

(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2019-534034
(P2019-534034A)

(43) 公表日 令和1年11月28日(2019.11.28)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/13 (2006.01)	C12N 15/13 ZNA	4B064
CO7K 16/28 (2006.01)	CO7K 16/28	4B065
C12N 15/63 (2006.01)	C12N 15/63 Z	4C076
C12N 1/13 (2006.01)	C12N 1/13	4C084
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4C085

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 39 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-531512 (P2019-531512)
 (86) (22) 出願日 平成29年8月22日 (2017.8.22)
 (85) 翻訳文提出日 平成31年4月19日 (2019.4.19)
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2017/098465
 (87) 国際公開番号 W02018/036472
 (87) 国際公開日 平成30年3月1日 (2018.3.1)
 (31) 優先権主張番号 201610705763.5
 (32) 優先日 平成28年8月23日 (2016.8.23)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 中国 (CN)

(71) 出願人 519063026
 中山康方生物医▲薬▼有限公司
 AKESO BIOPHARMA, INC
 .
 中国▲広▼▲東▼省中山市火炬▲開▼▲發
 ▼区神▲農▼路6号
 6 Shennong Road, Torch Development Zone
 Zhongshan, Guangdong 528437 (CN)
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】抗PD1モノクローナル抗体、その医薬組成物およびその使用

(57) 【要約】

抗PD1モノクローナル抗体またはその抗原結合断片、その医薬組成物及びその使用。前記モノクローナル抗体の重鎖可変領域は、アミノ酸配列がSEQ ID NO : 9 - 11であるCDRを含み、及び/または、前記モノクローナル抗体の軽鎖可変領域は、アミノ酸配列がSEQ ID NO : 12 - 14であるCDRを含む。前記モノクローナル抗体は、PD1と特異的にうまく結合でき、特異的にPD1の生体に対する免疫抑制を取り除け、Tリンパ球を活性化させることができる。

【選択図】図2

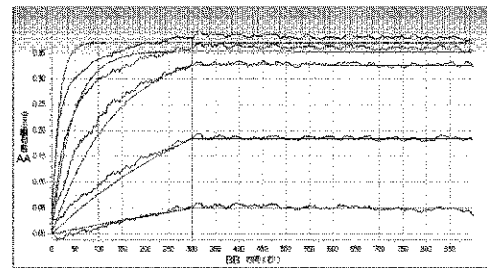


图 2
AA TIME (SECOND)
BB RESPONSE VALUE

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

モノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、
前記モノクローナル抗体の重鎖可変領域はアミノ酸配列が SEQ ID NO: 9 - 11
である CDR を含み、
及び/または、
前記モノクローナル抗体の軽鎖可変領域はアミノ酸配列が SEQ ID NO: 12 - 14
である CDR を含む、
モノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 2】

前記モノクローナル抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列が SEQ ID NO: 2 および
SEQ ID NO: 6 からなる群から選択され、
及び/または、
前記モノクローナル抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列が SEQ ID NO: 4 および
SEQ ID NO: 8 からなる群から選択される、
請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 3】

前記モノクローナル抗体またはその抗原結合断片が Fab、Fab'、F(ab')₂、
Fd、Fv、dAb、相補性決定領域断片、1 本鎖抗体（例えば scFv）、ヒト化抗体
、キメラ抗体またはダイアボディからなる群から選択されるものである、請求項 1 または
2 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 4】

前記モノクローナル抗体の PD1 タンパク質と結合する K_D が約 10⁻⁵ M 未満、例えば
、約 10⁻⁶ M、10⁻⁷ M、10⁻⁸ M、10⁻⁹ M または 10⁻¹⁰ M 未満またはそ
れ以下であり、好ましくは、前記 K_D が Fortebio 分子間相互作用機で測定される
、請求項 1 または 2 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 5】

前記モノクローナル抗体は、非 - CDR 領域を含み、かつ、前記非 - CDR 領域は、鼠類
以外の種由来、例えばヒト抗体由来である、請求項 1 または 2 に記載のモノクローナル抗
体またはその抗原結合断片。

【請求項 6】

前記モノクローナル抗体がハイブリドーマ細胞株 LT003 から産生したモノクローナル
抗体であり、前記ハイブリドーマ細胞株 LT003 が中国典型培養物保蔵センター (CC
TCC) に寄託され、受託番号が CCTCC NO: C2015105 である、請求項 1
または 2 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 7】

抗体の重鎖可変領域をコードすることが可能な核酸配列を含む単離核酸分子であって、
前記抗体の重鎖可変領域は、アミノ酸配列が SEQ ID NO: 9 - 11 である CDR
を含み、
好ましくは、前記抗体の重鎖が SEQ ID NO: 2 または SEQ ID NO: 6 で
示すアミノ酸配列を有し、
より好ましくは、前記核酸分子が SEQ ID NO: 1 または SEQ ID NO: 5
で示す塩基配列を有する、単離核酸分子。

【請求項 8】

抗体軽鎖可変領域をコードすることが可能な核酸配列を含む単離核酸分子であって、
前記抗体軽鎖可変領域は、アミノ酸配列が SEQ ID NO: 12 - 14 である CDR
を含み、
好ましくは、前記抗体軽鎖可変領域が SEQ ID NO: 4 または SEQ ID NO
: 8 で示すアミノ酸配列を有し、
より好ましくは、前記核酸分子が SEQ ID NO: 3 または SEQ ID NO: 7

10

20

30

40

50

で示す塩基配列を有する、単離核酸分子。

【請求項 9】

請求項 7 及び / または請求項 8 に記載の単離核酸分子を含むベクター。

【請求項 10】

請求項 7 及び / または請求項 8 に記載の単離核酸分子、あるいは、請求項 9 に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 6 の何れか一項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を調製する方法であって、請求項 10 に記載の宿主細胞を適切な条件で培養する工程、および、細胞培養物から前記モノクローナル抗体またはその抗原結合断片を回収する工程を含む、方法。

10

【請求項 12】

中国典型培養物保蔵センター (CCTCC) に寄託され、受託番号が CCTCC NO : C2015105 である、ハイブリドーマ細胞株 LT003。

【請求項 13】

モノクローナル抗体またはその抗原結合断片および複合部分を含む複合体であって、前記モノクローナル抗体は請求項 1 ~ 6 の何れか一項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であり、前記複合部分は検出可能な標識であり、好ましくは、前記複合部分が放射性同位体、蛍光物質、発光性物質、色素または酵素である、複合体。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 6 の何れか一項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片、あるいは、請求項 13 に記載の複合体を含むキットであって、好ましくは、前記キットが前記モノクローナル抗体またはその抗原結合断片を特異的に認識する第 2 抗体をさらに含み、任意的に、前記第 2 抗体が検出可能な標識、例えば放射性同位体、蛍光物質、発光性物質、色素または酵素をさらに含む、キット。

20

【請求項 15】

試料中の PD1 の存在またはそのレベルを検出するために用いられるキットの製造における、請求項 1 ~ 6 の何れか一項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片あるいは請求項 13 に記載の複合体の使用。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 6 の何れか一項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片あるいは請求項 13 に記載の複合体を含み、さらに、薬学的に許容されるベクター及び / または賦形剤をに任意的に含む、医薬組成物。

30

【請求項 17】

腫瘍または貧血を、予防および / または治療、あるいは、診断する薬剤の調製における、請求項 1 ~ 6 の何れか一項に記載のモノクローナル抗体もしくはその抗原結合断片あるいは請求項 13 に記載の複合体の使用であって、好ましくは、前記腫瘍が、メラノーマ、腎臓腫瘍、前立腺癌、膀胱癌、結腸直腸癌、消化器癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌および白血病からなる群から選択されるものである、使用。

40

【請求項 18】

請求項 1 ~ 6 の何れか一項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片あるいは請求項 13 に記載の複合体の、

PD1 のリガンドへの PD1 の結合を遮断する薬剤、

PD1 の活性またはレベルを制御 (例えば下方制御) する薬剤、

PD1 の生体に対する免疫抑制を取り除く薬剤、あるいは、

Tリンパ球における IFN- γ 及び / または IL-2 の発現を増加させる薬剤

の調製における使用であって、

好ましくは、前記 PD1 のリガンドが PDL1 または PDL2 であり、より好ましくは PDL1 である、使用。

50

【請求項 19】

有効量の請求項 1 ~ 6 の何れか一項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片あるいは請求項 13 に記載の複合体を、細胞またはニーズがある被験者にインビボまたはインビトロで投与することを含む、

PD1 のリガンドへの PD1 の結合を遮断する方法、

PD1 の活性またはレベルを制御（例えば下方制御）する方法、

PD1 の生体に対する免疫抑制を取り除く方法、あるいは、

Tリンパ球における IFN- γ 及び/または IL-2 の発現を増加させる方法、

からなる群から選択される方法であって、

好ましくは、前記 PD1 のリガンドが PDL1 または PDL2 であり、より好ましくは、

PDL1 である、方法。

10

【請求項 20】

腫瘍または貧血を、予防および/または治療、あるいは、診断するために用いられる、請求項 1 ~ 6 の何れか一項に記載のモノクローナル抗体もしくはその抗原結合断片あるいは請求項 13 に記載の複合体であって、好ましくは、前記腫瘍が、メラノーマ、腎臓腫瘍、前立腺癌、膀胱癌、結腸直腸癌、消化器癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌および白血病からなる群から選択されるものである、請求項 1 ~ 6 の何れか一項に記載のモノクローナル抗体もしくはその抗原結合断片あるいは請求項 13 に記載の複合体。

【請求項 21】

PD1 のリガンドへの PD1 の結合を遮断すること、

PD1 の活性またはレベルを制御（例えば下方制御）すること、

PD1 の生体に対する免疫抑制を取り除くこと、あるいは、

Tリンパ球における IFN- γ 及び/または IL-2 の発現を増加させること、

に用いられる、請求項 1 ~ 6 の何れか一項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片あるいは請求項 13 に記載の複合体であって、

好ましくは、前記 PD1 のリガンドが PDL1 または PDL2 であり、より好ましくは、

PDL1 である、請求項 1 ~ 6 の何れか一項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片あるいは請求項 13 に記載の複合体。

20

【請求項 22】

有効量の請求項 1 ~ 6 の何れか一項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片あるいは請求項 13 に記載の複合体を、ニーズがある被験者に投与することを含む、腫瘍または貧血を、予防および/または治療、あるいは、診断する方法であって、

好ましくは、前記腫瘍が、メラノーマ、腎臓腫瘍、前立腺癌、膀胱癌、結腸直腸癌、消化器癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌および白血病からなる群から選択されるものである、方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、腫瘍治療および分子免疫学の分野に属し、抗 PD1 抗体、その医薬組成物およびその使用に関する。具体的に、本発明は抗 PD1 モノクローナル抗体に関する。

40

【背景技術】

【0002】

膜貫通受容体 PD1 (programmed cell death 1、プログラム細胞死因子 1、PD-1 とも略称される。) は CD28 遺伝子ファミリーの一員であり、活性化 T 細胞、B 細胞、および骨髄系細胞のいずれにおいても発現される。PD1 の受容体 PDL1 および PDL2 はいずれも B7 スーパーファミリーに属し、そのうち、PDL1 は T 細胞、B 細胞、内皮細胞および上皮細胞を含む様々な細胞において発現され、PDL2 は樹状細胞およびマクロファージなどの抗原提示細胞においてのみ発現される。

50

【0003】

T細胞はウイルス感染の除去に非常に重要な役割を果たすが、T細胞の抗ウイルス反応は、通常、免疫病理学と関連している。PD1はT細胞の活性化に対する負的制御に非常に重要な役割を果たし、T細胞に対するPD1を介した負的制御は感染によって引き起こされる組織損傷を減らすことができるが、PD1の負的制御を遮断または阻害すると、自己免疫疾患を引き起こす可能性がある。例えば、PD1ノックアウトマウスは膵臓ウイルス感染の除去により効果的であるが、より重篤な肝障害を引き起こす(Isai et al., 2003, J. Exp. Med. 198:39-50)。また、PD1を高度に発現する腫瘍は一般的に検出が困難な癌を形成する(Hamanishi et al., 2007, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104:3360-5)。インビボで抗体を注射することによってPD1の発現をコントロールする方法は、有効的な方法である。

10

【0004】

PD1抗体は広範囲の抗腫瘍の予想および素晴らしい効果を有するため、PD1経路を標的とする抗体が様々な腫瘍の治療において飛躍的な進歩をもたらすことは、業界で広く受け入れられており、例えば、非小細胞肺癌、腎細胞がん、卵巣がん、黒色腫の治療に用いられ(Homet M. B., Parisi G., et al., Anti-PD1 Therapy in Melanoma. Semin Oncol. 2015 Jun; 42(3):466-473)、白血病および貧血の治療に用いられる(Held SA, Heine A, et al., Advances in immunotherapy of chronic myeloid leukemia CML. Curr Cancer Drug Targets. 2013 Sep; 13(7):768-74)。

20

【0005】

2012年と2013年のアメリカ癌学会(AACR)の年次総会及びアメリカ臨床腫瘍学会(ASCO)の年次総会で、これまでにない臨床効果データが発表された後、PD1抗体は世界の製薬業界で最も熱く研究される新薬になる。

現在、PD1のPDL1への結合を効果的に遮断するために、より良い結合効率を有する新しい抗PD1抗体を開発する必要がある。

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Isai et al., 2003, J. Exp. Med. 198:39-50

【非特許文献2】Hamanishi et al., 2007, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104:3360-5

【非特許文献3】Homet M. B., Parisi G., et al., Anti-PD1 Therapy in Melanoma. Semin Oncol. 2015 Jun; 42(3):466-473

【非特許文献4】Held SA, Heine A, et al., Advances in immunotherapy of chronic myeloid leukemia CML. Curr Cancer Drug Targets. 2013 Sep; 13(7):768-74

40

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、鋭意研究および創造的な取り組みを施した後、哺乳動物細胞発現系を用いて発現した組み換えPD1を免疫マウスへの抗原として使用し、マウス脾臓細胞を骨髓腫細胞と融合させることによってハイブリドーマ細胞を得た。本発明者らは、多数の試料をスクリーニングすることによってハイブリドーマ細胞株LT003を得た(受託番号:C

50

CTCC NO: C2015105)。

【0008】

驚くべきことに、本発明者らは、ハイブリドーマ細胞株LT003がPD1に特異的に結合する特異的モノクローナル抗体(14C12と命名)を分泌することができ、そして当該モノクローナル抗体がPDL1へのPD1の結合を非常に有効的に遮断できることを見出した。

【0009】

さらに、本発明者らは、創造的に、抗PD1のヒト化抗体(14C12H1L1と命名)を作製した。

そして、本発明者らはまた、驚くべきことに、本発明の抗体14C12、14C12H1L1がヒトT細胞に有効的に結合し、T細胞を活性化してヒトリンパ球によるIFN- γ およびIL-2の分泌を誘導できることを見出した。本発明の抗体14C12および14C12H1L1は、肺癌、黒色腫、腎臓腫瘍、卵巣癌、白血病などの癌及び貧血を予防・治療する薬物を調製するために用いられる可能性を有する。

【0010】

したがって、次の発明を提供する。

【0011】

本発明のある態様は、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、前記のモノクローナル抗体の重鎖可変領域(V_H)は、アミノ酸配列がSEQ ID NO: 9 - 11であるCDRを含み、

及び/または、

前記のモノクローナル抗体の軽鎖可変領域(V_L)は、アミノ酸配列がSEQ ID NO: 12 - 14であるCDRを含むモノクローナル抗体またはその抗原結合断片に関する。

本発明の実施形態の何れか1つによる、前記のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片において、

前記のモノクローナル抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 2およびSEQ ID NO: 6からなる群から選択され、

及び/または、

前記のモノクローナル抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 4およびSEQ ID NO: 8からなる群から選択されるものである。

【0012】

本発明の実施形態の1つによる、前記のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片において、

前記のモノクローナル抗体は、

(1) SEQ ID NO: 2で示す V_H およびSEQ ID NO: 4で示す V_L ;

(2) SEQ ID NO: 6で示す V_H およびSEQ ID NO: 8で示す V_L

を含む。

【0013】

抗原の結合は、軽鎖および重鎖の可変領域に依存し、各鎖の可変領域は、いずれも相補性決定領域(CDR)と呼ばれる3つの超可変領域を含む(重鎖(H)のCDRは、HC DR1、HC DR2、HC DR3を含み、軽鎖(L)のCDRはLC DR1、LC DR2、LC DR3を含み;それらはKabataらに命名され、詳しくは、Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition (1991), Vol. 1-3, NIH Publication 91-3242, Bethesda Mdを参照のこと)。

【0014】

当業者によって周知の技術的手段によって、例えば、VBASE2データベースによって、前記の(1)-(2)のモノクローナル抗体配列におけるCDR領域のアミノ酸配列を分析した結果は、下記のとおりである。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 5 】

本発明の抗体 1 4 C 1 2、1 4 C 1 2 H 1 L 1 は、同じ C D R を有する。
 その重鎖可変領域の 3 つの C D R 領域のアミノ酸配列は、下記のとおりである。
 H C D R 1 : G F A F S S Y D (S E Q I D N O : 9)、
 H C D R 2 : I S G G G R Y T (S E Q I D N O : 1 0)、
 H C D R 3 : A N R Y G E A W F A Y (S E Q I D N O : 1 1) ;
 その軽鎖可変領域の 3 つの C D R 領域のアミノ酸配列は、下記のとおりである。
 L C D R 1 : Q D I N T Y (S E Q I D N O : 1 2)、
 L C D R 2 : R A N (S E Q I D N O : 1 3)、
 L C D R 3 : L Q Y D E F P L T (S E Q I D N O : 1 4)。

10

【 0 0 1 6 】

本発明の実施形態の何れか 1 つによる、前記のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片において、
 前記のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、F a b、F a b'、F (a b')₂、F d、F v、d A b、相補性決定領域断片、1 本鎖抗体 (例えば、s c F v)、ヒト化抗体、キメラ抗体またはダイアボディからなる群から選ばれるものである。
 本発明の実施形態の何れか 1 つによる、前記のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片において、
 前記のモノクローナル抗体は、P D 1 タンパク質と結合する K_D が約 1 0⁻⁵ M 未満、例えば約 1 0⁻⁶ M、1 0⁻⁷ M、1 0⁻⁸ M、1 0⁻⁹ M または 1 0⁻¹⁰ M 未満または
 それ以下であり、好ましくは、前記 K_D は F o r t e b i o 分子間相互作用機で測定される。

20

【 0 0 1 7 】

本発明の実施形態の何れか 1 つによる、前記のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片において、
 前記のモノクローナル抗体は、P D 1 タンパク質と結合する E C₅₀ が約 1 0 0 n M 未満、例えば約 1 0 n M、1 n M、0 . 9 n M、0 . 8 n M、0 . 7 n M、0 . 6 n M、0 . 5 n M、0 . 4 n M、0 . 3 n M、0 . 2 n M、0 . 1 n M 未満またはそれ以下である。
 具体的に、前記 E C₅₀ は間接 E L I S A 法で測定される。

30

【 0 0 1 8 】

本発明の実施形態の何れか 1 つによる、前記のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片において、
 前記のモノクローナル抗体は、P D 1 タンパク質と結合する K_D が約 1 0⁻⁵ M 未満、例えば約 1 0⁻⁶ M、1 0⁻⁷ M、1 0⁻⁸ M、1 0⁻⁹ M または 1 0⁻¹⁰ M 未満またはそれ以下である。
 本発明の実施形態の何れか 1 つによる、前記のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片において、
 前記のモノクローナル抗体は、非 - C D R 領域を含み、かつ、前記の非 - C D R 領域は、鼠類以外の種由来、例えばヒト抗体由来である。
 本発明の実施形態の何れか 1 つによる、前記のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片において、
 前記のモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ細胞株 L T 0 0 3 から産生したモノクローナル抗体であり、前記のハイブリドーマ細胞株 L T 0 0 3 は、中国典型培養物保蔵センター (C C T C C) に寄託され、受託番号は C C T C C N O : C 2 0 1 5 1 0 5 である。
 本発明の別の態様は、抗体の重鎖可変領域をコードすることが可能な核酸配列を含む単離核酸分子であって、
 前記の抗体の重鎖可変領域は、アミノ酸配列が S E Q I D N O : 9 - 1 1 である C D R を含み、
 具体的に、前記の抗体の重鎖は、S E Q I D N O : 2 または S E Q I D N O : 6 で示すアミノ酸配列を有し、

40

50

さらに具体的に、前記の核酸分子は、SEQ ID NO: 1またはSEQ ID NO: 5で示す塩基配列を有する、単離核酸分子に関する。

【0019】

本発明のもう一つの態様は、抗体の軽鎖可変領域をコードすることが可能な核酸配列を含む単離核酸分子であって、

前記の抗体の軽鎖可変領域は、アミノ酸配列がSEQ ID NO: 12 - 14であるCDRを含み、

具体的に、前記の抗体の軽鎖可変領域は、SEQ ID NO: 4またはSEQ ID NO: 8で示すアミノ酸配列を有し、

さらに具体的に、前記の核酸分子は、SEQ ID NO: 3またはSEQ ID NO: 7で示す塩基配列を有する、単離核酸分子に関する。

本発明のさらなる態様は、本発明の実施形態の何れか1つによる単離核酸分子を含むベクターに関する。

【0020】

本発明のさらなる態様は、本発明の実施形態の何れか1つによる単離核酸分子または本発明によるベクターを含む宿主細胞に関する。

【0021】

本発明のさらなる態様は、本発明の実施形態の何れか1つによる、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片を調製する方法であって、本発明の宿主細胞を適切な条件下で培養する工程、および、細胞培養物から前記モノクローナル抗体またはその抗原結合断片を回収する工程を含む方法に関する。

【0022】

本発明のさらなる態様は、中国典型培養物保蔵センター(CCTCC)に寄託され、受託番号がCCTCC NO: C2015105である、ハイブリドーマ細胞株LT003に関する。

【0023】

本発明のさらなる態様は、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片および複合部分を含む複合体であって、前記モノクローナル抗体は、本発明の実施形態の何れか1つによるモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であり、前記複合部分は検出可能な標識であり、具体的に、前記複合部分は、放射性同位体、蛍光物質、発光性物質、色素または酵素である、複合体に関する。

【0024】

本発明のさらなる態様は、本発明の実施形態の何れか1つによるモノクローナル抗体またはその抗原結合断片あるいは本発明による複合体を含むキットであって、

具体的に、前記キットは、前記のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を特異的に認識する第2抗体をさらに含み；任意的に、前記第2抗体は、検出可能な標識、例えば放射性同位体、蛍光物質、発光性物質、色素または酵素をさらに含む、キットに関する。

【0025】

本発明のさらなる態様は、試料中のPD1の存在またはそのレベルを検出するために用いられるキットの製造における、本発明の実施形態の何れか1つによるモノクローナル抗体またはその抗原結合断片あるいは本発明による複合体の使用に関する。

【0026】

本発明のさらなる態様は、本発明の実施形態の何れか1つによるモノクローナル抗体またはその抗原結合断片あるいは本発明による複合体を含み、さらに薬学的に許容されるベクター及び/または賦形剤を含んでいてもよい、医薬組成物に関する。

【0027】

本発明のさらなる態様は、腫瘍または貧血を、予防および/または治療および/または補助治療および/または診断する薬剤の調製における、本発明の実施形態の何れか1つによるモノクローナル抗体またはその抗原結合断片あるいは本発明による複合体の使用であって、具体的に、前記腫瘍が、メラノーマ、腎臓腫瘍、前立腺癌、膀胱癌、結腸直腸癌、消

10

20

30

40

50

化器癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌および白血病からなる群から選択される、使用に関する。

【0028】

発明者らは、動物試験で14C12H1L1がPD-1 HuGEMMマウス右側皮下で接種したMC38腫瘍細胞の成長を効果的に抑制できることを発見した。抗体薬剤14C12H1L1を投与することによって、PD-1 HuGEMM担癌マウス腫瘍体積の増加を著しく抑制でき、薬力学的効果が市販されているターゲットが同じである薬剤Nivolumabモノクローナル抗体に相当すると示されている。

【0029】

本発明のさらなる態様は、本発明の実施形態の何れか1つによるモノクローナル抗体またはその抗原結合断片あるいは本発明による複合体の、
PD1のリガンドへのPD1の結合を遮断する薬剤、
PD1の活性またはレベルを制御（例えば下方制御）する薬剤、
PD1の生体に対する免疫抑制を取り除く薬剤、あるいは、
Tリンパ球におけるIFN- γ 及び/またはIL-2の発現を増加させる薬剤
の調製における使用であって、
具体的に、前記PD1のリガンドがPDL1またはPDL2であり、好ましくはPDL1である、使用に関する。

10

【0030】

本発明のさらなる態様は、有効量の本発明の実施形態の何れか1つによるモノクローナル抗体またはその抗原結合断片あるいは本発明による複合体を、細胞またはニーズがある被験者にインビボまたはインビトロで投与することを含む、
PD1のリガンドへのPD1の結合を遮断する方法、
PD1の活性またはレベルを制御（例えば下方制御）する方法、
PD1の生体に対する免疫抑制を取り除く方法、あるいは、
Tリンパ球におけるIFN- γ 及び/またはIL-2の発現を増加させる方法、
からなる群から選択される方法であって、
具体的に、前記PD1のリガンドがPDL1またはPDL2であり、好ましくは、PDL1である、方法に関する。

20

【0031】

本発明のある具体的な実施形態において、前記インビトロ方法は、非治療目的または診断目的の方法である。

30

【0032】

インターフェロン（IFN γ ）は、主にナチュラルキラー細胞（NK）、ナチュラルキラーT細胞（NKT）から自然に生成されるもの、および、CD4⁺Th1細胞とCD8⁺細胞障害性Tリンパ球のようなエフェクターT細胞から特定の抗原による刺激を経た後産生したものがあある。IFN γ は、重要な先天性および後天性免疫サイトカインとして、ウイルス、ある細菌感染および原虫感染との戦いまたは抑制において重要な役割を果たす。同時に、IFN γ は、マクロファージを活性化し、クラスII主要組織適合遺伝子複合体（MHC）の発現を誘導して、免疫反応を活性化し、腫瘍の発達を制御することができる（Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of Interferon- γ During Innate and Adaptive Immune Responses. *Advances in Immunology* 2007; 96: 41-101）。本発明のインビトロ試験において、抗体anti-PD1抗体は、IFN γ の分泌を誘導して免疫反応を活性化することができる。

40

【0033】

インターロイキン2（IL-2）はT細胞から産生され、T細胞サブセットを調節する成長因子であり、また免疫応答を調節する重要な因子であり、そして活性化B細胞の増殖を促進し、抗体反応、造血および腫瘍監視に関与することができる。組換えヒトIL-2は悪性腫瘍（メラノーマ、腎臓腫瘍などを含む）の治療に米国FDAによって承認されてお

50

り、慢性ウイルス感染症の治療に臨床研究を受けている (Chavez, A. R., et al., Pharmacologic administration of interleukin-2. Ann N Y Acad Sci, 2009. 1182: p. 14-27)。インビトロ試験において、本発明のPD1抗体は、PD1の生体に対する免疫抑制を特異的に取り除き、T細胞を活性化し、IL-2産生を誘導し、抗腫瘍および寄生虫症などの疾患の遺伝子治療において広い応用見通しを有する。

【0034】

本発明の実施形態の何れか1つによるモノクローナル抗体またはその抗原結合断片あるいは複合体によれば、腫瘍または貧血を、予防および/または治療および/または補助治療および/または診断することに用いられる。具体的に、前記腫瘍が、メラノーマ、腎臓腫瘍、前立腺癌、膀胱癌、結腸直腸癌、消化器癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌および白血病からなる群から選択されるものである。

10

【0035】

本発明の実施形態の何れか1つによるモノクローナル抗体またはその抗原結合断片あるいは複合体によれば、

PD1のリガンドへのPD1の結合を遮断すること、
PD1の活性またはレベルを制御(例えば下方制御)すること、
PD1の生体に対する免疫抑制を取り除くこと、あるいは、
Tリンパ球におけるIFN- γ 及び/またはIL-2の発現を増加させること、
に用いられ、

20

具体的に、前記PD1のリガンドはPDL1またはPDL2であり、好ましくは、PDL1である。

【0036】

本発明のある具体的実施形態において、本発明のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片あるいは複合体は、PDL1へのPD1の結合だけを遮断する。

【0037】

本発明のさらなる態様は、有効量の本発明の実施形態の何れか1つによるモノクローナル抗体またはその抗原結合断片あるいは本発明による複合体を、被験者に投与することを含む、腫瘍または貧血を、予防および/または治療及び/または補助治療及び/または診断する方法であって、具体的に、前記腫瘍が、メラノーマ、腎臓腫瘍、前立腺癌、膀胱癌、結腸直腸癌、消化器癌、肝臓癌、非小細胞肺癌、卵巣癌および白血病からなる群から選択される、方法に関する。

30

【0038】

本発明において、別段の指定のない限り、本明細書中で使用される科学用語および技術用語は、当業者により一般的に理解されるものと同じ意味を有する。さらに、本明細書中で使用される細胞培養、分子遺伝学、核酸化学、免疫学の試験室操作の手順は、いずれも関連技術分野で広く利用される一般的なものである。同時に、本発明をより良く理解する目的のために、関連用語の定義および説明を以下で提供する。

本明細書中で使用される場合、PD1タンパク質(Programmed cell death protein 1、NCBI GenBank: NP_005009.2)のアミノ酸配列を言うと、PD1タンパク質の全長、又はPD1の細胞外断片PD1ECD、または、PD1ECDを含有する断片を含み、さらにPD1ECDの融合タンパク質、例えばマウスまたはヒトIgGのFcタンパク質断片(mFcまたはhFc)と融合した断片を含む。しかし、当業者は、PD1タンパク質のアミノ酸配列において突然変異または変形(置換、欠失、および/または付加を含むがこれらに限定されない)が、それらの生物学的機能に影響を及ぼすことなく、自然にまたは人工的に起こり得ると理解できる。したがって、本発明において、「PD1タンパク質」という用語には、そのような配列のすべて、ならびに、それらの天然または人工の変異体が含まれるべきである。また、PD1タンパク質の配列断片を記載するとき、それは配列断片だけでなくその天然または人工の変異体における対応配列断片も含む。

40

50

本明細書中で使用される場合、PDL1タンパク質 (Programmed death - ligand 1、NCBI Genebank ID: NP_054862.1) のアミノ酸配列を言うと、PDL1タンパク質の全長、又はPDL1の細胞外断片PDL1ECD、または、PDL1ECDを含有する断片を含み、さらに、PDL1ECDの融合タンパク質、例えばマウスまたはヒトIgGのFcタンパク質断片 (mFcまたはhFc) と融合した断片を含む。しかし、当業者は、PDL1タンパク質のアミノ酸配列において突然変異または変形 (置換、欠失、および/または付加を含むがこれらに限定されない) は、それらの生物学的機能に影響を及ぼすことなく、自然にまたは人工的に起こり得ると理解できる。したがって、本発明において、「PDL1タンパク質」という用語には、そのような配列のすべて、ならびに、それらの天然または人工の変異体が含まれるべきである。また、PDL1タンパク質の配列断片を記載するとき、それはPDL1配列断片だけでなくその天然または人工の変異体における対応する配列断片も含む。

10

【0039】

本明細書中で使用される場合、EC₅₀という用語は、最大効果の50%に対する濃度 (concentration for 50% of maximal effect) 、すなわち最大効果の50%を引き起こす濃度を指す。

【0040】

本明細書中で使用される場合、「抗体」という用語は、一般的に2対のポリペプチド鎖 (各対は「軽」(L)鎖および「重」(H)鎖を有する。) からなる免疫グロブリン分子を指す。抗体軽鎖は、 および 軽鎖として分類され得る。重鎖はμ、 、 または として分類され得、抗体のアイソタイプはそれぞれIgM、IgD、IgG、IgAおよびIgEとして定められる。軽鎖および重鎖内で、可変領域および定常領域は、約12つ以上のアミノ酸の「J」領域を介して連結され、重鎖は約3つ以上のアミノ酸の「D」領域をさらに含む。各重鎖は、重鎖可変領域 (V_H) および重鎖定常領域 (C_H) からなる。重鎖定常領域は、3つのドメイン (C_{H1}、C_{H2}およびC_{H3}) からなる。各軽鎖は、軽鎖可変領域 (V_L) および軽鎖定常領域 (C_L) からなる。軽鎖定常領域はC_Lドメインからなる。抗体の定常領域は、免疫系の様々な細胞 (例えばエフェクター細胞) および古典的な補体系の第一の構成成分 (C1q) を含め、宿主組織また因子への免疫グロブリンの結合に介在し得る。V_HおよびV_L領域は、比較的保存されるフレームワーク領域 (FR) と呼ばれる領域に散在する高い可変性を有する領域 (相補性決定領域 (CDR) と呼ばれる。) にさらに細かく分けられ得る。各V_HまたはV_Lは、アミノ末端からカルボキシ末端へと次の順序: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4で並んでいる、3つのCDRおよび4つのFRからなる。重鎖/軽鎖の各対の可変領域 (V_HおよびV_L) は抗体結合部位をそれぞれ形成する。各領域またはドメインに対するアミノ酸の割り当ては、Kabats Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987および1991)) またはChothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901 - 917; Chothiaら (1989) Nature 342: 878 - 883で提供される定義に従う。「抗体」という用語は、抗体を産生させるための何らかの具体的な方法に限定されない。例えば、これは、特に、組み換え抗体、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を含む。抗体は、異なるアイソタイプの抗体、例えばIgG (例えばIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4サブタイプ)、IgA1、IgA2、IgD、IgEまたはIgM抗体であり得る。

20

30

40

【0041】

本明細書中で使用される場合、抗体の「抗原結合断片」という用語は、全長抗体が結合する抗原と同じ抗原に特異的に結合する能力を保持する、および/または抗原への特異的な結合について全長抗体と競合する全長抗体の断片を含むポリペプチドを指す。これは、「抗原結合部分」とも呼ばれる。全般的には、全ての目的に対してその全体において引用により本明細書中に組み込まれる、Fundamental Immunology, Ch

50

. 7 (Paul , W . e d . , S e c o n d E d i t i o n , R a v e n P r e s s , N . Y . (1 9 8 9)) を参照のこと。抗体の抗原結合断片は、組み換えDNA技術またはインタクトな抗体の酵素的もしくは化学的切断により作製され得る。いくつかの場合において、抗原結合断片は、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAbおよび相補性決定領域(CDR)断片、1本鎖抗体(例えば、scFv)、キメラ抗体、ダイアボディ(diabody)および、特異的抗原結合能を付与するのに十分な抗体の少なくとも一部を含むポリペプチドを含む。

【0042】

いくつかの場合において、抗体の抗原結合断片は、ダイアボディ(2価抗体)であり、ここでV_HおよびV_Lドメインは、単一のポリペプチド鎖上で発現されるが、利用されるリンカーは、短すぎて同じ鎖上の2つのドメインが互いに対形成できないので、別の鎖上の相補的なドメインと対形成せざるを得ず、2つの抗原結合部位が形成される(例えば、Holliger P.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448(1993)およびPoljak R. J.ら、Structure 2:1121-1123(1994)を参照のこと。)

10

【0043】

抗体の抗原結合断片(例えば、上記の抗体断片)は、当業者にとって公知の通常技術(例えば、組み換えDNA技術または酵素的もしくは化学的切断法)を用いて、所定の抗体(例えば本発明において提供されるモノクローナル抗体14C12、14C12H1L1)から得ることができ、インタクト抗体の場合と同じように特異性についてスクリーニングし得る。

20

【0044】

本明細書中で、文脈において明らかに指定されない限り、「抗体」という用語について申し述べる場合、インタクトな抗体を含むだけでなく、抗体の抗原結合断片も含む。

【0045】

本明細書中で使用される場合、「単抗」または「モノクローナル抗体」という用語は、高度に相同性を有する抗体分子の集団からの抗体または抗体断片を指し、すなわち、可能性のある天然の突然変異を除き、完全に同一の抗体分子の集団である。単抗は、抗原上の単一のエピトープに非常に高い特異性を有する。モノクローナル抗体とは対照的に、ポリクローナル抗体は、一般的には、抗原上の異なるエピトープを認識する少なくとも2つ以上の異なる抗体を含む。モノクローナル抗体は、一般的に、最初にKohlerらにより報告されたハイブリドーマ技術(Nature, 256:495, 1975)を用いて得ることができるが、組み換えDNA技術(例えば米国特許第4,816,567号を参照のこと。)を使用して得ることもできる。

30

【0046】

本明細書中で使用される場合、「ヒト化抗体」という用語は、ヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)の全てのまたは一部のCDRを非ヒト抗体(ドナー抗体)のCDR領域で置き換えた後に得られた抗体または抗体断片を指し、そのうち、ドナー抗体は、所望の特異性、親和性または反応性を有する非ヒト(例えばマウス、ラットまたはウサギ)抗体であり得る。さらに、レシピエント抗体のフレームワーク領域(FR)の一部のアミノ酸残基も、抗体の性能をさらに向上させるかまたは最適化するように対応する非ヒト抗体のアミノ酸残基または他の抗体のアミノ酸残基で置き換えられ得る。ヒト化抗体に関するより詳細な説明については、例えばJonesら、Nature, 321:522-525(1986); Reichmannら、Nature, 332:323-329(1988); Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596(1992); およびClark, Immunol. Today 21:397-402(2000)を参照のこと。

40

【0047】

本明細書中で使用される場合、「単離されている」又は「単離される」という用語は、人工的手段によってネイティブ状態から得られていることを意味する。自然界にある「単離

50

されている」物質または構成成分が生じる場合、それが位置する天然の環境が変化しているか、または当該物質が天然の環境から単離されているか、またはその両方であると考えられる。例えば、ある単離されていないポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、ある生きている動物の体に天然に存在し、このような天然の状態から単離される高純度の同一のポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、「単離されている」ものとされる。「単離されている」又は「単離される」という用語は、人工的または合成物質との混合物を排除せず、物質の活性に影響を与えない他の不純物の存在も排除しない。

【0048】

本明細書中で使用される場合、「ベクター (vector)」という用語は、ポリヌクレオチドが挿入され得る核酸送達ビヒクルを指す。ベクターが、挿入されたポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質の発現を可能にする場合、そのベクターは、発現ベクターと呼ばれる。ベクターは、ベクターにより保有される遺伝物質構成要素が宿主細胞で発現されるように、形質転換、形質導入またはトランスフェクションによって宿主細胞に導入することができる。ベクターは、当業者にとって周知であり、プラスミド；ファージミド；コスミド；酵母人工染色体 (YAC)、細菌人工染色体 (BAC) または P1 - 由来人工染色体 (PAC) のような人工染色体；例えば ファージまたは M13 ファージなどのバクテリオファージならびに動物ウイルスなどが含まれるがこれらに限定されない。ベクターとして使用し得る動物ウイルスは、レトロウイルス (レンチウイルスを含む。)、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス (例えば単純ヘルペスウイルス)、ポックスウイルス、バキュロウイルス、パピローマウイルス、パポバウイルス (例えば SV40) が含まれるがこれらに限定されない。ベクターは、プロモーター配列、転写開始配列、エンハンサー配列、選択構成要素およびレポーター遺伝子を含むがこれらに限定されない、発現を調節するための複数の構成要素を含み得る。さらに、ベクターは、複製開始サイトも含み得る。

10

20

【0049】

本明細書中で使用される場合、「宿主細胞」という用語は、ベクターの導入のために使用し得る細胞を指し、例えば E. コリ (E. coli) または バチルス・サブチリス (Bacillus subtilis) などの原核細胞、例えば酵母細胞またはアスペルギルス (Aspergillus) などの真菌細胞、例えば S2 ショウジョウバエ細胞もしくは Sf9 などの昆虫細胞、または、例えば線維芽細胞、CHO 細胞、COS 細胞、NSO 細胞、HeLa 細胞、BHK 細胞、HEK293 細胞またはヒト細胞などの動物細胞が含まれるがこれらに限定されない。

30

【0050】

本明細書中で使用される場合、「特異的な結合」という用語は、2つの分子間の非無作為結合反応、例えば抗体とその標的抗原との間の反応を指す。いくつかの実施形態において、ある抗原に特異的に結合する抗体 (またはある抗原に特異的な抗体) は、抗体が約 10^{-5} M 未満、例えば約 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M または 10^{-10} M 未満またはそれ以下の親和性 (K_D) で抗原に結合することを意味する。

【0051】

本明細書中で使用される場合、「 K_D 」という用語は、抗体と抗原との間の結合親和性を表現する特定の抗体 - 抗原相互作用の解離平衡定数を指す。解離平衡定数が小さいほど、抗体 - 抗原結合が堅固であり、抗体と抗原との間の親和性が高くなる。一般的に、抗体 (例えば、本発明のモノクローナル抗体 14C12、14C12H1L1) は、約 10^{-5} M 未満、例えば約 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M または 10^{-10} M 未満またはそれ以下の解離平衡定数 (K_D) で抗原 (例えば、PD1 タンパク質) と結合する。 K_D は、当業者が周知した方法、例えば、Fortebio 分子間相互作用機で測定される。

40

【0052】

本明細書中で使用される場合、「モノクローナル抗体」および「単抗」という用語は同じ意味を有し、交換可能に使用され得る。また、「ポリクローナル抗体」および「マルチ抗

50

体」という用語は同じ意味を有し、交換可能に使用され得る。また、「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は同じ意味を有し、交換可能に使用され得る。さらに、本発明において、アミノ酸は一般的に、本分野で周知の、1文字または3文字略号により表される。例えば、アラニンはAまたはAlaで表し得る。

【0053】

本明細書中で使用される場合、「ハイブリドーマ」および「ハイブリドーマ細胞株」という用語は、交換可能に使用され得る。さらに、「ハイブリドーマ」または「ハイブリドーマ細胞株」という用語について申し述べる場合、これは、ハイブリドーマのサブクローンおよび子孫細胞も含む。例えば、ハイブリドーマ細胞株LT003について申し述べる場合、これは、ハイブリドーマ細胞株LT003のサブクローンおよび子孫細胞も指す。

10

【0054】

本明細書中で使用される場合、「医薬的に許容可能なベクターおよび/または賦形剤」という用語は、薬理学および/または生理学において被験者および活性のある構成要素と相溶性を有するベクターおよび/または賦形剤を指し、これらは当技術分野で周知であり(例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro AR編, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995を参照のこと。)、pH調整剤、界面活性剤、アジュバント、イオン強度促進剤が含まれるがこれらに限定されない。例えば、pH調整剤としてはリン酸緩衝液が含まれるがそれに限定されず;界面活性剤としては陽イオン性、陰イオン性または非イオン性界面活性剤、例えばTween-80が含まれるがこれらに限定されず;イオン強度促進剤としては塩化ナトリウムが含まれるがそれに限定されない。

20

【0055】

本明細書中で使用される場合、「有効量」という用語は、所望の効果を達成するかまたは少なくとも一部達成するのに十分な量を指す。例えば、疾患(例えば腫瘍)に対する予防的有効量は、疾患(例えば腫瘍)の発症を防ぐか、抑止するかまたは遅延させるのに十分である量を指し;疾患に対する治療的有効量は、疾患に罹患している患者において疾患およびその合併症を治癒させるか少なくとも部分的に抑止するのに十分な量を指す。このような有効量を測定することは十分に当業者の技術の範囲内である。例えば、治療用途の有効量は、治療しようとする疾患の重症度、患者の自己免疫系の全般的状況、患者の全般的状況、例えば年齢、体重および性別、薬剤の投与形式、同時に行われる他の治療などに依存する。

30

【0056】

【発明の効果】

【0057】

本発明のモノクローナル抗体、特に14C12H1L1は、PD1と特異的によく結合でき、かつ、PD1のPDL1との結合を非常に効果的に遮断でき、PD1の生体に対する免疫抑制を特異的に取り除け、Tリンパ球を活性化させることができる。そのうち、PD1抗体14C12H1L1は、IFN- γ とIL-2の分泌を誘導する効果が対照抗体5C4(5C4:PD1 antibody、Medarex会社から入手したものである。Alan J. Korman, et al., Human monoclonal antibodies to programmed death 1 (PD1) and methods for treating cancer using anti-PD1 antibodies alone or in combination with other immunotherapeutics, United States Patent, Patent No. US 8008449 B2)より著しく強い。本発明のモノクローナル抗体、特に14C12H1L1は、抗腫瘍作用が市販されているターゲットが同じである薬剤Nivolumabの効果に相当する。本発明の抗体は、非小細胞肺癌、腎細胞癌、卵巣癌、黒色腫、白血病または貧血を予防・治療する薬剤を調製するために用いられる、あるいはこれらの薬剤とする可能性がある。

40

50

【図面の簡単な説明】

【0058】

【図1】モノクローナルヒト化抗体14C12H1L1のSDS-PAGE検出結果である。試料およびそれらのローディング量は、左から右への4つのレーンで次のとおりであった：1. 非還元型タンパク質電気泳動ローディング緩衝液サンプル抗体、1 μ g；2. 還元型タンパク質電気泳動ローディング緩衝液サンプル抗体、1 μ g；マーカー、5 μ l；3. BSA、1 μ g。

【図2】抗体14C12の動的特性パラメーターの検出結果である。

【図3】抗体14C12H1L1の動的特性パラメーターの検出結果である。

【図4】抗体5C4の動的特性パラメーターの検出結果である。

10

【図5】抗体14C12H1L1および5C4のPD1との結合を間接ELISAで測定した結果である。

【図6】抗体14C12H1L1および5C4のPDL1と競合して結合したPD1を競合ELISAで測定した結果である。

【図7】抗体14C12H1L1の、293T-PD1細胞表面のターゲットPD1タンパク質との結合EC₅₀である。

【図8】抗体14C12H1L1の、T細胞表面抗原PD1との結合活性である。

【図9】抗体14C12H1L1の混合リンパ球のIFN- γ 分泌への影響である。

【図10】抗体14C12H1L1の混合リンパ球のIL-2分泌への影響である。

【図11】抗体14C12H1L1のPBMC、MDA-MB-231およびRaji細胞を混合し共培養して誘導したサイトカインIL-2の分泌への影響である。

20

【図12】抗体14C12H1L1のPD-1 HuGEMMマウスMC38腫瘍モデルにおける腫瘍成長への影響である。ハイブリドーマ細胞株LT003、2015年6月16日に中国典型培養物保蔵センター(CCTCC)に寄託され、受託番号は、CCTCC NO: C2015105であり、アドレスは：中国武漢、武漢大学で、郵便番号は、430072である。

【発明を実施するための形態】

【0059】

以下で実施例を組み合わせ本発明の実施形態を詳述する。当業者は、次の実施例が単に本発明を例示するために提供され、本発明の範囲を制限するものとして解釈されるべきものではないことを理解できる。具体的な技術または条件が記載されていない実施例は、当技術分野の文献で開示される技術または条件（例えば、J. Sambrookら著、Peitang HUANGら訳、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, Science Press）に従い、または製品とともに提供される説明書に従い、行った。用いた供給者が示されていない試薬および機器は、いずれも市販の通常製品である。

30

【0060】

本発明の次の実施例において、用いられたT細胞は、Akeso Biopharma Inc., Zhongshanから入手した。用いられたBALB/Cマウスは、Guangdong Medical Laboratory Animal Centerから購入されたものである。用いられたPD-1 HuGEMMマウスは、Nanjing Galaxy Biopharma Co, Ltdから入手した。使用されたMC38細胞は、Fudan IBS Cell Centerから入手した。使用された市販されているターゲットが同じである薬剤Nivolumab (Opdivo(R)) 単抗は、Bristol-Myers Squibb Companyから入手した。

40

【実施例】

【0061】

実施例1：ハイブリドーマ細胞株LT003の取得およびモノクローナル抗体14C12の調製

【0062】

50

1. ハイブリドーマ細胞株 LT003 の構築

【0063】

PD1-mFc (PD1: Programmed cell death protein 1, NCBI GenBank ID: NP_005009.2) を、タンパク質と融合させて抗原として使用し、免疫BALB/Cマウス (Guangdong Medical Laboratory Animal Center から購入) の脾臓細胞を、マウス骨髄瘤細胞と融合させてハイブリドーマ細胞を合成し、現在確立された方法 (例えば、Stewart, S. J., "Monoclonal Antibody Production", in Basic Methods in antibody Production and Characterization, Eds. G. C. Howard and D. R. Bethell, Boca Raton: CRC Press, 2000) に従った。

10

【0064】

PD1-mFc を抗原としてマイクロタイタープレートを被覆し、間接ELISA法によってスクリーニングし、PD1と特異的に結合する新規な抗体を分泌するハイブリドーマ細胞を得た。

【0065】

競合ELISAでリガンドPDL1-hFc融合タンパク質 (PDL1: Programmed death-ligand 1, NCBI Genebank ID: NP_054862.1) と競合してPD1と結合するモノクローナル抗体を分泌できるハイブリドーマ細胞株をスクリーニングした。限界希釈法により安定的なハイブリドーマ細胞株を得、かつ、限界希釈法によりLT003安定細胞株 (これにより分泌したモノクローナル抗体を14C12と命名した) を得た。

20

【0066】

ハイブリドーマ細胞株LT003 (PD1-14C12) は、2015年6月16日に中国典型培養物保蔵センター (CCTCC) に寄託され、受託番号は、CCTCC NO: C2015105であり、アドレスは：中国武漢、武漢大学で、郵便番号は、430072である。

【0067】

2. モノクローナル抗体 14C12 の調製

30

【0068】

本発明のLT003細胞株を10%の低IgGウシ胎児血清を含むIMDM培地で培養し、7日後に細胞培養上清を回収し、精製して抗体14C12を調製した。

【0069】

実施例2: モノクローナル抗体14C12の軽鎖と重鎖配列の取得

培養細胞/細菌Total RNA Extraction Kit (Tiangen、カタログ番号DP430) の方法で、実施例1にて得られたハイブリドーマ細胞株LT003からmRNAを抽出した。

【0070】

Invitrogen SuperScript(R) III First-Strand Synthesis System for RT-PCRキット取扱説明書に従ってcDNAを合成し、かつ、PCRにより増幅させた。

40

【0071】

PCR増幅産物を直接にTAクローニングに供した。具体的な操作は、pEASY-T1 Cloning Kit (Transgen CT101) キット取扱説明書を参照し行った。

【0072】

TAクローニングの産物を直接に配列決定に供し、配列決定結果は以下のとおりである。

【0073】

重鎖可変領域のDNA配列決定結果: (354bp)

50

G A G G T C A A A C T G G T G G A G A G C G G C G G C G G G C T G G T G A A G C
 C C G G C G G G T C A C T G A A A C T G A G C T G C G C C G C T T C C G G C T T
 C G C C T T T A G C T C C T A C G A C A T G T C A T G G G T G A G G C A G A C C
 C C T G A G A A G C G C C T G G A A T G G G T C G C T A C T A T C A G C G G A G
 G C G G G C G A T A C A C C T A C T A T C C T G A C T C T G T C A A A G G G A G
 A T T C A C A A T T A G T C G G G A T A A C G C C A G A A A T A C T C T G T A T
 C T G C A G A T G T C T A G T C T G C G G T C C G A G G A T A C A G C T C T G T
 A C T A T T G T G C A A A C C G G T A C G G C G A A G C A T G G T T T G C C T A
 T T G G G G A C A G G G C A C C C T G G T G A C A G T C T C T G C C (S E Q I
 D N O : 1)

10

【0074】

これによりコードされるタンパク質配列：(118aa)

E V K L V E S G G G L V K P G G S L K L S C A A S G F A F S S Y D M S W V R Q T
 P E K R L E W V A T I S G G G R Y T Y Y P D S V K G R F T I S R D N A R N T L Y
 L Q M S S L R S E D T A L Y Y C A N R Y G E A W F A Y W G Q G T L V T V S A (S
 E Q I D N O : 2)

【0075】

軽鎖可変領域のDNA配列決定結果：(318bp)

G A C A T T A A G A T G A C A C A G T C C C C T T C C T C A A T G T A C G C T A
 G C C T G G G C G A G C G A G T G A C C T T C A C A T G C A A A G C A T C C C A
 G G A C A T C A A C A C A T A C C T G T C T T G G T T T C A G C A G A A G C C A
 G G C A A A A G C C C C A A G A C C C T G A T C T A C C G G G C C A A T A G A C
 T G G T G G A C G G G G T C C C C A G C A G A T T C T C C G G A T C T G G C A G
 T G G G C A G G A T T A C T C C C T G A C C A T C A G C T C C C T G G A G T A T
 G A A G A C A T G G G C A T C T A C T A T T G C C T G C A G T A T G A T G A G T
 T C C C T C T G A C C T T T G G A G C A G G C A C A A A A C T G G A A C T G (S
 E Q I D N O : 3)

20

【0076】

これによりコードされるタンパク質配列：(106aa)

D I K M T Q S P S S M Y A S L G E R V T F T C K A S Q D I N T Y L S W F Q Q K P
 G K S P K T L I Y R A N R L V D G V P S R F S G S G S G Q D Y S L T I S S L E Y
 E D M G I Y Y C L Q Y D E F P L T F G A G T K L E L (S E Q I D N O : 4)

30

【0077】

2. 組換え抗体14C12(Re)の調製

14C12(Re)の重鎖cDNA配列(その可変領域配列は、SEQ ID NO:1
 で示す。)と軽鎖のcDNA配列(その可変領域配列は、SEQ ID NO:3で示す
)を、それぞれpUC57simple(GenScript Corp.提供)ベクタ
 ーにクローニングし(酵素切断サイト: XbaI & BamHI)、それぞれ、pUC57
 simple-14C12H、pUC57simple-14C12Lプラスミドを得た
 。

40

【0078】

プラスミドpUC57simple-14C12HとpUC57simple-14C1
 2Lを、それぞれ、酵素(HindIII & EcoRI)で切断し、電気泳動によって回
 収された重鎖軽鎖をそれぞれpcDNA3.1ベクターにサブクローニングし、組み換え
 プラスミドを抽出し、293F細胞に同時トランスフェクションした。

【0079】

細胞培養7日間後、培養液を高速遠心、細孔フィルター膜を通じた真空ろ過した後、Hi
 Trap MabSelect SuRe柱に供し、Elution Bufferでタン
 パク質を一步で溶出させ、目的試料を回収し、かつHiTrap Desaltingで
 液をPBSに変更した後精製して組換え抗体14C12(Re)を得た。

50

【0080】

組換え抗体14C12(Re)をELISA結合活性試験で抗体14C12に匹敵する結合活性があり、次の抗体ヒト化のデザインに用いられることが検証された。

【0081】

実施例3：ヒト化抗体14C12H1L1の重鎖と軽鎖配列のデザイン

【0082】

1. ヒト化抗体14C12H1L1の軽鎖と重鎖配列のデザイン

PD1タンパク質の三次元結晶構造(Shinohara T, et al., Structure and chromosomal localization of the human PD1 gene(PDCD1). Genomics 1995, 23(3):704-6)および実施例2にて得られた抗体14C12の配列に基づき、抗体モデルのコンピューターシミュレーションによって、モデルによって変異をデザインし、抗体14C12H1L1の可変領域配列を得た(重鎖定常領域は、Ig gamma-1 chain C region, ACCESSION: P01857であり、軽鎖定常領域は、Ig kappa chain C region, ACCESSION: P01834である)。可変領域配列は、以下の通りである。

【0083】

重鎖可変領域のDNA配列:(354bp)

GAAGTGCAGCTGGTTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGC
CCGGCGGGTCACTGCGACTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATT
CGCCTTTAGCTCCTACGACATGTCCTGGGTGCGACAGGCA
CCAGGAAGGGACTGGATTGGGTGCTACTATCTCAGGAG
GCGGGAGATACACCTACTATCCTGACAGCGTCAAGGGCCG
GTTCAACAATCTCTAGAGATAACAGTAAGAACAATCTGTAT
CTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGAGGACACCGCACTGT
ACTATTGTGCCAACCGCTACGGGGAAGCATGGTTTGCCTA
TTGGGGGCAGGGAACCCTGGTGACAGTCTCTAGT(SEQ ID
NO:5)

【0084】

これによりコードされるタンパク質配列:(118aa)

EVQLVESGGGLVQP GGS LRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQA
PGKGLDWVATISGGGRYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLY
LQMNSLR AEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQGT LVT VSS(S
EQ ID NO:6)

【0085】

軽鎖可変領域のDNA配列:(321bp)

GACATTCAGATGACTCAGAGCCCTCCTCCATGTCCGCCCT
CTGTGGGCGACAGGGTCACTTCACATGCCGCGCTAGTCA
GGATATCAACACCTACCTGAGCTGGTTTTCAGCAGAAGCCA
GGGAAAAGCCCCAAGACACTGATCTACC GG GCTAATAGAC
TGGTGTCTGGAGTCCCAAGTCGGTTCAGTGGCTCAGGGAG
CGGACAGGACTACACTCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCT
GAGGACATGGCAACCTACTATTGCCTGCAGTATGATGAGT
TCCC ACTGACCTTTGGCGCCGGGACAAA ACTGGAGCTGAA
G(SEQ ID NO:7)

【0086】

これによりコードされるタンパク質配列:(107aa)

DIQMTQSPSSMSASV GDRVTFTRASQDINTYLSWFQQKP
GKSPKTLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQP
EDMATY YCLQYDEFPLTFGAGTKLELK(SEQ ID NO:8)

【0087】

実施例4：ヒト化抗体14C12H1L1の調製およびSDS-PAGEの電気泳動検出
14C12H1L1の重鎖cDNA（その可変領域配列はSEQ ID NO：5で示し、
重鎖定常領域はIg gamma-1 chain C region、ACCESSION：P01857である）と軽鎖のcDNA（その可変領域配列は、SEQ ID
NO：7で示し、軽鎖定常領域はIg kappa chain C region、ACCESSION：P01834である）を、pUC57simple（GenScript Corp. 提供）ベクターにそれぞれクローニングし（酵素切断サイト：XbaI
& BamHI）、pUC57simple-14C12H1とpUC57simple-14C12L1プラスミドをそれぞれ得、かつ、それぞれp cDNA3.1ベクターにサブクローニングし（酵素切断サイト：XbaI & BamHI）、組み換えプラスミドを抽出し、293F細胞に同時トランスフェクションした。

10

【0088】

細胞培養7日間後、培養液を高速遠心、細孔フィルター膜を通じた真空ろ過した後、HiTrap MabSelect SuRe柱に供し、Elution Bufferでタンパク質を一步で溶出させ、目的試料を回収し、かつHiTrap Desaltingで液をPBSに変更した後精製して組換え抗体14C12H1L1を得た。SDS-PAGE電気泳動測定を行った。

【0089】

結果は、図1に示したように、還元型タンパク質試料の目的タンパク質は、約24.5 kDと49 kDにあったが、非還元型タンパク質試料の目的タンパク質は、約147 kDにあった。

20

【0090】

実施例5：抗体の動的パラメータの測定

Fortebio分子間相互作用機で抗体14C12およびヒト化14C12H1L1の抗原PD1との結合の動的パラメータを測定した。

【0091】

1. TEVタンパク質酵素でPD1-mFcタンパク質を切断し、かつカラム精製してPD1抗原を得た。

【0092】

2. 抗原PD1（抗原濃度：1 μg/ml）をビオチンで標識してSAセンサー表面に固定させ、PBSTでバランスした後、それぞれ抗体14C12、14C12H1L1および5C4と結合し、抗体をPBSTで200 nMから3倍希釈させて、PBSTにて解離させた。

30

【0093】

抗体14C12、14C12H1L1及び5C4の動的パラメータは、表1に示し、動的特性パラメーター検出結果をそれぞれ図2、図3、図4に示す。結果からわかるように、14C12と14C12H1L1は、いずれも抗原と良い親和性を有し、かつ、親和性が共に対照抗体5C4より強い。

【0094】

40

【表 1】

表 1：抗体 1 4 C 1 2 の動的パラメータ

抗体名	K_D (M)	K_{on} (1/Ms)	K_{off} 誤差	K_{dis} (1/s)	K_{dis} 誤差
1 4 C 1 2	$1.81E-11$	$3.38E+05$	$8.23E+03$	$6.12E-06$	$1.04E-05$
1 4 C 1 2 H 1 L 1	$2.42E-11$	$3.17E+05$	$5.90E+03$	$7.66E-06$	$8.70E-06$
5 C 4	$6.46E-10$	$5.63E+05$	$1.38E+04$	$3.63E-04$	$9.77E-06$

K_D ：親和性定数； k_{on} ：抗原-抗体結合速率； k_{dis} ：抗原抗体解離速率；
 $K_D = k_{dis} / k_{on}$ 。

【0095】

実施例 6：間接 ELISA 法による抗体の抗原 PD 1 との結合活性の測定

間接 ELISA 法で 1 4 C 1 2 H 1 L 1 及び 5 C 4 の PD 1 との結合活性をそれぞれ測定した。具体的な方法は以下の通りであった。

【0096】

ELISA プレートに PD 1 - mFc を加えてインキュベートし、4 で一晩置き、1% の BSA で 37、2 時間ブロッキングした後、それぞれ抗体を加え、37 で 30 min インキュベートし、HRP で標識したヒツジ抗ヒト IgG (H + L) 二次抗体 (Jackson, 109-035-088) を添加し、TMB (Neogen, 308177) で 5 min 発色反応を行い、かつ、マイクロプレートリーダーで 450 nm 波長における吸光度を測定した。

20

【0097】

抗体 1 4 C 1 2 H 1 L 1 及び 5 C 4 の抗原 PD 1 と結合した結果を図 5 に示す。図 5 からわかるように、抗体 1 4 C 1 2 H 1 L 1 と 5 C 4 は、いずれも有効的に PD 1 タンパク質と結合でき、かつその結合効率も、投与量に依存し、各投与量の蛍光強度を表 2 に示す。結合された抗体 1 4 C 1 2 H 1 L 1 および 5 C 4 に対して蛍光定量分析を行い、曲線シミュレーションによる抗体 1 4 C 1 2 H 1 L 1 および 5 C 4 の結合効率 E_{50} は、それぞれ 0.032 nM、0.043 nM であった。

30

【0098】

【表 2】

表 2：抗体 1 4 C 1 2 H 1 L 1 及び 5 C 4 の PD 1 との結合の蛍光強度

抗体濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	抗原被覆：PD 1 - mFc ($0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$)			
	1 4 C 1 2 H 1 L 1		5 C 4	
1	2.970	2.954	2.959	2.991
0.3	2.886	2.961	2.978	3.079
0.1	2.864	2.868	2.838	2.926
0.03	2.674	2.669	2.617	2.659
0.01	2.222	2.201	1.981	2.221
0.003	1.383	1.464	1.169	1.222
0.001	0.676	0.736	0.527	0.548
0	0.062	0.062	0.065	0.073
二次抗体	HRP で標識したヒツジ抗ヒト二次抗体			

【0099】

実施例 7：競合 ELISA 法による抗体の PD 1 と競合して抗原 PD 1 と結合する活性の測定

【0100】

競合 ELISA 法でヒト化抗体 1 4 C 1 2 H 1 L 1 および 5 C 4 の PD 1 と競合して抗

50

原PD1と結合することをそれぞれ測定した。具体的な方法は以下の通りであった。

【0101】

PD1-mFcでELISAプレートを一晩被覆し、1%BSAで2時間ブロッキングした後、異なる濃度の抗体14C12H1L1と5C4を別々にPDL1-mFcと10min混合し(希釈濃度は表3に示す。)、37℃で30minインキュベートした後、対応する抗ヒトおよび抗マウス酵素標識二次抗体を添加して37℃で30minインキュベートした。マイクロプレートリーダーで450nmにおける吸光度値を測定した。

【0102】

抗体14C12H1L1及び5C4の抗原PD1との結合を測定した結果を図6に示す。図6からわかるように、抗体14C12H1L1は、PDL1と競合してPD1タンパク質と有効的に結合することができ、かつ、その結合効率、投与量に依存し、各投与量の蛍光強度は表3に示す。結合された抗体14C12H1L1と5C4に対して蛍光定量分析を行い、曲線シミュレーションによる抗体14C12H1L1および5C4の結合効率EC₅₀は、それぞれ1.322nM、1.199nMであった。

10

【0103】

【表3】

表3：抗体14C12H1L1及び5C4のPDL1と競合してPD1との結合

抗原被覆 抗体濃度/希釈勾配	PD1-mFc 0.5 μg/mL			
	14C12H1L1		5C4	
1.5 μg/mL	0.062	0.064	0.070	0.075
1:3	0.069	0.064	0.081	0.086
1:9	0.363	0.305	0.372	0.269
1:27	1.727	1.543	1.429	1.604
1:81	1.892	1.752	1.766	1.881
1:243	1.984	2.029	2.045	2.005
1:729	1.937	1.978	1.934	1.954
0	1.870	1.977	1.933	1.977
リガンド	PDL1-mFc 0.3 μg/mL			
二次抗体	HRPで標識したヒツジ抗マウス二次抗体			

【0104】

実施例8：フローサイトメータ法による抗体の細胞表面抗原PD1との結合活性の検出
まず、PD1抗原を発現する宿主細胞293Tを構築し、そして、本発明にて調製したヒト化抗体14C12H1L1(実施例4を参照)を用いて当該宿主細胞を標識した。そして、フローサイトメトリ法で細胞表面の天然立体配座抗原に対する抗体14C12H1L1の特異的結合能を分析および検証する。

30

【0105】

1. PD1抗原を発現する宿主細胞293Tの構築

具体的な工程は、以下の通りであった。

【0106】

PD1抗原を発現する宿主細胞293Tの構築：lipofectaminトランスフェクションキット(Invitrogen社から購入した)の方法に従ってPD1を含むベクターpLenti6.3-PD1(ベクターpLenti6.3は、Invitrogen社から購入した)を293T細胞にトランスフェクションし、スクリーニングによりPD1を安定的に発現するクローン集団293T-PD1を得た。

40

【0107】

2. 抗体の293T-PD1細胞表面抗原への結合

抗体標識とフローサイトメータ測定：通常のトリプシン消化法で前記工程にて得られたPD1抗原を発現する宿主細胞293T-PD1を消化し、かつ各回収チューブにおける細胞数を 2×10^5 とし、PBS(1%BSA)で濃度50nM、10nM、5nM、1nM、0.1nM、0.01nMのPD1抗体希釈液をそれぞれ調製し、氷上でPD1を発

50

現する293T細胞と2時間インキュベートし、100 μ L FITCヒツジ抗ヒトIgG(1:500)を各チューブに加え、氷上で1時間インキュベートし、PBSで3回洗った後300 μ L PBSを添加し、細胞を再懸させ、フローサイトメータでFITCチャンネルを用いて蛍光シグナルを測定した。

【0108】

ヒト化抗体14C12H1L1の293T-PD1細胞との結合結果は、図7に示す。図7からわかるように、14C12H1L1抗体は、宿主細胞293T-PD1表面のターゲットPD1タンパク質と有効的に結合することができ、かつ、その結合効率、投与量に依存し、各投与量の蛍光強度は、表4に示す。結合された14C12H1L1抗体に対して蛍光定量分析を行い、曲線シミュレーションによる14C12H1L1抗体の結合効率EC₅₀は1.89nMであった。

10

【0109】

【表4】

表4：フローサイトメータによる14C12H1L1が結合したPD1宿主細胞293T-PD1表面抗原の蛍光強度の測定分析

濃度 (nM)	0.01	0.1	1	5	10	50
蛍光強度	8.32	20.31	17 4.6 2	57 9.4 1	68 6.4 9	669. 54

【0110】

実施例9：フローサイトメータ法による抗体のT細胞表面抗原PD1との結合活性の測定
Ficoll-Plus (GE Healthcare LOT No.: 171440-02)を採用してPBMCを分離させ、PBMCからCD4⁺細胞を分離した。PHA(上海疾控生物科技有限公司、50 μ l/ml)で3日間刺激した後PBSで1回洗い、異なる濃度を有する抗体を加え、氷上で1.5時間インキュベートした。インキュベーションが完了した後、PBSで1回洗い、FITCで標識された抗ヒト二次抗体IgG(Jackson immunoresearch lot.102155)を加えた。氷上でかつ遮光下で1時間インキュベートした後、PBSで1回洗ってフローサイトメータで測定した。

30

【0111】

ヒト化抗体14C12H1L1のT細胞との結合は、図8に示す。図8からわかるように、14C12H1L1抗体は、T細胞表面のターゲットPD1タンパク質と効果的に結合でき、かつ、その結合効率は、投与量に依存する。

【0112】

実施例10：混合リンパ球反応：サイトカインIFN- γ 、IL-2の分泌
Ficoll-Plus (GE Healthcare LOT No.: 171440-02)を採用してPBMCを分離させ、分離したPBMCにIL-4(Peprotech K2513、1000U/ml)とGM-CSF(Peprotech H1513、1000U/ml)を添加して6日間誘導した後、TNF- α (Peprotech G1513、200U/ml)を添加して3日間誘導し、DC細胞を得た。

40

【0113】

PBMCからT細胞を分離し、得られたDC細胞とT細胞を、1:10の比率で混合して培養し、かつ、異なる比率の抗体14C12H1L1、5C4およびhIgG(hIgGをアイソタイプ対照とする)を加えて5~6日間培養した後、ELISAキットを用いてIFN- γ (Dakewe Groupから購入した)とIL-2(Dakewe Groupから購入した)の分泌量を測定した。

【0114】

DC細胞とT細胞を混合して培養した後、IFN- γ とIL-2の分泌検出結果は、それ

50

ぞれ図9、図10に示す。14C12H1L1抗体は、効果的に混合リンパ球によるIFN- γ とIL-2の分泌を誘導することができ、かつ、その分泌量は、抗体14C12H1L1の投与量に依存する。抗体14C12H1L1のIFN- γ とIL-2の分泌を誘導する効果は共に対照抗体5C4より強い。

【0115】

実施例11：IL-2分泌の誘導

(実施例10と同じ方法で)分離して得たPBMCを、PHA(上海疾控生物科技有限公司、50 μ l/ml)で3日間刺激した後、96ウェルプレートに刺激によって成熟したPBMC(5 \times 10⁴ cells/ウェル)、Raji細胞(上海中科院)(5 \times 10⁴ cells/孔)、および、MDA-MB-231細胞(ATCC)(1 \times 10⁴ cells/孔)を加え、100nM 14C12H1L1または対照抗体5C4またはhIgG(hIgGをアイソタイプ対照とする)を添加して均一になるように混合して共培養した。3日間後、ELISAキットを採用してIL-2(Dakewe Groupから購入した)の分泌量を測定し、具体的な手順は、キットの取扱説明書に従って行った。

10

【0116】

細胞を混合して培養した後のIL-2の分泌検出結果は図11に示す。図11からわかるように、14C12H1L1抗体は、効果的にPBMCのIL-2分泌を誘導でき、抗体14C12H1L1のIL-2分泌に対する誘導効果は、対照抗体5C4より著しく強い。

【0117】

実施例12：抗体14C12H1L1の、PD-1 HuGEMMマウスMC38腫瘍モデルにおける腫瘍成長への影響

PD-1 HuGEMMマウス(ヒトPD-1遺伝子導入マウス)右側皮下にMC38腫瘍細胞(1 \times 10⁶/匹)を接種し、平均腫瘍体積が約118mm³に達すると、腫瘍体積によってマウスをランダムに4つの実験群に分け、腹腔内投与した。各群毎に、いずれも8匹のマウスであった。具体的な分類と投与量は以下の通りであった。

Isotype Control群(投与量8mg/kg)

14C12H1L1高投与量群(投与量8mg/kg)

14C12H1L1低投与量群(投与量0.8mg/kg)、

Nivolumab群(投与量8mg/kg)。

30

【0118】

前記の4つの群は、いずれも周2回、合計5回で投与した。各群に投与した後、腫瘍のサイズを周2回で測定した。

結果は、図12に示す。

結果により、下記のこと分かる。

Nivolumab群、14C12H1L1高投与量群、14C12H1L1低投与量群の腫瘍体積は、いずれも、統計的にIsotype control群($P < 0.01$ 、 < 0.01 、 < 0.05)より著しく小さい。14C12H1L1高投与量群(8mg/kg)は、PD-1 HuGEMMマウスMC38腫瘍モデルにおいて、統計的に有意な抗腫瘍効果を示し、かつ、薬学効果が市販されているターゲットが同じである薬剤Nivolumab(8mg/kg)に相当する。

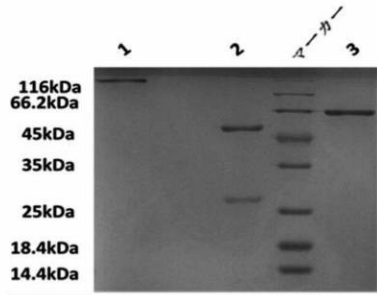
40

【0119】

本発明の具体的な実施形態を詳細に記載してきたが、当業者は、本明細書で開示される教示に照らして、本発明の構成に対して様々な改変および変更がなされ得、これらが全て本発明の保護範囲に包含されることを理解できる。本発明の全範囲は、添付の特許請求の範囲およびその何らかの同等物において定められる。

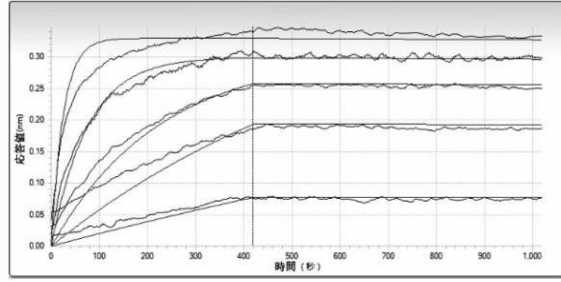
【 図 1 】

【 図 1 】



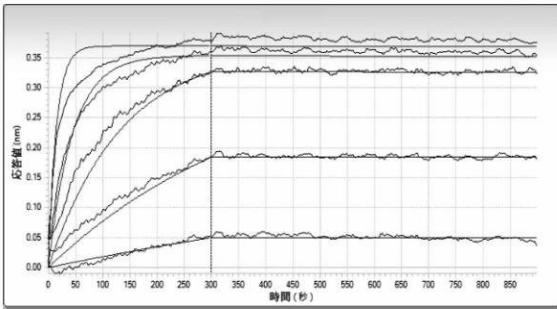
【 図 3 】

【 図 3 】



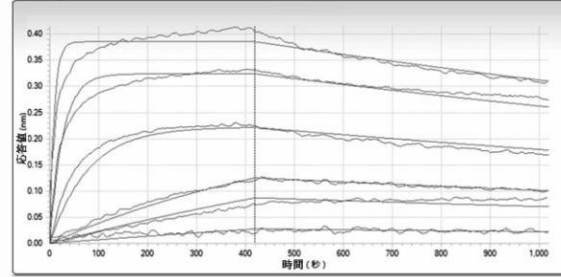
【 図 2 】

【 図 2 】



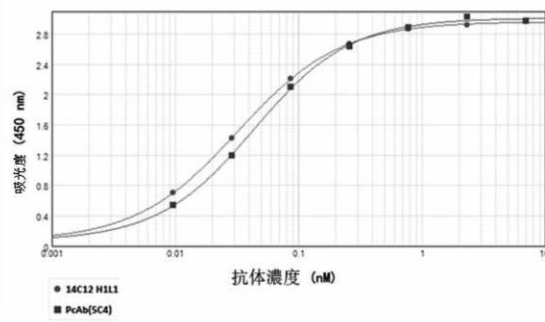
【 図 4 】

【 図 4 】



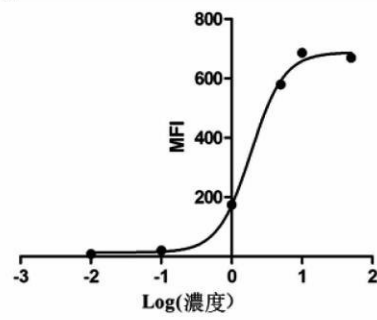
【 図 5 】

【 図 5 】



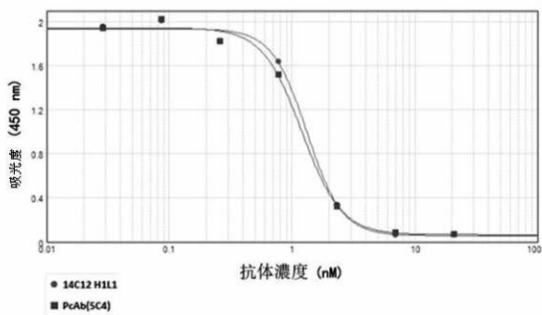
【 図 7 】

【 図 7 】



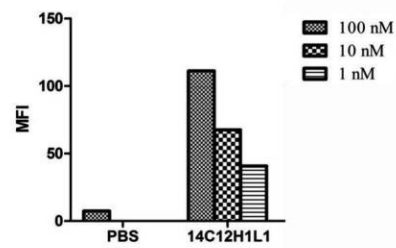
【 図 6 】

【 図 6 】



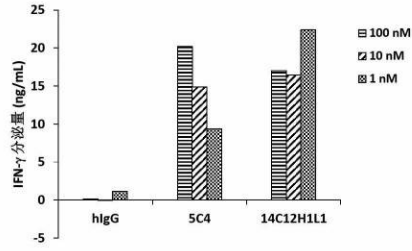
【 図 8 】

【 図 8 】



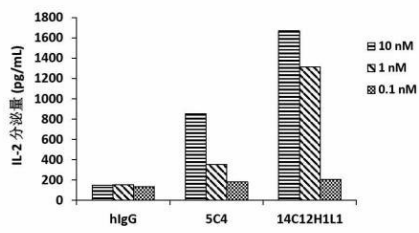
【 図 9 】

【 図 9 】



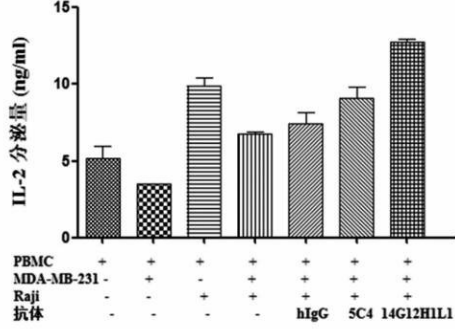
【 図 10 】

【 図 10 】



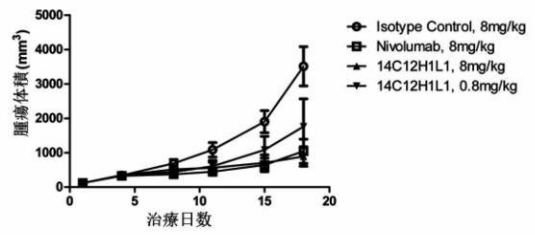
【 図 11 】

【 図 11 】



【 図 12 】

【 図 12 】



【 配 列 表 】

2019534034000001.app

【 国际調查報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2017/098465
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 16/28 (2006.01) i; C12N 15/13 (2006.01) i; C12N 5/20 (2006.01) i; G01N 33/68 (2006.01) i; G01N 33/577 (2006.01) i; A61K 39/395 (2006.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i; A61P 35/02 (2006.01) i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K 16, C12N 15, C12N 5, G01N 33, A61K 39, A61P 35		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) DWPI; VEN; CNABS; CNKI; PubMed; ISI web of knowledge; Genbank; EBI-EMBL; 中山康方生物医药有限公司, 李百勇, 夏瑜, 王忠民, 张鹏, 庞醒华, SEQ ID NO: 1-14, 程序性细胞死亡因子 1, 抗体, 单抗, 癌, 瘤, 白血病, 贫血, PD1, programmed cell death 1, antibody, mab, C2015105, 14C12, LT003, cancer, carcinoma, tumor, leucocythemia, anemia		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 106977602 A (AKESO BIOPHARMA, INC. et al.), 25 July 2017 (25.07.2017), claims 1-19	1-22
PX	CN 106967172 A (AKESO BIOPHARMA, INC. et al.), 21 July 2017 (21.07.2017), description, paragraphs [0018]-[0019]	1-22
X	CN 105175544 A (ANHUI RUBIOX-VISION BIOTECHNOLOGY CO., LTD.), 23 December 2015 (23.12.2015), description, paragraphs [0008]-[0017], [0037], [0041]-[0042] and [0046]	1-22
A	CN 105175545 A (ANHUI RUBIOX-VISION BIOTECHNOLOGY CO., LTD.), 23 December 2015 (23.12.2015), entire document	1-22
A	CN 104250302 A (SHANGHAI JUNSHI BIOSCIENCES CO., LTD. et al.), 31 December 2014 (31.12.2014), entire document	1-22
<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: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 17 October 2017	Date of mailing of the international search report 31 October 2017	
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer PAN, Hao Telephone No. (86-10) 52871050	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/CN2017/098465
--

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2015112800 A1 (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.), 30 July 2015 (30.07.2015), entire document	1-22
A	CN 104936982 A (DANA-FARBER CANCER INSTITUTE), 23 September 2015 (23.09.2015), entire document	1-22
A	CN 102264762 A (DANA-FARBER CANCER INSTITUTE), 30 November 2011 (30.11.2011), entire document	1-22
A	CN 103608040 A (AMPLIMMUNE INC.), 26 February 2014 (26.02.2014), entire document	1-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/098465

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/098465

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

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

1. Claims Nos.: 19, 22
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] Claim 19 relates to a technical solution of internal administering to a subject and claim 22 is a method for preventing or treating a disease, which fall within the cases set out in PCT Rule 39.1(iv) for which a search is not required by the International Searching Authority. A search is carried out based on that said subject matter is amended to be a pharmaceutical use subject matter.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2017/098465

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 106977602 A	25 July 2017	None	
CN 106967172 A	21 July 2017	None	
CN 105175544 A	23 December 2015	None	
CN 105175545 A	23 December 2015	None	
CN 104250302 A	31 December 2014	EP 3026062 A1	01 June 2016
		PH 12015502819 A1	21 March 2016
		US 2016272708 A1	22 September 2016
		EP 3026062 A4	16 August 2017
		WO 2014206107 A1	31 December 2014
		RU 2016102176 A	31 July 2017
		JP 2016523265 A	08 August 2016
WO 2015112800 A1	30 July 2015	UY 35964 A	31 August 2015
		CA 2936075 A1	30 July 2015
		SG 11201605482 S A	30 August 2016
		MX 2016009554 A	17 November 2016
		EA 201691482 A1	30 November 2016
		AU 2015209233 A1	04 August 2016
		PH 12016501330 A1	15 August 2016
		US 2015203579 A1	23 July 2015
		CN 106068275 A	02 November 2016
		KR 20160132010 A	16 November 2016
		EP 3097119 A1	30 November 2016
		TW 201540726 A	01 November 2015
		JP 2017505125 A	16 February 2017
CN 104936982 A	23 September 2015	US 2015197571 A1	16 July 2015
		EP 2890715 A1	08 July 2015
		WO 2014022758 A1	06 February 2014
		HK 1210481 A1	22 April 2016
		EP 2890715 A4	27 April 2016
		JP 2015527342 A	17 September 2015
CN 102264762 A	30 November 2011	HU E030807 T2	29 May 2017
		AU 2009296392 B2	02 June 2016
		JP 2015214549 A	03 December 2015
		US 2013291136 A1	31 October 2013
		DK 2342226 T3	26 September 2016
		SI 2342226 T1	30 November 2016
		BR PI0919377 A2	27 September 2016
		IL 211830 D0	30 June 2011
		WO 2010036959 A3	23 September 2010
		ES 2592216 T3	28 November 2016
		WO 2010036959 A2	01 April 2010
		AU 2009296392 A1	01 April 2010
		IL 211830 A	31 January 2017
		EP 2342226 A2	13 July 2011
		MX 2011003195 A	12 August 2011
		US 2011271358 A1	03 November 2011
		KR 20110079673 A	07 July 2011
		US 2016137731 A1	19 May 2016
		EP 2342226 A4	28 November 2012

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/098465

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 103608040 A	26 February 2014	US 9102727 B2	11 August 2015
		US 8552154 B2	08 October 2013
		SI EP2342226 T1	30 November 2016
		JP 6087503 B2	08 March 2017
		AU 2016222431 A1	22 September 2016
		PL 2342226 T3	31 January 2017
		EP 3133086 A1	22 February 2017
		EP 2342226 B1	22 June 2016
		CA 2738252 A1	01 April 2010
		JP 2012503984 A	16 February 2012
		EP 2699264 A4	08 October 2014
		AU 2012245477 B2	23 March 2017
		MX 2013012088 A	30 April 2014
		RU 2625034 C2	11 July 2017
		JP 6072771 B2	01 February 2017
		KR 20140048121 A	23 April 2014
		JP 2017101042 A	08 June 2017
		RU 2013151455 A	27 May 2015
		US 2014044738 A1	13 February 2014
		CA 2833636 A1	26 October 2012
		EP 2699264 A1	26 February 2014
		AU 2012245477 A1	31 October 2013
		US 9205148 B2	08 December 2015
		AU 2012245477 C1	15 June 2017
		MX 338353 B	13 April 2016
		CN 103608040 B	01 March 2017
JP 2014523401 A	11 September 2014		
US 2016130348 A1	12 May 2016		
WO 2012145493 A1	26 October 2012		

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/098465

A. 主题的分类		
C07K 16/28(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 5/20(2006.01)i; G01N 33/68(2006.01)i; G01N 33/577(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 35/02(2006.01)i		
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. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
C07K16; C12N15; C12N5; G01N33; A61K39; A61P35		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
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))		
DWP1; VEN; CNABS; CNKI; PubMed; ISI web of knowledge; Genbank; EBI-EMBL; 中山康方生物医药有限公司, 李百勇, 夏瑜, 王忠民, 张鹏, 庞醒华, SEQ ID NO:1-14, 程序性细胞死亡因子1, 抗体, 单抗, 癌, 瘤, 白血病, 贫血, PD1, programmed cell death 1, antibody, mab, C2015105, 14C12, LT003, cancer, carcinoma, tumor, leucocytopenia, anemia		
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
PX	CN 106977602 A (中山康方生物医药有限公司等) 2017年 7月 25日 (2017-07-25) 权利要求1-19	1-22
PX	CN 106967172 A (中山康方生物医药有限公司等) 2017年 7月 21日 (2017-07-21) 说明书第[0018]-[0019]段	1-6
X	CN 105175544 A (安徽瀚海博兴生物技术有限公司) 2015年 12月 23日 (2015-12-23) 说明书第[0008]-[0017], [0037], [0041]-[0042], [0046]段	1-22
A	CN 105175545 A (安徽瀚海博兴生物技术有限公司) 2015年 12月 23日 (2015-12-23) 全文	1-22
A	CN 104250302 A (上海君实生物医药科技有限公司等) 2014年 12月 31日 (2014-12-31) 全文	1-22
<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: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "B" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "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) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "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, 但为了解发明之理论或原理的在后文件 "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 "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 "&" 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期
2017年 10月 17日		2017年 10月 31日
ISA/CN的名称和邮寄地址		受权官员
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088		潘浩
传真号 (86-10)62019451		电话号码 (86-10)52871050

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2009年7月)

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/098465

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
A	WO 2015112800 A1 (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 2015年 7月 30日 (2015 - 07 - 30) 全文	1-22
A	CN 104936982 A (丹娜法伯癌症研究院) 2015年 9月 23日 (2015 - 09 - 23) 全文	1-22
A	CN 102264762 A (达纳-法伯癌症研究公司) 2011年 11月 30日 (2011 - 11 - 30) 全文	1-22
A	CN 103608040 A (安普利穆尼股份有限公司) 2014年 2月 26日 (2014 - 02 - 26) 全文	1-22

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2009年7月)

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/098465

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何对要求保护的发明必要的核苷酸和/或氨基酸序列，国际检索是在下列基础上进行的：
- a. (提交提供)
- 纸件形式
- 电子形式
- b. (提交时间)
- 含在申请提交时的国际申请中
- 以电子形式与国际申请一起提交
- 为检索之用随后提交本单位
2. 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的申请中的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。
3. 补充意见：

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/098465

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. 权利要求： 19, 22
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求19涉及在体内给予受试者的技术方案和权利要求22为疾病的预防和治疗方法，属于PCT实施细则39.1(iv)规定的国际检索单位无须检索情形。基于其修改为制药用途主题进行了检索。
2. 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3. 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/098465

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	106977602	A	2017年 7月 25日	无			
CN	106967172	A	2017年 7月 21日	无			
CN	105175544	A	2015年 12月 23日	无			
CN	105175545	A	2015年 12月 23日	无			
CN	104250302	A	2014年 12月 31日	EP	3026062	A1	2016年 6月 1日
				PH	12015502819	A1	2016年 3月 21日
				US	2016272708	A1	2016年 9月 22日
				EP	3026062	A4	2017年 8月 16日
				WO	2014206107	A1	2014年 12月 31日
				RU	2016102176	A	2017年 7月 31日
				JP	2016523265	A	2016年 8月 8日
WO	2015112800	A1	2015年 7月 30日	UY	35964	A	2015年 8月 31日
				CA	2936075	A1	2015年 7月 30日
				SG	11201605482S	A	2016年 8月 30日
				MX	2016009554	A	2016年 11月 17日
				EA	201691482	A1	2016年 11月 30日
				AU	2015209233	A1	2016年 8月 4日
				PH	12016501330	A1	2016年 8月 15日
				US	2015203579	A1	2015年 7月 23日
				CN	106068275	A	2016年 11月 2日
				KR	20160132010	A	2016年 11月 16日
				EP	3097119	A1	2016年 11月 30日
				TW	201540726	A	2015年 11月 1日
				JP	2017505125	A	2017年 2月 16日
CN	104936982	A	2015年 9月 23日	US	2015197571	A1	2015年 7月 16日
				EP	2890715	A1	2015年 7月 8日
				WO	2014022758	A1	2014年 2月 6日
				HK	1210481	A1	2016年 4月 22日
				EP	2890715	A4	2016年 4月 27日
				JP	2015527342	A	2015年 9月 17日
CN	102264762	A	2011年 11月 30日	HU	E030807	T2	2017年 5月 29日
				AU	2009296392	B2	2016年 6月 2日
				JP	2015214549	A	2015年 12月 3日
				US	2013291136	A1	2013年 10月 31日
				DK	2342226	T3	2016年 9月 26日
				SI	2342226	T1	2016年 11月 30日
				BR	PI0919377	A2	2016年 9月 27日
				IL	211830	D0	2011年 6月 30日
				WO	2010036959	A3	2010年 9月 23日
				ES	2592216	T3	2016年 11月 28日
				WO	2010036959	A2	2010年 4月 1日
				AU	2009296392	A1	2010年 4月 1日
				IL	211830	A	2017年 1月 31日
				EP	2342226	A2	2011年 7月 13日
				MX	2011003195	A	2011年 8月 12日
				US	2011271358	A1	2011年 11月 3日
				KR	20110079673	A	2011年 7月 7日
				US	2016137731	A1	2016年 5月 19日
				EP	2342226	A4	2012年 11月 28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/CN2017/098465

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
				US	9102727	B2	2015年 8月 11日
				US	8552154	B2	2013年 10月 8日
				SI	EP2342226	T1	2016年 11月 30日
				JP	6087503	B2	2017年 3月 8日
				AU	2016222431	A1	2016年 9月 22日
				PL	2342226	T3	2017年 1月 31日
				EP	3133086	A1	2017年 2月 22日
				EP	2342226	B1	2016年 6月 22日
				CA	2738252	A1	2010年 4月 1日
				JP	2012503984	A	2012年 2月 16日
CN	103608040	A	2014年 2月 26日	EP	2699264	A4	2014年 10月 8日
				AU	2012245477	B2	2017年 3月 23日
				MX	2013012088	A	2014年 4月 30日
				RU	2625034	C2	2017年 7月 11日
				JP	6072771	B2	2017年 2月 1日
				KR	20140048121	A	2014年 4月 23日
				JP	2017101042	A	2017年 6月 8日
				RU	2013151455	A	2015年 5月 27日
				US	2014044738	A1	2014年 2月 13日
				CA	2833636	A1	2012年 10月 26日
				EP	2699264	A1	2014年 2月 26日
				AU	2012245477	A1	2013年 10月 31日
				US	9205148	B2	2015年 12月 8日
				AU	2012245477	C1	2017年 6月 15日
				MX	338353	B	2016年 4月 13日
				CN	103608040	B	2017年 3月 1日
				JP	2014523401	A	2014年 9月 11日
				US	2016130348	A1	2016年 5月 12日
				WO	2012145493	A1	2012年 10月 26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		4 C 0 8 7
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10		4 H 0 4 5
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08		
C 1 2 N 5/20 (2006.01)	C 1 2 N 5/20		
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46		
A 6 1 K 49/16 (2006.01)	A 6 1 K 49/16		
A 6 1 K 51/10 (2006.01)	A 6 1 K 51/10	2 0 0	
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 47/68		
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N	
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76		
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00		
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00		
A 6 1 P 7/06 (2006.01)	A 6 1 P 7/06		
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02		
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D	

(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,GH,T,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 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁理士 山本 健策

(72)発明者 李百勇

中国 広 東 省中山市火炬 開 發 区神 農 路 6 号

(72)発明者 夏 ゆ

中国 広 東 省中山市火炬 開 發 区神 農 路 6 号

(72)発明者 王忠民

中国 広 東 省中山市火炬 開 發 区神 農 路 6 号

(72)発明者 張 鵬

中国 広 東 省中山市火炬 開 發 区神 農 路 6 号

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA19 CE12 DA05

4B065 AA91X AA91Y AA93Y AB01 AB05 AC14 BA02 CA25 CA44

4C076 AA95 EE41 EE59 FF34 FF68

4C084 AA13 NA14 ZA55 ZB26 ZB27

4C085 AA14 DD62 EE01 HH03 HH11 KA27 KA29 KB82 LL01 LL18

4C087 AA01 AA02 CA12 CA20 NA14 ZA55 ZB26 ZB27

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 BA70 BA71 BA72 CA40 DA76
EA28 FA74 GA26

专利名称(译)	抗pd1单克隆抗体，其药物组合物及其用途		
公开(公告)号	JP2019534034A	公开(公告)日	2019-11-28
申请号	JP2019531512	申请日	2017-08-22
[标]申请(专利权)人(译)	中山康方生物医药有限公司		
[标]发明人	李百勇 夏冲 王忠民		
发明人	李百勇 夏▲冲▼ 王忠民 ▲張▼▲鵬▼		
IPC分类号	C12N15/13 C07K16/28 C12N15/63 C12N1/13 C12N1/15 C12N1/19 C12N5/10 C12P21/08 C12N5/20 C07K16/46 A61K49/16 A61K51/10 A61K47/68 A61K39/395 A61K35/76 A61K48/00 A61P35/00 A61P7/06 A61P35/02 G01N33/53		
CPC分类号	A61K2039/505 C07K16/2818 C07K2317/24 C07K2317/565 C07K2317/76 C07K2317/92 A61P35/00 A61P35/02 A61K39/395 C07K16/28 G01N33/577 G01N33/68 A61P7/06 G01N33/574 G01N2333 /70521 G01N2800/7019		
FI分类号	C12N15/13.ZNA C07K16/28 C12N15/63.Z C12N1/13 C12N1/15 C12N1/19 C12N5/10 C12P21/08 C12N5/20 C07K16/46 A61K49/16 A61K51/10.200 A61K47/68 A61K39/395.N A61K35/76 A61K48/00 A61P35/00 A61P7/06 A61P35/02 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CE12 4B064/DA05 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4C076/AA95 4C076 /EE41 4C076/EE59 4C076/FF34 4C076/FF68 4C084/AA13 4C084/NA14 4C084/ZA55 4C084/ZB26 4C084/ZB27 4C085/AA14 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/HH03 4C085/HH11 4C085/KA27 4C085 /KA29 4C085/KB82 4C085/LL01 4C085/LL18 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/CA12 4C087/CA20 4C087/NA14 4C087/ZA55 4C087/ZB26 4C087/ZB27 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045 /BA10 4H045/BA41 4H045/BA70 4H045/BA71 4H045/BA72 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
优先权	201610705763.5 2016-08-23 CN		
其他公开文献	JP2019534034A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

抗PD1 (程序性细胞死亡1) 单克隆抗体或其抗原结合片段，其药物组合物及其用途。单克隆抗体的重链可变区包含如SEQ ID NO : 9-11所示的氨基酸序列的CDR (互补决定区) ; 和 和/或单克隆抗体的轻链可变区包含氨基酸序列的CDR，如SEQ ID NO : 12-14所示。单克隆抗体可以特异性地与PD1结合，减轻PD1在生物体上的免疫抑制并激活T淋巴细胞。

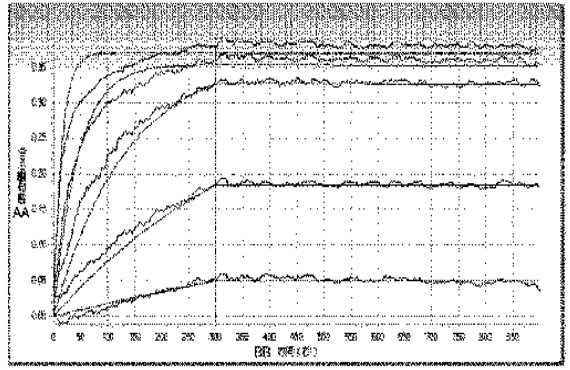


图 2

AA TIME (SECOND)
BB RESPONSE VALUE