

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-508658
(P2020-508658A)

(43) 公表日 令和2年3月26日(2020.3.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C12N 15/13 (2006.01)	C12N 15/13	4B064
C12N 15/62 (2006.01)	C12N 15/62 ZNAZ	4B065
C12N 15/63 (2006.01)	C12N 15/63 Z	4C084
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4C085
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/19	4H045

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 50 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-544918 (P2019-544918)
 (86) (22) 出願日 平成30年2月26日 (2018.2.26)
 (85) 翻訳文提出日 令和1年10月4日 (2019.10.4)
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2018/077190
 (87) 国際公開番号 WO2018/153366
 (87) 国際公開日 平成30年8月30日 (2018.8.30)
 (31) 優先権主張番号 201710108747.2
 (32) 優先日 平成29年2月27日 (2017.2.27)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 中国 (CN)

(71) 出願人 510166892
 ジェンス ヘンルイ メディシンカンパニ
 ー リミテッド
 JIANGSU HENGRUI MED
 ICINE CO., LTD.
 中華人民共和国 ジェンス 222002
 リエンユンガン エコノミック・アンド
 ・テクノロジカル・ディベロップメント・
 ゾーン クンルンジャン ロード ナンバ
 ー7

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 TIM-3 抗体、その抗原結合断片、及びそれらの医学的使用

(57) 【要約】

本発明は、TIM-3 抗体、その抗原結合断片、及びそれらの医学的使用を提供する。更に、本発明は、前記 TIM-3 抗体の CDR 領域を含むラット由来抗体、キメラ抗体、ヒト由来抗体、及び前記 TIM-3 抗体及びその抗原結合断片を含む医薬組成物、並びに薬物としてのそれらの使用を提供する。薬物としての使用と同様に。特に、本発明は、TIM-3 に関連した状態を治療するための薬物の調製における、ヒト由来 TIM-3 抗体の使用を提供する。

【選択図】 図 2 C

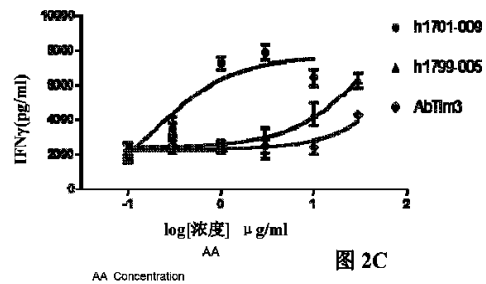


図 2C

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1. ヒト TIM-3 抗原の細胞外領域に結合し、以下の(i)から(ii)のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片の何れか 1 つから選択される TIM-3 抗体又はその抗原結合断片：

(i) 以下の配列から選択されるか、又は以下の配列と少なくとも 95% の同一性を有するアミノ酸配列から選択される 1 つ以上の CDR 領域配列を含むモノクローナル抗体又はその抗原結合断片：

配列番号：8、43 及び 10 に示される重鎖可変領域 HCDR 配列；並びに配列番号：11、12 及び 13 に示される軽鎖可変領域 LCDR 配列、

ここで、前記配列番号：43 は DIIPX₁X₂X₃GSKYNQKFKD として示され、

配列中、X₁ は N、L、V、M 又は E から選択され、X₂ は N、E、M、H、K、L、A 又は V から選択され、X₃ は G 又は A から選択される；

(ii) 以下の配列から選択されるか、又は以下の配列と少なくとも 95% の同一性を有するアミノ酸配列から選択される 1 つ以上の CDR 領域配列を含むモノクローナル抗体又はその抗原結合断片：

配列番号：14、15 及び 16 に示される重鎖可変領域 HCDR 配列；並びに配列番号：17、18 及び 19 に示される軽鎖可変領域 LCDR 配列。

【請求項 2】

以下の(i)から(ii)のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片の何れか 1 つから選択される、請求項 1 に記載の TIM-3 抗体又はその抗原結合断片：

(i) 配列番号：8、43 及び 10 にそれぞれ示される抗体重鎖可変領域 HCDR1-3、並びに配列番号：11、12 及び 13 にそれぞれ示される抗体軽鎖可変領域 LCDR1-3 を含む、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片；

(ii) 配列番号：14、15 及び 16 にそれぞれ示される抗体重鎖可変領域 HCDR1-3、並びに配列番号：17、18 及び 19 にそれぞれ示される抗体軽鎖可変領域 LCDR1-3 を含む、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 3】

以下の (a) から (m) のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片の何れか 1 つから選択される、請求項 1 又は請求項 2 に記載の TIM-3 抗体又はその抗原結合断片：

(a) 配列番号：8、9 及び 10 にそれぞれ示される抗体重鎖可変領域 HCDR1-3、並びに配列番号：11、12 及び 13 にそれぞれ示される抗体軽鎖可変領域 LCDR1-3 を含む、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片；

(b) 配列番号：8、62 及び 10 にそれぞれ示される抗体重鎖可変領域 HCDR1-3、並びに配列番号：11、12 及び 13 にそれぞれ示される抗体軽鎖可変領域 LCDR1-3 を含む、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片；

(c) 配列番号：8、63 及び 10 にそれぞれ示される抗体重鎖可変領域 HCDR1-3、並びに配列番号：11、12 及び 13 にそれぞれ示される抗体軽鎖可変領域 LCDR1-3 を含む、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片；

(d) 配列番号：8、64 及び 10 にそれぞれ示される抗体重鎖可変領域 HCDR1-3、並びに配列番号：11、12 及び 13 にそれぞれ示される抗体軽鎖可変領域 LCDR1-3 を含む、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片；

(e) 配列番号：8、65 及び 10 にそれぞれ示される抗体重鎖可変領域 HCDR1-3、並びに配列番号：11、12 及び 13 にそれぞれ示される抗体軽鎖可変領域 LCDR1-3 を含む、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片；

(f) 配列番号：8、66 及び 10 にそれぞれ示される抗体重鎖可変領域 HCDR1-3、並びに配列番号：11、12 及び 13 にそれぞれ示される抗体軽鎖可変領域 LCDR1-3 を含む、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片；

(g) 配列番号：8、67 及び 10 にそれぞれ示される抗体重鎖可変領域 HCDR1-3、並びに配列番号：11、12 及び 13 にそれぞれ示される抗体軽鎖可変領域 LCDR1-3 を含む、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片；

10

20

30

40

50

(h) 配列番号：8、68 及び 10 にそれぞれ示される抗体重鎖可変領域 HCDR1-3、並びに配列番号：11、12 及び 13 にそれぞれ示される抗体軽鎖可変領域 LCDR1-3 を含む、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片；

(i) 配列番号：8、69 及び 10 にそれぞれ示される抗体重鎖可変領域 HCDR1-3、並びに配列番号：11、12 及び 13 にそれぞれ示される抗体軽鎖可変領域 LCDR1-3 を含む、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片；

(j) 配列番号：8、70 及び 10 にそれぞれ示される抗体重鎖可変領域 HCDR1-3、並びに配列番号：11、12 及び 13 にそれぞれ示される抗体軽鎖可変領域 LCDR1-3 を含む、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片；

(k) 配列番号：8、71 及び 10 にそれぞれ示される抗体重鎖可変領域 HCDR1-3、並びに配列番号：11、12 及び 13 にそれぞれ示される抗体軽鎖可変領域 LCDR1-3 を含む、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片；

(l) 配列番号：8、72 及び 10 にそれぞれ示される抗体重鎖可変領域 HCDR1-3、並びに配列番号：11、12 及び 13 にそれぞれ示される抗体軽鎖可変領域 LCDR1-3 を含む、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片；

(m) 配列番号：14、15 及び 16 にそれぞれ示される抗体重鎖可変領域 HCDR1-3、並びに配列番号：17、18 及び 19 にそれぞれ示される抗体軽鎖可変領域 LCDR1-3 を含む、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 4】

前記モノクローナル抗体が組換え抗体である、請求項 1 から 3 の何れか一項に記載の TIM-3 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 5】

前記モノクローナル抗体が、マウス抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体又はそれらの抗原結合断片の組換え抗体から選択される、請求項 4 に記載の TIM-3 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 6】

前記ヒト化抗体の軽鎖及び重鎖可変領域の FR 配列が、ヒト生殖細胞系列型軽鎖及び重鎖にそれぞれ由来する、又はその変異配列に由来する、請求項 5 に記載の TIM-3 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 7】

前記ヒト化抗体が配列番号：44 若しくは 31 に示される重鎖可変領域又はそのバリエーションを含み、前記バリエーションが配列番号：44 又は 31 の重鎖可変領域それぞれに 1-10 個のアミノ酸変異を有する、請求項 6 に記載の TIM-3 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 8】

前記バリエーションが配列番号：44 又は 31 の重鎖可変領域の FR 領域に 1-10 個のアミノ酸復帰変異を有し；好ましくは、前記復帰変異が、配列番号：44 の重鎖可変領域上の D89E、R98T、G49A、M48I、M70L、R38K 及び V68A 復帰変異からなる群から選択される、又は配列番号：31 の重鎖可変領域内の Q3K 若しくは R87K 復帰変異から選択される、請求項 7 に記載の TIM-3 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 9】

前記ヒト化抗体が、配列番号：45-50 の何れか 1 つから選択される重鎖可変領域を含む、又は配列番号：34-35 の何れか 1 つから選択される重鎖可変領域を含む、請求項 8 に記載の TIM-3 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 10】

前記ヒト化抗体が、配列番号：21 又は 32 に示される軽鎖可変領域又はそのバリエーションを含み；前記バリエーションが配列番号：21 又は 32 の軽鎖可変領域上に 1-10 個のアミノ酸変異を有する、請求項 6 に記載の TIM-3 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 11】

前記バリエーションが、配列番号：21 又は 32 の軽鎖可変領域の FR 領域に 1-10 個のアミノ酸の復帰変異を有し；好ましくは、前記復帰変異が、配列番号：21 の軽鎖可変領域

10

20

30

40

50

の A43S 復帰変異から選択される、又は配列番号：32 の重鎖可変領域の Q3K、I48V、K45 Q、A43S 若しくは T85S 復帰変異から選択される、請求項 10 に記載の TIM-3 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 12】

前記ヒト化抗体が、配列番号：30 の軽鎖可変領域を含む、又は配列番号：37-40 の何れか 1 つから選択される軽鎖可変領域を含む、請求項 11 に記載の TIM-3 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 13】

前記ヒト化抗体が、配列番号：44-50 の何れか 1 つから選択される重鎖可変領域、及び配列番号：29-30 の何れか 1 つから選択される軽鎖可変領域を含む；若しくは配列番号：22-28 の何れか 1 つから選択される重鎖可変領域、及び配列番号：29-30 の何れか 1 つから選択される軽鎖可変領域を含む；又は配列番号：33-35 の何れか 1 つから選択される重鎖可変領域、及び配列番号：36-40 の何れか 1 つから選択される軽鎖可変領域を含む；好ましくは、配列番号：24 の重鎖可変領域、及び配列番号：29 の軽鎖可変領域を含む；若しくは配列番号：33 の重鎖可変領域、及び配列番号：36 の軽鎖可変領域を含む、請求項 1 から 12 の何れか一項に記載の TIM-3 抗体又はその抗原結合断片。

10

【請求項 14】

前記ヒト化抗体が、配列番号：51-61 の何れか 1 つから選択される重鎖可変領域、及び配列番号：29-30 の何れか 1 つから選択される軽鎖可変領域を含み；好ましくは、配列番号：51 の重鎖可変領域、及び配列番号：29 の軽鎖可変領域を含む、又は、配列番号：52 の重鎖可変領域、及び配列番号：29 の軽鎖可変領域を含む、請求項 13 に記載の TIM-3 抗体又はその抗原結合断片。

20

【請求項 15】

前記抗体が全長抗体であり、ヒト抗体の定常領域を更に含み、好ましくは配列番号：41 に示されるヒト重鎖定常領域を含み、及び好ましくは配列番号：42 に示されるヒト軽鎖定常領域を含む、請求項 1 から 14 の何れか一項に記載の TIM-3 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 16】

前記抗原結合断片が、Fab、Fab'、F(ab')₂、単鎖抗体 (scFv)、二量体化 V 領域 (ダイアボディ (diabody))、ジスルフィド安定化 V 領域 (dsFv) 及び CDR 含有ペプチドからなる群より選択される、請求項 1 から 14 の何れか一項に記載の TIM-3 抗体又はその抗原結合断片。

30

【請求項 17】

TIM-3 への結合について、請求項 1 から 16 に記載のモノクローナル抗体又は抗原結合断片と競合することを特徴とする、単離されたモノクローナル抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 18】

治療有効量の請求項 1 から 17 の何れか一項に記載の TIM-3 抗体又はその抗原結合断片、及び 1 つ以上の薬学的に許容される担体、希釈剤又は賦形剤とを含む組成物。

【請求項 19】

請求項 1 から 17 の何れか一項に記載の抗体又はその抗原結合断片をコードする核酸分子。

40

【請求項 20】

請求項 19 に記載の核酸分子を含む組換えベクター。

【請求項 21】

宿主細胞が、原核細胞及び真核細胞からなる群、好ましくは真核細胞、より好ましくは哺乳動物細胞から選択される、請求項 20 に記載の組換えベクターで形質転換された宿主細胞。

【請求項 22】

請求項 21 に記載の宿主細胞を培養物中で培養して、請求項 1 から 17 の何れか一項に

50

記載の抗体又はその抗原結合断片を形成及び蓄積させ、及び前記培養物から前記抗体又はその抗原結合断片を回収することを含む、請求項 1 から 17 の何れか一項に記載の抗体又はその抗原結合断片を生産する方法。

【請求項 23】

請求項 1 から 17 の何れか一項に記載の抗体又はその抗原結合断片を使用することを含む、ヒト TIM-3 を免疫アッセイする、又は測定するための方法。

【請求項 24】

請求項 1 から 17 の何れか一項に記載の抗体又はその抗原結合断片を含む、ヒト TIM-3 を検出するため、又は測定するための試薬。

【請求項 25】

請求項 1 から 17 の何れか一項に記載の抗体又はその抗原結合断片を含む、ヒト TIM-3 陽性細胞に関連する疾患を検出するのに使用するための診断薬。

【請求項 26】

請求項 1 から 17 の何れか一項に記載の抗体又はその抗原結合断片を使用することにより、ヒト TIM-3 又は TIM-3 陽性細胞を検出すること、又は測定することを含む、ヒト TIM-3 陽性細胞に関連する疾患を診断するための方法。

【請求項 27】

ヒト TIM-3 陽性細胞に関連する疾患の診断薬を調製することにおける、請求項 1 から 17 の何れか一項に記載の抗体又はその抗原結合断片の使用。

【請求項 28】

請求項 1 から 17 の何れか一項に記載の抗体又はその抗原結合断片、若しくは請求項 18 に記載の医薬組成物、又は請求項 19 に記載の核酸分子を含む、ヒト TIM-3 陽性細胞に関連する疾患で使用するための治療薬。

【請求項 29】

請求項 1 から 17 の何れか一項に記載の抗体又はその抗原結合断片、若しくは請求項 18 に記載の医薬組成物、又は請求項 19 に記載の核酸分子によって、ヒト TIM-3 陽性細胞死を誘導することを含む、ヒト TIM-3 陽性細胞に関連する疾患を治療する方法。

【請求項 30】

ヒト TIM-3 陽性細胞に関連する疾患の治療のための治療薬の調製における、請求項 1 から 17 の何れか一項に記載の抗体又はその抗原結合断片、若しくは請求項 18 に記載の医薬組成物、又は請求項 19 に記載の核酸分子の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、TIM-3 抗体及びその抗原結合断片に関する。更に、本発明は、前記 TIM-3 抗体の CDR 領域を含むキメラ抗体及びヒト化抗体、並びに TIM-3 抗体及びその抗原結合断片を含む医薬組成物、並びに TIM-3 関連疾患における診断薬及び治療薬としてのそれらの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

T 細胞免疫グロブリン及びムチンドメイン含有分子-3 (T cell immunoglobulin and mucin domain-containing molecule-3 (TIM-3)) は、A 型肝炎ウイルス細胞受容体 2 (HAV CR-2) としても知られ、I 型膜表面タンパク質分子であり、TIM ファミリーのメンバーに属する。ヒト TIM-3 分子は、シグナル・ペプチド、Ig 可変領域 (IgV)、セリン/スレオニンに富むムチン領域、膜貫通ドメイン、及び細胞質領域等を含む 301 アミノ酸で構成され、マウスとヒトの間で 63% の相同性がある。

【0003】

TIM-3 は、IFN- γ を分泌するヘルパー T 細胞 (Th1 及び Th17)、制御性 T 細胞 (Treg)、樹状細胞 (DC)、単球、マスト細胞、NK 細胞及び腫瘍浸潤リンパ球 (TILs) 等で、選択的に発現する (例えば、Clayton et al., J. Immunol., 192(2): 782-791 (2014))

10

20

30

40

50

; Jones et al., J. Exp. Med., 205: 2763-2779 (2008) を参照)。現在知られている TIM-3 受容体には、ホスファチジルセリン・ガラクトース・レクチン 9 (ガレクチン-9、Gal-9)、高移動度グループ・タンパク質 1 (high mobility group protein 1 (HMGB1))、及びがん胎児性抗原細胞接着分子 1 (carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 1 (CEACAM1)) が含まれる。

【0004】

TIM-3 は、多くの態様において、免疫系の機能を調節することができる。TIM-3 は、Th1 細胞の表面の Gal-9 リガンドに結合した後、Th1 細胞の免疫応答をダウンレギュレートすることができ、Th1 細胞のアポトーシスを誘発し、自己免疫疾患 (全身性エリテマトーデス、喘息等) 及び免疫寛容において、重要な役割を果たす。単球マクロファージが発現する TIM-3 は、ホスファチジルセリンと相互作用して、アポトーシス細胞の細胞貪食を促進する; TIM-3 は、腫瘍に浸潤した樹状細胞の HMGB1 リガンドに結合し、核酸の正常な輸送を阻害するため、核酸の免疫応答を阻害し、免疫回避に関与する。TIM-3 は免疫細胞だけでなく、卵巣がん、髄膜腫、黒色腫、その他の腫瘍細胞にも発現し、腫瘍の成長を直接的に促進する。TIM-3 の発現がダウンレギュレーションすると、Hela 細胞の浸潤と転移が著しく抑制される。TIM-3 が過剰発現することは、肺がん、胃がん、前立腺がん、及び子宮頸がんが予後不良であることと密接に関連していた。血液悪性腫瘍では、TIM-3 は、急性骨髄性白血病患者の白血球幹細胞及び MDS (骨髄異形成症候群) 患者の造血幹細胞で過剰発現し、TIM-3⁺ 造血幹細胞は、低分化、低アポトーシス及び高増殖等の悪性の生物学的特性を持っている。従って、TIM-3 の活性を阻害して (TIM-3 抗体等) 固有の免疫系の機能を改善することは、腫瘍を治療するための有望な新しい方法である (例えば、Ngiow et al., Cancer Res., 71(21): 1-5 (2011); Guo et al., Journal of Translation Medicine, 11: 215 (2013); 及び Ngiow et al., Cancer Res., 71(21): 6567-6571 (2011) を参照)。

【0005】

抗体ベースの薬物の安定性は、それが薬剤になり得る可能性 (ドラッグビリティ (drugability)) に影響を与える重要な要因の 1 つである。ここで、アスパラギン (Asn) とグルタミン (Gln) が非酵素的に脱アミド化されると、抗体の不安定化と不均一化が引き起こされるが、これは、抗体分子の一般的な化学分解経路の 1 つである。複数の IgG1 サブタイプ抗体が、CDR 領域のアミノ酸の脱アミド化及び異性化によって、生物学的活性を失うことが報告されている。Huang らは、IgG1 モノクローナル抗体の重鎖可変領域 2 (CDR2) に位置する Asn55 が脱アミド化されると、前記抗体の結合活性が著しく低下することを発見した。従って、抗体を開発するプロセスでは、その対応するアミノ酸を回避するか、アミノ酸を変更することによって、脱アミド化が発生することを減らし、抗体の安定性と生物学的利用能を高める必要がある。

【0006】

TIM-3 抗体が報告されているいくつかの特許、例えば、WO2011159877、WO2013006490、WO2015117002、WO2016144803、WO2016161270、US20150218274 があるが、中国及び海外で、臨床研究段階にある TIM-3 抗体は僅か 2 つだけである。他の抗体ベースの薬物はまだ探索 (discovery) 及び研究段階にあり、臨床適用されている TIM-3 抗体は存在しない。従って、TIM-3 関連疾患における治療研究及び適用のためには、より高い活性、より高い親和性及びより高い安定性を備えた TIM-3 抗体を更に開発する必要がある。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、TIM-3 の細胞外領域のアミノ酸配列又は三次元構造に結合するモノクローナル抗体又はその抗原結合断片を提供する。更に、本発明は、本モノクローナル抗体又はその抗体断片と競合する抗ヒト TIM-3 抗体をスクリーニングすることにより、高い活性及び高い安定性を有する抗ヒト TIM-3 抗体を提供する。

【0008】

10

20

30

40

50

また、本発明は、本発明の抗体を生産するハイブリドーマ、本発明の抗体をコードする DNA、前記 DNA を含むベクター、前記ベクターで形質転換をすることによって得られる形質転換体、前記ハイブリドーマ又は前記形質転換体を使用することによる前記抗体又はその抗体断片の生産方法、及び前記抗体又はその抗体断片を使用することによる診断薬又は治療薬、を提供するものである。

【課題を解決するための手段】

【0009】

ある態様では、本発明は、ヒト TIM-3 の細胞外領域に結合し、及び以下の (i) から (iv) から選択されるモノクローナル抗体又は抗原結合断片と競合する、又は以下の (i) から (iv) から選択されるモノクローナル抗体又は抗原結合断片である、TIM-3 抗体又は抗原結合断片を提供する；

(i) 以下の配列から選択されるか、又は以下の配列と少なくとも 95% の同一性を有するアミノ酸配列から選択される 1 つ以上の CDR 領域配列を含むモノクローナル抗体又はその抗原結合断片；

配列番号： 8、43 及び 10 に示される重鎖可変領域 HCDR 配列；並びに配列番号： 11、12 及び 13 に示される軽鎖可変領域 LCDR 配列；

(ii) 以下の配列から選択されるか、又は以下の配列と少なくとも 95% の同一性を有するアミノ酸配列から選択される 1 つ以上の CDR 領域配列を含むモノクローナル抗体又はその抗原結合断片；

配列番号： 14、15 及び 16 に示される重鎖可変領域 HCDR 配列；並びに配列番号： 17、18 及び 19 に示される軽鎖可変領域 LCDR 配列；

(iii) 配列番号： 8、43 及び 10 にそれぞれ示される重鎖可変領域 HCDR1-3、並びに配列番号： 11、12 及び 13 にそれぞれ示される軽鎖可変領域 LCDR1-3 を含む、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片；

(iv) 配列番号： 14、15 及び 16 にそれぞれ示される重鎖可変領域 HCDR1-3、並びに配列番号： 17、18 及び 19 にそれぞれ示される軽鎖可変領域 LCDR1-3 を含む、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片。

【0010】

ある態様では、本発明は、ヒト TIM-3 の細胞外領域に結合し、及び以下の (a) から (m) からなる群から選択されるモノクローナル抗体若しくはその抗原結合断片と競合する、又は以下の (a) から (m) からなる群から選択されるモノクローナル抗体若しくはその抗原結合断片である、TIM-3 抗体又はその抗原結合断片を提供する；

(a) 配列番号： 8、9 及び 10 にそれぞれ示される抗体重鎖可変領域 HCDR1-3、並びに配列番号： 11、12 及び 13 にそれぞれ示される抗体軽鎖可変領域 LCDR1-3 を含む、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片；

(b) 配列番号： 8、62 及び 10 にそれぞれ示される抗体重鎖可変領域 HCDR1-3、並びに配列番号： 11、12 及び 13 にそれぞれ示される抗体軽鎖可変領域 LCDR1-3 を含む、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片；

(c) 配列番号： 8、63 及び 10 にそれぞれ示される抗体重鎖可変領域 HCDR1-3、並びに配列番号： 11、12 及び 13 にそれぞれ示される抗体軽鎖可変領域 LCDR1-3 を含む、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片；

(d) 配列番号： 8、64 及び 10 にそれぞれ示される抗体重鎖可変領域 HCDR1-3、並びに配列番号： 11、12 及び 13 にそれぞれ示される抗体軽鎖可変領域 LCDR1-3 を含む、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片；

(e) 配列番号： 8、65 及び 10 にそれぞれ示される抗体重鎖可変領域 HCDR1-3、並びに配列番号： 11、12 及び 13 にそれぞれ示される抗体軽鎖可変領域 LCDR1-3 を含む、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片；

(f) 配列番号： 8、66 及び 10 にそれぞれ示される抗体重鎖可変領域 HCDR1-3、並びに配列番号： 11、12 及び 13 にそれぞれ示される抗体軽鎖可変領域 LCDR1-3 を含む、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片；

(g) 配列番号：8、67 及び 10 にそれぞれ示される抗体重鎖可変領域 HCDR1-3、並びに配列番号：11、12 及び 13 にそれぞれ示される抗体軽鎖可変領域 LCDR1-3 を含む、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片；

(h) 配列番号：8、68 及び 10 にそれぞれ示される抗体重鎖可変領域 HCDR1-3、並びに配列番号：11、12 及び 13 にそれぞれ示される抗体軽鎖可変領域 LCDR1-3 を含む、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片；

(i) 配列番号：8、69 及び 10 にそれぞれ示される抗体重鎖可変領域 HCDR1-3、並びに配列番号：11、12 及び 13 にそれぞれ示される抗体軽鎖可変領域 LCDR1-3 を含む、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片；

(j) 配列番号：8、70 及び 10 にそれぞれ示される抗体重鎖可変領域 HCDR1-3、並びに配列番号：11、12 及び 13 にそれぞれ示される抗体軽鎖可変領域 LCDR1-3 を含む、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片；

(k) 配列番号：8、71 及び 10 にそれぞれ示される抗体重鎖可変領域 HCDR1-3、並びに配列番号：11、12 及び 13 にそれぞれ示される抗体軽鎖可変領域 LCDR1-3 を含む、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片；

(l) 配列番号：8、72 及び 10 にそれぞれ示される抗体重鎖可変領域 HCDR1-3、並びに配列番号：11、12 及び 13 にそれぞれ示される抗体軽鎖可変領域 LCDR1-3 を含む、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片；

(m) 配列番号：14、15 及び 16 にそれぞれ示される抗体重鎖可変領域 HCDR1-3、並びに配列番号：17、18 及び 19 にそれぞれ示される抗体軽鎖可変領域 LCDR1-3 を含む、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片。

【0011】

本発明の好ましい実施形態では、本明細書に記載の TIM-3 抗体又はその抗原結合断片を提供し、ここで、前記 TIM-3 抗体又はその抗原結合断片は、上記 (i) から (iv) から選択されるモノクローナル抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合する。

【0012】

本発明の好ましい実施形態では、本明細書に記載の TIM-3 抗体又はその抗原結合断片を提供し、前記モノクローナル抗体は組換え抗体である。

【0013】

本発明の好ましい実施形態では、本明細書に記載の TIM-3 抗体又はその抗原結合断片を提供し、前記モノクローナル抗体は、マウス抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体又はそれらの抗原結合断片の組換え抗体から選択される。

【0014】

本発明の好ましい実施形態では、本明細書に記載の TIM-3 抗体又はその抗原結合断片を提供し、ここで、前記ヒト化抗体の軽鎖及び重鎖可変領域の FR 配列が、ヒト生殖細胞系列型の軽鎖及び重鎖にそれぞれ由来する、又はそれらの変異配列に由来する。

【0015】

本発明の好ましい実施形態では、本明細書に記載の TIM-3 抗体又はその抗原結合断片を提供し、前記ヒト化抗体は、配列番号：44 若しくは 31 又はそれらのバリエーションとして示される重鎖可変領域を含み、前記バリエーションは、配列番号：44 又は 31 の重鎖可変領域に 1-10 個のアミノ酸変異を有する。

【0016】

本発明の好ましい実施形態では、本明細書に記載の TIM-3 抗体又はその抗原結合断片を提供し、前記バリエーションが配列番号：44 又は 31 の重鎖可変領域の FR 領域に 1-10 個のアミノ酸復帰変異を有し；好ましくは、前記復帰変異は、配列番号：44 の重鎖可変領域上の D89E、R98T、G49A、M48I、M70L、R38K 及び V68A 復帰変異からなる群から選択される、又は配列番号：31 の重鎖可変領域内の Q3K 若しくは R87K 復帰変異から選択される。

【0017】

本発明の好ましい実施形態では、本明細書に記載の TIM-3 抗体又はその抗原結合断片

10

20

30

40

50

を提供し、前記抗体の CDR 領域におけるアセチル化及び脱アミド化等の化学的修飾を排除するために、前記 CDR 領域上の化学修飾を起こしやすいアミノ酸部位を置換し、好ましくは CDR2 中の NNG を置換する。好ましくは、本明細書に記載の TIM-3 抗体又はその抗原結合断片を提供し、前記ヒト化抗体は、配列番号：45-50 の何れか 1 つから選択される重鎖可変領域を含む、又は配列番号：34-35 の何れか 1 つから選択される重鎖可変領域を含む。

【0018】

本発明の好ましい実施形態では、本明細書に記載の TIM-3 抗体又はその抗原結合断片を提供し、前記ヒト化抗体は、配列番号：21 又は 32 に示される軽鎖可変領域又はそのバリエーションを含み、前記バリエーションは、配列番号：21 又は 32 に示される軽鎖可変領域上に 1-10 個のアミノ酸変異を有する。

10

【0019】

本発明の好ましい実施形態では、本明細書に記載の TIM-3 抗体又はその抗原結合断片を提供し、前記バリエーションは、配列番号：21 又は 32 の軽鎖可変領域の FR 領域に 1-10 個のアミノ酸復帰変異を有し；前記復帰変異は、配列番号：21 の軽鎖可変領域の A43S 復帰変異から選択される、又は配列番号：32 の重鎖可変領域の Q3K、I48V、K45Q、A43S 及び T85S 復帰変異から選択される。

【0020】

本発明の好ましい実施形態では、本明細書に記載の TIM-3 抗体又はその抗原結合断片を提供し、前記ヒト化抗体は、配列番号：30 の軽鎖可変領域を含む、又は配列番号：37-40 の何れか 1 つから選択される軽鎖可変領域を含む。

20

【0021】

本発明の好ましい実施形態では、本明細書に記載の TIM-3 抗体又はその抗原結合断片を提供し、ここで、前記抗体の CDR 領域におけるアセチル化及び脱アミド化等の化学的修飾を排除するために、前記 CDR 領域上の化学修飾を起こしやすいアミノ酸部位を置換し、好ましくは CDR2 中の NNG を置換し、及び配列番号：43 に示されるような CDR2 配列を得る。好ましくは、本明細書に記載の TIM-3 抗体又はその抗原結合断片を提供し、ここで、前記ヒト化抗体が、配列番号：44-50 の何れか 1 つから選択される重鎖可変領域、及び配列番号：29-30 の何れか 1 つから選択される軽鎖可変領域を含む；若しくは配列番号：22-28 の何れか 1 つから選択される重鎖可変領域、及び配列番号：29-30 の何れか 1 つから選択される軽鎖可変領域を含む；又は配列番号：33-35 の何れか 1 つから選択される重鎖可変領域、及び配列番号：36-40 の何れか 1 つから選択される軽鎖可変領域を含む；好ましくは、配列番号：24 の重鎖可変領域、及び配列番号：29 の軽鎖可変領域を含む；若しくは配列番号：33 の重鎖可変領域、及び配列番号：36 の軽鎖可変領域を含む。

30

【0022】

本発明の好ましい実施形態では、本明細書に記載の TIM-3 抗体又はその抗原結合断片を提供し、ここで、前記抗体の CDR 領域におけるアセチル化及び脱アミド化等の化学的修飾を排除するために、前記 CDR 領域上の化学修飾を起こしやすいアミノ酸部位を置換し、好ましくは CDR2 中の NNG を置換する。好ましい実施形態では、本明細書に記載の TIM-3 抗体又はその抗原結合断片を提供し、ここで前記ヒト化抗体は、配列番号：51-61 の何れか 1 つから選択される重鎖可変領域、及び配列番号：29-30 の何れか 1 つから選択される軽鎖可変領域を含み；好ましくは、配列番号：51 の重鎖可変領域及び配列番号：29 の軽鎖可変領域を含む、又は、配列番号：52 の重鎖可変領域及び配列番号：29 の軽鎖可変領域を含む。

40

【0023】

本発明の好ましい実施形態では、本明細書で提供される TIM-3 抗体又はその抗原結合断片は、全長抗体であり、ヒト抗体の定常領域を更に含む。好ましくは、配列番号：41 に示されるヒト重鎖定常領域配列、及び好ましくは配列番号：42 に示されるヒト軽鎖定常領域配列を含む。

50

【0024】

本発明の好ましい実施形態では、本明細書に記載の TIM-3 抗体又はその抗原結合断片を提供し、前記抗原結合断片が、Fab、Fab'、F(ab')₂、単鎖抗体 (scFv)、二量体化 V 領域 (ダイアボディ (diabody))、ジスルフィド安定化 V 領域 (dsFv) 及び CDR 含有ペプチドからなる群より選択される。

【0025】

本発明は更に、治療有効量の本明細書に記載の TIM-3 抗体又は抗原結合断片、及び 1 つ以上の薬学的に許容される賦形剤、希釈剤又は担体とを含む医薬組成物を提供する。

【0026】

本発明は更に、上記の TIM-3 抗体又はその抗原結合断片をコードする核酸分子を提供する。

10

【0027】

本発明は更に、上記の核酸分子を含む組換えベクターを提供する。

【0028】

本発明は更に、上記の組換えベクターで形質転換された宿主細胞を提供し、前記宿主細胞は、原核細胞及び真核細胞からなる群、好ましくは真核細胞、より好ましくは哺乳動物細胞から選択される。

【0029】

本発明は更に、上記宿主細胞を培養物中で培養して、上記の抗体又はその抗原結合断片を形成及び蓄積させ、及び前記培養物から前記抗体又はその抗原結合断片を回収することを含む、上記の抗体又はその抗原結合断片を生産する方法を提供する。

20

【0030】

本発明は更に、ヒト TIM-3 を免疫アッセイする、又は測定するための方法を提供し、前記方法は、上記の抗体又はその抗原結合断片を使用することを含む。

【0031】

本発明は更に、上記の抗体又はその抗原結合断片を含む、ヒト TIM-3 を検出するため、又は測定するための試薬を提供する。

【0032】

本発明は更に、ヒト TIM-3 陽性細胞に関連する疾患を検出するのに使用するための診断薬を提供し、前記診断薬は上記の抗体又はその抗原結合断片を含む。

30

【0033】

本発明は更に、ヒト TIM-3 陽性細胞に関連する疾患を診断する方法を提供し、前記方法は、上記の何れか 1 つに記載の抗体又はその抗体断片を使用することにより、ヒト TIM-3 陽性細胞を検出すること、又は測定することを含む。

【0034】

本発明は更に、ヒト TIM-3 陽性細胞に関連する疾患の診断薬を製造するための、上記の抗体又はその抗原結合断片の使用を提供する。

【0035】

本発明は更に、ヒト TIM-3 陽性細胞に関連する疾患で使用するための治療薬を提供し、前記治療薬は前記抗体若しくはその抗原結合断片を含む、又は上記の組成物を含む若しくは核酸分子を含む。

40

【0036】

本発明は更に、ヒト TIM-3 陽性細胞に関連する疾患を治療する方法を提供し、前記方法は、上記の抗体若しくはその抗原結合断片若しくは前記組成物又は前記核酸分子によって、ヒト TIM-3 陽性細胞死を誘導することを含む。

【0037】

本発明は更に、ヒト TIM-3 陽性細胞に関連する疾患を治療するための治療薬を製造するための、上記の抗体若しくはその抗原結合断片若しくは前記組成物又は前記核酸分子の使用を提供する。

【図面の簡単な説明】

50

【 0 0 3 8 】

【図 1】図 1：候補 TIM-3 抗体の細胞への結合に関する実験曲線。本データは、候補抗体 mAb-1701 及び mAb-1799 の両方が抗原発現細胞に対して強い結合活性を有することを示している。

【図 2】図 2 A - 2 C：混合リンパ球反応の実験における、IFN の分泌に対する本発明の候補抗体及びその抗原結合断片の効果。図 2 A：IFN の分泌に対する h1701-009 及びその抗原結合断片の効果；図 2 B：IFN の分泌に対する h1701-005 及びその抗原結合断片の効果；図 2 C：IFN の分泌に対する h1701-009 及び h1799-005 の効果。この結果は、h1701-009 と h1799-005 の両方が IFN の分泌を効果的に刺激できることを示す。

【図 3】図 3 A - 3 D：PBMC は CD3/CD28 抗体によって活性化された。活性化された PBMC における IFN の発現に対する h1701-009、h1799-005 及び AbTIM-3 の効果。それらは全て、IFN 陽性細胞の割合と IFN の発現を様々な程度に増加させた。

【図 4】図 4 A - 4 B：PBMC を SEB で刺激してから 5 日後、h1701-009、h1799-005 及び AbTIM-3 は全て、SEB 誘導性の IL12 及び IFN の分泌を増加させた。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 3 9 】

発明の詳細な説明

用語

本発明をより容易に理解するために、ある特定の技術用語及び科学用語を以下で具体的に定義する。本文書の他の箇所で特に定義していない限り、本明細書で使用する他のすべての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解される意味を有する。

【 0 0 4 0 】

本明細書で使用する場合、アミノ酸の 1 文字コード及び 3 文字コードは、J. Biol. Chem, 243, (1968) p3558 に記載されている通りである。

【 0 0 4 1 】

本明細書で使用する場合、「抗体」は、免疫グロブリン、即ち、2 つの同一の重鎖と 2 つの同一の軽鎖の間のジスルフィド結合によって一緒に繋がった 4 つのペプチド鎖構造を指す。異なる免疫グロブリン重鎖定常領域は、異なるアミノ酸組成とランク順を示すため、異なる種類の抗原性を示す。それ故に、免疫グロブリンは、5 つのタイプに分けられ、重鎖 μ 、 δ 、 γ 及び ϵ を有する免疫グロブリン・アイソタイプ、即ち IgM、IgD、IgG、IgA 及び IgE と、それぞれ呼ばれることがある。ヒンジ領域のアミノ酸組成と重鎖ジスルフィド結合の数と位置に応じて、同じタイプの Ig を異なるサブタイプに分けることができる（例えば、IgG を IgG1、IgG2、IgG3 及び IgG4 に分けることができる）。軽鎖は、異なる定常領域を考慮して、 κ 又は λ 鎖に分けることができる。5 種類の Ig はそれぞれ、 μ 、 δ 、 γ 、 ϵ 又は κ 、 λ 鎖を有する。

【 0 0 4 2 】

本発明では、本明細書で言及する抗体軽鎖は、ヒト又はマウスの κ 、 λ 鎖又はそれらのバリエーションを含む軽鎖定常領域を更に含む。

【 0 0 4 3 】

本発明では、本明細書で言及する抗体重鎖は、ヒト又はマウスの IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 又はそのバリエーションを含む重鎖定常領域を更に含む。

【 0 0 4 4 】

抗体の重鎖及び軽鎖の N 末端付近では、約 110 個のアミノ酸が大きく変化し、可変領域 (Fv 領域) として知られている；C 末端付近の残りのアミノ酸残基は比較的安定しており、定常領域として知られている。可変領域は、3 つの超可変領域 (hypervariable regions (HVR)) 及び 4 つの比較的保存された FR 領域 (FR) を含む。3 つの超可変領域は、前記抗体の特異性を決定し、相補性決定領域 (complementarity determining region (CDR)) としても知られる。各軽鎖可変領域 (LCVR) 及び各重鎖可変領域 (HCVR) は、3

10

20

30

40

50

つの CDR 領域と 4 つの FR 領域で構成され、これらが、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、及び FR4 の順に、アミノ末端からカルボキシル末端に向かって配列する。3 つの軽鎖 CDR 領域を、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 と呼び、3 つの重鎖 CDR 領域を、HCDR1、HCDR2、及び HCDR3 と呼ぶ。本明細書の抗体又は抗原結合断片の LCVR 及び HCVR 領域にある CDR 領域アミノ酸残基の数及び位置は、既知のカバット (Kabat) の番号付け基準 (LCDR1-3、HCDE2-3) に準拠するか、カバット (Kabat) 及びコーシア (Chothia) の番号付け基準 (HCDR1) に準拠する。

【0045】

本発明の抗体は、マウス抗体、キメラ抗体及びヒト化抗体を含み、好ましくはヒト化抗体である。

10

【0046】

本発明における用語「マウス抗体」は、当該分野の知識及び技能に従って調製された抗ヒト TIM-3 モノクローナル抗体を指す。前記調製では、対象に TIM-3 抗原を注射し、その後、所望の配列又は機能特性を有する抗体を発現するハイブリドーマを単離した。本発明の好ましい実施形態では、マウス TIM-3 抗体又はその抗原結合断片は、マウス、鎖又はそれらのパリアントの軽鎖定常領域を更に含むか、又はマウス IgG1、IgG2、IgG3 若しくは IgG4、又はそのパリアントの重鎖定常領域を更に含む。

【0047】

用語「キメラ抗体」は、マウス抗体の可変領域をヒト抗体の定常領域と融合させることによる抗体であり、前記キメラ抗体は前記マウス抗体誘導性の免疫応答を軽減することができる。キメラ抗体を確立するために、特定のマウス・モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを確立し、可変領域遺伝子をマウス・ハイブリドーマからクローン化する。次いで、ヒト抗体の所望の定常領域遺伝子をクローン化し、これをマウスの可変領域遺伝子と連結してキメラ遺伝子とし、その後発現ベクターに挿入する。最後に、キメラ抗体分子を真核生物又は原核生物のシステムで発現させる。本発明の好ましい実施形態では、TIM-3 キメラ抗体の軽鎖は、ヒト、鎖又はそのパリアントに由来する軽鎖定常領域を更に含む。TIM-3 キメラ抗体の重鎖は、ヒト IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 又はそのパリアントに由来する重鎖定常領域を更に含む、好ましくは、アミノ酸変異 (例えば、YTE 変異又は復帰変異等) をさせた後、ヒト IgG1、IgG2、IgG4 又はそのパリアントに由来する重鎖定常領域を含む。

20

30

【0048】

用語「ヒト化抗体」は、CDR 移植抗体 (CDR-grafted antibody) としても知られていて、ヒト抗体の可変領域フレームワークに移植したマウス CDR 配列によって生成される抗体、即ち、異なるタイプのヒト生殖細胞系列型抗体のフレームワーク配列で産生される抗体、を指す。ヒト化抗体は、多数のマウス成分を含むキメラ抗体が誘発する強い抗体応答という欠点を克服する。そのようなフレームワーク配列は、生殖細胞系列型抗体の遺伝子配列を網羅する公共の DNA データベース又は公開された参考文献から取得できる。例えば、ヒト重鎖及び軽鎖可変領域遺伝子の生殖細胞系列型の DNA 配列は、「VBase」ヒト生殖細胞系列型配列データベース (ウェブ www.mrccpe.com.ac.uk/vbase で入手可能)、及び Kabat, EA, etc. 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版

40

【0049】

本発明の好ましい実施形態では、TIM-3 ヒト化抗体のマウス CDR 配列は、配列番号: 8-13 及び 14-19 からなる群から選択される。前記重鎖 FR 領域の配列が、ヒト生殖細胞系列型重鎖IGHV1-18*01 と hjh4.1 の組み合わせ配列又はIGHV3-7*01 と hjh4.1 の組み合わせ配列に由来する; 前記軽鎖 FR 領域の配列が、ヒト生殖細胞系列型軽鎖IGKV1-33*01 と hjk4.1 の組み合わせ配列、又はIGKV1-39*01 と hjk2.1 の組み合わせ配列に由

50

来する、ヒト抗体可変領域フレームワークを設計及び選択した。免疫原性が下降することによる活性の低下を回避するために、ヒト抗体可変領域に最小限の復帰変異を入れ、前記活性を維持する。

【0050】

CDR を移植すると、抗原と接触するフレームワーク残基により、前記抗原に対する TIM-3 抗体又はその抗原結合断片の親和性が減少することがある。そのような相互作用は、高度な体細胞変異の結果である可能性がある。従って、ドナー・フレームワークのアミノ酸をヒト化抗体フレームワークに移す必要が依然としてあることがある。非ヒト TIM-3 抗体又はその抗原結合断片の抗原結合に關与するアミノ酸残基は、マウス・モノクローナル抗体可変領域の配列及び構造をチェックすることにより同定することができる。ドナーの CDR フレームワークと生殖細胞系列型との間で異なるアミノ酸残基が關連している、と考えることがある。最も密接に關連する生殖細胞系列型を決定することが不可能な場合、前記配列を、サブタイプの共通配列、又は高い類似性割合を有するマウスの配列と比較することがある。まれなフレームワーク残基は、体細胞の高い変異の結果であると考えられており、結合に重要な役割を果たす。

10

【0051】

本明細書で使用する場合、「抗原結合断片 (antigen-binding fragment)」又は「機能的断片 (functional fragment)」は、前記抗原 (例えば、TIM-3) への結合能力を保持する 1 つ以上の抗体の断片を指す。全長抗体の断片は、特定の抗原と結合する機能があることが示されてきている。用語「抗原結合断片」における結合断片の例には、(i) Fab断片、VL、VH、CL 及び CH1 ドメインから構成される一価の断片；(ii) F(ab')₂ 断片、ヒンジ領域のジスルフィド結合で繋がった 2 つの Fab 断片を含む二価の断片；(iii) Fd断片、VH 及び CH1 ドメインからなる；(iv) Fv 断片、片腕の抗体の VH 及び VL ドメインからなる；(v) VH ドメインで構成される単一ドメイン又は dAb断片 (Ward et al. (1989) Nature341: 544-546)；及び (vi) 別個の相補性決定領域 (complementarity determining region (CDR)) 並びに (vii) 合成リンカーによって任意選択的に繋がった 2 つ以上の別個の CDRs の組み合わせ、が挙げられる。更に、Fv 断片の VL ドメインと VH ドメインは 2 つの別々の遺伝子によってコードされているが、それらを組換え法を使用する合成リンカーによって繋げて、VL と VH ドメインをペアリングすることにより、一価の分子である一本のタンパク質鎖を生成する (一本鎖 Fv (scFv) と呼ぶ；例えば、Bird et al. (1988): 423-426; Science 242 及び Huston et al (1988) Proc. Natl. Acad. Sci USA85:5879-5883 を参照)。この一本鎖抗体が前記抗体の用語「抗原結合断片」に含まれることも意図する。そのような抗体は、当該分野で公知である従来技術を使用して得られ、断片の機能的スクリーニングを、失われた部分が無い抗体の場合と同じ方法で使用する。抗原結合部分は、組換え DNA 技術又は失われた部分が無い免疫グロブリンを酵素的又は化学的に破壊することによって作製することができる。抗体は、異なる表現型 (例えば、IgG (例えば、IgG1、IgG2、IgG3 又は IgG4 サブタイプ)、IgA1、IgA2、IgD、IgE 又は IgM) の形態をとることがある。

20

30

【0052】

本発明における抗原結合断片には、Fab、F(ab')₂、Fab'、一本鎖抗体 (scFv)、二量体化 V 領域 (ダイアポディ)、ジスルフィド安定化 V 領域 (dsFv) 及び CDR-含有ペプチドが含まれる。

40

【0053】

Fab は、IgG 抗体分子をパインで処理することにより (H 鎖の位置 224 のアミノ酸残基で切断する) 得られる抗体断片である。前記 Fab 断片は、約 50,000 の分子量を有し、抗原結合活性を有し、H 鎖の N 末端側の約半分及び L 鎖全体がジスルフィド結合を介して一緒に結合した Fab 断片を含む。

【0054】

本発明の Fab は、ヒト TIM-3 を特異的に認識し、その細胞外領域又はその三次元構造に結合する本発明のモノクローナル抗体をパインで処理することにより生産することが

50

できる。また、前記抗体の Fab をコードする DNA を原核生物発現ベクター又は真核生物発現ベクターに挿入し、このベクターを原核生物又は真核生物に導入して前記 Fab を発現させることにより、前記 Fab を生産することもできる。

【0055】

F(ab')₂は、分子量が約 100,000 であり、抗原結合活性を有し、IgG のヒンジ領域にある 2 つのジスルフィド結合のうち、より下側の部分をペプシンで消化することにより得られる、ヒンジ位置で結合した 2 つの Fab 領域を含む抗体断片である。

【0056】

本発明の F(ab')₂ は、ヒト TIM-3 を特異的に認識し、その細胞外領域又はその三次元構造に結合する本発明のモノクローナル抗体をペプシンで処理することにより生産することができる。また、前記 F(ab')₂ は、チオエーテル結合又はジスルフィド結合を介して、以下に説明する Fab' に結合することにより、生産することもできる。

10

【0057】

Fab' は、約 50,000 の分子量を有し、抗原結合活性を有する抗体断片である。Fab' は、上記 F(ab')₂ のヒンジ領域で、ジスルフィド結合を切断することにより得られる。本発明の Fab' は、TIM-3 を特異的に認識し、その細胞外領域又はその三次元構造に結合する本発明の F(ab')₂ を、ジチオトレイトール等の還元剤で処理することにより生産することができる。

【0058】

また、前記抗体の Fab' 断片をコードする DNA を原核生物発現ベクター又は真核生物発現ベクターに挿入し、このベクターを原核生物又は真核生物に導入して前記 Fab' を発現させることにより、前記 Fab' を生産することもできる。

20

【0059】

用語「単鎖抗体」、「単鎖 Fv (single chain Fv)」又は「scFv」は、リンカーによって繋がった、抗体重鎖可変ドメイン (又は領域; VH) 及び抗体軽鎖可変ドメイン (又は領域; VL) を含む分子を指す。そのような scFv 分子は、NH₂-VL-リンカー-VH-COOH 又は NH₂-VH-リンカー-VL-COOH の一般構造を有する。先行技術における適切なリンカーは、繰り返される GGGGS アミノ酸配列又はそのパリアントからなり、例えば、1-4 回の繰り返しを有するパリアントを使用する (Holliger et al. (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448)。本発明に使用できる他のリンカーは、Alfthan et al. (1995), Protein Eng. 8:725-731、Choi et al. (2001), Eur. J. Immunol. 31:94-106、Hu et al. (1996), Cancer Res. 56:3055-3061、Kipriyanov et al. (1999), J. Mol. Biol. 293:41-56 及び Roovers et al. (2001), Cancer Immunol に記載されている。

30

【0060】

本発明の scFv は、以下のステップによって生産することができる: ヒト TIM-3 を特異的に認識し、その細胞外領域又はその三次元構造に結合する本発明のモノクローナル抗体の VH 及び VL をコードする cDNAs を取得し、scFv をコードする DNA を構築し、この DNA を原核生物発現ベクター又は真核生物発現ベクターに挿入し、その後、この発現ベクターを原核生物又は真核生物に導入して前記 scFv を発現させる。

【0061】

ダイアボディ (diabody) は、前記 scFv を二量体化させた抗体断片であり、二価の抗原結合活性を有する抗体断片である。二価の抗原結合活性に関しては、2 つの抗原は同じでも、又は異なってもよい。

40

【0062】

本発明のダイアボディは、以下のステップによって生産することができる。ヒト TIM-3 を特異的に認識し、その細胞外領域又はその三次元構造に結合する本発明のモノクローナル抗体の VH 及び VL をコードする cDNAs を取得し、リンカー・ペプチドの長さが 8 アミノ酸残基以下になるように scFv をコードする DNA を構築し、この DNA を原核生物発現ベクター又は真核生物発現ベクターに挿入し、その後、この発現ベクターを原核生物又は真核生物に導入して前記ダイアボディを発現させる。

50

【0063】

dsFv は、VH と VL にあるそれぞれの 1 つのアミノ酸残基をシステイン残基で置換し、この 2 つのシステイン残基間のジスルフィド結合を介して、この置換したポリペプチドを繋げることににより取得される。システイン残基で置換されるアミノ酸残基は、既知の方法による抗体の三次元構造予測に基づいて選択することができる (Protein Engineering, 7, 697 (1994))。

【0064】

本発明の dsFv は、以下のステップによって生産することができる：ヒト TIM-3 を特異的に認識し、その細胞外領域又はその三次元構造に結合する本発明のモノクローナル抗体の VH 及び VL をコードする cDNAs を取得し、dsFv をコードする DNA を構築し、この DNA を原核生物発現ベクター又は真核生物発現ベクターに挿入し、その後、この発現ベクターを原核生物又は真核生物に導入して前記 dsFv を発現させる。

10

【0065】

CDR 含有ペプチドは、VH 又は VL の CDRs の 1 つ以上の領域を含むことにより構成される。複数の CDRs を含むペプチドは、直接的に、又は適切なリンカー・ペプチドを介して、繋げることができる。

【0066】

本発明の CDR 含有ペプチドは、以下のステップによって生産することができる：ヒト TIM-3 を特異的に認識し、その細胞外領域又は三次元に結合する本発明のモノクローナル抗体の VH 及び VL の CDRs をコードする DNA を構築する、この DNA を原核生物発現ベクター又は真核生物発現ベクターに挿入し、次いで、この発現ベクターを原核生物又は真核生物に導入して前記ペプチドを発現させる。前記 CDR 含有ペプチドは、Fmoc 法又は t Boc 法等の化学合成法によって生産することもできる。

20

【0067】

用語「CDR」は、抗原結合に主に寄与する、抗体の可変ドメイン内の 6 つの超可変領域のうちの 1 つを指す。前記 6 つの CDRs に対して最も一般的に使用される定義の 1 つは、(Kabat E.A. et al., (1991) Sequences of proteins of immunological interest. NIH Publication 91-3242) によって提供される。本明細書で使用する場合、CDRs に関する Kabat の定義は、軽鎖可変ドメインの CDR1、CDR2 及び CDR3 (CDR L1、CDR L2、CDR L3、又は L1、L2、L3)、並びに重鎖可変ドメインの CDR2 及び CDR3 (CDR H2、CDR H3、又は H2、H3) にのみ適用される。

30

【0068】

本明細書で使用される用語「抗体フレームワーク (antibody framework)」は、VL 又は VH のどちらかの可変ドメインの一部を指し、この可変ドメインの抗原結合ループ (CDRs) の足場として機能する。本質的には、CDRs のない可変ドメインである。

【0069】

用語「エピトープ」又は「抗原決定基」は、免疫グロブリン又は抗体が特異的に結合する抗原上の部位 (例えば、TNF 分子上の特定の部位) を指す。エピトープには、通常、ユニークな空間的コンフォメーションの中にある、少なくとも 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 又は 15 個の連続の又は非連続のアミノ酸が含まれる。例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, 編. (1996) を参照のこと。

40

【0070】

用語「特異的結合」、「選択的結合」、「選択的に結合する」、及び「特異的に結合する」は、所定の抗原上のエピトープへの抗体の結合を指す。典型的には、前記抗体は、およそ 10^{-7} M 未満 (例えば、およそ 10^{-8} M、 10^{-9} M 又は 10^{-10} M 未満又は更に低い等) の親和性 (KD) で結合する。

【0071】

用語「KD」又は「Kd」は、特定の抗体-抗原相互作用の解離平衡定数を指す。典型的には、本発明の抗体は、およそ 10^{-7} M 未満 (例えば、およそ 10^{-8} M、 10^{-9} M 又は 10^{-10} M 未満又は更に低い等) の親和性 (KD) で結合する。

50

10^{-10} M 未満又は更に低い等)の解離平衡定数(KD)でTIM3に結合し、例えば、BIACORE機器の表面プラズモン共鳴(surface plasmon resonance (SPR))テクノロジーを使用して測定される。

【0072】

用語「競合的結合」は、本発明のモノクローナル抗体によって認識されるヒトTIM-3の細胞外ドメインに関して、同じエピトープ(抗原決定基としても知られる)又は同じエピトープの一部を認識し、その抗原に結合する抗体を指す。本発明のモノクローナル抗体が結合するのと同じエピトープに結合する抗体は、本発明のモノクローナル抗体によって同定されるヒトTIM-3のアミノ酸配列を認識して結合する抗体である。

【0073】

本明細書で使用される用語「核酸分子」は、DNA分子及びRNA分子を指す。核酸分子は一本鎖でも二本鎖でもよいが、好ましくは二本鎖DNAである。核酸は、別の核酸配列と機能的に関係するように配置されている場合、「効果的に繋がっている」。例えば、プロモーター又はエンハンサーは、コーディング配列の転写に影響を与える場合、そのコーディング配列に効果的に繋がっている。

【0074】

用語「ベクター」は、繋がっている別の核酸を運ぶことができる核酸分子を指す。ある実施形態では、前記ベクターは「プラスミド」であり、これは、追加の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。別の実施形態では、前記ベクターはウイルス・ベクターであり、追加のDNAセグメントをウイルス・ゲノムに連結することができる。本明細書で開示されるベクターは、それらを導入した宿主細胞で自己複製することができる(例えば、細菌複製起点を有する細菌ベクター及びエピソーマル哺乳動物ベクター)、又は宿主細胞への導入時に前記宿主細胞のゲノム中に組み込まれ、それにより前記宿主のゲノムに合わせて複製される(例えば、非エピソーマル哺乳類ベクター)。

【0075】

抗体及び抗原結合断片を生産及び精製する方法は、当技術分野で周知であり、例えば、Harlow and Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 第5-8章及び第15章中に見出すことができる。例えば、当技術分野で良く知られた従来の方法によって、マウスをヒトTIM-3又はその断片で免疫し、その後、得られた抗体を復元(renatured)し、精製し、及びアミノ酸配列について配列決定することができる。抗原結合断片はまた、従来の方法によって調製することもできる。本発明の抗体又は抗原結合断片は、非ヒト抗体に由来するCDRs上に1つ以上のヒトのフレームワーク領域(FRs)を含むように改変される。ヒトのフレームワークの生殖細胞系列型の配列は、ImmunoGeneTics (IMGT)のウェブサイト(<http://imgt.cines.fr>)のヒト抗体の可変的な生殖細胞系列型遺伝子のデータベース及びMOEソフトウェアを連携させることによって、又はThe Immunoglobulin Facts Book, 2001, ISBN 012441351から取得することができる。

【0076】

用語「宿主細胞」は、前記発現ベクターを導入した細胞を指す。宿主細胞には、細菌、微生物、植物又は動物の細胞が含まれる。形質転換しやすい細菌には、例えば大腸菌(*Escherichia coli*)やサルモネラ株(*Salmonella strains*)等の腸内細菌科(enterobacteriaceae); 例えば枯草菌(*Bacillus subtilis*)等のバチルス科(Bacillaceae); 肺炎球菌(*Pneumococcus*); 連鎖球菌(*Streptococcus*)及びインフルエンザ菌(*Haemophilus influenzae*)のメンバーが含まれる。適した微生物には、出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)及びピキア酵母(*Pichia pastoris*)が含まれる。適した動物宿主細胞株には、CHO(チャイニーズハムスター卵巣細胞株)及びNSO細胞が含まれる。

【0077】

本発明の改変抗体又は抗原結合断片は、公知の方法を使用して調製及び精製することができる。例えば、重鎖及び軽鎖をコードするcDNA配列をクローン化し、GS発現ベクタ

10

20

30

40

50

ーに組み込むことがある。次いで、改変した免疫グロブリン発現ベクターを、CHO 細胞に安定的にトランスフェクトすることがある。当該分野で周知のより推奨される方法として、哺乳動物発現系を使用すると、典型的には Fc 領域の高度に保存された N 末端部位で、グリコシル化される。ヒト TIM-3 に特異的に結合する抗体の発現について、安定したクローンを確認することがある。バイオリアクター中で抗体を生産するために、陽性クローンを無血清培地に入れて増やすこともある。抗体が分泌された培養培地は、従来の技術により精製することができる。例えば、前記培地に対して、適合性のあるバッファーで平衡化したプロテイン A 又は G セファロース FF カラムをうまく適用することができる。非特異的な結合成分を除去するために、前記カラムを洗浄する。結合した抗体は、例えば、pH 勾配によって溶出し、抗体画分を、例えば SDS-PAGE 等によって検出し、プールする。前記抗体を、一般的な手法を使用して、ろ過及び濃縮することができる。可溶性の凝集体と多量体は、サイズ排除やイオン交換等の一般的な手法で、効果的に除去できる。この生成物は、例えば -70 で即座に凍結しても良いし、凍結乾燥しても良い。

10

20

30

40

50

【0078】

動物、ヒト、実験対象、細胞、組織、臓器、又は体液に適用する場合、「投与 (Administration)」及び「治療・処置 (treatment)」とは、外因性の医薬品、治療薬、診断薬、又は組成物が、前記の動物、ヒト、対象、細胞、組織、臓器、又は体液に接触することを指す。「投与」及び「治療・処置」は、例えば、治療、薬物動態、診断、研究、及び実験の方法を指す場合がある。細胞を処置することは、細胞に試薬を接触させること、並びに流体が細胞と接触している場合、その流体に試薬を接触させることを包含する。「投与」及び「治療・処置」は、例えば細胞を、試薬、診断薬、結合化合物、又は別の細胞により、*in vitro* 及び *ex vivo* で処置することも意味する。「治療」とは、人間、獣医、又は研究の対象に適用する場合、治療的処置、予防的 (prophylactic) 又は予防的 (preventative) 手段、研究及び診断適用を指す。

【0079】

「治療する・処置する (treat)」とは、本発明の結合化合物の何れかを含む組成物等の治療薬を、前記治療薬が既知の治療活性を有する 1 種以上の疾患症状を有する患者に対して、内部的に又は外部的に投与することを意味する。典型的には、前記薬剤は、臨床的に測定可能な何らかの程度まで、症状の退行を誘導すること、或いは症状の進行を阻害することの何れかによって、治療を受ける患者又は集団における 1 種以上の疾患症状を緩和するのに有効な量で投与される。任意の具体的な疾患症状を緩和するのに有効な治療薬の量 (「治療有効量」とも呼ばれる) は、患者の病状、年齢、体重、及び患者に望ましい反応を引き出すことができる薬剤の力によって変わり得る。病気の症状が緩和されたかどうかは、その症状の重症度又は進行状態を評価するために医師又は他の熟練した医療提供者が通常使用する臨床測定によって、評価できる。本発明の実施形態 (例えば、治療方法又は生産品) は、標的とする疾患症状を緩和するのに、すべての患者において、必ずしも効果的ではないかもしれないが、統計的に有意な数の患者において (例えば、スチューデント (Student's) の t-検定、カイ 2 乗検定、マンホイットニー (Mann and Whitney) による U-検定、クラスカル-ウォリス (Kruskal-Wallis) 検定 (H-検定)、ヨルクヒール-タブストラ (Jonckheere-Terpstra) 検定、及びウィルコクソン (Wilcoxon) 検定等の当技術分野で知られている統計検定によって決定されるように)、その標的とする疾患症状を緩和するはずである。

【0080】

「保存的修飾 (Conservative modifications)」又は「保存的置換 (conservative substitution)」とは、タンパク質中のアミノ酸を、類似の特性 (例えば、電荷、側鎖のサイズ、疎水性/親水性、骨格の立体配座及び剛性など) を有する他のアミノ酸で置換することを指す。そして、前記タンパク質の生物活性を変えことなく、頻繁にこうした変更を加えることができる。当業者は、一般に、ポリペプチドの非必須領域において、単一のアミノ酸を置換することは、実質的に生物学的活性を変化させないものと認識する (例えば、Watson et al. (1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pu

b. Co., p. 224 (第 4 版)を参照)。更に、構造的又は機能的に類似したアミノ酸による置換は、生物学的活性を破壊する可能性がより低い。

【 0 0 8 1 】

「有効量」には、病状の症状又は兆候を改善又は予防するのに十分な量が含まれる。有効量とは、診断を可能にする又は促進するのに十分な量も意味する。特定の患者又は獣医学的な対象にとっての有効量は、例えば治療中の状態、前記患者の全体的な健康状態、投与の経路と用量、及び副作用の重症度等の要因によって変わり得る。有効量は、重大な副作用又は毒性作用を回避する最大用量又は投与プロトコルであることがある。

【 0 0 8 2 】

「外因性 (Exogenous)」とは、状況に応じて、生物、細胞、又は人体の外部で生成される物質を指す。「内因性 (Endogenous)」とは、状況に応じて、細胞、生物、又は人体の内部で生成される物質を指す。

【 0 0 8 3 】

「ホモロジー (Homology)」とは、2 つのポリヌクレオチド配列間又は 2 つのポリペプチド配列間の配列の類似性を指す。比較する 2 つの配列の両方の位置が、同じ塩基又はアミノ酸モノマー・サブユニットによって占められている場合 (例えば、2 つの DNA 分子のそれぞれの位置がアデニンによって占められている場合)、その分子はその位置でホモロジーがある。2 つの配列間のホモロジーの割合は、2 つの配列が共有する、一致する位置又はホモロジーがある位置の数を、比較する位置の数で割って 100 倍した値の関数である。例えば、2 つの配列を最適に並べたときに、2 つの配列中の 10 個の位置のうち 6 個が一致する又はホモロジーがある場合、この 2 つの配列のホモロジーは 60% である。一般的に、この比較は、2 つの配列を並べて最大パーセントのホモロジーの割合になるようにして実行される。

【 0 0 8 4 】

本明細書で使用される場合、表現「細胞」、「細胞株」、及び「細胞培養」は、交換可能に使用され、それら全てが示すことは派生物を含む。従って、「形質転換体」及び「形質転換した細胞」という言葉には、継代 (transfer) の回数に関係なく、初代の対象細胞及びそこから派生した培養物が含まれる。又、意図的又は不測の変異のために、すべての派生物の DNA 含有量が正確に同一ではない可能性があることも理解する必要がある。最初に形質転換した細胞でスクリーニングしたものと同一機能又は生物学的活性を有する変異体の派生物が含まれる。はっきりと異なるものを示すことを意図する場合、それは文脈から明確に理解されるであろう。

【 0 0 8 5 】

本明細書で使用する場合、「ポリメラーゼ連鎖反応」又は「PCR」とは、例えば米国特許第 4,983,973 号に記載されているように、微量な核酸、RNA 及び / 又は DNA の特定部分を増幅する手順又は技術を指す。一般に、オリゴヌクレオチド・プライマーを設計できるように、関心領域の末端の配列情報又はそれ以降の配列情報を入手する必要がある ; これらのプライマーは、増幅するテンプレートの反対の鎖と配列が同一又は類似である。2 つのプライマーの 5' 末端ヌクレオチドは、増幅された材料の末端と一致することがある。PCR は、特定の RNA 配列を、全ゲノム DNA 中の特定の DNA 配列を、及び全細胞の RNA から転写した cDNA を、バクテリオファージ又はプラスミド配列等を増幅するために使用することがある。Mullis et al. (1987) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263 ; Erlich, ed., (1989) PCR TECHNOLOGY (Stockton Press, N.Y.) を一般的に参照のこと。本発明で使用する PCR 試験は、核酸の試験サンプルを増幅するためのポリメラーゼ反応方法の 1 つの例であると考えられるが、唯一ではない。この方法は、既知の核酸配列をプライマーとして、及び核酸ポリメラーゼを使用して、核酸の特定の部分を増幅又は生成することを含む。

【 0 0 8 6 】

「任意選択的の (Optional)」又は「任意選択的に (optionally)」とは、これに後述するイベント又は状況が発生することがあるが、必ずしも発生するわけではないことを意

10

20

30

40

50

味し、その記載にはそのイベント又は状況が発生する、又は発生しない事例が含まれる。例えば、「1-3 個の抗体重鎖可変領域を任意選択的に含む (optionally contains 1-3 antibody heavy chain variable regions)」とは、特定の配列を有する抗体重鎖可変領域が存在することがあるが、必ずしも存在する必要はないことを意味する。

【0087】

「医薬組成物」とは、本発明に係る 1 種以上の化合物又はその生理学的/薬学的に許容される塩若しくはプロドラッグ、及び生理学的/薬学的に許容される担体及び賦形剤等の他の化学成分を含む混合物を指す。前記医薬組成物は、生物への投与を促進し、活性成分の吸収を促進し、それにより生物学的効果を発揮することを目的としている。

【0088】

更に、本発明は、TIM-3 陽性細胞に関連する疾患を治療するための薬剤を含み、この薬剤は、本発明のモノクローナル抗体又はその抗体断片を有効成分として含む。

【0089】

がん、自己免疫疾患及びアレルギー性疾患等、TIM-3 を発現する細胞に関連する疾患である限り、TIM-3 陽性細胞に関連する疾患は限定されるものではない。

【0090】

前記がんには、血液がん、乳がん、子宮がん、結腸直腸がん、食道がん、胃がん、卵巣がん、肺がん、腎臓がん、直腸がん、甲状腺がん、子宮頸がん、小腸がん、前立腺がん、膵臓がんが含まれる。前記がんの好ましい例には、血液がん、食道がん、胃がん、結腸直腸がん、肝臓がん及び前立腺がんが含まれる。

【0091】

前記血液がんの例には、急性骨髄性白血病 (AML)、慢性骨髄性白血病 (CML)、骨髄異形成症候群 (MDS)、多発性骨髄腫、皮膚 T 細胞リンパ腫 (CTCL)、末梢 T 細胞リンパ腫 (PTCL)、未分化大細胞リンパ腫 (anaplastic large cell lymphoma (ALCL))、急性リンパ性白血病 (ALL)、慢性リンパ性白血病 (CLL)、その他のリンパ性白血病、NK 細胞リンパ腫、ホジキン・リンパ腫、パーキット・リンパ腫などの非ホジキン・リンパ腫等が含まれる。

【0092】

自己免疫疾患の具体例としては、関節リウマチ、乾癬、クローン病、強直性脊椎炎、多発性硬化症、I 型糖尿病、肝炎、心筋炎、シェーグレン症候群、移植拒絶後の自己免疫性溶血性貧血、水疱性類天疱瘡、グレーブス病、橋本病 (Hashimoto's thyroiditis)、全身性エリテマトーデス (SLE)、重症筋無力症、天疱瘡、悪性貧血等が含まれる。

【0093】

前記アレルギー性疾患の例には、急性又は慢性反応性気道疾患、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、蕁麻疹 (urticaria)、PIE 症候群、食物アレルギー、花粉症、アレルギー性の鼻 (allergic nose)、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、アナフィラキシー・ショック等が含まれる。

【0094】

更に、本発明は、TIM-3 の免疫アッセイ又は測定のための方法、TIM-3 の免疫アッセイ又は測定のための薬剤、TIM-3 を発現する細胞の免疫アッセイ又は測定のための方法、及び TIM-3 陽性細胞に関連する疾患を診断するための診断薬に関するものであり、これらは、ヒト TIM-3 を特異的に認識し、その細胞外領域又はその三次元構造に結合する本発明のモノクローナル抗体又は抗体断片を有効成分として含む。

【0095】

本発明において、TIM-3 を検出する、又は TIM-3 の量を測定する方法は、任意の既知の方法であることがある。例えば、それには免疫アッセイや測定の方法が含まれる。

【0096】

免疫アッセイ又は測定は、標識した抗原又は抗体を使用して、抗体又は抗原の量を検出する、又は測定する方法である。この免疫アッセイ又は測定の方法の例には、放射性物質標識免疫抗体法 (radioactive substance-labeled immunoantibody method (RIA))、酵

10

20

30

40

50

素免疫測定法 (enzyme immunoassay (EIA 又は ELISA))、蛍光免疫測定法 (fluorescent immunoassay (FIA))、発光免疫測定法、ウエスタン・ブロット法、物理化学法等が含まれる。

【0097】

TIM-3 陽性細胞に関連する上記疾患は、本発明のモノクローナル抗体又は抗体断片を使用して、TIM-3 を発現する細胞を検出又は測定することにより診断することができる。

【0098】

前記ポリペプチドを発現する細胞の検出には、公知の免疫学的検出法を用いることができ、免疫沈降法、蛍光細胞染色法、免疫組織染色法等が好ましく用いられる。また、FMAT 8100 HTS システム (Applied Biosystem) 等を用いた蛍光抗体染色法を使用することも

10

【0099】

本発明において、TIM-3 を検出する、又は測定するのに用いる生体サンプルは、TIM-3 を発現する細胞を含む可能性がある限り、特に限定されず、例えば、組織細胞、血液、血漿、血清、唾液、尿、糞便、組織液又は培養液等がある。

【0100】

本発明のモノクローナル抗体若しくはその抗体断片、又はその複合体を含む診断薬は、所望の診断方法に応じて、抗原抗体反応を行うための試薬又はその反応を検出するための試薬を更に含むことがある。前記抗原抗体反応を実施するための試薬には、バッファー、塩等が含まれる。この検出用試薬には、前記モノクローナル抗体、その抗体断片又はその複合体、を認識する標識二次抗体、前記標識に対応する基質等の、免疫学的な検出又は測定に、一般的に使用される試薬が含まれる。

20

【実施例】

【0101】

実施例と試験例

以下、実施例を参照して本発明を更に説明する。しかし、本発明の範囲はこれに限定されない。特定の条件が記載されていない本発明の実施例では、実験は、一般に、Cold Spring Harbor の Antibody Technology Laboratory Manual 及び Molecular Cloning Manual に記載されている従来の条件下、又は材料又は製品の生産業者によって提示される条件下、で行う。試薬の供給元が具体的に示されていない場合、前記試薬は市販されている普通の試薬である。

30

【0102】

実施例 1 . TIM-3 抗原と検出用タンパク質の調製

1 . TIM-3 抗原の設計と発現

UniProt の A 型肝炎ウイルス細胞受容体 2 (ヒト HAVCR2、ヒト TIM-3、UniProt 番号: Q8TDQ0) を、本発明の TIM-3 のテンプレートとして使用して、抗原のアミノ酸配列及び検出用タンパク質を設計した。又は、様々なタグを TIM-3 タンパク質に基づいて融合させ、pHr ベクター (インハウス (in-house) で生産) 又は pTarget ベクター (プロメガ、A1410) 中にそれぞれクローニングし、293 細胞で一過的に発現させるか、CHO-S 細胞で安定的に発現させ、精製して本発明の抗原及び検出用タンパク質を入手する。以下

40

【0103】

TIM-3 細胞外ドメイン及び hIgG1 Fc 融合タンパク質: マウスを免疫するための TIM-3 -Fc (配列番号: 1)。

【化 1】

MEFGLSWLFLVAILKGVQCSEVEYRAEVGQNAYLPCFYTPAAPGNLVPVCWGKGACPVFECGN
VVLRTDERDVNYWTSRYWLN^{GD}FRKGDVSLTIENVTLADSGIYCCRIQIPGIMNDEKFN^{LK}LVI
 KPAKVTPAPTRQRDFTAAAFPRMLTTRGHGPAETQTLGSLPDINLTQISTLANELRDSRLANDLR
 DSGATIREPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
 VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
 KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
 LDDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC^{SVM}HEALHNHYTQKSLSLSPGK

注：下線部分はシグナル・ペプチドを表す。斜体部分は Fc を表す。

10

【0104】

フラグ (Flag) タグ及び His タグを有する TIM-3 の細胞外ドメイン：検出のための TIM-3-Flag-His (配列番号：2)。

TIM-3-flag-His

【化 2】

MEFGLSWLFLVAILKGVQCSEVEYRAEVGQNAYLPCFYTPAAPGNLVPVCWGKGACPVFECGN
VVLRTDERDVNYWTSRYWLN^{GD}FRKGDVSLTIENVTLADSGIYCCRIQIPGIMNDEKFN^{LK}LVI
 KPAKVTPAPTRQRDFTAAAFPRMLTTRGHGPAETQTLGSLPDINLTQISTLANELRDSRLANDLR
 DSGATIRGSSDYKDDDDKHHHHHHH

注：下線部分はシグナル・ペプチドを表す。斜体部分は Flag-His タグを表す。

20

【0105】

TIM-3 過剰発現細胞株を構築するための TIM-3 の全長

TIM-3-full length (配列番号：3)

【化 3】

MFSHLPFDCVLLLLLLLLL^{TR}SSSEVEYRAEVGQNAYLPCFYTPAAPGNLVPVCWGKGACPVFEC
 GNVVLR^{TD}ERDVNYWTSRYWLN^{GD}FRKGDVSLTIENVTLADSGIYCCRIQIPGIMNDEKFN^{LK}LVI
 KPAKVTPAPTRQRDFTAAAFPRMLTTRGHGPAETQTLGSLPDINLTQISTLANELRDSRLAND
 LRDSGATIRIGIYIGAGICAGLALALIFGALIFKWYSHSKEKIQNLSLISLANLPPSGLANAVAEGI
 RSEENIYTIENVEVEEPPNEYYCYVSSRQQPSQPLGCRFAMP

注：シグナル・ペプチド+細胞外領域+膜貫通領域+細胞内領域

30

【0106】

2. 組換え TIM-3 関連タンパク質、ハイブリドーマ抗体及び組換え抗体の精製

2.1. 組換え TIM-3-Flag-His タンパク質の精製ステップ：

前記サンプルを高速で遠心分離して不純物を除去し、適切な容量に濃縮した。NI-NTA
 アフィニティーカラム (QIAGEN、カタログ番号 30721) を PBS で平衡化し、2-5 倍のカラ
 ム容量で洗浄した。不純物のない上清をカラムにロードした。A280 測定値がベースライ
 ンに戻るまで、前記カラムを PBS で洗浄した。次に、前記カラムを PBS で洗浄して非特
 異的にハイブリダイズしたタンパク質を除去し、流出液を回収した。洗浄バッファー (20
 mM イミダゾール) 及び溶出バッファー (300 mM イミダゾール) を順に使用し、標的タン
 パク質を溶出し、その溶出ピークを集めた。

40

【0107】

この集めた溶出液は、イオン交換 (HiLoad 16/600 superdex 200 カラム) により更に
 精製した。前記カラムを 2-5 倍のカラム容量の PBS で平衡化して、pH7.4 になるように
 した。標的タンパク質を含む溶出バッファーを濃縮して前記カラムにロードし、サンプル
 を集めた。得られたタンパク質は SDS-PAGE 及び LC-MS により同定し、正しいサンプル
 を分注して使用した。

【0108】

2.2. ハイブリドーマ、組換え抗体、Fc 融合タンパク質の精製

50

細胞発現の上清のサンプルを高速で遠心分離して、不純物を除去した。ハイブリドーマ発現の上清をプロテイン G カラムで精製し、組換え抗体と Fc 融合タンパク質をプロテイン A カラムで精製した。A280 の読み取り値がベースラインに低下するまで、カラムを PBS で洗浄した。標的タンパク質は、100mM 酢酸ナトリウム (pH 3.0) で溶出し、1M Tris-HCl (pH 8.0) で中和させた。溶出したサンプルを適切に濃縮した後、PBS で平衡化したゲル・クロマトグラフィー Superdex200 (GE) で更に精製した。凝集物のないピークを収集し、分注して使用した。

【0109】

実施例 2 . 抗ヒト TIM-3 モノクローナル抗体の調製

1 . 動物への免疫

抗ヒト TIM-3 モノクローナル抗体は、マウスを免疫することにより作製した。実験用 SJL 白マウス、雌、6-8 週齢 (Beijing Weitong Lihua Experimental Animal Technology Co., Ltd., 動物生産ライセンス番号 : SCXK (北京) 2012-0001)。給餌環境を SPF レベルにした。マウスを購入した後、その動物を実験室で 1 週間、12/12 時間の明暗サイクル、温度 20-25、湿度 40-60% で適応させた。その環境に適応したマウスを、以下のスキームに従って免疫した。免疫するための抗原は、Fc タグを有する TIM-3 の細胞外ドメインとした (配列番号 : 1)。

10

【0110】

免疫スキーム : マウスを QuickAntibody-Mouse5W (KX0210041) で免疫した。抗原とアジュバントの比は 1:1、10 µg/マウス、1 回注射 (初回免疫/追加免疫) とした。抗原とアジュバントを迅速かつ完全に混合し、それからそれを接種した。1 回目と 2 回目の免疫の間隔は 21 日間で、2 回目の免疫後の間隔は 14 日間とした。各免疫の 7 日後にマウスから血液を採取した。マウス血清中の抗体の力価は ELISA 法により測定した。抗体の血清力価がより高く、プラトーに達している傾向があるマウスを、脾細胞融合用として選択し、脾細胞融合をする 3 日前に、生理食塩水中に調製した抗原を 20 µg/マウスで i.p. 注射をして、追加免疫をした。

20

【0111】

2 . 脾細胞融合

ハイブリドーマ細胞は、最適化された PEG を介した融合手順を使用して、脾臓リンパ球と骨髓腫 Sp2/0 細胞 (ATCC (登録商標) CRL-8287 (登録商標)) を融合することにより得た。前記ハイブリドーマ細胞を 4-5E5/ml の密度で完全培地 (20% FBS、1 x HAT 及び 1 x OPI を含む DMEM 培地) に再懸濁し、96 ウェル細胞培養プレート (100 µl/ウェル) で、37 °C、5% CO₂、3-4 日間、インキュベートした。100 µl/ウェルの HAT 完全培地を添加し、針様クローンが形成されるまで 3-4 日間、インキュベーションを続けた。上清を除去し、200 µl/ウェルの HAT 完全培地 (20% FBS、1xHT 及び 1xOPI を含む RPMI-1640 培地) を添加し、37、5% CO₂ で 3 日間培養した。その後、ELISA アッセイを実施した。

30

【0112】

3 . ハイブリドーマ細胞のスクリーニング

ハイブリドーマの培養上清は、細胞成長密度に従って ELISA 法を使用して、検出を行った (実施例 4 及び試験例 4 を参照)。TIM-3 過剰発現細胞との結合アッセイは、ELISA によって実施した (実施例 4 及び試験例 2 を参照)。タンパク質結合アッセイと細胞結合アッセイの両方での陽性クローンを直接的に拡大し、凍結保存のために凍結し、及び 2 回から 3 回サブクローニングして単一細胞クローンを得た。

40

【0113】

TIM-3 結合 ELISA 及び細胞結合アッセイを、サブクローン化した細胞のそれぞれで実施した。上記の実験により、ハイブリドーマ・クローンを得て、そのハイブリドーマが分泌する mAb-1701 及び mAb-1799 抗体を得た。前記抗体は、試験例で使用するために、無血清培養を使用することにより更に調製し、精製の実施例に従って精製した。

【0114】

50

4. 陽性ハイブリドーマ・クローンの DNA シークエンシング

陽性ハイブリドーマのクローニング及びシークエンシングの手順は、以下の通りとした：
対数増殖期のハイブリドーマ細胞を収集し、RNA をトリゾール (Trizol) (Invitrogen、カタログ番号 15596-018) により、そのキットのマニュアルに従って、抽出した。PrimeScript (登録商標) Reverse Transcriptase Kit (Takara、カタログ番号 2680A) を使用して逆転写を行った。逆転写から得られた cDNA を、マウス Ig-プライマー・セット (Novagen、TB326 Rev.B 0503) で PCR 増幅し、シークエンシング受託会社でシークエンシングを行った。mAb-1799 及び mAb-1701 の重鎖及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、次のようなものとして得た：

【0115】

mAb-1701 重鎖可変領域 (配列番号：4)

【化4】

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYIMNWVKQSHGKSLEWIADIIPNNGGSKYNQ
KFKDKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCATWGYGSSYRWFYWGQGLVSVSA

10

【0116】

mAb-1701 軽鎖可変領域 (配列番号：5)

【化5】

DIQMTQSPASQSASLGESVTITCLASQPIGIWLAWYQQKPGKSPQLLIYAATSLADGVPSRFSGS
SGGTKFSFKISSLQAEDFVSYQCQLYSSPWTFGGGTKLEIK

20

【0117】

mAb-1799 重鎖可変領域 (配列番号：6)

【化6】

EVKLVESEGGLVQPGSSMKLSCTASGFTFSDYYMAWVRQVPEKGLEWVANINYDGSSTYYLD
SLKSRFIISRDNAKNILYLQMNSLKSDDTATYYCARDVGYGGNYGFAYWGQGLTVTSA

【0118】

mAb-1799 軽鎖可変領域 (配列番号：7)

【化7】

DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASDNIYSYLAWYQQKQKSPQLLVYNAKTLAEGVPSRFSG
SGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYQCQHYSPLTFGAGTKLELK

30

【0119】

各抗体の重鎖及び軽鎖の CDR 配列は表 1 に示す通りである。

【0120】

【表 1】

表 1 抗体の重鎖と軽鎖の CDR 配列

抗体	重鎖		軽鎖	
1701	HCDR1	DYYMN 配列番号: 8	LCDR1	LASQPIGIWLA 配列番号: 11
	HCDR2	DIIPNNGGSKYNQKFKD 配列番号: 9	LCDR2	AATSLAD 配列番号: 12
	HCDR3	WGYGSSYRWFYD 配列番号: 10	LCDR3	QQLYSSPWT 配列番号: 13
1799	HCDR1	DYYMA 配列番号: 14	LCDR1	RASDNIYSYLA 配列番号: 17
	HCDR2	NINYDGSSTYYLDSLKS 配列番号: 15	LCDR2	NAKTLAE 配列番号: 18
	HCDR3	DVGYYGGNYGFAY 配列番号: 16	LCDR3	QQHYGSPLT 配列番号: 19

10

【 0 1 2 1 】

実施例 3 . 抗ヒト TIM-3 マウス・ハイブリドーマ・モノクローナル抗体のヒト化

1 . 抗 TIM-3 抗体 mAb-1701 のヒト化

MOE ソフトウェアにより、IMGT ヒト抗体重鎖及び軽鎖可変領域の遺伝子データベースと比較することによって、mAb-1701 と高い相同性を有する重鎖及び軽鎖可変領域の生殖細胞系列型遺伝子をテンプレートとして選択し、前記マウス抗体の CDRs を対応するヒトのソース・テンプレートに移植して、FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 の順序の可変領域配列を形成した。前記アミノ酸残基は、Kabat 番号付けシステムによって同定し、及び注釈を付けた。

20

【 0 1 2 2 】

1 . 1 ハイブリドーマ・クローン mAb-1701 のヒト化フレームワーク配列の選択

マウス抗体 mAb-1701 軽鎖のヒト化テンプレートは IGKV1-33*01 及び hjk4.1 であり、重鎖のヒト化テンプレートはIGHV1-18*01 及び hjh4.1 である。ヒト化可変領域の配列は次の通りである：

【 0 1 2 3 】

h1701VH-CDR グラフト (graft) (配列番号: 20)

【化 8】

*QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMN WVRQAPGQGLEWMGDIIPNNGGSKYN
QKFKDRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDTAVYYCARWGYGSSYRWFY WGQGTLVTVSS*

30

【 0 1 2 4 】

h1701VL-CDR グラフト (graft) (配列番号: 21)

【化 9】

*DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCLASQPIGIWLA WYQQKPGKAPKLLIYAAATSLAD GVPSRFSGS
GSGTDFTFTISLQPEDIATYYCQQLYSSPWT FGGGTKVEIK*

40

注：順序は FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4、斜体の配列は FR 配列、下線付きの配列は CDR 配列である。

注：順序は FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4、斜体の配列は FR 配列、下線付きの配列は CDR 配列である。

【 0 1 2 5 】

1 . 2 . h1701 のテンプレート選択及び復帰変異の設計

具体的な変異を表 2 に示す。

【 0 1 2 6 】

【表 2】

表 2 h1701 のテンプレート選択及び復帰変異の設計

h1701_VL		h1701_VH	
h1701_VL.1	移植 (Grafted)	h1701_VH.1	移植 (Grafted)
h1701_VL.1A	A43S	h1701_VH.1A	M48I
		h1701_VH.1B	R98T
		h1701_VH.1C	M48I, R98T
		h1701_VH.1D	M48I, R98T, R38K, D89E
		h1701_VH.1E	M48I, R98T, G49A, V68A, M70L
		h1701_VH.1F	M48I, R98T, G49A, V68A, M70L, R38K, D89E

10

注：例えば、A43S は、Kabat 番号付けシステムによる位置 43 での A から S への復帰変異を示す。移植 (Grafted) は、マウス抗体の CDRs をヒト生殖細胞系列型の FR 配列に移植したことを示す。

20

【 0 1 2 7 】

【表 3】

表 3 : h1701 ヒト化抗体の重鎖及び軽鎖可変領域の組み合わせ

	h1701_VL.1	h1701_VL.1A
h1701_VH.1	h1701-005	h1701-006
h1701_VH.1A	h1701-007	h1701-008
h1701_VH.1B	h1701-009	h1701-010
h1701_VH.1C	h1701-011	h1701-012
h1701_VH.1D	h1701-013	h1701-014
h1701_VH.1E	h1701-015	h1701-016
h1701_VH.1F	h1701-017	h1701-018

30

注：この表は、様々な変異の様々な配列の組み合わせを示す。例えば、h1701-007 は、ヒト化マウス抗体 h1701-007 に 2 つの変異 (軽鎖 h1701_VL.1A 及び重鎖 h1701_VH.1A) が存在することを示す。他も同様である。

【 0 1 2 8 】

ヒト化抗体 1701 の具体的な配列は次の通りである。

> h1701_VH.1 (h1701VH-CDR グラフト (graft) と同じ、配列番号：22)

40

【化 1 0】

QVQLVQSGAEVKKKPGASVKVSKASGYTFTDYIMNWVRQAPGQGLEWMGDIIPNNGGSKYN
QKFKDRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWGYGSSYRWFQYWGQGLTVTVSS

【 0 1 2 9 】

>h1701h1701_VH.1A (配列番号：23)

【化 1 1】

QVQLVQSGAEVKKKPGASVKVSKASGYTFTDYIMNWVRQAPGQGLEWIGDIIPNNGGSKYNQ
KFKDRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWGYGSSYRWFQYWGQGLTVTVSS

50

【 0 1 3 0 】

>h1701_VH.1B (配列番号: 24)

【 化 1 2 】

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQGLEWMGDIIPNNGGSKYN
QKFKDRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCATWGYGSSYRWFYWGQGTLVTVSS

【 0 1 3 1 】

>h1701_VH.1C (配列番号: 25)

【 化 1 3 】

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQGLEWIGDIIPNNGGSKYNQ
KFKDRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCATWGYGSSYRWFYWGQGTLVTVSS

10

【 0 1 3 2 】

>h1701_VH.1D (配列番号: 26)

【 化 1 4 】

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVKQAPGQGLEWIGDIIPNNGGSKYNQ
KFKDRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSEDVAVYYCATWGYGSSYRWFYWGQGTLVTVSS

【 0 1 3 3 】

>h1701_VH.1E (配列番号: 27)

【 化 1 5 】

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQGLEWIADIIPNNGGSKYNQ
KFKDRATLTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCATWGYGSSYRWFYWGQGTLVTVSS

20

【 0 1 3 4 】

>h1701_VH.1F (配列番号: 28)

【 化 1 6 】

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYMNWVKQAPGQGLEWIADIIPNNGGSKYNQ
KFKDRATLTTDTSTSTAYMELRSLRSEDVAVYYCATWGYGSSYRWFYWGQGTLVTVSS

30

【 0 1 3 5 】

>h1701_VL.1 (h1701VL-CDR グラフト (graft) と同一、配列番号: 29)

【 化 1 7 】

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCLASQPIGIWLAWYQQKPKGKAPKLLIYAATSLADGVPSRFSGS
GSGTDFTFITISLQPEDATYYCQQLYSSPWTFGGGTKVEIK

【 0 1 3 6 】

>h1701_VL.1A (配列番号: 30 と同一)

【 化 1 8 】

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCLASQPIGIWLAWYQQKPKGKSPKLLIYAATSLADGVPSRFSGS
GSGTDFTFITISLQPEDATYYCQQLYSSPWTFGGGTKVEIK

40

【 0 1 3 7 】

2 . 抗 TIM-3 抗体 mAb-1799 のヒト化

IMGT のヒト抗体重鎖及び軽鎖可変領域の遺伝子データベース及び MOE ソフトウェアを使った比較をして、mAb-1799 と高い相同性を持つ重鎖及び軽鎖可変領域の生殖細胞系列型遺伝子をテンプレートとして選択した。マウス抗体の CDRs を、対応するヒト・ソース・テンプレートに移植して、FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 の順に可変領域配列を形成した。アミノ酸残基は、Kabat 番号付けシステムによって特定し、及び注釈を付けた。

【 0 1 3 8 】

50

2.1. ハイブリドーマ・クローン 1799 についてのヒト化フレームワーク配列の選択
マウス抗体 mAb-1799 軽鎖についてのヒト化テンプレートは IGKV1-39*01 及び hjk2.1
であり、重鎖のヒト化テンプレートは IGHV3-7*01 及び hjh4.1 である。ヒト化可変領
域の配列は次の通りである：

【0139】

h1799VH-CDR グラフト (graft) (配列番号: 31)

【化19】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYMA WVRQAPGKGLEWVANINYDGSSTYYLDS
LKSRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVGYGGNYGFAYWGQGLTIVTSS

10

【0140】

h1799VL-CDR グラフト (graft) (配列番号: 32)

【化20】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASDNIYSYLA WYQQKPGKAPKLLIYNAKTLAE GVPSRFSG
SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYGSPLTFGQGTKLEIK

注：順序は FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4、斜体の配列は FR 配列、下線付きの配列は
CDR 配列である。

注：順序は FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4、斜体の配列は FR 配列、下線付きの配列
は CDR 配列である。

20

【0141】

2.2. ハイブリドーマ・クローン 1799 についてのテンプレートの選択と復帰変異の
設計。

表4は以下の通り：

【0142】

【表4】

表4 ハイブリドーマ・クローン h1799 のテンプレートの選択と復帰変異の設計

h1799_VL		h1799_VH	
h1799_VL.1	移植 (Grafted)	h1799_VH.1	移植 (Grafted)
h1799_VL.1A	I48V	h1799_VH.1A	Q3K
h1799_VL.1B	I48V, K45Q	h1799_VH.1B	Q3K, R87K
h1799_VL.1C	I48V, K45Q, A43S		
h1799_VL.1D	I48V, K45Q, A43S, T85S		

30

注：例えば、I48V は、Kabat 番号付けシステムによる位置 48 での I から V への復帰
変異を示す。移植 (Grafted) は、マウス抗体の CDRs をヒト生殖細胞系列型 FR 配列に
移植したことを示す。

40

【0143】

【表5】

表5：ヒト化マウス抗体 1799 の重鎖及び軽鎖可変領域の組み合わせ

	h1799_VL.1	h1799_VL.1A	h1799_VL.1B	h1799_VL.1C	h1799_VL.1D
h1799_VH.1	h1799-005	h1799-006	h1799-007	h1799-008	h1799-009
h1799_VH.1A	h1799-010	h1799-011	h1799-012	h1799-013	h1799-014
h1799_VH.1B	h1799-015	h1799-016	h1799-017	h1799-018	h1799-019

50

注：この表は、様々な変異の様々な配列の組み合わせを示す。例えば、h1799-005 は、ヒト化マウス抗体 h1799-005 に 2 つの変異（軽鎖 h1799_VL.1A 及び重鎖 h1799_VH.1A）が存在することを示す。他も同様である。

【 0 1 4 4 】

ヒト化 1799 の特異的配列は以下の通りである：

【 0 1 4 5 】

>h1799_VH.1 (h1799VH-CDR グラフト (graft) と同一である、配列番号：33)

【 化 2 1 】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMAWVRQAPGKGLEWVANINYDGSSTYYLDS
LKS RFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVGYGGNYGFAYWGQGTLVTVSS

10

【 0 1 4 6 】

>h1799_VH.1A (配列番号：34)

【 化 2 2 】

EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMAWVRQAPGKGLEWVANINYDGSSTYYLDS
LKS RFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVGYGGNYGFAYWGQGTLVTVSS

【 0 1 4 7 】

>h1799_VH.1B (配列番号：35)

【 化 2 3 】

EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMAWVRQAPGKGLEWVANINYDGSSTYYLDS
LKS RFTISRDN AKNSLYLQMNSLKAEDTAVYYCARDVGYGGNYGFAYWGQGTLVTVSS

20

【 0 1 4 8 】

>h1799_VL.1 (h1799VL-CDR グラフト (graft) と同一、配列番号：36)

【 化 2 4 】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASDNIYSYLAWYQQKPKGKAPKLLIYNAKTLAEGVPSRFSG
SGSGTDFLTITISLQPEDFATYYCQQHYGSPLTFGQGTKLEIK

30

【 0 1 4 9 】

>h1799_VL.1A (配列番号：37)

【 化 2 5 】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASDNIYSYLAWYQQKPKGKAPKLLVYNAKTLAEGVPSRFSG
SGSGTDFLTITISLQPEDFATYYCQQHYGSPLTFGQGTKLEIK

【 0 1 5 0 】

>h1799_VL.1B (配列番号：38)

【 化 2 6 】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASDNIYSYLAWYQQKPKGKAPQLLVYNAKTLAEGVPSRFSG
SGSGTDFLTITISLQPEDFATYYCQQHYGSPLTFGQGTKLEIK

40

【 0 1 5 1 】

>h1799_VL.1C (配列番号：39)

【 化 2 7 】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASDNIYSYLAWYQQKPKSPQLLVYNAKTLAEGVPSRFSG
SGSGTDFLTITISLQPEDFATYYCQQHYGSPLTFGQGTKLEIK

【 0 1 5 2 】

50

>h1799_VL.1D (配列番号: 40)

【化28】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASDNIYSYLAWYQQKPKGKSPQLLVYNAKTLAEGVPSRFSG
SGSGTDFLTITSLQPEDFASYCQQHYGSPLTFGGGTKLEIK

【0153】

実施例4. 組換えキメラ抗体及びヒト化抗体の調製及び試験

ヒト重鎖 IgG4 / 軽鎖カッパ定常領域及び様々な可変領域の組み合わせを抗体用を選択した。S228P 変異を Fc セグメントに導入して、IgG4 抗体の安定性を高めた。また、この分野で知られている他の変異を使用してその性能を向上させることもできる。

10

【0154】

重鎖定常領域の配列を配列番号: 41 に示す

【化29】

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH
YTKSLSLSLGGK

20

【0155】

軽鎖定常領域の配列を配列番号: 42 に示す

【化30】

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYLSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【0156】

1. キメラ抗体重鎖の分子クローニング

可変領域の遺伝子配列は、ハイブリドーマのスクリーニングから選択した陽性抗体分子をシーケンシングすることにより得た。取得した配列に従ってプライマーを設計した。シーケンシングした遺伝子は、PCR を介して様々な抗体の VH/VK 遺伝子断片を構築するためのテンプレートとして使用した。取得した断片を、相同組換えを介して発現ベクター pHr (シグナル・ペプチド及び hIgG4/h 定常領域 (CH1-FC/CL) 断片とともに) に挿入し、組換えキメラ抗体の全長発現プラスミド VH-CH1-FC-pHr/VL-CL-pHr を構築した。最終的に、2つのキメラ抗体 Ch1701 及び Ch1799 とした。

30

【0157】

2. ヒト化抗体の分子クローニング

ヒト化抗体について設計した配列は、コドン最適化をされており、ヒトのコドン嗜好性を有するコーディング配列を得た。プライマーを設計し、さまざまな抗体の VH/VK 遺伝子断片を構築した。取得した断片を、相同組換えを介して発現ベクター pHr (シグナル・ペプチド及び hIgG4/h 定常領域 (CH1-FC/CL) 断片とともに) に挿入し、ヒト化抗体の全長発現プラスミド VH-CH1-FC-pHr/VL-CL-pHr を構築した。

40

【0158】

3. 組換えキメラ抗体及びヒト化抗体の発現と精製

抗体の重鎖及び軽鎖を発現するベクターを 1:1.2 の比率で HEK293E 細胞にトランスフェクトし、6 日後に上清を回収した。サンプルを高速で遠心分離して不純物を除去し、プロテイン A カラムで精製した。A280 の測定値がベースラインに低下するまで、前記カラムを PBS で洗浄した。標的のタンパク質を酸性溶出バッファー (pH 3.0 - pH 3.5) で溶出した。1M Tris-HCl (pH 8.0-9.0) を使用して、前記標的タンパク質を中和した。溶出したサンプルを適切に濃縮し、PBS で平衡化したゲル・クロマトグラフィー Superdex2

50

00 (GE) で更に精製した。凝集物のないピークを収集し、分注して使用した。

【 0 1 5 9 】

実施例 5 . 抗体 h1701 の点変異

脱アミド化は、抗体の安定性に影響を与える、より後の段階での一般的な化学修飾である。特に、変異を介して、CDR アミノ酸の高度な脱アミド化、酸化、又は異性化の修飾を回避する、又はこのような修飾を減らすことは一般的である。加速安定性試験及び抗体構造及びホットスポット予測に関するコンピューター・シミュレーションによると、h1701 抗体の重鎖 CDR2 中の NNG 部位は脱アミド化されやすい傾向がある。上記の NNG は、抗体 h1701 重鎖可変領域のアミノ酸位置 54-56 に位置する。アミノ酸の特性及び抗体構造のコンピューター・シミュレーションによれば、上記の部位のアミノ酸を任意のアミノ酸に置換することができる。好ましくは、h1701 の CDR2 パリアントは：DIIPX₁X₂X₃GSKYNQKFKD (配列番号：43) であり、ここで、X₁X₂X₃は、h1701 抗体の重鎖可変領域の中の位置 54-56 のアミノ酸残基であり、X₁ は、Asn、Leu、Val、Met 又は Glu から選択され、X₂ は Asn、Glu、Met、His、Lys、Leu、Ala 又は Val から選択され、X₃ は Gly 又は Ala から選択される。

10

【 0 1 6 0 】

更に、位置 54-56 に上記の変異を含む CDR2 及び異なる復帰変異を含む FR は、以下の重鎖可変領域を形成することがある：

【 0 1 6 1 】

>h1701_VH.1-CDR2 変異体 (配列番号：44)

20

【 化 3 1 】

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYIMNWVRQAPGQGLEWMGDIIPX₁X₂X₃GSKY
NPKFKDRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWGYGSSYRWFDFYWGQGLVTVSS

【 0 1 6 2 】

>h1701_VH.1A-CDR2 変異体 (配列番号：45)

【 化 3 2 】

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYIMNWVRQAPGQGLEWIGDIIPX₁X₂X₃GSKYN
QKFKDRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWGYGSSYRWFDFYWGQGLVTVSS

30

【 0 1 6 3 】

>h1701_VH.1B-CDR2 変異体 (配列番号：46)

【 化 3 3 】

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYIMNWVRQAPGQGLEWMGDIIPX₁X₂X₃GSKY
NPKFKDRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCATWGYGSSYRWFDFYWGQGLVTVSS

【 0 1 6 4 】

>h1701_VH.1C-CDR2 変異体 (配列番号：47)

【 化 3 4 】

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYIMNWVRQAPGQGLEWIGDIIPX₁X₂X₃GSKYN
QKFKDRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCATWGYGSSYRWFDFYWGQGLVTVSS

40

【 0 1 6 5 】

>h1701_VH.1D-CDR2 変異体 (配列番号：48)

【化 3 5】

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF¹TDYYMNWVKQAPGQGLEWIGDIIPX₁X₂X₃GSKYN
QKFKDRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSEDTAVYYCATWGYGSSYRWF²DYWGQGTLVTVSS

【 0 1 6 6 】

>h1701_VH.1E-CDR2 変異体 (配列番号: 49)

【化 3 6】

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF¹TDYYMNWVRQAPGQGLEWIADIIPX₁X₂X₃GSKYN
QKFKDRATLTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCATWGYGSSYRWF²DYWGQGTLVTVSS

10

【 0 1 6 7 】

>h1701_VH.1F-CDR2 変異体 (配列番号: 50)

【化 3 7】

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF¹TDYYMNWVKQAPGQGLEWIADIIPX₁X₂X₃GSKYN
QKFKDRATLTTDTSTSTAYMELRSLRSEDTAVYYCATWGYGSSYRWF²DYWGQGTLVTVSS.

20

【 0 1 6 8 】

抗体 h1701 HCDR2 バリエーション及び対応する CDR2 バリエーションを含むヒト化 h1701_VH.1 B-CDR2 バリエーション (配列番号: 46) の例示的な配列を、以下のバリエーション及び表 6 に示す。

【 0 1 6 9 】

例えば、h1701-009 HCDR2 の NNG を、NLG、NVG、NNA、NMA、NEA、NHA、NMG、NEG、NKG、NAG、NHG として設計した (対応する重鎖可変領域 CDR2 の配列は、配列番号: 51-61 に示す)。発現プラスミドの構築と 293E の発現は、分子クローニングにより行った。この変異抗体の親和性と安定性を、精製後にも更に検出した。

【 0 1 7 0 】

例示的なバリエーションの親和性試験の結果を、試験例 1 及び 3 に示す。

30

【 0 1 7 1 】

h1701-009 に、一連の特定のアミノ酸変異を入れた。これらの変異には、表 6 に示すものが含まれるが、これらに限定されない。化学的安定性試験の結果は、試験例 9 に示す。

【 0 1 7 2 】

【表 6】

表 6 脱アミド化修飾を防ぐ h1701-009 バリエーションの重鎖可変領域の配列

重鎖可変領域	VH の配列番号	対応する HCDR2 配列
h1701-009	配列番号: 24	DIIPNNGGSKYNQKFKD (配列番号: 9)
h1701-009NLG	配列番号: 51	DIIPNLGGSKYNQKFKD (配列番号: 62)
h1701-009NVG	配列番号: 52	DIIPNVGGSKYNQKFKD (配列番号: 63)
h1701-009NNA	配列番号: 53	DIIPNAGSKYNQKFKD (配列番号: 64)
h1701-009NMA	配列番号: 54	DIIPNMAGSKYNQKFKD (配列番号: 65)
h1701-009NEA	配列番号: 55	DIIPNEAGSKYNQKFKD (配列番号: 66)
h1701-009NHA	配列番号: 56	DIIPNHAGSKYNQKFKD (配列番号: 67)
h1701-009NMG	配列番号: 57	DIIPNMGSKYNQKFKD (配列番号: 68)
h1701-009NEG	配列番号: 58	DIIPNEGSKYNQKFKD (配列番号: 69)
h1701-009NKG	配列番号: 59	DIIPNKGSKYNQKFKD (配列番号: 70)
h1701-009NAG	配列番号: 60	DIIPNAGGSKYNQKFKD (配列番号: 71)
h1701-009NHG	配列番号: 61	DIIPNHGGSKYNQKFKD (配列番号: 72)

10

【 0 1 7 3 】

本抗体の性能と利点を、以下に示す試験方法により検証する。

【 0 1 7 4 】

試験例 1. ヒト TIM-3 を過剰発現する CHO-s 細胞に対する抗 TIM-3 抗体の結合アッセイ

20

ヒト TIM-3 を過剰発現する CHO-S 細胞に対する抗 TIM-3 抗体の結合活性を、結合アッセイにより検出する。前記 TIM-3 全長のプラスミド（インハウス（in-house）で作製、配列番号： 3）をエレクトロポレーションにより CHO-S 細胞にトランスフェクトし、選択圧を加えて 2 週間後に TIM-3 の発現を検出した。TIM-3 過剰発現細胞を 96 ウェルプレートに固定した。抗体を添加した後、シグナル強度を使用して、抗体が Tim-3 過剰発現 CHO-S 細胞に結合する活性を測定した。具体的な手順は次の通りである。AbTim-3 を陽性対照として使用し、その配列は US20150218274A1 の表 2 からのものであり、当社が作製した。

【 0 1 7 5 】

30

細胞を 96 ウェルプレートに 4E5/ml の密度で、100 µg/ウェルで播種し、一晚培養した。上清を廃棄し、前記プレートを PBS で 3 回洗浄した。100 µl/ウェルの 4% PFA を各ウェルに加え、プレートを室温で 30 分間固定した。このプレートを PBS で 3 回洗浄した。液体を捨て、200 µl のブロッキング溶液（PBS で希釈した 5% スキムミルク（光明（Guangming）スキム・ミルク・パウダー））を各ウェルに加えた。プレートを 37 で 2.5 時間インキュベートした。次に、前記ブロッキング溶液を捨て、プレートを PBST バッファー（0.05% の tween-20 を含む pH7.4 PBS）で 5 回洗浄した。サンプル・バッファーで希釈した、試験する様々な濃度の抗体（ハイブリドーマ精製した抗体又はヒト化抗体）を、50 µl/ウェルで各ウェルに加え、37 で 1 時間インキュベートした。インキュベーション後、プレートを PBST バッファーで 5 回洗浄し、サンプル希釈液で希釈した HRP 標識ヤギ抗マウス二次抗体（Jackson Immuno Research、カタログ番号 115-035-003）又はヤギ抗ヒト二次抗体（Jackson Immuno Research、カタログ番号 109-035-003）を、100 µl/ウェルで各ウェルに添加し、37 で 1 時間インキュベートした。プレートを PBST で 6 回洗浄し、100 µl/ウェルの TMB 発色基質（KPL、カタログ番号、52-00-03）を各ウェルに加えた。プレートを室温で 5-15 分間インキュベートした。50 µl の 1M H₂SO₄ を各ウェルに加えることにより、反応を停止させた。450nm の波長での OD 値を ELISA マイクロプレート・リーダー（BMG Labtech、NOVOSTar）で読み取り、TIM-3 抗体が Tim-3 過剰発現細胞に結合することに関する EC50 値を計算した。

40

【 0 1 7 6 】

【表 7】

表 7 細胞結合アッセイにおける候補抗体の EC50

候補抗体	細胞ベースの結合 ELISA での EC50(nM)	候補抗体	細胞ベースの結合 ELISA での EC50(nM)
mAb-1701	0.122	Ch1799	0.080
mAb-1799	0.117	h1799-005	0.063
Ch1701	0.166	h1799-006	0.095
h1701-005	0.602	h1799-007	0.109
h1701-006	0.735	h1799-008	0.067
h1701-007	-	h1799-009	0.076
h1701-008	2.422	h1799-010	0.077
h1701-009	0.187	h1799-011	0.114
h1701-010	0.069	h1799-012	0.158
h1701-011	0.188	h1799-013	0.139
h1701-012	0.221	h1799-014	0.116
h1701-013	0.199	h1799-015	0.188
h1701-014	0.124	h1799-016	0.117
h1701-015	0.265	h1799-017	0.194
h1701-016	0.058	h1799-018	0.215
h1701-017	0.105	h1799-019	0.119
h1701-018	0.087		

10

20

【 0 1 7 7 】

本結果は、TIM-3 抗体 1701 及び 1799 及びそのヒト化抗体が、ヒトの全長 TIM-3 タンパク質を発現する CHO-s 細胞に対して良好な結合活性を有することを示している。

【 0 1 7 8 】

h1701-009 及び HCDR2 に点変異を有するそのバリエーションの、ヒト TIM-3 過剰発現細胞に対する結合活性を表 8 に示した。

【 0 1 7 9 】

【表 8】

表 8 細胞ベースの結合アッセイにおける候補抗体の EC50

候補抗体	結合 ELISA での EC50(nM)
h1701-009	0.503
h1701-009 NNA	0.515
h1701-009 NHA	0.530
h1701-009 NEA	0.667
h1701-009 NMA	0.629
h1701-009 NMG	0.603
h1701-009 NEG	0.673
h1701-009 NVG	0.717
h1701-009 NLG	0.637
h1701-009 NKG	0.438
h1701-009 NAG	0.512
h1701-009 NHG	0.317

30

40

【 0 1 8 0 】

本結果によれば、HCDR2 に点変異を有する 1701-009 抗体のバリエーションが、ヒト TIM-3 過剰発現 CHO-s 細胞に対して良好な結合活性を有する、ことが示された。

【 0 1 8 1 】

試験例 2 . 抗 TIM-3 抗体の競合試験

50

抗体 A を PBS、pH7.4 (Sigma、カタログ番号 P4417-100TAB) で 2 µg/ml に希釈し、50 µg/ウェルを 96 ウェル・マイクロタイター・プレート (Corning、カタログ番号CLS35 90-100EA) に添加し、37 °C で 2 時間、インキュベートした。この液体は捨てた。200 µl のブロッキング溶液 (PBS で希釈した 5% スキムミルク (光明 (Guangming) スキム・ミルク・パウダー) を各ウェルに添加し、このプレートを 37 °C で 2.5 時間又は 4 °C で一晚 (16-18 時間) インキュベートした。次にこのブロッキング溶液を捨てて、プレートを PBST バッファー (0.05% の tween-20 を含む PH7.4 PBS) で 5 回洗浄した。サンプル希釈液 (1% BSA を含む PH7.4 PBS) で希釈した 20 µg/ml 及び 4 µg/ml の抗体 B と 0.4 µg/ml のビオチン標識 TIM-3-Fc タンパク質 (インハウスで作製、配列番号: 1) の事前混合物を 50 µl/ウェルで各ウェルに加えた。このプレートを 37 °C で 1 時間インキュベートした。インキュベーション後、マイクロタイタープレート内の液体を廃棄し、そのプレートを PBST バッファーで 5 回洗浄した。サンプル溶液で希釈した HRP 標識ストレプトアビジン (Sigma、カタログ番号 S2438) を 100 µl/ウェルで各ウェルに加え、そのプレートを 37 °C で 1 時間インキュベートした。そのプレートを PBST で 5 回洗浄し、50 µl/ウェルの TMB 発色基質 (KPL、カタログ番号、52-00-03) を各ウェルに加え、プレートを室温で 5-10 分間インキュベートした。この反応は、1M H₂SO₄ を 50 µl/ウェルで各ウェルに加えることにより、停止させた。450nm の波長での OD 値を ELISA マイクロプレート・リーダー (BMG Labtech、NOVOSTar) で読み取り、Tim-3 への結合に対する種々の抗体の競合効果を計算した。

10

【0182】

20

【表9】

表9 TIM-3 への結合についての mAb-1701 及び mAb-1799 の競合試験

	µg/ml	mAb-1701	mAb-1799
mAb-1701	20	0.054	1.599
	4	0.072	1.685
mAb-1799	20	0.835	0.091
	4	0.86	0.077

【0183】

30

本結果によれば、TIM-3 との結合において、mAb-1701 と mAb-1799 の間に競合関係がないことが示された。

【0184】

試験例3 .Biacore を使用した TIM-3 抗体の親和性アッセイ

1 .Biacore システムを使用したマウス抗体の親和性アッセイ

マウス抗体捕捉抗体キット (the mouse antibody capture antibody Kit (カタログ番号 BR-1008-38、GE)) のマニュアルに記載されている方法に従って、試験する前記抗体を捕捉するために、マウス抗体捕捉抗体をバイオセンサー・チップ CM5 (カタログ番号 BR-1000-12、GE) に共有結合的に固定させた。そして、TIM-3-His 抗原 (Sino. Biol, カタログ番号 10390-H03H) をチップの表面を通るように流した。この反応シグナルを、Biacore 機器を使用してリアルタイムで検出し、結合及び解離曲線を取得した。最後に、親和性の値をフィッティングすることによって取得した。本実験では、解離させる各サイクルが終了した後、前記バイオセンサー・チップをマウス捕捉抗体キットにある再生溶液で洗浄した。結果を表10に示す。

40

【0185】

【表 10】

表 10 候補抗体についての親和性試験

候補抗体	移動相	親和性 (M)
h1701	TIM-3-His	1.82E-10
h1799		2.36E-10

【0186】

本結果によれば、TIM-3 抗体 mAb-1701 及び mAb-1799 がヒト TIM-3 タンパク質に対して、強い結合活性と親和性を持っていることが示される。

10

【0187】

2. Biacore システムを使用したキメラ抗体及びヒト化抗体の親和性アッセイ

ヒト抗体捕捉キット (the human antibody capture Kit (カタログ番号 BR-1008-39、GE)) のマニュアルに記載されている方法に従って、試験する前記抗体を親和性で捕捉するために、ヒト抗体捕捉抗体をバイオセンサー・チップ CM5 (カタログ番号 BR-1000-12、GE) に共有結合的に固定させた。そして、TIM-3-Flag-His 抗原 (インハウスで作製、配列番号: 2) をチップの表面を通るように流した。これの反応シグナルを、Biacore 機器を使用してリアルタイムで検出し、結合及び解離曲線を取得した。最後に、親和性の値をフィッティングすることによって取得した。下記の表 11 を参照のこと。本実験では、解離させる各サイクルが終了した後、前記バイオセンサー・チップをヒト捕捉抗体キットに入っている再生溶液で洗浄した。

20

【0188】

【表 11】

表 11 抗-TIM-3 抗体の親和性

候補抗体	移動相	親和性 (M)
Ch1701	TIM-3-His	1.39E-9
h1701-009		1.34E-9
h1701-010		2.25E-9
h1701-016		1.60E-9
Ch1799		1.76E-9
h1799-005		1.78E-9
h1799-006		1.89E-9
h1799-010		2.48E-9

30

【0189】

本結果によれば、取得した本発明のヒト化抗体がヒト TIM-3 タンパク質に対して、強い結合活性と親和性を有することが示される (すべての結果を示しているわけではない)。

40

【0190】

HCDR2 に点変異を有する h1701-009 パリアント抗体の結合親和性は、BIAcore を使用して検出した。その結果を表 12 に示す。

【0191】

【表 1 2】

表 1 2 抗-TIM-3 抗体の親和性

固定相	移動相	親和性 (M)
h1701-009	TIM-3-His	5.99E-10
h1701-009 NAG		5.79E-10
h1701-009 NEG		6.40E-10
h1701-009 NEA		6.53E-10
h1701-009 NHG		6.40E-10
h1701-009 NHA		5.97E-10
h1701-009 NKG		4.72E-10
h1701-009 NLG		6.40E-10
h1701-009 NMG		6.75E-10
h1701-009 NMA		6.53E-10
h1701-009 NNA		5.69E-10
h1701-009 NVG		5.81E-10

10

20

【0192】

本結果によれば、上記の h1701-009 パリアントが、なお依然として TIM-3 に対して強い親和性を持っていることが示される。NNG 部位での変異は、抗原に対する抗体の結合親和性に影響しない。

【0193】

試験例 4 . In vitro での細胞性免疫機能アッセイ

T リンパ球の活性化に対する抗 TIM-3 抗体の効果を研究するために、in vitro での 3 種の機能試験：即ち、混合リンパ球反応 (MLR アッセイ)、PBMC 活性化試験及びスーパー抗原ブドウ球菌エンテロトキシン B (SEB) 刺激試験、を確立した。

30

【0194】

1 . 混合リンパ球反応 (MLR アッセイ)

実験手順は次のとおりである：

1) ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) を採取して精製した；
 2) PBMCs を NUNC プレートに 2E6 細胞/ml の密度で播種し、2 時間置いた。
 3) 非接着細胞を除去し、接着細胞を GM-CSF (100ng/ml) 及び IL-4 (100ng/ml) で 5 日間刺激した後、TNF (100ng/ml) で 2 日間インキュベートして、DC 細胞の成熟を誘導した；

4) 前記成熟した DC 細胞を、異なるドナーからの PBMCs と 1 : 5 の比率で混合し、10ng/ml の CD3 抗体でプレコートしてある 96 ウェル・プレートで培養し、様々な濃度の h1701-009、h1799-005、AbTIM-3 及び陰性対照の Fc-IgG を添加した；

40

5) 5 日後に、上清中の IFN の濃度を ELISA で検出した (結果を図 2 A から 2 C に示す)。

【0195】

本結果によれば、h1701-009、h1799-005 及び AbTIM-3 が IFN の分泌を効果的に刺激し、h1701-009 及び h1799-005 がより強い刺激効果を示すことが示される。

【0196】

2 . PBMC 活性化試験

本実験の手順を次のように簡単に説明する：

50

1) ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) を採取して精製し、96 ウェル・プレートに CD3 及び CD28 抗体 (両方とも濃度 10ng/ml) でコーティングした;

2) PBMCs を、コーティングした 96 ウェル・プレートに、1E5 細胞/ウェルの密度で播種し、様々な濃度の TIM-3 抗体と陰性対照 Fc-IgG を同時に添加した;

3) 6 日後、細胞内の IFN 及び TIM-3 を染色するために細胞を回収した。IFN 陽性細胞の割合 (IFN +%) (すべての細胞の IFN 幾何 (Geo) 平均値) 及び IFN 及び TIM-3 の二重陽性細胞の割合 (TIM-3+IFN +%) (TIM-3+細胞中の IFN 幾何 (Geo) 平均値) を FACS で解析した (図 3 A から 3 D);

【 0 1 9 7 】

本結果によれば、h1701-009、h1799-005 及び AbTIM-3 が IFN 陽性細胞の割合及び IFN の発現を様々な程度に増加させ、h1701-009 及び h1799-005 の効果が、AbTIM-3 より強いことが示された。

10

【 0 1 9 8 】

3 . SEB 刺激試験

本実験の手順は次のとおりである :

1) ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) を採取して精製した;

2) PBMCs を、1E5 細胞/ウェルの密度でコーティングした 96 ウェル・プレートに播種し、1ng/ml SEB 並びに様々な濃度の TIM-3 抗体及び陰性対照 Fc-IgG を同時に添加した;

3) 5 日後、その上清を収集し、IL12 及び IFN を ELISA で検出した (それぞれ図 4 A 及び 4 B を参照)。

20

【 0 1 9 9 】

本結果によれば、h1701-009、h1799-005 及び AbTIM-3 の全てが SEB により誘導される IL12 及び IFN の分泌を効果的に増加させ、h1701-009 及び h1799-005 は低用量で、AbTIM-3 より良い効果を示すことが示された。

【 0 2 0 0 】

試験例 5 . ラットにおけるヒト化抗 TIM-3 抗体、h1701-009、h1799-005 の薬物動態 (PK) アッセイ

体重 180-240g の 12 匹の SD ラットを Sippr-BK 実験動物社から購入した。給餌期間中、ラットは水と飼料を自由に摂取できるようにした。実験環境での適応期間は、12/12 時間の明暗サイクル制御で 3 日以上とした (温度は 16-26 °C、相対湿度は 40-70% とした)。本実験の 1 日前に、SD ラットに番号を付け、各群に 3 匹のラット (雄 2 匹と雌 1 匹) となるようにランダムに群分けをした。実験当日に、2 群のラットに試験薬 h1701-009 を 3 mg/kg と 10 mg/kg の用量で静脈内注射した; 2 群のラットに試験薬 h1701-005 を 3 mg/kg と 10 mg/kg の用量で静脈内注射した。静脈内注射の容量は 5 ml/kg とした。

30

【 0 2 0 1 】

投与前及び投与後 5 分、8 時間、1 日、2 日、4 日、7 日、10 日、14 日、21 日、28 日、の各時点で血液を採取した。抗凝固剤を使わないで、各動物から 0.2 ml の全血を採取した。この血液サンプルを 4 °C で 30 分間置いた後、1000 g で 15 分間遠心分離した。前記上清を EP チューブに取り、-80 で保存した。

40

【 0 2 0 2 】

血清抗体の濃度は ELLSA によって測定し、薬物動態パラメータは Winnolin ソフトウェアによって計算した。主な薬物動態パラメータについては、表 1 3 を参照のこと。

【 0 2 0 3 】

【表 1 3】

表 1 3 ラット中での h1799-005 及び h1701-009 の半減期

用量(mg/kg)	h1799-005		h1701-009	
	3	10	3	10
t _{1/2} (日)	13.6±1.1	11.4±1.7	10.6±1.8	15.5±2.5

【0 2 0 4】

SD ラットに 10mg/kg の用量で抗 TIM 3 抗体 h1701-009 及び h1701-005 を静脈内注射した後、ラット中でのその血清レベルは類似していた。抗体 h107-005 に関して、3 mg/kg 及び 10 mg/kg の投与量での血清レベルの増加は、投与量の増加と線形的に相関した；一方、抗体 h107-009 に関しては、3 mg/kg 及び 10 mg/kg の投与量での血清レベルの増加は、投与量の増加よりわずかに高かった。抗体 h1701-009 と g1799-005 の排出半減期は類似していた。

10

【0 2 0 5】

試験例 6 . DSC による抗体 h1701-009 及び h1799-005 の熱安定性

熱安定性を、様々な pH 値の様々なバッファー系で比較した。様々な pH を有する例示的なバッファー系は、例えば、10mM PB (pH7)、15mM His (pH6.0) 及び 10mM 酢酸 (pH5.2) であった。前記サンプルを対応するバッファーに溶解し、その濃度を約 1 mg/ml に調節した。MicroCal*VP-Capillary DSC (Malvern) によって検出を行った。試験前に、真空脱気装置を使用して、各サンプルとブランク・バッファーを 1 分間から 2 分間脱気した。プレートの各ウェルに 400 µl のサンプル又はブランク・バッファーを加えた (ローディング量は 300 µl とした)。最後に、2 組のウェルに洗浄用にそれぞれ 14% の Deco n 90 と ddH₂O を添加した。そして、プレートをプラスチック・カバーで密閉した。スキャンは 25 °C の温度から開始し、100 °C で終了し、スキャン速度は 60 °C/h とした。本結果を表 1 4 に示す。本結果によれば、h1701-009 と h1799-005 の両方がいくつかの試験系で良好な熱安定性を示すことを示される。

20

【0 2 0 6】

【表 1 4】

表 1 4 様々な pH での、抗体 h1701-009 及び h1799-005 の熱安定性

30

サンプル	バッファー	T _m -開始 (°C)	T _M (°C)
h1701-009	pH7.0	63.09	74.59
	pH 6.0	59.1	77.24
	pH 5.2	60.32	77.13
h1799-005	pH7.0	62.99	76.63
	pH 6.0	60.01	77.49
	pH 5.2	60.2	77.69

【0 2 0 7】

試験例 7 . SEC-HPLC による純度のモニタリング、及び特定の濃度での安定性を断続的に観察すること

40

例示的な条件は、例えば、前記サンプルの濃度を約 50mg/ml に調節するものとした。PBS (pH7.4) 系中の様々な抗体の安定性を、-80 °C で 5 回凍結融解を繰り返し、4 °C 及び 40 °C で 1 か月間保存する等の条件下で比較した。Xbridge タンパク質 BEH SEC 200 A (Waters) HPLC カラムを使用して、抗体の純度を検出した。1 か月間検討した後、h1701-009 と h1799-005 の両方が良好な安定性を示し、SEC による純度は、40 で 1 か月間置いても、有意に変化しなかった。

【0 2 0 8】

試験例 8 . 抗体の化学的安定性

配列番号：51-55 に示す h1701-009、h1799-005 及び h1701-009 バリアントの化学的

50

安定性を検出した。

【0209】

試験する 500 µg の抗体を 500 µl の PBS、pH 7.4 に溶解し、40 の水浴に置いた。酵素加水分解アッセイのために、0、14、28 日目にサンプリングを実施した。様々な時点で採取した各サンプル 100 µg を、100 µl の 0.2 M His-HCl、8 M Gua-HCl 溶液 (pH 6.0) に溶解した。3 µl の 0.1g/mL DTT を加えた後、前記サンプルを 50 の水浴に 1 時間置いた。それから、前記サンプルを 0.02M His-HCl (pH 6.0) で 2 回限外ろ過し、3 µl の 0.25 mg/mL トリプシンを加え、37 の水浴に置いて、一晚、酵素消化をした。

【0210】

LC-MS 解析を、Agilent 6530 Q-TOF によって行った。その結果によれば、h1799-005 は、40 の条件に 1 か月間置いて、明らかな異性化、酸化、脱アミド化の修飾を示さないことが示され、この分子が良好な化学的安定性を有することが示された。h1701-009 は、明らかな酸化及び異性化の修飾を示さなかった。しかしながら、N54N55G56 部位で、強く脱アミド化の修飾を受けていることが h1701-009 で観察された。例えば NLG、NVG、NMA、NEA、NNA 等の変異等を含む、一連のアミノ酸変異を導入することを試みた。これらの変異は、in vitro 活性アッセイを使用することにより、生物活性に影響を与えないことが実証された。加速試験の後、前記変異を LC-MS で解析し、その結果によれば、これら全ての変異が脱アミド化の修飾を効果的に減らすことが示された。加速試験後の様々なバリエーションにおける脱アミド化の修飾の割合を表 15 に示す。

10

【0211】

【表 15】

20

表 15 CDR2 内に変異を有する h1701-009 バリエーションの化学的安定性

	0 日目	1 週目	2 週目
h1701-009	11.16%	17.55%	34.62%
h1701-009NLG	0	0	0
h1701-009NVG	0	0	0
h1701-009NMA	0	0	0
h1701-009NEA	0	0	0
h1701-009NNA	0	0	13.58%

30

【0212】

本発明を、明確な理解を目的として、図及び特定の実施形態を使って詳細に説明したが、本説明及び実施形態は、本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。本出願で引用された文献及び特許のすべての公開内容は、参照によりその全体が明示的に組み込まれる。

【 図 1 】

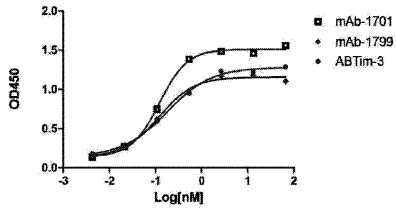
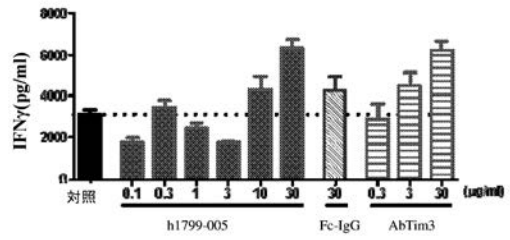


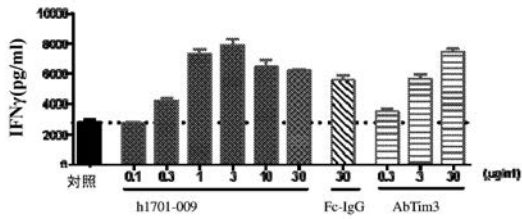
图 1

【 図 2 B 】



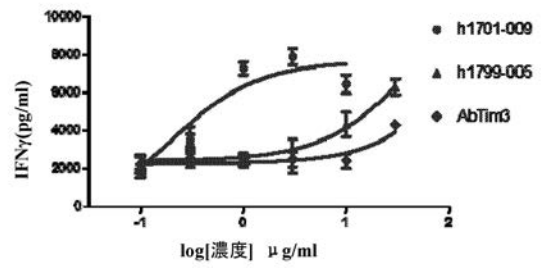
B

【 図 2 A 】



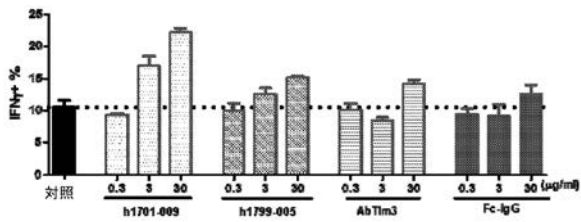
A

【 図 2 C 】



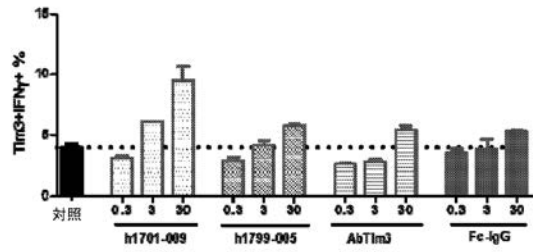
C

【 図 3 A 】



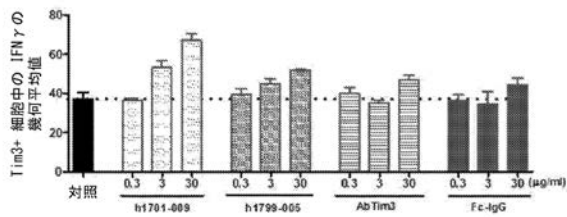
A

【 図 3 C 】



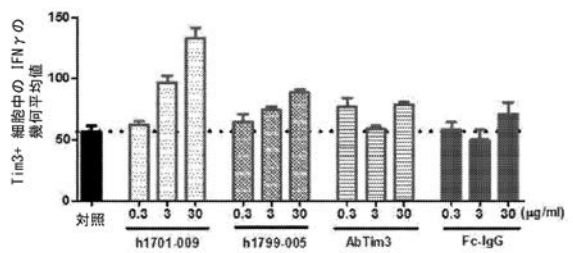
C

【 図 3 B 】



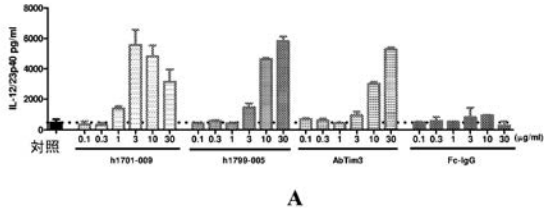
B

【 図 3 D 】



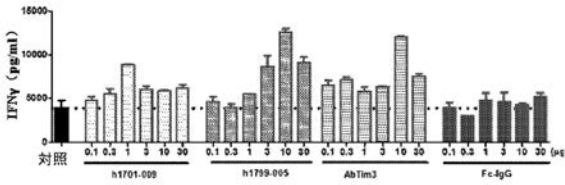
D

【 图 4 A 】



A

【 图 4 B 】



B

【 配列表 】

2020508658000001.app

【 国际調查報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2018/077190
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 16/28 (2006.01) i; C12N 15/13 (2006.01) i; C12N 15/63 (2006.01) i; A61K 39/395 (2006.01) i; C12P 21/08 (2006.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i; G01N 33/577 (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; C12N; A61K; A61P; G01N		
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) CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, CPEA, SIPOABS, BPTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, ELSEVIER, EMBASE and search terms: Tim-3, 单克隆, 抗体, antibody, monoclonal etc.;		
GENBANK, EMBL, NATIONAL BIO-SEQUENCE DATABASE OF CHINESE PATENT and searched sequences: SEQ ID NO: 1-72		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 103079644 A (KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD. et al.), 01 May 2013 (01.05.2013), claims 1-23, and description, paragraph [0412]	17-28, 30
A	CN 103079644 A (KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD. et al.), 01 May 2013 (01.05.2013), entire document	1-16
X	CN 102492038 A (INSTITUTE OF BASIC MEDICAL SCIENCES OF THE ACADEMY OF MILITARY MEDICAL SCIENCES OF THE PEOPLE'S LIBERATION ARMY), 13 June 2012 (13.06.2012), claims 1-7, and embodiments 1-4	17-28, 30
A	CN 102492038 A (INSTITUTE OF BASIC MEDICAL SCIENCES OF THE ACADEMY OF MILITARY MEDICAL SCIENCES OF THE PEOPLE'S LIBERATION ARMY), 13 June 2012 (13.06.2012), entire document	1-16
X	CN 106132991 A (NOVARTIS AG et al.), 16 November 2016 (16.11.2016), claims 1-167	17-28, 30
A	CN 106132991 A (NOVARTIS AG et al.), 16 November 2016 (16.11.2016), entire document	1-16
<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 15 May 2018	Date of mailing of the international search report 29 May 2018	
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer LI, Chen Telephone No. 86-10-62411100	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/077190

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

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

1. Claims Nos.: 29
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] PCT Rule 39.1(iv) – a surgical method or a treatment method for the disposal of a human body or animal body.

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2018/077190

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 103079644 A	01 May 2013	AU 2011262758 B8	04 September 2014
		EP 2581113 A4	25 December 2013
		WO 2011155607 A1	15 December 2011
		CA 2814155 A1	15 December 2011
		AU 2011262758 A1	10 January 2013
		US 2017088616 A1	30 March 2017
		EP 2581113 A1	17 April 2013
		TW 201207397 A	16 February 2012
		AU 2011262758 B2	24 April 2014
		US 8552156 B2	08 October 2013
		CN 103079644 B	15 February 2017
		AU 2011262758 A8	04 September 2014
		US 2012189617 A1	26 July 2012
		JP WO2011155607 A1	15 August 2013
		US 9556270 B2	31 January 2017
		US 2014044728 A1	13 February 2014
		JP 2017189168 A	19 October 2017
		KR 20130132695 A	05 December 2013
		JP 6158511 B2	05 July 2017
		CN 102492038 A	13 June 2012
CN 106132991 A	16 November 2016	SG 11201605627T A	30 August 2016
		CR 20160347 A	10 March 2017
		TW 201612193 A	01 April 2016
		US 9884913 B2	06 February 2018
		US 2015218274 A1	06 August 2015
		WO 2015117002 A1	06 August 2015
		EP 3099717 A1	07 December 2016
		CA 2936863 A1	06 August 2015
		US 2017198041 A1	13 July 2017
		US 2017190777 A1	06 July 2017
		UY 35973 A	31 August 2015
		CL 2016001716 A1	09 June 2017
		JP 2017511687 A	27 April 2017
		PE 03302017 A1	21 April 2017
		AU 2015210750 A1	21 July 2016
		CU 20160118 A7	02 February 2017
		MX 2016009961 A	11 January 2017
		PH 12016501482 A1	22 August 2016
		EA 201691556 A1	30 December 2016
		US 9605070 B2	28 March 2017
KR 20160113272 A	28 September 2016		

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/077190

A. 主题的分类		
C07K 16/28(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; C12P 21/08(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; G01N 33/577(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; C12N; A61K; A61P; G01N		
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))		
CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, CPEA, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, ELSEVIER, EMBASE和检索词: Tim-3, 单克隆, 抗体, antibody, monoclonal等; GENBANK, EMBL, 中国专利生物序列检索系统和检索的序列: SEQ ID NO: 1-72		
C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 103079644 A (协和发酵麒麟株式会社等) 2013年 5月 1日 (2013-05-01) 权利要求1-23, 说明书第【0412】段	17-28、30
A	CN 103079644 A (协和发酵麒麟株式会社等) 2013年 5月 1日 (2013-05-01) 全文	1-16
X	CN 102492038 A (中国人民解放军军事医学科学院基础医学研究所) 2012年 6月 13日 (2012-06-13) 权利要求1-7, 实施例1-4	17-28、30
A	CN 102492038 A (中国人民解放军军事医学科学院基础医学研究所) 2012年 6月 13日 (2012-06-13) 全文	1-16
X	CN 106132991 A (诺华股份有限公司等) 2016年 11月 16日 (2016-11-16) 权利要求1-167	17-28、30
A	CN 106132991 A (诺华股份有限公司等) 2016年 11月 16日 (2016-11-16) 全文	1-16
<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:		“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
“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件		“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
“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利		“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
“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其特殊理由而引用的文件(如具体说明的)		“&” 同族专利的文件
“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		
国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期	
2018年 5月 15日	2018年 5月 29日	
ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员	
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	李晨	
传真号 (86-10)62019451	电话号码 86-10-62411100	

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2015年1月)

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/077190

第1栏	核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)
	<p>1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:</p> <p>a. <input checked="" type="checkbox"/> 作为国际申请的一部分提交的:</p> <p style="padding-left: 20px;"><input checked="" type="checkbox"/> 附件C/ST. 25文本文件形式</p> <p style="padding-left: 20px;"><input type="checkbox"/> 纸件或图形文件形式</p> <p>b. <input type="checkbox"/> 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:</p> <p>c. <input type="checkbox"/> 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:</p> <p style="padding-left: 20px;"><input type="checkbox"/> 附件C/ST. 25文本文件形式 (细则13之三. 1(a))</p> <p style="padding-left: 20px;"><input type="checkbox"/> 纸件或图形文件形式 (细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)</p> <p>2. <input type="checkbox"/> 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围 (如适用) 的所需声明。</p> <p>3. 补充意见:</p>

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/077190

第11栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. 权利要求： 29
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] PCT细则39.1 (iv) ——处置人体或者动物体的外科手术方法或治疗方法。
2. 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/077190

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	103079644	A	2013年 5月 1日	AU	2011262758	B8	2014年 9月 4日
				EP	2581113	A4	2013年 12月 25日
				WO	2011155607	A1	2011年 12月 15日
				CA	2814155	A1	2011年 12月 15日
				AU	2011262758	A1	2013年 1月 10日
				US	2017088616	A1	2017年 3月 30日
				EP	2581113	A1	2013年 4月 17日
				TW	201207397	A	2012年 2月 16日
				AU	2011262758	B2	2014年 4月 24日
				US	8552156	B2	2013年 10月 8日
				CN	103079644	B	2017年 2月 15日
				AU	2011262758	A8	2014年 9月 4日
				US	2012189617	A1	2012年 7月 26日
				JP	W02011155607	A1	2013年 8月 15日
				US	9556270	B2	2017年 1月 31日
				US	2014044728	A1	2014年 2月 13日
				JP	2017189168	A	2017年 10月 19日
				KR	20130132695	A	2013年 12月 5日
				JP	6158511	B2	2017年 7月 5日
CN	102492038	A	2012年 6月 13日	CN	102492038	B	2014年 5月 28日
CN	106132991	A	2016年 11月 16日	SG	11201605627T	A	2016年 8月 30日
				CR	20160347	A	2017年 3月 10日
				TW	201612193	A	2016年 4月 1日
				US	9884913	B2	2018年 2月 6日
				US	2015218274	A1	2015年 8月 6日
				WO	2015117002	A1	2015年 8月 6日
				EP	3099717	A1	2016年 12月 7日
				CA	2936863	A1	2015年 8月 6日
				US	2017198041	A1	2017年 7月 13日
				US	2017190777	A1	2017年 7月 6日
				UY	35973	A	2015年 8月 31日
				CL	2016001716	A1	2017年 6月 9日
				JP	2017511687	A	2017年 4月 27日
				PE	03302017	A1	2017年 4月 21日
				AU	2015210750	A1	2016年 7月 21日
				CU	20160118	A7	2017年 2月 2日
				MX	2016009961	A	2017年 1月 11日
				PH	12016501482	A1	2016年 8月 22日
				EA	201691556	A1	2016年 12月 30日
				US	9605070	B2	2017年 3月 28日
				KR	20160113272	A	2016年 9月 28日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	
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 P	35/00	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P	37/08	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	D

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(71)出願人 508209602

シャンハイ ヘンルイ ファーマスーティカル カンパニー リミテッド

SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD.

中華人民共和国 シャンハイ, ミンシン・ディストリクト, ウェンジン・ロード No. 279

(74)代理人 100147485

弁理士 杉村 憲司

(74)代理人 230118913

弁理士 杉村 光嗣

(74)代理人 100214259

弁理士 山本 睦也

(72)発明者 ツァオ ジュオシャオ

中華人民共和国 200245 シャンハイ ミンハン ディストリクト ウェンジン ロード
ナンバー 279

(72)発明者 フー ヤーユアン

中華人民共和国 200245 シャンハイ ミンハン ディストリクト ウェンジン ロード
ナンバー 279

(72)発明者 チャン ティン

中華人民共和国 200245 シャンハイ ミンハン ディストリクト ウェンジン ロード
ナンバー 279

(72)発明者 タオ ウェイカン

中華人民共和国 200245 シャンハイ ミンハン ディストリクト ウェンジン ロード
ナンバー 279

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA19 CC24

4B065 AC14 BA02 CA25 CA44 CA46

4C084 AA13 MA66 NA14 ZB081 ZB131 ZB261

4C085 AA14 AA15 AA16 BB11 BB31 BB41 BB43 CC02 CC05 CC31

DD62 DD63 DD88 EE01 GG02

4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA76 EA28 EA51 FA74

专利名称(译)	tim-3抗体，其抗原结合片段及其医学用途		
公开(公告)号	JP2020508658A	公开(公告)日	2020-03-26
申请号	JP2019544918	申请日	2018-02-26
[标]申请(专利权)人(译)	江苏恒瑞医药股份有限公司 上海恒瑞医药有限公司		
申请(专利权)人(译)	Jiensu Henrui Medei信有限公司 上海Henrui制药股份有限公司		
发明人	ツアオ ジュオシャオ フー ヤーユアン チャン テイン タオ ウエイカン		
IPC分类号	C12N15/13 C12N15/62 C12N15/63 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K16/46 C07K16/28 C12P21/08 A61K39/395 A61P35/00 A61P37/06 A61P37/08 A61K48/00 G01N33/53		
CPC分类号	A61K39/395 A61P35/00 C07K16/28 C12N15/63 G01N33/577 A61K2039/505 C07K16/2803 C07K2317/24 C07K2317/52 C07K2317/567 C07K2317/92 G01N33/68 G01N2333/705		
FI分类号	C12N15/13 C12N15/62.ZNA.Z C12N15/63.Z C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K16/46 C07K16/28 C12P21/08 A61K39/395.N A61P35/00 A61P37/06 A61P37/08 A61K48/00 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZB081 4C084/ZB131 4C084/ZB261 4C085/AA14 4C085/AA15 4C085/AA16 4C085/BB11 4C085/BB31 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/CC02 4C085/CC05 4C085/CC31 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/DD88 4C085/EE01 4C085/GG02 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA74		
代理人(译)	杉村健二 山本 睦也		
优先权	201710108747.2 2017-02-27 CN		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供TIM-3抗体，其抗原结合片段及其医学用途。此外，本发明提供了包含TIM-3抗体的CDR区的大鼠源抗体，嵌合抗体，人源抗体以及包含TIM-3抗体及其抗原结合片段的药物组合物。及其用作药物的用途。特别地，本发明提供了人源TIM-3抗体在制备用于治疗TIM-3相关病症的药物中的用途。

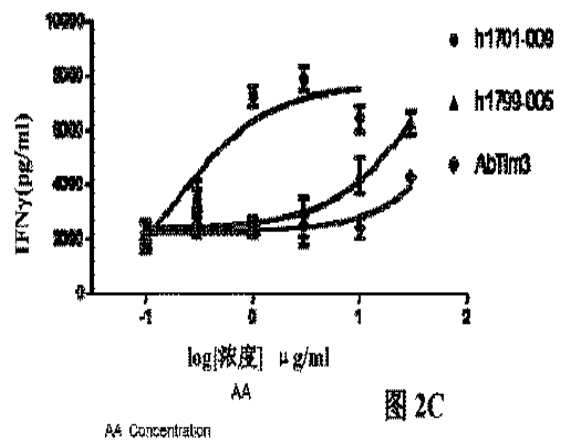


图 2C