

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号
特許第6883590号
(P6883590)

(45) 発行日 令和3年6月9日 (2021. 6. 9)

(24) 登録日 令和3年5月12日 (2021. 5. 12)

(51) Int. Cl.	F I
C O 7 K 16/28 (2006. 01)	C O 7 K 16/28 Z N A
C O 7 K 16/30 (2006. 01)	C O 7 K 16/30
A 6 1 K 39/395 (2006. 01)	A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 P 35/00 (2006. 01)	A 6 1 K 39/395 T
A 6 1 P 35/02 (2006. 01)	A 6 1 K 39/395 U

請求項の数 18 (全 38 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-559164 (P2018-559164)	(73) 特許権者 514291864 ソレント・セラピューティクス・インコーポレイテッド Sorrento Therapeutics, Inc. アメリカ合衆国92121カリフォルニア州サンディエゴ、ダイレクターズ・プレイス4955番
(86) (22) 出願日 平成29年1月27日 (2017. 1. 27)	
(65) 公表番号 特表2019-507183 (P2019-507183A)	
(43) 公表日 平成31年3月14日 (2019. 3. 14)	
(86) 国際出願番号 PCT/US2017/015429	
(87) 国際公開番号 W02017/132562	
(87) 国際公開日 平成29年8月3日 (2017. 8. 3)	
審査請求日 令和1年11月15日 (2019. 11. 15)	
(31) 優先権主張番号 62/288, 912	(74) 代理人 100078282 弁理士 山本 秀策
(32) 優先日 平成28年1月29日 (2016. 1. 29)	(74) 代理人 100113413 弁理士 森下 夏樹
(33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)	(74) 代理人 100181674 弁理士 飯田 貴敏

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 PD-L1 に結合する抗原結合性タンパク質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

PD-L1 エピトープに結合する IgG クラスの完全ヒト抗体であって、ここで、抗体が、配列番号 1 に示すアミノ酸配列と少なくとも 95% 同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含み、かつ配列番号 2 または配列番号 3 に示すアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含み、重鎖可変ドメインが、それぞれ配列番号 5、配列番号 6 および配列番号 7 のアミノ酸配列に示す CDR1 ドメイン、CDR2 ドメインおよび CDR3 ドメインを含む、完全ヒト抗体。

【請求項 2】

PD-L1 エピトープに結合する IgG クラスの完全ヒト抗体であって、ここで、抗体がそれぞれ配列番号 5、配列番号 6 および配列番号 7 のアミノ酸配列に示す CDR1 ドメイン、CDR2 ドメインおよび CDR3 ドメインを含む重鎖可変ドメインならびに配列番号 2 または配列番号 3 に示すアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む、完全ヒト抗体。

【請求項 3】

配列番号 1 / 配列番号 2 または配列番号 1 / 配列番号 3 の重鎖 / 軽鎖可変ドメインアミノ酸配列組み合わせを有する、請求項 2 に記載の完全ヒト抗体。

【請求項 4】

IgG1 または IgG4 である、請求項 1 ~ 3 の何れか一項に記載の完全ヒト抗体。

【請求項 5】

10

20

重鎖からの可変ドメインおよび軽鎖からの可変ドメインを有する抗 P D - L 1 F a b 完全ヒト抗体フラグメントであって、ここで、重鎖可変ドメインが配列番号 1 に示すアミノ酸配列と少なくとも 95 % 同一であるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変ドメインが配列番号 2 または配列番号 3 に示すアミノ酸配列を含み、重鎖可変ドメインが、それぞれ配列番号 5、配列番号 6 および配列番号 7 のアミノ酸配列に示す C D R 1 ドメイン、C D R 2 ドメインおよび C D R 3 ドメインを含む、完全ヒト抗体 F a b フラグメント。

【請求項 6】

抗体が配列番号 1 / 配列番号 2 または配列番号 1 / 配列番号 3 の重鎖 / 軽鎖可変ドメインアミノ酸配列組み合わせを有する、請求項 5 に記載の完全ヒト抗体 F a b フラグメント。

10

【請求項 7】

ペプチドリinker を介して連結した重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを有する抗 P D - L 1 一本鎖ヒト抗体であって、ここで、重鎖可変ドメインが配列番号 1 に示すアミノ酸配列と少なくとも 95 % 同一であるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変ドメインが配列番号 2 または配列番号 3 に示すアミノ酸配列を含み、重鎖可変ドメインが、それぞれ配列番号 5、配列番号 6 および配列番号 7 のアミノ酸配列に示す C D R 1 ドメイン、C D R 2 ドメインおよび C D R 3 ドメインを含む、抗 P D - L 1 一本鎖ヒト抗体。

【請求項 8】

一本鎖ヒト抗体が配列番号 1 / 配列番号 2 または配列番号 1 / 配列番号 3 の重鎖 / 軽鎖可変ドメインアミノ酸配列組み合わせを有する、請求項 7 に記載の抗 P D - L 1 一本鎖ヒト抗体。

20

【請求項 9】

配列番号 2 の軽鎖可変ドメインアミノ酸配列を有する、請求項 1 ~ 4 の何れか一項に記載の完全ヒト抗体、請求項 5 または 6 に記載の抗 P D - L 1 F a b 完全ヒト抗体フラグメント、あるいは請求項 7 または 8 に記載の抗 P D - L 1 一本鎖ヒト抗体。

【請求項 10】

配列番号 3 の軽鎖可変ドメインアミノ酸配列を有する、請求項 1 ~ 4 の何れか一項に記載の完全ヒト抗体、請求項 5 または 6 に記載の抗 P D - L 1 F a b 完全ヒト抗体フラグメント、あるいは請求項 7 または 8 に記載の抗 P D - L 1 一本鎖ヒト抗体。

【請求項 11】

癌または自己免疫性または炎症性疾患を有するヒト対象を処置するための医薬組成物であって、請求項 1 ~ 3、9 または 10 の何れか一項に記載の完全ヒト抗体を有効成分として含む、医薬組成物。

30

【請求項 12】

癌または自己免疫性または炎症性疾患を有するヒト対象を処置するための医薬組成物であって、請求項 5、6、9 または 10 の何れか一項に記載の抗 P D - L 1 F a b 完全ヒト抗体フラグメントを有効成分として含む、医薬組成物。

【請求項 13】

癌または自己免疫性または炎症性疾患を有するヒト対象を処置するための医薬組成物であって、請求項 7 ~ 10 の何れか一項に記載の抗 P D - L 1 一本鎖ヒト抗体を有効成分として含む、医薬組成物。

40

【請求項 14】

癌が卵巣癌、結腸癌、乳癌、肺癌、骨髄腫、神経芽細胞由来 C N S 腫瘍、単球性白血病、B 細胞由来白血病、T 細胞由来白血病、B 細胞由来リンパ腫、T 細胞由来リンパ腫および肥満細胞由来腫瘍からなる群から選択される、請求項 11 ~ 13 の何れか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

自己免疫性または炎症性疾患が腸粘膜炎症、大腸炎と関連する消耗性疾患、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、ウイルス感染、リウマチ性関節炎、骨関節症、乾癬、クローン病および炎症性腸疾患からなる群から選択される、請求項 11 ~ 13 の何れか一項に

50

記載の医薬組成物。

【請求項 1 6】

哺乳動物宿主細胞において産生される、請求項 1 ~ 3、9 または 1 0の何れか一項に記載の抗体。

【請求項 1 7】

哺乳動物宿主細胞がチャイニーズハムスター卵巣(C H O)細胞である、請求項 1 6に記載の抗体。

【請求項 1 8】

請求項 1 ~ 3、9 または 1 0の何れか一項に記載の抗体および薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願

本出願は、2 0 1 6 年 1 月 2 9 日出願の米国仮特許出願 6 2 / 2 8 8 , 9 1 2 に基づく優先権を主張し、その全内容を引用により明示的に本明細書に包含させる。

【0 0 0 2】

配列表

本出願は、ASCII形式で電子的に提供し、引用によりその全体を本明細書に包含させる、配列表を含む。該ASCIIコピーは、2 0 1 7 年 1 月 2 7 日に作成し、126036-06620_ST25 .txtなる名称であり、8 . 0 キロバイトサイズである。

【0 0 0 3】

技術分野

本発明は、高収率で製造される、改善された能力を有する、抗 P D - L 1 I g G クラス抗体を提供する。より具体的に、本発明は、P D - L 1 に結合するヒト抗体、このような抗体の P D - L 1 結合フラグメントおよび誘導体およびこのようなフラグメントを含む P D - L 1 結合性ポリペプチドを提供する。

【背景技術】

【0 0 0 4】

背景

プログラム死リガンド 1 (P D - L 1) は、4 0 kDa 1 型膜貫通タンパク質である。P D - 1 のリガンドである P D - L 1 (ヒト P D - L 1 c D N A は EMBL / GenBank Acc. No. NM_001267706 により示される塩基配列からなり、マウス P D - L 1 c D N A は NM_021893 により示される塩基配列からなる) は、活性化単球および樹状細胞などのいわゆる抗原提示細胞に発現される。これらの細胞は、T リンパ球に多様な免疫誘導型シグナルを誘発する相互作用分子を提示し、P D - L 1 は P D - 1 との結合により阻害性シグナルを誘導する、これら分子の 1 つである。P D - L 1 結合は、P D - 1 発現 T リンパ球の活性化 (細胞増殖および種々のサイトカイン産生の誘発) を抑制することが確認されている。P D - L 1 発現は、免疫担当細胞だけでなく、ある種の腫瘍細胞株 (単球性白血病由来細胞株、肥満細胞由来細胞株、肝臓癌由来細胞株、神経芽細胞由来細胞株および乳癌由来細胞株) でも確認されている (Nature Immunology (2001), vol. 2, issue 3, p. 261-267.) 。

【0 0 0 5】

プログラム死 1 (P D - 1) は、C D 2 8、C T L A - 4、I C O S、P D - L 1 および B T L A を含む、受容体の C D 2 8 ファミリーのメンバーである。このファミリーの最初のメンバー、C D 2 8 は、モノクローナル抗体添加後の T 細胞増殖増強に対する機能効果により発見された (Hutloff et al. (1999) Nature 397:263-266; Hansen et al. (1980) Immunogenics 10:247-260) 。 P D - 1 に対する 2 種の細胞表面糖タンパク質リガンド、P D - L 1 および P D L - 2 が同定されており、P D - 1 への結合により T 細胞活性化およびサイトカイン分泌を下方制御することが示されている (Freeman et al. (2000) J. Exp. Med. 192:1027-34; Latchman et al. (2001) Nat. Immunol. 2:261-8; Carter et al. (

10

20

30

40

50

2002) Eur. J. Immunol. 32:634-43; Ohigashi et al. (2005) Clin. Cancer Res. 11:2947-53)。PD-L1(B7-H1)およびPD-L2(B7-DC)の両方とも、PD-1に結合するB7ホモログである。細胞表面へのPD-L1の発現は、IFN-刺激により上方制御されることも示されている。

【0006】

PD-L1発現は、ヒト肺、卵巣および結腸癌および種々の骨髄腫を含む数種のマウスおよびヒト癌で見られている(Iwai et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:12293-7; Ohigashi et al. (2005) Clin. Cancer Res. 11:2947-53)。PD-L1は、抗原特異的T細胞クローンのアポトーシスを増加させることにより、腫瘍免疫において役割を有することが示唆されている(Dong et al. (2002) Nat. Med. 8:793-800)。PD-L1は腸

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

発明の概要

本発明は、野生型重鎖として配列番号213を、軽鎖として配列番号214を有し、米国特許出願米国特許公開2013-0323249号(2013年5月31日出願の13/907,685号)(その開示は、引用により本明細書に包含させる)に開示されている抗体(H6B1Lと呼ばれる)が、アミノ末端が開裂する条件下で、十分な量で製造できなかったことを見出したことに基づく。従って、本発明は、特に、CHO細胞で、軽鎖開裂を伴わずに製造できる、バリエーションH6B1L抗体を提供する。

20

【課題を解決するための手段】

【0008】

ある実施態様において、本発明は、PD-L1エピトープに結合するIgGクラスの完全ヒト抗体を提供し、これは、配列番号1のアミノ酸配列と少なくとも95%同一である重鎖可変ドメイン配列および配列番号2および配列番号3からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも95%同一である軽鎖可変ドメイン配列を有する。好ましくは、完全ヒト抗体は重鎖および軽鎖を有し、ここで、抗体は、配列番号1/配列番号2(ここではH6B1L-EMと称する)および配列番号1/配列番号3(ここではH6B1L-EVと称する)からなる群から選択される重鎖/軽鎖可変ドメイン配列を有する。

30

【0009】

ある実施態様において、本発明は、重鎖からの可変ドメイン領域および軽鎖からの可変ドメイン領域を有するFab完全ヒト抗体フラグメントを提供し、これは、配列番号1のアミノ酸配列と少なくとも95%同一である重鎖可変ドメイン配列および配列番号2および配列番号3からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも95%同一である軽鎖可変ドメイン配列を有する。好ましくは、完全ヒト抗体Fabフラグメントは重鎖可変ドメイン領域および軽鎖可変ドメイン領域両方を有し、ここで、抗体は、配列番号1/配列番号2および配列番号1/配列番号3からなる群から選択される重鎖/軽鎖可変ドメイン配列を有する。

40

【0010】

ある実施態様において、本発明は、重鎖からの可変ドメイン領域および軽鎖からの可変ドメイン領域および重鎖および軽鎖可変ドメイン領域を連結するペプチドリinkerを有する一本鎖ヒト抗体を提供し、これは、配列番号1のアミノ酸配列と少なくとも95%同一である重鎖可変ドメイン配列および配列番号2および配列番号3からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも95%同一である軽鎖可変ドメイン配列を有する。好ましくは、完全ヒト一本鎖抗体は重鎖可変ドメイン領域および軽鎖可変ドメイン領域両方を有し、ここで、一本鎖完全ヒト抗体は、配列番号1/配列番号2および配列番号1/配列番号3からなる群から選択される重鎖/軽鎖可変ドメイン配列を有する。

【0011】

50

ある実施態様において、本発明は、さら、抗PD-L1ポリペプチドの有効量を投与することを含む、哺乳動物の広汎な癌または広汎な炎症性疾患および自己免疫性疾患を処置する方法を提供し、ここで、抗PD-L1ポリペプチドは、PD-L1エピトープに結合するIgGクラスの完全ヒト抗体、重鎖からの可変ドメイン領域および軽鎖からの可変ドメイン領域を有するFab完全ヒト抗体フラグメント、重鎖からの可変ドメイン領域および軽鎖からの可変ドメイン領域および重鎖および軽鎖可変ドメイン領域を連結するペプチドリンカーを有する一本鎖ヒト抗体およびこれらの組み合わせからなる群から選択され；

ここで、完全ヒト抗体は配列番号1のアミノ酸配列と少なくとも95%同一である重鎖可変ドメイン配列および配列番号2および配列番号3からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも95%同一である軽鎖可変ドメイン配列を有し

10

ここで、Fab完全ヒト抗体フラグメントは配列番号1のアミノ酸配列と少なくとも95%同一である重鎖可変ドメイン配列および配列番号2および配列番号3からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも95%同一である軽鎖可変ドメイン配列を有し；そして

ここで、一本鎖ヒト抗体は配列番号1のアミノ酸配列と少なくとも95%同一である重鎖可変ドメイン配列および配列番号2および配列番号3からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも95%同一である軽鎖可変ドメイン配列を有する。ある実施態様において、重鎖可変領域は、配列番号5、配列番号6および配列番号7のアミノ酸配列に示すCDR1ドメイン、CDR2ドメインおよびCDR3ドメインを含む。

【0012】

20

ある実施態様において、完全ヒト抗体は重鎖および軽鎖を有し、ここで、抗体は、配列番号1/配列番号2(ここではH6B1L-EMと称する)および配列番号1/配列番号3(ここではH6B1L-EVと称する)からなる群から選択される重鎖/軽鎖可変ドメイン配列を有する。好ましくは、完全ヒト抗体Fabフラグメントは重鎖可変ドメイン領域および軽鎖可変ドメイン領域両方を有し、ここで、抗体は、配列番号1/配列番号2(ここではH6B1L-EMと称する)および配列番号1/配列番号3(ここではH6B1L-EVと称する)からなる群から選択される重鎖/軽鎖可変ドメイン配列を有する。好ましくは、完全ヒト一本鎖抗体は重鎖可変ドメイン領域および軽鎖可変ドメイン領域両方を有し、ここで、一本鎖完全ヒト抗体は、配列番号1/配列番号2および配列番号1/配列番号3からなる群から選択される重鎖/軽鎖可変ドメイン配列を有する。

30

【0013】

ある実施態様において、本発明は、PD-L1エピトープに結合するIgGクラスの完全ヒト抗体を提供し、ここで、抗体は、配列番号1に示すアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号2または配列番号3に示すアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【0014】

他の実施態様において、本発明は、PD-L1エピトープに結合するIgGクラスの完全ヒト抗体を提供し、ここで、抗体は、それぞれ配列番号5、配列番号6および配列番号7のアミノ酸配列に示すCDR1ドメイン、CDR2ドメインおよびCDR3ドメインを含む重鎖可変ドメインならびに配列番号2または配列番号3に示すアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。

40

【0015】

本発明の完全ヒト抗体は、ある実施態様において、IgG1またはIgG4であり得る。

【0016】

ある実施態様において、本発明はまた本発明の抗PD-L1抗体(またはそのフラグメント)および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物も含む。

【0017】

本発明はまた癌または自己免疫性もしくは炎症性疾患を有するヒト対象を処置する方法も含み、該方法は、抗PD-L1完全ヒト抗体、FabフラグメントまたはscFvの有

50

効量を投与することを含む。ある実施態様において、処置される哺乳動物の広汎な癌は、卵巣、結腸、乳房、肺癌、骨髄腫、神経芽細胞由来 CNS 腫瘍、単球性白血病、B 細胞由来白血病、T 細胞由来白血病、B 細胞由来リンパ腫、T 細胞由来リンパ腫、肥満細胞由来腫瘍およびこれらの組み合わせからなる群から選択される。ある実施態様において、自己免疫性疾患または炎症性疾患は、腸粘膜炎症、大腸炎と関連する消耗性疾患、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、ウイルス感染症、リウマチ性関節炎、骨関節症、乾癬、クローン病および炎症性腸疾患からなる群から選択される。

【0018】

ある実施態様において、本発明の抗体またはフラグメントは、哺乳動物宿主細胞、例えば、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞において産生される。

10

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】図1Aおよび1Bは、上部グラフの元の野生型抗体 H6B1L (図1A) および下部グラフの本発明のバリエーション抗体 H6-B1L-EM (図1B) について、軽鎖のマススペクトルピークの比較を示す。図1Bに記載するとおり、親軽鎖と比較して、軽鎖 (LC) フラグメントは、H6B1LEM 軽鎖では検出されなかった。図1に記載の抗体は、CHO 細胞で産生された。

【発明を実施するための形態】

【0020】

詳細な記載

20

定義

“抗原結合性タンパク質”は、抗原に結合する部分、および、所望により、該抗原結合部分が該抗原結合性タンパク質の抗原への結合を助長する立体構造を取ることを可能にする足場またはフレームワーク部分を含むタンパク質をいう。抗原結合性タンパク質の例は、抗体、抗体フラグメント (例えば、抗体の抗原結合部分)、抗体誘導体および抗体アナログを含む。抗原結合性タンパク質は、例えば、移植 CDR または CDR 誘導体を有する代替タンパク質足場または人工足場を含み得る。このような足場は、例えば、抗原結合性タンパク質の三次元構造を安定化するために導入された変異を含む抗体由来足場ならびに、例えば、生体適合性ポリマーを含む、完全合成足場を含むが、これらに限定されない。例えば、Korndorfer et al., 2003, Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, Volume 53, Issue 1:121-129; Roque et al., 2004, Biotechnol. Prog. 20:639-654 参照。さらに、ペプチド抗体模倣物 (“PAM”) ならびに足場としてフィブロネクチン成分を利用する抗体模倣物に基づく足場が使用され得る。

30

【0021】

抗原結合性タンパク質は、例えば、天然に存在する免疫グロブリンの構造を有し得る。“免疫グロブリン”は、四量体分子である。“インタクト免疫グロブリン” (天然に存在する免疫グロブリンのような重鎖および軽鎖構造を有する) において、該四量体はポリペプチド鎖の2個の同一ペアからなり、各ペアは1 “軽” 鎖 (約 25 kDa) および1 “重” 鎖 (約 50 ~ 70 kDa) を有する。各鎖のアミノ末端部分は、主に抗原認識を担う約 100 ~ 110 またはそれ以上のアミノ酸の可変領域を含む。各鎖のカルボキシ末端部分は、主にエフェクター機能を担う定常領域を規定する。ヒト軽鎖はカッパまたはラムダ軽鎖として分類される。重鎖は、ミュー、デルタ、ガンマ、アルファまたはイプシロンとして分類され、それぞれ IgM、IgD、IgG、IgA および IgE としての抗体のアイソタイプを規定する。軽鎖および重鎖内で、可変領域と定常領域は、約 12 またはそれ以上のアミノ酸の “J” 領域により連結され、重鎖はまた約 10 以上のアミノ酸の “D” 領域を含む。一般に、Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)) 参照のこと (全ての目的のために、全体を引用により本明細書に包含させる)。各軽/重鎖ペアの可変領域は、インタクト免疫グロブリンが2結合部位を有するように、抗体結合部位を形成する。用語 “天然に存在する免疫グロブリン” は、免疫グロブリンの供給源ではなく、むしろ免疫グロブリンの全体的構造をいう。

40

50

【 0 0 2 2 】

天然に存在する免疫グロブリン鎖の可変領域は、ここでは相補性決定領域またはCDRとも称する3超可変領域により連結された、比較的保存されたフレームワーク領域(FR)の一般的構造を示す。N末端からC末端側に、軽鎖および重鎖は、両方ともドメインFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3およびFR4を含む。各ドメインへのアミノ酸の割り当ては、Kabat et al. in Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, NIH Publication no. 91-3242, 1991に従う。免疫グロブリン鎖におけるアミノ酸の他のナンバリングシステムは、IMGT.RTM. (international ImMunoGeneTics information system; Lefranc et al, Dev. Comp. Immunol. 29:185-203; 2005)およびAHO(HoneggerおよびPluckthun, J. Mol. Biol. 309(3):657-670; 2001)を含む。

10

【 0 0 2 3 】

抗体は、多様な抗原特異性を有する免疫グロブリンを含む、血清または血漿などの供給源から得ることができる。このような抗体は親和性精製に付すことにより、特定の抗原特異性について富化され得る。抗体のこのような富化調製物は、通常特定の抗原に対して特異的結合活性を有する抗体約10%未満からなる。これらの調製物を数回親和性精製して、その抗原に対する特異的結合活性を有する抗体の割合を増加させ得る。この方法で調製された抗体は、しばしば“単特異的”と称される。単特異的抗体調製物は、特定の抗原に対して特異的結合活性を有する抗体を約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%または99.9%まで含み得る。

20

【 0 0 2 4 】

“抗体”は、特に断らない限り、インタクト免疫グロブリンまたは、該インタクト抗体と特異的結合について競合するその抗原結合部分をいう。ある実施態様において、抗体はインタクト免疫グロブリンである。抗原結合部分は、組み換えDNA技法またはインタクト抗体の酵素もしくは化学開裂により産生され得る。抗原結合部分は、とりわけ、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、ドメイン抗体(dAb)および相補性決定領域(CDR)フラグメント、一本鎖抗体(scFv)、キメラ抗体、二重特異性抗体、トリアポディ、テトラポディおよび少なくともポリペプチドに特異的抗原結合を付与するのに十分な免疫グロブリンの一部を含むポリペプチドを含む。

30

【 0 0 2 5 】

ある抗体の相補性決定領域(CDR)およびフレームワーク領域(FR)は、Kabat et al. supra; Lefranc et al., supraおよび/またはHonegger and Pluckthun, supraに記載のシステムを使用して同定し得る。1以上のCDRが、共有結合的または非共有結合的に分子に取り込まれ、それを抗原結合性タンパク質とし得る。抗原結合性タンパク質は、大型ポリペプチド鎖の一部としてCDRを取り込んでよく、他のポリペプチド鎖にCDRを共有結合的に結合させてよくまたはCDRを非共有結合的に取り込んでよい。CDRは、抗原結合性タンパク質が目的の特定の抗原に特異的に結合することを可能とする。

【 0 0 2 6 】

抗原結合性タンパク質は、1以上の結合部位を有し得る。1を超える結合部位があるならば、これら結合部位は互いに同一でも異なってもよい。例えば、天然に存在するヒト免疫グロブリンは、一般に2個の同一結合部位を有するが、“二特異的”または“二機能性”抗体は、2個の異なる結合部位を有する。

40

【 0 0 2 7 】

用語“ヒト抗体”は、ヒト免疫グロブリン配列由来の1以上の可変領域および定常領域を有する、抗体または抗体の抗原結合フラグメントをいう。ある実施態様において、可変および定常ドメイン全てが、ヒト免疫グロブリン配列由来である(完全ヒト抗体)。これらの抗体は多様な方法で製造でき、その例を下に記載し、ヒト重および/または軽鎖コード遺伝子由来の抗体を発現するように遺伝的に修飾されているマウスの目的の抗原での免疫化によるものを含む。ヒト抗体を多様な方法で同定でき、ファージディスプレイによるま

50

たはヒト重および／または軽鎖コード遺伝子由来の抗体を発現するように遺伝的に修飾されているマウスの免疫化によるものを含む。ある実施態様において、完全ヒト抗体を、抗体のグリコシル化パターンが、同じ配列を有する抗体が、それが天然で存在したときと異なるように、組み換え方法を使用して製造する。

【 0 0 2 8 】

“ヒト化抗体”は、ヒト対象に投与したとき、非ヒト種抗体と比較して、ヒト化抗体が免疫応答を誘発する可能性が低いおよび／または重篤度が低い免疫応答を誘発するように、1以上のアミノ酸置換、欠失および／または付加により、非ヒト種由来の抗体の配列と異なる配列を有する。ある実施態様において、非ヒト種抗体の重および／または軽鎖のフレームワークおよび定常ドメインのあるアミノ酸を、ヒト化抗体を産生するために変異させる。他の実施態様において、ヒト抗体からの定常ドメインを、非ヒト種の可変ドメインに融合させる。他の実施態様において、非ヒト抗体の1以上のCDR配列における1以上のアミノ酸残基が、ヒト対象に投与されたとき、非ヒト抗体で可能性のある免疫原性を低減するように変更され、ここで、該変更されたアミノ酸残基は、該抗体のその抗原への免疫特異的結合に重要でないかまたはアミノ酸配列になされた変更が、該ヒト化抗体の抗原への結合を、非ヒト抗体の抗原への結合より顕著に低下させないような、保存的変更である。ヒト化抗体をどのように製造するかは、米国特許6,054,297号、5,886,152号および5,877,293号に見ることができる。

【 0 0 2 9 】

用語“キメラ抗体”は、ある抗体からの1以上の領域および1以上の他の抗体からの1以上の領域を含む、抗体をいう。ある実施態様において、CDRの1以上は、ヒト抗PD-L1抗体に由来する。他の実施態様において、CDR全ては、ヒト抗PD-L1抗体に由来する。他の実施態様において、キメラ抗体において1を超えるヒト抗PD-L1抗体からのCDRが混合され、整合される。例えば、キメラ抗体は、第一ヒト抗PD-L1抗体の軽鎖からのCDR1、第二ヒト抗PD-L1抗体の軽鎖からのCDR2およびCDR3ならびに第三抗PD-L1抗体の重鎖からのCDRを含み得る。他の組み合わせも可能である。さらに、フレームワーク領域は、同じ抗PD-L1抗体の1つから、ヒト抗体などの1以上の異なる抗体からまたはヒト化抗体からであり得る。キメラ抗体の一例において、重および／または軽鎖の部分は、特定の種からの抗体と同一であるか、相同であるかまたはそれに由来するかまたは特定の抗体クラスまたはサブクラスに属するが、鎖の残りは、他の種からの抗体と同一であるか、相同であるかまたはそれに由来するかまたは他の抗体クラスまたはサブクラスに属する。また包含されるのは、所望の生物活性(すなわち、PD-L1に特異的に結合する能力)を示す、このような抗体のフラグメントである。

【 0 0 3 0 】

“Fabフラグメント”は V_L 、 V_H 、 C_L および C_{H1} ドメインを有する単価フラグメントであり、 $F(ab')_2$ フラグメントはヒンジ領域でジスルフィド架橋により結合された2Fabフラグメントを有する二価フラグメントであり、Fdフラグメントは V_H および C_{H1} ドメインを有し、Fvフラグメントは抗体の単一アームの V_L および V_H ドメインを有し、そしてdAbフラグメントは V_H ドメイン、 V_L ドメインまたは V_H または V_L ドメインの抗原結合フラグメントを有する(米国特許6,846,634号; 6,696,245号; 米国出願公開20/0202512号; 2004/0202995号; 2004/0038291号; 2004/0009507号; 2003/0039958号およびWard et al., Nature 341:544-546, 1989)。

【 0 0 3 1 】

“一本鎖抗体”または“scFv”は、 V_L および V_H 領域が連続タンパク質鎖を形成するようにリンカー(例えば、アミノ酸残基の合成配列)を介して結合される、抗体である。ある実施態様において、リンカーは、タンパク質鎖がそれ自身折り畳まれて、単価抗原結合部位を形成することを可能にする程に十分長い(例えば、Bird et al., 1988, Science 242:423-26およびHuston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-83参照)。二重特異性抗体は、2ポリペプチド鎖を含む二価抗体であり、ここで、各ポリペプチ

10

20

30

40

50

ド鎖は、同じ鎖の2ドメイン間の対形成を可能とするには短すぎ、それ故に、各ドメインが他のポリペプチド鎖の相補性ドメインと対になることを可能にする、リンカーにより結合されたV_HおよびV_Lドメインを含む(例えば、Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-48, and Poljak et al., 1994, Structure 2:1121-23参照)。二重特異性抗体の2ポリペプチド鎖が同一であるならば、その対形成に起因する二重特異性抗体は、2個の同一抗原結合部位を有する。異なる配列を有するポリペプチド鎖を、2個の異なる抗原結合部位を有する二重特異性抗体の製造に使用できる。同様に、トリアボディおよびテトラボディは、それぞれ、同一でも異なってもよい3および4ポリペプチド鎖を含み、それぞれ、3および4抗原結合部位を形成する抗体である。

【0032】

“中和抗体”または“阻害性抗体”は、過剰の抗PD-L1抗体が実施例に記載するようなアッセイを使用して、活性化の程度を少なくとも約20%減少させるなら、PD-L1のタンパク分解の活性化を阻害する抗体である。種々の実施態様において、抗原結合性タンパク質は、PD-L1のタンパク分解の活性化の程度を、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%および99.9%減少させる。

【0033】

抗体のフラグメントまたはアナログは、本明細書の教示に従って、当分野で知られる技法を使用して、当業者により容易に製造され得る。フラグメントまたはアナログの好ましいアミノ末端およびカルボキシ末端は、機能的ドメインの境界近辺に生じる。構造的および機能的ドメインは、ヌクレオチドおよび/またはアミノ酸配列データを一般のまたは所有権のある(proprietary)配列データベースと比較することにより同定され得る。コンピューターによる比較方法を使用して、既知構造および/または機能の他のタンパク質にある配列モチーフまたは予測タンパク質構造ドメインを同定し得る。既知三次元構造に折り畳まれたタンパク質配列を同定する方法は知られている。Bowie et al., 1991, Science 253:164参照。

【0034】

“CDR移植抗体”は、特定の種またはアイソタイプの抗体由来の1以上のCDRおよび同一または異なる種またはアイソタイプの他の抗体のフレームワークを含む抗体である。

【0035】

“多特異的抗体”は、1以上の抗原の1を超えるエピトープを認識する抗体である。このタイプの抗体のサブクラスは、同一または異なる抗原の2つの異なるエピトープを認識する“二特異的抗体”である。

【0036】

抗原結合性タンパク質は、1ナノモル以下の解離定数で抗原(例えば、ヒトPD-L1)と結合するならば、該抗原と“特異的に結合する”。

【0037】

“抗原結合ドメイン”、“抗原結合領域”または“抗原結合部位”は、抗原結合性タンパク質の、抗原と相互作用し、該抗原に対する該抗原結合性タンパク質の特異性および親和性に寄与する、アミノ酸残基(または他の部分)を含む部分をいう。抗原に特異的に結合する抗体について、これは、そのCDRドメインの少なくとも1つの少なくとも一部を含む。

【0038】

“エピトープ”は、抗原結合性タンパク質(例えば、抗体)により結合される、分子の部分を含む。エピトープは、分子の非連続的部分である(例えば、ポリペプチドにおいて、ポリペプチドの一次配列では連続的ではないが、ポリペプチドの三次および四次構造において、抗原結合性タンパク質により結合されるのに互いに十分に近いアミノ酸残基)。

【0039】

2ポリヌクレオチドまたは2ポリペプチド配列の“パーセント同一性”または“パーセ

10

20

30

40

50

ント相同性”は、GAPコンピュータープログラム(GCG Wisconsin Package, version 10.3 (Accelrys, San Diego, Calif.))の一部)を使用して、そのデフォルトパラメータを使用して、配列を比較することにより決定される。

【0040】

用語“ポリヌクレオチド”、“オリゴヌクレオチド”および“核酸”は、全体にわたって相互交換可能に使用され、DNA分子(例えば、cDNAまたはゲノムDNA)、RNA分子(例えば、mRNA)、ヌクレオチドアナログを使用して産生されたDNAまたはRNAのアナログ(例えば、ペプチド核酸および天然に存在しないヌクレオチドアナログ)およびこれらのハイブリッドを含む。核酸分子は、一本鎖または二本鎖である。ある実施態様において、本発明の核酸分子は、抗体またはそのフラグメント、誘導體、ムテインまたはバリエーションをコードする連続的オープンリーディングフレームを含む。

10

【0041】

2つの一本鎖ポリヌクレオチドは、ギャップの導入なしでかつ何れかの配列の5'または3'末端に不對ヌクレオチドなく、一方のポリヌクレオチドにおける全ヌクレオチドが、他方のポリヌクレオチドにおけるその相補的ヌクレオチドと逆であるように逆平行配向でアラインされ得るならば、それらの配列は互いに“相補体”である。ポリヌクレオチドは、2ポリヌクレオチドが、互いに中程度のストリンジェント条件下でハイブリダイズできるならば、他方のポリヌクレオチドと“相補的”である。それ故に、ポリヌクレオチドは、その相補体とならずに、他のポリヌクレオチドと相補的であり得る。

20

【0042】

“ベクター”は、それに結合した他の核酸を細胞に導入するのに使用され得る核酸である。ベクターの1つのタイプは“プラスミド”であり、これは、付加的核酸セグメントがその中にライゲートされ得る直線状または環状二本鎖DNA分子である。他のタイプのベクターは、ウイルスベクター(例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス)であり、ここで、導入すべきDNAセグメントがウイルスゲノムに統合され得る。あるベクターは、導入された宿主細胞で自律複製可能である(例えば、細菌複製起点を含む細菌ベクターおよびエピソーム哺乳動物ベクター)。他のベクター(例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター)は、宿主細胞への導入により宿主細胞のゲノムに統合され、それにより宿主ゲノムと共に複製する。“発現ベクター”は、選択ポリヌクレオチドの発現を指示できるタイプのベクターである。

30

【0043】

ヌクレオチド配列は、制御配列が該ヌクレオチド配列の発現(例えば、発現のレベル、タイミングまたは位置)に影響するならば、該制御配列に“操作可能に結合する”。“制御配列”は、操作可能に結合している核酸の発現(例えば、発現のレベル、タイミングまたは位置)に影響する核酸である。制御配列は、例えば、その効果を直接制御される核酸にまたは1以上の他の分子(例えば、制御配列および/または核酸に結合するポリペプチド)の作用を介して発揮し得る。制御配列の例は、プロモーター、エンハンサーおよび他の発現制御要素(例えば、ポリアデニル化シグナル)を含む。制御配列のさらなる例は、例えば、Goeddel, 1990, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. and Baron et al., 1995, Nucleic Acids Res. 23:3605-06に記載される。

40

【0044】

“宿主細胞”は、核酸、例えば、本発明の核酸の発現に使用できる細胞である。宿主細胞は、原核生物、例えば、大腸菌であってよくまたは真核生物、例えば、単細胞真核生物(例えば、酵母または他の真菌)、植物細胞(例えば、タバコまたはトマト植物細胞)、動物細胞(例えば、ヒト細胞、サル細胞、ハムスター細胞、ラット細胞、マウス細胞または昆虫細胞)またはハイブリドームであってよい。宿主細胞の例は、サル腎臓細胞のCOS-7株(ATCC CRL 1651)(Gluzman et al., 1981, Cell 23:175参照)、L細胞、C127細胞、3T3細胞(ATCC CCL 163)、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞または無血清培地で増殖されたVeggie CHOおよび関連細胞株(Ras

50

mussen et al., 1998, Cytotechnology 28:31参照)またはD H F Rを欠損するC H O株D X - B 1 1 (Urlaub et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-20)などのこれらの誘導体、H e L a細胞、B H K (A T C C C R L 1 0)細胞株、アフリカミドリザル腎臓細胞株C V 1由来C V 1 / E B N A細胞株(A T C C C C L 7 0)(McMahan et al., 1991, EMBO J. 10:2821参照)、2 9 3, 2 9 3 E B N AまたはM S R 2 9 3などのヒト胚腎臓細胞、ヒト上皮A 4 3 1細胞、ヒトC o l o 2 0 5細胞、他の形質転換霊長類細胞株、正常2倍体細胞、一次組織のインビトロ培養に由来する細胞株、一次外植片、H L - 6 0、U 9 3 7、H a KまたはJ u r k a t細胞を含み得る。ある実施態様において、宿主細胞は、ヒトではない哺乳動物宿主細胞である。一般に、宿主細胞は、ポリペプチドコード核酸で形質転換またはトランスフェクトされ得る、培養細胞であり、これはその後宿主細胞で発現され得る。用語“組み換え宿主細胞”は、発現されるべき核酸で形質転換またはトランスフェクトされている宿主細胞を意味するように使用され得る。宿主細胞はまた核酸を含むが、それを、該核酸と操作可能に結合となるように制御配列を宿主細胞に導入しない限り、所望のレベルで発現されない細胞であり得る。用語宿主細胞は特定の対象細胞だけでなく、そのような細胞の子孫または潜在的子孫も含むことは理解される。例えば、変異または環境の影響により、ある修飾が後代で生じ得て、このような子孫は、実際、親細胞と同一ではないかもしれないが、なおここで使用する該用語の範囲内に包含される。ある実施態様において、宿主細胞はC H O細胞である。

【0045】

用語“組み換え抗体”は、抗体またはその一部のコード配列(例えば、ここに記載する重鎖または軽鎖可変領域をコードするD N A配列)を含む、発現ベクター(またはおそらく1を超える発現ベクター)でトランスフェクトされた宿主細胞(または細胞株)から発現される抗体をいう。ある実施態様において、該コード配列は、該細胞と天然では関係しない。ある実施態様において、組み換え抗体は、同じ抗体が、それが天然で存在したときと同じ配列を有する抗体のグリコシル化パターンと異なるグリコシル化パターンを有する。ある実施態様において、組み換え抗体は、ヒト宿主細胞ではない哺乳動物宿主細胞で発現される。特に、個々の哺乳動物宿主細胞は特有のグリコシル化パターンを有する。

【0046】

用語“P D - L 1阻害剤”および“P D - L 1アンタゴニスト”は、相互交換可能に使用される。各々、P D - L 1の少なくとも1つの機能を検出可能に阻害する分子である。逆に、“P D - L 1アゴニスト”は、P D - L 1の少なくとも1つの機能を検出可能に増進せる分子である。P D - L 1阻害剤により引き起こされる阻害は、アッセイを使用して検出可能である限り、完全である必要はない。P D - L 1の機能のあらゆるアッセイを使用でき、その例は、ここに提供される。P D - L 1阻害剤に阻害されるまたはP D - L 1アゴニストにより増強されることが可能であるP D - L 1の機能の例は、癌細胞増殖またはアポトーシス(プログラム細胞死)などを含む。P D - L 1阻害剤およびP D - L 1アゴニストのタイプの例は、P D - L 1結合性ポリペプチド、例えば、抗原結合性タンパク質(例えば、P D - L 1阻害性抗原結合性タンパク質)、抗体、抗体フラグメントおよび抗体誘導体を含むが、これらに限定されない。

【0047】

用語“ペプチド”、“ポリペプチド”および“タンパク質”は、各々、ペプチド結合により互いに連結された、2以上のアミノ酸残基を含む分子をいう。これらの用語は、例えば、天然および人工タンパク質、タンパク質フラグメントおよびポリペプチドアナログ(例えばムテイン、バリエーションおよび融合タンパク質)ならびに翻訳後または他に、共有結合的または非共有結合的に修飾されたタンパク質を包含する。ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質は、単量体でも多量体でもよい。

【0048】

ポリペプチド(例えば、抗体)の“バリエーション”は、他のポリペプチド配列に対して、1以上のアミノ酸残基がアミノ酸配列において挿入、欠失および/または置換されている、アミノ酸配列をいう。開示されるバリエーションは、例えば、融合タンパク質を含む。

【 0 0 4 9 】

ポリペプチドの“誘導体”は、例えば、他の化学基(例えば、例えば、ポリエチレングリコールまたはアルブミン、例えば、ヒト血清アルブミン)へのコンジュゲーション、リン酸化およびグリコシル化により、化学的に修飾されているポリペプチド(例えば、抗体)である。特に断らない限り、用語“抗体”は、2完全長重鎖および2完全長軽鎖を含む抗体に加えて、その誘導体、バリエーション、フラグメントおよびムテインを含み、その例を下に記載する。

【 0 0 5 0 】

P D - L 1 抗原結合性タンパク質

本発明は、配列番号1のアミノ酸配列と少なくとも95%同一である重鎖可変ドメイン配列および配列番号2および配列番号3からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも95%同一である軽鎖可変ドメイン配列を有する、 10^{-6} M以下の結合親和性を有する、P D - L 1 エピトープに結合するI g Gクラスの完全ヒト抗体を提供する。好ましくは、完全ヒト抗体は重鎖および軽鎖を有し、ここで、抗体は、配列番号1 / 配列番号2(ここではH 6 B 1 L - E Mと称する)および配列番号1 / 配列番号3(ここではH 6 B 1 L - E Vと称する)からなる群から選択される重鎖 / 軽鎖可変ドメイン配列を有する。親抗体H 6 B 1 Lおよびそのバリエーション - E Mおよび - E Vの配列が、下記配列の表に提供される。ここに開示する - E Mおよび - E V抗P D - L 1抗体は、特に、開裂が回避される点で、C H O細胞における発現に利益を有するものとして同定されている。

【 0 0 5 1 】

好ましくは、本発明の抗P D - L 1抗体(またはフラグメント)は、ヒトP D - L 1に結合する。

抗原結合性タンパク質は、P D - L 1の生物活性を阻害する完全ヒトモノクローナル抗体を含む。

【 0 0 5 2 】

ある実施態様において、完全ヒト抗体は、配列番号7のアミノ酸配列を有するC D R 3ドメイン(K a b a tナンバリングスキームを使用して決定)を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号10のアミノ酸配列を有するC D R 3ドメインを含む軽鎖可変ドメインを含む。ある実施態様において、完全ヒト抗体は、配列番号6のアミノ酸配列を有するC D R 2ドメインを含む重鎖可変ドメインおよび配列番号9のアミノ酸配列を有するC D R 2ドメインを含む軽鎖可変ドメインを含む。ある実施態様において、完全ヒト抗体は、配列番号5のアミノ酸配列を有するC D R 1ドメインを含む重鎖可変ドメインおよび配列番号8のアミノ酸配列を有するC D R 1ドメインを含む軽鎖可変ドメインを含む。ある実施態様において、完全ヒト抗体は、それぞれ配列番号7、6および5のアミノ酸配列を有するC D R 3、C D R 2およびC D R 1を含む重鎖可変ドメインおよびそれぞれ配列番号10、9および8のアミノ酸配列を有するC D R 3、C D R 2およびC D R 1を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【 0 0 5 3 】

本発明は、ある実施態様において、P D - L 1 エピトープに結合するI g Gクラス(例えば、I g G 1またはI g G 4)の完全ヒト抗体を提供し、ここで、抗体は、配列番号1に示すアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号2または配列番号3に示すアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。ある実施態様において、本発明は、P D - L 1 エピトープに結合するI g Gクラス(例えば、I g G 1またはI g G 4)の完全ヒト抗体を提供し、ここで、抗体は、それぞれ配列番号5、配列番号6および配列番号7のアミノ酸配列に示すC D R 1ドメイン、C D R 2ドメインおよびC D R 3ドメインを含む重鎖可変ドメインならびに配列番号2または配列番号3に示すアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【 0 0 5 4 】

抗体フラグメントもまたここで企図され、ここで、該抗体フラグメントはP D - L 1に結合し、配列番号1に示すアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含

10

20

30

40

50

む重鎖可変ドメインおよび配列番号2または配列番号3に示すアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。ある実施態様において、本発明は、それぞれ配列番号5、配列番号6および配列番号7のアミノ酸配列に示すCDR1ドメイン、CDR2ドメインおよびCDR3ドメインを含む重鎖可変ドメインならびに配列番号2または配列番号3に示すアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む、抗PD-L1抗体フラグメントを提供する。

【0055】

本発明は、重鎖からの可変ドメイン領域および軽鎖からの可変ドメイン領域を有するFab完全ヒト抗体フラグメントを提供し、ここで、配列番号1のアミノ酸配列と少なくとも95%同一である重鎖可変ドメイン配列および配列番号2および配列番号3からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも95%同一である軽鎖可変ドメイン配列を有する。好ましくは、完全ヒト抗体Fabフラグメントは重鎖可変ドメイン領域および軽鎖可変ドメイン領域両方を有し、ここで、抗体は、配列番号1/配列番号2および配列番号1/配列番号3からなる群から選択される重鎖/軽鎖可変ドメイン配列を有する。

【0056】

ある実施態様において、Fab完全ヒト抗体フラグメントは、配列番号7のアミノ酸配列を有するCDR3(Kabatナンバリングスキームを使用して決定)を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号10のアミノ酸配列を有するCDR3を含む軽鎖可変ドメインを含む。ある実施態様において、Fab完全ヒト抗体フラグメントは、配列番号6のアミノ酸配列を有するCDR2を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号9のアミノ酸配列を有するCDR2を含む軽鎖可変ドメインを含む。ある実施態様において、Fab完全ヒト抗体フラグメントは、配列番号5のアミノ酸配列を有するCDR1を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号8のアミノ酸配列を有するCDR1を含む軽鎖可変ドメインを含む。ある実施態様において、Fab完全ヒト抗体フラグメントは、それぞれ配列番号7、6および5のアミノ酸配列を有するCDR3、CDR2およびCDR1を含む重鎖可変ドメインおよびそれぞれ配列番号10、9および8のアミノ酸配列を有するCDR3、CDR2およびCDR1を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【0057】

本発明の抗原結合性タンパク質の抗原結合フラグメントは、慣用の技法により製造され得る。このようなフラグメントの例は、FabおよびF(ab')₂フラグメントを含むが、これらに限定されない。

【0058】

本発明は、重鎖からの可変ドメイン領域および軽鎖からの可変ドメイン領域および重鎖および軽鎖可変ドメイン領域を連結するペプチドリンカーを有する一本鎖ヒト抗体を提供し、これは、配列番号1のアミノ酸配列と少なくとも95%同一である重鎖可変ドメイン配列および配列番号2および配列番号3からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも95%同一である軽鎖可変ドメイン配列を有する。好ましくは、完全ヒト一本鎖抗体は重鎖可変ドメイン領域および軽鎖可変ドメイン領域両方を有し、ここで、一本鎖完全ヒト抗体は、配列番号1/配列番号2および配列番号1/配列番号3からなる群から選択される重鎖/軽鎖可変ドメイン配列を有する。

【0059】

ある実施態様において、一本鎖ヒト抗体は、配列番号7のアミノ酸配列を有するCDR3(Kabatナンバリングスキームを使用して決定)を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号10のアミノ酸配列を有するCDR3を含む軽鎖可変ドメインを含む。ある実施態様において、一本鎖ヒト抗体は、配列番号6のアミノ酸配列を有するCDR2を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号9のアミノ酸配列を有するCDR2を含む軽鎖可変ドメインを含む。ある実施態様において、一本鎖ヒト抗体は、配列番号5のアミノ酸配列を有するCDR1を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号8のアミノ酸配列を有するCDR1を含む軽鎖可変ドメインを含む。ある実施態様において、一本鎖ヒト抗体は、それぞれ配列番号7、6および5のアミノ酸配列を有するCDR3、CDR2およびCDR1を含む重鎖可変ドメインおよびそれぞれ配列番号10、9および8のアミノ酸配列を有するCDR3、

C D R 2 および C D R 1 を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【 0 0 6 0 】

本発明は、さらに、抗 P D - L 1 ポリペプチドの有効量を投与することを含む、哺乳動物の広範囲の癌または炎症性疾患または自己免疫性疾患を処置する方法を提供し、ここで、抗 P D - L 1 ポリペプチドは、少なくとも 10^{-6} M の結合親和性を有する P D - L 1 エピトープに結合する I g G クラスの完全ヒト抗体、重鎖からの可変ドメイン領域および軽鎖からの可変ドメイン領域を有する F a b 完全ヒト抗体フラグメント、重鎖からの可変ドメイン領域および軽鎖からの可変ドメイン領域および重鎖および軽鎖可変ドメイン領域を連結するペプチドリンカーを有する一本鎖ヒト抗体およびこれらの組み合わせからなる群から選択され；

10

ここで、該完全ヒト抗体は、配列番号 1 のアミノ酸配列と少なくとも 95 % 同一である重鎖可変ドメイン配列および配列番号 2 および配列番号 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 95 % 同一である軽鎖可変ドメイン配列を有し；ここで、F a b 完全ヒト抗体フラグメントは配列番号 1 のアミノ酸配列と少なくとも 95 % 同一である重鎖可変ドメイン配列および配列番号 2 および配列番号 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 95 % 同一である軽鎖可変ドメイン配列を有し；およびここで、一本鎖ヒト抗体は配列番号 1 のアミノ酸配列と少なくとも 95 % 同一である重鎖可変ドメイン配列および配列番号 2 および配列番号 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 95 % 同一である軽鎖可変ドメイン配列を有する。

【 0 0 6 1 】

20

好ましくは、完全ヒト抗体は重鎖および軽鎖を有し、ここで、抗体は、配列番号 1 / 配列番号 2 および配列番号 1 / 配列番号 3 からなる群から選択される重鎖 / 軽鎖可変ドメイン配列を有する。好ましくは、完全ヒト抗体 F a b フラグメントは重鎖可変ドメイン領域および軽鎖可変ドメイン領域両方を有し、ここで、抗体は、配列番号 1 / 配列番号 2 および配列番号 1 / 配列番号 3 からなる群から選択される重鎖 / 軽鎖可変ドメイン配列を有する。好ましくは、完全ヒト一本鎖抗体は重鎖可変ドメイン領域および軽鎖可変ドメイン領域両方を有し、ここで、一本鎖完全ヒト抗体は、配列番号 1 / 配列番号 2 および配列番号 1 / 配列番号 3 からなる群から選択される重鎖 / 軽鎖可変ドメイン配列を有する。

【 0 0 6 2 】

特定の実施態様において、本発明の抗原結合性タンパク質は、少なくとも 10^6 の結合親和性 (K_a) を P D - L 1 に対して有する。他の実施態様において、抗原結合性タンパク質は、少なくとも 10^7 、少なくとも 10^8 、少なくとも 10^9 または少なくとも 10^{10} の K_a を示す。他の実施態様において、抗原結合性タンパク質は、ここで実施例に記載する抗体のものと実質的に同等な K_a を示す。

30

【 0 0 6 3 】

他の実施態様において、本発明は、P D - L 1 からの低解離速度を有する、抗原結合性タンパク質を提供する。ある実施態様において、抗原結合性タンパク質は、 $1 \times 10^{-4} \sim 10^{-1}$ 以下の K_{off} を有する。他の実施態様において、 K_{off} は $5 \times 10^{-5} \sim 10^{-1}$ 以下である。他の実施態様において、 K_{off} は、ここに記載する抗体と実質的に同等である。他の実施態様において、抗原結合性タンパク質は、ここに記載する抗体と実質的に同等な K_{off} で P D - L 1 に結合する。

40

【 0 0 6 4 】

親和性パラメータは、当分野で知られる標準法、例えば、B I A C O R E を使用して決定し得る。

【 0 0 6 5 】

他の態様において、本発明は、P D - L 1 の活性を阻害する抗原結合性タンパク質を提供する。ある実施態様において、抗原結合性タンパク質は、 1000 nM 以下の $I C_{50}$ を有する。他の実施態様において、 $I C_{50}$ は 1000 nM 以下であり、他の実施態様において、 $I C_{50}$ は 10 nM 以下である。他の実施態様において、 $I C_{50}$ は、ここで実施例に記載する抗体のものと実質的に同等である。他の実施態様において、抗原結合性タンパク質

50

は、ここに記載する抗体と実質的に同等な IC_{50} で PD-L1 の活性を阻害する。

【0066】

他の態様において、本発明は、細胞の表面に発現されるヒト PD-L1 に結合し、そのように結合したとき、該細胞表面の PD-L1 量の有意な減少をもたらさず、該細胞における PD-L1 シグナル伝達活性を阻害する、抗原結合性タンパク質を提供する。細胞表面および/または内部の PD-L1 の量を決定または推定するあらゆる方法が使用され得る。他の実施態様において、抗原結合性タンパク質の PD-L1 発現細胞への結合は、細胞表面 PD-L1 の約 75%、50%、40%、30%、20%、15%、10%、5%、1% または 0.1% 未満を内在化させる。

【0067】

他の態様において、本発明は、インビトロまたはインビボ(例えば、ヒト対象に投与したとき)で少なくとも1日の半減期を有する抗原結合性タンパク質を提供する。ある実施態様において、抗原結合性タンパク質は、少なくとも3日の半減期を有する。他の実施態様において、抗原結合性タンパク質は、4日以上半減期を有する。他の実施態様において、抗原結合性タンパク質は、8日以上半減期を有する。他の実施態様において、抗原結合性タンパク質は、非誘導体化または非修飾抗原結合性タンパク質と比較して、長い半減期を有するように誘導体化または修飾される。他の実施態様において、抗原結合性タンパク質は、引用により本明細書に包含させる WO 00/09560 号に記載のような、血清半減期を延長するための1以上の点変異を含む。

【0068】

本発明は、さらに、多特異的抗原結合性タンパク質、例えば、二特異的抗原結合性タンパク質、例えば、2つの異なる抗原結合部位または領域により、PD-L1 の2つの異なるエピトープまたは PD-L1 のエピトープと他の分子のエピトープに結合する、抗原結合性タンパク質を提供する。さらに、ここに記載する抗体の1つからの PD-L1 結合部位および、ここに開示する二特異的抗原結合性タンパク質は、他の刊行物を引用してここに開示されるものを含むここに記載する他の抗体からの第二 PD-L1 結合領域を含むことができる。あるいは、二特異的抗原結合性タンパク質は、ここに記載する抗体の1つからの抗原結合部位および当分野で知られる他の PD-L1 抗体または既知方法もしくはここに記載する方法により製造した抗体からの第二抗原結合部位を含み得る。

【0069】

二特異的抗体を製造する多数の方法が当分野で知られる。このような方法は、Milstein et al., 1983, Nature 305:537に記載のハイブリッド-ハイブリドーマの使用および抗体フラグメントの化学カップリング(Brennan et al., 1985, Science 229:81; Glennie et al., 1987, J. Immunol. 139:2367; 米国特許 6,010,902 号)を含む。さらに、二特異的抗体は、組み換え手段により、例えばロイシンジッパー部分(すなわち、優先的にヘテロ二量体を形成する、Fos および Jun タンパク質から; Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148:1547)または米国特許 5,582,996 号に記載の他の鍵と鍵穴相互作用ドメイン構造の使用により、製造され得る。さらなる有用な技法は、米国特許 5,959,083 号および 5,807,706 号に記載のものを含む。

【0070】

他の態様において、抗原結合性タンパク質は、抗体の誘導体を含む。誘導体化抗体は、特定の用途における半減期延長などの、抗体に所望の性質を付与するあらゆる分子または物質を含み得る。誘導体化抗体は、例えば、検出可能(または標識)部分(例えば、放射性、比色、抗原性または酵素分子、検出可能ビーズ(例えば磁気または高電子密度(例えば、金ビーズ))または他の分子に結合する分子(例えば、ビオチンまたはストレプトアビジン)、治療用または診断用部分(例えば、放射性、細胞毒性または薬学的活性部分)または特定の用途(例えば、ヒト対象などの対象への投与または他のインビボまたはインビトロ用途)における抗体の適合性を高める分子を含み得る。抗体の誘導体化に使用され得る分子の例は、アルブミン(例えば、ヒト血清アルブミン)およびポリエチレングリコール(PEG)を含む。抗体のアルブミン結合およびペグ化誘導体は、当分野で周知の技法を使用して製造

され得る。ある実施態様において、抗体は、トランスサイレチン(TTR)またはTTRバリエーションにコンジュゲートまたは他の方法で結合される。TTRまたはTTRバリエーションは、例えば、デキストラン、ポリ(n-ビニルピロリドン)、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオールおよびポリビニルアルコールからなる群から選択される化学基で化学修飾され得る。

【0071】

1以上の抗原結合性タンパク質を含むオリゴマーをPD-L1アンタゴニストとして用い得る。オリゴマーは、共有結合的に結合したまたは非共有結合的に結合した二量体、三量体または高次オリゴマーの形であり得る。2以上の抗原結合性タンパク質を含むオリゴマーは、使用のために企図され、その一例はホモ二量体である。他のオリゴマーは、ヘテロ二量体、ホモ三量体、ヘテロ三量体、ホモ四量体、ヘテロ四量体などを含む。

10

【0072】

ある実施態様は、抗原結合性タンパク質に融合したペプチド部分間の共有結合的または非共有結合的相互作用により連結された複数抗原結合性タンパク質を含むオリゴマーに関する。このようなペプチドは、オリゴマー化を促進する性質を有するペプチドリンカー(スペーサー)またはペプチドであり得る。ロイシンジッパーおよび抗体由来のポリペプチドは、下にさらに詳述するとおり、それに結合した抗原結合性タンパク質のオリゴマー化を促進できるペプチドに包含される。

【0073】

20

特定の実施態様において、オリゴマーは、2~4抗原結合性タンパク質を含む。オリゴマーの抗原結合性タンパク質は、上記の形態の何れか、例えば、バリエーションまたはフラグメントなどの任意の形態であり得る。好ましくは、オリゴマーは、PD-L1結合活性を有する抗原結合性タンパク質を含む。

【0074】

ある実施態様において、オリゴマーは、免疫グロブリン由来ポリペプチドを使用して製造される。抗体由来ポリペプチドの種々の部分(Fcドメインを含む)に融合したある異種ポリペプチドを含む融合タンパク質の製造は、例えば、Ashkenazi et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10535; Byrn et al., 1990, Nature 344:677; およびHollenbach et al., 1992 "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", in Current Protocols in Immunology, Suppl. 4, pages 10.19.1-10.19.11により開示される。

30

【0075】

ある実施態様は、抗PD-L1抗体のPD-L1結合フラグメントの、抗体のFc領域への融合により作製した、2融合タンパク質を含む、二量体に関する。二量体は、例えば、融合タンパク質をコードする遺伝子融合体を適切な発現ベクターに導入し、該遺伝子融合体を組み換え発現ベクターで形質転換した宿主細胞で発現させ、発現させた融合タンパク質を抗体分子のように集合させ、次いで鎖間ジスルフィド結合がFc部分間に形成されて、二量体を得ることにより製造され得る。

【0076】

用語“Fcポリペプチド”は、抗体のFc領域由来の天然およびムテイン形態のポリペプチドを含む。二量体化を促進するヒンジ領域を含むこのようなポリペプチドの切断形態も包含される。Fc部分を含む融合タンパク質(およびそれから形成されるオリゴマー)は、タンパク質Aまたはタンパク質Gカラムによる親和性クロマトグラフィーによる精製が容易である利点を提供する。

40

【0077】

オリゴマー抗原結合性タンパク質を製造する他の方法は、ロイシンジッパーの使用を含む。ロイシンジッパードメインは、それが見られるタンパク質のオリゴマー化を促進するペプチドである。ロイシンジッパーは、最初は数DNA結合性タンパク質において同定され(Landschulz et al., 1988, Science 240:1759)、それ以来、多様な種々のタンパク質において発見されている。既知ロイシンジッパーに含まれるのは、二量体化または三量体

50

化する天然に存在するペプチドおよびその誘導体である。可溶性オリゴマータンパク質の産生に適するロイシンジッパードメインの例は、WO 94 / 10308号に記載されるものおよびHoppe et al., 1994, FEBS Letters 344:191に記載の肺表面活性タンパク質D (SPD)由来ロイシンジッパーである。融合した異種タンパク質の安定な三量体化を可能にする修飾ロイシンジッパーの使用は、Fanslow et al., 1994, Semin. Immunol. 6:267-78に記載される。ある試みにおいて、ロイシンジッパーペプチドに融合した抗PD-L1抗体フラグメントまたは誘導体を含む組み換え融合タンパク質が、適当な宿主細胞で発現され、形成される可溶性オリゴマー抗PD-L1抗体フラグメントまたは誘導体が、培養上清から採取される。

【0078】

10

ポリペプチドの翻訳後修飾

ある実施態様において、本発明の結合性ポリペプチドは、さらに翻訳後修飾を含み得る。翻訳後タンパク質修飾の例は、リン酸化、アセチル化、メチル化、ADPリボシル化、ユビキチン化、グリコシル化、カルボニル化、SUMO化、ピオチン化またはポリペプチド側鎖もしくは疎水性基の付加を含む。その結果、修飾可溶性ポリペプチドは、脂質、多または単糖およびリン酸などの非アミノ酸要素を含み得る。グリコシル化の好ましい形態は、1以上のシアル酸部分をポリペプチドにコンジュゲートさせるシアリル化である。シアル酸部分は、溶解度および血清半減期を改善し、同時にまたタンパク質のあり得る免疫原性を低減させる。Raju et al. Biochemistry. 2001 31; 40(30):8868-76参照。ポリペプチドの機能性に対するこのような非アミノ酸要素の効果は、PD-L1またはPD-1機能におけるその拮抗性の役割、例えば、血管形成または腫瘍増殖に対するその阻害性効果について試験され得る。

20

【0079】

ある特定の実施態様において、修飾形態の対象可溶性ポリペプチドは、対象可溶性ポリペプチドの非タンパク質性ポリマーへの結合を含む。ある特定の実施態様において、ポリマーは、米国特許4,640,835号、4,496,689号、4,301,144号、4,670,417号、4,791,192号または4,179,337号に示される方法における、ポリエチレングリコール(“PEG”)、ポリプロピレングリコールまたはポリオキシアルキレンである。

【0080】

30

PEGは、市販のまたは当分野で周知の方法によるエチレングリコールの開環重合により製造できる水可溶性ポリマーである(Sandler and Karo, Polymer Synthesis, Academic Press, New York, Vol. 3, pages 138-161)。用語“PEG”は、サイズまたはPEG末端への修飾と無関係に、あらゆるポリエチレングリコール分子を包含するように広義に使用され、式： $X - O(CH_2CH_2O)_n - CH_2CH_2OH$ (1)(式中、 n は20~2300であり、 X はHまたは末端修飾、例えば、 C_{1-4} アルキルである)により表すことができる。ある実施態様において、本発明のPEGは、一端がヒドロキシまたはメトキシで終わり、すなわち、 X はHまたは CH_3 (“メトキシPEG”)である。PEGは、結合反応に必要な、分子の化学合成に由来するまたは分子の複数部分の最適距離のためのスペーサーである、さらなる化学基を含んでよい。さらに、このようなPEGは、結合して一体となる、1以上のPEG側鎖からなり得る。1を超えるPEG鎖を有するPEGは、ここでは分岐または分枝PEGと称する。分枝PEGは、例えば、ポリエチレンオキシドの、グリセロール、ペンタエリトリールおよびソルビトールを含む種々のポリオールへの結合により製造され得る。例えば、4アーム分枝PEGは、ペンタエリトリールおよびエチレンオキシドから製造され得る。分枝PEGは、例えば、EP-A0473084号および米国特許5,932,462号に記載される。PEGの一形態は、リシンの一級アミノ基により結合した2PEG側鎖(PEG2)を含む(Monfardini et al., Bioconjugate Chem. 6 (1995) 62-69)。

40

【0081】

PEGは周知であるが、我々の知る限り、ペグ化 $^{10}F_n$ 3ポリペプチドがペグ化でき

50

、リガンド結合活性を保持することを証明したのは初めてである。好ましい実施態様において、ペグ化 ^{10}F n 3ポリペプチドを、部位特異的ペグ化により、特にPEGのシステイン部分へのNまたはC末端でのコンジュゲーションにより製造する。従って、本発明は、薬物動態が改善した標的結合 ^{10}F n 3ポリペプチドを提供し、該ポリペプチドは、約80～約150アミノ酸の ^{10}F n 3ドメイン(ここで、該 ^{10}F n 3ドメインのループの少なくとも1つが標的結合に参加する)および共有結合的に結合したPEG部分を含み、ここで、該 ^{10}F n 3ポリペプチドは、哺乳動物において100nM未満の K_D で標的に結合し、30mL/時間/kg未満のクリアランス速度を有する。PEG部分は、Cys残基への結合によるなどの部位特異的ペグ化により ^{10}F n 3ポリペプチドに結合でき、ここで、Cys残基は ^{10}F n 3ポリペプチドのN末端またはN末端と最N末端ベータもしくはベータ様鎖の間または ^{10}F n 3ポリペプチドのC末端またはC末端と最C末端ベータもしくはベータ様鎖の間に位置してよい。Cys残基は同様に他の位置に、特に標的結合に参加しないループの何れかに配置してよい。PEG部分はまたアミンへのコンジュゲーションによるものを含む、他の化学により結合させてもよい。

10

【0082】

ペプチドまたはタンパク質へのPEGコンジュゲーションは、一般にPEGの活性化および活性化PEG中間体の標的タンパク質/ペプチドへの直接のまたは、その後活性化され、標的タンパク質/ペプチドに結合されるリンカーへの、カップリングを含む(Abuchowski et al., J. Biol. Chem., 252, 3571 (1977)およびJ. Biol. Chem., 252, 3582 (1977), Zalipsky, et al.ならびにHarris et. al., in: Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications; (J. M. Harris ed.) Plenum Press: New York, 1992; Chap.21 and 22参照)。PEG分子を含む結合性ポリペプチドはまたコンジュゲートタンパク質としても知られ、一方結合したPEG分子がないタンパク質は、非コンジュゲートと称することがある。

20

【0083】

PD-L1結合性ポリペプチドへのコンジュゲートのために、例えば、約1,000ダルトン(Da)～100,000Da(n は20～2300である)の、多様な分子量形態のPEGが選択され得る。PEGの反復単位数“ n ”は、ダルトンで記載する分子量の概算である。活性化リンカー上のPEGの合算分子量が医薬用途に適することが好ましい。それ故に、ある実施態様において、PEG分子の分子量は100,000Daを超えない。例えば、リンカーに3PEG分子が結合するならば、各PEG分子が12,000Da(各 n は約270)の分子量を有するならば、リンカー上のPEGの総分子量は約36,000Da(総 n は約820)である。リンカーに結合するPEGの分子量は異なってもよく、例えば、リンカー上の3分子のうち、2PEG分子が各5,000Da(各 n は約110)であり、1PEG分子は12,000Da(n は約270)であってよい。

30

【0084】

本発明の特定の実施態様において、PD-L1結合性ポリペプチドは、式： $-CO-(CH_2)_x-(OCH_2CH_2)_m-OR$ の1つのポリ(エチレングリコール)に共有結合的に結合し、ポリ(エチレングリコール)基の $-CO$ (すなわちカルボニル)は、結合性ポリペプチドのアミノ基の1つとアミド結合を形成し、Rは低級アルキルであり、 x は2または3であり、 m は約450～約950であり、 n および m は、コンジュゲートから結合性ポリペプチドを減じた分子量が約10～40kDaになるように選択される。ある実施態様において、結合性ポリペプチドのリシンの6-アミノ基は、利用可能な(遊離)アミノ基である。

40

【0085】

上記コンジュゲートは、より具体的に式(II)： $P-NHCO-(CH_2)_x-(OCH_2CH_2)_m-OR$ (II)(式中、Pはここに記載する結合性ポリペプチドの基である、すなわち式(II)に示されるカルボニルとアミド結合を形成する1以上のアミノ基がなく、Rは低級アルキルであり、 x は2または3であり、 m は約450～約950であり、コンジュゲートから結合性ポリペプチドを減じた分子量が約10～40kDaになるように選択さ

50

れる)により表され得る。ここで使用する、“m”の記載する範囲は、配向性の意味を有する。“m”の範囲は何れの場合も、そして厳密に、PEG基の分子量により決定される。

【0086】

当業者は、例えば、ペグ化結合性ポリペプチドがどのように治療的に使用されるか、所望の投与量、循環時間、タンパク質分解に対する抵抗性、免疫原性および他の考察に基づき、PEGの適当な分子質量を選択できる。PEGおよびタンパク質の性質を増強するためのその使用の検討について、Katre, *Advanced Drug Delivery Reviews* 10: 91-114 (1993)を参照のこと。

【0087】

ある実施態様において、PEG分子を活性化させて、リシンなどの結合性ポリペプチド上のアミノ基と反応させ得る(Bencham et al., *Anal. Biochem.*, 131, 25 (1983); Veronese et al., *Appl. Biochem.*, 11, 141 (1985); Zalipsky et al., *Polymeric Drugs and Drug Delivery Systems*, adrs 9-110 ACS Symposium Series 469 (1999); Zalipsky et al., *Europ. Polym. J.*, 19, 1177-1183 (1983); Delgado et al., *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 12, 119-128 (1990))。

【0088】

ある特定の実施態様において、PEGの炭酸エステルを使用して、PEG結合性ポリペプチドコンジュゲートを形成する。N,N'-ジスクシンイミジルカーボネート(DSC)を、PEGとの反応に使用して、活性混合型PEG-スクシンイミジルカーボネートを形成でき、これをその後リンカーの求核性基または結合性ポリペプチドのアミノ基と反応させ得る(米国特許5,281,698号および5,932,462号参照)。類似タイプの反応において、1,1'-(ジベンゾトリアゾリル)カーボネートおよびジ-(2-ピリジル)カーボネートをPEGと反応させて、それぞれ、PEG-ベンゾトリアゾリルおよびPEG-ピリジル混合型カーボネート(米国特許5,382,657)を形成し得る。

【0089】

¹⁰F_n3ポリペプチドのペグ化を、最先端の方法により、例えば結合性ポリペプチドと求電子的に活性なPEG(供給者: Shearwater Corp., USA, www.shearwatercorp.com)の反応により、実施できる。本発明の好ましいPEG剤は、例えば、N-ヒドロキシスクシンイミジルプロピオネート(PEG-SPA)、ブタノエート(PEG-SBA)、PEG-スクシンイミジルプロピオネートまたは分枝N-ヒドロキシスクシンイミド、例えば、mPEG2-NHSである(Monfardini et al., *Bioconjugate Chem.* 6 (1995) 62-69)。このような方法を使用して、結合性ポリペプチドのリシンのε-アミノ基または結合性ポリペプチドのN末端アミノ基でペグ化し得る。

【0090】

他の実施態様において、PEG分子を、結合性ポリペプチドのスルフヒドリル基と結合させ得る(Sartore et al., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 27, 45 (1991); Morpurgo et al., *Biocon. Chem.*, 7, 363-368 (1996); Goodson et al., *Bio/Technology* (1990) 8, 343; 米国特許5,766,897号)。米国特許6,610,281号および5,766,897号は、スルフヒドリル基に結合し得る反応性PEG種の例を記載する。

【0091】

PEG分子が結合性ポリペプチドのシステイン残基にコンジュゲートするある実施態様において、システイン残基は元々結合性ポリペプチドにあり、一方他の実施態様において、1以上のシステイン残基は、結合性ポリペプチドに形成される。変異を結合性ポリペプチドコード配列に導入して、システイン残基を形成し得る。これは、例えば、1以上のアミノ酸残基のシステインへの変異により達成される。システイン残基に変異するための好ましいアミノ酸は、セリン残基、スレオニン残基、アラニン残基および他の親水性残基を含む。好ましくは、システインに変異させる残基は、表面露出残基である。一次配列またはタンパク質に基づく残基の表面アクセシビリティを予測するためのアルゴリズムは、当分野で周知である。あるいは、表面残基は、結合性ポリペプチドが設計され、展開されて

10

20

30

40

50

いるフレームワークの結晶構造が解明されたならば、結合性ポリペプチドのアミノ酸配列との比較により予測でき(Himanen et al., Nature. (2001) 20-27; 414(6866):933-8)、
そうして、表面露出残基が決定される。ある実施態様において、システイン残基は、Nおよび/またはC末端またはその近辺またはループ領域内で結合性ポリペプチドに導入される。

【0092】

ある実施態様において、ペグ化結合性ポリペプチドは、N末端アミノ酸のアルファアミノ基に共有結合的に結合したPEG分子を含む。部位特異的N末端還元的アミノ化は、Peppinsky et al., (2001) JPET, 297, 1059および米国特許5,824,784号に記載される。他の利用可能な求核性アミノ基を利用する、タンパク質の還元的アミノ化のためのPEG-アルデヒドの使用は、米国特許4,002,531号、Wieder et al., (1979) J. Biol. Chem. 254,12579およびChamow et al., (1994) Bioconjugate Chem. 5, 133に記載される。

10

【0093】

他の実施態様において、ペグ化結合性ポリペプチドは、リンカーに共有結合的に結合した1以上のPEG分子を含み、当該リンカーが次に結合性ポリペプチドのN末端でアミノ酸残基のアルファアミノ基に結合する。このような試みは、米国特許公開2002/0044921号およびWO094/01451号に開示される。

【0094】

ある実施態様において、結合性ポリペプチドは、C末端でペグ化される。特定の実施態様において、タンパク質は、C末端アジド-メチオニンの導入および引き続くシュタウディング反応によるメチル-PEG-トリアリールホスフィン化合物のコンジュゲーションにより、C末端でペグ化される。このC末端コンジュゲーション方法は、Cazalis et al., Bioconjug. Chem. 2004; 15(5):1005-1009に記載される。

20

【0095】

結合性ポリペプチドのモノペグ化はまたWO94/01451号に記載の一般法によっても行い得る。WO94/01451号は、修飾末端アミノ酸アルファ-炭素反応性基を有する組み換えポリペプチドを製造する方法を記載する。該方法の工程は、組み換えポリペプチドの形成およびN末端アルファ-アミンおよびC末端アルファ-カルボキシルでの1以上の生物学的に付加された保護基での保護を含む。次いで、ポリペプチドを化学保護剤と反応させて、反応性側鎖基を選択的に保護し、それにより側鎖基が修飾されるのを阻止する。次いで、ポリペプチドを、生物学的保護基に特異的な開裂剤で開裂し、非保護末端アミノ酸アルファ-炭素反応性基を形成する。非保護末端アミノ酸アルファ-炭素反応性基を、化学修飾剤で修飾する。次いで、側鎖保護された末端修飾された単一コピーポリペプチドを側鎖基で脱保護して、末端修飾された組み換え単一コピーポリペプチドを形成する。本方法の工程の数および順番は、ポリペプチドのNおよび/またはC末端アミノ酸での選択的修飾を達成するために変わり得る。

30

【0096】

コンジュゲーション反応における結合性ポリペプチド対活性化PEGの比は、約1:0.5~1:50、約1:1~1:30または約1:5~1:15であり得る。種々の水性緩衝液を本方法において使用して、結合性ポリペプチドへのPEGの共有結合的付加を触媒し得る。ある実施態様において、使用する緩衝液のpHは約7.0~9.0である。他の実施態様において、pHは、わずかに塩基性の範囲、例えば、約7.5~8.5である。中性pH範囲に近いpKaを有する緩衝液、例えば、リン酸緩衝液を使用し得る。

40

【0097】

サイズ排除(例えばゲル濾過)およびイオン交換クロマトグラフィーなどの当分野で知られる慣用の分離および精製技法をペグ化結合性ポリペプチドの精製に使用できる。生成物を、SDS-PAGEを使用して分離してもよい。分離され得る生成物は、モノ-、ジ-、トリ-、ポリ-および非ペグ化結合性ポリペプチド、ならびに遊離PEGを含む。モノ-PEGコンジュゲートのパーセンテージを、組成物のモノ-PEGのパーセンテージを

50

増加させるように、溶出ピーク近辺の広い画分を貯留することにより制御することができる。約90パーセントのモノ-PEGコンジュゲートが収率と活性の良好なバランスを表す。例えば、コンジュゲートの、少なくとも92パーセントまたは少なくとも96パーセントがモノ-PEG種である組成物が望まれ得る。本発明のある実施態様において、モノ-PEGコンジュゲートのパーセンテージは90パーセント~96パーセントである。

【0098】

ある実施態様において、本発明のペグ化結合性ポリペプチドは、1、2またはそれ以上のPEG部分を含む。ある実施態様において、PEG部分は、タンパク質の表面上のおよび/または標的リガンドと接触する表面から離れているアミノ酸残基に結合する。ある実施態様において、PEG結合性ポリペプチドにおけるPEGの合算または総分子質量は、約3,000Da~60,000Da、所望により約10,000Da~36,000Daである。ある実施態様において、ペグ化結合性ポリペプチドにおけるPEGは、実質的に直線状の、直鎖PEGである。

【0099】

ある実施態様において、ペグ化結合性ポリペプチドにおけるPEGは、ヒドロキシルアミンアッセイ、例えば、8~16時間にわたる、室温での450mM ヒドロキシルアミン(pH6.5)を使用してペグ化アミノ酸残基から加水分解されず、それ故に、安定である。ある実施態様において、組成物の80%超、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%が安定なモノ-PEG結合性ポリペプチドである。

【0100】

他の実施態様において、本発明のペグ化結合性ポリペプチドは、好ましくは非修飾タンパク質に関連する生物活性の少なくとも25%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%または100%を保持する。ある実施態様において、生物活性は、 K_D 、 k_{on} または k_{off} により評価される、PD-L1に結合するその能力をいう。ある特定の実施態様において、ペグ化結合性ポリペプチドタンパク質は、非ペグ化結合性ポリペプチドと比較して、PD-L1への結合の増加を示す。

【0101】

PEG修飾ポリペプチドの血清クリアランス速度は、非修飾結合性ポリペプチドのクリアランス速度と比較して、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%または90%さえも減少され得る。PEG修飾ポリペプチドは、非修飾タンパク質の半減期に対して増強された半減期($t_{1/2}$)を有し得る。PEG結合性ポリペプチドの半減期は、非修飾結合性ポリペプチドの半減期に対して、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、400%または500%または1000%さえも増強され得る。ある実施態様において、タンパク質半減期を、緩衝化食塩水溶液または血清などのインビトロで決定する。他の実施態様において、タンパク質半減期は、動物の血清または他の体液における該タンパク質の半減期などのインビボ半減期である。

【0102】

治療方法、製剤および投与方式

ここに提供されるある方法は、PD-L1結合抗原結合性タンパク質を対象に投与し、それにより特定の状態において役割を有するPD-L1誘発生物学的応答を低減することを含む。特定の実施態様において、本発明の方法は、内因性PD-L1とPD-L1結合抗原結合性タンパク質を、例えば、対象への投与またはエキスピボ手法により接触させることを含む。

【0103】

用語“処置”は、少なくとも1症状または障害の他の態様の軽減または予防または疾患重症度の低減などを包含する。抗原結合性タンパク質は、価値ある治療剤を構成するために、疾患の全ての症状または徴候の完全治癒または根絶に効果がある必要はない。関連分野において認識されるとおり、治療剤として用いられる薬物は、ある疾患状態の重症度を低減させ得るが、有用な治療剤として認識されるために疾患の全ての徴候を消失させる必

10

20

30

40

50

要はない。同様に、予防的に投与される処置は、価値ある予防剤を構成するために、状態の発症予防に完全に有効である必要はない。単なる疾患の影響の低減(例えば、症状の数または重症度の低減または他の処置の有効性の増加または他の有益な効果の発生による)または対象において疾患が生じるまたは悪化する可能性の低減が十分である。本発明のある実施態様は、特定の障害の重症度を反映する指標のベースラインを超える持続性の改善を誘発するのに十分な、量および時間、患者にPD-L1アンタゴニストを投与することを含む、方法に関する。

【0104】

本発明は、PD-L1生物活性の阻害に応答する状態を処置するまたは前駆状態を予防する方法に関する。好ましい例は、炎症または細胞過増殖により特徴付けられる状態である。投与のための技法および投与量は、特定のポリペプチドおよび処置する特定の状態のタイプにより変わるが、当業者により容易に決定され得る。一般に、規制当局は、治療剤として使用されるタンパク質剤は、容認できる低レベルの発熱物質を有するように製剤されることを要求する。従って、治療製剤は、一般に実質的に発熱物質を含まないまたは少なくとも適切な規制当局(例えば、FDA)により決定される許容されるレベルを超える発熱物質を含まない点で、他の製剤と区別される。

【0105】

関連分野において理解されたとおり、本発明の抗体およびそのフラグメントを含む医薬組成物は、適応症に適する方式で対象に投与される。それ故に、本発明は、ここに開示する抗PD-L1抗体(またはフラグメント)および薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物を含む。

【0106】

医薬組成物は、経腸的、局所的または吸入を含むが、これらに限定されない任意の適当な技法により投与され得る。注射ならば、医薬組成物は、例えば、関節内、静脈内、筋肉内、病巣内、腹腔内または皮下経路により、ボラス注射または連続点滴により投与され得る。経皮送達およびインプラントからの持続的放出におけるような、例えば疾患または傷害の部位への、局在型投与が企図される。吸入による送達は、例えば、経鼻または経口吸入、ネブライザーの使用、エアロゾル形態のアンタゴニストの吸入などを含む。他の選択肢は、点眼、丸剤、シロップ剤、ロゼンジ剤またはチューインガム剤を含む経口製剤ならびにローション剤、ゲル剤、スプレー剤および軟膏剤などの局所製剤を含む。

【0107】

有利には、抗原結合性タンパク質は、生理学的に許容される担体、添加物または希釈剤などの1以上の付加的成分を含む組成物の形態で投与される。所望により、組成物は、1以上の生理学的活性剤、例えば、第二の炎症または免疫阻害性物質、抗血管形成物質、鎮痛物質などをさらに含み、その非排他的例は、ここに提供される。種々の特定の実施態様において、組成物は、PD-L1結合抗原結合性タンパク質に加えて、1、2、3、4、5または6の生理学的活性剤を含む。

【0108】

本発明の治療組成物を、薬学的に許容される希釈剤、担体または添加物と共に、単位剤形で投与し得る。投与は、非限定的例として、経腸(例えば、静脈内、皮下)、経口または局所であり得る。さらに、患者の細胞のエクスピボ操作を含む、ネイキッドDNA送達、組み換え遺伝子およびベクター、細胞ベースの送達など、本発明のポリペプチドをコードする核酸を使用する任意の遺伝子療法技法を用いてよい。

【0109】

組成物は、経口投与用丸剤、錠剤、カプセル剤、液体または持続的放出錠剤または静脈内、皮下または経腸投与用液体、局所投与用ゲル剤、ローション剤、軟膏、クリーム剤またはポリマーもしくは他の持続的放出媒体の形であり得る。

【0110】

製剤を製造するための当分野で周知の方法は、例えば、"Remington: The Science and Practice of Pharmacy" (20th ed., ed. A. R. Gennaro A R., 2000, Lippincott Willia

10

20

30

40

50

ms & Wilkins, Philadelphia, PA)に見ることができる。非経腸投与用製剤は、例えば、添加物、無菌水、食塩水、ポリエチレングリコールなどのポリアルキレングリコール、植物起源油または水素化ナフタレンを含み得る。生体適合性、生分解性ラクチドポリマー、ラクチド/グリコリドコポリマーまたはポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレンコポリマーを、化合物の放出制御のために使用し得る。ナノ粒子製剤(例えば、生分解性ナノ粒子、固形脂質ナノ粒子、リボソーム)を、化合物の体内分布制御に使用し得る。他の有用な可能性のある非経腸送達系は、エチレン-酢酸ビニルコポリマー粒子、浸透圧ポンプ、植込み型注入システムおよびリボソームを含む。製剤中の化合物の濃度は、投与すべき薬物の投与量および投与経路を含む、多数の因子により変わる。

【0111】

ポリペプチドは、所望により、医薬品産業において一般に使用される非毒性酸付加塩などの薬学的に許容される塩または金属錯体として投与され得る。酸付加塩の例は、酢酸、乳酸、パモ酸、マレイン酸、クエン酸、リンゴ酸、アスコルビン酸、コハク酸、安息香酸、パルミチン酸、スベリン酸、サリチル酸、酒石酸、メタンスルホン酸、トルエンスルホン酸またはトリフルオロ酢酸などの有機酸、タンニン酸、カルボキシメチルセルロースなどのポリマー酸および塩酸、臭化水素酸、硫酸リン酸などの無機酸を含む。金属錯体は、亜鉛、鉄などを含む。一例において、ポリペプチドを、熱安定性を高めるために、酢酸ナトリウム存在下製剤する。

【0112】

経口使用のための製剤は、非毒性で薬学的に許容される添加物との混合物で活性成分を含む錠剤を含む。これらの添加物は、例えば、不活性希釈剤または充填剤(例えば、スクロースおよびソルビトール)、滑沢剤、流動性促進剤および抗接着剤(例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸亜鉛、ステアリン酸、シリカ、水素化植物油またはタルク)であり得る。経口使用のための製剤はまた咀嚼錠剤または活性成分が不活性固形希釈剤と混合されている硬ゼラチンカプセル剤または活性成分が水または油媒体と混合されている軟ゼラチンカプセル剤としても提供されてよい。

【0113】

治療有効用量は、投与されたものに対して治療効果を生じる用量をいう。正確な用量は、処置する障害により、既知技法を使用して当業者により確認され得る。一般に、ポリペプチドは、1日あたり約0.01 μg/kg~約50 mg/kg、好ましくは1日あたり0.01 mg/kg~約30 mg/kg、最も好ましくは1日あたり0.1 mg/kg~約20 mg/kg投与される。ポリペプチドは、毎日(例えば、1日1回、2回、3回または4回)または好ましくは低頻度(例えば、毎週、2週毎、3週毎、毎月または四半期毎)で投与され得る。さらに、当分野において知られるとおり、年齢ならびに体重、一般的健康状態、性別、食習慣、投与の時間、薬物相互作用および疾患の重症度に対する調整が必要であり得るが、当業者により日常の実験により確認可能である。

【0114】

ここに記載するPD-L1結合性タンパク質およびその関連バリエーションは、多数の治療および診断適用において有用である。これらは、PD-L1への結合の競合または遮断によるPD-L1の生物活性の阻害ならびに細胞、好ましくは細胞発現PD-L1への細胞毒性または造影部分の送達を含む。これらの分子の小さなサイズおよび安定な構造が、薬物の製造、迅速なクリアランスが望まれるある適用について体からの迅速なクリアランスまたはこのような特徴を有する分子を使用して適するまたは改善される新規送達系への製剤に関して、特に価値がある。

【0115】

ある態様において、本発明は、対象を処置する方法を提供する。方法は、例えば、対象に一般に健康によい効果を有し、例えば、対象の余命を延長できる。あるいは、方法は、疾患、障害、状態または病気(“状態”)を、例えば、処置、予防、治療、緩和または改善する。処置される状態は、PD-L1の不適切な発現または活性により特徴付けられる状態を含む。このような状態の一部において、発現または活性レベルは高過ぎ、処置は、こ

10

20

30

40

50

ここに記載するPD-L1アンタゴニストの投与を含む。障害または状態は癌関連である。特に、これらの癌は、肺、卵巣および結腸癌および種々の骨髄腫を含むが、これらに限定されない。

【0116】

本発明の抗原結合性タンパク質で処置可能または予防可能な特定の医学的状态および疾患は種々の癌を含む。

【0117】

PD-L1の生物活性の阻害剤としての有効性に基づき、本発明のポリペプチドは、多数の癌状態ならびに胸水および腹水などの癌に起因する合併症に対して有効である。好ましくは、本発明のPD-L1結合性ポリペプチドを、過増殖性疾患または癌および癌の転移拡散の処置または予防に使用できる。本発明の抗PD-L1抗体の好ましい適応症は、結腸直腸癌、頭頸部癌、小細胞肺癌、非小細胞性肺癌(NSCLC)および膵臓癌を含む。癌の非限定的例は、膀胱、血液、骨、脳、乳房、軟骨、結腸腎臓、肝臓、肺、リンパ節、神経組織、卵巣、膵臓、前立腺、骨格筋、皮膚、脊髄、脾臓、胃、精巣、胸腺、甲状腺、気管、泌尿生殖路、輸尿管、尿道、子宮または膣の癌を含む。ある実施態様において、処置される癌は、卵巣癌、結腸癌、乳癌または肝臓癌、骨髄腫、神経芽細胞由来CNS腫瘍、単球性白血病、B細胞由来白血病、T細胞由来白血病、B細胞由来リンパ腫、T細胞由来リンパ腫、肥満細胞由来腫瘍およびこれらの任意の組み合わせから選択される。

10

【0118】

ある実施態様において、処置される哺乳動物の広範囲の癌は、卵巣、結腸、乳房、肺癌、骨髄腫、神経芽細胞由来CNS腫瘍、単球性白血病、B細胞由来白血病、T細胞由来白血病、B細胞由来リンパ腫、T細胞由来リンパ腫、肥満細胞由来腫瘍およびこれらの組み合わせからなる群から選択される。好ましくは、自己免疫性疾患または炎症性疾患は、腸粘膜炎症、大腸炎と関連する消耗性疾患、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、ウイルス感染症、リウマチ性関節炎、骨関節症、乾癬、クローン病および炎症性腸疾患からなる群から選択される。

20

【0119】

さらに、種々の炎症性障害が、ここに開示する本発明の抗PD-L1結合性ポリペプチドにより処置され得る。このような炎症性障害は、例えば、大腸炎と関連する腸粘膜炎症消耗性疾患、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、ウイルス感染症、リウマチ性関節炎、骨関節症、乾癬およびクローン病を含む。

30

【0120】

エキスピボ手法における抗原結合性タンパク質使用も企図される。例えば、患者の血液または他の体液を、エキスピボでPD-L1に結合する抗原結合性タンパク質と接触させ得る。抗原結合性タンパク質は、適当な不溶性マトリクスまたは固形支持材に結合され得る。

【0121】

PD-L1結合性ポリペプチドは単独でまたは化学療法、放射線療法、免疫療法、外科的処置またはこれらの任意の組み合わせなどの1以上の付加的治療剤と組み合わせて投与できる。長期治療は、上記の他の処置戦略におけるアジュバント治療と同様に可能である。

40

【0122】

他の実施態様において、方法は、ここに記載するPD-L1アンタゴニストの1以上および1以上の他の処置(例えば、治療的または対症的処置)の投与を含む。方法が対象への1を超える処置の投与を含むとき、投与の順番、タイミング、数、濃度および体積は、医学的要求および処置の制限によってのみ制限され、すなわち、2処置は、対象に、例えば、同時に、一緒に、交互にまたは任意の他のレジメンによって投与してよい。

【0123】

それ故に、他の態様において、本発明は、PD-L1阻害性抗原結合性タンパク質および1以上の他の処置で対象を処置する方法を提供する。ある実施態様において、このよう

50

な組み合わせ治療は、例えば、腫瘍における複数部位または分子標的の攻撃により、相乗的または相加的效果を達成する。本発明に関連して使用し得る組み合わせ治療のタイプは、単一疾患関連経路における複数節、標的細胞における複数経路および標的組織内の複数細胞型の阻害または活性化(適当ならば)を含む。

【0124】

他の実施態様において、組み合わせ治療方法は、対象に2、3、4、5、6またはそれ以上のここに記載するPD-L1アゴニストまたはアンタゴニストを投与することを含む。他の実施態様において、方法は、対象に、一体となってPD-L1介在シグナル伝達を阻害または活性化(直接的または間接的)する2以上の処置を投与することを含む。このような方法の例は、2以上のPD-L1阻害性抗原結合性タンパク質、PD-L1阻害性抗原結合性タンパク質と1以上の抗癌性質(例えば、細胞毒性剤および/または免疫調節剤)を有する他の治療部分またはPD-L1阻害性抗原結合性タンパク質と1以上の他の処置(例えば、手術または放射線照射)の組み合わせの使用を含む。さらに、1以上の抗PD-L1抗体または抗体誘導体を、1以上の分子または他の処置と組み合わせて使用でき、ここで、他の分子および/または処置はPD-L1に直接結合または影響しないが、この組み合わせは、処置される状態の処置または予防に有効である。ある実施態様において、分子および/または処置の1以上は、治療の間に他の分子または処置の1以上により引き起こされる状態、例えば、悪心、疲労、脱毛症、カヘキシー、不眠症などを処置または予防する。分子および/または他の処置の組み合わせが使用される全ての場合において、個々の分子および/または処置は、任意の期間にわたり、例えば、同時、一緒または交互の、有効である任意の順番で投与できる。ある実施態様において、処置の方法は、二回目の処置の開始前の、ある分子または他の処置での初回の処置の完了を含む。初回の処置の終わってから二回目の処置の開始までの期間の長さは、治療の総経過を有効とする任意の期間、例えば、秒、分、時間、日、週、月または年でさえあり得る。

【0125】

ある実施態様において、本発明の対象抗PD-L1抗体剤は、単独で使用され得る。あるいは、対象剤を、増殖性障害(例えば、腫瘍)の処置または予防に対する他の慣用の抗癌治療法と組み合わせて使用し得る。例えば、このような方法を、予防的癌阻止、手術後の癌再発および転移予防および他の慣用の癌治療のアジュバントとして使用し得る。本発明は、慣用の癌治療(例えば、化学療法、放射線照射治療、光線療法、免疫療法および手術)の有効性は、対象ポリペプチド治療剤の使用により増強され得ることを認める。

【0126】

このような方法のある実施態様において、1以上のポリペプチド治療剤を、一緒に(同時に)または異なる時に(逐次的に)投与してよい。さらに、ポリペプチド治療剤を、癌処置または血管形成阻害のための他のタイプの化合物と投与してよい。

【0127】

幅広い慣用の化合物が、抗新生物活性を有することが示されている。これらの化合物は、固形腫瘍退縮、転移およびさらなる増殖阻止または白血病または骨髄悪性腫瘍における悪性細胞数減少のための化学療法における医薬として使用されている。化学療法は、種々のタイプの悪性腫瘍の処置に有効であるが、多くの抗新生物化合物は、望ましくない副作用を誘発する。2以上の異なる処置を組み合わせたととき、これら処置は、相乗的に働き、各処置の投与量の減少を可能にし、それにより高投与量で各化合物により生じる有害副作用を減少することが示されている。他の例において、ある処置に難治性である悪性腫瘍は、2以上の異なる処置の組み合わせ治療に応答し得る。

【0128】

本発明のポリペプチド治療剤を他の慣用の抗新生物剤と組み合わせて、同時にまたは逐次的に投与したとき、このような治療剤は、抗新生物剤の治療効果を増強するかまたはこのような抗新生物剤に対する細胞耐性を克服することが見られ得る。これは、抗新生物剤の投与量を減少させ、それにより望ましくない副作用を減少するかまたは耐性細胞に対する抗新生物剤の有効性を回復させることを可能とする。

【 0 1 2 9 】

組み合わせ抗腫瘍治療に使用し得る医薬化合物は、単なる例として、アミノグルテチミド、アムサクリン、アナストロゾール、アスパラギナーゼ、b c g、ピカルタミド、ブレオマイシン、ブセレリン、ブスルファン、カンプトテシン、カペシタビン、カルボプラチン、カルムスチン、クロラムブシル、シスプラチン、クラドリビン、クロドロネ酸、コルヒチン、シクロホスファミド、シプロテロン、シタラビン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ジエネストロール、ジエチルスチルベストロール、ドセタキセル、ドキシソルビシン、エピルビシン、エストラジオール、エストラムスチン、エトポシド、エキセメスタン、フィルグラスチム、フルダラビン、フルドロコルチゾン、フルオロウラシル、フルオキシメステロン、フルタミド、ゲムシタビン、ゲニステイン、ゴセレリン、ヒドロキシ尿素、イダルビシン、イホスファミド、イマチニブ、インターフェロン、イリノテカン、イリノテカン、レトロゾール、ロイコボリン、リユープロリド、レバミソール、ロムスチン、メクロレタミン、メドロキシプロゲステロン、メゲストロール、メルファラン、メルカプトプリン、メスナ、メトトレキサート、マイトマイシン、ミトタン、ミトキサントロン、ニルタミド、ノコダゾール、オクトレオチド、オキサリプラチン、パクリタキセル、パミドロン酸、ペントスタチン、プリカマイシン、ポルフィマー、プロカルバジン、ラルチトレキセド、リツキシマブ、ストレプトゾシン、スラミン、タモキシフェン、テモゾロミド、テニポシド、テストステロン、チオグアニン、チオテパ、チタノセンジクロリド、トボテカン、トラスツズマブ、トレチノイン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシンおよびビノレルビンを含む。

10

20

【 0 1 3 0 】

ある化学療法抗腫瘍化合物は、作用機序により、例えば、次の群に分類され得る。ピリミジンアナログ(5 - フルオロウラシル、フロクスウリジン、カペシタビン、ゲムシタビンおよびシタラビン)およびプリンアナログ、葉酸アンタゴニストおよび関連阻害剤(メルカプトプリン、チオグアニン、ペントスタチンおよび2 - クロロデオキシアデノシン(クラドリビン))などの代謝拮抗剤/抗癌剤；ピンカアルカロイド(ビンブラスチン、ビンクリスチンおよびビノレルビン)などの天然物、タキサン(パクリタキセル、ドセタキセル)、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ノコダゾール、エポチロンおよびナベルピン、エビジポドフィロトキシン(エトポシド、テニポシド)、DNA 損傷剤(アクチノマイシン、アムサクリン、アントラサイクリン、ブレオマイシン、ブスルファン、カンプトテシン、カルボプラチン、クロラムブシル、シスプラチン、シクロホスファミド、シトキサン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキシソルビシン、エピルビシン、ヘキサメチルメラミンオキサリプラチン、イホスファミド、メルファラン、メクロレタミン、マイトマイシン、ミトキサントロン、ニトロソ尿素、プリカマイシン、プロカルバジン、タキソール、タキソテル、テニポシド、トリエチレンチオホスホロアミドおよびエトポシド(V P 1 6))などの微小管攪乱剤を含む抗増殖性/有糸分裂阻害剤；ダクチノマイシン(アクチノマイシンD)、ダウノルビシン、ドキシソルビシン(アドリアマイシン)、イダルビシン、アントラサイクリン、ミトキサントロン、ブレオマイシン、プリカマイシン(ミトラマイシン)およびマイトマイシンなどの抗生物質；酵素(L - アスパラギンを全身性に代謝し、自身のアスパラギンを合成する能力を有しない細胞で欠乏させるL - アスパラギナーゼ)；抗血小板剤；窒素マスタード(メクロレタミン、シクロホスファミドおよびアナログ、メルファラン、クロラムブシル)、エチレンイミンおよびメチルメラミン(ヘキサメチルメラミンおよびチオテパ)、アルキルスルホネート - ブスルファン、ニトロソウレア(カルムスチン(B C N U)およびアナログ、ストレプトゾシン)、トリアゼン - ダカルバジン(D T I C)などの抗増殖性/抗有糸分裂アルキル化剤；葉酸アナログ(メトトレキサート)などの抗増殖性/抗有糸分裂代謝拮抗剤；白金配位錯体(シスプラチン、カルボプラチン)、プロカルバジン、ヒドロキシ尿素、ミトタン、アミノグルテチミド；ホルモン、ホルモンアナログ(エストロゲン、タモキシフェン、ゴセレリン、ピカルタミド、ニルタミド)およびアロマターゼ阻害剤(レトロゾール、アナストロゾール)；抗凝血剤(ヘパリン、合成ヘパリン塩および他のトロンビンの阻害剤)；血栓溶解剤(例えば組織プラスミノゲン活性化因子、

30

40

50

ストレプトキナーゼおよびウロキナーゼ)、アスピリン、ジピリダモール、チクロピジン、クロピドグレル、アブシキシマブ；抗遊走剤；抗分泌剤(プレフェルジン)；免疫抑制剤(シクロスポリン、タクロリムス(FK-506)、シロリムス(ラパマイシン)、アザチオプリン、ミコフェノール酸モフェチル)；抗血管形成化合物(TNP-470、ゲニステイン)および増殖因子阻害剤(例えば、VEGF阻害剤、線維芽細胞増殖因子(FGF)阻害剤)；アンギオテンシン受容体ブロッカー；一酸化窒素ドナー；アンチセンスオリゴヌクレオチド；抗体(トラスツズマブ)；細胞周期阻害剤および分化誘発因子(トレチノイン)；mTOR阻害剤、トポイソメラーゼ阻害剤(ドキシソルピシン(アドリアマイシン)、アムサクリン、カンプトテシン、ダウノルピシン、ダクチノマイシン、テニボシド、エピルピシン、エトボシド、イダルピシンおよびミトキサントロン、トポテカン、イリノテカン)、コルチコステロイド(コルチゾン、デキサメサゾン、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾン、プレドニゾンおよびプレニゾン)；増殖因子シグナル伝達キナーゼ阻害剤；ミトコンドリア機能不全誘発因子およびカスパーゼアクティベーター；およびクロマチン攪乱剤。

10

【0131】

組み合わせ治療の性質により、本発明の抗PD-L1抗体(またはそのフラグメント)の投与を、他の治療を投与している間および/またはその後につけて得る。ポリペプチド治療剤の投与は、単回投与または複数回投与で行い得る。いくつかの例において、ポリペプチド治療剤の投与を、慣用の治療の少なくとも数日前に開始し、一方他の例において、投与を、慣用の治療の投与の直前または同時に開始する。

20

【0132】

診断適応の一例において、不適切な血管形成により特徴付けられる状態を有することが疑われる患者からの血清または組織生検などの生物学的サンプルを、検出可能に標識した本発明のポリペプチドと接触させて、PD-L1のレベルを検出する。検出されたPD-L1のレベルを、次いで、同様に標識ポリペプチドと接触させた正常サンプルで検出されたPD-L1のレベルと比較する。PD-L1のレベルの少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%または90%増加が、診断的指標と考えられ得る。

【0133】

ある実施態様において、PD-L1結合性ポリペプチドを、さらに検出され得る標識に結合する(例えば、標識は、放射性同位体、蛍光化合物、酵素または酵素補因子であり得る)。活性部分は、鉄キレートなどの放射性重金属、ガドリニウムまたはマンガンの放射性キレート、酸素、窒素、鉄、炭素またはガリウムの陽電子放射体、 ^{43}K 、 ^{52}Fe 、 ^{57}Co 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{132}I または ^{99}Tc などの放射性薬剤であり得る。このような部分に付加された結合剤は、造影剤として使用でき、ヒトなどの哺乳動物に診断用途に有効な量で投与され、次いで、該造影剤の局在性および蓄積が検出される。造影剤の局在性および蓄積は、ラジオシンチグラフィ、核磁気共鳴造影、コンピューター断層撮影または陽電子放出断層撮影により検出され得る。PD-L1を指向するPD-L1結合性ポリペプチドを使用する免疫シンチグラフィを使用して、癌および脈管構造を検出および/または診断し得る。例えば、 ^{99}Tc ネチウム、 ^{111}In ンジウムまたは ^{125}I ヨウ素で標識されたPD-L1マーカーに対する結合性ポリペプチドの何れかを、このような造影に効率的に使用し得る。当業者には明らかとなり、投与すべき放射性同位体の量は、放射性同位体による。当業者は、活性部分として使用されるある放射性核種の特定の活性およびエネルギーに基づき、投与すべき造影剤の量を容易に定めることができる。一般に、造影剤の投与あたり0.1~100ミリキュリー、好ましくは1~100ミリキュリー、最も頻繁には2~5ミリキュリーが投与される。それ故に、放射性部分にコンジュゲートしたターゲティング部分を含む、造影剤として有用な本発明の組成物は、0.1~1000ミリキュリー、ある実施態様において好ましくは1~100ミリキュリー、ある実施態様において好ましくは2~5ミリキュリー、ある実施態様においてより好ましくは1~5ミリキュリーを含む。

30

40

50

【0134】

本発明の抗PD-L1抗体(またはそのフラグメント)はまたPD-L1を発現する細胞または組織に付加的治療剤(薬物化合物、化学療法化合物および放射線療法化合物)を送達するためにも使用され得る。一例において、本発明の抗PD-L1抗体(またはそのフラグメント)を、PD-L1を発現する腫瘍細胞または組織への化学療法剤の標的化送達のために、化学療法剤と融合させる。

【0135】

本発明の抗PD-L1抗体(またはそのフラグメント)は、研究、診断および治療適用を含む多様な適用において有用である。例えば、受容体またはその部分の単離および/または精製ならびに受容体構造(例えば、構造)および機能の研究に使用され得る。

10

【0136】

ある態様において、多様な結合性ポリペプチドを使用して、例えば、内皮細胞(例えば、静脈内皮細胞)またはPD-L1遺伝子でトランスフェクトした細胞の、PD-L1発現を検出または測定できる。それ故に、診断的または研究目的での、細胞選別および造影(例えば、フローサイトメトリーおよび蛍光活性化細胞選別)などにおける適用にも有用性がある。

【0137】

ある実施態様において、結合性ポリペプチドまたはそのフラグメントは、診断目的で標識しても標識しなくてもよい。一般に、診断的アッセイは、結合性ポリペプチドのPD-L1の結合に起因する複合体の形成の検出を伴う。結合性ポリペプチドまたはフラグメントを、抗体と同様直接標識できる。放射性核種、蛍光体、酵素、酵素基質、酵素補因子、酵素阻害剤およびリガンド(例えば、ピオチン、ハプテン)を含むが、これらに限定されない多様な標識が用いられ得る。多数の適切な免疫アッセイは、当業者に知られる(米国特許3,817,827号、3,850,752号、3,901,654号および4,098,876号)。標識しないとき、結合性ポリペプチドを、凝集アッセイなどのアッセイに使用できる。非標識結合性ポリペプチドをまた結合性ポリペプチドと反応性の標識抗体または他の適当な試薬(例えば、標識タンパク質A)などの、結合性ポリペプチドの検出に使用できる他の(1以上の)適当な試薬と組み合わせて使用してもよい。

20

【0138】

ある実施態様において、本発明の結合性ポリペプチドは、酵素免疫アッセイにおいて利用でき、ここで、対象ポリペプチドは、酵素にコンジュゲートされる。PD-L1タンパク質を含む生物学的サンプルを対象結合性ポリペプチドと組み合わせるとき、結合性ポリペプチドとPD-L1タンパク質の間で結合が生じる。ある実施態様において、PD-L1タンパク質発現細胞(例えば、内皮細胞)を含むサンプルを対象抗体と組み合わせ、結合は、結合性ポリペプチドと結合性ポリペプチドにより認識されるPD-L1タンパク質担持細胞の間で生じる。これらの結合細胞は、非標識試薬から分離でき、細胞に特異的に結合した結合性ポリペプチド-酵素コンジュゲートの存在を、例えば、該サンプルと、酵素が作用したとき発色または他の検出可能変化を生じる酵素の基質との接触により、決定し得る。他の実施態様において、対象結合性ポリペプチドは非標識であってよく、対象結合性ポリペプチドを認識する第二の標識ポリペプチド(例えば、抗体)を付加できる。

30

40

【0139】

ある態様において、生物学的サンプルにおけるPD-L1タンパク質の存在の検出に使用するためのキットもまた製造できる。このようなキットは、PD-L1タンパク質または該受容体の一部に結合するPD-L1結合性ポリペプチドならびに結合性ポリペプチドと受容体タンパク質またはその一部の複合体の存在の検出に適当な1以上の補助的試薬を含む。本発明のポリペプチド組成物は、単独でまたは他のエピトープに特異的な付加的抗体と組み合わせて、凍結乾燥形態で提供され得る。標識されていても標識されていなくてもよい、結合性ポリペプチドおよび/または抗体を、補助剤成分(例えば、Tris、リン酸および炭酸などの緩衝液、安定化剤、添加物、殺生物剤および/または不活性タンパク質、例えば、ウシ血清アルブミン)と共にキットに包含させ得る。例えば、結合性ポリ

50

ペプチドおよび/または抗体は、補助剤成分との凍結乾燥混合物として提供できまたは補助剤成分を、使用者が組み合わせるために別々に提供できる。一般にこれらの補助剤は、活性結合性ポリペプチドまたは抗体の量に基づき、約5重量%未満の量で存在し、通常ポリペプチドまたは抗体濃度に基づき、少なくとも約0.001重量%の総量で存在する。結合性ポリペプチドへの結合が可能な第二抗体を用いるとき、このような抗体を、例えば、別のバイアルまたは容器で、キット中に提供し得る。第二抗体は、存在するならば、一般に標識され、上記抗体製剤と同様の方法で製剤され得る。

【0140】

同様に、本発明はまたPD-L1の発現を検出および/または定量する方法を提供し、ここで、細胞またはその画分(例えば、膜画分)を含む組成物を、PD-L1または受容体の一部と結合する結合性ポリペプチドと、それらの結合に適する条件下接触させ、結合をモニターする。結合性ポリペプチドとPD-L1またはその一部の間の複合体形成の指標である結合性ポリペプチドの検出が、受容体の存在を示す。ポリペプチドの細胞への結合は、実施例に記載するような標準法により検出され得る。方法を使用して、個体からの細胞のPD-L1の発現を検出できる。所望により、内皮細胞表面のPD-L1の定量的発現を、例えば、フローサイトメトリーにより評価でき、染色強度を、疾患感受性、進行またはリスクと相関させ得る。

10

【0141】

本発明はまた、哺乳動物のある疾患に対する感受性を検出する方法も提供する。説明として、方法を使用して、哺乳動物における細胞に存在するPD-L1の量および/またはPD-L1陽性細胞の数に基づき、進行する疾患に対する哺乳動物の感受性を検出できる。

20

【0142】

ポリペプチド配列は、標準1文字または3文字略号を使用して示す。特に断らない限り、各ポリペプチド配列は、左側にアミノ末端および右側にカルボキシ末端を有し、各一本鎖核酸配列および各二本鎖核酸配列の上鎖は、右側に5'末端および左側に3'末端を有する。特定のポリペプチド配列はまた参照配列とどのように異なるかを説明することによっても表し得る。

【0143】

PD-L1に対する抗原結合性タンパク質を、例えば、インビトロまたはインビボで、PD-L1ポリペプチドの存在を検出するアッセイにおいて使用し得る。抗原結合性タンパク質はまた免疫親和性クロマトグラフィーによるPD-L1タンパク質の精製にも用い得る。抗原結合性タンパク質の遮断を、ここに開示する方法において使用し得る。PD-L1アンタゴニストとして機能するこのような抗原結合性タンパク質を、種々の癌を含むが、これらに限定されない、あらゆるPD-L1誘発状態の処置に用い得る。

30

【0144】

抗原結合性タンパク質を、PD-L1誘発生物活性を阻害するためにインビトロ手法で用いてもインビボで投与してもよい。その例をここに提供している、PD-L1のタンパク分解活性化により引き起こされるまたは増悪する(直接的または間接的)障害を、それ故に、処置し得る。ある実施態様において、本発明は、処置を必要とする哺乳動物に、PD-L1誘発生物活性を減少するために有効な量でPD-L1遮断抗原結合性タンパク質をインビボで投与することを含む、治療方法を提供する。

40

【0145】

本発明抗体と腫瘍ワクチンの医薬製剤

本発明抗PD-L1抗体と治療ワクチンの組み合わせ治療製品または製剤は、相乗的腫瘍学的治療効果を提供する。例えば、本発明は、本発明抗PD-L1抗体と、“Neuvax”の組み合わせを提供し、“Neuvax”は、その開示を引用により本明細書に包含させる米国特許8,222,214号に記載のアジュバントとしてGM-CSFを組み合わせたHER2/neuから単離されたE75由来9量体合成ペプチドである。さらに、本発明は、本発明抗PD-L1抗体とALVAC-CEAワクチンの組み合わせを提供し、該ワクチン

50

は癌胎児性抗原と組み合わせたカナリア痘ウイルスである。

【 0 1 4 6 】

抗 P D - L 1 抗原結合性タンパク質の産生

抗原結合性タンパク質は、多数の慣用の技法の何れかにより製造され得る。本発明は、ある実施態様において、P D - L 1 に結合するモノクローナル抗体を提供する。モノクローナル抗体は、例えば、それらを天然で発現する細胞から単離でき(例えば、抗体は、それを産生するハイブリドーマから精製し得る)または当分野で知られる任意の技法を使用して、組み換え発現系で産生できる。例えば、Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Kennet et al. (eds.), Plenum Press, New York (1980); and Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Land (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1988)参照。

10

【 0 1 4 7 】

モノクローナル抗体は、当分野で知られる任意の技法を使用して、例えば、免疫化スケジュール完了後、トランスジェニック動物から採取した脾臓細胞を不死化することにより製造できる。脾臓細胞は、当分野で知られる任意の技法を使用して、例えば、ハイブリドーマを産生するために骨髓腫細胞と融合させて不死化させ得る。ハイブリドーマ産生融合手順において使用する骨髓腫細胞は、好ましくは非抗体産生性であり、高融合効率を有し、所望の融合細胞(ハイブリドーマ)のみの増殖を支持するある選択培地における増殖を不可能とする酵素欠損である。マウス融合に使用する適当な細胞株の例は、S p - 2 0、P 3 - X 6 3 / A g 8、P 3 - X 6 3 - A g 8.6 5 3、N S 1 / 1. A g 4 1、S p 2 1 0 - A g 1 4、F O、N S O / U、M P C - 1 1、M P C 1 1 - X 4 5 - G T G 1.7およびS 1 9 4 / 5 X X 0 B u lを含み、ラット融合に使用する細胞株の例は、R 2 1 0、R C Y 3、Y 3 - A g 1.2.3、I R 9 8 3 Fおよび4 8 2 1 0を含む。細胞融合に有用な他の細胞株は、U - 2 6 6、G M 1 5 0 0 - G R G 2、L I C R - L O N - H M y 2およびU C 7 2 9 - 6である。

20

【 0 1 4 8 】

一例において、ポリペプチドは、該ポリペプチドをコードする核酸配列(例えば、c D N A)を組み換え発現ベクターに導入し、発現が促進される条件下、該D N A配列を発現させることによる、組み換えD N A法により産生される。

【 0 1 4 9 】

抗 P D - L 1 抗体の組み換え産生のために、抗体をコードする核酸を単離し、さらなるクローニングおよび/または宿主細胞における発現のために、1以上のベクターに挿入する。このような核酸は、慣用の手順を使用して容易に単離され、配列決定される(例えば、抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブの使用により)。

30

【 0 1 5 0 】

ここに開示する抗 P D - L 1 抗体(またはフラグメント)の何れかをコードする核酸を、化学合成し得る。コドン使用頻度を、細胞における発現を改善するために選択し得る。このようなコドン使用頻度は、選択した細胞型による。固有コドン使用頻度パターンが大腸菌および他の細菌、ならびに哺乳動物細胞、植物細胞、酵母細胞および昆虫細胞について開発されている。例えば: Mayfield et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003 100(2):438-42; Sinclair et al. Protein Expr. Purif. 2002 (1):96-105; Connell N D. Curr. Opin. Biotechnol. 2001 12(5):446-9; Makrides et al. Microbiol. Rev. 1996 60(3):512-38; and Sharp et al. Yeast. 1991 7(7):657-78参照。

40

【 0 1 5 1 】

核酸操作の一般的技法は、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2 ed., 1989, or F. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (Green Publishing and Wiley-Interscience: New York, 1987)および定期的改訂版に記載され、引用により本明細書に包含させる。ポリペプチドをコードするD N Aは、哺乳動物、ウイルスまたは昆虫遺伝子

50

由来の適当な転写または翻訳制御要素に操作可能に結合される。このような制御要素は、転写プロモーター、任意の転写制御用オペレーター配列、適当なmRNAリボソーム結合部位をコードする配列ならびに転写および翻訳の転写を制御する配列を含む。通常形質転換体の認識を促進するための複製起点および選択遺伝子により付与される宿主において複製する能力が、さらに組み込まれる。

【0152】

組み換えDNAはまたタンパク質精製に有用であり得る任意のタイプのタンパク質タグ配列も含み得る。タンパク質タグの例は、ヒスチジンタグ、FLAGタグ、mycタグ、HAタグまたはGSTタグを含むが、これらに限定されない。細菌、真菌、酵母および哺乳動物細胞宿主で用いるための適切なクローニングおよび発現ベクターは、Cloning Vectors: A Laboratory Manual, (Elsevier, N.Y., 1985)に見ることができる。

10

【0153】

発現構築物を、宿主細胞に適する方法を使用して、宿主細胞に導入する。核酸を宿主細胞に導入するための多様な方法が当分野で知られ、エレクトロポレーション；塩化カルシウム、塩化ルビジウム、リン酸カルシウム、DEAE-デキストランまたは他の物質を用いるトランスフェクション；微粒子銃；リポフェクション；および感染(ベクターが感染因子であるとき)を含むが、これらに限定されない。適当な宿主細胞は、下にさらに詳述するとおり、原核生物、酵母、哺乳動物細胞または細菌細胞を含む。

【0154】

当分野で知られる任意の発現系を、本発明の組み換えポリペプチド(例えば、組み換え抗体)の産生に使用できる。一般に、宿主細胞を、所望のポリペプチドをコードするDNAを含む組み換え発現ベクターで形質転換する。用い得る宿主細胞に含まれるのは、原核生物、酵母または高等真核生物細胞である。原核生物は、グラム陰性またはグラム陽性生物、例えば大腸菌または桿菌を含む。高等真核生物細胞は、昆虫細胞および哺乳動物起源の確立された細胞株を含む。抗体コードベクターのクローニングまたは発現のための適当な宿主細胞は、ここに記載する原核生物または真核生物細胞を含む。例えば、抗体を、特に、グリコシル化およびFcエフェクター機能が必要でないとき、細菌で産生し得る。細菌における抗体フラグメントおよびポリペプチドの発現について、例えば、米国特許5,648,237号、5,789,199号および5,840,523号参照(また大腸菌における抗体フラグメントの発現を記載する、Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), pp. 245-254も参照のこと)。発現後、抗体を可溶性フラクションにおける細菌細胞ペーストから単離でき、さらに精製し得る。高等真核生物細胞は、昆虫細胞および哺乳動物起源の確立された細胞株を含む。適当な哺乳動物宿主細胞株の例は、サル腎臓細胞のCOS-7系統(ATCC CRL 1651)(Gluzman et al., 1981, Cell 23:175)、L細胞、293細胞、C127細胞、3T3細胞(ATCC CCL 163)、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、HeLa細胞、BHK(ATCC CRL 10)細胞株およびMcMahan et al., 1991, EMBO J. 10: 2821により記載のアフリカミドリザル腎臓細胞株CV1由来CV1/EBNA細胞株(ATCC CCL 70)を含む。細菌、真菌、酵母および哺乳動物細胞宿主で使用する適切なクローニングおよび発現ベクターは、Pouwels et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y., 1985)に記載される。

20

30

40

【0155】

ある実施態様において、脊椎動物細胞を、抗PD-L1抗体またはそのフラグメントを発現するために宿主として使用し得る。例えば、懸濁液での増殖に適応させた哺乳動物細胞株が有用であり得る。有用な哺乳動物宿主細胞株の他の例は、SV40で形質転換したサル腎臓CV1系統(COS-7)；ヒト胚腎臓系統(例えば、Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59 (1977)に記載の293または293細胞)；ベビーハムスター腎臓細胞(BHK)；マウスセルトリ細胞(例えば、Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)に記載のTM4細胞)；サル腎臓細胞(CV1)；アフリカミドリザル腎臓細胞(VERO-76)；ヒト子宮頸癌細胞(HELA)；イヌ腎臓細胞(MDCK)；バッファローラット肝臓細胞(BR

50

L 3 A) ; ヒト肺細胞(W 1 3 8) ; ヒト肝臓細胞(H e p G 2) ; マウス乳房腫瘍(M M T 0 6 0 5 6 2) ; 例えば、Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982) に記載の T R I 細胞 ; M R C 5 細胞 ; および F S 4 細胞である。他の有用な哺乳動物宿主細胞株は、D H F R ⁺ C H O 細胞を含むチャイニーズハムスター卵巣(C H O)細胞(U r l a u b et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)) ; および Y 0、N S 0 および S p 2 / 0 などの骨髄腫細胞株を含む。抗体産生に適当な哺乳動物宿主細胞株のレビューについて、例えば、Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B . K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J.), pp. 255-268 (2003) 参照。適当な哺乳動物宿主細胞株の例は、サル腎臓細胞の C O S - 7 系統(A T C C C R L 1 6 5 1)(G l u z m a n et al., 1981, Cell 23:175)、L 細胞、2 9 3 細胞、C 1 2 7 細胞、3 T 3 細胞(A T C C C C L 1 6 3)、チャイニーズハムスター卵巣(C H O)細胞、H e L a 細胞、B H K(A T C C C R L 1 0)細胞株およびMcMahan et al., 1991, EMBO J. 10: 28 21 に記載のアフリカミドリザル腎臓細胞株 C V 1 由来 C V 1 / E B N A 細胞株(A T C C C C L 7 0)を含む。

【 0 1 5 6 】

原核生物に加えて、糸状菌または酵母などの真核微生物が、抗体コードベクターのクローニングまたは発現宿主に適し、グリコシル化経路が“ヒト化”されており、一部または完全ヒトグリコシル化パターンを有する抗体の産生をもたらす、真菌および酵母株を含む。Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004) および Li et al., Nat. Biotech. 24: 210-215 (2006) 参照。

【 0 1 5 7 】

グリコシル化抗体の発現に適当な宿主細胞はまた多細胞生物(無脊椎動物および脊椎動物)に由来する。無脊椎動物細胞の例は、植物および昆虫細胞を含む。多数のパキキュロウイルス株が同定されており、特に、ヨトウガ(Spodoptera frugiperda)細胞のトランスフェクションのために、昆虫細胞と組み合わせて使用し得る。

【 0 1 5 8 】

細菌、真菌、酵母および哺乳動物細胞宿主で使用するための適切なクローニングおよび発現ベクターは、Pouwels et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y., 1985) に記載される。

【 0 1 5 9 】

形質転換細胞を、ポリペプチドの発現を促進する条件下で培養し、該ポリペプチドを慣用のタンパク質精製手順により回収し得る。1つのこのような精製手順は、例えば、結合した P D - L 1 の全てまたは一部(例えば、細胞外ドメイン)を有するマトリクス上での、親和性クロマトグラフィーを含む。ここでの使用のために企図されるポリペプチドは、汚染内因性の実質的にない実質的に均一な、組み換え哺乳動物抗 P D - L 1 抗体ポリペプチドである。

【 0 1 6 0 】

それ故に、抗体を、例えば、米国特許 4,816,567 号に記載のとおり、組み換え方法および組成物を使用して産生し得る。ある実施態様において、ここに記載する抗 P D - L 1 抗体をコードする単離核酸が提供される。このような核酸は、抗体(例えば、抗体の軽および/または重鎖)の V_L を含むアミノ酸配列および/または V_H を含むアミノ酸配列をコードし得る。さらなる実施態様において、このような核酸を含む 1 以上のベクター(例えば、発現ベクター)が提供される。さらなる実施態様において、このような核酸を含む宿主細胞が提供される。あるこのような実施態様において、宿主細胞は、(1)抗体の V_L を含むアミノ酸および抗体の V_H を含むアミノ酸をコードする核酸を含むベクターまたは(2)抗体の V_L を含むアミノ酸をコードする核酸を含む第一ベクターおよび抗体の V_H を含むアミノ酸をコードする核酸を含む第二ベクターを含む(例えば、形質転換されている)。ある実施態様において、宿主細胞は、真核生物、例えばチャイニーズハムスター卵巣(C H O)細胞またはリンパ系細胞(例えば、Y 0、N S 0、S p 2 0 細胞)である。ある実施態様において、抗 P D - L 1 抗体を製造する方法が提供され、ここで、方法は、上記

の、抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を、抗体の発現に適する条件下培養し、所望により抗体を宿主細胞(または宿主細胞培養培地)から回収することを含む。

【0161】

ここに開示するタンパク質はまた細胞翻訳系を使用しても産生できる。このような目的のために、ポリペプチドをコードする核酸を、mRNAを産生するためのインビトロ転写を可能とし、利用する特定の無細胞系(哺乳動物または酵母無細胞翻訳系などの真核生物または細菌無細胞翻訳系などの原核生物)におけるmRNAの無細胞翻訳を可能とするために、修飾されなければならない。

【0162】

PD-L1結合性ポリペプチドは、化学合成によっても製造できる(例えば、Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd ed., 1984, The Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.に記載の方法により)。タンパク質への修飾も化学合成によりなし得る。

【0163】

本発明のポリペプチドを、タンパク質化学の分野で一般に知られるタンパク質の単離/精製方法により精製し得る。非限定的例は、抽出、再結晶、塩析(例えば、硫酸アンモニウムまたは硫酸ナトリウムで)、遠心分離、透析、限外濾過、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、順相クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ゲル剤濾過、ゲル浸透クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー、電気泳動、向流分配またはこれらの任意の組み合わせを含む。精製後、ポリペプチドを異なる緩衝液に交換しおよび/または濾過および透析を含むが、これらに限定されない当分野で知られる多様な方法の何れかにより濃縮してよい。

【0164】

精製ポリペプチドは、好ましくは少なくとも85%純粋、より好ましくは少なくとも95%純粋、最も好ましくは少なくとも98%純粋である。純度の正確な数値に係わらず、ポリペプチドは、医薬品として使用するために十分に純粋である。抗原結合性タンパク質(例えば、抗体、抗体フラグメント、抗体誘導体、抗体ムテインおよび抗体バリエーション)は、PD-L1(好ましくは、ヒトPD-L1)に結合するポリペプチドである。抗原結合性タンパク質は、PD-L1の生物活性を阻害する抗原結合性タンパク質を含む。

【0165】

抗原結合性タンパク質を、多数の既知技法の何れかにより製造し、所望の性質に対してスクリーニングし得る。技法のいくつかは、目的の抗原結合性タンパク質(例えば、抗PD-L1抗体)のポリペプチド鎖(またはその一部)をコードする核酸を単離し、組み換えDNAテクノロジーにより核酸を操作することを含む。核酸を、他の目的の核酸と融合するかまたは改変(例えば、変異誘発または他の慣用の技法)して、例えば、1以上のアミノ酸残基を付加、欠失または置換し得る。

【0166】

一本鎖抗体を、単一ポリペプチド鎖をもたらず、アミノ酸架橋(短ペプチドリinker)により重鎖および軽鎖可変ドメイン(Fv領域)フラグメントを連結することにより形成し得る。このような一本鎖Fv(scFv)は、2つの可変ドメインポリペプチド(V_LおよびV_H)をコードするDNA間のペプチドリinkerをコードするDNAを融合することにより製造されている。得られたポリペプチドを、2可変ドメイン間の可動性リンカーによって、抗原結合単量体を形成するように折り畳むことができまたは多量体(例えば、二量体、三量体または四量体)を形成できる(Kortt et al., 1997, Prot. Eng. 10:423; Kortt et al., 2001, Biomol. Eng. 18:95-108)。異なるV_LおよびV_H含有ポリペプチドを合わせることで、異なるエピトープに結合する多量体scFvを形成できる(Kriangkum et al., 2001, Biomol. Eng. 18:31-40)。一本鎖抗体の産生のために開発された技法は、米国特許4,946,778号; Bird, 1988, Science 242:423; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879; Ward et al., 1989, Nature 334:544, de Graaf et al., 2002, Methods Mol. Biol. 178:379-87に記載のものを含む。

【0167】

目的の抗体と異なるサブクラスまたはアイソタイプの抗体を誘導する技法、すなわち、サブクラススイッチングは知られている。それ故に、例えば、I g G 抗体は I g M 抗体に由来してよく、この逆も可能である。このような技法は、ある抗体(親抗体)の抗原結合性質を有するが、親抗体と異なる抗体アイソタイプまたはサブクラスと関連する生物学的性質も示す、新規抗体の製造を可能とする。組み換え D N A 技法を用い得る。特定の抗体ポリペプチドをコードするクローン化 D N A、例えば、所望のアイソタイプの抗体の定常ドメインをコードする D N A をこのような手順に用いることができる(Lantto et al., 2002, Methods Mol. Biol. 178:303-16)。さらに、I g G 4 が望ましいならば、I g G 4 抗体における不均質をもたらし得る H 鎖内ジスルフィド結合を形成する傾向を低減するために、ヒンジ領域に点変異(C P S C P C P P C P)(Bloom et al., 1997, Protein Science 6:407)を導入するのが望ましいことがある。

10

【 0 1 6 8 】

他の実施態様は、次の非限定的実施例に記載される。

【 0 1 6 9 】

実施例 1 : H 6 B 1 L 抗体およびバリエーション抗体の親和性比較

本実施例は、3つの完全ヒト抗体、野生型(H 6 B 1 L)、H 6 B 1 L - E VおよびH 6 B 1 L - E Mが、下記表 1 に示すとおり、ヒト P D - L 1 に互いに類似する親和性を有することを示す、B i a c o r e データを提供する。

【表 1】

表 1. 親抗体 H 6 B 1 L およびバリエーション H 6 B 1 L - E V および - E M についての比較 B I A C O R E データ

20

名称	k_a (1/Ms)	K_D (1/s)	R_{max} (RU)	K_A (1/M)	K_D (M)	Chi2
H6B1L	1.51E+06	2.80E-03	60.1	5.40E+08	1.85E-09	0.38
H6B1L-E V	1.57E+06	2.87E-03	57.3	5.48E+08	1.82E-09	0.496
H6B1L-E M	1.38 E6	2.14E-03	248	6.44E+08	1.55E-09	7.93

従って、驚くべきことに、軽鎖における 1 または 2 アミノ酸の変化が、抗体を十分な量製造する能力を改善したが、その標的、ヒト P D - L 1 に結合する結合能に影響しなかった。

30

【 0 1 7 0 】

実施例 2 : 抗体 H 6 B 1 L - E M の製造改善

本実施例は、親野生型抗体 H 6 B 1 L からの軽鎖(配列番号 4)および H 6 B 1 L - E M 軽鎖(配列番号 2)の 2 軽鎖のマススペクトル分析を説明する。抗体を各々 C H O 細胞で産生した。達成されたピークの比較を図 1 A に示す。さらに、N 末端エドマン配列決定は、野生型 H 6 B 1 L 軽鎖についてのマススペクトルピークにおいて、S Y E L M X X X および L M X X X の軽鎖フラグメントがあることを確認した。図 1 B に示すとおり、親軽鎖と比較して、H 6 B 1 L E M 軽鎖について、軽鎖(L C)フラグメントは検出されなかった。

40

【 0 1 7 1 】

【表 2】

配列の表

	重鎖可変ドメイン領域 斜体残基は CDR 配列を示す。	軽鎖可変ドメイン領域 H6B1L 親鎖に対する変化を下線を引く。H6B1L 鎖における太字残基は、EM および EV における変異鎖の変異位置を示す。斜体残基は CDR 配列を示す。	
H6B1L-EM	QMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSYAYSWVRQAPGQGL EWMGGIIPSFGTANYA <i>QKFQ</i> GRVT ITADESTSTAYMELSSLRSEDYAV YYCARGPIVATITPLDYWGQGTLV TVSS (配列番号 1)	SYVLTQPPSVSVAPGKTATACGGEN <i>IGRKT</i> VHWYQQKPGQAPVLYYYDS RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEA GDEADYYCLVWDSSSDHRIFGGGTKL TVL (配列番号 2)	10
H6B1L-EV	QMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSYAYSWVRQAPGQGL EWMGGIIPSFGTANYA <i>QKFQ</i> GRVT ITADESTSTAYMELSSLRSEDYAV YYCARGPIVATITPLDYWGQGTLV TVSS (配列番号 1)	SYVLMQPPSVSVAPGKTATACGGEN <i>IGRKT</i> VHWYQQKPGQAPVLYYYDS RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEA GDEADYYCLVWDSSSDHRIFGGGTKL TVL (配列番号 3)	20
H6B1L	QMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSYAYSWVRQAPGQGL EWMGGIIPSFGTANYA <i>QKFQ</i> GRVT ITADESTSTAYMELSSLRSEDYAV YYCARGPIVATITPLDYWGQGTLV TVSS (配列番号 1)	SYELMQPPSVSVAPGKTATACGGEN <i>IGRKT</i> VHWYQQKPGQAPVLYYYDS RPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEA GDEADYYCLVWDSSSDHRIFGGGTKL TVL (配列番号 4)	
重鎖可変ドメイン CDR1	SYAYS (配列番号 5)		
重鎖可変ドメイン CDR2	GIIPSFGTANYA <i>QKFQ</i> G (配列番号 6)		
重鎖可変ドメイン CDR3	GPIVATITPLDY (配列番号 7)		
軽鎖可変ドメイン CDR1	GGENIGRKT VH (配列番号 8)		
軽鎖可変ドメイン CDR2	YDS DRPS (配列番号 9)		
軽鎖可変ドメイン CDR3	LVWDSSSDHRI (配列番号 10)		

【 0 1 7 2 】

引用による取り込み

本明細書をとおりて引用されている全ての引用文献、特許および特許出願は、引用によ

り明示的に本明細書に包含させる。

さらに、本発明は次の態様を包含する。

1. PD-L1エピトープに結合するIgGクラスの完全ヒト抗体であって、ここで、抗体が配列番号1に示すアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインおよび配列番号2または配列番号3に示すアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む、完全ヒト抗体。

2. PD-L1エピトープに結合するIgGクラスの完全ヒト抗体であって、ここで、抗体がそれぞれ配列番号5、配列番号6および配列番号7のアミノ酸配列に示すCDR1ドメイン、CDR2ドメインおよびCDR3ドメインを含む重鎖可変ドメインならびに配列番号2または配列番号3に示すアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む、完全ヒト抗体。

3. 配列番号1 / 配列番号2または配列番号1 / 配列番号3の重鎖 / 軽鎖可変ドメインアミノ酸配列組み合わせを有する、項2に記載の完全ヒト抗体。

4. IgG1またはIgG4である、項1～3の何れかに記載の完全ヒト抗体。

5. 重鎖からの可変ドメインおよび軽鎖からの可変ドメインを有する抗PD-L1 Fab完全ヒト抗体フラグメントであって、ここで、重鎖可変ドメインが配列番号1に示すアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変ドメインが配列番号2または配列番号3に示すアミノ酸配列を含む、完全ヒト抗体Fabフラグメント。

6. 抗体が配列番号1 / 配列番号2または配列番号1 / 配列番号3の重鎖 / 軽鎖可変ドメインアミノ酸配列組み合わせを有する、項5に記載の完全ヒト抗体Fabフラグメント。

7. ペプチドリンカーを介して連結した重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインを有する抗PD-L1一本鎖ヒト抗体であって、ここで、重鎖可変ドメインが配列番号1に示すアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変ドメインが配列番号2または配列番号3に示すアミノ酸配列を含む、ヒト一本鎖抗体。

8. 一本鎖完全ヒト抗体が配列番号1 / 配列番号2または配列番号1 / 配列番号3の重鎖 / 軽鎖可変ドメインアミノ酸配列組み合わせを有する、項7に記載の完全ヒト一本鎖抗体。

9. 癌または自己免疫性または炎症性疾患を有するヒト対象を処置する方法であって、ヒト対象に有効量の項1～3の何れかに記載の完全ヒト抗体を投与することを含む、方法。

10. 癌または自己免疫性または炎症性疾患を有するヒト対象を処置する方法であって、ヒト対象に有効量の項5または6に記載の完全ヒト抗体Fabフラグメントを投与することを含む、方法。

11. 癌または自己免疫性または炎症性疾患を有するヒト対象を処置する方法であって、ヒト対象に有効量の項7または8に記載の完全ヒト一本鎖抗体を投与することを含む、方法。

12. 癌が卵巣癌、結腸癌、乳癌、肺癌、骨髄腫、神経芽細胞由来CNS腫瘍、単球性白血病、B細胞由来白血病、T細胞由来白血病、B細胞由来リンパ腫、T細胞由来リンパ腫および肥満細胞由来腫瘍からなる群から選択される、項9～11の何れかに記載の方法。

13. 自己免疫性または炎症性疾患が腸粘膜炎症、大腸炎と関連する消耗性疾患、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、ウイルス感染、リウマチ性関節炎、骨関節症、乾癬、クローン病および炎症性腸疾患からなる群から選択される、項9～11の何れかに記載の方法。

14. 哺乳動物宿主細胞において産生される、項1～3の何れかに記載の抗体。

15. 哺乳動物宿主細胞がチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞である、項14に記載の抗体。

16. 項1～3の何れかに記載の抗体および薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物。

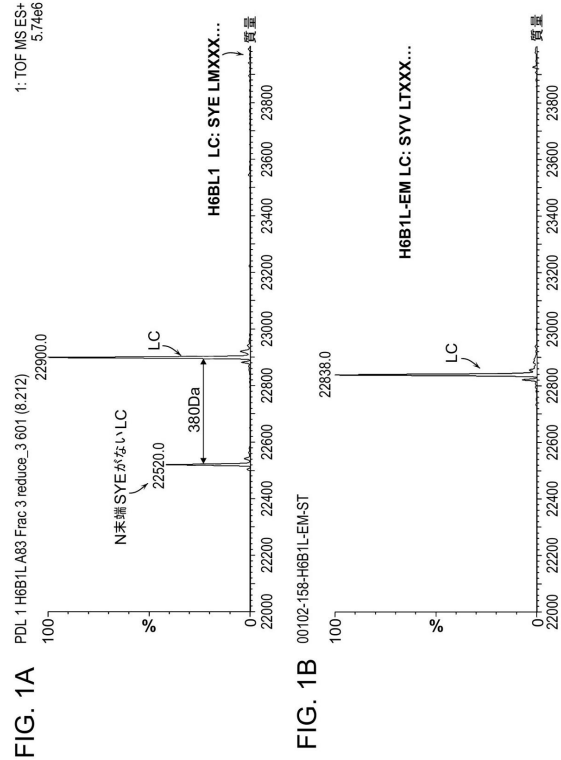
10

20

30

40

【図 1】



【配列表】

0006883590000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 37/02	(2006.01)	A 6 1 P 35/02
C 1 2 N 5/10	(2006.01)	A 6 1 P 29/00
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	A 6 1 P 37/02
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	C 1 2 N 5/10
		C 1 2 N 15/09
		C 1 2 P 21/08

(74)代理人 100181641
弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332
弁護士 山本 健策

(72)発明者 ジョウ・ヘユー
アメリカ合衆国 9 2 1 2 7 カリフォルニア州サンディエゴ、ポトマック・リッジ・ロード 1 5 7 3
2 番

審査官 山本 晋也

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 3 2 3 2 4 9 (U S , A 1)
Kotia RB, Raghani AR, "Analysis of monoclonal antibody product heterogeneity resulting from alternate cleavage sites of signal peptide." Anal Biochem, 2010 Apr 15;399(2):190-5, doi: 10.1016/j.ab.2010.01.008. Epub 2010 Jan 13. PMID: 20074542. , 2 0 1 0 年
Gibson SJ. et al., "N-terminal or signal peptide sequence engineering prevents truncation of human monoclonal antibody light chains." Biotechnol Bioeng, 2017 Sep;114(9):1970-1977, doi: 10.1002/bit.26301. Epub 2017 May 8. PMID: 28369727. , 2 0 1 7 年

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
C 0 7 K 1 6 / 0 0 - 1 6 / 4 6
C 1 2 N 1 5 / 1 3
C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
U n i P r o t / G e n e S e q
P u b M e d