

(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2017-531028

(P2017-531028A)

(43) 公表日 平成29年10月19日(2017.10.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 38/04 (2006.01)	A 6 1 K 38/04 Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C	4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 7
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 49 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-526774 (P2017-526774)
 (86) (22) 出願日 平成27年8月5日 (2015.8.5)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年3月31日 (2017.3.31)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2015/055943
 (87) 国際公開番号 WO2016/020856
 (87) 国際公開日 平成28年2月11日 (2016.2.11)
 (31) 優先権主張番号 62/033,177
 (32) 優先日 平成26年8月5日 (2014.8.5)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/053,366
 (32) 優先日 平成26年9月22日 (2014.9.22)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/093,368
 (32) 優先日 平成26年12月17日 (2014.12.17)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

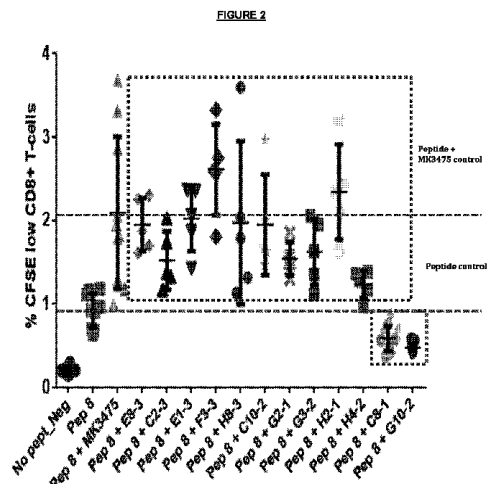
(71) 出願人 517036884
 マブクエスト エスエー
 MabQuest SA
 スイス国 1009 ビュリー アヴェニ
 ュ ジェネラルーギサン 62 ケアオブ
 ジュゼッペ パンタレオ
 (74) 代理人 100073184
 弁理士 柳田 征史
 (74) 代理人 100175042
 弁理士 高橋 秀明
 (72) 発明者 パンタレオ, ジュゼッペ
 スイス国 CH-1009 ビュリー ア
 ヴェニユ ジェネラルーギサン 62

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫学的試薬

(57) 【要約】

本開示は、プログラム細胞死1 (PD-1) に対する特異性を有する結合剤、ならびに感染症 (例えば、ヒト免疫不全ウイルス (HIV))、癌および/または自己免疫を治療、予防および/または改善するためにそれを使用する方法に関する。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

配列番号 1 ~ 138 からなる群より選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列、および / または表 1 A および / または 1 B に示される少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含む、プログラム細胞死 1 (PD1) に結合する結合剤。

【請求項 2】

単離モノクローナル抗体である、請求項 1 記載の結合剤。

【請求項 3】

配列番号 1 ~ 23 からなる群より選択される少なくとも 1 つの重鎖 CDR1 アミノ酸配列を含む、請求項 1 または 2 記載の結合剤。

10

【請求項 4】

配列番号 24 ~ 46 からなる群より選択される少なくとも 1 つの重鎖 CDR2 アミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 3 いずれか 1 項記載の結合剤。

【請求項 5】

配列番号 47 ~ 69 からなる群より選択される少なくとも 1 つの重鎖 CDR3 アミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 4 いずれか 1 項記載の結合剤。

【請求項 6】

配列番号 70 ~ 92 からなる群より選択される少なくとも 1 つの軽鎖 CDR1 アミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 5 いずれか 1 項記載の結合剤。

【請求項 7】

配列番号 93 ~ 115 からなる群より選択される少なくとも 1 つの軽鎖 CDR2 アミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 6 いずれか 1 項記載の結合剤。

20

【請求項 8】

配列番号 116 ~ 138 からなる群より選択される少なくとも 1 つの軽鎖 CDR3 アミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 7 いずれか 1 項記載の結合剤。

【請求項 9】

【表 1】

DDFLH (配列番号 1),	RIDPANGESRYAPKFQD (配列番号 24),	TDYRGYYYAMDY (配列番号 47),	
NYYIH (配列番号 2),	SIYPNYGDTNYNQKVKD (配列番号 25),	GYSYAMDY (配列番号 48),	
NYYIH (配列番号 3),	SIYPNYGETNYNQEFKG (配列番号 26),	GYSYAMDY (配列番号 49),	
SNWMH (配列番号 4),	AVNPGNSDTTYNQKFK G (配列番号 27),	GRSYDGSFDY (配列番号 50),	10
RYWMH (配列番号 5),	NIDPSDSTTHYNPKFRD (配列番号 28),	DLDDFYVGSHEFDY (配列番号 51),	
SNWMH (配列番号 6),	AVYPGNSDTTYNQNFK G (配列番号 29),	GRSYDGSFDY (配列番号 52),	
NSYIH (配列番号 7),	WISPGDGSTNYNEKFK G (配列番号 30),	EEYDYDNY (配列番号 53),	
NYWIG (配列番号 8),	DIYPGGGYTNYNEKFKG (配列番号 31),	GYDFVLDLDR (配列番号 54),	
SYAMS (配列番号 9),	TISGGGADTYLDNVKG (配列番号 32),	QRGENLFAH (配列番号 55),	20
SDYAWN (配列番号 10),	YINYSGYTNYNPFLLKS (配列番号 33),	YGGSYPWNFVDV (配列番号 56),	
SYWIN (配列番号 11),	NIYPGSSSTDYNEKFKS (配列番号 34),	GLYWYFDV (配列番号 57),	
SSYIH (配列番号 12),	WIFPGDGKTNYNEKFRD (配列番号 35),	NDFDRGVY (配列番号 58),	
NHGMS (配列番号 13),	SINTGGYSTYYPDNVKG (配列番号 36),	DDYNWFAY (配列番号 59),	
NYWIG (配列番号 14),	DIYPGSEYENYNEKFKG (配列番号 37),	GYDFVLDH (配列番号 60),	30
DSYIH (配列番号 15),	RIDPAHGNVIYASKFRD (配列番号 38),	IYYDYGEGDF (配列番号 61),	
DTYIH (配列番号 16),	RIDLANDDILYASKFQG (配列番号 39),	IYYDYGEGDY (配列番号 62),	
NFYIH (配列番号 17),	SIYPNYGDTAYNQKFKD (配列番号 40),	GYSYAMDY (配列番号 63),	
DSYIH (配列番号 18),	RIDPARDNIIYASKFRD (配列番号 41),	IYYDYGEGDY (配列番号 64),	
DDFLH (配列番号 19),	RIDPANGESRYAPQFQD (配列番号 42),	TDYRGYYYAMDY (配列番号 65),	40
SYFMS (配列番号 20),	GISTGGADTYADSMKG (配列番号 43),	LSHYYDGIPLDC (配列番号 66),	
NHGMS (配列番号 21),	SISGGGDNTYYPDNLKG (配列番号 44),	VRQLGLHRAAMDY (配列番号 67),	
NYWIG (配列番号 22),	DIYPGGDHKNYNEKFKD (配列番号 45),	GDFVLDY (配列番号 68),	
SFAMS (配列番号 23),	TITGGGVNTYYPDTVKG (配列番号 46),	QAIYDGHYVLDY (配列番号 69),	

からなる群より選択されるアミノ酸配列および / または

【表 2】

KSSQSVLYSSNQKNYLA (配列番号 70),	WASTRES (配列番号 93),	HQYLSSYT (配列番号 116),
SASQGISDGLN (配列番号 71),	HTSTLHS (配列番号 94),	QQYSKFPLT (配列番号 117),
SASQGISNGLN (配列番号 72),	HTSTLHS (配列番号 95),	QQYSKFPLT (配列番号 118),
KASQDINKYIA (配列番号 73),	YTSTLRP (配列番号 96),	LQYDNLWT (配列番号 119),
RSSQSIVYSNGNTYLE (配列番号 74),	KVSHRFS (配列番号 97),	FQGSHVPYT (配列番号 120),
KASQDINKYMA (配列番号 75),	YTSTLRP (配列番号 98),	LQYDNLWT (配列番号 121),
KASQNVGTNVG (配列番号 76),	SASYRYN (配列番号 99),	QQYNTYPWT (配列番号 122),
KSSQSLFNSETQKNYLA (配列番号 77),	WASTRES (配列番号 100),	KQSYTLRT (配列番号 123),
LASQTIGTWLA (配列番号 78),	AATSLAD (配列番号 101),	QQLYSTPWT (配列番号 124),
RSSQTIVHNGDTYPE (配列番号 79),	KISNRFF (配列番号 102),	FQGSHVPYT (配列番号 125),
KSSQSLFNSGTRKKNYLA (配列番号 80),	WASTRDS (配列番号 103),	KQSYNLYT (配列番号 126),
KASQNVDTNVA (配列番号 81),	SASYRYN (配列番号 104),	QQYNNYPYT (配列番号 127),
KSSQSLLNQGNQKNYLT (配列番号 82),	WASTRES (配列番号 105),	QSDYSYPLT (配列番号 128),
KSSQSLFNSGTRKSYLA (配列番号 83),	WASTRET (配列番号 106),	MQSYNLRT (配列番号 129),
HASQNINVWLS (配列番号 84),	KASNLHT (配列番号 107),	QQGQSWPLT (配列番号 130),
HASQNINVWLS (配列番号 85),	KASNLHT (配列番号 108),	QQGQSYPLT (配列番号 131),
SASQGISGDLN (配列番号 86),	HTSSLHS (配列番号 109),	QYYSKDLLT (配列番号 132),
HASQNINVWLS (配列番号 87),	KASNLHT (配列番号 110),	QQGQSWPLT (配列番号 133),
KSSQSVLYSSNQKNYLA (配列番号 88),	WASTRES (配列番号 111),	HQYLSSYT (配列番号 134),
RASESVDNSGVSFLT (配列番号 89),	AASNQGS (配列番号 112),	QQTKEVPWT (配列番号 135),
KASQSVSDDVS (配列番号 90),	SAFFRYP (配列番号 113),	QQDYSSPLT (配列番号 136),
KSSQSLFNSGTRKKNYLA (配列番号 91),	WASTRES (配列番号 114),	MQSFNLRT (配列番号 137),
RTSGNIHNYLA (配列番号 92),	NVKTLD (配列番号 115),	QQFWSIPWT (配列番号 138),

10

20

30

40

。

【請求項10】

配列番号1、24、47、70、93および116；
 配列番号2、25、48、71、94および117；
 配列番号3、26、49、72、95および118；
 配列番号4、27、50、73、96および119；
 配列番号5、28、51、74、97および120；
 配列番号6、29、52、75、98および121；
 配列番号7、30、53、76、99および122；
 配列番号8、31、54、77、100および123；
 配列番号9、32、55、78、101および124；
 配列番号10、33、56、79、102および125；
 配列番号11、34、57、80、103および126；
 配列番号12、35、58、81、104および127；
 配列番号13、36、59、82、105および128；
 配列番号14、37、60、83、106および129；
 配列番号15、38、61、84、107および130；
 配列番号16、39、62、85、108および131；
 配列番号17、40、63、86、109および132；
 配列番号18、41、64、87、110および133；
 配列番号19、42、65、88、111および134；
 配列番号20、43、66、89、112および135；
 配列番号21、44、67、90、113および136；
 配列番号22、45、68、91、114および137；および
 配列番号23、46、69、92、115および138

10

20

からなる群より選択されるアミノ酸配列の組合せを含む、請求項9記載の結合剤。

【請求項11】

ヒト抗体、ヒトIgG、ヒトIgG1、ヒトIgG2、ヒトIgG2a、ヒトIgG2b、ヒトIgG3、ヒトIgG4、ヒトIgM、ヒトIgA、ヒトIgA1、ヒトIgA2、ヒトIgD、ヒトIgE、イヌ抗体、イヌIgGA、イヌIgGB、イヌIgGC、イヌIgGD、ニワトリ抗体、ニワトリIgA、ニワトリIgD、ニワトリIgE、ニワトリIgG、ニワトリIgM、ニワトリIgY、ヤギ抗体、ヤギIgG、マウス抗体、マウスIgG、ブタ抗体またはラット抗体に由来する、請求項1～10いずれか1項記載の結合剤。

30

【請求項12】

請求項1～11いずれか1項記載の結合剤の誘導体。

【請求項13】

F_{ab}、F_{ab2}、F_{ab'}一本鎖抗体、F_v一本鎖、単一特異性抗体、二重特異性抗体、三量体抗体、多重特異性抗体、多価抗体、キメラ抗体、イヌ-ヒトキメラ抗体、イヌ-マウスキメラ抗体、イヌFcを含む抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、イヌ化抗体、CDRグラフト化抗体、サメ抗体、ナノボディおよびラクダ抗体からなる群より選択される、請求項12記載の誘導体。

40

【請求項14】

少なくとも第1および第2の特異性を有し、前記第1の特異性はPD-1に対するものであり、および前記第2の特異性は異なる抗原に対するものである、請求項1～13いずれか1項記載の結合剤もしくは誘導体または請求項38～40いずれか1項記載の組合せ。

【請求項15】

前記第2の特異性は、感染性因子の抗原または腫瘍抗原に対するものである、請求項14記載の結合剤または誘導体。

50

【請求項 16】

前記感染性因子はヒト免疫不全ウイルス (HIV) である、請求項 15 記載の結合剤または誘導体。

【請求項 17】

前記抗原は HIV env である、請求項 16 記載の結合剤または誘導体。

【請求項 18】

固定的に付着した検出可能な標識を含む、請求項 1 ~ 17 いずれか 1 項記載の結合剤またはその誘導体。

【請求項 19】

前記検出可能な標識は、フルオロセイン、DyLight、Cy3、Cy5、FITC、HiLyte Fluor 555、HiLyte Fluor 647、5 - カルボキシ - 2, 7 - ジクロロフルオレセイン、5 - カルボキシフルオレセイン、5 - FAM、ヒドロキシトリプタミン、5 - ヒドロキシトリプタミン (5 - HAT)、6 - カルボキシフルオレセイン (6 - FAM)、FITC、6 - カルボキシ - 1, 4 - ジクロロ - 2', 7' - ジクロロフルオレセイン (TET)、6 - カルボキシ - 1, 4 - ジクロロ - 2', 4', 5', 7' - テトラクロロフルオレセイン (HEX)、6 - カルボキシ - 4', 5' - ジクロロ - 2', 7' - ジメトキシフルオレセイン (6 - JOE)、Alexa fluor、Alexa fluor 350、Alexa fluor 405、Alexa fluor 430、Alexa fluor 488、Alexa fluor 500、Alexa fluor 514、Alexa fluor 532、Alexa fluor 546、Alexa fluor 555、Alexa fluor 568、Alexa fluor 594、Alexa fluor 610、Alexa fluor 633、Alexa fluor 635、Alexa fluor 647、Alexa fluor 660、Alexa fluor 680、Alexa fluor 700、Alexa fluor 750、BODIPY 蛍光体、BODIPY 492 / 515、BODIPY 493 / 503、BODIPY 500 / 510、BODIPY 505 / 515、BODIPY 530 / 550、BODIPY 542 / 563、BODIPY 558 / 568、BODIPY 564 / 570、BODIPY 576 / 589、BODIPY 581 / 591、BODIPY 630 / 650 - X、BODIPY 650 / 665 - X、BODIPY 665 / 676、FLATP、FI - セラミド、R6G SE、TMR、TMR - X 複合体、TMR - X、SE、TR、TR ATP、TR - X SE、ローダミン、ローダミン 110、ローダミン 123、ローダミン B、ローダミン B 200、ローダミン BB、ローダミン BG、ローダミン B extra、5 - カルボキシテトラメチルローダミン (5 - TAMRA)、5 - GLD、6 - カルボキシローダミン 6G、リサミン、リサミンローダミン B、ファリジジン、ファロイジン、ローダミンレッド、Rhod - 2、6 - カルボキシ - X - ローダミン (ROX)、カルボキシ - X - ローダミン (5 - ROX)、スルホローダミン B can C、スルホローダミン G Extra、6 - カルボキシテトラメチルローダミン (TAMRA)、テトラメチルローダミン (TRITC)、ローダミン WT、テキサスレッドおよびテキサスレッド - X からなる群より選択される、請求項 18 記載の結合剤。

【請求項 20】

固定的に付着したエフェクター部分を含む、請求項 1 ~ 19 いずれか 1 項記載の結合剤またはその誘導体。

【請求項 21】

前記エフェクター部分は、細胞傷害性薬、毒素、ジフテリア A 鎖、外毒素 A 鎖、リシン A 鎖、アプリン A 鎖、クルシン、クロチン、フェノマイシン、エノマイシンおよび放射化学薬品からなる群より選択される、請求項 20 記載の結合剤または誘導体。

【請求項 22】

請求項 1 ~ 17 いずれか 1 項記載の結合剤をコードする単離ポリヌクレオチド。

【請求項 23】

10

20

30

40

50

請求項 2 2 記載の 1 つ以上のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 2 4】

請求項 2 2 記載の単離ポリヌクレオチドおよび / または請求項 2 3 記載の発現ベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 2 5】

請求項 1 ~ 2 1 いずれか 1 項記載の少なくとも 1 つの結合剤もしくは誘導体 ; 請求項 2 2 記載の少なくとも 1 つの単離ポリヌクレオチド ; 請求項 2 3 記載の少なくとも 1 つの発現ベクター ; および / または請求項 2 4 記載の少なくとも 1 つの宿主細胞 ; またはそれらの組合せ ; および / または請求項 3 9 ~ 4 3 いずれか 1 項記載の組合せ ; ならびに医薬上許容される担体を含む、組成物。

10

【請求項 2 6】

細胞上の PD - 1 を検出する方法において、

試験生物学的サンプルを、請求項 1 ~ 2 1 いずれか 1 項記載の結合剤もしくは誘導体および / または請求項 3 9 ~ 4 3 いずれか 1 項記載の組合せと接触させる工程、および前記生物学的サンプルもしくはその成分に結合した前記結合剤を検出する工程、を含む、方法。

【請求項 2 7】

前記試験生物学的サンプルもしくはその成分に結合する量を、コントロール生物学的サンプルもしくはその成分に結合する量と比較する工程をさらに含み、前記コントロール生物学的サンプルもしくはその成分に結合する量と比較して、増加した試験生物学的サンプルもしくはその成分に結合する量は、試験生物学的サンプルにおける PD - 1 を発現する細胞の存在を示す、請求項 2 6 記載の方法。

20

【請求項 2 8】

前記試験生物学的サンプルは哺乳動物血液である、請求項 2 6 または 2 7 記載の方法。

【請求項 2 9】

前記方法は *in vivo* 法である、請求項 2 6 ~ 2 8 いずれか 1 項記載の方法。

【請求項 3 0】

前記方法は *in vitro* 法である、請求項 2 6 ~ 2 8 いずれか 1 項記載の方法。

【請求項 3 1】

哺乳動物における感染性疾患、癌および / または自己免疫状態を治療、予防および / または改善する方法において、前記哺乳動物に、請求項 1 ~ 2 1 いずれか 1 項記載の結合剤もしくはその誘導体、および / または請求項 3 9 ~ 4 3 いずれか 1 項記載の組合せを含む、少なくとも 1 つの有効量の医薬組成物を投与する工程を含む、方法。

30

【請求項 3 2】

前記感染性疾患はヒト免疫不全ウイルス (HIV) である、請求項 3 1 記載の方法。

【請求項 3 3】

感染性疾患、HIV および / または癌を治療するために使用される前記結合剤および / またはその誘導体は、PD - 1 アンタゴニストである、請求項 3 1 または 3 2 記載の方法。

【請求項 3 4】

自己免疫状態を治療するために使用される前記結合剤および / またはその誘導体は、PD - 1 アゴニストである、請求項 3 1 記載の方法。

40

【請求項 3 5】

前記動物に複数回投与される、請求項 3 1 ~ 3 4 いずれか 1 項記載の方法。

【請求項 3 6】

前記結合剤は、約 1 ~ 50 mg / kg の投与量で投与される、請求項 3 1 ~ 3 5 いずれか 1 項記載の方法。

【請求項 3 7】

細胞内または細胞上での PD - 1 の発現を検出するためのキットにおいて、請求項 1 ~ 2 1 いずれか 1 項記載の結合剤もしくはその誘導体または組合せ、ならびに使用説明書を

50

含む、キット。

【請求項 38】

前記結合剤、抗体または誘導体は、凍結乾燥形態にある、請求項 37 記載のキット。

【請求項 39】

PD - 1 と PD - L 1 との相互作用を遮断する第 1 結合剤、および PD - 1 と PD - L 1 との相互作用を遮断しない第 2 結合剤を含む、結合剤の組合せ。

【請求項 40】

前記第 2 結合剤は PD - 1 に結合する、請求項 39 記載の組合せ。

【請求項 41】

前記第 1 および / または第 2 結合剤は抗体である、請求項 39 記載の組合せ。

10

【請求項 42】

前記結合剤はモノクローナル抗体である、請求項 40 記載の組合せ。

【請求項 43】

前記第 2 結合剤は、配列番号 2、25、48、71、94 および 117 のアミノ酸配列、または配列番号 17、40、63、86、109 および 132 のアミノ酸配列を含む、請求項 39 記載の組合せ。

【請求項 44】

PD - 1 と PD - L 1 との相互作用を遮断する第 1 結合剤、および PD - 1 と PD - L 1 との相互作用を遮断しない第 2 結合剤を組み合わせる工程を含む、請求項 39 ~ 43 いずれか 1 項記載の組合せを製造する方法。

20

【請求項 45】

前記第 2 結合剤は PD - 1 に結合する、請求項 44 記載の方法。

【請求項 46】

前記第 1 および / または第 2 結合剤は抗体である、請求項 44 記載の方法。

【請求項 47】

前記結合剤はモノクローナル抗体である、請求項 44 記載の方法。

【請求項 48】

前記第 2 結合剤は、配列番号 2、25、48、71、94 および 117 のアミノ酸配列、または配列番号 17、40、63、86、109 および 132 のアミノ酸配列を含む、請求項 44 記載の方法。

30

【請求項 49】

医薬上許容される賦形剤の添加をさらに含む、請求項 44 ~ 48 いずれか 1 項記載の方法。

【請求項 50】

免疫細胞を請求項 39 ~ 43 いずれか 1 項記載の組合せと接触させることにより、抗原の存在下で免疫細胞の増殖を誘導する方法。

【請求項 51】

PD - 1 抗体結合剤を同定する方法において、

a) 疲弊機能回復アッセイ (EFRA) により候補 PD - 1 結合剤をアッセイする工程

;

b) PD - 1 に対する前記候補結合剤の親和性を決定する工程 ; および

c) 前記候補結合剤の相補性決定領域 (CDR) のヌクレオチド配列を決定する工程 ;

を含む、方法。

40

【請求項 52】

請求項 1 ~ 11 いずれか 1 項記載の結合剤を製造する方法において、

細胞において前記結合剤を発現させる工程 ; および

前記細胞または前記細胞の培養上清から前記結合剤を単離する工程 ; を含む、方法。

【請求項 53】

請求項 1 ~ 11 いずれか 1 項記載の結合剤をコードする核酸を宿主細胞において発現させる工程をさらに含む、請求項 52 記載の方法。

50

【請求項 5 4】

単離後、前記結合剤を医薬上許容される賦形剤と組み合わせる工程をさらに含む、請求項 5 2 または 5 3 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【0001】

本出願は、それぞれがこれにより全体として本開示に組み込まれる、2014年8月5日に出願された米国特許出願第62/033,177号；2014年9月22日に出願された米国特許出願第62/053,366号；および2014年12月17日に出願された米国特許出願第62/093,368号に対する優先権を主張するものである。

10

【技術分野】

【0002】

本開示は、プログラム細胞死1(PD-1)(例えば、ヒトPD-1)に対する特異性を有する結合剤、ならびに感染症(例えば、ヒト免疫不全ウイルス(HIV))、癌および/または自己免疫を治療および/または予防するためにそれを使用する方法に関する。

【背景技術】

【0003】

HIVが流行し始めてから40年目に入り、HIVの病因に関する理解が進み、強力で安全な抗ウイルス薬の開発が大きな進歩を遂げてきた。30種を超える抗ウイルス薬が登録され、組合せ抗レトロウイルス療法(ART)が罹患率および死亡率に及ぼす大きな影響は注目すべきものであった。しかし、ARTを最適に順守した患者においてはHIV複製の長期間にわたる抑制が達成されてきたにもかかわらず、HIVは常に療法の中断後には逆戻りする。さらに、上首尾が得られる療法は、ARTの非存在下ではHIV複製を制御できるウイルス特異的免疫応答を誘導せず、あるいはそれらの回復(restoration)/発生を可能にしない。そこで、大多数のHIV感染対象においてHIV複製および関連疾患を制御するためには生涯にわたりARTが必要とされる。

20

【0004】

HIVに潜伏感染した長寿命のセントラルメモリーCD4 T細胞の集団は、HIV細胞リザーバーの重要な構成要素として、およびHIVの永続性の主要原因として、血液中において同定されている。この潜伏細胞リザーバー(latent cell reservoir)の寿命は、ARTを用いた完全HIV抑制の存在下ではおよそ70年であると推定されている。しかし、近年の研究は、リンパ節内に存在するCD4 T細胞の2つの集団が、HIVの感染、複製および生成のための主要なCD4 T細胞コンパートメントとして機能することを証明している。これらの2つのCD4 T細胞集団は、PD-1およびCXCR5の発現によって規定され、PD-1⁺CXCR5⁺、つまり濾胞性ヘルパーT細胞(Tfh)およびPD-1⁺CXCR5⁻CD4 T細胞集団を含んでいる。

30

【0005】

HIV潜伏細胞リザーバーの確立および維持を担う多数の機序が提案されている。これらの機序の1つは、HIV細胞リザーバーに補充し得る、ART下での最小ウイルス複製の持続である。従って、ARTは、HIV複製の完全抑制を誘導することができず、ART下での「天然」HIV-1特異的免疫応答も、進行中の残留ウイルス複製を完全に抑制および排除することができない。ARTおよびHIV特異的免疫応答の失敗は、永続的なHIV細胞リザーバーをも標的とする代替インターベンションを検討する理論的根拠を提供する。

40

【0006】

これまでに多数の免疫学的インターベンションが検討されてきたが、現在でも、持続的な抗ウイルス療法なしにウイルス複製が抑制されるHIVの機能的治癒を達成することを目標に、さらに開発が続けられている(9)。治療的ワクチン戦略はこれまでに検討された主要インターベンション戦略であったが、その結果は、実験動物モデルおよび患者において、CMVをベースとするベクターHIVワクチン(NHPモデルにおける50%有効

50

性；10)を除いてささやかな有効性しか示していない。近年の研究は、HIV感染症における治療薬として抗エンペロープ広域中和抗体(bNabs)を使用する可能性に関して興味深い結果をもたらした(11、12)。さらに、アンタゴニストPD-1抗体は、HIV感染患者においてT細胞機能を回復させることが示されており、HIV特異的T細胞応答の効力を増強する治療戦略としてこれらの抗体を使用する可能性が提案されている(13、14)。

【0007】

浸潤性腫瘍特異的CD8 T細胞が、増殖しおよび細胞傷害活性を媒介する能力に関して機能不全であることはよく確立されている。大多数の浸潤性腫瘍特異的CD8 T細胞は、いわゆる機能的疲弊(exhaustion)状態にある。浸潤性腫瘍特異的CD8 T細胞の疲弊を担う主要な機序は、多数の調節受容体および特にPD-1調節受容体の発現の増加である。PD-1/PDL-1/2(PD-1リガンド)の遮断がCD8 T細胞の疲弊からの回復に関連していることの所見は、疲弊CD8 T細胞により発現されたPD-1分子を標的とするインターベンション戦略を開発するための理論的根拠を提供した。近年の研究は、進行性癌関連疾患を有する患者における、アンタゴニスト活性を備えるPD-1抗体の使用による極めて前途有望な結果を示している。研究は、進行性黒色腫、非小細胞性肺癌および腎癌を有する患者において、18~40%の範囲の実質的な応答率を示している。これらの研究において、抗PD-1抗体は、単独でまたは抗CTL-A4抗体との組合せのいずれかで使用された。これらの初期の研究の後、血液腫瘍も含む様々な腫瘍を有する患者において、現在の研究が行なわれている。

10

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本技術分野において、PD-1を標的とするための追加の試薬およびそれを使用する方法に対する要求がある。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本開示は、PD-1およびそれを発現する細胞および/または組織を標的とするのに使用できる試薬および方法を提供することによって、それらの要求に対処する。

【0010】

本開示は、プログラム細胞死1(PD-1)(例えば、ヒトPD-1)に対して特異性を有する結合剤、ならびに、例えば、感染症(例えば、ヒト免疫不全ウイルス(HIV))、癌および/または自己免疫状態を治療、予防および/または改善するためにそれを使用する方法に関する。PD-1と相互作用する結合剤を同定するための機能的アッセイも提供される。PD-1とPD-L1との相互作用を遮断する第1結合剤、およびPD-1とPD-L1との相互作用を遮断しない第2結合剤のような、結合剤の組合せも提供され、それらはT細胞を疲弊から救済するために相乗的に作用する。

30

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】A.マウスPD-1; B.ヒトPD-1。

40

【図2】HIV特異的CD8 T細胞の増殖に抗PD-1抗体が及ぼす機能的効果を評価するためのCFSEアッセイ。

【図3】活性化CD4 T細胞上の細胞表面PD-1への抗PD-1抗体の濃度反応結合。

【図4】抗体のクラス。

【図5】コントロール(NEGおよびペプチド8)と比較した増殖。

【図6a】機能的疲弊回復アッセイにおける、様々なエピトープに結合する抗PD-1抗体により媒介されたHIVペプチド特異的CD8 T細胞増殖の回復。

【図6b】機能的疲弊回復アッセイにおける、様々なエピトープに結合する抗PD-1抗体により媒介されたHIVペプチド特異的CD8 T細胞増殖の回復。

50

【図7】機能的疲弊回復アッセイにおける、様々なPD-1エピトープに結合する抗PD-1抗体の組合せにより媒介されるHIVペプチド特異的CD8 T細胞増殖の回復の増強。

【図8】PD-1とPD-L1との相互作用を遮断する第1結合剤と、PD-1とPD-L1との相互作用を遮断しない第2結合剤との相乗作用。

【発明を実施するための形態】

【0012】

本開示は、*in vitro*および/または*in vivo*で、細胞表面上のプログラム細胞死1(PD-1)タンパク質(例えば、これにより全体として参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5,698,520号明細書(Honjo, et al.)の配列番号1、図1A、図1B)(例えば、ヒトPD-1)に結合する結合剤に関する。その結合剤は、単離PD-1ポリペプチド(例えば、ヒトPD-1)および/またはその断片および/または誘導体にも、典型的には*in vitro*で、結合することができる。さらに、PD-1を発現する細胞の存在に関連する1種以上の疾患を診断、治療、予防および/または改善するために、そのような結合剤を使用する方法も提供される。例えば、結合剤は、PD-1のエピトープと反応できるおよび/またはPD-1のエピトープに結合できる抗体(例えば、モノクローナル抗体)であってよい。本明細書に記載した「結合剤」は、例えば、PD-1のアゴニストまたはアンタゴニストを含むことができる。アゴニスト結合剤は、典型的には、T細胞機能および/またはPD-1の発現を回復させることのできない結合剤である。アゴニストPD-1結合剤は、PD-1発現細胞が疾患の進行に關与する、自己免疫疾患等を治療するのに有用となり得る。これとは対照的に、アンタゴニスト結合剤は、T細胞機能および/またはPD-1の発現を回復させることができる結合剤である。例えば、PD-1アンタゴニスト結合剤は、HIV感染症および様々な腫瘍において生じることが知られている機能的疲弊から、PD-1発現T細胞の機能を回復させることができるであろう。T細胞機能の回復は、例えば、そのような細胞の増殖、サイトカイン産生、細胞傷害活性またはその他の特徴を測定することによって決定することができる。本明細書に記載した結合剤の別の用途は、複製可能なHIV(例えば、潜伏および/または複製状態にある)を含むHIV感染CD4 T細胞集団の選択的標的化および排除である。そのようなPD-1を発現するPD-1発現細胞は、複製可能なHIVのための主要細胞リザーブとして機能することが知られている。これらのCD4 T細胞集団を排除するための潜在的機序は、本明細書に記載した結合剤(例えば、単一および/または二重特異性PD-1抗体)を使用する抗体依存性細胞傷害(ADCC)である。一部の実施形態では、例えば、異なる特異性(例えば、異なるエピトープを認識する)を有する1つ以上のPD-1アンタゴニスト結合剤を、PD-1発現によって誘発される機能的疲弊からの抗原特異的CD8 T細胞の救済(例えば、増殖、サイトカイン産生および/または細胞傷害活性の回復または改善)をそれらの細胞において誘導するために組み合わせてもよい。一部の実施形態では、本明細書に記載した結合剤を、PD-1発現細胞の選択的排除および/または抑制のために提供してもよい。一部の実施形態では、本明細書に記載したPD-1アゴニスト結合剤は、例えば、感染性疾患(例えば、HIV)、癌、および/または特に自己免疫状態を治療するためにPD-1発現細胞を抑制および/または排除するために使用できる。その他の実施形態、使用などについては下記に記載する。

【0013】

結合剤は、例えば、表1に示したアミノ酸配列(および/またはそれらの1つ以上の断片および/または誘導体)のいずれか1つ以上を含んでいてよい、例えば、モノクローナル抗体などの抗体であってよい。本開示はさらに、PD-1を発現する細胞を単離する、同定するおよび/または標的とするためのそのようなモノクローナル抗体の使用を提供する。所定の実施形態では、これらのモノクローナル抗体は、細胞表面に発現したPD-1に対して反応性であってよい。用語「抗体」もしくは「複数の抗体」は、未精製形態もしくは部分精製形態(例えば、ハイブリドーマ上清、腹水、ポリクローナル抗血清)または精製形態にある、全抗体もしくは断片化抗体を意味し得る。抗体は、例えば、マウス(例

10

20

30

40

50

えは、マウスハイブリドーマ細胞によって生成される)を含む任意の好適な起源もしくは形態にあってよい、またはヒト化抗体、キメラ抗体、ヒト抗体などとして発現させることができる。例えば、抗体は、例えば完全に、または部分的にヒト(例えば、IgG(IgG1、IgG2、IgG2a、Ig2b、IgG3、IgG4)、IgM、IgA(IgA1およびIgA2)、IgDおよびIgE)、イヌ(例えば、IgGA、IgGB、IgGC、IgGD)、ニワトリ(例えば、IgA、IgD、IgE、IgG、IgM、IgY)、ヤギ(例えば、IgG)、マウス(例えば、IgG、IgD、IgE、IgG、IgM)および/またはブタ(例えば、IgG、IgD、IgE、IgG、IgM)、ラット(例えば、IgG、IgD、IgE、IgG、IgM)抗体に由来してよい。様々なタイプの抗体を調製、利用および保存する方法は当業者には周知であり、本発明を実施する際には好適であろう(例えば、Harlow, et al. *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; Harlow, et al. *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Portable Protocol No. 1, 1998; Kohler and Milstein, *Nature*, 256: 495 (1975); Jones et al. *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al. *Nature*, 332: 323-329 (1988); Presta (*Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992); Verhoeyen et al. (*Science*, 239: 1534-1536 (1988); Hoogenboom et al., *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581 (1991); Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1): 86-95 (1991); Marks et al., *Bio/Technology* 10, 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368 812-13 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996); Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13 65-93 (1995); ならびに米国特許第4,816,567号明細書; 同第5,545,807号明細書; 同第5,545,806号明細書; 同第5,569,825号明細書; 同第5,625,126号明細書; 同第5,633,425号明細書および同第5,661,016号明細書を参照されたい)。所定の用途では、抗体は、ハイブリドーマ上清もしくは腹水内に含有されている場合があり、そのまま直接的に、または標準技術を使用した濃縮後のいずれかで利用してもよい。他の用途では、抗体は、例えば、塩析による分画およびイオン交換クロマトグラフィー、あるいはアガロースビーズなどの固体支持体に共有結合したプロテインA、プロテインG、プロテインA/Gおよび/またはプロテインLリガンドを用いたアフィニティークロマトグラフィーを使用して、さらに精製することができる。抗体は、冷凍製剤(例えば、-20°Cもしくは-70°C)、凍結乾燥形態を含む任意の好適な形態で、または通常の冷蔵条件(例えば、4)下で保存することができる。例えば、液体形態で保存される場合は、例えばトリス緩衝食塩液(TBS)もしくはリン酸緩衝食塩液(PBS)などの好適なバッファーを利用するのが好ましい。一部の実施形態では、結合剤は、非毒性の非経口的に摂取可能な希釈剤もしくは溶剤中の懸濁液のような、注射用製剤として調製することができる。利用できる好適なビヒクルおよび溶剤として、特に水、リンゲル液および等張性塩化ナトリウム溶液、TBSおよび/またはPBSが挙げられる。そのような製剤は、*in vitro*または*in vivo*で使用するのに好適となり得、当技術分野において公知であるように調製ことができ、正確な製剤は特定の用途に依存するであろう。

10

20

30

40

50

【0014】

しかしながら、本明細書に記載した結合剤は、決して抗体には限定されない。例えば、結合剤は、別のものと類似の結合特性を示す任意の化合物（例えば、模倣物(mimetic)）であってよい。例えば、代表的な結合剤は、PD-1に結合する、および/またはそれらに対する特異性を有する結合剤（モノクローナル抗体）と競合できる結合剤であってよい。一部の実施形態では、模倣物は、比較される結合剤（例えば、モノクローナル抗体）と、結合アッセイにおいて実質的に同一の親和性を示し得る。特定の結合剤の親和性は、限定はされないが、実施例において記載するような活性化CD4 T細胞での内因性細胞表面PD-1のFACS染色を含む、任意の好適なアッセイによって測定することができる。1つの結合剤が、別の結合剤と測定値（例えば、nm）が相互に約1~20、1~5、5~10、10~15または15~20%のいずれかの範囲内にある場合は、別の結合剤と「実質的に同一親和性」を有すると言うことができる。典型的な模倣物には、例えば、PD-1に特異的に結合する有機化合物、またはアフィボディ(Nygren, et al. FEBS J. 275(11):2668-76(2008))、アフィリン(Ebersbach, et al. J. Mol. Biol. 372(1):172-85(2007))、アフィチン(Krehenbrink, et al. J. Mol. Biol. 383(5):1058-68(2008))、アンチカリン(Skerra, A. FEBS J. 275(11):2677-83(2008))、アビマー(Silverman, et al. Nat. Biotechnol. 23(12):1556-61(2005))、DARPin(Stumpp, et al. Drug Discov. Today 13(15-16):695-701(2008))、フィノマー(Grabulovski, et al. J. Biol. Chem. 282(5):3196-3204(2007))、Kunitzドメインペプチド(Nixon, et al. Curr. Opin. Drug Discov. Devel. 9(2):261-8(2006))および/またはモノボディ(Koide, et al. Methods Mol. Biol. 352:95-109(2007))を含むことができる。その他の模倣物は、例えば、抗体（例えば、モノクローナル抗体1E4、1G10および/または1G1）の誘導體、例えば、Fab、Fab₂、Fab'-一本鎖抗体、F_v、単ドメイン抗体、単一特異性抗体、二重特異性抗体、三重特異性抗体、多価抗体、キメラ抗体、イヌ-ヒトキメラ抗体、イヌ-マウスキメラ抗体、イヌFcを含む抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、イヌ化、CDRグラフト化抗体、サメ抗体、ナノボディ、ラクダ抗体、マイクロボディおよび/またはイントラボディまたはそれらの誘導體を含むことができる。当業者には理解されるように、本明細書ではその他の結合剤も提供される。

【0015】

PD-1に対する（例えば、結合する）特異性を有する結合剤を作成するために、当業者には公知である任意の方法を使用できる。例えば、モノクローナル抗体を作成および単離するために、マウスなどの動物に1つ以上のPD-1タンパク質（例えば、PD-1Fc融合タンパク質および/またはPD-1Hisタグタンパク質）を投与することができる。次に、抗PD-1ハイブリドーマ細胞株を作成するために、活性化ヒトTリンパ球上に発現されたPD-1に対して（例えば、フローサイトメトリーおよび/または顕微鏡によって決定される）血清反応性を示す動物を選択することができる。これを、複数回ラウンドにわたり繰り返すことができる。例えば、第1ラウンドの結合剤選択のための一次基準は：i) フローサイトメトリーによる活性化ヒトTリンパ球上のPD-1の染色レベル；(ii) 既存の抗PD-1抗体と比較したCDR V_HおよびV_L配列の多様性；および(iii) PD-L1またはPD-1上の様々なエピトープに結合する数種の市販で入手できる抗PD-1抗体結合の1つと予備結合したPD-1共役Luminexビーズ(PD-1 conjugated Luminex beads)を用いた競合結合試験によって実施されるエピトープマッピングを含むことができるがそれらに限定されない。典型的な第1もしくは第2ラウンドの選択はさらに、例えば、親和性結合（抗PD-1抗体の刺激能力と相関していない可能性があるので一次基準ではない）および/または結合剤をアゴニストまたはアンタ

ゴニストであると同定するための機能的特性解析も含むことができる。

【0016】

本明細書の実施例1に記載するように、例えば、疲弊機能回復アッセイ (Exhaustion Functional Recovery Assay) (EFRA) を使用できる。このアッセイでは、試験結合剤は、T細胞などの免疫細胞を疲弊から救済する能力についてアッセイすることができる。これは、例えばヒト免疫不全ウイルス (HIV) のようなウイルスに由来する試験ペプチドなどの抗原の存在下において、そのような細胞に増殖を回復させる結合剤の能力を測定することによって決定できる。増殖は、例えば試験ペプチド単独のようなコントロール、または例えばMK-3475 (ペンプロリズマブ) のような陽性コントロールである抗PD-1抗体と比較して、CFSEアッセイにおいて測定される。一部の実施形態では、ペプチド単独コントロール、またはアイソタイプのコントロールマウスIgG1抗体と共にペプチドを使用した場合の、いずれかと比較して、有意差 (例えば、 < 0.001 のP値) を示す場合に、結合剤は増殖を回復させると決定される。このアッセイは、PD-1 (例えば、PD-L1またはPD-L2) への結合について他の結合剤と競合する、および/または免疫細胞の機能的回復をもたらす結合剤 (例えば抗体) を同定するために使用できる。実施例1は、Luminexに基づくアッセイを使用して表2に列挙した抗体をエピトープマッピングする2つの方法も記載する。1つの生化学的アッセイでは、PD-1 Fc融合タンパク質をビーズに結合させ、表2に記載されている抗PD-1抗体と2つの異なる市販の抗PD-1抗体のうちの一つとの間で、競合的結合試験を実施する。実施例1は、PD-1上の別個のエピトープに結合するモノクローナル抗体の4つのクラス：クラス1 (PD-1とPD-L1との相互作用を遮断する第1モノクローナル抗体と競合的)、クラス2 (PD-1に結合するがPD-1とPD-L1との相互作用を遮断しない第2モノクローナル抗体と競合的)、クラス3 (第1および第2モノクローナル抗体の両方と競合的) およびクラス4 (第1および第2抗体のいずれとも非競合的) を記載する。別個のアッセイでは、組換えPD-1タンパク質に対する結合についての競合を、表2に列挙する抗PD-1抗体およびビオチン化PD-L1組換えタンパク質について評価した。EFRAにおいて増殖を誘導した抗体は、PD-1上の異なるエピトープに結合するとして提案された4つの結合クラスの全てから同定された。さらに、EFRAは、PD-1/PD-L1相互作用と競合的、部分競合的または非競合的のいずれかでありかつHIV特異的CD8⁺T細胞に対して増殖機能を明確に回復した抗PD-1抗体の同定を可能にした。

10

20

30

【0017】

例えば実施例2に記載するような、結合剤の組合せも同定することができる。一部の実施形態では、1つ以上の結合剤だけを使用して他の物質を使用せずに得られた結果から統計的有意差を提供する組合せを同定することができる。一部の実施形態では、免疫細胞機能を回復させる相乗的能力を示す組合せを同定できる。一部の実施形態では、組合せは、PD-1とPD-L1との相互作用を遮断する第1結合剤を、PD-1とPD-L1との相互作用を遮断しない第2結合剤とともに含むことができる。第1および第2結合剤は、例えば2種以上の異なるモノクローナル抗体もしくはそれらの誘導体などの異なる構成要素であっても、あるいは、例えば二重機能性抗体 (bi-functional antibody) (複数の結合特異性を含む単一抗体もしくはその誘導体) のような同一構成要素上に見いだされてもよい。例えば、典型的な二重機能性抗体は、PD-1とPD-L1との相互作用を遮断する第1結合領域、およびPD-1とPD-L1との相互作用を遮断しない第2結合領域を含むことができる。さらに、複数のタイプの各結合剤を提供する組合せが企図されている。例えば、組合せは、PD-1とPD-L1との相互作用を遮断しない1つ以上の結合剤とともに、PD-1とPD-L1との相互作用を遮断する複数のタイプの結合剤を含むことができる。一部の実施形態では、組合せは、PD-1とPD-L1との相互作用を遮断しない複数の結合剤とともに、PD-1とPD-L1との相互作用を遮断する1つ以上の結合剤を含むことができる。一部の実施形態では、組合せは、PD-1とPD-L1との相互作用を遮断する複数の結合剤を、PD-1とPD-L1との相互作用を遮断しない複数

40

50

の結合剤とともに含むことができる。本明細書に記載されているそのような組合せは、C T L A - 4 などに対する抗体のような、免疫細胞機能に影響し得る 1 種以上の他の作用物質と組み合わせてもよい。当業者は、多数のそのような組合せが本明細書に記載した使用のために好適となり得ることを認識できるであろう。

【 0 0 1 8 】

結合剤が抗体である場合、その可変領域および/または相補性決定領域(「CDR」)に対応するヌクレオチドおよび/またはアミノ酸配列に関して、それを同定することができる。可変領域/CDR配列は、1つ以上の他の可変領域/CDRアミノ酸配列と組み合わせで使用できる。可変領域/CDRアミノ酸配列は、その代りにおよび/またはさらに、抗体分子の1つ以上のタイプの定常領域ポリペプチドに隣接させることができる。例えば、表1Aおよび1Bに示したCDRアミノ酸配列は、同一もしくは異なる種(例えば、ヒト、ヤギ、ラット、ヒツジ、ニワトリ)の任意の抗体分子および/またはCDRアミノ酸配列が由来する抗体サブタイプの定常領域に隣接または結合していてもよい。例えば、例示的な結合剤は、表2に列挙されているハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体、またはそれに由来する、またはそれに関連するものでよく、および/または表2に示されているのとほぼ同一の親和性および/または増殖効果を有する、および/または同一結合クラスを有するものでよく、および/または配列番号1~138のアミノ酸配列および/または表1Aおよび1Bに示した配列番号のいずれか1つ以上を有していてもよい。結合剤は、それぞれが1つ以上の定常領域および/または可変領域を含む抗体重鎖および/または軽鎖を含んでいてよい。可変領域は、典型的には、抗体の結合特異性を決定できる1つ以上のCDRを含んでいる。モノクローナル抗体は、そのような可変領域の(例えば、そのようなヌクレオチド配列によってコードされ得る)アミノ酸配列の解析によって同定することができる。例えば、PD-1に結合する結合剤の重鎖CDRの典型的なアミノ酸配列は、配列番号1~138からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸配列および/または表1Aおよび/または1Bに示した任意の他の配列を含む1つ以上を含むことができる。本明細書に記載したアミノ酸配列のいずれかおよび/またはそれらの任意の断片および/または誘導体も、標準技術を使用してハイブリッドおよび/または融合結合剤を形成するために任意の順序および/または組合せで任意の他の可変領域および/またはCDRと結合する、および/または他の重鎖および/または軽鎖可変領域内に導入することができる。本開示のPD-1(例えば、ヒトPD-1)結合剤内で見いだすことのできるCDRの典型的な組合せ(例えば、重鎖および/または軽鎖CDR1、CDR2およびCDR3アミノ酸配列の組合せ)は、例えば、表1Aおよび/または1Bに示した実施形態を含むことができる。

【 0 0 1 9 】

10

20

30

【表 1 A】

表 1 A

クローン	重鎖:アミノ酸配列		
	CDR1	CDR2	CDR3
122F10	DDFLH (配列番号 1)	RIDPANGESRYAPKFQD (配列番号 24)	TDYRGYYAMDY (配列番号 47)
139D6	NYYIH (配列番号 2)	SIYPNYGDTNYNQKVKD (配列番号 25)	GYSYAMDY (配列番号 48)
135D1	NYYIH (配列番号 3)	SIYPNYGETNYNQEFKG (配列番号 26)	GYSYAMDY (配列番号 49)
134D2	SNWMH (配列番号 4)	AVNPGNSDTTYNQKFKG (配列番号 27)	GRSYDGSFDY (配列番号 50)
121G1	RYWMH (配列番号 5)	NIDPSDSTTHYNPKFRD (配列番号 28)	DLDDFYVGSHEFDY (配列番号 51)
136B5	SNWMH (配列番号 6)	AVYPGNSDTTYNQNFKG (配列番号 29)	GRSYDGSFDY (配列番号 52)
127C2	NSYIH (配列番号 7)	WISPGDGSTNYNEKFKG (配列番号 30)	EEYDYDNY (配列番号 53)
137F2	NYWIG (配列番号 8)	DIYPGGGYTNYNEKFKG (配列番号 31)	GYDFVLDR (配列番号 54)
138H5	SYAMS (配列番号 9)	TISGGGADTYLDNVKG (配列番号 32)	QRGENLFAH (配列番号 55)
140A1	SDYAWN (配列番号 10)	YINYSGYTNYPFLKS (配列番号 33)	YGGSPWNFDV (配列番号 56)
135H12	SYWIN (配列番号 11)	NIYPGSSSTDYNEKFKS (配列番号 34)	GLYWYFDV (配列番号 57)
131D11	SSYIH (配列番号 12)	WIFPGDGKTNYNEKFRD (配列番号 35)	NDFDRGVY (配列番号 58)
132F7	NHGMS (配列番号 13)	SINTGGYSTYYPDNVKG (配列番号 36)	DDYNWFAY (配列番号 59)
126E4	NYWIG (配列番号 14)	DIYPGSEYENYNEKFKG (配列番号 37)	GYDFVLDH (配列番号 60)
135G1	DSYIH (配列番号 15)	RIDPAHGNIYASKFRD (配列番号 38)	IYYDYGEGDF (配列番号 61)
136E10	DTYIH (配列番号 16)	RIDLANDDILYASKFQG (配列番号 39)	IYYDYGEGDY (配列番号 62)
135C12	NFYIH (配列番号 17)	SIYPNYGDTAYNQKFKD (配列番号 40)	GYSYAMDY (配列番号 63)
136F4	DSYIH (配列番号 18)	RIDPARDNIIYASKFRD (配列番号 41)	IYYDYGEGDY (配列番号 64)
136B4	DDFLH (配列番号 19)	RIDPANGESRYAPQFQD (配列番号 42)	TDYRGYYAMDY (配列番号 65)
135E10	SYFMS (配列番号 20)	GISTGGADTYADSMKG (配列番号 43)	LSHYDGIPLDC (配列番号 66)
140G5	NHGMS (配列番号 21)	SISGGGDNTYYPDNLKG (配列番号 44)	VRQLGLHRAAMDY (配列番号 67)
122H2	NYWIG (配列番号 22)	DIYPGGDHKNYNEKFKD (配列番号 45)	GFDFVLDY (配列番号 68)
139F11	SFAMS (配列番号 23)	TITGGGVNTYYPDVKG (配列番号 46)	QAIYDGHYVLDY (配列番号 69)

10

20

30

40

【表 1 B】

表 1 B

クローン	軽鎖:アミノ酸配列		
	CDR1	CDR2	CDR3
122F10	KSSQSVLYSSNQKNYLA (配列番号 70)	WASTRES (配列番号 93)	HQYLSSYT (配列番号 116)
139D6	SASQGISDGLN (配列番号 71)	HTSTLHS (配列番号 94)	QQYSKFPLT (配列番号 117)
135D1	SASQGISNGLN (配列番号 72)	HTSTLHS (配列番号 95)	QQYSKFPLT (配列番号 118)
134D2	KASQDINKYIA (配列番号 73)	YTSTLRP (配列番号 96)	LQYDNLWT (配列番号 119)
121G1	RSSQSIVYSNGNTYLE (配列番号 74)	KVSHRFS (配列番号 97)	FQGSHVPYT (配列番号 120)
136B5	KASQDINKYMA (配列番号 75)	YTSTLRP (配列番号 98)	LQYDNLWT (配列番号 121)
127C2	KASQNVGTNVG (配列番号 76)	SASYRYN (配列番号 99)	QQYNTYPWT (配列番号 122)
137F2	KSSQSLFNSETQKNYLA (配列番号 77)	WASTRES (配列番号 100)	KQSYTLRT (配列番号 123)
138H5	LASQTIGTWLA (配列番号 78)	AATSLAD (配列番号 101)	QQLYSTPWT (配列番号 124)
140A1	RSSQTIVHNGDNTYLE (配列番号 79)	KISNRFF (配列番号 102)	FQGSHVPYT (配列番号 125)
135H12	KSSQSLFNSTGTRKNYLA (配列番号 80)	WASTRDS (配列番号 103)	KQSYNLYT (配列番号 126)
131D11	KASQNVDTNVA (配列番号 81)	SASYRYN (配列番号 104)	QQYNNYPYT (配列番号 127)
132F7	KSSQSLNLSGNQKNYLT (配列番号 82)	WASTRES (配列番号 105)	QSDYSYPLT (配列番号 128)
126E4	KSSQSLFNSTGTRKSYLA (配列番号 83)	WASTRET (配列番号 106)	MQSYNLRT (配列番号 129)
135G1	HASQNINVWLS (配列番号 84)	KASNLHT (配列番号 107)	QQGQSWPLT (配列番号 130)
136E10	HASQNINVWLS (配列番号 85)	KASNLHT (配列番号 108)	QQGQSYPLT (配列番号 131)
135C12	SASQGISDGLN (配列番号 86)	HTSSLHS (配列番号 109)	QYYSKDLLT (配列番号 132)
136F4	HASQNINVWLS (配列番号 87)	KASNLHT (配列番号 110)	QQGQSWPLT (配列番号 133)
136B4	KSSQSVLYSSNQKNYLA (配列番号 88)	WASTRES (配列番号 111)	HQYLSSYT (配列番号 134)
135E10	RASESVDNSGVSFLT (配列番号 89)	AASNQGS (配列番号 112)	QQTKEVPWT (配列番号 135)
140G5	KASQSVSDDVS (配列番号 90)	SAFFRYP (配列番号 113)	QQDYSSPLT (配列番号 136)
122H2	KSSQSLFNSTGTRKNYLA (配列番号 91)	WASTRES (配列番号 114)	MQSFNLRT (配列番号 137)
139F11	RTSGNIHNYLA (配列番号 92)	NVKTLTD (配列番号 115)	QQFWSIPWT (配列番号 138)

10

20

30

40

さらに、結合剤において、配列番号 1 ~ 69 の任意のものを、配列番号 70 ~ 138 の任意の 1 つ以上と組み合わせることができる。好ましい実施形態では、結合剤において、各クローンの重鎖 C D R を、それら各自の軽鎖 C D R と組み合わせることができる。一部の実施形態では、結合剤は、下記に示す重鎖 C D R および軽鎖 C D R を含むことができる：

1 2 2 F 1 0 (配列番号 1、2 4、4 7、7 0、9 3 および 1 1 6) ;
 1 3 9 D 6 (配列番号 2、2 5、4 8、7 1、9 4 および 1 1 7) ;
 1 3 5 D 1 (配列番号 3、2 6、4 9、7 2、9 5 および 1 1 8) ;
 1 3 4 D 2 (配列番号 4、2 7、5 0、7 3、9 6 および 1 1 9) ;
 1 2 1 G 1 (配列番号 5、2 8、5 1、7 4、9 7 および 1 2 0) ;
 1 3 6 B 5 (配列番号 6、2 9、5 2、7 5、9 8 および 1 2 1) ;
 1 2 7 C 2 (配列番号 7、3 0、5 3、7 6、9 9 および 1 2 2) ;
 1 3 7 F 2 (配列番号 8、3 1、5 4、7 7、1 0 0 および 1 2 3) ;
 1 3 8 H 5 (配列番号 9、3 2、5 5、7 8、1 0 1 および 1 2 4) ;
 1 4 0 A 1 (配列番号 1 0、3 3、5 6、7 9、1 0 2 および 1 2 5) ;
 1 3 5 H 1 2 (配列番号 1 1、3 4、5 7、8 0、1 0 3 および 1 2 6) ;
 1 3 1 D 1 1 (配列番号 1 2、3 5、5 8、8 1、1 0 4 および 1 2 7) ;
 1 3 2 F 7 (配列番号 1 3、3 6、5 9、8 2、1 0 5 および 1 2 8) ;
 1 2 6 E 4 (配列番号 1 4、3 7、6 0、8 3、1 0 6 および 1 2 9) ;
 1 3 5 G 1 (配列番号 1 5、3 8、6 1、8 4、1 0 7 および 1 3 0) ;
 1 3 6 E 1 0 (配列番号 1 6、3 9、6 2、8 5、1 0 8 および 1 3 1) ;
 1 3 5 C 1 2 (配列番号 1 7、4 0、6 3、8 6、1 0 9 および 1 3 2) ;
 1 3 6 F 4 (配列番号 1 8、4 1、6 4、8 7、1 1 0 および 1 3 3) ;
 1 3 6 B 4 (配列番号 1 9、4 2、6 5、8 8、1 1 1 および 1 3 4) ;
 1 3 5 E 1 0 (配列番号 2 0、4 3、6 6、8 9、1 1 2 および 1 3 5) ;
 1 4 0 G 5 (配列番号 2 1、4 4、6 7、9 0、1 1 3 および 1 3 6) ;
 1 2 2 H 2 (配列番号 2 2、4 5、6 8、9 1、1 1 4 および 1 3 7) ; または
 1 3 9 F 1 1 (配列番号 2 3、4 6、6 9、9 2、1 1 5 および 1 3 8)

当業者が確認できるように、その他の組合せも有用となり得る。

【 0 0 2 2 】

表 1 A および / または 1 B の C D R または直前の段落の C D R を含む結合剤も、下記の特徴を示し得る。

【 0 0 2 3 】

10

20

30

【表 2】

表 2

クローン	親和性* (nM)	結合 クラス**	PD-1/PD-L1 相互作用との 抗体競合***	EFRA ペプチド刺激単独に対す るパーセンテージ (%) [†]
122F10	2.2	4	非競合的	146%
139D6	2.4	2	部分的競合	195%
135D1	6.5	2	部分的競合	187%
134D2	4.8	4	競合的	205%
121G1	11.9	4	非競合的	120%
136B5	7.7	4	競合的	200%
127C2	1.0	2	非競合的	100%
137F2	1.5	1	競合的	250%
138H5	1.6	3	競合的	210%
140A1	1.4	3	競合的	160%
135H12	1.9	1	競合的	190%
131D11	2.7	1	競合的	180%
132F7	100	2	非競合的	210%
126E4	0.5	4	競合的	130%
135G1	32	4	NA	138%
136E10	7.1	4	非競合的	148%
135C12	1.7	2	部分的競合	195%
136F4	8.3	4	非競合的	108%
136B4	1.4	2	非競合的	185%
135E10	1.5	3	競合的	165%
140G5	1.6	1	競合的	205%
122H2	4.3	1	競合的	200%
139F11	3.1	1	競合的	250%

* 表 1 に列挙した抗体に対する結合親和性は、活性化 CD4 T 細胞上の内因性細胞表面 PD-1 の FACS 染色により評価した。

** 結合クラスは、Luminex アッセイ競合結合試験によって決定した。結合クラス 1 の mAb クローンは EH12.2H7 クローン市販抗体と競合的であり、クラス 2 の mAb クローンは J116 クローン市販抗体と競合的であり、クラス 3 の mAb クローンは EH12.2H7 抗体および J116 抗体の両方と競合的であり、クラス 4 の mAb クローンは EH12.2H7 抗体および J116 抗体の両方の存在下で結合する。

*** PD-1/PD-L1 相互作用との抗体競合は、第 2 の Luminex 結合アッセイにおいて決定した。このアッセイでは、PD-1 Fc 融合タンパク質被覆ビーズを、濃度 20nM で表 2 からの抗 PD-1 抗体の非存在下または存在下においてインキュベートした。次に PD-1/PD-L1 相互作用の IC₅₀ とほぼ等価である固定濃度の 1.25nM のビオチン化 PD-L1 を PD-1/抗体複合体とインキュベートし、フィコエリトリン標識ストレプトアビジンを使用して蛍光により PD-L1 結合を検出した。PD-1/抗体複合体への PD-L1 の結合に基づいて、抗体を、PD-1/PD-L1 相互作用と競合的、部分競合的または非競合的であると定義した。

□ 増殖作用は、CFSE アッセイ（疲弊機能回復アッセイ「EFRA」の 1 つの実施形態）を使用して評価する。慢性 HIV 感染した対象から単離した PBMC を、抗 PD-1 抗体の存在下および非存在下で HIV 特異的ペプチドにより刺激した。6 日間のインキュベーション後、ペプチド単独コントロールと比較した HIV 特異的 CD8 T 細胞の増殖を抗 PD-1 処置サンプルにおいて評価した。

NA=利用不可(not available)

結合親和性は、当業者が利用できる任意の技術によって決定できる。表2に提示した結合親和性データは、フィットヘマグルチニン(PHA)を用いて3~6日間にわたり刺激したCD4 T細胞上の内因性細胞表面PD-1のフローサイトメトリー染色によって評価した。結合クラスも、当業者が利用できる任意の技術によって決定できる。表2に提示した結合クラスデータは、Luminexアッセイ競合結合試験によって決定した。表2では、結合クラス1のモノクローナル抗体は、EH12.2H7クローン市販抗体(BioLegend社、San Diego, CAから入手可能(例えば、製品番号329905))と競合的であると決定された抗体である;クラス2の抗体は、J116クローン市販抗体(Affymetrix eBioscience社、San Diego, CAから入手可能(例えば、製品番号16-9989-80))と競合的であると決定された抗体である;クラス3の抗体は、EH12.2H7抗体およびJ116抗体の両方と競合的であると決定された抗体である;およびクラス4のモノクローナル抗体クローン抗体は、EH12.2H7抗体およびJ116抗体の両方の存在下でPD-1に結合すると決定された抗体である。

【0025】

増殖効果は、当業者が利用できる任意の技術によって決定できる。例えば、上述した、および実施例1で使用したEFRAシステムを使用できる。そのようなアッセイを使用して、表2に提示した増殖効果データを決定した。簡単に説明すると、慢性HIV感染した対象から末梢血単核細胞(PBMC)を単離し、その細胞を抗PD-1抗体の存在下および非存在下においてHIV特異的ペプチドで刺激する、カルボキシフルオレセインスクシニミジルエステル(CFSE)アッセイである。コントロール抗PD1抗体(Merck社の抗体MK-3475)についても陽性コントロールとして試験した。6日間のインキュベーション後、HIV特異的CD8 T細胞の増殖を、ペプチド単独コントロールと比較して抗PD-1処置サンプルにおいて評価し、コントロールを超えるパーセンテージとして結果を表わした(増殖効果)。

【0026】

一部の実施形態では、例えば抗体のようなPD-1結合剤を同定および特性付けるために使用される技術を、そのような結合剤を同定および特徴付けるためのシステムを提供するために組み合わせることができる。例えば、1種以上のモノクローナル抗体のような1つ以上の候補結合剤を、免疫原性ペプチドの存在下での増殖等によって測定されるような、免疫細胞に対する機能を回復させる候補結合剤の能力を決定するために、EFRAまたは類似のアッセイによってアッセイすることができる。一部の実施形態では、このタイプのアッセイは、さらに検討すべき候補結合剤が免疫細胞機能を回復させることができることを裏付けるための初期スクリーンとして使用できる。一部の実施形態では、これらのタイプのアッセイの後に、例えば活性化末梢血単核細胞(PBMC)などの免疫細胞に対する結合親和性を決定するアッセイを実施することができる。一部の実施形態では、このアッセイは、例えばFACS(fluorescence activated cell sorting)などの技術を使用することができる。一部の実施形態では、このアッセイは例えば抗PD1抗体(例えば、ペンブロリズマブとしても公知であるMerck社の抗体MK-3475)などの公知の結合剤を使用する非特異的結合および/または競合的結合試験の存在または非存在を含むことができる。これらのアッセイの後は、次に例えば上記の表1Aおよび/または1Bに提供したCDRなどの候補結合剤のCDRをシーケンシングする工程を実施することができる。総合して、本明細書に記載したEFRA、親和性決定、エピトープマッピング試験およびCDR同定法は、候補結合剤を同定できるシステムを提供する。

【0027】

表1Aおよび/または1Bのアミノ酸配列のいずれか(および/または任意のそれらの1つ以上の断片および/または誘導体)はさらに、当業者が所望する任意の他のアミノ酸によって置換されてもよい。例えば、当業者は、特定のアミノ酸を下記の表3に示す他のアミノ酸と交換することによって保存的置換を行うことができる。選択される特定のアミノ酸置換は、選択される部位の位置に依存し得る。そのような保存的アミノ酸置換は、そ

の位置でのアミノ酸残基のサイズ、極性、荷電、疎水性または親水性への効果がほとんどまたは全くないように、および特に、PD-1結合の低減を生じさせないように、天然アミノ酸残基の非天然残基による置換を含んでよい。

【0028】

【表3】

表3

配列番号1~138の元のアミノ酸残基	配列番号1~138の元のアミノ酸残基の典型的な保存的置換	配列番号1~138の元のアミノ酸残基の好ましい保存的置換
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, ノルロイシン	Leu
Leu	ノルロイシン, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4 ジアミノ酪酸, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, ノルロイシン	Leu

10

20

30

40

50

【0029】

一部の実施形態では、本開示は、PD-1および少なくとも1つの他の第2の抗原（例えば、細胞表面タンパク質）に単一結合剤が結合できるように、複数の特異性を有する結合剤を提供する。一部の実施形態では、第2の抗原は、感染性因子に感染した細胞によって発現される抗原であってよい。例えば、典型的な第2の抗原は、HIV Env抗原であってよい。そのような結合剤は、第2の抗原に結合できる、および/または感染性因子を中和するように機能することができる。所定の実施形態では、例えばPD-1と例えばenvおよび/または他の抗原などのHIV抗原とに対する二重特異性を有する二重特異性結合剤である。HIV免疫原は、本明細書、または任意の他の場所に記載された任意のサブタイプに由来し得る。一部の実施形態では、そのような結合剤は：PD-1アゴニスト/Env結合；PD-1アゴニストPD-1/Env結合および中和；PD-1アンタゴニスト/Env結合；および/またはPD-1アンタゴニスト/PD-1/Env結合および中和を含み得る。様々なサブタイプの有病率を前提にすると、HIV-1サブタイプBおよび/またはC由来の抗原を選択するのが好ましいであろう。さらに、単一組成物中に、複数のHIVサブタイプ（例えば、HIV-1サブタイプBおよびC、HIV-2サブタイプAおよびB、またはHIV-1およびHIV-2サブタイプの組合せ）由来の抗原に特異性を有する結合剤を含めるのが望ましいであろう。癌などの疾患を治療するために、複数のPD-1特異性（例えば、2つの異なるエピトープに特異的な二重特異性PD-1a/PD-1bアンタゴニストPD-1抗体）および/またはPD-1および1種以上の腫瘍抗原（例えば、癌精巢（CT）抗原（すなわち、MAGE、NY-ESO-1）；メラノサイト分化抗原（すなわち、Melan A/MART-1、チロシナーゼ、g

p 1 0 0) ; 突然変異抗原 (すなわち、MUM - 1、p 5 3、CDK - 4) ; 過剰発現「自己」抗原 (すなわち、HER - 2 / neu、p 5 3) ; および / またはウイルス抗原 (すなわち、HPV、EBV)) の両方に対する特異性を有する結合剤を得ることが有益となり得る。結合剤 (例えば、モノクローナル抗体) は、概して上述したように作成することができる。そのような結合剤の特異性を、当業者に広く利用可能な技術を使用して、単一結合剤に再合成 (recombinant) することができる。一部の実施形態では、効果的な複数の特異性を有する試薬を提供するために、複数の単一特異性結合剤を組み合わせる (例えば、投与する) こともできる。

【 0 0 3 0 】

一部の実施形態では、本明細書に記載された結合剤は、PD - 1 (および / または複数の特異性を有する結合剤の場合には別の抗原) を発現する細胞集団の機能を標的化および阻害する、および / またはその細胞集団を排除するために、活性薬剤に共役させてもよい。例えば、複製可能な HIV を含む CD4⁺ T 細胞集団を、結合剤 / 薬物複合体 (例えば、抗体 - 薬物複合体 (ADC)) を用いて、標的化および排除することができる。単一および / または二重特異性候補結合剤は、1 つ以上のタイプの薬物 (例えば、微小管を標的とする、DNA を損傷させる薬物) と共役させることができる。また、本明細書に記載した結合剤および / またはそれらの誘導体は、*in vitro* および / または *in vivo* 使用のために、機能的薬剤に隣接および / または共役させてもよい。例えば、結合剤は、細胞傷害剤もしくは毒素のような機能的成分、および / または例えばジフテリア A 鎖、外毒素 A 鎖、リシン A 鎖、アブリン A 鎖、クルシン、クロチン、フェノマイシン、エノマイシンのようなそれらの活性断片に、隣接および / または共役させることができる。好適な機能的成分は、放射化学薬品を含み得る。抗体のような結合剤は、当技術分野における標準技術を使用して、1 種以上の機能的薬剤に隣接および / または共役させることができる。

【 0 0 3 1 】

一部の実施形態では、結合剤は、例えば抗感染剤 (例えば、抗生物質、抗ウイルス薬) などの他の薬剤と共に投与することができる。例えば、本明細書に記載した結合剤は、モノクローナル抗体および / または他の試薬、例えばニボルマブ (MDX - 1 1 0 6、BMS - 9 3 6 5 5 8 としても公知である (Topalian, et al. N. Eng. J. Med. 2 0 1 2 ; 3 6 6 (2 6) : 2 4 4 3 - 2 4 5 4)、MDX - 1 1 0 6、ON 30
O - 4 5 3 8、Bristol - Myers Squibb 社から入手できる完全ヒト IgG4 モノクローナル抗体)、ランプロリズマブ (MK - 3 4 7 5 としても公知である、および Merck 社から入手できるヒト化 IgG4 モノクローナル抗体である SCH 9 0 0 4 7 5)、ピジリズマブ (CureTech 社から入手できるヒト化 IgG1 モノクローナル抗体)、AMP - 2 2 4 (GlaxoSmithKline / Amplimmune 社から入手できる B7 - DC / IgG1 融合タンパク質)、および / または米国特許第 8, 3 5 4, 5 0 9 B 2 号明細書 (Carven, et al.)、米国特許第 8, 0 0 8, 4 4 9 B 2 号明細書 (Korman, et al.)、国際公開第 2 0 1 2 / 1 3 5 4 0 8 A 1 号 (Manoj, et al.)、米国特許出願公開第 2 0 1 0 / 0 2 6 6 1 7 号明細書 (Carven, et al.)、国際公開第 2 0 1 1 / 1 1 0 6 2 1 A 1 40
号 (Tyson, et al.)、米国特許第 7, 4 8 8, 8 0 2 B 2 号明細書 (Collins, et al.)、国際公開第 2 0 1 0 / 0 2 9 4 3 5 A 1 号 (Simon, et al.)、国際公開第 2 0 1 0 / 0 8 9 4 1 1 A 2 号 (Olive, D.)、国際公開第 2 0 1 2 / 1 4 5 4 9 3 A 1 号 (Langermann, et al.)、国際公開第 2 0 1 3 / 0 4 3 5 5 6 9 A 1 号 (Rolland, et al.)、国際公開第 2 0 1 1 / 1 5 9 8 7 7 A 2 号 (Kuchroo, et al.)、米国特許第 7, 5 6 3, 8 6 9 B 2 号明細書 (Ono Pharm.)、米国特許第 7, 8 5 8, 7 4 6 B 2 号明細書 (Honjo, et al.)、米国特許第 8, 7 2 8, 4 7 4 B 2 号明細書 (Ono Pharm.)、米国特許第 9, 0 6 7, 9 9 9 号明細書 (Ono Pharm.) および / または米国特許第 9, 0 6 7, 9 9 9 号明細書のいずれかに記載された抗体また 50

は他の試薬または方法と組み合わせることができ、上記のそれぞれは参照により本開示に全体として組み込まれる。

【0032】

上述のように、本明細書に記載したPD-1結合剤（例えば、PD-1アンタゴニスト）は、HIVによる感染症の症状を治療および/または予防および/または改善するために使用できる。当技術分野において周知であるように、HIV単離体は、現在では別個の遺伝子サブタイプに分類される。HIV-1は、少なくとも10種のサブタイプ（A1、A2、A3、A4、B、C、D、E、F1、F2、G、H、JおよびK）を含むことは公知である（Taylor et al, NEJM, 359(18): 1965-1966 (2008)）。HIV-2は、少なくとも5種のサブタイプ（A、B、C、DおよびE）を含むことが公知である。サブタイプBは、世界中の男性同性愛者および静注薬物使用者におけるHIV流行と関連付けられてきた。大多数のHIV-1免疫原、検査室適応単離体、試薬およびマッピングされたエピトープはサブタイプBに属する。新規HIV感染症の発生率が高いサハラ以南のアフリカ、インドおよび中国領域では、HIV-1サブタイプBはほんの少数の感染症しか占めておらず、サブタイプHIV-1Cが最も一般的な感染サブタイプであると思われる。これらのタイプの単離体はいずれも、本明細書に記載した結合剤を使用して対応できるであろう。1つ以上の結合剤は、例えば、プロテアーゼ阻害剤、HIV侵入阻害剤、逆転写酵素阻害剤および/または抗レトロウイルスヌクレオシドアナログのような、HIVを予防、治療および/または改善するのに使用できる1種以上の薬剤と一緒にまたは共に投与することもできる。好適な化合物には、例えば、Agenerase（アンブレナビル）、Combivir（Retrovir/Epivir）、Crixivan（インジナビル）、Emtriva（エムトリシタピン）、Epivir（3tc/ラミブジン）、Epzicom、Fortovase/Invirase（サキナビル）、Fuzeon（エンフビルチド）、Hivid（ddc/ザルシタピン）、Kaletra（ロピナビル）、Lexiva（ホスアンブレナビル）、Norvir（リトナビル）、Rescriptor（デラビルジン）、Retrovir/AZT（ジドブジン）、Reyatax（アタザナビル、BMS-232632）、Sustiva（エファビレンツ）、Trizivir（アパカビル/ジドブジン/ラミブジン）、Truvada（エムトリシタピン/テノホビルDF）、Videx（ddI/ジダノシン）、Videx EC（ddI、ジダノシン）、Viracept（ネビラピン）、Viread（テノホビルジソプロキシルフマレート）、Zerit（d4T/スタブジン）およびZiagen（アパカビル）が含まれる。その他の好適な薬剤は当業者では公知であり、本明細書に記載するように使用するのに好適となり得る。そのような薬剤は、本明細書に記載した結合剤の投与および/または方法の使用の前、間または後のいずれでも使用できる。

【0033】

上述のように、本明細書に記載したPD-1結合剤（例えば、PD-1アンタゴニスト）は、癌の症状を治療および/または予防および/または改善するために使用できる。典型的な癌は、例えば、特に乳癌、血液癌、大腸癌、胃癌、結腸癌、骨格組織癌、皮膚癌（例えば、黒色腫）、脳腫瘍、肺癌、膀胱癌、腎臓癌、卵巣癌および/または肝臓癌のいずれかを含み得る。1つ以上の結合剤は、例えば、アルキル化剤（例えば、任意のナイトロジェンマスタード、ニトロソウレア、テトラジン、アジリジン、シスプラチンおよび/またはそれらの誘導体）、代謝拮抗物質（例えば、メトトレキセート類、ペメトトレキセド類、フルオロピリミジン類および/またはそれらの誘導体）、抗微小管薬（例えば、ビンカアルキロイド類、タキサン類、ポドフィロトキシンおよび/またはそれらの誘導体）、トポイソメラーゼIおよび/またはII阻害剤（例えば、カンプトテシン、イリノテカン、トポテカン、エトポシド、ドキシソルピシン、ミトキサントロン、テニポシド、ノボピオシン、メルパロン、アクラルピシンおよび/またはそれらの誘導体）および/または細胞傷害性抗生物質（例えば、任意のアントラサイクリン類、アクチノマイシン、プレオマイシン、プリカマイシンおよびマイトマイシンおよび/またはそれらの誘導体）などの癌を予

10

20

30

40

50

防、治療および/または改善するのに使用される1種以上の薬剤と組み合わせてもよく、および/またはそれらと一緒にまたは共に投与してもよい。その1つ以上の結合剤は、さらにまたは代りに、例えばニボルマブ、ランプロリズマブ、ビジリズマブおよび/またはその他の類似の薬剤および/またはそれらの誘導体などの癌を治療する、予防するおよび/または改善するのに当業者が入手できる1つ以上の他の結合剤と組み合わせることができる。その他の好適な薬剤は当業者では公知であり、本明細書に記載するように使用するのに好適となり得る。そのような薬剤は、本明細書に記載した結合剤の投与および/または方法の使用の前、間または後のいずれでも使用できる。

【0034】

上述のように、本明細書に記載したPD-1結合剤(例えば、PD-1アゴニスト)は、自己免疫の症状を治療および/または予防および/または改善するために使用できる。典型的な自己免疫状態は、例えば、全身性エリテマトーデス(SLE)、I型糖尿病、関節リウマチ、糸球体腎炎および多発性硬化症のような、PD-1が自己寛容を維持することに関係しおよび/または炎症性T細胞(例えば、自己反応性または自己抗原特異的T細胞)を伴う任意の状態を含み得る。そのようなPD-1結合剤は、例えば抗CTLA-4薬剤(例えば、イピリムマブ)などの他の薬剤と組み合わせてもよい。1つ以上の結合剤は、例えば、グルココルチコイド剤、細胞増殖抑制剤(例えば、アルキル化剤、代謝拮抗物質、メトトレキサート、アザチオプリン、メルカプトプリン、細胞傷害性抗生物質(例えば、ダクチノマイシン、アントラサイクリン類、マイトマイシンC、プレオマイシン、ミトラマイシン)、抗体類(例えば、Atgam、Thymoglobuline、Simulect、Zenapax)、イムノフィリン類(例えば、シクロスポリン、タクロリムス、シロリムス)に作用する薬剤、インターフェロン類、オピオイド剤、TNF結合剤(例えば、Remicade、Enbrel、Humira)、ミコフェノレート、フィンゴリモド、ミリオシンおよび/またはそれらの誘導体のような、例えば自己免疫を予防、治療および/または改善するために使用できる1種以上の薬剤と組み合わせる、および/または一緒にまたは共に投与することもできる。その他の好適な薬剤は当業者に公知であり、本明細書に記載するように使用するのに好適となり得る。そのような薬剤は、本明細書に記載した結合剤の投与および/または方法の使用の前、間または後のいずれでも使用できる。

【0035】

一部の実施形態では、結合剤は、1つ以上の検出可能な標識に隣接および/または共役させることができる。例えば、好適な検出可能な標識は、例えば、フルオロセイン類(例えば、DyLight、Cy3、Cy5、FITC、HiLyte Fluor 555、HiLyte Fluor 647; 5-カルボキシ-2,7-ジクロロフルオレセイン; 5-カルボキシフルオレセイン(5-FAM); 5-HAT(ヒドロキシトリプタミン); 5-ヒドロキシトリプタミン(HAT); 6-JOE; 6-カルボキシフルオレセイン(6-FAM); FITC; 6-カルボキシ-1,4-ジクロロ-2',7'-ジクロロフルオレセイン(TET); 6-カルボキシ-1,4-ジクロロ-2',4',5',7'-テトラクロロフルオレセイン(HEX); 6-カルボキシ-4',5'-ジクロロ-2',7'-ジメトキシフルオレセイン(JOE); Alexa fluor類(例えば、350、405、430、488、500、514、532、546、555、568、594、610、633、635、647、660、680、700、750); BODIPY蛍光体(例えば、492/515、493/503、500/510、505/515、530/550、542/563、558/568、564/570、576/589、581/591、630/650-X、650/665-X、665/676、FL、FL ATP、FI-セラミド、R6G SE、TMR、TMR-X複合体、TMR-X、SE、TR、TR ATP、TR-X SE)、ローダミン類(例えば、110、123、B、B 200、BB、BG、B extra、5-カルボキシテトラメチルローダミン(5-TAMRA)、5 GLD、6-カルボキシローダミン6G、リサミン、リサミンローダミンB、ファリシジン、ファロイジン、レッド、Rhod-2、

R O X (6 - カルボキシ - X - ローダミン)、5 - R O X (カルボキシ - X - ローダミン)、スルホローダミン B c a n C、スルホローダミン G E x t r a、T A M R A (6 - カルボキシテトラメチルローダミン)、テトラメチルローダミン (T R I T C)、W T)、テキサスレッドおよび / またはテキサスレッド - X を含み得る。当技術分野において公知の他の検出可能な標識も使用に好適となり得る。例えば抗体などの結合剤は、当技術分野における標準技術を使用して 1 種以上の検出可能な標識に隣接および / または共役させることができる。

【 0 0 3 6 】

所定の実施形態では、本明細書に記載した 1 つ以上の結合剤をコードする核酸分子は、下記でより詳細に考察するように、1 種以上の発現ベクター内に挿入することができる。そのような実施形態では、結合剤は、アミノ酸配列に対応するヌクレオチドによってコードされ得る。様々なアミノ酸 (A A) をコードするヌクレオチド (コドン) の特定の組合せは、当業者によって使用される様々な参考文献に記載されているように当技術分野において周知である (例えば、L e w i n , B . G e n e s V , O x f o r d U n i v e r s i t y P r e s s , 1 9 9 4)。前記結合剤のアミノ酸をコードするヌクレオチド配列は、例えば、表 4 を参照して確認することができる。核酸変異体は、結合剤をコードするヌクレオチドの任意の組合せを使用できる。

10

【 0 0 3 7 】

【表 4】

表 4

配列番号 1-138 またはそれらの変異体のアミノ酸 (A A) をコードするコドン

20

AA	コドン	AA	コドン	AA	コドン	AA	コドン
Phe (F)	TTT	Ser (S)	TCT	Tyr (Y)	TAT	Cys (C)	TGT
	TTC		TCC		TAC		TGC
Leu (L)	TTA		TCA	TERM	TAA	TERM	TGA
	TTG		TCG		TAG	Trp (W)	TGG
	CTT	Pro (P)	CCT	His (H)	CAT	Arg (R)	CGT
	CTC		CCC		CAC		CGC
	CTA		CCA	Gln (Q)	CAA		CGA
CTG	CCG		CAG		CGG		
Ile (I)	ATT	Thr (T)	ACT	Asn (N)	AAT	Ser (S)	AGT
	ATC		ACC		AAC		AGC
	ATA		ACA	Lys (K)	AAA	Arg (R)	AGA
Met (M)	ACG		AAG		AGG		
Val (V)	GTT	Ala (A)	GCT	Asp (D)	GAT	Gly (G)	GGT
	GTC		GCC		GAC		GGC
	GTA		GCA	Glu (E)	GAA		GGA
	GTG		GCG		GAG		GGG

30

【 0 0 3 8 】

当業者は、特定のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を、表 4 に提示したアミノ酸配列および情報から容易に導き出せることを理解できる。例えば、アミノ酸配列 D D F L H (配列番号 1) および表 4 に提示した情報から、このアミノ酸配列がヌクレオチド配列 G A T G A T T T T T T A C A T (配列番号 1 3 9) によってコードされ得ることを推定することができる。当業者は、配列番号 2 ~ 1 3 8 をコードするヌクレオチド配列を同じやり方で推定することができ、そのようなヌクレオチド配列が本明細書で企図されていることを理解できるであろう。結合剤が抗体である場合、所定の調製物 (例えば、ヒト化抗体) を作成するために、その可変領域をコードするヌクレオチド配列を、発現ベクター中にクローン化されたそれを発現するファージおよび / またはハイブリドーマ細胞から単離することもできる。そのような調製物を作成する方法は、当技術分野におい

40

50

て周知である。

【0039】

重要な可変領域（例えば、CDR）のアミノ酸配列を決定するために、PD-1抗原/免疫原を用いて免疫したマウス由来のハイブリドーマ細胞を、本明細書に記載した機能的アッセイおよび当業者が容易に利用可能なクローニング技術を使用して選択することができる。例えば、選択されたハイブリドーマの重鎖および軽鎖可変領域をコードする核酸を単離およびシーケンシングするために、製造業者のプロトコルにしたがってTRIzol試薬を使用して新鮮ハイブリドーマ細胞から全RNAを抽出することができる。cDNAは、標準技術を使用してRNAからアイソタイプ特異的アンチセンスプライマーもしくはユニバーサルプライマーを用いて（例えば、PrimeScript（商標）1st Strand cDNA合成キットの技術的マニュアルにしたがって）合成することができる。次にポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を実施して、選択されたハイブリドーマによって産生される抗体の（重鎖および軽鎖）可変領域をコードする核酸を増幅することができる。次いでそれを標準クローニングベクター内に別個にクローン化してシーケンシングすることができる。次にコロニーPCRスクリーニングを実施すると、正しいサイズのインサートを有するクローンを同定することができる。好ましくは、正確なサイズのインサートを有する5個以下の単一コロニーを各抗体可変領域に対してシーケンシングする。次に抗PD-1抗体の発現および精製のために標準プロトコルを使用することができる。例えば、ハイブリドーマクローンは、無血清培地中で増殖させることができ、細胞培養ブラスを遠心し、次に濾過した。次に、抗体を含有する濾過上清を親和性カラム（例えば、プロテインAカラム）に装填し、洗浄し、適切なバッファー（例えば、Pierce IgG溶出バッファー）を用いて溶出させることができる。溶出分画をプールし、PBS（pH 7.2）中にバッファー交換してもよい。次に、分子量、収率および純度についての標準プロトコルを使用して、SDS-PAGEおよびウェスタンブロットによって精製抗体を分析することができる。次に、タンパク質凝集体の存在が少ない高抗体純度（概して>90%）を確実にするために、生物物理学的特性解析に適切なカラム（例えば、TSK GEL-G3000 SWXLカラム（Tosoh））においてサイズ排除クロマトグラフィーHPLCを実施することができる。これらの手法は、選択されたハイブリドーマ細胞由来の配列番号1~138をコードする核酸を単離およびシーケンシングする際に使用した。これらの技術、それらの変形および/またはその他は、さらにまた当業者に理解できるようにこれらの目的に使用することもできる。

10

20

30

【0040】

1つ以上のPD-1結合剤をコードする核酸分子は、ウイルスおよび/または非ウイルスベクター内に含まれていてよい。1つの実施形態では、DNAベクターが、1つ以上のPD-1結合剤をコードする核酸を患者に送達するために利用される。そのように実施する場合に、そのような機序の効率を改善するために、例えば、自己複製ウイルスレプリコン（Caley, et al. 1999. Vaccine, 17: 3124-2135; Dubensky, et al. 2000. Mol. Med. 6: 723-732; Leitner, et al. 2000. Cancer Res. 60: 51-55）、コード最適化（Liu, et al. 2000. Mol. Ther., 1: 497-500; Dubensky, supra; Huang, et al. 2001. J. Virol. 75: 4947-4951）、in vivoエレクトロポレーション（Widera, et al. 2000. J. Immunol. 164: 4635-3640）、共刺激性分子であるサイトカイン類および/またはケモカイン類をコードする核酸分子の組み込み（Xiang, et al. 1995. Immunity, 2: 129-135; Kim, et al. 1998. Eur. J. Immunol., 28: 1089-1103; Iwasaki, et al. 1997. J. Immunol. 158: 4591-3601; Sheerlinck, et al. 2001. Vaccine, 19: 2647-2656）、例えばCpGなどの刺激性モチーフの組み込み（Gurunathan, supra; Leitner, supra）、エンドサイトーシスもしくはユビキチンプロセ

40

50

ッシング経路をターゲティングするための配列 (Thomson, et al. 1998 . J. Virol. 72: 2246 - 2252; Velders, et al. 2001 . J. Immunol. 166: 5366 - 5373)、プライム-ブーストレジメン (Gurunathan, supra; Sullivan, et al. 2000. Nature, 408: 605 - 609; Hanke, et al. 1998. Vaccine, 16: 439 - 445; Amara, et al. 2001. Science, 292: 69 - 74)、プロテアソーム感受性開裂部位の使用ならびに例えばサルモネラ (Salmonella) などの粘膜送達ベクターの使用 (Darji, et al. 1997 . Cell, 91: 765 - 775; Woo, et al. 2001. Vaccine, 19: 2945 - 2954) を含む様々な戦略を利用できる。その他の方法は当技術分野

において公知であり、それらの一部について下記に記載する。宿主に核酸を導入するの
 うまく利用されてきた様々なウイルスベクターは、例えば、レトロウイルス、アデノウ
 イルス、アデノ関連ウイルス (AAV)、ヘルペスウイルスおよびポックスウイルスを含む
 。、当業者に広く利用可能な標準的な組換え技術を使用してベクターを構築することが
 できる。そのような技術は、例えば Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook, et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press)、Gene Expression Technology (Methods in Enzymology, Vol. 185, edited by D. Goeddel, 1991. Academic Press, San Diego, CA) および PCR Protocols: A

Guide to Methods and Applications (Innis, et al. 1990. Academic Press, San Diego, CA) など
 の一般的な分子生物学参考文献の中に見いだすことができる。「非ウイルス」プラスミ
 ドベクターは、所定の実施形態においても好適となり得る。好ましいプラスミドベクター
 は、細菌、昆虫および/または哺乳動物宿主細胞と適合し得る。そのようなベクターには
 、例えば、PCR-i i、PCR3 および pCDNA3.1 (Invitrogen, San Diego, CA)、pBSii (Stratagene, La Jolla, CA)、pet15 (Novagen, Madison, WI)、pGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)、pEGFP-n2 (Clontech, Palo Alto, CA)、pET1 (Bluebacci, Invitrogen)、

pDSR - (国際公開第 90/14363号) および pFASTBACdual (Gibco-BRL, Grand Island, NY) ならびに Bluescript (登録商標) プラスミド誘導体 (高コピー数 COLE1 ベースのファージミド、
 Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA)、TAQ 増幅 PCR 産物をクローニングするために設計された PCR クローニングプラスミド (例えば、TOPO (商標) TA cloning (登録商標) キット、PCR2.1 (登録商標) プラスミド誘導体、Invitrogen, Carlsbad, CA) が含まれる。細菌ベクターも使用できる。これらのベクターには、例えば、シゲラ (Shigella)、サルモネラ (Salmonella)、ビブリオ・コレラ (Vibrio cholerae)、ラクトバチルス (Lactobacillus)、カルメット・ゲ

ラン桿菌 (Bacille Calmette Guerin: BCG) およびストレプトコッカス (Streptococcus) (例えば、国際公開第 88/6626号; 国際公開第 90/0594号; 国際公開第 91/13157号; 国際公開第 92/1796号 および 国際公開第 92/21376号を参照されたい) が含まれる。多数の他の非ウイルスプラスミド発現ベクターおよび発現系が当技術分野において公知であり、使用できる。例えば、DNA-リガンド複合体、アデノウイルス-リガンド-DNA 複合体、DNA の直接注入、CaPO₄ 沈降、遺伝子銃技術、エレクトロポレーションおよびコロイド分散系を含む、他の送達技術も差し支えない。コロイド分散系には、高分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、ビーズおよび水中油エマルジョン、ミセル、混合ミセルおよびリポソームを含む脂質ベース系が含まれる。好ましいコロイド系は、in vitro

および *in vivo* での送達ビヒクルとして有用な人工膜小胞であるリポソームである。RNA、DNA および無傷ビリオンを水性内部にカプセル封入し、生物活性形態にある細胞に送達することができる (Fraleley, R., et al., 1981, Trends Biochem. Sci., 6: 77)。リポソームの組成は、通常はステロイド、特にコレステロールと組み合わせた、リン脂質、特に高相転移温度リン脂質の組合せである。その他のリン脂質または他の脂質も使用できる。リポソームの物理的特性は、pH、イオン強度および二価カチオンの存在に依存する。リポソーム生成において有用な脂質の例には、ホスファチジル化合物、例えばホスファチジルグリセロール、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴ脂質、セレブロシドおよびガングリオシドが含まれる。特に有用であるのは、脂質部分が、14 ~ 18 個の炭素原子、特に 16 ~ 18 個の炭素原子を有し、および飽和している、ジアシルホスファチジルグリセロールである。例示的なリン脂質には、卵ホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリンおよびジステアロイルホスファチジルコリンが含まれる。

10

20

30

40

50

【0041】

ベクターを含む培養細胞も提供される。培養細胞は、ベクターでトランスフェクトされた培養細胞またはその細胞の子孫であり、その細胞は免疫原性ポリペプチドを発現する。好適な細胞株は当業者には公知であり、例えば、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (ATCC) を通して市販で入手可能である。トランスフェクトされた細胞を、免疫原性ポリペプチドを生成する方法において使用できる。その方法は、任意選択的に発現配列の制御下において、免疫原性ポリペプチドの発現を可能にする条件下でベクターを含む細胞を培養する工程を含む。免疫原性ポリペプチドは、標準のタンパク質精製法を使用して細胞または培養培地から単離することができる。

【0042】

当業者は、それに結合するタンパク質を含有する生物学的サンプルを同定するために本明細書に記載した結合剤 (例えば、抗体) を使用するための多数の好適な技術を有する。例えば、免疫沈降法または他の捕捉タイプのアッセイを使用し、抗体を利用して PD-1 を単離することができる。この周知の技術は、固体支持体またはクロマトグラフィー材料 (例えば、プロテイン A、プロテイン G および / またはプロテイン L) に抗体を付着させることによって実施される。次に、結合した抗体を、PD-1 を含有するまたは含有すると考えられる溶液 (例えば、HIV 感染 T 細胞溶解物) 中に導入する。それにより、PD-1 は抗体に結合し、PD-1 が抗体に結合したままである条件下で非結合物質を洗い流す。次に、結合タンパク質を抗体から分離し、所望の分析を行う。抗体を使用してタンパク質を単離する類似の方法は、当技術分野において周知である。結合剤 (例えば、抗体) は、生物学的サンプル中の PD-1 を検出するためにも利用できる。例えば、フローサイトメトリー分析、ELISA、免疫ブロッティング (例えば、ウェスタンブロット)、*in situ* 検出、免疫細胞化学および / または免疫組織化学などのアッセイにおいて、抗体を使用できる。そのようなアッセイを実施する方法は、当技術分野において周知である。

【0043】

本明細書に記載した結合剤は、患者における疾患状態の存在を決定する、予後を予測する、または化学療法薬もしくは他の治療計画の有効性を決定するためにも使用できる。本明細書に記載するように実施したまたは当技術分野において公知である発現プロファイルアッセイは、PD-1 の発現の相対レベルを決定するために使用できる。次に、特定疾患が患者の体内に存在するか否か、患者の予後、または特定の治療計画が有効であるか否かを決定するために、その発現のレベルを基準 (例えば、コントロール) レベルと関連させることができる。例えば、患者が特定の抗感染症治療計画により治療される場合、患者の組織 (例えば、末梢血、乳腺組織生検) における PD-1 の発現レベルの増加または減少は、その治療計画が宿主内の感染性因子の量を悪化させるまたは改善することを指示し得る。発現の増加または減少は、治療計画が所望の効果を有するまたは有さないこと、従っ

て、別の治療様式を選択され得ることを指示することができる。

【0044】

さらに、例えば、新規薬物の候補を試験するための薬物スクリーニングアッセイにおける試薬として、本明細書に記載した結合剤を使用することも可能である。その試薬を使用して、細胞株あるいは患者の細胞または組織における免疫原性標的の発現に対する、候補薬剤の効果を確認することができる。有用な化合物の迅速な同定を可能にしおよび候補薬剤を用いた治療の有効性をモニターするために、発現プロファイリング技術を高スループットスクリーニング技術と組み合わせてもよい(例えば、Zlokarnik, et al., Science 279, 84-8 (1998))。候補薬剤は、化学的化合物、核酸、タンパク質、抗体、またはそれらの誘導体であってよく、天然のものまたは合成由来のものいずれであってもよい。このように同定された候補薬剤は、例えば、患者に投与するための医薬組成物として、または他のスクリーニングアッセイにおいて使用するために利用することができる。

10

【0045】

一部の実施形態では、結合剤は精製形態にある。「精製」結合剤(例えば、抗体)は、(例えば、モノクローナル抗体の場合にはハイブリドーマ上清または腹水調製物の一部として)最初に一緒に含まれるタンパク質および/または他の成分の少なくとも約50%から分離されたものであってよい。精製結合剤(例えば、抗体)は、最初に一緒に含まれるタンパク質および/または他の成分の少なくとも約50%、60%、75%、90%または95%から分離されたものであってよい。

20

【0046】

本明細書に記載したポリペプチドおよび核酸は、宿主に投与する前に1つ以上の医薬上許容される担体と組み合わせることができる。医薬上許容される担体は、生物学的もしくは他の点で望ましくない物質ではなく、例えば、その物質は、いずれの望ましくない生物学的影響も生じることなく、またはそれが含まれる医薬組成物の他の成分のいずれとも有害に相互作用することなく、対象に投与することができる。担体は必然的に、当業者に周知であるように、有効成分の分解を最小限に抑え、および対象における有害副作用を最小限に抑えるように選択されるであろう。好適な医薬担体およびそれらの調製物は、例えば、Remington's: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, David B. Troy, ed., Lippicott Williams & Wilkins (2005)に記載されている。典型的には、調製物を等張性にさせるために調製物中で適切な量の医薬上許容される塩が使用される。医薬上許容される担体の例には、無菌水、食塩液、リンゲル液およびデキストロス溶液のような緩衝液が含まれるがそれらに限定されない。溶液のpHは、一般に約5~8または約7~約7.5である。その他の担体には、例えばポリペプチドもしくはそれらの断片を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスのような、徐放性製剤が含まれる。マトリックスは、成形品、例えば、フィルム、リポソームもしくは微粒子の形態にあってよい。所定の担体が、例えば、投与経路および投与される組成物の濃度に依存して、より好ましいものとなり得ることは当業者に明白であろう。担体は、ヒトまたは他の対象にポリペプチドおよび/またはその断片を投与するのに好適なものである。医薬組成物は、免疫原性ポリペプチドに加えて、担体、増粘剤、希釈剤、保存料、界面活性剤、アジュバント、免疫刺激剤も含んでいてよい。医薬組成物は、抗菌剤、抗炎症剤および麻酔剤などの1種以上の有効成分も含んでいてよい。医薬組成物は、従来の医薬上許容される担体、アジュバントおよびビヒクルを含有する単位用量調製物(dosage unit formulations)において、経口的に、非経口的に、吸入スプレーにより、経直腸により、結節内にまたは局所的に投与することができる。本明細書で使用する用語「医薬上許容される担体」もしくは「生理学上許容される担体」は、医薬組成物として核酸、ポリペプチドまたはペプチドの送達を達成または増強するのに好適な1種以上の調製物材料(formulation material)を意味する。「医薬組成物」は、治療有効量の核酸またはポリペプチドを含む組成物である。用語「有効量」および「治療有効量」は、それぞれ所望の治療効果(例えば

30

40

50

、T細胞機能を回復させる)を観察するために使用される結合剤、核酸などの量を意味する。

【0047】

少なくとも1つ以上の有効量の本明細書に記載した1つ以上の結合剤(および/またはそれらの誘導体)を哺乳動物に投与する工程を含む、哺乳動物宿主における1つ以上の疾患状態(例えば、HIVまたは癌)を治療する方法も提供される。一部の実施形態では、結合剤は、配列番号1~138および/または表1Aおよび1Bに示した1つ以上を含むモノクローナル抗体またはそれらの断片もしくは誘導体である。その1つ以上の結合剤は、約1~約50mg/kg、約1~約30mg/kg、または約5~約30mg/kg(例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35または40mg/kgのいずれか)の用量で投与することができる。所定の実施形態では、1つ以上の結合剤は、約10mg/kgで1回以上、哺乳動物に(例えば、皮内、静脈内、経口、経直腸)投与することができる。複数回の用量が投与される場合、投与は各用量でほぼ同一の量または異なる量の結合剤を含むことができる。投与は、同一または異なる間隔を空けて時間的に分離してもよい。例えば、投与は、約6、12、24、36、48、60、72、84もしくは96時間、1週間、2週間、3週間、1カ月間、2カ月間、3カ月間、4カ月間、5カ月間、6カ月間、7カ月間、8カ月間、9カ月間、10カ月間、11カ月間、12カ月間、1.5年間、2年間、3年間、4年間、5年間、あるいはこれらの期間のいずれかの前、後および/またはそれらの間の期間により、分離することができる。一部の実施形態では、結合剤は、例えば他の薬剤(例えば、抗感染剤および/または化学療法薬)と共に投与することができる。そのような他の薬剤は、結合剤とほぼ同時に、または異なる時点および/または頻度で投与することができる。当業者が容易に特定できるように、そのような方法の他の実施形態も適切となり得る。

【0048】

本明細書に記載した抗体を使用する際に当業者を助けるために、同一物をキットフォーマットで提供してもよい。そのような抗体、および任意選択的に、その抗体を使用してPD-1を発現する細胞を検出するのに必要な他の成分を含むキットが提供される。キットの抗体は、冷凍、凍結乾燥を含む任意の好適な形態で、あるいはTBSまたはPBSのような医薬上許容されるバッファー中において、提供することができる。キットは、例えば、バッファー(例えば、TBS、PBS)、ブロック化剤(脱脂粉乳、正常血清、Tween-20界面活性剤、BSAもしくはカゼインを含む溶液)および/または検出試薬(例えば、ヤギ抗マウスIgGビオチン、ストレプトアビジン-HRP複合体、アロフィコシアニン、B-フィコエリトリン、R-フィコエリトリン、ペルオキシダーゼ、検出可能な標識およびその他の標識および/または染色キット(例えば、ABC染色キット、Pierce))などの、*in vitro*または*in vivo*で抗体を利用するのに必要とされる他の試薬も含んでいてよい。キットは、例えばフローサイトメトリー分析、ELISA、免疫ブロッティング(例えば、ウェスタンブロット)、*in situ*検出、免疫細胞化学、免疫組織化学などの、上述した一般的に利用されるアッセイにおいて抗体を使用するための他の試薬および/または取扱説明書も含んでいてよい。1つの実施形態では、キットは、精製形態にある結合剤を提供する。また別の実施形態では、結合剤は、ビオチン化形態で、それを単独でまたはアビジン共役検出試薬(例えば、抗体)と共に、提供することができる。また別の実施形態では、キットは、PD-1を直接的に検出するのに使用できる1種以上の検出可能な標識を含む結合剤を含む。これらの系のいずれかを使用するのに必要とされるバッファーなどは、当技術分野において周知であり、および/または最終使用者によって準備するか、またはキットの構成成分として提供してもよい。キットは、陽性コントロールおよび陰性コントロールタンパク質および/または組織サンプルを含む、固体支持体も含んでいてよい。例えば、スポットティングもしくはウェスタンブロットタイプのアッセイを実施するためのキットは、SDS-PAGEで使用するためのコントロール細胞または組織溶解物、あるいは、実験サンプルのための追加のスペースと

10

20

30

40

50

共に事前に固定されたコントロールサンプルを含有するナイロン膜もしくは他の膜を含むことができる。スライド上の細胞におけるPD-1を可視化するためのキットは、実験サンプルのための追加のスペースと共にコントロール細胞もしくは組織サンプルを含有するフォーマット済みスライドを含むことができる。当業者には理解されるように、キットの他の実施形態も本明細書において企図されている。

【0049】

そこで、本開示は、PD-1に作動的または拮抗的に結合する結合剤を提供する。一部の実施形態では、結合剤は、配列番号1~138からなる群より選択されるおよび/または表1Aおよび1Bに示した少なくとも1つのアミノ酸配列を含むポリペプチドである。一部の実施形態では、結合剤は、配列番号1~138(例えば、表1Aおよび/または1Bに示した)の1つ以上の組合せを含むポリペプチドである。一部の実施形態では、結合剤は抗体である。一部の実施形態では、結合剤は、配列番号1~23からなる群より選択される重鎖CDR1アミノ酸配列を含む抗体のような、ポリペプチドである。一部の実施形態では、結合剤は、配列番号24~46からなる群より選択される重鎖CDR2アミノ酸配列を含む抗体のような、ポリペプチドである。一部の実施形態では、結合剤は、配列番号47~69からなる群より選択される重鎖CDR3アミノ酸配列を含む抗体のような、ポリペプチドである。一部の実施形態では、結合剤は、配列番号70~92からなる群より選択される軽鎖CDR1アミノ酸配列を含む抗体のような、ポリペプチドである。一部の実施形態では、結合剤は、配列番号93~115からなる群より選択される重鎖CDR2アミノ酸配列を含む抗体のような、ポリペプチドである。一部の実施形態では、結合剤は、配列番号116~138からなる群より選択される重鎖CDR3アミノ酸配列を含む抗体のような、ポリペプチドである。一部の実施形態では、結合剤は、表1Aおよび/または1Bに示したCDRの組合せを含む、および/または表2に記載した特性を有する。一部の実施形態では、結合剤は、ヒト抗体、ヒトIgG、ヒトIgG1、ヒトIgG2、ヒトIgG2a、ヒトIgG2b、ヒトIgG3、ヒトIgG4、ヒトIgM、ヒトIgA、ヒトIgA1、ヒトIgA2、ヒトIgD、ヒトIgE、イヌ抗体、イヌIgGA、イヌIgGB、イヌIgGC、イヌIgGD、ニワトリ抗体、ニワトリIgA、ニワトリIgD、ニワトリIgE、ニワトリIgG、ニワトリIgM、ニワトリIgY、ヤギ抗体、ヤギIgG、マウス抗体、マウスIgG、ブタ抗体および/またはラット抗体および/またはそれらの誘導体由来する、または(例えば、配列または起源によって)それらに関連する。一部の実施形態では、誘導体は、例えば、Fab、Fab₂、Fab'一本鎖抗体、F_v、一本鎖、単一特異性抗体、二重特異性抗体、三重特異性抗体、多重特異性抗体、多価抗体、キメラ抗体、イヌ-ヒトキメラ抗体、イヌ-マウスキメラ抗体、イヌFcを含む抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、イヌ化抗体、CDRグラフト化抗体、サメ抗体、ナノボディおよび/またはラクダ抗体からなる群より選択することができる。一部の実施形態では、結合剤は少なくとも第1および第2の特異性を有し、第1の特異性はPD-1に対するものであり、および第2の特異性は異なる抗原(例えば、HIV(例えばenv)などの感染性因子および/または腫瘍抗原などの抗原)に対するものである。一部の実施形態では、結合剤および/またはその誘導体は、それに固定可能に付着させた検出可能な標識を含むことができる。一部の実施形態では、任意の1つおよび/またはその誘導体の結合剤は、それに固定可能に付着させたエフェクター部分(例えば、細胞傷害性薬物、毒素、ジフテリアA鎖、外毒素A鎖、リシンA鎖、アプリンA鎖、クルシン、クロチン、フェノマイシン、エノマイシンおよび放射化学薬品)を含む。一部の実施形態では、1つ以上の結合剤をコードするポリヌクレオチド(例えば、発現ベクター)も提供される。そのようなポリヌクレオチドのポリペプチド産物を含むおよび/または発現する宿主細胞も提供される。一部の実施形態では、少なくとも1つの結合剤もしくは誘導体;少なくとも1つの単離ポリヌクレオチド;少なくとも1つの発現ベクター;および/または少なくとも1つの宿主細胞;またはそれらの組合せ;ならびに医薬上許容される担体を含む組成物も提供される。

【0050】

10

20

30

40

50

本開示はさらに、細胞上のPD-1を検出するための方法において、試験生物学的サンプルを本明細書に記載した結合剤もしくは誘導体と接触させる工程、およびその生物学的サンプルもしくはその成分に結合した結合剤を検出する工程を含む方法も提供する。そのような方法は、*in vivo*法または*in vitro*法であってよい。一部の実施形態では、本方法は、試験生物学的サンプルもしくはその成分に結合する量をコントロール生物学的サンプルもしくはその成分に結合する量と比較する工程を含み、コントロール生物学的サンプルもしくはその成分に結合する量と比較して増加した試験生物学的サンプルもしくはその成分に結合する量は、試験生物学的サンプル（例えば、哺乳動物血液）におけるPD-1を発現する細胞の存在を示す。一部の実施形態では、PD-1抗体結合剤を同定するためのシステムにおいて、疲弊機能回復アッセイ（EFRA）により候補結合剤をアッセイする工程；PD-1に対する候補結合剤の親和性を決定する工程；および候補結合剤のCDRのヌクレオチド配列を決定する工程によるシステムが提供される。

10

【0051】

一部の実施形態では、細胞内または細胞上でのPD-1の発現を検出するためのキットにおいて、結合剤もしくはその誘導体および使用説明書を含むキットを提供する。一部の実施形態では、結合剤および/またはその誘導体は、凍結乾燥形態にある。

【0052】

一部の実施形態では、本開示は、哺乳動物における感染性疾患、癌および/または自己免疫を治療、予防および/または改善する方法において、結合剤もしくはその誘導体を含む少なくとも1つの有効量の医薬組成物を、その哺乳動物に投与する工程を含む方法を提供する。一部の実施形態では、感染性疾患は、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）である。一部の実施形態では、感染性疾患および/または癌を治療するために使用される結合剤および/またはその誘導体は、PD-1アンタゴニストである。一部の実施形態では、自己免疫状態を治療するために使用される結合剤および/またはその誘導体は、PD-1アゴニストである。一部の実施形態では、複数回用量が動物に投与される。一部の実施形態では、結合剤および/またはその誘導体は、それに約1~50mg/kgの投与量で投与することができる。

20

【0053】

本開示は、さらにPD-1結合剤の組合せも提供する。一部の実施形態では、組合せは、PD-1とPD-L1との相互作用を遮断する第1結合剤、およびPD-1とPD-L1との相互作用を遮断しない第2結合剤を含む。そのような組合せは、本明細書に記載したまたは当業者が確認できる任意の用途のために使用できる。例えば、そのような組合せは、本明細書に記載した哺乳動物における感染性疾患、癌および/または自己免疫を治療、予防および/または改善する方法において使用できる。

30

【0054】

本開示は、細胞において結合剤を発現させる工程、およびその細胞またはその細胞の培養上清から結合剤を単離する工程により、本明細書に記載した結合剤を製造する方法も提供する。一部の実施形態では、そのような方法は、そのような結合剤をコードする核酸を発現させる工程をさらに含むことができる。一部の実施形態では、そのような方法は、単離後に結合剤を1種以上の医薬上許容される賦形剤と組み合わせる工程をさらに含むことができる。

40

【0055】

本開示によって、例えばPD-1とPD-L1との相互作用を遮断する第1結合剤、およびPD-1とPD-L1との相互作用を遮断しない第2結合剤などの、結合剤の組合せを製造する方法も提供される。一部の実施形態では、第2結合剤はPD-1に結合する。一部の実施形態では、第1および/または第2結合剤は、例えばモノクローナル抗体またはそれらの断片もしくは誘導体のような抗体である。一部の実施形態では、第2結合剤は、配列番号2、25、48、71、94および117のアミノ酸配列、または配列番号17、40、63、86、109および132のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、これらの方法は、医薬上許容される賦形剤の添加をさらに含むことができる。

50

【0056】

用語「約」、「およそ」などは、数値もしくは範囲のリストに先行する場合は、リストもしくは範囲内の各個別値が、その用語の直前に置かれているかのように、そのリストもしくは範囲内の各個別の値に独立して言及する。これらの用語は、それが言及する数値がその数値と正確に同一、それに近い、またはそれに類似することを意味する。

【0057】

本明細書で使用する「対象(subject)」もしくは「宿主」は、個体であることが意図されている。対象は、例えばネコおよびイヌ、家畜類（例えば、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジおよびヤギ）などの家畜化された動物、実験動物（例えば、マウス、ウサギ、ラット、モルモット）およびトリ類を含むことができる。1つの態様では、対象は、例えば霊長類もしくはヒトなどの哺乳動物である。

10

【0058】

「任意選択的(optional)」もしくは「任意選択的に(optionally)」は、続いて記載した事象もしくは状況が発生する場合がある、または発生しない場合があること、およびその記述が事象もしくは状況が発生する場合およびそれが発生しない場合を含むことを意味する。例えば、語句の「任意選択的に組成物が組合せを含み得る」は、その記述が組合せおよび組合せの非存在（すなわち、組合せの個別メンバー）の両方を含むように、その組成物が、異なる分子の組合せを含んでいてもまたは組合せを含まなくてもよいことを意味する。

【0059】

本明細書では、「範囲」は、約1つの特定値から、および/またはまた別の特定値まで表示することができる。そのような範囲が表示される場合、また別の態様は、1つの特定値から、および/または他の特定値までを含む。同様に、数値が近似値として表示される場合は、先行詞「約」もしくは「およそ」の使用によって、特定値がまた別の態様を形成すると理解されるであろう。さらに、範囲のそれぞれの終点は、他の終点に関連して、および他の終点からは独立しての両方で重要であることは理解されるであろう。範囲（例えば、90～100%）は、各数値が個別に列挙されているかのように範囲自体ならびにその範囲内の各独立値を含むことが意図されている。

20

【0060】

用語「組み合わせた(combined)」、「組み合わせて(in combination)」または「共に(in conjunction)」は、一緒に投与される薬剤の物理的組合せ、あるいは、特定疾患を治療、予防および/または改善するための治療計画における2種以上の薬剤の使用（例えば、物理的および/または時間において別個に投与される）を意味することができる。

30

【0061】

「治療する」、「予防する」および/または「改善する」の用語が、所定の状態のための所定の治療（例えば、HIVによる感染、癌を予防する）と関連して使用される場合、治療された患者がその状態の臨床的に観察可能なレベルを全く発生しない、または彼/彼女が治療を受けなかった場合より、よりゆっくりおよび/または少ない程度までしか発生しないことを伝えることを意図している。これらの用語は、患者が何であれその状態の態様を全く経験しない状況のみに限定されるものではない。例えば、「治療」は、状態の所定の発現を生じると予測される刺激物への患者の曝露中に与えられ、それが与えられなかった場合に予測されるよりも少ないおよび/またはより軽度の症状をその患者が経験する場合に、その状態を予防したと言われるであろう。例えば、治療は、患者が感染の軽度の明らかな症状しか示さない状態をもたらすことによって、感染を「予防する」ことができる；これは、微生物の感染による細胞の侵入があってはならないことを意味するものではない。

40

【0062】

同様に、特定の治療による所定の状態の予防、治療および/または改善と関連して本明細書に使用される「低減させる」、「低減させる工程」および/または「低減」は、典型的には、治療（例えば、1つ以上のPD-1結合剤の投与）の非存在下において感染症を

50

発生するコントロールもしくは基礎レベルと比較して、よりゆっくり、またはより少ない程度に感染症を対象が発生することを称する。感染症のリスクの低減は、患者が、感染の軽度の明らかな症状または感染の遅延された症状のみを示すことを生じさせ得る；これは、微生物の感染による細胞の侵入があってはならないことを意味するものではない。

【0063】

本開示の中で言及したすべての参考文献は、その全体が参照によりここに組み込まれる。下記の実施例では、所定の実施形態についてさらに記載する。これらの実施形態は、例示としてのみ提供され、決して特許請求項の範囲を限定することを意図していない。

【実施例】

【0064】

10

実施例 1

PD-1 結合剤の生成および特性解析

4種のマウス系統(マウス計16匹)を、2種のPD-1タンパク質、すなわちヒトPD-1Fc融合タンパク質およびヒトPD-1モノマータンパク質で免疫した。活性化ヒトTリンパ球上に発現されたPD-1に対して血清反応性を示すマウスを、抗PD-1ハイブリドーマ細胞株を作成するために選択した。組換えPD-1タンパク質に結合する抗体を作成するために、計240のPD-1ハイブリドーマ細胞株を選択した。第1ラウンドの抗体選択のための一次基準は：i)フローサイトメトリーによる活性化ヒトTリンパ球上のPD-1の染色；ii)既存の抗PD-1抗体と比較したCDR-VHおよびVL配列の多様性；および(iii)PD-1共役LuminesxビーズとPD-1上の様々なエピトープに結合する2種の市販の抗PD-1抗体との競合結合試験によって実施されるエピトープマッピングであった。第2ラウンドの選択は、次に：iv)親和性結合アッセイ(抗PD-1抗体の刺激能力とは相関しないので一次基準ではない)；v)PD-1に結合し、かつLuminesx生化学的アッセイにおいてPD-L1の結合と競合的、部分競合的または非競合的のいずれかである抗PD-1抗体の評価；およびvi)アゴニスト(T細胞を機能的疲弊から回復させられない)またはアンタゴニスト(T細胞を機能的疲弊から回復させられる)としての抗体の機能的特性解析；によって実施した。これらの試験では、抗体がHIV特異的疲弊CD8⁺T細胞における増殖を救済する能力に基づき、抗体を試験および識別した。

20

【0065】

30

個々の細胞培養ハイブリドーマ細胞クローンからの抗体上清の一次スクリーニングにおいて、HIV特異的CD8⁺T細胞の増殖に対する抗PD-1抗体の機能的効果を評価するためにEFRAアッセイを実施した(図2)。上方のボックス内の抗体クローン(E8-3、C2-3、E1-3、F3-3、H8-3、C10-2、G2-1、G3-2、H2-1およびH4-2)は、PD-1アンタゴニストとして作用して増殖を刺激するが、下方のボックス内の抗体クローン(C8-1およびG10-2)は作動性で、PD-1の負の調節作用(negative regulatory effect)を促進する。ペプチドコントロール(Pep8)によって誘導される増殖のレベルは、下方水平線(1%の直ぐ下)によって表示され、Merck MK-3475抗PD-1抗体により誘導された増殖は上方水平線(2%の直ぐ上)によって示される。これらのプロセスによって同定された関心抗体は、第2ラウンドのサブクロニングを受け、その結果得られたハイブリドーマクローンは、表2における抗体の製造および精製のために使用された。サブクロニングがPD-1に対する親和性を維持していることを確認するために、精製抗PD-1を用いて結合アッセイを実施した。抗PD-1抗体の細胞表面PD-1への濃度反応結合は、活性化CD4⁺T細胞上で評価した(図3)。

40

【0066】

EFRAは、機能的疲弊からT細胞を回復させるが必ずしも拮抗性ではない結合剤(これはPD-1とその生物学的リガンド(例えば、PD-L1またはPD-L2)との相互作用を必ずしも妨害しない結合剤であることを意味する)の選択を提供する。EFRAの実施形態は、PD-1に結合するそのような結合剤(抗体)を同定するためであった。P

50

D - 1 に結合する抗体のエピトープマッピングは、2つの別個の生物化学的アッセイを用いて実施した。1つのアッセイでは、PD - 1 Fc融合タンパク質標識ビーズへの競合的結合は、2種の市販の抗PD - 1抗体 (BMS - 5C4およびMK3475) のうちの1つと、列挙した (表2にも記載した) 抗PD - 1抗体との間で評価した。別個のエピトープに結合する4つのクラスのモノクローナル抗体を、このアッセイに基づいて同定した。これらは：クラス1 (PD - 1とPD - L1との相互作用を遮断する市販モノクローナル抗体クローンEH12.2H7と競合的)、クラス2 (PD - 1に結合するがPD - 1とPD - L1との相互作用を遮断しない市販モノクローナル抗体クローンJ116と競合的)、クラス3 (市販モノクローナル抗体EH12.2H7およびJ116の両方と競合的) およびクラス4 (市販抗体EH12.2H7およびJ116のどちらとも非競合的) である。図4において、細胞表面PD - 1に対するこれら抗体の相対結合を、コントロール抗PD - 1抗体に対する平均蛍光強度 (MFI) によって表わした。これらの結果は、緊密な結合抗体が4つ全ての結合クラスから同定されたことを示している。第2のLuminescence結合アッセイを使用して、抗PD - 1抗体が、PD - 1とPD - L1との間の相互作用を遮断するか否かを直接的に評価した。このアッセイは、表2に列挙した抗PD - 1抗体の様々な濃度の非存在下または存在下においてインキュベートしたPD - 1 Fc融合タンパク質被覆ビーズを用いて実施した。次に、PD - 1 / PD - L1相互作用のIC₅₀とほぼ等価である固定濃度のビオチン化PD - L1を、PD - 1 / 抗体複合体とインキュベートし、蛍光標識ストレプトアビジンを使用してPD - L1結合を検出した (図5a ~ cに示した代表的な結合曲線)。この生化学的アッセイを使用して、PD - 1 / PD - L1相互作用と競合的、部分競合的または非競合的であるとして抗体を規定した。PD - 1上の別個の部位に結合し、および高い結合親和性を示す競合的、部分競合的または非競合的抗体が同定された (表2)。PD - 1 Fc融合タンパク質被覆Luminescenceビーズを、20nMの表2からの抗PD - 1抗体とインキュベーションし、その後PD - 1 / 抗体複合体を様々な濃度のビオチン化PD - L1とインキュベーションすることにより、PD - 1に結合しかつPD - L1と非競合的または部分競合的である抗体のさらなる評価を実施した。図5d ~ fは、競合的抗PD - 1抗体がPD - 1とPD - L1との間の相互作用を完全に遮断することを示している。表2に列挙した部分競合的および非競合的抗PD - 1抗体は、PD - 1に対するPD - L1の結合親和性のシフトを生じさせるが、PD - L1の濃度が上昇した場合には相互作用を遮断しない。これら抗体の一部は、コントロール (図6aおよび6bにおける、ペプチド8単独コントロール、またはそのペプチドおよびIgG1アイソタイプコントロール抗体) と比較して増殖の統計的に有意な増加を示すことも証明された。クラス1の抗体 (PD - 1とPD - L1との相互作用を遮断する市販モノクローナル抗体EH12.2H7と競合的、またはPD - 1 / PD - L1相互作用アッセイにおいて競合的) は、概して、改善された増殖回復をもたらすことが特定された。複数回のEFRA実験からのデータを組み合わせ、および共通コンパレーターとしてのMK - 3475を使用して、図7は、表2に記載した選択抗体が、ベンチマークMK - 3475抗体と比較して、同等または統計的に改善された活性 (p < 0.007) を示したことを証明している。

【0067】

実施例2

抗体の組合せ

様々なPD - 1エピトープに結合する抗体の組合せが、機能的疲弊回復アッセイにおいて、HIVペプチド特異的CD8 T細胞増殖の回復を増強することが見いだされた (図8)。抗体タイプ間の相乗作用も観察された。例えば、クラス1 (図8におけるMK - 3475) およびクラス2 (図8における139D6) の抗体が同時にPD - 1に結合することが特定された。MK - 3475について観察された最高の刺激は、HIVペプチドに対して一貫して約200%であるが、5μg/mlでのMK - 3475および139D6モノクローナル抗体の組合せは、HIVペプチドコントロール単独に対してHIV特異的CD8 T細胞増殖の288%の増加、またはMK - 3475もしくは139D6添加

10

20

30

40

50

単独に対して144%の増殖増加をもたらし、相乗作用を示した(図8)。増殖におけるこの相乗的増加は、数回の実験による試験において0.007の統計的有意なp値をもって観察された。比較として、MK-3475または139D6いずれか単独の10 μ g/mlの添加は、EFAにおける増殖増加を生じさせなかった。そこで、PD-1とPD-L1との相互作用を遮断する第1結合剤およびPD-1とPD-L1との相互作用を遮断しない第2結合剤のような、結合剤の組合せは、T細胞を疲弊から救済するために相乗的に作用すると決定された。

【0068】

所定の実施形態について好ましい実施形態に関して記載してきたが、当業者は、変形および修飾を思い付くであろうと理解されている。このため、添付の特許請求項が以下の特許請求項の範囲内に含まれるそのような同等の変形全てに及ぶと意図されている。

【0069】

参考文献

1. Chun TW et al. Nature 387:183-188, 1997
2. Chun TW et al. Proc Natl Acad Sci USA 94:13193-13197, 1997
3. Finzi D et al. Science 278:1295-1300, 1997
4. Chomont N et al. Nat Med 15:893-900, 2009
5. Siliciano JD et al. Nat Med 9:727-728, 2003
6. Perreau M et al. J Exp Med 210:143-156, 2013
7. Rong L and Perelson A J Theoret Biol 260:308-331, 2009
8. Sigal A et al. Nature 477:95-98, 2011
9. Katlama C et al. Lancet 381:2109-2117, 2013
10. Hansen SG et al. Nature 503:100-106, 2013
11. Klein F et al. Nature 492:518-522, 2012
12. Barouch DH et al. Nature 503:224-228, 2013
13. Trautmann L et al. Nat Med 12:1198-1202, 2006
14. Day CL et al. Nature 443:350-354, 2006
15. Archin NM et al. Nature 487:482-485, 2012
16. Sievers EL and Senter PD Annu Rev Med 64:15-29, 2013
17. Zolot RS et al. Nat Rev Drug Discov 4:259-260, 2013

【 図 1 】

A. マウスPD-1(GenBankアクセッション番号CAA48113.1,Ishida,et al.EMBO J.11(11): 3887-3895(1992))

```

1  mvvrqvpwswf twavqlqgwz sgwllvpng pwrsltfypa wltvsegana tftcslsnws
61  edmlnwnrl spsnqtekqa afcnglsqpv qdarfqiql pnrhdhnmni ldtrrndsgl
121 ylcgaislap kakikespa elvvtterile tstryppsp kpegrfmgmv igimsalvgi
181 pvlllllwal avfcetmme argagskddt lkeepsaapv psavayeldf qgrektpeip
241 tacvhteyat ivfteglgas amgrzgsadg lqsprrprhe dghcswpl
(配列番号140)

```

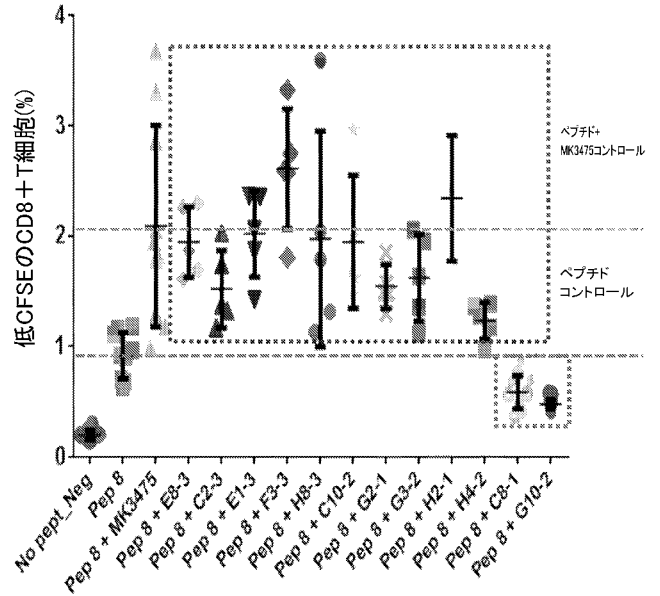
B. ヒトPD-1(GenBankアクセッション番号AAC51773.1,Finger,et al.Gene 197(1-2): 177-187(1997))

```

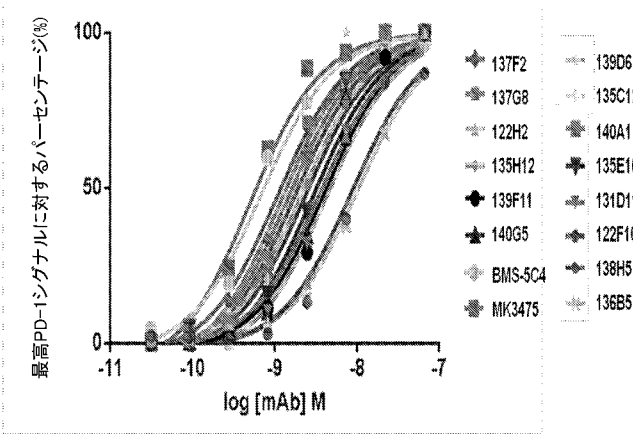
1  mqipqapwv vwavlqgwz pgwildspdr pwnpftfpa llvvtgedna tftcslsnws
61  esfvlnwrym spsnqtekqa afcnglsqpv qdarfqiql pnrhdhnmni ldtrrndsgl
121 ylcgaislap kakikesira elvvtterae vptahpspsp rpaggfqtiv vgvvggllgs
181 lvllwvlav icrsraargti garrrtgplk edpaavpvs vdygelfqw rektpeppvw
241 cvpeqtayat ivfpagmgts sparrgsadg prsaqplrpe dghcswpl
(配列番号141)

```

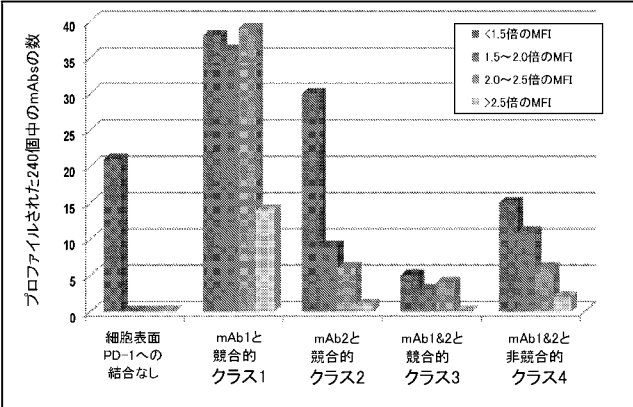
【 図 2 】



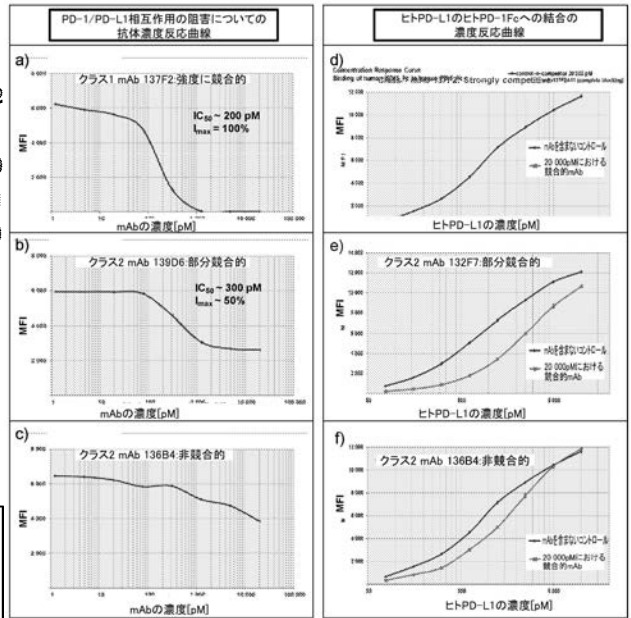
【 図 3 】



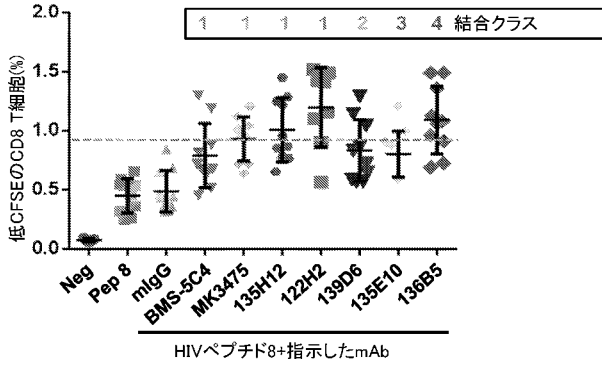
【 図 4 】



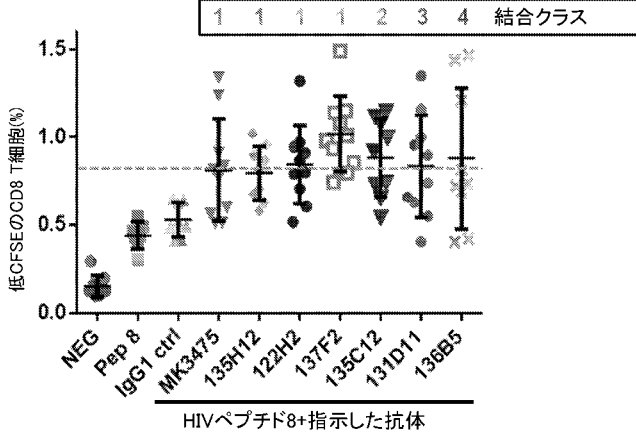
【 図 5 】



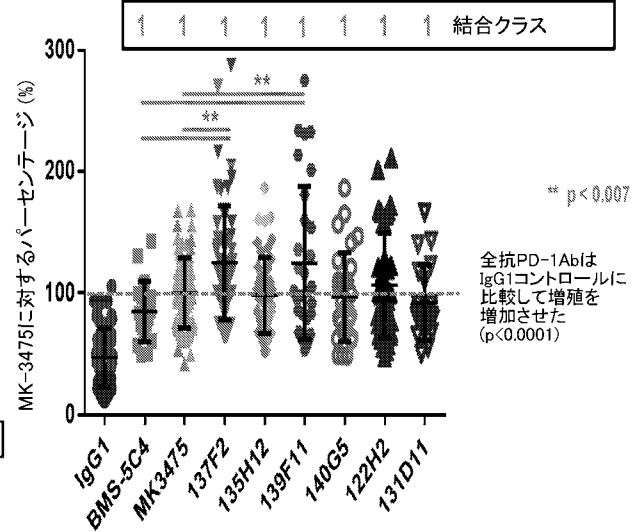
【 図 6 a 】



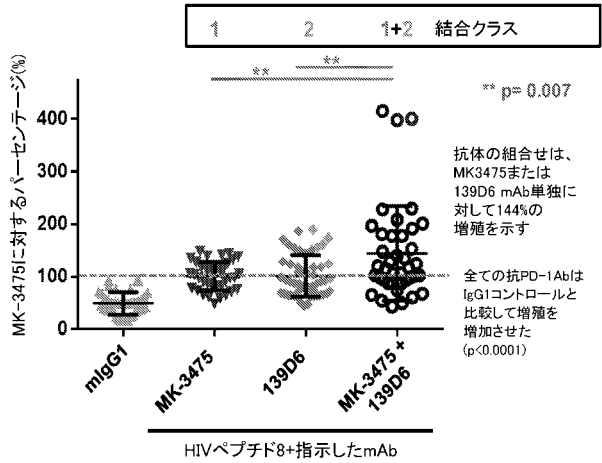
【 図 6 b 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2015/055943

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 ADD.		
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		
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) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/056875 A1 (WYETH CORP [US]; CAMBRIDGE ANTIBODY TECH [GB]; COLLINS MARY [US]; WOOD) 8 July 2004 (2004-07-08) paragraph [0010] paragraph [0011] paragraph [0012]	1-38, 52-54
X	WO 2006/121168 A1 (ONO PHARMACEUTICAL CO [JP]; MEDAREX INC [US]; KORMAN ALAN J; SRINIVASA) 16 November 2006 (2006-11-16) page 2, paragraph 4 - page 8, paragraph 5 claims 9-34 claims 62,65,66 page 9, paragraph 5	1-38, 52-54
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 4 November 2015		Date of mailing of the international search report 27/01/2016
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Irion, Andrea

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2015/055943

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/110621 A1 (UCB PHARMA SA [BE]; TYSON KERRY LOUISE [GB]) 15 September 2011 (2011-09-15) page 4, lines 20-22 page 6, lines 15-27 -----	1-38, 52-54
X	WO 2012/145493 A1 (AMPLIMUNE INC [US]; LANGERMANN SOLOMON [US]; LIU LINDA [US]; MARSHALL) 26 October 2012 (2012-10-26) paragraphs [0028] - [0030] paragraph [0032] claims 17-20 -----	1-38, 52-54
X	WO 2013/019906 A9 (GENENTECH INC [US]; HOFFMANN LA ROCHE [CH]; MAECKER HEATHER [US]; IRVI) 20 March 2014 (2014-03-20) paragraph [0014] claims 8-12, 49 -----	1-38, 52-54
X	WO 2013/169693 A1 (SQUIBB BRISTOL MYERS CO [US]) 14 November 2013 (2013-11-14) paragraphs [0007] - [0012] paragraph [0103] -----	1-38, 52-54
X	WO 2014/055648 A1 (SQUIBB BRISTOL MYERS CO [US]) 10 April 2014 (2014-04-10) page 3, paragraph 3 - page 8, paragraph 1 -----	1-38, 52-54
X	US 8 735 553 B1 (LI KANG [CN] ET AL) 27 May 2014 (2014-05-27) abstract column 2, line 29 - column 6, line 23 examples 1-11 -----	1-38, 52-54
A	R. MOREIRA DA SILVA: "Nivolumab: Anti-PD-1 monoclonal antibody cancer immunotherapy", DRUGS OF THE FUTURE, vol. 39, no. 1, 1 January 2014 (2014-01-01), pages 15-24, XP055199597, ES ISSN: 0377-8282, DOI: 10.1358/dof.2014.039.01.2103754 the whole document ----- -/--	1-38, 52-54

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2015/055943

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>EDWARD SEUNG ET AL: "PD-1 Blockade in Chronically HIV-1-Infected Humanized Mice Suppresses Viral Loads", PLOS ONE, vol. 8, no. 10, 21 October 2013 (2013-10-21), page e77780, XP055225451, DOI: 10.1371/journal.pone.0077780 abstract page 2, right-hand column, paragraph 6 -----</p>	1-38, 52-54
A	<p>BASILE SIEWE ET AL: "Regulatory B Cells Inhibit Cytotoxic T Lymphocyte (CTL) Activity and Elimination of Infected CD4 T Cells after In Vitro Reactivation of HIV Latent Reservoirs", PLOS ONE, vol. 9, no. 4, 16 April 2014 (2014-04-16), page e92934, XP055225452, DOI: 10.1371/journal.pone.0092934 abstract -----</p>	1-38, 52-54

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2015/055943**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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
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).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

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

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-38, 52-54(all partially)

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2015/055943

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004056875 A1	08-07-2004	AT 514713 T	15-07-2011
		AU 2003288675 A1	14-07-2004
		AU 2010235966 A1	11-11-2010
		BR 0316880 A	25-10-2005
		CA 2508660 A1	08-07-2004
		CN 1753912 A	29-03-2006
		CN 101899114 A	01-12-2010
		EP 1576014 A1	21-09-2005
		ES 2367430 T3	03-11-2011
		HK 1083510 A1	16-12-2011
		IL 169152 A	30-11-2010
		JP 4511943 B2	28-07-2010
		JP 2006521783 A	28-09-2006
		JP 2010189395 A	02-09-2010
		MX PA05006828 A	08-09-2005
		NO 336442 B1	17-08-2015
		US 2004213795 A1	28-10-2004
		US 2006210567 A1	21-09-2006
		US 2008311117 A1	18-12-2008
		US 2010028330 A1	04-02-2010
WO 2004056875 A1	08-07-2004		
WO 2006121168 A1	16-11-2006	AU 2006244885 A1	16-11-2006
		BR PI0610235 A2	08-06-2010
		CA 2607147 A1	16-11-2006
		CN 103059138 A	24-04-2013
		DK 2161336 T3	28-10-2013
		EP 1896582 A1	12-03-2008
		EP 2161336 A1	10-03-2010
		EP 2418278 A2	15-02-2012
		EP 2439272 A2	11-04-2012
		EP 2439273 A2	11-04-2012
		ES 2427646 T3	31-10-2013
		HK 1140793 A1	27-06-2014
		IL 187108 A	30-06-2011
		IL 208642 A	30-08-2012
		JP 4361545 B2	11-11-2009
		JP 5028700 B2	19-09-2012
		JP 2006340714 A	21-12-2006
		JP 2009155338 A	16-07-2009
		JP 2012158605 A	23-08-2012
		JP 2014077015 A	01-05-2014
		KR 20080011428 A	04-02-2008
		KR 20130032908 A	02-04-2013
		KR 20130114226 A	16-10-2013
		NZ 563193 A	28-05-2010
		PT 2161336 E	03-10-2013
		RU 2010135087 A	27-02-2012
		RU 2013133714 A	27-01-2015
		TW 1379898 B	21-12-2012
		US 2009217401 A1	27-08-2009
		US 2013133091 A1	23-05-2013
		US 2014212422 A1	31-07-2014
		US 2014294852 A1	02-10-2014
US 2014328833 A1	06-11-2014		
US 2014348743 A1	27-11-2014		
US 2015165025 A1	18-06-2015		
WO 2006121168 A1	16-11-2006		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2015/055943

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011110621 A1	15-09-2011	AR 080501 A1	11-04-2012
		CA 2791944 A1	15-09-2011
		CN 102892785 A	23-01-2013
		EP 2545076 A1	16-01-2013
		JP 2013521769 A	13-06-2013
		TW 201134488 A	16-10-2011
		US 2011229461 A1	22-09-2011
		WO 2011110621 A1	15-09-2011
		WO 2012145493 A1	26-10-2012
CA 2833636 A1	26-10-2012		
CN 103608040 A	26-02-2014		
EP 2699264 A1	26-02-2014		
JP 2014523401 A	11-09-2014		
KR 20140048121 A	23-04-2014		
RU 2013151455 A	27-05-2015		
US 2014044738 A1	13-02-2014		
WO 2012145493 A1	26-10-2012		
WO 2013019906 A9	20-03-2014	AR 087405 A1	19-03-2014
		AU 2012290121 A1	09-05-2013
		CA 2843595 A1	07-02-2013
		CN 103842030 A	04-06-2014
		CO 6900118 A2	20-03-2014
		CR 20140034 A	23-07-2014
		EA 201490369 A1	29-08-2014
		EC SP14013223 A	31-03-2014
		EP 2739358 A1	11-06-2014
		JP 2014525918 A	02-10-2014
		KR 20140063643 A	27-05-2014
		MA 35366 B1	01-08-2014
		PE 16932014 A1	24-11-2014
		TW 201318638 A	16-05-2013
		US 2014341902 A1	20-11-2014
		WO 2013019906 A1	07-02-2013
WO 2013169693 A1	14-11-2013	NONE	
WO 2014055648 A1	10-04-2014	AU 2013327116 A1	16-04-2015
		CA 2887027 A1	10-04-2014
		CN 104837868 A	12-08-2015
		EA 201590671 A1	30-10-2015
		EP 2904011 A1	12-08-2015
		JP 2015532292 A	09-11-2015
		KR 20150067227 A	17-06-2015
		US 2015290316 A1	15-10-2015
		WO 2014055648 A1	10-04-2014
US 8735553 B1	27-05-2014	TW 201538525 A	16-10-2015
		US 8735553 B1	27-05-2014
		US 2015079109 A1	19-03-2015
		US 2015315274 A1	05-11-2015
		WO 2015035606 A1	19-03-2015

International Application No. PCT/ IB2015/ 055943

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-38, 52-54(all partially)

anti-PD-1 antibody comprising the CDRs referred to as SEQ ID NO. 1, 24, 47, 70, 93, and 116 (derived from antibody designated 122F10)

2. claims: 1-38, 52-54(all partially)

anti-PD-1 antibody comprising the CDRs referred to as SEQ ID NO. 2, 25, 48, 71, 94, and 117 (derived from antibody designated 139D6)

3. claims: 1-38, 52-54(all partially)

anti-PD-1 antibody comprising the CDRs referred to as SEQ ID NO. 3, 26, 49, 72, 95, and 118 (derived from antibody designated 135D1)

4. claims: 1-38, 52-54(all partially)

anti-PD-1 antibody comprising the CDRs referred to as SEQ ID NO. 4, 27, 50, 73, 96, and 119 (derived from antibody designated 134D2)

5. claims: 1-38, 52-54(all partially)

anti-PD-1 antibody comprising the CDRs referred to as SEQ ID NO. 5, 28, 51, 74, 97, and 120 (derived from antibody designated 121G1)

6. claims: 1-38, 52-54(all partially)

anti-PD-1 antibody comprising the CDRs referred to as SEQ ID NO. 6, 29, 52, 75, 98, and 121 (derived from antibody designated 136B5)

7. claims: 1-38, 52-54(all partially)

anti-PD-1 antibody comprising the CDRs referred to as SEQ ID NO. 7, 30, 53, 76, 99, and 122 (derived from antibody designated 127C2)

8. claims: 1-38, 52-54(all partially)

anti-PD-1 antibody comprising the CDRs referred to as SEQ ID

International Application No. PCT/IB2015/055943

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

NO. 8, 31, 54, 77, 100, and 123 (derived from antibody designated 137F2)

9. claims: 1-38, 52-54(all partially)

anti-PD-1 antibody comprising the CDRs referred to as SEQ ID NO. 9, 32, 55, 78, 101, and 124 (derived from antibody designated 138H5)

10. claims: 1-38, 52-54(all partially)

anti-PD-1 antibody comprising the CDRs referred to as SEQ ID NO. 10, 33, 56, 79, 102, and 125 (derived from antibody designated 140A1)

11. claims: 1-38, 52-54(all partially)

anti-PD-1 antibody comprising the CDRs referred to as SEQ ID NO. 11, 34, 57, 80, 103, and 126 (derived from antibody designated 135H12)

12. claims: 1-38, 52-54(all partially)

anti-PD-1 antibody comprising the CDRs referred to as SEQ ID NO. 12, 35, 58, 81, 104, and 127 (derived from antibody designated 131D11)

13. claims: 1-38, 52-54(all partially)

anti-PD-1 antibody comprising the CDRs referred to as SEQ ID NO. 13, 36, 59, 82, 105, and 128 (derived from antibody designated 132F7)

14. claims: 1-38, 52-54(all partially)

anti-PD-1 antibody comprising the CDRs referred to as SEQ ID NO. 14, 37, 60, 83, 106, and 129 (derived from antibody designated 126E4)

15. claims: 1-38, 52-54(all partially)

anti-PD-1 antibody comprising the CDRs referred to as SEQ ID NO. 15, 38, 61, 84, 107, and 130 (derived from antibody designated 135G1)

16. claims: 1-38, 52-54(all partially)

International Application No. PCT/IB2015/055943

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

anti-PD-1 antibody comprising the CDRs referred to as SEQ ID NO. 16, 39, 62, 85, 108, and 131 (derived from antibody designated 136E10)

17. claims: 1-38, 52-54(all partially)

anti-PD-1 antibody comprising the CDRs referred to as SEQ ID NO. 17, 40, 63, 86, 109, and 132 (derived from antibody designated 135C12)

18. claims: 1-38, 52-54(all partially)

anti-PD-1 antibody comprising the CDRs referred to as SEQ ID NO. 18, 41, 64, 87, 110, and 133 (derived from antibody designated 136F4)

19. claims: 1-38, 52-54(all partially)

anti-PD-1 antibody comprising the CDRs referred to as SEQ ID NO. 19, 42, 65, 88, 111, and 134 (derived from antibody designated 136B4)

20. claims: 1-38, 52-54(all partially)

anti-PD-1 antibody comprising the CDRs referred to as SEQ ID NO. 20, 43, 66, 89, 112, and 135 (derived from antibody designated 135E10)

21. claims: 1-38, 52-54(all partially)

anti-PD-1 antibody comprising the CDRs referred to as SEQ ID NO. 21, 44, 67, 90, 113, and 136 (derived from antibody designated 140G5)

22. claims: 1-38, 52-54(all partially)

anti-PD-1 antibody comprising the CDRs referred to as SEQ ID NO. 22, 45, 68, 91, 114, and 137 (derived from antibody designated 122H2)

23. claims: 1-38, 52-54(all partially)

anti-PD-1 antibody comprising the CDRs referred to as SEQ ID NO. 23, 46, 69, 92, 115, and 138 (derived from antibody designated 139F11)

24. claims: 39-50(completely); 14, 25-36(partially)

International Application No. PCT/IB2015/055943

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

a combination of an anti-PD-1 antibody that blocks the interaction of PD-1 and PD-L1, and an anti-PD-1 antibody that does not block the interaction of PD-1 and PD-L1, a method for producing said combination and a method for using said combination.

25. claim: 51

Method for identifying a PD-1 antibody binding agent, the method comprising:

- a) assaying a candidate PD-1 binding agent by the exhaustion functional recovery assay (EFRA);
- b) determining the affinity of the candidate binding agent for PD-1; and
- c) determining the nucleotide sequence of the CDR of the candidate binding agent.

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	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10		
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395		N
A 6 1 P	31/18	(2006.01)	A 6 1 P	31/18		
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00		
A 6 1 K	35/12	(2015.01)	A 6 1 K	35/12		
A 6 1 P	31/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/00		
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00		
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06		
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1	
A 6 1 K	45/06	(2006.01)	A 6 1 K	45/00		
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	A 6 1 K	45/06		
G 0 1 N	33/15	(2006.01)	G 0 1 N	33/53		D
C 0 7 K	17/06	(2006.01)	G 0 1 N	33/15		Z
C 0 7 K	7/08	(2006.01)	C 0 7 K	17/06		
C 0 7 K	14/47	(2006.01)	C 0 7 K	7/08		
C 0 7 K	16/18	(2006.01)	C 0 7 K	14/47		
C 0 7 K	16/46	(2006.01)	C 0 7 K	16/18		
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K	16/46		
			C 0 7 K	19/00		

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

(72)発明者 フェンウィック, クレイグ

スイス国 C H - 1 0 0 5 ローザンヌ アヴェニュー デュ レマン 3 6

Fターム(参考) 4B065 AA90X AA90Y AA95X AA95Y AB01 AC14 BA01 CA24 CA25 CA44
 4C084 AA02 AA13 AA17 AA20 BA01 BA16 BA17 BA18 BA20 BA23
 NA14 ZB211 ZC411 ZC412
 4C085 AA14 AA25 AA27 BB31 BB33 BB34 BB35 BB36 BB37 BB41
 BB42 BB43 BB50 CC23 EE01
 4C087 AA01 BB65 NA14 ZC41
 4H045 AA10 AA30 BA10 BA13 BA14 BA15 BA16 BA17 CA40 EA20
 EA50

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2017531028A5	公开(公告)日	2018-09-20
申请号	JP2017526774	申请日	2015-08-05
[标]申请(专利权)人(译)	MABQUEST		
[标]发明人	パンタレオジュゼッペ フェンウィッククレイグ		
发明人	パンタレオ,ジュゼッペ フェンウィック,クレイグ		
IPC分类号	A61K38/04 C12N15/02 C12N11/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61P43/00 A61K39/395 A61P31/18 A61K48/00 A61K35/12 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/06 A61K45/00 A61K45/06 G01N33/53 G01N33 /15 C07K17/06 C07K7/08 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/46 C07K19/00		
CPC分类号	A61K2039/507 C07K16/2818 C07K2317/74 A61P31/00 A61P31/18 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P43/00 C07K16/1063 C07K2317/21 C07K2317/24 C07K2317/31 C07K2317/565 C07K2317/75 C07K2317/76 C07K2317/92 G01N33/6893		
FI分类号	A61K38/04.ZNA C12N15/00.C C12N11/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61P43/00.105 A61K39/395. N A61P31/18 A61K48/00 A61K35/12 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/06 A61P43/00.111 A61K45/00 A61K45/06 G01N33/53.D G01N33/15.Z C07K17/06 C07K7/08 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/46 C07K19/00		
F-TERM分类号	4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AA95X 4B065/AA95Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/AA20 4C084 /BA01 4C084/BA16 4C084/BA17 4C084/BA18 4C084/BA20 4C084/BA23 4C084/NA14 4C084/ZB211 4C084/ZC411 4C084/ZC412 4C085/AA14 4C085/AA25 4C085/AA27 4C085/BB31 4C085/BB33 4C085 /BB34 4C085/BB35 4C085/BB36 4C085/BB37 4C085/BB41 4C085/BB42 4C085/BB43 4C085/BB50 4C085/CC23 4C085/EE01 4C087/AA01 4C087/BB65 4C087/NA14 4C087/ZC41 4H045/AA10 4H045 /AA30 4H045/BA10 4H045/BA13 4H045/BA14 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/CA40 4H045/EA20 4H045/EA50		
代理人(译)	高桥秀明		
优先权	62/033177 2014-08-05 US 62/053366 2014-09-22 US 62/093368 2014-12-17 US		
其他公开文献	JP6629321B2 JP2017531028A		

摘要(译)

本公开内容提供了对程序性细胞死亡1 (PD-1) 具有特异性, 并用于治疗, 预防和/或改善传染性疾病 (例如人免疫缺陷病毒 (HIV)), 癌症和/或自身免疫的结合剂。关于如何使用它。

