

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016年1月14日(14.01.2016)



(10) 国際公開番号

WO 2016/006241 A1

- (51) 国際特許分類:
C07K 16/28 (2006.01) C07K 16/18 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/003444
- (22) 国際出願日: 2015年7月8日(08.07.2015)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2014-140982 2014年7月9日(09.07.2014) JP
- (71) 出願人: 日本全薬工業株式会社(NIPPON ZENYAKU KOGYO CO., LTD.) [JP/JP]; 〒9630196 福島県郡山市安積町笹川字平ノ上1番地の1 Fukushima (JP).
- (72) 発明者: 水野 拓也(MIZUNO, Takuya); 〒7538515 山口県山口市吉田1677-1 国立大学法人山口大学共同獣医学部内 Yamaguchi (JP). 正司 麗葉(SHOSU, Kazuha); 〒7538515 山口県山口市吉田1677-1 国立大学法人山口大学共同獣医学部内 Yamaguchi (JP).
- (74) 代理人: 廣田 雅紀(HIROTA, Masanori); 〒1070052 東京都港区赤坂二丁目2番19号アドレスビル6階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告(条約第21条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則5.2(a))

(54) Title: ANTI-CANINE PD-1 ANTIBODY OR ANTI-CANINE PD-L1 ANTIBODY

(54) 発明の名称: 抗イヌPD-1抗体又は抗イヌPD-L1抗体

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing: an anti-canine PD-1 antibody or an anti-canine PD-L1 antibody; an agent for inhibiting binding of canine PD-1 and canine PD-L1 that contains said antibody; a method for inhibiting binding of canine PD-1 and canine PD-L1 that uses said antibody; and a gene that codes said antibody. An anti-canine PD-1 antibody that binds specifically to canine PD-1 comprising an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 or an anti-canine PD-L1 antibody that binds specifically to canine PD-L1 comprising an amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 6 are produced. Furthermore, an agent for inhibiting binding of canine PD-1 and canine PD-L1 that contains said antibody is produced.

(57) 要約: 抗イヌPD-1抗体又は抗イヌPD-L1抗体や、かかる抗体を含有するイヌPD-1とイヌPD-L1との結合阻害剤や、かかる抗体を用いるイヌPD-1とイヌPD-L1との結合阻害方法や、かかる抗体をコードする遺伝子を提供することを課題とする。配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるイヌPD-1に特異的に結合する抗イヌPD-1抗体や、配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるイヌPD-L1に特異的に結合する抗イヌPD-L1抗体を作製する。また、かかる抗体を含有するイヌPD-1とイヌPD-L1との結合阻害剤を作製する。

WO 2016/006241 A1

明 細 書

発明の名称：抗イヌPD-1抗体又は抗イヌPD-L1抗体

技術分野

[0001] 本発明は、抗イヌPD-1抗体又は抗イヌPD-L1抗体や、かかる抗体を含有するイヌPD-1とイヌPD-L1との結合阻害剤や、かかる抗体を用いるイヌPD-1とイヌPD-L1との結合阻害方法や、かかる抗体をコードする遺伝子に関する。

背景技術

[0002] ヒトにおいては、近年、免疫抑制性分子である免疫チェックポイント分子を標的とした抗体医薬が注目されており、多くの臨床試験が実施されている。特にPD-1 (Programmed cell death 1) 及びPD-L1 (programmed cell death 1 ligand-1) を標的としたヒトのがんを対象とした臨床試験では優れた成績をおさめており、次世代のがん治療として着目されている（非特許文献1、2参照）。

[0003] PD-1はT細胞の表面に存在する受容体である。T細胞の活性化を抑制する機能を有しており、自己に対する免疫反応を抑制するなどの機能が明らかにされている。かかる免疫反応の抑制は、PD-1のリガンドであるPD-L1がPD-1に結合することによって行われる。一方、がん細胞はPD-L1を発現し、発現したPD-L1がPD-1に結合することによってT細胞の活性化を抑制し、免疫反応から逃れる能力を獲得している。したがって、PD-1とPD-L1との結合を阻害することが、がんの治療に有効であると考えられる。

[0004] これまでに、抗PD-L1抗体を有効成分として含み、インビボにおいてがん細胞の増殖を抑制する作用を有するがん治療剤（特許文献1参照）や、iNK T細胞リガンドの投与によりアレルギーが誘導されたiNK T細胞の反応性を回復させる抗PD-1抗体又は抗PD-L1抗体を含む抗がん剤（特許文献2参照）が提案されている。また、メラノーマ、非小細胞肺がん、

腎細胞がんの治療剤として抗PD-1抗体の開発が進められている（非特許文献3参照）。

[0005] 一方、ペットの長寿化に伴い、近年、件数が急増しているのがペットのがんである。人間同様、ペットのがん治療も進歩を遂げ、外科療法、放射線治療、化学療法（抗がん剤）の三大療法が積極的に行われている。

[0006] ペットの中ではイヌの飼育率が高く、日本国内において約1300万頭が飼われている。そのため、イヌのがんの発生件数が増加している。イヌのがんの治療においては、従来から用いられている上記3大療法では限界があり、それに代わる、又は同時に用いることができる新たな治療法として、PD-1、PD-L1などの免疫チェックポイント分子を標的とした治療が期待されるが、ヒトのPD-1やPD-L1に対する抗体医薬はイヌに対しては作用しないという問題があった。そこで、イヌPD-1やイヌPD-L1に対する抗体の開発が求められていた。しかしながら、イヌにおいては、PD-1やPD-L1についての研究が進んでおらず、イヌにおけるPD-1やPD-L1のcDNAの発現も確認されていない状況であり、イヌのPD-1及びPD-L1を認識する抗体の作製は困難であるのが現状であった。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：特開2014-65748号公報

特許文献2：特開2010-83863号公報

非特許文献

[0008] 非特許文献1：横山勇生 “PD-1に関連した抗体製剤などの開発が活発化”

2013年3月6日 日経メディカルオンライン、インターネットURL：
<http://medical.nikkeibp.co.jp/leaf/all/search/cancer/news/201303/529345.html>（2014年6月23日検索）

非特許文献2：野中希 “ipilimumabと抗PD-1抗体薬nivolumabの併用により進行悪性黒色腫の半数に顕著で持続的な腫瘍縮小効果”
2013年5月17日 日経メディカルオンライン、インターネットU

R L : <http://medical.nikkeibp.co.jp/leaf/all/search/cancer/news/201305/530569.html> (2014年6月23日検索)

非特許文献3 : Suzanne L. et al., The New England Journal of Medicine Vol.366, No. 26:2443-2454, 2012

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0009] 本発明の課題は、抗イヌPD-1抗体又は抗イヌPD-L1抗体や、かかる抗体を含有するイヌPD-1とイヌPD-L1との結合阻害剤や、かかる抗体を用いるイヌPD-1とイヌPD-L1との結合阻害方法や、かかる抗体をコードする遺伝子を提供することにある。

課題を解決するための手段

- [0010] 発明者らは、まずイヌPD-1及びイヌPD-L1のcDNAのクローニングに成功し、塩基配列及びアミノ酸配列を決定した。次に、イヌPD-1又はイヌPD-L1のcDNAを用いてイヌPD-1又はイヌPD-L1発現細胞株を作製し、かかる細胞株を用いてイヌPD-1又はイヌPD-L1に対するラットモノクローナル抗体の作製に成功した。さらに、得られたラットモノクローナル抗体はイヌPD-1とイヌPD-L1との結合を阻害する能力を有することを見だし、本発明を完成した。

- [0011] すなわち、本発明は以下に開示されるとおりのものである。

(1) 配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるイヌPD-1に特異的に結合する、以下の(a)又は(b)記載の抗イヌPD-1抗体。

(a) 配列番号2に示されるアミノ酸配列、又は配列番号2に示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号3に示されるアミノ酸配列、又は配列番号3に示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を備えたことを特徴とする抗イヌPD-1抗体；

(b) 配列番号4に示されるアミノ酸配列、又は配列番号4に示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する重鎖可変領域

、及び配列番号5に示されるアミノ酸配列、又は配列番号5に示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を備えたことを特徴とする抗イヌPD-1抗体；

(2) 配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるイヌPD-L1に特異的に結合する、以下の(c)又は(d)記載の抗イヌPD-L1抗体。

(c) 配列番号7に示されるアミノ酸配列、又は配列番号7に示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号8に示されるアミノ酸配列、又は配列番号8に示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を備えたことを特徴とする抗イヌPD-L1抗体；

(d) 配列番号9に示されるアミノ酸配列、又は配列番号9に示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号10に示されるアミノ酸配列、又は配列番号10に示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を備えたことを特徴とする抗イヌPD-L1抗体；

(3) 配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるイヌPD-1に特異的に結合する、以下の(e)又は(f)記載の抗イヌPD-1抗体。

(e) 配列番号11に示されるアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号12に示されるアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号13に示されるアミノ酸配列からなるCDR3を含む重鎖可変領域と、配列番号14に示されるアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号15に示されるアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号16に示されるアミノ酸配列からなるCDR3を含む軽鎖可変領域を備えたことを特徴とする抗イヌPD-1抗体；

(f) 配列番号17に示されるアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号18に示されるアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号19に示されるアミノ酸配列からなるCDR3を含む重鎖可変領域と、配列番号20に示されるアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号21に示されるアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号22に示されるアミノ酸配列からなるCDR3

を含む軽鎖可変領域を備えたことを特徴とする抗イヌPD-1抗体；

(4) 配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるイヌPD-L1に特異的に結合する、以下の(g)又は(h)記載の抗イヌPD-L1抗体。

(g) 配列番号23に示されるアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号24に示されるアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号25に示されるアミノ酸配列からなるCDR3を含む重鎖可変領域と、配列番号26に示されるアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号27に示されるアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号28に示されるアミノ酸配列からなるCDR3を含む軽鎖可変領域を備えたことを特徴とする抗イヌPD-L1抗体；

(h) 配列番号29に示されるアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号30に示されるアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号31に示されるアミノ酸配列からなるCDR3を含む重鎖可変領域と、配列番号32に示されるアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号33に示されるアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号34に示されるアミノ酸配列からなるCDR3を含む軽鎖可変領域を備えたことを特徴とする抗イヌPD-L1抗体；

(5) 上記(1)～(4)のいずれか記載の抗体を含有することを特徴とするイヌPD-1とイヌPD-L1との結合阻害剤。

(6) 上記(1)～(4)のいずれか記載の抗体を用いることを特徴とするイヌPD-1とイヌPD-L1との結合阻害方法。

(7) 上記(1)～(4)のいずれか記載の抗体をコードする遺伝子。

発明の効果

[0012] 本発明の抗体は、イヌPD-1又はイヌPD-L1を認識して結合可能であることから、イヌPD-1又はイヌPD-L1の発現解析や機能解析が可能となるほか、イヌPD-1とイヌPD-L1との結合阻害剤として用いることが可能となる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]イヌPD-1 (canine PD-1、以後「cPD1」ともいう)の塩基配列及びその塩基配列がコードするアミノ酸配列を示す図である。

[図2]イヌPD-L1 (canine PD-L1、以後「cPDL1」ともいう)の塩基配列及びその塩基配列がコードするアミノ酸配列を示す図である。

[図3] (A)はcPD1に対するラットモノクローナル抗体とNRK/cPD1との結合を調べた結果を示す図であり、(B)はcPDL1に対するラットモノクローナル抗体とNRK/cPDL1との結合を調べた結果を示す図である。

[図4] (A)はヒトのPD-L1 (hPDL1)-hlgとNRK/cPD1との結合を調べた結果を示す図であり、(B)はcPD1-hlgとNRK/cPDL1との結合を調べた結果を示す図である。

[図5] (A) cPD1に対するラットモノクローナル抗体によるhPDL1-hlgとNRK/cPD1との結合阻害を調べた結果を示す図であり、(B)はcPDL1に対するラットモノクローナル抗体によるcPD1-hlgとNRK/cPDL1との結合阻害を調べた結果を示す図である。

[図6] cPD1に対するラットモノクローナル抗体によるcPD1-hlgとNRK/cPDL1との結合阻害を調べた結果を示す図である。

[図7]末梢血単核細胞にPD-1に対するラットモノクローナル抗体 (anti-PD-1: 4F12-E6又はcPD-L1に対するラットモノクローナル抗体 (anti-PD-L1: G11-6)を加えて、さらにコンカナバリンA (ConA)を加えて刺激培養し、得られた培養上清中のイヌIFN- γ をELISAにより測定した結果を示す図である。

[図8]イヌPBMCをPMA/ionomycin又はConA存在下で培養し、PBMCを回収後、CD3陽性分画 (T細胞)におけるPD-1、PD-L1の発現を、cPD1に対するラットモノクローナル抗体 (4F12-E6)又はcPDL1に対するラットモノクローナル抗体 (G11-6)を用いてフローサイトメトリー解析した結果を示す図である。

[図9]イヌPBMCより磁気ビーズにより分離したCD14陽性単球をIL-4及びGM-CSF存在下で6日間培養し、未成熟樹状細胞を誘導し、かか

る未成熟樹状細胞（MHC Class II 抗体陽性）におけるPD-1又はPD-L1の発現を、cPD1に対するラットモノクローナル抗体（4F12-E6）、又はcPD-L1に対するラットモノクローナル抗体（G11-6）を用いてフローサイトメトリー解析した結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0014] 本発明の抗イヌPD-1抗体としては、配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるイヌPD-1に特異的に結合し、

（a）配列番号2に示されるアミノ酸配列、又は配列番号2に示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号3に示されるアミノ酸配列、又は配列番号3に示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を備えたことを特徴とする抗イヌPD-1抗体；

（b）配列番号4に示されるアミノ酸配列、又は配列番号4に示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号5に示されるアミノ酸配列、又は配列番号5に示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を備えたことを特徴とする抗イヌPD-1抗体；

の（a）又は（b）記載の抗イヌPD-1抗体であれば特に制限されないが、

（a'）配列番号2に示されるアミノ酸配列、又は配列番号2に示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号3に示されるアミノ酸配列、又は配列番号3に示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域とを備えたことを特徴とする抗イヌPD-1抗体；（b'）配列番号4に示されるアミノ酸配列、又は配列番号4に示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号5に示されるアミノ酸配列、又は配列番号5に示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を備えたことを特徴

とする抗イヌPD-1抗体；

の（a'）又は（b'）記載の抗イヌPD-1抗体であることが好ましく、かかる抗イヌPD-1抗体はイヌPD-1を認識して結合可能であることから、イヌPD-1の発現解析や機能解析が可能となるほか、イヌPD-1とイヌPD-L1との結合を阻害することが可能となる。

[0015] また、本発明の抗イヌPD-L1抗体としては、配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるイヌPD-L1に特異的に結合し、

（c）配列番号7に示されるアミノ酸配列、又は配列番号7に示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号8に示されるアミノ酸配列、又は配列番号8に示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を備えたことを特徴とする抗イヌPD-L1抗体；

（d）配列番号9に示されるアミノ酸配列、又は配列番号9に示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号10に示されるアミノ酸配列、又は配列番号10に示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を備えたことを特徴とする抗イヌPD-L1抗体；

の（c）又は（d）記載の抗イヌPD-L1抗体であれば特に制限されないが、

（c'）配列番号7に示されるアミノ酸配列、又は配列番号7に示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号8に示されるアミノ酸配列、又は配列番号8に示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を備えたことを特徴とする抗イヌPD-L1抗体；（d'）配列番号9に示されるアミノ酸配列、又は配列番号9に示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる重鎖可変領域、及び配列番号10に示されるアミノ酸配列、又は配列番号10に示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を備えたことを

特徴とする抗イヌPD-L1抗体；

の(c')又は(d')記載の抗イヌPD-L1抗体であることが好ましく、かかる抗イヌPD-L1抗体はイヌPD-L1を認識して結合可能であることから、イヌPD-L1の発現解析や機能解析が可能となるほか、イヌPD-1とイヌPD-L1との結合を阻害することが可能となる。

[0016] 本発明の抗イヌPD-1抗体の他の態様としては、配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるイヌPD-1に特異的に結合し、

(e) 配列番号11に示されるアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号12に示されるアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号13に示されるアミノ酸配列からなるCDR3を含む重鎖可変領域と、配列番号14に示されるアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号15に示されるアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号16に示されるアミノ酸配列からなるCDR3を含む軽鎖可変領域を備えたことを特徴とする抗イヌPD-1抗体；

(f) 配列番号17に示されるアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号18に示されるアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号19に示されるアミノ酸配列からなるCDR3を含む重鎖可変領域と、配列番号20に示されるアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号21に示されるアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号22に示されるアミノ酸配列からなるCDR3を含む軽鎖可変領域を備えたことを特徴とする抗イヌPD-1抗体；

の(e)又は(f)記載の抗イヌPD-1抗体を挙げることができる。

[0017] 本発明の抗イヌPD-L1抗体の他の態様としては、配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるイヌPD-L1に特異的に結合し、

(g) 配列番号23に示されるアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号24に示されるアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号25に示されるアミノ酸配列からなるCDR3を含む重鎖可変領域と、配列番号26に示されるアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号27に示されるアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号28に示されるアミノ酸配列からなるCDR3を含む軽鎖可変領域を備えたことを特徴とする抗イヌPD-L1抗体；

(h) 配列番号 29 に示されるアミノ酸配列からなる C D R 1、配列番号 30 に示されるアミノ酸配列からなる C D R 2 及び配列番号 31 に示されるアミノ酸配列からなる C D R 3 を含む重鎖可変領域と、配列番号 32 に示されるアミノ酸配列からなる C D R 1、配列番号 33 に示されるアミノ酸配列からなる C D R 2 及び配列番号 34 に示されるアミノ酸配列からなる C D R 3 を含む軽鎖可変領域を備えたことを特徴とする抗イヌ P D - L 1 抗体；
の (g) 又は (h) 記載の抗イヌ P D - L 1 抗体を挙げることができる。

[0018] 上記抗イヌ P D - 1 抗体や抗イヌ P D - L 1 抗体（以後、これらを総称して「本件抗イヌ抗体」ともいう）の種類としては特に制限されないが、モノクローナル抗体を挙げることができ、モノクローナル抗体の配列から組換えタンパクとして作製されるキメラ抗体、イヌ化抗体や、抗体をペプシンで消化して得られる F (a b ') 2、抗体をパパインで消化して得られる F a b、重鎖可変領域と軽鎖可変領域とを、アミノ酸架橋によって連結させた S c F v、S c F v が二量体化した d i a b o d y などの抗体の一部からなる抗体断片も含まれる。

[0019] 本発明において、「90%以上の同一性」とは、同一性が90%以上であることを意味し、好ましくは93%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは98%以上の同一性を意味する。

[0020] 本件抗イヌ抗体をコードする遺伝子としては、例えば、上記抗イヌ P D - 1 抗体をコードする遺伝子として、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列、又は配列番号 2 に示されるアミノ酸配列と 90%以上の同一性を有するアミノ酸配列をコードする遺伝子、及び配列番号 3 に示されるアミノ酸配列、又は配列番号 3 に示されるアミノ酸配列と 90%以上の同一性を有するアミノ酸配列をコードする遺伝子とを備えた遺伝子であって、かかる遺伝子によって得られる抗体が配列番号 1 に示されるアミノ酸配列からなるイヌ P D - 1 に特異的に結合する遺伝子を挙げることができ、具体的には、配列番号 35 に示される塩基配列と、配列番号 36 に示される塩基配列とを備えた遺伝子を挙げることができる。このほか、配列番号 11 ~ 13 に示される重鎖可変領

域のCDR1～3のアミノ酸配列をコードする遺伝子、及び配列番号14～16に示される軽鎖可変領域のCDR1～3のアミノ酸配列をコードする遺伝子を備えた遺伝子を挙げることができる。

[0021] また、上記抗イヌPD-1抗体をコードする遺伝子の他の態様としては、配列番号4に示されるアミノ酸配列、又は配列番号4に示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列をコードする遺伝子、及び配列番号5に示されるアミノ酸配列、又は配列番号5に示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列をコードする遺伝子とを備えた遺伝子であって、かかる遺伝子によって得られる抗体が配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるイヌPD-1に特異的に結合する遺伝子を挙げることができ、具体的には、配列番号37に示される塩基配列と、配列番号38に示される塩基配列とを備えた遺伝子を挙げることができる。このほか、配列番号17～19に示される重鎖可変領域のCDR1～3のアミノ酸配列をコードする遺伝子、及び配列番号20～22に示される軽鎖可変領域のCDR1～3のアミノ酸配列をコードする遺伝子を備えた遺伝子を挙げることができる。

[0022] 上記抗イヌPD-L1抗体をコードする遺伝子としては、配列番号7に示されるアミノ酸配列、又は配列番号7に示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列をコードする遺伝子、及び配列番号8に示されるアミノ酸配列、又は配列番号8に示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列をコードする遺伝子とを備えた遺伝子であって、かかる遺伝子によって得られる抗体が配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるイヌPD-L1に特異的に結合する遺伝子を挙げることができ、具体的には、配列番号39に示される塩基配列と、配列番号40に示される塩基配列とを備えた遺伝子を挙げることができる。このほか、配列番号23～25に示される重鎖可変領域のCDR1～3のアミノ酸配列をコードする遺伝子、及び配列番号26～28に示される軽鎖可変領域のCDR1～3のアミノ酸配列をコードする遺伝子を備えた遺伝子を挙げることができる。

[0023] 上記抗イヌPD-L1抗体をコードする遺伝子の他の態様としては、配列番号9に示されるアミノ酸配列、又は配列番号9に示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列をコードする遺伝子、及び配列番号10に示されるアミノ酸配列、又は配列番号10に示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列をコードする遺伝子とを備えた遺伝子であって、かかる遺伝子によって得られる抗体が配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるイヌPD-L1に特異的に結合する遺伝子を挙げることができ、具体的には、配列番号41に示される塩基配列と、配列番号42に示される塩基配列とを備えた遺伝子を挙げることができる。このほか、配列番号29～31に示される重鎖可変領域のCDR1～3のアミノ酸配列をコードする遺伝子、及び配列番号32～34に示される軽鎖可変領域のCDR1～3のアミノ酸配列をコードする遺伝子を備えた遺伝子を挙げることができる。

[0024] 上記抗イヌPD-1抗体又は抗イヌPD-L1抗体をコードする遺伝子をベクターに組み込むことによって、上記抗イヌPD-1抗体又は抗イヌPD-L1抗体をコードする遺伝子の発現ベクターを作製することができる。かかる発現ベクターに用いるベクターとしては、上記抗イヌPD-1抗体又は抗イヌPD-L1抗体をコードする遺伝子を発現できるものであればよく、プラスミドベクターでも、ファージベクターでもよい。

[0025] 上記モノクローナル抗体は、慣用のプロトコールに従って作製することが可能である。たとえば、遺伝子組換え技術により、上記本件抗イヌ抗体をコードする遺伝子を発現させることにより、組換え抗体として作製することが可能である。組換え抗体を作製する方法としては、例えば本件抗イヌ抗体をコードする遺伝子を発現ベクターに組み込み、かかる発現ベクターをチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞などの哺乳類細胞株や、大腸菌、酵母細胞、昆虫細胞、植物細胞などの宿主細胞へ導入して、宿主細胞において組換え抗体を生産させる方法を挙げることができる（Peter J. Delves, ANTIBODY PRODUCTION ESSENTIAL TECHNIQUES, WILEY, 1997参照）。発現ベクターに

組み込む本件抗イヌ抗体をコードする遺伝子の塩基配列は、発現させる宿主細胞に合わせてコドン配列の最適化がされていてもよい。

[0026] また、トランスジェニック動物作製技術を用いて本件抗イヌ抗体をコードする遺伝子が組み込まれたマウス、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ニワトリ、ブタなどのトランスジェニック動物を作製し、かかるトランスジェニック動物の血液、ミルク中などから大量に産生することも可能である。

[0027] さらに、上記モノクローナル抗体は、配列番号 1 又は 6 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質を発現する細胞を抗原としてマウス、ラットなどのヒト以外の動物へ投与し、本件抗イヌ抗体を産生する細胞クローンを細胞融合技術（ハイブリドーマ法（Kohler G, et al., Nature 256:495-497, 1975 参照）、トリオーマ法、ヒト B 細胞ハイブリドーマ法（Danuta Kozbor, et al., Immunology Today 4, 72-79, 1983 参照）及び EBV-ハイブリドーマ法（Cole et al., MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY:77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985）参照）によりスクリーニングすることにより作製することが可能である。

[0028] 上記イヌ化抗体は、たとえば重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を有する抗体の定常領域をイヌ抗体の定常領域に置換することにより作製することが可能である。イヌ抗体の定常領域としては公知のものを採用することができる。

[0029] 作製した本件抗イヌ抗体は、例えば、Protein A、Protein G カラムによるクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、硫酸塩析法、ゲル濾過、アフィニティクロマトグラフィーなどを用いて精製することができる。

[0030] 本件抗イヌ抗体を含有することを特徴とするイヌ PD-1 とイヌ PD-L1 との結合阻害剤としては、本件抗イヌ抗体を含有していれば特に制限されず、抗イヌ PD-1 抗体及び／又は抗イヌ PD-L1 抗体を複数種類含んでもよい。かかる結合阻害剤は、イヌ PD-1 とイヌ PD-L1 との結合を阻害することから、PD-L1 を発現しているイヌのがんの治療剤として用いることもできる。なお、本発明における結合阻害には、in vivo における結

合阻害も *in vitro* における結合阻害も含まれる。

[0031] 上記結合阻害剤は、製剤化のために通常使用され薬学的に許容される賦形剤、結合剤、滑沢剤、崩壊剤、防腐剤、等張化剤、安定化剤、分散剤、酸化防止剤、着色剤、香味剤、緩衝剤などの添加物を含んでいてもよい。また、上記結合阻害剤をイヌに投与する場合の投与方法としては、経口投与のほか、注射や点滴、塗布、坐剤、鼻腔内スプレーなどによる非経口投与とすることもでき、適宜任意の形態に製剤することができる。

[0032] 上記結合阻害剤中に含まれる本件抗体の量は、0.0001～50重量%、好ましくは0.001～5重量%を挙げることができる。

[0033] 本件抗イヌ抗体を用いることを特徴とするイヌPD-1とイヌPD-L1との結合阻害方法としては、本件抗イヌ抗体を用いるかぎり特に制限されず、抗イヌPD-1抗体及び／又は抗イヌPD-L1抗体を複数種類用いてもよい。

[0034] 以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

[0035] なお、以下の実施例におけるPCRに用いるプライマーを表1に示す。

[0036] [表1]

Primer name	Nucleotide sequence (5' to 3')	配列番号	Direction	Purpose
YTM1142	CCCTTCGCTCACACCTCT	43	F	to amplify the full length of cPD1
YTM1143	GGCTCCTGGTGGACAGTCT	44	R	
YTM1144	CGGTGGTCACCTCAGAACG	45	F	to amplify the full length of cPDL1
YTM1145	TGCTGAACCTCAACACACGG	46	R	
M13(-20)	GTAAACGACGGCCAG	47	F	sequence reaction
M13 reverse	CAGGAACAGCTATGAC	48	R	sequence reaction
YTM1167	<u>GTCGATGTCATGATCTTTATAATCAGGGGGCCACAGGCC</u>	51	R	Addition of 1st FLAG tag to cPD1
YTM1168	<u>GTCGATGTCATGATCTTTATAATCTGTCTCTTCAAATTG</u>	52	R	Addition of 1st FLAG tag to cPDL1
YTM838	<u>GTCGATGTCATGATCTTTATAATCGTCGATGTCATG</u>	53	R	Addition of 2nd FLAG tag
YTM1150	GGGCATTCCAGAAAGATGAG	54	F	to amplify the full length of hPDL1
YTM1151	CCCATTCTCTCTTGTCA	55	R	
YTM1153	ACTAGACTCCCTGACAGG	56	F	to amplify the extracellular domain of cPD1
YTM1154	CGGGATCCCTGCAACTGGCCGCT	57	R	
YTM1157	ATTTACTGTCACGGTTCC	58	F	to amplify the extracellular domain of hPDL1
YTM1158	CGAGATCTAGTCTTTCATTGGAGG	59	R	
YTM166	GGCCACGGTCGACTAGTACGGGGGGGGGGGGGGGG	62	F	to amplify the V region of rat heavy and light chains
YTM170	GGCCACGGTCGACTAC	63	F	
YTM171	TGCCATCAATCTTCCACTTGACA	60	R	
YTM172	AAYTTCTTGTCCACCTTGG	61	R	
YTM173	GTTGTTCAWGAAGCAGCAGCTGAGGCA	64	R	
YTM174	AATAGCCCTTGACCAGGCAT	65	R	
YTM1224	AGGATGATGTCTTATGAACAA	66	R	

F, forward; R, reverse; Bold types indicate restriction enzyme sites and underlines indicate FLAG coding region.

[0037] また、以下の実施例で用いたラット腎臓細胞株であるNRK細胞、及びヒト腎臓細胞株であるHEK293T細胞は、10%FBS、100units/mlのペニシリン、100μg/mlのストレプトマイシン、55μMの2-メルカプトエタノールを添加したDMEM培地で維持した。これらの細胞株は加湿インキュベーターにより、5%CO₂ガス濃度下、37℃で培養したものを用いた。

実施例 1

[0038] [cPD1又はcPDL1に対するラットモノクローナル抗体の作製]

1. cPD1又はcPDL1のcDNAクローニング

(プライマーの設計)

cPD1のcDNAを増幅するためのフォワードプライマー (YTM1142: 配列番号43) とリバースプライマー (YTM1143: 配列番号44) は、NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>) Accession No. XM_543338の配列に基づいて設計し、cPDL1のcDNAsを増幅するためのフォワードプライマー (YTM1144: 配列番号45) とリバースプライマー (YTM1145: 配列番号46) は、NCBI Accession No. XM_005615936.1の配列に基づいて設計した。なお、Accession No. XM_543338及びAccession No. XM_005615936.1の配列は、イヌにおいて発現が確認されていない遺伝子である。

[0039] (PCR反応)

上記プライマー対を用い、正常なイヌの胸腺のcDNAをテンプレートとし、KOD-Plus-Neo (東洋紡社製) を用い、その添付のプロトコールに従ってcPD1遺伝子とcPDL1遺伝子を増幅した。PCRは、プレ変性を94℃で2分行い、その後98℃で10秒の変性、58℃で30秒のアニーリング、68℃で60秒の伸長を35サイクル行い、さらに最終伸長を68℃で10分行った。

[0040] (ベクターへの挿入及び塩基配列の決定)

上記で調製したPCR産物をゲル精製し、pBluescript SK(-)ベクターのSma I部位に挿入し、インサートとしてcPD1又はcPDL1遺伝子を含むコンストラクトベクター(pBS-cPD1、pBS-cPDL1)を作製した。かかるコンストラクトベクターはフォワードプライマー (M13(-20) : 配列番号47) とリバースプライマー (M13 reverse : 配列番号48) を用い、BigDye (登録商標) Termination v3.1 Cycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer社製) 及びABI Prism (登録商標) 377 自動DNAシーケンサー (Applied Biosystems社製) によって塩基配列を決定した。得られたcPD1の塩基配列及びその塩基配列がコードするアミノ酸配列を図1に、cPDL1の塩基配列及びその塩基配列がコードするアミノ酸配列を図2に示すと共に、cPD1の塩基配列を配列番号49、アミノ酸配列を配列番号1に、cPDL1の塩基配列を配列番号50、アミノ酸配列を配列番号6に示す。

[0041] 2. ラットモノクローナル抗体の作製

(cPD1又はcPDL1発現ベクターの構築)

cPD1又はcPDL1タンパク質を過剰発現するレトロウイルスベクターを構築した。まず、cPD1の配列とcPDL1の配列のC末端に2つのFLAGタグ配列を加えるため、cPD1の増幅には、pBS-cPD1をテンプレートとし、フォワードプライマー (YTM1142 : 配列番号43) と、cPD1配列のC末端にFLAGタグ配列を含むリバースプライマー (YTM1167 : 配列番号51) とを用い、cPDL1の増幅には、pBS-cPDL1をテンプレートとし、フォワードプライマー (YTM1144 : 配列番号45) と、cPDL1配列のC末端にFLAGタグ配列を含むリバースプライマー (YTM1168 : 配列番号52) を用いて一次PCRを行った。

[0042] 次に、各一次PCR産物をテンプレートとし、一次PCRと同様のフォワードプライマーと、1st FLAGタグ配列にアニールするダブルFLAGタグ配列を含むリバースプライマー (YTM838 : 配列番号53) を用いて、二次PCRを行った。得られた各PCR産物をpMx-IPベクターのEcoRIとNotI部位に挿入し、pMx-IP-cPD1-FL、pMx-IP-cPDL1-FL#9を作製した。

[0043] (形質導入細胞の作製)

一般的なトランスフェクション方法によって、pMx-IP-cPD1-FL、pMx-IP-cPDL1-FL#9をNRK細胞にトランスフェクトし、cPD1を安定発現するNRK細胞、cPDL1を安定発現するNRK細胞を作製した。まず、トランスフェクションを行う1日前にNRK細胞(3.5×10^5 個)を6ウェルディッシュに播種した。細胞のトランスフェクションは、Lipofectamine 2000(In vitrogen社製)を用い、添付のプロトコールに従って行った。トランスフェクション後の細胞を48時間インキュベートし、その後、安定な形質導入細胞を得るために $7.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ のプロマイシン(Sigma-Aldrich社製)の存在下で培養し、cPD1を安定発現するNRK細胞(NRK/cPD1)、cPDL1を安定発現するNRK細胞(NRK/cPDL1)を作製した。

[0044] 上記NRK/cPD1及びNRK/cPDL1において、cPD1及びcPDL1が安定発現していることは、一次抗体として、抗FLAG M2抗体(1:1000希釈、Sigma-Aldrich社製)、二次抗体としてIgG-Dylight(登録商標)488-標識抗マウス(Biolegend社製)を用いた免疫蛍光法によって確認した。

[0045] (ラットモノクローナル抗体の作製)

cPD1又はcPDL1に対するラットモノクローナル抗体を作製するために、上述で作製したNRK/cPD1又はNRK/cPDL1($500 \mu\text{l}$ の上記DMEM培地中、 1×10^7 個)を等量のTiter Max(登録商標)Gold(CytRx社製)で乳化し、7週齢のSprague-Dawleyラット(九動社製)の後足蹠に皮肉投与した。投与から2週間後に、膝窩のリンパ節細胞を単離し、P3U1細胞と融合させた。すなわち、リンパ節単球細胞(1×10^8 個)とP3U1細胞(2×10^7 個)と混合し、無血清のRPMI 1640培地で2回洗浄した。上澄みを除去後、細胞を 37°C で2分インキュベートし、 37°C の 0.5 ml ポリエチレングリコール1500(Roche Diagnostics社製)を加え、さらに 37°C の 9 ml 無血清RPMI 1640培地を加え、 900 rpm で5分、室温にて遠心した。上澄みを除去後、10%FBSとhypoxanth

ine-aminopterin-thymidine (HAT: Life Technologies社製) を含む36 ml のGIT培地(和光純薬工業社製)で懸濁し、加湿インキュベーターにより、5%CO₂ガス濃度下、37℃で1時間培養した。4 mlのBM-Condimed H1培地(Roche Diagnostics社製)を加え、細胞を4つの96ウェル組織培養プレートに播種(100 μl/ウェル)して培養した。コロニーが得られた後、cPD1又はcPDL1を発現するNRK細胞陽性ハイブリドーマをELISA法やフローサイトメトリーで同定し、かかるハイブリドーマを限定希釈によりクローニングし、cPD1を発現するNRK細胞陽性ハイブリドーマとしてハイブリドーマ3B7-D9、ハイブリドーマ4F12-E6、cPDL1を発現するNRK細胞陽性ハイブリドーマとしてハイブリドーマH7-9、ハイブリドーマG11-6を得た。以後、ハイブリドーマ3B7-D9によって産生された抗体を「3B7-D9」、ハイブリドーマ4F12-E6によって産生された抗体を「4F12-E6」、ハイブリドーマH7-9によって産生された抗体を「H7-9」、ハイブリドーマG11-6によって産生された抗体を「G11-6」ともいう。なお、ハイブリドーマ3B7-D9、4F12-E6、H7-9、G11-6は国立大学法人山口大学共同獣医学部に保管されており、一定の条件下で分譲可能である。

実施例 2

[0046] [抗cPD1抗体又は抗cPDL1抗体であることの確認]

(抗体濃度及び細胞数)

cPD1に対するラットモノクローナル抗体である3B7-D9、4F12-E6と、上記で作製したNRK/cPD1との結合や、cPDL1に対するラットモノクローナル抗体であるH7-9、G11-6と、上記で作製したNRK/cPDL1との結合を、以下に示すフローサイトメトリー解析により調べた。各ラットモノクローナル抗体の濃度は0、0.04、0.156、0.625、2.5、10 μg/mlであり、NRK/cPD1 (2×10⁵個) 又はNRK/cPDL1 (2×10⁵個) を用いた。

[0047] (フローサイトメトリー解析)

フローサイトメトリー解析に用いる細胞株の染色は次の文献 (Mizuno et al., J Vet Med Sci, 71(12):1561-1568, 2009) に記載の方法に従って行った。一次抗体としては、精製した c P D 1 又は c P D L 1 に対する各ラットモノクローナル抗体を用いた。二次抗体としては抗ラット I g G - P E (Southern biotech社製)を用いた。サンプルはBD AccuriC6 (BD Bioscience社製)を用いて解析し、得られた結果をFlowJo software (Treestar社製)によって解析した。

[0048] (結果)

結果を図3に示す。図3 (A) は c P D 1 に対するラットモノクローナル抗体 (anti-cPD1 mAb) と N R K / c P D 1 との結合を調べた結果であり、図3 (B) は c P D L 1 に対するラットモノクローナル抗体 (anti-cPD-L1 mAb) と N R K / c P D L 1 との結合を調べた結果である。横軸は作製した抗体に対する蛍光標識二次抗体の蛍光強度、縦軸は各ラットモノクローナル抗体の濃度を示す。図3に示すように、いずれのラットモノクローナル抗体を用いた場合でも蛍光強度が増加しており、c P D 1 に対するラットモノクローナル抗体である 3 B 7 - D 9、4 F 1 2 - E 6 は N R K / c P D 1 と結合し、c P D L 1 に対するラットモノクローナル抗体である H 7 - 9、G 1 1 - 6 は、N R K / c P D L 1 に結合することが確認された。すなわち、3 B 7 - D 9、4 F 1 2 - E 6 は抗 c P D 1 抗体であり、H 7 - 9、G 1 1 - 6 は、抗 c P D L 1 抗体であることが明らかとなった。

実施例 3

[0049] [ラットモノクローナル抗体による P D - 1 と P D - L 1 との結合阻害試験]

1. c P D 1 とヒト I g F c 領域との融合タンパク質、ヒトの P D - L 1 (h P D L 1) とヒト I g F c 領域との融合タンパク質の作製
(h P D L 1 発現プラスミドの構築)

h P D L 1 発現プラスミドを構築するため、ヒトのバーキットリンパ腫細胞株 (R a j i) 由来の c D N A をテンプレートとし、フォワードプライマ

ー (YTM1150 : 配列番号 54) とリバープライマー (YTM1151 : 配列番号 55) を用いて hPDL1 を増幅した。PCR による増幅は上記実施例 1 と同様に行った。増幅した PCR 産物を pBluescript SK(-) ベクターの Sma I 部位に導入した。このプラスミドを EcoRI と NotI で切断し、得られた断片を pMxs-IP ベクターの EcoRI と NotI 部位に連結し、hPDL1 発現プラスミドである pMx-IP-hPDL1#21 を作製した。

[0050] (融合タンパク質発現ベクターの作製)

cPD1 又は hPDL1 の細胞外領域と、ヒト IgG2 Fc 領域との融合タンパク質とを発現するベクターを構築した。かかる発現ベクターを作製するために、実施例 1 で作製した pMx-IP-cPD1-FL をテンプレートとしてフォワードプライマー (YTM1153 : 配列番号 56) とリバープライマー (YTM1154 : 配列番号 57) を用いて PCR を行うことで cPD1 の細胞外領域を増幅し、上述で作製した pMx-IP-hPDL1#21 をテンプレートとしてフォワードプライマー (YTM1157 : 配列番号 58) とリバープライマー (YTM1158 : 配列番号 59) を用いて PCR を行うことで hPDL1 の細胞外領域を増幅した。それぞれの PCR 産物は、cPD1 については BamHI、hPDL1 については BglII で切断し、pFUSE-hIgG2-Fc2 ベクター (Invivogen 社製) の EcoRV と BglII 部位にクローニングし、cPD1 の細胞外領域と、ヒト IgG2 Fc 領域との融合タンパク質とを発現するベクター (pFUSE-cPD1-hIg#2)、hPDL1 の細胞外領域と、ヒト IgG2 Fc 領域との融合タンパク質とを発現するベクター (pFUSE-hPDL1-hIg#9) を作製した。

[0051] (融合タンパク質の作製及び精製)

上述で作製したベクター pFUSE-cPD1-hIg#2、pFUSE-hPDL1-hIg#9、又は空ベクターの pFUSE-hIgG2-Fc2 を HEK293T 細胞株にトランスフェクトした。まず、トランスフェクションを行う 1 日前に、 2×10^6 個の HEK293T 細胞を 4 つの 10cm ディッシュに播種した。次に、7.5 μ g の各ベクターと 30 μ l の 1mg/ml PEI Max を含む 375 μ l の OPTI-MEM を混合して室温で 15 分インキュベートし、細胞に加えた。トランスフェクションか

ら24時間後に、培地をGIT無血清培地（和光純薬工業社製）に置換し、さらに細胞を48時間培養した。4日目と8日目の各トランスフェクト細胞から上澄みを集め、rProtein A agarose（GE healthcare社製）によって精製した。続いて、可溶性タンパク質を透析によって脱塩し、cPD1の細胞外領域とhlgG2Fc領域との融合タンパク質（cPD1-hlg）、及び、hPDL1の細胞外領域とhlgG2Fc領域との融合タンパク質（hPDL1-hlg）を作製した。上記融合タンパク質の純度は、SDS-PAGEとウェスタンブロッティングによって確認した。

[0052] 2. PD-1とPD-L1との結合試験

後述するラットモノクローナル抗体によるPD-1とPD-L1との阻害試験の予備試験として、hPDL1-hlgとNRK/cPD1との結合、又はcPD1-hlgとNRK/cPDL1との結合を、上記フローサイトメトリー解析と同様の方法で調べた。hPDL1-hlg、cPD1-hlgの濃度は0、0.04、0.156、0.625、2.5、10、40 μ g/mlとし、NRK/cPD1（ 2×10^5 個）又はNRK/cPDL1（ 2×10^5 個）を用いた。結果を図4に示す。図4（A）はhPDL1-hlgとNRK/cPD1との結合を調べた結果であり、図4（B）はcPD1-hlgとNRK/cPDL1との結合を調べた結果である。横軸は作製した融合タンパク質に対する蛍光標識二次抗体の蛍光強度、縦軸はhPDL1-hlg又はcPD1-hlgの濃度を示す。図4に示すように、hPDL1-hlgはNRK/cPD1に結合し、cPD1-hlgはNRK/cPDL1に結合することが明らかとなった。

[0053] 3. ラットモノクローナル抗体によるPD-1とPD-L1との結合阻害試験

（フローサイトメトリー解析）

（1）NRK/cPD1に、cPD1に対するラットモノクローナル抗体（3B7-D9、4F12-E6）を反応させ、その後hPDL1-hlgを反応させることで、hPDL1-hlgとNRK/cPD1との結合をc

PD1に対するラットモノクローナル抗体が阻害するか、(2) NRK/cPDL1に、cPDL1に対するラットモノクローナル抗体(H7-9、G11-6)を反応させ、その後cPD1-hlgを反応させることで、cPD1-hlgとNRK/cPDL1との結合をcPDL1に対するラットモノクローナル抗体が阻害するか、又は(3) cPD1に対するラットモノクローナル抗体(3B7-D9、4F12-E6)とcPD1-hlgを反応させ、その後その混合反応物をNRK/cPDL1に反応させることで、cPD1-hlgとNRK/cPDL1との結合をcPD1に対するラットモノクローナル抗体が阻害するか、の3点をそれぞれ調べた。各抗体によるPD-1とPD-L1との結合阻害は上記フローサイトメトリー解析と同様に調べた。各ラットモノクローナル抗体の濃度は0、0.04、0.156、0.625、2.5、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とし、hPDL1-hlg、cPD1-hlgの濃度は40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とし、NRK/cPD1 (2×10^5 個)又はNRK/cPDL1 (2×10^5 個)を用いた。

[0054] (結果)

結果を図5、6に示す。図5(A)はcPD1に対するラットモノクローナル抗体によるhPDL1-hlgとNRK/cPD1との結合阻害を調べた結果であり、図5(B)はcPDL1に対するラットモノクローナル抗体によるcPD1-hlgとNRK/cPDL1との結合阻害を調べた結果であり、図6はcPD1に対するラットモノクローナル抗体によるcPD1-hlgとNRK/cPDL1との結合阻害を調べた結果である。横軸は作製した抗体に対する蛍光標識二次抗体の蛍光強度、縦軸左は各ラットモノクローナル抗体の濃度、縦軸右はhPDL1-hlg又はcPD1-hlgの有(+)／無し(-)を示す。図5(A)、(B)、図6に示すように、hPDL1-hlgとNRK/cPD1との結合や、cPD1-hlgとNRK/cPDL1との結合をcPD1に対するラットモノクローナル抗体である3B7-D9、4F12-E6が阻害し、cPD1-hlgとNRK/cPDL1との結合をcPDL1に対するラットモノクローナル抗体であるH

7-9、G11-6が阻害することが明らかとなった。

実施例 4

[0055] [ラットモノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖の塩基配列の決定]

トータルRNAを実施例1で得られた各ハイブリドーマ細胞株から単離し、全ての可変領域と定常領域の5'領域を含む、免疫グロブリン重鎖(IgG2a)の塩基配列とκ軽鎖の塩基配列を5' RACE PCR法によって得た。

[0056] まず、単離したRNAを逆転写酵素Superscript (登録商標) IIIを用いて逆転写した。プライマーとしては、軽鎖の増幅にはYTM171 (配列番号60)、重鎖の増幅にはYTM172 (配列番号61)を用いた。逆転写反応後、TdT酵素反応によりpolyCを付加し、その後、軽鎖の増幅にはフォワードプライマー (YTM166: 配列番号62) とリバースプライマー (YTM171: 配列番号60)、重鎖の増幅にはフォワードプライマー (YTM166: 配列番号62) とリバースプライマー (YTM172: 配列番号61) を用いて一次PCRを行った。PCR産物をゲル精製し、軽鎖又は重鎖の全ての可変領域を増幅するために、フォワードプライマー (YTM170: 配列番号63) とリバースプライマー (YTM173: 配列番号64)、又はフォワードプライマー (YTM170: 配列番号63) とリバースプライマー (YTM174: 配列番号65) を用いてnested PCRを行った。ハイブリドーマ3B7-D9及びハイブリドーマG11-6においては、5' RACEや一次PCRにおけるプライマーとしてYTM171の代わりにYTM1224 (配列番号42)、を用いた。Nested PCR産物をpBluescript SK(-)ベクターにクローニングし、その塩基配列及びその塩基配列がコードするアミノ酸配列を決定した。

[0057] 3B7-D9の重鎖可変領域の塩基配列を配列番号35に、アミノ酸配列を配列番号2に、軽鎖可変領域の塩基配列を配列番号36に、アミノ酸配列を配列番号3に、4F12-E6の重鎖可変領域の塩基配列を配列番号37に、アミノ酸配列を配列番号4に、軽鎖可変領域の塩基配列を配列番号38に、アミノ酸配列を配列番号5に、H7-9の重鎖可変領域の塩基配列を配

列番号 39 に、アミノ酸配列を配列番号 7 に、軽鎖可変領域の塩基配列を配列番号 40 に、アミノ酸配列を配列番号 8 に、G11-6 の重鎖可変領域の塩基配列を配列番号 41 に、アミノ酸配列を配列番号 9 に、軽鎖可変領域の塩基配列を配列番号 42 に、アミノ酸配列を配列番号 10 に示す。

[0058] さらに、それぞれの重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の CDR のアミノ酸配列を、既知の抗体のアミノ酸配列と比較することにより同定した。3B7-D9 の重鎖可変領域の CDR 1~3 のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号 11~13、軽鎖可変領域の CDR 1~3 のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号 14~16 に、4F12-E6 の重鎖可変領域の CDR 1~3 のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号 17~19、軽鎖可変領域の CDR 1~3 のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号 20~22 に、H7-9 の重鎖可変領域の CDR 1~3 のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号 23~25、軽鎖可変領域の CDR 1~3 のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号 26~28 に、G11-6 の重鎖可変領域の CDR 1~3 のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号 29~31、軽鎖可変領域の CDR 1~3 のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号 32~34 に示す。

実施例 5

[0059] [IFN- γ の産生増強]

3頭のイヌ (A, B, C) より末梢血単核細胞 (PBMC) を回収し、PBMC を 96 ウェル丸底プレート中にウェル当たり 2×10^5 個、isotype (ラット IgG2a: eBioscience 社製)、PD-1 に対するラットモノクローナル抗体 (anti-PD-1: 4F12-E6)、又は cPDL1 に対するラットモノクローナル抗体 (anti-PD-L1: G11-6) を $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度となるように加えて、さらにコンカナバリン A (ConA) を $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように加えて 3 日間刺激培養し、得られた培養上清中のイヌ IFN- γ を canine IFN-gamma DuoSet ELISA (R&D 社製) により測定した。結果を図 7 に示す。

[0060] 図 7 から明らかなように、ConA 刺激により産生される IFN γ は、a

n t i - P D - 1 である 4 F 1 2 - E 6 や a n t i - P D - L 1 である G 1 1 - 6 の存在下で産生増強される傾向がみられた。このことから、C o n A 刺激によりイヌの T 細胞では P D - 1 及び P D - L 1 の発現が増強し、それらがその P D - L 1 が P D - 1 に結合することで過剰な T 細胞の活性化を防いでいる可能性が示唆され、得られた P D - 1 及び P D - L 1 抗体は、イヌの細胞上に発現する P D - 1 及び P D - L 1 両分子の相互作用を阻害できることが示唆された。

実施例 6

[0061] [P M A (Phorbol-12-myristate-13-acetate) / i o n o m y c i n (i o n o) 又は C o n A 存在下での P D - 1 又は P D - L 1 の発現誘導]

イヌ P B M C を P M A / i o n o m y c i n 又は C o n A 存在下で 3 日間培養し、P B M C を回収後、C D 3 陽性分画 (T 細胞) における P D - 1、P D - L 1 の発現を、c P D 1 に対するラットモノクローナル抗体 (4 F 1 2 - E 6) 又は c P D L 1 に対するラットモノクローナル抗体 (G 1 1 - 6) を用いてフローサイトメトリー解析した。結果を図 8 に示す。

[0062] 図 8 から明らかなように、活性化イヌ T 細胞には、P D - 1 も P D - L 1 も発現が誘導されていることが明らかとなった。このように、本発明の抗体を用いることで、T 細胞における P D - 1 又は P D - L 1 の発現を調べることが可能であること、換言すれば、イヌの細胞における細胞表面に発現する P D - 1 や P D - L 1 の発現を調べることが可能であることが明らかとなった。

実施例 7

[0063] [I L - 4 又は G M - C S F 存在下での P D - 1 又は P D - L 1 の発現誘導]

イヌ P B M C より磁気ビーズにより分離した C D 1 4 陽性単球を I L - 4 及び G M - C S F 存在下で 6 日間培養し、未成熟樹状細胞を誘導した。未成熟樹状細胞であることは、M H C C l a s s I I 抗体 (eBioscience 社製) を同時に染色することで確認した。得られた未成熟樹状細胞における P D -

1 又は PD-L1 の発現を cPD1 に対するラットモノクローナル抗体 (4F12-E6)、又は cPDL1 に対するラットモノクローナル抗体 (G11-6) を用いてフローサイトメトリー解析した結果を図9に示す。

[0064] 図9に示すとおり、PD-1 は発現しておらず、PDL-1 が発現していることが確認できた。このように、本発明の抗体を用いることで、未成熟樹状細胞における PD-1 又は PD-L1 の発現を調べるのが可能であることが明らかとなった。

産業上の利用可能性

[0065] 本発明で得られたラットモノクローナル抗体は、イヌPD-1 又はイヌPD-L1 を認識して結合可能であることから、イヌPD-1 又はイヌPD-L1 の発現解析や機能解析に用いることができるほか、イヌPD-1 とイヌPD-L1 との結合阻害剤として用いることができる。

請求の範囲

[請求項1] 配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるイヌPD-1に特異的に結合する、以下の(a)又は(b)記載の抗イヌPD-1抗体。

(a) 配列番号2に示されるアミノ酸配列、又は配列番号2に示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号3に示されるアミノ酸配列、又は配列番号3に示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を備えたことを特徴とする抗イヌPD-1抗体；

(b) 配列番号4に示されるアミノ酸配列、又は配列番号4に示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号5に示されるアミノ酸配列、又は配列番号5に示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を備えたことを特徴とする抗イヌPD-1抗体；

[請求項2] 配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるイヌPD-L1に特異的に結合する、以下の(c)又は(d)記載の抗イヌPD-L1抗体。

(c) 配列番号7に示されるアミノ酸配列、又は配列番号7に示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号8に示されるアミノ酸配列、又は配列番号8に示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を備えたことを特徴とする抗イヌPD-L1抗体；

(d) 配列番号9に示されるアミノ酸配列、又は配列番号9に示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、及び配列番号10に示されるアミノ酸配列、又は配列番号10に示されるアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を備えたことを特徴とする抗イヌPD

－ L 1 抗体；

[請求項3] 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列からなるイヌ PD－1 に特異的に結合する、以下の (e) 又は (f) 記載の抗イヌ PD－1 抗体。

(e) 配列番号 11 に示されるアミノ酸配列からなる CDR 1、配列番号 12 に示されるアミノ酸配列からなる CDR 2 及び配列番号 13 に示されるアミノ酸配列からなる CDR 3 を含む重鎖可変領域と、配列番号 14 に示されるアミノ酸配列からなる CDR 1、配列番号 15 に示されるアミノ酸配列からなる CDR 2 及び配列番号 16 に示されるアミノ酸配列からなる CDR 3 を含む軽鎖可変領域を備えたことを特徴とする抗イヌ PD－1 抗体；

(f) 配列番号 17 に示されるアミノ酸配列からなる CDR 1、配列番号 18 に示されるアミノ酸配列からなる CDR 2 及び配列番号 19 に示されるアミノ酸配列からなる CDR 3 を含む重鎖可変領域と、配列番号 20 に示されるアミノ酸配列からなる CDR 1、配列番号 21 に示されるアミノ酸配列からなる CDR 2 及び配列番号 22 に示されるアミノ酸配列からなる CDR 3 を含む軽鎖可変領域を備えたことを特徴とする抗イヌ PD－1 抗体；

[請求項4] 配列番号 6 に示されるアミノ酸配列からなるイヌ PD－L 1 に特異的に結合する、以下の (g) 又は (h) 記載の抗イヌ PD－L 1 抗体。

(g) 配列番号 23 に示されるアミノ酸配列からなる CDR 1、配列番号 24 に示されるアミノ酸配列からなる CDR 2 及び配列番号 25 に示されるアミノ酸配列からなる CDR 3 を含む重鎖可変領域と、配列番号 26 に示されるアミノ酸配列からなる CDR 1、配列番号 27 に示されるアミノ酸配列からなる CDR 2 及び配列番号 28 に示されるアミノ酸配列からなる CDR 3 を含む軽鎖可変領域を備えたことを特徴とする抗イヌ PD－L 1 抗体；

(h) 配列番号 29 に示されるアミノ酸配列からなる CDR 1、配列番号 30 に示されるアミノ酸配列からなる CDR 2 及び配列番号 31

に示されるアミノ酸配列からなるCDR3を含む重鎖可変領域と、配列番号32に示されるアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号33に示されるアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号34に示されるアミノ酸配列からなるCDR3を含む軽鎖可変領域を備えたことを特徴とする抗イヌPD-L1抗体；

- [請求項5] 請求項1～4のいずれか記載の抗体を含有することを特徴とするイヌPD-1とイヌPD-L1との結合阻害剤。
- [請求項6] 請求項1～4のいずれか記載の抗体を用いることを特徴とするイヌPD-1とイヌPD-L1との結合阻害方法。
- [請求項7] 請求項1～4のいずれか記載の抗体をコードする遺伝子。

[図1]

ccgctcacacctct GCGGGAGCCCGGGGGAGGGCGAGCAGGCGGGCTGGCGCTCCGGGC ccttt
 66 ATGGGGAGCCCGGCGGGGGCCCTGGCCGCTCGTCTGGGGCCCTGCTGCAGCTGGGCTGGTGG
 1 M G S R R G P W P L V W A V L Q L G W W
 126 CCAGGATGGCTCCTAGACTCCCTGACAGGCCCTGGAGCCCGCTCACCTTCTCCCGGGCG
 21 P G W L L D S F D R P W S P L T F S P A
 186 CAGCTCACGGTGCAGGAGGGAGAGAACGCCACCTTCACCTGCAGCCTGGCCGACATCCCC
 41 Q L T V Q E G E N A T F T C S L A D I P
 246 GACAGCTTCGTGCTCAACTGGTACCGCCTGAGCCCCCGCAACCAGACGGACAAGCTGGCC
 61 D S F V L N W Y R L S P R N Q T D K L A
 306 GCCTTCCAGGAGGACCGCATCGAGCCGGGCGGGACAGGCGCTTCCGCGTCACGCGGCTG
 81 A F Q E D R I E P G R D R R F R V T R L
 366 CCCAACGGGCGGGACTTCCACATGAGCATCGTTCGCTGCGCGCCTCAACGACAGCGGCATC
 101 P N G R D F H M S I V A A R L N D S G I
 426 TACCTGTGCGGGGCCATCTACCTGCCCCCAACACACAGATCAACGAGAGTCCCCGCGCA
 121 Y L C G A I Y L P P N T Q I N E S P R A
 486 GAGCTCTCCGTGACGGAGAGAACCTGGAGCCCCCACACAGAGCCCCAGCCCCCACCC
 141 E L S V T E R T L E P P T Q S P S P P P
 546 AGACTCAGCGGCCAGTTGCAGGGGCTGGTCATCGGCGTCACGAGCGTGTGGTGGGTGTC
 161 R L S G Q L Q G L V I G V T S V L V G V
 606 CTGCTACTGCTGCTGCTGACCTGGGTCTGGCCGCTGTCTTCCCCAGGGCCACCCGAGGT
 181 L L L L L L T W V L A A V F P R A T R G
 666 GCCTGTGTGTGCGGGAGCGAGGACGAGCCTCTGAAGGAGGGCCCCGATGCAGCGCCCGTC
 201 A C V C G S E D E P L K E G P D A A P V
 726 TTCACCCTGGACTACGGGAGCTGGACTTCCAGTGGCGAGAGAAGACGCGGAGCCCCCG
 221 P T L D Y G E L D F Q W R E K T P E P P
 786 GCGCCCTGTGCCCCGGAGCAGACCGAGTATGCCACCATCGTCTTCCCGGGCAGGCCGGCG
 241 A P C A P E Q T E Y A T I V F P G R P A
 846 TCCCCGGGCCCCAGGGCCTCGGCCAGCAGCCTGCAGGGAGCCCAGCCTCCGAGCCCCGAG
 261 S P G R R A S A S S L Q G A Q P P S P E
 906 GACGGACCCGGCCTGTGGCCCCCCTGACCGGCCGCTCCGCTGGCCCATGTCTGCAGAC
 281 D G P G L W P P *

TGTCCACCAGGAGCC

[図2]

CGGTGGTCACTTCAGAACG

20 ATGAGAATGTTTACTGTCTTTACATTCATGGCCTACTGCCATTTGCTAAAAGCATTACG
 1 M R M F S V F T F M A Y C H L L K A F T

80 ATCACAGTTTCTAAGGACCTGTATGTGGTAGAGTATGCTGGCAATGTGACAATGGAATGC
 21 I T V S K D L Y V V E Y G G N V T M E C

140 AAATTCCCGGTGGAAAAACAGTTAAACTTGTGTTGCACTAATCGTCTACTGGGAAATGGAG
 41 K F P V E K Q L N L F A L I V Y W E M E

200 GATAAAAAAATTATACAATTTGTGAATGGAAAGGAAGACCTGAAAGTTCAGCACAGCAGC
 61 D K K I I Q F V N G K E D L K V Q H S S

260 TACAGCCAGAGGGCTCAGCTATTGAAGGACCAGCTCTTCTTGGGGAAGGCTGCGCTTCAG
 81 Y S Q R A Q L L K D Q L F L G K A A L Q

320 ATCACAGATGTGAGATTGCAGGATGCAGGGGTTTACTGCTGCTTGATCGGCTATGGCGGT
 101 I T D V R L Q D A G V Y C C L I G Y G G

380 GCTGACTACAAGCGGATTACTTTGAAAGTTCATGCCCCGTACCGCAACATCAGCCAAAGA
 121 A D Y K R I T L K V H A P Y R N I S Q R

440 ATTTCTGTGGATCCTGTACCTCTGAACATGAACTAATGTGTCAGGCTGAGGGTTACCCT
 141 I S V D P V T S E H E L M C Q A E G Y P

500 GAGGCTGAAGTCATCTGGACAAGCACTGACCACCGAGTCCTGAGTGGCAAAACCACCATC
 161 E A E V I W T S S D H R V L S G K T T I

560 ACTAATTCCAATAGGGAAGAGAAGCTTTTCAATGTGACCAGCACGCTGAACATCAATGCA
 181 T N S N R E E K L F N V T S T L N I N A

620 ACAGCTAATGAGATTTTCTACTGCACTTTTCAAAGATCAGGTCCTGAGGAAAACAATACT
 201 T A N E I F Y C T F Q R S G P E E N N T

680 GCCGAGTTGGTCATCCCAGAACGACTGCCCGTTCCAGCAAGTGAGAGGACTCATTTTCATG
 221 A E L V I P E R L P V P A S E R T H F M

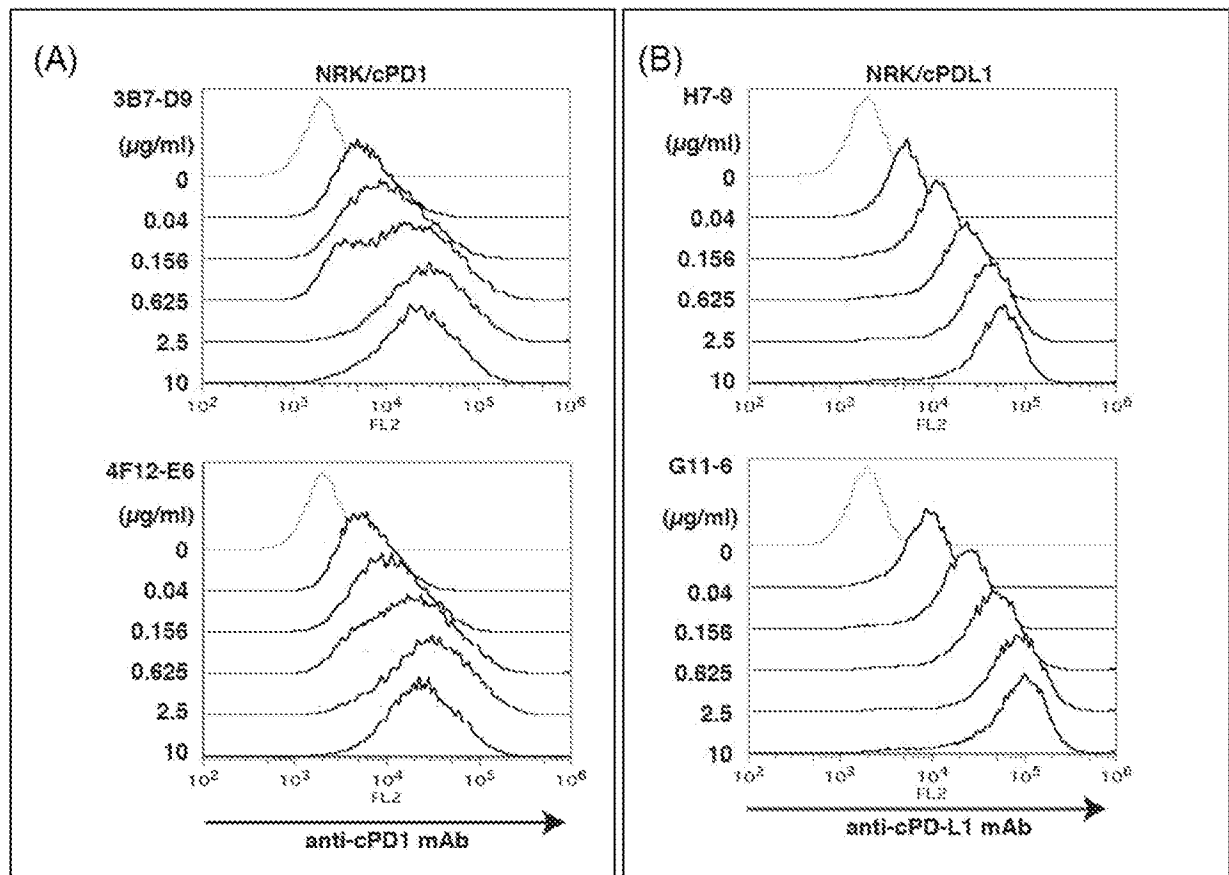
740 ATTCTGGGACCTTTCTGTGCTTCTTGGTGTAGTCCTGBCAGTCACTTTCTGTCTAAAA
 241 I L G P F L L L L G V V L A V T F C L K

800 AAACATGGGAGAATGATGGATGTGGAAAAATGTTGCACCCGAGATAGGAACTCAAAGAAA
 261 K H G R M M D V E K C C T R D R N S K K

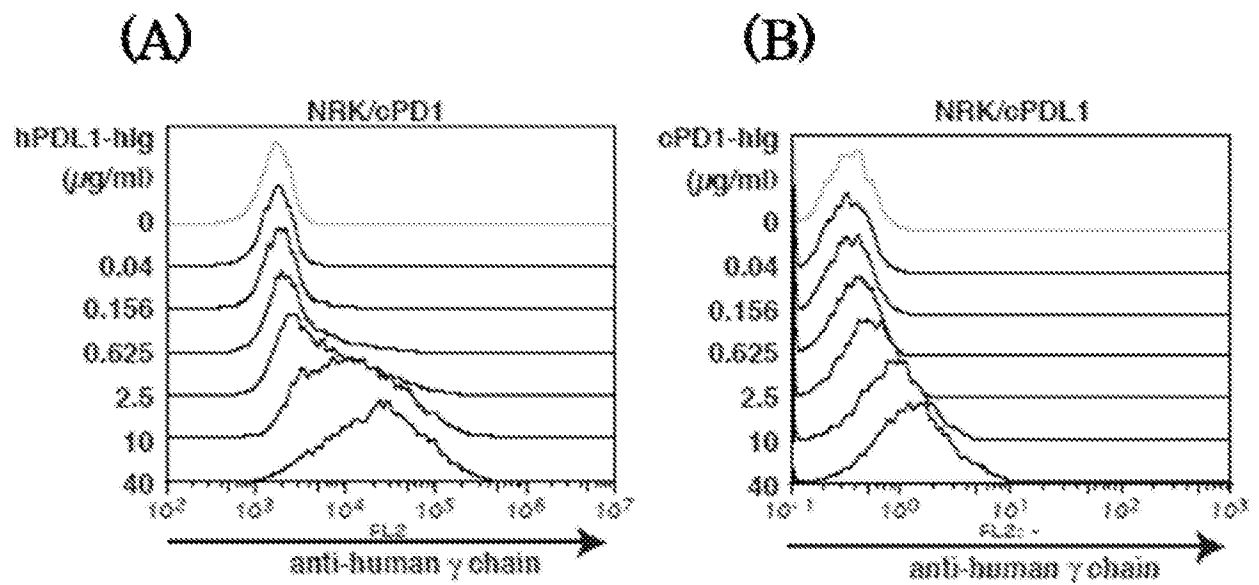
860 CGAAATGATATACAATTTGAAGAGACATAATCCAGCATGGAAACTCCTGATCTTAAAGCA
 281 R N D I Q F E E T *

GGGATTCTCGGCCTGTGGTTTGAGTTCAGCA

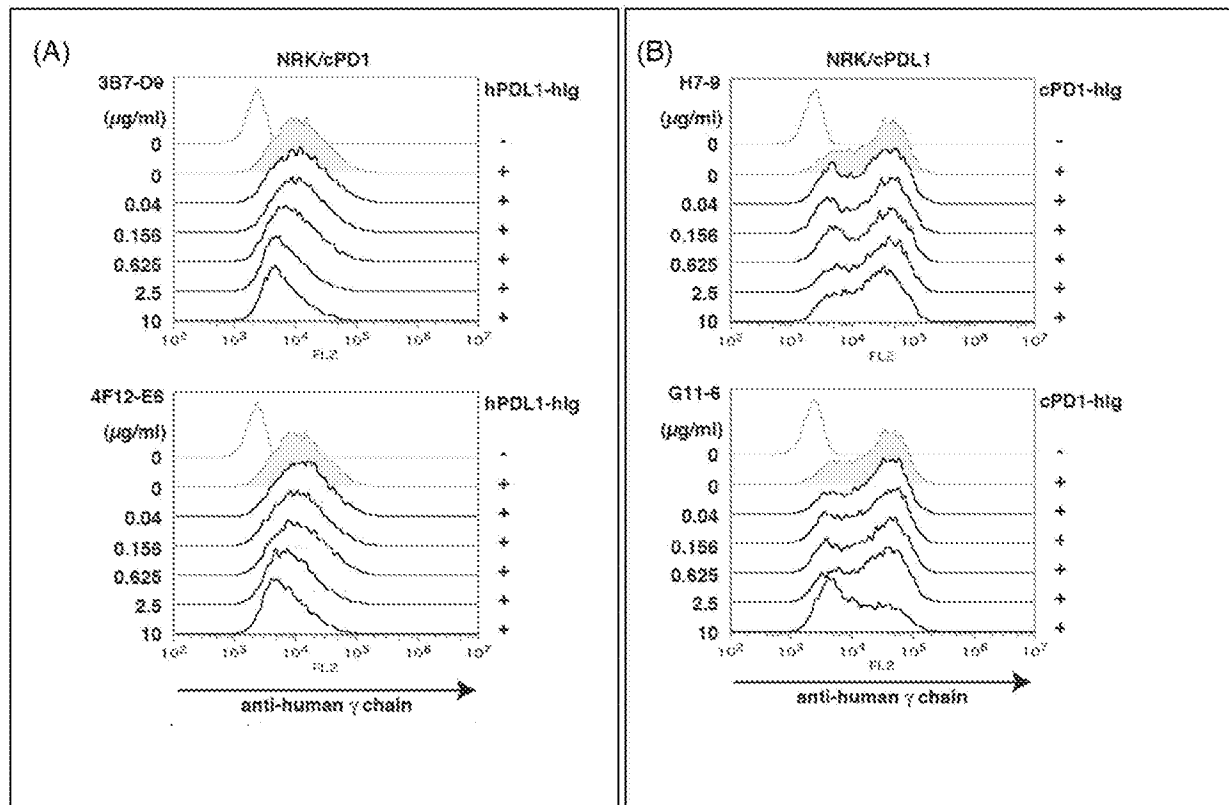
[図3]



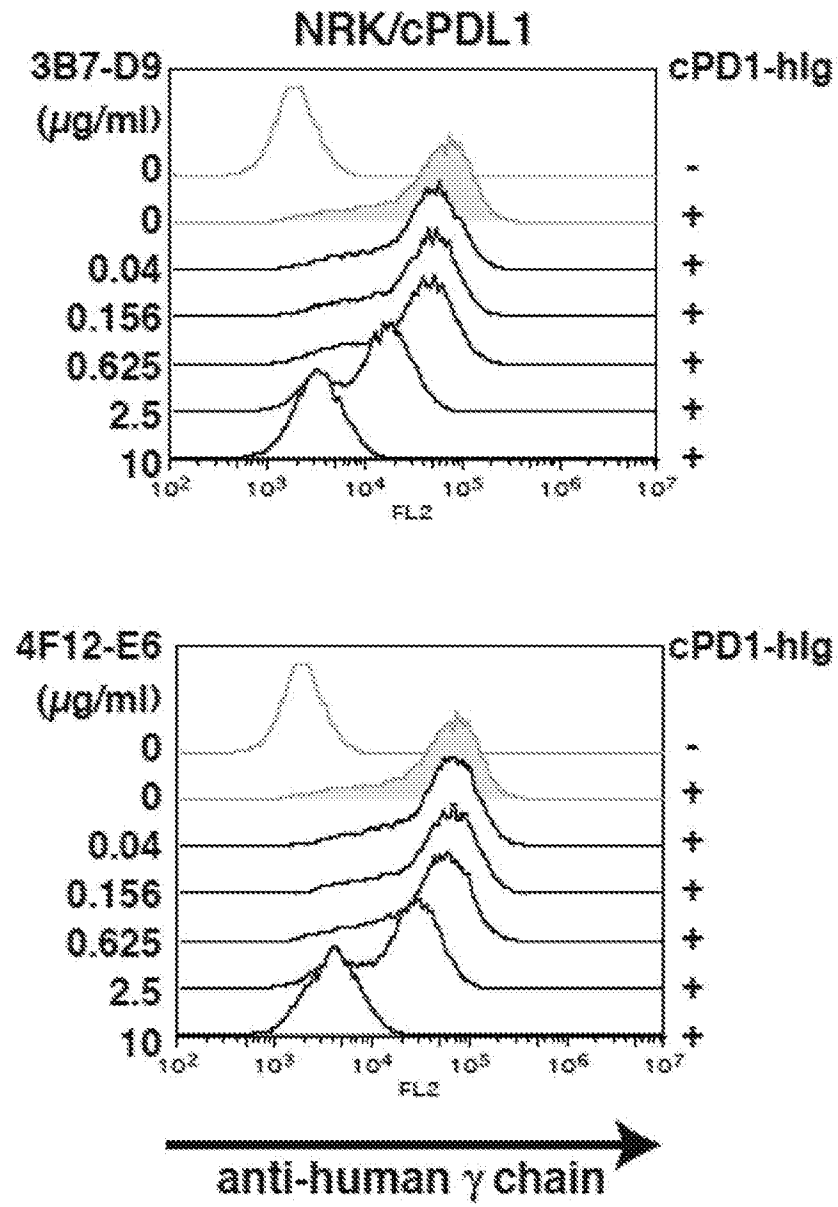
[図4]



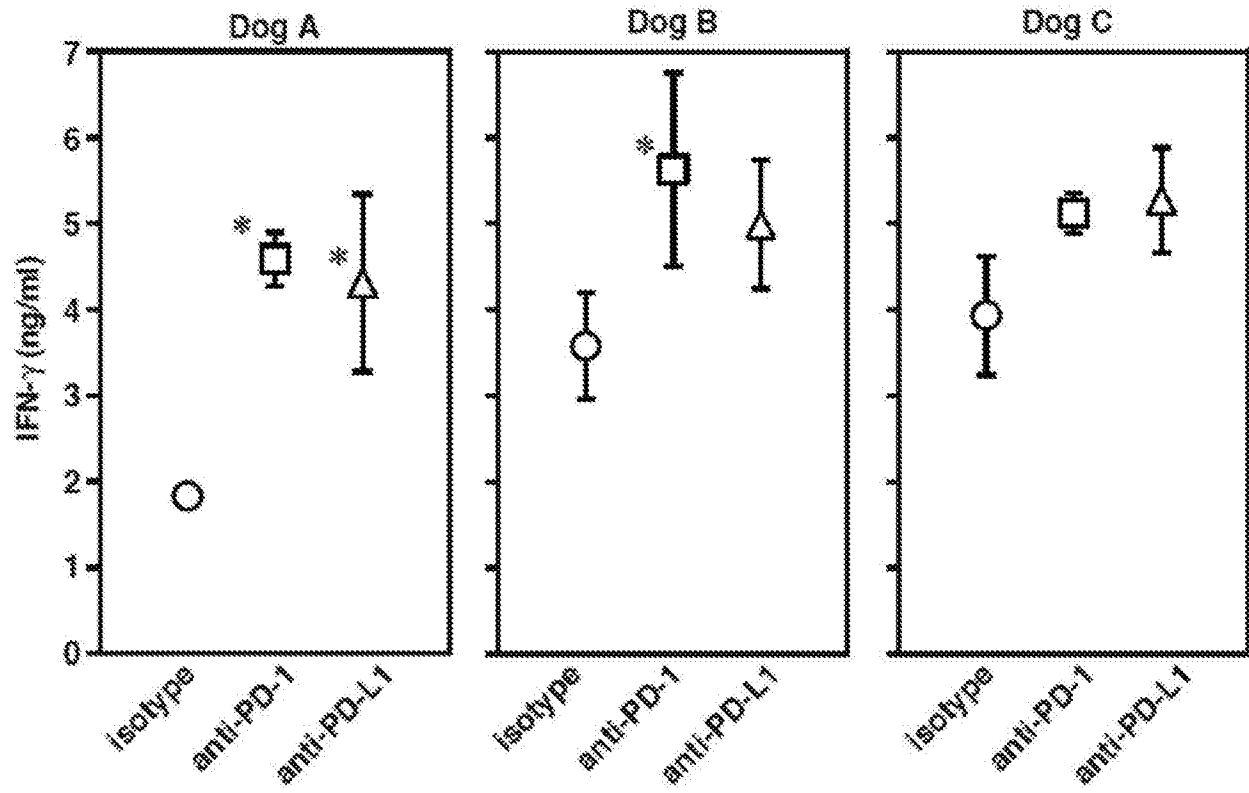
[図5]



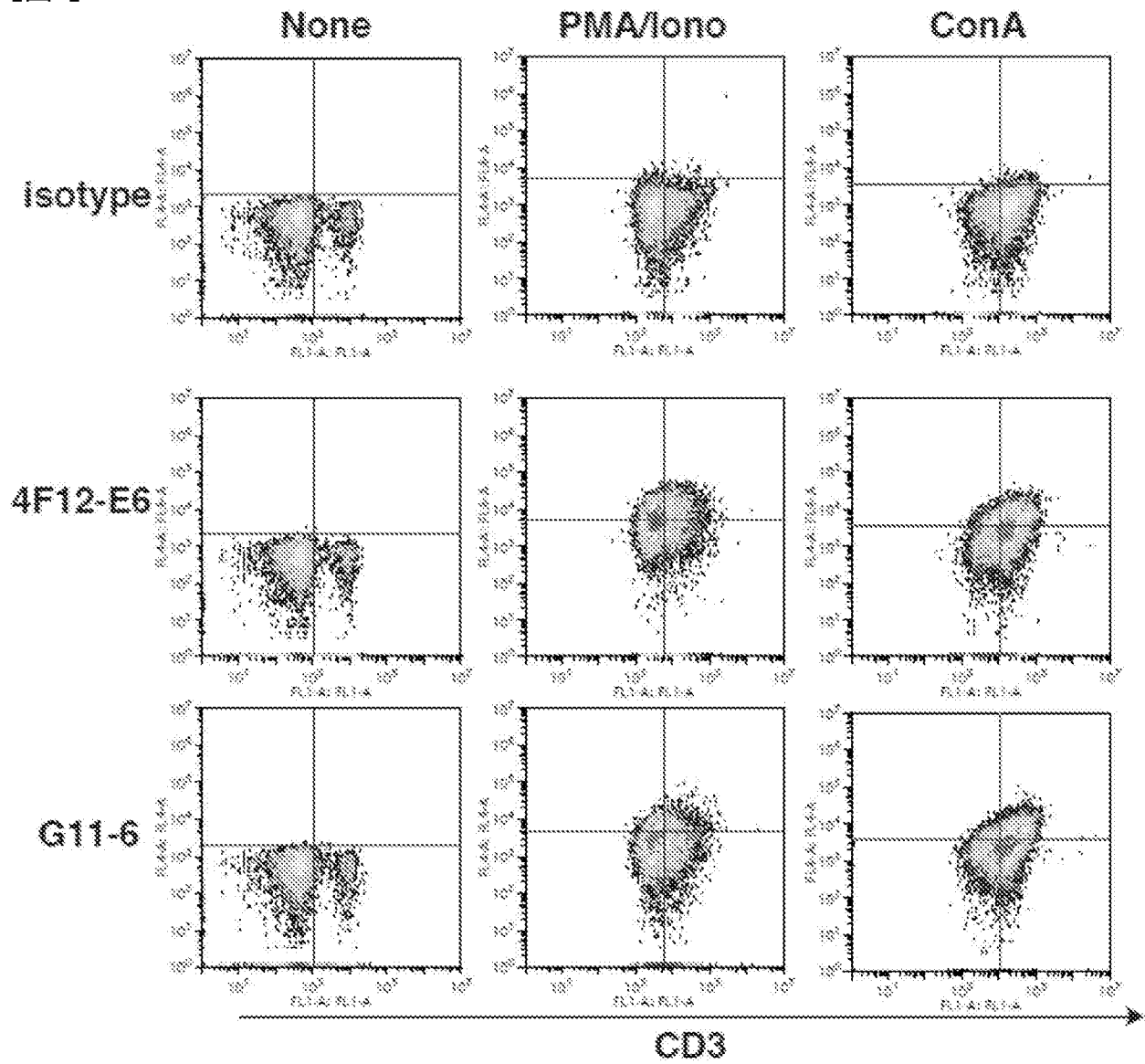
[図6]



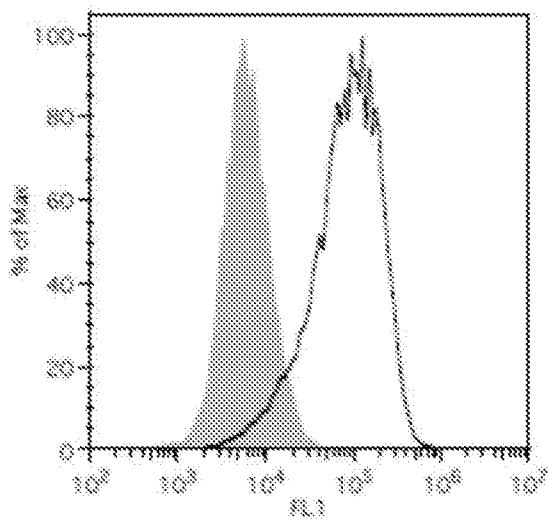
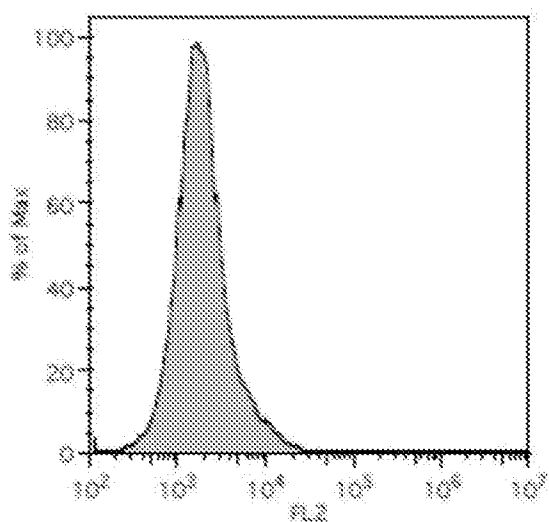
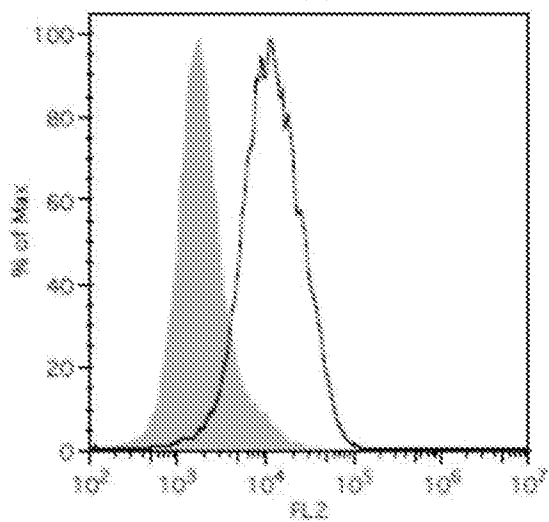
[図7]



[図8]



[図9]

MHCII**4F12-E6****G11-6**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/003444

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K16/28(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K16/00-16/46, A61K39/395, A61P35/00, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	WO 2013/173223 A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB CO.), 21 November 2013 (21.11.2013), claims; page 16, lines 20 to 26; page 19, line 23 to page 35, line 19 & JP 2015-518826 A & US 2015/0125463 A1 & US 2013/0309250 A1 & CA 2873402 A & AU 2013263076 A & IL 235591 A & KR 10-2015-0020189 A & CN 104470949 A & MX 2014013565 A & EA 201492105 A	1, 2, 5-7 3, 4
Y A	MEAEKAWA et al., Expression of PD-L1 on canine tumor cells and enhancement of IFN- γ production from tumor-infiltrating cells by PD-L1 blockade, PLOS ONE, 2014.06, Vol.9, Issue 6, e98415	1, 2, 5-7 3, 4

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
24 August 2015 (24.08.15)

Date of mailing of the international search report
08 September 2015 (08.09.15)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C07K16/28(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C07K16/00-16/46, A61K39/395, A61P35/00, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 5 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 5 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 5 年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y A	WO 2013/173223 A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 2013.11.21, 請求の範囲、第16頁第20-26行、第19頁第23行-第35 頁第19行 & JP 2015-518826 A & US 2015/0125463 A1 & US 2013/0309250 A1 & CA 2873402 A & AU 2013263076 A & IL 235591 A & KR 10-2015-0020189 A & CN 104470949 A & MX 2014013565 A & EA 201492105 A	1, 2, 5-7 3, 4

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 4 . 0 8 . 2 0 1 5

国際調査報告の発送日

0 8 . 0 9 . 2 0 1 5

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

中根 知大

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

4 N

4 0 4 7

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y A	MEAEKAWA et al., Expression of PD-L1 on canine tumor cells and enhancement of IFN- γ production from tumor-infiltrating cells by PD-L1 blockade, PLOS ONE, 2014.06, Vol.9, Issue 6, e98415	1, 2, 5-7 3, 4