

(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2019-519247

(P2019-519247A)

(43) 公表日 令和1年7月11日(2019.7.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13 Z N A	4 B 0 6 4
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 B 0 6 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C 0 8 4
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	4 C 0 8 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 6
審査請求 有 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2019-502126 (P2019-502126)
 (86) (22) 出願日 平成28年10月28日 (2016.10.28)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年11月29日 (2018.11.29)
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2016/103814
 (87) 国際公開番号 WO2017/166804
 (87) 国際公開日 平成29年10月5日 (2017.10.5)
 (31) 優先権主張番号 201610207741.6
 (32) 優先日 平成28年4月1日 (2016.4.1)
 (33) 優先権主張国 中国 (CN)

(71) 出願人 517031177
 アケソ・バイオフーマ・インコーポレイテッド
 中華人民共和国、528437・ガンドン、ゾンシャン、トーチ・ディベロップメンタル・ゾーン、シェンノン・ブルバード・6
 (71) 出願人 518349215
 タイチョウ ハンチョン バイオフーマ シューティクス インコーポレイテッド
 中華人民共和国 225316 チャンサー タイチョウ ナンバー 1 オブ チャイナ メディカル シティ ロード
 (74) 代理人 100107515
 弁理士 廣田 浩一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗PD-1のモノクローナル抗体

(57) 【要約】

抗PD-1のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を提供する。(1)配列番号: 1に示すアミノ酸配列、(2)配列番号: 3に示すアミノ酸配列、(3)配列番号: 5に示すアミノ酸配列、(4)(1)~(3)と比べて、少なくとも1つの保守的アミノ酸突然変異を有するアミノ酸配列から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

抗 PD - 1 のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、

(1) 配列番号 : 1 に示すアミノ酸配列、

(2) 配列番号 : 3 に示すアミノ酸配列、

(3) 配列番号 : 5 に示すアミノ酸配列、及び

(4) (1) ~ (3) と比べて、少なくとも 1 つの保守的アミノ酸突然変異を有するアミノ酸配列、

から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む、
ことを特徴とするモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

10

【請求項 2】

前記抗 PD - 1 のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、

(5) 配列番号 : 2 に示すアミノ酸配列、

(6) 配列番号 : 4 に示すアミノ酸配列、

(7) 配列番号 : 6 に示すアミノ酸配列、及び

(8) (5) ~ (7) と比べて、少なくとも 1 つの保守的アミノ酸突然変異を有するアミノ酸配列、

から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を更に含む、
ことを特徴とする請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

20

【請求項 3】

前記抗 PD - 1 のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、

配列番号 : 1 に示すアミノ酸配列を有する重鎖可変領域及び配列番号 : 2 に示すアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、

配列番号 : 3 に示すアミノ酸配列を有する重鎖可変領域及び配列番号 : 4 に示すアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び

配列番号 : 5 に示すアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と配列番号 : 6 に示すアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、

から選択される 1 つを含む、

ことを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

30

【請求項 4】

前記抗体は、モノクローナル抗体である、

ことを特徴とする請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 5】

前記抗 PD - 1 のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片が、

PD - 1 と特異的、効率的に結合でき、かつ T 細胞の活性化と増殖を促進し、サイトカインの発現と分泌を調節し、または抗腫瘍細胞を刺激してより強い免疫応答を生成することに用いられる、

ことを特徴とする請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 6】

単離ポリヌクレオチドであって、

請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片をコードする、
ことを特徴とする単離ポリヌクレオチド。

40

【請求項 7】

前記ポリヌクレオチドは、

配列番号 : 7 に示すヌクレオチド配列またはその相補配列、

配列番号 : 8 に示すヌクレオチド配列またはその相補配列、

配列番号 : 9 に示すヌクレオチド配列またはその相補配列、

配列番号 : 10 に示すヌクレオチド配列またはその相補配列、

配列番号 : 11 に示すヌクレオチド配列またはその相補配列、及び

配列番号 : 12 に示すヌクレオチド配列またはその相補配列、

50

から選択される少なくとも1つを含む、
ことを特徴とする請求項6に記載のポリヌクレオチド。

【請求項8】

発現ベクターであって、
請求項6または7に記載のポリヌクレオチドを含む、
ことを特徴とする発現ベクター。

【請求項9】

前記発現ベクターは、
宿主細胞における前記ポリヌクレオチドの発現を制御するように、前記ポリヌクレオチ
ドと操作可能に連結する制御要素を更に含む、
ことを特徴とする請求項8に記載の発現ベクター。

10

【請求項10】

前記宿主細胞は、哺乳動物細胞である、
ことを特徴とする請求項9に記載の発現ベクター。

【請求項11】

前記哺乳動物細胞は、ヒト腎上皮細胞系細胞である、
ことを特徴とする請求項10に記載の発現ベクター。

【請求項12】

前記ヒト腎上皮細胞系細胞は、293T細胞である、
ことを特徴とする請求項11に記載の発現ベクター。

20

【請求項13】

前記制御要素は、
プロモーター、エンハンサー、及びターミネーターから選択される少なくとも1つを含
み、
任意的に、前記プロモーターは、CMVプロモーターであり、前記エンハンサーは、初
期CMVエンハンサーであり、前記ターミネーターは、SV poly Aターミネーター
である、
ことを特徴とする請求項9に記載の発現ベクター。

【請求項14】

組み換え細胞であって、
請求項8～13のいずれかに記載の発現ベクターを含む、
ことを特徴とする組み換え細胞。

30

【請求項15】

請求項1～5のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片の製造方法であって、
請求項14に記載の組み換え細胞を培養するステップを含む、
ことを特徴とする抗体またはその抗原結合断片の製造方法。

【請求項16】

請求項6または7に記載のポリヌクレオチド、請求項8～13のいずれかに記載の発現
ベクター、または請求項14に記載の組み換え細胞の抗体またはその抗原結合断片の製造
における使用であって、
前記抗体がPD-1と特異的に結合する、
ことを特徴とする使用。

40

【請求項17】

ハイブリドーマであって、
中国典型培養物保蔵センター(CCTCC)に寄託され、寄託番号は、C201667
であり、寄託日付は、2016年4月1日である、
ことを特徴とするハイブリドーマ。

【請求項18】

請求項17に記載のハイブリドーマのモノクローナル抗体の製造における使用。

【請求項19】

50

請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片、請求項 6 または 7 に記載のポリヌクレオチド、請求項 8 ~ 13 のいずれかに記載の発現ベクター、請求項 14 に記載の組み換え細胞または請求項 17 に記載のハイブリドーマの医薬の製造における使用であって、

前記医薬が、T細胞の活性化と増殖を促進し、サイトカインの発現と分泌を調節し、または抗腫瘍細胞を刺激してより強い免疫応答を生成することに用いられる、ことを特徴とする使用。

【請求項 20】

医薬組成物であって、

請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片、

請求項 6 または 7 に記載のポリヌクレオチド、

請求項 8 ~ 13 のいずれかに記載の発現ベクター、

請求項 14 に記載の組み換え細胞、または

請求項 17 に記載のハイブリドーマを含む、

ことを特徴とする医薬組成物。

10

【請求項 21】

PD-1 と結合できる医薬の検出方法であって、

前記方法は、

検出対象である医薬が存在する場合、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片と抗原を接触させ、かつ前記抗体またはその抗原結合断片と前記抗原との第 1 の結合量を決定して、前記抗原は、PD-1 またはその断片であるステップ、及び

20

検出対象である医薬が存在しない場合、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片と抗原を接触させ、かつ前記抗体またはその抗原結合断片と前記抗原との第 2 の結合量を決定して、前記抗原は、PD-1 またはその断片であるステップを含み、

ただし、前記第 2 の結合量が前記第 1 の結合量より多いことは、前記検出対象である医薬が PD-1 と結合できる合図である、

ことを特徴とする検出方法。

【請求項 22】

混合薬であって、

(1) 請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片、請求項 6 または 7 に記載のポリヌクレオチド、請求項 8 ~ 13 のいずれかに記載の発現ベクター、請求項 14 に記載の組み換え細胞、または請求項 17 に記載のハイブリドーマと、

30

(2) (1) と異なる免疫強化剤と、を含む、

ことを特徴とする混合薬。

【請求項 23】

前記 (1) と異なる免疫強化剤は、

抗 CTLA-4 抗体、抗 CD40 抗体、ブデソニド及びサリチル酸塩からなる群から選択される少なくとも 1 つを含み、

任意的に、前記サリチル酸塩は、スルファサラジン、オルサラジン、バルサラジド及びメサラジンから選択される少なくとも 1 つを含む、

40

ことを特徴とする請求項 16 に記載の混合薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生物医薬分野に関し、特に、抗 PD-1 のモノクローナル抗体に関する。

【背景技術】

【0002】

プログラム化細胞死因子 (PD-1) (別称: CD279、遺伝子名: PDCD1、登録番号: NP__005009) は、免疫システムの刺激シグナルと阻害シグナルとのバランスの調節、及び末梢性トレランスの維持に対して、重要な作用を発揮する細胞表面受容

50

体であり、同時にCD28と同一性を有する免疫グロブリンスーパーファミリーの阻害メンバーとする。PD-1は、モノマーI型膜貫通タンパク質であり、免疫グロブリン可変領域系細胞外構成域(immunoglobulin variable region-like extracellular domain)、及び免疫受容体チロシン依存性抑制モチーフ(ITIM)と免疫受容体チロシン依存性スイッチモチーフ(ITSM)を含有する細胞質ドメインからなる。T細胞、B細胞、ナチュラル・キラー(NK)細胞と単球にPD-1の発現を誘導でき、例えば、T細胞受容体(TCR)またはB細胞受容体(BCR)シグナル伝達によりリンパ球を活性化した。PD-1が既知の二つのリガンドを有し、即ち、PD-L1(B7-H1、CD274)とPD-L2(B7-DC、CD273)であり、これらは、細胞表面に発現されるB7ファミリーのメンバーである。リガンドと結合する場合、PD-1がホスファターゼ(例えば、SHP-1とSHP-2)をその細胞内のチロシンモチーフに動員する。その後、前記チロシンモチーフが、TCRまたはBCRシグナル伝達により活性化されたエフェクタ分子を脱リン酸化させる。これにより、TCRまたはBCRと同時に結合する場合のみ、PD-1が抑制性シグナルをT細胞とB細胞に伝達することができる。

10

【0003】

しかしながら、現在、PD-1を特異的に認識する抗体を改善することが求められている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

20

【0004】

本発明は、上記の技術課題の1つを一定の程度で解決し、または有用の商用利用可能な選択を提供することである。そのため、本発明の1つの目的は、抗PD-1のモノクローナル抗体を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明の第1の側面において、本発明は、抗PD-1のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を提供する。本発明の実施例によれば、前記抗体またはその抗原結合断片は、(1)配列番号：1に示すアミノ酸配列、(2)配列番号：3に示すアミノ酸配列、(3)配列番号：5に示すアミノ酸配列、(4)(1)~(3)と比べて、少なくとも1つの保守的アミノ酸突然変異(conservative amino acid mutation)を有するアミノ酸配列から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む。

30

【0006】

本発明の実施例によれば、前記抗体またはその抗原結合断片は、(5)配列番号：2に示すアミノ酸配列、(6)配列番号：4に示すアミノ酸配列、(7)配列番号：6に示すアミノ酸配列、(8)(5)~(7)と比べて、少なくとも1つの保守的アミノ酸突然変異を有するアミノ酸配列から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を更に含む。

40

【0007】

本発明の実施例によれば、前記抗体またはその抗原結合断片は、

配列番号：1に示すアミノ酸配列(EVQLVQSGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSYGMVSRQTPKGLDWAATISGGGRDITYYPDSVKGRFTISRDNKNNLYLQMNSLR AEDTALYYCARQKGEAWFAYWGQGT L V T V S S)を有する重鎖可変領域と、

配列番号：2に示すアミノ酸配列(DIVLTQSPASLA V S P G Q R A T I T C R A S E S V D N Y G I S F M N W F Q Q K P G Q P P K L L I Y A A S N K G T G V P A R F S G S G S G T D F T L N I H P M E E N D T A M Y F C Q Q S K E V P W T F G G G T K L E I K)を有する軽鎖可変領域と、を含む。

【0008】

50

本発明の実施例によれば、前記抗体またはその抗原結合断片は、

配列番号：3に示すアミノ酸配列（EVQLVQSGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSYGMWVRQAPGKGLDWVATISGGGRDITYYPDSVKGRFTISRDNKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCARQKGEAWFAYWGQGTLLVTVSS）を有する重鎖可変領域と、

配列番号：4に示すアミノ酸配列（DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVDNYGISFMNWFQQKPGQPPKLLIYAASNKGTGVPARFSGSGSGTDFTLNINPMEENDTAMYFCQQSKEVPWTFGGGTTKLEIK）を有する軽鎖可変領域と、を含む。

【0009】

本発明の実施例によれば、前記抗体またはその抗原結合断片は、

配列番号：5に示すアミノ酸配列（EVQLVQSGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSYGMWVRQAPGKGLDWVATISGGGRDITYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQKGEAWFAYWGQGTLLVTVSS）を有する重鎖可変領域と、

配列番号：6に示すアミノ酸配列（DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVDNYGISFMNWFYQQKPGQPPKLLIYAASNKATGVPARFSGSGSGTDFTLNINPMEANDTAVYFCQQSKEVPWTFGGGTTKLEIK）を有する軽鎖可変領域と、を含む。

【0010】

本発明の実施例によれば、前記抗体またはその抗原結合断片の抗体は、モノクローナル抗体である。

【0011】

本発明の実施例によれば、前記抗体またはその抗原結合断片が、PD-1と特異的、効率的に結合でき、T細胞の活性化と増殖を促進し、サイトカインの発現と分泌を調節し、または抗腫瘍細胞を刺激してより強い免疫応答を生成することに用いられる。

【0012】

発明者が、本発明の実施例による抗体またはその抗原結合断片、PD-1を特異的に認識でき、かつT細胞の活性化と増殖を促進し、サイトカインの発現と分泌を調節し、抗腫瘍細胞を刺激してより強い免疫応答を生成できることを見出す。

【0013】

本発明の第2の側面において、本発明が、単離ポリヌクレオチドを提供する。本発明の実施例によれば、前記ポリヌクレオチドが前記抗体またはその抗原結合断片をコードする。

【0014】

本発明の実施例によれば、前記ポリヌクレオチドは、下記のヌクレオチド配列の少なくとも1つを有する。

【0015】

本発明の具体的な実施例によれば、前記ポリヌクレオチドが、配列番号：1に示すアミノ酸配列（H1L1のヌクレオチド配列）をコードする配列番号：7に示すヌクレオチド配列またはその相補配列を有する。

G A A G T G C A G C T G G T G C A G A G C G G A G G G G G A C T G G T G C A G
C C C G G C G G G T C T C T G A A G C T G A G T T G C G C C G C T T C A G G A T
T C A C T T T T A G C T C C T A C G G C A T G T C C T G G G T G C G A C A G A C
C C C C G A G A A A G G G C T G G A C T G G G T C G C T A C C A T C T C T G G A
G G C G G G A G A G A C A C A T A C T A T C C T G A T A G T G T C A A G G G C C
G G T T C A C A A T T A G C A G A G A C A A C T C C A A A A C A A T C T G T A
T C T G C A G A T G A A T A G C C T G A G G G C A G A A G A T A C C G C C C T G
T A C T A T T G T G C C C G C C A G A A A G G A G A G G C T T G G T T T G C A T
A C T G G G G A C A G G G G A C A C T G G T C A C C G T C A G C A G C (配列番号

10

20

30

40

50

: 7)。

【0016】

本発明の具体的な実施例によれば、前記ポリヌクレオチドが配列番号：3に示すアミノ酸配列（H2L2のヌクレオチド配列）をコードする配列番号：8に示すヌクレオチド配列またはその相補配列を有する。

G A G G T G C A G C T G G T G C A G T C T G G C G G C G G A C T G G T G C A G
C C C G G C G G G T C A C T G A A G C T G A G C T G C G C C G C T T C C G G C T
T C A C C T T T A G C T C C T A C G G A A T G T C C T G G G T G C G A C A G G C
A C C C G G G A A G G G G C T G G A C T G G G T C G C T A C T A T C T C A G G A
G G C G G G A G A G A C A C C T A C T A T C C T G A T A G C G T C A A G G G C C
G G T T C A C A A T T A G C C G G G A C A A C A G C A A G A A C A A T C T G T A
C C T G C A G A T G A A C A G C C T G A G G G C T G A G G A T A C T G C A C T G
T A C T A T T G T G C C C G C C A G A A G 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 C C A G G G A A C C C T G G T G A C A G T C T C T A G T (配列番号
: 8)。

10

【0017】

本発明の具体的な実施例によれば、前記ポリヌクレオチドが配列番号：5に示すアミノ酸配列（H3L3のヌクレオチド配列）をコードする配列番号：9に示すヌクレオチド配列またはその相補配列を有する。

G A G G T G C A G C T G G T G C A G A G T G G A G G C G G G C T G G T G C A G
C C C G G C G G G T C A C T G A A G C T G A G C T G C G C C G C T T C C G G C T
T C A C C T T T A G C T C C T A C G G A A T G T C C T G G G T G C G A C A G G C
A C C C G G G A A G G G G C T G G A C T G G G T C G C T A C T A T C T C A G G A
G G C G G G A G A G A C A C C T A C T A T C C T G A T A G C G T G A A G G G C C
G G T T C A C A A T T A G C C G G G A C A A C A G C A A G A A C A C T C T G T A
C C T G C A G A T G A A C T C T C T G A G G G C T G A G G A T A C A G C A G T C
T A C T A T T G T G C C C G C C A G A A G 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 C C A G G G A A C C C T G G T G A C A G T C T C T A G T (配列番号
: 9)。

20

【0018】

本発明の具体的な実施例によれば、前記ポリヌクレオチドが配列番号：2に示すアミノ酸配列（H1L1のヌクレオチド配列）をコードする配列番号：10に示すヌクレオチド配列またはその相補配列を有する

G A T A T T G T G C T G A C T C A G A G C C C T G C T T C C C T G G C C G T G
T C T C C A G G A C A G C G A G C T A C C A T C A C A T G C A G A G C A T C T G
A G A G T G T G G A C A A C T A C G G A A T T A G T T T C A T G A A T T G G T T
T C A G C A G A A G C C C G G C C A G C C C C T A A A C T G C T G A T C T A T
G C C G C T A G C A A C A A G G G C A C C G G G G T G C C T G C T C G A T T C T
C A G G A A G C G G C T C C G G G A C A G A C T T T A C T C T G A A C A T T C A
C C C A A T G G A G G A A A A T G A T A C A G C A A T G T A C T T C T G C C A G
C A G A G C A A G G A G G T G C C C T G G A C C T T T G G C G G G G G A A C A A
A G C T G G A A A T C A A A (配列番号：10)。

30

40

【0019】

本発明の具体的な実施例によれば、前記ポリヌクレオチドが配列番号：4に示すアミノ酸配列（H2L2のヌクレオチド配列）をコードする配列番号：11に示すヌクレオチド配列またはその相補配列を有する。

G A T A T T G T G C T G A C T C A G A G C C C T G C T T C C C T G G C C G T G
T C T C C A G G A C A G C G A G C T A C C A T C A C A T G C A G A G C A T C T G
A G A G T G T G G A C A A C T A C G G A A T T A G T T T C A T G A A T T G G T T
T C A G C A G A A G C C C G G C C A G C C C C T A A A C T G C T G A T C T A T

50

G C C G C T A G C A A C A A G G G C A C C G G G G T G C C T G C T C G A T T C T
 C A G G A A G C G G C T C C G G G A C A G A C T T T A C T C T G A A C A T T A A
 C C C A A T G G A G G A A A A T G A T A C A G C A A T G T A C T T C T G C C A G
 C A G A G C A A G G A G G T G C C C T G G A C C T T T G G C G G G G G A A C A A
 A G C T G G A A A T C A A A (配列番号：11)。

【0020】

本発明の具体的な実施例によれば、前記ポリヌクレオチドが配列番号：6に示すアミノ酸配列(H3L3のヌクレオチド配列)をコードする配列番号：12に示すヌクレオチド配列またはその相補配列を有する。

G A C A T C G T C C T G A C T C A G A G C C C T G C T T C C C T G G C C G T G
 A G C C C A G G C C A G C G A G C A A C C A T C A C A T G C A G A G C C T C A G
 A G A G C G T G G A C A A C T A C G G C A T T A G C T T C A T G A A T T G G T A
 T C A G C A G A A G C C C G G G C A G C C T C C C A A G C T G C T G A T C T A C
 G C C G C T T C C A A C A A G G C C A C T G G G G T G C C T G C T C G A T T C T
 C C G G C T C T G G G A G T G G A A C A G A C T T T A C T C T G A A C A T T A A
 T C C A A T G G A A G C T A A T G A T A C A G C A G T G T A T T T C T G C C A G
 C A G A G C A A G G A G G T C C C A T G G A C C T T C G G C G G C G G C A C C A
 A G C T G G A G A T C A A G (配列番号：12)。

【0021】

発明者が、本発明の実施例によれば、本発明のポリヌクレオチドを介して、PD-1を特異的に認識する抗体またはその抗原結合断片を合成することができる。PD-1を特異的に認識する抗体またはその抗原結合断片の前記特徴及びメリットについて、前記ポリヌクレオチドにも適用できるため、ここで、詳細な説明は省略する。

【0022】

本発明の第3の側面において、本発明が発現ベクターを提供する。前記発現ベクターが前記ポリヌクレオチドを含む。

【0023】

本発明の具体的な実施例によれば、前記発現ベクターは、宿主細胞における前記ポリヌクレオチドの発現を制御するように、前記ポリヌクレオチドと操作可能に連結する制御要素を更に含む。

【0024】

本発明の具体的な例示によれば、前記宿主細胞は、哺乳動物細胞でも良い。前記哺乳動物細胞は、ヒト腎上皮細胞系細胞でも良い。

【0025】

本発明の具体的な例示によれば、前記ヒト腎上皮細胞系細胞は、293T細胞でも良い。

【0026】

本発明の具体的な実施例によれば、前記制御要素は、プロモーター、エンハンサー、及びターミネーターから選択される少なくとも1つを含み、

任意的に、前記プロモーターは、CMVプロモーターであり、前記エンハンサーは、初期CMVエンハンサーであり、前記ターミネーターは、SV polyAターミネーターである。

【0027】

本発明の第4の側面によれば、本発明は、組み換え細胞を提供する。前記組み換え細胞は、前記発現ベクターを含む。

【0028】

本発明の第5の側面において、本発明は、前記抗体またはその抗原結合断片の製造方法を提供する。本発明の実施例によれば、前記組み換え細胞を培養するステップを含む。

【0029】

10

20

30

40

50

発明者が、本発明の方法を介して、前記組み換え細胞を培養することにより、本発明の実施例によるPD-1を特異的に認識する抗体またはその抗原結合断片を合成できることを見出す。PD-1を特異的に認識する抗体またはその抗原結合断片の前記特徴及びメリットについて、前記方法にも適用できるため、ここで、詳細な説明は省略する。

【0030】

本発明の第6の側面において、本発明は、前記ポリヌクレオチド、発現ベクター、または組み換え細胞の抗体またはその抗原結合断片の製造における使用を提供する。前記抗体とPD-1とが特異的に結合する。これにより、発明者が、前記ポリヌクレオチド、発現ベクター、または組み換え細胞を利用することにより、PD-1と特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片を製造できることを見出す。従って、得られた抗体またはその抗原結合断片によりPD-1とその受容体の結合を阻害できるため、PD-1受容体（例えば、SHP1/2）に関するシグナル経路を阻害でき、腫瘍の成長を有効に抑制できる。

10

【0031】

本発明の第7の側面において、本発明は、ハイブリドーマを提供する。それが中国典型培養物保蔵センターに寄託されていた（CCTC）。

【0032】

発明者が、本発明のハイブリドーマを利用することにより、本発明の実施例におけるPD-1を特異的に認識する抗体またはその抗原結合断片を合成できることを見出す。PD-1を特異的に認識する抗体またはその抗原結合断片の前記特徴及びメリットについて、前記ハイブリドーマにも適用できるため、ここで、詳細な説明は省略する。

20

【0033】

本発明の第8の側面において、本発明は、前記ハイブリドーマのモノクローナル抗体の製造における使用を提供する。

【0034】

発明者が、本発明のハイブリドーマを利用することにより、本発明の実施例によるPD-1を特異的に認識する抗体またはその抗原結合断片を合成できることを見出す。PD-1を特異的に認識する抗体またはその抗原結合断片の前記特徴及びメリットについて、前記使用にも適用できるため、ここで、詳細な説明は省略する。

【0035】

本発明の第9の側面において、本発明は、前記抗体またはその抗原結合断片、前記ポリヌクレオチド、発現ベクター、組み換え細胞または前記ハイブリドーマの医薬の製造における使用を提供する。前記医薬が、T細胞の活性化と増殖を促進し、サイトカインの発現と分泌を調節し、抗腫瘍細胞を刺激してより強い免疫応答を生成することに用いられる。

30

【0036】

本発明の第10の側面において、本発明は、医薬組成物を提供する。本発明の実施例によれば、前記医薬組成物は、前記抗体またはその抗原結合断片、前記ポリヌクレオチド、前記発現ベクター、前記組み換え細胞または前記ハイブリドーマを含む。

【0037】

本発明の第11の側面において、本発明は、PD-1と結合できる医薬の検出方法を提供する。

40

【0038】

本発明の実施例によれば、前記方法は、

検出対象である医薬が存在する場合、前記抗体またはその抗原結合断片と抗原を接触させ、かつ前記抗体またはその抗原結合断片と前記抗原との第1の結合量を決定して、前記抗原は、PD-1またはその断片であるステップ、及び

検出対象である医薬が存在しない場合、前記抗体またはその抗原結合断片と抗原を接触させ、かつ前記抗体またはその抗原結合断片と前記抗原との第2の結合量を決定して、前記抗原は、PD-1またはその断片であるステップを含み、

ただし、前記第2の結合量が前記第1の結合量より多いことは、前記検出対象である医薬がPD-1と結合できる合図である。

50

前記方法により、PD-1と結合できる検出対象である医薬を選別できる。

【0039】

本発明の第12の側面において、本発明は、混合薬を提供する。

【0040】

本発明の実施例によれば、前記混合薬は、

(1) 前記抗体またはその抗原結合断片、前記ポリヌクレオチド、前記発現ベクター、前記組み換え細胞または前記ハイブリドーマ、及び

(2) (1)と異なる免疫強化剤、を含む。

【0041】

本発明の実施例によれば、前記(1)と異なる免疫強化剤は、抗CTLA-4抗体、抗CD40抗体、ブデソニド(Budesonide)、サリチル酸塩から選択される少なくとも1つを含み、任意的に、前記サリチル酸塩は、スルファサラジン(sulfasalazine)、オルサラジン(olsalazine)、バルサラジド(balsalazide)及びメサラジン(mesalamine)から選択される少なくとも1つを含む。

10

【0042】

PD-1とCTLA-4との併用による阻害と、腫瘍の標準治療(例えば、化学療法)と同時に利用されることがある。臨床試験に基づいて、抗PD-1抗体と抗CTLA-4抗体との併用により、化学療法剤の用量を低下しても同じ効果を達成できる。従来文献によると、抗PD-1抗体と抗CTLA-4抗体、及びダカルバジン(ドセタキセル、抗がん薬に属する)またはインターロイキン-2(IL-2)とを併用することにより悪性黒色腫を治療することが提案する。多種類の化学療法薬における細胞毒素は、細胞死を誘導し、腫瘍細胞によって発現される抗原のレベルを増加させる。一方、抗PD-1抗体と抗CTLA-4抗体を併用すると、放射線療法、手術、ホルモン療法などの相乗効果を増加させることができる。上記のいずれも体内の抗原のソースを増加するためである。血管増殖を阻害することにより、腫瘍細胞の増殖をさらに阻害させるため、血管新生阻害剤も抗PD-1抗体および抗CTLA-4抗体と併用できる。これにより、体内の抗原発現の増加に寄与することがある。

20

【0043】

本発明の付加的な特徴及びメリットは、以下の説明において一部が述べられ、一部が以下の説明においてさらに明瞭になり、又は本発明の実践を介して把握できる。

30

【0044】

本発明の付加的な特徴及びメリットは、下記の図面を参考しながら実施例を説明することにより、明瞭かつ理解しやすくなる。

【図面の簡単な説明】

【0045】

【図1】本発明の1つの実施例によれば、H1L1、H2L2、H3L3のPD-1との結合のELISA結果図である。

【図2】本発明の1つの実施例によれば、H1L1、H2L2、H3L3がPD-1とPdL1との結合を抑制する競合ELISA結果図である。

40

【図3】本発明の1つの実施例によれば、H2L2がPD-1とPdL2との結合を抑制する競合ELISA結果図である。

【図4】本発明の1つの実施例によれば、H1L1の運動特性パラメータ検出結果を示す図である。

【図5】本発明の1つの実施例によれば、H2L2の運動特性パラメータ検出結果を示す図である。

【図6】本発明の1つの実施例によれば、H3L3の運動特性パラメータ検出結果を示す図である。

【図7】本発明の1つの実施例によれば、抗体H1L1、H2L2、H3L3が、PD-1タンパク質の活性化を阻害することにより、T細胞を刺激してIL-2とIFN γ am

50

m a の分泌レベルを示す図。

【図 8】本発明の 1 つの実施例によれば、それぞれ抗体 H 1 L 1、H 2 L 2、H 3 L 3 の B B 0 0 7 細胞との結合の蛍光を示す図。

【図 9】本発明の 1 つの実施例によれば、それぞれ抗体 H 1 L 1、H 2 L 2、H 3 L 3 の B B 0 0 7 細胞との結合後の蛍光強度を示す図。

【発明を実施するための形態】

【0046】

以下、本発明の実施形態を詳細に説明する。以下の実施形態は、例示的なものであり、本発明を解釈するのみに用いられ、本発明を限定するものと理解されてはならない。また、明確に記載されていない場合、下記実施例に利用された試薬は、いずれも一般的な市販品に属することや、本発明または既知の方法で合成できるものであり、明確に記載されていない反応条件は、当業者にとって容易に取得できるものである。

【実施例】

【0047】

実施例 1 PD - 1 4 G 1 0 ハイブリドーマ細胞株の確立

分子生物学の方法に基づいて、下記のアミノ酸配列を有する融合タンパク質 PD - 1 - m I g G F c を調製する。

M Q I P Q A P W P V V W A V L Q L G W R P G W F L D S P D R P W N P P T F S P
A L L V V T E G D N A T F T C S F S N T S E S F V L N W Y R M S P S N Q T D K L
A A F P E D R S Q P G Q D C R F R V T Q L P N G R D F H M S V V R A R R N D S G
T Y L C G A I S L A P K A Q I K E S L R A E L R V T E R R A E V P T A H P S P S
P R P A G Q F Q T L V S P R P S E T V T C N V A H P A S S T K V D K K I V P R D
C G C K P C I C T V P E V S S V F I F P P K P K D V L T I T L T P K V T C V V V
D I S K D D P E V Q F S W F V D D V E V H T A Q T Q P R E E Q F N S T F R S V S
E L P I M H Q D W L N G K E F K C R V N S A A F P A P I E K T I S K T K G R P K
A P Q V Y T I P P P K E Q M A K D K V S L T C M I T D F F P E D I T V E W Q W N
G Q P A E N Y K N T Q P I M N T N G S Y F V Y S K L N V Q K S N W E A G N T F T
C S V L H E G L H N H H T E K S L S H S P G K (配列番号：13)。

【0048】

1. マウス免疫及び細胞融合

フロイントアジュバントにより予め乳化された抗原（前記方法により調製された PD - 1 - m I g G F c 融合タンパク質）で B A L B / C マウスを免疫する。B A L B / C マウスが免疫応答を生成した後、その脾細胞を採取し、マウス骨髄腫細胞と融合させてハイブリドーマを得、96 ウェルプレートで前記ハイブリドーマを培養する。

【0049】

2. 間接 E L I S A

各ハイブリドーマ細胞株細胞が分泌する抗体について、抗原である PD - 1 - h F c によりコーティングされ、1% B S A を含む P B S 緩衝液で E L I S A プレートブロックして、コーティングされた E L I S A プレートを利用する間接 E L I S A 法で、PD - 1 と特異的に結合する新たな抗体を分泌するハイブリドーマ細胞を選別する。

【0050】

具体的なステップは、以下のようである。

1) 抗原のコーティング

4 で、1 μ g / m l である PD - 1 - h F c 抗原（50 μ l / ウェル）を一晩コーティングするステップ。

2) ブロッキング

37、1% B S A (P B S で希釈する) で 2 時間ブロックして、1% T w e e n - 20 を含む 1 × P B S T で 3 回洗浄して、乾燥するように軽く叩くステップ。

3) 一次抗体

1 μ g / m l から 1 : 3 で希釈して、7 つの濃度勾配の抗体溶液を得て、対照組は、P

10

20

30

40

50

B Sであり、それぞれ37 で1時間インキュベートするステップ。

4) 二次抗体

P B S Tで3回洗浄して、乾燥するように軽く叩き、1 : 5 0 0 0で希釈したH R P 標識ヤギ抗マウスI g G (H + L)を各ウェルに5 0 μ lずつ入れ、37 で1時間インキュベートするステップ。

5) 顕色

P B S Tで3回洗浄して、乾燥するように軽く叩き、T M B 顕色剤を各ウェルに5 0 μ lずつ入れ、室温で5 ~ 1 0分反応するステップ。

6) 顕色完了

5 0 μ l / ウェルで2 M H₂ S O₄ 溶液を入れ、顕色反応を完了するステップ。

10

7) 読取り

マイクロプレートリーダーにより、吸光度450nmで各ウェルの吸光値を検出するステップ。

【0051】

3. 競合E L I S A

間接E L I S Aにより選別されたハイブリドーマ細胞を、競合E L I S A法でP D - L 1と競合してP D - 1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を選別する。

【0052】

具体的なステップは、以下のようである。

20

1) 抗原のコーティング

96ウェルE L I S Aプレートに、4 で0.5 μ g / m lであるP D - 1 - m I g G F c 抗原(50 μ l / ウェル)を一晩コーティングするステップ。

2) ブロッキング

P B S Tでプレートを3回洗浄して、乾燥するように軽く叩き、37、1% B S A (P B Sで希釈する)で2時間ブロックして、1% T w e e n - 2 0を含む1 x P B S Tで3回洗浄するステップ。

3) 一次抗体

3 μ g / m lから1 : 3で希釈して、7つの濃度勾配の抗体溶液を得て、対照組は、P B Sであり、それぞれ室温で10分インキュベートするステップ。

30

4) リガンド

2 μ g / m lのP D L 1 - h I g G 1 F c 溶液を各ウェルに5 0 μ lずつを入れ、37で1時間インキュベートするステップ。

5) 二次抗体

P B S Tで3回洗浄して、乾燥するように軽く叩き、1 : 5 0 0 0で希釈した二次抗体であるH R P 標識ヤギ抗マウスI g G - (H + L)を各ウェルに5 0 μ lずつ入れ、37で1時間インキュベートするステップ。

6) 顕色

P B S Tで3回洗浄して、乾燥するように軽く叩き、T M B 顕色剤を各ウェルに5 0 μ lずつ入れ、室温で5 ~ 1 0分反応するステップ。

40

7) 顕色完了

5 0 μ l / ウェルで2 M H₂ S O₄ 溶液を入れ、顕色反応を完了するステップ。

8) 読取り

マイクロプレートリーダーにより、吸光度450nmで各ウェルの吸光値を検出するステップ。

検出結果に基づいて、P D - 1 1 8 A 1 0ハイブリドーマ細胞株を選別して、それが分泌するモノクローナル抗体は、1 8 A 1 0と名付ける。

【0053】

4. サブクロニングにより安定な細胞株を取得する

選別された細胞株1 8 A 1 0をサブクロニングすることにより、P D - L 1と競合し

50

てPD-1と特異的に結合する抗体を分泌するモノクローナル安定細胞株を選別する。

【0054】

具体的に、サブクローニング対象の細胞をカウントして、生存細胞数に基づいて、15%ウシ胎児血清を含むIMDM培地により希釈され、96ウェルプレートに接種して培養する。理論上の細胞密度は、1細胞/ウェルである。細胞がモノクローナル細胞集塊に成長した後、ELISA法で選別を行い、サブクローニング・選別することを何回繰り返して、安定的なモノクローナル細胞株18A10を得た。

【0055】

5. 18A10抗体の製造

安定的な細胞株18A10を得た後、10%IgGを含むウシ胎児血清で安定的な細胞株18A10を培養する。7~10日培養した後、細胞培養上清を収集・精製して、18A10抗体を得た。

10

【0056】

実施例2 KF007ハイブリドーマ細胞株cDNA配列の取得

1. 細胞/細菌トータルRNA抽出キットの取扱書(Tiagen、製番DP430)に従って、18A10ハイブリドーマ細胞株からmRNAを抽出する。

2. Invitrogen SuperScript(商標)III First-Strand Synthesis system for RT-PCRキットの取扱書に従って、一本鎖を合成して、PCR増幅を行う。

3. pEASY-T1 クローニングキット(Tiagen、製番CT101)の取扱書に従って、TAクローニングを行う。

20

4. M13ユニバーサルプライマーを利用してPCR法によって検出して、陽性クローンを選んでシーケンシングする。

5. シーケンシング結果をアライメントして、正確なcDNA配列を取得する。

【0057】

実施例3 抗体18A10ヒト化

ヒト化抗体を構成するため、マウス18A10抗体の可変領域アミノ酸配列と、ヒトの可変領域基因配列とアライメントして、マウスアミノ酸配列の一部を選択的に変異させ、ヒト化アミノ酸配列を得ることにより、3つのヒト化抗体を取得する。ヒト化の程度に基づいて、それぞれH1L1、H2L2及びH3L3と名付ける。

30

【0058】

ヒト化抗体H1L1の重鎖可変領域配列は、

EVQLVQSGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTTFSSYGMSWVRQTPEKGLDWVATISGGGRDTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCARQKGEAWFA YWGQGT LVT VSS (配列番号: 1) である。

ヒト化抗体H1L1の軽鎖可変領域アミノ酸配列は、

DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVDNYGISFMNWFQQKPGQPPKLLIYAASNKGTGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPMEENDTAMYFCQQSKEVPWTFGGG TKLEIK (配列番号: 2) である。

40

ヒト化抗体H2L2の重鎖可変領域配列は、

EVQLVQSGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTTFSSYGMSWVRQAPGKGLDWVATISGGGRDTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCARQKGEAWFA YWGQGT LVT VSS (配列番号: 3) である。

ヒト化抗体H2L2の軽鎖可変領域アミノ酸配列は、

DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVDNYGISFMNWFQQKPGQPPKLLIYAASNKGTGVPARFSGSGSGTDFTLNINPMEENDTAMYFCQQSKEVPWTFGGG TKLEIK (配列番号: 4)

50

である。

ヒト化抗体 H 3 L 3 の重鎖可変領域配列は、

E V Q L V Q S G G G L V Q P G G S L K L S C A A S G F T F S S Y G M S W V R Q
A P G K G L D W V A T I S G G G R D T Y Y P D S V K G R F T I S R D N S K N T L
Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R Q K G E A W F A Y W G Q G T L V T V S S (配列番号 : 5) である。

ヒト化抗体 H 3 L 3 の軽鎖可変領域アミノ酸配列は、

D I V L T Q S P A S L A V S P G Q R A T I T C R A S E S V D N Y G I S F M N W
Y Q Q K P G Q P P K L L I Y A A S N K A T G V P A R F S G S G S G T D F T L N I
N P M E A N D T A V Y F C Q Q S K E V P W T F G G G T K L E I K (配列番号 : 6) である。

10

【 0 0 5 9 】

実施例 4 ヒト化抗体 H 1 L 1、H 2 L 2 及び H 3 L 3 のタンパク発現

遺伝子合成手段でヒト化抗体 H 1 L 1、H 2 L 2、H 3 L 3 をコードするヌクレオチド配列を合成して、発現ベクターに取り込む。発現ベクターの DNA を抽出し、哺乳動物細胞である 2 9 3 細胞にトランスフェクトする。トランスフェクション後、抗体が哺乳動物細胞内に発現され、細胞外に分泌された。プロテイン A アフィニティークロマトグラフィーカラムで、発現された抗体を精製して、ヒト化抗体 H 1 L 2、H 2 L 2、H 3 L 3 タンパクを得た。

20

【 0 0 6 0 】

実施例 5 1 8 A 1 0 組み換えヒト化抗体の E L I S A 実験

1 8 A 1 0 DNA 配列を取得した後、組み換え手段によりヒト化させ、ヒト化抗体を製造して、対比実験を行う。前記実験について、E L I S A 結合実験と競合 E L I S A 実験を含むが、これらに限定されるものではない。

【 0 0 6 1 】

1 . 1 8 A 1 0 H 1 L 1、1 8 A 1 0 H 2 L 2、1 8 A 1 0 H 3 L 3 E L I S A 結合実験

具体的なステップは、以下のようである。

1) 抗原のコーティング

4 で 0 . 5 μ g / m l である P D - 1 - m F c 抗原 (5 0 μ l / ウェル) を一晚コーティングするステップ。

30

2) ブロッキング

3 7 、 1 % B S A (P B S で希釈する) で 2 時間ブロックして、 1 % T w e e n - 2 0 を含む 1 \times P B S T で 3 回洗浄して、乾燥するように軽く叩くステップ。

3) 一次抗体

1 μ g / m l から 1 : 3 で希釈して、 7 つの濃度勾配の抗体溶液を得て、対照組は、P B S であり、それぞれ 3 7 で 1 時間インキュベートするステップ。

4) 二次抗体

P B S T で 3 回洗浄して、乾燥するように軽く叩き、 1 : 5 0 0 0 で希釈した二次抗体である H R P 標識ヤギ抗マウス I g G - (H + L) を各ウェルに 5 0 μ l ずつ入れ、 3 7 で 1 時間インキュベートするステップ。

40

5) 顕色

P B S T で 3 回洗浄して、乾燥するように軽く叩き、 T M B 顕色剤を各ウェルに 5 0 μ l ずつ入れ、室温で 5 ~ 1 0 分反応するステップ。

6) 顕色完了

5 0 μ l / ウェルで 2 M H ₂ S O ₄ 溶液を入れ、顕色反応を完了するステップ。

7) 読取り

マイクロプレートリーダーにより、吸光度 4 5 0 n m で各ウェルの吸光値を検出するステップ。

結果を図 1 に示すように、H 1 L 1、H 2 L 2 及び H 3 L 3 の P D - 1 に対する E C ₅

50

。値は、それぞれ 0.156 nM、0.111 nM 及び 0.144 nM である。

図 1 に示すように、前記 3 つの抗体 H1L1、H2L2 及び H3L3 が、PD-1 に対して強い親和性を有する。

【0062】

【表 1】

表 1

抗体の希釈	18A10 H1L1		18A10 H2L2		18A10 H3L3	
1 µg/ml	2.468	2.323	2.359	2.434	2.139	2.435
1:3	2.347	2.342	2.132	2.358	2.286	2.091
1:9	1.960	1.978	2.180	1.978	1.954	2.056
1:27	1.620	1.650	1.778	1.631	1.584	1.503
1:81	0.883	0.834	1.036	1.139	0.928	0.809
1:243	0.450	0.431	0.545	0.475	0.432	0.377
1:729	0.186	0.163	0.226	0.224	0.200	0.185
0	0.074	0.078	0.064	0.070	0.067	0.039

10

20

【0063】

2. 18A10 H1L1、18A10 H2L2、及び 18A10 H3L3 と PD-L1 競合 ELISA 実験

具体的なステップは、以下のようである。

1) 抗原のコーティング

96 ウェル ELISA プレートに、4 で 0.5 µg/ml である PD-1-mIgG Fc 抗原 (50 µl / ウェル) を一晩コーティングするステップ。

2) ブロッキング

PBST でプレートを 3 回洗浄して、乾燥するように軽く叩き、37、1% BSA (PBS で希釈する) で 2 時間ブロックして、1% Tween-20 を含む 1 x PBST で 3 回洗浄するステップ。

30

3) 一次抗体

3 µg/ml から 1:3 で希釈して、7 つの濃度勾配の抗体溶液を得て、対照組は、PBS であり、それぞれ室温で 10 分インキュベートするステップ。

4) リガンド

2 µg/ml の PD-L1-mIgG2aFc 溶液を各ウェルに 50 µl ずつを入れ、37 で 1 時間インキュベートするステップ。

5) 二次抗体

PBST で 3 回洗浄して、乾燥するように軽く叩き、1:5000 で希釈した二次抗体である HRP 標識ヤギ抗マウス IgG-(H+L) を各ウェルに 50 µl ずつ入れ、37 で 1 時間インキュベートするステップ。

40

6) 顕色

PBST で 3 回洗浄して、乾燥するように軽く叩き、TMB 顕色剤を各ウェルに 50 µl ずつ入れ、室温で 5 ~ 10 分反応するステップ。

7) 顕色完了

50 µl / ウェルで 2M H₂SO₄ 溶液を入れ、顕色反応を完了するステップ。

8) 読取り

マイクロプレートリーダーにより、吸光度 450 nm で各ウェルの吸光値を検出するステップ。

結果を図 2 に示すように、H1L1、H2L2 及び H3L3 が、PdL1 と競合して P

50

D - 1 と結合する EC_{50} 値は、それぞれ 0.992 nM、0.838 nM 及び 1.194 nM である。

図 2 に示すように、前記 3 つの抗体 H1L1、H2L2 及び H3L3 が、PDL1 と PD-1 との結合を有効に阻害できる。

【0064】

【表 2】

表 2

抗体の希釈	18A10 H1L1		18A10 H2L2		18A10 H3L3	
1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.110	0.107	0.110	0.102	0.101	0.102
1:3	0.123	0.109	0.097	0.097	0.103	0.108
1:9	0.625	0.586	0.474	0.506	0.700	0.678
1:27	1.062	1.039	0.951	0.903	1.002	0.986
1:81	1.293	1.136	1.095	1.100	1.093	1.194
1:243	1.258	1.210	1.158	1.208	1.197	1.207
1:729	1.347	1.296	1.199	1.191	1.283	1.243
0	1.378	1.312	1.263	1.291	1.255	1.369
リガンド	PDL1-mIgG2aFc 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$					

10

20

【0065】

3. 18A10 H2L2 及び PDL2 の競合 ELISA 実験

具体的なステップは、以下のものである。

1) 抗原のコーティング

96 ウェルプレートに、4 で 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である PD-1-hIgGFc 抗原 (50 μl / ウェル) を一晩コーティングするステップ。

30

2) ブロッキング

PBST で 3 回洗浄して、乾燥するように軽く叩き、37、1% BSA (PBST で希釈する) で 2 時間ブロックして、1% Tween-20 を含む 1 x PBST で 4 回洗浄するステップ。

3) 一次抗体

20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から 1:3 で希釈して、7 つの濃度勾配の抗体溶液を得て、対照組は、PBST であり、それぞれ室温で 10 分インキュベートするステップ。

4) リガンド

1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の PDL2-histag 溶液を各ウェルに 50 μl ずつを入れ、37 で 1 時間インキュベートするステップ。

40

5) 二次抗体

PBST で 5 回洗浄して、乾燥するように軽く叩き、1:750 で希釈した二次抗体である HRP 標識抗 histag マウスモノクローナル抗体を各ウェルに 50 μl ずつ入れ、37 で 1 時間インキュベートするステップ。

6) 顕色

PBST で 6 回洗浄して、乾燥するように軽く叩き、TMB 顕色剤を各ウェルに 50 μl ずつ入れ、室温で 30 分反応するステップ。

7) 顕色完了

50 μl / ウェルで 2M H_2SO_4 溶液を入れ、顕色反応を完了するステップ。

50

8) 読取り

マイクロプレートリーダーにより、吸光度 450nm で各ウェルの吸光値を検出するステップ。

図3に示すように、前記3つの抗体 H2L2 が、PDL1 と PD-1 との結合を有効に阻害できることが分かる。

【0066】

【表3】

表3

抗体の希釈	18A10 H2L2	
10 μ g/ml	0.876	0.792
1:3	0.821	0.803
1:9	0.865	0.793
1:27	1.431	1.385
1:81	2.654	2.251
1:243	2.624	2.904
1:729	3.24	3.185
ブランク	0.401	0.28
リガンド	PDL2-his tag 0.5 μ g/ml	

10

20

【0067】

実施例6

Fortebio分子間相互作用解析装置によりKF007H1L1、H2L2、H3L3の運動特性パラメータを検出する。

30

ビオチン標識の抗原PD-1をSAセンサーの表面に固定され、PBSTと平衡した後、抗体H1L1と結合して、H1L1:PBST=1:3で希釈し(濃度は、200、66.67、22.22、7.41、2.47、0.82、0.27、0nM)、PBSTで解離させる。H2L2とH3L3の検出方法は、H1L1と同一である。それぞれH1L1、H2L2、H3L3の運動特性パラメータを表4に示し、検出結果を図4~6に示す。

【0068】

【表4】

表4

抗体名称	KD(M)	kon (1/MS)	kon Error	Kdis (1/s)	kdis Error	Rmax Range
H1L1	3.60E-11	3.67E+05	7.28E+03	1.32E-05	8.12E-06	0.6192-0.9442
H2L2	4.28E-11	2.31E+05	6.11E+03	9.86E-06	1.12E-05	0.5382-1.3794
H3L3	1.14E-10	1.37E+05	2.41E+03	1.56E-05	7.97E-06	0.4226-0.9384

40

【0069】

実施例7 抗体H1L1、H2L2及びH3L3がT細胞を刺激してIL-2とIFN

50

g a m m aを分泌することに対する分析

混合リンパ球反応（MLR）実験で、抗体H1L1、H2L2とH3L3がTリンパ球を刺激してIL-2とIFN gammaの分泌能力を検出する。MLR実験は、異なるヒトT細胞（TC）とヒト樹状細胞（DC）とを混合して、DC細胞の抗原提供能力によりT細胞を刺激してIL-2とIFN gammaを分泌する。まず、サイトカインGM-CSFとIL-4で血液における単球を樹状細胞に分化させ、TNF alphaで未熟なDC細胞を成熟させる。その後、成熟DC細胞と同種異系のTC細胞と混合して5日培養した後、細胞上清におけるIL-2とIFN gammaの分泌レベルを検出する。

【0070】

96ウェルプレートに、TCとDCを混合して、ウェルごとに 1×10^5 TC細胞と 1×10^4 DC細胞を入れ、3つの抗体の濃度（1 nM、10 nMと100 nM）で、5日培養した後、IL-2アッセイキットで上清におけるIL-2の含量を検出し、IFN gammaアッセイキットでIFN gammaの含量を検出する。

10

【0071】

図7に、抗体H1L1、H2L2及びH3L3がT細胞を刺激してIL-2とIFN gammaを分泌するレベルを示す。図7に示すように、抗体H1L1、H2L2及びH3L3がT細胞を刺激してIL-2とIFN gammaを有効に分泌し、かつ用量依存的な関係を呈する。

【0072】

実施例8 抗体H1L1、H2L2及びH3L3とPD-1との結合のEC50に対する分析

20

フローサイトメトリーにより抗体H1L1、H2L2及びH3L3が、PD-1を安定的に発現する細胞（BB007細胞と名付ける）の表面抗原の結合活性を検出する。通常なトリプシン消化法によりBB007細胞を取得して、PBSで1回洗浄して、複数なチューブに分けられ、チューブごとに 2×10^5 個細胞を有する。PBS（1%BSA）でそれぞれ濃度20 nM、10 nM、5 nM、1 nM、0.1 nM、0 nMのH1L1、H2L2及びH3L3の抗体希釈液を調製して、各濃度の総体積は、 $100 \mu\text{l}$ であり、氷上で細胞を1時間インキュベートする、PBSで1回洗浄して、各チューブに $100 \mu\text{l}$ FITC-Goat-Anti-Human IgG（1:500）を入れ、氷上で1時間インキュベートして、その後、各チューブに $300 \mu\text{l}$ PBSを入れ、フローサイトメーターでFITCチャンネルを利用して蛍光シグナルを検出する。

30

【0073】

それぞれH1L1、H2L2、H3L3抗体とBB007細胞との結合を図7に示す。図8に示すように、H1L1、H2L2及びH3L3抗体が、BB007細胞表面のターゲットタンパク質であるPD-1と有効に結合でき、かつその結合効率が、用量依存的な関係を呈することが分かる。

【0074】

【表5】

表5 H1L1、H2L2、H3L3とBB007細胞と結合後の蛍光強度

		蛍光強度					EC50
(nM)	0	0.1	1	5	10	20	
hIgG	7.4						
H1L1		18.96	64.4	252.42	316.13	358.13	2.82
H2L2		19.09	92.55	320.89	349.07	329.08	1.14
H3L3		21.18	110.34	342.71	386.38	366.73	1.56

40

【0075】

50

結合後の H 1 L 1、H 2 L 2、H 3 L 3 抗体に対して蛍光定量分析を行い、曲線模擬により H 1 L 1、H 2 L 2、H 3 L 3 の E C 5 0 (結合効率を示す) は、それぞれ 3 . 3 8 n M、1 . 5 9 n M、1 . 6 8 n M (図 9) である。

【 0 0 7 6 】

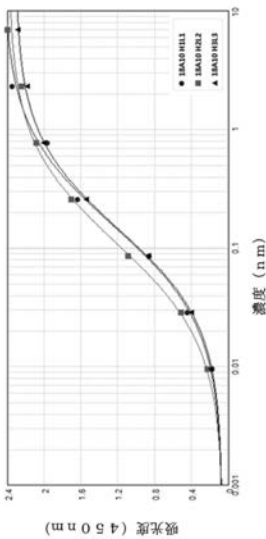
本願の明細書の説明において、「 1 つの実施例」、「いくつかの実施例」、「例示」、「具体的な例示」または「いくつかの例示」などの用語は、該当実施例または例示を結合しながら説明した具体的な特徴、構成、材料または特性が本願の少なくとも 1 つの実施例または例示に含まれることを意味する。本明細書において、前記用語の概要な表現は、同一の実施例または例示を対象とする必要がない。かつ、説明した具体的な特徴、構成、材料または特性が任意の 1 つまたは複数の実施例または例示に適当な手段で結合されることができ

10

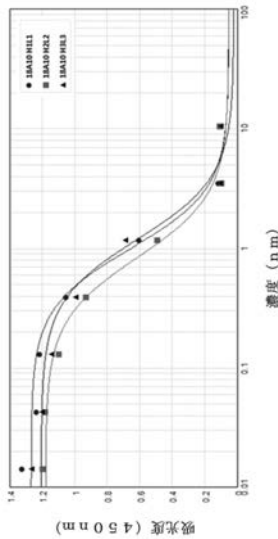
【 0 0 7 7 】

本発明の実施例は、上記内容に開示・説明されているが、上記実施例は、例示として挙げられ、それに限定されるものではない、当業者が本発明の範囲で、様々な変化、修正、取り替え及び変形を行うことができる。

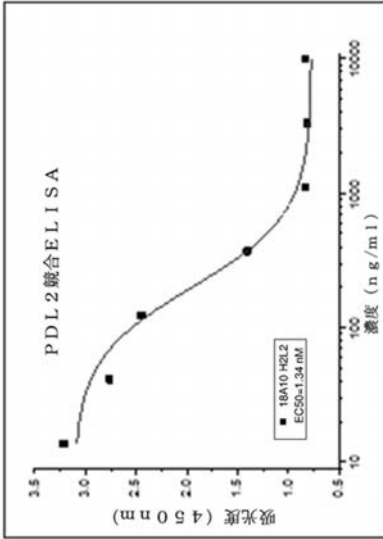
【 図 1 】



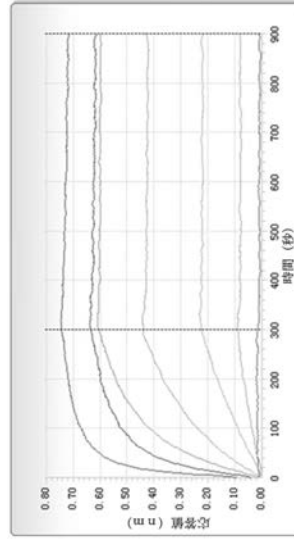
【 図 2 】



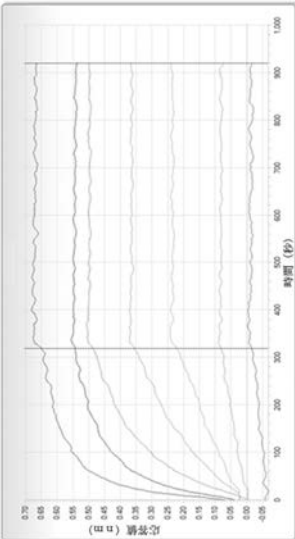
【 図 3 】



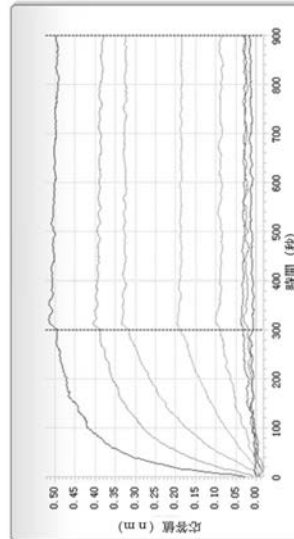
【 図 4 】



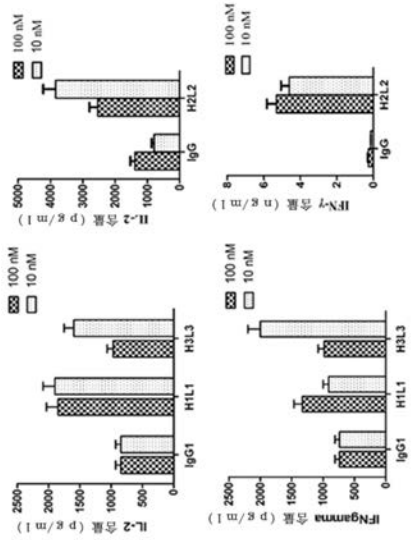
【 図 5 】



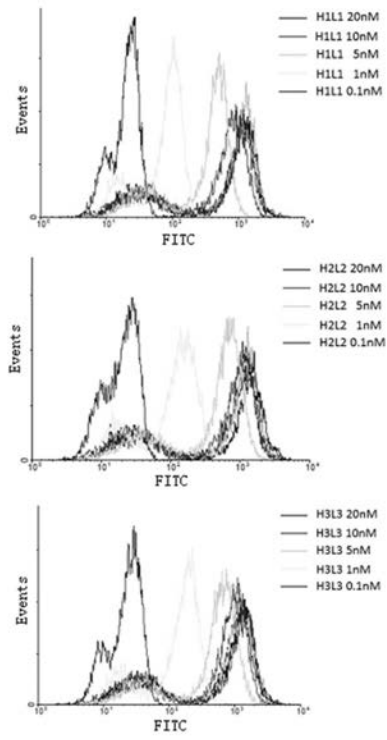
【 図 6 】



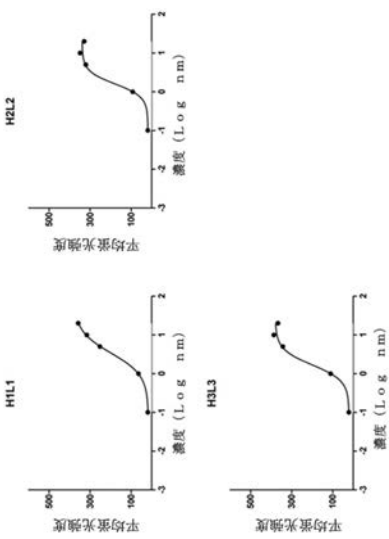
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



【配列表】

2019519247000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成30年11月29日(2018.11.29)

【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】

抗PD-1のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、
配列番号：14に示す重鎖CDR1配列、配列番号：15に示す重鎖CDR2配列、配
列番号：16に示す重鎖CDR3配列、及び
配列番号：17に示す軽鎖CDR1配列、配列番号：18に示す軽鎖CDR2配列、配
列番号：19に示す軽鎖CDR3配列、を含む、
ことを特徴とするモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項2】

抗PD-1のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、
(1)配列番号：1に示すアミノ酸配列、
(2)配列番号：3に示すアミノ酸配列、
(3)配列番号：5に示すアミノ酸配列、及び
(4)(1)～(3)と比べて、少なくとも1つの保守的アミノ酸突然変異を有するア
ミノ酸配列から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、及び
任意的に、
(5)配列番号：2に示すアミノ酸配列、
(6)配列番号：4に示すアミノ酸配列、
(7)配列番号：6に示すアミノ酸配列、及び
(8)(5)～(7)と比べて、少なくとも1つの保守的アミノ酸突然変異を有するア
ミノ酸配列から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、
を含む、
ことを特徴とする請求項1に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項3】

前記抗PD-1のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、
配列番号：1に示すアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と配列番号：2に示すアミノ酸
配列を有する軽鎖可変領域、
配列番号：3に示すアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と配列番号：4に示すアミノ酸
配列を有する軽鎖可変領域、及び
配列番号：5に示すアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と配列番号：6に示すアミノ酸
配列を有する軽鎖可変領域から選択される少なくとも1つを含む、
ことを特徴とする請求項1または2に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項4】

前記抗PD-1のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片が、
PD-1と特異的、効率的に結合でき、かつT細胞の活性化と増殖を促進し、サイトカ
インの発現と分泌を調節し、または抗腫瘍細胞を刺激してより強い免疫応答を生成するこ
とに用いられる、
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抗原結合断片。

【請求項5】

単離ポリヌクレオチドであって、
請求項1～4のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片をコードする、

ことを特徴とする単離ポリヌクレオチド。

【請求項 6】

配列番号：7 に示すヌクレオチド配列が、配列番号：1 に示すアミノ酸配列を含む重鎖可変領域をコードし、配列番号：10 に示すヌクレオチド配列が、配列番号：2 に示すアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域をコードし、

配列番号：8 に示すヌクレオチド配列が、配列番号：3 に示すアミノ酸配列を含む重鎖可変領域をコードし、配列番号：11 に示すヌクレオチド配列が、配列番号：4 に示すアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域をコードし、または

配列番号：9 に示すヌクレオチド配列が、配列番号：5 に示すアミノ酸配列を含む重鎖可変領域をコードし、配列番号：12 に示すヌクレオチド配列が、配列番号：6 に示すアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域をコードする、

ことを特徴とする請求項 5 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 7】

発現ベクターであって、

請求項 5 または 6 に記載のポリヌクレオチド、

任意的に、宿主細胞における前記ポリヌクレオチドの発現を制御するように、前記ポリヌクレオチドと操作可能に連結する制御要素を含む、

ことを特徴とする発現ベクター。

【請求項 8】

前記宿主細胞は、哺乳動物細胞であり、

好ましくは、前記哺乳動物細胞は、ヒト腎上皮細胞系細胞であり、

好ましくは、前記ヒト腎上皮細胞系細胞は、293T 細胞である、

ことを特徴とする請求項 7 に記載の発現ベクター。

【請求項 9】

前記制御要素は、

プロモーター、エンハンサー、及びターミネーターから選択される少なくとも 1 つを含み、

任意的に、前記プロモーターは、CMV プロモーターであり、前記エンハンサーは、初期 CMV エンハンサーであり、前記ターミネーターは、SV40 polyA ターミネーターである、

ことを特徴とする請求項 7 または 8 に記載の発現ベクター。

【請求項 10】

組み換え細胞であって、

請求項 7 ~ 9 のいずれかに記載の発現ベクターを含む、

ことを特徴とする組み換え細胞。

【請求項 11】

ハイブリドーマであって、

中国典型培養物保蔵センター (CCTCC) に寄託され、寄託番号は、C201667 であり、寄託日付は、2016 年 4 月 1 日である、

ことを特徴とするハイブリドーマ。

【請求項 12】

T 細胞の活性化と増殖を促進し、サイトカインの発現と分泌を調節し、または抗腫瘍細胞を刺激してより強い免疫応答を生成することに用いられる請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片、請求項 5 または 6 に記載のポリヌクレオチド、請求項 7 ~ 9 のいずれかに記載の発現ベクター、請求項 10 に記載の組み換え細胞または請求項 11 に記載のハイブリドーマ。

【請求項 13】

医薬組成物であって、

(1) 請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片、請求項 5 または 6 に記載のポリヌクレオチド、請求項 7 ~ 9 のいずれかに記載の発現ベクター、請求項 1

0に記載の組み換え細胞、または請求項11に記載のハイブリドーマを含む、
ことを特徴とする医薬組成物。

【請求項14】

前記医薬組成物は、免疫強化剤を更に含み、
(1)と異なる前記免疫強化剤は、
好ましくは、抗CTLA-4抗体、抗CD40抗体、ブデソニド及びサリチル酸塩からなる群から選択される少なくとも1つを含み、
好ましくは、前記サリチル酸塩は、スルファサラジン、オルサラジン、バルサラジド及びメサラジンから選択される少なくとも1つを含む、
ことを特徴とする請求項13に記載の医薬組成物。

【請求項15】

PD-1と結合できる医薬の検出方法であって、
前記方法は、
検出対象である医薬が存在する場合、請求項1～4のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片と抗原を接触させ、かつ前記抗体またはその抗原結合断片と前記抗原との第1の結合量を決定して、前記抗原は、PD-1またはその断片であるステップ、及び
検出対象である医薬が存在しない場合、請求項1～4のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合断片と抗原を接触させ、かつ前記抗体またはその抗原結合断片と前記抗原との第2の結合量を決定して、前記抗原は、PD-1またはその断片であるステップを含み、
ただし、前記第2の結合量が前記第1の結合量より多いことは、前記検出対象である医薬がPD-1と結合できる合図である、
ことを特徴とする検出方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0015

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0015】

本発明の具体的な実施例によれば、前記ポリヌクレオチドが、配列番号：1に示すアミノ酸配列（即ち、H1L1の重鎖可変領域のアミノ酸配列）をコードする配列番号：7に示すヌクレオチド配列またはその相補配列を有する。

G A A G T G C A G C T G G T G C A G A G C G G A G G G G G A C T G G T G C A G
C C C G G C G G G T C T C T G A A G C T G A G T T G C G C C G C T T C A G G A T
T C A C T T T T A G C T C C T A C G G C A T G T C C T G G G T G C G A C A G A C
C C C C G A G A A A G G G C T G G A C T G G G T C G C T A C C A T C T C T G G A
G G C G G G A G A G A C A C A T A C T A T C C T G A T A G T G T C A A G G G C C
G G T T C A C A A T T A G C A G A G A C A A C T C C A A A A C A A T C T G T A
T C T G C A G A T G A A T A G C C T G A G G G C A G A A G A T A C C G C C C T G
T A C T A T T G T G C C C G C C A G A A A G G A G A G G C T T G G T T T G C A T
A C T G G G G A C A G G G G A C A C T G G T C A C C G T C A G C A G C（配列番号：7）。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0016

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0016】

本発明の具体的な実施例によれば、前記ポリヌクレオチドが配列番号：3に示すアミノ

酸配列（即ち、H 2 L 2 の重鎖可変領域のアミノ酸配列）をコードする配列番号：8に示すヌクレオチド配列またはその相補配列を有する。

G A G G T G C A G C T G G T G C A G T C T G G C G G C G G A C T G G T G C A G
C C C G G C G G G T C A C T G A A G C T G A G C T G C G C C G C T T C C G G C T
T C A C C T T T A G C T C C T A C G G A A T G T C C T G G G T G C G A C A G G C
A C C C G G G A A G G G G C T G G A C T G G G T C G C T A C T A T C T C A G G A
G G C G G G A G A G A C A C C T A C T A T C C T G A T A G C G T C A A G G G C C
G G T T C A C A A T T A G C C G G G A C A A C A G C A A G A A C A A T C T G T A
C C T G C A G A T G A A C A G C C T G A G G G C T G A G G A T A C T G C A C T G
T A C T A T T G T G C C C G C C A G A A G 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 C C A G G G A A C C C T G G T G A C A G T C T C T A G T（配列番号
：8）。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0017

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0017】

本発明の具体的な実施例によれば、前記ポリヌクレオチドが配列番号：5に示すアミノ酸配列（即ち、H 3 L 3 の重鎖可変領域のアミノ酸配列）をコードする配列番号：9に示すヌクレオチド配列またはその相補配列を有する。

G A G G T G C A G C T G G T G C A G A G T G G A G G C G G G C T G G T G C A G
C C C G G C G G G T C A C T G A A G C T G A G C T G C G C C G C T T C C G G C T
T C A C C T T T A G C T C C T A C G G A A T G T C C T G G G T G C G A C A G G C
A C C C G G G A A G G G G C T G G A C T G G G T C G C T A C T A T C T C A G G A
G G C G G G A G A G A C A C C T A C T A T C C T G A T A G C G T G A A G G G C C
G G T T C A C A A T T A G C C G G G A C A A C A G C A A G A A C A C T C T G T A
C C T G C A G A T G A A C T C T C T G A G G G C T G A G G A T A C A G C A G T C
T A C T A T T G T G C C C G C C A G A A G 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 C C A G G G A A C C C T G G T G A C A G T C T C T A G T（配列番号
：9）。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0018

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0018】

本発明の具体的な実施例によれば、前記ポリヌクレオチドが配列番号：2に示すアミノ酸配列（即ち、H 1 L 1 の軽鎖可変領域のアミノ酸配列）をコードする配列番号：10に示すヌクレオチド配列またはその相補配列を有する。

G A T A T T G T G C T G A C T C A G A G C C C T G C T T C C C T G G C C G T G
T C T C C A G G A C A G C G A G C T A C C A T C A C A T G C A G A G C A T C T G
A G A G T G T G G A C A A C T A C G G A A T T A G T T T C A T G A A T T G G T T
T C A G C A G A A G C C C G G C C A G C C C C C T A A A C T G C T G A T C T A T
G C C G C T A G C A A C A A G G G C A C C G G G G T G C C T G C T C G A T T C T
C A G G A A G C G G C T C C G G G A C A G A C T T T A C T C T G A A C A T T C A
C C C A A T G G A G G A A A A T G A T A C A G C A A T G T A C T T C T G C C A G
C A G A G C A A G G A G G T G C C C T G G A C C T T T G G C G G G G G A A C A A

A G C T G G A A A T C A A A (配列番号：10)。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0019

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0019】

本発明の具体的な実施例によれば、前記ポリヌクレオチドが配列番号：4に示すアミノ酸配列（即ち、H2L2の軽鎖可変領域のアミノ酸配列）をコードする配列番号：11に示すヌクレオチド配列またはその相補配列を有する。

G A T A T T G T G C T G A C T C A G A G C C C T G C T T C C C T G G C C G T G
T C T C C A G G A C A G C G A G C T A C C A T C A C A T G C A G A G C A T C T G
A G A G T G T G G A C A A C T A C G G A A T T A G T T T C A T G A A T T G G T T
T C A G C A G A A G C C C G G C C A G C C C C T A A A C T G C T G A T C T A T
G C C G C T A G C A A C A A G G G C A C C G G G T G C C T G C T C G A T T C T
C A G G A A G C G G C T C C G G G A C A G A C T T T A C T C T G A A C A T T A A
C C C A A T G G A G G A A A A T G A T A C A G C A A T G T A C T T C T G C C A G
C A G A G C A A G G A G G T G C C C T G G A C C T T T G G C G G G G G A A C A A
A G C T G G A A A T C A A A (配列番号：11)。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0020

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0020】

本発明の具体的な実施例によれば、前記ポリヌクレオチドが配列番号：6に示すアミノ酸配列（即ち、H3L3の軽鎖可変領域のアミノ酸配列）をコードする配列番号：12に示すヌクレオチド配列またはその相補配列を有する。

G A C A T C G T C C T G A C T C A G A G C C C T G C T T C C C T G G C C G T G
A G C C C A G G C C A G C G A G C A A C C A T C A C A T G C A G A G C C T C A G
A G A G C G T G G A C A A C T A C G G C A T T A G C T T C A T G A A T T G G T A
T C A G C A G A A G C C C G G G C A G C C T C C C A A G C T G C T G A T C T A C
G C C G C T T C C A A C A A G G C C A C T G G G T G C C T G C T C G A T T C T
C C G G C T C T G G G A G T G G A A C A G A C T T T A C T C T G A A C A T T A A
T C C A A T G G A A G C T A A T G A T A C A G C A G T G T A T T T C T G C C A G
C A G A G C A A G G A G G T C C C A T G G A C C T T C G G C G G C G G C A C C A
A G C T G G A G A T C A A G (配列番号：12)。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0050

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0050】

具体的なステップは、以下のようである。

1) 抗原のコーティング

4 で、E L I S Aプレートに1 μg / mlであるPD - 1 - h F c 抗原 (50 μl / ウェル) を一晩コーティングするステップ。

2) ブロッキング

37、1% BSA (PBSで希釈する)で2時間ブロックして、1% Tween-20を含む1x PBSTで3回洗浄して、乾燥するように軽く叩くステップ。

3) 一次抗体のインキュベート

1 µg/ml から1:3で希釈して、7つの濃度勾配の抗体溶液を得て、対照組は、PBSであり、それぞれ37で1時間インキュベートするステップ。

4) 二次抗体のインキュベート

PBSTで3回洗浄して、乾燥するように軽く叩き、1:5000で希釈したHRP標識ヤギ抗マウスIgG (H+L)を各ウェルに50 µlずつ入れ、37で1時間インキュベートするステップ。

5) 顕色

PBSTで3回洗浄して、乾燥するように軽く叩き、TMB 顕色剤を各ウェルに50 µlずつ入れ、室温で5~10分反応するステップ。

6) 顕色完了

50 µl / ウェルで2M H₂SO₄ 溶液を入れ、顕色反応を完了するステップ。

7) 読取り

マイクロプレートリーダーにより、吸光度450nmで各ウェルの吸光値を検出するステップ。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0052

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0052】

具体的なステップは、以下のようである。

1) 抗原のコーティング

96ウェルELISAプレートに、4で0.5 µg/mlであるPD-1-mIgG Fc抗原(50 µl / ウェル)を一晩コーティングするステップ。

2) ブロッキング

PBSTでプレートを3回洗浄して、乾燥するように軽く叩き、37、1% BSA (PBSで希釈する)で2時間ブロックして、1% Tween-20を含む1x PBSTで3回洗浄するステップ。

3) 一次抗体のインキュベート

3 µg/ml から1:3で希釈して、7つの濃度勾配の抗体溶液を得て、対照組は、PBSであり、それぞれ室温で10分インキュベートするステップ。

4) リガンド

2 µg/mlのPDL1-hIgG1Fc溶液を各ウェルに50 µlずつを入れ、37で1時間インキュベートするステップ。

5) 二次抗体のインキュベート

PBSTで3回洗浄して、乾燥するように軽く叩き、1:5000で希釈した二次抗体であるHRP標識ヤギ抗マウスIgG-(H+L)を各ウェルに50 µlずつ入れ、37で1時間インキュベートするステップ。

6) 顕色

PBSTで3回洗浄して、乾燥するように軽く叩き、TMB 顕色剤を各ウェルに50 µlずつ入れ、室温で5~10分反応するステップ。

7) 顕色完了

50 µl / ウェルで2M H₂SO₄ 溶液を入れ、顕色反応を完了するステップ。

8) 読取り

マイクロプレートリーダーにより、吸光度450nmで各ウェルの吸光値を検出するス

テップ。

検出結果に基づいて、PD-1 18A10ハイブリドーマ細胞株を選別して、それが分泌するモノクローナル抗体は、18A10と名付ける。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0056

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0056】

実施例2 ハイブリドーマ細胞株cDNA配列の取得

1. 細胞/細菌トータルRNA抽出キットの取扱書(Tiagen、製番DP430)に従って、18A10ハイブリドーマ細胞株からmRNAを抽出する。

2. Invitrogen SuperScript(商標)III First-Strand Synthesis system for RT-PCRキットの取扱書に従って、一本鎖を合成して、PCR増幅を行う。

3. pEASY-T1 クローニングキット(Tiagen、製番CT101)の取扱書に従って、TAクローニングを行う。

4. M13ユニバーサルプライマーを利用してPCR法によって検出して、陽性クローンを選んでシーケンシングする。

5. シーケンシング結果をアライメントして、正確なcDNA配列を取得する。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0061

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0061】

1. 18A10 H1L1、18A10 H2L2、18A10 H3L3 ELISA結合実験

具体的なステップは、以下のようである。

1) 抗原のコーティング

4で0.5µg/mlであるPD-1-mFc抗原(50µl/ウェル)を一晩コーティングするステップ。

2) ブロッキング

37、1% BSA(PBSで希釈する)で2時間ブロックして、1% Tween-20を含む1×PBSTで3回洗浄して、乾燥するように軽く叩くステップ。

3) 一次抗体のインキュベート

1µg/mlから1:3で希釈して、7つの濃度勾配の抗体溶液を得て、対照組は、PBSであり、それぞれ37で1時間インキュベートするステップ。

4) 二次抗体のインキュベート

PBSTで3回洗浄して、乾燥するように軽く叩き、1:5000で希釈した二次抗体であるHRP標識ヤギ抗マウスIgG-(H+L)を各ウェルに50µlずつ入れ、37で1時間インキュベートするステップ。

5) 顕色

PBSTで3回洗浄して、乾燥するように軽く叩き、TMB顕色剤を各ウェルに50µlずつ入れ、室温で5~10分反応するステップ。

6) 顕色完了

50µl/ウェルで2M H₂SO₄溶液を入れ、顕色反応を完了するステップ。

7) 読取り

マイクロプレートリーダーにより、吸光度 450 nm で各ウェルの吸光値を検出するステップ。

結果を図 1 に示すように、H 1 L 1、H 2 L 2 及び H 3 L 3 の P D - 1 に対する EC_{50} 値は、それぞれ 0.156 nM、0.111 nM 及び 0.144 nM である。

図 1 に示すように、前記 3 つの抗体 H 1 L 1、H 2 L 2 及び H 3 L 3 が、P D - 1 に対して強い親和性を有する。

【手続補正 1 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0063

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0063】

2. 18A10 H 1 L 1、18A10 H 2 L 2、及び 18A10 H 3 L 3 と P D L 1 競合 E L I S A 実験

具体的なステップは、以下のようである。

1) 抗原のコーティング

96 ウェル E L I S A プレートに、4 で 0.5 μ g/ml である P D - 1 - m I g G F c 抗原 (50 μ l / ウェル) を一晩コーティングするステップ。

2) ブロッキング

P B S T でプレートを 3 回洗浄して、乾燥するように軽く叩き、37、1% B S A (P B S で希釈する) で 2 時間ブロックして、1% T w e e n - 2 0 を含む 1 x P B S T で 3 回洗浄するステップ。

3) 一次抗体のインキュベート

3 μ g/ml から 1 : 3 で希釈して、7 つの濃度勾配の抗体溶液を得て、対照組は、P B S であり、それぞれ室温で 10 分インキュベートするステップ。

4) リガンド

2 μ g/ml の P D L 1 - m I g G 2 a F c 溶液を各ウェルに 50 μ l ずつを入れ、37 で 1 時間インキュベートするステップ。

5) 二次抗体のインキュベート

P B S T で 3 回洗浄して、乾燥するように軽く叩き、1 : 5000 で希釈した二次抗体である H R P 標識ヤギ抗マウス I g G - (H + L) を各ウェルに 50 μ l ずつ入れ、37 で 1 時間インキュベートするステップ。

6) 顕色

P B S T で 3 回洗浄して、乾燥するように軽く叩き、T M B 顕色剤を各ウェルに 50 μ l ずつ入れ、室温で 5 ~ 10 分反応するステップ。

7) 顕色完了

50 μ l / ウェルで 2 M H_2SO_4 溶液を入れ、顕色反応を完了するステップ。

8) 読取り

マイクロプレートリーダーにより、吸光度 450 nm で各ウェルの吸光値を検出するステップ。

結果を図 2 に示すように、H 1 L 1、H 2 L 2 及び H 3 L 3 が、P d L 1 と競合して P D - 1 と結合する EC_{50} 値は、それぞれ 0.992 nM、0.838 nM 及び 1.194 nM である。

図 2 に示すように、前記 3 つの抗体 H 1 L 1、H 2 L 2 及び H 3 L 3 が、P d L 1 と P D - 1 との結合を有効に阻害できる。

【手続補正 1 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0065

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0065】

3. 18A10 H2L2及びPDL2の競合ELISA実験

具体的なステップは、以下のものである。

1) 抗原のコーティング

96ウェルプレートに、4で1.0 μ g/mlであるPD-1-hIgGfc抗原(50 μ l/ウェル)を一晩コーティングするステップ。

2) ブロッキング

PBSTで3回洗浄して、乾燥するように軽く叩き、37、1% BSA(PBSTで希釈する)で2時間ブロックして、1% Tween-20を含む1xPBSTで4回洗浄するステップ。

3) 一次抗体のインキュベート

20 μ g/mlから1:3で希釈して、7つの濃度勾配の抗体溶液を得て、対照組は、PBSであり、それぞれ室温で10分インキュベートするステップ。

4) リガンド

1.0 μ g/mlのPDL2-histag溶液を各ウェルに50 μ lずつを入れ、37で1時間インキュベートするステップ。

5) 二次抗体のインキュベート

PBSTで5回洗浄して、乾燥するように軽く叩き、1:750で希釈した二次抗体であるHRP標識抗histagマウスモノクローナル抗体を各ウェルに50 μ lずつ入れ、37で1時間インキュベートするステップ。

6) 顕色

PBSTで6回洗浄して、乾燥するように軽く叩き、TMB顕色剤を各ウェルに50 μ lずつ入れ、室温で30分反応するステップ。

7) 顕色完了

50 μ l/ウェルで2M H₂SO₄溶液を入れ、顕色反応を完了するステップ。

8) 読取り

マイクロプレートリーダーにより、吸光度450nmで各ウェルの吸光値を検出するステップ。

図3に示すように、前記抗体H2L2が、PdL1とPD-1との結合を有効に阻害できることが分かる。

【手続補正14】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0067

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0067】

実施例6

Fortebio分子間相互作用解析装置によりH1L1、H2L2、H3L3の運動特性パラメータを検出する。

ビオチン標識の抗原PD-1をSAセンサーの表面に固定され、PBSTと平衡した後、抗体H1L1と結合して、H1L1:PBST=1:3で希釈し(濃度は、200、66.67、22.22、7.41、2.47、0.82、0.27、0nM)、PBSTで解離させる。H2L2とH3L3の検出方法は、H1L1と同一である。それぞれH1L1、H2L2、H3L3の運動特性パラメータを表4に示し、検出結果を図4~6に示す。

【手続補正15】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0073

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0073】

それぞれH1L1、H2L2、H3L3抗体とBB007細胞との結合を表5に示す。図8に示すように、H1L1、H2L2及びH3L3抗体が、BB007細胞表面のターゲットタンパク質であるPD-1と有効に結合でき、かつその結合効率が、用量依存的な関係を呈することが分かる。

【手続補正16】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0074

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0074】

【表5】

表5 H1L1、H2L2、H3L3とBB007細胞と結合後の蛍光強度

(nM)	0	蛍光強度					EC50
		0.1	1	5	10	20	
hIgG	7.4						
H1L1		18.96	64.4	252.42	316.13	358.13	<u>3.38nM</u>
H2L2		19.09	92.55	320.89	349.07	329.08	<u>1.59nM</u>
H3L3		21.18	110.34	342.71	386.38	366.73	<u>1.68nM</u>

【手続補正17】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

[2019519247000001.app](#)

【 国际調查報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2016/103814
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
A61K 39/395 (2006.01) ; C07K 16/28 (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; A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CNABS, CPRSABS, SIPOABS, DWPI, CNKI, ISI web of Knowledge, Genbank: PD-1, monoclonal antibody, CD279, programmed death factor, antibody, a search based on sequences 1 and 2		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 105175544 A (ANHUI RUBIOX-VISION BIOTECHNOLOGY CO., LTD.), 23 December 2015 (23.12.2015), the whole document	1-23
A	CN 105061597 A (BEIJING ORIENTAL 100 TAI BIOTECHNOLOGY CO., LTD.; BEIJING JINGYI TAIXIANG TECHNOLOGY DEVELOPMENT CO., LTD.), 18 November 2015 (18.11.2015), the whole document	1-23
A	CN 105238762 A (WUXI ORIGENE BIO-TECHNOLOGY CO., LTD.), 13 January 2016 (13.01.2016), the whole document	1-23
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 22 January 2017 (22.01.2017)		Date of mailing of the international search report 03 February 2017 (03.02.2017)
Name and mailing address of the ISA/CN: 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 WU, Li Telephone No.: (86-10) 62411046

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/103814**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- [1] the present application relates to a monoclonal antibody, claim 1 defines a heavy chain variable region having three possibilities, and claim 2 further defines a light chain variable region having three possibilities. Therefore, the present application totally contains $3 \times 3 = 9$ kinds of possible sequences, and these sequences do not have one or more the same or corresponding technical features therebetween, and do not comply with the requirement of unity of invention under PCT Rule 13.1.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: relating to a monoclonal antibody with a heavy chain variable region being sequence 1 and a light chain variable region being sequence 2

Remark on protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2016/103814

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 105175544 A	23 December 2015	None	
CN 105061597 A	18 November 2015	CN 105061597 B	27 April 2016
		HK 1215870 A1	23 September 2016
CN 105238762 A	13 January 2016	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2016/103814

A. 主题的分类 A61K 39/395(2006.01)i; C07K 16/28(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 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)) CNABS, CPRSABS, SIPOABS, DWPI, CNKI, ISI web of Knowledge, Genbank:PD-1, 单克隆抗体, 单抗, CD279, 程序化死亡因子, antibody, 基于序列1和2的检索	
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	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 1-23
A	CN 105061597 A (北京东方百泰生物科技有限公司 北京精益泰翔技术发展有限公司) 2015年 11月 18日 (2015 - 11 - 18) 全文 1-23
A	CN 105238762 A (无锡傲锐东源生物科技有限公司) 2016年 1月 13日 (2016 - 01 - 13) 全文 1-23
<input 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 2017年 1月 22日	国际检索报告邮寄日期 2017年 2月 3日
ISA/CN的名称和邮寄地址 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 传真号 (86-10)62019451	受权官员 吴立 电话号码 (86-10)62411046

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2009年7月)

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2016/103814

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

[1] 本申请涉及单克隆抗体，权利要求1限定了重链可变区有三种可能，权利要求2进一步限定了轻链可变区有三种可能，因此，本申请共包含了 $3 \times 3 = 9$ 种可能的序列，这些序列之间不具有一个或多个相同或相应的技术特征，不符合PCT细则13.1规定的单一性。

1. 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2. 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何加费。
3. 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求，具体地说，是权利要求：
4. 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：涉及重链可变区为序列1，轻链可变区为序列2的单克隆抗体

对异议的意见

- 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。
- 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
- 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2016/103814

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	105175544	A	2015年 12月 23日	无			
CN	105061597	A	2015年 11月 18日	CN	105061597	B	2016年 4月 27日
				HK	1215870	A1	2016年 9月 23日
CN	105238762	A	2016年 1月 13日	无			

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 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 7
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	4 H 0 4 5
A 6 1 K 31/58 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	
A 6 1 K 31/60 (2006.01)	A 6 1 K 31/58	
A 6 1 K 31/635 (2006.01)	A 6 1 K 31/60	
A 6 1 K 31/606 (2006.01)	A 6 1 K 31/635	
A 6 1 K 31/603 (2006.01)	A 6 1 K 31/606	
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	A 6 1 K 31/603	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	
C 1 2 N 5/12 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	C 1 2 N 5/12	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 G	
	C 1 2 P 21/08	

(81)指定国 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, T J, 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, R O, 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, G T, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

(74)代理人 100107733

弁理士 流 良広

(74)代理人 100115347

弁理士 松田 奈緒子

(72)発明者 ユー・シャ

中華人民共和国 5 2 8 4 3 7 グアンドン チョンシャン トーチ ディベロップメンタル ゾーン シェンノン プールバード 6

(72)発明者 バイヨン・リ

中華人民共和国 5 2 8 4 3 7 グアンドン チョンシャン トーチ ディベロップメンタル ゾーン シェンノン プールバード 6

(72)発明者 チョンミン・マクスウェル・ワン

中華人民共和国 5 2 8 4 3 7 グアンドン チョンシャン トーチ ディベロップメンタル ゾーン シェンノン プールバード 6

(72)発明者 ファミン・チャン

中華人民共和国 4 3 0 0 7 4 フーベイ ウーハン イーストレイク ナショナル ハイ・テック ディベロップメント ゾーン バイオレイク B 6 - 5 1 5

(72)発明者 ガン・シー

中華人民共和国 4 3 0 0 7 4 フーベイ ウーハン イーストレイク ナショナル ハイ・テック ディベロップメント ゾーン バイオレイク B 6 - 5 1 5

(72)発明者 イン・フワン

中華人民共和国 4 3 0 0 7 4 フーベイ ウーハン イーストレイク ナショナル ハイ・テック

ク ディベロップメント ゾーン バイオレイク B 6 - 5 1 5

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA19 CA20 DA01 DA13
4B065 AA90X AA93X AA93Y AB01 BA02 BA08 CA25 CA44 CA46
4C084 AA13 MA02 NA05 NA14 ZB091 ZB092 ZB211 ZB212 ZB261 ZB262
ZC751
4C085 AA14 BB11 CC02 CC23 EE01 EE03
4C086 AA01 AA02 DA12 DA17 DA20 MA02 MA04 NA05 ZB09 ZB21
ZB26 ZC75
4C087 AA01 AA02 CA12 NA14 ZB09 ZB21 ZB26
4H045 AA11 AA20 AA30 DA76 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	抗PD-1单克隆抗体		
公开(公告)号	JP2019519247A	公开(公告)日	2019-07-11
申请号	JP2019502126	申请日	2016-10-28
发明人	ユー・シャ バイヨン・リ チョンミン・マクスウェル・ワン ファミン・チャン ガン・シー イン・フウアン		
IPC分类号	C12N15/13 A61K39/395 A61P43/00 A61P37/04 A61P35/00 A61K48/00 A61K35/76 A61K31/58 A61K31/60 A61K31/635 A61K31/606 A61K31/603 C12N15/63 C07K16/28 C12N5/10 C12N5/12 G01N33/53 C12P21/08		
CPC分类号	A61K45/06 C07K16/2818 C07K2317/56 A61P35/00 A61P37/04 A61P43/00 C07K2317/24 C07K2317/74 C07K2317/76 C07K2317/92 C07K2317/565		
FI分类号	C12N15/13.ZNA A61K39/395.N A61P43/00.111 A61P37/04 A61P35/00 A61K48/00 A61K35/76 A61P43/00.121 A61K31/58 A61K31/60 A61K31/635 A61K31/606 A61K31/603 C12N15/63.Z C07K16/28 C12N5/10 C12N5/12 G01N33/53.G C12P21/08		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/MA02 4C084/NA05 4C084/NA14 4C084/ZB091 4C084/ZB092 4C084/ZB211 4C084/ZB212 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C084/ZC751 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/CC02 4C085/CC23 4C085/EE01 4C085/EE03 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/DA12 4C086/DA17 4C086/DA20 4C086/MA02 4C086/MA04 4C086/NA05 4C086/ZB09 4C086/ZB21 4C086/ZB26 4C086/ZC75 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/CA12 4C087/NA14 4C087/ZB09 4C087/ZB21 4C087/ZB26 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	广田幸一		
优先权	201610207741.6 2016-04-01 CN		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了抗PD-1单克隆抗体或其抗原结合片段。(1) SEQ ID NO: 1所示的氨基酸序列,(2) SEQ ID NO: 3所示的氨基酸序列,(3) SEQ ID NO: 5所示的氨基酸序列,(4)与(1)至(3)比较,它包含具有至少一个氨基酸序列的重链可变区,所述至少一个氨基酸序列选自具有至少一个保守氨基酸突变的氨基酸序列。[选择图]无

(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2019-519247 (2019-519247A)
	(43) 公表日	令和1年7月11日(2019.7.11)
(5) Int. Cl.	F I	テーマコード(参考)
C12N 15/13 (2006.01)	C12N 15/13 ZNA	4B064
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395 N	4B065
A61P 43/00 (2006.01)	A61P 43/00 111	4C084
A61P 37/04 (2006.01)	A61P 37/04	4C085
A61P 35/00 (2006.01)	A61P 35/00	4C086
	審査請求 有	予備審査請求 未請求 (全39頁) 最終頁に続く
(2) 出願番号	特願2019-502126(P2019-502126)	(7) 出願人
(6) (22) 出願日	平成28年10月28日(2016.10.28)	517031177
(8) 翻訳文提出日	平成30年11月29日(2018.11.29)	アケソ・バイオファーマ・インコーポレイテッド
(9) 国際出願番号	PCT/CN2016/103814	中華人民共和国、5284377・ガンドン、ゾンジャン、トーチ・ディベロップメントル・ゾーン、シェンノン・ブルバード・6
(8) 国際公開番号	W02017/168904	(7) 出願人
(8) 国際公開日	平成29年10月5日(2017.10.5)	518349215
(3) 優先権主張番号	201610207741.6	タイチョウ ハンチョン バイオファーマシューティクス インコーポレイテッド 中華人民共和国 225316 チャンスー タイチョウ ナンバー 1 オブ チョイナ メディカル シティ ロード
(2) 優先日	平成28年4月1日(2016.4.1)	100107515
(3) 優先権主張国	中国(CN)	(7) 代理人
		弁理士 廣田 浩一
		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗PD-1のモノクローナル抗体