

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-517239

(P2020-517239A)

(43) 公表日 令和2年6月18日 (2020.6.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	4 B 0 6 5
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	C 0 7 K 14/705	Z N A 4 C 0 7 6
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	4 C 0 8 5
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)	C 1 2 N 5/0783	4 H 0 4 5
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 61 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2019-556600 (P2019-556600)
 (86) (22) 出願日 平成30年4月18日 (2018.4.18)
 (85) 翻訳文提出日 令和1年12月11日 (2019.12.11)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2018/028206
 (87) 国際公開番号 W02018/195226
 (87) 国際公開日 平成30年10月25日 (2018.10.25)
 (31) 優先権主張番号 PCT/US2017/028206
 (32) 優先日 平成29年4月18日 (2017.4.18)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(71) 出願人 516268356
 アールーファーム・オーバーシーズ・イン
 コーポレイテッド
 R-Pharm Overseas, Inc.
 アメリカ合衆国92037カリフォルニア
 州ラ・ホヤ、コースト・ブールバード・サ
 ウス505番、スウィート102
 (74) 代理人 100106518
 弁理士 松谷 道子
 (74) 代理人 100122301
 弁理士 富田 憲史
 (74) 代理人 100157956
 弁理士 稲井 史生

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗PD-L1抗体とその使用

(57) 【要約】

完全ヒト抗PD-L1抗体とそれに対応する応用が開示される。完全ヒト抗体は、ヒトPD-L1に特異的に結合できる。酵母ディスプレイライブラリーベースのスクリーニング技術を採用し、また、PD-L1に対する親和性をさらに向上させる親和性成熟によって抗体を得た。開示される完全ヒト抗PD-L1抗体は、良好な特異性、親和性、安定性を示す。それらは、腫瘍成長を顕著に阻害する一方で、活性化T細胞に結合することによりT細胞の活性を高めることができる。開示される完全ヒト抗PD-L1抗体は、PD-L1関連のがんおよびその他の関連疾患の診断および治療に使用することができる。

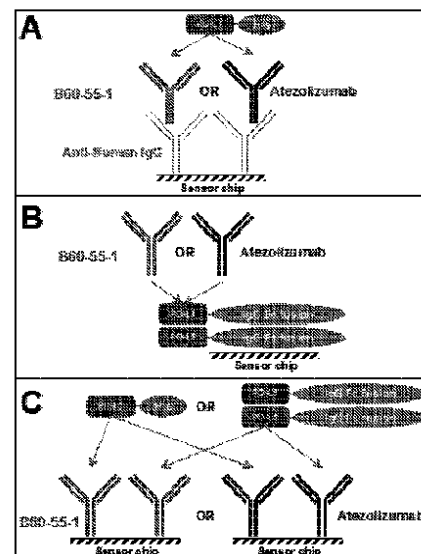


Figure 17

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(1) 配列番号 1、2 および 3 にそれぞれ対応する C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列を含む重鎖、ならびに配列番号 4、5 および 6 にそれぞれ対応する C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列を含む軽鎖；

(2) 配列番号 7、8 および 9 にそれぞれ対応する C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列を含む重鎖、ならびに配列番号 10、11 および 12 にそれぞれ対応する C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列を含む軽鎖；

(3) 配列番号 13、14 および 15 にそれぞれ対応する C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列を含む重鎖、ならびに配列番号 16、17 および 18 にそれぞれ対応する C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列を含む軽鎖；

(4) 配列番号 1、2 および 19 にそれぞれ対応する C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列を含む重鎖、ならびに配列番号 4、5 および 6 にそれぞれ対応する C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列を含む軽鎖；

(5) 配列番号 7、20 および 9 にそれぞれ対応する C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列を含む重鎖、ならびに配列番号 10、11 および 12 にそれぞれ対応する C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列を含む軽鎖；ならびに

(6) 配列番号 13、14 および 15 にそれぞれ対応する C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列を含む重鎖、ならびに配列番号 21、17 および 18 にそれぞれ対応する C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列を含む軽鎖

からなる群から選択されるポリペプチドの群を含む、抗 P D - L 1 抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 2】

以下の中から選択される配列を有する重鎖可変領域を含む、請求項 1 に記載の抗 P D - L 1 抗体またはその対応する抗原結合部分：配列番号 47、49、51、53 もしくは 54、または前記配列の 1 つとそれぞれ 70 %、80 %、85 %、90 %、95 % もしくは 99 % 同一である配列。

【請求項 3】

以下の中から選択される配列を有する軽鎖可変領域を含む、請求項 1 に記載の抗 P D - L 1 抗体またはその対応する抗原結合部分：配列番号 48、50、52、55 もしくは 56、または前記配列の 1 つとそれぞれ 70 %、80 %、85 %、90 %、95 % または 99 % 同一である配列。

【請求項 4】

抗体全体、二重特異性抗体、s c F v、F a b、F a b'、F (a b') 2 または F v に対応する、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の抗 P D - L 1 抗体またはその対応する抗原結合部分。

【請求項 5】

重鎖可変領域と軽鎖可変領域との間に連結ペプチドをさらに含む s c F v である、請求項 4 に記載の抗 P D - L 1 抗体またはその対応する抗原結合部分。

【請求項 6】

前記連結ペプチドが配列番号 67 の配列を含む、請求項 5 に記載の抗 P D - L 1 抗体またはその対応する抗原結合部分。

【請求項 7】

重鎖定常領域が、I g G、I g M、I g E、I g D および I g A を含む群から選択される、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の抗 P D - L 1 抗体またはその対応する抗原結合部分。

【請求項 8】

重鎖定常領域が、I g G 1、I g G 2、I g G 3 および I g G 4 を含む群から選択される、請求項 7 に記載の抗 P D - L 1 抗体またはその対応する抗原結合部分。

【請求項 9】

軽鎖定常領域が 領域または 領域である、請求項 6 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗 P D - L 1 抗体またはその対応する抗原結合部分。

【請求項 10】

抗体重鎖可変領域をコードすることができる核酸配列を含む核酸分子であって、前記抗体重鎖可変領域が、

- (i) 配列番号 1 ~ 3 ;
- (i i) 配列番号 7 ~ 9 ;
- (i i i) 配列番号 13 ~ 15 ;
- (i v) 配列番号 1、2 および 19 ; ならびに
- (v) 配列番号 7、20 および 9

10

からなる群から選択されるアミノ酸配列の群を含む、核酸分子。

【請求項 11】

前記抗体重鎖可変領域が以下の中から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 10 に記載の核酸分子：配列番号 47、配列番号 49、配列番号 51、配列番号 53、および配列番号 54。

【請求項 12】

抗体軽鎖可変領域をコードすることができる核酸配列を含む核酸分子であって、前記抗体軽鎖可変領域が：

- (i) 配列番号 4 ~ 6 ;
- (i i) 配列番号 10 ~ 12 ;
- (i i i) 配列番号 16 ~ 18 ; ならびに
- (i v) 配列番号 21、17、および 18

20

からなる群から選択されるアミノ酸配列の群を含む、核酸分子。

【請求項 13】

前記抗体重鎖可変領域が以下の中から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 12 に記載の核酸分子：配列番号 48、配列番号 50、配列番号 52、配列番号 55、配列番号 56。

【請求項 14】

抗体重鎖可変領域をコードすることができる核酸配列を含む核酸分子を含むベクターであって、前記抗体重鎖可変領域が：

30

- (i) 配列番号 1 ~ 3 ;
- (i i) 配列番号 7 ~ 9 ;
- (i i i) 配列番号 13 ~ 15 ;
- (i v) 配列番号 1、2 および 19 ; ならびに
- (v) 配列番号 7、20 および 9

からなる群から選択されるアミノ酸配列の群を含む、ベクター。

【請求項 15】

抗体軽鎖可変領域をコードすることができる核酸配列を含む核酸分子をさらに含み、前記抗体軽鎖可変領域が：

40

- (i) 配列番号 4 ~ 6 ;
- (i i) 配列番号 10 ~ 12 ;
- (i i i) 配列番号 16 ~ 18 ; ならびに
- (i v) 配列番号 21、17、および 18

からなる群より選択されるアミノ酸配列の群を含む、請求項 14 に記載のベクター。

【請求項 16】

配列番号 85 のアミノ酸配列を有する重鎖および配列番号 87 のアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗 P D - L 1 抗体、または抗体の抗原結合部分。

【請求項 17】

配列番号 85 および配列番号 87 からなる群から選択される配列を有するポリペプチドをコードすることができる核酸配列を含む核酸分子。

50

【請求項 18】

配列番号 86 または配列番号 88 の配列を含む、請求項 17 に記載の核酸分子。

【請求項 19】

配列番号 85 および配列番号 87 からなる群から選択される配列を有するポリペプチドをコードすることができる核酸を含む宿主細胞。

【請求項 20】

配列番号 85 の重鎖および配列番号 87 の軽鎖を有する抗体、または抗体の抗原結合部分；ならびに医薬的に許容される賦形剤またはアジュバントを含む組成物。

【請求項 21】

約 5.9 の pH を有する、約 275 mM のセリン、約 10 mM のヒスチジンを含む、請求項 21 に記載の組成物。

10

【請求項 22】

約 5.8 の pH を有する、約 0.05 % のポリソルベート 80、約 1 % の D - マンニトール、約 120 mM の L - プロリン、約 100 mM の L - セリン、約 10 mM の L - ヒスチジン - HCl を含む、請求項 21 に記載の組成物。

【請求項 23】

ヒト PD - L1 の活性の調節に関連する疾患を治療または予防する必要がある患者に配列番号 85 の重鎖および配列番号 87 の軽鎖を有する抗体、または抗体の抗原結合部分を含む医薬組成物の治療有効量を投与することを含む、ヒト PD - L1 の活性の調節に関連する疾患または状態を治療または予防する方法。

20

【請求項 24】

前記疾患が肺がん、卵巣がん、結腸がん、結腸直腸がん、メラノーマ、腎臓がん、膀胱がん、乳がん、肝臓がん、リンパ腫、血液悪性腫瘍、頭頸部がん、神経膠腫、胃がん、鼻咽頭がん、喉頭がん、子宮頸がん、子宮がんまたは骨肉腫である、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記疾患が HBV、HCV または HIV 感染である、請求項 24 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

30

本開示は、生物医学の分野に関連し、完全ヒト抗 PD - L1 抗体およびその医薬的使用に関する。

【背景技術】**【0002】**

T 細胞が外因性抗原に反応するとき、休止 T リンパ球に 2 つのシグナルを提供するために抗原提示細胞 (APC) が必要である：最初のシグナルは、TCR の助けにより T 細胞が MHC 分子に結合した抗原ペプチドを認識する際に生成され、その後、抗原認識シグナルが TCR / CD3 複合体を介して伝達される；そして、第 2 の信号は一連の共刺激分子によって提供される；そして、このようにして、T 細胞は正常に活性化されることがあり、その結果、正常な免疫応答が生じる。これらの共刺激分子は、2 番目の信号によって生じる効果に応じて、正の共刺激分子または負の共刺激分子のいずれかに分類することができ、正および負の共刺激信号の調節と、前記信号間の相対バランスは、体全体の免疫反応を通じて重要な調節の役割を果たす。

40

【0003】

PD - 1 は CD28 受容体ファミリーのメンバーであり、前記ファミリーには CTLA4、CD28、ICOS および BTLA もまた含まれる。このファミリーの最初のメンバーである CD28 および ICOS は、モノクローナル抗体を加えたときに発見され、T 細胞増殖の増加として観察された [Hutloff et al. (1999) Nature 397: 263-266; Hansen et al. (1980) Immunogenics 10: 247-260]。PD - 1 のリガンドには PD - L1 と PD - L2 が含まれ、受容体 が リガンド に 結合 すると T 細胞 の 活性化 と 関連 サイトカイン の 分

50

泌を下方制御することが研究結果によりすでに示されている [Freeman et al. (2000) J Exp Med 192: 1027-34; Latchman et al. (2001) Nat Immunol 2: 261-8; Carter et al. (2002) Eur J Immunol 32: 634-43; Ohigashi, et al. (2005) Clin Cancer Res 11: 29 47-53]。

【 0 0 0 4 】

P D - L 1 (B 7 - H 1) は、B 7 ファミリーに属する細胞表面糖タンパク質であり、I g V および I g C 様領域、膜貫通領域、細胞質尾部領域を含む。1 9 9 9 年に対応する遺伝子が最初に発見およびクローン化され [Dong H, et al. (1999) Nat Med 5: 1365-13 69]、糖タンパク質自体が T 細胞受容体 P D - 1 と相互作用し、免疫応答の負の調節において重要な役割を果たすと判断された。T 細胞で発現する P D - 1 に作用することに加えて、P D - L 1 は、T 細胞で発現する場合、A P C 上で C D 8 0 と相互作用して負のシグナルを伝達し、T 細胞阻害剤として機能することができる。マクロファージ系細胞で発現することに加えて、P D - L 1 は正常なヒト組織においても低レベルで発現するが、糖タンパク質は、例えば肺がん、卵巣がん、結腸がんおよびメラノーマを含む特定の腫瘍細胞株で比較的高い発現を示す [Iwai et al. (2002) PNAS 99: 12293-7; Ohigashi, et al. (2005) Clin Cancer Res 11: 2947-53]。腫瘍細胞における P D - L 1 の発現の増加が T 細胞アポトーシスを上昇させ、それにより、腫瘍細胞が免疫応答を回避するのに重要な役割を果たすことが、研究結果により示唆されている。研究者は、P D - L 1 遺伝子をトランスフェクトした P 8 1 5 腫瘍細胞株が特定の C T L 溶解に対してインビトロで耐性を示すことがあり、マウスに接種するとき、前記細胞がより高い腫瘍形成性および侵襲性を示し得ることを発見した。これらの生物学的特性は、P D - L 1 をブロックすることで反転させることができる。P D - 1 ノックアウトマウスでは、P D - L 1 / P D - 1 経路がブロックされ、接種された腫瘍細胞は腫瘍を形成することができない [Dong H et al. (200 2) Nat Med 8: 793-800]。

【 0 0 0 5 】

高い親和性で P D - L 1 に結合することができ、したがって P D - 1 と P D - L 1 の結合をブロックすることができる抗 P D - L 1 抗体が依然として必要である。

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 6 】

本発明の特定の態様において、スクリーニングおよび親和性成熟と組み合わせた酵母ディスプレイシステムを利用して、良好な特異性および比較的高い親和性および安定性を示す完全ヒト抗 P D - L 1 抗体を得て、それにより本発明を完成した。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 7 】

本発明の第 1 の態様は、以下の 1 つから選択される C D R 領域の群を含む抗 P D - L 1 抗体またはその抗原結合部分に関する：

(1) 配列番号 1 ~ 3 にそれぞれ対応する重鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列、ならびに配列番号 4 ~ 6 にそれぞれ対応する軽鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列、または前述の配列の 1 つとそれぞれ 7 0 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、もしくは 9 5 % を超えて同一である配列；

(2) 配列番号 7 ~ 9 にそれぞれ対応する重鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列、ならびに配列番号 1 0 ~ 1 2 にそれぞれ対応する軽鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列、または前述の配列の 1 つとそれぞれ 7 0 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、もしくは 9 5 % を超えて同一である配列；

(3) 配列番号 1 3 ~ 1 5 にそれぞれ対応する重鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列、ならびに配列番号 1 6 ~ 1 8 にそれぞれ対応する軽鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列、または前述の配列の 1 つとそれぞれ 7 0 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、もしくは 9 5 % を超えて同一である配列；

(4) 配列番号 1、2 および 1 9 にそれぞれ対応する重鎖 C D R 1、C D R 2 および C D

R 3 配列、ならびに配列番号 4 ~ 6 にそれぞれ対応する軽鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列、または前述の配列の 1 つとそれぞれ 7 0 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、もしくは 9 5 % を超えて同一である配列；

(5) 配列番号 7、2 0 および 9 にそれぞれ対応する重鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列、ならびに配列番号 1 0 ~ 1 2 にそれぞれ対応する軽鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列、または前述の配列の 1 つとそれぞれ 7 0 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、もしくは 9 5 % を超えて同一である配列；

(6) 配列番号 1 3 ~ 1 5 にそれぞれ対応する重鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列、ならびに配列番号 2 1、1 7 および 1 8 にそれぞれ対応する軽鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 配列、または前述の配列の 1 つとそれぞれ 7 0 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、もしくは 9 5 % を超えて同一である配列。

10

【 0 0 0 8 】

本発明の第 1 の態様により構成される抗 P D - L 1 抗体または対応する抗原結合部分のいずれか 1 つは、以下の 1 つから選択される重鎖可変領域フレームワーク領域の群もまた含む：

1) 配列番号 2 2 ~ 2 5 にそれぞれ対応する F R 1、F R 2、F R 3 および F R 4 配列、または前述の配列の 1 つとそれぞれ 7 0 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 % もしくは 9 9 % を超えて同一である配列；

2) 配列番号 3 0 ~ 3 3 にそれぞれ対応する F R 1、F R 2、F R 3 および F R 4 配列、または前述の配列の 1 つとそれぞれ 7 0 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 % もしくは 9 9 % を超えて同一である配列；

20

3) 配列番号 3 8 ~ 4 1 にそれぞれ対応する F R 1、F R 2、F R 3 および F R 4 配列、または前述の配列の 1 つとそれぞれ 7 0 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 % もしくは 9 9 % を超えて同一である配列；

4) 配列番号 3 0 ~ 3 3 にそれぞれ対応する F R 1、F R 2、F R 3 および F R 4 配列、または前述の配列の 1 つとそれぞれ 7 0 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 % もしくは 9 9 % を超えて同一である配列。

【 0 0 0 9 】

本発明の第 1 の態様により構成される抗 P D - L 1 抗体または対応する抗原結合部分のいずれか 1 つは、以下の 1 つから選択される軽鎖可変領域フレームワーク領域の群もまた含む：

30

1) 配列番号 2 6 ~ 2 9 にそれぞれ対応する F R 1、F R 2、F R 3 および F R 4 配列、または前述の配列の 1 つとそれぞれ 7 0 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 % もしくは 9 9 % を超えて同一である配列；

2) 配列番号 3 0 ~ 3 3 にそれぞれ対応する F R 1、F R 2、F R 3 および F R 4 配列、または前述の配列の 1 つとそれぞれ 7 0 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 % もしくは 9 9 % を超えて同一である配列；

3) 配列番号 3 8 ~ 4 1 にそれぞれ対応する F R 1、F R 2、F R 3 および F R 4 配列、または前述の配列の 1 つとそれぞれ 7 0 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 % もしくは 9 9 % を超えて同一である配列；

40

4) 配列番号 3 0 ~ 3 3 にそれぞれ対応する F R 1、F R 2、F R 3 および F R 4 配列、または前述の配列の 1 つとそれぞれ 7 0 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 % もしくは 9 9 % を超えて同一である配列。

【 0 0 1 0 】

本発明の第 1 の態様により構成される抗 P D - L 1 抗体または対応する抗原結合部分のいずれか 1 つは、以下の 1 つから選択される重鎖可変領域の群を含む：

1) 配列番号 4 7、4 9、5 1、5 3 もしくは 5 4 に対応する配列、または前述の配列の 1 つとそれぞれ 7 0 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 % もしくは 9 9 % 同一である配列。

。

【 0 0 1 1 】

50

本発明の第１の態様により構成される抗ＰＤ－Ｌ１抗体またはその対応する抗原結合部分のいずれか１つは、以下から選択される軽鎖可変領域の群を含む：

１）配列番号４８、５０、５２、５５もしくは５６に対応する配列、または前述の配列の１つとそれぞれ７０％、８０％、８５％、９０％、９５％もしくは９９％同一である配列。

【００１２】

本発明の第１の態様により構成される抗ＰＤ－Ｌ１抗体または対応する抗原結合部分のいずれか１つは、抗体全体、二重特異性抗体、ｓｃＦｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ'、Ｆ（ａｂ'）_２またはＦｖに対応する。

【００１３】

本発明のいずれの例においても、本発明がｓｃＦｖにより構成される場合、連結ペプチドもまた、前述の抗ＰＤ－Ｌ１抗体またはその抗原結合部分の重鎖および軽鎖可変領域の間に含まれる。

【００１４】

本発明のいくつかの特定の例において、前述の連結ペプチドの配列は、配列番号６７に示される通りである。

【００１５】

本発明の第１の態様により構成される抗ＰＤ－Ｌ１抗体またはその対応する抗原結合部分のいずれか１つの例は、抗体全体に対応する。

【００１６】

重鎖定常領域が、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＥ、ＩｇＤおよびＩｇＡを含む群から選択される、本発明の第１の態様によって構成される抗ＰＤ－Ｌ１抗体またはその対応する抗原結合部分のいずれか１つの例。

【００１７】

本発明の特定の例において、重鎖定常領域は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、およびＩｇＧ４を含む群から選択される。

【００１８】

本発明の特定の例において、重鎖定常領域は、ＩｇＧ１に対応する。

【００１９】

本発明の特定の例において、ＩｇＧ１アミノ酸配列は配列番号６８に示される通りである。

【００２０】

軽鎖定常領域が 領域または 領域である、本発明の第１の態様によって構成される抗ＰＤ－Ｌ１抗体または対応する抗原結合部分のいずれか１つ。

【００２１】

本発明の特定の例において、 軽鎖定常領域のアミノ酸配列は、配列番号７０に示される通りである。

【００２２】

本発明の特定の例において、 軽鎖定常領域のアミノ酸配列は、配列番号７２に示される通りである。

【００２３】

本発明の第２の態様は、抗体重鎖可変領域をコードする核酸配列を含む核酸分子に関し、ここで、前述の抗体重鎖可変領域は、以下から選択されるアミノ酸配列の群を含む：

（ｉ）配列番号１～３；

（ｉｉ）配列番号７～９；

（ｉｉｉ）配列番号１３～１５；

（ｉｖ）配列番号１、２および１９；

（ｖ）配列番号７、２０および９；

【００２４】

本発明の第２の態様によって構成される核酸分子のいずれか１つであって、前述の抗体

10

20

30

40

50

重鎖可変領域は、以下から選択される核酸配列の群を含む：配列番号 47、配列番号 49、配列番号 51、配列番号 53、配列番号 54、または前述の配列の 1 つのフレーム領域に含まれるアミノ酸の 1 つまたはいくつかを置換することによって作成される配列。

【0025】

本発明のいくつかの例において、前述の核酸は、配列番号 57 ~ 61 に示されるものから選択される配列を含む。

【0026】

本発明のいくつかの例において、前述の核酸は、抗体重鎖定常領域をコードする核酸配列もまた含み、前記重鎖定常領域は、I g G、I g M、I g E、I g D および I g A を含む群から選択される。

【0027】

本発明のいくつかの例において、重鎖定常領域は、I g G 1、I g G 2、I g G 3、および I g G 4 を含む群から選択される。

【0028】

本発明の特定の例において、重鎖定常領域は I g G 1 に対応する。

【0029】

本発明の特定の例において、I g G 1 核酸配列は配列番号 69 に示される通りである。

【0030】

本発明の第 3 の態様は、抗体軽鎖可変領域をコードすることができる核酸配列を含む核酸分子に関し、ここで、前述の抗体軽鎖可変領域は、以下から選択されるアミノ酸配列の群を含む：

- (i) 配列番号 4 ~ 6 ；
- (i i) 配列番号 10 ~ 12 ；
- (i i i) 配列番号 16 ~ 18 ；
- (i v) 配列番号 21、17 および 18。

【0031】

本発明の第 3 の態様により構成される核酸分子のいずれか 1 つであって、前述の抗体軽鎖可変領域は、以下から選択される核酸配列の群を含む：配列番号 48、配列番号 50、配列番号 52、配列番号 55、配列番号 56、または前述の配列の 1 つのフレーム領域に含まれるアミノ酸の 1 つまたはいくつかを置換することによって作成された配列。

【0032】

本発明のいくつかの態様において、前述の核酸は、配列番号 62 ~ 66 に示されるものから選択される配列を含む。

【0033】

本発明のいくつかの態様において、前述の核酸は、抗体軽鎖定常領域をコードすることができる核酸配列も含み、ここで、前記軽鎖定常領域は、領域または領域である。

【0034】

本発明の特定の態様において、軽鎖定常領域の核酸配列は配列番号 70 に示される通りである。

【0035】

本発明の特定の態様において、軽鎖定常領域のアミノ酸配列は、配列番号 72 に示される通りである。

【0036】

本発明の第 4 の態様は、本発明の第 2 または第 3 の態様により構成される核酸のいずれか 1 つを含むベクターに関する。

【0037】

本発明の第 4 の態様により構成されるベクターのいずれかは、本発明の第 2 の態様により構成される核酸のいずれか 1 つと、本発明の第 3 の態様により構成される核酸のいずれか 1 つを含む。

【0038】

10

20

30

40

50

本発明の第 5 の態様は、本発明の第 2 または第 3 の態様により構成される核酸のいずれか 1 つ、または本発明の第 4 の態様により構成されるベクターのいずれか 1 つを含む宿主細胞に関する。

【0039】

本発明の第 6 の態様は、本発明の第 1 の態様により構成される抗 PD - L 1 抗体または対応する抗原結合部分のいずれか 1 つ、ならびに他の生物活性物質を含むコンジュゲートに関し、ここで、前述の抗 PD - L 1 抗体または対応する抗原結合部分は、直接または連結断片を介して、別の生物活性物質にコンジュゲートされている。

【0040】

本発明のいくつかの態様では、前述のさらなる生物活性物質は、化学物質、毒素、ポリペプチド、酵素、同位体、サイトカインまたは直接もしくは間接的に細胞の増殖を阻害することができるかもしくは細胞を殺傷することができるか、そうでなければ細胞をアウリストアチン MMAE (Auristatin MMAE)、アウリストアチン MMAF (Auristatin MMAF)、メイタンシン DM1 (Maytansine DM1)、メイタンシン DM4 (Maytansine DM4)、カリケアマイシン (calicheamicin)、デュオカルマイシン MGBA (duocarmycin MGBA)、ドキソルビシン (doxorubicin)、リシン、ジフテリア毒素およびその他の関連毒素、I 131、インターロイキン、腫瘍壊死因子、ケモカイン、ナノ粒子などの免疫応答の活性化を介して阻害もしくは殺傷することができる他の個々の生物活性物質またはそれらの混合物を含む群から選択される。

10

20

【0041】

本発明の第 7 の態様は、本発明の第 1 の態様により構成される抗 PD - L 1 抗体または対応する抗原結合部分のいずれか 1 つ、本発明の第 2 または第 3 の態様により構成される核酸のいずれか 1 つ、本発明の第 4 の態様により構成されるベクターのいずれか 1 つ、本発明の第 5 の態様により構成される宿主細胞のいずれか 1 つ、または本発明の第 6 の態様により構成されるコンジュゲートのいずれか 1 つ、ならびに任意の医薬的に許容されるベクターまたは賦形剤および任意の他の生物活性物質を含む組成物 (医薬組成物など) に関する。

【0042】

本発明の第 7 の態様により構成される組成物のいずれか 1 つ (医薬組成物など)、前述のさらなる生物活性物質には、他の抗体、融合タンパク質または薬物 (例えば、化学療法薬および放射線療法薬のような抗がん剤) が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0043】

本発明はさらに、本発明の第 1 の態様により構成される抗 PD - L 1 抗体または対応する抗原結合部分のいずれか 1 つを含む試薬または試薬キットに関し、前述の検出試薬または試薬キットは、PD - L 1 タンパク質またはその誘導体の有無を検出するために使用される。

【0044】

本発明はさらに、本発明の第 1 の態様により構成される抗 PD - L 1 抗体または対応する抗原結合部分のいずれか 1 つを含む診断試薬または試薬キットに関し、ここで、前述の診断試薬または試薬キットはインビトロ (細胞や組織など) またはインビボ (ヒトやモデル動物など) での PD - L 1 関連疾患 (例えば、高い PD - L 1 発現を示すウイルス感染や、または高い PD - L 1 発現を示す腫瘍の場合のような、腫瘍またはウイルス感染) の診断において使用される。

40

【0045】

本発明のいくつかの態様において、前述の抗 PD - L 1 抗体または対応する抗原結合部分は、検出に使用することができるか、または別の試薬で検出することができる蛍光色素、化学物質、ポリペプチド、酵素、同位体、標識などにさらに結合される。

【0046】

本発明のいくつかの態様において、前述の腫瘍には、肺がん、卵巣がん、結腸がん、結

50

腸直腸がん、メラノーマ、腎臓がん、膀胱がん、乳がん、肝臓がん、リンパ腫、血液悪性腫瘍、頭頸部がん、神経膠腫、胃がん、鼻咽頭がん、喉頭がん、子宮頸がん、子宮がん、骨肉腫、甲状腺がん、前立腺がんが含まれるが、これらに限定されない。

【0047】

本発明のいくつかの態様において、前述のウイルス感染には、急性、亜急性または慢性のHBV、HCVまたはHIV感染が含まれるが、これらに限定されない。

【0048】

本発明はさらに、本発明の第1の態様によって構成される抗PD-L1抗体または対応する抗原結合部分のいずれか1つ、第2または第3の態様によって構成される核酸のいずれか1つ、本発明の第4の態様により構成されるベクターのいずれか1つ、本発明の第5の態様により構成される宿主細胞のいずれか1つ、本発明の第6の態様により構成されるコンジュゲートのいずれか1つ、または本発明の第7の態様によって構成される組成物のいずれか1つを使用して、PD-L1関連疾患（例えば、高いPD-L1発現を示すウイルス感染や、または高いPD-L1発現を示す腫瘍の場合のような、腫瘍またはウイルス感染）の予防または治療に使用される薬物を調製する用途に関する。

10

【0049】

本発明の特定の態様において、前述の腫瘍は、高レベルのPD-L1発現を示す腫瘍などのPD-L1関連腫瘍を指す。

【0050】

本発明の特定の態様において、前述の腫瘍には、肺がん、卵巣がん、結腸がん、結腸直腸がん、メラノーマ、腎臓がん、膀胱がん、乳がん、肝臓がん、リンパ腫、血液悪性腫瘍、頭頸部がん、神経膠腫、胃がん、鼻咽頭がん、喉頭がん、子宮頸がん、子宮がん、骨肉腫、甲状腺がん、前立腺がんが含まれるが、これらに限定されない。

20

【0051】

本発明のいくつかの態様において、前述のウイルス感染には、急性、亜急性または慢性のHBV、HCVまたはHIV感染が含まれるが、これらに限定されない。

【0052】

本発明はさらに、本発明の第1の態様により構成される抗PD-L1抗体または対応する抗原結合部分のいずれか1つを使用して、PD-L1関連疾患（例えば、高いPD-L1発現を示すウイルス感染や、または高いPD-L1発現を示す腫瘍の場合のような、腫瘍またはウイルス感染）の診断のための試薬または試薬キットを調製する用途に関する。

30

【0053】

本発明のいくつかの態様において、前述の腫瘍は、高レベルのPD-L1発現を示す腫瘍などのPD-L1関連腫瘍を指す。

【0054】

本発明の特定の態様において、前述の腫瘍には、肺がん、卵巣がん、結腸がん、結腸直腸がん、メラノーマ、腎臓がん、膀胱がん、乳がん、肝臓がん、リンパ腫、血液悪性腫瘍、頭頸部がん、神経膠腫、胃がん、鼻咽頭がん、喉頭がん、子宮頸がん、子宮がん、骨肉腫、甲状腺がん、前立腺がんが含まれるが、これらに限定されない。

40

【0055】

本発明のいくつかの態様において、前述のウイルス感染には、急性、亜急性または慢性のHBV、HCVまたはHIV感染が含まれるが、これらに限定されない。

【0056】

本発明のいくつかの態様において、前述の抗PD-L1抗体または対応する抗原結合部分は、検出に使用することができるか、または別の試薬で検出することができる蛍光色素、化学物質、ポリペプチド、酵素、同位体、標識などにさらに結合される。

【0057】

本発明はさらに、本発明の第1の態様により構成される抗PD-L1抗体または対応する抗原結合部分のいずれか1つを使用して、CD80関連疾患の予防または治療のための薬物を調製する用途に関する。

50

【 0 0 5 8 】

本発明の文脈において、上記で言及した C D 8 0 関連疾患には、高い C D 8 0 発現に関連する疾患が含まれる。

【 0 0 5 9 】

本発明はさらに、 P D - L 1 関連疾患（例えば、高い P D - L 1 発現を示すウイルス感染や、または高い P D - L 1 発現を示す腫瘍の場合のような、腫瘍またはウイルス感染）を予防または治療するために使用される方法に関し、前述の方法は、任意選択の放射線療法（X線照射など）の投与と組み合わせた、有効な予防または治療用量の本発明の第 1 の態様により構成される抗 P D - L 1 抗体または対応する抗原結合部分のいずれか 1 つ、本発明の第 2 または第 3 の態様により構成される核酸のいずれか 1 つ、本発明の第 4 の態様により構成されるベクターのいずれか 1 つ、本発明の第 5 の態様により構成される宿主細胞のいずれか 1 つ、本発明の第 6 の態様により構成されるコンジュゲートのいずれか 1 つ、または本発明の第 7 の態様によって構成される組成物のいずれか 1 つを対象に与えることを含む。

10

【 0 0 6 0 】

本発明のいくつかの態様において、前述の腫瘍は、高レベルの P D - L 1 発現を示す腫瘍などの P D - L 1 関連腫瘍を指す。

【 0 0 6 1 】

本発明の特定の態様において、前述の腫瘍には、肺がん、卵巣がん、結腸がん、結腸直腸がん、メラノーマ、腎臓がん、膀胱がん、乳がん、肝臓がん、リンパ腫、血液悪性腫瘍、頭頸部がん、神経膠腫、胃がん、鼻咽頭がん、喉頭がん、子宮頸がん、子宮がん、骨肉腫、甲状腺がん、前立腺がんが含まれるが、これらに限定されない。

20

【 0 0 6 2 】

本発明のいくつかの態様において、前述のウイルス感染には、急性、亜急性または慢性の H B V、H C V または H I V 感染が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 0 6 3 】

本発明はさらに、有効な予防または治療用量の本発明の第 1 の態様により構成される抗 P D - L 1 抗体または対応する抗原結合部分のいずれか 1 つを対象に与えることを含む、C D 8 0 関連疾患を予防または治療するために使用される方法に関する。

【 0 0 6 4 】

本発明の文脈において、上記で言及した C D 8 0 関連疾患には、高い C D 8 0 発現に関連する疾患が含まれる。

30

【 0 0 6 5 】

本発明は以下の本文でさらに記載される。

【 0 0 6 6 】

本発明の文脈において、特に示さない限り、本文で使用される科学技術用語は、当業者により理解されるようなそれぞれの共通の意味に対応するものとする。さらに、タンパク質および核酸化学、分子生物学、細胞および組織培養、微生物学および免疫学関連の用語、ならびに本文で使用される実験室手順はすべて、それぞれの分野で広く採用されている用語および標準手順に対応する。しかしながら、関連用語の定義および説明を以下に提供して、本発明をさらに明確にする。

40

【 0 0 6 7 】

本発明の文脈において、「抗体」という用語は、通常 2 対の同一ポリペプチド鎖 [各対は 1 つの「軽」(L) 鎖と 1 つの「重」(H) 鎖を有する] からなる免疫グロブリン分子を指す。抗体の軽鎖は、または軽鎖のいずれかに分類されることがある。重鎖は、 μ 、 δ 、 γ 、または ϵ のいずれかに分類することができ、それぞれの対応する抗体アイソタイプは、I g M、I g D、I g G、I g A、および I g E として定義される。軽鎖と重鎖については、可変領域と定常領域はおよそ 1 2 以上のアミノ酸「J」領域で接続される一方で、重鎖はおよそ 3 以上のアミノ酸「D」領域もまた含む。各重鎖は、重鎖可変領域 (V_H) と重鎖定常領域 (C_H) で構成されている。重鎖定常領域は、3 つの構造ドメ

50

イン ($C_H 1$ 、 $C_H 2$ 、 $C_H 3$) で構成されている。各軽鎖は、軽鎖可変領域 (V_L) と軽鎖定常領域 (C_L) で構成されている。軽鎖定常領域は、1つの構造ドメイン (C_L) で構成されている。抗体の定常領域は、免疫系のさまざまな細胞 (エフェクター細胞など) および古典的な補体系 ($C1q$) の第1のコンポーネントを含む宿主組織または因子への免疫グロブリンの結合を媒介することができる。 V_H および V_L 領域は、フレームワーク領域 (FR) として知られる、より保存された領域で散在された、ばらつきの大きい領域 (相補性決定領域 (CDR) として知られる) にさらに細分され得る。各 V_H および V_L は、3つの CDR と4つの FR で構成され、アミノ末端からカルボキシ末端に向かって、 $FR 1$ 、 $CDR 1$ 、 $FR 2$ 、 $CDR 2$ 、 $FR 3$ 、 $CDR 3$ 、および $FR 4$ の順序で配置されている。各重鎖/軽鎖ペアの可変領域 (V_H および V_L) は、それぞれ抗体の各結合部位を形成する。各領域または構造ドメインへのアミノ酸の割り当ては、Kabat Sequence s of Proteins of Immunological Interest [National Institutes of Health, Bethesda, Md (1987 and 1991)] または Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917 および Chothia et al. (1989) Nature 342: 878-883 により与えられた定義に従う。「抗体」という用語は、抗体を産生するために使用される方法に関して特定の制限を受けない。例えば、それには、特には組換え抗体、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体が含まれる。抗体は、例えば IgG (例えば、 $IgG 1$ 、 $IgG 2$ 、 $IgG 3$ または $IgG 4$ サブタイプ)、 $IgA 1$ 、 $IgA 2$ 、 IgD 、 IgE 、または IgM 抗体を含む、異なるアイソタイプの抗体であり得る。

10

20

30

40

50

【0068】

本発明の文脈において、抗体の「抗原結合部分」とは、抗体の全長に沿った1つまたは複数の部分を指し、ここで、前記部分は、抗体が結合する同じ抗原 (例えば、 $PD-L 1$) に結合する能力を維持し、インタクトな抗体と競合して、所与の抗原に特異的に結合する。一般的には、全文の引用を介してすべての目的について本明細書に組み込まれる *Fundamental Immunology*, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd edition, Raven Press, NY (1989)) を参照されたい。抗原結合部分は、組換え DNA 技術または全体の抗体の酵素または化学的分解によって生成することができる。いくつかの例において、抗原結合部分には、 Fab 、 Fab' 、 $F(ab')_2$ 、 Fd 、 Fv 、 dAb 、相補性決定領域 (CDR) 断片、単鎖抗体 (例えば、 $scFv$)、キメラ抗体、ダイアボディおよび類似のポリペプチドが含まれ、これらは、ポリペプチド特異的抗原結合能力を付与することができる抗体の少なくとも一部を含む。

【0069】

本発明の文脈において、「 Fd 断片」という用語は、 V_H および $C_H 1$ 構造ドメインからなる抗体断片を指す；「 Fv 断片」という用語は、抗体の単一アームの V_L および V_H 構造ドメインからなる抗体断片を指す；「 dAb 断片」という用語は、 V_H 構造ドメインから構成される抗体断片を指す [Ward et al., Nature 341: 544-546 (1989)]；「 Fab 断片」という用語は、 V_L 、 V_H 、 C_L および $C_H 1$ 構造ドメインから構成される抗体断片を指す；ならびに「 $F(ab')_2$ 断片」という用語は、ヒンジ領域のジスルフィド架橋を介して接続された2つの Fab 断片を含む抗体断片を指す。

【0070】

いくつかの場合において、抗体の抗原結合部分は単鎖抗体 (例えば、 $scFv$) であり、 V_L および V_H 構造ドメインは、単一ポリペプチド鎖リンカーとして生成させることによりペアリングを介して一価分子を形成する [例えば、Bird et al., Science 242: 423-426 (1988) および Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883 (1988) を参照されたい]。そのような $scFv$ 分子は、 $NH_2 - V_L - \text{コネクタ} - V_H - COOH$ または $NH_2 - V_H - \text{コネクタ} - V_L - COOH$ の一般構造を持つことができる。適切な従来のコネクタ (連結ペプチド) は、 $GGGGS$ アミノ酸配列の繰り返しまたはその変異体で構成されている。例えば、アミノ酸配列 ($GGGGS$)₄ を持つコネクタが使用できるが、変異体もまた使用できる [Holliger et al. (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. U SA 90: 6444-6448]。本発明に使用することができる他のコネクタは、Alfthan et al.

(1995), Protein Eng. 8: 725-731, Choi et al. (2001), Eur. J. Immunol. 31: 94-106, Hu et al. (1996), Cancer Res. 56: 3055-3061, Kipriyanov et al. (1999), J. Mol. Biol. 293: 41-56 and Roovers et al. (2001), Cancer Immunolに記載されている。本発明の一態様において、前述の連結ペプチドの配列は (G G G G S)₃ である。

【0071】

いくつかの例において、抗体は、2つの異なる種類の抗原もしくは抗原エпитープにそれぞれ結合することができる二重特異性抗体によって構成され、一次抗原に特異的に結合する抗体の軽鎖および重鎖、またはその抗原結合部分、ならびに二次抗原に特異的に結合する抗体の軽鎖および重鎖、またはその抗原結合部分を含む。本発明のいくつかの態様において、前述の二重特異性抗体に含まれる一次抗原に特異的に結合する抗体の軽鎖および重鎖、またはその抗原結合部分は、本発明により構成される抗体または対応する抗原結合部分のいずれか1つに対応し得、前述の二重特異性抗体に含まれる二次抗原に特異的に結合する抗体の軽鎖および重鎖、またはその抗原結合部分は、異なる抗PD-L1抗体もしくは対応する抗原結合部分、または異なる抗原を標的とする抗体もしくは対応する抗原結合部分に対応し得る。

【0072】

いくつかの場合において、抗体はダイアボディ、すなわち二価抗体に対応し、ここで、V_H および V_L 構造ドメインが単一のポリペプチド鎖で発現されるが、使用されるリンカーが短すぎるため、同じ鎖上の2つの構造ドメイン間でペアリングができず、そのことにより、構造ドメインを別の鎖の相補構造ドメインと強制的にペアリングさせ、2つの抗原結合部位が生じる [例えば、Holliger P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993), および Poljak R.J. et al., Structure 2: 1121-1123 (1994)を参照されたい]。

【0073】

当業者に知られている従来の技術 (例えば、組換えDNA技術または酵素的または化学的切断) を使用して、所定の抗体 (モノクローナル抗体2E12のような) から抗原結合部分 (例えば、上記の抗体断片) を得て、抗体全体について使用されるものと同じ方法を使用して、抗体の抗原結合部分を選択的にスクリーニングすることができる。

【0074】

本発明の文脈において、上記の抗原結合部分には、単鎖抗体 (scFv)、キメラ抗体、ダイアボディ、scFv-Fc二価分子、dAbおよび相補性決定領域 (CDR) 断片、Fab断片、Fd断片、Fab'断片、FvおよびF(ab')₂断片が含まれる。

【0075】

本発明の文脈において、上記のIgG1重鎖定常領域には、G1m(f)、G1m(z)、G1m(z、a) および G1m(z、a、x) などのアロタイプが含まれる。本発明のいくつかの態様において、前述のIgG1重鎖定常領域はG1m(f)に対応する。

【0076】

本発明の文脈において、前述の軽鎖定常領域はKm1、Km1,2およびKm3などのさまざまなアロタイプを含む。本発明のいくつかの態様において、前述の軽鎖定常領域はKm3型領域に対応する。

【0077】

本発明の文脈において、前述の軽鎖定常領域はI、II、IIIおよびVIなどのさまざまなアロタイプを含む。本発明のいくつかの態様において、前述の軽鎖定常領域はII型領域に対応する。

【0078】

本発明に関する抗体核酸は、従来の遺伝子工学組換え技術または化学合成法を介しても得ることができる。一方で、本発明に関する抗体核酸の配列には、抗PD-L1抗体重鎖可変領域または抗体分子に属する部分核酸配列が含まれる。一方で、本発明に関する抗体核酸の配列には、抗PD-L1抗体軽鎖可変領域または抗体分子に属する部分核酸配列も含まれる。さらに別の一方で、本発明に関する抗体核酸の配列は、重鎖および軽鎖可変領

域に属する C D R 配列もさらに含む。相補性決定領域 (C D R) は、抗原エピトープに結合する部位であり、本発明の文脈内で、C D R 配列は I M G T / V - Q U E S T (<http://imgt.cines.fr/textes/vquest/>) を介して検証される。しかしながら、異なる解析法で得た C D R 配列はわずかに異なる。

【 0 0 7 9 】

本発明の一態様は、抗体 B 6 0 - 5 5、B I I 6 1 - 6 2、B 5 0 - 6、B 6 0、B I I 6 1 および B 5 0 重鎖および軽鎖可変領域配列をコードする核酸分子に関する。抗体 B 6 0 - 5 5、B I I 6 1 - 6 2、B 5 0 - 6、B 6 0、B I I 6 1 および B 5 0 重鎖可変領域配列をコードする核酸分子は、それぞれ配列番号 5 7、配列番号 5 8、配列番号 5 9、配列番号 6 0、配列番号 6 1 および配列番号 5 9 に対応する。抗体 B 6 0 - 5 5、B I I 6 1 - 6 2、B 5 0 - 6、B 6 0、B I I 6 1、および B 5 0 軽鎖可変領域配列をコードする核酸分子は、それぞれ配列番号 6 2、配列番号 6 3、配列番号 6 4、配列番号 6 2、配列番号 6 5 および配列番号 6 6 に対応する。本発明は、抗体 B 6 0 - 5 5、B I I 6 1 - 6 2、B 5 0 - 6、B 6 0、B I I 6 1 および B 5 0 重鎖および軽鎖可変領域配列をコードする核酸分子の変異体または類似体にも関する。

10

【 0 0 8 0 】

他方で、本発明はまた、さまざまな分離された核酸分子変異体にも関する；具体的には、前記核酸変異体の配列は、以下の核酸配列と少なくとも 7 0 % の類似性を示すはずである：配列番号 5 7、配列番号 5 8、配列番号 5 9、配列番号 6 0、配列番号 6 1、配列番号 5 9、配列番号 6 2、配列番号 6 3、配列番号 6 4、配列番号 6 2、配列番号 6 5 および配列番号 6 6、ここで少なくとも 7 5 % に達する類似性が好ましく、少なくとも 8 0 % に達する類似性がより好ましく、少なくとも 8 5 % に達する類似性がさらに好ましく、少なくとも 9 0 % に達する類似性がさらに好ましく、少なくとも 9 5 % に達する類似性が最も好ましい。

20

【 0 0 8 1 】

本発明はさらに、配列番号 4 7、4 9、5 1、5 3、5 4、および 5 1 のアミノ酸配列の形で抗体 B 6 0 - 5 5、B I I 6 1 - 6 2、B 5 0 - 6、B 6 0、B I I 6 1 および B 5 0 重鎖可変領域配列をコードする、対応する分離された核酸分子に関する。本発明はまた、配列番号 4 8、5 0、5 2、4 8、5 5 および 5 6 のアミノ酸配列の形で抗体 B 6 0 - 5 5、B I I 6 1 - 6 2、B 5 0 - 6、B 6 0、B I I 6 1、および B 5 0 軽鎖可変領域配列をコードする、対応する核酸分子にも関する。

30

【 0 0 8 2 】

本発明は、前述の核酸分子を含む組換え発現ベクターに関し、さらに、前記分子で形質転換された宿主細胞に関する。さらに、本発明は、前述の核酸分子を含む宿主細胞の特定の条件下での培養、引き続き、本発明に記載の抗体を得るための分離に使用される方法に関する。

【 0 0 8 3 】

抗体のアミノ酸配列

モノクローナル抗体 m A b B 6 0 - 5 5、B I I 6 1 - 6 2、B 5 0 - 6、B 6 0、B I I 6 1 および B 5 0 重鎖および軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、対応する核酸配列に由来してもよい。抗体 m A b B 6 0 - 5 5、B I I 6 1 - 6 2、B 5 0 - 6、B 6 0、B I I 6 1 および B 5 0 重鎖可変領域のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号 4 7、4 9、5 1、5 3、5 4 および 5 1 に対応する。抗体 m A b B 6 0 - 5 5、B I I 6 1 - 6 2、B 5 0 - 6、B 6 0、B I I 6 1 および B 5 0 軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号 4 8、5 0、5 2、4 8、5 5 および 5 6 に対応する。

40

【 0 0 8 4 】

一方で、本発明により提供される抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号 4 7、4 9、5 1、5 3、5 4 および 5 1 で与えられる配列と少なくとも 7 0 % の類似性を示すはずであり、類似性は少なくとも 8 0 % に達することが好ましく、類似性は少なくとも 8 5 % に達することがより好ましく、類似性は少なくとも 9 0 % に達することがさらによ

50

り好ましく、類似性は少なくとも95%に達することが最も好ましい。

【0085】

一方で、本発明により提供される抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号48、50、52、48、55および56に示される配列と少なくとも70%の類似性を示すはずであり、類似性は少なくとも80%に達することが好ましく、類似性は少なくとも85%に達することがより好ましく、類似性は少なくとも90%に達することがさらにより好ましく、類似性は少なくとも95%に達することが最も好ましい。

【0086】

抗体B60-55、BII61-62、B50-6、B60、BII61およびB50の重鎖および軽鎖可変領域のCDRアミノ酸配列は次のように決定される：抗体B60-55の重鎖のCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号1~3に対応する。抗体B60-55の軽鎖のCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号4~6に対応する。

10

【0087】

抗体BII61-62の重鎖のCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号7~9に対応する。抗体BII61-62の軽鎖のCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号10~12に対応する。

【0088】

抗体B50-6の重鎖のCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号13~15に対応する。抗体B50-6の軽鎖のCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号16~18に対応する。

20

【0089】

一方で、抗PD-L1抗体またはその断片の重鎖のCDRに含まれるアミノ酸配列は、配列番号1~3、7~9、13~15、19および20の1つまたは複数のアミノ酸の変異、付加または欠失を介して得てもよい。好ましくは、変異、付加または欠失に供されるアミノ酸の数は3を超えてはならない。より好ましくは、変異、付加または欠失に供されるアミノ酸の数は2を超えてはならない。最も好ましくは、変異、付加または欠失に供されるアミノ酸の数は1を超えてはならない。

【0090】

一方で、抗PD-L1抗体またはその断片の軽鎖のCDRに含まれるアミノ酸配列は、配列番号4~6、10~12、16~18、および21の1つまたは複数のアミノ酸の変異、追加、または欠失を介して得てもよい。好ましくは、変異、付加、または欠失に供されるアミノ酸の数は3を超えてはならない。より好ましくは、変異、付加または欠失に供されるアミノ酸の数は2を超えてはならない。最も好ましくは、変異、付加または欠失に供されるアミノ酸の数は1を超えてはならない。

30

【0091】

抗体B60-55、BII61-62、B50-6、B60、BII61およびB50の重鎖および軽鎖可変領域のFRアミノ酸配列は次のように決定される：抗体B60-55およびB60の重鎖可変領域のFR1、FR2、FR3およびFR4配列は、それぞれ配列番号22~25に対応する。軽鎖可変領域のFR1、FR2、FR3およびFR4配列は、それぞれ配列番号26~29に対応する。

40

【0092】

抗体BII61-62の重鎖可変領域のFR1、FR2、FR3およびFR4配列は、それぞれ配列番号30~33に対応する。軽鎖可変領域のFR1、FR2、FR3およびFR4配列は、それぞれ配列番号34~37に対応する。

【0093】

抗体B50-6およびB50の重鎖可変領域のFR1、FR2、FR3およびFR4配列は、それぞれ配列番号38~41に対応する。軽鎖可変領域のFR1、FR2、FR3およびFR4配列は、それぞれ配列番号42~45に対応する。

【0094】

50

抗体 B I I 6 1 の重鎖可変領域の F R 1、F R 2、F R 3 および F R 4 配列は、それぞれ配列番号 3 0 ~ 3 3 に対応する。軽鎖可変領域の F R 1、F R 2、F R 3 および F R 4 配列は、それぞれ配列番号 3 4、4 6、3 6、3 7 に対応する。

【0095】

一方で、抗 P D - L 1 抗体の重鎖可変領域の F R に含まれるアミノ酸配列は、配列番号 2 2 ~ 4 6 の 1 つまたは複数のアミノ酸の変異、付加、または欠失を介して得てもよい。好ましくは、変異、付加または欠失に供されるアミノ酸の数は 3 を超えてはならない。より好ましくは、変異、付加または欠失に供されるアミノ酸の数は 2 を超えてはならない。最も好ましくは、変異、付加または欠失に供されるアミノ酸の数は 1 を超えてはならない。

10

【0096】

前述の抗体、C D R、またはフレーム領域に含まれるアミノ酸の変異、付加、または欠失後に得られる変異体は、ヒト P D - L 1 に特異的に結合する能力を依然として保持するはずである。本発明は、抗原結合部分のそのような変異体もまた含む。

【0097】

前述の抗体の変異体は、配列番号 8 5 の完全な重鎖および配列番号 8 7 の完全な軽鎖を有する抗体 B 6 0 - 5 5 - 1 であり、重鎖の C 末端の末端リジン残基は無くてもよい。B 6 0 - 5 5 - 1 の重鎖は、配列番号 8 6 の核酸配列を利用することにより発現させることができる。核酸配列は、発現細胞株へのさらなる組み込みのために発現ベクターに組み込むことができる。B 6 0 - 5 5 - 1 の軽鎖は、配列番号 8 8 の核酸配列を利用することにより発現させることができる。核酸配列は、発現細胞株へのさらなる組み込みのために発現ベクターに組み込むことができる。

20

【0098】

B 6 0 - 5 5 - 1 抗体は、医薬的に許容される賦形剤またはアジュバントを添加することにより、医薬組成物として製剤化できる。組成物は、約 2 7 5 m M のセリン、約 1 0 m M のヒスチジンを含み、約 5 . 9 の p H 値を有し得る。組成物は、約 0 . 0 5 % のポリソルベート 8 0、約 1 % の D - マンニトール、約 1 2 0 m M の L - プロリン、約 1 0 0 m M の L - セリン、約 1 0 m M の L - ヒスチジン - H C l を含み、約 5 . 8 の p H を有し得る。

【0099】

本発明により構成されるモノクローナル抗体変異体は、従来の遺伝子工学法により得ることができる。当業者は、核酸変異を用いて D N A 分子を修飾する方法を十分にわかっている。さらに、重鎖および軽鎖の変異体をコードする核酸分子もまた化学合成を介して得ることができる。

30

【0100】

本発明の文脈において、配列同一性および配列類似性パーセンテージを決定するために使用されるアルゴリズムの例には、B L A S T および B L A S T 2 . 0 が含まれ、これらはそれぞれ Altschul et al. (1977) Nucl. Acid. Res. 25: 3389-3402 および Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 に記載されている。例えば、文献において与えられるパラメータまたはデフォルトパラメータを使用して、本発明により構成されるアミノ酸配列のパーセンテージ類似性を B L A S T および B L A S T 2 . 0 を使用して決定することができる。B L A S T 分析を実行できるソフトウェアは、国立バイオテクノロジー情報センター (N a t i o n a l C e n t e r f o r B i o t e c h n o l o g y I n f o r m a t i o n) を介して一般の任意のメンバーが得ることができる。

40

【0101】

本発明の文脈において、上記の所与のアミノ酸配列と少なくとも 7 0 % 同一であるアミノ酸配列には、本文中で概説された方法（例えば、標準パラメータを用いた B L A S T 分析）が使用される場合、本発明により構成されるポリペプチド配列と少なくとも 7 0 % 同一であると決定される配列など、前記アミノ酸配列と基本的に同一であるポリペプチド配列が含まれ、少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9

50

0%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上を示す配列が好ましい。

【0102】

本発明の文脈において、「ベクター」という用語は、特定のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含み、前記タンパク質の発現を可能にする核酸送達媒体のタイプを指す。ベクターは、宿主細胞の形質転換、形質導入またはトランスフェクション後に前記宿主細胞内にそれが運ぶ、遺伝物質成分の発現を可能にする。例えば、ベクターには以下が含まれる：プラスミド；ファージミド；コスミド；酵母人工染色体（YAC）、細菌人工染色体（BAC）、またはP1由来人工染色体（PAC）のような人工染色体；ファージまたはM13ファージなどのバクテリオファージおよび動物ウイルス。ベクターとして使用される動物ウイルスの例には、レトロウイルス（レンチウイルスを含む）、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス（単純ヘルペスウイルスなど）、ボックスウイルス、バキュロウイルス、パピローマウイルス、パポバウイルス（例えば、SV40）が含まれる。ベクターには、プロモーター配列、転写開始配列、エンハンサー配列、選択エレメント、レポーター遺伝子を含む、いくつかの発現制御エレメントが含まれてもよい。さらに、ベクターには複製起点が含まれてもよい。ベクターはまた、ウイルス粒子、リボソームまたはタンパク質コートなどの細胞への侵入を促進する成分を含んでもよいが、前記成分は上記物質に限定されない。

10

【0103】

本発明の文脈において、「宿主細胞」という用語は、大腸菌もしくは枯草菌などの原核細胞、酵母細胞もしくはアスペルギルスなどの真菌細胞、ショウジョウバエS2細胞もしくはSf9などの昆虫細胞、または線維芽細胞、CHO細胞、COS細胞、NS0細胞、HEL細胞、BHK細胞、HEK293細胞もしくは他のヒト細胞などの動物細胞を含む、多くの異なる細胞型を含む、ベクターが導入される細胞を指す。

20

【0104】

本発明により構成される抗体断片は、抗体分子全体の加水分解を介して得ることができる[Morimoto et al., J. Biochem. Biophys. Methods 24: 107-117 (1992)およびBrennan et al., Science 229: 81 (1985)を参照されたい]。さらに、これらの抗体断片は、組換え宿主細胞によって直接生成することもできる[Hudson, Curr. Opin. Immunol. 11: 548-557 (1999); Little et al., Immunol. Today, 21: 364-370 (2000)においてレビューされる]。例えば、Fab'断片は、大腸菌細胞から直接得られるか、または化学的に結合してF(ab')₂断片を形成することができる[Carter et al., Bio/Technology, 10: 163-167 (1992)]。別の例として、GCN4ロイシンジッパーを使用した連結を介してF(ab')₂断片を得ることができる。さらに、Fv、Fab、またはF(ab')₂断片も、組換え宿主細胞培養培地から直接、単離できる。当業者は、抗体断片の生成についての他の技術を十分にわかっているであろう。

30

【0105】

本発明の文脈において、「特異的結合」という用語は、抗体と対応する抗原との間で起こる反応など、2つの分子の間のランダムでない結合反応を指す。ここで、一次抗原に結合する抗体の二次抗原に対する結合親和性は非常に弱い、または検出不能である。特定の態様において、所与の抗原に特異的な抗体は、 10^{-5} M（例えば、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、または 10^{-10} M）の親和性（KD）で前記抗原に結合し、ここでKDは解離速度の結合速度に対する比（ k_{off}/k_{on} ）を指し、この量は当業者がよく知る方法で測定することができる。

40

【0106】

本発明のいくつかの態様において、本発明により構成される抗PD-L1抗体は、ヒトPD-L1に特異的に結合し、同時にマウスPD-L1にも結合することができるが、PD-L2またはB7H3には結合しない。

【0107】

本発明のいくつかの態様において、本発明により構成される抗PD-L1抗体は、hP

50

D - L 1 に h P D - 1 に対して競合的に結合することができる。

【 0 1 0 8 】

本発明の文脈において、P D - L 1 関連疾患には、例えば、P D - L 1 に関与する腫瘍およびウイルス感染、特に高レベルの P D - L 1 発現に関連する腫瘍およびウイルス感染が含まれる。

【 0 1 0 9 】

本発明のいくつかの態様では、前述の腫瘍には、肺がん、卵巣がん、結腸がん、結腸直腸がん、メラノーマ、腎臓がん、膀胱がん、乳がん、肝臓がん、リンパ腫、血液悪性腫瘍、頭頸部がん、神経膠腫、胃がん、鼻咽頭がん、喉頭がん、子宮頸がん、子宮がん、骨肉腫、甲状腺がん、前立腺がんが含まれるが、これらに限定されない。

10

【 0 1 1 0 】

本発明のいくつかの態様において、前述のウイルス感染には、急性、亜急性または慢性の H B V、H C V または H I V 感染が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 1 1 1 】

本発明の文脈において、20 の従来のアミノ酸およびそれらの略語は従来の用法に従う。Immunology - A Synthesis (2nd Edition, E.S. Golub and D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)) を参照されたい。

【 発明の効果 】

【 0 1 1 2 】

本発明は、酵母ディスプレイ技術をスクリーニングおよび親和性成熟を組み合わせる使用して、良好な特異性および比較的高い親和性および安定性を示す完全ヒト抗 P D - L 1 抗体を得る。ここで、前記抗体はヒト P D - L 1 に特異的に結合することができ、または、同時にマウス P D - L 1 にも結合することができるが、B 7 H 3 または P D - L 2 には結合しない；また、前記抗体は、活性化された T 細胞に結合して、T 細胞の活性化をさらに増強し、腫瘍成長の顕著な阻害をもたらす。

20

【 図面の簡単な説明 】

【 0 1 1 3 】

【 図 1 】 精製した抗 h P D - L 1 s c F v による h P D - L 1 / h P D - 1 リガンド受容体結合の阻害。X 軸は E G F P 蛍光強度を表し、Y 軸は S A - P E 蛍光強度を表す。A はブランク対照に対応し、B は陰性対照に対応し、C は B 5 0 s c F v に対応し、D は B 6 0 s c F v に対応し、E は B I I 6 1 s c F v に対応する。

30

【 図 2 】 親和性成熟スクリーニング後の h P D - L 1 酵母に対する親和性の増加を示す酵母ここで、X 軸は m y c の蛍光強度を表し（全抗体断片を発現する酵母に対応する m y c 陽性）、Y 軸は抗原結合能を示す蛍光強度 S A - A P C を表す。

【 図 3 】 親和性成熟後に得られた抗体が h P D - 1 と競合して h P D - L 1 に結合する能力の比較ここで、横軸は抗体濃度に対応し（単位：n g / m l）、縦軸は O D 値に対応する。A）B I I 6 1 - 6 2 と B I I 6 1 の比較を示す、B）B 5 0 と B 5 0 - 6 の比較を示す、C）B 6 0 と B 6 0 - 5 5 の比較を示す。

【 図 4 】 抗 h P D - L 1 抗体および h P D - L 1 結合能の E L I S A 測定ここで、横軸は抗体濃度に対応し（単位：n g / m l）、縦軸は O D 値に対応する。

40

【 図 5 】 抗 h P D - L 1 および h P D - 1 の、h P D - L 1 との競合結合の競合 E L I S A 測定ここで、横軸は抗体濃度に対応し（単位：n g / m l）、縦軸は O D 値に対応する。グラフ # 5 は B I I 6 1 - 6 2 m A b に対応し、グラフ # 2 は B 5 0 - 6 m A b に対応し、グラフ # 3 は B 6 0 - 5 5 m A b に対応する。

【 図 6 】 h P D - L 1 の抗 h P D - L 1 および C D 8 0 競合結合の競合 E L I S A 測定

【 図 7 】 抗 h P D - L 1 抗体特異性の検出ここで、X 軸は E G F P 蛍光強度を表し、Y 軸は対応する抗体結合の蛍光強度を表し、A はブランク対照に対応し、B は陰性対照に対応し、C は B I I 6 1 - 6 2 m A b に対応し、D は B 6 0 - 5 5 m A b に対応し、E は B 5 0 - 6 m A b に対応する；（ 1 ）は h P D - L 1 - E G F P タンパク質に対応し、（ 2 ）は h B 7 H 3 - E G F P に対応し、（ 3 ）は h P D - L 2 - E G F P タンパク質に

50

対応する。

【図 8】抗 h P D - L 1 抗体と m P D - L 1 結合能。ここで、X 軸は E G F P 蛍光強度を表し、Y 軸は対応する抗体結合の蛍光強度を表す。A はブランク対照に対応し、B は陰性対照に対応し、C は B 6 0 - 5 5 m A b に対応し、D は B I I 6 1 - 6 2 m A b に対応し、E は B 5 0 - 6 m A b に対応する；(1) は h P D - L 1 - E G F P タンパク質に対応し、(2) は m P D - L 1 - E G F P タンパク質に対応する。

【図 9】抗 h P D - L 1 抗体とカニクイザル P D - L 1 の結合能力

【図 1 0】抗 h P D - L 1 抗体による C D 4 ⁺ T 細胞の活性化

【図 1 1】腫瘍成長における抗 h P D - L 1 抗体 B 5 0 - 6 の阻害活性

【図 1 2】腫瘍成長における抗 h P D - L 1 抗体 B 6 0 - 5 5 および B I I 6 1 - 6 2 の阻害活性ここで、A は、3 m g / k g の用量を使用した場合の腫瘍成長の B I I 6 1 - 6 2 m A b および B 6 0 - 5 5 阻害に対応する；B は異なる用量を使用した場合の腫瘍成長における B I I 6 1 - 6 2 m A b の阻害効果に対応する。

【図 1 3】B 6 0 - 5 5 と抗体 2 . 4 1 H 9 0 P の安定性の比較ここで、A は経時的な B 6 0 - 5 5 および抗体 2 . 4 1 H 9 0 P の I C 5 0 値に対応する。B は経時的な抗体二量体の割合に対応する；C は B 6 0 - 5 5 加速安定性試験で得られた競合 E L I S A 結果に対応する。

【図 1 4】C a P u r e - H A での B 6 0 - 5 5 - 1 のクロマトグラフィー；B 6 0 - 5 5 - 1 保持時間は約 4 5 分である。

【図 1 5】T S K g e l G 3 0 0 0 S W _X L (T o s o h) カラムでの精製 B 6 0 - 5 5 - 1 のサイズ排除クロマトグラフィー分析。

【図 1 6】精製 B 5 0 - 5 5 - 1 のクマシー染色 S D S - P A G E 分析：レーン 1 - 還元条件下、レーン 2 - 非還元条件下、レーン 3 - 分子量マーカー。

【図 1 7】S P R 測定の代替捕捉アプローチ：パネル A - 抗ヒト I g G は抗体を捕捉するようにチップ上に固定化し；B 6 0 - 5 5 - 1 またはアテゾリズマブ (a t e z o l i z u m a b) を固定した抗体によって捕捉し、さまざまな濃度の P D - L 1 - H i s リガンドを適用した。パネル B - P D - L 1 - F c 融合タンパク質をセンサーチップ上に直接固定し、さまざまな濃度の B 6 0 - 5 5 - 1 またはアテゾリズマブを適用した。パネル C - P D - L 1 - F c 融合タンパク質および P D - L 1 - H i s の両方の相互作用を調査するために、B 6 0 - 5 5 - 1 またはアテゾリズマブをチップ上に直接固定化した；P D - L 1 - H i s タグまたは P D - L 1 - F c の濃度範囲を適用した。

【図 1 8】P D - L 1 - H i s タグリガンドの固定した比較薬抗体アテゾリズマブまたは B 6 0 - 5 5 - 1 への結合のセンサーグラム；アプローチは左パネルに模式的に示されており、キネティックパラメータは表にまとめた；抗ヒト捕捉抗体をセンサーチップに固定し、アテゾリズマブまたは B 6 0 - 5 5 - 1 を捕捉した後、さまざまな濃度の P D - L 1 - H i s リガンドを続けた：パネル A - アテゾリズマブの結果；パネル B - B 6 0 - 5 5 - 1 の結果。

【図 1 9】固定した P D - L 1 - F c 融合タンパク質へのアテゾリズマブまたは B 6 0 - 5 5 - 1 の結合のセンサーグラム；アプローチは左パネルに模式的に示されており、キネティックパラメータは表にまとめた；さまざまな濃度の B 6 0 - 5 5 - 1 またはアテゾリズマブをチップに適用した。パネル A - アテゾリズマブの結果；パネル B - B 6 0 - 5 5 - 1 の結果。

【図 2 0】P D - L 1 - H i s または P D - L 1 - F c の固定化 B 6 0 - 5 5 - 1 への結合のセンサーグラム；アプローチは左パネルに模式的に示されており、キネティックパラメータは表にまとめた。

【図 2 1】P D - L 1 - H i s または P D - L 1 - F c の固定化アテゾリズマブへの結合のセンサーグラム；アプローチは左パネルに模式的に示されており、キネティックパラメータは表にまとめた。

【図 2 2】B 6 0 - 5 5 - 1 とアテゾリズマブは、P r o m e g a A D C C R e p o r t e r B i o a s s a y K i t の対照抗体と比較して A D C C 活性を有さない。

10

20

30

40

50

【図 2 3】C 1 q への B 6 0 - 5 5 - 1 およびアテゾリズマブ結合の評価。

【図 2 4】M L R アッセイにおける T 細胞活性化に対する B 6 0 - 5 5 - 1 および比較薬抗体の濃度依存効力。

【図 2 5】薬物治療に際しての体重変化；矢印は投与時間を示す。

【図 2 6】薬物治療に際しての腫瘍容量阻害；矢印は投与時間を示す。

【図 2 7】グループ分け（n = 8）後、29 日間の観察期間中の 3 つのグループにおける個々の腫瘍成長。

【図 2 8】投与後 29 日目の腫瘍重量阻害。

【図 2 9】以下の表 7 に示す実験計画からの 3 つの試験グループの平均腫瘍容量。

【図 3 0】以下の表 7 において示されている実験計画の 21 日目と 41 日目での 3 つの試験グループの平均腫瘍容量；各日の 3 つのカラムは、グループ 1（左）、2（中央）、3（右）に対応している。

10

【発明を実施するための形態】

【0114】

以下のセクションでは、本発明の態様を以下の例を介してさらに説明する；しかしながら、当業者によって理解されるべきであるように、以下の例は本発明を説明するためにのみ使用されるのであって、本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。以下の例で指定されていない条件は、従来使用されている条件または製造業者が推奨する条件に設定されよう。製造業者が指定されていない試薬または機器はすべて、市販の標準製品に対応する。

20

【実施例 1】

【0115】

組換えヒト PD - L 1 および PD - 1 発現および関連 EGF P 細胞の調製。

ヒト PD - L 1 の細胞外ドメインのアミノ酸配列は、タンパク質データベース UniProt に含まれる PD - L 1 (Q9NZQ7) のアミノ酸配列（すなわち、Q9NZQ7 に含まれる残基 1 から残基 238 の配列）に基づいて得られた；IgG1 - Fc の構造ドメインのアミノ酸配列は、タンパク質データベース UniProt に含まれるヒト免疫グロブリン gamma 1 (IgG1) (P01857) の定常領域のアミノ酸配列に基づいて得られた（すなわち、P01857 に含まれる残基 104 から残基 330 の配列）；および、IgG1 - Fc の構造ドメインのアミノ酸配列は、タンパク質データベース UniProt に含まれるヒト免疫グロブリン gamma 1 (IgG1) (P01868) の定常領域のアミノ酸配列に基づいて得られた（すなわち、P01868 に含まれる残基 98 から残基 324 の配列）。オンラインツール DNABank (<http://helixweb.nih.gov/dnabank/>) を使用して、対応コードする DNA 配列を設計し、hPD - L 1 - Fc および hPD - L 1 - muFc 融合タンパク質遺伝子を得て、同じ方法を使用して hPD - L 1 - Fc 遺伝子を得た。増強した緑色蛍光タンパク質 (EGFP) のアミノ酸配列 (C5MKY7)、ならびにヒト PD - L 1 のアミノ酸配列 (Q9NZQ7)、マウス PD - L 1 のアミノ酸配列 (Q9EP73) およびヒトのアミノ酸配列 PD - 1 (Q15116) は、タンパク質データベース UniProt に含まれる情報に基づいて得られた。オンラインツール DNABank (<http://helixweb.nih.gov/dnabank/>) を使用して、対応コードする DNA 配列を設計し、PD - L 1 - EGF P 融合タンパク質遺伝子を得て、同じ方法を使用して hPD - L 1 - EGF P および mPD - L 1 - EGF P 遺伝子を得た。対応する DNA 断片は、人工合成によって得られた。合成した遺伝子配列は、Fermentas 製の HindIII と EcoRI で二重切断され、市販のベクター pcDNA4 / myc - HisA (Invitrogen、V863 - 20) にクローンし、その後、プラスミドが正確に構築されて組換えプラスミド DNA；すなわち、pcDNA4 - hPD - L 1 - Fc、pcDNA4 - hPD - L 1 - muFc、pcDNA4 - hPD1 - Fc、pcDNA4 - hPD - L 1 - EGF P、pcDNA4 - hPD1 - EGF P および pcDNA4 - mPD - L 1 - EGF P が得られたことを確認するために配列決定を行った。

30

40

50

【0116】

逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) を使用して、実験室で培養した樹状細胞 (DC細胞) からヒトPD-L2およびB7H3遺伝子を増幅した (前記DC細胞は、PBMCから単離された単核細胞のTNF-成熟により得られた)。使用した遺伝子増幅プライマーは以下の通りである:

PD-L2-F HindIII: GCGCAAGCTTGCCACCATGATCTTCCTCCTGCTAATG (配列番号74)、

PD-L2-R EcoI: GCGGAATTCGATAGCACTGTTCACCTCCCTC (配列番号75);

hB7H3-F HindIII: GCGCAAGCTTGCCACCATGCTGCGTCGGCGGGGCAGC (配列番号76);

hB7H3-R BamHI: GCGCGAATTCGGCTATTTCTTGTCATCATCTTC (配列番号77)

【0117】

次いで、得られたPCR産物をFermentas HindIIIおよびEcoRIを使用して二重切断し、前もって構築されたpcDNA4-hPD-L1-EGFPにクローニング後、プラスミドが正確に構築され組換えプラスミドDNA; すなわち、pcDNA4-hPD-L2-EGFPおよびpcDNA4-hB7H3-EGFPが得られたことを確認するために配列決定を行った。

【0118】

対応するEGFP組換えプラスミドをHEK293 [ATCC、CRL-1573 (商標)] 細胞にトランスフェクトし、hPD-L1、mPD-L1、hPD-L2およびhB7H3の発現を確認するためにトランスフェクションの48時間後に蛍光活性化細胞分類 (FACS) を実行した。

【0119】

タンパク質産生のために、pcDNA4-hPD-L1-Fc、pcDNA4-hPD-L1-muFc、およびpcDNA4-hPD1-Fcを一時的にHEK293細胞にトランスフェクトした。組換え発現プラスミドをFreeStyle293培地に希釈し、形質転換に必要なPEI (ポリエチレンジアミン) 溶液に加えた後、各プラスミド/PEI混合物をそれぞれ別々に細胞懸濁液に加え、37、10%CO₂ および90rpmで培養した; 同時に、50μg/Lのインスリン様成長因子 (IGF-1) の補充添加が行われた。その4時間後、EX293培地、2mMグルタミン、および50μg/L IGF-1の補充添加を行い、135rpmで培養を継続した。さらに24時間後、3.8mMバルブプロ酸ナトリウム (VPA) を添加した。5~6日間の培養後、一過性発現培養液の上清を回収し、プロテインAアフィニティクロマトグラフィーを使用して一次精製し、以下の例に使用するためにhPD-L1-Fc、hPD-L1-muFcおよびhPD-L1-Fcタンパク質サンプルを得た。このようにして得られたタンパク質サンプルをSDS-PAGEを使用した予備試験に供し、標的バンドが明らかに見られた。

【実施例2】

【0120】

酵母ディスプレイライブラリーにおける抗hPD-L1抗体のスクリーニング、クローニング発現および同定。

酵母ディスプレイ技術を使用して、PD-L1についての完全ヒト抗体をスクリーニングした。21人の健康なヒト対象から得られた脾臓およびリンパ節IgMおよびIgG cDNAに含まれるVHおよびVL遺伝子のクローニングを行って、scFV酵母ディスプレイライブラリーを構築した (VHとVL間の連結配列は連結ペプチド

GGGSGGGSGGGGS (配列番号67)

および連結ペプチドであった) ライブラリーのストレージ容量は 5×10^8 であった。10倍容量の酵母ライブラリーを起こし、その表面に抗体が発現するように酵母を誘導した。100nMのビオチン化hPD-L1抗原磁気ビーズを使用して2ラウンドの濃縮を行い、その後、抗myc抗体とビオチン化hPD-L1フローソーティングを使用してさら

10

20

30

40

50

に 2 ラウンドの濃縮を行った。このようにして得られた酵母をプレーティングし、単一クローンを採った。増幅および発現の誘導に供されたモノクローナル酵母は、抗 m y c 抗体ならびにビオチン化 h P D - L 1 または対照抗原 h P D - 1 を使用した染色分析にさらに供され、抗原 - 陽性または対照 - 陰性である酵母は陽性酵母として評価された。

【 0 1 2 1 】

F A C S によって確認した酵母クローンを、以下の P C R プライマーを使用した酵母コロニー P C R および配列決定に供した：

p N L 6 - F :

GTACGAGCTAAAAGTACAGTG (配列番号 7 8) ;

p N L 6 - R :

TAGATACCCATACGACGTTC (配列番号 7 9) ;

ここで、使用された配列決定プライマーは p N L 6 - R であった。配列決定後に得られた配列結果は、B i o E d i t ソフトウェアパッケージを使用したアライメント解析に供した。

【 0 1 2 2 】

上記のように得られた単鎖抗体 s c F v 遺伝子と以前に得られた I g G 1 - F c 遺伝子を融合し、F e r m e n t a s H i n d I I I および E c o R I 酵素の二重切断を使用して市販ベクター p E E 6 . 4 (L o n z a) にクローニングし、その後、標準的な分子クローニング手順に従ってクローニングおよびプラスミドミニプレップを行った。抽出されたプラスミドを H E K 2 9 3 細胞で一時的に発現し、プロテイン A カラムを使用して精製した。

【 0 1 2 3 】

h P D - L 1 - E G F P 細胞を 0 . 5 % P B S - B S A 緩衝液に再懸濁し、その後、前述の精製抗 h P D - L 1 s c F v 抗体を加え、一方で同時に、2 μ g の h I g G 1 タンパク質を陰性対照として使用し、h P D - 1 - F c を陽性対照に加え、対応する対照を確立した。使用した二次抗体は、e B i o s c i e n c e の抗 h I g - P E であった。染色が完了した後、フローサイトメトリーで検出を行った。上記の方法を使用して、細胞表面 P D - L 1 抗原に結合できる抗体を同定した。

【 0 1 2 4 】

h P D - L 1 - E G F P 細胞を 0 . 5 % P B S - B S A 緩衝液に再懸濁し、その後、前述の精製抗 h P D - L 1 s c F v 抗体を添加し、一方で同時に、2 μ g の h I g G 1 タンパク質を陰性対照として使用して陰性対照を確立した；0 . 3 μ g の h P D - 1 - F c - ビオチンをすべてのサンプルに加え、e B i o s c i e n c e からの S A - P E を二次抗体として使用した；染色が完了した後、フローサイトメトリーで検出を行い、結果を図 1 に示す。上記の方法を使用して、細胞表面 P D - L 1 抗原と P D - 1 結合をブロックできる抗体を特定した。

【 0 1 2 5 】

スクリーニングと同定の後、好ましい特性を示した 3 つの抗体株が得られた：B 5 0、B 6 0 および B I I 6 1。結果からわかるように、3 つの抗 h P D - L 1 抗体株すべてが h P D - 1 受容体との結合をブロックすることができた。

【 0 1 2 6 】

連結ペプチド配列

GGGSGGGSGGGGS (配列番号 6 7)

は前述の抗体の重鎖可変領域と軽鎖可変領域の間に含まれていた。

【 0 1 2 7 】

B 5 0 重鎖可変領域のアミノ酸配列は：

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSTKAAWYWI RQSPSRGLEWLGRTYFRSKWYNDYADSVKSRLTINPDTS
KNQFSLQLKSVSPEDTAVYYCARGQYTAFDIWGQGTMTVSS (配列番号 5 1) ;

ここで、下線部は C D R 1、2 および 3 を構成し、それぞれ配列番号 1 3 ~ 1 5 に対応し、非下線部は F R 1、2、3 および 4 を構成し、それぞれ配列番号 3 8 ~ 4 1 に対応する

10

20

30

40

50

;

【 0 1 2 8 】

対応する D N A 配列は :

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGA
CAGTGTCTCTAGCACCAAGGCTGCTTGGTACTGGATCAGGCAGTCCCTTCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATA
CTTCCGGTCCAAGTGGTATAATGACTATGCCGACTCTGTGAAAAGTCGATTAACCATCAACCCAGACACATCCAAGAACC
AGTTCTCCCTGCAATTAAGTCTGTGAGTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGGGCAATACACTGCTTTTG
ATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA (配列番号 5 9) ;

【 0 1 2 9 】

軽鎖可変領域のアミノ酸配列は :

10

QSALIQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYDLVSWYQQYPGQAPRLIIYEVIKRPSGISDRFSGSKSGNTASLTISGL
QAEDEADYYC^{SSY}AGRR^{LHG}VFGGGTQLTVL (配列番号 5 6) ;

ここで、下線部は C D R 1、2 および 3 を構成し、それぞれ配列番号 2 1、1 7 および 1
8 に対応し、非下線部は F R 1、2、3 および 4 を構成し、それぞれ配列番号 4 2 ~ 4 5
に対応する ;

【 0 1 3 0 】

ならびに対応する D N A 配列は :

CAGTCTGCTCTGATTACGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCCCCTGGACAGTCGATCACTATCTCCTGTACTGGCACCAGT
AGTGATGTTGGAGGTTATGACCTTGTCTCCTGGTACCAACAGTACCCGCCAAGCCCCCAGACTCATCATTTATGAGGTC
ATTAAGCGGCCCTCAGGGATTCTGATCGCTTCTCTGGTTCCAAGTCTGGCAACACGGCCTCCCTGACAATCTCTGGGCT
CCAGGCTGAGGACGAGCTGATTATTATTGCAGCTCATATGCAGGTAGACGTCTTCATGGTGTGTTCCGAGGAGGCACCCA
GCTGACCGTCTC (配列番号 6 6)

20

【 0 1 3 1 】

B 6 0 重鎖可変領域のアミノ酸配列は :

QVQLVQSGAEVKKPASSVKV^{SCT}ASGGSFSTYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTTKYAQR^{FQGRVT}ITADESTTTAY
MELSSLISDDTALYYCTTSR^{GFSY}GWFDYWGQGT^{LVTVSS} (配列番号 5 3) ;

ここで、下線部は C D R 1、2 および 3 を構成し、それぞれ配列番号 1、2 および 1 9 に
対応し、非下線部は F R 1、2、3 および 4 を構成し、それぞれ配列番号 2 2 ~ 2 5 に対
応する ;

【 0 1 3 2 】

30

対応する D N A 配列は :

CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGCGTCCTCGGTCAAAGTCTCCTGCACGGCTTCTGGCGG
CTCCTTCAGCACCTATGCTATCAGTTGGGTGCGACAGGCTCCTGGACAGGGCTTGAATGGATGGGCGGGATCATCCCCAT
CTTTGGTACA^{ACTA}AGTACGCACAGAGGTTCCAGGGCAGGGTCACGATTACCGCGACGAATCGACGACCACAGCCTACA
TGGAGCTGAGCAGCTGATATCTGACGACACGGCCCTGTATTATTGTACGACGTCTCGTGGATTCAGCTATGGCTGGTTTG
ACTACTGGGGCCAGGGTACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (配列番号 6 0) ;

【 0 1 3 3 】

軽鎖可変領域のアミノ酸配列は :

EIVMTQSPATLSLSPGERATLS^{CRASQ}SVGIHLAWYQQKLGQAPRLIIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP
EDFAVYYCQQYGS^{LPR}TFGQGTKVEIK (配列番号 4 8) ;

40

ここで、下線部は C D R 1、2 および 3 を構成し、それぞれ配列番号 4 ~ 6 に対応し、非
下線部は F R 1、2、3 および 4 を構成し、それぞれ配列番号 2 6 ~ 2 9 に対応する ;

【 0 1 3 4 】

ならびに対応する D N A 配列は :

GAAATTGTAATGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGTAGGGCCAGT
CAGAGTGTGGCATACACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACTTGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAG
TAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGATTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCC
TGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTTCTTTACCTCGGACGTTCCGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCA
AA (配列番号 6 2)

【 0 1 3 5 】

50

B I I 6 1 重鎖可変領域のアミノ酸配列は：

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSASWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYDDYAVSVKSRISINPDTSKN
QFSLQLNSVTPEDTAVYYCARSQGRYFVNYGMDVWGQGTITVTVSS (配列番号 5 4)；

ここで、下線部は C D R 1、2 および 3 を構成し、それぞれ配列番号 7、2 および 9 に対応し、非下線部は F R 1、2、3 および 4 を構成し、それぞれ配列番号 3 0 ~ 3 3 に対応する。

【0 1 3 6】

対応する D N A 配列は：

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGA
CAGTGTCTCTAGCAACAGTGCTTCTTGGAACTGGATCAGGCAGTCCCATCGAGAGGCCTTGAGTGCTGGGAAGGACATA
TTACAGGTCCAAATGGTATGATGATTATGCAGTATCTGTGAAAAAGTCGAATCAGCATCAACCCAGACACATCCAAGAACC
AGTTCTCCCTGCAGTGAACCTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAAGCCAGGGACGATATTTTG
TCAACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (配列番号 6 1)；

10

【0 1 3 7】

軽鎖可変領域のアミノ酸配列は：

DIRLTQSPSSLSASVGDRIITICRASQSISYLNWYQQKPKAPKLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ
PEDVATYYCQSYFTPRGITFGPGTKVDIK (配列番号 5 5)；

ここで、下線部は C D R 1、2 および 3 を構成し、それぞれ配列番号 1 0 ~ 1 2 に対応し、非下線部は F R 1、2、3 および 4 を構成し、それぞれ配列番号 3 4、4 6、3 6 および 3 7 に対応する；

20

【0 1 3 8】

対応する D N A 配列は：

GACATCCGGTTGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAATCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCA
GAGCATTAGCAGTTATTTAAATTTGGTATCAACAGAAACCAGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATGGTGCATCCAGTTT
GCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTG
AAGATGTTGCAACTACTACTGTCAACAGAGTTACTTTACCCCCCGCGGGATCACTTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATA
TCAAA (配列番号 6 5)

【実施例 3】

【0 1 3 9】

抗 h P D - L 1 s c F v 親和性改善酵母ライブラリーの構築。

30

テンプレートとして p E E 6 . 4 - B 5 0 - F c、p E E 6 . 4 - B 6 0 - F c および
p E E 6 . 4 - B I I 6 1 - F c プラスミド、ならびに：

p E E 6 . 4 - F：

TCTGGTGGTGGTGGTTCTGCTAGC (配列番号 8 0) および

c M y c - B B X h o I：GCCAGATCTCGAGCTATTACAAGTCTTCTTCAGAAATAAGCTTTTGTCTAGAA
TTCCG (配列番号 8 1)

をプライマーとして使用して、標準 P C R 反応をそれぞれ行った。P C R 産物を精製し、
F e r m e n t a s N h e I および B g l I I を用いて市販の p C T 3 0 2 ベクター市
販 (a d d g e n e：# 4 1 8 4 5) にクローニングして、組換えプラスミド p C T 3 0
2 - B 5 0、p C T 3 0 2 - B 6 0 および p C T 3 0 2 - B I I 6 1 を得た。次に、Ging
e r e t a l. (2006) Nat Protoc 1(2):755-68 に詳述されている方法に基づいて、エラープ
ローン P C R を使用し、s c F v ランダム変異 P C R 産物を得た。使用したプライマーは
：

40

T 7 プロショート：

TAATACGACTCACTATAGGG (配列番号 8 2) および

スプライス 4 / L：

GGCAGCCCCATAAACACACAGTAT (配列番号 8 3)

【0 1 4 0】

このようにして得られた P C R 産物は F e r m e n t a s G e n e J E T D N A 精
製キットを使用して精製し、エタノール沈殿により 1 μ g / μ l を超える濃度に濃縮した

50

。Fermentas Nhe I および BamH I を使用して市販ベクター p C T 3 0 2 を二重切断し、同時に Fermentas Fast A P 脱リン酸化酵素を使用してベクターの脱リン酸化を行い、その後 Fermentas Gene J E T D N A P u r i f i c a t i o n K i t を使用して精製を再び行い、エタノール沈殿を行って、産物を $1 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ を超える濃度に濃縮した。酵母の電気形質転換およびインビボ組換えを Ginger et al. (2006) Nat. Protoc. 1(2): 755-68 に記載された方法に従って行い、親和性成熟酵母ライブラリーを得た。

【実施例 4】

【0141】

親和性が改善された抗 h P D - L 1 s c F v を発現する酵母のスクリーニング。

10

上記のように得られた親和性成熟酵母ライブラリーを 10 nM および 1 nM の h P D - L 1 - F c タンパク質を使用した 2 ラウンドのフローソーティングに供し、このようにして得られた酵母産物をプレーティングし、同定のためにモノクローンを採った。低濃度の抗原染色を使用してフロー染色を行い、以前に得た野生型酵母を対照として使用することにより、親和性が増加した酵母モノクローンを同定した。

【0142】

上記の方法論を使用し、F A C S 検証を通過した酵母クローンを酵母コロニー P C R および配列決定に供した。親和性成熟後に得られた s c F v 遺伝子と前に得られた I g G 1 - F c 遺伝子を融合し、Fermentas Hind I I I と E c o R I 酵素の二重切断を使用して市販ベクター p E E 6 . 4 にクローニングし、その後標準分子クローニング手順に従ってクローニングとプラスミドミニプレップを行った。抽出されたプラスミドは、H E K 2 9 3 細胞内に一時的に発現され、プロテイン A カラムを使用して精製された。

20

【0143】

抗体結合能力およびブロック能力は、実施例 2 に記載の方法を使用して測定した。

【0144】

結合能力試験の結果については、図 2 を参照されたい；結果は、親和性成熟後に得られた 3 つの抗体株が親和性を著しく増加させたことを示している。

【0145】

ブロック能力試験の結果については、図 3 を参照されたい；結果は、親和性成熟後に得られた 3 つの抗体株について得られた P D - 1 との競合における P D - L 1 への競合的結合の I C 5 0 値は、B I I 6 1 - 6 2 について $0.837 \mu\text{g} / \text{ml}$ (B I I 6 1 について $0.884 \mu\text{g} / \text{ml}$)、B 5 0 - 6 について $4.56 \mu\text{g} / \text{ml}$ (B 5 0 について $5.63 \mu\text{g} / \text{ml}$)、B 6 0 - 5 5 について $1.14 \mu\text{g} / \text{ml}$ (B 6 0 について $16.8 \mu\text{g} / \text{ml}$) であることを示している。

30

【0146】

親和性成熟後、親和性の増加を示す 3 つの抗 h P D - L 1 s c F v 抗体配列、すなわち B 5 0 - 6、B 6 0 - 5 5 および B I I 6 1 - 6 2 が得られた。B 5 0 と比較して、B 5 0 - 6 はその V L C D R 1 内で D から N へのアミノ酸変異を示した；B 6 0 と比較して、B 6 0 - 5 5 はその V H C D R 3 内で S から N へのアミノ酸変異を示した；および、B I I 6 1 と比較して、B I I 6 1 - 6 2 は、その V H C D R 2 内で S から G へのアミノ酸変異、ならびにその V L F R 2 内で I から V へのアミノ酸変異を示した。連結ペプチド配列

40

GGGSGGGSGGGGS (配列番号 6 7)

が前述の抗体の重鎖可変領域と軽鎖可変領域の間に含まれていた。

【0147】

B 5 0 - 6 重鎖可変領域のアミノ酸配列は：

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSTKAAWYWI RQSPSRGLEWLGR¹TYFRSKWYNDYADSVKSRLTINPDTSKN
QFSLQLKSVSPEDTAVYYCARGQYTAFDIWGQGTMTVSS (配列番号 5 1) ；

ここで、下線部は C D R 1、2 および 3 を構成し、それぞれ配列番号 1 3 ~ 1 5 に対応し、非下線部は F R 1、2、3 および 4 を構成し、それぞれ配列番号 3 8 ~ 4 1 に対応する

50

;

【 0 1 4 8 】

対応する D N A 配列は :

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGA
 CAGTGTCTCTAGCACCAAGGCTGCTTGGTACTGGATCAGGCAGTCCCTTCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATA
 CTTCCGGTCCAAGTGGTATAATGACTATGCCGACTCTGTGAAAAGTCGATTAACCATCAACCCAGACACATCCAAGAACC
 AGTTCTCCCTGCAATTAAGTCTGTGAGTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGGGCAATACACTGCTTTTG
 ATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA (配列番号 5 9) ;

【 0 1 4 9 】

軽鎖可変領域のアミノ酸配列は :

10

QSALIQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNVGGYDLVSWYQQYPGQAPRLIIYEVIKRPSGISDRFSGSKSGNTASLTIS
 GLQAEDEADYYC¹SSYAGRR²LHGVFGGGTQLTVL (配列番号 5 2) ;

ここで、下線部は C D R 1、2 および 3 を構成し、それぞれ配列番号 1 6 ~ 1 8 に対応し、
 非下線部は F R 1、2、3 および 4 を構成し、それぞれ配列番号 4 2 ~ 4 5 に対応する。

【 0 1 5 0 】

対応する D N A 配列は :

CAGTCTGCTCTGATTTCAGCCTGCCTCCGTGTCTGGGTCCCCTGGACAGTCGATCACTATCTCCTGTACTGGCACCAGTAG
 TAATGTTGGAGGTTATGACCTTGTCTCCTGGTACCAACAGTACCCGGGCCAAGCCCCAGACTCATCATTTATGAGGTCA
 TTAAGCGGCCCTCAGGGATTTCTGATCGCTTCTCTGGTTCCAAGTCTGGCACACGGCCTCCCTGACAATCTCTGGGCTCC
 AGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTATTCAGCTCATATGCAGGTAGACGTCTTCATGGTGTGTTCCGAGGAGGCACCCAG
 CTGACCGTCCCTC (配列番号 6 4) ;

20

【 0 1 5 1 】

B 6 0 - 5 5 重鎖可変領域のアミノ酸配列は :

QVQLVQSGAEVKKPASSVKV¹SCTASGGSFSTYAISWVRQAPGGGLEWMGGIIPIFGTTKYAQR²FQGRVTITADESTTT
 AYMELSSLSDDTALYYCTTSR³GFNYGWFDYWGQGT⁴LVTVSS (配列番号 4 7) ;

ここで、下線部は C D R 1、2 および 3 を構成し、それぞれ配列番号 1 ~ 3 に対応し、非
 下線部は F R 1、2、3 および 4 を構成し、それぞれ配列番号 2 2 ~ 2 5 に対応する ;

【 0 1 5 2 】

対応する D N A 配列は :

30

CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGCGTCCTCGGTCAAAGTCTCCTGCACGGCTTCTGGCGG
 CTCCTTCAGCACCTATGCTATCAGTTGGGTGCGACAGGCTCCTGGACAGGGCTTGAATGGATGGGCGGGATCATCCCAT
 CTTTGGTACAACTAAGTACGCACAGAGGTTCCAGGGCAGGGTCACGATTACCGCGGACGAATCGACGACCACAGCCTACA
 TGGAGCTGAGCAGCTGATATCTGACGACACGGCCCTGTATTATTGTACGACGTCTCGTGGATTCAACTATGGCTGGTTTG
 ACTACTGGGGCCAGGGTACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (配列番号 5 7) ;

【 0 1 5 3 】

軽鎖可変領域のアミノ酸配列は :

EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVGIHLAWYQQKLGQAPRLIIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL
 EPEDFAVYYCQQYGS¹LPRTFGQGT²KVEIK (配列番号 4 8) ;

ここで、下線部は C D R 1、2 および 3 を構成し、それぞれ配列番号 4 ~ 6 に対応し、非
 下線部は F R 1、2、3 および 4 を構成し、それぞれ配列番号 2 6 ~ 2 9 に対応する ;

40

【 0 1 5 4 】

対応する D N A 配列は :

GAAATTGTAATGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGTAGGGCCAGT
 CAGAGTGTGGCATACTTAGCCTGGTACCAACAGAACTTGGCCAGGTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGT
 AGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCC
 TGAAGATTTTGCAGTGATTACTGTGACGAGTATGGTTCTTTACCTCGGACGTTCCGCCAAGGGACCAAGGTGGAAAT CA
 AA (配列番号 6 2) ;

【 0 1 5 5 】

B I I 6 1 - 6 2 重鎖可変領域のアミノ酸配列は :

50

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSASWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYDDYAVSVKGRISINPDTSS
KNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARSQGRYFVNYGMDVWGQGTITVTV SS (配列番号 49) ;

ここで、下線部は C D R 1、2 および 3 を構成し、それぞれ配列番号 7 ~ 9 に対応し、非下線部は F R 1、2、3 および 4 を構成し、それぞれ配列番号 30 ~ 33 に対応する ;

【0156】

対応する D N A 配列は :

CAGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTGCCATCTCCGGG
GACAGTGTCTCTAGCAACAGTGCTTCTTGGAAGTGGATCAGGCAGTCCCATCGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGGAAGGACA
TATTACAGGTCCAAATGGTATGATGATTATGCAGTATCTGTGAAAGGTGCAATCAGCATCAACCCAGACACATCCAAGAA
CCAGTTCTCCCTGCAGTGAAGTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAAGCCAGGGACGATATTT
TGTCAACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (配列番号 58) ;

10

【0157】

軽鎖可変領域のアミノ酸配列は :

DIRLTQSPSSLSASVGDRIITICRASQSISYLNWYQQKPKAPKLLVYGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP
EDVATYYCQQSYFTPRGITFGPGTKVDIK (配列番号 50) ;

ここで、下線部は C D R 1、2 および 3 を構成し、それぞれ配列番号 10 ~ 12 に対応し、非下線部は F R 1、2、3 および 4 を構成し、それぞれ配列番号 34 ~ 37 に対応する ;

【0158】

ならびに対応する D N A 配列は :

20

GACATCCGGTTGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAATCACCATCACTTGCCGGGCAAGT
CAGAGCATTAGCAGTTATTTAAATTTGGTATCAACAGAAACCAGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGGTCTATGGTGCATCCAGT
TTGCAAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACC
TGAAGATGTTGCAACTACTACTGTCAACAGAGTTACTTTACCCCCGCGGGATCACTTTGCGCCCTGGGACCAAAGTGGAT
TATCAAA (配列番号 63)

【実施例 5】

【0159】

s c F v 抗体の I g G 抗体へのフォーマット。

Uniprot タンパク質データベース (P01857) に含まれるヒト免疫グロブリン
gamma 1 (I g G 1) の定常領域のアミノ酸配列に基づいて、ヒト I g G 1 定常領
域のアミノ酸配列が得られた。ヒト I g G 1 定常領域遺伝子を得るため、オンラインツ
ール DN A w o r k s (http://helixweb.nih.gov/dnaworks/) を使用して対応するエンコード DN A 配列を設計し、スクリーニングにより得ら
れた B 5 0 - 6、B 6 0 - 5 5 および B I I 6 1 - 6 1 の重鎖可変領域の V H 配列をヒト
I g G 1 定常領域遺伝子とともにスプライスし、同時に V H の 5' 末端に以下のシグナル
ペプチド配列を加えた :

30

ATGGAGACAGACACACTCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACCGGT (配列番号 84) ;

【0160】

スプライスされた遺伝子を合成し、Fermentas HindIII および Eco
RI 酵素を使用して二重切断を行い、遺伝子をベクター p E E 6 . 4 にクローニングして
p E E 6 . 4 - B 5 0 - 6 H C ; p E E 6 . 4 - B 6 0 - 5 5 H C ; および p E E 6 . 4
- B I I 6 1 - 6 2 H C を得た。Uniprot タンパク質データベース (P01834)
に含まれるヒト免疫グロブリン kappa の定常領域のアミノ酸配列に基づいて、ヒトカ
ッパ軽鎖定常領域のアミノ酸配列が得られた。ヒトカッパ軽鎖定常領域遺伝子を得るため、
オンラインツール DN A w o r k s (http://helixweb.nih.gov/dnaworks/) を使用して
対応するエンコード DN A 配列を設計し、スクリーニングにより得られた B 6 0 - 5 5 お
よび B I I 6 1 - 6 1 の重鎖可変領域の V L 配列をヒトカッパ軽鎖定常領域遺伝子ととも
にスプライスし、同時に V L の 5' 末端に以下のシグナルペプチド配列を加えた :

40

ATGGAGACAGACACACTCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACCGGT (配列番号 84) ;

【0161】

50

ヒトラムダ () 軽鎖定常領域遺伝子を得るため、オンラインツール *DNAworks* (<http://helixweb.nih.gov/dnaworks/>) を使用して対応するエンコード DNA 配列を設計し、スクリーニングにより得られた B 5 0 - 6 の軽鎖可変領域の V L 配列をヒトラムダ軽鎖定常領域遺伝子とともにスプライスし、同時に V L の 5 ' 末端に以下のシグナルペプチド配列を加えた：

ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACCGGT (配列番号 8 4) ；

【 0 1 6 2 】

スプライスされた遺伝子を合成し、*Fermentas HindIII* および *EcoRI* 酵素を使用して二重切断を行い、遺伝子をベクター pEE12.4 (*Lonza*) にクローニングして pEE12.4 - B50 - 6LC ; pEE12.4 - B60 - 55LC ; および pEE12.4 - BII61 - 62LC を得た。

10

【 0 1 6 3 】

上記のようにして得られた重鎖および軽鎖プラスミドは、*AidLab MaxiPrep* キット (PL14) を使用して調製された。組換えにより構築された軽鎖および重鎖プラスミドを HEK293 細胞に同時トランスフェクトし、抗体を発現させた。組換え発現プラスミドを *FreeStyle* 293 培地で希釈し、形質転換に必要な PEI (ポリエチレンジミン) 溶液に加えた後、各プラスミド / PEI 混合物を別々に細胞懸濁液に加え、37 °C、10 % CO₂ および 90 rpm で培養した；同時に、50 μg / IGF - 1 の補充添加を行った。4 時間後、EX293 培地、2 mM グルタミン、50 μg / L IGF - 1 の補充添加を行い、135 rpm で培養し続けた。さらなる 24 時間後、3.8 mM VPA を添加した。5 ~ 6 日間の培養後、一過性発現培養の上清を収集し、プロテイン A アフィニティクロマトグラフィーを使用して、抗 hPD - L1 B50 - 6、B60 - 55 および BII61 - 62 mAb 抗体を精製および取得した。

20

【 0 1 6 4 】

I g G 1 鎖定常領域のアミノ酸配列は：

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 6 8) ；

30

【 0 1 6 5 】

I g G 1 鎖定常領域の核酸配列は：

GCCAGCACTAAGGGGCCCTCTGTGTTTCCACTCGCCCCTTCTAGCAAAAAGCACTTCCGGAGGCACTGCAGCACTCGGGTGTCTGGTCAAAGATTATTTCCCTGAGCCAGTCACCGTGAGCTGGAACCTGGCGCCCTCACCTCCGGGGTTACACCTTTCCAGCCGTCCTGCAGTCCTCCGGCCTGTAAGTCCCTGAGCAGCGTCGTTACCGTGCCATCCTCTTCTCTGGGGACCCAGACATACATCTGCAATGTCAACATAAGCCTAGCAACACCAAGGTGGACAAAAAGGTCGAGCCAAAGAGCTGCGATAAGACACACACCTGCCCTCCATGCCCGCACCTGAACTCCTGGGCGGGCCTTCCGTTTTCTGTTTCTCCAAGCCCAAGGATACACTGATGATTAGCCGACCCCCGAAGTCACTTGCGTGGTGGTGGATGTGAGCCATGAAGATCCAGAAGTTAAGTTTAACTGGTATGTGGACGGGGTCGAGGTGCACAATGCTAAACAAAGCCAGGGAGGAGCAATATAACTCCACATACAGAGTGGTGTCCGTTCTGACAGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGGAAGGAATACAAGTGCAAGGTGTCTAATAAGGCACTGCCAGCCCCATAGAGAAGACAATCTCTAAAGCTAAAGGCCAACACGCGAGCCTCAGGTCTACACACTGCCACCATCCAGGGACGAACTGACCAAGAATCAGGTGAGCCTGACTTGTCTCGTCAAAGGATTCTACCAAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAATCCAACGGCCAACAGAGAACAACTACAAGACCACCCACAGTCTGGACTCTGATGGGAGCTTTTTCTGTATTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCTCGTGGCAACAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCTCCGTGATGCATGAAGCCCTGCATAACCACTATACCCAGAAAGCCTCAGCCTGTCCCCCGGAAATAATGA (配列番号 6 9) ；

40

【 0 1 6 6 】

カッパ鎖定常領域のアミノ酸配列は：

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 7 0) ；

【 0 1 6 7 】

50

カップ鎖定常領域の核酸配列は：

CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGTACCGCTAGCGTTGTG
TGCCTGTCTGAATAACTTTTATCCACGGGAGGCTAAGGTGCAGTGGAAAGGGACAATGCCCTCCAGAGCGGAAATAGCCAA
GAGTCCGTTACCGAACAGGACTCTAAAGACTCTACATACTCCCTGTCTCCACACTGACCCCTCTCCAAGGCCGACTATGA
GAAACACAAGGTTTACCATGCGAGGTCACACACCAGGACTCTCCTCTCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGAGAATG
C (配列番号 71) ;

【0168】

B50 - 6 軽鎖 (ラムダ) 定常領域のアミノ酸配列は：

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLVSDFYPGA VTA W KADGSPVKVGVETTKPSKQSNKYYAASSYLSLTPEQWK
SHRSYSCRVTHEGSTVEKTVAPAECS (配列番号 72) ;

10

【0169】

ならびに B50 - 6 軽鎖 (ラムダ) 定常領域核酸配列は：

GGTCAGCCCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCACCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGT
GTGTCTCGTAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAGGCAGATGGCAGCCCCGTCAAGGTGGGAGTGGA
GACCACCAAACCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTATGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCCGAGCAGTGGAAGT
CCCACAGAAGCTACGCTGCCGGGTACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCTGCAGAATGCTCT (配
列番号 73)

【実施例 6】

【0170】

抗 hPD - L1 mAb 特性の検証。

20

精製抗 hPD - L1 抗体および hPD - L1 結合能の測定 (ELISA 法)：

コーティング緩衝液 (50 mM 炭酸塩 - 重炭酸塩緩衝液、pH 9.6) を使用して hPD
D - L1 - m u F c を $2 \mu\text{g} / \text{ml}$ に希釈し、その後、溶液を $100 \mu\text{L} / \text{ウェル}$ に分注
し、4 で一晩静置した。次に、プレート上の液体を捨て、PBST (pH 7.4、0.
05 % Tween - 20、V/V) を使用して洗浄を行い、サンプルを 3 % BSA - PB
S で 1 時間シールした。抗体 B50 - 6 mAb、B60 - 55 mAb、および BII61
- 62 mAb は、対照として使用される希釈液 (1 % BSA - PBS) で、それぞれ 20
00 ng / ml から始まる 2 倍連続希釈に供して合計 11 種類の濃度とし、37 で 2 時
間、インキュベーションを行った。次いで、ヤギ抗ヒト IgG - HRP (ヤギ抗ヒト Ig
G - HRP コンジュゲート) を添加し、1 時間、インキュベーションを行った。次に、可
溶性の単一成分 TMB 発色基質溶液を添加し、各サンプルを室温で暗い環境で 5 ~ 10 分
間展開した。2 NH₂SO₄ を $50 \mu\text{L} / \text{ウェル}$ で添加して、展開反応を停止した。次に
、各サンプルを MD SpectraMax Plus 384 マイクロプレートリーダー
上に置き、OD_{450nm} - 650nm の値を読み取り、その後、SoftMax Pro
v5.4 ソフトウェアパッケージを使用してデータ処理とマッピング分析を行った；
結果を図 4 に示す。

30

【0171】

上記の方法を使用して、3 つの抗体株の抗原結合 EC₅₀ 値は、 $40 \mu\text{g} / \text{ml}$ (B6
0 - 55 mAb)、 $18.3 \mu\text{g} / \text{ml}$ (BII61 - 62 mAb)、および $28.1 \mu\text{g} / \text{ml}$ (B50 - 6 mAb) と決定された。

40

【0172】

精製された抗 hPD - L1 抗体および hPD - L1 結合キネティクス (SPR) の測定
：

組換えヒト PD - L1 に関する抗 PD - L1 抗体 B50 - 6 mAb、BII61 - 6
2 mAb および B60 - 55 mAb の結合キネティクスの測定は、Biacore
X100 を使用して行われた表面プラズモン共鳴 (SRP) を使用して測定された。およ
そ 1000 応答単位 (RU) を得るために、組換え hPD - L1 - Fc を CM5 バイオセ
ンサーチップに直接コーティングした。キネティクス測定のために、HBS - EP + 1 x
緩衝液 (GE、カタログ番号：BR - 1006 - 69) での 3 倍連続希釈 (1.37 nm
から 1000 nm) で抗体を希釈し、サンプリングを 25 で 120 秒間行い、30 分の

50

解離時間で、再生は10 mM グリシン - HCl (pH 2.0) で120秒間行った。単純な1対1のLangmuir結合モデル(Biacore評価ソフトウェアバージョン3.2)を使用して、結合率(kon)と解離率(koff)を計算した。平衡解離定数(KD)は、koff/konの比として計算した。

【0173】

測定された抗PD-L1結合親和性値については、表1を参照されたい。

【0174】

【表1】

表1. 抗hPD-L1抗体およびhPD-L1結合キネティクスの測定

名称	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
B50-6mAb	1.672E+5	1.370E-2	8.193E-8
B60-55mAb	1.295E+6	2.222E-4	1.716E-10
BII 61-62mAb	9.795E+4	4.264E-4	4.353E-9

10

【0175】

hPD-1と競合したhPD-L1についての精製抗hPD-L1抗体結合能の測定：コーティング緩衝液(50 mM炭酸塩-重炭酸塩緩衝液、pH 9.6)を使用してhPD-L1-hIgGを5 µg/mlに希釈した後、溶液を4で一晚静置した。PBST (pH 7.4、0.05% Tween-20、V/V)を使用して洗浄を行い、サンプルを3% BSA-PBSで1時間シールした。測定待ちの抗hPD-L1 mAbの濃度を100 µg/mlに希釈し、その後1% BSA-PBST-0.05% Tween-20 (100 µg/mlのhPD-1-hIgG-ビオチンを含む)を用い、合計9種類の希釈液で1:6連続希釈し、希釈液を37で2時間静置した。プレートを洗浄した後、西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲートストレプトアビジン(SA-HRP)を添加し、サンプルを室温で1.5時間インキュベートした。次に、可溶性の単一成分TMB発色基質溶液を加え、各サンプルを室温、暗室環境で5~10分間展開し、その後2 NH₂SO₄を加えて展開反応を停止した。次に、各サンプルをMD SpectraMax Plus 384マイクロプレートリーダー上に置き、OD 450 nm-650 nmの値を読み取り、その後、SoftMax Pro v5.4ソフトウェアパッケージを使用してデータ処理とマッピング分析を行った；また、測定データとIC50値に基づいて抗体の競合性を分析し、結果を図5に示す。

20

30

【0176】

上記の方法を使用して、PD-1に関する3つの抗体株のPD-L1についての競合抗原結合IC50値を0.255 µg/ml 1.7 nM (B60-55)、0.24 µg/ml 1.6 nM (BII 61-62)、および1.76 µg/ml 11.7 nM (B50-6)と決定した。

【0177】

CD80と競合するhPD-L1についての精製抗hPD-L1抗体結合能の測定：スクリーニングによって得られた3つの抗体株、B60-55、BII 61-62およびB50-6を競合ELISA法により、PD-L1およびCD80結合をブロックできるか否かを判定するために評価した。使用した特定の方法は以下の通りである：コーティング緩衝液(50 mM炭酸塩-重炭酸塩緩衝液、pH 9.6)を使用してhPD-L1-hFcを5 µg/mlに希釈し、その後、溶液を4で一晚静置した。PBST (pH 7.4、0.05% Tween-20、V/V)を使用して洗浄を行い、サンプルを3% BSA-PBSで1時間シールした。測定待ちの抗hPD-L1 mAbの濃度を100 µg/mlに希釈し、その後1% BSA-PBST-0.05% Tween-20 (100 µg/mlのhCD80-hFc-ビオチン、R&D: 140-B1-100を含む)を使用して、合計9種類の希釈液に1:6連続希釈を行い、希釈液を37で2時間静置し

40

50

た。プレートを洗浄した後、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン・ビオチン (S A - H R P コンジュゲート) を加え、サンプルを室温で 1 . 5 時間インキュベートした。次に、可溶性の単一成分 T M B 発色基質溶液を加え、各サンプルを室温、暗室環境で 5 ~ 1 0 分間展開し、その後 2 N H ₂ S O ₄ を加えて展開反応を停止した。次に、各サンプルを M D S p e c t r a M a x P l u s 3 8 4 マイクロプレートリーダー上に置き、O D 4 5 0 n m - 6 5 0 n m の値を読み取り、その後、S o f t M a x P r o v 5 . 4 ソフトウェアパッケージを使用してデータ処理とマッピング分析を行った；また、測定データと I C 5 0 値に基づいて抗体の競合性を分析し、結果を図 6 に示す。

【 0 1 7 8 】

上記の方法を使用して、C D 8 0 に関する 3 つの抗体株の P D - L 1 についての競合抗原結合 I C 5 0 値を 0 . 5 4 3 μ g / m l (B 6 0 - 5 5)、0 . 7 0 9 μ g / m l (B I I 6 1 - 6 2)、および 0 . 5 5 3 μ g / m l 1 1 . 7 n M (B 5 0 - 6) と決定した。

【 0 1 7 9 】

P D - L 1 が特異的に認識されるか否かを判定する検証：精製された抗 h P D - L I の h P D - L 1、h P D - L 2 および h B 7 H 3 との結合

実施例 1 で構築された h P D - L 1 - E G F P、h B 7 H 3 - E G F P および h P D - L 2 - E G F P を含む H E K 2 9 3 細胞を 0 . 5 % P B S - B S A 緩衝液に懸濁し、その後、抗 h P D - L 1 m A b タンパク質を添加し (陰性対照として使用した h I g G F c とともに)、氷上でインキュベーションを 2 0 分間行った。洗浄後、e B i o s c i e n c e 二次抗体抗 - h I g - P E を加え、サンプルを氷上に 2 0 分間静置した。洗浄後、細胞を 5 0 0 μ l の 0 . 5 % P B S - B S A 緩衝液に再懸濁し、フローサイトメーターでの測定に供した。

【 0 1 8 0 】

結果を図 6 に示す。結果に示すように、3 つの抗体株はすべて h P D - L 1 - E G F P 細胞と結合できたが、h B 7 H 3 - E G F P および h P D - L 2 - E G F P 細胞と結合できず、良好な特異性を実証した。

【 0 1 8 1 】

精製抗 h P D - L I のマウス P D - L 1 (m P D - L 1) との結合：

実施例 1 で構築された h P D - L 1 - E G F P および m P D - L 1 - E G F P を含む H E K 2 9 3 細胞を 0 . 5 % P B S - B S A 緩衝液に懸濁し、その後、標的抗 h P D - L 1 m A b を添加し (陰性対照として使用した h I g G F c とともに)、氷上でインキュベーションを 2 0 分間行った；次に洗浄を行い、e B i o s c i e n c e 二次抗体抗 h I g - P E を加え、サンプルを氷上に 2 0 分間静置した。洗浄後、細胞を 0 . 5 % P B S - B S A 緩衝液に再懸濁し、フローサイトメーターでの測定に供した。結果を図 7 に示す。結果に示すように、B 5 0 - 6 m A b はマウス P D - L 1 (m P D - L 1) と結合可能であったが、B 6 0 - 5 5 および B I I 6 1 - 6 2 は m P D - L 1 と結合できなかった。

【 0 1 8 2 】

精製抗 h P D - L I のカニクイザル P D - L 1 との結合：

カニクイザル P B M C はヒトリンパ球分離培地 (T i a n j i n H a o Y a n g) を使用して分離し、細胞を R P M I 完全培地に再懸濁し、その後、細胞密度を 1 0 0 万細胞 / m l に調整した；続けて、2 0 0 万のカニクイザル P B M C を 2 4 ウェルプレートに加え、同時にフィトヘマグルチニン (p h y t o h a e m a g g l u t i n i n ; P H A) を最終濃度 2 μ g / m l で加えた；細胞を 4 8 時間刺激した後、収集し、F A C S 緩衝液で洗浄し、抗体染色に供した。アイソタイプ c t r l (抗 K L H) を陰性対照として使用し、市販の P E 標識抗ヒト P D - L 1 抗体 (B i o l e g e n d : 3 2 9 7 0 5) を陽性対照として使用した。自家抗体を一次抗体として使用し、洗浄を行った後、二次抗体として抗 h I g - P E を使用して抗体染色を行った。各染色工程の後、4 で 3 0 分間インキュベートし、染色を行った後、F A C S 緩衝液を使用して遠心分離で細胞を 2 回洗浄し、その後、二次抗体を加えるか、または細胞を 2 % パラホルムアルデヒドで直接固定し、

10

20

30

40

50

その後、グアバ (Guava) を使用して分析した。結果を図 8 に示す。結果は、カニクイザル T 細胞が PHA で刺激された後に PD - L 1 を発現し、産生された 3 つの抗体株が活性化したカニクイザル T 細胞と結合可能であることを示した。

【実施例 7】

【0183】

樹状細胞 - T 細胞混合リンパ球反応における CD 4 + T 細胞の PD - L 1 抗体活性化の測定。

ヒトリンパ球分離培地 (Tianjin Hao Yang) を使用して、密度勾配遠心を介して健康なドナーから得られた濃縮末梢白血球細胞から末梢血単核細胞 (PBMC) を分離した。次に、前記細胞を無血清 RPMI 1640 に再懸濁し、10 cm ディッシュで 1 ~ 2 時間培養した後、非接着細胞を除去し、10 % FBS を含む RPMI 内で細胞を培養した。GM - CSF (Shanghai Primegene : 102 - 03) については 250 ng / ml、IL - 4 (Shanghai Primegene : 101 - 04) については 100 ng / ml の最終濃度でサイトカインを加え、その後、2 ~ 3 日毎に新鮮なサイトカイン含有培地を加えた。培養 6 日目、50 ng / ml TNF - alpha (Shanghai Primegene : 103 - 01) を使用して細胞成熟を誘導し、細胞をさらに 24 時間インキュベートした。成熟樹状細胞を採取し、HLA - DR 抗体で染色して、成熟を確認した。その後、細胞を 200000 細胞 / ml の濃度で RPMI 完全培地に再懸濁した。得られた懸濁液 50 µl を 96 ウェル U 底プレート (Costar : 3799) の各ウェルに加え、インキュベーター内で細胞を培養させた。

【0184】

磁気ビーズ単離キット (Miltenyi Biotec : 130 - 096 - 533) を使用して、提供された取扱説明書に従って別のドナーから得た PBMC から CD 4 + T 細胞を単離した。細胞をカウントし、200 万細胞 / ml の濃度で RPMI 完全培地に再懸濁した後、樹状細胞を含む 96 ウェル U 底プレートに加え、50 µl を各ウェルに加えた。RPMI 完全培地で連続希釈した 100 µl の PD - L 1 抗体を各ウェルに加えて、最終抗体濃度 100、10、1、0.1、0.01、0.001 および 0 µg / ml を得た。その後、細胞を 5 日間培養し、上清を取り、IFN - ELISA 検出キット (eBioscience) を使用して、上清中の IFN - レベルを検出した。結果を図 9 に示す。結果は、PD - L 1 抗体が混合リンパ球反応で IFN の CD 4 + T 細胞分泌を増強できることを示している；つまり、PD - L 1 抗体は T 細胞の活性化を増強した。BII 61 - 62 について得られた EC50 値は 0.078 µg / ml (0.5 nM と等価)、B60 - 55 について得られた EC50 値は 0.189 µg / ml (1.2 nM と等価) であった。

【実施例 8】

【0185】

腫瘍成長に対する抗 h PD - L 1 抗体の阻害活性。

体の抗腫瘍 T 細胞応答を弱める方法として、多くの腫瘍が PD - 1 リガンドを発現することはすでに明らかである。PD - L 1 の発現レベルの特徴的な増加は、多くの異なる対象の腫瘍および腫瘍浸潤白血球において発見され、前記の PD - L 1 発現の増加はしばしば予後不良と関連している。マウス腫瘍モデルは、腫瘍における PD - L 1 発現の同様の増加を示しており、腫瘍免疫の阻害における PD - 1 / PD - L 1 経路の役割もまた実証している。

【0186】

ここで、本発明者らは PD - L 1 のブロッキングが同系 C57B6 マウスで見られる MC38 細胞 (マウス結腸直腸がん細胞) の腫瘍成長に影響することを示す実験結果を提供した。

【0187】

0 日目に、100 万個の MC38 細胞 (シカゴ大学の Yangxin Fu 教授の好意により提供されたもの) が C57B6 マウスに皮下接種された；その後、マウスを、0、

10

20

30

40

50

3、7、10日目に10mg/kgの抗PD-L1(B50-6)またはPBSの腹腔内注射に供した。3日目に腫瘍の大きさを測定し、腫瘍容量を計算して腫瘍成長曲線を描き(図10を参照);結果は、抗PD-L1(B50-6)が腫瘍成長を著しく阻害可能であることを示している。

【0188】

免疫不全NOD/SCID(非肥満糖尿病/重症複合免疫不全)マウスを使用して、マウスPD-L1を認識できないPD-L1抗体B60-55およびBII61-62のインビボ活性を調査した。NOD/SCIDマウスおよびヒト末梢血単核細胞(PBMC)に皮下移植した場合にヒトPD-L1を発現するメラノーマ細胞株A375[ATCC、CRL-1619(商標)]を使用した実験を、上記の目的を達成するために使用した。注射前に、A375細胞とPBMCを5:1の比率で混合し、総容量100μl(500万個のA375細胞と100万個のPBMCを含む)の皮下注射を行った;腫瘍接種後0、7、14、21および28日目に抗体を腹腔内投与した(図11-Aについての抗体用量は3mg/kgであり、図11-Bについての抗体用量は図11に直接示される)。PBSを陰性対照として用いた。各実験グループは、4~6匹のマウスで構成された。腫瘍形成は週に2回観察され、大きさはノギスを使用して測定され、腫瘍容量を計算して腫瘍成長曲線を描いた(図11を参照);結果は、抗体B60-55およびBII-61-62が腫瘍の成長を著しく阻害できることを示している。

【実施例9】

【0189】

B60-55と抗体2.41H90P(Medimmune)の安定性の比較。

抗PD-L1抗体B60-55とMedimmune LLCの抗体2.41H90Pの加速安定性試験を45で行った。使用した具体的な試験手順は以下の通りであった:抗PD-L1抗体B60-55とMedimmune LLCの抗-PD-L1抗体2.41H90P(米国特許20130034559に記載されている2.14H9の調製方法に従って調製され、その後抗体は2.41H90Pと名付け直した)を10mg/mlの濃度に濃縮し、その後100μgの抗体を200μgのPCRチューブに加え、45のバッチに設置した;0、10、20、30日目にサンプルを取り、その後、競合ELISAおよびSE-HPLC分析試験を行った。ここで、IC50値を得るために使用した競合ELISA法は、実施例6に記載したものと同一であった。SE-HPLCはShimadzu LC LC20AT HPLCクロマトグラフを使用して行った;サンプルを1mg/mlに濃縮し、50μgの総サンプル容量について、サンプルを0.5ml/分の流量でロードした;サンプルのロード後30分間、アイソクラティック溶出を行い、結果を図12に示した。

【0190】

図12において、AはB60-55と抗体2.41H90Pの経時的なIC50値のグラフの比較を示しており、データは異なる時点でサンプルの競合力に有意な変化がなかったことを示している;Bは、抗体ダイマーの経時的な割合を示し、データはB60-55と2.41H90Pの両方でダイマー比が経時的に減少したことを示している;しかしながら、2.41H90PはB60-55よりも減少を示した速度は速く、B60-55がより安定であることを示している;CはB60-55加速安定性試験で得られた競合ELISA曲線を示しており、データはB60-55が比較的良好な活性と安定性を維持可能であることを示している。

【実施例10】

【0191】

抗体変異体B60-55-1の調製スケールアップおよび製剤安定性。

抗体の調製スケールアップの可能性を評価するために、前に記載されるように例示的な抗体変異体B50-55-1を本質的にクローン化した。B60-55-1完全重鎖のアミノ酸配列は:

QVQLVQSGAEVKKPASSVKV SCTASGGSFSTYAI SWVRQAPGQGLEWMGGI IPIFGTTKYAQR FQGRVTITADESTTTAY

10

20

30

40

50

MELSSLISDDTALYYCTTSRGFNWGFYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV
LDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHREALHNHTQKSLSLSP GK

(配列番号 8 5) ;

【 0 1 9 2 】

対応する D N A 配列は :

CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGCGTCCTCGGTCAAAGTCTCCTGCACGGCTTCTGGCGG
CTCCTTCAGCACCTATGCTATCAGTTGGGTGCGACAGGCTCCTGGACAAGGGCTTGAATGGATGGGCGGGATCATCCCCA
TCTTTGGTACAACAAAGTACGCACAGAGGTTCCAGGGCAGGGTCACGATTACCGCGGACGAATCGACGACCACAGCCTAC
ATGGAGCTGAGCAGCCTGATATCTGACGACACGGCCCTGTATTATTGTACGACGTCTCGTGGATTCAACTATGGCTGGTT
TGACTACTGGGGCCAGGGTACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCAGCACTAAGGGGGCCCTCTGTGTTTTCCACTCGCCCCCTT
CTAGCAAAAGCACTTCCGGAGGCACTGCAGCACTCGGGTGTCTGGTCAAAGATTATTTCCCTGAGCCAGTCACCGTGAGC
TGGAACCTCTGGCGCCCTCACCTCCGGGGTTCACACCTTTCCAGCCGTCTGCAGTCTCCGGCCTGTACTCCCTGAGCAG
CGTCGTTACCGTGCCATCCTCTTCTCTGGGGACCCAGACATACATCTGCAATGTCAACCATAAGCCTAGCAACACCAAGG
TGGACAAAAAGGTCGAGCCAAAGAGCTGCGATAAGACACACACCTGCCCTCCATGCCCCGCACCTGAACTCCTGGGCGGG
CCTTCCGTTTTCTGTCTTCTCCCAAGCCCAAGGATACACTGATGATTAGCCGCACCCCCGAAGTCACTTGCGTGGTGGT
GGATGTGAGCCATGAAGATCCAGAAGTTAAGTTAACTGGTATGTGGACGGGGTCGAGGTGCACAATGCTAAAAACAAAGC
CCAGGGAGGAGCAATATGCCTCCACATACAGAGTGGTGTCCGTTCTGACAGTCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGGAAG
GAATACAAGTGCAAGGTGTCTAATAAGGCACTGCCAGCCCCCATAGAGAAGACAATCTCTAAAGCTAAAGGCCAACACG
CGAGCCTCAGGTCTACACACTGCCACCATCCAGGGAGGAAATGACCAAGAATCAGGTGAGCCTGACTTGTCTCGTCAAAG
GATTCTACCCAAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAATCCAACGGCCAACCAGAGAACAACCTACAAGACCACCCCAACGATC
CTGGACTCTGATGGGAGCTTTTTCTGTATTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCTCGGTGGCAACAGGGCAACGTGTTTCAG
CTGCTCCGTGATGCATGAAGCCCTGCATAACCACTATACCCAGAAAAGCCTCAGCCTGTCCCCCGGGAAATAATGA

10

20

(配列番号 8 6) ;

【 0 1 9 3 】

完全軽鎖のアミノ酸配列は :

EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVGIHLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP
EDFAVYYCQQYGSIPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

30

(配列番号 8 7) ;

【 0 1 9 4 】

対応する D N A 配列は :

GAAATTGTAATGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGTAGGGCCAGTCA
GAGTGTGGCATACACTTAGCCTGGTATCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGTA
GGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCT
GAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTGACAGTATGGTTCTTTACCTCGGACGTTCCGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAA
ACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGTACCGCTAGCGTTGTGT
GCCTGCTGAATAACTTTTATCCACGGGAGGCTAAGGTGCAGTGGAAAGTGGACAATGCCCTCCAGAGCGGAAATAGCCAA
GAGTCCGTTACCGAACAGGACTCTAAAGACTCTACATACTCCCTGTCTCCACACTGACCCTCTCCAAGGCCGACTATGA
GAAACACAAGGTTTACGCATGCGAGGTACACACCAGGACTCTCCTCTCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGAGAAT
GC

40

(配列番号 8 8) ;

【 0 1 9 5 】

B 6 0 - 5 5 - 1 は、A c t i C H O (G E) または D y n a m i s (T h e r m o
F i s h e r S c i e n t i f i c) 培地のいずれかを使用して、バイオリアクターで
増殖した C H O 細胞で産生した。最初に、B 6 0 - 5 5 - 1 は、清澄化した細胞培養液か
ら、プロテイン A アフィニティークロマトグラフィー樹脂 M a b S e l e c t S u r e
L X、G E を使用し、その後 2 つのクロマトグラフィーステップ - フロースルーモード

50

でのQ吸着剤(GE)膜上の陰イオン交換クロマトグラフィーおよび最終研磨工程であるヒドロキシアパタイト樹脂(CaPure-HA、東ソー)上のカラムクロマトグラフィーで精製された。

【0196】

プロテインA樹脂でのB60-55-1精製の工程収率は約95~98%と観察された。Q吸着剤クロマトグラフィーにおける工程収率は約93%~95%と観察された。B60-55-1のダイマー、オリゴマー、および凝集体、残留DNAの痕跡、プロテインAカラムから漏れるプロテインAが除去されるB60-55-1の最終精製工程は、CaPure-HAの研磨クロマトグラフィーであり、これは良いウイルス除去工程としても機能する。最終的なヒドロキシアパタイトの工程収率は約77%~85%であった。CaPure-HAでのB60-55-1精製のクロマトグラムを図14に示す。

10

【0197】

サイズ排除HPLCで評価したCaPure-HAでのクロマトグラフィー後のB60-55-1の均一性は99%以上であった。分析的サイズ排除クロマトグラムを図15に示す。

【0198】

還元および非還元条件下でのSDS存在下ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)もまたB60-55-1調製物の高純度を示した。クマシー染色したゲルの像を図16に示す。

【0199】

精製したB50-55-1のLC-MSトリプシンペプチドマッピング分析は、精製抗体の重鎖にC末端リジン残基が欠けていることを示したが、これは精製抗体の抗原結合特性に影響を与えない(実施例11を参照)。

20

【0200】

B60-55-1用開発された、いくつかの液体製剤は、ストレス安定性調査で試験された。これらの調査中、約50mg/mLの濃度のB60-55-1を含むさまざまなB60-55-1製剤の滅菌サンプルを、40°Cで6週間インキュベートした。インキュベーション中、7つの時点でサンプルをプールし、分析した: 0、1週間、2週間、3週間、4週間、5週間および6週間。プールされたサンプルに対して、タンパク質濃度(B60-55-1の濃度)、純度、完全性、濁度、および浸透圧を測定する後続試験が行われた。タンパク質濃度は280nmの吸光度で測定し、タンパク質の同一性と完全性はSDS-PAGEで評価し、濁度はA600で測定し、浸透圧は校正済み浸透圧計で測定した。ストレス安定性実験の結果に基づいて、後続調査に次の製剤を使用した: 275mMセリン、10mMヒスチジン、pH5.9。この製剤において、40°Cで5週間インキュベートした後もB60-55-1の純度は95%を超えた。加えて、以下の製剤は、実質的に同様のタンパク質安定性をもたらした: 0.05%ポリソルベート80、1%D-マンニトール、120mM L-プロリン、100mM L-セリン、10mM L-ヒスチジン-HCl、pH5.8。

30

【実施例11】

【0201】

SPRによる精製B60-55-1およびhPD-L1結合キネティクス調査。
この調査の目的は、SPR法を使用して、B60-55-1とアテゾリズマブのヒトPD-L1との相互作用の結合パラメータを比較評価することであった。いくつかのアプローチを使用してアッセイを行い、PD-L1-Hisタグ付きタンパク質とPD-L1-Fc融合タンパク質の2つのバージョンのヒトPD-L1を使用した。一連の異なる濃度のPD-L1リガンドを使用して、解離定数(Kd)を計算した。以下の機器を用いた: R75000DC、プラズモン共鳴分光計、Reichert Technologies、SPRAutoLinkコントロールおよびTraceDrawer評価ソフトウェアパッケージを備えた機器番号00478-1115。センサーチップSR7000ゴールドセンサースライド、500kDaカルボキシメチルデキストラン、Reichert

40

50

、Inc、Prt No:13206066

【0202】

使用した試薬は次の通りである：1% D-マンニトール中の B60-55-1 ストック溶液 32 mg/ml、10 mM 酢酸ナトリウム、pH 5.4 中；アテゾリズマブ (Tecentriq)、20 mM ヒスチジン中の 60 mg/ml、14 mM 酢酸、0.04% ボリソルベート 20、4% スクロース、ロット 3109904、Genentech Inc；PD-L1-His タグ付き、ヒト組換え、HEK293 由来、Phe19-Thr239、アクセッション番号 Q9NZQ7、R&D システム、カタログ番号 9049-B7-100、ロット番号 DDIW0116081；PD-L1-Fc、ヒト IgG Fc 融合タンパク質、ヒト組換え、HEK293 由来、Phe19-Thr239、アクセッション番号 Q9NZQ7、R&D システム、カタログ番号 156-B7-100、ロット番号 DKL2116031；ヒト抗体捕捉キット、GE Healthcare、カタログ番号 BR-1008-39、ロット番号 10247121；ランニング緩衝液：0.005% Tween-20 を補充した 1x PBS、脱気および 0.2 μm フィルターでろ過したもの。

10

【0203】

結合パラメータを測定するための標準アプローチの 1 つは、チップ上に抗体を捕捉して固定化し、続いて試験抗体をロードして、その後リガンドを適用することである。しかしながら、PD-L1-Fc 融合タンパク質内のヒト IgG Fc 断片の存在のため、このリガンドには抗ヒト抗体を介した捕捉が使用できなかった。したがって、PD-L1-Fc については、図 17 に示す代替アプローチを利用した。リガンドの PD-L1-His タグ付きバージョンについては、図 17、パネル A に示された抗体捕捉アプローチを使用した。PD-L1-Fc 融合タンパク質の結合を試験するために、2 つの代替方法を使用した：(1) 図 17、パネル B に示された PD-L1-Fc 自体の直接固定化、および (2) 図 17、パネル C に示された試験抗体、B60-55-1 および比較薬アテゾリズマブの固定化。

20

【0204】

すべてのタンパク質は、同じ化学物質とプロトコルを使用してチップに共有結合させた。チップにコンジュゲートしたタンパク質には、モノクローナル抗ヒト IgG 抗体、PD-L1-Fc リガンド、B60-55-1 およびアテゾリズマブが含まれていた。抗ヒト IgG および PD-L1-Fc はコンジュゲーション手順に適合する緩衝液で使用し、B60-55-1 およびアテゾリズマブ調製物はカップリング前に 0.1x PBS に対して十分に透析した。SR7000 Gold Sensor Slide を機器に設置し、ランニング緩衝液、0.005% Tween-20 を補充した 1x PBS で 250 μl/分、5 分間プライミングし、25 μl/分で安定させた。すべての工程は 25 °C で行った。タンパク質調製物は、固定化緩衝液 (10 mM 酢酸ナトリウム pH 5.0) を使用して最終濃度 25 μg/ml に希釈した。固定化手順の試薬は、次のように調製した：水中の EDC [1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド] 40 mg/ml および NHS [N-ヒドロキシスクシンイミド] 10 mg/ml からなる EDC/NHS 活性化剤、水中の 1 M エタノールアミン-HCl、pH 8.5。活性化：EDC/NHS 活性化剤を 10 μl/分で 8 分間、チップ内に注入し、続いてランニング緩衝液で 5 分間洗浄した。固定化：最終濃度 25 μg/ml の抗ヒト IgG を 10 μl/分で 8 分間、チップに注入した。非活性化：チップ表面の未反応の活性基は、10 μl/分で 7 分間 1 M エタノールアミン-HCl を注入することによりブロックした。抗体のコンジュゲート後、ランニング緩衝液で 15 分間、25 μl/分でチップを洗浄した。

30

40

【0205】

PD-L1-His タグ付きリガンドと B60-55-1 およびアテゾリズマブとの相互作用を調査するために、抗体捕捉アプローチを使用した。抗ヒト IgG をチップに共有結合させ、図 17 のパネル A に示すように、試験抗体の捕捉に使用した。固定化抗ヒト IgG を有するチップは、10~15 分間、25 μl/分の流速でランニング緩衝液を用い

50

て平衡化した。試験抗体、B60-55-1またはアテゾリズマブを25 μ l /分で2分間ロードした後、チップを3分間洗浄して未結合抗体を除去した。PD-L1-Hisリガンドの2倍希釈液は、100 nM濃度からランニング緩衝液を使用して調製した。7つの濃度を使用した：100、50、25、12.5、6.25、3、1.25および1.56 nM。リガンドを25 μ l /分で3分間ロードした。リガンドをロードした後、25 μ l /分の流速で5分間ランニング緩衝液を使用することにより実験の解離段階を行った。固定化された抗ヒトIgGが結合したタンパク質複合体の解離は、3M MgCl₂をチップに25 μ l /分で30秒間通すことによって行った。図18に示すように、さまざまなPD-L1-Hisリガンド濃度で、捕捉されたB60-55-1またはアテゾリズマブの一連のセンソグラムが生成され、分析に使用された。1：1結合モデルのキネティック評価は、PD-L1-Hisの試験抗体との相互作用の分析に使用した。次のK_d値が得られた：B60-55-1 K_d = 40.2 nM；アテゾリズマブ K_d = 0.67 nM。

【0206】

調査の結果は、比較薬アテゾリズマブに対する単量体PD-L1の結合親和性が、B60-55-1に対するよりも約2-log高く、それぞれ0.67 nM対40.2 nMであることを示した。B60-55-1-PD-L1-His相互作用の低い親和性は解離速度が速いためであったが、B60-55-1とアテゾリズマブの会合相は図18の表のように本質的に同一であった。

【0207】

PD-L1-FcリガンドとB60-55-1およびその比較薬であるアテゾリズマブとの結合特性を調べるために、図17、パネルBに示すように、PD-L1-Fc融合タンパク質をチップ上に直接固定した。チップの効率的な再生の条件を同定するために、偵察実験が行われた。3M MgCl₂は、固定化PD-L1-Fcから結合抗体（B60-55-1やアテゾリズマブのどちらも）を解離しなかったことが見出された。pH3.0、pH2.5、pH2.0、10mM NaOHを有する10mMグリシン-HCl緩衝液を含むいくつかの再生条件が試験された。pH3.0およびpH2.5の緩衝液は結合した抗体を効果的に除去せず、NaOH処理はリガンドを不活性化し、結合の喪失をもたらすことが判明した。その後、グリシン-HCl、pH2.0がこれらの一連の実験に適すると結論された。

【0208】

この例で前に記載したように、PD-L1-Fcリガンドをチップに固定し、一連の濃度のB60-55-1またはアテゾリズマブを適用した。ランニング緩衝液を使用して100 nM濃度から始めてB60-55-1またはアテゾリズマブの2倍希釈液を調製した。7つの濃度を使用した：100、50、25、12.5、6.25、3、1.25および1.56 nM。リガンドを25 μ l /分で3分間ロードした。リガンドをロードした後、25 μ l /分の流速で5分間、ランニング緩衝液を使用して実験の解離段階を行った。異なる濃度のB60-55-1またはアテゾリズマブで、固定化PD-L1-Fcについての一連のセンソグラムが生成され（図19を参照）、分析に使用された。試験抗体との固定化PD-L1-Fc相互作用の分析に1：1結合モデルのキネティック評価を使用した。次のK_d値が得られた：B60-55-1 K_d = 0.66 nM；アテゾリズマブ K_d = 0.26 nM。

【0209】

調査の結果、固定された二量体PD-L1-Fcの結合親和性は、図19の表に示すように、B60-55-1および比較薬アテゾリズマブで類似しており、それぞれ0.6 nM対0.26 nMであることが示された。観察された両方の抗体の親和性の類似性は、二量体リガンドとの相互作用を反映しており、リガンドの単量体Hisタグ付きバージョンとの相互作用とは明らかに異なっていた。

【0210】

試験抗体の結合特性をさらに評価するため、図17、パネルCに示すように、B60-

10

20

30

40

50

55-1またはアテゾリズマブをチップ上に共有結合でクロスリンクした。このアプローチにより、PD-L1リガンドの両方のバージョン、His-タグ付きおよびFc融合タンパク質の直接的な比較が可能になった。この結合システムの再生条件を再評価し、10 mMグリシン-HCl、pH 2.0が十分な回復を提供することを見出した。この例で前に記載したように、B60-55-1およびアテゾリズマブを別々のセンサーチップに固定し、さまざまな濃度のPD-L1-HisまたはPD-L1-Fc融合タンパク質を固定化抗体に順次適用した。100 nMの濃度から始めてランニング緩衝液を用いて、PD-L1-HisまたはPD-L1-Fcの2倍希釈液を調製した。7つの濃度を使用した：100、50、25、12.5、6.25、3、1.25および0.625 nM。リガンドを25 μ l/分で3分間ロードした。リガンドをロードした後、25 μ l/分の流速で5分間、ランニング緩衝液を使用して実験の解離段階を行った。図20および21に示すように、異なる濃度のPD-L1-HisまたはPD-L1-Fc融合タンパク質で、固定化B60-55-1またはアテゾリズマブの一連のセンソグラムが生成され、分析に使用された。PD-L1-HisとPD-L1-Fcの両方のバージョンのリガンドとの固定化B60-55-1相互作用の分析に、1:1結合モデルのキネティック評価を使用した。B60-55-1については、以下のK_d値が得られた：単量体PD-L1-Hisリガンドについては、K_d = 14.3 nM；二量体PD-L1-Fcリガンドについては、K_d = 0.45 nM；アテゾリズマブについては：単量体PD-L1-HisリガンドについてK_d = 0.62 nMであり、二量体PD-L1-FcリガンドについてK_d = 0.19 nMであった。

10

20

【0211】

したがって、単量体PD-L1-Hisおよび二量体PD-L1-FcのB60-55-1およびその比較薬アテゾリズマブへの結合親和性の比較により、B60-55-1はPD-L1-Hisに対して約2-log高いPD-L1-Fcへの親和性を示し、アテゾリズマブはPD-L1-HisおよびPD-L1-Fcに対して同様の親和性を有することが明らかとなった。後者は、アテゾリズマブがリガンドの単量体型と二量体型を区別できないことを示している。

【0212】

B60-55-1とアテゾリズマブの結合特性の評価により、B60-55-1は、現在臨床的に使用されている比較薬抗体とは異なり、そのコグネート標的PD-L1の二量体および単量体を実質的に区別できることが予想外に明らかとなった。

30

【実施例12】

【0213】

B60-55-1抗体とアテゾリズマブのエフェクター機能の相互比較性。

この例では、B60-55-1抗体のエフェクター機能の比較薬抗体アテゾリズマブとのさらなる分析と比較を開示している。本開示は、Fcガンマ受容体への結合の評価を含む：CD16a、CD32a、およびCD64；PD-L1陽性細胞を使用した抗体依存性細胞介在性細胞傷害（ADCC）活性；補体誘導細胞毒性（CDC）活性、C1q結合、およびFcRn結合評価。

【0214】

抗原の結合における役割に加えて、抗体は、抗体のFc領域との相互作用を介してFcガンマ受容体と相互作用することにより免疫応答を調節することができる。ナチュラルキラー（NK）や他の骨髄系細胞に存在する受容体とのこれらの相互作用により、これらの細胞は、IFNのようなサイトカインならびにパーフォリンおよびグランザイムを含む細胞傷害性顆粒を放出し、これはADCCに達する。

40

【0215】

B60-55-1抗体はCD16a受容体への検出可能な結合を示さない一方で、CD16aに対するアテゾリズマブのK_dは1.6 E-5 Mであった；B60-55-1はCD32a受容体への検出可能な結合を示さない一方で、CD32aに対するアテゾリズマブのK_dは4.1 E-5 Mであった；B60-55-1は、他のIgG1抗体と比較

50

してCD64受容体への結合が10倍低い、アテゾリズマブと比較してCD64への結合は同様であることが、行われた調査により明らかになった。

【0216】

抗体依存性細胞介在性細胞傷害(ADCC)とは、ウイルスに感染した細胞やその他の病気の細胞が、ナチュラルキラー細胞のような細胞介在性免疫系の成分による破壊の標的となる抗体の作用機序である。PromegaのADDCレポーターバイオアッセイキット(カタログ番号G7014)は、ADCCを定量化するための生物発光レポーターアッセイである。このアッセイでは、標的受容体を発現する細胞の表面に結合した試験抗体のFc断片に結合する細胞表面上のFcγRIIIa受容体を発現するエフェクター細胞を組み合わせる。生物学的手法による標的細胞のエフェクター細胞への架橋は、エフェクター細胞におけるNFAT経路を介した遺伝子転写の活性化をもたらし、発光によって定量化することができるホタルルシフェラーゼの発現を引き起こす。B60-55-1はCD16aおよびCD32aへの結合を示さなかったため、この分子はADCC活性を示すとは期待されなかった。アッセイは、PD-L1陽性細胞株A2058を使用して行われた。B60-55-1とアテゾリズマブのADCC活性を、強力なADCC活性を示すことが知られている抗体であるリツキシマブのADCCと比較した。

10

【0217】

この操作されたIgG1抗体について期待されるように、B60-55-1はリツキシマブと比較して実質的なADCC活性を示さなかった(図22における対照)が、アテゾリズマブと同等のADCC活性を示した。

20

【0218】

B60-55-1とアテゾリズマブはPD-L1を標的とする抗体であり、両方の抗体のC1qへの結合を比較した。抗原結合2サイトELISAを利用して、両方の抗PD-L1抗体がC1qと相互作用する親和性を調べた。このアッセイにおいて、両方の抗体をプレートに25、20、15、10、8、4、2、1、0.5および0μg/mLで4晩コーティングした。その後、プレートをSuperBlock溶液で洗浄してブロッキングし、その後、結合緩衝液にC1q(Sigma、カタログ番号C1740)を2μg/mLで添加し、室温で1時間インキュベートした。次に、プレートを洗浄し、抗C1q-HRPコンジュゲート(Thermo、カタログ番号PA1-84324)を結合緩衝液中1:250希釈で室温、1時間プレートに加えた(100μL/ウェル)。洗浄緩衝液で洗浄することにより、結合していないHRPコンジュゲート抗体を除去した。HRP活性は、発色基質TMBを使用して検出された。硫酸を加えることにより呈色反応を停止し、プレートを450nmで読み取った。3-パラメータ曲線フィットの後、サンプルおよび参照標準についてEC50を計算した。報告可能な値は、サンプルのEC50に対する参照標準EC50の%EC50であり、%が高いほど、サンプルの効力が高い。これらの実験の目的は、ELISAフォーマットを使用して、アテゾリズマブとB60-55-1のC1qへの結合を決定することであった。

30

【0219】

ELISAアッセイの結果を図23に示す。C1qに結合するアテゾリズマブのEC50は14.9μg/mLであり、B60-55-1のC1qへの結合のEC50は6.9μg/mLであると決定された。したがって、これらの結合特性は同等である。

40

【0220】

さらに、PD-L1陽性細胞(A2058細胞)においてCDCを誘導する能力をB60-55-1とアテゾリズマブで比較した。このアッセイ細胞溶解においては、「細胞ゴースト」(溶解細胞)を顕微鏡で観察し、1時間細胞に添加した発光Cytotox-G10試薬を介して定量化できる。

【0221】

両方の産物は、非常に低いCDC活性を示した。アテゾリズマブについてのEC50は0.09μg/mLであり、B60-55-1のEC50は0.05μg/mLであった。

50

【0222】

I g Gの半減期は、新生児型F c受容体(F c R n)に依存しており、これは、他の機能の中でも、異化からI g Gを保護する。F c R nは酸性p HでI g GのF cドメインに結合し、エンドサイトーシスされたI g Gがリソソーム区画で分解されずに血流に放出されるようにする。C H O細胞によって安定して発現されたF c R n受容体への結合についてB 6 0 - 5 5 - 1とアテゾリズマブを比較した。

【0223】

B 6 0 - 5 5 - 1は、抗体に典型的な4 . 7 e - 7 MのK dでF c R nに結合し、アテゾリズマブは1 E - 7 MのK dでF c R nにわずかに高い親和性を示したことがこの調査により示された。

10

【実施例13】

【0224】

混合リンパ球反応によるB 6 0 - 5 5 - 1抗体、アテゾリズマブおよびペンブロリズマブ(p emb ro l i z u m a b)の効力の比較評価。

混合リンパ球反応(M L R)アッセイを行い、T細胞の活性化に対するB 6 0 - 5 5 - 1およびアテゾリズマブの効力を評価した。T細胞の活性化は、T細胞によって分泌されるインターロイキン2(I L - 2)の濃度によって測定された。樹状細胞(D C)およびC D 4 + T細胞は、ヒト末梢血単核細胞(P B M C)から単離された。M L RにおけるT細胞活性化に対するペンブロリズマブの効力を、アッセイ性能を監視するための内部対照として使用した。G r a p h P a d P r i s mによるS字型用量反応非線形回帰フィットを用いて、半最大有効濃度(E C 5 0)値を分析した。

20

【0225】

試薬と材料

R P M I 1 6 4 0 : G i b c o、I n v i t r o g e n(カタログ番号2 2 4 0 0) ; F B S、G i b c o、(カタログ番号1 0 0 9 9) ; ペニシリン - ストレプトマイシン(P / S) : G i b c o、I n v i t r o g e n(カタログ番号1 0 3 7 8) ; リン酸緩衝生理食塩水(P B S) : G i b c o、I n v i t r o g e n(カタログ番号1 0 0 1 0 - 0 2 3) ; 樹状細胞のQ C抗体 : 抗C D 1 a [H I 1 4 9] (F I T C)、A b c a m (a b 1 8 2 3 1)、抗C D 8 3 [H B 1 5 e] (F I T C)、A b c a m (a b 1 3 4 4 9 1)、抗C D 8 6 [B U 6 3] (F I T C)、A b c a m (a b 7 7 2 7 6)、抗H L A D R [G R B 1] (F I T C)、A b c a m (a b 9 1 3 3 5) ; C D 4 + T細胞単離キット : M i l t e n y i B i o t e c、(カタログ番号1 3 0 - 0 9 6 - 5 3 3) ; パン単球単離キット : M i l t e n y i B i o t e c、(カタログ番号1 3 0 - 0 9 6 - 5 3 7)。

30

【0226】

細胞株

単離されたばかりのヒト血液から調製された樹状細胞(20人を超える健康なドナー) ; 単離されたばかりのヒト血液から調製されたC D 4 + T細胞(20人を超える健康なドナー)。

40

【0227】

アッセイキット

ヒトI L 2 H T R Fキット(C i s b i o、カタログ番号6 4 I L 2 P E B)。

【0228】

検出装置

P H E R A s t a r P l u s、B M G L a b t e c h。

【0229】

細胞の調製

C D 4 + T細胞は、C D 4 + T細胞単離キットによって精製された。P B M Cは、L y m p h o p r e pを使用して密度勾配遠心分離で調製した。G e n S c r i p tのプロトコルに従って、細胞を完全培地で3 7 / 5 % C O 2に維持した。

50

【 0 2 3 0 】

樹状細胞は、パン単球単離キットで精製した。P B M C は、L y m p h o p r e p を使用して密度勾配遠心分離で調製した。G e n S c r i p t のプロトコルに従って、細胞を完全培地で 3 7 / 5 % C O 2 に維持した。樹状細胞の純度は、F A C S によるそれらの表面マーカー (C D 1 a 、 C D 8 3 、 C D 8 6 、 および H L A - D R) によって検証された。

【 0 2 3 1 】

抗体の調製

サンプルはドライシッパーで配送され、試験前に 4 で保管された。サンプルを R P M I 1 6 4 0 で希釈し、試験に適用した。

10

【 0 2 3 2 】

抗体試験のための混合リンパ球反応

- 1 0 0 0 r p m 、 3 分間の遠心分離によるエフェクター細胞 (C D 4 + T 細胞) の収穫。

- アッセイ緩衝液での試験サンプルの連続希釈 ;

- エフェクター細胞ストックを 9 6 ウェルアッセイプレートに播種し、試験サンプルを加える ;

- 1 0 0 0 r p m で 3 分間の遠心分離による標的細胞 (樹状細胞) の収穫 ;

- 標的細胞を加えて反応を開始し、穏やかに混合する ;

- プレートを 3 7 / 5 % C O 2 インキュベーターで 3 日間インキュベートする ;

20

- ヒト I L - 2 試験を行い、プレートを読み取る ;

- B 6 0 - 5 5 - 1 およびアテゾリズマブの濃度範囲を試験する : 3 0 0 n M から開始して、3 倍希釈、3 重に 1 0 ポイント ;

- ペンブロリズマブの試験濃度範囲 : 1 0 μ g / m l から開始、5 倍希釈、3 重で 6 ポイント。

【 0 2 3 3 】

混合リンパ球反応 (M L R) アッセイ

M L R アッセイの結果を図 2 4 に示す。B 6 0 - 5 5 - 1 とアテゾリズマブは、異なる I L - 2 分泌物での M L R における T 細胞を活性化することができた。対照として使用したペンブロリズマブの T 細胞活性化データは、過去のデータと一致していた。M L R データの分析を表 2 に示す。M L R アッセイにおける B 6 0 - 5 5 - 1 およびアテゾリズマブの E C 5 0 値は、0 . 4 6 6 5 n M および 2 1 . 5 3 n M であった。したがって、B 6 0 - 5 5 - 1 は、M L R アッセイで T 細胞を実質的に高い効力で活性化する。

30

【 0 2 3 4 】

【表 2】

表 2 . M L R についての最適値の要約

	ペンブロリズマブ	B60-55-1	ペンブロリズマブ	アテゾリズマブ
最低	60.62	49.49	68.18	55.2
最高	164.2	94.34	161.3	86.13
LogEC ₅₀	-0.8871	-0.3311	-0.7364	1.333
ヒルスロープ (HillSlope)	0.7036	1.097	0.9005	1.356
EC ₅₀	0.1297 μ g/ml	0.4665 nM	0.1835 μ g/ml	21.53 nM
EC ₅₀ (nM)	0.8705	0.4665	1.2315	21.53

40

【実施例 1 4】

【 0 2 3 5 】

50

ヒト化PD-L1マウスにおける皮下MC38-hPD-L1マウス結腸癌モデルの治療におけるB60-55-1の有効性の評価

この調査の目的は、ヒト化PD-L1マウスに移植された皮下MC38-hPD-L1マウス結腸癌の治療において、B60-55-1とその比較薬アテゾリズマブのインビボでの効力を、共に10mg/kgの用量で、試験することであった。

【0236】

試薬および機器

ダルベッコの改良イーグル培地(DMEM): Cellgro、カタログ番号10-013-CVR、4で保存。ウシ胎児血清(FBS): Excell、カタログ番号FSP500、-20で保存。リン酸緩衝生理食塩水(PBS): Gibco、カタログ番号20012027、4で保存。バランス: Shanghai Shun Yu Heng Ping Science and Equipment Co. Ltd、カタログ番号MP5002。キャリパー: Hexagon Metrolog、カタログ番号00534220。

10

【0237】

試験品と対照品

抗体B50-55-1は、濃度50mg/mlでPBSに保存した; 陰性対照IVI: Guang Dong Shuang Lin BIO-Pharmacy Co. Ltd、ロット番号20160407、PBSに50mg/mlで保存。陽性対照抗体アテゾリズマブ: Genentech/Roche、ロット番号3109904、60mg/mlを、氷酢酸(16.5mg)、L-ヒスチジン(62mg)、ポリソルベート20(8mg)およびスクロース(821.6mg)を含む緩衝液に保存した。

20

【0238】

投与溶液の調製

試験品および対照品は、投与前にPBSで希釈し、2~8で一時的に保存し、室温で4時間以内に使用した。希釈されていない残りの試験品および対照品は、2~8で保存された。

【0239】

動物

40匹の雄B-hPD-L1ヒト化マウス株C57BL/6は、Beijing Biocytogen Co. Ltd. から供給された(品質証明書番号: 201716816)。

30

【0240】

動物飼育管理

動物はBeijing Biocytogen Co., Ltd. の動物センターの特定の病原体フリーバリアで、個々の換気ケージ(IVC)あたり5匹の動物が飼育された。動物は到着後3日間から1週間気候順化させた。

【0241】

温度は20~26に維持され、湿度は40~70%に維持された。ケージはポリカーボネート製で、サイズは300mm*180mm*150mmであった。寝床の材料は、圧力滅菌された軟材で、週に1回交換された。各ケージの識別ラベルには、以下の情報が含まれていた: 動物の数、性別、系統、受け取った日付、治療、グループ番号、および治療の開始日。動物は、調査期間全体の間、オートクレーブされた乾燥顆粒食品および水を自由に摂取させた。食品はSPFグレードであり、Beijing Keao Xiel i Feed Co., Ltdから購入した。水は限外ろ過によって精製された。動物は耳コーディングによってマークされた。

40

【0242】

実験方法と手順

親のMC38マウス結腸癌細胞株は、Shunran Shanghai Biological Technology Co. Ltdから購入した。MC38-hPD-L

50

1細胞株は、Biocytogen Co、LtdによるマウスPD-L1をヒトPD-L1に置き換えることにより構築した。細胞は、10%熱不活性化FBSを補充したDMEM中の単層培養で維持し、週2回継代培養した。対数増殖期で増殖する細胞を収穫し、腫瘍接種についてカウントした。

【0243】

腫瘍発達のため、右前腹部に0.1mLのPBSを含むMC38-hPD-L1腫瘍細胞(5×10^5)を各マウスに皮下注射した。平均腫瘍サイズがおよそ100mm³に達したときに、腫瘍を持つ動物を3つの調査グループヘランダムに登録した。各グループは8匹のマウスで構成された。以下に示す所定のレジメンに従って、試験品および対照品を、腫瘍を持つマウスに投与した。

【0244】

【表3】

投与レジメン

群	治療	動物数	用量 (mg/kg)	作業濃度 (mg/mL)	投与経路	スケジュール
1	IVIG	8	10	1	i.p.	BIW*8
2	陽性対照	8	10	1	i.p.	BIW*8
3	B60-55-1	8	10	1	i.p.	BIW*8

注：(1)体重に基づいて投与容量を投与した(10μL/g)。

(2)i.p.は、腹腔内を指す。

(3)BIW×8は、1週間に2度の8回用量の投与頻度を指す。

【0245】

マウスの体重減少が10%を超えた場合、治療スケジュールを調整し、それに応じて投与容量を減らすか、あるいは、その動物の調査を中止した。

【0246】

投与の完了後、腫瘍の容量と体重の監視を、週に2度、2週間まで続けた。

【0247】

動物をCO₂で安楽死させ、続いて骨髄破壊を行って、安楽死を確認させた。

【0248】

腫瘍測定指標

腫瘍の大きさは、キャリパーを使用して2次元で週に2回測定され、容量は式： $V = 0.5 \cdot a \cdot b^2$ を使用してmm³と表した。ここで、aおよびbはそれぞれ腫瘍の長径と短径である。

【0249】

腫瘍接種および動物のグループ分けの前に、その後、実験の間に週に2回、最後に、実験の終点で動物を安楽死させる前に、動物の体重を測定した。偶発的な死が起きたとき、または動物の死の寸前に、動物の体重を測定した。

【0250】

実験の全期間の間、動物は、腫瘍潰瘍の出現、動物の精神状態、食物と水の消費の視覚的推定などを含むが、それらに限定されない、行動と状態について、1日2回(午前と午後)チェックされた。

【0251】

調査終了時に腫瘍を収集し、重量を測定した。安楽死させた動物と収集した腫瘍の両方について写真を撮り、後に報告書に添付した。

【0252】

薬物評価指標

相対的な腫瘍成長阻害 (TGI%) : $TGI\% = (1 - T/C) \times 100\%$ 。TおよびCは、それぞれ、所与の日の治療群および媒体群の平均相対腫瘍容量 (RTV) を指す。T/C%は相対腫瘍増殖率^[1]を表し、その式は： $T/C\% = T_{RTV} / C_{RTV} \times 100\%$ (T_{RTV} : 治療群の平均RTV ; C_{RTV} : 媒体群の平均RTV ; $RTV = V_t / V_0$ 、 V_0 はグループ分け時の腫瘍容量を指し、 V_t は治療後に示された各時点で測定された腫瘍容量を指す。)

10

【0253】

腫瘍重量の阻害率 (IR_{TW}%) : 終点で、動物の腫瘍の重量を測定し、各群の平均腫瘍重量を決定し、IR_{TW}%を式：

$IR_{TW}\% = (W_{\text{対照群}} - W_{\text{治療群}}) / W_{\text{対照群}} \times 100$ で計算した。Wは平均腫瘍重量を指す。

【0254】

スチューデントt検定/二元配置ANOVAを使用してデータを分析し、 $P < 0.05$ を統計的に有意であるとみなした。統計分析と生物学的観察の両方を考慮した。

20

【0255】

結果

実験の全体の間で明らかな臨床徴候は観察されなかった。ほとんどの動物の体重は、調査の間、徐々に増加した。経時的な平均体重と平均体重変化率を図25と表3に示した。B60-55-1群の動物は、対照群の動物と比較して、体重に統計的差異を示さなかった ($P > 0.05$)。

【0256】

【表4】

表3. マウス結腸がん MC38-hPD-L1 腫瘍移植片を有するヒト化 B-hPD-L1 マウスの体重変化。

30

群	治療	動物数	体重 (g) ^a	体重 (g) ^a	P ^b	体重変化 (g)
			グループ分けの 前	グループ分け の23日後		
1	IVIG	10	22.7±0.5	27.2±1.0	—	+4.5
2	陽性対照	10	22.9±0.7	28.3±1.2	0.8	+5.4
3	B60-55-1	10	23.3±0.7	28.2±1.1	0.9	+4.9

40

注：

a: 平均±SEM

b: グループ分け後23日目での治療群対媒体群の平均体重における独立サンプルT検定による統計分析。

50

【 0 2 5 7 】

すべてのマウスは、実験の全体を通じて腫瘍の成長を厳密に監視し、腫瘍の大きさを週に2回測定して記録した。腫瘍成長阻害 (TGI%) を計算し、最適な治療ポイント (グループ分けの23日後) で分析した。統計分析結果を表4および5に示す。3つの群の個々のマウス腫瘍成長を図26および図27にプロットした。アテゾリズマブおよびB60-55-1の投与後、腫瘍成長率の低下が観察された。アテゾリズマブおよびB60-55-1群における明確な腫瘍退縮は、2/8および1/8マウスにおいて別々に観察された。

【 0 2 5 8 】

【表5】

10

表 4. グループ分け後 23 日目の B60-55-1 の腫瘍成長阻害

群	動物数	腫瘍容量 (mm ³) ^a		TGI _{TV} (%)	P ^b
		グループ 分けの前	グループ分 けの 23 日後		
G1: IVIG	10	119±4	2078±459	--	--
G2: 陽性対照	10	119±4	1046±336	52.7	0.10
G3: B60-55-1	10	120±5	1022±552	53.9	0.17

20

注:

a: 平均±SEM

b: グループ分け後 23 日目での治療群対媒体群の平均腫瘍容量におけるプール標準偏差 t 検定による統計分析。

30

【 0 2 5 9 】

【表6】

表 5. B60-55-1 のさまざまな群の間での腫瘍容量の統計分析

群	3
2: 陽性対照	0.970
3: B60-55-1	—

40

注:

グループ分け後 23 日目での相対的腫瘍容量におけるプール標準偏差 t 検定による統計分析。

【 0 2 6 0 】

50

グループ分け後 29 日目、屠殺したマウスからすべての腫瘍を摘出し、写真を撮り、重量を測定した。腫瘍重量の統計分析結果を表 6 および図 28 に示す。投与完遂後も腫瘍がなおも成長しているため、23 日目と比較して腫瘍成長阻害率 ($TGI_{TV}\%$) が低下した。調査の終点 (23 日目) の治療群における腫瘍重量は、媒体群との有意差はなかった ($P > 0.05$)。

【0261】

【表 7】

表 6. 投与開始後 29 日目における B60-55-1 の腫瘍重量阻害

群	動物数	腫瘍重量 (g) ^a	腫瘍重量阻害 $IR_{TW}\%$	P^b
G1: IVIG	10	4.653±1.009	--	--
G2: 陽性対照	10	2.596±0.860	44.2	0.193
G3: B60-55-1	10	3.173±1.570	31.8	0.447

注:

a: 平均±SEM

b: グループ分け後 29 日目での平均腫瘍重量における独立サンプル T 検定による統計分析

【0262】

この調査では、ほとんどの動物の重量が徐々に増加した。B60-55-1 群の動物は、対照群の動物と比較して体重に統計的差異を示さず ($P > 0.05$)、B60-55-1 が現在の投与量で安全であることを示している。アテゾリズマブと B60-55-1 の投与後、腫瘍成長率の低下が観察された。最良の腫瘍成長阻害点 (グループ分け後 23 日目) で、媒体対照群の平均腫瘍容量は $2078 \pm 459 \text{ mm}^3$ であったが、陽性対照治療群では、平均腫瘍容量は $1046 \pm 336 \text{ mm}^3$ であり、B60-55-1 治療群では、平均腫瘍容量は $1022 \pm 552 \text{ mm}^3$ であった。腫瘍成長阻害 $TGI_{TV}\%$ は、それぞれ 52.7% と 53.9% であった。この調査の終点 (グループ分け後 29 日目) で、2/8 および 1/8 マウスにおいてアテゾリズマブおよび B60-55-1 群での明確な腫瘍退縮が観察され、腫瘍重量阻害 $IR_{TW}\%$ はそれぞれ 44.2% および 31.8% であった。対照群と比較して、B60-55-1 群の動物の腫瘍容量は、化合物に抗腫瘍活性があったが、有意差はなかった。

【0263】

したがって、この調査において、B60-55-1 は、動物の体重に悪影響を与えたりなんらかの異常な臨床所見を誘導したりすることなく、 10 mg/kg の用量レベルでアテゾリズマブに匹敵する抗腫瘍効力を示した。

【実施例 15】

【0264】

ヒト化 NSG (商標) マウスを使用した乳がんの異種移植モデルにおける B60-55-1 の評価。

皮膚がんを除いて、乳がんは女性で最も一般的ながんの形態であり、70 歳 (CDC) に達するまでに女性の約 7% が発症している。米国がん協会の推定によると、2017 年

は米国で新たに診断された患者は252,710人、死者は40,610人となるであろう。2006年から2012年までの5年間の相対生存率は、すべてのステージあわせておよそ90%であった。トリプルネガティブ乳がんは、エストロゲンとプロゲステロン受容体とHER2タンパク質の発現が臨床的に陰性である、乳がんのユニークで攻撃的なサブタイプである。現在、この形態の乳がんに対処する標的療法はない。原発性ヒトがんのマウスモデルは、ヒト疾患を再現する、マウスにおける臨床的に重要ながんモデルとなるため、その開発は、ヒト疾患にとって重要である。ジャクソン研究所(Jackson Laboratory)は、患者由来の異種移植(PDX)乳がんモデルと、高度免疫不全NSG(商標)マウス系統およびNSG(商標)-SGM3のようなNSG(商標)由来系統における細胞株異種移植モデルを確立した。NSG(商標)(NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ)マウスは、ヒトの細胞と組織を効率的に移植するその能力について開発された。移植効率は、免疫系の先天性欠損症のため、他のマウス系統よりも大幅に改善されている。ヒト化NSG(商標)[hu-CD34 NSG(商標)]マウスは、ヒトCD34+造血幹細胞を注射したNSG(商標)マウスであり、インビボでヒトの免疫機能を調査するための重要なツールとなってきた。これらのマウスは、新規の免疫療法、特にヒト特異的であり、マウスと十分に交差反応しないものの応用のための強力な前臨床プラットフォームを提供する。さらに、これらのモデルは、疾患のゲノムプロファイリングおよび/または前臨床薬開発のために使用される。この調査においては、ヒト化NSG(商標)マウスで確立された乳がんのMDA-MB-231細胞株異種移植モデルを使用し、新規の抗体を評価した。

10

20

30

40

【0265】

マウスおよび飼育

移植後16週間の末梢血に>25%のヒトCD45+細胞を有するヒトCD34+細胞を移植した雌hu-CD34 NSG(商標)マウスをこの調査に使用した。2人のドナーからのCD34+細胞を移植したhu-CD34 NSG(商標)マウスのコホートをを使用した。マウスは、1つのケージにつき5匹までのマウスの密度で、HEPAろ過した空気で個別に換気されたポリスルホンケージで飼育された。動物室は、制御された12時間の明暗サイクル(午前6時から午後6時)で、人工蛍光灯で全体を照らされた。動物室の通常温度と相対湿度の範囲は、それぞれ22~26と30~70%であった。動物室は、1時間あたり15までの空気交換されるように設定された。ろ過された水道水をpH 2.5~3.0に酸性化し、標準的なげっ歯類用固形飼料が自由に提供された。

【0266】

方法と記録

2人の個々のドナーからの38匹のhu-CD34 NSG(商標)マウスを、マトリゲルとの1:1混合物中、5x106のMDA-MB-231細胞を用いて、乳房脂肪体に移植した。体重と臨床所見は、移植後週に1X~2X記録され、腫瘍が触知可能になったら、デジタルキャリパー測定を使用して腫瘍容量を週に2X決定した。腫瘍容量が~62-98mm3に達した時、腫瘍容量に基づいてマウスを無作為化し、0日目から始めて表7に従って投与した。体重、臨床所見およびデジタルキャリパー測定は、投与開始後週に2X記録した。2の身体状態スコア、20%の体重減少、または2000mm3の腫瘍容量に達した動物は、調査終了前に安楽死させた。潰瘍性腫瘍のある動物も調査終了前に安楽死させた。残りの動物はすべて、調査41日目にCO2窒息により安楽死させた。

【0267】

【表 8】

表 7. 実験設計

群	N	化合物	用量 (mg/kg)	投与経路**	投与頻度***
1	10	媒体*	N/A (容量当量)	IV	週に 2 回、6 週間
2	10	ペンブロリズマブ	10 (0 日目) 5 (その後)	IV	週に 2 回、6 週間
3	11	B60-55-1	25	IV	週に 2 回、6 週間

*同じ媒体を使用して B60-55-1 を製剤化した。

**腫大のために尾の静脈から IV 注射を行うことができない場合には、投与経路を IP に切り替えた。群 3 の 1 匹の動物は 35 日目に IP で投与し、群 1 の 1 匹と群 3 の 2 匹の動物は 38 日目に IP で投与した。

***動物は、0、3、7、10、14、17、21、24、28、31、35、および 38 日目に投与した。

【0268】

結果

この調査の結果を図 29 および図 30 に要約する。この結果は、調査において使用した乳がんの異種移植モデルにおいて、抗体 B60-55-1 がペンブロリズマブと同等の効力を示すことを示している。

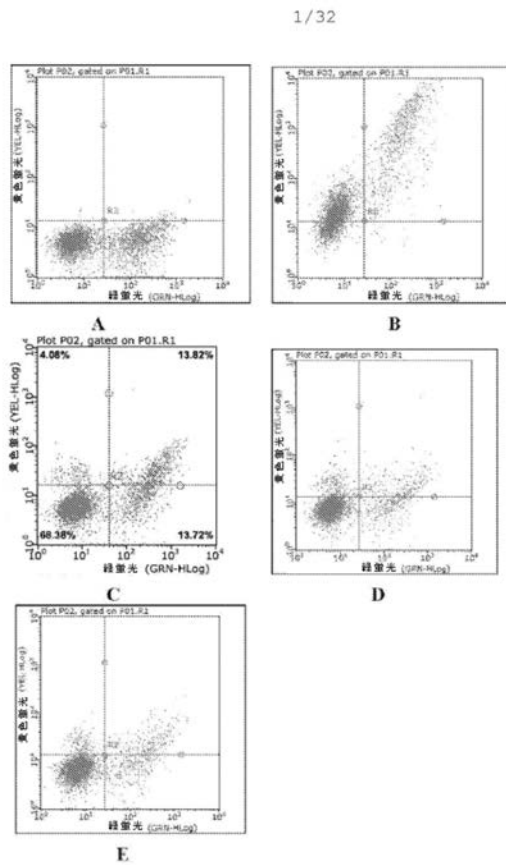
【0269】

Tecentriq は、Genentech USA、Inc. の登録商標である。

【0270】

本発明の特定の実施形態をここで詳細に記載したが、当業者は、すでに公開されているガイドラインおよび教示に基づいて、より詳細な態様のさまざまな修正および置換を実行できることを理解するであろう。そして、前記変更はすべて本発明の範囲内にある。本発明の全範囲は、添付の特許請求の範囲および任意の同等の文書によって与えられる。

【図 1】



【図 3 - 1】

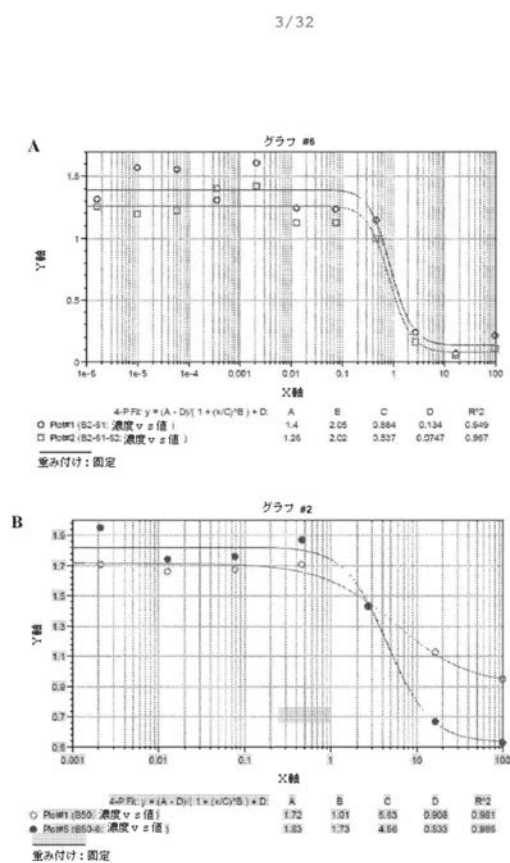
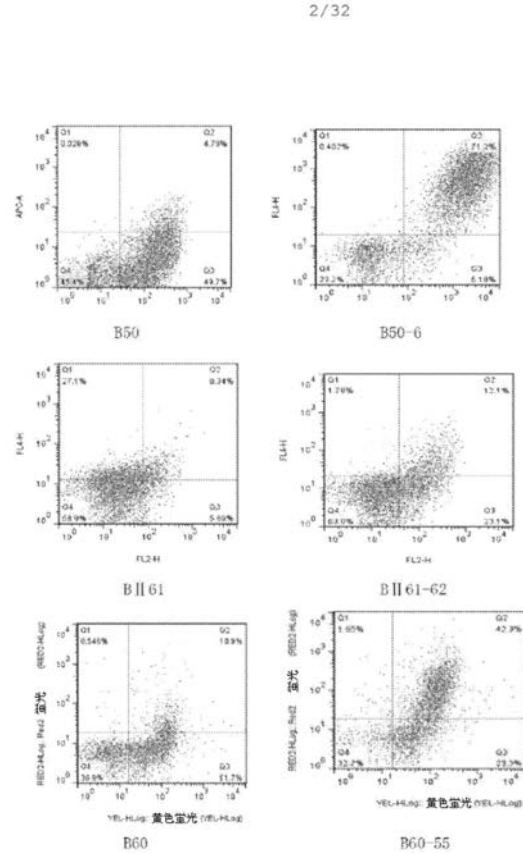


Figure 3

【図 2】



【図 3 - 2】

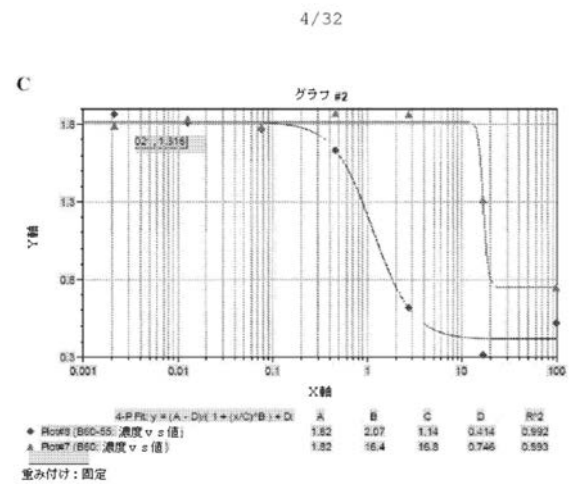


Figure 3

【図 4】

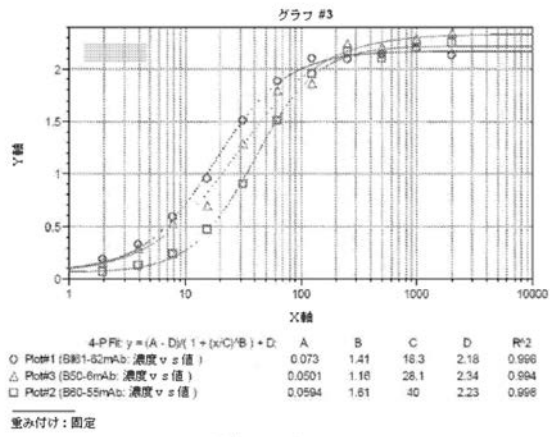


Figure 4

【図 5 - 1】

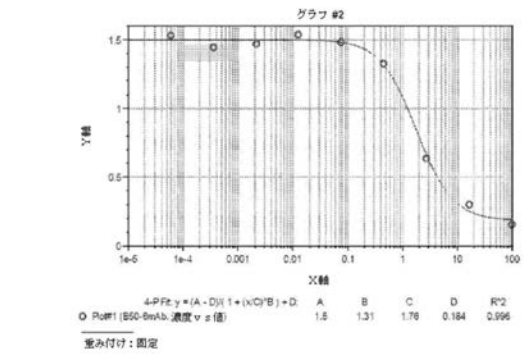
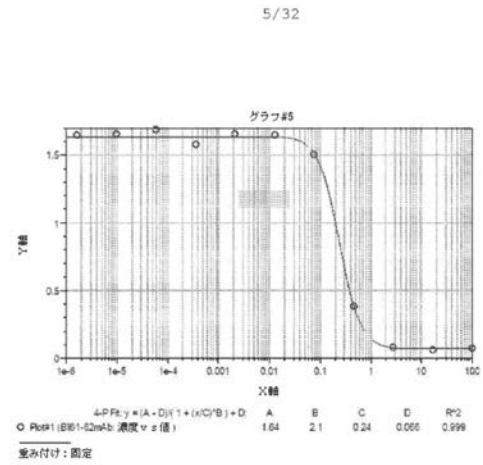


Figure 5

【図 5 - 2】

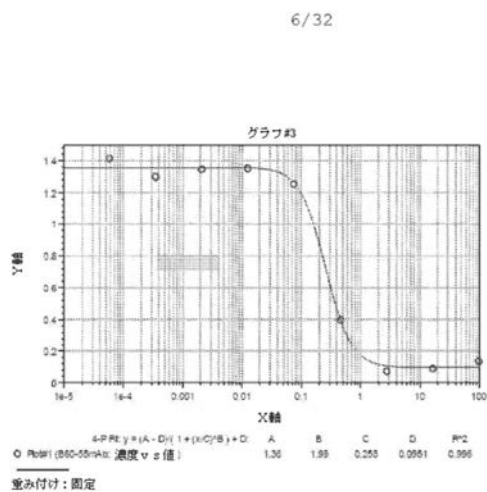


Figure 5

【図 6】

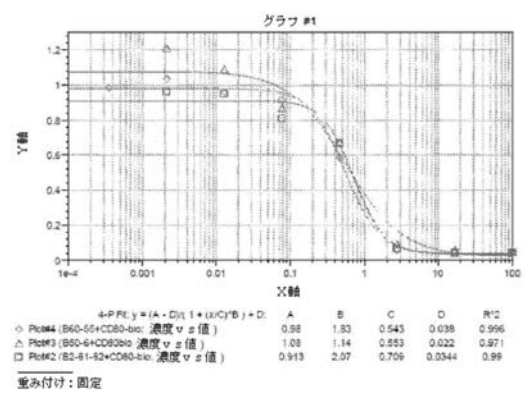


Figure 6

【図 7 - 1】

7/32

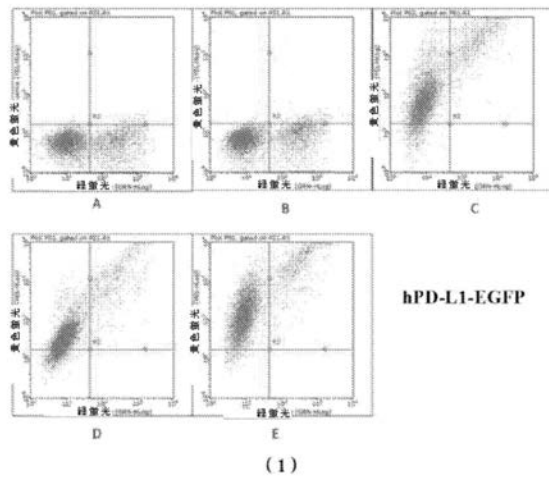


Figure 7

【図 7 - 2】

8/32

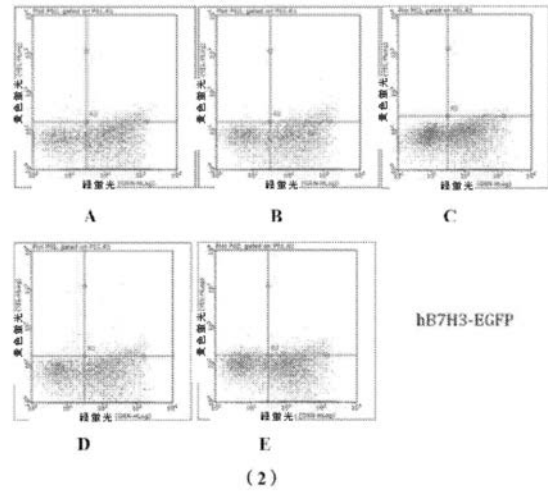


Figure 7

【図 7 - 3】

9/32

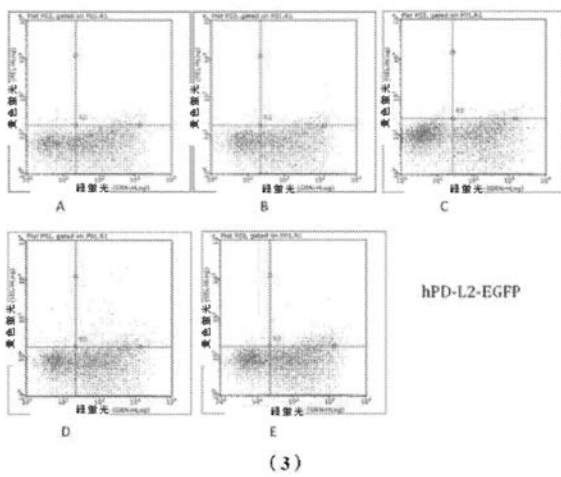


Figure 7

【図 8 - 1】

10/32

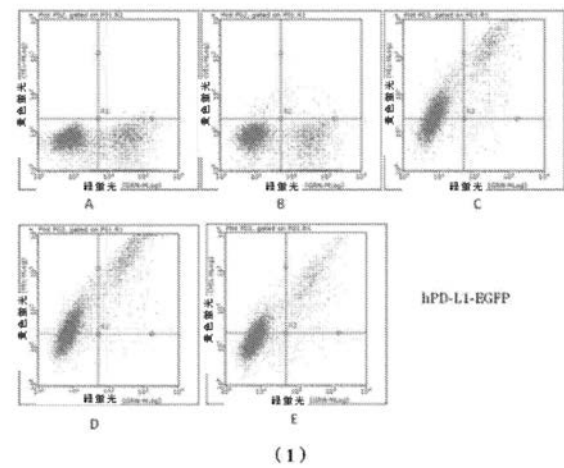
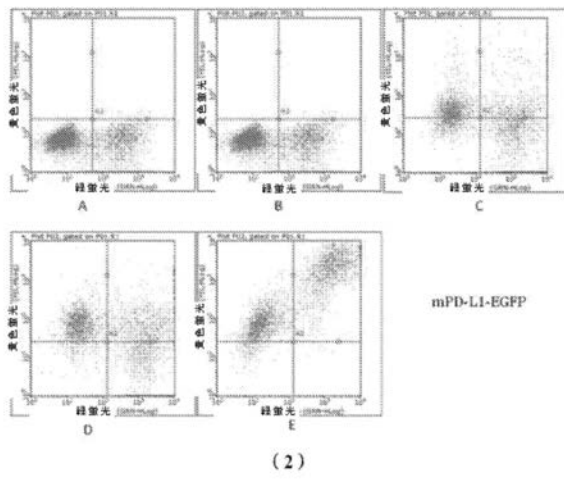


Figure 8

【図 8 - 2】

11/32



(2)

Figure 8

【図 9】

12/32

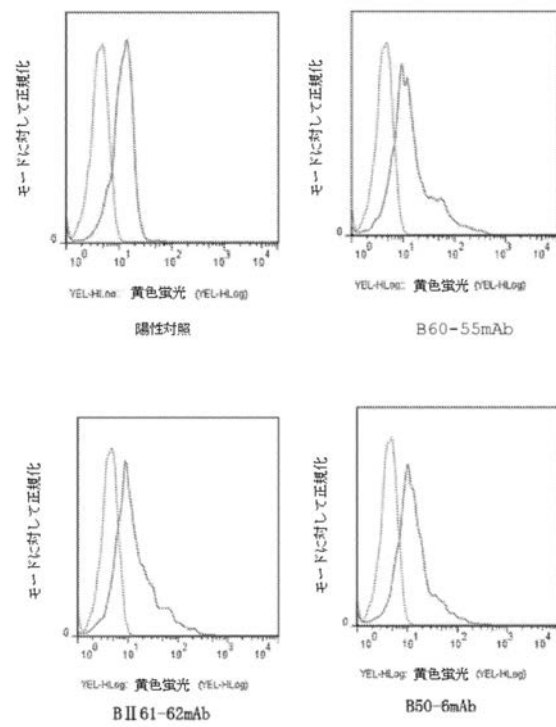


Figure 9

【図 10】

13/32

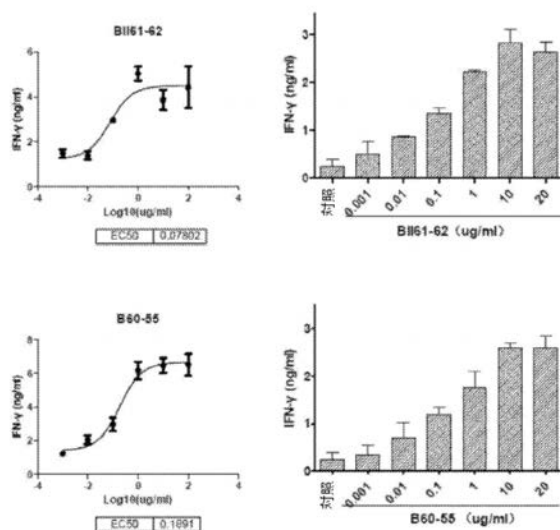


Figure 10

【図 11】

14/32

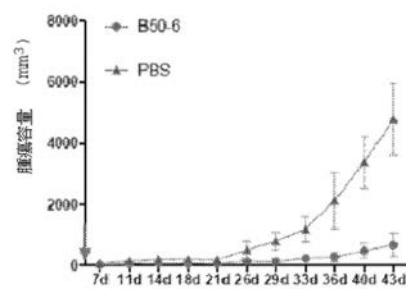


Figure 11

【図 12】

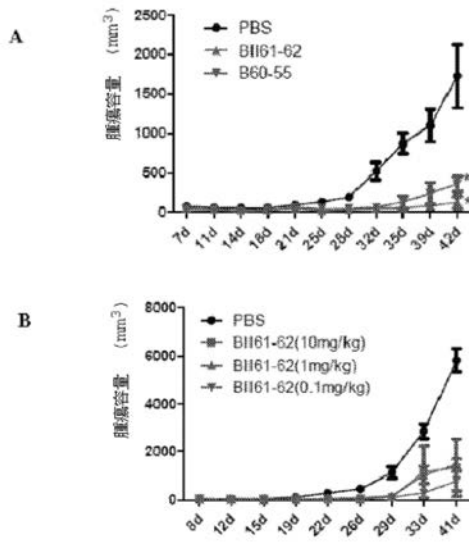


Figure 12

【図 13】

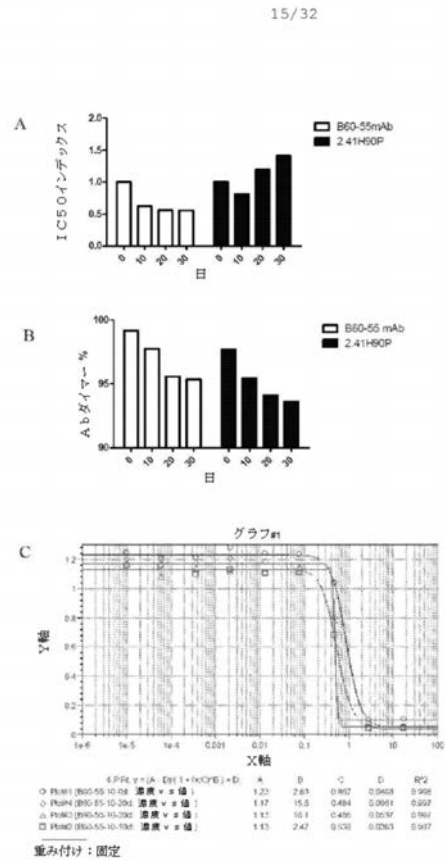


Figure 13

【図 14】

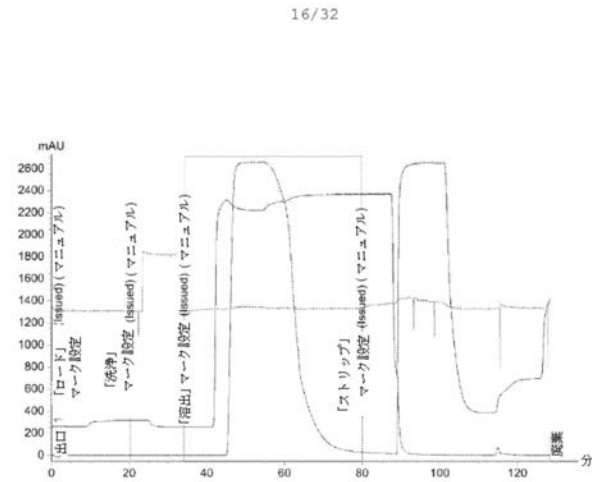


Figure 14

【図 15】

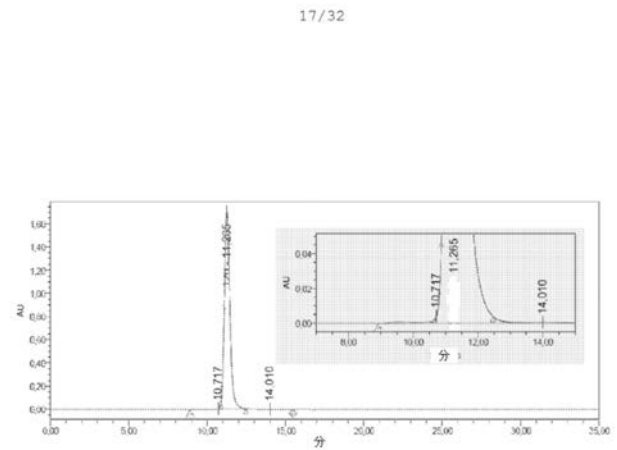


Figure 15

【 図 1 6 】

18/32

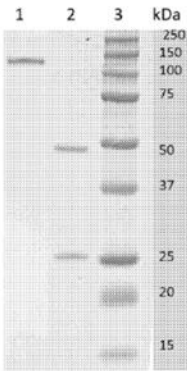


Figure 16

【 図 1 7 】

19/32

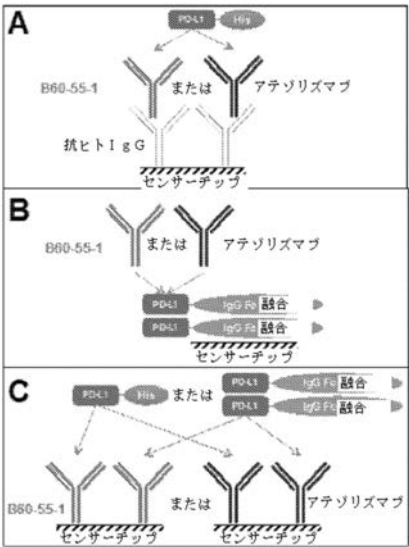


Figure 17

【 図 1 8 】

20/32

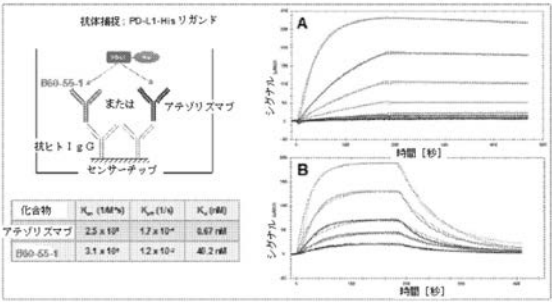


Figure 18

【 図 1 9 】

21/32

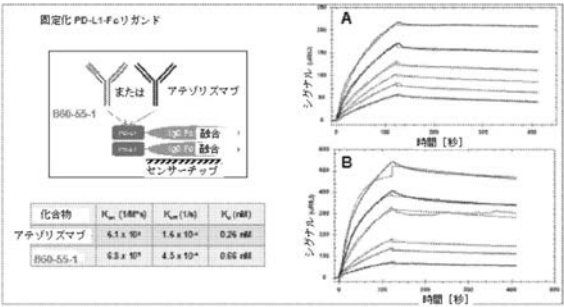


Figure 19

【図 20】

22/32

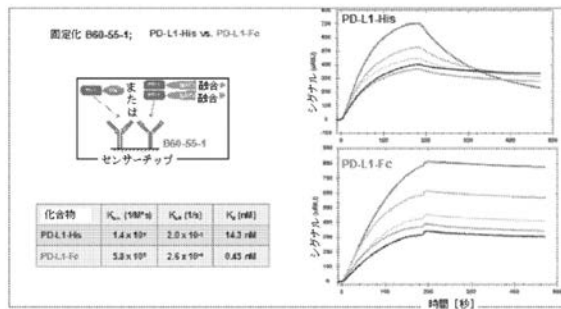


Figure 20

【図 21】

23/32

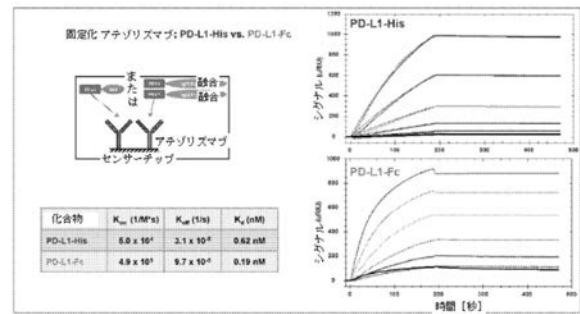


Figure 21

【図 22】

24/32

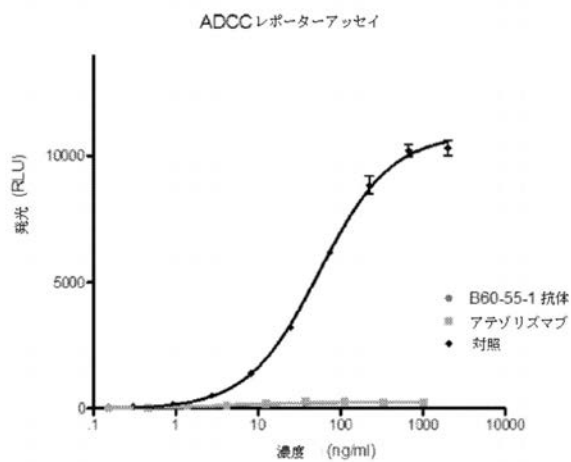


Figure 22

【図 23】

25/32

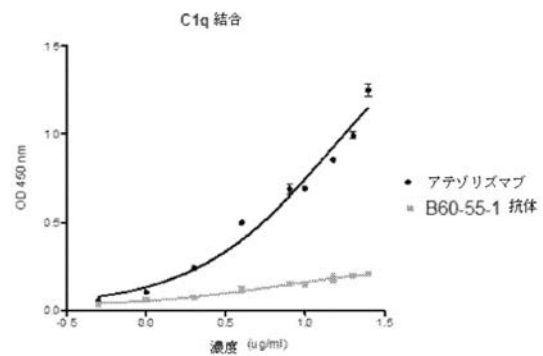


Figure 23

【図 24】

26/32

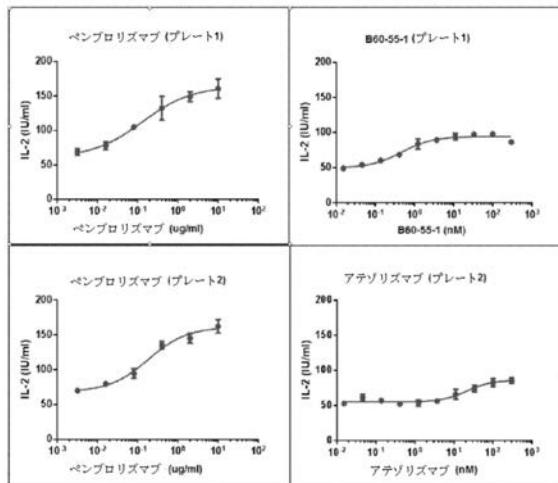


Figure 24

【図 25】

27/32

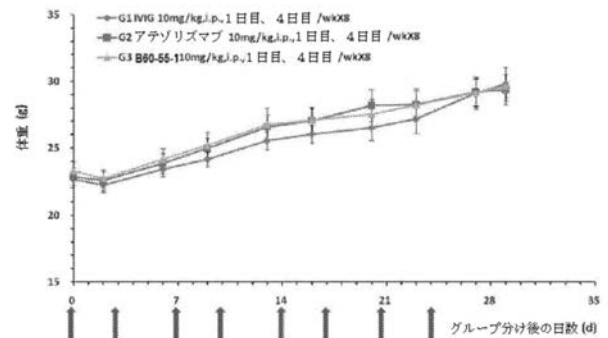


Figure 25

【図 26】

28/32

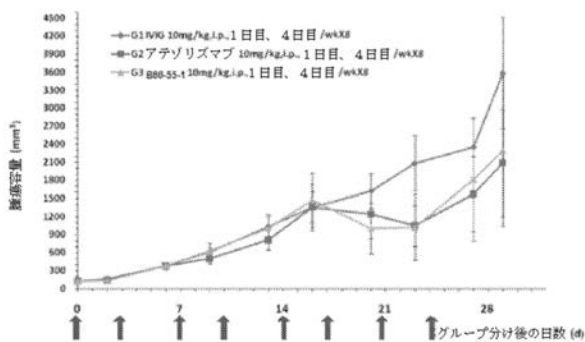


Figure 26

【図 27】

29/32

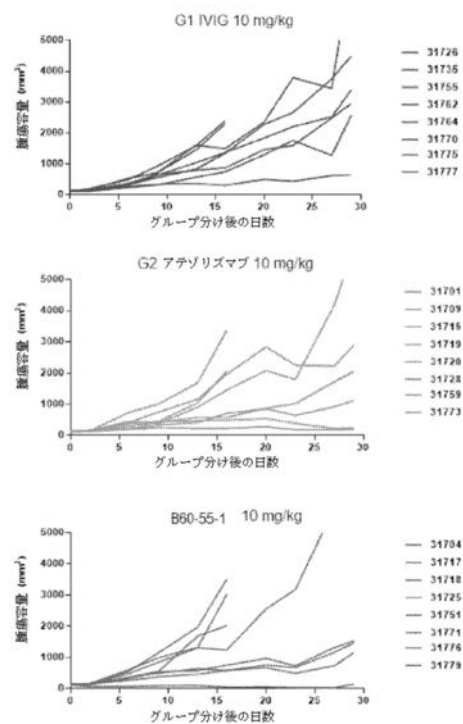


Figure 27

【図 28】

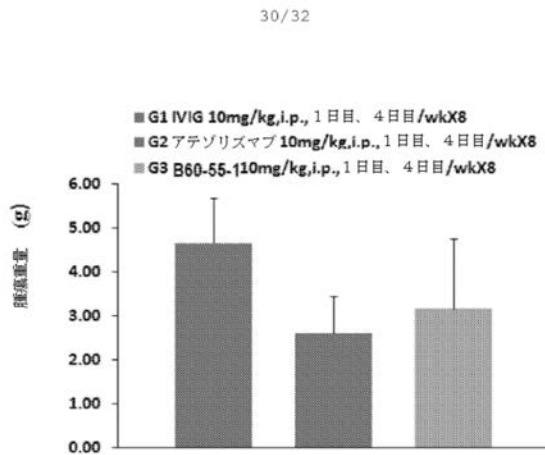


Figure 28

【図 29】

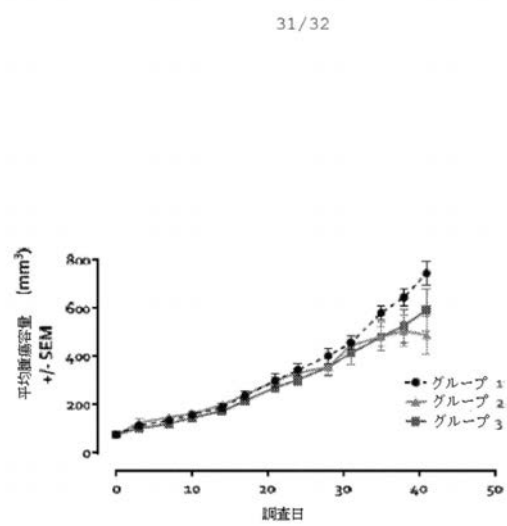


Figure 29

【図 30】

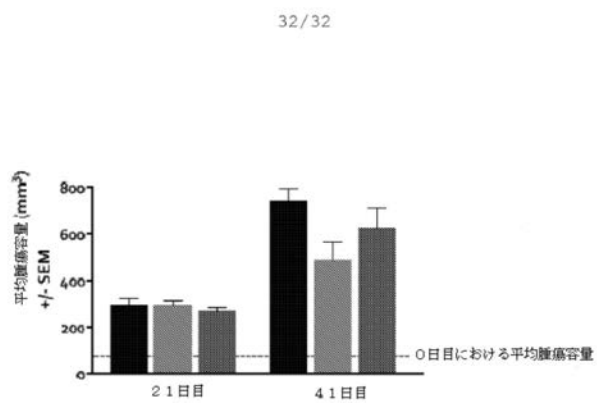


Figure 30

【配列表】

2020517239000001.app

【 国 際 調 査 報 告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 2018/028206
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C07K 16/28</i> (2006.01) <i>C12N 15/63</i> (2006.01) <i>C12N 15/13</i> (2006.01) <i>A61K 39/395</i> (2006.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K, C12N, A61K		
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) PatSearch, USPTO DB, RUPTO, EAPATIS, PubMed, ScienceDirect, E-Library, NCBI, EMBI-EBI, ESP@CENET		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2016/149201 A2 (CYTOMX THERAPEUTICS, INC.) 22.09.2016, claims, examples	1-6, 10-25
A	US 2016/0272712A1 (DANA-FARBER CANCER INSTITUTE INC.) 22.09.2016, examples 4, 5	1-6, 10-25
A	WO 2015/103602 A1 (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA et al.) 09.07.2015, abstract	1-6, 10-25
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 document 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 24 August 2018 (24.08.2018)		Date of mailing of the international search report 06 September 2018 (06.09.2018)
Name and mailing address of the ISA/RU: Federal Institute of Industrial Property, Berezhkovskaya nab., 30-1, Moscow, G-59, GSP-3, Russia, 125993 Facsimile No: (8-495) 531-63-18, (8-499) 243-33-37		Authorized officer G. Gromova Telephone No. (8-499) 240-25-91

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. <div style="text-align: center;">PCT/US 2018/028206</div>
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. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:	
2. <input type="checkbox"/> 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. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 7-9, 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:	
1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.	
2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.	
3. <input type="checkbox"/> 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. <input type="checkbox"/> 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.:	
Remark on Protest	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. <input type="checkbox"/> 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. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 N 7/00 (2006.01)	C 1 2 N 7/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 31/20 (2006.01)	A 6 1 P 31/20	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	U
A 6 1 K 9/08 (2006.01)	A 6 1 K 9/08	
A 6 1 K 47/18 (2006.01)	A 6 1 K 47/18	
A 6 1 K 47/26 (2006.01)	A 6 1 K 47/26	
A 6 1 K 47/22 (2006.01)	A 6 1 K 47/22	

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

(特許庁注 : 以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

(74)代理人 100170520

弁理士 笹倉 真奈美

(72)発明者 ヤン・ラブロフスキー

アメリカ合衆国 9 2 0 1 4 カリフォルニア州デル・マー、ザボ・ストリート 1 9 6 9 番

(72)発明者 シュイ・ティン

アメリカ合衆国 0 2 4 9 2 マサチューセッツ州ニーダム、ウェイン・ロード 6 7 番

(72)発明者 セルゲイ・バルバシヨフ

アメリカ合衆国 9 2 6 0 3 カリフォルニア州アーバイン、クウェイル・メドウズ 3 1 1 0 5 番

(72)発明者 アレクセイ・レピク

ロシア 1 5 0 0 0 0 ヤロスラヴル、コトロスルナヤ・ナベレズナヤ 5 4 番、アパートメント 9

(72)発明者 ミハイル・サムソノフ

ロシア 1 2 5 3 1 3 モスクワ、レニングラツキ・プロスペクト 7 4 - 6 - 7 7

(72)発明者 ヴァシリイ・イグナティエフ

ロシア 1 2 1 3 5 3 モスクワ、スコルコフスコエ・ショッセ 1 3 番、アパートメント 2 1 2

(72)発明者 ショレーナ・アルチュアゼ

ロシア 1 4 1 0 0 2 モスクワ、ムイティシ、インスチトゥツカヤ・ストリート 1 9 / 2 番、アパートメント 3 4

F ターム (参考) 4B065 AA94X AA95X AA96X AA97X AB01 BA02 CA24 CA25 CA44

4C076 AA12 BB11 CC27 CC35 DD09 DD38 DD51 DD60 EE23 FF63

4C085 AA14 CC23 DD62 EE01 EE07

4H045 AA11 AA30 CA40 DA50 DA76 EA20 FA74