

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6552621号

(P6552621)

(45) 発行日 令和1年7月31日(2019.7.31)

(24) 登録日 令和1年7月12日(2019.7.12)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13 Z N A
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10

請求項の数 37 (全 121 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-530259 (P2017-530259)	(73) 特許権者	505129415
(86) (22) 出願日	平成27年12月2日 (2015.12.2)		ライナット ニューロサイエンス コーポ レーション
(65) 公表番号	特表2018-503365 (P2018-503365A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 940 80, サウス サンフランシスコ, イ ー, グランド アベニュー 230
(43) 公表日	平成30年2月8日 (2018.2.8)	(74) 代理人	100133927
(86) 国際出願番号	PCT/IB2015/059268		弁理士 四本 能尚
(87) 国際公開番号	W02016/092419	(74) 代理人	100137040
(87) 国際公開日	平成28年6月16日 (2016.6.16)		弁理士 宮澤 純子
審査請求日	平成30年11月28日 (2018.11.28)	(74) 代理人	100147186
(31) 優先権主張番号	62/089,658		弁理士 佐藤 真紀
(32) 優先日	平成26年12月9日 (2014.12.9)	(74) 代理人	100174447
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 龍田 美幸
(31) 優先権主張番号	62/242,750		
(32) 優先日	平成27年10月16日 (2015.10.16)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗PD-1抗体およびその使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

PD-1 に特異的に結合し、

(1) 配列番号3のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域(VH)のVH相補性決定領域1(CDR1)、VH CDR2、およびVH CDR3を含むVH；ならびに

配列番号2のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域(VL)のVL CDR1、VL CDR2、およびVL CDR3を含むVL、

(2) 配列番号3のアミノ酸配列を有するVHのVH CDR1、VH CDR2、およびVH CDR3を含むVH；ならびに

配列番号7のアミノ酸配列を有するVLのVL CDR1、VL CDR2、およびVL CDR3を含むVL、

(3) 配列番号3のアミノ酸配列を有するVHのVH CDR1、VH CDR2、およびVH CDR3を含むVH；ならびに

配列番号8のアミノ酸配列を有するVLのVL CDR1、VL CDR2、およびVL CDR3を含むVL、

(4) 配列番号3のアミノ酸配列を有するVHのVH CDR1、VH CDR2、およびVH CDR3を含むVH；ならびに

配列番号9のアミノ酸配列を有するVLのVL CDR1、VL CDR2、およびVL CDR3を含むVL、

(5) 配列番号4のアミノ酸配列を有するVHのVH CDR1、VH CDR2、およ

10

20

びVH CDR3を含むVH；ならびに

配列番号2のアミノ酸配列を有するVLのVL CDR1、VL CDR2、およびVL CDR3を含むVL、

(6) 配列番号4のアミノ酸配列を有するVHのVH CDR1、VH CDR2、およびVH CDR3を含むVH；ならびに

配列番号7のアミノ酸配列を有するVLのVL CDR1、VL CDR2、およびVL CDR3を含むVL、

(7) 配列番号4のアミノ酸配列を有するVHのVH CDR1、VH CDR2、およびVH CDR3を含むVH；ならびに

配列番号8のアミノ酸配列を有するVLのVL CDR1、VL CDR2、およびVL CDR3を含むVL、 10

(8) 配列番号4のアミノ酸配列を有するVHのVH CDR1、VH CDR2、およびVH CDR3を含むVH；ならびに

配列番号9のアミノ酸配列を有するVLのVL CDR1、VL CDR2、およびVL CDR3を含むVL、

(9) 配列番号5のアミノ酸配列を有するVHのVH CDR1、VH CDR2、およびVH CDR3を含むVH；ならびに

配列番号2のアミノ酸配列を有するVLのVL CDR1、VL CDR2、およびVL CDR3を含むVL、

(10) 配列番号5のアミノ酸配列を有するVHのVH CDR1、VH CDR2、およびVH CDR3を含むVH；ならびに 20

配列番号7のアミノ酸配列を有するVLのVL CDR1、VL CDR2、およびVL CDR3を含むVL、

(11) 配列番号5のアミノ酸配列を有するVHのVH CDR1、VH CDR2、およびVH CDR3を含むVH；ならびに

配列番号8のアミノ酸配列を有するVLのVL CDR1、VL CDR2、およびVL CDR3を含むVL、

(12) 配列番号5のアミノ酸配列を有するVHのVH CDR1、VH CDR2、およびVH CDR3を含むVH；ならびに

配列番号9のアミノ酸配列を有するVLのVL CDR1、VL CDR2、およびVL CDR3を含むVL、 30

(13) 配列番号6のアミノ酸配列を有するVHのVH CDR1、VH CDR2、およびVH CDR3を含むVH；ならびに

配列番号2のアミノ酸配列を有するVLのVL CDR1、VL CDR2、およびVL CDR3を含むVL、

(14) 配列番号6のアミノ酸配列を有するVHのVH CDR1、VH CDR2、およびVH CDR3を含むVH；ならびに

配列番号7のアミノ酸配列を有するVLのVL CDR1、VL CDR2、およびVL CDR3を含むVL、

(15) 配列番号6のアミノ酸配列を有するVHのVH CDR1、VH CDR2、およびVH CDR3を含むVH；ならびに 40

配列番号8のアミノ酸配列を有するVLのVL CDR1、VL CDR2、およびVL CDR3を含むVL、または

(16) 配列番号6のアミノ酸配列を有するVHのVH CDR1、VH CDR2、およびVH CDR3を含むVH；ならびに

配列番号9のアミノ酸配列を有するVLのVL CDR1、VL CDR2、およびVL CDR3を含むVL

を含む、単離アンタゴニスト抗体。

【請求項2】

PD-1に特異的に結合し、

(1 3) 配列番号 1 3 のアミノ酸配列を含む V H C D R 1、配列番号 2 8 のアミノ酸配

50

列を含むVH CDR 2、配列番号18のアミノ酸配列を含むVH CDR 3、配列番号10のアミノ酸配列を含むVL CDR 1、配列番号11のアミノ酸配列を含むVL CDR 2、および配列番号12のアミノ酸配列を含むVL CDR 3、
 (14) 配列番号13のアミノ酸配列を含むVH CDR 1、配列番号28のアミノ酸配列を含むVH CDR 2、配列番号18のアミノ酸配列を含むVH CDR 3、配列番号10のアミノ酸配列を含むVL CDR 1、配列番号20のアミノ酸配列を含むVL CDR 2、および配列番号12のアミノ酸配列を含むVL CDR 3、
 (15) 配列番号13のアミノ酸配列を含むVH CDR 1、配列番号28のアミノ酸配列を含むVH CDR 2、配列番号18のアミノ酸配列を含むVH CDR 3、配列番号10のアミノ酸配列を含むVL CDR 1、配列番号20のアミノ酸配列を含むVL CDR 2、および配列番号21のアミノ酸配列を含むVL CDR 3、または
 (16) 配列番号13のアミノ酸配列を含むVH CDR 1、配列番号28のアミノ酸配列を含むVH CDR 2、配列番号18のアミノ酸配列を含むVH CDR 3、配列番号22のアミノ酸配列を含むVL CDR 1、配列番号11のアミノ酸配列を含むVL CDR 2、および配列番号12のアミノ酸配列を含むVL CDR 3
 を含む、単離アンタゴニスト抗体。

10

【請求項3】

定常領域を含む、請求項1または2に記載の単離アンタゴニスト抗体。

【請求項4】

IgG2、IgG2 a、IgG4、IgG4 b、IgG4 c、IgG4 S228P、IgG4 b S228P、およびIgG4 c S228Pからなる群から選択されるアイソタイプを有する、請求項3に記載の単離アンタゴニスト抗体。

20

【請求項5】

定常領域がIgG4 S228Pである、請求項3に記載の単離アンタゴニスト抗体。

【請求項6】

抗体のそれぞれのCDRが、CDRのKabat定義、Chothia定義、Kabat定義とChothia定義の組合せ、AbM定義、または接触定義によって定義される、請求項1または2に記載の単離アンタゴニスト抗体。

【請求項7】

T細胞からのIFN および/またはTNF分泌を促進する、請求項1から6のいずれか一項に記載の単離抗体。

30

【請求項8】

T細胞の増殖を促進する、請求項1から7のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項9】

腫瘍増殖を阻害する、請求項1から8のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項10】

ヒトPD-1およびマウスPD-1に結合する、請求項1から9のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項11】

表面プラズモン共鳴によって測定される場合、25 で約0.73 nMの親和性でヒトPD-1に結合する、請求項10に記載の単離抗体。

40

【請求項12】

請求項1から11のいずれか一項に記載の抗体を産生する単離細胞株。

【請求項13】

請求項1から11のいずれか一項に記載の抗体をコードする単離核酸。

【請求項14】

請求項13に記載の核酸を含む組換え発現ベクター。

【請求項15】

請求項14に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項16】

50

請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の抗体を産生することができるハイブリドーマ。

【請求項 17】

抗 PD - 1 アンタゴニスト抗体を産生させる方法であって、抗体が産生される条件下で、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の抗体を組換え産生する細胞株を培養するステップと、抗体を回収するステップとを含む、方法。

【請求項 18】

抗 PD - 1 アンタゴニスト抗体を産生させる方法であって、抗体が産生される条件下で、配列番号 29 または 38 に示したアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号 39 に示したアミノ酸配列を含む軽鎖を含む抗体をコードする核酸を含む細胞株を培養するステップと、抗体を回収するステップとを含む、方法。

10

【請求項 19】

抗体の重鎖および軽鎖が、別個のベクターでコードされる、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

抗体の重鎖および軽鎖が、同じベクターでコードされる、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 21】

請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の抗体および薬学的に許容できる担体を含む医薬組成物。

【請求項 22】

請求項 21 に記載の医薬組成物を含む、がんを治療するためのキット。

20

【請求項 23】

有効量の請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の抗 PD - 1 抗体または請求項 21 に記載の医薬組成物を含み、がんに関連した 1 つまたは複数の症状を、個体において緩和する、がんの治療剤。

【請求項 24】

がんが、胃がん (gastric cancer)、肉腫、リンパ腫、ホジキンリンパ腫、白血病、頭頸部がん、扁平細胞頭頸部がん、胸腺がん、上皮がん、唾液腺がん、肝がん、胃がん (stomach cancer)、甲状腺がん、肺がん、卵巣がん、乳がん、前立腺がん、食道がん、膵がん、神経膠腫、白血病、多発性骨髄腫、腎細胞癌、膀胱がん、子宮頸がん、絨毛癌、大腸がん、口腔がん、皮膚がん、および黒色腫からなる群から選択される、請求項 23 に記載の治療剤。

30

【請求項 25】

個体が、局所進行性もしくは転移性黒色腫、扁平細胞頭頸部がん (SCCHNC)、卵巣癌、肉腫、または再発もしくは難治性古典的ホジキンリンパ腫 (cHL) を有する、以前に治療された成人患者である、請求項 23 または 24 に記載の治療剤。

【請求項 26】

抗 PD - 1 抗体が、約 0.5 mg/kg、約 1.0 mg/kg、約 3.0 mg/kg、または約 10 mg/kg の投与量で投与される、請求項 23 から 25 のいずれか一項に記載の治療剤。

【請求項 27】

抗 PD - 1 抗体が、7、14、21、または 28 日毎に 1 回投与される、請求項 23 から 26 のいずれか一項に記載の治療剤。

40

【請求項 28】

抗 PD - 1 抗体が、静脈内または皮下に投与される、請求項 23 から 27 のいずれか一項に記載の治療剤。

【請求項 29】

有効量の第 2 の治療剤と共に用いる、請求項 23 から 28 のいずれか一項に記載の治療剤。

【請求項 30】

第 2 の治療剤が、抗 CTLA4 抗体、抗 4 - 1 BB 抗体、第 2 の PD - 1 アンタゴニス

50

ト、抗PD-L1抗体、抗TIM3抗体、抗LAG3抗体、抗TIGIT抗体、抗OX40抗体、抗GITR抗体、チロシンキナーゼ阻害剤、およびALK阻害剤からなる群から選択される、請求項29に記載の治療剤。

【請求項31】

チロシンキナーゼ阻害剤が、アキシチニブまたはパルボシクリブである、請求項30に記載の治療剤。

【請求項32】

ALK阻害剤が、スニチニブまたはクリゾチニブである、請求項30に記載の治療剤。

【請求項33】

(1)有効量の請求項1から11のいずれか一項に記載の抗PD-1抗体または請求項21に記載の医薬組成物、および(2)有効量のがんの細胞に対して免疫応答を誘発することができるワクチンを含む、がんの治療剤。

【請求項34】

がんを治療するためのワクチンを受けている対象のための、有効量の請求項1から11のいずれか一項に記載の抗PD-1抗体または請求項21に記載の医薬組成物を含む、ワクチンの免疫原性または治療効果の増強剤。

【請求項35】

がんが、乳がん、胃がん、肝がん、肺がん、卵巣がん、膵がん、前立腺がん、および結腸直腸がんから選択される、請求項33に記載の治療剤または請求項34に記載の増強剤。

【請求項36】

有効量の1種または複数の他の免疫モジュレーターと共に用いる、請求項33に記載の治療剤または請求項34に記載の増強剤。

【請求項37】

他の免疫モジュレーターが、プロテインキナーゼ受容体阻害剤、CTLA-4アンタゴニスト、CD40アゴニスト、およびTLR9アゴニストからなる群から選択される、請求項36に記載の治療剤または増強剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、PD-1に結合する抗体、例えば、全長抗体に関する。本発明はさらに、PD-1に対する抗体を含む組成物、および医薬として抗PD-1抗体を使用する方法に関する。ある特定の実施形態は、がんなどの過剰増殖性疾患を含めた様々な疾患を治療、予防、および/または診断するために抗PD-1抗体を使用する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

PD-1は、活性化誘導アポトーシスを受けているT細胞株内で最初に同定された50~55kDaのI型膜貫通受容体である。PD-1は、T細胞、B細胞、およびマクロファージ上で発現される。PD-1のリガンドは、B7ファミリーメンバーPD-L1(B7-H1)およびPD-L2(B7-DC)である。

【0003】

PD-1は、その細胞外領域内に単一IgV様ドメインを含有する免疫グロブリン(Ig)スーパーファミリーのメンバーである。PD-1細胞質ドメインは、2つのチロシンを含有し、最も膜近位のチロシン(マウスPD-1中のVAYEEL)は、ITIM(免疫受容体チロシンベース阻害性モチーフ)内に位置している。PD-1上のITIMの存在は、この分子が細胞質ホスファターゼの動員によって抗原受容体シグナル伝達を減弱させるように機能することを示す。ヒトおよびマウスPD-1タンパク質は、4つの潜在的なN-グリコシル化部位の保存を伴った約60%のアミノ酸同一性、およびIg-Vドメインを確定する残基を共有する。細胞質領域内のITIMおよびカルボキシ末端チロシンを囲繞するITIM様モチーフも、ヒトオルソログとマウスオルソログとの間で保存され

10

20

30

40

50

ている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

がん免疫療法は、細胞、および個別化された時間のかかる調製を使用する複雑な方法を伝統的に伴っている。最近、適応免疫系に送達される抑制シグナルの中断に基づくモノクローナル抗体ベースがん免疫療法が、既製の全身免疫療法の設定内で診療所において有望性を示した。しかし、がんのより安全でより有効な治療を得るための当技術分野における継続的な必要性が存在する。

【課題を解決するための手段】

10

【0005】

PD-1と選択的に相互作用する抗体が提供される。ある特定の抗PD-1抗体は、がんを予防および/または治療するのに*in vivo*で有効であることが実証されている。有利には、本明細書に提供する抗PD-1抗体は、ヒト、カニクイザル、およびマウスPD-1に結合する。また、有利には、本明細書に提供する抗PD-1抗体は、T細胞増殖を刺激するのに*in vivo*で有効である。

【0006】

PD-1に特異的に結合し、PD-1の生物学的効果を防止または低減する単離アンタゴニスト抗体が本明細書に提供される。一部の実施形態では、アンタゴニスト抗体は、例えば、ヒト、ヒト化、またはキメラ抗体であり得る。本明細書に開示の発明は、PD-1

20

【0007】

一態様では、本発明は、PD-1に特異的に結合する単離アンタゴニスト抗体であって、配列番号3、配列番号4、配列番号5、および配列番号6からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域(VH)のVH相補性決定領域1(CDR1)、VH CDR2、およびVH CDR3を含むVH、ならびに配列番号2、配列番号7、配列番号8、および配列番号9からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域(VL)のVL CDR1、VL CDR2、およびVL CDR3を含むVLを含む、単離アンタゴニスト抗体を提供する。

【0008】

30

一部の実施形態では、VH領域は、配列番号3、4、5、もしくは6に示したアミノ酸配列、またはCDR内にない残基中に1つもしくはいくつかの保存的アミノ酸置換を有するバリエーションを含み、かつ/あるいはVL領域は、配列番号2、7、8、もしくは9に示したアミノ酸配列、またはCDR内にないアミノ酸中に1つもしくはいくつかのアミノ酸置換を有するそのバリエーションを含む。一部の実施形態では、抗体は、配列番号39に示した配列を含む軽鎖および/または配列番号29もしくは38に示した配列を含む重鎖を含む。一部の実施形態では、抗体は、ATCC受託番号PTA-121183を有する発現ベクターによって産生されるVH領域を含む。一部の実施形態では、抗体は、ATCC受託番号PTA-121182を有する発現ベクターによって産生されるVL領域を含む。

【0009】

40

別の態様では、本発明は、PD-1に特異的に結合する単離抗体であって、配列番号13、14、または15のアミノ酸配列を含むVH CDR1、配列番号16、17、24、25、27、28、35、または36のアミノ酸配列を含むVH CDR2、配列番号18、23、26、または37に示したアミノ酸配列を含むVH CDR3、配列番号10、22、30、または32に示したアミノ酸配列を含むVL CDR1、配列番号11、20、または33に示したアミノ酸配列を含むVL CDR2、および配列番号12、21、31、または34に示したアミノ酸配列を含むVL CDR3を含む、単離抗体を提供する。

【0010】

一部の実施形態では、抗体は、ヒト抗体、ヒト化抗体、またはキメラ抗体であり得る。

50

一部の実施形態では、抗体は、モノクローナル抗体である。

【 0 0 1 1 】

一部の実施形態では、抗体は、定常領域を含む。一部の実施形態では、抗体は、ヒト I g G₁、I g G₂、I g G_{2 a}、I g G₃、I g G₄、I g G_{4 b}、I g G_{4 c}、I g G_{4 S 2 2 8 P}、I g G_{4 b S 2 2 8 P}、および I g G_{4 c S 2 2 8 P} サブクラスのものである。一部の実施形態では、抗体は、I g G₄ アイソタイプのものであり、安定化されたヒンジ、例えば、S 2 2 8 Pを含む。

【 0 0 1 2 】

別の態様では、本発明は、P D - 1 に特異的に結合し、かつ本明細書に記載の抗体と同じ P D - 1 エピトープと競合し、かつ / またはそれに結合する単離抗体を提供する。

10

【 0 0 1 3 】

一部の実施形態では、本明細書に提供する抗 P D - 1 抗体は、T 細胞からの I F N および / または T N F 分泌を促進する。

【 0 0 1 4 】

一部の実施形態では、本明細書に提供する抗 P D - 1 抗体は、T 細胞の増殖を促進する。

【 0 0 1 5 】

一部の実施形態では、本明細書に提供する抗 P D - 1 抗体は、腫瘍増殖を阻害する。

【 0 0 1 6 】

一部の実施形態では、本明細書に提供する抗 P D - 1 抗体は、ヒト P D - 1 およびマウス P D - 1 に結合する。

20

【 0 0 1 7 】

別の態様では、本発明は、治療有効量の本明細書に記載の P D - 1 抗体および薬学的に許容できる担体を含む医薬組成物を提供する。

【 0 0 1 8 】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載の P D - 1 抗体をコードするヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチドを提供する。別の態様では、本発明は、ポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。

【 0 0 1 9 】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載の P D - 1 抗体を組換え産生する単離宿主細胞を提供する。

30

【 0 0 2 0 】

別の態様では、本発明は、抗 P D - 1 アンタゴニスト抗体を産生させる方法であって、抗体が産生される条件下で本明細書に記載の抗体を組換え産生する細胞株を培養するステップと、抗体を回収するステップとを含む、方法を提供する。

【 0 0 2 1 】

別の態様では、本発明は、抗 P D - 1 アンタゴニスト抗体を産生させる方法であって、抗体が産生される条件下で、配列番号 2 9 または 3 8 に示したアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号 3 9 に示したアミノ酸配列を含む軽鎖を含む抗体をコードする核酸を含む細胞株を培養するステップと、抗体を回収するステップとを含む、方法を提供する。

40

【 0 0 2 2 】

一部の実施形態では、重鎖および軽鎖は、別個のベクター上でコードされる。他の実施形態では、重鎖および軽鎖は、同じベクター上でコードされる。

【 0 0 2 3 】

別の態様では、本発明は、対象における状態を治療するための方法であって、それを必要とする対象に有効量の本明細書に記載の医薬組成物を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、状態は、がんである。一部の実施形態では、がんは、胃癌 (g a s t r i c c a n c e r)、肉腫、リンパ腫、白血病、頭頸部がん、胸腺がん、上皮がん、唾液腺がん、肝がん、胃がん (s t o m a c h c a n c e r)、甲状腺がん、肺がん、卵巣がん、乳がん、前立腺がん、食道がん、膵がん、神経膠腫、白血病、

50

多発性骨髄腫、腎細胞癌、膀胱がん、子宮頸がん、絨毛癌、大腸がん、口腔がん、皮膚がん、および黒色腫からなる群から選択される。一部の実施形態では、対象は、局所進行性もしくは転移性黒色腫、扁平細胞頭頸部がん（S C H N C）、卵巣癌、肉腫、または再発もしくは難治性古典的ホジキンリンパ腫（c H L）を有する以前に治療された成人患者である。一部の実施形態では、がんは、白金耐性および／または白金難治性がん、例えば、白金耐性および／もしくは難治性卵巣がん、白金耐性および／もしくは／難治性乳がん、または白金耐性および／もしくは難治性肺がんなどであり得る。一部の実施形態では、抗 P D - 1 抗体は、約 0 . 5 m g / k g、約 1 . 0 m g / k g、約 3 . 0 m g / k g、または約 1 0 m g / k g の投与量で投与される。一部の実施形態では、抗 P D - 1 抗体は、7、14、21、または28日毎に1回投与される。一部の実施形態では、抗 P D - 1 抗体は、静脈内または皮下に投与される。

10

【0024】

別の態様では、本発明は、腫瘍を有する対象における腫瘍増殖または進行を阻害する方法であって、対象に有効量の本明細書に記載の医薬組成物を投与するステップを含む、方法を提供する。

【0025】

別の態様では、本発明は、対象におけるがん細胞の転移を阻害または防止する方法であって、それを必要とする対象に有効量の本明細書に記載の医薬組成物を投与するステップを含む、方法を提供する。

【0026】

20

別の態様では、本発明は、P D - 1 発現腫瘍を有する対象における腫瘍退縮を誘導する方法であって、対象に有効量の本明細書に記載の医薬組成物を投与するステップを含む、方法を提供する。

【0027】

一部の実施形態では、本明細書の抗体は、対象において非経口的に投与することができる。一部の実施形態では、対象は、ヒトである。

【0028】

一部の実施形態では、方法は、有効量の第2の治療剤を投与するステップをさらに含む。一部の実施形態では、第2の治療剤は、例えば、クリゾチニブ、バルボシクリブ、抗 C T L A 4 抗体、抗 4 - 1 B B 抗体、または第2の P D - 1 抗体である。

30

【0029】

それを必要とする対象におけるがんを治療し、または腫瘍増殖もしくは進行を阻害するための医薬の製造における本明細書に提供する抗 P D - 1 アンタゴニスト抗体のいずれかの使用も提供される。一部の実施形態では、抗 P D - 1 アンタゴニスト抗体は、対象における体重増加を低減する。

【0030】

それを必要とする対象におけるがんの治療における、または腫瘍増殖もしくは進行を阻害するための使用のための抗 P D - 1 アンタゴニスト抗体も提供される。一部の実施形態では、がんは、例えば、限定することなく、胃がん（g a s t r i c c a n c e r）、肉腫、リンパ腫、ホジキンリンパ腫、白血病、頭頸部がん、胸腺がん、上皮がん、唾液腺がん、肝がん、胃がん（s t o m a c h c a n c e r）、甲状腺がん、肺がん（例えば、非小細胞肺癌を含む）、卵巣がん、乳がん、前立腺がん、食道がん、膵がん、神経膠腫、白血病、多発性骨髄腫、腎細胞癌、膀胱がん、子宮頸がん、絨毛癌、大腸がん、口腔がん、皮膚がん、および黒色腫である。

40

【0031】

別の態様では、本開示は、哺乳動物、特にヒトにおけるがんを治療するためのワクチンの免疫原性または治療効果を増強するための方法であって、ワクチンを受けている哺乳動物に、有効量の本開示によって提供される抗 P D - 1 アンタゴニスト抗体を投与するステップを含む、方法を提供する。

【0032】

50

別の態様では、本開示は、哺乳動物、特にヒトにおけるがんを治療するための方法であって、哺乳動物に、(1)がんの細胞に対する免疫応答を誘発することができる有効量のワクチン、および(2)有効量の本開示によって提供される抗PD-1アンタゴニスト抗体を投与するステップを含む、方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1A】抗PD-1アンタゴニスト抗体で処置されたマウスの体重を要約するグラフを表す図である。

【図1B】抗PD-1アンタゴニスト抗体で処置されたマウスの体重を要約するグラフを表す図である。

【図1C】抗PD-1アンタゴニスト抗体で処置されたマウスの体重を要約するグラフを表す図である。

【図1D】抗PD-1アンタゴニスト抗体で処置されたマウスの体重を要約するグラフを表す図である。

【図1E】抗PD-1アンタゴニスト抗体で処置されたマウスの体重を要約するグラフを表す図である。

【図2A】初代ヒト活性化T細胞に結合する抗PD-1抗体のE50を要約するグラフを表す図である。

【図2B】初代カニクイザル(cyno)活性化T細胞に結合する抗PD-1抗体のE50を要約するグラフを表す図である。

【図3】以下、すなわち、(a)抗体なし；(b)アイソタイプ対照；(c)EH12.1；(d)C1；(e)C2；(f)C3；(g)mAb1；(h)mAbX；(i)mAb4；(j)mAb5；(k)mAb6；(l)mAb7；(m)mAb9；(n)mAb10；(o)mAb11；(p)mAb14；(q)mAb15；(r)mAb16の通り処置された培養された活性化CD4⁺T細胞の増殖を要約する棒グラフを表す図である。

【図4】以下、すなわち、(a)抗体なし；(b)アイソタイプ対照；(c)EH12.1；(d)C1；(e)C2；(f)C3；(g)mAb1；(h)mAbX；(i)mAb4；(j)mAb5；(k)mAb6；(l)mAb7；(m)mAb9；(n)mAb10；(o)mAb11；(p)mAb14；(q)mAb15；(r)mAb16の通り処置された培養された活性化CD8⁺T細胞の増殖を要約する棒グラフを表す図である。

【発明を実施するための形態】

【0034】

PD-1に特異的に結合する抗体が本明細書に開示される。抗PD-1抗体を作製する方法、これらの抗体を含む組成物、および医薬としてこれらの抗体を使用する方法が提供される。抗PD-1抗体は、腫瘍進行を阻害するのに使用することができ、がんおよび/または他の疾患の予防および/または治療において使用することができる。

【0035】

一般的な技法

本発明の実施では、別段の指定のない限り、分子生物学(組換え技法を含む)、微生物学、細胞生物学、生化学、および免疫学の慣例的な技法を使用し、これらは、当技術分野の技術内である。このような技法は、文献、例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、2版(Sambrookら、1989) Cold Spring Harbor Press; Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait 編、1984); Methods in Molecular Biology、Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J. E. Cellis 編、1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R. I. Freshney 編、1987); Introduction to Cell and

10

20

30

40

50

Tissue Culture (J. P. Mather および P. E. Roberts、1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle、J. B. Griffiths、および D. G. Newell 編、1993~1998) J. Wiley and Sons; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir および C. C. Blackwell 編); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller および M. P. Calos 編、1987); Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel ら編、1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction、(Mullis ら編、1994); Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan ら編、1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley および Sons、1999); Immunobiology (C. A. Janeway および P. Travers、1997); Antibodies (P. Finch、1997); Antibodies: a practical approach (D. Catty 編、IRL Press、1988~1989); Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd および C. Dean 編、Oxford University Press、2000); Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow および D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press、1999); The Antibodies (M. Zanetti および J. D. Capra 編、Harwood Academic Publishers、1995) など
10
20
で完全に説明されている。

【0036】

定義

以下の用語は、別段に示されていない限り、以下の意味を有すると理解されるものとする。その起源または派生の源によって、(1) その天然の状態でそれに付随する天然に付随するコンポーネントと付随していない、(2) 同じ源、例えば、種、それが発現される細胞、ライブラリーなどに由来する他の分子を実質的に含まない、(3) 異なる種に由来する細胞によって発現される、または(4) 自然において存在しない分子(分子が、例えば、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、または抗体である場合)を指すものとしての用語「単離分子」。したがって、化学合成される、またはそれが天然に端を発する系と異なる細胞系内で発現される分子は、その天然に付随するコンポーネントから「単離されている」ことになる。分子は、当技術分野で周知の精製技法を使用して、単離によって天然に付随するコンポーネントを実質的に含まないようにすることもできる。分子の純度または均質性は、当技術分野で周知のいくつかの手段によってアッセイすることができる。例えば、ポリペプチド試料の純度は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、および当技術分野で周知の技法を使用するポリペプチドを可視化するためのゲルの染色を使用してアッセイすることができる。ある特定の目的に関して、より高い分解能を、HPLC、または精製のための当技術分野で周知の他の手段によってもたすことができる。
30
40

【0037】

「抗体」は、免疫グロブリン分子であって、免疫グロブリン分子の可変領域内に位置した少なくとも1つの抗原認識部位によって標的、例えば、炭水化物、ポリヌクレオチド、脂質、ポリペプチドなどに特異的に結合することができる、免疫グロブリン分子である。本明細書では、この用語は、インタクトなポリクローナルまたはモノクローナル抗体だけでなく、別段の指定のない限り、特異的結合についてインタクト抗体と競合するその任意の抗原結合部分、抗原結合部分を含む融合タンパク質、および抗原認識部位を含む免疫グロブリン分子の任意の他の修飾された構成も包含する。抗原結合部分としては、例えば、
50

Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、ドメイン抗体(dAb、例えば、サメおよびラクダ抗体)、相補性決定領域(CDR)、単鎖可変断片抗体(scFv)、マキシボディ、ミニボディ、イントラボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、v-NAR、およびビス-scFvを含めた断片、ならびにポリペプチドへの特異的抗原結合を付与するのに十分である免疫グロブリンの少なくとも一部を含有するポリペプチドがある。抗体としては、任意のクラスの抗体、例えば、IgG、IgA、もしくはIgM(またはそのサブクラス)などがあり、抗体は、任意の特定のクラスのものである必要はない。その重鎖の定常領域の抗体アミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンは、異なるクラスに割り当てられ得る。免疫グロブリンの5つの主要クラス、すなわち、IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMがあり、これらのうちのいくつかは、サブクラス(アイソタイプ)、例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、およびIgA₂にさらに分類することができる。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常領域は、それぞれ、 γ 、 δ 、 ϵ 、および μ と呼ばれる。免疫グロブリンの異なるクラスのサブユニット構造および3次元構成は、周知である。

【0038】

抗体の「可変領域」は、単独で、または組合せて抗体軽鎖の可変領域または抗体重鎖の可変領域を指す。当技術分野で公知であるように、重鎖および軽鎖の可変領域は、それぞれ、3つの超可変領域としても公知の相補性決定領域(CDR)によって接続された4つのフレームワーク領域(FR)からなり、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する。特に、CDR領域の外側(すなわち、フレームワーク領域内)のアミノ酸残基において置換を有する、対象可変領域のパリアントが望まれる場合、適切なアミノ酸置換、好ましくは保存的アミノ酸置換は、対象可変領域を対象可変領域と同じカノニカルクラスにおいてCDR1およびCDR2配列を含有する他の抗体の可変領域と比較することによって同定することができる(ChothiaおよびLesk、J Mol Biol 196(4):901~917、1987)。

【0039】

ある特定の実施形態では、CDR、および抗体の結合部位を含む残基の同定の最終的な描写は、抗体の構造を解明し、かつ/または抗体-リガンド複合体の構造を解明することによって達成される。ある特定の実施形態では、それは、X線結晶構造解析法などの当業者に公知の様々な技法のいずれかによって達成され得る。ある特定の実施形態では、分析の様々な方法を、CDR領域を同定または近似するのに使用することができる。

【0040】

Kabat定義は、抗体における残基を番号付けるための標準であり、典型的にはCDR領域を同定するのに使用される。例えば、Johnson&Wu、2000、Nucleic Acids Res.、28:214~8を参照。Chothia定義は、Kabat定義と同様であるが、Chothia定義は、ある特定の構造ループ領域の位置を考慮に入れる。例えば、Chothiaら、1986、J.Mol.Biol.、196:901~17; Chothiaら、1989、Nature、342:877~83を参照。AbM定義は、抗体構造をモデル化するOxford Molecular Groupによって作製された統合された一式のコンピュータプログラムを使用する。例えば、Martinら、1989、Proc Natl Acad Sci(USA)、86:9268~9272; 「AbM(商標)、A Computer Program for Modeling Variable Regions of Antibodies」、Oxford、UK; Oxford Molecular, Ltd.を参照。AbM定義は、PROTEINS, Structure, Function and Genetics Suppl.、3:194~198におけるSamudralaら、1999、「Ab Initio Protein Structure Prediction Using a Combined Hierarchical Approach」によって記載されたものなどの知識データベースおよびアブイニシオ法の組合せを使用して一次配列から抗体の三次構造をモデル化する。接触定義は、利用可能な複雑な結

10

20

30

40

50

晶構造の分析に基づく。例えば、MacCallumら、1996、J. Mol. Biol.、5:732~45を参照。CDRの「コンホメーション定義」と本明細書で呼ばれる別の手法では、CDRの位置は、抗原結合にエンタルピー的寄与をする残基として同定することができる。例えば、Makabeら、2008、Journal of Biological Chemistry、283:1156~1166を参照。さらに他のCDR境界定義は、上記手法の1つに厳密には従わないが、それにもかかわらず、これらは、特定の残基または残基の群が抗原結合に有意にインパクトを与えないという予測または実験的知見を踏まえると短くまたは長くされ得るが、Kabatt CDRの少なくとも一部と重なることになる。本明細書において、CDRは、手法の組合せを含めて、当技術分野で公知の任意の手法によって定義されるCDRを指すことができる。本明細書で使用される方法は、これらの手法のいずれかに従って定義されるCDRを利用することができる。1つを超えるCDRを含有する任意の所与の実施形態について、CDRは、Kabatt、Chothia、拡張、AbM、接触、および/またはコンホメーション定義のいずれかに従って定義され得る。

10

【0041】

当技術分野で公知であるように、抗体の「定常領域」は、単独で、または組合せで、抗体軽鎖の定常領域または抗体重鎖の定常領域を指す。

【0042】

本明細書において、「モノクローナル抗体」は、実質的に均質な抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、集団を構成する個々の抗体は、軽微な量で存在し得る可能な天然に存在する突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一抗原部位に向けられている。さらに、異なる決定基（エпитープ）に向けられた異なる抗体を一般に含むポリクローナル抗体配合物と対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一決定基に向けられている。修飾語「モノクローナル」は、抗体の実質的に均質な集団から得られる抗体の特徴を示し、任意の特定の方法による抗体の生成を必要とすると解釈されるべきでない。例えば、本発明によって使用されるモノクローナル抗体は、KohlerおよびMilstein、1975、Nature、256:495によって最初に記載されたハイブリドーマ法によって作製することができ、または米国特許第4,816,567号に記載されたものなどの組換えDNA法によって作製することができる。モノクローナル抗体は、例えば、McCaffertyら、1990、Nature、348:552~554に記載の技法を使用して生成されるファージライブラリーから単離することもできる。本明細書において、「ヒト化」抗体は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含有する、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖、またはこれらの断片（Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂、もしくは抗体の他の抗原結合部分配列など）である、非ヒト（例えば、マウス）抗体の形態を指す。好ましくは、ヒト化抗体は、CDRに由来する残基が、所望の特異性、親和性、および能力を有する、非ヒト種（ドナー抗体）、例えば、マウス、ラット、またはウサギなどのCDRに由来する残基と置き換えられているヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入されるCDRもしくはフレームワーク配列にも見つからないが、抗体性能をさらに洗練および最適化するために含められる残基を含むことができる。

20

30

40

【0043】

「ヒト抗体」は、ヒトによって産生される抗体のアミノ酸配列に対応し、かつ/または本明細書に開示のヒト抗体を作製するための技法のいずれかを使用して作製されたアミノ酸配列を有するものである。ヒト抗体のこの定義は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を具体的に除外する。

【0044】

用語「キメラ抗体」は、可変領域配列が1つの種に由来し、定常領域配列が別の種に由来する抗体、例えば、可変領域配列がマウス抗体に由来し、定常領域配列がヒト抗体に由来する抗体などを指す。

【0045】

50

用語「エピトープ」は、抗体の抗原結合領域の1つまたは複数において抗体によって認識および結合され得る分子の部分の部分を指す。エピトープは、アミノ酸または糖側鎖などの分子の表面基群 (s u r f a c e g r o u p i n g) からなることが多く、特定の3次元構造特性および特定の帯電特性を有する。一部の実施形態では、エピトープは、タンパク質エピトープであり得る。タンパク質エピトープは、線状または立体構造的であり得る。線状エピトープでは、タンパク質と相互作用分子 (抗体など) との間の相互作用のポイントのすべては、タンパク質の一次アミノ酸配列に沿って直線的に存在する。「非線状エピトープ」または「立体構造エピトープ」は、エピトープに特異的な抗体が結合する抗原タンパク質内に非連続ポリペプチド (またはアミノ酸) を含む。用語「抗原エピトープ」は、本明細書において、当技術分野で周知の任意の方法によって、例えば、慣例的なイムノアッセイによって判定される場合、抗体が特異的に結合することができる抗原の部分として定義される。抗原上の所望のエピトープが決定された後、例えば、本明細書に記載の技法を使用してそのエピトープに対する抗体を生成することが可能である。代わりに、発見プロセス中に、抗体の生成および特徴付けにより、望ましいエピトープについての情報を解明することができる。この情報から、次いで同じエピトープへの結合について、抗体を競合的にスクリーニングすることが可能である。これを実現するための手法は、競合および交差競合試験を行って、PD-1への結合を互いに競合または交差競合する抗体、例えば、抗原への結合を競合する抗体を見つけることである。

10

【0046】

本明細書において、用語「PD-1」は、任意の形態のPD-1、およびPD-1の活性の少なくとも一部を保持するそのバリエーションを指す。ヒトPD-1への具体的な言及などによって異なって示されていない限り、PD-1は、すべての哺乳動物種の天然配列PD-1、例えば、ヒト、イヌ、ネコ、ウマ、およびウシを含む。1つの例示的なヒトPD-1は、UniProt受託番号Q15116 (配列番号1) として見出される。

20

【0047】

用語「アゴニスト」は、別の分子の生物活性または効果を促進する (すなわち、誘導し、引き起こし、増強し、または増大させる) 物質を指す。用語アゴニストは、抗体などの受容体に結合する物質、および受容体に結合することなく (例えば、付随タンパク質を活性化することによって) 受容体機能を促進する物質を包含する。

【0048】

用語「アンタゴニスト」または「阻害剤」は、受容体などの別の分子の生物活性または効果を防止、遮断、阻害、中和、または低減する物質を指す。

30

【0049】

用語「アンタゴニスト抗体」は、標的に結合し、その標的の生物学的効果を防止または低減する抗体を指す。一部の実施形態では、この用語は、抗体であって、それが結合している標的、例えば、PD-1が生物学的機能を実施するのを防止する抗体を表すことができる。

【0050】

本明細書では、「抗PD-1アンタゴニスト抗体」は、PD-1生物活性および/またはPD-1によって媒介される下流事象 (複数可) を阻害することができる抗体を指す。抗PD-1アンタゴニスト抗体は、PD-1によって媒介される下流事象、例えば、PD-L1結合と下流シグナル伝達、PD-L2結合と下流シグナル伝達、T細胞増殖の阻害、T細胞活性化の阻害、IFN分泌の阻害、IL-2分泌の阻害、TNF分泌の阻害、IL-10の誘導、および抗腫瘍免疫応答の阻害などを含めたPD-1生物活性を遮断、アンタゴナイズ、抑制、または低減する (有意にを含む任意の程度に) 抗体を包含する。本発明の目的に関して、用語「抗PD-1アンタゴニスト抗体」 (「アンタゴニストPD-1抗体」、「アンタゴニスト抗PD-1抗体」、または「PD-1アンタゴニスト抗体」と互換的に呼ばれる) は、すべての以前に識別した用語、表題、および機能状態、ならびにPD-1自体、PD-1生物活性、または生物活性の帰趨が、任意の意味のある程度において実質的に無効にされ、減少され、または中和される特性を包含することが明示的に理

40

50

解されることになる。一部の実施形態では、抗PD-1アンタゴニスト抗体は、PD-1に結合し、抗腫瘍免疫応答を上方制御する。抗PD-1アンタゴニスト抗体の例は、本明細書に提供される。

【0051】

用語「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」は、任意の長さのアミノ酸の鎖を指すのに本明細書で互換的に使用される。鎖は、直鎖状であっても分枝状であってもよく、修飾アミノ酸を含むことができ、かつ/または非アミノ酸によって中断されていてよい。この用語は、天然に、または介入、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、または標識コンポーネントとのコンジュゲーションなどの任意の他の操作もしくは修飾によって修飾されたアミノ酸鎖も包含する。例えば、アミノ酸の1つまたは複数の類似体（例えば、非天然アミノ酸などを含む）、および当技術分野で公知の他の修飾を含有するポリペプチドもこの定義の中に含まれる。ポリペプチドは、単鎖または会合鎖として存在し得ることが理解される。

【0052】

当技術分野で公知であるように、本明細書で互換的に使用する「ポリヌクレオチド」または「核酸」は、任意の長さのヌクレオチドの鎖を指し、DNAおよびRNAを含む。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾ヌクレオチドもしくは塩基、および/またはこれらの類似体、あるいはDNAまたはRNAポリメラーゼによって鎖中に組み込まれ得る任意の基質であり得る。ポリヌクレオチドは、修飾ヌクレオチド、例えば、メチル化ヌクレオチド、およびこれらの類似体などを含むことができる。存在する場合、ヌクレオチド構造への修飾は、鎖をアセンブリーする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、非ヌクレオチドコンポーネントによって中断される場合がある。ポリヌクレオチドは、標識コンポーネントとのコンジュゲーションなどによって、重合後にさらに修飾することができる。他のタイプの修飾としては、例えば、「キャップ」、天然に存在するヌクレオチドのうちの1つまたは複数の類似体との置換、ヌクレオチド間修飾、例えば、非荷電連結（例えば、ホスホン酸メチル、ホスホトリエステル、ホスホロアミデート、カルバメートなど）を有するもの、および荷電した連結（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を有するもの、ペンダント部分、例えば、タンパク質（例えば、ヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、ポリ- L- リシンなど）などを含有するもの、インターカレーター（例えば、アクリジン、ソラレンなど）を有するもの、キレーター（例えば、金属、放射性金属、ホウ素、酸化金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾連結を有するもの（例えば、アノマー核酸など）など、ならびにポリヌクレオチド（複数可）の無修飾形態がある。さらに、糖内に通常存在するヒドロキシル基のいずれも、例えば、ホスホネート基、リン酸基によって置き換え、標準的な保護基によって保護し、または活性化して追加のヌクレオチドへの追加の連結を準備することができ、または固体支持体にコンジュゲートすることができる。5'および3'末端OHを、リン酸化し、またはアミンもしくは1~20炭素原子の有機キャッピング基部分で置換することができる。他のヒドロキシルも、誘導体化して標準的な保護基にすることができる。ポリヌクレオチドは、例えば、2'-O-メチル-、2'-O-アリル、2'-フルオロ-、または2'-アジド-リボース、炭素環糖類似体、-または-アノマー糖、エピマー糖、例えば、アラビノース、キシロース、またはリキソースなど、ピラノース糖、フラノース糖、セドヘプツロース、非環式類似体、およびメチルリボシドなどの脱塩基ヌクレオシド類似体を含めた、当技術分野で一般に公知であるリボースまたはデオキシリボース糖の類似形態も含有し得る。1つまたは複数のホスホジエステル連結を、代替の連結基によって置き換えることができる。これらの代替の連結基としては、それだけに限らないが、ホスフェートが、P(O)S（「チオエート」）、P(S)S（「ジチオエート」）、(O)NR₂（「アミデート」）、P(O)R、P(O)OR'、CO、またはCH₂（「ホルムアセタール」）（式中、各RまたはR'は、独立して、H、またはエーテル（-O-）連結、アリアル、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、もしくはアラリジル（araldyl）を含有してもよい置

10

20

30

40

50

換もしくは非置換のアルキルである(1~20C))によって置き換えられている実施形態がある。ポリヌクレオチド中のすべての連結が同一である必要はない。前述の説明は、RNAおよびDNAを含めた、本明細書で参照されるすべてのポリヌクレオチドに当てはまる。

【0053】

本明細書において、抗体は、平衡解離定数が、実施例7における本明細書に開示の方法によって測定した場合、20nMに等しい、またはそれ未満、好ましくは約6nM未満、より好ましくは約1nM未満、最も好ましくは約0.2nM未満であるとき、PD-1「と相互作用する」。

【0054】

エピトープに「優先的に結合する」または「特異的に結合する」(本明細書で互換的に使用される)抗体は、当技術分野でよく理解されている用語であり、このような特異的または優先的結合を判定する方法も当技術分野で周知である。分子は、それが特定の細胞または物質と、それが代替の細胞または物質と反応または会合するより、頻繁に、急速に、長い継続時間で、かつ/または大きい親和性で反応または会合する場合、「特異的結合」または「優先的結合」を呈すると言われる。抗体は、それが他の物質に結合するより、大きい親和性、結合活性で、容易に、かつ/または長い継続時間で結合する場合、標的に「特異的に結合し」、または「優先的に結合する」。例えば、PD-1エピトープに特異的または優先的に結合する抗体は、抗体であって、それが他のPD-1エピトープまたは非PD-1エピトープに結合するより、大きい親和性、結合活性で、容易にかつ/または長い継続時間でこのエピトープに結合する、抗体である。例えば、第1の標的に特異的または優先的に結合する抗体(または部分もしくはエピトープ)は、第2の標的に特異的または優先的に結合することができ、または結合しない場合があることも、この定義を読むことによって理解される。したがって、「特異的結合」または「優先的結合」は、排他的結合を必ずしも要求しない(しかし、これは排他的結合を含み得る)。一般に、しかし必ずしもではないが、結合への言及は、優先的結合を意味する。

【0055】

本明細書において、「実質的に純粋」は、少なくとも50%純粋(すなわち、混入物を含まない)、より好ましくは、少なくとも90%純粋、より好ましくは、少なくとも95%純粋、なおより好ましくは、少なくとも98%純粋、最も好ましくは、少なくとも99%純粋である材料を指す。

【0056】

「宿主細胞」には、ポリヌクレオチドインサートの組込みのためのベクター(複数可)のレシピエントであり得る、またはそれであった個々の細胞または細胞培養物が含まれる。宿主細胞には、単一宿主細胞の子孫が含まれ、子孫は、天然の、偶発的な、または意図的な突然変異に起因して、必ずしも元の親細胞と完全に同一(形態において、またはゲノムDNA補体において)でない場合がある。宿主細胞には、本発明のポリヌクレオチド(複数可)をin vivoでトランスフェクトされた細胞が含まれる。

【0057】

当技術分野で公知であるように、用語「Fc領域」は、免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するのに使用される。「Fc領域」は、天然配列Fc領域であっても、バリエーションFc領域であってもよい。免疫グロブリン重鎖のFc領域の境界は、様々であり得るが、ヒトIgG重鎖Fc領域は、通常、Cys226位のアミノ酸残基から、またはPro230からそのカルボキシル末端まで伸びるように定義される。Fc領域中の残基の番号付けは、KabatのEUインデックスのものである。Kabatら、Sequence of Proteins of Immunological Interest、5版、Public Health Service、National Institutes of Health、Bethesda、Md.、1991。免疫グロブリンのFc領域は、一般に、2つの定常ドメイン、CH2およびCH3を含む。当技術分野で公知であるように、Fc領域は、二量体または単量体形態で存在し得る。

【0058】

当技術分野で使用される場合、「Fc受容体」および「FcR」は、抗体のFc領域に結合する受容体を記述する。好適なFcRは、天然配列ヒトFcRである。さらに、好適なFcRは、IgG抗体（ガンマ受容体）に結合するものであり、好適なFcRとして、FcRI、FcRII、およびFcRIIIサブクラスの受容体が挙げられ、これらの受容体の対立遺伝子バリエーションおよび選択的にスプライスされた形態を含む。FcRII受容体としては、FcRIIA（「活性化受容体」）およびFcRIIB（「阻害受容体」）があり、これらは、その細胞質ドメインにおいて主に異なる同様のアミノ酸配列を有する。FcRは、RavetchおよびKinet、1991、Ann.Rev.Immunol.、9：457～92；Capelら、1994、Immunometh-ods、4：25～34；ならびにde Haasら、1995、J.Lab.Clin.Med.、126：330～41に総説されている。「FcR」には、新生仔受容体、FcRnも含まれ、これは、母体IgGの胎児への移動を担う（Guyerら、1976、J.Immunol.、117：587；およびKimら、1994、J.Immunol.、24：249）。

10

【0059】

用語「競合する」は、抗体に関して本明細書で使用する場合、第1の抗体またはその抗原結合部分が、第2の抗体またはその抗原結合部分の結合と十分に同様の様式でエピトープに結合し、その結果、第1の抗体のその同族エピトープとの結合の結果が、第2の抗体の非存在下での第1の抗体の結合と比較して、第2の抗体の存在下で検出可能な程度に減少することを意味する。第2の抗体のそのエピトープへの結合も第1の抗体の存在下で検出可能な程度に減少する残された選択も、当てはまり得るが、そうである必要はない。すなわち、第1の抗体は、第2の抗体のそのエピトープへの結合を、その第2の抗体が第1の抗体のそのそれぞれのエピトープへの結合を阻害することなく、阻害することができる。しかし、それぞれの抗体が、他の抗体のその同族エピトープまたはリガンドとの結合を、同じ程度であっても、より大きい程度であっても、またはより小さい程度であっても、検出可能な程度に阻害する場合、抗体は、これらのそれぞれのエピトープ（複数可）の結合を互いに「交差競合する」と言われる。競合および交差競合する抗体はともに、本発明によって包含されている。このような競合または交差競合が起こる機構（例えば、立体障害、コンホメーション変化、または共通エピトープもしくはその部分への結合）にかかわらず、当業者は、本明細書に提供する教示に基づいて、このような競合および/または交差競合する抗体が包含され、本明細書に開示の方法に有用であり得ることを理解するはずである。

20

30

【0060】

「機能性Fc領域」は、天然配列Fc領域の少なくとも1つのエフェクター機能を有する。例示的な「エフェクター機能」としては、C1q結合；補体依存性細胞傷害；Fc受容体結合；抗体依存性細胞媒介性細胞傷害；食作用；細胞表面受容体（例えば、B細胞受容体）の下方制御などがある。このようなエフェクター機能は一般に、Fc領域が結合ドメイン（例えば、抗体可変ドメイン）と結合されることを必要とし、このような抗体エフェクター機能を評価するための当技術分野で公知の様々なアッセイを使用して評価することができる。

40

【0061】

「天然配列Fc領域」は、自然において見つかるFc領域のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を含む。「バリエーションFc領域」は、少なくとも1つのアミノ酸修飾によって天然配列Fc領域のものと異なるが、それでも天然配列Fc領域の少なくとも1つのエフェクター機能を保持するアミノ酸配列を含む。好ましくは、バリエーションFc領域は、天然配列Fc領域または親ポリペプチドのFc領域と比較して少なくとも1個のアミノ酸置換、例えば、天然配列Fc領域または親ポリペプチドのFc領域内に約1～約10個のアミノ酸置換、好ましくは約1～約5個のアミノ酸置換を有する。本明細書のバリエーションFc領域は、好ましくは、天然配列Fc領域および/または親ポリペプチドのFc領域と少なく

50

とも約 80 % の配列同一性、最も好ましくは、これらと少なくとも約 90 % の配列同一性、より好ましくは、これらと少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、少なくとも約 99 % の配列同一性を有することになる。

【0062】

本明細書において、「治療」は、有益なまたは所望の臨床結果を得るための手法である。本発明の目的に関して、有益なまたは所望の臨床結果としては、それだけに限らないが、以下のうちの 1 つまたは複数がある：新生物もしくはがん性細胞の増殖の低減（またはその破壊）、新生物細胞の転移の阻害、腫瘍のサイズの縮小もしくは減少、がんの寛解、がんから生じる症状の減少、がん罹患している者の生活の質の増大、がんを治療するのに要求される他の薬物療法の用量の減少、がんの進行の遅延、がんの治癒、および / またはがんを有する患者の生存期間の延長。

10

【0063】

「緩和」は、抗 PD - 1 アンタゴニスト抗体を投与しないことと比較して、1 つまたは複数の症状の軽減または改善を意味する。「緩和」は、症状の継続時間の短縮または低減も含む。

【0064】

本明細書において、薬剤、化合物、または医薬組成物の「有効投与量」または「有効量」は、任意の 1 つまたは複数の有益なまたは所望の結果をもたらすのに十分な量である。より具体的な態様では、有効量は、疾患の症状を予防し、和らげ、もしくは緩和し、かつ / または治療されている対象の生存期間を延長する。予防的使用に関して、有益なまたは所望の結果としては、疾患、疾患の発達中に呈する、その合併症、および中間の病理学的表現型の生化学的、組織学的、および / または行動的的症状を含めた、疾患のリスクの排除もしくは低減、重症度の軽減、または発症の遅延がある。治療的使用に関して、有益なまたは所望の結果としては、例えば、限定することなく、胃癌 (gastric cancer)、肉腫、リンパ腫、ホジキンリンパ腫、白血病、頭頸部がん、扁平細胞頭頸部がん、胸腺がん、上皮がん、唾液腺がん、肝がん、胃がん (stomach cancer)、甲状腺がん、肺がん、卵巣がん、乳がん、前立腺がん、食道がん、膵がん、神経膠腫、白血病、多発性骨髄腫、腎細胞癌、膀胱がん、子宮頸がん、絨毛癌、大腸がん、口腔がん、皮膚がん、および黒色腫を含めたがんなどの疾患の 1 つもしくは複数の症状の低減、疾患を治療するのに要求される他の薬物療法の用量の減少、別の薬物療法の効果の増強、ならびに / または患者におけるがんの進行の遅延などの臨床結果がある。有効投与量は、1 回または複数の投与で投与することができる。本発明の目的に関して、薬剤、化合物、または医薬組成物の有効投与量は、直接的にまたは間接的に予防的または治療的処置を達成するのに十分な量である。臨床状況において理解されているように、薬剤、化合物、または医薬組成物の有効投与量は、別の薬剤、化合物、または医薬組成物と併せて実現することができ、または実現されなくてもよい。したがって、「有効投与量」は、1 種または複数の治療剤の投与という状況で考慮することができ、単剤は、1 種または複数の他の作用物質と併せて、望ましい結果が実現され得る、または実現されている場合、有効量で与えられていると見なすことができる。

20

30

【0065】

「個体」または「対象」は、哺乳動物、より好ましくはヒトである。哺乳動物には、それだけに限らないが、家畜（例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ニワトリなど）、競技動物、ペット、霊長類、ウマ、イヌ、ネコ、マウス、およびラットも含まれる。

40

【0066】

本明細書において、「ベクター」は、宿主細胞内の対象とする 1 種または複数の遺伝子（複数可）または配列（複数可）を送達し、好ましくは発現させることができるコンストラクトを意味する。ベクターの例としては、それだけに限らないが、ウイルスベクター、裸の DNA または RNA 発現ベクター、プラスミド、コスミドまたはファージベクター、カチオン性縮合剤に付随した DNA または RNA 発現ベクター、リボソーム中に被包された DNA または RNA 発現ベクター、および産生細胞などのある特定の真核細胞がある。

50

【0067】

本明細書において、「発現制御配列」は、核酸の転写を指示する核酸配列を意味する。発現制御配列は、構成的もしくは誘導プロモーターなどのプロモーター、またはエンハンサーであり得る。発現制御配列は、転写される核酸配列に作動可能に連結されている。

【0068】

本明細書において、「薬学的に許容できる担体」または「薬学的に許容できる賦形剤」として、活性成分と合わせたとき、成分に生物活性を保持させ、対象の免疫系と非反応性である任意の材料が挙げられる。例としては、それだけに限らないが、標準的な薬学的担体、例えば、リン酸緩衝溶液、水、油／水エマルジョンなどのエマルジョン、および様々なタイプの湿潤剤などのいずれかがある。エアロゾルまたは非経口投与用の好適な希釈剤は、リン酸緩衝溶液（PBS）または通常の（0.9%）生理食塩水である。このような担体を含む組成物は、周知の従来法によって製剤化される（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences、18版、A. Gennaro編、Mack Publishing Co., Easton, PA、1990；およびRemington, The Science and Practice of Pharmacy、20版、Mack Publishing、2000を参照）。

10

【0069】

用語「 k_{on} 」は、本明細書において、抗原への抗体の会合の速度定数を指す。具体的には、速度定数（ k_{on} および k_{off} ）ならびに平衡解離定数は、全長抗体および／またはFab抗体断片（すなわち、一価）、ならびにPD-1を使用して測定される。

20

【0070】

用語「 k_{off} 」は、本明細書において、抗体／抗原複合体からの抗体の解離の速度定数を指す。

【0071】

用語「 K_D 」は、本明細書において、抗原 - 抗体相互作用の平衡解離定数を指す。

【0072】

本明細書で「約」のついた値またはパラメータへの言及は、その値またはパラメータ自体を対象としている実施形態を含む（かつ記述する）。例えば、「約X」に言及する記述は、「X」の記述を含む。数値範囲は、その範囲を画定する数値を含む。

【0073】

用語「免疫効果細胞エンハンサー」または「IECエンハンサー」は、哺乳動物の免疫エフェクター細胞の1つまたは複数のタイプの数、品質、または機能を増大させ、または増強することができる物質を指す。免疫エフェクター細胞の例としては、細胞溶解性CD8 T細胞、CD4 T細胞、NK細胞、およびB細胞がある。

30

【0074】

用語「免疫モジュレーター」は、免疫応答（本明細書で定義される）、または宿主哺乳動物の自然、体液性、もしくは細胞免疫系の任意のコンポーネントの働きを変更する（例えば、阻害し、減少させ、増大させ、増強し、または刺激する）ことができる物質を指す。したがって、用語「免疫モジュレーター」は、本明細書で定義される「免疫効果細胞エンハンサー」および本明細書で定義される「免疫抑制細胞阻害剤」、ならびに哺乳動物の免疫系の他のコンポーネントに影響する物質を包含する。

40

【0075】

用語「免疫応答」は、宿主哺乳動物の免疫系による特定の物質（抗原または免疫原など）に対する任意の検出可能な応答、例えば、自然免疫応答（例えば、トール受容体シグナル伝達カスケードの活性化）、細胞媒介免疫応答（例えば、抗原特異的T細胞などのT細胞、および免疫系の非特異的細胞によって媒介される応答）、ならびに体液性免疫応答（例えば、B細胞によって媒介される応答、例えば、血漿、リンパ、および／または組織流体中への抗体の生成および分泌など）などを指す。

【0076】

用語「免疫原性」は、アジュバントの存在または非存在下で、単独であっても、担体に

50

連結されているときであっても、特定の抗原に対して、免疫応答を引き起こし、誘発し、刺激し、もしくは誘導し、または既存の免疫応答を改善し、増強し、増大させ、もしくは延長する、物質の能力を指す。

【 0 0 7 7 】

用語「免疫抑制細胞阻害剤」または「ISC阻害剤」は、哺乳動物の免疫抑制細胞の数または機能を低減または抑制することができる物質を指す。免疫抑制細胞の例としては、調節性T細胞（「T reg」）、骨髓由来抑制細胞、および腫瘍関連マクロファージがある。

【 0 0 7 8 】

用語「皮内投与」または「皮内に投与される」は、ヒトを含めた哺乳動物への物質の投与という状況で、哺乳動物の皮膚の真皮層中への物質の送達を指す。哺乳動物の皮膚は、表皮層、真皮層、および皮下層から構成される。表皮は、皮膚の外層である。真皮は、皮膚の中間層であり、神経終末、汗腺および油（皮脂線性）腺、毛嚢、ならびに血管を含有する。皮下層は、脂肪、ならびにより大きい血管および神経を収容する結合組織から構成される。皮内投与においてと対照的に、「皮下投与」は、皮下層内への物質の投与を指し、「局部投与」は、皮膚の表面上への物質の投与を指す。

10

【 0 0 7 9 】

用語「新生物障害」は、細胞が異常に高く制御されない速度、周囲の正常組織のものを超え、それと非協調的な速度で増殖する状態を指す。これは、通常、「腫瘍」として公知の固体病変部または塊をもたらす。この用語は、良性および悪性新生物障害を包含する。用語「悪性新生物障害」は、本開示では用語「がん」と互換的に使用され、腫瘍細胞の体内の他の場所に拡散する能力（「転移」として公知）によって特徴付けられる新生物障害を指す。用語「良性新生物障害」は、腫瘍細胞が転移する能力を欠く新生物障害を指す。

20

【 0 0 8 0 】

用語「予防すること」または「予防する」は、（a）障害が起こることを避けること、または（b）障害の発症もしくは障害の症状の発症を遅延させることを指す。

【 0 0 8 1 】

用語「腫瘍関連抗原」または「TAA」は、腫瘍細胞によって特異的に発現され、または同じ組織型の非腫瘍細胞によってより、腫瘍細胞によって高い頻度または密度で発現される抗原を指す。腫瘍関連抗原は、宿主によって通常発現されない抗原であり得、これらは、宿主によって通常発現される分子の突然変異された、トランケートされた、ミスフォールドされた、もしくは別段に異常な顕在化であり得、これらは、通常発現される分子と同一であり得るが、異常に高いレベルで発現され得、またはこれらは、異常である場面もしくは環境において発現され得る。腫瘍関連抗原は、例えば、タンパク質もしくはタンパク質断片、複合炭水化物、ガングリオシド、ハプテン、核酸、またはこれらもしくは他の生物学的分子の任意の組合せであり得る。

30

【 0 0 8 2 】

用語「ワクチン」は、哺乳動物内の特定の抗原に対する免疫応答を誘発するための哺乳動物への投与のための免疫原性組成物を指す。ワクチンは、典型的には、病原微生物または腫瘍細胞などの免疫応答の標的に類似または由来する作用物質（「抗原」または「免疫原」として公知）を含有する。がんなどの腫瘍の治療のために意図されたワクチンは、典型的には、標的腫瘍上に見つかるTAAに由来する抗原を含有し、標的腫瘍上のTAAに対して免疫原性を誘発することができる。

40

【 0 0 8 3 】

用語「ワクチンベース免疫療法レジメン」は、ワクチンが1種または複数の免疫モジュレーターと組み合わせて投与される治療レジメンを指す。ワクチンおよび免疫モジュレーターは、単一製剤で一緒に投与されても、別個に投与されてもよい。

【 0 0 8 4 】

実施形態が言い回し「含む」を用いて本明細書で記載されている場合は必ず、「からなる」および/または「から本質的になる」の観点から記載される別段の類似の実施形態も

50

提供されることが理解される。

【0085】

本発明の態様または実施形態が選択肢のマーカッシュ群または他の分類の観点から記載される場合、本発明は、全体として列挙された群全体だけでなく、群の各メンバーを個々に、および主群のすべての可能な亜群、また群メンバーの1つまたは複数を欠く主群を包含する。本発明は、請求項に係る発明における群メンバーのいずれかの1つまたは複数を明確に除外することも想定する。

【0086】

別段の定義のない限り、本明細書で使用するすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者が一般に理解するのと同じ意味を有する。矛盾する場合、定義を含めて本明細書が支配する。本明細書および特許請求の範囲全体にわたって、単語「含む (comprises)」または「含む (comprises)」もしくは「含むこと」などの変形は、述べた整数または整数の群を含めることを暗示するが、任意の他の整数または整数の群の除外を暗示しないことが理解されるであろう。脈絡による別段の要求のない限り、単数形の用語は、複数を含むものとし、複数形の用語は、単数形を含むものとする。用語「例えば (e.g.)」または「例えば (for example)」に続く任意の例 (複数可) は、網羅的または限定的であるように意味しない。

【0087】

例示的な方法および材料を本明細書に記載するが、本明細書に記載のものと同様または等価な方法および材料も、本発明の実施または試験において使用することができる。材料、方法、および例は、例示的であるだけであり、限定的であるように意図していない。

【0088】

抗PD-1アンタゴニスト抗体

PD-1によって媒介される下流事象を含めたPD-1生物活性を遮断、抑制、または低減する (有意に低減するを含む) 抗PD-1アンタゴニスト抗体が本明細書に提供される。抗PD-1アンタゴニスト抗体は、以下の特性のうちの任意の1つまたは複数を呈するはずである: (a) PD-1に結合し、下流シグナル伝達事象を遮断し、(b) PD-1へのPD-L1結合を遮断し、(c) T細胞媒介免疫応答を上方制御し、(d) IFN分泌を刺激し、(e) TNF分泌を刺激し、(f) T細胞増殖を増大させ、(g) PD-1による阻害性シグナル伝達を低減する。

【0089】

本発明の目的に関して、抗体は、好ましくは、PD-1シグナル伝達機能を阻害する様式でPD-1と反応する。一部の実施形態では、抗PD-1アンタゴニスト抗体は、霊長類PD-1に特異的に結合する。

【0090】

本発明で有用な抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、抗体断片 (例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、Fcなど)、キメラ抗体、二重特異性抗体、ヘテロコンジュゲート抗体、単鎖 (ScFv)、これらの突然変異体、抗体部分 (例えば、ドメイン抗体) を含む融合タンパク質、ヒト化抗体、ならびに抗体のグリコシル化バリエーション、抗体のアミノ酸配列バリエーション、および共有結合的に修飾された抗体を含めた、要求された特異性の抗原認識部位を含む免疫グロブリン分子の任意の他の修飾された構成を包含することができる。抗体は、マウス、ラット、ヒト、または任意の他の起源 (キメラ抗体もしくはヒト化抗体を含む) であり得る。一部の実施形態では、抗PD-1アンタゴニスト抗体は、モノクローナル抗体である。一部の実施形態では、抗体は、ヒトまたはヒト化抗体である。

【0091】

抗PD-1アンタゴニスト抗体は、当技術分野で公知の任意の方法によって作製することができる。ヒトおよびマウス抗体を生成するための一般的技法は、当技術分野で公知であり、かつ/または本明細書に記載されている。

【0092】

抗PD-1アンタゴニスト抗体は、当技術分野で公知の方法を使用して同定し、または特徴付けることができ、それによってPD-1生物活性の低減、緩和、または中和が検出および/または測定される。一部の実施形態では、抗PD-1アンタゴニスト抗体は、候補剤をPD-1とともにインキュベートし、PD-1の結合および/または生物活性の付随的低減もしくは中和を監視することによって同定される。結合アッセイは、例えば、精製PD-1ポリペプチド（複数可）を用いて、またはPD-1ポリペプチド（複数可）を天然に発現し（例えば、様々な系統）、もしくはこれらを発現するようにトランスフェクトされた細胞を用いて実施することができる。一実施形態では、結合アッセイは、競合的結合アッセイであり、この場合、候補抗体がPD-1結合を公知の抗PD-1アンタゴニスト抗体と競合する能力が評価される。アッセイは、ELISA形式を含めて様々な形式で実施することができる。一部の実施形態では、抗PD-1アンタゴニスト抗体は、候補抗体をPD-1とともにインキュベートし、結合を監視することによって同定される。

10

【0093】

最初に同定した後、候補抗PD-1アンタゴニスト抗体の活性を、標的にされる生物活性を試験することが知られているバイオアッセイによってさらに確認および洗練することができる。一部の実施形態では、*in vitro*細胞アッセイが使用されて候補抗PD-1アンタゴニスト抗体がさらに特徴付けられる。例えば、候補抗体が初代ヒトT細胞とともにインキュベートされ、PD-L1が添加され、IFN 分泌が監視される。代わりに、バイオアッセイを使用して、候補を直接スクリーニングすることができる。

【0094】

20

本発明の抗PD-1アンタゴニスト抗体は、以下の特性の1つまたは複数を呈する：(a) PD-1に結合し、下流シグナル伝達事象を遮断し、(b) PD-1へのPD-L1結合を遮断し、(c) T細胞媒介免疫応答を上方制御し、(d) IFN 分泌を刺激し、(e) TNF分泌を刺激し、(f) T細胞増殖を増大させ、(g) PD-1による阻害性シグナル伝達を低減し、(h) PD-1へのPD-L2結合を遮断する。好ましくは、抗PD-1抗体は、これらの特徴の2つ以上を有する。より好ましくは、抗体は、特徴の3つ以上を有する。より好ましくは、抗体は、特徴の4つ以上を有する。より好ましくは、抗体は、特徴の5つ以上を有する。より好ましくは、抗体は、特徴の6つ以上を有する。より好ましくは、抗体は、特徴の7つ以上を有する。最も好ましくは、抗体は、8つすべての特性を有する。

30

【0095】

抗PD-1アンタゴニスト抗体は、当技術分野で周知の方法を使用して特徴付けることができる。例えば、1つの方法は、それが結合するエピトープを同定すること、または「エピトープマッピング」である。例えば、HarlowおよびLane、Using Antibodies、a Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、New York、1999の11章に記載されている、抗体-抗原複合体の結晶構造の解明、競合アッセイ、遺伝子断片発現アッセイ、および合成ペプチドベースアッセイを含めて、タンパク質上のエピトープの位置をマッピングし、特徴付けるための多くの当技術分野で公知の方法がある。追加の例では、エピトープマッピングを使用して、抗PD-1アンタゴニスト抗体が結合する配列を求めることができる。エピトープマッピングは、様々な源、例えば、Pepscan Systems (Edelherdtweg 15、8219 PH Lelystad、オランダ) から商業的に利用可能である。エピトープは、線状エピトープであり得、すなわち、アミノ酸の単一ストレッチ内に含有され得、または必ずしも単一ストレッチ内に含有されていない場合がある、アミノ酸の3次元相互作用によって形成される立体構造エピトープであり得る。様々な長さ（例えば、少なくとも4~6アミノ酸の長さ）のペプチドを、単離または合成し（例えば、組換えで）、抗PD-1アンタゴニスト抗体を用いた結合アッセイに使用することができる。別の例では、抗PD-1アンタゴニスト抗体が結合するエピトープは、PD-1配列に由来する重複ペプチドを使用し、抗PD-1アンタゴニスト抗体による結合を決定することによ

40

50

って、系統的なスクリーニングで決定することができる。遺伝子断片発現アッセイによれば、PD-1をコードするオープンリーディングフレームがランダムに、または特定の遺伝子構築によって断片化され、PD-1の発現断片の試験される抗体との反応性が決定される。遺伝子断片は、例えば、放射性アミノ酸の存在下で、*in vitro*で、PCRによって生成され、次いで転写され、およびタンパク質に翻訳され得る。次いで放射性標識PD-1断片への抗体の結合が、免疫沈降およびゲル電気泳動によって決定される。ある特定のエピトープは、ファージ粒子の表面上にディスプレイされたランダムペプチド配列の大きいライブラリー（ファージライブラリー）または酵母（酵母ディスプレイ）を使用することによっても同定することができる。代わりに重複ペプチド断片の定義されたライブラリーを、単純な結合アッセイで試験抗体への結合について試験することができる。追加の例では、抗原の突然変異誘発、ドメイン交換実験、およびアラニンスキャニング突然変異誘発を実施して、エピトープ結合に要求され、十分な、かつ/または必要な残基を同定することができる。例えば、アラニンスキャニング突然変異誘発実験は、PD-1ポリペプチドの様々な残基がアラニンで置き換えられた突然変異体PD-1を使用して実施することができる。突然変異体PD-1への抗体の結合を評価することによって、抗体結合に対する特定のPD-1残基の重要性を評価することができる。

10

【0096】

抗PD-1アンタゴニスト抗体を特徴付けるのに使用することができるさらに別の方法は、同じ抗原、すなわち、PD-1の様々な断片に結合することが知られている他の抗体との競合アッセイを使用して、抗PD-1アンタゴニスト抗体が他の抗体と同じエピトープに結合するか否かを決定することである。競合アッセイは、ELISA形式を含めて当業者に周知である。

20

【0097】

PD-1に対する抗PD-1アンタゴニスト抗体の結合親和性(K_D)は、約0.001~約200nMであり得る。一部の実施形態では、結合親和性は、約200nM、約100nM、約50nM、約10nM、約1nM、約500pM、約100pM、約60pM、約50pM、約20pM、約15pM、約10pM、約5pM、約2pM、または約1pMのいずれかである。一部の実施形態では、結合親和性は、約250nM、約200nM、約100nM、約50nM、約10nM、約1nM、約500pM、約100pM、約50pM、約20pM、約10pM、約5pM、または約2pMのいずれか未満である。

30

【0098】

したがって、本発明は、以下のいずれか、または表1に見つかる部分的な軽鎖配列および部分的な重鎖配列を有する抗体、もしくはそのバリエーションを含む組成物（医薬組成物を含む）を提供する。表1において、下線を引いた配列は、CDR配列である。表1において、 K_D は、別段に示されていない限り、25℃で表面プラズモン共鳴を使用して測定したヒトPD-1の親和性を示す。

【0099】

【表 1 - 1】

表1:抗PD-1アンタゴニスト抗体の可変領域配列

mAb	軽鎖	重鎖	KD (nM)
mAb1	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLWDSGNQKNF <u>LTWYQQKPGQPPKLLIYWT</u> <u>STRES</u> GVPDRFSGSGSGT DFTLTISLQAEDVAVYYCQ <u>NDYFYPLTFGGGTKVEIK</u> (配列番号 2)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYWINWVRQAP GQGLEWMGNIYPGSSLTNYN <u>EKFKN</u> RVMTMRDSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARLLTGTF <u>AYWGQ</u> GLTVTVSS (配列番号 3)	64.24
mAb2	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLWDSGNQKNF <u>LTWYQQKPGQPPKLLIYWT</u> <u>SYRES</u> GVPDRFSGSGSGT DFTLTISLQAEDVAVYYCQ <u>NDYFYPLTFGGGTKVEIK</u> (配列番号 7)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYWINWVRQAP GQGLEWMGNIYPGSSLTNYN <u>EKFKN</u> RVMTMRDSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARLLTGTF <u>AYWGQ</u> GLTVTVSS (配列番号 3)	2.22
mAb3	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLWDSGNQKNF <u>LTWYQQKPGQPPKLLIYWT</u> <u>SYRES</u> GVPDRFSGSGSGT DFTLTISLQAEDVAVYYCQ <u>NDYFYPHTFGGGTKVEIK</u> (配列番号 8)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYWINWVRQAP GQGLEWMGNIYPGSSLTNYN <u>EKFKN</u> RVMTMRDSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARLLTGTF <u>AYWGQ</u> GLTVTVSS (配列番号 3)	1.43
mAb4	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLWDSTNQKNF <u>LTWYQQKPGQPPKLLIYWT</u> <u>STRES</u> GVPDRFSGSGSGT DFTLTISLQAEDVAVYYCQ <u>NDYFYPLTFGGGTKVEIK</u> (配列番号 9)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYWINWVRQAP GQGLEWMGNIYPGSSLTNYN <u>EKFKN</u> RVMTMRDSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARLLTGTF <u>AYWGQ</u> GLTVTVSS (配列番号 3)	89(37℃ におい て)

10

20

30

40

【表 1 - 2】

mAb	軽鎖	重鎖	KD (nM)	
mAb5	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLWDSGNQKNF LTWYQQKPGQPPKLLIYWT STRESGVPDRFSGSGSGT DFTLTISLQAEDVAVYYCQ NDYFYPLTFGGGTKVEIK (配列番号 2)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYWINWVRQAP GQGLEWMGNIYPGSSLTNYN EKFKNRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDVAVYYCARLSTGTF AYWGQGTLLTVSS (配列番号 4)	12.82	10
mAb6	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLWDSGNQKNF LTWYQQKPGQPPKLLIYWT SYRESGVPDRFSGSGSGT DFTLTISLQAEDVAVYYCQ NDYFYPLTFGGGTKVEIK (配列番号 7)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYWINWVRQAP GQGLEWMGNIYPGSSLTNYN EKFKNRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDVAVYYCARLSTGTF AYWGQGTLLTVSS (配列番号 4)	1.16	20
mAb7	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLWDSGNQKNF LTWYQQKPGQPPKLLIYWT SYRESGVPDRFSGSGSGT DFTLTISLQAEDVAVYYCQ NDYFYPHTFGGGGTKVEIK (配列番号 8)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYWINWVRQAP GQGLEWMGNIYPGSSLTNYN EKFKNRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDVAVYYCARLSTGTF AYWGQGTLLTVSS (配列番号 4)	0.73	30
mAb8	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLWDSTNQKNF LTWYQQKPGQPPKLLIYWT STRESGVPDRFSGSGSGT DFTLTISLQAEDVAVYYCQ NDYFYPLTFGGGTKVEIK (配列番号 9)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYWINWVRQAP GQGLEWMGNIYPGSSLTNYN EKFKNRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDVAVYYCARLSTGTF AYWGQGTLLTVSS (配列番号 4)	17.35	40

【表 1 - 3】

mAb	軽鎖	重鎖	KD (nM)
mAb9	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLWDSGNQKNF <u>LTWYQQKPGQPPKLLIYWT</u> <u>STRESGVPDRFSGSGSGT</u> DFTLTISLQAEDVAVYYCQ <u>NDYFYPLTFGGGTKVEIK</u> (配列番号 2)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYWINWVRQAP GQGLEWMGNIYPGSSITNYNE <u>KFKNRVTMTRDTSTSTVYMEL</u> SSLRSEDTAVYYCARLTTGTF <u>AYWGQGT</u> LVTVSS (配列番号 5)	13.54
mAb10	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLWDSGNQKNF <u>LTWYQQKPGQPPKLLIYWT</u> <u>SYRESGVPDRFSGSGSGT</u> DFTLTISLQAEDVAVYYCQ <u>NDYFYPLTFGGGTKVEIK</u> (配列番号 7)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYWINWVRQAP GQGLEWMGNIYPGSSITNYNE <u>KFKNRVTMTRDTSTSTVYMEL</u> SSLRSEDTAVYYCARLTTGTF <u>AYWGQGT</u> LVTVSS (配列番号 5)	0.98
mAb11	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLWDSGNQKNF <u>LTWYQQKPGQPPKLLIYWT</u> <u>SYRESGVPDRFSGSGSGT</u> DFTLTISLQAEDVAVYYCQ <u>NDYFYPHTFGGGGTKVEIK</u> (配列番号 8)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYWINWVRQAP GQGLEWMGNIYPGSSITNYNE <u>KFKNRVTMTRDTSTSTVYMEL</u> SSLRSEDTAVYYCARLTTGTF <u>AYWGQGT</u> LVTVSS (配列番号 5)	0.93
mAb12	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLWDSTNQKNF <u>LTWYQQKPGQPPKLLIYWT</u> <u>STRESGVPDRFSGSGSGT</u> DFTLTISLQAEDVAVYYCQ <u>NDYFYPLTFGGGTKVEIK</u> (配列番号 9)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYWINWVRQAP GQGLEWMGNIYPGSSITNYNE <u>KFKNRVTMTRDTSTSTVYMEL</u> SSLRSEDTAVYYCARLTTGTF <u>AYWGQGT</u> LVTVSS (配列番号 5)	17.27

10

20

30

40

【表 1 - 4】

mAb	軽鎖	重鎖	KD (nM)
mAb13	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLWDSGNQKNF <u>LTWYQQKPGQPPKLLIYW</u> <u>STRESGV</u> PDRFSGSGSGT DFTLTISLQAEDVAVYYCQ <u>NDYFYPLTFGGG</u> TKVEIK (配列番号 2)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYWINWVRQAP GQGLEWMGNIWPGSSLTNYN <u>EKF</u> KNRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARLLTGTF <u>AYW</u> GQGTLVTVSS (配列番号 6)	5.87
mAb14	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLWDSGNQKNF <u>LTWYQQKPGQPPKLLIYW</u> <u>SYRESGV</u> PDRFSGSGSGT DFTLTISLQAEDVAVYYCQ <u>NDYFYPLTFGGG</u> TKVEIK (配列番号 7)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYWINWVRQAP GQGLEWMGNIWPGSSLTNYN <u>EKF</u> KNRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARLLTGTF <u>AYW</u> GQGTLVTVSS (配列番号 6)	0.6
mAb15	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLWDSGNQKNF <u>LTWYQQKPGQPPKLLIYW</u> <u>SYRESGV</u> PDRFSGSGSGT DFTLTISLQAEDVAVYYCQ <u>NDYFY</u> PHTFGGGTKVEIK (配列番号 8)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYWINWVRQAP GQGLEWMGNIWPGSSLTNYN <u>EKF</u> KNRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARLLTGTF <u>AYW</u> GQGTLVTVSS (配列番号 6)	0.49
mAb16	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSLWDSTNQKNF <u>LTWYQQKPGQPPKLLIYW</u> <u>STRESGV</u> PDRFSGSGSGT DFTLTISLQAEDVAVYYCQ <u>NDYFYPLTFGGG</u> TKVEIK (配列番号 9)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVS CKASGYTFTSYWINWVRQAP GQGLEWMGNIWPGSSLTNYN <u>EKF</u> KNRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCARLLTGTF <u>AYW</u> GQGTLVTVSS (配列番号 6)	7.51

【 0 1 0 3 】

本発明は、PD-1に対する抗体のCDR部分も提供する。CDR領域の決定は、当技術分野の技術の十分範囲内である。一部の実施形態では、CDRは、KabataおよびChothiaのCDRの組合せであり得る（「組合せCDR」または「拡張CDR」とも呼ばれる）ことが理解される。CDRの「コンホメーション定義」と本明細書で呼ばれる別の手法では、CDRの位置は、抗原結合にエンタルピー的寄与をする残基として同定す

10

20

30

40

50

ることができる。例えば、Makabeら、2008、Journal of Biological Chemistry、283:1156~1166を参照。一般に、「立体構造CDR」は、Kabat CDR、および抗体が特異的抗原に結合するための適切なループ構造を維持するために束縛されているパーニアゾン内に残基位置を含む。立体構造CDRの決定は、当技術分野の技術の十分範囲内である。一部の実施形態では、CDRは、Kabat CDRである。他の実施形態では、CDRは、Chothia CDRである。他の実施形態では、CDRは、拡張、AbM、コンホメーション、または接触CDRである。言い換えれば、1つを超えるCDRを有する実施形態では、CDRは、Kabat、Chothia、拡張、AbM、コンホメーション、接触CDR、またはこれらの組合せのいずれかであり得る。

10

【0104】

一部の実施形態では、抗体は、表1に示した重鎖可変領域のいずれか1つの3つのCDRを含む。一部の実施形態では、抗体は、表1に示した軽鎖可変領域のいずれか1つの3つのCDRを含む。一部の実施形態では、抗体は、表1に示した重鎖可変領域のいずれか1つの3つのCDR、および表1に示した軽鎖可変領域のいずれか1つの3つのCDRを含む。

【0105】

表2は、本明細書に提供する抗PD-1アンタゴニスト抗体のCDR配列の例を提供する。

【0106】

20

【表 2 - 1】

表2.抗PD-1アンタゴニスト抗体(mAb)、およびKabat(下線を引いた)およびChothia(太字)によるこれらの抗原結合CDR配列

mAb		CDR1	CDR2	CDR3
mAb1	L	<u>KSSQSLWDSGNQKN</u> <u>FLT</u> (配列番号10)	<u>WTSTRES</u> (配列番号11)	<u>QNDYFYPLT</u> (配列番号12)
	H	<u>GYTFTSYWIN</u> (配列番号13(全体)、 14 および15)	<u>NIYPGSSLTNYNEKFK</u> <u>N</u> (配列番号 16 および17)	<u>LLTGTFAY</u> (配列番号18)
mAb2	L	<u>KSSQSLWDSGNQKN</u> <u>FLT</u> (配列番号10)	<u>WTSYRES</u> (配列番号20)	<u>QNDYFYPLT</u> (配列番号12)
	H	<u>GYTFTSYWIN</u> (配列番号13(全体)、 14 および15)	<u>NIYPGSSLTNYNEKFK</u> <u>N</u> (配列番号 16 および17)	<u>LLTGTFAY</u> (配列番号18)
mAb3	L	<u>KSSQSLWDSGNQKN</u> <u>FLT</u> (配列番号10)	<u>WTSYRES</u> (配列番号20)	<u>QNDYFYPLT</u> (配列番号21)
	H	<u>GYTFTSYWIN</u> (配列番号13(全体)、 14 および15)	<u>NIYPGSSLTNYNEKFK</u> <u>N</u> (配列番号 16 および17)	<u>LLTGTFAY</u> (配列番号18)
mAb4	L	<u>KSSQSLWDSTNQKNF</u> <u>LT</u> (配列番号22)	<u>WTSTRES</u> (配列番号11)	<u>QNDYFYPLT</u> (配列番号12)
	H	<u>GYTFTSYWIN</u> (配列番号13(全体)、 14 および15)	<u>NIYPGSSLTNYNEKFK</u> <u>N</u> (配列番号 16 および17)	<u>LLTGTFAY</u> (配列番号18)
mAb5	L	<u>KSSQSLWDSGNQKN</u> <u>FLT</u> (配列番号10)	<u>WTSTRES</u> (配列番号11)	<u>QNDYFYPLT</u> (配列番号12)
	H	<u>GYTFTSYWIN</u> (配列番号13(全体)、 14 および15)	<u>NIYPGSSLTNYNEKFK</u> <u>N</u> (配列番号 16 および17)	<u>LSTGTFAY</u> (配列番号23)

10

20

30

40

【表 2 - 2】

mAb		CDR1	CDR2	CDR3
mAb6	L	<u>KSSQSLWDSGNQKN</u> <u>FLT</u> (配列番号10)	<u>WTSYRES</u> (配列番号20)	<u>QNDYFYPLT</u> (配列番号12)
	H	<u>GYTFTSYWIN</u> (配列番号13(全体)、 14 および <u>15</u>)	<u>NIYPGSSLTNYNEKFK</u> <u>N</u> (配列番号 16 および <u>17</u>)	<u>LSTGTFAY</u> (配列番号23)
mAb7	L	<u>KSSQSLWDSGNQKN</u> <u>FLT</u> (配列番号10)	<u>WTSYRES</u> (配列番号20)	<u>QNDYFYPHY</u> (配列番号21)
	H	<u>GYTFTSYWIN</u> (配列番号13(全体)、 14 および <u>15</u>)	<u>NIYPGSSLTNYNEKFK</u> <u>N</u> (配列番号 16 および <u>17</u>)	<u>LSTGTFAY</u> (配列番号23)
mAb8	L	<u>KSSQSLWDSTNQKNF</u> <u>LT</u> (配列番号22)	<u>WTSTRES</u> (配列番号11)	<u>QNDYFYPLT</u> (配列番号12)
	H	<u>GYTFTSYWIN</u> (配列番号13(全体)、 14 および <u>15</u>)	<u>NIYPGSSLTNYNEKFK</u> <u>N</u> (配列番号 16 および <u>17</u>)	<u>LSTGTFAY</u> (配列番号23)
mAb9	L	<u>KSSQSLWDSGNQKN</u> <u>FLT</u> (配列番号10)	<u>WTSTRES</u> (配列番号 11)	<u>QNDYFYPLT</u> (配列番号12)
	H	<u>GYTFTSYWIN</u> (配列番号13(全体)、 14 および <u>15</u>)	<u>NIYPGSSITNYNEKFKN</u> (配列番号 24 および <u>25</u>)	<u>LTTGTFAY</u> (配列番号26)
mAb10	L	<u>KSSQSLWDSGNQKN</u> <u>FLT</u> (配列番号10)	<u>WTSYRES</u> (配列番号20)	<u>QNDYFYPLT</u> (配列番号12)
	H	<u>GYTFTSYWIN</u> (配列番号13(全体)、 14 および <u>15</u>)	<u>NIYPGSSITNYNEKFKN</u> (配列番号 24 および <u>25</u>)	<u>LTTGTFAY</u> (配列番号26)

10

20

30

40

【表 2 - 3】

mAb		CDR1	CDR2	CDR3
mAb11	L	<u>KSSQSLWDSGNQKN</u> <u>FLT</u> (配列番号10)	<u>WTSYRES</u> (配列番号20)	<u>QNDYFYPH</u> <u>T</u> (配列番号21)
	H	<u>GYTFTSYWIN</u> (配列番号13(全体)、 14 および <u>15</u>)	<u>NIYPGSSITNYNEKFKN</u> (配列番号 24 および <u>25</u>)	<u>LTGTFAY</u> (配列番号26)
mAb12	L	<u>KSSQSLWDSTNQKNF</u> <u>LT</u> (配列番号22)	<u>WTSTRES</u> (配列番号11)	<u>QNDYFYPLT</u> (配列番号12)
	H	<u>GYTFTSYWIN</u> (配列番号13(全体)、 14 および <u>15</u>)	<u>NIYPGSSITNYNEKFKN</u> (配列番号 24 および <u>25</u>)	<u>LTGTFAY</u> (配列番号26)
mAb13	L	<u>KSSQSLWDSGNQKN</u> <u>FLT</u> (配列番号10)	<u>WTSTRES</u> (配列番号11)	<u>QNDYFYPLT</u> (配列番号12)
	H	<u>GYTFTSYWIN</u> (配列番号13(全体)、 14 および <u>15</u>)	<u>NIWPGSSLTNYNEKFK</u> <u>N</u> (配列番号 27 および <u>28</u>)	<u>LLTGT</u> <u>FAY</u> (配列番号18)
mAb14	L	<u>KSSQSLWDSGNQKN</u> <u>FLT</u> (配列番号10)	<u>WTSYRES</u> (配列番号20)	<u>QNDYFYPLT</u> (配列番号12)
	H	<u>GYTFTSYWIN</u> (配列番号13(全体)、 14 および <u>15</u>)	<u>NIWPGSSLTNYNEKFK</u> <u>N</u> (配列番号 27 および <u>28</u>)	<u>LLTGT</u> <u>FAY</u> (配列番号18)
mAb15	L	<u>KSSQSLWDSGNQKN</u> <u>FLT</u> (配列番号10)	<u>WTSYRES</u> (配列番号20)	<u>QNDYFYPH</u> <u>T</u> (配列番号21)
	H	<u>GYTFTSYWIN</u> (配列番号13(全体)、 14 および <u>15</u>)	<u>NIWPGSSLTNYNEKFK</u> <u>N</u> (配列番号 27 および <u>28</u>)	<u>LLTGT</u> <u>FAY</u> (配列番号18)

10

20

30

40

【表 2 - 4】

mAb		CDR1	CDR2	CDR3
mAb16	L	<u>KSSQSLWDSTNQKNF</u> <u>LT</u> (配列番号22)	<u>WTSTRES</u> (配列番号11)	<u>QNDYFYPLT</u> (配列番号12)
	H	<u>GYTFTSYWIN</u> (配列番号13(全体)、 14 および <u>15</u>)	<u>NIWPGSSLTNYNEKFK</u> <u>N</u> (配列番号 27 および <u>28</u>)	<u>LLTGTFAY</u> (配列番号18)

10

【 0 1 1 0 】

一部の実施形態では、抗体は、表 2 からの 3 つの軽鎖 C D R および 3 つの重鎖 C D R を含む。

【 0 1 1 1 】

抗 P D - 1 抗体に由来する軽鎖 C D R のアラインメントを、表 3 に提供する。可変残基は、太字で示されている。コンセンサス軽鎖 C D R 配列は、表 3 の最終行に提供されている。

【 0 1 1 2 】

20

【表 3】

表3.抗PD-1軽鎖CDRのアラインメント

mAb	VL CDR1	配列番号	VL CDR2	配列番号	VL CDR3	配列番号
1, 5, 9, 13	KSSQSLWDSGNQK NFLT	10	WTSTRES	11	QNDYFYPLT	12
2, 6, 10, 14	KSSQSLWDSGNQK NFLT	10	WTSYRES	20	QNDYFYPLT	12
3, 7, 11, 15	KSSQSLWDSGNQK NFLT	10	WTSYRES	20	QNDYFYPH T	21
4, 8, 12, 16	KSSQSLWDSTNQK NFLT	22	WTSTRES	11	QNDYFYPLT	12
17	KSSQSLLDSGNQK NFLT	30	WTSTRES	11	QNDY S YPLT	31
	KSSQSL X ₁ DS X ₂ NQ KNFLT、式中、 X ₁ は、WまたはLであ り、 X ₂ は、GまたはT である	32	WTS X ₁ RE S、式中、 X ₁ は、Tま たはYであ る	33	QNDY X ₁ YP X ₂ T、式中、 X ₁ は、FまたはSで あり、 X ₂ は、L またはHである	34

30

40

【 0 1 1 3 】

抗 P D - 1 抗体に由来する重鎖 C D R のアラインメントを表 4 に提供する。可変残基は

50

、太字で示されている。コンセンサス重鎖 C D R 配列は、表 4 の最終行に提供されている。

【 0 1 1 4 】

【 表 4 】

表4.抗PD-1重鎖CDRのアラインメント

mAb	VH CDR1	配列 番号	VH CDR2	配列 番号	VH CDR3	配列 番号
1-4	GYTFTSYWIN	13	NIYPGSSLTNYNEKFKN	17	LLTGTFAY	18
5-8	GYTFTSYWIN	13	NIYPGSSLTNYNEKFKN	17	L ST GT F AY	23
9-12	GYTFTSYWIN	13	NIYPGSSITNYNEKFKN	25	L TT GT F AY	26
13-16	GYTFTSYWIN	13	NI W PGSSLTNYNEKFKN	28	LLTGTFAY	18
17	GYTFTSYWIN	13	NIYPGSS S TNYNEKFKN	35	LLTGTFAY	18
	GYTFTSYWIN	13	NIX ₁ PGSS X ₂ TNYNEKFKN 、式中、 X ₁ は、YまたはW であり、 X ₂ は、L、I、また はSである	36	L X ₁ TGT F AY 、式中、 X ₁ は、Lまたは Sである	37

【 0 1 1 5 】

一部の実施形態では、抗体は、表 3 からの 3 つの軽鎖 C D R および表 4 からの 3 つの重鎖 C D R を含む。

【 0 1 1 6 】

一部の実施形態では、抗体は、抗 P D - 1 アンタゴニスト抗体 m A b 7 または m A b 1 5 の C 末端リシンを含み、もしくは含まない全長重鎖、および / または全長軽鎖を含む。m A b 7 全長重鎖（配列番号 2 9 ）のアミノ酸配列を以下に示す。

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T S Y W I N W V R Q A
P G Q G L E W M G N I Y P G S S L T N Y N E K F K N R V T M T R D T S T S T V Y
M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R L S T G T F A Y W G Q G T L V T V S S A S T
K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S
G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T K T Y T C
N V D H K P S N T K V D K R V E S K Y G P P C P P C P A P E F L G G P S V F L F
P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q F N W Y V D G V E
V H N A K T K P R E E Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V
S N K G L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M T K N Q V
S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S
F F L Y S R L T V D K S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L
S L G K （配列番号 2 9 ）

【 0 1 1 7 】

C 末端リシンを含まない m A b 7 全長重鎖のアミノ酸配列（配列番号 3 8 ）を以下に示す。

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T S Y W I N W V R Q A
P G Q G L E W M G N I Y P G S S L T N Y N E K F K N R V T M T R D T S T S T V Y
M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R L S T G T F A Y W G Q G T L V T V S S A S T
K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S
G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T K T Y T C
N V D H K P S N T K V D K R V E S K Y G P P C P P C P A P E F L G G P S V F L F

P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q F N W Y V D G V E
V H N A K T K P R E E Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V
S N K G L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M T K N Q V
S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S
F F L Y S R L T V D K S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L
S L G (配列番号38)

【0118】

mAb7全長軽鎖のアミノ酸配列(配列番号39)を以下に示す。

D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C K S S Q S L W D S G N Q K N F L T
W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y W T S Y R E S G V P D R F S G S G S G T D F T L T
I S S L Q A E D V A V Y Y C Q N D Y F Y P H T F G G G T K V E I K R G T V A A P
S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A
L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A
C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C (配列番号39)

【0119】

本発明は、抗PD-1アンタゴニスト抗体を生成、選択、および作製する方法も提供する。本発明の抗体は、当技術分野で公知の手順によって作製することができる。一部の実施形態では、抗体は、組換えで作製し、当技術分野で公知の任意の方法を使用して発現させることができる。

【0120】

一部の実施形態では、抗体は、ファージディスプレイ技術によって調製および選択することができる。例えば、米国特許第5,565,332号;同第5,580,717号;同第5,733,743号;および同第6,265,150号;ならびにWinterら、Annu. Rev. Immunol. 12:433~455、1994を参照。代わりに、ファージディスプレイ技術(McCaffertyら、Nature、348:552~553、1990)を使用して、非免疫化ドナーに由来する免疫グロブリン可変(V)ドメイン遺伝子レパートリーから、*in vitro*でヒト抗体および抗体断片を生成することができる。この技法によれば、抗体Vドメイン遺伝子が、糸状バクテリオファージのメジャーまたはマイナーコートタンパク質遺伝子、例えば、M13またはfdなどの中にインフレームでクローニングされ、ファージ粒子の表面上に機能的な抗体断片としてディスプレイされる。糸状粒子は、ファージゲノムの一本鎖DNAコピーを含有するので、抗体を機能的性質に基づいて選択すると、これらの性質を呈する抗体をコードする遺伝子も選択される。したがって、ファージは、B細胞の性質の一部を模倣する。ファージディスプレイは、様々な形式で実施することができる。総説については、例えば、Johnson, Kevin S.およびChiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564~571、1993を参照。V遺伝子セグメントのいくつかの源を、ファージディスプレイに使用することができる。Clacksonら、Nature 352:624~628、1991は、免疫化マウスの脾臓に由来するV遺伝子の小ランダムコンビナトリアルライブラリーから、抗オキサゾロン抗体の多様なアレイを単離した。Markら、J. Mol. Biol. 222:581~597、1991またはGriffithら、EMBO J. 12:725~734、1993によって記載された技法に本質的に従って、ヒトドナーに由来するV遺伝子のレパートリーを構築することができ、抗原(自己抗原を含む)の多様なアレイに対する抗体を単離することができる。天然の免疫応答では、抗体遺伝子は、高い割合で突然変異を蓄積する(体細胞超変異)。導入された変化のいくつかは、より高い親和性を付与することになり、高親和性表面免疫グロブリンをディスプレイするB細胞が、後続の抗原チャレンジの間に選択的に複製および分化される。この自然過程は、「鎖シャッフリング」として公知の技法を使用することによって模倣することができる。(Marksら、Bio/Technol. 10:779~783、1992)。この方法では、ファージディスプレイによって得られる「一次」ヒト抗体の親和性は、非免疫

化ドナーから得られるVドメイン遺伝子の天然に存在するバリエーションのレパートリー（レパートリー）で、重鎖および軽鎖V領域遺伝子を順次置き換えることによって改善することができる。この技法により、pM～nM範囲内の親和性を有する抗体および抗体断片の生成が可能になる。非常に大きいファージ抗体レパートリー（「マザーオブオールライブラリー」としても公知）を作製するための戦略が、Waterhouseら、Nucleic Acids Res. 21:2265～2266、1993によって記載されている。げっ歯類抗体からヒト抗体を導出するのに遺伝子シャフリングも使用することができ、この場合、ヒト抗体は、出発げっ歯類抗体と同様の親和性および特異性を有する。「エピトープ刷り込み」とも呼ばれるこの方法によれば、ファージディスプレイ技法によって得られるげっ歯類抗体の重鎖または軽鎖Vドメイン遺伝子がヒトVドメイン遺伝子のレパートリーと置き換えられ、げっ歯類-ヒトキメラが作り出される。抗原の選択により、機能的抗原結合部位を回復することができるヒト可変領域が単離され、すなわち、エピトープがパートナーの選択を支配する（刷り込む）。残りのげっ歯類Vドメインを置き換えるためにこのプロセスが繰り返されると、ヒト抗体が得られる（PCT公開第WO93/06213を参照）。CDR移植によるげっ歯類抗体の伝統的なヒト化と異なり、この技法は、げっ歯類起源のフレームワークまたはCDR残基をまったく有さない完全ヒト抗体をもたらす。

10

【0121】

一部の実施形態では、抗体は、ハイブリドーマ技術を使用して作製することができる。ヒトを含めた任意の哺乳動物対象またはそれに由来する抗体産生細胞を、ヒトを含めた哺乳動物およびハイブリドーマ細胞株を生成するための基盤として機能を果たすように操作することができることが企図されている。宿主動物の免疫化の経路およびスケジュールは一般に、本明細書でさらに記載するように、抗体を刺激および生成するための確立された技法および慣例的な技法を踏まえている。一般に、宿主動物は、本明細書に記載するように、腹腔内、筋肉内、経口的、皮下、足底内、および/または皮内に、ある量の免疫原を接種される。

20

【0122】

ハイブリドーマは、Kohler, B.およびMilstein, C., 1975, Nature, 256:495～497の、またはBuck, D.W.ら、In Vitro, 18:377～381、1982によって改良された一般的な体細胞ハイブリダイゼーション技法を使用して、リンパ球および不死化骨髄腫細胞から調製することができる。それだけに限らないが、X63-Ag8.653、およびthe Salk Institute、Cell Distribution Center、San Diego、Calif., USAからのものを含めた利用可能な骨髄腫株を、ハイブリダイゼーションで使用するすることができる。一般に、この技法では、ポリエチレングリコールなどの融合剤を使用して、または当業者に周知の電気的手段によって、骨髄腫細胞およびリンパ系細胞を融合する。融合後、細胞は、融合培地から分離され、ヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン（HAT）培地などの選択的増殖培地内で増殖されて未ハイブリダイズ親細胞が排除される。血清の有無にかかわらず補充された、本明細書に記載の培地のいずれも、モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを培養するのに使用することができる。細胞融合技法の別の選択肢として、EBV不死化B細胞を使用して、対象発明のPD-1モノクローナル抗体を生成することができる。ハイブリドーマまたは他の不死化B細胞は、必要に応じて、展開およびサブクローニングされ、慣例的なイムノアッセイ手順（例えば、ラジオイムノアッセイ、酵素免疫アッセイ、または蛍光イムノアッセイ）によって抗免疫原活性について上清がアッセイされる。

30

40

【0123】

抗体源として使用され得るハイブリドーマは、PD-1に特異的なモノクローナル抗体、またはこれらの一部を産生するすべての誘導体、親ハイブリドーマの子孫細胞を包含する。

【0124】

50

このような抗体を産生するハイブリドーマは、公知の手順を使用して、*in vitro*または*in vivo*で増殖させることができる。モノクローナル抗体は、必要に応じて、慣例的な免疫グロブリン精製手順、例えば、硫酸分画、ゲル電気泳動、透析、クロマトグラフィー、および限外濾過などによって、培地または体液から単離することができる。望まれない活性は、存在する場合、例えば、固相に付着した免疫原でできた吸着剤上に配合物を流し、免疫原から所望の抗体を溶出または放出することによって除去することができる。PD-1ポリペプチド、または免疫される種内で免疫原性であるタンパク質、例えば、キーホールリンペットヘモシニアン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、もしくはダイズトリプシン阻害剤にコンジュゲートした標的アミノ酸配列を含有する断片を用いて、二機能性剤または誘導体化剤、例えば、マレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル（システイン残基によるコンジュゲーション）、N-ヒドロキシスクシンイミド（リシン残基による）、グルタルアルデヒド、無水コハク酸、SOCl₂、またはR¹N=C=N R（式中、RおよびR¹は、異なるアルキル基である）を使用して、宿主動物を免疫化すると、抗体（例えば、モノクローナル抗体）の集団を生じさせることができる。

10

【0125】

必要に応じて、対象とする抗PD-1アンタゴニスト抗体（モノクローナルまたはポリクローナル）を配列決定し、次いで、ポリヌクレオチド配列をベクター中にクローン化し、発現または増殖させることができる。対象とする抗体をコードする配列を、宿主細胞内のベクター中に維持することができ、次いで宿主細胞を展開し、将来使用するために凍結することができる。細胞培養物内での組換えモノクローナル抗体の生成は、当技術分野で公知の手段によって、B細胞から抗体遺伝子をクローニングすることによって実施することができる。例えば、Tillerら、2008、J. Immunol. Methods、329、112、米国特許第7,314,622号を参照。

20

【0126】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチド配列を遺伝子操作に使用して、抗体を「ヒト化」し、または抗体の親和性もしくは他の特性を改善することができる。抗体は、例えば、イヌ、ネコ、霊長類、ウマ、およびウシにおいて使用するためにカスタマイズすることもできる。

【0127】

一部の実施形態では、特定のヒト免疫グロブリンタンパク質を発現するように遺伝子工学的に改変された市販のマウスを使用することによって、完全ヒト抗体を得ることができる。より望ましい（例えば、完全ヒト抗体）、またはよりロバストな免疫応答を生じるように設計されたトランスジェニック動物も、ヒト化抗体またはヒト抗体を生成するのに使用することができる。このような技術の例は、Abgenix, Inc. (Fremont, CA)製のXenomouse（商標）、ならびにMedarex, Inc. (Princeton, NJ)製のHuMAb-Mouse（登録商標）およびTC Mouse（商標）である。

30

【0128】

抗体は、宿主動物から抗体および抗体産生細胞を最初に単離し、遺伝子配列を得、遺伝子配列を使用して、宿主細胞（例えば、CHO細胞）内で抗体を組換えで発現させることによって組換えで作製することができる。使用することができる別の方法は、植物（例えば、タバコ）またはトランスジェニック乳内で抗体配列を発現させることである。植物または乳内で、組換えで抗体を発現させるための方法は、開示されている。例えば、Petersら、Vaccine 19:2756、2001、Lonberg, N.およびD. Huszar Int. Rev. Immunol 13:65、1995ならびにPollackら、J Immunol Methods 231:147、1999を参照。抗体の誘導体、例えば、ドメイン、単鎖などを作製するための方法は、当技術分野で公知である。

40

【0129】

50

イムノアッセイ、および蛍光活性化細胞分類（FACS）などのフローサイトメトリーソーティング技法も、PD-1に対して特異的な抗体を単離するのに使用することができる。

【0130】

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、モノクローナル抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）容易に単離および配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、このようなDNAなどの好適な源として機能を果たす。単離した後、発現ベクター（PCT公開第WO87/04462号に開示された発現ベクターなど）内にDNAを配置することができ、次いでこれらは、宿主細胞、例えば、大腸菌（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、または免疫グロブリンタンパク質を他の方法で産生しない骨髓腫細胞などの中にトランスフェクトされて、組換え宿主細胞内でモノクローナル抗体の合成が得られる。例えば、PCT公開第WO87/04462号を参照。DNAは、例えば、相同マウス配列の代わりにヒト重鎖および軽鎖定常領域のコード配列を置換することによって、Morrissonら、Proc. Nat. Acad. Sci. 81:6851、1984、または免疫グロブリンコード配列に、非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列のすべてもしくは一部を共有結合的に接合することによって、修飾することもできる。その様式で、本明細書のPD-1モノクローナル抗体の結合特異性を有する「キメラ」または「ハイブリッド」抗体が調製される。

【0131】

抗体断片は、抗体のタンパク質分解もしくは他の分解によって、上述した組換え法（すなわち、単一もしくは融合ポリペプチド）によって、または化学合成によって生成することができる。抗体のポリペプチド、特に最大約50アミノ酸のより短いポリペプチドは、化学合成によって好都合に作製される。化学合成の方法は、当技術分野で公知であり、商業的に利用可能である。例えば、抗体は、固相法を使用する自動ポリペプチドシンセサイザーによって生成することができる。米国特許第5,807,715号、同第4,816,567号、および同第6,331,415号も参照。

【0132】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、抗体mAb1、mAb2、mAb3、mAb4、mAb5、mAb6、mAb7、mAb8、mAb9、mAb10、mAb11、mAb12、mAb13、mAb14、mAb15、またはmAb16の重鎖および/または軽鎖可変領域をコードする配列を含む。対象とする抗体をコードする配列は、宿主細胞内のベクター中に維持することができ、次いで宿主細胞を展開し、将来使用するために凍結させることができる。ベクター（発現ベクターを含む）および宿主細胞は、本明細書でさらに記載されている。

【0133】

本発明は、親和性成熟した実施形態を含む。例えば、親和性成熟抗体は、当技術分野で公知の手順によって生成することができる（Marksら、1992、Bio/Technology、10:779~783、Barbasら、1994、Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809~3813、Schierら、1995、Gene、169:147~155、Yeltonら、1995、J. Immunol.、155:1994~2004、Jacksonら、1995、J. Immunol.、154(7):3310~9、Hawkinsら、1992、J. Mol. Biol.、226:889~896、およびPCT公開第WO2004/058184）。

【0134】

以下の方法は、抗体の親和性を調整し、CDRを特徴付けるのに使用することができる。抗体のCDRを特徴付け、かつ/または抗体などのポリペプチドの結合親和性を変更する（改善するなど）一方法は、「ライブラリースキャンニング突然変異誘発」と呼ばれた。一般に、ライブラリースキャンニング突然変異誘発は、以下のように働く。CDR内の

1つまたは複数のアミノ酸位置が、当技術分野で承認されている方法を使用して、2つ以上(3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個など)のアミノ酸と置き換えられる。これにより、クローンの小ライブラリーが生成され(一部の実施形態では、分析されるアミノ酸位置毎に1つ)、それぞれは、2つ以上のメンバーの複雑性を有する(位置毎に2つ以上のアミノ酸が置換される場合)。一般に、ライブラリーは、天然(非置換)アミノ酸を含むクローンも含む。各ライブラリーから少数のクローン、例えば、約20~80クローン(ライブラリーの複雑性に応じて)が、標的ポリペプチド(または他の結合標的)に対する結合親和性についてスクリーニングされ、結合性が増大した、同じ、減少した、またはまったくない候補が同定される。結合親和性を決定するための方法は、当技術分野で周知である。結合親和性は、例えば、約2倍以上の結合親和性の差異を検出するBiacore(商標)表面プラズモン共鳴分析、Kinexa(登録商標)バイオセンサー、シンチレーション近接アッセイ、ELISA、ORIGEN(登録商標)イムノアッセイ、蛍光消光、蛍光移動、および/または酵母ディスプレイを使用して求めることができる。結合親和性は、適当なバイオアッセイを使用してスクリーニングすることもできる。Biacore(商標)は、出発抗体が比較的高い親和性、例えば、約10nM以下の K_D で既に結合する場合、特に有用である。

10

【0135】

一部の実施形態では、CDR内のすべてのアミノ酸位置が、当技術分野で承認されている突然変異誘発法(これらのいくつかを本明細書に記載する)を使用して、20すべての天然アミノ酸で置き換えられる(一部の実施形態では、一つずつ)。これにより、クローンの小ライブラリーが生成され(一部の実施形態では、分析されるアミノ酸位置毎に1つ)、それぞれは、20のメンバーの複雑性を有する(位置毎に20個すべてのアミノ酸が置換される場合)。

20

【0136】

一部の実施形態では、スクリーニングされるライブラリーは、2つ以上の位置に置換を含み、これらは、同じCDR内であっても、2つ以上のCDR内であってもよい。したがって、ライブラリーは、1つのCDR内の2つ以上の位置に置換を含み得る。ライブラリーは、2つ以上のCDR内の2つ以上の位置に置換を含み得る。ライブラリーは、2、3、4、5、または6つのCDR内に見つかる、3、4、5、またはそれ以上の位置に置換を含み得る。置換は、低冗長性コドンを使用して調製することができる。例えば、Ballintら1993、Gene 137(1):109~18の表2を参照。

30

【0137】

CDRは、重鎖可変領域(VH)CDR3および/または軽鎖可変領域(VL)CDR3であり得る。CDRは、VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2、および/またはVL CDR3の1つまたは複数であり得る。CDRは、Kabatt CDR、Chothia CDR、拡張CDR、AbM CDR、接触CDR、またはコンホメーションCDRであってもよい。

【0138】

結合性が改善された候補を配列決定し、それによって、親和性を改善するCDR置換突然変異体(「改善された」置換とも呼ばれる)を同定することができる。結合する候補を配列決定し、それによって、結合性を保持するCDR置換を同定することもできる。

40

【0139】

複数ラウンドのスクリーニングを行うことができる。例えば、結合性が改善された候補(それぞれは、1つまたは複数のCDRの1つまたは複数の位置でアミノ酸置換を含む)は、それぞれの改善されたCDR位置(すなわち、置換突然変異体が結合性の改善を示したCDR内のアミノ酸位置)で少なくとも元のアミノ酸および置換されたアミノ酸を含有する第2ライブラリーの設計にも有用である。このライブラリーの調製、およびスクリーニングまたは選択を以下でさらに論じる。

【0140】

50

改善された結合性、同じ結合性、減少した結合性を有し、または結合性をまったく有さないクローンの頻度も、抗体 - 抗原複合体の安定性について各アミノ酸位置の重要性に関する情報を提供する限り、ライブラリースキャンニング突然変異誘発も、CDRを特徴付けるための手段を提供する。例えば、CDRの位置が、20個すべてのアミノ酸に変更されたとき結合性を保持する場合、その位置は、抗原結合に必要とされそうにない位置として同定される。反対に、CDRの位置が、置換の小パーセンテージのみにおいて結合性を保持する場合、その位置は、CDR機能に重要である位置として同定される。したがって、ライブラリースキャンニング突然変異誘発法により、多くの異なるアミノ酸（20個すべてのアミノ酸を含む）に変更することができるCDR内の位置、および変更することができないか、または数種のアミノ酸に変更することができるだけであるCDR内の位置に関する情報が生成される。

10

【0141】

親和性が改善された候補は、第2ライブラリー内で組み合わせることができ、このライブラリーは、改善されたアミノ酸、その位置における元のアミノ酸を含み、望まれる、または所望のスクリーニングもしくは選択法を使用して許容されるライブラリーの複雑性に応じて、その位置で追加の置換をさらに含むことができる。さらに、必要に応じて、隣接するアミノ酸位置は、少なくとも2つ以上のアミノ酸に対してランダム化することができる。隣接するアミノ酸をランダム化すると、突然変異体CDR内の追加の立体構造的柔軟性を可能にすることができ、それはさらには、より多数の改善突然変異の導入を可能にし、または促進することができる。このライブラリーはまた、スクリーニングの第1ラウンドで親和性の改善を示さなかった位置で置換を含むことができる。

20

【0142】

第2ライブラリーは、Kinexa（商標）バイオセンサー分析を使用するスクリーニング、ならびにファージディスプレイ、酵母ディスプレイ、およびリボソームディスプレイを含む、選択のための当技術分野で公知の任意の方法を使用する選択を含めて、当技術分野で公知の任意の方法を使用して、結合親和性が改善および/または変更されたライブラリーメンバーについてスクリーニングまたは選択される。

【0143】

本発明の抗PD-1抗体を発現させるために、VHおよびVL領域をコードするDNA断片を、上述した方法のいずれかを使用して最初に得ることができる。様々な修飾、例えば、突然変異、欠失、および/または付加も、当業者に公知の標準方法を使用して、DNA配列中に導入することができる。例えば、突然変異誘発は、PCR媒介突然変異誘発などの標準方法を使用して実施することができ、PCR媒介突然変異誘発では、突然変異したヌクレオチドがPCRプライマー中に組み込まれ、その結果、PCR産物が所望の突然変異または部位特異的突然変異誘発を含有する。

30

【0144】

本発明は、表1に示した可変領域、および表2、3、または4に示したCDRに対する修飾を包含する。例えば、本発明は、これらの性質に有意に影響しない機能的に等価な可変領域およびCDRを含む抗体、ならびに活性および/または親和性が増強され、もしくは減少したバリエーションを含む。例えば、アミノ酸配列を突然変異させて、PD-1に対する所望の結合親和性を有する抗体を得ることができる。ポリペプチドの修飾は、当技術分野で日常の行為であり、本明細書で詳細に説明する必要はない。修飾ポリペプチドの例としては、アミノ酸残基の保存的置換、機能活性を有意に有害に変更しない、もしくはポリペプチドのそのリガンドに対する親和性を成熟させる（増強する）アミノ酸の1つもしくは複数の欠失もしくは付加、または化学的類似体の使用を有するポリペプチドがある。

40

【0145】

アミノ酸配列挿入としては、1つの残基から、100以上の残基を含有するポリペプチドまでの長さの範囲のアミノ末端融合および/またはカルボキシル末端融合、ならびに単一または複数のアミノ酸残基の配列内挿入がある。末端挿入の例としては、N末端メチオニル残基を有する抗体、またはエピトープタグに融合した抗体がある。抗体分子の他の挿

50

入バリエーションには、血液循環中で抗体の半減期を増大させる酵素またはポリペプチドの、抗体のN末端またはC末端への融合が含まれる。

【0146】

置換バリエーションは、除去された抗体分子内の少なくとも1つのアミノ酸残基、およびその場所内に挿入された異なる残基を有する。置換突然変異誘発の最も大きな関心のある部位には超可変領域が含まれるが、フレームワーク変化も企図されている。保存的置換を、「保存的置換」の表題で表5に示す。このような置換が生物活性を変化させる場合、表5で「例示的な置換」と命名した、またはアミノ酸クラスを参照して以下にさらに記載する、より実質的な変化を導入することができ、生成物をスクリーニングすることができる。

【0147】

【表5】

表5:アミノ酸置換

元の残基	保存的置換	例示的な置換
Ala (A)	Val	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu	Glu; Asn
Cys (C)	Ser	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn	Asn; Glu
Glu (E)	Asp	Asp; Gln
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Arg	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノルロイシン
Leu (L)	Ile	ノルロイシン; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Tyr	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Phe	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Leu	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン

【0148】

抗体の生物学的性質の実質的な修飾は、(a)例えば、シートもしくはヘリックスコンホメーションとしての置換範囲内のポリペプチド骨格の構造、(b)標的部位における分子の電荷もしくは疎水性、または(c)側鎖のバルクを維持することに対する置換の効果が有意に異なる置換を選択することによって達成される。天然に存在する残基は、共通の側鎖の性質に基づいて群に分類される：

(1) 非極性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

10

20

30

40

50

- (2) 電荷を有さない極性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- (3) 酸性（負に荷電した）：Asp、Glu；
- (4) 塩基性（正に荷電した）：Lys、Arg；
- (5) 鎖配向に影響を与える残基：Gly、Pro、および
- (6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe、His。

【0149】

非保存的置換は、これらのクラスの1つのクラスのメンバーを別のクラスと交換することによって行われる。

【0150】

例えば、行うことができる1つのタイプの置換は、別の残基、例えば、限定することなく、アラニンまたはセリンなどに化学反応性であり得る、抗体中の1つまたは複数のシステインを変更することである。例えば、非カノニカルシステインの置換が存在し得る。置換は、可変ドメインのCDRもしくはフレームワーク領域内、または抗体の定常領域内で行うことができる。一部の実施形態では、システインは、カノニカルである。抗体の適切なコンホメーションの維持に関与していない任意のシステイン残基も、分子の酸化安定性を改善し、異常な架橋を防止するために、一般にセリンと置換することができる。反対に、システイン結合（複数可）を、特に抗体がFv断片などの抗体断片である場合、抗体の安定性を改善するために抗体に付加することができる。

【0151】

抗体は、例えば、抗体の結合性を変更するために、例えば、重鎖および/または軽鎖の可変ドメイン内で修飾することもできる。可変領域内の変化は、結合親和性および/または特異性を変更し得る。一部の実施形態では、1～5個以下の保存的アミノ酸置換がCDRドメイン内で行われる。他の実施形態では、1～3個以下の保存的アミノ酸置換がCDRドメイン内で行われる。例えば、PD-1に対する抗体の K_D を増減し、 k_{off} を増減し、または抗体の結合特異性を変更するために、CDR領域の1つまたは複数内で突然変異を行うことができる。部位特異的突然変異誘発における技法は、当技術分野で周知である。例えば、SambrookらおよびAusubelら、上記を参照。

【0152】

修飾または突然変異をフレームワーク領域または定常領域内で行って、抗PD-1抗体の半減期を延ばすこともできる。例えば、PCT公開第WO00/09560号を参照。フレームワーク領域または定常領域内での突然変異を行って、抗体の免疫原性を変更し、別の分子への共有結合性もしくは非共有結合性結合のための部位を提供し、または補体結合、FcR結合、および抗体依存性細胞媒介性細胞傷害などの性質を変更することもできる。一部の実施形態では、1～5個以下の保存的アミノ酸置換がフレームワーク領域または定常領域内で行われる。他の実施形態では、1～3個以下の保存的アミノ酸置換がフレームワーク領域または定常領域内で行われる。本発明によれば、単一抗体は、可変ドメインのCDRまたはフレームワーク領域の任意の1つまたは複数内、または定常領域内に突然変異を有することができる。

【0153】

修飾には、グリコシル化および非グリコシル化ポリペプチド、ならびに他の翻訳後修飾、例えば、異なる糖でのグリコシル化、アセチル化、およびリン酸化などを有するポリペプチドも含まれる。抗体は、これらの定常領域内の保存位置でグリコシル化される（JefferysおよびLund、1997、Chem. Immunol.、65：111～128；WrightおよびMorrison、1997、TibTECH、15：26～32）。免疫グロブリンのオリゴ糖側鎖は、タンパク質の機能（Boydら、1996、Mol. Immunol.、32：1311～1318；WittweおよびHoward、1990、Biochem.、29：4175～4180）、ならびにコンホメーションに影響し得る糖タンパク質の部分と、糖タンパク質の提示された三次元表面との分子内相互作用（JefferysおよびLund、上記；WyssおよびWagner、1996、Current Opin. Biotech.、7：409～416）に影響

10

20

30

40

50

する。オリゴ糖は、特異的な認識構造に基づいて、ある特定の分子に所与の糖タンパク質を向ける機能を果たすこともできる。抗体のグリコシル化は、抗体依存性細胞傷害（ADCC）に影響することも報告されている。特に、バイセクティングGlcNAcの形成を触媒するグリコシルトランスフェラーゼである（1,4）-N-アセチルグルコサミントランスフェラーゼIII（GnTIII）がテトラサイクリンにより発現制御されるCHO細胞によって産生される抗体は、改善されたADCC活性を有することが報告された（Umanaら、1999、Nature Biotech.、17：176～180）。

【0154】

抗体のグリコシル化は、一般に、N結合型またはO結合型である。N結合型は、アスパラギン残基の側鎖への炭水化物部分の結合を指す。トリペプチド配列のアスパラギン-X-セリン、アスパラギン-X-トレオニン、およびアスパラギン-X-システイン（式中、Xは、プロリンを除く任意のアミノ酸である）は、炭水化物部分がアスパラギン側鎖に酵素的結合するための認識配列である。したがって、ポリペプチド中にこれらのトリペプチド配列のいずれかが存在すると、潜在的なグリコシル化部位が作り出される。O結合型グリコシル化は、糖N-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、またはキシロースのうちの1種の、ヒドロキシアミノ酸、最も一般にはセリンまたはトレオニンへの結合を指すが、5-ヒドロキシプロリンまたは5-ヒドロキシリシンも使用することができる。

【0155】

グリコシル化部位の抗体への付加は、アミノ酸配列を、これが上述したトリペプチド配列の1つまたは複数を含有するように変更することによって好都合には達成される（N結合型グリコシル化部位に関して）。変更は、元の抗体の配列への、1つまたは複数のセリンまたはトレオニン残基の付加、またはこれらによる置換によっても行うことができる（O結合型グリコシル化部位に関して）。

【0156】

抗体のグリコシル化パターンも、基本的なヌクレオチド配列を変更することなく変更することができる。グリコシル化は、抗体を発現させるのに使用される宿主細胞に大部分は依存する。潜在的な治療剤としての組換え糖タンパク質、例えば、抗体の発現に使用される細胞型は、まれにネイティブ細胞であるので、抗体のグリコシル化パターンのバリエーションが予期され得る（例えば、Hseら、1997、J. Biol. Chem.、272：9062～9070を参照）。

【0157】

宿主細胞の選択に加えて、抗体を組換え生産する間にグリコシル化に影響する要因としては、増殖モード、培地配合、培養密度、酸素供給、pH、精製スキームなどがある。オリゴ糖生成に関与するある特定の酵素の導入または過剰発現を含めて、特定の宿主生物体内で実現されるグリコシル化パターンを変更するための様々な方法が提案されている（米国特許第5,047,335号、同第5,510,261号、および同第5,278,299号）。グリコシル化、またはある特定のタイプのグリコシル化は、例えば、エンドグリコシダーゼH（Endo H）、N-グリコシダーゼF、エンドグリコシダーゼF1、エンドグリコシダーゼF2、エンドグリコシダーゼF3を使用して、糖タンパク質から酵素的に除去することができる。さらに、組換え宿主細胞は、ある特定のタイプの多糖のプロセッシングにおいて欠陥のあるように遺伝子工学的に改変することができる。これらの技法および同様の技法は、当技術分野で周知である。

【0158】

修飾の他の方法には、それだけに限らないが、酵素的手段、酸化的置換、およびキレート化を含めた、当技術分野で公知のカップリング技法の使用が含まれる。修飾は、例えば、イムノアッセイ用標識の結合に使用することができる。修飾ポリペプチドは、当技術分野で確立した手順を使用して作製され、当技術分野で公知の標準アッセイを使用してスクリーニングすることができる。これらのアッセイのいくつかを以下および実施例で記載する。

10

20

30

40

50

【0159】

一部の実施形態では、Fcは、ヒトIgG₂またはヒトIgG₄であり得る。一部の実施形態では、抗体は、以下の突然変異を含むIgG₄の定常領域を含む(Armourら、2003、Molecular Immunology 40、585~593)：番号付けが野生型IgG₄を参照している、E233F234L235からP233V234A235(IgG₄_c)。さらに別の実施形態では、Fcは、欠失G236を伴ったE233F234L235からP233V234A235への変異を含むヒトIgG₄である。一部の実施形態では、Fcは、S228からP228へのヒンジ安定化突然変異を含有する任意のヒトIgG₄ Fc(IgG₄_a、IgG₄_b、またはIgG₄_c)である(Aalberseら、2002、Immunology 105、9~19)。他の実施形態では、Fcは、アミノ酸残基が野生型IgG₂配列を参照して番号付けされる、A330P331からS330S331への突然変異(IgG₂_a)を含有するヒトIgG₂であり得る。Eur. J. Immunol.、1999、29：2613~2624。

10

【0160】

一部の実施形態では、抗体は、ヒトFc受容体に対する結合親和性が増大もしくは減少した修飾定常領域を含み、免疫学的に不活性もしくは部分的に不活性であり、例えば、補体媒介溶解を誘発せず、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)を刺激せず、もしくはミクログリアを活性化せず、または以下、すなわち、補体媒介溶解の誘発、ADCCの刺激、もしくはミクログリアの活性化のうちの任意の1つもしくは複数において活性が低減している(無修飾抗体と比較して)。エフェクター機能の最適レベルおよび/または組合せを実現するために、定常領域の異なる修飾を使用することができる。例えば、Morganら、Immunology 86：319~324、1995；Lundら、J. Immunology、157：4963~9 157：4963~4969、1996；Idusogieら、J. Immunology、164：4178~4184、2000；Taoら、J. Immunology 143：2595~2601、1989；およびJefferisら、Immunological Reviews、163：59~76、1998を参照。一部の実施形態では、定常領域は、Eur. J. Immunol.、1999、29：2613~2624、PCT公開第WO1999/058572に記載されているように修飾される。

20

30

【0161】

一部の実施形態では、抗体定常領域を修飾して、Fc受容体と補体および免疫系との相互作用を回避することができる。このような抗体を調製するための技法は、WO99/58572に記載されている。例えば、抗体がヒトにおける臨床試験および治療で 사용되는場合、定常領域をヒト定常領域により類似しているように遺伝子工学的に改変して、免疫応答を回避することができる。例えば、米国特許第5,997,867号および同第5,866,692号を参照。

【0162】

さらに他の実施形態では、定常領域は、N結合型グリコシル化の代わりに非グリコシル化されている。一部の実施形態では、定常領域は、オリゴ糖付着残基および/または定常領域中のN-グリコシル化認識配列の一部であるフランキング残基を突然変異させることによって、N結合型グリコシル化の代わりに非グリコシル化されている。例えば、N-グリコシル化部位N297は、例えば、A、Q、K、またはHに突然変異され得る。Taoら、J. Immunology 143：2595~2601、1989、およびJefferisら、Immunological Reviews、163：59~76、1998を参照。一部の実施形態では、定常領域は、N結合型グリコシル化について非グリコシル化されている。定常領域は、酵素的に(酵素PNGaseによって炭水化物を除去するなど)、またはグリコシル化欠損宿主細胞内の発現によって、N結合型グリコシル化について非グリコシル化されていてもよい。

40

【0163】

50

他の抗体修飾には、PCT公開第WO99/58572号に記載されたように修飾された抗体が含まれる。これらの抗体は、標的分子に向けられた結合ドメインに加えて、ヒト免疫グロブリン重鎖の定常領域のすべてまたは一部に実質的に相同のアミノ酸配列を有するエフェクタードメインを含む。これらの抗体は、標的の著しい補体依存性溶解または細胞媒介性破壊を誘発することなく、標的分子に結合することができる。一部の実施形態では、エフェクタードメインは、FcRnおよび/またはFcRIIbに特異的に結合することができる。これらは一般に、2つ以上のヒト免疫グロブリン重鎖CH2ドメインに由来するキメラドメインに基づく。このようにして修飾された抗体は、慣例的な抗体療法に対する炎症反応および他の拒絶反応を回避するための長期抗体療法で使用するのに特に適している。

10

【0164】

一部の実施形態では、抗体は、無修飾抗体と比較してFcRnに対する結合親和性の増大および/または血清半減期の増大を有する修飾定常領域を含む。

【0165】

「生殖系列化(germlining)」として公知のプロセスでは、VHおよびVL配列中のある特定のアミノ酸を突然変異させて、生殖系列VHおよびVL配列中に天然に見つかるものとマッチさせることができる。特に、抗体が投与されときの免疫原性のリスクを低減するために、VHおよびVL配列中のフレームワーク領域のアミノ酸配列を突然変異させて、生殖系列配列とマッチさせることができる。ヒトVHおよびVL遺伝子についての生殖系列DNA配列は、当技術分野で公知である(例えば、「Vbase」ヒト生殖系列配列データベースを参照; Kabat, E. A. ら、1991、Sequences of Proteins of Immunological Interest、5版、U.S. Department of Health and Human Services、NIH刊行物番号91-3242; Tomlinson ら、1992、J. Mol. Biol.、227:776~798; および Cox ら、1994、Eur. J. Immunol.、24:827~836も参照)。

20

【0166】

行うことができる別のタイプのアミノ酸置換は、抗体中の潜在的なタンパク質分解部位を除去することである。このような部位は、可変ドメインのCDRもしくはフレームワーク領域内または抗体の定常領域内に存在し得る。システイン残基を置換し、タンパク質分解部位を除去すると、抗体生成物中の不均質性のリスクを減少させ、したがってその均質性を増大させることができる。別のタイプのアミノ酸置換は、潜在的なアミド分解部位を形成するアスパラギン-グリシン対を、これらの残基の一方または両方を変更することによって排除することである。別の例では、本発明の抗PD-1抗体の重鎖のC末端リシンを切断することができる。本発明の様々な実施形態では、抗PD-1抗体の重鎖および軽鎖は、シグナル配列を任意選択により含む場合がある。

30

【0167】

本発明のVHおよびVLセグメントをコードするDNA断片が得られた後、これらのDNA断片を、標準的な組換えDNA技法によってさらに操作して、例えば、可変領域遺伝子を全長抗体鎖遺伝子、Fab断片遺伝子、またはscFv遺伝子に変換することができる。これらの操作では、VLまたはVHコードDNA断片は、抗体定常領域などの別のタンパク質をコードする別のDNA断片、または可動性リンカーに作動可能に連結される。用語「作動可能に連結した」は、本脈絡において使用する場合、2つのDNA断片によってコードされるアミノ酸配列がインフレームのままであるように2つのDNA断片が接合されていることを意味するように意図されている。

40

【0168】

VH領域をコードする単離DNAは、VHコードDNAを、重鎖定常領域(CH1、CH2、およびCH3)をコードする別のDNA分子に作動可能に連結することによって、完全長重鎖遺伝子に変換することができる。ヒト重鎖定常領域遺伝子の配列は、当技術分野で公知であり(例えば、Kabat, E. A. ら、1991、Sequences o

50

f Proteins of Immunological Interest、5版、U.S. Department of Health and Human Services、NIH刊行物番号91-3242を参照)、これらの領域を包含するDNA断片は、標準的なPCR増幅によって得ることができる。重鎖定常領域は、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA、IgE、IgM、またはIgD定常領域とすることができるが、最も好ましくはIgG₁またはIgG₂定常領域である。IgG定常領域配列は、異なる個体の中で存在することが知られている様々な対立遺伝子またはアロタイプ、例えば、Gm(1)、Gm(2)、Gm(3)、およびGm(17)などのいずれかであり得る。これらのアロタイプは、IgG1定常領域中の天然に存在するアミノ酸置換を代表する。Fab断片重鎖遺伝子に関して、VHコードDNAは、重鎖CH1定常領域のみをコードする別のDNA分子に作動可能に連結することができる。CH1重鎖定常領域は、重鎖遺伝子のいずれかに由来し得る。

10

【0169】

VL領域をコードする単離DNAは、VLコードDNAを軽鎖定常領域、CLをコードする別のDNA分子に作動可能に連結することによって、完全長軽鎖遺伝子(およびFab軽鎖遺伝子)に変換することができる。ヒト軽鎖定常領域遺伝子の配列は、当技術分野で公知であり(例えば、Kabat, E.A.ら、1991、Sequences of Proteins of Immunological Interest、5版、U.S. Department of Health and Human Services、NIH刊行物番号91-3242を参照)、これらの領域を包含するDNA断片は、標準的なPCR増幅によって得ることができる。軽鎖定常領域は、または定常領域とすることができる。定常領域は、異なる個体の中で存在することが知られている様々な対立遺伝子、例えば、Inv(1)、Inv(2)、およびInv(3)のいずれかであり得る。定常領域は、3種の遺伝子のいずれかに由来し得る。

20

【0170】

scFv遺伝子を作り出すために、VHおよびVLコードDNA断片は、可動性リンカーをコードする別の断片に、VHおよびVL配列が、VLおよびVH領域が可動性リンカーによって接合された連続した単鎖タンパク質として発現され得るように作動可能に連結される(例えば、Birdら、1988、Science 242:423~426; Hustonら、1988、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879~5883; McCaffertyら、1990、Nature 348:552~554を参照)。連結ペプチドの例は、(GGGGS)₃(配列番号19)であり、これは、一方の可変領域のカルボキシ末端と他方の可変領域のアミノ末端との間のおよそ3.5 nmを架橋する。他の配列のリンカーも設計および使用されている(Birdら、1988、上記)。リンカーは、次に、追加の機能、例えば、薬剤の結合または固体支持体への結合などのために修飾することができる。単鎖抗体は、単一のVHおよびVLのみが使用される場合、一価であり得、2つのVHおよびVLが使用される場合、二価であり得、または2つを超えるVHおよびVLが使用される場合、多価であり得る。PD-1および別の分子に特異的に結合する二重特異性抗体または多価抗体を生成することができる。単鎖バリエーションは、組換えで、または合成的に生成することができる。scFvの合成生成のために、自動シンセサイザーを使用することができる。scFvの組換え産生のために、scFvをコードするポリヌクレオチドを含有する適当なプラスミドを、酵母、植物、昆虫、もしくは哺乳動物細胞などの真核生物、または大腸菌(E. coli)などの原核生物の適当な宿主細胞内に導入することができる。対象とするscFvをコードするポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドのライゲーションなどの慣例的な操作によって作製することができる。結果として生じるscFvは、当技術分野で公知の標準的なタンパク質精製技法を使用して単離することができる。

30

40

【0171】

ダイアボディなどの単鎖抗体の他の形態も包含される。ダイアボディは、VHおよびVLが、単一ポリペプチド鎖上であるが、短すぎて同じ鎖上の2つのドメイン間で対形成さ

50

せることができず、それによってドメインを別の鎖の相補的ドメインと強制的に対形成させ、2つの抗原結合部位を作り出すリンカーを使用して発現される、二価の二重特異性抗体である(例えば、Holliger, P.ら、1993、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444~6448; Poljak, R. J.ら、1994、Structure、2:1121~1123を参照)。

【0172】

2つの共有結合的に接合された抗体を含むヘテロコンジュゲート抗体も、本発明の範囲内である。このような抗体は、免疫系細胞を望まれない細胞に向けるのに(米国特許第4,676,980号)、およびHIV感染を治療するために(PCT公開第WO1991/000360および同第92/200373号;EP03089)使用されている。ヘテロコンジュゲート抗体は、任意の好都合な架橋法を使用して作製することができる。適当な架橋剤および架橋技法は、当技術分野で周知であり、米国特許第4,676,980号に記載されている。

【0173】

キメラまたはハイブリッド抗体も、架橋剤を伴うものを含めて、合成タンパク質化学の公知の方法を使用して*in vitro*で調製することができる。例えば、免疫毒素は、ジスルフィド交換反応を使用して、またはチオエーテル結合を形成することによって構築することができる。この目的用の適当な試薬の例としては、イミノチオレートおよびメチル-4-メルカプトブチルイミデート(mercaptobutyrimidate)がある。

【0174】

本発明は、本明細書に開示の抗体に由来する1つまたは複数の断片または領域を含む融合タンパク質も包含する。一部の実施形態では、別のポリペプチドに連結された本発明の抗PD-1抗体のすべてまたは一部を含む融合抗体を作製することができる。別の実施形態では、抗PD-1抗体の可変ドメインのみがポリペプチドに連結される。別の実施形態では、抗PD-1抗体のVHドメインは、第1ポリペプチドに連結され、一方、抗PD-1抗体のVLドメインは、VHおよびVLドメインが互いに相互作用して抗原結合部位を形成することができる様式で第1ポリペプチドと会合する第2ポリペプチドに連結される。別の好適な実施形態では、VHドメインは、VHおよびVLドメインが互いに相互作用することができるように、リンカーによってVLドメインから分離される。次いで、VH-リンカー-VL抗体は、対象とするポリペプチドに連結される。さらに、2つ(またはそれ以上)の単鎖抗体が互いに連結された融合抗体を作り出すことができる。これは、単一ポリペプチド鎖上に二価もしくは多価抗体を作り出したい場合、または二重特異性抗体を作り出したい場合、有用である。

【0175】

一部の実施形態では、配列番号2、7、8、もしくは9に示した可変軽鎖領域の少なくとも10の連続したアミノ酸、および/または配列番号3、4、5、もしくは6に示した可変重鎖領域の少なくとも10個のアミノ酸を含む融合ポリペプチドが提供される。他の実施形態では、可変軽鎖領域の少なくとも約10個、少なくとも約15個、少なくとも約20個、少なくとも約25個、もしくは少なくとも約30個の連続したアミノ酸および/または可変重鎖領域の少なくとも約10個、少なくとも約15個、少なくとも約20個、少なくとも約25個、もしくは少なくとも約30個の連続したアミノ酸を含む融合ポリペプチドが提供される。別の実施形態では、融合ポリペプチドは、配列番号2と3、7と3、8と3、8と9と3、2と4、7と4、8と4、9と4、2と5、7と5、8と5、9と5、2と6、7と6、8と6、および9と6の中から選択される配列対のいずれかに示された軽鎖可変領域および/または重鎖可変領域を含む。別の実施形態では、融合ポリペプチドは、1つまたは複数のCDR(複数可)を含む。さらに他の実施形態では、融合ポリペプチドは、VH CDR3および/またはVL CDR3を含む。本発明の目的に関して、融合タンパク質は、1種または複数の抗体、および天然分子内に結合されていない別のアミノ酸配列、例えば、異種配列、または別の領域からの相同配列を含有する。例示

的な異種配列としては、それだけに限らないが、FLAGタグまたは6Hisタグなどの「タグ」がある。タグは、当技術分野で周知である。

【0176】

融合ポリペプチドは、当技術分野で公知の方法によって、例えば、合成的に、または組換えで作ることができる。一般に、本発明の融合タンパク質は、本明細書に記載の組換え法を使用して、これらをコードするポリヌクレオチドを調製し、発現させることによって作製されるが、これらは、例えば、化学合成を含めた当技術分野で公知の他の手段によっても調製することができる。

【0177】

他の実施形態では、抗PD-1抗体コード核酸分子を使用して他の修飾抗体を調製することができる。例えば、「カッパボディ」(Illra, 1997, Protein Eng., 10:949~57)、「ミニボディ」(Martins, 1994, EMBO J., 13:5303~9)、「ダイアボディ」(Holligerら、上記)、または「ジャヌシン(Janusin)」(Trauneckerら、1991, EMBO J., 10:3655~3659およびTrauneckerら、1992, Int. J. Cancer (補遺)、7:51~52)を、本明細書の教示に従って、標準的な分子生物学的技法を使用して調製することができる。

【0178】

例えば、二重特異性抗体、すなわち、少なくとも2つの異なる抗原に対する結合特異性を有するモノクローナル抗体を、本明細書に開示の抗体を使用して調製することができる。二重特異性抗体を作製するための方法は、当技術分野で公知である(例えば、Sureshら、1986, Methods in Enzymology 121:210を参照)。例えば、二重特異性抗体または抗原結合断片は、ハイブリドーマの融合またはFab'断片の連結によって生成することができる。例えば、Songsivilai & Lachmann, 1990, Clin. Exp. Immunol., 79:315~321、Kostelnyら、1992, J. Immunol., 148:1547~1553を参照。伝統的に、二重特異性抗体の組換え生産は、2本の重鎖が異なる特異性を有する、2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の同時発現に基づいていた(MillsteinおよびCuello, 1983, Nature 305, 537~539)。さらに、二重特異性抗体を「ダイアボディ」または「ジャヌシン」として形成することができる。一部の実施形態では、二重特異性抗体は、PD-1の2つの異なるエピトープに結合する。一部の実施形態では、上述した修飾抗体は、本明細書に提供する抗PD-1抗体に由来する可変ドメインまたはCDR領域の1つまたは複数を使用して調製される。

【0179】

二重特異性抗体を作製するための一手法によれば、所望の結合特異性(抗体-抗原結合部位)を有する抗体可変ドメインが、免疫グロブリン定常領域配列に融合される。融合は、好ましくは、ヒンジ、CH2、およびCH3領域の少なくとも一部を含む免疫グロブリン重鎖定常領域とのものである。融合物の少なくとも1つの中に存在する、軽鎖結合に必要な部位を含有する第1重鎖定常領域(CH1)を有することが好適である。免疫グロブリン重鎖融合物および必要に応じて、免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAは、別個の発現ベクター内に挿入され、適当な宿主生物体内にコトランスフェクトされる。これは、構築物内で不等比の3本のポリペプチド鎖が使用されると収率が最適になる実施形態において、3つのポリペプチド断片の相互の比率の調整に大きな柔軟性をもたらす。しかし、少なくとも2本のポリペプチド鎖が等比で発現されると収率が高くなる場合、または比が特に重要でない場合、2本、または3本すべてのポリペプチド鎖のコード配列を1つの発現ベクター内に挿入することが可能である。

【0180】

一手法では、二重特異性抗体は、一方のアーム内の第1の結合特異性を有するハイブリッド免疫グロブリン重鎖、および他方のアーム内のハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対(第2の結合特異性をもたらす)から構成される。二重特異性分子の半分のみに免疫

グロブリン鎖を有する非対称構造は、望まれない免疫グロブリン鎖の組合せからの所望の二重特異性化合物の分離を促進する。この手法は、PCT公開第WO94/04690に記載されている。

【0181】

本発明は、固体支持体へのカップリングを促進する作用物質（ビオチンまたはアビジンなど）にコンジュゲートした（例えば、連結した）抗体を含む組成物も提供する。単純性のために、これらの方法が本明細書に記載のPD-1結合および/またはアンタゴニストの実施形態のいずれかに適用されるという理解で、一般に、抗体に言及する。コンジュゲーションは一般に、本明細書に記載のこれらのコンポーネントを連結することを指す。連結（これは一般に、少なくとも投与のために、近接会合でこれらのコンポーネントを固定することである）は、任意の数の方法で実現され得る。例えば、作用物質と抗体との直接反応は、それぞれが他方の置換基と反応することができる置換基を有する場合、可能である。例えば、一方上の求核基、例えば、アミノ基またはスルフヒドリル基などは、他方上のカルボニル含有基、例えば、無水物もしくは酸ハロゲン化物など、または良好な脱離基（例えば、ハロゲン化物）を含有するアルキル基と反応することができる。

【0182】

抗体は、多くの異なる担体に結合することができる。担体は、活性および/または不活性であり得る。周知の担体の例としては、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、ガラス、天然および変性セルロース、ポリアクリルアミド、アガロースならびに磁鉄鉱がある。担体の性質は、本発明の目的に関して可溶性または不溶性であり得る。当業者は、結合抗体用の他の適当な担体が分かり、または日常の実験を使用してこのようなものを確認することができるであろう。一部の実施形態では、担体は、肺、心臓、または心臓弁を標的にする部分を含む。

【0183】

本発明の抗体またはポリペプチドは、標識化剤、例えば、蛍光性分子、放射性分子、または当技術分野で公知の任意の他の標識などに連結され得る。一般にシグナルをもたらす（直接的にまたは間接的に）標識は、当技術分野で公知である。

【0184】

ポリヌクレオチド、ベクター、および宿主細胞

本発明は、本明細書に記載の抗体断片および修飾抗体を含めた抗体、例えば、エフェクター機能が損なわれた抗体などのいずれかをコードするポリヌクレオチドも提供する。別の態様では、本発明は、本明細書に記載のポリヌクレオチドのいずれかを作製する方法を提供する。ポリヌクレオチドは、当技術分野で公知の手順によって作製し、発現させることができる。したがって、本発明は、以下：抗体mAb1、mAb2、mAb3、mAb4、mAb5、mAb6、mAb7、mAb8、mAb9、mAb10、mAb11、mAb12、mAb13、mAb14、mAb15、mAb16、およびmAb17、またはPD-1をアンタゴナイズする能力を有するその任意の断片もしくは部分のうちのいずれかをコードするポリヌクレオチドを含む、ポリヌクレオチドまたは医薬組成物を含めた組成物を提供する。

【0185】

任意のこのような配列に相補的なポリヌクレオチドも本発明によって包含される。ポリヌクレオチドは、一本鎖（コードまたはアンチセンス）であっても、二本鎖であってもよく、DNA（ゲノム、cDNA、または合成）であっても、RNA分子であってもよい。RNA分子には、イントロンを含有し、1対1の様式でDNA分子に対応するhnRNA分子、およびイントロンを含有しないmRNA分子が含まれる。追加のコード配列または非コード配列が本発明のポリヌクレオチド内に存在してもよいが、その必要はなく、ポリヌクレオチドは、他の分子および/または支持材に連結されていてもよいが、その必要はない。

【0186】

ポリヌクレオチドは、天然配列（すなわち、抗体またはその断片をコードする内因性配

10

20

30

40

50

列)を含むことができ、またはこのような配列のバリエーションを含むことができる。ポリヌクレオチドバリエーションは、コードされるポリペプチドの免疫反応性が天然の免疫反応性分子と比べて減少しないように、1つまたは複数の置換、付加、欠失、および/または挿入を含む。コードされるポリペプチドの免疫反応性に対する効果は、一般に、本明細書に記載するように評価することができる。バリエーションは、好ましくは、自然抗体またはその断片をコードするポリヌクレオチド配列と、少なくとも約70%の同一性、より好ましくは、少なくとも約80%の同一性、さらにより好ましくは、少なくとも約90%の同一性、最も好ましくは、少なくとも約95%の同一性を呈する。

【0187】

2つのポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列は、2つの配列中のヌクレオチドまたはアミノ酸の配列が、以下に記載するように、最大対応に関してアラインメントされたとき同じである場合、「同一」と言われる。2つの配列間の比較は、典型的には、比較ウィンドウにわたって配列を比較して、配列類似性の局所領域を同定および比較することによって実施される。「比較ウィンドウ」は、本明細書において、少なくとも約20の連続した位置、通常30~約75、または40~約50のセグメントを指し、この中で1つの配列を同じ数の連続した位置の参照配列と、2つの配列を最適にアラインメントさせた後に比較することができる。

【0188】

比較するための配列の最適なアラインメントは、バイオインフォマティクスソフトウェアのLasergene(登録商標)一式内のMegAlign(登録商標)プログラム(DNA STAR(登録商標), Inc., Madison, WI)を使用して、デフォルトのパラメータを使用することができる。このプログラムは、以下の参考文献に記載されたいくつかのアラインメントスキームを具現する: Dayhoff, M.O., 1978, A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff, M.O. (編), Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC, 5巻、補遺3、345~358頁; Hein J., 1990, Unified Approach to Alignment and Phylogenesis, 626~645頁, Methods in Enzymology, 183巻, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. および Sharp, P.M., 1989, CABIOS 5:151~153; Myers, E.W. および Muller W., 1988, CABIOS 4:11~17; Robinson, E.D., 1971, Comb. Theor. 11:105; Santou, N., Nes, M., 1987, Mol. Biol. Evol. 4:406~425; Sneath, P.H.A. および Sokal, R.R., 1973, Numerical Taxonomy the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W.J. および Lipman, D.J., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726~730。

【0189】

好ましくは、「配列同一性のパーセンテージ」は、少なくとも20の位置の比較のウィンドウにわたって2つの最適にアラインメントされた配列を比較することによって求められ、ここで、比較ウィンドウ内のポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の部分は、2つの配列の最適なアラインメントのための参照配列(これは、付加または欠失を含まない)と比較して、20パーセント以下、通常5~15パーセント、または10~12パーセントの付加または欠失(すなわち、ギャップ)を含み得る。パーセンテージは、同一の核酸塩基またはアミノ酸残基が両配列内で起こる位置の数を求めてマッチした位置の数を

10

20

30

40

50

、マッチした位置の数を参照配列（すなわち、ウィンドウサイズ）内の位置の総数で除し、結果に100を乗じて、配列同一性のパーセンテージを得ることによって計算される。

【0190】

バリエーションは、加えて、または代わりに、天然遺伝子またはその部分もしくは相補鎖に実質的に相同である。このようなポリヌクレオチドバリエーションは、自然抗体（または相補配列）をコードする天然に存在するDNA配列に、中程度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができる。

【0191】

適当な「中程度にストリンジェントな条件」は、 $5 \times \text{SSC}$ 、0.5%のSDS、1.0 mMのEDTA（pH 8.0）の溶液中での予洗、50 ~ 65、 $5 \times \text{SSC}$ で一晩のハイブリダイゼーション、その後の0.1%のSDSを含有する $2 \times$ 、0.5 \times 、および0.2 $\times \text{SSC}$ のそれぞれを用いた65で20分間の2回の洗浄を含む。

【0192】

本明細書において、「高度にストリンジェントな条件」または「高ストリンジェンシー条件」は、（1）洗浄のために低イオン強度および高温、例えば、50で、0.015 Mの塩化ナトリウム/0.0015 Mのクエン酸ナトリウム/0.1%のドデシル硫酸ナトリウムを使用し、（2）ハイブリダイゼーションの間に、42で、ホルムアミド、例えば、0.1%のウシ血清アルブミンを含む50%（v/v）のホルムアミド/0.1%のフィコール/0.1%のポリビニルピロリドン/750 mMの塩化ナトリウム、75 mMのクエン酸ナトリウムを含むpH 6.5の50 mMのリン酸ナトリウム緩衝液などの変性剤を使用し、または（3）42で0.2 $\times \text{SSC}$ （塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム）および55で50%のホルムアミド中での洗浄、その後の55でEDTAを含有する0.1 $\times \text{SSC}$ からなる高ストリンジェンシー洗浄を伴った、42で、50%のホルムアミド、 $5 \times \text{SSC}$ （0.75 MのNaCl、0.075 Mのクエン酸ナトリウム）、50 mMのリン酸ナトリウム（pH 6.8）、0.1%のピロリン酸ナトリウム、5 \times デンハルト溶液、超音波処理したサケ精子DNA（50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）、0.1%のSDS、および10%のデキストラン硫酸を使用するものである。当業者は、プローブ長などの要因に対応するために、必要に応じてどのように温度、イオン強度などを調整するかを認識するであろう。

【0193】

遺伝コードの縮退の結果として、本明細書に記載のポリペプチドをコードする多くのヌクレオチド配列が存在することを当業者が理解することになる。これらのポリヌクレオチドのいくつかは、任意の天然遺伝子のヌクレオチド配列と最小の相同性を持つ。それにもかかわらず、コドン使用頻度の差異に起因して変化するポリヌクレオチドは、本発明によって具体的に企図されている。さらに、本明細書に提供するポリヌクレオチド配列を含む遺伝子の対立遺伝子は、本発明の範囲内である。対立遺伝子は、ヌクレオチドの1つまたは複数の突然変異、例えば、欠失、付加、および/または置換などの結果として変更されている内因性遺伝子である。得られるmRNAおよびタンパク質は、変更された構造または機能を有し得るが、その必要はない。対立遺伝子は、標準技法（ハイブリダイゼーション、増幅、および/またはデータベース配列比較など）を使用して同定することができる。

【0194】

本発明のポリヌクレオチドは、化学合成、組換え法、またはPCRを使用して得ることができる。化学的なポリヌクレオチド合成の方法は、当技術分野で周知であり、本明細書で詳細に記載する必要はない。当業者は、所望のDNA配列を生成するために、本明細書に提供する配列、および市販のDNAシンセサイザーを使用することができる。

【0195】

組換え法を使用してポリヌクレオチドを調製するために、本明細書でさらに論じるように、所望の配列を含むポリヌクレオチドを適当なベクター中に挿入することができ、ベクターを次に、複製および増幅のために適当な宿主細胞内に導入することができる。ポリヌ

クレオチドは、当技術分野で公知の任意の手段によって宿主細胞内に挿入することができる。細胞は、直接取込み、エンドサイトーシス、トランスフェクション、F - 接合、または電気穿孔により、外因性ポリヌクレオチドを導入することによって形質転換される。導入された後、外因性ポリヌクレオチドは、非組み込みベクター（プラスミドなど）として細胞内で維持し、または宿主細胞ゲノム中に組み込むことができる。このように増幅されたポリヌクレオチドは、当技術分野で周知の方法によって宿主細胞から単離することができる。例えば、Sambrookら、1989を参照。

【0196】

代わりに、PCRにより、DNA配列の複製が可能になる。PCR技術は、当技術分野で周知であり、米国特許第4,683,195号、同第4,800,159号、同第4,754,065号、および同第4,683,202号、ならびにPCR: The Polymerase Chain Reaction、Mullisら編、Birkhäuser Press、Boston、1994に記載されている。

【0197】

RNAは、適切なベクター中で単離DNAを使用し、適当な宿主細胞内にこれを挿入することによって得ることができる。細胞が複製し、DNAがRNAに転写される場合、次いで、例えば、Sambrookら、1989、上記に示されているように、当業者に周知の方法を使用してRNAを単離することができる。

【0198】

適当なクローニングベクターを標準技法によって構築することができ、または当技術分野で利用可能な多数のクローニングベクターから選択することができる。選択されるクローニングベクターは、使用されるように意図された宿主細胞によって変更することができるが、有用なクローニングベクターは一般に、自己複製する能力を有することになり、特定の制限エンドヌクレアーゼに対する単一標的を有することができ、かつ/またはベクターを含有するクローンの選択に使用することができるマーカー遺伝子を担持することができる。適当な例としては、プラスミドならびに細菌ウイルス、例えば、pUC18、pUC19、Bluescript（例えば、pBS SK+）およびその誘導体、mp18、mp19、pBR322、pMB9、ColE1、pCR1、RP4、ファージDNA、ならびにpSA3およびpAT28などのシャトルベクターがある。これらの、および多くの他のクローニングベクターは、市販供給業者、例えば、BioRad、Stratagene、およびInvitrogenから入手可能である。

【0199】

発現ベクターがさらに提供される。発現ベクターは一般に、本発明によるポリヌクレオチドを含有する複製可能ポリヌクレオチドコンストラクトである。発現ベクターは、エピソームとして、または染色体DNAの一体部分として宿主細胞内で複製可能でなければならないことが暗示されている。適当な発現ベクターとしては、それだけに限らないが、プラスミド、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルスを含めたウイルスベクター、コスミド、およびPCT公開第WO87/04462号に開示された発現ベクター（複数可）がある。ベクターコンポーネントとして一般に、それだけに限らないが、以下、すなわちシグナル配列、複製起点、1つまたは複数のマーカー遺伝子、適当な転写制御エレメント（プロモーター、エンハンサー、およびターミネーターなど）の1つまたは複数を持つことができる。発現（すなわち、翻訳）のために、1つまたは複数の翻訳制御エレメント、例えば、リボソーム結合部位、翻訳開始部位、および終止コドンなども通常必要とされる。

【0200】

対象とするポリヌクレオチドを含有するベクターは、電気穿孔、塩化カルシウム、塩化ルビジウム、リン酸カルシウム、DEAE-デキストラン、または他の物質を使用するトランスフェクション；微粒子銃；リポフェクション；および感染（例えば、この場合、ベクターは、ワクシニアウイルスなどの感染性病原体である）を含めたいくつかの適切な手段のいずれかによって宿主細胞内に導入することができる。ベクターまたはポリヌクレオ

10

20

30

40

50

チドを導入する選択は、宿主細胞の特徴に依存することになることが多い。

【0201】

本発明は、本明細書に記載のポリヌクレオチドのいずれかを含む宿主細胞も提供する。異種DNAを過剰発現することができる任意の宿主細胞を、対象とする抗体、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に使用することができる。哺乳動物宿主細胞の非限定例としては、それだけに限らないが、COS、HeLa、およびCHO細胞がある。PCT公開第WO87/04462号も参照。適当な非哺乳動物宿主細胞としては、原核生物（大腸菌（*E. coli*）または*B. subtilis*）など）、および酵母（*S. cerevisiae*）、*S. pombe*）、または*K. lactis*）など）がある。好ましくは、宿主細胞は、存在する場合、宿主細胞中の対象とする、対応する内因性抗体またはタンパク質のレベルより、約5倍高い、より好ましくは10倍高い、さらにより好ましくは20倍高いレベルでcDNAを発現する。PD-1またはPD-1ドメインへの特異的結合のための宿主細胞のスクリーニングは、イムノアッセイまたはFACSによって行われる。対象とする抗体またはタンパク質を過剰発現する細胞を同定することができる。

10

【0202】

発現ベクターを抗PD-1アンタゴニスト抗体の直接発現に使用することができる。当業者は、*in vivo*で外因性タンパク質の発現を得るための発現ベクターの投与に精通している。例えば、米国特許第6,436,908号、同第6,413,942号、および同第6,376,471号を参照。発現ベクターの投与としては、注入、経口投与、粒子銃もしくはカテーテル挿入投与、および局部投与を含めた局所投与または全身投与がある。別の実施形態では、発現ベクターは、交感神経幹もしくは神経節に、または冠動脈、心房、心室、もしくは心膜内に直接投与される。

20

【0203】

発現ベクターまたはサブゲノムポリヌクレオチドを含有する治療用組成物の標的化送達も使用することができる。受容体媒介DNA送達技法は、例えば、Findelsら、*Trends Biotechnol.*、1993、11:202、Chiouら、*Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer*、J.A.Wolff編、1994、Wuら、*J. Biol. Chem.*、1988、263:621、Wuら、*J. Biol. Chem.*、1994、269:542、Zenkeら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*、1990、87:3655、Wuら、*J. Biol. Chem.*、1991、266:338に記載されている。ポリヌクレオチドを含有する治療用組成物は、遺伝子療法プロトコルの局所投与に関して、約100ng～約200mgのDNAの範囲内で投与される。約500ng～約50mg、約1μg～約2mg、約5μg～約500μg、および約20μg～約100μgのDNAの濃度範囲も、遺伝子療法プロトコルの間に使用することができる。治療用ポリヌクレオチドおよびポリペプチドは、遺伝子送達ビヒクルを使用して送達することができる。遺伝子送達ビヒクルは、ウイルス起源であっても、非ウイルス起源であってもよい（一般に、Jolly、*Cancer Gene Therapy*、1994、1:51、Kimura、*Human Gene Therapy*、1994、5:845、Connelly、*Human Gene Therapy*、1995、1:185、およびKaplit、*Nature Genetics*、1994、6:148を参照）。このようなコード配列の発現は、内因性哺乳動物プロモーターまたは異種プロモーターを使用して誘導され得る。コード配列の発現は、構成的であってもよく、または制御されてもよい。

30

40

【0204】

所望のポリヌクレオチドを送達し、所望の細胞内で発現させるためのウイルス系ベクターは、当技術分野で周知である。例示的なウイルス系ビヒクルとしては、それだけに限らないが、組換えレトロウイルス（例えば、PCT公開第WO90/07936号、同第WO94/03622号、同第WO93/25698号、同第WO93/25234号、同

50

第WO93/11230号、同第WO93/10218号、同第WO91/02805号、米国特許第5,219,740号および同第4,777,127号、英国特許第2,200,651号、ならびに欧州特許第0345242号を参照)、アルファウイルス系ベクター(例えば、シンドビスウイルスベクター、セムリキ森林ウイルス(ATCC VR-67、ATCC VR-1247)、ロスリバーウイルス(ATCC VR-373、ATCC VR-1246)、ならびにベネズエラウマ脳炎ウイルス(ATCC VR-923、ATCC VR-1250、ATCC VR1249、ATCC VR-532))、ならびにアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター(例えば、PCT公開第WO94/12649号、同第WO93/03769号、同第WO93/19191号、同第WO94/28938号、同第WO95/11984号、および同第WO95/00655を参照)がある。Curriel、Hum. Gene Ther.、1992、3:147に記載された死滅アデノウイルスに連結したDNAの投与も使用することができる。

10

【0205】

それだけに限らないが、死滅アデノウイルス単独に連結した、または連結していないポリカチオン凝縮DNA(例えば、Curriel、Hum. Gene Ther.、1992、3:147を参照)、リガンド連結DNA(例えば、Wu、J.、Biol. Chem.、1989、264:16985を参照)、真核細胞送達ビヒクル細胞(例えば、米国特許第5,814,482号、PCT公開第WO95/07994号、同第WO96/17072号、同第WO95/30763号、および同第WO97/42338号を参照)、ならびに核電荷中和または細胞膜との融合を含めた、非ウイルス送達ビヒクルならびに方法も使用することができる。裸のDNAも使用することができる。例示的な裸のDNA導入方法は、PCT公開第WO90/11092号、および米国特許第5,580,859号に記載されている。遺伝子送達ビヒクルとして作用することができるリポソームは、米国特許第5,422,120号、PCT公開第WO95/13796号、同第WO94/23697号、同第WO91/14445号、およびEP0524968に記載されている。追加の手法は、Philip、Mol. Cell Biol.、1994、14:2411、およびWoffendin、Proc. Natl. Acad. Sci.、1994、91:1581に記載されている。

20

【0206】

組成物

30

本発明は、有効量の本明細書に記載の抗PD-1抗体を含む医薬組成物も提供する。このような組成物の例および製剤化方法も、本明細書に記載されている。一部の実施形態では、組成物は、1種または複数のPD-1抗体を含む。他の実施形態では、抗PD-1抗体は、PD-1を認識する。他の実施形態では、抗PD-1抗体は、ヒト抗体である。他の実施形態では、抗PD-1抗体は、ヒト化抗体である。一部の実施形態では、抗PD-1抗体は、所望の免疫応答、例えば、抗体媒介溶解またはADCCなどを誘発することができる定常領域を含む。他の実施形態では、抗PD-1抗体は、望まれない、または望ましくない免疫応答、例えば、抗体媒介溶解またはADCCなどを誘発しない定常領域を含む。他の実施形態では、抗PD-1抗体は、抗体の1つまたは複数のCDR(1、2、3、4、5、または一部の実施形態では、6つすべてのCDRなど)を含む。

40

【0207】

組成物は、1種を超える抗PD-1抗体(例えば、PD-1の異なるエピトープを認識するPD-1抗体の混合物)を含み得ることが理解される。他の例示的な組成物は、同じエピトープ(複数可)を認識する1種を超える抗PD-1抗体、またはPD-1の異なるエピトープに結合する抗PD-1抗体の異なる種を含む。一部の実施形態では、組成物は、PD-1の異なるバリエーションを認識する抗PD-1抗体の混合物を含む。

【0208】

本発明で使用される組成物は、凍結乾燥製剤または水性液剤の形態で、薬学的に許容できる担体、賦形剤、または安定剤(Remington: The Science and practice of Pharmacy 20版、2000、Lippincott)

50

tt Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hoover) をさらに含むことができる。許容できる担体、賦形剤、または安定剤は、投与量および濃度でレシピエントに無毒性であり、緩衝剤、例えば、リン酸塩、クエン酸塩、および他の有機酸など；アスコルビン酸およびメチオニンを含めた抗酸化剤；防腐剤（オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチル、もしくはベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えば、メチルもしくはプロピルパラベンなど；カテコール；レソルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾールなど）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリンなど；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、もしくはリシンなど；グルコース、マンノース、もしくはデキストランを含めた単糖、二糖、および他の炭水化物；EDTAなどのキレート化剤；糖、例えば、スクロース、マンニトール、トレハロース、もしくはソルビトールなど；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；ならびに/または非イオン性界面活性剤、例えば、TWEEN（商標）、PLURONICS（商標）、もしくはポリエチレングリコール（PEG）などを含むことができる。薬学的に許容できる賦形剤は、本明細書でさらに記載されている。

【0209】

抗PD-1抗体およびその組成物はまた、作用物質の有効性を増強および/または補完するように機能を果たす他の作用物質と併せて使用し、または別個に、同時に、もしくは順次投与することができる。

【0210】

本発明は、本発明のポリヌクレオチドのいずれかを含む、医薬組成物を含めた組成物も提供する。一部の実施形態では、組成物は、本明細書に記載の抗体をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含む。他の実施形態では、組成物は、本明細書に記載の抗体のいずれかをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含む。

【0211】

PD-1によって媒介される状態を予防または治療するための方法

本発明の抗体および抗体コンジュゲートは、それだけに限らないが、治療的処置方法および診断的処置方法を含めた、様々な用途で有用である。

【0212】

一態様では、本発明は、がんを治療するための方法を提供する。一部の実施形態では、対象におけるがんを治療する方法は、それを必要とする対象に、本明細書に記載のPD-1抗体のいずれかを含む有効量の組成物（例えば、医薬組成物）を投与するステップを含む。本明細書において、がんとしては、それだけに限らないが、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、絨毛癌、大腸がん、食道がん、胃がん、神経膠芽腫、神経膠腫、脳腫瘍、頭頸部がん、腎がん、肺がん、口腔がん、卵巣がん、膵がん、前立腺がん、肝がん、子宮がん、骨がん、白血病、リンパ腫、肉腫（sarcoma）、血液がん、甲状腺がん、胸腺がん、眼がん、および皮膚がんがある。一部の実施形態では、対象における腫瘍増殖または進行を阻害する方法であって、それを必要とする対象に、本明細書に記載のPD-1抗体またはPD-1抗体コンジュゲートを含む有効量の組成物を投与するステップを含む、方法が提供される。一部の実施形態では、腫瘍は、PD-L1発現腫瘍である。他の実施形態では、腫瘍は、PD-L1を発現しない。他の実施形態では、対象におけるがん細胞の転移を阻害する方法であって、それを必要とする対象に、本明細書に記載のPD-1抗体のいずれかを含む有効量の組成物を投与するステップを含む、方法が提供される。他の実施形態では、対象における腫瘍の退縮を誘導する方法であって、それを必要とする対象に、本明細書に記載のPD-1抗体のいずれかを含む有効量の組成物を投与するステップを含む、方法が提供される。

【0213】

別の態様では、がんを検出、診断、および/または監視する方法が提供される。例えば

、本明細書に記載のPD-1抗体は、造影剤および酵素-基質標識などの検出可能部分で標識することができる。本明細書に記載の抗体は、*in vivo*イメージング（例えば、PETもしくはSPECT）などの*in vivo*診断アッセイ、または染色試薬に使用することもできる。

【0214】

一部の実施形態では、本明細書に記載の方法は、追加の形態の療法で対象を治療するステップをさらに含む。一部の実施形態では、追加の形態の療法は、それだけに限らないが、化学療法、放射線、手術、ホルモン療法、および/または追加の免疫療法を含めた追加の抗がん療法である。

【0215】

本明細書に記載のすべての方法に関して、抗PD-1アンタゴニスト抗体への言及は、1種または複数の追加の作用物質を含む組成物も含む。これらの組成物は、当技術分野で周知である、緩衝剤を含めた薬学的に許容できる賦形剤などの適当な賦形剤をさらに含み得る。本発明は、単独で、または治療の他の方法と組み合わせて使用することができる。

【0216】

抗PD-1アンタゴニスト抗体は、任意の適当な経路を介して対象に投与することができる。本明細書に記載の例は、利用可能な技法を限定するように意図されておらず、例示するものであるように意図されていることが当業者に明らかであるはずである。したがって、一部の実施形態では、抗PD-1アンタゴニスト抗体は、公知の方法、例えば、ボーラスのような静脈内投与、またはある時間にわたる持続注入によるもの、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内、経皮、皮下、関節内、舌下、滑液包内や、ガス注入を介した、クモ膜下、経口、吸入、または局所的の経路によるものなどに合わせて対象に投与される。投与は、全身的、例えば、静脈内投与であっても、局在的であってもよい。ジェット噴霧器および超音波噴霧器を含めた液体製剤用市販噴霧器は、投与に有用である。液体製剤を直接噴霧することができ、凍結乾燥粉末を再構成後に噴霧することができる。代わりに、抗PD-1アンタゴニスト抗体は、フルオロカーボン製剤および定量吸入器を使用してエアロゾル化することができ、凍結乾燥し、粉碎した粉末として吸入することができる。

【0217】

一部の実施形態では、抗PD-1アンタゴニスト抗体は、部位特異的、または標的化局所的送達技法を介して投与される。部位特異的、または標的化局所的送達技法の例としては、抗PD-1アンタゴニスト抗体の様々な移植可能なデポ源、または局所的送達カテーテル、例えば、注入カテーテル、留置カテーテル、もしくはニードルカテーテルなど、合成移植片、外膜ラップ、シャントおよびステントもしくは他の埋め込み型デバイス、部位特異的担体、直接注入、または直接塗布がある。例えば、PCT公開第WO 00/53211号および米国特許第5,981,568号を参照。

【0218】

抗PD-1アンタゴニスト抗体の様々な製剤が投与のために使用され得る。一部の実施形態では、抗PD-1アンタゴニスト抗体は、そのまま投与することができる。一部の実施形態では、抗PD-1アンタゴニスト抗体および薬学的に許容できる賦形剤は、様々な製剤中に存在し得る。薬学的に許容できる賦形剤は、当技術分野で公知であり、薬理的に有効な物質の投与を促進する相対的に不活性な物質である。例えば、賦形剤は、形態もしくは粘稠度を与え、または希釈剤として作用することができる。適当な賦形剤としては、それだけに限らないが、安定化剤、湿潤剤および乳化剤、モル浸透圧濃度を変更するための塩、封入剤、緩衝剤、および皮膚浸透エンハンサーがある。非経口および非腸管外の(nonparenteral)薬物送達用賦形剤および製剤は、Remington、The Science and Practice of Pharmacy、20版 Mack Publishing、2000に示されている。

【0219】

一部の実施形態では、これらの作用物質は、注射（例えば、腹腔内、静脈内、皮下、筋肉内など）による投与のために製剤化される。したがって、これらの作用物質は、薬学的

10

20

30

40

50

に許容できるビヒクル、例えば、生理食塩水、リンガー液、デキストロース溶液などと組み合わせることができる。特定の投薬レジメン、すなわち、用量、タイミング、および繰り返しは、特定の個体およびその個体の医療歴に依存することになる。

【0220】

抗PD-1アンタゴニスト抗体は、注射（例えば、腹腔内、静脈内、皮下、筋肉内など）によってを含めて、任意の適当な方法を使用して投与することができる。抗PD-1抗体は、本明細書に記載するように、局部的に、または吸入を介して投与することもできる。一般に、抗PD-1抗体の投与に関して、最初の候補投与量は、約2 mg/kgであり得る。本発明の目的に関して、一般的な1日投与量は、上述した要因に応じて、約3 µg/kg ~ 約30 µg/kg ~ 約300 µg/kg ~ 約3 mg/kg ~ 約30 mg/kg ~ 約100 mg/kg またはそれ以上のいずれかの範囲となり得る。例えば、約1 mg/kg、約2.5 mg/kg、約5 mg/kg、約10 mg/kg、および約25 mg/kgの投与量を使用することができる。状態に応じて数日間またはそれ以上にわたって投与を繰り返すことに関して、治療は、症状の所望の抑制が起こるまで、または例えば、がんに関連した症状を低減するのに十分な治療レベルが実現されるまで持続される。この療法の進行は、慣例的な技法およびアッセイによって容易に監視される。投薬レジメン（使用される抗PD-1アンタゴニスト抗体を含む）は、経時的に変更することができる。

10

【0221】

本発明の目的に関して、抗PD-1アンタゴニスト抗体の適切な投与量は、使用される抗PD-1アンタゴニスト抗体（またはその組成物）、治療される症状のタイプおよび重症度、作用物質が予防目的または治療目的に投与されるか否か、以前の療法、患者の病歴および作用物質に対する応答、投与される作用物質の患者のクリアランス速度、ならびに主治医の自由裁量に依存する。一般に、臨床医は、抗PD-1アンタゴニスト抗体を、投与量が所望の結果を実現するものに到達するまで投与する。用量および/または頻度は、治療の過程にわたって変更することができる。半減期などの経験的な考慮事項は一般に、投与量の決定に寄与する。例えば、ヒト免疫系と適合した抗体、例えば、ヒト化抗体または完全ヒト抗体などを、抗体の半減期を延ばし、抗体が宿主の免疫系によって攻撃されるのを防止するために使用することができる。投与の頻度は、療法の過程にわたって決定および調整することができ、症状の治療および/または抑制および/または緩和および/または遅延に必ずではないが一般に基づく。代わりに、抗PD-1アンタゴニスト抗体の持続的連続的放出製剤が適切となり得る。徐放を実現するための様々な製剤およびデバイスが当技術分野で公知である。

20

30

【0222】

一実施形態では、アンタゴニスト抗体の投与量は、アンタゴニスト抗体の1つまたは複数の投与を与えられた個体において経験的に決定され得る。個体は、抗PD-1アンタゴニスト抗体の漸増投与量を与えられる。有効性を評価するために、疾患の指標をフォローすることができる。

【0223】

本発明の方法による抗PD-1アンタゴニスト抗体の投与は、例えば、レシピエントの生理的条件、投与の目的が治療的であるか、または予防的であるか、および熟練した開業医に公知の他の要因に応じて、連続的であっても、断続的であってもよい。抗PD-1アンタゴニスト抗体の投与は、予め選択された時間にわたって本質的に連続的であってもよく、または間隔を置いた一連の投薬におけるものであってもよい。

40

【0224】

一部の実施形態では、1種を超える抗PD-1アンタゴニスト抗体が存在する場合がある。少なくとも1種、少なくとも2種、少なくとも3種、少なくとも4種、少なくとも5種の異なる、またはそれ超のアンタゴニスト抗体が存在し得る。一般に、これらの抗PD-1アンタゴニスト抗体は、互いに悪影響しない相補的な活性を有し得る。抗PD-1アンタゴニスト抗体は、他の抗体および/または他の療法と併せて使用することもできる。抗PD-1アンタゴニスト抗体は、作用物質の有効性を増強および/または補完するよう

50

に機能を果たす他の作用物質と併せて使用することもできる。

【 0 2 2 5 】

一部の実施形態では、抗 P D - 1 アンタゴニスト抗体は、1 種または複数の追加の治療剤の投与と組み合わせて投与することができる。これらとしては、それだけに限らないが、化学療法剤、ワクチン、C A R - T 細胞ベース療法、放射線療法、サイトカイン療法、抗 P D - 1 二重特異性抗体、他の免疫抑制経路の阻害剤、血管新生の阻害剤、T 細胞活性化因子、代謝経路の阻害剤、m T O R 阻害剤 (i n h i t o r)、アデノシン経路の阻害剤、それだけに限らないが、インライタ、A L K 阻害剤、およびスニチニブを含めたチロシンキナーゼ阻害剤、B R A F 阻害剤、エピジェネティック調節剤、T r e g 細胞および/または骨髄由来抑制細胞の阻害剤または枯渇薬、J A K 阻害剤、S T A T 阻害剤、サイ

10 クリン依存性キナーゼ阻害剤、生物治療剤 (それだけに限らないが、V E G F、V E G F R、E G F R、H e r 2 / n e u、他の増殖因子受容体、C D 2 0、C D 4 0、C D - 4 0 L、C T L A - 4、O X - 4 0、4 - 1 B B、および I C O S に対する抗体を含む)、免疫原性剤 (例えば、減弱がん性細胞、腫瘍抗原、腫瘍由来抗原または核酸をパルスした樹状細胞などの抗原提示細胞、免疫刺激サイトカイン (例えば、I L - 2、I F N 2、G M - C S F)、およびそれだけに限らないが、G M - C S F などの免疫刺激サイトカインをコードする遺伝子をトランスフェクトした細胞) の投与がある。化学療法剤の例としては、アルキル化剤、例えば、チオテパおよびシクロホスファミド (c y c l o s p h o s p h a m i d e) など; スルホン酸アルキル、例えば、ブスルファン、インプロスルファン、およびピボスルファンなど; アジリジン、例えば、ベンゾドパ、カルボコン、メツ

20 レドパ、およびウレドパなど; アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミド、およびトリメチロールオメラミン (t r i m e t h y l o l o m e l a m i n e) を含めたエチレンイミンおよびメチルアメラミン; アセトゲニン (特にプラタシンおよびプラタシノン); カンプトテシン (合成類似体トポテカンを含む); プリオスタチン; カリスタチン; C C - 1 0 6 5 (そのアドゼレシン、カルゼレシン、およびビゼレシン合成類似体を含む); クリプトフィシン (特にクリプトフィシン 1 およびクリプトフィシン 8); ドラスタチン; デュオカルマイシン (合成類似体、K W - 2 1 8 9、および C B I - T M I を含む); エロイテロピン; パンクラチスタチン; サルコジクチン; スポンギスタチン; ナイトロジェンマスタード、例えば、クロランブシル、クロルナファジン、コロホスファミド、エストラムスチン、イホスファ

30 ミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベンピチン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタードなど; ニトロソ尿素 (n i t r o s u r e a s)、例えば、カルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチンなど; 抗生物質、例えば、エンジイン抗生物質 (例えば、カリケアマイシン、特にカリケアマイシガンマ 1 I およびカリケアマイシンファイ I 1、例えば、A g n e w, C h e m. I n t l. E d. E n g l., 3 3 : 1 8 3 ~ 1 8 6 (1 9 9 4) を参照; ジネマイシン A を含めたジネマイシン; クロドロネートなどのビスホスホネート; エスペラマイシン; ならびにネオカルジノスタチン発色団および関連色素タンパク質エンジイン抗生物質発色団 (c h r o m o m o p h o r e s))、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アントラマイシン (a u t h r a m y c i n)、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン、カミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6 - ジアゾ - 5 - オキソ - L - ノルロイシン、ドキシソルピシン (モルホリノ - ドキシソルピシン、シアノモルホリノ - ドキシソルピシン、2 - ピロリノ - ドキシソルピシン、およびデオキシドキシソルピシンを含む)、P E G 化リボソームドキシソルピシン、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシン C などのマイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、ピューロマイシン、ケラマイシン、ロドルピシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルピシンなど; 抗代謝

40 産物、例えば、メトトレキセートおよび 5 - フルオロウラシル (5 - F U) など; 葉酸類

50

似体、例えば、デノプテリン、メトトレキセート、プテロプテリン、トリメトレキセートなど；プリン類似体、例えば、フルダラビン、6 - メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンなど；ピリミジン類似体、例えば、アンシタピン、アザシチジン、6 - アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン、フロクスウリジンなど；アンドロゲン、例えば、カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトンなど；抗副腎剤（*anti-adrenal*）、例えば、アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンなど；フロリン酸などの葉酸補充剤；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレプリン酸；エニルラシル；アムサクリン；ベストラブシル；ピサントレン；エダトラキセート；デホファミン；デメコルシン；ジアジクォン；エルフォルミチン；エリブチニウム酢酸塩；エポチロン；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシウレア；レンチナン；ロニダミン；マイタンシノイド、例えば、マイタンシンおよびアンサミトシンなど；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダモール；ニトラクリン；ペントスタチン；フェナメト；ピラルピシン；ロソキサントロン；ポドフィリン酸；2 - エチルヒドラジド；プロカルバジン；ラゾキサン；リゾキシン；シゾフィラン（*sizofuran*）；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジコン；2、2'、2'' - トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン（特に T - 2 毒素、ベラクリン A、ロリジン A、およびアングイジン）；ウレタン；ピンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトプロニトール；ミトラクトール；ピボプロマン；ガシトシン；アラビノシド（「*Ar a - C*」）；シクロホスファミド；チオテパ；タキソイド、例えば、パクリタキセルおよびドキセタキセル；クロランブシル；ゲムシタピン；6 - チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキセート；白金類似体、例えば、シスプラチンおよびカルボプラチンなど；ピンブラスチン；白金；エトポシド（VP - 16）；イホスファミド；ミトキサントロン；ピンクリスチン；ピノレルピン；ノバントロン；テニボシド；エダトレキセート；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼローダ；イバンドロネート；CPT - 11；トポイソメラーゼ阻害剤 RFS 2000；ジフルオロメチルオルニチン（DMFO）；レチノイン酸などのレチノイド；カベシタピン；ならびに上記のいずれかの薬学的に許容できる塩、酸、または誘導体がある。例えば、タモキシフェン、ラロキシフェン、ドロロキシフェン、4 - ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、LY 117018、オナプリストン、およびトレミフェン（ファレストン）を含めた抗エストロゲンおよび選択的エストロゲン受容体モジュレーター（SERM）などの腫瘍に対するホルモン作用を制御または阻害するように作用する抗ホルモン剤；副腎におけるエストロゲン生成を制御する酵素アロマターゼを阻害するアロマターゼ阻害剤、例えば、4（5） - イミダゾール、アミノグルテチミド、酢酸メゲストロール、エキセメスタン、フォルメスタン、ファドロゾール、ボロゾール、レトロゾール、およびアナストロゾールなど；ならびに抗アンドロゲン、例えば、フルタミド、ニルタミド、ピカルタミド、ロイプロリド、およびゴセレリンなど；ならびに上記のいずれかの薬学的に許容できる塩、酸、または誘導体も含まれる。

【0226】

一部の実施形態では、抗 PD - 1 アンタゴニスト抗体は、免疫チェックポイントモジュレーターを標的にする 1 種または複数の他の治療剤、例えば、限定することなく、PD - 1、PD - L1、CTLA - 4、LAG - 3、B7 - H3、B7 - H4、B7 - DC（PD - L2）、B7 - H5、B7 - H6、B7 - H8、B7 - H2、B7 - 1、B7 - 2、ICOS、ICOS - L、TIGIT、CD2、CD47、CD80、CD86、CD48、CD58、CD226、CD155、CD112、LAIR1、2B4、BTLA、CD160、TIM1、TIM - 3、TIM4、VISTA（PD - H1）、OX40、OX40L、GITR、GITRL、CD70、CD27、4 - 1BB、4 - BBL、DR3、TL1A、CD40、CD40L、CD30、CD30L、LIGHT、HVEM、SLAM（SLAMF1、CD150）、SLAMF2（CD48）、SLAMF3（CD229）、SLAMF4（2B4、CD244）、SLAMF5（CD84）、SLAMF6（NTB - A）、SLAMCF7（CS1）、SLAMF8（BLAME）、S

10

20

30

40

50

L A M F 9 (C D 2 F)、C D 2 8、C E A C A M 1 (C D 6 6 a)、C E A C A M 3、C E A C A M 4、C E A C A M 5、C E A C A M 6、C E A C A M 7、C E A C A M 8、C E A C A M 1 - 3 A S、C E A C A M 3 C 2、C E A C A M 1 - 1 5、P S G 1 - 1 1、C E A C A M 1 - 4 C 1、C E A C A M 1 - 4 S、C E A C A M 1 - 4 L、I D O、T D O、C C R 2、C D 3 9 - C D 7 3 - アデノシン経路 (A 2 A R)、B T K、T I K、C X C R 2、C C R 4、C C R 8、C C R 5、V E G F 経路、C S F - 1、または自然免疫応答モジュレーターを標的にする作用物質などと併せて使用される。一部の実施形態では、抗 P D - 1 アンタゴニスト抗体は、例えば、抗 P D - L 1 アンタゴニスト抗体、例えば、B M S - 9 3 6 5 5 9 (M D X - 1 1 0 5) および M P D L 3 2 8 0 A など；抗 P D - 1 アンタゴニスト抗体、例えば、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、およびピジリズマブなど；抗 C T L A - 4 アンタゴニスト抗体、例えば、イピリムマブなど；抗 L A G - 3 アンタゴニスト抗体、例えば、B M S - 9 8 6 0 1 6 および I M P 7 0 1 など；抗 T I M - 3 アンタゴニスト抗体；抗 B 7 - H 3 アンタゴニスト抗体、例えば、M G A 2 7 1 など；抗 V I S T A アンタゴニスト抗体；抗 T I G I T アンタゴニスト抗体；抗 C D 2 8 アンタゴニスト抗体；抗 C D 8 0 抗体；抗 C D 8 6 抗体；抗 B 7 - H 4 アンタゴニスト抗体；抗 I C O S アゴニスト抗体；抗 C D 2 8 アゴニスト抗体；自然免疫応答モジュレーター（例えば、T L R、K I R、N K G 2 A）、ならびに I D O 阻害剤と併せて使用される。一部の実施形態では、抗 P D - 1 アンタゴニスト抗体は、4 - 1 B B (C D 1 3 7) アゴニスト、例えば、P F - 0 5 0 8 2 5 6 6 または B M S - 6 6 3 5 1 3 などと併せて使用される。一部の実施形態では、抗 P D - 1 アンタゴニスト抗体は、例えば、抗 O X - 4 0 アゴニスト抗体などの O X 4 0 アゴニストと併せて使用される。一部の実施形態では、抗 P D - 1 アンタゴニスト抗体は、G I T R アゴニスト、例えば、抗 G I T R アゴニスト抗体など、例えば、限定することなく T R X 5 1 8 などと併せて使用される。一部の実施形態では、抗 P D - 1 アンタゴニスト抗体は、I D O 阻害剤と併せて使用される。一部の実施形態では、抗 P D - 1 アンタゴニスト抗体は、サイトカイン療法、例えば、限定することなく、I L - 1 5、C S F - 1、M C S F - 1 などと併せて使用される。

【 0 2 2 7 】

一部の実施形態では、抗 P D - 1 アンタゴニスト抗体は、1 種または複数の他の治療抗体、例えば、限定することなく、C D 1 9、C D 2 2、C D 4 0、C D 5 2、または C C R 4 を標的にする抗体などと併せて使用される。

【 0 2 2 8 】

一部の実施形態では、抗 P D - 1 抗体療法は、数分～数週間の範囲の間隔によって他の作用物質治療に先行し、またはそれに続く場合がある。他の作用物質および/またはタンパク質もしくはポリヌクレオチドが別個に投与される実施形態では、一般に、著しい時間がそれぞれの送達間で経過せず、その結果本発明の作用物質および組成物が依然として対象に有利に組み合わせられた効果を発揮することができることを保証するはずである。このような場合では、両モダリティーを互いに約 1 2 ～ 2 4 時間以内に、より好ましくは互いに約 6 ～ 1 2 時間以内に投与することができることが企図される。いくつかの状況では、投与の時間を大きく延長することが望ましい場合があるが、この場合、数日（2、3、4、5、6、または 7）～数週間（1、2、3、4、5、6、7、または 8）がそれぞれの投与間で経過する。

【 0 2 2 9 】

一部の実施形態では、抗 P D - 1 アンタゴニスト抗体組成物は、クリゾチニブ、パルボシクリブ、ゲムシタピン、シクロホスファミド、フルオロウラシル、フォルフォックス、ホリン酸、オキサリプラチン、アキシチニブ、スニチニブリンゴ酸塩、トファシチニブ、ベバシズマブ、リツキシマブ、およびトラスツズマブ (t r a z t u z u m a b) から選択される第 2 の作用物質を含む。

【 0 2 3 0 】

一部の実施形態では、抗 P D - 1 抗体組成物は、手術、放射線療法、化学療法、標的療法、免疫療法、ホルモン療法、血管新生阻害、および緩和ケアからなる群から選択される

10

20

30

40

50

伝統的な療法をさらに含む治療レジメンと組み合わせられる。

【0231】

がんのワクチンベース免疫療法レジメンにおけるPD-1抗体の使用

一部の特定の実施形態では、本開示は、哺乳動物、特にヒトにおけるがんを治療するためのワクチンの免疫原性または治療効果を増強するための方法であって、ワクチンを受けている哺乳動物に、有効量の本開示によって提供される抗PD-1アンタゴニスト抗体を投与するステップを含む、方法を提供する。一部の他の特定の実施形態では、本開示は、哺乳動物、特にヒトにおけるがんを治療するための方法であって、哺乳動物に、(1)有効量のがんの細胞に対して免疫応答を誘発することができるワクチン、および(2)有効量の本開示によって提供される抗PD-1アンタゴニスト抗体を投与するステップを含む、方法を提供する。哺乳動物における新生物障害を治療する方法、および上記で本明細書に記載の哺乳動物における新生物障害を治療するためのワクチンの免疫原性または治療効果を増強する方法は、「がんのワクチンベース免疫療法レジメン」(または「がんのVBI R」)と総称して呼ばれる。

10

【0232】

がんのVBI Rでは、ワクチンは、任意の形態または製剤、例えば、(i)細胞ベースワクチン、(ii)サブユニットワクチン、(iii)タンパク質ベースワクチン、(iv)ペプチドベースワクチン、または(v)核酸ベースワクチン(DNAベースワクチン、RNAベースワクチン、プラスミドベースワクチン、もしくはウイルスベクターベースワクチンなど)などであり得る。

20

【0233】

本開示によって提供されるがんのVBI Rは、任意のタイプのがんに適用可能であり得る。具体的ながんの例としては、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、神経膠腫、胃がん、消化器がん、腎がん(renal cancer)、卵巣がん、肝がん、結腸直腸がん、子宮内膜がん、腎がん(kidney cancer)、前立腺がん、甲状腺がん、神経芽細胞腫、膵がん、多形性神経膠芽腫、子宮頸がん、膀胱がん、乳がん、および頭頸部がんがある。

【0234】

がんの治療を意図されたワクチンは、典型的には、標的腫瘍の細胞上でまたはその細胞によって発現される特定のTAAに対する免疫応答を誘発することができる抗原(ペプチド、タンパク質、細胞コンポーネント、全細胞、またはペプチドベース抗原をコードする核酸分子の形態での)を含有する。多くのTAAが当技術分野で公知である。公知のTAAの例としては、前立腺がんについてPSA、PSCA、およびPSMA;結腸直腸がんについてCEA、MUC-1、Ep-CAM、5T4、hCG-b、K-ras、およびTERT;卵巣がんについてCEA、Muc-1、p53、メソテリン、サバイピン、およびNY-ESO-1;非小細胞肺癌についてMuc-1、5T4、WT-1、TERT、CEA、EGF-R、およびMAGE-A3;腎細胞癌について5T4;ならびに膵がんについてMuc-1、メソテリン、K-Ras、アネキシンA2、TERT、およびCEAがある。一部の特定の実施形態では、本開示によって提供されるがんのVBI Rにおいて使用されるワクチンは、

30

(1)PSA、PSCA、PSMA、CEA、MUC-1、TERT、メソテリン、EGF-R、またはMAGE-A3から選択されるTAAに対して免疫応答を誘発することができるワクチン;

(2)PSA、PSCA、PSMA、CEA、MUC-1、TERT、メソテリン、EGF-R、またはMAGE-A3から選択されるTAAに由来するペプチド抗原を含有するワクチン;および

(3)PSA、PSCA、PSMA、CEA、MUC-1、TERT、メソテリン、EGF-R、またはMAGE-A3から選択されるTAAに由来するペプチド抗原をコードする核酸分子を含有するワクチン

からなる群から選択される。

40

50

【0235】

さらに他の特定の実施形態では、ワクチンは、P S Aに由来する1種もしくは複数の免疫原性ポリペプチド、P S C Aに由来する1種もしくは複数の免疫原性ポリペプチド、またはP S M Aに由来する1種もしくは複数の免疫原性ポリペプチドをコードする核酸分子を含有する。

【0236】

特定の実施形態では、核酸分子は、

(1) 配列番号42のヒトP S M Aに由来する免疫原性ポリペプチドをコードする核酸分子；

(2) 配列番号42のアミノ酸15～750を含む免疫原性ポリペプチドをコードする核酸分子；

(3) 配列番号43のヌクレオチド配列またはその縮重バリエーションを含む核酸分子；

(4) 配列番号44のヌクレオチド配列またはその縮重バリエーションを含む核酸分子；

(5) 配列番号45のヌクレオチド配列またはその縮重バリエーションを含む核酸分子；

(6) 配列番号46のヌクレオチド配列またはその縮重バリエーションを含む核酸分子；

(7) 配列番号47のヒトP S Aに由来する免疫原性ポリペプチドをコードする核酸分子；

(8) 配列番号47のアミノ酸25～261を含む免疫原性ポリペプチドをコードする核酸分子；

(9) 配列番号48のヒトP S C Aに由来する免疫原性ポリペプチドをコードする核酸分子；

(10) (i) 配列番号42のヒトP S M Aに由来する免疫原性ポリペプチド；(ii) 配列番号47のヒトP S Aに由来する免疫原性ポリペプチド、および(iii) 配列番号48のヒトP S C Aに由来する免疫原性ポリペプチドをコードする核酸分子；ならびに

(11) (i) 配列番号42のアミノ酸15～750を含む免疫原性ポリペプチド、(ii) 配列番号47のアミノ酸25～261を含む免疫原性ポリペプチド、および(iii) 配列番号48の免疫原性ポリペプチドをコードする核酸分子

からなる群から選択される。

【0237】

前立腺関連抗原に由来する1種または複数の免疫原性ポリペプチドをコードする核酸分子は、プラスミドまたはベクターの形態であり得る。このようなプラスミドの例は、配列番号46の核酸コンストラクトである(プラスミド458とも呼ばれる)。ヒトP S M Aに由来する免疫原性ポリペプチドを発現するベクターのヌクレオチド配列は、配列番号44に示されている(ベクターA d C 6 8 Wとも呼ばれる)。ヒトP S M Aに由来する免疫原性ポリペプチド、ヒトP S Aに由来する免疫原性ポリペプチド、およびヒトP S C Aに由来する免疫原性ポリペプチドを発現するベクターのヌクレオチド配列は、配列番号45に示されており、ベクターヒトP S M A(ベクターA d C 6 8 W - 7 3 4)である。ヒトP S M A、P S A、およびP S C Aに由来する様々な免疫原性ポリペプチド、このような免疫原性ポリペプチドをコードする核酸コンストラクト(プラスミドおよびベクターを含む)、ならびに免疫原性ポリペプチドならびにプラスミド458、ならびにベクターA d C 6 8 WおよびA d C 6 8 W - 7 3 4を含めた核酸コンストラクトを調製するための方法は、国際出願公開第W O 2 0 1 3 / 1 6 4 7 5 4号ならびに同第W O 2 0 1 5 / 0 6 3 6 4 7号に開示されており、これらのそれぞれは、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。

【0238】

一態様では、本発明は、P D - 1に特異的に結合する単離アンタゴニスト抗体であって、配列番号3、配列番号4、配列番号5、および配列番号6からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域(V H)のV H相補性決定領域1(C D R 1)、V H C D R 2、およびV H C D R 3を含むV H、ならびに配列番号2、配列番号7、配列番号8、および配列番号9からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域(

V L) の V L C D R 1、V L C D R 2、および V L C D R 3 を含む V L を含む、単離アンタゴニスト抗体を提供する。

【 0 2 3 9 】

本開示で開示される任意の抗 P D - 1 アンタゴニスト抗体を、がんの V B I R において使用することができる。一部の実施形態では、抗 P D - 1 アンタゴニスト抗体は、V H 領域および/または V L 領域を含み、V H 領域は、配列番号 3、4、5、もしくは 6 に示したアミノ酸配列、または C D R 内にない残基中に 1 つもしくはいくつかの保守的アミノ酸置換を有するバリエーションを含み、V L 領域は、配列番号 2、7、8、もしくは 9 に示したアミノ酸配列、または C D R 内にないアミノ酸中に 1 つもしくはいくつかのアミノ酸置換を有するそのバリエーションを含む。一部の実施形態では、抗体は、配列番号 39 に示した配列を含む軽鎖および/または配列番号 29 もしくは 38 に示した配列を含む重鎖を含む。一部の特定の実施形態では、抗体は、A T C C 受託番号 P T A - 1 2 1 1 8 3 を有する発現ベクターによって産生される V H 領域を含む。一部の実施形態では、抗体は、A T C C 受託番号 P T A - 1 2 1 1 8 2 を有する発現ベクターによって産生される V L 領域を含む。

10

【 0 2 4 0 】

本開示によって提供されるがんの V B I R は、1 種または複数の他の免疫モジュレーターをさらに含み得る（本開示によって提供される P D - 1 アンタゴニスト抗体に加えて）。他の免疫モジュレーターは、免疫効果細胞エンハンサー（「I E C エンハンサー」）または免疫抑制細胞阻害剤（「I S C 阻害剤」）であり得る。追加の I E C エンハンサーまたは追加の I S C 阻害剤は、がんの V B I R と組み合わせて単独で使用することができる。追加の I E C エンハンサーおよび追加の I S C 阻害剤は、がんの V B I R と組み合わせて一緒に使用することもできる。

20

【 0 2 4 1 】

I S C 阻害剤のクラスの例としては、プロテインキナーゼ阻害剤、シクロオキシゲナーゼ - 2 (C O X - 2) 阻害剤、ホスホジエステラーゼ 5 型 (P D E 5) 阻害剤、および D N A 架橋剤がある。C O X - 2 阻害剤の例としては、セレコキシブおよびロフェコキシブがある。P D E 5 阻害剤の例としては、アバナフィル、ロデナフィル、ミロデナフィル、シルデナフィル、タダラフィル、バルデナフィル、ウデナフィル、およびザブリナストがある。D N A 架橋剤の例は、シクロホスファミドである。用語「プロテインキナーゼ阻害剤」は、プロテインキナーゼの選択的または非選択的阻害剤として作用する任意の物質を指す。がんの V B I R において使用するのに適した具体的なプロテインキナーゼ阻害剤の例としては、ラパチニブ、A Z D 2 1 7 1、E T 1 8 O C H 3、インジルビン - 3' - オキシム、N S C - 1 5 4 0 2 0、P D 1 6 9 3 1 6、ケルセチン、ロスコビチン、トリシリピン、Z D 1 8 3 9、5 - ヨードツベルシジン、アダホスチン、アロイシン、アルステルパウロン、アミノゲニステイン、A P I - 2、アピゲニン、アルクチゲニン、A R R Y - 3 3 4 5 4 3、アキシチニブ (A G - 0 1 3 7 3 6)、A Y - 2 2 9 8 9、A Z D 2 1 7 1、ビスインドリルマレイミド I X、C C 1 - 7 7 9、ケレリトリン、D M P Q、D R B、エデルホシン、E N M D - 9 8 1 6 9 3、エルブスタチン類似体、エルロチニブ、ファスジル、ゲフィチニブ (Z D 1 8 3 9)、H - 7、H - 8、H - 8 9、H A - 1 0 0、H A - 1 0 0 4、H A - 1 0 7 7、H A - 1 1 0 0、ヒドロキシファスジル、ケンパウロン、K N - 6 2、K Y 1 2 4 2 0、L F M - A 1 3、ルテオリン、L Y 2 9 4 0 0 2、L Y - 2 9 4 0 0 2、マロトキシン、M L - 9、M L N 6 0 8、N S C - 2 2 6 0 8 0、N S C - 2 3 1 6 3 4、N S C - 6 6 4 7 0 4、N S C - 6 8 0 4 1 0、N U 6 1 0 2、オロモウシン、オキシンドール I、P D 1 5 3 0 3 5、P D 9 8 0 5 9、フロリジン、ピセアタンノール、ピクロポドフィリン、P K I、P P 1、P P 2、P T K 7 8 7 / Z K 2 2 2 5 8 4、P T K 7 8 7 / Z K - 2 2 2 5 8 4、プルバラノール A、ラパミューン、ラパマイシン、R o 3 1 - 8 2 2 0、ロットレリン、S B 2 0 2 1 9 0、S B 2 0 3 5 8 0、シロリムス、S L 3 2 7、S P 6 0 0 1 2 5、スタウロスポリン、S T I - 5 7 1、S U 1 4 9 8、S U 4 3 1 2、S U 5 4 1 6、S U 5 4 1 6 (セマキサニブ)、S U 6 6 5 6

30

40

50

、SU6668、syk阻害剤、TBB、TCN、チロホスチンAG1024、チロホスチンAG490、チロホスチンAG825、チロホスチンAG957、U0126、W-7、ワートマニン、Y-27632、ザクティマ(ZD6474)、ZM252868、ゲフィチニブ(イレッサ・RTM.)、スニチニブリンゴ酸塩(SUTENT; SU11248)、エルロチニブ(TARCEVA; OSI-1774)、ラパチニブ(GW572016; GW2016)、カネルチニブ(CI1033)、セマキシニブ(SU5416)、パタラニブ(PTK787/ZK222584)、ソラフェニブ(BAY43-9006)、イマチニブ(グリベック・RTM.; STI571)、ダサチニブ(BMS-354825)、レフルノミド(SU101)、バンデタニブ(ZACTIMA; ZD6474)、およびニロチニブがある。

10

【0242】

一部の特定の実施形態では、チロシンキナーゼ阻害剤は、スニチニブリンゴ酸塩、ソラフェニブトシル酸塩、またはアキシチニブである。スニチニブリンゴ酸塩は、商標名SUTENTの下でPfizer Inc.によって販売されており、N-[2-(ジエチルアミノ)エチル]-5-[(Z)-(5-フルオロ-1,2-ジヒドロ-2-オキソ-3H-インドール-3-イリジン)メチル]-2,4-ジメチル-1H-ピロール-3-カルボキサミドとのブタン二酸、ヒドロキシ-、(2S)-化合物(1:1)として化学的に記述される。この化合物、その合成、および特定の多形は、米国特許第6,573,293号に記載されている。スニチニブリンゴ酸塩は、切除不能な局所進行または転移性疾患を有する患者における消化管間質腫瘍、進行腎細胞癌、および進行性高分化型膵神経内

分泌腫瘍の治療のために米国において承認された。ヒトに対する消化管間質腫瘍(GIST)および進行腎細胞癌(RCC)のためのスニチニブリンゴ酸塩の推奨用量は、50mgであり、治療に4週間、その後の2週間のオフのスケジュール(スケジュール4/2)で1日1回経口服用される。膵神経内分泌腫瘍のためのリンゴ酸スニチニブの推奨用量は、37.5mgであり、1日1回経口服用される。がんのVBIIRでは、スニチニブリンゴ酸塩は、単回用量または複数回用量で経口投与することができる。典型的には、スニチニブリンゴ酸塩は、2、3、4、またはそれ超の連続した毎週用量について送達され、その後、スニチニブリンゴ酸塩が送達されない約1もしくは2週間またはそれ超の「オフ」期間が続く。一実施形態では、用量は、約4週間送達され、2週間のオフを伴う。ヒトに経口投与されるスニチニブリンゴ酸塩の有効量は、典型的には、1日当たり1人当たり40mg未満、例えば、1日当たり1人当たり37.5、31.25、25、18.75、12.5、または6.25mgなどである。一部の実施形態では、スニチニブリンゴ酸塩は、1日当たり1人当たり1~25mgの範囲内で経口投与される。一部の他の実施形態では、スニチニブリンゴ酸塩は、1用量当たり1人当たり6.25、12.5、または18.75mgの範囲内で経口投与される。他の投薬レジメンおよびバリエーションも予見でき、医師のガイダンスによって決定されることになる。

20

30

【0243】

ソラフェニブトシル酸塩は、商標名NEXAVARの下で販売されており、4-(4-{3-[4-クロロ-3-(トリフルオロメチル)フェニル]ウレイド}フェノキシ)-N-メチルピリド-イン-2-カルボキサミドである化学名を有する。これは、原発性腎

がん(進行腎細胞癌)および進行原発性肝がん(肝細胞癌)の治療のために米国で承認されている。推奨一日用量は、400mgであり、1日2回経口服用される。本開示によって提供されるがんのVBIIRでは、経口投与されるソラフェニブトシル酸塩の有効量は、典型的には、1日当たり1人当たり400mg未満である。一部の実施形態では、経口投与されるソラフェニブトシル酸塩の有効量は、1日当たり1人当たり10~300mgの範囲内である。いくつかの他の実施形態では、経口投与されるソラフェニブトシル酸塩の有効量は、1日当たり1人当たり10~200mgの間、例えば、1日当たり1人当たり10、20、60、80、100、120、140、160、180、または200mgなどである。

40

【0244】

50

アキシチニブは、商標名 I N L Y T A の下で販売されており、(N - メチル - 2 - [3 - ((E) - 2 - ピリジン - 2 - イル - ビニル) - 1 H - インダゾール - 6 - イルスルファニル] - ベンズアミドである化学名を有する。これは、1つの先の全身療法の失敗後の進行腎細胞癌の治療のために承認されている。出発用量は、1日2回経口的に5mgである。用量調整は、個体の安全性および耐容性に基づいて行うことができる。本開示によって提供されるがんのV B I Rでは、経口投与されるアキシチニブの有効量は、典型的には1日2回5mg未満である。いくつかの他の実施形態では、経口投与されるアキシチニブの有効量は、1日2回1～5mgの間である。一部の他の実施形態では、経口投与されるアキシチニブの有効量は、1日2回1、2、3、4、または5mgの間である。

【0245】

10

本開示によって提供されるがんのV B I Rにおいて使用され得るI E Cエンハンサーの例としては、T N F Rアゴニスト、C T L A - 4アンタゴニスト、T L Rアゴニスト、他のP D - 1アンタゴニスト(B M S - 936558および抗P D - 1抗体C T - 011など)、プログラム細胞死タンパク質1リガンド1(P D - L 1)アンタゴニスト(B M S - 936559など)、リンパ球活性化遺伝子3(L A G 3)アンタゴニスト、ならびにT細胞免疫グロブリン - およびムチン - ドメイン含有分子 - 3(T I M - 3)アンタゴニストがある。T N F Rアゴニストの例としては、O X 40、4 - 1 B B (B M S - 663513など)、G I T R (T R X 518など)、およびC D 40のアゴニストがある。具体的なC D 40アゴニストの例は、以下で本明細書に詳細に記載されている。

【0246】

20

ある特定の他の実施形態では、追加の免疫モジュレーターは、抗C D 40アゴニスト抗体である。抗体は、ヒト、ヒト化、または部分ヒトキメラ抗C D 40抗体であり得る。具体的な抗C D 40モノクローナル抗体の例としては、G 28 - 5、m A b 89、E A - 5、またはS 2 C 6モノクローナル抗体、およびC P 870893がある。特定の実施形態では、抗C D 40アゴニスト抗体は、C P 870893またはダセツズマブ(S G N - 40)である。

【0247】

C P - 870, 893は、抗腫瘍療法として臨床的に調査されている完全ヒトアゴニストC D 40モノクローナル抗体である。C P 870, 893の構造および調製は、W O 2003040170に開示されており、この中で抗体C P 870, 893は、抗体「21 . 4 . 1」として識別されている。C P - 870, 893の重鎖および軽鎖のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号46および配列番号48に、ならびにW O 2003040170の表7に示されている。臨床試験では、C P 870, 893は、一般に注入1回当たり0 . 05～0 . 25mg / kgの範囲内の用量で静脈内注入によって投与された。本開示によって提供されるがんのV B I Rにおいて、C P - 870, 893は、皮内、皮下、または局部的に投与することができる。レジメンにおいて投与されるC P 870893の有効量は、一般に0 . 2mg / kg未満、典型的には0 . 01mg～0 . 15mg / kgまたは0 . 05～0 . 1mg / kgの範囲内である。

30

【0248】

ダセツズマブ(S G N - 40またはh u S 2 C 6としても公知；C A S番号88 - 486 - 59 - 9)は、緩慢性リンパ腫、びまん性大B細胞リンパ腫、および多発性骨髄腫のための臨床試験において調査されている別の抗C D 40アゴニスト抗体である。本開示によって提供されるがんのV B I Rにおいて、ダセツズマブは、皮内、皮下、または局部的に投与することができる。投与されるダセツズマブの有効量は、一般に16mg / kg未満、典型的には0 . 2mg～14mg / kgまたは0 . 5～8mg / kg、または1～5mg / kgの範囲内である。

40

【0249】

さらに他の実施形態では、追加の免疫モジュレーターは、抗C T L A - 4アンタゴニストである。適当な抗C T L A - 4アンタゴニストの例としては、抗C T L A - 4抗体(ヒト抗C T L A - 4抗体、マウス抗C T L A - 4抗体、哺乳動物抗C T L A - 4抗体、ヒト

50

化抗CTLA-4抗体、モノクローナル抗CTLA-4抗体、ポリクローナル抗CTLA-4抗体、キメラ抗CTLA-4抗体、抗CTLA-4ドメイン抗体など)、および共刺激経路をアゴナイズするCTLA-4の阻害剤がある。一部の実施形態では、CTLA-4阻害剤は、イピリムマブまたはトレメリムマブである。

【0250】

イピリムマブ(YERV0Yとして販売されている; MEX-010、MDX-101としても、またはそのCAS登録番号477202-00-9によっても公知)は、その全体においてかつすべての目的に関して参照により本明細書に組み込まれているPCT公開第WO01/14424号において抗体10DIとして開示されている。イピリムマブを含む医薬組成物の例は、PCT公開第WO2007/67959号において提供されている。イピリムマブは、切除不能または転移性黒色腫の治療のために米国で承認されている。本発明によって提供される方法では、イピリムマブは、皮内または皮下に投与することができる。局所的に投与されるイピリムマブの有効量は、1人当たり5~200mg/用量の範囲内である。一部の実施形態では、イピリムマブの有効量は、1用量当たり1人当たり10~150mg/用量の範囲内である。一部の特定の実施形態では、イピリムマブの有効量は、1人当たり約10、25、50、75、100、125、150、175、または200mg/用量である。

【0251】

トレメリムマブ(CP-675,206としても公知)は、完全ヒトIgG2モノクローナル抗体であり、CAS番号745013-59-6を有する。トレメリムマブは、その全体においてかつすべての目的に関して参照により本明細書に組み込まれている米国特許第6,682,736号において抗体11.2.1として開示されている。本発明によって提供されるがんのVBI Rにおいて、トレメリムマブは、静脈内、皮内、または皮下に投与することができる。皮内または皮下に投与されるトレメリムマブの有効量は、典型的には1人当たり5~200mg/用量の範囲内である。一部の実施形態では、トレメリムマブの有効量は、1用量当たり1人当たり10~150mg/用量の範囲内である。一部の特定の実施形態では、トレメリムマブの有効量は、1人当たり約10、25、50、75、100、125、150、175、または200mg/用量である。

【0252】

さらに他の実施形態では、追加の免疫モジュレーターは、トール様受容体(TLR)アゴニストである。用語「トール様受容体アゴニスト」または「TLRアゴニスト」は、トール様受容体(TLR)のアゴニストとして作用する化合物を指す。これには、TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、およびTLR11、またはこれらの組合せのアゴニストが含まれる。

【0253】

本発明の方法において有用なTLRアゴニストには、低有機分子および大生物学的分子の両方が含まれる。低分子TLRアゴニストの例としては、4-アミノ-アルファ、アルファ,2-トリメチル-1H-イミダゾ[4,5-c]クモリン(qumolin)-1-エタノール、N-(2-{2-[4-アミノ-2-(2-メトキシエチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル]エトキシ-}エチル)-N-メチルモルホリン-4-カルボキサミド、1-(2-アミノ-2-メチルプロピル)-2-(エトキシメチル)-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-4-アルニン(arnine)、N-[4-(4-アミノ-2-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル]メタンスルホンアミド、N-[4-(4-アミノ-2-プロピル-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-1-イル)ブチル]メタンスルホンアミド、およびイミキモドがある。本開示によって提供される方法またはレジメンにおいて特に有用ないくつかのTLRアゴニストは、総説:Folkert Steinhagenら:TLR-based immune adjuvants、Vaccine、29(2011):3341~3355に論じられている。一部の実施形態では、TLRアゴニストは、TLR9アゴニスト、特にCpGオリゴヌクレオチド(またはCpG.ODN)である。CpGオ

10

20

30

40

50

リゴヌクレオチドは、シトシンのピリミジン環がメチル化されていないリン酸結合によって連結されたシトシンその後のグアニンを含有する短い核酸分子である。本開示によって提供される方法において有用な特定のCpGオリゴヌクレオチドの例としては、

5' TCGTTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT3' (CpG 7909; 配列番号 49);

5' TCGTTCGTTTTTCGGTGCTTTT3' (CpG 24555; 配列番号 50); および

5' TCGTTCGTTTTTCGGTCGTTTTT3' (CpG 10103; 配列番号 51) がある。

【0254】

CpG 7909、合成 24mer 一本鎖は、単剤療法として、化学療法剤ならびにがんおよび感染疾患に対するワクチンのアジュバントと組み合わせてがんを治療するために広範に調査されている。本開示によって提供される方法では、CpG 7909 は、筋肉内への注射または任意の他の適当な方法によって投与することができる。DNA ワクチンなどの核酸ベースワクチンとともに使用するために、CpG を単一製剤でワクチンとともに共製剤化し、電気穿孔と一緒にされた筋肉内注射によって投与することができる。筋肉内、皮内、または皮下投与による CpG 7909 の有効量は、典型的には 10 μg / 用量 ~ 10 mg / 用量の範囲内である。一部の実施形態では、CpG 7909 の有効量は、0.05 mg ~ 14 mg / 用量の範囲内である。一部の特定の実施形態では、CpG 7909 の有効量は、約 0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1 mg / 用量である。CpG 24555 および CpG 10103 を含めた他の CpG オリゴヌクレオチドも、同様の様式および用量レベルで投与することができる。

【0255】

がんの VBI R において、抗 PD-1 アンタゴニスト、ワクチン、および追加の免疫モジュレーターは、同時にまたは順次投与することができる。一部の実施形態では、ワクチンは、抗 PD-1 アンタゴニスト抗体に関して順次投与されるが、1 種または複数の追加の免疫モジュレーターに関して同時に（例えば、混合物で）投与される。核酸ワクチンが CpG と組み合わせて投与される場合では、ワクチンおよび CpG を単一製剤中に閉じ込め、任意の適当な方法によって一緒に投与することができる。一部の実施形態では、共製剤（混合物）中の核酸ワクチンおよび CpG は、電気穿孔と組み合わせて筋肉内注射によって投与される。

【0256】

製剤

本発明によって使用される抗 PD-1 アンタゴニスト抗体の治療製剤は、凍結乾燥製剤または水性液剤の形態で、所望の程度の純度を有する抗体を、任意選択の薬学的に許容できる担体、賦形剤、または安定剤 (Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 20 版, Mack Publishing, 2000) と混合することによって、貯蔵用に調製することができる。許容できる担体、賦形剤、または安定剤は、使用される投与量および濃度でレシipient に無毒性であり、緩衝剤、例えば、リン酸塩、クエン酸塩、および他の有機酸など；塩化ナトリウムなどの塩；アスコルビン酸およびメチオニンを含めた抗酸化剤；防腐剤（オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；塩化ヘキサメチウム；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチル、もしくはベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えば、メチルもしくはプロピルパラベンなど；カテコール；レソルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；および m-クレゾールなど）；低分子量（約 10 残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリンなど；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、もしくはリシンなど；グルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含めた単糖、二糖、および他の炭水化物；EDTA などのキレート化剤；糖、例えば、スクロース、マンニトール、トレハロース

10

20

30

40

50

、もしくはソルビトールなど；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；ならびに/または非イオン性界面活性剤、例えば、TWEEN（商標）、PLURONICS（商標）、もしくはポリエチレングリコール（PEG）などを含むことができる。

【0257】

抗PD-1アンタゴニスト抗体を含有するリボソームは、Epsteinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、82:3688(1985)；Hwangら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、77:4030(1980)；ならびに米国特許第4,485,045号、および同第4,544,545号に記載されたものなどの、当技術分野で公知の方法によって調製される。循環時間が増強されたリボソームは、米国特許第5,013,556号に開示されている。特に有用なリボソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール、およびPEG-誘導体化ホスファチジルエタノールアミン（PEG-PE）を含む脂質組成物を用いて、逆相蒸発法によって生成することができる。リボソームは、所望の直径を有するリボソームを生じるように、規定孔サイズのフィルターを通して押し出される。

10

【0258】

活性成分は、コロイド薬物送達システム（例えば、リボソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、およびナノカプセル）内で、またはマクロエマルジョン内で、例えば、コアセルベーション技法によって、または界面重合によって調製されるマイクロカプセル、例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースもしくはゼラチン-マイクロカプセル、およびポリ-（メチルメタクリレート）マイクロカプセル中に封入することもできる。このような技法は、Remington、The Science and Practice of Pharmacy、20版、Mack Publishing(2000)に開示されている。

20

【0259】

徐放配合物を調製することができる。徐放配合物の適当な例には、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが含まれ、これらのマトリックスは、造形品、例えば、フィルムまたはマイクロカプセルの形態にある。徐放マトリックスの例としては、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（2-ヒドロキシエチル-メタクリレート）、またはポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号）、L-グルタミン酸と7エチル-L-グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、例えば、LUPRON DEPOT（商標）（乳酸-グリコール酸コポリマーおよび酢酸ロイプロリドから構成される注射用ミクロスフェア）など、スクロースアセテートイソブチレート、およびポリ-D-（-）-3-ヒドロキシ酪酸がある。

30

【0260】

in vivo投与に使用される製剤は、滅菌されていなければならない。これは、例えば、滅菌濾過膜を通す濾過によって容易に達成される。治療用抗PD-1アンタゴニスト抗体組成物は一般に、滅菌したアクセスポートを有する容器、例えば、皮下注射針で穿孔可能なストッパーを有する静脈注射用溶液バッグまたはバイアル内に入れられる。

40

【0261】

本発明による組成物は、経口、非経口もしくは直腸投与、または吸入もしくはガス注入による投与のための単位剤形、例えば、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、液剤もしくは懸濁剤、または坐剤などであり得る。

【0262】

錠剤などの固体組成物を調製するために、主な活性成分は、薬学的担体、例えば、慣例的な錠剤化成分、例えば、コーンスターチ、ラクトース、スクロース、ソルビトール、タルク、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム、リン酸二カルシウム、またはガムなど、および他の薬学的希釈剤、例えば、水と混合されて、本発明の化合物、または無毒性の薬学的に許容できるその塩の均質な混合物を含有する固体予備製剤組成物が形成される。

50

これらの予備製剤組成物が均質であるという場合、活性成分が組成物全体にわたって均等に分散されており、その結果、組成物が同様に有効な単位剤形、例えば、錠剤、丸剤、およびカプセル剤などに容易にさらに分割され得ることを意味する。次いで、この固体予備製剤組成物は、約 0.1 ~ 約 500 mg の本発明の活性成分を含有する上述したタイプの単位剤形にさらに分割される。新規組成物の錠剤または丸剤は、持続性作用の利点をもたらす剤形を提供するために、被覆または他の方法で調合することができる。例えば、錠剤または丸剤は、内側投与および外側投与コンポーネントを含むことができ、後者は、前者の上の外被の形態である。2つのコンポーネントは、胃内での崩壊に耐える機能を果たし、内側コンポーネントがインタクトで十二指腸内に入り、または放出が遅延されることを可能にする腸溶性層によって分離することができる。様々な材料を、このような腸溶性層または被覆に使用することができ、このような材料には、多数のポリマー酸ならびにシェラック、セチルアルコール、および酢酸セルロースのような材料とのポリマー酸の混合物が含まれる。

10

【0263】

適当な表面活性剤としては、特に、非イオン性剤、例えば、ポリオキシエチレンソルビタン（例えば、Tween（商標）20、40、60、80、または85）、および他のソルビタン（例えば、Span（商標）20、40、60、80、または85）などがある。表面活性剤を含む組成物は、好都合には、0.05 ~ 5%の間の表面活性剤を含むことになり、0.1 ~ 2.5%の間であり得る。必要であれば、他の成分、例えば、マンニトールまたは他の薬学的に許容できるビヒクルを添加することができることが理解されるであろう。

20

【0264】

適当なエマルジョンは、市販の脂肪エマルジョン、例えば、Intralipid（商標）、Liposyn（商標）、Infonutrol（商標）、Lipofundin（商標）、およびLipiphysan（商標）などを使用して調製することができる。活性成分を、予備混合エマルジョン組成物中に溶解させることができ、または代わりに、活性成分を、油（例えば、ダイズ油、サフラワー油、綿実油、ゴマ油、トウモロコシ油、または扁桃油）、ならびにリン脂質（例えば、卵リン脂質、ダイズリン脂質、またはダイズレシチン）および水と混合して形成されたエマルジョン中に溶解させることができる。エマルジョンの張性を調整するために、他の成分、例えば、グリセロールまたはグルコースを添加してもよいことが理解されるであろう。適当なエマルジョンは一般に、最大20%の油、例えば、5 ~ 20%の間の油を含有することになる。脂肪エマルジョンは、0.1 ~ 1.0 μm 、特に0.1 ~ 0.5 μm の間の脂肪滴を含み、5.5 ~ 8.0の範囲内のpHを有することができる。

30

【0265】

エマルジョン組成物は、抗PD-1アンタゴニスト抗体をIntralipid（商標）またはそのコンポーネント（ダイズ油、卵リン脂質、グリセロール、および水）と混合することによって調製されるものであり得る。

【0266】

吸入またはガス注入用組成物は、薬学的に許容できる水性溶媒もしくは有機溶媒、またはこれらの混合物中の溶液および懸濁液、ならびに粉末を含む。液体または固体組成物は、上記に示した適当な薬学的に許容できる賦形剤を含有し得る。一部の実施形態では、組成物は、局所的または全身的効果のために、経口呼吸経路または鼻呼吸経路によって投与される。好ましくは滅菌した薬学的に許容できる溶媒中の組成物は、ガスを使用して霧状化することができる。霧状化溶液は、噴霧器から直接吸い込むことができ、または噴霧器をフェイスマスク、テント、もしくは間欠的陽圧呼吸機に取り付けてもよい。溶液、懸濁液、または粉末組成物は、適切な様式で製剤を送達するデバイスから、好ましくは経口的または経鼻的に投与することができる。

40

【0267】

キット

50

本発明は、本明細書に記載の抗体のいずれかまたはすべてを含むキットも提供する。本発明のキットは、本明細書に記載の抗PD-1アンタゴニスト抗体を含む1つまたは複数の容器、および本明細書に記載の本発明の方法のいずれかに従って使用するための指示書を含む。一般に、これらの指示書は、上述した治療的処置のための抗PD-1アンタゴニスト抗体の投与の記述を含む。一部の実施形態では、キットは、単回用量投与ユニットを生成するために提供される。ある特定の実施形態では、キットは、乾燥タンパク質を有する第1の容器および水性製剤を有する第2の容器の両方を含有し得る。ある特定の実施形態では、シングルおよびマルチチャンバー型プレフィルドシリンジ（例えば、液体シリンジおよびリオシリンジ）を含有するキットが含まれる。

【0268】

一部の実施形態では、抗体は、ヒト抗体である。一部の実施形態では、抗体は、ヒト化抗体である。一部の実施形態では、抗体は、モノクローナル抗体である。抗PD-1抗体の使用に関する指示書は、一般に、意図された治療のための投与量、投薬スケジュール、および投与経路に関する情報を含む。容器は、単位用量、バルクパッケージ（例えば、マルチドーズパッケージ）、またはサブユニット用量のものであり得る。本発明のキット内に供給される指示書は、一般に、ラベルまたは添付文書（例えば、キット内に含まれる紙シート）での書面による指示書であるが、機械可読な指示書（例えば、磁気または光記憶ディスクで携帯される指示書）も許容できる。

【0269】

本発明のキットは、適当な包装内にある。適当な包装としては、それだけに限らないが、バイアル、ボトル、広口瓶、フレキシブル包装（例えば、密封されたマイラーバッグまたはビニール袋）などがある。特定のデバイス、例えば、吸入器、経鼻投与デバイス（例えば、アトマイザ）、またはミニポンプなどの注入デバイスなどと組み合わせて使用するためのパッケージも企図されている。キットは、滅菌したアクセスポートを有することができる（例えば、容器は皮下注射針で穿孔可能なストッパーを有する静脈注射用溶液バッグまたはバイアルであり得る）。容器も、滅菌したアクセスポートを有することができる（例えば、容器は皮下注射針で穿孔可能なストッパーを有する静脈注射用溶液バッグまたはバイアルであり得る）。組成物中の少なくとも1種の活性剤は、抗PD-1抗体である。容器は、第2医薬活性剤をさらに含むことができる。

【0270】

キットは、追加のコンポーネント、例えば、緩衝液および解釈情報などを任意選択により提供することができる。通常、キットは、容器、および容器上の、またはこれに付随したラベルまたは添付文書（複数可）を含む。

【0271】

生物学的寄託

本発明の代表的な材料は、2014年4月29日にアメリカンタイプカルチャーコレクション、10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209、USAに寄託した。ATCC受託番号PTA-121182を有するベクターmsb7-LCは、mAb7軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドであり、ATCC受託番号PTA-121183を有するベクターmab7-HCは、mAb7重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドである。寄託は、特許手続上の微生物の寄託の国際承認に関するブダペスト条約およびその下の規定（ブダペスト条約）の条項下で行った。これにより、寄託日から30年間、寄託物の生存培養が保証される。寄託物は、ブダペスト条約の条項、ならびにPfizer, Inc.とATCCとの契約の対象であって、関係する米国特許の発行の後、または米国もしくは外国特許出願の公共への公開の後のいずれか早い方に、公共に寄託物の培養の子孫の永続的および非制限的利用可能性を保証し、米国特許法第122条およびこれに準じた長官規則（886OG638を特に参照して連邦規則法典第37巻第1.14条を含む）によって、米国特許商標庁長官が権利を有すると決定したものへの子孫の利用可能性を保証する、契約の対象の下でATCCによって利用可能にされることになる。

10

20

30

40

50

【0272】

本願の代理人は、寄託した材料の培養物が、適当な条件下で培養されたとき、死滅し、または失われ、もしくは破壊された場合、通知された後、材料を別の同じものに即座に置き換えることに同意している。寄託した材料の利用可能性は、任意の政府の権限下でその特許法に従って付与された権利に違反した本発明の実施のライセンスと解釈されるべきでない。

【0273】

以下の実施例は、例示的な目的だけのために提供されており、本発明の範囲を決して限定するように意図されていない。実際に、本明細書に示し、記載したものに加えて、本発明の様々な修正形態が、前述の説明から当業者に明らかとなり、添付の特許請求の範囲内に入る。

【実施例】

【0274】

(実施例1)

IFN- およびTNF分泌に対する抗PD-1抗体の効果

本実施例は、混合リンパ球反応(MLR)アッセイにおけるIFN- およびTNF分泌に対する抗PD-1抗体の効果を例示する。

【0275】

全血(スタンフォード大学血液銀行)から単離した初代ヒトT細胞を、CD14+骨髄細胞に由来するIL-4およびGM-CSFを使用して以前に分化された高レベルのPD-L1およびPD-L2を発現する同種樹状細胞(DC)によって活性化した。本試験では、以下の抗体を使用した:アイソタイプ対照(IgG4 ヒンジ安定化)、抗PD-1 アンタゴニスト抗体C1、抗PD-1 アンタゴニスト抗体C2、抗PD-1 アンタゴニスト抗体C3、EH12.1(BD Biosciencesマウス抗ヒト抗PD-1抗体、マウスアイソタイプIgG1)、mAb7-G4、mAb15-G4、mAb-AAA、mAb15-AAA(G4=IgG4ヒンジ安定化;AAA=Fc Rに結合しない突然変異体IgG1)。抗体を以下の濃度:0、0.1、1、または10 µg/mlで試験した。

【0276】

MLRアッセイに関して、培養物を、1:10のDC:T細胞の比で、三つ組みで96ウェルプレート中で試験または対照抗体とともにインキュベートし、加湿したインキュベーター内で、37 °Cで5%のCO₂とともにインキュベートした。上清を5日目に回収し、以下のヒト分析物に対して製造者のプロトコールに従ってヒト可溶性タンパク質Flex Setシステムキット(BD Biosciences、カタログ番号558265)を使用して、細胞数測定ビーズアレイ(CBA)を使用してサイトカインを測定した:IFN- (BD Biosciences、カタログ番号558269)、TNF (BD Biosciences、カタログ番号558273)。簡単に言えば、96ウェルフィルタープレート(Millipore、カタログ番号MSBVN1250)を洗浄緩衝液(BD Biosciences独自の配合)で洗浄し、真空マニホールドによって吸引した。キットによって提供された標準物質および試料をアッセイ希釈剤(BD Biosciences独自の配合)中に希釈し、捕捉ビーズ(別個の蛍光で被覆された特定の可溶性タンパク質に対する抗体で被覆されたビーズである)を有するプレートに添加した。プレートを、プレートシェーカーを使用して500 rpmで5分間混合し、室温で1時間インキュベートした。検出試薬(フィコエリトリン(PE)コンジュゲート抗体、kによって提供された)をプレートに添加し、プレートを5分間混合した。プレートを室温で2時間インキュベートした。次いで緩衝液で5分間洗浄した。試料をBD Fortessaプラットフォーム上で得た。データを、FCAPアレイv3(BD)を使用して分析した。MLRアッセイの結果を以下の表6AおよびBに示す。表6Aは、IFN- レベル(pg/mlでの)を示し、表6Bは、TNFレベル(pg/mlでの)を示す。データは、生物学的な三つ組の平均±S.E.Mとして提示されている。試料は、1つのMLR実

10

20

30

40

50

験の代表である。

【 0 2 7 7 】

【 表 6 】

表6A:IFN γ 分泌

抗体	IFN γ レベル(pg/ml)							
	抗体濃度(μ g/ml)							
	0		0.1		1		10	
	平均	SE	平均	SE	平均	SE	平均	SE
アイソタイプ対照	1190.598	173.4735	3760	367.4262	3693.972	1033.879	3525.655	744.676
EH12.1	1190.598	173.4735	3443.495	749.905	6196.637	576.9022	7111.465	2619.065
mAb15-G4	1190.598	173.4735	4728.295	2.035	8893.595	365.125	7790.95	1700.012
mAb7-G4	1190.598	173.4735	8567.203	2085.826	11876.86	1259.788	11794.82	1827.243
mAb7-AAA	1190.598	173.4735	10978.78	1006.925	10177.68	1907.027	9048.097	2022.583
mAb15-AAA	1190.598	173.4735	9068.905	1332.045	7083.987	2109.455	8644.313	1797.077
C1	1190.598	173.4735	5891.74	583.57	6992.53	338.89	7523.7	1907.073
C2	1190.598	173.4735	3433.687	52.36606	8121.305	195.315	4295.95	3124.257
C3	1190.598	173.4735	9698.06	529.47	11650.97	143.025	8282.573	2332.477

【 0 2 7 8 】

【 表 7 】

表6B:TNF分泌

抗体	TNF レベル(pg/ml)							
	抗体濃度(μ g/ml)							
	0		0.1		1		10	
	平均	SE	平均	SE	平均	SE	平均	SE
アイソタイプ対照	371.3233	17.01197	407.4133	49.58195	486.7167	14.42418	501.17	5.033334
EH12.1	371.3233	17.01197	571.1233	60.43963	667.0033	35.72991	799.3033	7.836955
mAb15-G4	371.3233	17.01197	743.1167	56.75547	686.32	45.63348	798.8533	9.143657
mAb7-G4	371.3233	17.01197	730.47	33.35488	793.05	21.19019	930.6233	16.04937
mAb7-AAA	371.3233	17.01197	795.1133	58.01784	773.32	32.32587	798.68	17.37746
mAb15-AAA	371.3233	17.01197	803.87	34.20712	869.4867	43.04225	731.33	37.8211
C1	371.3233	17.01197	641.5533	58.65366	809.1767	55.78437	656.6467	36.03128
C2	371.3233	17.01197	724.9133	35.53936	769.6367	22.06726	772.5367	49.44021
C3	371.3233	17.01197	692.1067	39.12236	642.25	21.44117	744.0067	49.58307

【 0 2 7 9 】

活性化T細胞を抗PD-1アンタゴニスト抗体で処置すると、アイソタイプ対照と比較してIFN γ レベルが増大した(表6A)。例えば、0.1 μ g/mlのmAb15-G4およびmAb7-G4で処置すると、それぞれ4728.295 \pm 2.035 pg/mlおよび8567.203 \pm 2085.826 pg/mlのIFN γ レベルがもたらされた。1 μ g/mlのmAb15-G4およびmAb7-G4で処置すると、それぞれ8893.595 \pm 365.125 pg/mlおよび11876.86 \pm 1259.788 pg/mlのIFN γ レベルがもたらされた。10 μ g/mlのmAb15-G4およびmAb7-G4で処置すると、それぞれ7790.95 \pm 1700.012 pg/mlおよび11794.82 \pm 1827.243 pg/mlのIFN γ レベルがもたらされた。対照的に、0.1、1、または10 μ g/mlのアイソタイプ対照で処置すると、それぞれ3760 \pm 367.4262 pg/ml、3693.972 \pm 1033.879 pg/ml、および3525.655 \pm 744.676 pg/mlのIFN γ レベルがもたらされた。

10

【 0 2 8 0 】

活性化T細胞を抗PD-1アンタゴニスト抗体で処置すると、アイソタイプ対照と比較してTNFレベルが増大した(表6B)。例えば、0.1 μ g/mlのmAb15-G4またはmAb7-G4で処置すると、それぞれ743.1167 \pm 56.75547 pg/mlおよび730.47 \pm 33.35488 pg/mlのTNFレベルがもたらされた。1 μ g/mlのmAb15-G4およびmAb7-G4で処置すると、それぞれ686.32 \pm 45.63348 pg/mlおよび793.05 \pm 21.19019 pg/mlのTNFレベルがもたらされた。10 μ g/mlのmAb15-G4またはmAb7-G4で処置すると、それぞれ798.853 \pm 9.14366 pg/mlおよび930.623 \pm 16.0494 pg/mlのTNFレベルがもたらされた。対照的に、0.1、1、または10 μ g/mlのアイソタイプ対照で処置すると、それぞれ407.4133 \pm 49.58195 pg/ml、486.7167 \pm 4.4241 pg/ml、および501.17 \pm 5.033334 pg/mlのTNFレベルがもたらされた。

20

【 0 2 8 1 】

これらの結果は、抗PD-1抗体mAb7およびmAb15が、抗PD-1抗体C1、C2、およびC3と少なくとも同様に、またはこれらより良好にT細胞からのIFN γ およびTNF分泌を刺激することを実証する。

30

【 0 2 8 2 】

第2のMLR試験を行って、T細胞活性化に対するより低い抗体濃度の効果を試験した。全血から単離した初代ヒトT細胞を上述の通り活性化した。以下の抗体：mAb7(G4)、mAb15(G4)、C1(G4)、EH12.1、およびG4アイソタイプ対照を第2の試験で試験した。以下の濃度：0.0001、0.001、0.01、0.1、1、および10 μ g/mlで抗体を試験した。MLRアッセイを上述の通り行った。結果を以下の表7Aおよび7Bに要約する。

【 0 2 8 3 】

【表 8】

表7A:IFN γ 分泌

抗体	IFN γ レベル(pg/ml)					
	抗体濃度(μ g/ml)					
	0.0001	0.001	0.01	0.1	1	10
アイソ タイプ 対照	558.9629 + 489.4828	753.3767 + 291.6092	1074.37 + 324.2031	1667.96 + 144.7286	1867.96 + 282.7461	2501.293 + 220.1829
EH12.1	1703.907 + 417.5669	2284.153 + 408.1215	4384.477 + 396.1451	4726.87 + 1201.688	9914.05 + 1188.064	15110.19 + 1864.176
C1	1774.38 + 290.6059	2804.017 + 598.5177	4148.123 + 194.2466	6883.113 + 1480.168	9598.413 + 617.4762	10283.24 + 1008.533
mAb7 (G4)	2082.07 + 720.9931	3062.09+ 370.2791	5067.823 + 111.4903	7082.667 + 1336.082	11928.81 + 1457.723	11862.13 + 800.586
mAb15 (G4)	1678.27 + 233.82	1410.758 + 439.9474	4734.49 + 322.2087	5416 + 1054.075	9140.337 + 1320.499	10992.13 + 1008.533

10

20

【 0 2 8 4 】

【表 9】

表7B:TNF分泌

抗体	TNF レベル(pg/ml)					
	抗体濃度(μ g/ml)					
	0.0001	0.001	0.01	0.1	1	10
アイソ タイプ 対照	452.7133 + 62.85	282.9287 + 56.77266	310.9144 + 21.7811	358.948 + 81.09122	338.1107 + 46.88385	331.008 + 31.35559
EH12.1	752.87 + 32.81303	687.3733 + 29.09567	859.0367 + 89.3586	744.98 + 131.3658	978.7567 + 227.9979	1950.73 + 155.2098
C1	446.98 + 26.89211	444.7867 + 59.03216	465.0933 + 65.75044	1045.45 + 146.9018	997.6067 + 79.17846	895.7267 + 60.92022
mAb7 (G4)	227.6 + 50.63436	394.4233 + 30.47005	452.65 + 30.64335	1089.377 + 174.7824	1583.52 + 267.2131	1419.88 + 108.711
mAb15 (G4)	494.7967 + 48.18105	489.2333 + 30.63302	593.34 + 65.87622	811.16 + 89.50238	1143.54 + 136.3954	1109.063 + 57.70232

30

40

【 0 2 8 5 】

活性化T細胞を抗PD-1アンタゴニスト抗体で処置すると、アイソタイプ対照と比較してIFN γ レベルが増大した(表7A)。抗体を含まない培養物では、IFN γ レベルは、 901.453 ± 216.472 pg/mlであった。0.0001、0.001、0.01、0.1、1、または10 μ g/mlのアイソタイプ対照抗体を与えた培養物では、IFN γ レベルは、それぞれ 558.9629 ± 489.4828 pg/ml、 753.3767 ± 291.6092 pg/ml、 1074.37 ± 324.2031 pg/ml、 1667.96 ± 144.7286 pg/ml、 1867.96 ± 282.7461 pg/ml、 2501.293 ± 220.1829 pg/mlであった。対照的に、0

50

、0.0001、0.0001、0.01、0.1、1、または10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のmAb7 (G4) で処置した培養物では、IFN レベルは、それぞれ2082.07 \pm 720.99 31 pg/ml、3062.09 \pm 370.2791 pg/ml、5067.823 \pm 111.4903 pg/ml、7082.667 \pm 1336.082 pg/ml、11928.81 \pm 1457.723 pg/ml、11862.13 \pm 800.586 pg/ml であった。0.0001、0.0001、0.01、0.1、1、または10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のmAb15 (G4) で処置した培養物では、IFN レベルは、それぞれ1678.27 \pm 233.82 pg/ml、1410.758 \pm 439.9474 pg/ml、4734.49 \pm 322.2087 pg/ml、5416 \pm 1054.075 pg/ml、9140.337 \pm 1320.499 pg/ml、および10992.13 \pm 1008.533 pg/ml であった。

10

【0286】

活性化T細胞を抗PD-1アンタゴニスト抗体で処置すると、アイソタイプ対照と比較してTNFレベルが増大した(表7B)。抗体を含まない培養物では、TNFレベルは、365.523 \pm 84.6607 pg/ml であった。0.0001、0.0001、0.01、0.1、1、または10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のアイソタイプ対照抗体で処置した培養物では、TNFレベルは、それぞれ452.7133 \pm 62.85 pg/ml、282.9287 \pm 56.77266 pg/ml、310.9144 \pm 21.7811 pg/ml、358.948 \pm 81.09122 pg/ml、338.1107 \pm 46.88385 pg/ml、および331.008 \pm 31.35559 pg/ml であった。対照的に、0.0001、0.0001、0.01、0.1、1、または10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のmAb7 (G4) で処置した培養物では、TNFレベルは、それぞれ227.6 \pm 50.63436 pg/ml、394.4233 \pm 30.47005 pg/ml、452.65 \pm 30.64335 pg/ml、1089.377 \pm 174.7824 pg/ml、1583.52 \pm 267.2131 pg/ml、および1419.88 \pm 108.711 pg/ml であった。0.0001、0.0001、0.01、0.1、1、または10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のmAb15 (G4) を与えた培養物では、TNFレベルは、それぞれ494.7967 \pm 48.1810 pg/ml、489.2333 \pm 30.63302 pg/ml、593.34 \pm 65.87622 pg/ml、811.16 \pm 89.50238 pg/ml、1143.54 \pm 136.3954 pg/ml、および1109.063 \pm 57.70232 pg/ml であった。

20

30

【0287】

これらの結果は、抗PD-1抗体mAb7およびmAb15が、PD-1シグナル伝達を遮断し、初代ヒトT細胞からのIFN およびTNF分泌を促進することを実証する。

【0288】

(実施例2)

T細胞増殖に対する抗PD-1抗体の効果

本実施例は、T細胞増殖に対する抗PD-1抗体の効果为例示する。

【0289】

本試験では、T細胞増殖をMLRアッセイで測定し、このアッセイでは、T細胞を抗PD-1アンタゴニストまたはアイソタイプ対照抗体の存在下で培養した。

40

【0290】

MLRに関して、全血(スタンフォード大学血液銀行から得た)から単離した初代ヒトT細胞を、CD14+骨髄細胞に由来するIL-4およびGM-CSFを使用して以前に分化された高レベルのPD-L1およびPD-L2を発現する同種樹状細胞(DC)によって活性化した。2つの実験を行った。

【0291】

第1の実験では、mAb7(IgG4 ヒンジ安定化)、mAb15(IgG4 ヒンジ安定化)、C1、EH12.1、およびアイソタイプ対照を比較した。第2の実験では、クローンmAb7、mAb15、C2、EH12.1、およびアイソタイプ対照を比較

50

した。両実験において、抗体を以下の濃度：0、0.0001；0.001；0.01；0.1；1、および10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で添加した。

【0292】

両実験に関して、培養物を、1：10のDC：T細胞の比で、三つ組みで、96ウェルプレート中で抗体とともにインキュベートし、加湿したインキュベーター内で、37℃で5%のCO₂とともにインキュベートした。5日目に、培養物を1ウェル当たり1 μCi の[³H]-チミジンで18時間パルスした後、回収した。次いでプレートを、ハーベスター96 (Tomtec Life Sciences) を使用してDNA特異的濾紙 (DNA specific filter paper) (Perkin Elmer) 上に回収した。放射標識フィルターをベータシンチレーション液 (Perkin Elmer) で覆い、Microbeta (登録商標) カウンタープレート (Perkin Elmer) で読み取った。チミジン取り込みを1分当たりのカウント (CPM) として分析した。結果を三つ組の平均 \pm SEMとして示す。

【0293】

【表10】

表8A

抗体濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	チミジン取り込み(CPM)				
	アイソタイプ ブ対照	EH12.1	mAb7	mAb15	C1
0	183419.3 \pm 4049.932	183419.3 \pm 4049.932	183419.3 \pm 4049.932	183419.3 \pm 4049.932	183419.3 \pm 4049.932
0.0001	205190 \pm 7769.199	227412.3 \pm 7769.199	226145 \pm 9610.045	217278.7 \pm 24472.76	211881.3 \pm 10119.4
0.001	197943 \pm 13904.69	218722 \pm 13904.69	235367.3 \pm 15199.75	193192 \pm 11885.7	212198.3 \pm 36451.79
0.01	175973.3 \pm 10177.52	253913.3 \pm 10177.52	265654.3 \pm 12087.89	219167.3 \pm 8928.691	232600 \pm 26403.78
0.1	192495.3 \pm 16825.35	248270.7 \pm 16825.35	264057.7 \pm 10339.94	257924 \pm 3376.669	278997.3 \pm 18441.4
1	210104.7 \pm 11484.23	210104.7 \pm 11484.23	298696.7 \pm 6164.177	276531 \pm 3855.779	276141.3 \pm 18516.97
10	206281.7 \pm 16001.33	294602.7 \pm 16001.33	301293 \pm 6313.417	286260.7 \pm 11483.22	264223.7 \pm 9809.792

【0294】

【表 1 1】

表8B

抗体濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	チミジン取り込み(CPM)				
	アイソタイプ 対照	EH12.1	mAb7	mAb15	C2
0	229959 \pm 5794.112	229959 \pm 27771.7	229959 \pm 27771.7	229959 \pm 5794.112	229959 \pm 27771.7
0.0001	299107 \pm 3193	258428.3 \pm 36794.25	280415.3 \pm 14101.94	241112.7 \pm 40486.56	258069.7 \pm 23962.19
0.001	277197 \pm 17518	272289 \pm 29320.04	260183 \pm 24634.25	233184 \pm 28899.06	267117.7 \pm 16388.83
0.01	278072.3 \pm 32671.62	324891.3 \pm 3396.229	365625.3 \pm 30171.07	317377 \pm 31915.29	381936.3 \pm 31901.57
0.1	268939.7 \pm 12332.06	342131.3 \pm 19839.88	380054.3 \pm 9774.328	360226.3 \pm 1802.69	381110.7 \pm 16996.97
1	241164 \pm 13776.81	388757.7 \pm 15684.37	392256.7 \pm 15341.19	421229 \pm 27865.13	401219 \pm 1816.754
10	231897.7 \pm 25865.95	408098 \pm 20237.34	372889.7 \pm 14826.49	323441.3 \pm 64476.55	391925.3 \pm 46054.82

【0295】

活性化T細胞を0.01 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度の抗PD-1アンタゴニスト抗体で処置すると、アイソタイプ対照と比較してT細胞増殖が有意に増大した(表8Aおよび8B)。

【0296】

例えば、0.01、0.1、1、または10 $\mu\text{g/ml}$ のmAb7で処置すると、それぞれ365625.3 \pm 30171.07 CPM、380054.3 \pm 9774.328 CPM、392256.7 \pm 15341.19 CPM、および372889.7 \pm 14826.49 CPMのチミジン取り込み率がもたらされた(表8B)。0.01、0.1、1、または10 $\mu\text{g/ml}$ のmAb15-G4およびmAb7で処置すると、それぞれ317377 \pm 31915.29 CPM、360226.3 \pm 1802.69 CPM、421229 \pm 27865.13 CPM、および323441.3 \pm 64476.55 CPMのチミジン取り込み率がもたらされた(表8B)。対照的に、0.01、0.1、1、または10 $\mu\text{g/ml}$ のアイソタイプ対照で処置すると、それぞれ278072.3 \pm 32671.62 CPM、268939.7 \pm 12332.06 CPM、241164 \pm 13776.81 CPM、および231897.7 \pm 25865.95 CPMのチミジン取り込み率がもたらされた(表8B)。

【0297】

これらの結果は、抗PD-1抗体mAb7およびmAb15が、PD-1シグナル伝達を遮断し、初代ヒトT細胞の増殖を促進することを実証する。

【0298】

(実施例3)

GvHDのマウスモデルにおける抗PD-1抗体の効果

本実施例は、移植片対宿主疾患(GvHD)のマウスモデルにおけるT細胞増殖および体重減少に対する抗PD-1抗体の効果为例示する。

【0299】

NOD-scid-IL-2受容体鎖ヌル(NSG)マウスを本試験で使用して、in vivoでT細胞増殖に対する抗PD-1アンタゴニスト抗体の効果を試験した。NSGマウスは、T細胞およびB細胞を欠き、損なわれたNK細胞を有するので、ヒト細胞の高い生着が容易に実現される。ヒトPBMCがこれらのマウス中に生着されるとき、ヒ

トT細胞増殖が起こり、GvHDを誘導する。GvHDは、宿主およびヒト細胞の骨髓区画を伴う。ヒトリンパ球の大量増殖が早期に血液中で見ることができ、その後マウス臓器、例えば、肝臓、脾臓、腎臓、腸などへのこれらの細胞の高い浸潤が続き、マウスの体重減少、ならびに皮膚病変、丸まった背中、および死をもたらす。モデルの重症度は、ドナーPBMCに依存し、ドナー間で異なり得る。

【0300】

本試験では、以下の抗PD-1アンタゴニスト抗体：mAb7（ヒトIgG4ヒンジ安定化、またはAAA）、mAb15（ヒトIgG4ヒンジ安定化）、C1、C2、およびC3を使用した。陰性対照に関して、アイソタイプ対照ヒトIgG4ヒンジ安定化抗体を使用した。初代ヒトPBMCを、フィコール勾配を使用して全血（スタンフォード大学血液銀行）から単離した。10⁷個のヒトPBMCをNSGマウス（生後8週の雌、Jackson Laboratories）に注射した。0日目に、マウスを体重に基づいてランダム化し、PBMCを静脈内に注射した。実験1～4に関して、2日目および8日目に、抗体を10mg/kgで腹腔内に投与した。実験5に関して、2日目および8日目に、抗体を1mg/kgまたは10mg/kgで腹腔内に投与した。表9は、それぞれの実験で使用した抗体を要約するものである。

【0301】

【表12】

表9:実験1～5で使用した抗体

実験1	実験2	実験3	実験4	実験5
アイソタイプ 対照 mAb7 mAb15 mAb7-AAA C1	アイソタイプ 対照 mAb15 mAb7 C1	アイソタイプ 対照 mAb15 mAb7 C3	アイソタイプ 対照 mAb15 mAb7 C2	アイソタイプ 対照 mAb7

【0302】

体重を定期的に測定した。結果を図1A～1Eに要約する。マウスを定期的に採血してT細胞増殖を評価した。抗PD-1抗体で処置すると、体重減少の速度によって測定した場合、疾患過程が加速した。対照マウスと比較して、抗PD-1アンタゴニスト抗体で処置したマウスは、より急速な体重減少を有した（図1A～1E）。

【0303】

ヒトT細胞の増殖を、マーカーとしてCD45（クローンHI30；BD Biosciences）を使用してフローサイトメトリーによって測定した。フローサイトメトリーを表10で以下に要約する。T細胞増殖は、アイソタイプ対照で処置したマウスより抗PD-1アンタゴニスト抗体で処置したマウスにおいて高かった。より高いパーセンテージのCD45は、CD45細胞の増殖のより高いレベル、したがってより重度のGvHDを示す。

【0304】

実験1では、CD45陽性血液細胞のパーセンテージは、対照マウスにおいて63.86%であった（表10）。対照的に、抗PD-1抗体mAb7、mAb15、C1、またはmAb7-AAAで処置したマウスにおけるCD45陽性血液細胞のパーセンテージは、それぞれ80.34%、77.62%、77.26%、および76.9%であった（表10）。

【0305】

【表 1 3 - 1】

表10:CD45の存在によって測定したT細胞増殖、処置した動物

実験1:17日目における血液中の%CD45陽性細胞					
	抗体(10 mg/ml)				
	対照	mAb7	mAb15	C1	mAb7-AAA
	51.5	72.4	70	87.6	66.6
	52	76.8	69	82	81
	74.7	82.5	85.8	64.7	71
	65.3	84	93.3	80	85.883
	75.8	86	70	72	80
平均	63.86	80.34	77.62	77.26	76.8966
SEM	5.892643719	2.80258809	5.608074536	4.48826247	3.937116896
実験2:12日目における血液中の%CD45陽性細胞					
	抗体				
	対照	mAb7	C1	mAb15	
	59	81	80	78.1	
	51	80.078	75	79.3	
	66	82.5	78	69.9	
	75	84	80	81.8	
	66	86	86	83.9	
平均	63.4	82.7156	79.8	78.6	
SEM	4.480513	1.182785	2.012461	2.678152	
実験3:12日目における血液中の%CD45陽性細胞					
	抗体(10 mg/ml)				
	対照	mAb7	C3	mAb15	
	51.5	72.4	70	72	
	66	80	69	74.8	
	74.7	82.5	85.8	86.9	
	65.3	84	93.3	90.2	
	75.8	86	70	79.4	
平均	66.66	80.98	77.62	80.66	
SEM	4.875269	2.63638	5.608075	3.880013	

【 0 3 0 6 】

【表 13 - 2】

実験4:12日目における血液中の%CD45陽性細胞				
	抗体(10 mg/ml)			
	対照	mAb7	C2	mAb15
	67	92.23	83.1	88.1
	77.98	88.71	82.3	74.8
	78	82.5	85.8	86.9
	90	93	93.3	90.2
	86.8	80.1	90	79.4
平均	79.956	87.308	86.9	83.88
SEM	4.495211	2.890314	2.336932	3.253729
実験5:10日目における血液中の%CD45陽性細胞				
	抗体			
	対照	mAb7 (1 mg/kg)	mAb7 (10 mg/kg)	
	70	72.4	77	
	66	79	77	
	74.7	82.5	85.8	
	65.3	84	93.3	
	70	86	90	
平均	69.2	80.78	84.62	
SEM	1.887127	2.668895	3.723305	

【0307】

要約すると、抗PD-1抗体で処置したマウスは、アイソタイプ対照で処置したマウスと比較して、より急速な体重減少およびT細胞増殖の増大を有した。これらの結果は、抗PD-1抗体で処置すると、*in vivo*でヒトT細胞の増殖が刺激されることを実証する。

【0308】

(実施例4)

抗PD-1抗体の結合

本実施例は、活性化ヒトT細胞およびカニクイザル(カニクイザル(cyno))T細胞に対する抗PD-1抗体結合を例示する。

【0309】

初代ヒトT細胞を、製造者プロトコールに従ってヒトPAN T細胞単離キット(Miltenyi Biotec; 130-096-353)を使用してPBMC(スタンフォード大学血液銀行)から単離した。カニクイザルPBMCは、(Bio reclamation IVT)から購入し、PAN T細胞は、製造者プロトコールに従って非ヒト霊長類PAN T細胞単離キット(Miltenyi Biotec; 130-091-993)を使用して単離した。ヒトT細胞を、細胞展開および活性化のためのDYNABEADS(商標)ヒトT-活性化因子CD3/CD28(Life Technologies; 11131D)で3日間活性化した。使用したビーズと細胞の比は、それぞれ1:1のビーズ:T細胞であった。カニクイザルT細胞を、製造者プロトコールに従ってT細胞活性化/展開キット、非ヒト霊長類(Miltenyi Biotec; 130-092-919)を使用して3日間活性化した。使用したビーズと細胞の比は、それぞれ1:1のビーズ:T細胞であった。3日後、培養物を回収し、ビーズを、磁力を使用して活性

化T細胞から分離した。細胞を、FACS緩衝液(2%のFBSを含む)およびヒトFc受容体結合阻害剤(Affymetrix eBioscienceカタログ番号16-9161-73)で洗浄およびインキュベートした。カニクイザルに関して、細胞にFc Block試薬(BD Biosciencesカタログ番号564765)を使用した。細胞を室温で10分間インキュベートし、次いで死細胞を除外するためのライブデッドカラー(LIVE/DEAD(登録商標)Fixable Blue Dead Cell Stain Kit、UV励起用;カタログ#A10346)でさらに5分間染色した。抗PD-1抗体を添加し(緒濃度の抗PD-1クローンを10 μ g/ml~0 μ g/mlで出発して1:3の連続希釈比で細胞によってインキュベートした)、1 \times 10⁶細胞を合計100 μ l中のそれぞれの反応において使用し、細胞を氷上で30分間インキュベートした。次いで細胞をFACS緩衝液で洗浄して、過剰の一次抗体を除去し、抗ヒト(アロフィコシアニン(APC)で二次コンジュゲートされたAffiniPure F(ab')₂断片ロバ抗ヒトIgG(H+L);カタログ番号709-136-149)とともにインキュベートした。細胞を氷上で30分間染色した。細胞を洗浄し、BD LSRT Fortessa細胞分析装置(BD Biosciences、カタログ番号647465)を使用して読み取るまで氷上に保った。データをFlowJo(商標)ソフトウェアを使用して分析した。結果を図2Aおよび2Bに要約する。

10

【0310】

図2Aは、ヒト活性化細胞への抗PD-1抗体結合について測定したEC50を示し、図2Bは、カニクイザル活性化細胞への抗PD-1抗体結合について測定したEC50を示す。抗PD-1抗体mAb7およびC1は、同様のEC50で活性化T細胞に結合する(図2Aおよび2C)。

20

【0311】

(実施例5)

抗PD-1抗体によるPD-L1結合の阻害

本実施例は、抗PD-1抗体によるPD-L1リガンド(PD-L1)結合の阻害を例示する。

【0312】

初代ヒトT細胞を、製造者プロトコールに従ってヒトPAN T細胞単離キット(Miltenyi Biotec; 130-096-353)を使用してPBMC(スタンフォード大学血液銀行)から単離した。カニクイザルPBMCは、(Bio reclamation IVT)から購入し、PAN T細胞は、製造者プロトコールに従って非ヒト霊長類PAN T細胞単離キット(Miltenyi Biotec; 130-091-993)を使用して単離した。ヒトT細胞を、DYNABEADS(商標)ヒトT-活性化因子CD3/CD28(細胞展開および活性化用、Life Technologies; 11131D)で3日間活性化した。使用したビーズと細胞の比は、それぞれ1:1であった。カニクイザルT細胞を、製造者プロトコールに従ってT細胞活性化/展開キット、非ヒト霊長類(Miltenyi Biotec; 130-092-919)を使用して3日間活性化した。使用したビーズと細胞の比は、それぞれ1:1であった。3日後、培養物を回収し、ビーズを、磁力を使用して活性化T細胞から分離した。細胞を、FACS緩衝液(2% FBSを含む)およびヒトFc受容体結合阻害剤(Affymetrix eBioscienceカタログ番号16-9161-73)で洗浄およびインキュベートした。カニクイザルに関して、細胞にFc Block試薬(BD Biosciencesカタログ番号564765)を使用した。細胞を室温で10分間インキュベートし、次いで死細胞を除外するためのライブデッドカラー(LIVE/DEAD(登録商標)Fixable Blue Dead Cell Stain Kit、UV励起用;カタログ#A10346)でさらに5分間染色した。ヒト組換えPD-L1 Fc(R&D Systems、カタログ番号156-B7)または緩衝液単独を、10ng/mlで細胞とともにインキュベートした。それぞれのリガンドを別個にインキュベートし、氷上で30分間インキュベートした。次いで細胞を洗浄し、抗PD-1抗体とともにイン

30

40

50

キュベートし（緒濃度の抗PD-1クローンを $1\mu\text{g}/\text{ml} \sim 0\mu\text{g}/\text{ml}$ で出発して1:3の連続希釈比で細胞によってインキュベートした）、 1×10^6 細胞を合計 $100\mu\text{l}$ 中のそれぞれの反応において使用し、細胞を氷上で30分間インキュベートした。次いで細胞をFACS緩衝液で洗浄して、過剰の一次抗体を除去し、アロフィコシアニン（APC）とコンジュゲートされた抗ヒト（Life Technologies；カタログ番号MH10515）とともにインキュベートした。細胞を氷上で30分間染色し、次いで洗浄し、BD LSRFortessa細胞分析装置（BD Biosciences、カタログ番号647465）を使用して読み取るまで氷上に保った。データをFlowJo（商標）ソフトウェアを使用して分析し、生細胞に対するAPC染色の平均蛍光強度（MFI）および幾何平均（Geo.M）を、FlowJo（商標）ソフトウェアを使用して計算した。幾何平均（geo.mean）を計算した後、IC50をGraphPad Prismソフトウェアを使用して計算した。結果を以下の表11および12に要約する。

【0313】

【表14】

表11:ヒトT細胞上のPD-1へのPD-L1結合の抗PD-1遮断

抗体濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	幾何平均	
	mAb7	C1
0.0083375	107	143
0.00416875	129	190
0.002084375	162	245
0.001042188	205	327
0.000521094	482	415
0.000260547	358	469
0.000130273	445	484
0.000065137	503	458
0.000032568	450	420
IC50 (μM)	0.001117	0.00224

【0314】

【表15】

表12:カニクイザルト細胞上のPD-1へのPD-L1結合の抗PD-1遮断

抗体濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	幾何平均	
	mAb7	C1
0.0083375	114	108
0.00416875	135	144
0.002084375	174	183
0.001042188	240	264
0.000521094	322	325
0.000260547	440	404
0.000130273	494	469
0.000065137	491	472
0.000032568	410	406
IC50 (μM)	0.00092	0.00108

10

20

30

40

50

【0315】

これらの結果は、抗PD-1抗体mAb7およびC1が、同様のIC50でヒトおよびカニクイザルT細胞へのPD-L1結合を阻害することを実証する。

【0316】

(実施例6)

T細胞増殖に対する抗PD-1抗体の効果

本実施例は、T細胞増殖に対する抗PD-1抗体の効果を例示する。CD4およびCD8 (All Cells、LLC)を、DYNABEADS (商標) ヒトT-活性化因子CD3/CD28 (または細胞展開および活性化 (Life Technologies; 11131D))を用いて2日間活性化した。使用したビーズと細胞の比は、PD-1を誘導するためにそれぞれ1:1であった。2日目に、培養物を回収し、ビーズを、磁力を使用して活性化T細胞から分離した。次いで細胞をPD-L1発現樹状細胞上で活性化し、細胞を、1:10のDC:T細胞の比で、三つ組みで、96ウェルプレート中で1μg/mlの異なる抗PD-1クローンとともにインキュベートし、加湿したインキュベーター内で、37℃で5%のCO₂とともにインキュベートした。3日目に、培養物を1ウェル当たり1μCiの[³H]-チミジンで18時間パルスした後、回収した。次いでプレートを、ハーベスター96 (Tomtec Life Sciences)を使用してDNA特異的濾紙 (Perkin Elmer) 上に回収した。放射標識フィルターをベータシンチレーション液 (Perkin Elmer) で覆い、Microbeta (登録商標) カウンタープレート (Perkin Elmer) で読み取った。チミジン取り込みを1分当たりのカウント (CPM) として分析した。結果を図3および4において三つ組の平均±SEMとして示す。

【0317】

(実施例7)

ヒト化抗PD-1抗体と相互作用するヒト、カニクイザル、およびマウスPD-1の速度論的および親和性決定

本実施例は、ヒト、カニクイザル、またはマウスPD-1への抗PD-1抗体の結合を例示する。

【0318】

すべての相互作用分析は、別段の明言のない限り、25℃で、無標識バイオセンサーで実施した。表面プラズモン共鳴バイオセンサー (BioRad (商標) 製Protein-XPR (商標)、ならびにGE Life Sciences製Biacore 2000 (商標) およびBiacore T200 (商標))を使用して、ヒトならびにカニクイザルPD-1を試験し、バイオレイヤー干渉法バイオセンサー (Octet-Red 384、Fortebio/Pall Life Sciences)を使用してマウスPD-1を試験した。Protein実験は、PBS pH7.4+0.01% Tween-20 (PBST) ランニング緩衝液中で実施した。Biacore実験は、10mM HEPES pH7.4、150mM NaCl、0.05% Tween-20 (HBST+) 中で実施し、Octet実験は、1g/lのBSAを含むHBST+中で実施した。Proteinデータは、Protein Managerソフトウェアで処理し、Biacoreデータは、Biaevaluationで処理し、Octetデータは、制御ソフトウェアでゼロに対して単に整列させた。SPRデータを二重参照し (Myszka、1999、J Mol Recognit、12(5):279~284)、単純ラングミュアモデルに包括的にフィッティングして、速度論的速度定数の比 ($K_D = k_d / k_a$) から平衡解離定数、 K_D を決定した。

【0319】

キャリブレーションフリー濃度分析 (CFCA)

IgGを固定化した速度論的実験における分析物として使用するためのヒトPD-1 (hPD-1) モノマー (Sino Biologicals、カタログ番号10377-H08H) の活性濃度を、CM5センサーチップを備えたBiacore T200 (商

標)でC F C Aアッセイを使用して経験的に決定した。これらの実験のための表面を準備するために、大容量(およそ12,000RU)のmAb15 hIgG4(または一部の試験では、競合抗体C2-hIgG1)をフローセル2上にアミン結合させ、フローセル1をブランクのままにして(いずれのIgGも用いずに単に「活性化およびブロックした」、参照表面を提供した。hPD-1試料を、低(5μl/分)および高(100μl/分)流量の両方で、36秒間0.1、1、および10μg/mlの名目上の濃度で注入した。2:1v/vのPierce IgG溶出緩衝液(pH2.8):4M NaClのカクテルで表面を再生した。データをT200ソフトウェアのC F C Aツールで分析してhPD-1分析物の見かけ上の活性値を導出し、これを使用して、適切な吸光係数を用いて280nmでの吸光度によって判定したその「名目上の」タンパク質濃度を「活性」タンパク質濃度に補正した。一部のロットは、32%活性であることが判明し、一方、他のロットは、100%活性であった。

10

【0320】

アミン結合mAb7、mAb15、C1、C2、C3、およびC4、mAbへのヒトPD-1(hPD-1)結合の速度論的分析

GLCセンサーチップを備えたProtein-XPR36(BioRad(商標)Hercules、CA)を使用して、PBSTランニング緩衝液中でのアミン結合抗hPD-1 mAbのパネル(mAb7、mAb15、C1、C2、C3、およびC4)へのhPD-1モノマー結合の速度論および親和性を判定した。これらの実験のための表面を3つのステップで準備した;(1)水中の最終0.8mMのEDCおよび0.2mMのスルホ-NHSでの活性化試薬の新たに調製した混合物を使用して、リガンドチャンネルを2分間最小限で活性化し、(2)IgGを、10mMの酢酸ナトリウムpH4.5中、15μg/mlで3分間結合させ、(3)過剰の反応性エステルを、1MのエタノールアミンHCl pH8.5で3分間ブロックした。結合したIgGの最終レベルは、400RU~1157RUの範囲であった。hPD-1モノマーを、実験に応じて、30、44、または36nMの最高「活性」濃度を伴う3倍希釈系列として「分析物」チャンネルに沿って、ワンショットキネティックモード(Bravmanら、2006、Anal Biochem、358(2):281~288)で注入した。会合および解離時間は、それぞれ3分および20分であり、すべての分析物を、二つ組の結合サイクルで注入した。表面を、2:1v/vのPierce IgG溶出緩衝液(pH2.8):4MのNaClのカクテルで再生した。

20

30

【0321】

【表 16】

表13:アミン結合IgGへのhPD-1モノマー結合の速度論的分析

IgG	k_a (1/Ms) $\times 10^5$	k_d (1/s) $\times 10^{-4}$	25°Cでの K_D (pM)
mAb7 IgG1 AAA	4.97	<0.43*	<86
mAb7 IgG4	4.53, 4.45	<0.43*	<94, <96 (N = 2)
mAb15 IgG1 AAA	8.13	<0.43*	<53
mAb15 IgG4	7.32	<0.43*	<58
C4 hIgG1	5.57, 4.84	5.25, 5.89	943, 1217 (N = 2)
C3 hIgG2	4.56	5.21	1143
C3 hIgG4	5.59	4.03	721
C2 hIgG2	4.88	6.07	1244
C2 hIgG4	5.84	4.33	741
C1 hIgG2	14.8	7.55	510
C1	11.1, 8.34	5.57, 5.73	502, 687 (N = 2)

【0322】

hPD-1モノマーのmAb7およびmAb15との相互作用は、許容された解離相内で結合応答の目に見える減衰を示さず、したがって、「5%規則」(Katsambara、2008、Anal Biochem 352(2):208~221)を適用してこれらの k_d および K_D 値の上限に設けたことに従って、上限をこれらの k_d および K_D 値に設けた。N = 2は、異なるチップ上の2つの独立した実験を指す。

【0323】

mAb7およびmAb15のカニクイザルPD-1との交差反応

組換え精製Fab断片(mAb7およびmAb15)のhPD-1-hFc1(R&D systemsカタログ番号1086PD)およびカニクイザルPD-1-hFc1(社内で調製)の両方への結合速度論を、CM4センサーチップを備えたBiacore 2000(商標)およびHBS-T+ランニング緩衝液を使用して判定した。抗hFcポリクローナル抗体をチップにアミン結合させ、フローセル1をブランクのままして(裸の抗hFc捕捉表面)参照チャンネルを提供して、フローセル2および3上でおよそ90RUのhPD-1-hFc1および125RUのカニクイザルPD-1-hFc1を捕捉するのに使用した。組換え精製Fabを、15分の解離時間を許容して、新たに捕捉されたPD-1-hFc1融合タンパク質上に0、10、および100nMで分析物として2分間注入した。捕捉表面を、75mMのリン酸を使用して再生し、mAb7 Fab試料を二つの結合サイクルで注入した。すべてのFab/PD-1複合体は、非常に安定であり、その結果、相互作用のいずれも、許容された解離時間内でこれらの結合応答におけるいずれの目に見える減衰も示さず、「5%規則」(Katsambara、2008)を適用して、これらの k_d および K_D 値に上限を設けた。

【0324】

【表 17】

表14:hPD-1-hFc1およびカニクイザルPD-1-hFc1融合タンパク質に対するmAb7およびmAb15 Fabの親和性判定

分析物	チップ上	k_a (1/Ms) $\times 10^5$	$*k_d$ (1/s) $\times 10^{-5}$	25°Cにおける K_D (pM)
mAb7 Fab	hPD-1-hFc1	5.67	<5.7	<101
mAb7 Fab	cynoPD-1-hFc1	5.26	<5.7	<108
mAb15 Fab	hPD-1-hFc1	9.16	<5.7	<62
mAb15 Fab	cynoPD-1-hFc1	8.24	<5.7	<69

10

【0325】

mAb15、mAb7、およびC3に対するhPD-1結合親和性の温度依存性

CM4センサーチップを備えたBiacore T200（商標）を使用してアミン結合抗hFcポリクローナル抗体を介して低レベルで捕捉されたhIgG4分子のパネル（mAb15、mAb7、およびC3）へのhPD-1モノマー結合の速度論および親和性を判定した。hIgG4 mAbを、フローセル1を参照表面（裸の捕捉表面）として機能を果たすようにブランクのままにして、個々のフローセル上で10 μ g/mlで捕捉した。hPD-1を、18分の解離相を許容して3分間0、10、および100 nMの活性濃度で注入した。捕捉表面を、それぞれの結合サイクル後に75 mMのリン酸を用いて再生した。

20

【0326】

【表 18】

表15:抗hFc捕捉hIgG4分子への分析物としてのhPD-1モノマー結合の速度論的分析

チップ上のhIgG4	温度(25°C)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)
mAb15	25	3.49×10^5	1.71×10^{-4}	0.49
mAb15	37	6.94×10^5	3.73×10^{-4}	0.54
mAb7	25	2.37×10^5	1.73×10^{-4}	0.73
mAb7	37	4.28×10^5	3.63×10^{-4}	0.85
C3	25	2.14×10^5	2.25×10^{-3}	10.5
C3	37	9.70×10^5	1.56×10^{-2}	16.1

30

【0327】

mAb7のマウス-PD-1との交差反応

ストレプトアビジンセンサーチップを備えたOctet-Red384を使用して、マウスPD-1がmAb7に結合するか否かを判定した。結合活性プローン（avidity-prone）アッセイフォーマットを選択してアッセイの検出感度を増大させた。センサーをビオチン化抗ヒトポリクローナルで被覆し、10 μ g/mlでhIgG4抗hPD-1 mAb（mAb7、C1、C2、およびC3）のパネルを捕捉するのに使用し、それぞれのmAbを8個のセンサーで捕捉した。陽性対照として、8個のストレプトアビジンセンサーをビオチン化J43（eBioSciences）、抗マウスPD-1抗体で被覆した。それぞれのmAb被覆センサーを以下の分析物；緩衝液、1 μ Mの結合部位マウスPD-1-hFc、1 μ Mの結合部位hPD-1-hFc（陽性対照）、または1 μ Mの結合部位hGHR-hFc（陰性対照）に曝露した。すべての組換えFc-融合タンパク質は、R&D systems製であった。したがって、それぞれの分析物/mAb相互作用を二つ組のセンサーで試験した。

40

50

【0328】

抗PD-1抗体C1、C2、およびC3は、マウス-PD-1-hFc1に結合しなかった（データを示さず）。抗PD-1抗体mAb7は、マウス-PD-1-hFc1に弱く結合した（データを示さず）。試験したすべての抗PD-1抗体は、hPD-1-hFcに結合した。これらの結果は、mAb7は、マウスPD-1と弱く交差反応性であり、一方、C1、C2、およびC3は、マウスPD-1と交差反応性でないことを実証する。

【0329】

（実施例8）

抗PD-1抗体を用いたがんの治療

これは、がんを治療するための本発明の抗PD-1抗体の使用を例示する預言的实施例である。

10

【0330】

組織学的に確認され、以前に治療されていない測定可能な転移性結腸直腸がんを有する患者を、抗PD-1抗体を用いた治療のために選択する。患者を2つの処置群：化学療法とプラセボまたは化学療法とmAb7の一方に割り当てる。動的ランダム化アルゴリズムを利用して、全体的に、かつ以下のカテゴリー：試験センター、ベースラインECOGパフォーマンスステータス（0対1）、原発性疾患の部位（結腸対直腸）、および転移部の数（1対>1）のそれぞれの中でバランスを実現する。化学療法処置を、それぞれの8週間サイクルの最初の6週間、毎週投与する。化学療法を、試験完了（96週間）または疾患進行まで継続する。mAb7 5mg/kgまたはプラセボを2週間毎に投与する。化学療法処置の結果として完全奏功が確認された、または容認できない毒性を経験したmAbアームにおける患者は、化学療法を中断させられ、ファーストライン処置としてmAb7単独を受け続ける。mAb7群にランダム化されている患者のみが、セカントライン処置のコンポーネントとしてmAb7を受けることができる。試験を完了した後、患者を、死までの4カ月毎の任意の後続の処置および生存時間、経過観察の喪失、または試験の終結について追跡する。

20

【0331】

患者は、適切な放射線透過写真術による技法、典型的にはスパイラルCTスキニングを使用して、ベースライン時および8週間サイクルごとの完了時に腫瘍状態の評価を受ける。腫瘍応答または進行は、固形腫瘍における応答評価基準を利用して研究者および独立放射線学施設（independent radiology facility）（IRF）の両方によって判定される。Therasseら、（2000）。IRF評価は、処置割り当てまたは研究者評価の知識なしで実施される。さらに、患者は、ベースライン時および疾患進行までのそれぞれの処置サイクルの前に、がん療法の機能的評価 - 結腸直腸（FACT-C）、バージョン4、結腸直腸がん患者における生活の質（QOL）を評価するための有効な手段を完了する。Wardら（1999）、Qual. Life Res. 8:181~195。

30

【0332】

安全性は、有害事象、実験室試験結果、およびバイタルサイン測定の報告から評価される。有害事象および異常な実験室結果は、国立がん研究所共通毒性基準（NCI-CTC）バージョン2を使用して分類される。予め指定された安全性尺度は、特に興味深い4つの有害事象（高血圧、タンパク尿症、血栓形成、および出血）を含む。

40

【0333】

一次転帰尺度は、全生存期間の継続時間である。二次転帰尺度は、無増悪生存期間、客観的反応速度（完全および部分的な）、応答継続時間、およびFACT-C QOLスコアの変化を含む。生存時間継続時間は、ランダム化から死までの時間として定義される。分析の時に生存している患者に関して、生存時間の継続時間は、最終接触の日付で検閲される。無増悪生存期間は、ランダム化から疾患進行の早期、または治験薬または化学療法の最後の用量の30日以内の任意の原因からの死として定義される、試験上の死までの時間として定義される。分析の時に疾患進行を伴うことなく生存している患者に関して、無

50

増悪生存期間は、彼らの最後の腫瘍評価、またはベースライン後評価が実施されなかった場合1日目（試験処置の最初の日）で検閲される。客観的反応の分析において、腫瘍評価を伴わない患者は、ノンレスポnderとして分類される。疾患進行および応答分析は、IRF評価に基づく。生活の質の変化は、ランダム化から結腸がん特定のFACT-Cサブスケールスコア（CCS）のベースラインからの3ポイント以上の減少、疾患進行、または試験上の死のうちの最も早いものまでの時間の長さとして定義される、QOLの劣化までの時間（TDQ）として分析される。TDQは、TOI-C（CCSの和、身体的および機能的な健康）およびベースラインからの変化の総FACT-Cについても判定される。

【0334】

10

（実施例9）

抗PD-1抗体を用いたがんの治療

本実施例は、がんを治療するための本発明の抗PD-1抗体の使用を例示する。

【0335】

本実施例における試験は、局所進行性もしくは転移性黒色腫、扁平細胞頭頸部がん（SCCHN）、卵巣癌、肉腫、または再発もしくは難治性古典的ホジキンリンパ腫（cHL）を有する以前に治療された成人患者における静脈内投与される抗PD-1モノクローナル抗体mAb7の第1相、非盲検、多施設、複数回用量、用量漸増、安全性、PK、およびPD試験である。試験プロトコルを表16で以下に要約する。

【0336】

20

【表19】

表16

アーム	割り当てられた介入
アーム 1:21 日毎に mAb7 0.5mg/kg	21日毎に薬剤mAb7 IV
アーム 1:21 日毎に mAb7 1.0mg/kg	21日毎に薬剤mAb7 IV
アーム 1:21 日毎に mAb7 3.0mg/kg	21日毎に薬剤mAb7 IV
アーム 1:21 日毎に mAb7 10mg/kg	21日毎に薬剤mAb7 IV

30

【0337】

試験対象患者基準：局所進行性もしくは転移性黒色腫、SCCHN、卵巣がん、肉腫、または再発もしくは難治性cHLの組織学的または細胞学的診断：- 患者は、標準ケアおよび試験療法の両方を含む再発性または転移性疾患の少なくとも1かつ5以下の事前ラインの療法を受けていたものとする。- RECISTバージョン1.1によって定義される少なくとも1つの測定可能な病変部、または（cHLについて）以前に照射されていなかった悪性リンパ腫の応答基準によって定義される、1.5cm超の少なくとも1つのフルオロデオキシグルコースポジトロン放出断層撮影（FDG PET）の強い（Deauville 4/5）測定可能な病変部。- パート1B展開およびすべてのパート2コホートに関して：患者は、処置前および処置中生検を受けることに同意している。- 十分な腎臓、肝臓、骨髓機能除外基準 - 活性な脳または軟膜転移。- 眼黒色腫 - 活性な、既知の、または疑わしい自己免疫疾患。白斑、I型糖尿病、ホルモン置換を必要とするだけである自己免疫状態に起因する残存甲状腺機能低下症、全身的治療を必要としない乾癬、または外部誘因の非存在下で再発することが予期されない状態を有する患者は、登録することが許容される。免疫抑制療法を必要とする先の免疫不全の診断または臓器移植、- パート2に関して：PD1またはPD-L1抗体を用いた先の治療。- 先の免疫調節療法（例えば、免疫チェックポイント阻害剤、共刺激剤など）に関連しており、免疫抑制療法が要求されると考えられた3以上のグレードの免疫媒介AE（薬剤が関

40

50

連していると考えられたAST/ALT上昇およびサイトカイン放出症候群を含む)の履歴。

【0338】

ORR(客観的応答率)を有する患者の数は、ベースライン時、および最大で24カ月まで、疾患進行または容認できない毒性まで6週間毎に測定される。

【0339】

(実施例10)

ヒトおよびカニクイザル初代T細胞における抗PD-1抗体のアンタゴニスト活性

本実施例は、ヒトおよびカニクイザル初代T細胞における抗PD-1抗体の活性を例示する。

【0340】

本試験では、抗PD-1モノクローナル抗体mAb7のアンタゴニスト活性を、混合リンパ球反応(MLR)を使用して*in vitro*で検査した。初代T細胞をヒトおよびカニクイザル末梢血単核細胞(PBMC)から単離した。mAb7曝露後、細胞増殖ならびにサイトカイン分泌を、ヒトおよびカニクイザルのMLRならびにブドウ球菌エンテロトキシンB(SEB)超抗原で活性化されたカニクイザル血液を使用するサイトカイン放出アッセイを使用して、異なる活性化条件下で*in vitro*で評価した。

【0341】

方法

ヒトTリンパ球

ヒトパフィーコートをスタンフォード血液センター(Stanford, CA)から購入し、リン酸緩衝溶液(PBS)で希釈し、PBMCを単離するためにフィコール上に層状に重ねた。hu-PBMCをPBSで4回洗浄し、Tリンパ球を、製造者のプロトコルに記載の負の選択とともにヒト特異的Pan T細胞単離キット(Miltenyi Biotec, San Diego, CA)を使用して単離した。

【0342】

カニクイザルTリンパ球

新鮮なカニクイザル-PBMCをBioreclamation IVT(New York, NY)から購入し、PBSで2回洗浄した。Tリンパ球を、製造者のプロトコルに記載の負の選択とともに非ヒト霊長類特異的pan T細胞単離キット(Miltenyi Biotec, San Diego, CA)を使用して単離した。

【0343】

高レベルのPD-L1を発現するヒト樹状細胞の生成

ヒトパフィーコートをスタンフォード血液センター(Stanford, CA)から購入し、PBSで希釈し、hu-PBMCを単離するためにフィコール上に層状に重ねた。hu-PBMCをPBSで4回洗浄し、分化14(CD14⁺)単球のクラスターを、製造者のプロトコルに記載の正の選択とともにヒト特異的CD14細胞単離キット(Miltenyi Biotec, San Diego, CA)を使用して単離した。次いで細胞を、10%のウシ胎児血清(FBS)を補充した完全Roswell Park Memorial Institute(RPMI)1640培地中で7日間、 5×10^5 細胞/mLで播種した。0、2、および5日目に、培養物に組換えヒト(rh-)IL-4(1000U/mL)(R&D Systems, Minneapolis, MN)およびrh-顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)(rh-GMCSF)(500U/mL)(R&D Systems, Minneapolis, MN)を補充した。未成熟DCを7日目に回収、洗浄、およびカウントした。それぞれの調製物の試料を、LSRFortessa(商標)分析装置(BD Biosciences, San Jose, CA)を使用するフローサイトメトリーによって、r-フィコエリトリン(RPE)標識抗hu-PD-L1(eBioscience/Affymatrix, San Diego, CA)を使用してPD-L1発現について試験した。

【0344】

高レベルのPD-L1を発現するカニクイザル樹状細胞の生成

新鮮なカニクイザルPBMCをBioreclamation IVT (New York, NY) から購入し、PBSで2回洗浄した。CD14⁺単球を、製造者のプロトコールに記載の正の選択とともに非ヒト霊長類特異的CD14細胞単離キット (Miltenyi Biotec, San Diego, CA) を使用して単離した。次いで細胞を、10%のFBSを補充した完全RPMI 1640培地中で7日間、 5×10^5 細胞/mLとして播種した。0、2、および5日目に、培養物にrhIL-4 (1000 U/mL) (R&D Systems, Minneapolis) およびrh-GM-CSF (500 U/mL) (R&D Systems, Minneapolis, MN) を補充した。未成熟DCを7日目に回収、洗浄、およびカウントした。それぞれの調製物の試料を、LSR Fortessa (商標) 分析装置 (BD Biosciences, San Jose, CA) を使用するフローサイトメトリーによって、RPE標識抗hu-PD-L1 (eBioscience / Affymatrix, San Diego, CA) を使用してPD-L1発現について試験した。

10

【0345】

高レベルのヒトPD-L1を発現するJeKo-1-Luc-緑色蛍光タンパク質細胞クローンの生成

JeKo-1細胞株 (マントル細胞リンパ腫) をアメリカンタイプカルチャーコレクション (ATCC, Manassas, VA) から購入した。JeKo-1-Luc-2A-GFP細胞株を、形質導入プロセスによってPfizer (South San Francisco, CA) において生成した。このプロセスは、製造者のプロトコールに従ってブラストサイジンマーカ (AMSBIO, LVP323、200 μ L当たり 1×10^7 粒子) を含むバイシストロニック系によって個々にホタルルシフェラーゼ (Luc2A) および緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現するレンチウイルス粒子を使用した。JeKo-1細胞をペレット化し、20%のFBSを含むRPMI培地で 1×10^6 細胞/mLに希釈した。レンチウイルス粒子は、細胞0.5 mL当たりウイルス50 μ Lの比で希釈した細胞に添加した。hu-PD-L1を発現するJeKo-1細胞株を生成するために、hu-PD-L1 cDNAをLife Technologies (San Diego, CA) によってカスタム合成し、一般的な発現ベクター (pcDNA3.1) 中にクローニングした。hu-PD-L1を安定に発現するJeKo-1-Luc-GFP細胞株を、Amaxa (登録商標) Nucleofectorシステム (Lonza, Walkersville, MD) および製造者のプロトコールに従って使用したKit V (Lonza, Walkersville, MD) を使用して電気穿孔によってPfizer (South San Francisco, CA) において生成した。次いで細胞を250 μ g/mLのハイグロマイシンの存在下で2週間増殖させ、次いでBD FACSAria (商標) II細胞選別機 (BD Biosciences, San Jose, CA) を使用して細胞選別によって選択した。細胞の選別は、アロフィコシアニン (APC) 標識を直接標識した抗hu-PD-L1抗体クローンMIH-1 (Affymatrix / eBioscience, San Diego, CA) を用いて行った。陽性クローンを展開し、フローサイトメトリー (LSR Fortessa (商標) 分析装置、BD Biosciences, San Jose, CA) を使用して高PD-L1発現について試験した。単一の選別された細胞から生成し、高レベルのPD-L1発現を含有したクローンを選択した。

20

30

40

【0346】

抗体の生成

mAb7を、優良試験所規範 (GLP) 材料 (ロット番号STL0005717) を使用してCHO細胞 (Pharmaceutical Sciences, Pfizer Inc, Saint Louis, MO) 内で生成し、20 mMのヒスチジン、85 mg/mLのスクロース、0.2 mg/mLのポリソルベート-80、0.05 mg/mLの二ナトリウムEDTA、pH 5.5の緩衝液中に提供した。エンドトキシンを 0.01

50

EU/mgとして測定した。

【0347】

すべてのin vitroアッセイで使用した対照抗体は、IgG4-HGフレームワーク(MAB7と同じフレームワーク)中にクローニングされた抗ウシヘルペスウイルスであった。対照抗体は、Pfizer(South San Francisco, CA)、ロット番号4945で生成し、0.3EU/mgのエンドトキシンを伴った。

【0348】

2種の抗hu-PD-1抗体を以前の特許で公開された配列から生成し、MAB7に使用したものと類似するIgG4-HGフレームワーク内で発現させた。抗体は、Pfizer(South San Francisco, CA)で生成し、陽性対照1および陽性対照2と命名した(それぞれロット番号5053および4255)。測定されたエンドトキシンは、それぞれ0.13EU/mgおよび0.056EU/mgであった。

【0349】

高レベルのPD-L1を発現する樹状細胞を使用するヒトアッセイ

プロトコールは、いくつかの改変を用いてKruisbeekら、2004から適応させた。分化初代hu-DCを、7日目に回収し、T細胞活性化に必要な高レベルのPD-L1発現および共刺激シグナルについてフローサイトメトリーによって検証した。マーカーは、CD80およびCD86(BD Bioscience, San Jose, CAから購入した抗体)を含んでいた。細胞をカウントし、RS2000X線装置(Radsource, Brentwood, TN)を使用して3000放射線単位(ラド)で照射して、DCがT細胞に対するAg提示担体としてのみ機能することを除き、サイトカインを分泌することを防止した。したがって、アッセイの成果は、T細胞によってのみ誘導された。7日目に、同種ドナーから新たに単離したhu-T細胞を回収した。T細胞を、異なる濃度のmAb7、陰性および陽性対照抗体、または培地単独(ベースライン反応を評価するための)の存在下で10:1の比で照射されたDCとともに蒔いた(最適なアッセイ条件は、培養液200μL中で 2×10^4 DCとともにインキュベートした 2×10^5 T細胞と判定された)。すべての条件を96ウェル平底組織培養処置プレート(Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)中に蒔いた。細胞は、無血清X-vivo15培地(Lonza, Walkersville, MD)を使用して培養して、実験間のヒト血清ばらつきを防止した。培養物を、5%のCO₂とともに37で5日間インキュベートした。5日目に、上清を収集し、サイトカイン濃度を製造者のプロトコールに従って細胞数測定ビーズアレイ(CBA)(BD Biosciences, San Jose, CA)を使用して測定した。データは、フローサイトメトリー(LS RFortessa(商標)分析装置、BD Biosciences, San Jose, CA)を使用して取得し、データ分析は、BD FCAPアレイソフトウェアバージョン3.0(BD Biosciences, San Jose, CA)を使用して実施した。増殖を、1μCiの3H-メチル滴定チミジン(Perkin Elmer, Waltham, MA)を各ウェルに添加することによって並行培養で測定し、16~18時間さらにインキュベートした。次いで培養物をデオキシリボ核酸(DNA)組込みフィルター(incorporation filter)(Perkin Elmer, Waltham, MA)で回収し、細胞増殖の指標をもたらしたトリチウム標識チミジン組込みを、MicroBeta2 Machine(Perkin Elmer, Waltham, MA)を使用して1分間当たりのカウント(cpm)として測定した。

【0350】

JeKo1-PD-L1発現細胞株を使用するヒトアッセイ

このアッセイは、5:1の比のT細胞とJeKo-1-PD-L1細胞株を使用して実施し、その理由は、この比が、5日目にサイトカイン分泌物を捕捉するのにより理想的な手法をもたらしたためである。したがって各ウェルを 4×10^4 のJeKo-1-PD-L1と一緒に 2×10^5 T細胞とともにインキュベートした。5日目に、上清を収集し、サイトカイン濃度を製造者のプロトコールに従ってCBA(BD Bioscience

10

20

30

40

50

s、San Jose、CA)を使用して測定した。この細胞株は、非常に適度の量の共刺激分子(CD80およびCD86)を発現し、したがって増殖の増強は、抗体処置の後に非常に穏やかである。対照的に、IL-2を含めたサイトカイン分泌物は、ロバストであり、それによって、mAb7処置後にサイトカイン分泌の測定を可能にし、T細胞増殖の測定を可能にしない。

【0351】

高レベルのPD-L1を発現する樹状細胞を使用するカニクイザルアッセイ

分化DCを7日目に回収し、T細胞活性化に必要な高PD-L1発現および共刺激シグナルについてフローサイトメトリー(LSRFortessa(商標)分析装置、BD Biosciences、San Jose、CAを使用する)によって検証した。マーカーは、CD80およびCD86(BD Bioscience、San Jose、CA製の抗体)を含んでいた。細胞をカウントし、RS2000X線装置(Radsourc e、Brentwood、TN)を使用して3000ラドで照射した。同種ドナーから新たに単離したカニクイザルT細胞を回収した。T細胞を、異なる濃度のmAb7、陰性および陽性対照抗体、またはベースライン反応を評価するための培地単独の存在下で10:1のT細胞とDCの比を使用して照射されたDCとともに蒔いた(2×10^5 T細胞を培養液200 μ L中で 2×10^4 DCとともにインキュベートしたとき最適なアッセイ条件)。すべての条件を96ウェル平底組織培養処置プレート(Fisher Scientific Pittsburg、PA)中に蒔いた。細胞は、無血清X-vivo15培地(Lonza、Walkersville、MD)を使用して培養して、実験間の血清ばらつきを防止した。培養物を、5%のCO₂とともに37℃で5日間インキュベートした。5日目に、上清を収集し、サイトカイン濃度を製造者のプロトコールに従ってCBA(BD Biosciences、San Jose、CA)を使用して測定した。データは、フローサイトメトリー(LSRFortessa(商標)分析装置、BD Biosciences、San Jose、CA)を使用して取得し、データ分析は、BD FCAPアレイソフトウェアバージョン3.0(BD Biosciences、San Jose、CA)を使用して実施した。同時にかつ同様の培養液中で、1 μ Ciの3Hメチル滴定チミジン(Perkin Elmer、Waltham、MA)を各ウェルに添加した。細胞を16~18時間さらに培養して増殖を測定した。培養物をDNA組込みフィルターGlass Printed filtermate A(Perkin Elmer、Waltham、MA)で回収し、細胞増殖の指標をもたらすトリチウム標識チミジン組込みを、MicroBeta2 Machine(Perkin Elmer、Waltham、MA)を使用してcpmとして測定した。

【0352】

超抗原刺激(ブドウ球菌エンテロトキシンB)によって誘導されるカニクイザル血液からのサイトカイン放出

カニクイザルからの全血を収集した。血液225 μ Lを組織培養処理96ウェルプレート(Fisher Scientific、Pittsburg、PA)中にアリコートした。試料を、0.1~100 μ g/mLの範囲の濃度でmAb7またはアイソタイプマッチ陰性対照抗体の存在下で5%のCO₂中で、37℃で、二つ組でインキュベートした。抗体を添加して1時間後に、試料を0.1 μ g/mLのSEB(Toxic Technologies、Sarasota、FL)で刺激し、培養物を3日間インキュベートした。3日目に、血漿を回収し、プールし、-80℃で凍結させた。解凍した血清試料中のIFN- γ 、IL-2、およびTNF- α の濃度を、MSDイムノアッセイプレート(Meso Scale Diagnostics、Rockville、MD)およびMSD Discovery Workbenchソフトウェア(バージョン4.0.12)を伴うMSD Reader(モデル1200)を使用して、製造者のプロトコールに従って二つ組で測定した。二つ組の平均を報告した。

【0353】

結果

ヒト初代T細胞に対するmAb7のアンタゴニスト活性

初代ヒトT細胞をPD-L1を発現する同種hu-CDとのMLRで活性化したとき、mAb7は、用量依存的な様式でT細胞増殖（トリチウム標識チミジン組込みによって測定した）およびT細胞活性化（炎症促進性サイトカイン分泌によって測定した）を増大させた。mAb7（10 µg/mL）でのT細胞の処置は、陰性対照抗体（10 µg/mL）での処置に対して最大で2.5倍のT細胞増殖の増大をもたらした。IFN- およびTNF- レベルは、陰性対照抗体と比較したとき、それぞれ最大で8および5倍増大した。IFN- 増大は、TNF- 増大より優れていた。IL-2発現は、これらの培養物中で検出されなかった。初代ヒトT細胞を同種抗原提示細胞として腫瘍細胞株JeKo1 PD-L1を使用してMLRで活性化したとき、mAb7は、陰性対照抗体と比較してIFN- （最大で2.5倍）、TNF- （最大で2倍）、およびIL-2（最大で5倍）分泌の用量依存的な増大を誘導した。このアッセイにおけるmAb7の効果は、両方の陽性対照抗体で得たデータと類似していた。T細胞増殖の増大は、これらの条件下で観察されなかった。細胞増殖は、初代DCによって媒介されるMLRと比較して、CD80およびCD86によってもたらされる弱いシグナルを伴って最小限であった。IL-10、IL-4、IL-17A、およびIL-6は、上述したすべてのアッセイにおいて最小限～非検出であった。

【0354】

カニクイザル初代T細胞に対するmAb7のアンタゴニスト活性

溶液中にあるときのmAb7のhu-PD-1およびカニクイザルPD-1への結合親和性は、速度論的排除アッセイ（KinExA）において非常に同様であった（それぞれヒトおよびカニクイザルPD-1についてKD = 23および28 pM）。ヒトPD-1およびカニクイザルPD-1を発現する細胞に対するmAb7のEC50も同様であった。異なるカニクイザルから単離したT細胞およびDCを使用したMLR機能アッセイでは、mAb7は、用量依存様式でT細胞増殖および活性化を誘導した（トリチウム標識チミジン組込みによって測定した）。この効果は、陽性対照（抗体1および抗体2）でも観察されたが、陰性対照抗体で観察されなかった。mAb7は、サイトカイン分泌（すなわち、IFN- およびTNF- ）も、陰性対照抗体での処置と比較して、最大で5倍および3倍増強した。IL-2発現は、これらの培養物中に検出されなかった。0.1 µg/mLのSEB超抗原で3日間刺激されたカニクイザル全血を使用する異なるサイトカイン放出アッセイでは、mAb7（0.1～100 µg/mL）は、陰性対照抗体と比較したとき、より大きくIFN- 、IL-2、およびTNF- 分泌を誘導した。

【0355】

MLR試験を使用して、T細胞がPD-L1を発現する同種DCまたは腫瘍細胞の存在下で活性化され、高レベルのPD-1を発現している腫瘍微小環境に類似しているin vitro設定を作り出した。PD-1/PD-L1相互作用は、さらなるT細胞増殖およびサイトカイン放出を阻害する。これらのMLRにおいて抗PD-1抗体を添加すると、PD-1/PD-L1軸の遮断に起因して、T細胞活性化が回復し、増殖およびサイトカイン分泌、特にIFN- が増大した。

【0356】

mAb7は、高レベルのPD-L1を発現する同種細胞（DCまたはJeKo1 PD-L1細胞株）とともに培養したとき、ヒトT細胞によるIFN- 、TNF- 、およびIL-2の増殖および分泌を加速した。対照的に、培地単独と同様であることを証明した陰性対照抗体は、これらの効果を増強しなかった。同様に、mAb7は、カニクイザル-MLR系におけるT細胞増殖、IFN- およびTNF- 分泌を増強し、超抗原SEBを使用するカニクイザル全血からのサイトカイン放出を増強した。

【0357】

これらの結果は、抗PD-1抗体mAb7が、T細胞増殖、ならびにインターフェロン- （IFN- ）、腫瘍壊死因子（TNF- ）、およびインターロイキン（IL-2）を含めた炎症促進性サイトカイン分泌を増強したことを実証する。これらの活性は、

初代ヒトおよびカニクイザルT細胞の両方において観察された。

【0358】

(実施例11)

移植片対宿主疾患における抗PD-1抗体の効果

本実施例は、hu-PBMCを移植されたMSGマウスにおける異種-aGvHDモデルを使用するin vivoでのT細胞活性化および展開に対する抗PD-1抗体の効果を示す。

【0359】

本試験では、in vivoでのT細胞活性化および展開に対する抗PD-1抗体mAb7の効果、hu-末梢血単核細胞(PBMC)を使用する非肥満糖尿病性(NOD)、重度複合免疫不全症(SCID)、インターロイキン2受容体ヌル(IL2r^{nu}₁₁) (NSG)マウスにおける異種急性移植片対宿主疾患(aGvHD)モデルにおいて試験した。

【0360】

年齢8~10週の免疫無防備状態NSG雌マウス(1群当たり5匹)(公式名称、NOD、Cg-Prkdc^{scid}IL2rg^{tm1Wjl}/SzJ)を、Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME)から購入した。すべての動物を、施設内動物管理使用委員会(IACUC)に従ってPfizer (South San Francisco, CA)における病原体フリー施設に収容した。

【0361】

ヒトパフィーコートをスタンフォード血液センター(Stanford, CA)から購入し、リン酸緩衝溶液(PBS)で希釈し、PBMCを単離するためにフィコール上に層状に重ねた。PBMCをPBSで2回洗浄した。赤血球(RBC)を、製造者のプロトコールに示されたように塩化アンモニウム-カリウム(ACK)溶解緩衝液(Life Technologies; San Diego, CA)を使用して溶解させた。RBC溶解後、細胞を再び洗浄し、1mL当たり 5×10^7 細胞でPBS中に希釈した。

【0362】

異種-aGvHDの誘導のために、NSGマウスにhu-PBMCを、尾静脈を介して静脈内注射した。それぞれのマウスは、PBS 200μL中の 1×10^7 細胞を受けた。すべての実験において、マウスを毎週3回秤量し、体重減少、猫背の姿勢、波立った毛、機動性の低減、および一部の 경우에는、下痢症を含めた異種-aGvHD様症状の出現について監視した。マウスを、20%の体重の喪失または2日にわたる1g/日の喪失後に安楽死させ、この時点を生全時間として記録した。mAb7、陰性対照抗体、および陽性対照抗体を、実施例10で上述した通り生成した。

【0363】

NSGマウスを、1キログラム当たり0.1~10ミリグラム(mg/kg)の間の用量範囲で、陰性対照抗体、陽性対照抗体、またはmAb7で処置した。抗体を、hu-PBMC移植後2日目および8日目に適切なビヒクルを使用してマウスに投与した。抗体投与の経路は、腹腔内(ip)であった。

【0364】

末梢血、脾臓、および肝臓を、hu-PBMCを移植されたマウスから回収した。それぞれの臓器からの単細胞懸濁液を以下の通り調製した：末梢血を収集し、RBCを、ACK-溶解緩衝液を使用して溶解させ、PBSで洗浄した。脾臓および肝臓を、シリンジプランジャーの後部を使用して機械的にホモジナイズして、細胞を70μmフィルターに通してマセレートし、PBSで1回洗浄する。RBCを溶解させ、細胞をさらに2回洗浄し、70μmフィルターに通して再びマセレートする。この段階で、脾臓細胞は、準備ができていた。肝臓から白血球を単離するために、単細胞懸濁液を30%~80%のパーコール勾配(Percol(商標)Plus、GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA)を使用して層状に重ね、高速遠心分離にかけた。白血球を中間層から回収し、PBSで2回洗浄した。すべての単細胞懸濁液

をカウントし、各試料からの 1×10^6 細胞を蛍光活性化細胞分類 (FACS) のために使用した。ヒトサイトカイン分泌アッセイに関して、マウス CD45⁺ 細胞を、製造者のプロトコールに記載されたように正の選択によるマウス特異的 CD45 細胞単離キット (Miltenyi Biotec, San Diego, CA) を使用して枯渇させて、サイトカイン分泌がヒト免疫細胞単独からであったことを保証した。細胞をカウントし、各試料からの 1×10^6 細胞をアッセイにおいて使用した。

【0365】

末梢血、脾臓、および肝臓からの単一細胞懸濁液を異種 - aGvHD マウスから得た。1 試料当たり合計 1×10^6 細胞を、2% のウシ胎児血清 (FBS) を含有する 1×10^6 PB S を含む FACS 緩衝液中で適切な蛍光標識モノクローナル抗体の混合物とともに、光からの保護下で、4℃ で 30 分間インキュベートし、次いで細胞を FACS 緩衝液で洗浄した。Kiel 67 タンパク質 (Ki 67、増殖中の細胞を測定するため) の細胞内染色のために、細胞を製造者のプロトコールに従って Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set (Affymetrix/eBioscience, San Diego, CA) を使用して表面染色した後に固定した。細胞内染色は、暗所で、4℃ で 30 分間実施した。染色の最後に、試料を洗浄し、BD LSR Fortessa (商標) 細胞分析装置 (BD Biosciences, San Jose, CA) を使用してマルチカラーフローサイトメトリーに付した。データ分析を、FlowJo ソフトウェア (FLOWJO LLC, Ashland, OR) を使用して行った。細胞表面分子を認識するために異なる組合せで使用した抗体は、抗 hu - CD45 パシフィックブルー (PB) または Amcyan、抗マウス CD45 - プリリアントバイオレット (BV) - 711、抗 hu - CD3 - PerCP Cy 5.5、抗 hu - CD8 フィコエリトリン - Cy 7 (PE - Cy 7) または BV - 786、抗 hu - CD4 - フルオレセインイソチオシアネート (FITC) または BV - 650、抗 hu - PD - 1 (クローン EH12.1) BV - 786 または PE、抗 hu - PD - 1 (クローン MIH - 4) PE または FITC、抗 hu - Ki 67 アロフィコシアニン (APC) (すべて BD Biosciences, San Jose, CA 製抗体)、抗 hu - PD - L1 (PE - Affymetrix - eBioscience, San Diego, CA)、およびライブ/デッド染色のための青色蛍光反応性染料 (Life Technologies, Grand Island, NY) であった。

【0366】

脾臓および肝臓からのヒト CD45 強化集団の単一細胞懸濁液を、異種 - aGvHD マウスから得た (マウス CD45 枯渇後)。1 試料当たり合計 1×10^6 細胞を、平底組織培養処理 96 ウェルプレート (Fisher Scientific; Pittsburgh, PA) 内で X - vivo 15 培地 200 μ L 中でインキュベートした。次いで細胞を未刺激のままにし、または低刺激条件としてホルボールミリステートアセテート (PMA) 10 ng/mL およびイオノマイシン (iono) 125 ng/mL、もしくは高刺激条件として PMA 50 ng/mL およびイオノマイシン 1 μ g/mL で刺激した (ともに Sigma - Aldrich, Saint Louis, MO から得た)。培養物を 5% の CO₂ 中で、37℃ で 8 時間インキュベートして、最大サイトカイン分泌を保証した。上清を収集し、ヒトサイトカイン濃度を、製造者のプロトコールに従ってヒトサイトカインに特異的な細胞数測定ビーズアレイ (CBA) (BD Biosciences, San Jose, CA) を使用して測定した。データは、フローサイトメトリー (LSR Fortessa (商標) 分析装置、BD Biosciences, San Jose, CA) を使用して取得し、データ分析は、FCAP Array (商標) ソフトウェアバージョン 3.0 (BD Biosciences, San Jose, CA) を使用して実施した。Hu - IFN - γ 、hu - TNF - α 、および hu - IL - 2 ビーズアレイキットを BD Biosciences (San Jose, CA) から購入し、これらは、マウスサイトカインと交差反応しないことが確認された。

【0367】

すべての分析は、独立試料 t - 検定を使用する平均の比較、または Graphpad Prism (Graphpad Software, San Diego, CA) を使用する 2 元配置 ANOVA を伴った。0.05 の値は、統計的に有意と見なした。生着データは、平均の標準誤差 (sem) を含む平均濃度として図に表されている。

【0368】

NSG 免疫不全マウスを抗 PD-1 抗体 mAb7 で処置すると、体重減少が加速され (表 17)、このモデルにおいて一般に見られる他の疾患徴候、例えば、猫背の姿勢、波立った毛、機動性の減少、および一部の 경우에는、下痢症などが誘導された。このモデルでは、体重減少は、移植後 20 日目から 30 日目の間で加速することが予期される (例えば、Schroeder および DiPersio, 2011 を参照)。mAb7 ならびに陽性対照 1 および 2 で処置すると、異種 - aGvHD 症状が加速されたので、マウスをより早期の時点で安楽死させなければならず、生存曲線を得ることができなかった。したがって体重減少は、一次転帰測定であった。第 1 の実験では、マウスを 0.1、1、および 10 mg/kg の mAb7、または 10 mg/kg の陰性対照抗体で処置した。表 17 において、体重減少を 0 日目に対して 23 日目の処置群間の体重差異を正規化することによって計算した。値は、1 群当たり 5 匹のマウスの平均 \pm sem を示す。

【0369】

【表 20】

表17

処置群	体重 0日目	体重 14日目	体重 23日目	1群当たり の数	体重 減少
陰性対照 mAb: 10 mg/kg	20.68 \pm 0.36	22.00 \pm 0.36	20.88 \pm 1.11	5	0%
mAb7: 10 m/kg	20.78 \pm 0.36	17.76 \pm 0.57	17.74 \pm 0.86	5	15%
mAb7: 1 mg/kg	21.52 \pm 0.36	19.26 \pm 0.35	17.7 \pm 0.58	5	15%
mAb7: 0.1 mg/kg	20.5 \pm 0.78	19.78 \pm 1.38	19.22 \pm 1.95	5	7.95%

【0370】

マウスを hu - PBMC 移植後 2 日目および 8 日目に示した抗体で処置した。体重減少は、23 日目に対照群において明らかとなったが、体重減少および疾患進行は、hu - PBMC 移植後 10 ~ 11 日目に開始してすべての抗 PD-1 抗体 mAb7 処置群からの個々のマウスにおいて検出された。1 mg/kg および 10 mg/kg 処置群の両方において、体重減少は、陰性対照処置群と比較したとき、14 ~ 23 日目の間に有意性に到達した ($p = 0.0001$)。23 日目に、15% の体重減少が 1 mg/kg および 10 mg/kg 処置群において検出され、7.9% の体重減少が 0.1 mg/kg 処置群において検出された (表 17)。

【0371】

末梢血、肝臓、および脾臓の FACS 分析は、対照群に対して mAb7 処置群において hu - CD45 陽性細胞および hu - CD3 陽性 T 細胞のパーセンテージの増大を実証した。脾臓からの代表的なデータも、陰性対照抗体処置群に対して mAb7 において hu - CD8 陽性 T 細胞数および hu - CD4 陽性 T 細胞数 (しかしより少ない程度に) の増大を示した。同様の増大は、肝臓および血液中の hu - T 細胞数においても認められた。T 細胞の増加が mAb7 のヒト T 細胞への結合による PD-1 の遮断に起因したものであったか否かを評価するために、T 細胞を mAb7 の結合を競合する PD-1 に対する市販の抗体 (クローン EH12.1) で染色した。すべての臓器からの mAb7 処置リンパ球は (FACS によって分析した)、EH12.1 への結合を示さなかった。mAb7 で処置された T 細胞が依然として PD-1 を発現することを確認するために、T 細胞を、T 細胞への結合を mAb7 と部分的に競合する異なる抗 hu - PD-1 クローン (クローン MIH4) で染色した。結果は、mAb7 で処置された T 細胞が MIH4 に部分的に結合し、したがって PD-1 が処置された T 細胞上で発現されることを示し、mAb7 による PD

- 1 遮断が明白であることを示した（データを示さず、P f i z e r 内部記録に維持されている）。検出可能な変化は、T細胞（h u - C D 3 陽性）上、または非 h u - T細胞（h u - C D 3 陰性）上の脾臓における h u - P D - L 1 発現について観察されなかった。K i 6 7、リンパ球増殖のマーカーは、脾臓において陰性対照処置群に対して P F - 0 6 8 1 5 9 1 - 処置群からの h u - C D 3 陽性細胞内で上昇した（中央パネル）。同様の結果が血液および肝臓において見られた。

【 0 3 7 2 】

異種 - a G v H D 中のサイトカイン放出に対する m A b 7 の効果を検査するために、h u - C D 4 5 陽性細胞（肝臓および脾臓からの）をマウス C D 4 5 陽性細胞からさらに単離した。次いでこれらのリンパ球を 3 7 で 8 時間 P M A およびイオノマイシンの混合物で処置し（2つの濃度：低対高で）、または未処置のままにした。サイトカイン分泌を C B A によって上清中で測定した（表 1 8）。検出可能なサイトカインは、刺激なしで得られなかった（表 1 8）。m A b 7 処置後、h u - I F N - 、h u - I L - 2、および h u - T N F - は、対照群と比較してマウス脾臓および肝臓区画の両方から単離したヒトリンパ球において上昇した。弱い e x v i v o 刺激条件下で、m A b 7 処置 T 細胞は、h u - I F N - 分泌を陰性対照群から単離した T 細胞のものより有意に高いレベルまで増大させた（p 0 . 0 5）。強い e x v i v o 刺激条件下で、すべてのサイトカインが、すべての群において誘導されたが、陰性対照から単離した T 細胞と比較した m A b 7 処置 T 細胞内でさらに増大した。表 1 8 は、それぞれの群中の 5 匹の異なるマウスから収集したデータを示す。表 1 8 において、m A b 7 対陰性対照群を比較する対応のない t - 検定において * p < 0 . 0 5、* * p < 0 . 0 1；a G v H D = 急性移植片対宿主疾患；H u = ヒト；I F N - = インターフェロン；I L - 2 = インターロイキン - 2；I n o = イオノマイシン；N = 数；n s = 有意でない；P = P 値；P M A = ホルボールミリスレートアセテート；T N F = 腫瘍壊死因子；X e n o = 異種。

【 0 3 7 3 】

10

20

【表 2 1】

表18

臓器-単離したHuリンパ球	Ex Vivo刺激条件(PMA/Iono)(ng/mL)	Hu-サイトカインpg/mL	In Vivoでの処置		N	統計対応のないt-検定
			mAb7 10 mg/kg	陰性対照 mAb 10 mg/kg		
肝臓	弱い (10/125 ng/mL)	IFN- γ	414.1 \pm 59.4	163.9 \pm 43.41	5	**P<0.05
脾臓			2599.96 \pm 863.45	503.9 \pm 111.9	5	*P<0.01
肝臓		IL-2	783.1 \pm 776.26	19.41 \pm 5.29	5	ns
脾臓			1813.98 \pm 840.26	14.26 \pm 1.40	5	ns
肝臓		TNF- α	80.75 \pm 60.45	9.92 \pm 2.55	5	ns
脾臓			368.81 \pm 209.73	14.1 \pm 2.51	5	ns
肝臓	強い (50/1000 ng/mL)	IFN- γ	3838.65 \pm 178.84	2931.26 \pm 556.98	5	ns
脾臓			3084.1 \pm 204.1	2523.9 \pm 141.2	5	ns
肝臓		IL-2	7759.44 \pm 809.24	4565.26 \pm 1240.8	5	ns
脾臓			16735.57 \pm 1417	13204.5 \pm 1834.3	5	ns
肝臓		TNF- α	1611.9 \pm 150.82	758.1 \pm 188.2	5	**P<0.01
脾臓			2842.6 \pm 224.2	2311.7 \pm 281.36	5	ns
肝臓	なし (0/0 ng/mL)	IFN- γ	3.1 \pm 1.25	4.6 \pm 0.96	5	ns
脾臓			3.94 \pm 0.97	4.86 \pm 1.16	5	ns
肝臓		IL-2	3.9 \pm 0.14	4.66 \pm 0.41	5	ns
脾臓			3.23 \pm 0.77	4.39 \pm 0.55	5	ns
肝臓		TNF- α	0.1 \pm 0.09	0.3 \pm 0.2	5	ns
脾臓			0.4 \pm 0.15	0.27 \pm 0.3	5	ns

10

20

30

【0374】

これらの結果は、異種 - a G v H D を抗 P D - 1 抗体 m A b 7 で処置すると、体重減少、T 細胞増殖、およびインターフェロン - (I F N -) およびインターロイキン - 2 (I L - 2) を含めたサイトカイン分泌の増大によって測定した場合、N S G マウスにおける異種 - a G v H D 発達が加速したことを実証する。

【0375】

(実施例12)

抗 P D - 1 抗体の特徴付け

本実施例は、表面受容体 P D - 1 を発現する細胞に対する抗 P D - 1 抗体 m A b 7 の結合親和性、特異性、およびリガンド遮断活性を例示する。

40

【0376】

m A b 7、陰性対照抗体、および陽性対照抗体を、実施例10で上述した通り生成した。フィコエリトリン (P E) またはブリリアントバイオレット (B V) - 7 8 6 で一次標識された抗 h u - P D - 1 抗体クローン E H 1 2 . 1、および同じ色素で標識されたアイソタイプ対照抗体を B D B i o s c i e n c e s (S a n J o s e、C A) から購入した。P E - 標識抗マウス P D - 1 クローン J 4 3 および抗ハムスター I g G アイソタイプ対照抗体を A f f y m e t r i x / e B i o s c i e n s e (S a n D i e g o、C A) から購入した。ピオチン化 h u - P D - L 1 およびピオチン化 h u - P D - L 2 (C D 2 7 3) を A C R O B i o s y s t e m s (N e w a r k、D E) から得た。カニ

50

カイザルPD-L1およびPD-L2は、Creative BioMart(商標) Recombinant Proteins (Shirley, NY) から購入し、製造者のプロトコールによって指示された通りAlexa Fluor(登録商標) 647タンパク質標識キット(Life Technologies, San Diego, CA)を使用してAlexa Fluor(登録商標) 647色素で、両方を社内で標識した。カニカイザルPD-L1およびPD-L2をカニカイザルPD-1発現細胞株への結合について試験した。ラットおよびマウス-PD-L1-Fc-Tags(C末端におけるヒトIgG1のFc領域)を、Creative BioMart(商標) Recombinant Proteins (Shirley, NY) から購入した。ピオチン化PD-L1およびPD-L2の検出は、ストレプトアビジンPEまたはアロフィコシアニン(APC)(Affymetrix/eBioscience, San Diego, CA)を使用して実現した。ラットまたはマウス-PD-L1の検出は、APC標識Fcガンマ(Fc)断片特異的ロバ抗ヒトaffiniPure F(ab')₂ IgG(Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, West Grove, PA)を使用して実現した。

10

【0377】

一過性トランスフェクションのためのベクター

Hu-PD-1発現プラスミド(pCMV6-エントリーベクター中)をOriGene Technologies, Inc(Rockville, MD)、カタログ番号RC210364/受託番号NM__005018から購入した。

20

【0378】

マウス-PD-1発現プラスミド(pCMV6-エントリーベクター中)をOriGene Technologies, Inc(Rockville, MD)、カタログ番号MR227347/受託番号NM__008798から購入した。カニカイザル-PD-1は、Life Technologies(San Diego, CA)、ロット番号1482149/受託番号EF443145によってコドン最適化および合成された。これを、C末端にC末端FLAGタグを付加したマウス 分泌シグナル配列とインフレームで独自のPfizer(San Francisco, CA)サイトメガロウイルス(CMV)ベース発現プラスミド中にクローニングした。

【0379】

ラット-PD-1デオキシリボ核酸(DNA)を受託番号NM__001106927からの配列に従ってカスタム合成し、Life Technologies(San Diego, CA)製発現ベクターpEF1V5-His、ロット番号1598305のBamHI-NotI部位中にクローニングした。

30

【0380】

安定なトランスフェクションのためのPD-1発現ベクター

Hu-PD-1 DNAを受託番号NM__005018からの配列に従ってカスタム合成し、InvitroGen発現ベクターpEF1V5-His B;ロット番号513478のBamHI-NotI部位中にクローニングした。

【0381】

カニカイザル-PD-1 DNAを受託番号EF443145に従ってカスタム合成し、InvitroGen発現ベクターpEF1V5-His B、ロット番号1482149のBamHI-NotI部位中にクローニングした。

40

【0382】

マウス-PD-1 DNAを受託番号NM__008798に従ってカスタム合成し、InvitroGen発現ベクターpEF1V5-His B、ロット番号1513476のBamHI-NotI部位中にクローニングした。

【0383】

すべてのベクターは、Life Technologies(San Diego, CA)によって合成され、InvitroGen発現ベクターpEF1V5-His B中

50

にクローニングされた。すべてのベクターは、細胞外ドメイン、膜ドメイン、および細胞質ゾルドメインを含む完全なPD-1配列を含有する。すべてのベクターは、PD-1のC末端でV5-6Hisエピトープタグをコードした。ネオマイシン耐性遺伝子を、G418硫酸塩抗生物質を使用して選択するためにそれぞれのベクター中に含めた。

【0384】

HEK-293T細胞株を使用する一過性トランスフェクション

HEK-293T細胞をアメリカンタイプカルチャーコレクション(ATCC(商標)、Manassas, VA)から購入し、細胞を、10%のウシ胎児血清(FBS)および1×ペニシリン/ストレプトマイシン(Pen/Strep)を補充したダルベッコ改良イーグル培地(DMEM)(Corning CellGro, Manassas, VA)中に維持し、6%の二酸化炭素(CO₂)中で、37℃で増殖させた。トランスフェクションの1日前に、細胞をトリプシン処理し、T75フラスコ(Fisher Scientific, Pittsburg, PA)1つ当たり4×10⁶細胞で蒔いた。トランスフェクションの日に、予熱した抗生物質フリー増殖培地に古い培地と取り替え、細胞を6%のCO₂中37℃で2時間さらにインキュベートした。発現ベクターまたは空ベクター(10μg)をOptiMEM培地1.5mL(Life Technologies, San Diego, CA)に添加した。次いでリポフェクタミン2000試薬(20μl)(Life Technologies, San Diego, CA)を別のOptiMEM 1.5mlに添加した。次いでプラスミドOptiMEMおよびリポフェクタミンOptiMEM管と一緒に混合し、室温で25分間インキュベートした。次いでOptiMEM混合物を適切な培養フラスコに滴下して添加し、フラスコを6%のCO₂中37℃で一晩放置した。翌日、培地をフラスコから取り出し、完全増殖培地に置き換えた。トランスフェクションして四十八(48)時間後に、細胞を、StemPro-Accutase(Life Technologies, San Diego, CA)を使用して回収し、それによって細胞をPD-1表面発現に影響することなく培養表面から穏やかに取り出すことを可能にした。次いで細胞を抗体結合および蛍光活性化細胞分類(FACS)分析に付した。

【0385】

ジャーカット細胞株を使用する安定なトランスフェクション

ジャーカット細胞株(クローンE6-1-TIB-152(商標)、ATCC(登録商標)、Manassas, VA)を使用してhuおよびカニクイザル-PD-1を安定に発現させた。細胞株を、Amaxa nucleofectorシステム(Lonza, Walkersville, MD)を介して電気穿孔を使用して生成した。トランスフェクションは、製造者のプロトコールによって指示された通りKit V(Lonza, Walkersville, MD)を使用してPfizer(San Francisco, CA)において実施した。細胞を、0.3~1.0×10⁶細胞/mlの間の密度で、5%CO₂中37℃で10%のFBSおよび1×L-グルタミンを補充した増殖培地Roswell Park Memorial Institute(RPMI)-1640(Life Technologies, San Diego, CA)中で維持した。ベクターのそれぞれについて、2×10⁶細胞をトランスフェクトするのに2μg/mLを使用した。トランスフェクション後、細胞を、安定トランスフェクション細胞の選択および維持のために2週間G418硫酸塩(600μg/mL)の存在下で増殖させた。長期の汚染を防止するために、1×Pen/Strepを培地に添加した。単一細胞クローンを、1:200(G418硫酸塩抗生物質を補充した完全培地200μL中1細胞)の希釈液中で細胞を培養することによって選択した。高いhuまたはカニクイザル-PD-1を発現するクローンを選択するために、PE標識抗hu-PD-1クローンEH12.1をフローサイトメトリーアッセイにおいて使用した。試料を、BD LSRTF ortessa(商標)細胞分析装置(BD Biosciences, San Jose, CA)を使用して収集した。データ分析および平均蛍光強度(MFI)を、Flowjoソフトウェア(Flowjo LLC, Ashland, OR)を使用して計算した

。高いMFIを有する細胞株をアッセイ進展のために選択した。

【0386】

hu - 、カニクイザル - 、マウス - 、もしくはラット - PD - 1ベクター、または空ベクターをトランスフェクトしたHEK - 293T細胞を、トランスフェクション後48時間において回収した。mAb7と結合させる前に、それぞれの特定のトランスフェクションからの細胞を市販抗体またはリガンドを用いて試験して、適切なPD - 1受容体が細胞表面上で高度に発現されたことを保証した。ヒトおよびカニクイザルに関して、交差反応性の市販の抗PD - 1抗体(クローンEH12.1)を使用した。マウスに関して、市販の抗マウス - PD - 1抗体(クローンJ43)を使用した。ラットに関して、ラット - PD - L1リガンドを使用した(利用可能な市販のラット交差反応性抗PD - 1抗体がないため)。適切なPD - 1発現を確認した後、細胞をカウントし、 2×10^5 細胞をhu - Fc受容体結合阻害剤機能グレード混合物($1 \mu\text{g} / 1 \times 10^6$ 細胞のFc受容体ブロック、Affymetrix/eBioscience、San Diego、CA)とともに20分間インキュベートし、ライブ/デッド染色に使用される青色蛍光反応性染料を混合物に添加した(Life Technologies、San Diego、CA)。mAb7または陰性対照($1 \sim 0.00001 \mu\text{g} / \text{mL}$)抗体の連続希釈液を細胞混合物に添加し、次いで氷上で1時間インキュベートさせた。次いで細胞を洗浄し、APC標識ロバ - 抗ヒト - affinityPure F(ab')₂断片IgG、Fc特異的($1:100$ 希釈液)(Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc、West Grove、PA)を混合物に添加し、その後、細胞を氷上でさらに30分間インキュベートした。データをBD LSRI Fortessa(商標)細胞分析装置(BD Biosciences、San Jose、CA)で取得し、Flowjoソフトウェア(Flowjo LLC、Ashland、OR)を使用して分析した。

【0387】

hu - 、カニクイザル - 、またはマウス - PD - 1受容体をトランスフェクトされた安定なジャーカット細胞クローンを生成した。それぞれの種からこれらのアッセイのために選択したPD - 1細胞クローンは、同様の量のPD - 1受容体を発現した(約400,000受容体/細胞;受容体は、これらの細胞株の生成中に以前に定量化した)。適切なPD - 1発現を確認した後、細胞をカウントし、 2×10^5 細胞をhu - Fc受容体結合阻害剤機能グレード($1 \mu\text{g} / 1 \times 10^6$ 細胞のFc受容体ブロック、Affymetrix/eBioscience、San Diego、CA)とともに20分間インキュベートし、ライブ/デッド染色に使用される青色蛍光反応性染料を混合物に添加した(Life Technologies、San Diego、CA)。mAb7、陽性対照1、陽性対照2、または陰性対照抗体(IgG4フレームワークを使用する)の連続希釈液($1:3$)を細胞混合物に添加し、次いで氷上で1時間インキュベートさせた。次いで細胞を洗浄し、APC標識ロバ - 抗ヒト - affinityPure F(ab')₂断片IgG、Fc特異的($1:100$ 希釈液)(Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc、West Grove、PA)を混合物に添加し、次いで細胞を氷上でさらに30分間インキュベートした。データをBD LSRI Fortessa(商標)細胞分析装置(BD Biosciences、San Jose、CA)で取得した。分析は、Flowjoソフトウェア(Flowjo LLC、Ashland、OR)を使用して行い、幾何平均を計算した。EC₅₀値を、Graph Pad Prism(Logアゴニスト対応答[結合])を使用して計算した。

【0388】

高レベルのPD - 1受容体を発現する活性化T細胞を生成した。適切なPD - 1発現を、市販の試薬(ヒトおよびカニクイザルについて抗hu - PD - 1クローンEH12.1、マウス - PD - 1について抗マウス - PD - 1クローンJ43、ならびにラット - PD - 1についてラット - PD - L1)を使用してそれぞれの種から得たT細胞について確認した。細胞をカウントし、 1×10^6 細胞をhu - Fc受容体結合阻害剤機能グレード(

1 $\mu\text{g} / 1 \times 10^6$ 細胞のFc 受容体ブロック、Affymetrix/eBioscience、San Diego、CA)とともに20分間インキュベートし、ライブ/デッド染色に使用される青色蛍光反応性染料を混合物に添加した(Life Technologies、San Diego、CA)。mAb7の連続希釈液(1:3の希釈)を細胞混合物に添加し、次いで氷上で1時間インキュベートさせた。次いで細胞を洗浄した後、APC標識ロバ-抗ヒト-affiniPure F(ab')₂断片IgG、Fc 特異的二次抗体(1:100の希釈)(Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc、West Grove、PA)を添加し、細胞を氷上でさらに30分間インキュベートした。データをBD LSRFortessa (商標)細胞分析装置(BD Biosciences、San Jose、CA)で取得した。データ分析は、Flowjoソフトウェア(FlowJo LLC、Ashland、OR)を使用して行った。幾何平均をカウントし、EC₅₀値を、Graph Pad Prism(Logアゴニスト対応答[結合])を使用して計算した。

【0389】

高レベルのhu-PD-1を発現する安定なジャーカット細胞クローンをアッセイのために選択した。二十(20) $\mu\text{g} / \text{mL}$ のビオチン化hu-PD-L1またはビオチン化hu-PD-L2は、この細胞株上のすべてのPD-1受容体を飽和させた(結合滴定アッセイを予見した後)。したがって、この濃度を本発明者らの試験における最適濃度として選択した。Hu-PD-1発現ジャーカット細胞(2×10^5)をhu-Fc受容体結合阻害剤機能グレード(1 $\mu\text{g} / 1 \times 10^6$ 細胞のFc 受容体ブロック、Affymetrix/eBioscience、San Diego、CA)とともに20分間インキュベートし、ライブ/デッド染色に使用される青色蛍光反応性染料を同様に混合物に添加した(Life Technologies、San Diego、CA)。ビオチン化hu-PD-L1またはビオチン化hu-PD-L2を20 $\mu\text{g} / \text{mL}$ で細胞に添加し、直後にmAb7、陽性対照1、陽性対照2、または陰性対照抗体の連続希釈液を添加した(すべてIgG4骨格中かつ1:3の連続希釈液中)。細胞を氷上で1時間インキュベートさせた。次いで細胞を洗浄し、PEストレプトアビジン(1:100希釈液)(Affymetrix/eBioscience、San Diego、CA)を添加し、細胞を氷上で30分間インキュベートさせた。次いでデータをBD LSRFortessa (商標)細胞分析装置(BD Biosciences、San Jose、CA)で取得し、Flowjoソフトウェア(FlowJo LLC、Ashland、OR)を使用して分析し、幾何平均を計算した。IC₅₀値をGraph Pad Prism(Log阻害剤対応答[結合])を使用して計算した。

【0390】

ジャーカット細胞に高レベルのhuまたはカニクイザル-PD-1受容体を安定にトランスフェクトした。カニクイザル-PD-1受容体を発現する細胞(約400,000受容体/細胞)をこのアッセイのために選択した。カニクイザル-PD-L1およびPD-L2結合を、これらの細胞を使用して試験し、結果は、20 $\mu\text{g} / \text{mL}$ のカニクイザル-PD-L1またはPD-L2は、この細胞株に結合しているとき異なる濃度(50 ng/mL ~ 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$)のこれらのリガンドについて試験した幾何平均に基づいてすべてのPD-1受容体を飽和させるのに十分であることを示した。カニクイザル-PD-1発現ジャーカット細胞(2×10^5)をhu-Fc受容体結合阻害剤機能グレード(1 $\mu\text{g} / 1 \times 10^6$ 細胞のFc 受容体ブロック、Affymetrix/eBioscience、San Diego、CA)とともに20分間インキュベートし、ライブ/デッド染色に使用される青色蛍光反応性染料を混合物に添加した(Life Technologies、San Diego、CA)。Alexa-Fluor(登録商標)-647-カニクイザルPD-L1またはAlexa-Fluor(登録商標)-647-カニクイザルPD-L2を20 $\mu\text{g} / \text{mL}$ で細胞に添加し、直後に異なる濃度のmAb7、陽性対照1、陽性対照2、または陰性対照抗体を添加した(IgG4骨格を使用して、1:3の連続希釈液中)。次いで細胞を氷上で1時間インキュベートさせた。洗浄後、細胞を

BD LSRFortessa (商標) 細胞分析装置 (BD Biosciences, San Jose, CA) で取得した。データ分析を Flowjo ソフトウェア (FLO WJO LLC, Ashland, OR) を使用して行い、幾何平均を計算した。IC50 値を Graph Pad Prism (Log 阻害剤対応答 [結合]) を用いて計算した。

【0391】

スタンフォード血液センター (Stanford, CA) から購入したヒトバフィーコート、PBS で希釈し、PBMC を単離するためにフィコール上に層状に重ねた。PBMC を PBS で 4 回洗浄した。RBC を、製造者のプロトコールに示されたように ACK 溶解緩衝液 (Life Technologies; San Diego, CA) を使用して溶解させた。RBC 溶解後、細胞を再び洗浄し、1 mL 当たり 5×10^7 細胞で PBS 中に希釈した。PBMC の半分をカウントし、凍結培地 (10% のジメチルスルホキシド [DMSO]) を伴う 90% の FBS) 中に凍結させ、残っている細胞を T 細胞精製に付した。

【0392】

残っている PBMC から、Tリンパ球を、製造者のプロトコールに記載の負の選択とともに hu 特異的 Pan T 細胞単離キット (Miltenyi Biotec, San Diego, CA) を使用して単離した。

【0393】

ADCC アッセイに関して、新たに単離した T 細胞 (標的細胞) をカウントし、1 mL 当たり 1×10^6 T 細胞を無血清 X-vivo 15 培地 (Lonza, Walkersville, MD) 中で培養し、抗 CD3 および抗 CD28 で被覆したビーズ (T 細胞展開および活性化のための Dynabeads (商標) ヒト T 活性化因子 CD3 / CD28 (Life Technologies, San Diego, CA)) および 100 U / mL の組換えヒト (rh) - IL - 2 (R&D Systems, Minneapolis, MN) を使用して刺激した。培養物を 5% の CO₂ 中、37 °C で 72 時間インキュベートした。T 細胞活性化が 48 時間の時点に到達したとき、PBMC (同じドナーに由来するエフェクター細胞) を解凍し、カウントし、次いで 10% の FBS を含む完全 RPMI - 1640 培地中で合計 18 ~ 24 時間、rh - IL - 2 (50 U / mL ~ 5×10^6 細胞 / 培養液 1 mL) で刺激した。アッセイの日に、両細胞型をカウントし、フローサイトメトリーによって試験して適切な活性化を保証した。T 細胞について、高 PD - 1 の発現を検査し、PBMC について、ADCC を媒介する受容体 CD16、CD32、および CD64 (それぞれ Fc - 受容体 - [Fc R] I I I [a および b]、Fc R I I a、Fc R I) の発現レベルを検査した。抗体: mAb 7 (IgG4 および IgG1 フレームワーク)、および陽性対照抗体を添加した後、平底 96 ウェル組織培養処理プレート (Fisher Scientific, Pittsburg, PA) 中に 5 : 1 のエフェクターと標的の比 (これが最適な比であったので) で細胞を蒔いた。すべての抗体を 0.01 ~ 100 μ g / mL の濃度で (1 : 10 の連続希釈液で) 試験した。最大溶解を評価するための標的細胞単独、エフェクター細胞単独、および抗体を添加しない 5 : 1 の比のエフェクターと標的を含むアッセイ対照を添加した。アッセイプレートを、5% の CO₂ 中 37 °C で 4 時間インキュベートした。データを、製造者のプロトコールによって指示された通り Cytotox 96 (登録商標) 非放射性細胞傷害性アッセイ (Promega US, Madison, WI) を使用して分析した。アッセイにより、乳酸脱水素酵素 (LDH)、細胞溶解すると放出される安定な細胞質内酵素が定量的に測定された。細胞傷害性のパーセント (%) を、 $= 100 \times (\text{実験的な LDH 放出} [\text{OD} 490]) / \text{最大 LDH 放出} [\text{OD} 490])$ として測定した。最大 LDH 放出は、標的細胞単独 (T 細胞) 細胞が化学的に溶解して最大殺傷を得たとき計算した。

【0394】

mAb 7 の hu - 、カニクイザル - 、マウス - 、およびラット - PD - 1 に結合する能力を、一過性にトランスフェクトされた HEK - 293 T 細胞株、初代活性化 T 細胞、な

10

20

30

40

50

らびに h u - P D - 1 または カニクイザル - および マウス - P D - 1 を 安定に トランスフェクトされた ジャーカット細胞を含んでいた フローサイトメトリー (F A C S) 細胞ベース結合アッセイを使用して評価した。m A b 7 は、高親和性で h u - P D - 1 および カニクイザル - P D - 1 の両方に結合し、2 種について同様の E C ₅₀ 値を示した (これらのアイソフォームのアミノ酸配列は、分析した種のうちで最も同様である)。データを表 19、20、および 21 に要約する。マウス - P D - 1 への結合は、生物学的に無関係であり、親和性成熟プロセスに起因し得る高濃度の m A b 7 においてのみ実現された。m A b 7 の結合は、トランスフェクション細胞または活性化初代 T 細胞を使用したとき、ラット - P D - 1 について検出されなかった (表 19)。

【 0 3 9 5 】

10

【 表 2 2 】

表19:FACSによる初代ナイーブおよび活性化T細胞に対するmAb7結合

種	mAb7 (%結合)		陰性対照 (%結合)	
	ナイーブ	活性化	ナイーブ	活性化
ヒト T 細胞	9.68 ± 4.82	87.95 ± 1.65	3.49 ± 0.59	4.75 ± 0.59
カニクイザル T 細胞	9.21 ± 0.89	84.35 ± 0.75	5.385 ± 0.38	4.67 ± 0.47
マウス T 細胞	4.63 ± 0.62	4.14 ± 1.87	0.93 ± 0.07	0.68 ± 0.10
ラット T 細胞	3.82 ± 1.72	0.74 ± 0.05	0.82 ± 0.16	4.36 ± 0.34

20

【 0 3 9 6 】

【 表 2 3 】

表20:個々のヒトおよびカニクイザルに由来するPD-1を発現する得られた活性化初代T細胞へのmAb7結合(EC50)

個体	ヒト T 細胞(pM)	カニクイザル T 細胞(pM)
個体 1	45.9	73.61
個体 2	56.11	97.07
平均 ± sem	51.04 ± 5.07	85.34 ± 11.73

30

【 0 3 9 7 】

表 20 において、それぞれの数値は、異なるドナーへの m A b 7 結合の E C ₅₀ 値を表す。最下行は、平均 ± s e m を表す。s e m = 平均の標準誤差。

【 0 3 9 8 】

【表 2 4】

表21:ヒトPD-1またはカニクイザルPD-1を含む安定にトランスフェクトされたジャーカ
ット細胞株へのmAb7結合(EC50)

mAb (IgG4)	繰り返し数	ジャーカット/ ヒト-PD-1 (pM)	ジャーカット/カニクイザル- PD-1 (pM)
mAb7	1	62.84	181.3
	2	66.61	263.8
	*平均 ± sem	64.725 ± 1.89	222.55 ± 41.3
陽性対照 mAb 1	1	54.52	265.2
	2	57.60	267.2
	*平均 ± sem	56.01 ± 1.55	266.2 ± 1.0
陽性対照 mAb 2	1	181.6	380.4
	2	179.6	375.9
	*平均 ± sem	180.6 ± 1.0	378.15 ± 2.5

【 0 3 9 9】

表 2 1 において、それぞれの数値は、単一実験における m A b 7 結合についての E C ₅₀ 値を表す。* 平均 ± s e m を表す。m A b (I g G 4) = I g G 4 フレームワークを有するモノクローナル抗体；P D - 1 = プログラム死 - 1；s e m = 平均の標準誤差。

【 0 4 0 0】

h u - およびカニクイザル - P D - 1 の両方への m A b 7 結合を、異なる細胞ベースアッセイシステムを使用して検査した。すべてのシステムにおいて、結合は、両方の種において高い親和性および特異性を伴うものであることが判明した。h u - またはカニクイザル - P D - 1 を発現した H E K - 2 9 3 T ー過性トランスフェクション細胞株を使用して、m A b 7 は、M F I によって示されたものと同様の結合パターンを示した。最小限の結合 ~ 結合なしが、空ベクター（ビヒクル）をトランスフェクトした親細胞株において観察された

【 0 4 0 1】

活性化 h u - およびカニクイザル - 初代 T 細胞への m A b 7 結合の E C ₅₀ 値を、細胞表面上の P D - 1 発現および細胞生存能が最適であった活性化後 7 2 時間において判定した（表 1 9）。E C ₅₀ 値は、それぞれの種の 2 つの異なるドナーについて計算した（表 2 0）。h u - およびカニクイザル - 活性化 T 細胞の両方において、低 E C ₅₀ 値が得られ、E C ₅₀ 値は、2 つの種間で近い、それぞれ 5 1 . 0 4 ± 5 . 0 7 p M および 8 5 . 3 4 ± 1 1 . 7 3 p M（平均 ± 平均の標準誤差 [s e m]）ことが判明した。結合は、陰性対照抗体についてベースライン値を超えて観察されなかった。

【 0 4 0 2】

h u - P D - 1 受容体を最小限で発現するジャーカット T 細胞株を使用して、安定にトランスフェクトされた h u - P D - 1、カニクイザル - P D - 1、およびマウス - P D - 1 細胞株を生成した。細胞株をサブクロニングし、高レベルの h u - P D - 1 およびカニクイザル - P D - 1 受容体を発現するクローンを選択した（1 細胞当たり約 4 0 0 , 0 0 0 P D - 1 受容体が発現された最高の発現であった）。このシステムでは、m A b 7 は、h u - P D - 1 およびカニクイザル - P D - 1 受容体に対して高親和性を示した。2 つの種についての E C ₅₀ 値は、初代活性化 T 細胞データと同様であった（表 2 1）；h u - P D - 1 について E C ₅₀ = 6 4 . 7 2 5 ± 1 . 8 9 およびカニクイザル - P D - 1 について 2 2 2 . 5 5 ± 4 1 . 3。カニクイザル - P D - 1 発現細胞の E C ₅₀ 値は、2 つ実験作業間でヒト E C ₅₀ 値よりばらついた。2 つの種のデータは、任意の所与の繰り返しにおいて使用した陽性対照抗体で得たデータと同様であった（表 2 1）。陰性対照抗体は、実験的繰り返しのいずれにおいてもベースライン値を超えて結合を呈さなかった。P D - 1 受容体との相互作用から P D - L 1 および P D - L 2 リガンドを遮断する m A b 7 の能力を、P D - 1 - トランスフェクションジャーカット細胞株（h u - P D - 1 またはカ

ニクイザル - P D - 1 を発現する) において検査した。このアッセイでは、細胞を、異なる濃度の未標識 m A b 7 とともにインキュベートした後、飽和濃度の標識リガンドとともにインキュベートした。表 2 2 に示したように、m A b 7 は、P D - L 1 および P D - L 2 リガンドを用量依存的な様式で P D - 1 受容体への結合から阻害した。P D - 1 の陽性対照抗体は、同等の阻害を示した。m A b 7 の I C 5 0 は、h u - とカニクイザル - P D - 1 との間で同等であった (h u - P D - L 1 および h u - P D - L 2 についてそれぞれ 880.15 ± 289.85 および 1058 ± 355.4 ; ならびにカニクイザル - P D - L 1 およびカニクイザル - P D - L 2 についてそれぞれ 942.9 ± 110.1 および 839 ± 89.5) 。 I C 5 0 値の概要を表 2 2 に提供する。表 2 2 において、それぞれの数値は、単一実験での m A b 7 の I C ₅₀ 値を表す ; * 平均 \pm s e m を示す ; ‡ 括弧内で繰り返し数を示す ; m A b I g G 4 = I g G 4 フレームワークを有するモノクローナル抗体 ; P D - 1 = プログラム死 - 1 ; P D - L 1 = プログラム死 - リガンド 1 ; P D - L 2 = プログラム死 - リガンド 2 ; s e m = 平均の標準誤差。

【 0 4 0 3 】

【表 2 5】

表22:安定にトランスフェクトされたジャーカット細胞株システムを使用した、PD-L1およびPD-L2へのヒトPD-1またはカニクイザルPD-1結合の遮断についての阻害濃度

(IC₅₀;pM)

mAb (IgG4)	ヒト-PD-1/ジャーカット		カニクイザル-PD-1/ジャーカット	
	PD-1/PD-L1 遮断	PD-1/PD-L2 遮断	PD-1/PD-L1 遮断	PD-1/PD-L2 遮断
mAb7 (1)‡	590.3	703.2	832.8	749.5
(2)‡	1170	1414	1053	928.5
*平均 \pm sem	880.15 ± 289.85	1058 ± 355.4	942.9 ± 110.1	839 ± 89.5
C1 (1)‡	1022	1226	1286	1316
(2)‡	629	811.1	861.8	1289
*平均 \pm sem	825.5 ± 196.5	1081.55 ± 207.45	1073.9 ± 212.1	1302.5 ± 13.5
C2 (1)‡	1715	1972	1809	1961
(2)‡	1597	1560	1881	2111
*平均 \pm sem	1656 ± 59	1766 ± 206	1845 ± 36	2036 ± 75

【 0 4 0 4 】

m A b 7 は、補体コンポーネント 1、q サブコンポーネント (C 1 q)、および C D 6 4 に対して弱い結合を示した。C 1 q および C D 6 4 (I g G 4 フレームワークの) は、それぞれ補体依存性細胞傷害 (C D C) および A D C C の潜在的なサロゲートであると考えられる。i n v i t r o で T 細胞の殺傷を誘導する m A b 7 の能力の欠如をさらに調査するために、A D C C アッセイを、高レベルの P D - 1 受容体を発現する活性化 T 細胞 (標的細胞) および高レベルの F c 受容体を発現した P B M C (エフェクター細胞) を用いて実施した。細胞は、2 人の健康なドナーから選択した。m A b 7 (その元の I g G 4 フレームワーク中) は、両ドナーにおいて最小限の A D C C 活性を示した。A D C C 活性の欠如は、I g G 4 フレームワーク中の抗 P D - 1 陽性対照抗体が呈した活性と一致し、両方は、陰性対照 I g G 4 抗体と同様であった。抗 P D - 1 (m A b 7 または陽性対照抗 P D - 1 抗体) を、より強い A D C C を誘導することが公知であるヒト I g G 1 フレームワークにおいて評価したとき、抗 P D - 1 は、抗体が I g G 4 フレームワーク中にあるとき、最大で 4 倍高い A D C C を誘導した。最大 L D H 放出を、標的細胞単独 (T 細胞) を化学的に溶解させて最大殺傷を得たとき計算した (殺傷は、アッセイ計算によってそれぞれのドナーについて 1 0 0 % 溶解と推定した) 。I g G 1 フレームワークを使用する T

細胞溶解は、活性化T細胞上のPD-1のレベルに対応し（ドナー1のPD-1発現および溶解は、ドナー2より高い）、アッセイの精度を確認する。

【0405】

これらの結果は、抗PD-1抗体mAb7が、試験システムに応じて46~270pMの間の範囲のEC₅₀を伴って、細胞上で発現されるhu-およびカニクイザル-PD-1受容体に高親和性で結合することを実証する。mAb7は、生理的濃度においてマウス-PD-1またはラットPD-1を発現する細胞に結合しなかった。mAb7は、PD-L1およびPD-L2リガンドが細胞表面PD-1受容体と相互作用するのを遮断した。IC50値は、500~1000pMの範囲であり、リガンド結合を介して誘導されるPD-1機能の遮断におけるその高いアンタゴニスト機能を示した。そのIgG4フレームワークにおけるmAb7は、最小限~なしの抗体誘導細胞傷害性を誘発した。それは、IgG4抗体の性質と一致する。

10

【0406】

（実施例13）

標識フリーバイオセンサーおよびELISAを使用するPD-1、FcRn、FcR、およびC1Qへの抗PD-1抗体mAb7結合の特徴付け

本実施例は、SPRバイオセンサーを使用する毒性学試験に関連した様々な種に由来する組換え精製PD-1に対するmAb7の*in vitro*結合親和性を例示する。FCGRおよびFcRnにエンゲージするmAb7のFc領域の能力もSPRによって試験して、それがアイソタイプマッチ対照のものと一致する性質を呈することを確認した。ELISAによって、mAb7およびアイソタイプマッチ対照を、ヒトC1qへの結合についてアッセイした。PD-1のそのリガンド、PD-L1およびPD-L2との結合相互作用を遮断するmAb7の能力も、標識フリーバイオセンサーによって試験してその作用機序を支持した。

20

【0407】

すべての速度論的および親和性実験は、別段の明言のない限り、リン酸緩衝溶液(PBS)+0.01%のTween20ランニング緩衝液中25℃で行った。速度論的試験は、NLC(ニュートラピジン被覆)チップを備えたSPR ProteOn XPR36バイオセンサー(BioRad、Hercules、CA)で実施した。ProteOnは、参照標準としてのmAb7に対する滴定を介してhu-PD-1およびカニクイザル-PD-1分析物の活性濃度を判定するのに使用した。ここで使用したタンパク質分析物の濃度は、「活性な」または「名目上の」値を指す。ヒトFc受容体(hu-FCGR)I、ヒト新生児Fc受容体(hu-FcRn)(ロット番号R3091)、およびカニクイザル-新生仔Fc受容体(カニクイザル-FcRn)(ロット番号JCR)の活性濃度を、CM5センサーチップを備えたBiacore T200(GE Life Sciences、Marlborough、MA)でキャリブレーションフリー濃度分析(CFCA)実験を使用して判定した。すべての他の分析物は、適切な吸光係数を用いたA280nmの吸光度によって判定されたこれらの名目上の濃度でを使用した。溶液親和性は、オートサンプラーを備えたKinExA機器3000または3200(Sapidyne)を使用して室温(およそ23℃)で判定した。二次検出抗体を、製造者の指示に従ってDyLight 650(Pierce Biotechnology、Grand Island、NY)で標識した。免疫グロブリンG(IgG)ビオチン化は、製造者の指示に従ってEZ-Link(商標)Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin(Pierce Biotechnology、Grand Island、NY)を使用して等モル比のリンカー:IgGで実施した。別段の明言のない限り、固定化されたIgGは、Pierce IgG溶出緩衝液(pH2.8)/4Mの塩化ナトリウム(NaCl)の2:1v/v混合物を含む「Pierce/塩」カクテルで再生した。

30

40

【0408】

mAb7に対するhu-PD-1およびカニクイザル-PD-1(ともにHis-タグ付きモノマー)の結合相互作用を、PBS+0.01%のTween20のランニング緩

50

衝液およびPBS + 0.01%のTween 20 + 1 g / lのウシ血清アルブミン (BSA) の試料緩衝液中でKinExA法を使用して溶液中で判定した。2つの異なるアッセイフォーマットを使用した。第1のアッセイフォーマットでは、mAb 7を滴定して一定濃度のhu-PD-1 (名目上の200、400、または4000 pM) にし、試料を平衡状態に到達させた。遊離hu-PD-1を、抗hu-PD-1モノクローナル抗体mAb 7 (非優良試験所規範 (GLP) 条件下で社内で調製した [ロット番号R5432]) で被覆されていた (吸着によって) ポリメチルメタクリレート (PMMA) ビーズ上に捕捉した。次いでビーズに捕捉されたhu-PD-1を0.5 µg / mLのDyLight標識抗His mAb (R&D Systems、Minneapolis、MN) で検出した。第2のアッセイフォーマットでは、hu-PD-1またはカニクイザル-PD-1を滴定して一定濃度のmAb 7 (20、50、100、または500 pM) にし、これらの混合物を平衡化させた。遊離mAb 7を、遊離mAb 7に特異的に結合するがPD-1飽和mAb 7に特異的に結合しないブロッカー抗イディオタイプマウス抗mAb 7 mAb 1699.1H6を吸着したPMMAビーズ上に捕捉した。次いでビーズに捕捉されたmAb 7を、DyLight標識ヤギ抗hu-IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Inc、West Grove、PA) で検出した。すべての滴定は、実験に応じて範囲1 nM ~ 10 nM内に入るように最高名目上結合部位濃度を変更して12メンバーの2倍希釈系列として調製した。試料を最大で48時間平衡化し、注射量を、範囲0.7 V ~ 1.9 V内に入った総シグナルを与えるように1実験当たりで調整した。すべての試料は、二つ組のサイクルで注射した。1相互作用当たり最大で4つの独立した実験からのデータを、分析ソフトウェアのN曲線ツールを使用して包括的に分析し、単純な二分子モデルにフィッティングし、この場合、mAb 7の濃度を参照濃度として使用した。大域解析は、PD-1のK_Dおよび見かけ上の活性結合部位濃度について最良フィット値 (および95%の信頼区間) を報告する。

【0409】

溶液中のmAb 7に対するhu-PD-1およびカニクイザル-PD-1の結合親和性は、KinExAアッセイを使用して試験したとき互いに区別不能であり; 23での見かけ上の平衡解離定数 (K_D) 値は、hu-PD-1について17 pMまたは23 pM (反対のアッセイ方向で試験したとき)、およびカニクイザル-PD-1について28 pMと判定され; これらの3つの値は、互いに統計的に区別不能であった。これらの値は、表面プラズモン共鳴 (SPR) バイオセンサー測定によって再現され、それは、25でhu-PD-1について42 pMおよびカニクイザル-PD-1について69 pMならびに37でhu-PD-1について109 pMおよびカニクイザル-PD-1について115 pMのK_D値を生じた。mAb 7は、0.9 µMのK_D値でマウス-PD-1に結合し、SPR速度論的分析を用いて0.5 µMで試験したとき、ラット-PD-1に対して結合は検出されなかった。標識フリーバイオセンサーを使用して、mAb 7が、hu-PD-1がその天然リガンド、ヒトプログラム死-リガンド1 (hu-PD-L1)、およびヒトプログラム死-リガンド2 (hu-PD-L2) に結合するのを遮断することを実証した。SPRをさらに使用して、mAb 7が、アイソタイプマッチ対照と同じ速度論および特異性でヒトおよびカニクイザル種の両方に由来する一連の断片結晶性 (Fc) 受容体 (FCGR) および新生仔Fc受容体 (FcRn) に結合することを確認した。ELISAによって、mAb 7は、アイソタイプマッチ対照の挙動と一致して、補体コンポーネント1、qサブコンポーネント (C1q) への無視できる結合を示した。全体的に、mAb 7は、高い結合親和性および特異性でhu-PD-1およびカニクイザル-PD-1の両方に結合するが、マウス-PD-1に対して低い親和性およびラット-PD-1に対して無視できる結合を有する。

【0410】

表23は、mAb 7の様々な種に由来するPD-1との相互作用分析について得られた速度論的および親和性データを要約するものである。mAb 7は、これらの相互作用をKinExA法を使用して23で溶液中で測定したとき、統計的に区別不能な見かけ上

10

20

30

40

50

の親和性で $h u - P D - 1$ および $カニクイザル - P D - 1$ に結合し；見かけ上の K_D 値は、 $h u - P D - 1$ について 17 pM および 23 pM （2つの反対のアッセイ方向で試験したとき）ならびに $カニクイザル - P D - 1$ について 28 pM であった。 $KinExA$ 値は、 SPR によって実施した速度論的測定によって確認され、それは、 $h u - P D - 1$ について $42 \pm 11 \text{ pM}$ （ $n = 10$ ）および $カニクイザル - P D - 1$ について $69 \pm 24 \text{ pM}$ （ $n = 10$ ）の25 での見かけ上の K_D 値を与えた。37 での SPR 測定は、25 でのものより $1/2$ 弱い親和性を示し；37 での K_D 値は、 $h u - P D - 1$ について $109 \pm 8 \text{ pM}$ （ $n = 15$ ）および $カニクイザル - P D - 1$ について $115 \pm 15 \text{ pM}$ （ $n = 8$ ）であると判定された。 $mAb7$ は、 SPR によって25 で測定したとき、 $0.9 \pm 0.1 \mu\text{M}$ （ $n = 5$ ）の見かけ上の K_D でマウス $PD - 1$ に結合し、 $h u - P D - 1$ についてのもより $1/20$ ，000 弱い親和性に対応した。 SPR によって25 で、 $0.5 \mu\text{M}$ で試験したとき、ラット $- P D - 1$ について結合は検出されなかったが、ラット $- P D - 1$ タンパク質は、陽性対照、マウス $- P D - L1$ 、およびマウス $- P D - L2$ へのこれらの明らかな結合を介して活性であることが確認された。 $KinExA$ 測定についての K_D 値は、N回の独立した実験の大域解析の最良フィットおよび95%信頼区間を表し、一方、 SPR 測定についての K_D 値は、 $Protein - NLC$ センサーチップでのn回の独立した実験の平均 \pm 標準偏差を表す。表23において、 h または $h u =$ ヒト； $k_a =$ 会合速度定数； $k_d =$ 解離速度定数； $K_D =$ 平衡解離定数； $KinExA =$ 速度論的排除アッセイ； $mAb =$ モノクローナル抗体； $Ms =$ 1秒当たりのモル； $n =$ 数； $ND =$ 判定せず； $PD - 1 =$ プログラム死 - 1； $s =$ 秒； $SPR =$ 表面プラズモン共鳴； $Temp =$ 温度；* $h u - P D - 1$ との $mAb7$ の相互作用は、Beeら、2012に記載されたように2つの反対のアッセイ方向で試験した。

【0411】

【表26】

表 23: PF06801591 のヒト PD-1、カニクイザル PD-1、およびマウス PD-1 との相互作用について得られた速度論的および親和定数の概要

温度(°C)	方法	PD-1	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (pM)	n
23	KinExA	ヒト (MAb を滴定)*	ND	ND	23 (28-18)	3
23	KinExA	ヒト (PD-1 を滴定)*	ND	ND	17 (24-12)	3
25	SPR	ヒト	$(4.2 \pm 0.6) \times 10^5$	$(1.8 \pm 0.4) \times 10^{-5}$	42 ± 11	10
37	SPR	ヒト	$(8.4 \pm 2.0) \times 10^5$	$(8.5 \pm 1.2) \times 10^{-5}$	109 ± 28	15
23	KinExA	カニクイザル (PD-1 を滴定)	ND	ND	28 (34-23)	4
25	SPR	カニクイザル	$(4.3 \pm 1.4) \times 10^5$	$(2.9 \pm 0.4) \times 10^{-5}$	69 ± 24	10
37	SPR	カニクイザル	$(9.8 \pm 1.1) \times 10^5$	$(1.12 \pm 0.07) \times 10^{-4}$	115 ± 15	8
25	SPR	マウス	$(6.0 \pm 0.5) \times 10^3$	$(5.2 \pm 0.4) \times 10^{-3}$	$(9.0 \pm 1.0) \times 10^5$	5

【0412】

表24は、ヒトおよびカニクイザルの両方に由来するFCGRおよびFcRnを含めた一連のFc受容体に対するmAb7についての結合速度論および特異性は、アイソタイプマッチアイソタイプ対照、 $h u - IgG4$ について予期される値を再現したことを示す。例えば、 $mAb7$ は、アイソタイプ対照についての $177 \pm 71 \text{ pM}$ （ $n = 4$ ）と比較し

て $146 \pm 42 \text{ pM}$ ($n = 14$) の 25 での見かけ上の K_D 値 (平均 \pm 標準偏差) で $h u - F C G R I$ に結合した。すべての他の相互作用は、弱い親和性 (約 $1 \text{ } \mu\text{M}$ またはそれ超の K_D 値) によって特徴付けられた。速度論的分析は、 $F C G R$ について $p H 7.4$ および $F c R n$ について $p H 5.9$ で、 $P r o t e O n N L C$ チップで実施した。表 24 において、 $C D$ = 分化のクラスター; $c y$ = カニクイザル; $F C G R = F c$ 受容体; $F c R n$ = 新生仔 $F c$ 受容体; $h u$ = ヒト; k_a = 会合速度定数; k_d = 解離速度定数; K_D = 平衡解離定数; $M s$ = 1 秒当たりのモル; n = 数; s = 秒。

【0413】

【表 27】

表 24

分析物	mAb7	アイソタイプマッチ対照
hu-FCGRI (hu-CD64)	$k_a = (9.1 \pm 1.7) \times 10^6 (1/Ms)$ $k_d = (1.3 \pm 0.3) \times 10^{-3} (1/s)$ $K_D = 146 \pm 42 \text{ pM} (n = 14)$	$k_a = (1.0 \pm 0.3) \times 10^6 (1/Ms)$ $k_d = (1.8 \pm 0.4) \times 10^{-3} (1/s)$ $K_D = 177 \pm 71 \text{ pM} (n = 4)$
hu-FCGRIIa (hu-CD32a) 131H	3.6 μM	3.9 μM
hu-FCGRIIa (hu-CD32a) 131R	0.8 μM	0.4 μM
hu-FCGRIIb (hu-CD32b)	1.1 μM	0.7 μM
hu-FCGRIIIa (hu-CD16a) 158F	5 μM でかろうじて結合する	5 μM でかろうじて結合する
hu-FCGRIIIa (hu-CD16a) 158V	1 μM でかろうじて結合する	1 μM でかろうじて結合する
hu-FcRn	0.93 μM	$0.82 \pm 0.06 \mu\text{M} (n = 3)$
カニクイザル-FCGRIIa	2.4 μM	$2.6 \pm 0.5 \mu\text{M} (n = 3)$
カニクイザル-FCGRIIIa 42R	2.7 μM	$3.2 \pm 0.1 \mu\text{M} (n = 3)$
カニクイザル-FCGRIIIa 42S	1.6 μM	$1.9 \pm 0.2 \mu\text{M} (n = 3)$
カニクイザル-FcRn	0.61 μM	$0.57 \pm 0.04 \mu\text{M} (n = 3)$

【0414】

さらに、 $m A b 7$ は、アイソタイプマッチ対照、 $h u - I g G 4$ の挙動と一致して、 $E L I S A$ によって $C l q$ にかろうじて結合する (データを示さず)。その結合は、ヒト免疫グロブリン $G 2$ ($h u - I g G 2$) の低い結合より低くさえあった。対照的に、陽性対照、 $h u - I g G 1$ 、およびヒト免疫グロブリン $G 3$ ($h u - I g G 3$) は、高い結合シグナルを与えた。 $S P R$ および $O c t e t$ バイオセンサーの両方ならびに異なるアッセイフォーマット (ともにプレミックスおよび古典的なサンドイッチアッセイフォーマット) を使用して、 $m A b 7$ は、 $h u - P D 1$ の天然リガンド、 $h u - P D - L 1$ および $h u - P D - L 2$ への $h u - P D 1$ 結合を遮断することが実証された。

【0415】

これらのデータは、 $m A b 7$ が $h u - P D - 1$ に対して高親和性および高特異性で結合することを実証する。 $K i n E x A$ 法を使用して 23 で溶液中で測定したとき、 $m A b 7$ は、 $h u - P D - 1$ について 17 pM および 23 pM (交互のアッセイ方向で試験したとき)、ならびにカニクイザル - $P D - 1$ について 28 pM の統計的に区別不能な見かけ上の K_D 値で $h u - P D - 1$ およびカニクイザル - $P D - 1$ に結合した。 $m A b 7$ は、マウス - $P D - 1$ に対して 1 / 20, 000 弱い親和性 ($S P R$ によって 25 で 0.9 μM の見かけ上の K_D) および 0.5 μM で試験したときラット - $P D - 1$ への検出可能な結合なしを示した。 $m A b 7$ およびアイソタイプマッチ対照 $h u - I g G 4$ は、 $S P R$ によって 25 で測定した場合、 $h u -$ およびカニクイザル - $F c$ 受容体のパネルに対して

試験したとき、同様の速度論および特異性で結合した。m A b 7 は、h u - I g G 4 アイソタイプ対照と一致して、E L I S A によって試験したとき、無視できるシグナルで h u - C l q に結合し、その結合は、h u - I g G 2 のものより低くさえあった。m A b 7 は、h u - P D - 1 がその天然リガンド、h u - P D - L 1、および h u - P D - L 2 への結合することを遮断することが実証された。

【 0 4 1 6 】

(実施例 1 4)

抗 P D - 1 抗体および抗 O X 4 0 抗体を用いた組合せ療法

本実施例は、大腸がんについてのマウスモデルにおける抗 O X 4 0 抗体と組み合わせた抗 P D - 1 抗体での処置の効果を例示する。

【 0 4 1 7 】

本試験のために、C 5 7 B 6 / J 雌マウス (生後 6 ~ 8 週) の皮下に、 5×10^5 細胞 / マウスで M C - 3 8 マウス結腸腫瘍 (グレード I I I 腺癌) を接種した。10 日目に、マウスをランダム化し、10 m g / k g の抗マウス - P D - 1 および 1 m g / k g の抗マウス - O X - 4 0 で処置を始めた。処置は、抗 O X 4 0 抗体 (1 m g / k g) について、10、12、および 14 日目に、ならびに抗 P D - 1 抗体 (10 m g / k g) について 10、12、14、17、23、および 25 日目に i . p . 投与した。腫瘍体積を週 2 回測定した。試験は、34 日目に終わらせた。統計分析を、2 元配置 A N O V A を使用して実施して、単一時点でそれぞれの 2 つの群間で平均を比較した。結果を表 2 5 に要約する。表 2 5 において、値は、示された日における腫瘍体積、1 群当たり 8 匹のマウスの平均 \pm (平均の標準誤差) s e m を示す ; N = 1 群当たりの数、m m ² = 立方ミリメートル。アイソタイプ対照は、抗 O X 4 0 について 1 m g / k g および抗 P D - 1 について 10 m g / k g でそれぞれの抗体の適切なアイソタイプを含んでいた。

【 0 4 1 8 】

【表 2 8】

表25.抗PD-1抗体および抗OX40抗体を用いた処置後のMC38担持マウスにおける腫瘍体積

処置群	腫瘍体積(mm ²)				N	無腫瘍マウスの%
	10 日目	24 日目	27 日目	34 日目		
アイソタイプ対照	67.±7.9	832.±139.0	1408 ± 252.4	1866 ± 279.0	8	0%
抗 PD-1	67 ± 8.0	312 ± 63.2	540 ± 125.0	939 ± 169.0	8	0%
抗 OX40	67 ± 7.5	302 ± 64.1	370 ± 77.2	720 ± 145.0	8	0%
抗 PD-1 + 抗 OX40	67 ± 7.4	190 ± 38.0	255 ± 51.2	423.0 ± 90.0	8	12.5%

【 0 4 1 9 】

24 日目に始まって、すべての抗 P D - 1 抗体および / または抗 O X - 4 0 抗体処置群は、対照群と比較したとき、有意により小さい腫瘍体積を示した (表 2 5)。24 日目に、組合せ (抗 P D - 1 抗体と抗 O X 4 0 抗体) 処置群は、アイソタイプ対照群と比較したとき、p = 0.0001 の有意性を示した一方、それぞれの単一抗体処置は、対照群と比較したとき、p = 0.01 の有意性を示した。34 日目に、すべての処置群は、対照群と比較したとき、p = 0.0001 の有意性を示した。34 日目に、組合せ処置群は、抗 P D - 1 抗体単独処置群または抗 O X - 4 0 抗体単独処置群と比較したとき、差異を示した。これらの結果は、抗 P D - 1 抗体および抗 O X 4 0 抗体の両方を用いた処置は、いずれかの抗体単独を用いた処置と比較したとき、腫瘍増殖を減速させたことを実証する。

【 0 4 2 0 】

(実施例15)

活性化T細胞上のPD-1の発現に対するワクチンの効果

本実施例は、抗CTLA4モノクローナル抗体トレメリムマブ(チェックポイント阻害剤)の存在下でのCD3⁺CD4(表26)およびCD3⁺CD8⁺T細胞(表27)上のPD-1の発現に対するヒト前立腺特異的膜抗原(PMSA)を発現するDNAベースワクチンの効果を例示する。

【0421】

in vivo Study手順。3つの群のチャイニーズカニクイザル(*Chinese cynomolgus macaque*)(*n* = 8/群)を試験で使用した。群1および2中の動物に、ヒトPMSAのアミノ酸15~750をコードするAdC68アデノウイルスベクター(配列番号44)を含有するワクチンを筋肉内注射し(2e11 VPの合計用量で)、一方、群3中の動物は、ワクチン接種を受けなかった。AdC68アデノウイルスベクターの完全な配列は、配列番号44に提供されている。さらに、ワクチン接種直後に、群2中の動物を、皮下注射によって抗CTLA4モノクローナル抗体トレメリムマブ50mgで処置した。ワクチン接種前(Pre)および後のそれぞれの動物からの全血試料を、9、15、および29日目に収集し、フローサイトメトリーによってPD-1発現CD3⁺CD4およびCD3⁺CD8⁺T細胞の頻度について分析した。

【0422】

CD3⁺CD4およびCD8⁺T細胞フェノタイピング。白血球集団を、新たに収集した全血に対してマルチカラーフローサイトメトリー分析を実施することによってフェノタイピングした。簡単に言えば、全血を、CD3-V500(クローンSP34-2)、CD4-BV605(クローンL200)、CD8-APC.H7(クローンSK1)、PD1-AF488(クローンEH12.2H7、Biolegend)、PDL1-BV421(クローンMIH1)、Lag3-PE.Cy7(クローン11E3、Novus)、CD69-PE.テキサスレッド(クローンTP1.553、Beckman Coulter)、TIM3-APC(クローン344823、R&D Systems)、CD20-PE.Cy5.5(クローン2H7、eBioscience)、CD14-AF700(クローンM5E2)、CD16-PE.Cy5(クローン3G8)、CD56-PerCP.Cy5.5(クローンB159)、およびCD11c-PE(クローンSHCL3)を含有する抗体カクテルで、室温で20分間染色した。すべての抗体は、別段に示されていない限りBDから購入した。試料を、RBC溶解緩衝液(BD)で処理し、洗浄し、ビーズをカウントする液体(BD)50mlと混合し、LSR Fortessa(BD)で取得した。データを、FlowJo(Tree Star Inc、USA)を使用して分析した。

【0423】

CD3⁺CD4⁺T細胞上のPD-1発現の結果を表26に提示し、CD3⁺CD8⁺T細胞上のPD-1発現の結果を表27に提示する。PD-1の誘導が、ワクチン接種して9日後に観察され、ワクチン接種後29日目までにナイーブ動物(群3)において見られるレベルまで消散した。これらの結果は、抗CTLA4抗体と一緒に与えられたワクチンベクターは、非ヒト霊長類においてCD3⁺CD4およびCD8⁺T細胞上のPD-1発現を誘発することができることを示す。

【0424】

10

20

30

40

【表 29】

表 26. カニクイザル(*Cynomolgus macaque*)における CD3⁺CD4⁺ T 細胞上の PD-1 発現速度論

時点	群	総 CD3 ⁺ CD4 ⁺ T 細胞中の個々の % PD-1 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ T 細胞							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Pre	1	16.0	7.473	8.275	12.441	12.935	12.481	10.93	12.649
	2	9.757	11.383	7.795	5.943	13.279	24.959	12.112	10.375
	3	11.577	7.577	9.943					
9 日目	1	18.124	11.72	11.977	18.861	20.657	10.623	11.766	12.792
	2	32.07	29.001	38.593	27.516	25.962	34.568	27.435	28.378
	3	18.608	10.101	13.205					
15 日目	1	14.87	10.302	8.27	15.742	13.609	8.763	10.407	9.82
	2	16.421	14.578	18.138	15.667	20.927	27.778	16.612	17.583
	3	16.878	10.607	10.878					
29 日目	1	14.819	9.39	8.412	14.051	14.436	9.576	10.524	11.116
	2	11.594	10.209	12.971	8.293	20.989	26.388	14.126	13.868
	3	14.182	9.098	14.138					

【0425】

【表 30】

表 27. カニクイザル(*Cynomolgus macaque*)における CD3⁺CD8⁺ T 細胞上の PD-1 発現速度論

時点	群	総 CD3 ⁺ CD8 ⁺ T 細胞中の個々の % PD-1 ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ T 細胞							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Pre	1	10.8	4.9	10.1	5.7	11.9	13.5	7.1	9.6
	2	5.3	19.4	5.0	20.2	16.9	29.8	7.7	8.7
	3	8.8	6.9	4.3					
9 日目	1	5.3	7.0	12.3	8.1	16.1	13.2	5.8	11.3
	2	15.6	22.5	7.4	29.5	20.7	26.2	11.4	10.2
	3	11.5	5.8	5.7					
15 日目	1	7.4	6.9	11.7	8.2	16.2	15.4	6.8	14.0
	2	7.6	21.6	10.8	21.8	27.1	25.7	14.2	10.5
	3	12.3	7.4	6.4					
29 日目	1	9.4	7.5	15.3	9.8	14.7	16.7	5.9	14.7
	2	8.5	20.3	8.0	22.5	26.0	22.4	9.1	9.9
	3	11.6	8.6	8.5					

【0426】

(実施例 16)

ヒト P S M A を発現するワクチンによって誘導される抗原特異的 T 細胞応答に対する抗 P D - 1 抗体の効果

本実施例は、カニクイザル (*C y n o m o l g u s m a c a q u e*) においてヒト P S M A を発現する A d C 6 8 アデノウイルスベクターを含有するワクチンによって誘導される I F N C D 4 および C D 8 T 細胞応答に対する抗 P D 1 抗体の効果を示す。

【0427】

細胞内サイトカイン染色 (I C S) アッセイ。簡単に言えば、個々の動物からの P B M C を、各ペプチド 2 μ g / m l で、それぞれの抗原の全配列に及ぶ 1 1 アミノ酸重複する 1 5 m e r ペプチドライブラリーからのペプチドのプールとともに共インキュベートした

。プレートに、37℃、5%のCO₂で約16時間インキュベートした。次いで細胞をCD8⁺ T細胞からの細胞内IFN γ 発現を検出するために染色し、固定した。細胞をフローサイトメーターで取得した。応答の頻度を、ペプチドを含有しなかったジメチルスルホキシド対照ウェル中の応答を差し引いて、CD8⁺ T細胞100万個当たりのIFN γ CD8⁺ T細胞の数に正規化した。表中の抗原特異的応答は、対応する抗原特異的ペプチドプールに対する応答の和を表す。

【0428】

in vivo 試験手順。簡単に言えば、5つの群のチャイニーズマカク（*Chinese cynomolgus macaque*）（ $n=8$ /群）に、2e11 VPPの総用量でヒトPSMA（hPSMA）のアミノ酸15～750をコードするAdC68アデノウイルス（配列番号44）を含有するワクチンを筋肉内注射した。群2、4、および5におけるワクチン接種の直後に、抗CTLA4モノクローナル抗体トレメリムマブ50mgを皮下注射し、かつ/または抗PD-1モノクローナル抗体mAb7を10mg/kgで皮下（群3および4）もしくは静脈内（群5）に与えた。PBMCをそれぞれの動物から単離し、ICCSアッセイに付してヒトPSMA特異的IFN γ CD4（9日目もしくは29日目）またはCD8 T細胞応答（29日目）を測定した。全長ヒトPSMAのアミノ酸配列は、配列番号42に提供されている。ヒトPSMAのアミノ酸15～750を発現するAdC68アデノウイルスベクターの配列は、配列番号44に提供されている。

【0429】

結果。結果を表29、30、および31に提示する。データは、抗CTLA4および抗PD-1の両方は個々に、ワクチンによって誘導されるIFN γ CD4およびCD8 T細胞応答の頻度を増大させることができることを実証した。

【0430】

【表31】

表 28. P 抗原特異的 IFN γ T 細胞応答を誘導するための ELISpot および ICCS アッセイにおいて使用したペプチドプールのペプチド配列情報

抗原	ペプチドライブラリープール
ヒト PSMA	3つの別個のプールとしてアッセイした全長 hPSMA タンパク質配列全体(アミノ酸配列:1~750)に及ぶ、11 アミノ酸重複する、185 の連続した 15mer ペプチド

【0431】

【表32】

表 29.9 日目におけるワクチンによって誘導された IFN γ CD8 T 細胞応答

群	チェックポイント 阻害剤 (複数可)	MAB7 経路	個々の hPSMA 特異的 IFN γ CD8 T 細胞力価(IFN γ ⁺ CD8 細胞/1e6 CD8 T 細胞、バックグラウンド調整した)								幾何 平均
			1	2	3	4	5	6	7	8	
1	なし	n/a	1072	1	1453	6722	1	1	1055	503	92.91
2	トレメリムマブ	n/a	7278	356	423	6009	954	15862	935	2511	1977
3	mAb7	SC	2077	6537	3138	449	1302	4063	769	487	1575
4	トレメリムマブ mAb7	SC	222	667	1199	6879	933	1959	40349	6901	2235
5	トレメリムマブ mAb7	IV	1037	1735	2371	489	7435	1	20947	4613	1052

【0432】

【表 3 3】

表 30.9 日目におけるワクチンによって誘導された IFN γ CD4 T 細胞応答

群	チェックポイント 阻害剤 (複数可)	mAb7 経路	個々の hPSMA 特異的 IFN γ CD4 T 細胞力価(IFN γ ⁺ CD4 細胞/1e6 CD4 T 細胞、バックグラウンド調整した)								幾何 平均
			1	2	3	4	5	6	7	8	
1	なし	n/a	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	トレメリムマブ	n/a	665	259	1	11914	271	326	1	1747	154
3	mAb7	SC	174	669	457	193	194	1	192	159	125
4	トレメリムマブ + mAb7	SC	1955	1	435	1764	736	1307	1852	471	401
5	トレメリムマブ + mAb7	IV	858	1567	1398	1102	163	705	4938	1029	102 4

10

【 0 4 3 3】

【表 3 4】

表 31.29 日目におけるワクチンによって誘導された IFN γ CD4 T 細胞応答

群	チェックポイント 阻害剤 (複数可)	mAb7 経路	個々の hPSMA 特異的 IFN γ CD4 T 細胞力価(IFN γ ⁺ CD4 細胞/1e6 CD4 T 細胞、バックグラウンド調整した)								幾何 平均
			1	2	3	4	5	6	7	8	
1	なし	n/a	1	506	246	143	504	1	1	1	24
2	トレメリムマブ	n/a	175	63	1021	2845	867	662	265	372	230
3	mAb7	SC	129	1	145	1	230	1	97	1	12
4	トレメリムマブ + mAb7	SC	816	107	527	315	168	1084	1131	135	377
5	トレメリムマブ + mAb7	IV	332	1496	559	360	221	361	1164	248	468

20

【 0 4 3 4】

(実施例 17)

ヒト前立腺特異的膜抗原 (PSMA)、前立腺幹細胞抗原 (PSCA)、および前立腺特異的抗原 (PSA) を共発現するワクチンによって誘導される IFN T 細胞応答に対する抗 PD-1 抗体の効果

in vivo 試験手順。簡単に言えば、3つの群のチャイニーズマカケ (Chinese cynomolgus macaque) ($n = 4$ / 群) を試験で使用した。群 1 の動物にビヒクルを筋肉内注射した。群 2 の動物に、 $20 \text{ mg} / \text{kg}$ で皮下に抗 PD-1 モノクローナル抗体 mAb7 を投与した。群 3 の動物を、 $6 \text{ e } 11 \text{ VP}$ の総用量で 3 種のヒト前立腺関連抗原 (PSMA、PSCA、および PSA) を共発現する Ad C68 アデノウイルスベクター (ベクター Ad C68 W-734) を含有するワクチンで処置し、直後に抗 CTLA4 抗体トレメリムマブ 150 mg および $20 \text{ mg} / \text{kg}$ での抗 PD-1 モノクローナル抗体 mAb7 を皮下注射した。注射して 28 日後に、動物を、ビヒクル (群 1)、 $20 \text{ mg} / \text{kg}$ で皮下に抗 PD-1 モノクローナル抗体 mAb7 (群 2)、または電気穿孔によって送達される 3 種のヒト前立腺がん抗原 (PSMA、PSCA、および PSA) を発現する DNA プラスミド (プラスミド 458) でブーストし、直後に抗 CTLA4 150 mg および $20 \text{ mg} / \text{kg}$ での抗 PD-1 モノクローナル抗体を皮下注射した (群 3)。最も重要な最初の注射の 48 日後に、PBMC をそれぞれの動物から単離し、ELISPOT アッセイに付して PSMA、PSCA、および PSA 特異的 IFN T 細胞応答を測定した。

40

【 0 4 3 5】

50

試験で使用したベクター A d C 6 8 W - 7 3 4 の完全な配列は、本開示の配列番号 4 5 および国際出願公開第 W O 2 0 1 5 / 0 6 3 6 4 7 号の配列番号 6 3 に提供されている。ベクター A d C 6 8 W - 7 3 4 の構築も W O 2 0 1 5 / 0 6 3 6 4 7 に記載されており、その開示は、参照により本明細書に組み込まれている。A d C 6 8 W - 7 3 4 ベクターおよびプラスミド 4 5 8 はそれぞれ、(1) 配列番号 4 2 の配列を有するヒト P S M A のアミノ酸 1 5 ~ 7 5 0 をコードするヌクレオチド配列、(2) 配列番号 4 7 の配列を有するヒト P S A のアミノ酸 2 5 ~ 2 6 1 をコードするヌクレオチド配列、および (3) 配列番号 4 8 の全長ヒト P S C A をコードするヌクレオチドを含む。

【 0 4 3 6 】

I F N E L I S P O T アッセイ。簡単に言えば、個々の動物からの末梢血単核細胞 (P B M C) を、各ペプチド 2 μ g / m l で、それぞれの抗原の全配列に及ぶ 1 1 アミノ酸重複する 1 5 m e r ペプチドライブラリーからのペプチドのプールとともに二つ組で共インキュベートした。プレートは、製造者の指示に従って、3 7 、5 % の C O ₂ で約 1 6 時間インキュベートし、次いで洗浄および現像した。I F N スポット形成細胞 (S F C) の数を C T L リーダーでカウントした。二つ組の平均を計算し、ペプチドを含有しなかった陰性対照ウェルの応答を差し引いた。次いで S F C カウントを正規化して 1 e 6 P B M C 1 個当たりの応答を記述した。表中の抗原特異的応答は、対応する抗原特異的ペプチドプールに対応する応答の和を表す。

【 0 4 3 7 】

結果。表 3 3 に提示されている E L I S p o t 結果は、皮下の抗 P D - 1 抗体および抗 C T L A 4 抗体でワクチンを受けた動物は、少なくとも 1 種の前立腺がん抗原に対する I F N T 細胞応答のロバストな増大を呈した一方、ビヒクル群 (群 1) または抗 P D - 1 抗体単独を投与された群 (群 2) においてこれらの抗原に対する I F N T 細胞応答は存在しなかったことを実証する。

【 0 4 3 8 】

【表 3 5】

表 32. 抗原特異的 IFN γ T 細胞応答を誘導するための ELISpot および ICCS アッセイにおいて使用したペプチドプールのペプチド配列情報

抗原	ペプチドライブラリープール
PSMA	3 つの別個のプールとしてアッセイした全長 PSMA タンパク質配列全体(アミノ酸配列:1~750)に及ぶ、11 アミノ酸重複する、185 個の連続した 15mer ペプチド
PSCA	単一の別個のプールとしてアッセイした全長 PSCA タンパク質配列全体(アミノ酸配列:1~123)に及ぶ、11 アミノ酸重複する、28 個の連続した 15mer ペプチド
PSA	1 つの単一の別個のプールとしてアッセイした全長 PSA タンパク質配列全体(アミノ酸配列:1~246)に及ぶ、11 アミノ酸重複する、62 個の連続した 15mer ペプチド

【 0 4 3 9 】

【表 3 6】

表 33. カニクイザル(*Cynomolgus macaque*)におけるワクチンによって誘導される抗原特異的 IFN γ ELISpot T 細胞応答に対する抗 PD-1 抗体の効果

群	ワクチン	チェックポイント 阻害剤(複数可)	刺激抗原	個々の IFN γ ELISpot T 細胞力 価(SFC/1e6 PBMC、バックグラ ウンドを差し引いた)			
1	n/a	n/a	PSMA	2	2	2	4
2	n/a	mAb7		10	1	7	3
3	+	トレメリムマブ + mAb7		1360	1263	2441	3224
1	n/a	n/a	PSCA	0	0	1	1
2	n/a	mAb7		0	0	4	4
3	+	トレメリムマブ + mAb7		91	18	488	416
1	n/a	n/a	PSA	0	0	5	2
2	n/a	mAb7		0	0	3	0
3	+	トレメリムマブ + mAb7		404	[1267]	527	512
ブラケット内の値は、少なくとも 1 つのアッセイのレプリケートがアッセイの定量化 の上限(1333 SFC/1e6 PBMC)を超えていた応答を表す。0 SFC/1e6 PBMC の値を幾 何平均の計算のために 1 に変換した。							

【 0 4 4 0 】

開示される教示を、様々な用途、方法、キット、および組成物を参照して記載してきたが、様々な変更および改変を、本明細書の教示および以下の請求項に係る発明から逸脱することなく行うことができることが理解されるであろう。上記の実施例は、開示される教示をより良好に例示するために提供されており、本明細書に提示した教示の範囲を限定するように意図されていない。本教示をこれらの例示的な実施形態の観点から記載してきたが、当業者は、これらの例示的な実施形態の多数のバリエーションおよび改変が、過度の実験を伴うことなく可能であることを容易に理解するであろう。すべてのこのようなバリエーションおよび改変は、本教示の範囲内である。

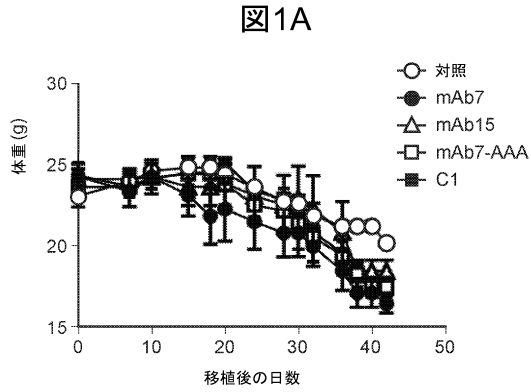
【 0 4 4 1 】

特許、特許出願、論文、教科書などを含む本明細書に引用したすべての参考文献、ならびにこれらに引用された参考文献は、これらが既に組み込まれていない程度に、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。組み込まれた文献および同様の資料の 1 つまたは複数、それだけに限らないが、定義された用語、用語の使用法、記載した技法などを含めて、本願と異なる、または矛盾する場合には、本願が支配する。

【 0 4 4 2 】

上記の記載および実施例は、本発明のある特定の具体的な実施形態を詳述し、本発明者らが企図するベストモードを記述する。しかし、どんなに詳細に上記のことが本文中に現れる場合があっても、本発明を多くの方法で実践することができ、本発明は、添付の特許請求の範囲およびその任意の均等物に従って解釈されるべきであることが理解されるであろう。

【図 1 - 1】



【図 1 - 2】

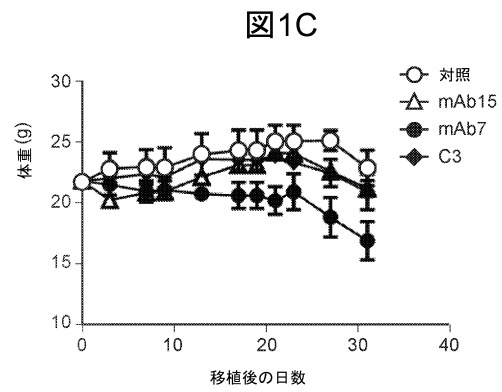


図1B

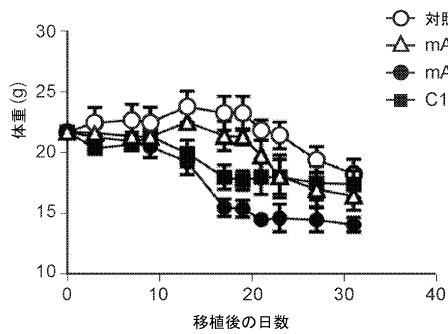
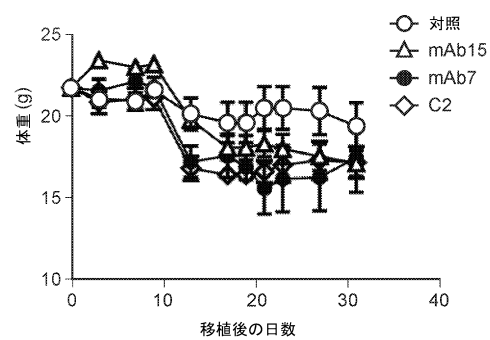
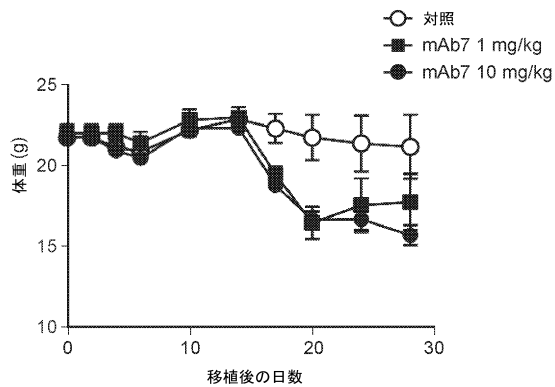


図1D



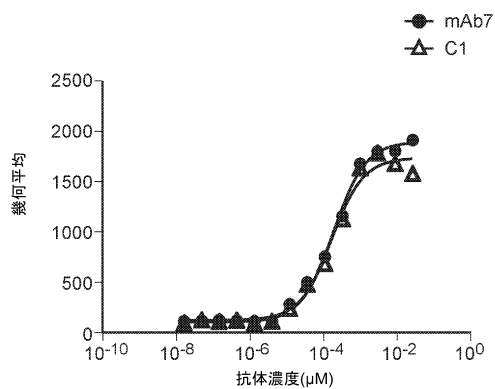
【図 1 - 3】

図1E



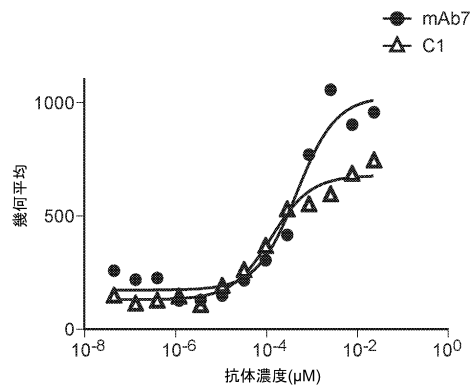
【図 2 - 1】

図2A



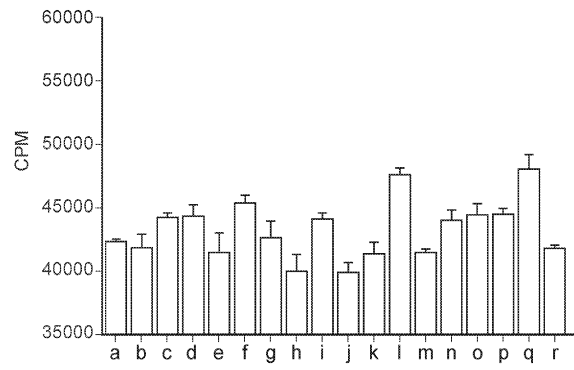
【 図 2 - 2 】

図2B



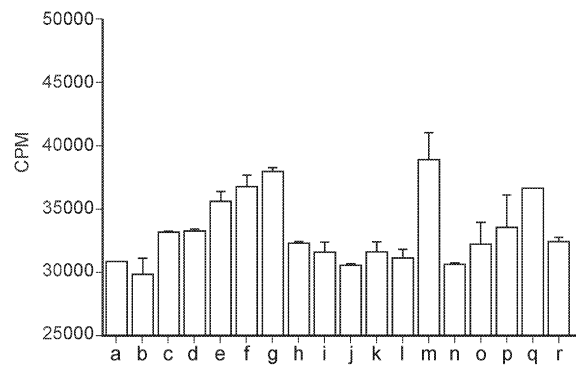
【 図 3 】

図3



【 図 4 】

図4



【配列表】

0006552621000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N 15/63 (2006.01)		C 1 2 N 15/63	Z
C 1 2 N 5/12 (2006.01)		C 1 2 N 5/12	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)		C 1 2 P 21/08	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)		C 0 7 K 16/28	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	T
A 6 1 P 43/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)		A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 21/00 (2006.01)		A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)		A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 1/02 (2006.01)		A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)		A 6 1 P 1/02	
A 6 1 P 5/00 (2006.01)		A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)		A 6 1 P 5/00	
A 6 1 P 15/00 (2006.01)		A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 13/08 (2006.01)		A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 1/18 (2006.01)		A 6 1 P 13/08	
A 6 1 P 19/00 (2006.01)		A 6 1 P 1/18	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)		A 6 1 P 19/00	
		A 6 1 P 13/12	

(31)優先権主張番号 62/251,973

(32)優先日 平成27年11月6日(2015.11.6)

(33)優先権主張国 米国(US)

微生物の受託番号 ATCC PTA-121182

微生物の受託番号 ATCC PTA-121183

早期審査対象出願

(74)代理人 100185960

弁理士 池田 理愛

(72)発明者 ヤスミナ ノウビア アブディッチ

アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州 サウス・サンフランシスコ市 イースト・グラ
ンド・アヴェニュー 2 3 0 ライナット ニューロサイエンス コーポレーション内

(72)発明者 ヘレン キム チョ

アメリカ合衆国 9 2 1 3 0 カリフォルニア州 サン・ディエゴ市 トワイライト・リッジ 4
1 2 7

(72)発明者 ウェイシェン ホー

アメリカ合衆国 9 4 0 0 2 カリフォルニア州 ベルモント市 アカデミー・アヴェニュー 9
1 7

(72)発明者 カリン ウテ ヨース

アメリカ合衆国 9 2 1 0 6 カリフォルニア州 サン・ディエゴ市 ガーデン・レーン 3 7 1
2

(72)発明者 アーヴィンド ラジュパル

アメリカ合衆国 9 4 1 2 7 カリフォルニア州 サンフランシスコ市 フォースター・ストリー

ト 519

(72)発明者 サウサン ユーセフ

アメリカ合衆国 94025 カリフォルニア州 メンロー・パーク市 シャロン・パーク・ドラ
イブ 675 #104

審査官 堂畑 厚志

(56)参考文献 特表2012-503984(JP,A)

特表2016-523516(JP,A)

国際公開第2014/159562(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/13

C07K 16/28

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/REGISTRY(STN)