

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-48804

(P2019-48804A)

(43) 公開日 平成31年3月28日(2019.3.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 16/28 (2006.01)</b>	C07K 16/28 ZNA	4B063
<b>C12N 15/13 (2006.01)</b>	C12N 15/13	4B064
<b>C07K 19/00 (2006.01)</b>	C07K 19/00	4C085
<b>C07K 14/705 (2006.01)</b>	C07K 14/705	4H045
<b>C12Q 1/02 (2006.01)</b>	C12Q 1/02	

審査請求 有 請求項の数 7 O L (全 52 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-177092 (P2018-177092)  
 (22) 出願日 平成30年9月21日 (2018. 9. 21)  
 (62) 分割の表示 特願2016-541756 (P2016-541756) の分割  
 原出願日 平成25年9月13日 (2013. 9. 13)

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. TWEEN

(71) 出願人 514164650  
 ベイジーン リミテッド  
 英国領ケイマン諸島 グランド ケイマン  
 カマナ ベイ ソラリス アベニュー  
 94 ムーラント オザネス コーポレイ  
 ト サービスズ (ケイマン) リミテッ  
 ド内  
 (74) 代理人 100144048  
 弁理士 坂本 智弘  
 (72) 発明者 ソン ジン  
 中華人民共和国 102206 ベイジン  
 , チャンピン, ジョングンチュン ライフ  
 サイエンス パーク, サイエンス パー  
 ク ロード No. 30

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗PD-1抗体並びにその治療及び診断のための使用

(57) 【要約】

【課題】プログラム死-1 (PD-1、Pdcd-1、又はCD279) の免疫抑制 (阻害) のための方法および組成物を提供すること。

【解決手段】プログラム死-1 (PD-1、Pdcd-1、又はCD279) に特異的に結合し、免疫細胞におけるPD1 媒介性細胞内シグナル伝達を阻害し、リガンド結合に必要な一組のアミノ酸残基に結合する抗体と、癌、感染症、またはPD1 媒介性功能によって調節される他の病的異常を治療又は診断する該抗体の使用。

【選択図】 図1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

配列番号 11 - 22、31 - 42、59 - 63 から選択された配列を有する相補性決定領域 (CDR) を含み、ヒト PD - 1 に特異的に結合する、抗体抗原結合ドメイン。

## 【請求項 2】

以下を含む重鎖可変領域 (Vh) 又は軽鎖可変領域 (Vk) を含む、請求項 1 に記載のドメイン：

- a) CDR - H1 (配列番号 11、17、31、又は 37)、
- b) CDR - H2 (配列番号 12、18、32、又は 38)、
- c) CDR - H3 (配列番号 13、19、33、又は 39)、
- d) CDR - L1 (配列番号 14、20、34、又は 40)、
- e) CDR - L2 (配列番号 15、21、35、又は 41)、又は
- f) CDR - L3 (配列番号 16、22、36、又は 42)。

10

## 【請求項 3】

以下を含む重鎖可変領域 (Vh) 又は軽鎖可変領域 (Vk) を含む、請求項 1 に記載のドメイン：

- a) mu317 : CDR - H1、CDR - H2、及び CDR - H3 (配列番号 11 - 13) ; 又は  
CDR - L1、CDR - L2、及び CDR - L3 (配列番号 14 - 16) ;
- b) mu326 : CDR - H1、CDR - H2、及び CDR - H3 (配列番号 17 - 19) ; 又は  
CDR - L1、CDR - L2、及び CDR - L3 (配列番号 20 - 22) ;
- c) 317 - 4B6 : CDR - H1、CDR - H2、及び CDR - H3 (配列番号 31 - 33) ; 又は  
CDR - L1、CDR - L2、及び CDR - L3 (配列番号 34 - 36) ;
- d) 326 - 4A3 : CDR - H1、CDR - H2、及び CDR - H3 (配列番号 37 - 39) ; 又は  
CDR - L1、CDR - L2、及び CDR - L3 (配列番号 40 - 42) ;
- e) 317 - 1H : CDR - H1、CDR - H2、及び CDR - H3 (配列番号 11、59、13) ; 又は  
CDR - L1、CDR - L2、及び CDR - L3 (配列番号 14 - 16) ;
- f) 317 - 4B2 : CDR - H1、CDR - H2、及び CDR - H3 (配列番号 11、60、13) ; 又は  
CDR - L1、CDR - L2、及び CDR - L3 (配列番号 61、15、16) ;
- g) 317 - 4B5 : CDR - H1、CDR - H2、及び CDR - H3 (配列番号 11、60、13) ; 又は  
CDR - L1、CDR - L2、及び CDR - L3 (配列番号 61、15、16) ;
- h) 317 - 4B6 : CDR - H1、CDR - H2、及び CDR - H3 (配列番号 11、32、13) ; 又は  
CDR - L1、CDR - L2、及び CDR - L3 (配列番号 61、15、16) ;
- i) 326 - 1 : CDR - H1、CDR - H2、及び CDR - H3 (配列番号 17、62、19) ; 又は

20

30

40

50

- CDR - L 1、CDR - L 2、及び CDR - L 3 (配列番号 2 0 - 2 2) ;
- j) 3 2 6 - 3 B 1 : CDR - H 1、CDR - H 2、及び CDR - H 3 (配列番号 1 7、6 2、1 9) ; 又は  
CDR - L 1、CDR - L 2、及び CDR - L 3 (配列番号 2 0 - 2 2) ;
- k) 3 2 6 - 3 G 1 : CDR - H 1、CDR - H 2、及び CDR - H 3 (配列番号 1 7、6 2、1 9) ; 又は  
CDR - L 1、CDR - L 2、及び CDR - L 3 (配列番号 2 0 - 2 2) 。

10

## 【請求項 4】

以下を含む重鎖可変領域 (V<sub>h</sub>) 及び軽鎖可変領域 (V<sub>k</sub>) を含む、請求項 1 に記載のドメイン:

- a) m u 3 1 7 : CDR - H 1、CDR - H 2、及び CDR - H 3 (配列番号 1 1 - 1 3) ; 並びに  
CDR - L 1、CDR - L 2、及び CDR - L 3 (配列番号 1 4 - 1 6) ;
- b) m u 3 2 6 : CDR - H 1、CDR - H 2、及び CDR - H 3 (配列番号 1 7 - 1 9) ; 並びに  
CDR - L 1、CDR - L 2、及び CDR - L 3 (配列番号 2 0 - 2 2) ;
- c) 3 1 7 - 4 B 6 : CDR - H 1、CDR - H 2、及び CDR - H 3 (配列番号 3 1 - 3 3) ; 並びに  
CDR - L 1、CDR - L 2、及び CDR - L 3 (配列番号 3 4 - 3 6) ;
- d) 3 2 6 - 4 A 3 : CDR - H 1、CDR - H 2、及び CDR - H 3 (配列番号 3 7 - 3 9) ; 並びに  
CDR - L 1、CDR - L 2、及び CDR - L 3 (配列番号 4 0 - 4 2) ;
- e) 3 1 7 - 1 H : CDR - H 1、CDR - H 2、及び CDR - H 3 (配列番号 1 1、5 9、1 3) ; 並びに  
CDR - L 1、CDR - L 2、及び CDR - L 3 (配列番号 1 4 - 1 6) ;
- f) 3 1 7 - 4 B 2 : CDR - H 1、CDR - H 2、及び CDR - H 3 (配列番号 1 1、6 0、1 3) ; 並びに  
CDR - L 1、CDR - L 2、及び CDR - L 3 (配列番号 6 1、1 5、1 6) ;
- g) 3 1 7 - 4 B 5 : CDR - H 1、CDR - H 2、及び CDR - H 3 (配列番号 1 1、6 0、1 3) ; 並びに  
CDR - L 1、CDR - L 2、及び CDR - L 3 (配列番号 6 1、1 5、1 6) ;
- h) 3 1 7 - 4 B 6 : CDR - H 1、CDR - H 2、及び CDR - H 3 (配列番号 1 1、3 2、1 3) ; 並びに  
CDR - L 1、CDR - L 2、及び CDR - L 3 (配列番号 6 1、1 5、1 6) ;
- i) 3 2 6 - 1 : CDR - H 1、CDR - H 2、及び CDR - H 3 (配列番号 1 7、6 2、1 9) ; 並びに  
CDR - L 1、CDR - L 2、及び CDR - L 3 (配列番号 2 0 - 2 2) ;
- j) 3 2 6 - 3 B 1 : CDR - H 1、CDR - H 2、及び CDR - H 3 (配列番号 1 7

20

30

40

50

、 6 2、 1 9 ) ; 並びに

C D R - L 1、 C D R - L 2、 及び C D R - L 3 ( 配列番号 2 0 - 2 2 ) ;

k ) 3 2 6 - 3 G 1 : C D R - H 1、 C D R - H 2、 及び C D R - H 3 ( 配列番号 1 7、 6 2、 1 9 ) ; 並びに

C D R - L 1、 C D R - L 2、 及び C D R - L 3 ( 配列番号 2 0 - 2 2 )。

**【請求項 5】**

以下を含む重鎖可変領域 ( V h ) 又は軽鎖可変領域 ( V k ) を含む、請求項 1 に記載のドメイン:

10

( a ) C D R - H 1 ( 配列番号 3 1 )、 C D R - H 2 ( 配列番号 1 2、 3 2、 5 9 又は 6 0 )、 及び C D R - H 3 ( 配列番号 3 3 )、

C D R - L 1 ( 配列番号 1 4、 3 4、 又は 6 1 )、 C D R - L 2 ( 配列番号 3 5 )、 及び C D R - L 3 ( 配列番号 3 6 ) ; 又は

( b ) C D R - H 1 ( 配列番号 3 7 )、 C D R - H 2 ( 配列番号 1 8、 3 8、 又は 6 2 )、 及び C D R - H 3 ( 配列番号 3 9 )、

C D R - L 1 ( 配列番号 4 0 )、 C D R - L 2 ( 配列番号 4 1 )、 及び C D R - L 3 ( 配列番号 4 2 )。

**【請求項 6】**

以下を含む重鎖可変領域 ( V h ) 又は軽鎖可変領域 ( V k ) を含む、請求項 1 に記載のドメイン:

20

a ) m u 3 1 7 ( 配列番号 4 又は 6 ) ;

b ) m u 3 2 6 ( 配列番号 8 又は 1 0 ) ;

c ) 3 1 7 - 4 B 6 ( 配列番号 2 4 又は 2 6 ) ;

d ) 3 2 6 - 4 A 3 ( 配列番号 2 8 又は 3 0 ) ;

e ) 3 1 7 - 4 B 2 ( 配列番号 4 3 又は 4 4 ) ;

f ) 3 1 7 - 4 B 5 ( 配列番号 4 5 又は 4 6 ) ;

g ) 3 1 7 - 1 ( 配列番号 4 8 又は 5 0 ) ;

h ) 3 2 6 - 3 B 1 ( 配列番号 5 1 又は 5 2 ) ;

i ) 3 2 6 - 3 G 1 ( 配列番号 5 3 又は 5 4 ) ;

30

j ) 3 2 6 - 1 ( 配列番号 5 6 又は 5 8 ) ;

k ) 3 1 7 - 3 A 1 ( 配列番号 6 4 ) ;

l ) 3 1 7 - 3 C 1 ( 配列番号 6 5 ) ;

m ) 3 1 7 - 3 E 1 ( 配列番号 6 6 ) ;

n ) 3 1 7 - 3 F 1 ( 配列番号 6 7 ) ;

o ) 3 1 7 - 3 G 1 ( 配列番号 6 8 ) ;

p ) 3 1 7 - 3 H 1 ( 配列番号 6 9 ) ;

q ) 3 1 7 - 3 I 1 ( 配列番号 7 0 ) ;

r ) 3 1 7 - 4 B 1 ( 配列番号 7 1 ) ;

s ) 3 1 7 - 4 B 3 ( 配列番号 7 2 ) ;

40

t ) 3 1 7 - 4 B 4 ( 配列番号 7 3 ) ;

u ) 3 1 7 - 4 A 2 ( 配列番号 7 4 ) ;

v ) 3 2 6 - 3 A 1 ( 配列番号 7 5 ) ;

w ) 3 2 6 - 3 C 1 ( 配列番号 7 6 ) ;

x ) 3 2 6 - 3 D 1 ( 配列番号 7 7 ) ;

y ) 3 2 6 - 3 E 1 ( 配列番号 7 8 ) ;

z ) 3 2 6 - 3 F 1 ( 配列番号 7 9 ) ;

a a ) 3 2 6 - 3 B N 5 5 D ( 配列番号 8 0 ) ;

a b ) 3 2 6 - 4 A 1 ( 配列番号 8 1 ) ; 又は

a c ) 3 2 6 - 4 A 2 ( 配列番号 8 2 )。

50

## 【請求項 7】

以下を含む重鎖可変領域 (Vh) 及び軽鎖可変領域 (Vk) を含む、請求項 1 に記載のドメイン：

- a) m u 3 1 7 (配列番号 4 及び 6) ;
- b) m u 3 2 6 (配列番号 8 及び 10) ;
- c) 3 1 7 - 4 B 6 (配列番号 2 4 及び 2 6) ;
- d) 3 2 6 - 4 A 3 (配列番号 2 8 及び 3 0) ;
- e) 3 1 7 - 4 B 2 (配列番号 4 3 及び 4 4) ;
- f) 3 1 7 - 4 B 5 (配列番号 4 5 及び 4 6) ;
- g) 3 1 7 - 1 (配列番号 4 8 及び 5 0) ;
- h) 3 2 6 - 3 B 1 (配列番号 5 1 又は 5 2) ;
- i) 3 2 6 - 3 G 1 (配列番号 5 3 及び 5 4) ;
- j) 3 2 6 - 1 (配列番号 5 6 及び 5 8) ;
- k) 3 1 7 - 3 A 1 (配列番号 6 4 及び 2 6) ;
- l) 3 1 7 - 3 C 1 (配列番号 6 5 及び 2 6) ;
- m) 3 1 7 - 3 E 1 (配列番号 6 6 及び 2 6) ;
- n) 3 1 7 - 3 F 1 (配列番号 6 7 及び 2 6) ;
- o) 3 1 7 - 3 G 1 (配列番号 6 8 及び 2 6) ;
- p) 3 1 7 - 3 H 1 (配列番号 6 9 及び 2 6) ;
- q) 3 1 7 - 3 I 1 (配列番号 7 0 及び 2 6) ;
- r) 3 1 7 - 4 B 1 (配列番号 7 1 及び 2 6) ;
- s) 3 1 7 - 4 B 3 (配列番号 7 2 及び 2 6) ;
- t) 3 1 7 - 4 B 4 (配列番号 7 3 及び 2 6) ;
- u) 3 1 7 - 4 A 2 (配列番号 7 4 及び 2 6) ;
- v) 3 2 6 - 3 A 1 (配列番号 7 5 及び 3 0) ;
- w) 3 2 6 - 3 C 1 (配列番号 7 6 及び 3 0) ;
- x) 3 2 6 - 3 D 1 (配列番号 7 7 及び 3 0) ;
- y) 3 2 6 - 3 E 1 (配列番号 7 8 及び 3 0) ;
- z) 3 2 6 - 3 F 1 (配列番号 7 9 及び 3 0) ;
- aa) 3 2 6 - 3 B N 5 5 D (配列番号 8 0 及び 3 0) ;
- ab) 3 2 6 - 4 A 1 (配列番号 2 8 及び 8 1) ; 又は
- ac) 3 2 6 - 4 A 2 (配列番号 2 8 及び 8 2) 。

## 【請求項 8】

以下の PD 1 残基に特異的に結合する、請求項 1 に記載のドメイン：

- (a) K 4 5 及び I 9 3 (文献 [ 2 0 0 8 P N A S、1 0 5 : 1 0 4 8 3 ] に基づくアミノ酸番号付け；配列番号 2 における K 5 8 および I 1 0 6 に相当する)；又は
- (b) I 9 3、L 9 5 及び P 9 7 (文献 [ 2 0 0 8 P N A S、1 0 5 : 1 0 4 8 3 ] に基づくアミノ酸番号付け；配列番号 2 における I 1 0 6、L 1 0 8 および P 1 1 0 に相当する)。

## 【請求項 9】

HEK 2 9 3 / OS 8 / PD - L 1 細胞又は HEK 2 9 3 / OS 8 / PD - L 2 細胞と共培養した Hu T 7 8 / PD - 1 細胞における IL - 2 放出を誘導し、及び / 又は、HEK 2 9 3 / PD - L 1 細胞又は HEK 2 9 3 / PD - L 2 細胞と共培養した Hu T 7 8 / P 3 Z 細胞における IL - 2 分泌を阻害する、請求項 1 に記載のドメイン。

## 【請求項 10】

配列番号 8 3 - 8 8 のいずれかを含む、抗体 Ig G 4 重鎖エフェクター又は定常領域。

## 【請求項 11】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のドメインを含む、抗体、F ( a b ) 又は F ( a b )<sub>2</sub>。

## 【請求項 12】

10

20

30

40

50

配列番号 87 又は 88 を含む I g G 4 重鎖エフェクター又は定常領域と、請求項 7 に記載のドメインと、を含む抗体。

【請求項 13】

請求項 1 に記載のドメインをコードするポリヌクレオチド。

【請求項 14】

請求項 1 に記載のドメインをコードする c D N A 配列を含むポリヌクレオチド。

【請求項 15】

癌またはウイルス感染症の判定を受けた個体、または、P D - 1 拮抗作用を必要とする個体に前記ドメインを投与することを含む、請求項 1 に記載のドメインを使用する方法。

【請求項 16】

( a ) マウス C D 8 の C 末端ドメイン ( 1 1 3 - 2 2 0 ) に融合された抗ヒト C D 3 モノクローナル抗体 O K T 3 の単鎖可変断片 ( s c F v ) ( 配列番号 8 9 ) ; 又は  
( b ) ヒト C D 3 鎖の細胞質ドメインに融合されたヒト P D - 1 の細胞外及び膜貫通ドメイン ( 配列番号 9 0 )  
を含む融合タンパク質。

【請求項 17】

請求項 16 に記載の融合タンパク質を使用する方法であって、前記融合タンパク質を発現する細胞株で抗 P D - 1 抗体をアッセイ、スクリーニング、または、選択することを含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗 P D - 1 抗体並びに該抗体の治療及び診断のための使用に関する。

【背景技術】

【0002】

プログラム死 - 1 ( P D - 1、また、「C D 2 7 9」とも呼ぶ) は、C D 2 8 / C T L A 4 共刺激 / 阻害性受容体ファミリーに関連する 5 5 K D 受容体タンパク質である。非特許文献 1 参照。P D - 1 をコードする c D N A 及び遺伝子をクローニングし、マウスおよびヒトにおいて特性を明らかにした。非特許文献 2、非特許文献 3 参照。全長 P D - 1 は、2 8 8 個のアミノ酸残基 ( N C B I 受託番号 : N P \_ 0 0 5 0 0 9 ) を含む。その細胞外ドメインは、アミノ酸残基 1 ~ 1 6 7 で構成され、そして、細胞質 C - 末端テールは、二つの仮想の疫調節性モチーフ、免疫受容体チロシン系阻害モチーフ ( 非特許文献 4 参照 ) および、免疫受容体チロシンスイッチモチーフ ( 非特許文献 5 参照 ) を有する。

【0003】

今まで、二つの配列関連リガンド ( s e q u e n c e - r e l a t e d l i g a n d )、P D - L 1 ( B 7 - H 1 ) および P D - L 2 ( B 7 - D C ) は、P D - 1 と特異的に相互作用して、C D 3 および C D 2 8 媒介性 T 細胞活性化を阻害する細胞内シグナル伝達を誘導し ( 非特許文献 6 参照 )、それにより、例えば、細胞増殖の減少、I L - 2 および I F N - の分泌、他の成長因子およびサイトカイン分泌といった T 細胞活性を弱化させることが確認されていた。

【0004】

P D - 1 の発現は、しばしば、T 細胞、B 細胞、単球およびナチュラルキラー ( N K ) 細胞などの免疫細胞においてみられる。それは、ヒトの他の組織、例えば、筋肉、上皮、神経組織等においては希に発現される。また、P D - 1 の高水準発現は、多くの場合、免疫細胞の活性化と関連している。例えば、ヒト T 細胞株、ジャーカット ( J u r k a t ) はフィットヘマグルチニン ( P H A ) またはホルボールエステル ( 1 2 - O - テトラデカノイルホルボール - 1 3 - アセテート、または T P A ) によって活性化されたときに、P D - 1 の発現はウエスタンブロットにおいて上方制御されることが確認された。非特許文献 7 参照。同様の現象は、抗 C D 3 抗体による刺激の際に、刺激されたマウス T - , 及び B - リンパ球、及び、初代 ( p r i m a r y ) ヒト C D 4 + T 細胞において観察された。非

10

20

30

40

50

特許文献 8 及び非特許文献 9 参照。Tエフェクター細胞の刺激後のPD-1発現の増加は、枯渇(exhaustion)及び免疫活性減少のほうに活性化Tエフェクター細胞を向け直す。したがって、PD-1媒介性阻害シグナルは、免疫寛容(immunetolerance)に重要な役割をしている。非特許文献 10 参照。

【0005】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)におけるPD-1発現増加及び腫瘍細胞におけるPD-1リガンド発現増加は、肺(非特許文献 11 参照)、肝臓(非特許文献 12 及び非特許文献 13 参照)、胃(非特許文献 14 参照)、腎臓(非特許文献 15 及び非特許文献 16 参照)、乳房(非特許文献 17 参照)、卵巣(非特許文献 18 参照)、膵臓(非特許文献 19 参照)、メラノサイト(非特許文献 20 参照)、及び食道(非特許文献 21 参照)などの異なるタイプの臓器及び組織に關与する様々な癌において報告されている。これらの癌におけるPD-1とPD-L1の発現増加は、より頻繁に患者の生存転帰の予後不良と関連している。異種移植片癌細胞の増殖を阻害するPD-1遺伝子ノックアウトを有するトランスジェニックマウスは、癌の根絶または寛容のための免疫系の調節におけるPD-1シグナル伝達の重要性を明らかにした。非特許文献 22 参照。

【0006】

PD-1シグナル伝達の上方調節は、ヒトにおいて、免疫寛容、癌の増殖をもたらすだけでなく、ウイルス感染及びその拡大をももたらす。流行する肝臓感染症ウイルス、HBV及びHCVは、肝細胞においてPD-1リガンドの過剰発現を誘導するとともにTエフェクター細胞においてPD-1信号伝達を活性化して、T細胞枯渇及びウイルス感染に対する寛容をもたらす。非特許文献 23 及び非特許文献 24 参照。同様に、HIV感染症は、同様のメカニズムにより頻繁にヒトの免疫系を回避する。拮抗剤分子によるPD-1シグナル伝達が、免疫細胞を寛容から戻し、がんや慢性ウイルス感染を根絶するよう再活性化し得る。非特許文献 25 及び非特許文献 26 参照。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献 1】Blank et al., 2005 Cancer Immunol Immunother 54:307-314

【非特許文献 2】Ishida et al., 1992 EMBO J 11:3887-3395

【非特許文献 3】Shinohara et al., 1994 Genomics 23:704-706

【非特許文献 4】ITIM; Vivier et al., 1997 Immunol Today 18:286-291

【非特許文献 5】ITSM; Chemnitz et al., 2004 J Immunol 173:945-954

【非特許文献 6】Riley, 2009 Immunol Rev 229:114-125

【非特許文献 7】Vibharka et al., 1997 Exp Cell Res 232:25-28

【非特許文献 8】Agata et al., 1996 Int Immunol 8:765-772

【非特許文献 9】Bennett et al., 2003 J Immunol 170:711-118

【非特許文献 10】Bour-Jordan et al., 2011 Immunol Rev 241:180-205

【非特許文献 11】Konishi et al., 2004 Clin Cancer Res 10:5094-5100

【非特許文献 12】Shi et al., 2008 Int J Cancer 1

10

20

30

40

50

28 : 887 - 896

【非特許文献13】Gao et al., 2009 Clin Cancer Res 15:971-979)5100

【非特許文献14】Wu et al., 2006 Acta Histochem 108:19-24

【非特許文献15】Thompson et al., 2004 Proc Natl Acad Sci 101:17174-17179

【非特許文献16】Thompson et al., 2007 Clin Cancer Res 13:1757-1761

【非特許文献17】Ghebeh et al., 2006 Neoplasia 8 : 190 - 198 10

【非特許文献18】Hamaniishi et al. 2007 Proc Natl Acad Sci 104:3360-3365

【非特許文献19】Nomi et al., 2007 Clin Cancer Res 13:2151-2157

【非特許文献20】Hino et al., 2010 Cancer 116:1757-1766

【非特許文献21】Ohigashi et al., 2005 Clin Cancer Res 11:2947-2953

【非特許文献22】Zhang et al., 2009 Blood 114:1545-1552 20

【非特許文献23】Boni et al., 2007 J Virol 81:4215-4225

【非特許文献24】Golden-Mason et al., 2008 J Immunol 180:3637-3641

【非特許文献25】Blank et al., 2005 Cancer Immunol Immunother 54:307-314

【非特許文献26】Okazaki et al., 2007 Int Immunol 19:813-824

【発明の概要】 30

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、PD-1の免疫抑制(障害)のための方法および組成物を提供する。一態様において、本発明は、ヒトPD-1に結合する、配列番号11-22、31-42および59-63から選択される配列を有する相補性決定領域(CDR)を含む、抗体抗原結合ドメインを提供する。

CDRは、(CDR-H1、CDR-H2及びCDR-H3)並びに(CDR-L1、CDR-L2及びCDR-L3)配列をそれぞれ含む重鎖可変領域(Vh)及び軽鎖可変領域(Vk)への組換えに適しており、PD-1特異的結合及び/又は機能性を保持する。

【0009】 40

特定の実施形態では、ドメインは、以下を含む重鎖可変領域(Vh)又は軽鎖可変領域(Vk)を含む：

- a) CDR-H1 (配列番号11、17、31、又は37)、
- b) CDR-H2 (配列番号12、18、32、又は38)、
- c) CDR-H3 (配列番号13、19、33、又は39)、
- d) CDR-L1 (配列番号14、20、34、又は40)、
- e) CDR-L2 (配列番号15、21、35、又は41)、又は
- f) CDR-L3 (配列番号16、22、36、又は42)。

【0010】 50

特定の実施形態では、ドメインは、以下を含む重鎖可変領域（Vh）及び／又は軽鎖可変領域（Vk）を含む：

- a) mu317 : CDR - H1、CDR - H2、及びCDR - H3（配列番号11 - 13）；  
CDR - L1、CDR - L2、及びCDR - L3（配列番号14 - 16）；
- b) mu326 : CDR - H1、CDR - H2、及びCDR - H3（配列番号17 - 19）；  
CDR - L1、CDR - L2、及びCDR - L3（配列番号20 - 22）；
- c) 317 - 4B6 : CDR - H1、CDR - H2、及びCDR - H3（配列番号31 - 33）；  
CDR - L1、CDR - L2、及びCDR - L3（配列番号34 - 36）；
- d) 326 - 4A3 : CDR - H1、CDR - H2、及びCDR - H3（配列番号37 - 39）；  
CDR - L1、CDR - L2、及びCDR - L3（配列番号40 - 42）；
- e) 317 - 1H : CDR - H1、CDR - H2、及びCDR - H3（配列番号11、59、13）；  
CDR - L1、CDR - L2、及びCDR - L3（配列番号14 - 16）；
- f) 317 - 4B2 : CDR - H1、CDR - H2、及びCDR - H3（配列番号11、60、13）；  
CDR - L1、CDR - L2、及びCDR - L3（配列番号61、15、16）；
- g) 317 - 4B5 : CDR - H1、CDR - H2、及びCDR - H3（配列番号11、60、13）；  
CDR - L1、CDR - L2、及びCDR - L3（配列番号61、15、16）；
- h) 317 - 4B6 : CDR - H1、CDR - H2、及びCDR - H3（配列番号11、32、13）；  
CDR - L1、CDR - L2、及びCDR - L3（配列番号61、15、16）；
- i) 326 - 1 : CDR - H1、CDR - H2、及びCDR - H3（配列番号17、62、19）；  
CDR - L1、CDR - L2、及びCDR - L3（配列番号20 - 22）；
- j) 326 - 3B1 : CDR - H1、CDR - H2、及びCDR - H3（配列番号17、62、19）；  
CDR - L1、CDR - L2、及びCDR - L3（配列番号20 - 22）；
- k) 326 - 3G1 : CDR - H1、CDR - H2、及びCDR - H3（配列番号17、62、19）；又は  
CDR - L1、CDR - L2、及びCDR - L3（配列番号20 - 22）。

**【0011】**

特定の実施形態では、ドメインは、以下を含む重鎖可変領域（Vh）又は軽鎖可変領域（Vk）を含む：

- (a) CDR - H1（配列番号31）、CDR - H2（配列番号12、32、59又は

10

20

30

40

50

60)、及び CDR - H 3 (配列番号 33)、  
 CDR - L 1 (配列番号 14、34、又は 61)、CDR - L 2 (配列番号 35)  
 )、及び CDR - L 3 (配列番号 36) ; 又は  
 (b) CDR - H 1 (配列番号 37)、CDR - H 2 (配列番号 18、38、又は 62)  
 )、及び CDR - H 3 (配列番号 39)、  
 CDR - L 1 (配列番号 40)、CDR - L 2 (配列番号 41)、及び CDR -  
 L 3 (配列番号 42)。

**【0012】**

特定の実施形態では、以下を含む重鎖可変領域 (Vh) 又は軽鎖可変領域 (Vk) を含  
 む :

- a) mu 3 1 7 (配列番号 4 又は 6) ;
- b) mu 3 2 6 (配列番号 8 又は 10) ;
- c) 3 1 7 - 4 B 6 (配列番号 2 4 又は 2 6) ;
- d) 3 2 6 - 4 A 3 (配列番号 2 8 又は 3 0) ;
- e) 3 1 7 - 4 B 2 (配列番号 4 3 又は 4 4) ;
- f) 3 1 7 - 4 B 5 (配列番号 4 5 又は 4 6) ;
- g) 3 1 7 - 1 (配列番号 4 8 又は 5 0) ;
- h) 3 2 6 - 3 B 1 (配列番号 5 1 又は 5 2) ;
- i) 3 2 6 - 3 G 1 (配列番号 5 3 又は 5 4) ;
- j) 3 2 6 - 1 (配列番号 5 6 又は 5 8) ;
- k) 3 1 7 - 3 A 1 (配列番号 6 4) ;
- l) 3 1 7 - 3 C 1 (配列番号 6 5) ;
- m) 3 1 7 - 3 E 1 (配列番号 6 6) ;
- n) 3 1 7 - 3 F 1 (配列番号 6 7) ;
- o) 3 1 7 - 3 G 1 (配列番号 6 8) ;
- p) 3 1 7 - 3 H 1 (配列番号 6 9) ;
- q) 3 1 7 - 3 I 1 (配列番号 7 0) ;
- r) 3 1 7 - 4 B 1 (配列番号 7 1) ;
- s) 3 1 7 - 4 B 3 (配列番号 7 2) ;
- t) 3 1 7 - 4 B 4 (配列番号 7 3) ;
- u) 3 1 7 - 4 A 2 (配列番号 7 4) ;
- v) 3 2 6 - 3 A 1 (配列番号 7 5) ;
- w) 3 2 6 - 3 C 1 (配列番号 7 6) ;
- x) 3 2 6 - 3 D 1 (配列番号 7 7) ;
- y) 3 2 6 - 3 E 1 (配列番号 7 8) ;
- z) 3 2 6 - 3 F 1 (配列番号 7 9) ;
- aa) 3 2 6 - 3 B N 5 5 D (配列番号 8 0) ;
- ab) 3 2 6 - 4 A 1 (配列番号 8 1) ; 又は
- ac) 3 2 6 - 4 A 2 (配列番号 8 2) 。

**【0013】**

特定の実施形態では、ドメインは、以下を含む重鎖可変領域 (Vh) 及び軽鎖可変領域  
 (Vk) を含む :

- a) mu 3 1 7 (配列番号 4 及び 6) ;
- b) mu 3 2 6 (配列番号 8 及び 10) ;
- c) 3 1 7 - 4 B 6 (配列番号 2 4 及び 2 6) ;
- d) 3 2 6 - 4 A 3 (配列番号 2 8 及び 3 0) ;
- e) 3 1 7 - 4 B 2 (配列番号 4 3 及び 4 4) ;
- f) 3 1 7 - 4 B 5 (配列番号 4 5 及び 4 6) ;
- g) 3 1 7 - 1 (配列番号 4 8 及び 5 0) ;
- h) 3 2 6 - 3 B 1 (配列番号 5 1 又は 5 2) ;

10

20

30

40

50

- i) 3 2 6 - 3 G 1 (配列番号 5 3 及び 5 4) ;
- j) 3 2 6 - 1 (配列番号 5 6 及び 5 8) ;
- k) 3 1 7 - 3 A 1 (配列番号 6 4 及び 2 6) ;
- l) 3 1 7 - 3 C 1 (配列番号 6 5 及び 2 6) ;
- m) 3 1 7 - 3 E 1 (配列番号 6 6 及び 2 6) ;
- n) 3 1 7 - 3 F 1 (配列番号 6 7 及び 2 6) ;
- o) 3 1 7 - 3 G 1 (配列番号 6 8 及び 2 6) ;
- p) 3 1 7 - 3 H 1 (配列番号 6 9 及び 2 6) ;
- q) 3 1 7 - 3 I 1 (配列番号 7 0 及び 2 6) ;
- r) 3 1 7 - 4 B 1 (配列番号 7 1 及び 2 6) ;
- s) 3 1 7 - 4 B 3 (配列番号 7 2 及び 2 6) ;
- t) 3 1 7 - 4 B 4 (配列番号 7 3 及び 2 6) ;
- u) 3 1 7 - 4 A 2 (配列番号 7 4 及び 2 6) ;
- v) 3 2 6 - 3 A 1 (配列番号 7 5 及び 3 0) ;
- w) 3 2 6 - 3 C 1 (配列番号 7 6 及び 3 0) ;
- x) 3 2 6 - 3 D 1 (配列番号 7 7 及び 3 0) ;
- y) 3 2 6 - 3 E 1 (配列番号 7 8 及び 3 0) ;
- z) 3 2 6 - 3 F 1 (配列番号 7 9 及び 3 0) ;
- aa) 3 2 6 - 3 B N 5 5 D (配列番号 8 0 及び 3 0) ;
- ab) 3 2 6 - 4 A 1 (配列番号 2 8 及び 8 1) ; 又は
- ac) 3 2 6 - 4 A 2 (配列番号 2 8 及び 8 2) 。

10

20

## 【0014】

特定の実施形態では、ドメインは、以下のPD1残基に特異的に結合する：

- (a) K 4 5 及び I 9 3 (文献 [ 2 0 0 8 P N A S、1 0 5 : 1 0 4 8 3 ] に基づくアミノ酸番号付け；配列番号 2 における K 5 8 および I 1 0 6 に相当する)；又は
- (b) I 9 3、L 9 5 及び P 9 7 (文献 [ 2 0 0 8 P N A S、1 0 5 : 1 0 4 8 3 ] に基づくアミノ酸番号付け；配列番号 2 における I 1 0 6、L 1 0 8 および P 1 1 0 に相当する)。

## 【0015】

特定の実施形態では、ドメインは、HEK 2 9 3 / O S 8 / P D - L 1 細胞又は HEK 2 9 3 / O S 8 / P D - L 2 細胞と共培養した Hu T 7 8 / P D - 1 細胞における IL - 2 放出を誘導し、及び / 又は、HEK 2 9 3 / P D - L 1 細胞又は HEK 2 9 3 / P D - L 2 細胞と共培養した Hu T 7 8 / P 3 Z 細胞における IL - 2 分泌を阻害する。

30

## 【0016】

また、本発明は、配列番号 8 3 - 8 8、特に配列番号 8 7 又は 8 8 のいずれかを含む、抗体 Ig G 4 重鎖エフェクター又は定常領域を提供する。

## 【0017】

また、本発明は、対象 PD - 1 結合ドメインを含む、抗体、F ( a b ) 又は F ( a b )<sub>2</sub> を提供する。

## 【0018】

また、本発明は、配列番号 8 3 - 8 8、特に配列番号 8 7 又は 8 8 を含む Ig G 4 重鎖エフェクター又は定常領域と、対象 PD - 1 結合ドメインと、を含む抗体を提供する。

40

## 【0019】

また、本発明は、対象 PD - 1 結合ドメインをコードするポリヌクレオチド、特に c D N A 配列を提供する。

## 【0020】

また、本発明は、癌またはウイルス感染症の判定を受けた個体、または、PD - 1 拮抗作用を必要とする個体に対象ドメインを投与することを含む、対象ドメインを使用する方法を提供する。

## 【0021】

50

また、本発明は、(a) マウスCD8 のC末端ドメイン(113-220)に融合された抗ヒトCD3モノクローナル抗体OKT3の単鎖可変断片(scfv)(配列番号89);又は(b)ヒトCD3鎖の細胞質ドメインに融合されたヒトPD-1の細胞外及び膜貫通ドメイン(配列番号90)を含む融合タンパク質を提供する。

【0022】

また、本発明は、対象融合タンパク質を使用する方法であって、該融合タンパク質を発現する細胞株で抗PD-1抗体をアッセイ、スクリーニング、または、選択することを含む、方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】PD-1/Fc(上)及びPD-1/His(下)の概略図である。ECD:細胞外ドメイン;L:リンカー;H:Hisタグ;Fc:ヒトIgG4からのFc断片;N:N末端;C:C末端。

【図2】ELISAにおけるヒトPD-1に結合するマウスモノクローナル抗体の用量依存的反応曲線である。マウスモノクローナル抗体は、各図の左上隅に表示されている。モノクローナル抗体317及び517は重鎖及び軽鎖の可変領域において高い相同性を共有している。結合シグナル強度は直接的なOD<sub>450</sub>読み取り(値)によって表される。抗原、PD-1/Hisを50µlの容積でウェルあたり70µgまで増加する濃度で被覆した。この方法は実施例1において説明する。

【図3】FACS分析に基づく、生きている細胞上に発現されたヒトPD-1に結合するマウスmAbの用量依存的反応曲線である。マウス抗体コード及びEC<sub>50</sub>を各パネル上に表示した。MFIは、平均蛍光強度を表す。HuT78/PD-1細胞を、FACSのためにウェル当たり5×10<sup>4</sup>細胞で96ウェルプレート中に懸濁した。実施例1に記載したように、細胞表面標的へのPD-1モノクローナル抗体の結合及びFACS検出を行った。

【図4】抗PD-1モノクローナル抗体の機能的活性をアッセイするために使用される細胞共培養システムの概略図である。T細胞(CD4<sup>+</sup>またはCD8<sup>+</sup>のいずれか)は、PBMCにおけるHuT78/PD-1または初代T細胞を表す。TCR:T細胞受容体;N:核;C:細胞質。

【図5】図HEK293/OS8/PD-L1細胞と共培養したHuT78/PD-1細胞におけるマウスモノクローナル抗体誘導性のIL-2分泌の用量依存的反応曲線である。ベースライン:すべての試験濃度でmIgGによって誘導される平均IL-2放出。トップライン:プリズムソフトウェアによる回帰計算に基づいた最高のIL-2放出。

【図6】図6(A)は、細胞株HEK293/OS8/PD-L1と共培養したPBMC(ドナー19)における抗PD-1モノクローナル抗体によって誘導されたIFN-分泌を示すヒストグラムである。図6(B)は、細胞株HEK293/OS8/PD-L1と共培養したPBMC(ドナー20)における抗PD-1モノクローナル抗体によって誘導されたIFN-分泌を示すヒストグラムである。

【図7】図7(A)及び図7(B)は、エフェクター細胞(NK92MI/PD-1)及び標的細胞(HuT78/PD-1)の共培養による抗PD-1モノクローナル抗体の活性を示す。平均は、代表的な実験の2つのデータ点から算出した。モノクローナル抗体を10µg/mlの濃度に添加した。実施例9に記載したように実験を行った。

【図8】ELISA(上のパネル)及びウエスタンブロット(下のパネル)による抗PD-1モノクローナル抗体のマッピング及び結合エピトープである。WT又はMt PD-1を含有する馴化培地を用いてELISA及びウエスタンブロットによって結合活性を評価した。\*\*はモノクローナル抗体結合活性がWT PD-1の25-50%に減少されたAA残基を示す。\*\*\*はモノクローナル抗体結合活性がWT PD-1の25%未満に減少したAA残基を示す。

【図9】図HEK293/OS8/PD-L1細胞と共培養した別の健康なドナーからの初代ヒトPBMCにおけるヒト化抗PD-1モノクローナル抗体により誘導されたIFN

10

20

30

40

50

- 放出である。

【図10】ヒト化抗PD-1モノクローナル抗体、hu317(A)及びhu326(B)によって増強されたNK92MI/PD-1細胞の細胞毒性を示す。標的肺癌細胞、SK-MES-1/PD-L1は、エフェクター細胞と(T対E)1対2の比率で共培養し、実施例12に記載したようにアッセイした。

【図11】3つの処置群、ピヒクル(PBS)、ヒトIgG(huIgG)および抗PD-1モノクローナル抗体(hu317-1/IgG4mt2)における個々の腫瘍増殖(成長)曲線である。各曲線は、各パネルの右側に数字で示した腫瘍持ちマウスの腫瘍増殖経路を表す。(肝細胞癌株Hep3Bから確立された)Hep3B/OS8/PD-L1細胞を1日目に播種し、PBMCを15日目に移植し、3回分のhu317-1/IgG4mt2を18、28および38日目にそれぞれ注入した。方法については、実施例12に記載されている。

10

【発明を実施するための形態】

【0024】

PD-1は、そのリガンド、PD-L1またはPD-L2と結合すると、免疫細胞において抑制性シグナル伝達を開始する。癌の増殖やウイルス感染の場合に、PD-1シグナル伝達の活性化は、免疫寛容(immune tolerance)を促進して、癌又はウイルス感染細胞が免疫監視(immune surveillance)から逃れるようにし、癌転移又はウイルス負荷(viral load)増加をももたらす。治療薬によるPD-1媒介細胞内シグナル伝達の阻害は、T細胞、B細胞およびNK細胞を含む免疫細胞を活性化することで、癌細胞増殖またはウイルス感染を阻害する免疫細胞機能を増強させるとともに、免疫監視および免疫記憶機能を回復させて、これらのヒトの疾患を治療する。

20

【0025】

本発明は、免疫細胞においてがリガンドによって誘導されるPD-1媒介性細胞内シグナル伝達に拮抗する機能を有する抗体を提供する。マウス抗PD-1抗体は、フレームワーク領域内のヒト抗体と高度に類似するようにヒト化された。変異されたヒトIgG4変異体フォーマットに作製された完全な抗体は、エフェクター機能および物理化学的特性の面でユニークな特徴を有している。開示された抗PD-1抗体は、癌の治療、ウイルス感染の制御、及び、悪化した免疫寛容に構造的に関与する他のヒトの疾患における治療的使用に適している。

30

【0026】

定義

【0027】

文脈が他に示さない限り、用語「抗体」は最も広い意味で使われ、具体的に、抗体(全長モノクローナル抗体を含む)およびPD-1を認識できる抗体断片を含む。抗体分子は、通常、単一特異性であるが、独自特異性(idiospecific)、異種特異性(heterospecific)、または多特異性(polyspecific)としても記載され得る。抗体分子は、抗原上の特定の抗原決定基またはエピトープに対する特異的結合部位によって結合する。「抗体断片」とは、全長抗体の一部を含み、一般的にその抗原結合領域または可変領域である。抗体断片の例として、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、及びFv断片；二特異性抗体(diabody)；線形抗体；単鎖抗体分子；および抗原断片から形成された多特異性抗体などがある。

40

【0028】

モノクローナル抗体(mAb)は、当業者に周知の方法によって得ることができる。例えば、文献[Kohler et al (1975)]；米国特許4,376,110；文献[Ausubel et al (1987-1999)]；文献[Harlow et al (1988)]；及び文献[Colligan et al (1993)]参照。本発明のモノクローナル抗体は、IgG、IgM、IgE、IgAを含む任意の免疫グロブリンクラス、及びそれらの任意のサブクラスであってもよい。モノクローナ

50

ル抗体を産生するハイブリドーマは、*in vitro*または*in vivo*で培養され得る。モノクローナル高力価の抗体は、個々のハイブリドーマからの細胞をマウス、例えば、プリスティーン・プライムド (*pristine-primed*) Balb/cマウスに腹腔内注射し、所望のモノクローナル抗体を高濃度で含有する腹水を産生する *in vivo* 産生によって得ることができる。アイソタイプ IgM または IgG のモノクローナル抗体は、当業者に周知のカラムクロマトグラフィー法を用いて、腹水から、または培養上清から精製することができる。

【0029】

「単離 (された) ポリヌクレオチド」とは、天然状態でそれに隣接する配列から分離されたポリヌクレオチドセグメントまたは断片、例えば、通常その断片に隣接する配列 (例えば、天然のゲノム中の断片に隣接する配列) から取り除かれた DNA 断片をいう。したがって、この用語は、例えば、ベクター、自己複製プラスミドまたはウイルス、または原核生物もしくは真核生物のゲノム DNA へ組み込まれたか、他の配列とは独立した分離分子 (例えば、cDNA 断片又はゲノム断片、又は PCR 又は制限酵素消化によって産生された cDNA 断片) として存在する、組換え DNA を含む。また、追加のポリペプチド配列をコードするハイブリッド遺伝子の一部である組換え DNA を含む。

10

【0030】

「構造体 (*construct*)」は、1 以上のポリヌクレオチド分子が機能的に作動可能に (*operative*) 連結された、即ち、作動可能に連結された、ポリヌクレオチド分子を含む、任意の供給源に由来する、ゲノムの組込または自己複製できる、直鎖状または環状の一本鎖または二本鎖 DNA または RNA ポリヌクレオチド分子、プラスミド、コスミド、ウイルス、自己複製性ポリヌクレオチド分子、またはファージ等任意の組換えポリヌクレオチド分子を意味する。組換え構造体は、典型的に、意図された宿主細胞においてポリヌクレオチドの転写を指令する転写開始調節配列に作動可能に連結された本発明のポリヌクレオチドを含むであろう。異種および非異種 (すなわち、内因性) プロモーターは、本発明の核酸の発現を指示するよう使用され得る。

20

【0031】

「ベクター」とは、軽質転換、すなわち、宿主細胞への異種 DNA の導入のために使用することができる任意の組換えポリヌクレオチド構造体を意味する。ベクターの一種に、付加的な DNA セグメントを連結することができる環状二本鎖 DNA ループを指す「プラスミド」がある。別のタイプのベクターとして、付加的な DNA セグメントがウイルスゲノムに連結され得るウイルスベクターである。特定のベクターは、それらが導入される宿主細胞内で自己複製可能である (例えば、細菌性複製起点及びエピソーム哺乳動物ベクターを有する細菌ベクター)。他のベクター (例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター) は、宿主細胞への導入の際に宿主細胞に組み込まれ、それによって宿主ゲノムと共に複製される。さらに、特定のベクターは、それらが作動可能に連結された遺伝子の発現を指令することができる。このようなベクターを本願明細書では「発現ベクター」と呼ぶ。

30

【0032】

本明細書で使用される「発現ベクター」とは、宿主細胞への形質転換 (*transform*)、トランスフェクト (*transfect*)、又は、形質導入された (*transduce*) ときに、目的の遺伝子を複製及び発現することができる核酸分子をいう。発現ベクターは、該ベクターを確実に維持し、必要に応じて、宿主内で増幅させるために複製起点と、1 以上の表現型選択マーカーと、を含む。さらに、発現ベクターは、細胞内のポリペプチドの発現を駆動するプロモーターを含む。適切な発現ベクターは、例えば、市販されている種々の pUC プラスミド又は pBR322 に由来するプラスミドであってもよい。他の発現ベクターは、バクテリオファージ、ファージミド、またはコスミド発現ベクターに由来するものであってもよい。

40

【0033】

本発明の更なる実施形態

【0034】

50

特定の実施形態において、本発明は、本明細書に開示されたマウスハイブリドーマクローのスクリーニングから同定されたマウスモノクローナル抗体を提供する。

【0035】

他の実施形態において、本発明は、以下のポリヌクレオチドおよびタンパク質配列の組成を提供する：

【0036】

a) マウスモノクローナル抗体 3 1 7 の重鎖可変領域をコードする c D N A 配列、配列番号 3 ；

【0037】

b) マウスモノクローナル抗体 3 1 7 または  $\mu$  3 1 7 \_ V h の重鎖可変領域のタンパク質配列 ( 配列番号 4 ) ；

【0038】

c) マウスモノクローナル抗体 3 1 7 の軽鎖可変領域をコードする c D N A 配列、配列番号 5 ；

【0039】

d) マウスモノクローナル抗体 3 1 7 または  $\mu$  3 1 7 \_ V k の軽鎖可変領域のタンパク質配列 ( 配列番号 6 ) ；

【0040】

e) マウスモノクローナル抗体 3 2 6 の重鎖可変領域をコードする c D N A 配列、配列番号 7 ；

【0041】

f) マウスモノクローナル抗体 3 2 6 または  $\mu$  3 2 6 \_ V h の重鎖可変領域のタンパク質配列 ( 配列番号 8 ) ；

【0042】

g) マウスモノクローナル抗体 3 2 6 の軽鎖可変領域をコードする c D N A 配列、配列番号 9 ；

【0043】

h) マウスモノクローナル抗体 3 2 6 または  $\mu$  3 2 6 \_ V k の軽鎖可変領域のタンパク質配列 ( 配列番号 1 0 ) ；

【0044】

一態様において、本発明は、 $\mu$  3 1 7 及び  $\mu$  3 2 6 の C D R 配列を含む、標的抗原 P D - 1 への結合を媒介する相補性決定領域 ( C D R ) 配列を含む組成物を提供する。

【0045】

a)  $\mu$  3 1 7 重鎖の C D R 1 (  $\mu$  3 1 7 H - C D R 1 ) は G F S L T S Y G V H のアミノ酸 ( 配列番号 1 1 ) を含む。

【0046】

b)  $\mu$  3 1 7 H - C D R 2 は V I W A G G S T N Y N S A L M S のアミノ酸配列 ( 配列番号 1 2 ) を含む。

【0047】

c)  $\mu$  3 1 7 H - C D R 3 は A R A Y G N Y W Y I D V のアミノ酸配列 ( 配列番号 1 3 ) を含む。

【0048】

d)  $\mu$  3 1 7 軽鎖の C D R 1 (  $\mu$  3 1 7 L - C D R 1 ) は K A S Q S V S N D V A のアミノ酸配列 ( 配列番号 1 4 ) を含む。

【0049】

e)  $\mu$  3 1 7 L - C D R 2 は Y A F H R F T のアミノ酸配列 ( 配列番号 1 5 ) を含む。

【0050】

f)  $\mu$  3 1 7 L - C D R 3 は H Q A Y S S P Y T のアミノ酸配列 ( 配列番号 1 6 ) を含む。

10

20

30

40

50

- 【 0 0 5 1 】  
g) m u 3 2 6 H - C D R 1 は G Y T F T N Y G M N のアミノ酸配列 ( 配列番号 1 7 ) を含む。
- 【 0 0 5 2 】  
h) m u 3 2 6 H - C D R 2 は W I N N N N G E P T Y A E E F K G のアミノ酸配列 ( 配列番号 1 8 ) を含む。
- 【 0 0 5 3 】  
i) m u 3 2 6 H - C D R 3 は A R D V M D Y のアミノ酸配列 ( 配列番号 1 9 ) を含む。
- 【 0 0 5 4 】 10  
j) m u 3 2 6 L - C D R 1 は R A S E S V D N Y G Y S F M H のアミノ酸配列 ( 配列番号 2 0 ) を含む。
- 【 0 0 5 5 】  
k) m u 3 2 6 L - C D R 2 は R A S N L E S のアミノ酸配列 ( 配列番号 2 1 ) を含む。
- 【 0 0 5 6 】  
l) m u 3 2 6 L - C D R 3 は Q Q S K E Y P T のアミノ酸配列 ( 配列番号 2 2 ) を含む。
- 【 0 0 5 7 】 20  
別の実施形態において、本発明は、以下を含めた、マウスのモノクローナル抗体 m u 3 1 7 及び m u 3 2 6 から生成されたヒト化モノクローナル抗体の配列を含む組成物を提供する：
- 【 0 0 5 8 】  
a) ヒト化モノクローナル抗体 h u 3 1 7 - 4 B 6 は、以下によってコードされる配列番号 2 4 としての重鎖可変領域 ( V h ) のタンパク質配列を含む：
- 【 0 0 5 9 】  
b) h u 3 1 7 - 4 B 6 \_\_ V h の c D N A ( 配列番号 2 3 ) ；
- 【 0 0 6 0 】 30  
c) ヒト化モノクローナル抗体 h u 3 1 7 - 4 B 6 は、以下によってコードされる配列番号 2 6 としての軽鎖可変領域 ( V k ) のタンパク質配列を含む：
- 【 0 0 6 1 】  
d) h u 3 1 7 - 4 B 6 の c D N A ( 配列番号 2 5 ) ；
- 【 0 0 6 2 】  
e) ヒト化 m A b h u 3 2 6 - 4 A 3 は、以下によってコードされる配列番号 2 8 としての V h のタンパク質配列を含む：
- 【 0 0 6 3 】  
f) h u 3 2 6 - 4 A 3 - V h の c D N A ( 配列番号 2 7 ) ；
- 【 0 0 6 4 】 40  
g) ヒト化モノクローナル抗体 h u 3 2 6 - 4 A 3 は、以下によってコードされる配列番号 3 0 としての V k のタンパク質配列を含む：
- 【 0 0 6 5 】  
h) h u 3 2 6 - 4 A 3 \_\_ V k の c D N A ( 配列番号 2 9 ) ；
- 【 0 0 6 6 】  
i) h u 3 1 7 - 4 B 2 \_\_ V h のタンパク質配列 ( 配列番号 4 3 ) および h u 3 1 7 - 4 B 2 \_\_ V k のタンパク質 ( 配列番号 4 4 ) ；
- 【 0 0 6 7 】  
j) h u 3 1 7 - 4 B 5 \_\_ V h のタンパク質配列 ( 配列番号 4 5 ) および h u 3 1 7 - 4 B 5 \_\_ V k のタンパク質配列 ( 配列番号 4 6 ) ；
- 【 0 0 6 8 】 50  
k) h u 3 1 7 - 1 \_\_ V h のタンパク質配列 ( 配列番号 4 8 ) および h u 3 1 7 - 1 \_\_

V h をコードする c D N A ( 配列番号 4 7 ) ;

【 0 0 6 9 】

l ) h u 3 1 7 - 1 \_\_ V k のタンパク質配列 ( 配列番号 5 0 ) および h u 3 1 7 - 1 \_\_ V k をコードする c D N A ( 配列番号 4 9 ) ;

【 0 0 7 0 】

m ) h u 3 2 6 - 3 B 1 \_\_ V h のタンパク質配列 ( 配列番号 5 1 ) および h u 3 2 6 - 3 B 1 \_\_ V k のタンパク質配列 ( 配列番号 5 2 ) ;

【 0 0 7 1 】

n ) h u 3 2 6 - 3 G 1 \_\_ V h のタンパク質配列 ( 配列番号 5 3 ) および h u 3 2 6 - 3 G 1 \_\_ V k のタンパク質配列 ( 配列番号 5 4 ) ;

【 0 0 7 2 】

o ) h u 3 2 6 - 1 \_\_ V h のタンパク質配列 ( 配列番号 5 6 ) および h u 3 2 6 - 1 \_\_ V h をコードする c D N A ( 配列番号 5 5 ) ;

【 0 0 7 3 】

p ) h u 3 2 6 - 1 \_\_ V k のタンパク質配列 ( 配列番号 5 8 ) および h u 3 2 6 - 1 \_\_ V k をコードする c D N A ( 配列番号 5 7 ) ;

【 0 0 7 4 】

q ) m u 3 1 7 から産生される他のヒト化モノクローナル抗体のタンパク質配列 ( 配列番号 6 3 - 7 4 ) ;

【 0 0 7 5 】

r ) m u 3 2 6 から産生される他のヒト化モノクローナル抗体のタンパク質配列 ( 配列番号 7 5 - 8 2 ) 。

【 0 0 7 6 】

一側面において、本発明は、ヒト化モノクローナル抗体の C D R 配列を含む組成物を提供する。C D R は、h u 3 1 7 又は h u 3 2 6 等の同じ系列のヒト化モノクローナル抗体間で共有され得る ( 表 1 5 ~ 1 8 参照 ) 。非冗長の C D R は以下の通りである :

【 0 0 7 7 】

a ) 重鎖におけるヒト化モノクローナル抗体、h u 3 1 7 及び m u 3 1 7 を通して共有される H - C D R 1 配列、G F S L T S Y G V H ( 配列番号 3 1 ) ;

【 0 0 7 8 】

b ) 重鎖におけるヒト化モノクローナル抗体、h u 3 1 7 及び m u 3 1 7 を通して共有される H - C D R 3 配列、A R A Y G N Y W Y I D V ( 配列番号 3 3 ) ;

【 0 0 7 9 】

c ) 軽鎖におけるヒト化モノクローナル抗体、h u 3 1 7 - 4 B 2 、 h u 3 1 7 - 4 B 5 、 及び h u 3 1 7 - 4 B 6 を通して共有される L - C D R 1 配列、K S S E S V S N D V A ( 配列番号 3 4 ) ;

【 0 0 8 0 】

d ) 軽鎖におけるヒト化モノクローナル抗体、h u 3 1 7 及び m u 3 1 7 を通して共有される L - C D R 2 配列、Y A F H R F T ( 配列番号 3 5 ) ;

【 0 0 8 1 】

e ) 軽鎖におけるヒト化モノクローナル抗体、h u 3 1 7 及び m u 3 1 7 を通して共有される L - C D R 3 配列、H Q A Y S S P Y T ( 配列番号 3 6 ) ;

【 0 0 8 2 】

f ) h u 3 1 7 - 4 B 6 \_\_ V h における H - C D R 2 配列、V I Y A D G S T N Y N P S L K S ( 配列番号 3 2 ) ;

【 0 0 8 3 】

g ) h u 3 1 7 - 4 B 2 \_\_ V h 及び h u 3 1 7 - 4 B 5 \_\_ V h における H - C D R 2 配列、V I Y A G G S T N Y N P S L K S ( 配列番号 6 0 ) ;

【 0 0 8 4 】

h ) h u 3 1 7 - 1 \_\_ V h における H - C D R 2 配列、V I W A G G S T N Y N P S L

10

20

30

40

50

K S ( 配列番号 5 9 ) ;

【 0 0 8 5 】

h u 3 1 7 - 1 \_\_ V k における L - C D R 1 配列、 K A S Q S V S N D V A ( 配列番号 1 1 ) ;

【 0 0 8 6 】

j ) 重鎖におけるヒト化モノクローナル抗体、 h u 3 2 6 及び m u 3 2 6 を通して共有される H - C D R 1 配列、 G Y T F T N Y G M N ( 配列番号 3 7 ) ;

【 0 0 8 7 】

k ) 重鎖におけるヒト化モノクローナル抗体、 h u 3 2 6 及び m u 3 2 6 を通して共有される H - C D R 3 配列、 A R D V M D Y ( 配列番号 3 9 ) ;

【 0 0 8 8 】

l ) 軽鎖におけるヒト化モノクローナル抗体、 h u 3 2 6 及び m u 3 2 6 を通して共有される L - C D R 1 配列 R A S E S V D N Y G Y S F M H ( 配列番号 4 0 ) ;

【 0 0 8 9 】

m ) 軽鎖におけるヒト化モノクローナル抗体、 h u 3 2 6 及び m u 3 2 6 を通して共有される L - C D R 2 配列、 R A S N L E S ( 配列番号 4 1 ) ;

【 0 0 9 0 】

n ) 軽鎖におけるヒト化モノクローナル抗体、 h u 3 2 6 及び m u 3 2 6 を通して共有される L - C D R 3 配列、 Q Q S K E Y P T ( 配列番号 4 2 ) 。

【 0 0 9 1 】

o ) h u 3 2 6 \_\_ 4 A 3 \_\_ V h における H - C D R 2 配列、 W I N N N N A E P T Y A Q D F R G ( 配列番号 3 8 ) ;

【 0 0 9 2 】

p ) h u 3 2 6 \_\_ 1 及び他の h u 3 1 7 モノクローナル抗体の V h における H - C D R 2 配列、 W I N N N N G E P T Y A Q G F R G ( 配列番号 6 2 ) 。

【 0 0 9 3 】

別の側面において、本発明は、抗原上のヒト化抗 P D - 1 モノクローナル抗体の特定の結合エピトープ、およびその機能的提供を提供する。リガンド結合に必要な P D - 1 における 6 つの重要なアミノ酸 ( A A ) 残基を個別に変異させ、変異体および野生型 P D - 1 タンパク質を用いて、結合エピトープを評価した。変異によってその抗体結合が有意に損なわれた残基を、重要な結合エピトープとして認識する。モノクローナル抗体、 h u 3 1 7 - 4 B 5 及び h u 3 1 7 - 4 B 6 の重要な結合エピトープは K 4 5 および I 9 3 であり ( 2 0 0 8 P N A S , 1 0 5 : 1 0 4 8 3 に基づくアミノ酸番号付け ; 配列番号 2 における K 5 8 及び I 1 0 6 に相当する ( 等価物 ) ) ; モノクローナル抗体 h u 3 2 6 - 3 B 1 及び h u 3 1 7 - 4 A 3 の有意な結合エピトープは I 9 3 、 L 9 5 及び P 9 7 である ( 2 0 0 8 P N A S , 1 0 5 : 1 0 4 8 3 に基づくアミノ酸番号付け ; 配列番号 2 における I 1 0 6 , L 1 0 8 及び P 1 1 0 の等価物 ) 。

【 0 0 9 4 】

さらなる別の側面において、本発明は、好ましいエフェクター機能および物理化学的性質を示した、ヒト化抗 P D - 1 モノクローナル抗体を含め、対象の抗体の可変領域に連結され得る組換えヒト I g G 4 変異体の定常領域配列を含む組成物を提供する。その配列は以下の通りである :

【 0 0 9 5 】

I g G 4 m t 1 0 の定常領域配列 ( 配列番号 8 8 ) ;

a ) I g G 4 m t 1 の参照配列 ( 配列番号 8 3 ) ;

b ) I g G 4 m t 2 の参照配列 ( 配列番号 8 4 ) ;

c ) I g G 4 m t 6 の参照配列 ( 配列番号 8 5 ) ;

d ) I g G 4 m t 8 の参照配列 ( 配列番号 8 6 ) ;

e ) I g G 4 m t 9 の参照配列 ( 配列番号 8 7 ) 。

【 0 0 9 6 】

10

20

30

40

50

別の実施形態において、本発明は、OS8（T細胞活性化分子）とPD-1リガンドを共発現する、安定な細胞株、HEK293/OS8/PD-L2又はHEK293/OS8/PD-L1を産生する組換え融合タンパク質OS8を発現するプラスミドを用いて、抗PD-1抗体機能を分析する方法を提供する。この細胞株を用いて、共培養によってT細胞及びPBMCを結合して、抗PD-1モノクローナル抗体の機能を評価した（実施例3および実施例4参照）。あるいは、組換え融合タンパク質、P3Zを発現する別のプラスミドを用いて安定な細胞株、HuT78/P3Zを作製した。ここで、P3Zは、分子センサーおよびシグナル伝達メディエーターとして機能する。PD-1リガンドがP3Zに結合したとき、それは細胞内シグナルを送ってHuT78細胞におけるIL-2の放出を活性化する。このシステムを用いて、抗PD-1モノクローナル抗体の阻害効果を評価してもよい（実施例3参照）。

10

**【0097】**

一態様において、本発明は、以下のように組換え融合タンパク質のアミノ酸配列を含む組成物を提供する。

- a) OS8のタンパク質配列（配列番号89）；
- b) P3Zのタンパク質配列（配列番号90）

**【0098】**

別の側面において、本発明は、本明細書に記載された組換え融合タンパク質を発現する安定な細胞株を生成する方法、および抗PD-1モノクローナル抗体の機能的活性を定量的にアッセイするためにシステムを使用する方法を提供する。

20

**【0099】**

別の実施形態において、本発明は、対象のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを提供する。このポリヌクレオチドは、発現のために異種転写調節配列に作動可能に連結されていてもよく、ベクター、細胞等に組み込まれていてもよい。

**【0100】**

別の実施形態において、本発明は、PD-1媒介性シグナル伝達を抑制する機能、及び、癌細胞などの標的細胞に対するサイトカイン分泌および細胞毒性を含む免疫応答のカスケードを引き起こす免疫細胞を活性化する機能を有する、hu317-4B6、hu317-4B5、hu317-4B2等、及びhu326-4A3、hu326-3B1、hu326-3G1等を含む、マウス抗PD-1抗体及びヒト化バージョン抗PD-1抗体、並びに、該抗体のそのような機能的提供を提供する。

30

**【0101】**

一態様において、本発明は、癌細胞およびウイルス感染のクリアランスのために免疫応答シグナルを増幅し、免疫系を動員し、免疫エフェクター細胞として作用する機能を有する、ヒトT細胞、NK細胞およびPBMCを含む、PD-1を発現するいくつかのタイプの免疫細胞を活性化するヒト化抗PD-1抗体、及び、該抗体のそのような機能的提供を提供する。

**【0102】**

別の側面において、ヒト化抗PD-1モノクローナル抗体は、疾患の進行、特に、癌及びウイルス感染症をもたらす、PD-1媒介細胞内シグナル伝達による免疫細胞の抑制に関与するヒトの疾患を治療するための治療薬として使用される。

40

**【0103】**

本発明の組成物は、癌、神経変性疾患、及び、感染性疾患、特に、ウイルス感染性疾患、及びヒトPD-1の不適切または有害な発現が該状態の病因又は病態の要素である他の疾患の治療に有用である。したがって、本発明は、抗PD-1タンパク質で、それを必要とする対象（被験体）における癌を治療し、または、腫瘍の進行を阻害する方法を提供する。本発明はさらに、対象において癌を治療しまたは腫瘍の進行を阻害するための医薬の製造における対象のポリヌクレオチドの使用を提供する。

**【0104】**

本発明は、列挙された特定の実施形態の全ての組み合わせを含む。更なる実施形態及び

50

本発明の適用可能な全範囲は、以下の詳細な説明から明らかになるであろう。本発明の精神および範囲内における種々の変更および修正が当業者に明らかであるために、本発明の好ましい実施形態を示してはいるが、発明の詳細な説明および具体例はあくまで例示として設けられたことを理解すべきである。引用文献を含めて本明細書に言及された文献、特許、特許出願すべては、ここに全ての目的のためにその全体が参考として援用される。

【実施例】

【0105】

実施例1 抗PD-1モノクローナル抗体の作製

【0106】

抗PD-1モノクローナル抗体(mAb)は、従来のハイブリドーマ融合技術(マイナーな変更あり)に基づいて作製した。文献[Kohler and Milstein 1976 Eur J Immunol 6:511-519]、文献[de St Groth and Sheidegger 1980, J Immunol Methods 35:1-21]、及び文献[Mechetner 2007 Methods Mol Biol 378:1-13]参照。酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)および蛍光活性化セルソーティング(FACS)アッセイで高い結合活性を有するモノクローナル抗体を、さらなる特徴付けのために選択した。

【0107】

免疫化および結合アッセイのためのPD-1組換えタンパク質

【0108】

全長ヒトPD-1 cDNAを含む発現プラスミドは、Origene社(カタログ番号SC117011、NCBI受託番号:NM\_005018.1、北京、中国)より入手した。PD-1のアミノ酸(AA)1~168からなる細胞外ドメイン(配列番号1、配列番号2)をPCR増幅し、ヒトIgG4重鎖のFcドメイン又はHis<sub>6</sub>タグのいずれかに融合されたC末端を有するpcDNA3.1系発現ベクター(インビトロジェン社、カールスバッド、カリフォルニア州、米国)にてサブクローニングして、2つの組換え融合タンパク質発現プラスミド、PD-1-EC/HisおよびPD-1-EC/Fc(PD-1/HisおよびPD-1/Fcと略称する)を得た。免疫原/抗原タンパク質を概略的に図1に示す。組換え融合タンパク質の産生のために、PD-1/HisおよびPD-1/Fcプラスミドを、1~3リットルの培地(インビトロジェン社)中で一時的に293-F細胞にトランスフェクトし、回転式シェーカーを備えたCO<sub>2</sub>インキュベーター中で5~7日間培養した。組換えタンパク質を含有する上清を収集し、15000gで30分間遠心分離して除去した。PD-1/Hisを、Ni-セファロース・ファスト・フロー(カタログ番号17531801、GEライフサイエンス社、上海、中国)を用いる固定化金属アフィニティークロマトグラフィーに続くHiLoad16/60 Superdex 200カラム(カタログ番号17106901、GEライフサイエンス社、上海、中国)を用いるサイズ排除クロマトグラフィーによって精製した。PD-1/Fcは、プロテインG・セファロース・ファスト・フロー・カラム(カタログ番号17531801、GEライフサイエンス社)を用いて精製した。PD-1/HisおよびPD-1/Fcタンパク質の両方をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に対して透析し、小アリコートで-80の冷凍庫に保存した。

【0109】

ヒトPD-L1をコードするcDNAは、公表された配列(NCBI受託番号NM\_014143)に基づいてGenescript(南京、中国)によって化学的に合成した。PD-L2発現プラスミドは、Origene社(カタログ番号SC108873、NCBI受託番号NM\_025239.2、北京、中国)から購入した。両方のcDNAは、pcDNA3.1/ハイグロマイシン(カタログ番号V870-20、インビトロジェン社)およびpcDNA3.1/V5-His(カタログ番号V810-20、インビトロジェン社)にてそれぞれクローニングした。

【0110】

10

20

30

40

50

## 安定な発現細胞株

## 【0111】

ヒトPD-1、PD-L1またはPD-L2を発現する安定な細胞株は、PD-1、PD-L1およびPD-L2を含有するpcDNA3.1プラスミドのHuT78(ATCC、マナサス、バージニア州、米国)およびHEK293(ATCC)へそれぞれトランスフェクションした後、1ml当たり200 $\mu$ gのハイグロマイシン(カタログ番号10687-010、インビトロジェン社)又は1mgのG418(シグマ社)を含有する培地で選択することで、確立した。単クローンは、従来の方法、培地 ウェル表面から単一のコロニーのピックアップ又は限界希釈のいずれかによって単離した。すべてのコロニーを、抗PD-1、PD-L1、及び、PD-L2抗体(カタログ番号12-9969、17-5983、12-5888、イーバイオサイエンス、サンディエゴ、米国)を用いたウエスタンブロットおよびFACS分析によりそれぞれスクリーニングし、トップ発現クローンを、ハイブリドーマモノクローナル抗体をスクリーニングするFACS結合アッセイのために選択し、機能分析に使用した。

10

## 【0112】

免疫化、ハイブリドーマ融合およびクローニング

## 【0113】

8~12週齢のBalb/cマウス(BEIJING HFK BIO SCIENCE CO., LTD、北京、中国)に、5 $\mu$ gのPD-1/Fcを含有する含むアジュバント100 $\mu$ l(カタログ番号KX0210041、Kang Bi Quan、北京、中国)を皮下免疫した。免疫化は、上記免疫原を3週間おきに2回注射することで行った。第2ラウンドの免疫化後2週間の時点でマウス血清をFACS(以下の項)によってPD-1結合を評価した。血清中高力価の抗PD-1抗体を有するマウスを選択し、アジュバントの不在下で50 $\mu$ gのPD-1/Fcを腹腔内に追加免疫した。その三日後に、標準的な技術(文献[Gefter, M.L. et al., 1977 Somat Cell Genet, 3:231-236]参照)を用いて、脾細胞を単離し、マウス骨髓腫細胞株、SP2/0細胞(ATCC)と融合した。

20

## 【0114】

ELISAおよびFACSによる抗体のPD-1結合活性の評価

## 【0115】

文献[Flanagan, M.L. et al. 2007 Methods in Molecular Biology 378:33-52]に記載された酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)(一部変更あり)によって、ハイブリドーマクローンの上清を最初にスクリーニングした。簡単に言えば、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)50 $\mu$ l中のPD-1/HisまたはPD-1/Fcタンパク質50~200ngを96ウェルプレート(Shenzhen JinCanHua Industry Co., Ltd、深セン、中国)にウェル単位でコーティングした。HRP連結抗マウスIgG抗体(カタログ番号7076S、Cell Signaling Technology、米国及び中国上海)及び化学発光試薬(カタログ番号PA107-01、TIANGEN、中国)を用いて、ELISAシグナルを検出及び現像して、波長450nmでプレートリーダー(PHREASTAR FS、BMG LABTECH、ドイツ)にて読み出した。ELISA陽性の抗体産生クローンを、従来の方法を用いる蛍光活性化細胞ソーティング(FACS)によってさらに確認した。前述したPD-1安定発現細胞株、HuT78/PD-1(10<sup>5</sup>細胞/ウェル)を、V底96ウェルプレート(カタログ番号3897、コーニング社、米国及び中国上海)で抗PD-1ハイブリドーマからの上清で染色した。ヒトFc受容体を遮断するために、細胞をヒトIgG(20 $\mu$ g/ml)(カタログ番号H11296、ライフホルダー社、米国及び中国上海)でプレインキュベートした。PD-1抗体は、DyLight(登録商標)649標識ヤギ抗マウスIgG抗体(カタログ番号405312、バイオレジェンド社、サンディエゴ、米国)で検出し、細胞蛍光をフローサイトメータ(Guava easyCyte 8HT、Merck-Milli

30

40

50

porre社、米国及び中国上海)を用いてモニターした。

【0116】

ELISAおよびFACSアッセイの両方で陽性のシグナルを示したハイブリドーマ細胞の馴化培地(conditioned media)を機能分析に供して、ヒト免疫細胞系アッセイ(本明細書中)で良好な機能的活性を有する抗体を同定した。陽性の機能的活性を有する抗体をさらにサブクロニングし、特徴付けした。

【0117】

無血清または低血清培地へのサブクロニングおよび適応

【0118】

ELISA、FACSおよび機能分析を介した一次スクリーニングからの陽性ハイブリドーマクローンを従来の限界希釈法によってサブクロニングした。各々の陽性クローンを、96ウェルプレートにプレートし、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で10%ウシ胎児血清(FBS、カタログ番号SH30084.03、Hyclone社、北京、中国)を有するRPMI1640培地(カタログ番号SH30809.01B、Hyclone社、上海、中国)中で培養した。各限界希釈プレートからの3つのサブクローンを選択し、FACSおよび機能分析によって特徴付けした。機能分析を介して選択されたサブクローンをモノクローナル抗体と定義した。トップサブクローンは、1-3%のFBSを有するCDM4モノクローナル抗体培地(カタログ番号SH30801.02、Hyclone社)での増殖に適していた。

10

【0119】

モノクローナル抗体の発現及び精製

20

【0120】

マウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞または組換え抗体プラスミドでトランスフェクトされた293-F細胞(カタログ番号R79007、インビトロジェン社)のいずれかを、37のCO<sub>2</sub>インキュベーター内でそれぞれCDM4モノクローナル抗体培地(カタログ番号SH30801.02、Hyclone社)又はFreestyle293発現培地(カタログ番号12338018、インビトロジェン社)にて5~7日間培養した。全ての細胞および細胞破片を除去する10000gでの30分間の遠心分離によって馴化培地を収集し、精製前に0.22μm膜を通して濾過した。製造業者のガイドに従ってマウスのまたは組換え抗体をプロテインAカラム(カタログ番号17127901、GEライフサイエンス社)に適用し、それに結合させ、PBSで洗浄し、20mMのクエン酸、150mMの塩化ナトリウムを含有する緩衝液(pH3.5)中で溶出させた。溶出した物質は、1MトリスpH8.0で中和され、通常90%超の純度の抗体を含有した。プロテインA親和性精製された抗体は、PBSに対して透析するか、または、HiLoad16/60Superdex200カラム(カタログ番号17531801、GEライフサイエンス社)を用いてさらに精製して凝集物を除去した。280nmで吸光度を測定することにより、または、標準として定義された濃度のウシIgG(カタログ番号23212、Thermo Scientific社)を用いるブラッドフォードアッセイ(カタログ番号1856210、Thermo Scientific社、ロックフォード、イリノイ州、米国)により、タンパク質濃度を測定した。精製された抗体を-80の冷凍庫の中にアリコートで保存した。

30

40

【0121】

実施例2 抗PD-1抗体間の結合活性の比較

【0122】

我々は、数千のハイブリドーマクローンをスクリーニングして、高い特異性と強度をもってヒトPD-1に結合するいくつかのトップモノクローナル抗体(mAb)を同定した。ELISAアッセイ(図2)に示すように、3つのトップ抗体がかかる結合強度及び特異性を引き出した。FACS解析の結果から、選択されたモノクローナル抗体が細胞表面上に発現された天然(native)PD-1タンパク質に結合することが分かった。マウスモノクローナル抗体317(mu317)、mu326及びmu150は、濃度依存

50

的な結合活性を示し、それらの結合  $EC_{50}$  (50% 活性における有効濃度) はコントロール  $\mu 55$  よりも有意に低かった (図 3)。

【0123】

表面プラズモン共鳴 (SPR) によりモノクローナル抗体の結合親和性を評価する。

【0124】

ELISA および FACS における高い結合活性と共に、細胞系アッセイ (本明細書中) における強力な機能的活性を有するモノクローナル抗体を、リアルタイム結合反応における結合速度定数について調べた。マウス抗 PD-1 モノクローナル抗体を、プロテイン A フローカラム (カタログ番号 17531801、GE ライフサイエンス社) に続く Hi Load 16/60 Superdex 200 カラム (カタログ番号 17106901、GE ライフサイエンス社) を用いる排除 (exclusion) クロマトグラフィーによってハイブリドーマ上清から精製した。精製した抗 PD-1 抗体は、PBS 中で 0.5 mg/ml まで濃縮し、-80 の冷凍庫の中にアリコートで保存した。

10

【0125】

PD-1 モノクローナル抗体の結合親和性を測定するために、BIAcore (登録商標) T-200 装置 (GE ライフサイエンス社) を用いて HBS-N 緩衝液 (10 mM の HEPES pH 7.4、0.15 M の NaCl、3 mM の EDTA、0.005% v/v 界面活性剤 P20、GE ヘルスケア社) の中で SPR 測定を実施した。抗マウス FcCM5 バイオセンサーチップ (GE ヘルスケア社) は、標準的な第一級アミンカップリングプロトコルを使用して作成した。0.3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の PD-1 モノクローナル抗体を 10  $\mu\text{l}/\text{分}$  で 1 分間抗マウス Fc 表面上に捕捉した。3.3 nM から 120 nM までの連続希釈液中 PD-1/Fc を 30  $\mu\text{l}/\text{分}$  で 3 分間抗体結合表面上に注入してから解離相が 10 分間続く。会合速度 ( $K_a$  又は  $k_{on}$ ) および解離速度 ( $K_d$  又は  $k_{off}$ ) を 1 対 1 ラングミュア結合モデル (BIA 評価ソフトウェア、GE ライフサイエンス社) を用いて計算した。平衡解離定数 ( $K_D$ ) を比率  $k_{off}/k_{on}$  として算出した。

20

【0126】

表 1 に示すように、 $\mu 326$  及び  $\mu 517$  の両方、 $\mu 317$  に関連する同族系列ファミリー員は、 $\mu 134$  よりも有意に良好な、それぞれ 0.324 nM および 0.289 nM に相当するサブナノモルの  $K_D$  を持っている。 $k_{on}$  速度は表 1 に示す 3 つのモノクローナル抗体間で類似していたが、 $k_{off}$  速度は有意に異なり、 $\mu 134$  においてより速い解離速度が観察された。

30

【0127】

【表 1】

特定トップ抗体の結合定数

mAb	$K_{on}$ ( $M^{-1}, s^{-1}$ )	$K_{off}$ (s)	$K_D$ (M)
$\mu 326$	$2.4 \times 10^5$	$7.79 \times 10^{-5}$	$3.24 \times 10^{-10}$
$\mu 517$	$1.96 \times 10^5$	$5.66 \times 10^{-5}$	$2.89 \times 10^{-10}$
$\mu 134$	$1.1 \times 10^5$	$3.69 \times 10^{-4}$	$3.35 \times 10^{-9}$

40

【0128】

SPR による抗 PD-1 FAb の親和性測定

【0129】

抗 PD-1 モノクローナル抗体を PCR によって FAb バージョンに変換して、それぞれ重鎖および軽鎖の可変領域をヒト IgG2-CH1 の N 末端および鎖の定常領域と融合させ、pcDNA3.1 ベクター (インビトロジェン社) にサブクローニングした。両方の発現ベクターは、全体抗体の一過性発現に類似する一過性トランスフェクションプロトコルを使用して、293-F 細胞中で共発現させた。簡単に言えば、Fab カップ鎖を PCR 増幅し、pcDNA3.1 系発現ベクター (インビトロジェン社、カールスバッド、カリフォルニア州、米国) でサブクローニングした。別のプラスミドでは、PCR を重

50

ねることで、ヒトIgG2からのCH1コード配列と共に重鎖可変領域(VH)C末端c-myc-His8タグと融合し、その後、発現ベクター中でサブクローニングした。C232SおよびC233S(文献[Kabat residue numbering, Kabat et al. Sequence of proteins of immunologic interest, 5<sup>th</sup> ed Bethesda, MD, NIH 1991]参照)突然変異をIgG2重鎖に導入して、IgG2-A構造においてジスルフィド結合交換を防止し、ヒトIgG2を安定化した。文献[Lightle et al. 2010 Protein Sci 19(4): 753-762]参照。両方の構造体は、FAb成熟配列の上流にシグナルペプチドを含有していた。FAbの分泌発現は、293-F細胞への上記2つのプラスミドの共トランスファクションによって得られ、トランスファクションから6-7日後細胞培養上清を回収した。His8タグ付きのFabは、ニッケルセファロース・ファスト・フロー・カラム(カタログ番号17531801、GEライフサイエンス社)に続くHiLoad16/60Superdex200カラム(カタログ番号17106901、GEライフサイエンス社)を用いるサイズ排除クロマトグラフィーによって、細胞培養上清から精製された。精製されたFabは、PBS中に0.5~5mg/mLに濃縮し、-80の冷凍庫にアリコートで保存した。

#### 【0130】

抗PD-1Fabの親和性測定のために、BIAcore(登録商標)T-200機器(GEライフサイエンス社)を用いてSPRアッセイを行った。簡単に言えば、ヒトPD-1/HisまたはカニクイザルPD-1/Hisを活性化CM5バイオセンサーチップ(カタログ番号BR100530、GEライフサイエンス社)に結合して、約100~200応答単位(RU)を得てから、1Mエタノールアミンで未反応基をブロックした。0.12nMから90nMまで増加する濃度のFabサンプルを、30μL/分でSPRランニング緩衝液(10mMのHEPES、150mMのNaCl、0.05%のTween20、pH7.4)に注入し、ヒトPD-1/HisまたはサルPD-1/His上の結合反応は、ブランク・フロー・セル(blank flow-cell)からRUを差し引くことで算出した。会合速度( $k_{on}$ )と解離速度( $k_{off}$ )は、1対1ラングミュア結合モデル(BIA評価ソフトウェア、GEライフサイエンス社)を用いて算出した。平衡解離定数( $K_D$ )を比率 $k_{off}/k_{on}$ として算出した。

#### 【0131】

SPRによって測定された抗PD-1Fabの結合親和性を表18に示す。各抗PD-1FabはヒトPD-1に高親和性( $K_d = 0.15 - 1$  nM)で結合した。すべてのFabは、326-3G1除き、カニクイザルPD-1への親和性よりもわずかに低いとそれに匹敵する親和性( $K_d$  5倍以内)で結合した。

#### 【0132】

実施例3 ヒトT細胞における抗PD-1抗体の機能的活性

#### 【0133】

安定な細胞株の作製

#### 【0134】

レトロウイルスパッケージング細胞株PT67、ヒトT細胞系HuT78及びHEK293は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC、ロックビル、メリーランド州)から入手した。PD-1を発現するHuT78サブラインHuT78/PD-1は、前述したプロトコル(文献[Zhang et al. 2005 Blood 106: 1544-1551]参照)に従って、PD-1遺伝子を含むpFB-neoベクター(Stratagene/Agilent Tech社、サンタクララ、カリフォルニア州)を用いて、レトロウイルス形質導入によって作製した。T細胞エンゲジャー(engager)、膜アンカーキメラ抗体(OS8)は、抗ヒトCD3モノクローナル抗体、OKT3(文献[Kipriyanov et al. 1997, PEDS 10: 445-453]参照)の一本鎖可変断片(scFV)を、ヒンジ、膜貫通ド

10

20

30

40

50

メイン、及び、細胞質ドメインを含むマウスのCD8 (NCBI受託番号: NP\_001074579.1)のC末端ドメイン(113-220)に融合することによって構築した。そうすることによって、抗CD3 scFvがT細胞活性化剤として細胞表面に固定される(anchor)。ヒトPD-L1、PD-L2およびOS8 cDNAをpcDNA3.1ベクターにサブクローニングした。OS8とPD-L1またはPD-L2 cDNAの両方を共発現する安定な細胞株HEK293/OS8/PD-L1、Hep3B/OS8/PD-L1およびHEK293/OS8/PD-L2は、対プラスミドでHEK293及びHep3B細胞(ATCC)を共トランスファクトさせてから、10~14日間ハイグロマイシンまたはG418選択することで作製した。その後、細胞株は、前述のように限界希釈によってクローニングした(文献[Fuller SA, et al. Curr Protoc Mol Biol. Chapter 11: Unit 11.8., 2001]参照)。P3Zと命名されたキメラPD-1受容体は、ヒトCD3鎖の細胞質ドメイン(NCBI受託番号NP\_932170.1)にヒトPD-1の細胞外ドメインおよび膜貫通ドメインを融合することによって構築した。P3ZをコードするcDNA配列をPFB-neoにクローニングし、レトロウイルス形質導入を介してHuT78細胞に送達して、HuT78/P3Z細胞を作製した。

10

## 【0135】

HuT78/PD-1細胞におけるIL-2の放出によるPD-1抗体の機能の決定

## 【0136】

抗PD-1抗体が、PD-L1誘導性(PD-L1により誘導された)PD-1シグナル伝達の相互作用をブロックすることができるかどうかを決定するために、HuT78/PD-1細胞(96ウェルプレート中ウェルあたり $1.5 \times 10^4$ 細胞)と共に15分間プレインキュベートした後、37°Cでウェルあたり200 $\mu$ lのRPMI1640増殖培地を供給した平底プレートでHEK293/OS8/PD-L1またはHEK293/OS8/PD-L2細胞(ウェルあたり $4 \times 10^4$ )と共培養した。16-18時間後、共培養物の上清を回収した。IL-2は、ヒトIL-2 Ready-Set-Go! ELISAキット(カタログ番号88-7025、eBiosciences、サンディエゴ、カリフォルニア州)を用いて、ELISAによってアッセイした。このアッセイでは、抗PD-1抗体によるPD-1シグナル伝達をブロックした結果、TCRシグナル伝達及びIL-2産生が増強された(図4)。

20

30

## 【0137】

図5及び表2に示すように、マウス抗PD-1モノクローナル抗体mu317及びmu326は、mu30よりも有意に高い機能的活性を誘導して、IL-2分泌増加を導くPD-L1誘導性PD-1シグナル伝達を阻害した。両方は、より高いIL-2分泌(トプライン、表2)、それぞれ675および634pg/mlを有するとともに、mu30抗体よりも低いEC<sub>50</sub>(50%水準のIL-2分泌誘導におけるモノクローナル抗体の有効濃度)を有していた。

## 【0138】

## 【表 2】

HEK293/OS8/PD-L1細胞と共培養されたHuT78/PD-1細胞における抗PD-1モノクローナル抗体によって誘導されたIL-2放出

抗体	ベースライン (pg/ml)	トップライン (pg/ml)	EC <sub>50</sub> (μg/ml)
mu30	95	527	0.229
mu317	95	675	0.083
mu326	95	634	0.053
mIgGs	95	N/A	N/A

ベースライン：テストした全ての濃度のmIgGにより誘導された平均IL-2放出、図4参照  
 トップライン：プリズムソフトウェアによる回帰計算に基づく最も高いIL-2放出、図4参照  
 N/A：該当事項なし

10

## 【0139】

抗PD-1モノクローナル抗体のHuT78/PD-1細胞への結合 (engagement) は、PD-L1誘導性T細胞活性化をブロックするだけでなく、PD-L2誘導性IL-2放出をもブロックした。表3は、mu317及びmu326が、IL-2分泌のパラメータ (EC<sub>50</sub>) で示されたT細胞活性においてmu476よりも高い効力を有していることを示す。

20

## 【0140】

## 【表 3】

HEK293/OS8/PD-L2細胞と共培養したHuT78/PD-1細胞における抗PD-1モノクローナル抗体により誘導されたIL-2放出

抗体	ベースライン (pg/ml)	トップライン (pg/ml)	EC <sub>50</sub> (μg/ml)
476	180	599	0.183
317	192	563	0.032
326	218	635	0.038

ベースライン：シグモイド反応曲線の下側のテール部分において誘導された平均IFN-γ放出  
 トップライン：シグモイド反応曲線のプラトー部分において誘導された平均IFN-γ放出

30

## 【0141】

HuT78/P3Z細胞におけるIL-2の放出の逆シグナル伝達によるPD-1抗体の機能の決定

40

## 【0142】

キメラ受容体P3Zにおいて、PD-1シグナル伝達ドメインをCD3の細胞質ドメインと交換した。したがって、P3Zは、元のPD-1受容体としての阻害というより、PD-L1との結合時に活性化を仲介する。このアッセイにおいて、HuT78/P3Z細胞 (3 × 10<sup>4</sup> / ウェル) は、ハイブリドーマ上清またはPD-1抗体と共に1分間ブレインキュベートした後、37 °C の96ウェル平底プレートでHEK293/OS8/PD-L1またはHEK293/OS8/PD-L2細胞 (ウェルあたり4 × 10<sup>4</sup>) (ウェルあたり総容積200 μl) と共培養した。16-18時間後、共培養物の上清を回収し、前述したようにELISAによってアッセイした。

## 【0143】

50

マウス抗PD-1モノクローナル抗体の機能的活性は、前述した逆シグナル伝達アッセイにおけるT細胞活性化の直接的な読み出しによってさらに確認した。上記結果と一致して、mu317及びmu326は、我々がスクリーンしたモノクローナル抗体の間で最高の機能的活性を有していた。表4及び表5に示すように、mu317及びmu326は、IC<sub>50</sub>及び最大阻害の両方の点で、低活性モノクローナル抗体の一つ、mu37よりもはるかに強力であった。

【0144】

【表4】

HEK293/PD-L1細胞と共培養したHuT78/P3Z細胞における  
抗PD-1モノクローナル抗体によるIL-2分泌阻害

抗体	IC <sub>50</sub> (μg/ml)	最大阻害 (%)
37	0.287	86.9
317	0.083	99.3
326	0.039	97.6

最大阻害は、抗PD-1モノクローナル抗体が培養物中10μg/mlの最高濃度で加えられたときの阻害の割合 (%) として算出した。

10

【0145】

【表5】

HEK293/PD-L2細胞と共培養したHuT78/P3Z細胞における  
抗PD-1モノクローナル抗体によるIL-2分泌阻害

抗体	IC <sub>50</sub> (μg/ml)	最大阻害 (%)
37	0.127	43.3
317	0.020	94.3
326	0.018	93.4

最大阻害は、抗PD-1モノクローナル抗体が培養物中10μg/mlの最高濃度で添加されたときの阻害の割合 (%) として算出した。

20

30

【0146】

実施例4 HEK293/OS8/PD-L1細胞と共培養した初代ヒトPBMCにおける抗PD-1抗体によるIFN-分泌の活性化

【0147】

PD-1に対して選択されたトップmAbがまた初代ヒト免疫細胞に対して機能的効果を発揮するかどうか確認するために、我々は、主にT細胞(50-70%)、B細胞及びNK細胞(15-30%)、並びに単球(2-10%)で構成された新たに単離した末梢血単核細胞(PBMC)を用いて、抗体の機能をアッセイした。製造業者の説明書に従って、ヒトPBMCをフィコールリンパ球分離培地(Histopaque-1077; シグマアルドリッチ、ミゾーリ州)を用いた密度勾配遠心によって健康なドナーから単離した。すべてのヒト血液採取はBeigeneの内部手順に従った。その後、アッセイの前に3日間、抗CD3モノクローナル抗体(40ng/ml)OKT3(カタログ番号16-0037、イーバイオサイエンス社、カリフォルニア州)でPBMCを刺激した。FACS分析(実施例1)は、活性化したPBMC(主にT細胞)におけるPD-1発現が、個々のドナーに依存して可変的に増加したことを示した(表6)。TCR/CD3複合体の結合後、PD-1リガンド陽性腫瘍細胞に対する前活性化(pre-activate)T細胞の応答を決定するために、96ウェル平底プレート中でPBMC(1×10<sup>4</sup>)をHEK293/OS8/PD-L1またはHEK293/OS8/PD-L2細胞(3×10<sup>4</sup>)のいずれかと15-18時間共培養した。無細胞上清を、T細胞活性化及び

40

50

他の免疫細胞活性化の最も顕著な指標である、Ready-Set-Go! ELISAキットを用いるELISAによって、IFN- $\gamma$ レベルについてアッセイした。文献[Thakur A. et al. 2012 Vaccine, 30:4907-4920]参照。

【0148】

【表6】

PBMC及び処理	染色した全体PBMCに対するPD-1染色陽性細胞の割合	
	ドナー3	ドナー4
PBMCs、刺激なし/PD-1 Abで染色	12.0%	3.2%
PBMCs、刺激あり/PD-1 Abで染色	40.0%	38.1%
PBMCs、刺激なし/コントロールAbで染色	≤0.5%	≤0.5%
PBMCs、刺激あり/コントロールAbで染色	≤0.5%	≤0.5%
刺激：新たに単離したPBMCを抗CD3抗体、OKT3、及びIL-2の存在下で3日間培養した。		
刺激なし：新鮮なPBMCを抗体染色及びFACS分析に供した		

10

【0149】

図6は、予備活性化PBMCおよびHEK293/OS8/PD-L1細胞の共培養(物)にモノクローナル抗体mu317及びmu326が存在することで用量依存的にIFN- $\gamma$ 蓄積が増加することを実証した。コントロールマウスのIgG処理によるIFN- $\gamma$ のベースレベルはドナー間で変化するが、mu317またはmu326で処理されたPBMCにおけるIFN- $\gamma$ 分泌の増加は、0.1~10 $\mu$ g/ml範囲の抗体治療において統計的に有意である。mIgGで処理されたPBMCの相応するレベルと比較すると、mu317及びmu326によって誘導された0.1~10 $\mu$ g/ml濃度レベルのIFN- $\gamma$ 分泌は、ドナー19からのPBMCにおいて2.5~3.2倍増加し、ドナー20のPBMCにおいて1.4~2.3倍増加した。

20

【0150】

実施例5 抗PD-1モノクローナル抗体によるヒトNK細胞の活性化

30

【0151】

NK細胞における機能分析用の安定な細胞株

【0152】

初代ヒトNK細胞は、IL-2治療に応答してPD-1タンパク質を発現し、PD-1媒介信号伝達によって増強されるNK細胞の細胞毒性を阻害することが以前に報告されていた。文献[2010 Blood, 116:2286]参照。NK細胞における抗PD-1モノクローナル抗体によって発揮される機能的効果の定量的分析のために、ヒトNK細胞株NK92MI(ATCC)および肺癌細胞株SK-Mes-1(ATCC)を、前述したプロトコルに基づくレトロウイルス形質導入によって、ヒトPD-1及びPD-L1を安定的に発現するよう操作した。文献[Zhang et al. 2005, Blood 106:1544-1551]、文献[Zhang et al. 2006, Cancer Res, 66:5927]参照。二つの安定な細胞株をNK92MI/PD-1およびSK-Mes-1/PD-L1と命名した。

40

【0153】

抗PD-1AbがNK92MI/PD-1細胞におけるIFN- $\gamma$ 産生および分泌を促進する

【0154】

NK細胞に対する抗PD-1モノクローナル抗体の機能的活性は、ウェルあたり合計6 $\times$ 10<sup>4</sup>個の細胞を有する96ウェル平底プレートにおいて肺癌細胞株SK-MES-1/PD-L1と1対2の比率で共培養したNK92MI/PD-1細胞におけるIFN-

50

産生および分泌の定量的測定によってアッセイした。抗PD-1モノクローナル抗体は、共培養を開始する15分前にNK92MI/PD-1に添加し、その後、該細胞をCO<sub>2</sub>インキュベーター中で一晩共培養した。実施例4に記載したように、無細胞上清をELISAによってIFN- $\gamma$ レベルについてアッセイした。

【0155】

全ての抗PD-1モノクローナル抗体は、抗体治療濃度の低いベースラインから抗体治療濃度の高いトップラインまでIFN- $\gamma$ 産生を有意に増加させた。2つのトップ抗体、mu317及びmu326は、比較抗体5Cよりも低いEC<sub>50</sub>を有しており、それは、NK細胞に対して強力な活性化効果を持っていることを示す(表7)。

【0156】

【表7】

抗PD-1モノクローナル抗体及びSK-MES-1/PD-L1細胞の存在下でNK92MI/PD-1細胞による、培地中に分泌されたIFN- $\gamma$  (pg/ml)

抗体	ベースライン (pg/ml)	トップライン (pg/ml)	EC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml)
317	28	532	0.40
326	15	509	0.20
5C	20	535	1.17

ベースライン：シグモイド反応曲線の下側のテール部分において誘導された平均IFN- $\gamma$ 放出  
トップライン：シグモイド反応曲線のプラトー部分において誘導された平均IFN- $\gamma$ 放出

【0157】

抗PD-1抗体がNK92MI/PD-1細胞によって媒介される癌細胞死滅を増強する

【0158】

SK-MES-1/PD-L1細胞に対するNK92MI/PD-1細胞の細胞毒性を、Cytotoxicity Assay kit (Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit) (プロメガ社、マディソン、ウィスコンシン州)を用いる乳酸脱水素酵素(LDH)放出アッセイによって決定した。簡単に言えば、NK92MI/PD-1の細胞(10<sup>5</sup>)を0.004-10 $\mu$ g/mlの範囲内の最終濃度で抗PD-1モノクローナル抗体とともにプレインキュベートし、96ウェルV底プレート中でエフェクター対腫瘍細胞の比率(E:T)5:1でSK-MES-1/PD-L1細胞(2 $\times$ 10<sup>4</sup>)を免役細胞培養物に添加した後、5時間共培養した。完全な腫瘍細胞の溶解を最大細胞死滅とし、各サンプルのLDH放出アッセイの読み出しを最大細胞死滅の割合(%)として算出した。全てのサンプルの細胞死滅(%)は、共通の基準としてベースラインの10%を使用してプレートを通じて(cross)標準化した。

【0159】

前述のように設定した特定の細胞毒性アッセイにおいて、選択された抗PD-1モノクローナル抗体は、高濃度のモノクローナル抗体入力(値)において19%~20.2%の範囲の最終腫瘍細胞死滅(=トップライン-ベースライン)をもたらした。mu317及びmu326はmu336よりも低いEC<sub>50</sub>を有していたが、それは、NK92MI/PD-1細胞媒介性腫瘍細胞死滅をもたらすことを示す(表8)。

【0160】

10

20

30

40

## 【表 8】

抗PD-1モノクローナル抗体によって誘導された腫瘍細胞に対するNK92MI/P

D-1細胞の細胞毒性

抗体	ベースライン (%)	トップライン (%)	EC <sub>50</sub> (μg/ml)
317	10	29.06	0.50
326	10	30.19	0.37
336	10	29.72	1.52

ベースライン：10%クロスプレートに標準化された、抗PD-1モノクローナル抗体の効果に基づかないで死滅した腫瘍細胞の割合 (%)  
トップライン：最高濃度 (即ち、3 μg/ml 及び 10 μg/ml) のモノクローナル抗体の存在下で死滅した腫瘍の平均割合 (%)

10

## 【0161】

実施例 6 PD-1モノクローナル抗体のクローニング及び配列分析

## 【0162】

特定のモノクローナル抗体を分泌するマウスハイブリドマクローンを、100mm組織培養皿中で $3 \sim 10 \times 10^6$ 個(細胞)の密度まで培養し、その細胞をスイングバケツトローター中で1500rpmでの遠心分離を介して収集した。全細胞RNAを、超純RNAキット(ウルトラファインRNAキット)(カタログ番号CW0581、CWBIO TECH社、北京、中国)を用いて製造業者のプロトコルに従い単離した。RNAを二重脱イオン水中に再懸濁し、ナノドロップ(ThermoFisher社、上海、中国)によって濃度を測定した。

20

## 【0163】

モノクローナル抗体cDNAクローニング用のPCRプライマーは、以前報告された配列(文献[Brocks et al., 2001 Mol Med 7:461-469]参照)に基づいてインビトロジェン社(北京、中国)によって合成された。第一鎖cDNAを逆転写酵素(カタログ番号AH301-02、Transgen Biotech社、北京、中国)を用いて合成した。PCR試薬キット(カタログ番号Ap221-12、Transgen Biotech社、北京、中国)を用いて、製造業者のプロトコルに従い特定モノクローナル抗体cDNAのPCR増幅を行った。PCR産物は、サービスプロバイダ(GeneWiz社、北京、中国)によって直接的に配列決定するか、又は、PCRベクター(インビトロジェン社)にサブクローニングしてから配列決定した(GeneWiz社)。

30

## 【0164】

マウスモノクローナル抗体のタンパク質配列を、配列相同性アラインメントにより分析した。モノクローナル抗体を配列相同性およびエピトープマッピングの結果(実施例13)に基づいて分類した。配列主積及びインタネット系配列分析([http://www.imgt.org/IMGT\\_vquest/share/textes/index.html](http://www.imgt.org/IMGT_vquest/share/textes/index.html)及び<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>)により、Kabata(文献[Wu, T.T. and Kabat, E.A., 1970 J. Exp. Med. 132:211-250]参照)及びIMGTシステム(文献[Lefranc M.-P. et al., 1999 Nucleic Acids Research, 27, 209-212]参照)に基づいて相補性決定領域(CDR)を同定した。表9に示すように、mu317及びmu326のCDRは、配列の長さおよび同一性において非常に異なる。

40

## 【0165】

【表 9】

mu 3 1 7 及び mu 3 2 6 の CDR

MAb	CDR1	配列番号	CDR2	配列番号	CDR3	配列番号
mu 3 1 7, HC	<u>GFSLTSYG</u> VH	11	VIWAGGSTNY NSALMS	12	<u>ARAYGNY</u> <u>WYIDV</u>	13
mu 3 1 7, LC	<u>KASQSVSN</u> DVA	14	<u>YAFHRFT</u>	15	<u>HQAYSSP</u> <u>YT</u>	16
mu 3 2 6, HC	<u>GYTFTNYG</u> MN	17	<u>WINNNNGEPT</u> YAEFFKG	18	<u>ARDVMDY</u>	19
mu 3 2 6, LC	<u>RASESVDN</u> <u>YGYSFMH</u>	20	<u>RASNLES</u>	21	<u>QQSKEYP</u> <u>T</u>	22

注：太字のCDRは、Kabatシステムに基づく；下線を引いたCDRは、IMGTシステムに基づく。

10

## 【0166】

実施例7 マウスモノクローナル抗体のヒト化

## 【0167】

抗体3D構造のシミュレーション

## 【0168】

CDRループ構造をサポートするために重要である可能性のあるフレームワーク残基を同定するために、mu 3 1 7 及び mu 3 2 6 の可変ドメインについて三次元構造をシミュレートした。潜在的に重要なフレームワーク残基は、抗体ヒト化の第一ラウンドにおいて元のマウス残基として維持された。抗体について以前に確立された構造モデリング法（文献 [Morea et al. Methods 2000 20:267-279] 参照）を採用して、抗体の既知の標準構造（文献 [Al-Lazikani et al. 1997 JOURNAL of Molecular Biology 273:927-948] 参照）に基づいて抗PD-1モノクローナル抗体の3D構造をシミュレートした。簡単に言えば、既知の高解像度構造（解像度2.5オングストローム未満）と最も相同な抗体配列を同定するために、マウス抗体の各可変ドメイン（Vk及びVh）の配列をPDBデータベース（Protein Data bank、<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>）でブラストした。mu 3 1 7 及び mu 3 2 6 モデリング用に選択された鑄型（表10に示す）は、モデル化される標的抗体のL CDR1、L CDR2、L CDR3、H CDR1、およびH CDR2において同類の標準的なループ構造を有していた。VkおよびVhの鑄型が異なる免疫グロブリンに由来する場合、スイモデルプログラム（文献 [Kiefer et al. 2009 Nucleic Acids Research 37, D387-D392] 参照）による構造相同性モデリング用鑄型として使用されるVk-Vh界面残基（interface residue）のハイブリッド構造を形成するよう主鎖原子の最小二乗当てはめ（least-square fit）によってそれらは一緒にパックされる。主鎖構造（conformation）を保持しながら、特定の側鎖構造を調整した。親構造とモデル化構造が同一の残基を有する部位において側鎖構造は保持されていた。残基が異なる部位では、鑄型構造、回転異性体ライブラリーおよびパッキングの考慮事項に基づいて側鎖構造をモデル化された。相同性モデリング後、PLOPプログラム（文献 [Jacobson et al. 2002 JOURNAL of Physical Chemistry 106:11673-11680] 参照）を用いて、全原子エネルギー（all-atom energy）を最小限に抑えるとともに、VhとVhの界面を最適化するように相同性モデルを純化（改良）した。このステップは、特に、異なる抗体からの構造のセグメントを結合した領域において、立体化学を改良するために行われる。

20

30

40

## 【0169】

50

【表 10】

抗体鎖	鋳型構造のPDBコード (H-CDR3用のPDB鋳型)	配列同一性	配列類似性
mu317Vk	3MXV	87%	92%
mu317Vh	3VFG	83%	91%
mu326Vk	1EJO	92%	94%
mu326Vh	1NCA	88%	90%
317-1Vk	4HJJ	90%	95%
317-1Vh	3VFG (1AY1)	75%	87%
326-1Vk	1EJO	87%	92%
326-1Vh	3T2N (3CXD)	84%	86%

10

## 【0170】

ヒト化の程度を高め、および/または抗体の安定性を高めるよう抗体工学の更なる段階を案内するために、CDR移植317-1及び326-1の構造をシミュレートした。選択された構造鋳型をまた表10に示す。構造シミュレーションは、H-CDR3の可能性のある構造が、同様のサイズ及びトルソ領域のH-CDR3を含有する、317-1についてはPDB鋳型1AY1、及び326-1についてはPDB鋳型3CXDからそれぞれ取った点を除いて、上記手順と同様に行われた。移植されたH-CDR3残基についてのエネルギー最小化は、PLOPを用いて行われた。

20

## 【0171】

ヒト化

## 【0172】

抗PD-1モノクローナル抗体のヒト化のために、我々はIMGT ([http://www.imgt.org/IMGT\\_vquest/share/textes/index.html](http://www.imgt.org/IMGT_vquest/share/textes/index.html)) 及びNCBIウェブサイト (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) においてヒト免疫グロブリン遺伝子のデータベースをブラストすることでmu317及びmu326可変領域のcDNA配列に相同のヒト生殖系列IgG遺伝子を調べた。PD-1モノクローナル抗体と高い相同性を有するヒトIGVH及びIGVはヒト化のための鋳型として選択された。

30

## 【0173】

ヒト化は、原則的にCDR移植により行われた。ヒト化の第1ラウンドでは、可変領域のフレームワーク配列におけるアミノ酸残基のマウスからヒトへの変異は、シミュレートされた3D構造によって案内され、その結果、マウスの全体的な抗体は保持され、CDRループ構造のみが前述したヒト配列に変異された。ヒト化モノクローナル抗体の初期バージョンは、ヒトIgG2定常領域(NCBI受託番号P01859)に融合したヒト化可変重鎖(Vh)を有する重鎖及びヒトIgC領域(NCBI受託番号P01834)に融合したヒト化可変軽鎖(V)を有する軽鎖を含むhu317-1(配列番号47-50)及びhu326-1(配列番号55-58)であった。同様に、我々は、ヒトIgG2定常領域に融合したマウスのVH及びヒトIgC領域に融合したマウスのVから構成されたmu317及びmu326からのキメラ抗体を作製した。完全な(full)キメラ抗体をそれぞれ、ch317及びch326と命名した。実施例1に記載したように、すべての組換えモノクローナル抗体を発現させ、精製した。

40

## 【0174】

FACSおよび機能分析によって、モノクローナル抗体hu317-1がほぼmu31

50

7及びch317と同じ結合活性および機能的活性を保持していることを実証した。mu317対ch317及びhu317-1間のFACS分析におけるEC<sub>50</sub>の差は、FACSで二つの異なる検出抗体、ヤギ抗マウスIgGおよびヤギ抗ヒトIgGを使用したという事実によって解釈され得る。二つの機能分析では、317の3つの全てのバージョンがより同等に処理され、互いに近接な結果が得られた(表11)。

【0175】

mu326のヒト化の最初のラウンドの結果として、モノクローナル抗体hu326-1は、親のch326及びmu326に類似した機能的特徴を保持しているが、FACS結合アッセイ及びHuT78/PD-1細胞系IL-2放出アッセイにおける機能的活性は、ch326よりわずかに弱いかもしれない(表12)。

10

【0176】

【表11】

FACSおよび機能分析によるmu317、ch317、及びhu317-1の比較

アッセイ/パラメータ		mu317	ch317	hu317-1
FACS	EC <sub>50</sub> (μg/ml)	0.11	0.36	0.46
	トップMFI*	205	217	203
アッセイ-1	EC <sub>50</sub> (μg/ml)	0.11	0.08	0.09
	トップライン (pg/ml)	346	294	386
	ベースライン (pg/ml)	98	82	91
アッセイ-2	IC <sub>50</sub> (μg/ml)	0.11	0.10	0.11
	最大阻害	99.5%	99.0%	99.8%

\*MFI: FACS分析からの平均蛍光強度  
 アッセイ-1: HEK293/OS8/PD-L1細胞と共培養したHuT78/PD-1におけるモノクローナル抗体によって誘導されたIL-2放出  
 アッセイ-2: HEK293/PD-L1細胞と共培養したHuT78/P3Z細胞におけるモノクローナル抗体によって誘導されたIL-2放出

20

30

【0177】

【表 1 2】

FACSおよび機能分析によるmu317、ch317、及びhu317-1の比較

アッセイ/パラメータ		mu317	ch317	hu317-1
FACS	EC <sub>50</sub> (μg/ml)	0.126	0.072	0.117
	トップMFI*	195	163	129
アッセイ-1	EC <sub>50</sub> (μg/ml)	0.038	0.074	0.112
	トップライン (pg/ml)	1149	1057	1143
	ベースライン (pg/ml)	242	250	283
アッセイ-2	IC <sub>50</sub> (μg/ml)	0.14	0.12	0.10
	最大阻害	96.9%	81.0%	84.4%
アッセイ-1: HEK293/OS8/PD-L1細胞と共培養したHuT78/PD-1におけるモノクローナル抗体によって誘導されたIL-2放出 アッセイ-2: HEK293/PD-L1細胞と共培養したHuT78/P3Z細胞におけるモノクローナル抗体によって誘導されたIL-2放出				

10

20

## 【0178】

ヒト化の第一ラウンドに基づいて、我々はさらに抗体機能への影響を評価するために、hu317-1\_\_Vh及び\_\_Vのフレームワーク(FR)内のマウスの他のアミノ酸(AA)残基をそれぞれ変異させた。表13に示すように、Vhにおける7つの個々の変異(体)及びhu317-1のVにおいて一変異(体)すべては同様の機能的活性を有する。変異(体)のうち、わずかにより弱い阻害機能を有するhu317-2\_\_K71VといったいくつかのVhの変異(体)においてごくわずかな変化が観察された。しかし、すべてのマウスのアミノ酸残基をヒトに変異させると(hu317-3A)、FACSおよびIL-2放出アッセイにおいてその機能は他の変異(体)よりも明らかに弱かった。

30

## 【0179】

以上で説明した初期の試験では、hu326-1は、一部のマウスのAA残基を残したことを除けば、FRにおいて有意なヒト化レベルに達した。しかし、それはmu326より弱い機能を有する。したがって、我々はマウスの残基に戻るか、または、ヒト残基へといったいずれかのさらなる個別変異(体)を作製し、モノクローナル抗体326機能への個々のAAの寄与を調べた。表14は、hu326-1\_\_Vh鑄型(配列番号56、配列番号57)に基づいて作製したすべての単一AA変異(体)、及び、それらの機能分析の結果を示した。変異の大半は、元のmu326モノクローナル抗体と同程度で、hu326-1よりも良好な機能的活性を示した。2つの変異(体)(E46KおよびF95Y)はEC<sub>50</sub>又はIC<sub>50</sub>において潜在力がやや劣る結果となったが、それは、抗体構造および機能におけるそれらの残基の役割を示す。

40

## 【0180】

【表 13】

hu317-1フレームワークにヒト化変異を有するFabの機能的活性の比較

Fab及び組成		FAC S、 EC <sub>50</sub>	HuT78/P3ZにおけるIL-2放出	
Vh	Vκ		最大阻害 (%)	EC <sub>50</sub>
hu317-1 _Vh	hu317-1 _Vκ	0.19	98.78	0.30
hu317-2 _L48I	hu317-1 _Vκ	0.14	98.51	0.37
hu317-2 _L67V	hu317-1 _Vκ	0.15	98.57	0.30
hu317-2 _K71V	hu317-1 _Vκ	0.18	96.55	0.48
hu317-2 _N73T	hu317-1 _Vκ	0.15	98.29	0.31
hu317-2 _S76N	hu317-1 _Vκ	0.13	98.56	0.28
hu317-2 _V78F	hu317-1 _Vκ	0.18	98.03	0.38
hu317-2 _M82L	hu317-1 _Vκ	0.13	98.47	0.27
hu317-1 _Vh	HU317-2 _G100Q	0.21	98.86	0.27
hu317-3 A	hu317-1 _Vκ	0.32	79.66	0.35

注：EC<sub>50</sub>の単位はμg/mlである；変異させたアミノ酸残基の番号付けは、記載したhu317-1の配列と同じである；hu317-3Aはフレームワーク内の全ての配列をヒトへ変異させたものである。

10

20

【0181】

30

【表 1 4】

hu326-1 フレームワークにヒト化変異を有する mAb の機能的活性の比較

抗体	FACS, EC <sub>50</sub> ・g/ml	HuT78/P3Z における IL-2 放出		HuT78/PD-1 における IL-2 放出	
		最大阻害 (%)	IC <sub>50</sub> (μg/ml)	トップライン (pg/ml)	EC <sub>50</sub> (μg/ml)
ch326	0.118	93.05	0.074	993	0.135
hu326-1	0.317	92.38	0.087	987	0.213
hu326-2 S9P <sup>B</sup>	0.145	96.04	0.075	1022	0.136
hu326-2 A16E <sup>B</sup>	0.155	96.33	0.078	1048	0.126
hu326-2 E46K <sup>B</sup>	0.132	95.25	0.079	1244	0.259
hu326-2 G63D <sup>B</sup>	0.139	96.44	0.064	1069	0.120
hu326-2 A76V <sup>F</sup>	0.102	96.65	0.071	1002	0.112
hu326-2 S84N <sup>B</sup>	0.131	96.52	0.060	1015	0.126
hu326-2 S85N <sup>B</sup>	0.110	95.62	0.093	932	0.104
hu326-2 T88N <sup>B</sup>	0.098	95.85	0.102		
hu326-2 F95Y <sup>F</sup>	0.097	95.62	0.166	1028	0.135

<sup>B</sup>: マウスアミノ酸へ戻る変異 (back mutation); <sup>F</sup>: ヒトアミノ酸に進む (向かう) 変異 (forward mutation)  
 すべての変異は、hu326-1\_Vk (配列番号58) と対となっている hu326-1\_Vh (配列番号56) において行われた。

## 【0182】

ヒトにおいて治療薬として使用することができるモノクローナル抗体 317 及び 326 のために最高の可能性のある Vh 及び V<sub>H</sub> 配列組成を調べるために、我々は、FR におけるヒト化レベル、機能的活性、物理化学的特性、抗体依存性細胞媒介細胞毒性 (ADCC) 及び補体依存性細胞毒性 (CDC) などの抗体特徴を考慮して、様々な変異の組み合わせ (CDR 配列内の一部の変異を含む) を作った。ほとんどの変異は、認定基準を通過していないとみなされた。操作プロセスを経て、潜在的な治療的有用性について 6 つのヒト化組換えモノクローナル抗体を選択した: hu317-4B2 (配列番号 43-44)、hu317-4B5 (配列番号 45-46)、hu317-4B6 (配列番号: 23-26)、hu326-3B1 (配列番号 51-52)、hu326-3G1 (配列番号 53-54) と hu326-4A3 (配列番号 27-30)。モノクローナル抗体の CDR を元のマウス抗体の CDR と比較したものを表 15、16 に示す。

## 【0183】

6 つのモノクローナル抗体のうち、hu317-4B2、hu317-4B5、及び hu317-4B6 は、配列において互いに密接に関連し、それらの機能的活動や強度において非常に類似している。一方、hu326-3B1、hu326-3G1、及び hu326-4A3 は配列および機能において互いに非常に接近している (表 17-18)。これらの 2 つのグループそれぞれに属したモノクローナル抗体は、いくつかの小さな違いはあるものの、(実施例 10 及び 11 に記載されている) 物理化学的性質および結合エピート等、配列および機能以外の他の多くの特徴をも共有していた。

## 【0184】

10

20

30

40

【表 15】

様々なバージョンのmAb 317間のCDR比較

mAb	CDR1	配列 番号	CDR2	配列 番号	CDR3	配列 番号
mu317, HC	G F S L T S Y G V H	11	V I W A G G S T N Y N S A L M S	12	A R A Y G N Y W Y I D V	13
hu317-1, HC	G F S L T S Y G V H	11	V I W A G G S T N Y <u>N P S L K S</u>	59	A R A Y G N Y W Y I D V	13
hu317-4 B2, HC	G F S L T S Y G V H	11	V I <u>Y</u> A G G S T N Y <u>N P S L K S</u>	60	A R A Y G N Y W Y I D V	13
hu317-4 B5, HC	G F S L T S Y G V H	11	V I <u>Y</u> A G G S T N Y <u>N P S L K S</u>	60	A R A Y G N Y W Y I D V	13
hu317-4 B6, HC	G F S L T S Y G V H	11	V I <u>Y</u> A <u>D</u> G S T N Y <u>N P S L K S</u>	32	A R A Y G N Y W Y I D V	13
mu317, LC	K A S Q S V S N D V A	14	Y A F H R F T	15	H Q A Y S S P Y T	16
hu317-1, LC	K A S Q S V S N D V A	14	Y A F H R F T	15	H Q A Y S S P Y T	16
hu317-4 B2, LC	<u>K S S E S</u> V S N D V A	61	Y A F H R F T	15	H Q A Y S S P Y T	16
hu317-4 B5, LC	<u>K S S E S</u> V S N D V A	61	Y A F H R F T	15	H Q A Y S S P Y T	16
hu317-4 B6, LC	<u>K S S E S</u> V S N D V A	61	Y A F H R F T	15	H Q A Y S S P Y T	16

主：下線を引いたAA残基は、物理化学的特性の改良のためにマウス配列からヒト抗体配列へ変更されている。

【0185】

10

20

30

【表 16】

様々なバージョンのモノクローナル抗体326間のCDR比較

mAb	CDR1	配列番号	CDR2	配列番号	CDR3	配列番号
mu326、HC	GYTFTNYGMN	17	WINNNNGEP TYAEEFKG	18	ARDVMDY	19
hu326-1、HC	GYTFTNYGMN	17	WINNNNGEP TYAQDFRG	62	ARDVMDY	19
hu326-3B1、HC	GYTFTNYGMN	17	WINNNNGEP TYAQDFRG	62	ARDVMDY	19
hu326-3G1、HC	GYTFTNYGMN	17	WINNNNGEP TYAQDFRG	62	ARDVMDY	19
hu326-4A3、HC	GYTFTNYGMN	17	WINNNNAEP TYAQDFRG	38	ARDVMDY	19
mu326、LC	RASESVDN YGYSFMH	20	RASNLES	21	QQSK EYPT	22
hu326-1、LC	RASESVDN YGYSFMH	20	RASNLES	21	QQSK EYPT	22
hu326-3B1、LC	RASESVDN YGYSFMH	20	RASNLES	21	QQSK EYPT	22
hu326-3G1、LC	RASESVDN YGYSFMH	20	RASNLES	21	QQSK EYPT	22
hu326-4A3、LC	RASESVDN YGYSFMH	20	RASNLES	21	QQSK EYPT	22

主：下線を引いたAA残基は、物理化学的特性の改良のためにマウス配列からヒト抗体配列へ変更されている。

【0186】

【表 17】

ELISA及びFACSによって分析されたヒト化mAbの結合活性

mAb	ELISA、EC <sub>50</sub> μg/ml	FACS、EC <sub>50</sub> μg/ml
hu317-4B2	0.066	0.129*
hu317-4B5	0.057	0.115*
hu317-4B6	0.061	0.092*
hu326-3B1	0.092	0.165
hu326-3G1	0.088	0.190
hu326-4A3	0.091*	0.142*

\*正規化なしの抗体のFabバージョンを用いたFACSデータ  
\*\*ブリッジ研究からの正規化データ

【0187】

【表 18】

SPRによって分析されたFabの結合親和性

Fab	$K_{on}$ ( $M^{-1} \cdot s^{-1}$ )	$K_{off}$ (s)	$K_D$ (M)
hu317-4B 5	$3.89 \times 10^5$	$9.07 \times 10^{-5}$	$2.33 \times 10^{-10}$
hu317-4B 6	$5.71 \times 10^5$	$8.37 \times 10^{-5}$	$1.47 \times 10^{-10}$
hu326-3B 1	$2.18 \times 10^5$	$1.90 \times 10^{-4}$	$8.70 \times 10^{-10}$
hu326-3G 1	$2.00 \times 10^5$	$2.01 \times 10^{-4}$	$1.00 \times 10^{-9}$

10

## 【0188】

SPRによるヒト化抗PD-1Fabの親和性決定

## 【0189】

抗PD-1モノクローナル抗体をPCRによってFabバージョンに転換して、重鎖及び軽鎖の可変領域をヒトIgG2-CH1のN末端及び鎖の定常領域にそれぞれ融合させ、pcDNA3.1ベクター（インビトロジェン社）にサブクローニングした。完全な抗体の一過性トランスフェクションプロトコルを使用して293-F細胞で両方の発現ベクターを発現させた。簡単にいえば、Fabカッパ鎖をPCR増幅し、pcDNA3.1系発現ベクター（インビトロジェン社、カールスバッド、カリフォルニア州、米国）にサブクローニングした。別のプラスミドで、PCRを重ねることにより、ヒトIgG2からのCH1コード配列とともに重鎖可変領域（VH）をC末端c-Myc-His8タグと融合し、その後、発現ベクターにサブクローニングした。C232SおよびC233S（文献[Kabat residue numbering, Kabat et al. Sequence of proteins of immunologic interest, 5<sup>th</sup> ed Bethesda, MD, NIH 1991]参照）変異をIgG2重鎖に導入して、IgG2-A構造においてジスルフィド結合交換を防止し、ヒトIgG2を安定化した（文献[Lightle et al. 2010 Protein Sci 19(4): 753-762]参照）。両方の構造物は、Fab成熟配列の上流にシグナルペプチドを含有していた。Fabの分泌発現は、上記2つのプラスミドの293-F細胞への共トランスフェクションによって得られ、トランスファクション後6-7日が経過した時点で細胞培養上清を回収した。His8タグ付きのFabは、細胞培養上清からNi-セファロースファストフローカラム（カタログ番号17531801、GEライフサイエンス社）及びHiLoad16/60Superdex200カラムを用いるサイズ排除クロマトグラフィー（カタログ番号17106901、GEライフサイエンス社）を順次行うことで精製した。精製したFabを、PBS中に0.5~5mg/mlに濃縮し、-80の冷凍庫にアリコートで保存した。

20

30

## 【0190】

抗PD-1Fabの親和性測定のために、SPRアッセイはBIAcore（登録商標）T-200機器（GEライフサイエンス社）で行った。簡単に言えば、ヒトPD-1/HisまたはカニクイザルPD-1/Hisを活性化CM5バイオセンサーチップ（カタログ番号BR100530、GEライフサイエンス社）に結合して、約100~200応答単位（RU）を得てから、1Mのエタノールアミンで未反応基をブロックした。0.12nMから90nMまで増加する濃度のFabサンプルを、30μL/分でSPRランニング緩衝液（10mMのHEPES、150mMのNaCl、0.05%のTween20、pH7.4）に注入し、ヒトPD-1/His又はサルPD-1/His上の結合反応は、ブランク・フロー・セル（blank flow-cell）からRUを差し引くことで算出した。会合速度（ $k_{on}$ ）と解離速度（ $k_{off}$ ）は、1対1ラングミュア結

40

50

合モデル (BIA 評価ソフトウェア、GE ライフサイエンス社) を用いて算出した。平衡解離定数 ( $K_D$ ) を比率  $k_{off} / k_{on}$  として算出した。

【0191】

SPR によって測定された抗 PD-1 の Fab の結合親和性を表 18 に示す。各抗 PD-1 Fab はヒト PD-1 に高親和性 ( $K_d = 0.15 - 1 \text{ nM}$ ) で結合した。すべての Fab は、326-3G1 を除き、カニクイザル PD-1 への親和性よりもわずかに低いとそれに匹敵する親和性 ( $K_d$  5 倍以内) で結合した。

【0192】

実施例 8 変異ヒト IgG4 定常領域を有する組換え抗 PD-1 モノクローナル抗体の作製及び発現

10

【0193】

PD-1 は、主に活性化 T 細胞において発現されるので、天然の IgG の Fc 部分に連結された PD-1 ブロッキング抗体は、ADCC 及び CDC などの Fc 媒介エフェクター機能を IgG サブクラスに応じて異なる程度に誘導し、その結果、活性化 T 細胞を除去すると期待されている。文献 [Natsume A, et al, 2009 Drug Des Devel Ther. 3: 7-16] 参照。ヒト抗体サブクラス IgG4 は、少量の ADCC を有し、ほとんど CDC エフェクター機能を有しないことが、これまでに多く報告されていた。文献 [Moore GL, et al. 2010 mAbs, 2: 181-189] 参照。一方、自然の IgG4 は、酸性緩衝液または上昇する温度下等のストレス条件において安定性が劣ることが知られていた。文献 [Angal, S. 1993 Mol Immunol, 30: 105-108]; 文献 [Dall'Acqua, W. et al, 1998 Biochemistry, 37: 9266-9273]; 文献 [Aalberse et al. 2002 Immunol, 105: 9-19] 参照。PD-1<sup>+</sup> 細胞を死滅から免れさせるとともに抗 PD-1 抗体の物理化学的特性を改善するために、変異の組み合わせによって操作した IgG4 にヒトモノクローナル抗体を結合し、減少されたまたはヌル (null) FcR 結合または C1q 結合活性を持たせ、それにより、ADCC 及び CDC エフェクター機能を弱体化させるか、又は、除去した。生物学的薬剤としての抗体の物理化学的特性を考慮すると、IgG4 のあまり望ましくない固有の特性の一つは、溶液中で 2 つの重鎖が動的に分離して半抗体 (half antibody) を形成することである。これによって、*in vivo* で二重特異性抗体が生じる。文献 [Van der Neut Kolf schoten M, et al. 2007 Science, 317: 1554-157] 参照。位置 228 (EU 番号付けシステム) におけるセリンのプロリンへの突然変異は、IgG4 の重鎖分離を抑制しているようであった。文献 [Angal, S. 1993 Mol Immunol, 30: 105-108]; 及び文献 [Aalberse et al. 2002 Immunol, 105: 9-19] 参照。ヒンジ及び Fc 領域中のいくつかのアミノ酸残基は、Fc 受容体との抗体相互作用に影響を及ぼすことが報告されている。文献 [Chappel SM, et al. 1999 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 9036-9040]; 文献 [Mukherjee, J. et al., 1995 FASEB J, 9: 115-119]; 文献 [Armour, K.L. et al., 1999 Eur J Immunol, 29: 2613-2624]; 文献 [Clynes, R.A. et al., 2000 Nature Medicine, 6: 443-446]; 及び文献 [Arnold J.N., 2007 Annu Rev Immunol, 25: 21-50] 参照。さらに、ヒト集団において稀に現れるいくつかの IgG4 のアイソフォームは、異なる物理化学的性質を誘発し得る。文献 [Brusco, A. et al. 1998 Eur J Immunogenet, 25: 349-55]; 及び文献 [Aalberse et al. 2002 Immunol, 105: 9-19] 参照。以前に報告されたすべての突然変異及びアイソフ

20

30

40

50

ームを特定の抗体として一括して扱うことが、理想的な抗体分子が前述したような治療薬の特徴すべてを共有することを保証するものではない。それは、抗体のエフェクター機能及び物理化学的特性への可変領域の影響並びに組み合わせられた変異の矛盾する効果に基づく。文献 [ Igawa T. et al., 2010 Prot Eng Design Select, 23:385-392 ] ; 及び文献 [ Perchiacca J.M. and Tessier P.M., 2012 Ann Rev Bio mol Eng 3:263-286 ] 参照。

【0194】

最小限のADCC、CDCおよび不安定性を有する抗PD-1モノクローナル抗体を産生するために、我々は、ヒトIgG4のヒンジ及びFc領域に多数の突然変異の組み合わせを導入して、IgG4mt1及びIgG4mt12を生じさせた。変異されたいくつかのIgG4変異体は、我々の分析結果にて示した通り、あまり望ましくないことが明らかであった。表19には、いくつかの関連のIgG4変異体及び変異配列をまとめた。これらの抗体の評価が本明細書に記載されている。

【0195】

【表19】

IgG4変異体の配列変異

IgG4 及び変異 体	アミノ酸残基*														
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	4		
IgG4	S	C	P	A	P	E	F	L	G	D	L	R			
IgG4 mt1	<u>P</u>	C	P	A	P	E	F	L	G	D	L	R			
IgG4 mt2	<u>P</u>	C	P	A	P	<u>P</u>	<u>V</u>	<u>A</u>	G	D	L	R			
IgG4 mt6	<u>P</u>	C	P	A	P	<u>P</u>	<u>V</u>	<u>A</u>	G	<u>A</u>	L	R			
IgG4 mt8	<u>P</u>	C	P	A	P	<u>P</u>	<u>V</u>	<u>A</u>	G	<u>T</u>	L	R			
IgG4 mt9	<u>P</u>	C	P	A	P	<u>P</u>	<u>V</u>	<u>A</u>	G	<u>A</u>	L	<u>K</u>			
IgG4 mt10	<u>P</u>	C	P	A	P	<u>P</u>	<u>V</u>	<u>A</u>	G	<u>A</u>	<u>V</u>	<u>K</u>			

\*アミノ酸番号付けは、EUシステムに基づく。変化(変更)は、下線にて強調されている。

【0196】

実施例9 IgGmt10はFcR結合を有しなく、最も低いADCC及びCDCエフェクター機能を有する

【0197】

抗体が細胞表面標的タンパク質に結合し、エフェクター細胞上に発現されたFc受容体(FcR)に連結されると、ATCCが開始される。ヒトIgG1はIgG2及びIgG4よりもFcR、特に、FcR-I及びFcR-IIIAに対する高い結合親和性を有しているが、それはADCCを活性化するIgG1の強度に関係することが十

10

20

30

40

50

分に裏付けられていた。ADCCに似ているCDCは、抗体が細胞表面標的及びC1qタンパク質に交差結合したときに活性化され、補体複合体形成及び砲撃細胞溶解といったカスケード反応が続く。ADCCおよびCDCのプロキシとして、FcR及びC1qに結合する抗体のアッセイは、ADCCおよびCDCの基本的な指標として機能し得る。したがって、我々はすべての主要なFcRへのモノクローナル抗体結合を体系的に評価した。

【0198】

FcR結合

【0199】

FcRへの種々のIgG4変異体の結合をフローサイトメトリーによって決定した。簡単に言えば、ヒトFcRを発現する一連のHEK293トランスフェクタント(transfectant)を確立した。これらのトランスフェクタントはFcRI、FcRIIA、FcRIIB、またはFcRIIAを発現した。マルチサブユニットFcR(すなわち、FcRIおよびFcRIIA)をFcRと共発現させた。多型変異体(polymorphic variant)(すなわち、FcRIIA H131及びR131、FcRIIA F158及びV158)も含まれていた。二次抗体(ヤギ抗ヒトIgG F(ab)'<sub>2</sub>-アレクサフルオロ488、ジャクソン・イムノリサーチ、ウェストグロブ、PA、USA)を使用して、FcR<sup>+</sup> HEK293細胞に対する変異されたIgG4の変異体(表9)を有する抗PD-1モノクローナル抗体の結合を検出した。予想通り、IgG1フォーマットの抗PD-1モノクローナル抗体(hu317-1/IgG1及びhu317-4B6/IgG1)はFcRI、FcRIIA(H131およびR131対立遺伝子)、FcRIIB、およびFcRIIA(V158とF158の対立遺伝子)を含むすべてのFcRに強く結合する(表20)。興味深いことに、2つの異なるバージョンのヒト化モノクローナル抗体、hu317-1及びhu317-4B6(Vh及びVの両方において異なる)を同じIgG4変異体フォーマット(例えば、IgG4mt1またはIgG4mt6フォーマットのいずれか)に作製したときに、それらの結合強度(MFI)は、2倍~100倍近くまでの範囲で異なる(例えば、455.2/115.7=3.9倍; 13.6/1.0=13.6倍; 434.6/4.9=88.7倍など、表20参照)。これは、抗体の可変領域は、FcRへの結合に有意な影響を及ぼすので、ADCCなどエフェクター機能に影響を及ぼすという他の研究者による以前の知見と一致している。文献[Igawa T. et al., 2010 Prot Eng Design Select, 23:385-392];及び文献[Perchiacca J.M. and Tessier P.M., 2012 Ann Rev Biomol Eng 3:263-286]参照。

【0200】

表20に示すように、hu317-4B6及びhu326-4A3がIgG4mt10フォーマットで作製されたときに、それらは、表に示したPD-1モノクローナル抗体及びIgG変異体フォーマット及び我々がこの研究でテストした数多くの他のヒト化モノクローナル抗体及びIgGフォーマットの中でFcRへの結合活性が最も低い。ここで、IgG4mt10フォーマットのhu317-4B6及びhu326-4A3の独自性は、やや遠い配列相同性を有する、例えば、前述したhu317-1のような同じ系列のヒト化モノクローナル抗体にまで拡張できない。

【0201】

10

20

30

40

【表 20】

FACSによって測定されたFcγRへの抗PD-1の結合強度 (MFI\*)

mAbs	FcγRI	FcγRIIA (H131)	FcγRIIA (R131)	FcγRIIB	FcγRIIIA (F158)	FcγRIIIA (V158)
hu317-1/IgG1	2152.9	168.7	139.6	442.4	99.7	277.2
hu317-4B6 /IgG1	2771.7	1.7	0.6	1.9	28.0	293.7
hu317-1 /IgG4mt1	455.2	21.3	21.9	434.6	0.6	20.7
hu317-4B6 /IgG4mt1	115.7	0.2	0.0	4.9	0	6.1
hu317-1 /IgG4mt6	13.6	1.0	0.8	1.8	0.9	1.1
hu317-4B6 /IgG4mt6	1.0	0	0	0	0	0
hu317-4B6 /IgG4mt10	0.4	0	0	0	0	0
hu326-4A3 /IgG4mt10	0.5	0	0	0	0	0

\*MFI : FACS分析からの平均蛍光強度

10

20

## 【0202】

ADCC

## 【0203】

古典的なADCCは、FcRIIIAのまたはCD16に結合する抗体によってNK細胞の活性化に關与する。ヒト化抗PD-1モノクローナル抗体がADCCを誘導するかどうかを確認するために、CD16 (V158対立遺伝子) 及びFcR 遺伝子を含む発現プラスミドを共形質導入することでNK92MI細胞から生成されたNK92MI/CD16V細胞をエフェクター細胞として使用し、そして、PD-1を発現するT細胞系、HuT78/PD-1を標的細胞として使用した。NK92MI/CD16V細胞 ( $4 \times 10^4$ ) を96ウェルV底プレートで同数のHuT78/PD-1細胞と共培養した。細胞毒性は、前の項で説明したLDH放出アッセイによって測定した。結果から、hu317-4B2/IgG4mt6、hu317-4B6/IgG4mt6、hu317-4B6/IgG4mt10及びhu326-4A3/IgG4mt10すべてが陽性対照群と比較してベースレベルのADCCを有していることが確認された(図7)。これらの4つのモノクローナル抗体の間におけるADCCのわずかな違いは、実験誤差に起因する可能性がある(図7中のエラーバー参照)。

30

40

## 【0204】

CDC

## 【0205】

ヒトIgG4抗体は、一般的に古典的経路を介してはいかなるCDCをも誘導しない。IgG4mt10フォーマットの抗PD-1モノクローナル抗体がCDCを誘導するかどうかは、PD-1を発現するT細胞系、HuT78/PD-1及び健康なドナーからの新鮮なヒト血清を用いて評価した。CDCによる細胞溶解をCELLTITER GL0アッセイキット(プロメガ社、北京、中国)によって測定した。簡単にいえば、HuT78/PD-1細胞 ( $2 \times 10^4$  個) を無血清RPMI1640(インビトロジェン社)中で抗PD-1Ab ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) とともに37°Cで15分間インキュベートした後、9

50

6 ウェル平底プレート中で総容量 120  $\mu$ l の正常ヒト血清 (NHS) を最終濃度 15 ~ 50 % まで添加した。37 °C で一晩インキュベートした後、細胞を溶解し、ATP 濃度についてアッセイした。IgG4 mt 10 におけるヒト化抗 PD-1 モノクローナル抗体が CDC を介して PD-1<sup>+</sup> を死滅させることができるかどうかをテストするために、抗 PD-1 と共培養の前に、健康なドナーから単離した PBMC を抗 CD3 Ab OKT3 (40 ng/ml) で3日間予め活性化させた。ATP の量は、培養物中に存在する細胞の数に正比例する。蛍光は、96 ウェル蛍光光度計 (PHERA Star FS、BMG LABTECH) を用いて読み取った。結果は、生存細胞の数に比例する相対的蛍光単位 (RFU) で示す。% CDC 活性は以下の通り算出した: % CDC 活性 = [ (RFU テスト - RFU バックグラウンド) / (総細胞溶解時の RFU - RFU バックグラウンド) ] × 100。一般的に、我々は、活性化 PBMC に結合する IgG4 mt 10 フォーマットの抗 PD-1 によって媒介されたいかなる ADC をも検出することができなかった。PD-1 を高度に発現する細胞株、高い血清及び抗体濃度を用いるような過敏の実験条件下で、我々はいくつかの場面で非常に低レベルの CDC を検出し、異なるバージョンおよび抗 PD-1 モノクローナル抗体間にそれほどの差異はない。それは、IgG4 変異体フォーマットの抗 PD-1 モノクローナル抗体が IgG4 の一般的な形態としての低 CDC 活性または CDC 活性なしという特徴を保持したことを示す。

#### 【0206】

実施例 10 IgG4 mt 10 フォーマットのヒト化抗 PD-1 モノクローナル抗体は、ストレス条件下で増強された安定性を有する

#### 【0207】

高温・酸性条件での抗 PD-1 抗体の安定性

#### 【0208】

安定性研究に使用される抗 PD-1 抗体はすべて、前の項において説明したように、プロテイン A カラムの後サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) によって精製された。精製後、精製した抗体サンプルの凝集体の含量を分析用サイズ排除クロマトグラフィー - 高速液体クロマトグラフィー (SEC-HPLC) にてモニターした。それは、0% ~ 0.5% の範囲内であった。

#### 【0209】

SEC-HPLC 分析のために、抗体サンプルをイソクラティック溶出条件下で (溶出緩衝液 0.02 M リン酸ナトリウム、pH 7.2) TSK gel G3000 SWXL カラム (7.8 × 300 mm、カタログ番号 08541、Tosoh Bioscience 社、上海、中国)、及び、それに続く UV-215 nm での検出によって分析した。各実験では、抗体サンプル 10  $\mu$ l をカラムに充填し、1 mL/分の流速で溶出した。二量体またはより大きな凝集体種の抗体を、モノマー種から分離し、二量体および凝集体の割合を UV トレースから統合されたピーク面積に基づいて決定した。

#### 【0210】

加速貯蔵安定性研究においては、高温条件での抗体の安定性を試験するために、抗 PD-1 抗体 (PBS 中 10 ~ 40 mg/mL) を 40 ~ 50 °C のインキュベーターの中で 4 ~ 7 日間維持した。その後、抗体サンプルは、SEC-HPLC にて、熱による二量体及び凝集体の形成について分析した。分析された各々の抗 PD-1 では、2% 未満が高分子量種 (二量体及び凝集体) となったが、それは、抗 PD-1 抗体が高温条件下で良好な安定性を有することを示す。

#### 【0211】

酸性条件下での抗体の安定性は、下流製造プロセス (文献 [Liu et al. 2010 Abs 2: 480-499] 参照) において重要な課題となっている。プロテイン A からの抗体の溶出及びウイルスの不活性化は、通常、低 pH (2.5 ~ 4) 条件での抗体のインキュベーションを必要とする。しかし、このような酸性条件は、潜在的に、抗体の変性および凝集を引き起こす可能性がある。ヒト IgG4 は、IgG1 および IgG2 のよりも安定性が劣ることが知られている。文献 [2002 Immunology 50

105 : 9 ] 参照。したがって、我々は様々な I g G 4 の突然変異フォーマットで作製したヒト化モノクローナル抗体をアッセイした。簡単に言えば、低 P H 条件での抗体の安定性を、p H 3 . 6 , 3 . 3 , 3 . 0、または、2 . 7 で 5 0 m M のクエン酸ナトリウム、1 0 0 m M の N a C l を含有する低 p H 緩衝液と 1 : 1 容積で混合した各抗体サンプル ( P B S 中 1 0 m g / m L ) によって調べた。室温で 1 時間インキュベートした後、低 p H 条件の抗体サンプルを 1 : 5 希釈によって S E C - H P L C 溶出緩衝液 ( 0 . 2 M のリン酸ナトリウム含有、p H 7 . 2 ) 中へ中和した。上述したように S E C - H P L C 分析を行って、低 p H 条件によって誘導された二量体及び凝集体の割合 ( % ) を定量化した。I g G 1 形式の抗 P D - 1 モノクローナル抗体 3 1 7 - 4 B 6 は、p H 値が 2 . 7 と低い得る場合でも、バイオプロセッシング関連酸性条件下で最も安定であった。いくつかの I g G 4 変異体として作られた抗 P D - 1 モノクローナル抗体のうち、酸によって誘導された凝集体が I g G 1 フォーマットの抗 P D - 1 モノクローナル抗体、3 1 7 - 4 B 6 および 3 2 6 - 4 A 3 に匹敵する水準まで有意に減少されたことから、h u 3 1 7 - 4 B 6 / I g G 4 m t 1 0 及び h u 3 2 6 - 4 A 3 / I g G 4 m t 1 0 が酸緩衝液条件下で最も安定であった ( 表 2 1 ) 。

10

【 0 2 1 2 】

【 表 2 1 】

酸性緩衝液中に形成され、S E C - H P L C によってアッセイされた二量体及び可溶性凝集体

抗 P D - 1 モノクローナル抗体	二量体及び凝集体 ( % )				
	p H 7 . 2	p H 3 . 6	p H 3 . 3	p H 3 . 0	p H 2 . 7
3 1 7 - 4 B 6 / I g G 1	0 . 0 %	0 . 0 %	0 . 2 %	0 . 1 %	0 . 2 %
3 1 7 - 4 B 6 / I g G 4 m t 1	0 . 0 %	1 . 0 %	1 1 . 0 %	4 9 . 0 %	4 8 . 0 %
3 1 7 - 4 B 6 / I g G 4 m t 3	0 . 0 %	1 3 . 0 %	3 1 . 0 %	> 5 0 %	> 5 0 %
3 1 7 - 4 B 6 / I g G 4 m t 6	0 . 0 %	4 . 0 %	4 1 . 0 %	> 5 0 %	> 5 0 %
3 1 7 - 4 B 6 / I g G 4 m t 9	0 . 0 %	0 . 5 %	2 . 1 %	3 . 3 %	2 . 0 %
3 1 7 - 4 B 6 / I g G 4 m t 1 0	0 . 0 %	0 . 2 %	0 . 6 %	0 . 6 %	1 . 4 %
3 2 6 - 4 A 3 / I g G 4 m t 1 0	0 . 0 %	0 . 0 %	0 . 4 %	0 . 5 %	1 . 2 %

20

30

【 0 2 1 3 】

実施例 1 1 抗 P D - 1 モノクローナル抗体の結合エピトープのマッピング

【 0 2 1 4 】

P D - 1 / P D - L 1 および P D - 1 / P D - L 2 の複合体の結晶構造に関する以前の報告は、リガンド結合に必要な P D - 1 上の重要なアミノ酸 ( A A ) の理解に光を当てた。文献 [ Z h a n g e t a l . 2 0 0 4 I m m u n i t y , 2 0 : 3 3 7 - 3 4 7 ] ; 文献 [ L i n D . Y . e t a l . 2 0 0 8 P N A S 1 0 5 : 3 0 1 1 - 3 0 1 6 ] ; 及び文献 [ L a z a r - M o l n a r E . e t a l . 2 0 0 8 P N A S , 1 0 5 : 1 0 4 8 3 - 1 0 4 8 8 ] 参照。実際に、このような 6 個の A A アミノ酸残基を、P D - L 1 結合に必要な点突然変異分析により受容体上で同定した。上記 6 個の A A 残基のうち 5 個は P D - L 1 結合にも必要であった。文献 [ L i n D . Y . e t a l . 2 0 0 8 P N A S 1 0 5 : 3 0 1 1 - 3 0 1 6 ] 参照。構造誘導型変異分析からの情報に基づいて、我々は、機能的モノクローナル抗体が P D - 1 媒介性のシグナル伝達を遮断する最も効果的な方法は、6 個の重要な A A 残基に結合することで、リガンド結合に必要な結合エピトープを占有することで P D - 1 リガンドと競争するこ

40

50

とであるという仮説を立てた。仮説を研究し、機能的PD-1抗体による作用メカニズムを理解するために、我々は、6つの重要なAA(すなわち、K45A、I93A、L95A、P97A、I101A、及びE103A)それぞれを個別にAlaに置き換えることにより、PD-1の6個の変異体を作製した。文献[Lin D. Y. et al. 2008 PNAS 105:3011-3016に基づくAA残基番号付け]参照。変異体PD-1/FcおよびPD-1/His(図1)は、PCRにより導かれた突然変異誘発またはファストミタジェネシスシステム(カタログ番号FM111、Transgen Biotech社、北京、中国)を使用するローリングサークル突然変異誘発のための鋳型として使用した。全ての変異体は、我々のpcDNA系発現ベクター中でサブクローニングされ、配列決定により確認された。突然変異PD-1及び野生型PD-1タンパク質は、(実施例1に記載された)一過性トランスフェクションによって発現され、4-6日間の培養後に用意された。馴化培地(CM)をウエスタンブロットによって分析して、質と量の面でPD-1タンパク質の発現を検証した。上清(CM)は、細胞破片をクリアした後、エピトープマッピングのためのELISA分析又はウエスタンブロットにおいて直接使用した。

10

#### 【0215】

ヒト化抗PD-1モノクローナル抗体の結合エピトープを調べるために、野生型(WT)および突然変異体(Mt)PD-1を用いるELISAアッセイを行って、hu317-4B5、hu317-4B6、hu326-3B1及びhu326-4A3の結合活性を評価した。抗体結合特徴の独自性を確認する比較のために、2つの基準抗体(それぞれUS8008449B2及びUS8168757B2からの基準Ab-1および基準Ab-2)をこの研究に含ませた。同じELISAアッセイにおいて、WTまたはMtPD-1を含有する同容積のCMをすべてのモノクローナル抗体について96-ウェルに被覆した。すべてのELISAの結果を、標準としてWT PD-1結合シグナルの平均ELISA測定値を用いて正規化した。特定のMt PD-1に対するELISA結合シグナルを、特定のMt PD-1に対する最も高い抗体結合読み出し(100%として設定する)に対してさらに標準化した。データ解析の便宜のために、特定の突然変異体のモノクローナル抗体のELISA結合シグナルがWT PD-1に対して50%未満に落ちたときに、アミノ酸残基は重要な結合エピトープとなると定義される。それは、その突然変異が抗体結合を有意に排除するからである。同様に、特定の突然変異体のモノクローナル抗体のELISA結合シグナルが25%未満に落ちたときに、それは非常に重要であると定義される。図8に示すように、PD-1に重要なアミノ酸残基のうち2つ、K45およびI93は、モノクローナル抗体hu317-4B5及びhu317-4B6結合のための重要または非常に重要なエピトープであり、3つのAA残基、I93、L95及びP97は、hu326-3B1及びhu326-4A3のための重要または非常に重要なエピトープである。一方で、2つの基準抗体は、独自の結合エピトープを有するが、P97は基準Ab-1に重要であるが、L95及びP97は、基準Ab-2に重要である。

20

30

#### 【0216】

興味深いことに、PD-1タンパク質はウエスタンブロットで変性されたとき、重要な結合エピトープ(K45及びI93)は互いに近接していないものの(非線形)、依然としてWT PD-1に結合することができた。これは、PD-1タンパク質は、ウエスタンブロットプロセスのSDS-PAGEにおいて変性した後ある程度再生されるようになったことを示す。これによって、抗PD-1モノクローナル抗体がそれを認識し、かつ、結合することができる。この観察結果を利用して、我々は、上記ELISA研究に使用されたすべての6つの抗体についてウエスタンブロット分析を行った。ウエスタンブロットからの全体的な結果はELISA結果をよく裏付けた。つまり、重要又は非常に重要なエピトープを変異させると、ELISAにおいて低い結合シグナルが得られたが、他の変異体PD-1への結合と比較して、最も弱いウエスタンブロットバンドを示した(図8)。ELISAとウエスタンブロットとの間に一部わずかな違い(例えば、基準Ab-2によるI93A及びE103A上のELISA結合シグナルはウエスタンブロットにおけるそ

40

50

れらよりも比較的強かった)もあった。これは、これらのAA残基が、変異されたときにストレス条件下においても(すなわち、変性又は天然の構造を失うこと)結合に影響を与えたことから、結合に寄与し得ることを示すかもしれない。表22にまとめたように、本発明において、抗PD-1モノクローナル抗体は、他の抗PD-1抗体とは異なる識別可能な結合エピトープを有している。

【0217】

【表22】

抗PD-1モノクローナル抗体の重要なエピトープの概要

	K45A	I93A	L95A	P97A	I101A	E103A
hu317-4B5	***	**				
hu317-4B6	***	**				
hu326-3B1		**	**	**		
hu326-4A3		***	**	**		
基準Ab-1				**		
基準Ab-2			**	**		
*図8に基づく						

10

20

【0218】

実施例12 抗PD-1モノクローナル抗体は、異種移植マウスモデルにおいて初代ヒトPBMCを活性化し、腫瘍増殖を阻害する

【0219】

ヒト化抗PD-1モノクローナル抗体はヒトPBMCを活性化する

【0220】

ヒト化プロセス全体を通して、様々な段階におけるヒト化抗PD-1モノクローナル抗体は、ELISA、FACS、及び、免疫細胞系サイトカイン放出アッセイによって評価したように同様の機能的活性を保持した。ヒト化モノクローナル抗体の最終版の機能を確認するために、我々は、初代ヒトPBMCを使用してhu317-4B5、hu317-4B6、hu326-3B1及びhu326-4A3の活性化機能をアッセイした。結果は、これらのモノクローナル抗体がヒト化を通じて、活性化の程度は個々の遺伝的バックグラウンドの違いに起因して4つのドナー間で異なるが、初代PBMCを活性化する元のマウスのモノクローナル抗体機能を維持したことを実証した。

30

【0221】

ヒト抗PD-1モノクローナル抗体は、癌細胞に対するNK細胞系細胞毒性を増強する

【0222】

元のマウスモノクローナル抗体からのヒト化抗PD-1モノクローナル抗体、hu317-4B5、hu317-4B6、hu326-3B1及びhu326-3G1は、標的肺癌細胞、SK-MES-1/PD-L1に対するNK92MI/PD-1細胞媒介性細胞毒性を用量依存的に増強する(図10、表23)。原理的には、ヒト化抗PD-1モノクローナル抗体は、PD-1シグナル伝達によって媒介される免疫細胞寛容を破壊して、NK細胞及び細胞毒性Tリンパ球等の免疫細胞による癌死滅活性を増強するよう機能する可能性が明らかになった。

40

【0223】

ヒト抗PD-1モノクローナル抗体は、マウス異種移植片癌モデルにおいてin vivoでヒトPBMCを活性化し、in vivoで腫瘍増殖を阻害する

【0224】

全ての実験証拠は、上記抗PD-1モノクローナル抗体が、ヒト癌細胞を異種移植した免疫不全マウスにヒトPBMCを移植し、モノクローナル抗体処理を行ってin vivo

50

oでの癌細胞増殖を阻害するマウス癌モデルにおいて作用し得ることを示した。次の通り実験を設計した。7～8週齢のSCID-雄マウス(バイタル・リバー・ラボラトリーズ、中国)を50%マトリゲル(BD Biosciences、New Jersey、USA)中で $3 \times 10^6$ のHep3B/OS8-PD-L1細胞を右脇腹に皮下接種した。腫瘍接種後15日経過した時点で、大きさ $100 - 250 \text{ mm}^3$ の腫瘍を有するマウスを無作為化し、3つの処置群に分けた。2人の健康なドナーからプールされたPBMC( $5 \times 10^5$ ) $100 \mu\text{l}$ を腫瘍内に注入した。PBMCを移植してから3日後、抗PD-1抗体(Hu317-IgG4mt2)およびヒトIgGを皮下経路でそれぞれ $10 \text{ mg/kg}$ の投与量で投与した。抗体処置は、10日に1回で総3回繰り返した。PBSを陰性対照群として並行群に注射した。7日目から週2回キャリパーで腫瘍を測定した。腫瘍体積は、以下の式を用いて算出した： $[D \times (d^2)] / 2$ (Dは腫瘍の大きな直径を表し、dは小さな直径を表す)。すべての動物研究は、Beigene Animal Care and Use Procedureに従って行った。

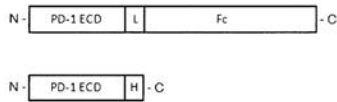
10

#### 【0225】

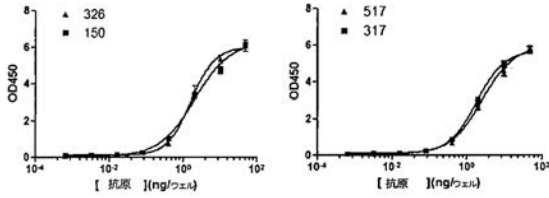
in vivo研究では、対照群における腫瘍の60%が自動回帰したが、in vivoでの実験の残りは、依然として、かなり参考になり、それを図11に示した。対照群(ビヒクル処置群又はヒトIgG(huIgG)処置群)それぞれは出発点のベースラインよりも40%の腫瘍(5匹のマウスのうち2匹)成長(増殖)がみられた。PBS処置群の2つの腫瘍はより大きく成長した( $2000 \text{ mm}^3$ 超、プロトコルによって腫瘍サイズ制限を超えた1匹の腫瘍マウスは早めに終了させた)。huIgG処置群の2つの腫瘍は、PBS処置群のサイズよりは小さいものの、平均ベースライン $164 \text{ mm}^3$ を有意に超える、 $800 - 1370 \text{ mm}^3$ にまで成長した。一方で、抗PD-1モノクローナル抗体(hu317-1/IgG4mt2)処置群では、腫瘍が完全に回帰したが、ベースラインのサイズに近くなっていた(一つの腫瘍= $200 \text{ mm}^3$ 、これはPBMC移植から2週間の時点でベースラインの50%まで回帰した後、ゆっくりと元の状態に戻った)。この結果は、前述した抗PD-1抗体がマウスのin vivo癌モデルにおける腫瘍細胞増殖を阻害するヒト免疫細胞を活性化することを示すが、これは、前述したin vitro実験結果に一致するものである。

20

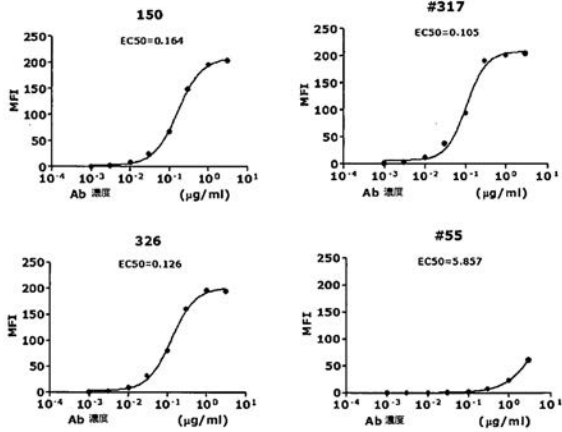
【 図 1 】



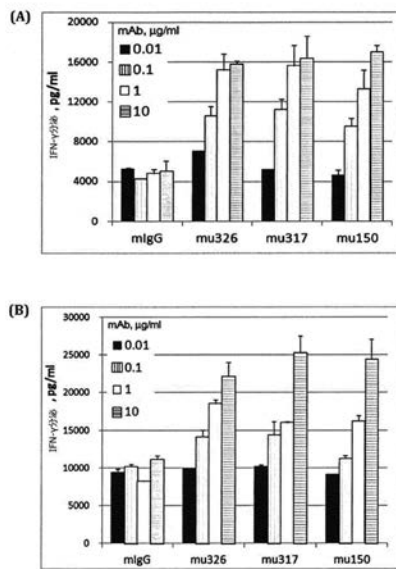
【 図 2 】



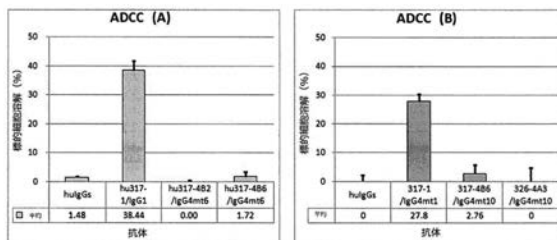
【 図 3 】



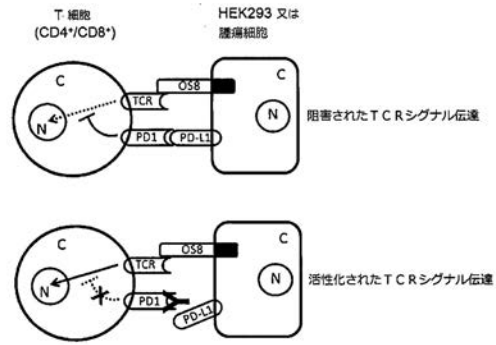
【 図 6 】



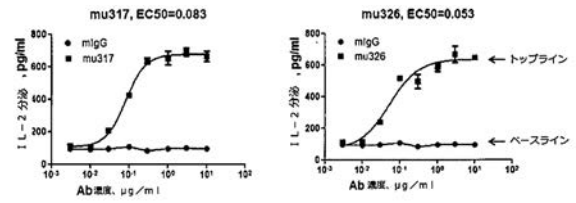
【 図 7 】



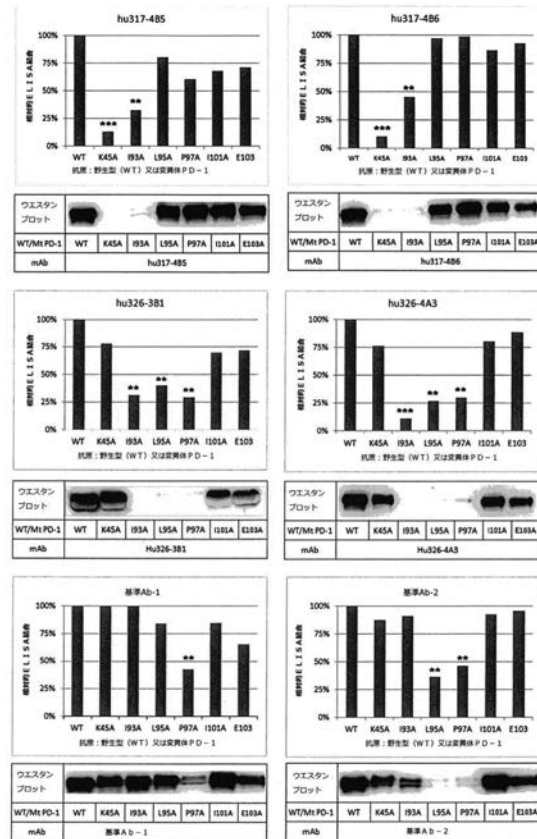
【 図 4 】



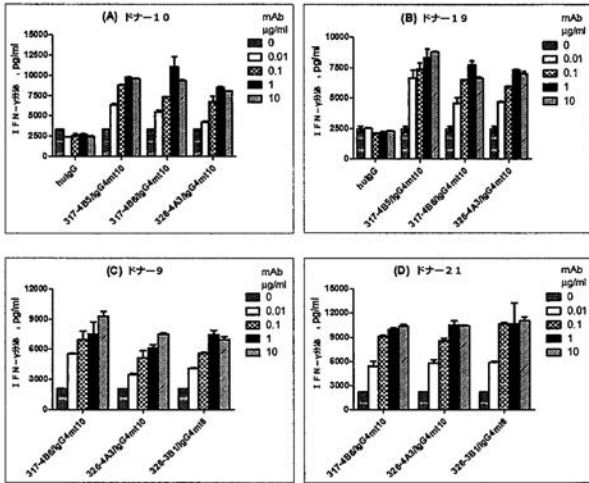
【 図 5 】



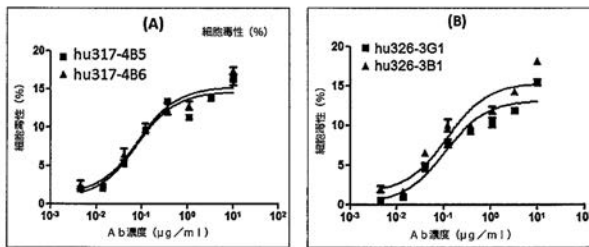
【 図 8 】



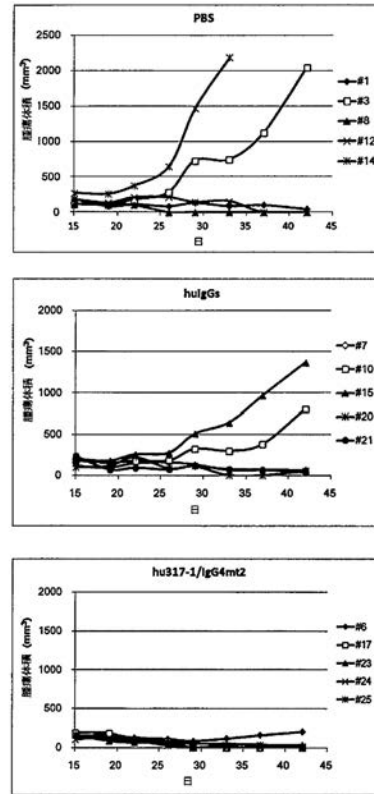
【 図 9 】



【 図 10 】



【 図 11 】



【 配 列 表 】

2019048804000001.app

【 手 続 補 正 書 】

【 提 出 日 】 平 成 30 年 10 月 22 日 (2018.10.22)

【 手 続 補 正 1 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 特 許 請 求 の 範 囲

【 補 正 対 象 項 目 名 】 全 文

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 特 許 請 求 の 範 囲 】

【 請 求 項 1 】

ヒト PD - 1 に結合するモノクローナル抗体であって、

PD - 1 結合ドメインと、位置 228、233、234 及び 235 のアミノ酸変異を有する IgG4Fc 領域とを含み、

位置 233、234 及び 235 のアミノ酸変異によって、位置 228 の変異を有し、その他の Fc 領域の変異が無い参照 IgG4 抗体の Fc 結合と比較して、少なくとも 1 つの Fc 受容体への低い結合を、前記抗体が示し、

IgG4Fc 領域における残基の番号が、EU 番号付けシステムによる番号である、抗体。

【 請 求 項 2 】

IgG4Fc 領域が、位置 228、233、234、235 及び 265 のアミノ酸変異を有する、請求項 1 に記載の抗体。

【 請 求 項 3 】

IgG4Fc 領域が、位置 228、233、234、235、265、309 及び 409 のアミノ酸変異を有する、請求項 1 に記載の抗体。

**【請求項 4】**

I g G 4 F c 領域が、S 2 2 8 P、E 2 3 3 P、F 2 3 4 V 及び L 2 3 5 A のアミノ酸変異を有する、請求項 1 に記載の抗体。

**【請求項 5】**

配列番号 8 4 ~ 8 8 のいずれかを含む抗体 I g G 4 重鎖エフェクター又は定常領域をさらに含む、請求項 1 に記載の抗体。

**【請求項 6】**

抗体 I g G 4 重鎖エフェクター又は定常領域が、配列番号 8 7 又は 8 8 を含む、請求項 5 に記載の抗体。

**【請求項 7】**

癌若しくはウイルス感染症を有する、又はその他、P D - 1 拮抗作用を必要とするとの判定を受けた患者における、癌又はウイルス感染症の治療に使用するための請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の抗体。

## 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 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	N
	C 1 2 P 21/08	

- (72)発明者 リ カン  
中華人民共和国 1 0 2 2 0 6 ベイジン,チャンピン,ジョンガンチュン ライフ サイエンス  
パーク,サイエンス パーク ロード No. 3 0
- (72)発明者 チャン トン  
中華人民共和国 1 0 2 2 0 6 ベイジン,チャンピン,ジョンガンチュン ライフ サイエンス  
パーク,サイエンス パーク ロード No. 3 0
- (72)発明者 シュ ランラン  
中華人民共和国 1 0 2 2 0 6 ベイジン,チャンピン,ジョンガンチュン ライフ サイエンス  
パーク,サイエンス パーク ロード No. 3 0
- (72)発明者 リュウ チ  
中華人民共和国 1 0 2 2 0 6 ベイジン,チャンピン,ジョンガンチュン ライフ サイエンス  
パーク,サイエンス パーク ロード No. 3 0
- (72)発明者 ペン ハオ  
中華人民共和国 1 0 2 2 0 6 ベイジン,チャンピン,ジョンガンチュン ライフ サイエンス  
パーク,サイエンス パーク ロード No. 3 0

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ02 QQ03 QQ08 QR72 QR77 QS02 QS32  
4B064 AG26 AG27 BJ12 CA10 CA20 CC24 DA01  
4C085 AA13 BB11 EE01  
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA75 DA76  
EA20 FA74

专利名称(译)	抗pd-1抗体及其在治疗和诊断中的用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP2019048804A</a>	公开(公告)日	2019-03-28
申请号	JP2018177092	申请日	2018-09-21
[标]申请(专利权)人(译)	百济神州有限公司		
申请(专利权)人(译)	北津有限公司		
[标]发明人	ソンジン リカン チャントン シュランラン リュウチ ペンハオ		
发明人	ソン ジン リ カン チャ ントン シュ ランラン リュウ チ ペン ハオ		
IPC分类号	C07K16/28 C12N15/13 C07K19/00 C07K14/705 C12Q1/02 A61K39/395 A61P35/00 A61P31/12 G01N33/53 C12P21/08		
FI分类号	C07K16/28.ZNA C12N15/13 C07K19/00 C07K14/705 C12Q1/02 A61K39/395.N A61K39/395.D A61P35/00 A61P31/12 G01N33/53.N C12P21/08		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS02 4B063/QS32 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/BJ12 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4C085/AA13 4C085/BB11 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/FA74		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明提供用于程序性死亡-1 ( PD-1 , Pdc1-1或CD279 ) 的免疫抑制 ( 抑制 ) 的方法和组合物。 一组特异性结合程序性死亡-1 ( PD-1 , Pdc1-1或CD279 ) 的氨基酸, 抑制免疫细胞中PD1介导的细胞内信号传导, 是配体结合所必需的。使用与残基结合并且治疗或诊断由PD1介导的功能调节的癌症, 感染或其他病理异常的抗体。 [选图]图1

