCT出願第PCT/CN2018/096206号の優先権の恩典および優先権を主張する。本出願の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。

【0002】

ASCIIテキストファイルでの配列表の提出

ASCIIテキストファイルでの以下の提出物の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれている：コンピューター読み取り可能な形態（CRF）の配列表（ファイル名：792572000940SEQULIST.TXT、記録日：2019年7月17日、サイズ：36KB）。

30

【背景技術】

【0003】

プログラム細胞死1（PD-1）のcDNAは、1992年にマウスT細胞ハイブリドーマおよびアポトーシスを受けつつある造血前駆細胞株から単離された。遺伝的アブレーション試験により、PD-1の欠損が様々なマウス系統において異なる自己免疫表現型をもたらすことが示された。トランスジェニックT細胞受容体（TCR）を有するPD-1欠損同種異系T細胞は、アロ抗原に対して増強された応答を示し、このことは、T細胞上のPD-1が抗原に対する応答において負の制御的役割を果たすことを示している。

【0004】

40

いくつかの研究が、PD-1と相互作用する分子の発見に寄与した。1999年に、B7ホモログ1（B7-H1、プログラム細胞死リガンド1〔PD-L1〕とも呼ばれる）が、分子クローニング、およびB7ファミリー分子とのその相同性に基づくヒトの発現された配列タグデータベース検索を使用してPD-1とは独立して同定され、B7-H1が、*in vitro*でヒトT細胞応答の阻害剤として作用することが示された。これらの2つの独立した系統の研究は、1年後にFreeman、Wood、およびHonjoの研究所が、B7-H1（本明細書において以降、PD-L1と呼ぶ）がPD-1の結合および機能的パートナーであることを示したことから1つにまとまった。次いで、PD-L1欠損マウス（PD-L1 KOマウス）は、この系統のマウスがそのような疾患を自然発症しなかったにもかかわらず、自己免疫疾患を誘導する傾向があったことが決定された

50

。PD-L1/PD-1相互作用が、*in vivo*で、特に腫瘍の微小環境でのT細胞応答の抑制において主要な役割を果たすことは後に明白となっている。

【0005】

その最初の試験は、腫瘍関連PD-L1が活性化T細胞のアポトーシスを促進し (Dong H. et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nature medicine*. 2002;8(8):793-800)、またヒト末梢血T細胞におけるIL-10産生を刺激して (Dong H, et al., B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nature medicine*. 1999;5(12):1365-9) 免疫抑制を媒介することを示した。現在では、免疫抑制に及ぼすPD-L1の効果がさらに複雑であることは公知である。T細胞のアポトーシスおよびIL-10誘導に加えて、PD-L1はまた、多様な機構を通してT細胞機能障害を誘導することができる。PD経路はまた、*in vitro*および*in vivo*でT細胞アネルギーを促進することも示された。

【0006】

最近、FDAは、2つのPD-1 mAbをヒトがんの処置のために承認し、1つはBristol-Myers SquibbのmAb (Opdivo、ニボルマブ、MDX-1106、BMS-936558、ONO-4538)であり、他方はMerck (Keytruda、ペンブロリズマブ、ランブロリズマブ、MK-3475)のmAbであった。加えて、PD-1またはPD-L1のいずれかに対する複数のmAbが、何千人もの患者を必要とする何百もの臨床試験において活発に開発中である。これまで、抗PD治療は、進行腫瘍および転移腫瘍の退縮ならびに生存の改善を誘導することによって有意な臨床利益を生成する。より重要なことに、抗PD治療は、持続的な効果、忍容可能な毒性を有し得、広いスペクトルのがんのタイプ、特に固形腫瘍に適用可能であることを示し得る。これらの臨床知見から、PD経路遮断の原理がさらに確証され、抗PD治療は、個別化または腫瘍タイプ特異的治療とは異なる独自のカテゴリーに入る。他のがん治療とのその独自の重複しない機構により、治療有効性をさらに増幅する試みで、抗PD治療をほぼ全てのがんの処置方法と組み合わせることが進行中である。がんワクチン、同時刺激および同時阻害抗体ならびに養子細胞治療などの様々ながん免疫療法のアプローチと組み合わせることに加えて、抗PD治療を化学療法、放射線療法、および標的化治療と組み合わせるために様々な臨床試験がまた開始されている。

抗PD治療は、ヒトがん、特に固形腫瘍に対する免疫療法において中心的な位置を占めている。この治療は、全身免疫応答をブーストすること、またはがんに対する*de novo*免疫を生成することを主にねらいとするこれまでの免疫療法剤とは異なる；その代わりに、抗PD治療は腫瘍部位での免疫応答を調節し、腫瘍誘導性の免疫欠損を標的とし、進行中の免疫応答を修復する。多様なヒトがんの処置に関して抗PD治療が臨床で成功していることからこのアプローチが確証されているが、本発明者らはなおこの経路および関連する免疫応答を研究中であり、これは、がん免疫療法における新規の臨床応用可能なアプローチの発見および設計を助けるであろう。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【文献】Dong H. ら、*Nature medicine* (2002) 8 (8) : 793 ~ 800

【文献】Dong H, ら、*Nature medicine* (1999) 5 (12) : 1365 ~ 9

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

本開示は、PD-1タンパク質に対して優れた結合および阻害活性を示す抗PD-1抗体を提供する。試験した抗体の1つは、規制当局に承認された2つの抗PD-1抗体製品

より強い結合活性をさらに示した。

【0009】

したがって、本開示の一実施形態に従って、ヒトプログラム細胞死タンパク質1（PD-1）に対して特異性を有する単離された抗体またはその断片であって、重鎖相補性決定領域HCDR1、HCDR2、およびHCDR3を含む重鎖可変領域、ならびに軽鎖相補性決定領域LCDR1、LCDR2、およびLCDR3を含む軽鎖可変領域を含み、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、およびLCDR3が、（a）HCDR1：GFTFSSYT（配列番号1）、HCDR2：ISHGGGDT（配列番号2）、HCDR3：ARHSGYERGYYYVMDY（配列番号3）、LCDR1：ESVDYYGFSF（配列番号4）、LCDR2：AAS（配列番号5）、LCDR3：QQSKEVPW（配列番号6）；（b）HCDR1：GYTFTSYT（配列番号7）、HCDR2：INPTTGYT（配列番号8）、HCDR3：ARDDAYYSGY（配列番号9）、LCDR1：ENIYSNL（配列番号10）、LCDR2：AAK（配列番号11）、LCDR3：QHFWGTPWT（配列番号12）；および（c）HCDR1：GFAFSSYD（配列番号13）、HCDR2：ITIGGGTT（配列番号14）、HCDR3：ARHRYDYFAMDN（配列番号15）、LCDR1：ENV DNYGINF（配列番号16）、LCDR2：VSS（配列番号17）、LCDR3：QQSKDVPW（配列番号18）からなる群より選択される、単離された抗体またはその断片を提供する。

【0010】

一部の実施形態では、本開示の抗体または断片は、重鎖定常領域、軽鎖定常領域、Fc領域、またはその組合せをさらに含む。一部の実施形態では、軽鎖定常領域は、カップまたはラムダ鎖定常領域である。

【0011】

抗体またはその断片は、一部の実施形態では、IgG、IgM、IgA、IgE、またはIgDのアイソタイプであり得る。一部の実施形態では、アイソタイプは、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4である。一部の実施形態では、抗体またはその断片は、キメラ抗体、ヒト化抗体、または完全なヒト抗体である。

【0012】

一部の実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号35、配列番号37、配列番号39のアミノ酸配列、または配列番号35、配列番号37、もしくは配列番号39と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。一部の実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号41、配列番号43、配列番号45のアミノ酸配列、または配列番号41、配列番号43、もしくは配列番号45と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0013】

別の実施形態では、本開示は、ヒトプログラム細胞死タンパク質1（PD-1）に対して特異性を有する単離された抗体またはその断片であって、重鎖相補性決定領域HCDR1、HCDR2、およびHCDR3を含む重鎖可変領域、ならびに軽鎖相補性決定領域LCDR1、LCDR2、およびLCDR3を含む軽鎖可変領域を含み、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、およびLCDR3が、（a）HCDR1：GFTFSSYT（配列番号1）、HCDR2：ISHGGGDT（配列番号2）、HCDR3：ARHSGYERGYYYVMDY（配列番号3）、LCDR1：ESVDYYGFSF（配列番号4）、LCDR2：AAS（配列番号5）、LCDR3：QQSKEVPW（配列番号6）；（b）HCDR1：GYTFTSYT（配列番号7）、HCDR2：INPTTGYT（配列番号8）、HCDR3：ARDDAYYSGY（配列番号9）、LCDR1：ENIYSNL（配列番号10）、LCDR2：AAK（配列番号11）、LCDR3：QHFWGTPWT（配列番号12）；（c）HCDR1：GFAFSSYD（配列番号13）、HCDR2：ITIGGGTT（配列番号14）、HCDR3：ARHRYDYFAMDN（配列番号15）、LCDR1：ENV DNYGINF（

配列番号 16)、LCDR2:VSS(配列番号 17)、LCDR3:QQSKDVPW(配列番号 18);および(d)(a)~(c)に示されるHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、およびLCDR3であって、ただしそのうちの少なくとも1つが、1つ、2つ、または3つのアミノ酸付加、欠失、保存的アミノ酸置換、またはその組合せを含む、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、およびLCDR3からなる群より選択される、単離された抗体またはその断片を提供する。

【0014】

一部の実施形態では、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、およびLCDR3は、(a)~(c)のいずれか1つに示されるとおりであるが、そのうちの1つが保存的アミノ酸置換を含む。一部の実施形態では、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、およびLCDR3は、(a)~(c)のいずれか1つに示されるとおりであるが、そのうちの2つが、各々保存的アミノ酸置換を含む。一部の実施形態では、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、およびLCDR3は、(a)~(c)のいずれか1つに示されるとおりであるが、そのうちの3つが各々保存的アミノ酸置換を含む。

10

【0015】

一部の実施形態では、本開示は、本明細書に記載される抗体またはその断片をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを提供する。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、本明細書に記載される抗体またはその断片の重鎖をコードするヌクレオチド配列を含む。例えば、重鎖は、配列番号19、23、27、31、35、37、および39からなる群より選択されるアミノ酸配列またはそのバリエーションを含む。例えば、ヌクレオチド配列は、20、24、28、32、36、38、および40からなる群より選択されるヌクレオチド配列またはそのバリエーションを含む。

20

【0016】

あるいは、一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、本明細書に記載される抗体またはその断片の軽鎖をコードするヌクレオチド配列を含む。例えば、軽鎖は、配列番号21、25、29、33、41、43、および45からなる群より選択されるアミノ酸配列またはそのバリエーションを含む。例えば、ヌクレオチド配列は、22、26、30、34、42、44、および46からなる群より選択されるヌクレオチド配列またはそのバリエーションを含む。

30

【0017】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号1~18からなる群より選択されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0018】

一実施形態では、本明細書に記載されるポリヌクレオチドを含む核酸構築物も提供する。一部の実施形態では、核酸構築物は、ポリヌクレオチドに作動可能に連結された1つまたは複数の制御配列をさらに含む。一部の実施形態では、1つまたは複数の制御配列は、適した宿主において本明細書に記載される抗体またはその断片の産生を方向付ける。一部の実施形態では、1つまたは複数の制御配列は、プロモーター、エンハンサー、終止シグナル、シグナルペプチド、リーダー、転写ターミネーター、およびその任意の組合せから選択される。例えば、1つまたは複数の制御配列はプロモーターであり得る。

40

【0019】

一実施形態では、本明細書に記載される核酸構築物を含むベクターも提供する。一部の実施形態では、ベクターは発現ベクターである。一部の実施形態では、ベクターは、プラスミド、コスミド、ウイルス、ミニ染色体、および人工染色体から選択される。

【0020】

一実施形態では、本明細書に記載される核酸構築物または本明細書に記載されるベクターを含む宿主細胞も提供する。一部の実施形態では、核酸構築物またはベクターは、宿主細胞のゲノムに組み込まれる。一部の実施形態では、核酸構築物またはベクターは、染色

50

体外実体として存在する。宿主細胞は原核細胞であり得る。宿主細胞は真核宿主細胞であり得る。例えば、宿主細胞は哺乳動物細胞であり得る。例えば、宿主細胞はヒト細胞であり得る。

【0021】

一実施形態では、本明細書に記載される抗体またはその断片、本明細書に記載されるポリヌクレオチド、本明細書に記載される核酸構築物、本明細書に記載されるベクター、または本明細書に記載される宿主細胞を含む発酵培地も提供する。

【0022】

一実施形態では、本開示の抗体またはその断片および薬学的に許容される担体を含む組成物も提供する。なおさらに、一実施形態では、抗体またはその断片をコードする1つまたは複数のポリヌクレオチドを含む単離された細胞も提供する。

10

【0023】

使用および方法も提供する。一実施形態では、がんの処置のための医薬を製造するための、本開示の抗体またはその断片の使用を提供する。がんは、膀胱がん、肝臓がん、結腸がん、直腸がん、子宮内膜がん、白血病、リンパ腫、膵臓がん、小細胞肺がん、非小細胞肺がん、乳がん、尿道がん、頭頸部がん、消化器がん、胃がん、食道がん、卵巣がん、腎臓がん、黒色腫、前立腺がん、および甲状腺がんからなる群より選択することができる。それを必要とする患者におけるがんを処置する方法であって、本開示の抗体またはその断片を患者に投与するステップを含む方法も提供する。

【0024】

別の実施形態では、本開示は、それを必要とする患者におけるがんまたは感染症を処置する方法であって、(a)細胞を、*in vitro*で本開示の抗体またはその断片によって処置するステップ；および(b)処置した細胞を患者に投与するステップを含む方法を提供する。一部の実施形態では、細胞はT細胞である。

20

【0025】

別の実施形態では、感染症の処置のための医薬を製造するための本開示のいずれか1つの抗体またはその断片の使用を提供する。一部の実施形態では、感染症は、ウイルス感染症、細菌感染症、真菌感染症、または寄生生物による感染症である。

【0026】

なお別の実施形態では、免疫障害の処置のための医薬を製造するための本開示の抗体またはその断片の使用を提供する。一部の実施形態では、免疫障害は、感染症、感染症に関連するエンドトキシンショック、関節炎、関節リウマチ、喘息、COPD、骨盤腹膜炎、アルツハイマー病、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、ペロニー病、セリアック病、胆嚢疾患、毛巣病、腹膜炎、乾癬、血管炎、外科的癒着、卒中、I型糖尿病、ライム病、関節炎、髄膜炎、自己免疫性ぶどう膜炎、中枢および末梢神経系の免疫媒介性炎症障害、多発性硬化症、狼瘡およびギラン・バレー症候群、アトピー性皮膚炎、自己免疫性肝炎、線維化肺肺炎、グレーブス病、IgA腎症、特発性血小板減少性紫斑病、メニエール病、天疱瘡、原発性胆汁性肝硬変、サルコイドーシス、強皮症、ウェゲナー肉芽腫症、膵炎、外傷、移植片対宿主病、移植片の拒絶、虚血疾患、心筋梗塞、アテローム性動脈硬化症、血管内凝固、骨吸収、骨粗鬆症、変形性関節炎、歯周炎、低塩酸症、および母子間免疫寛容の欠如に関連する不妊症からなる群より選択される。

30

【0027】

一部の態様では、それを必要とする患者におけるがん、感染症、または免疫障害を処置する方法であって、1つまたは複数の用量の、ヒトプログラム細胞死タンパク質1(PD-1)に対して特異性を有する単離された抗体またはその断片を患者に投与するステップを含み、各用量が、約1mg/kg～約10mg/kgである、方法を提供する。一部の実施形態では、各用量は、約1mg/kg、約3mg/kg、または約10mg/kgである。一部の実施形態では、各用量は3mg/kgである。

40

【0028】

本明細書に記載される方法のいずれか1つに従う一部の実施形態では、抗体またはその

50

断片は、重鎖相補性決定領域HCDR1、HCDR2、およびHCDR3を含む重鎖可変領域、ならびに軽鎖相補性決定領域LCDR1、LCDR2、およびLCDR3を含む軽鎖可変領域を含み、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、およびLCDR3は、(a) HCDR1: GFTTFSSYT (配列番号1)、HCDR2: ISHGGGDT (配列番号2)、HCDR3: ARHSGYERGGYYVMDY (配列番号3)、LCDR1: ESVDYYGFSF (配列番号4)、LCDR2: AAS (配列番号5)、LCDR3: QQSKEVPW (配列番号6); (b) HCDR1: GYTFTSYT (配列番号7)、HCDR2: INPTTGYT (配列番号8)、HCDR3: ARDDAYYSGY (配列番号9)、LCDR1: ENIYSNL (配列番号10)、LCDR2: AAK (配列番号11)、LCDR3: QHFWGTPWT (配列番号12); および (c) HCDR1: GFAFSSYD (配列番号13)、HCDR2: ITIGGGTT (配列番号14)、HCDR3: ARHRYDYFAMDN (配列番号15)、LCDR1: ENV DNYGINF (配列番号16)、LCDR2: VSS (配列番号17)、LCDR3: QQSKDVPW (配列番号18) からなる群より選択される。本明細書に記載される方法のいずれか1つに従う一部の実施形態では、抗体またはその断片は、重鎖定常領域、軽鎖定常領域、Fc領域、またはその組合せをさらに含む。一部の実施形態では、抗体またはその断片は、軽鎖定常領域を含み、軽鎖定常領域はカップまたはラムダ鎖定常領域である。一部の実施形態では、アイソタイプは、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4である。一部の実施形態では、抗体またはその断片は、キメラ抗体、ヒト化抗体、または完全なヒト抗体である。一部の実施形態では、抗体またはその断片は、ヒト化抗体である。

【0029】

本明細書に記載される方法のいずれか1つに従う一部の実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号35、配列番号37、配列番号39のアミノ酸配列、または配列番号35、配列番号37、もしくは配列番号39と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。一部の実施形態では、抗体またはその断片は、配列番号41、配列番号43、配列番号45のアミノ酸配列、または配列番号41、配列番号43、もしくは配列番号45と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0030】

本明細書に記載される方法のいずれか1つに従う一部の実施形態では、抗体またはその断片は、重鎖相補性決定領域HCDR1、HCDR2、およびHCDR3を含む重鎖可変領域、ならびに軽鎖相補性決定領域LCDR1、LCDR2、およびLCDR3を含む軽鎖可変領域を含み、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、およびLCDR3は、(a) HCDR1: GFTTFSSYT (配列番号1)、HCDR2: ISHGGGDT (配列番号2)、HCDR3: ARHSGYERGGYYVMDY (配列番号3)、LCDR1: ESVDYYGFSF (配列番号4)、LCDR2: AAS (配列番号5)、LCDR3: QQSKEVPW (配列番号6); (b) HCDR1: GYTFTSYT (配列番号7)、HCDR2: INPTTGYT (配列番号8)、HCDR3: ARDDAYYSGY (配列番号9)、LCDR1: ENIYSNL (配列番号10)、LCDR2: AAK (配列番号11)、LCDR3: QHFWGTPWT (配列番号12); (c) HCDR1: GFAFSSYD (配列番号13)、HCDR2: ITIGGGTT (配列番号14)、HCDR3: ARHRYDYFAMDN (配列番号15)、LCDR1: ENV DNYGINF (配列番号16)、LCDR2: VSS (配列番号17)、LCDR3: QQSKDVPW (配列番号18); および (d) (a) ~ (c) に示されるHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、およびLCDR3であって、ただしそのうちの少なくとも1つが、1つ、2つ、または3つのアミノ酸付加、欠失、保存的アミノ酸置換、またはその組合せを含む、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、およびLCDR3からなる群より選択される。一部の実施形態では、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、お

よびLCDR3は、(a)～(c)のいずれか1つに示されるとおりであるが、そのうちの1つが保存的アミノ酸置換を含む。一部の実施形態では、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、およびLCDR3は、(a)～(c)のいずれか1つに示されるとおりであるが、そのうちの2つが、保存的アミノ酸置換を含む。一部の実施形態では、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、およびLCDR3は、(a)～(c)のいずれか1つに示されるとおりであるが、そのうちの3つが保存的アミノ酸置換を含む。

【0031】

本明細書に記載される方法のいずれか1つに従う一部の実施形態では、方法はがんを処置するためであり、がんは、膀胱がん、肝臓がん、結腸がん、直腸がん、子宮内膜がん、白血病、リンパ腫、膵臓がん、小細胞肺がん、非小細胞肺がん、乳がん、尿道がん、頭頸部がん、消化器がん、胃がん、食道がん、卵巣がん、腎臓がん、黒色腫、前立腺がん、および甲状腺がんからなる群より選択される。

10

【0032】

本明細書に記載される方法のいずれか1つに従う一部の実施形態では、方法は、感染症を処置するためであり、感染症は、ウイルス感染症、細菌感染症、真菌感染症、または寄生生物による感染症である。一部の実施形態では、感染症は肝炎である。一部の実施形態では、肝炎は、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、D型肝炎、およびE型肝炎から選択される。

【0033】

20

本明細書に記載される方法のいずれか1つに従う一部の実施形態では、方法は、免疫障害を処置するためであり、免疫障害は、感染症、感染症に関連するエンドトキシンショック、関節炎、関節リウマチ、喘息、COPD、骨盤腹膜炎、アルツハイマー病、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、ペロニー病、セリアック病、胆嚢疾患、毛巣病、腹膜炎、乾癬、血管炎、外科的癒着、卒中、I型糖尿病、ライム病、関節炎、髄膜炎、自己免疫性ぶどう膜炎、中枢および末梢神経系の免疫媒介性炎症障害、多発性硬化症、狼瘡およびギラン・バレー症候群、アトピー性皮膚炎、自己免疫性肝炎、線維化肺肺炎、グレーブス病、IgA腎症、特発性血小板減少性紫斑病、メニエール病、天疱瘡、原発性胆汁性肝硬変、サルコイドーシス、強皮症、ウェゲナー肉芽腫症、膵炎、外傷、移植片対宿主病、移植片の拒絶、虚血疾患、心筋梗塞、アテローム性動脈硬化症、血管内凝固、骨吸収、骨粗鬆症、変形性関節炎、歯周炎、低塩酸症、および母子間免疫寛容の欠如に関連する不妊症からなる群より選択される。

30

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目1)

がん、感染症、または免疫障害の処置を必要とする患者におけるがん、感染症、または免疫障害を処置する方法であって、1つまたは複数の用量の、ヒトプログラム細胞死タンパク質1(PD-1)に対して特異性を有する単離された抗体またはその断片を前記患者に投与するステップを含み、各用量が約1mg/kg～約10mg/kgである、方法。

(項目2)

各用量が、約1mg/kg、約3mg/kg、または約10mg/kgである、項目1に記載の方法。

40

(項目3)

各用量が3mg/kgである、項目2に記載の方法。

(項目4)

前記抗体またはその断片が、重鎖相補性決定領域HCDR1、HCDR2、およびHCDR3を含む重鎖可変領域、ならびに軽鎖相補性決定領域LCDR1、LCDR2、およびLCDR3を含む軽鎖可変領域を含み、前記HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、およびLCDR3が、

(a) HCDR1: GFTFSSYT (配列番号1)、HCDR2: ISHGGGDT (

50

配列番号2)、HCDR3:ARHSGYERGYYYVMDY(配列番号3)、LCDR1:ESVDYYGFSF(配列番号4)、LCDR2:AAS(配列番号5)、LCDR3:QQSKEVPW(配列番号6);

(b)HCDR1:GYTFTSYT(配列番号7)、HCDR2:INPTTGYT(配列番号8)、HCDR3:ARDDAYYSGY(配列番号9)、LCDR1:ENIYSNL(配列番号10)、LCDR2:AAK(配列番号11)、LCDR3:QHFWGTPWT(配列番号12);および

(c)HCDR1:GFAFSSYD(配列番号13)、HCDR2:ITIGGGTT(配列番号14)、HCDR3:ARHRYDYFAMDN(配列番号15)、LCDR1:ENV DNYGINF(配列番号16)、LCDR2:VSS(配列番号17)、LCDR3:QQSKDVPW(配列番号18)

からなる群より選択される、項目1~3のいずれか一項に記載の方法。

(項目5)

前記抗体またはその断片が、重鎖定常領域、軽鎖定常領域、Fc領域、またはその組合せをさらに含む、項目4に記載の方法。

(項目6)

前記抗体またはその断片が、軽鎖定常領域を含み、前記軽鎖定常領域がカップまたはラムダ鎖定常領域である、項目5または6に記載の方法。

(項目7)

前記抗体またはその断片が、IgG、IgM、IgA、IgE、またはIgDのアイソタイプのものである、項目1~6のいずれか一項に記載の方法。

(項目8)

前記アイソタイプが、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4である、項目7に記載の方法。

(項目9)

前記抗体またはその断片が、キメラ抗体、ヒト化抗体、または完全なヒト抗体である、項目1~8のいずれか一項に記載の方法。

(項目10)

前記抗体またはその断片が、ヒト化抗体である、項目9に記載の方法。

(項目11)

前記抗体またはその断片が、配列番号35、配列番号37、配列番号39のアミノ酸配列、または配列番号35、配列番号37、もしくは配列番号39と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、項目1~10のいずれか一項に記載の方法。

(項目12)

前記抗体またはその断片が、配列番号41、配列番号43、配列番号45のアミノ酸配列、または配列番号41、配列番号43、もしくは配列番号45と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、項目1~10のいずれか一項に記載の方法。

(項目13)

前記抗体またはその断片が、

重鎖相補性決定領域HCDR1、HCDR2、およびHCDR3を含む重鎖可変領域、ならびに軽鎖相補性決定領域LCDR1、LCDR2、およびLCDR3を含む軽鎖可変領域を含み、前記HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、およびLCDR3が、

(a)HCDR1:GFTFSSYT(配列番号1)、HCDR2:ISHGGGDT(配列番号2)、HCDR3:ARHSGYERGYYYVMDY(配列番号3)、LCDR1:ESVDYYGFSF(配列番号4)、LCDR2:AAS(配列番号5)、LCDR3:QQSKEVPW(配列番号6);

(b)HCDR1:GYTFTSYT(配列番号7)、HCDR2:INPTTGYT(配列番号8)、HCDR3:ARDDAYYSGY(配列番号9)、LCDR1:ENI

10

20

30

40

50

Y S N L (配列番号 10)、L C D R 2 : A A K (配列番号 11)、L C D R 3 : Q H F W G T P W T (配列番号 12) ;

(c) H C D R 1 : G F A F S S Y D (配列番号 13)、H C D R 2 : I T I G G G T T (配列番号 14)、H C D R 3 : A R H R Y D Y F A M D N (配列番号 15)、L C D R 1 : E N V D N Y G I N F (配列番号 16)、L C D R 2 : V S S (配列番号 17)、L C D R 3 : Q Q S K D V P W (配列番号 18) ; および

(d) (a) ~ (c) に示される H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、および L C D R 3 であって、ただしそのうちの少なくとも 1 つが、1 つ、2 つ、または 3 つのアミノ酸付加、欠失、保存的アミノ酸置換、またはその組合せを含む、H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、および L C D R 3 からなる群より選択される、項目 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

10

(項目 14)

前記 H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、および L C D R 3 が、(a) ~ (c) のいずれか 1 つに示されるとおりであるが、そのうちの 1 つが保存的アミノ酸置換を含む、項目 13 に記載の方法。

(項目 15)

前記 H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、および L C D R 3 が、(a) ~ (c) のいずれか 1 つに示されるとおりであるが、そのうちの 2 つが、各々保存的アミノ酸置換を含む、項目 13 に記載の方法。

(項目 16)

前記 H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、および L C D R 3 が、(a) ~ (c) のいずれか 1 つに示されるとおりであるが、そのうちの 3 つが各々保存的アミノ酸置換を含む、項目 13 に記載の方法。

20

(項目 17)

前記方法ががんを処置するためであり、前記がんが、膀胱がん、肝臓がん、結腸がん、直腸がん、子宮内膜がん、白血病、リンパ腫、膵臓がん、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、乳がん、尿道がん、頭頸部がん、消化器がん、胃がん、食道がん、卵巣がん、腎臓がん、黒色腫、前立腺がん、および甲状腺がんからなる群より選択される、項目 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 18)

前記方法が感染症を処置するためであり、前記感染症が、ウイルス感染症、細菌感染症、真菌感染症、または寄生生物による感染症である、項目 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法。

30

(項目 19)

前記方法が免疫障害を処置するためであり、前記免疫障害が、感染症、感染症に関連するエンドトキシンショック、関節炎、関節リウマチ、喘息、C O P D、骨盤腹膜炎、アルツハイマー病、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、ペロニー病、セリアック病、胆嚢疾患、毛巣病、腹膜炎、乾癬、血管炎、外科的癒着、卒中、I 型糖尿病、ライム病、関節炎、髄膜脳炎、自己免疫性ぶどう膜炎、中枢および末梢神経系の免疫媒介性炎症障害、多発性硬化症、狼瘡およびギラン・バレー症候群、アトピー性皮膚炎、自己免疫性肝炎、線維化肺肺炎、グレーブス病、I g A 腎症、特発性血小板減少性紫斑病、メニエール病、天疱瘡、原発性胆汁性肝硬変、サルコイドーシス、強皮症、ウェゲナー肉芽腫症、肺炎、外傷、移植片対宿主病、移植片の拒絶、虚血疾患、心筋梗塞、アテローム性動脈硬化症、血管内凝固、骨吸収、骨粗鬆症、変形性関節炎、歯周炎、低塩酸症、および母子間免疫寛容の欠如に関連する不妊症からなる群より選択される、項目 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法。

40

(項目 20)

前記方法が感染症を処置するためであり、前記感染症が肝炎である、項目 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 21)

50

前記肝炎が、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、D型肝炎、およびE型肝炎から選択される、項目21に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図1】図1は、5つ全てのhPD-1 mAbアイソタイプが、高い特異性でhPD-1に結合することができることを示す図である。

【0035】

【図2】図2は、抗hPD-1がhB7-1、hPD-L1、hB7-H3、hB7-H4、およびhCD137に結合しないことを示す図である。

【0036】

【図3】図3は、hPD-1 mAbが、mPD-1に対して交叉結合を示すことなく、ヒトおよびカニクイザル両方の細胞PD-1タンパク質に結合することができることを示す図である。

【0037】

【図4】図4は、hPD-1 mAbが、hPD-1のhPD-L1に対する結合に対して投薬量に応じて遮断効果を有し得ることを示す図である。

【0038】

【図5-1】図5Aおよび図5Bは、競合的結合環境下で観察した場合のhPD-1 mAbの抑制効果および遮断効果を示す図である。

【図5-2】図5Aおよび図5Bは、競合的結合環境下で観察した場合のhPD-1 mAbの抑制効果および遮断効果を示す図である。

【0039】

【図6】図6は、RACE産物を確認するゲル電気泳動分析の結果を示す図である。

【0040】

【図7】図7は、組換えDNA抗体がPD-1に結合する能力(A)、およびPD-1のPD-L1に対する結合能に及ぼすその遮断効果(B)を示す図である。

【0041】

【図8】図8は、9つのヒト化抗体が、親抗体より高いおよび低い親和性の両方を含む、PD-1に対する様々な結合親和性を示すことを示す図である。

【0042】

【図9】図9は、ヒト化抗体が、PD-1のPD-L1に対する結合能に対して遮断効果を有し得ることを示す図である。

【0043】

【図10-1】図10Aおよび図10Bは、ヒト化抗体が、PD-1のPD-L2に対する結合能に対して遮断効果を有し得ることを示す図である。

【図10-2】図10Aおよび図10Bは、ヒト化抗体が、PD-1のPD-L2に対する結合能に対して遮断効果を有し得ることを示す図である。

【0044】

【図11】図11は、ヒト化mAbが、*in vitro*でがん細胞に対するアロCD8+CTL細胞の細胞傷害を増強することを示す図である。

【0045】

【図12】図12は、抗hPD-1抗体に対するMLRの増殖応答を示す図である。

【0046】

【図13】図13は、MLR培養上清におけるIL-2およびIFN γ 発現プロファイルを示す図である。

【0047】

【図14-1】図14Aおよび図14Bは、リンパ球上のPD-L1の発現がPD-1 mAbによって阻害されたことを示す図である。

【図14-2】図14Aおよび図14Bは、リンパ球上のPD-L1の発現がPD-1 mAbによって阻害されたことを示す図である。

10

20

30

40

50

【0048】

【図15】図15は、ヒト化PD-1抗体の*in vivo*抗腫瘍活性を示す図である。

【0049】

【図16】図16は、抗体結合親和性および動態の比較を表す図である。

【0050】

【図17】図17は、PD-1/PD-L1遮断におけるPD-1抗体の比較を示す図である。

【0051】

【図18】図18は、*in vitro*でがん細胞に対するアロCD8+CTL細胞の細胞傷害の増強に関するmAbの比較を示す図である。

【0052】

【図19】図19は、hPD-1またはmPD-1に対する試験物質の結合を示す図である（ELISAアッセイ）。

【0053】

【図20】図20は、フローサイトメトリーを使用した、hPD-1発現またはcPD-1発現CHOK1細胞に対する試験物質の結合を示す図である。

【0054】

【図21】図21は、hPD-L1（左）およびhPD-L2（右）のhPD-1発現CHOK1細胞に対する結合に及ぼす試験物質の遮断活性を示す図である。

【0055】

【図22】図22は、ヒトMLRアッセイにおけるIL-2（左）およびIFN-γ（右）レベルを示す図である。

【0056】

【図23】図23は、操作された腫瘍とT細胞の同時培養アッセイにおけるIFN-γレベルを示す図である。

【0057】

【図24】図24は、ELISA結果によるエピトープ結合（上のパネル）および異なる試験物質のエピトープ重複の概略図（下のパネル）を示す図である。

【0058】

【図25】図25は、ニボルマブ（上のパネル）またはTY101-04-T3-05（下のパネル）抗体の、低い固定レベル（60RU、左のパネル）および高い固定レベル（960RU、右のパネル）での組換えhPD-1に対する結合を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0059】

定義

用語「1つの（a）」または「1つの（an）」実体は、その実体の1つまたは複数を指すことに注意すべきである；例えば「1つの抗体」は、1つまたは複数の抗体を表すと理解される。そのため、用語「1つの（または1つの（an））」、「1つまたは複数」、および「少なくとも1つ」は、本明細書において互換的に使用することができる。

【0060】

本明細書において使用する場合、用語「ポリペプチド」は、単数の「ポリペプチド」ならびに複数の「ポリペプチド」を包含すると意図され、アミド結合（ペプチド結合としても知られる）によって直線状に連結された単量体（アミノ酸）で構成される分子を指す。用語「ポリペプチド」は、2つまたはそれより多いアミノ酸の任意の鎖（単数または複数）を指し、その産物の特定の長さを指すのではない。このため、ペプチド、ジペプチド、トリペプチド、オリゴペプチド、「タンパク質」、「アミノ酸鎖」、または2つもしくはそれより多いアミノ酸の鎖（単数もしくは複数）を指すために使用される他の任意の用語が、「ポリペプチド」の定義内に含まれ、用語「ポリペプチド」は、これらの用語のいずれかの代わりにまたはこれらの用語のいずれかと互換的に使用することができる。用語「ポリペプチド」はまた、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、公知の保護基

10

20

30

40

50

／ブロッキング基による誘導体化、タンパク質分解切断、または天然に存在しないアミノ酸による修飾を含むがこれらに限定されないポリペプチドの発現後修飾の産物を指すことも意図される。ポリペプチドは、天然の生物資源から誘導してもよく、または組換え技術によって産生してもよいが、指定された核酸配列から必ずしも翻訳されるわけではない。これは、化学合成による方法を含む任意の方法で生成することができる。

【0061】

細胞、核酸、例えばDNAまたはRNAに関して本明細書で使用される場合、用語「単離された」は、高分子の天然資源に存在する他のDNAまたはRNAからそれぞれ分離された分子を指す。本明細書で使用される場合、用語「単離された」はまた、組換えDNA技術によって産生された場合に、細胞材料、ウイルス材料、もしくは培養培地を実質的に含まない、または化学合成された場合には化学前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まない核酸またはペプチドも指す。その上、「単離された核酸」は、断片として天然に存在せず、天然の状態で見出されない核酸断片を含むことを意味する。用語「単離された」はまた、本明細書において他の細胞タンパク質または組織から単離された細胞またはポリペプチドを指すためにも使用される。単離されたポリペプチドは、精製されたポリペプチドおよび組換えポリペプチドの両方を包含することを意味する。

【0062】

本明細書で使用される場合、用語「組換え」は、それがポリペプチドまたはポリヌクレオチドに関する場合、天然に存在しないポリペプチドまたはポリヌクレオチドの形態を意図し、その非制限的な例は、通常、共に存在しないポリヌクレオチドまたはポリペプチドを組み合わせることによって作製することができる。

【0063】

「相同性」または「同一性」または「類似性」は、2つのペプチド間または2つの核酸分子間の配列類似性を指す。相同性は、比較目的で整列させることができる各配列における位置を比較することによって決定することができる。比較した配列における位置が同じ塩基またはアミノ酸によって占有されている場合、分子はその位置で相同である。配列間の相同性の程度は、配列によって共有されるマッチするまたは相同な位置の数の関数である。「無関係な」または「非相同な」配列は、本開示の配列の1つと40%未満の同一性、好ましくは25%未満の同一性を共有する。

【0064】

ポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチド領域（またはポリペプチドもしくはポリペプチド領域）が、別の配列に対してある特定のパーセンテージ（例えば、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%）の「配列同一性」を有することは、整列させた場合に、塩基（またはアミノ酸）のそのパーセンテージが、2つの配列を比較する場合に同じであることを意味する。このアライメントおよびパーセント相同性または配列同一性は、当技術分野で公知のソフトウェアプログラム、例えばAusubel et al. eds. (2007) Current Protocols in Molecular Biologyに記載されるプログラムを使用して決定することができる。好ましくは、アライメントのためにデフォルトパラメーターを使用する。1つのアライメントプログラムは、デフォルトパラメーターを使用するBLASTである。特に、プログラムは、以下のデフォルトパラメーターを使用するBLASTNおよびBLASTPである：遺伝子コード＝標準；フィルター＝なし；鎖＝両方；カットオフ＝60；期待値＝10；マトリックス＝BLOSUM62；説明＝50配列；選別＝HIGH SCORE；データベース＝非冗長、GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS translations+Swiss Protein+SPupdate+PIR。生物学的に等価のポリヌクレオチドは、上記の指定されたパーセント相同性を有し、同じまたは類似の生物活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドである。

【0065】

用語「等価な核酸またはポリヌクレオチド」は、核酸またはその相補体のヌクレオチド配列とある特定の程度の相同性または配列同一性を有するヌクレオチド配列を有する核酸

10

20

30

40

50

を指す。二本鎖核酸のホモログは、その相補体とある特定の程度の相同性を有するまたはその相補体を有するヌクレオチド配列を有する核酸を含むと意図される。一態様では、核酸のホモログは、核酸またはその相補体とハイブリダイズすることが可能である。同様に、「等価なポリペプチド」は、参照ポリペプチドのアミノ酸配列とある特定の程度の相同性または配列同一性を有するポリペプチドを指す。一部の態様では、配列同一性は、少なくとも約70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%である。一部の態様では、等価なポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、参照ポリペプチドまたはポリヌクレオチドと比較して1つ、2つ、3つ、4つ、または5つの付加、欠失、置換、およびその組合せを有する。一部の態様では、等価な配列は、参照配列の活性（例えば、エピトープ結合）または構造（例えば、塩橋）を保持する。

10

【0066】

ハイブリダイゼーション反応は、異なる「ストリンジェンシー」の条件下で実施することができる。一般的に、低ストリンジェンシーハイブリダイゼーション反応は、約10×SSCまたは同等のイオン強度／温度の溶液中、約40℃で行われる。中等度ストリンジェンシーハイブリダイゼーションは、典型的に約6×SSC中、約50℃で実施され、高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション反応は、一般的に約1×SSC中、約60℃で実施される。ハイブリダイゼーション反応はまた、当業者に周知である「生理的条件」下で実施することができる。生理的条件の非制限的な例は、温度、イオン強度、pH、および通常細胞において見出される Mg^{2+} の濃度である。

【0067】

20

ポリヌクレオチドは、4種のヌクレオチド塩基：アデニン（A）；シトシン（C）；グアニン（G）；チミン（T）；およびポリヌクレオチドがRNAの場合にはチミンの代わりにウラシル（U）の特定の配列で構成される。このため、用語「ポリヌクレオチド配列」は、ポリヌクレオチド分子のアルファベット表記である。このアルファベット表記を、中央処理装置を有するコンピューターにおいてデータベースに入力し、機能的ゲノム学および相同性検索などのバイオインフォマティクス適用に使用することができる。用語「多型」は、遺伝子またはその一部の1つより多い形態が同時に存在することを指す。少なくとも2つの異なる形態、すなわち2つの異なるヌクレオチド配列が存在する遺伝子の部分は、「遺伝子の多型領域」と呼ばれる。多型領域は、異なる対立遺伝子でその同一性が異なる単一のヌクレオチドであり得る。

30

【0068】

用語「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」は、互換的に使用され、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド、またはそのアナログいずれかである任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指す。ポリヌクレオチドは、任意の三次元構造を有することができ、公知のまたは未知の任意の機能を実施し得る。以下はポリヌクレオチドの非制限的な例である：遺伝子または遺伝子断片（例えば、プローブ、プライマー、EST、またはSAGEタグ）、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、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離されたDNA、任意の配列の単離されたRNA、核酸プローブおよびプライマー。ポリヌクレオチドは、改変ヌクレオチド、例えばメチル化ヌクレオチド、およびヌクレオチドアナログを含むことができる。存在する場合、ヌクレオチド構造に対する改変を、ポリヌクレオチドのアセンブリの前または後に付与することができる。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分によって中断され得る。ポリヌクレオチドは、標識成分とのコンジュゲーションなどによって重合後にさらに改変することができる。用語はまた、二本鎖および一本鎖分子の両方を指す。特に明記されているかまたは必要である場合を除き、ポリヌクレオチドである本開示の任意の実施形態は、二本鎖形態と、二本鎖形態を構成することが公知であるかまたは構成すると予想される2つの相補的な一本鎖形態の各々の両方を包含する。

40

【0069】

50

ポリヌクレオチドに適用される場合の用語「コードする」は、それがその天然の状態にある場合、または当業者に周知の方法によって操作される場合、それを転写および／または翻訳してポリペプチドおよび／またはその断片のmRNAを産生することができる場合に、ポリペプチドを「コードする」と言われるポリヌクレオチドを指す。アンチセンス鎖は、そのような核酸の相補体であり、コードする配列をそこから推定することができる。

【0070】

本明細書で使用される場合、「抗体」または「抗原結合性ポリペプチド」は、抗原を特異的に認識して結合するポリペプチドまたはポリペプチド複合体を指す。抗体は、完全な抗体およびその任意の抗原結合性断片またはその一本鎖であり得る。このように、用語「抗体」は、抗原に結合する生物活性を有する免疫グロブリン分子の少なくとも一部を含む分子を含有する任意のタンパク質またはペプチドを含む。そのような例には、重鎖もしくは軽鎖の相補性決定領域(CDR)、またはそのリガンド結合部分、重鎖もしくは軽鎖可変領域、重鎖もしくは軽鎖定常領域、フレームワーク(FR)領域、またはその任意の部分、または結合タンパク質の少なくとも1つの部分を含むがこれらに限定されない。

【0071】

本明細書で使用される場合、用語「抗体断片」または「抗原結合性断片」は、F(ab')₂、F(ab)₂、Fab'、Fab、Fv、scFv等などの抗体の一部である。構造にかかわらず、抗体断片は、インタクト抗体によって認識される同じ抗原に結合する。用語「抗体断片」は、アプタマー、スピーゲルマー(spiegelmer)、およびダイアボディ(diabody)を含む。用語「抗体断片」はまた、特異的抗原に結合して複合体を形成することによって抗体のように挙動する任意の合成または遺伝子操作タンパク質を含む。

【0072】

「一本鎖可変断片」または「scFv」は、免疫グロブリンの重鎖(V_H)および軽鎖(V_L)の可変領域の融合タンパク質を指す。一部の態様では、領域は、10～約25アミノ酸の短いリンカーペプチドによって接続される。リンカーは、可撓性のためにグリシンに富み、ならびに溶解度のためにセリンまたはトレオニンに富むことができ、V_HのN末端をV_LのC末端に、またはその逆に接続することができる。このタンパク質は、定常領域が除去され、リンカーが導入されているにもかかわらず、元の免疫グロブリンの特異性を保持する。ScFv分子は当技術分野で公知であり、例えば米国特許第5,892,019号に記載されている。

【0073】

用語抗体は、生化学的に区別することができる様々な広いクラスのポリペプチドを包含する。当業者は、重鎖がガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、またはイプシロン(γ、μ、α、δ、ε)に分類され、その中にいくつかのサブクラス(例えば、γ1～γ4)があることを認識している。抗体の「クラス」を、IgG、IgM、IgA、IgG、またはIgEであるとそれぞれ決定するのはこの鎖の性質である。免疫グロブリンサブクラス(アイソタイプ)、例えばIgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgG₅等は、十分に特徴付けされており、機能的特殊化を付与することが公知である。これらのクラスおよびアイソタイプの各々の改変型は、本開示を考慮して当業者に容易に区別可能であり、したがって本開示の範囲内である。全ての免疫グロブリンクラスが明白に本開示の範囲内であるが、以下の考察は、一般的に免疫グロブリン分子のIgGクラスを対象とする。IgGに関して、標準的な免疫グロブリン分子は、分子量およそ23,000ダルトンの2つの同一の軽鎖ポリペプチド、および分子量53,000～70,000の2つの同一の重鎖ポリペプチドを含む。4つの鎖は、典型的には、ジスルフィド結合によって「Y」字形状で結合し、軽鎖は、「Y」字の口部分から始まり可変領域にわたり続く重鎖部分に取り付けられる。

【0074】

本開示の抗体、抗原結合性ポリペプチド、バリエーション、またはその誘導体は、ポリクローナル、モノクローナル、多特異性、ヒト、ヒト化、霊長類化、またはキメラ抗体、一本鎖抗体、エピトープ結合性断片、例えば、Fab、Fab'、およびF(ab')₂、Fd、

10

20

30

40

50

F v s、一本鎖 F v s (s c F v)、一本鎖抗体、ジスルフィド結合 F v (s d F v)、V K または V H ドメインのいずれかを含む断片、F a b 発現ライブラリーによって産生された断片、および抗イディオタイプ (抗 I d) 抗体 (例えば、本明細書に開示される L I G H T 抗体に対する抗 I d 抗体を含む) を含むがこれらに限定されない。本開示の免疫グロブリンまたは抗体分子は、任意のタイプ (例えば、I g G、I g E、I g M、I g D、I g A、および I g Y)、クラス (例えば、I g G 1 (I g G)、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1 (I g A)、および I g A 2)、または免疫グロブリン分子のサブクラスの分子であり得る。

【 0 0 7 5 】

軽鎖は、カッパまたはラムダ (K、λ) のいずれかとして分類される。各々の重鎖クラスは、カッパまたはラムダ軽鎖のいずれかに結合し得る。一般的に、軽鎖および重鎖は、互いに共有結合し、2つの重鎖の「テール」部分は、免疫グロブリンがハイブリドーマ、B細胞、または遺伝子操作された宿主細胞のいずれかによって生成される場合、共有結合性のジスルフィド結合または非共有結合性の結合によって互いに結合する。重鎖では、アミノ酸配列は、Y 字形状のフォーク状の末端での N 末端から各鎖の底部の C 末端に伸びる。

【 0 0 7 6 】

軽鎖および重鎖はいずれも、構造的および機能的相同性の領域に分割される。用語「定常」および「可変」は、機能的に使用される。この点において、軽鎖 (V K) および重鎖 (V H) 部分の両方の可変ドメインが、抗原認識および特異性を決定すると認識される。逆に、軽鎖 (C K) および重鎖 (C H 1、C H 2、または C H 3) の定常ドメインは、分泌、経胎盤移行能 (t r a n s p l a c e n t a l m o b i l i t y)、F c 受容体結合、補体結合などなどの重要な生物特性を付与する。慣例により、定常領域ドメインのナンバリングは、それが抗体の抗原結合部位またはアミノ末端から遠位になるにつれて増加する。N 末端部分は可変領域であり、C 末端部分は定常領域であり；C H 3 および C K ドメインは実際に、重鎖および軽鎖のカルボキシ末端をそれぞれ含む。

【 0 0 7 7 】

上記で示したように、可変領域によって、抗体は、抗原上のエピトープを選択的に認識して特異的に結合することができる。すなわち、抗体の V K ドメインおよび V H ドメイン、または相補性決定領域 (C D R) のサブセットが結合して、三次元抗原結合部位を定義する可変領域を形成する。この四次抗体構造は、Y の各アームの末端に存在する抗原結合部位を形成する。より詳しくは、抗原結合部位は、V H および V K 鎖の各々における3つの C D R (すなわち、C D R - H 1、C D R - H 2、C D R - H 3、C D R - L 1、C D R - L 2、および C D R - L 3) によって定義される。一部の例、例えばラクダ種に由来するまたはラクダ免疫グロブリンに基づいて操作されたある特定の免疫グロブリン分子では、完全な免疫グロブリン分子は、重鎖のみからなり得、軽鎖を含まない。例えば、Hamers-Casterman et al., Nature 363:446-448 (1993)を参照されたい。

【 0 0 7 8 】

天然に存在する抗体において、各々の抗原結合ドメインに存在する6つの「相補性決定領域」または「C D R」は、抗体が水性環境中でその三次元立体配置をとると仮定して、抗原結合ドメインを形成するように特に位置するアミノ酸の短い、非連続配列である。抗原結合ドメインにおけるアミノ酸の残りは、「フレームワーク」領域と呼ばれ、より少ない分子間変動を示す。フレームワーク領域は主としてβ-シートコンフォメーションをとり、C D R は、β-シート構造を接続し、一部の例ではβ-シート構造の一部を形成するループを形成する。このように、フレームワーク領域は、鎖間の非共有結合性の相互作用によって、正しい方向での C D R の配置を提供する足場を形成するように作用する。配置された C D R によって形成される抗原結合ドメインは、免疫反応性抗原上のエピトープと相補的である表面を定義する。この相補的表面は、抗体のその同起源のエピトープに対する非共有結合性の結合を促進する。C D R およびフレームワーク領域を含むアミノ酸はそれぞれ、それらが正確に定義されていることから、任意の所与の重鎖または軽鎖可変領域に関して当業者によって容易に同定され得る ("Sequences of Proteins of Immuno

10

20

30

40

50

logical Interest," Kabat, E., et al., U.S. Department of Health and Human Services, (1983); および Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987)を参照されたい)。

【0079】

当技術分野で使用および／または容認されている用語の2つまたはそれより多い定義が存在する場合、本明細書で使用される用語の定義は、明白に逆であることが述べられていない限り、そのような全ての意味を含むと意図される。特定の例は、重鎖および軽鎖ポリペプチドの両方の可変領域内で見出される不連続な抗原結合部位を記載するための用語「相補性決定領域」(「CDR」)の使用である。この特定の領域は、その全体が参照により本明細書に組み込まれている、Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) および Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)によって記載されている。Kabat および Chothia に従う CDR の定義は、互いに比較した場合に、重複するアミノ酸残基またはアミノ酸残基のサブセットを含む。それにもかかわらず、抗体またはそのバリエーションの CDR を指すためのいずれの定義の適用も、本明細書に定義され、使用される用語の範囲内であると意図される。上記で引用した参考文献の各々によって定義される CDR を包含する適切なアミノ酸残基を、比較として以下の表に記載する。特定の CDR を包含する正確な残基の数は、CDR の配列およびサイズに応じて変化する。当業者は、抗体の可変領域アミノ酸配列を考慮してどの残基が特定の CDR を構成するかを慣例的に決定することができる。

【0080】

重鎖および軽鎖可変ドメインを、様々な対の組合せによって組み合わせていくつかの抗 PD-L1 抗体部分を生成することができる。抗 PD-L1 抗体の例示的な配列を、表 1 および 3C に提供する。表 1 に示す例示的な CDR、VH、および VK 配列は、INTERNATIONAL IMMUNOGENETICS INFORMATION SYSTEM (登録商標) (IMGT) に従って範囲が定められる。例えば、その開示の全体が参照により本明細書に組み込まれている、Lefranc, MP et al., Nucleic Acids Res., 43:D413-422 (2015)を参照されたい。当業者は、抗体重鎖および軽鎖可変領域における CDR 位置の予測のための多くのアルゴリズムが公知であること、ならびに本明細書に記載される抗体からの CDR を含むが IMGT 以外の予測アルゴリズムに基づく抗体作用剤が本発明の範囲内であることを認識するであろう。表 3C は、様々な他のナンバリングスキームおよび／または定義下での例示的な CDR 配列を記載する。

【0081】

【表 5】

	Kabat	Chothia	接触	Abm
CDR-H1	31-35	26-32	30-35	26-35
CDR-H2	50-65	52-56	47-58	50-58
CDR-H3	95-102	95-102	93-101	95-102
CDR-L1	24-34	26-32	30-36	24-34
CDR-L2	50-56	52-56	46-55	50-56
CDR-L3	89-97	89-97	89-96	89-97

【0082】

Kabat らはまた、任意の抗体に適用可能である可変ドメイン配列に関するナンバリングシステムも定義した。当業者は、配列そのもの以上のいかなる実験データにも頼ることなく、任意の可変ドメイン配列にこの「Kabat ナンバリング」システムを明確に割付することができる。本明細書で使用される場合、「Kabat ナンバリング」は、Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983)によって記載されるナンバリングシステムを指す。

【0083】

上記の表に加えて、Kabatの番号システムは、CDR領域を以下のように記載する：CDR-H1はおよそアミノ酸31（すなわち、第1のシステイン残基後のおよそ9残基）で始まり、およそ5～7アミノ酸を含み、次のトリプトファン残基で終止する。CDR-H2は、CDR-H1の末端後の15番目の残基で始まり、およそ16～19アミノ酸を含み、次のアルギニンまたはリシン残基で終止する。CDR-H3は、CDR-H2の末端後のおよそ33番目のアミノ酸残基で始まり、3～25アミノ酸を含み、Xが任意のアミノ酸である配列W-G-X-Gで終止する。CDR-L1は、およそ残基24（すなわち、システイン残基の後）で始まり、およそ10～17残基を含み、次のトリプトファン残基で終止する。CDR-L2は、CDR-L1の末端後およそ16番目の残基で始まり、およそ7残基を含む。CDR-L3は、CDR-L2の末端後およそ33番目の残基で始まり（すなわち、システイン残基の後）、およそ7～11残基を含み、配列F、またはXが任意のアミノ酸であるW-G-X-Gで終止する。

10

【0084】

本明細書に開示される抗体は、鳥類および哺乳動物を含む任意の動物起源に由来し得る。好ましくは、抗体は、ヒト、マウス、ロバ、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ラマ、ウマ、またはニワトリ抗体である。別の実施形態では、可変領域は、軟骨魚綱（chondrichthoid）起源（例えば、サメ由来）であり得る。

【0085】

本明細書で使用される場合、用語「重鎖定常領域」は、免疫グロブリン重鎖に由来するアミノ酸配列を含む。重鎖定常領域を含むポリペプチドは、以下の少なくとも1つを含む：CH1ドメイン、ヒンジ（例えば、上部、中央部、および／または下部ヒンジ領域）ドメイン、CH2ドメイン、CH3ドメイン、またはそのバリエーションもしくは断片。例えば、本開示において使用するための抗原結合性ポリペプチドは、CH1ドメインを含むポリペプチド鎖；CH1ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部、およびCH2ドメインを含むポリペプチド鎖；CH1ドメインおよびCH3ドメインを含むポリペプチド鎖；CH1ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部、およびCH3ドメインを含むポリペプチド鎖、またはCH1ドメイン、ヒンジドメインの少なくとも一部、CH2ドメイン、およびCH3ドメインを含むポリペプチド鎖を含み得る。別の実施形態では、本開示のポリペプチドは、CH3ドメインを含むポリペプチド鎖を含む。さらに、本開示において使用するための抗体は、CH2ドメインの少なくとも一部（例えば、CH2ドメインの全てまたは一部）を欠如し得る。上記で記載したように、重鎖定常領域を、天然に存在する免疫グロブリン分子からのアミノ酸配列が変化するように、改変してもよいことは当業者によって理解されるであろう。

20

30

【0086】

本明細書に開示の抗体の重鎖定常領域は、異なる免疫グロブリン分子に由来し得る。例えば、ポリペプチドの重鎖定常領域は、IgG₁分子に由来するCH1ドメインおよびIgG₃分子に由来するヒンジ領域を含み得る。別の例では、重鎖定常領域は、IgG₁分子に部分的に由来し、およびIgG₃分子に部分的に由来するヒンジ領域を含み得る。別の例では、重鎖部分は、IgG₁分子に部分的に由来し、およびIgG₄分子に部分的に由来するキメラヒンジを含み得る。

40

【0087】

本明細書で使用される場合、用語「軽鎖定常領域」は、抗体軽鎖に由来するアミノ酸配列を含む。好ましくは、軽鎖定常領域は、定常カッパドメインまたは定常ラムダドメインのうちの少なくとも1つを含む。

【0088】

「軽鎖-重鎖対」は、軽鎖のCLドメインと重鎖のCH1ドメインとの間のジスルフィド結合を通して二量体を形成することができる軽鎖および重鎖のコレクションを指す。

【0089】

既に示したように、様々な免疫グロブリンクラスの定常領域のサブユニット構造および

50

三次元立体配置が周知である。本明細書で使用される場合、用語「VHドメイン」は、免疫グロブリン重鎖のアミノ末端可変ドメインを含み、用語「CH1ドメイン」は、免疫グロブリン重鎖の第1の（最もアミノ末端の）定常領域ドメインを含む。CH1ドメインはVHドメインに隣接し、免疫グロブリン重鎖分子のヒンジ領域に対してアミノ末端にある。
【0090】

本明細書で使用される場合、用語「CH2ドメイン」は、例えば慣例的なナンバリングスキームを使用して抗体の残基約244から残基360に伸びる重鎖分子の一部を含む（残基244～360、Kabatナンバリングシステム、および残基231～340、EUナンバリングシステム；Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983)を参照されたい）。CH2ドメインは、それが別のドメインと厳密に対を形成しないという点において独自である。むしろ、2つのN結合分岐炭化水素鎖が、インタクトの天然のIgG分子の2つのCH2ドメインの間に介在する。CH3ドメインが、IgG分子のCH2ドメインからC末端まで伸び、およそ108残基を含むことも十分に報告されている。

【0091】

本明細書で使用される場合、用語「ヒンジ領域」は、CH1ドメインをCH2ドメインに結合する重鎖分子の部分を含む。このヒンジ領域はおよそ25残基を含み、可撓性であり、このため、2つのN末端抗原結合領域が独立して移動することができる。ヒンジ領域は3つの別個のドメイン：上部、中央部、および下部ヒンジドメインに細分することができる（Roux et al., J. Immunol 161:4083 (1998)）。

【0092】

本明細書で使用される場合、用語「ジスルフィド結合」は、2つの硫黄原子間で形成される共有結合を含む。アミノ酸システインは、第2のチオール基とジスルフィド結合または架橋を形成することができるチオール基を含む。ほとんどの天然に存在するIgG分子では、CH1およびCK領域は、ジスルフィド結合によって連結され、2つの重鎖は、Kabatナンバリングシステムを使用して239および242（226または229位、EUナンバリングシステム）に対応する位置で、2つのジスルフィド結合によって連結される。

【0093】

本明細書で使用される場合、用語「キメラ抗体」は、免疫反応性領域または部位が、第1の種から得られるかまたはそれに由来し、定常領域（インタクト、部分的、または本開示に従って改変されていてもよい）が第2の種から得られる任意の抗体を意味すると考えられる。ある特定の実施形態では、標的結合領域または部位は、非ヒト起源（例えば、マウスまたは霊長類）に由来し、定常領域はヒトのものである。

【0094】

本明細書で使用される場合、「パーセントヒト化」は、ヒト化ドメインと生殖系列ドメインとの間のフレームワークアミノ酸の差（すなわち、非CDRの差）の数を決定し、その数をアミノ酸の総数から減算し、次いでそれをアミノ酸の総数で除算して、100を乗算することによって計算される。

【0095】

「特異的に結合する」または「特異性を有する」とは、一般的に抗体がその抗原結合ドメインを介してエピトープに結合すること、および結合が抗原結合ドメインとエピトープとの間に何らかの相補性を必要とすることを意味する。この定義に従って、抗体は、ランダムで無関係なエピトープに結合するより容易にその抗原結合ドメインを介してそのエピトープに結合する場合、エピトープに「特異的に結合する」と言われる。用語「特異性」は、本明細書においてある特定の抗体がある特定のエピトープに結合する相対的親和性を認定するために使用される。例えば、抗体「A」は、抗体「B」より所与のエピトープに対して高い特異性を有するよう思われ得るか、または抗体「A」は、関連するエピトープ「D」に関してそれが有するより高い特異性でエピトープ「C」に結合すると言うことができる。

【0096】

本明細書で使用される場合、用語「処置する」または「処置」は、その目的が、望ましくない生理的变化または障害、例えばがんの進行を防止するまたは遅らせる（弱める）ことである治療的処置および予防的または防止的手段の両方を指す。有益なまたは望ましい臨床結果は、検出可能であるか検出不能であるかによらず、症状の軽減、疾患の程度の減少、疾患状態の安定化（すなわち、悪化しない）、疾患進行の遅延または遅らせること、疾患状態の改善または緩和、および寛解（部分的または完全）を含むがこれらに限定されない。「処置」はまた、処置を受けていない場合に予想される生存と比較して生存の延長を意味し得る。処置を必要とする人は、状態または障害を既に有する人ならびに状態もしくは障害を有する傾向がある人、または状態もしくは障害を防止すべき人を含む。

10

【0097】

「被験体」または「個体」または「動物」または「患者」または「哺乳動物」は、診断、予後判定、または治療が望まれる任意の被験体、特に哺乳動物被験体を意味する。哺乳動物被験体は、ヒト、家畜動物、農場動物、および動物園、競技用、またはペット動物、例えばイヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、マウス、ウマ、畜牛、ウシ等を含む。

【0098】

本明細書で使用される場合、「処置を必要とする患者に」または「処置を必要とする被験体」などの句は、例えば検出のために、診断手順のために、および／または処置のために使用される本開示の抗体または組成物の投与から利益が得られる哺乳動物被験体などの被験体を含む。

20

【0099】

抗PD-1抗体

本開示は、ヒトPD-1タンパク質に対して高い親和性を有する抗PD-1抗体を提供する。試験される抗体は、強力な結合活性および阻害活性を示し、治療的使用および診断的使用にとって有用である。さらに、試験したヒト化抗体の1つ（TY101）は、FDAが承認した2つの抗hPD-1抗体より有意に高い結合親和性を示した。

【0100】

したがって、本開示の一実施形態は、ヒトプログラム細胞死1（PD-1）タンパク質に特異的に結合することができる抗PD-1抗体またはその断片を提供する。

【0101】

本開示の一実施形態に従って、表1のCDR群の1つとしてCDR領域を有する重鎖および軽鎖可変ドメインを含む抗体を提供する。

30

表1. CDR領域の配列

【表1】

CDR 群	配列(配列番号)
CDR 群 1	HCDR1: GFTFSSYT (1) HCDR2: ISHGCGDT (2) HCDR3: ARHSGYERGGYYVMDY (3) LCDR1: ESVDYYGFSF (4) LCDR2: AAS (5) LCDR3: QQSKEVPW (6)
CDR 群 2	HCDR1: GYTFTSYT (7) HCDR2: INPTTGYT (8) HCDR3: ARDDAYYSGY (9) LCDR1: ENIYSNL (10) LCDR2: AAK (11) LCDR3: QHFWGTPWT (12)
CDR 群 3	HCDR1: GFAFSSYD (13) HCDR2: ITIGGGTT (14) HCDR3: ARHRYDYFAMDN (15) LCDR1: ENVVDNYGINF (16) LCDR2: VSS (17) LCDR3: QQSKDVPW (18)

40

【0102】

50

例として、一実施形態では、ヒトプログラム細胞死タンパク質1 (PD-1) に対して特異性を有する単離された抗体またはその断片であって、重鎖相補性決定領域HCDR1、HCDR2、およびHCDR3を含む重鎖可変領域、ならびに軽鎖相補性決定領域LCDR1、LCDR2、およびLCDR3を含む軽鎖可変領域を含み、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、およびLCDR3が、HCDR1: GFTFSSYT (配列番号1)、HCDR2: ISHGGGDT (配列番号2)、HCDR3: ARHSGYERGYVMDY (配列番号3)、LCDR1: ESVDYYGFSF (配列番号4)、LCDR2: AAS (配列番号5)、LCDR3: QQSKEVPW (配列番号6) である、単離された抗体またはその断片を提供する。

【0103】

例として、一実施形態では、ヒトプログラム細胞死タンパク質1 (PD-1) に対して特異性を有する単離された抗体またはその断片であって、重鎖相補性決定領域HCDR1、HCDR2、およびHCDR3を含む重鎖可変領域、ならびに軽鎖相補性決定領域LCDR1、LCDR2、およびLCDR3を含む軽鎖可変領域を含み、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、およびLCDR3が、HCDR1: GYTFTSYT (配列番号7)、HCDR2: INPTTGYT (配列番号8)、HCDR3: ARDDAYYSYG (配列番号9)、LCDR1: ENIYSNL (配列番号10)、LCDR2: AAK (配列番号11)、LCDR3: QHFWGTPWT (配列番号12) である、単離された抗体またはその断片を提供する。

【0104】

例として、一実施形態では、ヒトプログラム細胞死タンパク質1 (PD-1) に対して特異性を有する単離された抗体またはその断片であって、重鎖相補性決定領域HCDR1、HCDR2、およびHCDR3を含む重鎖可変領域、ならびに軽鎖相補性決定領域LCDR1、LCDR2、およびLCDR3を含む軽鎖可変領域を含み、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、およびLCDR3が、HCDR1: GFASFSSYD (配列番号13)、HCDR2: ITIGGGTT (配列番号14)、HCDR3: ARHRYDYFAMDN (配列番号15)、LCDR1: ENV DNYGINF (配列番号16)、LCDR2: VSS (配列番号17)、LCDR3: QQSKDVPW (配列番号18) である、単離された抗体またはその断片を提供する。

【0105】

実験例において実証するように、これらのCDR領域を含有する抗体は、マウス、ヒト化、またはキメラであるか否かによらず、強力なPD-1結合活性および阻害活性を有した。さらなるコンピューターモデリングにより、CDR内のある特定の残基を改変させて抗体の特性を保持または改善することができることが示された。一部の実施形態では、本開示の抗PD-1抗体は、1つ、2つ、または3つのさらなる改変を有する、表1に記載されるVHおよびVL CDRを含む。そのような改変は、アミノ酸の付加、欠失、または置換 (substation) であり得る。

【0106】

一部の実施形態では、改変は、CDRの各々からの1つ以下のホットスポット位置での置換である。一部の実施形態では、改変は、1つ、2つ、または3つのそのようなホットスポット位置での置換である。一実施形態では、改変は、ホットスポット位置の1つでの置換である。そのような置換は、一部の実施形態では保存的置換である。

【0107】

「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、類似の側鎖を有するアミノ酸残基に交換されている置換である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーが当技術分野において定義されており、塩基性側鎖 (例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖 (例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電極性側鎖 (例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン)、非極性側鎖 (例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、ベータ分岐側鎖 (例えば、トレオニン、バリン、イソロイ

10

20

30

40

50

シン)、および芳香族側鎖(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)を含む。このように、免疫グロブリンポリペプチドにおける非必須アミノ酸残基は、好ましくは、同じ側鎖ファミリーからの別のアミノ酸残基に交換される。別の実施形態では、アミノ酸の列を、側鎖ファミリーメンバーの順序および／または組成が異なる構造的に類似の列に交換することができる。

【0108】

保存的アミノ酸置換の非制限的な例を以下の表に提供し、この中で、0またはそれより高い類似性スコアは、2つのアミノ酸間での保存的置換を示す。

アミノ酸類似性マトリックス

【表6】

	C	G	P	S	A	T	D	E	N	Q	H	K	R	V	M	I	L	F	Y	W
W	-8	-7	-6	-2	-6	-5	-7	-7	-4	-5	-3	-3	2	-6	-4	-5	-2	0	0	17
Y	0	-5	-5	-3	-3	-3	-4	-4	-2	-4	0	-4	-5	-2	-2	-1	-1	7	10	
F	-4	-5	-5	-3	-4	-3	-6	-5	-4	-5	-2	-5	-4	-1	0	1	2	9		
L	-6	-4	-3	-3	-2	-2	-4	-3	-3	-2	-2	-3	-3	2	4	2	6			
I	-2	-3	-2	-1	-1	0	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	4	2	5				
M	-5	-3	-2	-2	-1	-1	-3	-2	0	-1	-2	0	0	2	6					
V	-2	-1	-1	-1	0	0	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	4						
R	-4	-3	0	0	-2	-1	-1	-1	0	1	2	3	6							
K	-5	-2	-1	0	-1	0	0	0	1	1	0	5								
H	-3	-2	0	-1	-1	-1	1	1	2	3	6									
Q	-5	-1	0	-1	0	-1	2	2	1	4										
N	-4	0	-1	1	0	0	2	1	2											
E	-5	0	-1	0	0	0	3	4												
D	-5	1	-1	0	0	0	4													
T	-2	0	0	1	1	3														
A	-2	1	1	1	2															
S	0	1	1	1																
P	-3	-1	6																	
G	-3	5																		
C	12																			

保存的アミノ酸置換

10

20

30

40

50

【表 7】

アミノ酸	以下による置換
アラニン	D-Ala, Gly, Aib, β -Ala, L-Cys, D-Cys
アルギニン	D-Arg, Lys, D-Lys, Orn D-Orn
アスパラギン	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-GluGln, D-Gln
アスパラギン酸	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
システイン	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr, L-Ser, D-Ser
グルタミン	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
グルタミン酸	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
グリシン	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, Aib, β -Ala
イソロイシン	D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
ロイシン	Val, D-Val, Met, D-Met, D-Ile, D-Leu, Ile
リシン	D-Lys, Arg, D-Arg, Orn, D-Orn
メチオニン	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
フェニルアラニン	D-Phe, Tyr, D-Tyr, His, D-His, Trp, D-Trp
プロリン	D-Pro
セリン	D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, L-Cys, D-Cys
トレオニン	D-Thr, Ser, D-Ser, allo-Thr, Met, D-Met, Val, D-Val
チロシン	D-Tyr, Phe, D-Phe, His, D-His, Trp, D-Trp
バリン	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met

10

20

【0109】

VHの非制限的な例を、配列番号27、配列番号31、配列番号35、配列番号37、および配列番号39に提供する。配列番号27はマウスVHである。配列番号31は、キメラ抗体のVHであり、配列番号35、配列番号37、および配列番号39はヒト化されている。

30

【0110】

VLの非制限的な例を、配列番号29、配列番号33、配列番号41、配列番号43、および配列番号45に提供する。配列番号29はマウスVLである。配列番号33は、キメラ抗体のVLであり、配列番号41、配列番号43、および配列番号45はヒト化されている。

【0111】

一部の実施形態では、本開示の抗PD-1抗体は、配列番号27、配列番号31、配列番号35、配列番号37、もしくは配列番号39のVH、配列番号29、配列番号33、配列番号41、配列番号43、もしくは配列番号45のVL、またはそのそれぞれの生物学的等価物を含む。VHまたはVLの生物学的等価物は、指定されたアミノ酸を含むが、全体で80%、85%、90%、95%、98%、または99%の配列同一性を有する配列である。例として配列番号27の生物学的等価物は、配列番号27と全体で80%、85%、90%、95%、98%、または99%の配列同一性を有するがCDRを保持するVHであり得る。

40

【0112】

本明細書に開示される抗体を、それらが由来する天然に存在する結合ポリペプチドからアミノ酸配列が変化するように改変してもよいこともまた、当業者によって理解されるであろう。例えば、指定されたタンパク質に由来するポリペプチドまたはアミノ酸配列は類似し得、例えば出発配列とある特定のパーセント同一性を有し、例えば出発配列と60%

50

、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、または99%同一であり得る。

【0113】

ある特定の実施形態では、抗体は、抗体に通常会合しないアミノ酸配列または1つもしくは複数の部分を含む。例示的な改変を以下により詳細に記載する。例えば、本開示の抗体は、可撓性リンカー配列を含んでもよく、または機能的部分（例えば、PEG、薬物、毒素、または標識）を付加するように改変してもよい。

【0114】

本開示の抗体、そのバリエーション、または誘導体は、すなわち共有結合によって、抗体とエピトープとの結合が防止されないように、抗体に対する任意のタイプの分子の共有結合によって改変された誘導体を含む。例えば、限定ではないが、抗体は、例えばグリコシル化、アセチル化、PEG化、リン酸化、アミド化、公知の保護基／ブロック基による誘導体化、タンパク質分解切断、細胞リガンドまたは他のタンパク質との結合等によって改変することができる。多数の化学的改変のいずれも、特異的な化学的切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝的合成等を含むがこれらに限定されない、公知の技術によって実行され得る。加えて、抗体は、1つまたは複数の非古典的アミノ酸を含有してもよい。

【0115】

一部の実施形態では、抗体は、治療剤、プロドラッグ、ペプチド、タンパク質、酵素、ウイルス、脂質、生物応答調節剤、医薬品、またはPEGにコンジュゲートされ得る。

【0116】

抗体は、放射性標識、免疫調節剤、ホルモン、酵素、オリゴヌクレオチド、光活性治療剤または診断剤、薬物または毒素であり得る細胞傷害剤、超音波増強剤、非放射性標識、その組合せ、ならびに当技術分野で公知の他のそのような作用剤などの検出可能な標識を含み得る治療剤にコンジュゲートまたは融合され得る。

【0117】

抗体は、それを化学発光化合物にカップリングさせることによって検出可能に標識することができる。次いで、化学発光タグを付けた抗原結合性ポリペプチドの存在を、化学反応の過程で生じる発光の存在を検出することによって決定する。特に有用な化学発光標識化合物の例は、ルミノール、イソルミノール、セロマトニック (theromatic) アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩、およびシュウ酸エステルである。

【0118】

抗体はまた、 ^{152}Eu またはランタニド系列の他の金属などの蛍光放出金属を使用して検出可能に標識することもできる。これらの金属を、ジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA) またはエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) のような金属キレート基を使用して抗体に結合させることができる。様々な部分を抗体にコンジュゲートする技術は周知であり、例えば、Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. (1985); Hells trom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al., (eds.), Marcel Dekker, Inc., pp. 623-53 (1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), Academic Press pp. 303-16 (1985)、およびThorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev. (52:119-58 (1982))を参照されたい。

【0119】

二機能性分子

PD-1は、免疫チェックポイント分子であり、腫瘍抗原でもある。腫瘍抗原標的化分子として、PD-1に特異的な抗体または抗原結合性断片を、免疫細胞に特異的な第2の抗原結合性断片と組み合わせて、二特異性抗体を生成することができる。

【0120】

一部の実施形態では、免疫細胞は、T細胞、B細胞、単球、マクロファージ、好中球、樹状細胞、食細胞、ナチュラルキラー細胞、好酸球、好塩基球、および肥満細胞からなる群より選択される。標的化され得る免疫細胞上の分子は、例えば、CD3、CD16、CD19、CD28、およびCD64を含む。他の例には、PD-1、CTLA-4、LAG-3（CD223としても公知）、CD28、CD122、4-1BB（CD137としても公知）、TIM3、OX-40、またはOX40L、CD40またはCD40L、LIGHT、ICOS/ICOSL、GITR/GITRL、TIGIT、CD27、VISTA、B7H3、B7H4、HEVMまたはBTLA（CD272としても公知）、キラー細胞免疫グロブリン様受容体（KIRs）、およびCD47が挙げられる。二特異性の特定の例には、PD-L1/PD-1、PD-1/LAG3、PD-1/TIGIT、およびPD-1/CD47が挙げられるがこれらに限定されない。

【0121】

免疫チェックポイント阻害剤として、PD-1に特異的な抗体または抗原結合性断片を、腫瘍抗原に特異的な第2の抗原結合性断片と組み合わせて、二特異性抗体を生成することができる。「腫瘍抗原」は、腫瘍細胞において産生された抗原性物質であり、すなわちこれは宿主において免疫応答を誘発する。腫瘍抗原は、腫瘍細胞を同定するのに有用であり、がん治療において使用するための潜在的な候補体である。体における通常のタンパク質は抗原性ではない。しかし、ある特定のタンパク質は、腫瘍形成の際に産生または過剰発現され、このため、体に対して「異物」となるように思われる。これは、免疫系から十分に隔離されている正常なタンパク質、極めて少量で通常産生されるタンパク質、発達のある特定の段階に限って通常産生されるタンパク質、または変異によりその構造が改変されているタンパク質を含み得る。

【0122】

多数の腫瘍抗原が当技術分野で公知であり、新規腫瘍抗原を、スクリーニングによって容易に同定することができる。腫瘍抗原の非制限的な例には、EGFR、Her2、EpCAM、CD20、CD30、CD33、CD47、CD52、CD133、CD73、CEA、gpA33、ムチン、TAG-72、CIX、PSMA、葉酸結合タンパク質、GD2、GD3、GM2、VEGF、VEGFR、インテグリン、 $\alpha V \beta 3$ 、 $\alpha 5 \beta 1$ 、ERBB2、ERBB3、MET、IGF1R、EPHA3、TRAILR1、TRAILR2、RANKL、FAP、およびテナシンが挙げられる。

【0123】

一部の態様では、一価の単位が、対応する非腫瘍細胞と比較して腫瘍細胞上で過剰発現されるタンパク質に対して特異性を有する。本明細書で使用される「対応する非腫瘍細胞」は、腫瘍細胞の起源と同じ細胞タイプの細胞である非腫瘍細胞を指す。そのようなタンパク質は、必ずしも腫瘍抗原と異なるわけではないことに注意されたい。非制限的な例には、ほとんどの結腸癌、直腸癌、乳癌、肺癌、膵臓癌、および消化管癌において過剰発現される癌胎児性抗原（CEA）；乳がん、卵巣がん、結腸がん、肺がん、前立腺がん、および子宮頸がんにおいてしばしば過剰発現されるヘレグリン受容体（HER-2、neuまたはc-erbB-2）；乳房、頭頸部、非小細胞肺、および前立腺の固形腫瘍を含む広範囲の固形腫瘍において高度に発現される上皮細胞増殖因子受容体（EGFR）；アシアロ糖タンパク質受容体；トランスフェリン受容体；肝細胞において発現されるセルピン酵素複合体受容体；膵管腺癌細胞において過剰発現される線維芽細胞増殖因子受容体（FGFR）；抗血管新生遺伝子治療のための血管内皮増殖因子受容体（VEGFR）；粘液非産生性卵巣癌の90%において選択的に過剰発現される葉酸受容体；細胞表面グリコカ

10

20

30

40

50

リックス；炭水化物受容体；ならびに呼吸上皮細胞への遺伝子送達にとって有用であり、
嚢胞性線維症などの肺疾患の処置にとって魅力的であるポリマーの免疫グロブリン受容体
が挙げられる。この点における二特異性の非制限的な例には、PD-1／EGFR、PD-
1／Her2、PD-1／CD33、PD-1／CD133、PD-1／CEA、およ
びPD-1／VEGFが挙げられるがこれらに限定されない。

【0124】

異なるフォーマットの二特異性抗体もまた提供する。一部の実施形態では、抗PD-1
断片の各々および第2の断片の各々は、Fab断片、一本鎖可変断片（scFv）、また
はシングルドメイン抗体から独立して選択される。一部の実施形態では、二特異性抗体は
、Fc断片をさらに含む。

【0125】

ただ抗体または抗原結合性断片を含むだけではない二機能性分子も提供する。腫瘍抗原
標的化分子として、例えば本明細書に記載されるものなどのPD-1に特異的な抗体また
は抗原結合性断片を、必要に応じてペプチドリンカーを通して免疫サイトカインまたはリ
ガンドと組み合わせることができる。連結される免疫サイトカインまたはリガンドには、
IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、GM-CSF、TNF-α、CD40L、OX40L、C
D27L、CD30L、4-1BBL、LIGHT、およびGITRLが挙げられるがこ
れらに限定されない。そのような二機能性分子は、免疫チェックポイント遮断効果を腫瘍
部位局所免疫調節と組み合わせることができる。

【0126】

抗体およびその断片をコードするポリヌクレオチド

一部の実施形態では、本開示は、本明細書に記載される抗体またはその断片をコードす
るヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを提供する。

【0127】

本出願は、本明細書に記載される抗体（例えば、抗PD-1抗体）の1つまたは複数の
鎖をコードするポリヌクレオチドをさらに提供する。一部の実施形態では、核酸分子は、
抗体（例えば、抗PD-1抗体）の重鎖または軽鎖をコードするポリヌクレオチドを含む
。一部の実施形態では、核酸分子は、抗体（例えば、抗PD-1抗体）の重鎖をコードす
るポリヌクレオチドおよび軽鎖をコードするポリヌクレオチドの両方を含む。一部の実施
形態では、第1の核酸分子は、重鎖をコードする第1のポリヌクレオチドを含み、第2の
核酸分子は軽鎖をコードする第2のポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、断片
（例えば、抗PD-1断片）をコードする核酸分子を提供する。

【0128】

一部のそのような実施形態では、重鎖および軽鎖は、1つの核酸分子からまたは2つの
個別の核酸分子から2つの個別のポリペプチドとして発現される。したがって、一部の実
施形態では、ポリヌクレオチドは、本明細書に記載される抗体またはその断片の重鎖をコ
ードするヌクレオチド配列を含む。例えば、重鎖は、配列番号19、23、27、31、
35、37、および39からなる群より選択されるアミノ酸配列またはそのバリエーションを
含む得る。例えば、ヌクレオチド配列は、20、24、28、32、36、38、および
40からなる群より選択されるヌクレオチド配列またはそのバリエーションを含む得る、例
えば、重鎖は、配列番号19、23、27、31、35、37、および39からなる群より
選択されるアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%
、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む得る。例えば、ヌクレオチド配列は、20、24、28、32
、36、38、および40からなる群より選択されるヌクレオチド配列、またはそのバリ
アントと少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%
、96%、97%、98%、99%、99.5%、または100%同一であるヌクレオチ
ド配列を含む得る。一部の実施形態では、バリエーションは、CDRの外部の部分が本明細書
に記載される配列とは異なる。

10

20

30

40

50

【0129】

あるいは、一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、本明細書に記載される抗体またはその断片の軽鎖をコードするヌクレオチド配列を含む。例えば、軽鎖は、配列番号21、25、29、33、41、43、および45からなる群より選択されるアミノ酸配列またはそのバリエーションを含み得る。例えば、ヌクレオチド配列は、22、26、30、34、42、44、および46からなる群より選択されるヌクレオチド配列またはそのバリエーションを含み得る。例えば、軽鎖は、配列番号21、25、29、33、41、43、および45からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、または100%同一であるアミノ酸配列を含み得る。例えば、ヌクレオチド配列は、22、26、30、34、42、44、および46からなる群より選択されるヌクレオチド配列またはそのバリエーションと少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、または100%同一であるヌクレオチド配列を含み得る。一部の実施形態では、バリエーションは、CDRの外部の部分が本明細書に記載される配列とは異なる。

10

【0130】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、CDRをコードするヌクレオチド配列を含む。例えば、一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号1~18からなる群より選択されるアミノ酸配列またはそのバリエーションをコードするヌクレオチド配列を含む。例えば、一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号1~18からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、または100%同一であるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む。

20

【0131】

一部の実施形態では、抗体（例えば、抗PD-1抗体）の重鎖または軽鎖をコードするポリヌクレオチドは、翻訳されると重鎖または軽鎖のN末端に位置するリーダー配列をコードするヌクレオチド配列を含む。リーダー配列は、天然の重鎖もしくは軽鎖リーダー配列であってもよく、または別の異種リーダー配列であってもよい。

【0132】

一部の実施形態では、本開示は、本明細書に記載されるポリヌクレオチドを含む核酸構築物を提供する。核酸構築物は、ポリヌクレオチドに作動可能に連結された1つまたは複数の制御配列をさらに含み得る。

30

【0133】

核酸分子は、当技術分野で慣例的な組換えDNA技術を使用して構築することができる。一部の実施形態では、核酸分子は、選択した宿主細胞における発現にとって適した発現ベクターである。

【0134】

したがって、本開示はまた、本明細書に記載されるポリヌクレオチドを含む核酸構築物も提供する。核酸構築物は、本明細書に記載される任意の方法を使用して調製され得る。

【0135】

一部の実施形態では、核酸構築物は、ポリヌクレオチドに作動可能に連結された1つまたは複数の制御配列をさらに含む。一部の実施形態では、1つまたは複数の制御配列は、適した宿主における本明細書に記載される抗体またはその断片の産生を方向付ける。一部の実施形態では、1つまたは複数の制御配列は、プロモーター、エンハンサー、終止シグナル、シグナルペプチド、リーダー、転写ターミネーター、およびその任意の組合せから選択される。例えば、1つまたは複数の制御配列はプロモーターであり得る。

40

【0136】

一部の実施形態では、核酸構築物は、ポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーターをさらに含む。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、遺伝子に対応し、プロモーターはその遺伝子の野生型プロモーターである。

50

【0137】

本開示は、本明細書に記載される核酸構築物を含むベクターをさらに提供する。

【0138】

本明細書に記載される抗体（例えば、抗PD-1抗体）のいずれか1つの重鎖および／または軽鎖をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。本明細書に記載される抗体断片のいずれかをコードするポリヌクレオチドを含むベクターも提供する。そのようなベクターは、DNAベクター、ファージベクター、ウイルスベクター、レトロウイルスベクター等を含むがこれらに限定されない。一部の実施形態では、ベクターは、ベクター、プラスミド、バクテリオファージ、コスミド、S因子、レトロエレメント、レトロウイルス、ウイルス、人工染色体（YAC、BAC、またはMAC）、ミニ染色体、および染色体からなる群より選択される。

10

【0139】

一部の実施形態では、ベクターは、重鎖をコードする第1のポリヌクレオチド配列および軽鎖をコードする第2のポリヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、重鎖および軽鎖は、2つの個別のポリペプチドとしてベクターから発現される。一部の実施形態では、重鎖および軽鎖は、例えば抗体がscFvである場合、単一のポリペプチドの一部として発現される。

【0140】

一部の実施形態では、ベクターは、発現ベクターである。一部の実施形態では、本明細書に記載されるポリペプチド（または活性誘導体もしくはその断片）をコードする核酸配列を含有する発現ベクターは、少なくとも1つの調節配列に作動可能に連結される。多くの発現ベクターが市販されており、他の適したベクターは、当業者によって容易に調製することができる。「作動可能に連結された」は、ヌクレオチド配列が、核酸配列の発現を可能にする様式で調節配列に連結されることを意味すると意図される。調節配列は、当技術分野で認識され、ポリペプチドまたはその活性誘導体もしくは断片を産生するように選択される。したがって、用語「調節配列」は、プロモーター、エンハンサー、および他の発現制御エレメントを含み、これらは、Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)に記載されている。例えば、天然の調節配列または生物に対して天然である調節配列を使用することができる。

20

【0141】

一部の実施形態では、第1のベクターは重鎖をコードするポリヌクレオチドを含み、第2のベクターは軽鎖をコードするポリヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、第1のベクターおよび第2のベクターは、類似の量（例えば、類似のモル量または類似の質量）で宿主細胞にトランスフェクトされる。一部の実施形態では、5:1~1:5の間のモル比または質量比の第1のベクターおよび第2のベクターが宿主細胞にトランスフェクトされる。一部の実施形態では、重鎖をコードするベクターと軽鎖をコードするベクターの1:1~1:5の間の質量比を使用する。一部の実施形態では、重鎖をコードするベクターと軽鎖をコードするベクターの1:2の質量比を使用する。

30

【0142】

一部の実施形態では、ベクターは、CHOもしくはCHO由来細胞、またはNSO細胞などの宿主細胞においてポリペプチドの発現に関して最適化されるように選択される。例示的なベクターは、例えば、Running Deer et al., Biotechnol. Prog. 20:880-889 (2004)に記載される。

40

【0143】

したがって、本開示はまた、本明細書に記載される核酸構築物または本明細書に記載されるベクターを含む宿主細胞も提供する。

【0144】

一部の実施形態では、核酸構築物またはベクターは宿主細胞ゲノムに組み込まれる。一部の実施形態では、核酸構築物またはベクターは、染色体外実体として存在する。宿主細胞

50

胞は原核細胞であり得る。宿主細胞は真核宿主細胞であり得る。例えば、宿主細胞は哺乳動物細胞であり得る。例えば、宿主細胞はヒト細胞であり得る。

【0145】

一部の実施形態では、本明細書に記載される抗体（例えば、抗PD-1抗体）は、原核細胞、例えば細菌細胞において；または真核細胞、例えば真菌細胞（例えば、酵母）、植物細胞、昆虫細胞、および哺乳動物細胞において発現され得る。そのような発現は、例えば当技術分野で公知の手順に従って行われ得る。ポリペプチドを発現させるために使用され得る例示的な真核細胞には、COS7細胞を含むCOS細胞；293-6E細胞を含む293細胞；CHO-S、DG44、Lec13 CHO細胞、およびFUT8 CHO細胞を含むCHO細胞；PER.C6（登録商標）細胞（CruCell）；ならびにNSO細胞が挙げられるがこれらに限定されない。一部の実施形態では、本明細書に記載される抗体（例えば、抗PD-1抗体）は、酵母において発現され得る。例えば、米国公開第US2006/0270045A1号を参照されたい。一部の実施形態では、特定の真核宿主細胞は、抗体の重鎖および／または軽鎖に対して所望の翻訳後改変を行うその能力に基づいて選択される。例えば、一部の実施形態では、CHO細胞は、293細胞において産生される同じポリペプチドより高いレベルのシアリル化を有するポリペプチドを産生する。

10

【0146】

1つまたは複数の核酸を所望の宿主細胞に導入することは、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、電気穿孔、形質導入、感染等が挙げられるがこれらに限定されない任意の方法によって達成され得る。非制限的な例示的な方法は、例えばSambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)に記載されている。核酸は、任意の適した方法に従って所望の宿主細胞において一過性または安定にトランスフェクトされ得る。

20

【0147】

本発明はまた、本明細書に記載されるポリヌクレオチドまたはベクターのいずれかを含む宿主細胞も提供する。一部の実施形態では、本発明は、抗PD-1抗体を含む宿主細胞を提供する。異種DNAを過剰発現させることが可能な任意の宿主細胞を、目的の抗体、ポリペプチド、またはタンパク質をコードする遺伝子を単離する目的のために使用することができる。哺乳動物宿主細胞の非制限的な例には、COS、HeLa、およびCHO細胞が挙げられるがこれらに限定されない。PCT公開第WO87/04462号も参照されたい。適した非哺乳動物宿主細胞には、原核生物（例えば、E.coliまたはB.subtilis）および酵母（例えば、S.cerevisiae、S.pombe；またはK.lactis）が挙げられる。一部の実施形態では、宿主細胞は原核細胞である。一部の実施形態では、宿主細胞は細菌細胞である。一部の実施形態では、細胞は真核細胞である。一部の実施形態では、宿主細胞は酵母細胞である。一部の実施形態では、宿主細胞は動物細胞である。一部の実施形態では、宿主細胞は哺乳動物細胞である。一部の実施形態では、宿主細胞はCHO細胞である。

30

【0148】

一部の実施形態では、抗体は、無細胞システムで産生される。非制限的で例示的な無細胞システムは、例えばSitaraman et al., *Methods Mol. Biol.* 498: 229-44 (2009)；Spirin, *Trends Biotechnol.* 22: 538-45 (2004)；Endo et al., *Biotechnol. Adv.* 21: 695-713 (2003)に記載される。

40

【0149】

抗体（例えば、抗PD-1抗体）は、任意の適した方法によって精製され得る。そのような方法には、アフィニティマトリックスまたは疎水性相互作用クロマトグラフィーの使用が挙げられるがこれらに限定されない。適した親和性リガンドは、ROR1 ECDおよび抗体定常領域に結合するリガンドを含む。例えば、プロテインA、プロテインG、プロテインA/G、または抗体アフィニティカラムを使用して定常領域を結合させ、Fc断

50

片を含む抗体を精製してもよい。疎水性相互作用クロマトグラフィー、例えばブチルまたはフェニルカラムもまた、抗体などの一部のポリペプチドを精製するために適し得る。イオン交換クロマトグラフィー（例えば、アニオン交換クロマトグラフィーおよび／またはカチオン交換クロマトグラフィー）もまた、抗体などの一部のポリペプチドを精製するために適し得る。混合型クロマトグラフィー（例えば、逆相／アニオン交換、逆相／カチオン交換、親水性相互作用／アニオン交換、親水性相互作用／カチオン交換等）もまた、抗体などの一部のポリペプチドを精製するために適し得る。ポリペプチドを精製する多くの方法が当技術分野で公知である。

【0150】

本開示は、本明細書に記載される任意の抗体またはその断片、ポリヌクレオチド、核酸構築物、ベクター、および／または宿主細胞を含む培養培地をさらに提供する。一部の実施形態では、本明細書に記載されるいずれかの方法を使用して調製された培養培地を提供する。

10

【0151】

一部の実施形態では、培地は、ヒポキサンチン、アミノプテリン、および／またはチミジン（例えば、HAT培地）を含む。一部の実施形態では、培地は血清を含まない。一部の実施形態では、培地は血清を含む。一部の実施形態では、培地はD-MEMまたはRPMI-1640培地である。

【0152】

抗体を作製する方法は、当技術分野で周知であり、本明細書に記載される。ある特定の実施形態では、本開示の抗原結合性ポリペプチドの可変領域および定常領域の両方が、完全なヒトのものである。完全なヒト抗体は、当技術分野で記載され、本明細書に記載される技術を使用して作製することができる。例えば、特異的抗原に対する完全なヒト抗体は、抗原チャレンジに応答してそのような抗体を産生するように改変されているが、その内因性の遺伝子座が無効化されているトランスジェニック動物に抗原を投与することによって調製することができる。そのような抗体を作製するために使用することができる例示的な技術は、その全体が参照により本明細書に組み込まれている、米国特許第6,150,584号；第6,458,592号；第6,420,140号に記載されている。

20

【0153】

ある特定の実施形態では、調製された抗体は、処置される動物、例えばヒトにおいて有害な免疫応答を誘発しない。一実施形態では、本開示の抗原結合性ポリペプチド、そのバリエーション、または誘導体は、当技術分野で認識された技術を使用してその免疫原性を低減させるように改変される。例えば、抗体をヒト化、霊長類化、脱免疫を行うことができ、またはキメラ抗体を作製することができる。これらのタイプの抗体は、親抗体の抗原結合特性を保持するかまたは実質的に保持するが、ヒトにおいて免疫原性がより低い非ヒト抗体、典型的にはマウスまたは霊長類抗体に由来する。これは、（a）非ヒト可変ドメイン全体をヒト定常領域にグラフトしてキメラ抗体を生成するステップ；（b）非ヒト相補性決定領域（CDR）の1つまたは複数の少なくとも一部を、肝要なフレームワーク残基を保持したままもしくは保持せずに、ヒトフレームワークおよび定常領域にグラフトするステップ；または（c）非ヒト可変ドメイン全体を移植するが、それらを表面残基の交換によってヒト様区分によって「隠す」ステップを含む様々な方法によって達成され得る。そのような方法は、その全ての全体が参照により本明細書に組み込まれている、Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 57:6851-6855 (1984); Morrison et al., Adv. Immunol. 44:65-92 (1988); Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immun. 25:489-498 (1991); Padlan, Molec. Immun. 31:169-217 (1994)、ならびに米国特許第5,585,089号、第5,693,761号、第5,693,762号、および第6,190,370号に開示されている。

30

40

【0154】

脱免疫もまた使用して抗体の免疫原性を減少させることができる。本明細書で使用され

50

る場合、用語「脱免疫」は、T細胞エピトープを改変するための抗体の変化を含む（例えば、国際出願公開第WO／9852976A1号およびWO／0034317A2号を参照されたい）。例えば、出発抗体の可変重鎖および可変軽鎖配列を分析し、配列内の相補性決定領域（CDR）および他の重要な残基に関連してエピトープの位置を示す各V領域からのヒトT細胞エピトープ「マップ」を作製する。T細胞エピトープマップからの個々のT細胞エピトープを、最終抗体の活性を変化させるリスクが低い代替のアミノ酸置換を同定するために分析する。アミノ酸置換の組合せを含む広範囲の代替の可変重鎖および可変軽鎖配列を設計し、これらの配列をその後、広範囲の結合ポリペプチドに組み入れる。典型的に、12～24個のバリエーション抗体を生成し、結合および／または機能に関して試験する。次いで、改変された可変領域およびヒト定常領域を含む完全な重鎖および軽鎖遺伝子を発現ベクターにクローニングし、その後抗体全体を産生するためにプラスミドを細胞株に導入する。次いで、抗体を適切な生化学アッセイおよび生物アッセイにおいて比較し、最適なバリエーションを同定する。

【0155】

本開示の抗原結合性ポリペプチドの結合特異性は、*in vitro*アッセイ、例えば免疫沈降、ラジオイムノアッセイ（RIA）または酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）によって決定することができる。

【0156】

あるいは、一本鎖単位の産生について記載される技術（米国特許第4,694,778号；Bird, Science 242:423-442 (1988)；Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 55:5879-5883 (1988)；およびWard et al., Nature 334:544-554 (1989)）を、本開示の一本鎖単位の産生するように適合させることができる。一本鎖単位は、アミノ酸架橋を介してFv領域の重鎖および軽鎖断片を連結し、一本鎖融合ペプチドをもたらすことによって形成される。E. coliにおける機能的Fv断片のアセンブリのための技術も使用してもよい（Skerra et al., Science 242: 1038-1041 (1988)）。

【0157】

一本鎖Fv（scFv）および抗体を産生するために使用することができる技術の例は、米国特許第4,946,778号および第5,258,498号；Huston et al., Methods in Enzymology 203:46-88 (1991)；Shu et al., Proc. Natl. Sci. USA 90:1995-1999 (1993)；ならびにSkerra et al., Science 240:1038-1040 (1988)に記載される例を含む。ヒトにおける抗体の*in vivo*での使用および*in vitro*検出アッセイを含む一部の使用では、キメラ、ヒト化、またはヒト抗体を使用することが好ましい場合がある。キメラ抗体は、マウスモノクローナル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などの、抗体の異なる部分が異なる動物種に由来する分子である。キメラ抗体を産生する方法は、当技術分野で公知である。例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれている、Morrison, Science 229:1202 (1985)；Oi et al., BioTechniques 4:214 (1986)；Gillies et al., J. Immunol. Methods 125:191-202 (1989)；米国特許第5,807,715号；第4,816,567号；および第4,816,397号を参照されたい。

【0158】

ヒト化抗体は、非ヒト種からの1つまたは複数の相補性決定領域（CDR）およびヒト免疫グロブリン分子からのフレームワーク領域を有する、所望の抗原に結合する非ヒト種抗体に由来する抗体分子である。しばしば、ヒトフレームワーク領域におけるフレームワーク残基を、抗原結合を変化させるために、好ましくは改善するためにCDRドナー抗体からの対応する残基で置換する。これらのフレームワーク置換は、当技術分野で周知の方法によって、例えば特定の位置で異常なフレームワーク残基を同定するために抗原結合および配列比較にとって重要であるフレームワーク残基を同定するためにCDRおよびフレームワーク残基の相互作用のモデリングによって同定される（例えば、全体が参照により本明細書に組み込まれている、Queen et al., 米国特許第5,585,089号；Riechmann et al., Nature 332:323 (1988)を参照されたい）。抗体は、例えばCDR

10

20

30

40

50

グラフティング (EP 239, 400; PCT 公開 WO 91/09967; 米国特許第 5, 225, 539 号; 第 5, 530, 101 号; および第 5, 585, 089 号)、ベニヤリング (veneer ing) またはリサーフェシング (resurfacing) (EP 592, 106; EP 519, 596; Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7(6):805-814 (1994); Roguska, et al., Proc. Natl. Sci. USA 91:969-973 (1994))、ならびにチェーンシャッフリング (その全体が参照により本明細書に組み込まれている、米国特許第 5, 565, 332 号) を含む当技術分野で公知の多様な技術を使用してヒト化することができる。

【0159】

完全なヒト抗体は、ヒト患者の治療的処置にとって特に望ましい。ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン配列に由来する抗体ライブラリーを使用するファージディスプレイ法を含む当技術分野で公知の多様な方法によって作製することができる。その各々の全体が参照により本明細書に組み込まれている、米国特許第 4, 444, 887 号および第 4, 716, 111 号; ならびに PCT 公開 WO 98/46645、WO 98/50433、WO 98/24893、WO 98/16654、WO 96/34096、WO 96/33735、および WO 91/10741 も参照されたい。

【0160】

ヒト抗体はまた、機能的な内因性の免疫グロブリンを発現することが不可能であるがヒト免疫グロブリン遺伝子を発現することができるトランスジェニックマウスを使用して産生することもできる。例えば、ヒト重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子複合体を、ランダムにまたは相同組換えによってマウス胚性幹細胞に導入してもよい。あるいは、ヒト可変領域、定常領域、および多様性領域を、ヒト重鎖および軽鎖遺伝子に加えてマウス胚性幹細胞に導入してもよい。マウス重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子を、相同組換えによるヒト免疫グロブリン遺伝子座の導入と個別にまたは同時に非機能的にしてもよい。特に、JH 領域のホモ接合欠失は、内因性の抗体産生を防止する。改変された胚性幹細胞を増大させて、胚盤胞にマイクロインジェクションし、キメラマウスを産生する。次いでキメラマウスを交配させて、ヒト抗体を発現するホモ接合子孫を産生する。トランスジェニックマウスを、選択された抗原、例えば所望の標的ポリペプチドの全てまたは一部によって通常の様式で免疫する。抗原に対するモノクローナル抗体を、慣例的なハイブリドーマ技術を使用して、免疫したトランスジェニックマウスから得ることができる。トランスジェニックマウスが有するヒト免疫グロブリントランスジーンは、B 細胞分化の際に再構成し、その後クラススイッチおよび体細胞変異を受ける。このため、そのような技術を使用して、治療的に有用な IgG、IgA、IgM、および IgE 抗体を産生することが可能である。ヒト抗体を産生するためのこの技術の概要に関しては、Lonberg and Huszar Int. Rev. Immunol. 73:65-93 (1995) を参照されたい。ヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体を産生するためのこの技術ならびにそのような抗体を産生するプロトコルの詳細な考察に関しては、その全体が参照により本明細書に組み込まれている、PCT 公開 WO 98/24893; WO 96/34096; WO 96/33735; 米国特許第 5, 413, 923 号; 第 5, 625, 126 号; 第 5, 633, 425 号; 第 5, 569, 825 号; 第 5, 661, 016 号; 第 5, 545, 806 号; 第 5, 814, 318 号; および第 5, 939, 598 号を参照されたい。加えて、Abgenix, Inc. (Freemont, Calif.) および GenPharm (San Jose, Calif.) などの企業は、上記の技術と類似の技術を使用して選択された抗原に対するヒト抗体の提供に携わることができる。

【0161】

選択されたエピトープを認識する完全なヒト抗体はまた、「誘導選択」と呼ばれる技術を使用して生成することもできる。このアプローチでは、選択された非ヒトモノクローナル抗体、例えばマウス抗体を使用して、同じエピトープを認識する完全なヒト抗体の選択を誘導する (Jespers et al., Bio/Technology 72:899-903 (1988)、その全体が

10

20

30

40

50

参照により本明細書に組み込まれている、米国特許第 5, 565, 332 号も参照されたい)。

【0162】

別の実施形態では、所望のモノクローナル抗体をコードする DNA は、慣例的な手順を使用して（例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することが可能なオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）容易に単離およびシーケンシングすることができる。単離およびサブクローニングされたハイブリドーマ細胞は、そのような DNA の好ましい起源としての役目を果たす。単離後、DNA を発現ベクターに入れて、次いでこれを、他に免疫グロブリンを産生しない原核または真核宿主細胞、例えば *E. coli* 細胞、サル COS 細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞または骨髓腫細胞にトランスフェクトする。より詳しくは、単離された DNA（本明細書に記載されるように合成であり得る）を使用して、参照により本明細書に組み込まれている、1995 年 1 月 25 日に出願された、Newman et al. の米国特許第 5, 658, 570 号に記載されるように抗体を製造するために定常領域および可変領域配列をクローニングしてもよい。本質的に、これは選択された細胞からの RNA の抽出、cDNA への変換、および Ig 特異的プライマーを使用する PCR による増幅を伴う。この目的のために適したプライマーもまた、米国特許第 5, 658, 570 号に記載される。以下により詳細に考察するように、所望の抗体を発現する形質転換細胞は、免疫グロブリンの臨床的および商業的供給を提供するために比較的大量に成長させることができる。

【0163】

加えて、慣例的な組換え DNA 技術を使用して、本開示の抗原結合性ポリペプチドの CDR の 1 つまたは複数を、フレームワーク領域内に、例えばヒトフレームワーク領域内に挿入して非ヒト抗体をヒト化することができる。フレームワーク領域は、天然に存在するまたはコンセンサスフレームワーク領域、好ましくはヒトフレームワーク領域であり得る（例えば、ヒトフレームワーク領域の記載に関しては、Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 278:457-479 (1998) を参照されたい）。好ましくは、フレームワーク領域および CDR の組合せによって生成されるポリヌクレオチドは、所望のポリペプチド、例えば LIGHT の少なくとも 1 つのエピトープに特異的に結合する抗体をコードする。好ましくは、1 つまたは複数のアミノ酸置換をフレームワーク領域内に行うことができ、好ましくはアミノ酸置換は、抗体のその抗原に対する結合を改善する。加えて、そのような方法を使用して、鎖内ジスルフィド結合に関与する 1 つまたは複数の可変領域システイン残基のアミノ酸置換または欠失を作製し、1 つまたは複数の鎖内ジスルフィド結合を欠如する抗体分子を生成することができる。ポリヌクレオチドに対する他の変化は、本開示によって包含され、当技術分野の技能の範囲内である。

【0164】

加えて、適切な抗原特異性を有するマウス抗体分子からの遺伝子を、適切な生物活性を有するヒト抗体分子からの遺伝子と共にスプライシングすることによって「キメラ抗体」を産生するために開発された技術 (Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* :851-855 (1984); Neuberger et al., *Nature* 372:604-608 (1984); Takeda et al., *Nature* 314:452-454 (1985)) を使用することができる。本明細書で 사용되는場合、キメラ抗体は、異なる部分が異なる動物種に由来する分子、例えばマウスモノクローナル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分子である。

【0165】

組換え抗体を生成するためのなお別の非常に効率的な手段は、Newman, *Biotechnology* 10: 1455-1460 (1992) によって開示される。具体的には、この技術は、サル可変ドメインおよびヒト定常配列を含有する霊長類化抗体の生成をもたらす。この参考文献は、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。その上、この技術はまた、その各々が参照により本明細書に組み込まれている、同一出願人による米国特許第 5, 658, 570 号、第 5, 693, 780 号および第 5, 756, 096 号に記載されている。

【0166】

あるいは、抗体産生細胞株を、当業者に周知の技術を使用して選択および培養することができる。そのような技術は、多様な実験マニュアルおよび主要な刊行物に記載されている。この点において、以下に記載される本開示において使用するために適した技術は、補足を含むその全体が参照により本明細書に組み込まれている、Current Protocols in Immunology, Coligan et al., Eds., Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, New York (1991)に記載されている。

【0167】

加えて、アミノ酸置換をもたらす部位特異的変異誘発およびPCR媒介変異誘発を含むがこれらに限定されない、当業者に公知の標準的な技術を使用して、本開示の抗体をコードするヌクレオチド配列に変異を導入することができる。好ましくは、バリエーション（誘導体を含む）は、参照の重鎖可変領域CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、可変軽鎖領域CDR-L1、CDR-L2、またはCDR-L3と比較して、50個未満のアミノ酸置換、40個未満のアミノ酸置換、30個未満のアミノ酸置換、25個未満のアミノ酸置換、20個未満のアミノ酸置換、15個未満のアミノ酸置換、10個未満のアミノ酸置換、5個未満のアミノ酸置換、4個未満のアミノ酸置換、3個未満のアミノ酸置換、または2個未満のアミノ酸置換をコードする。あるいは、変異は、飽和変異誘発などのコード配列の全てまたは一部に沿って無作為に導入することができ、得られた変異体を生物活性に関してスクリーニングして、活性を保持する変異体を同定することができる。

【0168】

がんの処置

本明細書に記載されるように、本開示の抗体、バリエーション、または誘導体は、ある特定の処置および診断方法において使用することができる。

【0169】

本開示は、本明細書に記載される障害または状態の1つまたは複数処置するために、本開示の抗体を、動物、哺乳動物、およびヒトなどの患者に投与するステップを伴う抗体に基づく治療をさらに対象とする。本開示の治療化合物は、本開示の抗体（本明細書に記載されるそのバリエーションおよび誘導体を含む）および本開示の抗体をコードする核酸またはポリヌクレオチド（本明細書に記載されるそのバリエーションおよび誘導体を含む）を含むがこれらに限定されない。

【0170】

本開示の抗体はまた、がんを処置または阻害するためにも使用することができる。PD-1は、腫瘍細胞において過剰発現され得る。腫瘍由来PD-1は、免疫細胞上のPD-L1に結合することができ、それによって抗腫瘍T細胞免疫を制限し得る。マウス腫瘍モデルにおけるPD-1を標的とする低分子阻害剤またはモノクローナル抗体による結果は、標的化PD-1治療が腫瘍成長の有効な制御に対する重要な代替の現実的なアプローチであることを示している。実験例において実証されるように、抗PD-1抗体は、養子免疫応答機構を活性化し、これはがん患者における生存の改善をもたらす得る。

【0171】

したがって、一部の実施形態では、それを必要とする患者においてがんを処置する方法を提供する。一実施形態では、方法は、有効量の本開示の抗体を患者に投与するステップを伴う。一部の実施形態では、患者におけるがん細胞の少なくとも1つ（例えば、間質細胞）は、PD-1を発現する、過剰発現する、または発現するように誘導される。PD-1発現の誘導は、例として、腫瘍ワクチンの投与または放射線療法によって行うことができる。

【0172】

PD-1タンパク質を発現する腫瘍は、膀胱がん、非小細胞肺癌、腎臓がん、乳がん、尿道がん、結腸直腸がん、頭頸部がん、扁平上皮がん、メルケル細胞癌、消化器がん、胃がん、食道がん、卵巣がん、腎臓がん、および小細胞肺癌の腫瘍を含む。したがって、本開示の抗体は、任意の1つまたは複数のそのようながんを処置するために使用するこ

とができる。

【0173】

細胞治療、例えばキメラ抗原受容体（CAR）T細胞治療もまた、本開示に提供する。本開示の抗PD-1抗体と接触する（または代わりに本開示の抗PD-1抗体を発現するように操作された）適した細胞を使用することができる。そのような接触または操作によって、次いで細胞を、処置を必要とするがん患者に導入することができる。がん患者は、本明細書に開示されるタイプのいずれかのがんを有し得る。細胞（例えば、T細胞）は、例として腫瘍浸潤Tリンパ球、CD4+ T細胞、CD8+ T細胞、またはその組合せであり得るがこれらに限定されない。

【0174】

一部の実施形態では、細胞は、がん患者自身から単離された。一部の実施形態では、細胞は、ドナーまたは細胞バンクから提供された。細胞ががん患者から単離される場合、望ましくない免疫反応を最小限にすることができる。

【0175】

本開示の抗体またはバリエーションまたはその誘導体によって処置、防止、診断、および／または予後判定され得る、細胞生存の増加に関連する追加の疾患または状態には、悪性疾患および関連する障害、例えば白血病（急性白血病（例えば、急性リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病（骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性、および赤白血病を含む））、および慢性白血病（例えば、慢性骨髄性（顆粒球性）白血病、および慢性リンパ球性白血病）を含む）、真性赤血球増加症、リンパ腫（例えば、ホジキン病および非ホジキン病）、多発性骨髄腫、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、重鎖病、ならびに肉腫および癌腫、例えば線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、膵臓がん、乳がん、甲状腺がん、子宮内膜がん、黒色腫、前立腺がん、卵巣がん、前立腺がん、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭状癌、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原性癌、腎細胞癌、肝腫、胆管癌、絨毛癌、セミノーマ、胎児性癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸がん、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星細胞腫、髄膜芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫（meningioma）、黒色腫、神経芽腫、および網膜芽腫を含むがこれらに限定されない固形腫瘍の進行および／または転移が挙げられるがこれらに限定されない。

【0176】

感染症および免疫障害の処置

実験例において実証するように、本開示の抗体は、感染症を処置するために有用であり得る免疫応答を活性化することができる。

【0177】

感染症は、病原体による生物の体組織の侵入、その増殖およびこれらの生物に対する宿主組織の反応、ならびにそれらが産生する毒素である。感染症は、ウイルス、ピロイド、プリオン、細菌、寄生性の回虫および蟯虫などの線虫、マダニ、ダニ、ノミ、およびシラミなどの節足動物、白癬などの真菌、ならびに条虫および他の蠕虫などの他の大寄生物などの感染性因子によって引き起こされ得る。一態様では、感染性因子は、細菌、例えばグラム陰性菌である。一態様では、感染性因子は、ウイルス、例えばDNAウイルス、RNAウイルス、および逆転写ウイルスである。ウイルスの非制限的な例には、アデノウイルス、コクサッキーウイルス、エプスタインバーウイルス、A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、単純ヘルペスウイルス1型、単純ヘルペスウイルス2型、サイトメガロウイルス、ヒトヘルペスウイルス8型、HIV、インフルエンザウイルス、麻疹ウイルス、ムンプスウイルス、ヒト乳頭腫ウイルス、パラインフルエンザウイルス、ポリオウイルス、狂犬病ウイルス、RSウイルス、風疹ウイルス、水痘-帯状疱疹ウイルスが挙げられる。

【0178】

一部の実施形態では、免疫障害を処置するための抗体またはその断片の方法または使用も提供する。免疫障害の非制限的な例には、感染症、感染症に関連するエンドトキシンショック、関節炎、関節リウマチ、喘息、COPD、骨盤腹膜炎、アルツハイマー病、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、ペロニー病、セリアック病、胆嚢疾患、毛嚢病、腹膜炎、乾癬、血管炎、外科的癒着、卒中、I型糖尿病、ライム病、関節炎、髄膜炎、自己免疫性ぶどう膜炎、中枢および末梢神経系の免疫媒介性炎症障害、多発性硬化症、狼瘡およびギラン・バレー症候群、アトピー性皮膚炎、自己免疫性肝炎、線維化肺炎、グレーブス病、IgA腎症、特発性血小板減少性紫斑病、メニエール病、天疱瘡、原発性胆汁性肝硬変、サルコイドーシス、強皮症、ウェゲナー肉芽腫症、脾炎、外傷、移植片対宿主病、移植片の拒絶、虚血疾患、心筋梗塞、アテローム性動脈硬化症、血管内凝固、骨吸収、骨粗鬆症、変形性関節炎、歯周炎、低塩酸症、および母子間免疫寛容の欠如に関連する不妊症が挙げられる。

10

【0179】

本開示の抗体はまた、微生物および免疫細胞を標的化して微生物の除去を行うことによって、微生物によって引き起こされる感染疾患を処置するために、または微生物を殺滅するために使用することもできる。一態様では、微生物は、RNAおよびDNAウイルスを含むウイルス、グラム陽性菌、グラム陰性菌、原虫、または真菌である。

【0180】

例えば、微生物は肝炎ウイルスである。肝炎ウイルスの非制限的な例には、A型肝炎ウイルス(HAV)、B型肝炎ウイルス(HBV)、C型肝炎ウイルス(HCV)、D型肝炎ウイルス(HDV)、およびE型肝炎ウイルス(HEV)が挙げられ得る。

20

【0181】

いかなる特定の理論にも拘束されることを望まないが、本明細書に記載される抗体またはその断片は、PD-1/PD-L1軸の免疫チェックポイントを遮断し、このため、肝炎患者における免疫抑制からT細胞を救うことができる。

【0182】

一部の実施形態では、本明細書に記載される抗体またはその断片は、肝炎ウイルス感染を有する被験体においてT細胞増殖を誘導する。

【0183】

一部の実施形態では、本明細書に記載される抗体またはその断片は、肝炎ウイルス感染を有する被験体においてT細胞によるサイトカイン産生を誘導する。T細胞によって産生され得る非制限的なサイトカインは、IL-1、IL-18、TNF-α、CD70、IL-2、IFN-α、IFN-γ、IL-6、IL-11、IL-31、IL-10、IL-17、およびTGF-βを含む。一部の実施形態では、サイトカインはIL-2である。一部の実施形態では、サイトカインはIFN-γである。

30

【0184】

一部の実施形態では、本明細書に記載される抗体またはその断片は、肝炎ウイルス感染を有する被験体におけるT細胞の細胞傷害を増加させる。

【0185】

一部の実施形態では、本明細書に記載される抗体またはその断片は、肝炎ウイルス感染を有する被験体における1つまたは複数の血清学的指標を低減させる。任意の適した血清学的指標を使用してもよい。例えば、HAVの場合、血清学的指標は、抗HAV IgMであり得る。HBVの場合、血清学的指標は、HBsAg、HBeAg、または抗HBc IgMであり得る。HCVの場合、血清学的指標は、抗HCVであり得る。HDVの場合、血清学的指標は、抗HDV IgMまたは抗HDV IgGであり得る。HEVの場合、血清学的指標は、抗HEV IgMであり得る。

40

【0186】

一部の実施形態では、本明細書に記載される抗体またはその断片は、肝炎ウイルス感染を有する被験体におけるウイルス量を低減させる。例えば、ウイルス量は、被験体におけるウイルスDNAまたはRNAの量として測定され得る。一部の実施形態では、本明細書

50

に記載される抗体またはその断片は、HBV感染を有する被験体におけるHBV DNAを低減させる。一部の実施形態では、本明細書に記載される抗体またはその断片は、HCV感染を有する被験体におけるHCV RNAを低減させる。

【0187】

一部の実施形態では、本明細書に記載される抗体またはその断片は、肝炎ウイルス感染を有する被験体におけるアミノトランスフェラーゼ活性を低減させる。アミノトランスフェラーゼは、その増加が肝炎または肝炎ウイルス感染を示す限り、任意の適したアミノトランスフェラーゼであり得る。例えば、アミノトランスフェラーゼは、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）であり得る。例えば、アミノトランスフェラーゼは、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）であり得る。

【0188】

一部の実施形態では、増加は約1%～約50倍の増加であり得る。一部の実施形態では、増加は少なくとも約1%の増加であり得る。一部の実施形態では、増加は、最大で約50倍の増加であり得る。一部の実施形態では、増加は、約1%～約2%、約1%～約5%、約1%～約10%、約1%～約20%、約1%～約50%、約1%～約2倍、約1%～約3倍、約1%～約500%、約1%～約10倍、約1%～約50倍、約2%～約5%、約2%～約10%、約2%～約20%、約2%～約50%、約2%～約2倍、約2%～約3倍、約2%～約5倍、約2%～約10倍、約2%～約50倍、約5%～約10%、約5%～約20%、約5%～約50%、約5%～約2倍、約5%～約3倍、約5%～約5倍、約5%～約10倍、約5%～約50倍、約10%～約20%、約10%～約50%、約10%～約2倍、約10%～約3倍、約10%～約5倍、約10%～約10倍、約10%～約50倍、約20%～約50%、約20%～約2倍、約20%～約3倍、約20%～約5倍、約20%～約10倍、約20%～約50倍、約50%～約2倍、約50%～約3倍、約50%～約5倍、約50%～約10倍、約50%～約50倍、約2倍～約3倍、約2倍～約5倍、約2倍～約10倍、約2倍～約50倍、約3倍～約5倍、約3倍～約10倍、約3倍～約50倍、約5倍～約10倍、約5倍～約50倍、または約10倍～約50倍の増加であり得る。一部の実施形態では、増加は、約1%、約2%、約5%、約10%、約20%、約50%、約2倍、約3倍、約5倍、約10倍、または約50倍の増加であり得る。一部の実施形態では、増加は、約1%、約2%、約5%、約10%、約20%、約50%、約2倍、約3倍、約5倍、約10倍、または約50倍より多い増加であり得る。

【0189】

一部の実施形態では、低減は約1%～約90%の低減であり得る。一部の実施形態では、低減は、少なくとも約1%の低減であり得る。一部の実施形態では、低減は、最大で約90%の低減であり得る。一部の実施形態では、低減は、約1%～約2%、約1%～約5%、約1%～約10%、約1%～約15%、約1%～約20%、約1%～約30%、約1%～約40%、約1%～約50%、約1%～約70%、約1%～約80%、約1%～約90%、約2%～約5%、約2%～約10%、約2%～約15%、約2%～約20%、約2%～約30%、約2%～約40%、約2%～約50%、約2%～約70%、約2%～約80%、約2%～約90%、約5%～約10%、約5%～約15%、約5%～約20%、約5%～約30%、約5%～約40%、約5%～約50%、約5%～約70%、約5%～約80%、約5%～約90%、約10%～約15%、約10%～約20%、約10%～約30%、約10%～約40%、約10%～約50%、約10%～約70%、約10%～約80%、約10%～約90%、約15%～約20%、約15%～約30%、約15%～約40%、約15%～約50%、約15%～約70%、約15%～約80%、約15%～約90%、約20%～約30%、約20%～約40%、約20%～約50%、約20%～約70%、約20%～約80%、約20%～約90%、約30%～約40%、約30%～約50%、約30%～約70%、約30%～約80%、約30%～約90%、約40%～約50%、約40%～約70%、約40%～約80%、約40%～約90%、約50%～約70%、約50%～約80%、約50%～約90%、約70%～約80%、約70%～約90%、または約80%～約90%の低減であり得る。一部の実施形態では、低減は、約1

10

20

30

40

50

％、約 2 ％、約 5 ％、約 10 ％、約 15 ％、約 20 ％、約 30 ％、約 40 ％、約 50 ％、約 70 ％、約 80 ％、または約 90 ％の低減であり得る。一部の実施形態では、約 1 ％、約 2 ％、約 5 ％、約 10 ％、約 15 ％、約 20 ％、約 30 ％、約 40 ％、約 50 ％、約 70 ％、約 80 ％、または約 90 ％より多い低減であり得る。

【0190】

任意の特定の患者に関する特定の投薬量および処置レジメンは、使用される特定の抗体、そのバリエーション、または誘導体、患者の年齢、体重、全身健康、性別、および食事、ならびに投与時期、排泄速度、薬物の組み合わせ、および処置される特定の疾患の重症度を含む多様な要因に依存する。医療従事者によるそのような要因の判断は、当技術分野の通常の技能の範囲内である。量はまた、処置される個々の患者、投与経路、製剤のタイプ、使用される化合物の特徴、疾患の重症度、および所望の効果にも依存する。使用される量は、当技術分野で周知の薬理学的および薬物動態原理によって決定することができる。

【0191】

抗体またはバリエーションの投与方法は、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外、および経口経路を含むがこれらに限定されない。抗原結合性ポリペプチドまたは組成物は、任意の簡便な経路によって、例えば注入またはボーラス注射によって、表皮または粘膜皮膚内層（例えば、口腔粘膜、直腸および腸粘膜等）を通しての吸収によって投与してもよく、他の生物活性剤と共に投与してもよい。このため、本開示の抗原結合性ポリペプチドを含有する医薬組成物は、経口、直腸、非経口、槽内（intracisternally）、腔内、腹腔内、局所（散剤、軟膏、滴剤、または経皮パッチによる）、頬側、または経口もしくは点鼻スプレーとして投与され得る。

【0192】

用語「非経口」は、本明細書で使用される場合、静脈内、筋肉内、腹腔内、胸骨内、皮下、および関節内注射および注入を含む投与様式を指す。

【0193】

投与は全身または局所であり得る。加えて、本開示の抗体を脳室内および髄腔内注射を含む任意の適した経路によって中枢神経系に導入することが望ましいであろう；脳室内注射は、例えばリザーバー、例えば Ommaya リザーバーに取り付けた脳室内カテーテルによって容易となり得る。肺投与もまた、例えばインヘラーまたはネブライザーおよびエアロゾル化剤を含む製剤を使用することによって使用することができる。

【0194】

本開示の抗体ポリペプチドまたは組成物を、処置を必要とする領域に局所投与することは望ましいであろう；これは、例えば、限定ではないが手術中の局所注入、局所適用、例えば手術後の創傷包帯と共に、注射によって、カテーテルによって、坐剤によって、またはインプラントによって達成され得るが、前記インプラントは、膜、例えばシラステック（sialastic）膜または線維を含む、多孔性、非多孔性、またはゼラチン様材料である。好ましくは、抗体を含む本開示のタンパク質を投与する場合、タンパク質を吸収しない材料を使用するように配慮しなければならない。

【0195】

別の実施形態では、抗体または組成物は、小胞、特にリポソーム中で送達することができる（Langer, 1990, Science 249:1527-1533; Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, ibid., pp. 317-327を参照されたい；一般的には同書を参照されたい）。

【0196】

なお別の実施形態では、抗原結合性ポリペプチドまたは組成物は、制御放出システムで送達することができる。一実施形態では、ポンプを使用してもよい（Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201; Buchwald et al., 1980, Surgery 88:507; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574を参照されたい）。別の実施形態では、ポリマー材料を使用することができる（Medical Applications of Co

ntrolled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, J., 1983, Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61を参照されたい; Levy et al., 1985, Science 228:190; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71:105も参照されたい)。なお別の実施形態では、制御放出システムは、治療標的、すなわち脳の近位に配置することができ、このため必要量は全身用量の一部のみである（例えば、Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)を参照されたい)。他の制御放出システムがLanger (1990, Science 249:1527-1533) による総説において考察されている。

10

【0197】

本開示の組成物がタンパク質をコードする核酸またはポリヌクレオチドを含む特定の実施形態では、それを適切な核酸発現ベクターの一部として構築すること、およびそれを例えばレトロウイルスベクターを使用することによって（米国特許第4,980,286号を参照されたい）、または直接注射によって、または微粒子衝突の使用によって（例えば、遺伝子銃、微粒子銃（Biolistic）、Dupon t）、または脂質もしくは細胞表面受容体もしくはトランスフェクト剤によるコーティングによって、または核に入ることがわかっているホメオボックス様ペプチドにそれを連結して投与することによって（例えば、Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868を参照されたい）細胞内となるように投与することによって、核酸を *in vivo* で投与してそのコードされるタンパク質の発現を促進することができる。あるいは、核酸を、相同組換えによって、細胞内に導入して発現のために宿主細胞DNA内に組み込むことができる。

20

【0198】

炎症、免疫または悪性疾患、障害、または状態の処置、阻害、および防止において有効である本開示の抗体の量は、標準的な臨床技術によって決定することができる。加えて、*in vitro* アッセイを、最適な投薬量範囲を同定するために役立つように必要に応じて使用してもよい。製剤において使用される正確な用量はまた、投与経路、および疾患、障害、または状態の重篤さにも依存し、医療提供者の判断および各患者の状況に従って決定すべきである。有効用量は、*in vitro* または動物モデル試験システムから導出される用量反応曲線から外挿することができる。

30

【0199】

一部の態様では、それを必要とする患者におけるがん、感染症、または免疫障害を処置する方法であって、患者に、1つまたは複数の用量の、ヒトプログラム細胞死タンパク質1（PD-1）に対して特異性を有する単離された抗体またはその断片を投与するステップを含み、各用量が約1mg/kg～約10mg/kgである、方法を提供する。一部の実施形態では、投薬量は約1mg/kgである。一部の実施形態では、投薬量は約10mg/kgである。一部の実施形態では、投薬量は約3mg/kgである。一部の実施形態では、ヒトプログラム細胞死タンパク質1（PD-1）に対して特異性を有する単離された抗体またはその断片は、重鎖相補性決定領域HCDR1、HCDR2、およびHCDR3を含む重鎖可変領域、ならびに軽鎖相補性決定領域LCDR1、LCDR2、およびLCDR3を含む軽鎖可変領域を含み、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、およびLCDR3は、(a) HCDR1: GFTFSSYT（配列番号1）、HCDR2: ISHG GGD T（配列番号2）、HCDR3: ARHSGYER GY YYVMDY（配列番号3）、LCDR1: ESVDY YGFSF（配列番号4）、LCDR2: AAS（配列番号5）、LCDR3: QQSKEVPW（配列番号6）; (b) HCDR1: GYTFTSYT（配列番号7）、HCDR2: INPTTG Y T（配列番号8）、HCDR3: ARDDAY YSGY（配列番号9）、LCDR1: ENIYSNL（配列番号10）、LCDR2: AAK（配列番号11）、LCDR3: QHFWGT

40

50

PWT (配列番号12) ; (c) HCDR1:GFAFSSYD (配列番号13)、HCDR2:ITIGGGTT (配列番号14)、HCDR3:ARHRYDYFAMDN (配列番号15)、LCDR1:ENV DNYGINF (配列番号16)、LCDR2:VSS (配列番号17)、LCDR3:QQSKDVPW (配列番号18) ; および (d) (a) ~ (c) に示されるHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、およびLCDR3であって、ただしそのうちの少なくとも1つが、1つ、2つ、または3つのアミノ酸付加、欠失、保存的アミノ酸置換、またはその組合せを含む、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、およびLCDR3からなる群より選択される。

【0200】

一般的な提案として、患者に投与される本開示の抗原結合性ポリペプチドの投薬量は、典型的には、 $0.1\text{mg}/\text{kg} \sim 100\text{mg}/\text{kg}$ 患者体重、 $0.1\text{mg}/\text{kg}$ から $20\text{mg}/\text{kg}$ 患者体重の間、または $1\text{mg}/\text{kg} \sim 10\text{mg}/\text{kg}$ 患者体重である。

【0201】

例えば、一部の実施形態では、投薬量は、 $0.1\text{mg}/\text{kg}$ から $20\text{mg}/\text{kg}$ 患者体重の間、または $1\text{mg}/\text{kg} \sim 10\text{mg}/\text{kg}$ 患者体重である。一部の実施形態では、投薬量は、約 $1\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $2\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $2\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $3\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $3\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $4\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $4\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $5\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $5\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $6\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $6\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $7\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $7\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $8\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $8\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $9\text{mg}/\text{kg}$ 、または約 $9\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $10\text{mg}/\text{kg}$ である。一部の実施形態では、投薬量は、約 $1\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $2\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $3\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $4\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $5\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $6\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $7\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $8\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $9\text{mg}/\text{kg}$ 、または約 $10\text{mg}/\text{kg}$ である。一部の実施形態では、投薬量は約 $1\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $3\text{mg}/\text{kg}$ 、または約 $10\text{mg}/\text{kg}$ である。一部の実施形態では、投薬量は約 $3\text{mg}/\text{kg}$ である。

【0202】

例えば、一部の実施形態では、投薬量は、約 $0.001\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $1,000\text{mg}/\text{kg}$ である。一部の実施形態では、投薬量は、少なくとも約 $0.001\text{mg}/\text{kg}$ である。一部の実施形態では、投薬量は、最大で約 $1,000\text{mg}/\text{kg}$ である。一部の実施形態では、投薬量は、約 $0.001\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $0.01\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.001\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $0.05\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.001\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $0.1\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.001\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.001\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $1\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.001\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $5\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.001\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $10\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.001\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $50\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.001\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $100\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.001\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $500\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.001\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $1,000\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.01\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $0.05\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.01\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $0.1\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.01\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.01\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $1\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.01\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $5\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.01\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $10\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.01\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $50\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.01\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $100\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.01\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $500\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.01\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $1,000\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.05\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $0.1\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.05\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.05\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $1\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.05\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $5\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.05\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $10\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.05\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $50\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.05\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $100\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.05\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $500\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.05\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $1,000\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.1\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.1\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $1\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.1\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $5\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.1\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $10\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.1\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $50\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.1\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $100\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.1\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $500\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.1\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $1,000\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.5\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $1\text{mg}/\text{kg}$ 、約 $0.5\text{mg}/\text{kg} \sim$ 約 $5\text{mg}/\text{kg}$ 、約 0.5mg

／k g～約10mg／k g、約0.5mg／k g～約50mg／k g、約0.5mg／k g～約100mg／k g、約0.5mg／k g～約500mg／k g、約0.5mg／k g～約1,000mg／k g、約1mg／k g～約5mg／k g、約1mg／k g～約10mg／k g、約1mg／k g～約50mg／k g、約1mg／k g～約100mg／k g、約1mg／k g～約500mg／k g、約1mg／k g～約1,000mg／k g、約5mg／k g～約10mg／k g、約5mg／k g～約50mg／k g、約5mg／k g～約100mg／k g、約5mg／k g～約500mg／k g、約5mg／k g～約1,000mg／k g、約10mg／k g～約50mg／k g、約10mg／k g～約100mg／k g、約10mg／k g～約500mg／k g、約10mg／k g～約1,000mg／k g、約50mg／k g～約100mg／k g、約50mg／k g～約500mg／k g、約50mg／k g～約1,000mg／k g、約100mg／k g～約500mg／k g、約100mg／k g～約1,000mg／k g、または約500mg／k g～約1,000mg／k gである。一部の実施形態では、投薬量は、約0.001mg／k g、約0.01mg／k g、約0.05mg／k g、約0.1mg／k g、約0.5mg／k g、約1mg／k g、約5mg／k g、約10mg／k g、約50mg／k g、約100mg／k g、約500mg／k g、または約1,000mg／k gである。一部の実施形態では、投薬量は、約0.001mg／k g、約0.01mg／k g、約0.05mg／k g、約0.1mg／k g、約0.5mg／k g、約1mg／k g、約5mg／k g、約10mg／k g、約50mg／k g、約100mg／k g、約500mg／k g、または約1,000mg／k gより多い。

10

20

【0203】

例えば、一部の実施形態では、投薬量は、約0.01mg／k g～約100mg／k gである。一部の実施形態では、投薬量は、少なくとも約0.01mg／k gである。一部の実施形態では、投薬量は、最大で約100mg／k gである。一部の実施形態では、投薬量は、約0.01mg／k g～約0.02mg／k g、約0.01mg／k g～約0.05mg／k g、約0.01mg／k g～約0.1mg／k g、約0.01mg／k g～約0.2mg／k g、約0.01mg／k g～約0.5mg／k g、約0.01mg／k g～約1mg／k g、約0.01mg／k g～約2mg／k g、約0.01mg／k g～約5mg／k g、約0.01mg／k g～約10mg／k g、約0.01mg／k g～約50mg／k g、約0.01mg／k g～約100mg／k g、約0.02mg／k g～約0.05mg／k g、約0.02mg／k g～約0.1mg／k g、約0.02mg／k g～約0.2mg／k g、約0.02mg／k g～約0.5mg／k g、約0.02mg／k g～約1mg／k g、約0.02mg／k g～約2mg／k g、約0.02mg／k g～約5mg／k g、約0.02mg／k g～約10mg／k g、約0.02mg／k g～約50mg／k g、約0.02mg／k g～約100mg／k g、約0.05mg／k g～約0.1mg／k g、約0.05mg／k g～約0.2mg／k g、約0.05mg／k g～約0.5mg／k g、約0.05mg／k g～約1mg／k g、約0.05mg／k g～約2mg／k g、約0.05mg／k g～約5mg／k g、約0.05mg／k g～約10mg／k g、約0.05mg／k g～約50mg／k g、約0.05mg／k g～約100mg／k g、約0.1mg／k g～約0.2mg／k g、約0.1mg／k g～約0.5mg／k g、約0.1mg／k g～約1mg／k g、約0.1mg／k g～約2mg／k g、約0.1mg／k g～約5mg／k g、約0.1mg／k g～約10mg／k g、約0.1mg／k g～約50mg／k g、約0.1mg／k g～約100mg／k g、約0.2mg／k g～約0.5mg／k g、約0.2mg／k g～約1mg／k g、約0.2mg／k g～約2mg／k g、約0.2mg／k g～約5mg／k g、約0.2mg／k g～約10mg／k g、約0.2mg／k g～約50mg／k g、約0.2mg／k g～約100mg／k g、約0.5mg／k g～約1mg／k g、約0.5mg／k g～約5mg／k g、約0.5mg／k g～約10mg／k g、約0.5mg／k g～約50mg／k g、約0.5mg／k g～約100mg／k g、約1mg／k g～約2mg／k g、約1mg／k g～約5mg／k g

30

40

50

、約1mg/kg～約10mg/kg、約1mg/kg～約50mg/kg、約1mg/kg～約100mg/kg、約2mg/kg～約5mg/kg、約2mg/kg～約10mg/kg、約2mg/kg～約50mg/kg、約2mg/kg～約100mg/kg、約5mg/kg～約10mg/kg、約5mg/kg～約50mg/kg、約5mg/kg～約100mg/kg、約10mg/kg～約50mg/kg、約10mg/kg～約100mg/kg、または約50mg/kg～約100mg/kgである。一部の実施形態では、投薬量は、約0.01mg/kg、約0.02mg/kg、約0.05mg/kg、約0.1mg/kg、約0.2mg/kg、約0.5mg/kg、約1mg/kg、約2mg/kg、約5mg/kg、約10mg/kg、約50mg/kg、または約100mg/kgである。一部の実施形態では、投薬量は、約0.01mg/kg、約0.02mg/kg、約0.05mg/kg、約0.1mg/kg、約0.2mg/kg、約0.5mg/kg、約1mg/kg、約2mg/kg、約5mg/kg、約10mg/kg、約50mg/kg、または約100mg/kgより多い。

【0204】

本開示の抗原結合性ポリペプチドは、本開示の抗原結合性ポリペプチドの重量で0.5mg～5000mg、1mg～1000mg、または5mg～100gの単位剤形で製剤化され得る。

【0205】

一部の実施形態では、本開示の抗原結合性ポリペプチドは、約0.1mg～約10,000mgの単位剤形で製剤化され得る。一部の実施形態では、本開示の抗原結合性ポリペプチドは、少なくとも約0.1mgの単位剤形で製剤化され得る。一部の実施形態では、本開示の抗原結合性ポリペプチドは、最大で約10,000mgの単位剤形で製剤化され得る。一部の実施形態では、本開示の抗原結合性ポリペプチドは、約0.1mg～約0.5mg、約0.1mg～約1mg、約0.1mg～約5mg、約0.1mg～約10mg、約0.1mg～約50mg、約0.1mg～約100mg、約0.1mg～約500mg、約0.1mg～約1,000mg、約0.1mg～約5,000mg、約0.1mg～約10,000mg、約0.5mg～約1mg、約0.5mg～約5mg、約0.5mg～約10mg、約0.5mg～約50mg、約0.5mg～約100mg、約0.5mg～約500mg、約0.5mg～約1,000mg、約0.5mg～約5,000mg、約0.5mg～約10,000mg、約1mg～約5mg、約1mg～約10mg、約1mg～約50mg、約1mg～約100mg、約1mg～約500mg、約1mg～約1,000mg、約1mg～約5,000mg、約1mg～約10,000mg、約5mg～約10mg、約5mg～約50mg、約5mg～約100mg、約5mg～約500mg、約5mg～約1,000mg、約5mg～約5,000mg、約5mg～約10,000mg、約10mg～約50mg、約10mg～約100mg、約10mg～約500mg、約10mg～約1,000mg、約10mg～約5,000mg、約10mg～約10,000mg、約50mg～約100mg、約50mg～約500mg、約50mg～約1,000mg、約50mg～約5,000mg、約50mg～約10,000mg、約100mg～約500mg、約100mg～約1,000mg、約100mg～約5,000mg、約100mg～約10,000mg、約500mg～約1,000mg、約500mg～約5,000mg、約500mg～約10,000mg、約1,000mg～約5,000mg、約1,000mg～約10,000mg、または約5,000mg～約10,000mgの単位剤形で製剤化され得る。一部の実施形態では、本開示の抗原結合性ポリペプチドは、約0.1mg、約0.5mg、約1mg、約5mg、約10mg、約50mg、約100mg、約500mg、約1,000mg、約5,000mg、または約10,000mgより多い単位剤形で製剤化され得る。

【0206】

一部の実施形態では、本開示の抗原結合性ポリペプチドは、約0.5mg～約5,000mgの単位剤形で製剤化され得る。一部の実施形態では、本開示の抗原結合性ポリペプチドは、少なくとも約0.5mgの単位剤形で製剤化され得る。一部の実施形態では、本開示の抗原結合性ポリペプチドは、最大で約5,000mgの単位剤形で製剤化され得る。一部の実施形態では、本開示の抗原結合性ポリペプチドは、約0.5mg～約1mg、約0.5mg～約2mg、約0.5mg～約5mg、約0.5mg～約10mg、約0.5mg～約20mg、約0.5mg～約50mg、約0.5mg～約100mg、約0.5mg～約200mg、約0.5mg～約1,000mg、約0.5mg～約2,000mg、約0.5mg～約5,000mg、約1mg～約2mg、約1mg～約5mg、約1mg～約10mg、約1mg～約20mg、約1mg～約50mg、約1mg～約100mg、約1mg～約200mg、約1mg～約1,000mg、約1mg～約2,000mg、約1mg～約5,000mg、約2mg～約5mg、約2mg～約10mg、約2mg～約20mg、約2mg～約50mg、約2mg～約100mg、約2mg～約200mg、約2mg～約1,000mg、約2mg～約2,000mg、約2mg～約5,000mg、約5mg～約10mg、約5mg～約20mg、約5mg～約50mg、約5mg～約100mg、約5mg～約200mg、約5mg～約1,000mg、約5mg～約2,000mg、約5mg～約5,000mg、約10mg～約20mg、約10mg～約50mg、約10mg～約100mg、約10mg～約200mg、約10mg～約1,000mg、約10mg～約2,000mg、約10mg～約5,000mg、約20mg～約50mg、約20mg～約100mg、約20mg～約200mg、約20mg～約1,000mg、約20mg～約2,000mg、約20mg～約5,000mg、約50mg～約100mg、約50mg～約200mg、約50mg～約1,000mg、約50mg～約2,000mg、約50mg～約5,000mg、約100mg～約200mg、約100mg～約1,000mg、約100mg～約2,000mg、約100mg～約5,000mg、約200mg～約1,000mg、約200mg～約2,000mg、約200mg～約5,000mg、約1,000mg～約2,000mg、または約2,000mg～約5,000mgの単位剤形で製剤化され得る。一部の実施形態では、本開示の抗原結合性ポリペプチドは、約0.5mg、約1mg、約2mg、約5mg、約10mg、約20mg、約50mg、約100mg、約200mg、約1,000mg、約2,000mg、または約5,000mgの単位剤形で製剤化され得る。一部の実施形態では、本開示の抗原結合性ポリペプチドは、約0.5mg、約1mg、約2mg、約5mg、約10mg、約20mg、約50mg、約100mg、約200mg、約1,000mg、約2,000mg、または約5,000mgより多い単位剤形で製剤化され得る。

【0207】

単位剤形は、1日1、2、3、4、5回、またはそれより多く、毎日、2日毎、3日毎、週に2回、4日毎、5日毎、6日毎、毎週、2週間毎、3週間毎、毎月、またはより高頻度でもしくはより低頻度で、またはその間の任意の間隔で投与され得る。

【0208】

一般的に、ヒト抗体は、異物ポリペプチドに対する免疫応答により他の種からの抗体より長いヒト体内での半減期を有する。このため、ヒト抗体のより低い投薬量およびより低頻度の投与がしばしば可能である。さらに、本開示の抗体の投薬量および投与頻度は、例えば脂質付加などの改変によって抗体の取り込みおよび組織浸透（例えば、脳への）を増強することによって低減させることができる。

【0209】

本開示の抗体、そのバリエーション、または誘導体の投与を含む、感染または悪性疾患、状態、または障害を処置する方法は、典型的にヒトでの使用前に、所望の治療活性または予防活性に関して *in vitro* で試験後、許容される動物モデルにおいて *in vivo* で試験される。トランスジェニック動物を含む適した動物モデルが、当業者に周知である。例えば、本明細書に記載される抗原結合性ポリペプチドの治療有用性を実証するための

*in vitro*アッセイは、細胞株または患者組織試料に対する抗原結合性ポリペプチドの効果を含む。細胞株および／または組織試料に対する抗原結合性ポリペプチドの効果は、当業者に公知の技術、例えば本明細書において他所で開示されるアッセイを利用して決定することができる。本開示に従って、特異的抗原結合性ポリペプチドの投与が適応されるか否かを決定するために使用することができる *in vitro*アッセイは、患者の組織試料を培養において成長させ、化合物に曝露するかまたは他の方法で化合物を投与し、そのような化合物が組織試料に及ぼす効果を観察する *in vitro*細胞培養アッセイを含む。

【0210】

様々な送達システムが公知であり、本開示の抗体または本開示の抗体をコードするポリヌクレオチドを投与するために使用することができる、それらは例えばリポソーム、微粒子、マイクロカプセルへのカプセル化、化合物を発現することが可能な組換え細胞、受容体媒介エンドサイトーシス（例えば、Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432を参照されたい）、レトロウイルスまたは他のベクターの一部としての核酸の構築等である。

【0211】

診断方法

PD-1の過剰発現は、ある特定の腫瘍試料において観察され、PD-1過剰発現細胞を有する患者は、本開示の抗PD-1抗体による処置に应答する可能性が高い。したがって、本開示の抗体はまた、診断目的および予後判定目的のために使用することもできる。

【0212】

好ましくは細胞を含む試料を、がん患者であり得る患者、または診断を望んでいる患者から得ることができる。細胞は、腫瘍組織または腫瘍ブロックの細胞、血液試料、尿試料、および患者からの任意の試料であり得る。必要に応じて試料を前処置した後、試料を、抗体が、試料中におそらく存在するPD-1タンパク質と相互作用することができる条件下で、本開示の抗体と共にインキュベートすることができる。抗PD-1抗体を利用して、ELISAなどの方法を使用して、試料中のPD-1タンパク質の存在を検出することができる。

【0213】

試料中のPD-1タンパク質の存在（必要に応じて量または濃度で）を、患者が抗体による処置にとって適していることの指標として、または患者ががんの処置に应答している（または应答していない）ことの指標として、がんの診断のために使用することができる。予後判定方法の場合、ある特定の段階で、処置の進行を示すためにがんの処置の開始時に検出を1回、2回またはそれより多く行うことができる。

【0214】

組成物

本開示はまた、医薬組成物も提供する。そのような組成物は、有効量の抗体および許容される担体を含む。一部の実施形態では、組成物は、第2の抗がん剤（例えば、免疫チェックポイント阻害剤）をさらに含む。

【0215】

特定の実施形態では、用語「薬学的に許容される」は、動物、より特にヒトにおいて使用するために連邦政府もしくは州政府の規制当局によって承認された、または米国薬局方もしくは他の一般的に認識された薬局方に記載されていることを意味する。さらに、「薬学的に許容される担体」は、一般的に非毒性の固体、半固体、または液体増量剤、希釈剤、カプセル化材料または任意のタイプの製剤補助剤である。

【0216】

用語「担体」は、それと共に治療剤が投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤、またはビヒクルを指す。そのような薬学的担体は、滅菌液体、例えば水、および石油、動物、植物または合成起源の油、例えば落花生油、ダイズ油、鉱油、ゴマ油等を含む油であり得る。水は、医薬組成物を静脈内に投与する場合に好ましい担体である。食塩水溶液および

10

20

30

40

50

デキストロース水溶液およびグリセロール溶液もまた、液体担体として、特に注射用溶液として使用することができる。適した薬学的賦形剤は、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、コメ、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノール等を含む。望ましければ、組成物はまた、微量の湿潤剤または乳化剤、またはpH緩衝化剤、例えば酢酸塩、クエン酸塩、もしくはリン酸塩を含有し得る。ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗菌剤；アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウムなどの抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸などのキレート剤；および塩化ナトリウムまたはデキストロースなどの張度を調整するための作用物質も企図される。これらの組成物は、液剤、懸濁剤、乳剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、徐放性製剤等の形態をとることができる。組成物は、従来の結合剤および担体（トリグリセリドなど）と共に坐剤として製剤化することができる。経口製剤は、薬学等級のマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウム等などの標準的な担体を含み得る。適した薬学的担体の例は、参照により本明細書に組み込まれている、Remington's Pharmaceutical Sciences by E. W. Martinに記載されている。そのような組成物は、患者に適切な投与のための剤形を提供するために、治療有効量の、好ましくは精製された形態での抗原結合性ポリペプチドを、適した量の担体と共に含有する。製剤は、投与様式に適合すべきである。非経口調製物は、ガラスまたはプラスチック製のアンプル、使い捨てシリンジ、または多用量バイアルに封入することができる。

10

20

【0217】

一実施形態では、組成物は、ヒトに静脈内投与するように適合される医薬組成物として慣例的な手順に従って製剤化される。典型的には、静脈内投与のための組成物は、滅菌等張水性緩衝液中の溶液である。必要であれば、組成物はまた、可溶化剤、および注射部位での疼痛を緩和するためのリグノカインなどの局所麻酔薬も含み得る。一般的に、成分は、個別にまたは共に混合して単位剤形で、例えば気密容器中、例えば活性剤の量を示すアンプルまたは小袋中の乾燥凍結乾燥粉末または水を含まない濃縮物として供給される。組成物を注入によって投与する場合、これは滅菌薬学等級の水または食塩水を含有する注入ボトルによって配布することができる。組成物を注射によって投与する場合、成分が投与前に混合され得るように、滅菌注射用水または食塩水のアンプルを提供することができる。

30

【0218】

本開示の化合物は、中性または塩の形態で製剤化することができる。薬学的に許容される塩は、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸等に由来する塩などのアニオンと共に形成される塩、およびナトリウム、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、プロカイン等に由来する塩などのカチオンと共に形成される塩を含む。

【実施例】

【0219】

（実施例1：ヒトPD-1に対するヒトモノクローナル抗体の生成）

全長のヒトPD-1 cDNAのクローニング

40

ヒトTリンパ球を、ヒト末梢血リンパ球（PBMC）からMACSビーズ（Miltenyi Biotec）によって単離した。総RNAを、RNeasy Mini Kit（QIAGEN）によってヒトT細胞から抽出し、cDNAを、逆転写PCR（SuperScript First-Strand Synthesis System、Invitrogen）によって得た。hPD-1をコードする全長のcDNAを、ヒトT細胞mRNAからのセンスプライマー（5'-CTGTCTAGAATGCAGATCCACA GGC GCC、配列番号47）およびアンチセンスプライマー（5'-GGATCCTCAGAGGGGCCAAGAGCAGT、配列番号48）を使用してRT-PCRによって生成した。配列を、DNAシーケンシング、およびNCBIデータベース（NM-005018.2）との比較によって確認した。

50

【0220】

hPD-1 安定発現細胞株の樹立：XbaI および BamHI による消化後、hPD-1 PCR断片を pCDNA3.1 (-) ベクター (Invitrogen) においてクローニングした。次いで pCDNA-hPD-1 全長プラスミドを、lipofectamine 2000 (Invitrogen) を使用してチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞にトランスフェクトした。hPD-1 を安定に発現する細胞株 (CHO/hPD-1) を G418 によって選択し、フローサイトメトリーによってスクリーニングした。

【0221】

ヒト PD-1 Ig 融合タンパク質の産生：hPD-1 の細胞外ドメインを含有する hPD-1 mIg および hPD-1 hIg 融合タンパク質の cDNA を、特異的プライマーによって pCDNA-hPD-1 全長から PCR によって増幅した。EcoRI および BglII によって消化した PCR断片を、発現プラスミド pmIgG におけるマウス IgG2a 重鎖または発現プラスミド pHlgG におけるヒト IgG1 重鎖の CH2-CH3 ドメインに融合した (H Dong et al. Nat Med. 1999; 5:1365-1369)。培養上清中のタンパク質を、プロテイン A セファロースカラム (HiTrap Protein A HP, GE healthcare) によって精製した。精製タンパク質を SDS-PAGE 電気泳動によって確認した。

【0222】

モノクローナル抗体の生成：8~10 週齢の雌性 Balb/c マウスに、hPD-1 mIg 融合タンパク質 100 µg およびフロイント完全アジュバント (CFA) (Sigma-Aldrich) を含む乳剤 200 µl を複数の部位に皮下 (s.c.) 免疫した。3 週間後、マウスに、フロイント不完全アジュバント (IFA) (Sigma-Aldrich) と共にタンパク質 50~100 µg を s.c. によって全体で 3 回免疫した。血清中力価の検査のために各免疫の 2 週間後にマウスから採血した。力価が十分であれば、マウスを、PBS 中のタンパク質 60 µg で腹腔内注射 (i.p.) によってブーストした。免疫したマウス脾細胞と SP2/0-Ag14 骨髓腫細胞株 (ATCC から) とを融合させることによってハイブリドーマを得た。ブーストしたマウスを二酸化炭素によって

殺し、脾臓を無菌的に回収した。脾臓全体を単細胞懸濁物に解離させ、赤血球を ACK 緩衝液によって溶解した。SP2/0-Ag14 骨髓腫および脾細胞を、50 ml の円錐遠心チューブ中、1:1 の比率で混合した。遠心分離後、上清を捨て、細胞融合を 50% ポリエチレングリコール (Roche) によって実施した。融合した細胞を HAT 選択培地中で 8~10 日間培養し、ハイブリドーマ培養上清を、ハイスループットトランスフェクションおよびスクリーニングシステム (S Yao et al. Immunity. 2011; 34(5):729-40) によって hPD-1 発現細胞に対する結合に関してスクリーニングし、陽性クローンをフローサイトメトリー分析によって確認した。陽性ハイブリドーマのサブクローニングは、純粋に単クローン性の培養物を達成するために限界希釈技術を少なくとも 5 回使用して実施した。

【0223】

(実施例 2：PD-1 モノクローナル抗体の特徴付け)

MAb のアイソタイプ：マウス免疫グロブリンアイソタイピングキット (BD Biosciences) を使用して mAb のアイソタイプを同定した。5 つ全ての PD-1 mAb が、IgG1 アイソタイプおよび κ 鎖であることが同定された。

【0224】

抗 hPD-1 の結合特異性：表面に hPD-1 を発現する CHO 細胞 (CHO/hPD-1) を使用して、PD-1 mAb の特異性をフローサイトメトリーによって決定した。CHO/hPD-1 細胞を、氷上で抗 PD-1 mAb と共にインキュベートした。インキュベーション後、細胞を洗浄し、抗 mIgG-APC (eBiosciences) と共にさらにインキュベートした。フローサイトメトリー分析を、FACSVerse (BD Biosciences) を使用して実施した。データは、5 つ全ての hPD-1

mAbがhPD-1に対して高い特異性で結合したことを示した(図1)。hPD-1 mAbが他のタンパク質に結合する可能性を除外するために、hB7-1、hPD-L1、hB7-H3、hB7-H4、hCD137、または他のタンパク質分子をトランスフェクトしたCHO細胞を、フローサイトメトリー分析によって抗hPD-1 mAbによって染色した。これらの細胞をまた、陽性対照としてその各々の陽性抗体によっても各々染色した。データは、抗PD-1 mAbが、これらの試験したタンパク質に結合しなかったことを実証した(図2)。

【0225】

種交差反応性：抗hPD-1 mAbの種特異性を評価するために、カニクイザル(Guangdong Landau Biotechnology Companyから)の末梢血単核細胞(PBMC)を、Ficoll(Sigma-Aldrich)によって末梢血から単離した。PBMCを、10% FCSを含有するRPMI 1640培地中に懸濁し、1 µg/mlの抗hCD3を予めコーティングした24ウェルプレートに入れた。細胞を2日間培養した。細胞を最初に抗hPD-1によって染色した。洗浄後、細胞を、フローサイトメトリー分析のために抗mIgG-APCおよびCD3-FITC、CD8-PerCPによって染色した。加えて、mAbとマウスPD-1との交差反応性を、マウスPD-1トランスフェクトCHO細胞(CHO/mPD-1)を使用してフローサイトメトリーによって決定した。

【0226】

データは、抗hPD-1 mAbがヒトおよびカニクイザルT細胞の両方におけるPD-1タンパク質に結合することができ、マウスPD-1に対する交差結合が見出されなかったことを実証した(図3)。

【0227】

リガンドの遮断：リガンド結合の遮断を調べるために、hPD1 hIg融合タンパク質100 ngを、表記の用量のmAb(400、300、200、100、50 ng/10 µl)または対照Igと共に4℃で30分間ブレインキュベートした後、CHO/hB7-H1細胞を染色するために使用した。細胞を洗浄し、ヤギ抗hIgG-APCによってさらに染色した。遮断効果をフローサイトメトリーによって評価した。

【0228】

データは、抗hPD-1 mAb 1および2(Ab 1およびAb 2)が、リガンドの遮断に対して作用を有しないことを実証した。Ab 3、Ab 4、およびAb 5は、hPD-1融合タンパク質のhPD-L1に対する結合を、用量依存的に遮断することができる(図4)。

【0229】

競合的結合アッセイ：競合的結合アッセイを実施して、これらのmAbがhPD-1タンパク質の同じまたは異なる結合部位を認識するか否かを調べた。CHO/hPD-1細胞を、過剰量(10 µg)の5つのPD-1 mAbと共にそれぞれ、4℃で30分間ブレインキュベートした。洗浄後、細胞を、異なるビオチン標識mAb 50 ngと共に4℃で20分間インキュベートした。mAbの結合効果を、フローサイトメトリー分析を使用して測定した。

【0230】

フローサイトメトリー分析は、Ab 4およびAb 5がhPD-1タンパク質に対する結合を互いに完全に抑止し、飽和用量のAb 3がAb 4およびAb 5結合に対して部分的に遮断効果を有し、Ab 1およびAb 2が、Ab 4およびAb 5のhPD-1に対する結合に対して遮断効果を有しなかったことを示した(図5 Aおよび図5 B)。したがって、Ab 4およびAb 5に関するPD-1上の結合部位は重複し得る。Ab 1またはAb 2、およびAb 4またはAb 5は、異なる界面を通してPD-1に結合し、このことはまたリガンド遮断試験によっても確認された。

【0231】

(実施例3：抗PD-1抗体産生ハイブリドーマのシーケンシングおよび抗体のヒト

10

20

30

40

50

化)

抗PD-1抗体産生ハイブリドーマのシーケンシング： 1×10^7 個のハイブリドーマ細胞を回収してPBSによって洗浄した。メッセンジャーRNAを、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を使用してハイブリドーマから抽出した。RACE-Ready 第1鎖cDNAを、SMARTer RACE cDNA増幅キット (Clontech) を使用して合成した。逆転写後、5' RACE PCR反応を、鋳型としてのready cDNA、ならびにキットによって供給された5' ユニバーサルプライマー (UPM)、ならびにマウスIgG重鎖可変領域およびκ軽鎖遺伝子配列によって設計された3' 遺伝子特異的プライマー (GSP1) によって実施した。RACE産物を、ゲル電気泳動分析によって決定した(図6)。PCR産物を、Zero Blunt TOPO PCRクローニングキット (Invitrogen) を使用してTベクターにクローニングした。形質転換後、プラスミドをシーケンシング分析によって確認した。抗体遺伝子断片を、VBASE2 (<http://www.vbase2.org>) を使用して分析した。配列を(表2)に開示する。

表2.マウス抗体の配列

【表2-1】

名称 (配列番号)	配列(下線の太字はCDRを示す)
マウス Ab2 VH (19)	SQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKAS <u>GYTF</u> <u>TSY</u> TMHWVKORPGQGLEWIGY <u>INPT</u> <u>TGYTN</u> YNQKFKDKANPTTGTYNYNQKFKDKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC <u>CARDDAY</u> <u>YSGYWGQGTTLTVSS</u>
マウス Ab2 VH (20)	TCCCAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAG ATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTAGTTACACGATGCACTGGGTAAACAG AGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATACATTAATCCTACTACTGGTTATACTAAT TACAATCAGAAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCC TACATGCAATTGAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGAT GATGCTTACTACTCGGGCTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
マウス Ab2 VK (21)	DIQMTQSPASLSVSVGETVTTITCRASE <u>ENIYSN</u> LAWYRQKQKSPQLLVY <u>AAK</u> NLADGVPS RFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGSYYC <u>QHF</u> <u>WGTPWT</u> FGGGTKLEIKR
マウス Ab2 VK (22)	GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGTATCTGTGGGAGAACTGTCACC ATCACATGTCGAGCAAGTGAGAAATTTACAGTAATTTAGCATGGTATCGGCAGAAACAG GCAAAATCTCCTCAGCTCCTGCTCTATGCTGCAAAAACTTAGCACATGGTGTGCCATCA AGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGCACACAGTATTCCTCAAGATCAACAGCCTGCAGTCT GAAGATTTTGGGAGTTATTACTGTCAACATTTTGGGGTACTCCGTGGACGTTCCGGTGA GGCACCAAGCTGGAAATCAAACGG
マウス Ab3 VH (23)	VQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAAS <u>GFAFSS</u> YDMSWVRQTPEKRLVWVAY <u>ITIGGGT</u> TYYS DIVKRLVWVAYITIGGGTYYSDTVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYC <u>ARH</u> <u>RYDYFAMD</u> NWGHGTSVTVSS
マウス Ab3 VH (24)	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTC TCCTGTGCAGCCTCTGGATTGCTTTCAGTAGCTATGACATGTCTTGGGTTGCCAGACT

【表 2 - 2】

	CCGGAGAAGAGGCTGGTGTGGGTCGCATACATTACTATTGGTGGTGGCACCACCTACTAT TCAGACACTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCGTGTAC CTGCAAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGACATAGG TACGATTACTTCGCTATGGACAACCTGGGGTCATGGAACCTCAGTCACCGTCTCTCTCA
マウス Ab3 VK (25)	DIVLTQSPASLAVSLEHRATISCRASE <u>ENV</u> <u>NDNYGIN</u> FMNWFQHKPAQPPQLLIY <u>VSS</u> NLGS GVPAKFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDTAMYFC <u>Q</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>D</u> <u>V</u> <u>P</u> <u>W</u> TFSGGKLEIKR
マウス Ab3 VK (26)	GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGAGCACAGGGCCACC ATCTCCTGCCAAGCCAGCGAAAATGTTGATAATTATGGCATTAATTTTATGAACTGGTTC CAACACAAACCAGCACAGCCACCCCACTCCTCATCTATGTTTCATCCAACCTAGGATCC GGGGTCCCTGCCAAGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGACTTCAGCCTCAACATCCAT CCTATGGAAGAGATGATACTGCAATGTATTTCTGTGAGCAAGTAAGGACGTTCCGTGG ACGTTTCAGTGGAGGCACCAAACTGGAAATCAAACGG
マウス Ab4 VH (27)	EVKLIVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS <u>GFTFSS</u> YTM ^{SWIRQTPEKRLEWVAYI} <u>SHGGGDTYY</u> PDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSLSKSEDTAMYFC <u>ARHSGYER</u> <u>GY</u> <u>Y</u> <u>V</u> <u>M</u> <u>D</u> <u>Y</u> WGQTSVT VSS
マウス Ab4 VH (28)	GAAGTGAAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTC TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTCAGTAGCTATACCATGTCTTGGATTGCCAGACT CCAGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTGCGCATACATTAGTCATGGTGGTGGTGACACCTACTAT CCAGACACTGTAAAGGGCCGATTACCATCTCCAGGGACAATGCCAAGAACACCCGTGTAC CTGCAAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGACATAGT GGTTACGAGAGGGATATTACTATGTTATGGATTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACC GTCTCTCTCA
マウス Ab4 VK (29)	DIVLTQFPTSLAVSLGQRATISCRASE <u>SV</u> <u>VDY</u> <u>GF</u> <u>S</u> <u>F</u> INWFOQKPGQPPKLLIY <u>AAS</u> NQGS GVPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDTAMYFC <u>Q</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>K</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>P</u> <u>W</u> TFSGGKLEIK
マウス Ab4 VK (30)	GACATTGTGCTGACCCAATTTCCAACCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACC ATCTCCTGCAGAGCCAGCGAAAAGTGTGATTACTATGGCTTTAGTTTTATAAACTGGTTC CAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAACTCCTCATCTATGCTGCATCCAACAGGGATCC GGGGTCCCTGCCAGGTTTGGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCAGCCTCAACATCCAT CCTATGGAGGAGGATGATACTGCAATGTATTTCTGTGAGCAAGTAAGGAGGTTCCGTGG ACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGG

10

20

【0 2 3 2】

組換え抗体のタンパク質発現および機能の決定：組換え抗体配列の正確性を確保するた
めに、組換え抗体重鎖および軽鎖の全長の配列を、p c D N A 3 . 1 ベクターにそれぞれ
クローニングし、H E K 2 9 3 T 細胞に一過性にトランスフェクトした。細胞培養上清か
らのタンパク質を、機能的評価のためにプロテイン G セファロースカラム (G E h e a
l t h c a r e) によって精製した。

30

【0 2 3 3】

サイトメトリー分析データは、組換え抗体が h P D - 1 タンパク質に結合することがで
き、h P D - 1 融合タンパク質の P D - L 1 タンパク質に対する結合を遮断することがで
きることを実証した (図 7、パネル A、B)。

【0 2 3 4】

抗ヒト P D - 1 抗体のヒト化：ヒト化は、抗 h P D - 1 ハイブリドーマの可変重鎖 (V
H) および可変軽鎖 (V L) 配列に基づいて実施した。一般的に、親マウス V H および V
L 配列ならびにヒト I g G 4 - S 2 2 8 P 定常領域およびヒト κ 鎖で構成されるマウス
ヒトキメラ m A b を最初に構築した。キメラ抗体の特徴を同定した後、3つの V L および
3つの V L ヒト化配列を設計し、これを使用して 9 個のヒト化抗体を作製した。配列を (

40

表 3 A および 3 B) に記載する。

表 3 A . キメラ抗体 (ヒト I g G 4 - S 2 2 8 P 骨格)

【表 3 A - 1】

名称 (配列番号)	配列(下線の太字は CDR を示す)
キメラ重鎖 (31)	EVKLIVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS <u>GFTFSS</u> YTM ^{SWIRQTPEKRLEWVAYI} <u>SHGGGDTYY</u> PDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSLSKSEDTAMYFC <u>ARHSGYER</u> <u>GY</u> <u>Y</u> <u>V</u> <u>M</u> <u>D</u> <u>Y</u> WGQTSVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPEFLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN

50

【表 3 A - 2】

	STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLKG
キメラ重鎖 (32)	CGAAGTGAAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTTTGTAGTCAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACT CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATACCATGTCTTGGATTGCGCCAGAC TCCAGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTGCGATACATTAGTCATGGTGGTGGTACACCTACTA TCCAGACACTGTAAAGGGCCGATTCAACCATCTCCAGGGACAATGCCAAGAACACCCCTGTA CCTGCAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGACATAG TGGTTACGAGAGGGGATATTACTATGTTATGGATTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCAC CGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTTCTCTCGCTCCCTGCAGCCGGAG CACATCCGAGAGCACCGCTGCTCTGGGCTGTCTCGTGAAGGACTACTTCCCTGAACCCGT CACCGTCAGCTGGAATAGCGGCGCCCTGACATCCGGCGTCCACACATTCCCCTGTCTCT GCAGAGCAGCGGCCCTGTACAGCCTGAGCTCCGTGGTCACCGTGCTAGCAGCAGCCTGGG AACAAAGACCTACACCTGCAACGTGGACCATAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGCG GGTGGAAATCCAAGTATGGACCCCCCTGTCTCTTGCCTGCTCCTGAATTCTCGGAGG CCCCCTCCGTCTTCTGTTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCTGATGATCTCCCGGACACC CGAAGTCACCTGCGTGGTGGTGTGTCAGCCAGGAAGATCCCAGGTCAGTTCAAGTG GTACGTGGACGGAGTGGAGGTGCATAACGCCAAAACCAAGCCAGGGAAGAGCAGTTCAA CAGCACCTATCGGGTCTGTCCGTGCTCACCGTCTGTCATCAGGATTGGCTCAACGGCAA GGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCCTCCTCCATCGAGAAGACCATCTC CAAGGCTAAGGGCCAACCTCGGGAGCCCCAAGTGTATACCTCCCTCCCAGCCAGGAGGA GATGACCAAGAATCAAGTGAGCCTGACCTGCCTCGTGAAGGGATTTTACCCTCCGACAT CGCTGTGGAATGGGAAAGCAATGGCCAACCTGAGAACAACACAGACCACACCCCCGT GCTGGACTCCGATGGCTCCTTCTTCTGTACAGCAGGCTGACCGTGGACAATCCCGGTG GCAAGAGGGGAAACGTGTTTCACTGCTCCGTGATGCACGAGGCTCTCCACAACCACTACAC CCAGAAGAGCCTCTCCCTGAGCCTCGGCAAGTAGTAA
キメラ軽鎖 (33)	DIVLTQFPTSLAVSLGQRATISCRASESVDDYGFSEFINWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGS GVPARFGSGSGTDFSLNIHPMEEDDTAMYFCQOSKEVPWTFGGGKLEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQQDSKSTYSLS TSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
キメラ軽鎖 (34)	AGACATTTGCTGACCCAATTTCCAATTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCAC CATCTCCTGCAGAGCCAGCGAAAGTGTTGATTACTATGGCTTAGTTTTATAAACTGGTT CCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAACTCCTCATCTATGCTGCATCCAACCAGGGATC CGGGGTCCCTGCCAGGTTTGGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCAGCCTCAACATCCA TCCTATGGAGGAGGATGATACTGCAATGTATTCTGTACAGCAAAGTAAGGAGGTTCCGTG GACGTTCCGTGGAGGCACCAAGCTGGAATCAAGCGGACCGTGGCCGCCCCAGCGTGTT CATCTTCCCTCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCT GAACAACCTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTGGACAACGCCCTGCAGAG CGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAACAGGACTCCAAGGACAGCACCTACAGCCT ACCAGCACCTTGACCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCAAGGTGTACGCTGCGA GGTGACCCACCAGGGACTGTCTAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGCTA A

10

20

30

表 3 B. ヒト化重鎖および軽鎖可変領域

【表 3 B - 1】

名称 (配列番号)	配列(下線の太字はCDRを示す)
VH バリエント a (35)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMSWVRQAPGKGLEWVS ~~YISHGGGDTYY~~ ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>ARHS</u> <u>GYER</u> <u>GY</u> <u>YVMDY</u> WGQGTIVT VSSA
VH バリエント a (36)	CGAAGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACT GTCTTGTGCCGCCTCCGGCTTCACCTTCTCCAGCTACACCATGTCCTGGGTGCGACAGGC TCCTGGCAAGGGCCTGGAATGGGTGTCTACATCTCTCACGGCGGAGGCGACACCTACTA CGCCGACTCTGTGAAGGGCCGTTTCAACCATCTCCCGGACAACTCCAAGAACACCCCTGTA CCTGCAGATGAACCTCCTGCGGGCCGAGGACACCGCGTGTACTACTGTGCTCGGCACCTC TGGCTACGAGCGGGGCTACTACTACGTGATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTCGTGAC CGTGTCTCTGCT
VH バリエント b (37)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMSWVRQAPGKGLEWVS ~~YISHGGGDTYY~~ PDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC <u>ARHS</u> <u>GYER</u> <u>GY</u> <u>YVMDY</u> WGQGTIVT VSS

40

50

【表 3 B - 2】

VH パリアント b (38)	CGAAGTGCAGCTGGTGGGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACT GTCTTGTGCCGCTCCGGCTTCACCTTCTCCAGCTACACCATGTCTGGGTGGGACAGGC TCCTGGCAAGGGCCTGGAATGGGTGTCTACATCTCTCACGGCGGAGGCGACACCTACTA CCCCGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCGGGACAACCCAAGAACACCCTGT CCTGCAGATGAACCTCCTGCGGGCCGAGGACACCGCGGTGTACTACTGTGCTCGGCACTC TGGCTACGAGCGGGCTACTACTACGTGATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTCGTGAC CGTGTCATCTGCT
VH パリアント c (39)	EVKLLSEGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMSSVVRQAPGKLEWVSYISHGGGDTYY PDSVKGRFTISRDNKGGDTYYPDVSKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR HSGYERGYYYVMDYWGKGTTTVSSA
VH パリアント c (40)	GAAGTGAAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTG TCTTGTGCCGCTCCGGCTTCACCTTCTCCAGCTACACCATGTCTGGGTGGGACAGGCT CCTGGCAAGGGCCTGGAATGGGTGTCTACATCTCTCACGGCGGAGGCGACACCTACTAC CCCCGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCGGGACAACCCAAGAACACCCTGTAC CTGCAGATGAACCTCCTGCGGGCCGAGGACACCGCGGTGTACTACTGTGCTCGGCACTCT GGCTACGAGCGGGCTACTACTACGTGATGGACTACTGGGGCAAGGGCACCCCGTGACC GTGTCATCTGCT
VK パリアント a (41)	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSESVDYIGFSFLNWFQKPGQPPKLLIYAASNRES GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIKR
VK パリアント a (42)	AGACATCGTGATGACCCAGTCCCCGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGAGCCAC CATCAACTGCAAGTCCCGAGTCCGTGGACTACTACGGCTTCTCCTTCCCTGAACCTGGTT CCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCTAAGCTGCTGATCTACGCCGCTCCAACCGCGAGTC TGGCGTGCCCGATAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCAGCTTTACCCTGACCATCAG CTCCCTGCAGGCCGAGGATGTGGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTCCAAGAGGTGCCCTG GACCTTCGGCCAGGGCACAAAGCTGGAAATCAAGCGG
VK パリアント b (43)	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKASESVDYIGFSFLNWFQKPGQPPKLLIYAASNRES GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIKR
VK パリアント b (44)	AGACATCGTGATGACCCAGTCCCCGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGAGCCAC CATCAACTGCAAGGCTCCCGAGTCCGTGGACTACTACGGCTTCTCCTTCCCTGAACCTGGTT CCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCTAAGCTGCTGATCTACGCCGCTCCAACCGCGAGTC TGGCGTGCCCGATAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCAGCTTTACCCTGACCATCAG CTCCCTGCAGGCCGAGGATGTGGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTCCAAGAGGTGCCCTG GACCTTCGGCCAGGGCACAAAGCTGGAAATCAAGCGG
VK パリアント c (45)	DIQLTQSPDLSVSLGERATINCKASESVDYIGFSFLNWFQKPGQPPKLLIYAASNRQS GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQSKEVPWTFGQGTKLEIKR
VK パリアント c (46)	GACATCCAGCTGACCCAGTCCCCGACTCCCTGTCTGTGTCTCTGGGCGAGAGAGCCACC ATCAACTGCAAGGCTCCCGAGTCCGTGGACTACTACGGCTTCTCCTTCCCTGAACCTGGTT CAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCTAAGCTGCTGATCTACGCCGCTCCAACCGCCAGTCT GGCGTGCCCGATAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCAGCTTTACCCTGACCATCAGC TCCCTGCAGGCCGAGGATGTGGCCGTGTACTTCTGCCAGCAGTCCAAGAGGTGCCCTGG ACCTTCGGCCAGGGCACAAAGCTGGAAATCAAGCGG

10

20

30

表 3C.様々なCDR定義での例示的な抗PD-1 CDR

【表 3 C - 1】

パリアン ト	説 明	IMGT 配列 (配列番号)	Kabat 配列 (配列番号)	Chothia 配列 (配列番号)	Abm 配列 (配列番号)	接触配列 (配列番号)
a	CDR-H1	GFTFSSYT (1)	SYTMS (49)	GFTFSSY (58)	GFTFSSYTMS (60)	SSYTMS (62)
a	CDR-H2	ISHGGGDT (2)	YISHGGGDTY YADSVKG (50)	SHGGGD (59)	YISHGGGDTY (61)	WVSYISHGGG DTY (63)
a	CDR-H3	ARHSGYERGYYYVMD Y (3)	HSGYERGYYY VMDY (51)	HSGYERGYYY VMDY (51)	HSGYERGYYY VMDY (51)	ARHSGYERGY YYVMD (64)

40

50

【表 3 C - 2】

a	CDR-L1	ESVDYYGFSF (4)	KSESVDYYG FSFLN (52)	KSESVDYYG FSFLN (52)	KSESVDYYG FSFLN (52)	DYYGFSFLNW F (65)
a	CDR-L2	AAS (5)	AASNRES (53)	AASNRES (53)	AASNRES (53)	LLIYAASNRE (66)
a	CDR-L3	QQSKEVPW (6)	QQSKEVPWT (54)	QQSKEVPWT (54)	QQSKEVPWT (54)	QQSKEVPW (6)
b	CDR-H1	GFTFSSYT (1)	SYTMS (49)	GFTFSSY (58)	GFTFSSYTMS (60)	SSYTMS (62)
b	CDR-H2	ISHGGGDT (2)	YISHGGGDTY YEDSVKG (55)	SHGGGD (59)	YISHGGGDTY (61)	WVSYISHGGG DTY (63)
b	CDR-H3	ARHSGYERGYVMD Y (3)	HSGYERGY VMDY (51)	HSGYERGY VMDY (51)	HSGYERGY VMDY (51)	ARHSGYERGY YYVMD (64)
b	CDR-L1	ESVDYYGFSF (4)	KSESVDYYG FSFLN (56)	KSESVDYYG FSFLN (56)	KSESVDYYG FSFLN (56)	DYYGFSFLNW F (65)
b	CDR-L2	AAS (5)	AASNRES (53)	AASNRES (53)	AASNRES (53)	LLIYAASNRE (66)
b	CDR-L3	QQSKEVPW (6)	QQSKEVPWT (54)	QQSKEVPWT (54)	QQSKEVPWT (54)	QQSKEVPW (6)
c	CDR-H1	GFTFSSYT (1)	SYTMS (49)	GFTFSSY (58)	GFTFSSYTMS (60)	SSYTMS (62)
c	CDR-H2	ISHGGGDT (2)	YISHGGGDTY YEDSVKG (55)	SHGGGD (59)	YISHGGGDTY (61)	WVSYISHGGG DTY (63)
c	CDR-H3	ARHSGYERGYVMD Y (3)	HSGYERGY VMDY (51)	HSGYERGY VMDY (51)	HSGYERGY VMDY (51)	ARHSGYERGY YYVMD (64)
c	CDR-L1	ESVDYYGFSF (4)	KSESVDYYG FSFLN (56)	KSESVDYYG FSFLN (56)	KSESVDYYG FSFLN (56)	DYYGFSFLNW F (65)
c	CDR-L2	AAS (5)	AASNRQS (57)	AASNRQS (57)	AASNRQS (57)	LLIYAASNRQ (67)
c	CDR-L3	QQSKEVPW (6)	QQSKEVPWT (54)	QQSKEVPWT (54)	QQSKEVPWT (54)	QQSKEVPW (6)

【0235】

(実施例 4：ヒト化抗体の特徴および機能)

ヒト化抗体の結合活性：CHO／hPD-1細胞を、連続希釈したmAbと共にインキュベートした。9つのヒト化抗体のPD-1タンパク質に対する結合効果を、フローサイトメトリー分析を使用して評価し、キメラ親抗体と比較した。

【0236】

フローサイトメトリー分析結果は、一部の変異体の組合せの結合活性が、その親抗体より高く、一部は親抗体と同じであるか、またはわずかに低いことを示した(図8)。変異体の組合せを以下の表4に記載する。

【表 4 - 1】

名称	VHバリエーション	VKバリエーション
バリエーション1	a	a

10

20

30

40

50

【表 4－2】

バリエーション2	a	b
バリエーション3 (TY101)	a	c
バリエーション4	b	a
バリエーション5	b	b
バリエーション6	b	c
バリエーション7	c	a
バリエーション8	c	b
バリエーション9	c	c

【0237】

ヒト化抗体の遮断能力：ヒト化抗体が、hPD-1のhPD-L1に対する結合を遮断する能力を測定した。hPD1mIg 100ngを、PBS 10μl中で異なる用量のヒト化抗体と共に4℃で30分間プレインキュベートした後、これを使用してCHO/hB7-H1細胞を染色した。細胞を洗浄し、ヤギ抗mIgG-APCによってさらに染色した。遮断効果を、フローサイトメトリーによって評価した。類似の方法を使用して、ヒト化抗体がhPD-1のhPD-L2に対する結合を遮断する能力を測定した。

【0238】

結果は、hPD-1mIgのCHO/hPD-L1細胞に対する結合が、全てのヒト化抗体によって用量依存的に阻害されたことを示した。一部の変異体の組合せは、キメラ親抗体より高い遮断能力を有する（図9）。結果はまた、hPD-1mIgのCHO/hPD-L2細胞に対する結合も遮断されたことを示した（図10Aおよび図10B）。

【0239】

ヒト化抗体の結合親和性および動態の決定：hPD-1タンパク質と相互作用するヒト化PD-1 mAbの結合親和性および動態を、Biacore T100（GE Healthcare Life Sciences）によって評価した。hPD-1mIgタンパク質を、アミンカップリングによってセンサーチップCM5に固定した。濾過したヒト化抗体を、HBS-EP Buffer pH7.4（GE Healthcare Life Sciences）によって希釈し、その後hPD-1mIg固定（immobilised）表面上に注入した。各試料に関して、9つの異なる濃度を試験した。詳細な結合動態パラメーター（結合速度、 K_a 、解離速度、 K_d 、および親和性定数、 K_D ）を、完全な動態分析によって決定することができる。

【0240】

分析データは、変異体の組合せとキメラ親抗体との間で結合速度（ K_a ）に有意差がなかったことを示した。3つの変異体の組合せ（3、6、9）は、解離速度（ K_d ）がキメラ親抗体に近かった。ヒト化抗体は全て、低いナノモル濃度範囲（ 10^{-10} M）の K_D 値で強い親和性を有する。2つの変異体の組合せ（3、6）の K_D 値は、キメラ親抗体（ 9.89×10^{-11} M）と近かった（表4）。

表4.ヒト化抗体の結合親和性および動態の決定

【表 4－3】

	k_a (1/Ms)	K_d (1/s)	K_D (M)
親	2.88E+05	2.85E-05	9.89E-11
バリエーション1	2.10E+05	6.15E-05	2.93E-10
バリエーション2	2.10E+05	7.64E-05	3.63E-10
バリエーション3	2.42E+05	2.33E-05	9.63E-11
バリエーション4	1.19E+05	6.29E-05	3.38E-10
バリエーション5	2.11E+05	6.94E-05	3.29E-10
バリエーション6	2.48E+05	2.23E-05	8.98E-11
バリエーション7	2.18E+05	6.48E-05	2.91E-10
バリエーション8	2.22E+05	7.95E-05	3.58E-10
バリエーション9	2.59E+05	3.20E-05	1.23E-10

【0241】

アロCD8⁺ CTLの*in vitro*でのPD-L1陽性腫瘍細胞の殺滅に及ぼす抗PD-1の増強効果：抗PD-1抗体の抗腫瘍機構に基づき、本実施例は、ヒト同種異系CD8⁺細胞傷害性リンパ球（アロCD8⁺ CTL）による腫瘍細胞殺滅に対する抗PD-1抗体の増強効果を決定するために*in vitro*モデルを設計した。最初に、CD8⁺リンパ球をヒトPBMCから単離して、hB7-1をトランスフェクトした放射線照射ヒト黒色腫細胞（624Mel/B7-1）と共に培養し、アロCD8⁺cyto CTLを産生した。次いで、アロCD8⁺ CTL細胞をヒト化抗体または対照Igの存在下で96ウェルプレートにおいて、一晚培養した624Mel/hPD-L1腫瘍細胞と5日間同時培養した。プレートウェル中の細胞を、0.5%クリスタルバイオレットによって染色し、プレートをELISAリーダーによって540nmで読み取った。殺滅活性は、腫瘍細胞の生存に基づいて計算した。

10

【化1】

$$\%細胞傷害 = \frac{100\%生存細胞対照ウェルの吸光度 - 試験ウェルの吸光度}{100\%生存細胞対照ウェルの吸光度} \times 100$$

【0242】

結果は、一部の変異体の組合せが、アロCTL細胞が*in vitro*で腫瘍細胞を殺滅する能力を増強し得ることを実証した（図11）。

【0243】

変異体の組合せ（バリエーション3）の最善のセットを選択し、タンパク質コード配列を適した発現ベクターにクローニングし、CHO細胞に移入してTY101とも呼ばれる抗hPD-1抗体を産生した。

20

【0244】

（実施例5：がん免疫療法におけるTY101の特徴）

PBMCにおけるサイトカイン増強混合リンパ球反応（MLR）。健康な個体からのヒト末梢血単核細胞（PBMC）を、Ficoll-Hypaqueを使用する密度勾配遠心分離によって単離した。健康なドナー1からのPBMCに、40Gyの線量のX線を照射し、スティミュレーター細胞とした。Tリンパ球を、ヒト汎T細胞単離キット（Miltenyl Biotech）によって健康なドナー2から単離し、レスポンダー細胞とした。レスポンダー細胞およびスティミュレーター細胞を、10%FCSを含有する完全RPMI培地に再懸濁し、TY101またはhIgG対照の連続希釈物の存在下で、96ウェルプレートにウェルあたり2.5×10⁵個のレスポンダー細胞および1.25×10⁵個のスティミュレーター細胞（R/S=2）を播種した。細胞を、5%CO₂の湿潤インキュベーター内で、37℃で5日間培養した。T細胞の増殖活性を、5日目に細胞計数キット-8（Dojindo Molecular Technologies, Inc）によって評価した。サイトカインを検出するために、培養上清を3日目および5日目に収集した。サイトカイン分析を、ヒトTh1/Th2/Th17細胞測定ビーズアレイキット（CBA; BD Biosciences）を使用して実施した。

30

【0245】

結果は、TY101に対するT細胞増殖応答が、hIgGと類似であったことを実証した（図12）。興味深いことに、サイトカインIL-2およびIFNγ産生は、hIgGと比較して、TY101を投与したMLRの培養上清において有意に増加した（図13）。

40

【0246】

Tリンパ球におけるPD-1の発現の遮断。腫瘍細胞におけるPD-L1の発現は、腫瘍の微小環境において腫瘍浸潤性リンパ球（TIL）においてPD-1発現を誘導することができ、PD-1依存的免疫抑制を誘発することができる。本実施例は、TY101がhPD-L1トランスフェクト腫瘍細胞と共に培養した場合にヒトリンパ球におけるhPD-1発現を阻害できるか否かを決定するための*in vitro*モデルを設計した。ヒトPBMCから単離したヒトTリンパ球を、10μg/mlのTY101または対照Ig

50

Gの存在下、hPD-L1をトランスフェクトしたヒト黒色腫（624/hPD-L1）細胞と共に4日間培養した。リンパ球におけるhPD-1の発現をフローサイトメトリーによって検出した。

【0247】

結果は、リンパ球におけるPD-1の発現が培地のみおよびhIgG対照と比較してTY101の添加によって完全に阻害されたことを実証した（図14Aおよび図14B）。

【0248】

ヒト化PD-1抗体の*in vivo*抗腫瘍活性：TY101の*in vivo*抗腫瘍効果を調べた。8週齢の雌性ヒトPD-1ノックインマウス（Shanghai Model Organisms Center, Inc. から購入）に、hPD-L1をトランスフェクトしたMC38（MC38/hPD-L1）腫瘍細胞（ 1×10^6 /マウス）を0日目に右脇腹の皮下（s.c.）に移植した。TY101または対照Igを6日目、9日目、および13日目にi.p.注射によって投与した（10mg/kg）。腫瘍サイズおよび生存をモニターした。

【0249】

全ての動物は最初、検出可能な腫瘍（6日目までに4～5mm）を有した。しかし、MC38/hPD-L1腫瘍を有するマウスをTY101によって処置すると、完全な応答が100%のマウスに起こった。TY101によって処置した5匹全てのマウスにおける腫瘍は25日目までに完全に退縮した。これに対し、対照IgGによって処置したマウス5匹中2匹が次第に成長する腫瘍を発症した。対照IgGによって処置した別の3匹のマウスでは、腫瘍は32日目に退縮もしたが、2匹のマウスでは腫瘍がまもなく再発した（図15）。結果は、TY101が*in vivo*で抗腫瘍有効性を増強することができることを示した。

【0250】

（実施例6：TY101と市販のPD-1抗体の機能の比較）

本実施例は、TY101と比較するために、がん患者の臨床的処置のために現在承認されている2つの抗hPD-1抗体を選択した：MerckのKeytruda（ペンブロリズマブ）およびBristol-Myers SquibbのOpdivo（ニボルマブ）。

【0251】

抗体結合親和性および動態：TY101の親和性および動態を、Biacore T200機器（GE Healthcare Life Sciences）を使用して分析し、2つの市販の抗体と比較した。hPD-1mIgタンパク質を、センサーチップCM5上に低濃度（33RU）で固定し、抗体を検体（移動相）として、相互作用を検出した。データは、3つの抗体の結合速度 K_a に有意差がないことを示した。TY101は、市販の抗体よりわずかに低い。TY101の解離速度 K_d は、2つの市販の抗体より10倍遅く、TY101の親和性 K_D は、市販の抗体より4～7倍強い。結果は、TY101が、より強い結合を示していることを示した（図16）。

【0252】

PD-1/PD-L1遮断におけるPD-1抗体の比較：PD-1/PD-L1遮断バイオアッセイを、PD-1/PD-L1遮断バイオアッセイキット（Promega）を使用してアッセイした。Jurkat-PD1細胞 1×10^5 個/ウェルを、不透明な96ウェルTCプレートにおいて、TY101、ペンブロリズマブ、ニボルマブ、または陰性対照hIgG4の連続希釈物（0～30 μ g/ml）の存在下で、一晚培養したCHO-PD-L1細胞（培養を 5×10^4 個/ウェルで開始）と共に5時間刺激した。5時間インキュベーション後、Jurkat-PD-1細胞の活性化を、SpectraMAX Lルミノメーターにおける相対光単位（RLU）に関してONE-Glo基質（Promega）によってルシフェラーゼ活性を測定することによって検出した。

【0253】

分析データは、TY101および2つの市販の抗体が、PD-1/PD-L1経路を遮

10

20

30

40

50

断できることを示した。TY101の遮断効果は、ペンブロリズマブの効果と類似であり、ニボルマブの効果より良好である（図17）。

【0254】

in vitroでの腫瘍細胞成長の阻害効果の比較：既に記載したように、アロCD8⁺ CTL細胞を、異なるmAbおよび対照IgGの存在下で、96ウェルプレートにおいて、一晚培養した624Mel/PD-L1腫瘍細胞と共に5日間同時培養した。細胞を、0.5%クリスタルバイオレットによって染色し、プレートをELISAリーダーによって540nmで読み取った。殺滅活性を、腫瘍細胞の生存に基づいて計算した。

【0255】

結果は、3つ全ての抗PD-1mAbが、アロCD8⁺ CTLの腫瘍の殺滅能を増強することができることを示した。TY101の増強効果は、2つの市販の抗体の効果より高かった（図18）。

【0256】

（実施例7：TY101のクローンの生成およびその活性）

TY101の配列を、専売の発現ベクターにクローニングし、CHO細胞にトランスフェクトした。単クローン性の細胞株を、ClonePixおよび／または限界希釈を使用して樹立した。複数のクローンを樹立し、そのような3つのクローンによって産生された抗体（TY101-01-09、TY101-04-T3-05、およびTY101-4G1）を特徴付けした。

【0257】

hPD-1またはmPD-1タンパク質に対する試験抗体の結合（ELISA）

抗体のhPD-1に対する結合およびmPD-1タンパク質に対する交差反応性を、ELISAによって試験した。試験抗体の連続希釈物を、1μg/mL hPD-1またはmPD-1を予めコーティングしたELISAプレートに添加した。次いで、HRPコンジュゲートヤギ抗ヒトIgGまたはヤギ抗マウスIgG抗体を添加した後、基質テトラメチルベンジジン（TMB）を添加し、SpectraMax Plus 384マイクロプレートリーダー（Molecular Device, LLC, Sunnyvale, CA）によって450nmの波長で定量した。試験したTY101クローン、TY101-01-09、TY101-04-T3-05、およびTY101-4G1は、0.01~0.15nMの範囲のEC50でhPD-1タンパク質に対して良好な結合を示した。抗体は、mPD-1タンパク質に対する結合を示さなかった（図19）。

【0258】

hPD-1およびcPD-1発現CHOK1細胞に対する試験抗体の結合（フローサイトメトリー）

抗体のhPD-1に対する結合およびカニクイザルPD-1（cPD-1）に対する交差反応性を、フローサイトメトリーによって、hPD-1またはcPD-1発現CHOK1細胞を使用して試験した。CHOK1-hPD-1、CHOK1-cPD-1、およびCHOK1ブランク細胞を、試験物質の連続希釈物と共にインキュベートし、その後にAlexa Fluor（登録商標）488コンジュゲートヤギ抗ヒトIgG（H+L）抗体と共にインキュベートし、FACS Canto II（BD Biosciences, San Jose, CA）を使用して分析した。試験したTY101クローン、TY101-01-09、TY101-04-T3-05、およびTY101-4G1は、CHOK1-hPD-1に対してナノモル濃度より低いEC50で良好な結合を示し、CHOK1-cPD-1細胞に対して一桁のナノモル濃度EC50で良好な結合を示した（図20）。

【0259】

hPD-1/hPD-L1またはhPD-1/hPD-L2結合に対する試験抗体の遮断活性（フローサイトメトリー）

これらの抗体を、がん患者の処置における潜在的有効性の鍵となる、hPD-1/hPD-L1ならびにhPD-1/hPD-L2結合を遮断する能力に関してさらに試験した

10

20

30

40

50

。CHOK1-hPD-1細胞を、ビオチン-hPD-L1またはビオチン-hPD-L2と混合した試験物質の連続希釈物と共にインキュベートした。次いで、細胞をAlexa 488標識ストレプトアビジンと共にインキュベートし、FACSCanto IIを使用して分析した。抗hPD-1抗体TY101-01-09、TY101-04-T3-05、およびTY101-4G1は、hPD-L1のhPD-1発現CHOK1細胞に対する結合を1.15~1.47 nMのIC50で遮断した。それらはまた、hPD-L2のhPD-1発現CHOK1細胞に対する結合を1.52~2.33 nMのIC50で遮断した（図21）。

【0260】

T細胞に及ぼす抗体の効果を試験するためのヒト混合白血球反応（MLR）アッセイ
これらの抗体がT細胞機能に及ぼす効果を、2人のドナーから単離されたT細胞によるヒトMLRアッセイにおいて試験した。接着PBMC（ほとんどが単球；ドナー1から単離され、細胞培養皿に播種して接着させたもの）を、100 ng/mLの組換えヒト（rh）GM-CSFおよび50 ng/mLのrhIL-4の存在下で5日間培養し、培地の半分の体積を3日後に新しくし、1 µg/mL LPSを6日目に添加した。7日目に、得られた細胞（ほとんどが成熟DC）を回収し、マイトマイシンCによって処置した。CD3⁺ T細胞を、ドナー2および3からEasySep（商標）ヒトT細胞単離キット（ネガティブセレクション、STEMCELL Technologies）によって単離した。DCおよびT細胞を、試験抗体の3つの濃度（5、0.5、0.05 µg/mL）の存在下で5日間同時培養した。上清を3日後に回収して、IL-2レベルを決定し、5日後（100 µL）にIFN-γレベルを決定した。抗hPD-1抗体TY101-01-09、TY101-04-T3-05、およびTY101-4G1は、アイソタイプ対照hIgG4と比較した場合に、用量依存的に両方のドナーからの細胞によるIL-2およびIFN-γの分泌を促進した（図22）。

【0261】

T細胞に及ぼす抗体の効果を試験するための操作された腫瘍細胞-ヒトT細胞同時培養アッセイ

これらの抗体がT細胞機能に及ぼす効果もまた、4人の異なるドナーから単離したT細胞を使用して、操作された腫瘍細胞-ヒトT細胞同時培養アッセイにおいて試験した。CD3⁺ T細胞を、4人のドナーのPBMCからEasySep（商標）ヒトT細胞単離キットによって単離した。OS8（抗CD3一本鎖可変断片（scFv））ならびにhPD-L1を安定に発現するように操作されたHep3B細胞（KCLB、カタログ番号：88064）である操作された腫瘍細胞Hep3B-OS8-hPDL1を、マイトマイシンCによって処置し、試験抗体の3つの濃度（5、0.5、0.05 µg/mL）の存在下でCD3⁺ T細胞と共に3日間同時培養し、培養上清を回収してIFN-γレベルを決定した。抗hPD-1抗体TY101-01-09、TY101-04-T3-05、およびTY101-4G1は、アイソタイプ対照hIgG4と比較した場合に4人全てのドナーからの細胞によるIFN-γの分泌を用量依存的に促進した（図23）。

【0262】

（実施例8：TY101クローンは、FDAが承認した抗hPD-1抗体と比較して良好な結合親和性を示した）

抗体エпитープ重複を試験するための競合的ELISA

これらの抗体がFDA承認抗hPD-1抗体であるニボルマブまたはペンブロリズマブと同じエпитープに結合するか否かを、競合的ELISAアッセイにおいて試験した。競合抗体の連続希釈物およびビオチン-hPD-1を、1 µg/mLの試験抗体によって予めコーティングしたELISAプレートに添加した。次いで、HRPコンジュゲートストレプトアビジンを添加し、その後、基質TMBを添加し、SpectraMax Plus 384マイクロプレートリーダーによって波長450 nmで定量した。抗hPD-1抗体TY101-01-09、TY101-04-T3-05、およびTY101-4G1は、hPD-1に対する互いの結合をほぼ完全に遮断し、それらが類似のエピトープを共有

することを示唆する。3つの抗体はまた、ニボルマブおよびペンブロリズマブのhPD-1に対する結合もほぼ完全に（93%～94%）遮断したが、ニボルマブおよびペンブロリズマブは、これらの抗体のhPD-1に対する結合をごく部分的に遮断した（ニボルマブに関して77%～78%、ペンブロリズマブに関して46%～49%）。これらのデータは、TY101-01-09、TY101-04-T3-05、およびTY101-4G1抗体が、ニボルマブおよびペンブロリズマブとは異なるエピトープに結合し、それらがhPD-1に対してニボルマブおよびペンブロリズマブより高い親和性を有し得ることを示唆している（図24）。

【0263】

SPRによって決定した試験抗体のhPD-1に対する結合親和性

hPD-1に対する結合親和性の正確な測定を得るために、抗体TY101-01-09、TY101-04-T3-05およびTY101-4G1、ならびにニボルマブおよびペンブロリズマブを、SPRによって分析した。ヒトPD-1ECDタンパク質を、フローセル3において低い固定レベル（60RU）およびフローセル4において高い固定レベル（960RU）を達成するために異なる長さの時間、CM5センサーチップ上に固定した。連続希釈した（0、1.5625、3.125、6.25、12.5、25、および50nM）抗体を、フローセルに注入した。結合時間は180秒であり、解離時間は600秒（ニボルマブおよびペンブロリズマブに関して）または1500秒（TY101-01-09、TY101-04-T3-05、およびTY101-4G1に関して）であった。参照（フローセル1）およびゼロ濃度の両方のシグナルを試料のシグナルから差し引いた後、結合動態を、Biacore T200評価ソフトウェアバージョン1.0およびカーブフィッティングのために1:1結合モデルを使用して計算した。対照ヒトIgG4のhPD-1に対する結合は認められなかった。hPD-1の低い固定レベル（約60RU；表3；図23）からのデータに基づき、抗hPD-1抗体TY101-01-09、TY101-04-T3-05、およびTY101-4G1によるヒトPD-1に対する結合速度は、ニボルマブおよびペンブロリズマブの結合速度よりわずかに低かった（1/2～1/4）。これら3つの抗体のヒトPD-1からの解離速度は、ニボルマブおよびペンブロリズマブの1/12～1/30であり、ニボルマブおよびペンブロリズマブの親和性より4～8倍良好な親和性をもたらした（より低い K_D は、より良好な親和性に対応し、その逆も同様である；表3）。抗hPD-1抗体TY101-01-09、TY101-04-T3-05、およびTY101-4G1のhPD-1に対する結合親和性をまた、hPD-1の高い固定レベルでも試験した。抗体TY101-01-09、TY101-04-T3-05、およびTY101-4G1は、非常に遅い解離速度を示し、最小の解離は、1500秒の解離時間後でさえ観察された（図23）。データは、TY101-01-09、TY101-04-T3-05、およびTY101-4G1の結合親和性が、主に遅い解離速度によりニボルマブおよびペンブロリズマブの結合親和性より良好であったことを示唆した（図25）。

【0264】

（実施例9：カニクイザルにおけるTY101の投薬試験および薬物動態）

TY101の薬物動態を評価するために、全体で18匹のカニクイザルを、3匹/性別/群で3つの群に割付した。TY101をそれぞれ、1、3、および10mg/kgの用量レベルで静脈内注入によって注射した。各投薬は、注射ポンプを使用して右後肢を通して投与した。注入速度は、30mL/kg/hであった。用量体積は10mL/kgであった。確認されたELISA法を、動物血漿中でのTY101の定量のために使用した。薬物動態分析のためにEDTA-K2抗凝固剤を有するおよそ1mLの血液試料を、群1～3において、投与前、注入終了の直前直後（±1分）、ならびに注入開始後2、6、24（D2）、48（D3）、72（D4）、96（D5）、120（D6）、168（D8）、240（D11）、336（D15）、408（D18）、504（D22）、576（D25）、および672（D29）時間に左後肢の皮下静脈から収集した。血液試料を、薬物動態分析のための血漿の調製のために使用した。

【0265】

TY101のPKパラメーターを以下の表に示す。

【表8】

投薬量	性別	$t_{1/2}$ h	T_{max} h	C_{max} μg/mL	$AUC_{(0-672h)}$ h*μg/mL	AUC_{inf} h*μg/mL	V_d mL/kg	CI mL/h/kg	MRT h	C_{max} 比	$AUC_{(0-672h)}$ の比
1mg/kg	♂	平均値	153.53	0.33	23.80	4255.30	4614.27	49.52	0.23	195.00	—
		SD	33.86	0.00	3.01	1254.81	1215.81	11.55	0.07	42.14	—
	♀	平均値	160.62	0.89	21.63	2557.59	3476.92	65.14	0.29	115.89	—
		SD	61.00	0.96	4.08	330.49	568.46	13.84	0.05	14.39	—
3 mg/kg	♂	平均値	176.87	2.00	72.65	13153.36	14868.89	48.22	0.21	203.86	3.05
		SD	120.00	0.00	10.80	1956.02	2895.52	27.20	0.05	12.92	3.09
	♀	平均値	95.05	2.22	61.67	10353.29	10625.10	39.27	0.28	194.42	2.85
		SD	40.23	3.27	4.99	808.64	664.57	17.67	0.02	14.27	4.05
10 mg/kg	♂	平均値	220.26	0.33	261.62	44497.84	54125.93	54.87	0.21	203.12	10.99
		SD	123.00	0.00	9.91	11981.63	20275.76	16.11	0.10	69.70	10.46
	♀	平均値	199.43	0.89	198.30	39538.31	42856.30	67.29	0.24	219.39	9.17
		SD	35.58	0.96	24.35	6001.59	7685.37	4.61	0.05	12.86	15.46

10

【0266】

 C_{max} 比=中用量または高用量での平均 C_{max} / 低用量での平均 C_{max}

20

【0267】

#7 曲線下面積 (AUC) 比=中用量または高用量での平均 AUC (0-672h) / 低用量での平均 AUC (0-672h)

【0268】

TY101は、基本的に、1、3、および10mg/kgの1回静脈内注入後にカニクイザルにおいて線形の動力的特徴を表した。平均 C_{max} および AUC (0-672h) 値は、一般的に1~10mg/kgの間で用量に比例して増加した。1回静脈内注入後の1~10mg/kgのTY101の薬物動態特徴に明白な性差は認められなかった。

【0269】

類似の条件下で、本発明者らはまた、TY101およびOPDIVO (登録商標) (Bristol-Myers Squibb) の3mg/kgのPKプロファイルと比較した。データを以下の表に要約する。

30

【表9】

群	性別	$T_{1/2}$ h	T_{max} h	C_{max} μg/mL	$AUC_{(0-672h)}$ h*μg/mL	AUC_{inf} h*μg/mL	V_d mL/kg	CI mL/h/kg	MRT h	C_{max} 比	$AUC_{(0-672h)}$ の比
TY101 3 mg/kg	♂	平均値	226.70	0.33	76.59	12203.89	15595.46	63.05	0.19	181.10	0.99
		SD	41.36	0.00	2.44	1016.76	338.36	12.85	0.00	67.02	1.22
		CV%	18.25	0.00	3.19	8.33	2.17	20.38	2.17	37.01	—
	♀	平均値	111.65	1.17	75.35	12729.44	12993.14	37.02	0.24	161.81	1.11
		SD	36.39	1.18	1.94	3888.20	3840.41	1.18	0.07	60.79	1.26
		CV%	32.59	101.02	2.57	30.54	29.56	3.19	29.56	37.57	—
Opdivo 3 mg/kg	♂	平均値	191.96	0.33	77.29	9997.33	14088.48	55.89	0.23	130.30	—
		SD	121.24	0.00	0.33	268.79	5111.70	16.96	0.08	10.35	—
		CV%	63.16	0.00	0.43	2.69	36.28	30.35	36.28	7.95	—
	♀	平均値	146.58	0.33	67.81	10127.26	11384.49	56.09	0.27	161.61	—
		SD	1.38	0.00	3.67	2614.53	1240.57	6.63	0.03	50.05	—
		CV%	0.94	0.00	5.41	25.82	10.90	11.83	10.90	30.97	—

40

 C_{max} 比=TY101の平均 C_{max} / OPDIVO (登録商標) の平均 C_{max}

AUC比=TY101の平均 AUC (0-672h) / OPDIVO (登録商標) の平均 AUC (0-672h)

【0270】

50

TY101およびOPDIVO（登録商標）は、3mg/kgで同等のPKプロファイルを実証した。

【0271】

本開示は、本開示の個々の態様の単なる例として意図される記載される特定の実施形態によって範囲を限定されず、機能的に等価である任意の組成物または方法は本開示の範囲内である。本開示の精神または範囲から逸脱することなく、様々な改変および変化を本開示の方法および組成物に行うことができることは当業者に明らかであろう。このように、本開示は、添付の特許請求の範囲およびその均等物の範囲内に入る限り、本開示の改変および変化形を含むことが意図される。

【0272】

本明細書において言及される全ての刊行物および特許出願は、各々の個々の刊行物または特許出願が、参照により本明細書に組み込まれることが具体的および個々に示されているのと同程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

30

40

50

【図面】
【図 1】

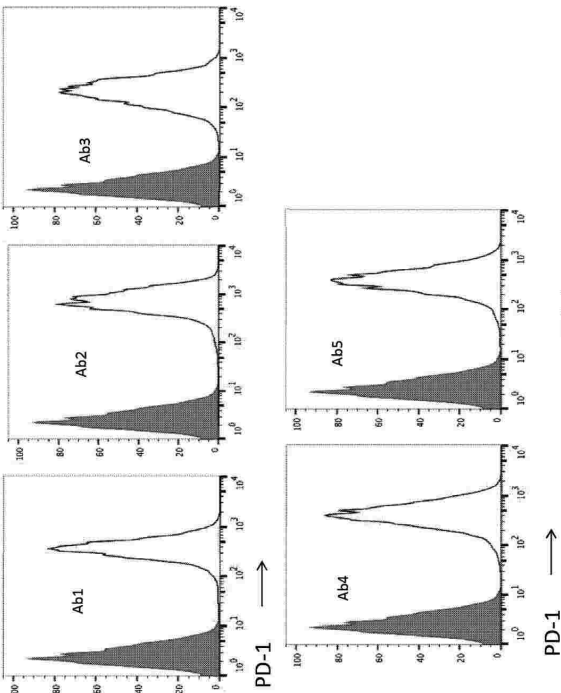


FIG. 1

【図 2】

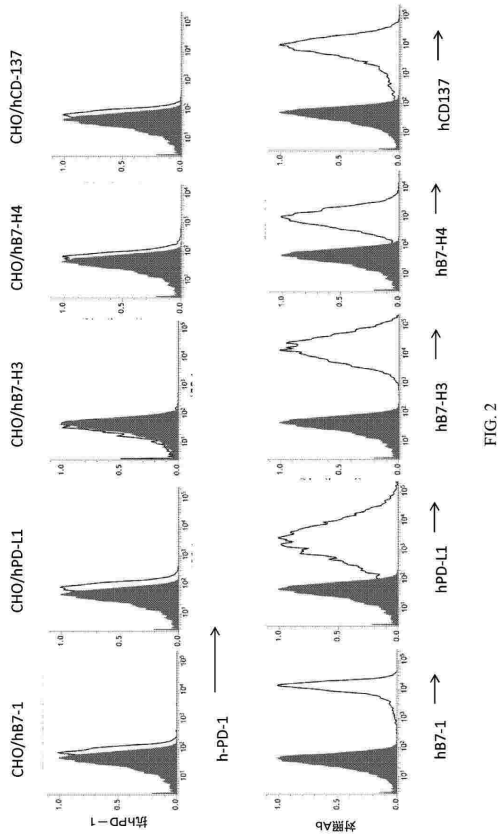


FIG. 2

10

20

30

40

50

【図 3】

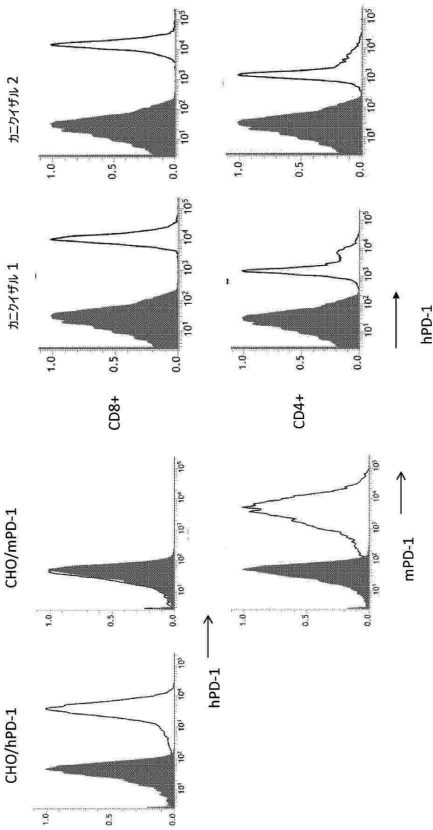


FIG. 3

【図 4】

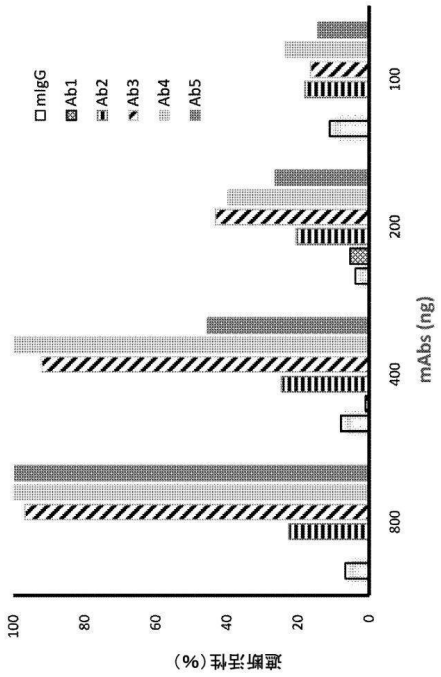


FIG. 4

【図 5 - 1】

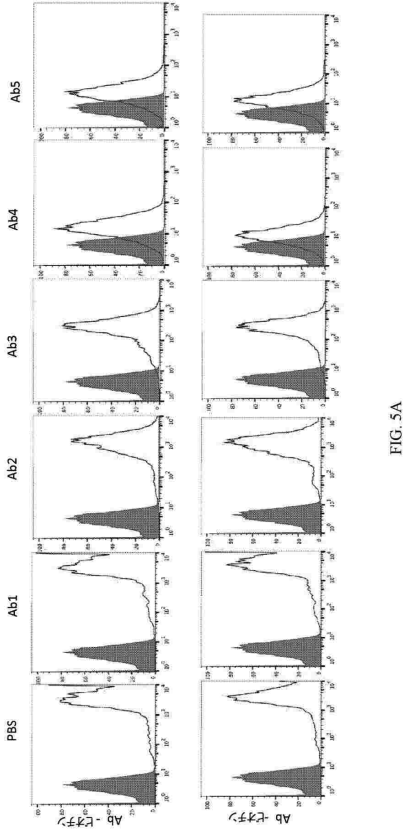


FIG. 5A

【図 5 - 2】

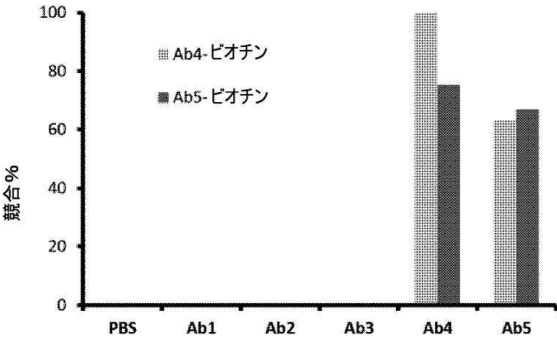


FIG 5B

10

20

30

40

50

【図 6】

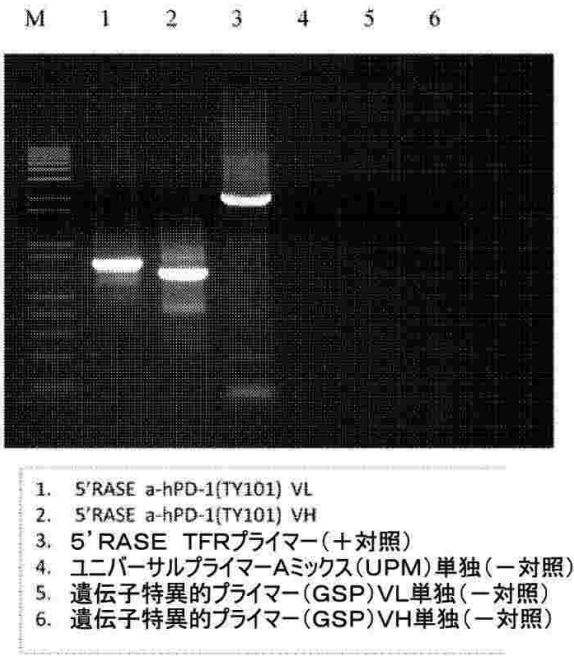
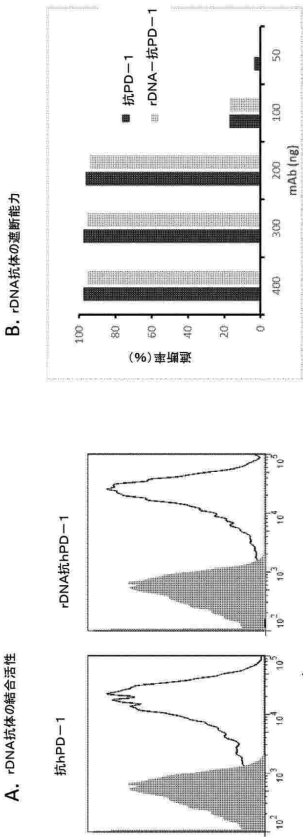


FIG. 6

【図 7】



10

20

【図 8】

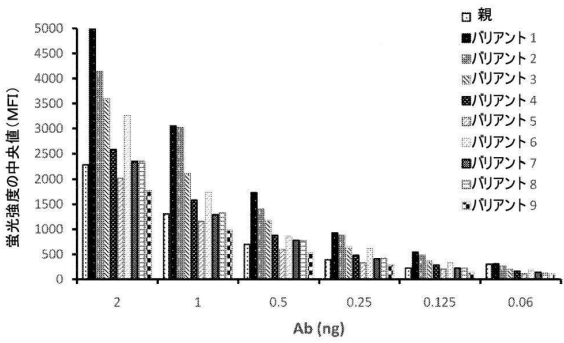


FIG. 8

【図 9】

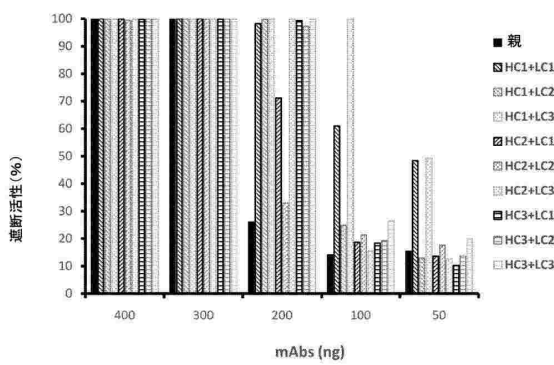


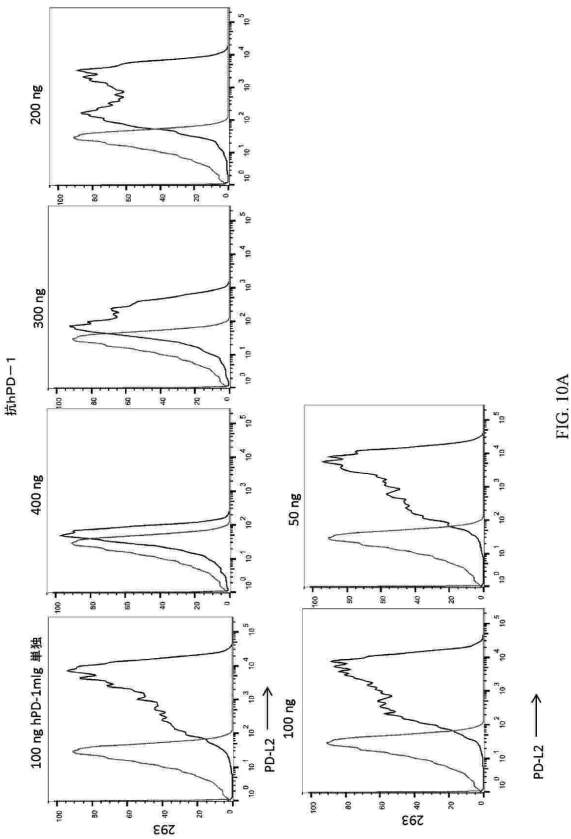
FIG. 9

30

40

50

【図 10 - 1】



【図 10 - 2】

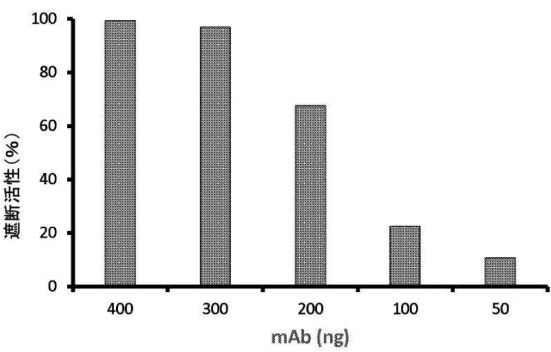


FIG. 10B

【図 11】

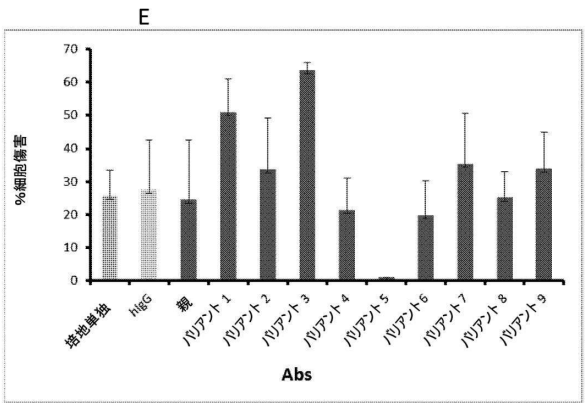


FIG. 11

【図 12】

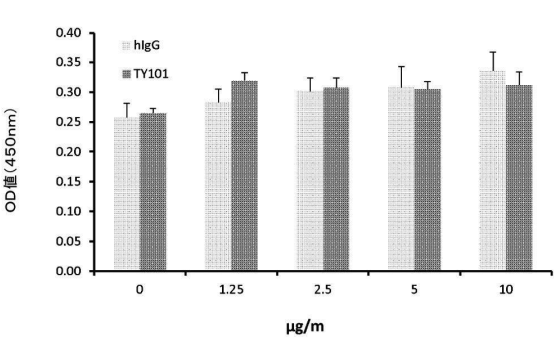
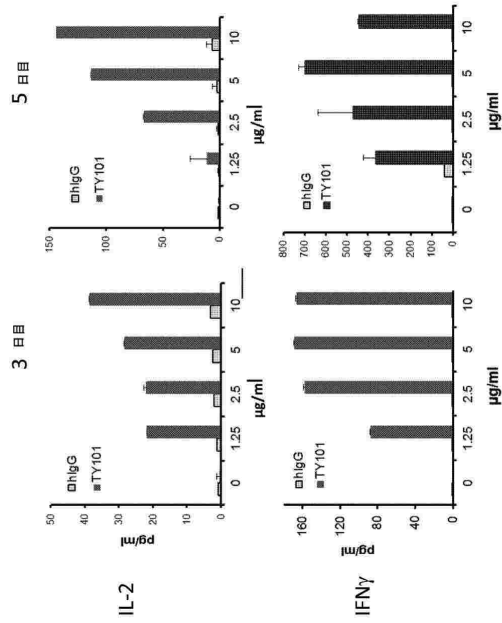


FIG. 12

【図 1 3】



【図 1 4 - 1】

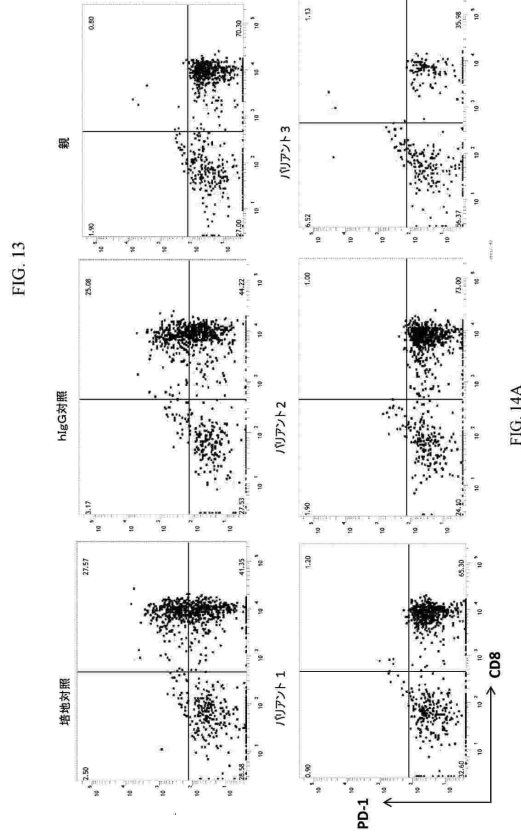


FIG. 13

FIG. 14A

【図 1 4 - 2】

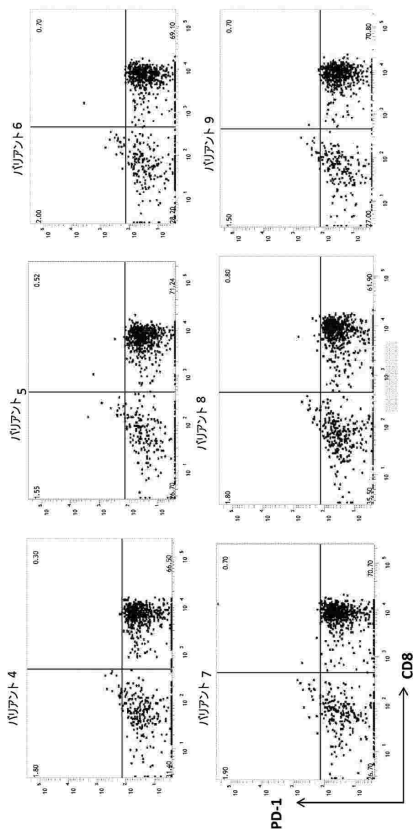


FIG. 14B

【図 1 5】

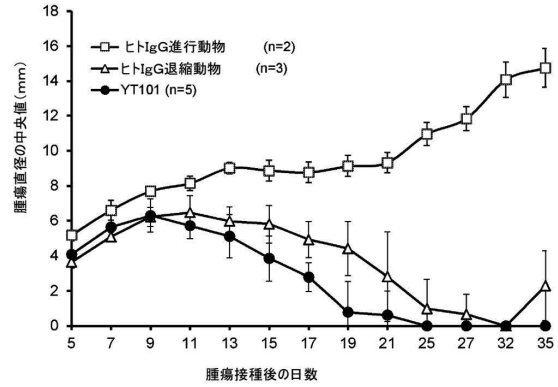


FIG. 15

10

20

30

40

50

【図 1 6】

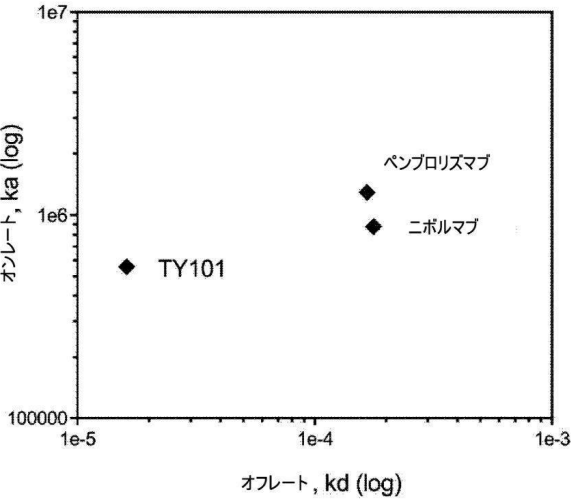


FIG. 16

【図 1 7】

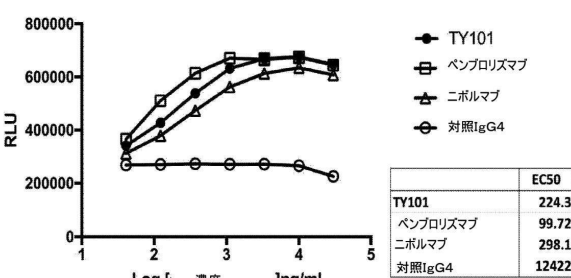


FIG. 17

【図 1 8】

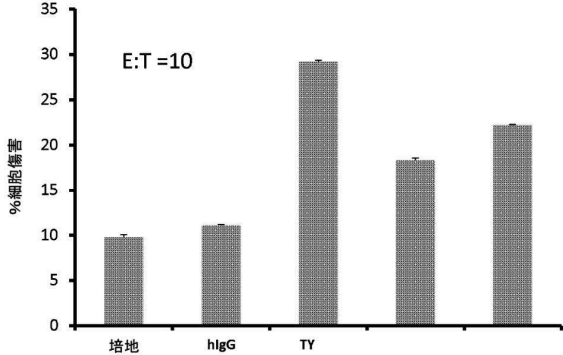


FIG. 18

【図 1 9】

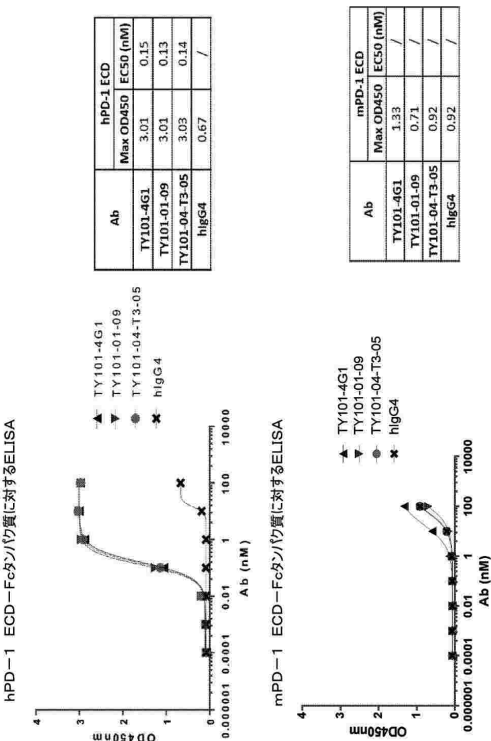


FIG. 19

【図 20】

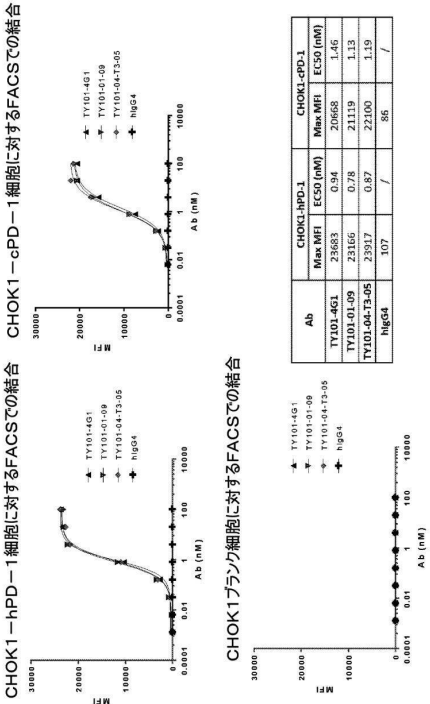


FIG. 20

【図 21】

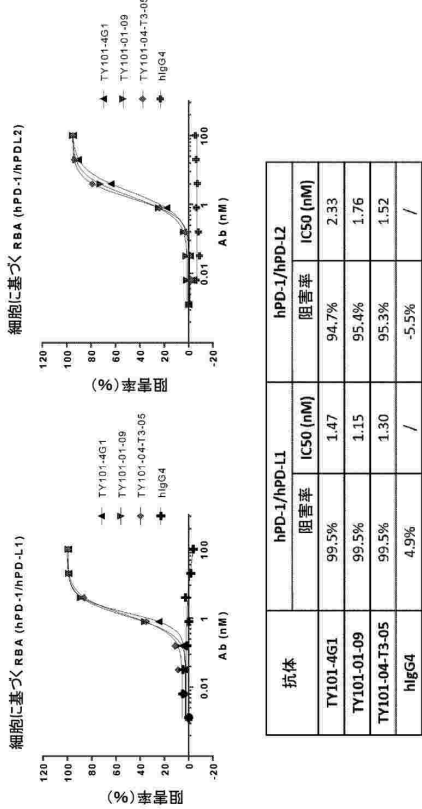


FIG. 21

【図 22】

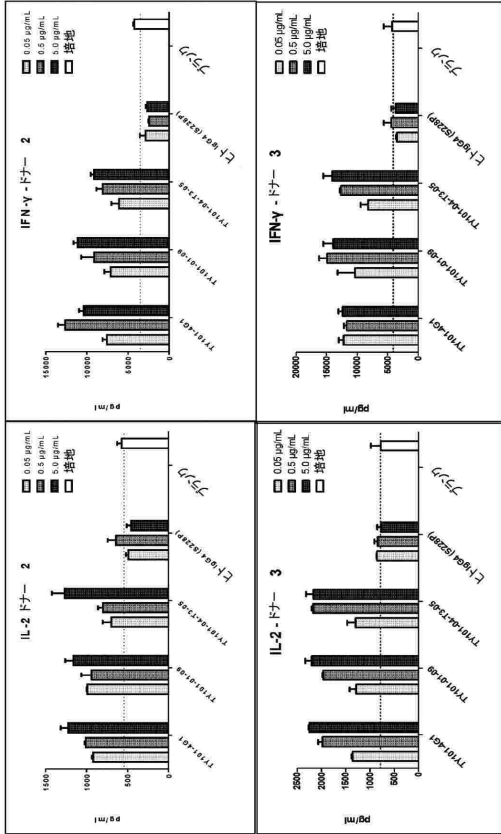


FIG. 22

【図 23】

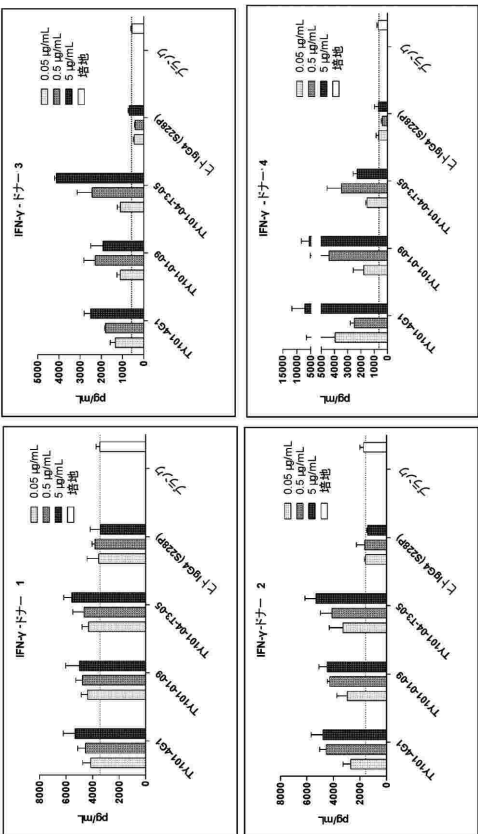


FIG. 23

10

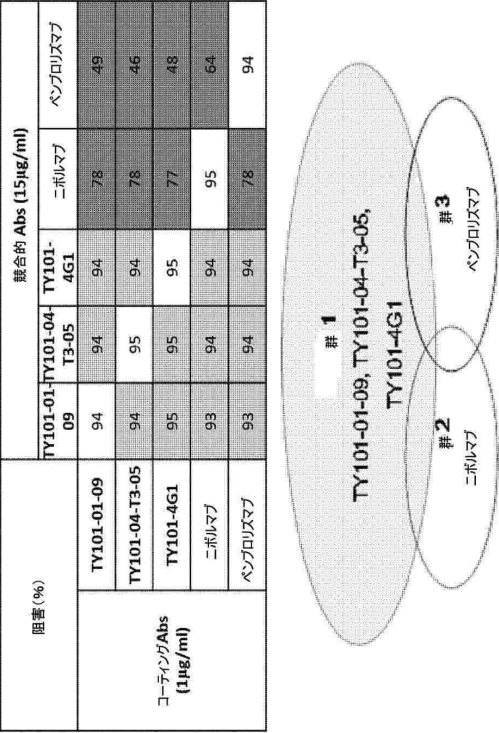
20

30

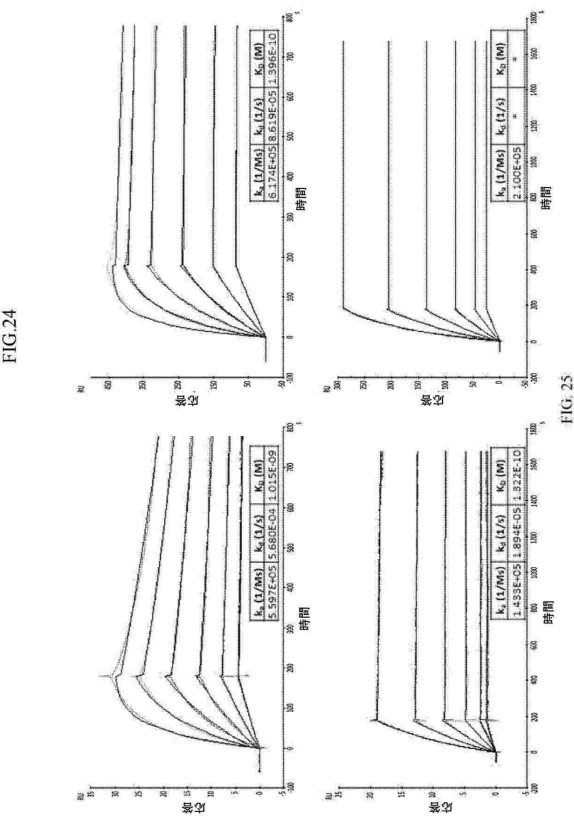
40

50

【図 2 4】



【図 2 5】



【配列表】

0007519985000001.app

フロントページの続き

弁理士 石川 大輔
(74)代理人 230113332
弁護士 山本 健策
(72)発明者 チェン, リエピン
中華人民共和国 102629 ベイジン, ダシン ディストリクト, ベイザンチュン タウン,
ヨンワン シールー 26 ユアン, ジョングアンチュン イーリャオチーシエ ユアン, 12-2 ロウ
(72)発明者 ルオ, リチュン
中華人民共和国 102629 ベイジン, ダシン ディストリクト, ベイザンチュン タウン,
ヨンワン シールー 26 ユアン, ジョングアンチュン イーリャオチーシエ ユアン, 12-2 ロウ
審査官 川合 理恵
(56)参考文献 国際公開第2017/019846 (WO, A1)
特表2017-505125 (JP, A)
(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
A61K
A61P
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
Caplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (ST
N)