

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6432121号
(P6432121)

(45) 発行日 平成30年12月5日 (2018. 12. 5)

(24) 登録日 平成30年11月16日 (2018. 11. 16)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/13 (2006. 01)	C 1 2 N 15/13 Z N A
C O 7 K 16/28 (2006. 01)	C O 7 K 16/28
C O 7 K 16/46 (2006. 01)	C O 7 K 16/46
C 1 2 N 15/63 (2006. 01)	C 1 2 N 15/63 Z
C 1 2 N 1/15 (2006. 01)	C 1 2 N 1/15

請求項の数 43 (全 51 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-565750 (P2017-565750)	(73) 特許権者	517273308
(86) (22) 出願日	平成29年3月2日 (2017. 3. 2)		シチュアン ケルン-バイオテック バイ
(65) 公表番号	特表2018-526974 (P2018-526974A)		オフーマシューティカル カンパニー
(43) 公表日	平成30年9月20日 (2018. 9. 20)		リミテッド
(86) 国際出願番号	PCT/CN2017/075484		中華人民共和国, シチュアン 6 1 1 1
(87) 国際公開番号	W02017/148424		3 8, チェンドウ, ウェンジャン デ
(87) 国際公開日	平成29年9月8日 (2017. 9. 8)		イストリクト, ハイ シャ インダスト
審査請求日	平成29年12月18日 (2017. 12. 18)		リアル パーク, シンフワ アヴェニュー
(31) 優先権主張番号	201610122117.6		ー (セクション 2), ナンバー 6
(32) 優先日	平成28年3月4日 (2016. 3. 4)		6 6
(33) 優先権主張国	中国 (CN)	(74) 代理人	100107456
早期審査対象出願			弁理士 池田 成人
		(74) 代理人	100162352
			弁理士 酒巻 順一郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 P D L-1 抗体、その医薬組成物及びその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗 P D L-1 モノクローナル抗体が、配列番号 1 5 に規定される H C D R 1 と、配列番号 1 6 に規定される H C D R 2 と、配列番号 1 7 に規定される H C D R 3 と、を含む重鎖可変領域を有し、かつ配列番号 1 8 に規定される L C D R 1 と、配列番号 1 9 に規定される L C D R 2 と、配列番号 2 0 に規定される L C D R 3 と、を含む軽鎖可変領域を有する、抗 P D L-1 モノクローナル抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 2】

重鎖可変領域が、配列番号 2、配列番号 6 又は配列番号 1 0 のアミノ酸配列を有し、かつ軽鎖可変領域が、配列番号 4、配列番号 8 又は配列番号 1 2 のアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の抗 P D L-1 モノクローナル抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 3】

前記重鎖可変領域が配列番号 2 のアミノ酸配列を有し、かつ前記軽鎖可変領域が配列番号 4 のアミノ酸配列を有するか、

前記重鎖可変領域が配列番号 6 のアミノ酸配列を有し、かつ前記軽鎖可変領域が配列番号 8 のアミノ酸配列を有するか、

前記重鎖可変領域が配列番号 6 のアミノ酸配列を有し、かつ前記軽鎖可変領域が配列番号 1 2 のアミノ酸配列を有するか、

前記重鎖可変領域が配列番号 1 0 のアミノ酸配列を有し、かつ前記軽鎖可変領域が配列番号 8 のアミノ酸配列を有するか、

前記重鎖可変領域が配列番号10のアミノ酸配列を有し、かつ前記軽鎖可変領域が配列番号12のアミノ酸配列を有する、請求項2に記載の抗PD L-1モノクローナル抗体又はその抗原結合断片。

【請求項4】

F a b、F a b'、F (a b')₂、F d、F v、d A b、相補性決定領域断片、一本鎖抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体及びダイアボディから選択される、請求項1又は2に記載の抗PD L-1モノクローナル抗体又はその抗原結合断片。

【請求項5】

前記一本鎖抗体がs c F vである、請求項4に記載の抗PD L-1モノクローナル抗体又はその抗原結合断片。

10

【請求項6】

100 nM未満のEC₅₀でPD L-1に結合する、請求項1又は2に記載の抗PD L-1モノクローナル抗体又はその抗原結合断片。

【請求項7】

10 nM未満のEC₅₀でPD L-1に結合する、請求項1又は2に記載の抗PD L-1モノクローナル抗体又はその抗原結合断片。

【請求項8】

前記EC₅₀が間接ELISA法により決定される、請求項6又は7に記載の抗PD L-1モノクローナル抗体又はその抗原結合断片。

【請求項9】

20

前記抗PD L-1モノクローナル抗体が非CD R領域を含み、前記非CD R領域がマウス以外の種から得られる、請求項1又は2に記載の抗PD L-1モノクローナル抗体又はその抗原結合断片。

【請求項10】

前記抗PD L-1モノクローナル抗体が非CD R領域を含み、前記非CD R領域がヒト抗体から得られる、請求項1又は2に記載の抗PD L-1モノクローナル抗体又はその抗原結合断片。

【請求項11】

前記抗PD L-1モノクローナル抗体の定常領域が、ヒトI g G 1、ヒトI g G 2、ヒトI g G 3又はヒトI g G 4の定常領域から選択される、請求項1又は2に記載の抗PD L-1モノクローナル抗体又はその抗原結合断片。

30

【請求項12】

前記抗PD L-1モノクローナル抗体の定常領域が、変異したヒトI g G 1定常領域である、請求項1又は2に記載の抗PD L-1モノクローナル抗体又はその抗原結合断片。

【請求項13】

前記変異したヒトI g G 1定常領域が、EU付番方式に従って重鎖定常領域にN 2 9 7 A突然変異を含む、請求項12に記載の抗PD L-1モノクローナル抗体又はその抗原結合断片。

【請求項14】

前記変異したヒトI g G 1定常領域が、EU付番方式に従って2 3 4、2 3 5又は2 3 7位に少なくとも1つの突然変異を有し、F c γ R I I I a及び／又はC 1 qに対する前記抗PD L-1モノクローナル抗体又はその抗原結合断片の動力学的親和性が、変異後になる、請求項12又は13に記載の抗PD L-1モノクローナル抗体又はその抗原結合断片。

40

【請求項15】

前記変異したヒトI g G 1定常領域が、EU付番方式に従って2 3 4、2 3 5及び2 3 7位に1つ、2つ又は3つの突然変異を有し、前記突然変異が、L 2 3 4 A、L 2 3 5 A及びG 2 3 7 Aから選択される、請求項12又は13に記載の抗PD L-1モノクローナル抗体又はその抗原結合断片。

【請求項16】

50

前記変異が、前記抗 P D L - 1 モノクローナル抗体若しくはその抗原結合断片の A D C C 活性及び／又は C D C 活性を減少させる、請求項 1 2 ～ 1 5 のいずれか一項に記載の抗 P D L - 1 モノクローナル抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 1 7】

前記抗 P D L - 1 モノクローナル抗体が、ハイブリドーマ細胞株 L T 0 0 5 により產生され、前記ハイブリドーマ細胞株 L T 0 0 5 が、中国タイプカルチャーコレクションセンター（C C T C C）に寄託されており、受託番号が、C C T C C C 2 0 1 5 1 3 3 である、請求項 1 又は 2 に記載の抗 P D L - 1 モノクローナル抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 1 8】

核酸分子 A 及び核酸分子 B を含む、単離された核酸分子 C であって、

前記核酸分子 A は、抗 P D L - 1 モノクローナル抗体の重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含み、前記抗 P D L - 1 モノクローナル抗体の前記重鎖可変領域は、配列番号 1 5 に規定される H C D R 1 と、配列番号 1 6 に規定される H C D R 2 と、配列番号 1 7 に規定される H C D R 3 と、を含み、

前記核酸分子 B は、前記 P D L - 1 モノクローナル抗体の軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含み、前記抗 P D L - 1 モノクローナル抗体の前記軽鎖可変領域は、配列番号 1 8 に規定される L C D R 1 と、配列番号 1 9 に規定される L C D R 2 と、配列番号 2 0 に規定される L C D R 3 と、を含む、単離された核酸分子 C。

【請求項 1 9】

前記抗 P D L - 1 モノクローナル抗体の前記重鎖可変領域が、配列番号 2、配列番号 6 又は配列番号 1 0 のアミノ酸配列を有し、

前記抗 P D L - 1 モノクローナル抗体の前記軽鎖可変領域が、配列番号 4、配列番号 8 又は配列番号 1 2 のアミノ酸配列を有する、請求項 1 8 に記載の単離された核酸分子 C。

【請求項 2 0】

前記核酸分子 A が、配列番号 1、配列番号 5 又は配列番号 9 のアミノ酸配列を有し、

前記核酸分子 B が、配列番号 3、配列番号 7 又は配列番号 1 1 のアミノ酸配列を有する、請求項 1 8 に記載の単離された核酸分子 C。

【請求項 2 1】

前記核酸分子 A と前記核酸分子 B とを接続するためのリンカーをさらに含む、請求項 1 8 ～ 2 0 のいずれか一項に記載の単離された核酸分子 C。

【請求項 2 2】

請求項 1 8 ～ 2 1 のいずれか一項に記載の核酸分子 C を含む、ベクター。

【請求項 2 3】

請求項 1 8 ～ 2 1 のいずれか一項に記載の核酸分子 C 又は請求項 2 2 に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 2 4】

請求項 1 ～ 1 6 のいずれか一項に記載の抗 P D L - 1 モノクローナル抗体又はその抗原結合断片を調製する方法であって、

適切な条件下で請求項 2 3 に記載の宿主細胞を培養するステップと、宿主細胞培養物から前記抗 P D L - 1 モノクローナル抗体又はその抗原結合断片を回収するステップとを含む、方法。

【請求項 2 5】

受託番号 C C T C C C 2 0 1 5 1 3 3 で中国タイプカルチャーコレクションセンター（C C T C C）に寄託されている、ハイブリドーマ細胞株 L T 0 0 5。

【請求項 2 6】

モノクローナル抗体又はその抗原結合断片と、カップリング部分と、を含むコンジュゲートであって、前記モノクローナル抗体又はその抗原結合断片が請求項 1 ～ 1 6 のいずれか一項に記載の抗 P D L - 1 モノクローナル抗体又はその抗原結合断片であり、前記カップリング部分が検出可能な標識である、コンジュゲート。

【請求項 2 7】

10

20

30

40

50

前記カップリング部分が、ラジオアイソトープ、蛍光物質、発光物質、着色物質又は酵素である、請求項 2 6 に記載のコンジュゲート。

【請求項 2 8】

モノクローナル抗体又はその抗原結合断片と、コンジュゲートした部分と、を含む二機能性抗体コンジュゲートであって、前記モノクローナル抗体又はその抗原結合断片が請求項 1 ～ 1 6 のいずれか一項に記載の抗 P D L - 1 モノクローナル抗体又はその抗原結合断片であり、前記コンジュゲートした部分が第 2 の生物学的機能的断片である、二機能性抗体コンジュゲート。

【請求項 2 9】

前記第 2 の生物学的機能的断片が、結合活性を有し、かつ、タンパク質、ポリエチレングリコール (P E G)、核種、核酸、小分子毒素、受容体又はリガンドである、請求項 2 8 に記載の二機能性抗体コンジュゲート。

【請求項 3 0】

第 1 の抗体若しくはその断片と、更なる抗体若しくはその断片又は抗体模倣体と、のコンジュゲーションにより形成される多重特異性抗体であって、各抗体若しくはその断片又は抗体模倣体が、元の結合特異性を保持しており、前記第 1 の抗体又はその断片が、請求項 1 ～ 1 6 のいずれか一項に記載の抗 P D L - 1 モノクローナル抗体又はその抗原結合断片である、多重特異性抗体。

【請求項 3 1】

二重特異性抗体又は三重特異性抗体又は四重特異性抗体である、請求項 3 0 に記載の多重特異性抗体。

【請求項 3 2】

請求項 1 ～ 1 6 のいずれか一項に記載の抗 P D L - 1 モノクローナル抗体若しくはその抗原結合断片を含む、又は請求項 2 6 若しくは 2 7 に記載のコンジュゲートを含む、又は請求項 2 8 若しくは 2 9 に記載の二機能性抗体コンジュゲートを含む、又は請求項 3 0 若しくは 3 1 に記載の多重特異性抗体を含む、キット。

【請求項 3 3】

前記抗 P D L - 1 モノクローナル抗体又はその抗原結合断片を特異的に認識する二次抗体をさらに含む、請求項 3 2 に記載のキット。

【請求項 3 4】

前記二次抗体が、検出可能な標識で標識されている、請求項 3 3 に記載のキット。

【請求項 3 5】

前記検出可能な標識が、ラジオアイソトープ、蛍光物質、発光物質、着色物質又は酵素である、請求項 3 4 に記載のキット。

【請求項 3 6】

キットの製造における、請求項 1 ～ 1 6 のいずれか一項に記載の抗 P D L - 1 モノクローナル抗体若しくはその抗原結合断片、又は請求項 2 6 若しくは 2 7 に記載のコンジュゲート、又は請求項 2 8 若しくは 2 9 に記載の二機能性抗体コンジュゲート、又は請求項 3 0 若しくは 3 1 に記載の多重特異性抗体の使用であって、前記キットを使用してサンプル中の P D L - 1 の存在又はレベルを検出する、使用。

【請求項 3 7】

請求項 1 ～ 1 6 のいずれか一項に記載の抗 P D L - 1 モノクローナル抗体若しくはその抗原結合断片、又は請求項 2 6 若しくは 2 7 に記載のコンジュゲート、又は請求項 2 8 若しくは 2 9 に記載の二機能性抗体コンジュゲート、又は請求項 3 0 若しくは 3 1 に記載の多重特異性抗体を含む、医薬組成物。

【請求項 3 8】

薬学的に許容可能な担体及び／又は賦形剤をさらに含む、請求項 3 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 9】

腫瘍若しくは貧血の予防及び／又は処置及び／又は補助療法及び／又は診断用医薬の製

10

20

30

40

50

造における、請求項 1 ～ 1 6 のいずれか一項に記載の抗 P D L - 1 モノクローナル抗体若しくはその抗原結合断片、又は請求項 2 6 若しくは 2 7 に記載のコンジュゲート、又は請求項 2 8 若しくは 2 9 に記載の二機能性抗体コンジュゲート、又は請求項 3 0 若しくは 3 1 に記載の多重特異性抗体の使用。

【請求項 4 0】

前記腫瘍が、乳がん、肺がん、肝臓がん、胃がん、大腸がん、結腸直腸がん、食道がん、卵巣がん、子宮頸がん、腎がん、前立腺がん、膀胱がん、膵臓がん、膠腫、黒色腫及び白血病から選択される、請求項 3 9 に記載の使用。

【請求項 4 1】

前記肺がんが非小細胞肺がんである、請求項 4 0 に記載の使用。

10

【請求項 4 2】

前記結腸直腸がんが直腸がんである、請求項 4 0 に記載の使用。

【請求項 4 3】

- a) P D - 1 又は B 7 - 1 に対する P D L - 1 の結合を遮断するための薬物；
- b) P D L - 1 活性又は P D L - 1 レベルを下方調節するための薬物；
- c) P D - 1 又は P D L - 1 による免疫抑制を除去するための薬物；又は
- d) T リンパ球による I F N - γ 及び／又は I L - 2 の発現を強化するための薬物

の製造における、請求項 1 ～ 1 6 のいずれか一項に記載の抗 P D L - 1 モノクローナル抗体若しくはその抗原結合断片、又は請求項 2 6 若しくは 2 7 に記載のコンジュゲート、又は請求項 2 8 若しくは 2 9 に記載の二機能性抗体コンジュゲート、又は請求項 3 0 若しくは 3 1 に記載の多重特異性抗体の使用。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、腫瘍治療及び分子免疫学の分野に関係し、抗 P D L - 1 抗体、その医薬組成物及びその使用に関する。特に、本発明は、抗 P D L - 1 モノクローナル抗体に関する。

【背景技術】

【0002】

P D - 1 / P D L - 1 シグナル伝達経路は、免疫寛容、微生物感染症及び腫瘍免疫回避の調節に必須である。P D - 1 (プログラム細胞死 1) は、T 細胞及び他の免疫細胞において主に発現され、そのリガンド P D L - 1 は、ヒト腫瘍型の多くで高度に発現されている。P D L - 1 タンパク質の存在は、ヒト乳がん、肺がん、胃がん、結腸直腸がん、食道がん、卵巣がん、子宮頸がん、腎細胞癌、膀胱がん、膵臓がん、膠腫及び黒色腫において免疫組織化学的分析により実証されている。更に、P D L - 1 の発現レベルは、患者の臨床的処置及び予後と密接に関係する。

30

【0003】

P D - 1 / P D L - 1 シグナル伝達経路の遮断は、阻害されている T 細胞を活性化し、活性化された T 細胞を誘導してがん細胞を攻撃することができる。P D - 1 / P D L - 1 シグナル伝達の遮断は、腫瘍細胞を死滅させる役割を果たす腫瘍抗原特異的 T 細胞の増殖を促進することができ、次いで局所腫瘍の成長を阻害し (J u l i e R ら、2 0 1 2 年、N E n g l J M e d . 3 6 6 : 2 4 5 5 ~ 2 4 6 5 頁) ; P D L - 1 モノクローナル抗体は、腫瘍浸潤 C D 8 ⁺ T 細胞により I F N - γ の分泌を上方調節することができ、このことは、P D - 1 / P D L - 1 シグナル伝達経路の遮断が、腫瘍細胞の免疫応答に役割を果たして免疫応答を誘導することを示している (B l a n k C ら、2 0 0 6 年、I n t . J . C a n c e r . 1 1 9 : 3 1 7 ~ 3 2 7 頁) 。

40

【0004】

加えて、P D L - 1 は、i n v i v o で B 7 - 1 に結合することもできる。研究は、P D L - 1 / B 7 - 1 複合体が、T 細胞活性化の負のシグナルであり、上記相互作用が、T 細胞表面活性化マーカーの下方調節をもたらし、T 細胞の増殖を阻害し得ることを示し

50

た。

【0005】

IL-2（インターロイキン-2）は、T_h細胞により分泌されるリンフォカインの一種であり：（1）T細胞の増殖及び分化を刺激する；（2）細胞傷害性T細胞の生成を刺激する；（3）NK細胞の増殖及び分化を刺激し、NK細胞の活性を強化する；（4）*in vitro*で3～6日間のIL-2の刺激下で、リンパ球から形質転換される殺腫瘍性免疫細胞の一種であるリンフォカイン活性化キラー細胞（LAK）の生成を刺激する、といった広範囲な免疫活性を有する。IFN- γ （インターフェロン- γ ）はT細胞により産生され、腫瘍細胞の増殖を阻害し、MHCによる抗原の提示を増加させ、腫瘍壊死因子の発現を刺激し、腫瘍血管形成を防止することができる。最近の研究は、IFN- γ が、腫瘍細胞のFas/FasLの発現を調節することにより免疫系からの攻撃をかわす腫瘍細胞の能力を抑制し、Fas媒介アポトーシスに対する腫瘍細胞の感受性を強化し、悪性腫瘍細胞の阻害をもたらし得ると報告している。

10

【0006】

現在では、PDL-1経路を標的とする抗体が、非小細胞肺がん、腎細胞癌、卵巣がん、黒色腫（Homet M. B.、Paris G.ら、*Anti-PD1 Therapy in Melanoma. Semin Oncol.* 2015年6月；42（3）：466～473頁）を含めた様々な腫瘍、白血病及び貧血（Held SA、Heine A.ら、*Advances in immunotherapy of chronic myeloid leukemia CML. Curr Cancer Drug Targets.* 2013年9月；13（7）：768～74頁）の処置に進展をもたらすことになるかと一般に考えられている。

20

【0007】

現在のところ、Tリンパ球を活性化するためのより優れた結合親和性及び遮断効率（PD-1に対するPDL-1）を持つ新たな抗PDL-1抗体を開発することが依然として必要である。

【発明の概要】

【0008】

徹底的な研究及び創造的な作業により、本発明者らは、マウスを免疫化するための抗原として哺乳動物細胞により発現させた組換えPDL-1を使用し、マウスの脾臓細胞を採取し、骨髓腫細胞と融合させてハイブリドーマを生成した。多数のハイブリドーマをスクリーニングすることにより、ハイブリドーマ細胞株：LT005を得た。この細胞株は、2015年8月4日に受託番号CCTCC C2015133で中国タイプカルチャーコレクションセンター（CCTCC）に寄託された。

30

【0009】

本発明者らは、驚くべきことに、ハイブリドーマ細胞株LT005が、PDL-1に特異的に結合し、PD-1に対するPDL-1の結合を効果的に遮断できるモノクローナル抗体（5C10と命名した）を分泌し得ることを見出した。加えて、本発明者らは、PD-1に対するPDL-1の結合を遮断する5F10及び9F6と命名した他の2つのモノクローナル抗体も発見した。

40

【0010】

更に、本発明者らは、PDL-1に対するヒト化抗体を独創的に産生し、それぞれ5C10H1L1、5C10H1L2、5C10H2L1及び5C10H2L2と命名した。

【0011】

なお更に、本発明者らは、5C10H2L2の定常領域を独創的に変異させ、ADCC（抗体依存性細胞傷害作用）及び／又はCDC（補体依存性細胞傷害）が効果的に下げられた5C10H2L2-IgG1mt抗体を生成した。

【0012】

なお更に、本発明者らは、本発明の抗体、特に5C10、5C10H1L1、5C10H1L2、5C10H2L1、5C10H2L2、5F10、9F6及び5C10H2L

50

2-IgG1mt が、ヒトT細胞を効果的に結合し、活性化してIFN- γ 及びIL-2の分泌を誘導し得ることも見出し、このことは、肺がん、黒色腫、腎腫瘍、卵巣がん、白血病及び貧血の防止並びに処置に対する潜在性を示している。

【0013】

従って、以下の発明が提供される：

一態様において、本発明はモノクローナル抗体又はその抗原結合断片に関し：

前記モノクローナル抗体が、配列番号15～17に規定されるCDRを含む重鎖可変領域を有し、及び／又は配列番号18～20に規定されるCDRを含む軽鎖可変領域を有し；

又は

前記モノクローナル抗体が、配列番号29～31に規定されるCDRを含む重鎖可変領域を有し、及び／又は配列番号32～34に規定されるCDRを含む軽鎖可変領域を有し；

又は

前記モノクローナル抗体が、配列番号35～37に規定されるCDRを含む重鎖可変領域を有し、及び／又は配列番号38～40に規定されるCDRを含む軽鎖可変領域を有する。

【0014】

5C10、5C10H1L1、5C10H1L2、5C10H2L1又は5C10H2L2のCDRのアミノ酸配列は、以下と同じである：

HCDR1：GFSLSNYD（配列番号15）

HCDR2：IWTGGAT（配列番号16）

HCDR3：VRDSNYRYDEPFTY（配列番号17）

LCDR1：QSIGTN（配列番号18）

LCDR2：YAS（配列番号19）

LCDR3：QQSNSWPYT（配列番号20）。

【0015】

5F10のCDRのアミノ酸配列は、以下の通りである：

HCDR1：GFDIKDTY（配列番号29）

HCDR2：IDPADGNT（配列番号30）

HCDR3：ARGLGAWFAS（配列番号31）

LCDR1：QDITNS（配列番号32）

LCDR2：YTS（配列番号33）

LCDR3：QQGHTLPPT（配列番号34）。

【0016】

9F6のCDRのアミノ酸配列は、以下の通りである：

HCDR1：GFNIKDTY（配列番号35）

HCDR2：IDPANGNT（配列番号36）

HCDR3：SRGPPGGIGEYIYAMDY（配列番号37）

LCDR1：SSVSSSY（配列番号38）

LCDR2：STS（配列番号39）

LCDR3：HQYHRSPPT（配列番号40）

【0017】

上のCDRは、当業者によく知られている技術的手法によって得ることができる。例えば、VBASE2データベースによりIMGT定義を使用して重鎖又は軽鎖の可変領域のアミノ酸配列を分析することによる。

【0018】

いくつかの実施形態において、前記モノクローナル抗体又はその抗原結合断片であって：

重鎖可変領域は、配列番号2、配列番号6及び配列番号10から選択されるアミノ酸配

10

20

30

40

50

列を有し、及び／又は軽鎖可変領域は、配列番号4、配列番号8及び配列番号12から選択されるアミノ酸配列を有し；

又は

重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号21であり、及び／又は、軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号23であり；

又は

重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号25であり、及び／又は、軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号27である。

【0019】

いくつかの実施形態において、前記モノクローナル抗体は、以下の(1)～(7)から選択される： 10

(1) 重鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号2に示され、軽鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号4に示される(5C10)；

(2) 重鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号6に示され、軽鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号8に示される(5C10H1L1)；

(3) 重鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号10に示され、軽鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号12に示される(5C10H2L2又は5C10H2L2-IgG1mt)；

(4) 重鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号6に示され、軽鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号12に示される(5C10H1L2)； 20

(5) 重鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号10に示され、軽鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号8に示される(5C10H2L1)；

(6) 重鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号21に示され、軽鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号23に示される(5F10)；

(7) 重鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号25に示され、軽鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号27に示される(9F6)。

【0020】

いくつかの実施形態において、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb、相補性決定領域断片、一本鎖抗体(例えば、scFv)、ヒト化抗体、キメラ抗体若しくはダイアボディから選択される。 30

【0021】

いくつかの実施形態において、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、100nM未満、例えば、10nM、1nM、0.9nM、0.8nM、0.7nM、0.6nM、0.5nM、0.4nM、0.3nM、0.2nM、0.1nM未満若しくはより小さいEC₅₀でPD L-1に結合し、EC₅₀は間接ELISA法により決定されることが好ましい。

【0022】

いくつかの実施形態において、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片であって、モノクローナル抗体は非CDR領域を含み、非CDR領域はマウス以外の種、例えば、ヒト抗体から得られる。 40

【0023】

モノクローナル抗体の定常領域は、ヒトIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4の定常領域から選択されることが好ましく；

モノクローナル抗体の定常領域は、変異したヒトIgG1定常領域であることが好ましく；変異したヒトIgG1定常領域は、EU付番方式に従って234、235及び237位に1つ、2つ又は3つの突然変異を有し、突然変異は、L234A、L235A及びG237Aから選択されることがより好ましい。

【0024】

いくつかの実施形態において、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片であり、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ細胞株LT005により産生され、ハイブリドーマ細胞 50

胞株 L T 0 0 5 は、中国タイプカルチャーコレクションセンター（C C T C C）に寄託されており、受託番号は、C C T C C C 2 0 1 5 1 3 3 である。

【0 0 2 5】

本発明の別の態様は、抗体の重鎖可変領域をコードしているヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子 A に関し：

前記抗体は、配列番号 1 5 ～ 1 7 に規定される C D R を含む重鎖可変領域を有し、

前記抗体の重鎖は、配列番号 2、配列番号 6 又は配列番号 1 0 のアミノ酸配列を有することが好ましく；

前記核酸分子は、配列番号 1、配列番号 5 又は配列番号 9 のヌクレオチド配列を有することがより好ましい。

10

【0 0 2 6】

本発明の別の実施形態において、前記抗体は、配列番号 2 9 ～ 3 1 に規定される C D R を含む重鎖可変領域を有し、

前記抗体の重鎖は、配列番号 2 1 のアミノ酸配列を有することが好ましく、

前記核酸分子は、配列番号 2 2 のヌクレオチド配列を有することがより好ましい。

【0 0 2 7】

本発明の別の実施形態において、前記抗体は、配列番号 3 5 ～ 3 7 に規定される C D R を含む重鎖可変領域を有し、

前記抗体の重鎖は、配列番号 2 5 のアミノ酸配列を有することが好ましく、

前記核酸分子は、配列番号 2 6 のヌクレオチド配列を有することがより好ましい。

20

【0 0 2 8】

本発明の更に別の態様は、抗体の軽鎖可変領域をコードしているヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子 B に関し：

前記抗体は、配列番号 1 8 ～ 2 0 に規定される C D R を含む軽鎖可変領域を有し、

前記抗体の軽鎖は、配列番号 4、配列番号 8 又は配列番号 1 2 のアミノ酸配列を有することが好ましく；

前記核酸分子は、配列番号 3、配列番号 7 又は配列番号 1 1 のヌクレオチド配列を有することがより好ましい。

【0 0 2 9】

本発明の別の実施形態において、前記抗体は、配列番号 3 2 ～ 3 4 に規定される C D R を含む軽鎖可変領域を有し、

前記抗体の軽鎖は、配列番号 2 3 のアミノ酸配列を有することが好ましく、

前記核酸分子は、配列番号 2 4 のヌクレオチド配列を有することがより好ましい。

30

【0 0 3 0】

本発明の別の実施形態において、前記抗体は、配列番号 3 8 ～ 4 0 に規定される C D R を含む軽鎖可変領域を有し、

前記抗体の軽鎖は、配列番号 2 7 のアミノ酸配列を有することが好ましく、

前記核酸分子は、配列番号 2 8 のヌクレオチド配列を有することがより好ましい。

【0 0 3 1】

本発明の更に別の態様は、前の核酸分子 A 及び核酸分子 B を含む単離された核酸分子 C に関し；任意選択で、核酸分子 C は、核酸分子 A 及び核酸分子 B を接続するためのリンカー配列を更に含む。

40

【0 0 3 2】

本発明の更に別の態様は、単離された核酸分子 A、単離された核酸分子 B 又は単離された核酸分子 C を含むベクターに関する。

【0 0 3 3】

本発明の更に別の態様は、単離された核酸分子 A、単離された核酸分子 B 若しくは単離された核酸分子 C、又はベクターを含む宿主細胞に関する。

【発明の効果】

【0 0 3 4】

50

本においてモノクローナル抗体5C10は、PD L-1に特異的に結合し、PD L-1がPD-1と相互作用することを非常に効果的に遮断し、PD L-1による免疫系に対する免疫抑制を特異的に除去し、Tリンパ球を活性化することができる。

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図1】PD L-1 E C D-m F c融合タンパク質のSDS-PAGE分析を示す図である。左から右にサンプル及びそのロード量：マーカー（10 μ L）；クロマトグラフィーカラムにロードしたサンプル（10 μ L）；通過画分（10 μ L）；溶出（10 μ L）。

【図2】PD-1-h F c融合タンパク質のSDS-PAGE分析を示す図である。左から右にサンプル及びそのロード量：クロマトグラフィーカラムにロードしたサンプル（10 μ L）；マーカー（10 μ L）。

10

【図3】B7-1-h F c融合タンパク質のSDS-PAGE分析を示す図である。左から右にサンプル及びそのロード量：クロマトグラフィーカラムにロードしたサンプル（10 μ L）；マーカー（10 μ L）。

【図4】抗体5C10のSDS-PAGE分析を示す図である。左から右にサンプル及びそのロード量：マーカー（10 μ L）；還元タンパク質サンプル（1 μ g）；クロマトグラフィーカラムの通過画分；非還元タンパク質サンプル（1 μ g）。

【図5】5C10H1L1（5C10のヒト化抗体）のSDS-PAGE分析を示す図である。左から右にサンプル及びそのロード量：マーカー（10 μ L）；クロマトグラフィーカラムの溶出（10 μ L）；通過画分（10 μ L）；クロマトグラフィーカラムにロードしたサンプル（10 μ L）。

20

【図6】5C10H1L2（5C10のヒト化抗体）のSDS-PAGE分析を示す図である。左から右にサンプル及びそのロード量：マーカー（10 μ L）；クロマトグラフィーカラムの溶出（10 μ L）；通過画分（10 μ L）；クロマトグラフィーカラムにロードしたサンプル（10 μ L）。

【図7】5C10H2L1（5C10のヒト化抗体）のSDS-PAGE分析を示す図である。左から右にサンプル及びそのロード量：マーカー（10 μ L）；クロマトグラフィーカラムの溶出（10 μ L）；通過画分（10 μ L）；クロマトグラフィーカラムにロードしたサンプル（10 μ L）。

【図8】5C10H2L2（5C10のヒト化抗体）のSDS-PAGE分析を示す図である。左から右にサンプル及びそのロード量：マーカー（10 μ L）；クロマトグラフィーカラムの溶出（10 μ L）；通過画分（10 μ L）；クロマトグラフィーカラムにロードしたサンプル（10 μ L）。

30

【図9】PD L-1に対する抗体5C10H2L2の結合動態パラメーターを示す図である。

【図10】PD L-1に対する抗体H p L pの結合動態パラメーターを示す図である。

【図11】PD L-1に対する抗体P C A Bの結合動態パラメーターを示す図である。

【図12】抗体5C10、5C10H2L2及びH p L pによるPD L-1がPD-1と相互作用することの遮断を示す図である（フォルテバイオ）。

【図13】PD L-1陽性293T細胞に対する5C10H1L1の結合を示す図である。

40

【図14】PD L-1陽性293T細胞に対する5C10H1L2の結合を示す図である。

【図15】PD L-1陽性293T細胞に対する5C10H2L1の結合を示す図である。

【図16】PD L-1陽性293T細胞に対する5C10H2L2の結合を示す図である。

【図17】PD L-1陽性293T細胞に対するH p L pの結合を示す図である。

【図18】PD L-1陽性293T細胞に対するP C A Bの結合を示す図である。

【図19】間接ELISAによるヒトPD L-1組換えタンパク質に対する5C10H1

50

L 1、5 C 1 0 H 1 L 2、5 C 1 0 H 2 L 2 又は 5 C 1 0 H 2 L 1 の結合を示す図である。

【図 2 0】間接 E L I S A によるサル P D L - 1 組換えタンパク質に対する 5 C 1 0 H 2 L 2 又は H p L p の結合を示す図である。

【図 2 1】E L I S A によるヒト P D L - 1、ヒト P D L - 2 又はマウス P D L - 1 組換えタンパク質に対する 5 C 1 0 H 2 L 2 の結合を示す図である。

【図 2 2】5 C 1 0 H 1 L 1、5 C 1 0 H 1 L 2、5 C 1 0 H 2 L 2 又は 5 C 1 0 H 2 L 1 が、P D L - 1 に対する結合について P D - 1 と競合したことを示す図である（競合 E L I S A）。

【図 2 3】5 C 1 0 H 2 L 2 が、P D L - 1 に対する結合について B 7 - 1 と競合したことを示す図である（競合 E L I S A）。 10

【図 2 4】5 C 1 0 H 2 L 2 が、P D L - 1 が P D - 1 と相互作用することを遮断することにより I F N - γ 分泌を増加させたことを示す図である。

【図 2 5】5 C 1 0 H 2 L 2 が、P D L - 1 が P D - 1 と相互作用することを遮断することにより I L - 2 分泌を増加させたことを示す図である。

【図 2 6 A】ビアコアによる F c γ R I I I a に対する 5 C 1 0 H 2 L 2 - I g G 1 m t の結合親和性及び動的定数を示す図である。

【図 2 6 B】ビアコアによる F c γ R I I I a に対するテセントリク（登録商標）（T e c e n t r i q）の結合親和性及び動的定数を示す図である。

【図 2 7 A】ビアコアによる C 1 q に対する 5 C 1 0 H 2 L 2 - I g G 1 m t の結合親和性及び動的定数を示す図である。 20

【図 2 7 B】ビアコアによる C 1 q に対するテセントリク（登録商標）の結合親和性及び動的定数を示す図である。

【図 2 8】非小細胞肺癌細胞に対する 5 C 1 0 H 2 L 2 - I g G 1 m t の治癒効果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0 0 3 6】

用語「単離された核酸分子 A」「単離された核酸分子 B」又は「単離された核酸分子 C」に関して、文字 A、B 若しくは C は、明快さ又は区別する目的だけに使用され、文字自体に特別な意味はない。 30

【0 0 3 7】

本発明の更に別は、上述のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片を調製する方法に関し、適切な条件下で本発明の宿主細胞を培養するステップと、細胞培養物からモノクローナル抗体又はその抗原結合断片を回収するステップとを含む。

【0 0 3 8】

本発明の更に別の態様は、中国タイプカルチャーコレクションセンター（C C T C C）に寄託されており、受託番号が、C C T C C C 2 0 1 5 1 3 3 であるハイブリドーマ細胞株 L T 0 0 5 に関する。

【0 0 3 9】

本発明の別の態様は、ハイブリドーマ細胞株 L T 0 0 5 により分泌される抗体若しくは断片の抗原エпитープに競合結合できるモノクローナル抗体又はその抗原結合断片に関する。抗体又はその抗原結合断片は、 40

P D - 1 又は B 7 - 1 に結合する P D L - 1 を遮断する薬物、

P D L - 1 活性又は P D L - 1 レベルを調節する（例えば下方調節）薬物、

P D - 1 又は P D L - 1 による身体免疫抑制を除去する薬物、又は

T リンパ球における I F N - γ 及び／又は I L - 2 の発現を強化する薬物の活性のいずれか 1 つを有することが好ましい。

【0 0 4 0】

本発明の更に別の態様は、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片及びカップリング部分を含むコンジュゲートに関し、モノクローナル抗体は、本発明に記述されるモノクロ 50

ーナル抗体又はその抗原結合断片のいずれか1つであり、カップリング部分は検出可能な標識であり、カップリング部分はラジオアイソトープ、蛍光物質、発光物質、着色物質又は酵素であることが好ましい。

【0041】

本発明の更に別の態様は、モノクローナル抗体若しくはその抗原結合断片、又は前に上述したコンジュゲートを含むキットに関する；

キットは、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片を特異的に認識する二次抗体を更に含むことが好ましく；任意選択で、二次抗体は、ラジオアイソトープ、蛍光物質、発光物質、着色物質又は酵素など検出可能な標識で標識されている。

【0042】

本発明の更に別の態様は、キットの製造における前記モノクローナル抗体若しくはその抗原結合断片又はそのコンジュゲートの使用に関し、前記キットを使用してサンプル中のPD L-1の存在又はレベルを検出する。

【0043】

本発明の更に別の態様は、本発明のモノクローナル抗体若しくはその抗原結合断片又はコンジュゲートを含み、任意選択で、薬学的に許容可能な担体及び／又は賦形剤を更に含む医薬組成物に関する。

【0044】

本発明の更に別の態様は、腫瘍若しくは貧血の防止及び／又は処置及び／又は補助療法及び／又は診断用の医薬の製造における本発明のモノクローナル抗体若しくはその抗原結合断片又はコンジュゲートの使用に関し；前記腫瘍は、乳がん、非小細胞肺がんなどの肺がん、肝臓がん、胃がん、大腸がん又は直腸がんなどの結腸直腸がん、食道がん、卵巣がん、子宮頸がん、腎臓がん、前立腺がん、膀胱がん、膵臓がん、膠腫、黒色腫及び白血病から選択されることが好ましい。

【0045】

本発明の更に別の態様は、

PD-1又はB7-1に結合するPD L-1を遮断するための薬物、

PD L-1活性又はPD L-1レベルを調節（例えば下方調節）するための薬物、

PD-1又はPD L-1による免疫抑制を除去するための薬物、又は

Tリンパ球によるIFN- γ 及び／又はIL-2の発現を強化するための薬物

の製造における本発明のモノクローナル抗体若しくはその抗原結合断片又はコンジュゲートの使用に関する。

【0046】

本発明の更に別の態様は、本発明モノクローナル抗体若しくはその抗原結合断片又はコンジュゲートの有効量を細胞に投与するステップを含むin vivo又はin vitro方法に関し、前記方法は：

PD-1又はB7-1に結合するPD L-1を遮断する方法、

PD L-1活性又はPD L-1レベルを調節（例えば下方調節）する方法、

PD-1又はPD L-1による免疫抑制を除去する方法、又は

Tリンパ球におけるIFN- γ 及び／又はIL-2の発現を強化する方法である。

【0047】

本発明の一実施形態において、前記方法は、治療目的でない。

【0048】

本発明の更に別の態様は、本発明のモノクローナル抗体若しくはその抗原結合断片又はコンジュゲートの有効量を対象に投与するステップを含む腫瘍又は貧血の処置及び／若しくは予防の方法に関し；腫瘍は、乳がん、非小細胞肺がんなどの肺がん、肝臓がん、胃がん、大腸がん又は直腸がんなどの結腸直腸がん、食道がん、卵巣がん、子宮頸がん、腎臓がん、前立腺がん、膀胱がん、膵臓がん、膠腫、黒色腫及び白血病から選択されることが好ましい。

【0049】

本発明において、特に明記しない限り、本発明において使用される科学的及び技術的な用語は、当業者により一般に理解される意味を有するものとする。加えて、本発明において使用される細胞培養、分子遺伝学、核酸化学及び免疫学関連実験室手順は、関連分野において使用される一般的な手順である。同時に、本発明をより良く理解するために、関連用語の定義及び解釈を以下に提供する。

【0050】

本発明では、全長PDL-1タンパク質、又はPDL-1の細胞外ドメイン（PDL-1ECD）若しくはPDL-1ECDを含有する断片を含めたPDL-1タンパク質（プログラム死ーリガンド1、NCBI GenBank ID: NP_054862.1）のアミノ酸配列を指す場合；PDL-1ECDの融合タンパク質、例えば、マウス又はヒト由来IgG Fc（mFc又はhFc）と融合された断片も含まれる。更に、当業者に理解される通り、PDL-1タンパク質は、アミノ酸配列の突然変異が生物学的機能に影響を及ぼすことなく天然又は人工的に導入されている（置きかえ、欠失及び／又は追加を含むがそれだけに限定されない）タンパク質も含むことになる。従って、本発明において、用語「PDL-1タンパク質」は、上の配列リスト及びその天然又は人工的バリエーションを含めたそのような配列全てを含むべきである。加えて、PDL-1タンパク質の配列断片を指す場合、その断片は、上の配列断片だけでなく、天然又は人工的なバリエーションの対応する配列断片も意味する。

10

【0051】

用語EC₅₀は、最大効果の50%の濃度、即ち最大効果の50%を生じ得る濃度を指すために本明細書で使用される。

20

【0052】

用語「抗体」は、2対のポリペプチド鎖（「軽」（L）鎖及び「重」（H）鎖による各対）から通常構成される免疫グロブリン分子を指すために本明細書で使用される。抗体軽鎖は、κ及びλ鎖に分類することができる。重鎖は、μ、δ、γ、α又はεに分類することができる。対応する抗体はそれぞれIgM、IgD、IgG、IgA及びIgEと定義される。軽及び重鎖において、可変及び定常領域は、約12又はより多くのアミノ酸の「J」領域により連結されており、重鎖は、約3又はより多くのアミノ酸の「D」領域も含む。各重鎖は、重鎖可変領域（V_H）及び重鎖定常領域（C_H）からなる。重鎖定常領域は、3つのドメイン（C_{H1}、C_{H2}及びC_{H3}）からなる。各軽鎖は、軽鎖可変領域（V_L）及び軽鎖定常領域（C_L）からなる。軽鎖定常領域は、1つのドメイン（C_L）からなる。抗体の定常領域は、免疫系の様々な細胞（例えばエフェクター細胞）及び古典的な補体系の第1成分（C1q）を含めた宿主組織又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及びV_L領域は、高度な可変領域（相補性決定領域、CDRと呼ばれる）及びCDR間に分布するフレームワーク（FR）と呼ばれる保存領域に更に細分することができる。各V_H及びV_Lは、アミノ末端からカルボキシル末端にFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順序で配置される3つのCDR及び4つのFRからなる。重鎖及び軽鎖の可変領域（V_H及びV_L）は、抗原結合部位を形成する。各領域又はドメインのアミノ酸の割当ては、免疫学的対象のタンパク質のKabat配列（Kabat sequences of proteins of immunological interest）（米国国立衛生研究所、Bethesda, Md. [1987年及び1991年]）、又はChothia及びLesk（J. Mol. Biol. 196: 901~917頁 [1987年]；Chothiaら、Nature 342: 878~883頁 [1989年]）の定義に従った。用語「抗体」は、どんな特定の抗体生成方法にも限定されない。例えば、抗体には、特に、組換え抗体、モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体がある。抗体は、異なるアイソタイプ若しくはサブアイソタイプ、例えば、IgG（例えば、IgG1、IgG2、IgG3又はIgG4サブタイプ）、IgA1、IgA2、IgD、IgE又はIgM抗体であることができる。

30

40

【0053】

用語、抗体の「抗原結合断片」は、全長抗体断片を含有するポリペプチドを指すために

50

本明細書で使用され、抗原結合断片は、全長抗体と同じ抗原に特異的に結合する能力を維持しており、及び／又は抗原特異的結合について全長抗体と競合し、「抗原結合部分」としても公知である。Fundamental Immunology、第7章（Paul, W. 編、第2版、Raven Press、N. Y. [1989年]）のテキストにしばしば見られるそれは、全ての目的のために参照により本発明に統合される。抗原結合断片は、組換えDNA技術又は完全な抗体の酵素的若しくは化学的切断により産生することができる。いくつかの場合において、抗原結合断片には、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb、及び相補性決定領域（CDR）断片、一本鎖抗体断片（例えば、scFv）、キメラ抗体、ダイアボディ並びに抗体の抗原特異的結合能を付与するのに十分なポリペプチドの少なくとも一部を含むようなポリペプチドがある。

10

【0054】

本発明に使用される通り、用語「Fd断片」は、V_H及びC_H1ドメインからなる抗体断片を意味し；用語「Fv断片」は、抗体の一本鎖V_L及びV_Hドメインからなる抗体断片を意味し；用語「dAb断片」は、V_Hドメインからなる抗体断片を意味し（Wardら、Nature 341:544～546頁[1989年]）；用語「Fab断片」は、V_L、V_H、C_L及びC_H1ドメインからなる抗体断片を意味し；用語「F(ab')₂断片」は、ヒンジ領域においてジスルフィド結合ブリッジによって接続されている2つのFab断片を含有する抗体断片を意味する。

【0055】

いくつかの場合において、抗体の抗原結合断片は、一本鎖抗体（例えば、scFv）であり、一本鎖抗体のV_L及びV_Hドメインは、単一ポリペプチド鎖を形成するためのリンカーにより一価の分子を形成する（参照については、例えばBirdら、Science 242:423～426頁[1988年]及びHustonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879～5883頁[1988年]）。そのようなscFv分子は、一般構造：NH₂-V_L-リンカー-V_H-COOH又はNH₂-V_H-リンカー-V_L-COOHを有することができる。リンカーの最近の適切な技術は、反復GGGGSアミノ酸配列又はそのバリエーションで作製される。例えば、（GGGGS）₄、しかしそのバリエーションも使用され得る（Holligerら、[1993年]、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444～6448頁）。本発明において使用できる他のリンカーについては、Alfthanら、（1995年）、Protein Eng. 8:725～731頁、Choiら、（2001年）Eur. J. Immunol. 31:94～106頁、Huら、（1996年）、Cancer Res. 56:3055～3061頁、Kipriyanovら、（1999年）、J. Mol. Biol. 293:41～56頁、及びRooversら、（2001年）、Cancer Immunol. に記述されている。

20

30

【0056】

いくつかの場合において、抗体の抗原結合断片は、ダイアボディ、即ち、二価抗体であり、V_H及びV_Lは単一ポリペプチド鎖で発現され、しかしながら、非常に短いリンカーを使用して同じ鎖の2つのドメインの対合が防止され、従って、ドメインは、他の鎖の相補的ドメインと対にならざるを得ず、2つの抗原結合部位が形成される（参照については、例えば、Holliger P. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444～6448頁[1993年]及びPoljak R. J. ら、Structure 2:1121～1123頁[1994年]）。

40

【0057】

他の場合において、抗体抗原結合断片は、「二重特異性抗体」であり、第1の抗体（断片）及び第2の抗体（断片）又はカップリングアームによりカップリングされた抗体模倣体により定義され、カップリング方法には、化学反応、遺伝子融合及び酵素反応があるがこれに限定されない。抗体抗原結合断片は、三重特異性抗体及び四重特異性抗体などの「多重特異性抗体」であることができ、前者は3つの異なる抗原に特異的に結合することができ、後者は4つの異なる抗原に特異的に結合することができる。例えば、CN第104

50

341529A号の場合のように設計されたアンキリンリピートタンパク質（DARPin）が、IgG抗体、scFv-Fc抗体断片と；国際公開第2015141862号A1の場合のように、抗-IL-17aフィノマーが、抗-IL-6R抗体と連結又は合体している。

【0058】

他の場合において、抗体抗原結合断片は、「二重特異性抗体コンジュゲート」であり、第1の抗体（断片）及びカップリングアームによりカップリングされた第2の生物学的機能断片（抗体でもその模倣体でもない）により定義され、カップリング方法には、化学反応、遺伝子融合及び酵素反応があるがこれに限定されず、第2の生物学的機能断片には、結合活性があるペプチド、タンパク質、ポリエチレングリコール（PEG）、放射性核種、核酸、小分子毒素、受容体又はリガンド、等があり、コンジュゲートは、各断片の活性を保持しており、従って二重機能／二重特異性である。

10

【0059】

抗原結合断片（例えば、上記抗体断片）は、当業者に公知の従来通りの技術（例えば、組換えDNA又は酵素的若しくは化学的切断方法）により所与の抗体（例えば、本発明における5C10、5C10H1L1、5C10H1L2、5C10H2L1及び5C10H2L2）から得ることができ、完全抗体と同じ特異的スクリーニング方法を抗原結合断片に適用することができる。

【0060】

本発明において、特に言及しない限り、用語「抗体」は、完全抗体だけでなく、抗体の抗原結合断片も含む。

20

【0061】

用語「mAb」及び「モノクローナル抗体」は、高度に相同な群内の抗体又は抗体分子の断片を指すために本明細書で使用され、自然突然変異が起こらない限り、それは同一抗体分子の一群である。モノクローナル抗体は、抗原上の単一のエピトープに対して高度に特異的である。ポリクローナル抗体は、モノクローナル抗体とは異なり、ポリクローナル抗体は、同じ抗原上の異なるエピトープを認識する少なくとも2つ又はより多くの異なる抗体を通常含有している。モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ技術により通常得ることができ、その技術は、Kohlerら（Nature、256：495頁、1975年）によって初めて報告されたが、組換えDNA技術により得ることもできる（米国特許第4,816,567号も参照のこと）。

30

【0062】

用語「キメラ抗体」は、軽鎖及び／又は重鎖の部分がある抗体（特定の種から得ることができる又は特定の抗体クラス若しくはサブクラスに属している）由来であり、軽鎖及び／又は重鎖の他の部分が別の抗体（同じ若しくは異なる種から得ることができる又は同じ若しくは異なる抗体クラス若しくはサブクラスに属している）由来であり、にもかかわらず、標的抗原に対する結合活性をなお保持している抗体を指すために本明細書で使用する（Cabillyら、に対する米国特許第4,816,567号；Morrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、81：6851～6855頁〔1984年〕）。

40

【0063】

用語「ヒト化抗体」は、CDRの全部又は一部が非ヒト抗体（ドナー抗体）由来のCDR領域によって置き換えられているヒト免疫グロブリン（アクセプター抗体）を指すために本明細書で使用され、ドナー抗体は、期待される特異性、親和性又は反応性を持つ非ヒト（例えば、マウス、ラット又はウサギ）抗体であり得る。加えて、アクセプター抗体のフレームワーク領域（FR）のアミノ酸残基を、非ヒト抗体由来のアミノ酸又は他の抗体のアミノ酸によって置き換えて、抗体の性能を更に改善することができる。ヒト化抗体に関するより詳細については、例、Jonesら、Nature、321：522～525頁（1986年）；Reichmannら、Nature、332：323～329頁（1988年）；Presta、Curr. Op. Struct. Biol. 2：593～

50

596頁(1992年) ; 及びClark、Immunol. Today 21:397～402頁(2000年)を参照のこと。

【0064】

ヒト化の方法は、ヒト化のために一般に使用される方法の1つ又は複数の組み合わせに基づく。例えば、下記の方法を使用する。

【0065】

ヒト化は、CDR移植によって認識され得る。この方法において、マウス抗体のCDR領域がまず決定され、次いでマウス重鎖及び軽鎖の6つのCDRが、マウスFR領域に高い相同性を持つヒト供給源鋳型へ移植された。ヒト供給源鋳型は、IMGTデータベースから得られる生殖細胞株配列など、元の生殖細胞株配列(生殖細胞株)から選択することができ、Gene bankから得られる抗体配列など、成熟した抗体配列から選択することもできる。復帰変異を、CDR移植抗体に導入することができる。ヒト鋳型のいくつかのアミノ酸をマウス鋳型のアミノ酸に復帰変異させて、抗体の親和性を改善することができる。

10

【0066】

ヒト化は、SDR移植によっても認識され得る。この方法において、マウス抗体のSDR領域を、まず決定する必要がある。SDR領域は、アラニンスキャニングなどの方法によって決定することができる。次いで、マウスSDR領域が、マウス鋳型に高い相同性を持つヒト鋳型へ移植された。ヒト供給源鋳型は、IMGTデータベースから得られる生殖細胞株配列など、元の生殖細胞株配列(生殖細胞株)から選択することができ、Gene bankから得られる抗体配列など、成熟した抗体配列から選択することもできる。復帰変異を、SDR移植抗体に導入することができる。ヒト鋳型のいくつかのアミノ酸をマウス鋳型のアミノ酸に復帰変異させて、抗体の親和性を改善することができる。Tamura, M.、D. E. Milenic、M. Iwahashi、E. Padlan、J. Schlom及びS. V. Kashmiri: Structural correlates of an anti-carcinoma antibody: identification of specificity determining residues (SDRs) and development of a minimally immunogenic antibody variant by retention of SDRs only.、J. Immunol. 164、1432～41頁(2000年)。

20

30

【0067】

ヒト化は、表面再建によっても認識され得る。この方法において、マウス抗体モデルが、コンピュータ相同性モデリング又はタンパク質結晶構造分析により得られる場合がある。抗体表面上のアミノ酸を、本モデルによって決定することができ、これらのアミノ酸が、ヒト抗体の対応するアミノ酸に突然変異された。同じ部位で頻度の高いヒト抗体のアミノ酸を、選択することができる。Padlan, E. A. : A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand-binding properties.、Mol. Immunol. 28、489～98頁(1991年)。

40

【0068】

ヒト化はまた、超ヒト化によっても認識され得る。この方法において、マウス抗体のCDR領域がまず決定され、次いで6つのCDRに高い相同性を持つヒト配列を、6つのマウスCDRが移植される鋳型として選んだ。ヒト供給源鋳型は、IMGTデータベースから得られる生殖細胞株配列など、元の生殖細胞株配列(生殖細胞株)から選択することができ、Gene bankから得られる抗体配列など、成熟した抗体配列から選択することもできる。復帰変異を、CDR移植抗体に導入することができる。ヒト鋳型のいくつかのアミノ酸をマウス鋳型のアミノ酸に復帰変異させて、抗体の親和性を改善することができる。Tan, P.、D. A. Mitchell、T. N. Buss、M. A. Holmes

50

、C. Anasetti及びJ. Foote: "Superhumanized" antibodies: reduction of immunogenic potential by complementarity determining region grafting with human germline sequences: application to an anti-CD28.、J. Immunol. 169、1119～25頁(2002年)。

【0069】

用語「分離する」又は「分離した」とは、天然の状態では人工的な手段による何かの獲得のことを指す。いわゆる「分離した」物質若しくは成分が天然に存在する場合、それは、置かれている物質若しくは成分が変化した、又は物質若しくは成分が自然環境下で分離した、又は両方の事例が起こった自然環境であり得る。例えば、生きている動物において、分離されていない天然のポリヌクレオチド又はポリペプチドが存在し、高純度の同じポリヌクレオチド又はポリペプチドをこの天然の状態下で単離する過程を、分離と呼ぶ。用語「分離する」又は「分離した」は、人工又は合成物質の存在を除外せず、活性に影響を及ぼさない他の不純物の存在を除外しない。

【0070】

用語「ベクター」は、ポリヌクレオチドを挿入することができる核酸媒体を指すために本明細書で使用される。発現ベクターは、挿入したポリヌクレオチドにコードされているタンパク質を発現することができるベクターである。ベクターは、形質転換、形質導入又はトランスフェクションにより宿主細胞に導入されて、宿主細胞において運ばれた遺伝的エレメントを発現することができる。ベクターは、当業者に周知であり：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)又はP1由来人工染色体(PAC)などの人工染色体；λファージ又はM13ファージなどのファージ及び動物ウイルスがあるがこれに限定されない。ベクターとして使用できる動物ウイルスには、それだけには限らないが、レトロウイルス(レンチウイルスを含める)、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス(単純ヘルペスウイルスなど)、ポックスウイルス、バキュロウイルス、パピローマウイルス、パポバウイルス(SV40など)がある。ベクターは、プロモーター配列、転写開始配列、エンハンサー配列、選択エレメント及びレポーター遺伝子を含むがこれに限定されない様々な発現制御エレメントを含有することができる。加えて、ベクターは複製起点を含有することもできる。

【0071】

用語「宿主細胞」は、大腸菌(*Escherichia coli*)若しくは枯草菌(*Bacillus subtilis*)などの原核生物細胞、酵母細胞若しくはアスペルギルス(*Aspergillus*)などの真菌細胞、ショウジョウバエ細胞S2若しくはSf9などの昆虫細胞、又は繊維芽細胞、CHO細胞、COS細胞、NS0細胞、HeLa細胞、BHK細胞、HEK293細胞若しくはヒト細胞などの動物細胞を含むがこれに限定されないベクター導入に使用し得る細胞を指すために本明細書で使用される。

【0072】

用語「特異的結合」は、抗体とその標的抗原の間の反応など、2つの分子間のランダムではない結合反応を指すために本明細書で使用される。いくつかの実施形態において、抗原に対する抗体の特異的結合(又は抗原に対して特異性がある抗体)は、抗原に対して 10^{-5} M未満、例えば、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M未満又はいっそう小さい結合親和性(K_D)を持つ抗体を指すために本明細書で使

【0073】

用語「 K_D 」は、特定の抗体-抗原相互作用の解離平衡定数を指すために本明細書で使

10

20

30

40

50

相互作用検出器により測定して 10^{-5} M未満、例えば、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M未満又はいっそう小さい K_D で抗原（例えばPDL-1タンパク質）に結合する。

【0074】

用語「モノクローナル抗体」及び「mAb」は、同じ意味を有し、互換的に使用される；用語「ポリクローナル抗体」及び「pAb」は、同じ意味を有し、交換可能に使用される；用語「ポリペプチド」及び「タンパク質」は、同じ意味を有し、互換的に使用される。また、本発明において、アミノ酸は、本技術分野において受け入れられている1文字又は3文字の省略形により通常表される。例えば、アラニンはA又はAlaで表すことができる。

10

【0075】

用語「ハイブリドーマ」及び「ハイブリドーマ細胞株」は互換的に使用され、用語「ハイブリドーマ」及び「ハイブリドーマ細胞株」について言及する場合、その用語は、ハイブリドーマのサブクローン及び後代細胞も含む。例えば、ハイブリドーマ細胞株LT005について言及する場合、その用語は、ハイブリドーマ細胞株LT005のサブクローン及び後代細胞を指すためにも本明細書で使用される。

【0076】

用語「薬学的に許容される媒体及び／若しくは賦形剤」は、薬学及び／又は生理学においてレシipient及び有効成分に適合する媒体及び／若しくは賦形剤を指すために本明細書で使用され、上記媒体及び／若しくは賦形剤は、本技術分野において周知であり（例、Remington's Pharmaceutical Sciences, Genaro AR編、第19版、Pennsylvania:Mack Publishing Company、1995年を参照のこと）、pH変調物質、界面活性剤、アジュバント、イオン強度エンハンサーがあるがこれに限定されない。例えば、pH変調物質には、リン酸緩衝食塩水があるがこれに限定されない；界面活性剤には、陽イオン性、陰イオン性又はTween-80などの非イオン性界面活性剤があるがこれに限定されない；イオン強度エンハンサーには、塩化ナトリウムがあるがこれに限定されない。

20

【0077】

用語「アジュバント」は、抗原に対する免疫応答を強化する又は事前に若しくは抗原と一緒に身体に送達された場合に免疫応答の型を変化させる非特異的免疫刺激剤を指すために本明細書で使用される。アルミニウムアジュバント（例えば、水酸化アルミニウム）、フロイントアジュバント（例えば完全フロイントアジュバント及び不完全フロイントアジュバント）、コリネバクテリウム・パルヴム（Corynebacterium parvum）、リポ多糖、サイトカイン等を含むがこれに限定されない多くの種類のアジュバントが存在する。フロイントアジュバントは、動物実験において最も一般的に使用されるアジュバントである。水酸化アルミニウムアジュバントは、臨床試験においてより頻繁に使用されている。

30

【0078】

用語「有効量」は、所望の効果を得る又は少なくともいくらか得るのに十分な量を指すために本明細書で使用される。例えば、腫瘍などの疾患を防止する有効量とは、腫瘍などの疾患の発症を防止、阻害、又は遅延させるのに十分な量を指すために本明細書で用いられる；疾患を処置する有効量は、疾患及びその合併症を治癒する又は患者がそうなるのを少なくとも部分的に阻害するのに十分な量を指すために本明細書で用いられる。そのような有効量の決定は、当業者の技能範囲内である。例えば、疾患を処置する有効量は、重症度、患者の免疫系全体の状態、年齢、体重及び性別など患者の全身状態、薬物送達、更には同時に適用されている他の処置によって決まることになる。

40

【実施例】

【0079】

生物材料の保存の説明

ハイブリドーマ細胞LT005は、2015年8月4日に受託番号CCTCC C20

50

15133でWuhan大学（郵便番号：430072）の中国タイプカルチャーコレクションセンター（CCTCC）に寄託された。

【0080】

以下の例は、当業者に本発明の方法並びに組成物をどのように製作し、使用するかの完全な開示及び説明を提供するために提示するものであり、本発明者らが発明と考えるものの範囲を限定しないものとする。例に示されていない技術又は条件は、文献若しくは製品仕様に従って実施され得る。製造業者が示されていない試薬又は機器は、市場から購入することができる従来通りの製品である。

【0081】

本発明において使用したBALB/cマウスは、広東省医学実験動物センターから購入された。本発明において使用したT細胞は、Akeso Biopharma Co., Ltd. 製であった。

【0082】

調製例1：組換えタンパク質PDL-1ECD-mFc

1. PDL-1ECD-mFcの遺伝子合成

キメラ遺伝子を、PDL-1ECDと命名したPDL-1（プログラム細胞死1リガンド1、NCBI GenBank ID：NP_054862.1）の細胞外ドメイン及びマウスIgGのFc断片（mFc）を含むように設計した。293F細胞における標的遺伝子の発現効率を改善するために、ヌクレオチド配列をコドン最適化し、GenScript Biotech Co., Ltdで合成した。科学文献において、PDL-1及びPD-L1は互換的に使用することができ、本発明はPDL-1の使用に統一した。

【0083】

2. pUC57simple-PDL-1ECD-mFcプラスミドの生成

GenScript Biotech Co., Ltdで合成したPDL-1ECD-mFc融合遺伝子を、発現ベクターpUC57simple（GenScript Biotech Co., Ltdにより供給されている）にクローニングして、pUC57simple-PDL-1ECD-mFcプラスミドを得た。

【0084】

3. pcDNA3.1-PDL-1ECD-mFcの組換えプラスミドの構築

プラスミドpUC57simple-PDL-1ECD-mFcを、酵素消化（XbaI及びBamHI）、次いで電気泳動に供した。回収したPDL-1ECD-mFc遺伝子断片を、ライゲーションによりpcDNA3.1発現ベクター（Invitrogenから購入した）にクローニングして、pcDNA3.1-PDL-1ECD-mFcプラスミドを得た。ライゲーション産物を、使用説明書に従って大腸菌DH5a株（TIANGEN BIOTECH CO. LTD. から購入した）に次いで形質転換した。陽性pcDNA3.1-PDL-1ECD-mFcコロニーをスクリーニングによって得、次いで従来通りの方法で増幅した。組換えプラスミドを、キットの使用説明書に従ってキット（TIANGEN BIOTECH [Beijing] CO. LTD. ; DP103-03）を使用して抽出した。

【0085】

4. 組換えプラスミドpcDNA3.1-PDL-1ECD-mFcを、リポフェクタミン（lipofectamine）トランスフェクションキット（Invitrogen）により293F細胞（Invitrogen）にトランスフェクトした。

【0086】

5. トランスフェクトした293F細胞を、7日間培養した。組換えタンパク質を含有する培養上清を、高速遠心分離、微細孔膜真空ろ過及びHiTrapプロテインA HPカラムにより次いで精製して、PDL-1ECD-mFc融合タンパク質を得た。そのタンパク質を、電気泳動ローディング緩衝液を添加して還元条件下でSDS-PAGE電気泳動分析に供した。図1に示すように、標的タンパク質の分子量は、約53kDである。

【0087】

調製例 2：組換えタンパク質 PD-1-hFc の調製

1. PD-1-hFc の遺伝子合成

キメラ遺伝子を、PD-1ECDと命名したPD-1（プログラム細胞死タンパク質1、NCBI GenBank ID：NP_005009.2）の細胞外ドメイン及びヒトIgGのFc断片（hFc）を含むように設計した。293F細胞における標的遺伝子の発現効率を改善するために、ヌクレオチド配列をコドン最適化し、GenScript Biotech Co., Ltdで合成した。

【0088】

2. pUC57simple-PD-1ECD-TEV-hFcプラスミドの生成

PD-1ECD-TEV-hFc遺伝子を、発現ベクターpUC57simple（GenScript Biotech Co., Ltdにより供給された）にクローニングして、pUC57simple-PD-1ECD-TEV-hFcプラスミドを得た。

【0089】

3. プラスミドpCDNA3.1-PD-1ECD-TEV-hFcの構築

プラスミドpUC57simple-PD-1ECD-TEV-hFcを、酵素（XbaI及びBamHI）で消化した。精製したPD-1ECD-TEV-hFc遺伝子断片を、pCDNA3.1発現ベクター（Invitrogenから購入した）にクローニングして、大腸菌DH5a株（TIANGENから購入した）に形質転換されたpCDNA3.1-PD-1ECD-TEV-hFcを得た。陽性コロニーをスクリーニングにより得、次いで従来通りの大腸菌DH5a培養技術により増幅し、組換えプラスミドをキットの使用説明書（TIANGEN BIOTECH [Beijing] CO. LTD. DP103-03）に従って抽出した。

【0090】

4. 組換えプラスミドpCDNA3.1-PD-1ECD-TEV-hFcを、リポフェクタミン（lipofectamine）トランスフェクションキット（Invitrogen）により293F細胞（Invitrogen）にトランスフェクトした。

【0091】

5. 293F細胞をpCDNA3.1-PD-1ECD-TEV-hFcでトランスフェクトし、7日間培養した。組換えタンパク質を含有する培養上清を、高速遠心分離、微細孔膜真空ろ過及びMabselect Sureカラムにより次いで精製して、PD-1ECD-TEV-hFc融合タンパク質を得た。そのタンパク質を、電気泳動ローディング緩衝液を添加して還元条件下でSDS-PAGE電気泳動分析に供した（図2）。

【0092】

調製例 3：組換えタンパク質 B7-1-hFc の調製

1. B7-1-hFc の遺伝子合成

キメラ遺伝子を、B7-1（B7-1ECD；分化抗原群80 [CD80及びB7-1とも呼ばれる]、NCBI GenBank ID：NP_005182.1）の細胞外ドメイン及びヒトIgGのFc断片（hFc）を含むように設計した。293F細胞における標的遺伝子の発現効率を改善するために、ヌクレオチド配列をコドン最適化し、GenScript Biotech Co., Ltdで合成した。

【0093】

2. pUC57simple-B7-1ECD-hFcプラスミドの生成

B7-1ECD-hFc遺伝子を、発現ベクターpUC57simple（GenScript Biotech Co., Ltdにより供給された）にクローニングして、pUC57simple-B7-1ECD-hFcプラスミドを得た。

【0094】

3. プラスミドpCDNA3.1-B7-1ECD-hFcの構築

プラスミドpUC57simple-B7-1ECD-hFcを、酵素（XbaI及びBamHI）で消化した。精製したB7-1ECD-hFc遺伝子断片を、ライゲーションによりpCDNA3.1発現ベクター（Invitrogenから購入した）にクロー

10

20

30

40

50

ニングして、p c D N A 3. 1-B 7-1 E C D-h F cを得た。ライゲーション産物を、大腸菌D H 5 a株（T I A N G E Nから購入した）に、次いで形質転換した。コロニースクリーニングを遂行し、p c D N A 3. 1-B 7-1 E C D-h F cの陽性クローンを得、次いでそのクローンを従来通りの大腸菌D H 5 a培養技術により増幅し、組換えプラスミドをキットの使用説明書（T I A N G E N B I O T E C H [B e i j i n g] C O . L T D. D P 1 0 3-0 3）に従って抽出した。

【0095】

4. 組換えプラスミドp c D N A 3. 1-B 7-1 E C D-h F cを、リポフェクタミン（l i p o f e c t a m i n e）トランスフェクションキット（I n v i t r o g e n）により293F細胞（I n v i t r o g e n）にトランスフェクトした。

10

【0096】

5. 293F細胞をp c D N A 3. 1-P D-1 E C D-T E V-h F cプラスミドでトランスフェクトし、次いで7日間培養した。組換えタンパク質を含有する培養上清を、高速遠心分離、微細孔膜真空ろ過及びM a b s e l e c t S u R eカラムにより次いで精製して、B 7-1 E C D-h F c融合タンパク質を得た。そのタンパク質を、電気泳動ローディング緩衝液を添加して還元条件下でS D S-P A G E電気泳動分析に供した（図3）。

【0097】

実施例1：ハイブリドーマ細胞株L T 0 0 5及びモノクローナル抗体5 C 1 0、5 F 1 0及び9 F 6の生成

20

哺乳動物細胞により発現された組換えP D L-1 E C D-m F cタンパク質を免疫原として使用して、マウスを免疫化した。免疫化したマウスの脾細胞を回収し、骨髄腫細胞と融合してハイブリドーマ細胞を生成した。多数のサンプルによるスクリーニング後に、次いでハイブリドーマ細胞株L T 0 0 5を得、その細胞株は、P D L-1に特異的に結合し得るモノクローナル抗体5 C 1 0を産生した。他の2つのモノクローナル抗体5 F 1 0及び9 F 6も、本発明において得られた。

【0098】

詳細は以下の通りである：

1. ハイブリドーマ細胞の生成

調製例1において得られた組換えP D L-1 E C D-m F c融合タンパク質を免疫原として使用して、B A L B/Cマウス（広東省医学実験動物センター）を免疫化した。免疫化したマウスの脾細胞を回収し、一般的な方法に従ってマウス骨髄腫細胞と融合してハイブリドーマ細胞を生成した（例えば、S t e w a r t, S. J. 「M o n o c l o n a l A n t i b o d y P r o d u c t i o n」、in B a s i c M e h o d s i n a n t i b o d y P r o d u c t i o n a n d C h a r a c t e r i z a t i o n、G. C. H o w a r d及びD. R. B e t h e l l編、B o c a R a t o n : C R C P r e s s、2000年）。

30

【0099】

被覆抗原としてP D L-1 E C D-m F cを使用して間接E L I S A分析を実行して、P D L-1 E C D-m F cに特異的に結合できる抗体を産生しているハイブリドーマ細胞を得た。その後ハイブリドーマ細胞を競合E L I S Aに供し、P D L-1に対する結合においてP D-1（調製例2から得たP D-1-h F c）と競合するモノクローナル抗体を分泌している細胞を選択した。そして、モノクローナル抗体5 C 1 0を産生している安定なハイブリドーマ細胞株L T 0 0 5を、限界希釈により更に得た。

40

【0100】

ハイブリドーマ細胞株L T 0 0 5は、2015年8月4日に受託番号C C T C C C 2 0 1 5 1 3 3でW u h a n大学（郵便番号：430072）の中国タイプカルチャーコレクションセンター（C C T C C）に寄託された。

【0101】

同様に、マウス抗体を産生している更に2つのハイブリドーマ細胞株（それぞれ5 F 1

50

0 及び 9 F 6 と命名した) も得た。

【0102】

2. モノクローナル抗体 5 C 1 0、5 F 1 0 及び 9 F 6 の調製

P D L-1-5 C 1 0 ハイブリドーマ細胞株を、10% (低 I g G) ウシ胎仔血清 (F B S) を含有する培地中で7日間培養し、次いで細胞培養上清を採取し、精製して抗体 5 C 1 0 を得た。

【0103】

同様に、抗体 5 F 1 0、9 F 6 を上の方法に従って調製した。

【0104】

3. 抗体 5 C 1 0 の S D S-P A G E 分析

精製したタンパク質のサンプルに、還元ローディング緩衝液及び非還元ローディング緩衝液をそれぞれ添加した。精製からの通過画分と一緒に、全てのサンプルを煮沸し、S D S-P A G E ゲルにロードして分析した。結果は、還元タンパク質の分子量が約 50 k D 及び 25 k D であり、非還元タンパク質が約 150 k D であることを示した (図 4)。

【0105】

4. マウス抗体 5 C 1 0、5 F 1 0 及び 9 F 6 に対する親和性、競合親和性及び細胞親和性の決定:

抗体の親和性を、例 9 及び例 13 に記述される方法を使用して E L I S A 及び競合 E L I S A によりそれぞれ決定し、細胞に対する親和性を、例 8 に記述される方法を使用して F A C S により決定した。

【0106】

結果を、表 1 に示す。

【表 1】

表 1: マウス抗体 5C10、5F10 及び 9F6 の親和性、競合親和性及び細胞親和性

抗体	ELISA による 親和性(nM)	競合 ELISA による 親和性(nM)	FACS による細胞親 和性(nM;陽性%)
5C10	0.031	0.785	2.3、100%
5F10	0.029	0.838	1.48、60.3%
9F6	0.029	0.767	2.93、80.2%
PCAB	0.031	0.799~1.026	2.12、70.5%

【0107】

結果は、3つのマウス抗体が、親和性及び競合親和性の点で参照抗体 P C A B (例 5 で得た) に劣っていないことを示した。5 C 1 0 は、細胞親和性及び陽性率において最良の性能を有した。5 F 1 0 の細胞親和性は、P C A B より優れており、9 F 6 の陽性率は P C A B より優れている。

【0108】

実施例 2: モノクローナル抗体 5 C 1 0、5 F 1 0 並びに 9 F 6 の重鎖及び軽鎖の配列の取得

全 m R N A を、製造業者の使用説明書に従って R N A 単離キット (T I A N G E N、D P 4 3 0) を使用して、例 1 で得られたハイブリドーマ細胞株 L T 0 0 5 から抽出した。

【0109】

cDNAを、製造業者の使用説明書に従ってTransGen Biotech TransScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMixキットを使用して合成し、PCRにより増幅した。TAAクローニングを、pEASY-T1クローニングキット(TransGen CT101)の使用説明書に従ってPCR産物に対して実行した。TAAクローニングの産物を配列決定に供し、結果は以下の通りである：

【0110】

抗体5C10のVHをコードしているヌクレオチド配列(360bp)：

CAGGTGCAACTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCG
CCCTCACAGAACCTGTCCATTACCTGCACTGTCTCTGGGT
TCTCATTTAAGCAACTATGATATAAGCTGGATTTCGCCAGCC
ACCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTCGGAGTAATATGGACT
GGTGGAGCCACAAATTATAATTTCAGCTTTCATGTCCAGAC
TGAGCATCAGTAGGGACAACTCCAAGAGCCAAAGTTTTCTT
AAAAATGAACAGTCTGCAAACTGATGACACAGCCATATAT
TACTGTGTGAGAGATTTCGAACCTATAGGTACGACGAGCCGT
TTACTTACTGGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGC
A (配列番号1)

10

【0111】

抗体5C10のVHのアミノ酸配列(120aa)：

QVQLKESGPGLVAPSQNLSITCTVSGFSLSNYDISWIRQ
PPGKGLEWLGVIWTGGATNYNSAFMSRLSISRDNSSKSQVF
LKMNSLQTTDDTAIYYCVRDSNRYDEPFITYWGQGGLVTVS
A (配列番号2)

20

【0112】

抗体5C10のVLをコードしているヌクレオチド配列(318bp)：

GACATCTTGCTGACTCAGTCTCCAGCCATCCTGTCTGTG
AGTCCAGGAGAAAGAGTCACTCTCCTGCAAGGGCCAGTC
AGAGCATTGGCACAAACATACACTGGTTTTCAGCAAAGAAC
AAATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCTTCTGAG
TCTATCTCTGGGATCCCTTCCAGGTTTAGTGGCAGTGGAT
CAGGGACAGATTTTACTCTTAGCATCAACAGTGTGGAGTC
TGAAGATATTGCAGATTACTACTGTCAACAAAGTAATAGC
TGGCCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATA (配列番号3)

30

【0113】

抗体5C10のVLのアミノ酸配列(106aa)：

DILLTQSPAILSVSPGERVSLSCRASQSIGTNIHWFQQR
TNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVE
SEDIADYYCQQSNSWPYTFGGGTKLEI (配列番号4)

40

同様に、モノクローナル抗体9F6及び5F10の軽及び重鎖配列を得た。

【0114】

抗体5F10のVHのアミノ酸配列(117aa)：

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFDIKDTYIHWVKQ
RPEQGLEWIGRIDPADGNTRYDPKFQDKTTITTDTSSTNA
HLQLSSLTSEDTAVYYCARGLGAWFASWGQGGLVTVSA (配列番号21)

【0115】

抗体5F10のVHをコードしているヌクレオチド配列(351bp)：

GAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAAG

50

CCAGGGGGCCTCAGTCAAGTTGTCTCTGCACAGCTTCTTGGCT
TCGACATTAAAGACACCTATATCCACTGGGTGAAGCAGAG
GCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCT
GCGGACGGTAATACTAGGTATGACCCGAAGTTCCAGGACA
AGACCACCTATAACAACCGACACATCCTCCAACACAGCCCA
CCTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTC
TATTACTGTGCTAGAGGCCCTCGGAGCTTGGTTTGCTTCCT
GGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA (配列番号 22)

【0116】

抗体 5F10 の VL のアミノ酸配列 (106 aa) :

10

DIQMTQTSSLSASLGDRVITISCRASQDITNSLNWYQQK
PDGTVKLLIHYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLE
QEDIATYFCQQGHTLPPTFGGGTKLEI (配列番号 23)

【0117】

抗体 5F10 の VL をコードしているヌクレオチド配列 (318 bp) :

GATATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCC
TCTCTGGGAGACAGAGTCAACCATCAGTTGCAGGGCAAGTC
AGGACATTACCAATTCTTTAAACTGGTATCAGCAGAAACC
AGATGGAACCTGTTAAACTCCTGATCCACTACACATCAAGA
TTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTTCAAGTGGCAGTGGGT
CTGGAACAGATTATCTCTCACCATTAAGCAACCTGGAGCA
AGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAGGGTCATACG
CTTCTCTCCGACGTTTCGGTGGAGGGCACCAAGCTGGAAATC (

20

配列番号 24)

【0118】

抗体 9F6 の VH のアミノ酸配列 (124 aa) :

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNLIKDTYMYWVKQ
RPEQGLEWIGRIDPANGNTKYDPKFQ GKATITADTSANTA
YLQLSSLTSEDTAVYYCSRGP PGGIG EYIYAMDYWGQGTS
VTVSS (配列番号 25)

30

【0119】

抗体 9F6 の VH をコードしているヌクレオチド配列 (372 bp) :

GAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAAG
CCAGGGGGCCTCAGTCAAGTTGTCTCTGCACAGCTTCTTGGCT
TCAACATTAAAGACACCTATATGTACTGGGTGAAGCAGAG
GCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCT
GCGAATGGTAATACTAAATATGACCCGAAGTTCCAGGGCA
AGGCCACTATAACAGCAGACACATCCGCCAACACAGCCTA
CCTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTC
TATTACTGTTCTAGAGGCCCTCCAGGAGGTATCGGCGAGT
ATATCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGT
CACCGTCTCTCTCA (配列番号 26)

40

【0120】

抗体 9F6 の VL のアミノ酸配列 (107 aa) :

QIVLTQSPA IMSASLGERVTMTCTASSSVSSSYLHWYQQ
KPGSSPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSM
EAEDAATYYCHQYHRSPPTFGGGTKLEI (配列番号 27)

【0121】

抗体 9F6 の VL をコードしているヌクレオチド配列 (321 bp) :

CAAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCA

50

TCTCTAGGGGAACGGGTCAACCATGACCTGCACTGCCAGCT
CAAGTGTAAGTTCCAGTTACTTGCACCTGGTACCAGCAGAA
GCCAGGATCCTCCCCCAAACCTCTGGATTTATAGCACATCC
AACCTGGCTTCTTGGAGTCCCAGCTCGCTTCAGTGGCAGTG
GGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAAATCAGCAGCATGGA
GGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCACCAGTATCAT
CGTTCCCCACCCACGTTCGGTGGAGGCAACCAAGCTGGAAA
TC (配列番号28)

【0122】

実施例3：ヒト化抗体5C10H1L1、5C10H1L2、5C10H2L1並びに5C10H2L2の軽及び重鎖配列の設計

10

PDL-1タンパク質の三次元結晶構造(PDB Code 3BIK, Lin、DYら、PNAS USA 105(8):3011~6[2008年])及び実施例2における配列に基づくコンピュータモデリングによって得られた5C10構造を突然変異設計に使用し、5C10H1L1、5C10H1L2、5C10H2L1、5C10H2L2の変異した抗体可変領域配列を、次いで生成した(重鎖の定常領域は、Ig γ -1鎖C領域、受託番号:P01857であり;軽鎖の定常領域は、Ig κ 鎖C領域、受託番号:P01834であった)。可変領域の配列を以下に示す:

【0123】

1. ヒト化モノクローナル抗体5C10H1L1の軽及び重鎖の配列

20

抗体5C10H1L1のVHのヌクレオチド配列(360bp):

CAGGTCCAGCTGCAGGAGTCAAGCCCCCGGCCCTGGTGAAG
CCCAGTGAGAACCTGTCAATCACCTGCACAGTCTCTGGCT
TCTCACTGAGCAATTACGACATCAGTTGGATTCGACAGCC
CCCTGGAAAGGGCCTGGAATGGCTGGGGCGTGATCTGGACA
GGCGGGGGCAACTAATAATCCAGCCTTTAAAGCCGGC
TGACCAATTTCCAGAGACAACCTCCAAGTCTCAGGTGTCTCT
GAAAAATGAGCTCCCTGCAGGCGCGCTGATACCGCTGTGTAC
TATTGTGTTCAGGGACAGCAATTACCGCTATGATGAGCCCT
TCACATACTGGGGGCAGGGAACTCTGGTGACCGTCTCTAG
T (配列番号5)

30

【0124】

抗体5C10H1L1のVHのアミノ酸配列(120aa):

QVQLQESGPGLVKPSENLSITCTVSGFSLSNYDISWIRQ
PPGKGLEWLGVITWTGGATNYPNPAFKSRSLTISRDNSSKSQVS
LKMSSLQAADTAVYYCVRDSNYRYDEPFTYWGGQGT LVTVS
S (配列番号6)

【0125】

抗体5C10H1L1のVLをコードしているヌクレオチド配列(321bp):

40

GAAATCGTGCTGACACAGAGCCCTGACACACTGAGCGTGG
ACTCCCAAGGAGAAAGTCAACCTGACATGCCGGGGCATCAC
AGAGCATCGGAACAACAATTCACCTGGTTCCAGCAGAGACC
AGGCCAGAGCCCCAAGCTGCTGATCAAATACGCCCTCCGAA
TCTATCAGTGGCATTCCTTCCCGATTCTCAGGCAGCGGGT
CCGGAACCGACTTTACTCTGACCATTAACTCTGTGGAGGC
TGAAGATGCCGCTACATACTATTGCCAGCAGTCTAATAGT
TGGCCCTTATACCTTCGGCCAGGGGACAAAGCTGGAGATCA
AA (配列番号7)

【0126】

抗体5C10H1L1のVLのアミノ酸配列(107aa):

50

E I V L T Q S P D T L S V T P K E K V T L T C R A S Q S I G T N I H W F Q Q R
P G Q S P K L L I K Y A S E S I S G I P S R F S G S G S G T D F T L T I N S V E
A E D A A T Y Y C Q Q S N S W P Y T F G Q G T K L E I K (配列番号 8)

2. ヒト化モノクローナル抗体 5C10H2L2 の軽及び重鎖の配列

【0127】

抗体 5C10H2L2 の VH をコードしているヌクレオチド配列 (360bp) :

C A G G T C C A G C T G C A G G A G T C C G G C C C C G G C C T G G T G A A G
C C C T C C G A G A C A C T G T C T A T C A C C T G C A C A G T C A G C G G C T
T C T C A C T G A G C A A C T A C G A C A T C T C C T G G A T T C G A C A G C C
C C C T G G A A A G G G C C T G G A A T G G C T G G G C G T G A T C T G G A C A
G G C G G G G C A A C T A A C T A T A A T C C A G C C C T G A A A T C T C G G C
T G A C T A T T A G T A G A G A C A A C T C A A A G A A T C A G G T G T C C C T
G A A A A T G A G C T C C G T C A C C G C C G C T G A T A C A G C T G T G T A C
T A T T G T G T C A G G G A C A G C A A T T A C C G C T A T G A T G A G C C C T
T T A C C T A C T G G G G G C A G G G A A C T C T G G T G A C C G T C T C T A G
T (配列番号 9)

10

【0128】

抗体 5C10H2L2 の VH のアミノ酸配列 (120aa) :

Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L S I T C T V S G F S L S N Y D I S W I R Q
P P G K G L E W L G V I W T G G A T N Y N P A L K S R L T I S R D N S K N Q V S
L K M S S V T A A D T A V Y Y C V R D S N Y R Y D E P F T Y W G Q G T L V T V S
S (配列番号 10)

20

【0129】

抗体 5C10H2L2 の VL をコードしているヌクレオチド配列 (321bp) :

G A A A T C G T G C T G A C A C A G T C T C C T G A T A C C C T G A G C G T G
A C T C C C A A G G A G A A A G T C A C C C T G A C A T G C A G G G C A T C A C
A G A G C A T C G G A A C A A A C A T T C A C T G G T T C C A G C A G A A G C C
A G G C C A G A G C C C C A A G C T G C T G A T C A A A T A C G C C T C C G A A
T C T A T T A G T G G A G T G C C T T C C G C T T C T C A G G C A G C G G G T
C C G G A A C C G A C T T T A C T C T G A C C A T C A A C T C T G T G G A G G C
T G A A G A T G C C G C T A C A T A C T A T T G C C A G C A G T C T A A T A G T
T G G C C T T A T A C C T T C G G C C A G G G G A C A A A G C T G G A G A T C A
A A (配列番号 11)

30

【0130】

抗体 5C10H2L2 の VL のアミノ酸配列 (107aa) :

E I V L T Q S P D T L S V T P K E K V T L T C R A S Q S I G T N I H W F Q Q K
P G Q S P K L L I K Y A S E S I S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I N S V E
A E D A A T Y Y C Q Q S N S W P Y T F G Q G T K L E I K (配列番号 12)

3. ヒト化モノクローナル抗体 5C10H1L2 の軽及び重鎖の配列

抗体 5C10H1L2 の VH をコードしているヌクレオチド配列：配列番号 5

40

抗体 5C10H1L2 の VH のアミノ酸配列：配列番号 6

抗体 5C10H1L2 の VL をコードしているヌクレオチド配列：配列番号 11

抗体 5C10H1L2 の VL のアミノ酸配列：配列番号 12

4. ヒト化モノクローナル抗体 5C10H2L1 の軽及び重鎖の配列

抗体 5C10H2L1 の VH をコードしているヌクレオチド配列：配列番号 9

抗体 5C10H2L1 の VH のアミノ酸配列：配列番号 10

抗体 5C10H2L1 の VL をコードしているヌクレオチド配列：配列番号 7

抗体 5C10H2L1 の VL のアミノ酸配列：配列番号 8

【0131】

実施例 4 : 5C10 のヒト化抗体 5C10H1L1、5C10H1L2、5C10H2L

50

1、5C10H2L2の調製及びそのSDS-PAGE分析

5C10H1L1、5C10H1L2、5C10H2L1及び5C10H2L2の重鎖（VH：配列番号5又は配列番号9；CH：hIgG1）並びに軽鎖（VL：配列番号7又は配列番号11；CL：ヒトκ配列）のcDNAを、ベクターpUC57simple（GenScript Biotech Co., Ltd）にクローニングして、pUC57simple-5C10H1、pUC57simple-5C10L1、pUC57simple-5C10H2及びpUC57simple-5C10L2プラスミドを得た。

【0132】

配列を、調製例1に記述されている方法に従って、ベクターpcDNA3.1に更にクローニングした。組換えプラスミドを抽出し、293F細胞に同時トランスフェクトした。7日間培養した後、培養上清を、高速遠心分離、微細孔膜真空ろ過及びHiTrapプロテインA HPカラムにより次いで精製した。

【0133】

精製したタンパク質のサンプルに還元及び非還元ローディング緩衝液を別々に添加し、全てのサンプルを煮沸し、SDS-PAGEゲルにロードして分析した。結果を図5、図6、図7及び図8に示す。還元サンプルは、ゲル上でタンパク質マーカースに対して50kD及び25kDバンドにそれぞれ対応する2本のバンドを有し、非還元タンパク質は、150kDにバンドを有する。

【0134】

実施例5：ヒト化抗体5C10H2L2の結合動的パラメーターの分析

抗原PDL-1（NCBI GenBank ID：NP_054862.1、ヌクレオチド配列：配列番号13；アミノ酸配列：配列番号14）に対するヒト化抗体5C10H2L2の結合動的パラメーターを、フォルテバイオにより決定した。

【0135】

1. サンプル調製

(1) PDL-1-mFcタンパク質を、調製例1に記述される方法により調製し、次いでPDL-1-mFcタンパク質を、TEVプロテアーゼで消化し、カラムクロマトグラフィーによって精製してPDL-1抗原を得た。

【0136】

PDL-1のDNA配列（870bp）：

```
ATGAGGATTTTCGCCGTCCTTTATCTTTATGACCTACTGG
CATCTGCTGAACGCTTTTACTGTGACCGTCCCAAGGATC
TGTAATGTGGTGGAGTACGGAAGCAACATGACTATCGAGTG
CAAGTTCCCCGTGGAAAAACAGCTGGACCTGGCCGCTCTG
ATTGTCCTATTGGGAGATGGAAGATAAGAATATCATTCAGT
TTGTGTCACGGCGAGGAAGACCTGAAAGTCCAGCATAGCTC
CTACAGGCGAGCGCGCCCGACTGCTGAAGGATCAGCTGTCC
CTGGGGGAACGCGAGCCCTGCAGATCACCGACGTGAAACTGC
AGGATGCTGGAGTCTACAGGTGCATGATCTCTTACGGCGG
GGCTGATTATAAGCGCATTTACAGTGAAAGTCAATGCACCT
TATAACAAGATCAATCAGAGAAATTCCTGGTGGTTCGACCCAG
TGACCAGTGAGCACGAACCTGACATGTCAGGCTGAGGGGCTA
CCCCAAGGCAGAAAGTGATCTGGACCTCTAGTGATCATCAG
GTCCTGTCAAGGGAACCAACAACCTACCAACAGCAAGCGAG
AGGAACAACTGTTCAATGTGACATCCACTCTGAGGATCAA
CACAACTACCAATGAGATTTTCTATTGCACTTTTTCGGAGA
CTGGACCCCTGAGGAAAAACCAACACCGCAGAGCTGGTCAATCC
CAGAACTGCCACTGGCACACCCACCTAATGAGCGAACACA
CCTGGTCAATCCTGGGAGCCATTCTGCTGTGCCTGGGCGTC
```

10

20

30

40

50

GCTCTGACTTTTCATTTTTCGGCTGAGAAAGGGGCGGATGATGGACGCTGAAAAAGTGTTGGCATTCAGGATACTAACTCAAAAAGCAGTCCGATACCCATCTGGAAGAAACC (配列番号13)

【0137】

PDL-1のアミノ酸配列(290aa):

MRIFAVFIFMTYWHLLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNI IQFVHGEEDLKVQHS
SYRQRARLLKDL SLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRI LVVDPVTSEHELTCAEG
YPKAEV IWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRI
NTTTNEIF YCTFRRLDPEENHTAELVIP ELPLAHPPNER
THLVILGA ILLCLGVALT FIFRLRKGRMMDVKKCGIQDTNS
KKQSDTHLEET (配列番号14)

10

【0138】

(2) 陽性対照抗体HpLp及びPCABの調製

本発明において、HpLp又はPCABを陽性対照として選択し、HpLpは、市場においてアテゾリズマブ(商品名テセントリク[登録商標])であり、PCABは、臨床試験におけるPDL-1抗体である。

【0139】

アテゾリズマブ(商品名テセントリク[登録商標])は、Rocheから購入した。HpLp(別名KF025HpLp)を生成する方法は、米国特許出願公開第2010/0203056号A1(例えば、例10)に見ることができ、その中でHpLp抗体のVH配列は、配列番号20に記述され、一方VL配列は、配列番号21に記述された。

20

【0140】

PCABを生成する方法は、米国特許第7943743号B2(例えば、例1)に見ることができ、抗体のVH配列は、配列番号1に記述され、VL配列は、配列番号11に記述された。

2. 方法

【0141】

抗原PDL-1に対する5C10H2L2、HpLp及びPCABの結合親和性を検出するために、抗原PDL-1(5µg/mL)をアミノカップリングによりAR2Gセンサの表面上にコーティングし、その後エタノールアミンでブロッキングした。PBST中の平衡後に、バイオセンサに捕捉された抗原と抗体との結合を実施し、抗体を、PBST(10mM)で、3倍希釈(初期濃度:200nM)で段階的に希釈した。抗原PDL-1に対する5C10H2L2、HpLp及びPCABの結合親和性を、フォルテバイオData Analysis 7.0により分析した。

30

【0142】

3. 結果

PDL-1に対する5C10H2L2、HpLp及びPCABの結合親和性及び動的定数を、表2及び図9~11に示す。

40

【表 2】

表 2:PDL-1 に対する 5C10H2L2、HpLp 及び PCAB の結合親和性及び動的定数

抗体	K_D (M)	K_{on} (1/Ms)	SD (K_{on})	K_{dis} (1/s)	SD (K_{dis})
5C10 H2L2	8.08E-11	5.58E+06	2.06E+05	4.51E-04	1.66E-05
HpLp	3.68E-11	4.07E+06	1.02E+05	1.50E-04	9.99E-06
PCAB	1.28E-10	6.55E+06	3.88E+05	8.37E-04	2.25E-05

10

K_D :解離定数; K_{on} :会合速度定数; K_{dis} :解離速度定数; $K_D=K_{dis}/K_{on}$

【0143】

結果は、3つ全ての抗体が非常に高い親和性で抗原に結合することを示した。そして、
 抗原に対する5C10H2L2及びHpLpの結合親和性は、PCABより高かった。
 実施例6：抗体5C10、5C10H2L2及びHpLpによるPDL-1がPD-1と
 相互作用することの遮断（フォルテバイオ）

20

【0144】

PDL-1がPD-1と相互作用することを遮断する5C10、5C10H2L2及び
 HpLpの能力を検出するために、抗原PDL-1（5 μ g/mL）をアミノカップリン
 グによりAR2Gセンサの表面上にコーティングし、その後エタノールアミンでブロッキ
 ングした。PBST中での平衡後に、バイオセンサに捕捉された抗原と抗体との結合を
 実施し、抗体を、PBST（10mM）で、3倍希釈（初期濃度：33.33nM）で段
 階的に希釈した。次いでバイオセンサチップを、PD-1タンパク質（10 μ g/mL）
 を含有する溶液に420秒間浸漬した。

30

【0145】

図12に示すように、各抗体は、PD-1に対するヒトPDL-1の結合を用量依存的
 様式で効果的に阻害することができ、各用量の蛍光強度及びフィッティングしたEC₅₀
 を、表3に示した。

【表 3】

表 3:抗体 5C10、5C10H2L2 及び HpLp による PDL-1 が PD-1 と相互作用することの遮

断

抗体(nM)	5C10	5C10 H2L2	HpLp
33.33	0.0058	-0.0109	0.0127
11.11	0.0038	-0.0078	0.0149
3.704	0.0088	-0.0007	0.0073
1.235	0.0289	0.0103	0.0268
0.4115	0.0599	0.0425	0.0697
0.1372	0.0739	0.0732	0.0867
0.04572	0.0773	0.0601	0.0947
EC ₅₀ (nM)	0.817	0.654	0.625

【0146】

結果は、3つ全ての抗体が、PD-1に対するヒトPDL-1の結合を用量依存的様式で効果的に阻害できたことを示す。

【0147】

実施例7：抗体5C10H2L2及びHpLpによる、PDL-1がPD-1と相互作用することの遮断

PD1/PDL-1相互作用を遮断する5C10H2L2の能力を、PD1/PDL-1結合アッセイのキット(CISBIO; 63ADK000CPLPEH)を使用してHTRFによりHpLpと比較した。抗体5C10H2L2及びHpLpを、希釈緩衝液で、3倍希釈(初期濃度: 100 µg/mL; 10段階)で段階的に希釈した。サンプル2 µL、PDL-1-EuK 4 µL及びTag-PD1 4 µLを溶液に添加し、その後瞬間遠心し、インキュベートした(室温で20分間)。次いで、抗-Tag-XL665 10 µLを溶液に更に添加し、その後瞬間遠心し、インキュベートした(室温で2時間)。最後に、値を、PHERA star Fs (BMG)によって読み取り、データをGraph Prismによって分析した。

【0148】

結果は、HpLp及び5C10H2L2が、PD1/PDL-1の相互作用を遮断する同程度の能力を有することを示した(それぞれ67.29 ng/mL及び68.97 ng/mL)。両方の抗体が、PD-1に対するヒトPDL-1の結合を効果的に阻害し得る。

【0149】

実施例8：FACSにより決定した、PDL-1を発現している細胞に対するヒト化抗PDL-1抗体の結合

最初に、PDL-1を発現する293T細胞を構築し、次いで宿主細胞を、ヒト化抗体5C10H1L1、5C10H1L2、5C10H2L2、5C10H2L1及び陽性対照抗体(HpLp及びPCAB)で標識した。細胞表面において天然の立体配座を持つ抗

10

20

30

40

50

原に対する抗体 5C10H1L1、5C10H1L2、5C10H2L2、5C10H2L1 及び陽性対照抗体 (HpLp 及び PCAB) の特異的結合を、FACS により分析した。

【0150】

詳細は以下の通りである：

1. PDL-1 を発現する 293T 細胞の構築

PDL-1 を含有するベクター pLenti6.3-PDL-1 (Invitrogen から購入した) を、リポフェクタミントランスフェクションキット (Invitrogen から購入した) のマニュアルに従って 293T 細胞にトランスフェクトした。PDL-1 を安定して発現する細胞を、スクリーニング後に得た。

10

【0151】

2. 抗体標識及び FACS 分析

293T 細胞を、従来通りのトリプシン処理後に採取し、採取チューブ当たりの細胞数は、 2×10^5 であった。各抗体希釈を、50 nM、20 nM、10 nM、3 nM、1 nM、0.1 nM、0.01 nM 及び 0 nM の濃度で、PBS (1% BSA) でそれぞれ調製した。次いで抗体希釈を、PDL-1 を発現する 293T 細胞と氷上で 2 時間インキュベートし、その後 3 回 PBS 洗浄した。FITC-ヤギー抗ヒト IgG を PBS で希釈し (1:100)、各チューブに 100 μ L 添加し、次いで氷上で 1 時間インキュベートした。3 回の PBS 洗浄後に、細胞を PBS 300 μ L によって再懸濁し、蛍光シグナルを、フローサイトメトリーの FITC チャンネルによって検出した。

20

【0152】

3. 結果

PDL-1 を発現する 293T 細胞に対する抗体 5C10H1L1、5C10H1L2、5C10H2L1、5C10H2L2 及び陽性対照 (HpLp 及び PCAB) の抗体の結合を、図 13~18 に示した。

【0153】

結果は、全ての抗体が、293T 細胞の表面上の PDL-1 に対して用量依存的様式で効率的に結合し得ることを示した。結合した抗体に対する蛍光定量分析後に、結合曲線を標準モデルでフィッティングし、表 4 に示すように各抗体の結合有効性 EC_{50} を算出する。

30

【表 4】

表 4:FACS による、293T 表面抗原 PDL-1 に結合する抗体 5C10H1L1、5C10H1L2、5C10H2L2、5C10H2L1、HpLp、PCAB に対する蛍光強度分析

平均蛍光強度(MFI)								EC ₅₀ (nM)
抗体/nM	0.01	0.10	1.00	3.00	10.00	20.00	50.00	
5C10H1L1	4.84	15.27	113.99	245.65	256.56	247.63	194.04	1.084
5C10H1L2	7.25	12.63	74.81	202.24	294.53	264.22	260.09	1.771
5C10H2L2	4.85	12.92	83.59	199.45	263.95	285.02	299.63	1.962
5C10H2L1	4.64	13.54	94.70	209.32	264.17	283.13	255.58	1.504
HpLp	4.48	10.48	75.788	173.52	243.03	251.81	241.14	1.804
PCAB	5.55	11.82	61.12	99.86	131.66	130.95	104.43	1.108

【0154】

結果は、全ての抗体が、293T細胞の表面上の標的タンパク質（PDL-1）に対して用量依存的様式で効率的に結合し得ることを示した。

実施例 9：間接 ELISA による PDL-1 に対するヒト化抗 PDL-1 抗体の結合親和性の決定

【0155】

間接酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）を実行して、ヒト PDL-1 に対する 5C10H1L1、5C10H1L2、5C10H2L2、5C10H2L1 及び陽性対照抗体（HpLp 及び PCAB）の結合親和性を評価した。ELISA プレートにヒト PDL-1 をコーティングし、4℃で終夜インキュベートし、その後 1% BSA で、37℃で 2 時間ブロッキングした。次いで抗体を、各ウェルに添加し、37℃で 30 分間インキュベートした。二次抗体、HRP にコンジュゲートしたヤギ抗ヒト IgG（H+L）（Jackson、109-035-088）を、添加した。TMB 基質（Neogen、308177）を、発色反応のために添加し、5 分間インキュベートした。吸光度を、450nm で読み取った。

【0156】

結果を、図 19 に示す。図が示すように、5C10H1L1、5C10H1L2、5C10H2L2、5C10H2L1、HpLp 及び PCAB は、ヒト PDL-1 に用量依存的様式で効果的に結合し得る。各用量の蛍光強度及び曲線フィッティング後の EC₅₀ により表される算出した結合効率を、表 5 に挙げる。

【表 5】

表 5: ヒト PDL-1 に対する抗体 5C10H1L1、5C10H1L2、5C10H2L2、5C10H2L1、
HpLp 及び PCAB の結合(間接 ELISA)

コーティングした抗原:PDL-1-mFc(1 μ g/mL)												
抗体 (μ g/mL)	5C10 H1L1		5C10 H2L2		5C10 H1L2		5C10 H2L1		HpLp		PCAB	
1.000	3.168	2.923	2.914	3.010	3.075	2.983	2.839	2.985	3.023	2.934	3.017	3.177
0.333	3.153	3.044	3.176	2.974	2.992	3.089	3.004	2.997	2.854	3.099	3.006	3.158
0.111	2.958	2.926	3.084	2.899	3.006	2.999	3.001	2.921	2.995	3.085	3.037	3.163
0.037	2.950	2.786	2.930	2.758	2.783	2.827	2.814	2.704	2.908	2.894	2.843	2.892
0.012	2.495	2.228	2.337	2.280	2.243	2.305	2.169	2.202	2.446	2.315	2.374	2.525
0.004	1.574	1.336	1.367	1.346	1.320	1.408	1.309	1.205	1.673	1.643	1.502	1.770
0.001	0.816	0.616	0.659	0.622	0.624	0.690	0.595	0.560	0.866	0.855	0.746	0.940
0.000	0.053	0.055	0.059	0.052	0.052	0.054	0.054	0.055	0.053	0.059	0.055	0.055
二次	二次抗体としての HRP にコンジュゲートしたヤギ抗ヒト IgG											
EC ₅₀ (nM)	0.032		0.035		0.035		0.038		0.025		0.027	

【0157】

結果は、本発明の抗体が、ヒト PDL-1 に用量依存的様式で効果的に結合し得ることを示した。

【0158】

実施例 10：間接 ELISA による、サル PDL-1 に対する抗体 5C10H2L2 の結合親和性

実験動物に対して遂行される薬物動態学及び毒性学実験を考慮して、この実験の目的は、抗体 5C10H2L2 が、サル PDL-1 に結合できるかどうか決定することであり；抗体 5C10H2L2 が、サル PDL-1 に結合できる場合、その後サルを薬物動態学及び毒性学実験に使用することができる。

【0159】

サル PDL-1 に対する 5C10H2L2 及び陽性対照 HpLp の結合を、間接 ELISA によって測定した。ELISA プレートにサル PDL-1 をコーティングし、4℃で終夜インキュベートし、その後 PBS 中の 1% BSA で、37℃で 2 時間ブロッキングした。次いで抗体を、各ウェルに添加し、37℃で 30 分間インキュベートした。二次抗体、HRP にコンジュゲートしたヤギ抗ヒト IgG (H+L) (Jackson、109-035-088) を、添加した。TMB 基質 (Neogen、308177) を、発色反応のために添加し、5 分間インキュベートした。吸光度を、450nm で読み取った。

【0160】

サルPDL-1に対する5C10H2L2及びHpLpの結合活性の結果を、図20に示す。図20に示すように、5C10H2L2及びHpLpは、サルPDL-1に用量依存的様式で効果的に結合することができる。各用量の蛍光強度及び曲線フィッティング後の EC_{50} により表される算出した結合効率を、表6に示す。

【表6】

表6:サルPDL-1に対する抗体5C10H2L2及びHpLpの結合(間接ELISA)

抗体希釈 (μ g/mL)	コーティングした抗原:サルPDL-1-his(1 μ g/mL)			
	5C10 H2L2		HpLp	
1.000	3.328	3.302	2.531	2.123
0.333	3.395	3.169	1.969	1.740
0.111	3.040	2.740	1.424	1.151
0.037	2.411	2.013	0.969	0.763
0.012	1.194	1.047	0.431	0.374
0.004	0.562	0.495	0.243	0.221
0.001	0.267	0.244	0.171	0.153
0.000	0.110	0.115	0.111	0.104
二次抗体としてのHRPにコンジュゲートしたヤギ抗ヒトIgG				
EC_{50} (nM)	0.165		1.049	

【0161】

結果は、両方の抗体5C10H2L2及びHpLpが、サルPDL-1に用量依存的様式で効果的に結合することができ、5C10H2L2の結合能が、HpLpより高いことを示した。

【0162】

実施例11：間接ELISAによる、ヒトPDL-1、ヒトPD-L2及びマウスPDL-1に対する5C10H2L2の結合

ヒトPDL-1、ヒトPD-L2 (Sino Biological Inc. カタログ10292-H08H) 及びマウスPDL-1 (Sino Biological Inc. カタログ50010-M08H) に対する5C10H2L2の結合を、間接ELISAによって分析した。ヒトPDL-1、ヒトPD-L2又はマウスPDL-1を、ウェル当たり0.5 μ g/mL 100 μ LでELISAプレートに個別に添加し、4℃で終夜インキュベートした。抗体を、1 μ g/mLから開始して段階的に希釈した(3倍希釈; 11段階)。ウェルを、1%BSAで、37℃で2時間ブロッキングした。二次抗体、HRPにコンジュゲートしたヤギ抗ヒトIgG(H+L) (Jackson, 109-035-088) を、1:20000希釈で添加した。TMB基質(Neogen, 308177) を、発色反応のために添加し、5分間インキュベートした。吸光度を、450nmで読み取った。

【0163】

ヒトPDL-1、ヒトPD-L2及びマウスPDL-1に対する5C10H2L2結合の結果を、図21に示す。図21に示すように、5C10H2L2は、ヒトPDL-1に用量依存的様式で効果的に結合し得る。各用量の蛍光強度及び曲線フィッティング後に算出した結合効率は $EC_{50} = 9.16$ ng/mLであるが、5C10H2L2は、ヒトPD-L2及びマウスPDL-1に結合しない。

【0164】

結論として、5C10H2L2は、ヒトPDL-1に特異的に組み合わせることができ、アテゾリズマブは、マウスPDL-1に結合することができる(テセントリク[登録商標]) PHARMACOLOGY REVIEW、FDA、出願番号761034Ori

10

20

30

40

50

g 1 s 0 0 0)。これらのデータは、5 C 1 0 H 2 L 2 抗体が優れた特異性を有することを示している。

【0165】

実施例12：競合ELISAによる、PDL-1に対するPD-1とヒト化抗体の競合結合活性の決定

競合ELISAを実行して、ヒトPDL-1に対する結合においてPD-1と競合する5 C 1 0 H 1 L 1、5 C 1 0 H 1 L 2、5 C 1 0 H 2 L 2、5 C 1 0 H 2 L 1及び陽性対照（HpLp及びPCAB）の能力を評価した。ELISAプレートを受容体でコーティングし、4℃で終夜インキュベートした。ウェルを、1%BSAで、37℃で2時間ブロッキングした。その後、抗体及びPDL-1-mFcを混合し、室温で15分間インキュベートし、次いで各ウェルに添加し、37℃で30分間インキュベートした。二次抗体、HRPにコンジュゲートしたヤギ抗マウスIgG（H+L）（Jackson、109-035-062）を、添加した。TMB基質（Neogen、308177）を、発色反応のために添加し、5分間インキュベートした。吸光度を、450nmで読み取った。

【0166】

PDL-1に対するこれらの抗体の結合活性の結果を、図22に示す。5 C 1 0 H 1 L 1、5 C 1 0 H 1 L 2、5 C 1 0 H 2 L 2、5 C 1 0 H 2 L 1、HpLp及びPCABが、PDL-1に対する結合においてPD-1と用量依存的様式で競合し得ることが分かる。各用量の蛍光強度及び曲線フィッティング後のEC₅₀により表される算出した結合効率を、表7に示す。

【表7】

表7:PDL-1に対する抗体5C10H1L1、5C10H1L2、5C10H2L2、5C10H2L1、HpLp及びPCABの競合結合(競合ELISA)

コーティングした抗原:PD-1-hFc 0.5 µg/mL												
抗体 (µg/mL)	5C10 H1L1		5C10 H2L2		5C10 H1L2		5C10 H2L1		KF025 HPLP (HpLp)		PCAB	
10	0.131	0.123	0.124	0.124	0.123	0.117	0.138	0.124	0.130	0.127	0.175	0.176
3.3333	0.155	0.153	0.153	0.165	0.151	0.157	0.158	0.159	0.152	0.162	0.199	0.215
1.1111	1.961	1.999	1.672	1.695	1.797	1.799	1.843	1.871	1.501	1.244	0.806	0.905
0.3704	2.383	2.331	2.238	2.251	2.292	2.292	2.230	2.407	2.180	2.106	2.152	1.911
0.1235	2.399	2.367	2.241	2.291	2.289	2.328	2.326	2.256	2.120	2.022	2.146	2.078
0.0412	2.430	2.456	2.314	2.413	2.338	2.364	2.358	2.350	2.358	2.208	2.267	2.136
0.0137	2.395	2.334	2.298	2.331	2.339	2.368	2.394	2.357	2.186	2.297	2.290	2.199
0.0000	2.345	2.343	2.372	2.368	2.345	2.369	2.311	2.276	2.329	2.298	2.116	2.262
PDL-1-mFc:1 µg/ml												
二次抗体としての HRP にコンジュゲートしたヤギ抗マウス IgG												
EC ₅₀	10.37		9.683		9.952		10.03		8.73		6.145	

【0167】

結果は、検出した抗体の全てが、抗原 PDL-1 に用量依存的様式で競合的及び効果的に結合し得ることを示した。

【0168】

実施例 13：競合 ELISA による、PDL-1 に対する B7-1 と抗体 5C10H2L2 の競合結合活性の決定

PDL-1 に対する結合について B7-1 (B7-1-hFc、調製例 3 により得た) と競合する 5C10H2L2 及び陽性対照抗体 (HpLp 及び PCAB) の能力を、競合 ELISA により決定した。ELISA プレートを PDL-1 でコーティングし、4℃で終夜インキュベートした。ウェルを、1% BSA を用いて 37℃で 2 時間ブロッキングした。その後、抗体及び PDL-1-mFc を混合し、室温で 15 分間インキュベートし、次いで各ウェルに添加し、37℃で 30 分間インキュベートした。二次抗体、HRP にコンジュゲートしたヤギ抗マウス IgG (H+L) (Jackson、109-035-062) を、添加した。TMB 基質 (Neogen、308177) を、発色反応のために添加し、5 分間インキュベートした。吸光度を、450nm で読み取った。

【0169】

PDL-1 結合に対する B7-1 と 5C10H2L2 の競合の結果を、図 23 に示し、5C10H2L2、HpLp 及び PCAB は、PDL-1 結合について B7-1 と効果的に競合し得る。各用量の蛍光強度及び曲線フィッティング後の EC_{50} により表される算出した結合効率を、表 8 に示す。

【表 8】

表 8: PDL-1 に対する競合結合における抗体 5C10H2L2、HpLp, PCAB 及び B7-1 の競合

ELISA の結果

抗体 (μ g/mL)	コーティングした抗原: PDL-1-mFc (1μ g/mL)					
	5C10H2L2		HpLp		PCAB	
3 μ g/ml	0.583	0.583	0.735	0.683	0.400	0.413
1:3	0.661	0.665	0.731	0.781	0.525	0.581
1:9	0.694	0.699	0.713	0.789	0.606	0.682
1:27	0.798	0.824	0.791	0.853	0.762	0.747
1:81	0.965	0.976	0.988	0.959	0.889	0.906
1:243	1.043	1.052	0.985	1.055	1.031	1.009
1:729	1.064	1.069	0.990	0.986	1.029	1.013
0.000	1.052	0.984	0.955	0.938	1.013	1.036
B7-1-hFc-bio: 0.4 μ g/ml						
二次抗体	ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識したストレプトアビジン (SA-HRP) (1:4000)					
EC_{50} (nM)	0.756		0.639 (不完全な競合*)		1.554	

*不完全な競合。競合結合実験における HpLp のデータウィンドウが、他の 2 つの抗体より小さい点に留意する必要がある。表 7 に示すように、1:27 希釈 (1:9、1:3、3 μ g/mL など) から開始する HpLp 濃度の増加に伴う OD の低下は、明らかでない。

【0170】

結果は、決定した抗体全てが、PDL-1 結合について B7-1 と競合でき、5C10H2L2 の競合結合活性は、PCAB より強く、5C10H2L2 の EC_{50} は、PCA

Bの約半分であることを示す。H p L pの競合結合活性は、その濃度増加につれて有意に増加しない。

【0171】

実施例14：5C10H2L2及び陽性対照抗体（H p L p及びP C A B）の細胞生物活性分析

末梢血単核細胞（P B M C）におけるI L - 2及びI F N - γ の分泌に対するモノクローナル抗体5C10H2L2並びに陽性対照（H p L p及びP C A B）の効果を調査するために、F i c o l l - P a q u e P l u s（G E H e a l t h c a r e ロット番号171440-02）を使用して、P B M Cを単離した。P B M CにI L - 4（P e p r o T e c h K 2 5 1 3、1000U/mL）及びG M - C S F（P e p r o T e c h H 1 5 1 3、1000U/mL）を添加して、6日間誘導した。その後、P B M C及び細胞にT N F - α （P e p r o T e c h G 1 5 1 3、200U/mL）を更に添加して、3日間誘導し、それによってD C細胞を得た。

10

【0172】

T細胞をP B M Cから単離した。D C細胞をT細胞と混合し、1：10の比で培養した。異なる濃度の抗体5C10H2L2（対照としてh I g G）と5～6日間インキュベートした後、E L I S Aを実施してI F N - γ （D a k e w e B i o t e c h I n c. から購入したキット）及びI L - 2（D a k e w e B i o t e c h I n c. から購入したキット）の分泌を評価した。

20

【0173】

D C及びT細胞混合物からのI F N - γ 及びI L - 2の分泌の結果を、それぞれ図24及び図25に示した。結果は、5C10H2L2、H p L p並びにP C A Bが、I F N - γ 及びI L - 2の分泌を用量依存的様式で効果的に誘導し得ることを示す。

【0174】

実施例15：修飾I g G 1定常領域を持つモノクローナル抗体5C10H2L2-I g G 1 m tの設計及び調製

本発明において、重鎖定常領域は、I g γ -1鎖C領域、受託番号：P 0 1 8 5 7であり；軽鎖定常領域は、I g κ 鎖C領域、受託番号：P 0 1 8 3 4である。E U付番方式による234、235及び、237部位でアミノ酸を、L 2 3 4 A、L 2 3 5 A及びG 2 3 7 Aに突然変異させた。変異体抗体を、5C10H2L2-I g G 1 m tと命名し、実施例4の方法により調製した。

30

【0175】

実施例16：フォルテバイオにより決定したF c γ R I I I a及びC 1 qに対する5C10H2L2-I g G 1 m tの動力学的親和性

1. F c γ R I I I aに対する5C10H2L2-I g G 1 m t、テセントリク（登録商標）の親和性及び結合動態を、フォルテバイオ（P a l l カタログ番号O c t e t、Q k eから購入した）により以下の通り特徴づけた：

【0176】

精製したF c γ R I I I a-ビオチンを、固定条件（1 μ g/mL F c γ R I I I a-ビオチン、300秒）でフォルテバイオにより提供される標準的な方法及びキットを使用してビオチン-ストレプトアビジン結合によってストレプトアビジンコートされているS Aチップにカップリングした。チップに、抗体を濃度4000nMで120秒間結合させ、その後P B S T（pH 7. 4）中で180秒間インキュベートして解離させた。結合及び解離曲線を、O c t e tソフトウェアにより分析した。

40

【0177】

結果を、図26A及び26Bに示し、5C10H2L2-I g G 1 m t及びテセントリク（登録商標）は、F c γ R I I I aに結合しなかった、このことは両方ともA D C C活性がないことを示す。

【0178】

2. C 1 q（F i t z g e r a l d、カタログ番号32R-AC049から購入した）に

50

対する 5C10H2L2-IgG1mt、テセントリク（登録商標）の親和性及び結合動態を、フォルテバイオにより以下の通り特徴づけた：

【0179】

精製した抗体を、固定条件（20 μ g/mL 抗体-ビオチン、300秒）でフォルテバイオにより提供される標準的な方法及びキットを使用してビオチン-ストレプトアビジン結合によってストレプトアビジンコートされているSAチップにカップリングした。次いでチップに、C1qを濃度200nM（2倍希釈）で120秒間結合させ、その後PBST（pH7.4）中で180秒間インキュベートして解離させた。結合及び解離曲線を、Octetソフトウェアにより分析した。結合定数評価に対する親和性の効果を最小限に抑えるために、結合及び解離相の開始に対応するデータセグメントだけを、フィッティングした。K_D、K_{on}及びK_{off}の値を表9に示し、曲線を図27A及び27Bに示す。

【表9】

表9: C1qに対する5C10H2L2-IgG1mt及びテセントリク(登録商標)の動力的親和性

抗体	K _D (M)	K _{on} (1/Ms)	K _{dis} (1/s)
5C10H2L2-IgG1mt	8.53E-09	9.86E+05	8.41E-03
テセントリク(登録商標)	1.30E-09	1.36E+06	1.76E-03

【0180】

結果は、5C10H2L2-IgG1mtが、C1qに対してテセントリク（登録商標）より低い動力的親和性を有することを実証している。

【0181】

実施例17：5C10H2L2-IgG1mtのCDC活性

PDL-1陽性腫瘍細胞HCC1954（ATCCカタログ番号CRL-2338から購入した）を、対応する培地（RPMI1640+10%ウシ血清）で培養した。そして、5C10H2L2-IgG1mtを、10000 μ g/mLで開始して、培地（RPMI1640+10%ヒト血清）で段階的に希釈した（5倍希釈を10段階）。上述の腫瘍細胞をトリプシンで処理し、数本のチューブの細胞を採取し、対応する培地（RPMI1640+10%ヒト血清）に再懸濁し、次いで異なる希釈の抗体と共に96ウェルプレートに添加して（10000個の細胞/ウェル）、5時間インキュベートした。その後、CK8試薬（Dongren Chemical Technology Co.、Ltd.、カタログ番号CK04、ロット：JJ744から購入した）20 μ Lを各ウェルに添加して、3時間インキュベートした。吸光度を、マイクロプレートリーダー（Molecular Devices、Model：SpectraMax M2）により450nmで読み取った。ミトコンドリア内のデヒドロゲナーゼの活性は、HCC1954細胞に対する抗体の細胞毒性を反映している。

【0182】

結果は、5C10H2L2-IgG1mtが、HCC1954細胞に対してCDC効果がないことを実証している。

【0183】

実施例18：大腸がんに対するin vivo腫瘍阻害効果

1. サンプル

5C10H2L2-IgG1mt、テセントリク（登録商標）及びヒトIgGを、Sichuan Kelun Pharmaceutical Research Institute Co. Ltd. より得た。

テセントリク（登録商標）を、Rocheから購入し、ヒトIgGを、Chengdu

Rongsheng Pharmaceutical Co.、Ltd. から購入した。

【0184】

調製：3つのサンプルを、0.1%BSAを含有する生理食塩水で所望の濃度に希釈する。

【0185】

細胞及び動物

MC-38/H-11細胞を、マウス大腸がんMC-38細胞(Cobioer、カタログCBP60825から購入した)から得た。MC-38/H-11細胞の内生的マウスPDL-1は、CRISPR/Cas9によりノックアウトされており、ヒトPDL-1が、細胞にトランスフェクトされている。従って、MC-38/H-11細胞は、ヒトPDL-1タンパク質だけを発現することになる。

10

【0186】

C57BL/6マウス、7~8週齢、雌を、Shanghai Slac Laboratory Animal Co.、Ltd. から購入した。

【0187】

2. 手順

各マウスに、MC-38/H-11細胞 1×10^5 個を皮下接種し、無作為に群分けして、腫瘍接種(D0)の2日目から2日に1回(Q2D)サンプルを腹腔内注射(IP)した。注射用量は、ヒトIgG(15mg/kg)、5C10H2L2-IgG1mt(1.5、5、15mg/kg)及びテセントリク(登録商標)(15mg/kg)であった。各群は、0.1mL/10g体重の注射体積のマウス10匹であった。

20

【0188】

3. 実験的指標

腫瘍成長に対する薬物の影響を、T/C%又は腫瘍成長阻害(TGI)(%)により示す。

【0189】

腫瘍直径を、ノギスで週2回測定した。腫瘍体積(V)を：

$V = 1/2 \times a \times b^2$ として算出した、式中、a及びbはそれぞれ長さ及び幅を表す。

$T/C\% = T/C \times 100$ であり、Cは対照群の腫瘍体積又は腫瘍重量を表し、Tは処置群の腫瘍体積又は腫瘍重量を表す。

30

【0190】

腫瘍成長阻害(TGI)(%) = $(C - T) / C \times 100$ であり、Cは対照群の腫瘍体積又は腫瘍重量を表し、Tは、処置群の腫瘍体積又は腫瘍重量を表す。

【0191】

4. 結果

下記表10に示す。

【表 10】

表 10:MC-38/H-11 の大腸がんの皮下異種移植片に対する 5C10H2L2-

IgG1mt(1.5mg/kg、5mg/kg 及び 15mg/kg)及びテセントリク(登録商標)の有効性

群/用量	D27 の 平均腫 瘍体積 (mm ³)	D27 の T/C (%)	腫瘍成 長阻害 率 TGI (%)	D27 の 腫瘍体 積中央 値 (mm ³)	腫瘍成 長阻害 率 TGI(%)	D27 の 腫瘍重 量中央 値(g)	腫瘍成 長阻害 率 TGI(%)	腫瘍形 成率(%)
ヒト IgG (15mg/kg)	2486.0	-	-	2126.7	-	25.0	-	100.0
5C10H2L2- IgG1mt (1.5mg/kg)	898.5	36.1	63.9	0.0	100.0	0.0	100.0	40.0
5C10H2L2- IgG1mt (5mg/kg)	600.6	24.2	75.8	0.0	100.0	0.0	100.0	40.0
5C10H2L2- IgG1mt (15mg/kg)	780.6	31.4	68.6	0.0	100.0	0.0	100.0	40.0
テセントリク (登録商標) (15mg/kg)	867.2	34.9	65.1	132.0	93.8	0.2	93.7	50.0

注:マウスは無作為に群分けされ、最初の投与は D0 であった。D27 は、最初の投与後 27 日目を意味する。

【0192】

MC-38/H-11 の皮下異種移植片に対する 5C10H2L2-IgG1mt 1.5、5 及び 15mg/kg の TGI 率は、平均腫瘍体積により算出してそれぞれ 63.9%、75.8% 及び 68.6% であった。各群における腫瘍サイズの個体変動が非常に大きかったことを考えると、腫瘍成長阻害計算に腫瘍体積中央値を使用することは合理的であった。この条件下で、TGI 率は、100%、100% 及び 100% であった。参照薬物テセントリク(登録商標)(15mg/kg)は、TGI 93.8% (腫瘍体積中央値で算出した)を有した。腫瘍重量中央値により算出した場合、MC-38/H-11 に対する 5C10H2L2-IgG1mt (1.5、5、15mg/kg) の TGI は、100%、100% 及び 100% であった。テセントリク(登録商標)の TGI は、93.7% であった。腫瘍体積中央値と腫瘍重量中央値で算出される TGI には、高い整合性があり、腫瘍体積による計算の信頼性を示している。5C10H2L2-IgG1mt (1.5、5、15mg/kg) は、腫瘍成長を阻害するだけでなく、腫瘍化も阻害した。実験の終了時(D27)に、5C10H2L2-IgG1mt 1.5、5、15mg/kg の腫瘍出現率は、それぞれ 40%、40% 及び 40% であった。テセントリク(登録商標)群の腫瘍出現率は、50% であった。全ての薬物は、担腫瘍マウスにおいて有意な体重減少なく、また他の症候が観察されることもなくよく寛容される。テセントリク(登録商標)と比較して、5C10H2L2-IgG1mt (1.5、5、15mg/kg) は、大腸がん細胞 MC-38/H-11 皮下移植モデルに対してより強い抗腫瘍効果を有した。

【0193】

実施例 19：肺がんに対する *in vivo* 腫瘍阻害効果

動物モデルの方法：NOGマウスに、非小細胞肺がん細胞HCC827（ATCCカタログ番号CRL-2868から購入した）を皮下接種した。腫瘍体積が 100mm^3 に達したら、次いでマウスに活性化したヒトPBMCを静脈内注射して、投与前にヒト免疫系を模倣した。

【0194】

投薬計画： 10mg/kg 、静脈内注射、2日毎に1回、合計4回。腫瘍体積を、投与後週2回測定した。マウスを、3つの群に分けた：対照（IgG）、5C10H2L2-IgG1mt及びテセントリク（登録商標）、各群6匹のマウス。

【0195】

腫瘍成長曲線を、図28に示す。

【0196】

結果は、5C10H2L2-IgG1mt群の腫瘍体積が、4日目からテセントリク（登録商標）群及びIgG対照群より明らかに小さいことを示した。5C10H2L2-IgG1mt群の腫瘍成長は、ほぼ完全に阻害された。対照的に、テセントリク（登録商標）群及びIgG対照群において腫瘍は、継続的に成長した。結果は、本発明の抗体が、テセントリク（登録商標）より強い *in vivo* 抗腫瘍効果を有することを実証した。

【0197】

本発明の特定の実施形態について詳述してきたが、当業者であれば理解することができよう。開示された全ての詳細により、様々な修正及び置き換えをこれらの詳細に対して作製することができ、それらはなお本発明の保護範囲内にある。本発明の完全な範囲は、添付の特許請求の範囲及びその任意の等価物により与えられる。

【図1】

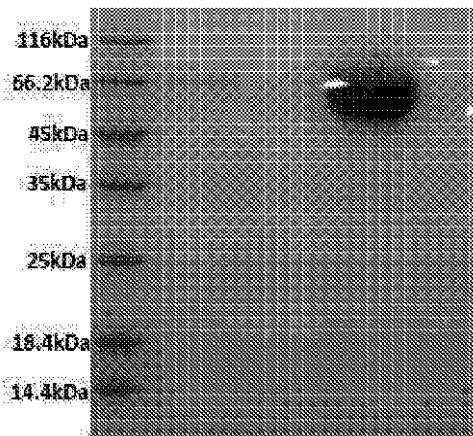


図 1

【図2】

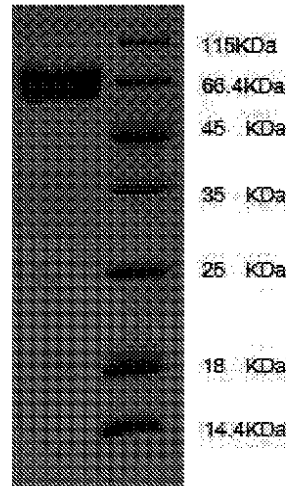


図 2

【図 3】

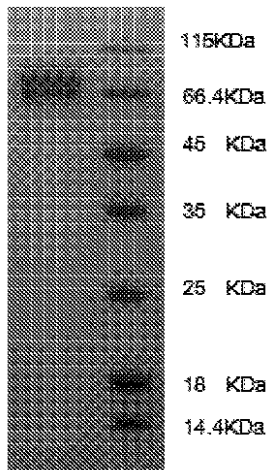


図 3

【図 4】

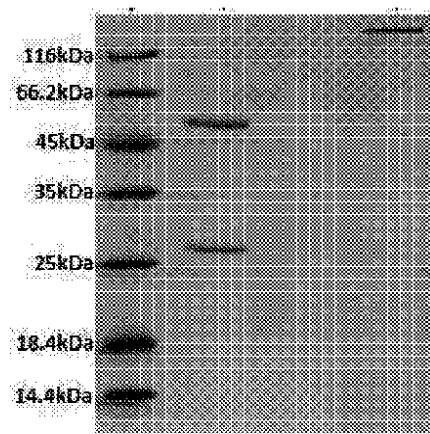


図 4

【図 5】

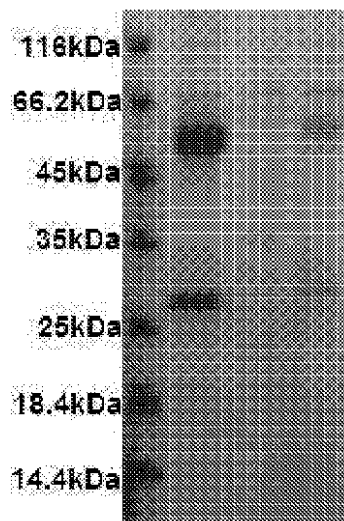


図 5

【図 6】

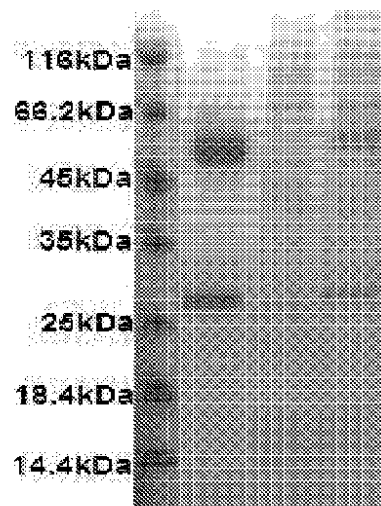


図 6

【図 7】

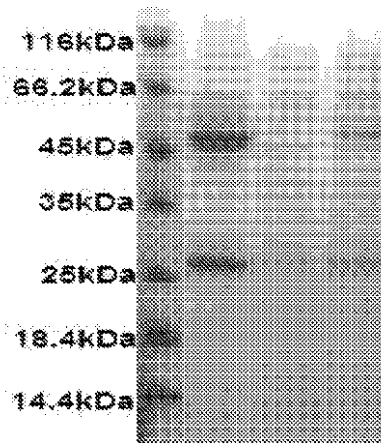


图 7

【図 8】

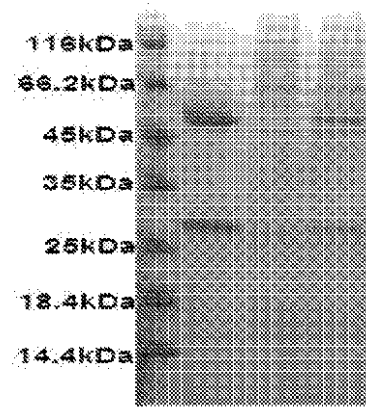


图 8

【図 9】

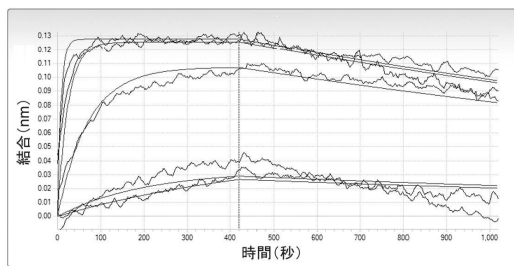


FIG. 9

【図 10】

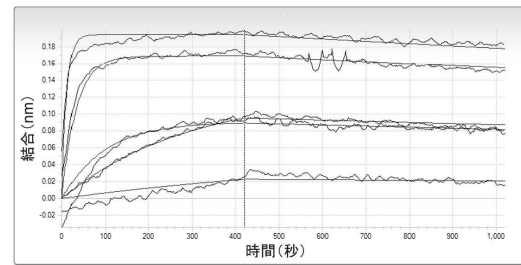


FIG. 10

【図 1 1】

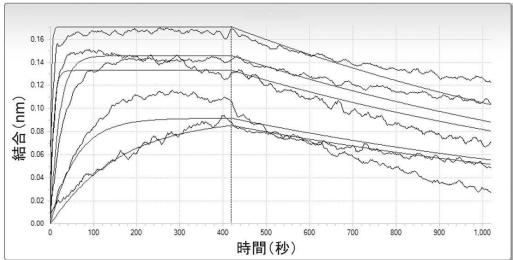
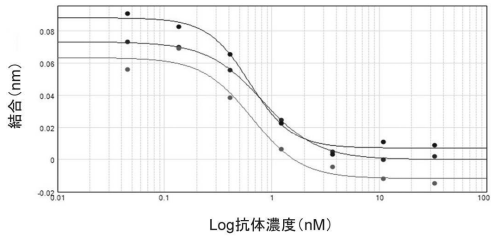


FIG. 11

【図 1 2】



- 5C10(5C10: 値対濃度)
- 5C10 H2L2(5C10 H2L2: 値対濃度)
- HpLp(HpLp: 値対濃度)

曲線フィッティング結果 ▲

曲線フィッティング
:4-パラメーター

$$y = D + \frac{A - D}{1 + (\frac{x}{EC50})^B}$$

	パラメーター	推定値	標準誤差	信頼区間
5C10	A	0.078	0.001	[0.074, 0.081]
	B	1.704	0.115	[1.337, 2.071]
	C	0.817	0.037	[0.699, 0.935]
	D	0.004	8.89e-4	[0.001, 0.007]
5C10 H2L2	A	0.068	0.007	[0.045, 0.090]
	B	1.880	0.749	[-0.503, 4.262]
	C	0.654	0.168	[0.118, 1.190]
	D	-0.008	0.005	[-0.024, 0.009]
HpLp	A	0.092	0.004	[0.080, 0.104]
	B	2.298	0.471	[0.710, 3.705]
	C	0.625	0.079	[0.375, 0.875]
	D	0.011	0.003	[0.002, 0.020]

FIG. 12

【図 1 3】

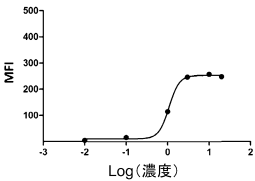


FIG. 13

【図 1 4】

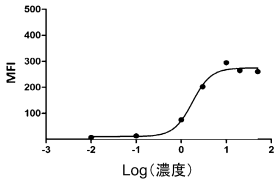
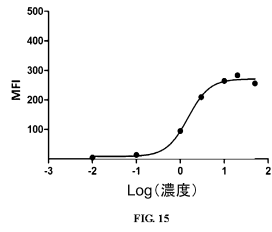
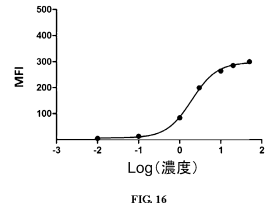


FIG. 14

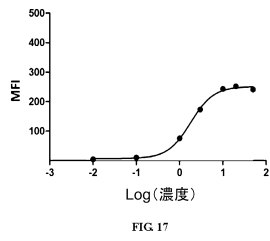
【図 1 5】



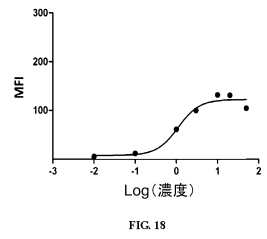
【図 1 6】



【図 1 7】



【図 1 8】



【図 19】

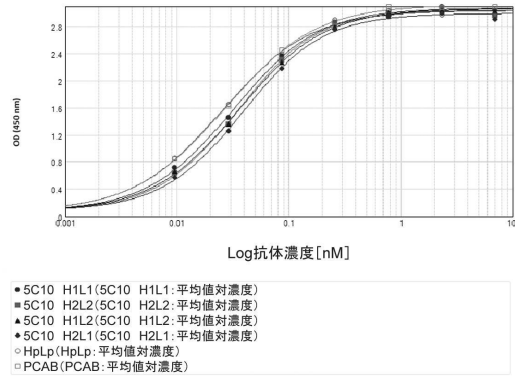


FIG. 19

【図 20】

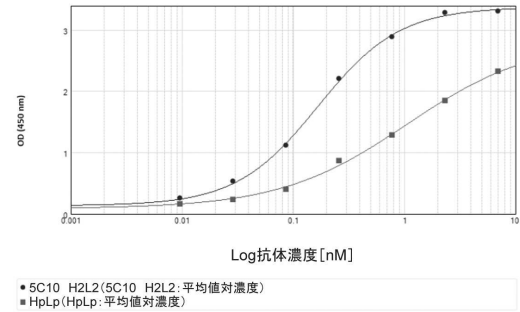


FIG. 20

【図 21】

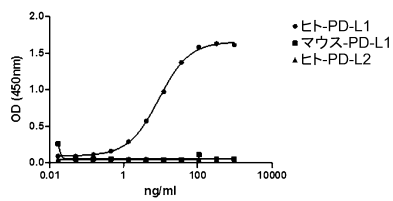


FIG. 21

【図 22】

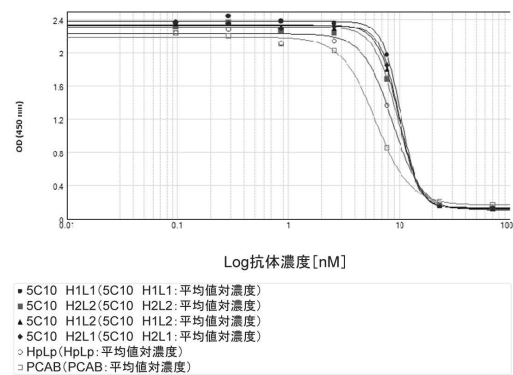
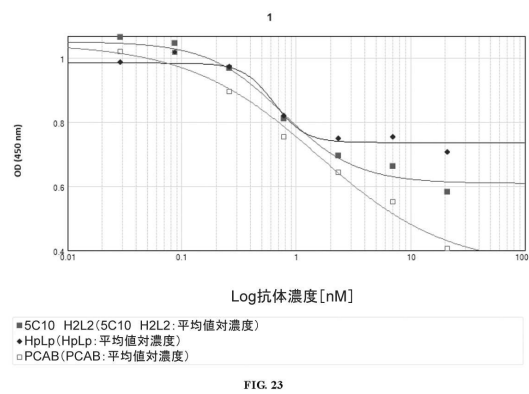
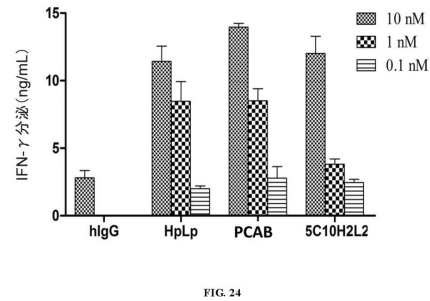


FIG. 22

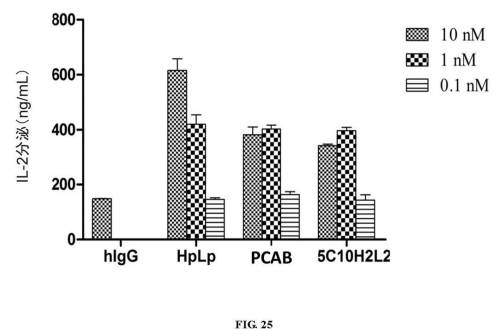
【図 2 3】



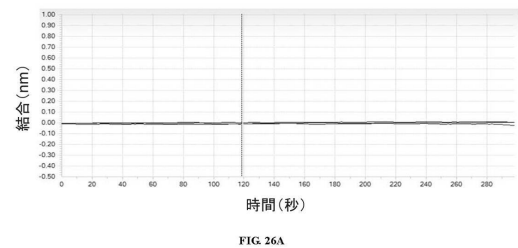
【図 2 4】



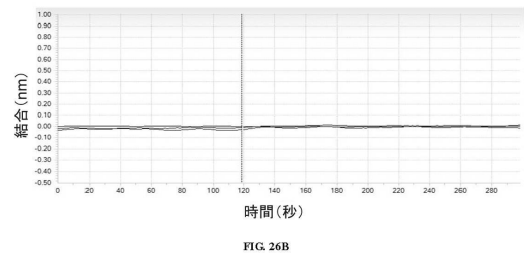
【図 2 5】



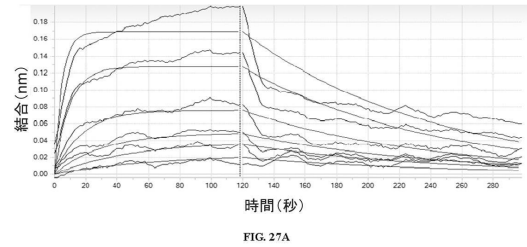
【図 2 6 A】



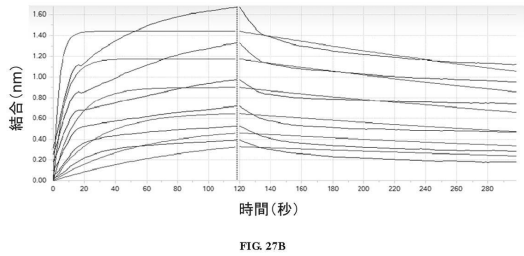
【図 2 6 B】



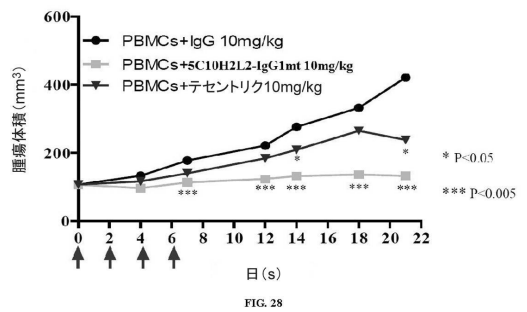
【図 2 7 A】



【図 2 7 B】



【図 2 8】



【配列表】

0006432121000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N 1/19
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 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P 21/08
C 1 2 N	5/18	(2006.01)	C 1 2 N 5/18
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K 39/395 U
A 6 1 K	51/10	(2006.01)	A 6 1 K 51/10 2 0 0
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P 35/02
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53 D
G 0 1 N	33/543	(2006.01)	G 0 1 N 33/543 5 4 5 A

(74)代理人 100123995

弁理士 野田 雅一

(74)代理人 100148596

弁理士 山口 和弘

(72)発明者 リ, バイヨン

中華人民共和国, グアンドン 5 2 8 4 3 7, チョンシャン, トーチ デベロップメント
ゾーン, シェンノン ビルディング 6

(72)発明者 シュエ, トントン

中華人民共和国, スーチョワン 6 1 1 1 3 8, チェンドウ, ウェンチャン ディストリク
ト, ハイ シア インドストリアル パーク, シンホア アベニュー (セクション 2)
, ナンバー 6 6 6

(72)発明者 シア, ユー

中華人民共和国, グアンドン 5 2 8 4 3 7, チョンシャン, トーチ デベロップメント
ゾーン, シェンノン ビルディング 6

(72)発明者 ワン, ゾンミン マックスウェル

中華人民共和国, グアンドン 5 2 8 4 3 7, チョンシャン, トーチ デベロップメント
ゾーン, シェンノン ビルディング 6

(72)発明者 シャオ, リャン

中華人民共和国, スーチョワン 6 1 1 1 3 8, チェンドウ, ウェンチャン ディストリク
ト, ハイ シア インドストリアル パーク, シンホア アベニュー (セクション 2)
, ナンバー 6 6 6

(72)発明者 ワン, リチュン

中華人民共和国, スーチョワン 6 1 1 1 3 8, チェンドウ, ウェンチャン ディストリク
ト, ハイ シア インドストリアル パーク, シンホア アベニュー (セクション 2)
, ナンバー 6 6 6

(72)発明者 ワン, ジンイー

中華人民共和国, スーチョワン 6 1 1 1 3 8, チェンドウ, ウェンチャン ディストリク
ト, ハイ シア インドストリアル パーク, シンホア アベニュー (セクション 2)
, ナンバー 6 6 6

審査官 野村 英雄

(56)参考文献 特表2008-544755 (JP, A)

特表2015-519375 (JP, A)

特表2015-535691 (JP, A)

特表2016-504336 (JP, A)

特表2015-518826 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

C07K 1/00-19/00

PubMed