

(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2019-515646
(P2019-515646A)

(43) 公表日 令和1年6月13日(2019.6.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	4 B 0 6 4
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28 Z N A	4 B 0 6 5
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 0 7 K 14/47	4 C 0 7 6
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	4 C 0 8 3
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 4

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 59 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-544554 (P2018-544554)
 (86) (22) 出願日 平成29年2月24日 (2017.2.24)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年9月4日 (2018.9.4)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2017/054367
 (87) 国際公開番号 WO2017/144681
 (87) 国際公開日 平成29年8月31日 (2017.8.31)
 (31) 優先権主張番号 16020057.2
 (32) 優先日 平成28年2月25日 (2016.2.25)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 510213255
 セル メディカ スイツァランド アー
 ゲー
 スイス国 8952 シュリーレン, ヴ
 ァーギシュトラーセ 27
 (74) 代理人 110001656
 特許業務法人谷川国際特許事務所
 (72) 発明者 シャムシーブ, アディジャパー
 スイス国 8053 チューリッヒ, ブッ
 フツェルグシュトラーセ 64
 (72) 発明者 クレッチュマー, タイタス
 スイス国 6331 ヒューネンベルク,
 ソンハルデンシュトラーセ 63b

最終頁に続く

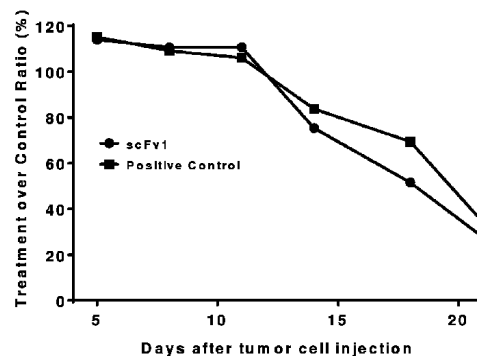
(54) 【発明の名称】 PD-L1 に対する結合メンバー

(57) 【要約】

本発明は、抗 PD-L1 結合メンバーに関し、詳細には、高度に安定で可溶性である一価の強力な PD-L1 結合抗体フラグメントに関する。当該結合メンバーは、癌および炎症性疾患の治療ならびに診断に使用され得る。関連する核酸、ベクター、細胞、および組成物も与えられる。

【選択図】 図 10

Figure 10
A



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

PD-L1 に対する結合特異性を有する結合メンバーであって、以下の特性：

(a) 一価フォーマットの場合は実施例 4、または二価フォーマットの場合は実施例 9 に示した条件下で、結合平衡除外法 (Kinetic Exclusion Assay) によって測定して 10 pM 未満の結合解離平衡定数 (K_D) でヒト PD-L1 に結合する、

(b) ヒト PD-1 およびヒト CD80 の両方とのヒト PD-L1 相互作用を妨げる PD-L1 上のエピトープに結合する、

(c) サル PD-L1 と交差反応する、

(d) サル PD-L1 と結合し、サル PD-L1 に対する結合親和性がヒト PD-L1 に対してと少なくとも同等、より好ましくは少なくとも 2 倍強い、

(e) ヒト PD-L2 またはヒト B7-H3 に結合しない、

(f) HCC827 ヒト肺癌モデルにおいて腫瘍増殖を阻害する、

(g) scFv フォーマットで、pH 7.2 の PBS 中 10 mg/ml の濃度で 37 °C で 1 または 2 週間の保存後に 3% 未満の二量体を形成する、

のうちの 1 つ以上を有する、前記結合メンバー。

【請求項 2】

PD-L1 に対する結合特異性を有する結合メンバーであって、特に、請求項 1 に記載の結合メンバーであって、

(i) 配列番号 6、7、および 8 に示される可変重鎖 CDR-H1、CDR-H2、および CDR-H3 配列のうちの少なくとも 1 つ、ならびに / もしくは

(ii) 配列番号 3、4、および 5 に示される可変軽鎖 CDR-L1、CDR-L2、および CDR-L3 配列のうちの少なくとも 1 つ、

またはそれらの変異体

を含む前記結合メンバー。

【請求項 3】

ヒト化されている、請求項 1 または 2 に記載の結合メンバー。

【請求項 4】

(i) 配列番号 1 と少なくとも 90% の配列同一性を有する可変軽鎖、および / もしくは

(ii) 配列番号 2 と少なくとも 90% の配列同一性を有する可変重鎖、またはそれぞれの変異体

を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の結合メンバー。

【請求項 5】

リンカー配列をさらに含み、前記リンカー配列が、配列番号 10 に示される配列またはその変異体である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の結合メンバー。

【請求項 6】

配列番号 9 もしくは配列番号 11 またはそれらの変異体を含む、請求項 4 に記載の結合メンバー。

【請求項 7】

(i) Fab、Fab'、F(ab)'₂、scFv、Fv フラグメント、scFab、ナノボディ、VHH、もしくは最小認識ユニットなどの抗体フラグメント、

(ii) 全長抗体分子、および / または

(iii) アフィボディ、アフィリン (affilin) 分子、AdNectin、リボカリン突然変異タンパク質、DARPin、Knottin、Kunitz 型ドメイン、Avimer、テトラネクチン、もしくはトランス-ボディ (trans-body) などの非抗体骨格、である、または、を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の結合メンバー。

【請求項 8】

一価または多価であり、多重特異性であってもよく、好ましくは二重特異性である、より好ましくはダイアボディ、単鎖ダイアボディ、DART、BiTE、またはタンデム scFv である、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の結合メンバー。

10

20

30

40

50

【請求項 9】

F cドメインを含む、請求項 1 ~ 4 または 7 のいずれか一項に記載の結合メンバー。

【請求項 10】

前記結合メンバーが、ヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3、または I g G 4 アイソタイプからなる群から選択される定常領域を含む、請求項 9 に記載の結合メンバー。

【請求項 11】

前記結合メンバーが、マウス I g G 1、I g G 2 A、I g G 2 B、I g G 3 アイソタイプからなる群から選択される定常領域を含む、請求項 9 に記載の結合メンバー。

【請求項 12】

前記 F cドメインが、細胞傷害性免疫応答を誘発しないように修飾されている、請求項 9 ~ 11 のいずれか一項に記載の結合メンバー。

10

【請求項 13】

化学的または生物学的に修飾されている、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の結合メンバー。

【請求項 14】

P E G 化または H E S 化などグリコシル化されている、かつ / または第 2 の部分で標識されているか、もしくは第 2 の部分に結合されている、請求項 13 に記載の結合メンバー。

【請求項 15】

ヒト P D - L 1 への結合について本明細書に開示される結合メンバーと競合する結合メンバー。

20

【請求項 16】

請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の結合メンバーをコードする配列を含む単離核酸分子。

【請求項 17】

請求項 16 に記載の核酸分子の配列を含むベクター。

【請求項 18】

発現ベクターまたはクローニングベクターである、請求項 17 に記載のベクター。

【請求項 19】

請求項 16 に記載の核酸分子または請求項 17 もしくは 18 に記載のベクターを含む宿主細胞。

30

【請求項 20】

請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の結合メンバー、請求項 16 に記載の核酸分子、請求項 17 もしくは 18 に記載のベクター、または請求項 19 に記載の宿主細胞を含み、好適な担体、希釈剤、または賦形剤をさらに含む、組成物。

【請求項 21】

化粧品、診断薬、または医薬組成物である、請求項 20 に記載の組成物。

【請求項 22】

医薬組成物であり、前記担体が、薬剂的に許容できる担体、希釈剤、または賦形剤である、請求項 21 に記載の組成物。

40

【請求項 23】

非経口、経口、直腸、全身、静脈内、皮下、泌尿生殖器、局所、硝子体内、眼内、耳内、鼻腔内、経皮、皮内、皮膚、舌下、頭蓋内、筋肉内、腹腔内、または口腔投与に適した形態である、請求項 21 または 22 に記載の組成物。

【請求項 24】

請求項 20 ~ 23 のいずれか一項に記載の医薬組成物を、治療を必要とする対象に投与することを含む、P D - L 1 媒介性疾患を治療する方法。

【請求項 25】

前記 P D - L 1 媒介性疾患が癌である、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

50

前記癌が、腎癌、NSCLC（非小細胞肺癌）、尿路上皮癌、メラノーマ、腎細胞癌、ホジキンリンパ腫、頭頸部扁平上皮癌、卵巣癌、胃腸癌、肝細胞癌、神経膠腫、乳癌、リンパ腫、小細胞肺癌、骨髄異形成症候群、前立腺癌、膀胱癌、子宮頸癌、非淡明細胞腎癌、結腸直腸癌、肉腫、結腸癌、腎臓癌、肺癌、膵臓癌または胃癌、皮膚癌、子宮癌、神経膠芽細胞腫、白血病、癌腫、メルケル細胞癌または腎細胞癌（RCC）、血液癌、多発性骨髄腫、リンパ芽球性白血病（ALL）、B細胞白血病、慢性リンパ球性白血病、非ホジキンリンパ腫、および卵巣癌のうちの少なくとも1つであるか、または前記疾患が、全身性エリテマトーデス、敗血症、脳卒中、病原体感染、もしくは自己免疫障害である、請求項24または25に記載の方法。

【請求項27】

PD-L1媒介性疾患の治療、予防、または進行の遅延における使用のための、請求項1～15のいずれか一項に記載の結合メンバー、請求項16に記載の核酸分子、請求項17もしくは18に記載のベクター、または請求項19に記載の宿主細胞。

【請求項28】

前記PD-L1媒介性疾患が、癌、例えば、NSCLC（非小細胞肺癌）、尿路上皮癌、メラノーマ、腎細胞癌、ホジキンリンパ腫、頭頸部扁平上皮癌、卵巣癌、胃腸癌、肝細胞癌、神経膠腫、乳癌、リンパ腫、小細胞肺癌、骨髄異形成症候群、前立腺癌、膀胱癌、子宮頸癌、非淡明細胞腎癌、結腸直腸癌、肉腫、結腸癌、腎臓癌、肺癌、膵臓癌または胃癌、皮膚癌、子宮癌、神経膠芽細胞腫、白血病、癌腫、メルケル細胞癌または腎細胞癌（RCC）、血液癌、多発性骨髄腫、リンパ芽球性白血病（ALL）、B細胞白血病、慢性リンパ球性白血病、非ホジキンリンパ腫、および卵巣癌のうちの少なくとも1つであるか、または前記疾患が全身性エリテマトーデスであるか、または前記疾患が、全身性エリテマトーデス、敗血症、脳卒中、病原体感染、もしくは自己免疫障害である、請求項27に記載の使用のための結合メンバー、核酸分子、ベクター、または宿主細胞。

【請求項29】

前記結合メンバーを、抗体療法、化学療法、サイトカイン療法、樹状細胞療法、遺伝子療法、ホルモン療法、レーザー光療法、放射線療法、またはワクチン療法の群から選択される1つ以上の療法との併用で投与する、請求項27もしくは28のいずれか一項に記載の結合メンバー、核酸分子ベクター、もしくは宿主細胞、または請求項24～26のいずれか一項に記載の方法。

【請求項30】

- (i) 薬剤として、特にPD-L1媒介性疾患の治療において使用するための、
- (ii) 診断に使用するための、
- (iii) 化粧品に使用するための；かつ/または
- (iv) 検出目的のための、

請求項1～15のいずれか一項に記載の結合メンバー、請求項16に記載の核酸分子、請求項17もしくは18に記載のベクター、または請求項19に記載の宿主細胞。

【請求項31】

腫瘍または腫瘍細胞の増殖を阻害する方法であって、前記腫瘍または腫瘍細胞を治療有効量の請求項1～15のいずれか一項に記載の結合メンバーと接触させるステップを含む、前記方法。

【請求項32】

- (i) 請求項19に記載の宿主細胞を培養し、それにより前記結合メンバーを発現させることと、
 - (ii) 前記結合メンバーを回収することと、
 - (iii) 必要に応じて前記結合メンバーを精製することと、
- を含む、請求項1～15のいずれか一項に記載の結合メンバーの製造方法。

【請求項33】

- (a) 無細胞発現系を核酸産物鑄型と接触させることであって、前記核酸産物鑄型が請求項1～15のいずれか一項に記載の結合メンバーをコードすることと、

10

20

30

40

50

(b) 前記核酸産物鋳型の転写および翻訳を起こさせ、それにより反応混合物を形成させることと、

(c) 前記結合メンバーを前記反応混合物から回収することと、

(d) 必要に応じて前記結合メンバーを精製することと、

を含む、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の結合メンバーの製造方法。

【請求項 34】

前記結合メンバーを製造することが、化学合成のステップを含む、請求項 32 または 33 のいずれか一項に記載の結合メンバーの製造方法。

【請求項 35】

生体試料中の PD-L1 の存在を検出する方法であって、

(a) 前記生体試料を、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の結合メンバーと、PD-L1 への前記結合メンバーの特異的結合を許容する条件下で接触させることと、

(b) 前記結合メンバーと PD-L1 との間の複合体が形成されるか否かを検出することと、

を含む前記方法。

【請求項 36】

インビトロ法またはインビボ法である、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

前記生体試料がヒト由来である、請求項 35 または 36 に記載の方法。

【請求項 38】

前記生体試料が、血液試料、尿試料、脳脊髄液試料、生検試料、および/またはリンパ液試料のうちの少なくとも 1 つである、請求項 35 ~ 37 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 39】

前記方法が、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の結合メンバーを用いて療法に適切な対象を選択する方法である、請求項 35 ~ 38 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 40】

PD-L1 と PD-1 サブユニットのレセプター複合体との間の相互作用を阻害する方法であって、

(a) PD-L1 および前記レセプター複合体を与えるステップと、

(b) PD-L1 を、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の結合メンバーと接触させるステップと、

を含む前記方法。

【請求項 41】

PD-L1 生物活性を阻害する方法であって、

(a) PD-L1 を与えるステップと、

(b) PD-L1 を、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の結合メンバーと接触させるステップと、

を含む前記方法。

【請求項 42】

請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の結合メンバーを、試薬と説明書とのパッケージされた組み合わせと共に含むキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

ヒト化抗体フラグメントなどの PD-L1 に対する結合メンバー、詳細には、治療および診断用途に適用可能な、一価の、非常に強力で安定な抗 PD-L1 scFv が与えられる。当該結合メンバーをコードする核酸分子、それぞれの核酸分子の配列を含むベクター、ベクターまたはそれぞれの核酸分子の塩基配列を含む宿主細胞、結合メンバーまたは核酸分子を含む医薬組成物および診断用組成物、ならびにそれらの使用も与えられる。

【背景技術】

10

20

30

40

50

【 0 0 0 2 】

プログラム細胞死タンパク質 1 (PD-1) は、活性化 T 細胞、B 細胞、および骨髄細胞上に発現される細胞表面レセプターである。PD-1 は、2 つのリガンド、PD-L1 (Dong H, et al. Nat Med. 1999;5:1365-1369) および PD-L2 (Latchman Y. et al Nat Immunol. 2001;2:261-8) に結合する。

【 0 0 0 3 】

リガンド PD-L1 または PD-L2 のいずれかが PD-1 に結合すると、IL-2 産生および T 細胞増殖の TCR 媒介性の活性化を阻害する阻害性シグナル伝達カスケードが T 細胞内で誘発される。PD-L1 (プログラム死-リガンド 1) は、ほとんどのヒト癌細胞および抗原提示細胞 (APC) の表面上の IFN γ によって構成的に発現または誘導される 1 型膜貫通タンパク質である。

10

【 0 0 0 4 】

PD-1 に加えて、PD-L1 は、CD28 および CTLA-4 に結合することができる膜レセプターである CD80 (Butte M.J. et al (2007) 27:111-122) に結合する。しかしながら、PD-L1 は、CD80 よりも PD-1 と強く相互作用する。PD-1 と同様に、CD80 は、T 細胞および B 細胞上に発現される膜レセプターである。PD-1 または CD80 のいずれかへの PD-L1 結合は、T リンパ球への阻害シグナルを伝達し、T 細胞遊走、増殖、および細胞傷害性メディエーターの分泌を抑制し、腫瘍細胞の殺滅を減少させる。しかし、PD-1 / PD-L1 相互作用は T 細胞疲弊を誘発するが、PD-L1 / CD80 相互作用は T 細胞アネルギーを誘発する。疲弊は、数週間または数ヶ月の期間にわたって進行性であり、慢性的な抗原刺激に依存し、一方、アネルギーは、適当な共刺激の非存在下で抗原刺激後に迅速に誘発されるので、これらは別個のプロセスである。

20

【 0 0 0 5 】

結果として、PD-L1 発現は、腫瘍細胞を T 細胞媒介性破壊から保護する (Haile S.T. et al (2011), J Immunol.;186(12):6822-9; Haile S.T. et al (2013), J Immunol.; 191(5): 2829-2836)。PD-L1 レベルのアップレギュレートは、腫瘍の攻撃性の増加および死亡リスクの増加と相関する。動物研究は、モノクローナル抗体による PD-L1 : PD-1 相互作用の遮断が、T 細胞活性化を改善し、腫瘍の進行を低減することを実証した。さらに、T 細胞発現 CD80 による PD-L1 シグナル伝達の抗体遮断は、T 細胞アネルギーを妨げる。

30

【 0 0 0 6 】

PD-1 または PD-L1 のいずれかを遮断するモノクローナル抗体は、疾患の進行期および転移期であっても広範な癌サブタイプにわたって優れた活性を示している (Maute et al (2015), PNAS, 112(47): E6506-E6514)。これまでの研究では、免疫病理のリスクを最小限に抑えながら免疫を増強する観点から、PD-1 または CD80 単独との PD-L1 相互作用の遮断がより有益であると示唆されたが (Butte MJ (2008), Mol Immunol;45(13):3567-72)、PD-1 と CD80 の両方との PD-L1 相互作用を遮断するモノクローナル抗体による最近の臨床試験は、いくつかの癌において顕著な臨床的成功を示し、従来の化学療法よりも毒性が低い。患者のサブセットのみがチェックポイント遮断に应答するが、免疫記憶によるこのような应答の持続時間は注目に値し、難治性疾患で他の薬剤で予想されるよりも長い (Janakiram M et al (2016), Immunotherapy; 8(7):809-19)。

40

【 0 0 0 7 】

アテゾリズマブ (例えば、米国第 8, 217, 149 号に記載されている MPDL3280A) は、PD-1 および CD80 へのレセプター結合が遮断されるように PD-L1 を標的とするヒト化 IgG1 抗体である。抗体は、Fc-エフェクター機能が低下し、それと共に PD-L1 を発現する細胞の枯渇が減少するように改変された。2016 年 10 月、FDA は、白金含有化学療法中または当該療法後の疾患進行がある転移性非小細胞肺癌 (NSCLC) 患者の治療用にアテゾリズマブを承認した。腫瘍が EGFR または ALK ゲノム異常を有する場合、患者は、抗体を受ける前に、これらの異常について FDA 認

50

可の療法で疾患の進行があるべきである。基礎となる臨床試験では、PD-L1の状態にかかわらず患者を登録し、扁平上皮疾患および非扁平上皮疾患の両方のタイプを含めた。2016年5月、FDAは、白金含有化学療法中または当該療法後の疾患進行がある局所進行性または転移性の尿路上皮癌を有する患者の治療用にアテゾリズマブを承認した。

【0008】

デュルバルマブ(MEDI4736;例えば、米国第8,779,108号、国際公開第2010077634号参照)は、PD-L1に結合するとPD-1およびCD80の両方の相互作用を遮断するヒトIgG1モノクローナル抗PD-L1抗体である。IgG2およびIgG4 XenoMouse動物を免疫し、定常ドメインをヒトIgG1トリプル変異体ドメインと交換することによって当該抗体を作製した。この定常ドメインは、C1qおよびFcガンマレセプターへの結合を低下させる3つの点変異を含み、当該変異は、抗体依存性細胞傷害性および補体依存性細胞傷害性を低下させる。当該抗体は、局所進行性または転移性NSCLC、尿路上皮癌、頭頸部癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、食道癌、卵巣癌、乳癌、SCLCおよび胃癌、ならびに頭頸部の再発性または転移性PD-L1陽性扁平上皮癌(SCCHN)を含む多くの適応症の単独療法として臨床試験中である。併用療法の臨床試験は進行中である。

10

【0009】

PD-1を標的とし、PD-L1とのPD-1およびCD80の相互作用の両方を遮断する他の抗体は、アベルマブ(MSB0010718C、国際公開第2013079174号に記載)である。完全ヒトIgG1モノクローナル抗体は、天然のFc領域を保持し、したがって、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)を誘導し得る。当該抗体は、固形腫瘍、胃癌、メルケル細胞癌、およびNSCLCについて臨床試験中である。

20

【0010】

免疫チェックポイントインヒビターを標的とする改良された化合物の必要性、ならびに免疫系関連障害、例えば、癌、免疫不全、自己免疫疾患、アレルギー、炎症性障害、移植拒絶、および他の障害を治療するための安全かつ有効な治療方法を提供する必要性が依然として存在する。

【発明の概要】

【0011】

本発明はPD-L1に結合する結合メンバーを与え、本発明は、当該メンバーを、コードする核酸およびベクター、発現する宿主細胞、含む組成物、ならびに療法におけるそれらの使用を含む。

30

【0012】

当該結合メンバーは、以下の特性のうちの1つ以上を有する。

(a) 免疫グロブリンとして、ならびにscFvなどの一価抗体フラグメントフォーマットでの両方で、PD-L1に対して高い親和性を有する。

(b) 一価型の場合は実施例4に示した条件下で、または二価型の場合は実施例9に示した条件下で、結合平衡除外法(Kinetic Exclusion Assay)によって測定して10pM未満の結合解離平衡定数(KD)でヒトPD-L1に結合する。

(c) ヒトPD-1およびヒトCD80の両方とのヒトPD-L1相互作用を妨げるPD-L1上のエピトープに結合する。

40

(d) サルPD-L1と交差反応する。

(e) サルPD-L1と結合し、サルPD-L1に対する結合親和性がヒトPD-L1に対してと少なくとも同等、より好ましくは少なくとも2倍強い。

(f) ヒトPD-L2またはヒトB7-H3に結合しない。

(g) HCC827ヒト肺癌モデルにおいて腫瘍増殖を阻害する。

(h) scFvフォーマットで、pH7.2のPBS中10mg/mlの濃度で37で1または2週間の保存後に3%未満の二量体を形成する。

【0013】

当該結合メンバーは、好ましくは、(i)それぞれ配列番号6、7、および8に示され

50

る可変重鎖 C D R - H 1、C D R - H 2、および C D R - H 3 配列のうちの少なくとも 1 つ、ならびに / もしくは (i i) それぞれ配列番号 3、4、および 5 に示される可変軽鎖 C D R - L 1、C D R - L 2、および C D R - L 3 配列のうちの少なくとも 1 つ、またはそれらの変異体を含む。

【 0 0 1 4 】

当該結合メンバーは、癌および炎症性疾患の治療ならびに診断に使用され得る。関連する核酸、ベクター、細胞、組成物、方法、およびキットも与えられる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 5 】

【 図 1 】 s c F v 1 が細胞ベースの系において組み換えヒト (r h) P D - L 1 および r h P D - 1 媒介性免疫チェックポイント阻害シグナルを遮断することを示す。

10

【 図 2 】 s c F v 1 が E L I S A で r h P D - L 1 と r h P D - 1 との間の相互作用を遮断することを示す。バックグラウンドレベルは s c F v および P D - 1 の非存在下で測定した。

【 図 3 】 s c F v 1 が E L I S A で r h P D - L 1 と r h C D 8 0 との間の相互作用を遮断することを示す。バックグラウンドレベルは P D - L 1 の非存在下で測定した。

【 図 4 】 E L I S A によって測定した r h P D - L 1 に結合する s c F v 1 の能力は、ヒト血清中で 3 7 で保存した後も影響を受けないことを示す。

【 図 5 】 結合平衡除外法 (Kinetic Exclusion Assay) で s c F v 1 が r h P D - L 1 に結合することを示す。

20

【 図 6 】 結合 E L I S A によって、 s c F v 1 が組み換えヒトおよびサル P D - L 1 に結合するが、ラット P D - L 1 に結合しないことを示す。バックグラウンドレベルは、 s c F v の非存在下で示され、タンパク質の機能性は、実施例 5 で定義される陽性対照抗体の使用によって確認される。

【 図 7 】 結合平衡除外法 (Kinetic Exclusion Assay) で s c F v 1 が組み換えサル P D - L 1 に結合することを示す。

【 図 8 】 結合平衡除外法 (Kinetic Exclusion Assay) で s c F v 1 が細胞の表面上のヒト天然型の P D - L 1 に結合することを示す。

【 図 9 】 大腸菌封入体から産生された s c F v 1 または C H O 細胞から分泌された s c F v 1 が、細胞ベースの系において P D - L 1 と P D - 1 との間の相互作用の類似の阻害を示すことを示す。

30

【 図 1 0 】 ヒト末梢血単核細胞 (P B M C) と共に投与されたヌードマウスにおける H C C 8 2 7 ヒト肺癌モデルにおいて s c F v 1 が腫瘍の縮小を促進することを示す。 A : 実施例 8 で定義される対照 (非結合 s c F v 2) に対する治療 (s c F v 1 または陽性対照 I g G) の比。 B : 実施例 8 で定義される腫瘍増殖阻害 (非結合 s c F v 2 と比較した s c F v 1 または陽性対照 I g G) 。

【 図 1 1 】 I g G _ 1 および I g G _ 2 は、 r h P D - L 1 と r h P D - 1 との間の相互作用の阻害において I g G _ 3 および I g G _ 4 より有効であることを示す。バックグラウンドレベルは I g G および P D - 1 の非存在下で測定した。

【 図 1 2 】 I g G _ 1 (A) は、 I g G と P D - L 1 との間の相互作用において I g G _ 2 (B) よりも親和性が強いことを示す。

40

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 1 6 】

詳細な説明

本明細書に開示される結合メンバー、核酸、ベクター、宿主細胞、組成物、方法、および使用に関する説明がより容易に理解されるように、特定の用語を最初に定義する。

【 0 0 1 7 】

定義

別段の定義がない限り、説明、図、および特許請求の範囲で使用される全ての他の科学用語および技術用語は、当業者によって一般的に理解されるような通常の意味を有する。

50

本明細書で開示される結合メンバー、核酸、ベクター、宿主細胞、組成物、方法、および使用の実施または試験において、本明細書に記載された方法および材料と類似または均等の方法および材料を使用することができるが、好適な方法および材料を以下に記載する。本明細書で言及される全ての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、その全体で参照により援用される。矛盾する場合、定義を含む本明細書が優先する。材料、方法、および実施例は、例示的なものに過ぎず、限定するものではない。

【0018】

本明細書で使用される用語「投与」は、物質、例えば、化合物、例えば医薬品、または他の薬剤、例えば抗原を対象に移入、送達、導入、または輸送する任意の様式を指す。投与様式には、限定はされないが、非経口投与、経口、直腸内、全身、静脈内、皮下、泌尿生殖器、局所、硝子体内、眼内、耳内、鼻腔内、経皮、皮内、皮膚、腹腔内、筋肉内、舌下、または口腔投与が含まれる。1つ以上の治療薬などの他の物質との「併用」での投与には、同時(simultaneous)(同時(concurrent))および任意の順序での連続投与が含まれる。

10

【0019】

本明細書で使用される場合、用語「保存的修飾」および「保存的置換」は、対応する基準に関して物理的、生物学的、化学的、および/または機能的に特性を維持する修飾および置換をそれぞれ指す。例えば、保存的置換を有する配列を含む分子は、類似のサイズ、形状、電荷、化学的特性、例えば共有結合もしくは水素結合を形成する同等の能力、および/または同等の極性を有し得る。このような保存的修飾には、1つ以上の核酸塩基およびアミノ酸の置換、付加、および欠失が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0020】

例えば、保存的アミノ酸置換には、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換されるものが含まれる。例えば、抗原への結合に関して必須ではないアミノ酸残基を、同じ側鎖ファミリー由来の別のアミノ酸残基で置換することができ、例えば、スレオニンをセリンで置換し得る。アミノ酸残基は、通常、以下のように、共通、類似の側鎖特性に基づいてファミリーに分けられる。

1. 非極性側鎖(例えば、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン)
2. 非荷電極性側鎖(例えば、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、プロリン、システイン、トリプトファン)
3. 塩基性側鎖(例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン、プロリン)
4. 酸性側鎖(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)
5. ベータ-分枝側鎖(例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン)、および
6. 芳香族側鎖(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)

30

【0021】

保存的置換は、上記の6つのグループのうち1つに含まれる第1のアミノ酸を、6つのグループのうち同じグループ内の他のアミノ酸により置換することとみなすことができる。好ましい保存的置換には、以下が含まれる。

40

1. アラニン(A)をバリン(V)により置換すること
2. アルギニン(R)をリシン(K)により置換すること
3. アスパラギン(N)をグルタミン(Q)により置換すること
4. アスパラギン酸(D)をグルタミン酸(E)により置換すること
5. システイン(C)をセリン(S)により置換すること
6. グルタミン酸(E)をアスパラギン酸(D)により置換すること
7. グリシン(G)をアラニン(A)により置換すること
8. ヒスチジン(H)をアルギニン(R)またはリシン(K)により置換すること
9. イソロイシン(I)をロイシン(L)により置換すること
10. メチオニン(M)をロイシン(L)により置換すること

50

- 1 1 . フェニルアラニン (F) をチロシン (Y) により置換すること
- 1 2 . セリン (S) をスレオニン (T) により置換すること
- 1 3 . トリプトファン (W) をチロシン (Y) により置換すること
- 1 4 . フェニルアラニン (F) をトリプトファン (W) により置換すること

および/または

- 1 5 . バリン (V) をロイシン (L) により置換すること

ならびにそれらの逆。プロリン (P) をアラニン (A) により置換するなどの他の置換も許容され、経験的に、または他の公知の保存的置換もしくは非保存的置換を踏まえて決定することができる。保存的置換はまた、非天然アミノ酸の使用を伴い得る。

【 0 0 2 2 】

非保存的置換、すなわち、あるファミリーの構成要素を別のファミリーの構成要素と交換することは、特に標的分子への結合に不可欠なアミノ酸が影響を受ける場合には、例えば、結合メンバーの電荷、双極子モーメント、サイズ、親水性、疎水性、またはコンフォメーションに関して、実質的な変化につながり得、結合活性を変化させる可能性がある。非保存的置換はまた、非天然アミノ酸の使用を伴い得る。

【 0 0 2 3 】

保存的および非保存的修飾は、当技術分野で公知の様々な標準的技術によって、例えば、コンビナトリアルケミストリー、部位特異的 DNA 突然変異誘発、PCR 媒介および/またはカセット突然変異誘発、ペプチド/タンパク質化学合成、適当な改変の導入、結合メンバーをコードする新しい塩基配列の構築、および/または親結合メンバー中の反応性基を特異的に修飾する化学反応によって、親結合メンバーに導入することができる。変異体は、それらの化学的、生物学的、生物物理学的、および/または生化学的特性について、常法により試験することができる。好ましくは、保存的アミノ酸置換は、親配列の機能的特徴を実質的に変化させず、通常は構造的特徴も実質的に変化させない。したがって、保存的置換を含む結合メンバーの結合特性は、少なくとも本質的に変わらない。さらに、保存的アミノ酸置換は、通常、親配列の二次構造を実質的に修飾または破壊しない。

【 0 0 2 4 】

用語「標識」は、本明細書では、物理的または化学的手段による直接的または間接的なその検出または測定が、試料中の選択された標的の生物学的実在を示す物質を指すために使用される。有用な検出可能な標識の代表的な例には、光吸収、蛍光、反射率、光散乱、リン光、もしくは発光特性に基づいて直接的もしくは間接的に検出可能な分子もしくはイオン、放射性特性によって検出可能な分子もしくはイオン、または核磁気共鳴もしくは常磁性によって検出可能な分子もしくはイオンが含まれるが、これらに限定されない。標識は、いくつかの実施形態において、吸光または蛍光に基づいて間接的に検出することができる分子、例えば適当な基質を、例えば非光吸収性分子から光吸収性分子に、または非蛍光性分子から蛍光分子に変換させる様々な酵素であり得る。

【 0 0 2 5 】

本明細書に開示される結合メンバーを含む化合物などの物品の「有効量」または「治療有効量」は、単回用量としてまたは一連の用量の一部として、適用される投薬計画で所望の治療効果をもたらす、すなわち特定の治療目標に達する量である。治療有効量は、通常、関連する病的状態の治療もしくは管理において治療上の利益を与えるのに、または当該状態の存在に関連する1つ以上の症状を遅延もしくは最小限にするのに十分な量である。投与量は、患者および臨床学的因子（例えば、患者の年齢、体重、性別、病歴、障害の重症度、および/または治療に対する応答）、治療される障害の性質、投与される具体的な組成物、投与経路、ならびに他の因子を含む様々な因子に依存する。

【 0 0 2 6 】

用語「から本質的になる」は、試料または組成物の特性に影響を与えない試料または組成物中の追加の成分の存在を可能にすると理解される。実例として、医薬組成物は、活性成分から本質的になる場合、賦形剤を含み得る。

【 0 0 2 7 】

10

20

30

40

50

本開示の範囲内で、用語「抗体」は、全長免疫グロブリンおよびそのフラグメントを指す。当該全長免疫グロブリンは、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ベニヤ (veneered) 抗体、および/またはヒト抗体であり得る。キメラ抗体は、例えば、異なる種および/もしくは異なるアイソタイプの定常領域を含み得るか、または人工の二重特異性もしくは多重特異性のコンストラクト、例えば、クアドロマ (quadroma)、k n o b - i n t o - h o l e (K i H)、またはCrossMabまたはDuoBodyであり得る。当該用語はまた、全長免疫グロブリンが抗体フラグメントまたは非抗体骨格に融合されているコンストラクトを包含する。これらの例示的な例として、Dimasi N. et al (2009), JMB 393, 672-692に記載されている B s 1 A b、B s 2 A b、B s 3 A b、B s 4 A b、T s 1 A b、および T s 2 A b が挙げられるが、これらに限定されない。他のキメラ抗体には、D V D - I g、I g G - s c F a b、s c F a b - d s s c F v、F v 2 - F c、s c F v - K I H、F y n o m A B s、または B i T E - K I H が含まれる。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される抗体は、グリコシル化されていることがあり得、他の実施形態において、当該抗体はグリコシル化されていない。

10

20

30

40

50

【0028】

抗体またはタンパク質性結合分子などのポリペプチドに関して「フラグメント」とは、全長免疫グロブリン配列よりも短く、かつ、目的のタンパク質の機能を果たすこと、抗体の場合には、所望の標的、例えば抗原 (例えば、P D - L 1) に特異的に結合することが可能である限り、対応するポリペプチド中に存在する任意のアミノ酸配列を意味する。用語「抗体フラグメント」は、特定の標的、典型的には分子に対する特異的結合親和性を示す抗体の部分の指し、しばしば超可変領域および周囲の重鎖および軽鎖の部分の指す。超可変領域は、ポリペプチド標的に物理的に結合する抗体の一部である。したがって、抗体フラグメントは、抗体の標的特異性を保持する全長抗体の1つ以上の部分を含むか、またはそれらからなる。当該抗体フラグメントは、例えば、全長抗体の定常領域 (F c 領域) を少なくとも部分的に欠くことがある。いくつかの実施形態において、全長抗体の消化によって抗体フラグメントが産生される。抗体フラグメントは、抗体の1つ以上の部分を含む合成または組み換えコンストラクトであってもよい (例えば、Holliger P and Hudson J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. Nature Biotechnol. 2005, vol. 23, 9, p.1126を参照)。抗体フラグメントの例には、s c F v、F a b、F a b'、F (a b')₂ フラグメント、s c F a b、d A b、V H H、ナノボディ、V (N A R) またはいわゆる最小認識ユニット、ダイアボディ、単鎖ダイアボディ (s c D b)、タンデム s c D b (T a n d a b)、線状二量体 s c D b (L D - s c D b)、環状二量体 s c D b (C D - s c D b)、B i T E (二重特異性T細胞エンゲージャー、タンデム s c F v、またはタンデムジ - s c F v と呼ばれる)、D A R T、タンデムトリ s c F v、トリ (ア) ボディ、二重特異性 F a b 2、ジミニ抗体、テトラボディ、ジグダイアボディ、または s c F a b - d s s c F v が含まれるが、これらに限定されない。

【0029】

「単鎖可変断片」または「単鎖抗体」または「s c F v」は、抗体フラグメントの種類例である。s c F v は、リンカーによって連結された抗体のV H およびV L ドメインを含む融合タンパク質である。したがって、s c F v は、全長抗体に存在する定常F c 領域が欠けている。

【0030】

本明細書で使用される「結合メンバー」は、本明細書に開示される1つ以上のC D R と、必要に応じて可変軽鎖および/または重鎖とを含むタンパク質性結合分子を指す。このように、用語「結合メンバー」は、抗体 (すなわち、上記の全長免疫グロブリンおよび抗体フラグメント)、タンパク質性非抗体骨格、ならびに/または他の結合化合物を含む。いくつかの実施形態において、非抗体骨格は、本明細書に開示される1つ以上のC D R 配列を含む。当該結合メンバーは、一価または多価であること、すなわち1つ以上の抗原結合部位を有することができる。一価結合メンバーの非限定的な例には、s c F v、F a b、s c F a b、d A b、V H H、V (N A R) (またはいわゆる最小認識ユニット)、D

ARPin、アフィリン、およびナノボディが含まれる。多価結合メンバーは、2、3、4、またはそれ以上の抗原結合部位を有することができる。全長免疫グロブリン、F(ab')₂フラグメント、bis-scFv（またはタンデムscFvまたはBiTE）、DART、ダイアボディ、scDb、DVD-Ig、IgG-scFab、scFab-Fc-scFab、IgG-scFv、scFv-Fc、scFv-fc-scFv、Fv2-Fc、FynomAbs、クアドローマ（quadroma）、CrossMab、DuoBody、トリアボディ、およびテトラボディは、多価結合メンバーの非限定的な例であり、例示的な多価結合メンバーにおいて、2つの結合部位が存在する、すなわち、結合メンバーは二価である。

【0031】

いくつかの実施形態において、多価結合メンバーは、二重特異性であり、すなわち、結合メンバーは2つの異なる標的または1つの標的分子上の2つの異なる標的部位に対するものである。二重特異性抗体は、例えば、Muller D. and Kontermann R.E. Bispecific antibodies. Edited by Dubel S. Weinheim: Wiley-VCH, 2007. ISBN 3527314539. p. 345において概説されている。いくつかの実施形態において、多価結合メンバーは、3つ以上の異なる結合部位、例えば3つまたは4つの異なる抗原それぞれに対しての3つまたは4つの異なる結合部位を含む。このような結合メンバーは、それぞれ多価かつ多特異性、具体的には三重特異性または四重特異性である。

【0032】

「非抗体骨格」は、Fielder M. and Skerra A. Non-antibody scaffolds. Edited by Dubel S. Weinheim: Wiley-VCH, 2007. ISBN 3527314539. p. 467またはGilbreth R.N. and Koide S. Structural insights for engineering binding proteins based on non-antibody scaffolds. Curr. Opin. Struct. Biol. 2012, vol. 22, p. 413などに記載されている抗原結合ポリペプチドである。非限定的な例には、アフィボディ、アフィリン分子、Adnectin、リポカリンファミリーのポリペプチドをベースとする突然変異タンパク質（Anticalins（登録商標））、DARPin、Knottin、Kunitz型ドメイン、Avimer、fynomer、テトラネクチン、およびトランスボディが含まれる。Avimerは、いくつかの細胞表面レセプターにおいて複数のドメインのストリングとして生じるいわゆるAドメインを含む（Silverman J., et al., Nature Biotechnol. 2005, vol. 23, p. 1556）。それぞれのヒトホモ三量体タンパク質に由来するテトラネクチンは同様に、所望の結合のために改変することができるC型レクチンドメインにループ領域を含む（同書）。

【0033】

本明細書に開示される結合メンバーは、必要に応じて、PEG化または高度にグリコシル化されていてもよく、以下も参照されたい。いくつかの実施形態において、結合メンバーは、上記の例示的なタンパク質性結合分子のうちの一つと、アルブミン結合ドメイン、例えば、連鎖球菌プロテインGのアルブミン結合ドメインとの融合タンパク質である。いくつかの実施形態において、結合メンバーは、抗体フラグメント、例えば単鎖ダイアボディと、抗体結合ドメイン、例えば細菌抗体結合ドメインとの融合タンパク質である。実例として、単鎖ダイアボディは、Unverdorben (Protein Eng., Design & Selection, 2012, vol. 25, p. 81)らによって記載されているブドウ球菌プロテインAのドメインBに融合されていてもよい。

【0034】

「IC₅₀」または「最大半阻害濃度」は、アンタゴニスト効力の尺度であり、生物学的または生化学的機能を阻害する化合物の有効性を定量的に記載する。したがって、この値は、特定の生物学的または生化学的プロセスまたは機能を50%阻害するために、結合メンバーなどの特定の物品がどれくらい必要であることを示す。親和性の直接的な指標はないが、IC₅₀およびK_i値は相関しており、Cheng-Prusoff方程式により求めることができる（Cheng Y. and Prusoff W.H. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhib

10

20

30

40

50

ition (IC₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* 1973, vol. 22, p.3099; Rammes G., et al., *PLOS ONE* 2009, vol. 4, p. 1-14; Zhen J., et al., Concentration of receptor and ligand revisited in a modified receptor binding protocol for high-affinity radioligands: [³H] spiperone binding to D₂ and D₃ dopamine receptors. *J. Neurosci. Meth.* 2010, vol. 188, p.32)。

【0035】

用語「フレームワーク」(FR)は、可変抗体ドメインの骨格である、それぞれのCDRを含む可変軽鎖(VL)または可変重鎖(VH)を指す。VLおよび/またはVHフレームワークは、CDR領域に隣接する4つのフレームワークセクション、FR1、FR2、FR3、およびFR4を通常含む。したがって、当技術分野で知られているように、VLは一般構造：(FR-L1)-(CDR-L1)-(FR-L2)-(CDR-L2)-(FR-L3)-(CDR-L3)-(FR-L4)を有し、一方、VHは一般構造：(FR-H1)-(CDR-H1)-(FR-H2)-(CDR-H2)-(FR-H3)-(CDR-H3)-(FR-H4)を有する。

10

【0036】

用語「CDR」は、抗原結合に主に寄与する抗体の超可変領域を指す。通常、抗原結合部位は、フレームワーク骨格に埋め込まれた6つのCDRを含む。本明細書において、VLのCDRをCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3と呼び、VHのCDRをCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3と呼ぶ。これらは、Kabat, E.A., et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 5th edition. Edited by U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. NIH Publications, 1991. p. 91-3242に記載されているように同定することができる。しかしながら、本明細書で使用されるCDR-H1は、位置27で開始し、位置36より前で終わる点でKabatの定義とは異なる(AH位置28~42を含む)。

20

【0037】

本明細書で使用される場合、抗体のVHおよびVLにおけるアミノ酸残基位置を同定するためのナンバリングシステムは、Honegger A.およびPluckthun A.によって記載された「AHo」システムに対応する。免疫グロブリン可変ドメインのさらに別のナンバリングスキームはAn automatic modelling and analysis tool. *J. Mol. Biol.* 2001, vol. 309, p.657である。この刊行物はさらに、AHoシステムとKabatシステムとの間の変換テーブルを与える(Kabat E.A. et al, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 5th edition. Edited by U.S. Department of Health and Human Services. NIH Publications, 1991.No. 91-3242)。

30

【0038】

「ヒト化」抗体は、非ヒト親抗体の1つ以上、典型的には6つ全てのCDR領域もしくはそれらの変異体、または合成CDRを含み、そのフレームワークが、例えば(i)非ヒト親抗体の1つ以上のフレームワーク残基を含む可能性があるヒトフレームワーク、または(ii)天然に産生されるヒトフレームワークとの類似性を増加させるように改変された非ヒト抗体由来のフレームワークである抗体を指す。抗体をヒト化する方法は、当技術分野、例えば、Leger O., and Saldanha J. *Antibody Drug Discovery*. Edited by Wood C. London: Imperial College Press, 2011. ISBN 1848166281. p.1-23で公知である。

40

【0039】

用語「単離」は、ペプチド、核酸分子、もしくは細胞などの物質が、その正常な生理環境、例えば天然源から取り出されたこと、またはペプチドもしくは核酸が合成されることを示す。用語「単離」の使用は、天然に存在する配列がその正常細胞(例えば、染色体)環境から取り出されたことを示す。したがって、配列は、無細胞溶液中に存在してもよく、または異なる細胞環境に置かれてもよい。ポリペプチドまたは核酸分子に関して「単離」とは、天然源から単離されるか、または合成されるポリペプチドまたは核酸分子を含む、互いに結合した2つ以上のアミノ酸またはヌクレオチドのポリマーを意味する。用語「単離」は、配列に、アミノ酸鎖またはヌクレオチド鎖だけが存在することを意味するので

50

はなく、配列が、それぞれ配列と自然に関連する非アミノ酸物質および/または非核酸物質などを実質的に含まないことを意味する。「単離細胞」は、細胞に自然に付随する分子および/または細胞成分から分離される細胞を指す。

【0040】

本明細書で使用される用語「同一性」は、2つのタンパク質または核酸間の配列の一致を指す。比較するタンパク質または塩基配列を、例えば、EMBOSS Needle (ペアワイズアラインメント; www.ebi.ac.ukで利用可能)などのバイオインフォマティクスツールを使用するか、またはマニュアルアラインメントおよび目視検査により、比較ウィンドウにわたって一致が最大となるようにアラインメントする。比較する配列中の同じ位置が同じ核酸塩基またはアミノ酸残基によって占められている場合、それぞれの分子はちょうどその位置で同一である。したがって、「同一性パーセント」は、一致位置の数を比較した位置の数で割って100%を掛けた関数である。例えば、10個の配列位置のうち6個が同一である場合、同一性は60%である。一致が最大となるように配列をアラインメントするには、ギャップを導入する必要がある。2つのタンパク質配列間の同一性パーセントは、例えば、EMBOSS Needleに組み込まれているNeedleman-Wunschアルゴリズム (Needleman S.B. and Wunsch C.D. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. J. Mol. Biol. 1970, vol. 48, p.443)を使用して、BLOSUM62マトリックス、「ギャップオープンペナルティ」10、「ギャップ伸長ペナルティ」0.5、偽「エンドギャップペナルティ」、「エンドギャップオープンペナルティ」10、および「エンドギャップ伸長ペナルティ」0.5を用いて、または同一性を最大にする方法でギャップを手動で導入する配列整列方法によって求めることができる。したがって、一実施形態では、配列同一性を最大化する方法で手動でギャップを導入することによって、本明細書に開示される配列をアラインメントする。同一の一次アミノ酸または塩基配列を有する2つの分子は、化学的および/または生物学的修飾にかかわらず同一である。例えば、同じ一次アミノ酸配列を有するが異なるグリコシル化パターンを有する2つの抗体は、この定義では同一である。核酸の場合、例えば、同じ配列を有するがリン酸の代わりにチオリン酸などの異なる結合成分を有する2つの分子は、この定義では同一である。いくつかの変ドメインまたは1つ以上の定常ドメインを含むことなどにより本明細書で与えられるいずれかの配列よりも長い配列は、比較ウィンドウにわたる配列同一性が示されている場合、本明細書に開示される基準配列となおも同一であるものとする。本明細書で使用される比較ウィンドウは、請求項に係る配列全体を含む。同様に、環外修飾のためにのみ異なる核酸塩基、例えばシトシンおよび5-メチル-シトシンは、この定義では同一である。

【0041】

本明細書で使用される用語「核酸分子」は、一本鎖、二本鎖、またはそれらの組み合わせなどの任意の可能な構成の任意の核酸を指す。核酸の例には、例えば、DNA分子、RNA分子、ヌクレオチド類似体を用いて、または核酸化学を用いて得られるDNAまたはRNAの類似体、ロックド核酸分子(LNA)、タンパク質核酸分子(PNA)、アルキルホスホネートおよびアルキルホスホトリエステル核酸分子、およびtecton-RNA分子(例えばLiu B. et al., J. Am. Chem. Soc. 2004, vol. 126, 4076)が含まれる。LNAは、より高い二本鎖安定性およびヌクレアーゼ耐性をそれぞれの分子に与える、C4'とO2'との間のメチレン架橋を有する修飾RNA骨格を有する。アルキルホスホネートおよびアルキルホスホトリエステル核酸分子は、それぞれ、核酸骨格中のリン酸基のP-OH基をアルキルおよびアルコキシ基に交換することによって核酸骨格のリン酸基が中和されているDNAまたはRNA分子と見ることができる。DNAまたはRNAは、ゲノムまたは合成起源のものであってもよく、一本鎖または二本鎖であってもよい。このような核酸は、例えば、mRNA、cRNA、合成RNA、ゲノムDNA、cDNA合成DNA、DNAとRNAの共重合体、オリゴヌクレオチドなどであることができる。それぞれの核酸は、非天然ヌクレオチド類似体をさらに含んでもよく、かつ/または親和性タグもしくは標識に連結されていてもよい。

10

20

30

40

50

【0042】

多くのヌクレオチド類似体が公知であり、本明細書に開示される方法で使用される核酸に使用することができる。ヌクレオチド類似体は、例えば塩基、糖、またはリン酸部分に修飾を含むヌクレオチドである。実例として、siRNAの2'-OH残基を2'-F、2'-O-Me、または2'-H残基で置換することは、それぞれのRNAのインビボ安定性を改善することが分かっている。塩基部分における修飾は、A、C、GおよびT/Uの天然または合成修飾、ウラシル-5-イル、ヒポキサンチン-9-イル、および2-アミノアデニン-9-イルなどの異なるプリンまたはピリミジン塩基、ならびに非プリンまたは非ピリミジンヌクレオチド塩基であり得る。他のヌクレオチド類似体はユニバーサル塩基として役立つ。ユニバーサル塩基の例には、3-ニトロピロールおよび5-ニトロインドールが含まれる。ユニバーサル塩基は、他の塩基と塩基対を形成することができる。塩基修飾を、例えば糖修飾、例えば2'-O-メトキシエチルなどと組み合わせて、二本鎖安定性の増加などの特異的性質を得ることができる。

10

【0043】

本明細書において使用される場合、「薬剤的に許容できる」という表現は、正しい医学的判断の範囲内で、過剰な毒性、刺激、アレルギー反応、または他の問題もしくは合併症なしに、妥当な利益/リスク比に見合っ、ヒトおよび動物の組織と接触させて使用するのに適している活性化化合物、材料、組成物、担体、および/または剤形に関する。

【0044】

医学的/生理学的状況における、すなわち生理学的状態と関連する「予防」という用語は、生物体が異常な状態にかかるか、または発症する可能性を低下させることを指す。

20

【0045】

「類似の」タンパク質配列は、アラインメントした場合に、比較される配列の同じ位置に類似のアミノ酸残基、ほとんどの場合に必須ではないが同一のアミノ酸残基を共有する配列である。類似のアミノ酸残基は、側鎖の化学的特徴によってファミリーに分類される。これらのファミリーは、「保存的アミノ酸置換」に関して上述されている。配列間の「パーセントの類似性」は、比較される配列の同じ配列位置に同一または類似の残基を含む位置の数を、比較した位置の総数で割って、100%を掛けたものである。例えば、10の配列位置のうち6つが同一のアミノ酸残基を有し、10の位置のうち2つが類似の残基を含む場合、配列は80%の類似性を有する。2つの配列間の類似性は、例えば、EMBOSS Needleを使用して求めることができる。いくつかの可変ドメインまたは1つ以上の定常ドメインを含むことなどにより本明細書で与えられるいずれかの配列よりも長い配列は、比較ウィンドウにわたる配列類似性が示されている場合、本明細書に開示される基準配列となおも類似であるものとする。本明細書で使用される比較ウィンドウは、請求項に係る配列全体を含む。

30

【0046】

本明細書において使用される用語「特異的」は、結合メンバーまたは結合化合物が、PD-L1などの所定の標的に、 $< 10^{-6}$ モルの平衡結合定数 K_D で結合することを示すと理解される。この定数は、例えば、Attana装置で水晶発振子微量天秤(QCM)を用いて、Biacore装置で表面プラズモン共鳴(SPR)技術を用いて、または結合平衡除外法(Kinetic Exclusion Assay)(KinExA(登録商標))を用いて測定することができる。

40

【0047】

本明細書で使用される用語「層別化する」および「層別化」は、個体が、本明細書に開示される結合メンバーに应答する対応する確率などのそれぞれのグループに合致する特徴に従って特定のグループに割り当てられることを示す。グループは、例えば、結合メンバーの試験、処方、投与調節、一時停止、または断念に使用され得る。したがって、本発明に係る方法または使用のいくつかの実施形態では、療法の臨床試験のサブグループを対象を層別化し得る。

【0048】

個体とも呼ばれる、本明細書で使用される用語「対象」は、ヒトまたは非ヒト動物、通

50

常哺乳動物を指す。対象は、哺乳類、例えば、ウサギ、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、イヌ、ネコ、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ウマ、サル(monkey)、サル(ape)、またはヒトであり得る。したがって、本明細書に記載の方法、使用、および組成物は、ヒトおよび動物の疾患の両方に適用可能である。以下により詳細に説明するように、試料は対象から得られ得る。したがって、試料中の発現レベルから導き出される結論およびそれに基づく決定は、試料が採取された対象に関するものであることが理解される。さらに、対象は典型的には生体であるが、本明細書に記載の方法または使用は死亡後分析にも使用され得る。対象が疾患または容態のために医療を受けている生きているヒトである場合、対象は「患者」とも呼ばれる。

【0049】

本明細書で使用される用語「治療」および「治療する」は、治療効果を有し、かつ/または対象の生物における病的状態を含む異常な状態を予防、減速(緩和)、もしくは少なくとも部分的に緩和もしくは抑制する、予防的または防止的手段を含む。本開示に係る治療は、薬剤的に有効な量の本明細書中に記載の分子、すなわちとりわけ、本明細書に開示される結合メンバー(例えば抗体)、核酸、ベクター、または細胞を、治療を必要とする対象に投与して、PD-L1関連障害の1つ以上の症状を予防、治癒、発症および/または進行の遅延、重症度の軽減、安定化、調節、治癒、または寛解することを伴う。典型的には、結合メンバー、核酸、ベクター、または宿主細胞は、本明細書に記載のものを含む医薬組成物で与えられる。治療を必要とする者には、すでに障害を有する者および障害を有しやすい者、または障害を防止(予防)すべき者が含まれる。一般に、治療は、疾患または病的状態の存在および/または進行に関連する症状の進行を軽減、安定化、または阻害する。

【0050】

本明細書で使用される場合、「PD-L1」は、「プログラム細胞死リガンド1」、「表面抗原分類274(すなわちCD274)」、または「B7ホモログ1(すなわちB7-H1)」としても知られているタンパク質を指す。天然タンパク質は、2つの細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞質ドメインを含む。当該用語は、全長および/またはプロセシングされていないPD-L1、ならびに細胞内でのプロセシングから生じる中間体を包含する。PD-L1は、膜貫通タンパク質または可溶性タンパク質として存在し得る。したがって、本明細書で使用される当該用語は、当該タンパク質の全長または細胞外ドメインを指し得る。当該用語は、PD-L1の天然に存在する変異体、例えばスプライス変異体または対立遺伝子変異体も包含する。当該タンパク質は、hisタグまたはFcタグなどのタグをさらに含み得る。例示的なヒト全長PD-L1タンパク質のアミノ酸配列は、例えば、NCBIタンパク質データベース受入れ番号NP_054862で見ることができる。用語「hPD-L1」は、ヒトPD-L1を指し、天然hPD-L1および組み換えヒトrhPD-L1を含む。「rPD-L1」は組み換えPD-L1を指す。組み換えPD-L1は、調製される方法に依存して、アミノ末端メチオニン残基を有すること、または有しないことがあり得る。「rhPD-L1」は組み換えヒトPD-L1を指す。同様に、PD-L1は、ヒトまたはヒト以外の起源の生体試料から単離することによっても得ることができる。rhPD-L1は、例えば、米国のRnD Systemsよりカタログ番号156-B7で、または米国のPeprotechによりカタログ番号310-35で入手し得る。「サルPD-L1」はアカゲザルのPD-L1を指す。例示的なサルPD-L1タンパク質のアミノ酸配列は、例えば、NCBIタンパク質データベース受入れ番号NP_001077358で見ることができる。サルPD-L1は、例えば、中国のSino Biologicalよりカタログ番号90251-C02Hで入手し得る。「ラットPD-L1」は、ドブネズミ(ノルウェーラット)のPD-L1を指す。例示的なラットPD-L1タンパク質のアミノ酸配列は、例えば、NCBIタンパク質データベース受入れ番号NP_001178883で見ることができる。ラットPD-L1は、例えば、中国のSino Biologicalよりカタログ番号80450-R02Hで入手し得る。「マウスPD-L1」は、ハツカネズミのPD-L1を指す。例示的なマウスPD-L1タンパク質のアミノ酸配列は、例えば、NCBIタンパク質デ

10

20

30

40

50

ータベース受入れ番号NP__068693で見ることができる。マウスPD-L1は、例えば、中国のSino Biologicalよりカタログ番号50010-M03Hで、または米国のRnD Systemsよりカタログ番号1019-B7-100で入手し得る。

【0051】

「PD-1」はプログラム細胞死タンパク質1であり、PD-L1の細胞表面レセプターであるCD279としても知られている。PD-1は、2つのリガンド、PD-L1およびPD-L2に結合する。PD-1は、細胞外ドメインとそれに続く膜貫通領域および細胞内ドメインを含む膜貫通タンパク質である。当該用語は、全長および/またはプロセシングされていないPD-1、ならびに細胞内でのプロセシングから生じる中間体を包含する。PD-1は、膜貫通タンパク質または可溶性タンパク質として存在し得る。したがって、本明細書で使用される当該用語は、当該タンパク質の全長または細胞外ドメインを指し得る。当該用語は、PD-1の天然に存在する変異体、例えばスプライス変異体または対立遺伝子変異体も包含する。当該タンパク質は、hisタグまたはFcタグなどのタグをさらに含み得る。例示的なヒトPD-1タンパク質のアミノ酸配列は、例えば、NCBIタンパク質データベース受入れ番号NP__005009で見ることができる。用語「hPD-1」は、ヒトPD-1を指し、その天然型(hPD-1)および組み換えヒト型(rhPD-1)を含む。「rPD-1」は組み換えPD-1を指す。

10

【0052】

「CD80」は、B7-1、B7.1、BB1、CD28LG、CD28LG1、LAB7としても知られている表面抗原分類80を指す。CD80は、CD28およびCTLA-4ならびにPD-L1に対する膜レセプターであり、細胞外ドメインとそれに続く膜貫通領域および細胞内ドメインを含む。当該用語は、全長および/またはプロセシングされていないCD80、ならびに細胞内でのプロセシングから生じる中間体を包含する。CD80は、膜貫通タンパク質または可溶性タンパク質として存在し得る。したがって、本明細書で使用される当該用語は、当該タンパク質の全長または細胞外ドメインを指し得る。当該用語は、CD80の天然に存在する変異体、例えばスプライス変異体または対立遺伝子変異体も包含する。当該タンパク質は、hisタグまたはFcタグなどのタグをさらに含み得る。例示的なヒトCD80タンパク質のアミノ酸配列は、例えば、NCBIタンパク質データベース受入れ番号NP__005182で見ることができる。CD80は、例えば、米国のRnD Systemsよりカタログ番号9050-B1-100で入手し得る。用語「hCD80」は、ヒトCD80を指し、その天然型(hCD80)および組み換えヒト型(rhCD80)を含む。「rCD80」は組み換えCD80を指す。

20

30

【0053】

「PD-L2」は、「プログラム細胞死1リガンド2」、「B7-DC」、または「CD273」(表面抗原分類273)としても知られているタンパク質を指す。本明細書で使用される当該用語は、全長および/またはプロセシングされていないPD-L2、ならびに細胞内でのプロセシングから生じる中間体を包含する。PD-L2は、膜貫通タンパク質または可溶性タンパク質として存在し得る。したがって、本明細書で使用される当該用語は、当該タンパク質の全長または細胞外ドメインを指し得る。当該用語は、PD-L2の天然に存在する変異体、例えばスプライス変異体または対立遺伝子変異体も包含する。当該タンパク質は、hisタグまたはFcタグなどのタグをさらに含み得る。例示的なヒト全長PD-L2タンパク質のアミノ酸配列は、例えば、NCBIタンパク質データベース受入れ番号NP__079515で見ることができる。PD-L2は、例えば、米国のRnD Systemsよりカタログ番号1224-PLで入手し得る。用語「rhPD-L2」は組み換えヒトPD-L2を指す。

40

【0054】

「B7-H3」は、CD276(表面抗原分類276)としても知られているタンパク質を指す。本明細書で使用される当該用語は、全長および/またはプロセシングされていないB7-H3、ならびに細胞内でのプロセシングから生じる中間体を包含する。B7-H3は、膜貫通タンパク質または可溶性タンパク質として存在し得る。したがって、本明

50

細書で使用される当該用語は、当該タンパク質の全長または細胞外ドメインを指し得る。当該用語は、B7-H3の天然に存在する変異体、例えばスプライス変異体または対立遺伝子変異体も包含する。当該タンパク質は、hisタグまたはFcタグなどのタグをさらに含み得る。例示的なヒト全長B7-H3タンパク質のアミノ酸配列は、例えば、NCBIタンパク質データベース受入れ番号NP_079516で見ることができる。B7-H3は、例えば、米国のRnD Systemsよりカタログ番号1027-B3で入手し得る。用語「rhB7-H3」は組み換えヒトB7-H3を指す。

【0055】

「変異体」は、本明細書で開示される親配列の少なくとも1つの所望の活性を保持しながら、1つ以上のアミノ酸残基または核酸塩基の付加（挿入を含む）、欠失、修飾、および/または置換により親配列と異なるアミノ酸または塩基配列を指す。抗体の場合、このような所望の活性には特異的抗原結合が含まれ得る。同様に、変異体塩基配列は、1つ以上の核酸塩基の付加、欠失、および/または置換により親配列と比較して改変されていることがあり得るが、コードされる抗体は上記の所望の活性を保持する。変異体は、対立遺伝子またはスプライス変異体などの天然に存在するものであってもよく、または人工的に構築されるものであってもよい。

【0056】

核酸ハイブリダイゼーション反応は、様々なストリンジェントな条件下で行うことができる。「ストリンジェントな条件」は、当技術分野で周知であり、公表されている。典型的には、ハイブリダイゼーション反応の間、SSCが0.15M NaClであり、15mMクエン酸緩衝液がpH7.0を有する、SSCをベースとする緩衝液を使用することができる。緩衝液濃度の増加および変性剤の存在は、ハイブリダイゼーションステップのストリンジェンシーを増加させる。例えば、高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件は、(i) 0.2×SSCおよび0.1%SDS中で42で洗浄しながら、42の50%（体積/体積）のホルムアミド、5×SSC（0.75M NaCl、0.075Mクエン酸ナトリウム）、50mMリン酸ナトリウム（pH6.8）、0.1%ピロリン酸ナトリウム、5×デンハルト溶液、超音波処理したサケ精子DNA（50mcg/ml）、0.1%SDS、および10%デキストラン硫酸；(ii) 42の0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%フィコール/0.1%ポリビニルピロリドン/750mM塩化ナトリウム、75mMクエン酸ナトリウムを含むpH6.5の50mMリン酸ナトリウム緩衝液を含む50%（体積/体積）のホルムアミド、または(iii) 55の10%デキストラン硫酸、2×SSC、および50%ホルムアミド、次いで55のEDTAを含む0.1×SSCからなる高ストリンジェンシー洗浄液、の使用を伴うことができる。追加的または代替的に、0.015M塩化ナトリウム/0.0015Mクエン酸ナトリウム/0.1%ドデシル硫酸ナトリウムを50で例えば使用するハイブリダイゼーションプロトコルに、低イオン強度および高温の洗浄溶液を使用する1回、2回、またはそれ以上の洗浄ステップを含めることができる。

【0057】

用語の使用の範囲および意味は、その用語が使用される具体的な文脈から明らかとなるであろう。本明細書を通して使用されている選択された用語についての特定の他の定義は、適宜、詳細な説明の適当な文脈において与えられる。

【0058】

用語「含む（comprising）」、「含む（including）」、「含む（containing）」、「有する」は、広範囲にまたは無制限に、限定なく読まれるものとする。「a」、「an」、または「the」などの単数形は、文脈上別段の明示がない限り、複数の言及を含む。したがって、例えば、「ベクター」への言及は、単一のベクターと、同一 - 例えば同一のオペロン - または異なる複数のベクターとを含む。同様に、「細胞」への言及は、単一細胞と複数の細胞とを含む。別段の定めがない限り、一連の要素に先行する用語「少なくとも」は、その一連のすべての要素に関するものであると理解されるべきである。用語「少なくとも1つ」および「のうちの少なくとも1つ」は、例えば、1、2、3、4、または

10

20

30

40

50

5、またはそれ以上の要素を含む。記載された範囲を上回る、および下回る僅かな変動を、範囲内の値と実質的に同じ結果を達成するために使用することができることがさらに理解される。また、別段の定めがない限り、範囲の開示は、最小値と最大値の間のあらゆる値を含む連続的な範囲として意図されている。

【0059】

本明細書に具体的かつ明示的に列挙された実施形態は、単独で、または1つ以上の他の実施形態と組み合わせて、除くクレームの基礎を形成し得る。

【0060】

別段の定義がない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、本明細書に記載の発明が属する技術分野の当業者に一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書で言及される全ての刊行物および特許は、本発明に関連して使用され得る刊行物に記載されている構築物および方法論などを記載および開示する目的で、その全体が参照により本明細書に援用される。

10

【0061】

本開示の様々な態様は、以下のサブセクションでさらに詳細に説明される。様々な実施形態、選好、および範囲は自由に組み合わせ得ることが了解される。さらに、特定の実施形態に応じて、選択された定義、実施形態、または範囲が適用されないこともある。

【0062】

結合メンバーキャラクタリゼーション

本明細書で与えられる結合メンバーは、PD-L1に特異的に結合する。結合メンバーの結合特異性は、当技術分野で周知の技術を用いて確認し得る。いくつかの実施形態において、PD-L1はヒトPD-L1である。

20

【0063】

結合メンバーのPD-L1への結合は、PD-L1とPD-1および/またはCD80との、好ましくはPD-1およびCD80の両方との相互作用を遮断する。

【0064】

いくつかの実施形態において、本明細書で与えられる結合メンバーは二価であり、KinExA（登録商標）により測定して10 pM未満、好ましくは5 pM未満、より好ましくは約3 pM、例えば2.9 pM、2.8 pM、または2.7 pMの K_D でhPD-L1に結合する。いくつかの実施形態において、このような二価結合メンバーは全長免疫グロブリンである。一実施形態において、二価の結合メンバーについての前記KinExA（登録商標）測定は、室温で行われる。一実施形態において、結合メンバーは二価であり、実施例9に明記された条件がKinExA（登録商標）測定に使用される。

30

【0065】

いくつかの実施形態において、本明細書で与えられる結合メンバーは一価であり、KinExA（登録商標）により測定して50 pM未満の K_D でhPD-L1に結合する。前記 K_D は、好ましくは、10 pM未満、例えば約9 pM未満、例えば9.0 pM、8.9 pM、8.8 pM、または8.7 pMである。一実施形態において、一価の結合メンバーについての前記KinExA（登録商標）測定は、室温で行われる。一実施形態において、結合メンバーは一価であり、実施例4に明記された条件がKinExA（登録商標）測定に使用される。

40

【0066】

いくつかの実施形態において、前記一価結合メンバーはscFvである。いくつかの実施形態において、前記一価結合メンバーは、約60 kDa以下、例えば約55 kDa、50 kDa、45 kDa、40 kDa、35 kDa、30 kDa、もしくは27 kDa、またはそれ以下の分子量を有する抗体フラグメントである。一実施形態において、結合メンバーの分子量は、約26 kDa、例えば、23、24、25、26、または27 kDaである。特に癌治療では、PD-1:PD-L1シグナル伝達経路を標的とする場合、抗体フラグメントは全長抗体よりも利点を有し得る(Maute et al (2015), PNAS, Nov 24; 112(47): E6506-E6514)。抗体フラグメントは、そのより小さいサイズに起因して、典型的には約150 kDaの分子量を有する全長抗体、または同程度もしくはそれ以上の分子量

50

を有する他の抗体フォーマットの場合よりも、より深く腫瘍に浸透すると考えられる。全長抗体、特にIgGに関連する別の欠点は、それらのFc領域（例えば、ADCC/ADCPまたはCDC）を介した細胞傷害性免疫応答を媒介する能力である。この阻害は、PD-1:PD-L1軸を標的とする場合、両方のタンパク質が抗腫瘍細胞傷害性T細胞の表面上に発現されるので、望ましくない可能性がある。したがって、機能的Fc部分を有する全長モノクローナル抗体を投与すると、活性化しようとするリンパ球そのものが枯渇する可能性がある。抗PD-1抗体による治療は、患者における循環T細胞数の低下と相関することが分かった。したがって、分子量が小さい（例えば、60kDa以下、例えば、約55kDa、50kDa、45kDa、40kDa、35kDa、30kDa、もしくは27kDa、またはそれ以下）抗体フラグメントは、癌の治療における全長抗体治療薬のより有効な代替物を提供し得る。したがって、好ましい実施形態において、結合メンバーは、Fab、Fab'、scFab、scFv、Fvフラグメント、ナノボディ、VHH、dAb、最小認識ユニット、ダイアボディ、単鎖ダイアボディ（scDb）、BiTE、またはDARTからなる群から選択される抗体フラグメントである。前記フォーマットは、60kDa未満の分子量を有し、Fcドメインを含まない。

10

【0067】

結合メンバーのサイズおよび/または構造は、その半減期と関係がある。治療的設定において副作用を減少させるために、短い半減期を有する結合メンバーを使用することが有利であり得る。これは、例えば、Fc部分を欠くか、または改変されたFc部分を有する結合メンバーを用いることによって達成され得る。

20

【0068】

特定の用途では、細胞傷害性免疫応答を誘導すること、および/または補体を活性化することが有利であり得、そのため、Fcドメインの存在が望まれる場合がある。したがって、一実施形態において、結合メンバーは、細胞傷害性免疫応答を媒介することができるFcドメインを含む。Fcドメインを含む結合メンバーの非限定的な例は、全長免疫グロブリン、DVD-Ig、scFv-Fc、およびscFv-Fc、scFv融合体、IgG-scFab、scFab-dsscFv、Fv2-Fc、IgG-scFv融合体（例えば、bsAb、Bs1Ab、Bs2Ab、Bs3Ab、Ts1Ab、Ts2Ab、Knob-into-Holes（KIHs）など）、DuoBody、CrossMabである。

30

【0069】

一実施形態において、結合メンバーは、細胞傷害性免疫応答を誘導しない、かつ/または補体を活性化しないように改変されているFcドメインおよび/またはヒンジを含む。このような不活性化されたFcドメインおよび/またはヒンジは、当技術分野で考えられているように1つ以上の置換を導入することによって作製することができる。当該結合メンバーは、細胞傷害性免疫応答を媒介せず、60kDa未満の分子量を有する抗体フラグメントと比較したときに半減期が長くなるという利点を有する。

【0070】

一実施形態において、結合メンバー誘導体はFcドメインを欠いている。Fcドメインを欠く例示的な結合メンバーは、Fab、Fab'、scFab、scFv、Fvフラグメント、ナノボディ、VHH、最小認識ユニット、ダイアボディ、単鎖ダイアボディ（scDb）、タンデムscDb（Tandab）、線状二量体scDb（LD-scDb）、環状二量体scDb（CD-scDb）、BiTE（タンデムジ-scFvもしくはタンデムscFvとも呼ばれる）、タンデムトリ-scFv、トリ（ア）ボディ、二重特異性Fab2、ジミニ抗体、ジ-ダイアボディ、scFab-dsscFv、またはDARTである。

40

【0071】

一実施形態において、結合メンバーは、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4アイソタイプからなる群から選択される定常領域を含む。

【0072】

一実施形態において、結合メンバーは、マウスIgG1、IgG2A、IgG2B、ま

50

たは I g G 3 アイソタイプからなる群から選択される定常領域を含む。

【0073】

一態様において、本発明は、

a) それぞれ配列番号 6、7、および 8 に示される V H C D R 配列 C D R - H 1、C D R - H 2、もしくは C D R - H 3、もしくはそれらの変異体のうちの少なくとも 1 つ、ならびに / または

b) それぞれ配列番号 3、4、および 5 に示される V L C D R 配列 C D R - L 1、C D R - L 2、もしくは C D R - L 3、もしくはそれらの変異体のうちの少なくとも 1 つ、を含む P D - L 1 に対する結合メンバーを与える。いくつかの実施形態において、結合メンバーは、少なくとも配列番号 5 の C D R - L 3 および / もしくは配列番号 8 の C D R - H 3、またはそれらの変異体を含む。いくつかの実施形態において、結合メンバーは、配列番号 6、7、および 8 からなる群から選択される 2 つの C D R 配列、またはそれらの変異体を含む。いくつかの実施形態において、結合メンバーは、配列番号 3、4、および 5 からなる群から選択される 2 つの C D R 配列、またはそれらの変異体を含む。いくつかの実施形態において、結合メンバーは、配列番号 6、7、および 8 の全 3 つの C D R、またはそれらの変異体を含む。いくつかの実施形態において、結合メンバーは、配列番号 3、4、および 5 の全 3 つの C D R、またはそれらの変異体を含む。好ましくは、結合メンバーは、配列番号 3 ~ 8 に示される全ての C D R、またはその変異体を含む。

10

【0074】

本明細書で与えられる結合メンバーは、ヒト P D - L 1 に対する強い結合親和性を有する。例えば、当該結合メンバーは、100 p M 未満、好ましくは 75 p M 未満、50 p M 未満、25 p M 未満、15 p M 未満の平衡結合定数 K_D でヒト P D - L 1 に結合することができ、最も好ましくは、 K_D は、約 10 p M 以下、例えば約 9 p M (例えば、9.0 p M、8.9 p M、8.8 p M、もしくは 8.7 p M)、約 8 p M、約 7 p M、約 6 p M、約 4 p M、約 3 p M (2.9 p M、2.8 p M、もしくは 2.7 p M)、またはそれ以下である。親和性は、以下の実施例のセクションに記載されているように、または当技術分野で利用可能な他の方法によって測定することができる。好ましい実施形態では、親和性は、室温で、より好ましくは、一価結合メンバーの場合は実施例 4 に示した条件下で、または二価結合メンバーの場合は実施例 9 に示した条件下で、結合平衡除外法 (Kinetic Exclusion Assay) (KinExA (登録商標)) によって測定する。

20

30

【0075】

本明細書に記載の結合メンバーは、抗体 (例えば、全長免疫グロブリン)、または抗体フラグメント (例えば、F a b、F a b'、F (a b')₂、s c F a b、s c F v、F v フラグメント、ナノボディ、V H H、もしくは最小認識ユニット)、または非抗体骨格、であり得る、から本質的になり得る、または含み得る。いくつかの結合メンバーは、本明細書に開示される可変軽鎖および / または重鎖の 1 以上のコピー、例えば、タンデム s c F v、ダイアボディまたは単鎖ダイアボディ (s c D b)、タンデム s c D b、線状二量体 s c D b、環状二量体 s c D b、B i T E ; タンデムトリ - s c F v、トリ (ア) ボディ、二重特異性 F a b 2、ジミニ抗体、I g G、トリアボディ、テトラボディ、s c F v - F c - s c F v 融合、ジ - ダイアボディ、D V D - 1 g、I g G - s c F a b、s c F a b - d s s c F v、F v 2 - F c、または I g G - s c F v 融合体 (例えば、限定はされないが、B s 1 A b、B s 2 A b、B s 3 A b、B s 4 A b、T s 1 A b、および T s 2 A b)、クアドローマ (quadroma)、k n o b - i n t o - h o l e (K I H)、二重特異性抗体、CrossMab、および DuoBody からなる群から選択されるフォーマットを含む。

40

【0076】

いくつかの実施形態において、結合メンバー、特に上記の一価抗体フラグメントは、s c F v である。V H および V L ドメインは、可動性リンカーによって、V L - リンカー - V H または V H - リンカー - V L のいずれかの配向で連結されることができる。好ましい実施形態では、配向は V L - リンカー - V H であり、すなわち軽鎖可変領域は N 末端にあ

50

り、重鎖可変領域はポリペプチドのC末端にある。

【0077】

結合メンバーは、好ましくは、ヒト化結合メンバー、例えばヒト化抗体、特にヒト化抗体フラグメント、例えばs c F vである。結合メンバーはモノクローナルおよび/またはキメラであることができる。

【0078】

したがって、いくつかの実施形態では、結合メンバーは、サブタイプV H 3の可変重鎖領域および/またはサブタイプV K a p p a 1の可変軽鎖領域を含む。

【0079】

好ましい実施形態において、結合メンバーは、配列番号2のV H配列またはその変異体を含む。当該変異体は、配列番号2と少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または最も好ましくは100%の配列同一性を有する。言い換えると、一実施形態において、結合メンバーは、配列番号2と少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または最も好ましくは100%の配列同一性を有するV H配列を含む。

10

【0080】

追加的または代替的に、本明細書で開示される結合メンバーは、配列番号1のV L配列またはその変異体を含む。当該変異体は、配列番号1と少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または最も好ましくは100%の配列同一性を有する。言い換えると、一実施形態において、結合メンバーは、配列番号1と少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または最も好ましくは100%の配列同一性を有するV L配列を含む。

20

【0081】

一実施形態において、当該結合メンバーは、配列番号2と少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または最も好ましくは100%の配列類似性を有するV H配列を含む。追加的または代替的に、結合メンバーは、配列番号1と少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または最も好ましくは100%の配列類似性を有するV L配列を含む。

30

【0082】

より好ましい実施形態において、結合メンバーは、配列番号1に示されるV Lおよび配列番号2に示されるV Hを含む。配列番号1および配列番号2の両方のフレームワーク配列は、国際公開第03/097697A号(ESBATEch AG)に記載のヒト免疫グロブリンに由来する。そのV HおよびV Lフレームワーク配列は、ウサギ抗体のヒト化および安定化のために改変されており、例えば、国際公開第2009/155726A号(ESBATEch, AN ALCON BIOMEDICAL RESEARCH UNIT LLC); Borrás, L., et al., JBC 2010, vol. 285 (12), p. 9054を参照されたい。

【0083】

いくつかの実施形態において、結合メンバーは、配列番号12~15からなる群から選択される1つ以上、好ましくは全てのV Lフレームワーク配列を含む。

40

【0084】

いくつかの実施形態において、結合メンバーは、配列番号16~19からなる群から選択される1つ以上、好ましくは全てのV Hフレームワーク配列を含む。

【0085】

結合メンバーは、例えばs c F vまたはタンデムs c F v、ダイアボディ、もしくは単鎖ダイアボディなどの二重特異性分子の場合、リンカー配列を含み得る。s c F vの場合、このようなリンカー配列は、典型的には10~約25個のアミノ酸を有する。通常、リンカーペプチドは、柔軟性を与えるグリシン、ならびに可溶性を向上させるためのセリン

50

および/またはスレオニンを豊富に含む。好ましい実施形態では、(GGGS)₄ リンカー(配列番号10)またはその変異体が使用される。2~5リピートを有する前記モチーフの変異体もまた使用され得る。他の好適なリンカーは、例えばAlfthan, K., Protein Eng 1995, vol. 8(7), p. 725に記載されている。

【0086】

したがって、一実施形態では、当該結合メンバーは、配列番号9を含むアミノ酸配列、を含むか、を有するか、から本質的になるか、または、からなる。いくつかの実施形態において、当該結合メンバーは、配列番号11を含むアミノ酸配列、を含むか、を有するか、から本質的になるか、または、からなる。

【0087】

特定の実施形態では、本明細書で与えられる結合メンバーの変異体が企図される。例えば、抗原結合、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性(ADCC)、補体依存性細胞傷害性(CDC)を改善すること、タンパク質分解に対する感受性および/もしくは酸化感受性を低減すること、安定性もしくは溶解性を増加させること、免疫原性を低下させること、ならびに/または結合メンバーの他の生物学的、生化学的、もしくは生物物理学的特性を変化させることが望ましい場合がある。いくつかの実施形態では、変異体は、親結合メンバーに対して改善を示さない。変異体は、いくつかの実施形態では、そのアミノ酸配列の1、2、3、4、5、またはそれ以上の位置において、所与の結合メンバーと異なるタンパク質性分子であり得る。このような違いは、例えば、置換、付加、修飾、または欠失であり得る。

【0088】

本明細書で与えられる結合メンバーの変異体は、タンパク質および/もしくは化学工学、結合メンバーをコードする塩基配列への適当な変更の導入、またはタンパク質/ペプチド合成によって調製し得る。得られる結合メンバーが適当な方法を用いてスクリーニングすることができる所望の特性を有するならば、フレームワークまたはCDRに、欠失、置換、付加、修飾、および挿入の任意の組み合わせをなすことができる。特に対象となるのは、置換であり、好ましくは上記の保存的置換である。

【0089】

本明細書に記載の結合メンバーは、このような保存的置換を1つ以上、例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、またはそれ以上含み得る。

【0090】

非保存的置換は、例えば、ポリペプチドの電荷、双極子モーメント、サイズ、親水性、疎水性、またはコンフォメーションに関して、より実質的な変化をもたらし得る。一実施形態において、結合メンバーは、このような非保存的置換を1つ以上、例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、またはそれ以上含む。

【0091】

修飾は、CDRおよび/またはフレームワーク配列中に存在し得る。例えば、本明細書で与えられるCDRは、1、2、3、4、5、またはそれ以上の修飾を含み得る。例えば、CDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3配列は全体として、本明細書で与えられるCDR、具体的には配列番号3、4、および5と、少なくとも75%、好ましくは少なくとも76%、77%、78%、79%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、またはより好ましくは99%同一である。追加的または代替的に、CDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3配列は全体として、本明細書で与えられるCDR、具体的には配列番号6、7、および8と、少なくとも80%、好ましくは少なくとも81%、82%、83%、84%、95%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、またはより好ましくは99%同一である。

【0092】

一実施形態において、CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3は全体として、本明細書で与えられるCDR、具体的に

10

20

30

40

50

は配列番号 3、4、および 5 と、少なくとも 85%、好ましくは少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、またはより好ましくは 99% 類似である。追加的または代替的に、CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2、および CDR-H3 は全体として、本明細書で与えられる CDR、具体的には配列番号 6、7、および 8 と、少なくとも 85%、好ましくは少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、またはより好ましくは 99% 類似である。

【0093】

一実施形態において、変異体は、配列番号 1 ~ 19 の配列のいずれか 1 つに 1、2、3、または 4 個の置換を含む。一実施形態において、変異体は、配列番号 1、2、9、または 11 の配列のいずれか 1 つに 5、6、7、8、9、10、11、または 12 個の置換を含む。

10

【0094】

特に好ましいタイプの変異体は、1 つ以上の CDR 全体が置換されているものである。通常、CDR-H3 および CDR-L3 は、抗原結合に最も顕著に寄与する。例えば、CDR-L1、CDR-L2、CDR-H1、および / または CDR-H2 全体を、天然または人工起源の異なる CDR により置き換え得る。いくつかの実施形態において、1 つ以上の CDR がアラニンカセットにより置き換えられている。

【0095】

追加的または代替的に、抗体の VH は、溶解性向上点変異を含む。国際公開第 2009 / 155725 号 (ESBATEch, a Novartis Company) は、抗体の全体的な溶解性を増加させることが証明されたモチーフを記載している。残基は、抗体の可変ドメインと定常ドメインとの界面にある位置に配置され、特に、定常ドメインを欠く scFv などの抗体フラグメントを安定化させる。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される結合メンバーの変異体では、以下の残基のうちの 1 つ、2 つ、または 3 つ全てが存在する。

20

(i) 重鎖アミノ酸 12 位のセリン (S) (AHOナンバリングによる) ;

(ii) 重鎖アミノ酸 103 位のセリン (S) もしくはスレオニン (T) (AHOナンバリングによる) ; および / または

(iii) 重鎖アミノ酸 144 位のセリン (S) もしくはスレオニン (T) (AHOナンバリングによる)。好ましい実施形態において、当該変異体は、VH12 位にセリン ; VH103 位にセリン ; VH144 位にスレオニン (すべて AHOナンバリング) を有する。

30

【0096】

追加的または代替的に、変異体は、本明細書に参照により援用される欧州第 2158315B1 号の請求項に係る 1 つ以上の点変異を含み得る。

【0097】

変異体は、例えば、本明細書に参照により援用される国際公開第 2014 / 206561 号に記載の修飾、具体的に挙げると、国際公開第 2014 / 206561 号の配列番号 15 ~ 22 の VL フレームワーク配列を含み得る。

【0098】

40

好ましくは、本明細書に記載の変異体結合メンバーは、

(i) PD-L1、特に hPD-L1 に対する特異的結合を保持する ; かつ / または

(ii) KinExA (登録商標) で測定して 100 pM 未満、好ましくは 75 pM 未満、50 pM 未満、40 pM 未満、30 pM 未満、20 pM 未満、より好ましくは 10 pM 未満のヒト PD-L1 に対する K_D を有する (好ましくは、一価結合メンバーの場合は実施例 4 に記載の条件、または二価結合メンバーの場合は実施例 9 に記載の条件を用いて測定がなされる) ; かつ / または

(iii) マウス PD-L1 に対して交差反応性でない、かつ / または ;

(iv) サル PD-L1 に対して交差反応性である ; かつ / または

(v) PD-L1 への結合に関して本明細書に開示される結合メンバーと競合する ; かつ

50

/または

(v i) 本明細書に開示される配列と少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、95%、もしくは97%の配列同一性を有する。

【0099】

変異体は、軽鎖および重鎖の鎖シャッフリングによっても調製され得る。単一の軽鎖を重鎖のライブラリと組み合わせて、変異体のライブラリを得ることができる。一実施形態において、前記単一の軽鎖は、上記のV L配列の群から選択され、かつ/または前記重鎖のライブラリは、1つ以上の上記のV H配列を含む。同様に、単一の重鎖は、軽鎖のライブラリと組み合わせることができる。好ましくは、前記単一の重鎖は、上記のV H配列の群から選択され、かつ/または前記軽鎖のライブラリは、1つ以上の上記のV L配列を含む。

10

【0100】

結合メンバーは、上記のV Lおよび/またはV H配列のいずれかを含むことができる。ナノボディまたはV H Hなどの単一ドメインフォーマットを有する結合メンバーは、上記のV LまたはV H配列のいずれか1つのみ、好ましくはV H配列を含む。多価結合メンバー、具体的にはF(a b') 2フラグメント、b i s - s c F v (タンデムs c F vとしても知られる)、ダイアボディ、s c D b、トリアボディ、またはテトラボディなど、好ましくは二重特異性結合メンバーは、1つ以上の上記のV L配列、および/または1つ以上の上記のV H配列を含み得る。

【0101】

本発明の結合メンバー、好ましくは一価抗体フラグメント、より好ましくはs c F vは、特に安定である。本明細書で使用される場合、用語「安定性」は、長期のインキュベーションおよび/または高温でのインキュベーション後に溶液中でモノマー状態を維持するポリペプチドの生物物理学的特性を指す。不安定なポリペプチドは、二量体化またはオリゴマー化およびさらには沈殿する傾向があり、それにより貯蔵寿命が短くなり、医薬用途にはあまり適さなくなる。

20

【0102】

本明細書で与えられる結合メンバー、特に上記の一価抗体フラグメントは、p H 7 . 2のP B S中10mg / mlの濃度で、4 の温度で2週間インキュベートした後、追加的または代替的に、22 または37 で同じ条件下でインキュベートした場合にも、少なくとも85%まで、好ましくは少なくとも90%、91%、92%、93%、94%まで、最も好ましくは95%までモノマー状態を維持する。いくつかの実施形態において、結合メンバー、特に上記の一価抗体フラグメントは、p H 7 . 2のP B S中10mg / mlの濃度で、4 の温度で3週間インキュベートした後、追加的または代替的に、22 または37 で同じ条件下でインキュベートした場合にも、少なくとも85%まで、好ましくは少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%まで、最も好ましくは97%までモノマー状態を維持する。

30

【0103】

いくつかの実施形態において、結合メンバーは、s c F vであり、p H 7 . 2のP B S中10mg / mlの濃度で37 で1週間または2週間の保存後に3%未満の二量体を形成する。

40

【0104】

モノマーの程度は、例えば、S E - H P L C (サイズ排除高速液体クロマトグラフィー)によって測定することができる。当該試験に適した移動相は、例えば、p H 7 . 2のP B Sである。モノマー含有量は、タンパク質クロマトグラフィー中に測定したU V 280シグナルのピーク積分によって定量することができる。好適なシステムは、例えば、Chromleon (登録商標) 6 . 8ソフトウェアによって制御されるDionex Summit H P L Cであり、これは、その後のクロマトグラム分析およびピーク定量も可能にする。

【0105】

結合メンバー、好ましくは上記一価抗体フラグメント、より好ましくはs c F vは、4

50

~ 10、好ましくは4~9、最も好ましくは約7.6の範囲の理論上の等電点(pI)を有し得る。理論上のpIは、例えば、ExPASy Server上のProtParamツールを用いて計算することができる(<http://web.expasy.org/protparam/>で利用可能; GASTEIGER E. et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. (In) The Proteomics Protocols Handbook. Edited by Walker J.M. Totowa: Humana Press Inc., 2005. ISBN 9781588295934. p. 571-607も参照)。

【0106】

結合メンバーは、動物モデルにおいて結合メンバーを試験するのに有利である非ヒト種由来のPD-L1と交差反応性であることができる。好ましくは、結合メンバーは、サルPD-L1と交差反応性である。いくつかの実施形態において、サルPD-L1に対するscFvフォーマットでの室温での一価結合メンバーのKDは、KinExA(登録商標)で測定して、例えば実施例5に示した条件下で測定して、約3.3pMである。いくつかの実施形態において、結合メンバーの親和性は、サルPD-L1に対して、ヒトPD-L1に対してと少なくとも同等、より好ましくは少なくとも2倍強い。いくつかの実施形態において、結合メンバーはマウスPD-L1に対して交差反応性ではない。しばしば、所与のヒト標的に対する抗体は、げっ歯類のオルソログに対してより低い親和性を有し、そのため、げっ歯類のインビボの動物データがより価値の低いものとなる。本明細書に開示される結合メンバーは、ヒトおよびサルPD-L1について同等のKD値を有するので、インビボの動物データは、ヒトにおける疾患をより反映するものと予想される。さらに、サルに対する交差反応性は、毒性学種としてのサルの使用を可能にする。

【0107】

好ましい実施形態において、結合メンバーは、PD-L2および/またはB7-H3などのB7ファミリーの他の構成要素と交差反応性ではない。両方のタンパク質は、PD-L1と高い配列類似性を有し、したがって、これらのB7ファミリーの構成要素への結合は、安全性の懸念を生じさせる。

【0108】

したがって、いくつかの実施形態において、PD-L1に特異的に結合する結合メンバーであって、配列番号1の少なくとも1つの可変軽鎖および配列番号2の少なくとも1つの可変重鎖を含み、ヒトPD-L1に対する平衡結合定数KDが10pM未満である前記結合メンバーが、与えられる。好ましくは、前記結合メンバーは、10mg/mlの濃度でPBS中、37°Cで1週間または2週間インキュベートした後、scFvフォーマットで少なくとも95%までモノマー状態を維持する。より好ましくは、前記結合メンバーはマウスPD-L1に対して交差反応性ではない。

【0109】

本発明は、ヒトPD-L1への結合について本明細書に開示される結合メンバーと競合する結合メンバーも与える。例えば、当該競合(または交差遮断)結合メンバーは中和性であり得る。好ましくは、当該競合結合メンバーは、250pM以下、例えば約100pM未満、40pM、30pM、20pM、10pM、または約5pM未満のヒトPD-L1への結合の平衡結合定数(KD)を有する。したがって、一実施形態では、結合メンバーは、約5pM未満のKDを有する。

【0110】

本明細書で使用される場合、用語「競合」は、同じ標的への結合についての結合メンバー間の競合を指す。競合は、目的の結合メンバーが、本明細書に開示される結合メンバーの共通抗原(ここでは、それぞれPD-L1またはそのフラグメント)への特異的結合を防止または阻害または低減する、競合結合測定によって測定することができる。当該競合結合測定は、当技術分野で公知であり、固相直接的または間接的ラジオイムノアッセイ(RIA)および固相直接的または間接的酵素イムノアッセイ(ELISA)を含むが、これらに限定されない。典型的には、当該アッセイは、固体表面に結合した精製抗原、被検結合メンバー、および本明細書に記載の基準結合メンバーの使用を伴う。競合阻害は、(i)被検結合メンバーの存在下で固体表面に結合した基準結合メンバー、または(ii)

基準結合メンバーの存在下で固体表面に結合した被検結合メンバーのいずれかの量を求めることにより、測定する。競合結合メンバーは、(i) 基準結合メンバーと同じエピトープに、(ii) 重複エピトープに、または (iii) 同じ標的分子上であるがその標的への基準結合メンバーの結合を立体的に妨害する異なるエピトープに、結合し得る。

【0111】

通常、競合結合メンバーは、過剰に存在する場合、PD-L1に対する本明細書に記載の結合メンバーの特異的結合を低減し、すなわち、少なくとも40~45%、45~50%、50~55%、55~60%、60~65%、65~70%、70~75%、または75%、またはそれ以上結合を交差遮断する。好ましくは、競合結合メンバーの存在下での本明細書に記載の結合メンバーの結合は、少なくとも80~85%、85~90%、90~95%、95~97%、または97%以上低下する。

10

【0112】

一実施形態において、結合メンバーは一価であり、例えばscFvまたはFabフラグメントである。別の実施形態において、結合メンバーは多価である。当該多価分子は、二価(例えば全長抗体またはF(ab')₂フラグメント)であることができ、または少なくとも3つの標的結合部位を含む。多価結合メンバーは、二重特異性抗体、例えば、ダイアボディ、単鎖ダイアボディ、bis-scFv、またはDARTであることができる(例えばKontermann R.E. Methods in Mol. Biol. Edited by LO, B. Totowa, N.J.: Humana Press, 2004. ISBN 1588290921. p. 227を参照されたい)。前記二重特異性抗体は、scFvについて上記したものよりも短いリンカー、すなわち配列番号10の基本モチーフの1~3リピートのみを有するリンカーを十分に使用し得る(例えばHolliger, P., et al., PNAS, 1993, vol. 90(14), p.6444を参照)。別の実施形態では、多価結合メンバーは、トリアボディ、ミニボディ、またはテトラボディである。多価結合メンバーの他の例には、限定はされないが、単鎖ダイアボディ、タンデムscDb、線状二量体scDb、環状二量体scDb、BiTE、タンデムトリ-scFv、トリ(ア)ボディ、二重特異性Fab₂、ジミニ抗体、scFv-Fc-scFv融合体、ジ-ダイアボディ、DVD-Ig、IgG-scFab、scFab-dsscFv、Fv₂-Fc、またはIgG-scFv融合体(例えば、限定はされないが、Bs1Ab、Bs2Ab、Bs3Ab、Bs4Ab、Ts1Ab、およびTs2Ab、クアドローマ(quadroma)、knob-into-hole(KIH)、二重特異性抗体、CrossMab、およびDuoBody)が含まれる。

20

30

【0113】

本開示に係る結合メンバーは、いくつかの実施形態では、捕捉部分、例えばストレプトアビジン結合タグ、例えば、米国特許出願第2003/0083474号、米国特許第5,506,121号、または第6,103,493号に記載されているSTREP-TAGS(登録商標)を含み得る。捕捉部分の他の例には、限定はされないが、マルトース結合タンパク質、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、カルモジュリン結合ペプチド(CBP)、FLAG-ペプチド(例えば、配列Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys-Gly)、T7エピトープ(Ala-Ser-Met-Thr-Gly-Gly-Gln-Gln-Met-Gly)、マルトース結合タンパク質(MBP)、単純ヘルペスウイルス糖タンパク質Dの配列Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-AspのHSVエピトープ、配列Tyr-Thr-Asp-Ile-Glu-Met-Asn-Arg-Leu-Gly-Lysの水疱性口内炎ウイルス糖タンパク質(VSV-G)エピトープ、配列Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Alaのヘマグルチニン(HA)エピトープ、および配列Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leuの転写因子c-mycの「myc」エピトープが含まれる。

40

【0114】

捕捉部分の他の例は、金属イオンを結合することができる金属キレート剤である。それぞれの捕捉部分は、エチレンジアミン、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、エチレンジアミングリコール四酢酸(EGTA)、ジエチレントリアミンペンタ酢酸(DTPA)、N,N

50

- ビス(カルボキシメチル)グリシン(ニトリロ三酢酸、NTAとも呼ばれる)、1, 2-ビス(o-アミノフェノキシ)エタン-N, N, N', N'-四酢酸(BAPTA)、2, 3-ジメルカプト-1-プロパノール(ジメルカプロール)、ポルフィン、またはヘムであり得る。当技術分野で使用される固定化金属アフィニティークロマトグラフィーの標準的方法に従って、例えば、オリゴヒスチジンタグは、例えば、キレート剤であるニトリロ三酢酸(NTA)を用いてクロマトグラフィー目的で与えられ得る、銅(Cu^{2+})、ニッケル(Ni^{2+})、コバルト(Co^{2+})、または亜鉛(Zn^{2+})イオンと複合体を形成することができる。

【0115】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される結合メンバーは、PD-L1に対する公知の結合メンバーよりも免疫原性が低い。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される結合メンバーは、PD-L1に対する公知の結合メンバーとは異なるエピトープに結合する。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される結合メンバーは、PD-L1に対する公知の結合メンバーとは異なるクリアランス速度を有する。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される結合メンバーは、PD-L1に対する公知の結合メンバーよりも、凝集および/またはプロテアーゼ分解に対する抵抗性が高い。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される結合メンバーは、PD-L1に対する公知の結合メンバーよりも改善された IC_{50} および/または EC_{50} を有する。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される結合メンバーは、PD-L1に対する公知の結合メンバーよりも、改善された k_{on} 、 k_{off} 、または K_D などの結合パラメーターを有する。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される結合メンバーは、PD-L1に対する公知の結合メンバーとは異なる種交差反応パターンを有する。いくつかの実施形態において、結合メンバーは、PD-L1に対する公知の結合メンバーとは異なるpH安定性を有する。いくつかの実施形態において、結合メンバーは、PD-L1に対する公知の結合メンバーとは異なる、指示温度での長期間の安定性を有する。いくつかの実施形態において、結合メンバーは、PD-L1に対する公知の結合メンバーとは異なる組織浸透能力を示す。いくつかの実施形態において、結合メンバーは、PD-L1に対する公知の結合メンバーよりも、そのレセプターであるPD-1および/またはCD80とのPD-L1相互作用の異なる遮断効率を有する。

【0116】

PD-L1への結合について本明細書に開示される結合メンバーと競合する結合メンバーも企図される。

【0117】

核酸、ベクター、宿主細胞、および製造方法

本明細書に記載の結合メンバーは、単一の塩基配列によって、または複数の塩基配列によってコードされ得る。複数の塩基配列の場合、各配列は1つの可変領域をコードし得る。いくつかの実施形態において、塩基配列は、2つ以上の可変領域をコードし得る。通常、複数の塩基配列は、結合メンバーの可変領域をコードする。典型的には、各可変領域は、1つの別々の塩基配列によってコードされる。可変領域をコードするそれぞれの塩基配列は、単一の核酸分子に含まれ得る。いくつかの実施形態において、可変領域をコードする2つ以上の塩基配列は、単一の核酸分子に含まれる。いくつかの実施形態において、可変領域をコードする各塩基配列は、単一の別個の核酸分子に含まれる。したがって、複数の核酸分子が、結合メンバーの製造に使用され得、例えば、それぞれが少なくとも1つの可変領域をコードする。それぞれの核酸分子は、いくつかの実施形態において、発現カセットを規定し得る。上記のように、発現カセットは、適当な宿主細胞中の特定の塩基配列の発現を指示することができる核酸分子である。

【0118】

発現カセットは、1つ以上の終結シグナルに機能的に連結されている目的の塩基配列に機能的に連結されたプロモーターを含む。発現カセットはまた、塩基配列の適切な翻訳に必要とされる配列も含み得る。コード領域は目的のポリペプチドをコードすることができ

、センスまたはアンチセンス方向に、目的の機能的RNA、例えば、限定されるものではないが、アンチセンスRNAまたは非翻訳RNAをコードすることもできる。目的の塩基配列を含む発現カセットはキメラであることができ、これは、その成分の少なくとも1つがその他の成分のうち少なくとも1つに対して異種であることを意味する。発現カセットは、天然に存在するが、異種発現に有用な組み換え型で得られたものであることもできる。いくつかの実施形態において、しかしながら、発現カセットは、宿主に対して異種である、すなわち、発現カセットの特定の塩基配列は、宿主細胞中に自然に存在せず、形質転換事象によって宿主細胞または宿主細胞の母細胞に導入された。発現カセット中の塩基配列の発現は、構成的プロモーター、または宿主細胞がいくつかの特定の外部刺激に曝された場合にのみ転写を開始する誘導性プロモーターの制御下にあり得る。植物または動物などの多細胞生物の場合、プロモーターは、特定の組織、器官、または発達段階に特異的であることもできる。

【0119】

結合メンバーまたはその部分の配列が分かると、ポリペプチド配列をコードするcDNAは、当技術分野で周知の方法、例えば、遺伝子合成により作製できる。これらのcDNAは、標準的なクローニングおよび突然変異誘発技術によって、発現ベクターまたはクローニングベクターなどの適切なベクターにクローニングすることができる。必要に応じて、可変軽鎖は、抗体の可変重鎖とは別のベクターによってコードされる。さらに、追加の配列、例えば、タグ（例えば、His-タグ）、Fabもしくは全長抗体の産生のための定常ドメイン、リンカー、第2の結合特異性のコード配列、または他の機能的ポリペプチド、例えば融合コンストラクトもしくは二重特異性分子を生じさせるための酵素を遺伝子コンストラクトに含め得る。

【0120】

選択されたクローニング法に基づいて、遺伝子コンストラクトは、N末端またはC末端に1つ以上の追加の残基を有する結合メンバーを生じさせ得る。例えば、開始コドンに由来するN末端メチオニンまたは追加のアラニンは、翻訳後に削り取られない限り、発現されたポリペプチド中に存在し得る。したがって、本明細書中に開示される抗体は、開示される配列からなるのではなく、むしろ開示される配列を含むことを理解されたい。したがって、一実施形態において、結合メンバーは、配列番号9の配列を含む。別の実施形態において、結合メンバーは、配列番号11の配列を含む。結合メンバーが配向VH-リンカー-VLを有するscFv、またはVHがN末端に配置される他の抗体フラグメントである場合、分子のVH配列部分は、N-末端がメチル化されていることがあり得る。したがって、一実施形態において、配列番号2は、N末端メチオニンを有する。

【0121】

標準的なクローニング、突然変異誘発、および分子生物学的手法の基本的なプロトコルは、例えば、Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Green M. and Sambrook, J. Molecular Cloning: a Laboratory Manual.4th edition.Cold Spring Harbor Laboratory, 2012.ISBN 1936113422.)に記載されている。

【0122】

本明細書に記載の核酸とストリンジентな条件下でハイブリダイズする単離核酸がさらに企図される。

【0123】

また、本明細書に開示される結合メンバーを組み換え発現する細胞も企図される。遺伝子コンストラクトの発現用の適当な宿主細胞は、原核細胞または真核細胞であることができる。好適な原核生物の宿主細胞は、グラム陰性またはグラム陽性であり、エシェリキア属、エルウィニア属、エンテロバクター属、クレブシエラ属、シュードモナス属、またはパチルス属の種を含む。いくつかの実施形態において、宿主細胞は、大腸菌、すなわち、大腸菌株BL21(DE3)（例えば、米国のInvitrogen、カタログ番号C600003）およびOrigami™ 2(DE3)（例えば、米国のNovagen、カタログ番号71345-3）のうちの一つ以上である。

【 0 1 2 4 】

グリコシル化またはリン酸化などの翻訳後修飾が望まれる場合、真核生物の宿主細胞を使用することが有利であり得る。例えば、一般的に使用されるサッカロマイセス・セレヴィシエ株またはピキア・パストリス株などの真核微生物は、宿主細胞として機能し得る。宿主細胞の好適な例には、植物細胞または動物細胞、特に昆虫細胞または哺乳類細胞も含まれる。好適な哺乳類細胞には、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）、ヒト胎児腎細胞（HEK）、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）、またはNS0骨髄腫細胞が含まれるが、これらに限定されない。原核生物の宿主細胞におけるグリコシル化もまた報告されており、例えば、Jaffe S.R.P. et al., Curr.Opin.Biotechnol.2014, vol. 30, p. 205を参照されたい。

10

【 0 1 2 5 】

好適な宿主細胞における発現によって結合メンバーを製造し得る。例えば、上記の発現ベクターを、エレクトロポレーションまたは化学的形質転換などの標準的な技術によって宿主細胞に導入する。次いで、形質転換細胞を、組み換えタンパク質発現に適した条件下で、典型的には適当な栄養培地中で培養し、必要に応じて、プロモーターを誘導するため、形質転換体を選択するため、または目的のコード配列を増幅するために改変する。結合メンバーを、培養物から回収し、必要に応じて、当技術分野の標準技術を用いて精製する。組み換えタンパク質の収率は、培地および温度または酸素供給などの培養条件を最適化することによって改善し得る。原核生物では、結合メンバーは、ペリプラズム内で、細胞内で封入体として産生されること、または培地中に分泌されることができる。動物細胞は、通常、結合メンバーを培地中に分泌する。タンパク質を採取したら、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、疎水性相互作用、混合モードクロマトグラフィー、および/またはアフィニティークロマトグラフィーなどの当技術分野で周知の方法を用いてタンパク質を精製することができる。

20

【 0 1 2 6 】

一実施形態において、結合メンバーを無細胞系で製造する。これは、典型的には、本明細書に記載のタンパク質をコードする核酸産物鋳型、例えばプラスミドDNAまたはPCR産物鋳型のインビトロ転写とその後のインビトロ翻訳を伴う。例えば、増殖細胞由来の粗溶解産物を使用し、必要な酵素および細胞タンパク質合成機構を与える。アミノ酸または核酸塩基およびエネルギー送達分子およびその他のものなどの必要な構成要素は、外的に供給することができる。無細胞発現系は、例えば、溶解したウサギ網状赤血球（例えば、Rabbit Reticulocyte Lysate System、Promega、カタログ番号L4540）、ヒラ細胞（例えば、1-Step Human In Vitro Translation Kit、88881、Thermo Scientific）、昆虫細胞（例えば、EasyXpress Insect Kit II、32561、Qiagen）、小麦胚芽（例えば、Wheat Germ Extract、L4380、Promega）、または大腸菌細胞（例えば、PURExpress（登録商標）In Vitro Protein Synthesis Kit、E6800S、NEB）をベースとすることができる。また、ジスルフィド結合生成の改善のために最適化された無細胞抗体発現系を製造に使用することができる。市販のキットには、昆虫細胞溶解産物（例えば、EasyXpress Disulfide Insect Kit、32582、Qiagen）または大腸菌細胞溶解産物（例えばEasyXpress Disulfide E.coli Kit、32572、Qiagen）が含まれる。無細胞タンパク質合成は、例えば、速度が速いこと、高い産物収率を達成すること、反応条件の容易な変更を可能にすること、副産物の程度を低くするか、または全く形成しないことという利点を有する。無細胞タンパク質合成は、純粋に生物学的または化学的製造系で行うことができない生物学的および/または化学的ステップを伴い得る。例えば、非天然または化学的に修飾されたアミノ酸を、所望の位置でタンパク質に組み込むことができる。scFv-毒素融合タンパク質は、無細胞系において成功裏に製造されている（Nicholls, P. J., et al., JBC 1993, vol. 268, pp. 5302-5308）。したがって、一実施形態では、本明細書に記載の結合メンバーを製造する方法が与えられ、前記方法は、（a）無細胞系を与えるステップ、（b）上記結合メンバーをコードする核酸産物鋳型を与えるステップ、（c）核酸産物鋳型の転写および翻訳を可能にするステップ、（d）結合メンバーを回収するステップ、ならびに必要な

30

40

50

て (e) 結合メンバーを精製するステップを含む。

【 0 1 2 7 】

追加的または代替的に、本明細書に記載の結合メンバーを製造する方法は、化学合成の少なくとも1つのステップを含む。例えば、当該方法は完全に化学的であってもよい。別の実施形態では、上記の細胞ベースまたは無細胞の製造系は、このような化学合成の少なくとも1つのステップを含む。

【 0 1 2 8 】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の結合メンバーを、大腸菌における細胞内発現のための発現ベクターを用いて細胞ベースの系において製造する。発現されると、ポリペプチドは、宿主細胞内の封入体として得られ、他の細胞粒子から分離された後、塩酸グアニジン (G n d H C l) などの変性剤中で可溶化され、当業者に周知の再生方法によってリフォールディングされる。

10

【 0 1 2 9 】

所望の結合メンバーは、トランスジェニック動物でも製造し得る。好適なトランスジェニック動物は、標準的な方法に従って得られ得、当該方法は、(i) 結合メンバーのコード配列および好適な制御配列を含むDNAコンストラクトを卵にマイクロインジェクションすることなどによって、トランスジェニック胚を作製するステップ、(i i) 卵を偽妊娠レシピエントのメスに移入するステップ、(i i i) 妊娠をモニタリングするステップ、ならびに(i v) 所望の抗体を発現する子孫を選択するステップを例えば含む。

20

【 0 1 3 0 】

上記の核酸、ベクター、宿主細胞、および製造方法は、本明細書に記載の結合メンバー(それらがタンパク質である限り)にも適用されることを理解されたい。

【 0 1 3 1 】

キメラ抗原レセプター(C A R) を発現する細胞が本明細書においてさらに企図される。C A R 発現細胞は、癌治療において十分に有用であることが分かっている。自己由来または同種異系由来の当該細胞は、細胞にレンチウイルスベクターを導入することなどにより、C A R を発現するように遺伝子改変されている。細胞は一般にT細胞であるが、N K 細胞もまた使用される。C A R は、典型的には、抗原結合ドメイン、スペーサー、膜貫通ドメイン、共刺激シグナル伝達ドメイン、およびシグナル伝達ドメインを含むいくつかのセクションを有する。

30

【 0 1 3 2 】

細胞外抗原結合ドメインは、通常癌細胞上にある、所与の標的タンパク質を特異的に認識する。標的に結合すると、C A R 細胞は活性化され、また、癌細胞の近くに保持される。抗原結合ドメインは、スペーサーを介して膜貫通ドメインに連結され、膜貫通ドメインは細胞内共刺激シグナル伝達ドメインに連結される。スペーサーの長さは、抗原結合ドメインおよびその標的タンパク質の特性に応じて最適化されなければならない場合がある。癌細胞への標的の結合は、シグナル伝達ドメイン、例えばC D 3 ゼータシグナル伝達ドメインによる活性化シグナルをもたらすコンフォメーション変化として誘発する。膜貫通ドメインとシグナル伝達ドメインとの間に通常位置する共刺激シグナル伝達ドメインは、活性化シグナルを増幅するのに役立つ。共刺激シグナル伝達ドメインの例示的な実施形態は、C D 2 8 または 4 - 1 B B である。

40

【 0 1 3 3 】

いくつかの実施形態において、抗原結合ドメインは、本明細書に記載のV L および/またはV H 配列を含む。いくつかの実施形態において、抗原結合ドメインは、本明細書に記載のs c F v を含む。

【 0 1 3 4 】

いくつかの実施形態において、C A R 発現細胞は、「装甲(armored) C A R 」細胞、すなわち、可溶性タンパク質を分泌してC A R 細胞が投与された対象の腫瘍微小環境内の免疫応答を変えるC A R 発現細胞である。いくつかの実施形態において、当該細胞は、本明細書に記載の結合メンバー、特にs c F v を分泌する。

50

【 0 1 3 5 】

化学的および/または生物学的修飾

一態様において、本明細書に開示される結合メンバーは、化学的および/または生物学的に修飾されている。当該修飾には、グリコシル化、PEG化、HES化、アルブミン融合技術、PAS化、色素および/もしくは放射性同位元素による標識、酵素および/もしくは毒素との結合、リン酸化、ヒドロキシル化、ならびに/または硫酸化が含まれ得るが、これらに限定されない。同様に、上記の結合メンバー、塩基配列、ベクター、および/または宿主細胞は、それ相応に改変されていることができる。

【 0 1 3 6 】

タンパク質の薬理または水溶性を最適化するため、またはその副作用を低下させるために、化学的および/または生物学的修飾を行い得る。例えば、PEG化、PAS化、および/またはHES化は、腎クリアランスを遅くし、それによって結合メンバーの血漿半減期を増加させるために適用され得る。追加的または代替的に、修飾は、タンパク質に異なる機能性を、例えば、癌細胞とより効果的に戦うための毒素、または診断目的のための検出分子を付加し得る。

10

【 0 1 3 7 】

グリコシル化は、タンパク質に炭水化物を結合させるプロセスを指す。生体系では、当該プロセスは、翻訳と同時および/または翻訳後の修飾の様式として細胞内で酵素的に行われる。タンパク質、ここでは抗体などの結合メンバーは、化学的にグリコシル化されていることもできる。典型的には、限定されるものではないが、グリコシル化は、(i) アスパラギンもしくはアルギニン側鎖の窒素へのN結合型である、(ii) セリン、スレオニン、チロシン、ヒドロキシリジン、もしくはヒドロキシプロリン側鎖のヒドロキシ酸素へのO結合型である、(iii) キシロース、フコース、マンノース、およびN-アセチルグルコサミンのホスホセリンへの結合を伴う、または(iv) マンノース糖が特定の認識配列中に見られるトリプトファン残基に付加されるC-マンノシル化の様式である。グリコシル化パターンは、例えば、適当な細胞株、培養培地、タンパク質工学製造モード、およびプロセス戦略を選択することによって制御することができる(HOSSLER, P. Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture. *Glycobiology* 2009, vol. 19, no. 9, p. 936-949.)。いくつかの実施形態において、本明細書に記載の結合メンバーのグリコシル化パターンは、ADCCおよびCDCエフェクター機能を増強するように改変されている。

20

30

【 0 1 3 8 】

グリコシル化パターンを制御または改変するタンパク質工学は、1つ以上のグリコシル化部位の欠失および/または付加を伴い得る。グリコシル化部位の生成は、対応する酵素認識配列を結合メンバーのアミノ酸配列に導入することによって、または上記のアミノ酸残基の1つ以上を付加もしくは置換することによって、簡便に達成することができる。

【 0 1 3 9 】

結合メンバーをPEG化することが望ましい場合がある。PEG化は、タンパク質の薬力学的特性および薬物動態学的特性を変化させる可能性がある。適当な分子量のポリエチレングリコール(PEG)を、タンパク質骨格に共有結合させる(例えば、Pasut G. and Veronese F. State of the art in PEGylation: the great versatility achieved after forty years of research. *J. Control Release*, 2012, vol. 161, no. 2, p.461を参照)。PEG化は、さらに、PEG化タンパク質を免疫系から遮蔽することによって免疫原性を低減し得、かつ/または、例えば、結合メンバーのインビボ安定性を増加させ、結合メンバーをタンパク質分解から保護し、その半減期を延長することにより、および、その生体内分布を変化させることにより、PEG化タンパク質の薬物動態を変え得る。

40

【 0 1 4 0 】

類似の効果は、PEG模倣物、例えば、抗体のHES化またはPAS化によって達成され得る。HES化は、ヒドロキシエチルデンプン(「HES」)誘導体を利用するが、PAS化の間、抗体は、アミノ酸のプロリン、アラニン、およびセリンからなる立体構造的

50

に不規則なポリペプチド配列に連結される。これらのPEG模倣物および関連化合物は、例えば、Binder U. and Skerra, A. Half-Life Extension of Therapeutic Proteins via Genetic Fusion to Recombinant PEG Mimetics, in Therapeutic Proteins: Strategies to Modulate Their Plasma Half-Lives. Edited by Kontermann R., Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2012 ISBN: 9783527328499. p. 63に記載されている。

【0141】

結合メンバーは、サルベージレセプター結合エピトープなどのエピトープを含み得る。当該サルベージレセプター結合エピトープは、典型的には、IgG分子（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4）のFc領域のエピトープを指し、分子のインビボ半減期を増加させる効果を有する。

10

【0142】

追加的または代替的に、結合メンバーは、標的結合後の補助的な機能に帰属する第2の部分で標識されているか、または当該部分に結合されている。第2の部分は、例えば、追加の免疫性エフェクター機能を有すること、薬剤標的化において有効であること、または検出に有用であることがあり得るが、これらに限定されない。第2の部分は、例えば、当該技術分野で公知の方法を使用して、結合メンバーに化学的に連結されるか、または遺伝子学的に融合されることができる。

【0143】

第2の部分として機能し得る分子には、限定はされないが、放射性同位体とも呼ばれる放射性核種、アポ酵素、酵素、補因子、HISタグなどのペプチド部分、タンパク質、マンノース-6-リン酸タグなどの炭水化物、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）などのフルオロフォア、フィコエリトリン、グリーン/ブルー/レッドまたは他の蛍光タンパク質、アロフィコシアニン（APC）、発色団、ビオチンなどのビタミン、キレート剤、メトトレキサートなどの代謝拮抗物質、リボソーム、細胞傷害性薬剤などの毒素、または放射性毒素が含まれる。放射性核種の実例は、 ^{35}S 、 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{18}F 、および ^{125}I である。好適な酵素の例には、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、およびアンジオジェニンが含まれるが、これらに限定されない。好適なタンパク質の実例は、レクチンである。好適な細胞傷害性薬剤の例には、タキソール、グラミシジンD、およびコルヒチンが含まれるが、これらに限定されない。

20

30

【0144】

標識された結合メンバーは、インビトロおよびインビボ検出または診断の目的に特に有用である。例えば、好適な放射性同位元素、酵素、フルオロフォア、または発色団で標識された結合メンバーは、ラジオイムノアッセイ（RIA）、酵素結合イムノソルベント検定法（ELISA）、またはフローサイトメトリーをベースとする単一細胞解析（例えば、FACS解析）によってそれぞれ検出することができる。同様に、本明細書に開示される核酸および/またはベクターは、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイにおいてこれらの標識されたフラグメントをプローブとして使用して、検出または診断の目的のために使用することができる。標識プロトコルは、例えば、Johnson I. and Spence, M. T.Z. Molecular Probes Handbook, A Guide to Fluorescent Probes and Labelling Technologies. Life Technologies, 2010. ISBN: 0982927916に見られ得る。

40

【0145】

組成物

本明細書に開示される結合メンバー、塩基配列、および/またはベクターは、好適な担体、賦形剤、または希釈剤をさらに含む組成物中に与えられ得る。典型的な実施形態では、それぞれの組成物は、本明細書に記載の抗体を含む。

【0146】

当該組成物は、例えば、診断用、美容用、または医薬用組成物であることができる。治療目的または美容目的では、組成物は、薬剤的に許容できる担体、賦形剤、または希釈剤を含む医薬組成物であり、すなわち、使用される用量および濃度で毒性ではない。

50

【0147】

好適な「担体」、「賦形剤」、または「希釈剤」には、限定はされないが、(i)緩衝剤、例えばリン酸、クエン酸、もしくは他の有機酸；(ii)酸化防止剤、例えばアスコルビン酸およびトコフェロール；(iii)防腐剤、例えば3-ペンタノール、塩化ヘキサメトニウム、塩化ベンザルコニウム、ベンジルアルコール、アルキルパラベン、カテコール、もしくはシクロヘキサノール；(iv)アミノ酸、例えばヒスチジン、アルギニン；(v)ペプチド、好ましくは最大10残基、例えばポリリシン；(vi)タンパク質、例えばウシもしくはヒト血清アルブミン；(vii)親水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン；(viii)単糖類、二糖類、多糖類、および/もしくは他の炭水化物、例えばグルコース、マンノース、スクロース、マンニトール、トレハロース、ソルビトール、アミノデキストラン、もしくはポリアミドアミン；(ix)キレート剤、例えばEDTA；(x)塩形成イオン、例えばナトリウム、カリウム、および/もしくは塩化物；(xi)金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；(xii)イオン性および非イオン性界面活性剤、例えばTWEEN^{T M}、PLURONICS^{T M}、もしくはポリエチレングリコール(PEG)、ならびに/または(xiii)凍結保存剤、例えばジメチルスルホキシド(DMSO)が含まれる。

10

【0148】

例示的な化合物の多くは、異なる機能を有し、例えば、担体および希釈剤として作用し得る。組成物は、各担体、希釈剤、または賦形剤のうち2つ以上を含み得ることも理解されたい。

20

【0149】

結合メンバー、塩基配列、またはベクターは、ビーズ、微粒子、またはナノ粒子などの固体支持体材料上に与えられ得る。典型的には、結合メンバー分子は、共有結合（必要に応じてリンカーを伴う）、非共有結合、またはその両方を介してこのような担体に連結される。ビーズおよび微粒子は、例えば、デンプン、セルロース、ポリアクリレート、ポリアセテート、ポリグリコール酸、ポリ(ラクチド-コ-グリコリド)、ラテックス、またはデキストランを含むことができる。

【0150】

一実施形態において、上記の結合メンバー、塩基配列、またはベクターを含む医薬組成物が与えられる。組成物は、治療有効量の1つ以上の追加の治療的に活性な化合物をさらに含み得る。追加の治療的に活性な化合物は、いくつかの実施形態において、PD-L1媒介性疾患に対して活性な化合物である。

30

【0151】

治療用途

本明細書に記載の分子、特に結合メンバー（抗体など）、核酸分子、宿主細胞、またはベクターは、薬剤として有用である。典型的には、当該薬剤は、本明細書で与えられる治療有効量の分子または細胞を含む。したがって、それぞれの分子または宿主細胞は、1つ以上のPD-L1関連障害の治療に有用な薬剤の製造に使用することができる。

【0152】

一態様において、PD-L1関連/PD-L1媒介性障害を治療する方法が与えられる。当該方法は、薬剤的に有効な量の本明細書に記載の分子または宿主細胞、特に抗体または宿主細胞を、治療を必要とする対象に投与するステップを含む。一実施形態において、このような薬剤的に有効な量の結合メンバー、例えば抗体または宿主細胞を含む、上記の医薬組成物を、対象に投与する。上記の薬剤を対象に投与し得る。

40

【0153】

治療を必要とする対象は、ヒトまたは非ヒト動物であり得る。典型的には、対象は、哺乳動物、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、イヌ、ネコ、サル(monkey)、サル(ape)、ヤギ、ヒツジ、ウマ、ニワトリ、モルモット、またはブタである。典型的な実施形態では、対象は、PD-L1関連障害と診断されるか、またはこのような障害を獲得し得る。動物モデルの場合、PD-L1関連障害を発症するように動物を遺伝子改変

50

し得る。動物モデルでは、PD-L1 媒介性疾患の特徴を示すようにも動物を遺伝子改変し得る。

【0154】

PD-L1 のアンタゴニストが治療効果を示す様々な PD-L1 関連障害が知られており、限定はされないが、NSCLC (非小細胞肺癌)、尿路上皮癌、メラノーマ、腎細胞癌、ホジキンリンパ腫、頭頸部扁平上皮癌、卵巣癌、胃腸癌、肝細胞癌、神経膠腫、乳癌、リンパ腫、小細胞肺癌、骨髄異形成症候群、前立腺癌、膀胱癌、子宮頸癌、非淡明細胞腎癌、結腸直腸癌、肉腫、結腸癌、腎臓癌、肺癌、膵臓癌または胃癌、皮膚癌、子宮癌、神経膠芽細胞腫、白血病、癌腫、メルケル細胞癌または腎細胞癌 (RCC)、血液癌、多発性骨髄腫、リンパ芽球性白血病 (ALL)、B 細胞白血病、慢性リンパ球性白血病、非

10

【0155】

PD-1 経路はまた、敗血症および関連障害に関与することも示されている (例えば、国際公開第 2015038538 号参照)。したがって、一実施形態において、PD-L1 関連疾患は、敗血症、敗血症性ショック、全身性炎症性反応症候群、または代償性炎症性反応症候群である。

【0156】

Bodhankar ら ((2015) Stroke 46(10): 2926-34) は、実験的脳梗塞の中大脳動脈閉塞マウスモデルにおいて抗 PD-L1 モノクローナル抗体による治療の有益な治療効果を実証した。

20

【0157】

PD-1 および PDL-1 は、原発性中枢神経系リンパ腫において免疫組織化学的に検出可能であり、免疫抑制性微小環境の生成に関与し得る (Berghoff et al., (2014) Clinical Neuropathology 33(1):42-9)。特定の免疫チェックポイント阻害剤は、この疾患における実験的治療アプローチのために検討され得る。

【0158】

移植後設定における急性白血病に対する PD-1 / PD-L1 相互作用の影響は、マウスおよびヒトの両方で評価されている。Koestner ら ((2011), Blood 117(3): 1030-1041) は、マウスモデルにおいて、PD-L1 遮断による移植片対宿主病の誘発のない移植片対リンパ腫効果の回復を観察し、造血幹細胞の移植後早期での遺伝子改変同種異系 T 細胞の養子移入は、移植片対宿主病を伴わない強力な移植片対リンパ腫効果を示したが、後の養子移入は同時 PD-L1 遮断のみで有効であった。T 細胞は、レシピエント白血病特異抗原に対する T 細胞レセプター (TCR) を発現するように改変された。

30

【0159】

医薬組成物は、様々な好適な投与経路のうちの 1 つ以上によって適用し得る。投与は、例えば、非経口的に行うことができる。いくつかの実施形態において、投与は筋肉内に行う。いくつかの実施形態において、投与はボラスまたは連続注入によって静脈内に行う。投与は、いくつかの実施形態において、関節内、滑液嚢内、皮下、局所的 (topically) (例えば、皮膚または眼)、非経口、直腸内、皮内、皮下、経皮 (transdermally)、経皮 (percutaneously)、または局所的 (locally) に行う。他の好適な投与様式には、限定はされないが、脳内、脳脊髄内、髄腔内、硬膜外、または腹腔内、経口、泌尿生殖器、硝子体内、全身、静脈内、腹腔内、筋肉内、眼内、耳内、鼻腔内、吸入、舌下、頭蓋内、筋肉内、腹腔内、または口腔が例えば含まれる。本明細書に開示される結合メンバー、塩基配列、ベクター、または宿主細胞は、1 以上の他の治療上有効な化合物と組み合わせることができる。当該化合物は、いくつかの実施形態では、PD-L1 レセプターを介したシグナル伝達を乱すことができる場合がある。それぞれの化合物は、いくつかの実施形態では、例えば炎症反応の他のメディエーターなどの 1 つ以上のさらなる標的を阻害することができる場合がある。当該化合物は、同時にまたは連続して投与することができる。

40

【0160】

50

治療用途では、結合メンバーは、放射性標識されていてもよく、毒素に連結されていてもよく、または上記の別のエフェクター機能に連結されていてもよい。

【0161】

本明細書に記載の結合メンバーの治療的使用は、抗体療法、化学療法、サイトカイン療法、樹状細胞療法、遺伝子療法、ホルモン療法、レーザー光療法、放射線療法、またはワクチン療法の群から選択される1つ以上の療法との併用であり得る。

【0162】

いくつかの実施形態において、結合メンバーを、1つ以上の異なる医薬化合物との併用で投与する。例示的な実施例には、CTLA-4阻害剤（例えば、トレメリムマブおよび/もしくはイピリムマブ）、VEGF阻害剤（例えば、ベバシズマブ）、EGFレセプター阻害剤（例えば、エルロチニブ）、細胞増殖阻害剤（例えば、シスプラチン、ペメトレキセド、カルボプラチン、および/もしくはパクリタキセル）、IFN-g、癌ワクチン、可溶性CD80、またはそれらの組み合わせが含まれる。1つ以上の医薬化合物との併用での抗PD-L1抗体に関する臨床試験の概説は、He J et al (2015), Nature Scientific Reports; 5:13110; DOI: 10.1038/srep13110に与えられている。併用で投与し得る化学療法剤には、限定はされないが、アルキル化剤、代謝拮抗物質、抗腫瘍抗生物質、アルカロイド、ニトロソ尿素剤、トポイソメラーゼ阻害剤、ホルモンまたはそのアンタゴニスト、アロマターゼ阻害剤、P-糖タンパク質阻害剤、および/または白金錯体誘導体が含まれる。化学療法剤の例示的な実施形態は、ゲムシタピン、cyclophosphamide、5-fluorouracil、オキサリプラチンであり、Black et al.(2016) Oncotarget 7(9):10557-67は、PD-L1を発現するヒトおよびマウスの乳癌および前立腺癌細胞株のパネルにおいて、PD-1/PD-L1免疫チェックポイントの活性化が、転移の増加に関連する腫瘍細胞の化学療法抵抗性を与えることを示した。彼らはまた、抗PD-1抗体を用いるPD-1/PD-L1軸の阻害が、ドキソルビシン化学療法を強化して、転移性乳癌の同系乳房同所性マウスモデルにおける転移を阻害することも示した。彼らは、化学療法と免疫チェックポイント遮断の併用が、化学療法抵抗性と転移性疾患への進行とを制限し得ると結論づけている。

【0163】

一実施形態において、本明細書に記載の抗体は、ウイルスの持続感染を有する対象へワクチンとの併用で投与される。マウスモデルでは、疲弊したCD8+ T細胞上のPD-1/PD-L1阻害シグナルの遮断が、治療的ワクチン接種との併用で、機能的CD8+ T細胞応答を相乗的に増強し、CD4(+) T細胞の補助がない場合でもウイルス制御を改善することが示された（例えば、Ha SJ et al, J Exp Med.2008 Mar 17;205(3):543-55 and EP2079760B1を参照）。対象は、例えば、アデノウイルス、サイトメガロウイルス、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、エプスタイン・バー・ウイルス、肝炎ウイルス、ヘルペスウイルス、パポウイルス、パピローマウイルス、バルボウイルス、T細胞白血病ウイルス、Tリンパ球向性ウイルス(HTLV)、および/または水痘-帯状疱疹ウイルスによるウイルスの持続感染を有し得る。

【0164】

また、腫瘍または腫瘍細胞の増殖を阻害する方法であって、前記腫瘍または腫瘍細胞を治療有効量の明細書に開示される結合メンバーと接触させるステップを含む、前記方法も企図される。一実施形態において、投与は腫瘍増殖を引き起し、別の実施形態では、投与は腫瘍サイズを減少させる。

【0165】

診断用途および/または検出目的

本明細書に開示される結合メンバーは、インビボおよび/またはインビトロでの検出または診断目的のために使用され得る。例えば、特定の細胞または組織における発現を検出するための抗体を含む幅広いイムノアッセイが当業者に知られている。同様に、前述の本文に記載されている結合メンバー、塩基配列、ベクター、および/または宿主細胞を、このセクションで詳述されるように、それ相応に使用することができる。

【0166】

腫瘍性PD-L1の発現状態は、複数の腫瘍型、例えば、限定はされないが、メラノーマ、腎細胞癌、および非小細胞肺癌において予後徴候であることが示されている。PD-L1発現は、抗PD-L1抗体が必須である免疫組織化学(IHC)によって測定することができる。

【0167】

このような用途のために、本明細書に開示される結合メンバー(例えば、抗体)、塩基配列、ベクター、または宿主細胞は、検出可能な標識を含み得る。いくつかの実施形態において、本明細書に開示される結合メンバー、塩基配列、ベクター、または宿主細胞は、検出可能な標識を含まない。実例として、非標識抗体を使用し、本明細書に記載の結合メンバー、例えば抗体上のエピトープに特異的に結合する二次抗体により検出し得る。

10

【0168】

いくつかの実施形態において、結合メンバー、塩基配列、ベクター、および/または宿主細胞は、検出物質が認識することができる1つ以上の物質に結合している。一例として、結合メンバーは、ストレプトアビジンに結合するその能力によって検出されることができ、結合メンバーは、ストレプトアビジンに結合するその能力によって検出されることができ、ストレプトアビジンに共有結合していることがあり得る。同様に、本明細書に開示される核酸および/またはベクターは、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイにおいてそれらの標識されたフラグメントをプローブとして使用することにより、検出または診断の目的のために使用することができる。

【0169】

特定の実施形態では、本明細書に与えられる分子のいずれか、特に抗体は、試料、好ましくは生体起源の試料中のPD-L1の存在を検出するのに有用である。この文脈で使用される用語「PD-L1」は、全長PD-L1、そのフラグメント、および/またはその前駆体を含む。用語「検出」は、量的および/または定性的検出を包含する。特定の実施形態において、生体試料は、ヒト患者由来の細胞または組織を含む。生体試料の非限定的な例には、血液、尿、脳脊髄液、生検、リンパ液、および/または非血液組織が含まれる。

20

【0170】

特定の実施形態では、方法は、存在する場合、その標的PD-L1への阻害剤の結合を許容する条件下で、本明細書に記載のPD-L1に対する結合メンバー(抗PD-L1抗体など)と生体試料を接触させることと、阻害剤-標的複合体を検出することを含む。当該方法は、インビトロまたはインビボの方法であり得る。一実施形態において、当該結合メンバーは、例えば、PD-L1が患者の選択のためのバイオマーカーである場合、本明細書に記載の結合メンバーによる治療に適格な対象を選択するために使用される。

30

【0171】

別の態様では、結合メンバー、例えば抗体は、例えば、皮膚の美的外観を改善するために、化粧用途に使用される。

【0172】

同様に、上述の塩基配列、ベクター、および/または宿主細胞は、上記のようにそれ相応に使用することができる。

40

【0173】

製品

他の態様において、製品(すなわち、キット)が与えられる。製品には、物質、例えば(i)PD-L1関連障害の治療、予防、進行の遅延、(ii)診断目的、または(iii)美容目的に有用な材料が含まれる。製品は、使用説明書および1つ以上の容器を含み得る。好適な容器には、例えば、ビン、バイアル、シリンジ、カートリッジ、プレート、および試験管が含まれ、ガラスまたはプラスチックなどの様々な材料からできていることができる。少なくとも1つの容器は、本明細書に開示される結合メンバーを含む組成物を保持する。容器は無菌のアクセスポートを有し得る。それぞれの容器は、典型的にはラベル付けされている。

50

【 0 1 7 4 】

試薬は、典型的には所定量の乾燥粉末で与えられ、通常は凍結乾燥され、溶解後に適当な濃度を有する試薬溶液を与える賦形剤を含む。安定剤および/または緩衝剤などの他の添加剤も含まれ得る。結合メンバーが酵素で標識されている場合、キットは、典型的には、それに応じた基質および補因子を含む。

【 0 1 7 5 】

使用説明書は、選択された障害の治療、予防、および/もしくは進行の遅延のために組成物を使用するという表示、または検出もしくは診断アッセイを実施するための説明を与え得る。説明書は、ラベルおよび/または添付文書に記載され得る。

【 0 1 7 6 】

言及されている配列

本明細書で開示される配列は以下である。

配列番号 1 - s c F V 1 の V L

E I V M T Q S P S T L S A S V G D R V I I T C Q A S E D I Y S L L A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y D A S D L A S G V P S R F S G S G S G A E F T L T I S S L Q P D D F A T Y Y C Q G N Y G S S S S S S Y G A V F G Q G T K L T V L G

配列番号 2 - s c F V 1 の V H

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C T V S G I D L S S Y T M G W V R Q A P G K G L E W V G I I S S G G R T Y Y A S W A K G R F T I S R D T S K N T V Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G R Y T G Y P Y F A L W G Q G T L V T V S S

配列番号 3 - s c F V 1 の C D R - L 1

Q A S E D I Y S L L A

配列番号 4 - s c F V 1 の C D R - L 2

D A S D L A S

配列番号 5 - s c F V 1 の C D R - L 3

Q G N Y G S S S S S S Y G A V

配列番号 6 - s c F V 1 の C D R - H 1

I D L S S Y T M G

配列番号 7 - s c F V 1 の C D R - H 2

I I S S G G R T Y Y A S W A K G

配列番号 8 - s c F V 1 の C D R - H 3

G R Y T G Y P Y F A L

配列番号 9 - s c F V 1

E I V M T Q S P S T L S A S V G D R V I I T C Q A S E D I Y S L L A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y D A S D L A S G V P S R F S G S G S G A E F T L T I S S L Q P D D F A T Y Y C Q G N Y G S S S S S S Y G A V F G Q G T K L T V L G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C T V S G I D L S S Y T M G W V R Q A P G K G L E W V G I I S S G G R T Y Y A S W A K G R F T I S R D T S K N T V Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G R Y T G Y P Y F A L W G Q G T L V T V S S

配列番号 10 - リンカー

G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S

配列番号 11 - メチル化 s c F V 1

M E I V M T Q S P S T L S A S V G D R V I I T C Q A S E D I Y S L L A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y D A S D L A S G V P S R F S G S G S G A E F T L T I S S L Q P D D F A T Y Y C Q G N Y G S S S S S S Y G A V F G Q G T K L T V L G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C T V S G I D L S S Y T M G W V R Q A P G K G L E W V G I I S S G G R T Y Y A S W A K G R F T I S R D T S K N T V Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G R Y T G Y P Y F A L W G Q G T L V T V S S

配列番号 12 - F R - L 1

E I V M T Q S P S T L S A S V G D R V I I T C

配列番号 13 - F R - L 2

W Y Q Q K P G K A P K L L I Y

配列番号 14 - F R - L 3

G V P S R F S G S G S G A E F T L T I S S L Q P D D F A T Y Y C

配列番号 15 - F R - L 4

F G Q G T K L T V L G

10

20

30

40

50

配列番号 1 6 - F R - H 1
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSG

配列番号 1 7 - F R - H 2
WVRQAPGKGLEWVG

配列番号 1 8 - F R - H 3
RFTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR

配列番号 1 9 - F R - H 4
WGQGTLLVTVSS

配列番号 2 0 - I g G _ 1 の重鎖

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGIDLSSYTMGWVRQAPGKGLEWVGIISSGGRTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLLQMNSLRAEDTAVYYCARGRYTGYPIYFALWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

配列番号 2 1 - I g G _ 2 の重鎖

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

20

配列番号 2 2 - I g G _ 3 の重鎖

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

30

配列番号 2 3 - I G G _ 4 の重鎖

EVQLVESGGGVVRPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMTWVRQAPGRGLEWVSGIHWHGKRTGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLKGEDTALYHCVRGGMSTGDWFDWPGQGTLLVIVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDITGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSSGLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFI FPPKIKDVLMI SLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQQTTHREDYNSTLRVVSALPI QHQDWMSGKEFKCKVNNKDL PAPI ERTISPKPGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTPEVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

40

配列番号 2 4 - I g G _ 1 の軽鎖

EIVMTQSPSTLSASVGDRVITCQASEDIYSLLOWYQQKPGKAPKLLIYDASDLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISSLQPD FATYYCQNGYSSSSSSSYGAVFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

40

配列番号 2 5 - I g G _ 2 の軽鎖

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号 26 - I g G _ 3 の軽鎖

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTI SRLEPEDFAVYYCQQYGLPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

配列番号 27 - I g G _ 4 の軽鎖

DIQMTQSPSSLSASLGDRTVITCRASQINSYLNWYQQKPGKAPKLLIYVASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTI SNLQP

50

EDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRADAAPTIVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNMFYPKIDINVKWKIDGSERQNGV
LNSWTDQDSKSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

【0177】

以下は、本明細書に開示される方法および組成物を例示する実施例である。上述の一般的な説明を考慮すると、様々な他の実施形態が実施され得ることが了解される。

【実施例】

【0178】

実施例1 - PD - L1結合scFvの同定

ウサギの免疫化：ウサギを組み換えヒト(rh)PD - L1Fc融合体で免疫化した(RnD Systems、米国、カタログ番号156-B7)。最後の追加免疫後にリンパ節を抜き取り、細胞を凍結保存した。

10

【0179】

PD - L1特異性の確認：PD - L1に対するウサギ血清の反応性の確認は、結合ELISAによって行った。簡潔には、PD - L1 - Fc融合体(RnD Systems、米国、カタログ番号156-B7)またはPD - L1 - His(BioVision、米国、カタログ番号7429)を、PBS中2mcg/mLの濃度で、37°Cで1時間、Maxisorp 96ウェルマイクロプレートにコーティングした。5%脱脂粉乳および1%BSAでブロッキングした後、濃度を増加させてウサギ血清を添加し、結合したIgGをヤギ抗ウサギIgGHRP(Southern Biotech、米国、カタログ番号4050-05)によって検出した。ELISAは、TMB ELISA基質溶液(eBioscience、米国、カタログ番号00-4201-56)を用いて発色させた。全てのウサギ血清はFc融合およびHisタグ化PD - L1の両方に結合し、免疫化がPD - L1に対するB細胞応答を成功裏に誘導したことを示した。

20

【0180】

ウサギB細胞のフローサイトメトリーソーティングおよび培養：PD - L1特異的メモリーB細胞をFACSria III(BD Biosciences)を用いて96ウェルマイクロプレートに単一細胞としてソーティングした。単一B細胞クローンを、フィーダー細胞および10%ウシ胎児血清(FCS)を含有する馴化培地の存在下で培養した。

【0181】

900を超える単一B細胞クローンをソーティングし、培養し、細胞培養上清を抗PD - L1特異的IgGの存在についてELISAにより分析した。簡潔には、rhPD - L1Fc融合体(RnD Systems、米国、カタログ番号156-B7)を、PBS中2mcg/mLの濃度で、4°Cで一晩、Maxisorp 96ウェルマイクロプレートにコーティングした。5%脱脂粉乳、1%BSA、および0.05%Tween - 20でブロッキングした後、細胞培養上清を添加した。PD - L1特異的IgGは、抗ウサギIgGHRP(Southern Biotech、カタログ番号4050-05)によって検出した。ELISAは、TMB ELISA基質溶液(eBioscience、米国、カタログ番号00-4201-56)を用いて発色させた。PD - L1特異的IgG産生B細胞クローンを同定し、PD - L1との相互作用を遮断する能力についてIgG抗体をさらに分析した。簡潔には、PD - L1発現CHO細胞(Promega、米国、カタログ番号CS187103)を96ウェルマイクロプレートに播種した。PD - L1特異的IgGを添加し、プレートを37°C、5%CO₂で20分間インキュベートした。PD - L1発現エフェクタージャーカット細胞(Promega、米国、カタログ番号CS187105)を添加し、プレートを37°C、5%CO₂でさらに6時間インキュベートした。TCR/CD3活性化は、Bio-Glo Luciferase Assay System(Promega, G7941)による発光検出によって測定した。69個のIgG産生B細胞クローンがPD - L1とPD - L1との相互作用を阻害することが分かった

30

40

【0182】

PD - L1中和IgGの配列決定：中和抗PD - L1IgG抗体を産生する全てのウサギB細胞クローンを、RNeasy Mini Kit(Qiagen、ドイツ、カタログ番号74106)を用いるmRNA単離に付した。mRNAを、製造業者のプロトコル(OneStep RT - PCRキット、Qiagen、ドイツ、カタログ番号210212)に従って逆転写の鋳型として使用

50

した。続いて、オリゴヌクレオチドを用いてウサギ Ig G 重鎖および軽鎖をコードする配列を特異的に増幅する PCR 反応を行った (Biometra Thermocycler T3)。重鎖および軽鎖 PCR フラグメントを独立に配列決定し (ABI、Sanger 3730xl; Microsynth AG、スイスのバルガッハ)、得られた塩基配列をEMBOSS Transeq (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/>) を用いてアミノ酸配列に翻訳し、CLUSTALW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) を用いてアラインメントした。

【0183】

抗 PD - L 1 s c F v 遺伝子の構築および s c F v タンパク質発現：上記に定義した可変軽鎖および可変重鎖のウサギ Ig G C D R 領域を同定し、ヒト軽鎖および重鎖アクセプターフレームワーク上へグラフト化した。一部において、点変異が導入された。配列番号 10 の配列によって C 末端可変重鎖に連結された N 末端可変軽鎖を有する s c F v タンパク質をコードする細菌発現ベクターを作製した。s c F v タンパク質は大腸菌 B L 2 1 (D E 3) (Novagen、米国、カタログ番号69450-3) で封入体として発現させ、これを単離し、可溶化し、タンパク質をリフォールディングさせた。リフォールディングされた s c F v をサイズ排除クロマトグラフィーにより精製し、約 26 k D a に対応するモノマーピーク画分を収集した。

10

【0184】

上記のように、ヒト化 s c F v を、E L I S A により、ヒト PD - L 1 F c 融合体結合について分析した。この手順により、試験した 47 の s c F v のうち 28 の s c F v をヒト PD - L 1 の結合剤として同定した。ヒト化 s c F v を、E L I S A により、マウス PD - L 1 への結合についてさらに分析した。簡潔には、マウス PD - L 1 F c 融合体 (Sino Biological、中国、カタログ番号50010-M03H、またはRnD Systems、米国、カタログ番号1019-B7-100) を、p H 7 . 2 の P B S 中で、5 m c g / m L または 1 m c g / m L の濃度で、4 で一晩、Maxisorp 96 ウェルマイクロプレートにコーティングした。p H 7 . 2 の P B S 中 1 % B S A、または p H 7 . 2 の P B S 中 1 % B S A を含む 5 % 脱脂粉乳でブロッキングした後、濃度を増加させて s c F v (0 . 0 0 1 6、0 . 0 0 8、0 . 0 4、0 . 2、1 . 0、および 5 . 0 m c g / m L、または 0 . 0 2、0 . 0 6、0 . 1 9、0 . 5 6、1 . 6 7、および 5 . 0 m c g / m L) をウェルに添加した。マウス PD - L 1 F c 融合体のコーティングの成功は、マウス PD - L 1 特異的抗体 (Sino Biological、中国、カタログ番号50010-M08H) を用いて確認した。s c F v はプロテイン L - H R P (Sigma-Aldrich、米国、カタログ番号P3226) により検出したが、全長 Ig G 対照抗体は H R P に結合したヤギ抗ウサギ Ig G (Southern Biotech、米国、カタログ番号4050-05) により検出した。T M B E L I S A 基質溶液 (eBioscience、米国、カタログ番号00-4201-56) を用いて発色させ、吸光度を 450 n m で測定した。S c F v 1 は、5 m c g / m L の濃度までマウス PD - L 1 と交差反応しなかった。1つの試験した s c F v は、マウス PD - L 1 に対する弱い交差反応性を示した。ヒト PD - L 1 結合 s c F v を、実施例 2 に示されているように、ヒト PD - L 1 の活性を中和するそれらの能力について、実施例 3 に示されているように、それらの安定性について、実施例 4 に示されているように、それらのヒト PD - L 1 に対する親和性について、実施例 5 に示されているように、それらの特異性について、さらにキャラクタリゼーションした。s c F v 1 を、実施例 6 に示されているように、天然型のヒト PD - L 1 への結合の分析によって、実施例 7 に示されているように、細胞から分泌された s c F v 1 の分析によって、実施例 8 に示されているように、インビボ有効性の測定によって、さらにキャラクタリゼーションした。Ig G フォーマットへの変換後、実施例 9 に示されているように、s c F v 1 に対応する抗体を、ヒト PD - L 1 とヒト PD - 1 との間の相互作用を阻害する能力によって、およびヒト PD - L 1 に対する親和性の分析によって、さらに分析した。

20

30

40

【0185】

実施例 2 - ヒト PD - L 1 の中和

26 の s c F v および 1 つの非結合 s c F v (s c F v 2) を、PD - 1 / PD - L 1 遮断アッセイにおいて、それらの PD - L 1 中和能力についてさらに試験した。このアッ

50

セイにおいて、ルシフェラーゼ活性はT細胞の活性によって促進される。PD-L1のPD-L1との相互作用は、阻害シグナルおよびルシフェラーゼ活性の低下を生じ、これは、PD-L1の阻害剤で細胞を処理することによって克服される。PD-L1発現CHO細胞(Promega、CS187103)を96ウェルマイクロプレートに播種した。濃度を増加させてscFvを添加し、プレートを37℃、5%CO₂で20分間インキュベートした。PD-1発現エフェクタージャーカット細胞(Promega、CS187105)を添加し、プレートを37℃、5%CO₂でさらに6時間インキュベートした。TCR/CD3活性化は、Bio-Glo Luciferase Assay System(Promega、G7941)による発光検出によって測定した。阻害曲線をプロットし、GraphPad Prism(登録商標)ソフトウェアバージョン6.05を用いてIC₅₀値を計算した。scFv1およびscFv2の結果を図1に示す。scFv1は、750pMのIC₅₀で免疫チェックポイント阻害シグナルを効果的に遮断した。非結合scFv2は、免疫チェックポイント阻害シグナルに対する効果を示さなかった。scFv1は、試験した27のscFvのうち最も高い効力を示した。最低効力のscFvのIC₅₀は、10mcg/mLまでの濃度範囲を用いて測定することができなかった。

10

【0186】

PD-L1のPD-1への結合を阻害するscFv1、非結合scFv2、および3つの他のscFvの能力を競合ELISAによって試験した。Maxisorp 96ウェルマイクロプレートに、rhPD-L1-Fc融合体(RnD Systems、米国、カタログ番号156-B7)をPBS中2mcg/mLの濃度で4℃で一晩コーティングした。プレートを、pH7.2のPBS中の1%BSAおよび0.05%Tween-20でブロッキングした。scFvの段階希釈液を調製し、11の1:3希釈液は1mcg/mLで始まり、これらをプレートに添加した。室温で1時間後、scFv希釈液の半分を除去し、ビオチン化PD-1-Fc融合体(BPS Bioscience、米国、カタログ番号71109)で15ng/mLの最終濃度で交換した。結合したPD-1-Fc融合体をストレプトアビジン-HRP(BD Pharmingen、米国、カタログ番号554060)で検出した。バックグラウンドレベルをPD-1の非存在下で測定した。ELISAは、TMB-ELISA基質溶液(eBioscience、米国、カタログ番号00-4201-56)を用いて発色させた。このアッセイにおいて、図2に示されているように、PD-L1がPD-1と相互作用する能力は、吸光シグナルを生じ、scFv1によって効果的に中和されるが、非結合scFv2によって中和されない。3つの他のscFvも、scFv1に匹敵する程度まで相互作用を中和した。

20

30

【0187】

PD-L1のCD80への結合を阻害するscFv1および非結合scFv2の能力を競合ELISAによって試験した。Maxisorp 96ウェルマイクロプレートに、rhCD80-His(RnD Systems、米国、カタログ番号9050-B1-100)をPBS中2mcg/mLの濃度で4℃で一晩コーティングした。プレートを、pH7.4のPBS中の1%BSAおよび0.05%Tween-20でブロッキングした。scFvの段階希釈液を、一定濃度の50nM rhPD-L1-Fc融合体(RnD Systems、米国、カタログ番号156-B7)を用いて調製し、11の1:3 scFv希釈液は1mMで始まるものであった。この混合物をCD80でコーティングしたプレートで室温で2時間インキュベートした。PD-L1のCD80への結合がないことに対応するバックグラウンドレベルは、PD-L1-Fcが存在しないscFv1の希釈系列を含めることによって測定した。結合したPD-L1-Fc融合体を、ヤギ抗ヒトIgG-Fc-HRP(Southern Biotech、米国、カタログ番号2048-05)で検出した。ELISAは、TMB-ELISA基質溶液(eBioscience、米国、カタログ番号00-4201-56)を用いて発色させた。このアッセイにおいて、図3に示されているように、PD-L1がCD80と相互作用する能力は、吸光シグナルを生じ、scFv1によってバックグラウンドレベルまで効果的に中和されるが、非結合scFv2によって中和されない。

40

【0188】

まとめると、これらの結果は、scFv1がPD-L1とPD-1およびCD80の両

50

方との相互作用を遮断することを示している。

【0189】

実施例3 - scFvの安定性

scFvの安定性に影響し得る2つの異なるプロセスを観察することができる。第一に、scFvは二量体化されやすく、その後オリゴマー化され、さらに凝集および沈殿することもよくある。第二に、より小さいフラグメントをもたらすscFvの分解は、時間が経つにつれて起こり得る。

【0190】

PBS pH 7.2中で製剤化されたscFv1および4種の他のscFvの安定性を、様々な温度条件下での保存時に調べた。scFvを1.5 mLポリプロピレンチューブ中で、4、22、37、および-20で10 mg/mL濃度で保存した。試料をSE-HPLCにより分析して、全ピーク面積に対するモノマー、ダイマー、および高分子量オリゴマーのレベル(%)を測定した。TOSOH TSKgel G2000 SWXLカラム、ジオール相、L x I.D. 30 cm x 7.8 mm、5 μm粒径(Sigma Aldrich、米国、カタログ番号08540)を使用した。10 mg/mLのscFv 5 μLをロードした。移動相としてPBS H 7.2を選択した。

10

【0191】

scFv1は、試験した5つのscFvのうち最も高い安定性であった。scFv1のSE-HPLC分析は、上記の実験条件において検出可能な低分子量分解生成物を示さなかった。4、22、および37で2週間保存すると、scFv1の二量体化または高分子量分子の形成は、わずかにしか観察されなかった。scFv1は、37で1または2週間保存した後、それぞれ最大1.8%および2.7%の二量体を形成した(表1)。

20

【0192】

【表1】

scFvs	モノマー含有量 (%)	
	7日目	14日目
scFv1, 10 mg/ml, 4° C	99.23	99.15
scFv1, 10 mg/ml, 22° C	99.07	98.91
scFv1, 10 mg/ml, 37° C	98.17	97.29

30

【0193】

scFv1の熱安定性も示差走査型蛍光定量法(DSF)によって評価した。PBS pH 7.2で製剤化された0.4 mg/mLのscFv1を、リアルタイムPCR装置(Corbett, Rotor-Gene)で、PBS pH 7.2中20 x SYPRO(登録商標) Orange(Sigma-Aldrich、米国、カタログ番号S5692、5000 x)の存在下で、30から95まで1/5秒の走査速度で加熱した。勾配運転中に蛍光値を測定した(励起波長470 nm;放射波長555 nm)。Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7.を用いて計算したscFv1の中間融解温度(Tm)は、81.5であった。

40

【0194】

タンパク質性生物製剤は、凝集および分解を引き起こし得る、製造、保存、および輸送中の凍結/融解ストレスにさらされることになり得る。凍結/融解サイクル中のscFv1の安定性を評価するために、1.5 mLのポリプロピレンチューブ中で10 mg/mLでPBS pH 7.2で製剤化した。バイアルを液体窒素中に1分間浸し、次いで室温の水浴中で5分間インキュベートした。3回、5回、7回、または10回の凍結/融解サイクルを行った。試料を16,100 x gで10分間遠心分離し、ペレットを廃棄した。上記のようにSE-HPLCにより上清を分析し、UV分光法によりタンパク質含有量を測定した。scFv1の実質的に100%は、10回の凍結/融解サイクル後にモノマーの

50

ままであり(表2)、タンパク質の損失または沈殿は観察されなかった。

【0195】

【表2】

凍結融解サイクル	モノマー含有量 (%)
0	99.3
3	99.3
5	99.3
7	99.3
10	99.3

10

【0196】

ヒト血清(Sigma-Aldrich、米国、カタログ番号H4522)中のs c F v 1の安定性を、10 mcg/mLで37℃で0、4、および20時間インキュベートした後、ELISAによって評価した。結合シグナルを、インキュベートしなかったpH7.4のPBS中のs c F v 1と比較した。簡潔には、rhPD-L1-Fc融合体(RnD Systems、米国、カタログ番号156-B7)を、PBS中1 mcg/mLの濃度で、4℃で一晩、Maxisorp 96ウェルマイクロプレートにコーティングした。1%BSAおよび0.05%Tween-20を含むpH7.4のPBSでブロッキングした後、2.5 mcg/mL~42 ng/mL血清/s c F v 1試料の1:3希釈系列をELISAプレートに2連で加えた。結合したs c F v 1を、プロテインL-HRP(Sigma-Aldrich、米国、カタログ番号P3226)で検出した。ELISAは、TMB-ELISA基質溶液(eBioscience、米国、カタログ番号00-4201-56)を用いて発色させた。図4に示されているように、37℃でヒト血清での20時間までのインキュベーション後にs c F v 1の結合活性の喪失はなかった。

20

【0197】

実施例4 - 可溶性PD-L1への結合

PD-L1-Fc融合体に対するs c F v 1および3つの他のs c F vの親和性を、オートサンプラー(Sapidyne Instruments、米国、5004)を含むKinExA 3200(Sapidyne Instruments、米国、カタログ番号5001)を用いる結合平衡除外法(Kinetic Exclusion Assay)(KinExA(登録商標))によって測定した。KinExA(登録商標)は、溶液中の未改変分子間の平衡結合親和性および動態を測定する。測定は、溶液中の対応する結合パートナーの濃度を測定するためのプローブとしてのみ作用するように、固相上に1つの相互作用パートナーを固定化することを必要とする。ここで、30 mcg/mLの濃度で、ポリ(メチルメタクリレート)(PMA)ビーズ(440176, Sapidyne Instruments Inc.)上にPD-L1-Fc融合体(RnD Systems、米国、カタログ番号156-B7)を固定化した。0.02%NaN₃を含むpH7.4のPBSをランニングバッファーとして使用した。PD-L1-Fc融合体に対するs c F vの親和性は、概して、PD-L1-Fc融合体の2倍希釈系列を一定量のs c F vに対して滴定した2つの曲線のセットを用いて求めた。各データ点について2つの測定値を準備した。s c F v 1については、第1の曲線において、5 nM PD-L1-Fc融合体から始まる、11種類の異なるPD-L1-Fc融合体濃度で、20 pM s c F v 1をインキュベートした。これらの混合物を5時間インキュベートした。第2の曲線において、2.5 nM PD-L1-Fc融合体から始まる、12種類の異なるPD-L1-Fc融合体濃度で、10 pM s c F v 1をインキュベートした。これらの混合物を9時間インキュベートした。これらの混合物中に存在する結合していないs c F vの量を検出するために、試料を固定されたPD-L1-Fc融合体を含む固相に0.25 mL/分の流速でさらした。次いで、250 ng/mLのビオチン化プロテインL(M00097, GenScript)0.5 mL、続いて250 ng/mLストレプトアビジンDyLight 650コンジュゲート(Jackson ImmunoResearch)0.5 mLをそれぞれ流速0.25 mL/分で注入することにより、捕捉されたs c F v 1を検出した。全ての工程は室温で行った。平衡試料中の遊離s c F v 1の濃度に正比例する蛍光シグナル

30

40

50

は、電圧信号に変換される。この電圧信号を用いて、KinExA（登録商標）Proソフトウェアバージョン4.1.9または4.2.10の「n曲線分析」を使用して（図5）、オプション「分析濃度基準としての滴定液」を用いて、s c F vの K_D 値および活性を計算する。s c F v 1について計算された K_D 値は8.8 pMであった。他のs c F vについて計算された K_D 値は、12 ~ 92 pMの範囲であった。

【0198】

実施例5 - s c F vの選択性

他の種からのPD-L1に対するs c F v 1およびs c F v 3の交差反応性をELISAによって測定した。ヒト（RnD Systems、米国、カタログ番号156-B7）、ラット（Sino Biological、中国、カタログ番号80450-R02H）、またはサル（Sino Biological、中国、カタログ番号90251-C02H）由来のPD-L1 Fc融合体を、Maxisorp 96ウェルマイクロプレートに、pH 7.2のPBS中1 mcg/mLの濃度で、4で一晚コーティングした。プレートを、pH 7.2のPBS中1% BSAおよび0.5% Tween-20でブロッキングした。1 mcg/mL、333 ng/mL、および111 ng/mLの濃度でs c F vの段階希釈液を調製し、プレートを添加した。陰性対照として、s c F vを含まないPBSを用い、陽性対照として、1 mcg/mLのマウス抗ヒトPD-L1抗体（BioLegend、米国、カタログ番号329716）またはビオチン化rhPD-L1 Fc融合体（BPS Bioscience、米国、カタログ番号71109）を含めた。結合したs c F vを、プロテインL-HRP（Sigma-Aldrich、米国、カタログ番号P3226）で検出し、結合したマウス抗ヒトPD-L1抗体を、ヤギ抗マウスIgG-HRP（Southern Biotech、米国、カタログ番号1033-01）で検出し、結合したビオチン化rhPD-L1 Fc融合体をストレプトアビジン-HRP（BD Pharmingen、米国、カタログ番号554060）で検出した。TMB ELISA基質溶液（eBioscience、米国、カタログ番号00-4201-56）を用いて発色させた。結果は、s c F v 1およびs c F v 3がヒトおよびサルPD-L1に特異的に結合するが、ラットPD-L1には特異的に結合しないことを示した（図6）。

【0199】

PD-L1と配列類似性を共有する組み換えヒトタンパク質に対するs c F v 1の交差反応性をELISAにより測定した。rhPD-L1 Fc融合体（RnD Systems、米国、カタログ番号156-B7）、rhPD-L2 Fc融合体（RnD Systems、米国、カタログ番号1224-PL）、またはrhB7-H3 Fc融合体（RnD Systems、米国、カタログ番号1027-B3）を、Maxisorp 96ウェルマイクロプレートに、pH 7.2のPBS中1 mcg/mLの濃度で、4で一晚コーティングした。プレートを、pH 7.2のPBS中1% BSAおよび0.5% Tween-20でブロッキングした。5、1、および0.2 mcg/mLの濃度でs c F vの段階希釈液を調製し、プレートを添加した。陰性対照として、非結合s c F v 2を用い、陽性対照として、5、1、および0.2 mcg/mLのマウス抗ヒトB7-H3抗体（RnD Systems、米国、カタログ番号MAB1027）または30および15 ng/mLのビオチン化rhPD-L1 Fc融合体（BPS Bioscience、米国、カタログ番号71109）を含めた。結合したs c F vを、プロテインL-HRP（Sigma-Aldrich、米国、カタログ番号P3226）で検出し、結合したマウス抗ヒトB7-H3抗体を、ヤギ抗マウスIgG-HRP（Southern Biotech、米国、カタログ番号1033-01）で検出し、結合したビオチン化rhPD-L1 Fc融合体をストレプトアビジン-HRP（BD Pharmingen、米国、カタログ番号554060）で検出した。TMB ELISA基質溶液（eBioscience、米国、カタログ番号00-4201-56）を用いて発色させた。結果は、s c F v 1がヒトPD-L1に特異的に結合し、ヒトPD-L2またはB7-H3に対しては交差反応性がないことを示した。

【0200】

サルPD-L1に対するs c F v 1の交差反応性を、KinExA（登録商標）を用いてさらに調べた。方法は、PMMAPeptideを20 mcg/mLのサルPD-L1 Fc融合体（Sino Biological、中国、カタログ番号90251-C02H）でコーティングしたことと、親和性は、サルPD-L1 Fc融合体の2倍希釈系列を一定量のs c F vに対して滴定した2

10

20

30

40

50

つの曲線のセットを用いて求めたことを除いて、実施例4に記載した通りであった。第1の曲線において、2.5 nM PD-L1 Fc融合体から始まる、2回の測定での12種類の異なるPD-L1 Fc融合体濃度で、50 pM scFv1をインキュベートした。これらの混合物を6時間インキュベートした。第2の曲線において、1 nM PD-L1 Fc融合体から始まる、12種類の異なるPD-L1 Fc融合体濃度で、10 pM scFv1をインキュベートした。これらの混合物を16時間インキュベートして、これらの混合物中に存在する結合していないscFvの量を検出し、試料を固定されたPD-L1 Fc融合体を含む固相に0.25 ml/分の流速でさらした。全ての工程は室温で行った。KinExA(登録商標)Proソフトウェアバージョン4.2.10の「n曲線分析」を用いて、オプション「分析濃度基準としての滴定液」を用いてscFv1について計算した K_D 値は、3.3 pMであった(図7)。結果は、scFv1が、ヒトPD-L1に対する結合よりも約2.7倍強い親和性でサルPD-L1に結合することを実証する。

10

【0201】

実施例6 - 天然型のPD-L1への結合

腫瘍細胞の表面上に発現された天然型のPD-L1に結合するscFv1および非結合対照scFvであるscFv2の能力を、細胞外FACS解析によって測定した。5 mcg/mLまたは1 mcg/mLのscFvまたは抗ヒトPD-L1マウスIgG2 (BioLegend、米国、カタログ番号329716)を用いて氷上で30分間ES-2細胞(ATCC、米国、カタログ番号CRL-1978)を染色した。結合したscFvを、ビオチン化プロテインL (Pierce、カタログ番号PI-29997)で染色し、続いてストレプトアビジン-フィコエリトリン(BD Pharmingen、米国、カタログ番号554061)で染色することにより検出した。洗浄後、ヨウ化プロピジウムを用いて死細胞を除き、細胞をFACS Aria III (BD Biosciences)で分析した。蛍光強度の平均および中央値を表3に示す。結果は、scFv1が、ES-2細胞の表面上に発現された天然型のPD-L1を特異的に認識することができることを実証する。

20

【0202】

【表3】

試料	蛍光強度の平均	蛍光強度の中央値
無染色ES-2細胞	62	50
陽性対照IgG	1172	948
scFv1, 5 mcg/mL	2739	2478
scFv1, 1 mcg/mL	2605	2338
scFv2, 5 mcg/mL	93	78

30

【0203】

細胞表面PD-L1へのscFv1の結合を、KinExA(登録商標)を用いてさらに調べた。方法は、一定量のscFv1(50 pM)に対して2回滴定したES-2細胞の(mLあたり2640万から始まる)12の2倍段階希釈液を用いて親和性を求めたことを除いて、実施例4に記載した通りであった。これらの混合物を5時間インキュベートし、3800 × gで10分間遠心分離し、上清を新しいチューブに移した。scFvの量を検出するために、試料を固定されたPD-L1 Fc融合体を含む固相に0.25 ml/分の流速でさらした。全ての工程は室温で行った。KinExA(登録商標)Proソフトウェアを用いた分析の結果、細胞表面PD-L1へのscFv1の結合について計算された K_D 値は12.8 pMであった(図8)。

40

【0204】

結果は、scFv1が、腫瘍細胞の表面上に発現された天然型のPD-L1に結合することを実証する。

【0205】

50

実施例 7 - s c F v 分泌

大腸菌細胞により封入体中に産生された s c F v 1 の特性を哺乳類細胞から分泌された s c F v 1 の特性と比較するために、s c F v 1 を (最初 ATCC から得、懸濁培養で無血清増殖に適合させた) 懸濁液適合 CHO K 1 細胞で Evitria (スイスのチューリッヒ) により産生した。既知組成の動物成分を含まない無血清培地で種を増殖させた。細胞を特注の専売のトランスフェクション試薬でトランスフェクションし、トランスフェクション後、動物成分を含まない無血清培地で細胞を増殖させた。S c F v 1 をプロテイン L アフィニティークロマトグラフィー、続いてサイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。

【 0 2 0 6 】

CHO 細胞および大腸菌細胞発現 s c F v 1 の PD - L 1 中和能を、PD - 1 / PD - L 1 遮断アッセイで比較した。このアッセイにおいて、ルシフェラーゼ活性は T 細胞の活性によって促進される。PD - L 1 の PD - 1 との相互作用は、阻害シグナルおよびルシフェラーゼ活性の低下を生じ、これは、PD - L 1 の阻害剤で細胞を処理することによって克服される。PD - L 1 発現 CHO 細胞 (Promega, CS187103) を 9 6 ウェルマイクロプレートに播種した。濃度を増加させて s c F v を添加し、プレートを 37 °C、5 % CO₂ で 2 0 分間インキュベートした。PD - 1 発現エフェクタージャーカット細胞 (Promega, CS187105) を添加し、プレートを 37 °C、5 % CO₂ でさらに 6 時間インキュベートした。TCR / CD 3 活性化は、Bio-Glo Luciferase Assay System (Promega, G7941) による発光検出によって測定した。阻害曲線をプロットし、GraphPad Prism (登録商標) ソフトウェア バージョン 7 . 0 2 を用いて IC₅₀ 値を計算した。CHO 細胞発現 s c F v 1、大腸菌細胞発現 s c F v 1、および s c F v 2 の結果を図 9 に示す。CHO 細胞発現 s c F v 1 は、6 0 2 p M の IC₅₀ で PD - L 1 媒介性阻害シグナルを効果的に遮断した。大腸菌細胞発現 s c F v 1 は、8 7 4 p M の IC₅₀ で免疫チェックポイント阻害シグナルを効果的に遮断した。非結合 s c F v 2 は、免疫チェックポイント阻害シグナルに対する効果を示さなかった。

【 0 2 0 7 】

実施例 8 - インビボ活性

5 ~ 6 週齢のメス NOG マウス (中国の北京の Vital River Laboratory Animal Technology Co.) の HCC 8 2 7 ヒト肺癌モデルを使用して、s c F v 1 のインビボ有効性を調べた。末梢血単核細胞 (P B M C) を、標準的な手順を用いる密度勾配遠心分離によって 4 人の健康なヒトドナーの血液から単離した。遠心分離後、細胞を P B S 溶液で洗浄し、P B S に再懸濁した。各ドナーからの P B M C を、HCC 8 2 7 腫瘍細胞接種の 3 日前に、0 . 1 m l の P B S 中 5×10^6 細胞の腹腔内注射により、マウスに移入した。次いで、各マウスに、0 . 1 m l の P B S 中 5×10^6 の HCC 8 2 7 腫瘍細胞を右脇腹領域に皮下接種した。腫瘍細胞接種の日付を 0 日目とした。マウスを 1 日目に無作為化し、1 5 m g / k g の s c F v 1 もしくは非結合 s c F v 2 の腹腔内注射で 1 日 2 回、または 5 m g / k g の陽性対照 I g G 抗体 (M P D L 3 2 8 0 A の類似体) の静脈内注射で毎週 2 回、治療した。腫瘍容積を少なくとも週に 2 回測定し、式 $V = 0 . 5 a \times b^2$ を用いて mm³ で表した。ここで、a および b はそれぞれ腫瘍の長さおよび幅である。腫瘍増殖阻害 (T G I) は、抗腫瘍効果の指標であり、 $T G I (\%) = 1 0 0 \times (1 - (\text{治療群の平均腫瘍容積}) / (\text{s c F v 2 群の平均腫瘍容積}))$ として表される。1 4 日目に、最大の腫瘍増殖阻害を示した 2 人のドナー由来の P B M C を有する動物を、研究の継続のために選択した。2 1 日目に、全ての動物を屠殺した。群の大きさは、ドナーあたりの群あたり n = 3 であり、2 人の選択されたドナーでの合計の群の大きさは n = 6 であった。対照に対する治療の比 (T / C) は、非結合 s c F v 2 対照群と比較した s c F v 1 または陽性対照 I g G 治療群の腫瘍容積の中央値の比として、式 $T / C (\%) = (\text{治療群の腫瘍容積の中央値} / \text{対照群の腫瘍容積の中央値}) \times 1 0 0$ を用いて、計算した。

【 0 2 0 8 】

選択された 2 人のドナー (n = 6) の T / C および T G I を図 1 0 に示す。s c F v 1 および陽性対照 I g G 抗体の有効性を 2 1 日目に評価した (表 4)。6 匹の s c F v 1 治

10

20

30

40

50

療マウスのうち3匹は腫瘍がなく、scFv1で治療した動物のTGIは47%であった。T/C比は28%であった。National Cancer Institute基準によるT/C%比の有効性基準は42%である。まとめると、このデータはscFv1のインビボ有効性を実証する。

【0209】

【表4】

治療	TGI	T/C	腫瘍のないマウス
scFv2, 15 mg/kg, 腹腔内 1日2回	適用不可	適用不可	0/6
scFv1, 15 mg/kg, 腹腔内 1日2回	47%	28%	3/6
陽性対照IgG, 5mg/kg, 静脈内 毎週2回	33%	34%	2/6

10

【0210】

実施例9 - IgGフォーマットにおけるキャラクタリゼーション

ScFv1を、配列番号20の重鎖および配列番号24の軽鎖を有するIgGフォーマット(IgG__1)に再フォーマットした。米国第2010/0203056号に記載のYW243.55.S70の公表された配列(配列番号21の重鎖および配列番号25の軽鎖を有するIgG__2)、国際公開第2011/066389/A1号に記載の2.14H9OPT(配列番号22の重鎖および配列番号26の軽鎖を有するIgG__3)、ならびに国際公開第2015/112805A1号に記載のH2M8314N(配列番号23の重鎖および配列番号27の軽鎖を有するIgG__4)に対応する抗体も調製した。合成は、Evitria(スイスのチューリッヒ)によって行われた。最初にATCCから受け取り、懸濁培養で無血清増殖に適合させた懸濁液適合CHO K1細胞を産生に使用した。IgG抗体をプロテインAクロマトグラフィー、続いてサイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。

20

【0211】

IgG抗体は、ヒトPD-L1とヒトPD-1との相互作用を阻害する抗体の能力を調べるにより最初にキャラクタリゼーションした。Maxisorp 96ウェルマイクロプレートに、rhPD-L1Fc融合体(RnD Systems、米国、カタログ番号156-B7)をPBS中2mcg/mLの濃度で4で一晚コーティングした。プレートを、pH7.4のPBS中の1%BSAおよび0.05%Tween-20でブロッキングした。IgGの段階希釈液を調製し、11の1:3希釈液は1mcg/mLで始まり、これらをプレートに添加した。室温で30分後、IgG希釈液の半分を除去し、ビオチン化PD-1Fc融合体(BPS Bioscience、米国、カタログ番号71109)で15ng/mLの最終濃度で交換した。結合したPD-1Fc融合体をストレプトアビジン-HRP(BD Pharmingen、米国、カタログ番号554060)で検出した。ELISAは、TMB ELISA基質溶液(eBioscience、米国、カタログ番号00-4201-56)を用いて発色させた。非結合scFv2を対照として含めた。このアッセイにおいて、図11に示されているように、PD-L1がPD-1と相互作用する能力は、吸光シグナルを生じ、IgG1~4によって効果的に中和されるが、非結合scFv2によって中和されない。試験された抗体の阻害プロファイルは2つの群に分かれ、より強力な効力のIgG__1およびIgG__2はIC50値がそれぞれ327pMおよび267pMであった。より弱い効力のIgG__3およびIgG__4は、それぞれ560pMおよび606pMのIC50値を有した。より強い効力を有するIgGを、結合親和性のキャラクタリゼーションに進ませた。

30

40

【0212】

ヒトPD-L1へのIgG__1およびIgG__2の結合をKinExA(登録商標)を用いて

50

調べた。公表されたデータは、IgG₂のヒトPD-L1への結合に利用可能であるが、このデータは、通常、固体表面上に1つの相互作用パートナーを固定化することを伴う技術に基づく。これらの手法は、溶液における相互作用条件を反映しない場合があり、また、非常に緊密な相互作用を調べる際の感度の問題を抱えている。したがって、抗体の結合を比較するために、溶液をベースとする方法を選択した。結合活性の測定を回避するために、FcタグのないPD-L1-Hisを相互作用パートナーとして選択した。方法は、親和性は、ヒトPD-L1-His (BioVision、米国、カタログ番号7429)の2倍希釈系列を一定量のscFvに対して滴定した2つの曲線のセットを用いて求めたことを除いて、実施例4に記載した通りであった。両方のIgGについて、第1の曲線において、5 nM PD-L1-Hisから始まる、2回の測定での12種類の異なるPD-L1 Fc融合体濃度で、100 pMのIgGをインキュベートした。これらの混合物を5時間インキュベートした。500マイクロリットルの各試料をヒトPD-L1 Fc融合体でコーティングしたビーズに噴射した。IgG₁については、第2の曲線において、5 nM PD-L1 Hisから始まる、12種類の異なるPD-L1-His濃度で、10 pMのIgGをインキュベートした。これらの混合物を10時間インキュベートした。5 mlの各試料をPD-L1 Fc融合体でコーティングしたPMMAビーズに噴射した。IgG₂については、第2の曲線において、1.25 nM PD-L1 Hisから始まる、12種類の異なるPD-L1-His濃度で、20 pMのIgGをインキュベートした。これらの混合物を10時間インキュベートした。5 mlの各試料をPD-L1 Fc融合体でコーティングしたPMMAビーズに噴射した。IgGについて計算されたK_D値は、表5に報告されており、n曲線分析は図12に示されている。

10

20

【0213】

結果は、IgG₁ (すなわちIgGフォーマットに変換されたscFv₁)が、PD-L1に対するscFv₁の親和性よりも約3倍強い親和性でPD-L1に結合することを実証する。IgG₂は、IgG₁に比べてPD-L1に対する親和性が弱い。

【0214】

【表5】

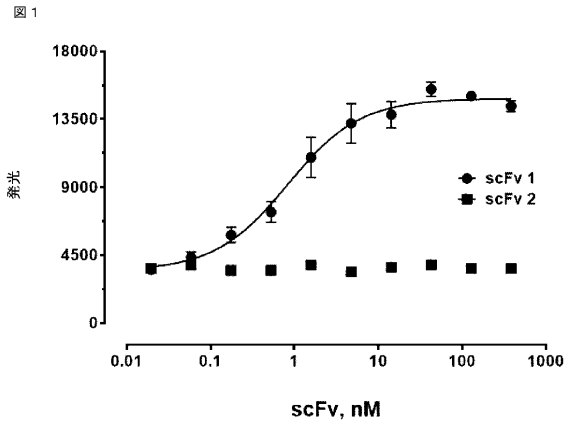
抗体	K _D (pM)
IgG ₁	2.77
IgG ₂	10.06

30

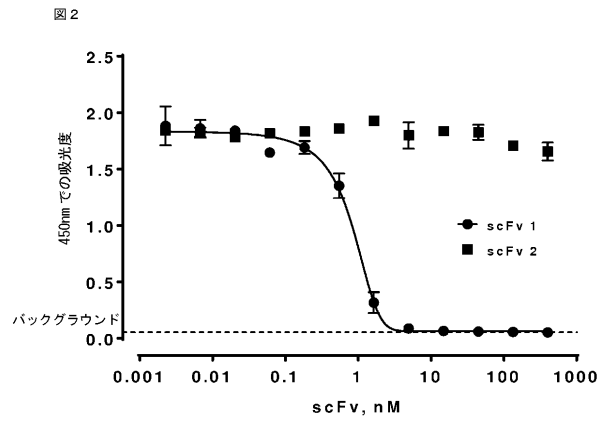
【0215】

本発明の現時点で好適な実施形態が示され記載されているが、本発明はこれらに限定されるものではなく、以下の特許請求の範囲内で様々に具体化され、実施され得ることを理解されたい。本発明の多くの修正および代替の実施形態が当業者には容易に明らかとなるので、この説明は、単に例示的なものとして解釈されるべきであり、当業者に本発明を実施するための最良の形態を教示することを目的とするものである。したがって、全ての好適な修正および均等物は、以下の特許請求の範囲に含まれるとみなされ得る。

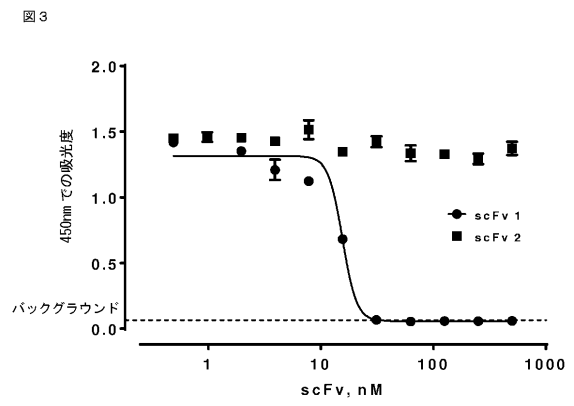
【 図 1 】



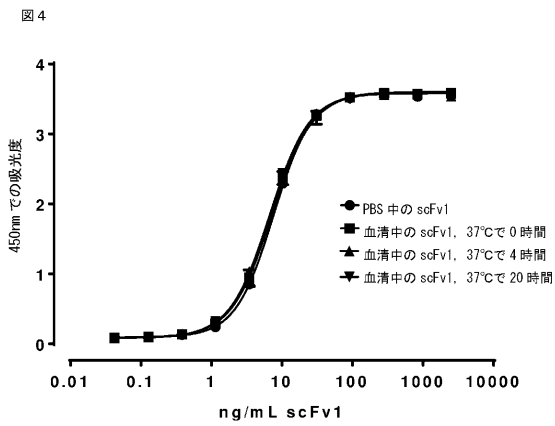
【 図 2 】



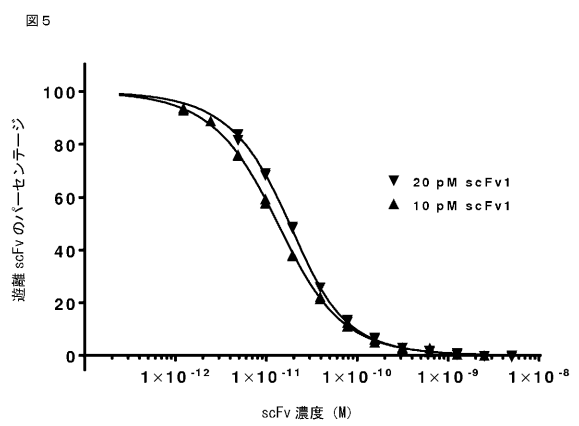
【 図 3 】



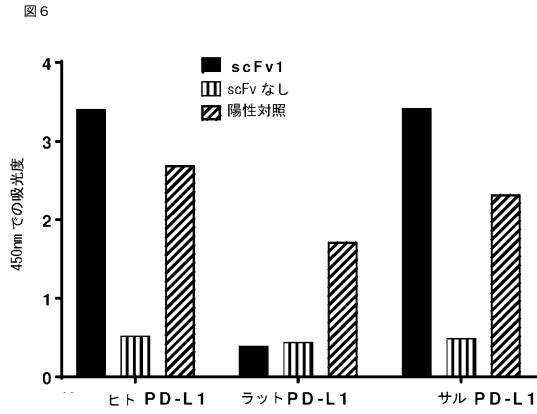
【 図 4 】



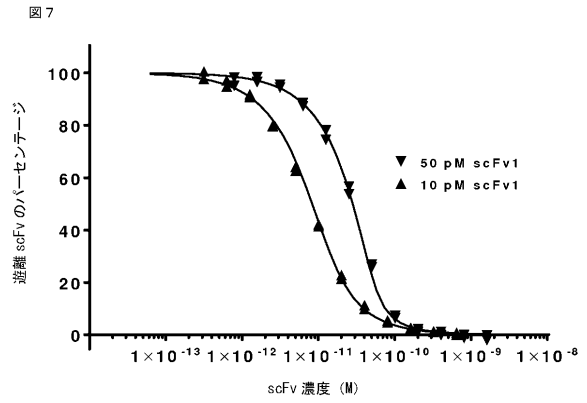
【 図 5 】



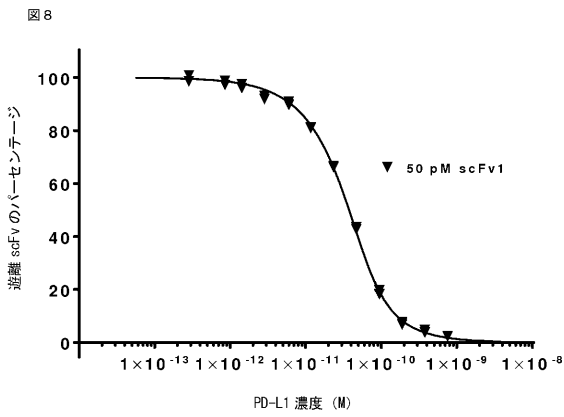
【 図 6 】



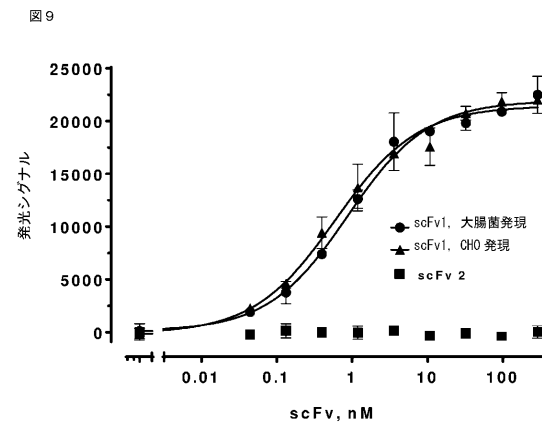
【 図 7 】



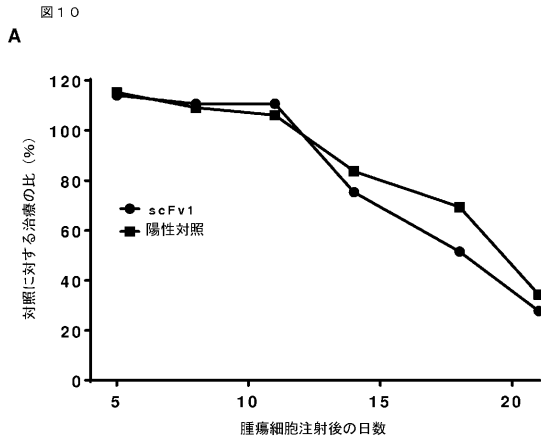
【 図 8 】



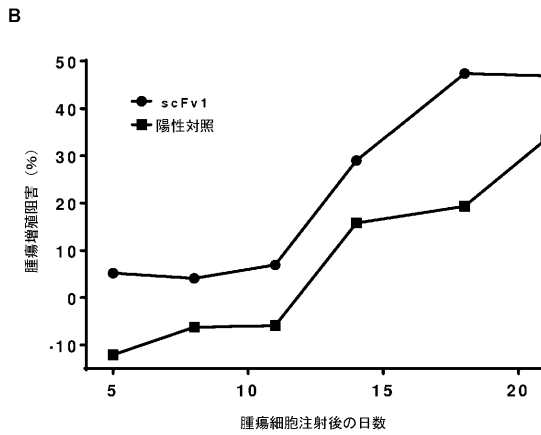
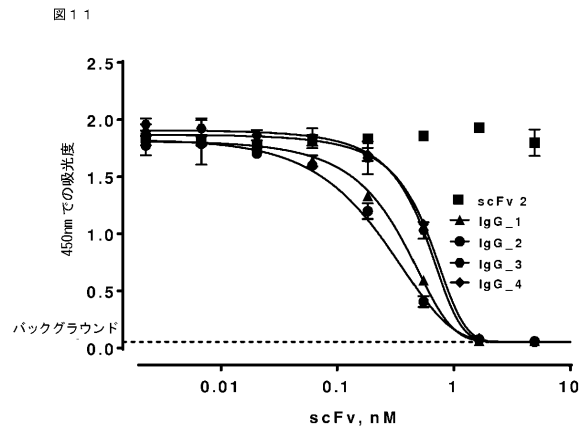
【 図 9 】



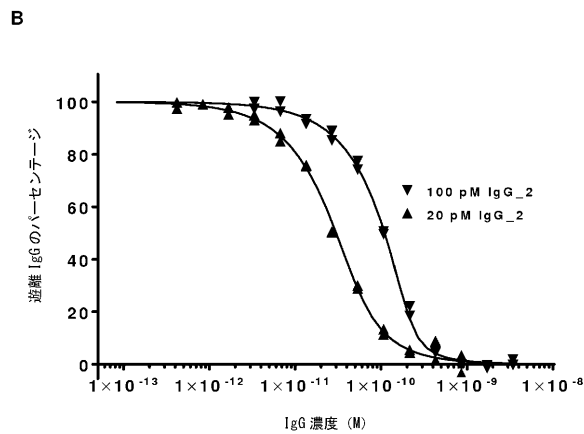
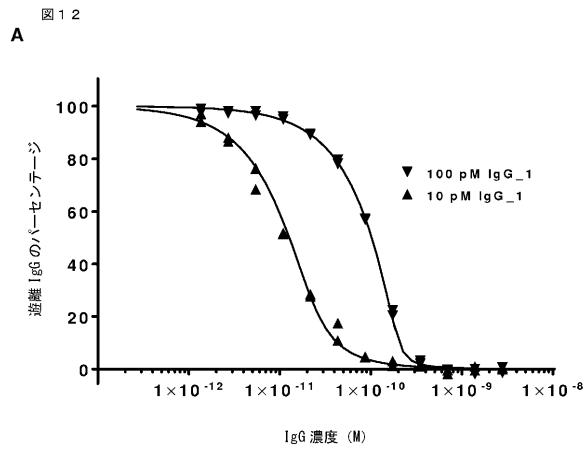
【 図 1 0 】



【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



【配列表】

2019515646000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2017/054367

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. C07K16/28	A61K35/17	C12N5/10 A61K39/395
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K C12N		
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) EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/077634 A1 (GENENTECH INC [US]; IRVING BRYAN [US]; CHEUNG JEANNE [US]; CHIU HENRY) 8 July 2010 (2010-07-08) cited in the application page 2, line 18 - page 9, line 11 page 43, line 29 - page 46, line 13 page 56, line 23 - page 57, line 10 page 71, line 30 - page 74, line 18 page 92, line 33 - page 93, line 11 page 98, line 33 - page 99, line 16 page 99, line 20 - page 102, line 35 page 105, line 6 - page 108, line 9 figure 10; example 8 claims 13,48-68 ----- -/--	1-11,13, 15-34, 40-42
<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		*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
E earlier application or patent but published on or after the international filing date		*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
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)		*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
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*Z* document member of the same patent family
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 24 May 2017		Date of mailing of the international search report 02/06/2017
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Page, Michael

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2017/054367

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2015/203580 A1 (PAPADOPOULOS NICHOLAS J [US] ET AL) 23 July 2015 (2015-07-23) paragraphs [0007] - [0009], [0024] - [0042], [0044] - [0049], [0087] - [0096], [0115], [0116]; claims 43-47,55-57; examples 3,4,9 paragraphs [0148], [0149] - [0152], [0158], [0166], [0181] - [0184] -----	1-42
X	WO 2011/066389 A1 (MEDIMMUNE LTD [GB]; ASTRAZENECA AB [SE]; AMGEN BRITISH COLUMBIA [CA];) 3 June 2011 (2011-06-03) cited in the application page 3, line 23 - page 42, line 7 page 54, line 23 - page 84, line 23 claims 1,21,31 -----	1-42
X	US 2016/009805 A1 (KOWANETZ MARCIN [US] ET AL) 14 January 2016 (2016-01-14) paragraphs [0002], [0005], [0013] - [0017], [0107], [0108], [0110], [0142], [0154], [0271] paragraphs [0285], [0291] - [0307] -----	1-42
A	BUTTE M J ET AL: "Interaction of human PD-L1 and B7-1", MOLECULAR IMMUNOLOGY, PERGAMON, GB, vol. 45, no. 13, 1 August 2008 (2008-08-01), pages 3567-3572, XP022849591, ISSN: 0161-5890, DOI: 10.1016/J.MOLIMM.2008.05.014 [retrieved on 2008-06-27] the whole document -----	1-42

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/054367

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
WO 2010077634 A1	08-07-2010	AR 074563 A1	26-01-2011		
		AU 2009333580 A1	08-07-2010		
		AU 2016203867 A1	30-06-2016		
		BR P10917592 A2	01-12-2015		
		CA 2740806 A1	08-07-2010		
		CN 102245640 A	16-11-2011		
		CN 104479018 A	01-04-2015		
		CO 6390023 A2	29-02-2012		
		CR 20110316 A	18-07-2011		
		EC SP11011115 A	29-07-2011		
		EP 2376535 A1	19-10-2011		
		HK 1163130 A1	17-07-2015		
		HK 1207387 A1	29-01-2016		
		IL 213353 A	30-04-2017		
		JP 5681638 B2	11-03-2015		
		JP 2012511329 A	24-05-2012		
		JP 2015091260 A	14-05-2015		
		KR 20110092300 A	17-08-2011		
		MA 32948 B1	02-01-2012		
		MX 342591 B	05-10-2016		
		NZ 592119 A	26-07-2013		
		PE 03412012 A1	24-04-2012		
		PE 17222014 A1	02-12-2014		
		RU 2011128399 A	20-01-2013		
		SG 172059 A1	28-07-2011		
		SG 196798 A1	13-02-2014		
		TW 201032822 A	16-09-2010		
		TW 201417828 A	16-05-2014		
		UA 109108 C2	27-07-2015		
		US 2010203056 A1	12-08-2010		
		US 2013045200 A1	21-02-2013		
		US 2013045201 A1	21-02-2013		
		US 2013045202 A1	21-02-2013		
		US 2014065135 A1	06-03-2014		
		US 2015322153 A1	12-11-2015		
		US 2016222117 A1	04-08-2016		
		US 2017107287 A1	20-04-2017		
		WO 2010077634 A1	08-07-2010		
		ZA 201102417 B	26-06-2013		
		US 2015203580 A1	23-07-2015	AU 2015209238 A1	21-07-2016
				CA 2937343 A1	30-07-2015
CN 106103482 A	09-11-2016				
EA 201691487 A1	30-12-2016				
EP 3097120 A1	30-11-2016				
JP 2017507650 A	23-03-2017				
KR 20160128309 A	07-11-2016				
PH 12016501384 A1	15-08-2016				
SG 11201605908W A	30-08-2016				
TW 201620936 A	16-06-2016				
US 2015203580 A1	23-07-2015				
UY 35965 A	31-08-2015				
WO 2015112805 A1	30-07-2015				
WO 2011066389 A1	03-06-2011	AU 2010324757 A1	24-05-2012		
		AU 2016203758 A1	23-06-2016		
		CA 2778714 A1	03-06-2011		
		CN 102918058 A	06-02-2013		

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/054367

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		CN 104961829 A	07-10-2015
		EP 2504364 A1	03-10-2012
		IL 219876 A	29-02-2016
		JP 5837504 B2	24-12-2015
		JP 6047646 B2	21-12-2016
		JP 2013511959 A	11-04-2013
		JP 2016117705 A	30-06-2016
		JP 2017070294 A	13-04-2017
		KR 20120101691 A	14-09-2012
		KR 20150132594 A	25-11-2015
		NZ 599405 A	26-09-2014
		NZ 628923 A	26-02-2016
		RU 2012126138 A	27-12-2013
		US 2013034559 A1	07-02-2013
		US 2014356353 A1	04-12-2014
		US 2017137522 A1	18-05-2017
		WO 2011066389 A1	03-06-2011

US 2016009805	A1	14-01-2016	AU 2015288232 A1
			CA 2954868 A1
			CN 106604933 A
			EP 3166974 A1
			KR 20170032350 A
			SG 11201700207W A
			US 2016009805 A1
			WO 2016007235 A1

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	4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C 0 8 7
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 H 0 4 5
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
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 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 47/68	
A 6 1 K 35/12 (2015.01)	A 6 1 K 35/12	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 K 8/64 (2006.01)	A 6 1 K 8/64	
A 6 1 K 8/98 (2006.01)	A 6 1 K 8/98	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	A

(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

(72)発明者 ドロステ, ミリアム

スイス国 8 9 5 3 ディーティコン、グリューナウシュトラッセ 1 4

(72)発明者 フィリップス, ダグラス

スイス国 8 9 5 2 シュリーレン、ワギシュトラッセ 2 7 セル メディカ スイツァラン
ド アーゲー内

F ターム(参考) 4B064 AG27 BJ12 CA19 CA50 CC24 CC30 CD12 CD20 CD30 DA01
4B065 AB01 BA02 CA23 CA25 CA44 CA46 CA50
4C076 AA95 BB01 BB13 BB15 BB16 BB22 BB24 BB25 BB26 BB28
BB29 BB30 BB31 CC07 CC11 CC27 CC31 EE41 EE59 FF36
4C083 AA071 CC50 EE01 EE03
4C084 AA13 MA02 MA52 MA55 MA56 MA57 MA58 MA59 MA60 MA63
MA65 NA02 NA03 NA13 ZA361 ZB051 ZB081 ZB261 ZB271 ZB351
ZC751
4C085 AA14 BB31 BB36 BB41 BB42 BB43 CC23 DD62 EE03 GG02
GG03 GG04 GG05 GG08
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA52 MA55 MA56 MA57 MA58 MA59
MA60 MA63 MA65 NA02 NA03 NA13 ZA36 ZB05 ZB08 ZB26

ZB27 ZB31 ZC75
4H045 AA11 AA20 AA30 BA40 BA53 BA57 CA40 DA76 EA20 FA74

专利名称(译)	PD-L1的结合成员		
公开(公告)号	JP2019515646A	公开(公告)日	2019-06-13
申请号	JP2018544554	申请日	2017-02-24
[标]申请(专利权)人(译)	细胞药物瑞士股份公司		
[标]发明人	フィリップスダグラス		
发明人	シャムシーブ,アディジャパー クレッチュマー,タイタス ドロステ,ミリアム フィリップス,ダグラス		
IPC分类号	C12N15/13 C07K16/28 C07K14/47 C12N15/63 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/06 A61P31/00 A61P31/04 A61P9/00 A61K39/395 A61K48 /00 A61K47/68 A61K35/12 A61P43/00 A61K35/76 A61K8/64 A61K8/98 G01N33/53 G01N33/574		
CPC分类号	C07K16/2827 A61K35/17 A61K39/0011 A61K39/39 A61K39/39591 A61K45/06 A61K2039/505 A61K2039/5156 A61K2039/545 A61P35/00 C07K14/705 C07K2317/24 C07K2317/33 C07K2317/52 C07K2317/622 C07K2317/73 C07K2317/76 C07K2317/92 C07K2317/94 C07K2319/03 G01N33/6872 G01N2333/70532		
FI分类号	C12N15/13 C07K16/28.ZNA C07K14/47 C12N15/63 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/06 A61P31/00 A61P31/04 A61P9/00 A61K39 /395.T A61K48/00 A61K47/68 A61K35/12 A61P43/00.121 A61K35/76 A61K8/64 A61K8/98 G01N33/53. D G01N33/574.A		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/BJ12 4B064/CA19 4B064/CA50 4B064/CC24 4B064/CC30 4B064/CD12 4B064 /CD20 4B064/CD30 4B064/DA01 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA23 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4B065/CA50 4C076/AA95 4C076/BB01 4C076/BB13 4C076/BB15 4C076/BB16 4C076 /BB22 4C076/BB24 4C076/BB25 4C076/BB26 4C076/BB28 4C076/BB29 4C076/BB30 4C076/BB31 4C076/CC07 4C076/CC11 4C076/CC27 4C076/CC31 4C076/EE41 4C076/EE59 4C076/FF36 4C083 /AA071 4C083/CC50 4C083/EE01 4C083/EE03 4C084/AA13 4C084/MA02 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084/MA56 4C084/MA57 4C084/MA58 4C084/MA59 4C084/MA60 4C084/MA63 4C084/MA65 4C084 /NA02 4C084/NA03 4C084/NA13 4C084/ZA361 4C084/ZB051 4C084/ZB081 4C084/ZB261 4C084 /ZB271 4C084/ZB351 4C084/ZC751 4C085/AA14 4C085/BB31 4C085/BB36 4C085/BB41 4C085/BB42 4C085/BB43 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/EE03 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085 /GG05 4C085/GG08 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/MA52 4C087/MA55 4C087/MA56 4C087/MA57 4C087/MA58 4C087/MA59 4C087/MA60 4C087/MA63 4C087/MA65 4C087 /NA02 4C087/NA03 4C087/NA13 4C087/ZA36 4C087/ZB05 4C087/ZB08 4C087/ZB26 4C087/ZB27 4C087/ZB31 4C087/ZC75 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA40 4H045/BA53 4H045 /BA57 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/FA74		
优先权	2016020057 2016-02-25 EP		
其他公开文献	JP2019515646A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及抗PD-L1结合成员，尤其涉及高度稳定和可溶的单价强PD-L1结合抗体片段。结合成员可用于治疗和诊断癌症和炎症疾病。还提供了相关的核酸，载体，细胞和组合物。[选定图]图10

Figure 10
A

