

(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2020-504627

(P2020-504627A)

(43) 公表日 令和2年2月13日(2020.2.13)

| (51) Int.Cl.                   | F I                 | テーマコード (参考) |
|--------------------------------|---------------------|-------------|
| <b>C 1 2 N 15/13 (2006.01)</b> | C 1 2 N 15/13 Z N A | 4 B 0 6 5   |
| <b>C 0 7 K 16/28 (2006.01)</b> | C 0 7 K 16/28       | 4 C 0 8 5   |
| <b>C 1 2 N 15/62 (2006.01)</b> | C 1 2 N 15/62 Z     | 4 H 0 4 5   |
| <b>C 1 2 N 15/63 (2006.01)</b> | C 1 2 N 15/63 Z     |             |
| <b>C 1 2 N 1/15 (2006.01)</b>  | C 1 2 N 1/15        |             |

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 43 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-555527 (P2019-555527)  
 (86) (22) 出願日 平成29年7月6日 (2017.7.6)  
 (85) 翻訳文提出日 令和1年6月27日 (2019.6.27)  
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2017/092026  
 (87) 国際公開番号 W02018/113258  
 (87) 国際公開日 平成30年6月28日 (2018.6.28)  
 (31) 優先権主張番号 201611198440.8  
 (32) 優先日 平成28年12月22日 (2016.12.22)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 中国 (CN)

(71) 出願人 519228566  
 アンブソース・バイオフィーマ・シャンハイ・インコーポレイテッド  
 AMPSOURCE BIOPHARMA  
 SHANGHAI INC.  
 中華人民共和国、シャンハイ 201318、  
 プドン・ニュー・エリア、ジピン・ロード、  
 レーン908、ナンバー3  
 No. 3, Lane 908, Ziping Road, Pudong New Area, Shanghai 201318, China  
 (74) 代理人 100110423  
 弁理士 曾我 道治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗PD-1抗体及びその使用

(57) 【要約】

本発明は、高親和力でPD-1に特異的に結合する抗体を提供し、前記抗体をコードする核酸分子、前記抗体を発現するための発現ベクターおよび宿主細胞、並びに前記抗体の生産方法を更に提供する。また、本発明は、前記抗体を含む免疫複合体および医薬組成物、並びに前記抗体の、癌、感染性疾患および炎症性疾患を治療する医薬の調製における使用を更に提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

CDR - H 1、CDR - H 2 および CDR - H 3 配列を含む重鎖可変領域と、  
CDR - L 1、CDR - L 2 および CDR - L 3 配列を含む軽鎖可変領域とを含む、P  
D - 1 に結合する単離モノクローナル抗体であって、

( i ) 重鎖可変領域は、SEQ ID NOs : 1 および 2 で表される CDR - H 1 配  
列と、SEQ ID NOs : 3 および 4 で表される CDR - H 2 配列と、SEQ ID  
NOs : 5 および 6 で表される CDR - H 3 配列と、を含み、

( II ) 軽鎖可変領域は、SEQ ID NOs : 7 および 8 で表される CDR - L 1  
配列と、SEQ ID NOs : 9 および 10 で表される CDR - L 2 配列と、SEQ  
ID NOs : 11 および 12 で表される CDR - L 3 配列と、を含む、PD - 1 に結合  
する単離モノクローナル抗体。 10

## 【請求項 2】

重鎖可変領域が SEQ ID NO : 1 で表される CDR - H 1 配列と、SEQ ID  
NO : 3 で表される CDR - H 2 配列と、SEQ ID NO : 5 で表される CDR -  
H 3 配列とを含み、軽鎖可変領域が SEQ ID NO : 7 で表される CDR - L 1 配  
列と、SEQ ID NO : 9 で表される CDR - L 2 配列と、SEQ ID NO : 11  
で表される CDR - L 3 配列と、を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の抗体。

## 【請求項 3】

前記抗体は、マウスまたはキメラであり、重鎖可変領域がマウス Ig G 1、Ig G 2、  
Ig G 3、Ig G 4 またはその変異体の重鎖 FR 領域を含み、軽鎖可変領域がマウス  
鎖またはその変異体の軽鎖 FR 領域を含む、ことを特徴とする請求項 2 に記載の抗体。 20

## 【請求項 4】

重鎖可変領域が SEQ ID NO : 13 のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域が SE  
Q ID NO : 14 のアミノ酸配列を含む、ことを特徴とする請求項 3 に記載の抗体。

## 【請求項 5】

前記抗体は、ヒト型化である、ことを特徴とする請求項 2 に記載の抗体。

## 【請求項 6】

重鎖可変領域が SEQ ID NOs : 17、19、21、23、25、27 および 2  
9 で表されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域が SEQ ID NOs : 18、20、  
22、24、26、28 および 30 で表されるアミノ酸配列を含む、ことを特徴とする請  
求項 5 に記載の抗体。 30

## 【請求項 7】

重鎖可変領域がそれぞれ SEQ ID NO : 17、19、21、23、25、27 お  
よび 29 で表されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域がそれぞれ SEQ ID NO :  
18、20、22、24、26、28 および 30 で表されるアミノ酸配列を含む、ことを  
特徴とする請求項 6 に記載の抗体。

## 【請求項 8】

重鎖可変領域が SEQ ID NO : 2 で表される CDR - H 1 配列と、SEQ ID  
NO : 4 で表される CDR - H 2 配列と、SEQ ID NO : 6 で表される CDR -  
H 3 配列とを含み、軽鎖可変領域が SEQ ID NO : 8 で表される CDR - L 1 配  
列と、SEQ ID NO : 10 で表される CDR - L 2 配列と、SEQ ID NO : 1  
2 で表される CDR - L 3 配列とを含む、ことを特徴とする請求項 1 に記載の抗体。 40

## 【請求項 9】

前記抗体は、マウスまたはキメラであり、重鎖可変領域がマウス Ig G 1、Ig G 2、  
Ig G 3、Ig G 4 またはその変異体の重鎖 FR 領域を含み、軽鎖可変領域がマウス  
鎖またはその変異体の軽鎖 FR 領域を含む、ことを特徴とする請求項 8 に記載の抗体。

## 【請求項 10】

重鎖可変領域が SEQ ID NO : 15 で表されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領  
域が SEQ ID NO : 16 で表されるアミノ酸配列を含む、ことを特徴とする請求項 10 40

9に記載の抗体。

【請求項11】

前記抗体は、ヒト型化である、ことを特徴とする請求項8に記載の抗体。

【請求項12】

重鎖可変領域がSEQ ID NOs: 31、33および35から選ばれるもので表されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域がSEQ ID NOs: 32、34および36から選ばれるもので表されるアミノ酸配列を含む、ことを特徴とする請求項11に記載の抗体。

【請求項13】

重鎖可変領域がそれぞれSEQ ID NO: 31、33および35で表されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域がそれぞれSEQ ID NO: 32、34および36で表されるアミノ酸配列を含む、ことを特徴とする請求項12に記載の抗体。

10

【請求項14】

前記抗体は、1つまたは複数のアミノ酸の置換、添加および/または欠失を含む、ことを特徴とする請求項1～13のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項15】

1つまたは複数のアミノ酸の置換、添加および/または欠失を含む抗体は、その由来配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%の同一性がある、ことを特徴とする請求項14に記載の抗体。

【請求項16】

前記抗体は、ヒトIgG4またはIgG1の重鎖定常領域とヒトの軽鎖定常領域を含む全長抗体であり、或いは、FabまたはFab'2またはScFvだけを含む抗原結合断片である、ことを特徴とする請求項1～15のいずれか一項に記載の抗体。

20

【請求項17】

前記抗体は、グリコシル化修飾を含有する、ことを特徴とする請求項1～15のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項18】

前記抗体は、1nMまたはより低いKDでPD-1に結合し、より好ましくは、100pMまたはより低いKDでPD-1に結合し、更に好ましくは、10pMまたはより低いKDでPD-1に結合し、最も好ましくは、1pMまたはより低いKDでPD-1に結合する、ことを特徴とする請求項1～15のいずれか一項に記載の抗体。

30

【請求項19】

請求項1～15のいずれか一項に記載の抗体をコードする、DNA分子。

【請求項20】

前記抗体重鎖可変領域をコードするDNA分子がSEQ ID NO: 37、39および41から選ばれ、前記抗体軽鎖可変領域をコードするDNA分子がSEQ ID NO: 38、40および42から選ばれる、ことを特徴とする請求項19に記載のDNA分子。

【請求項21】

請求項19に記載のDNA分子を含む、発現ベクター。

40

【請求項22】

請求項21に記載の発現ベクターにより形質転換された宿主細胞であって、CHO細胞であることが好ましい、宿主細胞。

【請求項23】

請求項1～15のいずれか一項に記載の抗体を含む二重特異性分子であって、好ましくは、前記二重特異性分子は、VEGF、EGFR、Her2/neu、VEGF受容体または他の成長因子受容体、CD20、CD40、CTLA-4、OX-40、4-1-BBおよびICOSという分子に対する抗体を含んだがそれに限定されない、二重特異性分子。

【請求項24】

50

請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の抗体を含む免疫抱合体であって、治療剤を更に含み、治療剤は、毒素、放射性同位体、医薬または細胞毒剤であることが好ましい、免疫抱合体。

【請求項 25】

請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の抗体および薬用可能賦形剤、ベクターまたは希釈剤を含む、医薬組成物。

【請求項 26】

請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の抗体を調製する方法であって、前記抗体の産生を許容する条件で、請求項 22 に記載の宿主細胞を培養し、産生した前記抗体を回収し分離することを含む、方法。

10

【請求項 27】

疾患または病症は、癌であることが好ましく、PD-L1 発現の高い癌であることが更に好ましく、前記癌は、肺がん、肝臓がん、卵巣がん、子宮頸がん、皮膚がん、膀胱がん、大腸がん、乳がん、神経膠腫、腎臓がん、胃がん、食道がん、口腔扁平上皮がん、および頭頸部がんを含んだがそれに限定されず、乳がん、肺がん、胃がん、腸がん、腎臓がん、メラノーマであることが好ましく、非小細胞肺癌、メラノーマ、腎臓がんであることが最も好ましく、前記疾患は感染性疾患であることが好ましく、前記感染性疾患は慢性ウイルス感染、細菌感染または寄生虫感染疾患を含んだがそれに限定されず、HIV、HBV および HCV であることが更に好ましい、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の抗体または請求項 23 に記載の二重特異性分子または請求項 24 に記載の免疫抱合体または請求項 25 に記載の医薬組成物の、PD-1 媒介の疾患または病症を治療するための医薬の調製における使用。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、治療性モノクローナル抗体の分野に属し、さらに具体的には、本発明は、プログラム死受容体 (PD-1) に対する抗体に関し、さらに前記抗体が多種の疾患 (癌、感染性疾患、および炎症性疾患を含む) を治療するための使用に関する。

【背景技術】

【0002】

プログラム死受容体 - 1 (Programmed Death - 1、PD-1) は、CD28 ファミリーメンバーで、活性化 T 細胞と B 細胞表面で発現される免疫阻害性受容体 (Yao Zhu 編、Nat Rev Drug Discov、2013; 12(2): 130-146) であり、初めてアポトーシスの T 細胞ハイブリドーマ中にハイブリダイゼーション削減技術を用いて得るものである。PD-1 は、主に、CD<sup>4+</sup> T 細胞、CD<sup>8+</sup> T 細胞、NK-T 細胞、B 細胞および活性化した単核細胞の表面で発現され、T 細胞受容体 (TCR) または B 細胞受容体 (BCR) シグナルにより誘導発現される。TNF は、PD-1 のこれらの細胞表面での発現 (Francisco LM 編、Immunol Rev、2010; 236: 219-242) を強化可能である。PD-1 分子は、細胞外領域、膜貫通領域および細胞内領域からなる。細胞外領域は免疫グロブリン可変領域 IgV 構造ドメインを 1 つ含有し、細胞内領域は 2 つのチロシンに基づくシグナル転換モチーフ ITIM (免疫受容体チロシン抑制作用モチーフ) と ITSM (免疫受容体チロシン転換作用モチーフ) を含有する。T 細胞が活性化された後、PD-1 は主に ITSM モチーフによってチロシンホスホリパーゼ SHP2 を集合して、CD3、PKC および ZAP70 などを含む効果型分子の脱リン酸化を引き起こす。PD-1 配位子には、PD-L1 と PD-L2 がある。PD-L1 は、B7H1 または CD274 と呼ばれ、PD-L2 は B7DC または CD273 と呼ばれる。PD-L1 と PD-L2 は、異なる細胞群 (Shimauchi、Kabashima 編、Int J Cancer、2007; 121(12): 2585-2590) に発現される。そのうち、PD-L2 発現は比較的に限られ、主に活性化したマクロファージ、樹状細胞および少数腫瘍細胞

30

40

50

胞にある。PD-L1は、活性化したT細胞、B細胞、マクロファージ、樹状細胞および腫瘍細胞に広く発現されながら、生体のある免疫遮蔽部位、例えば、胎盤、眼およびその上皮、筋肉、肝臓および血管内皮などの組織に発現される。

#### 【0003】

PD-1は、配位子( Programmed Death-1 Ligands、PD-Ls) PD-L1及びPD-L2と相互作用し、細胞内のシグナル転換経路によってCD3とCD28媒介のT細胞の活性化および細胞因子の産生を著しく抑制することができるため、T細胞反応を調節する重要な免疫関門である。正常の場合、PD-1/PD-Lsシグナル経路は、外周組織の免疫耐性を誘導し維持することができ、組織の過度炎症反応の防止および自身免疫性疾患の発生に対して積極的な作用を有する(Latchman Yら編、Nat Immunol、2001; 2: 261-268)。病理の場合、PD-1は、配位子PD-L1、PD-L2と相互作用し、例えばIFN- $\gamma$ 、IL-2およびTNF- $\alpha$ の分泌およびサバイビンなどのT細胞の免疫刺激性細胞因子の発現を下げ、免疫阻害性細胞因子IL-10の分泌を促進することで、T細胞の免疫反応を抑制する(Hamidovら編、Expert Opin Biol Ther、2013; 13(6): 847-861)。研究によれば、PD-1は、抑制シグナルを協力して人類の多種の疾患の発生と密に関連し、疾患治療のターゲット分子とすることができることが表明されている(Okazaki Tら編、J Immunol、2007; 19: 813-824)。

10

#### 【0004】

PD-1/PD-L1のシグナル経路が腫瘍の発展と密接に関係している。腫瘍患者の体内に、PD-L1高発現が腫瘍の転移能力を強化して患者の死亡率の向上を引き起こすと共に、患者の予後不良と関連する可能性がある。研究によれば、肺がん、肝臓がん、卵巣がん、子宮頸がん、皮膚がん、膀胱がん、大腸がん、乳がん、神経膠腫、腎臓がん、胃がん、食道がん、口腔扁平上皮がん、および頭頸部がんなどの人類の腫瘍組織においてPD-L1高発現タンパク質が検出されたことが表明されている。また、腫瘍細胞が多種の細胞因子の誘導下でPD-L1を高く発現するという現象は、腫瘍の免疫エスケープに関連する。それと同時に、腫瘍部位の浸潤性CD<sup>8+</sup>T細胞が腫瘍の微小環境にも影響され、PD-1発現も外周血液におけるT細胞よりも高く、それが腫瘍細胞表面PD-L1と作用し、T細胞の活性化および増殖を抑制する。腫瘍細胞は、この手段で細胞毒性Tリンパ細胞(cytotoxic lymphocyte、CTL)の殺傷作用を回避し、生体の抗腫瘍免疫応答を弱めることができる。遮断型抗PD-1モノクローナル抗体でPD-1/PD-L1のシグナルを遮断し、IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-10の分泌を上げることにより、CD<sup>4+</sup>およびCD<sup>8+</sup>T細胞の増殖抑制を効果的に逆転させながら、T細胞の活性化程度と殺傷能力を著しく向上させることができる(Dong HDら編、Nat Med、2002; 8: 793-800)。

20

30

#### 【0005】

多種の慢性および急性ウイルス感染もPD-1/PD-Lsのシグナルによってヒト体の免疫監視を回避する。生体外周ウイルス特異性CD<sup>4+</sup>、CD<sup>8+</sup>T細胞がPD-1を高く発現して機能不全または無力を招き、直ちに感染したウイルスを効果的に除去することができない(Narasimhan Jら編、J Virol、2008; 376: 140-153)。最近、大量の研究によれば、特異性モノクローナル抗体でPD-1/PD-Lsを遮断する抑制手段によってHIV、HBVおよびHCVなどのウイルス特異性CD<sup>4+</sup>、CD<sup>8+</sup>Tを効果的に活性化して増殖させ、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ および粒子酵素Bなどの殺傷因子を産生し、免疫細胞の特異性抗ウイルス機能を回復させることが表明されている(Barber DLら編、Nature、2006; 439: 682-687)。

40

#### 【0006】

従って、特異性抗PD-1モノクローナル抗体を調製し、PD-1/PD-L1のシグナルを特異的に遮断して当該抑制手段の作用を閉鎖し、CTLの腫瘍細胞を殺傷する機能

50

を強化し、腫瘍の形成および成長を効果的に抑制することができる。現在、2種類のPD-1阻害剤抗腫瘍抗体薬が発売され、それぞれPembrolizumab（商品名：Keytruda、メルク公司製）とNivolumab（商品名：Opdivo、小野製薬/ブリストル・マイヤーズスクイブ製）である。CureTech公司製のPidilizumabが第II相臨床研究段階にあり、MedImmune社製のAMP-224、AMP-514が第I相臨床研究段階にある。多種の抗PD-1、PD-L1およびCTLA4などの免疫関門としてのモノクローナル抗体が臨床に使用されたものの、これらの抗体が単薬として用いられる応答率が低く、平均15-20%だけである。そのため、新型の抗PD-1モノクローナル抗体は、より高い特異性、より低い毒副作用、及びより良い臨床効果を有し、癌または感染性患者に対してより多くの投薬選択を提供することができる。

10

**【発明の概要】****【0007】**

本発明は、PD-1分子に対して高い親和力を有する抗PD-1モノクローナル抗体を提供することを目的とする。

**【0008】**

1態様において、本発明は、

CDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3配列を含む重鎖可変領域と、

CDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3配列を含む軽鎖可変領域とを含む、P

D-1に結合する単離モノクローナル抗体であって、

20

(i)重鎖可変領域がSEQ ID NOs:1および2で表されるCDR-H1配列と、SEQ ID NOs:3および4で表されるCDR-H2配列と、SEQ ID NOs:5および6で表されるCDR-H3配列と、を含み、

(ii)軽鎖可変領域がSEQ ID NOs:7および8で表されるCDR-L1配列と、SEQ ID NOs:9および10で表されるCDR-L2配列と、SEQ ID NOs:11および12で表されるCDR-L3配列と、を含む、PD-1に結合する単離モノクローナル抗体を提供する。

**【0009】**

本発明の好ましい実施例において、前記抗体の重鎖可変領域がSEQ ID NO:1で表されるCDR-H1配列と、SEQ ID NO:3で表されるCDR-H2配列と、SEQ ID NO:5で表されるCDR-H3配列とを含み、軽鎖可変領域がSEQ ID NO:7で表されるCDR-L1配列と、SEQ ID NO:9で表されるCDR-L2配列と、SEQ ID NO:11で表されるCDR-L3配列と、を含む。

30

**【0010】**

他の好ましい実施例において、前記抗体の重鎖可変領域がSEQ ID NO:2で表されるCDR-H1配列と、SEQ ID NO:4で表されるCDR-H2配列と、SEQ ID NO:6で表されるCDR-H3配列とを含み、軽鎖可変領域がSEQ ID NO:8で表されるCDR-L1配列と、SEQ ID NO:10で表されるCDR-L2配列と、SEQ ID NO:12で表されるCDR-L3配列とを含む。

**【0011】**

さらに、上記CDR配列を含む抗体は、マウス、キメラまたはヒト型化である。

40

**【0012】**

例えば、前記抗体はマウスまたはキメラである、その重鎖可変領域がマウスIgG1、IgG2、IgG3、IgG4またはその変異体の重鎖FR領域を更に含み、その軽鎖可変領域がマウス、鎖またはその変異体の軽鎖FR領域を含む。

**【0013】**

より好ましくは、上記マウスまたはキメラ抗体は、

(a)SEQ ID NO:15で表されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、

(b)SEQ ID NO:16で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含む。

50

## 【0014】

例えば、本発明の好ましい実施例において、マウス抗体A B 1 2 N 1とキメラ抗体A B 1 2 N 2は、重鎖可変領域がSEQ ID NO: 15で表されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域がSEQ ID NO: 16で表されるアミノ酸配列を含む。

## 【0015】

さらに好ましくは、上記マウスまたはキメラ抗体は、

(a) SEQ ID NO: 13で表されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、

(b) SEQ ID NO: 14で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、を含む。

## 【0016】

例えば、本発明の好ましい実施例においてマウス抗体A B 1 2 M 1とキメラ抗体A B 1 2 M 2は、重鎖可変領域がSEQ ID NO: 13で表されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域がSEQ ID NO: 14で表されるアミノ酸配列を含む。

## 【0017】

例えば、前記抗体はヒト型化である。ヒト型化抗体の生産方法は当業者にとって公知である。例えば、本発明に係るCDR配列をヒト型化抗体可変領域に転移することによって本発明に係るヒト型化抗PD-1抗体を調製することができる。前記ヒト型化抗体は、抗抗体反応(AAR)とヒト抗マウス抗体反応(HAMA)を生じず、抗抗体に中和されることにより快速に除去されない。

## 【0018】

本発明の好ましい実施例において、上記マウス抗体A B 1 2 M 1に対してCDR移植(CDR-grafting)によってヒト型化改良を行う。より好ましくは、これによる前記ヒト型化抗体は、その重鎖可変領域がSEQ ID NOs: 17、19、21、23、25、27および29から選ばれるもので表されるアミノ酸配列を含み、その軽鎖可変領域がSEQ ID NOs: 18、20、22、24、26、28および30から選ばれるもので表されるアミノ酸配列を含む。更に好ましくは、これによる前記ヒト型化抗体A B 1 2 M 3、A B 1 2 M 4、A B 1 2 M 5、A B 1 2 M 6、A B 1 2 M 7、A B 1 2 M 8およびA B 1 2 M 9は、その重鎖可変領域がそれぞれSEQ ID NO: 17、19、21、23、25、27および29で表されるアミノ酸配列を含み、その軽鎖可変領域がそれぞれSEQ ID NO: 18、20、22、24、26、28和30で表されるアミノ酸配列を含む。

## 【0019】

本発明の他の好ましい実施例において、上記マウス抗体A B 1 2 N 1に対してCDR移植(CDR-grafting)によってヒト型化改良を行い。より好ましくは、これによる前記ヒト型化抗体は、その重鎖可変領域がSEQ ID NOs: 31、33および35から選ばれるもので表されるアミノ酸配列を含み、その軽鎖可変領域がSEQ ID NOs: 32、34および36から選ばれるもので表されるアミノ酸配列を含む。更に好ましくは、これによる前記ヒト型化抗体A B 1 2 N 3、A B 1 2 N 4およびA B 1 2 N 5は、その重鎖可変領域がそれぞれSEQ ID NO: 31、33および35で表されるアミノ酸配列を含み、その軽鎖可変領域がそれぞれSEQ ID NO: 32、34および36で表されるアミノ酸配列を含む。

## 【0020】

抗体の活性を実質的に影響しない前提で、当業者にとっては本発明に係る抗体の配列に対して1つまたは複数(例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9または10または複数)のアミノ酸の置換、添加および/または欠失を行うことにより、前記抗体の配列の変異体を取得することができる。これらは、本発明の保護範囲に含まれると見なされる。例えば、可変領域において類似する性質を有するアミノ酸を置換する。本発明に係る変異体の配列は、その由来配列と少なくとも80%の同一性がある。更に好ましくは、本発明に係る変異体の配列は、その由来配列と少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%の同一性がある。

10

20

30

40

50

## 【0021】

本発明の抗体は、全長抗体であってもよく、例えば、ある好ましい実施形態において、本発明のヒト抗PD-1抗体は、ヒトIgG4またはIgG1の重鎖定常領域およびヒトの軽鎖定常領域を更に含み、或いは、前記抗体は、FabまたはFab<sup>2</sup>断片、または単鎖抗体ScFvなどの抗原結合断片だけを含んでもよい。

## 【0022】

上記いずれの実施例において、本発明に係る抗体は、約1nMまたはより低いKDでPD-1に結合することができる。より好ましい実施例において、前記抗体またはその抗原結合は、約100pMまたはより低いKDでPD-1に結合することができる。更に好ましい実施例において、前記抗体は約10pMまたはより低いKDでPD-1に結合することができる。最も好ましい実施例において前記抗体は約1pMまたはより低いKDでPD-1を結合することができる。

10

## 【0023】

本発明の他の態様において、上述した抗体をコードするDNA分子が提供されている。

## 【0024】

例えば、本発明の好ましいキメラ抗体AB12M2の重鎖可変領域をコードするDNA分子は、SEQ ID NO:37で表され、軽鎖可変領域をコードするDNA分子はSEQ ID NO:38で表される。

## 【0025】

また、例えば、本発明の好ましいヒト型化抗体AB12M3の重鎖可変領域をコードするDNA分子はSEQ ID NO:39で表され、軽鎖可変領域配列をコードするDNA分子はSEQ ID NO:40で表される。

20

## 【0026】

更に例えば、本発明の別の好ましいヒト型化抗体AB12M4の重鎖可変領域をコードするDNA分子はSEQ ID NO:41で表され、軽鎖可変領域をコードするDNA分子はSEQ ID NO:42で表される。

## 【0027】

本発明の他の態様において、上述したDNA分子を含む発現ベクターが提供されている。

## 【0028】

本発明の他の態様において、上述した発現ベクターにより形質転換される宿主細胞が提供されている。宿主細胞は、CHO細胞であることが好ましい。

30

## 【0029】

本発明の他の態様において、治療剤と抱合した本発明に係る抗体を含む免疫複合体が提供されている。前記治療剤は、毒素、放射性同位体、医薬または細胞毒剤であることが好ましい。

## 【0030】

本発明の他の態様において、本発明に係る抗体のいずれか1種を含む二重特異性分子がさらに提供されている。例えば、上記PD-1抗体を、他の1種の抗原結合特性を有する抗体または抗体断片と機能的に連結して二重特異性抗体を構成してもよい。例えば、前記二重特異性抗体は、VEGF、EGFR、Her2/neu、VEGF受容体または他の成長因子受容体、CD20、CD40、CTLA-4、OX-40、4-1BBおよびICOSという分子に対する抗体を含んだがそれに限定されない。

40

## 【0031】

本発明の他の態様において、本発明に係る抗体および薬用可能賦形剤、ベクターまたは希釈剤を含む医薬組成物が更に提供されている。

## 【0032】

本発明のもう1態様において、本発明に係る抗体を調製する方法であって、(a)前記抗体の生産を許容する条件で、本発明に係る上記宿主細胞を培養することと、(b)調製した前記抗体を回収し単離することと、を含む方法が更に提供されている。

50

## 【0033】

本発明のさらなる1態様において、さらに、本発明に係るPD-1に結合する抗体、またはそれを含む医薬組成物、またはそれを含む免疫複合体、またはそれを含む二重特異性分子のPD-1媒介の疾患または病状を治療するための医薬の調製における使用に関する。

## 【0034】

そのうち、前記疾患は癌であることが好ましく、PD-L1高発現の癌であることが更に好ましく、前記癌は、肺がん、肝臓がん、卵巣がん、子宮頸がん、皮膚がん、膀胱がん、大腸がん、乳がん、神経膠腫、腎臓がん、胃がん、食道がん、口腔扁平上皮がん、および頭頸部がんを含んだがそれに限定されず、乳がん、肺がん、胃がん、腸がん、腎臓がん、およびメラノーマであることが好ましく、非小細胞肺がん、メラノーマ、および腎臓がんであることが最も好ましい。

## 【0035】

そのうち、前記疾患は、例えば、慢性ウイルス感染、細菌感染または寄生虫感染疾患などの感染性疾患であることが好ましい。前記感染性疾患は、HIV、HBVおよびHCVであることが更に好ましい。

## 【0036】

好ましくは、癌または感染性疾患を治療する医薬の調製において、キメラ、ヒト型化の抗PD-1抗体を用いてもよく、より好ましくは、ヒト型化のものを用いる。

## 【0037】

そのうち、本発明に係る抗体は、単独で用いられてもよいし、他の治療剤または治療方法と組み合わせて用いられてもよい。例えば、抗腫瘍薬または免疫原（例えば、腫瘍抗原）、抗原提示細胞（例えば、腫瘍由来の抗原または核酸で刺激される樹状細胞）、免疫刺激細胞因子（例えばIL-2、IFN $\alpha$ 2、GM-CSF）および免疫刺激細胞因子（例えば、GM-CSFに限らず）をコードする遺伝子でトランスフェクションした細胞、標準癌の治療（例えば、化学療法、放射線療法または手術）、または他の抗体（VEGF、EGFR、Her2/neu、VEGF受容体またはその成長因子受容体、CD20、CD40、CTLA-4、OX-40、4-1BBおよびICOSという分子に対する抗体を含んだがそれに限定されない）である。

## 【0038】

本発明により調製した抗PD-1ヒト型化抗体は、臨床で用いたKeytrudaとOpdivoに対してより高い結合親和力を有し、親和力定数KD値が1pM未満で、且つ極めて強い特異性を有する。体内の抗腫瘍研究データから、本発明に係るヒト型化抗体は、トランスジェニックマウス移植腫瘍の成長を著しく抑制し、ひいては一部のマウスの腫瘍が完全に消失することができる。また、本発明に係る抗体は、CHO細胞で発現され、産出量が高く、活性が高く、精製プロセスがシンプルであり、調製コストが低いという優勢がある。

詳細の説明

## 【0039】

省略形および定義

|                  |  |  |
|------------------|--|--|
| hPD-1            | ヒトPD-1タンパク質                            |  |
| CDR              | Kabat番号システムで定義した免疫グロブリン可変領域における相補性決定領域 |  |
| EC <sub>50</sub> | 50%の効果または結合を発生させる濃度                    |  |
| ELISA            | 酵素結合免疫吸着測定                             |  |
| FR               | 抗体フレームワーク領域：CDR領域以外の免疫グロブリン可変領域        |  |
| HRP              | 西洋ワサビペルオキシダーゼ                          |  |
| IL-2             | インターロイキン2                              |  |
| IFN              | インターフェロン                               |  |
| IC <sub>50</sub> | 50%阻害を発生させる濃度                          |  |

10

20

30

40

50

|                |                            |                     |
|----------------|----------------------------|---------------------|
| I g G          | 免疫グロブリン G                  |                     |
| K a b a t      | E l v i n A K a b a t      | により提唱する免疫グロブリン照合および |
| 番号システム         |                            |                     |
| m A b          | モノクローナル抗体                  |                     |
| P C R          | ポリメラーゼ連鎖反応                 |                     |
| V 領域           | 異なる抗体間に配列可変の I g G 鎖セグメント。 | 軽鎖に延びる 1 0 9 番      |
| 目の K a b a t   | 残基および重鎖の 1 1 3 番目の残基。      |                     |
| V H            | 免疫グロブリン重鎖可変領域              |                     |
| V K            | 免疫グロブリン 軽鎖可変領域             |                     |
| K <sub>D</sub> | 平衡解離定数                     | 10                  |
| k <sub>a</sub> | 結合速度定数                     |                     |
| K <sub>d</sub> | 解離速度定数                     |                     |

## 【0040】

本発明で用いられる専門用語「抗体」は、全長抗体（例えば、I g G 1 または I g G 4 抗体）、その各種の機能的な断片（例えば、F a b、F ( a b ' ) 2 または s c F v 断片などの抗原結合部分だけを含んでもよい）、及び修飾された抗体（例えば、ヒト型化、グリコシル化など）を含む。本発明は、グリコシル化修飾を有する抗 P D - 1 抗体を更に含む。ある適用において、望ましくないグリコシル化サイトを除去するように修飾が行われ、例えば、オリゴ糖鎖においてフコース除去修飾を行って抗体の依存性細胞毒性（A D C C）機能を強化させる。他のある適用において、補体依存性細胞毒性（C D C）を変更するように、ガラクトシル化の修飾が行われてもよい。

20

## 【0041】

専門用語「モノクローナル抗体または m A b」とは、単一のクローン細胞株から得られる抗体を指し、前記細胞株は、真核、原核またはファージのクローン細胞株に限定されない。モノクローナル抗体または抗原結合断片は、ハイブリドーマ技術、組換え技術、ファージ展示技術、合成技術（例えば、C D R - g r a f t i n g）、または他の従来技術を用い組換えを行って得てもよい。

## 【0042】

「抗体断片」および「抗原結合断片」とは、抗体の抗原結合断片および抗体類似物を意味する。それは、通常、少なくとも一部の母体（p a r e n t a l a n t i b o d y）の抗原結合領域または可変領域（例えば、1 つまたは複数の C D R）を含む。抗体断片は、母体の少なくともある結合特異性を保有する。通常、モルに基づいて活性を示す場合、抗体断片は、少なくとも 1 0 % の母体結合活性を保有する。好ましくは、抗体断片は、少なくとも 2 0 %、5 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 % または 1 0 0 % またはより多くの母体のターゲットに対する結合親和力を保有する。抗体断片の実例は、F a b、F a b<sub>2</sub>、F ( a b )<sub>2</sub> および F v 断片、二重抗体、線形抗体（l i n e a r a n t i b o d y）、単鎖抗体分子、例えば S c F v、モノクローナル抗体（技術が G e n m a b 由来である）、ナノメータ抗体（技術が D o m a n t i s 由来である）、構造ドメイン抗体（技術が A b l y n x 由来である）、並びに抗体断片から形成される多重特異性抗体を含んだがそれに限定されない。工程改良された抗体変異体については、H o l l i g e r など、2 0 0 5、N a t B i o t e c h n o l、2 3 : 1 1 2 6 - 1 1 3 6 に総括的に述べられている。

30

40

## 【0043】

「F a b 断片」は、1 本の軽鎖と 1 本の重鎖の C H 1、および可変領域からなる。F a b 分子の重鎖は、他の重鎖分子とジスルフィド結合を形成不可能である。

## 【0044】

「F c」領域は、抗体の C H 1 および C H 2 構造ドメインを含む 2 つの重鎖断片を含む。2 つの重鎖断片は、2 つまたは複数のジスルフィド結合で C H 3 構造ドメインの疎水作用によって一緒に保持される。

## 【0045】

50

「Fab断片」は、1本の軽鎖と1本の重鎖のVH構造ドメイン、CH1構造ドメイン、ならびにCH1およびCH2構造ドメイン間の定常領域部分を含有するため、2つのFab断片の2本の重鎖間で鎖間ジスルフィド結合を形成してF(ab)<sub>2</sub>分子を形成することができる。

【0046】

「F(ab)<sub>2</sub>断片」は、2本の軽鎖と2本の重鎖のVH構造ドメイン、CH1構造ドメイン、ならびにCH1およびCH2構造ドメイン間の定常領域部分を含有するため、2本の重鎖間で鎖間ジスルフィド結合を形成する。そのため、F(ab)<sub>2</sub>断片は、2本の重鎖間のジスルフィド結合によって一緒に保持された2つのFab断片からなる。

【0047】

「Fv領域」は、重鎖と軽鎖の両者からの可変領域を含んだが、定常領域を欠失する。

【0048】

「単鎖Fv抗体」(または「scFv抗体」とは、抗体のVH和VL構造ドメインを含む抗体断片を指し、そのうち、これらの構造ドメインが単一のペプチド鎖に存在する。scFvについては、Pluckthun(1994) The Pharmacology of Monoclonal Antibodies (モノクローナル抗体薬理学)、第113巻、RosenburgとMoore編、Springer-Verlag、New York、第269-315頁をご参照ください。国際特許出願公開番号WO88/01649、米国特許第4946778号および第5260203号公報を更にご参照ください。

【0049】

「抗原結合断片」とは、重鎖可変領域または軽鎖可変領域鎖だけを含む免疫学機能を有する免疫グロブリン断片を指す。

【0050】

本文で用いられる専門用語「超可変領域」とは、抗原結合を担当する抗体アミノ酸残基を指す。超可変領域は、配列照合により定義される「相補性決定領域」または「CDR」からのアミノ酸残基、例えば、軽鎖可変構造ドメインの24-34(L1)、50-56(L2)および89-97(L3)番目の残基、並びに重鎖可変構造ドメインの31-35(H1)、50-65(H2)および95-102(H3)番目の残基(Kabatなど、1991、Sequences of Proteins of Immunological Interest (免疫ターゲットのタンパク質配列)、第5版、Public Health Service、National Institutes of Health、Bethesda、Md.を参照)、および/または構造により定義される「超可変リング」(HVL)からの残基、例えば、軽鎖可変構造ドメインの26-32(L1)、50-52(L2)および91-96(L3)番目の残基、並びに重鎖可変構造ドメインの26-32(H1)、53-55(H2)および96-101(H3)番目の残基(ChothiaおよびLeskl、1987、J. Mol. Biol. 196:901-917を参照)などのアミノ酸残基を含む。「フレームワーク」残基または「FR」残基は、本文に定義される超可変領域残基以外の可変構造ドメイン残基である。

【0051】

専門用語「キメラ抗体(chimeric antibody)」とは、マウス抗体の可変領域とヒト抗体の定常領域を融合した抗体であり、マウス抗体により誘導された免疫応答反応を軽減させることができる。キメラ抗体を構築することは、マウス特異性モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを選択した後、マウスハイブリドーマ細胞から可変領域遺伝子をクローンし、そして必要に応じてヒト抗体のヒト抗体的定常領域遺伝子をクローンし、マウス可変領域遺伝子とヒト定常領域遺伝子をキメラ遺伝子に連結した後にベクターに挿入し、最後に真核発現システムまたは原核発現システムにおいてキメラ抗体分子を発現する。本発明の好ましい実施態様において、前記PD-1キメラ抗体の抗体軽鎖可変領域は、マウス鎖またはその変異体の軽鎖FR領域を更に含む。前記PD-1キメラ抗体の抗体重鎖可変領域は、マウスIgG1、IgG2、IgG3またはIgG

10

20

30

40

50

4 またはその変異体の重鎖FR領域を更に含む。ヒト抗体の定常領域は、ヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4またはその変異体の重鎖定常領域から選ばれてもよく、ヒトIgG2またはIgG4の重鎖定常領域を含み、或いはアミノ酸変異後のADCC（抗体が依存する細胞媒介の細胞毒作用）毒性がないIgG1を用いることが好ましい。  
【0052】

専門用語「二重特異性分子」とは、本発明に係る抗PD-1抗体またはその抗原結合断片が誘導体化を行うか、或いは他の機能性分子、例えば、他の1種のペプチドまたはタンパク質（例えば、腫瘍関連抗原、細胞因子および細胞表面受容体）に連結して、少なくとも2種の異なる結合サイトまたはターゲット分子に結合する二重特異性分子を産生する。本発明に係る二重特異性分子を構築するために、本発明に係る抗体を、機能的（例えば、化学カップリング、遺伝子融合、非共有結合または他の形態）で1種または多種の他の結合分子、例えば他の1種の抗体、抗体断片、ペプチドまたは結合模擬物に連結されることで、二重特異性分子を産生することができる。例えば、「二重特異性抗体」とは、2つの可変構造ドメインまたはScFv単位を含み、得た抗体に2種の異なる抗原を識別させることを指す。

10

【0053】

本文で用いられる専門用語「免疫結合」および「免疫結合性質」とは、非共有相互作用を指し、免疫グロブリン分子と抗原（当該抗原に対して免疫グロブリンが特異的なものである）との間に発生する。免疫結合相互作用の強度または親和力は、平衡解離定数（ $K_D$ ）で示されてもよく、そのうち、 $K_D$ 値が小さいほど、親和力が高い。選択したペプチドの免疫結合性質は、公知の方法で測定することができる。抗原結合サイト/抗原複合体の形成・解離速度を測定する方法に関する。「結合速度定数」（ $K_a$ または $K_{on}$ ）と「解離速度定数」（ $K_d$ または $K_{off}$ ）の両者は、濃度および結合と解離の実際速度によって算出されてもよい。（編、Nature、1993、361：186-187を参照）。 $K_d/K_a$ の比率は、解離定数 $K_D$ （通常、Daviesら編、Annual Rev Biochem、1990；59：439-473を参照）と等しい。いずれかの有効な方法で $K_D$ 、 $k_a$ および $k_d$ 値を測定することができる。好ましい実施態様において、生物発光干渉法（例えば、実施例3、4に記載されるForteBio Octet法）で解離定数を測定することができる。他の好ましい実施態様において、表面プラズモン共鳴技術（例えば、Biacore）またはKinexaで解離定数を測定することができる。平衡結合定数（ $K_D$ ）は10 $\mu$ Mであり、100nMであることが好ましく、10nMであることが更に好ましく、100pM～約1pMであることが最も好ましい場合、本発明に係る抗体がPD-1エピトープに特異的に結合すると考えられる。

20

30

【0054】

ホモ抗体

もう1態様において、本発明に係る抗体が含んだ重鎖および軽鎖可変領域に含まれたアミノ酸配列が、本文に記載される好ましい抗体のアミノ酸配列と同一性があり、且つそのうち、前記抗体は、本発明に係る抗PD-1抗体の望ましい機能特性を保有する。

【0055】

例えば、本発明は、ヒト型化のPD-1結合の抗体またはその抗原結合断片を提供する。それは、重鎖可変領域と軽鎖可変領域とを含み、そのうち、(a)前記重鎖可変領域はSEQ ID NOs：17、19、21、23、25、27および29から選ばれるアミノ酸配列と少なくとも80%の同一性があるアミノ酸配列を含み、さらに好ましくは、前記重鎖可変領域はSEQ ID NOs：17、19、21、23、25、27および29から選ばれるアミノ酸配列と少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%の同一性があるアミノ酸配列を含み、(b)前記軽鎖可変領域は、SEQ ID NOs：18、20、22、24、26、28および30から選ばれるアミノ酸配列と少なくとも80%の同一性があるアミノ酸配列を含み、更に好ましくは、前記軽鎖可変領域は、SEQ ID NOs：18、20、22、24、26、28および30から選ばれるアミノ酸配列と少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、

40

50

98%または99%の同一性があるアミノ酸配列を含む。

【0056】

保存的修飾を有する抗体

専門用語「保存的修飾」とは、アミノ酸修飾が当該アミノ酸配列を含有する抗体の結合特徴を著しく影響/変更することができないことを意味する。このような保存的修飾は、アミノ酸の置換、添加および欠失を含む。修飾は、既知の標準技術、例えば部位特異的突然変異誘発法およびPCR媒介の利点によって本発明に係る抗体に導入されてもよい。保存的アミノ酸の置換とは、アミノ酸残基を、類似側鎖を有するアミノ酸残基で置換することを指す。本分野において、類似側鎖を有するアミノ酸残基ファミリーについて詳細に説明した。これらのファミリーは、アルカリ性側鎖（例えばリジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えばアスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極性側鎖（例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、バリン、フェニルアラニン、メチオニン）、 $\beta$ -分岐側鎖（例えばトレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖（例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸を含む。そのため、同一の側鎖ファミリー由来の他のアミノ酸残基で本発明に係る抗体CDR領域における1つまたは複数のアミノ酸残基を置換することができる。

10

【0057】

ある実施形態において、本発明に係る抗体はCDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3配列を含有する重鎖可変領域と、CDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3配列を含有する軽鎖可変領域とを含み、そのうち、これらのCDR配列のうちの1つまたは複数は、本文に記載される好ましい抗体（例えばAB12M1またはAB12N1）に基づく特定のアミノ酸配列またはその保存的修飾を含み、且つ、そのうち、前記抗体は本発明に係る抗PD-1抗体の望ましい機能特性を保有する。そのため、本発明は、PD-1に結合する単離された抗体またはその抗原結合部分を提供し、CDR-H1、CDR-H2およびCDR-H3配列を含有する重鎖可変領域と、CDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3配列を含有する軽鎖可変領域とを含み、そのうち、(a)前記重鎖可変領域CDR-H1配列は、SEQ ID NOs: 1および2で表されるアミノ酸配列及びその保存的修飾されたアミノ酸配列を含み、および/または前記重鎖可変領域CDR-H2配列は、SEQ ID NOs: 3および4で表されるアミノ酸配列及びその保存的修飾されたアミノ酸配列を含み、および/または前記重鎖可変領域CDR-H3配列は、SEQ ID NOs: 5および6で表されるアミノ酸配列及びその保存的修飾されたアミノ酸配列を含み、および/または(b)前記軽鎖可変領域CDR-L1配列は、SEQ ID NOs: 7および8で表されるアミノ酸配列及びその保存的修飾されたアミノ酸配列を含みおよび/または(b)前記軽鎖可変領域CDR-L2配列は、SEQ ID NOs: 9および10で表されるアミノ酸配列及びその保存的修飾されたアミノ酸配列を含み、および/または(b)前記軽鎖可変領域CDR-L3配列は、SEQ ID NOs: 11および12で表されるアミノ酸配列及びその保存的修飾されたアミノ酸配列を含む。

20

30

40

【0058】

抗PD-L1抗体の治療における使用

【0059】

本発明に係る抗体（二重特異性、多重クローン、モノクローナル、ヒト型化抗体を含む）を治療剤とすることができる。これらの薬剤は、通常、被験者の中で、癌を治療/予防したり、ワクチン効果を向上したり、天然免疫応答を向上したりするために用いられてもよい。

【0060】

本発明に係るPD-1タンパク質に特異的に結合する抗体またはその断片は、医薬組成物として投与され、癌または慢性感染の治療に用いられることができる。

50

## 【0061】

本発明に係る抗体の治療上の有効量は、通常、目標の治療を実現するために必要となる量に関する。以上のように、抗体とそのターゲット抗原との結合相互作用であってもよい。また、投与量は、抗体がその特異性抗原に対する結合親和力に決められ、抗体の被験者体内における医薬動態特性にも決められる。本発明に係る抗体または抗体断片の治療上の有効的な投薬量のよく用いられる範囲（実例を限定しない形態で）は、約0.1mg/kg体重～約50mg/kg体重であってもよい。よく用いられる投薬頻度は、例えば、2回/日～1回/週の範囲である。

## 【0062】

抗体断片を使用する場合、ターゲットタンパク質に特異的に結合する結合構造ドメインの最小の阻害性断片が好ましい。例えば、抗体の可変領域配列に基づき、それはターゲットタンパク質配列に結合する能力を維持する。このようなペプチドは、化学合成および/または組換えDNA技術によって調製されてもよい。（例えば、Marascoら編、Proc Natl Acad Sci USA、1993、90:7889-7893を参照）。製剤は、治療の特定の適応症の必要に応じて1種以上の活性化合物を含有してもよく、互いに不利な影響がない相補性活性を有するものが好ましい。オプションとして、或いはまた、組成物は、細胞毒性剤、細胞因子、化学治療剤または成長阻害剤などのそれらの機能を強化する作用剤を含んでもよい。

## 【0063】

## 癌

本発明に係る抗体または抗原結合断片は、癌を治療する（即ち、腫瘍細胞の成長/生存を阻害する）ために用いられる。本発明に係る抗体でその成長を抑制可能な好ましい癌は、通常、免疫治療法に対して反応がある癌を含む。治療用の好ましい癌の非限定的な実例は、メラノーマ（例えば、悪性転移性メラノーマ）、腎臓がん（例えば、透明細胞がん）、前立腺がん（例えば、ホルモンで抑制にくい前立腺がん）、膵臓がん、乳がん、大腸がん、肺がん（例えば、非小細胞肺がん）、食道がん、頭頸部扁平上皮がん、肝がん、卵巣がん、子宮頸がん、甲状腺がん、膠芽細胞腫、神経膠腫、白血病、リンパ腫および他の悪性腫瘍を含む。

## 【0064】

## 感染性疾患

本発明に係る抗体または抗体断片は、さらに、感染および感染性疾患を防止/治療するために用いられてもよい。病原体、毒素および自体抗原に対する免疫応答を刺激するように、抗体または抗体断片は、単独で用いられてもよいし、ワクチンと組み合わせて用いられてもよい。抗体またはその抗原結合断片は、感染者の病原性ウイルスに対する免疫応答を刺激することができ、これらのウイルスの病原性ウイルスを含んだがそれに限定されないある実例は、HIV、肝炎（A型、B型またはC型）ウイルス（hepatitis（A、B、or C））、ヘルペスウイルス（herpes virus）（例えば、VZV、HSV-1、HAV-6、HSV-IIおよびCMV、エプスタインバールウイルス（Epstein Barr virus））、アデノウイルス（adenovirus）、インフルエンザウイルス（influenza virus）、フラビウイルス（flaviviruses）、エコウイルス（echovirus）、ライノウイルス（rhinovirus）、コクサッキーウイルス（coxsackie virus）、コロナウイルス（coronavirus）、呼吸器合胞体ウイルス（respiratory syncytial virus）、ムンプスウイルス（mumps virus）、ロタウイルス（rotavirus）、麻疹ウイルス（measles virus）、風疹ウイルス（rubella virus）、パルボウイルス（parvovirus）、ワクシニアウイルス（vaccinia virus）、HTLVウイルス、デングウイルス（dengue virus）、パピローマウイルス（papillomavirus）、軟属腫ウイルス（molluscum virus）、ポリオウイルス（poliovirus）、狂犬病ウイルス（rabies virus）、JCウイルスおよびアルボ

10

20

30

40

50

ウイルス脳炎ウイルス (arboviral encephalitis virus) を含む。抗体またはその抗原結合断片は、さらに、細菌または真菌寄生虫及び他の病原体による感染に対する免疫応答を刺激するために用いられてもよい。

【0065】

免疫アジュバント

本発明に係る抗体または抗体断片は、これらのタンパク質に対する免疫応答（即ち、接種案にある）を向上させるように、他の組換えタンパク質および/またはペプチド（例えば腫瘍抗原または癌細胞）と組み合わせて用いられてもよい。

【0066】

例えば、抗PD-1抗体とターゲット抗原（例えばワクチン）を共同に投与することにより、抗PD-1抗体およびその抗体断片を抗原の特異性免疫応答の刺激に用いることができる。そのため、本発明は、別の態様で被験者の抗原に対する免疫応答を強化する方法を提供する。前記方法は、(i) 抗原、および(II) 本発明に係る抗PD-1抗体またはその抗原結合部分を被験者に投薬して被験者の抗原に対する免疫応答を向上させることを更に含む。例えば、抗原は、腫瘍抗原、ウイルス抗原、細菌抗原または病原体由来の抗原である。前記抗原の非限定的な事例には、腫瘍抗原またはウイルス、細菌または他の病原体由来の抗原が含まれるがそれに限定されない。

10

【0067】

本発明に係る抗体および抗体断片の非治療的使用

非治療的に適用される抗PD-1抗体製品が既に存在した。例えば、eBioScience of San Diego、California、USAが販売したJ116およびJ105モノクローナル抗hPD-1抗体は、フローサイトメトリー分析、免疫組織化学および体外機能分析に用いられる。R&D Systems of Minneapolis、MN、USAが販売したMab1086モノクローナル抗hPD-1抗体は、フローサイトメトリー、ウエスタンブロットおよびELISAに用いられる。本発明に係る抗体は、現在J116、J105および/またはMab1086が提供したいずれの非治療的目的に用いられてもよい。

20

【0068】

本発明に係る抗体は、親和精製試料として用いられてもよい。

【0069】

前記抗体は、診断測定にも用いられてもよく、例えば、PD-1の特定の細胞、組織または血清における発現を検出するために用いられる。診断使用のために、通常、検出可能な部分で（直接的または間接的に）抗体をマークする。様々な標記物を使用することができ、一般的に、ビオチン、蛍光染料、放射性ヌクレオチド、酵素、ヨウ素および生物合成標記物に分けられる。

30

【0070】

本発明に係る抗体は、競合結合測定法、直接・間接サンドイッチ測定法、及び免疫沈澱測定法などのいずれの既知の測定法に用いられてもよい。Zola、Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques (モノクローナル抗体：技術マニュアル)、第147-158頁(CRC Press、Inc、1987)。

40

【0071】

抗体は、さらに体内診断測定に用いられてもよい。一般的に放射性核種（例えば<sup>111</sup>In、<sup>99</sup>Tc、<sup>4</sup>C、<sup>31</sup>I、<sup>125</sup>I、<sup>3</sup>H、<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>Sまたは<sup>18</sup>F）で抗体をマークして、免疫現像 (immunoscintigraphy) または陽電子イメージング法で抗原や抗体を発現する細胞を位置決めすることができる。

【0072】

モノクローナル抗体の調製

本発明に係るモノクローナル抗体 (mAb) は、多種の技術で調製されてもよく、従来モノクローナル抗体法、例えば、Kohler和Milstein、Nature、

50

1975 ; 256 : 495 に記載されている標準な体細胞ハイブリダイゼーション技術を含む多種の技術で調製されてもよい。ハイブリダイゼーションプロトコルであることが好ましいが、原則上に、例えば、Bリンパ細胞のウイルスまたは発がん性形質転換などのモノクローナル抗体を調製する他の方法を用いることもできる。

【0073】

ハイブリドーマを調製するための好ましい動物系は、マウス科動物系であることが好ましい。マウスの中でハイブリドーマを調製することは、非常に完全なプロトコルである。融合用の免疫された脾臓細胞を単離する免疫案および技術は、本分野において既知である。融合パートナー（例えば、マウス骨髄腫細胞）および融合プロトコルも既知である。

【0074】

抗体またはその抗体断片を発現するために、標準分子生物学技術（例えば、PCR増幅またはターゲット抗体を発現するハイブリドーマを使用するcDNAクローン）によってコード部分または全長軽鎖および重鎖のDNAを取得すると共に、DNAを発現ベクターに挿入することができることで、ターゲット遺伝子を転写・翻訳調節配列と操作可能に連結させ、トランスフェクション宿主細胞を発現し、発現宿主は、真核発現ベクターであることが好ましく、CHOおよびその誘導細胞系などの哺乳動物細胞であることが更に好ましい。

【0075】

抗体は、公知の技術、例えばプロテインAまたはプロテインGを用いる親和クロマトグラフィーによって精製される。その後、或いはオプションとして、特異性抗原またはそのエピトープをコラムに固定して免疫親和クロマトグラフィーによって免疫特異性抗体を精製する。免疫グロブリンの精製は、例えば、D. Wilkinsonにより述べられている（The Scientist、The Scientist、Inc.、Philadelphia PA、Vol. 14、No. 8（2000年4月17日）、25-28頁に記載されている）。

【0076】

本発明に係るキメラまたはヒト型化抗体は、上記調製したマウスモノクローナル抗体の配列に基づいて調製されてもよい。重鎖および軽鎖免疫グロブリンをコードするDNAターゲットマウスハイブリドーマから取得されると共に、標準分子生物学技術で工程改良を行って非マウス（例えば、ヒト）免疫グロブリン配列を含めることができる。例えば、キメラ抗体を構築するために、当業界で既知の方法で、マウス可変領域をヒト定常領域に連結することができる（例えば、Cabillyら編の米国特許No. 4816567を参照）。VHをコードするDNAを重鎖定常領域（CH1、CH2およびCH3）をコードする他のDNA分子に連結することによってVH領域をコードする単離されたDNAを全長重鎖遺伝子に形質転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業界で既知であり（例えば、Kabat、E. A.ら編（1991）Sequences of Proteins of Immunological Interest、Fifth Edition、U.S. Department of Health and Human Services、NIH Publication No. 91-3242を参照）、これらの領域を含むDNA断片は、標準PCR増幅により取得されてもよい。重鎖定常領域は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgMまたはIgD定常領域であってもよいが、IgG1またはIgG4定常領域であることが最も好ましい。

【0077】

ヒト型化抗体を構築するために、当業界で既知の方法でマウスCDR領域をヒトフレームワーク配列に挿入することができる（Winterの米国特許No. 5225539およびQueenなどの米国特許Nos. 5530101、5585089、5693762および6180370を参照）。更に、トランスジェニック動物、例えば、HuMAbマウス（Medarex、Inc.）が再組換えされていないヒト重鎖（ $\mu$ および $\delta$ ）および軽鎖免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子ミニ遺伝子座（m

10

20

30

40

50

i n i l o c i ) を含有することに加えて、内源  $\mu$  および 鎖遺伝子座を不活性化させるターゲット変異 (例えば、Lonbergら編、(1994) Nature 368 (6474) : 856 - 859 を参照) を含有し、或いは、ヒト重鎖トランスジェニックおよびヒト軽鎖トランスフェクション染色体を携帯する「KMマウス<sup>TM</sup>」(特許W002/43478を参照)を用いて抗体のヒト型化改良を行うことができる。他の抗体のヒト型化改良の方法は、ファージ展示技術を含む。

【0078】

以下の実施例によって本発明を更に説明し、前記実施例は更に限定すると解釈されるべきではない。ここで、明細書全文に援用されるすべての図面、参照文献、特許文献および公開公報が明確に参照として本文に含まれる。

10

【図面の簡単な説明】

【0079】

【図1】ELISAでAB12N1およびAB12M1とヒトPD-1との結合を測定する図である。

【図2-1】ELISAでAB12N1およびAB12M1とカニクイザルPD-1およびヒトICOSとの交差反応を測定する図である。

【図2-2】ELISAでAB12N1およびAB12M1とヒトCTLA4との交差反応を測定する図である。

【図2-3】ELISAでAB12N1およびAB12M1とヒトCD28との交差反応を測定する図である。

20

【図3】競合ELISAでAB12N1およびAB12M1がヒトPD-1およびPD-L1の結合を遮断する能力を測定する図である。

【図4】SDS-PAGEでAB12N1およびAB12M1に対して還元電気泳動定性分析を行う図である。

【図5】ELISAでAB12M2、AB12M3およびAB12M4の力価および特異性を測定する図である。

【図6】ELISAでAB12M2、AB12M3およびAB12M4とマウスPD-1との交差反応を測定する図である。

【図7】競合ELISAでAB12M2、AB12M3およびAB12M4とKeytrudaとの相対親和力を測定する図である。

30

【図8】競合ELISAでAB12M2、AB12M3およびAB12M4とOpdivoとの相対親和力を測定する図である。

【図9】AB12M3およびAB12M4とPD-1過剰発現のCHO細胞との結合を示す図である。

【図10】AB12M3およびAB12M4と活性化ヒトT細胞との結合を示す図である。

【図11】AB12M3およびAB12M4が濃度依存形態でT細胞の増殖を促進することを示す図である。

【図12】AB12M3およびAB12M4が濃度依存形態でIFN- $\gamma$ 分泌を促進することを示す図である。

40

【図13】AB12M3およびAB12M4がT細胞のIL-2分泌を促進することを示す図である。

【図14】AB12M4がマウス腫瘍体積の向上に対する阻害作用を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0080】

実施例1、抗PD-1マウスモノクローナル抗体の調製

ヒトPD-1細胞外セグメント精製抗原50 $\mu$ g(北京義翹神州生物技術有限公司から購入)を、完全フロイントアジュバントで十分に乳化させた後、多点免疫方式で雄Balb/Cマウスに対して免疫を行い、免疫周期は、1回/3週である。3回目の免疫を行った10日後に、眼窩採血によって、ELISAで血漿抗ヒトPD-1抗体の力価を測定し

50

てマウス免疫応答程度を監視する。そして、融合の3日前に、抗ヒトPD-1抗体の力価が最も高いマウスに対して強化免疫を1回行う。3日後、マウスを殺して当該マウスの脾臓を取り出し、マウス骨髄腫Sp2/0細胞株と融合させる。2×10<sup>8</sup> Sp2/0細胞と2×10<sup>8</sup>脾細胞を混合してポリエチレングリコール(分子量1450)50%とジメチルスルホキシド(DMSO)5%の溶液で融合させる。Iscove培地(10%ウシ胎仔血清、ペニシリン100単位/mL、ストレプトマイシン100μg/mL、ヒポキサンチン0.1mM、アミノプテリン0.4μMおよびチミジン16μgを含有する)で脾細胞数を5×10<sup>5</sup>/mLに調整し、96穴プレートのウェル内に0.3mL添加し、37℃、5%のCO<sub>2</sub>インキュベーターに置く。10日培養した後、実施例3.2におけるELISAで、それぞれ、上清液中の抗体とビオチンでマークしたヒトPD-L1-FcがPD-1に競合的に結合する能力を検出し、8個の競合性が強い陽性ハイブリドーマ細胞株を選別し鑑定し、それぞれサブクロニングし、上清液において精製したマウス抗体に対して選別および鑑定を行い、2個の陽性ハイブリドーマモノクローナル細胞株#22および#32を得た。

#### 【0081】

実施例2、ELISAで抗PD-1マウス抗体の力価を測定する

ELISAで、ハイブリドーマ細胞株#22(分泌した抗体がAB12N1と命名される)および#32(分泌した抗体がAB12M1と命名される)を用いて上清液において精製したマウスモノクローナル抗体を培養する力価を測定する。PBS緩衝液でPD-1(北京義翹神州生物技術有限公司から購入)を0.1μg/mLまでに希釈し、100μL/ウェルの体積で、96穴プレートに添加し、4℃で16-20h置く。96穴プレートにおけるPBS緩衝液を抽出し、PBST(pH7.4、PBSは0.05% tween 20を含有する)緩衝液でプレートを1回洗浄した後、200μL/ウェルでPBST/1%脱脂粉乳を添加し、室温で1hインキュベートして封入する。封入液を除去し、PBST緩衝液でプレートを3回洗浄した後、PBST/1%脱脂粉乳で適当な濃度までに希釈した測定待ちのPD-1マウス抗体を添加し、100μL/ウェル、室温で、1.5hインキュベートする。反応系を除去し、PBSTでプレートを3回洗浄した後、50μL/ウェルで、PBST/1%脱脂粉乳で(希釈割合1:4000)HRPでマークした羊抗マウスIgG二次抗体(The Jackson Laboratoryから購入)を添加し、室温で1hインキュベートする。PBSTでプレートを3回洗浄した後、100μL/ウェルのTMBを添加し、室温で10-30minインキュベートし顕色を行う。50μL/ウェル、0.2M硫酸を添加して反応を終了する。マイクロプレートリーダーで二重波長450/620nm箇所吸光度値(O.D.)を検出し、EC<sub>50</sub>を算出する。

#### 【0082】

図1から分かるように、ハイブリドーマクローン#22で発現されたマウスモノクローナル抗体AB12N1および#32ハイブリドーマクローンで発現されたマウスモノクローナル抗体AB12M1は、いずれもPD-1に結合することができる。AB12M1と抗原結合活性のEC<sub>50</sub>値が約0.002μg/mLであるが、AB12N1のEC<sub>50</sub>値が約0.1μg/mLである。

#### 【0083】

実施例3、抗PD-1マウスモノクローナル抗体の選別および鑑定

#### 【0084】

3.1、マウス抗体の結合特異性の測定

PD-1抗体がPD-1の同一のファミリーの他のプロテインに対する特異的な結合活性を検出するために、ヒトCTLA4、ヒトCD28およびヒトICOSが結合検出に用いられる。それと同時に、PD-1抗体がヒト以外の異なる種属に対する差異性を検出するために、マウスおよびカニクイザルのPD-1に対しても結合検出を行う。

#### 【0085】

PBS緩衝液で、ヒトPD-1/His、ヒトICOS/Fc、ヒトCTLA4/Hi

s、ヒトCD28/Fc、カニクイザルPD-1/FcおよびマウスPD-1/His (いずれも北京義翹神州生物技術有限公司から購入)を、 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ までに希釈し、 $100 \mu\text{l}$ /ウェルの体積で96穴プレートに添加し、4 で16~20h置く。96穴プレートにおけるPBS緩衝液を抽出し、PBST (pH7.4、PBSは0.05% tween20を含有する)緩衝液でプレートを1回洗浄した後、 $200 \mu\text{l}$ /ウェルPBST/1%脱脂粉乳を添加し、室温で1hインキュベートして封入する。封入液を除去し、PBST緩衝液でプレートを3回洗浄した後、測定待ちのPD-1抗体を添加し、 $100 \mu\text{l}$ /ウェル、室温で1.5hインキュベートする。反応系を除去し、PBSTでプレートを3回に洗浄した後、 $50 \mu\text{l}$ /ウェルで1:4000希釈したHRPでマークした羊抗マウスIgG二次抗体 (The Jackson Laboratoryから購入)を添加し、室温で1hインキュベートする。PBSTでプレートを3回洗浄した後、 $100 \mu\text{l}$ /ウェルTMBを添加し、室温で5-10 minインキュベートする。 $50 \mu\text{l}$ /ウェル0.2M硫酸を添加して反応を終了する。マイクロプレートリーダーは、二重波長450/620nm箇所吸光度値を読み出す。

#### 【0086】

図2-1~図2-3に示すように、AB12N1およびAB12M1は、PD-1ファミリーの他の3種のプロテインに対して特異的な結合能力がない。それと同時に、AB12N1およびAB12M1はマウスPD-1と種属の交差反応がないが、AB12M1はカニクイザルのPD-1に特異的に結合することができ、AB12N1はカニクイザルのPD-1に特異的に結合しない。

#### 【0087】

3.2、マウス抗体がPD-1とPD-L1との結合を遮断する実験

#### 【0088】

ビオチンでマークしたヒトPD-L1を試料とする。PBS緩衝液でPD-1 (北京義翹神州生物技術有限公司から購入)を $2.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ までに希釈し、 $100 \mu\text{l}$ /ウェルの体積で96穴プレートに添加し、室温で一晩越した。被覆溶液を除去し、 $200 \mu\text{l}$ /ウェルPBST/1%脱脂粉乳を添加し、室温で1hインキュベートし封入する。封入液を除去し、PBST緩衝液でプレートを3回除去した後、 $50 \mu\text{l}$ /ウェルの希釈したマウスモノクローナル抗体AB12N1とAB12M1を添加して $50 \mu\text{l}$ のビオチンでマークしたヒトPD-L1と混合し、十分にインキュベートした後、PBSTで結合していない抗体およびビオチンでマークしたPD-L1を除去し、そして、 $100 \mu\text{l}$ /ウェルのHRPでマークしたアビジンを添加し、十分にインキュベートした後、PBSTで結合していないHRPでマークしたアビジンを洗浄し、 $100 \mu\text{l}$ /ウェルのTMB顕色液を添加し、顕色を30分行う。0.2M硫酸で反応を終止し、マイクロプレートリーダーで二重波長450/620nm箇所吸光度値を読み出す。図3に示すように、マウス抗体AB12N1およびAB12M1はいずれもPD-1とPD-L1との結合を特異的に遮断することができる。AB12M1のPD-L1とPD-1との結合能力が明らかにAB12N1よりも優れる。

#### 【0089】

3.3、精製したマウス抗体SDS-PAGE分析およびWestern-Blot鑑定

SDS-PAGE電気泳動およびウェスタンブロット (Western-Blot) で精製したマウスモノクローナル抗体AB12N1およびAB12M1に対して定性、半定量分析を行う。ゲル調製方法で12%濃度のPAGEゲルを調製し、各電気泳動経路にそれぞれ $4 \mu\text{g}$ の抗体AB12N1、AB12M1、Keytruda及びOpdivoを添加する。染料までに電気泳動して単離ゲルの底部に到達し、電源を切り、ゲルイメージングシステムで電気泳動結果を観察する。図4に示すように、マウス抗体AB12N1およびAB12M1の還元性SDS-PAGE電気泳動結果がいずれもはっきりと示され、均一な2本のバンドは、それぞれ約50KD重鎖および約25KD軽鎖である (そのうち、各電気泳動経路でのサンプルは、1. Marker、2. AB12N1、3. AB12

10

20

30

40

50

N 1、4 . A B 1 2 M 1、5 . A B 1 2 M 1、6 . K e y t r u d a、7 . O p d i v o である)。

【0090】

ゲル調製方法で15%濃度の非還元PAGEゲルを調製し、ヒトPD-1のサンプルアプライ量が5 $\mu$ gであり、染料までに電気泳動して単離ゲルの底部に到達し、電源を切る。ゲルを取り出し、サイズが一致するNC膜に平らに置き、ゲル面積に応じて1mA/cm<sup>2</sup>で電源を添加し、100mAで2~4h電気転移する。封入液に浸入させ、4で一晚封入し、PBST緩衝液で膜を10min/回で3回洗浄する。そして過量のAB12N1およびAB12M1抗体を添加して1hインキュベートし、PBST緩衝液で膜を10min/回で3回洗浄する。1:5000で希釈したHRP-羊抗マウスIgG Fc二次抗体を検出抗体として、1hインキュベートし、PBST緩衝液で膜を3回洗浄する。DAB顕色液に暗所で顕色を15min行い、バンドが現れた後、直ちに水で洗浄して顕色反応を終止し、写真を撮った後、定量、定性分析を行う。

10

【0091】

Western-Blot結果から、約34KDのPD-1のバンドが現れ、AB12N1およびAB12M1はいずれもヒトPD-1に特異的に結合することができることが表明されている。

【0092】

3.4、抗PD-1マウス抗体の親和力測定および動力学分析

生物薄膜干渉技術(BLI)で、精製したマウスモノクローナル抗体のキャラクタリゼーション親和力および結合動力学を測定する。Octet分子相互作用計(ForteBio Octet RED&QKシステム、PALI公司製)の標準操作方法で測定し、照合抗体がKeytrudaおよびOpdivoとなる。多重経路平行定量分析濃度の勾配を、3.125、6.25、12.5、25、50および100nMとし、Human PD-1-His(北京義翹神州生物技術有限公司)をNi-NTAセンサにカップリングする。抗原-抗体結合動力学および解離動力学を追跡する。得たデータを分析し、この方法で測定したka(kon)、kd(koff)とKD値を表1に示した。マウスモノクローナル抗体AB12M1とヒトPD-1の平衡解離定数KD値 $<1 \times 10^{-12}$ Mであり、照合抗体KeytrudaおよびOpdivoとの結合親和力が相当である。AB12N1のKD値が $3.508 \times 10^{-10}$ Mであり、キャラクタリゼーション親和力が照合抗体KeytrudaおよびOpdivoよりも低い。

20

30

【0093】

【表1】

表1、マウスモノクローナル抗体AB12M1およびAB12N1の親和力の測定結果

| 抗体名称     | KD(M)       | Ka(M/s)    | Kd(1/s)     |
|----------|-------------|------------|-------------|
| AB12M1   | $<1.00E-12$ | $1.09E+05$ | $<1.00E-07$ |
| AB12N1   | $3.51E-10$  | $6.92E+04$ | $2.08E-05$  |
| Keytruda | $2.05E-12$  | $2.48E+05$ | $5.08E-07$  |
| Opdivo   | $5.60E-12$  | $1.92E+05$ | $1.07E-06$  |

40

【0094】

実施例4、抗PD-1マウスモノクローナル抗体サブタイプの鑑定および可変領域の増幅

【0095】

抗体サブタイプの鑑定

ハイブリドーマ細胞培養上清液を取り、IsoStrip<sup>TM</sup>マウスモノクローナル抗体サブタイプ鑑定キット(Santa Cruz Biotechnology、ロット番号sc-24958)で抗体サブタイプを鑑定する。モノクローナル抗体AB12N1

50

サブタイプは I g G 1 ( K a p p a ) と鑑定され、モノクローナル抗体 A B 1 2 M 1 サブタイプは I g G 2 b ( K a p p a ) と鑑定される。

【 0 0 9 6 】

抗体可変領域の増幅

候補ハイブリドーマ細胞 # 2 2 および # 3 2 をそれぞれ総数  $10^7$  個の細胞に培養し、  
1 0 0 0 r p m で 1 0 分遠心して細胞を収集し、T r i z o l キット ( I n v i t r o g e n )  
で総 R N A を抽出し、逆転写キット S M A R T e r R A C E で第 1 鎖 c D N A を  
合成し、第 1 鎖 c D N A で後続テンプレートにハイブリドーマ細胞が対応する抗体可変領域  
D N A 配列を増幅する。サブタイプの鑑定結果から、当該抗体サブタイプの重鎖および  
軽鎖定常領域配列を取得し、特異的な巢式 P C R プライマーを設計し、当該増幅反応にお  
いて用いられるプライマー配列が抗体可変領域の第 1 フレーム領域および定常領域と相補  
性がある。従来の P C R 方法で、目的遺伝子を増幅させ、増幅産物に対して配列決定を  
行った後、ハイブリドーマクローン # 2 2 分泌抗体 A B 1 2 N 1 の重鎖可変領域配列 S E  
Q I D N O : 1 5 および軽鎖可変領域配列 S E Q I D N O : 1 6 を得た。当該抗体の重鎖 C D R  
( C D R - H 1、C D R - H 2 および C D R - H 3 ) のアミノ酸配列が S E Q I D N O : 2、4  
および 6 で表され、その軽鎖 C D R ( C D R - L 1、C D R - L 2 および C D R - L 3 ) のア  
ミノ酸配列がそれぞれ S E Q I D N O : 8、1 0 および 1 2 で表される。ハイブリドーマク  
ローン # 3 2 分泌抗体 A B 1 2 M 1 の重鎖可変領域配列 S E Q I D N O : 1 3 および軽鎖可  
変領域配列 S E Q I D N O : 1 4 である。当該抗体の重鎖 C D R ( C D R - H 1、C D R - H 2  
および C D R - H 3 ) のアミノ酸配列がそれぞれ S E Q I D N O : 1、3 および 5 で表され、  
その軽鎖 C D R ( C D R - L 1、C D R - L 2 および C D R - L 3 ) のアミノ酸配列がそれ  
ぞれ S E Q I D N O : 7、9 および 1 1 で表される。

10

20

【 0 0 9 7 】

実施例 5、抗 P D - 1 マウス抗体のヒト型化

上記得た A B 1 2 N 1 および A B 1 2 M 1 抗体可変領域配列によれば、コンピュータ補  
助抗体三次元モデリングおよび構造分析を用いて抗体のヒト型化改良を行う。C D R 移植  
( C D R - G r a f t i n g ) はよく用いられる抗体のヒト型化方法であり、ヒト抗体の  
F R でマウス抗体の F R を置換して活性を保持し、免疫原性を低下させる目的を達成する  
。D i s c o v e r y S t u d i o 分析工具を結び付けて C D R 移植を行う抗体のヒト  
型化改良方法は、主に ( 1 ) 抗体三次元構造モデリング、( 2 ) 重要残基分析、( 3 ) ヒ  
トテンプレートの選択、及び ( 4 ) 重要残基分析における逆方向接木に基づき、ヒト型化  
抗体配列を得ることを含む。分子結合で可変領域およびその周辺のフレームアミノ酸配列  
を分析し、その空間立体結合形態を観察して C D R 領域の立体配座の維持に対して重要な  
重要残基を確定し、主に下記の 3 種類がある。1、2 つの構造ドメインの折り畳みに対し  
て重要な作用を果たす V L と V H の結合界面にある残基、2、C D R 領域に近寄ってプロ  
テイン内部に埋め込まれる残基、3、C D R 領域と直接的に相互作用する残基。相互作用  
は、疎水相互作用 / 水素結合 / 塩橋を含む。ヒトテンプレートの選択は、まず、各ハイ  
ブリドーマ細胞が分泌する抗体アミノ酸配列をヒト胚系抗体アミノ酸配列と照合し、同一  
性が高い配列を探し出し、次に、そのうちの M H C I I ( H L A - D R ) と親和力が  
低いヒト胚系 ( g e r m l i n e ) 抗体フレーム配列を選択してその免疫原性を低下させ  
るといふ 2 つの条件を同時に満たさなければならない。重要残基分析における逆方向接  
木に基づき、ヒト型化抗体配列を得た。

30

40

【 0 0 9 8 】

そのうち、マウス抗体 A B 1 2 M 1 は、ヒト V<sub>H</sub> 3 - 2 3 重鎖可変領域およびヒト V<sub>K</sub>  
3 D - 1 1 軽鎖可変領域をテンプレート配列として、合計 7 個のヒト型化抗体を得、それ  
ぞれ A B 1 2 M 3、A B 1 2 M 4、A B 1 2 M 5、A B 1 2 M 6、A B 1 2 M 7、A B 1  
2 M 8 および A B 1 2 M 9 である。それと同時に、その 1 株のヒトマウスキメラ抗体 A B  
1 2 M 2 を構築し、マウス抗体の重鎖可変領域配列をヒト I g G 1 重鎖定常領域に接木し  
、マウス抗体の軽鎖可変領域配列をヒト K a p p a 軽鎖定常領域に接木して得た。上記ヒ

50

ト型化抗体の可変領域アミノ酸配列は表 2 で示される。

【 0 0 9 9 】

マウス抗体 A B 1 2 N 1 は、ヒト V<sub>H</sub> 3 - 3 3 重鎖可変領域およびヒト V<sub>K</sub> 3 - 1 1 軽鎖可変領域をテンプレート配列として、合計 3 個のヒト型化抗体を得、それぞれ A B 1 2 N 3、A B 1 2 N 4 および A B 1 2 N 5 である。それと同時に、その 1 株のヒトマウスキメラ抗体 A B 1 2 N 2 を構築し、マウス抗体の重鎖可変領域配列をヒト I g G 1 重鎖定常領域に接木し、マウス抗体の軽鎖可変領域配列をヒト K a p p a 軽鎖定常領域に接木して得た。上記ヒト型化抗体の可変領域アミノ酸配列は表 2 で示される。

【 0 1 0 0 】

表 3 における各ヒト型化抗体の親和力定数および動力学のパラメータから分かるように、A B 1 2 M 3、A B 1 2 M 4、A B 1 2 M 5、A B 1 2 M 6、A B 1 2 M 7、A B 1 2 M 8 および A B 1 2 M 9 は、マウス抗体 A B 1 2 M 1 およびキメラ抗体 A B 1 2 M 2 と比べ、ヒト型化程度が 9 5 % 以上であるが、親和力が明らかに損失しなく、K D 値がいずれも  $1 \times 10^{-12}$  M 未満であり、親マウスモノクローナル抗体の親和力および特異性を保ち、その免疫原性を大幅に低下させる。

10

【 0 1 0 1 】

他の群のヒト型化抗体 A B 1 2 N 3、A B 1 2 N 4 および A B 1 2 N 5 は、マウス抗体 A B 1 2 N 1 およびキメラ抗体 A B 1 2 N 2 と比べ、ヒト型化程度も 9 5 % 以上であり、親和力も明らかに降下せず、K D 値がいずれも  $10^{-10}$  M レベルである。

【 0 1 0 2 】

20

【表 2】

表2、ヒト型化抗体可変領域アミノ酸配列

| 名称     | 重鎖可変領域配列     | 軽鎖可変領域配列     |
|--------|--------------|--------------|
| AB12M3 | SEQ ID NO:17 | SEQ ID NO:18 |
| AB12M4 | SEQ ID NO:19 | SEQ ID NO:20 |
| AB12M5 | SEQ ID NO:21 | SEQ ID NO:22 |
| AB12M6 | SEQ ID NO:23 | SEQ ID NO:24 |
| AB12M7 | SEQ ID NO:25 | SEQ ID NO:26 |
| AB12M8 | SEQ ID NO:27 | SEQ ID NO:28 |
| AB12M9 | SEQ ID NO:29 | SEQ ID NO:30 |
| AB12N3 | SEQ ID NO:31 | SEQ ID NO:32 |
| AB12N4 | SEQ ID NO:33 | SEQ ID NO:34 |
| AB12N5 | SEQ ID NO:35 | SEQ ID NO:36 |

30

40

【 0 1 0 3 】

## 【表 3】

表3、ヒト型化抗体の親和力の比較

| 名称     | KD (M)   | Ka (1/Ms) | Kd (1/s) |
|--------|----------|-----------|----------|
| AB12M2 | <1.0E-12 | 1.98E+05  | <1.0E-07 |
| AB12M3 | <1.0E-12 | 2.26E+05  | <1.0E-07 |
| AB12M4 | <1.0E-12 | 2.13E+05  | <1.0E-07 |
| AB12M5 | <1.0E-12 | 1.69E+05  | <1.0E-07 |
| AB12M6 | <1.0E-12 | 1.99E+05  | <1.0E-07 |
| AB12M7 | 2.42E-12 | 2.41E+05  | 5.84E-07 |
| AB12M8 | <1.0E-12 | 1.84E+05  | <1.0E-07 |
| AB12M9 | 4.11E-12 | 1.48E+05  | 6.08E-07 |
| AB12N2 | 3.59E-10 | 6.58E+04  | 2.36E-05 |
| AB12N3 | 3.65E-10 | 6.24E+04  | 2.28E-05 |
| AB12N4 | 3.78E-10 | 6.37E+04  | 2.41E-05 |
| AB12N5 | 4.14E-10 | 6.19E+04  | 2.56E-05 |

10

20

## 【0104】

実施例 6、抗 PD - 1 ヒト型化抗体機能の鑑定

## 【0105】

6.1、間接法 ELISA でヒト型化抗体の力価および結合特異性を測定する

間接法 ELISA でヒト型化抗体 AB12M3 および AB12M4 並びにキメラ抗体 AB12M2 と抗原 PD - 1 との結合特性を測定する。Keytruda および Opdivo を照合抗体として、培地を陰性照合とする。HRP でマークした羊抗ヒト IgG 抗体を検出抗体 (The Jackson Laboratory から購入) とする。具体的な方法は実施例 2 と同様である。同様な方法は、ヒト型化抗体 AB12M3 および AB12M4 並びにキメラ抗体 AB12M2 がマウス PD - 1 (北京義翹神州生物技術有限公司から購入) に対して交差反応の有無を検出するために用いられ、同様にして Keytruda および Opdivo を照合抗体とし、培地を陰性照合とする。

30

## 【0106】

図 5 に示すように、ヒト型化抗体 AB12M3 および AB12M4 並びにキメラ抗体 AB12M2 はいずれもヒト PD - 1 に特異的に結合することができ、且つこれらと抗原結合活性の EC<sub>50</sub> 値はいずれも照合抗体 Keytruda および Opdivo よりも低く、約 0.001 ~ 0.01 μg/ml である。これは、本発明において構築した抗 PD - 1 ヒト型化抗体 AB12M3 および AB12M4 並びにキメラ抗体 AB12M2 と PD - 1 との結合能力は、ヒト型化改良により削減されていなく、依然としてマウス親抗体の高親和力を保有する。且つ、これらはいずれもマウス PD - 1 に結合せず、強い種属特異性を有する (図 6 を参照)。

40

## 【0107】

6.2、PD - 1 ヒト型化抗体の相対親和力の測定

西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) でマークした Keytruda および Opdivo を試料とする。PBS 緩衝液で PD - 1 (北京義翹神州生物技術有限公司から購入) を 0.1 μg/ml までに希釈し、100 μl/ウェルの体積で 96 穴プレートに添加し

50

、室温で一晩置く。被覆溶液を除去し、 $200\mu\text{l}$  / ウェルの PBST / 1% 脱脂粉乳を添加し、室温で1hインキュベートして封入する。封入液を除去し、PBST緩衝液でプレート<sup>3</sup>回を洗浄した後、 $50\mu\text{l}$  / ウェルで成長培地 (DMEM + 5% FBS) と  $50\mu\text{l}$  HRPでマークした Keytruda または Opdivo 抗体の混合液を添加し、PBSで結合していない HRPでマークした Keytruda または Opdivo 抗体を洗浄した。そして抗体 AB12M2、AB12M3 および AB12M4 を添加し、マークしていない Keytruda または Opdivo を陽性照合とする。十分にインキュベートした後、PBSで結合していない HRPでマークした Keytruda または Opdivo 抗体を洗浄し、マイクロプレートリーダーで二重波長  $450/620\text{nm}$  箇所<sup>3</sup>で吸光度値を読み出す。

10

## 【0108】

図7および図8に示すように、抗体 AB12M2、AB12M3 および AB12M4 はいずれも競合的に Keytruda または Opdivo と PD-1 との結合を競合的に遮断することができ、且つこれらと Keytruda - HRP または Opdivo - HRP とが PD-1 に競合的に結合する  $\text{IC}_{50}$  値は Keytruda および Opdivo よりも低い<sup>3</sup>が、いずれも  $0.1 \sim 1\mu\text{g}/\text{ml}$  である。そのため、抗体 AB12M2、AB12M3 および AB12M4 と Keytruda および Opdivo との親和力の大きさが相当であると判断することができる。

## 【0109】

6.3、PD-1 ヒト型化抗体の PD-1 と PD-L1 との結合に対する体外遮断実験  
Hisラベル付きの PD-1 プロテイン細胞外領域断片を96穴プレートに被覆した後、封入し、プレートを洗浄し、測定待ちの PD-1 抗体を添加しながら、ビオチンでマークした PD-L1 - Fc を添加し、インキュベートして反応する。プレートを洗浄した後、ビオチンでマークした PD-L1 / Fc 結合分を検出し、PD-1 抗体の配位子 PD-L1 に対する結合遮断の  $\text{IC}_{50}$  値を算出する。

20

## 【0110】

pH7.2のPBS緩衝液でPD1/Hisを $2\mu\text{g}/\text{ml}$ までに希釈し、 $100\mu\text{l}$  / ウェルの体積で96穴プレートに添加し、室温で1h振動しながらインキュベートする。96穴プレートにおけるPBS緩衝液を除去し、 $200\mu\text{l}$  / ウェルのPBST (pH7.2 PBSは0.05% tween-20を含有する) / 1% 脱脂粉乳を添加し、室温で1hインキュベートして封入する。PBSTでプレートを3回洗浄し、 $50\mu\text{l}$  / ウェルの封入液で適当な濃度に希釈した測定待ちのPD-1抗体を添加しながら、 $50\mu\text{l}$  / ウェルの封入液で $200\text{ng}/\text{ml}$ までに希釈したビオチンでマークしたPD-L1 / Fcを添加し、室温で1hインキュベートし、PBSTでプレートを3回洗浄し、 $100\mu\text{l}$  / ウェルの封入液で1:250に希釈したSA-Avidin-HRP (HRPでマークしたstreptavidin) を添加し、室温で1hインキュベートする。PBSTでプレートを3回洗浄し、 $100\mu\text{l}$  / ウェルTMBを添加し、室温で5-10分インキュベートする。 $50\mu\text{l}$  / ウェルの0.2M硫酸を添加して反応を終了する。マイクロプレートリーダーで $450\text{nm}$ 箇所<sup>3</sup>で吸光度値を読み出し、PD-1抗体の配位子PD-L1に対する結合遮断の  $\text{IC}_{50}$  値を算出する。

30

40

## 【0111】

表4における実験結果から分かるように、AB12M3 および AB12M4 抗体は、いずれもPD-L1とPD-1との結合を効果的に遮断することができ、Keytruda、とOpdivoの結果が類似する。

## 【0112】

## 【表4】

表4、AB12M3およびAB12M4がPD-1とPD-L1との結合を体外で遮断するIC<sub>50</sub>値

| 測定待ちの抗体               | AB12M3 | AB12M4 | Keytruda | Opdivo |
|-----------------------|--------|--------|----------|--------|
| IC <sub>50</sub> (pM) | 114.3  | 96     | 126.5    | 96     |

## 【0113】

## 6.4、抗PD-1ヒト型化抗体の体外細胞結合実験

FACS（蛍光活性化セルソータ）は、タンパク質と細胞との結合を検出する実験方法である。本実験は、本発明に係るPD-1ヒト型化抗体と、細胞表面発現天然PD-1との結合活性を検出するために用いられる。本実験で用いられる細胞は、PD-1過剰発現のCHO細胞である。3 × 10<sup>5</sup>個のCHO細胞と一連の濃度勾配測定待ちのAB12M3またはAB12M4（一次抗体）を30分インキュベートし、洗浄した後、FITCでマークした羊抗ヒトIgG二次抗体（BD Biosciences 公司から購入）を添加して30分結合し、フローサイトメトリーでFITCシグナルを検出する。その結果が図9で示され、AB12M3およびAB12M4は、CHO細胞表面で過剰発現PD-1に特異的に結合することができる。

10

## 【0114】

## 6.5、抗PD-1ヒト型化抗体と活性化ヒトT細胞との特異性結合実験

密度勾配遠心法（Lymphoprep（登録商標）、ヒトリンパ細胞単離液、STEMCELL 公司製）でヒト外周血から新鮮な単一のコア細胞を取得し、T細胞選別試料（STEMCELL 公司製）を用いて高純度のTリンパ細胞を得た。5 μg/mlの抗CD3抗体で48h刺激し、250 IU/mlのヒトIL-2を添加して7日培養して大量の活性化Tリンパ細胞を得た。3 × 10<sup>5</sup>個のTリンパ細胞と一連の濃度勾配のAB12M3またはAB12M4（一次抗体）を30分インキュベートし、洗浄した後、FITCでマークした羊抗ヒトIgG二次抗体（BD Biosciences 公司製）を添加し、フローサイトメトリーでFITCシグナルを検出する。その結果が図10で示され、AB12M3およびAB12M4は、活性化ヒトT細胞表面発現PD-1受容体に特異的に結合することができる。

20

30

## 【0115】

## 実施例7、抗ヒトPD-1ヒト型化抗体の生物学活性の測定

## 【0116】

## 7.1、抗PD-1ヒト型化抗体が混合リンパ細胞反応において細胞増殖と細胞因子分泌に対する影響

混合リンパ細胞反応によれば、PD-1/PD-L1の遮断方法がリンパ効果細胞に対する影響を証明する。PD-1抗体または同型IgG照合抗体が混合リンパ細胞反応においてT細胞増殖およびIFN- $\gamma$ 分泌に対する影響を測定する。

## 【0117】

新鮮な単離されたヒトPBMC調整細胞の密度が2.0 × 10<sup>6</sup>個/mlであり、付着法で単核細胞を取得する。100 ng/mlのGM-CSFと100 ng/mlのIL-4を添加して5日培養し、100 ng/mlのTNF- $\alpha$ を追加添加してDC細胞を誘導成熟させる。CD4<sup>+</sup>T細胞正選キット（STEMCELL 公司製）で新鮮なヒトPBMCからCD4<sup>+</sup>T細胞を単離する。96穴プレートにおいて、250 μl/ウェルの培養液に10<sup>5</sup>個の単離されたT細胞、10<sup>4</sup>個の誘導成熟したDC細胞および一連の濃度勾配のAB12M3またはAB12M4を含有する。同型IgG照合抗体を陰性照合とする。混合リンパ細胞を、37℃で、5%のCO<sub>2</sub>細胞インキュベーターに6日培養した後、96穴プレートから100 μl/ウェル培養上清液を取り出してIFN- $\gamma$ 測定を行う。IFN- $\gamma$ は、OptEIA ELISAキット（BD Biosciences 公司製）により測定される。96穴プレートにおける残りの細胞に対して、Cell Tit

40

50

er Gloキット (Promega 公司製) で細胞増殖の状況を測定する。その結果、AB12M3 および AB12M4 は濃度依存形態で T 細胞増殖 (図 11) および IFN- $\gamma$  (図 12) 分泌を促進する。

#### 【0118】

7.2、抗 PD-1 ヒト型化抗体が超抗原でヒト PBMC 細胞を刺激誘導して細胞因子を分泌することに対する影響

新鮮に調製したヒト PBMC 細胞を、20  $\mu$ g/ml の AB12M3、AB12M4 または同型 IgG 照合抗体を含有する RPMI 1640 培地 (10% の不活化 FBS を含有する) で  $10^6$  / ml 再懸濁し、100  $\mu$ l / ウェルで 96 穴プレートに接種する。超抗原 SEB の最高濃度が 2500 ng/ml であり、10 倍で 4 つの勾配希釈し、96 穴プレートに添加し、3 ウェルを設置する。72 h 培養し、上清液を取り、OptEIA ELISA キット (BD Biosciences 公司製) で IL-2 濃度を測定する。その結果が図 13 で示され、AB12M3 および AB12M4 は T 細胞の IL-2 分泌を促進することができる。

10

#### 【0119】

7.3、抗 PD-1 ヒト型化抗体が T 細胞を刺激して腫瘍細胞を殺傷する効果を体外で測定する

PD-L1 過剰発現のヒト非小細胞肺癌細胞株 HCC827 (中科院上海セルバンク) を 96 穴プレートに接種し、一連の濃度の AB12M1、AB12M3、AB12M4 または huIgG を添加して、10:1 のエフェクタ: ターゲット比で抗 CD3 抗体と IL-2 で活性化された T 細胞を添加し、48 h 培養し、培地でプレートを洗浄し、大部分の T 細胞を除去し、CKK-8 細胞増殖キット (Dojindo 公司製) で HCC827 細胞の生存状況を測定し、殺傷率を算出する。その結果が表 5 で示され、AB12M3、および AB12M4 は、T 細胞が腫瘍細胞に対する殺傷を強化する能力を備える。

20

#### 【0120】

##### 【表 5】

表5、ヒト型化抗体AB12M3およびAB12M4の腫瘍細胞に対する殺傷率(%)

| 投薬量 ( $\mu$ g/ml) | AB12M1 | AB12M3 | AB12M4 | huIgG |
|-------------------|--------|--------|--------|-------|
| 100               | 58.2   | 30.3   | 59.1   | 21.8  |
| 10                | 37.3   | 22.0   | 32.9   | 30.8  |
| 1                 | 30.2   | 23.5   | 21.9   | 20.0  |
| 0.1               | 28.8   | 20.0   | 16.7   | 28.6  |

30

#### 【0121】

7.4、抗 PD-1 ヒト型化抗体がヒト型化 PD-1 マウス体内皮下で大腸がん MC38 細胞を移植するモデルにおける薬力研究

北京奥賽図生物技術有限公司により構築した B-hPD-1 ヒト型化マウスで抗ヒト PD-1 抗体の体内薬力評価を行い、当該マウスは C57BL/6 背景を用い、遺伝ターゲット技術でマウス PD-1 遺伝子の IgV 構造ドメイン部位を含んだ 2 番目のエキソン部分に対してヒト型化改良を行う。改良が成功したマウスに、細胞外部分が hPD-1 で、細胞内部分が mPD-1 であるヒトマウスキメラ PD-1 を有する。このようなキメラ PD-1 構造は、PD-1 の正常なシグナル伝送に影響せず、マウスまたはヒト PD-L1 配位子がこの PD-1 受容体に結合した後、T 細胞活性を抑制することができる。

40

#### 【0122】

MC38 マウス大腸がん細胞 (舜冉上海生物科学技術有限公司) を  $5 \times 10^5$  個 / 0.1 mL で雄 B-hPD-1 ヒト型化マウスの右側の前肋骨部の皮下に接種し、腫瘍が約 150 mm<sup>3</sup> に成長したと、腫瘍体積に応じて無作為に抽出し、群ごとに 8 匹、合計 3 群、それぞれ (1) 溶剤照合群 (PBS 群)、(2) AB12M4 処理群および (3) Key

50

truda照合群 (Merck 公司製、ロット番号: 5SNL80505) であり、群 (2) および群 (3) の投薬量が 20 mg / kg であり、投薬体積が 10 ml / kg である。すべての群の投薬方法は、いずれも腹腔注射であり、3 日ずつ 1 回投薬し、連続して 6 回投薬し、実験が接種の 28 日に進行して終了する。

【0123】

ノギスで腫瘍の長径 (L) と短径 (W) を測定し、算式  $V = 1 / 2 (L \times W^2)$  で腫瘍体積 (V) を計算し、週 3 回測定し、それと同時に、マウスの体重を測定する。

【0124】

図 14 に示すように、実験が終了する場合、溶剤照合群の平均腫瘍体積が 3405.2 mm<sup>3</sup> である。AB12M4 処理群の平均腫瘍体積が 277.4 mm<sup>3</sup> であり、Keytruda 投薬群の平均腫瘍体積が 249 mm<sup>3</sup> である。AB12M4 は著しい腫瘍阻害作用を有し、その腫瘍阻害効果が Keytruda と相当であることが表明されて入る。また、実験過程全体において、動物の健康状態がよく、亡くなる動物がない。実験が終了する場合、各群の動物の体重が向上し、AB12M4 処理群の動物は、溶剤照合群の動物と比べ、体重に著しい差異がないため (p > 0.05)、動物の AB12M4 に対する耐性がよく、実験動物に対して明らかな毒性作用が発生しないことが表明されている。

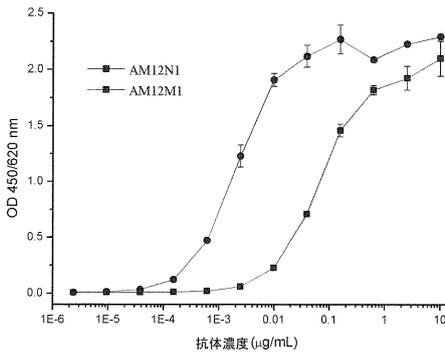
10

【0125】

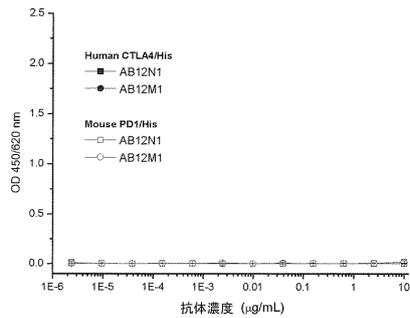
本発明に言及されているすべての文献は、各文献が単独で参照として援用されるように、本出願において参照として援用される。また、本発明に記載される内容を閲覧した後、当業者にとって、本発明に対して行われる各種の変更または修正、及びこれらの等価形態は本願に添付された特許請求の範囲により限定される範囲に含まれることを理解すべきである。

20

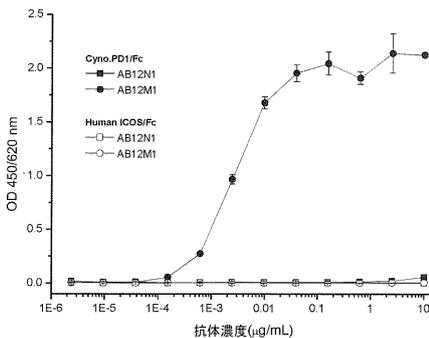
【図 1】



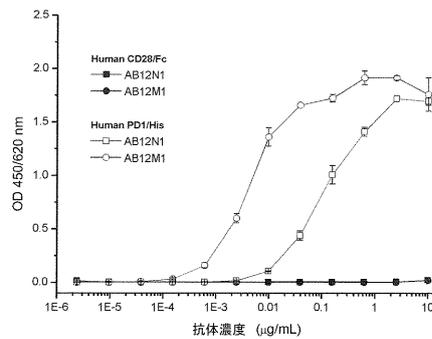
【図 2 - 2】



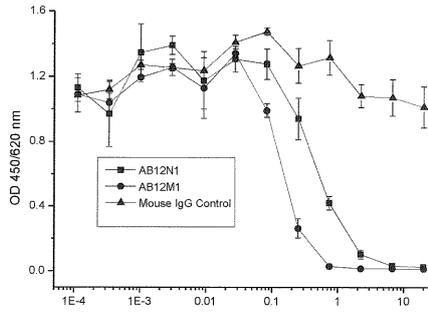
【図 2 - 1】



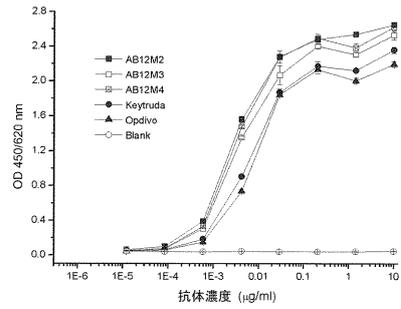
【図 2 - 3】



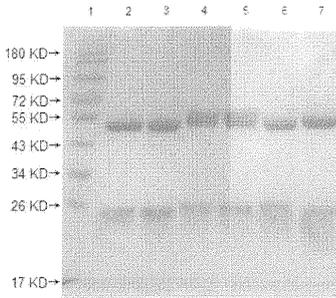
【 図 3 】



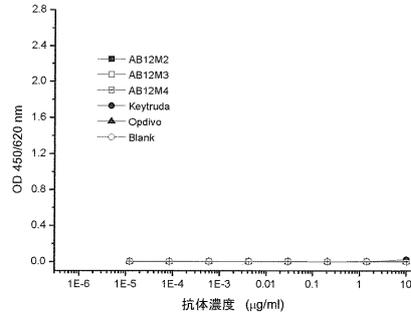
【 図 5 】



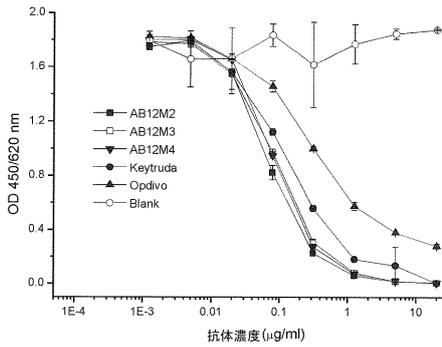
【 図 4 】



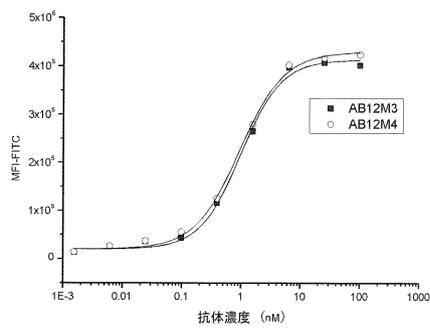
【 図 6 】



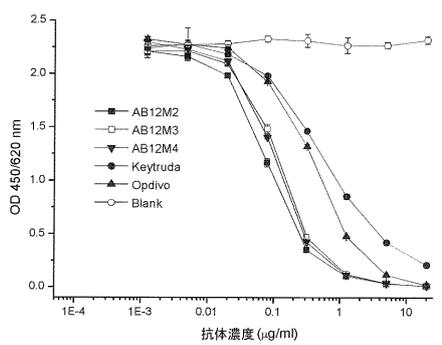
【 図 7 】



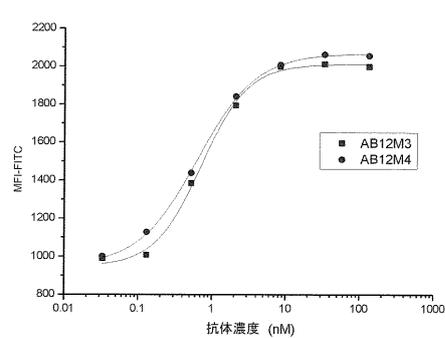
【 図 9 】



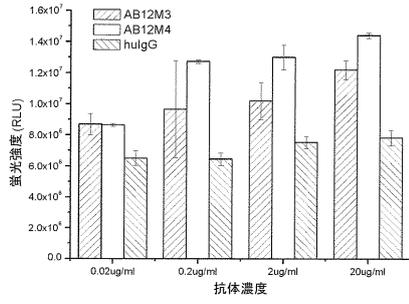
【 図 8 】



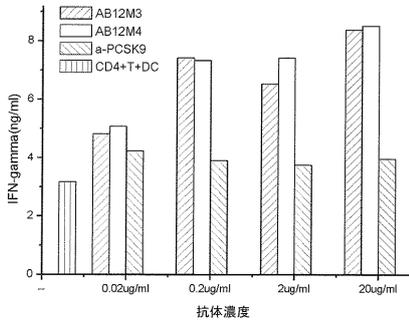
【 図 10 】



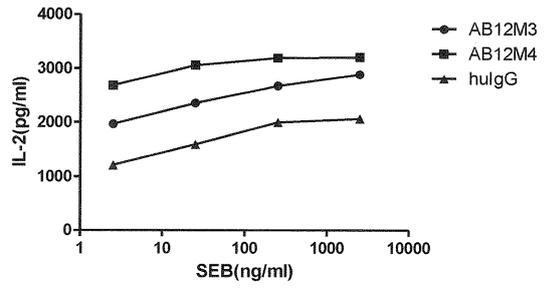
【 図 1 1 】



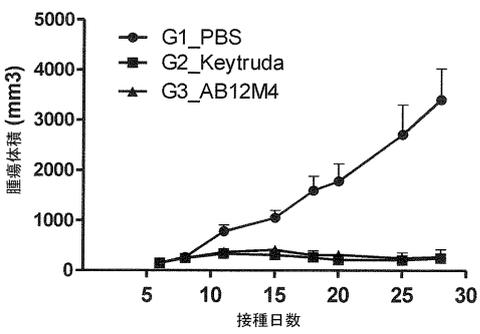
【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【 配 列 表 】

2020504627000001.app

## 【 国际调查报告 】

| <b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>   |  | International application No.<br>PCT/CN2017/092026 |
|--|--|--|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>   |  |  |
| C07K 16/28 (2006.01) i; C07K 16/46 (2006.01) i; C12N 15/13 (2006.01) i; A61K 39/395 (2006.01) i<br>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC   |  |  |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b>  |  |  |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  |  |  |
| C07K 16/, C12N 15/, A61K 39/   |  |  |
| 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)<br>CNABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, EPTXT, USIXT, WOTXT, CNKI, WANFANG, EBI, NCBI, GOOGLE, BAIDU, ISI WEB OF KNOWLEDGE, PUBMED: 安源医药科技 (上海) 有限公司, 李强, 郑云程, 杨瑞, 马心鲁, 李媛丽, 程序性死亡受体-1, Programmed Death-1, Programmed cell death protein 1, PD-1, 单克隆, 抗体, antibody, CDR, SEQ ID NOs: 1-42   |  |  |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>  |  |  |
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.                              |
| PX   | CN 106519034 A (ANYUAN PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY (SHANGHAI) CO., LTD.), 22 March 2017 (22.03.2017), claims 1-27  | 1-27   |
| PX   | WO 2017011580 A2 (CYTOMX THERAPEUTICS, INC.), 19 January 2017 (19.01.2017), claims 1-101, and sequences 626, 704, 711, 786, 789, 840, 1346, 1551, 1558, 1619, 1653, 1705, 1706, 1710, 1862, 1864 and 1868  | 1-27   |
| X  | CN 101213297 B (ONO PHARMACEUTICAL CO., LTD. et al.), 13 February 2013 (13.02.2013), abstract, claims 1-23, and embodiment 1   | 1-27   |
| X  | CN 105531288 A (BEIGENE LTD.), 27 April 2016 (27.04.2016), abstract, claims 1-17, and embodiment 1   | 1-27   |
| X  | CN 104945508 A (MERCK SHARP & DOHME CORP.), 30 September 2015 (30.09.2015), abstract, claims 1-10, and embodiments 1-2   | 1-27   |
| X  | CN 105683217 A (SORRENTO THERAPEUTICS, INC.), 15 June 2016 (15.06.2016), claims 1-13   | 1-27   |
| X  | CN 105339389 A (ANAPTYSBIO, INC.), 17 February 2016 (17.02.2016), claims 1-52  | 1-27   |
| <input checked="" 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:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"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)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"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<br>"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<br>"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<br>"&" document member of the same patent family |  |
| Date of the actual completion of the international search<br>07 September 2017   | Date of mailing of the international search report<br>20 September 2017  |  |
| Name and mailing address of the ISA<br>State Intellectual Property Office of the P. R. China<br>No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao<br>Haidian District, Beijing 100088, China<br>Facsimile No. (86-10) 62019451  | Authorized officer<br>LI, Juanjuan<br>Telephone No. (86-10) 82246978   |  |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/CN2017/092026

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |  |                       |
|---|--|-----------------------|
| Category*   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages     | Relevant to claim No. |
| X   | CN 104470949 A (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY), 25 March 2015 (25.03.2015), claims 1-21 | 1-27                  |
| X   | WO 2016014688 A2 (QIU, Junzhuan et al.), 28 January 2016 (28.01.2016), claims 1-46     | 1-27                  |
| A   | CN 102482347 A (CYTOMX THERAPEUTICS, INC.), 30 May 2012 (30.05.2012), entire document  | 1-27                  |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2017/092026

| Patent Documents referred<br>in the Report | Publication Date | Patent Family    | Publication Date  |
|--|------------------|------------------|-------------------|
| CN 106519034 A                             | 22 March 2017    | None             |                   |
| WO 2017011580 A2                           | 19 January 2017  | US 2017044259 A1 | 16 February 2017  |
|  |                  | WO 2017011580 A3 | 30 March 2017     |
| CN 101213297 B                             | 13 February 2013 | JP 2006340714 A  | 21 December 2006  |
|  |                  | US 9358289 B2    | 07 June 2016      |
|  |                  | TW 200716743 A   | 01 May 2007       |
|  |                  | EP 2161336 B1    | 31 July 2013      |
|  |                  | RU 2010135087 A  | 27 February 2012  |
|  |                  | US 9084776 B2    | 21 July 2015      |
|  |                  | RU 2013133714 A  | 27 January 2015   |
|  |                  | HU S1500067 11   | 29 February 2016  |
|  |                  | NL 300782 12     | 18 May 2016       |
|  |                  | CA 2970873 A1    | 16 November 2006  |
|  |                  | LT C2161336 I2   | 10 July 2017      |
|  |                  | US 2014348743 A1 | 27 November 2014  |
|  |                  | ES 2427646 T3    | 31 October 2013   |
|  |                  | US 9387247 B2    | 12 July 2016      |
|  |                  | US 2009217401 A1 | 27 August 2009    |
|  |                  | JP 2016033135 A  | 10 March 2016     |
|  |                  | AU 2006244885 B2 | 31 March 2011     |
|  |                  | KR 101339628 B1  | 09 December 2013  |
|  |                  | SI 2161336 T1    | 29 November 2013  |
|  |                  | US 2017088615 A1 | 30 March 2017     |
|  |                  | KR 101498834 B1  | 05 March 2015     |
|  |                  | JP 5028700 B2    | 19 September 2012 |
|  |                  | DK 2161336 T3    | 28 October 2013   |
|  |                  | IL 208642 A      | 30 August 2012    |
|  |                  | EP 2418278 A2    | 15 February 2012  |
|  |                  | JP 2012158605 A  | 23 August 2012    |
|  |                  | CN 103059138 B   | 28 October 2015   |
|  |                  | DK 2161336 T4    | 24 April 2017     |
|  |                  | EP 2418278 A3    | 04 July 2012      |
|  |                  | US 8008449 B2    | 30 August 2011    |
|  |                  | US 2015165025 A1 | 18 June 2015      |
|  |                  | EP 1896582 A4    | 08 April 2009     |
|  |                  | JP 5872377 B2    | 01 March 2016     |
|  |                  | TW 1379898 B     | 21 December 2012  |
|  |                  | KR 20130032908 A | 02 April 2013     |
|  |                  | CN 105315373 A   | 10 February 2016  |
|  |                  | CN 101213297 A   | 02 July 2008      |
|  |                  | KR 20130114226 A | 16 October 2013   |
|  |                  | US 2014328833 A1 | 06 November 2014  |
|  |                  | CN 103059138 A   | 24 April 2013     |
|  |                  | AU 2006244885 A1 | 16 November 2006  |
|  |                  | US 2013133091 A1 | 23 May 2013       |
|  |                  | KR 101318469 B1  | 23 October 2013   |
|  |                  | JP 2009155338 A  | 16 July 2009      |
|  |                  | RU 25994.17 C2   | 10 October 2016   |
|  |                  | EP 2161336 A1    | 10 March 2010     |
|  |                  | IL 187108 A      | 30 June 2011      |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2017/092026

| Patent Documents referred in the Report | Publication Date  | Patent Family    | Publication Date  |
|---|-------------------|------------------|-------------------|
| CN 105531288 A                          | 27 April 2016     | US 8779105 B2    | 15 July 2014      |
|   |                   | US 9492539 B2    | 15 November 2016  |
|   |                   | PT 2161336 E     | 03 October 2013   |
|   |                   | WO 2015035606 A1 | 19 March 2015     |
|   |                   | HK 1217501 A1    | 13 January 2017   |
|   |                   | US 2015079109 A1 | 19 March 2015     |
|   |                   | CN 107011441 A   | 04 August 2017    |
|   |                   | AU 2013400609 A8 | 21 July 2016      |
|   |                   | US 8735553 B1    | 27 May 2014       |
|   |                   | MX 2016003292 A  | 24 June 2016      |
|   |                   | TW 201538525 A   | 16 October 2015   |
|   |                   | EP 3044234 A4    | 09 August 2017    |
|   |                   | JP 2016533763 A  | 04 November 2016  |
|   |                   | CA 2924172 A1    | 19 March 2015     |
|   |                   | US 2015315274 A1 | 05 November 2015  |
|   |                   | EA 201690567 A1  | 31 August 2016    |
|   |                   | CN 104945508 A   | 30 September 2015 |
| EP 3044234 A1                           | 20 July 2016      |                  |                   |
| AU 2013400609 A1                        | 05 May 2016       |                  |                   |
| IL 244514 D0                            | 21 April 2016     |                  |                   |
| SG 11201601844 T A                      | 28 April 2016     |                  |                   |
| KR 20160044063 A                        | 22 April 2016     |                  |                   |
| IL 225530 D0                            | 27 June 2013      |                  |                   |
| HU S1500071 11                          | 29 February 2016  |                  |                   |
| HR P20131167 T1                         | 03 January 2014   |                  |                   |
| KR 20100054780 A                        | 25 May 2010       |                  |                   |
| AU 2008266951 B2                        | 12 December 2013  |                  |                   |
| NZ 600758 A                             | 27 September 2013 |                  |                   |
| CA 2691357 A1                           | 24 December 2008  |                  |                   |
| US 2016304606 A9                        | 20 October 2016   |                  |                   |
| BR PI 0812913 A2                        | 09 December 2014  |                  |                   |
| CY 1114849 T1                           | 22 June 2016      |                  |                   |
| IL 202813 A                             | 31 March 2015     |                  |                   |
| CA 2691357 C                            | 23 September 2014 |                  |                   |
| US 8952136 B2                           | 10 February 2015  |                  |                   |
| ES 2616355 T3                           | 12 June 2017      |                  |                   |
| NO 2015028 11                           | 11 January 2016   |                  |                   |
| US 8900587 B2                           | 02 December 2014  |                  |                   |
| AU 2008266951 A1                        | 24 December 2008  |                  |                   |
| EP 2170959 B1                           | 02 October 2013   |                  |                   |
| US 2010266617 A1                        | 21 October 2010   |                  |                   |
| MX 2009014199 A                         | 24 May 2010       |                  |                   |
| KR 20140133954 A                        | 20 November 2014  |                  |                   |
| KR 101562580 B1                         | 22 October 2015   |                  |                   |
| US 8354509 B2                           | 15 January 2013   |                  |                   |
| EP 2535354 A1                           | 19 December 2012  |                  |                   |
| DK 2170959 T3                           | 13 January 2014   |                  |                   |
| KR 101586617 B1                         | 20 January 2016   |                  |                   |
| US 2013108651 A1                        | 02 May 2013       |                  |                   |
| JP 2010530753 A                         | 16 September 2010 |                  |                   |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2017/092026

| Patent Documents referred<br>in the Report | Publication Date                 | Patent Family     | Publication Date |                  |                |
|--|----------------------------------|-------------------|------------------|------------------|----------------|
| CN 105683217 A<br>CN 105339389 A           | 15 June 2016<br>17 February 2016 | JP 2012254092 A   | 27 December 2012 |                  |                |
|  |                                  | PT 2170959 E      | 07 January 2014  |                  |                |
|  |                                  | SI 2170959 T1     | 30 April 2014    |                  |                |
|  |                                  | US 2015232555 A1  | 20 August 2015   |                  |                |
|  |                                  | PH 12015501524 A1 | 22 February 2016 |                  |                |
|  |                                  | NZ 582150 A       | 31 August 2012   |                  |                |
|  |                                  | WO 2008156712 A1  | 24 December 2008 |                  |                |
|  |                                  | IL 202813 D0      | 01 August 2011   |                  |                |
|  |                                  | LU 92936 12       | 29 February 2016 |                  |                |
|  |                                  | CA 2855098 A1     | 24 December 2008 |                  |                |
|  |                                  | HK 1140497 A1     | 07 March 2014    |                  |                |
|  |                                  | CN 102131828 B    | 17 June 2015     |                  |                |
|  |                                  | JP 5640052 B2     | 10 December 2014 |                  |                |
|  |                                  | EP 2170959 A1     | 07 April 2010    |                  |                |
|  |                                  | RS 53072 B        | 30 April 2014    |                  |                |
|  |                                  | CN 102131828 A    | 20 July 2011     |                  |                |
|  |                                  | KR 20150055114 A  | 20 May 2015      |                  |                |
|  |                                  | EP 2535354 B1     | 11 January 2017  |                  |                |
|  |                                  | ES 2437327 T3     | 10 January 2014  |                  |                |
|  |                                  | JP 5191537 B2     | 08 May 2013      |                  |                |
|  |                                  | US 2013109843 A1  | 02 May 2013      |                  |                |
|  |                                  | CN 104470949 A    | 25 March 2015    | None             |                |
|  |                                  |                   |                  | JP 2016523516 A  | 12 August 2016 |
|  |                                  |                   |                  | KR 20160034247 A | 29 March 2016  |
|  |                                  |                   |                  | HK 1219743 A1    | 13 April 2017  |
| RU 2015151505 A                            | 07 June 2017                     |                   |                  |                  |                |
| MX 2015015037 A                            | 08 July 2016                     |                   |                  |                  |                |
| CA 2910278 A1                              | 06 November 2014                 |                   |                  |                  |                |
| AU 2014259719 A1                           | 17 December 2015                 |                   |                  |                  |                |
| EP 2992017 A4                              | 29 March 2017                    |                   |                  |                  |                |
| WO 2014179664 A2                           | 06 November 2014                 |                   |                  |                  |                |
| WO 2014179664 A3                           | 19 February 2015                 |                   |                  |                  |                |
| EP 2992017 A2                              | 09 March 2016                    |                   |                  |                  |                |
| SG 11201508528 T A                         | 27 November 2015                 |                   |                  |                  |                |
| US 2016075783 A1                           | 17 March 2016                    |                   |                  |                  |                |
| SG 10201700698 W A                         | 27 February 2017                 |                   |                  |                  |                |
| 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                  |                   |                  |                  |                |
| WO 2013173223 A1                           | 21 November 2013                 |                   |                  |                  |                |
| CA 2873402 A1                              | 21 November 2013                 |                   |                  |                  |                |
| US 2015125463 A1                           | 07 May 2015                      |                   |                  |                  |                |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.  
PCT/CN2017/092026

| Patent Documents referred<br>in the Report | Publication Date  | Patent Family      | Publication Date |
|--|-------------------|--------------------|------------------|
| WO 2016014688 A2                           | 28 January 2016   | EP 2850102 A1      | 25 March 2015    |
|  |                   | SG 11201407190 T A | 30 December 2014 |
|  |                   | EP 3171892 A2      | 31 May 2017      |
|  |                   | SG 11201700496 W A | 27 February 2017 |
|  |                   | KR 20170036016 A   | 31 March 2017    |
|  |                   | AU 2015292678 A1   | 16 February 2017 |
|  |                   | WO 2016014688 A3   | 24 March 2016    |
|  |                   | CN 106573052 A     | 19 April 2017    |
|  |                   | CA 2955788 A1      | 28 January 2016  |
|  |                   | CN 102482347 A     | 30 May 2012      |
| CA 2749339 A1                              | 15 July 2010      |                    |                  |
| US 8513390 B2                              | 20 August 2013    |                    |                  |
| US 8563269 B2                              | 22 October 2013   |                    |                  |
| WO 2010081173 A3                           | 04 November 2010  |                    |                  |
| WO 2010081173 A2                           | 15 July 2010      |                    |                  |
| CN 102482347 B                             | 26 April 2017     |                    |                  |
| JP 2012514982 A                            | 05 July 2012      |                    |                  |
| US 2013309230 A1                           | 21 November 2013  |                    |                  |
| EP 2385955 A2                              | 16 November 2011  |                    |                  |
| JP 5851842 B2                              | 03 February 2016  |                    |                  |
| AU 2010203353 B2                           | 16 June 2016      |                    |                  |
| CN 106995495 A                             | 01 August 2017    |                    |                  |
| US 2012149061 A1                           | 14 June 2012      |                    |                  |
| RU 2011133819 A                            | 20 February 2013  |                    |                  |
| US 2010189651 A1                           | 29 July 2010      |                    |                  |
| EP 2385955 A4                              | 13 February 2013  |                    |                  |
| US 2014024810 A1                           | 23 January 2014   |                    |                  |
| US 2016228546 A1                           | 11 August 2016    |                    |                  |
| BR PI 1006141 A2                           | 23 February 2016  |                    |                  |
| JP 2015193654 A                            | 05 November 2015  |                    |                  |
| AU 2010203353 A1                           | 11 August 2011    |                    |                  |
| US 9453078 B2                              | 27 September 2016 |                    |                  |
| AU 2010203353 A2                           | 11 August 2011    |                    |                  |
| US 2017081397 A1                           | 23 March 2017     |                    |                  |
| AU 2016225810 A1                           | 22 September 2016 |                    |                  |

| 国际检索报告  |   | 国际申请号<br>PCT/CN2017/092026  |
|---|---|---|
| <b>A. 主题的分类</b><br>C07K 16/28(2006.01)i; C07K 16/46(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i<br>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类   |   |   |
| <b>B. 检索领域</b><br>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)<br>C07K16/, C12N15/, A61K39/<br>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献<br>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))<br>CNABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, CNKI, 万方, EBI, NCBI, GOOGLE, BAIDU, ISI Web of Knowledge, PUBMED:安源医药科技(上海)有限公司, 李强, 郑云程, 杨璐, 马心鲁, 李媛丽, 程序性死亡受体-1, Programmed Death-1, Programmed cell death protein 1, PD-1, 单克隆, 抗体, antibody, CDR, SEQ ID NOs: 1-42 |   |   |
| <b>C. 相关文件</b>  |   |   |
| 类型*   | 引用文件, 必要时, 指明相关段落   | 相关的权利要求   |
| PX  | CN 106519034 A (安源医药科技上海有限公司) 2017年 3月 22日 (2017-03-22)<br>权利要求1-27   | 1-27  |
| PX  | WO 2017011580 A2 (CYTOMX THERAPEUTICS, INC.) 2017年 1月 19日 (2017-01-19)<br>权利要求1-101, 序列626, 704, 711, 786, 789, 840, 1346, 1551, 1558, 1619, 1653, 1705, 1706, 1710, 1862, 1864, 1868 | 1-27  |
| X   | CN 101213297 B (小野药品工业株式会社等) 2013年 2月 13日 (2013-02-13)<br>摘要, 权利要求1-23, 实施例1  | 1-27  |
| X   | CN 105531288 A (百济神州有限公司) 2016年 4月 27日 (2016-04-27)<br>摘要, 权利要求1-17, 实施例1   | 1-27  |
| X   | CN 104945508 A (默沙东有限责任公司) 2015年 9月 30日 (2015-09-30)<br>摘要, 权利要求1-10, 实施例1-2  | 1-27  |
| X   | CN 105683217 A (索伦托治疗有限公司) 2016年 6月 15日 (2016-06-15)<br>权利要求1-13  | 1-27  |
| X   | CN 105339389 A (安奈普泰斯生物有限公司) 2016年 2月 17日 (2016-02-17)<br>权利要求1-52  | 1-27  |
| <input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。  |   | <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。  |
| * 引用文件的具体类型:<br>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件<br>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利<br>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)<br>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件<br>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件   |   | “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件<br>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性<br>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性<br>“&” 同族专利的文件 |
| 国际检索实际完成的日期<br>2017年 9月 7日  |   | 国际检索报告邮寄日期<br>2017年 9月 20日  |
| ISA/CN的名称和邮寄地址<br>中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)<br>中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088<br>传真号 (86-10)62019451   |   | 受权官员<br>李娟娟<br>电话号码 (86-10)82246978   |

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2009年7月)

## 国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/092026

| c. 相关文件 |   |         |
|---------|---|---------|
| 类型*     | 引用文件, 必要时, 指明相关段落   | 相关的权利要求 |
| X       | CN 104470949 A (百时美施贵宝公司) 2015年 3月 25日 (2015 - 03 - 25)<br>权利要求1-21         | 1-27    |
| X       | WO 2016014688 A2 (QIU, JUNZHUAN等) 2016年 1月 28日 (2016 - 01 - 28)<br>权利要求1-46 | 1-27    |
| A       | CN 102482347 A (希托马克斯医疗有限责任公司) 2012年 5月 30日 (2012 - 05 - 30)<br>全文          | 1-27    |

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2009年7月)

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/092026

| 检索报告引用的专利文件 |            |    | 公布日<br>(年/月/日) | 同族专利 | 公布日<br>(年/月/日)              |
|-------------|------------|----|----------------|------|-----------------------------|
| CN          | 106519034  | A  | 2017年 3月 22日   | 无    |                             |
| WO          | 2017011580 | A2 | 2017年 1月 19日   | US   | 2017044259 A1 2017年 2月 16日  |
|             |            |    |                | WO   | 2017011580 A3 2017年 3月 30日  |
| CN          | 101213297  | B  | 2013年 2月 13日   | JP   | 2006340714 A 2006年 12月 21日  |
|             |            |    |                | US   | 9358289 B2 2016年 6月 7日      |
|             |            |    |                | TW   | 200716743 A 2007年 5月 1日     |
|             |            |    |                | EP   | 2161336 B1 2013年 7月 31日     |
|             |            |    |                | RU   | 2010135087 A 2012年 2月 27日   |
|             |            |    |                | US   | 9084776 B2 2015年 7月 21日     |
|             |            |    |                | RU   | 2013133714 A 2015年 1月 27日   |
|             |            |    |                | HU   | S1500067 I1 2016年 2月 29日    |
|             |            |    |                | NL   | 300782 I2 2016年 5月 18日      |
|             |            |    |                | CA   | 2970873 A1 2006年 11月 16日    |
|             |            |    |                | LT   | C2161336 I2 2017年 7月 10日    |
|             |            |    |                | US   | 2014348743 A1 2014年 11月 27日 |
|             |            |    |                | ES   | 2427646 T3 2013年 10月 31日    |
|             |            |    |                | US   | 9387247 B2 2016年 7月 12日     |
|             |            |    |                | US   | 2009217401 A1 2009年 8月 27日  |
|             |            |    |                | JP   | 2016033135 A 2016年 3月 10日   |
|             |            |    |                | AU   | 2006244885 B2 2011年 3月 31日  |
|             |            |    |                | KR   | 101339628 B1 2013年 12月 9日   |
|             |            |    |                | SI   | 2161336 T1 2013年 11月 29日    |
|             |            |    |                | US   | 2017088615 A1 2017年 3月 30日  |
|             |            |    |                | KR   | 101498834 B1 2015年 3月 5日    |
|             |            |    |                | JP   | 5028700 B2 2012年 9月 19日     |
|             |            |    |                | DK   | 2161336 T3 2013年 10月 28日    |
|             |            |    |                | IL   | 208642 A 2012年 8月 30日       |
|             |            |    |                | EP   | 2418278 A2 2012年 2月 15日     |
|             |            |    |                | JP   | 2012158605 A 2012年 8月 23日   |
|             |            |    |                | CN   | 103059138 B 2015年 10月 28日   |
|             |            |    |                | DK   | 2161336 T4 2017年 4月 24日     |
|             |            |    |                | EP   | 2418278 A3 2012年 7月 4日      |
|             |            |    |                | US   | 8008449 B2 2011年 8月 30日     |
|             |            |    |                | US   | 2015165025 A1 2015年 6月 18日  |
|             |            |    |                | EP   | 1896582 A4 2009年 4月 8日      |
|             |            |    |                | JP   | 5872377 B2 2016年 3月 1日      |
|             |            |    |                | TW   | I379898 B 2012年 12月 21日     |
|             |            |    |                | KR   | 20130032908 A 2013年 4月 2日   |
|             |            |    |                | CN   | 105315373 A 2016年 2月 10日    |
|             |            |    |                | CN   | 101213297 A 2008年 7月 2日     |
|             |            |    |                | KR   | 20130114226 A 2013年 10月 16日 |
|             |            |    |                | US   | 2014328833 A1 2014年 11月 6日  |
|             |            |    |                | CN   | 103059138 A 2013年 4月 24日    |
|             |            |    |                | AU   | 2006244885 A1 2006年 11月 16日 |
|             |            |    |                | US   | 2013133091 A1 2013年 5月 23日  |
|             |            |    |                | KR   | 101318469 B1 2013年 10月 23日  |
|             |            |    |                | JP   | 2009155338 A 2009年 7月 16日   |
|             |            |    |                | RU   | 2599417 C2 2016年 10月 10日    |
|             |            |    |                | EP   | 2161336 A1 2010年 3月 10日     |
|             |            |    |                | IL   | 187108 A 2011年 6月 30日       |

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

| 国际检索报告<br>关于同族专利的信息 |           |                |              | 国际申请号<br>PCT/CN2017/092026 |                |               |               |
|---------------------|-----------|----------------|--------------|----------------------------|----------------|---------------|---------------|
| 检索报告引用的专利文件         |           | 公布日<br>(年/月/日) | 同族专利         |                            | 公布日<br>(年/月/日) |               |               |
|                     |           |                | US           | 8779105                    | B2             | 2014年 7月 15日  |               |
|                     |           |                | US           | 9492539                    | B2             | 2016年 11月 15日 |               |
|                     |           |                | PT           | 2161336                    | E              | 2013年 10月 3日  |               |
| CN                  | 105531288 | A              | 2016年 4月 27日 | WO                         | 2015035606     | A1            | 2015年 3月 19日  |
|                     |           |                |              | HK                         | 1217501        | A1            | 2017年 1月 13日  |
|                     |           |                |              | US                         | 2015079109     | A1            | 2015年 3月 19日  |
|                     |           |                |              | CN                         | 107011441      | A             | 2017年 8月 4日   |
|                     |           |                |              | AU                         | 2013400609     | A8            | 2016年 7月 21日  |
|                     |           |                |              | US                         | 8735553        | B1            | 2014年 5月 27日  |
|                     |           |                |              | MX                         | 2016003292     | A             | 2016年 6月 24日  |
|                     |           |                |              | TW                         | 201538525      | A             | 2015年 10月 16日 |
|                     |           |                |              | EP                         | 3044234        | A4            | 2017年 8月 9日   |
|                     |           |                |              | JP                         | 2016533763     | A             | 2016年 11月 4日  |
|                     |           |                |              | CA                         | 2924172        | A1            | 2015年 3月 19日  |
|                     |           |                |              | US                         | 2015316274     | A1            | 2015年 11月 5日  |
|                     |           |                |              | EA                         | 201690567      | A1            | 2016年 8月 31日  |
|                     |           |                |              | US                         | 9217034        | B2            | 2015年 12月 22日 |
|                     |           |                |              | EP                         | 3044234        | A1            | 2016年 7月 20日  |
|                     |           |                |              | AU                         | 2013400609     | A1            | 2016年 5月 5日   |
|                     |           |                |              | IL                         | 244514         | D0            | 2016年 4月 21日  |
|                     |           |                |              | SG                         | 11201601844T   | A             | 2016年 4月 28日  |
|                     |           |                |              | KR                         | 20160044063    | A             | 2016年 4月 22日  |
| CN                  | 104945608 | A              | 2015年 9月 30日 | IL                         | 225630         | D0            | 2013年 6月 27日  |
|                     |           |                |              | HU                         | S1500071       | I1            | 2016年 2月 29日  |
|                     |           |                |              | HR                         | P20131167      | T1            | 2014年 1月 3日   |
|                     |           |                |              | KR                         | 20100054780    | A             | 2010年 5月 25日  |
|                     |           |                |              | AU                         | 2008266951     | B2            | 2013年 12月 12日 |
|                     |           |                |              | NZ                         | 600758         | A             | 2013年 9月 27日  |
|                     |           |                |              | CA                         | 2691357        | A1            | 2008年 12月 24日 |
|                     |           |                |              | US                         | 2016304606     | A9            | 2016年 10月 20日 |
|                     |           |                |              | BR                         | P10812913      | A2            | 2014年 12月 9日  |
|                     |           |                |              | CY                         | 1114849        | T1            | 2016年 6月 22日  |
|                     |           |                |              | IL                         | 202813         | A             | 2015年 3月 31日  |
|                     |           |                |              | CA                         | 2691357        | C             | 2014年 9月 23日  |
|                     |           |                |              | US                         | 8952136        | B2            | 2015年 2月 10日  |
|                     |           |                |              | ES                         | 2616355        | T3            | 2017年 6月 12日  |
|                     |           |                |              | NO                         | 2015028        | I1            | 2016年 1月 11日  |
|                     |           |                |              | US                         | 8900587        | B2            | 2014年 12月 2日  |
|                     |           |                |              | AU                         | 2008266951     | A1            | 2008年 12月 24日 |
|                     |           |                |              | EP                         | 2170959        | B1            | 2013年 10月 2日  |
|                     |           |                |              | US                         | 2010266617     | A1            | 2010年 10月 21日 |
|                     |           |                |              | MX                         | 2009014199     | A             | 2010年 5月 24日  |
|                     |           |                |              | KR                         | 20140133954    | A             | 2014年 11月 20日 |
|                     |           |                |              | KR                         | 101562580      | B1            | 2015年 10月 22日 |
|                     |           |                |              | US                         | 8354509        | B2            | 2013年 1月 15日  |
|                     |           |                |              | EP                         | 2535354        | A1            | 2012年 12月 19日 |
|                     |           |                |              | DK                         | 2170959        | T3            | 2014年 1月 13日  |
|                     |           |                |              | KR                         | 101586617      | B1            | 2016年 1月 20日  |
|                     |           |                |              | US                         | 2013108651     | A1            | 2013年 5月 2日   |
|                     |           |                |              | JP                         | 2010530753     | A             | 2010年 9月 16日  |

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/092026

| 检索报告引用的专利文件    | 公布日<br>(年/月/日) | 同族专利              | 公布日<br>(年/月/日) |
|----------------|----------------|-------------------|----------------|
|                |                | JP 2012254092 A   | 2012年 12月 27日  |
|                |                | PT 2170959 E      | 2014年 1月 7日    |
|                |                | SI 2170959 T1     | 2014年 4月 30日   |
|                |                | US 2015232555 A1  | 2015年 8月 20日   |
|                |                | PH 12015501524 A1 | 2016年 2月 22日   |
|                |                | NZ 582150 A       | 2012年 8月 31日   |
|                |                | WO 2008156712 A1  | 2008年 12月 24日  |
|                |                | IL 202813 D0      | 2011年 8月 1日    |
|                |                | LU 92936 I2       | 2016年 2月 29日   |
|                |                | CA 2855098 A1     | 2008年 12月 24日  |
|                |                | HK 1140497 A1     | 2014年 3月 7日    |
|                |                | CN 102131828 B    | 2015年 6月 17日   |
|                |                | JP 5640052 B2     | 2014年 12月 10日  |
|                |                | EP 2170959 A1     | 2010年 4月 7日    |
|                |                | RS 53072 B        | 2014年 4月 30日   |
|                |                | CN 102131828 A    | 2011年 7月 20日   |
|                |                | KR 20150055114 A  | 2015年 5月 20日   |
|                |                | EP 2535354 B1     | 2017年 1月 11日   |
|                |                | ES 2437327 T3     | 2014年 1月 10日   |
|                |                | JP 5191537 B2     | 2013年 5月 8日    |
|                |                | US 2013109843 A1  | 2013年 5月 2日    |
| CN 105683217 A | 2016年 6月 15日   | 无                 |                |
| CN 105339389 A | 2016年 2月 17日   | JP 2016523516 A   | 2016年 8月 12日   |
|                |                | KR 20160034247 A  | 2016年 3月 29日   |
|                |                | HK 1219743 A1     | 2017年 4月 13日   |
|                |                | RU 2015151505 A   | 2017年 6月 7日    |
|                |                | MX 2015015037 A   | 2016年 7月 8日    |
|                |                | CA 2910278 A1     | 2014年 11月 6日   |
|                |                | AU 2014259719 A1  | 2015年 12月 17日  |
|                |                | EP 2992017 A4     | 2017年 3月 29日   |
|                |                | WO 2014179664 A2  | 2014年 11月 6日   |
|                |                | WO 2014179664 A3  | 2015年 2月 19日   |
|                |                | EP 2992017 A2     | 2016年 3月 9日    |
|                |                | SG 11201508528T A | 2015年 11月 27日  |
|                |                | US 2016075783 A1  | 2016年 3月 17日   |
| CN 104470949 A | 2015年 3月 25日   | SG 10201700698W A | 2017年 2月 27日   |
|                |                | KR 20150020189 A  | 2015年 2月 25日   |
|                |                | EA 201492105 A1   | 2015年 6月 30日   |
|                |                | US 2016090417 A1  | 2016年 3月 31日   |
|                |                | HK 1203971 A1     | 2015年 11月 6日   |
|                |                | US 9212224 B2     | 2015年 12月 15日  |
|                |                | IL 235591 D0      | 2015年 1月 29日   |
|                |                | JP 2015518826 A   | 2015年 7月 6日    |
|                |                | US 2013309250 A1  | 2013年 11月 21日  |
|                |                | MX 2014013565 A   | 2015年 2月 12日   |
|                |                | IL 235591 A       | 2015年 1月 29日   |
|                |                | AU 2013263076 A1  | 2015年 1月 22日   |
|                |                | WO 2013173223 A1  | 2013年 11月 21日  |
|                |                | CA 2873402 A1     | 2013年 11月 21日  |
|                |                | US 2015125463 A1  | 2015年 5月 7日    |

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/092026

| 检索报告引用的专利文件 |            |    | 公布日<br>(年/月/日) | 同族专利 |              |    | 公布日<br>(年/月/日) |
|-------------|------------|----|----------------|------|--------------|----|----------------|
|             |            |    |                | EP   | 2850102      | A1 | 2015年 3月 25日   |
|             |            |    |                | SG   | 11201407190T | A  | 2014年 12月 30日  |
| WO          | 2016014688 | A2 | 2016年 1月 28日   | EP   | 3171892      | A2 | 2017年 5月 31日   |
|             |            |    |                | SG   | 11201700496W | A  | 2017年 2月 27日   |
|             |            |    |                | KR   | 20170036016  | A  | 2017年 3月 31日   |
|             |            |    |                | AU   | 2015292678   | A1 | 2017年 2月 16日   |
|             |            |    |                | WO   | 2016014688   | A3 | 2016年 3月 24日   |
|             |            |    |                | CN   | 106573052    | A  | 2017年 4月 19日   |
|             |            |    |                | CA   | 2955788      | A1 | 2016年 1月 28日   |
| CN          | 102482347  | A  | 2012年 5月 30日   | US   | 2012207756   | A1 | 2012年 8月 16日   |
|             |            |    |                | CA   | 2749339      | A1 | 2010年 7月 15日   |
|             |            |    |                | US   | 8513390      | B2 | 2013年 8月 20日   |
|             |            |    |                | US   | 8563269      | B2 | 2013年 10月 22日  |
|             |            |    |                | WO   | 2010081173   | A3 | 2010年 11月 4日   |
|             |            |    |                | WO   | 2010081173   | A2 | 2010年 7月 15日   |
|             |            |    |                | CN   | 102482347    | B  | 2017年 4月 26日   |
|             |            |    |                | JP   | 2012514982   | A  | 2012年 7月 5日    |
|             |            |    |                | US   | 2013309230   | A1 | 2013年 11月 21日  |
|             |            |    |                | EP   | 2385955      | A2 | 2011年 11月 16日  |
|             |            |    |                | JP   | 5851842      | B2 | 2016年 2月 3日    |
|             |            |    |                | AU   | 2010203353   | B2 | 2016年 6月 16日   |
|             |            |    |                | CN   | 106995495    | A  | 2017年 8月 1日    |
|             |            |    |                | US   | 2012149061   | A1 | 2012年 6月 14日   |
|             |            |    |                | RU   | 2011133819   | A  | 2013年 2月 20日   |
|             |            |    |                | US   | 2010189651   | A1 | 2010年 7月 29日   |
|             |            |    |                | EP   | 2385955      | A4 | 2013年 2月 13日   |
|             |            |    |                | US   | 2014024810   | A1 | 2014年 1月 23日   |
|             |            |    |                | US   | 2016228546   | A1 | 2016年 8月 11日   |
|             |            |    |                | BR   | PI1006141    | A2 | 2016年 2月 23日   |
|             |            |    |                | JP   | 2015193654   | A  | 2015年 11月 5日   |
|             |            |    |                | AU   | 2010203353   | A1 | 2011年 8月 11日   |
|             |            |    |                | US   | 9453078      | B2 | 2016年 9月 27日   |
|             |            |    |                | AU   | 2010203353   | A2 | 2011年 8月 11日   |
|             |            |    |                | US   | 2017081397   | A1 | 2017年 3月 23日   |
|             |            |    |                | AU   | 2016225810   | A1 | 2016年 9月 22日   |

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

## フロントページの続き

| (51) Int.Cl.             | F I            | テーマコード(参考) |
|--------------------------|----------------|------------|
| 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   |            |
| C 0 7 K 16/46 (2006.01)  | C 0 7 K 16/46  |            |
| A 6 1 K 39/395 (2006.01) | A 6 1 K 39/395 | T          |
| A 6 1 P 31/00 (2006.01)  | A 6 1 K 39/395 | U          |
| A 6 1 P 31/12 (2006.01)  | A 6 1 P 31/00  |            |
| A 6 1 P 31/04 (2006.01)  | A 6 1 P 31/12  |            |
| A 6 1 P 33/00 (2006.01)  | A 6 1 P 31/04  |            |
| A 6 1 P 31/14 (2006.01)  | A 6 1 P 33/00  |            |
| A 6 1 P 31/20 (2006.01)  | A 6 1 P 31/14  |            |
| A 6 1 P 31/18 (2006.01)  | A 6 1 P 31/20  |            |
| A 6 1 P 35/00 (2006.01)  | A 6 1 P 31/18  |            |
| A 6 1 P 37/04 (2006.01)  | A 6 1 P 35/00  |            |
| A 6 1 P 43/00 (2006.01)  | A 6 1 P 37/04  |            |
|                          | A 6 1 P 43/00  | 1 1 1      |

(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, JO, JP, KE, KG, KH, 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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

(74) 代理人 100111648

弁理士 梶並 順

(74) 代理人 100122437

弁理士 大宅 一宏

(74) 代理人 100209495

弁理士 佐藤 さおり

(72) 発明者 リ、キャン

中華人民共和国、シャンハイ 201203、ブドン・ニュー・エリア、ビボ・ロード ナンバー  
518、ルーム106

(72) 発明者 ツェン、ユンチェン

中華人民共和国、シャンハイ 201203、ブドン・ニュー・エリア、ビボ・ロード ナンバー  
518、ルーム106

(72) 発明者 ヤン、ル

中華人民共和国、シャンハイ 201203、ブドン・ニュー・エリア、ビボ・ロード ナンバー  
518、ルーム106

(72) 発明者 マ、シンル

中華人民共和国、シャンハイ 201203、ブドン・ニュー・エリア、ビボ・ロード ナンバー  
518、ルーム106

(72) 発明者 リ、ユアンリ

中華人民共和国、シャanghai 201203、プドン・ニュー・エリア、ピボ・ロード ナンバー  
518、ルーム106

Fターム(参考) 4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X CA25 CA44  
4C085 AA14 AA16 BB01 BB18 BB36 BB41 BB43 BB44 CC21 DD62  
EE01 GG01  
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 BA72 DA76 EA20 FA72 FA74