

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7105235号

(P7105235)

(45)発行日 令和4年7月22日(2022.7.22)

(24)登録日 令和4年7月13日(2022.7.13)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K 16/28 (2006.01)

C 0 7 K 16/28

A 6 1 K 51/10 (2006.01)

A 6 1 K 51/10 2 0 0

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 T Z N A

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

A 6 1 K 45/00 (2006.01)

A 6 1 K 45/00

請求項の数 34 (全75頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-529257(P2019-529257)

(86)(22)出願日 平成29年12月1日(2017.12.1)

(65)公表番号 特表2020-512281(P2020-512281
A)

(43)公表日 令和2年4月23日(2020.4.23)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/064215

(87)国際公開番号 WO2018/102682

(87)国際公開日 平成30年6月7日(2018.6.7)

審査請求日 令和2年12月1日(2020.12.1)

(31)優先権主張番号 62/428,672

(32)優先日 平成28年12月1日(2016.12.1)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/457,267

(32)優先日 平成29年2月10日(2017.2.10)

最終頁に続く

(73)特許権者 597160510

リジェネロン・ファーマシューティカル
ズ・インコーポレイテッドREGENERON PHARMACE
UTICALS, INC.

アメリカ合衆国 1 0 5 9 1 - 6 7 0 7 ニ

ューヨーク州タリータウン、オールド・

ソー・ミル・リバー・ロード 7 7 7 番

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 ケリー, マーカス

アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 5 9

1, タリータウン, オールド ソー ミ

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 免疫 P E T イメージングのための放射性標識された抗 P D - L 1 抗体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単量体ヒトプログラム細胞死リガンド 1 (P D - L 1) に結合する抗体またはその抗原結合性断片、キレート化部分、およびポジトロン放射体を含む、放射性標識された抗体コンジュゲートであって、前記抗体またはその抗原結合性断片は、

3 つの重鎖相補性決定領域 (H C D R 1、H C D R 2、および H C D R 3) : 配列番号 8 4 に記載のアミノ酸配列を含む H C D R 1、配列番号 8 6 に記載のアミノ酸配列を含む H C D R 2、および配列番号 8 8 に記載の H C D R 3、を含む重鎖可変領域 (H C V R) と、

3 つの軽鎖相補性決定領域 (L C D R 1、L C D R 2、および L C D R 3) : 配列番号 9 2 に記載のアミノ酸配列を含む L C D R 1、配列番号 9 4 に記載のアミノ酸配列を含む L C D R 2、および配列番号 9 6 に記載のアミノ酸配列を含む L C D R 3、を含む軽鎖可変領域 (L C V R) と

を含む、コンジュゲート。

【請求項 2】

前記抗体またはその抗原結合性断片が、式 (A) :

- L - M z

(A)

の 1 または複数の部分に共有結合的に結合し、式中、

L はキレート化部分であり ; M はポジトロン放射体であり ; z は出現毎に独立に 0 または

1 であり； z の少なくとも 1 つは 1 である、
請求項 1 に記載のコンジュゲート。

【請求項 3】

前記キレート化部分が、デスフェリオキサミンを含む、請求項 1 または 2 に記載のコンジュゲート。

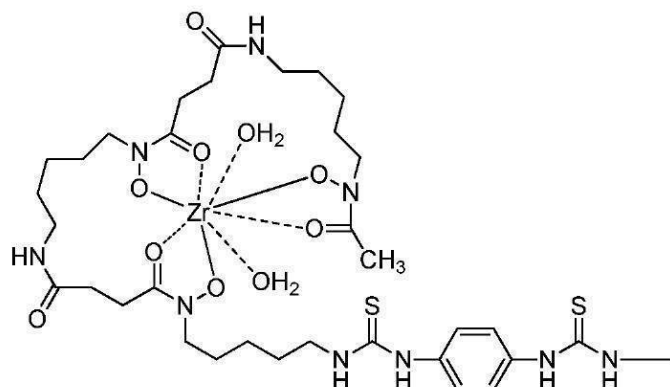
【請求項 4】

前記ポジトロン放射体が、 ^{89}Zr である、請求項 1 から 3 のいずれかに記載のコンジュゲート。

【請求項 5】

- L - M が、

【化 6】



であり、式中、 Zr はポジトロン放射体 ^{89}Zr である、請求項 2 から 4 のいずれかに記載のコンジュゲート。

【請求項 6】

抗体またはその抗原結合性断片が、式 (A) の 1 つ、2 つ、または 3 つの部分に共有結合的に結合する、請求項 1 から 5 に記載のコンジュゲート。

【請求項 7】

前記抗体が、以下：

(a) 37 での表面プラズモン共鳴アッセイにおいて測定される、約 310 pM 未満の結合解離平衡定数 (K_D) で、単量体 PD-L1 に結合すること；

(b) 25 での表面プラズモン共鳴アッセイにおいて、約 180 pM 未満の K_D で、単量体ヒト PD-L1 に結合すること；

(c) 37 での表面プラズモン共鳴アッセイにおいて測定される、約 15 pM 未満の K_D で、二量体ヒト PD-L1 に結合すること；および

(d) 25 での表面プラズモン共鳴アッセイにおいて、約 8 pM 未満の K_D で、二量体ヒト PD-L1 に結合すること

からなる群より選択される、1 または複数の特性を有する、請求項 1 から 6 のいずれかに記載のコンジュゲート。

【請求項 8】

前記抗体が、配列番号 82 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (HCV R) と、配列番号 90 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (LCV R) アミノ酸配列とを含む、請求項 1 から 7 のいずれかに記載のコンジュゲート。

【請求項 9】

PD-L1 を発現する組織を画像化する方法における使用のための、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の放射性標識された抗体コンジュゲートを含む組成物であって、前記方法は、前記組成物を前記組織に投与するステップ；および PD-L1 発現をポジトロン放射断層撮影 (PET) イメージングにより可視化するステップを含む、組成物。

【請求項 10】

腫瘍の処置のための、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の放射性標識された抗体コンジュゲートを含む組成物であって、前記処置が、

(a) 固形腫瘍を選択するステップ；

(b) 前記組成物を投与することによって前記固形腫瘍が P D - L 1 陽性であることを決定するステップ；および

前記腫瘍内の前記放射性標識された抗体コンジュゲートの局在化を、ポジトロン放射断層撮影 (P E T) イメージングによって画像化するステップであって、前記腫瘍内の前記放射性標識された抗体コンジュゲートの存在が、前記腫瘍が P D - L 1 陽性であることを指し示す、ステップ；および

(c) 1 または複数の用量の P D - 1 / P D - L 1 シグナル伝達軸の阻害剤を投与するステップ

10

を含む、組成物。

【請求項 1 1】

0 . 1 ~ 1 0 m g / k g の前記放射性標識された抗体コンジュゲートが投与されることを特徴とする、請求項 1 0 に記載の組成物。

【請求項 1 2】

前記組成物が、皮下または静脈内投与のために製剤化されている、請求項 1 0 または 1 1 に記載の組成物。

【請求項 1 3】

P E T イメージングが、前記組成物を投与してから 2 ~ 7 日後に行われる、請求項 1 0 から 1 2 のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 1 4】

ステップ (b) が、P D - 1 / P D - L 1 シグナル伝達軸の阻害剤による処置の前に実行される、請求項 1 0 から 1 3 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 1 5】

前記処置が、

(a) 少なくとも 1 用量の P D - 1 / P D - L 1 シグナル伝達軸の阻害剤による処置の後に前記組成物を投与するステップ；および

(b) 前記腫瘍内の前記放射性標識された抗体コンジュゲートの局在化を P E T イメージングにより画像化するステップ

30

をさらに含み、前記腫瘍内の前記放射性標識された抗体コンジュゲートの局在化領域のベースラインからの低下が、腫瘍退縮を指し示す、請求項 1 0 から 1 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 6】

前記 P D - 1 / P D - L 1 シグナル伝達軸の阻害剤の投与から 1 ~ 2 0 週後に、前記組成物が投与されることを特徴とする、請求項 1 5 に記載の組成物。

【請求項 1 7】

前記腫瘍が、血液がん、脳がん、腎細胞がん、卵巣がん、膀胱がん、前立腺がん、乳がん、肝細胞癌、骨がん、結腸がん、非小細胞肺癌、頭頸部扁平上皮がん、結腸直腸がん、中皮腫、B 細胞リンパ腫、およびメラノーマからなる群より選択される、請求項 1 0 から 1 6 のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項 1 8】

前記 P D - 1 / P D - L 1 シグナル伝達軸の阻害剤が、抗 P D - 1 抗体またはその抗原結合性断片である、請求項 1 0 から 1 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 9】

前記抗 P D - 1 抗体は、ニボルマブ、ペムプロリズマブおよび R E G N 2 8 1 0 からなる群より選択される、請求項 1 8 に記載の組成物。

【請求項 2 0】

前記 P D - 1 / P D - L 1 シグナル伝達軸の阻害剤が、抗 P D - L 1 抗体またはその抗原結合性断片である、請求項 1 0 から 1 7 のいずれか一項に記載の組成物。

50

【請求項 2 1】

前記抗 P D - L 1 抗体が、アテゾリズマブである、請求項 2 0 に記載の組成物。

【請求項 2 2】

前記抗 P D - L 1 抗体またはその抗原結合性断片が、配列番号 8 2 に記載の重鎖可変領域 (H C V R) アミノ酸配列；および配列番号 9 0 に記載の軽鎖可変領域 (L C V R) アミノ酸配列を含む、請求項 2 0 に記載の組成物。

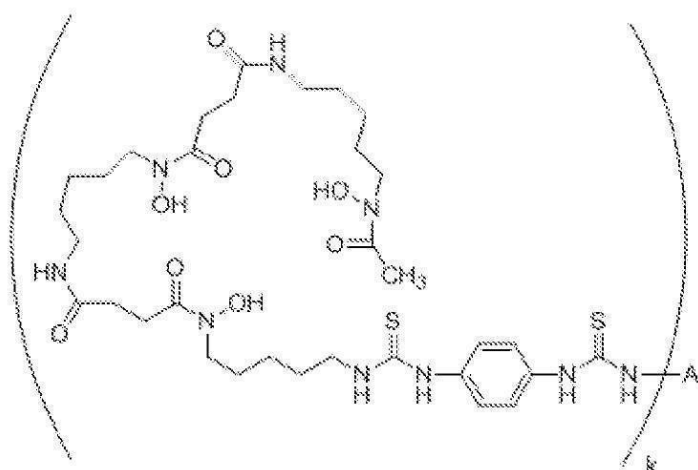
【請求項 2 3】

前記抗 P D - L 1 抗体またはその抗原結合性断片が、3つの H C D R (H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3) ならびに3つの L C D R (L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3) を含み、前記 H C D R 1 が、配列番号 8 4 に記載の アミノ酸配列を含み；前記 H C D R 2 が、配列番号 8 6 に記載の アミノ酸配列を含み；前記 H C D R 3 が、配列番号 8 8 に記載の アミノ酸配列を含み；前記 L C D R 1 が、配列番号 9 2 に記載の アミノ酸配列を含み；前記 L C D R 2 が、配列番号 9 4 に記載の アミノ酸配列を含み；および前記 L C D R 3 が、配列番号 9 6 に記載の アミノ酸配列を含む、請求項 2 0 に記載の組成物。

【請求項 2 4】

式 (I I I) :

【化 7】



の化合物であって、式中、A は、P D - L 1 に結合する抗体またはその抗原結合性断片であり、以下：

配列番号 8 4 に記載の アミノ酸配列を含む H C D R 1 ；

配列番号 8 6 に記載の アミノ酸配列を含む H C D R 2 ；

配列番号 8 8 に記載の アミノ酸配列を含む H C D R 3 ；

配列番号 9 2 に記載の アミノ酸配列を含む L C D R 1 ；

配列番号 9 4 に記載の アミノ酸配列を含む L C D R 2 ；および

配列番号 9 6 に記載の アミノ酸配列を含む L C D R 3

を含む、化合物。

【請求項 2 5】

抗腫瘍療法の有効性をモニタリングするための、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の放射性標識された抗体コンジュゲートを含む組成物であって、(a) 前記組成物は、それを必要とする被験体に投与され、(b) P D - L 1 局在化がポジトロン放射断層撮影 (P E T) イメージングにより可視化されることを特徴とする、組成物。

【請求項 2 6】

(c) 前記腫瘍が C T スキャンによって可視化されることをさらに特徴とする、請求項 2 5 に記載の組成物。

【請求項 2 7】

前記抗腫瘍療法が、P D - 1 / P D - L 1 シグナル伝達軸の阻害剤、L A G 3 の阻害剤、

または C T L A 4 の阻害剤を含む、請求項 2 5 に記載の組成物。

【請求項 2 8】

0 . 1 ~ 1 0 m g / k g の前記放射性標識された抗体コンジュゲートが前記被験体に投与されることを特徴とする、請求項 2 5 に記載の組成物。

【請求項 2 9】

皮下または静脈内投与されることを特徴とする、請求項 2 8 に記載の組成物。

【請求項 3 0】

P E T イメージングが、前記組成物を投与してから 2 ~ 7 日後に行われる、請求項 2 5 に記載の組成物。

【請求項 3 1】

P D - L 1 局在化のベースラインの決定が、抗腫瘍療法による処置の前に実施される、請求項 2 5 に記載の組成物。

【請求項 3 2】

前記腫瘍が、血液がん、脳がん、腎細胞がん、卵巣がん、膀胱がん、前立腺がん、乳がん、肝細胞癌、骨がん、結腸がん、非小細胞肺癌、頭頸部扁平上皮がん、結腸直腸がん、中皮腫、B 細胞リンパ腫、およびメラノーマからなる群より選択される、請求項 2 5 から 3 1 のいずれか一項に記載の組成物。

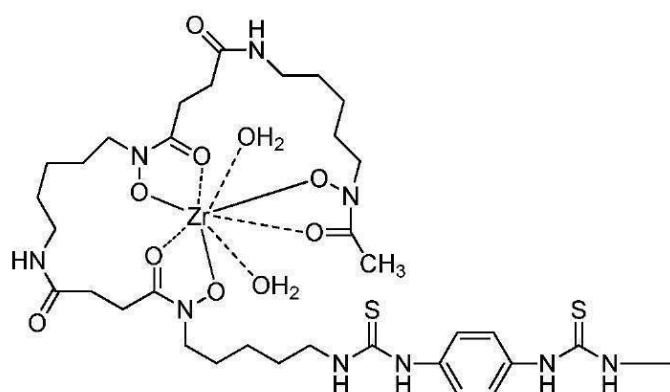
【請求項 3 3】

P D - L 1 発現の低下が、腫瘍退縮を指し示す、請求項 2 5 に記載の組成物。

【請求項 3 4】

ヒトプログラム細胞死リガンド 1 (P D - L 1) に結合する抗体またはその抗原結合性断片を含む、放射性標識された抗体コンジュゲートであって、
前記抗体またはその抗原結合性断片は、3 つの重鎖 C D R (H C D R 1、H C D R 2、および H C D R 3) および 3 つの軽鎖 C D R (L C D R 1、L C D R 2、および L C D R 3) を含み、前記 H C D R 1 は配列番号 8 4 に記載のアミノ酸配列を含み；前記 H C D R 2 は配列番号 8 6 に記載のアミノ酸配列を含み；前記 H C D R 3 は配列番号 8 8 に記載のアミノ酸配列を含み；前記 L C D R 1 は配列番号 9 2 に記載のアミノ酸配列を含み；前記 L C D R 2 は配列番号 9 4 に記載のアミノ酸配列を含み；前記 L C D R 3 は配列番号 9 6 に記載のアミノ酸配列を含み；前記抗体またはその抗原結合性断片は、

【化 7】



にコンジュゲートされており、式中、Z r はポジトロン放射体 ^{89}Zr である、コンジュゲート。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、放射性標識された抗 P D - L 1 抗体および免疫 P E T イメージングにおけるそれらの使用に関する。

【0002】

配列表

配列表の公式のコピーは、ファイル名「10305WO01__SEQ__LIST__ST25.txt」、作成日2017年12月01日および約117KBのサイズのASCIIフォーマットの配列表としてEFS-Webを介して電子的に本明細書と同時に提出される。このASCIIフォーマットの書類に含まれる配列表は、本明細書の一部であり、その全体が参考として本明細書に援用される。

【背景技術】

【0003】

プログラム細胞死リガンド1 (PD-L1) (B7-H1またはCD274ともまた呼ばれる) は、リンパ様および非リンパ様組織の両方、例えば、CD4およびCD8 T細胞、マクロファージ系統細胞、末梢組織並びに腫瘍細胞、およびウイルス感染細胞などに広く発現される290アミノ酸のタンパク質受容体リガンドである (Dongら、1999年、Nature Med.)。PD-L1は、T細胞共阻害性受容体のCD28/CTLA-4 (細胞傷害性Tリンパ球抗原) /ICOS (誘導性共刺激因子 (inducible co-stimulator)) ファミリーに属する受容体PD-1およびB7-1に結合し、T細胞活性化を阻害することにより免疫応答を弱める (Chenら、2013年、Nature Rev. Immunol. 13巻: 227~242頁)。PD-1またはB7-1へのPD-L1の結合は、がん、およびウイルス感染などの疾患における体液性および細胞性免疫応答を損なう、T細胞増殖およびサイトカイン分泌の低下をもたらす。腫瘍細胞およびウイルス感染細胞におけるPD-L1の発現は、免疫応答を回避するため腫瘍および慢性ウイルス感染により活用される。PD-L1は多種多様な腫瘍上で発現されており、動物モデルにおける研究では、腫瘍上のPD-L1が、T細胞活性化および腫瘍細胞の溶解を阻害し、腫瘍特異的なT細胞の死の増大をもたらすことが可能であることが示されている。慢性ウイルス感染では、ウイルス感染細胞上で発現するPD-L1は、ウイルス特異的なT細胞上のPD-1に結合し、これらのT細胞は、エフェクター機能および増殖能力の低減で「疲弊状態」になる (Freeman 2008年、PNAS 105巻: 10275~10276頁)。PD-1: PD-L1系は、誘導性T調節性 (Treg) 細胞発生および持続したTreg機能にも重要な役割を果たす (Franciscoら、2010年、Immunol. Rev. 236巻: 219~242頁)。モノクローナル抗体を含むアンタゴニストによるPD-L1の遮断は、がんおよび慢性ウイルス感染の処置において研究されている (Ribas 2012年、NEJM 366巻: 2517~2519頁; Freeman 2008年、PNAS 105巻: 10275~10276頁; Sheridan 2012年、Nature Biotechnology 30巻: 729~730頁)。

免疫ポジトロン放射断層撮影 (PET) は、ポジトロン放射体で標識されたモノクローナル抗体を活用して、抗体のターゲティング特性とポジトロン放射断層撮影カメラの感度とを組み合わせる診断的イメージングツールである。例えば、The Oncologist、12巻: 1379頁 (2007年); Journal of Nuclear Medicine、52巻 (8号): 1171頁 (2011年) を参照されたい。免疫PETは、in vivoでの、抗原の可視化および定量ならびに抗体蓄積を可能にし、それ自体で、診断および補完療法のための重要なツールとして機能することができる。例えば、免疫PETは、特定の療法並びに処置のモニタリングの潜在的な患者候補の選択を援助することができる。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【文献】Ribas、NEJM (2012年) 366巻: 2517~2519頁

Freeman、PNAS (2008年) 105巻: 10275~10276頁

Sheridan、Nature Biotechnology (2012年) 30巻: 729~730頁

10

20

30

40

50

【発明の概要】**【発明が解決しようとする課題】****【0005】**

P D 1 および P D - L 1 の両方が免疫療法の標的として登場してきたので、とりわけ、前記療法の適切な患者候補の検出を可能とする診断ツールを含む、抗 P D 1 および / または抗 P D - L 1 療法のための診断ツールに対する必要性が存在する。

【課題を解決するための手段】**【0006】**

免疫 P E T イメージングにおける使用のための放射性標識された抗 P D - L 1 抗体コンジュゲートが本開示に含まれる。

【0007】

一態様では、コンジュゲートは、抗 P D - L 1 抗体またはその抗原結合性断片、キレート化部分、およびポジトロン放射体を含む。

【0008】

前記コンジュゲートを合成するためのプロセス、およびそれに有用である合成中間体も本明細書に提供される。

【0009】

本明細書に記載される放射性標識された抗 P D - L 1 抗体コンジュゲートを組織に投与するステップ；および P D - L 1 発現をポジトロン放射断層撮影 (P E T) イメージングにより可視化するステップを含む P D - L 1 を発現する組織を画像化する方法も本明細書に提供される。

【0010】

本明細書に記載される放射性標識された抗 P D - L 1 抗体コンジュゲートを組織に投与するステップ；および P D - L 1 発現を P E T イメージングにより可視化するステップを含む組織内の P D - L 1 を検出するための方法も本明細書に提供される。一実施形態では、組織は、ヒト被験体に存在する。ある特定の実施形態では、被験体は、非ヒト哺乳動物である。ある特定の実施形態では、被験体は、がん、炎症性疾患、または感染などの疾患もしくはは障害を有する。

【0011】

一部の態様では、被験体は、5 m g、または 10 m g、または 20 m g の用量の放射性標識された抗 P D - L 1 抗体コンジュゲートを投与される。

【0012】

P D - 1 / P D - L 1 シグナル伝達軸の阻害剤を含む抗腫瘍療法に適切な患者を同定するための方法であって、固形腫瘍を有する患者を選択するステップ、本明細書に記載される放射性標識された抗体コンジュゲートを投与するステップ、および腫瘍内の投与された放射性標識された抗体コンジュゲートを P E T イメージングにより可視化するステップを含み、腫瘍内の放射性標識された抗体コンジュゲートの存在が、P D - 1 / P D - L 1 シグナル伝達軸 (s i g n a l i n g a x i s) の阻害剤を含む抗腫瘍療法に適切であるとして患者を同定する、方法も本明細書に提供される。

【0013】

固形腫瘍を有する被験体を選択するステップ；固形腫瘍が、P D - L 1 陽性であることを決定するステップ；および抗腫瘍療法をそれを必要とする被験体へと投与するステップを含む腫瘍を処置する方法も本明細書に提供される。ある特定の実施形態では、抗腫瘍療法は、P D - 1 / P D - L 1 シグナル伝達軸の阻害剤 (例えば、抗 P D - 1 抗体または抗 P D - L 1 抗体) を含む。ある特定の実施形態では、被験体は、本明細書に記載される放射性標識された抗体コンジュゲートを投与され、放射性標識された抗体コンジュゲートの局在化をポジトロン放射断層撮影 (P E T) イメージングを介して画像化して、腫瘍が P D - L 1 陽性であるかどうか決定される。

【0014】

抗腫瘍療法で処置されている固形腫瘍を有する被験体を選択するステップ；本明細書に記

10

20

30

40

50

載される放射性標識されたコンジュゲートを被験体に投与するステップ；腫瘍内の投与された放射性標識されたコンジュゲートの局在化をPETイメージングにより画像化するステップ；および腫瘍増殖を決定するステップを含み、コンジュゲートの取込みまたは放射性標識シグナルのベースラインからの低下が、腫瘍退縮および抗腫瘍療法の有効性を指し示す、被験体における抗腫瘍療法の有効性をモニタリングするための方法も本明細書に提供される。ある特定の実施形態では、抗腫瘍療法は、PD-1 / PD-L1シグナル伝達軸の阻害剤（例えば、抗PD-1抗体）を含む。

【0015】

PD-1 / PD-L1シグナル伝達軸の阻害剤を含む抗腫瘍療法に対する患者の応答を予測するための方法であって、固形腫瘍を有する患者を選択するステップ；および腫瘍が、PD-L1陽性であるかどうかを決定するステップを含み、腫瘍がPD-L1陽性である場合、PD-1 / PD-L1シグナル伝達軸の阻害剤を含む抗腫瘍療法に対する患者の陽性応答を示す、方法も本明細書に提供される。ある特定の実施形態では、腫瘍は、本開示の放射性標識された抗体コンジュゲートを投与するステップ、および腫瘍内の放射性標識された抗体コンジュゲートをPETイメージングにより局在化を決定するステップ（ここで、腫瘍内の放射性標識された抗体コンジュゲートの存在が、腫瘍が、PD-L1陽性であることを指し示す）により陽性と決定される。

本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

（項目1）

単量体ヒトプログラム細胞死リガンド1（PD-L1）に結合する抗体またはその抗原結合性断片、キレート化部分、およびポジトロン放射体を含む、放射性標識された抗体コンジュゲート。

（項目2）

前記コンジュゲートが、PD-L1に結合する抗体またはその抗原結合性断片を含み、前記抗体またはその抗原結合性断片が、式（A）：

- L - M_z

（A）

の1または複数の部分に共有結合的に結合し、式中、

Lはキレート化部分であり；Mはポジトロン放射体であり；zは出現毎に独立に0または1であり；zの少なくとも1つは1である、

項目1に記載のコンジュゲート。

（項目3）

前記キレート化部分が、デスフェリオキサミンを含む、項目1または2に記載のコンジュゲート。

（項目4）

前記ポジトロン放射体が、⁸⁹Zrである、項目1から3のいずれかに記載のコンジュゲート。

（項目5）

- L - Mが、

10

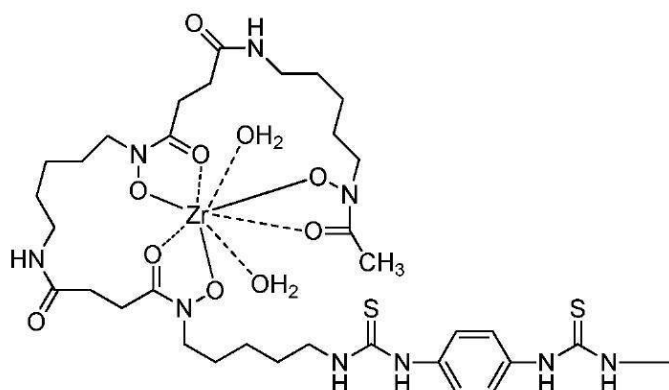
20

30

40

50

【化 6】



10

である、項目 2 から 4 のいずれかに記載のコンジュゲート。

(項目 6)

抗体またはその抗原結合性断片が、式 (A) の 1 つ、2 つ、または 3 つの部分に共有結合的に結合する、項目 1 から 5 に記載の化合物。

(項目 7)

前記抗体が、以下：

(a) 37 での表面プラズモン共鳴アッセイにおいて測定される、約 310 pM 未満の結合解離平衡定数 (K_D) で、単量体 PD-L1 に結合すること；

20

(b) 25 での表面プラズモン共鳴アッセイにおいて、約 180 pM 未満の K_D で、単量体ヒト PD-L1 に結合すること；

(c) 37 での表面プラズモン共鳴アッセイにおいて測定される、約 15 pM 未満の K_D で、二量体ヒト PD-L1 に結合すること；および

(d) 25 での表面プラズモン共鳴アッセイにおいて、約 8 pM 未満の K_D で、二量体ヒト PD-L1 に結合すること

からなる群より選択される、1 または複数の特性を有する、項目 1 から 6 のいずれかに記載のコンジュゲート。

(項目 8)

30

前記抗体が、配列番号 2、34、50、82、98、146、162、178、186、234、250、266、290、306、314、および 330 からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域 (HCV R) における 3 つの重鎖相補性決定領域 (HCD R)；ならびに配列番号 10、42、58、90、106、154、170、194、242、258、および 274 からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域 (LCV R) における 3 つの軽鎖相補性決定領域 (LCD R) を含む、項目 1 から 7 のいずれかに記載のコンジュゲート。

(項目 9)

前記抗体が、配列番号 82 の HCV R における 3 つの CDR；および配列番号 90 の LCV R における 3 つの CDR を含む、項目 1 から 8 のいずれかに記載のコンジュゲート。

40

(項目 10)

PD-L1 を発現する組織を画像化する方法であって、項目 1 から 9 のいずれか一項に記載の放射性標識された抗体コンジュゲートを前記組織に投与するステップ；および PD-L1 発現をポジトロン放射断層撮影 (PET) イメージングにより可視化するステップを含む、方法。

(項目 11)

(a) 固形腫瘍を有する被験体を選択するステップ；

(b) 前記固形腫瘍が、PD-L1 陽性であることを決定するステップ；および

(c) 1 または複数の用量の PD-L1 / PD-L1 シグナル伝達軸の阻害剤をそれを必要とする前記被験体に投与するステップ

50

を含む、腫瘍を処置するための方法。

(項目12)

ステップ(b)が:

(i) 項目1から9のいずれか一項に記載の放射性標識された抗体コンジュゲートをそれを必要とする前記被験体に投与すること; および

(ii) 前記腫瘍内の前記放射性標識された抗体コンジュゲートの局在化をポジトロン放射断層撮影(PET)イメージングにより画像化すること

を含み、前記腫瘍内の前記放射性標識された抗体コンジュゲートの存在が、前記腫瘍がPD-L1陽性であることを指し示す、項目11に記載の方法。

(項目13)

前記被験体が、0.1~10mg/kgの前記放射性標識された抗体コンジュゲートを投与される、項目12に記載の方法。

(項目14)

前記放射性標識された抗体コンジュゲートが、前記被験体に対して皮下または静脈内に投与される、項目12または13に記載の方法。

(項目15)

PETイメージングが、前記放射性標識された抗体コンジュゲートを投与してから2~7日後に行われる、項目12から14のいずれか一項に記載の方法。

(項目16)

ステップ(b)が、PD-1/PD-L1シグナル伝達軸の阻害剤で前記被験体を処置する前に実行される、項目12から15のいずれかに記載の方法。

(項目17)

(a) 少なくとも1用量のPD-1/PD-L1シグナル伝達軸の阻害剤で前記被験体を処置した後に前記放射性標識された抗体コンジュゲートを投与するステップ; および

(b) 前記腫瘍内の前記放射性標識された抗体コンジュゲートの局在化をPETイメージングにより画像化するステップ

をさらに含み、前記腫瘍内の前記放射性標識された抗体コンジュゲートの局在化領域のベースラインからの低下が、腫瘍退縮を指し示す、項目12から15のいずれか一項に記載の方法。

(項目18)

前記被験体が、前記PD-1/PD-L1シグナル伝達軸の阻害剤の投与から1~20週後に、前記放射性標識された抗体コンジュゲートを投与される、項目17に記載の方法。

(項目19)

前記腫瘍が、血液がん、脳がん、腎細胞がん、卵巣がん、膀胱がん、前立腺がん、乳がん、肝細胞癌、骨がん、結腸がん、非小細胞肺癌、頭頸部扁平上皮がん、結腸直腸がん、中皮腫、B細胞リンパ腫、およびメラノーマからなる群より選択される、項目11から18のいずれか一項に記載の方法。

(項目20)

前記PD-1/PD-L1シグナル伝達軸の阻害剤が、抗PD-1抗体またはその抗原結合性断片である、項目11から19のいずれか一項に記載の方法。

(項目21)

前記抗PD-1抗体は、ニボルマブ、ペムブロリズマブおよびREGN2810からなる群より選択される、項目20に記載の方法。

(項目22)

前記PD-1/PD-L1シグナル伝達軸の阻害剤が、抗PD-L1抗体またはその抗原結合性断片である、項目11から19のいずれか一項に記載の方法。

(項目23)

前記抗PD-L1抗体が、アテゾリズマブである、項目22に記載の方法。

(項目24)

前記抗PD-L1抗体またはその抗原結合性断片が、配列番号82の重鎖可変領域(H

10

20

30

40

50

C V R)における3つの重鎖相補性決定領域 (H C D R) ; および配列番号 9 0 の軽鎖可変領域 (L C V R) における3つの軽鎖相補性決定領域 (L C D R) を含む、項目 2 2 に記載の方法。

(項目 2 5)

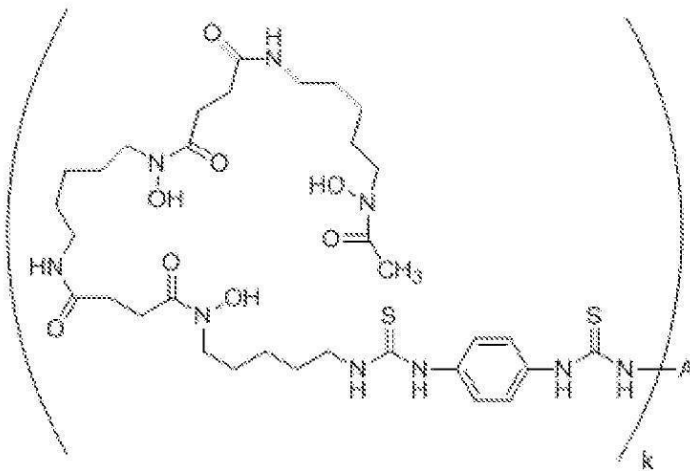
前記抗 P D - L 1 抗体またはその抗原結合性断片が、3つの H C D R (H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3) ならびに3つの L C D R (L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3) を含み、前記 H C D R 1 が、配列番号 8 4 のアミノ酸配列を含み；前記 H C D R 2 が、配列番号 8 6 のアミノ酸配列を含み；前記 H C D R 3 が、配列番号 8 8 のアミノ酸配列を含み；前記 L C D R 1 が、配列番号 9 2 のアミノ酸配列を含み；前記 L C D R 2 が、配列番号 9 4 のアミノ酸配列を含み；および前記 L C D R 3 が、配列番号 9 6 のアミノ酸配列を含む、項目 2 2 に記載の方法。

10

(項目 2 6)

式 (I I I) :

【化 7】



20

の化合物であって、式中、A は、P D - L 1 に結合する抗体またはその抗原結合性断片であり、k は 1 ~ 3 0 の整数である、化合物。

30

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 6】

【図 1】図 1 は、未修飾抗 P D - L 1 抗体および抗 P D - L 1 D F O 修飾抗体の S D S - P A G E および S E C を示す。

【 0 0 1 7】

【図 2】図 2 A および 2 B は、研究 1 に関する ^{89}Zr 放射性標識後の放射性 - S E C - H P L C を示す。

【 0 0 1 8】

【図 3】図 3 は、研究 2 に関する ^{89}Zr 放射性標識後の D F O - コンjugate (抗 P D - L 1) の放射性 - S E C - H P L C を示す。

40

【 0 0 1 9】

【図 4】図 4 は、研究 3 に関する ^{89}Zr 放射性標識後の放射性 - S E C - H P L C S E C を示す。

【 0 0 2 0】

【図 5】図 5 は、研究 1 に関する ^{89}Zr 放射性標識後の U V 2 8 0 - S E C - H P L C クロマトグラムおよび放射性 - i T L C トレースを示す。

【 0 0 2 1】

【図 6 A B】図 6 A、6 B、6 C、および 6 D は、本明細書の実施例 5 に記載されるように、*in vitro* での、腫瘍細胞系 M C 3 8 - c O V A / e G F P - m P D - L 1 - / - h P D - L 1 T g (図 6 A)、L O X - I M V I (図 6 B)、M D A - M B - 2 3 1

50

(図6C)、およびSK-Br-3(図6D)によるhPD-L1発現を示す。

【図6CD】図6A、6B、6C、および6Dは、本明細書の実施例5に記載されるように、*in vitro*での、腫瘍細胞系MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1-/-hPD-L1^{Tg}(図6A)、LOX-IMVI(図6B)、MDA-MB-231(図6C)、およびSK-Br-3(図6D)によるhPD-L1発現を示す。

【0022】

【図7】図7は、本明細書の実施例5に記載されるように、第2の実験の*in vitro*での、インターフェロンガンマ処置を伴うかまたは伴わない、MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1-/-hPD-L1^{Tg}およびLOX-IMVI腫瘍細胞によるhPD-L1発現を示す。

【0023】

【図8AB】図8は、A、B、D、およびEに示される研究に対する⁸⁹Zr-DFO-抗PD-L1抗体コンジュゲートならびにCおよびFに示される研究に対するアイソタイプ対照放射性免疫コンジュゲート⁸⁹Zr-DFO-IgG4Pの放射性免疫コンジュゲート調製物からの試料を使用するSEC-HPLC分析により作成されたクロマトグラムを示す。280nmでの吸光度に関するクロマトグラムはA~Cに示され、放射の強度に関するラジオクロマトグラムはD~Fに示される。A~Cでは、緩衝液成分の溶出も検出された。これらの試料緩衝液中の塩のピーク(保持時間>25分、アステリスク「*」)は、ピーク面積の積分から除外された。ピークは、HMW(高分子量)免疫コンジュゲート(「1」)、単量体免疫コンジュゲート(「2」)、組み込まれない⁸⁹Zr(「3」)、および試料緩衝液中の塩(「*」)を指し示すため標識されている。略語: mAU = ミリ吸光度単位; cps = 1秒当たりカウント。

【図8CD】図8は、A、B、D、およびEに示される研究に対する⁸⁹Zr-DFO-抗PD-L1抗体コンジュゲートならびにCおよびFに示される研究に対するアイソタイプ対照放射性免疫コンジュゲート⁸⁹Zr-DFO-IgG4Pの放射性免疫コンジュゲート調製物からの試料を使用するSEC-HPLC分析により作成されたクロマトグラムを示す。280nmでの吸光度に関するクロマトグラムはA~Cに示され、放射の強度に関するラジオクロマトグラムはD~Fに示される。A~Cでは、緩衝液成分の溶出も検出された。これらの試料緩衝液中の塩のピーク(保持時間>25分、アステリスク「*」)は、ピーク面積の積分から除外された。ピークは、HMW(高分子量)免疫コンジュゲート(「1」)、単量体免疫コンジュゲート(「2」)、組み込まれない⁸⁹Zr(「3」)、および試料緩衝液中の塩(「*」)を指し示すため標識されている。略語: mAU = ミリ吸光度単位; cps = 1秒当たりカウント。

【図8EF】図8は、A、B、D、およびEに示される研究に対する⁸⁹Zr-DFO-抗PD-L1抗体コンジュゲートならびにCおよびFに示される研究に対するアイソタイプ対照放射性免疫コンジュゲート⁸⁹Zr-DFO-IgG4Pの放射性免疫コンジュゲート調製物からの試料を使用するSEC-HPLC分析により作成されたクロマトグラムを示す。280nmでの吸光度に関するクロマトグラムはA~Cに示され、放射の強度に関するラジオクロマトグラムはD~Fに示される。A~Cでは、緩衝液成分の溶出も検出された。これらの試料緩衝液中の塩のピーク(保持時間>25分、アステリスク「*」)は、ピーク面積の積分から除外された。ピークは、HMW(高分子量)免疫コンジュゲート(「1」)、単量体免疫コンジュゲート(「2」)、組み込まれない⁸⁹Zr(「3」)、および試料緩衝液中の塩(「*」)を指し示すため標識されている。略語: mAU = ミリ吸光度単位; cps = 1秒当たりカウント。

【0024】

【図9】図9は、PD-1^{hu}/hu-PD-L1^{hu}/huマウスにおける⁸⁹Zr-DFO-抗PD-L1抗体コンジュゲートに関する*ex vivo*での生体内分布データを提供する。16匹のマウス(各々8動物の2群)は、単一IV用量の50μCi(1mg/kg)の⁸⁹Zr-DFO-抗PD-L1抗体コンジュゲートを0日に投与され、投与後6日目(黒色カラム)または10日目(灰色カラム)に殺された。心臓穿刺を介し

10

20

30

40

50

て回収された血液および指し示した採取された組織を秤量し、放射能を決定した。6 または 10 日目に回収された個体試料に関する 1 グラム当たりの注入用量のパーセント (% I D / g) 値を、注入物質 (^{89}Zr - D F O - 抗 P D - L 1 抗体コンジュゲート) からの線量標準の放射能および個体試料の重量と比較して計算した。データは、平均 \pm S D としてプロットされている。

【発明を実施するための形態】

【0025】

I. 定義

そうでないことが本明細書に規定されない限りにおいて、本明細書で使用される技術用語および科学用語は全て、開示されている主題が属する技術分野の当業者により一般に理解される意味と同じ意味を有する。

【0026】

「P D - L 1」という用語は、C D 2 7 4 および B 7 H 1 としてもまた公知であるプログラム細胞死リガンド 1 を指す。全長 P D - L 1 のアミノ酸配列は、G e n B a n k で、受託番号 N P _ 0 5 4 8 6 2 . 1 として提供されている。「P D - L 1」という用語はまた、P D - L 1 のタンパク質改変体も含む。「P D - L 1」という用語は、組換え P D - L 1 またはその断片を含む。用語はまた、例えば、ヒスチジントグ、マウス F c もしくはヒト F c、または R O R 1 などのシグナル配列へとカップリングさせた、P D - L 1 またはその断片も包含する。例えば、用語は、C 末端において、全長 P D - L 1 (N P _ 0 5 4 8 6 2 . 1) のアミノ酸残基 1 9 ~ 2 3 9 へとカップリングさせた、マウス F c (m I g G 2 a) またはヒト F c (h I g G 1) を含む配列を含む。タンパク質改変体は、C 末端において、N P _ 0 5 4 8 6 2 . 1 のアミノ酸残基 1 9 ~ 2 3 9 へとカップリングさせたヒスチジントグを含む。非ヒト種に由来することが指定されない限りにおいて、「P D - L 1」という用語は、ヒト P D - L 1 を意味する。P D - L 1 は、細胞外 I g V 様および I g C 様ドメイン (全長 P D - L 1 のアミノ酸 1 9 ~ 2 3 9)、膜貫通ドメインおよび約 3 0 アミノ酸の細胞内ドメインを有する 2 9 0 アミノ酸のタンパク質である。P D - L 1 は、多くの細胞、例えば、抗原提示細胞 (例えば、樹状細胞、マクロファージ、および B 細胞) ならびに造血および非造血細胞 (例えば、血管内皮細胞、脾臓、および免疫特権の部位) に構成的に発現される。P D - L 1 は、多種多様な腫瘍、およびウイルス感染細胞にも発現し、免疫抑制環境の構成要素である (R i b a s 2 0 1 2 年、N E J M 3 6 6 巻 : 2 5 1 7 ~ 2 5 1 9 頁)。P D - L 1 は、2 つの T 細胞共阻害剤 P D - 1 および B 7 - 1 の 1 つに結合する。

【0027】

「P D - 1」という用語は、C D 2 7 9 としてもまた公知である、T 細胞共阻害剤であるプログラム細胞死 1 タンパク質を指す。全長 P D - 1 のアミノ酸配列は、G e n B a n k で、受託番号 N P _ 0 0 5 0 0 9 . 2 として提供されている。用語はまた、例えば、ヒスチジントグ、マウス F c もしくはヒト F c、または R O R 1 などのシグナル配列へとカップリングさせた、P D - 1 またはその断片も包含する。例えば、用語は、C 末端において、C 9 3 S 変化を有する N P _ 0 0 5 0 0 9 . 2 のアミノ酸残基 2 5 ~ 1 7 0 へとカップリングさせた、マウス F c (m I g G 2 a) またはヒト F c (h I g G 1) を含む配列を含む。P D - 1 は、T 細胞共阻害剤の C D 2 8 / C T L A - 4 / I C O S ファミリーのメンバーである。P D - 1 は、I g V 様の細胞外 N 末端ドメイン、膜貫通ドメインならびに免疫受容抑制性チロシン (i m m u n o r e c e p t o r t y r o s i n e - b a s e d i n h i b i t o r y) (I T I M) モチーフおよび免疫受容体チロシン依存性スイッチ (i m m u n o r e c e p t o r t y r o s i n e - b a s e d s w i t c h) (I T S M) モチーフを含有する細胞内ドメインを有する 2 8 8 アミノ酸タンパク質である (C h a t t o p a d h y a y ら、2 0 0 9 年、I m m u n o l . R e v .)。P D - 1 受容体は、2 つのリガンド P D - L 1 および P D - L 2 を有する。

【0028】

「B 7 - 1」という用語は、共刺激因子 C D 8 0 としてもまた公知である、T リンパ球活

10

20

30

40

50

性化抗原を指す。B7-1は、IgV様領域(aa 37~138)およびIgC様領域(aa 154~232)を含む細胞外N末端ドメイン、膜貫通ドメイン(aa 243~263)ならびにC末端細胞内領域(aa 263~288)を有する288アミノ酸の膜受容体である。全長B7-1のアミノ酸配列は、GenBankで、受託番号NP_005182.1として提供されている。

【0029】

本明細書で使用される「T細胞共阻害剤」という用語は、T細胞の活性化または抑制を介して、免疫応答をモジュレートする、リガンドおよび/または受容体を指す。T細胞共シグナル伝達分子としてもまた公知である、「T細胞共阻害剤」という用語は、PD-1、リンパ球活性化遺伝子3タンパク質(LAG-3、CD223としても公知)、細胞傷害性Tリンパ球抗原4(CTLA-4)、BおよびTリンパ球アテニュエータ(B and T lymphocyte attenuator)(BTLA)、CD-28、2B4、LY108、T細胞免疫グロブリンおよびムチン3(T cell immunoglobulin and mucin 3)(TIM3)、免疫グロブリンおよびITIMを有するT細胞免疫受容体(T cell immunoreceptor with immunoglobulin and ITIM)(TIGIT; VSIG9としてもまた公知である)、白血球関連免疫グロブリン様受容体1(leucocyte associated immunoglobulin-like receptor 1)(LAIR1; CD305としてもまた公知である)、誘導性T細胞共刺激因子(inducible T cell costimulator)(ICOS; CD278としてもまた公知である)、B7-1(CD80)、およびCD160を含むがこれらに限定されない。

【0030】

本明細書で使用される「抗体」という用語は、ジスルフィド結合により相互接続された、2つの重(H)鎖および2つの軽(L)鎖である、4つのポリペプチド鎖から構成される免疫グロブリン分子(すなわち、「全長抗体分子」)、ならびにそれらの多量体(例えば、IgM)、またはそれらの抗原結合性断片を指すことを意図する。各重鎖は、重鎖可変領域(「HCVR」または「V_H」)および重鎖定常領域(C_H1ドメイン、C_H2ドメイン、およびC_H3ドメインから構成される)から構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域(「LCVRまたは「V_L」)および軽鎖定常領域(C_L)から構成される。V_H領域およびV_L領域は、相補性決定領域(CDR)と称する超可変性領域であって、フレームワーク領域(FR)と称する、より保存的な領域を散在させた領域へと、さらに細分することができる。各V_HおよびV_Lは、アミノ末端から、カルボキシ末端へと、以下の順序: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4で配置される、3つのCDRと、4つのFRとから構成される。ある特定の実施形態では、抗体のFR(またはそれらの抗原結合断片)は、ヒト生殖細胞系列の配列と同一の場合もあり、天然で修飾されている場合もあり、人工的に修飾される場合もある。アミノ酸のコンセンサス配列は、2つまたはこれを超えるCDRの照合解析に基づき規定することができる。

【0031】

1もしくは複数のCDR残基の置換、または1もしくは複数のCDRの省略もまた可能である。科学文献では、結合のために、1つまたは2つのCDRを可欠とした抗体について記載されている。Padlanら(1995年、FASEB J.、9巻:133~139頁)は、公表された結晶構造に基づき、抗体とそれらの抗原との接触領域について解析し、CDR残基のうちで、実際に抗原に接触するのは、約5分の1~3分の1だけであると結論付けた。Padlanはまた、1つまたは2つのCDRが、抗原と接触するアミノ酸を有さない、多くの抗体も見出した(Vajdosら、2002年、J Mol Biol 320巻:415~428頁もまた参照されたい)。

【0032】

抗原に接触しないCDR残基は、先行研究に基づき、Chothia CDRの外部に存在するKabatt CDRの領域から、分子モデル化および/または経験により同定することができる(例えば、CDRH2内の残基H60~H65は、多くの場合、要求され

10

20

30

40

50

ない)。C D Rまたはその残基を省略する場合は通例、別のヒト抗体配列内の対応する位置を占有するアミノ酸、またはこのような配列のコンセンサス配列で置換する。C D R内の置換のための位置、および置換するアミノ酸もまた、経験的に選択することができる。経験的置換は、保存的置換の場合もあり、非保存的置換の場合もある。

【0033】

本明細書で開示される完全ヒト抗P D - L 1モノクローナル抗体は、重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインのフレームワーク領域内および/またはC D R領域内に、対応する生殖細胞系列の配列と比較して、1または複数のアミノ酸の置換、挿入、および/または欠失を含みうる。このような変異は、本明細書で開示されるアミノ酸配列を、例えば、公表の抗体配列データベースから入手可能な生殖細胞系列の配列と比較することにより、たやすく確認することができる。本開示は、本明細書で開示されるアミノ酸配列のうちのいずれかに由来する、抗体およびそれらの抗原結合性断片を含むが、この場合、1または複数のフレームワーク領域内および/またはC D R領域内の、1または複数のアミノ酸を、抗体が由来した生殖細胞系列の配列の対応する残基、または別のヒト生殖細胞系列の配列の対応する残基、または対応する生殖細胞系列残基の保存的アミノ酸置換（本明細書では、このような配列変化をまとめて、「生殖細胞系列変異」と称する）に照らして変異させる。当業者は、本明細書で開示される、重鎖可変領域および軽鎖可変領域の配列から始めて、1カ所または複数カ所の個々の生殖細胞系列変異またはそれらの組み合わせを含む、多数の抗体および抗原結合性断片を容易に作製することができる。ある特定の実施形態では、V Hドメインおよび/またはV Lドメイン内のフレームワーク残基および/またはC D R残基の全てを、抗体が由来した、元の生殖細胞系列の配列内で見出される残基へと復帰変異させる。他の実施形態では、ある特定の残基だけを、元の生殖細胞系列の配列へと復帰変異させる、例えば、F R 1の最初の8アミノ酸内、もしくはF R 4の最後の8アミノ酸内に見出される残基だけを変異させるか、またはC D R 1内、C D R 2内、もしくはC D R 3内に見出される残基だけを変異させる。他の実施形態では、フレームワーク残基および/またはC D R残基のうちの1または複数、異なる生殖細胞系列の配列（すなわち、抗体が元来由来した生殖細胞系列の配列と異なる、生殖細胞系列の配列）の対応する残基に変異させる。さらに、本開示の抗体は、フレームワーク領域内および/またはC D R領域内の、2カ所またはこれを超える生殖細胞系列変異の任意の組み合わせを含有することが可能であり、この場合、例えば、ある特定の個々の残基を、特定の生殖細胞系列の配列の対応する残基に変異させる一方で、元の生殖細胞系列の配列と異なる、ある特定の他の残基を維持するか、または異なる生殖細胞系列の配列の対応する残基に変異させる。1カ所または複数カ所の生殖細胞系列変異を含有する抗体および抗原結合性断片が得られたら、これらを、結合特異性の改善、結合アフィニティーの増大、アンタゴニスト性またはアゴニスト性の生物学的特性（場合により）の改善または増強、免疫原性の低減など、1または複数の所望の特性について容易に調べることができる。この一般的な方式で得られた、抗体および抗原結合性断片は、本開示の中に包含される。

【0034】

本開示はまた、本明細書で開示されるH C V Rアミノ酸配列、L C V Rアミノ酸配列、および/またはC D Rアミノ酸配列であって、1カ所または複数カ所の保存的置換を有するアミノ酸配列のうちのいずれかの改変体を含む、完全ヒト抗P D - L 1モノクローナル抗体も含む。例えば、本開示は、本明細書で開示される、H C V Rアミノ酸配列、L C V Rアミノ酸配列、および/またはC D Rアミノ酸配列のうちのいずれかと比べて、例えば、10カ所またはこれより少数、8カ所またはこれより少数、6カ所またはこれより少数、4カ所またはこれより少数などの数の保存的アミノ酸置換を伴う、H C V Rアミノ酸配列、L C V Rアミノ酸配列、および/またはC D Rアミノ酸配列を有する抗P D - L 1抗体を含む。

【0035】

本明細書で使用される「ヒト抗体」という用語は、ヒト生殖細胞系列の免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する抗体を含むことを意図する。本開示のヒト

10

20

30

40

50

m A b は、例えば、C D R 内および特定の C D R 3 内に、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列によりコードされないアミノ酸残基（例えば、i n v i t r o におけるランダム変異誘発もしくは部位特異的変異誘発、または i n v i v o における体細胞変異により導入された変異）を含みうる。しかし、本明細書で使用される「ヒト抗体」という用語は、別の哺乳動物種（例えば、マウス）の生殖細胞系列に由来する C D R 配列を、ヒト F R 配列へとグラフトした m A b を含むことを意図しない。

【 0 0 3 6 】

本明細書で使用される「多特異性の抗原結合性分子」という用語は、二特異性、三特異性、または多特異性の抗原結合性分子およびそれらの抗原結合性断片を指す。多特異性抗原結合性分子は、1つの標的ポリペプチドの異なるエピトープに特異的な場合もあり、1つを超える標的ポリペプチドのエピトープに特異的な抗原結合性ドメインを含有する場合もある。多特異性の抗原結合性分子は、単一の多機能性ポリペプチドの場合もあり、2つまたはこれを超えるポリペプチドの多量体の複合体であって、互いと共有結合的または非共有結合的に会合する複合体の場合もある。「多特異性の抗原結合性分子」という用語は、別の機能的分子、例えば、別のペプチドまたはタンパク質へと連結する場合もあり、これと共発現させる場合もある、本開示の抗体を含む。例えば、抗体またはその断片は、第2の結合特異性を伴う、二特異性または多特異性の抗原結合性分子を作製するように、タンパク質またはその断片など、1または複数の他の分子の実体へと、機能的に連結する（例えば、化学的カップリング、遺伝子融合、非共有結合的会合によるか、または他の形で）ことができる。本開示に従い、「多特異性の抗原結合性分子」という用語はまた、二特異性抗体、三特異性抗体、もしくは多特異性抗体またはこれらの抗原結合性断片も含む。ある特定の実施形態では、本開示の抗体を、別の抗体またはその抗原結合性断片へと機能的に連結して、第2の結合特異性を伴う、二特異性抗体を作製する。本開示の二特異性抗体および多特異性抗体については、本明細書の別の箇所に記載する。

【 0 0 3 7 】

「～に特異的に結合する（s p e c i f i c a l l y b i n d s）」または「～に特異的に結合する（b i n d s s p e c i f i c a l l y t o）」などという用語は、抗体またはその抗原結合性断片が、生理学的条件下で、抗原と、比較的安定的な複合体を形成することを意味する。特異的結合は、少なくとも約 1×10^{-8} M またはこれ未満の平衡解離定数（例えば、小さな K_D は、緊密な結合を描示する）により特徴づけることができる。当技術分野では、2つの分子が特異的に結合するのかどうかを決定するための方法が周知であり、例えば、平衡透析、表面プラズモン共鳴などを含む。本明細書に記載される通り、P D - L 1 に特異的に結合する抗体は、表面プラズモン共鳴、例えば、B I A C O R E（商標）により同定されている。さらに、P D - L 1 内の1つのドメインと、1または複数のさらなる抗原とに結合する多特異性抗体、または P D - L 1 の2つの異なる領域に結合する二特異性抗体は、そうであるにも拘らず、本明細書で使用される通り、「～に特異的に結合する」抗体であると考えられる。

【 0 0 3 8 】

本明細書で使用される、抗体の「抗原結合性区分（a n t i g e n - b i n d i n g p o r t i o n）」、抗体の「抗原結合性断片」などの用語は、任意の、天然に存在するか、酵素的に得られるか、合成であるか、または遺伝子操作されたポリペプチドまたは糖タンパク質であって、抗原に特異的に結合して、複合体を形成するポリペプチドまたは糖タンパク質を含む。本明細書で使用される抗体の「抗原結合性断片」または「抗体断片」という用語は、P D - L 1 に結合する能力を保持する抗体の、1または複数の断片を指す。

【 0 0 3 9 】

本明細書で使用される「単離抗体」とは、異なる抗原特異性を有する他の抗体（A b）を実質的に含まない抗体を指すことを意図する（例えば、P D - L 1 に特異的に結合する単離抗体またはその断片は、P D - L 1 以外の抗原に特異的に結合する A b を実質的に含まない）。

【 0 0 4 0 】

10

20

30

40

50

本明細書で使用される「表面プラズモン共鳴」という用語は、例えば、B I A C O R E (商標) システム (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N. J.) を使用して、バイオセンサーマトリックス中のタンパク質濃度の変更を検出することにより、リアルタイムの生体分子の相互作用についての解析を可能とする光学現象を指す。

【 0 0 4 1 】

本明細書で使用される「K D」という用語は、特定の抗体 - 抗原間相互作用についての平衡解離定数を指すことを意図する。

【 0 0 4 2 】

「エピトープ」という用語は、パラトープとして公知の、抗体分子の可変領域内の特異的な抗原結合部位と相互作用する抗原決定基を指す。単一の抗原は、1つを超えるエピトープを有しうる。したがって、異なる抗体は、抗原上の異なる領域に結合する可能性があり、異なる生物学的効果を及ぼしうる。「エピトープ」という用語はまた、B細胞および/またはT細胞が応答する抗原上の部位も指す。「エピトープ」という用語はまた、抗体が結合する抗原の領域も指す。エピトープは、構造的エピトープとして規定することもでき、機能的エピトープとして規定することもできる。機能的エピトープは一般に、構造的エピトープのサブセットであり、相互作用のアフィニティーに直接寄与する残基を有する。エピトープはまた、コンフォメーションエピトープ、すなわち、非線形アミノ酸から構成されるエピトープでもありうる。ある特定の実施形態では、エピトープは、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリル基、またはスルホニル基など、化学的に活性の表面分子の群分けである決定基を含む場合があり、ある特定の実施形態では、特異的な三次元構造特徴、および/または特異的な電荷特徴を有しうる。

【 0 0 4 3 】

核酸またはその断片に言及する場合の、「実質的な同一性」または「実質的に同一な」という用語は、適切なヌクレオチドの挿入または欠失を伴って、別の核酸（またはその相補鎖）と、最適な形でアライメントされた場合に、F A S T A、B L A S TまたはG A Pなどの、配列同一性についての、任意の周知のアルゴリズムにより測定される通り、ヌクレオチド塩基のうちの少なくとも約90%、そしてより好ましくは、少なくとも約95%、96%、97%、98%、または99%においてヌクレオチド配列の同一性がすることを指し示す。

【 0 0 4 4 】

ポリペプチドに適用される場合の、「実質的な類似性」または「実質的に類似する」という用語は、2つのペプチド配列が、デフォルトのギャップの重みを使用する、G A PプログラムまたはB E S T F I Tプログラムなどにより、最適な形でアライメントされた場合に、少なくとも90%の配列同一性、なおより好ましくは、少なくとも95%、98%、または99%の配列同一性を共有することを意味する。好ましくは、同一でない残基位置は、保存的アミノ酸置換により異なる。「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸残基を、同様の化学的特性（例えば、電荷または疎水性）を伴う側鎖（R基）を有する別のアミノ酸残基で置換する置換である。一般に、保存的アミノ酸置換は、タンパク質の機能的な特性を実質的に変化させないであろう。2つまたはこれを超えるアミノ酸配列が、互いと、保存的置換により異なる場合は、置換の保存的性格について補正するように、類似性のパーセントまたは程度を、上方に調整することができる。当業者には、この補正を行うための手段が周知である。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、P e a r s o n (1 9 9 4 年)、M e t h o d s M o l . B i o l .、24巻：307～331頁を参照されたい。類似する化学的特性を伴う側鎖を有するアミノ酸の群の例は、1) 脂肪族側鎖：グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシン；2) 脂肪族 - ヒドロキシル側鎖：セリンおよびトレオニン；3) アミド含有側鎖：アスパラギンおよびグルタミン；4) 芳香族側鎖：フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファン；5) 塩基性側鎖：リシン、アルギニン、およびヒスチジン；6) 酸性側鎖：アスパラギン酸およびグルタミン酸；ならびに7) 硫黄含有側鎖：システインおよびメチオニンを含む。好ましい保

10

20

30

40

50

存的アミノ酸置換基は、バリン - ロイシン - イソロイシン、フェニルアラニン - チロシン、リシン - アルギニン、アラニン - バリン、グルタミン酸 - アスパラギン酸、およびアスパラギン - グルタミンである。代替的に、保存的置きかえは、G o n n e t ら (1 9 9 2 年)、S c i e n c e、2 5 6 巻 : 1 4 4 3 ~ 4 5 頁において開示されている、P A M 2 5 0 対数尤度行列で、正の値を取る任意の変化である。「中程度に保存的な」置きかえとは、P A M 2 5 0 対数尤度行列で、負でない値を取る任意の変化である。ポリペプチドの配列類似性は、配列解析ソフトウェアを使用して測定することが典型的である。タンパク質解析ソフトウェアは、保存的アミノ酸置換を含む、多様な置換、欠失、および他の修飾へと割り当てられる、類似性の尺度を使用して、類似する配列をマッチさせる。例えば、G C G ソフトウェアは、異なる種の生物に由来する、相同なポリペプチドなど、近縁のポリペプチドの間の配列相同性もしくは配列同一性、または野生型タンパク質とその変異タンパク質との配列相同性もしくは配列同一性を決定するのに、デフォルトのパラメータで使う、G A P および B E S T F I T などのプログラムを含有する。例えば、G C G V e r s i o n 6 . 1 を参照されたい。ポリペプチド配列はまた、G C G V e r s i o n 6 . 1 内のプログラムである F A S T A を、デフォルトのパラメータまたは推奨されるパラメータで使用する比較することもできる。F A S T A (例えば、F A S T A 2 および F A S T A 3) は、クエリー配列と、検索配列との最良の重複領域についての、アライメントおよび配列同一性パーセントを提示する (P e a r s o n (2 0 0 0 年)、前出)。本開示の配列を、異なる生物に由来する多数の配列を含有するデータベースと比較する場合の、別の好ましいアルゴリズムは、コンピュータプログラムである B L A S T、とりわけ、デフォルトのパラメータを使用する B L A S T P または T B L A S T N である。例えば、それらの各々が参照により本明細書に組み込まれる、A l t s c h u l ら (1 9 9 0 年)、J . M o l . B i o l .、2 1 5 巻 : 4 0 3 ~ 4 1 0 頁 ; および (1 9 9 7 年)、N u c l e i c A c i d s R e s .、2 5 巻 : 3 3 8 9 ~ 3 4 0 2 頁を参照されたい。

【 0 0 4 5 】

「治療有効量」という語句は、投与に所望される効果をもたらす量を意味する。正確な量は、処置の目的に依存し、公知の技法を使用して、当業者に確認可能である (例えば、L l o y d (1 9 9 9 年) 「The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding」を参照されたい)。

【 0 0 4 6 】

本明細書で使用される「被験体」という用語は、慢性ウイルス感染、がんまたは自己免疫疾患など、疾患または障害の、好転、防止、および / または処置を必要とする動物、好ましくは哺乳動物を指す。

【 0 0 4 7 】

II . 免疫 P E T イメージングのための P D - L 1 抗体の放射性標識された免疫コンジュゲート

プログラム細胞死リガンド 1 (P D - L 1) に結合する放射性標識された抗原結合性タンパク質が、本明細書に提供される。一部の実施形態では、放射性標識された抗原結合性タンパク質は、ポジトロン放射体をキレート化することが可能な化学的部分である、1 または複数のキレート化部分へと共有結合的に連結された抗原結合性タンパク質を含む。

【 0 0 4 8 】

一部の実施形態では、抗体などの P D - L 1 に結合する抗原結合性タンパク質が本明細書に提供され、P D - L 1 に結合する前記抗原結合性タンパク質は、以下の構造を有する 1 または複数の部分に共有結合的に結合される :

- L - M z

(式中、L はキレート化部分であり ; M はポジトロン放射体であり ; z は出現毎に独立に 0 または 1 であり ; z の少なくとも 1 つは 1 である)。

【 0 0 4 9 】

一部の実施形態では、放射性標識された抗原結合性タンパク質は、式 (I) の化合物であ

る：

$M - L - A - [L - Mz]_k$

(I)

AはPD-L1に結合するタンパク質であり；Lはキレート化部分であり；Mはポジトロン放射体であり；zは0または1であり；kは0～30の整数である。一部の実施形態では、kは1である。

【0050】

ある特定の実施形態では、放射性標識された抗原結合性タンパク質は、式(II)の化合物である：

$A - [L - M]_k$

(II)

(式中、AはPD-L1に結合するタンパク質であり；Lはキレート化部分であり；Mはポジトロン放射体であり；kは1～30の整数である)。

【0051】

一部の実施形態では、以下の構造を有するコンジュゲートを含む組成物が本明細書に提供される：

$A - L_k$

(式中、AはPD-L1に結合するタンパク質であり；Lはキレート化部分であり；kは1～30の整数であり；コンジュゲートは、臨床PETイメージングに適切な比放射能を提供するのに十分な量のポジトロン放射体でキレート化される)。

【0052】

適切な結合性タンパク質、キレート化部分、およびポジトロン放射体が、以下に提供される。

【0053】

A. PD-L1結合性タンパク質

適切なPD-L1結合性タンパク質は、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、米国特許公開第US2015-0203580A1号に記載されているものを含む、PD-L1に特異的に結合するタンパク質である。本開示の例示的な抗PD-L1抗体は、米国特許公開第US2015-0203580A1号の表1に列挙され、以下にも提示される。

10

20

30

40

50

【表 1】

表1:アミノ酸配列の識別子

抗体の呼称	配列番号							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H2M8306N	2	4	6	8	10	12	14	16
H2M8307N	18	20	22	24	26	28	30	32
H2M8309N	34	36	38	40	42	44	46	48
H2M8310N	50	52	54	56	58	60	62	64
H2M8312N	66	68	70	72	74	76	78	80
H2M8314N	82	84	86	88	90	92	94	96
H2M8316N	98	100	102	104	106	108	110	112
H2M8317N	114	116	118	120	122	124	126	128
H2M8321N	130	132	134	136	138	140	142	144
H2M8323N	146	148	150	152	154	156	158	160
H2M8718N	162	164	166	168	170	172	174	176
H2M8718N2	178	180	182	184	170	172	174	176
H2M8719N	186	188	190	192	194	196	198	200
H1H9323P	202	204	206	208	210	212	214	216
H1H9327P	218	220	222	224	226	228	230	232
H1H9329P	234	236	238	240	242	244	246	248
H1H9336P	250	252	254	256	258	260	262	264
H1H9344P2	266	268	270	272	274	276	278	280
H1H9345P2	282	284	286	288	274	276	278	280
H1H9351P2	290	292	294	296	274	276	278	280
H1H9354P2	298	300	302	304	274	276	278	280
H1H9364P2	306	308	310	312	274	276	278	280
H1H9373P2	314	316	318	320	274	276	278	280
H1H9382P2	322	324	326	328	274	276	278	280
H1H9387P2	330	332	334	336	274	276	278	280
H1H9396P2	338	340	342	344	274	276	278	280

表 1 は、例示的な抗 PD - L 1 抗体の重鎖可変領域（HCVR）、軽鎖可変領域（LCVR）、重鎖相補性決定領域（HCDR1、HCDR2 および HCDR3）、および軽鎖相補性決定領域（LCDR1、LCDR2 および LCDR3）のアミノ酸配列識別子を示す。

【0054】

一部の実施形態では、結合タンパク質は、表 1 に列挙される HCVR アミノ酸配列のいずれかから選択されるアミノ酸配列、あるいは少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98% または少なくとも 99% の配列同一性を有するそれと実質的に類似するその配列を含む HCVR を含む抗体または抗原結合断片である。

【0055】

一部の実施形態では、結合タンパク質は、表 1 に列挙される LCVR アミノ酸配列のい

10

20

30

40

50

れかから選択されるアミノ酸配列、あるいは少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を有するそれと実質的に類似するその配列を含むLCVRを含む抗体または抗原結合断片である。

【0056】

一部の実施形態では、結合タンパク質は、表1に列挙されるLCVRアミノ酸配列のいずれかと対となる表1に列挙されるHCVRアミノ酸配列のいずれかを含むHCVRおよびLCVRアミノ酸配列対(HCVR/LCVR)を含む抗体または抗原結合断片である。ある特定の実施形態に従うと、本開示は、表1に列挙される例示的な抗PD-L1抗体のいずれかに含まれるHCVR/LCVRアミノ酸配列対を含む抗体またはその抗原結合断片を提供する。ある特定の実施形態では、HCVR/LCVRアミノ酸配列対は、配列番号2/10、18/26、34/42、50/58、66/74、82/90、98/106、114/122、130/138、146/154、162/170、178/170、186/194、202/210、218/226、234/242、250/258、266/274、282/274、290/274、298/274、306/274、314/274、322/274、330/274、および338/274からなる群から選択される。ある特定の実施形態では、HCVR/LCVRアミノ酸配列対は、配列番号82/90(例えば、H2M8314N)、162/170(例えば、H2M8718N)、306/274(例えば、H1H9364P2)、および314/274(例えば、H1H9373P2)のうちの1つから選択される。ある特定の実施形態では、HCVR/LCVRアミノ酸配列対は、配列番号98/106(例えば、H2M8316N)、146/154(例えば、H2M8323N)、290/274(例えば、H1H9351P2)、および330/274(例えば、H1H9387P2)のうちの1つから選択される。

【0057】

一部の実施形態では、結合タンパク質は、表1に列挙されるHCDR1アミノ酸配列のいずれかから選択されるアミノ酸配列、あるいは少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を有する実質的に類似するその配列を含む重鎖CDR1(HCDR1)を含む抗体または抗原結合断片である。

【0058】

一部の実施形態では、結合タンパク質は、表1に列挙されるHCDR2アミノ酸配列のいずれかから選択されるアミノ酸配列、あるいは少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を有する実質的に類似するその配列を含む重鎖CDR2(HCDR2)を含む抗体または抗原結合断片である。

【0059】

一部の実施形態では、結合タンパク質は、表1に列挙されるHCDR3アミノ酸配列のいずれかから選択されるアミノ酸配列、あるいは少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を有する実質的に類似するその配列を含む重鎖CDR3(HCDR3)を含む抗体または抗原結合断片である。

【0060】

一部の実施形態では、結合タンパク質は、表1に列挙されるLCDR1アミノ酸配列のいずれかから選択されるアミノ酸配列、あるいは少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を有する実質的に類似するその配列を含む軽鎖CDR1(LCDR1)を含む抗体または抗原結合断片である。

【0061】

一部の実施形態では、結合タンパク質は、表1に列挙されるLCDR2アミノ酸配列のいずれかから選択されるアミノ酸配列、あるいは少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を有する実質的に類似するその配列を含む軽鎖CDR2(LCDR2)を含む抗体または抗原結合断片である。

【0062】

一部の実施形態では、結合タンパク質は、表1に列挙されるLCDR3アミノ酸配列のい

10

20

30

40

50

いずれかから選択されるアミノ酸配列、あるいは少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98% または少なくとも 99% の配列同一性を有する実質的に類似するその配列を含む軽鎖 CDR3 (LCDR3) を含む抗体または抗原結合断片である。

【0063】

一部の実施形態では、結合タンパク質は、表 1 に列挙される LCDR3 アミノ酸配列のいずれかと対となる表 1 に列挙される HCDR3 アミノ酸配列のいずれかを含む HCDR3 および LCDR3 アミノ酸配列対 (HCDR3 / LCDR3) を含む抗体または抗原結合断片である。ある特定の実施形態に従うと、本開示は、表 1 に列挙される例示的な抗 PD-L1 抗体のいずれかに含まれる HCDR3 / LCDR3 アミノ酸配列対を含む抗体またはその抗原結合断片を提供する。ある特定の実施形態では、HCDR3 / LCDR3 アミノ酸配列対は、配列番号 88 / 96 (例えば、H2M8314N)、168 / 176 (例えば、H2M8718N)、312 / 280 (例えば、H1H9364P2)、および 320 / 280 (例えば、H1H9373P2) からなる群から選択される。ある特定の別の実施形態では、HCDR3 / LCDR3 アミノ酸配列対は、配列番号 104 / 112 (例えば、H2M8316N)、152 / 160 (例えば、H2M8323N)、296 / 280 (例えば、H1H9351P2)、および 336 / 280 (例えば、H1H9387P2) からなる群から選択される。

10

【0064】

一部の実施形態では、結合タンパク質は、表 1 に列挙される例示的な抗 PD-L1 抗体のいずれかに含まれる 6 つの CDR (すなわち、HCDR1 - HCDR2 - HCDR3 - LCDR1 - LCDR2 - LCDR3) のセットを含む抗体または抗原結合断片である。ある特定の実施形態では、HCDR1 - HCDR2 - HCDR3 - LCDR1 - LCDR2 - LCDR3 アミノ酸配列セットは、配列番号 84 - 86 - 88 - 92 - 94 - 96 (例えば、H2M8314N) ; 164 - 166 - 168 - 172 - 174 - 176 (例えば、H2M8718N) ; 308 - 310 - 312 - 276 - 278 - 280 (例えば、H1H9364P2) ; および 316 - 318 - 320 - 276 - 278 - 280 (例えば、H1H9373P2) からなる群から選択される。ある特定の別の実施形態では、HCDR1 - HCDR2 - HCDR3 - LCDR1 - LCDR2 - LCDR3 アミノ酸配列セットは、配列番号 100 - 102 - 104 - 108 - 110 - 112 (例えば、H2M8316N) ; 148 - 150 - 152 - 156 - 158 - 160 (例えば、H2M8323N) ; 292 - 294 - 296 - 276 - 278 - 280 (例えば、H1H9351P2) ; および 332 - 334 - 336 - 276 - 278 - 280 (例えば、H1H9387P2) からなる群から選択される。

20

30

【0065】

一部の実施形態では、結合タンパク質は、表 1 に列挙した、例示的な抗 PD-L1 抗体のうちのいずれかにより規定される、HCVR / LCVR のアミノ酸配列対内に含有される、6 つの CDR のセット (すなわち、HCDR1 - HCDR2 - HCDR3 - LCDR1 - LCDR2 - LCDR3) を含む、抗体または抗原結合性断片である。一部の実施形態では、結合タンパク質は、配列番号 82 / 90 (例えば、H2M8314N)、98 / 106 (例えば、H2M8316N)、146 / 154 (例えば、H2M8323N)、162 / 170 (例えば、H2M8718N)、290 / 274 (例えば、H1H9351P2)、306 / 274 (例えば、H1H9364P2)、314 / 274 (例えば、H1H9373P2) および 330 / 274 (例えば、H1H9387P2) からなる群より選択される、HCVR / LCVR のアミノ酸配列対内に含有される HCDR1 - HCDR2 - HCDR3 - LCDR1 - LCDR2 - LCDR3 のアミノ酸配列のセットを含む、抗体またはそれらの抗原結合性断片を含む。当技術分野では、HCVR および LCVR のアミノ酸配列内の CDR を同定するための方法および技法が周知であり、本明細書で開示される、指定された HCVR および / または LCVR のアミノ酸配列内の CDR を同定するのに使用することができる。CDR の境界を同定するのに使用しうる、例示的な常套手段は、例えば、Kabatt による定義、Chothia による定義、および AbM によ

40

50

る定義を含む。一般に、Kabatによる定義という用語は、配列可変性に基づき、Chothiaによる定義という用語は、構造的なループ領域の位置に基づき、AbM定義とは、Kabat法とChothia法との折衷である。例えば、Kabat、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」、National Institutes of Health、Bethesda、Md. (1991年)；Al-Lazikaniら、J. Mol. Biol.、273巻：927～948頁(1997年)；およびMartinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、86巻：9268～9272頁(1989年)を参照されたい。公表のデータベースもまた、抗体内のCDR配列を同定するために利用可能である。

10

【0066】

一部の実施形態では、結合性タンパク質は、PD-L1への特異的結合について、HCV RのCDRおよびLCVRのCDRを含む抗体またはその抗原結合性断片であって、HCV RおよびLCVRの各々が、表1に列挙したHCV R配列およびLCVR配列から選択されるアミノ酸配列を有する抗体またはその抗原結合性断片と競合する抗体およびそれらの抗原結合性断片である。

【0067】

一部の実施形態では、結合性タンパク質は、PD-1またはB7-1へのPD-L1結合を遮断する単離抗体およびそれらの抗原結合性断片である。一部の実施形態では、PD-1またはB7-1へのPD-L1結合を遮断する抗体またはその抗原結合性断片は、PD-L1においてPD-1/B7-1と同じエピトープに結合しうる、あるいはPD-L1においてPD-1/B7-1と異なるエピトープに結合しうる。ある特定の実施形態では、PD-1またはB7-1へのPD-L1結合を遮断する本開示の抗体は、表1に列挙したHCV R配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するHCV RのCDR；および表1に列挙したLCVR配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するLCVRのCDRを含む。

20

【0068】

代替的な実施形態では、本開示は、PD-1またはB7-1へのPD-L1結合を遮断しない抗体およびその抗原結合断片を提供する。ある特定の実施形態では、本開示は、PD-L1に結合する単離抗体またはその抗原結合断片を提供し、ここで、抗体またはその抗原結合断片は、PD-1またはB7-1へのPD-L1結合を増強する。一部の実施形態では、PD-1/B7-1へのPD-L1結合を増強する単離抗体またはその抗原結合断片は、配列番号18、66、114、130、202、218、266、282、298、322および338からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するHCV RのCDR；ならびに配列番号26、74、122、138、210、226、および274からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するLCVRのCDRを含む。一部の実施形態では、単離抗体またはその抗原結合断片は、配列番号18/26(例えば、H2M8307N)、66/74(例えば、H2M8312N)、114/122(例えば、H2M8317N)、130/138(例えば、H2M8321N)、202/210(例えば、H1H9323P)、218/226(例えば、H1H9327P)、266/274(例えば、H1H9344P2)、282/274(例えば、H1H9345P2)、298/274(例えば、H1H9354P2)、322/274(例えば、H1H9382P2)、および338/274(例えば、H1H9396P2)からなる群から選択されるHCV R/LCVRアミノ酸配列対を含む。

30

40

【0069】

一部の実施形態では、結合性タンパク質は、ヒトまたは他の種に由来するPD-L1に特異的に結合する抗体およびそれらの抗原結合性断片である。ある特定の実施形態では、抗体は、ヒトPD-L1および/またはカニクイザルPD-L1に結合しうる。

【0070】

一部の実施形態では、結合性タンパク質は、PD-L1への結合について、HCV RのC

50

D RおよびL C V RのC D Rを含む基準抗体またはその抗原結合性断片であって、H C V RおよびL C V Rの各々が、表1に列挙したH C V R配列およびL C V R配列から選択されるアミノ酸配列を有する基準抗体またはその抗原結合性断片と交差競合する抗体およびそれらの抗原結合性断片である。

【0071】

一実施形態では、結合性タンパク質は、以下の特徴のうちの1または複数を有する単離抗体または抗原結合性断片である：(a) P D - 1またはB 7 - 1へのP D - L 1の結合を遮断する；(b) ヒトP D - L 1および/またはカニクイザルP D - L 1に特異的に結合する；(c) 混合リンパ球反応(M L R)アッセイにおいてT細胞増殖を阻害する；および(d) M L RアッセイにおいてI L - 2および/またはインターフェロンガンマ分泌を増大させる。

10

【0072】

一部の実施形態では、結合性タンパク質は、アゴニスト様式で、P D - L 1に特異的に結合しうる、すなわち、P D - L 1の結合および/または活性を増強するか、または刺激することが可能な抗体またはその抗原結合性断片である；他の実施形態では、抗体は、アンタゴニスト様式で、P D - L 1に特異的に結合することができる、すなわち、抗体は、P D - L 1が、その受容体に結合することを遮断する。

【0073】

ある特定の実施形態では、抗体または抗原結合性断片は、P D - L 1への第1の結合特異性と、第2の標的エピトープに対する第2の結合特異性とを含む二特異性である。第2の標的エピトープは、P D - L 1または異なるタンパク質、例えばT細胞共阻害剤における別のエピトープでありうる。ある特定の実施形態では、標的エピトープは、例えば、異なるT細胞、B細胞、腫瘍細胞、自己免疫組織細胞またはウイルス感染細胞を含む、異なる細胞上のエピトープでありうる。

20

【0074】

一部の実施形態では、抗体および抗体の抗原結合性断片は、例えば、米国特許公開第U S 2 0 1 5 - 0 2 0 3 5 8 0 A 1号の実施例3に規定されるアッセイフォーマットまたは実質的に類似するアッセイを使用して、表面プラズモン共鳴により測定される、約3 1 8 p M未満のK_Dで、単量体P D - L 1と結合する(例えば、2 5 または3 7 で)。ある特定の実施形態では、抗体またはそれらの抗原結合性断片は、例えば、米国特許公開第U S 2 0 1 5 - 0 2 0 3 5 8 0 A 1号の実施例3で規定されるアッセイフォーマット、または実質的に類似するアッセイを使用して、表面プラズモン共鳴により測定される、約3 0 0 p M未満、約2 5 0 p M未満、約1 5 0 p M未満、約1 0 0 p M未満、または約5 0 p M未満のK_Dで、単量体P D - L 1に結合する。

30

【0075】

一部の実施形態では、抗体およびそれらの抗原結合性断片は、例えば、米国特許公開第U S 2 0 1 5 - 0 2 0 3 5 8 0 A 1号の実施例3に規定されるアッセイフォーマットまたは実質的に類似するアッセイを使用して、表面プラズモン共鳴により測定される、約1 5 p M未満のK_Dで、二量体P D - L 1と結合する(例えば、2 5 または3 7 で)。ある特定の実施形態では、抗体またはそれらの抗原結合性断片は、例えば、米国特許公開第U S 2 0 1 5 - 0 2 0 3 5 8 0 A 1号の実施例3で規定されるアッセイフォーマット、または実質的に類似するアッセイを使用して、表面プラズモン共鳴により測定される、約1 2 p M未満、約1 0 p M未満、約8 p M未満、または約5 p M未満のK_Dで、二量体P D - L 1に結合する。

40

【0076】

一部の実施形態では、抗体またはそれらの抗原結合性断片は、例えば、米国特許公開第U S 2 0 1 5 - 0 2 0 3 5 8 0 A 1号の実施例3に規定されるアッセイフォーマットを使用して、表面プラズモン共鳴により測定される、約2 8 n M未満のK_Dで、カニクイザル(M a c a c a f a s c i c u l a r i s) P D - L 1と結合する(例えば、2 5 または3 7 で)。ある特定の実施形態では、抗体またはそれらの抗原結合性断片は、例えば

50

、米国特許公開第US 2015 - 0203580 A1号の実施例3で規定されるアッセイフォーマット、または実質的に類似するアッセイを使用して、表面プラズモン共鳴により測定される、約25 nM未満、約20 nM未満、約15 nM未満、約10 nM未満、または約5 nM未満のKDで、カニクイザルPD - L1に結合する。

【0077】

一部の実施形態では、抗体およびそれらの抗原結合性断片は、例えば、米国特許公開US 2015 - 0203580 A1の実施例3で規定されるアッセイフォーマット、または実質的に類似するアッセイを使用して、25 または37 で、表面プラズモン共鳴により測定される通り、約1分間を超える解離半減期 ($t_{1/2}$) で、PD - L1に結合する。ある特定の実施形態では、本発明の抗体または抗原結合性断片は、例えば、米国特許公開US 2015 - 0203580 A1の実施例3で規定されるアッセイフォーマット (例えば、mAb捕捉または抗原捕捉フォーマット)、または実質的に類似するアッセイを使用して、25 または37 で、表面プラズモン共鳴により測定される通り、約5分間を超える、約10分間を超える、約30分間を超える、約50分間を超える、約60分間を超える、約70分間を超える、約80分間を超える、約90分間を超える、約100分間を超える、約200分間を超える、約300分間を超える、約400分間を超える、約500分間を超える、約600分間を超える、約700分間を超える、または約800分間を超える $t_{1/2}$ で、PD - L1に結合する。

10

【0078】

一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、例えば、米国特許公開2015 - 0203580 A1の実施例4に示されるようなELISAベースの免疫アッセイアッセイ、または実質的に類似するアッセイを使用して決定した場合に約770 pM未満のIC₅₀でPD - 1へのPD - L1結合を遮断する。一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、例えば、米国特許公開2015 - 0203580 A1の実施例4に示されるようなELISAベースの免疫アッセイアッセイ、または実質的に類似するアッセイを使用して決定した場合に約10 nM未満のIC₅₀でB7 - 1へのPD - L1結合を遮断する。一部の実施形態では、抗体およびその抗原結合断片は、PD - L1に結合し、PD - L1のPD - 1またはB7 - 1への結合を増強する。

20

【0079】

一部の実施形態では、抗体は、PD - L1の細胞外ドメインまたはドメインの断片に結合する。一部の実施形態では、抗体は、1つよりも多いドメインに結合する (交差反応性抗体)。ある特定の実施形態では、抗体は、NP_054862.1のアミノ酸残基19 ~ 239を含む細胞外ドメインに位置するエピトープに結合する。

30

【0080】

ある特定の実施形態では、抗体は、全長タンパク質の任意の他の領域または断片への結合を介して、PD - L1と関連するPD - 1結合またはB7 - 1結合活性を遮断または阻害することにより機能する。ある特定の実施形態では、抗体は、PD - L1とPD - 1/B7 - 1との間の相互作用を弱めるまたはモジュレートする。

【0081】

ある特定の実施形態では、抗体は、二特異性抗体である。二特異性抗体は、PD - L1の1つのドメインにおいて1つのエピトープに結合することができ、PD - L1の異なるドメインにおいて第2のエピトープにも結合することができる。ある特定の実施形態では、二特異性抗体は、同じドメインにおいて2つの異なるエピトープに結合する。一実施形態では、多特異性抗原結合分子は、第1の抗原結合特異性を含み、第1の結合特異性は、PD - 1の細胞外ドメインまたはそれらの断片を含む; および第2の抗原結合特異性は、PD - L1の別のエピトープに対する。別の実施形態では、多特異性抗原結合分子は、第1の抗原結合特異性を含み、第1の結合特異性は、B7 - 1の細胞外ドメインまたはそれらの断片を含む; および第2の抗原結合特異性は、PD - L1の別のエピトープに対する。

40

【0082】

一実施形態では、抗体またはその断片は、以下の特徴: (i) 配列番号2、18、34、

50

50、66、82、98、114、130、146、162、178、186、202、218、234、250、258、266、274、282、290、298、306、314、322、330および338からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有する、それと実質的に類似する配列を有するHCV Rを含むこと；(i i) 配列番号10、26、42、58、74、90、106、122、138、154、170、194、210、226、242、258および274からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有する、それと実質的に類似する配列を有するLCVRを含むこと；(i i i) 配列番号8、24、40、56、72、88、104、120、136、152、168、184、192、208、224、240、256、272、280、288、296、304、312、320、328、336および344からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有する、それと実質的に類似する配列を有するHCDR3ドメイン；ならびに配列番号16、32、48、64、80、96、112、128、144、160、176、200、216、232、248、264および280からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有する、それと実質的に類似する配列を有するLCDR3ドメインを含むこと；(i v) 配列番号4、20、36、52、68、84、100、116、132、148、164、180、188、204、220、236、252、268、284、292、300、308、316、324、332および340からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有する、それと実質的に類似する配列を有するHCDR1ドメイン；配列番号6、22、38、54、70、86、102、118、134、150、166、182、190、206、222、238、254、270、286、294、302、310、318、326、334および342からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有する、それと実質的に類似する配列を有するHCDR2ドメイン；配列番号12、28、44、60、76、92、108、124、140、156、172、196、212、228、244、260および276からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有する、それと実質的に類似する配列を有するLCDR1ドメイン；ならびに配列番号14、30、46、62、78、94、110、126、142、158、174、198、214、230、246、262および278からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有する、それと実質的に類似する配列を有するLCDR2ドメインを含むこと；(v) PD-L1に対する第1の結合特異性と、PD-L1、腫瘍特異的な抗原、ウイルス感染細胞抗原およびT細胞共阻害剤からなる群より選択される抗原に対する第2の結合特異性を含む多特異性の抗原結合分子であること；(v i) 約4 pM~約645 nMのK_DでヒトPD-L1に結合すること；(v i i) 約70 pM~約400 nMのK_DでカニクイザルPD-L1に結合すること；(v i i i) IC₅₀ 770 pMでPD-1のPD-1への結合を遮断または増強すること；(i x) IC₅₀ 10 nMでPD-L1のB7-1への結合を遮断または増強すること；(x) T細胞/APCルシフェラーゼレポーターアッセイにおいて、PD-1誘導性T細胞下方制御を遮断し、かつ/またはT細胞シグナル伝達をレスキューすること；(x i) 混合リンパ球反応(MLR)アッセイにおいてT細胞増殖および活性を刺激すること；(x i i) MLRアッセイにおいてIL-2および/またはIFN 産生を誘導すること；(x i i i) がんを伴う被験体における腫瘍の増殖を抑制し、生存を延長することのうちの1または複数を呈示する、PD-L1に結合する完全ヒトモノクローナル抗体またはそ

10

20

30

40

50

の抗原結合性断片である。

【0083】

一実施形態では、抗体またはその断片は、以下の特徴：(i) 配列番号 82、98、146、162、290、306、314 および 330 からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、もしくは少なくとも 99% の配列同一性を有する、それと実質的に類似する配列を有する HCV R を含むこと；(ii) 配列番号 90、106、154、170 および 274 からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、もしくは少なくとも 99% の配列同一性を有する、それと実質的に類似する配列を有する LCVR を含むこと；(iii) 配列番号 88、104、152、168、296、312、320 および 336 からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、もしくは少なくとも 99% の配列同一性を有する、それと実質的に類似する配列を有する HCD R3 ドメイン；ならびに配列番号 96、112、160、176 および 280 からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、もしくは少なくとも 99% の配列同一性を有する、それと実質的に類似する配列を有する LCD R3 ドメインを含むこと；(iv) 配列番号 84、100、148、164、292、308、316 および 332 からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、もしくは少なくとも 99% の配列同一性を有する、それと実質的に類似する配列を有する HCD R1 ドメイン；配列番号 86、102、150、166、294、310、318 および 334 からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、もしくは少なくとも 99% の配列同一性を有する、それと実質的に類似する配列を有する HCD R2 ドメイン；配列番号 92、108、156、172 および 276 からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、もしくは少なくとも 99% の配列同一性を有する、それと実質的に類似する配列を有する LCD R1 ドメイン；ならびに配列番号 94、110、158、174 および 278 からなる群より選択されるアミノ酸配列、または少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、もしくは少なくとも 99% の配列同一性を有する、それと実質的に類似する配列を有する LCD R2 ドメインを含むこと；(v) PD-L1 に対する第 1 の結合特異性と、PD-L1 の異なるエピトープ、腫瘍特異的な抗原、ウイルス感染細胞抗原および T 細胞共阻害剤からなる群より選択される抗原に対する第 2 の結合特異性とを含む多特異性の抗原結合分子であること；(vi) KD₁₀-10M でヒト PD-L1 に結合すること；(vii) KD₁₀-7M でカニクイザル PD-L1 に結合すること；(viii) PD-1 の PD-1 または B7-1 への結合を遮断すること；(ix) T 細胞/APC ルシフェラーゼレポーターアッセイにおいて、PD-1 誘導性 T 細胞下方制御を遮断し、かつ/または T 細胞シグナル伝達をレスキューすること；(xi) 混合リンパ球反応 (MLR) アッセイにおいて T 細胞増殖および活性を刺激すること；(xii) MLR アッセイにおいて IL-2 および/または IFN γ 産生を誘導すること；(xiii) がんを伴う被験体における腫瘍の増殖を抑制し、生存を延長することのうちの 1 または複数を呈示する、PD-1 または B7-1 への PD-L1 結合を遮断する完全ヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合性断片である。

【0084】

ある特定の実施形態では、抗 PD-L1 抗体またはそれらの抗原結合性断片は、PD-L1 内の、例示される領域のうちの任意の 1 または複数の中のエピトープであって、天然形態のエピトープ、組換えにより作製されたエピトープ、またはこれらの断片に結合する。一部の実施形態では、本開示の抗体は、PD-L1 のアミノ酸残基 19 ~ 239 からなる群より選択される、1 または複数のアミノ酸を含む細胞外領域に結合する。一部の実施形態では、本開示の抗体は、カニクイザル PD-L1 のアミノ酸残基 1 ~ 221 からなる群より選択される、1 または複数のアミノ酸を含む領域に結合する。

【 0 0 8 5 】

ある特定の実施形態では、表 1 に示される、本開示の抗体は、PD - L 1 の約 1 9 位から約 1 3 0 位の範囲のアミノ酸残基；または PD - L 1 の約 1 3 0 位から約 1 5 3 位の範囲のアミノ酸残基；または PD - L 1 の約 1 5 3 位から約 2 1 0 位の範囲のアミノ酸残基；または PD - L 1 の約 2 1 0 位から約 2 3 9 位の範囲のアミノ酸残基からなる群より選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列と相互作用する。

【 0 0 8 6 】

一部の実施形態では、抗 PD - L 1 抗体は、本明細書の表 1 で記載される、特定の例示的な抗体のうちのいずれか、または表 1 で記載された例示的な抗体のうちのいずれかの C D R 配列を有する抗体と同じエピトープ、またはエピトープの区分に結合する。同様に、適切な抗体はまた、PD - L 1 または PD - L 1 断片への結合について、本明細書の表 1 で記載される、特定の例示的な抗体のうちのいずれか、または表 1 で記載された例示的な抗体のうちのいずれかの C D R 配列を有する抗体と競合する抗 PD - L 1 抗体も含む。例えば、適切な抗体は、PD - L 1 への結合について、本明細書の実施例 6 で規定される 1 または複数の抗体（例えば、H 2 a M 8 3 0 9 N、H 1 H 9 3 2 9 P、H 1 H 9 3 3 6 P、H 2 a M 8 3 1 4 N、H 2 a M 8 3 1 6 N、H 2 A M 8 7 1 8 N、H 1 H 9 3 8 7 P 2、H 1 H 9 3 5 1 P 2、H 1 H 9 3 6 4 P 2、H 1 H 9 3 7 3 P 2、および H 2 a M 8 3 0 6 N）と交差競合する抗 PD - L 1 抗体を含む。本開示は、PD - L 1 への結合について、米国特許公開第 U S 2 0 1 5 - 0 2 0 3 5 8 0 A 1 号の実施例 6 で規定される 1 または複数の抗体（例えば、H 1 H 9 3 9 6 P 2、H 2 a M 8 3 1 7 N、H 2 a M 8 3 2 1 N、H 1 H 9 3 2 3 P、H 1 H 9 3 8 2 P 2、H 1 H 9 3 4 4 P 2、H 1 H 9 3 4 5 P 2 および H 1 H 9 3 5 4 P 2）と交差競合する抗 PD - L 1 抗体も含む。

【 0 0 8 7 】

本明細書に記載される抗体および抗原結合性断片は、PD - L 1 に特異的に結合し、PD - L 1 と PD - 1 または B 7 - 1 との相互作用をモジュレートする。抗 PD - L 1 抗体は、PD - L 1 に、高アフィニティーで結合する場合もあり、低アフィニティーで結合する場合もある。ある特定の実施形態では、抗体は、遮断抗体であり、PD - L 1 に結合し、PD - L 1 と PD - 1 または B 7 - 1 との相互作用を遮断する。一部の実施形態では、本開示の遮断抗体は、PD - L 1 の、PD - 1 または B 7 - 1 への結合を遮断し、かつ / または T 細胞活性化を刺激もしくは増強する。一部の実施形態では、遮断抗体は、免疫応答を刺激もしくは増強し、かつ / またはがんもしくは慢性ウイルス感染を患う被験体を処置するのに有用でありうる。抗体は、それを必要とする被験体へと投与されると、被験体における HIV、LCMV、または HBV などのウイルスによる慢性感染を低減しうる。抗体を使用して、被験体における腫瘍細胞の増殖を阻害することができる。抗体は、単独で使用することもでき、がんまたはウイルス感染を処置するための、当技術分野で公知の、他の治療用部分または治療モダリティーを伴う補助治療として使用することもできる。ある特定の実施形態では、PD - L 1 に低アフィニティーで結合する抗 PD - L 1 抗体は、多特異性の抗原結合分子として使用され、ここで、第 1 の結合特異性が、PD - L 1 に低アフィニティーで結合し、第 2 の結合特異性が、PD - L 1 の異なるエピトープ、T 細胞共阻害剤、例えば PD - 1、腫瘍特異的な抗原および感染細胞特異的な抗原からなる群より選択される抗原に結合する。

【 0 0 8 8 】

ある特定の実施形態では、本開示の抗体は、アゴニスト抗体であり、PD - L 1 に結合し、PD - L 1 と PD - 1 / B 7 - 1 との相互作用を増強する。一部の実施形態では、活性化抗体は、PD - L 1 の、PD - 1 または B 7 - 1 への結合を増強し、かつ / または T 細胞活性化を阻害もしくは抑制する。本開示の活性化抗体は、被験体における免疫応答を阻害することによび / または自己免疫疾患を処置することにより有用でありうる。

【 0 0 8 9 】

ある特定の実施形態では、抗 PD - L 1 抗体は、多特異性の抗原結合性分子であり、PD - L 1 に対する第 1 の結合特異性と、PD - L 1 の異なるエピトープ、T 細胞共阻害剤（

10

20

30

40

50

例えば、PD-1)、腫瘍特異的な抗原および感染細胞特異的な抗原からなる群より選択される抗原に対する第2の結合特異性とを含む。ある特定の実施形態では、第1の結合特異性は、PD-L1に、 10^{-8} M、 10^{-7} Mまたはそれよりも大きい K_D などの低アフィニティーで結合する。

【0090】

本開示のある特定の抗PD-L1抗体は、*in vitro*アッセイまたは*in vivo*アッセイにより決定される通り、PD-L1に結合し、その活性を中和することが可能である。本開示の抗体が、PD-L1に結合し、その活性を中和する能力は、当業者に公知の、任意の標準的な方法であって、本明細書で記載される結合アッセイまたは活性アッセイを含む方法を使用して測定することができる。

10

【0091】

結合活性を測定するための、非限定的な、例示的*in vitro*アッセイは、米国特許公開第US2015-0203580A1号の実施例3に例示される。実施例3では、ヒト抗PD-L1抗体の、ヒトPD-L1およびカニクイザルPD-L1に対する結合アフィニティーおよび反応速度定数を、表面プラズモン共鳴により決定し、測定を、T200 Biacore機器上で行った。米国特許公開第US2015-0203580A1号の実施例4および5では、遮断アッセイを使用して、*in vitro*での、PD-1のまたはB7-1へのPD-L1結合能力を遮断する抗PD-L1抗体の能力を決定した。米国特許公開第US2015-0203580A1号の実施例6では、遮断アッセイを使用して、異なる抗PD-L1抗体の間の交差競合を決定した。米国特許公開第US2015-0203580A1号の実施例7では、PD-L1を過剰発現する細胞に対する抗体の結合が記載されている。US2015-0203580A1号の実施例8では、ルシフェラーゼアッセイを使用して、抗PD-L1抗体が、T細胞内の、PD-1/PD-L1シグナル伝達をアンタゴナイズする能力を決定した。

20

【0092】

そうでないことが具体的に指し示されない限りにおいて、本明細書で使用される「抗体」という用語は、2つの免疫グロブリン重鎖および2つの免疫グロブリン軽鎖を含む抗体分子（すなわち、「全長抗体分子」）ならびにこれらの抗原結合性断片を包含すると理解されるものとする。本明細書で使用される、抗体の「抗原結合性区分」、抗体の「抗原結合性断片」などの用語は、任意の、天然に存在するか、酵素的に得られるか、合成であるか、または遺伝子操作されたポリペプチドまたは糖タンパク質であって、抗原に特異的に結合して、複合体を形成するポリペプチドまたは糖タンパク質を含む。本明細書で使用される、抗体の「抗原結合性断片」または「抗体断片」という用語は、PD-L1に特異的に結合する能力を保持する、抗体の1または複数の断片を指す。抗体断片は、Fab断片、 $F(ab')_2$ 断片、Fv断片、dAb断片、CDRを含有する断片、または単離CDRを含みうる。ある特定の実施形態では、「抗原結合性断片」という用語は、多特異性の抗原結合性分子のポリペプチドまたはその断片を指す。このような実施形態では、「抗原結合性断片」という用語は、例えば、PD-L1に特異的に結合する、PD-1の細胞外ドメインを含む。抗体の抗原結合性断片は、例えば、タンパク質分解性消化、または抗体の可変ドメインおよび（任意選択で）定常ドメインをコードするDNAの操作（manipulation）および発現を伴う、組換え遺伝子操作（engineering）法など、任意の適切な標準的技法を使用して、全長抗体分子から導出することができる。このようなDNAは、公知であり、かつ/もしくは、例えば、市販の供給源である、DNAライブラリー（例えば、ファージ抗体ライブラリーを含む）からたやすく入手可能であるか、または合成することができる。DNAは、シーケンシングし、化学的に操作することもでき、分子生物学的技術を使用して、例えば、1または複数の可変ドメインおよび/または定常ドメインを、適切な構成へと配置するか、またはコドンを導入するか、システイン残基を創出するか、アミノ酸を修飾、付加、もしくは欠失させることなどにより操作することもできる。

30

40

【0093】

50

抗原結合性断片の非限定的な例は、(i) Fab断片；(ii) F(ab')₂断片；(iii) Fd断片；(iv) Fv断片；(v) 単鎖Fv(scFv)分子；(vi) dAb断片；および(vii) 抗体の超可変領域を模倣するアミノ酸残基からなる、最小限の認識単位（例えば、CDR3ペプチドなどの単離相補性決定領域(CDR)）、または拘束FR3-CDR3-FR4ペプチドを含む。ドメイン特異的抗体、単ドメイン抗体、ドメイン欠失抗体、キメラ抗体、CDRグラフト抗体、ダイアボディ(diabody)、トリアボディ(triabody)、テトラボディ(tetrabody)、ミニボディ(minibody)、ナノボディ(nanobody)（例えば、一価ナノボディ、二価ナノボディなど）、低分子免疫医薬(SMIP)、およびサメ可変IgNARDメインなど、他の操作分子もまた、本明細書で使用する「抗原結合性断片」という表現の中に包含される。

10

【0094】

抗体の抗原結合性断片は典型的に、少なくとも1つの可変ドメインを含むであろう。可変ドメインは、任意のサイズまたはアミノ酸組成であることが可能であり、一般に、1または複数のフレームワーク配列と隣接するか、またはこれらとインフレームにある、少なくとも1つのCDRを含むであろう。V_Lドメインと会合するV_Hドメインを有する抗原結合性断片内では、V_Hドメインと、V_Lドメインとを、互いと比べて、任意の適切な配置に置くことができる。例えば、可変領域は、二量体であることが可能であり、V_H-V_H二量体、V_H-V_L二量体、またはV_L-V_L二量体を含有しうる。代替的に、抗体の抗原結合性断片は、単量体のV_HドメインまたはV_Lドメインを含有しうる。

20

【0095】

ある特定の実施形態では、抗体の抗原結合性断片は、少なくとも1つの定常ドメインへと共有結合的に連結された、少なくとも1つの可変ドメインを含有しうる。本開示の抗体の抗原結合性断片内で見出されうる、可変ドメインおよび定常ドメインの、非限定的な例示的構成は、(i) V_H-C_H1；(ii) V_H-C_H2；(iii) V_H-C_H3；(iv) V_H-C_H1-C_H2；(v) V_H-C_H1-C_H2-C_H3；(vi) V_H-C_H2-C_H3；(vii) V_H-C_L；(viii) V_L-C_H1；(ix) V_L-C_H2；(x) V_L-C_H3；(xi) V_L-C_H1-C_H2；(xii) V_L-C_H1-C_H2-C_H3；(xiii) V_L-C_H2-C_H3；および(xiv) V_L-C_Lを含む。可変ドメインおよび定常ドメインの任意の構成であって、上記で列挙した例示的な構成のうちのいずれかを含む構成では、可変ドメインおよび定常ドメインを、互いと直接連結することもでき、完全なヒンジ領域もしくはリンカー領域または部分的なヒンジ領域もしくはリンカー領域により連結することもできる。ヒンジ領域は、少なくとも2つの（例えば、5つ、10、15、20、40、60、またはこれを超える）アミノ酸からなることが可能であり、単一のポリペプチド分子内の、隣接する可変ドメインおよび/または定常ドメインの間の、可撓性または半可撓性の連結を結果としてもたらす。さらに、本開示の抗体の抗原結合性断片は、上記で列挙した、可変ドメインおよび定常ドメインの構成であって、互いと、かつ/または1または複数の単量体のV_HドメインまたはV_Lドメインと非共有結合的に会合させた（例えば、ジスルフィド結合による）構成のうちのいずれかの、ホモ二量体またはヘテロ二量体（または他の多量体）を含みうる。

30

40

【0096】

全長抗体分子と同様に、抗原結合性断片は、単一特異性の場合もあり、多特異性（例えば、二特異性）の場合もある。抗体の多特異性抗原結合性断片は典型的に、少なくとも2つの異なる可変ドメインを含み、この場合、各可変ドメインは、別個の抗原または同じ抗原上の異なるエピトープに特異的に結合することが可能であろう。本明細書で開示される、例示的な二特異性抗体フォーマットを含む、任意の多特異性抗体フォーマットは、当技術分野で利用可能な慣用的な技法を使用して、本開示の抗体の抗原結合性断片の文脈における使用に適合させることができる。

【0097】

本開示の抗PD-L1抗体および抗体断片は、記載される抗体のアミノ酸配列から変動す

50

るが、PD-L1に結合する能力を保持するアミノ酸配列を有するタンパク質を包含する。このような改変体の抗体および抗体断片は、1カ所または複数カ所の、アミノ酸の付加、欠失、または置換であって、親配列と比較した場合、記載される抗体の生物学的活性と本質的に同等の生物学的活性を呈示する付加、欠失、または置換を含む。同様に、本開示の抗体をコードするDNA配列は、開示される配列と比較して、1カ所または複数カ所の、ヌクレオチドの付加、欠失、または置換を含むが、本開示の抗体または抗体断片と、本質的に生物学的に同等である抗体または抗体断片をコードする配列を包含する。

【0098】

2つの抗原結合性タンパク質または抗体は、例えば、単回用量であれ、複数回用量であれ、同様の実験条件下、同じモル用量で投与された場合に、それらの吸収の速度および程度が有意差を示さない、医薬同等物または医薬代替物であれば、生物学的に同等であると考えられる。一部の抗体は、それらの吸収の程度において同等であるが、それらの吸収の速度において同等でないが、このような吸収速度の差違が、意図的なものであり、例えば、長期使用時において、有効な体内薬物濃度を達成するのに必須ではなく、表示に反映されており、研究される特定の薬物製品にとって、医学的に重要でないと考えられるため、生物学的に同等であると考えうるならば、同等物または医薬代替物と考えられる。

10

【0099】

一実施形態では、2つの抗原結合性タンパク質は、それらの安全性、純度、または効力において、臨床的に有意義な差違が見られない場合、生物学的に同等である。

【0100】

20

一実施形態では、2つの抗原結合性タンパク質は、患者を、基準生成物と、生物学的生成物との間で、そのような切換えを伴わずに治療を持続させた場合と比較した、予測される有害作用の危険性の増大であって、免疫原性の臨床的に有意な変化、または有効性の減殺を含む有害作用の危険性の増大を伴わずに、1回または複数回にわたり切り換えうる場合、生物学的に同等である。

【0101】

一実施形態では、2つの抗原結合性タンパク質は、それらのいずれもが、そのような機構が公知である程度において、1または複数の使用条件に対する、1または複数の共通の作用機構により作用する場合、生物学的に同等である。

【0102】

30

生物学的等価性は、*in vivo*法により裏付けることもでき、かつ/または*in vitro*法により裏付けることもできる。生物学的等価性の尺度は、例えば、(a)ヒトまたは他の哺乳動物における*in vivo*試験であって、抗体またはその代謝物の濃度を、血液中、血漿中、血清中、または他の生物学的流体中で、時間の関数として測定する*in vivo*試験；(b)ヒトの*in vivo*におけるバイオアベイラビリティデータと相関しており、その妥当な予測である*in vitro*試験；(c)ヒトまたは他の哺乳動物における*in vivo*試験であって、抗体(またはその標的)の適切な短期的薬理学効果を時間の関数として測定する*in vivo*試験；および(d)十分にコントロールされた臨床試験であって、抗体の安全性、有効性、もしくはバイオアベイラビリティ、または生物学的等価性を確立する臨床試験を含む。

40

【0103】

本開示の抗体の生物学的に同等な改変体は、例えば、残基または配列の多様な置換を施すことにより構築することもでき、生物学的活性に必要とされない、末端または内部の残基または配列を欠失させることにより構築することもできる。例えば、生物学的活性に必須でないシステイン残基は、還元時における、不要であるかまたは不適正な分子内ジスルフィド架橋の形成を防止するように、欠失させるか、または他のアミノ酸で置きかえることができる。他の文脈では、生物学的に同等な抗体は、抗体のグリコシル化特徴を修飾するアミノ酸変化、例えば、グリコシル化を消失させるかまたは除去する変異を含む抗体改変体を含む。

【0104】

50

本開示のある特定の実施形態に従い、抗PD-L1抗体は、例えば、中性のpHと比較して、酸性のpHにおいて、抗体の、FcRn受容体への結合を増強または減殺する、1カ所または複数カ所の変異を含むFcドメインを含む。例えば、本開示は、Fcドメインの、CH2領域内またはCH3領域内に変異を含む、抗PD-L1抗体を含み、この場合、変異は、酸性環境（例えば、pHが約5.5～約6.0の範囲である、エンドソーム内）で、Fcドメインの、FcRnへのアフィニティを増大させる。このような変異は、動物へと投与されると、抗体の血清半減期の延長を結果としてもたらしうる。このようなFc修飾の非限定的な例は、例えば、250位（例えば、EまたはQ）；250および428位（例えば、LまたはF）；252位（例えば、L/Y/F/WまたはT）、254位（例えば、SまたはT）、ならびに256位（例えば、S/R/Q/E/DまたはT）における修飾；または428および/もしくは433位（例えば、H/L/R/S/P/QまたはK）、および/もしくは434位（例えば、A、W、H、FまたはY[N434A、N434W、N434H、N434F、またはN434Y]）における修飾；または250および/または428位における修飾；または307位もしくは308位（例えば、308F、V308F）および434位における修飾を含む。一実施形態では、修飾は、428L修飾（例えば、M428L）および434S修飾（例えば、N434S）；428L修飾、259I修飾（例えば、V259I）、および308F修飾（例えば、V308F）；433K修飾（例えば、H433K）、および434位の修飾（例えば、434Y）；252、254、および256位の修飾（例えば、252Y、254T、および256E）；250Q修飾および428L修飾（例えば、T250QおよびM428L）；ならびに307および/または308修飾（例えば、308Fまたは308P）を含む。さらに別の実施形態では、修飾は、265A修飾（例えば、D265A）および/または297A修飾（例えば、N297A）を含む。

【0105】

例えば、本開示は、250Qおよび248L（例えば、T250QおよびM248L）；252Y、254T、および256E（例えば、M252Y、S254T、およびT256E）；428Lおよび434S（例えば、M428LおよびN434S）；257Iおよび311I（例えば、P257IおよびQ311I）；257Iおよび434H（例えば、P257IおよびN434H）；376Vおよび434H（例えば、D376VおよびN434H）；307A、380A、および434A（例えば、T307A、E380A、およびN434A）；ならびに433Kおよび434F（例えば、H433KおよびN434F）からなる群より選択される、変異の1または複数の対または群を含むFcドメインを含む抗PD-L1抗体を含む。一実施形態では、本開示は、二量体の安定化を促進するように、IgG4のヒンジ領域内にS108P変異を含むFcドメインを含む抗PD-L1抗体を含む。前出のFcドメイン変異、および本明細書で開示される抗体可変ドメイン内の他の変異の全ての可能な組み合わせは、本開示の範囲内にあることが想定される。

【0106】

本開示はまた、キメラ重鎖定常（CH）領域を含む抗PD-L1抗体も含むが、この場合、キメラCH領域は、1つを超える免疫グロブリンアイソタイプのCH領域に由来するセグメントを含む。例えば、本開示の抗体は、ヒトIgG1分子、ヒトIgG2分子、またはヒトIgG4分子に由来する、CH2ドメインの一部または全部であって、ヒトIgG1分子、ヒトIgG2分子、またはヒトIgG4分子に由来する、CH3ドメインの一部または全部と組み合わせられた、CH2ドメインの一部または全部を含むキメラCH領域を含みうる。ある特定の実施形態に従い、本開示の抗体は、キメラヒンジ領域を有する、キメラCH領域を含む。例えば、キメラヒンジは、ヒトIgG1、ヒトIgG2、またはヒトIgG4のヒンジ領域に由来する、「上方ヒンジ」のアミノ酸配列（EU番号付けに従い、216～227位に由来するアミノ酸残基）であって、ヒトIgG1、ヒトIgG2、またはヒトIgG4のヒンジ領域に由来する「下方ヒンジ」の配列（EU番号付けに従い、228～236位に由来するアミノ酸残基）と組み合わせられたアミノ酸配列を含みう

10

20

30

40

50

る。ある特定の実施形態に従い、キメラヒンジ領域は、ヒトIgG1またはヒトIgG4の上方ヒンジに由来するアミノ酸残基と、ヒトIgG2の下方ヒンジに由来するアミノ酸残基とを含む。ある特定の実施形態では、本明細書に記載されるキメラCH領域を含む抗体は、抗体の治療特性または薬物動態特性に有害な影響を及ぼさず、Fcエフェクター機能の修飾を呈示する（例えば、その開示が、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、2014年1月31日に出願されたUSN14/170,166を参照されたい）。

【0107】

B. ポジトロン放射体およびキレート化部分

適切なポジトロン放射体は、キレート化部分と安定な複合体を形成し、免疫PETイメージングの目的に適切な物理的半減期を有するものを含むが、これらに限定されない。例示的なポジトロン放射体は、 ^{89}Zr 、 ^{68}Ga 、 ^{64}Cu 、 ^{44}Sc 、および ^{86}Y を含むが、これらに限定されない。適切なポジトロン放射体は、 ^{76}Br および ^{124}I を含むが、これらに限定されない、PD-L1結合性タンパク質に直接的に結合するもの、ならびに補欠分子族、例えば ^{18}F を介して導入されるものも含む。

【0108】

本明細書に記載されるキレート化部分は、PD-L1結合性タンパク質、例えば抗PD-L1抗体に共有結合的に連結された化学的な部分であり、ポジトロン放射体をキレート化することが可能な、すなわち、ポジトロン放射体と反応して配位キレート複合体を形成することが可能な区分を含む。適切な部分は、特定の金属の効率的な負荷を可能とし、*in vivo*で、免疫PETイメージングなどの診断的使用のため十分に安定な金属キレター複合体を形成するものを含む。例示的なキレート化部分は、ポジトロン放射体の解離および骨ミネラル (*mineral bone*)、血漿タンパク質、および/または骨髄への蓄積を最小化し、診断的使用に適切な程度に沈着するものを含む。

【0109】

キレート化部分の例は、ポジトロン放射体 ^{89}Zr 、 ^{68}Ga 、 ^{64}Cu 、 ^{44}Sc 、および/または ^{86}Y との安定な複合体を形成するものを含むが、これらに限定されない。例示的なキレート化部分は、*Nature Protocols*、5巻(4号):739頁、2010年; *Bioconjugate Chem.*、26巻(12号):2579頁(2015年); *Chem Commun (Camb)*、51巻(12号):2301頁(2015年); *Mol. Pharmaceutics*、12巻:2142頁(2015年); *Mol. Imaging Biol.*、18巻:344頁(2015年); *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*、37巻:250頁(2010年); *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* (2016年)、doi:10.1007/s00259-016-3499-x; *Bioconjugate Chem.*、26巻(12号):2579頁(2015年); WO2015/140212A1; およびUS5,639,879(参照によりその全体が本願に組み込まれる)に記載されているものを含むが、これらに限定されない。

【0110】

例示的なキレート化部分は、デスフェリオキサミン(DFO)、1,4,7,10-四酢酸(DOTA)、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、(1,4,7,10-テトラアザシクロデカン-1,4,7,10-テトラ(メチレンホスホン)酸(DOTP)、1R,4R,7R,10R)-1,4,7,10-テトラメチル-1,4,7,10-テトラアザシクロデカン-1,4,7,10-四酢酸(DOTMA)、1,4,8,11-テトラアザシクロテトラデカン-1,4,8,11-四酢酸(TETA)、 $\text{H}_4\text{octa pa}$ 、 $\text{H}_6\text{phos pa}$ 、 $\text{H}_2\text{ded pa}$ 、 $\text{H}_5\text{dec pa}$ 、 $\text{H}_2\text{az pa}$ 、HOPO、DO2A、1,4,7,10-テトラキス(カルバモイルメチル)-1,4,7,10-テトラアザシクロデカン(DOTAM)、1,4,7-トリアザシクロノナン-N,N',N''-三酢酸(NOTA)、1,4,7,10-テトラキス(カルバモイルメチル)-1,4,7,10-テトラアザシクロデカン

10

20

30

40

50

(DOTAM)、1, 4, 8, 11 - テトラアザピシクロ[6.6.2]ヘキサデカン - 4, 11 - ジセト酸 (dicetic acid) (CB-TE2A)、1, 4, 7, 10 - テトラアザシクロデカン (Cyclen)、1, 4, 8, 11 - テトラアザシクロテトラデカン (Cyclam)、八座キレーター (octadentate chelator)、六座キレーター (hexadentate chelator)、ホスホネートベースのキレーター、大環状キレーター、大環状テレフタルアミドリガンドを含むキレーター、二機能性キレーター、フサリニンCおよびフサリニンC誘導体キレーター、トリアセチルフサリニンC (TAF C)、フェリオキサミンE (FOX E)、フェリオキサミンB (FOX B)、フェリクロームA (FCHA) 等を含むものも含むが、これらに限定されない。

10

【0111】

一部の実施形態では、キレート化部分は、キレート化部分のキレート化区分を共有結合的に結合性タンパク質に付加する、リンカー部分を介して、PD-L1結合性タンパク質、例えば抗体またはその抗原結合性断片に共有結合的に結合させる。一部の実施形態では、これらのリンカー部分は、抗体のシステインまたはリシンなどのPD-L1結合性タンパク質の反応性部分と、p-イソチオシアナトベンジル (p-isothiocyanatobenzyl) 基などを含む、キレーターに付加された反応性部分と、以下のコンジュゲーション方法に提供される反応性部分との間の反応から形成される。加えて、このようなリンカー部分は、任意選択で、極性、溶解度、立体的な相互作用、剛性、および/またはキレート化区分とPD-L1結合性タンパク質との間の長さを調整する目的のため使用される化学基を含む。

20

【0112】

C. 放射性標識された抗PD-L1コンジュゲートの調製

放射性標識された抗PD-L1タンパク質コンジュゲートは、(1) PD-L1結合性タンパク質、例えば抗体を、ポジトロン放射体キレーターを含む分子およびPD-L1結合性タンパク質の望ましいコンジュゲーション部位に反応性の部分と反応させること、ならびに(2) 望ましいポジトロン放射体を負荷させることにより調製することができる。

【0113】

適切なコンジュゲーション部位は、リシンおよびシステインを含むが、これらに限定されず、その両方は、例えば、天然または操作されている場合もあり、例えば、抗体の重鎖または軽鎖に存在する場合もある。システインコンジュゲーション部位は、抗体ジスルフィド結合の変異、挿入、または還元から得られるものを含むが、これらに限定されない。システイン操作抗体を作る方法は、WO2011/056983に開示されているものを含むが、これらに限定されない。部位特異的なコンジュゲーション方法を使用して、コンジュゲーション反応を抗体の特異的な部位に方向づけて、望ましい化学量論および/または望ましい薬物対抗体(DAR)比を達成することもできる。このようなコンジュゲーション方法は、当業者に公知であり、グルタミンコンジュゲーション、Q295コンジュゲーション、およびトランスグルタミナーゼ媒介コンジュゲーション、並びに参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、J. Clin. Immunol.、36巻: 100頁(2016年)に記載されているものを含むが、これらに限定されない、システイン操作ならびに酵素および化学酵素法を含むが、これらに限定されない。望ましいコンジュゲーション部位に反応性の適切な部分は、一般に、PD-L1結合性タンパク質、例えば抗体およびポジトロン放射体キレーターの効率のおよび容易なカップリングを可能とする。リシンおよびシステイン部位に反応性の部分は、求電子基を含み、これは当業者に公知である。ある特定の態様では、所望のコンジュゲーション部位がリシンである場合、反応性の部分は、イソチオシアネート、例えばp-イソチオシアナトベンジル基または反応性エステルである。ある特定の態様では、所望のコンジュゲーション部位がシステインである場合、反応性の部分はマレイミドである。

30

40

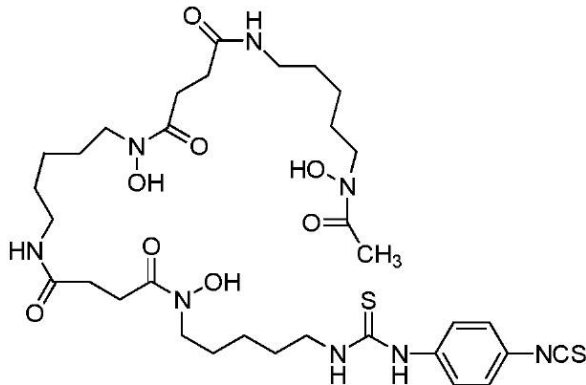
【0114】

キレーターがデスフェリオキサミン(DFO)である場合、適切な反応性の部分は、イソ

50

チオシアナトベンジル基 (isothiocyanatobenzyl group)、*n*-ヒドロキシスクシンイミドエステル、2,3,5,6テトラフルオロフェノールエステル (tetrafluorophenol ester)、*n*-スクシンイミジル-S-アセチルチオアセテート、および参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、BioMed Research International、2014巻、Article ID 203601に記載されているものを含むが、これらに限定されない。ある特定の実施形態では、PD-L1結合性タンパク質は、抗体およびポジトロン放射体キレーターを含む分子であり、コンジュゲーション部位に反応性の部分は、*p*-イソチオシアナトベンジル-デスフェリオキサミン (*p*-SCN-Bn-DFO)である：

【化1】



【0115】

ポジトロン放射体負荷は、例えば、本明細書に提供される実施例に記載される方法、または実質的に類似する方法を実施することにより、PD-L1結合性タンパク質キレーターコンジュゲートとポジトロン放射体を、キレーターに対する前記ポジトロン放射体の配位を可能とするため十分な時間で、インキュベートすることにより達成される。

【0116】

D. コンジュゲートの例示的な実施形態

ヒトプログラム細胞死リガンド1 (PD-L1) に結合する抗体またはその抗原結合性断片、キレート化部分、およびポジトロン放射体を含む、放射性標識された抗体コンジュゲートが、本開示に含まれる。

【0117】

一部の実施形態では、キレート化部分は、 ^{89}Zr と複合体を形成することが可能なキレーターを含む。ある特定の実施形態では、キレート化部分は、デスフェリオキサミンを含む。ある特定の実施形態では、キレート化部分は、*p*-イソチオシアナトベンジル-デスフェリオキサミンである。

【0118】

一部の実施形態では、ポジトロン放射体は、 ^{89}Zr である。

【0119】

一部の実施形態では、コンジュゲートのキレート化部分対抗体比は、1から2である。

【0120】

特定の実施形態では、キレート化部分は、*p*-イソチオシアナトベンジル-デスフェリオキサミンであり、ポジトロン放射体は ^{89}Zr である。別の特定の実施形態では、キレート化部分は、*p*-イソチオシアナトベンジル-デスフェリオキサミンであり、ポジトロン放射体は ^{89}Zr であり、コンジュゲートのキレート化部分対抗体比は、1から2である。

【0121】

一部の実施形態では、PD-L1に結合する抗原結合性タンパク質が本明細書に提供され、PD-L1に結合する前記抗原結合性タンパク質は、以下の構造を有する1または複数の部分に共有結合的に結合される：

- L - M z

(式中、Lはキレート化部分であり；Mはポジトロン放射体であり；zは出現毎に独立に0または1であり；zの少なくとも1つは1である)。ある特定の実施形態では、放射性標識された抗原結合性タンパク質は、式(I)の化合物である：

M - L - A - [L - M z] k

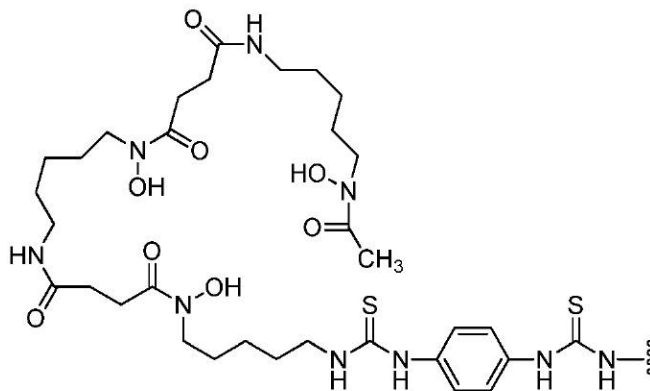
(I)

AはPD-L1に結合するタンパク質であり；Lはキレート化部分であり；Mはポジトロン放射体であり；zは0または1であり；kは0～30の整数である。一部の実施形態では、kは1である。

【0122】

一部の実施形態では、Lは：

【化2】



である。

【0123】

一部の実施形態では、Mは⁸⁹Zrである。

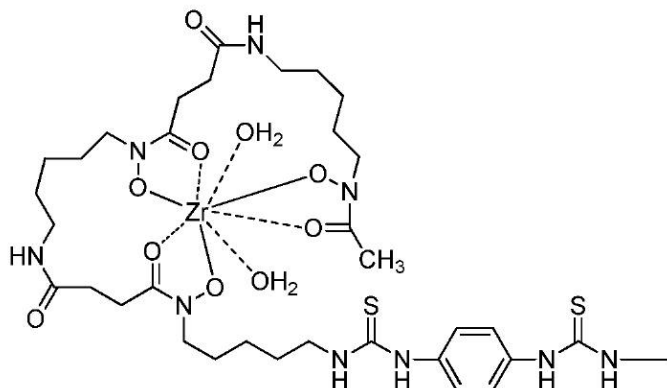
【0124】

一部の実施形態では、kは1から2の整数である。一部の実施形態では、kは1である。

【0125】

一部の実施形態では、- L - Mは、

【化3】



である。

【0126】

本開示には、放射性標識された抗体コンジュゲートを合成する方法であって、式(III)の化合物：

10

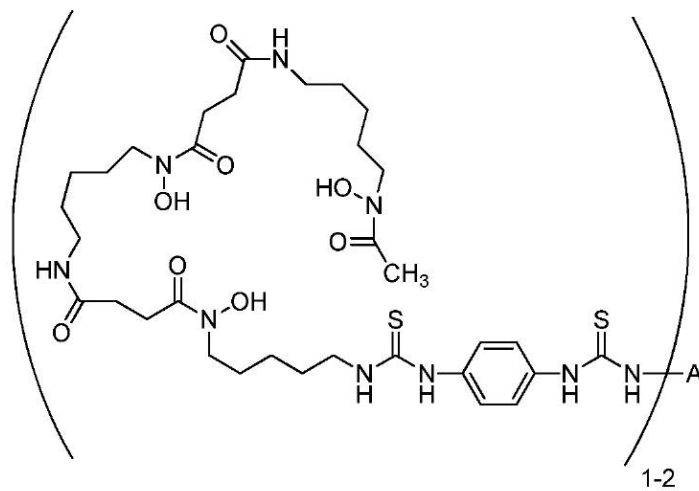
20

30

40

50

【化 4】



(III)

を、 $89Zr$ と接触させることを含み、式中、Aは、PD-L1に結合する抗体またはその抗原結合性断片である方法も含まれる。ある特定の実施形態では、式(III)の化合物は、PD-L1に結合する抗体またはその抗原結合性断片をp-SCN-Bn-DFOと接触させることにより合成される。

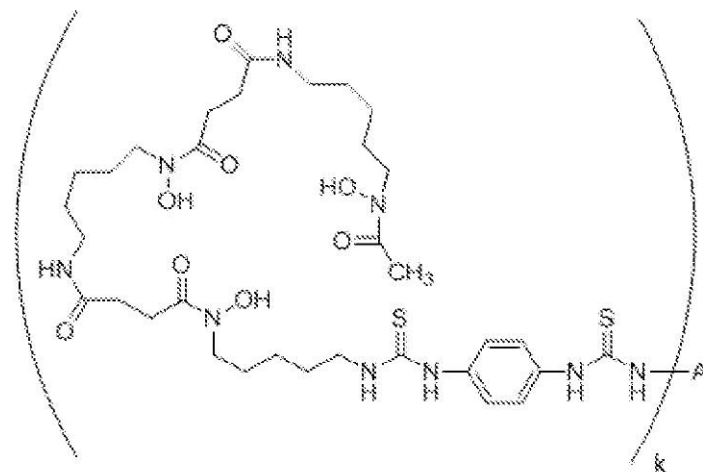
【0127】

式(III)の化合物と $89Zr$ との間の反応の産物も本明細書に提供される。

【0128】

式(III)：

【化 5】



の化合物が、本明細書に提供され、式中、Aは、PD-L1に結合する抗体またはその抗原結合性断片であり、kは1～30の整数である。一部の実施形態では、kは1または2である。

【0129】

一部の実施形態では、以下の構造を有するコンジュゲートを含む組成物が本明細書に提供される：

A-L_k

(式中、AはPD-L1に結合するタンパク質であり；Lはキレート化部分であり；kは

1 ~ 30 の整数であり；コンジュゲートは、臨床 PET イメージングに適切な比放射能を提供するのに十分な量のポジトロン放射体でキレート化される）。一部の実施形態では、キレート化されたポジトロン放射体の量は、1 ~ 50 mg の PD - L1 に結合するタンパク質当たり 1 ~ 3 mCi の比放射能を提供するのに十分な量である。

【0130】

一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、37 °C での表面プラズモン共鳴アッセイにおいて測定される、約 310 pM 未満の結合解離平衡定数 (K_D) で、単量体ヒトプログラム細胞死リガンド 1 (PD - L1) に結合する。

【0131】

一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、25 °C での表面プラズモン共鳴アッセイにおいて約 180 pM 未満の K_D で単量体ヒト PD - L1 に結合する。

10

【0132】

一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、37 °C での表面プラズモン共鳴アッセイにおいて測定される、約 15 pM 未満の K_D で二量体ヒト PD - L1 に結合する。

【0133】

一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、25 °C での表面プラズモン共鳴アッセイにおいて約 8 pM 未満の K_D で二量体ヒト PD - L1 に結合する。

【0134】

一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、表 1 に列挙される HCV R 配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する HCV R の相補性決定領域 (CDR)；および表 1 に列挙される LCV R 配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する LCV R の CDR を含む基準抗体とヒト PD - L1 への結合について競合する。一部の実施形態では、基準抗体またはその抗原結合断片は、表 1 に示される HCV R / LCV R アミノ酸配列対を含む。一部の実施形態では、基準抗体は、配列番号 82 / 90、98 / 106、146 / 154、162 / 170、290 / 274、306 / 274、314 / 274 および 330 / 274 からなる群から選択される HCV R / LCV R アミノ酸配列対を含む。

20

【0135】

一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、PD - 1 または B7 - 1 の一方への PD - L1 結合を増強する。一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、PD - 1 および / または B7 - 1 への PD - L1 結合を遮断する。一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、そのリガンドへの PD - L1 結合を増大も減少もさせない。

30

【0136】

一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 18、66、114、130、202、218、266、282、298、322、および 338 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する HCV R の相補性決定領域 (CDR)；および配列番号 26、74、122、138、210、226、および 274 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する LCV R の CDR を含む。ある特定の実施形態では、単離抗体は、配列番号 18 / 26、66 / 74、114 / 122、130 / 138、202 / 210、218 / 226、266 / 274、282 / 274、298 / 274、322 / 274、および 338 / 274 からなる群から選択される HCV R / LCV R アミノ酸配列対を含む。

40

【0137】

一部の実施形態では、抗体は、ヒト PD - L1 に特異的に結合するヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であり、ここで、抗体またはその抗原結合断片は、表 1 に列挙される HCV R 配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域 (HCV R) を含む。

【0138】

一部の実施形態では、抗体は、ヒト PD - L1 に特異的に結合するヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であり、ここで、抗体またはその抗原結合断片は、表 1 に列挙

50

される L C V R 配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域 (L C V R) を含む。

【 0 1 3 9 】

一部の実施形態では、ヒト P D - L 1 に特異的に結合する抗体ヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合断片において、抗体またはその抗原結合断片は、(a) 表 1 に列挙される H C V R 配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する H C V R ; および (b) 表 1 に列挙される L C V R 配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する L C V R を含む。

【 0 1 4 0 】

一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、表 1 に列挙される重鎖可変領域 (H C V R) 配列のいずれか 1 つに含まれる 3 つの重鎖相補性決定領域 (C D R) (H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3) ; および表 1 に列挙される軽鎖可変領域 (L C V R) 配列のいずれか 1 つに含まれる 3 つの軽鎖 C D R (L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3) を含む。

【 0 1 4 1 】

一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、

(a) 配列番号 4、20、36、52、68、84、100、116、132、148、164、180、188、204、220、236、252、268、284、292、300、308、316、324、332、および 340 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する H C D R 1 ドメイン ;

(b) 配列番号 6、22、38、54、70、86、102、118、134、150、166、182、190、206、222、238、254、270、286、294、302、310、318、326、334、および 342 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する H C D R 2 ドメイン ;

(c) 配列番号 8、24、40、56、72、88、104、120、136、152、168、184、192、208、224、240、256、272、288、296、304、312、320、328、336、および 344 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する H C D R 3 ドメイン ;

(d) 配列番号 12、28、44、60、76、92、108、124、140、156、172、196、212、228、244、260、および 276 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する L C D R 1 ドメイン ;

(e) 配列番号 14、30、46、62、78、94、110、126、142、158、174、198、214、230、246、262、および 278 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する L C D R 2 ドメイン ; および

(f) 配列番号 16、32、48、64、80、96、112、128、144、160、176、200、216、232、248、264、および 280 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する L C D R 3 ドメイン、を含む。

【 0 1 4 2 】

一部の実施形態では、抗体または抗原結合断片は、配列番号 82 / 90、98 / 106、146 / 154、162 / 170、290 / 274、306 / 274、314 / 274 および 330 / 274 からなる群から選択される H C V R / L C V R アミノ酸配列対を含む。

【 0 1 4 3 】

一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 2、34、50、82、98、146、162、178、186、234、250、290、306、314、および 330 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する H C V R の C D R ; および配列番号 10、42、58、90、106、154、170、194、242、258、および 274 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する L C V R の C D R を含む。

【 0 1 4 4 】

E . 抗 P D - L 1 抗体キレーターコンジュゲートの産生のための、スケールを拡大した製造キレーターへとコンジュゲートさせた抗 P D - L 1 抗体の産生のための拡大製造プロセス

が、本開示に含まれる。抗 P D - L 1 抗体キレーターコンジュゲートは、放射性標識に適切な形態にある。

【 0 1 4 5 】

良好な製造プロセスは、無菌環境を維持すること、無菌的な手順を実行すること、全てのプロセスの記録を保持すること、ならびに産物の質、純度、強度および同一性およびそこからのあらゆる偏差を記録することを含む、産生の全ての態様において順守される。

【 0 1 4 6 】

一部の実施形態では、拡大製造プロセスは、研究および開発のための製造プロセスよりもはるかに速い。一部の実施形態では、拡大製造プロセスは、12時間未満、または10時間未満、または8時間未満、または6時間未満、または4時間未満、または2時間未満もしくは約2時間かかる場合がある。

10

【 0 1 4 7 】

一部の実施形態では、第1のステップは、コンジュゲーションプロセスを阻害する賦形剤、コンジュゲーション干渉種、および塩を除去するための、抗 P D - L 1 抗体の、30 ~ 50 k D a 膜を使用する、限外濾過およびダイアフィルトレーション (U F D F) を含む。例示的な膜ポリマーは、ポリエーテルスルホン (P E S)、セルロースアセテート (C A)、および再生セルロース (R C) を含む。このステップでは、抗体は、低いイオン強度および非干渉緩衝液中で緩衝液交換される。緩衝液 p H は、約 4 . 5 から約 6、または約 5 から約 6、または約 5 . 3 から約 5 . 7 の間、または約 5 . 5 の場合もある。本明細書に有用であるとして想定される緩衝系は、一級アミンを欠く任意の緩衝系を含む。例示的な緩衝液は、酢酸、リン酸、またはクエン酸緩衝液を含む。緩衝液は、コンジュゲーション前の加工処理の間のタンパク質安定性を提供する。プロセス容量をさらに低減して、抗体を濃縮し、次いで濾過滅菌することができる。

20

【 0 1 4 8 】

コンジュゲーション前の U F D F 後、濃縮および濾過された抗体は、アミン不含炭酸緩衝系へと移す場合もある。炭酸緩衝系は、約 8 . 5 から約 9 . 6、または約 9 . 0 から約 9 . 6、または約 9 . 2 から約 9 . 4、または約 9 . 4 から約 9 . 6 の範囲、または約 9 . 4 の p H の p H を有することができる。

【 0 1 4 9 】

溶媒中の D F O などのキレーターは標的濃度まで抗体を含有する緩衝系へと添加され、追加の溶媒は所望のパーセンテージまで溶液へと添加することができる。キレーターは、モル濃度過剰で抗体、例えば、3 . 5 ~ 5 : 1 のキレーター対抗体で添加することができる。総反応容量は、5 L までの場合もある。

30

【 0 1 5 0 】

反応温度および反応時間は、逆相関する。例えば、反応温度がより高い場合、反応時間はより短い。反応温度がより低い場合、反応時間はより長い。例示的に、約 18 °C よりも高い温度で、反応は2時間未満かかる場合がある；18 °C 未満の温度で、反応は2時間よりも長くかかる場合がある。

【 0 1 5 1 】

コンジュゲーション反応は、例えば、酢酸の添加により、クエンチングすることにより停止することができる。

40

【 0 1 5 2 】

一部の実施形態では、抗体とデフェロキサミンのコンジュゲーションを実施して、D F O - m A b コンジュゲートを作製する。一部の実施形態では、抗体と p - S C N - B n - デフェロキサミンのコンジュゲーションを実施して、D F O - m A b コンジュゲートを作製する。

【 0 1 5 3 】

キレーターのための例示的な溶媒は、D M S O および D M A を含む。その後の U F D F ステップは、膜を利用し、膜は、コンジュゲーションステップで使用される溶媒系に基づき選択される。例えば、D M A は、P E S 膜を溶解し、そのため、これら2つは、同じ系で

50

使用できない。

【0154】

炭酸緩衝液は、長期貯蔵期間中のコンジュゲートの安定性には好ましくない。したがって、抗体キレーターコンジュゲートが形成されたら、それらは、長期貯蔵および安定性に関して特に選択された緩衝液へと緩衝液交換することができる。例示的な緩衝液は、クエン酸、酢酸、リン酸、アルギニン、およびヒスチジン緩衝液を含む。さらなるUFDFステップを実施して、残留する塩を除去し、コンジュゲートモノクローナル抗体の適切な濃度、賦形剤レベル、およびpHを提供することができる。結果として得られる抗体-キレーターコンジュゲートは、濾過滅菌され、その後の製剤化のため保存されうる。

【0155】

III. 放射性標識された免疫コンジュゲートを使用する方法

ある特定の態様では、本開示は、本開示の放射性標識された抗体コンジュゲートの使用の診断法および治療法を提供する。

【0156】

一態様に従い、組織内のPD-L1を検出する方法であって本明細書に提供される放射性標識された抗体コンジュゲートを組織に投与するステップ；およびPD-L1発現をポジトロン放射断層撮影（PET）イメージングにより可視化するステップを含む方法が本開示に提供される。ある特定の実施形態では、組織は、細胞または細胞系を含む。ある特定の実施形態では、組織は被験体に存在し、被験体は哺乳動物である。ある特定の実施形態では、被験体は、ヒト被験体である。ある特定の実施形態では、被験体は、がん、感染症および炎症性疾患からなる群より選択される疾患または障害を有する。一実施形態では、被験体は、がんを有する。ある特定の実施形態では、感染症は、例えば、B型肝炎ウイルス（HBV）、C型肝炎ウイルス（HCV）、ヒト免疫不全症ウイルス（HIV）、および結核菌により引き起こされる、細菌またはウイルス感染である。

【0157】

一態様に従い、PD-L1を発現する組織のイメージングの方法が本開示に提供され、該方法は、本開示の放射性標識された抗体コンジュゲートを組織に投与するステップ；およびPD-L1発現をポジトロン放射断層撮影（PET）イメージングにより可視化するステップを含む。一実施形態では、組織は、腫瘍に含まれる。一実施形態では、組織は、腫瘍細胞培養物または腫瘍細胞系に含まれる。一実施形態では、組織は、被験体における腫瘍病変に含まれる。

【0158】

一態様に従い、療法への応答が、炎症を測定することにより測定される、療法への応答を測定するための方法が本開示に提供される。本態様に従い、方法は、本明細書に提供される放射性標識された抗体コンジュゲートをそれを必要とする被験体へと投与するステップおよびPD-L1発現をポジトロン放射断層撮影（PET）イメージングにより可視化するステップを含む。ある特定の実施形態では、炎症は、被験体における腫瘍に存在する。ある特定の実施形態では、PD-L1発現における増加は、腫瘍中の炎症における増加と関連する。

【0159】

一態様に従い、患者がPD-1/PD-L1シグナル伝達軸の阻害剤を含む抗腫瘍療法好適かどうかを決定するための方法であって、固形腫瘍を有する患者を選択するステップ、本開示の放射性標識された抗体コンジュゲートを投与するステップ、および腫瘍内の投与された放射性標識された抗体コンジュゲートをPETイメージングにより局在化を決定する（localizing）ステップを含み、腫瘍内の放射性標識された抗体コンジュゲートの存在が、PD-1/PD-L1シグナル伝達軸の阻害剤を含む抗腫瘍療法に適切であるとして患者を同定する方法が本開示に提供される。

【0160】

一態様に従い、PD-1/PD-L1シグナル伝達軸の阻害剤を含む抗腫瘍療法に関する候補を同定するための方法であって、固形腫瘍を有する患者を選択するステップ、本開示

10

20

30

40

50

の放射性標識された抗体コンジュゲートを投与するステップ、および腫瘍内の投与された放射性標識された抗体コンジュゲートをPETイメージングにより局在化を決定する(localizing)ステップを含み、腫瘍内の放射性標識された抗体コンジュゲートの存在が、PD-1/PD-L1シグナル伝達軸の阻害剤を含む抗腫瘍療法に適切であるとして患者を同定する方法が本開示に提供される。

【0161】

一態様に従い、PD-1/PD-L1シグナル伝達軸の阻害剤を含む抗腫瘍療法に対する患者の応答を予測するための方法であって、固形腫瘍を有する患者を選択するステップ、腫瘍が、PD-L1陽性であるかどうかを決定するステップを含み、腫瘍がPD-L1陽性である場合、患者の陽性応答が予測される、方法が本開示に提供される。ある特定の実施形態では、腫瘍は、本開示の放射性標識された抗体コンジュゲートを投与するステップ、および腫瘍内の放射性標識された抗体コンジュゲートをPETイメージングにより局在化を決定するステップ(ここで、腫瘍内の放射性標識された抗体コンジュゲートの存在が、腫瘍が、PD-L1陽性であることを指し示す)により陽性と決定される。

10

【0162】

一態様に従い、被験体におけるPD-L1陽性腫瘍を検出するための方法が本開示に提供される。本態様に従い、方法は、固形腫瘍を有する被験体を選択するステップ；本開示の放射性標識された抗体コンジュゲートを被験体に投与するステップ；および放射性標識された抗体コンジュゲートの局在化をPETイメージングにより決定するステップ(ここで、腫瘍内の放射性標識された抗体コンジュゲートの存在が、腫瘍が、PD-L1陽性であることを指し示す)を含む。

20

【0163】

本明細書で使用される「それを必要とする被験体」という表現は、固形腫瘍を含む、がんの1または複数の症状または適応症を呈示するおよび/またはがんと診断されているおよびそれを処置する必要がある、ヒトまたは非ヒト哺乳動物を意味する。多くの実施形態では、「被験体」という用語は、「患者」という用語と互換的に使用されうる。例えば、ヒト被験体は、未解明の重量減少、全般的な衰弱(general weakness)、持続性疲労、食欲不振、発熱、寝汗、骨痛、息切れ、腹部腫大、胸痛/圧力、脾臓の肥大、およびがん関連バイオマーカー(例えば、CA125)のレベルの上昇を含むが、これらに限定されない、原発性もしくは転移性腫瘍および/または1または複数の症状もしくは適応症と診断されうる。表現は、原発性または確立された腫瘍を有する被験体を含む。具体的な実施形態では、表現は、固形腫瘍、例えば、結腸がん、乳がん、肺がん、前立腺がん、皮膚がん、肝臓がん、骨がん、卵巣がん、子宮頸がん、膵臓がん、頭頸部がん、および脳がんを有する、および/または、それらの処置を必要とするヒト被験体を含む。用語は、原発性または転移性腫瘍(進行した悪性疾患)を有する被験体を含む。ある特定の実施形態では、「それを必要とする被験体」という表現は、以前の治療(例えば、抗がん剤による処置)に対して耐性もしくは不応性であるまたは不適切に管理された固形腫瘍を有する患者を含む。例えば、表現は、1または複数の系統の以前の治療、例えば、化学療法による処置(例えば、カルボプラチンまたはドセタキセル)で処置されている被験体を含む。ある特定の実施形態では、「それを必要とする被験体」という表現は、1または複数の系統の以前の治療で処置されているが、その後、再発または転移した固形腫瘍を有する患者を含む。ある特定の実施形態では、用語は、がん、関節リウマチ、アテローム性動脈硬化症、歯周炎、枯草熱、心臓疾患、冠動脈疾患、感染症、気管支炎、皮膚炎、髄膜炎、喘息、結核、潰瘍性大腸炎、クローン病、炎症性腸疾患、肝炎、副鼻腔炎、乾癬、アレルギー、線維症、ループス、血管炎(vasculitis)、強直性脊椎炎、グレーブス病、セリアック病、線維筋痛、および移植拒絶を含むが、これらに限定されない、炎症性疾患または障害を有する被験体を含む。

30

40

【0164】

ある特定の実施形態では、本開示の方法は、固形腫瘍を有する被験体に使用される。「腫瘍」、「がん」および「悪性疾患」という用語は、本明細書において互換的に使用される

50

。本明細書で使用される「固形腫瘍」という用語は、嚢胞も液体領域も通常含有しない組織の異常な塊を指す。固形腫瘍は、良性（がんではない）または悪性（がん）でありうる。本開示の目的に関して、「固形腫瘍」という用語は、悪性の固形腫瘍を意味する。用語は、それらを形成する細胞型、すなわち肉腫、癌腫およびリンパ腫と名付けられている異なる型の固形腫瘍を含む。ある特定の実施形態では、「固形腫瘍」という用語は、結腸直腸がん、卵巣がん、前立腺がん、乳がん、脳がん、子宮頸がん、膀胱がん、肛門がん、子宮がん、結腸がん、肝臓がん、脾臓がん、肺がん、子宮内膜がん、骨がん、精巣がん、皮膚がん、腎臓がん、胃がん、食道がん、頭頸部がん、唾液腺がん、および骨髄腫を含むが、これらに限定されない、がんを含む。

【0165】

一態様に従い、被験体における腫瘍を処置する方法が本開示に提供される。本態様に従い、方法は、固形腫瘍を有する被験体を選択するステップ；腫瘍が、PD-L1陽性であることを決定するステップ；およびPD-1/PD-L1シグナル伝達軸の阻害剤の1または複数の用量を投与するステップを含む。ある特定の実施形態では、腫瘍は、本開示の放射性標識された抗体コンジュゲートを被験体に投与するステップ；および腫瘍内の放射性標識された抗体コンジュゲートをPETイメージングにより可視化するステップ（ここで、腫瘍内の放射性標識された抗体コンジュゲートの存在が、腫瘍が、PD-L1陽性であることを指し示す）によりPD-L1陽性であると決定される。

【0166】

本明細書で使用される「処置」、「処置すること」などの用語は、一時的または永続的な基準で、症状を軽減すること、症状の原因を消失させること、腫瘍増殖を遅延もしくは阻害すること、腫瘍細胞負荷もしくは腫瘍負担を低減すること、腫瘍退縮を促進すること、腫瘍の縮小、ネクロシスおよび/もしくは消失を引き起こすこと、腫瘍の再発を防止すること、転移を防止もしくは阻害すること、転移性腫瘍増殖を阻害すること、ならびに/または被験体の生存の持続期間を増加させることを意味する。

【0167】

一態様に従うと、本開示は、抗腫瘍療法で処置されている固形腫瘍を有する被験体を選択するステップ；本開示の放射性標識された抗体コンジュゲートを被験体に投与するステップ；腫瘍内の投与された放射性標識されたコンジュゲートの局在化をPETイメージングにより画像化するステップ；および腫瘍増殖を決定するステップを含み、放射性標識シグナルのベースラインからの低下が、腫瘍退縮および抗腫瘍療法の有効性を指し示す、被験体における抗腫瘍療法の有効性をモニタリングするための方法を提供する。ある特定の実施形態では、抗腫瘍療法は、PD-1/PD-L1シグナル伝達軸の阻害剤（例えば、抗PD-1抗体）を含む。

【0168】

ある特定の実施形態では、本開示は、抗腫瘍療法で処置されている固形腫瘍を有する被験体を選択するステップ；本明細書に提供される放射性標識された抗体コンジュゲートを被験体に投与するステップ；および腫瘍内の投与された放射性標識されたコンジュゲートの局在化をPETイメージングにより画像化するステップを含み、放射性標識シグナルのベースラインからの増大が、炎症の増大および抗腫瘍療法の有効性を指し示す、腫瘍の炎症状態における変化を評価する方法を提供する。ある特定の実施形態では、抗腫瘍療法は、PD-1/PD-L1シグナル伝達軸の阻害剤（例えば、抗PD-1抗体）を含む。

【0169】

本明細書で使用される「ベースライン」という用語は、腫瘍内のPD-L1発現に関して、抗腫瘍療法のある用量の投与前または投与時の、被験体に対する放射性標識されたコンジュゲートの取り込みの数値を意味する。放射性標識されたコンジュゲートの取り込みは、当技術分野において公知の方法（例えば、Oostingら、2015年、J. Nucl. Med. 56巻：63～69頁を参照されたい）を使用して決定される。ある特定の実施形態では、抗腫瘍療法は、PD-1/PD-L1シグナル伝達軸の阻害剤を含む。

【0170】

10

20

30

40

50

腫瘍退縮が存在するかどうかを決定するために、放射性標識されたコンジュゲートの取り込みが、ベースラインおよびPD-1/PD-L1シグナル伝達軸（例えば、抗PD-1抗体）の阻害剤の投与後の1または複数の時点で定量される。例えば、投与された放射性標識された抗体コンジュゲート（例えば、放射性標識された抗PD-L1抗体コンジュゲート）の取り込みは、PD-1/PD-L1シグナル伝達軸（例えば、抗PD-1抗体）の阻害剤による初期処置後、2日目、3日目、4日目、5日目、6日目、7日目、8日目、9日目、10日目、11日目、12日目、14日目、15日目、22日目、25日目、29日目、36日目、43日目、50日目、57日目、64日目、71日目、85日目；または1週、2週、3週、4週、5週、6週、7週、8週、9週、10週、11週、12週、13週、14週、15週、16週、17週、18週、19週、20週、21週、22週、23週、24週、またはそれよりも長い週数の終わりに測定されてもよい。処置の開始後の特定の時点での取り込みの値とベースラインでの取り込みの値との間の差を使用して、腫瘍組織（腫瘍退縮または進行）の量の差が存在しているかどうかを確認される。例えば、PD-1/PD-L1シグナル伝達軸の阻害剤の少なくとも1用量による処置時の取り込みのベースラインからの低下は、腫瘍退縮を意味し、抗腫瘍療法の有効性が指示される。

10

【0171】

ある特定の実施形態では、放射性標識された抗体コンジュゲートは、被験体に対して静脈内または皮下に投与される。ある特定の実施形態では、放射性標識された抗体コンジュゲートは、腫瘍内に投与される。投与時に、放射性標識された抗体コンジュゲートは、腫瘍に局在化する。局在化した放射性標識された抗体コンジュゲートは、PETイメージングにより画像化され、腫瘍による放射性標識された抗体コンジュゲートの取り込みは、当技術分野において公知の方法により測定される。ある特定の実施形態では、イメージングは、放射性標識されたコンジュゲートの投与1、2、3、4、5、6または7日後に実行される。ある特定の実施形態では、イメージングは、放射性標識された抗体コンジュゲートの投与と同日に実行される。

20

【0172】

ある特定の実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、PD-L1に特異的に結合する。ある特定の実施形態では、抗PD-L1抗体は、配列番号2、34、50、82、98、146、162、178、186、234、250、290、306、314、および330からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するHCVRのCDR；および配列番号10、42、58、90、106、154、170、194、242、258、および274からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するLCVRのCDRを含む。

30

【0173】

ある特定の実施形態では、PD-1/PD-L1シグナル伝達軸の阻害剤は、PD-1に特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片を含む。ある特定の実施形態では、抗PD-1抗体は、ニボルマブ、ペムブロリズマブおよびREGN2810からなる群より選択される。ある特定の他の実施形態では、PD-1/PD-L1シグナル伝達軸の阻害剤は、PD-L1に特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片を含む。一実施形態では、抗PD-L1抗体は、アテゾリズマブである。一実施形態では、抗PD-L1抗体は、配列番号82のHCVRおよび配列番号90のLCVRを含む。

40

【実施例】

【0174】

IV. 実施例

本開示のある特定の実施形態は、以下の非限定的な実施例により例示される。

【0175】

（実施例1：PD-L1に対するヒト抗体の作出）

表1に列挙されるものを含む、ヒト抗PD-L1抗体を、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、米国特許公開第US2015-0203580A1号に記載されるように、調製および特徴づけた。簡潔に述べると、PD-L1に対するヒト抗体を、P

50

D - L 1 (G e n b a n k 受託番号 N P _ 0 5 4 8 6 2 . 1) のアミノ酸約 1 9 ~ 2 3 9 の範囲の P D - L 1 の断片を使用して作出した。免疫原は直接、免疫応答を刺激するアジュバントと共に、ヒト免疫グロブリンの重鎖可変領域およびカッパ軽鎖可変領域をコードする DNA を含む V E L O C I M M U N E (登録商標) マウスへと投与した。抗体の免疫応答は、P D - L 1 特異的イムノアッセイによりモニタリングした。所望の免疫応答を達成したら、脾臓細胞を採取し、それらの生存度を保存し、ハイブリドーマ細胞系を形成するように、マウス骨髄腫細胞と融合させた。P D - L 1 特異的抗体を産生する細胞系を同定するように、ハイブリドーマ細胞系をスクリーニングおよび選択した。この技法および上記で記載した免疫原を使用して、いくつかの抗 P D - L 1 キメラ抗体 (すなわち、ヒト可変ドメインと、マウス定常ドメインとを保有する抗体) を得、このようにして、作出した例示的な抗体を、H 2 M 8 3 0 6 N、H 2 M 8 3 0 7 N、H 2 M 8 3 0 9 N、H 2 M 8 3 1 0 N、H 2 M 8 3 1 2 N、H 2 M 8 3 1 4 N、H 2 M 8 3 1 6 N、H 2 M 8 3 1 7 N、H 2 M 8 3 2 1 N、H 2 M 8 3 2 3 N、H 2 M 8 7 1 8 N、H 2 M 8 7 1 8 N 2 および H 2 M 8 7 1 9 N と命名した。

10

【 0 1 7 6 】

抗 P D - L 1 抗体はまた、参照によりその全体において本明細書に具体的に組み込まれる U . S . 2 0 0 7 / 0 2 8 0 9 4 5 A 1 において記載されている通り、骨髄腫細胞への融合を伴わずに、抗原陽性 B 細胞からも直接単離した。この方法を使用して、いくつかの完全ヒト抗 P D - L 1 抗体 (すなわち、ヒト可変ドメインと、ヒト定常ドメインとを保有する抗体) を得、この方式で作出した例示的な抗体を、以下 : H 1 H 9 3 2 3 P、H 1 H 9 3 2 7 P、H 1 H 9 3 2 9 P、H 1 H 9 3 3 6 P、H 1 H 9 3 4 4 P 2、H 1 H 9 3 4 5 P 2、H 1 H 9 3 5 1 P 2、H 1 H 9 3 5 4 P 2、H 1 H 9 3 6 4 P 2、H 1 H 9 3 7 3 P 2、H 1 H 9 3 8 2 P 2、H 1 H 9 3 8 7 P 2 および H 1 H 9 3 9 6 P 2 の通りに命名した。

20

【 0 1 7 7 】

(実施例 2 : 抗 P D - L 1 抗体 H 4 H 8 3 1 4 N と p - S C N - B n - D F O とのコンジュゲーション)

親抗 P D - L 1 抗体 H 4 H 8 3 1 4 N および放射性標識を有する免疫 P E T 研究に適切なアイソタイプ対照抗体を修飾するために、キレーター、p - S C N - b n - デフェロキサミン (D F O ; M a c r o c y c l i c s、型番 B - 7 0 5) を、抗体に付加した。

30

【 0 1 7 8 】

修飾のために、H 4 H 8 3 1 4 N を、最初に、4 で一晩にわたる透析 (S l i d e - A - L y z e r 透析カセット G 2 1 0 k M W C O ; T h e r m o S c i e n t i f i c) により、ヒスチジン緩衝液から P B S、p H 7 . 2 に緩衝液交換し、次いで、P D - 1 0 カラム (G E H e a l t h c a r e、型番 1 7 - 0 8 5 1 - 0 1) を使用して 5 0 m M 炭酸緩衝液、1 5 0 m M N a C l、p H 9 . 0 から構成される緩衝液 (コンジュゲーション緩衝液) へと再度緩衝液交換した。緩衝液交換後の濃度を決定するために、試料を、1 . 4 6 g / L の吸光率に基づき M a c V e c t o r シークエンスを使用して N a n o d r o p 2 0 0 0 U V / V I S 分光計 (T h e r m o S c i e n t i f i c) において測定した (表 2 を参照されたい)。1 5 m L ポリプロピレンチューブ中に、7 7 3 . 9 u L の H 4 H 8 3 1 4 N (1 2 . 5 m g) を、1 6 7 6 . 1 u L のコンジュゲーション緩衝液に添加した。別個のバイアル中に、2 9 . 3 u L の D M S O を、2 0 . 7 u L の D F O に添加した。4 分の 1 の増分で、この D F O 溶液を、H 1 H 8 3 1 4 N 溶液に添加し、各時点で、上下に静かにピペティングすることにより混合した。最終的な溶液は、D F O の 6 倍モル過剰でのコンジュゲーション緩衝液、2 % D M S O 中に 5 m g / m L の H 4 H 8 3 1 4 N であった。この溶液を、追加の攪拌なしで 3 7 ウォーターバス中でインキュベートした。

40

【 0 1 7 9 】

3 7 で 3 0 分間後、溶液を、2 5 0 m M N a A c O、p H 5 . 4 (製剤化緩衝液) を含有する緩衝液であらかじめ平衡化された P D - 1 0 脱塩カラム (G E H e a l t h c

50

are、型番17-0851-01)に迅速に通した。最終的な溶液を、シリンジフィルター(Acrodisc 13mmシリンジフィルター、Pall Corporation、型番4602)を介して濾過滅菌した。濃度およびDFO対抗体比(DAR)を、その後、UV/VIS分光光学により測定した。吸光度測定に関して、DFO-コンジュゲート抗体を、製剤化緩衝液に対し、252nm(A₂₅₂)、280nm(A₂₈₀)および600nm(A₆₀₀)で測定した。計算に関して、バックグラウンドを、以下の方程式を使用して各吸光度値を補正した：

$$A' = A - A_{600}$$

【0180】

抗体コンジュゲートを、PBS移動相(0.75mL/分)で280nmでモニタリングしたSuperdex 200カラム(GE Healthcare、型番17-5175-01)に注入した25ugの試料で、SECクロマトグラフィーを使用して凝集について試験した。抗体の完全性を、2ugの試料をロードして、4~20%Tris/Glyプレキャストゲル(Novex)でのSDS-PAGEにより評価した。ゲルは、図1に示される。抗体濃度、コンジュゲート濃度、およびDARを、以下の方程式を使用して計算した：

抗体濃度計算

【数1】

$$\text{mAb濃度 (mg/mL)} = \frac{A'_{280}}{\epsilon_{280}}$$

コンジュゲート濃度計算

【数2】

$$\text{コンジュゲート濃度 (mg/mL)} = \frac{A'_{252} - 1.53A'_{280}}{\epsilon_{252} - 1.53\epsilon_{280}}$$

DAR計算

【数3】

$$\text{DAR} = \frac{\epsilon_{252}A'_{280} - \epsilon_{280}A'_{252}}{18800A'_{252} - 28700A'_{280}}$$

【表2】

表 2:モル吸光率および分子量

抗体	MW (g mol ⁻¹)	ϵ 280 (L g ⁻¹ cm ⁻¹)	ϵ 252 (L g ⁻¹ cm ⁻¹)
H4H8314N	144984	1.46	0.553

10

20

30

40

50

【表 3】

表 3:UV DAR、凝集物パーセントおよび DFO 接着後濃度

抗体	UV DAR	濃度 (mg/mL)	凝集物%
H4H8314N	1.2	3.34	< 1%

【0181】

(実施例 3：DFO コンジュゲートモノクローナル抗体の ^{89}Zr キレート化)

in vivo 研究での免疫 PET における使用に関して、DFO - コンジュゲート抗 PD-L1 抗体、H4H8314N、および DFO - コンジュゲートアイソタイプ対照抗体を、 ^{89}Zr で放射性標識した。

【0182】

DFO - コンジュゲート抗体 (250 または 750 μg) を、最初に 1 M HEPES、pH 7.2 中で 1.25 mg/mL にした。各研究についての DFO - Ab コンジュゲート溶液のレシピは、表 4 に列挙される。個別に、 ^{89}Zr 溶液を、表 5 に示される各対応する研究についてのレシピを使用して調製した。ストック ^{89}Zr シュウ酸溶液を、PerkinElmer または 3D イメージングから得た。ストック溶液の放射能濃度が低い場合 (表 5 を参照されたい)、中和ステップを 1 M ボラート、pH 9.0 で実施した。溶液の最終的な放射能を、最初に Capintec CRC-25R 線量キャリブレーター (Capintec #520) を使用して確認し、次いで、DFO - Ab コンジュゲート溶液に直ちに組み合わせ、静かに混合 (上下にピペティング) し、その後、45 分間、室温でインキュベートした。

【0183】

インキュベーション後、各反応混合物の小試料を、iTLC (即時薄層液体クロマトグラフィー) にかけて、放射性標識反応の収量を決定し、残りの反応混合物を、重力送りでの脱塩のために、250 mM 酢酸ナトリウム、pH 5.4 であらかじめ平衡化された PD-10 カラム (Vendor) へと移した。各 PD-10 カラムは、1.2 mL 以下の反応混合物をかけた (さもなければ複数のカラムを使用した)。反応の内容物がカラムベッドに入った後、1.6 mL の 250 mM 酢酸ナトリウム、pH 5.4 (製剤化緩衝液) を添加し; フロースルーを廃棄した。追加の 1.8 mL の製剤化緩衝液を、カラムに添加し、溶出液を各カラムから回収した。次に、約 500 μL の各溶液を、Nanodrop 分光光度計 (Thermo Scientific) を使用して解析した。最終的な Ab 濃度を、以下の方程式を使用して適切な吸光率および 280 nm での吸収を使用して計算した: $\text{mg/mL での濃度} = 280 \text{ nm での吸収} \div 280 \text{ nm での吸光率}$ (表 6 に見出される)

【0184】

グラムで測定した最終的な質量を、表 4 に記録した。次いで、放射能を、線量キャリブレーターを使用して測定し、表 5 に報告した。PD-10 カラム処置前の材料と共に最終的な材料を、次いで、iTLC により解析した。このアッセイに関して、1 μL の各溶液を、シリカゲル (Agilent Technologies、型番 SG10001) を含浸させた iTLC-SG-Glass マイクロファイバークロマトグラフィーペーパーに添加し、TLC チャンバー中で 20 mM クエン酸緩衝液で展開した。最終的な材料はまた、UV 280 および放射性同位元素検出器を直列に接続した SEC-HPLC (Lablogic Radio-TLC/HPLC 検出器、SCAN-RAM 付きの Agilent 1260) を使用して、流量 0.75 mL/分での PBS 移動相による Superdex 200 カラムを使用して解析した。放射性トレーサー (radio trace) を、タンパク質ピーク (約 10 から 16 分) および遊離 ^{89}Zr ピーク (約 25 分) の積分と比較することにより放射化学的純度を決定するため使用した。単量体純度を、オリゴマーピーク (10 分から約 15 分) と単量体 (約 16 分) との積分を比較することにより決定し

た。

【 0 1 8 5 】

各放射性標識されたコンジュゲートの比放射能およびタンパク質回収（％）を、以下の方程式を使用して決定した：

a . mg でのコンジュゲートの質量 = mg / mL での濃度 \times グラムでの溶液の質量

b . mCi / mg での比放射能 = mCi でのバイアルの放射能 \div mg でのコンジュゲートの質量

c . タンパク質回収 = 開始コンジュゲート質量（ mg ） \div mg でのコンジュゲートの質量

【 0 1 8 6 】

最終的に、外観を注記し、表 7 に記録した。UV 280 および iTLC トレースの両方を精製した産物に対して行った。

【 0 1 8 7 】

結果は、表 7 に集約される。放射性 - SEC - HPLC クロマトグラムは、図 2 ~ 4 に示される。UV 280 HPLC SEC クロマトグラムおよび放射性 - iTLC の実施例は、研究 1、 ^{89}Zr 放射性標識に関する図 5 に示される。UV 280 - HPLC SEC クロマトグラムによって、高度に単量体の産物（99％）が確認される。放射性 - iTLC トレースを、7 点の二項式スムージング機能（binomial smoothing function）で加工した。起点および溶媒先端は、それぞれ、約 16 および 100 mm であった。検出可能な ^{89}Zr は、22 mm を超えては観察されず、図 2 B において放射性 - SEC - HPLC SEC により決定された放射化学的純度を補強する。

【表 4】

表 4. 放射性標識のための DFO-抗体コンジュゲート調製

放射性標識番号	研究番号	放射性標識ロット	濃度 (mg/mL)	DAR *	コンジュゲート質量 (mg)	総容量 (uL)	最終濃度 (mg/mL)
1	1	アイソタイプ-DFO- ^{89}Zr	3.7	1.6	250	200	1.25
2	1	H4H8314N-DFO- ^{89}Zr	3.34	1.2	250	200	1.25
3	2	H4H8314N-DFO- ^{89}Zr	3.34	1.2	750	600	1.25
4	3	アイソタイプ-DFO- ^{89}Zr	3.7	1.6	250	200	1.25
5	3	H4H8314N-DFO- ^{89}Zr	3.34	1.2	250	200	1.25

* DAR は DFO 対抗体比として規定される

10

20

30

40

50

【表 5】

表 5.放射性標識のための ^{89}Zr 反応溶液調製

放射性 標識	研究 番号	放射性 標識ロ ット	^{89}Zr -オ キサレ ート(uL)	添加し た追 加の 1M シ ュウ酸 (uL)	添加し た 1M ボラー ト、 pH9.0 (uL)	1 M HEPES, pH 7.2 (uL)	最終 容量 (uL)	最終放 射能 (uCi)	比放射 能 (uCi/uL)
1	1	アイソタ イプ- DFO- ^{89}Zr	50	50	400	500	1000	1009	1.01
2	1	H4H831 4N- DFO- ^{89}Zr	50	50	400	500	1000	1000	1
3	2	H4H831 4N- DFO- ^{89}Zr	150	150	1200	1500	3000	3070	1.02
4	3	アイソタ イプ- DFO- ^{89}Zr	~1	0	0	1000	1000	1680	1.68
5	3	H4H831 4N- DFO- ^{89}Zr	~1	0	0	1000	1000	1640	1.64

【表 6】

表 6:コンジュゲートロットに関する吸光率

放射性標識ロット	ε_{280} (AU ml mg^{-1} cm^{-1})
アイソタイプ-DFO- ^{89}Zr	1.71
H4H8314N-DFO- ^{89}Zr	1.61

10

20

30

40

50

【表 7】

表 7.in vivo イメージングおよび生体内分布研究のための ^{89}Zr 標識 DFO-Ab コンジュゲートの概要

放射性 標識	研究番 号	コンジュゲ ートロット	外観	放射化 学的純 度*(%)	単量体 純度 *(%)	タンパク 質回収 (%)	濃度 (mg/mL)	比放射 能 (mCi/mg)
1	1	アイソタイ プ-DFO- ^{89}Zr	透明	>99%	>95%	60%	0.106	3.35
2	1	H4H8341N -DFO- ^{89}Zr	透明	>99%	>95%	63%	0.121	2.75
3	2	H4H8341N -DFO- ^{89}Zr	透明	>99%	>95%	62%	0.134	3.58
4	3	アイソタイ プ-DFO- ^{89}Zr	透明	>99%	>95%	66%	0.074	5.38
5	3	H4H8341N -DFO- ^{89}Zr	透明	>99%	>95%	74%	0.084	5.13

*放射性-SEC-HPLC による

【0188】

(実施例 4：免疫反応性)

放射性標識された抗 PD-L1 抗体およびアイソタイプ対照抗体の免疫反応性 (IR) を、以下の通りに測定した。初期の研究に関して、MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1-/-hPD-L1Tg 細胞を使用して、その後、LOX-IMVI 細胞 (実施例 5 における細胞系の詳細な記載を参照されたい) も、後期の研究において使用した。これらのアッセイでは、20 ng のそれぞれの ^{89}Zr 標識した抗体を、1 mL の最終容量で、 1.5×10^6 個の MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1-/-hPD-L1Tg または 3.0×10^6 個の LOX-IMVI 細胞に添加した。試料を、連続的に混合しながら 45 分間インキュベートし、その後、培地で 3 回洗浄して、あらゆる結合しなかった抗体を除去した。被験細胞ペレットの放射能を、次いで、同じく 20 ng の ^{89}Zr 標識抗体を含有する 2 つの参照標準に対して自動ガンマカウンター (Wizard 2470、Perkin Elmer) においてカウントした。免疫反応性のパーセンテージを、総放射能の尺度として標準の平均を使用して、試料について決定した。

【0189】

表 8 に見られるように、 ^{89}Zr 標識抗 PD-L1 抗体は、研究を通じて 88 から 98 % の範囲の % IR で、コンジュゲーションおよび放射性標識後に免疫反応性を保持した。結合の特異性は、1 % 未満のバックグラウンド % IR を有する対照抗体において明らかである。

10

20

30

40

50

【表 8】

表 8:⁸⁹Zr キレート化 DFO-コンジュゲートの免疫反応性

研究	研究 1		研究 2		研究 3			
細胞系	MC38- cOVA/eGFP-mPD- L1 ^{-/-} /hPD-L1 ^{Tg}		MC38- cOVA/eGFP-mPD- L1 ^{-/-} /hPD-L1 ^{Tg}		MC38- cOVA/eGFP-mPD- L1 ^{-/-} /hPD-L1 ^{Tg}		LOX-IMVI	
抗体	⁸⁹ Zr-抗 PD-L1	⁸⁹ Zr- 対照	⁸⁹ Zr-抗 PD-L1	⁸⁹ Zr- 対照	⁸⁹ Zr-抗 PD-L1	⁸⁹ Zr- 対照	⁸⁹ Zr-抗 PD-L1	⁸⁹ Zr- 対照
細胞ペ レット放 射能	4048.4	29.6	8311.9	na	6262.4	68	5587.54	65.4
平均標 準放射 能	4536.5	6432.4	8567.2	na	6386.6	9544.8	6386.6	9544.8
IR パー セント	89.2	0.5	97.0	na	98.1	0.7	87.5	0.7

10

【0190】

(実施例 5：腫瘍細胞系におけるヒト PD-L1 発現の *in vitro* および *ex vivo* 特徴づけ)

雄性 NCrヌード (Taconic, Hudson NY) マウスまたは VelociGene (登録商標) 技術 (Valenzuela ら、2003 年、Nat. Biotechnol. 21 巻: 652 ~ 659 頁; 米国特許出願公開第 US 2016/0157469 号) を使用して 75% C57/B16/25% 129 系統バックグラウンドにおいてマウス PD-L1 の細胞外ドメインに代えて、ヒト PD-L1 の細胞外ドメインの発現に関してホモ接合性となるように操作されたマウス (PD-L1 HumIn マウス) のいずれかにおける、*in vivo* での、腫瘍により内因的に発現されたヒト PD-L1 の検出を目的として、いくつかの腫瘍細胞系を研究してヒト PD-L1 の発現レベルを評価した。

20

30

【0191】

これらの研究に使用された細胞系は、以下を含む：1) マウス結腸癌腫細胞系 MC38 (Frederick, MD の NCI、Laboratory of Tumor Immunology and Biology から得た)、これは、マウス PD-L1 がノックアウトされているが、全長ヒト PD-L1 および eGFP と融合させた全長ニワトリ卵白アルブミンを過剰発現するように所内で操作されており、したがって、ここでは、MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}/hPD-L1^{Tg} と称される；2) いくつかのヒト腫瘍細胞系：ヒトメラノーマ細胞系 LOX-IMVI (NCI、Frederick, MD、Division of Cancer Treatment and Diagnosis、Tumor Repository から得た、内因的 PD-L1 陽性細胞系)、ヒト乳がん細胞系 MDA-MB-231 (内因的 PD-L1 陽性細胞系) および SK-Br-3 (PD-L1 陰性細胞系) (両方とも ATCC から得た)。一部の場合では、ヒト PD-L1 は、*in vitro* で、何ら誘導させることなく直接的に評価した；一部の場合では、ヒト PD-L1 発現は、一晚のマウスまたはヒト IFN (100 ng/ml) 処置 (Peprotech から得た) で評価した；一部の場合では、ヒト PD-L1 を、腫瘍保有ヌードマウスまたはヒト化マウスから抽出された酵素的に解離させた腫瘍細胞において *ex vivo* で評価した。ヒト PD-L1 の全ての表面染色を、標準プロトコルに従い実施した。略述すると、腫瘍細胞を、PBS で一回洗浄し、氷冷染色緩衝液で一回洗浄し、染色緩衝液中の市販の利用可能な蛍光色素を直接的にコンジュゲート

40

50

させた抗ヒトPD-L1抗体(eBioscience、クローンMIH1)で30分間、氷上で暗所で染色し、次いで、2mLのPBSで再度一回洗浄した。定着性色素eFluor506も、製造者のプロトコール(eBioscience、型番17-5983)に従い含めた。試料を、DIVA v8を装備したBD FACSCanto II(商標)IVD10で収集した。データを、FlowJo v10.0.6または上記でさらに解析した。

【0192】

ヌードマウスにおける植込み前および植込み7日後のMC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}-hPD-L1^{Tg}細胞によるPD-L1発現は、表9に示される。

【表9】

表9:ヌードマウスにおける植込み前および植込み7日後のヒトPD-L1陽性MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}-hPD-L1^{Tg}細胞のパーセンテージ

	アイソタイプ染色	hPD-L1染色
植込み前	0.6%	94.7%
植込み後	1.09%	74.0%

【0193】

植込み前、非常に大多数のMC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}-hPD-L1^{Tg}細胞が、アイソタイプ対照染色と比較して、ヒトPD-L1陽性であった。ヌードマウスにおける植込み7日後および腫瘍解離のための酵素的および機械的加工処理時、約70%のMC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}-hPD-L1^{Tg}細胞が、依然としてヒトPD-L1陽性であった。

【0194】

PD-L1ヒト化マウスにおける植込み前および植込み14日後のMC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}-hPD-L1^{Tg}細胞によるPD-L1発現は、表10に示される。

【表10】

表10:PD-L1ヒト化マウスにおける植込み前および植込み14日後のヒトPD-L1陽性MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}-hPD-L1^{Tg}細胞のパーセンテージ

	アイソタイプ染色	hPD-L1染色
植込み前	0.2%	92.5%
植込み後	3.6	46.2%

【0195】

植込み前、非常に大多数のMC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}-hPD-L1^{Tg}細胞が、アイソタイプ対照染色と比較して、ヒトPD-L1陽性であった。PD-1/PD-L1二重ヒト化マウスにおける植込み14日後および腫瘍解離のための酵素的および機械的加工処理時、約50%のMC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}-hPD-L1^{Tg}細胞が、依然としてヒトPD-L1陽性であった。

【 0 1 9 6 】

*in vitro*で複数の腫瘍細胞系によるPD-L1発現は、図6に示される。操作された細胞系(MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}-hPD-L1^{Tg})および他のヒト腫瘍細胞系(LOX-IMVIメラノーマ細胞、MDA-MB-231乳がん細胞、およびSK-Br-3乳がん細胞)によるPD-L1の発現レベルが、どの程度同等であるかを評価するために、抗PD-L1抗体染色の用量滴定を実施した。図6は、MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}-hPD-L1^{Tg}が、最高レベルのヒトPD-L1発現を有し(図6A)ならびにSK-Br-3が、検出可能なPD-L1のない最低発現を有した(図6D)のに対し、LOX-IMVIおよびMDA-MB-231によるPD-L1発現が、中等度(MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}-hPD-L1^{Tg}の約5分の1)(図6Bおよび6C)であったことを例示する。

10

【 0 1 9 7 】

第2の実験では、LOX-IMVIとMC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}-hPD-L1^{Tg}との間のさらなる比較を、それぞれ、一晩の100ng/mLのhIFN- γ /mIFN- γ による*in vitro*処置を伴うかまたは伴わずに行った。図7は、PD-L1の蛍光強度中央値が、染色で使用された約150nMの抗PD-L1抗体でプラトーに達することを例示した。ベースラインで、LOX-IMVIによるPD-L1発現は、中等度(MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}-hPD-L1^{Tg}の約6~7分の1)であった。mIFN- γ での処置時、MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}-hPD-L1^{Tg}においてPD-L1染色に関して変化は存在しないのに対し、hIFN- γ での処置後、LOX-IMVIにヒトPD-L1染色の3倍の増加が見られた。

20

【 0 1 9 8 】

ヌードマウスにおける植込み約3週後のLOX-IMVIおよびMC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}-hPD-L1^{Tg}細胞による*ex vivo*でのPD-L1発現は、表11および12に示された。

【 表 1 1 】

表 11:ヌードマウスにおける植込み約3週後のPD-L1陽性LOX-IMVIおよびMC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}-hPD-L1^{Tg}細胞のパーセンテージ

30

	アイソタイプ染色	hPD-L1染色
LOX-IMVI	0.2%	56.6%
MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1 ^{-/-} -hPD-L1 ^{Tg}	0.2%	96.2%

【 表 1 2 】

40

表 12:ヌードマウスにおける植込み約3週後のLOX-IMVIおよびMC38-cOVA/eGFP-mPD-L1^{-/-}-hPD-L1^{Tg}細胞によるPD-L1の平均蛍光強度

	腫瘍 1	腫瘍 2
LOX-IMVI	8479.1	12121.5
MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1 ^{-/-} -hPD-L1 ^{Tg}	49589.1	51445.0

50

【0199】

腫瘍解離を可能とする酵素的および機械的加工処理時、細胞を、抗PD-L1抗体(20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)で染色した。LOX-IMVIにおけるPD-L1発現レベルは、MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1-/-hPD-L1Tg腫瘍細胞におけるものの約5分の1であった。

【0200】

(実施例6:ヌードマウスにおけるhPD-L1陽性腫瘍に対する放射性標識された抗PD-L1抗体の選択的な局在化)

抗PD-L1抗体の*in vivo*局在化を決定するために、ジルコニウム-89標識DFO-抗体コンジュゲートをPD-L1陽性腫瘍保有ヌードマウスの静脈内に投与した。

10

【0201】

研究で使用された腫瘍系は、MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1-/-hPD-L1Tgと称されるマウス結腸癌腫細胞系であり、これは、野生型MC38のマウスPD-L1がノックアウトされているが、全長ヒトPD-L1およびeGFPと融合させた全長ニワトリ卵白アルブミンを過剰発現するように操作されている。ヒトPD-L1の内因的発現を伴う腫瘍の第2の研究に関して、ヒトメラノーマ細胞系LOX-IMVIを使用して、その後の抗PD-L1抗体局在化研究のために*in vivo*で腫瘍を確立した。

【0202】

この研究で使用される例示的な放射性標識された抗PD-L1抗体は、H1H8314Nであり、配列番号82/90のHCVR/LCVRを含んだ。

20

【0203】

第1の研究に関して、 1×10^6 個のMC38-cOVA/eGFP-mPD-L1-/-hPD-L1Tg細胞を、雄性8~10週齢NCRヌードマウス(Taconic、Hudson NY)の左脇腹の皮下に移植した。LOX-IMVI腫瘍に関して、 1×10^6 個の細胞を、雄性8~10週齢NCRヌードマウスの左脇腹の皮下に移植した。腫瘍が $50 \sim 150 \text{ mm}^3$ (約7~10日目)の平均容量に達したら、マウスを群に無作為化し、 ^{89}Zr 標識抗PD-L1DFO-抗体コンジュゲート(H1H8314N)または ^{89}Zr 標識非結合性アイソタイプ対照DFO-抗体コンジュゲートのいずれかを投与した。MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1-/-hPD-L1Tg腫瘍保有ヌードマウスは、タンパク質用量約 $0.6 \text{ mg}/\text{kg}$ で $50 \pm 1 \text{ uCi}$ の ^{89}Zr 標識抗体を施された。LOX-IMVI腫瘍保有マウスを使用する研究では、マウスは、最終抗体用量 0.3 または $1 \text{ mg}/\text{kg}$ で $35 \pm 1 \text{ uCi}$ の ^{89}Zr 標識抗体を施された。

30

【0204】

抗体局在化のPETイメージングを、抗体の投与6日後に評価した。Sofie Biosciences G8 PET/CT(Sofie Biosciences and Perkin Elmer)を使用してイメージを収集した。測定器を、イメージ収集前に ^{89}Zr の検出のために、あらかじめ較正した。エネルギーウィンドウは、150から650 keVの範囲であり、視野の中心で1.4 mmの再構成された解像度を有していた。マウスは、イソフルランを使用して導入麻酔を受け、イメージングの間にイソフルランの連続フロー下に保持された。静的な10分間のイメージを、G8収集ソフトウェアを使用して収集し、その後、あらかじめ構成された設定を使用して再構成した。イメージデータを、減衰および他のパラメータについて補正した。CTイメージを、PET収集後に収集し、後にPETイメージと共に登録した。イメージを、VivoQuant加工処理後ソフトウェア(*in vivo* CRO Imaging Services)を使用して調製した。

40

【0205】

生体内分布に関して、マウスを最終時点(投与5~6日後)で安楽死させ、血液を心臓穿刺を介して回収した。腫瘍および正常組織を、次いで、切除し、カウントチューブに設置した。各試料についての重量を、測定し、記録した。CPMでの ^{89}Zr についてのカウントデータを、次いで、自動ガンマカウンタ(Wizard 2470、Perkin Elmer)における試料を測定することにより回収した。1グラム当たりの注入用量の

50

パーセント (% I D / g) を、注入物質から調製した標準を使用して各試料について計算した。

【 0 2 0 6 】

各抗体についての平均 % I D / g は、表 1 3 に提示される。

【表 1 3】

表 13:解析した組織における平均%ID/g

試料	⁸⁹ Zr-H1H8314N		⁸⁹ Zr-アイソタイプ対照抗体	
	平均 %ID/g	STDEV % D/g	平均 %ID/g	STDEV % D/g
肝臓	3.1	0.4	0.9	0.9
脾臓	4.4	1.1	1.5	1.3
腎臓	4.0	0.7	1.4	1.6
骨	5.1	2.6	1.7	1.6
肺	5.1	1.1	2.5	3.0
心臓	2.4	0.2	1.3	1.4
血液	7.6	1.6	3.8	4.6
胸腺	5.3	3.0	2.8	2.2
MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1 ⁻ /hPD-L1 ^{Tg}	55.3	12.2	3.0	3.3
小腸	1.5	0.3	0.6	0.6

【 0 2 0 7 】

これから、他の正常組織に対して、MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1⁻/hPD-L1^{Tg}腫瘍中の明瞭に高い取り込みが、明らかであり、55.3%ID/gの腫瘍の取り込みは、胸腺中で観察された5.3%ID/gの次に高い取り込みよりも有意に高かった。腫瘍の取り込みは、それぞれ、血液および肝臓中の放射能よりも7.3倍および17.8倍高かった。腫瘍への抗PD-L1の取り込み(55.3%ID/g)の特異性は、非結合性のアイソタイプ対照抗体について観察された3%の有意に低減した腫瘍の取り込みと比較して明らかであった。ここで実施されたパイロットPETイメージングは、MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1⁻/hPD-L1^{Tg}腫瘍への⁸⁹Zr標識抗PD-L1 DFO-抗体コンジュゲートの明瞭な局在化を裏付けた。わずかなバックグラウンドシグナルが、この投与後6日目時点で動物において観察された。抗PD-L1抗体を使用して明らかであった明瞭な腫瘍局在化とは対照的に、わずかなバックグラウンド放射能のみが、このモデルの対照抗体のイメージングにおいて明らかであった。イメージングは、ヒトPD-L1陽性腫瘍における抗PD-L1抗体の明瞭に高く特異的な取り込みを示し、NCrヌードマウスにおけるMC38-cOVA/eGFP-mPD-L1⁻/hPD-L1^{Tg}腫瘍への⁸⁹Zr放射性標識された抗PD-L1抗体の局在化を示した。

【 0 2 0 8 】

第2の研究では、ヒトPD-L1抗原の内因的レベルを発現する腫瘍を選択的にターゲティングする抗PD-L1抗体の能力を評価した。ここでは、ヒトLOX-IMVIメラノーマ腫瘍保有マウスは、0.3および1mg/kgの用量で⁸⁹Zr標識抗体を施された。再び、血液、腫瘍および組織を注射後6日目にとり、試料に関する%ID/gを計算した。各抗体についての平均%ID/gは、表14に提示される。

10

20

30

40

50

【表 14】

表 14:第 2 の研究(LOX-IMVI 腫瘍)から解析した組織における平均%ID/G

試料	⁸⁹ Zr-DFO-H1H8314N 0.3 mg/kg		⁸⁹ Zr-DFO-H1H8314N 1 mg/kg		⁸⁹ Zr-アイソタイプ対照抗体 1mg/kg	
	平均 %ID/g	STDEV %ID /g	平均 %ID/g	STDEV %ID /g	平均 %ID/g	STDEV %ID /g
肝臓	2.9	0.3	3.3	0.2	3.9	0.3
脾臓	4.2	0.2	4.3	0.9	4.2	0.7
腎臓	4.3	0.4	4.3	0.8	3.4	0.4
骨	3.2	0.6	2.7	0.5	3.6	0.4
肺	5.7	1.0	6.6	1.6	5.9	1.2
心臓	3.2	0.8	3.2	0.4	2.9	0.6
血液	8.1	1.4	9.5	1.0	11.1	6.2
胸腺	5.3	2.3	5.6	0.7	4.9	1.4
LOX-IMVI 腫瘍	20.6	2.7	10.6	2.6	12.0	1.8
小腸	1.5	0.2	1.8	0.4	2.0	0.3

【0209】

より低い 0.3 mg/kg 用量で、正常組織よりも腫瘍へと明確にターゲティングすることが、観察され、LOX-IMVI 腫瘍において 20.6 %ID/g が観察された。マウスがより高い 1 mg/kg 用量を施された場合、10.6 %ID/g の低減した腫瘍の取り込みが 0.3 mg/kg レベルと比較して観察された。これは、非標識抗体のより高いタンパク質用量およびおそらくその後のより高い割合が、⁸⁹Zr 標識抗 PD-L1 抗体による腫瘍の取り込みの遮断を導いたことを示唆する。これに一致して、PET イメージングが、生体内分布研究直前に行われ、1 mg/kg 用量での抗 PD-L1 抗体の取り込みが、対照抗体のものとおよそ同等であることも示された。より低い用量の 0.3 mg/kg で、抗 PD-L1 抗体の腫瘍局在化における明瞭な増加が、対照抗体と比較して明らかであった。全体では、PET イメージおよび生体内分布データは、0.3 mg/kg 用量の抗 PD-L1 抗体で、LOX-IMVI 腫瘍の特異的なターゲティングを裏付ける。

【0210】

(実施例 7: マウスにおける hPD-L1 陽性腫瘍に対する放射性標識された抗 PD-L1 抗体の選択的な局在化)

この実施例は、PD-L1 に関してヒト化されたマウスにおける、ジルコニウム-⁸⁹標識 DFO-抗 PD-L1 抗体コンジュゲートの *in vivo* 局在化を記載する。この実施例で使用される例示的な抗体は、H1H8314N であり、配列番号 82/90 の HCV R/LCVR を含んだ。

【0211】

PD-L1 に関してヒト化されたマウスは、VelociGene (登録商標) 技術 (Valenzuela ら、2003 年、Nat. Biotechnol. 21 巻: 652 ~ 659 頁; 米国特許出願公開 US 2016/0157469) を使用して操作された。

【0212】

使用された腫瘍系は、eGFP と融合させた全長ニワトリ卵白アルブミンを発現し、野生型 MC38 のマウス PD-L1 がノックアウトされているが、全長ヒト PD-L1 を過剰発現するように所内で操作されている、MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1/-hPD-L1 Tg と称されるマウス結腸癌腫細胞系であった。

【0213】

1 × 10⁶ 個の MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1/-hPD-L1 Tg の細胞を、雄性ヒト化 PD-L1 マウスの左脇腹の皮下に移植した。腫瘍が 50 ~ 150 mm

m³ (約7日目)の平均容量に達したら、マウスを群に無作為化し、⁸⁹Zr 標識抗 PD-L1 DFO - 抗体コンジュゲートまたは ⁸⁹Zr 標識非結合性アイソタイプ対照 DFO - 抗体コンジュゲートのいずれかを投与した。マウスは、最終タンパク質用量 1 または 3 mg / kg で 50 ± 1 uCi の ⁸⁹Zr 標識抗体を施された。

【0214】

抗体局在化の PET イメージングを、抗体の投与 6 日後に評価した。Sofie Biosciences G8 PET / CT (Sofie Biosciences and Perkin Elmer) を使用してイメージを収集した。測定器を、イメージ収集前に ⁸⁹Zr の検出のために、あらかじめ較正した。エネルギーウィンドウは、150 から 650 keV の範囲であり、視野の中心で 1.4 mm の再構成された解像度を有していた。マウスは、イソフルランを使用して導入麻酔を受け、イメージングの間にイソフルランの連続フロー下に保持された。静的な 10 分間のイメージを、G8 収集ソフトウェアを使用して収集し、その後、あらかじめ構成された設定を使用して再構成した。イメージデータを、減衰および他のパラメータについて補正した。CT イメージを、PET 収集後に収集し、後に PET イメージと共に登録した。イメージを、VivoQuant 加工処理後ソフトウェア (invivoCRO Imaging Services) を使用して調製した。

【0215】

生体内分布に関して、マウスを最終時点 (投与 5 ~ 6 日後) で安楽死させ、血液を心臓穿刺を介して回収した。腫瘍および正常組織を、次いで、切除し、カウントチューブに設置した。各試料についての重量を、測定し、記録した。CPM での ⁸⁹Zr についてのカウントデータを、次いで、自動ガンマカウンター (Wizard 2470、Perkin Elmer) における試料を測定することにより回収した。1 グラム当たりの注入用量のパーセント (% ID / g) を、注入物質から調製した標準を使用して各試料について計算した。

【0216】

結果

MC38 - cOVA / eGFP - mPD-L1⁻ / - hPD-L1^{Tg} 腫瘍保有ヒト化 PD-L1 マウスは、最終抗体用量 1 または 3 mg / kg で ⁸⁹Zr 標識抗 PD-L1 DFO - 抗体コンジュゲートを施された。血液、腫瘍および組織を注射後 6 日目にとり、秤量し、試料に関する % ID / g を各試料からのカウントに基づき計算した。1 および 3 mg / kg での用量についての平均 % ID / g は、それぞれ、表 15 および表 16 に提示される。

【表 15】

表 15: 1mg/kg での抗 PD-L1 抗体の解析した組織における平均 %ID/g

試料	平均 %ID/g	STDEV %ID/g
肝臓	8.6	1.5
脾臓	14.1	1.1
腎臓	7.8	1.0
骨	4.5	1.4
肺	7.9	3.0
心臓	4.3	1.1
血液	9.1	4.6
胸腺	9.7	3.5
MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1 ⁻ /hPD-L1 ^{Tg}	34.1	18.0
小腸	2.4	0.9

10

20

30

40

50

【 0 2 1 7 】

1 m g / k g 用量レベルで、M C 3 8 - c O V A / e G F P - m P D - L 1 - / - h P D - L 1 T g 腫瘍の明瞭な腫瘍ターゲティングは、これらのヒト化マウスの正常組織における P D - L 1 の発現にもかかわらず、3 4 . 1 % の % I D / g で明らかである。この用量で、8 9 Z r 標識抗 P D - L 1 抗体の一部の局在化は、脾臓において明らかであり、ここで 1 4 . 1 % I D / g の抗体の取り込みが観察された。このような取り込みは、脾臓中のヒト P D - L 1 のマウス P D - L 1 発現に代えてヒト P D - L 1 の正常発現が理由で予測される。3 m g / k g 抗体用量で、脾臓への 8 9 Z r - D F O - 抗 P D - L 1 抗体コンジュゲートの局在化は、取り込みが、ここで、この抗体用量を施されたマウスにおいて平均 9 . 7 % I D / g であるように、低減した（表 1 6 ）。

10

【 表 1 6 】

表 16:3mg/kg での抗 PD-L1 抗体の解析した組織における平均%ID/g

試料	平均%ID/g	STDEV %ID/g
肝臓	6.7	1.4
脾臓	9.7	1.3
腎臓	7.0	1.1
骨	3.6	0.6
肺	11.0	1.0
心臓	4.7	0.7
血液	12.4	2.1
胸腺	7.6	0.5
MC38-cOVA/eGFP-mPD-L1 ⁺ /-hPD-L1 ^{Tg}	28.7	13.1
小腸	0.4	0.2

20

【 0 2 1 8 】

明瞭な腫瘍ターゲティングは、依然として 3 m g / k g 用量で観察され、M C 3 8 - c O V A / e G F P - m P D - L 1 - / - h P D - L 1 T g 腫瘍により平均 2 8 . 7 % I D / g で取り込まれる。したがって、低減した正常組織局在化が、3 m g / k g 用量のイメージングに明らかであったが、M C 3 8 - c O V A / e G F P - m P D - L 1 - / - h P D - L 1 T g 腫瘍への抗 P D - L 1 標識抗体の明瞭な局在化は、この用量で明瞭のままであった。全体では、これらの結果は、M C 3 8 - c O V A / e G F P - m P D - L 1 - / - h P D - L 1 T g 腫瘍の明瞭なターゲティングが、正常組織発現の通常の部位に P D - L 1 を発現するマウスにおいて可能であったことを指し示す。

30

【 0 2 1 9 】

ここで実施された研究からの結果は、8 9 Z r で標識された抗 P D - L 1 抗体が、腫瘍に有意にかつ特異的に局在化することができることを明瞭に裏付ける。抗 P D - L 1 抗体が、その後の、P D - 1 / P D - L 1 シグナル伝達軸の阻害剤での処置のために P D - L 1 陽性腫瘍を有する患者の選択に使用されるとのシナリオが認識されうる。

40

【 0 2 2 0 】

（実施例 8 : D F O - 抗 P D - L 1 抗体コンジュゲートの産生のための拡大製造プロセス）
この実施例は、本明細書に記載される抗 P D - L 1 抗体（m A b、H 4 H 8 3 1 4 N）に p - S C N - b n - デフェロキサミン（D F O）を付加することにより、放射性標識に適切な抗 P D - L 1 抗体を調製するための拡大製造プロセスを詳細に記載する：（1）m A b コンジュゲーション前の限外濾過およびダイアフィルトレーション（U F D F）プロセスは、コンジュゲーションプロセスを阻害する賦形剤を除去する；（2）コンジュゲーション前の U F D F 後、m A b と p - S C N - B n - デフェロキサミンのコンジュゲーション

50

ンを実施して、D F O - m A b コンジュゲートを作製する；および（３）残留する塩を除去するためのコンジュゲーション後のU F D Fは、コンジュゲートモノクローナル抗体の適切な濃度、賦形剤レベル、およびp Hを提供する。結果として得られるD F O - m A b コンジュゲートは、次いで、その後の製剤化のため改善された安定性を有する緩衝された状態で提供される。

【 0 2 2 1 】

（１）コンジュゲーション前の限外濾過およびダイアフィルトレーション（U F D F）
1 0 0 gの抗P D - L 1抗体を、コンジュゲーション前に残留する塩を除去するため、S i u s P r o s t r e a m (T a n g e n X T e c h n o l o g y C o r p o r a t i o n) 膜（ 5 0 0 g / m ² の膜容量）を使用して、5 . 5 0のp Hを有する5 m M酢酸緩衝液に緩衝液交換した。プロセス容量を低減させ、抗体をさらに濃縮し、次いで、抗体を0 . 4 5 / 0 . 2 μ m（非均質P E S二重層）または同等の孔サイズを有するS a r t o p o r e 2 (S a r t o r i u s) 膜を使用して濾過滅菌した。酢酸緩衝液温度を、2 0 ± 5 の標的溫度に保持した。溶液を、よく混合した。

10

【 0 2 2 2 】

（２）コンジュゲーション

濃縮および濾過された抗体（2 0 g）を、アミン不含炭酸緩衝系（5 6 m M炭酸塩、1 6 7 m M塩化ナトリウム、p H 9 . 4 0）を含有するコンジュゲーション容器へと移したところ、結果として残留する酢酸塩は無視できるレベルになった。D F O（2 5 m M p - S C N - B n - デフェロキサミン）を、D M S Oに溶解し、追加のD M S Oと共にコンジュゲーション容器に添加して、D M S Oを5 %の最終量で存在させた。D F Oを、D F Oのm A bに対する比を4 . 5 : 1のモル過剰で添加した。総反応容量は、2 . 0 Lに等しかった。緩衝系を、反応成分を添加する間ずっと、および反応時間全体にわたって混合した。

20

【 0 2 2 3 】

反応温度を、温度を反応時間と関係づける方程式を使用することにより特定の時間で制御した。この例では、反応温度を、1 8 で1 2 0 分間保持した。反応を、2 M酢酸（2 3 m L / L）の添加によりクエンチングし、結果として溶液は6のp Hを有した。

【 0 2 2 4 】

（３）コンジュゲーション後のU F D F

コンジュゲーションステップ後、クエンチングしたD F O - m A b コンジュゲーション溶液を、残留するプロセス塩、D M S O、および未反応のD F Oを除去するため、ヒスチジン緩衝液（1 0 m Mヒスチジン、p H 5 . 5 0と剪断保護剤として添加した0 . 0 0 0 5 %（w / v）超精製ポリソルベート（s u p e r r e f i n e d p o l y s o r b a t e）8 0）に緩衝液交換した。ダイアフィルトレーションしたら、溶液を、次いで、濃縮し、その後、製剤化した。ヒスチジン緩衝液を - 8 0 でのタンパク質の長期貯蔵のため選択した。ステップ（１）で言及された同じS i u s P r o s t r e a m膜を、最終的なU F D Fステップで使用した。結果として得られる濃縮されたD F O - m A b コンジュゲート溶液を、上記で言及されたS a r t o p o r e 2 フィルターを使用して濾過滅菌した。

30

40

【 0 2 2 5 】

U V - D A R（1 . 5の標的）およびタンパク質濃度決定を、実施例 2 に記載されるように実施した。

【表 17】

表 17:モル吸光率および分子量

抗体	MW (g mol^{-1})	ϵ 280 ($\text{L g}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	ϵ 252 ($\text{L g}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
H4H8314N	144984	211480	80172

10

【0226】

(実施例9: ^{89}Zr -DFO-抗PD-L1抗体コンジュゲートのIV用量を施されたヒト被験体における放射能の予測された全身および組織曝露)

以下の実験の目的は、 ^{89}Zr -DFO-抗PD-L1抗体コンジュゲートの静脈内(IV)用量によってヒト被験体において放射能に対する予測された全身および組織曝露を推定することであった。放射性標識されたコンジュゲートで使用する例示的な抗PD-L1抗体は、H4H8314Nであった。

【0227】

放射性免疫コンジュゲートの特徴づけ

抗PD-L1免疫コンジュゲート(DFO-Ab)およびアイソタイプ対照免疫コンジュゲート(DFO-IgG4P対照)を、放射性標識し、*in vivo*イメージングおよび生体内分布研究の使用のために精製した。SEC-HPLC分析およびMC38/mPD-L1-/-/hPD-L1(マウスPD-L1がノックアウトされ、ヒトPD-L1を安定に発現するように操作されているマウスMC38結腸腺癌細胞)細胞ベース*in vitro*アッセイを実施して、結果として生じた放射性免疫コンジュゲートの特徴づけした。

20

【0228】

単量体および放射化学的純度

UVおよび放射検出器を使用するSEC-HPLCを実施して、単量体および放射化学的純度を評価した。 ^{89}Zr -DFO-抗PD-L1抗体コンジュゲートおよびアイソタイプ対照放射性免疫コンジュゲート ^{89}Zr -DFO-IgG4Pの放射性免疫コンジュゲート調製物についての結果は、図8に示される。

30

【0229】

280nmでの吸収に関するクロマトグラムの分析を実施して、放射性免疫コンジュゲート調製物中の高分子量(HMW)および単量体タンパク質の相対量を評価した。表18にまとめられたように、単量体ピーク(単量体純度のリードアウト)は、 ^{89}Zr -DFO-抗PD-L1抗体コンジュゲートおよびアイソタイプ対照 ^{89}Zr -DFO-IgG4Pの調製物についての総タンパク質ピーク面積の、それぞれ、99.6、99.2、および98.6%を構成する；低レベルのHMW種(それぞれ0.4、0.8、および1.4%)も検出された。低分子量(LMW)種は、被験試料のいずれについても観察されなかった。

40

【0230】

放射についての放射性クロマトグラムの分析を実施して、組み込まれない ^{89}Zr (例えば、遊離 ^{89}Zr または遊離DFO誘導体でキレート化された ^{89}Zr)と比べて、放射性免疫コンジュゲートに組み込まれた ^{89}Zr の相対量を評価した。表18にまとめられたように、組み込まれない ^{89}Zr についてのピークは、総放射ピーク面積の1.1%を構成するが、放射性標識された単量体およびHMW種についての組み合わせたピーク(放射化学的純度のリードアウト)は、 ^{89}Zr -DFO-抗PD-L1抗体コンジュゲートおよびアイソタイプ対照 ^{89}Zr -DFO-IgG4Pの調製物についての総放射ピーク面積の、それぞれ、98.9、99.5、および99.5%を構成する。

50

【表 18】

表18:SEC-HPLCデータの概要

ピーク番号	種	おおよその保持時間 (分)	ピーク面積(%)	
			UV- クロマトグラム	放射性 クロマトグラム
⁸⁹ Zr-DFO-H4H8314N 研究 1				
1	HMW	13	0.4	1.1
2	単量体	16	99.6	97.8
3	組み込まれない ⁸⁹ Zr	26	n/a	1.1
⁸⁹ Zr-DFO-H4H8314N 研究 2				
1	HMW	14	0.8	1.3
2	単量体	16	99.2	98.2
3	組み込まれない ⁸⁹ Zr	26	n/a	0.5
⁸⁹ Zr-DFO-IgG4 ^P 対照				
1	HMW	13	1.4	1.5
2	単量体	16	98.6	98.0
3	組み込まれない ⁸⁹ Zr	26	n/a	0.5

SEC-HPLC 分析についての数値は、図 8 においてグラフで表示する。UV クロマトグラムは、280 nm での吸収についてのクロマトグラムを指し示し、放射性クロマトグラムは、放射の強度についてのクロマトグラムを指し示す。HMW：高分子量；n/a：適用なし。

【0231】

免疫反応性

免疫反応性（その抗原を結合することが可能な、放射性標識され、コンジュゲートされた抗体のパーセントの尺度）を、⁸⁹Zr-DFO-抗PD-L1 抗体コンジュゲートを MC38/mPD-L1-/-/hPD-L1 細胞とインキュベートすることにより決定した。⁸⁹Zr-DFO-抗PD-L1 抗体コンジュゲートの 2 つの被験ロットは、MC38/mPD-L1-/-/hPD-L1 細胞における 84.5 および 88.8 % の免疫反応性を裏付けた（表 19）。バックグラウンドの 8.8 % の非特異的な免疫反応性が、アイソタイプ対照放射性免疫コンジュゲートについて観察された。

【表 19】

表 19:⁸⁹Zr 標識抗 PD-L1 DFO-抗体コンジュゲートおよびアイソタイプ対照 ⁸⁹Zr-DFO-IgG4^P の免疫反応性

放射性免疫コンジュゲート	免疫反応性
⁸⁹ Zr-DFO-抗 PD-L1 抗体コンジュゲート(ロット 1)	84.5%
⁸⁹ Zr-DFO-抗 PD-L1 抗体コンジュゲート(ロット 2)	88.8%
アイソタイプ対照 ⁸⁹ Zr-DFO-IgG4 ^P	8.8%

【0232】

結論として、2 つの別個のロットの ⁸⁹Zr-DFO-抗PD-L1 抗体コンジュゲートは、高い免疫反応性、単量体のパーセンテージ、および放射化学的純度を示した。

【0233】

マウス中の ^{89}Zr -DFO-抗PD-L1生体内分布

本実験は、抗ヒトPD-L1放射性免疫コンジュゲート、 ^{89}Zr -DFO-抗PD-L1抗体コンジュゲートの生体内分布を、単一の $50\mu\text{Ci}$ ($1\text{mg}/\text{kg}$) 静脈内 (IV) 用量をPD-L1/PD-1-ヒト化マウス (PD-1 $^{\text{hu}}/\text{hu}$ PD-L1 $^{\text{hu}}/\text{hu}$) に投与後に経時的に評価した。H4H8314NはマウスPD-L1に結合しないので、PD-L1エクストドメインをコードするマウスPD-L1遺伝子の区分を、PD-1 $^{\text{hu}}/\text{hu}$ -PD-L1 $^{\text{hu}}/\text{hu}$ マウス中の対応するヒト配列で置きかえた。この系統では、マウスPD-1のエクストドメインが、同様にヒト化された。これらのマウスは、免疫/炎症チャレンジにかけられず、したがって、免疫細胞におけるPD-L1発現の未刺激レベルを有することが予測される。各8動物の二群を、投与6日 (144時間) または10日 (240時間) 後に殺し、血液を回収し、以下の組織を採取した：心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、胃、小腸、盲腸、大腸、骨 (大腿骨)、胸腺、筋肉、膀胱、および脳。特定の組織または血液に局在化する総注射線量 (%ID) の放射能のパーセンテージを、決定し、組織の1グラム当たりの平均%ID (%ID/g) として報告した。殺に先立って、免疫PET/コンピュータ断層撮影法 (CT) イメージを、同じ動物から投与後1、24、48、72、144、192 (10日群のみ)、および240 (10日群のみ) 時間に収集した。

10

【0234】

血液中の ^{89}Zr レベルと比較して、 ^{89}Zr -DFO-抗PD-L1抗体コンジュゲートの特定の組織への取り込みは、*ex vivo* 組織分析 (表20および図9) および *in vivo* イメージングにより評価されたように、10日間の研究期間の全体にわたって無視できるものであった。血液 ($9.4 \pm 2.2\%$ ID/g) と比べて、脾臓を除く全ての採取された組織は、投与後6日目により低い ^{89}Zr レベル (6.7% ID/g) を裏付けた。低い程度の標的により媒介される ^{89}Zr -DFO-抗PD-L1抗体コンジュゲート取り込み ($10.2 \pm 1.9\%$ ID/g) は、フローサイトメトリーにより裏付けられたように、脾細胞におけるPD-L1発現と一致して、脾臓で観察された。投与10日後に、血液中の ^{89}Zr レベルは、投与後6日目と比較して7.8分の1に低下し、 ^{89}Zr -DFO-抗PD-L1抗体コンジュゲートレベルに影響を及ぼすマウス抗ヒト抗体 (MAHA) 応答が示唆される。この観察されたMAHA応答は、標的であるPD-L1が、抗原提示細胞に発現され (Francisco, 2010年)、マウス免疫系に対するヒト抗体の提示、その後のMAHA形成をもたらすとの事実によってである可能性が高い。並行して、肝臓中の ^{89}Zr レベルは、おそらくMAHA/ ^{89}Zr -DFO-抗PD-L1抗体コンジュゲート免疫複合体 (IC) 形成およびその後の肝臓により媒介されるICクリアランス (Rojko, 2014年) の結果として、投与後6日目と比べて10日目に4.1倍増大した。全動物 *in vivo* PETイメージングは、上記の脾臓についての低いシグナルおよび肝臓中のMAHAにより媒介される蓄積を超えた ^{89}Zr -DFO-抗PD-L1抗体コンジュゲートの著しい組織特異的な取り込みを明らかにしなかった。

20

30

【0235】

まとめると、血液中の ^{89}Zr レベルよりも多い、特定の組織への ^{89}Zr -DFO-抗PD-L1抗体コンジュゲートの著しい標的により媒介される取り込みは、 $1\text{mg}/\text{kg}$ ($50\mu\text{Ci}$) の ^{89}Zr -DFO-抗PD-L1抗体コンジュゲートの単一のIV用量を投与されたPD-L1/PD-1-ヒト化マウスにおいて6日間観察されなかったが、但し、脾細胞におけるPD-L1の発現が裏付けられたことに一致して、低い程度の標的により媒介される取り込みが観察された脾臓は例外である。投与後10日目での研究の終了時まで6日目を超えて回収されたデータは、MAHA応答により影響を受けた。

40

【表 2 0】

表 20:平均 ex vivo 生体内分布データ

組織	投与後 6 日目の ^{89}Zr レベル(%ID/g)		投与後 10 日目の ^{89}Zr レベル(%ID/g)	
	平均	SD	平均	SD
血液	9.4	2.2	1.2	1.4
心臓	3.1	0.6	1.2	0.4
肺	5.9	0.7	2.6	0.7
肝臓	4.9	1.9	20.2	7.8
脾臓	10.2	1.9	12.1	3.0
腎臓	5.3	1.1	3.9	1.3
胃	0.9	0.3	0.4	0.1
小腸	1.5	0.3	0.9	0.1
盲腸	1.0	0.2	0.6	0.2
大腸	1.4	0.3	0.7	0.2
骨(大腿骨)	6.3	2.1	6.9	1.4
胸腺	6.7	1.6	5.3	1.1
筋肉	0.9	0.1	0.5	0.1
膀胱	4.3	2.1	1.7	0.9
脳	0.4	0.1	0.2	0.1

略語:%ID/g=(組織の)1 グラム当たりの注入用量パーセント

【 0 2 3 6】

ヒトにおいて放射能への全身および組織曝露の推定値

本実験は、 $50 \mu\text{Ci}$ ($1 \text{ mg} / \text{kg}$) の ^{89}Zr - DFO - 抗 PD - L1 抗体コンジュゲートの単一 IV 投与後 1、24、48、72、144、192、および 240 時間で画像化した 4 匹の PD - 1 / PD - L1 - ヒト化雄性マウスおよび 4 匹の PD - 1 / PD - L1 - ヒト化雌性マウスについての PET / CT イメージデータを使用した。この臨床的に関連のある用量の投与により作成されたデータを、放射能へのヒト曝露の推定値を計算することに使用した。組織濃度データを、関心領域 (volume of interest : VOI) 分析を使用して決定した。

【 0 2 3 7】

放射線量測定推定に関して、平均滞留時間を、以下の領域について決定した：脳、胃内容物、心臓内容物、腎臓、肝臓、肺、筋肉、赤色骨髄、脾臓、膀胱内容物、および体の残部。これらの平均滞留時間値は、ヒトにおける平均吸収組織線量および有効線量を推定するため、OLINDA / EXM 1.1 ソフトウェアプログラムへの入力として使用された。

【 0 2 3 8】

^{89}Zr - DFO - 抗 PD - L1 抗体コンジュゲートについて有効なヒト用量は、成体雄において $0.513 \text{ mSv} / \text{MBq}$ (ミリシーベルト / メガベクレル) および成体雌において $0.622 \text{ mSv} / \text{MBq}$ であると推定された。ヒトにおいて最高吸収線量を有することが予測された器官は、脾臓および肝臓であった。脾臓中の推定吸収線量は、成体雄において $0.856 \text{ mSv} / \text{MBq}$ および成体雌において $1.12 \text{ mSv} / \text{MBq}$ であった。肝臓中の推定吸収線量は、成体雄において $0.764 \text{ mSv} / \text{MBq}$ および成体雌にお

いて 0.974 mSv / MBq であった。

【0239】

各 V O I に関する雄性および雌性マウス ($n = 4$ 雄、 $n = 4$ 雌) についての 1 mL 当たりの注射線量の平均減衰補正パーセント (DC \% ID / mL) 値は、表 2 1 にまとめられた。

【表 2 1】

表21:生体内分布データ

	1mL 当たりの注射線量の平均減衰補正パーセント(DC%ID/mL)±SD									
時間 (時間)	1		24		48		72		144	
性別	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄
脳	1.365 ± 0.115	1.190 ± 0.050	0.903 ± 0.115	0.538 ± 0.071	0.640 ± 0.079	0.548 ± 0.218	0.685 ± 0.096	0.623 ± 0.224	0.465 ± 0.231	0.398 ± 0.073
肺	12.503 ± 1.146	12.498 ± 0.414	8.293 ± 0.635	7.155 ± 1.175	6.715 ± 0.370	5.888 ± 0.990	6.060 ± 0.708	5.558 ± 0.385	4.863 ± 0.316	4.585 ± 0.339
肝臓	12.298 ± 0.664	12.078 ± 0.372	9.058 ± 0.793	7.200 ± 0.499	8.113 ± 0.969	6.125 ± 0.858	7.838 ± 0.932	6.203 ± 0.483	9.423 ± 1.885	6.208 ± 1.428
心臓	27.688 ± 1.942	25.695 ± 0.934	15.685 ± 1.223	13.323 ± 1.133	12.088 ± 0.883	10.25 ± 1.335	11.740 ± 1.553	9.915 ± 0.171	8.140 ± 0.598	7.463 ± 0.768
腎臓	11.430 ± 0.387	12.100 ± 0.872	7.345 ± 0.322	6.783 ± 0.811	6.418 ± 0.761	5.565 ± 0.680	6.475 ± 0.493	5.568 ± 0.550	5.643 ± 0.222	4.815 ± 0.450
脾臓	15.263 ± 2.166	15.860 ± 0.974	14.135 ± 2.010	11.265 ± 1.706	13.675 ± 2.195	9.388 ± 1.389	13.655 ± 3.606	9.920 ± 1.414	15.105 ± 2.959	10.303 ± 1.102
膀胱	6.045 ± 3.910	9.688 ± 4.991	1.653 ± 0.107	1.820 ± 0.283	1.443 ± 0.205	1.403 ± 0.160	1.318 ± 0.108	1.710 ± 0.346	1.115 ± 0.224	1.293 ± 0.430
筋肉	1.608 ± 0.182	1.435 ± 0.198	2.608 ± 0.196	1.780 ± 0.137	2.368 ± 0.259	1.955 ± 0.339	2.408 ± 0.181	2.148 ± 0.176	2.095 ± 0.168	1.918 ± 0.144
胃	3.238 ± 1.063	3.978 ± 0.632	2.875 ± 0.921	3.073 ± 0.566	2.478 ± 0.296	2.238 ± 0.487	2.260 ± 0.306	2.233 ± 0.491	2.380 ± 0.405	1.665 ± 0.148
骨	3.683 ± 1.418	3.023 ± 0.244	3.310 ± 0.330	2.738 ± 0.171	4.600 ± 0.511	3.493 ± 0.716	4.850 ± 1.292	4.658 ± 1.399	8.993 ± 1.057	7.635 ± 0.872

【0240】

推定ヒト平均滞留時間 (MRT) 値は、供給源の器官の各々について表 2 2 に提供される。体の残部における MRT は、全ての供給源の器官滞留時間の和を 89 Zr 減衰定数の逆数から減算することにより得られた (Huang ら、 Biodistribution、toxicity and radiation dosimetry studies of the serotonin transporter radioligand 4 - [^{18}F] - ADAM in rats and monkeys . Eur J Nuc l Med Mol Imaging、2010年 ; 37 巻 : 545 ~ 555 頁) 。これは、累積的な組織放射能の保守的な推定を表示する。

10

20

30

40

50

【表 2 2】

表 22:ヒト平均滞留時間(時間)

器官/組織	物理的減衰 ¹		二重指数関数フィット ²	
	雌	雄	雌	雄
脳	0.398	0.364	0.372	0.344
胃内容物	0.511	0.476	0.492	0.480
心臓内容物	2.433	2.279	2.290	2.154
腎臓	0.868	0.818	0.832	0.794
肝臓	5.902	5.919	8.240	5.938
肺	2.508	2.772	2.411	2.642
筋肉	17.635	23.677	13.348	17.182
赤色骨髄	2.777	2.024	2.613	1.913
脾臓	0.996	0.871	1.053	0.910
膀胱内容物	0.299	0.491	0.315	0.405
体の残部	78.794	73.430	81.157	80.361

¹6日目時点後の物理的減衰のみを仮定する計算された平均滞留時間

²データの二重指数関数フィット(biexponential fit)から計算された平均滞留時間

【0 2 4 1】

OLINDA/EXM1.1の成体雄および成体雌ファントムに関する全ての標的器官についての推定吸収組織線量は、表23に提供される。International Commission on Radiological Protection(ICRP)(International Commission on Radiological Protection.1990年 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection.ICRP Publication 60巻、Pergamon Press、New York、1991年)により規定される有効線量は、確率的リスク荷重係数による所与の器官に対する吸収線量を乗じることおよび加重した線量を一緒に加えることにより計算される量である。推定有効線量は、表23の終わりに提供される。これらの値は、放射能吸収線量の保守的な推定を表示する。

10

20

30

40

50

【表 2 3】

表 23:推定ヒト組織吸収線量および有効線量

器官/組織	物理的減衰 ¹		二重指数関数フィット ²	
	成体雄 (mSv/MBq)	成体雌 (mSv/MBq)	成体雄 (mSv/MBq)	成体雌 (mSv/MBq)
副腎	0.561	0.702	0.567	0.726
脳	0.179	0.237	0.182	0.234
乳房	0.366	0.459	0.379	0.466
胆嚢壁	0.601	0.692	0.610	0.751
LLI 壁	0.519	0.652	0.530	0.651
小腸	0.563	0.600	0.582	0.605
胃壁	0.575	0.714	0.584	0.718
ULI 壁	0.553	0.685	0.571	0.700
心臓壁	0.789	0.973	0.781	0.964
腎臓	0.650	0.773	0.641	0.774
肝臓	0.764	0.974	0.764	1.220
肺	0.575	0.705	0.561	0.700
筋肉	0.396	0.481	0.381	0.464
卵巣	0.533	0.645	0.542	0.642
脾臓	0.597	0.743	0.606	0.765
赤色骨髄	0.480	0.591	0.483	0.587
骨形成原細胞	0.604	0.777	0.625	0.779
皮膚	0.291	0.373	0.297	0.374
脾臓	0.856	1.120	0.876	1.160
精巣	0.399	NA	0.407	NA
胸腺	0.481	0.605	0.484	0.601
甲状腺	0.417	0.484	0.423	0.480
膀胱壁	0.580	0.496	0.559	0.494
子宮	0.545	0.638	0.554	0.636
全身	0.440	0.550	0.440	0.554
有効線量	0.513	0.622	0.516	0.625

¹6 日目時点後の物理的減衰のみを仮定する MRT から計算された吸収線量²データの二重指数関数フィットで MRT から計算された吸収線量

略語:LLI=下部大腸、ULI=上部大腸、NA=該当なし

【0 2 4 2】

物理的減衰および二重指数関数フィット法 (biexponential fit method) からの推定ヒト組織吸収線量および有効なヒト用量 (表 2 3) は、類似していた。物理的減衰法を選択して、このマウスモデルにおける見掛けの MAHA 応答に起因する、最終セットの推定ヒト組織吸収線量および有効線量を作製した。したがって、⁸⁹Zr-DFO-抗PD-L1抗体コンジュゲートについて有効なヒト用量は、成体雄において 0.513 mSv/MBq および成体雌において 0.622 mSv/MBq であると推定された。ヒトにおいて最高吸収線量を有することが予測された器官は、脾臓および肝臓である。脾臓中の推定吸収線量は、成体雄において 0.856 mSv/MBq および成体雌

において 1.12 mSv / MBq であった。肝臓中の推定吸収線量は、成体雄において 0.764 mSv / MBq および成体雌において 0.974 mSv / MBq であった。

【0243】

(実施例10：進行した胸部悪性疾患を有する患者における ^{89}Zr -DFO-抗PD-L1抗体コンジュゲートを使用する腫瘍中のPD-L1の免疫PETイメージング)

この研究の第1の課題は、放射性標識されたコンジュゲートで使用される抗PD-L1抗体が H4H8314N である、 ^{89}Zr -DFO-抗PD-L1抗体コンジュゲートの安全性および忍容性を決定することである。研究の第2の課題は、以下である：

- ・ 研究パートAのみ：トレーサー注入後のイメージングおよび採血により評価されるような、適切な質量用量 (mass dose) の ^{89}Zr -DFO-抗PD-L1抗体コンジュゲートおよび最適な注入後イメージング時間を確立すること。
- ・ 研究パートBのみ：パートAにより決定される、最適な質量用量およびイメージング時点での2つの別個のトレーサー注入において評価されるような、PET測定の信頼性試験/再試験を確立すること。
- ・ トレーサー血漿放射能濃度に基づき ^{89}Zr -DFO-抗PD-L1抗体コンジュゲートの薬物動態 (PK) プロファイルを特徴づけること。

【0244】

これは、 ^{89}Zr -DFO-抗PD-L1の安全性および忍容性を評価するためにデザインされた、オープンラベル、2パート研究である。研究パートAは、適切な質量用量および放射能線量の ^{89}Zr -DFO-抗PD-L1および最適な注入後イメージング時間を確立する。 ^{89}Zr -DFO-抗PD-L1の試験/再試験変動性は、パートBで評価される。

【0245】

全ての患者は、スクリーニング手順を経る。適格性基準を満たす患者は、病変の生存度、位置、および寸法を評価するため ^{18}F フルオロデオキシグルコース (^{18}F -FDG) PET/コンピュータ断層撮影法 (CT) および診断CTスキャンを経る。 ^{89}Zr -DFO-抗PD-L1の予測された第1の用量の28日以内に収集された、適切な品質のイメージが利用可能である場合、これらのスキャンは要求されない。

【0246】

パートA

3種の逐次的な用量コホートは、 5 mg 、 10 mg 、または 20 mg の ^{89}Zr -DFO-抗PD-L1でオープンラベルで処置するように計画される。

【0247】

^{89}Zr -DFO-抗PD-L1を注入後、患者は、1日目、4日目±1および7日目±1に ^{89}Zr -DFO-抗PD-L1 PET/CTスキャンを経る。追加のイメージングは、10日目まで実施されうる。患者は、安全性評価を経て、血液学、化学、免疫安全性アッセイ、薬物動態、抗薬物抗体分析、およびバイオマーカー分析のための試料を提供する。

【0248】

患者は、 ^{89}Zr -DFO-抗PD-L1トレーサーの注入後21日目まで、身体検査、バイタルサイン、および有害事象 (AE) の記録を含む安全性評価を継続して経る。

【0249】

適切な用量を同定する用量漸増決定は、下記で記載される、安全性および忍容性データならびに免疫ポジトロン放射断層撮影 (iPET) 陽性およびトレーサー血漿放射能濃度の評価により情報を提供される。

【0250】

パートAにおける用量コホート

3上昇質量用量までのコホートが、計画される。各質量用量コホートに関して、最初の2患者が、各患者の投与の間に最小で48時間のインターバルで投与される。所与の質量用量での第2の患者に対する7日目±1日のPET/CTスキャンの完了時、全ての利用可

10

20

30

40

50

能なイメージング、トレーサー血漿放射能濃度、臨床線量測定、および安全性データが再検討される。この再検討に基づき、決定は、以下のようになされる：

- ・ 腫瘍対血液比 > 1 により規定される、少なくとも 1 患者における腫瘍の取り込み陽性 / 腫瘍局在化が存在する場合、コホートを 6 患者に拡大する
- ・ 最適イメージング時点で 1 から 5 の血液の標準摂取率 (SUV) 範囲により適切に規定される、不十分な腫瘍の取り込みおよび血漿トレーサー放射能濃度が存在する場合、次の質量用量コホートに上昇する
- ・ 不十分な腫瘍の取り込みおよび適切な血漿トレーサー放射能濃度に基づき、より低い質量用量で、次の質量用量コホートで進める。

【0251】

腫瘍局在化が、全ての 3 つの提案された質量用量レベルで少なくとも 2 患者において不十分であり、かつ、これが、低いイメージング対ノイズによるものであると決定される場合、放射能線量は、以前に試験された質量用量コホートのさらなる拡大のため最大 185 MBq まで増大される。

【0252】

パート B

研究パート B は、適切な ^{89}Zr -DFO-抗 PD-L1 用量で一度始め、最適なイメージング時間はパート A において決定されている。パート B の 1 日目に、患者は、トレーサー質量用量を施される。トレーサーを施された後、患者は、パート A で同定された最適な時間でのスキャンを経る。パート B において患者は、第 2 のトレーサー用量を施され、14 から 28 日間の用量間インターバルの後にスキャンされる。インターバル後の第 2 のトレーサー用量の実際のタイミングは、パート A からの結果に基づいて決定される。

【0253】

患者は、 ^{89}Zr -DFO-抗 PD-L1 トレーサーが投与される、来院の間および後、身体検査、バイタルサイン、および有害事象 (AE) の記録を含む安全性評価を経る。これらの来院の間、患者は、PK、血液学、化学、免疫安全性アッセイ、のための試料を提供する。

【0254】

パート A およびパート B の両方に関して、患者は、 ^{89}Zr -DFO-抗 PD-L1 トレーサーの最後の注入後 21 日間まで、身体検査、バイタルサイン、および AE の記録を含む安全性評価を継続して経る。

【0255】

研究持続期間

パート A に関して、患者は、トレーサー用量の注入後、28 日間 (4 週間) までのスクリーニング期間および 21 日間 (約 3 週間) までの追跡期間を有する。研究パート A の持続期間は、スクリーニング期間を含む、約 7 週間である。

【0256】

パート B に関して、患者は、28 日間 (4 週間) までのスクリーニング期間、28 日間 (4 週間) までの注入間インターバル、および第 2 のスキャン期間を含む 21 日間 (3 週間) の安全性追跡期間を有する。各患者についての研究の総持続期間は、スクリーニング期間を含む、11 週間までである。

【0257】

本研究に関する研究の終わりは、最終患者の最終来院として規定される。

【0258】

研究パート A に関して、各々 6 患者までの 3 種の逐次的な用量レベルは、全体で 18 患者までについて、計画される 3 コホートで、1 コホート当たり計画される。研究パート B に関して、10 患者までが、登録される。単一の研究施設中で最大 28 患者の登録が、研究全体に関して計画される。

【0259】

患者標的集団

10

20

30

40

50

標的集団は、進行した胸部悪性疾患および診断上のまたはその後のバイオプシーの 1 % の PD - L 1 IHC スコア (2 2 C 3 PharmDx アッセイ、Dako North America Inc. による陽性 PD - L 1 IHC スコア) を有する 1 8 歳またはそれよりも年長の患者からなる。

・ パート A に関して、胸部悪性疾患は、NSCLC、胃 - 食道接合部腺癌、および胃がん限定され、IHC による PD - L 1 スコアが 1 % である。

・ パート B に関して、進行した胸部悪性疾患および IHC による PD - L 1 スコア 1 % を有する全ての患者が、適格である。患者は、2 つの最新のイメージング研究の間で RECIST 1.1 に従う安定病態も有さなければならない。

【0260】

療法を要求する全ての患者は、標準療法を受けなければならない。

【0261】

処置

^{89}Zr -DFO-抗 PD - L 1 は、二機能性キレーター (p - SCN - Bn - DFO) を H 4 H 8 3 1 4 N (抗 PD - L 1 モノクローナル抗体) に共有結合的にコンジュゲートすることおよび本化合物を ^{89}Zr で放射性標識することにより形成される放射性免疫コンジュゲートである。 ^{89}Zr -DFO-抗 PD - L 1 は、水性緩衝ビヒクル中にて供給される。

【0262】

パート A に関して、 ^{89}Zr -DFO-抗 PD - L 1 は、1 日目 (ベースライン) に IV 投与される。パート B に関して、 ^{89}Zr -DFO-抗 PD - L 1 は、1 日目および 7 日目 ± 3 に IV 投与される。パート B における第 2 の用量の実際のタイミングは、パート A における結果から決定される。

【0263】

^{89}Zr -DFO-抗 PD - L 1 トレーサーは、PK モデルに基づいてヒトにおける推定累積曝露レベルを十分下回り、かつ現在利用可能な抗 PD - 1 剤が抗がん処置で使用されるレベルより低い用量レベルで投与される。この研究は、標的に関する競合を回避するために、抗 PD - L 1 で現在処置される患者を排除する。

【0264】

エンドポイント

研究における主要エンドポイントは、 ^{89}Zr -DFO-抗 PD - L 1 を投与した胸部悪性疾患を有する患者における最終用量のトレーサー注入から 2 1 日目までの、治療下で発現した有害事象 (TEAE) の発生率および重症度である。

【0265】

パート A のみにに関して、研究は、 ^{89}Zr -DFO-抗 PD - L 1 の適切な質量用量および放射能線量ならびに最適な注入後イメージング時間を確立する、以下は、トレーサー注入後 1、4、および 7 日目での採血およびイメージングを介して決定される：

・ 血液プール中の ^{89}Zr -DFO-抗 PD - L 1 の標準摂取率と、その後のイメージングの時間での腫瘍対血液比の計算

・ PET イメージ収集データおよび血液中のトレーサー放射能濃度から計算される、吸収線量および有効な組織放射線に基づく臨床線量測定

・ 目的の腫瘍領域 (ROI) にわたる標準摂取率 (SUV)

・ 腫瘍 ROI 内の最大 SUV (SUV_{max})

・ 7 日目までの曲線下面積 (AUC₀₋₇) の計算で、SUV として表現される、血漿トレーサー放射能濃度

【0266】

パート B のみにに関して、研究は、 ^{89}Zr -DFO-抗 PD - L 1 PET 測定の信頼性試験 / 再試験を確立する、以下は、パート A から決定される、適切な質量用量および最適なイメージング時点での、2 つの別個のトレーサー注入の測定から決定される：

・ 血液プール SUV と、その後の腫瘍対血液比の計算

10

20

30

40

50

- ・ 腫瘍ROIにわたるSUV
- ・ 腫瘍ROI内のSUVmax
- ・ ^{89}Zr -DFO-抗PD-L1の生体内分布

【0267】

結果として得られるデータは、ヒトにおける ^{89}Zr -DFO-抗PD-L1の安全性および忍容性の指標である。

【0268】

上記の実施形態および実施例は、単なる例示であり、非限定的であることが意図される。当業者は、通常の実験方法のみを使用して、具体的な化合物、物質および手順の多数の均等物を認識し、または確認しうる。全てのそのような均等物は、付属の特許請求の範囲内であり、包含され则认为られる。

10

20

30

40

50

【図面】

【図 1】

H4H8314N-DFOの特徴づけ

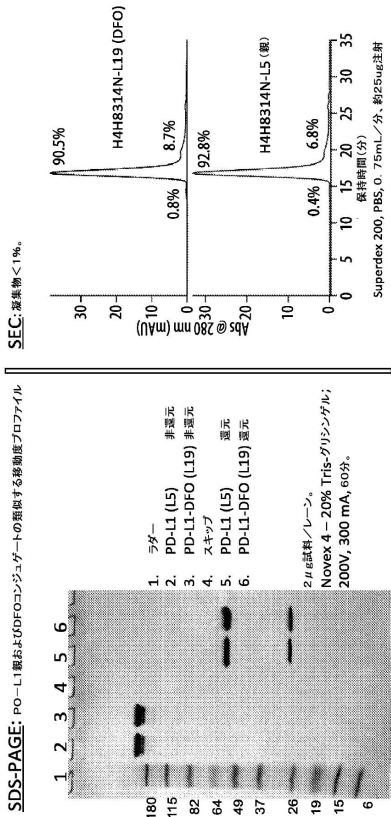


FIG. 1

【図 2】

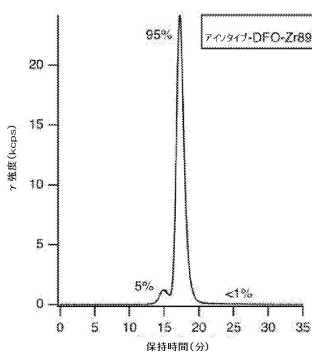


FIG. 2A

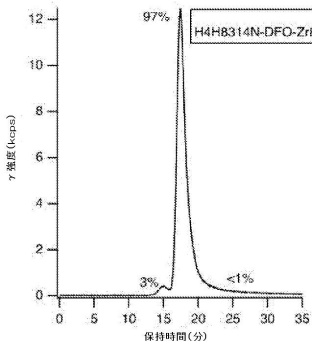


FIG. 2B

【図 3】

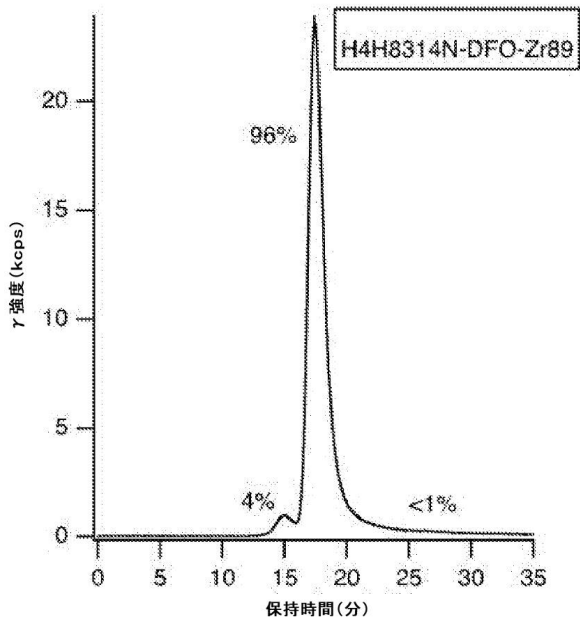


FIG. 3

【図 4】

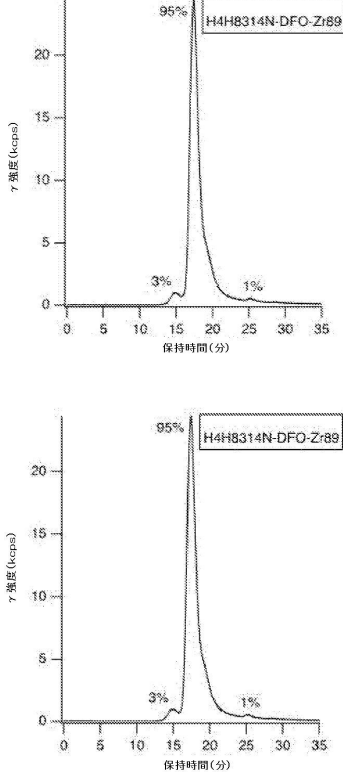


FIG. 4

10

20

30

40

50

【 図 5 】

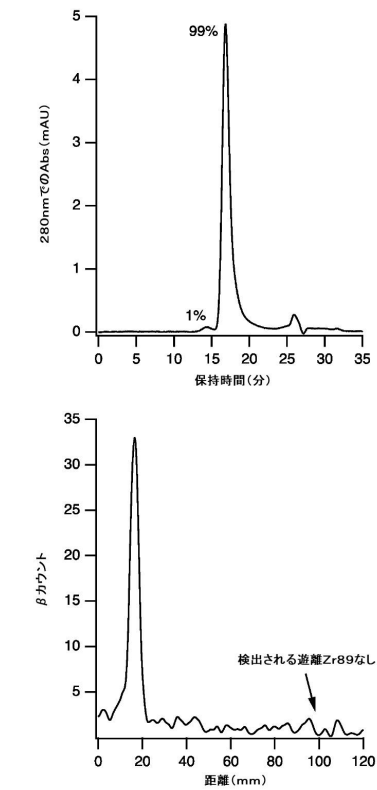


FIG. 5

【 図 6 A B 】

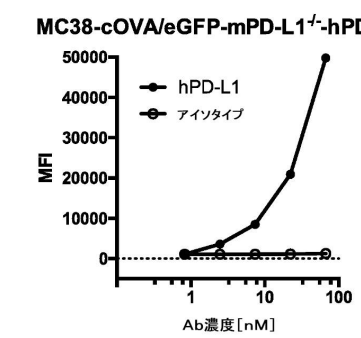


FIG. 6A

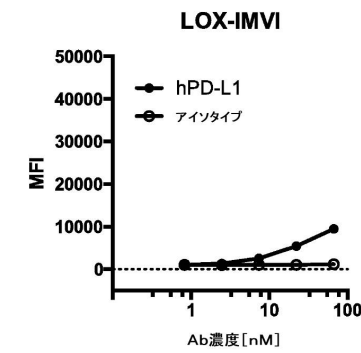


FIG. 6B

【 図 6 C D 】

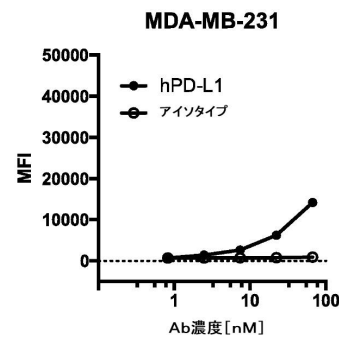


FIG. 6C

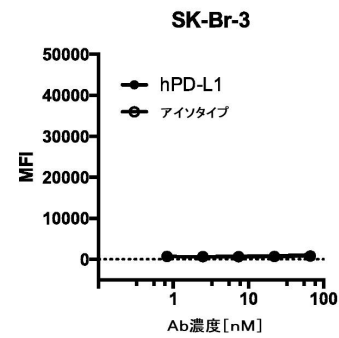


FIG. 6D

【 図 7 】

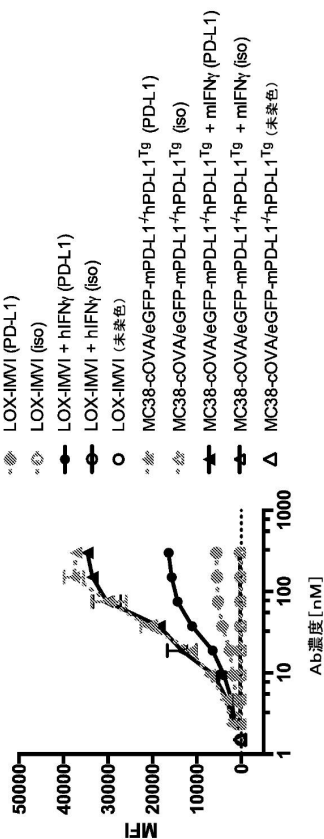


FIG. 7

10

20

30

40

50

【 図 8 A B 】

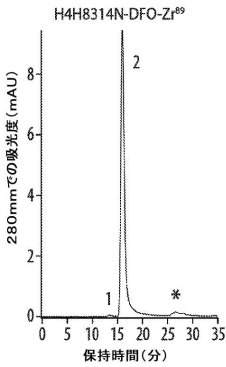


FIG. 8A

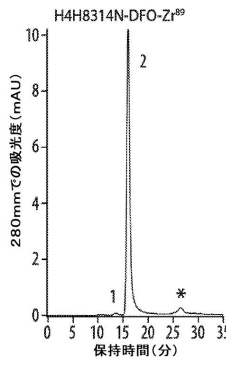


FIG. 8B

【 図 8 C D 】

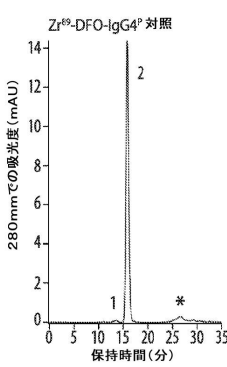


FIG. 8C

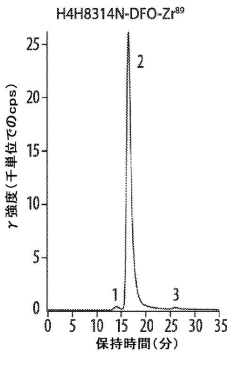


FIG. 8D

【 図 8 E F 】

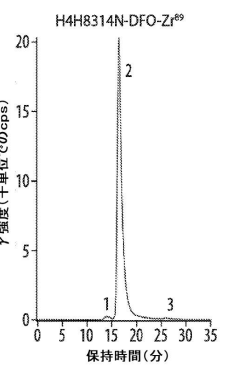


FIG. 8E

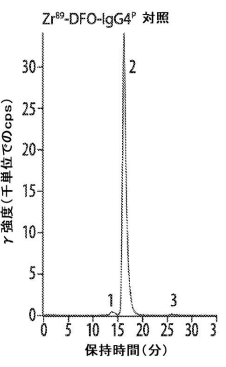


FIG. 8F

【 図 9 】

PD-1^{hu/hu} PD-L1^{hu/hu} マウスから採取された組織中のH4H8314N-DFO-Zr⁸⁹の生体内分布

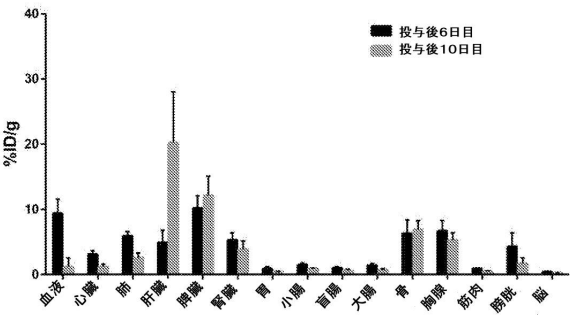


FIG. 9

10

20

30

40

50

【配列表】

0007105235000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

G 0 1 N 33/536 (2006.01)

G 0 1 N 33/536

B

G 0 1 T 1/161 (2006.01)

G 0 1 T 1/161

A

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

G 0 1 N 33/53

Y

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/569,773

(32)優先日 平成29年10月9日(2017.10.9)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

ル リバー ロード 7 7 7 , リジェネロン ファーマシューティカルズ , インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 マ , ダンシェ

アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 5 9 1 , タリータウン , オールド ソー ミル リバー ロード 7 7 7 , リジェネロン ファーマシューティカルズ , インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 オルソン , ウィリアム

アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 5 9 1 , タリータウン , オールド ソー ミル リバー ロード 7 7 7 , リジェネロン ファーマシューティカルズ , インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 サーストン , ギャビン

アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 5 9 1 , タリータウン , オールド ソー ミル リバー ロード 7 7 7 , リジェネロン ファーマシューティカルズ , インコーポレイテッド 気付

審査官 吉門 沙央里

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 6 / 1 6 2 3 6 8 (WO , A 1)

国際公開第 2 0 1 4 / 1 3 3 0 9 3 (WO , A 1)

Anders Josefsson , Cancer Research , 2016年01月15日 , 76(2) , 472-479

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 5 / 0 0 , 1 5 / 0 0

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

C 1 2 Q 1 / 0 0 - 3 / 0 0

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

U n i P r o t / G e n e S e q