

(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2016-504336

(P2016-504336A)

(43) 公表日 平成28年2月12日(2016.2.12)

| | | | |
|--------------|-----------|------------|-----------------|
| (51) Int.Cl. | F 1 | | テーマコード (参考) |
| C07K 16/28 | (2006.01) | C07K 16/28 | Z N A 4 B 0 2 4 |
| C07K 16/46 | (2006.01) | C07K 16/46 | 4 B 0 6 5 |
| C12N 15/09 | (2006.01) | C12N 15/00 | A 4 H 0 4 5 |
| C12N 1/15 | (2006.01) | C12N 1/15 | |
| C12N 1/19 | (2006.01) | C12N 1/19 | |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 50 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-549600 (P2015-549600)
 (86) (22) 出願日 平成25年12月18日 (2013.12.18)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年8月17日 (2015.8.17)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2013/075932
 (87) 國際公開番号 WO2014/100079
 (87) 國際公開日 平成26年6月26日 (2014.6.26)
 (31) 優先権主張番号 61/745,386
 (32) 優先日 平成24年12月21日 (2012.12.21)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 596129215
 メルク・シャープ・アンド・ドーム・コーポレーション
 Merck Sharp & Dohme Corp.
 アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・O
 7065-0907 ローウェイ、イースト・リンカーン・アベニュー
 126 East Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey 07065-0907 U.S.A.
 (74) 代理人 100114188
 弁理士 小野 誠

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ヒトプログラム死リガンド1(PD-L1)に結合する抗体

(57) 【要約】

本開示は、ヒトPD-L1に特異的に結合する単離された抗体およびそのような抗体の抗原結合性フラグメント、ならびに該抗PD-L1抗体または結合性フラグメントと、ヒトPD-L1に結合した該抗体またはその抗原結合性フラグメントの複合体を検出するための試薬のセットとを含むキットを提供する。本開示の抗体および抗原結合性フラグメントは組織サンプルにおけるヒトPD-L1発現の免疫組織化学的検出に有用である。本開示の抗体および抗原結合性フラグメントをコードする核酸分子ならびに発現ベクターおよびその発現のための宿主細胞も提供する。

【選択図】図11B

| | | MK-3475 response | |
|-----------------------|----------|------------------|----------|
| | | Positive | Negative |
| Anti-PD-L1 (22C3) IHC | Positive | 8 | 1 |
| | Negative | 3 | 6 |

$$\text{Sensitivity} = 8/8+3 = 72\%$$

$$\text{Specificity} = 6/1+6 = 86\%$$

FIG.11B

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

C D R L 1、C D R L 2 および C D R L 3 の、3 個の軽鎖 C D R、ならびに C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 の、3 個の重鎖 C D R を含む、ヒト P D - L 1 に特異的に結合する単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントであって、

(a) C D R L 1 が、配列番号 1、配列番号 9、配列番号 21、配列番号 9 の変異体および配列番号 21 の変異体からなる群から選択され、

(b) C D R L 2 が、配列番号 2 および配列番号 2 の変異体からなる群から選択され、

(c) C D R L 3 が、配列番号 3、配列番号 10、配列番号 22、配列番号 10 の変異体および配列番号 22 の変異体からなる群から選択され、10

(d) C D R H 1 が、配列番号 5、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 26、配列番号 27、配列番号 14 の変異体、配列番号 15 の変異体、配列番号 26 の変異体および配列番号 27 の変異体からなる群から選択され、

(e) C D R H 2 が、配列番号 6、配列番号 16、配列番号 28、配列番号 16 の変異体および配列番号 28 の変異体からなる群から選択され、ならびに

(f) C D R H 3 が、配列番号 7、配列番号 17、配列番号 29、配列番号 17 の変異体および配列番号 29 の変異体からなる群から選択される、単離された抗体またはその抗原結合性フラグメント。20

【請求項 2】

前記の 3 個の軽鎖 C D R が配列番号 1、配列番号 2 および配列番号 3 であり、前記の 3 個の重鎖 C D R が配列番号 5、配列番号 6 および配列番号 7 である、請求項 1 記載の単離された抗体またはその抗原結合性フラグメント。20

【請求項 3】

前記の 3 個の軽鎖 C D R が配列番号 9、配列番号 2 および配列番号 10 であり、前記の 3 個の重鎖 C D R が配列番号 14、配列番号 16 および配列番号 17 である、請求項 1 記載の単離された抗体またはその抗原結合性フラグメント。20

【請求項 4】

前記の 3 個の軽鎖 C D R が配列番号 21、配列番号 2 および配列番号 22 であり、前記の 3 個の重鎖 C D R が配列番号 26、配列番号 28 および配列番号 29 である、請求項 1 記載の単離された抗体またはその抗原結合性フラグメント。30

【請求項 5】

軽鎖可変領域および重鎖可変領域を含む、請求項 1 記載の単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントであって、

(a) 該軽鎖可変領域が、配列番号 4、配列番号 13、配列番号 13 の変異体、配列番号 25 および配列番号 25 の変異体からなる群から選択され、ならびに

(b) 該重鎖可変領域が、配列番号 8、配列番号 20、配列番号 20 の変異体、配列番号 32 および配列番号 32 の変異体からなる群から選択される、請求項 1 記載の単離された抗体またはその抗原結合性フラグメント。30

【請求項 6】

軽鎖可変領域および重鎖可変領域を含む、請求項 1 記載の単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントであって、40

(a) 該軽鎖可変領域が配列番号 13 であり、該重鎖可変領域が配列番号 20 であり、

(b) 該軽鎖可変領域が配列番号 25 であり、該重鎖可変領域が配列番号 32 であり、配列番号 32 における X が Q であり、または

(c) 該軽鎖可変領域が配列番号 25 であり、該重鎖可変領域が配列番号 32 であり、配列番号 32 における X が p E である、請求項 1 記載の単離された抗体またはその抗原結合性フラグメント。40

【請求項 7】

(a) 配列番号 13 の軽鎖可変領域および配列番号 20 の重鎖可変領域、または

(b) 配列番号 25 の軽鎖可変領域および配列番号 32 の重鎖可変領域を含む、ヒト P50

D - L 1 に特異的に結合し、参照抗体の結合を遮断する単離された抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【請求項 8】

該参照抗体が配列番号 25 の軽鎖可変領域および配列番号 32 の重鎖可変領域を含み、遮断抗体が配列番号 38 のアミノ酸 156 ~ 178 の第 1 セグメントにおける残基、および配列番号 38 のアミノ酸 196 ~ 206 の第 2 セグメントにおける残基に結合する、請求項 7 記載の単離された抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【請求項 9】

遮断抗体が、配列番号 32 のアミノ酸 3 ~ 9、配列番号 38 のアミノ酸 10 ~ 13、配列番号 38 のアミノ酸 88 ~ 93、および配列番号 38 のアミノ酸 135 ~ 147 からなる群から選択されるヒト P D - L 1 セグメントのいずれか 1 つ、2 つ、もしくは 3 つ、または 4 つ全てにおける残基に更に結合する、請求項 8 記載の単離された抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【請求項 10】

抗体軽鎖可変領域および抗体重鎖可変領域の一方または両方をコードする単離された核酸であって、

(a) 該抗体軽鎖可変領域が、配列番号 4、配列番号 13 および配列番号 25 からなる群から選択され、ならびに

(b) 該抗体重鎖可変領域が、配列番号 8、配列番号 20 および配列番号 32 (ここで、配列番号 32 における X は Q である) からなる群から選択される、単離された核酸。

【請求項 11】

該抗体軽鎖可変領域が配列番号 13 または配列番号 25 であり、該抗体重鎖可変領域が配列番号 20 または配列番号 32 である、請求項 10 記載の単離された核酸。

【請求項 12】

(a) 配列番号 33 および配列番号 34 の一方もしくは両方、または

(b) 配列番号 35 および配列番号 36 の一方もしくは両方を含む、請求項 10 記載の単離された核酸。

【請求項 13】

発現ベクターである、請求項 10 ~ 12 のいずれか 1 項記載の単離された核酸。

【請求項 14】

請求項 12 記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 15】

ヒトから摘出されたヒト組織サンプルを P D - L 1 発現に関してアッセイする方法であって、

(a) ヒト P D - L 1 への P D - L 1 結合試薬の特異的結合を可能にする条件下、該組織サンプルを P D - L 1 結合試薬と接触させ、ここで、該結合試薬は、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項記載の抗体または抗原結合性フラグメントを含み、

(b) 未結合 P D - L 1 結合試薬を除去し、

(c) 結合した P D - L 1 結合剤の存在または非存在を検出することを含む、方法。

【請求項 16】

結合した結合試薬の量を定量することを更に含む、請求項 15 記載の方法。

【請求項 17】

該結合試薬が配列番号 13 および配列番号 20 を含む、または配列番号 25 および配列番号 32 を含む、請求項 15 または請求項 16 記載の方法。

【請求項 18】

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項記載の単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントと、ヒト P D - L 1 に結合した該抗体または該抗原結合性フラグメントの複合体を検出するための試薬のセットとを含むキット。

【請求項 19】

該抗体または抗原結合性フラグメントが配列番号 13 および配列番号 20 を含む、また

10

20

30

40

50

は配列番号 25 および配列番号 32 を含む、請求項 18 記載のキット。

【請求項 20】

抗体分子の混合物を含む抗体組成物であって、該混合物における抗体分子の大部分が配列番号 25 および配列番号 32 (ここで、配列番号 32 における X は pE である) を含み、該混合物における抗体分子の残りが配列番号 25 および配列番号 32 (ここで、配列番号 32 における X は Q である) を含む、抗体組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒトプログラム死リガンド 1 (PD-L1) に結合し、免疫組織化学的 (IHC) 分析によるヒト組織サンプルにおける PD-L1 発現の検出に有用である特異的配列を有する抗体に関する。本発明はまた、これらの抗ヒト PD-L1 抗体を使用する特異的 IHC アッセイに関する。

10

【背景技術】

【0002】

PD-L1 は、プログラム死 1 (PD-1) のための 2 つの公知リガンドの 1 つである細胞表面糖タンパク質であり、これは免疫調節および末梢性トレランスの維持の重要な担い手として認識されている。PD-L1 の発現は、ナイーブリンパ球ならびに活性化 B および T 細胞、単球ならびに樹状細胞を含む種々の免疫細胞の表面上で観察されている (同誌)。更に、PD-L1 mRNA は、血管内皮細胞、上皮細胞、筋細胞を含む非リンパ系組織により、ならびに扁桃および胎盤組織において発現される。例えば、Keir, M. E. ら, Annu Rev Immunol. 26: 677-704 (2008); Sharp, A. H. ら, Nature Immunol. 8: 239-245 (2007); Okazaki, T および Honjo, T, Internat. Immunol. 19: 813-824 (2007) を参照されたい。

20

【0003】

PD-L1 発現は種々のヒト癌においても観察されており、PD-1 との腫瘍細胞発現 PD-L1 の相互作用は腫瘍特異的 T 細胞の抑制またはアポトーシスを誘導しうる。例えば卵巣、腎臓、結腸直腸、肺臓、肝臓癌およびメラノーマの大きなサンプルセットにおいて、PD-L1 発現は不良予後と相関し、後続治療に無関係に全生存期間を減少させることが示された。PD-1 への PD-L1 の結合を遮断する抗 PD-1 モノクローナル抗体は種々の腫瘍型に対する抗腫瘍活性を有することが示されており、初期のヒト臨床データは、PD-L1 を発現する腫瘍を有する患者が抗 PD-1 療法に応答する可能性がより高いことを示唆している。例えば、Iwai ら, PNAS 99: 12293-12297 (2002); Ohigashi ら, Clin Cancer Res 11: 2947-2953 (2005); Ghebeh ら, Neoplasia 8: 190-198 (2006); Hamanishi, J ら, PNAS 104: 3360-3365 (2007); Yang ら, Invest Ophthalmol Vis Sci. 49(6): 2518-2525 (2008); Gao ら, Clin Cancer Res 15: 971-979 (2009); Brahmer, J. R. ら, J Clin Oncol. 28: 3167-3175 (2010) を参照されたい。

30

【0004】

最近の報告は、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) ヒトメラノーマサンプルにおける hPD-L1 の発現を検出する際の有用性に関する 15 個の抗 PD-L1 抗体の比較を記載している (Gadiot, J. ら, Cancer 117(10): 2192-2201 (2011))。この比較において評価された有用性基準は、(1) パラフィン包埋組織を染色する能力、(2) 低いバックグラウンドの染色をもたらすこと、(3) PD-L1 融合タンパク質の存在下でブレインキュベーションすることにより、PD-L1 への結合が遮断されることであった。該著者は、ウサギ抗ヒトポリクローナル抗体 (ProSci, Poway, CA USA) である Ab # 4059 が、これらの基準の全てを

40

50

許容可能に満たした試験された 15 個のうちの唯一の抗ヒト P D - L 1 抗体であると結論づけた（同誌，2195，第2欄）。

【発明の概要】

【0005】

本発明は、ProSci Ab # 4059により產生されたものより免疫学的に適切であると本発明者らが考えているFFPE扁桃組織におけるIHC染色パターンを与える抗ヒトP D - L 1モノクローナル抗体に関する。後記実施例に記載されているとおり、このProSci抗体（PRS4059，Sigma-Aldrichロット40590604）は扁桃における造血系列の全てを等しい強度で染色し、一方、本発明の2つの抗体、すなわち、22C3および20C3は、扁桃陰窩上皮および濾胞CD68+骨髓細胞（これはマクロファージと形態学的に合致している）を選択的に染色したことを、本発明者らは見出した。更に、22C3および20C3はこれらの2つの別個の細胞集団の間の一貫した強度の相違を示しており、陰窩上皮における染色強度は濾胞マクロファージにおけるものより遙かに大きい。全3個の抗体（PRS4059、22C3および20C3）はP D - L 1抗原の存在下のプレインキュベーションにより中和され、このことは、該反応性が抗原結合ドメイン（CDR）によりもたらされることを示している。したがって、本発明はまた、FFPE組織切片においてP D - L 1を検出するためのIHCアッセイを含む、ヒト細胞の表面上のP D - L 1発現の検出における、本発明の抗体の使用に関する。

10

【0006】

1つの態様においては、本発明は、ヒトP D - L 1に特異的に結合する単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントを提供する。該単離モノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントは、CDRL1、CDRL2およびCDRL3の、3個の軽鎖CDR、ならびにCDRH1、CDRH2およびCDRH3の、3個の重鎖CDRを含む。

20

【0007】

CDRL1は、配列番号1、配列番号9、配列番号21、配列番号9の変異体および配列番号21の変異体からなる群から選択される。CDRL2は、配列番号2および配列番号2の変異体からなる群から選択される。CDRL3は、配列番号3、配列番号10、配列番号22、配列番号10の変異体および配列番号22の変異体からなる群から選択される。

30

【0008】

CDRH1は、配列番号5、配列番号14、配列番号15、配列番号26、配列番号27、配列番号14の変異体、配列番号15の変異体、配列番号26の変異体および配列番号27の変異体からなる群から選択される。CDRH2は、配列番号6、配列番号16、配列番号28、配列番号16の変異体および配列番号28の変異体からなる群から選択される。CDRH3は、配列番号7、配列番号17、配列番号29、配列番号17の変異体および配列番号29の変異体からなる群から選択される。

30

【0009】

本発明の抗体および抗原結合性フラグメントにおいては、変異体CDR配列（軽鎖または重鎖）は、参考配列における1個または2個の保存的アミノ酸置換を有すること以外は参考配列と同一であり、好ましくは、参考配列における唯一の保存的アミノ酸置換を有する。好ましい実施形態においては、前記の3個の軽鎖CDRの多くとも2個は変異体配列であり、前記の3個の重鎖CDRの多くとも2個は変異体配列である。より好ましい実施形態においては、前記の6個のCDRの3個、2個または1個のみが変異体配列である。

40

【0010】

1つの好ましい実施形態においては、前記の3個の軽鎖CDRは配列番号1、配列番号2および配列番号3であり、前記の3個の重鎖は配列番号5、配列番号6および配列番号7である。

【0011】

もう1つの好ましい実施形態においては、前記の3個の軽鎖CDRは配列番号9、配列番号2および配列番号10であり、前記の3個の重鎖CDRは配列番号14、配列番号1

50

6 および配列番号 1 7 である。

【 0 0 1 2 】

更にもう 1 つの好ましい実施形態においては、前記の 3 個の軽鎖 C D R は配列番号 2 1 、配列番号 2 および配列番号 2 2 であり、前記の 3 個の重鎖 C D R は配列番号 2 6 、配列番号 2 8 および配列番号 2 9 である。

【 0 0 1 3 】

本発明の幾つかの抗体および抗原結合性フラグメントは軽鎖可変領域および重鎖可変領域を含む。軽鎖可変領域は、配列番号 4 、配列番号 1 3 、配列番号 1 3 の変異体、配列番号 2 5 および配列番号 2 5 の変異体からなる群から選択され、重鎖可変領域は、配列番号 8 、配列番号 2 0 、配列番号 2 0 の変異体、配列番号 3 2 および配列番号 3 2 の変異体からなる群から選択される。そのような実施形態においては、可変体軽鎖可変領域配列は、フレームワーク領域（すなわち、 C D R 以外）における 5 個までの保存的アミノ酸置換を有すること以外は参照配列と同一であり、好ましくは、フレームワーク領域における 4 個未満、 3 個未満または 2 個未満の保存的アミノ酸置換を有する。同様に、可変体重鎖可変領域配列は、フレームワーク領域（すなわち、 C D R 以外）における 1 7 個までの保存的アミノ酸置換を有すること以外は参照配列と同一であり、好ましくは、フレームワーク領域における 1 0 個未満、 9 個未満、 8 個未満、 7 個未満、 6 個未満または 5 個未満の保存的アミノ酸置換を有する。

【 0 0 1 4 】

本発明の 1 つの好ましい抗体または抗原結合性フラグメントにおいては、軽鎖可変領域は配列番号 1 3 であり、重鎖可変領域は配列番号 2 0 である。

【 0 0 1 5 】

本発明のもう 1 つの好ましい抗体または抗原結合性フラグメントは配列番号 2 5 の軽鎖可変領域および配列番号 3 2 の重鎖可変領域を含む。

【 0 0 1 6 】

更にもう 1 つの実施形態においては、本発明の抗体または結合性フラグメントは配列番号 2 5 の軽鎖可変領域および配列番号 3 2 の重鎖可変領域を含み、ここで、配列番号 3 2 における X は p E である。

【 0 0 1 7 】

更にもう 1 つの実施形態においては、本発明の抗体または結合性フラグメントは配列番号 2 5 の軽鎖可変領域および配列番号 3 2 の重鎖可変領域を含み、ここで、配列番号 3 2 における X は Q である。

【 0 0 1 8 】

前記の抗体の実施形態の全てにおいては、該単離抗体は、 I g M 、 I g G 、 I g D 、 I g A および I g E を含む免疫グロブリンの任意のクラスの完全長抗体でありうる。好ましくは、該抗体は I g G 抗体、例えば I g G ₁ 、 I g G ₂ 、 I g G ₃ または I g G ₄ である。 1 つの実施形態においては、該抗体はマウス I g G ₁ 定常領域を含む。

【 0 0 1 9 】

特に好ましい抗体はモノクローナル抗体 2 0 C 3 および 2 2 C 3 であり、これらは、それぞれハイブリドーマ M E B 0 3 7 . 2 0 C 3 および M E B 0 3 7 . 2 2 C 3 により発現される I g G ₁ 抗体である。

【 0 0 2 0 】

本発明はまた、ヒト P D - L 1 に特異的に結合し 2 0 C 3 もしくは 2 2 C 3 の又は配列番号 2 5 および配列番号 3 2 を含む参照抗体のヒト P D - L 1 への結合を遮断する単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合性フラグメントを提供する。 1 つの好ましい実施形態においては、本発明の抗体または抗原結合性フラグメントは 2 0 C 3 および 2 2 C 3 のそれぞれの又は (a) 配列番号 1 3 および配列番号 2 0 を含む参照抗体ならびに (b) 配列番号 2 5 および配列番号 3 2 を含む参照抗体のそれぞれのヒト P D - L 1 への結合を遮断する。

【 0 0 2 1 】

10

20

30

40

50

本発明はまた、前記抗体または抗体フラグメントのいずれかを製剤（処方）中に含む抗体組成物を提供する。1つの適当な製剤は20 mM 酢酸ナトリウムおよび9% スクロースをpH 5.0で含む。好ましい実施形態においては、該組成物は抗体分子の混合物を含み、この場合、該混合物中の抗体分子の大部分（すなわち、60%、65%、70%、80%、85%、90%または95%のいずれかを超える）は配列番号25および配列番号32（ここで、配列番号32におけるXはpEである）を含み、該混合物中の抗体分子の残りは配列番号25および配列番号32（ここで、配列番号32におけるXはQである）を含む。

【0022】

前記実施形態のいずれかにおいては、該抗原結合性フラグメントはFabフラグメント、Fab'フラグメント、(Fab')₂フラグメントである。10

【0023】

前記実施形態のいずれかにおいては、該抗体または抗原結合性フラグメントは、検出可能な標識を更に含みうる。

【0024】

本発明はまた、前記で開示された抗体可変領域のいずれかをコードする単離された核酸を提供する。1つの好ましい実施形態においては、該核酸は配列番号33および配列番号34の一方または両方を含む。もう1つの好ましい実施形態においては、該核酸は配列番号35および配列番号36の一方または両方を含む。これらの実施形態のいずれかにおいては、該単離核酸は好ましくは発現ベクターである。20

【0025】

本発明はまた、前記で開示されている抗体可変領域のいずれかをコードする発現ベクターを含む宿主細胞に関する。好ましくは、該発現ベクターは配列番号33および配列番号34を含み、または配列番号35および配列番号36を含む。

【0026】

本発明はまた、ヒトから摘出されたヒト組織サンプルをPD-L1発現に関してアッセイする方法を提供する。該アッセイ方法は、ヒトPD-L1へのPD-L1結合試薬の特異的結合を可能にする条件下、該組織サンプルをPD-L1結合試薬と接触させ、未結合PD-L1結合試薬を除去し、結合したPD-L1結合剤の存在または非存在を検出することを含む。1つの好ましい実施形態においては、該方法は、結合した結合試薬の量を定量することを更に含む。該結合試薬は前記のモノクローナル抗体または抗原結合性フラグメントのいずれかである。好ましくは、該結合試薬は、配列番号13および配列番号20を含む又は配列番号25および配列番号32を含む抗体である。1つの好ましい実施形態においては、該結合試薬は、配列番号25および配列番号32を含む抗体分子の混合物を含む抗体組成物であり、この場合、該分子の大部分（すなわち、60%、65%、70%、80%、85%、90%または95%のいずれかを超える）は配列番号32におけるX位にpEを有し、該分子の残りは配列番号32におけるX位にQを有する。30

【0027】

もう1つの態様においては、本発明は、ヒト組織サンプルをPD-L1発現に関してアッセイするためのキットを提供する。該キットは、PD-L1結合剤と、ヒトPD-L1に結合した結合剤を含む複合体を検出するための試薬のセットとを含む。該PD-L1結合剤は、ヒトPD-L1に特異的に結合する前記の任意のモノクローナル抗体または抗原結合性フラグメントである。前記のモノクローナル抗体または抗原結合性フラグメントのいずれかである。好ましくは、該抗体または結合性フラグメントは配列番号13および配列番号20を含む、または配列番号25および配列番号32を含む。1つの好ましい実施形態においては、該結合試薬は、配列番号25および配列番号32を含む抗体分子の混合物を含む抗体組成物であり、この場合、該分子の大部分（すなわち、60%、65%、70%、80%、85%、90%または95%のいずれかを超える）は配列番号32におけるX位にpEを有し、該分子の残りは配列番号32におけるX位にQを有する。40

【0028】

50

20

30

40

50

詳細な説明

略語

本発明の詳細な説明および実施例の全体にわたって、以下の略語を用いる。

【0029】

A D C C : 抗体依存性細胞傷害

C D C : 補体依存性細胞傷害

C D R : 特に示されていない限り、Kabat 番号付け系を用いて定められた、免疫グロブリン可変領域における相補性決定領域

C H O : チャイニーズハムスター卵巣

C lo th ia (クロチア) : A 1 - L a z i k a n i l a , J M B 2 7 3 : 9 2 7 - 10
9 4 8 (1997) に記載されている抗体番号付け系

E C 5 0 : 50% の効力または結合をもたらす濃度

E L I S A : 酵素結合イムノソルベントアッセイ

F F P E : ホルマリン固定パラフィン包埋

F R : 抗体フレームワーク領域 : C D R 領域以外の免疫グロブリン可変領域

H R P : ホースラディッシュペルオキシダーゼ

I F N : インターフェロン

I C 5 0 : 50% の抑制をもたらす濃度

I g G : 免疫グロブリン G

K a b a t (カバト) : E l v i n A . K a b a t ((1 9 9 1) S e q u e n c e
s o f P r o t e i n s o f I m m u n o l o g i c a l I n t e r e s t ,
5 t h E d . P u b l i c H e a l t h S e r v i c e , N a t i o n a l I n
s t i t u t e s o f H e a l t h , B e t h e s d a , M d .) により先駆的に案
出された免疫グロブリンアライメントおよび番号付け系

m A b またはM a b またはM A b : モノクローナル抗体

M E S : 2 (N-モルホリノ)エタンスルホン酸

M O A : 作用メカニズム

N H S : 正常ヒト血清

P C R : ポリメラーゼ連鎖反応

p E : ピログルタミン酸

P K : 薬物動態

S E B : スタヒロコッカスエンテロトキシン B

T T : 破傷風トキソイド

V 領域 : 異なる抗体間で配列において可変性である I g G 鎮のセグメント。それは軽鎖
内の Kabat 残基 109 および重鎖内の同残基 113 に伸長する。

【0030】

V H : 免疫グロブリン重鎖可変領域

V K : 免疫グロブリンカッパ軽鎖可変領域

定義

本発明がより容易に理解されうるように、ある科学技術用途を特に以下に定義する。本
明細書の他の箇所で特に定義されていない限り、本明細書で用いられている全ての他の科
学技術用語は、本発明が属する技術分野の当業者により一般に理解されている意味を有す
る。

【0031】

添付の特許請求の範囲を含む本明細書において用いる単数形の単語は、文脈に明らかに
矛盾しない限り、対応する複数形対象物を含む。

【0032】

「活性化」は、それが細胞または受容体に適用される場合、文脈により又は明示的に特
に示されていない限り、リガンドでの細胞または受容体の活性化または処理を意味する。

「リガンド」は、天然および合成リガンド、例えばサイトカイン、サイトカイン変異体、

20

30

40

50

類似体、突然変異タンパク質、および抗体由来の結合性化合物を含む。「リガンド」はまた、小分子、例えば、サイトカインのペプチド模倣体、および抗体のペプチド模倣体を含む。「活性化」は、内的メカニズムにより及び外的または環境要因により調節される細胞活性化を意味しうる。

【0033】

分子の「活性」は、リガンドへの又は受容体への該分子の結合、あるいは触媒活性；遺伝子発現または細胞シグナリング、分化もしくは成熟を刺激する能力；抗原活性、他の分子の活性のモジュレーションなどを示しうる又は意味しうる。分子の「活性」は、細胞間相互作用、例えば接着をモジュレーションまたは維持する場合の活性、あるいは細胞の構造、例えば細胞膜または細胞骨格を維持する場合の活性をも意味しうる。「活性」は、比活性、例えば、[触媒活性] / [mgタンパク質]、または[免疫活性] / [mgタンパク質]、生物学的区画内の濃度などをも意味しうる。「活性」は、先天性または適応免疫系の構成要素のモジュレーションを意味しうる。

10

【0034】

「投与」および「治療（処理）」は、それが動物、ヒト、実験対象、細胞、組織、器官または生物学的流体に適用される場合には、該動物、ヒト、対象、細胞、組織、器官または生物学的流体と、外因性医薬、治療用物質、診断剤または組成物の接触を意味する。「投与」および「治療（処理）」は、例えば、治療方法、プラセボ方法、薬物動態学的方法、診断方法、研究方法および実験方法を意味しうる。「細胞の処理」は、該細胞と試薬の接触、および該細胞に接触している流体と試薬の接触を含む。「投与」および「処理（治療）」は、試薬、診断剤、結合性成分または別の細胞による、例えば細胞の、インピトロおよびエクスピリオ(ex vivo)処理をも意味する。「対象」なる語は、任意の生物、好ましくは動物、より好ましくは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、イヌ、ネコ、ウサギ）、最も好ましくはヒトを含む。

20

【0035】

「治療（処理）する」または「治療（処理）」は、治療用物質、例えば、本発明の抗体または抗原結合性フラグメントを含有する組成物を、該物質が治療活性を有する1以上の疾患症状を有する又は疾患有すると疑われる対象または患者に内的または外的に投与することを意味する。典型的には、該物質は、いずれかの臨床的に測定可能な度合でそのような症状の退縮を誘導する又はそのような症状の進行を抑制することにより、治療された対象または集団における1以上の疾患症状を軽減するのに有効な量で投与される。いずれかの特定の疾患症状を軽減するのに有効な治療用物質の量（「治療的有効量」とも称される）は、病態、患者の年齢および体重ならびにその薬物が対象において所望の応答を惹起する能力のような要因によって変動しうる。疾患症状が軽減したかどうかは、その症状の重症度または進行状態を評価するために医師または他の熟練した医療提供者により典型的に用いられるいずれかの臨床測定により評価されうる。本発明の1つの実施形態（例えば、治療方法または製造品）は、全ての対象における標的疾患症状を軽減するのに有効でないかもしれないが、それは、スチューデントt検定、カイ²乗検定、MannおよびWhitneyによるU検定、クラスカル・ウォリス(Kruskal-Wallis)検定(H検定)、ヨンクヒール・テルプストラ(Jonckheere-Terpstra)検定ならびにウィルコクソン(Wilcoxon)検定のような当技術分野で公知のいずれかの統計的検定により決定された統計的に有意な対象数において標的疾患症状を軽減するはずである。

30

【0036】

「治療（処理）」は、それがヒト、獣医学的または研究対象に適用される場合には、治療的処置ならびに研究および診断用途を意味する。「治療（処理）」は、それがヒト、獣医学的もしくはまたは研究対象または細胞、組織または器官に適用される場合には、ヒトもしくは動物対象、細胞、組織、生理的区画または生理学的流体との本発明の抗体または抗原結合性フラグメントの接触を含む。

40

【0037】

50

抗 P D - L 1 抗体

抗体 20C3 は、ハイブリドーマサブクローン MEB037.20C3.116 により產生される抗体である。

【0038】

抗体 22C3 は、ハイブリドーマサブクローン MEB037.22C3.138 により產生される抗体であり、マウス IgG1 のアロタイプ S414R に対応する。22C3 の成熟重鎖の N 末端残基はグルタミンまたはピログルタミン酸（ピログルタマート）(pE) のいずれかであり、これは、遺伝子配列が成熟重鎖または軽鎖における N 末端グルタミンをコードしている場合にモノクローナル抗体において頻繁に認められる一般的な翻訳後修飾である。

10

【0039】

本発明の抗体および抗原結合性フラグメントは、あるヒト細胞の表面上で発現されるヒト P D - L 1 の成熟形態（リーダーペプチドとも称される前分泌リーダー配列を欠く）に結合する。「P D - L 1」および「成熟 P D - L 1」なる語は本明細書においては互換的に用いられ、特に示されていない限り又は文脈に明らかに矛盾しない限り、同じ分子を意味すると理解される。成熟ヒト P D - L 1 分子は以下の配列（配列番号 37）のアミノ酸 19 - 290 からなる：M R I F A V F I F M T Y W H L L N A F T V T V P K D L Y V V E Y G S N M T I E C K F P V E K Q L D L A A L I V Y W E M E D K N I I Q F V H G E E D L K V Q H S S Y R Q R A R L L K D Q L S L G N A A L Q I T D V K L Q D A G V Y R C M I S Y G G A D Y K R I T V K V N A P Y N K I N Q R I L V V D P V T S E H E L T C Q A E G Y P K A E V I W T S S D H Q V L S G K T T T N S K R E E K L F N V T S T L R I N T T N E I F Y C T F R R L D P E E N H T A E L V I P E L P L A H P P N E R T H L V I L G A I L L C L G V A L T F I F R L R K G R M M D V K K C G I Q D T N S K K Q S D T H L E E T。

20

【0040】

成熟ヒト P D - L 1 の細胞外ドメインは以下の配列（配列番号 38）からなる：F T V T V P K D L Y V V E Y G S N M T I E C K F P V E K Q L D L A A L I V Y W E M E D K N I I Q F V H G E E D L K V Q H S S Y R Q R A R L L K D Q L S L G N A A L Q I T D V K L Q D A G V Y R C M I S Y G G A D Y K R I T V K V N A P Y N K I N Q R I L V V D P V T S E H E L T C Q A E G Y P K A E V I W T S S D H Q V L S G K T T T N S K R E E K L F N V T S T L R I N T T N E I F Y C T F R R L D P E E N H T A E L V I P E L P L A H P P N E R T。

30

【0041】

本明細書中で用いる抗ヒト P D - L 1 抗体または抗 h P D - L 1 抗体は、ヒト P D - L 1 に特異的に結合する抗体を意味する。「ヒト P D - L 1 に特異的に結合する」抗体または「ヒト P D - L 1 のアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的に結合する」抗体は、他の抗原と比較してヒト P D - L 1 への優先的な結合を示す抗体であるが、この特異性は絶対的な結合特異性を要しない。抗 h P D - L 1 抗体がヒト P D - L 1 に対して特異的とみなされるのは、例えば、IHC 診断アッセイにおける偽陽性のような望ましくない結果をもたらすことなく、その結合がサンプル中のヒト P D - L 1 の存在の決定因子である場合である。本発明の抗 h P D - L 1 抗体に必要な特異性の度合は該抗体の意図される用途に左右されうるが、いずれにせよ、意図される目的の用途のための適合性により定められる。本発明の抗体またはその結合性フラグメントは、いずれかの非 P D - L 1 タンパク質に対するアフィニティより少なくとも 2 倍大きな、好ましくは少なくとも 10 倍大きな、より好ましくは少なくとも 20 倍大きな、最も好ましくは少なくとも 100 倍大きなアフィニティでヒト P D - L 1 に結合する。本明細書中で用いる抗体が、ある与えられた配列を含むポリペプチド、例えば成熟ヒト P D - L 1（この場合、配列番号 37 のアミノ酸 19 - 290）に特異的に結合すると言えるのは、それが、その配列を含むポリペプチドには結合するが、その配列を欠くタンパク質には結合しない場合である。例えば、配列番号 37 の 19 - 290 を含むポリペプチドに特異的に結合する抗体は配列番号 37 の 19

40

50

- 290 の F L A G (登録商標) タグ付き形態には結合しうるが、他の F L A G (登録商標) タグ付きタンパク質には結合しない。

【0042】

本明細書中で用いる「抗体」なる語は、所望の生物活性を示す任意の形態の抗体を意味する。したがって、それは最も広義に用いられ、所望の生物活性を示す限り、特にモノクローナル抗体（完全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、ヒト化抗体、完全ヒト抗体、キメラ抗体およびラクダ化単一ドメイン抗体（これらに限定されるものではない）を含む。「親抗体」は、意図される用途のための抗体の修飾（例えば、ヒト治療用抗体としての使用のための抗体のヒト化）の前の、抗原への免疫系の曝露により得られた抗体である。10

【0043】

「抗体フラグメント」または「抗原結合性フラグメント」は、抗体の抗原結合性フラグメントを、すなわち、完全長抗体に結合する抗原に特異的に結合する能力を保有する抗体フラグメント、例えば、1以上のCDR領域を保有するフラグメントを意味する。抗体結合性フラグメントの例には、Fab、Fab'、F(ab')₂ およびFvフラグメント；ジアボディ；直鎖状抗体；一本鎖抗体分子、例えばsc-Fv；ナノボディならびに抗体フラグメントから形成される多重特異性抗体が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0044】

「Fabフラグメント」は1本の軽鎖と1本の重鎖のC_H1および可変領域とから構成される。Fab分子の重鎖は別の重鎖分子とのジスルフィド結合を形成できない。「Fabフラグメント」は抗体のパパイン切断の生成物でありうる。20

【0045】

「Fc」領域は、抗体のC_H1およびC_H2ドメインを含む2本の重鎖フラグメントを含有する。それらの2つの重鎖フラグメントは2以上のジスルフィド結合により、およびC_H3ドメインの疎水性相互作用により合体している。

【0046】

「Fab'フラグメント」は1本の軽鎖と、V_HドメインおよびC_H1ドメインを含有する1本の重鎖の一部分またはフラグメント、そしてまた、C_H1およびC_H2ドメインの間の領域を含有していて、2個のFab'フラグメントの2本の重鎖の間で鎖間ジスルフィド結合が形成されて、F(ab')₂分子を形成しうる。30

【0047】

「F(ab')₂フラグメント」は、C_H1およびC_H2ドメインの間の定常領域の一部分を2本の重鎖と、2本の軽鎖とを含有していて、それらの2本の重鎖の間で鎖間ジスルフィド結合が形成される。したがって、F(ab')₂フラグメントは、2本の重鎖の間のジスルフィド結合により合体する2本のFab'フラグメントから構成される。「F(ab')₂フラグメント」は抗体のペプシン切断の生成物でありうる。

【0048】

「Fv領域」は重鎖および軽鎖の両方からの可変領域を含むが、定常領域を欠く。

【0049】

「一本鎖Fv」または「scFv」抗体なる語は、抗体のV_HおよびV_Lドメインを含む抗体フラグメントを意味し、ここで、これらのドメインは单一ポリペプチド鎖内に存在する。一般に、Fvポリペプチドは更に、該scFvが抗原結合のための所望の構造を形成するのを可能にする、V_HおよびV_Lドメイン間のポリペプチドリンカーを含む。scFvの概説としては、Pluckthun (1994) THE PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES, vol. 113, Rosenberg and Moore編, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315を参照されたい。また、国際特許出願公開番号WO 88/01649および米国特許第4,946,778号および第5,260,203号も参照されたい。

【0050】

「ドメイン抗体」は、重鎖の可変領域または軽鎖の可変領域のみを含有する免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントである。幾つかの場合には、2以上のV_H領域がペプチドリンクターと共に結合して2価ドメイン抗体を形成している。2価ドメイン抗体の、2つのV_H領域は、同じ又は異なる抗原を標的としうる。

【0051】

「2価抗体」は2つの抗原結合部位を含む。幾つかの場合には、それらの2つの結合部位は同じ抗原特異性を有する。しかし、2価抗体は二重特異性である（後記を参照されたい）。

【0052】

ある実施形態においては、本明細書におけるモノクローナル抗体には、ラクダ化單一ドメイン抗体も含まれる。例えば、Muylder et al. (2001) Trends Biochem. Sci. 26: 230; Reichmann et al. (1999) J. Immunol. Methods 231: 25; WO 94/04678; WO 94/25591; 米国特許第6,005,079号を参照されたい。1つの実施形態においては、本発明は、單一ドメイン抗体が形成されるような修飾を伴う2つのV_Hドメインを含む單一ドメイン抗体を提供する。

【0053】

本明細書中で用いる「ジアボディ」なる語は、2つの抗原結合部位を有する小型抗体フラグメントを意味し、該フラグメントは、同一ポリペプチド鎖内で軽鎖可変ドメイン(V_L)に連結された重鎖可変ドメイン(V_H)を含む(V_H-V_LまたはV_L-V_H)。同一鎖上の2つのドメイン間のペア形成を可能にするには短すぎるリンクターを用いることにより、それらのドメインは別の鎖の相補的ドメインとのペア形成を強要され、2つの抗原結合部位を形成する。ジアボディは、例えばEP 404,097、WO 93/11161およびHolliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448に更に詳しく記載されている。操作された抗体変異体の概説としては、全般的には、HolligerおよびHudson (2005) Nat. Biotechnol., 23: 1126-1136を参照されたい。

【0054】

典型的には、本発明の抗体または抗原結合性フラグメントは（親抗体と比較された場合）そのヒトPD-L1結合活性の少なくとも10%（その活性がモルに基づいて表された場合）を保有する。好ましくは、本発明の抗体または抗原結合性フラグメントは、親抗体としてのヒトPD-L1結合アフィニティの少なくとも20%、50%、70%、80%、90%、95%または100%またはそれ以上を保有する。本発明の抗体または抗原結合性フラグメントは、その生物活性を実質的に改変しない保存的または非保存的アミノ酸置換（該抗体の「保存的変異体」または「機能的保存変異体」と称される）を含みうることも意図される。

【0055】

「単離された抗体」は精製状態を意味し、そのような文脈においては、該分子が他の生物学的分子、例えば核酸、タンパク質、脂質、炭水化物または細胞残渣および増殖培地のような他の物質を実質的に含有しないことを意味する。一般に、「単離（された）」なる語は、そのような物質の完全な非存在または水、バッファーもしくは塩の非存在を意味することを意図されないが、それらは、本明細書に記載されている結合性化合物の実験的または治療的使用を実質的に妨げる量で存在してはならない。

【0056】

本明細書中で用いる「モノクローナル抗体」なる語は実質的に均一な抗体の集団を意味する。すなわち、該集団を構成する抗体分子は、少量で存在しうる可能な天然に生じる突然変異以外はアミノ酸配列において同一である。これとは対照的に、通常の（ポリクローナル）抗体調製物は、典型的には、可変ドメイン、特にCDR内に種々のアミノ酸配列を有する多数の種々の抗体を含み、これらは種々のエピトープに特異的であることが多い。

「モノクローナル」なる修飾語は、実質的に均一な抗体集団から得られたという、抗体の特性を示し、いずれかの特定の方法による該抗体の產生を要すると解釈されるべきではない。例えば、本発明に従い使用されるモノクローナル抗体は、Kohlerら(1975)Nature 256:495に最初に記載されたハイブリドーマ法により製造されることが可能であり、あるいは組換えDNA法により製造されることが可能である(例えば、米国特許第4,816,567号を参照されたい)。「モノクローナル抗体」は、例えばClacksonら(1991)Nature 352:624-628およびMarksら(1991)J.Mol.Biol.222:581-597に記載されている技術を用いるファージ抗体ライブラリーからも単離されうる。また、Presta(2005)J.Allergy Clin.Immunol.116:731も参照されたい。

10

【0057】

一般に、基本的抗体構造単位は四量体を含む。各四量体は、ポリペプチド鎖の、2つの同一ペアを含み、各ペアは1つの「軽」鎖(約25kDa)および1つの「重」鎖(約50~70kDa)を有する。各鎖のアミノ末端部分は、主に抗原認識をもたらす約100~110個またはそれ以上のアミノ酸の可変領域を含む。重鎖のカルボキシ末端部分は、エフェクター機能を主にもたらす定常領域を定めうる。典型的には、ヒト軽鎖はカッパおよびラムダ軽鎖として分類される。更に、ヒト重鎖は、典型的には、ミュー、デルタ、ガンマ、アルファまたはイプシロンとして分類され、それぞれIgM、IgD、IgG、IgAおよびIgEとしての、抗体のアイソタイプを定める。軽鎖および重鎖においては、可変領域および定常領域は約12個以上のアミノ酸の「J」領域により連結されており、重鎖は約10個以上のアミノ酸の「D」領域をも含む。全般的には、Fundamental Immunology Ch.7(Paul, W.編, 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989))を参照されたい。

20

【0058】

各軽/重鎖ペアの可変領域は抗体結合部位を形成する。したがって、一般に、完全抗体は2つの結合部位を有する。二官能性または二重特異性抗体の場合を除き、それらの2つの結合部位は一般に同一である。

【0059】

典型的には、重鎖および軽鎖の両方の可変ドメインは、比較的保存されたフレームワーク領域(FR)内に位置する、相補性決定領域(CDR)とも称される3つの超可変領域を含む。CDRは通常、フレームワーク領域と整列していて、特異的エピトープへの結合を可能にする。一般に、N末端からC末端へと、軽鎖および重鎖可変ドメインは共に、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3およびFR4を含む。各ドメインへのアミノ酸の帰属は一般に、Sequences of Proteins of Immunological Interest, Kabatら; National Institutes of Health, Bethesda, Md.; 5th ed.; NIH Publ. No. 91-3242 (1991); Kabat (1978) Adv. Prot. Chem. 32:1-75; Kabatら(1977)J.Biol.Chem. 252:6609-6616; Chothiaら(1987)J.Mol.Biol. 196:901-917またはChothiaら(1989)Nature 342:878-883の定義に従っている。

30

【0060】

本明細書中で用いる「超可変領域」なる語は、抗原結合をもたらす、抗体のアミノ酸残基を意味する。超可変領域は、「相補性決定領域」、すなわち「CDR」(すなわち、軽鎖可変ドメイン内のCDRL1、CDRL2およびCDRL3ならびに重鎖可変ドメイン内のCDRH1、CDRH2およびCDRH3)からのアミノ酸残基を含む。Kabatら,(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.) (配列により抗体のCDR領域を定めている)を参照されたい。また、

40

50

Chothia および Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901 - 917 (構造により抗体の CDR 領域を定めている) も参照されたい。本明細書中で用いる「フレームワーク」または「FR」残基なる語は、本明細書中で CDR 残基として定められた超可変領域残基以外の可変ドメイン残基を意味する。

【0061】

「相同性」は、2つのポリヌクレオチド配列間または2つのポリペプチド配列間の、それらが最適に整列(アライメント)された場合の配列類似性を意味する。それらの2つの比較される配列の両方における位置が同一塩基またはアミノ酸単量体サブユニットにより占拠されている場合、例えば、2つのDNA分子のそれぞれにおける位置がアデニンにより占拠されている場合、該分子はその位置において相同である。相同性の百分率(%)は、それらの2つの配列により共有される相同位置の数を、比較される位置の総数で割り算し、100を掛け算したものである。例えば、2つの配列における10個中8個の位置が、それらの配列が最適に整列された場合に一致(マッチ)している又は相同であれば、それらの2つの配列は80%相同である。一般に、該比較は、最大の相同性(%)を与えるように2つの配列が整列された場合に行われる。例えば、該比較はBLASTアルゴリズムにより行われることが可能であり、この場合、該アルゴリズムのパラメータは、それぞれの参照配列の全長にわたってそれぞれの配列の間で最大マッチを与えるように選択される。

10

【0062】

「単離された核酸分子」は、単離されたポリヌクレオチドが天然で見出される場合に付随しているポリヌクレオチドの全部または一部を伴わない、あるいはそれが天然で連結されていないポリヌクレオチドに連結されている、ゲノム、mRNA、cDNAまたは合成由来のDNAまたはRNAあるいはそれらのいくつかの組合せを意味する。本開示の目的においては、特定のヌクレオチド配列を「含む核酸分子」は完全な染色体を含まないと理解されるべきである。特定された核酸配列を「含む」単離された核酸分子は、特定された配列に加えて、10個まで又は更には20個以上の他のタンパク質またはそれらの一部もしくは断片のコード配列を含むことが可能であり、あるいは、挙げられている核酸配列のコード領域の発現を制御する機能的に連結された調節配列を含むことが可能であり、および/またはベクター配列を含むことが可能である。

20

【0063】

「制御配列」なる表現は、特定の宿主生物における、機能的に連結されたコード配列の発現に必要なDNA配列を意味する。原核生物に適した制御配列には、例えば、プロモーター、所望により存在しうるオペレーター配列、およびリボソーム結合部位が含まれる。真核細胞はプロモーター、ポリアデニル化シグナルおよびエンハンサーを用いることが公知である。

30

【0064】

核酸が「機能的に連結」されていると言えるのは、それが別の核酸配列に対して機能的な関係で配置されている場合である。例えば、プレ配列または分泌リーダーのDNAがポリペプチドのDNAに機能的に連結されていると言えるのは、それが、該ポリペプチドの分泌に関するプレタンパク質として発現される場合であり、プロモーターまたはエンハンサーがコード配列に機能的に連結されていると言えるのは、それが該配列の転写に影響を及ぼす場合であり、あるいはリボソーム結合部位がコード配列に機能的に連結されていると言えるのは、翻訳を促進するようにそれが位置している場合である。一般に、「機能的に連結(されている)」は、連結されているこれらのDNA配列が連続的であり、分泌リーダー配列の場合には、連続的であり、かつ、リーディングフレームが一致していることを意味する。しかし、エンハンサーは連続的でなくてもよい。連結は簡便な制限部位における連結により達成される。そのような部位が存在しない場合には、通常の慣例に従つて合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーが使用される。

40

【0065】

本明細書中で用いる「細胞」、「細胞系」および「細胞培養」なる表現は互換的に用い

50

られ、全てのそのような語は後代を含む。したがって、「形質転換体」および「形質転換細胞」なる語は、導入の数には無関係に、初代対象細胞、およびそれに由来する培養を含む。また、意図的な又は故意でない突然変異のため、全ての後代が厳密に同じDNAの内容を有するわけではないと理解される。元の形質転換細胞においてスクリーニングされたものと同じ機能または生物活性を有する突然変異体後代も含まれる。異なる名称が意図される場合、それは文脈から明らかであろう。

【0066】

本明細書中で用いる「ポリメラーゼ連鎖反応」または「PCR」は、例えば米国特許第4,683,195号に記載されているとおり、特定の核酸配列、RNAおよび/またはDNAを増幅する方法または技術を意味する。一般に、オリゴヌクレオチドプライマーを設計するために、関心のある領域の末端またはその外側の配列情報が用いられる。これらのプライマーは、増幅すべき鑄型の逆鎖と配列において同一または類似であろう。それらの2つのプライマーの5'末端ヌクレオチドは、増幅される物質の末端と一致しうる。PCRは、特異的RNA配列、全ゲノムDNAからの特異的DNA配列、および全細胞RNAから転写されたcDNA、バクテリオファージまたはプラスミド配列などを増幅するために用いられる。全般的には、Mullisら、(1987)Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263; Erlich編、(1989)PCR TECHNOLOGY (Stockton Press, N.Y.)を参照されたい。本明細書中で用いるPCRは、核酸の特異的断片を増幅し又は生成させるための核酸ポリメラーゼとプライマーとしての既知核酸との使用を含む、核酸試験サンプルを増幅するための核酸ポリメラーゼ反応法の一例（しかし唯一の例ではない）とみなされる。

10

20

30

40

【0067】

本明細書中で用いる「生殖系列配列」は未再編成免疫グロブリンDNA配列の配列を意味する。いずれかの適当な未再編成免疫グロブリンDNA源が用いられる。ヒト生殖系列配列は、例えば、National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases of the United States National Institutes of Healthのウェブサイト上でJOIN SOLVER（登録商標）生殖系列データベースから得られる。マウス生殖系列配列は、例えば、Giudicelliら、(2005)Nucleic Acids Res. 33:D256-D261に記載されているとおりに得られる。

【0068】

典型的な抗PD-L1抗体の物理的および機能的特性

本発明は、単離された抗PD-L1抗体、および細胞の表面上のPD-L1発現の検出における該抗体またはその抗原結合性フラグメントの使用方法を提供する。本発明の抗PD-L1抗体の例には、抗体20C3および22C3（図1および2を参照されたい）が含まれるが、これらに限定されるものではない。20C3および22C3抗体は、同一ではないが隣接するエピトープに結合し（実施例2および図9を参照されたい）、このことは、これらのエピトープの一方または両方においてPD-L1に特異的に結合する追加的抗体を誘導するために、これらの2つの抗体のCDRが混合されることを示している。したがって、該単離抗体、またはヒトPD-L1に結合するその抗原結合性フラグメントは、以下の表1～3に示す重鎖CDRの3つ及び軽鎖相補性決定領域（CDR）の3つを含みうる。

【表1】

| 表1. モノクローナル抗体MEB037.20C3の特徴 | | |
|-----------------------------|--|------|
| 抗体の特徴 | アミノ酸配列 | 配列番号 |
| 軽鎖 | | |
| CDRL1 | KSSQSLLNSRTRKNYLA | 9 |
| CDRL2 | WASTRES | 2 |
| CDRL3 | QQSYDVVT | 10 |
| リーダー配列 | MDSQAQVLILLLLWVSGT | 11 |
| 可変領域 | MDSQAQVLILLLLWVSGT FGDIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQ SLLNSRTRKNYLA WYQQKPGQSPKLI YWASTRESGV PDRFTGSGSG TDFTLTIS SVQAE DLAVYY CQQSYDV VTFGAGTKLELK | 12 |
| 成熟可変領域 | DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQ SLLNSRTRKNYLA WYQQKPG QSPKLI YWASTRESGV PDRFTGSGSG TDFTLTIS SVQAE DLAVYY CQQSYDV VTFGAGTKLELK | 13 |
| 可変領域をコードするDNA配列 | ATGGATTACAGGCCAGGTTCTTATATTGCTGCTGCTATGGGTATC TGGTACCTTG GGGACATTGTGATGTCACAATCTCCATCCTCCCTGG CTGTGTCAGCAGGAGAGAAGGTCACTATGAGCTGCAAATCCAGTCAG AGTCTGCTCAACAGTAGAACCCGAAAGAACTACTTGGCTGGTACCA GCAGAAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGATCTACTGGGCATCCA CTAGGGGAATCTGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGG ACAGATTCAC TCTACCACATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGC AGTTTATTACTGCCAGCAATCTTATGATGTGGTACAGTTCGGTGCTGG ACACCAAGCTGGAGCTGAAA | 33 |
| 重鎖 | | |
| CDRH1 Kabat 定義 | SYWMH | 14 |
| CDRH1 Chothia 定義 | GYIFTSYWMH | 15 |
| CDRH2 | YINPSSDYNEYSEKFMD | 16 |
| CDRH3 | SGWLVHGDDYFDY | 17 |
| リーダー配列 | MERHWIFLFLFSVTAGVHS | 18 |
| 可変領域 | MERHWIFLFLFSVTAGVHSQVQVQSGAELAE PGASVKMSCKASGYI FTSYWMHWLQRPQGLEWIGYINPSSDYNEYSEKFMDKATLTADKA STTAYMQLISLTSEDAVYYCARSGWLHVGDYYFDYWGQGTTLVSS | 19 |
| 成熟可変領域 | QVQVQQSGAELAE PGASVKMSCKASGYI FTSYWMHWLQRPQGLEW IGYINPSSDYNEYSEKFMDKATLTADKA STTAYMQLISLTSEDAVYYCARSGWLHVGDYYFDYWGQGTTLVSS | 20 |
| 可変領域をコードするDNA配列 | ATGGAAAGGC ACTGGATCTTCTCTCCCTGTTTCAGTA ACTGCAGG TGTC CACTCCCAGGTCCAGGTT CAGCAGTCTGGGCTGA ACTGGCAG AACCTGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCCTCTGGCTACATC TTTACTAGCTACTGGATGC ACTGGCTAAAGCAGAGGCCTGGACAGGG TCTGGAATGGATTGGATA CATTAATCCCAGCAGTGATTATAATGAAT ACAGTGAGAAATT CATGGACAAGGCCACATTGACTGCAGACAAAGCC TCCACCACAGCCTACATGCAACTGATCAGCCTGACATCTGAGGACTC TGCAGTCTATTACTGTGCAAGATCGGGATGGTAGTACATGGAGACT ATTATTTGACTACTGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA | 34 |

【0069】

表2. モノクローナル抗体MEB037. 22C3の特徴

| 抗体の特徴 | アミノ酸配列 | 配列番号 |
|---------------------|--|------|
| 軽鎖 | | |
| CDRL1 | KSSQSLLLHTSTRKNYLA | 21 |
| CDRL2 | WASTRES | 2 |
| CDRL3 | KQSYDVVT | 22 |
| リーダー配列 | MDSQAQVLILLLLWVSGTCG | 23 |
| 可変領域 | MDSQAQVLILLLLWVSGTCGDIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMTCKSSQ SLLHTSTRKNYLAWYQQKPGQSPKLIYWASTRESGVPDFRTGSGSG TDFTLTISSVQAEIDLAVYYCKQSYDVVTFGAGTKLELK | 24 |
| 成熟可変領域 | DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMTCKSSQSLHTSTRKNYLAWYQQKPG QSPKLIYWASTRESGVPDFRTGSGSGTDFLTISSVQAEIDLAVYYC KQSYDVVTFGAGTKLELK | 25 |
| 可変領域をコードするDNA配列 | ATGGATTACAGGCCAGGTTCTTATATTGCTGCTGCTATGGGTATC TGGTACCTGTGGGCACATTGTGATGTCACAGTCTCCCTCCCTGG CTGTGTCAGCAGGAGAGAAGGTCACTATGACCTGCAAATCCAGTCAG AGTCTGCTCCACACTAGCACCCGAAAGAACTACTTGGCTTGGTACCA GCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGATCTATTGGCATCCA CTAGGAAATCTGGGTCCCTGATCGCTCACAGGCACTGGATCTGG ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGG AGTTTATTACTGCAAACAATCTTATGATGTGGTCACGTTGGTGCTG GGACCAAGCTGGAGCTGAAA | 35 |
| 重鎖 | | |
| CDRH1 Kabat Def'n | SYWIH | 26 |
| CDRH1 Chothia Def'n | GTTFTSYWIH | 27 |
| CDRH2 | YINPSSGYHEYNQKFID | 28 |
| CDRH3 | SGWLIGHGDYYFDF | 29 |
| リーダー配列 | MERHWIFLFLFSVTAGVHS | 30 |
| 可変領域 | MERHWIFLFLFSVTAGVHSQVHLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYT FTSYWIHWIKQRPGQGLEWIGYINPSSGYHEYNQKFIDKATLTADRS SSTAYMHLTSLTSEDAVYYCARSGWLIGHGDYYFDWGQGTTLVSS | 31 |
| 成熟可変領域 | XVHLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYTFTSYWIHWIKQRPGQGLEW IGYINPSSGYHEYNQKFIDKATLTADRSSSTAYMHLTSLTSEDAVY YCARSGWLIGHGDYYFDWGQGTTLVSS, ここで、X = Q 又は pE | 32 |
| 可変領域をコードするDNA配列 | ATGGAAAGGCACCTGGATCTTCTCTTCTGTTCTAGTAACAGCAGG TGTCCACTCCCAGGTCCACCTTCAGCAGTCTGGGCTGAACCTGGCAA AACCTGGGCCTCAGTGAAGATGTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACG TTTACTAGTTACTGGATAACACTGGATAAAGCAGAGGCCTGGACAGGG TCTGGAATGGATTGGATAACATTAATCCTCCTCTGGTTATCATGAAT ACAATCAGAAATTCTTACATGACAAGGCCACATTGACTGCTGACAGATCC TCCAGCACAGCCTACATGCACCTGACCAGCCTGACGTCTGAAGACTC TGCAGTCTATTACTGTGCAAGATCGGGATGGTTAATACATGGAGACT ACTACTTGACTCTGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA | 36 |

【 0 0 7 0 】

表3. 本発明のコンセンサス抗体配列

| 抗体の特徴 | アミノ酸配列 | 配列番号 |
|-----------|--|------|
| 軽鎖 | | |
| CDRL1 | KSSQSLLEX ₁ X ₂ X ₃ TRKNYLA, ここで、X ₁ = H又はN, X ₂ = S又はT, 及びX ₃ = R又はS | 1 |
| CDRL2 | WASTRES | 2 |
| CDRL3 | X ₁ QSYDVVT, ここで、X ₁ = Q又はK | 3 |
| 成熟可変領域 | DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMX ₁ CKSSQSL X ₂ X ₃ X ₄ TRKNYLA _Y QQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDF TLTISSVQAEDLAVYYCX ₅ QSYDVVTFGAGTKLELK, ここで、X ₁ = S又はT, X ₂ = H又はN, X ₃ = S又はT, X ₄ = R又はS, 及びX ₅ = Q又はK | 4 |
| 重鎖 | | |
| CDRH1 | SYWXH, ここで、X = I又はM | 5 |
| CDRH2 | YINPSSX ₁ YX ₂ EYX ₃ X ₄ KFX ₅ D, ここで、X ₁ = D又はG, X ₂ = H又はN, X ₃ = S又はN, X ₄ = E又はQ, 及び X ₅ = I又はM | 6 |
| CDRH3 | SGWLX ₁ HGDYYFDX ₂ , ここで、X ₁ = I又はV 及び X ₂ = F又はY | 7 |
| 成熟可変領域 | XVX ₁ X ₂ QQSGAELAX ₃ PGASVKMSCKASGYIFTSYWX ₄ HWX ₅ KQRPGQGLE WIGYINPSSX ₆ YX ₇ EYX ₈ X ₉ KFX ₁₀ DKATLTADX ₁₁ X ₁₂ SX ₁₃ TAYMX ₁₄ LX ₁₅ S LTSEDSAVYYCARSGWLX ₁₆ HGDYYFDX ₁₇ WGQGTTLVSS, ここで、X = Q又はpE, X ₁ = H又はQ, X ₂ = L又はV, X ₃ = E又はK, X ₄ = I又はM, X ₅ = I又はL, X ₆ = D又はG, X ₇ = H又はN, X ₈ = N又はS, X ₉ = E又はQ, X ₁₀ = I又はM, X ₁₁ = K又はR, X ₁₂ = A又はS, X ₁₃ = S又はT, X ₁₄ = H又是Q, X ₁₅ = I又是T, X ₁₆ = I又是V, 及び X ₁₇ = F又是Y | 8 |

【0071】

30

「保存的に修飾された変異体」または「保存的置換」は、タンパク質中のアミノ酸が、類似特性（例えば、電荷、側鎖サイズ、疎水性／親水性、バックボーンコンホーメーションおよび剛性など）を有する他のアミノ酸により置換されることを意味し、この場合、該変化は、しばしば、該タンパク質の生物活性を変化させずに施されうる。一般に、ポリペプチドの非必須領域における單一アミノ酸置換は生物活性を実質的に変化させない、と当業者は認識している（例えば、Watsonら（1987）Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4th Ed.) を参照されたい）。また、構造的または機能的に類似したアミノ酸の置換は、生物活性を損なう可能性が低い。典型的な保存的置換を表4に記載する。

40

【表2】

表4. 典型的な保存的アミノ酸置換

| 元の残基 | 保存的置換 |
|---------|---------------|
| Ala (A) | Gly; Ser |
| Arg (R) | Lys; His |
| Asn (N) | Gln; His |
| Asp (D) | Glu; Asn |
| Cys (C) | Ser; Ala |
| Gln (Q) | Asn |
| Glu (E) | Asp; Gln |
| Gly (G) | Ala |
| His (H) | Asn; Gln |
| Ile (I) | Leu; Val |
| Leu (L) | Ile; Val |
| Lys (K) | Arg; His |
| Met (M) | Leu; Ile; Tyr |
| Phe (F) | Tyr; Met; Leu |
| Pro (P) | Ala |
| Ser (S) | Thr |
| Thr (T) | Ser |
| Trp (W) | Tyr; Phe |
| Tyr (Y) | Trp; Phe |
| Val (V) | Ile; Leu |

10

20

30

40

50

【0072】

本発明の抗体の機能保存的変異体も本発明により想定される。本明細書中で用いる「機能保存的変異体」は、所望の特性、例えば抗原アフィニティおよび／または特異性を変化させることなく1以上のアミノ酸残基が改変された抗体またはフラグメントを意味する。そのような変異体には、あるアミノ酸が、類似特性を有するアミノ酸で置換（例えば、表4の保存的アミノ酸置換）されたものが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【0073】

もう1つの実施形態においては、本発明は、P D - L 1 に特異的に結合し、V_LドメインおよびV_Hドメインを有し、表1または2の軽鎖および重鎖C D Rに対する100%の配列相同性ならびに表1または2の軽鎖および重鎖成熟可変領域に対する少なくとも90%、92%、94%、96%、98%または99%の配列相同性を有する抗体またはその抗原結合性フラグメントを含む。

【0074】

核酸

本発明は、本明細書に開示されている抗P D - L 1 抗体の免疫グロブリン鎖および抗原結合性フラグメントをコードする核酸をも提供する。例えば、本発明は、表1、2および3に記載されているアミノ酸をコードする核酸、ならびにそれにハイブリダイズする核酸を含む。

【0075】

一般に、該核酸は、低い、中等度の、または高いストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズし、P D - L 1 に特異的に結合する能力を維持する抗体をコードしている。第1の核酸分子の一本鎖形態が温度および溶液イオン強度の適当な条件下（S a m b r o o k ら，前掲を参照されたい）で第2の核酸分子にアニールしうる場合、第1の核酸分子が第2の核酸分子に「ハイブリダイズ可能」である。温度およびイオン強度の条件は該ハイブリダイゼーションの「ストリンジェンシー」を決定する。典型的な低いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件は、5.5%、5×SSC、0.1% SDSおよび無ホルムアミド；または4.2%での3.0% ホルムアミド、5×SSC、0.5% SDSを

含む。典型的な中等度のストリンジエンシーのハイブリダイゼーション条件は42での $5 \times$ または $6 \times$ SSCおよび0.1% SDSを含有する40%ホルムアミドである。高いストリンジエンシーのハイブリダイゼーション条件は42あるいは所望により、より高い温度(例えば、57、59、60、62、63、65または68)での50%ホルムアミド、 $5 \times$ または $6 \times$ SSCである。一般に、SSCは0.15M NaClおよび0.015M クエン酸Naである。

ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーに応じて塩基間のミスマッチが可能であるが、ハイブリダイゼーションは、2つの核酸が相補的配列を含有することを要する。核酸のハイブリダイゼーションのための適当なストリンジエンシーは核酸の長さ及び相補性の度合、当技術分野でよく知られた変数に左右される。2つのスクレオチド配列間の類似性または相同性の度合が大きくなればなるほど、それらの核酸がハイブリダイズしうるストリンジエンシーは高くなる。100スクレオチド長を超えるハイブリッドの場合、融解温度を計算するための式が導かれている(Sambrookら, 前掲, 9.50-9.51を参照されたい)。より短い核酸、例えば、オリゴスクレオチドでのハイブリダイゼーションの場合、ミスマッチの位置がより重要となり、該オリゴスクレオチドの長さがその特異性を決定する(Sambrookら, 前掲, 11.7-11.8)。

【0076】

以下の参考文献は、配列分析にしばしば使用されるBLASTアルゴリズムに関するものである: BLASTアルゴリズム: Altschul, S. F. ら, (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410; Gish, W. ら, (1993) Nature Genet. 3: 266-272; Madden, T. L. ら, (1996) Methods Enzymol. 266: 131-141; Altschul, S. F. ら, (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402; Zhang, J. ら, (1997) Genome Res. 7: 649-656; Woottton, J. C. ら, (1993) Comput. Chem. 17: 149-163; Hancock, J. M. ら, (1994) Comput. Appl. Biosci. 10: 67-70; アライメントスコアリング系: Dayhoff, M. O. ら, "A model of evolutionary change in proteins." in Atlas of Protein Sequence and Structure, (1978) vol. 5, suppl. 3. M. O. Dayhoff(編), pp. 345-352, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, DC; Schwartz, R. M. ら, "Matrices for detecting distant relationships." in Atlas of Protein Sequence and Structure, (1978) vol. 5, suppl. 3. "M. O. Dayhoff(編)", pp. 353-358, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, DC; Altschul, S. F., (1991) J. Mol. Biol. 219: 555-565; States, D. J. ら, (1991) Methods 3: 66-70; Henikoff, S. ら, (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919; Altschul, S. F. ら, (1993) J. Mol. Evol. 36: 290-300; アライメント統計学: Karlin, S. ら, (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-2268; Karlin, S. ら, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877; Dembo, A. ら, (1994) Ann. Prob. 22: 2022-2039; およびAltschul, S. F. "Evaluating the statistical significance of multiple distinct local alignments." in Theoretical and Computational Methods in Genome Research (S. Suhai編), (1997) pp. 1-14, Plenum, New York.

【0077】

10

20

30

40

50

もう1つの実施形態においては、本発明は、単離された抗PDL1抗体または抗原結合性フラグメント（本明細書に記載されているもの）のポリペプチド鎖の少なくとも1つをコードする単離された核酸、例えばDNAを提供する。幾つかの実施形態においては、該単離核酸は単一核酸分子上で軽鎖および重鎖の両方をコードしており、他の実施形態においては、軽鎖および重鎖は別々の核酸分子上でコードされる。もう1つの実施形態においては、該核酸はシグナル配列を更にコードしている。

【0078】

本発明はまた、本発明の単離された核酸を含む発現ベクターを提供し、ここで、該核酸は、宿主細胞が該ベクターでトランスフェクトされた場合に該宿主細胞により認識される制御配列に機能的に連結されている。また、本発明の発現ベクターを含む宿主細胞、および本明細書に開示されている抗体またはその抗原結合性フラグメントの製造方法を提供し、該製造方法は、該抗体または抗原結合性フラグメントをコードする発現ベクターを含有する宿主細胞を培地内で培養し、該抗原またはその抗原結合性フラグメントを該宿主細胞または培地から単離することを含む。

10

【0079】

エピトープ結合

本発明は更に、ヒトPDL1への抗体20C3または22C3の結合を、それぞれ20C3または22C3と同じエピトープへの結合により遮断する抗体またはその抗原結合性フラグメントを提供する。実施例2に記載されているオクテット（Octet）競合分析を含む当技術分野で公知のいずれかの交差遮断または競合分析を用い、ついで、該交差遮断抗体が結合するヒトPDL1上のエピトープを特定することにより、そのような抗体および結合性フラグメントは特定されうる。第1抗体が第2抗体の結合を交差遮断するとみなされるのは、標的を第1抗体に飽和状態まで前結合させることができ、標的の最大半量結合を達成するのに必要な第2抗体の濃度を2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍、200倍またはそれ以上増加させる場合である。交差遮断性抗体に対する結合エピトープは、当技術分野でよく知られた技術を用いて特定されうる。

20

【0080】

1つのそのようなエピトープマッピング技術は、タンパク質分解および質量分析と共に役立った水素／重水素交換（HDX-MS）である。この方法は、重水（D₂O）の単体中および対応抗体の存在下で種々の時間間隔でインキュベートされた場合の抗原による重水素の取り込みの度合の正確な測定および比較に基づく。重水素は露出領域におけるタンパク質のアミドバックボーン上の水素と交換され、一方、抗体に結合した抗原の領域は保護され、タンパク質分解フラグメントの液体クロマトグラフィー・縦列質量分析（LC-MS/MS）による分析の後、より少ない交換を示すか又は交換を全く示さないであろう。

30

【0081】

実施例3に記載されているHDX-MSエピトープマッピングに基づけば、抗体22C3に対する成熟ヒトPDL1上の提示されているエピトープは細胞外ドメイン（配列番号38）内の2つの不連続なアミノ酸セグメントにおける残基（156～178および196～206）を含む。追加的エピトープ残基は、細胞外ドメイン（配列番号38）内の以下のセグメント内に存在する可能性がある：3～9、10～13、88～93および135～147。

40

【0082】

したがって、1つの実施形態においては、22C3と同じエピトープへの結合によるヒトPDL1への抗体22C3の結合を遮断する抗体は、配列番号38のアミノ酸156～178の第1セグメントにおける残基、および配列番号38のアミノ酸196～206の第2セグメントにおける残基に結合し、そして幾つかの実施形態においては、配列番号38の以下のセグメントの、いずれか1つ、2つ若しくは3つにおける又は4つ全部における残基にも結合する：アミノ酸3～9、アミノ酸10～13、アミノ酸88～93、およびアミノ酸135～147。

【0083】

50

抗体およびその抗原結合性フラグメントの製造方法

親（例えば、げっ歯類）モノクローナル抗X抗体を產生するハイブリドーマ細胞は、当技術分野で一般に公知の方法により產生されうる。これらの方には、Kohlerら(1975) (Nature 256: 495 - 497)により最初に開発されたハイブリドーマ技術、およびトリオーマ技術(Heringら(1988) Biomed. Biochim. Acta. 47: 211 - 216 およびHagiwaraら(1993) Hum. Antibod. Hybridomas 4: 15)、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozborら(1983) Immunology Today 4: 72 およびCoteら(1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 80: 2026 - 2030)、EBV-ハイブリドーマ技術(Coleら, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77 - 96, 1985)、およびサイトパルス大チャンバー細胞融合エレクトロポレーター(Cyto Pulse large chamber cul 1 fusion electroporator) (Cyto Pulse Sciences, Inc., Glen Burnie, MD)を使用する電場に基づく電気融合が含まれるが、これらに限定されるものではない。好ましくは、標準的なプロトコールに基づいて、マウス脾細胞を単離し、PEGで又は電気融合によりマウス骨髄腫細胞系と融合させる。

10

【0084】

ついで、生じたハイブリドーマを抗原特異的抗体の產生に関してスクリーニングすることが可能である。例えば、免疫化マウスからの脾リンパ球の単個細胞浮遊液を、50% PEGを使用して、P3X63-Ag8.653非分泌マウス骨髄腫細胞(ATCC, CRL 1580)の数の6分の1と融合させることが可能である。細胞を平底マイクロタイープレート内で約 2×10^5 細胞/mLでプレーティングし、ついで、20% 胎児クローン血清(Clone Serum)、18% 「653」馴らし培地、5% オリゲン(origen) (IGEN)、4 mM L-グルタミン、1 mM L-グルタミン、1 mM ピルビン酸ナトリウム、5 mM HEPES、0.055 mM 2-メルカプトエタノール、50単位/ml ペニシリン、50 mg/ml ストレプトマイシン、50 mg/ml ゲンタマイシンおよび1×HAT (Sigma; 該HATは該融合の24時間後に添加される)を含有する選択培地内で2週間インキュベートすることが可能である。2週間後、該HATがHTと交換された培地内で細胞を培養することが可能である。ついで個々のウェルを抗XモノクローナルIgG抗体に関してELISAによりスクリーニングすることが可能である。著しいハイブリドーマ増殖が生じたら、通常は10~14日後に培地を観察することが可能である。該抗体分泌性ハイブリドーマを再プレーティングし、再びスクリーニングし、ヒトIgG抗Xモノクローナル抗体に関して尚も陽性である場合には、限界希釈により少なくとも2回サブクローニングすることが可能である。

20

【0085】

ついで安定なサブクローンをインビトロで培養して、特徴づけのために組織培養培地内で少量の抗体を產生させることができある。例えば、約1グラムの22C3抗体を產生させ、以下の方法を用いてマウスハイブリドーマ細胞系MEB037.22C3.138から精製することが可能である。凍結MEB037.22C3.138細胞を解凍し、0.18% プルロニック(Pluronic)F-68の存在下または非存在下に2 mM追加的L-グルタミンを含有するハイブリドーマ無血清培地を使用して振とうフラスコに順応させる。プルロニックF-68の存在は該振とうフラスコ培養の生存性を改善しうる。該細胞が振とうフラスコに完全に順応したら、20リットルの生産培養を、10% CHO CD高効率的フィード(efficient Feed)B (Invitrogen, Catalogue # A10240-01)を添加しながら、WAVEバイオリアクター(GE Healthcare Life Sciences)内の無血清培地内で行う。細胞増殖のために、1リットルの培養を小さなWAVEバッグ内で開始させ、ついで該1L WAVE培養を該WAVEバイオリアクター内の20L培養へと拡大させる。

30

40

50

該 20 リットル培養を 0.5×10^6 生細胞 / mL の細胞密度で開始し、第 1 日に 10 % CHO CD 高効率フィード B を供給し、1 N Na₂CO₃ で pH を毎日調節する。4 日後に該細胞を回収する。NOVA 解析のために、小さなサンプルを毎日集めることができる。

【0086】

本発明の抗 hPD-L1 抗体は以下の方法によりハイブリドーマ培養から精製されうる。1.2 マイクロメーター ガラス纖維および 0.2 マイクロメーター 酢酸セルロースフィルターを使用するデブス濾過により、該ハイブリドーマ培養を清澄化する。等体積の 2 × ProSep A バッファー (100 mM ホウ酸, 5 M NaCl, pH 8.5) を該清澄化回収物に加え、該希釈回収物を 170 mL 床体積プロテイン A カラム上にローディングする。該カラムを 5 カラム体積 (CV) の 1 × ProSep A バッファー (50 mM ホウ酸, 2.5 M NaCl, pH 8.5) で洗浄し、ついで 2 CV の 1 × PBS で洗浄し、該抗 hPD-L1 抗体を 5 CV の溶出バッファー (0.1 M グリシン, pH 3.0) で溶出する。IgG を含有する溶出画分を一緒にし、1.0 M Tris, pH バッファーの 1 / 10 の体積を加えることにより pH を中和する。ついで該中和抗体組成物を、10 kDa 使い捨て TFFF カセットを使用して滅菌濾過する。該抗体は、10 リットルの製剤化バッファー (20 mM 酢酸ナトリウム, 9% スクロース, pH 5.0) に対するダイアフィルトレーションおよび 20 体積の交換により、保存のために製剤化されうる。この方法を用いて、SDS-PAGE、SEC HPLC および C8 RPLC 测定により少なくとも 98% の純度を有し、0.1 EU / mL 未満および 0.02 EU / mg 未満の内毒素レベルを有する、約 5.0 mg / mL の濃度の抗体 22C3 が製造されうる。

【0087】

本明細書に開示されている抗 PD-L1 抗体は組換え法（例えば、前記の大腸菌 (E. coli) / T7 発現系において）によっても製造されうる。この実施形態においては、本発明の抗体分子（例えば、V_H または V_L）をコードする核酸が、pET に基づくプラスミド内に挿入され、大腸菌 (E. coli) / T7 系において発現されうる。当技術分野で公知である組換え抗体を製造するための幾つかの方法が存在する。抗体の組換え製造のための方法の一例は米国特許第 4,816,567 号に開示されている。形質転換は、宿主細胞内にポリヌクレオチドを導入するためのいずれかの公知方法によるものである。哺乳類細胞内への異種ポリヌクレオチドの導入のための方法は当技術分野でよく知られており、デキストラン媒介性トランスフェクション、リン酸カルシウム沈降、ポリブレン媒介性トランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、リポソーム内へのポリヌクレオチドの封入、微粒子銃注入および核内への DNA の直接マイクロインジェクションを包含する。また、核酸分子はウイルスベクターにより哺乳類細胞内に導入されうる。細胞の形質転換方法は当技術分野でよく知られている。例えば、米国特許第 4,399,216 号、第 4,912,040 号、第 4,740,461 号および第 4,959,455 号を参照されたい。

【0088】

抗体 PD-L1 抗体は、米国特許第 6,331,415 号に記載されている方法のいずれかによっても合成されうる。

【0089】

本明細書に開示されている抗体またはフラグメントの発現のための宿主として利用可能な哺乳類細胞系は当技術分野でよく知られており、American Type Culture Collection (ATCC) から入手可能な多数の不死化細胞系を包含する。これらには、とりわけ、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、NSO、SP2 細胞、HeLa 細胞、乳児ハムスター腎 (BHK) 細胞、サル腎細胞 (COS)、ヒト肝細胞癌細胞（例えば、Hep G2）、A549 細胞、3T3 細胞、HEK-293 細胞および多数の他の細胞系が含まれる。哺乳類宿主細胞には、ヒト、マウス、ラット、イヌ、サル、ブタ、ヤギ、ウシ、ウマおよびハムスター細胞が含まれる。特に好ましい細

胞系は、どの細胞系が高い発現レベルを有するかを判断することにより選択される。使用されうる他の細胞系としては、昆虫細胞系、例えば S f 9 細胞、両生類細胞、細菌細胞、植物細胞および真菌細胞が挙げられる。重鎖またはその抗原結合性部分もしくはフラグメント、軽鎖および / またはその抗原結合性フラグメントをコードする組換え発現ベクターを哺乳類宿主細胞内に導入する場合には、該宿主細胞における該抗体の発現、またはより好ましくは、該宿主細胞が増殖する培地内への該抗体の分泌を可能にするのに十分な時間にわたり、該宿主細胞を培養することにより、該抗体を産生させる。

【 0 0 9 0 】

抗体は、標準的なタンパク質精製方法を用いて培地から回収されうる。更に、生産細胞系からの本発明の抗体（またはそれからの他の部分）の発現は、幾つかの公知技術を用いて増強されうる。例えば、グルタミンシンテターゼ遺伝子発現系（G S 系）は、ある条件下の発現を増強するための一般的なアプローチである。G S 系は全体的または部分的に欧洲特許第 0 2 1 6 8 4 6 号、第 0 2 5 6 0 5 5 および第 0 3 2 3 9 9 7 号ならびに欧洲特許出願第 8 9 3 0 3 9 6 4 . 4 号に記載されている。

10

【 0 0 9 1 】

ポリクローナル抗体は、1 以上の他の非同一抗体のなかで又はそのような非同一抗体の存在下で産生された抗体である。一般に、ポリクローナル抗体は種々の B リンパ球（例えば、全て免疫原に対するものである種々の抗体の集団を產生する、関心のある免疫原で処理された動物の B リンパ球）の集団から產生される。通常、ポリクローナル抗体は、免疫化動物、例えば脾臓、血清または腹水から直接的に得られる。

20

【 0 0 9 2 】

本発明は更に、本明細書に開示されている抗 P D - L 1 抗体の抗体フラグメントを含む。該抗体フラグメントには、F (a b)₂ フラグメントが含まれ、これは例えばペプシンによる I g G の酵素的切断により产生されうる。F a b フラグメントは、例えば、ジチオトレイトルまたはメルカブトエチルアミンでの F (a b)₂ の還元により製造されうる。F a b フラグメントは、ジスルフィド架橋により V_H - C_H₁ 鎖に結合した V_L - C_L 鎖である。F (a b)₂ フラグメントは、2 つのジスルフィド架橋により結合した 2 つの F a b フラグメントである。F (a b)₂ 分子の F a b 部分は F_c 領域の一部を含み、その間にジスルフィド架橋が位置する。F v フラグメントは V_L または V_H 領域である。

30

【 0 0 9 3 】

免疫グロブリンは、それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて種々のクラスに帰属されうる。少なくとも 5 つの免疫グロブリンの主要クラス（I g A、I g D、I g E、I g G および I g M）が存在し、これらの幾つかは更にサブクラス（アイソタイプ）、例えば I g G - 1、I g G - 2、I g G - 3 および I g G - 4；I g A - 1 および I g A - 2 に分類されうる。本発明は抗体のこれらのクラスまたはサブクラスのいずれかの抗体および抗原結合性フラグメントを含む。

【 0 0 9 4 】

1 つの実施形態においては、該抗体または抗原結合性フラグメントは重鎖定常領域、例えばヒト定常領域、例えば 1、2、3 または 4 ヒト重鎖定常領域またはそれらの変異体を含む。もう 1 つの実施形態においては、該抗体または抗原結合性フラグメントは軽鎖定常領域、例えばヒト軽鎖定常領域、例えばラムダまたはカッパヒト軽鎖領域またはそれらの変異体を含む。限定的ではない例示に過ぎないが、ヒト重鎖定常領域は 1 であることが可能であり、ヒト軽鎖定常領域はカッパであることが可能である。もう 1 つの実施形態においては、該抗体の F_c 領域は、S e r 2 2 8 P r o 突然変異を有する 4 である（S c h u u r m a n , J l a , M o l . I m m u n o l . 3 8 : 1 - 8 , 2 0 0 1 ）。

40

【 0 0 9 5 】

幾つかの実施形態においては、種々の定常ドメインは、本明細書に記載されている C D R から誘導されたヒト化 V_L および V_H 領域に連結されうる。例えば、本発明の抗体（またはフラグメント）の個々の意図される用途がエフェクター機能の改変を望むものである場合には、ヒト I g G 1 以外の重鎖定常ドメインが使用されることが可能であり、あるいは

50

はハイブリッド Ig G 1 / Ig G 4 が利用されうる。

【0096】

抗体の操作

特定の実施形態においては、以下のとおりに、最終抗体のより大きな化学的安定性を得るために、露出側鎖を含有する或るアミノ酸を別のアミノ酸残基に変化させることが望ましいであろう。アスパラギンの脱アミド化はN-GまたはD-G配列上で生じ、イソアスパラギン酸残基の生成をもたらすことが可能であり、これはポリペプチド鎖内に捻じれ(キンク)を導入し、その安定性を低減する(イソアスパラギン酸効果)。ある実施形態においては、本開示の抗体はアスパラギン異性部位を含有しない。

【0097】

例えば、いずれかのAsn-Gly配列における、特にCDR内のイソアスパルタートの形成の可能性を減少させるために、アスパラギン(Asn)残基はGlnまたはAlaに変換されうる。Asp-Gly配列においても、類似した問題が生じうる。ReissnerおよびAwad(2003)Cell.Mol.Life Sci.60:1281。イソアスパルタート形成は抗体のその標的抗原への結合を低減し、または完全に阻止しうる。Presta(2005)J.Allergy Clin.Immunol.116:731(734における)を参照されたい。1つの実施形態においては、アスパラギンはグルタミン(Gln)に変換される。脱アミド化(これは、アスパラギンまたはグルタミンの隣に小さなアミノ酸が存在する場合に、より大きな比率で生じる)の可能性を減少させるために、アスパラギン(Asn)またはグルタミン(Gln)残基に隣接するアミノ酸を改変することも望ましいかもしれない。Bischhoff & Kolbe(1994)J.Chromatogr.662:261を参照されたい。また、メチオニン硫黄が酸化する可能性(これは抗原結合アフィニティを減少させ、そしてまた、最終抗体調製物における分子不均一性に寄与しうるであろう)を減少させるために、CDRにおけるいずれかのメチオニン残基(典型的には溶媒露出Met)がLys、Leu、AlaまたはPheに変換されうる(同様)。1つの実施形態においては、該メチオニンはアラニン(Ala)に変換される。また、潜在的なAsn-Proペプチド結合の切断性を阻止または最小にするために、CDR内で見出されるいずれかのAsn-Proの組合せをGln-Pro、Ala-ProまたはAsn-Alaに改変することが望ましいかもしれない。ついで、該置換がヒトPD-L1に対する該抗体のアフィニティもしくは特異性または他の所望の生物活性を、許容し得ないレベルへと低減しないことが保証されるよう、そのような置換を有する抗体をスクリーニングする。

【表3】

表5. 典型的な安定化CDR変異体

| CDR残基 | 安定化変異体配列 |
|-----------------------|--|
| Asn-Gly (N-G) | Gln-Gly, Ala-Gly, 又はAsn-Ala (Q-G), (A-G), 又は(N-A) |
| Asp-Gly (D-G) | Glu-Gly, Ala-Gly又はAsp-Ala (E-G), (A-G), 又は(D-A) |
| Met(典型的には溶媒露出) (M) | Lys, Leu, Ala, 又はPhe (K), (L), (A), 又は(F) |
| Asn (N) | Gln又はAla (Q)又は(A) |
| Asn-Pro (N-P) | Gln-Pro, Ala-Pro, 又はAsn-Ala (Q-P), (A-P), 又は(N-A) |

【0098】

抗体コンジュゲート

本明細書に開示されている抗PD-L1抗体分子はまた、放射性核種または他の検出可能な標識のような化学的部分にコンジュゲート化されうる。放射性核種には、⁹⁹Tc、⁹⁰Y、¹¹¹In、³²P、¹⁴C、¹²⁵I、³H、¹³¹I、¹¹C、¹⁵O、¹O

10

20

30

40

50

³N、¹⁸F、³⁵S、⁵¹Cr、⁵⁷To、²²⁶Ra、⁶⁰Co、⁵⁹Fe、⁵⁷Se、¹⁵²Eu、⁶⁷Cu、²¹⁷Ci、²¹¹At、²¹²Pb、⁴⁷Sc、¹⁰⁹Pd、²³⁴Thおよび⁴⁰K、¹⁵⁷Gd、⁵⁵Mn、⁵²Tr、および⁵⁶Feが含まれる。蛍光または化学発光標識には、発蛍光団、例えば希土類キレート、フルオレセインおよびその誘導体、ローダミンおよびその誘導体、イソチオシアナート、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o-フタルアルデヒド、フルオレスカミン、¹⁵²Eu、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシフェリン、ルミナール標識、イソルミナル標識、芳香族アクリジニウムエステル標識、イミダゾール標識、アクリジミウム塩標識、シュウ酸エステル標識、エクオリン標識、2,3-ジヒドロフラジンジオン、ビオチン／アビジン、スピノン標識および安定なフリーラジカルが含まれる。

10

【0099】

抗体分子を種々の部分にコンジュゲート化するための当技術分野で公知のいずれかの方法が使用可能であり、これらには、Hunterら(1962)Nature 144:945; Davidら(1974)Biochemistry 13:1014; Painら(1981)J. Immunol. Meth. 40:219; およびNygren, J. (1982) Histochem. and Cytochem. 30:407に記載されている方法が含まれる。抗体をコンジュゲート化する方法は通常のものであり、当技術分野で非常によく知られている。

【0100】

実験的および診断的用途

本明細書に開示されている抗PD-L1抗体および抗体フラグメントは、細胞の表面上で発現されたヒトPD-L1を特異的に検出するために使用される。該細胞は、ヒト個体から得られた組織または血清サンプル中に存在することが可能であり、PD-L1発現の検出は、当技術分野で公知の種々のインピトロアッセイ方法のいずれかを用いて行われる。

20

【0101】

例えば、特定の実施形態はELISAアッセイ(酵素結合イムノソルベントアッセイ)を含み、これは典型的には以下の工程を含む：

- (a) 基質(例えば、マイクロタイタープレートウェル、例えばプラスチックプレートの表面)を抗PD-L1抗体またはその抗原結合性フラグメントで被覆(コート)し、
- (b) ヒトPD-L1の存在に関して試験されるべきサンプルを該基体に適用し、
- (c) 該サンプル中の未結合物質が除去されるように、該プレートを洗浄し、
- (d) 同様にヒトPD-L1に特異的である検出可能な様態で標識された抗体(例えば、酵素結合抗体)を適用し、
- (e) 未結合標識抗体が除去されるように、該基体を洗浄し、
- (f) 該標識抗体が、結合した酵素である場合には、該酵素により蛍光シグナルへと変換される化学物質を適用し、
- (g) 該標識抗体の存在を検出する。

30

【0102】

もう1つの実施形態においては、ABTS(例えば、2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸))または3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンと反応して、検出可能な変色を引き起こすペルオキシダーゼで、標識抗体を標識する。あるいは、シンチラント(sciintillant)の存在下でシンチレーションカウンターにより検出される検出可能な放射性同位体(例えば、³H)で標識抗体を標識する。

40

【0103】

本発明の抗PD-L1抗体およびその抗原結合性フラグメントはウエスタンプロットまたは免疫タンパク質プロット法において使用される。そのような方法は本発明の一部を構成し、例えば以下を含む：

- (1) ヒトPD-L1の存在に関して試験されるべき膜または他の固体基体を本発明

50

の抗体またはその抗原結合性フラグメントと接触させる。そのような膜は、非変性 P A G E (ポリアクリルアミドゲル電気泳動) ゲルまたは S D S - P A G E (ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動) ゲルにおいて X の存在に関して試験されるべきタンパク質が(例えば、該ゲルにおける電気泳動分離の後で) 移されたニトロセルロースまたはビニル系(例えば、ポリビニリデンフルオリド(P V D F))膜の形態をとりうる。該抗 P D - L 1 抗体またはフラグメントとの膜の接触の前に、該膜を、所望により、例えば乾燥脱脂乳などでプロッキングして、該膜上の非特異的タンパク質結合部位に結合するようとする。

【 0 1 0 4 】

(2) 該膜を1回以上洗浄して、未結合抗 P D - L 1 抗体またはフラグメントおよび他の未結合物質を除去する。 10

【 0 1 0 5 】

(3) 結合抗 P D - L 1 抗体またはフラグメントを検出する。該結合抗体またはフラグメントは、検出可能な様態で標識された二次抗体(抗免疫グロブリン抗体)と共に該結合抗体またはフラグメントをインキュベートし、ついで該二次抗体の存在を検出することにより検出されうる。

【 0 1 0 6 】

本明細書に開示されている抗 P D - L 1 抗体および抗原結合性フラグメントは免疫組織化学(I H C)アッセイにおいて使用可能であり、これは当技術分野で公知の種々の I H C 形態を用いて実施可能であり、それは本発明の実施形態を構成する。典型的な I H C アッセイは、顕微鏡スライド上でマウントされ乾燥される約3~4ミリメートル、好ましくは4マイクロメートルの F F P E 細胞切片を使用し、例えば、(1)組織切片を脱パラフィンおよび水和に付し、該再水和組織切片を抗 P D - L 1 抗体またはその抗原結合性フラグメントと接触させ、(2)該組織内の1以上の細胞の表面上で抗 P D - L 1 抗体またはその抗原結合性フラグメントを検出することを含む。該抗体またはフラグメント自体が検出可能な様態で標識されている場合、それは直接的に検出されうる。あるいは、該抗体またはフラグメントは、検出可能な様態で標識された検出される二次抗体により結合されうる。 20

【 0 1 0 7 】

好ましい I H C アッセイは、商業的に入手可能な D a k o E n V i s i o n (商標) F L E X 検出系を使用し、これは D a k o A u t o s t a i n e r 装置(D a k o , a n A g i l e n t T e c h n o l o g i e s C o m p a n y , G l o s t r u p , Denmark)と併用されることが意図される。22C3抗体、または22C3抗体の重鎖および軽鎖可変領域を含む抗体と共にこの系を使用する場合、I H C アッセイは以下のとおりに行われうる。スライド上にマウントされた4ミクロンの厚さの F F P E 細胞切片を一晩風乾し、60度45分間にわたって焼き、脱パラフィン処理し、再水和させる。脱パラフィン後、97、ついで室温で20分間、E n V i s i o n (商標) F L E X H i g h p H T a r g e t R e t r i e v a l S o l u t i o n を使用して F F P E スライドを熱誘発性エピトープ回復に付す。ついで該スライドを洗浄し、2 μg / mLの22C3で60分間染色し、ついで、以下のとおりに D a k o E n V i s i o n (商標) F L E X 試薬を使用して検出した: E n V i s i o n (商標) F L E X + M S L i n k e r (15分間)、E n V i s i o n (商標) F L E X / H R P (20分間)、E n V i s i o n (商標) F L E X D A B (10分間)およびD A B E n h a n c e r (7分間)(介在する洗浄工程を伴う)。 40

【 0 1 0 8 】

本明細書に開示されている或る抗 P D - L 1 抗体およびその抗原結合性フラグメントはインビボ腫瘍イメージングにも使用されうる。そのような方法は、放射能標識抗 P D - L 1 抗体またはその抗原結合性フラグメントを、P D - L 1 発現を伴う腫瘍の存在に関して試験されるべきヒト患者の体内に注射し、ついで、例えば、該腫瘍に結合した高濃度の該抗体またはフラグメントを含む部位における、該標識抗体またはフラグメントの存在を検

10

20

30

40

50

出するために、患者の身体の核イメージングを行うことを含みうる。

【0109】

イメージング技術には、SPECTイメージング（単一光子放出型コンピュータ断層撮影）またはPETイメージング（陽電子放射断層撮影）が含まれる。標識には、例えば、SPECTイメージングと組合されたヨウ素-123 (^{123}I) およびテクネチウム-99m (^{99}mTc)、または例えばPETイメージングと組合された ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O もしくは ^{18}F 、またはインジウム-111が含まれる（例えば、Gordonら（2005）International Rev. Neurobiol. 67: 385-440を参照されたい）。

【0110】

検出キットおよび治療用キット

便宜上、本明細書に開示されている抗体または特異的結合剤は、キット、すなわち、診断または検出アッセイを行うための説明を伴う所定量の試薬のパッケージされた組合せとして提供されうる。該抗体が酵素で標識される場合、該キットは基質と、酵素により要求される補因子（例えば、検出可能な発色団または発蛍光団を与える基質前駆体）とを含むであろう。また、安定剤、バッファー（例えば、ロックバッファーまたは細胞溶解バッファー）などのような他の添加剤が含まれうる。種々の試薬の相対量は、アッセイの感度を実質的に最適化する該試薬の溶液中の濃度がもたらされるように広範に変動しうる。特に、該試薬は、適当な濃度を有する試薬溶液を溶解に際して与える賦形剤を含む乾燥粉末、通常は凍結乾燥粉末として提供されうる。

10

20

【0111】

また、例えばELISA（サンドイッチ型または競合形態）のようなイムノアッセイを含む種々の検出アッセイにおける使用のための、1以上のそのような試薬を含む診断または検出試薬およびキットを提供する。該キットの成分は固体支持体に予め付着していることが可能であり、あるいは、該キットが使用される際に固体支持体の表面に適用されることが可能である。幾つかの実施形態においては、シグナル生成手段は、本発明の抗体に予め結合したものであることが可能であり、あるいは、使用前に1以上の成分、例えばバッファー、抗体-酵素コンジュゲート、酵素基質などと組合されることを要しうる。キットはまた、追加的試薬、例えば、固相表面への非特異的結合を低減するためのブロッキング試薬、洗浄試薬、酵素基質などを含みうる。該固相表面はチューブ（管）、ビーズ、マイクロタイタープレート、またはタンパク質、ペプチドもしくはポリペプチドを固定化するのに適した他の材質の形態でありうる。特定の態様においては、化学発光もしくは色素原産物の形成または化学発光もしくは色素原基質の還元を触媒する酵素がシグナル生成手段の一成分である。そのような酵素は当技術分野でよく知られている。キットは、本明細書に記載されている捕捉剤および検出試薬のいずれかを含みうる。所望により、該キットは、本発明の方法を実施するための説明をも含みうる。

30

【0112】

本明細書に開示されている検出キットはまた、本明細書に開示されている抗体または抗原結合性フラグメントの少なくとも1つと、検出試薬として該組成物を使用するための説明とを含むものとして製造されうる。そのようなキットにおいて使用する容器は、典型的には、少なくとも1つのバイアル、試験管、フラスコ、ボトル、シリンジ、または該検出組成物の1以上が配置され、好ましくは適切にアリコート化されうる他の適当な容器を含みうる。本明細書に開示されているキットは、典型的には、商業的販売のために密封された、バイアルを含有するための手段、例えば、所望のバイアルが収容される射出成型またはブロー成型プラスチック容器をも含むであろう。放射能標識、色素原、発蛍光または他のタイプの検出可能な標識または検出手段が該キット内に含まれる場合には、該標識剤は検出組成物自体と同じ容器内で提供されることが可能であり、あるいはこの第2の組成物が配置され適切にアリコート化されうる第2の別個の収容手段内に配置されることが可能である。あるいは、該検出試薬は单一容器手段において調製されることが可能であり、ほとんどの場合、該キットは、典型的には、商業的販売および/または簡便なパッケージン

40

50

グおよび運搬のために密封された、該バイアルを収容するための手段をも含むであろう。

【0113】

本明細書に記載されている検出またはモニタリング方法を行うための装置または器具も提供する。そのような装置は、サンプルが投入されるうるチャンバ(室)またはチューブ、流体処理系(これは、所望により、サンプル流を装置へ導くための弁またはポンプを含みうる)、血液から血漿または血清を分離するための所望により含まれうるフィルター、捕捉剤または検出試薬の添加のための混合チャンバ、および捕捉剤免疫複合体に結合した検出可能な標識の量を検出するための所望により含まれうる検出装置を含みうる。サンプル流は受動的なもの(例えば、毛管力、静水力、またはサンプルが一旦適用されると装置の更なる操作を要しない他の力によるもの)または能動的なもの(例えば、機械式ポンプ、電気浸透ポンプにより生じる力、遠心力、増加した空気圧の適用によるもの)または能動的な力および受動的な力の組合せによるものであります。

10

【0114】

更なる実施形態はまた、プロセッサ、コンピュータ読取可能メモリ、およびコンピュータ読取可能メモリ上に保存され、本明細書に記載されている方法のいずれかを行うために該プロセッサ上で実行されるように適合化されたルーチンを提供する。適當なコンピューティング(計算)システム、環境および/または構成の例には、パーソナルコンピュータ、サーバコンピュータ、携帯式またはラップトップ装置、マルチプロセッサシステム、マイクロプロセッサベースシステム、セットトップボックス、プログラム可能な大衆消費電子商品、ネットワークPC、ミニコンピュータ、メインフレームコンピュータ、前記システムまたは装置のいずれかを含む分散コンピューティング環境、あるいは当技術分野で公知のいずれかの他のシステムが含まれる。

20

【0115】

一般的方法

分子生物学における標準的な方法はSambrook, FritschおよびManiatis(1982 & 1989 2nd Edition, 2001 3rd Edition) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; SambrookおよびRussell(2001) Molecular Cloning, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Wu(1993) Recombinant DNA, Vol. 217, Academic Press, San Diego, CAに記載されている。標準的な方法はAusbelら(2001) Current Protocols in Molecular Biology, Vols. 1-4, John Wiley and Sons, Inc. New York, NYにも見られ、これは細菌細胞におけるクローニングおよびDNA突然変異誘発(Vol. 1)、哺乳類細胞および酵母におけるクローニング(Vol. 2)、複合糖質およびタンパク質発現(Vol. 3)ならびにバイオインフォマティクス(Vol. 4)を記載している。

30

【0116】

免疫沈降、クロマトグラフィー、電気泳動、遠心分離および結晶化を含むタンパク質精製方法が記載されている(Coliganら(2000) Current Protocols in Protein Science, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York)。化学的分析、化学的修飾、翻訳後修飾、融合タンパク質の製造、タンパク質のグリコシル化が記載されている(例えば、Coliganら(2000) Current Protocols in Protein Science, Vol. 2, John Wiley and Sons, Inc., New York; Ausubelら(2001) Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 3, John Wiley and Sons, Inc., NY, NY, pp. 16.0.5-16.22.17; Si

40

50

gma - Aldrich , Co . (2 0 0 1) P r o d u c t s f o r L i f e S c i e n c e R e s e a r c h , St . Louis , MO ; p p . 4 5 - 8 9 ; A m e r s h a m P h a r m a c i a B i o t e c h (2 0 0 1) B i o D i r e c t o r y , P i s c a t a w a y , N . J . , p p . 3 8 4 - 3 9 1) を 参 照 さ れ た い) 。 ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の製造、精製およびフラグメント化が記載されている (Coligan ら (2 0 0 1) C u r r e n t P r o t o c o l s i n I m m u n o l o g y , V o l . 1 , John Wiley and Sons , Inc . , New York ; Harlow および Lane (1 9 9 9) U s i n g A n t i b o d i e s , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s , C o l d S p r i n g Harbor , NY ; Harlow および Lane , 前掲) 10 。 リガンド / 受容体相互作用を特徴づけるための標準的な技術が利用可能である (例えは 、 Coligan ら (2 0 0 1) C u r r e n t P r o t o c o l s i n I m m u n o l o g y , V o l . 4 , John Wiley , Inc . , New York を 参 照 さ れ た い) 。

【 0 1 1 7 】

モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体およびヒト化抗体は製造可能である (例えは 、 Sheperd および Dean (編) (2 0 0 0) M o n o c l o n a l A n t i b o d i e s , O x f o r d U n i v . P r e s s , New York , NY ; K o n t e r m a n n および Dubel (編) (2 0 0 1) A n t i b o d y E n g i n e e r i n g , S p r i n g e r - V e r l a g , New York ; Harlow および Lane (1 9 8 8) A n t i b o d i e s A L a b o r a t o r y M a n u a l , C o l d S p r i n g Harbor L a b o r a t o r y P r e s s , C o l d S p r i n g Harbor , NY , p p . 1 3 9 - 2 4 3 ; C a r p e n t e r ら (2 0 0 0) J . I m m u n o l . 1 6 5 : 6 2 0 5 ; H e ら (1 9 9 8) J . I m m u n o l . 1 6 0 : 1 0 2 9 ; T a n g ら (1 9 9 9) J . B i o l . C h e m . 2 7 4 : 2 7 3 7 1 - 2 7 3 7 8 ; B a c a ら (1 9 9 7) J . B i o l . C h e m . 2 7 2 : 1 0 6 7 8 - 1 0 6 8 4 ; C h o t h i a ら (1 9 8 9) N a t u r e 3 4 2 : 8 7 7 - 8 8 3 ; F o o t e および W i n t e r (1 9 9 2) J . M o l . B i o l . 2 2 4 : 4 8 7 - 4 9 9 ; 米国特許第 6 , 3 2 9 , 5 1 1 号を 参 照 さ れ た い) 。

【 0 1 1 8 】

ヒト化に代わる手段は、ファージ上で提示されるヒト抗体ライブラリー、またはトランスジェニックマウスにおけるヒト抗体ライブラリーを使用することである (V a u g h a n ら (1 9 9 6) N a t u r e B i o t e c h n o l . 1 4 : 3 0 9 - 3 1 4 ; B a r b a s (1 9 9 5) N a t u r e M e d i c i n e 1 : 8 3 7 - 8 3 9 ; M e n d e z ら (1 9 9 7) N a t u r e G e n e t i c s 1 5 : 1 4 6 - 1 5 6 ; H o o g e n b o o m および Ch a m e s (2 0 0 0) I m m u n o l . T o d a y 2 1 : 3 7 1 - 3 7 7 ; B a r b a s ら (2 0 0 1) P h a g e D i s p l a y : A L a b o r a t o r y M a n u a l , C o l d S p r i n g Harbor , New York ; K a y ら (1 9 9 6) P h a g e D i s p l a y o f P e p t i d e s a n d P r o t e i n s : A L a b o r a t o r y M a n u a l , A c a d e m i c P r e s s , S a n D i e g o , C A ; de B r u i n ら (1 9 9 9) N a t u r e B i o t e c h n o l . 1 7 : 3 9 7 - 3 9 9) 。

【 0 1 1 9 】

抗原の精製は抗体の製造に必要ではない。関心のある抗原を含有する細胞で動物を免疫化することが可能である。ついで該免疫化動物から脾細胞を単離し、該脾細胞を骨髄腫細胞系と融合させてハイブリドーマを得ることが可能である (例えは 、 M e y a a r d ら (1 9 9 7) I m m u n i t y 7 : 2 8 3 - 2 9 0 ; W r i g h t ら (2 0 0 0) I m m u n i t y 1 3 : 2 3 3 - 2 4 2 ; P r e s t o n ら , 前掲 ; K a i t h a m a n a ら (1 9 9 9) J . I m m u n o l . 1 6 3 : 5 1 5 7 - 5 1 6 4 を 参 照 さ れ た い) 。

10

20

30

40

50

【0120】

抗体は例えば小薬物分子、酵素、リポソーム、ポリエチレングリコール（PEG）にコンジュゲート化されうる。抗体は治療、診断、キットまたは他の目的に有用であり、例えば色素、放射性同位体、酵素または金属、例えばコロイド金に結合した抗体を包含する（例えば、Le Doussalら（1991）J. Immunol. 146: 169-175；Gibelliiniら（1998）J. Immunol. 160: 3891-3898；HsingおよびBishop（1999）J. Immunol. 162: 2804-2811；Evertsら（2002）J. Immunol. 168: 883-889を参照されたい）。

【0121】

蛍光標識細胞分取（FACS）を含むフローサイトメトリーのための方法が利用可能である（例えば、Owensら（1994）Flow Cytometry Principles for Clinical Laboratory Practice, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ；Givan（2001）Flow Cytometry, 2nd ed.；Wiley-Liss, Hoboken, NJ；Shapiro（2003）Practical Flow Cytometry, John Wiley and Sons, Hoboken, NJを参照されたい）。例えば診断試薬としての使用のための、核酸プライマーおよびプローブを含む核酸、ポリペプチドおよび抗体を修飾するのに適した蛍光試薬が利用可能である（Molecular Probes（2003）Catalogue, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR；Sigma-Aldrich（2003）Catalogue, St. Louis, MO）。

【0122】

免疫系の標準的な組織学的方法が記載されている（例えば、Mueller-Harmelin（編）（1986）Human Thymus: Histopathology and Pathology, Springer Verlag, New York, NY；Hiattら（2000）Color Atlas of Histology, Lippincott, Williams, and Wilkins, Philadelphia, PA；Louisら（2002）Basic Histology: Text and Atlas, McGraw-Hill, New York, NYを参照されたい）。

【0123】

例えば抗原フラグメント、リーダー配列、タンパク質フォールディング、機能的ドメイン、グリコシル化部位および配列アライメントを決定するためのソフトウェアパッケージおよびデータベースが利用可能である（例えば、GenBank, Vector NTI（登録商標）Suite（Informax, Inc, Bethesda, MD）；GC G Wisconsin Package（Accelrys, Inc., San Diego, CA）；DeCypher（登録商標）（TimeLogic Corp., Crystal Bay, Nevada）；Menneら（2000）Bioinformatics 16: 741-742；Menneら（2000）Bioinformatics Applications Note 16: 741-742；Wrenら（2002）Comput. Methods Programs Biomed. 68: 177-181；von Heijne（1983）Eur. J. Biochem. 133: 17-21；von Heijne（1986）Nucleic Acids Res. 14: 4683-4690を参照されたい）。

【図面の簡単な説明】

【0124】

【図1】図1は、ハイブリドーマMEB037.20C3から単離された全RNAから調製された抗体可変軽鎖および重鎖cDNAのヌクレオチド配列、ならびにそれによりコードされる推定アミノ酸配列（太字）を示し、括弧はリーダーペプチドのヌクレオチドおよびアミノ酸配列を示し、下線はCDR配列を示す。

10

20

30

40

50

【図2】図2は、ハイブリドーマM E B 0 3 7 . 2 2 C 3から単離された全RNAから調製された抗体可変軽鎖および重鎖cDNAのヌクレオチド配列、ならびにそれによりコードされる推定アミノ酸配列(太字)を示し、括弧はリーダーペプチドのヌクレオチドおよびアミノ酸配列を示し、下線はCDR配列を示す。

【図3】図3は、抗体20C3および22C3の軽鎖および重鎖の成熟可変領域の整列(アライメント)されたアミノ酸配列を示し、太字は、それらの配列が異なっている位置を示し、下線は、Kabatの番号付け系により定められたCDR配列を示し、括弧は、C hot h i aの番号付け系により定められた重鎖CDR1を示す。

【図4】図4は、商業的に入手可能な抗体P R S 4 0 5 9(図4A)または本発明の22C3抗体(図4B)を使用する免疫組織学的アッセイにより得られた扁桃切片の染色を示し、図4Aおよび4Bの右側の切片は、ヒトPD-L1への結合に関して抗ヒトPD-L1抗体と競合するPD-L1-IgG1融合タンパク質(R&D Systems)の存在下のプレインキュベーションの後の結果を示す。

【図5】図5は隣接正常FFPE扁桃組織切片の写真を示し、これにおいては、抗体22C3を使用するIHCアッセイ(図5A)およびin situハイブリダイゼーション(I SH)(図5B)を用いて、それぞれ、ヒトPD-L1タンパク質およびin situハイブリダイゼーション(I SH)mRNA発現をアッセイした。このアッセイにより、2つの特有の細胞集団、すなわち、陰窩上皮(図5A左拡大図および図5B上図)と濾胞マクロファージ(図5A右拡大図および図5B下図)との間の異なる染色が示された。

【図6】図6は、mRNA分析(qPCR)によるhPD-L1の発現に関して陰性であることが判明したHT144細胞(図6A)および高レベルのhPD-L1 mRNA(qPCR)を発現することが判明したLOXメラノーマ細胞(図6B)への種々の抗ヒトPD-L1抗体および同位体対照抗体の結合のフローサイトメトリー評価の結果を示す。

【図7】図7は、操作されたCHO細胞系(図7A)およびヒト細胞系(図7B、上パネル)のFFPE細胞ペレット上で抗体22C3により得られたIHC染色を示し、染色強度が、同じヒト細胞系において測定されたhPD-L1 mRNA発現レベル(図7B、下パネル)と良く相關することを示している。

【図8】図8はhPD-L1に対する抗体22C3および20C3の選択的結合および相対アフィニティを示し、これらのグラフは細胞に基づくELISA実験の結果を示し、この場合、hPD-L1を発現しない細胞(図8A)、hPDL-1を発現する細胞(図8Bおよび8C)またはヒトPD-L2を発現する細胞(図8D)を、示されている濃度の示されている一次抗体と共にインキュベートし、ついで該一次抗体の結合を二次ヤギ抗ヒトIgG抗体で検出した(実施例に記載されているとおり)。

【図9】図9は、同一ではないが重複するエピトープに抗体22C3および20C3が結合することを示す抗体結合競合アッセイの結果を示す。

【図10】図10は、示されている腫瘍型からのFFPEサンプルの22C3 ICH染色の強度の半定量的ゲシュタルト・スコアリング(gestalt scoring)の結果を示し、染色の度合はスコア数の増加と共に増強する。

【図11】図11は、IHCアッセイにおいて抗体22C3で検出されたヒトPD-L1発現が抗ヒトPD-1抗体(MK-3475)での治療に対するメラノーマ患者の応答と関連することを示しており、図11Aは、hPD-L1発現に関して陽性、陰性または曖昧として解釈される22C3-IHC染色の代表的イメージを示し、図11Bは、IHCアッセイによるhPD-L1発現に関して(曖昧と評価された患者を含む)陽性または陰性と評価された、陽性または陰性応答を示した患者の数を示す。

【0125】

実施例

実施例1. 抗PD-L1ハイブリドーマの作製およびスクリーニング

アジュバント中のヒトPD-L1-Fc融合タンパク質(R&D Systems(登録商標) Catalogue No. 156-B7-100)でBalb/Cマウスを免

10

20

30

40

50

疫化した。この融合タンパク質は、ヒト IgG1 フラグメント (Pro100-Lys300) に融合した PD-L1 の細胞外ドメイン (Phe19-Thr239) を含有する。12回の免疫化後、ヒト PD-L1 に対する高い力価を有する2匹のマウスからのリンパ節を集め、電気融合を行って2バッチのハイブリドーマを得、これを研究名称 MEB033 および MEB037 と命名した。

【0126】

ヒト PD-L1 に対する抗体を産生するハイブリドーマを特定するために、MEB033 および MEB037 ハイブリドーマバッチの上清をスクリーニングした。該スクリーニングは、ヒト hPD-L1-Fc タンパク質への結合に関する、タンパク質に基づく ELISA、ならびにヒト PD-L1-CHO ヒト PD-L1 CHO 安定形質転換体および陰性対照としての親 CHO 細胞への結合に関する、細胞に基づく ELISA を用いた。抗 PD-L1 抗体の存在について陽性の試験結果（データ非表示）を示した MEB033 ハイブリドーマのクローン 23 個および MEB037 のクローン 88 個からの上清ならびにそれらのサンプルを正常ヒト扁桃からの FFPF 組織切片上の IHC 反応性について試験した（データ非表示）。

10

【0127】

該クローン 88 個のうち、MEB037 バッチからのクローン 11 個のみが、後記表に挙げられている商業的に入手可能な抗 PD-L1 抗体で得られた染色パターンとの比較に基づいて、更なる評価を保証するのに十分な強度および見掛け特異性の染色パターンを示した。

20

【表4】

表6 商業的に入手可能な抗ヒトPD-L1抗体

| 企業 | カタログ番号 | 種 | ロット番号 |
|---------------|---------|-----|--------------|
| eBioscience | 14-5983 | マウス | 14-5983-82 |
| R&D | AF156 | ヤギ | EE1010109111 |
| US Biological | 22 | | |
| US Biological | 22E | | |
| Sigma | PRS4059 | ウサギ | 40590604 |

30

【0128】

本発明者らが、該実験抗体で得られた種々の染色パターンを、これらの商業的に入手可能な抗ヒト PD-L1 抗体で得られたパターンと比較したところ、染色の局在化および染色細胞のタイプを含む、染色パターン間の有意な相違を認めた。これらの相違を説明するために、本発明者らは幾つかの追加的実験を行い、これらの商業的に入手可能な抗体がいずれも、FFPE 切片における PD-L1 発現の IHC における使用に要求される以下の属性の組合せを与えないことを見出した：（1）感度 - 陽性対照組織（例えば、ヒト扁桃）における正常生理的発現および腫瘍組織（例えば、ヒトメラノーマサンプル）における発現を検出する能力；（2）特異性 - 染色パターンは PD-L1 の既知解剖的 / 細胞分布と相關する必要があり、中和可能である必要がある；ならびに（3）頑強（ロバスト） - 「重複」組織切片をアッセイするために使用された場合に染色パターンにおける変動がほとんど乃至全く無い。

40

【0129】

例えば、Sigma / ProSpeco PRS4059 抗体は扁桃ライセート上で複数のバンド（それらはいずれも PD-L1 を表すとは証明できなかった）を示し、フローサイトメトリーでは PD-L1 陽性であることを示した LOX メラノーマ細胞系を染色せず、そして IHC により陽性細胞系と陰性細胞系とを識別しないことを、本発明者らは見出した。

【0130】

これらのデータの幾つかを図 4 に示す。この図において、扁桃切片の免疫組織化学的染

50

色は、FFPE組織切片におけるPD-L1発現を検出するための15個の抗ヒトPD-L1抗体のなかで唯一の適当な候補としてGadiotら(前掲)により特定されたPRS4059抗体と比較して、FFPE組織上で特異かつ有用な免疫組織化学的特性を有する2つの抗体として、22C3および20C3を特定した。本発明者らにより行われた実験においては、Prosci抗体(PRS4059,ロット40590604;0.4mg/ml(一次)で使用)およびそれに続くウサギポリマー検出系(DAKO Envision)は扁桃における造血系列の全てを等しい強度で染色し、一方、22C3抗体は扁桃陰窩上皮および濾胞CD68+骨髄細胞(これはマクロファージと形態学的に合致している)を選択的に染色した(図4B)。抗体20C3で実質的に同じ染色パターンが観察された(データ非表示)。更に、22C3および20C3は、これらの2つの異なる細胞集団の間で、一貫した染色強度の相違を示しており、陰窩上皮での染色強度は濾胞マクロファージでの強度より遥かに大きい。3個全ての抗体がPD-L1抗原とのブレインキュベーションにより中和可能であった。このことは、該反応性が抗原結合性ドメイン(CDR)によりもたらされることを示している。

10

【0131】

実施例2.20C3および22C3抗PD-L1抗体の品質評価

この実施例は、FFPE組織切片のIHCアッセイにおける使用のための20C3および22C3抗体の有用性を評価するために行った追加的実験を記載する。

20

【0132】

1つの実験は、正常ヒトFFPE扁桃切片のIHCアッセイにおいて或る範囲のヒトPD-L1(hPD-L1)タンパク質発現を検出する、これらの2つの抗体の能力を評価した。22C3に関する代表的イメージを図5Aに示す。22C3での免疫組織化学的染色は扁桃陰窩上皮を強力に標識し、CD68+濾胞骨髄集団(推定マクロファージ)の弱ないし中等度の染色を示している。両方の抗体(20C3のデータは非表示)は、これらの2つの細胞型において、明確な膜/細胞表面パターンで細胞を標識する。扁桃におけるhPD-L1発現の妥当性(すなわち、2つの細胞集団(陰窩上皮および濾胞マクロファージ)へのIHC染色の限局)は、隣接FFPE扁桃組織切片上で、独立した方法(hPD-L1 mRNAに関するin-situハイブリダイゼーション[ISH])により確認された。また、IHCにより評価されたhPD-L1タンパク質の差次の発現(陰窩上皮>>濾胞マクロファージ)は、ISHで観察されたhPD-L1 mRNAの相対存在量に対応している。

30

【0133】

もう1つの実験はhPD-L1発現細胞に対する20C3および22C3の結合特異性を評価した。mRNA分析(qPCR)によりhPD-L1の発現に関して陰性であることが判明したHT144細胞、および高レベルのhPD-L1 mRNA(qPCR)を発現することが知られているLOXメラノーマ細胞を、前記実施例1に記載されている実験において得られた7個のハイブリドーマからの1マイクログラム/mlの精製マウスIgGで染色した。同じ濃度の無関係なアイソタイプ対照マウス抗体も使用した。一次マウス抗体を検出するために蛍光標識抗マウス二次抗体を使用した。染色および反復洗浄の後、該細胞をフローサイトメトリーにより分析し、該集団に関する中央値蛍光強度を計算した(>10,000の収集事象)。結果を図6に示す。

40

【0134】

細胞表面hPD-L1を検出するためのフローサイトメトリー試薬として、20C3および22C3ならびに他のhPD-L1抗体を使用した。アイソタイプ対照抗体曲線と比較した場合の20C3および22C3ヒストグラム曲線(図6A)の両方の有意な右シフトはhPD-L1陽性LOXメラノーマ細胞系上のhPD-L1の選択的検出を反映している。この分析からのこれらのヒストグラムなどに関連した中央値蛍光強度を図6Bに示す。20C3および22C3結合の選択性は陰性細胞系HT144上の有意な結合の欠如(すなわち、アイソタイプと同程度の22C3および20C3のMFI)により更に確認される。これとは対照的に、図6Bにおけるデータは、hPD-L1陽性LOXメラノ-

50

マ細胞系において、20C3および22C3の両方が、アイソタイプと比較して、少なくとも10倍のMFI増加をもたらすことを示している。したがって、(クローン5F9、7C8、13D2および31D3に加えて)20C3および22C3はフローサイトメトリー評価によりhPD-L1発現細胞への選択的結合を示す。

【0135】

もう1つの実験は、操作された及びヒト細胞系上のhPD-L1の発現を検出する、22C3抗体の能力を評価した。hPD-L1に関して陰性であるチャイニーズハムスター卵巣(CH0)細胞系を、ヒトPD-L1をコードする発現ベクターでトランスフェクトして、操作された陽性対照細胞系を得た。図7Bに示されているとおり、親CH0細胞系(陰性対照)およびトランスフェクト化CH0細胞系(陽性対照)のホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)細胞ペレットの22C3での免疫組織化学的染色は適当な陽性および陰性染色を示す。

10

【0136】

追加的なFFPEヒト細胞系ペレット(A375、HS578TおよびLOXメラノーマ)が22C3で染色され、図7Bに示されているとおり、ある範囲の染色パターンおよび強度を示した。22C3染色はLOXメラノーマ細胞上では強力かつ均一であったが、A375およびHS578T細胞ペレットにおいては、稀有な単一陽性細胞を示したに過ぎなかった。20C3抗体で、類似した染色が観察された(データ非表示)。これらの3つの細胞系において22C3によりIHCアッセイで検出されたhPD-L1発現レベルは、ベースラインとしてのユビキチンmRNAと共にqPCRを用いて評価されたこれらの細胞系におけるPD-L1 mRNAレベルと良く相関した。

20

【0137】

hPD-L1発現細胞に対する22C3の選択的結合および相対アフィニティを、細胞に基づくELISA実験において評価した。幾つかの細胞系(hPDL1-CHOK1細胞、親CHOK1細胞、hPDL2-CHOK1細胞およびLOX細胞)をコラーゲン被覆96ウェルプレートの個々のウェル上でブレーティングし、コンフルエント状態まで増殖させた。培地を除去し、1.4~3,000ng/mlの漸増濃度の一次抗体を含有する新鮮なCHOK1培地(10%BCSを含有するDMEM/F12)と交換した。以下の一次抗体を使用した:抗体20C3および22C3の、マウスIgG1アイソタイプを有するそれぞれ2つの異なる生産ロット、抗PD-L1抗体(BioLegend)および对照として働く抗PD-L2抗体。該一次抗体を37で1時間インキュベートし、PBS/0.01%Tween20で3回洗浄し、二次抗体であるヤギ抗ヒトIgG, Fc特異的HRP(Southern Biotech, Cat # 1030-05)コンジュゲートをCHOK1培地中の1:2000の希釈度で加えた。該二次抗体を37で1時間インキュベートし、前記のとおりに5回洗浄した。ELISAを、TMBを使用して現像し、0.1Nリン酸で停止させ、吸光度を450nmで読み取った(650nmのバックグラウンド除去を伴う)。図8に示す結果は、hPD-L1を発現する細胞への22C3および20C3の選択的結合を示しており、22C3の結合アフィニティは、hPD-L1 CHOK1操作細胞およびLOX細胞の両方に関して、20C3より大きい。

30

【0138】

20C3または22C3抗体のいずれかがマウスPD-L1に結合するかどうかを評価するために、類似したELISA実験を行った。マウスPD-L1へのいずれの抗体の有意な結合も観察されなかった(データ非表示)。

40

【0139】

実施例1に記載されている実験において特定された抗hPD-L1抗体の異なるペアの間の抗体結合競合アッセイ(「交差遮断」)を行った。該アッセイはFortebio(登録商標)Octet(登録商標)プラットフォームを使用し、これはバイオ・レイヤー(bio-layer)インターフェロメトリーに基づく。簡潔に説明すると、この技術は、時間(X時間)の経過に伴いバイオセンサー先端における光学的厚さ(Y軸)を増加させる結合抗体による波長シフト()として、バイオセンサー先端表面への初期抗体

50

(mAb1)の結合を測定する。該先端は、hPD-L1-Fcが結合している抗hulgセンサーからなる。抗PD-L1抗体の結合の際の光学的厚さの変化は、第1の垂直の赤色点線において始まる上向きの傾きの曲線において反映され(図9A、9Bおよび9Cにおけるグラフを参照されたい)、これらは溶液中への飽和濃度のmAb1(10マイクログラム/m1)の添加を表す。平衡状態にした後(~1000秒)、二次抗体をアッセイ溶液中に注入する(図9A、9Bおよび9Cにおける第2の垂直の赤色点線により示されている)。該曲線の追加的な可動域により示される、二次mAb2の結合は、それらの2つの抗体が非重複エピトープに結合することを示唆しており、一方、該曲線の可動域がほとんど乃至全く無いことは、それらの2つの抗体が重複または同一エピトープに結合することを示唆している。

10

【0140】

要約すると、該結果は、22C3結合が、5H9を除くmAb2として試験された全ての他の抗hPDL-1クローンの追加的結合と競合することを示している(図9A)。同様に、20C3も5H9結合とは競合しないが、22C3および4B7との中間的な度合の追加的結合を示している(図B)。総合すると、これらのデータは、20C3および22C3が重複エピトープに結合することを示している。

【0141】

以下の腫瘍(膀胱、食道、頭頸部、腎臓、HCC、乳房、肺、卵巣および胃)から調製されたFFPE切片上でIHC分析を行うことにより、種々の腫瘍型における或る範囲のhPD-L1発現を検出する、22C3抗体の能力を評価した。これらの腫瘍組織切片との22C3反応性の予備的スクリーニングを、染色の度合の半定量的「ゲシュタルト(gestalt)」解釈を用いて行った。図10に示されるとおり、22C3は、実質的に染色無し(スコア=0)から顕著な強力発現(スコア=4)までの範囲のPD-L1発現を検出可能であり、これは、免疫抑制性PD-1/PD-L1相互作用の阻止に応答しうる将来の腫瘍型を誘導するための、22C3によるIHCアッセイの有用性を示している。

20

【0142】

Merck and Co., Inc.により開発されている抗PD-1治療用抗体であるMK-3475に関する第1相(P001)治験に登録された18名のメラノーマ患者から得られたアーカイブサンプルの22C3免疫組織化学的評価を利用する研究において、PD-1およびPD-L1の相互作用を遮断する療法に応答する可能性がより高い患者を層別化するための22C3抗体の有用性を評価した。症例は2名の病理医により独立して評価され、「陽性」、「陰性」または「曖昧」として帰属された。3つの範疇を示すこれらの代表的イメージを図11Aに示す。このサンプルセット(n=18)に関する病理医間の一致は100%であった。

30

【0143】

臨床応答を、免疫関連応答基準(irRC)を用いて評価し、IHC結果と相關させた。この分析では、「曖昧」例は陰性とみなされ、72%のアッセイ感度および86%の特異性を示した。図11Bに示す結果は、FFPE組織上の22C3免疫組織化学的染色が患者選択バイオマーカーとしての有用性を有することを示唆している。

40

【0144】

前記実験の結果に基づいて、本発明者らは、前記の88個の実験用ハイブリドーマのうちの2つ(MEB037.20C3.138およびMEB037.20C3.116)により産生された抗体が、候補FFPE反応性IHC診断試薬としての開発のために考慮されるための感度、特異性および頑強さの必須組合せを有すると判定した。

【0145】

実施例3.22C3抗PD-L1抗体に対するヒトPD-L1上のエピトープのマッピング

11マーのヒスチジンタグに融合した成熟ヒトPD-L1(配列番号38)の細胞外ドメインを含有する抗体22C3およびPD-L1-Hisタンパク質を使用して、HDX

50

- M S エピトープマッピングを行った。ヒト P D - L 1 (配列番号 3 8) の細胞外ドメイン上のセグメント 1 5 6 ~ 1 7 8 および 1 9 6 ~ 2 0 6 は抗体 2 2 C 3 への結合に際して強力な防御 (> 1 0 % の平均重水素化レベルの相違) を示した。また、セグメント 3 ~ 9 、 1 0 ~ 1 3 、 8 8 ~ 9 3 および 1 3 5 ~ 1 4 7 は、限界的であるが有意な防御を示した (5 % ~ 1 0 % の平均重水素化レベルの相違) 。

【 0 1 4 6 】

本明細書中に引用されている全ての参考文献は、各個の刊行物、データベースエントリー (例えば、GenBank 配列または GeneID エントリー) 、特許出願または特許が参照により本明細書に組み入れられると具体的かつ個別に示されている場合と同様に、参照により本明細書に組み入れることとする。参照により組み入れるというこの陳述は、そのような引用が、参照により組み入れるという特別な陳述に直に隣接して存在しない場合であっても、37 C . F . R . (米国特許規則) § 1 . 5 7 (b) (1) に従い、各個の刊行物、データベースエントリー (例えば、Genbank 配列または GeneID エントリー) 、特許出願または特許 [それらのそれぞれは 37 C . F . R . (米国特許規則) § 1 . 5 7 (b) (2) に従い明らかに特定されるものである] に関するものであることが出願人により意図される。参照により組み入れるという特別な陳述が明細書中に含まれている場合、それは、参照により組み入れるというこの一般的 (general) 陳述を何ら弱めるものではない。本明細書における参考文献の引用は、該参考文献が関連先行技術であると自認するものではなく、また、それは、これらの刊行物または文書の内容または日付に関して何ら自認するものでもない。

10

20

【 0 1 4 7 】

本発明は、本明細書に記載されている特定の実施形態により範囲において限定されるものではない。実際、本明細書に記載されているものに加えて、本発明の種々の変更が前記説明および添付図面から当業者に明らかとなるであろう。そのような変更は添付の特許請求の範囲の範囲内に含まれると意図される。

【 0 1 4 8 】

前記の明細書は、当業者が本発明を実施することを可能にするのに十分なものであるとみなされる。本明細書に示され記載されているものに加えて、本発明の種々の変更が前記説明から当業者に明らかとなり、添付の特許請求の範囲の範囲内に含まれる。

【図1】

抗体 20C3

重鎖

[ATGGAAAGGCACTGGATCTTCCTGTTTCAGTAAC TGCA GGG GIG CCA CTCC]

CAGGTCCAGGTT CAGCAGTCTGGGCTGA ACTGGCAGAACCTGGGCCCTCAGTGAA GATGTCCTGCAAGGCC CTC
TGCTCATCTTACTAGCTGAGCTGCAGCTGGCTAAGCAGAGGGCTGGACAGGGCTGGAA TGGATTGGAT
ACATTAATCCCAGCAGTGATTATAATGAATACAGTGAGAAATTCTATGACACAGGCCACATTGACTCAGACAAA

GCCTCACCA CACGCCATAC TGCA ACTGATCAGCCTGACATCTGAGACTCTGAGCTTAACTGTGCAAGATC

GGGATGGTTAGTACATGGAGACTATTATTTGACTCTGGGCCAAGGACACACTCTCACAGTCTCTCA

[MERHIVFLFLFSVTAGVHS]

QVQVQSGAELAEPGASVKMSCKASGYIFTSYWMIKQRPGQGLEWIGYINPSSDYNEYSEKFMDKATLTADK

ASTTAYMQLISLTSEDSAVYYCARSGWLVHGDDYFEDWQGQGTTLVSS

軽鎖

[ATGGATTACAGGCCAGGGTCTTATATTGCTGCTCATGGGTATCTGGTACCTTGGG]

GACATTGTGATGTCACAATCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTCAGCAGGAGAGGTCACATGAGCTGCAAAATC
CAGTCAGA GTCGTCACAGTAGAACCGGAAAGAACACTTGGCTTGGGTTGACAGCAGAACCCAGGGCAGTC
CTAAACCTGCTGATCTACIGGGCATCCTACAGGAAATCTGGGCTCCTGATCGCTTACAGCAGTGGATCTGG
ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGCAAGGCTGAAGACCTGGCAGTTAACTGCAAGAACATCTTATGA
TGTGGTCA CGGTTGGTGTGGGACCAAGCTGAGCTGAA

[MDSQAQVLILLLLWVSGTFG]

DIVMSQSPSSLAVSAGEKVMTMSCKSSQSLNSRTRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWA STRESGVPDFRTGS

GSG TDFTLTISSVQAEDLAVYYCQOSYDVFAGTKLELK

FIG.1

【図2】

抗体 22C3

重鎖

[ATGGAAAGGCACTGGATCTTCCTGTTTCAGTAAC TGCA GGG GIG CCA CTCC]

CAGGTCCACCTT CAGCAGTCTGGGCTGA ACTGGCAAACCTGGGCC CAGTGAA GATGTCCTGCAAGGCC
TGGCTACAGCTTACTAGTTACTGGATAACTGGATAAGCAGAGGGCTGGACAGGGCTGGAA TGGATTGGAT
ACATTAATCCCAGCAGTGATTATAATGAATACAGTGAGAAATTCTATGACACAGGCCACATTGACTGCTGACAGA
GCCTCACCA CACGCCATAC TGCA ACTGATCAGCCTGACATCTGAGACTCTGAGCTTAACTGTGCAAGATC

[MERHIVFLFLFSVTAGVHS]

QVHLQSGAELAEPGASVKMSCKASGYIWTWIKQRPGQGLEWIGYINPSSGYHEYNOKEIDKATLTADK
SSSTAYMHLTSLSEDSAVYYCARSGWLTHGDYYFEDWQGQGTTLVSS

軽鎖

[ATGGATTACAGGCCAGGGTCTTATATTGCTGCTCATGGGTATCTGGTACCTTGGG]

GACATTGTGATGTCACAGTCTCCCTCCCTGGCTGTGTCAGCAGGAGAGAAGGTCACATGACCTGCAAAATC
CAGTCAGA GTCGTCACACTAGAACCCGAAAGAACACTTGGCTTGGTACCGCAGAACCCAGGGCAGTC
CTAAACCTGCTGATCTACIGGGCATCCTACAGGAAATCTGGGCTCCTGATCGCTTACAGCAGTGGATCTGG
ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGCAAGGCTGAAGACCTGGCAGTTAACTGCAAAATCTTATGA
TGTGGTCA CGGTTGGTGTGGGACCAAGCTGAGCTGAA

[MDSQAQVLILLLLWVSGTCG]

DIVMSQSPSSLAVSAGEKVMTCKSSQSLNHTSTRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWA STRESGVPDFRTGS

FIG.2

【図3】

成熟可変領域のアライメント

軽鎖

20C3 DIVMSQSPSSLAVSAGEKVMTMSCKSSQSLNSRTRKNYLAWY
22C3 DIVMSQSPSSLAVSAGEKVMTCKSSQSLNHTSTRKNYLAWY

CDR1

20C3 QQKPGQSPKLLIYWA STRESGVPDFRTGS GSG TDFTLTISSV
22C3 QQKPGQSPKLLIYWA STRESGVPDFRTGS GSG TDFTLTISSV

CDR2

20C3 QAEDLAVYYCQOSYDVFAGTKLELK
22C3 QAEDLAVYYCQOSYDVFAGTKLELK

CDR3

重鎖

20C3 QVQVQSGAELAEPGASVKMSCKASGYIWTWIKQRPGQGL
22C3 QVHLQSGAELAEPGASVKMSCKASGYIWTWIKQRPGQGL

CDR1

20C3 FWIGYINPSSDYNEYSEKFMDKATLTADKASTTAYMQLISLSD
22C3 EWIGYINPSSGYHEYNOKEIDKATLTADRSSTAYMHLTSLS

CDR2

20C3 SAVYYCARSGWLVHGDDYFEDWQGQGTTLVSS
22C3 SAVYYCARSGWLTHGDYYFEDWQGQGTTLVSS

CDR3

FIG.3

【図4A】

扁桃: PRS4059ホリクローナルサギ抗hPD-L1

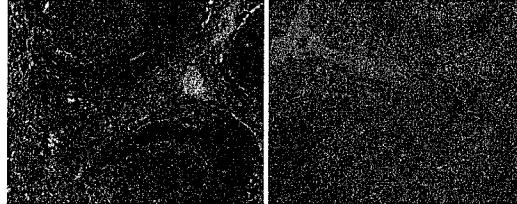


FIG.4A

【図4B】

扁桃: 22C3モノクローナルマウス抗hPD-L1

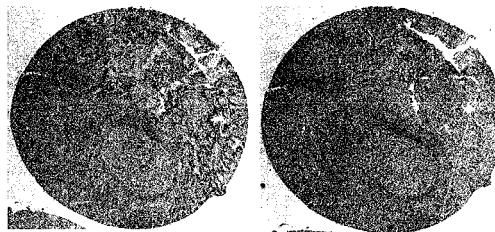


FIG.4B

【図 5 A】

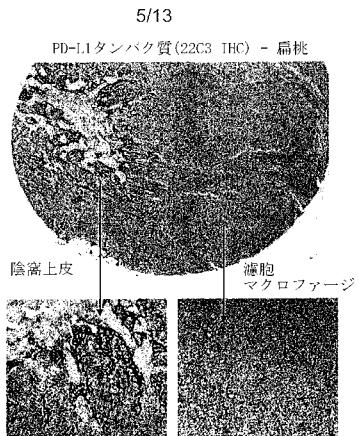


FIG.5A

【図 5 B】

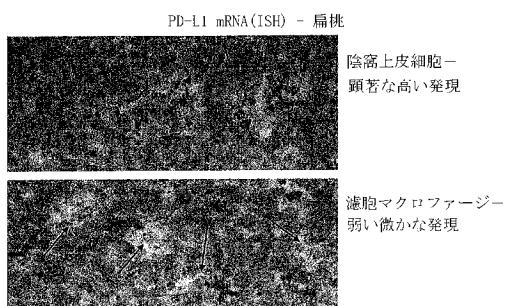


FIG.5B

【図 6 A】

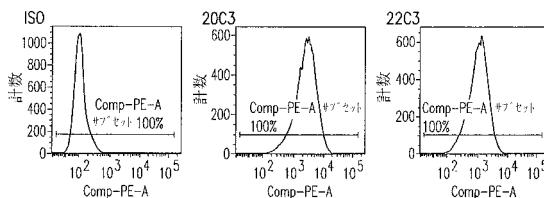


FIG.6A

【図 6 B】

| 細胞系 | クローン | PD-L1 MFI (PE) |
|--------|-------|----------------|
| 陰性対照細胞 | HT144 | アイソタイプ 95.6 |
| | HT144 | 1B10 |
| | HT144 | 5F9 |
| | HT144 | 7C8 |
| | HT144 | 13D2 |
| | HT144 | 2003 |
| 陽性対照細胞 | HT144 | 22C3 |
| | LOX | アイソタイプ 102 |
| | LOX | 1B10 |
| | LOX | 5F9 |
| | LOX | 7C8 |
| | LOX | 13D2 |
| | LOX | 2003 |
| | LOX | 22C3 |
| | LOX | 31D3 |
| | LOX | 2518 |
| | LOX | 1043 |
| | LOX | 1666 |

FIG.6B

【図 7 A】

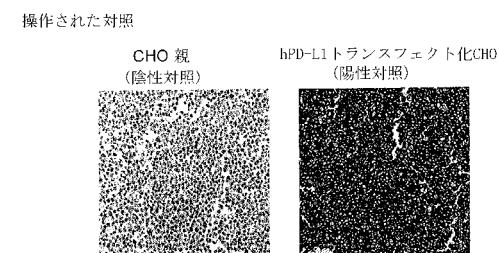


FIG.7A

【図 7 B】

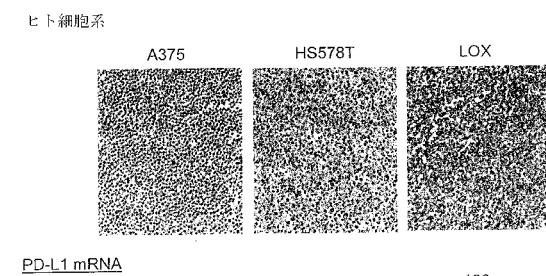


FIG.7B

【図 8 B】

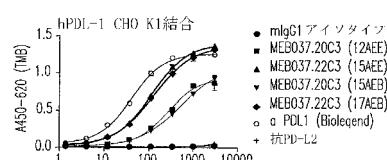


FIG.8B

【図 8 C】

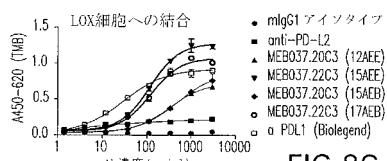


FIG.8C

【図 8 D】

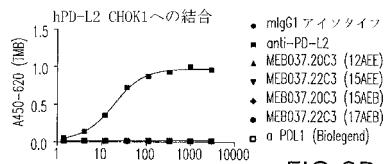


FIG.8D

【図 8 A】

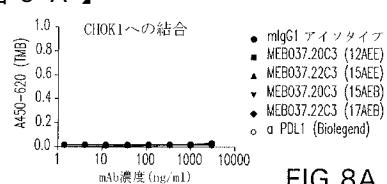


FIG.8A

【 図 9 A 】

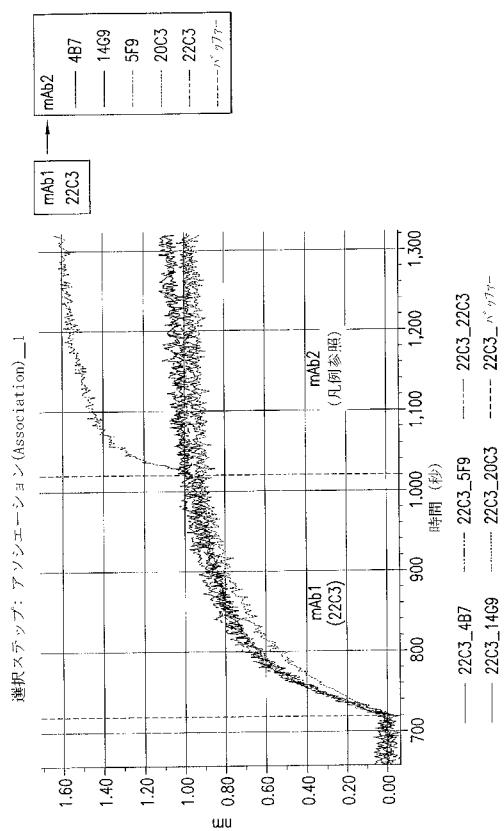


FIG. 9A

〔 図 9 C 〕

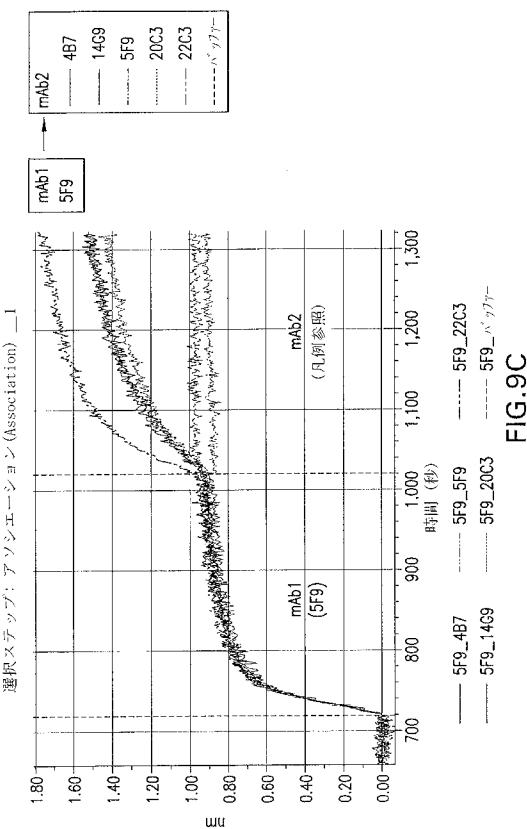


FIG. 9C

【 図 9 B 】

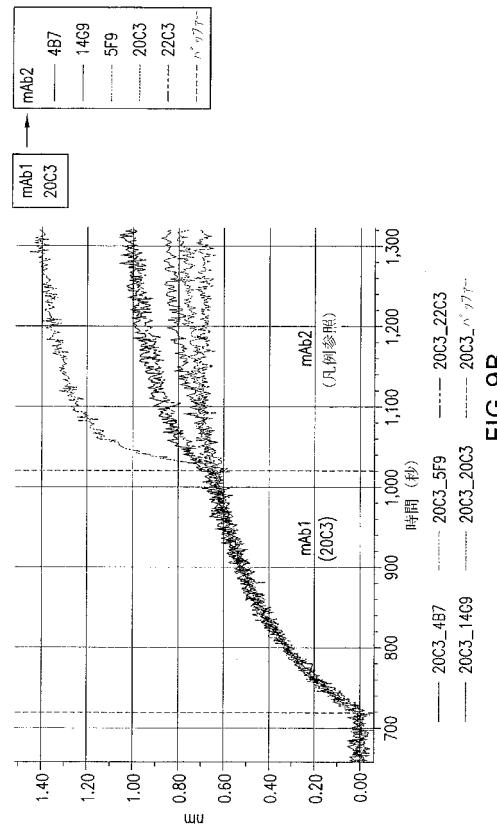


FIG 9B

【 図 1 0 】

22C3 IHC: 半定量的「ゲシュタルト」スコアリング

FIG. 10

【図 11A】

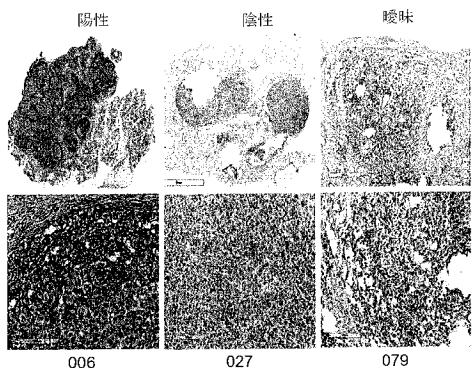


FIG.11A

【図 11B】

| | | MK-3475 応答 | |
|--------------------------|----|-------------------|----|
| | | 陽性 | 陰性 |
| 抗-PD-L1 (22C3) IHC 陽性 | 陽性 | 8 | 1 |
| | 陰性 | 3 | 6 |
| | | 感度 = 8/8+3 = 72% | |
| | | 特異性 = 6/1+6 = 86% | |

FIG.11B

【配列表】

2016504336000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成27年8月21日(2015.8.21)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

C D R L 1、C D R L 2 および C D R L 3 の、3 個の軽鎖 C D R、ならびに C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 の、3 個の重鎖 C D R を含む、ヒト P D - L 1 に特異的に結合する単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントであって、

(a) C D R L 1 が、配列番号 1、配列番号 9、配列番号 21、配列番号 9 の変異体および配列番号 21 の変異体からなる群から選択され、

(b) C D R L 2 が、配列番号 2 および配列番号 2 の変異体からなる群から選択され、

(c) C D R L 3 が、配列番号 3、配列番号 10、配列番号 22、配列番号 10 の変異体および配列番号 22 の変異体からなる群から選択され、

(d) C D R H 1 が、配列番号 5、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 26、配列番号 27、配列番号 14 の変異体、配列番号 15 の変異体、配列番号 26 の変異体および配列番号 27 の変異体からなる群から選択され、

(e) C D R H 2 が、配列番号 6、配列番号 16、配列番号 28、配列番号 16 の変異体および配列番号 28 の変異体からなる群から選択され、ならびに

(f) C D R H 3 が、配列番号 7、配列番号 17、配列番号 29、配列番号 17 の変異

体および配列番号29の変異体からなる群から選択される、単離された抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【請求項2】

前記の3個の軽鎖CDRが配列番号1、配列番号2および配列番号3であり、前記の3個の重鎖CDRが配列番号5、配列番号6および配列番号7である、請求項1記載の単離された抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【請求項3】

前記の3個の軽鎖CDRが配列番号9、配列番号2および配列番号10であり、前記の3個の重鎖CDRが配列番号14、配列番号16および配列番号17である、請求項1記載の単離された抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【請求項4】

前記の3個の軽鎖CDRが配列番号21、配列番号2および配列番号22であり、前記の3個の重鎖CDRが配列番号26、配列番号28および配列番号29である、請求項1記載の単離された抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【請求項5】

軽鎖可変領域および重鎖可変領域を含む、請求項1記載の単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントであって、

(a) 該軽鎖可変領域が、配列番号4、配列番号13、配列番号13の変異体、配列番号25および配列番号25の変異体からなる群から選択され、ならびに

(b) 該重鎖可変領域が、配列番号8、配列番号20、配列番号20の変異体、配列番号32および配列番号32の変異体からなる群から選択される、請求項1記載の単離された抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【請求項6】

軽鎖可変領域および重鎖可変領域を含む、請求項1記載の単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントであって、

(a) 該軽鎖可変領域が配列番号13であり、該重鎖可変領域が配列番号20であり、

(b) 該軽鎖可変領域が配列番号25であり、該重鎖可変領域が配列番号32であり、配列番号32におけるXがQであり、または

(c) 該軽鎖可変領域が配列番号25であり、該重鎖可変領域が配列番号32であり、配列番号32におけるXがpEである、請求項1記載の単離された抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【請求項7】

ヒトPD-L1に特異的に結合し、配列番号25の軽鎖可変領域および配列番号32の重鎖可変領域を含む参照抗体の結合を遮断する、単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントであって、

該遮断する抗体が、配列番号38のアミノ酸156～178の第1セグメントにおける残基、および配列番号38のアミノ酸196～206の第2セグメントにおける残基に結合する、前記単離された抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【請求項8】

遮断抗体が、配列番号32のアミノ酸3～9、配列番号38のアミノ酸10～13、配列番号38のアミノ酸88～93、および配列番号38のアミノ酸135～147からなる群から選択されるヒトPD-L1セグメントのいずれか1つ、2つ、もしくは3つ、または4つ全てにおける残基に更に結合する、請求項7記載の単離された抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【請求項9】

抗体軽鎖可変領域および抗体重鎖可変領域の一方または両方をコードする単離された核酸であって、

(a) 該抗体軽鎖可変領域が、配列番号4、配列番号13および配列番号25からなる群から選択され、ならびに

(b) 該抗体重鎖可変領域が、配列番号8、配列番号20および配列番号32（ここで

、配列番号 3 2 における X は Q である) からなる群から選択される、単離された核酸。

【請求項 1 0】

該抗体軽鎖可変領域が配列番号 1 3 または配列番号 2 5 であり、該抗体重鎖可変領域が配列番号 2 0 または配列番号 3 2 である、請求項 9 記載の単離された核酸。

【請求項 1 1】

発現ベクターである、請求項 9 または 1 0 記載の単離された核酸。

【請求項 1 2】

請求項 1 1 記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 1 3】

ヒトから摘出されたヒト組織サンプルを P D - L 1 発現に関してアッセイする方法であつて、

(a) ヒト P D - L 1 への P D - L 1 結合試薬の特異的結合を可能にする条件下、該組織サンプルを P D - L 1 結合試薬と接触させ、ここで、該結合試薬は、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項記載の抗体または抗原結合性フラグメントを含み、

(b) 未結合 P D - L 1 結合試薬を除去し、

(c) 結合した P D - L 1 結合剤の存在または非存在を検出することを含む、方法。

【請求項 1 4】

結合した結合試薬の量を定量することを更に含む、請求項 1 3 記載の方法。

【請求項 1 5】

該結合試薬が配列番号 1 3 および配列番号 2 0 を含む、または配列番号 2 5 および配列番号 3 2 を含む、請求項 1 3 または請求項 1 4 記載の方法。

【請求項 1 6】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項記載の単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントと、ヒト P D - L 1 に結合した該抗体または該抗原結合性フラグメントの複合体を検出するための試薬のセットとを含むキット。

【請求項 1 7】

該抗体または抗原結合性フラグメントが配列番号 1 3 および配列番号 2 0 を含む、または配列番号 2 5 および配列番号 3 2 を含む、請求項 1 6 記載のキット。

【請求項 1 8】

抗体分子の混合物を含む抗体組成物であつて、該混合物における抗体分子の大部分が配列番号 2 5 および配列番号 3 2 (ここで、配列番号 3 2 における X は p E である) を含み、該混合物における抗体分子の残りが配列番号 2 5 および配列番号 3 2 (ここで、配列番号 3 2 における X は Q である) を含む、抗体組成物。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|---|
| International application No PCT/US2013/075932 |
|---|

| |
|---|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/2827 G01N33/577 G01N33/574 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 G01N |
|--|

| |
|---|
| 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, EMBASE, FSTA, CHEM ABS Data, 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 | JULES GADIOD ET AL: "Overall survival and PD-L1 expression in metastasized malignant melanoma", CANCER, vol. 117, no. 10, 29 November 2010 (2010-11-29), pages 2192-2201, XP055107383, ISSN: 0008-543X, DOI: 10.1002/cncr.25747 cited in the application the whole document ----- -/- | 1-20 |

| |
|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. |
|--|

| |
|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex. |
|--|

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

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

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

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

"&" document member of the same patent family

| |
|---|
| Date of the actual completion of the international search |
|---|

| |
|--|
| Date of mailing of the international search report |
|--|

| |
|---------------|
| 11 April 2014 |
|---------------|

| |
|------------|
| 22/05/2014 |
|------------|

| |
|--|
| 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 |
|--------------------|

| |
|--------------|
| Sirim, Pinar |
|--------------|

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|---|
| International application No PCT/US2013/075932 |
|---|

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X | DONG HUA: "B7-H1 expression is associated with expansion of regulatory T cells in colorectal carcinoma", WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY, vol. 18, no. 9, 1 January 2012 (2012-01-01), page 971, XP055110548, ISSN: 1007-9327, DOI: 10.3748/wjg.v18.i9.971 the whole document ----- | 1-20 |
| X | HOLGER KRÖNIG ET AL: "PD-1 expression on Melan-A-reactive T cells increases during progression to metastatic disease", INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, vol. 130, no. 10, 11 January 2012 (2012-01-11), pages 2327-2336, XP055110549, ISSN: 0020-7136, DOI: 10.1002/ijc.26272 the whole document ----- | 1-20 |
| X | THOMPSON R H ET AL: "Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up", CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 66, no. 7, 1 April 2006 (2006-04-01), pages 3381-3385, XP008091321, ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4303 the whole document ----- | 1-20 |
| X | WU C ET AL: "Immunohistochemical localization of programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) in gastric carcinoma and its clinical significance", ACTA HISTOCHEMICA, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 108, no. 1, 10 May 2006 (2006-05-10), pages 19-24, XP027962807, ISSN: 0065-1281 [retrieved on 2006-05-10] the whole document ----- -/- | 1-20 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|---|
| International application No PCT/US2013/075932 |
|---|

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X | HONG LI ET AL: "The characteristic expression of B7-associated proteins in Langerhans cell sarcoma", ACTA HISTOCHEMICA, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 114, no. 7, 21 December 2011 (2011-12-21), pages 733-743, XP028399033, ISSN: 0065-1281, DOI: 10.1016/J.ACTHIS.2011.12.010 [retrieved on 2012-01-12] the whole document ----- | 1-20 |
| X | J. HAMANISHI ET AL: "Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 104, no. 9, 27 February 2007 (2007-02-27), pages 3360-3365, XP055030513, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.0611533104 the whole document ----- | 1-20 |
| X | DING H ET AL: "PD-L1 is expressed by human renal tubular epithelial cells and suppresses T cell cytokine synthesis", CLINICAL IMMUNOLOGY, ACADEMIC PRESS, US, vol. 115, no. 2, 1 May 2005 (2005-05-01), pages 184-191, XP004879483, ISSN: 1521-6616, DOI: 10.1016/J.CLIM.2005.01.005 the whole document ----- | 1-20 |
| X | LIANCAI WANG ET AL: "Clinical Significance of B7-H1 and B7-1 Expressions in Pancreatic Carcinoma", WORLD JOURNAL OF SURGERY ; OFFICIAL JOURNAL OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF SURGERY/SOCIÉTÉ INTERNATIONALE DE CHIRURGIE, SPRINGER-VERLAG, NE, vol. 34, no. 5, 10 February 2010 (2010-02-10), pages 1059-1065, XP019800514, ISSN: 1432-2323 the whole document ----- -/- | 1-20 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|---|
| International application No PCT/US2013/075932 |
|---|

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X,P | DATABASE MEDLINE [Online] US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; 2013, BIGELOW ELAINE ET AL: "Immunohistochemical staining of B7-H1 (PD-L1) on paraffin-embedded slides of pancreatic adenocarcinoma tissue.", XP002722587, Database accession no. NLM23328703 abstract -& Elaine Bigelow ET AL: "Immunohistochemical staining of B7-H1 (PD-L1) on paraffin-embedded slides of pancreatic adenocarcinoma tissue.", Journal of visualized experiments : JoVE, 1 March 2013 (2013-03-01), XP055111169, Retrieved from the Internet: URL: http://www.jove.com/video/4059/immunohistochemical-staining-b7-h1-pd-l1-on-paraffin-embedded-slides [retrieved on 2014-04-01] the whole document ----- | 1-20 |
| X,P | CHEN BENJAMIN J ET AL: "PD-L1 Expression Is Characteristic of a Subset of Aggressive B-cell Lymphomas and Virus-Associated Malignancies", CLINICAL CANCER RESEARCH, THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 19, no. 13, 1 July 2013 (2013-07-01), pages 3462-3473, XP009177218, ISSN: 1078-0432 [retrieved on 2013-05-14] the whole document ----- | 1-20 |
| X,P | SHENG-JIA SHI ET AL: "B7-H1 Expression Is Associated with Poor Prognosis in Colorectal Carcinoma and Regulates the Proliferation and Invasion of HCT116 Colorectal Cancer Cells", PLOS ONE, vol. 8, no. 10, 4 October 2013 (2013-10-04), page e76012, XP055110544, DOI: 10.1371/journal.pone.0076012 the whole document ----- | 1-20 |
| X,P | WO 2013/173223 A1 (SQUIBB BRISTOL MYERS CO [US]) 21 November 2013 (2013-11-21) the whole document ----- | 1-20 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2013/075932

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|---------------------|--------------------------------|--------------------------|
| WO 2013173223 A1 | 21-11-2013 US WO | 2013309250 A1 2013173223 A1 | 21-11-2013 21-11-2013 |

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 1/21 (2006.01) | C 1 2 N 1/21 | |
| C 1 2 N 5/10 (2006.01) | C 1 2 N 5/00 | 1 0 1 |
| G 0 1 N 33/53 (2006.01) | G 0 1 N 33/53 | V |

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,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,RO,R,S,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,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,H,R,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

| | |
|---------|---|
| (74)代理人 | 100119253 弁理士 金山 賢教 |
| (74)代理人 | 100124855 弁理士 坪倉 道明 |
| (74)代理人 | 100129713 弁理士 重森 一輝 |
| (74)代理人 | 100137213 弁理士 安藤 健司 |
| (74)代理人 | 100143823 弁理士 市川 英彦 |
| (74)代理人 | 100151448 弁理士 青木 孝博 |
| (74)代理人 | 100183519 弁理士 櫻田 芳恵 |
| (74)代理人 | 100196483 弁理士 川喜 洋祐 |
| (74)代理人 | 100185959 弁理士 今藤 敏和 |
| (74)代理人 | 100146318 弁理士 岩瀬 吉和 |
| (74)代理人 | 100127812 弁理士 城山 康文 |
| (72)発明者 | ピアース, ロバート, エイチ アメリカ合衆国、カリフォルニア・94107、サン・フランシスコ、ブライアント・ストリート ・712・ナンバー5 |
| (72)発明者 | ボーン, パトリシア アメリカ合衆国、カリフォルニア・94304、パロ・アルト、サウス・カリフォルニア・アベニ ユー・901 |
| (72)発明者 | リーアン, リンダ アメリカ合衆国、カリフォルニア・94304、パロ・アルト、サウス・カリフォルニア・アベニ ユー・901 |
| (72)発明者 | ビグラー,マイケル アメリカ合衆国、カリフォルニア・94304、パロ・アルト、サウス・カリフォルニア・アベニ ユー・901 |

4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AA93Y AB01 BA02 CA25 CA44 CA46
4H045 AA11 BA41 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 与人程序死亡配体1 (PD-L1) 结合的抗体 | | |
| 公开(公告)号 | JP2016504336A | 公开(公告)日 | 2016-02-12 |
| 申请号 | JP2015549600 | 申请日 | 2013-12-18 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 默沙东CORP. | | |
| 申请(专利权)人(译) | 默克公司和夏普公司巨蛋 | | |
| [标]发明人 | ピアースロバートエイチ ボーンパトリシア リーアンリンダ ビグラーマイケル | | |
| 发明人 | ピアース,ロバート,エイチ ボーン,パトリシア リーアン,リンダ ビグラー,マイケル | | |
| IPC分类号 | C07K16/28 C07K16/46 C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 G01N33/53 | | |
| CPC分类号 | C07K16/2827 C07K2317/565 G01N33/57407 G01N33/6872 C07K2317/31 C07K2317/34 G01N33/57492 G01N33/6878 G01N2333/70532 | | |
| FI分类号 | C07K16/28.ZNA C07K16/46 C12N15/00.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 G01N33/53. V | | |
| F-TERM分类号 | 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/GA11 4B024/HA03 4B065/ /AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/ /CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 | | |
| 代理人(译) | 小野 诚 金山 贤教 安藤健二 市川英彦 青木孝弘 近藤俊 | | |
| 优先权 | 61/745386 2012-12-21 US | | |
| 其他公开文献 | JP6586014B2 | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本公开公开了与人PD-L1特异性结合的分离的抗体和此类抗体的抗原结合片段，以及与人PD-L1结合的抗PD-L1抗体或结合片段。提供了一种试剂盒，其包含用于检测所述抗体或其抗原结合片段的复合物的一组试剂。本公开的抗体和抗原结合片段可用于免疫组织化学检测组织样品中人PD-L1表达。还提供了编码本发明的抗体和抗原结合片段的核酸分子，以及用于表达它们的表达载体和宿主细胞。[选择图]图11B

| | | | |
|-------------|------------------------------|---------|---|
| (21)出願番号 | 特願2015-549600 (P2015-549600) | (71)出願人 | 596129215 メリク・シャープ・アンド・ドーム・コー ボレーション Merck Sharp & Dohme Corp. |
| (86)(22)出願日 | 平成25年12月18日 (2013.12.18) | | アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー、0 7065-0907 ローウェイ、イース ト・リンカーン・アベニュー、126 126 East Lincoln Av enue, Rahway, New Jer sey 07065-0907 U. S. A. |
| (85)翻訳文提出日 | 平成27年8月17日 (2015. 8. 17) | | |
| (86)国際出願番号 | PCT/US2013/075932 | | |
| (87)国際公開番号 | W02014/100079 | | |
| (31)優先権主張番号 | 61/745,386 | (74)代理人 | 100114188 弁理士 小野 誠 |
| (32)優先日 | 平成24年12月21日 (2012.12.21) | | |
| (33)優先権主張国 | 米国 (US) | | |

最終頁に統く