

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-526974

(P2018-526974A)

(43) 公表日 平成30年9月20日(2018.9.20)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C12N 15/13 (2006.01)</b>	C12N 15/13 ZNA	4B064
<b>C07K 16/28 (2006.01)</b>	C07K 16/28	4B065
<b>C07K 16/46 (2006.01)</b>	C07K 16/46	4C076
<b>C12N 15/63 (2006.01)</b>	C12N 15/63 Z	4C085
<b>C12N 1/15 (2006.01)</b>	C12N 1/15	4H045

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 64 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-565750 (P2017-565750)  
 (86) (22) 出願日 平成29年3月2日 (2017.3.2)  
 (85) 翻訳文提出日 平成29年12月18日 (2017.12.18)  
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2017/075484  
 (87) 国際公開番号 WO2017/148424  
 (87) 国際公開日 平成29年9月8日 (2017.9.8)  
 (31) 優先権主張番号 201610122117.6  
 (32) 優先日 平成28年3月4日 (2016.3.4)  
 (33) 優先権主張国 中国 (CN)

(71) 出願人 517273308  
 シチュアン ケルン-バイオテック バイ  
 オファーマシューティカル カンパニー  
 リミテッド  
 中華人民共和国, シチュアン 6111  
 38, チェンドウ, ウェンジャン デ  
 イストリクト, ハイ シャ インダスト  
 リアル パーク, シンフワ アヴェニュー  
 (セクション 2), ナンバー 6  
 66  
 (74) 代理人 100107456  
 弁理士 池田 成人  
 (74) 代理人 100162352  
 弁理士 酒巻 順一郎

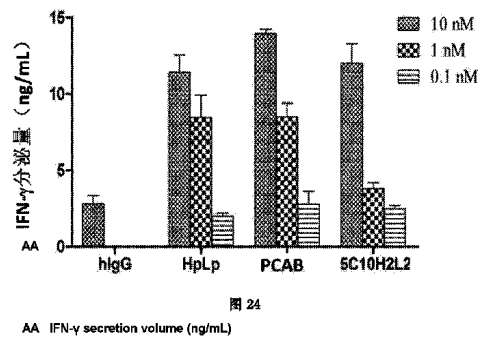
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 PDL-1 抗体、その医薬組成物及びその使用

(57) 【要約】

本発明は、腫瘍治療及び分子免疫学の分野に属し、PDL-1 抗体、その医薬組成物及びその使用に関する。特に、本発明は、PDL-1 モノクローナル抗体又はその抗原結合断片に関し、モノクローナル抗体は、配列番号 15 ~ 17 に規定される CDR を含む重鎖可変領域を有し、及び/又は配列番号 18 ~ 20 に規定される CDR を含む軽鎖可変領域を有する。本発明のモノクローナル抗体は、PDL-1 に特異的に結合することができ、PDL-1 の免疫抑制機能を特異的に除去し、Tリンパ球を活性化することができる。

【選択図】 図 24



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

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

又は

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

又は

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

10

## 【請求項 2】

重鎖可変領域が、配列番号 2、配列番号 6 及び配列番号 10 から選択されるアミノ酸配列を有し、及び / 又は軽鎖可変領域が、配列番号 4、配列番号 8 及び配列番号 12 から選択されるアミノ酸配列を有し；

又は

重鎖可変領域が配列番号 21 のアミノ酸配列を有し、及び / 又は軽鎖可変領域が配列番号 23 のアミノ酸配列を有し；

又は

重鎖可変領域が配列番号 25 のアミノ酸配列を有し、及び / 又は軽鎖可変領域が配列番号 27 のアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片。

20

## 【請求項 3】

前記抗体又はその抗原結合断片が、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fd、Fv、dAb、相補性決定領域断片、一本鎖抗体（例えば、scFv）、ヒト化抗体、キメラ抗体若しくはダイアボディから選択される、請求項 1 又は 2 に記載のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片。

## 【請求項 4】

前記モノクローナル抗体又はその抗原結合断片が、約 100 nM 未満、例えば、約 10 nM、1 nM、0.9 nM、0.8 nM、0.7 nM、0.6 nM、0.5 nM、0.4 nM、0.3 nM、0.2 nM、0.1 nM 未満若しくはより小さい EC<sub>50</sub> で PDL-1 に結合し、EC<sub>50</sub> が間接 ELISA 法により決定されることが好ましい、請求項 1 又は 2 に記載のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片。

30

## 【請求項 5】

前記モノクローナル抗体が非 CDR 領域を含み、前記非 CDR 領域がマウス以外の種、例えば、ヒト抗体から得られ、

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

前記モノクローナル抗体の定常領域が、変異したヒト IgG1 定常領域であることが好ましい、請求項 1 又は 2 に記載のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片。

40

## 【請求項 6】

前記変異したヒト IgG1 定常領域が、EU 付番方式に従って前記重鎖定常領域に N297A 突然変異を含む、請求項 5 に記載のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片。

## 【請求項 7】

前記変異したヒト IgG1 重鎖定常領域が、EU 付番方式に従って 234、235 又は 237 位に少なくとも 1 つの突然変異を有し、FcRIIIa 及び / 又は C1q に対する抗体又はその抗原結合断片の動力学的親和性が、突然変異後に下がる、請求項 5 又は 6 に記載のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片。

## 【請求項 8】

前記変異したヒト IgG1 定常領域が、EU 付番方式に従って 234、235 及び 23

50

7位に1つ、2つ又は3つの突然変異を有し、前記突然変異が、L234A、L235A及びG237Aから選択される、請求項5又は6に記載のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片。

【請求項9】

前記突然変異が、前記抗体若しくはその抗原結合断片のADCC活性及び/又はCDC活性を減少させる、請求項5～8のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片。

【請求項10】

前記モノクローナル抗体が、ハイブリドーマ細胞株LT005により産生され、前記ハイブリドーマ細胞株LT005が、中国タイプカルチャーコレクションセンター(CCTCC)に寄託されており、受託番号が、CCTCC C2015133である、請求項1又は2に記載のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片。

10

【請求項11】

単離された核酸分子Aであって、  
抗体が、配列番号15～17に規定されるCDRを含む重鎖可変領域を有し、  
前記抗体の重鎖が、配列番号2、配列番号6若しくは配列番号10のアミノ酸配列を有することが好ましく；

前記核酸分子が、配列番号1、配列番号5若しくは配列番号9のヌクレオチド配列を有することがより好ましく；

又は

20

抗体が、配列番号29～31に規定されるCDRを含む重鎖可変領域を有し、

前記抗体の重鎖が、配列番号21のアミノ酸配列を有することが好ましく、

前記核酸分子が、配列番号22のヌクレオチド配列を有することがより好ましく；

又は

抗体が、配列番号35～37に規定されるCDRを含む重鎖可変領域を有し、

前記抗体の重鎖が、配列番号25のアミノ酸配列を有することが好ましく、

前記核酸分子が、配列番号26のヌクレオチド配列を有することがより好ましい、抗体の重鎖可変領域をコードしているヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子A。

【請求項12】

単離された核酸分子Bであって、

30

抗体が、配列番号18～20に規定されるCDRを含む軽鎖可変領域を有し；

前記抗体の軽鎖が、配列番号4、配列番号8若しくは配列番号12のアミノ酸配列を有することが好ましく；

前記核酸分子が、配列番号3、配列番号7若しくは配列番号11のヌクレオチド配列を有することがより好ましく；

又は

抗体が、配列番号32～34に規定されるCDRを含む軽鎖可変領域を有し；

前記抗体の軽鎖が、配列番号23のアミノ酸配列を有することが好ましく、

前記核酸分子が、配列番号24のヌクレオチド配列を有することがより好ましく；

又は

40

抗体が、配列番号38～40に規定されるCDRを含む軽鎖可変領域を有し；

前記抗体の軽鎖が、配列番号27のアミノ酸配列を有することが好ましく、

前記核酸分子が、配列番号28のヌクレオチド配列を有することがより好ましい、抗体の軽鎖可変領域をコードしているヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子B。

【請求項13】

請求項11に記載の核酸分子A、及び請求項12に記載の核酸分子Bを含み；任意選択で、前記核酸分子A及び前記核酸分子Bを接続するためのリンカーを更に含む、単離された核酸分子C。

【請求項14】

請求項11に記載の核酸分子A、請求項12に記載の核酸分子B又は請求項13に記載

50

の核酸分子Cを含む、ベクター。

【請求項15】

請求項11に記載の核酸分子A、請求項12に記載の核酸分子B、請求項13に記載の核酸分子C又は請求項14に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項16】

適切な条件下で請求項15に記載の宿主細胞を培養するステップと、宿主細胞培養物からモノクローナル抗体又はその抗原結合断片を回収するステップとを含む、請求項1～9のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片を調製する方法。

【請求項17】

受託番号CCTCC C2015133で中国タイプカルチャーコレクションセンター(CCTCC)に寄託されている、ハイブリドーマ細胞株LT005。

10

【請求項18】

モノクローナル抗体又はその抗原結合断片及びカップリング部分を含むコンジュゲートであって、前記モノクローナル抗体が請求項1～9のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片であり、前記カップリング部分が検出可能な標識であり；

前記カップリング部分が、ラジオアイソトープ、蛍光物質、発光物質、着色物質又は酵素であることが好ましい、コンジュゲート。

【請求項19】

モノクローナル抗体又はその抗原結合断片及びコンジュゲートした部分を含む二機能性抗体コンジュゲートであって、前記抗体が請求項1～9のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片であり、前記コンジュゲートした部分が第2の生物学的機能的断片であり；

20

前記第2の生物学的機能的断片が、結合活性を有し、タンパク質、ポリエチレングリコール(PEG)、核種、核酸、小分子毒素、受容体又はリガンドであることが好ましい、二機能性抗体コンジュゲート。

【請求項20】

第1の抗体若しくはその断片と更なる抗体若しくはその断片又は抗体模倣体とのコンジュゲーションにより形成される多重特異性抗体であって、各抗体若しくはその断片又は抗体模倣体が、元の結合特異性を保持しており、前記第1の抗体又はその断片が、請求項1～9のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片であり；

30

前記多重特異性抗体が二重特異性抗体又は三重特異性抗体又は四重特異性抗体であることが好ましい、多重特異性抗体。

【請求項21】

請求項1～9のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体若しくはその抗原結合断片を含む、又は請求項18若しくは19に記載のコンジュゲートを含む、又は請求項20に記載の多重特異性抗体を含むキットであって；

前記キットが、前記モノクローナル抗体又はその抗原結合断片を特異的に認識する二次抗体を更に含むことが好ましく；

任意選択で、前記二次抗体が、ラジオアイソトープ、蛍光物質、発光物質、着色物質又は酵素など検出可能な標識で標識されているキット。

40

【請求項22】

キットの製造における請求項1～9のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体若しくはその抗原結合断片、又は請求項18若しくは19に記載のコンジュゲート、又は請求項20に記載の多重特異性抗体の使用であって、前記キットを使用してサンプル中のPDL-1の存在又はレベルを検出する、モノクローナル抗体若しくはその抗原結合断片、又はコンジュゲート、又は多重特異性抗体の使用。

【請求項23】

請求項1～9のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体若しくはその抗原結合断片、又は請求項18若しくは19に記載のコンジュゲート、又は請求項20に記載の多重特異性抗体を含む医薬組成物であって；

50

任意選択で、薬学的に許容可能な担体及び／又は賦形剤を更に含む医薬組成物。

【請求項 24】

腫瘍若しくは貧血の予防及び／又は処置及び／又は補助療法及び／又は診断用医薬の製造における請求項 1～9 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体若しくはその抗原結合断片、又は請求項 18 若しくは 19 に記載のコンジュゲート、又は請求項 20 に記載の多重特異性抗体の使用であり；

前記腫瘍が、乳がん、非小細胞肺がんなどの肺がん、肝臓がん、胃がん、大腸がん又は直腸がんなどの結腸直腸がん、食道がん、卵巣がん、子宮頸がん、腎がん、前立腺がん、膀胱がん、膵臓がん、膠腫、黒色腫及び白血病から選択されることが好ましい、モノクローナル抗体若しくはその抗原結合断片、又はコンジュゲート、又は多重特異性抗体の使用。

10

【請求項 25】

a) PD-1 又は B7-1 に対する PDL-1 の結合を遮断するための薬物；

b) PDL-1 活性又は PDL-1 レベルを調節（例えば下方調節）するための薬物；

c) PD-1 又は PDL-1 による免疫抑制を除去するための薬物、又は

d) Tリンパ球による IFN- $\gamma$  及び／又は IL-2 の発現を強化するための薬物の製造における、請求項 1～9 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体若しくはその抗原結合断片、又は請求項 18 若しくは 19 に記載のコンジュゲート、又は請求項 20 に記載の多重特異性抗体の使用。

20

【請求項 26】

請求項 1～9 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体若しくはその抗原結合断片、又は請求項 18 若しくは 19 に記載のコンジュゲート、又は請求項 20 に記載の多重特異性抗体の有効量を細胞に投与するステップを含む *in vivo* 又は *in vitro* 方法であり、前記方法が、

a) PD-1 又は B7-1 に結合する PDL-1 を遮断する方法、

b) PDL-1 活性又は PDL-1 レベルを調節（例えば下方調節）する方法、

c) PD-1 又は PDL-1 による免疫抑制を除去する方法、又は

d) Tリンパ球による IFN- $\gamma$  及び／又は IL-2 の発現を強化する方法である方法。

【請求項 27】

腫瘍若しくは貧血の処置及び／又は予防の方法であって、

請求項 1～9 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体若しくはその抗原結合断片、又は請求項 18 若しくは 19 に記載のコンジュゲート、又は請求項 20 に記載の多重特異性抗体の有効量を対象に投与するステップを含み；

前記腫瘍が、乳がん、非小細胞肺がんなどの肺がん、肝臓がん、胃がん、大腸がん又は直腸癌などの腸がん、食道がん、卵巣がん、子宮頸がん、腎がん、前立腺がん、膀胱がん、膵臓がん、膠腫、黒色腫及び白血病から選択されることが好ましい、腫瘍若しくは貧血の処置及び／又は予防の方法。

30

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

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

【背景技術】

【0002】

PD-1 / PDL-1 シグナル伝達経路は、免疫寛容、微生物感染症及び腫瘍免疫回避の調節に必須である。PD-1（プログラム細胞死 1）は、T細胞及び他の免疫細胞において主に発現され、そのリガンド PDL-1 は、ヒト腫瘍型の多くで高度に発現されている。PDL-1 タンパク質の存在は、ヒト乳がん、肺がん、胃がん、結腸直腸がん、食道

50

がん、卵巣がん、子宮頸がん、腎細胞癌、膀胱がん、膵臓がん、膠腫及び黒色腫において免疫組織化学的分析により実証されている。更に、PDL-1の発現レベルは、患者の臨床的処置及び予後と密接に関係する。

【0003】

PDL-1/PDL-1シグナル伝達経路の遮断は、阻害されているT細胞を活性化し、活性化されたT細胞を誘導してがん細胞を攻撃することができる。PDL-1/PDL-1シグナル伝達の遮断は、腫瘍細胞を死滅させる役割を果たす腫瘍抗原特異的T細胞の増殖を促進することができ、次いで局所腫瘍の成長を阻害し(Julie Rら、2012年、N Engl J Med. 366:2455~2465頁); PDL-1モノクローナル抗体は、腫瘍浸潤CD8<sup>+</sup>T細胞によりIFN- $\gamma$ の分泌を上方調節することができ、このことは、PDL-1/PDL-1シグナル伝達経路の遮断が、腫瘍細胞の免疫応答に役割を果たして免疫応答を誘導することを示している(Blank Cら、2006年、Int. J. Cancer. 119:317~327頁)。

10

【0004】

加えて、PDL-1は、in vivoでB7-1に結合することもできる。研究は、PDL-1/B7-1複合体が、T細胞活性化の負のシグナルであり、上記相互作用が、T細胞表面活性化マーカーの下方調節をもたらし、T細胞の増殖を阻害し得ることを示した。

【0005】

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

20

30

【0006】

現在では、PDL-1経路を標的とする抗体が、非小細胞肺癌、腎細胞癌、卵巣がん、黒色腫(Homet M.B., Parisi G.ら、Anti-PD1 Therapy in Melanoma. Semin Oncol. 2015年6月; 42(3):466~473頁)を含めた様々な腫瘍、白血病及び貧血(Held SA, Heine A.ら、Advances in immunotherapy of chronic myeloid leukemia CML. Curr Cancer Drug Targets. 2013年9月; 13(7):768~774頁)の処置に進展をもたらすことになると一般に考えられている。

【0007】

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

40

【発明の概要】

【0008】

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

50

レクシオンセンター（CCTCC）に寄託された。

【0009】

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

【0010】

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

10

【0011】

なお更に、本発明者らは、5C10H2L2の定常領域を独創的に変異させ、ADCC（抗体依存性細胞傷害作用）及び/又はCDC（補体依存性細胞傷害）が効果的に下げられた5C10H2L2-IgG1mAb抗体を生成した。

【0012】

なお更に、本発明者らは、本発明の抗体、特に5C10、5C10H1L1、5C10H1L2、5C10H2L1、5C10H2L2、5F10、9F6及び5C10H2L2-IgG1mAbが、ヒトT細胞を効果的に結合し、活性化してIFN-及びIL-2の分泌を誘導し得ることも見出し、このことは、肺がん、黒色腫、腎腫瘍、卵巣がん、白血病及び貧血の防止並びに処置に対する潜在性を示している。

20

【0013】

従って、以下の発明が提供される：

一態様において、本発明はモノクローナル抗体又はその抗原結合断片に関し：

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

又は

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

30

又は

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

【0014】

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

HCDR1：GFSLSNYD（配列番号15）

HCDR2：IWTGGAT（配列番号16）

HCDR3：VRDSNYRYDEPFTY（配列番号17）

40

LCDR1：QSIGTN（配列番号18）

LCDR2：YAS（配列番号19）

LCDR3：QQSNSWPYT（配列番号20）。

【0015】

5F10のCDRのアミノ酸配列は、以下の通りである：

HCDR1：GFDIKDTY（配列番号29）

HCDR2：IDPADGNT（配列番号30）

HCDR3：ARGLGAWFAS（配列番号31）

LCDR1：QDITNS（配列番号32）

LCDR2：YTS（配列番号33）

50

L C D R 3 : Q Q G H T L P P T ( 配列番号 3 4 ) 。

【 0 0 1 6 】

9 F 6 の C D R の アミノ酸配列は、以下の通りである：

H C D R 1 : G F N I K D T Y ( 配列番号 3 5 )

H C D R 2 : I D P A N G N T ( 配列番号 3 6 )

H C D R 3 : S R G P P G G I G E Y I Y A M D Y ( 配列番号 3 7 )

L C D R 1 : S S V S S S Y ( 配列番号 3 8 )

L C D R 2 : S T S ( 配列番号 3 9 )

L C D R 3 : H Q Y H R S P P T ( 配列番号 4 0 )

【 0 0 1 7 】

10

上の C D R は、当業者によく知られている技術的手法によって得ることができる。例えば、V B A S E 2 データベースにより I M G T 定義を使用して重鎖又は軽鎖の可変領域のアミノ酸配列を分析することによる。

【 0 0 1 8 】

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

重鎖可変領域は、配列番号 2、配列番号 6 及び配列番号 1 0 から選択されるアミノ酸配列を有し、及び / 又は軽鎖可変領域は、配列番号 4、配列番号 8 及び配列番号 1 2 から選択されるアミノ酸配列を有し；

又は

20

重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号 2 1 であり、及び / 又は、軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号 2 3 であり；

又は

重鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号 2 5 であり、及び / 又は、軽鎖可変領域のアミノ酸配列は配列番号 2 7 である。

【 0 0 1 9 】

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

( 1 ) 重鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号 2 に示され、軽鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号 4 に示される ( 5 C 1 0 ) ；

30

( 2 ) 重鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号 6 に示され、軽鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号 8 に示される ( 5 C 1 0 H 1 L 1 ) ；

( 3 ) 重鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号 1 0 に示され、軽鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号 1 2 に示される ( 5 C 1 0 H 2 L 2 又は 5 C 1 0 H 2 L 2 - I g G 1 m t ) ；

( 4 ) 重鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号 6 に示され、軽鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号 1 2 に示される ( 5 C 1 0 H 1 L 2 ) ；

( 5 ) 重鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号 1 0 に示され、軽鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号 8 に示される ( 5 C 1 0 H 2 L 1 ) ；

( 6 ) 重鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号 2 1 に示され、軽鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号 2 3 に示される ( 5 F 1 0 ) ；

40

( 7 ) 重鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号 2 5 に示され、軽鎖可変領域のアミノ酸配列が配列番号 2 7 に示される ( 9 F 6 ) 。

【 0 0 2 0 】

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

【 0 0 2 1 】

いくつかの実施形態において、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、1 0 0 n M 未満、例えば、1 0 n M、1 n M、0 . 9 n M、0 . 8 n M、0 . 7 n M、0 . 6 n M

50

、0.5 nM、0.4 nM、0.3 nM、0.2 nM、0.1 nM未満若しくはより小さい $EC_{50}$ でPDL-1に結合し、 $EC_{50}$ は間接ELISA法により決定されることが好ましい。

【0022】

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

【0023】

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

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

【0024】

いくつかの実施形態において、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片であり、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ細胞株LT005により産生され、ハイブリドーマ細胞株LT005は、中国タイプカルチャーコレクションセンター(CCTCC)に寄託されており、受託番号は、CCTCC C2015133である。

【0025】

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

前記抗体は、配列番号15～17に規定されるCDRを含む重鎖可変領域を有し、

前記抗体の重鎖は、配列番号2、配列番号6又は配列番号10のアミノ酸配列を有することが好ましく；

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

【0026】

本発明の別の実施形態において、前記抗体は、配列番号29～31に規定されるCDRを含む重鎖可変領域を有し、

前記抗体の重鎖は、配列番号21のアミノ酸配列を有することが好ましく、

前記核酸分子は、配列番号22のヌクレオチド配列を有することがより好ましい。

【0027】

本発明の別の実施形態において、前記抗体は、配列番号35～37に規定されるCDRを含む重鎖可変領域を有し、

前記抗体の重鎖は、配列番号25のアミノ酸配列を有することが好ましく、

前記核酸分子は、配列番号26のヌクレオチド配列を有することがより好ましい。

【0028】

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

前記抗体は、配列番号18～20に規定されるCDRを含む軽鎖可変領域を有し、

前記抗体の軽鎖は、配列番号4、配列番号8又は配列番号12のアミノ酸配列を有することが好ましく；

前記核酸分子は、配列番号3、配列番号7又は配列番号11のヌクレオチド配列を有することがより好ましい。

【0029】

本発明の別の実施形態において、前記抗体は、配列番号32～34に規定されるCDRを含む軽鎖可変領域を有し、

前記抗体の軽鎖は、配列番号23のアミノ酸配列を有することが好ましく、

前記核酸分子は、配列番号24のヌクレオチド配列を有することがより好ましい。

10

20

30

40

50

## 【0030】

本発明の別の実施形態において、前記抗体は、配列番号38～40に規定されるCDRを含む軽鎖可変領域を有し、

前記抗体の軽鎖は、配列番号27のアミノ酸配列を有することが好ましく、

前記核酸分子は、配列番号28のヌクレオチド配列を有することがより好ましい。

## 【0031】

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

## 【0032】

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

## 【0033】

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

## 【発明の効果】

## 【0034】

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

## 【図面の簡単な説明】

## 【0035】

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

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

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

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

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

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

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

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

10

20

30

40

50

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

【図10】PDL-1に対する抗体HpLpの結合動態パラメータを示す図である。

【図11】PDL-1に対する抗体PCABの結合動態パラメータを示す図である。

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

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

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

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

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

【図17】PDL-1陽性293T細胞に対するHpLpの結合を示す図である。

【図18】PDL-1陽性293T細胞に対するPCABの結合を示す図である。

【図19】間接ELISAによるヒトPDL-1組換えタンパク質に対する5C10H1L1、5C10H1L2、5C10H2L2又は5C10H2L1の結合を示す図である。

【図20】間接ELISAによるサルPDL-1組換えタンパク質に対する5C10H2L2又はHpLpの結合を示す図である。

【図21】ELISAによるヒトPDL-1、ヒトPDL-2又はマウスPDL-1組換えタンパク質に対する5C10H2L2の結合を示す図である。

【図22】5C10H1L1、5C10H1L2、5C10H2L2又は5C10H2L1が、PDL-1に対する結合についてPD-1と競合したことを示す図である（競合ELISA）。

【図23】5C10H2L2が、PDL-1に対する結合についてB7-1と競合したことを示す図である（競合ELISA）。

【図24】5C10H2L2が、PDL-1がPD-1と相互作用することを遮断することによりIFN- $\gamma$ 分泌を増加させたことを示す図である。

【図25】5C10H2L2が、PDL-1がPD-1と相互作用することを遮断することによりIL-2分泌を増加させたことを示す図である。

【図26A】ピアコアによるFcRIIaに対する5C10H2L2-IgG1mtの結合親和性及び動的定数を示す図である。

【図26B】ピアコアによるFcRIIaに対するテセントリク（登録商標）（Tencentriq）の結合親和性及び動的定数を示す図である。

【図27A】ピアコアによるC1qに対する5C10H2L2-IgG1mtの結合親和性及び動的定数を示す図である。

【図27B】ピアコアによるC1qに対するテセントリク（登録商標）の結合親和性及び動的定数を示す図である。

【図28】非小細胞肺癌細胞に対する5C10H2L2-IgG1mtの治癒効果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0036】

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

【0037】

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

10

20

30

40

50

ーナル抗体又はその抗原結合断片を回収するステップとを含む。

【0038】

本発明の更に別の態様は、中国タイプカルチャーコレクションセンター（CCTCC）に寄託されており、受託番号が、CCTCC C2015133であるハイブリドーマ細胞株LT005に関する。

【0039】

本発明の別の態様は、ハイブリドーマ細胞株LT005により分泌される抗体若しくは断片の抗原エピトープに競合結合できるモノクローナル抗体又はその抗原結合断片に関する。抗体又はその抗原結合断片は、

PD-1又はB7-1に結合するPDL-1を遮断する薬物、

PDL-1活性又はPDL-1レベルを調節（例えば下方調節）薬物、

PD-1又はPDL-1による身体免疫抑制を除去する薬物、又は

Tリンパ球におけるIFN- $\gamma$ 及び/又はIL-2の発現を強化する薬物

の活性のいずれか1つを有することが好ましい。

【0040】

本発明の更に別の態様は、モノクローナル抗体又はその抗原結合断片及びカップリング部分を含むコンジュゲートに関し、モノクローナル抗体は、本発明に記述されるモノクローナル抗体又はその抗原結合断片のいずれか1つであり、カップリング部分は検出可能な標識であり、カップリング部分はラジオアイソトープ、蛍光物質、発光物質、着色物質又は酵素であることが好ましい。

【0041】

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

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

【0042】

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

【0043】

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

【0044】

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

【0045】

本発明の更に別の態様は、

PD-1又はB7-1に結合するPDL-1を遮断するための薬物、

PDL-1活性又はPDL-1レベルを調節（例えば下方調節）するための薬物、

PD-1又はPDL-1による免疫抑制を除去するための薬物、又は

Tリンパ球によるIFN- $\gamma$ 及び/又はIL-2の発現を強化するための薬物

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

【0046】

10

20

30

40

50

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

- P D - 1 又は B 7 - 1 に結合する P D L - 1 を遮断する方法、
- P D L - 1 活性又は P D L - 1 レベルを調節（例えば下方調節）する方法、
- P D - 1 又は P D L - 1 による免疫抑制を除去する方法、又は
- T リンパ球における I F N - 及び / 又は I L - 2 の発現を強化する方法である。

【 0 0 4 7 】

本発明の一実施形態において、前記方法は、治療目的でない。

【 0 0 4 8 】

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

【 0 0 4 9 】

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

【 0 0 5 0 】

本発明では、全長 P D L - 1 タンパク質、又は P D L - 1 の細胞外ドメイン（P D L - 1 E C D）若しくは P D L - 1 E C D を含有する断片を含めた P D L - 1 タンパク質（プログラム死 - リガンド 1、N C B I G e n B a n k I D : N P \_ 0 5 4 8 6 2 . 1）のアミノ酸配列を指す場合；P D L - 1 E C D の融合タンパク質、例えば、マウス又はヒト由来 I g G F c（m F c 又は h F c）と融合された断片も含まれる。更に、当業者に理解される通り、P D L - 1 タンパク質は、アミノ酸配列の突然変異が生物学的機能に影響を及ぼすことなく天然又は人工的に導入されている（置きかえ、欠失及び / 又は追加を含むがそれだけに限定されない）タンパク質も含むことになる。従って、本発明において、用語「P D L - 1 タンパク質」は、上の配列リスト及びその天然又は人工的バリエーションを含めたそのような配列全てを含むべきである。加えて、P D L - 1 タンパク質の配列断片を指す場合、その断片は、上の配列断片だけでなく、天然又は人工的なバリエーションの対応する配列断片も意味する。

【 0 0 5 1 】

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

【 0 0 5 2 】

用語「抗体」は、2 対のポリペプチド鎖（「軽」（L）鎖及び「重」（H）鎖による各対）から通常構成される免疫グロブリン分子を指すために本明細書で使用される。抗体軽鎖は、及び鎖に分類することができる。重鎖は、 $\mu$ 、 $\gamma$ 、 $\alpha$ 、 $\delta$  又は  $\epsilon$  に分類することができる。対する抗体はそれぞれ I g M、I g D、I g G、I g A 及び I g E と定義される。軽及び重鎖において、可変及び定常領域は、約 12 又はより多くのアミノ酸の「J」領域により連結されており、重鎖は、約 3 又はより多くのアミノ酸の「D」領域も含む。各重鎖は、重鎖可変領域（ $V_H$ ）及び重鎖定常領域（ $C_H$ ）からなる。重鎖定常領域は、3 つのドメイン（ $C_{H1}$ 、 $C_{H2}$  及び  $C_{H3}$ ）からなる。各軽鎖は、軽鎖可変領域（ $V_L$ ）及び軽鎖定常領域（ $C_L$ ）からなる。軽鎖定常領域は、1 つのドメイン（ $C_L$ ）からなる。抗体の定常領域は、免疫系の様々な細胞（例えばエフェクター細胞）及び古典的な補体系の第 1 成分（ $C1q$ ）を含めた宿主組織又は因子への免疫グロブリンの結合を媒介

10

20

30

40

50

することができる。V<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>領域は、高度な可変領域（相補性決定領域、CDRと呼ばれる）及びCDR間に分布するフレームワーク（FR）と呼ばれる保存領域に更に細分することができる。各V<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>は、アミノ末端からカルボキシル末端にFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順序で配置される3つのCDR及び4つのFRからなる。重鎖及び軽鎖の可変領域（V<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>）は、抗原結合部位を形成する。各領域又はドメインのアミノ酸の割当ては、免疫学的対象のタンパク質のKabat配列（Kabat sequences of proteins of immunological interest）（米国国立衛生研究所、Bethesda、Md. [1987年及び1991年]）、又はChothia及びLesk（J. Mol. Biol. 196:901~917頁 [1987年]；Chothiaら、Nature 342:878~883頁 [1989年]）の定義に従った。用語「抗体」は、どんな特定の抗体生成方法にも限定されない。例えば、抗体には、特に、組換え抗体、モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体がある。抗体は、異なるアイソタイプ若しくはサブアイソタイプ、例えば、IgG（例えば、IgG1、IgG2、IgG3又はIgG4サブタイプ）、IgA1、IgA2、IgD、IgE又はIgM抗体であることができる。

#### 【0053】

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

#### 【0054】

本発明に使用される通り、用語「Fd断片」は、V<sub>H</sub>及びC<sub>H</sub>1ドメインからなる抗体断片を意味し；用語「Fv断片」は、抗体の一本鎖V<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>ドメインからなる抗体断片を意味し；用語「dAb断片」は、V<sub>H</sub>ドメインからなる抗体断片を意味し（Wardら、Nature 341:544~546頁 [1989年]）；用語「Fab断片」は、V<sub>L</sub>、V<sub>H</sub>、C<sub>L</sub>及びC<sub>H</sub>1ドメインからなる抗体断片を意味し；用語「F(ab')<sub>2</sub>断片」は、ヒンジ領域においてジスルフィド結合ブリッジによって接続されている2つのFab断片を含有する抗体断片を意味する。

#### 【0055】

いくつかの場合において、抗体の抗原結合断片は、一本鎖抗体（例えば、scFv）であり、一本鎖抗体のV<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>ドメインは、単一ポリペプチド鎖を形成するためのリンカーにより一価の分子を形成する（参照については、例えばBirdら、Science 242:423~426頁 [1988年]及びHoustonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879~5883頁 [1988年]）。そのようなscFv分子は、一般構造：NH<sub>2</sub>-V<sub>L</sub>-リンカー-V<sub>H</sub>-COOH又はNH<sub>2</sub>-V<sub>H</sub>-リンカー-V<sub>L</sub>-COOHを有することができる。リンカーの最近の適切な技術は、反復GGGGSアミノ酸配列又はそのバリエーションで作製される。例えば、（GGGGS）<sub>4</sub>、しかしそのバリエーションも使用され得る（Holligerら、[1993年]、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444~6448頁）。本発明において使用できる他のリンカーについては、Alfthanら、（1995年）、Protein Eng. 8:725~731頁、Choiら、（2001年）Eur. J. Immunol. 31:94~106頁、Huら、（1996年）、Cancer Res. 56:3055~3061頁、Kipriyanovら、（1999年）、J. Mol.

10

20

30

40

50

Biol. 293: 41~56頁、及びRooversら、(2001年)、Cancer Immunol. に記述されている。

【0056】

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

10

【0057】

他の場合において、抗体抗原結合断片は、「二重特異性抗体」であり、第1の抗体(断片)及び第2の抗体(断片)又はカップリングアームによりカップリングされた抗体模倣体により定義され、カップリング方法には、化学反応、遺伝子融合及び酵素反応があるがこれに限定されない。抗体抗原結合断片は、三重特異性抗体及び四重特異性抗体などの「多重特異性抗体」であることができ、前者は3つの異なる抗原に特異的に結合することができ、後者は4つの異なる抗原に特異的に結合することができる。例えば、CN第104341529A号の場合のように設計されたアンキリンリピートタンパク質(DARPin)が、IgG抗体、scFv-Fc抗体断片と;国際公開第2015141862号A1の場合のように、抗-IL-17aフィノマーが、抗-IL-6R抗体と連結又は合体している。

20

【0058】

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

【0059】

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

30

【0060】

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

【0061】

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

40

【0062】

用語「キメラ抗体」は、軽鎖及び/又は重鎖の部分がある抗体(特定の種から得ること

50

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

#### 【0063】

用語「ヒト化抗体」は、CDRの全部又は一部が非ヒト抗体(ドナー抗体)由来のCDR領域によって置き換えられているヒト免疫グロブリン(アクセプター抗体)を指すために本明細書で使用され、ドナー抗体は、期待される特異性、親和性又は反応性を持つ非ヒト(例えば、マウス、ラット又はウサギ)抗体であり得る。加えて、アクセプター抗体のフレームワーク領域(FR)のアミノ酸残基を、非ヒト抗体由来のアミノ酸又は他の抗体のアミノ酸によって置き換えて、抗体の性能を更に改善することができる。ヒト化抗体に関するより詳細については、例、Jonesら、Nature、321:522~525頁(1986年);Reichmannら、Nature、332:323~329頁(1988年);Presta、Curr.Op.Struct.Biol.2:593~596頁(1992年);及びClark、Immunol.Today 21:397~402頁(2000年)を参照のこと。

10

#### 【0064】

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

20

#### 【0065】

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

30

#### 【0066】

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

40

#### 【0067】

ヒト化は、表面再建によっても認識され得る。この方法において、マウス抗体モデルが

50

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

【0068】

ヒト化はまた、超ヒト化によって認識され得る。この方法において、マウス抗体のCDR領域がまず決定され、次いで6つのCDRに高い相同性を持つヒト配列を、6つのマウスCDRが移植される鑄型として選んだ。ヒト供給源鑄型は、IMGTデータベースから得られる生殖細胞株配列など、元の生殖細胞株配列(生殖細胞株)から選択することができる。Genebankから得られる抗体配列など、成熟した抗体配列から選択することもできる。復帰変異を、CDR移植抗体に導入することができる。ヒト鑄型のいくつかのアミノ酸をマウス鑄型のアミノ酸に復帰変異させて、抗体の親和性を改善することができる。Tan, P., D. A. Mitchell, T. N. Buss, M. A. Holmes, C. Anasetti及びJ. Foote: "Superhumanized" antibodies: reduction of immunogenic potential by complementarity detemining region grafting with human germline sequences: application to an anti-CD28., J. Immunol. 169, 1119~25頁(2002年)。

【0069】

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

【0070】

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

【0071】

用語「宿主細胞」は、大腸菌(*Escherichia coli*)若しくは枯草菌(*Bacillus subtilis*)などの原核生物細胞、酵母細胞若しくはアスペル

10

20

30

40

50

ギルス (*Aspergillus*) などの真菌細胞、ショウジョウバエ細胞 S2 若しくは Sf9 などの昆虫細胞、又は繊維芽細胞、CHO 細胞、COS 細胞、NS0 細胞、HeLa 細胞、BHK 細胞、HEK293 細胞若しくはヒト細胞などの動物細胞を含むがこれに限定されないベクター導入に使用し得る細胞を指すために本明細書で使用される。

【0072】

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

10

【0073】

用語「 $K_D$ 」は、特定の抗体-抗原相互作用の解離平衡定数を指すために本明細書で使用され、抗体と抗原との結合親和性を記述するために使用される。平衡解離定数がより小さい場合、抗体抗原結合はより強く、抗体と抗原との親和性はより高い。通常、抗体（例えば、本発明のモノクローナル抗体 5C10、5C10H1L1、5C10H1L2、5C10H2L1 及び 5C10H2L2）は、フォルテバイオ (Fortebio) 分子間相互作用検出器により測定して  $10^{-5}$  M 未満、例えば、 $10^{-6}$  M、 $10^{-7}$  M、 $10^{-8}$  M、 $10^{-9}$  M、 $10^{-10}$  M 未満又はいっそう小さい  $K_D$  で抗原（例えば PDL-1 タンパク質）に結合する。

20

【0074】

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

【0075】

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

30

【0076】

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

40

【0077】

用語「アジュバント」は、抗原に対する免疫応答を強化する又は事前に若しくは抗原と一緒に身体に送達された場合に免疫応答の型を変化させる非特異的免疫刺激剤を指すために本明細書で使用される。アルミニウムアジュバント（例えば、水酸化アルミニウム）、フロイントアジュバント（例えば完全フロイントアジュバント及び不完全フロイントアジュバント）、コリネバクテリウム・パルヴム (*Corynebacterium par*

50

vum)、リポ多糖、サイトカイン等を含むがこれに限定されない多くの種類のアジュバントが存在する。フロイントアジュバントは、動物実験において最も一般的に使用されるアジュバントである。水酸化アルミニウムアジュバントは、臨床試験においてより頻繁に使用されている。

【0078】

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

10

【実施例】

【0079】

生物材料の保存の説明

ハイブリドーマ細胞LT005は、2015年8月4日に受託番号CCTCC C2015133でWuhan大学（郵便番号：430072）の中国タイプカルチャーコレクションセンター（CCTCC）に寄託された。

【0080】

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

20

【0081】

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

【0082】

調製例1：組換えタンパク質PDL-1ECD-mFc

1. PDL-1ECD-mFcの遺伝子合成

キメラ遺伝子を、PDL-1ECDと命名したPDL-1（プログラム細胞死1リガンド1、NCBI GenBank ID：NP\_054862.1）の細胞外ドメイン及びマウスIgGのFc断片（mFc）を含むように設計した。293F細胞における標的遺伝子の発現効率を改善するために、ヌクレオチド配列をコドン最適化し、GenScript Biotech Co., Ltdで合成した。科学文献において、PDL-1及びPD-L1は互換的に使用することができ、本発明はPDL-1の使用に統一した。

30

【0083】

2. pUC57simple-PDL-1ECD-mFcプラスミドの生成

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

40

【0084】

3. pcDNA3.1-PDL-1ECD-mFcの組換えプラスミドの構築

プラスミドpUC57simple-PDL-1ECD-mFcを、酵素消化（XbaI及びBamHI）、次いで電気泳動に供した。回収したPDL-1ECD-mFc遺伝子断片を、ライゲーションによりpcDNA3.1発現ベクター（Invitrogenから購入した）にクローニングして、pcDNA3.1-PDL-1ECD-mFcプ

50

ラスミドを得た。ライゲーション産物を、使用説明書に従って大腸菌DH5a株(TIANGEN BIOTECH CO. LTD. から購入した)に次いで形質転換した。陽性pcDNA3.1-PDL-1ECD-mFcコロニーをスクリーニングによって得、次いで従来通りの方法で増幅した。組換えプラスミドを、キットの使用説明書に従ってキット(TIANGEN BIOTECH [Beijing] CO. LTD. ; DP103-03)を使用して抽出した。

【0085】

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

10

【0086】

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

【0087】

調製例2：組換えタンパク質PD-1-hFcの調製

1. PD-1-hFcの遺伝子合成

キメラ遺伝子を、PD-1ECDと命名したPD-1(プログラム細胞死タンパク質1、NCBI GenBank ID: NP\_005009.2)の細胞外ドメイン及びヒトIgGのFc断片(hFc)を含むように設計した。293F細胞における標的遺伝子の発現効率を改善するために、ヌクレオチド配列をコドン最適化し、GenScript Biotech Co., Ltdで合成した。

20

【0088】

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

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

30

【0089】

3. プラスミドpcDNA3.1-PD-1ECD-TEV-hFcの構築

プラスミドpUC57simple-PD-1ECD-TEV-hFcを、酵素(XbaI及びBamHI)で消化した。精製したPD-1ECD-TEV-hFc遺伝子断片を、pcDNA3.1発現ベクター(Invitrogenから購入した)にクローニングして、大腸菌DH5a株(TIANGENから購入した)に形質転換されたpcDNA3.1-PD-1ECD-TEV-hFcを得た。陽性コロニーをスクリーニングにより得、次いで従来通りの大腸菌DH5a培養技術により増幅し、組換えプラスミドをキットの使用説明書(TIANGEN BIOTECH [Beijing] CO. LTD. DP103-03)に従って抽出した。

【0090】

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

40

【0091】

5. 293F細胞をpcDNA3.1-PD-1ECD-TEV-hFcでトランスフェクトし、7日間培養した。組換えタンパク質を含有する培養上清を、高速遠心分離、微細孔膜真空ろ過及びMabselect SuReカラムにより次いで精製して、PD-1ECD-TEV-hFc融合タンパク質を得た。そのタンパク質を、電気泳動ローディング緩衝液を添加して還元条件下でSDS-PAGE電気泳動分析に供した(図2)。

【0092】

50

## 調製例 3 : 組換えタンパク質 B7-1-hFc の調製

## 1. B7-1-hFc の遺伝子合成

キメラ遺伝子を、B7-1 (B7-1ECD; 分化抗原群 80 [CD80 及び B7-1 とも呼ばれる]、NCBI GenBank ID: NP\_005182.1) の細胞外ドメイン及びヒト IgG の Fc 断片 (hFc) を含むように設計した。293F 細胞における標的遺伝子の発現効率を改善するために、ヌクレオチド配列をコドン最適化し、GenScript Biotech Co., Ltd で合成した。

【0093】

## 2. pUC57simple-B7-1ECD-hFc プラスミドの生成

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

【0094】

## 3. プラスミド pCDNA3.1-B7-1ECD-hFc の構築

プラスミド pUC57simple-B7-1ECD-hFc を、酵素 (XbaI 及び BamHI) で消化した。精製した B7-1ECD-hFc 遺伝子断片を、ライゲーションにより pCDNA3.1 発現ベクター (Invitrogen から購入した) にクローニングして、pCDNA3.1-B7-1ECD-hFc を得た。ライゲーション産物を、大腸菌 DH5a 株 (TIANGEN から購入した) に、次いで形質転換した。コロニースクリーニングを遂行し、pCDNA3.1-B7-1ECD-hFc の陽性クローンを得、次いでそのクローンを従来通りの大腸菌 DH5a 培養技術により増幅し、組換えプラスミドをキットの使用説明書 (TIANGEN BIOTECH [Beijing] CO. LTD. DP103-03) に従って抽出した。

【0095】

4. 組換えプラスミド pCDNA3.1-B7-1ECD-hFc を、リポフェクタミン (lipofectamine) トランスフェクションキット (Invitrogen) により 293F 細胞 (Invitrogen) にトランスフェクトした。

【0096】

5. 293F 細胞を pCDNA3.1-PD-1ECD-TEV-hFc プラスミドでトランスフェクトし、次いで 7 日間培養した。組換えタンパク質を含有する培養上清を、高速遠心分離、微細孔膜真空ろ過及び Mabselect SuRe カラムにより次いで精製して、B7-1ECD-hFc 融合タンパク質を得た。そのタンパク質を、電気泳動ローディング緩衝液を添加して還元条件下で SDS-PAGE 電気泳動分析に供した (図 3)。

【0097】

実施例 1 : ハイブリドーマ細胞株 LT005 及びモノクローナル抗体 5C10、5F10 及び 9F6 の生成

哺乳動物細胞により発現された組換え PD-L1 ECD-mFc タンパク質を免疫原として使用して、マウスを免疫化した。免疫化したマウスの脾細胞を回収し、骨髓腫細胞と融合してハイブリドーマ細胞を生成した。多数のサンプルによるスクリーニング後に、次いでハイブリドーマ細胞株 LT005 を得、その細胞株は、PD-L1 に特異的に結合し得るモノクローナル抗体 5C10 を産生した。他の 2 つのモノクローナル抗体 5F10 及び 9F6 も、本発明において得られた。

【0098】

詳細は以下の通りである：

## 1. ハイブリドーマ細胞の生成

調製例 1 において得られた組換え PD-L1 ECD-mFc 融合タンパク質を免疫原として使用して、BALB/C マウス (広東省医学実験動物センター) を免疫化した。免疫化したマウスの脾細胞を回収し、一般的な方法に従ってマウス骨髓腫細胞と融合してハイブリドーマ細胞を生成した (例えば、Stewart, S. J. 「Monoclonal

10

20

30

40

50

「Antibody Production」、in Basic Methods in antibody Production and Characterization、G. C. Howard及びD. R. Bethell編、Boca Raton: CRC Press、2000年)。

【0099】

被覆抗原としてPDL-1 ECD-mFcを使用して間接ELISA分析を実行して、PDL-1 ECD-mFcに特異的に結合できる抗体を産生しているハイブリドーマ細胞を得た。その後ハイブリドーマ細胞を競合ELISAに供し、PDL-1に対する結合においてPD-1(調製例2から得たPD-1-hFc)と競合するモノクローナル抗体を分泌している細胞を選択した。そして、モノクローナル抗体5C10を産生している安定なハイブリドーマ細胞株LT005を、限界希釈により更に得た。

10

【0100】

ハイブリドーマ細胞株LT005は、2015年8月4日に受託番号CCTCC C2015133でWuhan大学(郵便番号:430072)の中国タイプカルチャーコレクションセンター(CCTCC)に寄託された。

【0101】

同様に、マウス抗体を産生している更に2つのハイブリドーマ細胞株(それぞれ5F10及び9F6と命名した)も得た。

【0102】

2. モノクローナル抗体5C10、5F10及び9F6の調製

PDL-1-5C10ハイブリドーマ細胞株を、10%(低IgG)ウシ胎仔血清(FBS)を含有する培地中で7日間培養し、次いで細胞培養上清を採取し、精製して抗体5C10を得た。

20

【0103】

同様に、抗体5F10、9F6を上の方法に従って調製した。

【0104】

3. 抗体5C10のSDS-PAGE分析

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

30

【0105】

4. マウス抗体5C10、5F10及び9F6に対する親和性、競合親和性及び細胞親和性の決定:

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

【0106】

結果を、表1に示す。

## 【表 1】

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

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

10

## 【0107】

結果は、3つのマウス抗体が、親和性及び競合親和性の点で参照抗体PCAB（例5で得た）に劣っていないことを示した。5C10は、細胞親和性及び陽性率において最良の性能を有した。5F10の細胞親和性は、PCABより優れており、9F6の陽性率はPCABより優れている。

20

## 【0108】

実施例2：モノクローナル抗体5C10、5F10並びに9F6の重鎖及び軽鎖の配列の取得

全mRNAを、製造業者の使用説明書に従ってRNA単離キット（TransGen、DP430）を使用して、例1で得られたハイブリドーマ細胞株LT005から抽出した。

## 【0109】

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

30

## 【0110】

抗体5C10のVHをコードしているヌクレオチド配列（360bp）：

CAGGTGCAACTGAAGGAGTCAAGGACCTGGCCCTGGTGGCG  
 CCCTCACAGAACCCTGTCCATTACCTGCACTGTCTCTGGGT  
 TCTCATTAAGCAACTATGATATAAGCTGGATTTCGCCAGCC  
 ACCAGGAAGGGTCTGGAGTGGCTCGGAGTAATATGGACT  
 GGTGGAGCCACAAATTATAATTTCAGCTTTCATGTCCAGAC  
 TGAGCATCAGTAGGGACAACCTCCAAGAGCCAAGTTTTCTT  
 AAAAAATGAACAGTCTGCAAACTGATGACACAGCCATATAT  
 TACTGTGTGAGAGATTTCGAACCTATAGGTACGACGAGCCGT  
 TTACTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA  
 A（配列番号1）

40

## 【0111】

抗体5C10のVHのアミノ酸配列（120aa）：

QVQLKESGPGLVAPSQNLSITCTVSGFSLSNYDISWIRQ  
 PPGKGLEWLGVIWTGGATNYNSAFMSRLSISRDNKSKQVF

50

L K M N S L Q T D D T A I Y Y C V R D S N Y R Y D E P F T Y W G Q G T L V T V S  
A ( 配列番号 2 )

【 0 1 1 2 】

抗体 5 C 1 0 の V L をコードしているヌクレオチド配列 ( 3 1 8 b p ) :

G A C A T C T T G C T G A C T C A G T C T C C A G C C A T C C T G T C T G T G  
A G T C C A G G A G A A A G A G T C A G T C T C T C C T G C A G G G C C A G T C  
A G A G C A T T G G C A C A A A C A T A C A C T G G T T T C A G C A A A G A A C  
A A A T G G T T C T C C A A G G C T T C T C A T A A A G T A T G C T T C T G A G  
T C T A T C T C T G G G A T C C C T T C C A G G T T T A G T G G C A G T G G A T  
C A G G G A C A G A T T T T A C T C T T A G C A T C A A C A G T G T G G A G T C  
T G A A G A T A T T G C A G A T T A C T A C T G T C A A C A A A G T A A T A G C  
T G G C C G T A C A C G T T C G G A G G G G G G A C C A A G C T G G A A A T A ( 配列番号 3 )

10

【 0 1 1 3 】

抗体 5 C 1 0 の V L のアミノ酸配列 ( 1 0 6 a a ) :

D I L L T Q S P A I L S V S P G E R V S L S C R A S Q S I G T N I H W F Q Q R  
T N G S P R L L I K Y A S E S I S G I P S R F S G S G S G T D F T L S I N S V E  
S E D I A D Y Y C Q Q S N S W P Y T F G G G T K L E I ( 配列番号 4 )

同様に、モノクローナル抗体 9 F 6 及び 5 F 1 0 の軽及び重鎖配列を得た。

20

【 0 1 1 4 】

抗体 5 F 1 0 の V H のアミノ酸配列 ( 1 1 7 a a ) :

E V Q L Q Q S G A E L V K P G A S V K L S C T A S G F D I K D T Y I H W V K Q  
R P E Q G L E W I G R I D P A D G N T R Y D P K F Q D K T T I T T D T S S N T A  
H L Q L S S L T S E D T A V Y Y C A R G L G A W F A S W G Q G T L V T V S A ( 配列番号 2 1 )

【 0 1 1 5 】

抗体 5 F 1 0 の V H をコードしているヌクレオチド配列 ( 3 5 1 b p ) :

G A G G T T C A G C T G C A G C A G T C T G G G G C A G A G C T T G T G A A G  
C C A G G G G C C T C A G T C A A G T T G T C C T G C A C A G C T T C T G G C T  
T C G A C A T T A A A G A C A C C T A T A T C C A C T G G G T G A A G C A G A G  
G C C T G A A C A G G G C C T G G A G T G G A T T G G A A G G A T T G A T C C T  
G C G G A C G G T A A T A C T A G G T A T G A C C C G A A G T T C C A G G A C A  
A G A C C A C T A T A A C A A C C G A C A C A T C C T C C A A C A C A G C C C A  
C C T G C A G C T C A G C A G C C T G A C A T C T G A G G A C A C T G C C G T C  
T A T T A C T G T G C T A G A G G C C T C G G A G C T T G G T T T G C T T C C T  
G G G G C C A A G G G A C T C T G G T C A C T G T C T C T G C A ( 配列番号 2 2 )

30

【 0 1 1 6 】

抗体 5 F 1 0 の V L のアミノ酸配列 ( 1 0 6 a a ) :

D I Q M T Q T T S S L S A S L G D R V T I S C R A S Q D I T N S L N W Y Q Q K  
P D G T V K L L I H Y T S R L H S G V P S R F S G S G S G T D Y S L T I S N L E  
Q E D I A T Y F C Q Q G H T L P P T F G G G T K L E I ( 配列番号 2 3 )

40

【 0 1 1 7 】

抗体 5 F 1 0 の V L をコードしているヌクレオチド配列 ( 3 1 8 b p ) :

G A T A T C C A G A T G A C A C A G A C T A C A T C C T C C C T G T C T G C C  
T C T C T G G G A G A C A G A G T C A C C A T C A G T T G C A G G G C A A G T C  
A G G A C A T T A C C A A T T C C T T A A A C T G G T A T C A G C A G A A A C C  
A G A T G G A A C T G T T A A A C T C C T G A T C C A C T A C A C A T C A A G A  
T T A C A C T C A G G A G T C C C A T C A A G G T T C A G T G G C A G T G G G T  
C T G G A A C A G A T T A T T C T C T C A C C A T T A G C A A C C T G G A G C A  
A G A A G A T A T T G C C A C T T A C T T T T G C C A A C A G G G T C A T A C G

50

CTTCCTCCGACGTTTCGGTGGAGGCCACCAAGCTGGAAATC ( 配列番号24)

【0118】

抗体9F6のVHのアミノ酸配列(124aa):

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNLIKDTYMYWVKQRPEQGLEWIGRIDPANGNTKYDPKFKGKATITADTSANTAYLQLSSLTSEDTAVYYCSRGPPIGGI GEYIYAMDYWGQGTSVTVSS (配列番号25)

【0119】

抗体9F6のVHをコードしているヌクレオチド配列(372bp):

GAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAAGCCAGGGGCCTCAGTCAAGTTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAGACACCTATATGTACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTGCGAATGGTAATACTAAATATGACCCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATAACAGCAGACACATCCGCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGCTCTATTACTGTTCTAGAGGCCCTCCAGGAGGTATCGGCGAGTATATCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (配列番号26)

【0120】

抗体9F6のVLのアミノ酸配列(107aa):

QIVLTQSPAIMASLGERVTMTCTASSSVSSSYLHWYQQKPGSSPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSSYSLTISSMEAEADAATYYCHQYHRSPPTFGGGTKLEI (配列番号27)

【0121】

抗体9F6のVLをコードしているヌクレオチド配列(321bp):

CAAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCA TCTCTAGGGGAACGGGTCACCATGACCTGC ACTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTCCAGTTACTTTGCACTGGTACCAGCAGAA GCCAGGATCCTCCCCCAA ACTCTGGATTTATAGCACATCC AACCTGGCTTCTGGAGTCCCAGCTCGCTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAAATCAGCAGCATGGA GGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCACCAGTATCAT CGTTCCCCACCCACGTTTCGGTGGAGGCCACCAAGCTGGAAATC (配列番号28)

【0122】

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

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

【0123】

1. ヒト化モノクローナル抗体5C10H1L1の軽及び重鎖の配列

抗体5C10H1L1のVHのヌクレオチド配列(360bp):

CAGGTCCAGCTGCAGGAGTCAAGGCCCCCGGCCTGGTGAAG

CCCAGTGAGAACCTGTCAATCACCTGCACAGTCTCTGGCT  
TCTCACTGAGCAATTACGACATCAGTTGGATTGACAGCC  
CCCTGGAAGGGCCTGGAATGGCTGGGCGTGATCTGGACA  
GGCGGGGCAACTAACTATAATCCAGCCTTTAAAAGCCGGC  
TGACCATTTCAGAGACAACCTCCAAGTCTCAGGTGTCTCT  
GAAAATGAGCTCCCTGCAGGCCGCTGATACCGCTGTGTAC  
TATTGTGTCAGGGACAGCAATTACCGCTATGATGAGCCCT  
TCACATACTGGGGGCAGGGAACTCTGGTGACCGTCTCTAG  
T (配列番号5)

【0124】

10

抗体5C10H1L1のVHのアミノ酸配列(120aa):

QVQLQESGPGLVKPSENLSITCTVSGFSLSNYDISWIRQ  
PPGKGLEWLGVIWTGGATNYPNPAFKSRLTISRDNSSKQVS  
LKMSLQAADTAVYYCVRDSNYRYDEPFTYWGQGTLLVTVS  
S (配列番号6)

【0125】

抗体5C10H1L1のVLをコードしているヌクレオチド配列(321bp):

GAAATCGTGCTGACACAGAGCCCTGACACACTGAGCGTG  
ACTCCCAAGGAGAAAGTCCACCTGACATGCCGGGCATCAC  
AGAGCATCGGAACAACAATTCACCTGGTTCCAGCAGAGACC  
AGGCCAGAGCCCAAGCTGCTGATCAAATACGCCCTCCGAA  
TCTATCAGTGGCATTCTTCCCGATTCTCAGGCAGCGGGT  
CCGGAACCGACTTTACTCTGACCAATTAACCTCTGTGGAGGC  
TGAAGATGCCGCTACATACTATTGCCAGCAGTCTAATAGT  
TGGCCTTATACCTTTCGGCCAGGGGACAAAAGCTGGAGATCA  
AA (配列番号7)

20

【0126】

抗体5C10H1L1のVLのアミノ酸配列(107aa):

EIVLTQSPDTLSVTPKEKVTLTCSRASQSIGTNIHWFQQR  
PGQSPKLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLTINSVE  
AEDAATYYCQQSNSWPYTFGQGTKLEIK (配列番号8)

30

2. ヒト化モノクローナル抗体5C10H2L2の軽及び重鎖の配列

【0127】

抗体5C10H2L2のVHをコードしているヌクレオチド配列(360bp):

CAGGTCCAGCTGCAGGAGTCCGGCCCGGCCTGGTGAAG  
CCCTCCGAGACACTGTCTATCACCTGCACAGTCAAGCGGCT  
TCTCACTGAGCAACTACGACATCTCCTGGATTGACAGCC  
CCCTGGAAGGGCCTGGAATGGCTGGGCGTGATCTGGACA  
GGCGGGGCAACTAACTATAATCCAGCCTGAAAATCTCGGC  
TGACTATTAGTAGAGACAACCTCAAAGAATCAGGTGTCCCT  
GAAAATGAGCTCCGTCACCGCCGCTGATACAGCTGTGTAC  
TATTGTGTCAGGGACAGCAATTACCGCTATGATGAGCCCT  
TTACCTACTGGGGGCAGGGAACTCTGGTGACCGTCTCTAG  
T (配列番号9)

40

【0128】

抗体5C10H2L2のVHのアミノ酸配列(120aa):

QVQLQESGPGLVKPSSETLSITCTVSGFSLSNYDISWIRQ  
PPGKGLEWLGVIWTGGATNYPNPAFKSRLTISRDNSSKNQVS  
LKMSVTAADTAVYYCVRDSNYRYDEPFTYWGQGTLLVTVS  
S (配列番号10)

50

## 【0129】

抗体5C10H2L2のVLをコードしているヌクレオチド配列(321bp)：

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

10

## 【0130】

抗体5C10H2L2のVLのアミノ酸配列(107aa)：

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

3. ヒト化モノクローナル抗体5C10H1L2の軽及び重鎖の配列

抗体5C10H1L2のVHをコードしているヌクレオチド配列：配列番号5

抗体5C10H1L2のVHのアミノ酸配列：配列番号6

抗体5C10H1L2のVLをコードしているヌクレオチド配列：配列番号11

20

抗体5C10H1L2のVLのアミノ酸配列：配列番号12

4. ヒト化モノクローナル抗体5C10H2L1の軽及び重鎖の配列

抗体5C10H2L1のVHをコードしているヌクレオチド配列：配列番号9

抗体5C10H2L1のVHのアミノ酸配列：配列番号10

抗体5C10H2L1のVLをコードしているヌクレオチド配列：配列番号7

抗体5C10H2L1のVLのアミノ酸配列：配列番号8

## 【0131】

実施例4：5C10のヒト化抗体5C10H1L1、5C10H1L2、5C10H2L1、5C10H2L2の調製及びそのSDS-PAGE分析

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

30

## 【0132】

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

40

## 【0133】

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

## 【0134】

実施例5：ヒト化抗体5C10H2L2の結合動的パラメーターの分析

抗原PDL-1(NCBI GenBank ID：NP\_054862.1、ヌクレ

50

オチド配列：配列番号 13；アミノ酸配列：配列番号 14) に対するヒト化抗体 5C10H2L2 の結合動的パラメーターを、フォルテバイオにより決定した。

【0135】

1. サンプル調製

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

【0136】

PDL-1 の DNA 配列 (870 bp) :

```

ATGAGGATTTTCGCCGTCCTTTATCTTTATGACCTACTGG
CATCTGCTGAACGCTTTTACTGTGACCGTCCCAAGGATC
TGTATGTGGTGGAGTACGGAAGCAACATGACTATCGAGTG
CAAGTTCCCGTGGAAAACAGCTGGACCTGGCCGCTCTG
ATTGTCCTATTGGGAGATGGAAGATAAGAATAATCATTCAGT
TTGTGCACGGCGAGGAAGACCTGAAAAGTCCAGCATAGCTC
CTACAGGCAGCGCGCCGACTGCTGAAAGGATCAGCTGTCC
CTGGGGAACGCGAGCCCTGCAGATCACCGACGTGAAACTGC
AGGATGCTGGAGTCTACAGGTGCATGATCTCTTACGGCGG
GGCTGATTATAAGCGCATTACAGTGAAAAGTCAATGCACCT
TATAACAAGATCAATCAGAGAATTCTGGTGGTCCGACCCAG
TGACCAGTGAGCACGAACCTGACATGTGAGGCTGAGGGCTA
CCCCAAGGCAGAAAGTGATCTGGACCTCTAGTGATCATCAG
GTCCTGTGAGGGA AAAACCAACA ACTACCAACAGCAAGCGAG
AGGAAA AAAACTGTTCAATGTGACATCCACTCTGAGGATCAA
CACA ACTACCAATGAGATT TTTCTATTGCACTTTTCGGAGA
CTGGACCCTGAGGAAAACCAACCCGCAGAGCTGGTCAATCC
CAGAACTGCCACTGGCACACCCACCTAATGAGCGAACACA
CCTGGTCAATCCTGGGAGCCATTCTGCTGTGCTGGGCGTCC
GCTCTGACTTTTCATTTTTCGGCTGAGAAAAGGGGCGGATGA
TGGACGTGAAAAGTGTTGGCATTTCAGGATACTAACTCAAA
AAAGCAGTCCGATACCCATCTGGAAGAAAACC (配列番号 13)

```

【0137】

PDL-1 のアミノ酸配列 (290 aa) :

```

MRFVAVFIFMTYWHLLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIE
CKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNI IQFVHGEEDLKVQHS
SYRQRARLLKDQLSLGNAAALQITDVKLQDAGVYRCMISYG
GADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVD PVTSEHELTCQAE G
YPKAEV I WTS SDHQVLSGKT TTTNSKREEKLFNVTSTLRI
NTTTNEIF YCTFRRLDPEENHTAELVIP ELPLAHP PNER T
HLVILGAILLCLGVALT FIFRLRKGRMM DVKKCGIQDTNS
KKQSDTHLEET (配列番号 14)

```

【0138】

(2) 陽性対照抗体 HpLp 及び PCAB の調製

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

【0139】

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

配列は、配列番号 20 に記述され、一方 V L 配列は、配列番号 21 に記述された。

【0140】

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

2. 方法

【0141】

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

10

【0142】

3. 結果

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

【表 2】

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

20

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

30

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

【0143】

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

40

【0144】

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

【0145】

50

図12に示すように、各抗体は、PD-1に対するヒトPDL-1の結合を用量依存的様式で効果的に阻害することができ、各用量の蛍光強度及びフィッティングしたEC<sub>50</sub>を、表3に示した。

【表3】

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

断

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

10

20

## 【0146】

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

30

## 【0147】

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

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

40

## 【0148】

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

## 【0149】

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

50

最初に、PDL-1を発現する293T細胞を構築し、次いで宿主細胞を、ヒト化抗体5C10H1L1、5C10H1L2、5C10H2L2、5C10H2L1及び陽性対照抗体(HpLp及びPCAB)で標識した。細胞表面において天然の立体配座を持つ抗原に対する抗体5C10H1L1、5C10H1L2、5C10H2L2、5C10H2L1及び陽性対照抗体(HpLp及びPCAB)の特異的結合を、FACSにより分析した。

#### 【0150】

詳細は以下の通りである：

##### 1. PDL-1を発現する293T細胞の構築

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

10

#### 【0151】

##### 2. 抗体標識及びFACS分析

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

20

#### 【0152】

##### 3. 結果

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

#### 【0153】

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

30

## 【表 4】

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

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

10

20

## 【 0 1 5 4 】

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

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

## 【 0 1 5 5 】

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

30

## 【 0 1 5 6 】

結果を、図 19 に示す。図が示すように、5C10H1L1、5C10H1L2、5C10H2L2、5C10H2L1、HpLp 及び PCAB は、ヒト PDL-1 に用量依存的様式で効果的に結合し得る。各用量の蛍光強度及び曲線フィッティング後の EC<sub>50</sub> により表される算出した結合効率を、表 5 に挙げる。

40

## 【表 5】

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

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

10

20

30

## 【0157】

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

## 【0158】

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

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

40

## 【0159】

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

## 【0160】

50

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

【表6】

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

抗体希釈 ( $\mu\text{g/mL}$ )	コーティングした抗原:サルPDL-1-his( $1\mu\text{g/mL}$ )			
	5C10H2L2		HpLp	
1.000	3.328	3.302	2.531	2.123
0.333	3.395	3.169	1.969	1.740
0.111	3.040	2.740	1.424	1.151
0.037	2.411	2.013	0.969	0.763
0.012	1.194	1.047	0.431	0.374
0.004	0.562	0.495	0.243	0.221
0.001	0.267	0.244	0.171	0.153
0.000	0.110	0.115	0.111	0.104
二次抗体としてのHRPにコンジュゲートしたヤギ抗ヒトIgG				
$EC_{50}(\text{nM})$	0.165		1.049	

10

20

30

40

50

【0161】

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

【0162】

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

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

【0163】

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

【0164】

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

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

【 0 1 6 5 】

実施例 1 2 : 競合 E L I S A による、P D L - 1 に対する P D - 1 とヒト化抗体の競合結合活性の決定

競合 E L I S A を実行して、ヒト P D L - 1 に対する結合において P D - 1 と競合する 5 C 1 0 H 1 L 1、5 C 1 0 H 1 L 2、5 C 1 0 H 2 L 2、5 C 1 0 H 2 L 1 及び陽性対照 ( H p L p 及び P C A B ) の能力を評価した。E L I S A プレートを受容体でコーティングし、4 で終夜インキュベートした。ウェルを、1 % B S A で、3 7 で 2 時間ブロッキングした。その後、抗体及び P D L - 1 - m F c を混合し、室温で 1 5 分間インキュベートし、次いで各ウェルに添加し、3 7 で 3 0 分間インキュベートした。二次抗体、H R P にコンジュゲートしたヤギ抗マウス I g G ( H + L ) ( J a c k s o n、1 0 9 - 0 3 5 - 0 6 2 ) を、添加した。T M B 基質 ( N e o g e n、3 0 8 1 7 7 ) を、発色反応のために添加し、5 分間インキュベートした。吸光度を、4 5 0 n m で読み取った。

【 0 1 6 6 】

P D L - 1 に対するこれらの抗体の結合活性の結果を、図 2 2 に示す。5 C 1 0 H 1 L 1、5 C 1 0 H 1 L 2、5 C 1 0 H 2 L 2、5 C 1 0 H 2 L 1、H p L p 及び P C A B が、P D L - 1 に対する結合において P D - 1 と用量依存的様式で競合し得ることが分かる。各用量の蛍光強度及び曲線フィッティング後の E C <sub>50</sub> により表される算出した結合効率を、表 7 に示す。

【表 7】

表 7:PDL-1 に対する抗体 5C10H1L1、5C10H1L2、5C10H2L2、5C10H2L1、HpLp 及び

PCAB の競合結合(競合 ELISA)

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

## 【 0 1 6 7 】

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

## 【 0 1 6 8 】

実施例 1 3 : 競合 E L I S A による、 P D L - 1 に対する B 7 - 1 と抗体 5 C 1 0 H 2 L 2 の競合結合活性の決定

P D L - 1 に対する結合について B 7 - 1 ( B 7 - 1 - h F c 、調製例 3 により得た ) と競合する 5 C 1 0 H 2 L 2 及び陽性対照抗体 ( H p L p 及び P C A B ) の能力を、競合 E L I S A により決定した。 E L I S A プレートに P D L - 1 をコーティングし、 4 で終夜インキュベートした。ウェルを、 1 % B S A を用いて 3 7 で 2 時間ブロッキングした。その後、抗体及び P D L - 1 - m F c を混合し、室温で 1 5 分間インキュベートし、次いで各ウェルに添加し、 3 7 で 3 0 分間インキュベートした。二次抗体、 H R P にコンジュゲートしたヤギ抗マウス I g G ( H + L ) ( J a c k s o n 、 1 0 9 - 0 3 5 - 0 6 2 ) を、添加した。 T M B 基質 ( N e o g e n 、 3 0 8 1 7 7 ) を、発色反応のために添加し、 5 分間インキュベートした。吸光度を、 4 5 0 n m で読み取った。

10

## 【 0 1 6 9 】

P D L - 1 結合に対する B 7 - 1 と 5 C 1 0 H 2 L 2 の競合の結果を、図 2 3 に示し、 5 C 1 0 H 2 L 2 、 H p L p 及び P C A B は、 P D L - 1 結合について B 7 - 1 と効果的に競合し得る。各用量の蛍光強度及び曲線フィッティング後の E C <sub>50</sub> により表される算出した結合効率を、表 8 に示す。

20

## 【表 8】

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

## ELISA の結果

抗体 ( $\mu$ g/mL)	コーティングした抗原:PDL-1-mFc(1 $\mu$ g/mL)					
	5C10 H2L2		HpLp		PCAB	
3 $\mu$ g/ml	0.583	0.583	0.735	0.683	0.400	0.413
1:3	0.661	0.665	0.731	0.781	0.525	0.581
1:9	0.694	0.699	0.713	0.789	0.606	0.682
1:27	0.798	0.824	0.791	0.853	0.762	0.747
1:81	0.965	0.976	0.988	0.959	0.889	0.906
1:243	1.043	1.052	0.985	1.055	1.031	1.009
1:729	1.064	1.069	0.990	0.986	1.029	1.013
0.000	1.052	0.984	0.955	0.938	1.013	1.036
B7-1-hFc-bio: 0.4 $\mu$ g/ml						
二次抗体	ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識したストレプトアビジン(SA-HRP)(1:4000)					
EC <sub>50</sub> (nM)	0.756		0.639 (不完全な競合*)		1.554	

30

40

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

## 【 0 1 7 0 】

結果は、決定した抗体全てが、 P D L - 1 結合について B 7 - 1 と競合でき、 5 C 1 0 H 2 L 2 の競合結合活性は、 P C A B より強く、 5 C 1 0 H 2 L 2 の E C <sub>50</sub> は、 P C A

50

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

【0171】

実施例14：5C10H2L2及び陽性対照抗体(HpLp及びPCAB)の細胞生物活性分析

末梢血単核細胞(PBMC)におけるIL-2及びIFN- $\gamma$ の分泌に対するモノクローナル抗体5C10H2L2並びに陽性対照(HpLp及びPCAB)の効果を調査するために、Ficoll-Plus(GE Healthcare ロット番号171440-02)を使用して、PBMCを単離した。PBMCにIL-4(PeproTech K2513、1000U/mL)及びGM-CSF(PeproTech H1513、1000U/mL)を添加して、6日間誘導した。その後、PBMC及び細胞にTNF- $\alpha$ (PeproTech G1513、200U/mL)を更に添加して、3日間誘導し、それによってDC細胞を得た。

10

【0172】

T細胞をPBMCから単離した。DC細胞をT細胞と混合し、1:10の比で培養した。異なる濃度の抗体5C10H2L2(対照としてhIgG)と5~6日間インキュベートした後、ELISAを実施してIFN- $\gamma$ (Dakew Biotech Inc. から購入したキット)及びIL-2(Dakew Biotech Inc. から購入したキット)の分泌を評価した。

20

【0173】

DC及びT細胞混合物からのIFN- $\gamma$ 及びIL-2の分泌の結果を、それぞれ図24及び図25に示した。結果は、5C10H2L2、HpLp並びにPCABが、IFN- $\gamma$ 及びIL-2の分泌を用量依存的様式で効果的に誘導し得ることを示す。

【0174】

実施例15：修飾IgG1定常領域を持つモノクローナル抗体5C10H2L2-IgG1mtの設計及び調製

本発明において、重鎖定常領域は、Ig-1鎖C領域、受託番号：P01857であり；軽鎖定常領域は、Ig鎖C領域、受託番号：P01834である。EU付番方式による234、235及び、237部位でアミノ酸を、L234A、L235A及びG237Aに突然変異させた。変異体抗体を、5C10H2L2-IgG1mtと命名し、実施例4の方法により調製した。

30

【0175】

実施例16：フォルテバイオにより決定したFcRIIIa及びC1qに対する5C10H2L2-IgG1mtの動力的親和性

1. FcRIIIaに対する5C10H2L2-IgG1mt、テセントリク(登録商標)の親和性及び結合動態を、フォルテバイオ(Pall カタログ番号Octet、Qkeから購入した)により以下の通り特徴づけた：

【0176】

精製したFcRIIIa-ビオチンを、固定条件(1 $\mu$ g/mL FcRIIIa-ビオチン、300秒)でフォルテバイオにより提供される標準的な方法及びキットを使用してビオチン-ストレプトアビジン結合によってストレプトアビジンコートされているSAチップにカップリングした。チップに、抗体を濃度4000nMで120秒間結合させ、その後PBST(pH7.4)中で180秒間インキュベートして解離させた。結合及び解離曲線を、Octetソフトウェアにより分析した。

40

【0177】

結果を、図26A及び26Bに示し、5C10H2L2-IgG1mt及びテセントリク(登録商標)は、FcRIIIaに結合しなかった、このことは両方ともADCC活性がないことを示す。

【0178】

2. C1q(Fitzgerald、カタログ番号32R-AC049から購入した)に

50

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

【0179】

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

【表9】

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

抗体	K <sub>D</sub> (M)	K <sub>on</sub> (1/MS)	K <sub>dis</sub> (1/s)
5C10H2L2-IgG1mt	8.53E-09	9.86E+05	8.41E-03
テセントリク(登録商標)	1.30E-09	1.36E+06	1.76E-03

【0180】

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

【0181】

実施例17：5C10H2L2-IgG1mtのCDC活性

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

【0182】

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

【0183】

実施例18：大腸がんに対するin vivo腫瘍阻害効果

1. サンプル

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

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

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

【0184】

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

【0185】

細胞及び動物

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

10

【0186】

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

【0187】

2. 手順

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

20

【0188】

3. 実験的指標

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

【0189】

腫瘍直径を、ノギスで週2回測定した。腫瘍体積(V)を：

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

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

30

【0190】

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

【0191】

4. 結果

下記表10に示す。

## 【表 10】

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

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

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

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

## 【 0 1 9 2 】

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

## 【 0 1 9 3 】

10

20

30

40

50

### 実施例 19：肺がんに対する *in vivo* 腫瘍阻害効果

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

#### 【0194】

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

#### 【0195】

腫瘍成長曲線を、図28に示す。

#### 【0196】

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

#### 【0197】

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

10

20

【図1】

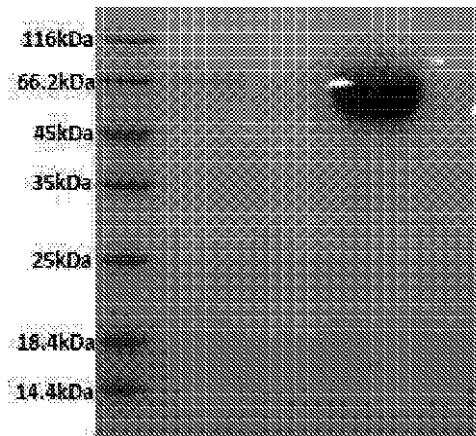


图 1

【図2】

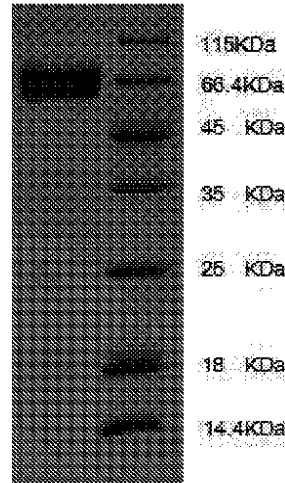


图 2

【 図 3 】

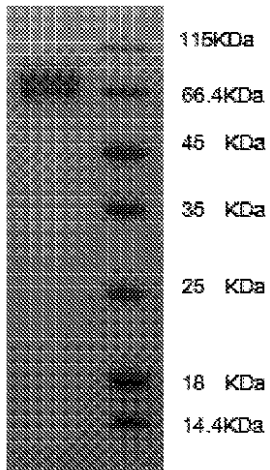


图 3

【 図 4 】

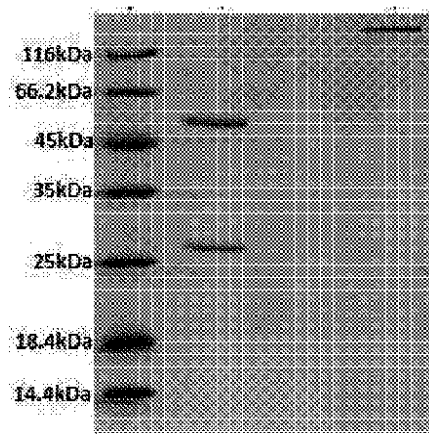


图 4

【 図 5 】

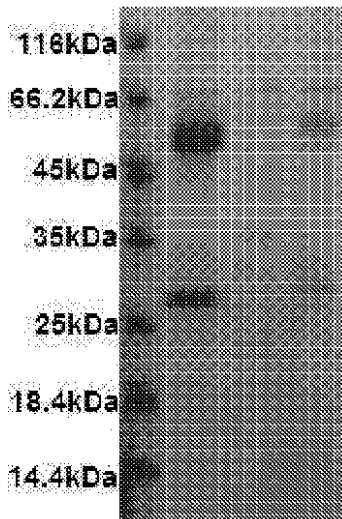


图 5

【 図 6 】

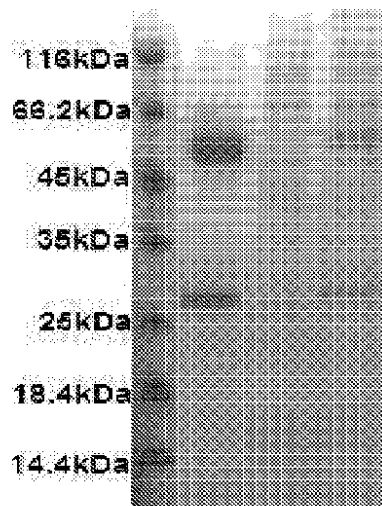


图 6

【 図 7 】

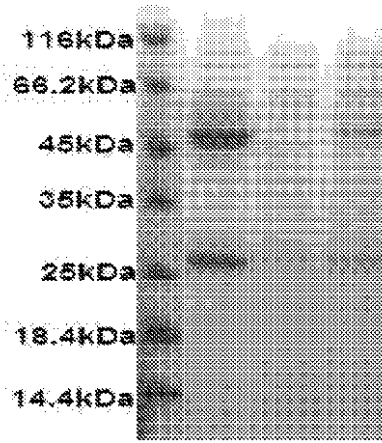


图 7

【 図 8 】

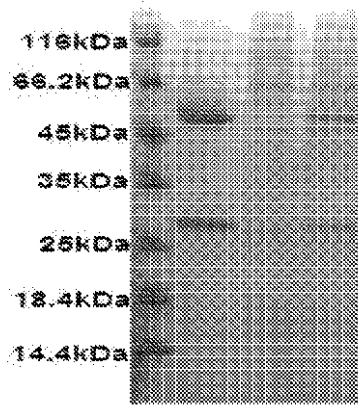


图 8

【 図 9 】

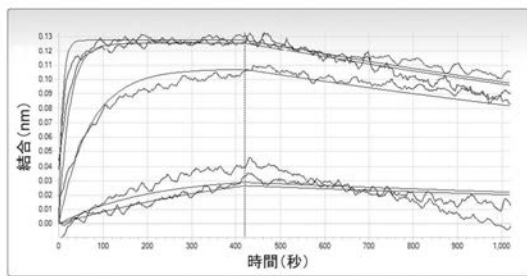


FIG. 9

【 図 10 】

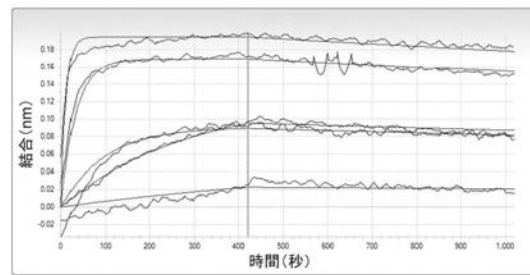


FIG. 10

【 図 1 1 】

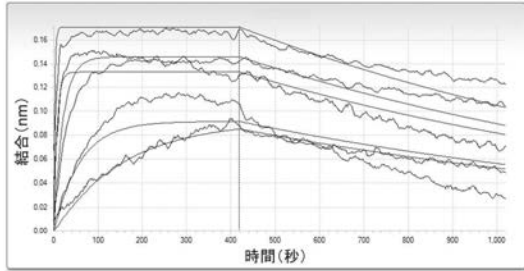
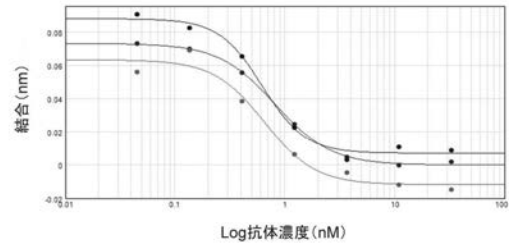


FIG. 11

【 図 1 2 】



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

曲線フィッティング結果

曲線フィッティング : 4-パラメーター  $y = D + \frac{A-D}{1 + (\frac{x}{C})^B}$

	パラメーター	推定値	標準偏差	信頼区間
5C10 $R^2 = 0.999$ EC50 = 0.817	A	0.076	0.001	[0.074, 0.081]
	B	1.704	0.115	[1.337, 2.071]
	C	0.817	0.037	[0.699, 0.935]
	D	0.004	8.87e-4	[0.001, 0.007]
5C10 H2L2 $R^2 = 0.975$ EC50 = 0.654	A	0.068	0.007	[0.046, 0.090]
	B	1.880	0.749	[0.503, 4.262]
	C	0.654	0.188	[0.118, 1.190]
	D	-0.008	0.005	[-0.024, 0.009]
HpLp $R^2 = 0.993$ EC50 = 0.625	A	0.092	0.004	[0.080, 0.104]
	B	2.208	0.471	[0.750, 3.705]
	C	0.625	0.079	[0.373, 0.875]
	D	0.011	0.003	[0.002, 0.020]

FIG. 12

【 図 1 3 】

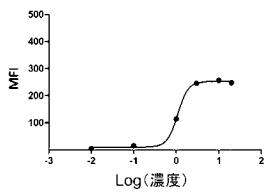


FIG. 13

【 図 1 4 】

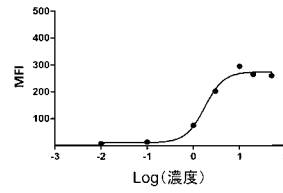
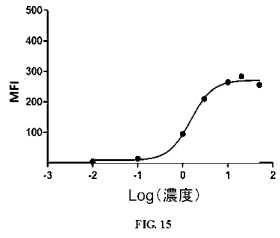
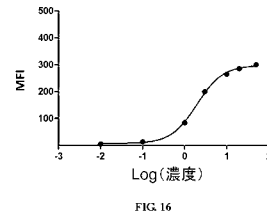


FIG. 14

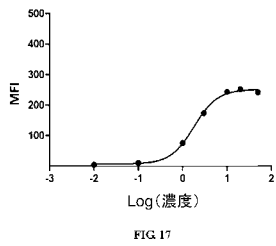
【 図 1 5 】



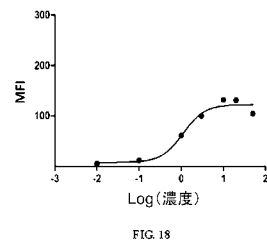
【 図 1 6 】



【 図 1 7 】



【 図 1 8 】



【 図 1 9 】

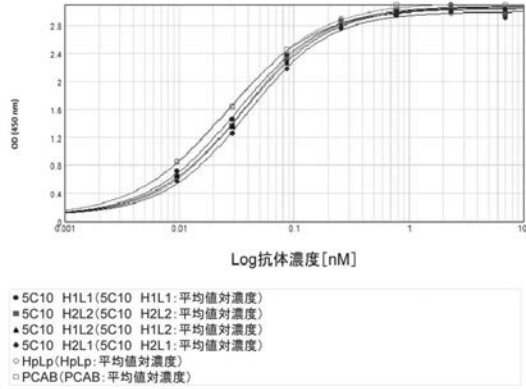


FIG 19

【 図 2 0 】

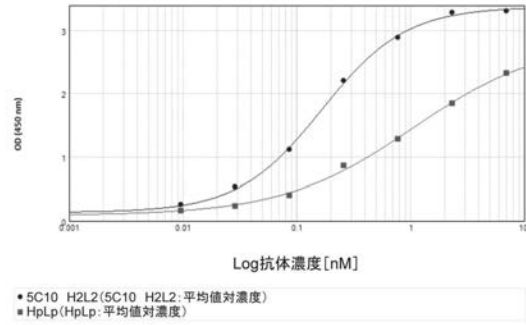


FIG 20

【 図 2 1 】

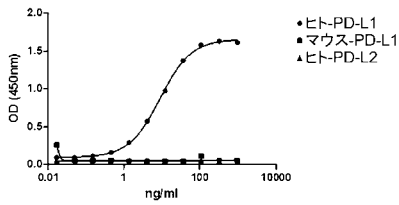


FIG 21

【 図 2 2 】

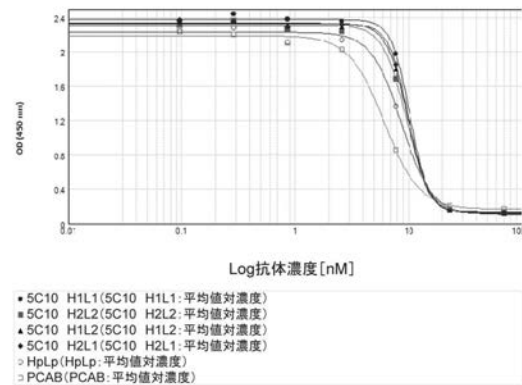


FIG 22

【 図 2 3 】

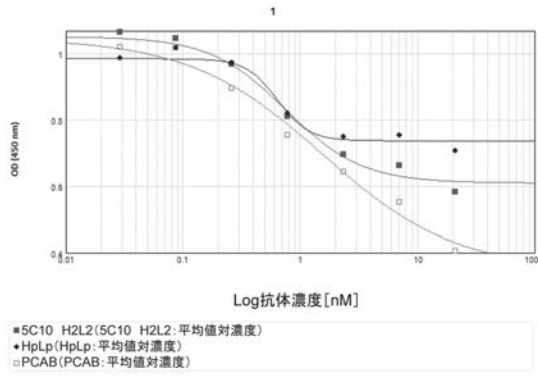


FIG. 23

【 図 2 4 】

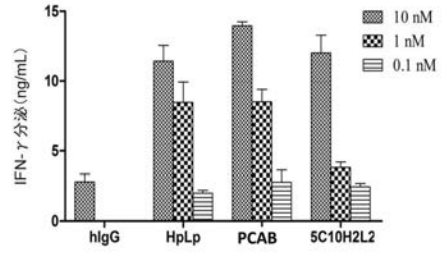


FIG. 24

【 図 2 5 】

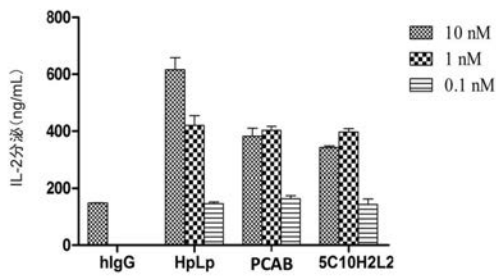


FIG. 25

【 図 2 6 A 】

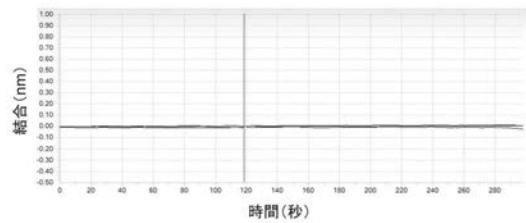
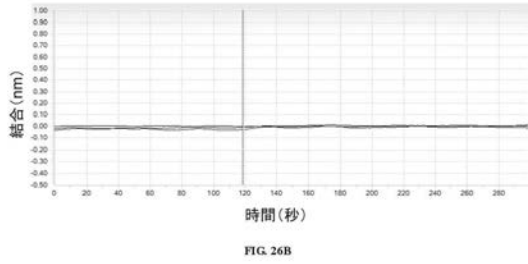
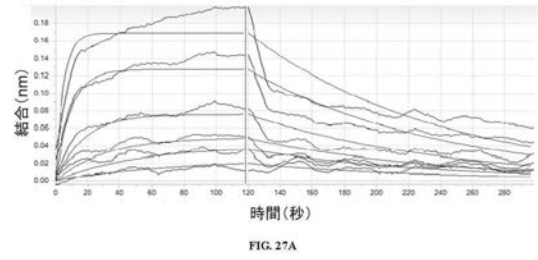


FIG. 26A

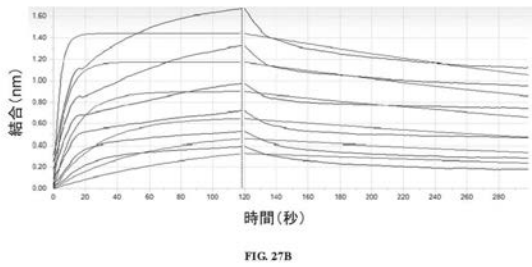
【 図 2 6 B 】



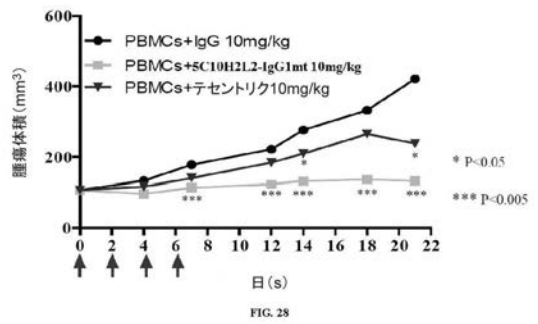
【 図 2 7 A 】



【 図 2 7 B 】



【 図 2 8 】



## 【配列表】

2018526974000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】平成29年12月18日(2017.12.18)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

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

又は

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

又は

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

## 【請求項2】

重鎖可変領域が、配列番号2、配列番号6及び配列番号10から選択されるアミノ酸配列を有し、及び/又は軽鎖可変領域が、配列番号4、配列番号8及び配列番号12から選択されるアミノ酸配列を有し；

又は

重鎖可変領域が配列番号21のアミノ酸配列を有し、及び/又は軽鎖可変領域が配列番号23のアミノ酸配列を有し；

又は

重鎖可変領域が配列番号25のアミノ酸配列を有し、及び/又は軽鎖可変領域が配列番号27のアミノ酸配列を有する、請求項1に記載のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片。

## 【請求項3】

前記抗体又はその抗原結合断片が、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fd、Fv、dAb、相補性決定領域断片、一本鎖抗体(例えば、scFv)、ヒト化抗体、キメラ抗体若しくはダイアボディから選択される、請求項1又は2に記載のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片。

## 【請求項4】

前記モノクローナル抗体又はその抗原結合断片が、約100nM未満、例えば、約10nM、1nM、0.9nM、0.8nM、0.7nM、0.6nM、0.5nM、0.4nM、0.3nM、0.2nM、0.1nM未満若しくはより小さいEC<sub>50</sub>でPDL-1に結合し、EC<sub>50</sub>が間接ELISA法により決定されることが好ましい、請求項1又は2に記載のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片。

## 【請求項5】

前記モノクローナル抗体が非CDR領域を含み、前記非CDR領域がマウス以外の種、例えば、ヒト抗体から得られ、

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

前記モノクローナル抗体の定常領域が、変異したヒトIgG1定常領域であることが好ましい、請求項1又は2に記載のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片。

## 【請求項6】

前記変異したヒト I g G 1 定常領域が、E U 付番方式に従って前記重鎖定常領域に N 2 9 7 A 突然変異を含む、請求項 5 に記載のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 7】

前記変異したヒト I g G 1 重鎖定常領域が、E U 付番方式に従って 2 3 4、2 3 5 又は 2 3 7 位に少なくとも 1 つの突然変異を有し、F c R I I I a 及び / 又は C 1 q に対する抗体又はその抗原結合断片の動力的親和性が、突然変異後に下がる、請求項 5 又は 6 に記載のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 8】

前記変異したヒト I g G 1 定常領域が、E U 付番方式に従って 2 3 4、2 3 5 及び 2 3 7 位に 1 つ、2 つ又は 3 つの突然変異を有し、前記突然変異が、L 2 3 4 A、L 2 3 5 A 及び G 2 3 7 A から選択される、請求項 5 又は 6 に記載のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 9】

前記突然変異が、前記抗体若しくはその抗原結合断片の A D C C 活性及び / 又は C D C 活性を減少させる、請求項 5 ~ 8 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 10】

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

【請求項 11】

単離された核酸分子 A であって、

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

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

前記核酸分子が、配列番号 1、配列番号 5 若しくは配列番号 9 のヌクレオチド配列を有することがより好ましく；

又は

抗体が、配列番号 2 9 ~ 3 1 に規定される C D R を含む重鎖可変領域を有し、

前記抗体の重鎖が、配列番号 2 1 のアミノ酸配列を有することが好ましく、

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

又は

抗体が、配列番号 3 5 ~ 3 7 に規定される C D R を含む重鎖可変領域を有し、

前記抗体の重鎖が、配列番号 2 5 のアミノ酸配列を有することが好ましく、

前記核酸分子が、配列番号 2 6 のヌクレオチド配列を有することがより好ましい、抗体の重鎖可変領域をコードしているヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子 A。

【請求項 12】

単離された核酸分子 B であって、

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

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

前記核酸分子が、配列番号 3、配列番号 7 若しくは配列番号 1 1 のヌクレオチド配列を有することがより好ましく；

又は

抗体が、配列番号 3 2 ~ 3 4 に規定される C D R を含む軽鎖可変領域を有し；

前記抗体の軽鎖が、配列番号 2 3 のアミノ酸配列を有することが好ましく、

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

又は

抗体が、配列番号 3 8 ~ 4 0 に規定される C D R を含む軽鎖可変領域を有し；

前記抗体の軽鎖が、配列番号 27 のアミノ酸配列を有することが好ましく、

前記核酸分子が、配列番号 28 のヌクレオチド配列を有することがより好ましい、抗体の軽鎖可変領域をコードしているヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子 B。

【請求項 13】

請求項 11 に記載の核酸分子 A、及び請求項 12 に記載の核酸分子 B を含み；任意選択で、前記核酸分子 A 及び前記核酸分子 B を接続するためのリンカーを更に含む、単離された核酸分子 C。

【請求項 14】

請求項 11 に記載の核酸分子 A、請求項 12 に記載の核酸分子 B 又は請求項 13 に記載の核酸分子 C を含む、ベクター。

【請求項 15】

請求項 11 に記載の核酸分子 A、請求項 12 に記載の核酸分子 B、請求項 13 に記載の核酸分子 C 又は請求項 14 に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 16】

適切な条件下で請求項 15 に記載の宿主細胞を培養するステップと、宿主細胞培養物からモノクローナル抗体又はその抗原結合断片を回収するステップとを含む、請求項 1～9 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片を調製する方法。

【請求項 17】

受託番号 CCTCC C2015133 で中国タイプカルチャーコレクションセンター (CCTCC) に寄託されている、ハイブリドーマ細胞株 LT005。

【請求項 18】

モノクローナル抗体又はその抗原結合断片及びカップリング部分を含むコンジュゲートであって、前記モノクローナル抗体が請求項 1～9 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片であり、前記カップリング部分が検出可能な標識であり；

前記カップリング部分が、ラジオアイソトープ、蛍光物質、発光物質、着色物質又は酵素であることが好ましい、コンジュゲート。

【請求項 19】

モノクローナル抗体又はその抗原結合断片及びコンジュゲートした部分を含む二機能性抗体コンジュゲートであって、前記抗体が請求項 1～9 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片であり、前記コンジュゲートした部分が第 2 の生物学的機能的断片であり；

前記第 2 の生物学的機能的断片が、結合活性を有し、タンパク質、ポリエチレングリコール (PEG)、核種、核酸、小分子毒素、受容体又はリガンドであることが好ましい、二機能性抗体コンジュゲート。

【請求項 20】

第 1 の抗体若しくはその断片と更なる抗体若しくはその断片又は抗体模倣体とのコンジュゲーションにより形成される多重特異性抗体であって、各抗体若しくはその断片又は抗体模倣体が、元の結合特異性を保持しており、前記第 1 の抗体又はその断片が、請求項 1～9 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体又はその抗原結合断片であり；

前記多重特異性抗体が二重特異性抗体又は三重特異性抗体又は四重特異性抗体であることが好ましい、多重特異性抗体。

【請求項 21】

請求項 1～9 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体若しくはその抗原結合断片を含む、又は請求項 18 若しくは 19 に記載のコンジュゲートを含む、又は請求項 20 に記載の多重特異性抗体を含むキットであって；

前記キットが、前記モノクローナル抗体又はその抗原結合断片を特異的に認識する二次抗体を更に含むことが好ましく；

任意選択で、前記二次抗体が、ラジオアイソトープ、蛍光物質、発光物質、着色物質又は酵素など検出可能な標識で標識されているキット。

【請求項 22】

キットの製造における請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体若しくはその抗原結合断片、又は請求項 18 若しくは 19 に記載のコンジュゲート、又は請求項 20 に記載の多重特異性抗体の使用であって、前記キットを使用してサンプル中の PDL - 1 の存在又はレベルを検出する、モノクローナル抗体若しくはその抗原結合断片、又はコンジュゲート、又は多重特異性抗体の使用。

【請求項 23】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体若しくはその抗原結合断片、又は請求項 18 若しくは 19 に記載のコンジュゲート、又は請求項 20 に記載の多重特異性抗体を含む医薬組成物であって；

任意選択で、薬学的に許容可能な担体及び / 又は賦形剤を更に含む医薬組成物。

【請求項 24】

腫瘍若しくは貧血の予防及び / 又は処置及び / 又は補助療法及び / 又は診断用医薬の製造における請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体若しくはその抗原結合断片、又は請求項 18 若しくは 19 に記載のコンジュゲート、又は請求項 20 に記載の多重特異性抗体の使用であり；

前記腫瘍が、乳がん、非小細胞肺癌などの肺がん、肝臓がん、胃がん、大腸がん又は直腸がんなどの結腸直腸がん、食道がん、卵巣がん、子宮頸がん、腎がん、前立腺がん、膀胱がん、膵臓がん、膠腫、黒色腫及び白血病から選択されることが好ましい、モノクローナル抗体若しくはその抗原結合断片、又はコンジュゲート、又は多重特異性抗体の使用。

【請求項 25】

a) PD - 1 又は B7 - 1 に対する PDL - 1 の結合を遮断するための薬物；  
b) PDL - 1 活性又は PDL - 1 レベルを調節（例えば下方調節）するための薬物；  
c) PD - 1 又は PDL - 1 による免疫抑制を除去するための薬物、又は  
d) Tリンパ球による IFN - 及び / 又は IL - 2 の発現を強化するための薬物の製造における、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体若しくはその抗原結合断片、又は請求項 18 若しくは 19 に記載のコンジュゲート、又は請求項 20 に記載の多重特異性抗体の使用。

## 【 国际调查报告 】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. <b>PCT/CN2017/075484</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
C07K 16/28 (2006.01) i; C12N 15/13 (2006.01) i; C12N 5/20 (2006.01) i; A61K 39/395 (2006.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K, C12N, A61K, A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS, CPRSABS, CNMED, TWABS, TWMED, HKABS, MOABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, TWTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, CNKI, Web of Science: ligand, programmed cell death factor 1, programmed cell death 1, PD-1, Programmed death-ligand 1, PDL-1, Monoclonal antibody; GenBank+DDBJ+PAJ: sequence search on SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15-20 and 29-40.		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HUANG, Zhiyu et al., "Clinical Research Progress of Anti PD-1/PD-L1 Monoclonal Antibody in the Treatment of Lung Cancer", CHINESE JOURNAL OF LUNG CANCER, volume 18, number 11, 30 November 2015 (30.11.2015), ISSN: 1009-3419, pages 706-713, and see the whole document	1-25
A	CN 104250302 A (SHANGHAI JUNSHI BIOSCIENCES CO., LTD. et al.), 31 December 2014 (31.12.2014), see the whole document	1-25
A	CN 103242448 A (ZHENGZHOU UNIVERSITY), 14 August 2013 (14.08.2013), see the whole document	1-25
A	CN 104673895 A (JIANGSU SIMCERE PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 30 June 2015 (30.06.2015), see the whole document	1-25
A	CN 105175544 A (ANHUI RUBIOX-VISION BIOTECHNOLOGY CO., LTD.), 23 December 2015 (23.12.2015), see the whole document	1-25
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier 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 09 May 2017 (09.05.2017)	Date of mailing of the international search report <b>02 June 2017 (02.06.2017)</b>	
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer <b>XING, Yunlong</b> Telephone No.: (86-10) <b>62411094</b>	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

**PCT/CN2017/075484**

<b>C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
<b>Category*</b>	<b>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</b>	<b>Relevant to claim No.</b>
A	US 8557777 B2 (PERAMBAKM, S.M. et al.), 15 October 2013 (15.10.2013), see the whole document	1-25
A	RIZVI, N.A. et al., "Activity and Safety of Nivolumab, an Anti-PD-1 Immune Checkpoint Inhibitor, for Patients with Advanced, Refractory Squamous Non-Small-Cell Lung Cancer (CheckMate 063): a Phase 2, Single-Arm Trial", LANCET ONCOLOGY, volume 3, number 16, 31 March 2015 (31.03.2015), ISSN: 1470-2045, pages 257-265, and see the whole document	1-25

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

**PCT/CN2017/075484****Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 26 and 27

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] the contents of claims 26 and 27 relate to a method for diagnosis and treatment of human and animal bodies.

2.  Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3.  Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- [1] Invention I: claims 1-9, 11-16, 18-27 (partial of all the claims) and claims 10 and 17, which respectively relate to a monoclonal antibody 5C10 (with the heavy chain CDR being SEQ ID NOs: 15-17, and the light chain CDR being SEQ ID NOs: 18-20) and humanized antibody derivatives thereof, antigen binding segments thereof, nucleic acid molecules encoding the monoclonal antibody 5C10, relevant carriers, host cells, a preparation method thereof, hybridoma cell lines, conjugates, multispecific antibodies, a kit thereof, drug combinations thereof, pharmaceutical purposes thereof, *in vivo* and *in vitro* methods and therapeutic methods;
- [2] Invention II: claims 1-9, 11-16 and 18-27 (partial of all the claims), which respectively relate to a monoclonal antibody 5F10 (with the heavy chain CDR being SEQ ID NOs: 29-31, and the light chain CDR being SEQ ID NOs: 32-34), antigen binding segments thereof, nucleic acid molecules encoding the monoclonal antibody 5C10, relevant carriers, host cells, a preparation method thereof, conjugates, multispecific antibodies, a kit thereof, drug combinations thereof, pharmaceutical purposes thereof, *in vivo* and *in vitro* methods and therapeutic methods; and
- [3] Invention III: claims 1-9, 11-16 and 18-27 (partial of all the claims), which respectively relate to a monoclonal antibody 9F6 (with the heavy chain CDR being SEQ ID NOs: 35-37, and the light chain CDR being SEQ ID NOs: 38-40), antigen binding segments thereof, nucleic acid molecules encoding the monoclonal antibody 5C10, relevant carriers, host cells, a preparation method thereof, conjugates, multispecific antibodies, a kit thereof, drug combinations thereof, pharmaceutical purposes thereof, *in vivo* and *in vitro* methods and therapeutic methods.
- [4] The sequence structures and the CDRs of the monoclonal antibodies involved in the above-mentioned three inventions are different from one another, and the same technical feature between the inventions is the monoclonal antibody aiming at programmed cell death factor ligand 1. However, the prior art (CN 104673897 A, published on 03 June 2015, see claim 5) has disclosed a monoclonal antibody MPDL3280A aiming at programmed death ligand 1, and accordingly the same technical feature cannot be considered as "the special technical feature" referred in PCT Rule 13.2. Therefore, these three inventions do not share the same or the corresponding special technical features, do not fall within a single general inventive concept, and accordingly lack unity therebetween and do not comply with the requirements of PCT Rule 13.1.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

**PCT/CN2017/075484****Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/CN2017/075484**

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 104250302 A	31 December 2014	EP 3026062 A1	01 June 2016
		PH 12015502819 A1	21 March 2016
		US 2016272708 A1	22 September 2016
		WO 2014206107 A1	31 December 2014
		JP 2016523265 A	08 August 2016
CN 103242448 A	14 August 2013	CN 103242448 B	14 January 2015
CN 104673895 A	30 June 2015	None	
CN 105175544 A	23 December 2015	None	
US 8557777 B2	15 October 2013	US 2012230939 A1	13 September 2012

## 国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/075484

A. 主题的分类	
C07K 16/28(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 5/20(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i	
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类	
B. 检索领域	
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)	
C07K, C12N, A61K, A61P	
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献	
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))	
CNABS, CPRSABS, CNMED, TWABS, TWMED, HKABS, MOABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, TWTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, CNKI, Web of Science; 程序性细胞死亡因子1, 配体, 单克隆抗体, 单抗, programmed cell death 1, PD-1, Programmed death-ligand 1, PDL-1, Monoclonal antibody; GenBank+DDBJ+PAJ; 对SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15-20, 29-40的序列检索。	
C. 相关文件	
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落
A	黄志煜等. “抗PD-1/PD-L1单抗治疗肺癌临床研究进展” 中国肺癌杂志, 第18卷, 第11期, 2015年 11月 30日 (2015 - 11 - 30), ISSN: 1009-3419, 第706-713页, 参见全文
A	CN 104250302 A (上海君实生物医药科技有限公司等) 2014年 12月 31日 (2014 - 12 - 31) 参见全文
A	CN 103242448 A (郑州大学) 2013年 8月 14日 (2013 - 08 - 14) 参见全文
A	CN 104673895 A (江苏先声药业有限公司) 2015年 6月 30日 (2015 - 06 - 30) 参见全文
A	CN 105175544 A (安徽瀚海博兴生物技术有限公司) 2015年 12月 23日 (2015 - 12 - 23) 参见全文
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。	
<input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。	
* 引用文件的具体类型:	“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件
“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件	“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性
“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利	“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性
“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)	“&” 同族专利的文件
“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件	
“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件	
国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2017年 5月 9日	2017年 6月 2日
ISA/CN的名称和邮寄地址	授权官员
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	邢云龙
传真号 (86-10)62019451	电话号码 (86-10)62411094

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2009年7月)

## 国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/075484

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	US 8557777 B2 (PERAMBAKAM SUPRIYA M等) 2013年 10月 15日 (2013 - 10 - 15) 参见全文	1-25
A	Rizvi, NA等. "Activity and safety of nivolumab, an anti-PD-1 immune checkpoint inhibitor, for patients with advanced, refractory squamous non-small-cell lung cancer (CheckMate 063): a phase 2, single-arm trial" LANCET ONCOLOGY, 第3卷, 第16期, 2015年 3月 31日 (2015 - 03 - 31), ISSN: 1470-2045, 第257-265页, 参见全文	1-25

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2009年7月)

## 国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/075484

## 第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a), 对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:

1.  权利要求: 26-27  
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题, 即:  
[1] 权利要求26-27内容涉及对人体和动物体进行诊断和治疗的方法。
2.  权利要求:  
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分, 以致不能进行任何有意义的国际检索, 具体地说:
3.  权利要求:  
因为它们是从属权利要求, 并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

## 第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明, 即:

- [1] 第一项: 权利要求1-9, 11-16, 18-27(都是部分), 权利要求10、17, 涉及单克隆抗体5C10(重链CDR为SEQ ID NO: 15-17、轻链CDR为SEQ ID NO: 18-20)及其人源化衍生抗体、其抗原结合片段、编码它的核酸分子、相关载体、宿主细胞、制备方法、杂交瘤细胞株、偶联物、多特异性抗体、试剂盒、药物组合物、制药用途、体内体外方法、治疗方法;
- [2] 第二项: 权利要求1-9, 11-16, 18-27(都是部分), 涉及单克隆抗体5F10(重链CDR为SEQ ID NO: 29-31、轻链CDR为SEQ ID NO: 32-34)、其抗原结合片段、编码它的核酸分子、相关载体、宿主细胞、制备方法、偶联物、多特异性抗体、试剂盒、药物组合物、制药用途、体内体外方法、治疗方法;
- [3] 第三项: 权利要求1-9, 11-16, 18-27(都是部分), 涉及单克隆抗体9F6(重链CDR为SEQ ID NO: 35-37、轻链CDR为SEQ ID NO: 38-40)、其抗原结合片段、编码它的核酸分子、相关载体、宿主细胞、制备方法、偶联物、多特异性抗体、试剂盒、药物组合物、制药用途、体内体外方法、治疗方法;
- [4] 上述三组发明之间涉及的单克隆抗体序列结构及其CDR各不相同, 它们之间相同的技术特征就是都属于针对程序性细胞死亡因子配体1的单克隆抗体, 然而, 现有技术文献(CN104673897 A 20150603, 参见权利要求5)已经公开了针对程序性死亡配体1的单克隆抗体MPDL3280A, 从而该共同技术特征不能被认为是PCT细则13.2所指的“特定技术特征”, 因此, 这三项发明之间不存在相同或相应的特定技术特征, 不属于一个总的发明构思, 它们之间没有单一性, 不符合PCT细则13.1的规定。

## 国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2017/075484

## 第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

1.  由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2.  由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何加费。
3.  由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求，具体地说，是权利要求：
4.  申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：

对异议的意见

- 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。
- 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
- 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/075484

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	104250302	A	2014年 12月 31日	EP	3026062	A1	2016年 6月 1日
				PH	12015502819	A1	2016年 3月 21日
				US	2016272708	A1	2016年 9月 22日
				WO	2014206107	A1	2014年 12月 31日
				JP	2016523265	A	2016年 8月 8日
CN	103242448	A	2013年 8月 14日	CN	103242448	B	2015年 1月 14日
CN	104673895	A	2015年 6月 30日	无			
CN	105175544	A	2015年 12月 23日	无			
US	8567777	B2	2013年 10月 15日	US	2012230939	A1	2012年 9月 13日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 N 5/18 (2006.01)	C 1 2 N 5/18	
A 6 1 P 7/06 (2006.01)	A 6 1 P 7/06	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 47/68	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	L
A 6 1 K 47/60 (2017.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 47/64 (2017.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 47/66 (2017.01)	A 6 1 K 39/395	T
A 6 1 K 49/00 (2006.01)	A 6 1 K 47/60	
A 6 1 K 47/56 (2017.01)	A 6 1 K 47/64	
A 6 1 K 47/54 (2017.01)	A 6 1 K 47/66	
A 6 1 K 51/10 (2006.01)	A 6 1 K 49/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 47/56	
G 0 1 N 33/543 (2006.01)	A 6 1 K 47/54	
C 1 2 N 15/06 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	U
	A 6 1 K 51/10	2 0 0
	G 0 1 N 33/53	D
	G 0 1 N 33/543	5 4 5 A
	C 1 2 N 15/06	1 0 0

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

(74)代理人 100123995

弁理士 野田 雅一

(74)代理人 100148596

弁理士 山口 和弘

(72)発明者 リ, バイオン

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

(72)発明者 シュエ, トントン

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

- (72)発明者 シア, ユー  
中華人民共和国, グアンドン 5 2 8 4 3 7, チョンシャン, トーチ デベロップメント  
ゾーン, シェンノン ビルディング 6
- (72)発明者 ワン, ゾンミン マックスウェル  
中華人民共和国, グアンドン 5 2 8 4 3 7, チョンシャン, トーチ デベロップメント  
ゾーン, シェンノン ビルディング 6
- (72)発明者 シャオ, リャン  
中華人民共和国, スーチョワン 6 1 1 1 3 8, チェンドウ, ウェンチャン ディストリク  
ト, ハイ シア インドストリアル パーク, シンホア アベニュー (セクション 2)  
, ナンバー 6 6 6
- (72)発明者 ワン, リチュン  
中華人民共和国, スーチョワン 6 1 1 1 3 8, チェンドウ, ウェンチャン ディストリク  
ト, ハイ シア インドストリアル パーク, シンホア アベニュー (セクション 2)  
, ナンバー 6 6 6
- (72)発明者 ワン, ジンイー  
中華人民共和国, スーチョワン 6 1 1 1 3 8, チェンドウ, ウェンチャン ディストリク  
ト, ハイ シア インドストリアル パーク, シンホア アベニュー (セクション 2)  
, ナンバー 6 6 6

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA19 CA20 CC03 CC15 CC24 CD21 CE03 CE12  
DA01 DA13  
4B065 AA91X AA91Y AA93X AA93Y AB01 AB05 AC14 BA02 BB25 BD14  
BD15 BD18 CA25 CA44 CA46  
4C076 AA95 BB13 CC41 EE59  
4C085 AA13 AA14 AA15 AA16 AA25 BB31 BB36 BB41 BB43 CC02  
CC31 DD62 EE01 GG02 HH03 HH11 HH13 KA04 KA05 KA27  
KA29 KB91 LL07 LL18  
4H045 AA11 AA30 BA50 BA70 BA71 DA76 EA20 EA50 FA74 GA15  
GA26

专利名称(译)	PDL-1抗体，其药物组合物及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP2018526974A</a>	公开(公告)日	2018-09-20
申请号	JP2017565750	申请日	2017-03-02
[标]申请(专利权)人(译)	四川科伦药物研究院有限公司		
[标]发明人	リバイオン シュエトントン シアユー ワンゾンミンマックスウェル シャオリャン ワンリチュン ワンジンイー		
发明人	リ, バイオン シュエ, トントン シア, ユー ワン, ゾンミン マックスウェル シャオ, リャン ワン, リチュン ワン, ジンイー		
IPC分类号	C12N15/13 C07K16/28 C07K16/46 C12N15/63 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 C12N5/18 A61P7/06 A61P35/00 A61P35/02 A61K47/68 A61K39/395 A61K47/60 A61K47/64 A61K47 /66 A61K49/00 A61K47/56 A61K47/54 A61K51/10 G01N33/53 G01N33/543 C12N15/06		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P7/06 A61P35/00 A61P35/02 C07K16/2827 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/92 G01N33/57407 G01N33/57411 G01N33/57446 G01N33/577 G01N33/68 A61K39/395 C07K14/70532 C07K2317/24 C07K2317/33 C07K2317/52 C07K2317/76 C07K2319/30 C07K2319/50 C07K2317/31 C07K2317/732 C07K2317/734 C12N5/16 A61K47/6803 C07K16/2896 C07K16/462 C07K16/468 C07K2317/51 C07K2317/515		
FI分类号	C12N15/13.ZNA C07K16/28 C07K16/46 C12N15/63.Z C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 C12N5/18 A61P7/06 A61P35/00 A61P35/02 A61K47/68 A61K39/395.L A61K39/395.D A61K39/395.N A61K39/395.T A61K47/60 A61K47/64 A61K47/66 A61K49/00 A61K47/56 A61K47/54 A61K39/395.U A61K51/10.200 G01N33/53.D G01N33/543.545.A C12N15/06.100		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC03 4B064/CC15 4B064/CC24 4B064 /CD21 4B064/CE03 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065 /AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BB25 4B065/BD14 4B065/BD15 4B065/BD18 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C076/AA95 4C076/BB13 4C076 /CC41 4C076/EE59 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA15 4C085/AA16 4C085/AA25 4C085/BB31 4C085/BB36 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/CC02 4C085/CC31 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085 /GG02 4C085/HH03 4C085/HH11 4C085/HH13 4C085/KA04 4C085/KA05 4C085/KA27 4C085/KA29 4C085/KB91 4C085/LL07 4C085/LL18 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA50 4H045/BA70 4H045 /BA71 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA15 4H045/GA26		
代理人(译)	池田 成人 小泉纯酒卷 山口和弘		
优先权	201610122117.6 2016-03-04 CN		
其他公开文献	JP6432121B2		

摘要(译)

本发明属于肿瘤治疗和分子免疫学领域，涉及PDL-1抗体，其药物组合物及其用途。特别地，本发明涉及PDL-1单克隆抗体或其抗原结合片段，其中所述单克隆抗体具有重链可变区，所述重链可变区包含SEQ ID NO：15至17和/或SEQ ID NO：18至20中定义的CDR。一种轻链可变区，其包含如SEQ ID NO：2中所定义的CDR。本发明的单克隆抗体可特异性结合PDL-1，可特异地消除PDL-1的免疫抑制功能，并可激活T淋巴细胞。 .The 24

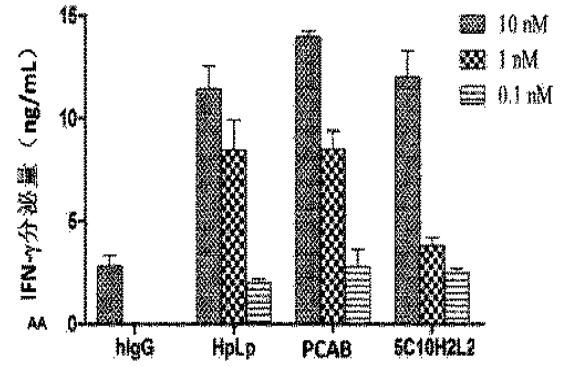


图 24

AA IFN-γ secretion volume (ng/mL)