

(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2019-532669
(P2019-532669A)

(43) 公表日 令和1年11月14日(2019.11.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/13 (2006.01)	C12N 15/13	4C076
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28 ZNA	4C084
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/46	4C085
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395 T	4H045
A61K 47/68 (2017.01)	A61K 47/68	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 54 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-535431 (P2019-535431)
 (86) (22) 出願日 平成29年9月8日 (2017.9.8)
 (85) 翻訳文提出日 平成31年3月13日 (2019.3.13)
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2017/101082
 (87) 国際公開番号 WO2018/050027
 (87) 国際公開日 平成30年3月22日 (2018.3.22)
 (31) 優先権主張番号 201610827099.1
 (32) 優先日 平成28年9月14日 (2016.9.14)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 中国 (CN)

(71) 出願人 513311664
 ベイジン・ハンミ・ファーマシューティカル・カンパニー・リミテッド
 BEIJING HANMI PHARMACEUTICAL CO., LTD.
 中華人民共和国、ベイジン 101312、シュンイ・ディストリクト、ティエンジュ・エアポート・インダストリアル・ゾーン・エイ、ティエンジュ・ウェスト・ロード・ナンバー10
 (74) 代理人 100140109
 弁理士 小野 新次郎
 (74) 代理人 100118902
 弁理士 山本 修

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 PD-1 に特異的に結合する可能な抗体及びその機能的断片

(57) 【要約】

PD-1 に特異的に結合する可能な抗体及びその機能的断片、前記抗体或その機能的断片は、PD-1 キメラ抗体及びその機能的断片、並びにPD-1 ヒト化抗体及びその機能的断片を含む。

【選択図】 図4

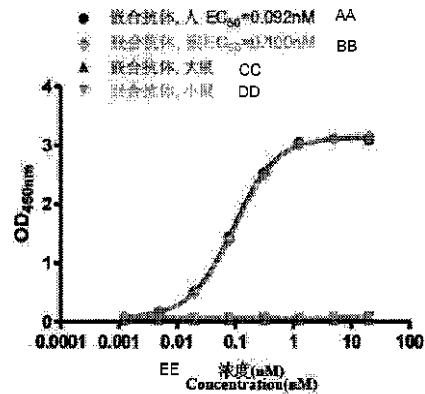


図4

AA Chimeric antibody, human $EC_{50} = 0.092$ nM
 BB Chimeric antibody, monkey $EC_{50} = 0.100$ nM
 CC Chimeric antibody, rat
 DD Chimeric antibody, mouse
 EE Concentration (nM)

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

PD - 1 に特異的に結合する可能な抗体及びその機能的断片であって、
 前記抗体及びその機能的断片は、軽鎖及び重鎖を含み、
 前記軽鎖は、CDR - L 1、CDR - L 2、CDR - L 3 からなる軽鎖 CDR を持ち、
 前記重鎖は、CDR - H 1、CDR - H 2、CDR - H 3 からなる重鎖 CDR を持ち、
 前記の CDR - L 1、CDR - L 2、CDR - L 3 のアミノ酸配列は、それぞれ SEQ ID NO : 1、5 及び 6 で表され、または、それぞれ SEQ ID NO : 2、5 及び 6 で表され、または、それぞれ SEQ ID NO : 3、5 及び 6 で表され、または、それぞれ SEQ ID NO : 4、5 及び 6 で表され、前記の CDR - H 1、CDR - H 2、CDR - H 3 のアミノ酸配列は、それぞれ SEQ ID NO : 7、8 及び 9 で表され、
 好ましくは、前記抗体及びその機能的断片は、PD - 1 キメラ抗体及びその機能的断片、並びに PD - 1 ヒト化抗体及びその機能的断片を含む、
 ことを特徴とする PD - 1 に特異的に結合する可能な抗体及びその機能的断片。

10

【請求項 2】

前記抗体は、ヒト抗体 Ig G 1、Ig G 2、Ig G 3、Ig G 4、Ig A、Ig M、Ig E、Ig D のいずれか 1 種の定常領域配列を含む、ことを特徴とする請求項 1 に記載の抗体及びその抗体機能的断片。

20

【請求項 3】

前記機能的断片は、F (a b ')₂、F a b '、F a b、F v、s c F v、二重特異性抗体、及び抗体の最小認識単位の 1 種又は複数種を含む、ことを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の抗体及びその機能的断片。

30

【請求項 4】

前記 PD - 1 キメラ抗体及びその機能的断片の軽鎖可変領域配列及び重鎖可変領域配列のアミノ酸配列は、それぞれ SEQ ID NO : 10 及び SEQ ID NO : 14 で表され、または、それぞれ SEQ ID NO : 11 及び SEQ ID NO : 14 で表され、または、それぞれ SEQ ID NO : 12 及び SEQ ID NO : 14 で表され、または、それぞれ SEQ ID NO : 13 及び SEQ ID NO : 14 で表され、

30

好ましくは、前記 PD - 1 キメラ抗体及びその機能的断片の軽鎖定常領域の配列及び重鎖定常領域の配列のアミノ酸配列は、それぞれ SEQ ID NO : 15 及び SEQ ID NO : 16 で表される、ことを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の抗体及びその機能的断片。

【請求項 5】

前記 PD - 1 ヒト化抗体及びその機能的断片の軽鎖フレームワーク領域は、FR - L 1、FR - L 2、FR - L 3 及び FR - L 4 を含み、重鎖フレームワーク領域は、FR - H 1、FR - H 2、FR - H 3 及び FR - H 4 を含み、

前記 FR - L 1 は、SEQ ID NO : 17 で表されるアミノ酸配列、又は以下の置換及びそれらの組合せにより得られたアミノ酸配列から選ばれ、

40

1 番目のアミノ酸 D は、E に置き換えられ、

2 番目のアミノ酸 V は、I に置き換えられ、

13 番目のアミノ酸 L は、V に置き換えられ、

19 番目のアミノ酸 A は、V に置き換えられ、

前記 FR - L 2 は、SEQ ID NO : 18 で表されるアミノ酸配列、又は以下の置換及びそれらの組合せにより得られたアミノ酸配列から選ばれ、

6 番目のアミノ酸 P は、S に置き換えられ、

7 番目のアミノ酸 G は、H に置き換えられ、

9 番目のアミノ酸 A は、S に置き換えられ、

前記 FR - L 3 は、SEQ ID NO : 19 で表されるアミノ酸配列、又は以下の置

50

換及びそれらの組合せにより得られたアミノ酸配列から選ばれ、

22番目のアミノ酸Lは、Vに置き換えられ、

24番目のアミノ酸Pは、Tに置き換えられ、

28番目のアミノ酸Aは、Gに置き換えられ、

31番目のアミノ酸Fは、Yに置き換えられ、

前記FR-L4は、SEQ ID NO: 20で表されるアミノ酸配列、又は以下の置換により得られたアミノ酸配列から選ばれ、

7番目のアミノ酸Vは、Lに置き換えられ、

前記FR-H1は、SEQ ID NO: 21で表されるアミノ酸配列から選ばれ、

前記FR-H2は、SEQ ID NO: 22で表されるアミノ酸配列、又は以下の置換及びそれらの組合せにより得られたアミノ酸配列から選ばれ、

5番目のアミノ酸Aは、Tに置き換えられ、

14番目のアミノ酸Aは、Sに置き換えられ、

前記FR-H3は、SEQ ID NO: 23で表されるアミノ酸配列、又は以下の置換及びそれらの組合せにより得られたアミノ酸配列から選ばれ

12番目のアミノ酸Nは、Tに置き換えられ、

14番目のアミノ酸Yは、Hに置き換えられ、

18番目のアミノ酸Nは、Sに置き換えられ、

前記FR-H4は、SEQ ID NO: 24で表されるアミノ酸配列から選ばれ、

好ましくは、前記PD-1ヒト化抗体及びその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、SEQ ID NO: 25-36のいずれか1つで表され、

好ましくは、前記PD-1ヒト化抗体及びその機能的断片の重鎖可変領域配列は、SEQ ID NO: 37-42のいずれか1つで表され、

更に好ましくは、前記PD-1ヒト化抗体及びその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、SEQ ID NO: 25で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、SEQ ID NO: 37で表され、

或いは、前記PD-1ヒト化抗体及びその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、SEQ ID NO: 25で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、SEQ ID NO: 38で表され、

或いは、前記PD-1ヒト化抗体及びその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、SEQ ID NO: 29で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、SEQ ID NO: 38で表され、

或いは、前記PD-1ヒト化抗体及びその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、SEQ ID NO: 30で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、SEQ ID NO: 38で表され、

或いは、前記PD-1ヒト化抗体及びその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、SEQ ID NO: 31で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、SEQ ID NO: 38で表され、

或いは、前記PD-1ヒト化抗体及びその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、SEQ ID NO: 26で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、SEQ ID NO: 38で表され、

或いは、前記PD-1ヒト化抗体及びその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、SEQ ID NO: 28で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、SEQ ID NO: 40で表され、

或いは、前記PD-1ヒト化抗体及びその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、SEQ ID NO: 25で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、SEQ ID NO: 40で表され、

或いは、前記PD-1ヒト化抗体及びその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、SEQ ID NO: 29で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、SEQ ID NO: 40で表され、

10

20

30

40

50

或いは、前記 P D - 1 ヒト化抗体及びその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、S E Q I D N O : 3 0 で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、S E Q I D N O : 4 0 で表され、

或いは、前記 P D - 1 ヒト化抗体及びその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、S E Q I D N O : 3 1 で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、S E Q I D N O : 4 0 で表され、

或いは、前記 P D - 1 ヒト化抗体及びその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、S E Q I D N O : 2 8 で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、S E Q I D N O : 3 8 で表され、

或いは、前記 P D - 1 ヒト化抗体及びその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、S E Q I D N O : 2 7 で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、S E Q I D N O : 3 9 で表され、

或いは、前記 P D - 1 ヒト化抗体及びその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、S E Q I D N O : 3 2 で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、S E Q I D N O : 3 9 で表され、

或いは、前記 P D - 1 ヒト化抗体及びその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、S E Q I D N O : 3 3 で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、S E Q I D N O : 3 9 で表され、

或いは、前記 P D - 1 ヒト化抗体及びその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、S E Q I D N O : 3 4 で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、S E Q I D N O : 3 9 で表され、

或いは、前記 P D - 1 ヒト化抗体及びその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、S E Q I D N O : 3 5 で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、S E Q I D N O : 4 1 で表され、

或いは、前記 P D - 1 ヒト化抗体及びその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、S E Q I D N O : 3 6 で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、S E Q I D N O : 4 2 で表され、

更に好ましくは、前記 P D - 1 ヒト化抗体及びその機能的断片の軽鎖定常領域配列及び重鎖定常領域配列のアミノ酸配列は、それぞれ S E Q I D N O : 1 5 及び S E Q I D N O : 1 6 で表される、ことを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の抗体及びその機能的断片。

【請求項 6】

単離された核酸分子であって、前記核酸分子は、以下の核酸から選ばれることを特徴とする核酸分子。

A) 請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の抗体及びその機能的断片をコードする D N A 又は R N A、

B) A) で定義された核酸に相補的な核酸。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の抗体及び/又はその機能的断片、又は前記抗体と他の成分とからなる化合物、又は前記抗体の機能的断片と他の成分とからなる化合物を有効成分とする、ことを特徴とする組成物。

【請求項 8】

前記抗体及びその機能的断片は、少なくとも 1 種の診断薬及び/又は治療薬とカップリングして免疫複合体を形成する、ことを特徴とする請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 9】

前記診断薬は、放射性核種、放射性造影剤、常磁性イオン、金属、蛍光標識、化学発光標識物、超音波造影剤、光増感剤からなる群より選ばれる 1 種又は複数種であり、

好ましくは、前記放射性核種は、 ^{110}In 、 ^{111}In 、 ^{177}Lu 、 ^{18}F 、 ^{52}Fe 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 、 ^{89}Zr 、 ^{94}mTc 、 ^{94}Tc 、 ^{99}mTc 、 ^{120}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I

¹I、¹⁵⁴-¹⁵⁸Gd、³²P、¹¹C、¹³N、¹⁵O、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、⁵¹Mn、⁵²mMn、⁵⁵Co、⁷²As、⁷⁵Br、⁷⁶Br、⁸²mRb及び⁸³Srからなる群より選ばれる1種又は複数種であり、

好ましくは、前記常磁性イオンは、クロム(III)、マンガン(II)、鉄(III)、鉄(II)、コバルト(II)、ニッケル(II)、銅(II)、ネオジウム(III)、サマリウム(III)、イッテルビウム(III)、ガドリニウム(III)、バナジウム(II)、テルビウム(III)、ジスプロシウム(III)、ホルミウム(III)及びエルビウム(III)からなる群より選ばれる1種又は複数種を含み、

好ましくは、前記蛍光標識は、Alexa 350、Alexa 405、Alexa 430、Alexa 488、Alexa 555、Alexa 647、AMCA、アミノアクリジン、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665、BODIPY-FL、BODIPY-R6G、BODIPY-TMR、BODIPY-TRX、5-カルボキシ-4',5'-ジクロロ-2',7'-ジメトキシフルオレセイン、5-カルボキシ-2',4',5',7'-テトラクロロフルオレセイン、5-カルボキシフルオレセイン、5-カルボキシローダミン、6-カルボキシローダミン、6-カルボキシテトラメチルローダミン、Cascade Blue、Cy2、Cy3、Cy5、Cy7、6-FAM、ダンシルクロリド、フルオレセイン、HEX、6-JOE、NBD(7-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾール)、Oregon Green 488、Oregon Green 500、Oregon Green 514、Pacific Blue、フタル酸、テレフタル酸、イソフタル酸、クレシルファーストバイオレット、クレシルバイオレット、プリリアントクレシルブルー、パラアミノ安息香酸、エリスロシン、フタロシアニン、アゾメチン、シアニン、キサンチン、スクシニルフルオレセイン、希土類金属クリプテート、トリス(ピピリジル)ジアミン ユウロピウム、ユウロピウムクリプテート又はキレート、ジアミン、ピシアニン、La Jolla Blue Dye、アロフィコシアニン、allocoocyanin B、フィコシアニンC、フィコシアニンR、チアミン、R-フィコエリトリン、C-フィコシアニン、フィコエリスリンR、REG、ローダミングリーン、ローダミンイソチオシアネート、ローダミンレッド、ROX、TAMRA、TET、TRIT(テトラメチルローダミンイソチオール)、テトラメチルローダミン及びテキサスレッドからなる群より選ばれる1種又は複数種である、ことを特徴とする請求項8に記載の組成物。

【請求項10】

前記治療薬は、裸抗体、細胞毒性薬、薬物、放射性核種、ホウ素原子、免疫調節剤、抗アポトーシス剤、光増感性治療薬、免疫複合体、オリゴヌクレオチドからなる群より選ばれる1種又は複数種であり、

好ましくは、前記薬物は、メトトレキサート、フルオロウラシル、メルカプトプリン、ヒドロキシカルバミド、シタラピン、メクロレタミン、シクロホスファミド、チオテパ、シスプラチン、マイトマイシン、プレオマイシン、カンプトテシン、ポドフィロトキシン、アクチノマイシンD、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ビンブラスチン、バクリタキセル、セファロタキシン、及びL-アスパラギナーゼからなる群より選ばれる1種又は複数種であり、

好ましくは、前記オリゴヌクレオチドは、shRNA、miRNA及びsiRNAからなる群より選ばれる1種又は複数種であり、

好ましくは、前記免疫調節剤は、サイトカイン、ケモカイン、幹細胞増殖因子、リンホトキシン、造血因子、コロニー刺激因子(CSF)、インターフェロン、エリスロポエチン、トロンボポエチン、腫瘍壊死因子(TNF)、インターロイキン(IL)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)及び幹細胞増殖因子からなる群より選ばれる1種又は複数種であり、

好ましくは、前記放射性核種は、¹¹¹In、¹¹¹At、¹⁷⁷Lu、²¹¹Bi、²¹²Bi、²¹³Bi、²¹¹At、⁶²Cu、⁶⁷Cu、⁹⁰Y、¹²⁵I、¹³¹I、¹³³I、³²P、³³P、⁴⁷Sc、¹¹¹Ag、⁶⁷Ga、¹⁵³Sm、¹⁶¹

10

20

30

40

50

Tb、^{1 5 2}Dy、^{1 6 6}Dy、^{1 6 1}Ho、^{1 6 6}Ho、^{1 8 6}Re、^{1 8 8}Re、^{1 8 9}Re、^{2 1 1}Pb、^{2 1 2}Pb、^{2 2 3}Ra、^{2 2 5}Ac、^{7 7}As、^{8 9}Sr、^{9 9}Mo、^{1 0 5}Rh、^{1 4 9}Pm、^{1 6 9}Er、^{1 9 4}Ir、^{5 8}Co、^{8 0}mBr、^{9 9}mTc、^{1 0 3}mRh、^{1 0 9}Pt、^{1 1 9}Sb、^{1 8 9}mOs、^{1 9 2}Ir、^{2 1 9}Rn、^{2 1 5}Po、^{2 2 1}Fr、^{2 5 5}Fm、^{1 1}C、^{1 3}N、^{1 5}O、^{7 5}Br、^{1 9 8}Au、^{1 9 9}Au、^{2 2 4}Ac、^{7 7}Br、^{1 1 3}mIn、^{9 5}Ru、^{9 7}Ru、^{1 0 3}Ru、^{1 0 5}Ru、^{1 0 7}Hg、^{2 0 3}Hg、^{1 2 1}mTe、^{1 2 2}mTe、^{1 2 5}mTe、^{1 6 5}Tm、^{1 6 7}Tm、^{1 6 8}Tm、^{1 9 7}Pt、^{1 0 9}Pd、^{1 4 2}Pr、^{1 4 3}Pr、^{1 6 1}Tb、^{5 7}Co、^{5 8}Co、^{5 1}Cr、^{5 9}Fe、^{7 5}Se、^{2 0 1}Tl、^{7 6}Br及び^{1 6 9}Ybからなる群より選ばれる1種又は複数種である、ことを特徴とする請求項8又は9に記載の組成物。

10

【請求項11】

請求項7～10のいずれかに記載の組成物の、自己免疫疾患、移植片に対する免疫応答、アレルギー反応、感染症、神経変性疾患、及び腫瘍を予防及び/又は治療するための薬物の調製における応用であって、

好ましくは、前記自己免疫疾患は、関節炎、関節リウマチ、乾癬、多発性硬化症、潰瘍性大腸炎、クローン病、全身性エリテマトーデス、糸球体腎炎、拡張型心筋症様疾患、シェーグレン症候群、アレルギー性接触皮膚炎、多発性筋炎、強皮症、結節性多発動脈炎、リウマチ熱、白斑、インスリン依存型糖尿病、ベーチェット症候群、及び慢性甲状腺炎からなる群より選ばれるいずれかの1種であり、

20

好ましくは、前記神経変性疾患は、パーキンソン病、ハンチントン病、マシヤド・ジョセフ病、筋萎縮性側索硬化症、及びクロイツフェルト・ヤコブ病からなる群より選ばれるいずれかの1種であり、

好ましくは、前記腫瘍は、白血病、リンパ腫、骨髄腫、脳腫瘍、頭頸部扁平上皮癌、非小細胞肺癌、上咽頭癌、食道癌、胃癌、膵臓癌、胆嚢癌、肝臓癌、結腸・直腸癌、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、子宮肉腫、前立腺がん、膀胱がん、腎細胞癌、及び黒色腫からなる群より選ばれるいずれかの1種である応用。

【請求項12】

請求項1～5のいずれかに記載の抗体及びその機能的断片の、自己免疫疾患、移植片に対する免疫応答、アレルギー反応、感染症、神経変性疾患、及び腫瘍を予防及び/又は治療するための薬物の調製における応用であって、

30

好ましくは、前記自己免疫疾患は、関節炎、関節リウマチ、乾癬、多発性硬化症、潰瘍性大腸炎、クローン病、全身性エリテマトーデス、糸球体腎炎、拡張型心筋症様疾患、シェーグレン症候群、アレルギー性接触皮膚炎、多発性筋炎、強皮症、結節性多発動脈炎、リウマチ熱、白斑、インスリン依存型糖尿病、ベーチェット症候群、及び慢性甲状腺炎からなる群より選ばれるいずれかの1種であり、

好ましくは、前記神経変性疾患は、パーキンソン病、ハンチントン病、マシヤド・ジョセフ病、筋萎縮性側索硬化症、及びクロイツフェルト・ヤコブ病からなる群より選ばれるいずれかの1種であり、

好ましくは、前記腫瘍は、白血病、リンパ腫、骨髄腫、脳腫瘍、頭頸部扁平上皮癌、非小細胞肺癌、上咽頭癌、食道癌、胃癌、膵臓癌、胆嚢癌、肝臓癌、結腸・直腸癌、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、子宮肉腫、前立腺がん、膀胱がん、腎細胞癌、及び黒色腫からなる群より選ばれるいずれかの1種である応用。

40

【請求項13】

自己免疫疾患、移植片に対する免疫応答、アレルギー反応、感染症、神経変性疾患、及び腫瘍を予防及び/又は治療するための薬物であって、

前記薬物は、請求項1～5のいずれかに記載のPD-1に特異的に結合する可能な抗体及びその機能的断片、並びに薬学的に許容されるベクターを含み、

又は、前記薬物は、請求項7～10のいずれかに記載の組成物、及び薬学的に許容されるベクターを含み、

50

好ましくは、前記自己免疫疾患は、関節炎、関節リウマチ、乾癬、多発性硬化症、潰瘍性大腸炎、クローン病、全身性エリテマトーデス、糸球体腎炎、拡張型心筋症様疾患、シェーグレン症候群、アレルギー性接触皮膚炎、多発性筋炎、強皮症、結節性多発動脈炎、リウマチ熱、白斑、インスリン依存型糖尿病、ベーチェット症候群、及び慢性甲状腺炎からなる群より選ばれるいずれかの1種であり、

好ましくは、前記神経変性疾患は、パーキンソン病、ハンチントン病、マシャド・ジョセフ病、筋萎縮性側索硬化症、及びクロイツフェルト・ヤコブ病からなる群より選ばれるいずれかの1種であり、

好ましくは、前記腫瘍は、白血病、リンパ腫、骨髄腫、脳腫瘍、頭頸部扁平上皮癌、非小細胞肺癌、上咽頭癌、食道癌、胃癌、膵臓癌、胆嚢癌、肝臓癌、結腸・直腸癌、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、子宮肉腫、前立腺がん、膀胱がん、腎細胞癌、及び黒色腫からなる群より選ばれるいずれかの1種である、ことを特徴とする薬物。

10

【請求項14】

請求項1～5のいずれかに記載の抗体及びその機能的断片の、自己免疫疾患、移植片に対する免疫応答、アレルギー反応、感染症、神経変性疾患、及び腫瘍の予防及び/又は治療における応用であって、

好ましくは、前記自己免疫疾患は、関節炎、関節リウマチ、乾癬、多発性硬化症、潰瘍性大腸炎、クローン病、全身性エリテマトーデス、糸球体腎炎、拡張型心筋症様疾患、シェーグレン症候群、アレルギー性接触皮膚炎、多発性筋炎、強皮症、結節性多発動脈炎、リウマチ熱、白斑、インスリン依存型糖尿病、ベーチェット症候群、及び慢性甲状腺炎からなる群より選ばれるいずれかの1種であり、

20

好ましくは、前記神経変性疾患は、パーキンソン病、ハンチントン病、マシャド・ジョセフ病、筋萎縮性側索硬化症、及びクロイツフェルト・ヤコブ病からなる群より選ばれるいずれかの1種であり、

好ましくは、前記腫瘍は、白血病、リンパ腫、骨髄腫、脳腫瘍、頭頸部扁平上皮癌、非小細胞肺癌、上咽頭癌、食道癌、胃癌、膵臓癌、胆嚢癌、肝臓癌、結腸・直腸癌、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、子宮肉腫、前立腺がん、膀胱がん、腎細胞癌、及び黒色腫からなる群より選ばれるいずれかの1種である応用。

【請求項15】

請求項14に記載の薬物を個体に投与することを特徴とする自己免疫疾患、移植片に対する免疫応答、アレルギー反応、感染症、神経変性疾患、及び腫瘍を予防及び/又は治療する方法。

30

【発明の詳細な説明】

【相互参照】

【0001】

本願は、2016年09月14日に中国特許庁へ提出された、出願番号がCN201610827099.1、発明の名称が「PD-1に特異的に結合する可能な抗体及びその機能的断片」である中国特許出願に基づき優先権を主張し、その全内容は、援用により本明細書に組み込まれる。

【技術分野】

40

【0002】

本発明は、医学・生物学的技術及びヒト化抗体修飾の研究分野に関し、具体的には、PD-1に特異的に結合する可能な抗体及びその機能的断片に関する。

【背景技術】

【0003】

プログラム細胞死-1 (programmed death-1、PD-1) は、近年大きな注目を集めている免疫チェックポイント (immune checkpoint) となり、T細胞活性化の調節に主に関与し、免疫応答の強さ及び持続期間を調節することができる。正常な状態には、PD-1は、生体組織の自己免疫寛容を仲介・維持し、炎症反応中の免疫系の過剰な活性化による自己組織の損傷を防止し、自己免疫疾患の発生を回

50

避するのに積極的な役割を果たし、病理学的状態には、腫瘍免疫および種々の自己免疫疾患の発生・進行に關与する (Anticancer Agents Med Chem. 2015; 15(3): 307-13. Hematol Oncol Stem Cell Ther. 2014 Mar; 7(1): 1-17. Trends Mol Med. 2015 Jan; 21(1): 24-33. Immunity. 2013 Jul 25; 39(1): 61-73. J Clin Oncol. 2015 Jun 10; 33(17): 1974-82.)。

【0004】

PD-1は、CD28ファミリーのメンバーに属するが、CD28ファミリーの他のメンバー、例えば、ジスルフィド結合によって共有結合二量体を形成できるCTLA4と異なり、PD-1は、単量体として存在する。PD-1の構造は、主に細胞外免疫グロブリン可変領域様ドメイン、疎水性膜貫通領域、及び細胞内領域を含み、その細胞内領域は、独立した2つのリン酸化部位を含み、それぞれ免疫受容体チロシンベース抑制モチーフ(ITIM)及び免疫受容体チロシンベーススイッチモチーフ(ITSM)である。PD-1は、主に活性化T細胞の表面に誘導され、B細胞、NK細胞、単球、DC細胞にも発現している。PD-1のリガンドは、PD-L1(programmed death ligand 1)、PD-L2(programmed death ligand 2)を含み、そのリガンドは、B7ファミリーに属し、中でも、PD-L1は、T細胞、B細胞、単球、マクロファージ、DC細胞、及び内皮細胞、表皮細胞などを含む複数種の免疫細胞の表面に誘導されているが、PD-L2は、マクロファージ、DC細胞、B細胞を含む幾つかの免疫細胞のみに誘導されている (Autoimmun Rev, 2013, 12(11): 1091-1100. Front Immunol, 2013, 4: 481. Nat Rev Cancer, 2012, 12(4): 252-264. Trends Mol Med. 2015 Jan; 21(1): 24-33.)。

【0005】

腫瘍研究では、PD-L1は、黒色腫、肺癌、腎臓癌、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、膀胱がん、食道癌、胃癌、膵臓癌、腸癌などを含む複数種の腫瘍表面に高発現し、PD-L2は、B細胞リンパ腫に高発現していることがわかった。腫瘍細胞は、PD-L1又はPD-L2の高発現を介してT細胞上のPD-1に結合し、免疫抑制シグナルを伝達し、腫瘍細胞への生体の免疫寛容をもたらすことにより、腫瘍細胞の増殖および転移に寄与する。PD-1リガンドの高発現は、癌患者における予後不良および薬剤耐性と密接に関連している (Hematol Oncol Stem Cell Ther. 2014 Mar; 7(1): 1-17.)。また、研究では、PD-1がT細胞の表面、特に、腫瘍細胞に浸潤しているT細胞の表面にアップレギュレートされることは、予後不良とも密接に関連している (Trends Mol Med. 2015 Jan; 21(1): 24-33.)。

【0006】

抗腫瘍のためにPD-1/PD-Lsシグナル伝達経路を遮断できる抗体を開発することは、最近の注目点となる。臨床的には、抗PD-1/PD-Ls抗体は、以下のような2つの明らかな特徴がある。即ち、第一、薬効は、特定の腫瘍タイプに限定されず、広範囲の腫瘍に対する強力かつ長期にわたる抗腫瘍効果を持ち、ますます多くの種類の腫瘍が臨床評価に入るにつれて、この特徴はさらに検証されることになる。第二、これらの抗体は、安全性が非常に良く、化学療法薬及び分子標的薬の一般的な副作用、例えば、疲労、白血球減少症、禿頭症、下痢、発疹などを起こすことがなく、幾つかの免疫関連副作用のみがある。PD-1抗体nivolumabは進行性黒色腫、非小細胞肺癌および腎細胞癌の治療薬として市販され、pembrolizumabは、進行性黒色腫、非小細胞肺癌の治療薬として市販されている。因みに、現在では、抗PD-1/PD-Ls抗体の良好な抗腫瘍効果は、少数の患者のみに有益であり、大部の患者は先天的な薬剤耐性を有し、または二次耐性が生じる (Oncology (Williston Park). 2014 Nov; 28 Suppl 3: 15-28.)。

これに鑑み、特に本発明を提案した。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、得られたヒトPD-1のタンパク質に特異的に結合する親抗ヒトPD-1マウスモノクローナル抗体に基づき、クローニング、同定、および遺伝子構造の分析により、そのCDR領域の配列を確認し、対応するキメラ抗体及びヒト化抗体を構築しつつ、対応する真核細胞発現系を樹立し、そのキメラ抗体及びヒト化抗体を生産して精製する。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明に係る上記の目的を達成するために、特に、以下の技術案を採用する。

PD-1に特異的に結合する可能な抗体及びその機能的断片において、前記の抗体又は抗体の機能的断片は、軽鎖及び重鎖を含み、

前記軽鎖は、CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3からなる軽鎖CDRを持ち、前記重鎖は、CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3からなる重鎖CDRを持ち、

前記のCDR-L1、CDR-L2、CDR-L3のアミノ酸配列は、それぞれSEQ ID NO: 1、5及び6で表され、または、それぞれSEQ ID NO: 2、5及び6で表され、または、それぞれSEQ ID NO: 3、5及び6で表され、または、それぞれSEQ ID NO: 4、5及び6で表され、前記のCDR-H1、CDR-H2、CDR-H3のアミノ酸配列は、それぞれSEQ ID NO: 7、8及び9で表され、

好ましくは、前記の抗体及びその機能的断片は、PD-1キメラ抗体及びその機能的断片、並びにPD-1ヒト化抗体及びその機能的断片を含む（前記の抗体及びその機能的断片は、PD-1キメラ抗体及びその機能的断片を含み、或いは、前記の抗体及びその機能的断片は、PD-1ヒト化抗体及びその機能的断片を含むことも理解すべきである）。

好ましくは、前記抗体及びその機能的断片は、PD-1キメラ抗体及びその機能的断片、並びにPD-1ヒト化抗体及びその機能的断片を含む（前記の抗体及びその機能的断片は、PD-1キメラ抗体及びその機能的断片を含み、或いは、前記の抗体及びその機能的断片は、PD-1ヒト化抗体及びその機能的断片を含むことも理解すべきである）。

【0009】

抗体の結合特異性および親和性はいずれも主にCDR配列によって決定されることは、当技術分野において周知であり、非CDR領域のアミノ酸配列を周知の成熟した既存技術により容易に変更して、類似の生物学的活性を有する変異体を取得する。本発明に係る上記CDR配列と完全に同じなCDR配列を有するモノクローナル抗体の変異体は、それが本発明に係るヒト化抗体と完全に同じなCDR配列を有するために、類似する生物学的活性を持つ。

好ましくは、上記のような抗体及びその機能的断片において、前記抗体は、ヒト抗体IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE、IgDからなる群より選ばれるいずれか1種の定常領域の配列を含む。

【0010】

好ましくは、上記のような抗体及びその機能的断片において、前記機能的断片は、F(ab')₂、Fab'、Fab、Fv、scFv、二重特異性抗体及び抗体の最小認識単位(minimal recognition units, MRU)からなる群より選ばれる1種又は複数種を含む。

本発明に係る「機能的断片」とは、特に、PD-1に対して親抗体と同じな特異性を持つ抗体断片を意味する。上記機能的断片に加えて、半減期が延長した任意の断片も含まれる。

scFv (sc = 一本鎖)、二重特異性抗体 (diabodies)。

【0011】

それらの機能的断片は、通常、それらが由来する抗体と同じな結合特異性を有する。当

10

20

30

40

50

業者は、本発明に係る抗体の断片は、例えば、酵素消化の方法（ペプシンまたはパピインを含む）、及び/又はジスルフィド結合を化学的に還元して開裂させる方法により上記機能的断片を取得することができることを本発明の説明に記載の内容から推測する。

抗体の断片は、当業者に周知の遺伝子組換え技術、又は自動ペプチド合成装置、例えば、Applied Biosystems などにより販売される自動ペプチド合成装置により、ペプチド合成により取得されることもできる。

【0012】

好ましくは、上記のような抗体及びその機能的断片において、前記PD-1キメラ抗体及びその機能的断片の軽鎖可変領域配列及び重鎖可変領域配列のアミノ酸配列は、それぞれSEQ ID NO: 10及びSEQ ID NO: 14で表され、または、それぞれSEQ ID NO: 11及びSEQ ID NO: 14で表され、または、それぞれSEQ ID NO: 12及びSEQ ID NO: 14で表され、または、それぞれSEQ ID NO: 13及びSEQ ID NO: 14で表される。

さらに好ましくは、上記のような抗体及びその機能的断片において、前記PD-1キメラ抗体及びその機能的断片の軽鎖定常領域配列及び重鎖定常領域配列のアミノ酸配列は、それぞれSEQ ID NO: 15及びSEQ ID NO: 16で表される。

【0013】

好ましくは、上記のような抗体及びその機能的断片において、前記PD-1ヒト化抗体及びその機能的断片の軽鎖フレームワーク領域は、FR-L1、FR-L2、FR-L3及びFR-L4を含み、重鎖フレームワーク領域は、FR-H1、FR-H2、FR-H3及びFR-H4を含む。

前記FR-L1は、SEQ ID NO: 17で表されるアミノ酸配列、又は以下の置換及びそれらの組合せにより得られたアミノ酸配列から選ばれ、

- 1番目のアミノ酸Dは、Eに置き換えられ、
- 2番目のアミノ酸Vは、Iに置き換えられ、
- 13番目のアミノ酸Lは、Vに置き換えられ、
- 19番目のアミノ酸Aは、Vに置き換えられ、

前記FR-L2は、SEQ ID NO: 18で表されるアミノ酸配列、又は以下の置換及びそれらの組合せにより得られたアミノ酸配列から選ばれ、

- 6番目のアミノ酸Pは、Sに置き換えられ、
- 7番目のアミノ酸Gは、Hに置き換えられ、
- 9番目のアミノ酸Aは、Sに置き換えられ、

前記FR-L3は、SEQ ID NO: 19で表されるアミノ酸配列、又は以下の置換及びそれらの組合せにより得られたアミノ酸配列から選ばれ、

- 22番目のアミノ酸Lは、Vに置き換えられ、
- 24番目のアミノ酸Pは、Tに置き換えられ、
- 28番目のアミノ酸Aは、Gに置き換えられ、
- 31番目のアミノ酸Fは、Yに置き換えられ、

前記FR-L4は、SEQ ID NO: 20で表されるアミノ酸配列、又は以下の置換により得られたアミノ酸配列から選ばれ、

- 7番目のアミノ酸Vは、Lに置き換えられ、

前記FR-H1は、SEQ ID NO: 21で表されるアミノ酸配列から選ばれ、

前記FR-H2は、SEQ ID NO: 22で表されるアミノ酸配列、又は以下の置換及びそれらの組合せにより得られたアミノ酸配列から選ばれ、

- 5番目のアミノ酸Aは、Tに置き換えられ、
- 14番目のアミノ酸Aは、Sに置き換えられ、

前記FR-H3は、SEQ ID NO: 23で表されるアミノ酸配列、又は以下の置換及びそれらの組合せにより得られたアミノ酸配列から選ばれ、

- 12番目のアミノ酸Nは、Tに置き換えられ、
- 14番目のアミノ酸Yは、Hに置き換えられ、

10

20

30

40

50

18番目のアミノ酸Nは、Sに置き換えられ、
前記FR-H4は、SEQ ID NO: 24で表されるアミノ酸配列から選ばれ、
一般的に、ウス抗体のCDRをヒト抗体フレームワークに移植し、配列相同性が高いヒト抗体フレームワークを選択することはある程度の成功率を有する。しかしながら、多くのCDR移植は、一定の抗体活性を回復させるために復帰突然変異を必要とすることが研究により示されている。如何に適切なヒト抗体フレームワークを選択するのは、主なボトルネックである。

【0014】

CDRは、抗原結合に主な関連部位であるが、多数の場合には、FR（フレームワーク、Framework region）は結合部位コンフォメーションに大きな影響を及ぼす。高親和性ヒト化抗体を得るために、本発明は、適切なFR領域を選択しながら、関連するFR残基をマウス由来アミノ酸又は同じな作用があるヒトに見出されるアミノ酸に復帰させる必要がある。

好ましくは、前記PD-1ヒト化抗体及びその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、SEQ ID NO: 25-36のいずれか1つで表され、

好ましくは、前記PD-1ヒト化抗体及びその機能的断片の重鎖可変領域配列は、SEQ ID NO: 37-42のいずれか1つで表され、

さらに好ましくは、前記PD-1ヒト化抗体及びその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、SEQ ID NO: 25で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、SEQ ID NO: 37で表され、

或いは、前記PD-1ヒト化抗体及びその機能的断片の軽鎖可変領域配列如SEQ ID NO: 25で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、SEQ ID NO: 38で表され、

或いは、前記PD-1ヒト化抗体及びその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、SEQ ID NO: 29で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、SEQ ID NO: 38で表され、

或いは、前記PD-1ヒト化抗体及びその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、SEQ ID NO: 30で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、SEQ ID NO: 38で表され、

或いは、前記PD-1ヒト化抗体及びその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、SEQ ID NO: 31で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、SEQ ID NO: 38で表され、

或いは、前記PD-1ヒト化抗体及びその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、SEQ ID NO: 26で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、SEQ ID NO: 38で表され、

或いは、前記PD-1ヒト化抗体及びその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、SEQ ID NO: 28で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、SEQ ID NO: 40で表され、

或いは、前記PD-1ヒト化抗体及びその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、SEQ ID NO: 25で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、SEQ ID NO: 40で表され、

或いは、前記PD-1ヒト化抗体及びその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、SEQ ID NO: 29で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、SEQ ID NO: 40で表され、

或いは、前記PD-1ヒト化抗体及びその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、SEQ ID NO: 30で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、SEQ ID NO: 40で表され、

或いは、前記PD-1ヒト化抗体及びその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、SEQ ID NO: 31で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、SEQ ID NO: 40で表され、

10

20

30

40

50

或いは、前記 P D - 1 ヒト化抗体及びその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、 S E Q
I D N O : 2 8 で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、 S E Q I D N O :
3 8 で表され、

或いは、前記 P D - 1 ヒト化抗体及びその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、 S E Q
I D N O : 2 7 で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、 S E Q I D N O :
3 9 で表され、

或いは、前記 P D - 1 ヒト化抗体及びその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、 S E Q
I D N O : 3 2 で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、 S E Q I D N O :
3 9 で表され、

或いは、前記 P D - 1 ヒト化抗体及びその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、 S E Q 10
I D N O : 3 3 で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、 S E Q I D N O :
3 9 で表され、

或いは、前記 P D - 1 ヒト化抗体及びその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、 S E Q
I D N O : 3 4 で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、 S E Q I D N O :
3 9 で表され、

或いは、前記 P D - 1 ヒト化抗体及びその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、 S E Q
I D N O : 3 5 で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、 S E Q I D N O :
4 1 で表され、

或いは、前記 P D - 1 ヒト化抗体及びその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、 S E Q
I D N O : 3 6 で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、 S E Q I D N O : 20
4 2 で表され、

さらに好ましくは、上記のような抗体及びその機能的断片、前記 P D - 1 ヒト化抗体及
びその機能的断片の軽鎖定常領域配列及び重鎖定常領域配列のアミノ酸配列は、それぞれ
S E Q I D N O : 1 5 及び S E Q I D N O : 1 6 で表される。

【 0 0 1 5 】

因みに、本願で上記に開示されているアミノ酸配列の以外は、キメラ抗体及びヒト化抗
体の産生は、当業者が任意の公知の方法、例えば、免疫されたマウスまたは骨髄腫細胞と
融合した他の種の脾臓細胞の骨髄腫細胞によって分泌されるマウス抗体の配列決定された
C D R により設計された組換えヒト化抗体により達成することができる。上記免疫された
動物は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を有してヒト抗体を直接産生するトランスジェニック 30
クマウスを含んでもよい。他の可能な実施形態は、ファージディスプレイ技術を使用して
ライブラリーをスクリーニングすることを含んでもよい。

【 0 0 1 6 】

単離された核酸分子であって、前記核酸分子は、以下の核酸から選ばれる。

- A) 上記のような抗体及びその機能的断片をコードする D N A 又は R N A 、
- B) A) で定義された核酸に相補的な核酸、から選ばれる単離された核酸分子。

上記のような核酸を含むベクター。

本発明は、さらに、上記のような核酸分子をコードする少なくとも 1 つの核酸構築物を
含み、その核酸構築物は、好ましくはベクターであり、さらに好ましくは発現ベクターで
あり、例えば、プラスミドであり、そのベクターの構築方法は本願に係る 1 つの実施例に 40
おいて説明する。

上記のようなベクターで形質転換された宿主細胞。

上記宿主細胞は、真核細胞、例えば、哺乳動物細胞である。

P D - 1 に特異的に結合する可能な抗体及びその機能的断片を生産する方法において、
培地において適切な培養条件下で上記のような宿主細胞を培養するステップと、

培地又は培養された宿主細胞からこのようにして産生された抗体及びその機能的断片を
回収するステップと、

を含む方法。

【 0 0 1 7 】

上記のような抗体和 / 或その機能的断片、又は前記抗体と他の成分とからなる化合物、 50

又は前記抗体の機能的断片と他の成分とからなる化合物を有効成分とする組成物。

好ましくは、上記のような組成物、前記抗体及びその機能的断片は少なくとも1種の診断薬及び/又は治療薬とカップリングして免疫複合体を形成する。

好ましくは、上記のような組成物において、前記診断薬は、放射性核種、放射性造影剤、常磁性イオン、金属、蛍光標識、化学発光標識物、超音波造影剤、光増感剤からなる群より選ばれる1種又は複数種である。

好ましくは、前記放射性核種は、 ^{110}In 、 ^{111}In 、 ^{177}Lu 、 ^{18}F 、 ^{52}Fe 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 、 ^{89}Zr 、 ^{94}mTc 、 ^{94}Tc 、 ^{99}mTc 、 ^{120}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 $^{154}\text{-}^{158}\text{Gd}$ 、 ^{32}P 、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{51}Mn 、 ^{52}mMn 、 ^{55}Co 、 ^{72}As 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 ^{82}mRb 及び ^{83}Sr からなる群より選ばれる1種又は複数種である。

【0018】

好ましくは、前記常磁性イオンは、クロム(III)、マンガン(II)、鉄(III)、鉄(II)、コバルト(II)、ニッケル(II)、銅(II)、ネオジム(III)、サマリウム(III)、イッテルビウム(III)、ガドリニウム(III)、バナジウム(II)、テルビウム(III)、ジスプロシウム(III)、ホルミウム(III)及びエルビウム(III)からなる群より選ばれる1種又は複数種を含む。

好ましくは、前記蛍光標識は、Alexa 350、Alexa 405、Alexa 430、Alexa 488、Alexa 555、Alexa 647、AMCA、アミノアクリジン、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665、BODIPY-FL、BODIPY-R6G、BODIPY-TMR、BODIPY-TRX、5-カルボキシ-4',5'-ジクロロ-2',7'-ジメトキシフルオレセイン、5-カルボキシ-2',4',5',7'-テトラクロロフルオレセイン、5-カルボキシフルオレセイン、5-カルボキシローダミン、6-カルボキシローダミン、6-カルボキシテトラメチルローダミン、Cascade Blue、Cy2、Cy3、Cy5、Cy7、6-FAM、ダンシルクロリド、フルオレセイン、HEX、6-JOE、NBD(7-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾール)、Oregon Green 488、Oregon Green 500、Oregon Green 514、Pacific Blue、フタル酸、テレフタル酸、イソフタル酸、クレシルファーストバイオレット、クレシルバイオレット、プリリアントクレシルブルー、パラアミノ安息香酸、エリスロシン、フタロシアニン、アゾメチン、シアニン、キサンチン、スクシニルフルオレセイン、希土類金属クリプテート、トリス(ビピリジル)ジアミン、ユウロピウム、ユウロピウムクリプテート又はキレート、ジアミン、ピシアニン、La Jolla Blue Dye、アロフィコシアニン、allocoocyanin B、フィコシアニンC、フィコシアニンR、チアミン、R-フィコエリトリン、C-フィコシアニン、フィコエリスリンR、REG、ローダミングリーン、ローダミンイソチオシアネート、ローダミンレッド、ROX、TAMRA、TET、TRIT(テトラメチルローダミンイソチオール)、テトラメチルローダミン及びテキサスレッドからなる群より選ばれる1種又は複数種である。

【0019】

好ましくは、上記のような組成物において、前記治療薬は、裸抗体、細胞毒性薬、薬物、放射性核種、ホウ素原子、免疫調節剤、抗アポトーシス剤、光増感性治療薬、免疫複合体及びオリゴヌクレオチドからなる群より選ばれる1種又は複数種である。

好ましくは、前記薬物は、メトトレキサート、フルオロウラシル、メルカプトプリン、ヒドロキシカルバミド、シタラビン、メクロレタミン、シクロホスファミド、チオテパ、シスプラチン、マイトマイシン、プレオマイシン、カンプトテシン、ポドフィロトキシン、アクチノマイシンD、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ビンブラスチン、パクリタキセル、セファロタキシン及びL-アスパラギナーゼからなる群より選ばれる1種又は複数種である。

10

20

30

40

50

好ましくは、前記オリゴヌクレオチドは、s h R N A、m i R N A及びs i R N Aからなる群より選ばれる1種又は複数種である。

【0020】

好ましくは、前記免疫調節剤は、サイトカイン、ケモカイン、幹細胞増殖因子、リンホトキシン、造血因子、コロニー刺激因子(C S F)、インターフェロン、エリスロポエチン、トロンボポエチン、腫瘍壊死因子(T N F)、インターロイキン(I L)、顆粒球コロニー刺激因子(G - C S F)、顆粒球 - マクロファージコロニー刺激因子(G M - C S F)及び幹細胞増殖因子からなる群より選ばれる1種又は複数種である。

ここで、前記サイトカインは、ヒト成長ホルモン、N - メチオニールヒト成長ホルモン、ウシ成長ホルモン、副甲状腺ホルモン、サイロキシン、インスリン、プロインスリン、リラキシン、プロリラキシン、卵胞刺激ホルモン(F S H)、甲状腺刺激ホルモン(T S H)、黄体形成ホルモン(L H)、肝細胞増殖因子、プロスタグランジン、線維芽細胞増殖因子、プロラクチン、胎盤性ラクトゲン、O Bタンパク質、腫瘍壊死因子 - 、腫瘍壊死因子 - 、ミューラー管障害物質、マウスゴナドトロピン関連ペプチド、インヒピン、アクチピン、血管内皮増殖因子、インテグリン、トロンボポエチン(T P O)、N G F - 、血小板由来成長因子、T G F - 、T G F - 、インスリン様成長因子 - I、インスリン様成長因子 - I I、エリスロポエチン(E P O)、骨誘導因子、インターフェロン - 、インターフェロン - 、マクロファージ - C S F (M - C S F)、I L - 1、I L - 1、I L - 2、I L - 3、I L - 4、I L - 5、I L - 6、I L - 7、I L - 8、I L - 9、I L - 10、I L - 11、I L - 12、I L - 13、I L - 14、I L - 15、I L - 16、I L - 17、I L - 18、I L - 21、I L - 25、L I F、F L T - 3、アンジオスタチン、トロンボスポンジン、エンドスタチン、腫瘍壊死因子及びL Tからなる群より選ばれる1種又は複数種であることが好ましい。

【0021】

前記ケモカインは、R A N T E S、M C A F、M I P 1 - 、M I P 1 - 及びI P - 10からなる群より選ばれる1種又は複数種であることが好ましい。

好ましくは、前記放射性核種は、¹¹¹In、¹¹¹At、¹⁷⁷Lu、²¹¹Bi、²¹²Bi、²¹³Bi、²¹¹At、⁶²Cu、⁶⁷Cu、⁹⁰Y、¹²⁵I、¹³¹I、¹³³I、³²P、³³P、⁴⁷Sc、¹¹¹Ag、⁶⁷Ga、¹⁵³Sm、¹⁶¹Tb、¹⁵²Dy、¹⁶⁶Dy、¹⁶¹Ho、¹⁶⁶Ho、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、¹⁸⁹Re、²¹¹Pb、²¹²Pb、²²³Ra、²²⁵Ac、⁷⁷As、⁸⁹Sr、⁹⁹Mo、¹⁰⁵Rh、¹⁴⁹Pm、¹⁶⁹Er、¹⁹⁴Ir、⁵⁸Co、⁸⁰mBr、⁹⁹mTc、¹⁰³mRh、¹⁰⁹Pt、¹¹⁹Sb、¹⁸⁹mOs、¹⁹²Ir、²¹¹Rn、²¹⁵Po、²²¹Fr、²⁵⁵Fm、¹¹C、¹³N、¹⁵O、⁷⁵Br、¹⁹⁸Au、¹⁹⁹Au、²²⁴Ac、⁷⁷Br、¹¹³mIn、⁹⁵Ru、⁹⁷Ru、¹⁰³Ru、¹⁰⁵Ru、¹⁰⁷Hg、²⁰³Hg、¹²¹mTe、¹²²mTe、¹²⁵mTe、¹⁶⁵Tm、¹⁶⁷Tm、¹⁶⁸Tm、¹⁹⁷Pt、¹⁰⁹Pd、¹⁴²Pr、¹⁴³Pr、¹⁶¹Tb、⁵⁷Co、⁵⁸Co、⁵¹Cr、⁵⁹Fe、⁷⁵Se、²⁰¹Tl、⁷⁶Br及び¹⁶⁹Ybからなる群より選ばれる1種又は複数種である。

【0022】

上記のような組成物の、自己免疫疾患、移植片に対する免疫応答、アレルギー反応、感染症、神経変性疾患、並びに腫瘍を予防及び/又は治療するための薬物の調製における応用。

好ましくは、前記自己免疫疾患は、関節炎、関節リウマチ、乾癬、多発性硬化症、潰瘍性大腸炎、クローン病、全身性エリテマトーデス、糸球体腎炎、拡張型心筋症様疾患、シェーグレン症候群、アレルギー性接触皮膚炎、多発性筋炎、強皮症、結節性多発動脈炎、リウマチ熱、白斑、インスリン依存型糖尿病、ベーチェット症候群、及び慢性甲状腺炎からなる群より選ばれるいずれか1種である。

好ましくは、前記神経変性疾患は、パーキンソン病、ハンチントン病、マシャド・ジョセフ病、筋萎縮性側索硬化症、クロイツフェルト・ヤコブ病からなる群より選ばれるい

10

20

30

40

50

れか 1 種である。

【 0 0 2 3 】

好ましくは、前記腫瘍は、白血病、リンパ腫、骨髄腫、脳腫瘍、頭頸部扁平上皮癌、非小細胞肺癌、上咽頭癌、食道癌、胃癌、膵臓癌、胆嚢癌、肝臓癌、結腸・直腸癌、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、子宮肉腫、前立腺がん、膀胱がん、腎細胞癌、及び黒色腫からなる群より選ばれるいずれか 1 種である。

上記のような抗体及びその機能的断片の、自己免疫疾患、移植片に対する免疫応答、アレルギー反応、感染症、神経変性疾患、及び腫瘍を予防及び/又は治療するための薬物の調製における応用。

【 0 0 2 4 】

自己免疫疾患、移植片に対する免疫応答、アレルギー反応、感染症、神経変性疾患、及び腫瘍を予防及び/又は治療する薬物であって、上記のような PD - 1 に特異的に結合する可能な抗体及びその機能的断片、並びに薬学的に許容されるベクターを含有し、

又は、上記のような組成物、及び薬学的に許容されるベクターを含有する薬物。

【 0 0 2 5 】

ここで、「薬学的に許容される」という用語とは、化合物がヒトに投与された場合に生理学的に許容され、胃腸障害、めまいなどのアレルギー反応、またはそれらのアレルギー反応と類似する全身性アレルギー反応を引き起こさないことを意味する。

本発明では、「薬学的に許容されるベクター」は、バインダー（例えば、微結晶セルロース、アルギン酸塩、ゼラチン及びポリビニルピロリドン）、充填剤（例えば、デンプン、ショ糖、グルコース及び無水乳酸）、崩壊剤（例えば、架橋 PVP、架橋カルボキシメチルスターチナトリウム、架橋カルボキシメチルセルロースナトリウム、及び低置換度ヒドロキシプロピルセルロース）、滑沢剤（ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸アルミニウム、タルク、ポリエチレングリコール、安息香酸ナトリウム）、湿潤剤（例えば、グリセリン）、界面活性剤（例えば、セチルアルコール）、及び吸収促進剤、矯味剤、甘味剤、希釈剤、コーティング剤などを含むが、これらに限定されない。

【 0 0 2 6 】

上記のような抗体及びその機能的断片の、自己免疫疾患、移植片に対する免疫応答、アレルギー反応、感染症、神経変性疾患、及び腫瘍の予防及び/又は治療における応用。

好ましくは、上記のような自己免疫疾患は、関節炎、関節リウマチ、乾癬、多発性硬化症、潰瘍性大腸炎、クローン病、全身性エリテマトーデス、糸球体腎炎、拡張型心筋症様疾患、シェーグレン症候群、アレルギー性接触皮膚炎、多発性筋炎、強皮症、結節性多動脈炎、リウマチ熱、白斑、インスリン依存型糖尿病、ベーチェット症候群、及び慢性甲状腺炎からなる群より選ばれるいずれか 1 種である。

【 0 0 2 7 】

好ましくは、上記のような神経変性疾患は、パーキンソン病、ハンチントン病、マシャド・ジョセフ病、筋萎縮性側索硬化症、及びクロイツフェルト・ヤコブ病からなる群より選ばれるいずれか 1 種である。

好ましくは、上記のような腫瘍は、白血病、リンパ腫、骨髄腫、脳腫瘍、頭頸部扁平上皮癌、非小細胞肺癌、上咽頭癌、食道癌、胃癌、膵臓癌、胆嚢癌、肝臓癌、結腸・直腸癌、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、子宮肉腫、前立腺がん、膀胱がん、腎細胞癌、及び黒色腫からなる群より選ばれるいずれか 1 種である。

【 0 0 2 8 】

自己免疫疾患、移植片に対する免疫応答、アレルギー反応、感染症、神経変性疾患、及び腫瘍を予防及び/又は治療する方法において、上記のような薬物を個体に投与することを含む方法。

好ましくは、上記個体は、ヒトである。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 9 】

本発明の具体的な実施形態又は従来技術に係る技術案をより明らかに説明するために、

10

20

30

40

50

以下、具体的な実施形態又は従来技術の説明で使用する必要がある図面を簡単に述べ、下記の説明における図面は、本発明の幾つかの実施形態であり、当業者は、いかなる創造的な作業もなしにそれらの図面に従って他の図面を得ることが明らかになる。

【0030】

【図1】図1は、本発明に係る実施例1における番号2のクローンによって分泌されたモノクローナル抗体のとヒトPD-1に対する結合活性を示す図である。

【図2】図2は、本発明に係る実施例1における番号2のクローンによって分泌されたモノクローナル抗体の、ヒトPD-1/PD-L1結合に対するブロッキング活性を示す図である。

【図3】図3は、本発明に係る実施例3における抗ヒトPD-1キメラ抗体のヒトPD-1に対する結合活性を示す図である。

【図4】図4は、本発明に係る実施例4における抗ヒトPD-1キメラモノクローナル抗体の種特異性を示す図である。

【図5】図5は、本発明に係る実施例4における抗ヒトPD-1キメラモノクローナル抗体の結合特異性を示す図である。

【図6】図6は、本発明に係る実施例5における抗ヒトPD-1キメラモノクローナル抗体の、PD-1/PD-L1、PD-1/PD-L2結合に対するブロッキング活性を示す図である。

【図7】図7は、本発明に係る実施例6における抗ヒトPD-1キメラモノクローナル抗体のT細胞機能調節活性を示す図である。

【図8】図8は、本発明に係る実施例7における抗ヒトPD-1キメラモノクローナル抗体のラット単回静脈内注射後の薬物血中濃度-時間曲線を示す図である。

【図9】図9は、本発明に係る実施例8における抗ヒトPD-1キメラモノクローナル抗体の*in vivo*抗腫瘍効果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0031】

以下、実施例を参照しながら本発明の実施態様をさらに詳細に説明し、しかしながら、当業者は、下記の実施例が、本発明を説明するために過ぎず、本発明の範囲を限定することを意図していないことを理解すべきである。実施例において具体的な条件を明記されないものは、通常の状態又は製造業者によって推奨される条件に従って行われる。使用する試薬又は機器が製造元を明記していないものは、いずれも市販で入手可能な通常の商品である。

【0032】

実施例1 マウス由来抗ヒトPD-1モノクローナル抗体の調製

1.1、動物免疫

実験動物は、北京華阜康生物科技股フン有限公司から購入された6~8週齢の雌性BALB/cマウスを選択した。マウスを環境に1週間慣れさせた後、免疫し始めた。初回免疫は、組換えヒトPD-1-Fcタンパク質100 μ gと完全フロイントアジュバント(Sigma-Aldrich、品番F5881)を使用し、十分に混合してエマルジョンを形成し、マウスに腹腔内注射した。2週間後、追加免疫を行った。追加免疫は、組換えヒトPD-1-Fcタンパク質50 μ gと不完全フロイントアジュバント(Sigma-Aldrich、品番F5806)を使用し、十分に混合してエマルジョンを形成し、マウスに腹腔内注射した。2週間おきに同様の方法で追加免疫し、追加免疫を合計で3回行った。最終免疫後7日目に、マウスの後眼窩静脈叢から採血して血清を遠心分離し、抗体力価をELISAにより測定した。高い力価のマウスを選択して融合させてハイブリドーマを作製した。融合の3日前に、組換えヒトPD-1-Fcタンパク質50 μ gをアジュバントなしで腹腔内注射した。融合当日に、脾臓を無菌的に取り出し、単一脾臓細胞懸濁液を作製し、融合のために用意した。

【0033】

1.2、ハイブリドーマ細胞の調製

対数増殖期の骨髓腫細胞SP2/0を採用し、1000rpmで5分間遠心させ、上清を捨て、細胞を不完全DMEM培養液(Gibco, cat No. 11965)で懸濁した後、計数し、必要な細胞数を取り出し、不完全培養液で2回洗浄した。同時に免疫脾臓細胞の懸濁液を調製し、不完全培養液で2回洗浄した。骨髓腫細胞と脾臓細胞とを割合で1:10又は1:5の比率で混合させ、50mlのプラスチック製遠心分離管中で不完全培養液で、1200rpmで、8分間で1回洗浄した。上清を捨て、スポイトで残存液を吸い出した。沈殿した細胞をほぐして均一化させるために、手掌上に遠心管の底を軽くタップし、40℃水浴に置いて予熱した。1mlのスポイトで1分間程度(最適時間が45秒間)をかけて40℃に予熱された45%のPEG-4000(PH 8.0、Sigma, cat No. P7181)1mlを添加しながら軽く攪拌し(スポイトで攪拌し)、目視観察で目に見える粒子が見えるはずである。10mlのスポイトを用いて90s内で37℃に予熱された不完全培地20~30mlを添加してPEGの作用を停止させ、20~37℃で10分間静置した。1000r/minで5分間遠心し、上清を捨てた。5mlのHAT培地(DMEM+HAT、Sigma, cat No. 1H0262-10VL)を加え、沈殿した細胞を軽く吹かし・吸い(融合した細胞が広がらないように強く吹かないことを注意)、懸濁させ、均一に混合し、その後、脾臓細胞の濃度が $1 \sim 2 \times 10^6 / \text{ml}$ となるように、80~100mlとなるまでにHAT培地を追加した。96ウェル細胞培養プレートを1ウェル当たり0.1mlずつ分注し、24ウェルプレートに1ウェル当たり1.0~1.5mlずつ分注し、その後、培養プレートを37℃で置き、6%CO₂インキュベーター内で培養した。一般的に、96ウェルプレートを6枚敷いた。5日後、1/2の培地をHAT培地と交換した。さらに、7~10日後でHAT培地をHT培地(DMEM+HT、Sigma cat No. H0137-10VL)と交換した。ハイブリドーマ細胞の増殖状況をしばしば観察し、ウェルの底部の面積の1/10以上までに増殖する時に上清を吸い出して抗体の検出に供した。陽性クローンの細胞を拡大培養して凍結保存した。

10

20

30

40

50

【0034】

1.3、クローンのグスクリーニング及び同定

ELISAは、ハイブリドーマ培養上清における抗ヒトPD-1抗体をグスクリーニングするために用いられる。pH=9.6の炭酸塩緩衝液で高吸着型ELISA用96ウェルプレートに組換えヒトPD-1(Beijing Sino Biological Inc.社、品番10377-H08H)を被覆し、被覆濃度は $1 \mu\text{g} / \text{mL}$ であり、被覆量は、1ウェル当たり100 μL であり、4℃で一晩被覆した。PBSTで5回洗浄した。1%BSAを含むPBSTで300 μL /ウェルでブロックし、25℃で1時間インキュベートした。PBSTで5回洗浄した。培養上清サンプル及び陽性対照血清を1ウェル当たり100 μL 加え、25℃で1時間インキュベートした。PBSTで5回洗浄した。そして、1%BSAを含むPBSTで1:10000で希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体(Abcam、品番Ab7068)を1ウェル当たり100 μL 加え、25℃で1時間インキュベートした。PBSTで5回洗浄した。100 μL /ウェルで比色基質TMBを加え、室温で10分間発色させた。100 μL /ウェルで1M H₂SO₄を加え、発色を停止させた。450nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダーで読み取った。OD450nmの強さに基づいて抗ヒトPD-1結合抗体を分泌することができる陽性クローンを選択した。

【0035】

ELISAは陽性クローンによって分泌された抗ヒトPD-1抗体がPD-1/PD-L1の結合を阻害できるか否かを測定した。pH=9.6の炭酸塩緩衝液で高吸着型ELISA用96ウェルプレートに組換えヒトPD-1-Fcを被覆し、被覆濃度は $1 \mu\text{g} / \text{mL}$ であり、被覆量は、1ウェル当たり100 μL であり、4℃で一晩被覆した。PBSTで5回洗浄した。1%BSAを含むPBSTで300 μL /ウェルでブロックし、25℃で1時間インキュベートした。PBSTで5回洗浄した。抗ヒトPD-1抗体サンプル及び陽性対照を1ウェル当たり50 μL 加え、ビオチン標識PD-L1を加え、濃度

が20 nM (最終濃度が10 nM)で、1ウェル当たり50 μ L加え、25℃で90分間インキュベートした。PBSTで5回洗浄した。そして、1%BSAを含むPBSTで1:1000で希釈したStreptavidin-HRP (BD Pharmingen、品番554066)を1ウェル当たり100 μ L加え、25℃で1時間インキュベートした。PBSTで5回洗浄した。100 μ L/ウェルで比色基質TMBを加え、室温で10分間発色させた。100 μ L/ウェルで1M H_2SO_4 を加え、発色を停止させた。450 nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダーで読み取った。ヒトPD-1-Fc/ビオチン標識PD-L1の結合を阻害できる抗ヒトPD-1抗体は、中和活性を持つ。ブロッキング能の強さに基づいて抗ヒトPD-1中和抗体を分泌することができる陽性クローンを選択した。

結果は、図1に示すように、番号2のクローンは、強いヒトPD-1結合活性を持ち、図2に示すように、番号2のクローンは、同時に強いヒトPD-1/PD-L1結合ブロッキング活性も持つ。

【0036】

1.4、モノクローナル抗体配列の決定

グスクリーニングされた抗原結合活性と抗原中和活性とを併せ持つクローンについて抗体DNA配列の決定を行った。まず、RNAprep Pureキット (Tiangen、DP430)を用いて細胞mRNAを抽出した。手順は以下の通りであり、即ち、懸濁細胞 1×10^7 を収集して300 \times gで5 min遠心させ、細胞を遠沈管に収集し、全ての培地上清を慎重に吸い出した。すぐに溶解ステップを行った。遠沈管の底部を軽く弾いて細胞ペレットをはぐし、適量のライセートRL 600 μ Lを加え、旋回・振動させた。全ての溶液をろ過カラムCS上(ろ過カラムCSが収集チューブにセットされている)に移し、12,000 rpm (~13,400 \times g)で2 min遠心し、濾液を収集した。濾液に70%エタノールを1倍体積(一般的に、350 μ L又は600 μ L)を加え、均一に混合して得られた溶液を沈殿とともに吸着カラムCR3に移し(吸着カラムCR3が収集チューブにセットされている)、12,000 rpm (~13,400 \times g)で30~60 sec遠心し、収集チューブ中の廃液を排出し、吸着カラムCR3を収集チューブに戻した。吸着カラムCR3に除蛋白液RW1を350 μ L加え、12,000 rpm (~13,400 \times g)で30~60 sec遠心し、収集チューブ中の廃液を排出し、吸着カラムCR3を収集チューブ中に戻した。吸着カラムCR3の中央に80 μ LのDNase I溶液を加え、室温で15 min放置した。吸着カラムCR3に350 μ Lの除蛋白液RW1を加え、12,000 rpm (~13,400 \times g)で30~60 sec遠心し、収集チューブ中の廃液を排出し、吸着カラムCR3を収集チューブ中に戻した。吸着カラムCR3に500 μ Lの洗浄液RW(使用前にエタノールを加えたか否かを検査)を加え、室温で2 min静置し、12,000 rpm (~13,400 \times g)で30~60 sec遠心し、収集チューブ中の廃液を排出し、吸着カラムCR3を収集チューブ中に戻した。12,000 rpm (~13,400 \times g)で2 min遠心させ、廃液を排出し、吸着カラムCR3を室温で数分間放置し、吸着材に残った洗浄液を徹底的に乾かした。吸着カラムCR3を新たなRNase-Free遠沈管に移し、30~100 μ LのRNase-Free dd H_2O を加えて室温で2 min放置し、12,000 rpm (~13,400 \times g) 2 min遠心し、RNA溶液を得た。

【0037】

QuantScript RTキット (Tiangen、KR103)を用いてcDNAの第一鎖を合成した。手順は以下の通りであり、即ち、氷上でテンプレートRNAを解凍し、プライマー、10 \times RT mix(ここで、RNasin及びDTTを含み)、Super pure dNTP混合液、RNase-Free dd H_2O を室温(15~25℃)で解凍した後、すばやく氷上にセットした。使用前に、各種の溶液を旋回・振動させて均一に混合し、短時間遠心して管壁に残った液体を収集した。表1の逆転写システムに従って混合液(天根生物Quant cDNAの第一鎖合成キット、品番KR103-04、10倍濃度の逆転写バッファー 2 μ L、超純dNTP 2 μ L、ランダムプ

10

20

30

40

50

ライマー (2 μ L、逆転写酵素 1 μ L) を調製し、よく均一に混合し、旋回・振動時間が5 min以下である。短時間遠心し、氷上に置き、最後にテンプレートRNA (50 ng ~ 2 μ g) を混合液に加え、よく均一に混合し、旋回・振動時間が5 sec以下であり、短時間遠心して管壁に残った液体を収集した。37 °Cで60 minインキュベートした。逆転写により産生されたcDNAの第一鎖を次のPCR反応に使用した。

PCR反応で用いられるプライマーは、表1に示した。

【0038】

【表1】

表1 PCRプライマー

VH primer	
F1 : GAGGTGAAGCTGCAGGAGTCAGGACCTAGCCTGGTG	
R1 : AGGT (C/G) (A/C) AACTGCAG (C/G) AGTC (A/T) GG	
R2 : AGGT (C/G) (A/C) AGCTGCAG (C/G) AGTC (A/T) GG	
R3 : AGGT (C/G) CAGCTGCAG (C/G) AGTC (A/T) GG	
R4 : CCAGGGGCCAGTGGATAGACAAGCTTGGGTGTCGTTTT	20
F2 : ATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTTGGC	
F3 : CTTGACCAGGCATCCTAGAGTCA	
F4 : AGGGGCCAGTGGATAGACTGATGG	
F5 : AGGGACCAAGGGATAGACAGATGG	
R5 : (G/C) A (A/G) GT (A/T/C/G) (A/C) AGCTG (G/C) AG (G/C) AGT C	30
R6 : (G/C) A (A/G) GT (A/T/C/G) (A/C) AGCTG (G/C) AG (G/C) AGT C (A/T) GG	
VL primer	
R1 : GGTGATATCGTGAT (A/G) AC (C/A) CA (G/A) GATGAACTCTC	
R2 : GGTGATATC (A/T) TG (A/C) TGACCCAA (A/T) CTCCACTCTC	
R3 : GGTGATATCGT (G/T) CTCAC (C/T) CA (A/G) TCTCCAGCAAT	
F1 : GGG AAGATGGATCCAGTTGGTGCAGCATCAGC	40
F2 : GGATACAGTTGGTGCAGCATC	
R4 : GA (C/T) ATTGTG (A/C) T (G/C) AC (A/C) CA (A/G) (A/T) CT (A/C) CA	

プライマーを使用する場合に、VH primer中のいずれかの上流プライマーは、いずれかの下流プライマーと配合されて使用することができ、同様にVL primer中のいずれかの上流プライマーは、いずれかの下流プライマーと配合されて使用することもできる。PCR増幅で得られた目的のバンドをpGEM-Tベクターにクローニングし

10

20

30

40

50

た。単一クローンを選別してDNAシーケンシングを行った。

【0039】

実施例2 キメラ抗ヒトPD-1モノクローナル抗体の調製

PCR増幅により得られた抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、SEQ ID NO : 10で表され、抗体の重鎖可変領域配列は、SEQ ID NO : 14で表される。マウス可変領域配列からフレームワーク領域配列を除外した後、その相補性決定領域配列を取得し、そのうち、軽鎖の3つの相補性決定領域CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3のアミノ酸配列は、それぞれSEQ ID NO : 1、5及び6で表され、重鎖の3つの相補性決定領域CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3のアミノ酸配列は、それぞれSEQ ID NO : 7、8及び9で表される。上記の可変領域配列を真核細胞発現ベクターX0GCにクローニングし、抗体の軽鎖定常領域配列は、SEQ ID NO : 15で表され、抗体の重鎖定常領域配列は、SEQ ID NO : 16で表される。抗体の軽鎖（軽鎖の全長配列は、抗体の軽鎖可変領域をSEQ ID NO : 15と連結することによって得られる）及び重鎖（重鎖の全長配列は、抗体の重鎖可変領域をSEQ ID NO : 16と連結することによって得られる）の発現ベクターを293F細胞株（FreeStyleTM 293-F Cells、品番R79007、invitrogen）にトランスフェクトした。トランスフェクションの1日前に細胞を接種し、トランスフェクション当日に細胞を遠心して収集し、細胞を新鮮なFreeStyleTM 293発現培地（FreeStyleTM 293 Expression Medium、品番12338001、Gibco）に再懸濁し、細胞密度が 200×10^5 cells/mLであった。トランスフェクション容量に従って最終濃度が36.67 µg/mLとなるように、プラスミドを加え、軽く混合して均一化した後、最終濃度が55 µg/mLとなるように、線状PEI（ポリエチレンジアミン、線状、M.W. 25000、品番43896、Alfa Aesar）を加え、軽く混合して均一化した。その後、細胞培養インキュベーター内に入れ、120 rpmのシェーカーで37 °Cで1時間インキュベートした。そして、19倍のトランスフェクション容量の新鮮な培地を加えた。120 rpmのシェーカーで37 °Cでインキュベートし続けた。5～6日にトランスフェクトした細胞培養上清を遠心して収集した。

10

20

【0040】

実施例3 キメラ抗ヒトPD-1モノクローナル抗体とヒトPD-1との結合活性及び結合動力学定数

ELISAにより抗ヒトPD-1キメラモノクローナル抗体とその抗原ヒトPD-1との結合活性を測定した。pH = 9.6の炭酸塩緩衝液で高吸着型ELISA用96ウェルプレートに組換えヒトPD-1（Beijing Sino Biological Inc.社から購入され）を被覆し、被覆濃度は1 µg/mLであり、被覆量は、1ウェル当たり100 µLであり、4 °Cで一晩被覆した。PBSTで5回洗浄した。1% BSAを含むPBSTで300 µL/ウェルでブロッキングし、25 °Cで1時間インキュベートした。PBSTで5回洗浄した。1% BSAを含むPBSTで配列が希釈した抗ヒトPD-1キメラモノクローナル抗体サンプル、及びモノクローナル抗体対照であるペムブロリズマブ（pembrolizumab）を、1ウェル当たり100 µL加え、25 °Cで1時間インキュベートした。PBSTで5回洗浄した。そして、1% BSAを含むPBSTで1:2000で希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG抗体（Chemicon、品番AP309P）を1ウェル当たり100 µL加え、25 °Cで1時間インキュベートした。PBSTで5回洗浄した。比色基質TMBを100 µL/ウェルで加え、室温で10分間発色させた。1M H₂SO₄を100 µL/ウェルで加え、発色を停止した。450 nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダーで読み取った。

30

40

結果は、図3に示すように、抗ヒトPD-1キメラモノクローナル抗体は、良好なヒトPD-1結合親和力、及びペムブロリズマブ（pembrolizumab）と類似している結合活性を持つ。

【0041】

50

Biacore X100により抗ヒトPD-1キメラモノクローナル抗体とその抗原ヒトPD-1とが結合する結合動力学定数を検出する。その装置は、光学的な表面プラズモン共鳴技術によりバイオチップに架橋・被覆された分子と被験分子の間の結合及び解離を検出した。用いられた主な試薬は、CM5チップ(GE Healthcare、BR-1000-12)である。実験過程は、簡単に説明すると、抗ヒトPD-1キメラ抗体をランニングバッファー(1×HBS-EP+10mM HEPES, 150mM NaCl, 3mM EDTA, 0.05% surfactant P20, pH7.4)で2µg/mLに希釈した後、10µL/minの速度で抗ヒトIgGが固定されたCM5チップに注入し、60秒間持続した。結合段階では、抗原PD-1用ランニングバッファーを複数の濃度に希釈し、それぞれ30µL/minの速度で180秒間注入し、解離段階では、解離時間は、1200秒間である。再生条件は、グリシン塩溶液(GE Healthcare、BR-1003-54)、10µL/minの速度で30秒間再生させた。対照抗体を分析する実験方法は、解離時間を600秒に調整した以外、同様にした。結合動力学定数及び解離動力学定数は、Biacore X100 evaluation softwareにより解析して算出した。抗ヒトPD-1キメラ抗体の結合動力学定数、解離動力学定数、及び解離平衡定数は、表2に示した。データにより、ペムブロリズマブ(pembrolizumab)と比較して、抗ヒトPD-1キメラモノクローナル抗体がPD-1抗原と結合した後、結合状態を長時間にわたって維持でき、解離しにくく、これは、その生物学的機能に対して非常に有利である。

10

20

【0042】

【表2】

表2. 抗ヒトPD-1キメラ抗体とヒトPD-1との結合動力学定数

検出サンプル	K_{on} (1/Ms)	K_{off} (1/s)	K_D (nM)
ペムブロリズマブ	3.731E+5	2.708E-3	7.257
抗ヒトPD-1キメラ抗体	2.150E+5	2.950E-4	1.372

30

40

50

【0043】

実施例4 キメラ抗ヒトPD-1モノクローナル抗体の種特異性及び結合特異性

ELISAにより抗ヒトPD-1キメラモノクローナル抗体の種特異性を測定した。pH=9.6の炭酸塩緩衝液を用いて高吸着型ELISA用96ウェルプレートに組換えヒトPD-1、サルPD-1、ラットPD-1及びマウスPD-1(いずれもBeijing Sino Biological Inc.社から購入)を被覆し、被覆濃度が1µg/mlであり、被覆量が100µL/ウェルであり、4で一晚被覆した。PBSTで5回洗浄した。1%BSAを含むPBSTで300µL/ウェルでブロッキングし、25で1時間インキュベートした。PBSTで5回洗浄した。1%BSAを含むPBSTで配列が希釈した抗ヒトPD-1キメラモノクローナル抗体サンプル、及び対照を1ウェル当たり100µL加え、25で1時間インキュベートした。PBSTで5回洗浄した。そして、1%BSAを含むPBSTに1:2000で希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG抗体(Chemicon、品番AP309P)を1ウェル当たり100µL加え、25で1時間インキュベートした。PBSTで5回洗浄した。比色基質TMBを100µL/ウェルで加え、室温で10分間発色させた。1M H₂SO₄を100µL/ウェルで加え、発色を停止した。450nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダーで読み取った。

【0044】

ELISAにより抗ヒトPD-1キメラモノクローナル抗体の結合特異性を測定した。pH=9.6の炭酸塩緩衝液を用いて高吸着型ELISA用96ウェルプレートに組換えヒトPD-1、CD28、CTLA4、ICOS、BTLA、PD-L1、PD-L2、

CD80、CD86、B7-H2（いずれもBeijing Sino Biological Inc.社から購入）を被覆し、被覆濃度が $1\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、被覆量が $100\mu\text{L}$ /ウェルであり、4で一晚被覆した。PBSTで5回洗浄した。1%BSAを含むPBSTで $300\mu\text{L}$ /ウェルでブロッキングし、25で1時間インキュベートした。PBSTで5回洗浄した。1%BSAを含むPBSTで配列が希釈した抗ヒトPD-1キメラモノクローナル抗体サンプル、及び対照を1ウェル当たり $100\mu\text{L}$ 加え、25で1時間インキュベートした。PBSTで5回洗浄した。そして、1%BSAを含むPBSTに1:2000で希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG抗体（Chemicon、品番AP309P）を1ウェル当たり $100\mu\text{L}$ 加え、25で1時間インキュベートした。PBSTで5回洗浄した。比色基質TMBを $100\mu\text{L}$ /ウェルで加え、室温で10分間発色させた。1M H_2SO_4 を $100\mu\text{L}$ /ウェルで加え、発色を停止した。450nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダーで読み取った。

結果は、図4に示すように、抗ヒトPD-1キメラモノクローナル抗体は、ヒトPD-1及びサルPD-1に結合でき、且つ親和力が類似しているが、ラット、マウスPD-1に結合せず、種特異性がある。同時に、図5に示すように、抗ヒトPD-1キメラモノクローナル抗体は、さらに、強い結合特異性も持ち、PD-1にのみ結合し、CD28ファミリーでの他のメンバーに結合しなく、さらに、B7ファミリーのメンバーに結合しない。

【0045】

実施例5 キメラ抗ヒトPD-1モノクローナル抗体のPD-1ブロッキング及びリガンド結合の活性

pH=9.6の炭酸塩緩衝液を用いて高吸着型ELISA用96ウェルプレートに組換えヒトPD-1-Fcを被覆し、被覆濃度が $1\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、被覆量が $100\mu\text{L}$ /ウェルであり、4で一晚被覆した。PBSTで5回洗浄した。1%BSAを含むPBSTで $300\mu\text{L}$ /ウェルでブロッキングし、25で1時間インキュベートした。PBSTで5回洗浄した。抗ヒトPD-1抗体サンプル及び陽性対照を1ウェル当たり $50\mu\text{L}$ 加え、濃度が20nM（最終濃度10nM）となるようにビオチン標識PD-L1を加え、又は濃度が320nM（最終濃度160nM）となるようにビオチン標識PD-L2を1ウェル当たり $50\mu\text{L}$ 加え、25で90分間インキュベートした。PBSTで5回洗浄した。そして、1%BSAを含むPBSTで1:1000で希釈したStreptavidin-HRP（BD Pharmingen、品番554066）を1ウェル当たり $100\mu\text{L}$ 加え、25で1時間インキュベートした。PBSTで5回洗浄した。比色基質TMBを $100\mu\text{L}$ /ウェルで加え、室温で10分間発色させた。1M H_2SO_4 を $100\mu\text{L}$ /ウェルで加え、発色を停止した。450nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダーで読み取った。

結果は、図6に示すように、抗ヒトPD-1キメラモノクローナル抗体は、ペムプロリズマブ（pembrolizumab）と類似しているPD-1/PD-L1及びPD-1/PD-L2ブロッキング活性を有する。

【0046】

実施例6 キメラ抗ヒトPD-1モノクローナル抗体のT細胞機能調節活性

実験で用いられたPBMCは、Lonzaから購入され、品番がCC-2702である。

まず、PBMCによるDC細胞の誘導は、PBMCを完全培地（RPMI 1640+10%FBS）で回復させ、次いで無血清培地で1回洗浄し、無血清培地に再懸濁し、細胞培養フラスコに接種し、37、5% CO_2 インキュベーター内でインキュベートした。90分間後、非接着細胞及び培地を除去し、接着単球を完全培地と交換して培養し、 $100\text{ng}/\text{mL}$ GM-CSF及び $100\text{ng}/\text{mL}$ IL-4を加えて培養し、3日後に培養液を1回交換し、さらに3日培養し、次いで培地を完全培地に交換し、 $100\text{ng}/\text{mL}$ GM-CSF、 $100\text{ng}/\text{mL}$ IL-4及び $20\text{ng}/\text{mL}$ TNF- α を加えて1日培養し、DC細胞の誘導を完成させた。さらに、他の個体由来PBMC

からのT細胞の単離は、Miltenyi Biotech社製Pan T Cell Isolation Kit (品番5150414820)を使用してT細胞を単離し、具体的な実験過程は、説明書を参照した。誘導された成熟DC細胞を1ウェルあたり10,000細胞で96ウェルプレートに播種し、単離されたT細胞を1ウェルあたり100,000細胞で加え、最後に、被験すべきサンプルを加え、共に120時間インキュベートした。インキュベート終了時に、上清を採取し、RayBiotechから購入されたELISAキットによりIL-2及びIFN-gamma (IFN-)のレベルを検出した。

結果は、図7に示すように、抗ヒトPD-1キメラモノクローナル抗体は、MLR系でIL-2及びIFN-gamma (IFN-)の分泌を亢進させることができ、ペムブロリズマブ (pembrolizumab) と類似しているT細胞機能調節活性を持つ。
【0047】

実施例7 キメラ抗ヒトPD-1モノクローナル抗体のラット体内での薬物動態研究
実験材料は、北京華阜康生物科技股フン有限公司から購入された6~8週齢の雌性SDラットを選択した。ラットを環境に1週間慣れさせた後、無作為に群分けし、1群当たり3匹である。各群は、それぞれ抗ヒトPD-1キメラモノクローナル抗体、対照モノクローナル抗体ペムブロリズマブ (pembrolizumab) を投与し、投与量がいずれも20nmol/kgであり、静脈内注射で単回投与した。0時に投与後5分間、30分間、1時間、4時間、8時間、24時間、48時間、72時間、96時間、120時間、168時間、216時間、264時間、312時間で眼窩から採血し、抗凝固処理を行わず、血液サンプルを室温で30分間~1時間放置し、血液凝固後、3000rpmで10分間遠心して得られた血清サンプルを-80 で凍結保存し、測定のために用意した。

【0048】

ELISAにより血清中の抗ヒトPD-1キメラモノクローナル抗体、対照モノクローナル抗体ペムブロリズマブ (pembrolizumab) の濃度を測定した。簡単に説明すると、pH=9.6の炭酸塩緩衝液を用いて4 でヒト組換えPD-1タンパク質を高吸着型ELISAプレートに一晩被覆した。PBSTで洗浄した。非特異的結合を防止するために、5% 脱脂粉乳含有PBSTでそのプレートをブロッキングし、PBSTで洗浄した。そして、10% 混合ラット血清、1% BSAを含むPBSTで希釈した被検血清サンプルを加えて25 で1時間インキュベートし、そのプレートをPBSTで洗浄した。5% 脱脂粉乳含有PBSTに希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG抗体 (Chemicon、品番AP309P) を加えて25 で1時間インキュベートし、そのプレートをPBSTで洗浄した。最後に、比色基質TMBを用いて室温で10分間発色させた。1M H₂SO₄を加え、発色を停止した。450nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダーで読み取った。

結果は、図8に示すように、用量が20nmol/kgである抗ヒトPD-1キメラモノクローナル抗体、対照モノクローナル抗体ペムブロリズマブ (pembrolizumab) の単回静脈内投与は、ラット体内において類似する薬物血中濃度-時間曲線及び薬物動態学的特性を示した。抗ヒトPD-1キメラモノクローナル抗体の薬物動態学的パラメータは、半減期 $t_{1/2}$ が212時間であり、薬物血中濃度-時間曲線下面積 $AUC_{0-312hr}$ が33967nM・hrであり、推定ゼロ濃度 C_0 が464nMであり、見かけの分布容積 V_d が118mL/kgであり、クリアランス CL が0.39mL/hr/kgであり、平均滞留時間 MRT_{last} が119時間である。

【0049】

実施例8 キメラ抗ヒトPD-1モノクローナル抗体のin vivo抗腫瘍効果研究
本実施例は、PBMCHit化マウスに接種されたHCC827異種移植片に対するキメラ抗ヒトPD-1モノクローナル抗体の増殖阻害作用を検出した。

実験材料は、6~8週齢の雌性NCG免疫不全マウスを選択し、南京銀河生物医薬有限公司から購入された。マウスを環境に1週間慣れさせた後、1匹マウス当たり 1×10^7 個のHCC827ヒト非小細胞肺癌細胞 (中国医学科学院基礎医学研究所基礎医学細胞セ

10

20

30

40

50

ンターから購入)を接種した。腫瘍体積が約 100 mm^3 となる場合には、腫瘍体積に従って群分けし、1群当たり6匹のマウスであり、それぞれ溶媒対照群、抗ヒトPD-1キメラモノクローナル抗体投与群、ペムブロリズマブ(pembrolizumab)投与群とした。各マウスに 5×10^6 個のヒトPBMC細胞を静脈内注射し、免疫系ヒト化マウスを作成し、その後、群分けで溶媒又は抗体を投与し、用量 70 nmol/kg で腹腔内投与(i.p.)し、1週2回投与を3週連続した。投与日から腫瘍体積を週3回測定し、長径a、短径bを計測し、腫瘍体積の計算式：腫瘍体積(mm^3) = $(a \times b^2) / 2$ 。

結果は、図9に示すように、抗ヒトPD-1キメラモノクローナル抗体は、抗腫瘍活性を有し、PBMCヒト化マウス体内でのHCC827非小細胞肺癌移植片の増殖を阻害し、ペムブロリズマブ(pembrolizumab)に匹敵するかそれよりやや強い抗腫瘍効果を示した強い抗腫瘍効果を示す。

【0050】

実施例9 ヒト化抗ヒトPD-1モノクローナル抗体の調製

ヒト化型の抗ヒトPD-1モノクローナル抗体は、Leung者ら(1995、Molecule Immunol 32:1413-27)の方法により得られたものである。

在Germlineデータベースからマウス由来抗体の可変領域配列と最もマッチするヒト化テンプレートを選別し、中でも、軽鎖可変領域のテンプレートは、配列がSEQ ID NO:43で表されるIGKV3-11*01であり、重鎖可変領域的テンプレートは、配列がSEQ ID NO:44で表されるIGHV3-23*04である。マウス由来抗体CDR領域を選別されたヒト化テンプレートに移植し、ヒト由来テンプレートのCDR領域を置き換え、配列がSEQ ID NO:45で表される移植されたヒト化抗体軽鎖可変領域、配列がSEQ ID NO:46で表される移植されたヒト化抗体重鎖可変領域を得た。SEQ ID NO:45及びSEQ ID NO:46において部位を選択して復帰突然変異を行い、SEQ ID NO:45のCDR1領域においてNQS部位を選択して突然変異を行い、可能性のあるグリコシル化部位を除去し、SEQ ID NO:2又はSEQ ID NO:3又はSEQ ID NO:4で表される新たなCDR-L1配列を得、SEQ ID NO:25-36で表される軽鎖可変領域配列を得、SEQ ID NO:37-42で表される重鎖可変領域配列を得た。軽鎖可変領域を軽鎖定常領域(配列がSEQ ID NO:15)と連結し、それぞれ対応する軽鎖全長配列を得、重鎖可変領域を重鎖定常領域(配列がSEQ ID NO:16)と連結し、それぞれ対応する重鎖全長配列を得た。親和力及び安定性スクリーニングにより利用可能なヒト化配列を得た。親和力及び安定性スクリーニングにより得られた利用可能なヒト化配列、得られたヒト化配列の軽鎖及び重鎖の可変領域配列情報は、表3に示した。

【0051】

10

20

30

【表 3 - 1】

表 3

VL	SEQ ID NO :
キメラモノクローナル抗体	10
AH00290 / AH00291/ AH00296	25
AH00293	26
AH00294	27
AH00295 AH00298	28
AH00291-N26Q/ AH00296-N26Q	29
AH00291-N26S/ AH00296-N26S	30
AH00291-S28A/ AH00296-S28A	31
AH00294-N26Q	32
AH00294-N26S	33
AH00294-S28A	34
BMI I I	35
BMI V	36

10

20

30

【表 3 - 2】

VH	SEQ ID NO:
キメラモノクローナル抗体	14
AH00290	37
AH00291 / AH00293/ AH00298/ AH00291-N26Q/ AH00291-N26S/ AH00291-S28A	38
AH00294 / AH00294-N26Q/ AH00294-N26S/ AH00294-S28A	39
AH00295 / AH00296/ AH00296-N26Q/ AH00296-N26S/ AH00296-S28A	40
BMI II	41
BMI V	42

10

20

30

40

【0052】

実施例10 ヒト化抗ヒトPD-1モノクローナル抗体の *in vitro* の生物学的活性

ヒト化抗ヒトPD-1モノクローナル抗体は、ヒトPD-1と結合する活性、及びPD-1/PD-L1結合に対するブロック活性を含む *in vitro* の生物学的活性を測定した。測定されたヒト化配列は、AH00290、AH00291、AH00293、AH00294、AH00295、AH00296、AH00298、BMIII、BMIV、AH00290-N26Q、AH00291-N26S、AH00291-S28A、AH00294-N26Q、AH00294-N26S、AH00294-S28A、AH00296-N26Q、AH00296-N26S、AH00296-S28Aを含み、測定方法は、ELISAであり、具体的な実験過程がキメラ抗ヒトPD-1モノクローナル抗体の測定方法と同様である。

実験結果は、表4に示した。キメラ抗ヒトPD-1モノクローナル抗体よりも、測定されたヒト化配列は、いずれも活性をよく維持し、強いPD-1結合活性及びPD-1/PD-L1ブロック活性を示した。

【0053】

【表4】

表4 抗ヒトPD-1ヒト化抗体のPD-1結合、PD-1/PD-L1ブロッキングの活性

サンプル	PD-1結合活性 (EC ₅₀ , nM)	PD-1/PD-L1ブロッキング活性 (IC ₅₀ , nM)
キメラモノクローナル抗体	0.031	1.453
AH00290	0.024	1.086
AH00291	0.025	1.105
AH00293	0.026	1.201
AH00294	0.032	1.350
AH00295	0.025	1.188
AH00296	0.027	1.207
AH00298	0.028	1.215
BMI II	0.034	1.197
BMI V	0.028	1.298
AH00291-N26Q	0.046	1.569
AH00291-N26S	0.039	1.431
AH00291-S28A	0.042	1.361
AH00294-N26Q	0.041	1.491
AH00294-N26S	0.043	1.479
AH00294-S28A	0.047	1.464
AH00296-N26Q	0.044	1.274
AH00296-N26S	0.037	1.066
AH00296-S28A	0.048	1.755

【0054】

実施例11. モレキュラーシーブ高速液体クロマトグラフィー (SE-HPLC) によるヒト化抗ヒトPD-1モノクローナル抗体の純度及びその熱安定性の検出

TSK gel Super SW3000クロマトグラフ用カラム (品番: 0018675) を使用し、移動相は、0.1 mol/L リン酸塩緩衝液 (NaH₂PO₄ - Na₂HPO₄)、0.1 mol/L 硫酸ナトリウム緩衝液であり、pHが6.7となり、流速は、0.35 mL/minであり、カラム温度は、25 °Cであり、サンプルセル温度は4 °Cであり、検出波長は280 nmであり、サンプル緩衝液でサンプルを1 mg/mLに希釈し、サンプルロード量は、5 µLである。実験結果に対してAgilent高速液体クロマトグラフ1260システムワークステーションによりデータ処理を行い、面積正規化法によりメインピークの割合を純度として算出した。上記調製されたヒト化抗ヒトPD-1モノクローナル抗体にはSE-HPLC純度検出を行った。それらのモノクローナル抗体の熱安定性を確認するために、上記サンプルを40 °Cの高温条件下で置き、2週目及び4週目にそれぞれ試料を採取し、SE-HPLC検出を行って熱安定性を観察した結果は以下の表5に示した。ヒト化抗ヒトPD-1抗体は、AH00296-S28Aを除く

て、いずれも良く且つ相当な安定性を示した。

【 0 0 5 5 】

【 表 5 】

表5. SE-HPLCによるヒト化抗ヒトPD-1モノクローナル抗体の40℃の条件下での熱安定

性の検出

ヒト化抗ヒトPD-1モノクローナル抗体	SE-HPLC純度 (%)		
	T=0	2週目	4週目
BMI I I	99.23	98.16	95.78
BMI V	98.19	98.42	94.80
AH00290	98.97	98.04	94.73
AH00291	99.30	98.22	95.87
AH00293	97.79	96.55	94.32
AH00294	98.77	97.68	96.52
AH00295	99.24	98.16	96.17
AH00296	99.63	98.55	96.73
AH00298	99.34	98.13	95.87
AH00291-N26Q	98.55	98.56	97.90
AH00291-N26S	99.05	99.08	98.50
AH00291-S28A	98.95	98.89	98.40
AH00294-N26Q	99.14	99.08	98.64
AH00294-N26S	99.23	99.19	98.64
AH00294-S28A	99.30	99.33	98.69
AH00296-N26Q	99.10	99.10	98.27
AH00296-N26S	99.60	99.59	98.96
AH00296-S28A	99.70	84.38	62.42

10

20

30

【 0 0 5 6 】

実施例12. ヒト化抗ヒトPD-1モノクローナル抗体のT_m値の測定

示差走査型蛍光定量法 (Differential scanning fluorimetry, DSF) を採用してヒト化抗ヒトPD-1モノクローナル抗体の変性温度 (T_m) を測定した。DSFは、蛍光指示薬の蛍光強度変化によりサンプルにおけるタンパク質の熱変性過程を検出する方法であり、タンパク質変性温度の測定を実現した。用いられた試薬は、米国のSigma-Aldrich社から購入されたSYPRO Orangeタンパク質蛍光色素 (品番: S5692、5000倍濃度、溶媒DMSO) である。装置は、米国のApplied Biosystems社から購入されたAB 7500 Real Time PCRシステムである。タンパク質蛍光色素をサンプル緩衝液で1:50に希釈し、1μlの希釈後の色素をそれぞれ19μlのタンパク質溶液と混合し、

40

50

蛍光色素の最終希釈倍率が1：1000であり、96ウェルプレートに加え、各サンプルについて3つの平行なウェルを設けた。光学封止フィルムでプレートを封止し、1000rpmで2min遠心し、気泡を除去した。RT-PCR装置の設定は以下の通りであり、即ち、融解曲線は、連続取り込みモードを採用し、走査温度範囲が25～99であり、昇温速率が1%（約1/min）であり、25で2min平衡化させ、昇温中にデータを収集し、レポーターとしてROXを選択し、クエンチャーとしてNoneを選択し、反応容量が20μlである。サンプルの測定濃度は、1mg/mlであり、参照溶液は、サンプルの緩衝液である。Protein Thermal Shift™ Software v1.3ソフトウェアを用いて蛍光曲線及びその一次微分曲線をプロットした。DSFによる試験では、通常、タンパク質の第一転移中点温度をタンパク質製剤の熱安定性の変性温度とする。下記の表6に示すように、上記調製されたヒト化抗ヒトPD-1モノクローナル抗体はTm値を測定した。結果は下表に示した。ヒト化抗ヒトPD-1モノクローナル抗体は、いずれも良いTm値を持つ。

10

【0057】

【表6】

表6. ヒト化抗ヒトPD-1モノクローナル抗体のTm値

ヒト化抗ヒトPD-1モノクローナル抗体	Tm値
BMI II	70.7℃
BMIV	65.2℃
AH00290	66.5℃
AH00291	67.7℃
AH00293	69.1℃
AH00294	67.9℃
AH00295	70.5℃
AH00296	70.0℃
AH00298	67.9℃
AH00291-N26Q	68.5℃
AH00291-N26S	67.8℃
AH00291-S28A	68.8℃
AH00294-N26Q	66.6℃
AH00294-N26S	65.9℃
AH00294-S28A	68.4℃
AH00296-N26Q	67.6℃
AH00296-N26S	70.1℃
AH00296-S28A	69.1℃

20

30

40

【0058】

実施例13. イオン交換クロマトグラフィー（CEX）によるヒト化抗ヒトPD-1モノクローナル抗体の電荷変異体の検出

陽イオン交換クロマトグラフ用カラム MabPac SCX-10, 4mm x 250m

50

m (品番 : 78655) を用いて、20 mmol/L モルホリノエタンスルホン酸 (2 - (N - Morpholino) ethanesulfonic acid, MES) (pH 5.6) 及び 60 mmol/L 塩化ナトリウムを移動相 A とし、20 mmol/L MES (pH 5.6) 及び 300 mmol/L 塩化ナトリウムを移動相 B として、流速が 0.5 mL/min であり、カラム温度が 25 °C であり、サンプルセル温度 : 4 °C、検出波長が 280 nm であり、サンプルロード量が 50 µl (1 mg/mL) であり、5 ~ 50 % の直線的濃度勾配で 60 分間溶出させた。実験結果は Agilent 高速液体クロマトグラフ 1260 システムワークステーションによりデータ処理を行い、面積正規化法でピーク面積百分率を算出した。上記調製されたヒト化抗ヒト PD - 1 モノクローナル抗体には CEX 検出を行った。それらのモノクローナル抗体の化学的安定性を確認するために、上記サンプルを 40 °C 高温条件下で置き、2 週目及び 4 週目にそれぞれ試料を採取して CEX 検出を行い、電荷変異体の割合の変化を観察した結果は、表 7 に示された。ヒト化抗ヒト PD - 1 抗体は、AH00296 - S28A を除いて、電荷変異体の割合変化がいずれも低い。

【0059】

【表 7】

表7. CEXによるヒト化抗ヒトPD-1モノクローナル抗体の40℃条件下での電荷変異体変化の検出

サンプル	電荷変異体の変化					
	T=0			2週目		
	メインピーク (%)	酸性ピーク (%)	塩基性ピーク (%)	メインピーク (%)	酸性ピーク (%)	塩基性ピーク (%)
BMI II	68.2	18.2	13.6	64.0	22.8	13.2
BMI V	64.9	21.1	14.0	58.0	27.1	14.9
AH00290	65.6	20.1	14.3	61.5	25.8	12.7
AH00291	66.6	20.0	13.4	61.5	24.8	13.7
AH00293	69.2	20.7	10.1	62.6	26.7	10.7
AH00294	68.4	17.8	13.8	63.5	22.3	14.2
AH00295	65.8	17.3	16.9	59.1	24.8	16.1
AH00296	66.9	19.3	13.8	59.7	25.2	15.1
AH00298	66.1	19.4	14.5	62.7	22.2	15.1
AH00291-N26Q	77.2	8.8	14.0	73.8	10.8	15.4
AH00291-N26S	77.6	8.2	14.2	71.6	11.4	17.0
AH00291-S28A	74.6	8.5	16.9	71.9	10.4	17.9
AH00294-N26Q	74.9	7.7	17.4	71.1	10.8	18.1
AH00294-N26S	78.0	7.7	14.3	73.2	11.2	15.6
AH00294-S28A	77.9	7.2	14.9	73.8	7.2	14.9
AH00296-N26Q	78.8	7.4	13.8	72.6	12.4	14.9
AH00296-N26S	76.9	7.3	15.8	70.6	12.6	16.8
AH00296-S28A	78.1	7.4	14.5	54.2	22.9	23.0

10

20

30

【0060】

最後に、以上の各実施例は、本発明に係る技術案のみを説明するためのみであり、制限的ではなく、上記各実施例を参照して本発明を詳しく説明したものの、当業者にとっては、上記各実施例に記載の技術案を修正したり、そのうちの一部又は全部の技術特徴を同等に置き換えることができ、それらの修正又は置き換えは、対応する技術案の主旨が本発明に係る各実施例の技術案の範囲から逸脱することなくなされることを理解すべきである。

40

【産業上の利用可能性】

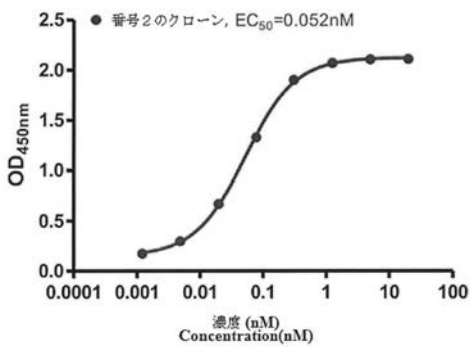
【0061】

本発明で提供された抗体及びその機能的断片は、PD-1に特異的に結合し、自己免疫疾患（例えば、関節炎、関節リウマチ、乾癬、多発性硬化症、潰瘍性大腸炎、クローン病、全身性エリテマトーデス、糸球体腎炎、拡張型心筋症様疾患、シェーグレン症候群、アレルギー性接触皮膚炎、多発性筋炎、強皮症、結節性多発動脈炎、リウマチ熱、白斑、インスリン依存型糖尿病、ベーチェット症候群、及び慢性甲状腺炎など）、移植片に対する

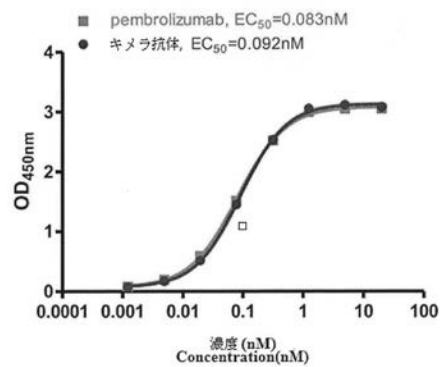
50

免疫応答、アレルギー反応、感染症、神経変性疾患（例えば、パーキンソン病、ハンチントン病、マシヤド・ジョセフ病、筋萎縮性側索硬化症、及びクロイツフェルト・ヤコブ病など）、並びに腫瘍（例えば、白血病、リンパ腫、骨髄腫、脳腫瘍、頭頸部扁平上皮癌、非小細胞肺癌、上咽頭癌、食道癌、胃癌、膵臓癌、胆嚢癌、肝臓癌、結腸・直腸癌、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、子宮肉腫、前立腺がん、膀胱がん、腎細胞癌、及び黒色腫等）などの予防及び/又は治療に適用することができる。

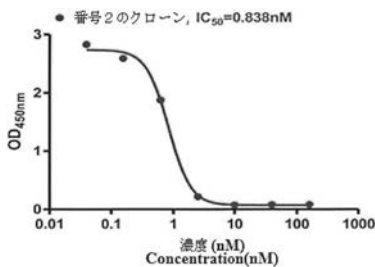
【 図 1 】



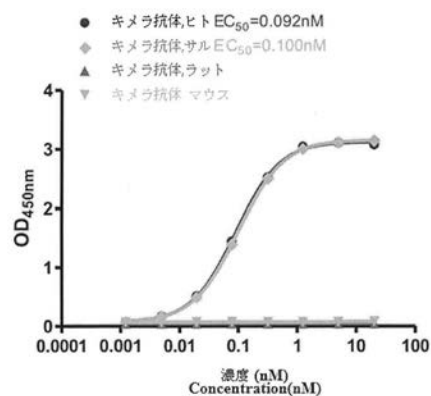
【 図 3 】



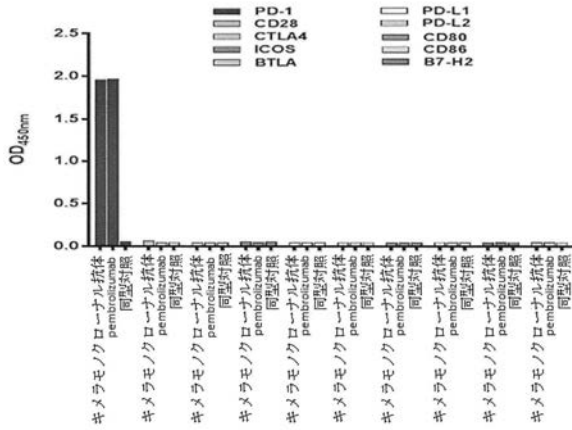
【 図 2 】



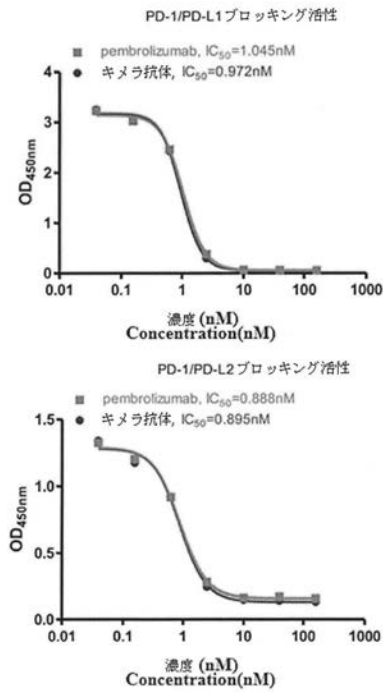
【 図 4 】



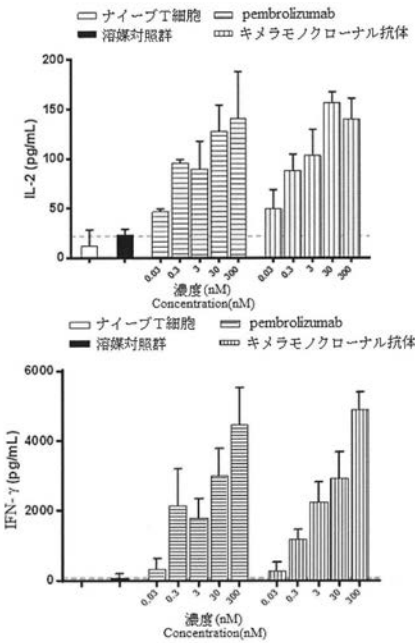
【 図 5 】



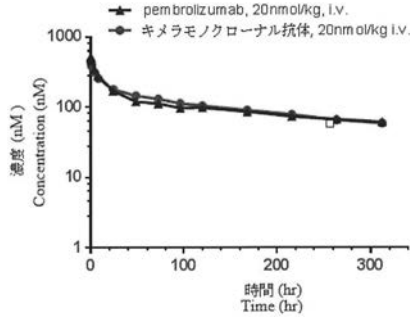
【 図 6 】



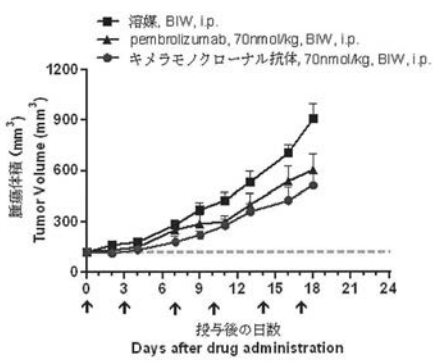
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



【配列表】

2019532669000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成31年4月1日(2019.4.1)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

PD-1に特異的に結合することが可能な抗体またはその機能的断片であって、
前記抗体またはその機能的断片は、軽鎖及び重鎖を含み、
前記軽鎖は、CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3からなる軽鎖CDRを持ち、
前記重鎖は、CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3からなる重鎖CDRを持ち、
前記のCDR-L1、CDR-L2、CDR-L3のアミノ酸配列は、それぞれSEQ ID NO: 1、5及び6で表され、または、それぞれSEQ ID NO: 2、5及び6で表され、または、それぞれSEQ ID NO: 3、5及び6で表され、または、それぞれSEQ ID NO: 4、5及び6で表され；前記のCDR-H1、CDR-H2、CDR-H3のアミノ酸配列は、それぞれSEQ ID NO: 7、8及び9で表され、

好ましくは、前記抗体またはその機能的断片は、PD-1キメラ抗体またはその機能的断片であるか、或いはPD-1ヒト化抗体またはその機能的断片である、

ことを特徴とするPD-1に特異的に結合する可能な抗体またはその機能的断片。

【請求項2】

前記抗体は、ヒト抗体IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgE、IgDのいずれか1種の定常領域配列を含む、請求項1に記載の抗体またはその抗体機能的断片。

【請求項3】

前記機能的断片は、F(ab')₂、Fab'、Fab、Fv、scFv、二重特異性抗体、及び抗体の最小認識単位の1種以上を含む、請求項1又は2に記載の抗体またはその機能的断片。

【請求項4】

前記PD-1キメラ抗体またはその機能的断片の軽鎖可変領域配列及び重鎖可変領域配列のアミノ酸配列は、それぞれSEQ ID NO: 10及びSEQ ID NO: 14で表され、または、それぞれSEQ ID NO: 11及びSEQ ID NO: 14で表され、または、それぞれSEQ ID NO: 12及びSEQ ID NO: 14で表され、または、それぞれSEQ ID NO: 13及びSEQ ID NO: 14で表され、

好ましくは、前記PD-1キメラ抗体またはその機能的断片の軽鎖定常領域の配列及び重鎖定常領域の配列のアミノ酸配列は、それぞれSEQ ID NO: 15及びSEQ ID NO: 16で表される、ことを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の抗体またはその機能的断片。

【請求項5】

前記PD-1ヒト化抗体またはその機能的断片の軽鎖フレームワーク領域は、FR-L1、FR-L2、FR-L3及びFR-L4を含み、重鎖フレームワーク領域は、FR-H1、FR-H2、FR-H3及びFR-H4を含み、

前記FR-L1は、SEQ ID NO: 17で表されるアミノ酸配列、又は以下の置換及びそれらの組合せにより得られたアミノ酸配列から選ばれ、

1番目のアミノ酸Dは、Eに置き換えられ、

2 番目のアミノ酸 V は、I に置き換えられ、
 1 3 番目のアミノ酸 L は、V に置き換えられ、
 1 9 番目のアミノ酸 A は、V に置き換えられ、
 前記 FR - L 2 は、SEQ ID NO : 1 8 で表されるアミノ酸配列、又は以下の置換及びそれらの組合せにより得られたアミノ酸配列から選ばれ、
 6 番目のアミノ酸 P は、S に置き換えられ、
 7 番目のアミノ酸 G は、H に置き換えられ、
 9 番目のアミノ酸 A は、S に置き換えられ、
 前記 FR - L 3 は、SEQ ID NO : 1 9 で表されるアミノ酸配列、又は以下の置換及びそれらの組合せにより得られたアミノ酸配列から選ばれ、
 2 2 番目のアミノ酸 L は、V に置き換えられ、
 2 4 番目のアミノ酸 P は、T に置き換えられ、
 2 8 番目のアミノ酸 A は、G に置き換えられ、
 3 1 番目のアミノ酸 F は、Y に置き換えられ、
 前記 FR - L 4 は、SEQ ID NO : 2 0 で表されるアミノ酸配列、又は以下の置換により得られたアミノ酸配列から選ばれ、
 7 番目のアミノ酸 V は、L に置き換えられ、
 前記 FR - H 1 は、SEQ ID NO : 2 1 で表されるアミノ酸配列から選ばれ、
 前記 FR - H 2 は、SEQ ID NO : 2 2 で表されるアミノ酸配列、又は以下の置換及びそれらの組合せにより得られたアミノ酸配列から選ばれ、
 5 番目のアミノ酸 A は、T に置き換えられ、
 1 4 番目のアミノ酸 A は、S に置き換えられ、
 前記 FR - H 3 は、SEQ ID NO : 2 3 で表されるアミノ酸配列、又は以下の置換及びそれらの組合せにより得られたアミノ酸配列から選ばれ
 1 2 番目のアミノ酸 N は、T に置き換えられ、
 1 4 番目のアミノ酸 Y は、H に置き換えられ、
 1 8 番目のアミノ酸 N は、S に置き換えられ、
 前記 FR - H 4 は、SEQ ID NO : 2 4 で表されるアミノ酸配列から選ばれ、
 好ましくは、前記 PD - 1 ヒト化抗体またはその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、SEQ ID NO : 2 5 - 3 6 のいずれか 1 つで表され、
 好ましくは、前記 PD - 1 ヒト化抗体またはその機能的断片の重鎖可変領域配列は、SEQ ID NO : 3 7 - 4 2 のいずれか 1 つで表され、
 更に好ましくは、前記 PD - 1 ヒト化抗体またはその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、SEQ ID NO : 2 5 で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、SEQ ID NO : 3 7 で表され、
 或いは、前記 PD - 1 ヒト化抗体またはその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、SEQ ID NO : 2 5 で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、SEQ ID NO : 3 8 で表され、
 或いは、前記 PD - 1 ヒト化抗体またはその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、SEQ ID NO : 2 9 で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、SEQ ID NO : 3 8 で表され、
 或いは、前記 PD - 1 ヒト化抗体またはその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、SEQ ID NO : 3 0 で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、SEQ ID NO : 3 8 で表され、
 或いは、前記 PD - 1 ヒト化抗体またはその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、SEQ ID NO : 3 1 で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、SEQ ID NO : 3 8 で表され、
 或いは、前記 PD - 1 ヒト化抗体またはその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、SEQ ID NO : 2 6 で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、SEQ ID NO : 3 8 で表され、

或いは、前記 P D - 1 ヒト化抗体またはその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、S E Q
 I D N O : 2 8 で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、S E Q I D N O
 : 4 0 で表され、
 或いは、前記 P D - 1 ヒト化抗体またはその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、S E Q
 I D N O : 2 5 で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、S E Q I D N O
 : 4 0 で表され、
 或いは、前記 P D - 1 ヒト化抗体またはその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、S E Q
 I D N O : 2 9 で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、S E Q I D N O
 : 4 0 で表され、
 或いは、前記 P D - 1 ヒト化抗体またはその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、S E Q
 I D N O : 3 0 で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、S E Q I D N O :
 4 0 で表され、
 或いは、前記 P D - 1 ヒト化抗体またはその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、S E Q
 I D N O : 3 1 で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、S E Q I D N O
 : 4 0 で表され、
 或いは、前記 P D - 1 ヒト化抗体またはその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、S E Q
 I D N O : 2 8 で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、S E Q I D N O
 :
 3 8 で表され、
 或いは、前記 P D - 1 ヒト化抗体またはその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、S E Q
 I D N O : 2 7 で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、S E Q I D N O
 : 3 9 で表され、
 或いは、前記 P D - 1 ヒト化抗体またはその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、S E Q
 I D N O : 3 2 で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、S E Q I D N O
 : 3 9 で表され、
 或いは、前記 P D - 1 ヒト化抗体またはその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、S E Q
 I D N O : 3 3 で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、S E Q I D N O
 : 3 9 で表され、
 或いは、前記 P D - 1 ヒト化抗体またはその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、S E Q
 I D N O : 3 4 で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、S E Q I D N O
 : 3 9 で表され、
 或いは、前記 P D - 1 ヒト化抗体またはその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、S E Q
 I D N O : 3 5 で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、S E Q I D N O
 : 4 1 で表され、
 或いは、前記 P D - 1 ヒト化抗体またはその機能的断片の軽鎖可変領域配列は、S E Q
 I D N O : 3 6 で表され、その対応する重鎖可変領域配列は、S E Q I D N O
 : 4 2 で表され、
 更に好ましくは、前記 P D - 1 ヒト化抗体またはその機能的断片の軽鎖定常領域配列及
 び重鎖定常領域配列のアミノ酸配列は、それぞれ S E Q I D N O : 1 5 及び S E Q
 I D N O : 1 6 で表される、ことを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の抗体ま
 たはその機能的断片。

【請求項 6】

単離された核酸分子であって、前記核酸分子は、以下の核酸から選ばれることを特徴とする核酸分子。

A) 請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の抗体及びその機能的断片をコードする D N A 又は R N A、

B) A) で定義された核酸に相補的な核酸。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の抗体及び/又はその機能的断片、又は前記抗体と他の成分とからなる化合物、又は前記抗体の機能的断片と他の成分とからなる化合物を有効成

分とする、ことを特徴とする組成物。

【請求項 8】

前記抗体またはその機能的断片は、少なくとも 1 種の診断薬及び/又は治療薬とカップリングして免疫複合体を形成する、ことを特徴とする請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 9】

前記診断薬は、放射性核種、放射性造影剤、常磁性イオン、金属、蛍光標識、化学発光標識物、超音波造影剤、光増感剤からなる群より選ばれる 1 種又は複数種であり、

好ましくは、前記放射性核種は、 ^{110}In 、 ^{111}In 、 ^{177}Lu 、 ^{18}F 、 ^{52}Fe 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 、 ^{89}Zr 、 ^{94}mTc 、 ^{94}Tc 、 ^{99}mTc 、 ^{120}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 $^{154-158}\text{Gd}$ 、 ^{32}P 、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{51}Mn 、 ^{52}mMn 、 ^{55}Co 、 ^{72}As 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 ^{82}mRb 及び ^{83}Sr からなる群より選ばれる 1 種又は複数種であり、

好ましくは、前記常磁性イオンは、クロム (III)、マンガン (II)、鉄 (III)、鉄 (II)、コバルト (II)、ニッケル (II)、銅 (II)、ネオジム (III)、サマリウム (III)、イッテルビウム (III)、ガドリニウム (III)、バナジウム (II)、テルビウム (III)、ジスプロシウム (III)、ホルミウム (III) 及びエルビウム (III) からなる群より選ばれる 1 種又は複数種を含み、

好ましくは、前記蛍光標識は、Alexa 350、Alexa 405、Alexa 430、Alexa 488、Alexa 555、Alexa 647、AMCA、アミノアクリジン、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665、BODIPY-FL、BODIPY-R6G、BODIPY-TMR、BODIPY-TRX、5-カルボキシ-4',5'-ジクロロ-2',7'-ジメトキシフルオレセイン、5-カルボキシ-2',4',5',7'-テトラクロロフルオレセイン、5-カルボキシフルオレセイン、5-カルボキシローダミン、6-カルボキシローダミン、6-カルボキシテトラメチルローダミン、Cascade Blue、Cy2、Cy3、Cy5、Cy7、6-FAM、ダンシルクロリド、フルオレセイン、HEX、6-JOE、NBD (7-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾール)、Oregon Green 488、Oregon Green 500、Oregon Green 514、Pacific Blue、フタル酸、テレフタル酸、イソフタル酸、クレシルファーストバイオレット、クレシルバイオレット、プリリアントクレシルブルー、パラアミノ安息香酸、エリスロシン、フタロシアニン、アゾメチン、シアニン、キサントゲン、スクシニルフルオレセイン、希土類金属クリプテート、トリス (ピピリジル) ジアミン ユウロピウム、ユウロピウムクリプテート又はキレート、ジアミン、ピシアニン、La Jolla Blue Dye、アロフィコシアニン、allocoocyanin B、フィコシアニン C、フィコシアニン R、チアミン、R-フィコエリトリン、C-フィコシアニン、フィコエリスリン R、REG、ローダミングリーン、ローダミンイソチオシアネート、ローダミンレッド、ROX、TAMRA、TET、TRIT (テトラメチルローダミンイソチオール)、テトラメチルローダミン及びテキサスレッドからなる群より選ばれる 1 種又は複数種である、ことを特徴とする請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 10】

前記治療薬は、裸抗体、細胞毒性薬、薬物、放射性核種、ホウ素原子、免疫調節剤、抗アポトーシス剤、光増感性治療薬、免疫複合体、オリゴヌクレオチドからなる群より選ばれる 1 種又は複数種であり、

好ましくは、前記薬物は、メトトレキサート、フルオロウラシル、メルカプトプリン、ヒドロキシカルバミド、シタラビン、メクロレタミン、シクロホスファミド、チオテパ、シスプラチン、マイトマイシン、プレオマイシン、カンプトテシン、ポドフィロトキシン、アクチノマイシン D、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ビンブラスチン、パクリタキセル、セファロタキシン、及び L-アスパラギナーゼからなる群より選ばれる 1 種又は複数種であり、

好ましくは、前記オリゴヌクレオチドは、shRNA、miRNA及びsiRNAからなる群より選ばれる1種又は複数種であり、

好ましくは、前記免疫調節剤は、サイトカイン、ケモカイン、幹細胞増殖因子、リンホトキシン、造血因子、コロニー刺激因子(CSF)、インターフェロン、エリスロポエチン、トロンボポエチン、腫瘍壊死因子(TNF)、インターロイキン(IL)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)及び幹細胞増殖因子からなる群より選ばれる1種又は複数種であり、

好ましくは、前記放射性核種は、¹¹¹In、¹¹¹At、¹⁷⁷Lu、²¹¹Bi、²¹²Bi、²¹³Bi、²¹¹At、⁶²Cu、⁶⁷Cu、⁹⁰Y、¹²⁵I、¹³¹I、¹³³I、³²P、³³P、⁴⁷Sc、¹¹¹Ag、⁶⁷Ga、¹⁵³Sm、¹⁶¹Tb、¹⁵²Dy、¹⁶⁶Dy、¹⁶¹Ho、¹⁶⁶Ho、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、¹⁸⁹Re、²¹¹Pb、²¹²Pb、²²³Ra、²²⁵Ac、⁷⁷As、⁸⁹Sr、⁹⁹Mo、¹⁰⁵Rh、¹⁴⁹Pm、¹⁶⁹Er、¹⁹⁴Ir、⁵⁸Co、^{80m}Br、^{99m}Tc、^{103m}Rh、¹⁰⁹Pt、¹¹⁹Sb、^{189m}Os、¹⁹²Ir、²¹⁹Rn、²¹⁵Po、²²¹Fr、²⁵⁵Fm、¹¹C、¹³N、¹⁵O、⁷⁵Br、¹⁹⁸Au、¹⁹⁹Au、²²⁴Ac、⁷⁷Br、^{113m}In、⁹⁵Ru、⁹⁷Ru、¹⁰³Ru、¹⁰⁵Ru、¹⁰⁷Hg、²⁰³Hg、^{121m}Te、^{122m}Te、^{125m}Te、¹⁶⁵Tm、¹⁶⁷Tm、¹⁶⁸Tm、¹⁹⁷Pt、¹⁰⁹Pd、¹⁴²Pr、¹⁴³Pr、¹⁶¹Tb、⁵⁷Co、⁵⁸Co、⁵¹Cr、⁵⁹Fe、⁷⁵Se、²⁰¹Tl、⁷⁶Br及び¹⁶⁹Ybからなる群より選ばれる1種又は複数種である、ことを特徴とする請求項8又は9に記載の組成物。

【請求項11】

自己免疫疾患、移植片に対する免疫応答、アレルギー反応、感染症、神経変性疾患、及び腫瘍を予防及び/又は治療に使用するための請求項7～10のいずれかに記載の組成物であって、

好ましくは、前記自己免疫疾患は、関節炎、関節リウマチ、乾癬、多発性硬化症、潰瘍性大腸炎、クローン病、全身性エリテマトーデス、糸球体腎炎、拡張型心筋症様疾患、シェーグレン症候群、アレルギー性接触皮膚炎、多発性筋炎、強皮症、結節性多発動脈炎、リウマチ熱、白斑、インスリン依存型糖尿病、ベーチェット症候群、及び慢性甲状腺炎からなる群より選ばれるいずれかの1種以上であり、

好ましくは、前記神経変性疾患は、パーキンソン病、ハンチントン病、マシャド・ジョセフ病、筋萎縮性側索硬化症、及びクロイツフェルト・ヤコブ病からなる群より選ばれるいずれかの1種以上であり、

好ましくは、前記腫瘍は、白血病、リンパ腫、骨髄腫、脳腫瘍、頭頸部扁平上皮癌、非小細胞肺癌、上咽頭癌、食道癌、胃癌、膵臓癌、胆嚢癌、肝臓癌、結腸・直腸癌、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、子宮肉腫、前立腺がん、膀胱がん、腎細胞癌、及び黒色腫からなる群より選ばれるいずれかの1種以上である、前記組成物。

【請求項12】

請求項1～5のいずれかに記載の抗体またはその機能的断片の、自己免疫疾患、移植片に対する免疫応答、アレルギー反応、感染症、神経変性疾患、及び腫瘍を予防及び/又は治療するための薬物の調製における使用であって、

好ましくは、前記自己免疫疾患は、関節炎、関節リウマチ、乾癬、多発性硬化症、潰瘍性大腸炎、クローン病、全身性エリテマトーデス、糸球体腎炎、拡張型心筋症様疾患、シェーグレン症候群、アレルギー性接触皮膚炎、多発性筋炎、強皮症、結節性多発動脈炎、リウマチ熱、白斑、インスリン依存型糖尿病、ベーチェット症候群、及び慢性甲状腺炎からなる群より選ばれるいずれかの1種以上であり、

好ましくは、前記神経変性疾患は、パーキンソン病、ハンチントン病、マシャド・ジョセフ病、筋萎縮性側索硬化症、及びクロイツフェルト・ヤコブ病からなる群より選ばれるいずれかの1種以上であり、

好ましくは、前記腫瘍は、白血病、リンパ腫、骨髄腫、脳腫瘍、頭頸部扁平上皮癌、非

小細胞肺癌、上咽頭癌、食道癌、胃癌、膵臓癌、胆嚢癌、肝臓癌、結腸・直腸癌、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、子宮肉腫、前立腺がん、膀胱がん、腎細胞癌、及び黒色腫からなる群より選ばれるいずれかの1種以上である応用。

【請求項13】

自己免疫疾患、移植片に対する免疫応答、アレルギー反応、感染症、神経変性疾患、または腫瘍を予防及び/又は治療に使用するための薬物であって、

前記薬物は、請求項1～5のいずれかに記載のPD-1に特異的に結合可能な抗体またはPD-1に特異的に結合可能なその機能的断片、並びに薬学的に許容される担体を含み、

又は、前記薬物は、請求項7～10のいずれかに記載の組成物、及び薬学的に許容される担体を含み、

好ましくは、前記自己免疫疾患は、関節炎、関節リウマチ、乾癬、多発性硬化症、潰瘍性大腸炎、クローン病、全身性エリテマトーデス、糸球体腎炎、拡張型心筋症様疾患、シエーグレン症候群、アレルギー性接触皮膚炎、多発性筋炎、強皮症、結節性多発動脈炎、リウマチ熱、白斑、インスリン依存型糖尿病、ベーチェット症候群、及び慢性甲状腺炎からなる群より選ばれるいずれかの1種以上であり、

好ましくは、前記神経変性疾患は、パーキンソン病、ハンチントン病、マシヤド・ジョセフ病、筋萎縮性側索硬化症、及びクロイツフェルト・ヤコブ病からなる群より選ばれるいずれかの1種以上であり、

好ましくは、前記腫瘍は、白血病、リンパ腫、骨髄腫、脳腫瘍、頭頸部扁平上皮癌、非小細胞肺癌、上咽頭癌、食道癌、胃癌、膵臓癌、胆嚢癌、肝臓癌、結腸・直腸癌、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、子宮肉腫、前立腺がん、膀胱がん、腎細胞癌、及び黒色腫からなる群より選ばれるいずれかの1種以上である、ことを特徴とする薬物。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/CN2017/101082**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/CN2017/101082

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.: 14 and 15
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] claims 14 and 15 relate to a method for treating a disease, and therefore do not comply with PCT Rule 39.1(iv). This search is made on the basis of the pharmaceutical use of a PD-1 antibody or a functional fragment thereof.

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

International application No. PCT/CN2017/101082
--

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 2015112900 A8 (DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC. et al.), 18 August 2016 (18.08.2016), entire document	1-15
A	WO 2015085847 A1 (SHANGHAI HENGRUI MEDICINE CO., LTD. et al.), 18 June 2015 (18.06.2015), entire document	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/101082

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 105566496 A	11 May 2016	None	
CN 105061597 A	18 November 2015	WO 2016197497 A1	15 December 2016
		SG 11201705252 U A	28 July 2017
		CA 2972833 A1	15 December 2016
		EP 3176182 A1	07 June 2017
		CN 105061597 B	27 April 2016
		US 2017240644 A1	24 August 2017
		KR 20170020933 A	24 February 2017
		HK 1215870 A1	23 September 2016
		AU 2015398193 A1	16 March 2017
		TW 201643193 A	16 December 2016
CN 104945508 A	30 September 2015	IL 225530 D0	27 June 2013
		HU S1500071 I1	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
		SI EP 2170959 T1	30 April 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 I1	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
		EP 3222634 A1	27 September 2017
		DK 2170959 T3	13 January 2014
		KR 101586617 B1	20 January 2016
		US 2013108651 A1	02 May 2013
		JP 2010530753 A	16 September 2010
		SI 2170959 T1	30 April 2014
		JP 2012254092 A	27 December 2012
		PT 2170959 E	07 January 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 I2	29 February 2016

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2017/101082

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 105175544 A CN 104479020 A CN 104250302 A	23 December 2015 01 April 2015 31 December 2014	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
WO 2015112900 A8	18 August 2016	None	
		None	
		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
		CN 106103485 A	09 November 2016
WO 2015085847 A1	18 June 2015	AU 2015209145 A1	07 July 2016
		US 9683048 B2	20 June 2017
		KR 20160110995 A	23 September 2016
		TW 201536808 A	01 October 2015
		PH 12016501456 A1	22 August 2016
		CA 2935423 A1	30 July 2015
		WO 2015112900 A1	30 July 2015
		US 2015210769 A1	30 July 2015
		PE 02552017 A1	22 March 2017
		JP 2017506067 A	02 March 2017
		UY 35967 A	31 August 2015
		EP 3097121 A1	30 November 2016
		SG 11201604939 S A	30 August 2016
		US 2017247456 A1	31 August 2017
		EA 201691488 A1	28 February 2017
		MX 2016009616 A	09 May 2017
		CR 20160319 A	08 November 2016
		IL 246137 D0	31 July 2016
		CN 105026428 A	04 November 2015
		SG 11201604738 T A	28 July 2016
		JP 2017500889 A	12 January 2017
		CA 2932966 A1	18 June 2015
		DO P2016000133 A	30 November 2016
		PE 09532016 A1	26 September 2016
		KR 20160113113 A	28 September 2016
		HK 1213910 A1	15 July 2016
		MX 2016007620 A	11 January 2017
		TW 201605901 A	16 February 2016
		EP 3081576 A1	19 October 2016

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/101082

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		CL 2016001460 A1	20 January 2017
		PH 12016501120 A1	15 August 2016
		EP 3081576 A4	05 July 2017
		EA 201691225 A1	30 September 2016
		AU 2014361473 A1	07 July 2016
		US 2016376367 A1	29 December 2016

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/101082

A. 主题的分类	
C07K 16/28(2006.01)i; A61K 47/68(2017.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 37/02(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 19/02(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)	
C07K; A61K; A61P	
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))	
CPRSABS; CNABS; DWPI; SIPOABS; VEN; CNKI; CNTXT; WOTXT; EPTXT; USTXT; Pubmed; NCBI Genbank; EBI-EMBL; Google; 序列, programmed death-1, PD-1, 抗体, 嵌合抗体, 人源化抗体, antibody, chimeric, humanize	
C. 相关文件	
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落
A	CN 105566496 A (大庆东竺明生物技术有限公司) 2016年 5月 11日 (2016-05-11) 权利要求1-9
A	CN 105061597 A (北京东方百泰生物科技有限公司 等) 2015年 11月 18日 (2015-11-18) 说明书第16-19、30、36段
A	CN 104945508 A (默沙东有限责任公司) 2015年 9月 30日 (2015-09-30) 权利要求1-4, 说明书第178-179、181-182段
A	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) 全文
A	CN 104479020 A (上海复宏汉霖生物技术有限公司) 2015年 4月 1日 (2015-04-01) 全文
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
<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 “E” 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, 但为了理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 11月 7日	2017年 11月 22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	郭婷婷
传真号 (86-10)62019451	电话号码 (86-10)62413879

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2009年7月)

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/101082

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 2015112900 A8 (DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC. 等) 2016年 8月 18日 (2016 - 08 - 18) 全文	1-15
A	WO 2015085847 A1 (上海恒瑞医药有限公司 等) 2015年 6月 18日 (2015 - 06 - 18) 全文	1-15

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2009年7月)

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/101082

第1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/CN2017/101082

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： 14-15
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14-15涉及疾病治疗的方法，因此不符合PCT细则第39.1(iv)的规定。本次检索基于PD-1抗体或其功能片段的制药用途作出。
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/CN2017/101082

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	105566496	A	2016年 5月 11日	无			
CN	105061597	A	2015年 11月 18日	WO	2016197497	A1	2016年 12月 15日
				SG	11201705252U	A	2017年 7月 28日
				CA	2972833	A1	2016年 12月 15日
				EP	3176182	A1	2017年 6月 7日
				CN	105061597	B	2016年 4月 27日
				US	2017240644	A1	2017年 8月 24日
				KR	20170020933	A	2017年 2月 24日
				HK	1215870	A1	2016年 9月 23日
				AU	2015398193	A1	2017年 3月 16日
				TW	201643193	A	2016年 12月 16日
CN	104945508	A	2015年 9月 30日	IL	225530	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	PI0812913	A2	2014年 12月 9日
				SI	EP2170959	T1	2014年 4月 30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
				EP	3222634	A1	2017年 9月 27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
				SI	2170959	T1	2014年 4月 30日
				JP	2012254092	A	2012年 12月 27日
				PT	2170959	E	2014年 1月 7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

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/CN2017/101082		
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)
				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
CN	105175544	A	2015年 12月 23日	无		
CN	104479020	A	2015年 4月 1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	2015112900	A8	2016年 8月 18日	CN	106103485	A 2016年 11月 9日
				AU	2015209145	A1 2016年 7月 7日
				US	9683048	B2 2017年 6月 20日
				KR	20160110995	A 2016年 9月 23日
				TW	201536808	A 2015年 10月 1日
				PH	12016501456	A1 2016年 8月 22日
				CA	2935423	A1 2015年 7月 30日
				WO	2015112900	A1 2015年 7月 30日
				US	2015210769	A1 2015年 7月 30日
				PE	02552017	A1 2017年 3月 22日
				JP	2017506067	A 2017年 3月 2日
				UY	35967	A 2015年 8月 31日
				EP	3097121	A1 2016年 11月 30日
				SG	11201604939S	A 2016年 8月 30日
				US	2017247456	A1 2017年 8月 31日
				EA	201691488	A1 2017年 2月 28日
				MX	2016009616	A 2017年 5月 9日
WO	2015085847	A1	2015年 6月 18日	CR	20160319	A 2016年 11月 8日
				IL	246137	DO 2016年 7月 31日
				CN	105026428	A 2015年 11月 4日
				SG	11201604738T	A 2016年 7月 28日
				JP	2017500889	A 2017年 1月 12日
				CA	2932966	A1 2015年 6月 18日
				DO	P2016000133	A 2016年 11月 30日
				PE	09532016	A1 2016年 9月 26日
				KR	20160113113	A 2016年 9月 28日
				HK	1213910	A1 2016年 7月 15日
				MX	2016007620	A 2017年 1月 11日
				TW	201605901	A 2016年 2月 16日
				EP	3081576	A1 2016年 10月 19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/CN2017/101082

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)
		CL 2016001460 A1	2017年 1月 20日
		PH 12016501120 A1	2016年 8月 15日
		EP 3081576 A4	2017年 7月 5日
		EA 201691225 A1	2016年 9月 30日
		AU 2014361473 A1	2016年 7月 7日
		US 2016376367 A1	2016年 12月 29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)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 1/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/00	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 5/14 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 25/14 (2006.01)	A 6 1 P 5/14	
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/14	
A 6 1 P 25/02 (2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 25/02	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
G 0 1 N 33/536 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
	G 0 1 N 33/536	B
	G 0 1 N 33/536	D
	G 0 1 N 33/536	E

(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

(74)代理人 100106208

弁理士 宮前 徹

(74)代理人 100120112

弁理士 中西 基晴

(74)代理人 100135415

弁理士 中濱 明子

(72)発明者 ヤーン, ヤーピーン

中華人民共和国、 베이ジン 1 0 1 3 1 2、シュンイ・ディストリクト、ティエンジュ・エアポート・インダストリアル・ゾーン・エイ、ティエンジュ・ウェスト・ロード・ナンバー 1 0

(72)発明者 リウ, ジアワーン

中華人民共和国、 베이ジン 1 0 1 3 1 2、シュンイ・ディストリクト、ティエンジュ・エアポート・インダストリアル・ゾーン・エイ、ティエンジュ・ウェスト・ロード・ナンバー 1 0

(72)発明者 ソーン, ナンマン

中華人民共和国、 베이ジン 1 0 1 3 1 2、シュンイ・ディストリクト、ティエンジュ・エアポート

ト・インダストリアル・ゾーン・エイ、ティエンジュ・ウェスト・ロード・ナンバー 10

(72)発明者 ジャーン, ホーンジュエン

中華人民共和国、 Beijing 101312、Shunyi District、Tianjin Airport Industrial Zone A、Tianjin West Road No. 10

(72)発明者 ジン, モンシエ

中華人民共和国、 Beijing 101312、Shunyi District、Tianjin Airport Industrial Zone A、Tianjin West Road No. 10

F ターム(参考) 4C076 AA95 CC04 CC07 CC18 CC20 CC27 EE41 EE59

4C084 AA17 NA13 ZA01 ZA22 ZA32 ZA36 ZA66 ZA81 ZA89 ZA96

ZB11 ZB13 ZB26 ZB27 ZC35 ZC41

4C085 AA14 CC22 CC23 EE01

4H045 AA11 AA20 AA30 BA70 BA71 BA72 DA76 EA20 EA21 EA22

EA28 EA54 FA74

专利名称(译)	与pd-1及其功能片段特异性结合的可能抗体		
公开(公告)号	JP2019532669A	公开(公告)日	2019-11-14
申请号	JP2019535431	申请日	2017-09-08
[标]申请(专利权)人(译)	北京韩美药品有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京韩美药品有限公司		
发明人	ヤーン, ヤーピーン リウ, ジアワーン ソーン, ナンマン ジャーン, ホーンジュエン ジン, モンシエ		
IPC分类号	C12N15/13 C07K16/28 C07K16/46 A61K39/395 A61K47/68 A61K45/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 A61P31/00 A61P35/00 A61P25/00 A61P29/00 A61P19/02 A61P1/00 A61P17/06 A61P17/00 A61P13/12 A61P3/10 A61P5/14 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/02 A61P35/02 A61P9/00 G01N33/536		
CPC分类号	A61K39/395 A61K47/68 A61P19/02 A61P35/00 A61P37/02 C07K16/2818 C07K2317/24 C07K2317/76 C07K2317/92 C07K16/28 A61K47/6803 A61K47/6849 A61K49/0058 A61K49/16 A61K49/221 A61K51/1027 A61K2039/505		
FI分类号	C12N15/13 C07K16/28.ZNA C07K16/46 A61K39/395.T A61K47/68 A61K45/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 A61P31/00 A61P35/00 A61P25/00 A61P29/00 A61P19/02 A61P1/00 A61P17/06 A61P17/00 A61P13/12 A61P29/00.101 A61P3/10 A61P5/14 A61P25/14 A61P25/16 A61P25/02 A61P35/02 A61P9/00 G01N33/536.B G01N33/536.D G01N33/536.E		
F-TERM分类号	4C076/AA95 4C076/CC04 4C076/CC07 4C076/CC18 4C076/CC20 4C076/CC27 4C076/EE41 4C076/EE59 4C084/AA17 4C084/NA13 4C084/ZA01 4C084/ZA22 4C084/ZA32 4C084/ZA36 4C084/ZA66 4C084/ZA81 4C084/ZA89 4C084/ZA96 4C084/ZB11 4C084/ZB13 4C084/ZB26 4C084/ZB27 4C084/ZC35 4C084/ZC41 4C085/AA14 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA70 4H045/BA71 4H045/BA72 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA21 4H045/EA22 4H045/EA28 4H045/EA54 4H045/FA74		
代理人(译)	山本修 宫前彻 中西 基晴 中滨 明子		
优先权	201610827099.1 2016-09-14 CN		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

能够特异性结合PD-1的抗体及其功能片段，该抗体或其功能片段是PD-1嵌合抗体及其功能片段，以及PD-1人源化抗体及其功能片段。包括。[选择图]图4

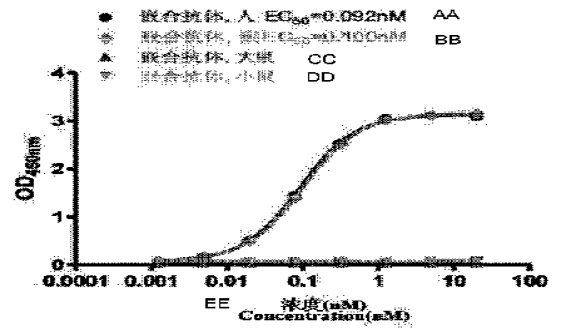


图 4

- AA Chimeric antibody, human $EC_{50} = 0.092 \text{ nM}$
- BB Chimeric antibody, monkey $EC_{50} = 0.100 \text{ nM}$
- CC Chimeric antibody, rat
- DD Chimeric antibody, mouse
- EE Concentration (nM)