

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7600487号
(P7600487)

(45)発行日 令和6年12月17日(2024.12.17)

(24)登録日 令和6年12月9日(2024.12.9)

(51)国際特許分類	F I		
C 0 7 K 16/30 (2006.01)	C 0 7 K	16/30	
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13	Z N A
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
請求項の数 13 (全45頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2023-538083(P2023-538083)	(73)特許権者	519439209 ベイジン マブワークス バイオテック カンパニー リミテッド 中華人民共和国、1 0 0 1 7 6、ベイジ ン、エコノミック アンド テクノロジカ ル ディベロップメント ゾーン、サウス ロンファ ロード ナンバー 2、ビルデ イング ナンバー 1、ルーム 2 5 0 5
(86)(22)出願日	令和3年8月30日(2021.8.30)	(74)代理人	110000877 弁理士法人R Y U K A国際特許事務所 リ、ジアンメイ
(65)公表番号	特表2024-506449(P2024-506449 A)	(72)発明者	中華人民共和国、1 0 0 1 7 6、ベイジ ン、エコノミック アンド テクノロジカ ル ディベロップメント ゾーン、サウス ロンファ ロード ナンバー 2、ビルデ 最終頁に続く
(43)公表日	令和6年2月14日(2024.2.14)		
(86)国際出願番号	PCT/CN2021/115301		
(87)国際公開番号	WO2022/193561		
(87)国際公開日	令和4年9月22日(2022.9.22)		
審査請求日	令和5年8月16日(2023.8.16)		
(31)優先権主張番号	202110284404.8		
(32)優先日	令和3年3月16日(2021.3.16)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)		

(54)【発明の名称】 P D - L 1 と結合する抗体及びその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

V H - C D R 1 領域、V H - C D R 2 領域及びV H - C D R 3 領域を有する重鎖可変領域、及びV L - C D R 1 領域、V L - C D R 2 領域及びV L - C D R 3 領域を有する軽鎖可変領域を備え、前記V H - C D R 1 領域、前記V H - C D R 2 領域、前記V H - C D R 3 領域、前記V L - C D R 1 領域、前記V L - C D R 2 領域及び前記V L - C D R 3 領域が、(1)それぞれ、配列番号 1、2、3、4、5 及び 6 ; 又は(2)それぞれ、配列番号 7、8、9、1 0、1 1 及び 1 2 のアミノ酸配列を含む、P D - L 1 に結合することが可能な単離モノクローナル抗体又はその抗原結合部分。

【請求項 2】

前記重鎖可変領域が、配列番号 1 3 ~ 2 3 のいずれか 1 つと少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又は 1 0 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の単離モノクローナル抗体又はその抗原結合部分。

【請求項 3】

前記軽鎖可変領域が、配列番号 2 4 ~ 3 2 のいずれか 1 つと少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又は 1 0 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を有する、請求項 1 又は 2 に記載の単離モノクローナル抗体又はその抗原結合部分。

【請求項 4】

前記重鎖可変領域及び前記軽鎖可変領域が、(1)それぞれ、配列番号13及び24；(2)それぞれ、配列番号14及び25；(3)それぞれ、配列番号14及び26；(4)それぞれ、配列番号14及び27；(5)それぞれ、配列番号15及び25；(6)それぞれ、配列番号15及び26；(7)それぞれ、配列番号15及び27；(8)それぞれ、配列番号16及び25；(9)それぞれ、配列番号16及び26；(10)それぞれ、配列番号16及び27；(11)それぞれ、配列番号17及び25；(12)それぞれ、配列番号17及び26；(13)それぞれ、配列番号17及び27；(14)それぞれ、配列番号18及び28；(15)それぞれ、配列番号19及び29；(16)それぞれ、配列番号20及び30；(17)それぞれ、配列番号20及び31；(18)それぞれ、配列番号20及び32；(19)それぞれ、配列番号21及び30；(20)それぞれ、配列番号21及び31；(21)それぞれ、配列番号21及び32；(22)それぞれ、配列番号22及び30；(23)それぞれ、配列番号22及び31；(24)それぞれ、配列番号22及び32；(25)それぞれ、配列番号23及び30；(26)それぞれ、配列番号23及び31；又は(27)それぞれ、配列番号23及び32と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、請求項1から3のいずれか一項に記載の単離モノクローナル抗体又はその抗原結合部分。

10

【請求項5】

前記重鎖可変領域に連結されている、配列番号33と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する重鎖定常領域、及び/又は前記軽鎖可変領域に連結されている、配列番号34と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する軽鎖定常領域を備える、請求項1から4のいずれか一項に記載の単離モノクローナル抗体又はその抗原結合部分。

20

【請求項6】

前記重鎖可変領域のC末端に連結されている重鎖定常領域、及び前記軽鎖可変領域のC末端に連結されている軽鎖定常領域を備え、前記重鎖定常領域が、PD-L1⁺細胞に対する減少した抗体依存性細胞介在性細胞傷害を誘導するか又はPD-L1⁺細胞に対する抗体依存性細胞介在性細胞傷害を誘導しない、請求項1から5のいずれか一項に記載の単離モノクローナル抗体又はその抗原結合部分。

30

【請求項7】

マウス、キメラ又はヒト化抗体又はその抗原結合部分である、請求項1から6のいずれか一項に記載の単離モノクローナル抗体又はその抗原結合部分。

【請求項8】

請求項1から7のいずれか一項に記載の単離モノクローナル抗体又はその抗原結合部分をエンコードする核酸分子。

【請求項9】

請求項8に記載の核酸分子を備える発現ベクター。

【請求項10】

請求項9に記載の発現ベクターを備える宿主細胞。

40

【請求項11】

請求項1から7のいずれか一項に記載の単離モノクローナル抗体又はその抗原結合部分、請求項8に記載の核酸分子、請求項9に記載の発現ベクター又は請求項10に記載の宿主細胞、及び薬学的に許容される担体を備える医薬組成物。

【請求項12】

癌の処置における、それを必要とする対象への使用のための、請求項11に記載の医薬組成物。

【請求項13】

前記癌が、黒色腫、非小細胞肺癌、腎細胞癌腫、ホジキンリンパ腫、膀胱癌、頭頸部癌

50

、神経内分泌腫瘍、マンツル細胞リンパ腫、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫、及び濾胞性リンパ腫から成る群から選択される、請求項 1 2 に記載の使用のための医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

[関連出願及び参照による組み込み]

本出願は、2021年3月16日に出願された中国特許出願第202110284404.8号の優先権を主張する。

【0002】

上記の出願、及びそこに引用されたか又はその出願手続き中に引用されたすべての文献（「出願引用文献」）、及び本明細書に引用又は参照されたすべての文献（本明細書に引用されたすべての文献資料、特許、公開特許出願を含むがこれらに限定されない）（「本明細書での引用文献」）、及び本明細書での引用文献において引用又は参照されたすべての文献は、本明細書又は本明細書に参照によって組み込まれる任意の文献に言及された任意の製品に関する任意の製造元の指示、説明、製品仕様、及び製品シートと共に、ここで本明細書に参照によって組み込まれて、本発明の実施で利用できるものである。より具体的には、参照されたすべての文献は、個々の各文献が参照によって組み込まれるように具体的かつ個々に示された場合と同程度まで、参照によって組み込まれる。本開示で言及される Genbank 配列は、本開示の最も早い有効出願日の Genbank 配列とすることにより、参照によって組み込まれる。

10

20

【0003】

本出願における任意の文献の引用又は同定は、そのような文献が本開示の従来技術として利用可能であることを承認するものではない。

【0004】

本開示は、ヒト PD-L1 に特異的に結合する抗体又はその抗原結合部分、その調製及び使用、特に癌及び感染性疾患などの PD-L1 シグナル伝達と関連する疾患の処置におけるその使用に関する。

【背景技術】

【0005】

T 細胞性免疫は、病原体感染細胞及び癌細胞を含む異常な細胞を認識及び破壊するように進化してきた。T 細胞活性は、免疫系が組織を無差別に攻撃することを予防する自己寛容に重要な、免疫チェックポイントとして知られる、一連の共刺激及び共抑制受容体並びにそれらのリガンドによって制御されている。

30

【0006】

免疫チェックポイント経路のうち、PD-L1 / PD-1 シグナル伝達は、大きな臨床上の利益を明らかにしている。免疫応答を負に制御する I 型膜貫通タンパク質である PD-1 は、末梢組織における抗原経験メモリー T 細胞に主に発現し、B 細胞、活性化単球、樹状細胞及びナチュラルキラー細胞には一般にあまり発現しない (Keir ME et al., (2008) Annu Rev Immunol. 26:677-704; Ishida Y et al., (1992) EMBO J. 11(11):3887-3895)。PD-L1 及び PD-L2 は PD-1 のリガンドである。PD-L1 は、2つの細胞外ドメイン (IgV 及び IgC 様ドメイン)、膜貫通ドメイン、及び細胞内ドメインから成る I 型膜貫通タンパク質である。それは、抗原提示細胞、T 細胞、B 細胞、単球、及び上皮細胞に恒常的に発現しており、これらの細胞の多くの種類において、炎症誘発性サイトカインの存在時に上方制御される (上記の Keir ME et al., (2008); Chen J et al., (2016) Ann Oncol. 27(3):409-416)。複数の研究は、PD-L1 が IL-10 放出を誘導し、したがって T 細胞に対する抑制作用を生じることを示している (Dong H et al., (1999) Nat Med. 5(12):1365-1369)。PD-L2 発現は、抗原提示細胞にほとんど制限され、誘導発現は、例えば樹状細胞及びマクロファージに見出すことができ

40

50

る。累積的な証拠は、PD-1軸が、PD-L1と結合した場合、サイトカイン（例えば、IFN- γ 、TNF- α 、及びIL-2）産生に影響を及ぼして、正常細胞/組織に対するT細胞応答を減衰させることを示した（上記のKeir ME et al., (2008); 上記のChen J et al., (2016)）。PD-1-PD-L1相互作用はまた、細胞生存因子の分泌、エフェクター細胞機能と関連する転写因子の発現、及び活性化B細胞及びNK細胞の溶解活性も抑制する（Terme M et al., (2011) *Cancer Res.* 71(16): 5393-5399; Fanoni D et al., (2011) *Immunol Lett.* 134(2): 157-160）。PD-1は、制御性T細胞（Treg）にも高度に発現し、Treg活性化及び増殖を促進して免疫応答を更に抑制し得る（Francisco LM et al., (2009) *J Exp Med.* 206(13): 3015-3029）。

10

【0007】

PD-1経路は、腫瘍細胞によって、宿主の免疫監視機構を逃れるために利用され得る。具体的には、多くの割合の腫瘍浸潤リンパ球（tumor-infiltrating lymphocyte: TIL）が高レベルのPD-1を発現しており、黒色腫、卵巣癌、肺癌及び腎癌細胞を含む多くの腫瘍細胞は、PD-1のリガンド、特にPD-L1を恒常的に発現している（Dong H et al., (2002) *Nat Med.* 8(8): 793-800; Kim J et al., (2005) *Am J Respir Cell Mol Biol.* 33(3): 280-289; Lee SK et al., (2005) *J Dermatol Sci.* 40(2): 95-103）。PD-L1は、微小環境中のマクロファージ及び樹状細胞を含む骨髄細胞にも発現している。したがって、微小環境では、PD-L1-PD-1相互作用は、T細胞機能不全及び疲弊、IL-10放出、及びCD8⁺T細胞による腫瘍細胞に対する細胞傷害性の低下を引き起こし、腫瘍細胞成長をもたらず（Zou W, Chen L. (2008) *Nat Rev Immunol.* 8(6): 467-477; Sun Z et al., (2015) *Cancer Res.* 75(8): 1635-1644）。免疫応答は、微小環境中のTreg（上記のFrancisco LM et al., (2009)）、及びCD80-CTLA4相互作用を減衰させるPD-L1-CD80ヘテロ二量体（Butte MJ et al., (2007) *Immunity.* 27(1): 111-122; Paterson AM et al., (2011) *J Immunol.* 187(3): 1097-1105）によって更に抑えられる場合がある。

20

30

【0008】

例えば抗体によるPD-1/PD-L1遮断は、固形腫瘍及び血液腫瘍を含むいくつかの癌において持続的腫瘍寛解を誘導することができる。PD-L1-PD-1軸を標的とする抗体は、現在まで、1,000を超える臨床試験において、黒色腫、非小細胞肺癌（non-small cell lung cancer: NSCLC）、腎細胞癌腫（renal cell carcinoma: RCC）、ホジキンリンパ腫、膀胱癌、頭頸部癌腫、神経内分泌腫瘍、高頻度マイクロサテライト不安定性（microsatellite instable-high: MSI-H）及びミスマッチ修復欠損（mismatch repair-deficient: dMMR）固形腫瘍などの固形腫瘍、及びマントル細胞リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、及び濾胞性リンパ腫などの血液腫瘍の処置に対して評価されている（Akinleye A, Rasool Z. (2019) *J Hematol Oncol.* 12(1): 92; Chong Sun et al. (2018) *Immunity.* 20; 48(3): 434-452）。3つの抗PD-L1抗体、すなわちアテゾリズマブ、デュルバルマブ、及びアベルマブはFDAによって承認されている。アテゾリズマブは、PD-L1-PD-1及びPD-L1-CD80結合を遮断することができるヒト化IgG1抗体であり、そのFc領域は、PD-L1⁺T細胞に対する損傷を除去するために、抗体依存性細胞介在性細胞傷害（antibody dependent cell mediated cytotoxicity: ADCC）を誘導しないように設計されている。アテゾリズマブは、NSCLC、黒色腫

40

50

、RCC、結腸直腸癌、胃癌、頭頸部扁平上皮細胞癌腫、及び尿路上皮癌腫を含む固形及び非固形腫瘍において臨床上的有効性を示している。同様に、ヒト化抗体のデュルバルマブは、PD-L1のPD-1又はCD80との結合を遮断することができ、PD-L1⁺T細胞に対するADCCを回避するように設計されている。それは、例えば尿路上皮癌腫及びNSCLCの処置において有効である。改変されていないFc領域を有する別のヒト化IgG1抗体であるアベルマブは、PD-L1-PD-1及びPD-L1-CD80相互作用を遮断し、腫瘍細胞に対するADCCを誘導することができ、メルケル細胞癌腫、尿路上皮癌腫、及びトリプルネガティブ乳癌の処置における良好な臨床転帰を示している。臨床試験中の他の抗PD-L1抗体としては、エンパフォリマブ及びBMS-936559が挙げられる。抗PD-L1抗体は、腫瘍成長をより良好に阻害するために、他の抗体、標的剤、及び/又は化学療法剤と組み合わせて使用されてもよい。

10

【0009】

しかしながら、抗PD-1/PD-L1療法の広域スペクトルな抗腫瘍効果にもかかわらず、すべての患者がこの療法に应答性であるわけではなく、一部の患者は、有望な初期应答を報告したが、最終的には療法に抵抗性となった。そのような耐性の獲得の原因を発見すること、及び新たな薬剤/療法を開発することは極めて重要であり得る。異なる及び/又は改善した薬学的特徴を有するより多くの抗PD-L1抗体、例えば、異なる結合親和性、PD-1-PD-L1に対する異なる遮断能、及び/又は異なる結合エピトープを有する抗体に対する必要が依然として存在する。

【0010】

PD-L1/PD-1遮断はまた、急性又は慢性ウイルス、細菌、又は寄生虫感染症の臨床又は前臨床研究において良好な効果を示した(Jubel JM et al., (2020) Front Immunol. 11: 487)。例えば、B型肝炎ウイルス(hepatitis B virus: HBV)、C型肝炎ウイルス(hepatitis C virus: HCV)、ヒト免疫不全ウイルス(human immunodeficiency virus: HIV)、又はサル免疫不全ウイルス(simian immunodeficiency virus: SIV)による慢性感染症において、抗PD-L1抗体の投与は、IFN- γ 、IL-2及びTNF α 放出を増加し、T細胞疲弊を機能的に逆転し、ウイルス血症を改善した。したがって、より多くの抗PD-L1抗体は、感染性疾患処置に対しても必要である。

20

【発明の概要】

【0011】

本開示は、PD-L1(例えば、ヒトPD-L1、及びサルPD-L1)に結合する単離モノクローナル抗体、例えば、マウス、ヒト、キメラ又はヒト化モノクローナル抗体、又はその抗原結合部分を提供する。それは、アテゾリズマブなどの従来技術の抗体と比較して、同等か又はより高いヒト及びサルPD-L1タンパク質に対する結合能、同等のPD-L1-PD-1相互作用に対する遮断活性、同等か又はより良好なT細胞活性化能、及び同等か又はより高いin vivo抗腫瘍活性を有する。

【0012】

本開示の抗体又はその抗原結合部分は、PD-L1タンパク質の検出及びPD-L1関連疾患の処置を含む様々な用途に使用することができる。

30

40

【0013】

したがって、一態様において、本開示は、i) VH-CDR1領域、VH-CDR2領域及びVH-CDR3領域を有し得、VH-CDR1領域、VH-CDR2領域及びVH-CDR3領域が、(1)それぞれ、配列番号1、2及び3;又は(2)それぞれ、配列番号7、8及び9と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性を有するか又はそれに記載されるアミノ酸配列を含み得る重鎖可変領域;及び/又はii) VL-CDR1領域、VL-CDR2領域及びVL-CDR3領域を有し得、VL-CDR1領域、VL-CDR2領域及びVL-C

50

D R 3 領域が、(1) それぞれ、配列番号 4、5 及び 6 ; 又は (2) それぞれ、配列番号 1 0、1 1 及び 1 2 と少なくとも 8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、又は 9 9 % の同一性を有するか又はそれに記載されるアミノ酸配列を含み得る軽鎖可変領域を備え得る、P D - L 1 と結合する単離モノクローナル抗体 (例えば、ヒト化抗体) 又はその抗原結合部分に関連する。

【 0 0 1 4 】

本開示の単離モノクローナル抗体又はその抗原結合部分は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を備え得、V H - C D R 1 領域、V H - C D R 2 領域、V H - C D R 3 領域、V L - C D R 1 領域、V L - C D R 2 領域及び V L - C D R 3 領域は、(1) それぞれ、配列番号 1、2、3、4、5 及び 6 ; 又は (2) それぞれ、配列番号 7、8、9、1 0、1 1 及び 1 2 と少なくとも 8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、又は 9 9 % の同一性を有するか又はそれに記載されるアミノ酸配列を含み得る。

10

【 0 0 1 5 】

本開示の重鎖可変領域は、配列番号 1 3 ~ 2 3 のいずれか 1 つと少なくとも 8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、又は 9 9 % の同一性を有するか又はそれに記載されるアミノ酸配列を有し得る。

【 0 0 1 6 】

本開示の軽鎖可変領域は、配列番号 2 4 ~ 3 2 のいずれか 1 つと少なくとも 8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、又は 9 9 % の同一性を有するか又はそれに記載されるアミノ酸配列を有し得る。

20

【 0 0 1 7 】

本開示の単離モノクローナル抗体又はその抗原結合部分は、(1) それぞれ、配列番号 1 3 及び 2 4 ; (2) それぞれ、配列番号 1 4 及び 2 5 ; (3) それぞれ、配列番号 1 4 及び 2 6 ; (4) それぞれ、配列番号 1 4 及び 2 7 ; (5) それぞれ、配列番号 1 5 及び 2 5 ; (6) それぞれ、配列番号 1 5 及び 2 6 ; (7) それぞれ、配列番号 1 5 及び 2 7 ; (8) それぞれ、配列番号 1 6 及び 2 5 ; (9) それぞれ、配列番号 1 6 及び 2 6 ; (1 0) それぞれ、配列番号 1 6 及び 2 7 ; (1 1) それぞれ、配列番号 1 7 及び 2 5 ; (1 2) それぞれ、配列番号 1 7 及び 2 6 ; (1 3) それぞれ、配列番号 1 7 及び 2 7 ; (1 4) それぞれ、配列番号 1 8 及び 2 8 ; (1 5) それぞれ、配列番号 1 9 及び 2 9 ; (1 6) それぞれ、配列番号 2 0 及び 3 0 ; (1 7) それぞれ、配列番号 2 0 及び 3 1 ; (1 8) それぞれ、配列番号 2 0 及び 3 2 ; (1 9) それぞれ、配列番号 2 1 及び 3 0 ; (2 0) それぞれ、配列番号 2 1 及び 3 1 ; (2 1) それぞれ、配列番号 2 1 及び 3 2 ; (2 2) それぞれ、配列番号 2 2 及び 3 0 ; (2 3) それぞれ、配列番号 2 2 及び 3 1 ; (2 4) それぞれ、配列番号 2 2 及び 3 2 ; (2 5) それぞれ、配列番号 2 3 及び 3 0 ; (2 6) それぞれ、配列番号 2 3 及び 3 1 ; 又は (2 7) それぞれ、配列番号 2 3 及び 3 2 と少なくとも 8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、又は 9 9 % の同一性を有するか又はそれに記載されるアミノ酸配列を有し得る重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を備え得る。

30

40

【 0 0 1 8 】

本開示の単離モノクローナル抗体は、重鎖定常領域及び / 又は軽鎖定常領域を備え得る。重鎖定常領域は、I g G 1、I g G 2、I g G 3 又は I g G 4 重鎖定常領域、又はその機能的断片であり得る。重鎖定常領域は、P D - L 1 + 細胞に対する減少した A D C C を誘導するように改変され得るか、又は P D - L 1 + 細胞に対する A D C C を誘導しないように改変され得る。例えば、重鎖定常領域は、例えば配列番号 3 3 のアミノ酸配列を有する、N 2 9 7 A 変異を有するヒト I g G 1 定常領域であり得る。軽鎖定常領域は、例えば

50

配列番号34のアミノ酸配列を有する、ヒトカップ軽鎖定常領域などのカップ軽鎖定常領域であり得る。重鎖定常領域のN末端は、重鎖可変領域のC末端に連結されており、軽鎖定常領域のN末端は、軽鎖可変領域のC末端に連結されている。

【0019】

特定の実施形態において、本開示の抗体は、ジスルフィド結合によって接続されている2つの重鎖及び2つの軽鎖を備え得るか又はそれから成り得、各重鎖は、上で言及した重鎖定常領域、重鎖可変領域又はCDR配列を有し、各軽鎖は、上で言及した軽鎖定常領域、軽鎖可変領域又はCDR配列を有する。本開示の抗体は、例えばIgG4、IgG1又はIgG2アイソタイプの完全長抗体であり得る。他の実施形態における本開示の抗体又はその抗原結合部分は、一本鎖抗体であり得るか、又はFab又はF(ab')₂断片などの抗体断片から成る。

10

【0020】

本開示の例示的な抗体又はその抗原結合部分は、アンタゴニストであり、ヒト/サルPD-L1に結合する、PD-L1-PD-1相互作用を遮断する、T細胞活性化を誘導する、及び/又はin vivo抗腫瘍効果を有する。

【0021】

本開示はまた、細胞毒又は抗癌剤などの治療剤に連結されている、抗体又はその抗原結合部分を備える免疫複合体を提供する。本開示はまた、本開示の抗体又はその抗原結合部分と異なる結合特異性を有する第2の機能部分(例えば、第2の抗体)に連結されている、本開示の抗体又はその抗原結合部分を備える二重特異性分子を提供する。別の態様において、本開示の抗体又はその抗原結合部分は、キメラ抗原受容体(chimeric antigen receptor: CAR)又はT細胞受容体(T cell receptor: TCR)の一部にすることができる。本開示は、T細胞及びNK細胞などの、本開示のCAR又はTCRを備える免疫細胞を更に提供する。本開示の抗体又はその抗原結合部分はまた、腫瘍溶解性ウイルスによってエンコードされ得るか又はそれと併せて使用され得る。

20

【0022】

本開示は、本開示の抗体又はその抗原結合部分をエンコードする核酸分子、並びにそのような核酸分子を備える発現ベクター及びそのような発現ベクターを備える宿主細胞を更に提供する。本開示の宿主細胞を使用して抗PD-L1抗体又はその抗原結合部分を調製するための方法であって、(i)抗体又はその抗原結合部分を宿主細胞において発現させる段階、及び(ii)抗体又はその抗原結合部分を宿主細胞又はその細胞培養液から単離する段階を備える、方法が提供される。

30

【0023】

本開示は、本開示の抗体又はその抗原結合部分、免疫複合体、二重特異性分子、免疫細胞、腫瘍溶解性ウイルス、核酸分子、発現ベクター、又は宿主細胞、及び薬学的に許容される担体を備える組成物を提供する。

【0024】

別の態様において、本開示は、免疫応答の増強を、それを必要とする対象において行うための方法であって、対象に、治療有効量の本開示の組成物を投与する段階を備える、方法を提供する。いくつかの実施形態において、方法は、T細胞活性化を誘導する段階を備える。

40

【0025】

別の態様において、本開示は、癌の処置又は緩和を、それを必要とする対象において行うための方法であって、対象に、治療有効量の本開示の組成物を投与する段階を備える、方法を提供する。癌は、黒色腫、非小細胞肺癌、腎細胞癌腫、ホジキンリンパ腫、膀胱癌、頭頸部癌、神経内分泌腫瘍、マントル細胞リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、及び濾胞性リンパ腫を含むがこれらに限定されない固形癌又は血液癌であり得る。いくつかの実施形態において、抗PD-1抗体、抗STAT3抗体、抗ROR1抗体、抗TIM-3抗体、及び/又は抗CTLA-4抗体などの少なくとも1つの追加の抗癌抗体が、

50

本開示の組成物と共に投与され得る。特定の実施形態において、本開示の組成物は、サイトカイン（例えば、IL-2及び/又はIL-21）、又は共刺激抗体（例えば、抗CD137及び/又は抗GITR抗体）と共に投与され得る。別の実施形態において、本開示の組成物は、細胞毒性剤であってもよい化学療法剤と共に投与され得る。

【0026】

別の態様において、本開示は、感染性疾患の処置又は緩和を、それを必要とする対象において行うための方法であって、対象に、治療有効量の本開示の抗体又はその抗原結合部分を投与する段階を備える、方法を提供する。感染性疾患は、慢性B型肝炎ウイルス（HBV）、C型肝炎ウイルス（HCV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、又はサル免疫不全ウイルス（SIV）感染症などの慢性ウイルス、細菌、真菌又はマイコプラズマ感染症であり得る。特定の実施形態において、抗ウイルス剤、抗菌剤、抗真菌剤、又は抗マイコプラズマ剤などの少なくとも1つの追加の抗感染症剤が、本開示の抗体又はその抗原結合部分と共に投与され得る。

10

【0027】

本開示の他の特徴及び利点は、以下の詳細な説明及び例から明らかとなるが、これは限定として解釈されるべきではない。本出願全体において引用されるすべての参考文献、Genbankエントリ、特許及び公開特許出願の内容は、参照によって本明細書に明示的に組み込まれる。

【0028】

したがって、本発明の目的は、任意の従来公知の製品、製品の製造プロセス、又は製品の使用方法を本発明に包含しないことであり、したがって、出願人は、任意の従来公知の製品、プロセス、又は方法の権利を留保し、これによりその免責事項を開示する。更に、本発明はUSPTO（35U.S.C. § 112、第1段落）又はEPO（EPC第83条）の記載要件及び実施可能要件を満たさない任意の製品、プロセス、又は製品の製造又は製品の使用方法を本発明の範囲に包含する意図するものではない、ということが留意され、したがって、出願人は、過去に記載した任意の製品、製品の製造プロセス又は製品の使用方法の権利を留保し、これによりその免責事項を開示する。EPC第53条（c）、及びEPC規則28（b）及び（c）に適合していることは、本発明の実施において有利であり得る。本出願の系統、又は任意の他の系統、又は任意の第三者の任意の先行出願における出願人の任意の許諾特許の対象である任意の実施形態を明示的に否認するすべての権利は、明示的に留保される。本明細書のいかなる内容も、約束と解釈されるものではない。

20

30

【0029】

本開示、特に特許請求の範囲及び/又は段落において、用語、例えば「含む（comprises）」、「含まれる（comprised）」、「含むこと（comprising）」などは、米国特許法においてそれに帰属する意味を有することができ；例えば、それらは、「含む（includes）」、「含まれる（included）」、「含むこと（including）」などを意味することができ；「から本質的に成ること（consisting essentially of）」及び「から本質的に成る（consists essentially of）」などの用語は、米国特許法においてそれらに帰属する意味を有し、例えば、それらは、明示的に記載されていない要素を許容するが、従来技術に見出されているか又は本発明の基本的な又は新規な特徴に影響を及ぼす要素を除外することに留意されたい。

40

【0030】

例として与えられるが、記載される特定の実施形態のみに本発明を限定することを意図したものではない以下の詳細な説明は、添付図面と併せて最もよく理解され得る。

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】100 µg/ml（A）又は0.1~10 µg/ml（B）のマウス抗PD-L1抗体の処理がT細胞によるIFN-分泌を増加させたことを示す。

50

【 0 0 3 2 】

【 図 2 】キメラ抗 P D - L 1 抗体の、 H E K 2 9 3 A / ヒト P D - L 1 細胞 (A)、 H E K 2 9 3 A / サル P D - L 1 細胞 (B)、 及び H E K 2 9 3 A / マウス P D - L 1 細胞 (C) に対する結合能を示す。

【 0 0 3 3 】

【 図 3 】キメラ抗 P D - L 1 抗体の P D - 1 - P D - L 1 相互作用を遮断する能力を示す。

【 0 0 3 4 】

【 図 4 】キメラ抗 P D - L 1 抗体が T 細胞による I F N - 分泌を用量依存的に誘導したことを示す。

【 0 0 3 5 】

【 図 5 】ヒト化 3 C 2 抗体の、 H E K 2 9 3 A / ヒト P D - L 1 細胞 (A)、 H E K 2 9 3 A / サル P D - L 1 細胞 (B)、 及び H E K 2 9 3 A / マウス P D - L 1 細胞 (C) に対する結合能を示す。

10

【 0 0 3 6 】

【 図 6 】ヒト化 5 6 E 5 抗体の、 H E K 2 9 3 A / ヒト P D - L 1 細胞 (A)、 H E K 2 9 3 A / サル P D - L 1 細胞 (B)、 及び H E K 2 9 3 A / マウス P D - L 1 細胞 (C) に対する結合能を示す。

【 0 0 3 7 】

【 図 7 】ヒト化 5 6 E 5 及び 3 C 2 抗体が T 細胞による I F N - 分泌を用量依存的に誘導したことを示す。

20

【 0 0 3 8 】

【 図 8 】 P D - L 1 結合に関する 3 C 2 V H 4 V L 4 (A)、 5 6 E 5 V H 5 V L 4 (B)、 アテゾリズマブ (C)、 アベルマブ (D) 及びデュルバルマブ (E) との競合における、 抗 P D L 1 抗体 5 6 E 5 V H 5 V L 4 の S P R 曲線を示す。

【 0 0 3 9 】

【 図 9 】 P D - L 1 結合に関する 3 C 2 V H 4 V L 4 (A)、 5 6 E 5 V H 5 V L 4 (B)、 アテゾリズマブ (C)、 アベルマブ (D) 及びデュルバルマブ (E) との競合における、 抗 P D L 1 抗体 3 C 2 V H 4 V L 4 の S P R 曲線を示す。

【 0 0 4 0 】

【 図 1 0 】それぞれ 5 6 E 5 V H 5 V L 4、 3 C 2 V H 6 V L 5 及びアベルマブを用いて処置した群における、 ヒト P D - L 1 を有するトランスジェニックマウスの平均腫瘍体積 (A) 及び平均腫瘍重量 (B) を示す。

30

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 4 1 】

本開示がより容易に理解され得ることを保証するべく、 特定の用語をまず定義する。 追加の定義は、 詳細な説明全体を通して記載される。

【 0 0 4 2 】

「 P D - L 1 」という用語は、 プログラム細胞死リガンド 1 を指す。「 P D - L 1 」という用語は、 バリエント、 アイソフォーム、 ホモログ、 オルソログ、 及びパラログを含む。 例えば、 ヒト P D - L 1 タンパク質に特異的な抗体は、 場合により、 サルなどのヒト以外の種由来の P D - L 1 タンパク質と交差反応し得る。 他の実施形態において、 ヒト P D - L 1 タンパク質に特異的な抗体は、 ヒト P D - L 1 タンパク質に完全に特異的で、 他の種に対する又は他のタイプの交差反応性を示し得ないか、 又は、 他のすべての種ではないが他の特定の種由来の P D - L 1 と交差反応し得る。

40

【 0 0 4 3 】

「ヒト P D - L 1 」という用語は、 G e n B a n k アクセション番号 A A I 1 3 7 3 5 . 1 を有する (S t r a u s b e r g R . L . e t a l . , (2 0 0 2) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 9 9 (2 6) : 1 6 8 9 9 - 1 6 9 0 3) か又は配列番号 3 5 に記載されるアミノ酸配列などの、 ヒト由来のアミノ酸配列を有する P D - L 1 タンパク質を指す。「サル P D - L 1 」という用語は、 N C B I アクセション

50

番号XP_005581836.1を有するか又は配列番号36に記載されるアミノ酸配列などの、サル由来のアミノ酸配列を有するPD-L1タンパク質を指す。「マウスPD-L1」という用語は、GenBankアクセッション番号AAH66841.1を有する(上記のStrausberg R. L. et al., (2002))か又は配列番号37に記載されるアミノ酸配列などの、マウス由来のアミノ酸配列を有するPD-L1タンパク質を指す。

【0044】

本明細書において言及される「抗体」という用語は、例えば、IgG、IgA、IgD、IgE及びIgMの全抗体、及びその任意の抗原結合断片(すなわち「抗原結合部分」)又は一本鎖を含む。全抗体は、ジスルフィド結合によって相互接続された少なくとも2つの重(H)鎖及び2つの軽(L)鎖を含む糖タンパク質である。各重鎖は、重鎖可変領域(本明細書においてV_Hと略記される)及び重鎖定常領域で構成される。重鎖定常領域は、3つのドメイン、すなわち、C_{H1}、C_{H2}、及びC_{H3}で構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域(本明細書においてV_Lと略記される)及び軽鎖定常領域で構成される。軽鎖定常領域は1つのドメインC_Lで構成される。V_H及びV_L領域は、フレームワーク領域(FR)と称されるより保存的な領域の間に挿入されている、相補性決定領域(CDR)と称される超可変性の領域に更に細分化することができる。各V_H及びV_Lは、3つのCDR及び4つのFRから構成され、アミノ末端からカルボキシ末端に向かって、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順に配置される。重鎖及び軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗体の定常領域は、免疫系の様々な細胞(例えば、エフェクター細胞)及び古典的補体系の第1成分(C1q)を含む、宿主組織又は因子に対する免疫グロブリンの結合を媒介できる。

【0045】

本明細書において使用される場合、抗体の「抗原結合部分」(又は単に「抗体部分」という用語は、抗原(例えばPD-L1タンパク質)に特異的に結合する能力を保持する抗体の1又は複数の断片を指す。抗体の抗原結合機能は、完全長抗体の断片によって発揮され得ることが示されている。抗体の「抗原結合部分」という用語に包含される結合断片の例としては、(i) V_L、V_H、C_L及びC_{H1}ドメインから成る一価断片であるFab断片；(ii) ヒンジ領域においてジスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片を含む二価断片であるF(ab')₂断片；(iii) V_H及びC_{H1}ドメインから成るFd断片；(iv) 抗体の単一アームのV_L及びV_Hドメインから成るFv断片、(v) V_Hドメインから成るdAb断片(Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546)；(vi) 単離された相補性決定領域(CDR)；及び(vii) 単一の可変ドメイン及び2つの定常ドメインを含有する重鎖可変領域であるナノボディが挙げられる。更に、Fv断片の2つのドメインであるV_L及びV_Hは、別個の遺伝子によってコードされるが、これらは、組換え法を使用して、V_L及びV_H領域が対合して一価分子を形成する単一タンパク質鎖(一本鎖Fv(single chain Fv: scFv)として知られる)としてこれらを作ることを可能にする合成リンカーによって結合することができる(例えば、Bird et al., (1988) Science 242: 423-426；及びHouston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883を参照されたい)。そのような一本鎖抗体もまた、抗体の「抗原結合部分」という用語に包含されることが意図される。これらの抗体断片は、当業者に知られている従来の技法を使用して取得され、断片は、完全な抗体と同じ方式で、有用性に関してスクリーニングされる。

【0046】

本明細書において使用される場合、「単離抗体」とは、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体を指すことが意図される(例えば、PD-L1タンパク質と特異的に結合する単離抗体は、PD-L1タンパク質以外の抗原と特異的に結合する抗体を実質的に含まない)。しかしながら、ヒトPD-L1タンパク質と特異的に結合する単離抗体は、他の種由来のPD-L1タンパク質などの他の抗原に対する交差反応性を有し

10

20

30

40

50

てもよい。更に、単離抗体は、他の細胞材料及び／又は化学物質を実質的に含まないことがあり得る。

【 0 0 4 7 】

本明細書において使用される場合、「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に同種の抗体の集団を指す、すなわち、集団を構成する個々の抗体は、少量存在し得る、天然に存在し得る変異及び／又は翻訳後修飾（例えば、異性化、アミド化）を除き、同一である。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一の抗原部位に対して指向性がある。異なる決定基（エピトープ）に対して指向性がある異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体調製物と対照的に、モノクローナル抗体は、抗原の単一の決定基に対して指向性がある。

10

【 0 0 4 8 】

本明細書において使用される場合、「マウス抗体」という用語は、フレームワーク及びCDR領域の両方がマウス生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する抗体を含むことが意図される。更に、抗体が定常領域を含有する場合、定常領域も、マウス生殖系列免疫グロブリン配列に由来する。本開示のマウス抗体は、マウス生殖系列免疫グロブリン配列によってエンコードされていないアミノ酸残基（例えば、*in vitro*のランダム又は部位特異的変異導入、又は、*in vivo*の体細胞変異によって導入される変異）を含み得る。しかしながら、本明細書において使用される場合、「マウス抗体」という用語は、別の哺乳類種の生殖系列に由来するCDR配列がマウスのフレームワーク配列に移植された抗体を含むことを意図していない。

20

【 0 0 4 9 】

「キメラ抗体」という用語は、非ヒト供給源からの遺伝物質をヒトの遺伝物質と組み合わせることによって作られる抗体を指す。又はより一般的には、キメラ抗体とは、特定の種の遺伝物質と別の種の遺伝物質とを有する抗体のことである。

【 0 0 5 0 】

本明細書において使用される場合、「ヒト化抗体」という用語は、ヒトにおいて天然に産生される抗体バリエーションとの類似性を増加させるようにタンパク質配列が改変された、非ヒト種の抗体を指す。

【 0 0 5 1 】

「抗原を認識する抗体」及び「抗原に特異的な抗体」という語句は、本明細書において、「抗原に特異的に結合する抗体」という用語と交換可能に使用される。

30

【 0 0 5 2 】

本明細書において使用される場合、「ヒトPD-L1に特異的に結合する」抗体とは、ヒトPD-L1タンパク質（及び、場合によっては、1又は複数の非ヒト種由来のPD-L1タンパク質）に結合するが、非PD-L1タンパク質には実質的に結合しない抗体を指すことが意図される。好ましくは、抗体は、「高親和性」で、すなわち、 $5.0 \times 10^{-8} \text{ M}$ 又はそれ未満、より好ましくは $1.0 \times 10^{-9} \text{ M}$ 又はそれ未満の K_D でヒトPD-L1タンパク質に結合する。

【 0 0 5 3 】

本明細書において使用される場合、タンパク質又は細胞に「実質的に結合しない」という用語は、タンパク質又は細胞に結合しないか、又は高親和性で結合しない、すなわち、 $1.0 \times 10^{-6} \text{ M}$ 又はそれよりも大きい、より好ましくは $1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ 又はそれよりも大きい、より好ましくは $1.0 \times 10^{-4} \text{ M}$ 又はそれよりも大きい、より好ましくは $1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$ 又はそれよりも大きい、更により好ましくは $1.0 \times 10^{-2} \text{ M}$ 又はそれよりも大きい K_D でタンパク質又は細胞に結合することを意味する。

40

【 0 0 5 4 】

IgG抗体に対する「高親和性」という用語は、標的抗原に対して、 $1.0 \times 10^{-6} \text{ M}$ 又はそれ未満、より好ましくは $5.0 \times 10^{-8} \text{ M}$ 又はそれ未満、更により好ましくは $1.0 \times 10^{-8} \text{ M}$ 又はそれ未満、更により好ましくは $5.0 \times 10^{-9} \text{ M}$ 又はそれ未満、更により好ましくは $1.0 \times 10^{-9} \text{ M}$ 又はそれ未満の K_D を有する抗体を指す。しかしな

50

がら、「高親和性」結合は、他の抗体アイソタイプに対して変動し得る。例えば、IgM アイソタイプに対する「高親和性」結合は、 10^{-6} M又はそれ未満、より好ましくは 10^{-7} M又はそれ未満、更により好ましくは 10^{-8} M又はそれ未満の K_D を有する抗体を指す。

【0055】

本明細書において使用される場合、「 K_{assoc} 」又は「 K_a 」という用語は、特定の抗体 - 抗原相互作用の会合速度を指すことが意図され、本明細書において使用される場合、「 K_{dis} 」又は「 K_d 」という用語は、特定の抗体 - 抗原相互作用の解離速度を指すことが意図される。本明細書において使用される場合、「 K_D 」という用語は、 K_a に対する K_d の比（すなわち、 K_d / K_a ）から取得され、モル濃度（M）で表される解離定数を指すことが意図される。抗体の K_D 値は、本技術分野において十分に確立された方法を使用して決定され得る。抗体の K_D を決定するための好ましい方法は、好ましくはBiacore（商標）システムなどのバイオセンサシステムを使用した表面プラズモン共鳴を使用することによるものである。

10

【0056】

半数効果濃度としても知られる「 EC_{50} 」という用語は、ベースライン及び指定された曝露時間後の最大値の中間の応答を誘導する抗体の濃度を指す。

【0057】

「抗体依存性細胞傷害」、「抗体依存性細胞介在性細胞傷害」、又は「ADCC」という用語は、抗体が結合した標的細胞を免疫系のエフェクター細胞が積極的に溶解する細胞介在性の免疫防御機構を指す。

20

【0058】

「対象」という用語は、任意のヒト又は非ヒト動物を含む。「非ヒト動物」という用語は、すべての脊椎動物、例えば、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ニワトリ、両生類、及び爬虫類などの哺乳類及び非哺乳類を含むが、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウシ、及びウマなどの哺乳類が好ましい。

【0059】

「アンタゴニストPD-L1抗体」又は「アンタゴニスト抗PD-L1抗体」という用語は、PD-L1に結合して、PD-L1とそのリガンド、例えばPD-1との相互作用によって誘導されるPD-L1シグナル伝達を遮断する抗PD-L1抗体を指す。アンタゴニスト抗PD-L1抗体は、T細胞活性化及びサイトカイン放出を促進して免疫を増強し得るため、例えば癌及び慢性感染症を処置するために使用することができる。

30

【0060】

「治療有効量」という用語は、疾患又は状態（例えば癌）と関連する症状を予防又は改善する及び/又は疾患又は状態の重症度を軽減するのに十分な、本開示の抗体又はその抗原結合部分の量を意味する。治療有効量は、処置されている状態の状況に沿うものと理解され、実際の有効量は、当業者によって容易に認識される。

【0061】

本開示の様々な態様は、以下のサブセクションで更に詳細に説明される。

【0062】

本開示の例示的な抗体又はその抗原結合部分は、アテゾリズマブなどの従来技術の抗PD-L1抗体のものと同様か又はそれよりも高い、高い結合能でヒト及びサルPD-L1タンパク質に特異的に結合する。本開示の抗体又はその抗原結合部分は、PD-L1-PD-1結合又は相互作用を遮断することができ、遮断活性は、アテゾリズマブなどの従来技術の抗PD-L1抗体のものと同等である。

40

【0063】

より重要なことに、本開示の抗体又はその抗原結合部分は、アテゾリズマブなどの従来技術の抗PD-L1抗体と比較してより高いわけではないが同等の、T細胞を活性化させる能力及びin vivo抗腫瘍活性を有する。

【0064】

50

本開示の好ましい抗体又はその抗原結合部分は、モノクローナルである。追加的に、抗体又はその抗原結合部分は、例えば、マウス、キメラ又はヒト化であり得る。

【0065】

本開示の例示的な抗体又はその抗原結合部分は、以下で構造的及び化学的に特徴付けられる。それらの重鎖及び軽鎖可変領域及びCDRの配列番号を表1に要約し、一部の抗体又はその抗原結合部分は、同じ重鎖/軽鎖可変領域を共有する。

【0066】

表1における重鎖可変領域CDR及び軽鎖可変領域CDRは、Kabatナンバリングシステムによって定義された。しかしながら、本技術分野において周知であるように、CDR領域は、重鎖/軽鎖可変領域配列に基づいて、Chothia、IMGT、AbM、又はContactナンバリングシステム/方法などの他のシステムによっても決定できる。

10

【0067】

本開示の抗体は各々、重鎖定常領域、例えばIgG1定常領域、例えば配列番号33のアミノ酸配列を有するヒトIgG1定常領域、又はその機能的断片を備え得る。

本開示の抗体は各々、軽鎖定常領域、例えばカッパ軽鎖定常領域、例えば配列番号34のアミノ酸配列を有するヒトカッパ定常領域、又はその機能的断片を備え得る。

【0068】

ヒトPD-L1に結合する他の抗PD-L1抗体のV_H及びV_L配列（又はCDR配列）は、本開示の抗PD-L1抗体のV_H及びV_L配列（又はCDR配列）と「混合及び対形成」することができる。好ましくは、V_H及びV_L鎖（又はそのような鎖の中のCDR）が混合及び対形成される場合、特定のV_H/V_LペアからのV_H配列は、構造的に同様のV_H配列で置き換えられる。同様に、好ましくは、特定のV_H/V_LペアからのV_L配列は、構造的に同様のV_L配列で置き換えられる。

20

【0069】

したがって、一実施形態において、本開示の抗体又はその抗原結合部分は、

(a) 表1における、上に列挙したアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；及び

(b) 表1における、上に列挙したアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、又は別の抗PD-L1抗体のV_L

を備え、抗体はヒトPD-L1と特異的に結合する。

30

表1 . 重鎖/軽鎖可変領域及びCDRのアミノ酸配列番号

40

50

【表 1】

配列番号 mAb 番号	HV-CDR1	HV-CDR2	HV-CDR3	HV	LV-CDR1	LV-CDR2	LV-CDR3	LV
マウス及びキメラ 3C2	1	2	3	13	4	5	6	24
3C2-VH2VL2	1	2	3	14	4	5	6	25
3C2-VH2VL3	1	2	3	14	4	5	6	26
3C2-VH2VL4	1	2	3	14	4	5	6	27
3C2-VH3VL2	1	2	3	15	4	5	6	25
3C2-VH3VL3	1	2	3	15	4	5	6	26
3C2-VH3VL4	1	2	3	15	4	5	6	27
3C2-VH4VL2	1	2	3	16	4	5	6	25
3C2-VH4VL3	1	2	3	16	4	5	6	26
3C2-VH4VL4	1	2	3	16	4	5	6	27
3C2-VH5VL2	1	2	3	17	4	5	6	25
3C2-VH5VL3	1	2	3	17	4	5	6	26
3C2-VH5VL4	1	2	3	17	4	5	6	27
3C2-VH6VL5	1	2	3	18	4	5	6	28
マウス及びキメラ 56E5	7	8	9	19	10	11	12	29
56E5-VH2VL2	7	8	9	20	10	11	12	30
56E5-VH2VL3	7	8	9	20	10	11	12	31
56E5-VH2VL4	7	8	9	20	10	11	12	32
56E5-VH3VL2	7	8	9	21	10	11	12	30
56E5-VH3VL3	7	8	9	21	10	11	12	31
56E5-VH3VL4	7	8	9	21	10	11	12	32
56E5-VH4VL2	7	8	9	22	10	11	12	30
56E5-VH4VL3	7	8	9	22	10	11	12	31
56E5-VH4VL4	7	8	9	22	10	11	12	32
56E5-VH5VL2	7	8	9	23	10	11	12	30
56E5-VH5VL3	7	8	9	23	10	11	12	31
56E5-VH5VL4	7	8	9	23	10	11	12	32

【0070】

別の実施形態において、本開示の抗体又はその抗原結合部分は、

(a) 表 1 における、上に列挙した重鎖可変領域の CDR 1、CDR 2、及び CDR 3 領域；及び

(b) 表 1 における、上に列挙した軽鎖可変領域の CDR 1、CDR 2、及び CDR 3 領域、又は別の抗 PD-L1 抗体の CDR

を備え、抗体はヒト PD-L1 と特異的に結合する。

【0071】

更に別の実施形態において、抗体又はその抗原結合部分は、ヒト PD-L1 と結合する他の抗体の CDR、例えば、異なる抗 PD-L1 抗体の重鎖可変領域由来の CDR 1 及び / 又は CDR 3、及び / 又は軽鎖可変領域由来の CDR 1、CDR 2、及び / 又は CDR 3 と組み合わせられた、抗 PD-L1 抗体の重鎖可変 CDR 2 領域を備える。

【0072】

加えて、CDR 3 ドメインが、CDR 1 及び / 又は CDR 2 ドメインとは無関係に単独で、抗体の同種抗原に対する結合特異性を決定できること、及び、共通の CDR 3 配列に基づいて同じ結合特異性を有する複数の抗体を予測的に生成できることは本技術分野において周知である。例えば、Klimka et al., British J. of Cancer 83(2):252-260(2000); Beiboer et al., J. Mol. Biol. 296:833-849(2000); Rader et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95:8910-8915(1998); Barbas et al., J. Am. Chem. Soc. 116:2161-2162(1994); Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:2529-2533(1995); Ditzel et al., J. Immunol. 157:739-749(1996); Berezov et al., BIA journal 8:Scientific Review 8(2001)

; Igarashi et al., J. Biochem (Tokyo) 117: 452 - 7 (1995); Bourgeois et al., J. Virol 72: 807 - 10 (1998); Levi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90: 4374 - 8 (1993); Polymenis and Stoller, J. Immunol. 152: 5218 - 5329 (1994) 及び Xu and Davis, Immunity 13: 37 - 45 (2000) を参照されたい。米国特許第 6,951,646 号; 同第 6,914,128 号; 同第 6,090,382 号; 同第 6,818,216 号; 同第 6,156,313 号; 同第 6,827,925 号; 同第 5,833,943 号; 同第 5,762,905 号及び同第 5,760,185 号もまた参照されたい。これらの参考文献の各々は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

10

【0073】

したがって、別の実施形態において、本開示の抗体又はその抗原結合部分は、抗 PD - L1 抗体の重鎖可変領域の CDR 2、及び抗 PD - L1 抗体の重鎖及び / 又は軽鎖可変領域の少なくとも CDR 3、又は別の抗 PD - L1 抗体の重鎖及び / 又は軽鎖可変領域の CDR 3 を備え、抗体又はその抗原結合部分は、ヒト PD - L1 に特異的に結合することが可能である。これらの抗体又はその抗原結合部分は、好ましくは、(a) 結合に関して PD - L1 と競合する; (b) 機能的特徴を保持する; (c) 同じエピトープに結合する; 及び / 又は (d) 本開示の抗 PD - L1 抗体と同様の結合親和性を有する。更に別の実施形態において、抗体又はその抗原結合部分は、抗 PD - L1 抗体の軽鎖可変領域の CDR 2、又は別の抗 PD - L1 抗体の軽鎖可変領域の CDR 2 を更に備えてもよく、抗体又はその抗原結合部分は、ヒト PD - L1 に特異的に結合することが可能である。別の実施形態において、本開示の抗体又はその抗原結合部分は、抗 PD - L1 抗体の重鎖及び / 又は軽鎖可変領域の CDR 1、又は別の抗 PD - L1 抗体の重鎖及び / 又は軽鎖可変領域の CDR 1 を備えてもよく、抗体又はその抗原結合部分は、ヒト PD - L1 に特異的に結合することが可能である。

20

【0074】

別の実施形態において、本開示の抗体又はその抗原結合部分は、本開示の抗 PD - L1 抗体又はその抗原結合部分のものと 1 又は複数の保存的改変の点で異なる CDR 1、CDR 2 及び CDR 3 配列の重鎖及び / 又は軽鎖可変領域配列を備える。本技術分野において、抗原結合を除去しない特定の保存的配列改変が行われ得ることが理解される。例えば、Brummell et al., (1993) Biochem 32: 1180 - 8; de Wildt et al., (1997) Prot. Eng. 10: 835 - 41; Komissarov et al., (1997) J. Biol. Chem. 272: 26864 - 26870; Hall et al., (1992) J. Immunol. 149: 1605 - 12; Kelley and O'Connell (1993) Biochem. 32: 6862 - 35; Adib-Conquy et al., (1998) Int. Immunol. 10: 341 - 6 及び Beers et al., (2000) Clin. Can. Res. 6: 2835 - 43 を参照されたい。

30

【0075】

したがって、一実施形態において、抗体又はその抗原結合部分は、CDR 1、CDR 2、及び CDR 3 配列を有する重鎖可変領域、及び / 又は CDR 1、CDR 2、及び CDR 3 配列を有する軽鎖可変領域を備え、

40

(a) 重鎖可変領域 CDR 1 配列は、上の表 1 に列挙された配列、及び / 又はその保存的改変を含む; 及び / 又は

(b) 重鎖可変領域 CDR 2 配列は、上の表 1 に列挙された配列、及び / 又はその保存的改変を含む; 及び / 又は

(c) 重鎖可変領域 CDR 3 配列は、上の表 1 に列挙された配列、及びその保存的改変を含む; 及び / 又は

(d) 軽鎖可変領域 CDR 1、及び / 又は CDR 2、及び / 又は CDR 3 配列は、上の表 1 に列挙された配列; 及び / 又はその保存的改変を含む; 及び

50

(e) 抗体はヒト P D - L 1 と特異的に結合する。

【 0 0 7 6 】

本開示の抗体又はその抗原結合部分は、ヒト P D - L 1 に対する高親和性結合、及び P D - L 1 陽性細胞に対する抗体依存性細胞介在性細胞傷害 (A D C C) を誘導する能力の低減又は除去などの、上に記載された機能特性のうちの 1 又は複数を有する。

【 0 0 7 7 】

様々な実施形態において、本開示の抗体又はその抗原結合部分は、例えば、マウス、キメラ、ヒト、又はヒト化であり得る。

【 0 0 7 8 】

本明細書において使用される場合、「保存的配列改変」という用語は、アミノ酸配列を含有する抗体の結合特徴に著しくは影響しないか、又は、それを変更しないアミノ酸改変を指すことが意図される。そのような保存的改変はアミノ酸置換、付加及び欠失を含む。部位特異的変異誘発及び P C R 媒介変異誘発など、本技術分野において知られている標準的な技法によって、本開示の抗体に改変が導入され得る。保存的アミノ酸置換とは、アミノ酸残基が、同様の側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられることである。同様の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーが本技術分野において定義されている。これらのファミリーは、塩基性側鎖 (例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖 (例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、極性無電荷側鎖 (例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン)、非極性側鎖 (例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン)、ベータ分岐側鎖 (例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン) 及び芳香族側鎖 (例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン) を有するアミノ酸を含む。したがって、本開示の抗体の C D R 領域における 1 又は複数のアミノ酸残基は、同じ側鎖ファミリーからの他のアミノ酸残基で置き換えられ得、変更された抗体は、本明細書において記載された機能的アッセイを使用して、保持された機能 (すなわち、上に記載された機能) について試験され得る。

【 0 0 7 9 】

本開示の抗体は、本開示の抗 P D - L 1 抗体の V_H / V_L 配列のうちの 1 又は複数を有する抗体を、改変抗体を操作するための出発物質として使用して調製することができる。抗体は、一方又は両方の可変領域 (すなわち、V_H 及び / 又は V_L) における、例えば、1 又は複数の C D R 領域における及び / 又は 1 又は複数のフレームワーク領域における 1 又は複数の残基を改変することによって操作され得る。追加的又は代替的に、例えば抗体のエフェクター機能を変更するために、抗体は、定常領域内の残基を改変することによって操作され得る。

【 0 0 8 0 】

特定の実施形態において、抗体の可変領域を操作するために、C D R 移植が使用され得る。抗体は、主に 6 の重鎖及び軽鎖相補性決定領域 (C D R) に位置するアミノ酸残基を通じて標的抗原と相互作用する。この理由から、C D R 内のアミノ酸配列は、C D R の外部の配列より、個々の抗体間の多様性が高い。C D R 配列は大半の抗体 - 抗原相互作用を担うため、異なる特性を有する異なる抗体由来のフレームワーク配列に移植された特定の天然に存在する抗体由来の C D R 配列を含む発現ベクターを構築することによって、特定の天然に存在する抗体の特性を模倣する組換え抗体を発現させることが可能である (例えば、Riechmann et al., (1998) Nature 332:323-327; Jones et al., (1986) Nature 321:522-525; Queen et al., (1989) Proc. Natl. Acad. U.S.A. 86:10029-10033; 米国特許第 5,225,539 号; 同第 5,530,101 号; 同第 5,585,089 号; 同第 5,693,762 号及び同第 6,180,370 号もまた参照されたい。)

【 0 0 8 1 】

したがって、本開示の別の実施形態は、上に記載された本開示の配列を含む C D R 1、

10

20

30

40

50

CDR2、及びCDR3配列を有する重鎖可変領域、及び/又は、上に記載された本開示の配列を含むCDR1、CDR2、及びCDR3配列を有する軽鎖可変領域を備える単離モノクローナル抗体又はその抗原結合部分に関連する。これらの抗体は本開示のモノクローナル抗体のV_H及びV_L CDR配列を含有するが、異なるフレームワーク配列を含有し得る。

【0082】

そのようなフレームワーク配列は、公共のDNAデータベース、又は、生殖系列抗体遺伝子配列を含む公開されている参考文献から取得できる。例えば、ヒト重鎖及び軽鎖可変領域遺伝子の生殖系列DNA配列は、「VBase」ヒト生殖系列配列データベース(インターネット上www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbaseにおいて入手可能)、並びに前掲のKabata et al., (1991); Tomlinson et al., (1992) J. Mol. Biol. 227: 776-798; 及びCox et al., (1994) Eur. J. Immunol. 24: 827-836で見ることができ; それらの各々の内容は参照によって本明細書に明示的に組み込まれる。別の例として、ヒト重鎖及び軽鎖可変領域遺伝子の生殖系列DNA配列はGenbankデータベースで見ることができる。例えば、Hco7 HuMAbマウスにおいて見られる以下の重鎖生殖系列配列は、添付のGenbankアクセス番号1-69 (NG-0010109、NT-024637 & BC070333)、3-33 (NG-0010109 & NT-024637) 及び3-7 (NG-0010109 & NT-024637) において入手可能である。別の例として、Hco12 HuMAbマウスにおいて見られる以下の重鎖生殖系列配列は、添付のGenbankアクセス番号1-69 (NG-0010109、NT-024637 & BC070333)、5-51 (NG-0010109 & NT-024637)、4-34 (NG-0010109 & NT-024637)、3-30.3 (CAJ556644) & 3-23 (AJ406678) において入手可能である。

【0083】

抗体タンパク質配列は、当業者に周知である、Gapped BLAST(上記のAltschul et al., (1997))と呼ばれる配列類似性検索方法の1つを使用して、コンパイルされたタンパク質配列データベースと比較される。

【0084】

本開示の抗体において使用される好ましいフレームワーク配列は、本開示の抗体によって使用されるフレームワーク配列と同様の構造である。V_H CDR1、CDR2、及びCDR3配列は、生殖系列免疫グロブリン遺伝子において見られるもの同一の配列を有するフレームワーク領域に移植され得るか(フレームワーク配列は生殖系列免疫グロブリン遺伝子に由来する)、又は、CDR配列は、生殖系列配列と比較して1又は複数の変異を含有するフレームワーク領域に移植され得る。例えば、特定の場において、抗体の抗原結合能力を維持又は強化するために、フレームワーク領域内の残基を変異させることが有益であることが分かった(例えば、米国特許第5,530,101号; 同第5,585,089号; 同第5,693,762号及び同第6,180,370号を参照されたい)。

【0085】

別のタイプの可変領域改変は、V_H及び/又はV_L CDR1、CDR2、及び/又はCDR3領域におけるアミノ酸残基を変異させ、これによって、目的の抗体の1又は複数の結合特性(例えば親和性)を改善することである。変異を導入するために、部位特異的変異誘発又はPCR媒介変異誘発が実行され得、抗体結合に対する影響、又は、他の目的の機能特性が、本技術分野において知られているように、in vitro又はin vivoアッセイで評価され得る。好ましくは、保存的改変(本技術分野において知られている)が導入される。変異は、アミノ酸置換、付加、又は欠失であり得るが、好ましくは置換である。更に、典型的には、CDR領域内の1、2、3、4又は5以下の残基が変更される。

【0086】

したがって、別の実施形態において、本開示は、(a)本開示の配列、又は1、2、3、4又は5のアミノ酸置換、欠失又は付加を有するアミノ酸配列を含むV_H CDR1領域；(b)本開示の配列、又は1、2、3、4又は5のアミノ酸置換、欠失又は付加を有するアミノ酸配列を含むV_H CDR2領域；(c)本開示の配列、又は1、2、3、4又は5のアミノ酸置換、欠失又は付加を有するアミノ酸配列を含むV_H CDR3領域；(d)本開示の配列、又は1、2、3、4又は5のアミノ酸置換、欠失又は付加を有するアミノ酸配列を含むV_L CDR1領域；(e)本開示の配列、又は1、2、3、4又は5のアミノ酸置換、欠失又は付加を有するアミノ酸配列を含むV_L CDR2領域；及び(f)本開示の配列、又は1、2、3、4又は5のアミノ酸置換、欠失又は付加を有するアミノ酸配列を含むV_L CDR3領域を有する重鎖可変領域を備える単離抗PD-L1モノクローナル抗体又はその抗原結合部分を提供する。

10

【0087】

操作された本開示の抗体は、例えば、抗体の特性を改善するために、V_H及び/又はV_L内のフレームワーク残基に改変が行われたものを含む。典型的には、そのようなフレームワーク改変は、抗体の免疫原性を減少させるために行われる。例えば、1つのアプローチは、1又は複数のフレームワーク残基を、対応する生殖系列配列に「復帰変異」させることである。より具体的には、体細胞変異を経験した抗体は、抗体の由来元である生殖系列配列とは異なるフレームワーク残基を含有し得る。そのような残基は、抗体フレームワーク配列を、抗体の由来元である生殖系列配列と比較することによって同定され得る。

【0088】

20

別のタイプのフレームワーク改変は、T細胞エピトープを除去するために、フレームワーク領域内、又は、更には1又は複数のCDR領域内の1又は複数の残基を変異させ、これによって、抗体の潜在的な免疫原性を低減することを伴う。このアプローチは、「脱免疫化」とも呼ばれ、米国特許公開第20030153043号に更に詳細に記載されている。

【0089】

フレームワーク又はCDR領域内で行われる改変に加えて、又は替えて、本開示の抗体は、典型的には、血中半減期、補体結合、Fc受容体結合、及び/又は、抗原依存性細胞傷害などの抗体の1又は複数の機能特性を変更するために、Fc領域内に改変を含むように操作され得る。更に、本開示の抗体は、化学的に改変され得る(例えば、1又は複数の化学的部分が抗体に結合し得る)か、又は、そのグリコシル化を変更するために改変され得、これにより、同様に抗体の1又は複数の機能特性が変更される。

30

【0090】

一実施形態において、C_{H1}のヒンジ領域は、ヒンジ領域におけるシステイン残基の数が変更されるように、例えば、増加又は減少するように改変される。このアプローチは、米国特許第5,677,425号に更に記載されている。C_{H1}のヒンジ領域におけるシステイン残基の数は、例えば、軽鎖及び重鎖の組み立てを容易にするために、又は、抗体の安定性を増加又は減少させるために変更される。

【0091】

別の実施形態において、抗体のFcヒンジ領域は、抗体の生物学的半減期を減少させるために、変異される。より具体的には、天然のFcヒンジドメインのスタフィロコッカスタンパク質A(SpA)結合と比べて弱いSpA結合を抗体が有するように、1又は複数のアミノ酸変異が、Fcヒンジ断片のC_{H2}-C_{H3}ドメイン境界領域に導入される。このアプローチは、米国特許第6,165,745号に更に詳細に記載されている。

40

【0092】

更に別の実施形態において、抗体のグリコシル化は改変される。例えば、グリコシル化された抗体が作られ得る(すなわち、抗体はグリコシル化を有しない)。グリコシル化は、例えば、抗原に対する抗体の親和性を増加させるために変更され得る。そのような炭水化物改変は、例えば、抗体配列内のグリコシル化の1又は複数の部位を変更することによって達成され得る。例えば、1又は複数の可変領域フレームワークグリコシル化部位の除

50

去をもたらす1又は複数のアミノ酸置換が行われ得、これによって、当該部位のグリコシル化を除去する。そのような非グリコシル化により、抗原に対する抗体の親和性が増加し得る。例えば、米国特許第5,714,350号及び同第6,350,861号を参照されたい。

【0093】

追加的又は代替的に、フコシル残基の量が低減された低フコシル化抗体、又は、二分GlcNaC構造を増加させた抗体など、グリコシル化のタイプが変更された抗体が作られ得る。そのような変更されたグリコシル化パターンは、抗体のADCC能力を増加させることが実証された。そのような炭水化物改変は、例えば、グリコシル化機構を変更した宿主細胞において、抗体を発現させることによって達成され得る。グリコシル化機構を変更した細胞は本技術分野において記載されており、本開示の組換え抗体を発現させるための宿主細胞として使用され得、これによって、グリコシル化が変更された抗体が産生される。例えば、細胞株Ms704、Ms705、及びMs709は、Ms704、Ms705、及びMs709細胞株において発現する抗体がそれらの炭水化物にフコースを有しないように、フコシルトランスフェラーゼ遺伝子FUT8((1,6)-フコシルトランスフェラーゼ)を欠如している。Ms704、Ms705、及びMs709FUT8-/-細胞株は、2つの置換ベクターを使用して、CHO/DG44細胞におけるFUT8遺伝子の標的化された破壊によって作製された(米国特許公開第20040110704号及びYamane-Ohnuki et al., (2004) Biotechnol Bioeng 87:614-22を参照されたい)。別の例として、EP1,176,195は、フコシルトランスフェラーゼをエンコードするFUT8遺伝子が機能的に破壊された細胞株を記載し、したがって、そのような細胞株において発現する抗体は、-1,6結合関連酵素を低減又は除去することによって低フコシル化を示す。EP1,176,195はまた、抗体のFc領域に結合するN-アセチルグルコサミンにフコースを追加するための酵素活性が低いか又はその酵素活性を有しない細胞株、例えば、ラット骨髄腫細胞株YB2/0(ATCC CRL 1662)を記載している。PCT公開WO03/035835号は、フコースをAsn(297)連結炭水化物に結合する能力が低下したバリエーションCHO細胞株のLec13細胞を記載しており、これもまた、その宿主細胞において発現する抗体の低フコシル化をもたらす(Shields et al., (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740もまた参照されたい)。改変されたグリコシル化プロファイルを有する抗体はまた、PCT公開WO06/089231号に記載されているように、ニワトリの卵において産生され得る。代替的に、改変されたグリコシル化プロファイルを有する抗体は、アオウキクサなどの植物細胞において産生され得る。PCT公開WO99/54342号は、糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼ(例えば、(1,4)-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII(GnTIII))を発現するように操作された細胞株を記載し、したがって、操作された細胞株において発現する抗体は、抗体のADCC活性の増加をもたらす二分GlcNaC構造の増加を示す(Umana et al., (1999) Nat. Biotech. 17:176-180もまた参照されたい)。代替的に、抗体のフコース残基は、フコシダーゼ酵素を使用して切断することができ;例えば、フコシダーゼである-L-フコシダーゼは抗体からフコシル残基を除去する(Tarentino et al., (1975) Biochem. 14:5516-23)。

【0094】

本開示によって想定される本明細書の抗体の別の改変はPEG化である。抗体は、例えば、抗体の生物学的(例えば、血中)半減期を増加させるためにPEG化され得る。抗体をPEG化するために、抗体又はその断片は典型的には、1又は複数のポリエチレングリコール(PEG)基が抗体又は抗体断片に結合するようになる条件下において、PEGの反応性エステル又はアルデヒド誘導體などのPEGと反応される。好ましくは、PEG化は、反応性PEG分子(又は、類似の反応性水溶性ポリマー)とのアシル化反応又はアルキル化反応を介して実行される。本明細書において使用される場合、「ポリエチレングリ

10

20

30

40

50

コール」という用語は、モノ(C₁ - C₁₀)アルコキシ又はアリーロキシ - ポリエチレングリコール又はポリエチレングリコール - マレイミドなどの、他のタンパク質を誘導体化するために使用されるPEGの任意の形態を包含することが意図される。特定の実施形態において、PEG化される抗体は、非グリコシル化抗体である。タンパク質をPEG化するための方法は本技術分野において知られ、本開示の抗体に適用され得る。例えば、EP0154316及びEP0401384を参照されたい。

【0095】

本開示の抗体は、その異なるクラスを検出及び/又は区別するために様々な物理的特性によって特徴付けることができる。

【0096】

例えば、抗体は、軽鎖又は重鎖可変領域のいずれかに1又は複数のグリコシル化部位を含有し得る。そのようなグリコシル化部位は、変更された抗原結合に起因して、抗体の免疫原性の増加、又は、抗体のpKの変更をもたらし得る(Marshall et al (1972) Annu Rev Biochem 41:673-702; Gala and Morrison (2004) J Immunol 172:5489-94; Wallick et al (1988) J Exp Med 168:1099-109; Spirio (2002) Glycobiology 12:43R-56R; Parekh et al (1985) Nature 316:452-7; Mimura et al., (2000) Mol Immunol 37:697-706)。グリコシル化は、N-X-S/T配列を含有するモチーフにおいて発生することが知られている。いくつかの場合において、可変領域グリコシル化を含有しない抗PD-L1抗体を有することが好ましい。これは、可変領域においてグリコシル化モチーフを含有しない抗体を選択すること、又は、グリコシル化領域内の残基を変異させることのいずれかによって達成され得る。

【0097】

好ましい実施形態において、抗体はアスパラギン異性部位を含有しない。アスパラギンの脱アミド化は、N-G又はD-G配列で発生し、ポリペプチド鎖にねじれを導入してその安定性を減少させる(イソアスパラギン酸作用)イソアスパラギン酸残基の生成をもたらし得る。

【0098】

各抗体は、一般に6~9.5のpH範囲に収まる固有の等電点(pI)を有する。IgG1抗体のpIは典型的には、7~9.5のpH範囲に収まり、IgG4抗体のpIは、典型的には、6~8のpH範囲に収まる。正常範囲外のpIを有する抗体は、in vivo条件下において、いくらかのアンフォールディング及び不安定性を有し得ると考えられる。したがって、正常範囲に収まるpI値を含有する抗PD-L1抗体を有することが好ましい。これは、正常範囲におけるpIを有する抗体を選択すること、又は、荷電表面残基を変異させることのいずれかによって達成できる。

【0099】

別の態様において、本開示は、本開示の抗体の重鎖及び/又は軽鎖可変領域又はCDRをエンコードする核酸分子を提供する。核酸は、全細胞中に、細胞溶解液中に、又は、部分的に精製されたか又は実質的に純粋な形態で存在し得る。核酸は、標準的な技法によって、他の細胞成分又は他の混入物質、例えば、他の細胞核酸又はタンパク質から精製される場合、「単離」されるか又は「実質的に純粋」になる。本開示の核酸は、例えば、DNA又はRNAであり得、イントロン配列を含有してもよく、又はしなくてもよい。好ましい実施形態において、核酸はcDNA分子である。

【0100】

本開示の核酸は、標準的な分子生物学技法を使用して取得され得る。ハイブリドーマ(例えば、下で更に説明される、ヒト免疫グロブリン遺伝子を保有するトランスジェニックマウスから調製されたハイブリドーマ)によって発現される抗体については、ハイブリドーマによって作られる抗体の軽鎖及び重鎖をエンコードするcDNAは、標準的なPCR増幅又はcDNAクローニング技法によって取得され得る。免疫グロブリン遺伝子ライブ

10

20

30

40

50

ラリから（例えば、ファージディスプレイ技法を使用して）取得される抗体については、そのような抗体をエンコードする核酸は、遺伝子ライブラリから回収され得る。

【0101】

本開示の好ましい核酸分子は、PD-L1モノクローナル抗体のV_H及びV_L配列、又はCDRをエンコードするものを含む。V_H及びV_LセグメントをエンコードするDNA断片が取得されると、これらのDNA断片は、例えば、可変領域遺伝子を完全長抗体鎖遺伝子、Fab断片遺伝子、又はscFv遺伝子に変換するために、標準的な組換えDNA技法によって更に処理され得る。これらの処理において、V_L又はV_HをエンコードするDNA断片は、抗体定常領域又はフレキシブルリンカーなどの、別のタンパク質をエンコードする別のDNA断片に作動可能に連結される。この文脈において使用される場合、「作動可能に連結される」という用語は、2つのDNA断片によってエンコードされるアミノ酸配列がインフレームに留まるように、2つのDNA断片が結合されることを意味することが意図される。

10

【0102】

V_H領域をエンコードする単離DNAは、V_HをエンコードするDNAを、重鎖定常領域（C_{H1}、C_{H2}、及びC_{H3}）をエンコードする別のDNA分子に作動可能に連結することによって、完全長重鎖遺伝子に変換され得る。ヒト重鎖定常領域遺伝子の配列は、本技術分野において知られ、これらの領域を包含するDNA断片は標準的なPCR増幅によって取得され得る。重鎖定常領域は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM、又はIgD定常領域であり得るが、最も好ましくは、IgG1又はIgG4定常領域である。Fab断片重鎖遺伝子については、V_HをエンコードするDNAは、重鎖C_{H1}定常領域のみをエンコードする別のDNA分子に作動可能に連結され得る。

20

【0103】

V_L領域をエンコードする単離DNAは、V_LをエンコードするDNAを、軽鎖定常領域C_Lをエンコードする別のDNA分子に作動可能に連結することによって、完全長軽鎖遺伝子（並びにFab軽鎖遺伝子）に変換され得る。ヒト軽鎖定常領域遺伝子の配列は、本技術分野において知られ、これらの領域を包含するDNA断片は標準的なPCR増幅によって取得され得る。好ましい実施形態において、軽鎖定常領域は、カッパ又はラムダ定常領域であり得る。

【0104】

scFv遺伝子を作製するために、V_H及びV_LをエンコードするDNA断片は、フレキシブルリンカーをエンコードする、例えばアミノ酸配列（Gly4-Ser）₃をエンコードする別の断片に作動可能に連結され、その結果、V_H及びV_L配列は、V_L及びV_H領域がフレキシブルリンカーによって結合された連続的な一本鎖タンパク質として発現され得る（例えば、Bird et al., (1988) Science 242: 423-426; Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883; McCafferty et al., (1990) Nature 348: 552-554を参照されたい）。

30

【0105】

本開示のモノクローナル抗体（mAb）は、Kohler and Milstein (1975) Nature 256: 495の周知の体細胞ハイブリダイゼーション（ハイブリドーマ）技法を使用して産生され得る。モノクローナル抗体を産生するための他の実施形態は、Bリンパ球のウイルス又は発癌性形質転換、及び、ファージディスプレイ技法を含む。キメラ又はヒト化抗体も本技術分野において周知である。例えば、その内容の全体が参照によって本明細書に具体的に組み込まれる、米国特許第4,816,567号；同第5,225,539号；同第5,530,101号；同第5,585,089号；同第5,693,762号、及び同第6,180,370号を参照されたい。

40

【0106】

本開示の抗体はまた、本技術分野において周知であるように、例えば、組換えDNA技法及び遺伝子トランスフェクション法の組み合わせを使用して、宿主細胞トランスフェク

50

トーマにおいて産生され得る（例えば、Morrisson, S. (1985) Science 229: 1202）。一実施形態において、標準的な分子生物学技法によって取得される部分的又は完全長軽鎖及び重鎖をエンコードするDNAは、1又は複数の発現ベクターに挿入される。その結果、遺伝子は、転写及び翻訳制御配列に作動可能に連結される。この文脈において、「作動可能に連結される」という用語は、ベクター内の転写及び翻訳調節配列が、抗体遺伝子の転写及び翻訳を制御するという意図された機能を果たすように、抗体遺伝子がベクターにライゲーションされることを意味することが意図される。

【0107】

「制御配列」という用語は、プロモーター、エンハンサー、及び、抗体遺伝子の転写又は翻訳を調節する他の発現調節エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含むことが意図される。そのような制御配列は、例えば、Goeddelに記載されている（Gene Expression Technology, Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)）。哺乳類宿主細胞発現のための好ましい制御配列は、サイトメガロウイルス（CMV）、シミアンウイルス40（SV40）、アデノウイルスに由来するプロモーター及び/又はエンハンサー、例えば、アデノウイルス主要後期プロモーター（AdMLP）及びポリオーマなど、哺乳類細胞において高レベルのタンパク質発現を指令するウイルスエレメントを含む。代替的に、ユビキチンプロモーター又はグロビンプロモーターなど、非ウイルス性制御配列が使用され得る。更に、SV40初期プロモーター及びヒトT細胞白血病ウイルス1型の長鎖末端反復配列由来の配列を含有するSRプロモーターシステム（Takebe et al., (1988) Mol. Cell. Biol. 8: 466-472）などの、異なる供給源由来の配列から構成される制御エレメント。発現ベクター及び発現調節配列は、使用される発現宿主細胞に適合するように選択される。

【0108】

抗体軽鎖遺伝子及び抗体重鎖遺伝子は、同じ、又は別個の発現ベクターに挿入され得る。好ましい実施形態において、可変領域を使用して、それらを、所望のアイソタイプの重鎖定常領域及び軽鎖定常領域を既にエンコードしている発現ベクターに挿入することによって、任意の抗体アイソタイプの完全長抗体遺伝子を作製する。その結果、V_Hセグメントは、ベクター内のC_Hセグメントに作動可能に連結され、V_Lセグメントは、ベクター内のC_Lセグメントに作動可能に連結される。追加的又は代替的に、組換え発現ベクターは、宿主細胞からの抗体鎖の分泌を促進するシグナルペプチドをエンコードし得る。抗体鎖遺伝子は、シグナルペプチドが抗体鎖遺伝子のアミノ末端にインフレームに連結されるように、ベクターにクローニングされ得る。シグナルペプチドは、免疫グロブリンシグナルペプチド、又は、異種シグナルペプチド（すなわち、非免疫グロブリンタンパク質からのシグナルペプチド）であり得る。

【0109】

抗体鎖遺伝子及び制御配列に加えて、本開示の組換え発現ベクターは、宿主細胞におけるベクターの複製を制御する配列（例えば、複製起点）及び選択マーカー遺伝子など、追加の配列を保有し得る。選択マーカー遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞の選択を容易にする（例えば、米国特許第4,399,216号；同第4,634,665号及び同第5,179,017号を参照されたい）。例えば、選択マーカー遺伝子は典型的には、ベクターが導入された宿主細胞に対して、G418、ハイグロマイシン、又はメトトレキサートなどの薬物に対する耐性を付与する。好ましい選択マーカー遺伝子としては、ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）遺伝子（メトトレキサート選択/増幅と共に、dhfr宿主細胞において使用）及びneo遺伝子（G418選択用）が挙げられる。

【0110】

軽鎖及び重鎖の発現のために、重鎖及び軽鎖をエンコードする発現ベクターが、標準的な技法によって宿主細胞にトランスフェクトされる。「トランスフェクション」という用語の様々な形態は、外来性DNAを原核生物又は真核生物の宿主細胞に導入するために一般に使用される幅広い様々な技法、例えば、電気穿孔法、リン酸カルシウム沈殿、DEA

10

20

30

40

50

Eデキストラントランスフェクションなどを包含することが意図される。本開示の抗体を原核生物又は真核生物のいずれの宿主細胞において発現させることも理論的に可能であるが、真核細胞（哺乳類宿主細胞が最も好ましい）における抗体の発現が最も好ましい。なぜなら、そのような真核細胞、特に哺乳類細胞は、原核生物の細胞よりも、適切に折り畳まれた、免疫活性抗体を組み立てて分泌する可能性が高いからである。

【0111】

本開示の組換え抗体を発現させるための好ましい哺乳類宿主細胞としては、チャイニーズハムスター卵巣（Chinese Hamster Ovary：CHO細胞）（例えば R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) J. Mol. Biol. 159: 601 - 621 に記載されているような DHFR 選択マーカーと共に使用される、Urlaub and Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 - 4220 に記載される dhfr - CHO細胞を含む）、NSO 骨髄腫細胞、COS細胞及びSP2細胞が挙げられる。特に、NSO 骨髄腫細胞と共に使用する場合、別の好ましい発現系は、WO87/04462、WO89/01036及びEP338,841に開示されているGS遺伝子発現系である。抗体遺伝子をエンコードする組換え発現ベクターが哺乳類宿主細胞に導入される場合、抗体は、宿主細胞における抗体の発現、又は、より好ましくは、宿主細胞が成長する培養培地への抗体の分泌を可能にするのに十分な期間にわたって宿主細胞を培養することによって産生される。抗体は、標準的なタンパク質精製方法を使用して培養培地から回収され得る。

【0112】

本開示の抗体又はその抗原結合部分は、抗体薬物コンジュゲート（antibody - drug conjugate：ADC）などのイムノコンジュゲートを形成するために、治療剤にコンジュゲートされてもよい。好適な治療剤としては、細胞毒、アルキル化剤、DNA小溝結合剤、DNAインターカレーター、DNA架橋剤、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤、核輸送阻害剤、プロテアソーム阻害薬、トポイソメラーゼI又はII阻害剤、熱ショックタンパク質阻害剤、チロシンキナーゼ阻害剤、抗生物質及び有糸分裂阻害剤が挙げられる。ADCにおいて、抗体及び治療剤は、好ましくは、ペプチジルリンカー、ジスルフィドリンカー、又はヒドラゾンリンカーなどの切断可能なリンカーを介してコンジュゲートされる。より好ましくは、リンカーは、Val - Cit、Ala - Val、Val - Ala - Val、Lys - Lys、Ala - Asn - Val、Val - Leu - Lys、Ala - Ala - Asn、Cit - Cit、Val - Lys、Lys、Cit、Ser、又はGluなどのペプチジルリンカーである。ADCは、米国特許第7,087,600号；同第6,989,452号；及び同第7,129,261号；PCT公開WO02/096910号；同第WO07/038,658号；同第WO07/051,081号；同第WO07/059,404号；同第WO08/083,312号；及び同第WO08/103,693号；米国特許公開第20060024317号；同第2006004081号；及び同第20060247295号に記載されているように調製することができる；これらの開示は参照によって本明細書に組み込まれる。

【0113】

別の態様において、本開示は、少なくとも2つの異なる結合部位又は標的分子に結合する二重特異性分子を生成する、少なくとも1つの他の機能分子、例えば別のペプチド又はタンパク質（例えば、別の抗体又は受容体に対するリガンド）に連結されている本開示の抗体又はその抗原結合部分を備える二重特異性分子を特徴とする。したがって、本明細書において使用される場合、「二重特異性分子」は、3又はそれよりも多い特異性を有する分子を含む。

【0114】

二重特異性分子には多くの異なるフォーマット及びサイズがあり得る。サイズの範囲の一端では、二重特異性分子は、同一の特異性の2つの結合アームを有する代わりに、異なる特異性を各々が有する2つの結合アームを有することを除いて、従来の抗体フォーマットを保持する。他端は、ペプチド鎖によって連結された2つの一本鎖抗体断片（scFv

）から成る二重特異性分子、いわゆるBs (scFv) 2コンストラクトである。中間サイズの二重特異性分子は、ペプチジルリンカーによって連結された2つの異なるF(ab)断片を含む。これらの及び他のフォーマットの二重特異性分子は、遺伝子操作、体細胞ハイブリダイゼーション、又は化学的方法によって調製され得る。例えば、前掲のKufert al.; Cao and Suresh, Bioconjugate Chemistry, 9(6), 635-644(1998); 及びvan Sprielt al., Immunology Today, 21(8), 391-397(2000)、及びそこに引用された参考文献を参照されたい。

【0115】

本開示は、本開示の重鎖及び軽鎖可変領域及び/又はCDRを有する抗PD-L1一本鎖可変断片(scFv)を備えるキメラ抗原受容体を提供する。

10

【0116】

キメラ抗原受容体は、(a)抗PD-L1 scFvを含有する細胞外抗原認識ドメイン、(b)膜貫通ドメイン、及び(c)細胞内シグナル伝達ドメインを備え得る。

【0117】

腫瘍溶解性ウイルスは、癌細胞に優先的に感染し、それを死滅させる。本開示の抗体又はその抗原結合部分は、腫瘍溶解性ウイルスと併せて使用され得る。代替的に、本開示の抗体又はその抗原結合部分をエンコードする腫瘍溶解性ウイルスは、ヒトの体内に導入され得る。

【0118】

20

別の態様において、本開示は、薬学的に許容される担体と共に製剤化された、本開示の抗体又はその抗原結合部分、イムノコンジュゲート、二重特異性分子、キメラ抗原受容体を保有する免疫細胞、腫瘍溶解性ウイルス、核酸分子、発現ベクター、及び/又は宿主細胞を備える医薬組成物を提供する。組成物は、任意選択で、抗腫瘍剤、抗感染症剤、又は免疫増強のための薬剤などの1又は複数の追加の薬学的に活性な成分を含有してもよい。本開示の医薬組成物は、併用療法において、例えば抗腫瘍剤、抗感染症剤、又は免疫増強のための薬剤と共に投与されてもよい。

【0119】

医薬組成物は、任意の数の賦形剤を備えてもよい。使用できる賦形剤としては、担体、表面活性剤、増粘又は乳化剤、固体結合剤、分散又は懸濁助剤、可溶化剤、着色剤、着色剤、コーティング、崩壊剤、滑沢剤、甘味剤、保存剤、等張剤、及びそれらの組み合わせが挙げられる。好適な賦形剤の選択及び使用は、その開示が参照によって本明細書に組み込まれるGennaro, ed., Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed. (Lippincott Williams & Wilkins 2003)に教示されている。

30

【0120】

医薬組成物は、好ましくは(例えば注射又は注入による)静脈内、筋肉内、皮下、非経口、脊髄又は表皮投与に好適である。投与経路に応じて、活性成分を材料でコーティングして、酸の作用及びそれを不活性化し得る他の天然の条件から保護することができる。本明細書において使用される場合、「非経口投与」という語句は、通常は注射による、経腸及び局所投与以外の投与様式を意味し、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、嚢下、くも膜下、脊髄内、硬膜外及び胸骨内注射及び注入を含むが、これらに限定されない。代替的に、本開示の抗体は、局所、表皮又は粘膜の投与経路などの非経口ではない経路を介して、例えば、鼻腔内、経口、経膈、直腸、舌下又は局所により投与することができる。

40

【0121】

医薬組成物は、滅菌水溶液又は分散剤の形態であり得る。医薬組成物は、マイクロエマルション、リポソーム、又は高い薬物濃度に好適な他の秩序構造に製剤化することもできる。

【0122】

50

単回投与形態を生成するために担体物質と組み合わせることができる活性成分の量は、処置される対象及び特定の投与様式に応じて変動し得、一般に、治療効果を生じさせる組成物の量であり得る。一般に、この量は、100パーセントのうち、約0.01%～約99%の、薬学的に許容される担体と組み合わせられる活性成分の範囲であり得る。

【0123】

最適な所望の反応（例えば治療反応）を提供するように投与計画が調整される。例えば、単回ボラスを投与する場合も、いくつかの分割された用量を経時的に投与する場合も、又は、治療状況の緊急事態による指示に応じて用量を比例的に低減又は増加させる場合もある。投与を容易にするために、及び、投与量を統一するために、単位用量形態で非経口組成物を製剤化することは特に有利である。本明細書において使用される場合、単位用量形態とは、処置される対象のための単位投与量として好適な物理的に別々の単位を指し；各単位は、必要な医薬担体と組み合わせて所望の治療効果を生じさせるために算出された活性成分の予め定められた量を含む。抗体は代替的に、徐放性製剤として投与できる。この場合、必要な投与頻度は少なくなる。

10

【0124】

抗体又はその抗原結合部分の投与に関して、投与量は、約0.0001～100mg/kg体重の範囲であり得る。例示的な治療計画は、週に1回の投与を伴う。本開示の抗PD-L1抗体に好ましい投与計画は、静脈内投与を含む。

【0125】

本開示の抗PD-L1抗体の「治療有効投与量」は好ましくは、疾患症状の重症度の低下、疾患症状がない期間の頻度及び長さの増加、又は疾患の罹患に起因する機能障害又は能力障害の予防をもたらし得る。例えば、担癌の対象を処置する場合、「治療有効投与量」は好ましくは、未処置の対象と比べて、腫瘍成長を少なくとも約20%、より好ましくは少なくとも約40%、更により好ましくは少なくとも約60%、なお更に好ましくは少なくとも約80%阻害する。治療抗体の治療有効量は、腫瘍サイズを低減できるか、又は、そうでなければ、典型的にはヒトであるか、又は別の哺乳類であり得る対象における症状を改善できる。

20

【0126】

医薬組成物は、インプラント、経皮パッチ、及びマイクロカプセル化送達システムを含む、放出制御製剤であり得る。エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、ポリ乳酸などの生分解性かつ生体適合性のポリマーを使用できる。例えば、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978を参照されたい。

30

【0127】

治療用組成物は、(1)無針皮下注射装置（例えば、米国特許第5,399,163号；同第5,383,851号；同第5,312,335号；同第5,064,413号；同第4,941,880号；同第4,790,824号；及び同第4,596,556号）；(2)マイクロ注入ポンプ（米国特許第4,487,603号）；(3)経皮装置（米国特許第4,486,194号）；(4)注入機器（米国特許第4,447,233号及び同第4,447,224号）；及び(5)浸透圧装置（米国特許第4,439,196号及び同第4,475,196号）などの医療装置を介して投与され得；これらの開示は、参照によって本明細書に組み込まれる。

40

【0128】

特定の実施形態において、本開示のモノクローナル抗体は、in vivoにおける適切な分布を確実にするように製剤化され得る。例えば、本開示の治療抗体が血液脳関門を越えることを確実にするために、それらは、特定の細胞又は臓器への選択的輸送を強化する標的化部分を追加的に含み得るリポソームにおいて製剤化され得る。例えば、米国特許第4,522,811号；同第5,374,548号；同第5,416,016号；及び同第5,399,331号；V. V. Ranade (1989) J. Clin. Phar

50

macol. 29: 685; Umezawa et al., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153: 1038; Bloeman et al., (1995) FEBS Lett. 357: 140; M. Owais et al., (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39: 180; Briscoe et al., (1995) Am. J. Physiol. 1233: 134; Schreier et al., (1994) J. Biol. Chem. 269: 9090; Keinänen and Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346: 123; 及び Killion and Fidler (1994) Immunomethods 4: 273を参照されたい。

【0129】

本開示の医薬組成物は、例えば、癌及び感染性疾患の処置及び/又は予防を伴う、多数の *in vitro* 及び *in vivo* 有用性を有する。本開示の医薬組成物は、腫瘍成長を阻害するか又は病原体を減少又は除去するためにヒト対象に投与され得る。

【0130】

本開示の抗PD-L1抗体の、癌細胞の増殖及び生存を阻害する能力を考慮すると、本開示は、対象における腫瘍細胞の成長を阻害するための方法であって、対象に、対象において腫瘍の成長を阻害するような本開示の医薬組成物を投与する段階を備える、方法を提供する。本開示の抗体によって処置され得る腫瘍の非限定的な例としては、原発性及び/又は転移性の黒色腫、非小細胞肺癌、腎細胞癌腫、ホジキンリンパ腫、膀胱癌、頭頸部癌、神経内分泌腫瘍、マンツル細胞リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、及び濾胞性リンパ腫が挙げられるが、これらに限定されない。追加的に、難治性又は再発性悪性腫瘍は、本開示の医薬組成物を使用して阻害され得る。

【0131】

別の態様において、本開示の医薬組成物は病原体を減少又は除去し得るため、本開示は、感染性疾患の処置を、それを必要とする対象において行うための方法であって、前記対象に、本開示の医薬組成物を投与する段階を備える、方法を提供する。感染性疾患は、ウイルス、細菌、真菌、又はマイコプラズマ感染症によって引き起こされ得る。前記感染性疾患は、慢性B型肝炎ウイルス(HBV)、C型肝炎ウイルス(HCV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、又はサル免疫不全ウイルス(SIV)感染症であり得る。

【0132】

別の態様において、本開示は、本開示の医薬組成物が、対象における腫瘍成長を阻害するのに効果的な1又は複数の追加の抗体又は非抗体剤と同時投与される併用療法の方法を提供する。一実施形態において、本開示は、対象における腫瘍成長を阻害するための方法であって、対象に、本開示の医薬組成物を、抗VISTA抗体、抗LAG-3抗体、抗PD-1抗体及び/又は抗CTLA-4抗体などの1又は複数の追加の抗体と共に投与する段階を備える、方法を提供する。本開示の医薬組成物は、細胞に毒性である化学療法剤と組み合わせて使用されてもよい。抗PD-L1抗体と組み合わせることができる他の療法としては、インターロイキン-2(IL-2)投与、放射線照射、外科的処置、又はホルモン除去が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、対象はヒトである。

【0133】

本開示の医薬組成物は、ウイルス、細菌、真菌、又はマイコプラズマなどの対象における病原体を効果的に減少又は除去するために、1又は複数の他の抗体又は非抗体剤と組み合わせて使用されてもよい。例えば、本開示の医薬組成物は、抗ウイルス剤、抗菌剤、抗真菌剤、及び抗マイコプラズマ剤を含むがこれらに限定されない抗感染症剤と共に使用されてもよい。

【0134】

本明細書において説明される治療剤の組み合わせは、薬学的に許容される担体における単一の組成物として同時に投与され得るか、又は、薬学的に許容される担体における各薬剤と共に別個の組成物として同時に投与され得る。別の実施形態において、治療剤の組み

10

20

30

40

50

合わせは、順次に投与され得る。

【0135】

更に、併用療法の1より多くの用量が順次に投与される場合、順次投与の順序は、投与の各時点において、逆になり得るか、又は、同じ順序に維持され得、順次投与は、同時投与、又は、それらの任意の組み合わせと組み合わせられ得る。

【0136】

本開示は以下の実施例において更に示されるが、これは、更なる限定として解釈されるべきでない。本出願全体において引用される、すべての図面及びすべての参考文献、Genbank配列、特許及び公開特許出願の内容は、参照によって本明細書に明示的に組み込まれる。

[実施例]

[実施例1 . ヒト、サル又はマウスPD - L1を安定的に発現するHEK293A細胞株の構築]

【0137】

ヒト、サル又はマウスPD - L1を安定的に過剰発現する細胞株を、HEK293A細胞(Cobioer, NJ, China)を使用して構築した。簡潔に説明すると、ヒト、サル及びマウスPD - L1タンパク質それぞれをエンコードするcDNA配列(それぞれ、配列番号35、36及び37に記載のアミノ酸配列)を合成し、次にpLV - EGFP(2A) - Puroベクターにサブクローニングした。Lipofectamine 3000キット(Thermo Fisher Scientific, US)における指示書に従ったpLV - EGFP(2A) - Puro - PD - L1、psPAX及びpMD2 . Gプラスミドの共トランスフェクションによって、HEK - 293T細胞(Cobioer, NJ, China)においてレンチウイルスを生成した。共トランスフェクションの3日後、レンチウイルスを細胞培養培地(10% FBS(カタログ番号: FND500, Excell))を含有するDMEM培地(カタログ番号: SH30022 . 01, Gibco)から回収した。最終的に、HEK293A細胞にレンチウイルスを感染させて、ヒト、サル及びマウスPD - L1それぞれを安定的に発現するHEK293A細胞株、すなわちHEK293A/ヒトPD - L1細胞、HEK293A/サルPD - L1細胞及びHEK293A/マウスPD - L1細胞を生成した。次に、トランスフェクトしたHEK293A細胞を、0 . 2 µg/mlピューロマイシン(カタログ番号: A11138 - 03, Gibco)を含有する培地(DMEM + 10% FBS)中で7日間培養した。ヒトPD - L1及びカニクイザルPD - L1の発現を、市販の抗PD - L1抗体(PE抗ヒトPD - L1抗体、カタログ番号: 393607, Biolegend, US)を使用するFACSによって確認した。同様に、マウスPD - L1の発現を、市販の抗マウスPD - L1抗体(PE抗マウスPD - L1抗体、カタログ番号: 124307, Biolegend, US)を使用するFACSによって確認した。

[実施例2 . ヒトPD - L1に対するモノクローナルマウス抗体を産生するハイブリドーマ細胞株の生成]

【0138】

マウス抗ヒトPD - L1モノクローナル抗体(mAb)を、以下のように、いくらかの変更を加えた従来のハイブリドーマ融合技術を使用して生成した。

[免疫化]

【0139】

10匹のBALB/cマウス(Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd, Beijing, China)に組換えヒトPD - L1(ECD) - hFc(カタログ番号: 10084 - H02H, Sino Biological, CN)及び組換えカニクイザルPD - L1(ECD) - hFc(カタログ番号: 90251 - C02H, Sino Biological, CN)を、以下の表2のスキームに従って注射した。ヒトPD - L1(ECD) - hFc及びカニクイザルPD - L1(ECD) - hFcは、等容量の完全フロイントアジュ

10

20

30

40

50

バント (カタログ番号: F 5 8 8 1 - 1 0 * 1 0 M L、S I G M A、U S)、不完全フロイントアジュバント (カタログ番号: F 5 5 0 6 - 6 * 1 0 M L、S I G M A、U S)、又は P B S を用いて、超音波処理によって乳化した。

表 2 . 免疫化スキーム

【表 2】

	初回免疫	1 回目の追加免疫	2 回目の追加免疫	3 回目の追加免疫	最終追加免疫
日数	0	14	28	42	56
免疫原及び用量	ヒト PD-L1 (ECD)-hFc (50µg/マウス)	ヒト PD-L1 (ECD)-hFc (50µg/マウス)	カニクイザル PD-L1 (ECD)-hFc (50µg/マウス)	ヒト PD-L1 (ECD)-hFc (50µg/マウス)	カニクイザル PD-L1 (ECD)-hFc (25µg/マウス) + ヒト PD-L1 (ECD)-hFc (25µg/マウス)
アジュバント	完全フロイント	不完全フロイント	不完全フロイント	不完全フロイント	PBS
免疫化	腹腔内注射 (i.p.)	i.p.	i.p.	i.p.	静脈内注射 (i.v.)

10

【 0 1 4 0 】

20

各追加免疫の1週間後、組換えヒトPD-L1 (ECD) - hFc (カタログ番号: 1 0 0 8 4 - H 0 8 H、S i n o B i o l o g i c a l、C N) 及びカニクイザルPD-L1 (ECD) - hFc (カタログ番号: 9 0 2 5 1 - C 0 2 H、S i n o B i o l o g i c a l、C N) を使用するELISAによる力価測定のために、各マウスから50µlのマウス血清を採取した。力価測定は、実施例1において調製した、ヒトPD-L1、カニクイザルPD-L1及びマウスPD-L1それぞれを過剰発現するHEK293A細胞を使用するFACSによっても行った。

【 0 1 4 1 】

最終追加免疫後のELISA及びFACSの結果に基づいて、10匹のマウスすべてをハイブリドーマ細胞株生成のために使用した。

30

[ハイブリドーマ細胞株の生成]

【 0 1 4 2 】

ハイブリドーマ細胞株を、以下のように、わずかな変更を加えた従来のハイブリドーマ融合技術を使用して生成した。

【 0 1 4 3 】

最終追加免疫の4日後、マウスを殺し、脾臓を採取して、PBSにおいて単細胞懸濁液として調製した。脾細胞をDMEM培地 (カタログ番号: S H 3 0 2 4 3 . 0 1 B、H y c l o n e、U S) で3回洗浄した。対数期の生存骨髄腫細胞SP2/0 (CRL-1581、ATCC、US) をマウス脾細胞と1:4の比で混合した。次に、細胞を2回洗浄し、その後PEG (カタログ番号: P 7 1 8 1、S i g m a、U S) を用いて細胞融合を実行した。融合後の細胞をDMEM培地で3回洗浄し、10% FBS及び1X HAT (カタログ番号: H 0 2 6 2、S i g m a) を補充した細胞成長培地 (RPMI培地1640 (カタログ番号: C 2 2 4 0 0 5 0 0 C P、G i b c o)) に懸濁した。細胞懸濁液を96ウェル細胞培養プレートに、1ウェル当たり200µl (約5×10⁴個の細胞を含有) でプレATINGし、37℃の湿潤5%CO₂インキュベーターにおいて7日間インキュベートした。次に、成長培地を、10% FBS及び1X HATを補充した新鮮なものと交換した。2~3日後、ELISA及びFACSによるハイブリドーマ細胞スクリーニングのために細胞培養上清を採取した。

40

[ELISAによるハイブリドーマ細胞株のスクリーニング]

【 0 1 4 4 】

50

ヒトPD-L1に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンをスクリーニングするために、ヒトPD-L1 (ECD) - his (カタログ番号: 10084-H08H, Sino Biological, CN) を使用してハイスループットELISA結合アッセイを実行した。ヒトPD-L1に結合する抗体を産生したハイブリドーマクローンを、カニクイザルPD-L1 (ECD) - hFc (カタログ番号: 90251-C02H, Sino Biological, CN) を使用して、カニクイザルPD-L1と交差反応する能力について更に試験した。

【0145】

ELISAアッセイにより、249のハイブリドーマクローンが、ヒトPD-L1及びサルPD-L1の両方に対して特異的結合を有すると同定された。

[FACSによるハイブリドーマ細胞株のスクリーニング]

【0146】

249のハイブリドーマクローンを、実施例1において調製した、HEK293A/ヒトPD-L1細胞、HEK293A/サルPD-L1細胞及びHEK293A/マウスPD-L1細胞を使用して、HEK293A細胞に発現するヒト、カニクイザル及びマウスPD-L1に対する結合能について更に試験した。

【0147】

FACSスクリーニングに基づいて、HEK293A/ヒトPD-L1細胞及びHEK293A/サルPD-L1細胞の両方に対して高い結合能を示した88の陽性クローンが取得された。

[抗PD-L1抗体を産生するハイブリドーマクローンのサブクロニング]

【0148】

88のハイブリドーマクローンを2回のサブクロニングに供した。サブクロニング中、各親クローンからの複数のサブクローン ($n > 3$) を選択し、上に記載のELISA及びFACSアッセイによって試験した。このプロセスを通じて選択されたサブクローンを、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞として定義した。最終的に、ヒトPD-L1及びサルPD-L1の両方に対して高い結合能を有する79のサブクローン (各親クローンから1つのサブクローン) が取得された。

[実施例3. マウス抗PD-L1モノクローナル抗体の精製]

【0149】

実施例2において取得された79のクローンから、ヒト及びサルPD-L1に対して比較的高い結合能を有する10のクローンを更に特徴付けた。初めに、10のクローンからのモノクローナルマウス抗体を精製した。簡潔に説明すると、各サブクローンのハイブリドーマ細胞を、1% HT補充物質 (カタログ番号: 11067-030, Gibco) を含有する100mlの新鮮無血清培地 (カタログ番号: 12045-076, Gibco, US) を各々有するT175細胞培養フラスコにおいて成長させた。5% CO₂、37のインキュベーターに細胞培養液を10日間置いた。細胞培養液を採取し、5分間3500rpmの遠心分離に供し、その後、0.22µmカプセルを使用して濾過して細胞残屑を除去した。次に、モノクローナル抗体を、予め平衡化したプロテインAアフィニティークラム (カタログ番号: 17040501, GE, US) を使用して精製し、溶出緩衝液 (20mMクエン酸、pH3.0~pH3.5) で溶出した。次に、抗体をPBS緩衝液 (pH7.0) で維持し、NanoDrop装置を使用して、その濃度を決定した。

【0150】

各精製抗体のアイソタイプを、カップ及びラムダ-マウスを有する迅速アイソタイプングキット (カタログ番号: 26179, Thermal, US) 及びマウスモノクローナル抗体アイソタイプング試薬 (カタログ番号: IS02-1KT, Sigma, US) を製造元のマニュアルに従って使用することによって決定した。

【0151】

3C2及び56E5を含む大半のクローンはIgG1/カップ抗体を産生したが、残りのものはIgG2a/カップ又はIgG2b/カップ抗体を産生した。クローン3C2及

10

20

30

40

50

び56E5の発現力価は、それぞれ6.3mg/L及び7.8mg/Lであった。

[実施例4. マウス抗PD-L1モノクローナル抗体はHEK293A細胞に発現するヒト及びサルPD-L1に結合した]

【0152】

抗PD-L1抗体がHEK293A細胞に発現するヒト、サル又はマウスPD-L1に結合するか否かを決定するために、細胞ベースの結合アッセイを、実施例1において生成した、ヒト、サル及びマウスPD-L1それぞれを安定的に過剰発現するHEK293A細胞を使用するFACSによって実行した。簡潔に説明すると、100µlの培養培地中10⁵個のHEK293A細胞を96ウェルプレートの各ウェルに播種し、そこに50µlの段階希釈した抗PD-L1抗体を添加した。4で1時間インキュベートした後に、プレートをPBSTで3回洗浄した。次に、500倍に希釈したAPC結合ヤギ抗マウスIgG(カタログ番号: 405308、BioLegend、US)をプレートに添加した。4での1時間のインキュベーションの後に、プレートをPBSで3回洗浄し、次に、FACSマシン(BD)を使用して細胞蛍光をモニタリングした。

10

【0153】

すべてのマウス抗PD-L1モノクローナル抗体は、ヒトPD-L1及びサルPD-L1の両方に対しては高い結合能を示したが、マウスPD-L1とは結合しなかった。代表的な抗体のEC₅₀値を以下の表3に要約した。

表3. マウス抗PD-L1抗体のヒト、サル及びマウスPD-L1に対する結合能

【表3】

20

mAb	FACS (EC ₅₀ : M)		
	HEK293A/ヒト PD-L1	HEK293A/サル PD-L1	HEK293A/マウス PD-L1
3C2	1.75E-9	1.25E-9	結合せず
56E5	5.72E-10	4.99E-10	結合せず

[実施例5. エピトープマッピング]

【0154】

エピトープマッピングのために、競合ELISAアッセイを実行した。簡潔に説明すると、96ウェルプレートを、1ウェル当たり100µlの0.5µg/mlヒトPD-L1(ECD)-His(カタログ番号: 10084-H08H、Sino Biological、CN)を用いて、4で一晩コーティングした。200µlのブロッキング緩衝液(1%BSA、1%ヤギ血清及び0.05%Tween(登録商標)20を含有するPBS)を用いて、ウェルを室温で2時間ブロッキングした。WO2020226986に開示されているアミノ酸配列をヒトIgG1(N297A)/カッパ定常領域と共に使用して調製したアテゾリズマブ、WO2013079174A1に開示されているアミノ酸配列をヒトIgG1/カッパ定常領域と共に使用して調製したアベルマブ、US20190276543A1に開示されているアミノ酸配列をヒトIgG1(L234F、L235E、P331S)/カッパ定常領域と共に使用して調製したデュルバルマブ、及び抗Hel抗体(カタログ番号: LT12031、LifeTein、US)をそれぞれ5µg/mlに希釈し、1ウェル当たり100µlをプレートに添加した。プレートを室温で1時間インキュベートし、PBSTで3回洗浄し、本開示の1µg/ml抗体100µlを添加し、室温で1時間インキュベートした。ELISAプレートをPBSTで3回洗浄し、1:20000に希釈した抗マウスFc-HRP(カタログ番号: A9309-1MC、Sigma、US)を添加し、室温で1時間インキュベートした。プレートをPBSTによって3回洗浄し、新たに調製したUltra-TMB(カタログ番号: TMB-S-003、Huzhou Yingchuang、CN)を用いて、室温で5分間発色させた。450nmの吸光度をマイクロプレートリーダー(Thermo Multiscan

30

40

50

FC)において測定した。

【0155】

クローン3C2からのものを含む9つのマウス抗体は、エピトープ結合に関してアテゾリズマブ、アベルマブ又はデュルバルマブと競合せず、それらが参照抗体と比較して異なるエピトープに結合したことを示した。クローン56E5からの抗体は、エピトープ結合に関して3つの参照抗体すべてと競合し、56E5抗体が、参照が結合したのと同じか又は同様のエピトープに結合したことを示した。

[実施例6.マウス抗PD-L1抗体はPD-1-PD-L1相互作用を阻害した]

【0156】

報告されているように、PD-1はPD-L1の受容体である。PD-1-PD-L1相互作用に対する抗体の遮断能を測定するために、細胞ベースの遮断アッセイを、実施例1において生成した、ヒトPD-L1を安定的に過剰発現するHEK293A細胞を使用するFACSによって実行した。簡潔に説明すると、100 μ lの培養培地中10⁵個のHEK293A/ヒトPD-L1細胞を96ウェルプレートの各ウェルに播種し、そこに50 μ lの段階希釈した抗PD-L1抗体を添加した。4で1時間インキュベートした後に、プレートをPBSTで3回洗浄した。次に、200 μ g/mlのPD1-hFcタンパク質(カタログ番号:10377-H02H、Sino Biological、CN)を1ウェル当たり100 μ lでプレートに添加した。4での1時間のインキュベーションの後に、プレートをPBSTで3回洗浄し、500倍に希釈したPE結合ヤギ抗ヒトIgG(カタログ番号:PAI-86078、ThermoFisher、US)を添加した。4での1時間のインキュベーションの後に、プレートをPBSTで3回洗浄し、次に、FACSマシン(BD)を使用して細胞蛍光をモニタリングした。

【0157】

データは、2つの抗体のみがPD-L1-PD-1相互作用を遮断できず、3C2及び56E5を含む残りの8つがPD-L1-PD-1相互作用を遮断したことを示した。代表的な抗体のEC₅₀値を以下の表4に要約した。

表4. PD-L1-PD-1相互作用に対するマウス抗PD-L1抗体の遮断能

【表4】

mAb	PD-L1-PD-1 遮断アッセイ EC ₅₀ (M)
アテゾリズマブ	1.13E-11
3C2	1.47E-11
56E5	1.00E-11

[実施例7.マウス抗PD-L1抗体はT細胞活性化を促進した]

【0158】

マウス抗PD-L1抗体のAPC媒介T細胞活性化に対する効果を、混合リンパ球反応(mixed lymphocyte reaction:MLR)アッセイにおいて研究した。

【0159】

簡潔に説明すると、PBMCを1名の健康なヒトドナーの血液試料から密度勾配遠心分離によって採取し、次にRPMI1640培地に再懸濁した。PBMCを37のインキュベーターで2時間培養し、容器の壁に付着した細胞を単離単球として採取した。単球を、10%FBS、100ng/ml組換えヒトGM-CSF(カタログ番号:7954-GM、R&D、US)及び100ng/ml組換えヒトIL-4(カタログ番号:6507-IL、R&D、US)を補充したRPMI1640培地において培養した。3日後、培地の半分を新鮮なものと交換した。培養6日目に、培養培地を、100ng/ml組換えヒトGM-CSF、100ng/ml組換えヒトIL-4、10ng/ml rhTN

F - (カタログ番号: 210-TA-100、R&D、US)、1000 U/ml rhIL-6 (カタログ番号: 7270-IL-025、R&D、US)、1 µg/ml PGE2 (カタログ番号: 363-24-6、TOCRIS、US) 及び 10 ng/ml IL-1 (カタログ番号: 210-LB-025、R&D、US) を含有する新鮮培地と交換した。細胞を更に2日間培養した。次に、別の健康なヒトドナーの血液試料からPBMCを密度勾配遠心分離によって採取し、次にRPMI 1640培地に再懸濁した。Invitrogen Dynabeads UntouchedヒトCD4⁺T細胞単離キット(カタログ番号: 11346D、Thermal Fisher Scientific、US)を製造元の指示に従って使用して、CD4⁺T細胞をPBMCから単離した。第1のドナーからの樹状細胞及び第2のドナーからのCD4⁺T細胞を、96ウェルU底プレートに、1ウェル当たり合計150 µlの培養培地中、それぞれ2.5 × 10⁴細胞/ウェル及び5 × 10⁴細胞/ウェルで播種した。プレートに50 µlの抗PD-L1抗体(0.1 ~ 10 µg/ml)又は抗Hel対照(カタログ番号: LT12031、LifeTein、US)を添加し、更に72時間インキュベートした。IFN-濃度をELISAキット(カタログ番号: SIF50、R&D、US)によって、製造元のプロトコルに従って決定した。アッセイを3連で行った。

10

【0160】

図1の(A)に示すように、最も高いIFN-レベルは、3C2及び56E5抗体を用いて処理したウェルにおいて検出された。これらの抗体は、抗Helアイソタイプ対照と比較して、T細胞によるIFN-分泌を用量依存的に増加させた(図1の(B))。

20

[実施例8. キメラ抗PD-L1抗体の発現及び精製]

【0161】

3C2及び56E5抗体を更に研究した。この2つの抗体の重鎖/軽鎖可変領域配列を、文献(Juste et al., (2006), Anal Biochem. 349(1): 159-61)に記載されているように、1組のプライマーを用いる標準的なPCR法を使用してハイブリドーマ細胞からクローニングして、配列決定した。配列を表1及び表8に要約した。可変領域配列とヒトIgG1(N297A)/カッパ定常領域配列(それぞれ配列番号33及び34に記載の重鎖定常領域及び軽鎖定常領域のアミノ酸配列)とをエンコードする配列をpCDNA3.1(Invitrogen、Carlsbad、US)のXhoI/BamHI制限部位に挿入することによって、発現ベクターを構築した。

30

【0162】

発現ベクターをHEK-293F細胞(Cobioer、NJ、CN)にPEIトランスフェクトした。具体的には、HEK-293F細胞をFree Style(商標)293発現培地(カタログ番号: 12338-018、Gibco)において培養し、1:3のDNA:PEI比のポリエチレンイミン(polyethyleneimine: PEI)、細胞培地1ミリリットル当たり1.5 µgのDNAを使用して発現ベクターをトランスフェクトした。トランスフェクトしたHEK-293F細胞を、120RPMで振とうしながら、5%CO₂下で、37℃でインキュベーターにおいて培養した。10~12日後、上清を回収し、モノクローナル抗体を実施例3に記載したように精製した。

40

[実施例9. キメラ抗PD-L1モノクローナル抗体はヒト及びサルPD-L1に結合した]

【0163】

キメラ抗PD-L1抗体を、ヒトPD-L1、サルPD-L1、及びマウスPD-L1に結合する能力について更に特徴付けた。簡潔に説明すると、ELISAプレートを、1ウェル当たり100 µlの500 ng/mlヒトPD-L1(ECD)-his(カタログ番号: 10084-H08H、Sino Biological、CN)を用いて、4℃で一晩コーティングした。200 µlのプロッキング緩衝液(1%BSA、1%ヤギ血清及び0.05%Tween(登録商標)20を含有するPBS)を用いて、ウェルを室温で2時間プロッキングし、100 µlの段階希釈した抗PD-L1抗体(40 µg/m

50

1 から出発) を添加し、室温で1時間インキュベートした。プレートをP B S T (P B S + 0 . 0 5 % T w e e n (登録商標) 2 0) で3回洗浄し、5 0 0 0 倍に希釈したヤギ抗ヒト I g G - H R P (カタログ番号 : 3 1 4 1 0 、 T h e r m a l 、 U S) を添加し、室温で1時間インキュベートした。プレートを、新たに調製したU l t r a - T M B (カタログ番号 : 5 5 5 2 1 4 、 B D 、 U S) を用いて、室温で5分間発色させた。4 5 0 n m の吸光度をS p e c t r a M a x (登録商標) i 3 X リーダー (M o l e c u l a r D e v i c e s 、 U S) において読み取った。

【 0 1 6 4 】

抗 P D - L 1 m A b のサル又はマウス P D - L 1 に対する種交差反応性を、直接 E L I S A によって更に評価した。簡潔に説明すると、9 6 ウェル E L I S A プレートを、1 ウェル当たり 1 0 0 μ l の 5 0 0 n g / m l サル P D - L 1 (E C D) - h i s (カタログ番号 : 9 0 2 5 1 - C 0 8 H 、 S i n o B i o l o g i c a l 、 C N) 又はマウス P D - L 1 (E C D) - h i s (カタログ番号 : 5 0 0 1 0 - M 0 8 H 、 S i n o B i o l o g i c a l 、 C N) を用いてコーティングし、次に 1 0 0 μ l の段階希釈した抗 P D - L 1 抗体 (4 0 μ g / m l から出発) を添加し、インキュベートした。次に、プレートに H R P とコンジュゲートしたヤギ抗ヒト I g G (カタログ番号 : 3 1 4 1 0 、 T h e r m a l 、 U S) を添加し、室温で1時間インキュベートした。プレートを、新たに調製したU l t r a - T M B (カタログ番号 : 5 5 5 2 1 4 、 B D 、 U S) を用いて、室温で5分間発色させ、4 5 0 n m の吸光度をS p e c t r a M a x (登録商標) i 3 X リーダー (M o l e c u l a r D e v i c e s 、 U S) において読み取った。アテゾリズマブを参照抗体として使用した。

【 0 1 6 5 】

結合能試験における代表的な抗体の E C ₅₀ 値を表 5 に要約した。データは、すべてのキメラ抗体がヒト及びサル P D - L 1 に対しては高い結合能を有したが、マウス P D - L 1 とは結合しなかったことを示した。キメラ 3 C 2 及び 5 6 E 5 抗体の結合能は、それらの親抗体のものと同等であり、アテゾリズマブのものよりも高かった。

表 5 . キメラ抗 P D L 1 m A b のヒト、サル及びマウス P D - L 1 に対する結合能

【 表 5 】

mAb	ELISA (EC ₅₀ : M)		
	ヒト PD-L1(ECD)-his	サル PD-L1 (ECD)-his	マウス PD-L1-his
3C2	4.56 E-11	1.72 E-10	結合せず
56E5	3.48 E-10	2.05 E-9	結合せず
アテゾリズマブ	8.79 E-11	6.28 E-9	1.02 E-9

【 0 1 6 6 】

抗体を、実施例 4 のプロトコルに従って、実施例 1 において生成した、H E K 2 9 3 A / ヒト P D - L 1 細胞、H E K 2 9 3 A / サル P D - L 1 細胞及び H E K 2 9 3 A / マウス P D - L 1 細胞に対する結合能についても試験した。試験結果を図 2 に示した。

【 0 1 6 7 】

図 2 に示すように、キメラ抗体は、ヒト P D - L 1 (図 2 の (A)) 及びサル P D - L 1 (図 2 の (B)) の両方に対しては高い結合能を有したが、マウス P D - L 1 (図 2 の (C)) には結合しなかった。

[実施例 1 0 . キメラ抗 P D - L 1 モノクローナル抗体は P D - L 1 - P D - 1 相互作用を阻害した]

【 0 1 6 8 】

キメラ抗 P D - L 1 抗体を、実施例 6 のプロトコルに従って、実施例 1 において生成した H E K 2 9 3 A / ヒト P D - L 1 細胞を使用して、P D - 1 - P D - L 1 相互作用に対

する遮断能力について更に特徴付けた。試験結果を図3に示した。

【0169】

図3に基づくと、キメラ抗体はPD1 - PD - L1相互作用を明らかに遮断し、キメラ56E5が最も良好な遮断効果を示し、これはアテゾリズマブのものよりも良好であった。

[実施例11.キメラ抗PD - L1モノクローナル抗体はT細胞活性化を促進した]

【0170】

これらのキメラ抗体を、実施例7のプロトコルに従って、T細胞機能アッセイにおいて、T細胞応答を刺激する能力について更に試験した。市販のキット(カタログ番号:ST A00C、R&D、US)を製造元の指示に従って使用して、IFN - レベルを決定した。

10

【0171】

図4に示すように、試験したすべてのキメラ抗体はT細胞活性を促進し、IFN - 分泌を増加させた。キメラ56E5抗体は、低用量、例えば0.01µg/mLにおいて、T細胞活性化に関してアテゾリズマブよりも強力であった。キメラ3C2抗体のT細胞活性化における能力は、すべての試験用量においてアテゾリズマブよりも高かった。

[実施例12.抗PD - L1抗体のヒト化]

【0172】

上のアッセイに基づいて、3C2及び56E5をヒト化し、更に検討した。マウス抗体のヒト化は、以下に詳細に記載されるような、十分に確立されたCDR移植方法(その全体が参照によって本明細書に組み込まれる米国特許第5,225,539号)を使用して実行した。

20

【0173】

マウス抗体3C2及び56E5のヒト化のためのアクセプターフレームワークを選択するために、3C2及び56E5の軽鎖及び重鎖可変領域配列を、NCBIウェブサイト(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>)において、ヒト免疫グロブリン遺伝子データベースに対してBLAST検索した。3C2及び56E5に対する相同性が最も高いヒト生殖系列IGHV及びIGVKをヒト化のためのアクセプターとして選択した。3C2について、選択したヒト重鎖アクセプターはIGHV1-46*01であり、選択したヒト軽鎖アクセプターはIGKV1-33*01であった。56E5について、選択したヒト重鎖アクセプターはIGHV4-31*02であり、選択したヒト軽鎖アクセプターはIGKV4-1*01であった。

30

【0174】

CDRループ構造の支持において重要な役割を果たし得る重要なフレームワーク残基を同定し、したがってヒト化抗体における復帰変異を設計するために、3C2及び56E5の可変ドメインについて3次元構造をシミュレートした。

【0175】

上に記載した構造モデリングに基づいて、3C2の重鎖について10の潜在的な復帰変異(M48I、M70L、R72V、R87T、R38K、A40R、T28S、Y95F、R67K、V68A)、及び軽鎖について7の復帰変異(K45R、Y49S、F71Y、T22S、K42N、T85V、F73L)を同定した。56E5では、重鎖について10の潜在的な復帰変異(S30T、W47Y、I48M、S70T、R87T、K43N、G44K、V71R、V67I、T68S)を同定し、軽鎖について4の復帰変異(I21M、R18K、A19V、V89L)を同定した。

40

【0176】

3C2について、5つのヒト化重鎖可変領域及び4つのヒト化軽鎖可変領域を設計し、合計で13のヒト化抗体を取得した。56E5について、4つのヒト化重鎖可変領域及び3つのヒト化軽鎖可変領域を設計し、合計で12のヒト化抗体を取得した。これらのヒト化抗体の配列を表1及び表8に要約した。

表6. 復帰変異

50

【表 6】

重鎖	復帰変異	軽鎖	復帰変異
3C2VH2	M48I, M70L, R72V, R87T	3C2VL2	K45R, Y49S, F71Y
3C2VH3	M48I, M70L, R72V, R87T, R38K, A40R	3C2VL3	K45R, Y49S, F71Y, T22S, K42N
3C2VH4	M48I, M70L, R72V, R87T, R38K, A40R, T28S, Y95F	3C2VL4	K45R, Y49S, F71Y, T22S, K42N, T85V
3C2VH5	M48I, M70L, R72V, R87T, R38K, A40R, T28S, Y95F, R67K, V68A	3C2VL5	Y49S, F73L
3C2VH6	R72V, M48I		
56E5VH2	S30T, W47Y, I48M, S70T, R87T	56E5VL2	I21M
56E5VH3	S30T, W47Y, I48M, S70T, R87T, K43N, G44K	56E5VL3	I21M, R18K, A19V
56E5VH4	S30T, W47Y, I48M, S70T, R87T, K43N, G44K, V71R	56E5VL4	I21M, R18K, A19V, V89L
56E5VH5	S30T, W47Y, I48M, S70T, R87T, K43N, G44K, V71R, V67I, T68S		

10

【 0 1 7 7 】

重鎖可変領域と N 2 9 7 A 変異を有するヒト I g G 1 定常領域とをエンコードする配列、及び軽鎖可変領域とヒトカッパ定常領域とをエンコードする配列（それぞれ配列番号 3 3 及び 3 4 に記載の重鎖定常領域及び軽鎖定常領域のアミノ酸配列）を化学合成し、次に E c o R I / X h o I 及び C l a I / H i n d I I I 制限部位をそれぞれ使用して、G S 発現ベクター（I n v i t r o g e n、U S A）にサブクローニングした。すべての発現コンストラクトを D N A 配列決定によって確認した。実施例 8 に記載のプロトコルに従って、E X P i C H O 発現系（I n v i t r o g e n、U S A）に重鎖及び軽鎖発現ベクターをトランスフェクトし、25 のヒト化抗 P D - L 1 抗体を一過性に発現させた。ヒト化抗体を実施例 3 に記載したように精製した。

20

[実施例 1 3 . ヒト化抗 P D - L 1 抗体の結合能 / 親和性]

【 0 1 7 8 】

ヒト化抗 P D - L 1 抗体を、実施例 4 に記載のプロトコルに従って、H E K 2 9 3 A / ヒト P D - L 1 細胞、H E K 2 9 3 A / サル P D - L 1 細胞及び H E K 2 9 3 A / マウス P D - L 1 細胞に対する結合能力について特徴付けた。結果を図 5 及び図 6 に示した。

30

【 0 1 7 9 】

これらの抗体を、S P R アッセイにおいて、B I A c o r e（商標）8 K 装置（G E L i f e S c i e n c e s）を用いてヒト及びサル P D - L 1 に対する結合親和性についても試験した。簡潔に説明すると、1 0 0 ~ 2 0 0 応答単位（r e s p o n s e u n i t : R U）のヒト P D - L 1（E C D）- h i s タンパク質（カタログ番号：1 0 0 8 4 - H 0 8 H、S i n o B i o l o g i c a l、C N）又はサル P D - L 1（E C D）- h i s タンパク質（カタログ番号：9 0 2 5 1 - C 0 8 H、S i n o B i o l o g i c a l、C N）を C M 5 バイオセンサチップ（カタログ番号：B R - 1 0 0 5 - 3 0、G E L i f e S c i e n c e s、U S）に結合し、未反応基を 1 M エタノールアミンでブロックした。0 . 3 μ M ~ 1 0 μ M の範囲の濃度の段階希釈した抗体を、S P R 用緩衝液（H B S - E P 緩衝液、p H 7 . 4、カタログ番号：B R - 1 0 0 6 - 6 9、G E L i f e S c i e n c e s、U S）に 3 0 μ L / 分で注入した。結合親和性を、ブランク対照の R U を減算して算出した。会合速度（k_a）及び解離速度（k_d）を、1 対 1 ラングミュア結合モデル（B I A E v a l u a t i o n S o f t w a r e、G E L i f e S c i e n c e s）を使用して算出し、平衡解離定数 K_D を k_d / k_a 比として算出した。結果を表 7 に示した。

40

【 0 1 8 0 】

図 5 及び図 6 に示すように、ヒト化抗 P D L 1 抗体は、ヒト P D - L 1 及びサル P D -

50

L1の両方に対して高い結合能力を有し、これは、それらのそれぞれのキメラ抗体のものと同等であった。

【0181】

表7に基づくと、ヒト化3C2及び56E5抗体は、ヒトPD-L1に対して、アテゾリズマブと比較して同等か又はより高い結合親和性を有した。

表7. ヒト化抗PD-L1抗体のヒト/サルPD-L1に対する結合親和性

【表7】

mAb	ヒト PD-L1			サル PD-L1		
	K_a	K_d	K_D	K_a	K_d	K_D
3C2VH4VL4	3.16e+05	9.69e-05	3.07e-10	3.16e+05	7.75e-05	2.45e-10
3C2VH6VL5	2.77e+05	1.20e-04	4.33e-10	4.16e+05	1.53e-04	3.69e-10
56E5VH5VL3	1.04e+06	3.19e-05	3.08e-11	2.49e+05	1.10e-04	4.41e-10
56E5VH5VL4	2.07e+05	1.07e-04	5.18e-10	8.16e+05	6.58e-06	8.07e-12
アテゾリズマブ	4.77e+05	5.88e-05	1.23e-10	1.92e+05	1.25e-04	6.50e-10

【実施例14. ヒト化抗PD-L1抗体はT細胞を活性化した】

【0182】

これらの抗体を、実施例7のプロトコルに従って、MLRアッセイにおいて、T細胞応答を刺激する能力について更に試験した。市販のキット(カタログ番号: STA00C、R&D、US)を製造元の指示に従って使用して、IFN- γ レベルを決定した。

【0183】

図7に示すように、すべてのヒト化抗体はT細胞活性化を用量依存的に促進し、IFN- γ 分泌を増加させた。抗体56E5VH5VL4及び3C2VH4VL4は、T細胞活性化における最も高い能力を示した。

【実施例15. エピトープマッピング】

【0184】

エピトープマッピングのために、競合SPRアッセイを実行した。簡潔に説明すると、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のヒトPD-L1(ECD)-hisタンパク質(カタログ番号: 10084-H08H、Sino Biological、CN)をCM5バイオセンサチップ(カタログ番号: BR-1005-30、GE Life Sciences、US)に結合し、未反応基を1Mエタノールアミンでブロッキングした。次に、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の56E5VH5VL4又は3C2VH4VL4抗体を、SPR用緩衝液(HBS-EP緩衝液、pH7.4、カタログ番号: BR-1006-69、GE Life Sciences、US)に30 $\mu\text{L}/\text{分}$ で注入し、その後、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の第2の抗PD-L1抗体(56E5VH5VL4、3C2VH4VL4、アテゾリズマブ、アベルマブ又はデュルバルマブ)を30 $\mu\text{L}/\text{分}$ で注入した。結合親和性を、ブランク対照のRUを減算して算出した。次に、1:1相互作用モデルを使用してデータをフィッティングした。

【0185】

図8及び図9に示すように、56E5VH5VL4及びアテゾリズマブは、同時にはPD-L1分子と結合せず、これらが同じか又は同様のエピトープに結合し得ることを示唆した。同様に、56E5VH5VL4は、エピトープ結合に関してアベルマブ及びデュルバルマブと競合した。56E5VH5VL4及び3C2VH4VL4はPD-L1分子に同時に結合したが、これは、これらが異なるエピトープに結合したことを意味する。抗体3C2VH4VL4は、56E5VH5VL4、アテゾリズマブ、アベルマブ又はデュルバルマブと同時にPD-L1分子に結合し、3C2VH4VL4が、他の抗体が結合した

ものと異なる新規なエピトープに結合し得ることを示唆した。

[実施例 16 . ヒト化抗 P D L 1 抗体は *in vivo* 抗腫瘍効果を有した]

【 0 1 8 6 】

ヒト I g G 1 (N 2 9 7 A) / カッパ定常領域を有する抗 P D - L 1 抗体 5 6 E 5 V H 5 V L 4 及び 3 C 2 V H 6 V L 5 の *in vivo* 抗腫瘍活性を、ヒト P D - L 1 を有するトランスジェニックマウス (G e m P h a r m a t e c h C o . L t d , C h i n a) に M C 3 8 マウス結腸腺癌腫を移植することによって確立された動物モデルにおいて研究した。0 日目に、マウスに 1×10^6 個の M C 3 8 細胞を一方の側腹部において皮下注射し、1 群当たり 8 匹で 7 つの群に無作為に割り付けた。次に、これらの動物に、5 6 E 5 V H 5 V L 4 (1 0 m g / k g)、3 C 2 V H 6 V L 5 (1 0 m g / k g)、アベルマブ (1 0 m g / k g) 及び P B S それぞれを、0、4、7、11、14 及び 18 日目に腹腔内投与した。

10

【 0 1 8 7 】

腫瘍サイズ及びマウス体重を経時的にモニタリングした。具体的には、腫瘍の長さ (最長径) 及び幅 (長さに対して垂直な直径) をノギスで測定し、腫瘍体積を $0.5 \times D \times d^2$ として算出することによって腫瘍サイズを決定した。対照群の腫瘍サイズが 3.5 cm^3 に達する前に試験を終了した。一元配置 A N O V A を使用して、群間の腫瘍サイズ差を同定した。

【 0 1 8 8 】

図 1 0 に示すように、すべての抗 P D - L 1 抗体はマウスにおいて腫瘍成長を有意に阻害し、5 6 E 5 V H 5 V L 4 及び 3 C 2 V H 6 V L 5 の抗腫瘍効果はアベルマブのものよりも良好であった。

20

【 0 1 8 9 】

本出願における配列を以下のように表 8 に要約する。

表 8 . 配列

30

40

50

【表 8】

説明/ 配列/配列番号
マウス、キメラ及びヒト化 3C2 抗体の VH-CDR1 DYHVN (配列番号 1)
マウス、キメラ及びヒト化 3C2 抗体の VH-CDR2 WIFPGSGRTFYTDKFKG (配列番号 2)
マウス、キメラ及びヒト化 3C2 抗体の VH-CDR3 DYGTSGYGLVY (配列番号 3)
マウス、キメラ及びヒト化 3C2 抗体の VL-CDR1 KASDRINNWLA (配列番号 4)
マウス、キメラ及びヒト化 3C2 抗体の VL-CDR2 GATSLET (配列番号 5)
マウス、キメラ及びヒト化 3C2 抗体の VL-CDR3 QQYWNIPFT (配列番号 6)
マウス、キメラ及びヒト化 56E5 抗体の VH-CDR1 SDYWN (配列番号 7)
マウス、キメラ及びヒト化 56E5 抗体の VH-CDR2 YISYTGSTYYNPSLKS (配列番号 8)
マウス、キメラ及びヒト化 56E5 抗体の VH-CDR3 YRDWDVDRAMDY (配列番号 9)
マウス、キメラ及びヒト化 56E5 抗体の VL-CDR1 KSSQSLISGNQKNFLT (配列番号 10)
マウス、キメラ及びヒト化 56E5 抗体の VL-CDR2 WASTRES (配列番号 11)
マウス、キメラ及びヒト化 56E5 抗体の VL-CDR3 QNDFGFPFT (配列番号 12)
マウス及びキメラ 3C2 抗体の VH QVQLNQSGLPELTKAGTSVKISCKASGYSFTDYHVNWVKQRPGQGLEWIGWIFPGSGRTFYTDKFKG KATLTVDLSTTAYIMLNSLTSEDSAVYFCATDYGTSGYGLVYWGQGTSVTVSS (配列番号 13)
ヒト化抗体 3C2-VH2VL2、3C2-VH2VL3 及び 3C2-VH2VL4 の VH QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIDYHVNWVRQAPGQGLEWIGWIFPGSGRTFYTDKFKG RVILTVDSTSTVYMESSLTSEDVAVYFCATDYGTSGYGLVYWGQGTTVTVSS (配列番号 14)
ヒト化抗体 3C2-VH3VL2、3C2-VH3VL3 及び 3C2-VH3VL4 の VH QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFIDYHVNWVKQRPGQGLEWIGWIFPGSGRTFYTDKFKG RVILTVDSTSTVYMESSLTSEDVAVYFCATDYGTSGYGLVYWGQGTTVTVSS (配列番号 15)

10

20

30

40

50

<p>ヒト化抗体 3C2-VH4VL2、3C2-VH4VL3 及び 3C2-VH4VL4 の VH QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYHVNWVKQRPGQGLEWIGWIFPGSGRIFYTDKFKG RVTLTVDSTSTVYMELSSLTSEDYAVYFCAIDYGTSGYGLVYWGQGTITVTVSS (配列番号 16)</p>	
<p>ヒト化抗体 3C2-VH5VL2、3C2-VH5VL3 及び 3C2-VH5VL4 の VH QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYHVNWVKQRPGQGLEWIGWIFPGSGRIFYTDKFKG KATLTVDSTSTVYMELSSLTSEDYAVYFCAIDYGTSGYGLVYWGQGTITVTVSS (配列番号 17)</p>	
<p>ヒト化抗体 3C2-VH6VL5 の VH QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYHVNWVRQAPGQGLEWIGWIFPGSGRIFYTDKFKG RVTMTVDSTSTVYMELSSLRSEDYAVYCATDYGTSGYGLVYWGQGTITVTVSS (配列番号 18)</p>	10
<p>マウス及びキメラ 56E5 抗体の VH EVQLQESGPGAKPSQTLSTLTCVSTGYSITSDYWNWIRKFPGNKLEYMGYISYTGSTYYNPSLKRISI TRDTSKNQYYLQLNSVITTEDATAYYCARYRDWDVDRAMDYWGQGTITVTVSS (配列番号 19)</p>	
<p>ヒト化抗体 56E5-VH2VL2、56E5-VH2VL3 及び 56E5-VH2VL4 の VH QVQLQESGPGLVKPSQTLSTLCTVSGGSITSDYWNWIRQHPGKGLYMGYISYTGSTYYNPSLKRISVT ITVDTSKNQFSLKLSVTTADTAVYYCARYRDWDVDRAMDYWGQGTITVTVSS (配列番号 20)</p>	
<p>ヒト化抗体 56E5-VH3VL2、56E5-VH3VL3 及び 56E5-VH3VL4 の VH QVQLQESGPGLVKPSQTLSTLCTVSGGSITSDYWNWIRQHPGNKLEYMGYISYTGSTYYNPSLKRISVT ITVDTSKNQFSLKLSVTTADTAVYYCARYRDWDVDRAMDYWGQGTITVTVSS (配列番号 21)</p>	
<p>ヒト化抗体 56E5-VH4VL2、56E5-VH4VL3 及び 56E5-VH4VL4 の VH QVQLQESGPGLVKPSQTLSTLCTVSGGSITSDYWNWIRQHPGNKLEYMGYISYTGSTYYNPSLKRISVT ITRDTSKNQFSLKLSVTTADTAVYYCARYRDWDVDRAMDYWGQGTITVTVSS (配列番号 22)</p>	20
<p>ヒト化抗体 56E5-VH5VL2、56E5-VH5VL3 及び 56E5-VH5VL4 の VH QVQLQESGPGLVKPSQTLSTLCTVSGGSITSDYWNWIRQHPGNKLEYMGYISYTGSTYYNPSLKRISI TRDTSKNQFSLKLSVTTADTAVYYCARYRDWDVDRAMDYWGQGTITVTVSS (配列番号 23)</p>	
<p>マウス及びキメラ 3C2 抗体の VL DIQMTQSSSYLSVSLGGRVTISCKASDRINNWLAWYQQKPGNAPRLLISGATSLETGVPSRFSGSGSGK DYTLTISLQTEDVAVYYCQYWNIPFTFGSGTKLEIK (配列番号 24)</p>	
<p>ヒト化抗体 3C2-VH2VL2、3C2-VH3VL2、3C2-VH4VL2 及び 3C2-VH5VL2 の VL DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASDRINNWLAWYQQKPGKAPRLLISGATSLETGVPSRFSGSGSGT DYFTISSLQPEDATYYCQYWNIPFTFGQGTKVEIK (配列番号 25)</p>	30
<p>ヒト化抗体 3C2-VH2VL3、3C2-VH3VL3、3C2-VH4VL3 及び 3C2-VH5VL3 の VL DIQMTQSPSSLSASVGDRVTISCKASDRINNWLAWYQQKPGNAPRLLISGATSLETGVPSRFSGSGSGT DYFTISSLQPEDATYYCQYWNIPFTFGQGTKVEIK (配列番号 26)</p>	
<p>ヒト化抗体 3C2-VH2VL4、3C2-VH3VL4、3C2-VH4VL4 及び 3C2-VH5VL4 の VL DIQMTQSPSSLSASVGDRVTISCKASDRINNWLAWYQQKPGNAPRLLISGATSLETGVPSRFSGSGSGT DYFTISSLQPEIAVYYCQYWNIPFTFGQGTKVEIK (配列番号 27)</p>	
<p>ヒト化抗体 3C2-VH6VL5 の VL DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASDRINNWLAWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGVPSRFSGSGSGT DFTLTISLQPEDATYYCQYWNIPFTFGQGTKVEIK (配列番号 28)</p>	40

10

20

30

40

50

マウス及びキメラ 56E5 抗体の VL DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMNCSSQSLISGNQKNFLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRF TSGSGSDTDFLTISVQAEDLAVYYCQNDGFGPFTFGSGTKLEIK (配列番号 29)	
ヒト化抗体 56E5-VH2VL2、56E5-VH3VL2、56E5-VH4VL2 及び 56E5-VH5VL2 の VL DIVMTQSPDSLAVSLGERATMNCSSQSLISGNQKNFLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRF SGSGSDTDFLTISLQAEDVAVYYCQNDGFGPFTFGQGTKVEIK (配列番号 30)	
ヒト化抗体 56E5-VH2VL3、56E5-VH3VL3、56E5-VH4VL3 及び 56E5-VH5VL3 の VL DIVMTQSPDSLAVSLGEKVTMNCSSQSLISGNQKNFLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRF SGSGSDTDFLTISLQAEDVAVYYCQNDGFGPFTFGQGTKVEIK (配列番号 31)	10
ヒト化抗体 56E5-VH2VL4、56E5-VH3VL4、56E5-VH4VL4 及び 56E5-VH5VL4 の VL DIVMTQSPDSLAVSLGEKVTMNCSSQSLISGNQKNFLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRF SGSGSDTDFLTISLQAEDLAVYYCQNDGFGPFTFGQGTKVEIK (配列番号 32)	
ヒト IgG1 重鎖定常領域(N297A) ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 33)	20
ヒトカッパ軽鎖定常領域 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 34)	
ヒト PD-L1 MRIFAVFIFMTYWHLLNAFTVTVPKDLVVEYGSNMTECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIQF VHGEE DLKVQHSSYRQRARLLKQQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAP YNKINQRILVVDVPTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSDDHQVLSGKTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTT TNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKC GIQDTNSKKQSDTHLEET (配列番号 35)	
サル PD-L1 MRIFAVFIFTTYWHLLNAFTVTVPKDLVVEYGSNMTECKFPVEKQLDLTSLIVYWEMEDKNIQFVH GEEDLKVQHSNYRQRAQLLKDQLSLGNAALRITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYN KINQRILVVDVPTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSDDHQVLSGKTTTNSKREEKLLNVTSTLRINTTAN EIFYCFRRLDPEENHTAELVIPELPLALPPNERTHLVILGAIFLLGVALTFIFYLKGRMMDMKKCGI RVTNSKKQRDTQLEET (配列番号 36)	30
マウス PD-L1 MRIFAGIIFTACCHLLRAFTITAPKDLVVEYGSNVTMECRFPVERELDLALVYVWEKEDEQVIQFV AGEEDLKPQHSNFRGRASLPKDLLKGNAAALQITDVKLQDAGVYCCISYGGADYKRITLKVNPYR KINQRISVDPATSEHELICQAEGYPEAEVIWTSDDHQVPSGKRSVTTSTRTEGMLLNVTSSLRVNATAN DVFYCTFWRSPGQNHTAELIPELPAHPNERTHWVLLGSILLFLIVVSTVLLFLRKQVRMLDVEKC GVEDTSSKNRNDTQFEET (配列番号 37)	40

【 0 1 9 0 】

本開示の好ましい実施形態をこのように詳細に記載したが、上の段落によって定義された本開示は上の説明に記載の特定の詳細に制限されるべきではなく、その多くの明らかな変形形態が本開示の趣旨又は範囲から逸脱することなく可能であることが理解されるべきである。

【 0 1 9 1 】

[項目 1]

VH - CDR 1 領域、VH - CDR 2 領域及び VH - CDR 3 領域を有する重鎖可変領域、及び VL - CDR 1 領域、VL - CDR 2 領域及び VL - CDR 3 領域を有する軽鎖

10

20

30

40

50

可変領域を備え、前記VH - CDR 1領域、前記VH - CDR 2領域、前記VH - CDR 3領域、前記VL - CDR 1領域、前記VL - CDR 2領域及び前記VL - CDR 3領域が、(1)それぞれ、配列番号1、2、3、4、5及び6；又は(2)それぞれ、配列番号7、8、9、10、11及び12のアミノ酸配列を含む、PD - L1に結合する単離モノクローナル抗体又はその抗原結合部分。

[項目2]

前記重鎖可変領域が、配列番号13～23のいずれか1つと少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、項目1に記載の単離モノクローナル抗体又はその抗原結合部分。

10

[項目3]

前記軽鎖可変領域が、配列番号24～32のいずれか1つと少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、項目1に記載の単離モノクローナル抗体又はその抗原結合部分。

[項目4]

前記重鎖可変領域及び前記軽鎖可変領域が、(1)それぞれ、配列番号13及び24；(2)それぞれ、配列番号14及び25；(3)それぞれ、配列番号14及び26；(4)それぞれ、配列番号14及び27；(5)それぞれ、配列番号15及び25；(6)それぞれ、配列番号15及び26；(7)それぞれ、配列番号15及び27；(8)それぞれ、配列番号16及び25；(9)それぞれ、配列番号16及び26；(10)それぞれ、配列番号16及び27；(11)それぞれ、配列番号17及び25；(12)それぞれ、配列番号17及び26；(13)それぞれ、配列番号17及び27；(14)それぞれ、配列番号18及び28；(15)それぞれ、配列番号19及び29；(16)それぞれ、配列番号20及び30；(17)それぞれ、配列番号20及び31；(18)それぞれ、配列番号20及び32；(19)それぞれ、配列番号21及び30；(20)それぞれ、配列番号21及び31；(21)それぞれ、配列番号21及び32；(22)それぞれ、配列番号22及び30；(23)それぞれ、配列番号22及び31；(24)それぞれ、配列番号22及び32；(25)それぞれ、配列番号23及び30；(26)それぞれ、配列番号23及び31；又は(27)それぞれ、配列番号23及び32と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する、項目2に記載の単離モノクローナル抗体又はその抗原結合部分。

20

30

[項目5]

前記重鎖可変領域に連結されている、配列番号33と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する重鎖定常領域、及び/又は前記軽鎖可変領域に連結されている、配列番号34と少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する軽鎖定常領域を備える、項目1に記載の単離モノクローナル抗体又はその抗原結合部分。

40

[項目6]

(a) ヒトPD - L1と結合する；(b) サルPD - L1と結合する；(c) マウスPD - L1に結合しない；(d) PD - L1 - PD - 1相互作用を遮断する；(e) T細胞活性化を促進する；及び/又は(f) *in vivo*抗腫瘍活性を有する、項目1に記載の単離モノクローナル抗体又はその抗原結合部分。

50

[項目 7]

マウス、キメラ又はヒト化である、項目 1 に記載の単離モノクローナル抗体又はその抗原結合部分。

[項目 8]

項目 1 から 7 のいずれか一項に記載の単離モノクローナル抗体又はその抗原結合部分をエンコードする核酸分子。

[項目 9]

項目 8 に記載の核酸分子を備える発現ベクター。

[項目 10]

項目 9 に記載の発現ベクターを備える宿主細胞。

10

[項目 11]

項目 1 から 7 のいずれか一項に記載の単離モノクローナル抗体又はその抗原結合部分、及び薬学的に許容される担体を備える医薬組成物。

[項目 12]

癌の処置を、それを必要とする対象において行うための方法であって、前記対象に、項目 11 に記載の医薬組成物を投与する段階を備える、方法。

[項目 13]

前記癌が、黒色腫、非小細胞肺癌、腎細胞癌腫、ホジキンリンパ腫、膀胱癌、頭頸部癌、神経内分泌腫瘍、マンテル細胞リンパ腫、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫、及び濾胞性リンパ腫から成る群から選択される、項目 12 に記載の方法。

20

[項目 14]

感染性疾患の処置を、それを必要とする対象において行うための方法であって、前記対象に、項目 11 に記載の医薬組成物を投与する段階を備える、方法。

[項目 15]

前記感染性疾患が、慢性 B 型肝炎ウイルス (H B V)、C 型肝炎ウイルス (H C V)、ヒト免疫不全ウイルス (H I V)、又はサル免疫不全ウイルス (S I V) 感染症である、項目 14 に記載の方法。

【 図面 】

【 図 1 】

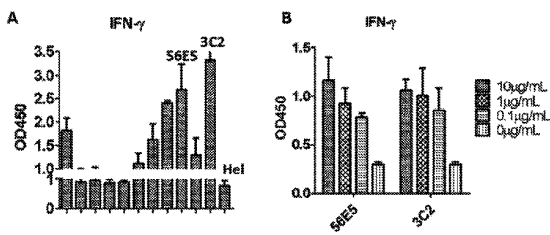
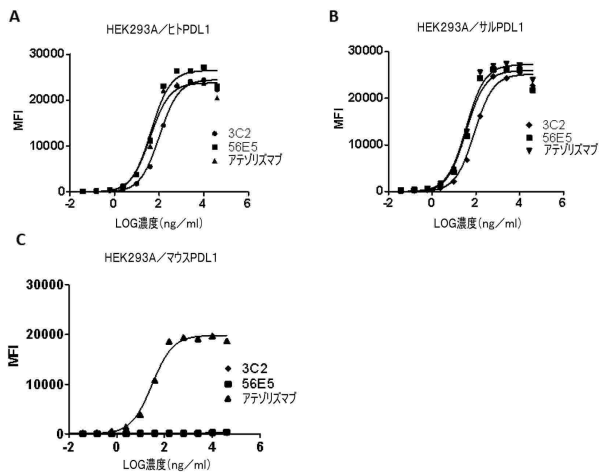


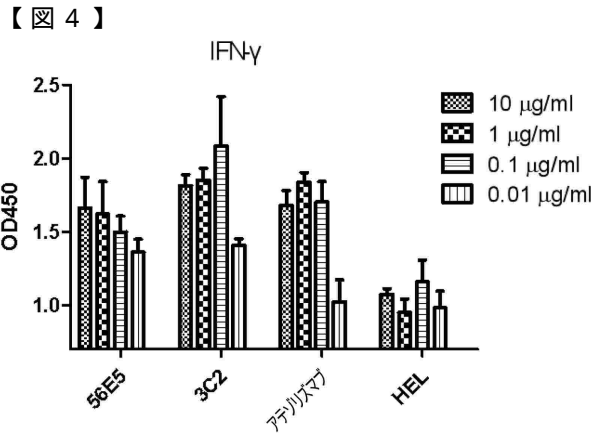
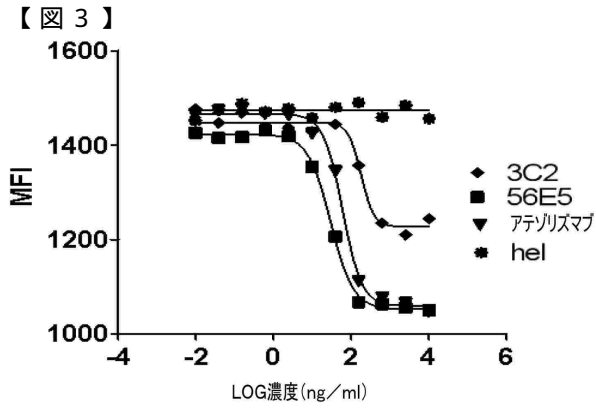
FIG. 1

【 図 2 】

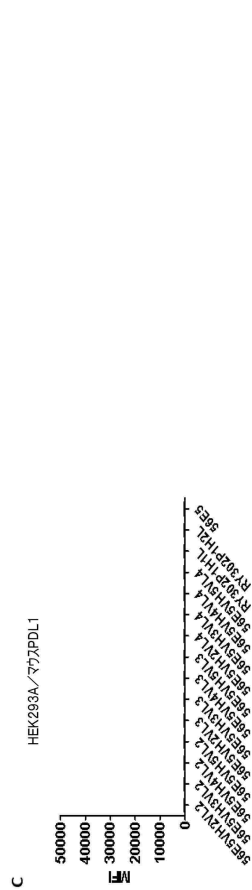
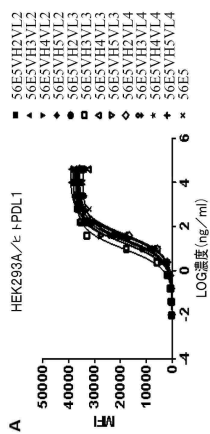
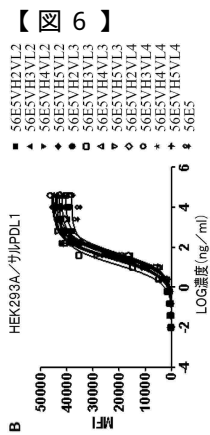
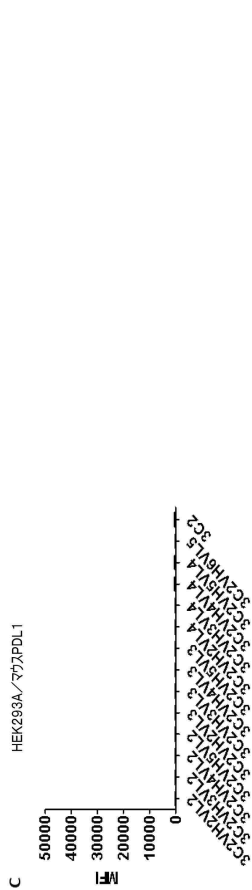
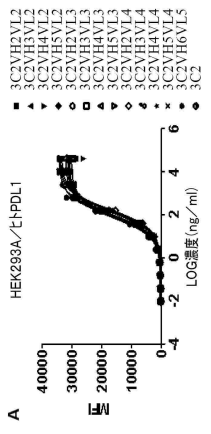
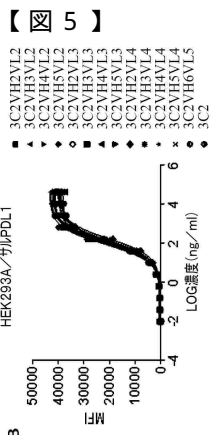


30

40



10



20

30

40

50

【 図 7 】

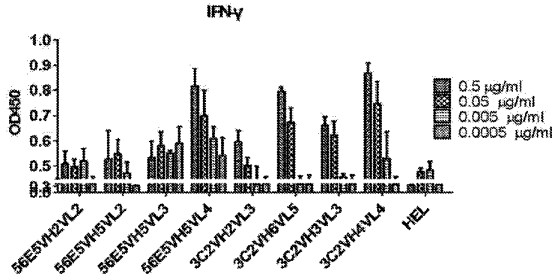
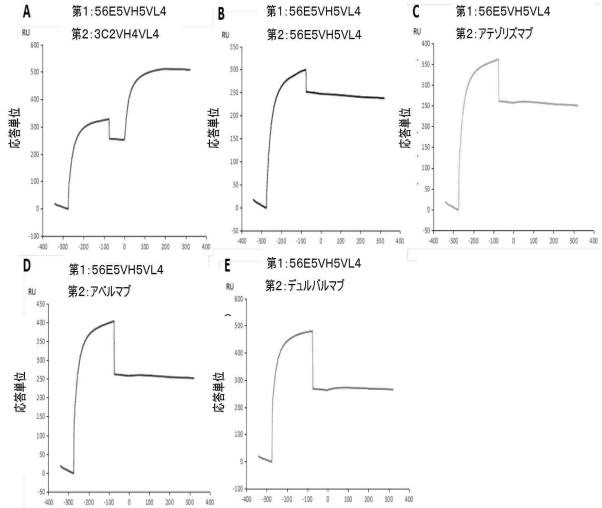


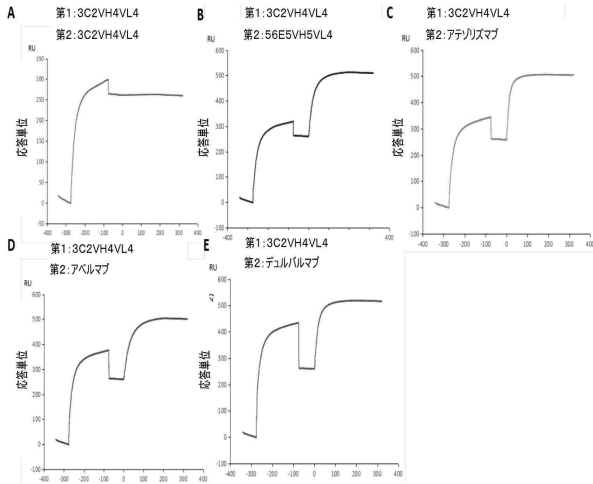
FIG. 7

【 図 8 】

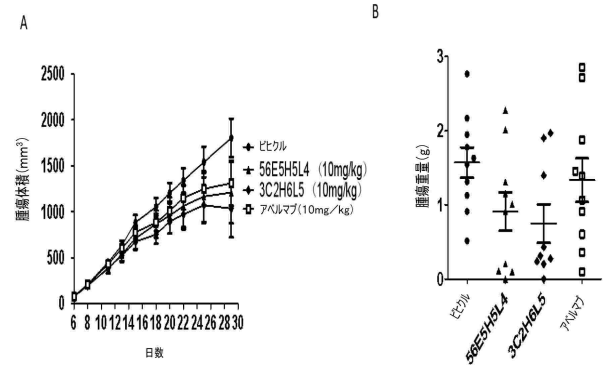


10

【 図 9 】



【 図 10 】



20

30

【 配列表 】

0007600487000001.app

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 1/21 (2006.01)
 C 1 2 N 1/19 (2006.01)
 C 1 2 N 1/15 (2006.01)
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)
 A 6 1 P 31/18 (2006.01)
 A 6 1 P 31/14 (2006.01)
 A 6 1 P 31/20 (2006.01)
 A 6 1 P 31/00 (2006.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 A 6 1 K 48/00 (2006.01)
 A 6 1 K 35/76 (2015.01)
 A 6 1 K 35/12 (2015.01)
 C 1 2 P 21/08 (2006.01)

F I

C 1 2 N 1/21
 C 1 2 N 1/19
 C 1 2 N 1/15
 A 6 1 K 39/395 U
 A 6 1 P 31/18
 A 6 1 P 31/14
 A 6 1 P 31/20
 A 6 1 P 31/00
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 K 48/00
 A 6 1 K 35/76
 A 6 1 K 35/12
 C 1 2 P 21/08

ィング ナンバー 1、ルーム 2 5 0 5 ベイジン マブワークス バイオテック カンパニー リミテッド内

(72)発明者

フ、ウェンチ

中華人民共和国、1 0 0 1 7 6、ベイジン、エコノミック アンド テクノロジカル ディベロップメント ゾーン、サウス ロンファ ロード ナンバー 2、ビルディング ナンバー 1、ルーム 2 5 0 5 ベイジン マブワークス バイオテック カンパニー リミテッド内

(72)発明者

リ、フェン

中華人民共和国、1 0 0 1 7 6、ベイジン、エコノミック アンド テクノロジカル ディベロップメント ゾーン、サウス ロンファ ロード ナンバー 2、ビルディング ナンバー 1、ルーム 2 5 0 5 ベイジン マブワークス バイオテック カンパニー リミテッド内

審査官 松原 寛子

(56)参考文献

中国特許出願公開第1 0 6 6 9 9 8 9 1 (C N , A)
 国際公開第2 0 2 0 / 2 2 6 9 8 6 (W O , A 1)
 国際公開第2 0 2 0 / 2 1 5 0 4 9 (W O , A 1)

(58)調査した分野

(Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
 C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0
 C 1 2 N 5 / 1 0
 C 1 2 N 1 / 0 0
 A 6 1 K 3 9 / 3 9 5
 A 6 1 P 3 1 / 1 8
 A 6 1 P 3 1 / 1 4
 A 6 1 P 3 1 / 2 0
 A 6 1 P 3 1 / 0 0
 A 6 1 P 3 5 / 0 0
 A 6 1 K 4 8 / 0 0
 A 6 1 K 3 5 / 7 6
 A 6 1 K 3 5 / 1 2
 C 1 2 P 2 1 / 0 8

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

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)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

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