

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-502038

(P2020-502038A)

(43) 公表日 令和2年1月23日(2020.1.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28 ZNA	4B064
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/10	4B065
C12P 21/08 (2006.01)	C12P 21/08	4C084
A61P 35/00 (2006.01)	A61P 35/00	4C085
A61P 17/00 (2006.01)	A61P 17/00	4H045
審査請求 有 予備審査請求 未請求		(全 33 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-535396 (P2018-535396)	(71) 出願人	518049935 イノベント バイオロジックス (スウツ ォウ) カンパニー, リミテッド
(86) (22) 出願日	平成28年10月15日 (2016.10.15)		中華人民共和国 ジャンスウ 21512 3, スウツォウ, スウツォウ インダスト リアル パーク, ドンビン ストリート 168
(85) 翻訳文提出日	平成30年7月6日 (2018.7.6)	(74) 代理人	100092783 弁理士 小林 浩
(86) 国際出願番号	PCT/CN2016/102238	(74) 代理人	100120134 弁理士 大森 規雄
(87) 国際公開番号	W02018/068336	(74) 代理人	100135943 弁理士 三橋 規樹
(87) 国際公開日	平成30年4月19日 (2018.4.19)	(74) 代理人	100104282 弁理士 鈴木 康仁
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 PD-1 抗体

(57) 【要約】

本発明は、ヒトプログラム細胞死1 (PD-1) に結合する抗体を提供し、単独で、かつ化学療法及び他のがん治療法と組み合わせてがんの治療に有用であり得る。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ヒト P D - 1 (配列番号 1) に結合する抗体であって、軽鎖 (L C) 及び重鎖 (H C) を含み、

前記軽鎖がそれぞれ配列番号 10、11 及び 12 に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域 L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 を含み、

前記重鎖が重鎖相補性決定領域 H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3 を含み、

H C D R 1 が配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなり、

H C D R 2 が配列番号 3、4、5、6 または 7 に示されるアミノ酸配列からなり、

H C D R 3 が配列番号 8 または 9 に示されるアミノ酸配列からなる、抗体。

10

【請求項 2】

H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3 がそれぞれ配列番号 2、配列番号 3、及び配列番号 8 に示されるアミノ酸配列からなる、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3 がそれぞれ配列番号 2、配列番号 4、及び配列番号 9 に示されるアミノ酸配列からなる、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 4】

H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3 がそれぞれ配列番号 2、配列番号 5、及び配列番号 8 に示されるアミノ酸配列からなる、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 5】

H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3 がそれぞれ配列番号 2、配列番号 6、及び配列番号 8 に示されるアミノ酸配列からなる、請求項 1 に記載の抗体。

20

【請求項 6】

H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3 がそれぞれ配列番号 2、配列番号 7、及び配列番号 9 に示されるアミノ酸配列からなる、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 7】

1 つまたは 2 つの軽鎖 (L C) 及び 1 つまたは 2 つの重鎖 (H C) を含む抗体であって、前記軽鎖の各々が軽鎖可変領域 (L C V R) を含み、前記重鎖の各々が重鎖可変領域 (H C V R) を含み、前記 L C V R が配列番号 18 に示されるアミノ酸配列を有し、前記 H C V R が配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、または配列番号 17 に示されるアミノ酸配列を有する、抗体。

30

【請求項 8】

前記 L C V R が配列番号 18 に示されるアミノ酸配列を有し、前記 H C V R が配列番号 13 に示されるアミノ酸配列を有する、請求項 7 に記載の抗体。

【請求項 9】

前記 L C V R が配列番号 18 に示されるアミノ酸配列を有し、前記 H C V R が配列番号 14 に示されるアミノ酸配列を有する、請求項 7 に記載の抗体。

【請求項 10】

前記 L C V R が配列番号 18 に示されるアミノ酸配列を有し、前記 H C V R が配列番号 15 に示されるアミノ酸配列を有する、請求項 7 に記載の抗体。

40

【請求項 11】

前記 L C V R が配列番号 18 に示されるアミノ酸配列を有し、前記 H C V R が配列番号 16 に示されるアミノ酸配列を有する、請求項 7 に記載の抗体。

【請求項 12】

前記 L C V R が配列番号 18 に示されるアミノ酸配列を有し、前記 H C V R が配列番号 17 に示されるアミノ酸配列を有する、請求項 7 に記載の抗体。

【請求項 13】

前記 L C が配列番号 24 に示されるアミノ酸配列を有し、前記 H C V R が配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21、配列番号 22、または配列番号 23 に示されるアミノ酸配列を有する、請求項 7 に記載の抗体。

50

【請求項 14】

前記 LC が配列番号 24 に示されるアミノ酸配列を有し、前記 HC が配列番号 19 に示されるアミノ酸配列を有する、請求項 13 に記載の抗体。

【請求項 15】

前記 LC が配列番号 24 に示されるアミノ酸配列を有し、前記 HC が配列番号 20 に示されるアミノ酸配列を有する、請求項 13 に記載の抗体。

【請求項 16】

前記 LC が配列番号 24 に示されるアミノ酸配列を有し、前記 HC が配列番号 21 に示されるアミノ酸配列を有する、請求項 13 に記載の抗体。

【請求項 17】

前記 LC が配列番号 24 に示されるアミノ酸配列を有し、前記 HC が配列番号 22 に示されるアミノ酸配列を有する、請求項 13 に記載の抗体。

【請求項 18】

前記 LC が配列番号 24 に示されるアミノ酸配列を有し、前記 HC が配列番号 23 に示されるアミノ酸配列を有する、請求項 13 に記載の抗体。

【請求項 19】

2つの軽鎖及び2つの重鎖を含み、各軽鎖が配列番号 24 に示されるアミノ酸配列を有し、各重鎖が配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21、配列番号 22、または配列番号 23 に示されるアミノ酸配列を有する、請求項 13 に記載の抗体。

【請求項 20】

各軽鎖が配列番号 24 に示されるアミノ酸配列を有し、各重鎖が配列番号 19 に示されるアミノ酸配列を有する、請求項 19 に記載の抗体。

【請求項 21】

各軽鎖が配列番号 24 に示されるアミノ酸配列を有し、各重鎖が配列番号 20 に示されるアミノ酸配列を有する、請求項 19 に記載の抗体。

【請求項 22】

各軽鎖が配列番号 24 に示されるアミノ酸配列を有し、各重鎖が配列番号 21 に示されるアミノ酸配列を有する、請求項 19 に記載の抗体。

【請求項 23】

各軽鎖が配列番号 24 に示されるアミノ酸配列を有し、各重鎖が配列番号 22 に示されるアミノ酸配列を有する、請求項 19 に記載の抗体。

【請求項 24】

各軽鎖が配列番号 24 に示されるアミノ酸配列を有し、各重鎖が配列番号 23 に示されるアミノ酸配列を有する、請求項 19 に記載の抗体。

【請求項 25】

前記重鎖のうちの1つが前記軽鎖のうちの1つと鎖間ジスルフィド結合を形成し、他の重鎖が他の軽鎖と鎖間ジスルフィド結合を形成し、前記重鎖のうちの1つが他の重鎖と2つの鎖間ジスルフィド結合を形成する、請求項 19 ~ 24 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 26】

前記抗体がグリコシル化されている、請求項 1 ~ 24 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 27】

配列番号 24 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列及び配列番号 20 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む DNA 分子を含む哺乳動物細胞であって、配列番号 24 のアミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号 20 のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体を発現することができ、好ましくは CHO 細胞である哺乳動物細胞。

【請求項 28】

配列番号 24 のアミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号 20 のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体の産生プロセスであって、請求項 27 に記載の哺乳動物細胞を前記抗体が発現されるような条件下で培養すること、及び前記発現された抗体を回収することを含む、

10

20

30

40

50

プロセス。

【請求項 29】

請求項 28 に記載のプロセスにより産生された、抗体。

【請求項 30】

請求項 1 ~ 26 のいずれか一項に記載の抗体、及び薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。

【請求項 31】

がんの治療方法であって、治療を必要とする対象に、有効量の請求項 1 ~ 26 のいずれか一項に記載の抗体を投与するステップを含む、方法。

【請求項 32】

前記がんが黒色腫、肺がん、頭頸部がん、結腸直腸がん、膵臓がん、胃がん、腎臓がん、膀胱がん、前立腺がん、乳がん、卵巣がん、または肝がんである、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

1 つ以上の抗腫瘍剤を同時に、別々に、または連続して投与することをさらに含む、請求項 31 または 32 に記載の方法。

【請求項 34】

療法における使用のための、請求項 1 ~ 26 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 35】

がんの治療における使用のための、請求項 1 ~ 26 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 36】

前記がんが、黒色腫、肺がん、頭頸部がん、結腸直腸がん、膵臓がん、胃がん、腎臓がん、膀胱がん、前立腺がん、乳がん、卵巣がん、または肝細胞癌である、請求項 35 に記載の使用のための抗体。

【請求項 37】

がんの治療における組み合わせた使用のための、1 つ以上の抗腫瘍剤との同時の、別々の、または連続した組み合わせでの、請求項 1 ~ 26 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 38】

前記がんが、黒色腫、肺がん、頭頸部がん、結腸直腸がん、膵臓がん、胃がん、腎臓がん、膀胱がん、前立腺がん、乳がん、卵巣がん、または肝細胞癌である、請求項 37 の組み合わせの使用のための抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、医学分野に関する。より具体的には、本発明は、ヒトプログラム細胞死 1 (PD-1) に結合する抗体に関し、単独で、かつ化学療法及び他のがん治療法と組み合わせてがんの治療に有用であり得る。

【背景技術】

【0002】

腫瘍細胞は、複数のメカニズムを通して、免疫系による検出及び排除を逃れる。免疫チェックポイント経路は、自己寛容の維持及び活性化 T 細胞の制御において使用されているが、がん細胞は、その経路を使用し、破壊を防ぐことができる。PD-1 / ヒトプログラム細胞死 1 リガンド 1 (PD-L1) 経路は、1 つのこのような免疫チェックポイントである。ヒト PD-1 は、T 細胞上で見られ、PD-L1 及びヒトプログラム細胞死 1 リガンド 2 (PD-L2) の PD-1 との結合は、T 細胞増殖及びサイトカイン産生を阻害する。PD-L1 及び PD-L2 の腫瘍細胞産生は、したがって T 細胞監視からの回避を可能にすることができる。

【0003】

ヒト PD-1 に対する完全ヒト IgG4 (S228P) 抗体ニボルマブは、PD-1 の

10

20

30

40

50

PD-L1及びPD-L2との結合を阻害することが示され、様々な臨床試験において試験されている。(Wang et al., Cancer Immunol Res (2014) 2(9): 846)。PD-1に対するヒト化IgG4(S228P)抗体ペンブロリズマブ(旧名ランプロリズマブ)は、PD-1のPD-L1及びPD-L2との結合を阻害することが示され、様々な臨床試験において試験されている。(WO2008/156712及びHamid et al., N Engl J Med (2013) 369:2)。

【0004】

PD-L1及びPD-L2とのヒトPD-1相互作用に結合し、これを中和する代替の抗体を提供する必要性が残る。特に、ヒトPD-1に高い親和性で結合する抗体を提供する必要性が残る。また、PD-L1及びPD-L2とのヒトPD-1相互作用を効果的にブロックする抗体を提供する必要性が残る。

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明の第1の態様は、ヒトPD-1(配列番号1)に結合する抗体であって、軽鎖(LC)及び重鎖(HC)を含み、

軽鎖が、それぞれアミノ酸配列RASQGISSWLA(配列番号10)、SAASSLQS(配列番号11)及びQQANHLPT(配列番号12)からなる、軽鎖相補性決定領域LCDR1、LCDR2及びLCDR3を含み、

20

重鎖が重鎖相補性決定領域HCDR1、HCDR2及びHCDR3を含み、HCDR1が、KASGGTFSSAIS(配列番号2(xd-16 A、xd-16 B、xd-16 C、xd-16 D及び/またはxd-16 EのHCDR1の場合))に示されるアミノ酸配列からなり、

HCDR2が、

GIWPSFGTANYAQKFQG(配列番号3(xd-16 AのHCDR2の場合))、

GIWPSFGTASYAQKFQG(配列番号4(xd-16 BのHCDR2の場合))、

GIWPSFGTASYAQKFRG(配列番号5(xd-16 CのHCDR2の場合))、

30

GIWPSFDTANYAQKFRG(配列番号6(xd-16 DのHCDR2の場合))、または

GIWPSFGTANYARKFQG(配列番号7(xd-16 EのHCDR2の場合))に示されるアミノ酸配列からなり、

HCDR3がARAEYSSTGTFDY(配列番号8(xd-16 A、xd-16 C及び/またはxd-16 DのHCDR3の場合))またはARAEYSSTGIFDY(配列番号9(xd-16 B及び/またはxd-16 EのHCDR3の場合))に示されるアミノ酸配列からなる、抗体を提供する。

【0006】

40

本発明の特定の抗体は、一定の条件下、ヒトPD-1にニボルマブ(nivolumab)及びペンブロリズマブ(pembrolizumab)よりも高い、高親和性で結合する。さらに、本発明の特定の抗体は、インビボモデルにおいて、ニボルマブ及びペンブロリズマブと比較して優先的な向上した同種反応性を媒介する。

【0007】

ある実施形態では、本発明は、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3が、それぞれアミノ酸配列RASQGISSWLA(配列番号10)、SAASSLQS(配列番号11)、及びQQANHLPT(配列番号12)からなり、HCDR1、HCDR2、及びHCDR3が、それぞれアミノ酸配列KASGGTFSSAIS(配列番号2)、GIWPSFGTANYAQKFQG(配列番号3)、及びARAEYSSTGTFDY(

50

配列番号 8) からなる、抗体を提供する。

【 0 0 0 8 】

さらなる実施形態では、本発明は、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3が、それぞれアミノ酸配列RASQGISSWLA(配列番号10)、SAASSLQS(配列番号11)、及びQQANHLPT(配列番号12)からなり、HCDR1、HCDR2、及びHCDR3が、それぞれアミノ酸配列KASGGTFSSTAIS(配列番号2)、GIWPSFGTASYAQKFQG(配列番号4)、及びARAEYSSTGIFY(配列番号9)からなる、抗体を提供する。

【 0 0 0 9 】

さらなる実施形態では、本発明は、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3が、それぞれアミノ酸配列RASQGISSWLA(配列番号10)、SAASSLQS(配列番号11)、及びQQANHLPT(配列番号12)からなり、HCDR1、HCDR2、及びHCDR3が、それぞれアミノ酸配列KASGGTFSSTAIS(配列番号2)、GIWPSFGTASYAQFRG(配列番号5)、及びARAEYSSTGTFDY(配列番号8)からなる、抗体を提供する。

10

【 0 0 1 0 】

さらなる実施形態では、本発明は、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3が、それぞれアミノ酸配列RASQGISSWLA(配列番号10)、SAASSLQS(配列番号11)、及びQQANHLPT(配列番号12)からなり、HCDR1、HCDR2、及びHCDR3が、それぞれアミノ酸配列KASGGTFSSTAIS(配列番号2)、GIWPSFDTANYAQFRG(配列番号6)、及びARAEYSSTGTFDY(配列番号8)からなる、抗体を提供する。

20

【 0 0 1 1 】

さらなる実施形態では、本発明は、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3が、それぞれアミノ酸配列RASQGISSWLA(配列番号10)、SAASSLQS(配列番号11)、及びQQANHLPT(配列番号12)からなり、HCDR1、HCDR2、及びHCDR3が、それぞれアミノ酸配列KASGGTFSSTAIS(配列番号2)、GIWPSFGTANYARKFQG(配列番号7)、及びARAEYSSTGIFY(配列番号9)からなる、抗体を提供する。

【 0 0 1 2 】

ある実施形態では、本発明は、1つまたは2つの軽鎖(LC)及び1つまたは2つの重鎖(HC)を含む抗体であって、軽鎖の各々が軽鎖可変領域(LCVR)を含み、重鎖の各々が重鎖可変領域(HCVR)を含み、LCVRが配列番号18に示されるアミノ酸配列を有し、HCVRが配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、または配列番号17に示されるアミノ酸配列を有する、抗体を提供する。

30

【 0 0 1 3 】

さらなる実施形態では、本発明は、LCVRが配列番号18に示されるアミノ酸配列を有し、HCVRが配列番号13に示されるアミノ酸配列を有する、抗体を提供する。

【 0 0 1 4 】

さらなる実施形態では、本発明は、LCVRが配列番号18に示されるアミノ酸配列を有し、HCVRが配列番号14に示されるアミノ酸配列を有する、抗体を提供する。

40

【 0 0 1 5 】

さらなる実施形態では、本発明は、LCVRが配列番号18に示されるアミノ酸配列を有し、HCVRが配列番号15に示されるアミノ酸配列を有する、抗体を提供する。

【 0 0 1 6 】

さらなる実施形態では、本発明は、LCVRが配列番号18に示されるアミノ酸配列を有し、HCVRが配列番号16に示されるアミノ酸配列を有する、抗体を提供する。

【 0 0 1 7 】

さらなる実施形態では、本発明は、LCVRが配列番号18に示されるアミノ酸配列を有し、HCVRが配列番号17に示されるアミノ酸配列を有する、抗体を提供する。

50

【0018】

ある実施形態では、本発明は、LCが配列番号24に示されるアミノ酸配列を有し、HCが配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、または配列番号23に示されるアミノ酸配列を有する、抗体を提供する。

【0019】

さらなる実施形態では、本発明は、LCが配列番号24に示されるアミノ酸配列を有し、HCが配列番号19に示されるアミノ酸配列を有する、抗体を提供する。

【0020】

さらなる実施形態では、本発明は、LCが配列番号24に示されるアミノ酸配列を有し、HCが配列番号20に示されるアミノ酸配列を有する、抗体を提供する。

10

【0021】

さらなる実施形態では、本発明は、LCが配列番号24に示されるアミノ酸配列を有し、HCが配列番号21に示されるアミノ酸配列を有する、抗体を提供する。

【0022】

さらなる実施形態では、本発明は、LCが配列番号24に示されるアミノ酸配列を有し、HCが配列番号22に示されるアミノ酸配列を有する、抗体を提供する。

【0023】

さらなる実施形態では、本発明は、LCが配列番号24に示されるアミノ酸配列を有し、HCが配列番号23に示されるアミノ酸配列を有する、抗体を提供する。

【0024】

ある実施形態では、本発明は、2つの軽鎖及び2つの重鎖を含む抗体であって、各軽鎖が配列番号24に示される前記アミノ酸配列を有し、各重鎖が配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、または配列番号23に示されるアミノ酸配列を有する、抗体を提供する。

20

【0025】

さらなる実施形態では、本発明は、各軽鎖が配列番号24に示されるアミノ酸配列を有し、各重鎖が配列番号19に示されるアミノ酸配列を有する、抗体を提供する。

【0026】

さらなる実施形態では、本発明は、各軽鎖が配列番号24に示されるアミノ酸配列を有し、各重鎖が配列番号20に示されるアミノ酸配列を有する、抗体を提供する。

30

【0027】

さらなる実施形態では、本発明は、各軽鎖が配列番号24に示されるアミノ酸配列を有し、各重鎖が配列番号21に示されるアミノ酸配列を有する、抗体を提供する。

【0028】

さらなる実施形態では、本発明は、各軽鎖が配列番号24に示されるアミノ酸配列を有し、各重鎖が配列番号22に示されるアミノ酸配列を有する、抗体を提供する。

【0029】

さらなる実施形態では、本発明は、各軽鎖が配列番号24に示されるアミノ酸配列を有し、各重鎖が配列番号23に示されるアミノ酸配列を有する、抗体を提供する。

【0030】

ある実施形態では、本発明は、重鎖のうちの1つが軽鎖のうちの1つと鎖間ジスルフィド結合を形成し、他の重鎖が他の軽鎖と鎖間ジスルフィド結合を形成し、重鎖のうちの1つが他の重鎖と2つの鎖間ジスルフィド結合を形成する、抗体を提供する。

40

【0031】

ある実施形態では、本発明は、グリコシル化された抗体を提供する。

【0032】

ある実施形態では、本発明は、ヒトPD-1(配列番号1)に結合する抗体であって、軽鎖(LC)及び重鎖(HC)を含み、軽鎖が軽鎖可変領域(LCVR)を含み、重鎖が重鎖可変領域(HCVR)を含み、LCVRが配列番号18に示されるアミノ酸配列を有し、HCVRが配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、または配列

50

。さらなる実施形態では、本発明は、ヒトPD-1（配列番号1）に結合する抗体であって、各軽鎖が配列番号24に示されるアミノ酸配列を有し、各重鎖が配列番号23に示されるアミノ酸配列を有する、抗体を提供する。ある実施形態では、本発明は、ヒトPD-1（配列番号1）に結合する抗体であって、重鎖のうちの1つが軽鎖のうちの1つと鎖間ジスルフィド結合を形成し、他の重鎖が他の軽鎖と鎖間ジスルフィド結合を形成し、重鎖のうちの1つが他の重鎖と2つの鎖間ジスルフィド結合を形成する、抗体を提供する。

【0038】

ある実施形態では、本発明は、ヒトPD-1（配列番号1）に結合する抗体であって、グリコシル化された、抗体を提供する。

【0039】

本発明の第2の態様では、本発明は、上記のいずれか1つの抗体、またはその断片もしくは誘導体をコードするポリヌクレオチドを提供する。

【0040】

別の好ましい実施形態では、xd-16 A S228P IgG4のHCをコードするポリヌクレオチドは、配列番号25に示される。

【0041】

別の好ましい実施形態では、xd-16 B S228P IgG4のHCをコードするポリヌクレオチドは、配列番号26に示される。

【0042】

別の好ましい実施形態では、xd-16 C S228P IgG4のHCをコードするポリヌクレオチドは、配列番号27に示される。

【0043】

別の好ましい実施形態では、xd-16 D S228P IgG4のHCをコードするポリヌクレオチドは、配列番号28に示される。

【0044】

別の好ましい実施形態では、xd-16 E S228P IgG4のHCをコードするポリヌクレオチドは、配列番号29に示される。

【0045】

別の好ましい実施形態では、xd-16 A、xd-16 B、xd-16 C、xd-16 D及びxd-16 EのLCをコードするポリヌクレオチドは、配列番号30に示される。

【0046】

本発明の第3の態様は、第3の態様のポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。

【0047】

本発明の第4の態様は、第3の態様のベクターを含む宿主細胞を提供し、または前記細胞のゲノムには、第2の態様に係る外来性ポリヌクレオチドが導入されている。

【0048】

好ましい実施形態では、前記宿主細胞は哺乳動物細胞、好ましくはCHO細胞である。

【0049】

ある実施形態では、本発明は、配列番号24のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列及び配列番号19のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むDNA分子を含む、哺乳動物細胞であって、配列番号24のアミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号19のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体を発現することができる、哺乳動物細胞を提供する。

【0050】

ある実施形態では、本発明は、配列番号24のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列及び配列番号20のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むDNA分子を含む、哺乳動物細胞であって、配列番号24のアミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号20のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体を発現することができる、哺乳動物細胞を提供する。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 1 】

ある実施形態では、本発明は、配列番号 2 4 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列及び配列番号 2 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む DNA 分子を含む、哺乳動物細胞であって、配列番号 2 4 のアミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号 2 1 のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体を発現することができる、哺乳動物細胞を提供する。

【 0 0 5 2 】

ある実施形態では、本発明は、配列番号 2 4 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列及び配列番号 2 2 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む DNA 分子を含む、哺乳動物細胞であって、配列番号 2 4 のアミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号 2 2 のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体を発現することができる、哺乳動物細胞を提供する。

10

【 0 0 5 3 】

ある実施形態では、本発明は、配列番号 2 4 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列及び配列番号 2 3 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む DNA 分子を含む、哺乳動物細胞であって、配列番号 2 4 のアミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号 2 3 のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体を発現することができる、哺乳動物細胞を提供する。

【 0 0 5 4 】

本発明の第 5 の態様は、配列番号 2 4 のアミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号 2 0 のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体の産生プロセスであって、第 4 の態様の宿主細胞を抗体が発現されるような条件下で培養すること、及び発現された抗体を回収することを含むプロセスを提供する。

20

【 0 0 5 5 】

ある実施形態では、本発明は、本発明のプロセスにより産生された抗体を提供する。

【 0 0 5 6 】

本発明の第 6 の態様は、本発明の抗体及び薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物を提供する。

【 0 0 5 7 】

本発明の第 7 の態様は、がんの治療方法であって、治療を必要とする患者に、有効量の本発明の抗体を投与するステップを含む、方法を提供する。

30

【 0 0 5 8 】

さらなる実施形態では、がんの治療方法は、治療を必要とする患者に、有効量の本発明の抗体を投与するステップを含み、そのがんは、黒色腫、肺がん、頭頸部がん、結腸直腸がん、膵臓がん、胃がん、腎臓がん、膀胱がん、前立腺がん、乳がん、卵巣がん、または肝がんである。

【 0 0 5 9 】

さらなる実施形態では、これらの方法は、1 つ以上の抗腫瘍剤、免疫療法剤またはそれらの組み合わせとの、同時の、別々の、または連続した組み合わせでの有効量の本発明の抗体の投与を含む。

40

【 0 0 6 0 】

好ましい実施形態では、前記抗腫瘍剤としては、限定されないが、ラムシルマブ (ramucirumab)、ネシツムマブ (necitumumab)、オララツマブ (olaratumab)、ガルニセルチブ (galunisertib)、アベマシクリブ (abemaciclib)、シスプラチン、カルボプラチン、ダカルバジン、リボソームドキシソルピシン、ドセタキセル、シクロホスファミド及びドキシソルピシン、ナベルピン (navelbine)、エリブリン (eribulin)、パクリタキセル、注射可能な懸濁液用のパクリタキセルタンパク質結合粒子、イザベピロン (ixabepilone)、カペシタピン、FOLFOX (ロイコボリン、フルオロウラシル、及びオキサリプラチン)、FOLFIRI (ロイコボリン、フルオロウラシル、及びイリノテカン)、セツ

50

キシマブまたはそれらの組み合わせが挙げられる。

【0061】

さらなる実施形態では、前記免疫療法剤としては、限定されないが、ニボルマブ、イピリムマブ (ipilimumab)、ピジリズマブ (pidilizumab)、ペンブロリズマブ、トレメリムマブ (tremelimumab)、ウレルマブ (urelumab)、リリルマブ (lirilumab)、アテゾリズマブ (atezolizumab)、デュルバルマブ (durvalumab) またはそれらの組み合わせが挙げられる。

【0062】

本発明の第8の態様は、療法における使用のための、本発明の抗体を提供する。

10

【0063】

本発明の第9の態様は、がん治療における使用のための、本発明の抗体を提供する。

【0064】

さらなる実施形態では、本発明は、がん治療における使用のための、本発明の抗体であって、そのがんが、黒色腫、肺がん、頭頸部がん、結腸直腸がん、膵臓がん、胃がん、腎臓がん、膀胱がん、前立腺がん、乳がん、卵巣がん、または肝がんである、抗体を提供する。

【0065】

本発明の第10の態様は、がんを治療における組み合わせた使用のための、1つ以上の抗腫瘍剤、免疫的抗腫瘍剤またはそれらの組み合わせとの、同時の、別々の、または連続した組み合わせでの、本発明の態様のいずれか1つに係る抗体を提供する。

20

【0066】

好ましい実施形態では、前記抗腫瘍剤としては、限定されないが、ラムシルマブ、ネシツムマブ、オララツマブ、ガルニセルチブ、アベマシクリブ、シスプラチン、カルボプラチン、ダカルバジン、リポソームドキシソルピシン、ドセタキセル、シクロホスファミド及びドキシソルピシン、ナベルピン、エリブリン、パクリタキセル、注射可能な懸濁液用のパクリタキセルタンパク質結合粒子、イザベピロン、カペシタピン、FOLFOX (ロイコボリン、フルオロウラシル、及びオキサリプラチン)、FOLFIRI (ロイコボリン、フルオロウラシル、及びイリノテカン)、セツキシマブまたはそれらの組み合わせが挙げられる。

30

【0067】

さらなる実施形態では、前記免疫療法剤としては、限定されないが、ニボルマブ、イピリムマブ、ピジリズマブ、ペンブロリズマブ、トレメリムマブ、ウレルマブ、リリルマブ、アテゾリズマブ、デュルバルマブまたはそれらの組み合わせが挙げられる。

【0068】

本発明の第11の態様は、がんの治療のための薬学的組成物の調製のための、本発明の抗体の使用を提供する。

【0069】

さらなる実施形態では、そのがんが、黒色腫、肺がん、頭頸部がん、結腸直腸がん、膵臓がん、胃がん、腎臓がん、膀胱がん、前立腺がん、乳がん、卵巣がん、または肝細胞癌である、方法を提供する。

40

【0070】

さらなる実施形態では、前記薬学的組成物は、1つ以上の抗腫瘍剤及び/または免疫療法剤をさらに含む。

【0071】

さらなる実施形態では、前記薬学的組成物は、1つ以上の抗腫瘍剤及び/またはイムノ腫瘍学剤との同時の、別々の、または連続した組み合わせで、必要とする対象に投与される。

【0072】

好ましい実施形態では、前記抗腫瘍剤としては、限定されないが、ラムシルマブ、ネシ

50

ツムマブ、オララツマブ、ガルニセルチブ、アベマシクリブ、シスプラチン、カルボプラチン、ダカルバジン、リポソームドキシソルピシン、ドセタキセル、シクロホスファミド及びドキシソルピシン、ナベルピン、エリブリン、パクリタキセル、注射可能な懸濁液用のパクリタキセルタンパク質結合粒子、イザベピロン、カペシタピン、FOLFOX（ロイコボリン、フルオロウラシル、及びオキサリプラチン）、FOLFIRI（ロイコボリン、フルオロウラシル、及びイリノテカン）、セツキシマブまたはそれらの組み合わせが挙げられる。

【0073】

さらなる実施形態では、前記免疫療法剤としては、限定されないが、ニボルマブ、イピリムマブ、ピジリズマブ、ペンブロリズマブ、トレメリムマブ、ウレルマブ、リリルマブ、アテゾリズマブ、デュルバルマブまたはそれらの組み合わせが挙げられる。

10

【0074】

本発明において、上記及び下記（例えば実施例）において、具体的に記載される技術的特徴が、相互いに組み合わせられ、それにより、個別の記載を要さない新たな、または好ましい技術的な解決手段を構成し得ることを理解すべきである。

【発明を実施するための形態】

【0075】

本発明の抗体は、改変された、非自然発生ポリペプチド複合体である。本発明のDNA分子は、本発明の抗体におけるポリペプチドのうちの1つのアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む、非自然発生DNA分子である。

20

【0076】

本発明の抗体は、改変CDR及び抗体のいくつかの部分（フレームワーク、ヒンジ領域、及び定常領域のすべてまたは一部）が、ヒトゲノム配列から誘導されたフレームワーク及び定常領域と同一または実質的に同一であるヒト由来となるように設計されている。完全ヒトフレームワーク、ヒンジ領域、及び定常領域は、それらのヒト生殖細胞系列配列ならびに自然発生体細胞突然変異を有する配列及び改変突然変異を有する配列である。本発明の抗体は、1つ以上のアミノ酸置換、欠失、または付加を含有する完全ヒトフレームワーク、ヒンジ、または定常領域から誘導されたフレームワーク、ヒンジ、または定常領域を含み得る。さらに、本発明の抗体は、好ましくはヒトにおいて実質的に非免疫原性である。

30

【0077】

本発明の抗体は、IgG型抗体であり、鎖内及び鎖間ジスルフィド結合を介して架橋された4つのアミノ酸鎖（2つの「重」鎖及び2つの「軽」鎖）を有する。各重鎖は、N末端HCVR及び重鎖定常領域（「HCCR」）からなる。各軽鎖は、LCVR及び軽鎖定常領域（「LCCR」）からなる。特定の生体系で発現される場合、天然のヒトFc配列を有する抗体は、Fc領域においてグリコシル化される。典型的には、高度に保存されたN-グリコシル化部位で抗体のFc領域にグリコシル化が起こる。N-グリカンは、典型的にはアスパラギンに結合する。抗体は、他の位置でもグリコシル化され得る。

【0078】

任意で、本発明の抗体は、Fc受容体媒介性炎症メカニズムに関与または補体を活性化能力の低下によりヒトIgG₄Fc領域から誘導されたFc部分を含有し、エフェクタ機能の低下をもたらす。

40

【0079】

S228P突然変異は、半抗体形成（IgG₄抗体における半分子の動的交換の現象）を防止するヒンジ突然変異である。F234A及びL235A突然変異は、既に低いヒトIgG₄アイソタイプのエフェクタ機能をさらに低減する。

【0080】

HCVR及びLCVR領域は、フレームワーク領域（「FR」）と称される、より保存された領域が散在する、相補性決定領域（「CDR」）と称される、超可変性を有する領域にさらに細分することができる。各HCVR及びLCVRは、アミノ末端からカルボキ

50

シ末端まで、次の順番、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4で配置された、3つのCDR及び4つのFRからなる。本明細書では、重鎖の3つのCDRは「HCDR1、HCDR2、及びHCDR3」と称され、軽鎖の3つのCDRは「LCDR1、LCDR2、及びLCDR3」と称される。CDRは、抗原と特異的な相互作用を形成する残基の大部分を含む。配列描写には、現在、抗体のCDR割り当ての3つのシステムが使用されている。KabatsのCDR定義(Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))は、抗体配列可変性に基づく。ChothiaのCDR定義(Chothia et al., "Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins", Journal of Molecular Biology, 196, 901-917 (1987); Al-Lazikani et al., "Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins", Journal of Molecular Biology, 273, 927-948 (1997))は、抗体の三次元構造及びCDRループの形態に基づく。ChothiaのCDR定義は、HCDR1及びHCDR2を除いては、KabatsのCDR定義と同一である。NorthのCDR定義(North et al., "A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations", Journal of Molecular Biology, 406, 228-256 (2011))は、多数の結晶構造との親和性伝播クラスタリングに基づく。本発明の目的には、NorthのCDR定義が使用される。

【0081】

HCVR領域をコードする単離DNAは、HCVRをコードするDNAを、重鎖定常領域をコードする別のDNA分子に動作可能に結合することにより、全長重鎖遺伝子に変換することができる。ヒト、及び他の哺乳動物の、重鎖定常領域遺伝子の配列は、当該技術分野において知られている。これらの領域を包含するDNA断片は、例えば、標準的なPCR増幅により得ることができる。

【0082】

LCVR領域をコードする単離DNAは、LCVRをコードするDNAを、軽鎖定常領域をコードする別のDNA分子に動作可能に結合することにより、全長軽鎖遺伝子に変換してもよい。ヒト、及び他の哺乳動物の、軽鎖定常領域遺伝子の配列は、当該技術分野において知られている。これらの領域を包含するDNA断片は、例えば、標準的なPCR増幅により得ることができる。軽鎖定常領域は、カッパまたはラムダ定常領域であり得る。

【0083】

本発明のポリヌクレオチドは、配列が発現制御配列に動作可能に結合した後で宿主細胞において発現されることになる。発現ベクターは、典型的には、エピソード、または宿主染色体DNAの不可欠な部分のいずれかとして宿主生物中で複製可能である。一般的に、発現ベクターは、選択マーカー、例えば、テトラサイクリン、ネオマイシン、及びジヒドロ葉酸還元酵素を含有し、所望のDNA配列で変換された細胞の検出を可能にするだろう。

【0084】

本発明の抗体は、CHO、NS0、HEK293、またはCOS細胞のような哺乳動物細胞において、容易に産生することができる。宿主細胞は、当該技術分野において周知の技術を使用して培養される。

【0085】

対象のポリヌクレオチド配列(例えば、抗体のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド及び発現制御配列)を含有するベクターは、細胞宿主のタイプに応じて変わる周知の方法により、宿主細胞に移入することができる。

【0086】

タンパク質精製の様々な方法を用いてもよく、このような方法は、当該技術分野において知られ、例えば、Deutscher, Methods in Enzymology 182: 83 - 89 (1990) 及び Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, 3rd Edition, Springer, NY (1994) において記載されている。

【0087】

本発明の別の実施形態では、抗体、またはそれをコードする核酸は、単離形態で提供される。本明細書で使用される「単離」という用語は、細胞環境において見られるその他の高分子種を含まない、または実質的に含まないタンパク質、ペプチド、または核酸を指す。本明細書で使用される「実質的に含まない」という用語は、対象のタンパク質、ペプチド、または核酸が、存在する高分子種の80%超(モル基準)、好ましくは90%超、より好ましくは95%超を含むことを意味する。

10

【0088】

本発明の抗体、またはそれを含む薬学的組成物は、非経口経路により(例えば、皮下及び静脈内)投与してもよい。本発明の抗体は、患者に、単独で、薬学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤と、単回または複数回で投与してもよい。本発明の薬学的組成物は、当該技術分野において周知の方法(例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th ed. (1995), A. Gennaro et al., Mack Publishing Co.)により調製することができ、本明細書において開示されている抗体、及び1つ以上の薬学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤を含む。

20

【0089】

「治療すること」(または「治療する」もしくは「治療」という用語は、既存の症状、障害、状態、または疾患の進行または重症度を遅らせること、妨げること、抑えること、止めること、低減すること、または回復に向かわせることを指す。

【0090】

本明細書においてヒトPD-1についての抗体の親和性に関して使用される「結合」とは、特に指示のない限り、本質的に本明細書において記載されているような37°での表面プラズモン共鳴(SPR)バイオセンサーの使用を含む、当該技術分野において知られている一般的な方法により決定される、約 1×10^{-9} M未満、好ましくは、約 2×10^{-10} M未満の K_D を意味することを意図している。

30

【0091】

本開示の目的には、「高親和性」という用語は、ヒトPD-1について約150 pM未満の K_D を指す。 K_D 値は、アッセイの節にある「結合反応速度及び親和性」において記載されているように、結合反応速度により構築される。

【0092】

本発明はさらに、安全かつ有効量の本発明のポリペプチドまたはそのアゴニストと、薬学的に許容される担体または賦形剤とを含む薬学的組成物を提供する。これらの担体としては(限定されないが)、生理食塩水、緩衝液、グルコース、水、グリセリン、エタノールまたはそれらの組み合わせが挙げられる。薬学的製剤は、投与方法に適合するものでなければならない。本発明の薬学的組成物は、注入用の剤形に調製することができ、例えば生理食塩水またはグルコース水溶液または他の助剤と共に従来法により調製できる。錠剤及びカプセル剤などの薬学的組成物は、従来法によって、調製できる。注入用、溶液状、タブレット状及びカプセル状の薬学的組成物は、好ましくは無菌条件において、製造され得る。有効成分の投与量は治療的有效量であり、例えば、1日あたり約 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ (体重)~ $5 \text{mg}/\text{kg}$ (体重)である。さらに、本発明のポリペプチドはさらに、他の治療薬と共に使用できる。

40

【0093】

「有効量」とは、研究者、医師、または他の臨床家により求められている、組織、シス

50

テム、動物、哺乳動物、またはヒトの、生物学的もしくは医学的応答、またはそれに対する所望の治療効果を引き出す、本発明の抗体または本発明の抗体を含む薬学的組成物の量を意味する。抗体の有効量は、個体の疾患状態、年齢、性別、及び体重、ならびに個体において所望の応答を引き出す抗体の能力のような因子に従って変化し得る。有効量はまた、抗体の毒性または有害な効果を治療上有益な効果が上回る量である。

【0094】

本発明を、下記の実施例によりさらに例示する。これらの実施例は、本発明の例示を目的とするものであり、本発明の範囲を限定するものではない。以下の実施例における実験方法においては、その具体的な条件を具体的に示さないが、それらは、Sambrook et al., in Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012などに記載のルーチン的な条件、または製造業者による取扱説明の記載に従い実施される。特に明記しない限り、パーセンテージ及び部は、重量百分率及び重量部を指す。

10

【0095】

本発明の大きな利点：

x d - 16 B、x d - 16 C、x d - 16 D及びx d - 16 Eは、一価の、及び特異的 (avid) な結合様式において、ペンプロリズマブ及びニボルマブより高い親和性でヒトPD - 1に結合する。各濃度の抗体x d - 16 Bは、免疫細胞活性化アッセイにおいて、ニボルマブ及びペンプロリズマブと同等に、またはそれらより良好に、IFN - のIL - 2を増加させた。

20

【実施例】

【0096】

実施例1：抗体発現及び精製

重鎖及び軽鎖の可変領域のポリペプチド、抗体A～抗体Iの完全重鎖及び軽鎖アミノ酸配列、ならびにそれをコードするヌクレオチド配列を、下で「アミノ酸及びヌクレオチド配列」と題されている節において列挙する。また、抗体A～抗体Iの軽鎖、重鎖、軽鎖可変領域、及び重鎖可変領域の配列番号を、表1に示す。

【0097】

限定されないが、抗体A～抗体Iを含む、本発明の抗体は、本質的に下記のように作製及び精製することができる。HEK293またはCHOのような適切な宿主細胞は、最適な所定のHC：LCベクター比（例えば、1：3または1：2）またはHC及びLCの両方をコードする単一ベクター系を用いて、抗体を分泌するための発現系で一時的または安定的にトランスフェクトすることができる。抗体が分泌された清澄化培地は、多くの一般的に使用されている技術のいずれかを使用して精製してもよい。例えば、培地は、リン酸緩衝生理食塩水（pH7.4）のような相溶性バッファで平衡化した、MabSelectカラム（GE Healthcare）、またはFab断片用のKappaSelectカラム（GE Healthcare）に便利に適用してもよい。カラムは、洗浄し、非特異的な結合成分を除去してもよい。結合抗体は、例えば、pH勾配（例えば、20mMトリスバッファpH7から10mMクエン酸ナトリウムバッファpH3.0まで、またはリン酸緩衝生理食塩水pH7.4から100mMグリシンバッファpH3.0まで）により溶出され得る。抗体画分は、例えばSDS-PAGEにより検出され、その後プールされ得る。意図する使用に応じて、さらなる精製は任意選択的である。抗体は、一般的な技術を用いて濃縮及び/または無菌濾過され得る。可溶性の凝集体及び多量体は、サイズ排除、疎水性相互作用、イオン交換、マルチモーダル、またはヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーを含む一般的な技術により、効率的に除去され得る。これらのクロマトグラフィーステップ後の抗体の純度は、95%を上回る。産生物は、直ちに-70で凍結してもよく、凍結乾燥してもよい。

30

40

【0098】

【表 1】

表 1: 配列番号

	抗体 A S228P IgG4 (xd-16 A)	抗体 B S228P IgG4 (xd-16 B)	抗体 C S228P IgG4 (xd-16 C)	抗体 D S228P IgG4 (xd-16 D)	抗体 E S228P IgG4 (xd-16 E)
HCVR	13	14	15	16	17
LCVR	18	18	18	18	18
重鎖	19	20	21	22	23
軽鎖	24	24	24	24	24

10

【0099】

アッセイ

結合反応速度及び親和性

ヒト PD-1 の反応速度及び平衡解離定数 (K_D) を、本発明の抗体について、MSD、表面プラズモン共鳴 (Biacore)、バイオライト (bio-light) 干渉 (ForteBio) アッセイ法を使用して決定する。

20

【0100】

本明細書で使用されるニボルマブとは、Proposed INN: List 107 からの重鎖及び軽鎖配列を利用する 293 HEK 細胞 (CAS 946414-94-4) において一時的に発現されたヒト IgG4 PD-1 抗体である。本明細書で使用されるペンプロリズマブとは、Proposed INN: List 72 からの重鎖及び軽鎖配列を利用する 293 HEK 細胞において一時的に発現されたヒト IgG4 PD-1 抗体である。

【0101】

MSD アッセイ

平衡親和性測定を、以前記載されているように実施する (Estep, P., et al., MAbs, 2013.5(2): p. 270-8)。溶液平衡滴定 (SET) を、抗原 (b-PD-1 単量体) が 10 ~ 100 pM で一定に保持され、5 ~ 100 nM から開始する Fab または mAbs の 3 ~ 5 倍連続希釈物と共にインキュベートされる、PBS + 0.1% IgG フリー BSA (PBSF) 中で実施する (実験条件は試料依存的である)。PBS 中で 20 nM に希釈した抗体を、標準的な結合 MSD-EC2 プレート上に 4 で一晩、または室温で 30 分間コーティングする。プレートを、700 rpm で振盪しながら、BSA で 30 分間ブロックする。プレートを次に洗浄バッファ (PBSF + 0.05% Tween 20) で 3 回洗浄する。SET 試料を適用し、プレート上で 150 秒間 700 rpm で振盪しながらインキュベートした後、1 回の洗浄を行う。プレート上に捕捉した抗原を、PBSF 中の 250 ng/mL のスルホタグ標識ストレプトアビジンで、プレート上での 3 分間のインキュベーションにより検出する。プレートを洗浄バッファで 3 回洗浄した後、界面活性剤を含む 1 倍読み取りバッファ T を使用して MSD Sector Imager 2400 装置上で読み取る。遊離型抗原パーセントを Prism において滴定抗体の関数としてプロットし、二次方程式に当てはめて K_D を抽出する。スループットを向上させるため、SET 試料調製を含む MSD-SET 実験全体を通して、液体ハンドリングロボットを使用する。

30

40

【0102】

本質的にこのアッセイにおいて記載されているように実施された実験では、IgG1 形式の、酵母で発現された xd-16 B、xd-16 C、xd-16 D 及び xd-1

50

6 Eは、それぞれ45 pM、50 pM、93 pM及び150 pMの K_D でヒトPD-1に結合する。ペンブロリズマブ及びニボルマブは、それぞれ130 pM及び640 pMの K_D でPD-1に結合する。xd-16 B、xd-16 C、xd-16 D及びxd-16 Eの場合の結合活性の測定の結果、それぞれ約0.9 pM、2.5 pM、1.3 pM及び0.9 pMの K_D である。ペンブロリズマブ及びニボルマブは、それぞれ約3 pM及び5 pMの K_D でヒトPD-1に結合する。

【0103】

【表2】

表2: IgG1形式の本発明の抗体のMSDによる結合

名称	ヒトPD-1に対する一価の K_D (pM)	ヒトPD-1に対する結合 K_D (pM)
xd-16 B	45	~0.9
xd-16 C	50	2.5
xd-16 D	93	1.3
xd-16 E	150	~0.9
ペンブロリズマブ	130	~3
ニボルマブ	640	~5

10

20

30

40

【0104】

バイオライト (Bio-light) 干渉法

ForteBio親和性測定を、一般的には以前記載されているように実施した (Estep, P., et al., High throughput solution-based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning. MAbs, 2013. 5(2): p. 270-8.)。簡潔に、ForteBio親和性測定を、IgGをオンラインでAHQセンサー上に負荷することにより実施した。センサーをオフラインでアッセイバッファにおいて30分間平衡化した後、ベースライン構築のためにオンラインで60秒間モニタリングした。免疫グロブリンGを負荷したセンサーを100 nMの抗原に5分間曝露し、その後オフレート測定のためにそれらをアッセイバッファに5分間移した。1:1結合モデルを使用して反応速度を分析した。

【0105】

本質的にこのアッセイにおいて記載されているように実施された実験では、Fab形式での、酵母で発現されたIgG1から産生されたxd-16 B、xd-16 C、xd-16 D及びxd-16 Eは、PD-1__Fcがセンサーチップ上にあった場合、ヒトPD-1__Fcに、ニボルマブ及びペンブロリズマブより約2倍から3倍低い K_D で結合する。抗体がセンサーチップ上にあった場合、IgG1形式の、酵母で発現されたxd-16 B、xd-16 C、xd-16 D及びxd-16 Eは、ヒトPD-1__Hisに、ニボルマブ及びペンブロリズマブより約3倍から4倍低い K_D で結合する。Fab形式での、酵母で発現されたIgG1から産生されたxd-16 B、xd-16 C、xd-16 D及びxd-16 Eは、cynoPD-1__Fcに、ニボルマブ及びペンブロリズマブと同様の K_D で結合する。

【0106】

【表 3】

表 3: IgG1 形式の、本発明の抗体のバイオライト干渉法による結合

	溶液における Fab の一価の K_D (M)、センサーチップ上は hPD-1_Fc	溶液における hPD-1_HIS の一価の K_D (M)、センサーチップ上は IgG	溶液における Fab の一価の K_D (M)、センサーチップ上は cynoPD-1_Fc
xd-16 B	6.30E-10	4.20E-10	7.80E-10
xd-16 C	5.70E-10	3.80E-10	7.30E-10
xd-16 D	9.90E-10	6.50E-10	1.20E-09
xd-16 E	8.60E-10	5.60E-10	1.00E-09
ペンブロリズマブ	2.00E-09	2.00E-09	4.70E-10
ニボルマブ	1.70E-09	4.10E-09	1.20E-09

10

20

【0107】

CHO 細胞上でのヒト PD-1 への結合

ヒト PD-1 に対する本発明の抗体の結合は、フローサイトメトリーアッセイにおいて測定され得る。

【0108】

CHO 細胞 (0.2×10^6 個) を、200 nM から 19 回、2 倍で 3.185 pM の最低濃度までの滴定される実験用抗体と共に 30 分間、PBS 1% BSA 中、氷上でインキュベートする。細胞を次に 3 回洗浄し、二次抗体 (PE 標識、5 μ g/ml の最終濃度) と共に、PBS 1% BSA 中、30 分間、氷 (光から保護) 上でインキュベートする。細胞を 3 回洗浄し、フローサイトメトリーによって分析する。Accuri C6 システム (BD Biosciences) 上でフローサイトメトリーを実施し、C6 ソフトウェア上で MFI を計算する。Graphpad ソフトウェア上で EC50 を計算する。

30

【0109】

本質的にこのアッセイにおいて記載されているように実施された実験では、xd-16 B (IgG4 S228P) は、PD-1 に用量依存的に 1.461 nM の EC50 値 ($n=1$) で結合し、xd-16 D (IgG4 S228P) は、PD-1 に用量依存的に 1.471 nM の EC50 値 ($n=1$) で結合し、ニボルマブ (IgG4 S228P) は、PD-1 に用量依存的に 1.311 nM の EC50 値 ($n=1$) で結合する。本質的にこのアッセイにおいて記載されているように実施された実験では、xd-16 B 及び xd-16 D は、これらの条件下、ニボルマブと同様の EC50 でヒト PD-1 に結合する。

40

【0110】

【表 4】

表 4: CHO 細胞上でのヒト PD-1 への結合

	xd-16 B IgG4	xd-16 D IgG4	ニボルマブ IgG4
PD-1 に対する結合 (EC50 nM)	1.461	1.471	1.311

【0111】

10

CHO 細胞における PD-L1 及び PD-L2 に対するヒト PD-1 のブロッキング。

PD-L1 及び PD-L2 に対するヒト PD-1 の結合をブロックする本発明の抗体の能力は、フローサイトメトリーにより測定され得る。

【0112】

CHO 細胞 0.2×10^6 個を、実験抗体 (100 nM) と共に、30 分間、PBS 1% BSA 中、氷上でインキュベートする。細胞を次に 3 回洗浄し、NHS-FITC (Promega) と関連した PD-L2 と共に、PBS 1% BSA 中、30 分間、氷 (光から保護) 上でインキュベートする。細胞を 3 回洗浄し、フローサイトメトリーによって分析する。Accuri C6 システム (BD Biosciences) 上でフローサイトメトリーを実施し、C6 ソフトウェア上で MFI を計算する。GraphPad ソフトウェア上で EC50 を計算する。

20

【0113】

本質的にこのアッセイにおいて記載されているように実施された実験では、xd-16 B、xd-16 C、xd-16 D 及び xd-16 E (IgG1 形式、酵母で発現された) は、ヒト PD-L2-FITC の結合をブロックし、182,959.1 の MFI をもたらした対照 IgG と比較して、それぞれ 26,445.9、26,524.8、39,983.1 及び 40,867.9 の MFI をもたらした。ペンブロリズマブ及びニボルマブは、それぞれ 46,245.9 及び 54,509.8 の MFI をもたらした。

【0114】

【表 5】

30

表 5: CHO 細胞上でのヒト PD-1 のブロッキング

試験試料	MFI (PD-L2-FITC)
細胞のみ	33,449.7
IgG なし	199,716.0
IgG 対照	182,959.1
ニボルマブ	54,509.8
ペンブロリズマブ	46,245.9
xd-16 B	26,445.9
xd-16 C	26,524.8
xd-16 D	39,983.1
xd-16 E	40,867.9

40

【0115】

混合リンパ球反応

本発明の抗体による PD-1 シグナルのブロッキングは、T 細胞活性化中の阻害シグナ

50

ルの放出を測定することにより評価され得る。

【0116】

2 × 10⁶ 個の P B M C を、完全 T 細胞培地において、6 ウェル組織培養プレート中の各ウェルまたは T 2 5 組織培養フラスコに分注する。細胞を 2 ~ 3 時間インキュベートし、単球を付着させる。付着が不十分である場合、無血清培地を使用する。新鮮な 3 倍培地と共にフラスコを穏やかに回転させることにより、非付着細胞を除去する。

【0117】

1 % A B 血清、10 mM の H E P E S、50 μ M の - M e、I L - 4 (10000 U / m l)、及び G M - C S F (10000 U / m l)、または 25 ~ 50 n g / m l の各々を含有する X - V I V O 15 培地において P B M C から単球 (1 × 10⁶ 個 / m l) を培養することにより、未成熟骨髄 D C を産生する。2 日後、I L - 4 及び G M - C S F を補足した新鮮な培地を添加する。5 日目、細胞を凍結するか、または、r T N F α (10000 U / m l)、I L - 1 b (5 n g / m l)、I L - 6 (10 n g / m l)、及び 1 μ M の P G E₂ を含有する刺激カクテルを 2 日間 3 × 10⁵ 個 / m l の細胞密度で添加することにより、成熟を誘導する。

10

【0118】

U n t o u c h e d C D 4 + T 細胞単離キット (I n v i t r o g e n) において、製造業者の指示に従って T 細胞単離を実施する。1.5 ml チューブラックを備え付けた磁石を使用し、望ましくない磁性ビーズ (Q I A G E N) を除去する。

【0119】

96 丸底組織培養プレートにおいて、100,000 ~ 200,000 個の単離 T 細胞を 10,000 ~ 20,000 個の同種異系 m o D C と、200 μ l の総体積で 4 ~ 5 日間 37 で混合する。陽性対照として 3 : 1 (細胞 : ビーズ) の比で抗 C D 3 / C D 2 8 D y n a B e a d s を使用して T 細胞を刺激し、ビーズは製造業者の指示に従って用意する。試験抗体を M L R の初期に添加し、培養期間全体を通してインキュベートする。

20

【0120】

製造業者の指示 (e B i o s c i e n c e) に従って I L - 2 及び I F N - の検出を実施する。O D 測定値を M u l t i s k a n F C システム (T h e r m o) 上で決定する。

【0121】

本質的にこのアッセイにおいて記載されているように実施された実験では、抗体 x d - 16 B は、各濃度で、ニボルマブ及びペンブロリズマブに相当して I F N - の I L - 2 を増加させた。

30

【0122】

【表 6】

表 6: IL-2 分泌倍率変化対 IgG 対照

	IgG の濃度				
	100 nM	10 nM	1 nM	0.1 nM	0.01nM
ペンブロリズマブ	2.03114	2.49216	2.04189	1.47268	1.05915
ニボルマブ	2.37395	2.44395	1.71526	1.26004	1.0918
xd-16 B	2.3661	2.38817	2.18347	1.45926	1.14941

40

【0123】

【表 7】

表 7: IFN γ 分泌倍率変化対 IgG 対照

	IgG の濃度				
	100 nM	10 nM	1 nM	0.1 nM	0.01nM
ペンブロリズ マブ	1.78083	1.771	1.75723	1.98907	1.02989
ニボルマブ	1.97395	1.877	1.57676	1.52809	0.83909
xd-16 B	1.89709	2.1678	2.14839	1.58718	1.08886

10

【 0 1 2 4 】

本発明に記載のすべての参照文献は、それらの各々が本願明細書で個々に引用されるのと同様に、参照により本願明細書に組み込まれる。さらに、当業者であれば、上記の内容を読んだ後、本発明に様々な修飾または変更を施すことができることを理解すべきである。すべてのこれらの均等物も、本願に添付される特許請求の範囲により定義される範囲内に含まれる。

【配列表】

20

2020502038000001.app

【手続補正書】

【提出日】令和1年8月9日(2019.8.9)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒトPD-1(配列番号1)に結合する抗体であって、軽鎖(LC)及び重鎖(HC)を含み、

前記軽鎖がそれぞれ配列番号10、11及び12に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、

前記重鎖が重鎖相補性決定領域HCDR1、HCDR2、及びHCDR3を含み、

HCDR1が配列番号2に示されるアミノ酸配列からなり、

HCDR2が配列番号3、4、5、6または7に示されるアミノ酸配列からなり、

HCDR3が配列番号8または9に示されるアミノ酸配列からなる、抗体。

【請求項2】

HCDR1、HCDR2、及びHCDR3が

(i)それぞれ配列番号2、配列番号3、及び配列番号8に示されるアミノ酸配列からなる、

(ii)それぞれ配列番号2、配列番号4、及び配列番号9に示されるアミノ酸配列からなる、

(iii)それぞれ配列番号2、配列番号5、及び配列番号8に示されるアミノ酸配列からなる、

(iv)それぞれ配列番号2、配列番号6、及び配列番号8に示されるアミノ酸配列からなる、または

(v)それぞれ配列番号2、配列番号7、及び配列番号9に示されるアミノ酸配列からなる、

請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

1 つまたは 2 つの軽鎖 (L C) 及び 1 つまたは 2 つの重鎖 (H C) を含む抗体であって、前記軽鎖の各々が軽鎖可変領域 (L C V R) を含み、前記重鎖の各々が重鎖可変領域 (H C V R) を含み、前記 L C V R が配列番号 1 8 に示されるアミノ酸配列を有し、前記 H C V R が配列番号 1 3、配列番号 1 4、配列番号 1 5、配列番号 1 6、または配列番号 1 7 に示されるアミノ酸配列を有する、抗体。

【請求項 4】

(i) 前記 L C V R が配列番号 1 8 に示されるアミノ酸配列を有し、前記 H C V R が配列番号 1 3 に示されるアミノ酸配列を有する、

(i i) 前記 L C V R が配列番号 1 8 に示されるアミノ酸配列を有し、前記 H C V R が配列番号 1 4 に示されるアミノ酸配列を有する、

(i i i) 前記 L C V R が配列番号 1 8 に示されるアミノ酸配列を有し、前記 H C V R が配列番号 1 5 に示されるアミノ酸配列を有する、

(i v) 前記 L C V R が配列番号 1 8 に示されるアミノ酸配列を有し、前記 H C V R が配列番号 1 6 に示されるアミノ酸配列を有する、または

(v) 前記 L C V R が配列番号 1 8 に示されるアミノ酸配列を有し、前記 H C V R が配列番号 1 7 に示されるアミノ酸配列を有する、

請求項 3 に記載の抗体。

【請求項 5】

前記 L C が配列番号 2 4 に示されるアミノ酸配列を有し、前記 H C V R が配列番号 1 9、配列番号 2 0、配列番号 2 1、配列番号 2 2、または配列番号 2 3 に示されるアミノ酸配列を有する、請求項 3 に記載の抗体。

【請求項 6】

(i) 前記 L C が配列番号 2 4 に示されるアミノ酸配列を有し、前記 H C が配列番号 1 9 に示されるアミノ酸配列を有する、

(i i) 前記 L C が配列番号 2 4 に示されるアミノ酸配列を有し、前記 H C が配列番号 2 0 に示されるアミノ酸配列を有する、

(i i i) 前記 L C が配列番号 2 4 に示されるアミノ酸配列を有し、前記 H C が配列番号 2 1 に示されるアミノ酸配列を有する、

(i v) 前記 L C が配列番号 2 4 に示されるアミノ酸配列を有し、前記 H C が配列番号 2 2 に示されるアミノ酸配列を有する、または

(v) 前記 L C が配列番号 2 4 に示されるアミノ酸配列を有し、前記 H C が配列番号 2 3 に示されるアミノ酸配列を有する、

請求項 5 に記載の抗体。

【請求項 7】

2 つの軽鎖及び 2 つの重鎖を含み、各軽鎖が配列番号 2 4 に示されるアミノ酸配列を有し、各重鎖が配列番号 1 9、配列番号 2 0、配列番号 2 1、配列番号 2 2、または配列番号 2 3 に示されるアミノ酸配列を有する、請求項 5 に記載の抗体。

【請求項 8】

(i) 各軽鎖が配列番号 2 4 に示されるアミノ酸配列を有し、各重鎖が配列番号 1 9 に示されるアミノ酸配列を有する、

(i i) 各軽鎖が配列番号 2 4 に示されるアミノ酸配列を有し、各重鎖が配列番号 2 0 に示されるアミノ酸配列を有する、

(i i i) 各軽鎖が配列番号 2 4 に示されるアミノ酸配列を有し、各重鎖が配列番号 2 1 に示されるアミノ酸配列を有する、

(i v) 各軽鎖が配列番号 2 4 に示されるアミノ酸配列を有し、各重鎖が配列番号 2 2 に示されるアミノ酸配列を有する、または

(v) 各軽鎖が配列番号 2 4 に示されるアミノ酸配列を有し、各重鎖が配列番号 2 3 に示されるアミノ酸配列を有する、

請求項 7 に記載の抗体。

【請求項 9】

前記重鎖のうちの 1 つが前記軽鎖のうちの 1 つと鎖間ジスルフィド結合を形成し、他の重鎖が他の軽鎖と鎖間ジスルフィド結合を形成し、前記重鎖のうちの 1 つが他の重鎖と 2 つの鎖間ジスルフィド結合を形成する、請求項 7 または 8 に記載の抗体。

【請求項 10】

前記抗体がグリコシル化されている、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 11】

配列番号 24 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列及び配列番号 20 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む DNA 分子を含む哺乳動物細胞であって、配列番号 24 のアミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号 20 のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体を発現することができ、好ましくは CHO 細胞である哺乳動物細胞。

【請求項 12】

配列番号 24 のアミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号 20 のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体の産生プロセスであって、請求項 11 に記載の哺乳動物細胞を前記抗体が発現されるような条件下で培養すること、及び前記発現された抗体を回収することを含む、プロセス。

【請求項 13】

請求項 12 に記載のプロセスにより産生された、抗体。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 10 及び 13 のいずれか一項に記載の抗体、及び薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。

【請求項 15】

がんの治療のための薬学的組成物の製造における請求項 1 ~ 10 及び 13 のいずれか一項に記載の抗体の使用。

【請求項 16】

前記がんが黒色腫、肺がん、頭頸部がん、結腸直腸がん、膵臓がん、胃がん、腎臓がん、膀胱がん、前立腺がん、乳がん、卵巣がん、または肝がんである、請求項 15 に記載の使用。

【請求項 17】

抗体が、1 つ以上の抗腫瘍剤と、同時に、別々に、または連続して使用される組み合わせとなる、請求項 15 または 16 に記載の使用。

【請求項 18】

療法における使用のための、請求項 14 に記載の薬学的組成物。

【請求項 19】

がんの治療における使用のための、請求項 14 に記載の薬学的組成物。

【請求項 20】

がんの治療における、1 つ以上の抗腫瘍剤との同時の、別々の、または連続した組み合わせでの使用のための、請求項 14 に記載の薬学的組成物。

【請求項 21】

前記がんが、黒色腫、肺がん、頭頸部がん、結腸直腸がん、膵臓がん、胃がん、腎臓がん、膀胱がん、前立腺がん、乳がん、卵巣がん、または肝細胞癌である、請求項 19 または 20 に記載の薬学的組成物。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0108

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0108】

CHO細胞(0.2×10⁶個)を、200nMから19回、2倍で0.3815pMの最低濃度までの滴定される実験用抗体と共に30分間、PBS1%BSA中、氷上でインキュベートする。細胞を次に3回洗浄し、二次抗体(PE標識、5μg/mlの最終濃度)と共に、PBS1%BSA中、30分間、氷(光から保護)上でインキュベートする。細胞を3回洗浄し、フローサイトメトリーによって分析する。Accuri C6システム(BD Biosciences)上でフローサイトメトリーを実施し、C6ソフトウェア上でMFIを計算する。Graphpadソフトウェア上でEC50を計算する。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0124

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0124】

本発明に記載のすべての参照文献は、それらの各々が本願明細書で個々に引用されるのと同様に、参照により本願明細書に組み込まれる。さらに、当業者であれば、上記の内容を読んだ後、本発明に様々な修飾または変更を施すことができることを理解すべきである。すべてのこれらの均等物も、本願に添付される特許請求の範囲により定義される範囲内に含まれる。

また、本発明は以下を提供する。

[1]

ヒトPD-1(配列番号1)に結合する抗体であって、軽鎖(LC)及び重鎖(HC)を含み、

前記軽鎖がそれぞれ配列番号10、11及び12に示されるアミノ酸配列からなる軽鎖相補性決定領域LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、

前記重鎖が重鎖相補性決定領域HCDR1、HCDR2、及びHCDR3を含み、

HCDR1が配列番号2に示されるアミノ酸配列からなり、

HCDR2が配列番号3、4、5、6または7に示されるアミノ酸配列からなり、

HCDR3が配列番号8または9に示されるアミノ酸配列からなる、抗体。

[2]

HCDR1、HCDR2、及びHCDR3がそれぞれ配列番号2、配列番号3、及び配列番号8に示されるアミノ酸配列からなる、[1]に記載の抗体。

[3]

HCDR1、HCDR2、及びHCDR3がそれぞれ配列番号2、配列番号4、及び配列番号9に示されるアミノ酸配列からなる、[1]に記載の抗体。

[4]

HCDR1、HCDR2、及びHCDR3がそれぞれ配列番号2、配列番号5、及び配列番号8に示されるアミノ酸配列からなる、[1]に記載の抗体。

[5]

HCDR1、HCDR2、及びHCDR3がそれぞれ配列番号2、配列番号6、及び配列番号8に示されるアミノ酸配列からなる、[1]に記載の抗体。

[6]

HCDR1、HCDR2、及びHCDR3がそれぞれ配列番号2、配列番号7、及び配列番号9に示されるアミノ酸配列からなる、[1]に記載の抗体。

[7]

1つまたは2つの軽鎖(LC)及び1つまたは2つの重鎖(HC)を含む抗体であって、前記軽鎖の各々が軽鎖可変領域(LCVR)を含み、前記重鎖の各々が重鎖可変領域(HCVR)を含み、前記LCVRが配列番号18に示されるアミノ酸配列を有し、前記HCVRが配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、または配列番号17に示されるアミノ酸配列を有する、抗体。

[8]

前記 L C V R が配列番号 1 8 に示されるアミノ酸配列を有し、前記 H C V R が配列番号 1 3 に示されるアミノ酸配列を有する、[7] に記載の抗体。

[9]

前記 L C V R が配列番号 1 8 に示されるアミノ酸配列を有し、前記 H C V R が配列番号 1 4 に示されるアミノ酸配列を有する、[7] に記載の抗体。

[1 0]

前記 L C V R が配列番号 1 8 に示されるアミノ酸配列を有し、前記 H C V R が配列番号 1 5 に示されるアミノ酸配列を有する、[7] に記載の抗体。

[1 1]

前記 L C V R が配列番号 1 8 に示されるアミノ酸配列を有し、前記 H C V R が配列番号 1 6 に示されるアミノ酸配列を有する、[7] に記載の抗体。

[1 2]

前記 L C V R が配列番号 1 8 に示されるアミノ酸配列を有し、前記 H C V R が配列番号 1 7 に示されるアミノ酸配列を有する、[7] に記載の抗体。

[1 3]

前記 L C が配列番号 2 4 に示されるアミノ酸配列を有し、前記 H C V R が配列番号 1 9 、配列番号 2 0 、配列番号 2 1 、配列番号 2 2 、または配列番号 2 3 に示されるアミノ酸配列を有する、[7] に記載の抗体。

[1 4]

前記 L C が配列番号 2 4 に示されるアミノ酸配列を有し、前記 H C が配列番号 1 9 に示されるアミノ酸配列を有する、[1 3] に記載の抗体。

[1 5]

前記 L C が配列番号 2 4 に示されるアミノ酸配列を有し、前記 H C が配列番号 2 0 に示されるアミノ酸配列を有する、[1 3] に記載の抗体。

[1 6]

前記 L C が配列番号 2 4 に示されるアミノ酸配列を有し、前記 H C が配列番号 2 1 に示されるアミノ酸配列を有する、[1 3] に記載の抗体。

[1 7]

前記 L C が配列番号 2 4 に示されるアミノ酸配列を有し、前記 H C が配列番号 2 2 に示されるアミノ酸配列を有する、[1 3] に記載の抗体。

[1 8]

前記 L C が配列番号 2 4 に示されるアミノ酸配列を有し、前記 H C が配列番号 2 3 に示されるアミノ酸配列を有する、[1 3] に記載の抗体。

[1 9]

2 つの軽鎖及び 2 つの重鎖を含み、各軽鎖が配列番号 2 4 に示されるアミノ酸配列を有し、各重鎖が配列番号 1 9 、配列番号 2 0 、配列番号 2 1 、配列番号 2 2 、または配列番号 2 3 に示されるアミノ酸配列を有する、[1 3] に記載の抗体。

[2 0]

各軽鎖が配列番号 2 4 に示されるアミノ酸配列を有し、各重鎖が配列番号 1 9 に示されるアミノ酸配列を有する、[1 9] に記載の抗体。

[2 1]

各軽鎖が配列番号 2 4 に示されるアミノ酸配列を有し、各重鎖が配列番号 2 0 に示されるアミノ酸配列を有する、[1 9] に記載の抗体。

[2 2]

各軽鎖が配列番号 2 4 に示されるアミノ酸配列を有し、各重鎖が配列番号 2 1 に示されるアミノ酸配列を有する、[1 9] に記載の抗体。

[2 3]

各軽鎖が配列番号 2 4 に示されるアミノ酸配列を有し、各重鎖が配列番号 2 2 に示されるアミノ酸配列を有する、[1 9] に記載の抗体。

[2 4]

各軽鎖が配列番号 24 に示されるアミノ酸配列を有し、各重鎖が配列番号 23 に示されるアミノ酸配列を有する、[19] に記載の抗体。

[25]

前記重鎖のうちの 1 つが前記軽鎖のうちの 1 つと鎖間ジスルフィド結合を形成し、他の重鎖が他の軽鎖と鎖間ジスルフィド結合を形成し、前記重鎖のうちの 1 つが他の重鎖と 2 つの鎖間ジスルフィド結合を形成する、[19] ~ [24] のいずれか一項に記載の抗体。

[26]

前記抗体がグリコシル化されている、[1] ~ [24] のいずれか一項に記載の抗体。

[27]

配列番号 24 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列及び配列番号 20 のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む DNA 分子を含む哺乳動物細胞であって、配列番号 24 のアミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号 20 のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体を発現することができ、好ましくは CHO 細胞である哺乳動物細胞。

[28]

配列番号 24 のアミノ酸配列を有する軽鎖及び配列番号 20 のアミノ酸配列を有する重鎖を含む抗体の産生プロセスであって、[27] に記載の哺乳動物細胞を前記抗体が発現されるような条件下で培養すること、及び前記発現された抗体を回収することを含む、プロセス。

[29]

[28] に記載のプロセスにより産生された、抗体。

[30]

[1] ~ [26] のいずれか一項に記載の抗体、及び薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。

[31]

がんの治療方法であって、治療を必要とする対象に、有効量の [1] ~ [26] のいずれか一項に記載の抗体を投与するステップを含む、方法。

[32]

前記がんが黒色腫、肺がん、頭頸部がん、結腸直腸がん、膵臓がん、胃がん、腎臓がん、膀胱がん、前立腺がん、乳がん、卵巣がん、または肝がんである、[31] に記載の方法。

[33]

1 つ以上の抗腫瘍剤を同時に、別々に、または連続して投与することをさらに含む、[31] または [32] に記載の方法。

[34]

療法における使用のための、[1] ~ [26] のいずれか一項に記載の抗体。

[35]

がんの治療における使用のための、[1] ~ [26] のいずれか一項に記載の抗体。

[36]

前記がんが、黒色腫、肺がん、頭頸部がん、結腸直腸がん、膵臓がん、胃がん、腎臓がん、膀胱がん、前立腺がん、乳がん、卵巣がん、または肝細胞癌である、[35] に記載の使用のための抗体。

[37]

がんの治療における組み合わせた使用のための、1 つ以上の抗腫瘍剤との同時の、別々の、または連続した組み合わせでの、[1] ~ [26] のいずれか一項に記載の抗体。

[38]

前記がんが、黒色腫、肺がん、頭頸部がん、結腸直腸がん、膵臓がん、胃がん、腎臓がん、膀胱がん、前立腺がん、乳がん、卵巣がん、または肝細胞癌である、[37] の組み合わせた使用のための抗体。

【 国际调查报告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2016/102238
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K 16/28(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K; A61P; A61K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) DWPI, EPODOC, CNPAT, CNKI, ISI Web of knowledge, NCBI, Google Scholar, GenBank: programmed cell death, PD-1, antibody, complementarity determining region, CDR, light chain, heavy chain, cancer, tumor, search for SEQ ID Nos. 2-12.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2013181452 A1 (GENENTECH INC. ET AL.) 05 December 2013 (2013-12-05) the whole document	1-38
A	WO 2013079174 A1 (MERCK PATENT GMBH) 06 June 2013 (2013-06-06) the whole document	1-38
A	WO 2013173223 A1 (SQUIBB BRISTOL MYERS CO) 21 November 2013 (2013-11-21) the whole document	1-38
A	WO 2012177624 A2 (UNIV JOHNS HOPKINS ET AL.) 27 December 2012 (2012-12-27) the whole document	1-38
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 February 2017		Date of mailing of the international search report 19 July 2017
Name and mailing address of the ISA/CN STATE INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE OF THE P.R.CHINA 6, Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing 100088 China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer ZHANG, Qi Telephone No. (86-10)62411036

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/102238

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
 - on paper
 - in electronic form
 - b. (time)
 - in the international application as filed
 - together with the international application in electronic form
 - subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/102238

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **31-33**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 - [1] The subject matter of claims 31-33 relates to a treatment method of the human or animal body, and therefore, according to the criteria set out in Rule 39.1(iv), relates to subject matter for which an international search is not required.
 - [2] The search for these claims is base on the subject matter of “the use of the antibody in manufacturing medicine for treating cancer”.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2016/102238

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)		
WO 2013181452 A1	05 December 2013	CN 104271601 A	07 January 2015		
		RU 2014147867 A	20 July 2016		
		SG 11201407859Y A	30 December 2014		
		KR 20150027135 A	11 March 2015		
		AR 091220 A1	21 January 2015		
		MX 2014014485 A	15 May 2015		
		SG 10201603055W A	30 May 2016		
		IL 235779 D0	29 January 2015		
		JP 2015519372 A	09 July 2015		
		CA 2874144 A1	05 December 2013		
		AU 2013267267 A1	18 December 2014		
		US 2015320859 A1	12 November 2015		
		EP 2855528 A1	08 April 2015		
		HK 1200857 A1	14 August 2015		
		IL 235779 A	29 January 2015		
		WO 2013079174 A1	06 June 2013	EA 201400625 A1	28 November 2014
				AU 2012344260 A1	17 July 2014
CN 103987405 A	13 August 2014				
JP 2015500207 A	05 January 2015				
KR 20140104982 A	29 August 2014				
AR 089010 A1	23 July 2014				
CA 2856895 A1	06 June 2013				
EP 2785375 A1	08 October 2014				
HK 1200736 A1	14 August 2015				
IL 232778 D0	31 July 2014				
SG 11201402603W A	27 June 2014				
MX 2014006316 A	04 September 2014				
US 2014341917 A1	20 November 2014				
WO 2013173223 A1	21 November 2013	KR 20150020189 A	25 February 2015		
		EA 201492105 A1	30 June 2015		
		US 2016090417 A1	31 March 2016		
		HK 1203971 A1	06 November 2015		
		US 9212224 B2	15 December 2015		
		IL 235591 D0	29 January 2015		
		JP 2015518826 A	06 July 2015		
		US 2013309250 A1	21 November 2013		
		MX 2014013565 A	12 February 2015		
		IL 235591 A	29 January 2015		
		AU 2013263076 A1	22 January 2015		
		CN 104470949 A	25 March 2015		
		CA 2873402 A1	21 November 2013		
		US 2015125463 A1	07 May 2015		
		EP 2850102 A1	25 March 2015		
SG 11201407190T A	30 December 2014				
WO 2012177624 A2	27 December 2012	EP 2723381 A2	30 April 2014		
		AU 2012273182 A1	16 January 2014		
		EP 2723381 A4	18 March 2015		
		US 9132281 B2	15 September 2015		
		WO 2012177624 A3	25 April 2013		
		CN 103796680 A	14 May 2014		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2016/102238

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		CA 2840170 A1	27 December 2012
		US 2014155678 A1	05 June 2014

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 1/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/00	
A 6 1 P 1/18 (2006.01)	A 6 1 P 1/18	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 13/08 (2006.01)	A 6 1 P 13/08	
A 6 1 P 15/00 (2006.01)	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
	C 1 2 N 15/13	

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

- (72) 発明者 ツン, アンディー
中華人民共和国 ジャンスウ 2 1 5 1 2 3, スウツォウ, スウツォウ インダストリアル パーク, ドンピン ストリート 1 6 8
- (72) 発明者 チェン, チェング
中華人民共和国 ジャンスウ 2 1 5 1 2 3, スウツォウ, スウツォウ インダストリアル パーク, ドンピン ストリート 1 6 8
- (72) 発明者 リュ, シャオリン
中華人民共和国 ジャンスウ 2 1 5 1 2 3, スウツォウ, スウツォウ インダストリアル パーク, ドンピン ストリート 1 6 8
- (72) 発明者 ユ, デ - チャオ マイケル
中華人民共和国 ジャンスウ 2 1 5 1 2 3, スウツォウ, スウツォウ インダストリアル パーク, ドンピン ストリート 1 6 8

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA05
4B065 AA90X AB01 AC14 BA02 CA25 CA44
4C084 AA19 ZA591 ZA592 ZA661 ZA662 ZA751 ZA752 ZA811 ZA812 ZA891
ZA892 ZB261 ZB262 ZC75
4C085 AA14 BB11 CC23 DD23 EE01 EE03
4H045 AA11 AA20 AA30 DA76 EA28 FA74