

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6666905号
(P6666905)

(45) 発行日 令和2年3月18日 (2020.3.18)

(24) 登録日 令和2年2月26日 (2020.2.26)

(51) Int. Cl.	F I
C O 7 K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04
C 1 2 Q 1/00 (2006.01)	C 1 2 Q 1/00 Z
G O 1 N 33/574 (2006.01)	G O 1 N 33/574 A
請求項の数 15 (全 45 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2017-514966 (P2017-514966)	(73) 特許権者	516357063
(86) (22) 出願日	平成27年5月29日 (2015.5.29)		スプリング バイオサイエンス コーポレーション
(65) 公表番号	特表2017-518366 (P2017-518366A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 94588, プレザントン, ハシエンダ ドライブ 4300
(43) 公表日	平成29年7月6日 (2017.7.6)	(74) 代理人	110002077
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/061921		園田・小林特許業務法人
(87) 国際公開番号	W02015/181342	(72) 発明者	チュー, イーフェイ
(87) 国際公開日	平成27年12月3日 (2015.12.3)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 95131, サン ノゼ, マックスウェルウェイ 1408
審査請求日	平成30年5月28日 (2018.5.28)		
(31) 優先権主張番号	62/004,572		
(32) 優先日	平成26年5月29日 (2014.5.29)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	62/069,420		
(32) 優先日	平成26年10月28日 (2014.10.28)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 PD-L1 抗体及びその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

重鎖 (HC) 免疫グロブリン可変ドメイン配列と軽鎖 (LC) 免疫グロブリン可変ドメイン配列とを含む単離された抗体であって、アミノ酸配列 C G I Q D T N S K K Q S D T H L E E T (配列番号 1) を含むヒト PD-L1 のエピトープに結合し、かつ／又は少なくとも 1.5×10^{-11} M の半数効果濃度 (EC₅₀) を有し、

HC が、

(a) アミノ酸配列 N H A I S (配列番号 14) を含む HC CDR1 ;

(b) アミノ酸配列 T I N S D T H T Y Y A T W P K G (配列番号 15) を含む HC CDR2 ; 及び

(c) アミノ酸配列 R I F S S S N I (配列番号 16) を含む HC CDR3 を含み；かつ

LC が、

(a) アミノ酸配列 Q A S Q S I Y N N N W L S (配列番号 17) を含む LC CDR1 ;

(b) アミノ酸配列 L A S T L A S (配列番号 12) を含む LC CDR2 ; 及び

(c) アミノ酸配列 I G G E S S N N D G I A (配列番号 18) を含む LC CDR3 を含む、抗体。

【請求項 2】

HC 免疫グロブリン可変ドメイン配列が配列番号 2 のアミノ酸配列を含み、かつ LC 免

疫グロブリン可変ドメイン配列が配列番号 3 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

抗体がモノクローナル抗体、キメラ抗体又はヒト化抗体である、請求項 1 又は 2 に記載の抗体。

【請求項 4】

抗原結合断片が F a b、F (a b ')₂、F a b '、s c F_v、及び F_v からなる群より選択される、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の抗体の抗原結合断片。

【請求項 5】

生物学的試料中の P D - L 1 を検出する方法であって、試料を請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の抗体又は請求項 4 に記載の抗原結合断片と接触させることと、抗体又は抗原結合断片の P D - L 1 への結合により形成される複合体を検出することを含む、方法。

10

【請求項 6】

試料が細胞又は組織試料を含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

試料が腫瘍試料である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

試料ががん罹患していると診断されるか、罹患していることが疑われるか、又は罹患するリスクがある対象から得られており、かつ、がんが膀胱移行細胞癌、肺腺癌、乳管癌、ホジキンリンパ腫、膵臓腺癌、前立腺腺癌、子宮頸部扁平上皮癌、皮膚扁平上皮癌、及び非小細胞肺癌からなる群より選択される、請求項 5 に記載の方法。

20

【請求項 9】

対象から単離された試料中の病的細胞を検出する方法であって、

(a) 生物学的試料中の P D - L 1 に結合する、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の抗体又は請求項 4 に記載の抗原結合断片により形成された複合体を検出することによって、対象からの該試料中の P D - L 1 のレベルを検出すること；及び

(b) 工程 (a) で観察された P D - L 1 のレベルを対照生物学的試料中で観察された P D - L 1 のレベルと比較すること

を含み、

30

P D - L 1 のレベルが対照生物学的試料中で観察されたレベルと比較して上昇している場合に病的細胞が検出され、P D - L 1 レベルが対照生物学的試料中で観察されたレベルと比較して上昇していない場合には検出されない、方法。

【請求項 10】

対象の生物学的試料が肺、腎臓、膀胱、乳房、膵臓、前立腺、子宮頸部又は皮膚から単離された一又は複数の試料を含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

検出が免疫組織化学 (I H C)、ウェスタンブロッティング、フローサイトメトリー又は E L I S A のうちの一又は複数を含む、請求項 5 から 8 のいずれか一項、又は請求項 9 若しくは 10 に記載の方法。

40

【請求項 12】

対象が哺乳動物である、請求項 9 から 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

哺乳動物がネズミ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ウシ、サル、及びヒトの群から選択される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

P D - L 1 を検出するためのキットであって、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の抗体又は請求項 4 に記載の抗原結合断片、及び使用説明書を含む、キット。

【請求項 15】

50

腫瘍試料中のPD-L1を検出する方法であって、

(a) 重鎖(HC)免疫グロブリン可変ドメイン配列及び軽鎖(LC)免疫グロブリン可変ドメイン配列を含む抗体又は抗体の抗原結合断片と試料を接触させることであって、ここで抗体はアミノ酸配列CGIQDTNSKKQSDTHLEET(配列番号1)を含むヒトPD-L1のエピトープに結合し、かつ／又は少なくとも 1.5×10^{-11} Mの半数効果濃度(EC₅₀)を有し、

HCは

(i) アミノ酸配列NHAIIS(配列番号14)を含むHC CDR1；

(ii) アミノ酸配列TINS DTHTYA TWPKG(配列番号15)を含むHC CDR2；及び

(iii) アミノ酸配列RIFSSNI(配列番号16)を含むHC CDR3を含み；かつ

LCは

(i) アミノ酸配列QASQSIYNNWLS(配列番号17)を含むLC CDR1；

(ii) アミノ酸配列LASTLAS(配列番号12)を含むLC CDR2；及び

(iii) アミノ酸配列IGGES SNNDGIA(配列番号18)を含むLC CDR3を含むこと；並びに

(b) 抗体又は抗原結合断片のPD-L1への結合により形成された複合体を検出すること

を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、内容全体が参照により本明細書に援用される、2014年5月29日出願の米国特許出願公開第62/004572号及び2014年10月28日出願の米国特許出願公開第62/069420号の利益を主張する。

【0002】

発明の背景

発明の分野

本開示は、新規のPD-L1抗体及び生物学的試料中のPD-L1ポリペプチドを検出するための、その使用方法に関する。PD-L1抗体は、PD-L1関連の医学的状态を有すると診断された対象における特定の治療剤の有効性を評価するのに有用である。

【0003】

関連技術の記載

以下の説明は、読者の理解を助けるために提供される。提供されている情報又は引用参照文献のいずれも、先行技術とは認められない。

【0004】

プログラム死1(PD-1)は、CD28、CTLA-4、ICOS、PD-1、及びBTLAを含む、受容体のCD28ファミリーのメンバーである。当該ファミリーの最初のメンバーであるCD28及びICOSは、モノクローナル抗体添加後のT細胞増殖増加に及ぼす機能効果により発見された(Hutloff et al., Nature 397:263-266 (1999); Hansen et al. Immunogenics10:247-260 (1980))。PD-1に対する二種類の細胞表面糖タンパク質リガンド、すなわちPD-L1及びPD-L2が同定されており、かつ、PD-1に結合すると、T細胞活性化及びサイトカイン分泌を下方調節することが示されている(Freeman et al., J Exp Med 192:1027-34 (2000); Latchman et al., Nat Immunol 2:261-8 (2001); Carter et al., Eur J Immunol 32:634-43 (2002); Ohigashi et al., Clin Cancer Res11:2947-53 (2005))。PD-L1(B7-H1)及びPD-L2(B7-DC)の両方とも、PD-1に結合するが、他のCD28ファミリーメンバーには結合しない

10

20

30

40

50

、B7ホモログである。

【0005】

ヒトPD-L1は、290アミノ酸(aa)I型の、推定18aaシグナルペプチドを持つ膜前駆体タンパク質、221aa細胞外ドメイン、21aa膜貫通領域、及び31aa細胞質ドメインをコードする。ヒトPD-L1は、心臓、骨格筋、胎盤、及び肺などのいくつかの器官では恒常的に発現しており、胸腺、脾臓、腎臓、及び肝臓では比較的少量発現している。PD-L1発現は、活性化T細胞及びB細胞のごく一部、並びに活性化単球のかなりより大きな部分において上方調節されている。PD-L1発現はまた、IFNガンマ刺激後の樹状細胞及び角化細胞中で誘導される。

【0006】

PD-L1-PD1経路は、いくつかの免疫応答の負の調節に関与し、末梢性寛容の調節に重要な役割を果たしうる。PD-L1とPD1の相互作用は、TCR媒介増殖及びサイトカイン産生の阻害をもたらす。PD-L1は、抗原特異的T細胞クローンのアポトーシスを増加させることによって、腫瘍免疫においてある役割を果たすことが示唆されている(Dong et al. Nat Med8:793-800 (2002))。実際、PD-L1発現は、ヒトの肺がん、卵巣がん、及び結腸がん並びに様々な骨髄腫を含めた、マウス及びヒトの複数のがんにおいて見出されている(Iwai et al. PNAS 99:12293-7 (2002); Ohigashi et al. Clin Cancer Res11:2947-53 (2005))。したがって、生物学的試料のPD-L1タンパク質の量を測定することは、がん病態の早期発見を助け、PD-L1タンパク質の結合を阻害する治療薬の有効性及び持続性を評価するのに役立つ。

【0007】

しかし、がんの、並びに／又は抗PD-1及び抗PD-L1指向療法の有効性の正確な予測因子としてのPD-L1タンパク質発現の使用は、依然として課題である。多くの市販のPD-L1標的抗体は、他のタンパク質と交差反応し、かつ／又は非特異的組織学的染色を示し、そのため信頼できない診断薬となる。<http://www.cellsignal.com/contents/science-cancer-research/pivotal-tumor-immunology-targets-pd-l1/pd-l1-signaling>を参照のこと。さらに、細胞外ドメインを標的とするPD-L1抗体と細胞ドメインを標的とするPD-L1抗体とを比較した場合、相反する結果が観察されている(McLaughlin et al., J. Clin Oncol 32:5 (2014))。その上、E1L3N(登録商標)(Cell Signaling Technology, MA)、5H1(Dong et al., Nat Med. 8:793-800 (2002))、及びE1J2Jなどの市販の抗体を用いた非小細胞肺癌試料中のPD-L1発現の評価でも、不一致な結果が得られた(McLaughlin et al., J. Clin Oncol 32:5 (2014))。

【発明の概要】

【0008】

本明細書で提供されるのは、重鎖(HC)免疫グロブリン可変ドメイン配列と軽鎖(LC)免疫グロブリン可変ドメイン配列とを含む単離された抗体であって、該抗体はアミノ酸配列CGIQDTNSKKQSDTHLEET(配列番号1)を含むヒトPD-L1のエピトープに結合し、かつ／又はヒトPD-L1のエピトープに結合する該抗体は少なくとも 1.5×10^{-11} Mの半数効果濃度(EC₅₀)を有する。

【0009】

さらなる態様では、(a)単離抗体のHCはCDR3コンセンサス配列RX₁FS SX₂NI(配列番号10)を含み、ここでX₁はI又はLであり、X₂はS又はTであり；かつ／又は(b)単離抗体のLCはCDR3コンセンサス配列X₃GGESSX₄X₅DGIA(配列番号13)を含み、ここでX₃はL又はIであり、X₄はN又はSであり、X₅はN、T又はDであり；かつ／又は(c)単離抗体のHCはCDR3コンセンサス配列RX₁FS SX₂NI(配列番号10)を含み、ここでX₁がI又はLであり、X₂がS又はTであり、かつ単離抗体のLCはCDR3コンセンサス配列X₃GGESSX₄X₅DGIA(配列番号13)を含み、ここでX₃はL又はIであり、X₄はN又はSであ

り、 X_5 は N、T 又は D である。

【0010】

追加的又は代替的に、該抗体のいくつかの態様では、HC は、CDR2 コンセンサス配列 T I N S D X_6 H X_7 Y X_8 A T W X_9 K G (配列番号 9) をさらに含み、ここで X_6 は T 又は S であり、 X_7 は T 又は I であり、 X_8 は Y 又は S であり、 X_9 は P 又は A である。

【0011】

追加的又は代替的に、該抗体のいくつかの態様では、HC は、CDR1 コンセンサス配列 X_{10} X_{11} A I S (配列番号 8) をさらに含み、ここで X_{10} は N 又は S であり、 X_{11} は H 又は N である。

10

【0012】

追加的又は代替的に、該抗体のいくつかの態様では、LC は、CDR2 配列 L A S T L A S (配列番号 12) をさらに含む。

【0013】

追加的又は代替的に、該抗体のいくつかの態様では、LC は、CDR1 配列 Q A S Q S I Y X_{12} X_{13} N W L S (配列番号 11) をさらに含み、ここで X_{12} は N 又は K であり、 X_{13} は N 又は D である。

【0014】

該抗体のいくつかの態様では、HC は、(a) アミノ酸配列 N H A I S (配列番号 14) を含む HC CDR1；及び／若しくは (b) アミノ酸配列 T I N S D T H T Y Y A T W P K G (配列番号 15) を含む HC CDR2；及び／若しくは (c) アミノ酸配列 R I F S S S N I (配列番号 16) を含む HC CDR3 を含み；かつ／又は LC は、(a) アミノ酸配列 Q A S Q S I Y N N N W L S (配列番号 17) を含む LC CDR1；及び／又は (b) アミノ酸配列 L A S T L A S (配列番号 12) を含む LC CDR2；及び／又は (c) アミノ酸配列 I G G E S S N N D G I A (配列番号 18) を含む LC CDR3 を含む。

20

【0015】

該抗体のいくつかの態様では、HC は、(a) アミノ酸配列 S N A I S (配列番号 19) を含む HC CDR1；及び／若しくは (b) アミノ酸配列 T I N S D T H T Y Y A T W P K G (配列番号 20) を含む HC CDR2；及び／若しくは (c) アミノ酸配列 R L F S S T N I (配列番号 21) を含む HC CDR3 を含み；かつ／又は LC は、(a) アミノ酸配列 Q A S Q S I Y N N N W L S (配列番号 22) を含む LC CDR1；及び／若しくは (b) アミノ酸配列 L A S T L A S (配列番号 12) を含む LC CDR2；及び／若しくは (c) アミノ酸配列 L G G E S S S D D G I A (配列番号 23) を含む LC CDR3 を含む。

30

【0016】

該抗体のいくつかの態様では、HC は、(a) アミノ酸配列 S H A I S (配列番号 24) を含む HC CDR1；及び／若しくは (b) アミノ酸配列 T I N S D T H T Y Y A T W P K G (配列番号 25) を含む HC CDR2；及び／若しくは (c) アミノ酸配列 R I F S S S N I (配列番号 16) を含む HC CDR3 を含み；かつ／又は LC は、(a) アミノ酸配列 Q A S Q S I Y N N N W L S (配列番号 17) を含む LC CDR1；及び／若しくは (b) アミノ酸配列 L A S T L A S (配列番号 12) を含む LC CDR2；及び／若しくは (c) アミノ酸配列 I G G E S S N N D G I A (配列番号 26) を含む LC CDR3 を含む。

40

【0017】

該抗体のいくつかの態様では、HC 免疫グロブリン可変ドメイン配列は、配列番号 2、配列番号 4 又は配列番号 6 のアミノ酸配列を含む。

【0018】

該抗体のいくつかの態様では、LC 免疫グロブリン可変ドメイン配列は、配列番号 3、配列番号 5 又は配列番号 7 のアミノ酸配列を含む。

50

【0019】

該抗体のいくつかの態様では、HC免疫グロブリン可変ドメイン配列は、配列番号2、配列番号4又は配列番号6のアミノ酸配列を含み、LC免疫グロブリン可変ドメイン配列は、配列番号3、配列番号5又は配列番号7のアミノ酸配列を含む。

【0020】

いくつかの態様では、該抗体は検出可能な標識をさらに不含む。

【0021】

いくつかの態様において、該抗体は、モノクローナル抗体、キメラ抗体又はヒト化抗体である。

【0022】

別の態様において、本明細書で提供されるのは、本明細書で開示される抗体の抗原結合断片であり、該抗原結合断片はFab、F(ab')₂、Fab'、scF_v、又はF_vの群から選択される。

【0023】

別の態様において、本明細書で提供されるのは、配列番号1を含むペプチドに結合する、本明細書に開示の抗体又は抗原結合断片、例えばヒトPD-L1タンパク質又はその断片を含む組成物である。別の態様において、配列番号1を含むペプチドは、細胞と結合している。例えば、組成物は、本明細書に開示の抗体又は抗体断片で標識された脱凝集細胞試料を含んでもよく、またその組成物は、例えば細胞を単離するため又はフローサイトメトリーに基づく細胞分析若しくは細胞選別のためのアフィニティークロマトグラフィー法において有用である。別の例として、組成物は、本明細書に開示の抗体又は抗体断片で標識された固定組織試料若しくは細胞塗抹標本を含んでもよく、またその組成物は、例えば免疫組織化学的又は細胞学的分析において有用である。別の態様において、抗体又は抗体断片は、PD-L1タンパク質若しくはその断片、PD-L1陽性細胞又はPD-L1と他の細胞成分とを含有する複合体を単離するための例えばELISA、アフィニティークロマトグラフィー又は免疫沈降法において有用である固体支持体に結合している。別の態様において、配列番号1を含むペプチドは、固体支持体に結合している。例えば、該ペプチドは、サンドイッチELISAなどにおいて有用である、ペプチドに特異的な二次抗体を介して固体支持体に結合していてもよい。別の例として、該ペプチドは、例えば本発明による抗体の単離又は精製において有用であるクロマトグラフィーカラムに結合していてもよい。別の態様において、該ペプチドは、PD-L1タンパク質若しくはその断片、又はPD-L1と他の細胞成分とを含有する複合体を単離するための、例えばELISA及びアフィニティークロマトグラフィー又は免疫沈降法において有用な溶液、例えば分画した細胞の亜細胞画分を含有する溶液又は溶解液などの溶液中に配置される。別の態様において、該ペプチドは、例えばゲル電気泳動ゲルなどのマトリックス、又はウェスタンブロットティングのために一般的に使用されるマトリックス（ニトロセルローズ又はフッ化ポリビニリデンから形成された膜など）と結合し、その組成物は、電気泳動法及び／又は免疫ブロットティング技術（例えばウェスタンブロットティング）に有用である。

【0024】

別の態様において、本明細書で提供されるのは、生物学的試料中のPD-L1を検出する方法であって、該方法は該試料と本明細書に開示の抗体又は抗原結合断片とを接触させることと、該抗体又は抗原結合断片のPD-L1への結合により形成された複合体を検出することとを含むか、又はそれらのことから本質的になるか、又はそれらのことからさらになる。一態様において、該方法は、試料と抗体又は抗原結合断片とを接触させる前に試料を単離することをさらに含むか、そのことから本質的になるか、又はそのことからさらになる。

【0025】

該方法のいくつかの態様において、該試料は、細胞又は組織試料を含む。

【0026】

該方法のいくつかの態様において、該試料は、がん罹患していると診断されるか、罹

10

20

30

40

50

患していることが疑われるか、又は罹患するリスクがある対象から得られる。

【0027】

該方法のいくつかの態様において、がんは、膀胱移行細胞癌、肺腺癌、乳管癌、ホジキンリンパ腫、膵臓腺癌、前立腺腺癌、子宮頸部扁平上皮癌、皮膚扁平上皮癌、及び非小細胞肺癌からなる群より選択される。

【0028】

該方法のいくつかの態様において、検出は、免疫組織化学（IHC）、ウェスタンブロッティング、フローサイトメトリー又はELISAのうちの一又は複数を含む。

【0029】

別の態様において、本明細書で提供されるのは、（a）対象からの生物学的試料中のPD-L1に結合する本開示の抗体又は抗原結合断片により形成された複合体を検出することにより、該試料中のPD-L1のレベルを検出すること；及び（b）工程（a）で観察されたPD-L1のレベルと、対照生物学的試料中で観察されたPD-L1のレベルとを比較することを含むか、又はそれらから本質的になるか、又はそれらからさらになる、対象から単離された試料中の病的細胞を検出する方法であって、ここで病的細胞は、PD-L1のレベルが対照生物学的試料中で観察されたものと比較して高い場合に検出され、PD-L1のレベルが対照生物学的試料中で観察されたものと比較して高くない場合には検出されない。

【0030】

該方法のいくつかの態様において、対象の生物学的試料は、肺、腎臓、膀胱、乳房、膵臓、前立腺、子宮頸部又は皮膚から単離された一又は複数の試料を含む。

【0031】

該方法のいくつかの態様において、検出は、免疫組織化学（IHC）、ウェスタンブロッティング、フローサイトメトリー又はELISAのうちの一又は複数を含む。

【0032】

追加的に又は代替的に、いくつかの態様において、本明細書に開示の方法は、該方法の実施の前に対象からの生物学的試料を単離することをさらに含む。

【0033】

追加的に又は代替的に、該方法のいくつかの態様において、対象は哺乳動物である。いくつかの態様において、対象は、マウス、ネコ、イヌ、ヒツジ、ウシ、サル、及びヒトからなる群より選択される。

【0034】

別の態様において、本明細書で提供されるのは、本明細書に開示の抗体と同じエピトープ特異性有するPD-L1特異的抗体又はその抗原結合断片である。

【0035】

最後の態様において、本明細書で提供されるのは、任意選択的に使用説明書を含めた、本明細書に開示の抗体又は抗原結合断片を含む、PD-L1を検出するためのキットである。

【0036】

一態様において、本明細書で提供されるのは、腫瘍試料中のPD-L1を検出する方法であって、（a）重鎖（HC）免疫グロブリン可変ドメイン配列及び軽鎖（LC）免疫グロブリン可変ドメイン配列を含む抗体又は抗体の抗原結合断片と該試料を接触させることであって、ここで抗体はアミノ酸配列CGIQDTNSKKQSDTHLEET（配列番号1）を含むヒトPD-L1のエピトープに結合し、かつ／又は少なくとも 1.5×10^{-11} Mの半数効果濃度（EC₅₀）を有し、HCは（i）アミノ酸配列NHAIIS（配列番号14）を含むHC CDR1；（ii）アミノ酸配列TINS DTH TY YATW PKG（配列番号15）を含むHC CDR2；及び（iii）アミノ酸配列RIFSSSNI（配列番号16）を含むHC CDR3を含み、かつLCは（i）アミノ酸配列QASQSIYNNNWLS（配列番号17）を含むLC CDR1；（ii）アミノ酸配列LASTLAS（配列番号12）を含むLC CDR2；及び（iii）アミノ酸配列

10

20

30

40

50

I G G E S S N N D G I A（配列番号18）を含むLC CDR3を含むこと；並びに（b）抗体又は抗原結合断片のPD-L1への結合により形成された複合体を検出することを含む方法である。

【0037】

さらに提供されるのは、アミノ酸配列CGIQDTNSKKQSDTHLEET（配列番号1）を含むか、又はそれから本質的になるか、又はそれからさらになる、PD-L1に結合する抗体を生成するのに有用な単離されたポリペプチドである。一態様において、単離されたポリペプチドは、アミノ末端又はカルボキシル末端に作動的に連結された標識及び／又は連続したポリペプチド配列（例えばキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）担体タンパク質）をさらに含む。

【図面の簡単な説明】

【0038】

本特許又は出願ファイルは、カラー図面を少なくとも一点含む。カラー図面を伴う本特許又は特許出願公報のコピーは、請求及び必要な料金の支払いに応じて特許庁より提供される。

【図1】図1は、本発明のモノクローナルPD-L1抗体を生成するための手順を示す。

【図2】図2Aは、抗PD-L1抗体SP263を使用した、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）の胎盤組織切片の免疫組織化学（IHC）の結果を示す画像である。図2Bは、抗PD-L1抗体SP263を使用した、FFPE扁桃組織切片のIHCの結果を示す画像である。図2Cは、抗PD-L1抗体SP263を使用した、FFPEホジキンリンパ腫組織切片のIHCの結果を示す画像である。図2Dは、抗PD-L1抗体SP263を使用した、FFPE肺扁平上皮癌組織切片のIHCの結果を示す画像である。上段はカラー写真で、下段はグレースケールの写真である。抗体染色は、カラー写真で褐色に見える。PD-L1染色は、グレースケール写真でより暗い領域に見える。グレースケールの写真の矢印は、それぞれの組織における抗体染色の例を示している。

【図3】図3は、抗PD-L1抗体SP263を使用した、NIH H820肺腺癌細胞株（高発現）、HEK293細胞株（弱発現）、Calu-3肺腺癌細胞株（陰性対照）、ZR75-1ヒト乳癌細胞株（陰性対照）、MCF7ヒト乳癌細胞株（陰性対照）、及びT47Dヒト乳癌細胞株（陰性対照）由来の細胞溶解物におけるPD-L1発現を示すウェスタンブロットである。

【図4】図4は、SP263、J45H2L4、及びJ27H6L4を使用した、種々の組織のIHC標識化を示す。左の列はカラー写真で、右の列は対応するグレースケールである。抗体染色は、カラー写真では褐色であり、グレースケール写真では矢印で示されている。図4Aは、抗PD-L1抗体SP263を使用した、FFPE胎盤組織切片のIHCの結果を示す画像である。図4Bは、抗PD-L1抗体SP263を使用した、FFPE結腸組織切片のIHCの結果を示す画像である。図4Cは、抗PD-L1抗体SP263を使用した、FFPE胃組織切片のIHCの結果を示す画像である。図4Dは、抗PD-L1抗体クローンJ45H2L4を使用した、FFPE胎盤組織切片のIHCの結果を示す画像である。図4Eは、抗PD-L1抗体クローンJ45H2L4を使用した、FFPE結腸組織切片のIHCの結果を示す画像である。非特異的核染色が見られる。図4Fは、抗PD-L1抗体クローンJ45H2L4を使用した、FFPE胃組織切片のIHCの結果を示す画像である。非特異的核染色が見られる。図4Gは、抗PD-L1抗体クローンJ27H6L4を使用した、FFPE胎盤組織切片のIHCの結果を示す画像である。胎盤栄養芽層に弱い染色が見られる。図4Hは、抗PD-L1抗体クローンJ27H6L4を使用した、FFPE結腸組織切片のIHCの結果を示す画像である。図4Iは、抗PD-L1抗体クローンJ27H6L4を使用した、FFPE胃組織切片のIHCの結果を示す画像である。

【図5】図5は、表示の濃度の抗PD-L1抗体E1L3N又はSP263を使用した、FFPE胎盤組織切片のIHCの結果を示す画像である。各抗体の上段はカラー画像であり、下段はグレースケール画像である。抗体染色は、カラー画像で褐色に見える。

【図6】図6は、表示の濃度の抗PD-L1抗体E1L3N又はSP263を使用した、FFPE胃上皮又は神経組織切片のIHCの結果を示す画像である。各抗体-組織の組み合わせの上段はカラー画像であり、下段はグレースケール画像である。抗体染色は、カラー画像で褐色に見える。

【図7】図7は、抗PD-L1抗体E1L3N又はSP263を使用した、FFPE胃上皮、腎臓、膀胱移行細胞癌(TCC)、乳管癌(Ca)、及び肺扁平上皮癌組織切片のIHCの結果を示す画像である。各抗体-組織の組み合わせの上段はカラー画像であり、下段はグレースケール画像である。抗体染色は、カラー画像で褐色に見える。

【図8】図8は、抗PD-L1抗体E1L3N又はSP263を使用した、次のFFPE組織切片：(A) 扁桃；(B) 子宮頸部扁平上皮癌(SCC)；(C) ホジキンリンパ腫(HKリンパ腫)；(D) 膵臓腺癌；(E) 前立腺腺癌；及び(F) 皮膚SCCのIHCの結果を示す画像である。各抗体-組織の組み合わせの上段はカラー画像であり、下段はグレースケール画像である。抗体染色は、カラー画像で褐色に見える。

10

【図9A-J】図9A-9Eは、抗PD-L1抗体E1L3Nを使用した、NSCLC患者由来のFFPE組織切片のIHCの結果を示す。図9F-9Jは、抗PD-L1抗体SP263を使用した、NSCLC患者由来のFFPE組織切片のIHCの結果を示す。各抗体-組織の組み合わせの上段はカラー画像であり、下段はグレースケール画像である。抗体染色は、カラー画像で褐色に見える。

【図10】図10は、固定化されたペプチド免疫原(PD-L1 aa 272-290)に結合しているSP263を伴うELISAアッセイの結果を示す。

20

【発明を実施するための形態】

【0039】

本開示は、特定の態様に限定されず、当然ながら変化しうる。また、本開示の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるため、本明細書で用いる用語は、特定の態様のみを説明するためのものであり、限定することを目的としていないことを理解されたい。

【0040】

特に定義しない限り、本明細書で使用される技術用語及び科学用語は、本開示が属する技術分野の当業者によって通常理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと類似又は同等の任意の方法及び物質を本開示の実施又は試験に用いることができるが、好ましい方法、装置、及び物質を以下に記載する。本明細書で引用するすべての技術及び特許刊行物は、それらの全容を参照により本明細書に援用するものである。本明細書の何も、本開示が先行開示によって、かかる開示に先行する資格がないという承認として解釈されるべきではない。

30

【0041】

本技術の実施は、特に明記しない限り、当業者の技術範囲内の組織培養、免疫学、分子生物学、微生物学、細胞生物学、及び組換えDNAの従来技術を用いることとなる。例えば、以下を参照のこと：Sambrook及びRussell編(2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual 第3版；Ausubelら編(2007) Current Protocols in Molecular Biologyのシリーズ；Methods in Enzymologyのシリーズ (Academic Press, Inc., N.Y.)；MacPhersonら(1991) PCR 1: A Practical Approach (IRL Press at Oxford University Press)；MacPhersonら(1995) PCR 2: A Practical Approach；Harlow及びLane編(1999) Antibodies, A Laboratory Manual；Freshney(2005) Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique 第5版；Gait編(1984) Oligonucleotide Synthesis；米国特許第4683195号；Hames及びHiggins編(1984) Nucleic Acid Hybridization；Anderson (1999) Nucleic Acid Hybridization；Hames 及びHiggins編(1984) Transcription and Translation；Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press (1986))；Perbal (1984) A Practical Guide to Molecular Cloning；Miller及びCalos編 (1987) Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Cold Spring Harbor Laboratory)；Makrides編 (2003) Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells；Mayer及びWalker編(1987) Immunochemical Methods in Cell

40

50

and Molecular Biology (Academic Press, London); 及びHerzenbergら編(1996) Weir 's Handbook of Experimental Immunology。

【0042】

すべての数値表示（例えばpH、温度、時間、濃度、及び分子量）は、範囲も含め、1.0又は0.1の増分だけ、あるいは+/-15%、又は10%、又は5%、又は2%の変動分だけ、（+）又は（-）に適宜変動する近似値である。常に明示されるというわけではないが、すべての数値表示の前には、用語「約」が置かれる。また、常に明示されるわけではないが、本明細書に記載の試薬は単なる例示であり、その等価物は当該技術分野で知られている。

【0043】

本開示がポリペプチド、タンパク質、ポリヌクレオチド又は抗体に関する場合、そのようなものの等価物又は生物学的等価物が本開示の範囲内であることが意図されることは、明示的な記述なしに、また、そうでないことを意図していない限り、推測される。

【0044】

本明細書及び特許請求の範囲において使用される場合、単数形「a」、「an」、及び「the」は、文脈が明らかにそうでない場合を指さない限り複数形の言及を含む。例えば、用語「細胞」は、細胞（その混合物を含む）の複数形iを含む。

【0045】

本明細書で使用される場合、対象（単数又は複数）への作用剤又は薬物の「投与」は、その意図された機能を実現するために、対象に化合物を導入するか又は送達する任意の経路を含む。適切な投与製剤及び作用剤の投与方法は、当該技術分野で知られている。投与経路も決定することができ、最も効果的な投与の経路を決定する方法は、当業者に知られており、また、治療のために使用される組成物、治療の目的、治療される対象の健康状態又は疾患の病期、及び標的細胞又は組織によって異なる。投与経路の非限定的例は、経口投与、腔内投与、鼻腔投与、注射、局所投与、及び坐剤によるものを含む。投与は、自己投与及び他者による投与を含む。記載されているさまざまな様式の医学的状态の治療又は予防は、「実質的」なものを意味し、全体的な治療又は予防もそれ未満のものも含み、いくつかの生物学的又は医学的に妥当な結果が達成されるものであることを認識されたい。

【0046】

投与は、治療の過程を通して連続的又は断続的に、単回投与で効果を発しうる。最も効果的な投与手段及び用量の決定方法は、当業者に知られており、また、治療のために使用される組成物、治療の目的、治療される標的細胞及び治療される対象によって異なる。単回又は複数回投与は、治療する医師により選択された用量レベル及びパターンで実施される。

【0047】

本明細書で使用する場合、用語「動物」は、例えば哺乳動物及び鳥類を含むカテゴリーである、生きた多細胞脊椎生物を指す。用語「哺乳動物」は、ヒト及び非ヒト哺乳動物を含む。同様に、用語「対象」又は「患者」は、ヒトと獣医学的对象の両方、例えばヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、マウス、ウマ、及びウシを含む。

【0048】

本明細書で使用する場合、用語「抗体」は、免疫グロブリン又は免疫グロブリン様分子をまとめて指し、非限定的な例としては、IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgM、それらの組み合わせ、並びに任意の脊椎動物（例えばヒト、ヤギ、ウサギ、及びマウス、並びにサメ免疫グロブリンなどの非哺乳動物種）における免疫応答の間に産生される類似の分子を含む。「抗体」という用語は、例えば、インタクトな免疫グロブリン及び「抗体断片」、又は他の分子との結合を実質的に排除するほどに目的の分子（又は目的の分子に高度に類似している分子の群）に特異的に結合する「抗原結合断片」を含む（例えば、生物学的試料中で、他の分子の結合定数よりも少なくとも 10^3 M^{-1} 、少なくとも 10^4 M^{-1} 又は少なくとも 10^5 M^{-1} 大きい、目的分子の結合定数を有する抗体及び抗断片）。用語「抗体」はまた、キメラ抗体（例えばヒト化マウス抗体）、ヘテロコンジュゲ

10

20

30

40

50

ート抗体（例えば二重特異性抗体）など、遺伝的に操作された形態も含む。Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.); Kuby, J., Immunology, 第3版, W.H. Freeman & Co., New York, 1997も参照のこと。

【0049】

より具体的には、「抗体」は、抗原のエピトープを特異的に認識してそれに結合する、少なくとも一の軽鎖又は重鎖免疫グロブリン可変領域を含むポリペプチドリガンドを指す。抗体は重及び軽鎖から構成され、その各々は、可変重 (V_H) 領域及び可変軽 (V_L) 領域と呼ばれる可変領域を有する。 V_H 領域及び V_L 領域は組み合わせあって、抗体により認識される抗原の結合に関与する。

【0050】

通常、免疫グロブリンは、ジスルフィド結合によって相互接続された重 (H) 鎖及び軽 (L) 鎖を有する。軽鎖には、ラムダと (λ) カッパ (k) の二種類がある。抗体分子の機能活性を決定する5つの主要な重鎖クラス（又はアイソタイプ）、すなわち IgM、IgD、IgG、IgA、及びIgEが存在する。各重鎖及び軽鎖は、定常領域及び可変領域を含んでいる（領域は「ドメイン」としても知られている）。重鎖及び軽鎖可変領域は、組み合わせあって、抗原に特異的に結合する。軽鎖及び重鎖可変領域は、「相補性決定領域」又は「CDR」と呼ばれる三つの超可変領域によって中断される「フレームワーク」領域を含んでいる。フレームワーク領域及びCDRの範囲は規定されている（本明細書により参照によって援用されるKabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1991を参照）。Kabat 20
データベースは、現在、オンラインで維持されている。異なる軽鎖又は重鎖のフレームワーク領域の配列は、種内で比較的保存されている。構成成分である軽鎖及び重鎖の組み合わせられたフレームワーク領域である抗体のフレームワーク領域は、主に β -シートコンフォメーションを採り、またCDRは、 β -シート構造を接続するループを形成し、場合によっては β -シート構造の一部を形成する。したがって、フレームワーク領域は、鎖内非共有相互作用によって正しい配向でのCDRの位置決めを提供する足場を形成するように作用する。

【0051】

CDRは、抗原のエピトープへの結合を主に担う。各鎖のCDRは、典型的には、N末端から順に番号が付けられ、CDR1、CDR2、及びCDR3と呼ばれ、また、典型的 30
には、特定のCDRが位置する鎖によって同定される。したがって、 V_H CDR3は、それが見出される抗体の重鎖の可変ドメインに位置し、一方、 V_L CDR1は、それが見出される抗体の軽鎖の可変ドメインのCDR1である。PD-L1に結合する抗体は、特異的な V_H 領域及び V_L 領域配列、したがって特異的CDR配列を有するであろう。異なる特異性を有する（すなわち異なる抗原に対する異なる結合部位）抗体は、異なるCDRを有する。抗体に応じて変化するのがCDRであるが、CDR内の限られた数のアミノ酸位置だけが、抗原結合に直接関与している。CDR内のこのような位置は、特異性決定残基 (SDR) と呼ばれる。

【0052】

「抗体」という用語はさらに、その消化断片、特異的部分、誘導体及び変異体を包含することが意図され、これには抗体模倣物を含むか、あるいは抗体又はその特異的断片若しくは部分（例えば短鎖抗体及びその断片）の構造及び／又は機能を模倣する抗体の部分を含む。抗体の「抗原結合部分」という用語の範囲に包含される結合断片の例は、 V_L 、 V_H 、 C_L 、及び C_H ドメインからなる一価の断片であるFab断片；ヒンジ領域でジスルフィド架橋により連結された二つのFab断片を含む二価の断片である $F(a b')_2$ 断片； V_H 及び C_H ドメインからなる F_d 断片；抗体の単一アームの V_L 及び V_H ドメインからなる F_v 断片、 V_H ドメインからなるdAb断片 (Ward et al. (1989) Nature 341: 544-546)；及び単離された相補性決定領域 (CDR) を含む。さらに、 F_v 断片の二つのドメインである V_L 及び V_H は別々の遺伝子によりコードされるが、組換え法を用い、これらを V_L 及び V_H 領域が対になって一価分子を形成する一本のタンパク質鎖（一本鎖 40
50

F_v ($s c F_v$) として知られる) とさせることのできる合成リンカーにより、つなぐことができる。Bird et al. (1988) Science 242:423-426 及び Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883。一本鎖抗体も、「抗体の断片」という用語の範囲に包含されることが意図される。上記抗体断片のいずれも、当業者に既知の従来の技術を用いて得られ、該断片は、インタクトな抗体と同じ方法で結合特異性及び中和活性についてスクリーニングされる。

【0053】

「抗体断片」又は「抗原結合断片」は、タンパク質分解抗体断片（当該技術分野で既知の $F(ab')_2$ 断片、 Fab' 断片、 $Fab'-SH$ 断片、及び Fab 断片など）、組換え抗体断片（当該技術分野で既知の $s F_v$ 断片、 $ds F_v$ 断片、二重特異性 $s F_v$ 断片、二重特異性 $ds F_v$ 断片、 $F(ab')_2$ 断片、一本鎖 F_v タンパク質（「 $s c F_v$ 」）、ジスルフィド安定化 F_v タンパク質（「 $ds F_v$ 」）、ダイアボディ及びトリアボディなど）、及びラクダ科の抗体（例えば米国特許第 6015695 号；6005079 号；5874541 号；5840526 号；5800988 号；及び 5759808 号参照）を含む。 $s c F_v$ タンパク質は、免疫グロブリンの軽鎖可変領域と免疫グロブリンの重鎖可変領域がリンカーにより結合されている融合タンパク質であるが、 $ds F_v$ では、ジスルフィド結合を導入して鎖の結合を安定化するように鎖が変異されている。

【0054】

本明細書で使用する場合、用語「抗体誘導体」は、本明細書に定義されているエピトープに結合し、本開示の単離された PD-L1 抗体の一時的変異又は誘導体である分子を包含することが意図される。誘導体は、限定されないが、例えば二重特異性、異種特異性、三重特異性、四重特異性、多重特異性抗体、ダイアボディ、キメラ、組換え、及びヒト化を含む。本明細書で使用する場合、用語「二重特異性分子」は、二の異なる結合特異性を有する任意の作用剤、例えばタンパク質、ペプチド又はタンパク質若しくはペプチド複合体を含むことが意図される。本明細書で使用する場合、用語「多重特異性分子」又は「異種特異性分子」は、二より多い異なる結合特異性を有する任意の作用剤、例えばタンパク質、ペプチド又はタンパク質若しくはペプチド複合体を含むことが意図される。本明細書で使用する場合、用語「異種抗体」は、二種以上の抗体、その抗体結合断片（例えば Fab ）、誘導体、又は連結された複数の抗原結合領域であって、少なくともそのうちの二つの領域が異なる特異性を有するものを指す。

【0055】

用語「抗体変異体」は、ウサギ以外の種で産生された抗体を含むことが意図される。それはまた、抗体又は断片の線状ポリペプチド配列への翻訳後修飾を含む抗体を含む。それは、完全なヒト抗体をさらに包含する。

【0056】

本明細書で使用する場合、用語「抗原」は、抗体分子又は T 細胞受容体などの特定の液性又は細胞性免疫の産物によって特異的に結合しうる化合物、組成物又は物質を指す。抗原は、例えばハプテン、単純な中間代謝物、糖類（例えばオリゴ糖）、脂質、及びホルモン、並びに複合炭水化物（例えば多糖）、リン脂質、及びタンパク質などの高分子を含む、任意のタイプの分子でありうる。抗原の一般的な種類は、限定されないが、ウイルス抗原、細菌抗原、真菌抗原、原虫抗原及び他の寄生虫抗原、腫瘍抗原、自己免疫疾患、アレルギー、及び移植片拒絶に關与する抗原、毒素、並びにその他の抗原を含む。

【0057】

本明細書で 사용되는場合、「結合親和性」とは、特定の結合対の一方のメンバーの、特定の結合対のもう一方のメンバーに対する傾向のような、ある分子が別の分子と（典型的には非共有結合的に）結合する傾向を指す。結合親和性は、結合定数として測定することができ、特定の結合対（例えば抗体／抗原対）の結合親和性は、少なくとも $1 \times 10^{-5} M$ 、少なくとも $1 \times 10^{-6} M$ 、少なくとも $1 \times 10^{-7} M$ 、少なくとも $1 \times 10^{-8} M$ 、少なくとも $1 \times 10^{-9} M$ 、少なくとも $1 \times 10^{-10} M$ 、少なくとも $1 \times 10^{-11} M$ 又は少なくとも $1 \times 10^{-12} M$ でありうる。一態様では、結合親和性は、Frankel

10

20

30

40

50

らのMol. Immunol., 16:101-106, 1979に記載のスキッチャード法の修正形態によって計算される。別の態様では、結合親和性は抗原／抗体解離速度によって測定される。さらに別の態様では、高結合親和性は、競合ラジオイムノアッセイによって測定される。いくつかの実施例では、抗体／抗原対の高結合親和性は、少なくとも約 1×10^{-8} Mである。他の態様では、高結合親和性は、少なくとも約 1.5×10^{-8} M、少なくとも約 2×10^{-8} M、少なくとも約 2.5×10^{-8} M、少なくとも約 3×10^{-8} M、少なくとも約 3.5×10^{-8} M、少なくとも約 4×10^{-8} M、少なくとも約 4.5×10^{-8} M又は少なくとも約 5×10^{-8} Mである。

【0058】

本明細書で使用する場合、用語「その生物学的等価物」は、基準のタンパク質、抗体、ポリペプチド、ポリヌクレオチド又は核酸に言及する場合、「その等価物」と同義であると意図され、所望の構造又は機能性を維持しながら最小限の相同性を有するものを意味する。本明細書で具体的に列挙しない限り、本明細書で言及されるあらゆる核酸、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、タンパク質又は抗体は、その等価物も含むと考えられる。例えば、等価物は、少なくとも約80%相同又は同一、あるいは少なくとも約85%、若しくは少なくとも約90%、若しくは少なくとも約95%、若しくは98%のパーセント相同性又は同一性を意味し、基準のタンパク質、ポリペプチド、抗体又は核酸と実質的に等しい生物活性を示す。

【0059】

一態様では、抗体の「等価物」又は「生物学的等価物」という用語は、ELISA、IHC又は他の適切な方法によって測定した場合、抗体の、そのエピトープタンパク質又はその断片に選択的に結合する能力を意味する。生物学的に等価な抗体は、限定されないが、基準抗体と同じエピトープに結合する抗体、ペプチド、抗体断片、抗体変異体、抗体誘導体、及び抗体模倣物を含む。当業者は、部位特異的突然変異誘発を用いて抗体に適切な変異を導入することにより、本開示の抗体と機能的に等価な抗体を調製することができる (Hashimoto-Gotoh, T. et al., Gene 152, 271-275 (1995); Zoller & Smith, Methods Enzymol. 100, 468-500 (1983); Kramer, W. et al., Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456 (1984); Kramer W. & Fritz H J., Methods. Enzymol. 154, 350-367 (1987); Kunkel, T A., Proc Natl Acad Sci USA. 82, 488-492 (1985); 及びKunkel Methods Enzymol. 85, 2763-2766 (1988))。

【0060】

本開示の抗体と機能的に等価であり、本開示の抗体のアミノ酸配列において一又は複数のアミノ酸の変異を含むアミノ酸配列を含む抗体も、本開示の抗体に含まれる。このような変異体において、変異されるアミノ酸の数は、通常50アミノ酸以下、好ましくは30以下、より好ましくは10以下（例えば5アミノ酸以下）である。アミノ酸残基は、好ましくはアミノ酸側鎖の性質を保存するものに変異される。例えば、側鎖の性質に基づき、アミノ酸は次の通りに分類される：疎水性アミノ酸（A、I、L、M、F、P、W、Y、及びV）；親水性アミノ酸（R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、及びT）；脂族側鎖を有するアミノ酸（G、A、V、L、I、及びP）；水酸基含有側鎖を有するアミノ酸（S、T、及びY）；硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸（C及びM）；カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸（D、N、E、及びQ）；塩基含有側鎖（R、K、及びH）；及び芳香族含有側鎖を有するアミノ酸（H、F、Y、及びW）。

【0061】

（括弧内の文字はアミノ酸の一文字コードを表す）

【0062】

本明細書で使用する場合、用語「生物学的試料」は、生細胞に由来するか又は生細胞により接触された試料物質を意味する。用語「生物学的試料」は、対象から単離された組織、細胞、及び生物学的流体、並びに対象内に存在する組織、細胞、及び流体を含むことが意図される。本開示の生物学的試料は、限定されないが、例えば全血、血漿、精液、唾液、涙、尿、糞便物質、汗、頬側、皮膚、脳脊髄液、及び毛髪を含む。生物学的試料は、内

臓の生検から又はがんからも得ることができる。生物学的試料は、基礎研究のための対照として、診断又は研究の対象から得ることができ、又は健康な個体からも得ることができる。

【0063】

「がん」、「新生物」、及び「腫瘍」という用語は、互換的に、また単数形又は複数形のいずれでも用いられ、宿主生物にとって病的な細胞にする悪性形質転換を受けた細胞を指し、膀胱移行細胞癌、肺腺癌、乳管癌、ホジキンリンパ腫、膵臓腺癌、前立腺腺癌、子宮頸部扁平上皮癌、皮膚扁平上皮癌、及び非小細胞肺癌からなる群より選択される。

【0064】

原発がん細胞（すなわち悪性形質転換の部位の近くから得られた細胞）は、十分に確立された技術、特に組織学的検査により、非癌性細胞から容易に識別できる。本明細書において使用されるがん細胞の定義は、原発がん細胞だけでなく、がん細胞の原型に由来するあらゆる細胞も含む。これには、転移したがん細胞、並びにがん細胞に由来するインビトロの培養物及び細胞株が含まれる。固形腫瘍として通常表れるタイプのがんに言及すると、「臨床的に検出可能な」腫瘍とは、腫瘍塊をもとに、例えばC A Tスキャン、磁気共鳴画像（M R I）、X線、超音波又は触診などの手法により検出可能なものである。生化学的又は免疫学的所見だけでは、この定義を満たすには不十分でありうる。

【0065】

新生物は、比較的自律的な組織の腫瘍によって生成される細胞の異常な塊又はコロニーである。ほとんどの新生物は悪性形質転換を受けた単一細胞のクローン増殖から生じる。正常細胞から腫瘍性細胞への転換は、直接かつ不可逆的に細胞ゲノムを変化させる、化学的、物理的又は生物学的因子（又はイベント）によって引き起こされうる。腫瘍性細胞は、いくつかの特殊機能の喪失及び新たな生物学的特性（何より、比較的自律的（制御不能）な増殖という特性）の取得により特徴付けられる。腫瘍性細胞は、自らの遺伝性の生物学的特性を子孫細胞に伝える。

【0066】

新生物の過去、現在、及び未来の予測される生物学的挙動又は臨床経過は、診断、治療、及び予後において非常に重要な区別である、良性又は悪性にさらに分類される。悪性新生物は、より高い自律度を示し、浸潤及び転移拡散することができ、治療に耐性であり得、死を引き起こしうる。良性新生物は、比較的低い自律度を有し、通常は浸潤性ではなく、転移せず、また、適切に治療されれば、一般的には大した害は生じない。

【0067】

がんは、悪性新生物の総称である。退形成は、がん細胞の特徴的な性質であり、正常な構造特性及び機能特性の欠如（未分化）を表す。

【0068】

腫瘍は、文字通りには炎症性又はその他の腫張など、任意のタイプの腫脹であるが、現代の用法は、一般に新生物を表す。

【0069】

組織形成は、組織の起源であり、また、起始組織細胞に基づいて新生物を分類する方法である。腺腫は、腺上皮の良性新生物である。癌腫は、上皮の悪性腫瘍である。肉腫は、間葉組織の悪性腫瘍である。良性か悪性か、新生物を分類するための一体系は、生物学的（臨床的）挙動、並びに組織形成、組織学的及び細胞学的検査によって決定される新生物の起始組織又は細胞を利用する。新生物は、有糸分裂が可能な細胞を含むほぼすべての組織に由来しうる。新生物の組織学的分類は、組織学的及び細胞学的検査によって決定される起始組織（又は細胞）に基づく。

【0070】

本明細書で使用する場合、用語「キメラ抗体」は、一つの種からのモノクローナル抗体のF c定常領域（例えばマウスF c定常領域）が、組換えD N A技術を用いて、別の種の抗体からのF c定常領域（例えばヒトF c定常領域）で置き換えられている抗体を意味する。概しては、Robinson et al., P C T出願／米国特許出願公開第86／02269号

10

20

30

40

50

; Akira et al., 欧州特許出願公開第 1 8 4 1 8 7 号; Taniguchi, 欧州特許出願公開第 1 7 1 4 9 6 号; Morrison et al., 欧州特許出願公開第 1 7 3 4 9 4 号; Neuberger et al., 国際公開第 8 6 / 0 1 5 3 3 号; Cabilly et al. 米国特許第 4 8 1 6 5 6 7 号; Cabilly et al., 欧州特許出願公開第 1 2 5 0 2 3 号; Better et al., Science 240: 1041-1043, 1988; Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3439-3443, 1987; Liu et al., J. Immunol. 139: 3521-3526, 1987; Sun et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 214-218, 1987; Nishimura et al., Cancer Res 47: 999-1005, 1987; Wood et al., Nature 314: 446-449, 1885; 及び Shaw et al., J. Natl. Cancer Inst. 80: 1553-1559, 1988 を参照のこと。特定の態様では、標的結合領域又は部位は、非ヒト供給源（例えばマウス又は霊長類）由来であろうし、定常領域はヒトである。

10

【0071】

本明細書で使用する場合、用語「含む（こと）」は、組成物及び方法が、列挙された要素を含むがそれ以外を排除するものではないと意図される。組成物及び方法を定義するのに用いられる場合の「～から本質的になる」は、意図された使用のための組み合わせに何らかの本質的な意義がある他の要素は排除することを意味するものとする。例えば、本明細書で定義される要素から本質的になる組成物は、単離及び精製方法からの微量混入物、並びにリン酸緩衝生理食塩水及び保存剤などの薬学上許容される担体を排除しない。「からなる」は、微量要素以上の他の成分及び本開示の組成物を投与するための実質的な方法工程以上のものは排除することを意味するものとする。これらの各移行句(transition term)により定義される態様は、本開示の範囲内である。

20

【0072】

「対照」生物学的試料は、比較目的の実験で使用される代替試料である。「対照」は、「陽性」又は「陰性」とすることができる。例えば、実験の目的が特定の種類のがんの治療のための治療剤の有効性の相関を決定するためである場合、陽性対照（所望の治療効果を示すことが知られている化合物又は組成物）と陰性対照（治療を受けないか、又はプラセボを受ける対象若しくは試料）とを用いることが一般的に好ましい。

【0073】

本明細書で使用する場合、用語「検出可能な標識」は、試料中の標識の存在及び／又は濃度を示す、（例えば視覚的に、電子的に又は他の方法で）検出可能なシグナルを生成することができる分子又は物質を指す。特異的な結合分子にコンジュゲートすると、検出可能な標識は、特異的な結合分子が向かう標的の位置を突き止め、かつ／又は定量化するのに使用されうる。したがって、試料中の標的の存在及び／又は濃度は、検出可能な標識に生成されたシグナルを検出することにより検出されうる。検出可能な標識は、直接又は間接的に検出することができ、異なる特異的な結合分子にコンジュゲートした複数の異なる検出可能な標識は、一又は複数の標的を検出するのに組み合わせて使用されうる。例えば、ある標的に特異的な抗体にコンジュゲートした第一の検出可能な標識は、第一の検出可能な標識に特異的に結合する分子にコンジュゲートしている第二の検出可能な標識の使用によって、間接的に検出されうる。個別に検出されうる複数の検出可能な標識は、異なる標的に特異的に結合する異なる特異的な結合分子にコンジュゲートされ得、試料中の複数の標的の同時検出を提供できる多重アッセイを提供することができる。検出可能なシグナルは、光子（無線周波数、マイクロ波周波数、赤外線周波数、可視周波数、及び紫外線周波数の光子を含む）の吸収、発光、及び／又は散乱を含む任意のメカニズムによって生成されうる。検出可能な標識は、着色、蛍光、リン光、及び発光性分子並びに物質、（例えば、無色の物質を着色物質に変換するか又はその逆によって、あるいは沈殿物を生成するか又は試料の濁度を上昇させることによって）一の物質を別の物質に変換して検出可能な相違をもたらす触媒（例えば酵素）、追加の検出可能な標識化抗体コンジュゲートを使用し、抗体－ハプテン結合相互作用によって検出できるハプテン、並びに常磁性及び磁性分子又は物質を含む。検出可能な標識の特定の例は、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、酸性ホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、B－ガラクトシダーゼ又はB－グルクロニダーゼ等の酵素、フルオレセイン、発光団、クマリン、

30

40

50

BODIPY染料、レゾルフィン、及びローダミン等のフルオロフォア（蛍光分子の多くの追加例は、The Handbook--A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, Molecular Probes（オレゴン州ユージーン）において見出すことができる）、量子ドット等のナノ粒子（例えば、カリフォルニア州ハイワードのQuantum Dot Corp, Invitrogen Nanocrystal Technologiesから取得；それぞれ参照により本明細書に援用される米国特許第6815064号、第6682596号及び第6649138号も参照されたい）；金属キレート、例えば Gd^{3+} のような放射性又は常磁性金属イオンのDOTA及びDPTAキレート、並びにリポソーム、例えば捕捉された蛍光分子を含有するリポソームを含む。検出可能な標識が酵素を含む場合、色原体等の検出可能な基質、蛍光性化合物又は発光性化合物を該酵素と組み合わせて使用し、検出可能なシグナルを生成することができる（多種多様な該化合物は、例えばオレゴン州ユージーンのInvitrogen Corporationから市販されている）。発色性化合物の特定の例は、ジアミノベンジジン（DAB）、4-ニトロフェニリン酸（pNPP）、ファストレッド、プロモクロロインドリルリン酸（BCIP）、ニトロブルーテトラゾリウム（NBT）、BCIP/NBT、ファストレッド、APオレンジ、APブルー、テトラメチルベンジジン（TMB）、2, 2'-アジノージー[3-エチルベンゾチアゾリンスルホン酸]（ABTS）、o-ジアニシジン、4-クロロナフトール（4-CN）、ニトロフェニル-B-D-ガラクトピラノシド（ONPG）、o-フェニレンジアミン（OPD）、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-B-ガラクトピラノシド（X-Gal）、メチルウンベリフェリル-B-D-ガラクトピラノシド（MU-Gal）、p-ニトロフェニル- α -D-ガラクトピラノシド（PNP）、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-B-D-グルクロニド（X-Glu）、3-アミノ-9-エチルカルバゾル（AEC）、フクシン、ヨードニトロテトラゾリウム（INT）、テトラゾリウムブルー、及びテトラゾリウムバイオレットを含む。あるいは、酵素を金属組織学的検出方式で用いることもできる。金属組織学的検出方法は、アルカリホスファターゼ等の酵素を水溶性金属イオン及び該酵素の酸化還元の不活性な基質と組み合わせて使用することを含む。該基質は、酵素によって酸化還元活性な作用剤に変換され、この酸化還元活性な作用剤は、金属イオンを還元し、検出可能な沈殿物を形成する。（例えば、2004年12月20日に出願された同時係属中の米国特許出願第11/015646号、PCT出願公開第2005/003777号、及び米国特許出願公開第2004/0265922号（これらはそれぞれ参照により本明細書に援用される）を参照されたい）。金属組織学的検出方法は、検出可能な沈殿物を再形成するために、酸化還元酵素（例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ）を水溶性金属イオン、酸化剤、及び還元剤と併せて使用することを含む。（例えば、参照により本明細書に援用される米国特許第6670113号を参照のこと）。ハプテンは、抗体によって特異的に結合される小分子であるが、それ自体は動物において免疫応答を惹起せず、免疫応答を生成するには、最初にタンパク質等のより大きい担体分子に結合されなければならない。ハプテンの例は、ジニトロフェニル、ビオチン、ジゴキシゲニン、及びフルオレセインを含む。オキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ニトロアリール、ベンゾフラン、トリペルペン、尿素、チオ尿素、ロテノイド、クマリン、及びシクロリグナンハプテンの追加の例は、参照により本明細書に援用される2006年11月1日に出願された米国仮特許出願第60/856133号に開示されている。例示的な例では、検出可能な標識は、例えばピラゾール、ニトロフェニル化合物、ベンゾフラザン、トリテルペン、尿素及びチオ尿素、ロテノン及びロテノン誘導体、オキサゾール及びチアゾール、クマリン及びクマリン誘導体、並びにシクロリグナンを含む、例えば（参照により本明細書に援用される）米国特許第7695929号、第8618265号、及び第8846320号に開示されているハプテンのような非内因性ハプテン（例えばビオチンではない）を含む。このような検出可能な標識はハプテンに結合することができる抗体又はその抗原結合断片を用いて検出することができる。

【0074】

本明細書で使用する場合、「エピトープ」又は「抗原決定基」とは、抗原性である、す

10

20

30

40

50

なわち特異的免疫応答を誘発する、特定の化学基又は分子の連続的な若しくは非連続的なペプチド配列を指す。抗体は、特定の抗原エピトープに結合する。エピトープは、通常、アミノ酸又は糖側鎖などの分子の化学的に活性な表面基からなり、通常は特有の三次元構造的特徴、並びに特有の電荷的特徴を有する。立体構造エピトープ及び非立体構造エピトープは、変性溶媒の存在下で、前者との結合は失われるが、後者との結合は失われない点において区別される。

【0075】

本明細書で使用する場合、「発現」は、それによりポリヌクレオチドがmRNAに転写されるプロセス及び／又はそれにより転写されたmRNAが続いてペプチド、ポリペプチド又はタンパク質に翻訳されるプロセスを指す。ポリヌクレオチドがゲノムDNAに由来する場合、発現は、真核細胞におけるmRNAのスプライシングを含みうる。遺伝子の発現レベルは、細胞又は組織試料中のmRNA又はタンパク質の量を測定することによって決定されうる。一態様では、一つの試料からの遺伝子の発現レベルは、対照又は基準試料からの遺伝子の発現レベルと直接比較されうる。別の態様では、一つの試料からの遺伝子の発現レベルは、化合物の投与後の同じ試料からの遺伝子の発現レベルと直接比較されうる。

【0076】

本明細書で使用する場合、「相同（性）」又は「同一」、パーセント「同一性」又は「類似性」は、二以上の核酸又はポリペプチド配列の文脈で使用する場合、同じである二以上の配列又はサブ配列、あるいは特定の領域にわたって同じであるヌクレオチド又はアミノ酸残基を特定のパーセント有する、例えば少なくとも60%同一性、好ましくは少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれ以上の同一性を有する二以上の配列又はサブ配列を指す（例えば本明細書に記載の抗体をコードするヌクレオチド配列又は本明細書に記載の抗体のアミノ酸配列）。比較の目的のために配列を整列させることができ、その各配列における位置を比較することによって相同性が決定されうる。比較される配列における位置が同じ塩基又はアミノ酸で占められる場合、分子はその位置で相同である。配列間の相同性の程度は、配列により共有される一致又は相同な位置の数の関数である。アラインメント及びパーセント相同性又は配列同一性は、当該技術分野で知られているソフトウェアプログラム、例えばCurrent Protocols in Molecular Biology (Ausubelら編、1987) 補遺30、7.7.18節、表7.7.1に記載のものを使用して決定することができる。好ましくは、アラインメントのためにデフォルトパラメーターが使用される。好ましいアラインメントプログラムは、デフォルトパラメーターを用いるBLASTである。特に好ましいプログラムは、次のデフォルトパラメーターを用いるBLASTN及びBLASTPである：遺伝子コード＝標準；フィルター＝無；鎖＝両方；カットオフ値＝60；期待値＝10；マトリックス＝BLOSUM62；記載＝50配列；分類手段＝HIGH SCORE；データベース＝非重複、GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS翻訳+SwissProtein+SPupdate+PIR。これらプログラムの詳細は、次のインターネットアドレスで見ることができる：ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST。用語「相同（性）」又は「同一」、パーセント「同一性」又は「類似性」はまた、試験配列の相補体を指し、又はそれに適用することができる。この用語はまた、欠失及び／又は付加を有する配列、並びに置換を有するものも含む。本明細書に記載の通り、好ましいアルゴリズムはギャップなどを説明することができる。好ましくは、同一性は、少なくとも長さが約25個のアミノ酸又はヌクレオチドである領域にわたって、より好ましくは少なくとも長さが50～100個のアミノ酸又はヌクレオチドである領域にわたって存在する。「無関係な又は「非相同の」配列は、本開示の配列の一つと40%未満の同一性又は25%未満の同一性を共有する。

【0077】

用語「ヒト抗体」は、本明細書で 사용되는場合、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に

10

20

30

40

50

由来する可変領域及び定常領域を有する抗体を含むことが意図される。本開示のヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基を含んでいてもよい（例えばインビトロでのランダム若しくは部位特異的突然変異誘発によって、又はインビボでの体細胞変異によって導入された変異）。しかしながら、本明細書で使用する用語「ヒト抗体」は、例えばウサギなどの別の哺乳動物種の生殖系列に由来するCDR配列がヒトフレームワーク配列に移植されている抗体を含むことは意図されない。したがって、本明細書で使用する場合、用語「ヒト抗体」は、タンパク質の実質的にすべての部分（例えばCDR、フレームワーク、 C_L 、 C_H ドメイン（例えば C_{H1} 、 C_{H2} 、 C_{H3} ）、ヒンジ、 V_L 、 V_H ）がヒトにおいて実質的に非免疫原性であり、配列変化又は変異はわずかである抗体を指す。同様に、霊長類（サル、ヒヒ、チンパンジー等）、げっ歯類（マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ハムスター等）、及び他の乳類を示す抗体は、このような種、亜属、属、亜科、及び科に特異的な抗体を指す。さらに、キメラ抗体は上記のいかなる組み合わせをも含む。このような変化又は変異は、任意選択的に且つ好ましくは、非修飾抗体に比べて、ヒト又は他の種における免疫原性を保持又は低下させる。したがって、ヒト抗体は、キメラ又はヒト化抗体とは違う。ヒト抗体は、再編成ヒト免疫グロブリン（例えば重鎖及び／又は軽鎖）遺伝子を機能的に発現することができる非ヒト動物又は原核若しくは真核細胞によって産生されることが指摘されている。さらに、ヒト抗体が単鎖抗体である場合、それは、天然のヒト抗体においては見出されないリンカーペプチドを含むことができる。例えば、Fvは、重鎖の可変領域及び軽鎖の可変領域を連結するリンカーペプチド、例えば2から約8個のグリシン又は他のアミノ酸残基を含むことができる。このようなリンカーペプチドは、ヒト起源であると考えられている。

【0078】

本明細書で使用される場合、用語「ヒト化抗体」は、ヒト化軽鎖及びヒト化重鎖免疫グロブリンを含む抗体を指す。ヒト化抗体は、CDRを提供するドナー抗体と同じ抗原に結合する。ヒト化免疫グロブリン又は抗体のアクセプターフレームワークは、ドナーフレームワークから採取したアミノ酸による限られた数の置換を有することができる。ヒト化又は他のモノクローナル抗体は、抗原結合又は他の免疫グロブリン機能に実質的に何の影響も及ぼさない、追加の保存的アミノ酸置換を有することができる。ヒト化免疫グロブリンは、遺伝子工学によって作成することができる（例えば米国特許第5585089号を参照）。

【0079】

本明細書で使用する場合、用語「ヒト化免疫グロブリン」は、ヒトフレームワーク領域及び非ヒト（例えばマウス、ラット、ウサギ又は合成の）免疫グロブリンからの一又は複数のCDRを含む免疫グロブリンを指す。CDRを提供する非ヒト免疫グロブリンは「ドナー」と呼ばれ、フレームワークを提供するヒト免疫グロブリンは「アクセプター」と呼ばれる。一態様では、全CDRはヒト化免疫グロブリン中のドナー免疫グロブリンに由来する。定常領域が存在する必要はないが、存在する場合、定常領域は、ヒト免疫グロブリン定常領域と実質的に同一、すなわち少なくとも約85～90%又は少なくとも約95%以上同一でなければならない。それ故、ヒト化免疫グロブリンのすべての部分は、おそらくはCDRを除いて、天然のヒト免疫グロブリン配列の対応する部分と実質的に同一である。

【0080】

本明細書で使用する「単離（された）」という用語は、他の物質を実質的に含まない分子又は生物学的物質又は細胞形質成分を指す。一態様において、「単離（された）」という用語は、DNA若しくはRNAなどの核酸、又はタンパク質若しくはポリペプチド（例えば抗体又はその誘導体）、又は細胞若しくは細胞小器官、又は組織若しくは器官であって、それぞれ天然源に存在している他のDNA若しくはRNA、又はタンパク質若しくはポリペプチド、又は細胞若しくは細胞小器官、又は組織若しくは器官から分離されているものを指す。「単離（された）」という用語はまた、組換えDNA技術により生成された場合には細胞形質成分、ウイルス性物質又は培地を、あるいは化学的に合成された場合に

は化学的前駆体又は他の化学物質を実質的に含まない核酸又はペプチドを指す。さらに、「単離された核酸」は、断片として天然に存在しない、自然状態では見られないような核酸断片を含むことも意味する。用語「単離（された）」はまた、他の細胞たんぱく質から単離されているポリペプチドを指すために本明細書で用いられており、精製されたポリペプチドと組換えポリペプチドの双方を包含することを意味する。「単離（された）」という用語はまた、他の細胞又は組織から単離されている細胞又は組織を指すために本明細書で用いられており、培養された細胞又は組織及び操作された細胞又は組織の双方を包含することを意味する。

【0081】

本明細書で使用する場合、用語「モノクローナル抗体」は、Bリンパ球の単一クローンにより、又は単一の抗体の軽鎖及び重鎖遺伝子がトランスフェクトされている細胞により産生される抗体を指す。モノクローナル抗体は、当業者に既知の方法により、例えば免疫脾臓細胞と骨髓腫細胞との融合からハイブリッド抗体形成細胞を作製することにより製造される。モノクローナル抗体は、ヒト化モノクローナル抗体を含む。

【0082】

本明細書で使用する場合、「病的細胞」は、疾患に関係する細胞、又は疾患から生じる細胞である。病的細胞は、過剰増殖することができる。「過剰増殖細胞」は、正常又は健康な状態にあるときよりも速い速度で分裂及び増殖している細胞又は組織を意味する。このようなものの例は、限定されないが、前がん性細胞（すなわち上皮性異形成）及びがん細胞を含む。過剰増殖細胞はまた、脱分化、不死化、腫瘍性、悪性、転移性細胞、及び肉腫細胞、白血病細胞、癌腫細胞又は腺癌細胞などのがん細胞も含む。

【0083】

本明細書で 사용되는場合、「PD-L1」（プログラム死リガンド1）又は「B7-H1」（ヒトB7ホモログ1）又はPDCD1L1（プログラム細胞死1リガンド1）は、T細胞活性化の刺激とT細胞活性化の阻害の両方のためのシグナルを提供する免疫タンパク質の増殖B7ファミリーのメンバーである。ヒトPD-L1は、290アミノ酸（aa）I型の、推定18aaシグナルペプチドを持つ膜前駆体タンパク質、221aa細胞外ドメイン、21aa膜貫通領域、及び31aa細胞質ドメインをコードする（Entrez Gene ID: 29126, UniProtKB: Q9NZQ7 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 直近アクセス日 2014年10月20日）。

【0084】

用語「タンパク質」、「ペプチド」、及び「ポリペプチド」は、互換的に使用され、その最も広い意味では、二以上のサブユニットアミノ酸、アミノ酸類似体又はペプチド模倣物の化合物を指す。サブユニットは、ペプチド結合により結合されうる。別の態様では、サブユニットは、他の結合、例えばエステル結合、エーテル結合などによって結合されうる。タンパク質又はペプチドは少なくとも二個のアミノ酸を含んでいなければならない。タンパク質の配列又はペプチドの配列を含みうるアミノ酸の数に上限はない。本明細書で使用する場合、用語「アミノ酸」は、グリシン、並びにD及びL光学異性体の両方、アミノ酸類似体及びペプチド模倣物を含めた、天然及び／又は非天然すなわち合成アミノ酸のいずれも指す。

【0085】

用語「ポリヌクレオチド」及び「オリゴヌクレオチド」は、互換的に使用され、デオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドのいずれか、あるいはその類似体である、任意の長さのヌクレオチドの重合体形態を指す。ポリヌクレオチドは、任意の三次元構造を有することができ、既知又は未知の任意の機能を果たしうる。次に挙げるのは、ポリヌクレオチドの非一限定的な例である：遺伝子又は遺伝子断片（例えばプローブ、プライマー、EST又はSAGEタグ）、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA（mRNA）、転移RNA、リボソームRNA、RNAi、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離DNA、任意の配列の単離RNA、核酸プローブ及びプライマー。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌ

クレオチドなどの修飾されたヌクレオチド及びヌクレオチド類似体を含みうる。ヌクレオチド構造に対する修飾は、存在するならば、ポリヌクレオチドのアセンブリの前又は後に付与されてよい。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分により中断されてもよい。ポリヌクレオチドは、重合後に例えば標識成分とのコンジュゲーションにより、さらに修飾されてもよい。該用語はまた、二重一及び一本鎖一分子の両方を指す。別段の定め又は求めがない限り、ポリヌクレオチドである本開示の任意の態様は、二本一鎖形態と、二本一鎖形態を構成することが既知であるか又は予測される二の相補的一本一鎖形態の各々との両方を包含する。

【0086】

ポリヌクレオチドは、次の4種のヌクレオチド塩基の特定の配列で構成される：アデニン（A）；シトシン（C）；グアニン（G）；チミン（T）；及びポリヌクレオチドがRNAの場合はチミンの代わりにウラシル（U）。したがって、用語「ポリヌクレオチド配列」は、ポリヌクレオチド分子のアルファベット表示である。このアルファベット表示は、中央処理装置を有するコンピューター内のデータベースに入力して、バイオインフォマティクス用途、例えば機能性ゲノミクス及び相同性調査などに使用することができる。

【0087】

本明細書で使用する場合、「精製された」という用語は絶対的な純度を必要としない。むしろ、それは相対的な用語として意図されている。したがって、例えば、精製された核酸、ペプチド、タンパク質、生物学的複合体又は他の活性化合物は、タンパク質又は他の混入物から全体的又は部分的に単離されているものである。一般に、本開示内での使用のための実質的に精製されたペプチド、タンパク質、生物学的複合体又は他の活性化合物は、調製物中に存在するすべての巨大分子種の80%超を、該ペプチド、タンパク質、生物学的複合体又は他の活性化合物の混合若しくは形成の前に、薬学的担体、賦形剤、緩衝剤、吸収促進剤、安定化剤、防腐剤、アジュバント又は他の共成分と共に治療的投与のための完全な医薬製剤中に含む。より典型的には、ペプチド、タンパク質、生物学的複合体又は他の活性化合物は、他の製剤成分と混合する前に、精製調製物中に存在するすべての巨大分子種の90%超、多くの場合95%超を占めるように精製される。他の場合には、精製された調製物は本質的に均質であってもよく、この場合、他の巨大分子種は従来の技術によって検出可能ではない。

【0088】

本明細書で使用される場合、「特異的結合」は、少なくとも 10^{-6} Mの結合親和性を有する抗体と抗原との間の接触を意味する。特定の態様において、抗体は、少なくとも約 10^{-7} M、好ましくは 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M又は 10^{-12} Mの親和性で結合する。

【0089】

本明細書で使用する場合、用語「組換えタンパク質」は、一般にポリペプチドをコードするDNAを適切な発現ベクターに挿入し、結果として宿主細胞が形質転換して異種タンパク質を生成するために使用される組換えDNA技術により製造されるポリペプチドを指す。

【0090】

本明細書で使用する場合、「治療（すること）」又は対象における疾患の「治療」は、（1）疾患の素因があるか又は症状がまだ現れていない対象において、症状又は疾患が発生しないようにすること；（2）疾患を阻止するか又はその進行を阻止すること；あるいは（3）疾患又は疾患の症状を改善すること若しくは後退を起こすことを指す。当該技術分野で理解されているように、「治療」は、臨床結果を含む有益な又は所望の結果を得るための手法である。本開示において、有益な又は所望の臨床結果は、検出可能であるか否かを問わず、一又は複数の症状の軽減若しくは改善、（疾患を含む）状態の範囲の縮小、（疾患を含む）状態の安定化状態（すなわち悪化ではない）、（疾患を含む）状態進行の遅延又は速度低下、（疾患を含む）状態の改善又は緩和及び寛解（部分的であれ全体的であれ）のうちの一又は複数を含むがこれらに限定されない。効能があって、非常に低用量

10

20

30

40

50

で局所的に投与することができ、したがって全身性副作用を最小にする化合物が好ましい。

【0091】

本開示を実施するための形態

抗体及び抗体断片

抗体の一般的な構造は、当該技術分野で知られており、ここでは簡単に要約する。免疫グロブリンモノマーは、ジスルフィド結合で連結された二の重鎖と二の軽鎖とを含む。各重鎖は、それがジスルフィド結合を介して直接結合している軽鎖の一つと対になっている。各重鎖は、定常領域（抗体のアイソタイプによって異なる）と可変領域とを含む。可変領域は、CDRH1、CDRH2、及びCDRH3と称され、フレームワーク領域内に維持される三つの超可変領域（すなわち相補性決定領域）を含む。各軽鎖は、定常領域と可変領域とを含み、可変領域は重鎖の可変領域に類似の様式でフレームワーク領域によって維持される三つの超可変領域（CDRL1、CDRL2、及びCDRL3と称される）を含む。

10

【0092】

重鎖及び軽鎖の各対の超可変領域は、互いに協働して、標的抗原に結合することができる抗原結合部位を提供する。重鎖及び軽鎖の対の結合特異性は、重鎖並びに軽鎖のCDR1、CDR2、及びCDR3の配列によって既定される。したがって、特定の結合特異性を生じる一組のCDR配列（すなわち重鎖並びに軽鎖のCDR1、CDR2、及びCDR3の配列）が決定されると、その一組のCDR配列は、原則として、同一の抗原結合特異性を有する異なる抗体を提供するために、任意の抗体定常領域と連結された任意の他の抗体フレームワーク領域内の適切な位置に挿入されうる。

20

【0093】

上記を踏まえ、一態様において、本明細書で提供されるのは、重鎖（HC）免疫グロブリン可変ドメイン配列及び軽鎖（LC）免疫グロブリン可変ドメイン配列を含む単離抗体であり、ここで重鎖及び軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列は、アミノ酸配列CGIQDTNSKKQSDTHLEET（配列番号1）を含むヒトPD-L1のエピトープに結合する結合部位を形成し、かつ／又は少なくとも 1.5×10^{-11} Mの半数効果濃度（EC₅₀）を有する。

【0094】

一態様では、本開示のPD-L1抗体の重鎖及び軽鎖のCDR3の配列は、配列番号10及び13に示されるコンセンサス配列に一致する。

30

【0095】

一態様では、本開示のPD-L1抗体の重鎖のCDR1及びCDR2の配列は、配列番号8及び9に示されるコンセンサス配列に一致する。

【0096】

一態様では、本開示のPD-L1抗体の軽鎖のCDR1の配列は、配列番号11に示されるコンセンサス配列に一致する。

【0097】

一態様では、本開示のPD-L1抗体の軽鎖のCDR2の配列は、配列番号12の配列を含む。

40

【0098】

別の態様では、本開示のPD-L1抗体は、配列番号13のコンセンサス配列に一致する軽鎖のCDR3配列と、配列番号10のコンセンサス配列に一致する重鎖のCDR3配列とを有する。

【0099】

本開示のいくつかの好ましい抗体（SP263、J45H2L4、及びJ27H6L4）からの特異的なCDR1、CDR2、及びCDR3配列を表1に示す。したがって、本開示は、これらの好ましい抗体からの配列を有するCDR1から3を含む抗体を提供する。しかし、本開示の好ましい抗体の配列間には高レベルの配列同一性があるため、異なる

50

好ましい抗体からのCDR配列を有する抗体を提供することも本開示の範囲内である。例えば、J27H6L4からのCDR1、J45H2L4からのCDR2、及びSP263からのCDR3の配列を有する重鎖と、J45H2L4からのCDR1、SP263からのCDR2、及びJ27H6L4からのCDR3の配列を有する軽鎖とを含む抗体もまた、本開示に含まれる。

【0100】

本開示の別の態様では、単離抗体は、以下の特徴の一又は複数を含む。

(a) LC免疫グロブリン可変ドメイン配列は、SP263、J45H2L4又はJ27H6L4のLC可変ドメインのCDRと少なくとも85%同一である一又は複数のCDRを含む；

10

(b) HC免疫グロブリン可変ドメイン配列は、SP263、J45H2L4又はJ27H6L4のHC可変ドメインのCDRと少なくとも85%同一である一又は複数のCDRを含む；

(c) LC免疫グロブリン可変ドメイン配列は、SP263、J45H2L4又はJ27H6L4のLC可変ドメインと少なくとも85%同一である；

(d) HC免疫グロブリン可変ドメイン配列は、SP263、J45H2L4又はJ27H6L4のHC可変ドメインと少なくとも85%同一である；及び

(e) 抗体は、SP263、J45H2L4又はJ27H6L4によって結合されたエピトープと重複するエピトープに結合する。

【0101】

20

一態様では、本開示は、SP263、J45H2L4、及びJ27H6L4からなる群より選択される抗体と少なくとも85%同一である単離抗体を提供する。一態様では、本開示は、SP263、J45H2L4、及びJ27H6L4からなる群より選択される単離抗体を提供する。

【0102】

一態様では、本開示は、SP263のCDRを含む単離抗体を提供する。一態様では、本開示は、SP263に少なくとも85%同一である単離抗体を提供する。SP263のCDRを表1に示す。

【0103】

一態様では、本開示は、J45H2L4のCDRを含む単離抗体を提供する。一態様では、本開示は、J45H2L4に少なくとも85%同一である単離抗体を提供する。J45H2L4のCDRを表1に示す。

30

【0104】

一態様では、本開示は、J27H6L4のCDRを含む単離抗体を提供する。一態様では、本開示は、J27H6L4に少なくとも85%同一である単離抗体を提供する。J27H6L4のCDRを表1に示す。

【0105】

本明細書で提供される抗体のいくつかの態様では、HC可変ドメイン配列は、SP263の可変ドメイン配列を含み、LC可変ドメイン配列は、SP263の可変ドメイン配列を含む。

40

【0106】

本明細書で提供される抗体のいくつかの態様では、HC可変ドメイン配列は、J45H2L4の可変ドメイン配列を含み、LC可変ドメイン配列は、J45H2L4の可変ドメイン配列を含む。

【0107】

本明細書で提供される抗体のいくつかの態様では、HC可変ドメイン配列は、J27H6L4の可変ドメイン配列を含み、LC可変ドメイン配列は、J27H6L4の可変ドメイン配列を含む。

【0108】

本明細書で提供される抗体のいくつかの態様では、抗体は、 10^{-4} M、 10^{-5} M、

50

10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M又は 10^{-12} M未満の解離定数 (K_D) でヒトPD-L1と結合する。本明細書で提供される抗体のいくつかの態様では、抗原結合部位は、ヒトPD-L1に特異的に結合する。

【0109】

本明細書で提供される抗体のいくつかの態様において、抗体は可溶性Fabである。

【0110】

本明細書で提供される抗体のいくつかの態様において、HC及びLC可変ドメイン配列は、同じポリペプチド鎖の構成要素である。本明細書で提供される抗体のいくつかの態様において、HC及びLC可変ドメイン配列は、異なるポリペプチド鎖の構成要素である。

【0111】

本明細書で提供される抗体のいくつかの態様において、抗体は完全長抗体である。

【0112】

本明細書で提供される抗体のいくつかの態様において、抗体はモノクローナル抗体である。

【0113】

本明細書で提供される抗体のいくつかの態様において、抗体は、キメラであるか又はヒト化されている。

【0114】

本明細書で提供される抗体のいくつかの態様において、抗体は、Fab、F(ab)'₂、Fab'、scFv、及びFvからなる群より選択される。

【0115】

本明細書で提供される抗体のいくつかの態様において、抗体は、Fcドメインを含む。本明細書で提供される抗体のいくつかの態様において、抗体は、ウサギ抗体である。本明細書で提供される抗体のいくつかの態様において、抗体は、ヒト若しくはヒト化抗体であるか、又はヒトにおいて非免疫原性である。

【0116】

本明細書で提供される抗体のいくつかの態様において、抗体は、ヒト抗体フレームワーク領域を含む。

【0117】

他の態様において、本明細書で提供される抗体のCDRにおける一又は複数のアミノ酸残基は、別のアミノ酸で置換されている。置換は、アミノ酸の同じファミリー内の置換であるという意味において、「保存的」でありうる。天然に存在するアミノ酸は、以下の4つのファミリーに分けることができ、それらのファミリー内で保存的置換が起こる。

- 1) 塩基性側鎖を有するアミノ酸：リジン、アルギニン、ヒスチジン
- 2) 酸性側鎖を有するアミノ酸：アスパラギン酸、グルタミン酸
- 3) 非荷電極性側鎖を有するアミノ酸：アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン
- 4) 非極性側鎖を有するアミノ酸：グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン、システイン

【0118】

別の態様では、一又は複数のアミノ酸残基が、抗体の一又は複数のCDRに付加又はそのCDRから欠失している。そのような付加又は欠失は、CDRのN若しくはC末端又はCDR内のある位置で起こる。

【0119】

アミノ酸の付加、欠失又は置換によって抗体のCDRのアミノ酸配列を変化させることにより、標的抗原に対する結合親和性の増加などの様々な効果を得ることができる。

【0120】

そのような様々なCDR配列を含む本開示の抗体は、SP263、J45H2L4、及びJ27H6L4と類似の特異性及び感受性プロファイルを有するPD-L1にさらに結合することが理解されるべきである。これは、本明細書に記載の実施例に開示される結合

10

20

30

40

50

アッセイにより試験することができる。

【0121】

抗体の定常領域はまた、抗体SP263、J45H2L4、及びJ27H6L4について具体的に開示されているものから変動し得る。例えば、任意のアイソタイプ：IgA（IgA1、IgA2）、IgD、IgE、IgG（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）又はIgMのFc領域を抗体に提供することができる、定常領域配列の非限定的な例は、以下を含む：

【0122】

ヒトIgD定常領域、Uniprot：P01880 配列番号27
A P T K A P D V F P I I S G C R H P K D N S P V V L A C L I T G Y H P T S V T V
T W Y M G T Q S Q P Q R T F P E I Q R R D S Y Y M T S S Q L S T P L Q Q W R Q G
E Y K C V V Q H T A S K S K K E I F R W P E S P K A Q A S S V P T A Q P Q A E G
S L A K A T T A P A T T R N T G R G G E E K K K E K E K E E Q E E R E T K T P E
C P S H T Q P L G V Y L L T P A V Q D L W L R D K A T F T C F V V G S D L K D A
H L T W E V A G K V P T G G V E E G L L E R H S N G S Q S Q H S R L T L P R S L
W N A G T S V T C T L N H P S L P P Q R L M A L R E P A A Q A P V K L S L N L L
A S S D P P E A A S W L L C E V S G F S P P N I L L M W L E D Q R E V N T S G F
A P A R P P P Q P G S T T F W A W S V L R V P A P P S P Q P A T Y T C V V S H E
D S R T L L N A S R S L E V S Y V T D H G P M K

10

【0123】

ヒトIgG1定常領域、Uniprot：P01857 配列番号28
A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G
P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W
Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K
E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E
L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V
L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T
Q K S L S L S P G K

20

30

【0124】

ヒトIgG2定常領域、Uniprot：P01859 配列番号29
A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S N F G T Q T
Y T C N V D H K P S N T K V D K T V E R K C C V E C P P C P A P P V A G P S V F
L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V Q F N W Y V D G
V E V H N A K T K P R E E Q F N S T F R V V S V L T V V H Q D W L N G K E Y K C
K V S N K G L P A P I E K T I S K T K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N
Q V S L T C L V K G F Y P S D I S V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P M L D S D
G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L
S L S P G K

40

【0125】

ヒトIgG3定常領域、Uniprot：P01860 配列番号30
A S T K G P S V F P L A P C S R S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
Y T C N V N H K P S N T K V D K R V E L K T P L G D T T H T C P R C P E P K S C
D T P P P C P R C P E P K S C D T P P P C P R C P E P K S C D T P P P C P R C P
A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D
P E V Q F K W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T F R V V S V L T V L H
Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K T K G Q P R E P Q V Y T

50

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

【0126】

ヒトIgM定常領域、Uniprot:P01871 配列番号31

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

10

【0127】

ヒトIgG4定常領域、Uniprot:P01861 配列番号32

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

20

【0128】

ヒトIgA1定常領域、Uniprot:P01876 配列番号33

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

30

【0129】

ヒトIgA2定常領域、Uniprot:P01877 配列番号34

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

40

50

【0130】

ヒトIgC α 1定常領域、UniProt: P01834 配列番号35
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【0131】

いくつかの態様において、SP263、J45H2L4、及びJ27H6L4抗体は、配列番号27～33又は34と少なくとも80%同一である重鎖定常領域を含む。

【0132】

いくつかの態様において、SP263、J45H2L4、及びJ27H6L4抗体は、配列番号35と少なくとも80%同一である軽鎖定常領域を含む。

10

【0133】

本明細書で提供される抗体のいくつかの態様において、抗体は、SP263、J45H2L4、及びJ27H6L4で結合されるエピトープに結合する。

【0134】

本明細書で提供される抗体のいくつかの態様において、抗体は、PD-L1への結合に関してSP263、J45H2L4、及びJ27H6L4と競合する。

【0135】

本明細書で提供される抗体のいくつかの態様において、抗体は、迅速な結合並びに細胞摂取及び／又は持続放出を促進するための構造的修飾を含む。いくつかの態様において、PD-L1抗体は、迅速な結合並びに細胞摂取及び／又は持続放出を促進するために、抗体のCH2定常重鎖領域に欠失を含む。いくつかの態様において、Fab断片は、迅速な結合並びに細胞摂取及び／又は持続放出を促進するために使用される。いくつかの態様において、F(ab)'2断片は、迅速な結合並びに細胞摂取及び／又は持続放出を促進するために使用される。

20

【0136】

抗体及び抗体断片を調製する方法

抗体、その製造及び使用は、よく知られており、例えばHarlow, E. and Lane, D., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999に開示されている。抗体は、当該技術分野で既知の標準的な方法を用いて生成されうる。抗体の例は、抗体のモノクローナル、一本鎖、及び機能的断片を含む（ただしこれらに限定されない）。

30

【0137】

抗体は、様々な宿主、例えばヤギ、ウサギ、ラット、マウス、ヒト、及びその他において産生されうる。それらは、PD-L1のC末端断片などの、免疫原性特性を有する標的抗原又はその断片又はオリゴペプチドを注入することにより免疫化することができる。宿主種に応じて種々のアジュバントを用い、免疫学的応答を増加させることができる。そのようなアジュバントは、限定されないが、フロイント、水酸化アルミニウムなどの鉱物ゲル、リゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油エマルジョン、キーホールリンペットヘモシアニン、及びジニトロフェノールなどの表面界面活性物質を含む。ヒトにおいて使用されるアジュバントの中で、BCG（カルメット・ゲラン桿菌）及びコリネバクテリウム属パルバム(Corynebacterium parvum)が特に有用である。

40

【0138】

特定の態様では、本開示の抗体は、ポリクローナル、すなわち異なるアミノ酸配列を有する複数の型の抗PD-L1抗体の混合物、例えば下記で簡単に説明されている、当該分野で既知の技術を用いる配列番号1に対して作製された抗体である。一態様において、ポリクローナル抗体は、異なるCDRを有する複数の型の抗PD-L1抗体の混合物を含む。このように、異なる抗体を産生する細胞の混合物を培養し、得られた培養物から精製された抗体を使用することができる（国際公開第2004/061104号を参照）。

【0139】

50

モノクローナル抗体製造 P D - L 1 に対するモノクローナル抗体は、培養液中で連続細胞株による抗体分子の産生をもたらす任意の技術を用いて調製することができ、一態様では、配列番号 1 を有するポリペプチドを用いて調製する。このような技術は、限定されないが、ハイブリドーマ技術（例えば Kohler & Milstein, Nature 256: 495-497 (1975) 参照）；トリオーマ技術；ヒト B 細胞ハイブリドーマ技術（例えば Kozbor, et al., Immunol. Today 4: 72 (1983) 参照）及びヒトモノクローナル抗体を産生させるための E B V ハイブリドーマ技術（例えば Cole, et al., MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985) 参照）を含む。ヒトモノクローナル抗体は、本開示の実施において利用することができ、ヒトハイブリドーマを用いることにより（例えば Cote, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 80: 2026-2030 (1983) 参照）、又はヒト B 細胞をインビトロでエプスタイン・バーウイルスで形質転換することにより（例えば Cole, et al., MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985) 参照）産生されうる。例えば、抗体の領域をコードする核酸集団を単離することができる。抗体の保存領域をコードする配列に由来するプライマーを利用する P C R を用いて、集団から抗体の一部をコードする配列を増幅し、次いで増幅された配列から抗体又はその断片、例えば可変ドメインをコードする D N A を再構築する。このような増幅された配列はまた、ファージ又はバクテリア上の融合ポリペプチドの発現及び提示のために、他のタンパク質、例えばバクテリオファージコート又は細菌細胞表面タンパク質をコードする D N A と融合させることができる。次いで、例えば P D - L 1 ポリペプチド上に存在する抗原又はエピトープに対する発現された抗体若しくはその断片の親和性に基づいて、増幅された配列を発現させ、さらに選別又は単離することができる。あるいは、抗 P D - L 1 モノクローナル抗体を発現するハイブリドーマは、対象を免疫化し、次いで常套的方法を用いて対象の脾臓からハイブリドーマを単離することによって調製することができる。例えば、Milstein et al., (Galfre and Milstein, Methods Enzymol 73: 3-46 (1981)) を参照のこと。標準的な方法を用いてハイブリドーマをスクリーニングすることは、様々な特異性（すなわち異なるエピトープに対する）及び親和性のモノクローナル抗体を産生させるであろう。所望の特性、例えば P D - L 1 結合を有する選択されたモノクローナル抗体は、（i）ハイブリドーマにより発現されたままで使用することができ、（i i）ポリエチレングリコール（P E G）のような分子に結合してその特性を変えることができ、又は（i i i）モノクローナル抗体をコードする c D N A を単離し、配列決定し、種々の方法で操作することができる。一態様では、抗 P D - L 1 モノクローナル抗体は、不死化細胞と融合した、ヒト重鎖導入遺伝子及び軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有するトランスジェニック非ヒト動物、例えばトランスジェニックマウスから得られる B 細胞を含むハイブリドーマにより産生される。ハイブリドーマ技術は、当該技術分野で知られているもの、及び Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 349 (1988); Hammerling et al., Monoclonal Antibodies And T-Cell Hybridomas, 563-681 (1981) で教示されているものを含む。

【0140】

ファージディスプレイ技術上記のように、本開示の抗体は、組換え D N A 及びファージディスプレイ技術の適用によって産生され得る。例えば、抗 P D - L 1 抗体は、当該技術分野で既知の様々なファージディスプレイ法を用いて調製することができる。ファージディスプレイ法では、機能的抗体ドメインが、それらをコードするポリヌクレオチド配列を有するファージ粒子の表面上に提示される。所望の結合特性を有するファージは、抗原、典型的には固体表面又はビーズに結合又は捕捉された抗原を用いて直接選択することにより、レパートリー又はコンビナトリアル抗体ライブラリー（例えばヒト又はマウス）から選択される。これらの方法で使用されるファージは、典型的にはファージ遺伝子 I I I 又は遺伝子 V I I I タンパク質のいずれかと組み換え融合している F a b、F v 又はジスルフィド安定化 F v 抗体ドメインを有する f d 及び M 1 3 を含む糸状ファージである。さらに、方法は、P D - L 1 ポリペプチド、例えばポリペプチド又はその誘導体、断片、類似体若しくはホモログに対する所望の特異性を有するモノクローナル F a b 断片の迅速かつ

効果的な同定を可能にするように、F a b 発現ライブラリー（例えばHuse, et al., Science 246: 1275-1281, 1989参照）の構築のために適合されうる。本開示の単離抗体を作製するために使用されうるファージディスプレイ法の他の例は、Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85: 5879-5883 (1988); Chaudhary et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87: 1066-1070 (1990); Brinkman et al., J. Immunol. Methods 182: 41-50 (1995); Ames et al., J. Immunol. Methods 184: 177-186 (1995); Kettleborough et al., Eur. J. Immunol. 24 952-958 (1994); Persic et al., Gene 187: 9-18 (1997); Burton et al., Advances in Immunology 57: 191-280 (1994); P C T / G B 第 9 1 / 0 1 1 3 4 号; 国際公開第 9 0 / 0 2 8 0 9 号; 国際公開第 9 1 / 1 0 7 3 7 号; 国際公開第 9 2 / 0 1 0 4 7 号; 国際公開第 9 2 / 1 8 6 1 9 号; 国際公開第 9 3 / 1 1 2 3 6 号; 国際公開第 9 5 / 1 5 9 8 2 号; 国際公開第 9 5 / 2 0 4 0 1 号; 国際公開第 9 6 / 0 6 2 1 3 号; 国際公開第 9 2 / 0 1 0 4 7 号 (Medical Research Council et al.); 国際公開第 9 7 / 0 8 3 2 0 号 (Morphosys); 国際公開第 9 2 / 0 1 0 4 7 号 (CAT/MRC); 国際公開第 9 1 / 1 7 2 7 1 号 (Affymax); 及び米国特許第 5 6 9 8 4 2 6 号、第 5 2 2 3 4 0 9 号、第 5 4 0 3 4 8 4 号、第 5 5 8 0 7 1 7 号、第 5 4 2 7 9 0 8 号、第 5 7 5 0 7 5 3 号、第 5 8 2 1 0 4 7 号、第 5 5 7 1 6 9 8 号、第 5 4 2 7 9 0 8 号、第 5 5 1 6 6 3 7 号、第 5 7 8 0 2 2 5 号、第 5 6 5 8 7 2 7、及び第 5 7 3 3 7 4 3 号に開示されているものを含む。

【0141】

ポリペプチドをジスルフィド結合を介して結合させることによってバクテリオファージ粒子の表面にポリペプチドを提示するのに有用な方法は、L o h n i n g による米国特許第 6 7 5 3 1 3 6 号で説明されている。上記の参考文献において説明されているように、ファージ選択後、ファージ由来の抗体コード領域は、単離し、ヒト抗体を含む完全抗体又は任意の他の所望の抗原結合断片を生成するのに使用し、かつ哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母、及び細菌を含む任意の所望の宿主において発現させることができる。また、例えば F a b、F a b'、及び F (a b')₂ 断片を組換えで生成するための技術も、国際公開第 9 2 / 2 2 3 2 4 号; Mullinax et al., BioTechniques 12: 864-869 (1992); Sawai et al., AJRI 34: 26-34 (1995); 及び Better et al., Science 240: 1041-1043 (1988)に開示されているもののような当該技術分野で既知の方法を用いて使用することができる。

【0142】

一般に、抗体又は抗体断片がファージ又はファージミド粒子の表面に存在することから、良好な結合活性を維持する変異体を同定するために、ディスプレイベクターにクローニングされるハイブリッド抗体又はハイブリッド抗体断片を適切な抗原に対して選択することができる。例えば、Barbas III et al., Phage Display, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001)を参照のこと。ただし、選択及び／又はスクリーニングのために抗体断片ライブラリーを溶菌ファージベクター（修飾 T 7 又はラムダ Z a p 系）にクローニングするなど、本方法には他のベクターフォーマットを使用することができる。

【0143】

抗体製造の代替方法抗体はまた、リンパ球集団におけるインビボ産生を誘導することによって、又は組換え免疫グロブリンライブラリー若しくは高度に特異的な結合試薬のパネルをスクリーニングすることによっても産生されうる (Orlandi et al., PNAS 86: 3833-3837 (1989); Winter, G. et al., Nature, 349: 293-299 (1991))。

【0144】

あるいは、一本鎖抗体の産生のための技術を使用することができる。一本鎖抗体 (s c F v s) は、リンカーペプチド（典型的には約 5 から 25 個の長さのアミノ酸）と連結された重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む。s c F v において、重鎖及び軽鎖の可変領域は、同じ抗体又は異なる抗体に由来しうる。s c F v s は、組換え技術を用いて、例えば大腸菌などの宿主生物における s c F v をコードするベクターの発現によって合成されう

る。s c F v をコードする D N A は、上記抗体の重鎖又は重鎖の可変領域をコードする D N A 及び上記抗体の軽鎖又は軽鎖の可変領域をコードする D N A から選択される D N A のアミノ酸配列のうちの全部又は所望の配列をコードする部分的な D N A を鋳型として用い、その両端を規定するプライマー対を用いる P C R 法により増幅を実施することによって、さらにポリペプチドリンカー部分をコードする D N A とその両端を既定するプライマー対とを、リンカーの両端がそれぞれ重鎖及び軽鎖と連結するように組み合わせて増幅を実施することにより得ることができる。s c F v をコードする D N A を含む発現ベクター及び発現ベクターによって形質転換された宿主は、当該技術分野で既知の一般的な方法に従って得ることができる。

【0145】

10

抗原結合断片、例えば抗体分子のペプシン消化により産生されうる F (a b ') ₂ 断片及び F (a b ') ₂ 断片のジスルフィド架橋を還元することにより生成されうる F a b 断片も生成されうる。あるいは、F a b 発現ライブラリーを構築して、所望の特異性を有するモノクローナル F a b 断片を迅速かつ容易に同定することができる (Huse et al., Science, 256: 1275-1281 (1989))。

【0146】

抗体修飾本開示の抗体は、抗原に対する親和性を増加させるために多量体化することができる。多量化する抗体としては、一種類の抗体であっても、同一の抗原の複数のエピートープを認識する複数の抗体であってもよい。抗体の多量体化の方法としては、I g G C H 3 ドメインの二の s c F v 分子との結合、ストレプトアビジンとの結合、ヘリックス・ターン・ヘリックス・モチーフの導入等が例として挙げられる。

20

【0147】

本開示の抗体組成物は、これらの抗体のいずれかと別の作用剤との間で形成されるコンジュゲートの形態 (イムノコンジュゲート) であってもよい。一態様において、本開示の抗体は、放射性物質にコンジュゲートされている。別の態様では、本開示の抗体は、ポリエチレングリコール (P E G) などの様々なタイプの分子に結合されうる。

【0148】

抗体スクリーニング種々のイムノアッセイが、所望の特異性を有する抗体を同定するためのスクリーニングに用いられうる。確立された特異性を有するポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体のいずれかを用いる競合結合又はイムノラジオメトリックアッセイのための多数のプロトコールが当該技術分野で周知である。そのようなイムノアッセイは、典型的には、P D - L 1 又はその任意の断片若しくはオリゴペプチドと、その特異的抗体との間の複合体形成の測定を伴う。二の非干渉性 P D - L 1 エピートープに特異的なモノクローナル抗体を利用する、モノクローナルベースの 2 部位イムノアッセイを使用することができるが、競合結合アッセイを用いることもできる (Maddox et al., J. Exp. Med., 158: 1211-1216 (1983))。

30

【0149】

可能性の高い抗 P D - L 1 抗体の自動免疫組織化学 (I H C) スクリーニングは、V e n t a n a M e d i c a l S y s t e m s , I n c (V M S I) D i s c o v e r y X T 及びホルマリン固定パラフィン包埋ヒト組織を用いてスライドガラス上で実施することができる。組織試料は、最初に脱パラフィンされ、抗原回収、続いて可能性の高い抗 P D - L 1 抗体及び検出抗体の添加を経る。検出抗体は、V M S I の色素原検出試薬を用いて視覚化される。染色されたスライドを顕微鏡下で手動でスクリーニングする。正しい一次抗体染色パターンを有する試料は、可能性の高い抗 P D - L 1 候補として選択される。

40

【0150】

抗体精製本開示の抗体は、均一性まで精製することができる。抗体の分離及び精製は、従来のタンパク質分離及び精製方法を用いて実施することができる。

【0151】

ほんの一例として、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析、

50

分取ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等の使用を適切に選択し組み合わせることによって、抗体を分離及び精製することができる。Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Daniel R. Marshakら編., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); Antibodies: A Laboratory Manual . Ed Harlow及びDavid Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)。

【0152】

クロマトグラフィーの例は、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、及び吸着クロマトグラフィーを含む。一態様において、クロマトグラフィーは、HPLC又はFPLCなどの液体クロマトグラフィーを使用することにより実施される。

10

【0153】

一態様では、プロテインAカラム又はプロテインGカラムをアフィニティークロマトグラフィーに使用することができる。他の例示的なカラムは、プロテインAカラム、Hyper D、POROS、Sephrose F.F.(Pharmacia)等を含む。

【0154】

診断及び予後の方法

概略本開示の抗体は、PD-L1ポリペプチドの局在化及び／又は定量化に関する当該技術分野で既知の方法において（例えば適切な生理学的試料中のPD-L1ポリペプチドのレベルの測定における使用のため、診断方法における使用のため、ポリペプチドの画像化における使用のため等）有用である。本開示の抗体は、アフィニティークロマトグラフィー又は免疫沈降などの標準的な技術によってPD-L1ポリペプチドを単離する際に有用である。本開示のPD-L1抗体は、生物学的試料、例えば哺乳動物の血清又は細胞及び宿主系において発現される組換え産生PD-L1ポリペプチド由来の天然PD-L1ポリペプチドの精製を容易にすることができる。さらに、ポリペプチドの発現の量及びパターンを評価するために、PD-L1抗体を用いて（例えば、血漿、細胞溶解物又は細胞上清中の）PD-L1ポリペプチドを検出することができる。例えば所与の治療レジメンの有効性を決定するために、臨床試験手順の一部として本開示のPD-L1抗体を用いて、組織中のPD-L1レベルを診断的にモニターすることができる。検出は、本開示のPD-L1抗体を検出可能な物質とカップリング（すなわち物理的に連結）させることにより促進される。

20

30

【0155】

PD-L1ポリペプチドの検出生物学的試料中のPD-L1ポリペプチドのレベルを検出するための例示的な方法は、対象から生物学的試料を得ることと、PD-L1ポリペプチドを検出することができる本開示のPD-L1抗体と生物学的試料を接触させることとを含む。

【0156】

一態様では、PD-L1抗体SP263、J45H2L4、及びJ27H6L4又はその断片は、検出可能に標識される。抗体に関して「標識された」という用語は、抗体に検出可能な物質をカップリング（すなわち物理的に結合）させることによる、抗体の直接的な標識化、及び直接的に標識化される別の化合物との反応による、抗体の間接的な標識化を含むことが意図される。間接的な標識化の非限定的な例は、蛍光標識二次抗体を用いた一次抗体の検出、及び蛍光標識ストレプトアビジンで検出できるようなビオチンによるDNAプローブの末端標識化を含む。

40

【0157】

本開示の検出方法は、インビトロ及びインビボで生物学的試料中のPD-L1ポリペプチドの発現レベルを検出するために使用される。PD-L1ポリペプチドの検出のためのインビトロ技術は、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、ウェスタンブロット、フローサイトメトリー、免疫沈降、ラジオイムノアッセイ、及び免疫蛍光法（例えばIHC）を含む。さらに、PD-L1ポリペプチドの検出のためのインビボ技術は、標識され

50

た抗PD-L1抗体を対象に導入することを含む。ほんの一例として、抗体は放射性マーカーで標識することができ、対象におけるその存在及び位置が標準的な画像化技術により検出されうる。一態様において、生物学的試料は、試験対象からのポリペプチド分子を含む。

【0158】

イムノアッセイ及び画像化抗体に基づく技術を用いて生物学的試料（例えば細胞又は組織試料）中のPD-L1ポリペプチドレベルをアッセイするために、本開示のPD-L1抗体を使用することができる。例えば、組織におけるタンパク質発現は、古典的な免疫組織化学（IHC）染色法で調べることができる(Jalkanen, M. et al., J. Cell. Biol. 101: 976-985 (1985); Jalkanen, M. et al., J. Cell. Biol. 105: 3087-3096 (1987))。タンパク質遺伝子発現を検出するのに有用な他の抗体に基づく方法は、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）及びラジオイムノアッセイ（RIA）などのイムノアッセイを含む。適切な抗体アッセイ標識は、当該技術分野で既知であり、グルコースオキシダーゼなどの酵素標識と、ヨウ素（ ^{125}I 、 ^{121}I 、 ^{131}I ）、炭素（ ^{14}C ）、硫黄（ ^{35}S ）、トリチウム（ ^3H ）、インジウム（ ^{112}In ）、及びテクネチウム（ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ）などの放射性同位体又は他の放射性剤と、フルオレセイン及びローダミンなどの蛍光標識、並びにビオチンを含む。

【0159】

生物学的試料中のPD-L1ポリペプチドレベルをアッセイすることに加えて、PD-L1ポリペプチドレベルは、画像化によってインビボで検出することもできる。PD-L1ポリペプチドレベルのインビボ画像化のために抗PD-L1抗体と組み合わせることができる標識は、X線撮影、NMR又はESRによって検出可能なものを含む。X線撮影の場合、適切な標識は、検出可能な放射線を放出するが対象にとって明らかに有害でない、バリウム又はセシウムなどの放射性同位体を含む。NMR及びESRのための適切なマーカーは、関連のscFvクローンに対する栄養素の標識化によりPD-L1抗体に組み込まれうる、重水素などの検出可能で特徴的なスピンを有するものを含む。

【0160】

放射性同位体（例えば ^{131}I 、 ^{112}In 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ）、放射線不透過性物質、又は核磁気共鳴により検出可能な物質などの検出可能で適切な画像化部分で標識されているPD-L1抗体が対象に（例えば非経口的に、皮下又は腹腔内に）導入される。対象の大きさ及び使用される画像化システムが診断画像を生成するために必要な画像化部分の量を決定するであろうことは、当該技術分野において理解されるであろう。放射性同位体部分の場合、ヒトの対象に対して注入される放射線の量は、通常約5から20ミリキュリー（mCi）の範囲の $^{99\text{m}}\text{Tc}$ であろう。次いで、標識されたPD-L1抗体は、特異的標的ポリペプチドを含む細胞の位置に優先的に蓄積するであろう。インビボ腫瘍画像化は、例えばS. W. Burchiel et al., Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer 13 (1982)で説明されている。

【0161】

いくつかの態様において、迅速な結合並びに細胞摂取及び／又は持続放出を促進する構造修飾を含むPD-L1抗体は、インビボ画像化検出方法において有用である。いくつかの態様において、PD-L1抗体は、迅速な結合並びに細胞摂取及び／又は持続放出を促進するために、抗体のCH2定常重鎖領域に欠失を含む。いくつかの態様において、Fab断片は、迅速な結合並びに細胞摂取及び／又は持続放出を促進するために使用される。いくつかの態様において、F(ab)'2断片は、迅速な結合並びに細胞摂取及び／又は持続放出を促進するために使用される。

【0162】

PD-L1抗体の診断用途本開示のPD-L1抗体組成物は、診断及び予後の方法において有用である。このため、本開示は、対象におけるPD-L1関連の医学的状態の診断に有用な本開示の抗体を使用するための方法を提供する。本開示の抗体は、それらが高レベルのエピトープ結合特異性及びPD-L1ポリペプチドに対する高い結合親和性を有す

るように選択することができる。一般に、抗体の結合親和性が高ければ高いほど、よりストリンジентな洗浄条件をイムノアッセイにおいて実施し、標的ポリペプチドを除去することなく非特異的に結合した物質を除去することができる。したがって、診断アッセイに有用な本開示のPD-L1抗体は通常、少なくとも 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 、 10^{-11} 又は 10^{-12} Mの結合親和性を有する。特定の態様では、診断試薬として使用されるPD-L1抗体は、少なくとも12時間、少なくとも5時間、少なくとも1時間又は少なくとも30分以内に標準条件下で平衡に達するのに十分な動的会合速度(kinetic on-rate)を有する。

【0163】

本開示のいくつかの方法は、診断用試薬として本開示の抗PD-L1抗体及び抗PD-L1抗体組成物のポリクローナル調製物を用い、他の方法はモノクローナル単離物を用いる。上述の方法に従って調製されたポリクローナルヒト抗PD-L1抗体を用いる方法において、調製物は通常、各種のPD-L1抗体、例えば標的ポリペプチドに対して異なるエпитープ特異性を有する抗体を含む。本開示のモノクローナル抗PD-L1抗体は、密接に関連する抗原の存在下又は存在の可能性下で単一の抗原の検出に有用である。

【0164】

本開示のPD-L1抗体は、いずれの種類の生物学的試料に対しても診断試薬として使用することができる。一態様では、本明細書に開示のPD-L1抗体は、ヒト生物学的試料に対する診断試薬として有用である。PD-L1抗体を使用して、様々な標準アッセイフォーマットでPD-L1ポリペプチドを検出することができる。そのようなフォーマットは、免疫沈降、ウェスタンブロッティング、ELISA、ラジオイムノアッセイ、フローサイトメトリー、IHC、及び免疫測定法を含む。Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Publications, New York, 1988);米国特許第3791932号;第3839153号;第3850752号;第3879262号;第4034074号;第3791932号;第3817837号;第3839153号;第3850752号;第3850578号;第3853987号;第3867517号;第3879262号;第3901654号;第3935074号;第3984533号;第3996345号;第4034074号;及び第4098876号を参照のこと。生物学的試料は、対象の任意の組織(生検を含む)、細胞又は体液から得ることができる。

【0165】

PD-L1抗体の予後用途本開示はまた、対象が、PD-L1ポリペプチドの発現又は活性の増加(例えば前がん細胞の検出)に関連する医学的疾患若しくは状態を発症するリスクがあるかどうかを判定するための予後(または予測)アッセイを提供する。そのようなアッセイは、予後又は予測目的で用いられ、それによりPD-L1ポリペプチド発現によって特徴付けられるか又はそれに関連する医学的疾患若しくは症状の発症前に個体を予防的に治療することができる。

【0166】

本開示の別の態様は、対象におけるPD-L1発現を判定し、それによりその対象に適切な治療化合物又は予防化合物を選択するための方法を提供する。

【0167】

あるいは、予後アッセイを利用して、膀胱移行細胞癌、肺腺癌、乳管癌、ホジキンリンパ腫、膵臓腺癌、前立腺腺癌、子宮頸部扁平上皮癌、皮膚扁平上皮癌、及び非小細胞肺癌を有するか又は発症するリスクのある対象を同定することができる。したがって、本開示は、対照試料と比較したPD-L1ポリペプチドレベルの増加の存在がPD-L1ポリペプチド発現レベルの増加に関連する疾患若しくは状態を有するか又は発症するリスクのある対象に対する予測である、PD-L1ポリペプチド発現レベルの増加に関連する疾患又は状態を同定するための方法(ここで試験試料は対象から得られ、かつPD-L1ポリペプチドが検出される)を提供する。いくつかの態様において、PD-L1ポリペプチド発現レベルの増加に関連する疾患又は状態は、膀胱移行細胞癌、肺腺癌、乳管癌、ホジキンリンパ腫、膵臓腺癌、前立腺腺癌、子宮頸部扁平上皮癌、皮膚扁平上皮癌、及び非小細胞

肺がんからなる群より選択される。

【0168】

別の態様では、本開示は、増加したPD-L1ポリペプチド発現に関連する疾患又は状態のための化合物で対象を効果的に治療することができるかどうかを判定する方法（ここで生物学的試料は対象から得られ、かつPD-L1抗体を用いてPD-L1ポリペプチドが検出される）を提供する。対象から得られた生物学的試料中のPD-L1ポリペプチドの発現レベルを決定し、該疾患を有しない対象から得られた生物学的試料中に見出されるPD-L1発現レベルと比較する。健康な対象から得られた試料と比較した、該疾患又は状態を有すると疑われる対象から得られた試料中のPD-L1ポリペプチドのレベルの上昇は、治療される対象におけるPD-L1関連疾患又は状態を示す。

10

【0169】

PD-L1ポリペプチドの発現レベルの上昇が疾患を有する対象が特定のタイプの療法又は治療に応答する可能性が高いかどうかを示すことが知られているような疾患状態は多く存在する。したがって、生物学的試料中のPD-L1ポリペプチドを検出する方法は、例えば対象が療法又は治療に応答する可能性を評価するために、予後の方法として用いることができる。対象からの適切な組織又は体液試料中のPD-L1ポリペプチドのレベルを決定し、適切な対照、例えば同じ疾患を有するが治療に対しすでに好ましい応答をした対象におけるレベルと比較する。

【0170】

一態様では、本開示は、PD-L1ポリペプチドの発現への作用剤（例えば薬物、化合物又小分子）の影響をモニターする方法を提供する。そのようなアッセイは、基本的な薬物スクリーニング及び臨床試験に適用することができる。例えば、PD-L1ポリペプチドレベルを低下させる作用剤の有効性は、PD-L1の発現上昇を示す対象、例えばがんと診断された患者の臨床試験においてモニターすることができる。PD-L1ポリペプチドの発現に影響を及ぼす作用剤は、その作用剤を投与し、応答を観察することにより同定することができる。このようにして、PD-L1ポリペプチドの発現パターンは、作用剤に対する対象の生理的応答を示すマーカーとしての役割を果たしうる。したがって、この応答状態は、作用剤による対象の治療の前及び治療中の様々な時点で決定されうる。

20

【0171】

一態様では、本開示は、PD-L1：PD-1経路を標的とする治療剤の有効性をモニター又は予測する方法を提供する。一態様では、作用剤は、PD-1又はPD-L1を特異的に阻害し、それによりPD-1又はPD-L1の活性若しくは発現を低下させる治療用モノクローナル抗体である。PD-1又はPD-L1を特異的に標的とする治療用モノクローナル抗体の非限定的例は、Brahmer et al., N Engl J Med. 366 (26) 2455-2465 (2012)（抗PD-L1抗体であるBMS-936559を説明）；Topalian et al., N Engl J Med. 366 (26) 2443-2454 (2012)（抗PD-1抗体であるBMS-936558を説明）；MPDL3280A（抗PD-L1モノクローナル抗体、カリフォルニア州サンフランシスコのジェネンテック）（gene.com/media/press-releases/14566/2014-05-31/investigational-immunotherapy-anti-pdl1）のウェブサイト参照。直近アクセス日は2014年10月27日）；MED14736（抗PD-L1モノクローナル抗体、AstraZeneca）（clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02125461?term=medi4736+nscl&rank=3）のアドレスのウェブサイト参照。直近アクセス日は2014年10月27日）；MSB0010718C（抗PD-L1モノクローナル抗体、ドイツのMerck Serono）（fiercebitech.com/press-releases/merck-serono-initiates-phase-iii-study-anti-pd-l1-antibody-msb0010718c-metas）のアドレスのウェブサイト参照。直近アクセス日は2014年10月27日）；及びMK-3475（抗PD-1モノクローナル抗体、ドイツのMerck）（cancer.gov/drugdictionary?cdrid=695789）のウェブサイト参照。直近アクセス日は2014年10月27日）で見出される。

30

40

【0172】

自動化実施態様当業者であれば、本明細書に開示のPD-L1抗体を使用するための方

50

法の態様が自動化されうることを理解するであろう。Ventana Medical Systems, Inc は、自動分析を実施するためのシステム及び方法を開示している、米国特許第5650327号、第5654200号、第6296809号、第6352861号、第6827901号、及び第6943029号、並びに米国特許出願公開第20030211630号及び第20040052685（これらは各々参照により本明細書に援用される）を含めた多くの米国特許の譲渡人である。PD-L1染色手順の特定の態様は、様々な自動化手順を用いて実施することができる。

【0173】

キット

本明細書に記載されるように、本開示は、PD-L1の発現レベルを決定するための診断方法を提供する。一つの特定の態様において、本開示は、このような方法を実施するためのキット、並びに組織の収集及び／又はスクリーニングの実施及び／又は結果の分析などの本開示の方法を実施するための説明書を提供する。

10

【0174】

キットは、本開示のPD-L1抗体組成物（例えばモノクローナル抗体）及び使用説明書を含むか、又はそれらから本質的になるか、又はそれらからさらになる。キットは、例えば痰、血清、血漿、リンパ液、囊胞液、尿、便、脳脊髄液、腹水(acitic fluid)又は血液を含むがこれらに限定されない任意の体液及び身体組織の生検試料を含めた生物学的試料中のPD-L1ポリペプチドの存在を検出するのに有用である。試験試料は、腫瘍細胞、腫瘍に隣接する正常細胞、腫瘍の組織型に相当する正常細胞、血液細胞、末梢血リンパ球又はそれらの組み合わせであってもよい。上記の方法で使用される試験試料は、アッセイフォーマット、検出方法の性質、及びアッセイ試料として使用される組織、細胞又は抽出物によって異なるであろう。細胞のタンパク質抽出物又は膜抽出物を調製するための方法は、当該分野で既知であり、利用される系と相溶性の試料を得るために容易に適合させることができる。

20

【0175】

いくつかの態様では、キットは、生物学的試料中のPD-L1ポリペプチドに結合することができる一又は複数のPD-L1抗体（例えばPD-L1抗体SP263、J45H2L4、及びJ27H6L4の同じ抗原結合特異性を有する抗体又はその抗原結合断片）；試料中のPD-L1ポリペプチドの量を決定するための手段；及び試料中のPD-L1ポリペプチドの量を標準と比較する手段を含む。一又は複数のPD-L1抗体は、標識されていてもよい。キット構成要素（例えば試薬）は、適切な容器に入れることができる。キットは、キットを使用してPD-L1ポリペプチドを検出するための説明書をさらに含むことができる。特定の態様において、キットは、PD-L1ポリペプチドに結合する第一の抗体、例えば固体支持体に結合したもの；及び任意選択的に；2）PD-L1ポリペプチド又は第一の抗体のいずれかに結合し、かつ検出可能な標識にコンジュゲートしている第二の異なる抗体を含む。

30

【0176】

キットはまた、例えば緩衝剤、防腐剤又はタンパク質安定化剤も含むことができる。キットは、検出可能な標識、例えば、酵素又は基質を検出するために必要な構成要素をさらに含むことができる。キットはまた、対照試料又は一連の対照試料を含んでもよく、それをアッセイして試験試料と比較することができる。キットの各構成要素は、個々の容器に入れられていてもよく、様々な容器はすべて、キットを用いて実施されたアッセイの結果を解釈するための説明書とともに一つに梱包されていてもよい。本開示のキットは、キット容器の表面又は中に書面による製品を含んでいてもよい。書面による製品は、キットに含まれている試薬の使用方法を説明する。

40

【0177】

したがって、これらの示唆されたキットの構成要素は、当業者が使用するために慣例的な様式で梱包することができる。例えば、これらの示唆されたキットの構成要素は、溶液中又は液体分散物などとして提供されうる。

50

【実施例】

【0178】

実施例1：ウサギモノクローナル抗体生成

図1は、ウサギ宿主を使用してPD-L1モノクローナル抗体を作製するために用られる全体的な手順を示す。抗PD-L1ウサギモノクローナル一次抗体は、ヒトPD-L1のアミノ酸残基272～290に相当する配列CGIQDTNSKKQSDTHLEET（配列番号1）に対して向けられた。したがって、得られた抗体は、E1L3N（登録商標）抗PD-L1抗体（マサチューセッツ州のCell Signaling Technology）に非常に類似しているヒトPD-L1のC末端細胞質領域を標的とすることになる。

10

【0179】

19アミノ酸ペプチドを合成し、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）担体タンパク質に共有結合によりコンジュゲートさせた。ニュージーランド白色ウサギを、完全フロインドアジュバントで乳化させたKLHコンジュゲートペプチドで免疫化し、これに不完全フロイントアジュバントで乳化させた一連の追加免疫用量の免疫原が続いた。IHC陽性ポリクローナル抗体を生成したウサギをさらなるモノクローナル開発のために選択した。IHC試験のために、標準OptiView DABキットプロトコルを、標準CC1細胞コンディショニング後にBenchMark Ultraプラットフォーム（Ventana Medical System）で使用した。簡単に述べると、一次抗体を37℃で16分間インキュベートした後、一次抗体と反応するハプテン化二次抗体とインキュベートした。次に、抗ハプテンHRP多量体を添加し、これをハプテン化二次抗体と反応させた。最後に、発色基質（DAB）を用いて標的抗原を検出した。

20

【0180】

ELISAの場合、抗体発現細胞を単離し、配列CGIQDTNSKKQSDTHLEET（配列番号1）との反応性について標準的な直接酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）によって（Antibodies:A Laboratory Manual、661頁、第2版参照）スクリーニングし、また対照胎盤組織ブロックに対するIHCアッセイによってもスクリーニングした。IHC陽性抗体産生細胞が同定された時点で、抗体重鎖及び軽鎖をコードするcDNAを単離し、標準的な組換え技術を用いてクローニングした。次に、クローン化された重鎖及び軽鎖cDNAを共トランスフェクションすることによりモノクローナル抗体を産生させ、得られた抗体の機能性をIHCによって確認した。最大の特異性を有するウサギ抗ヒトPD-L1モノクローナル抗体、すなわちSP263、J45H2L4、及びJ27H6L4を選択し、次にプロテインAカラムにより精製した。SP263、J45H2L4、及びJ27H6L4抗体のCDR領域を表1に示す。

30

表1

抗体	HC		
	CDR1	CDR2	CDR3
SP263	NHAIS (配列番号14)	TINSDTHTYYATWPKG (配列番号15)	RIFSSSNI (配列番号16)
J45H2L4	SNAIS (配列番号19)	TINSDSHIYSATWAKG (配列番号20)	RLFSSTNI (配列番号21)
J27H6L4	SHAIS (配列番号24)	TINSDSHTYYATWAK G(配列番号25)	RIFSSSNI (配列番号16)

10

20

抗体	LC		
	CDR1	CDR2	CDR3
SP263	QASQSIYNNNWL S (配列番号17)	LASTLAS (配列番号12)	IGGESSNNDGIA (配列番号18)
J45H2L4	QASQSIYKDNWL S (配列番号22)	LASTLAS (配列番号12)	LGGESSSDDGIA (配列番号23)
J27H6L4	QASQSIYNNNWL S (配列番号17)	LASTLAS (配列番号12)	IGGESSNTDGIA (配列番号26)

30

40

【0181】

抗PD-L1抗体SP263、J45H2L4、及びJ27H6L4のCDR1、CDR2、及びCDR3領域のアミノ酸配列は、以下に示すコンセンサス配列と一致する。

【0182】

重鎖CDR1コンセンサス配列は、 $X_{10}X_{11}AIS$ (配列番号8) であり、ここで X_{10} はN又はSであり、 X_{11} はH又はNである。

【0183】

重鎖CDR2コンセンサス配列は、 $TINSDX_6HX_7YX_8ATWX_9KG$ (配列番号9) であり、ここで X_6 はT又はSであり、 X_7 はT又はIであり、 X_8 はY又はSであり、 X_9 はP又はAである。

50

【0184】

重鎖CDR3コンセンサス配列は、 RX_1FSSX_2NI （配列番号10）であり、ここで X_1 はI又はLであり、 X_2 はS又はTである。

【0185】

軽鎖CDR1コンセンサス配列は、 $QASQSIYX_{12}X_{13}NWL S$ （配列番号11）であり、ここで X_{12} はN又はKであり、 X_{13} はN又はDである。

【0186】

軽鎖CDR3コンセンサス配列は、 $X_3GGESSX_4X_5DGI A$ （配列番号13）であり、ここで X_3 はL又はIであり、 X_4 はN又はSであり、 X_5 はN、T又はDである。

10

軽鎖CDR2配列は、 $LASTLAS$ （配列番号12）である。

【0187】

SP263、J45H2L4、及びJ27H6L4抗体のHC免疫グロブリン可変ドメイン配列及びLC免疫グロブリン可変ドメイン配列を以下に示す。

【0188】

SP263HC免疫グロブリン可変ドメイン配列：

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

20

【0189】

SP263 LC免疫グロブリン可変ドメイン配列（カッパ）：

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

【0190】

J45H2L4 HC免疫グロブリン可変ドメイン配列：

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

30

【0191】

J45H2L4 LC免疫グロブリン可変ドメイン配列（カッパ）：

V M T Q T S S P V S A A V G G T V T I N C Q A S Q S I Y K D N W L S W F Q Q K P
G Q P P K L L I Y L A S T L A S G V P S R F K G S G S G T Q F T L T I S D V V C
D D A A T Y Y C L G G E S S S D D G I A F G G G T E V V V K（配列番号5）

【0192】

J27H6L4 HC免疫グロブリン可変ドメイン配列：

Q S L E E S G G R L V T P G T P L T L T C T V S G F S L S S H A I S W V R Q A P
G K G L E W I G T I N S D S H T Y Y A T W A K G R F T S S K T S T T V D L K L T
S P T T E D T A T Y F C A R R I F S S S N I W G P G T L V T V S S（配列番号6）

40

【0193】

J27H6L4 LC免疫グロブリン可変ドメイン配列（カッパ）：

V M T Q T S S P V S A A V G G T V T I N C Q A S Q S I Y N N N W L S W F Q Q K P
G Q P P K L L I Y L A S T L A S G V P S R F K G S G S G T Q S T L T I S D V V C
D D A A T Y Y C I G G E S S N T D G I A F G G G T E V V V E（配列番号7）

【0194】

実施例2：抗PD-L1抗体の標的特異性

ウサギ抗ヒトPD-L1モノクローナル抗体SP263、J45H2L4、及びJ27H6L4をホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織試料に適用し、これらの抗体の染色パターンを評価した。組織試料は、胎盤（陽性対照）、胃（陰性対照）及び結腸を

50

含む。標準CC1細胞コンディショニング及び標準Opt i View DAB検出プロトコルを用い、BenchMark Ultra (Ventana Medical System) で免疫組織化学を実施した。各一次抗体を0.9 µg/mlで16分間インキュベートした。

【0195】

図4Gに示すように、J27H6L4抗PD-L1抗体は、胎盤栄養芽層では弱い染色を示し、結腸組織及び胃組織では何も染色されなかった(図4H~4I)。対照的に、J45H2L4抗PD-L1抗体は、胎盤栄養芽層で最も強いシグナルを生成した。図4Dを参照。しかし、J45H2L4はまた、結腸及び胃組織における非特異的核染色により実証された、有意なバックグラウンド染色も示した(図4E及び4F)。図4Aに示すように、SP263抗体は、胎盤シンシチウム栄養芽層の細胞膜で強いシグナルを生じ、対照の胃及び結腸組織ではバックグラウンド染色がほとんどないから全くないの間であった(図4B~4C)。SP263抗PD-L1抗体を、その好ましい免疫染色特性に照らして、さらなる特徴付けのために選択した。

10

【0196】

SP263抗PD-L1抗体を、FFPE胎盤、扁桃、ホジキンリンパ腫、及び肺扁平上皮細胞癌組織試料に適用した。これら四つの組織の各々は、高レベルの膜結合PD-L1発現を示すことが知られている。標準CC1細胞コンディショニング及び標準Opt i View DAB検出プロトコルを用い、BenchMark Ultra (Ventana Medical System) で免疫組織化学を実施した。SP263を0.9 µg/mlで16分間インキュベートした。

20

【0197】

図2A~2Dに示すように、SP263抗体とのインキュベーションは、胎盤、扁桃、ホジキンリンパ腫、及び肺扁平上皮細胞癌組織試料において堅牢な膜結合PD-L1染色を生じた。このことは、Brown et al., J. Immunol. 170:1257-1266 (2003)に記載されているPD-L1発現パターンと一致している。したがって、これらの結果は、本開示のPD-L1抗体が生物学的試料中のPD-L1ポリペプチドレベルを検出するための方法において有用であることを実証する。図2C及び2Dのホジキンリンパ腫及び肺扁平上皮癌からの腫瘍細胞は陽性PD-L1染色を示した一方、PD-L1陽性がん細胞を取り囲む間質細胞は陰性対照細胞としての役割を果たし、PD-L1抗体の特異性を証明した。したがって、この結果は、本開示のPD-L1抗体が対象における癌性細胞を検出するための方法において有用であることを実証する。

30

【0198】

実施例3：SP263抗ヒトPD-L1抗体の特徴付け

ウェスタンブロット分析を用いて、生物学的試料中のSP263抗PD-L1抗体の結合特異性を評価した。NIH H820肺腺癌細胞株(陽性対照)、HEK293細胞株、Calu-3肺腺癌細胞株(陰性対照)、ZR75-1ヒト乳癌細胞株(陰性対照)、MCF7ヒト乳癌細胞株(陰性対照)、及びT47Dヒト乳癌細胞株(陰性対照)からの細胞溶解物を、SDS-PAGEにより分画し、標準的技術を用いてSP263抗PD-L1抗体でウェスタンブロッティングに供した(Opt i View DAB検出プロトコル参照)。

40

【0199】

図3に示すように、SP263はヒトPD-L1タンパク質に相当する~45~55 kDaのタンパク質に結合した。45~55 kDaのPD-L1タンパク質は、NIH H820肺腺癌鎖細胞(PD-L1のレベル上昇を示すことが知られている)において検出され、4つのすべての陰性対照には存在しなかった。ヒトPD-L1に特異的に結合することに加えて、これらの結果は、SP263抗体がHEK293細胞(腎臓に由来する)中のPD-L1の低内在性レベルを検出することができることをさらに示している。したがって、ウェスタンブロットアッセイの結果は、図2に示すIHCの結果を補強する。

【0200】

50

固定化ペプチド免疫原（ヒトPD-L1 aa272-290）への結合を評価するために、SP263抗体でELISA試験を実施した。結果の要約を図10に示す。SP263抗体のEC₅₀は 1.5×10^{-11} Mであり、したがってPD-L1エピトープへの結合に関して抗体の高い能力を実証している。

【0201】

実施例4：SP263抗ヒトPD-L1抗体は、E1L3N（登録商標）抗PD-L1抗体と比較して優れた結合特異性を示す

E1L3N（登録商標）抗体（マサチューセッツ州のCell Signaling Technology）は、その改良された結合特性（特異性および感受性）が認められており、それにより生物学的試料（例えば組織生検）中のヒトPD-L1ポリペプチドの検出を助ける、市販のウサギ抗ヒトPD-L1モノクローナル抗体である。<http://www.cellsignal.com/contents/science-cancer-research/pivotal-tumor-immunology-targets-pd-l1/pd-li-signaling>を参照のこと。SP263及びE1L3N（登録商標）抗体はいずれも、ヒトPD-L1のC末端領域付近のエピトープを標的とし、したがってPD-L1の細胞内ドメインに結合する。

【0202】

FFPE胃、神経、腎臓、膀胱移行細胞癌、乳管癌及び肺扁平上皮癌組織試料に、SP263抗PD-L1抗体（特に明記しない限り $0.44 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）を適用した。免疫組織化学を、OptiView検出キットとともに標準CC1細胞コンディショニングを用い、Benchmark Ultra（Ventana Medical System）で実施した。E1L3N（登録商標）抗体での対応するIHC実験は、製造業者のプロトコールに従って行った。

【0203】

図6に示すように、SP263及びE1L3N（登録商標）の両方を異なる濃度で試験した。E1L3N（登録商標）は、 $0.44 \mu\text{g}/\text{ml}$ の低濃度でFFPE神経組織における有意なバックグラウンド染色を示した。対照的に、SP263抗体は、試験したすべての濃度でFFPE神経組織における比較的低いバックグラウンド染色を示した。例えば、 $28 \mu\text{g}/\text{ml}$ のSP263抗体を用いたFFPE神経組織におけるバックグラウンド染色の強度は、 $0.11 \mu\text{g}/\text{ml}$ のE1L3N（登録商標）抗体で観察されたものと同様であった。さらに、 $28 \mu\text{g}/\text{ml}$ のSP263抗体を用いたFFPE胃組織におけるバックグラウンド染色は、同じ濃度のE1L3N（登録商標）で観察されたものと比較して弱かった。

【0204】

E1L3N（登録商標）抗体は、胃、腎臓、膀胱移行細胞癌、乳管癌、及び肺扁平上皮癌組織試料における非特異的な核又は細胞質染色を示す（図7の矢印参照）。対照的に、非特異的染色は、対応する組織試料のいずれにおいてもSP263抗体では観察されなかった（図7参照）。これは、Ghebehら、Neoplasia 8(3):190-198(2006)に記載されている膜性PD-L1発現に適合する。さらに、SP263は、膀胱移行細胞癌、乳管癌、及び肺扁平上皮癌組織試料において堅牢な染色を示し、陰性対照、すなわち胃組織においては染色を示さなかった。図7を参照。これらの結果は、本開示のPD-L1抗体が、ヒトPD-L1のC末端領域において類似のエピトープを標的とする他の市販のPD-L1抗体より優れた特異性を示すことを実証する。したがって、本開示のPD-L1抗体は、生物学的試料中のPD-L1ポリペプチドレベルを検出し、対象におけるがんを診断するための方法において有用である。

【0205】

実施例5：SP263抗ヒトPD-L1抗体は、E1L3N（登録商標）抗PD-L1抗体と比較して向上した検出感度を示す

FFPE胎盤、扁桃、子宮頸部扁平上皮癌、ホジキンリンパ腫、膵臓腺癌、前立腺腺癌、皮膚扁平上皮癌、及び非小細胞肺癌（NSCLC）組織試料に、SP263抗PD-L1抗体（ $0.44 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）を適用した。免疫組織化学を、OptiView検出

キットとともに標準C C 1細胞コンディショニングを用い、B e n c h M a r k U l t r a (V e n t a n a M e d i c a l S y s t e m) で実施した。E 1 L 3 N (登録商標) 抗体での対応するI H C実験は、製造業者のプロトコールに従って行った。

【0206】

図5に示すように、S P 2 6 3 及びE 1 L 3 N (登録商標) の両方を異なる濃度で試験した。E 1 L 3 N (登録商標) は、 $0.44 \mu\text{g}/\text{ml}$ の低濃度でF F P E胎盤組織における検出可能な染色を示した。対照的に、S P 2 6 3 抗体は、試験したすべての濃度でF F P E胎盤組織における中程度から強度のシグナルを生成した。例えば、 $28 \mu\text{g}/\text{ml}$ のS P 2 6 3 抗体を用いたF F P E胎盤組織におけるP D - L 1シグナルの強度は、 $28 \mu\text{g}/\text{ml}$ のE 1 L 3 N (登録商標) 抗体で観察されたものと同様であった。

10

【0207】

さらに、扁桃、子宮頸部扁平上皮癌、ホジキンリンパ腫、及び皮膚扁平上皮癌組織試料中のS P 2 6 3 抗体により生成されたP D - L 1シグナルの強度には、同じ試験濃度でE 1 L 3 N (登録商標) 抗体とともにインキュベートした対応する組織試料中で観察されたものと比較して、相当な増加がある(図8を参照)。膵臓腺癌及び前立腺腺癌組織試料中のS P 2 6 3 抗体により生成されたP D - L 1シグナルは、E 1 L 3 N (登録商標) 抗体で観察されたものと同様であった(図8参照)。最後に、N S C L C組織試料中のS P 2 6 3 抗体により生成されたP D - L 1シグナルの強度は、同じ試験濃度でE 1 L 3 N (登録商標) 抗体とともにインキュベートしたN S C L C組織試料中で観察されたものよりも一貫して大きかった(図9 F - 9 Jを図9 A - 9 Eと比較のこと)。

20

【0208】

これらの結果は、本開示のP D - L 1抗体が、ヒトP D - L 1のC末端領域で類似のエピトープを標的とする他の市販のP D - L 1抗体と比較して、組織試料中のP D - L 1ポリペプチドレベルの検出において有意により感受性であることを実証する。したがって、本開示のP D - L 1抗体は、生物学的試料中のP D - L 1ポリペプチドレベルを検出し、対象におけるがんを診断するための方法において有用である。

【0209】

等価物

特に定義がない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語及び科学用語は、本開示が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるものと同一の意味を持つ。

30

【0210】

本明細書に例示的に記載されている開示は、本明細書に具体的に開示されていない要素、制限(単数又は複数)の非存在下で適切に実施することができる。したがって、例えば「含む」(「comprising」、「including」、「containing」)等の用語は、広範かつ制限なしに解されるものとする。さらに、本明細書で使用される用語及び表現は、限定ではない説明の用語として使用されており、そのような用語及び表現の使用には、示され説明されている特徴又はその一部の等価物を排除する意図はなく、特許請求されている開示の範囲内で様々な変更が可能であることは認識されている。

【0211】

したがって、本明細書で提供される物質、方法、及び例は、好ましい態様の代表例であり、例示であり、本開示の範囲の限定として意図されるものではないことを理解されたい。

40

【0212】

本開示は、本明細書において広く一般的に記載されてきた。一般的な本開示の範囲に入る、より狭い種及び亜属群の各々もまた本開示の一部を形成する。これは、排除される物質が本明細書に具体的に列挙されているか否かによらず、属から任意の対象を除くという但し書き又は否定的な限定を伴う、本開示の一般的記述を含む。

【0213】

さらに、本開示の特徴又は態様がマーカッシュグループで説明されている場合、それにより本開示が当該マーカッシュグループの任意の個々の要素又は要素のサブグループによ

50

っても説明されることを当業者は理解するであろう。

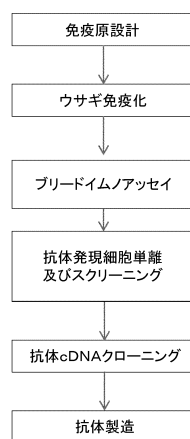
【0214】

本明細書で言及されるすべての刊行物、特許出願、特許、及び他の参考文献は、あたかもそれぞれが個々に参照により援用されるのと同程度に、その全文が出典明示により援用される。矛盾する場合、定義を含み、本明細書が支配する。

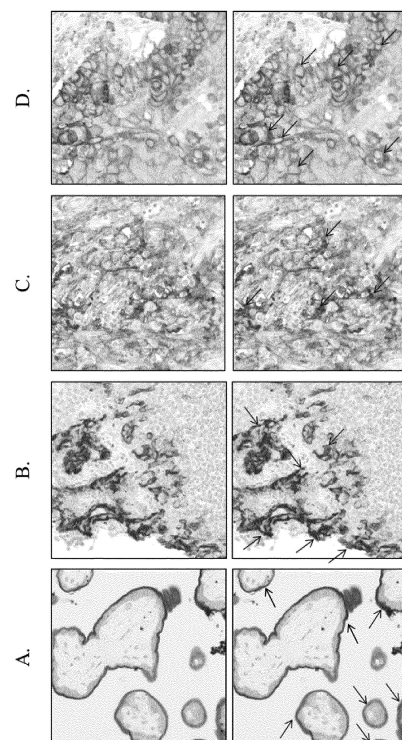
【0215】

他の態様は、以下の特許請求の範囲に記載されている。

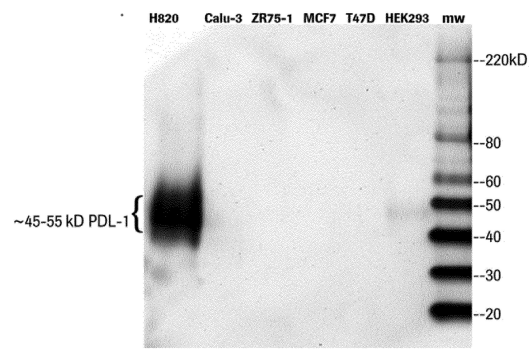
【図1】



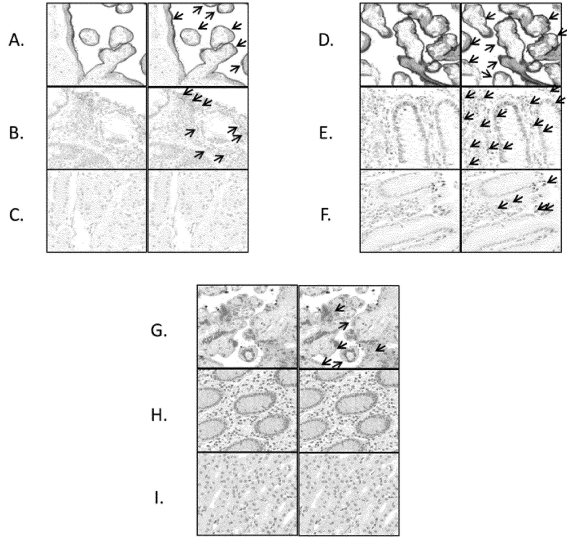
【図2】



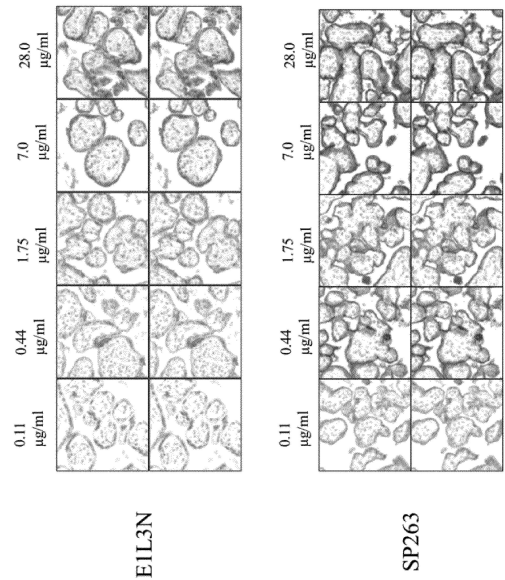
【図 3】



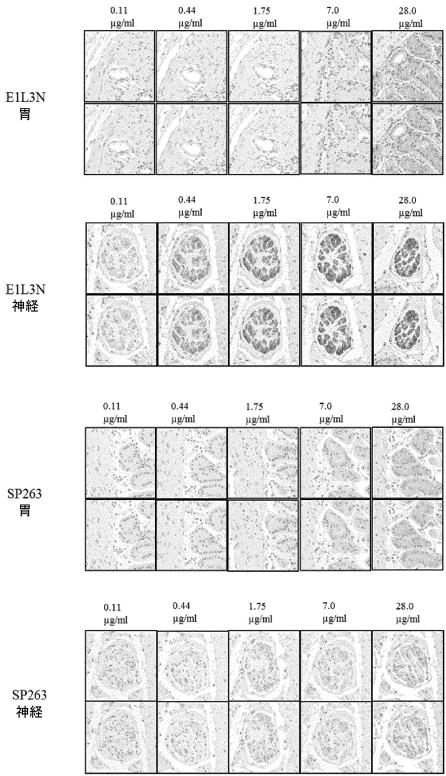
【図 4】



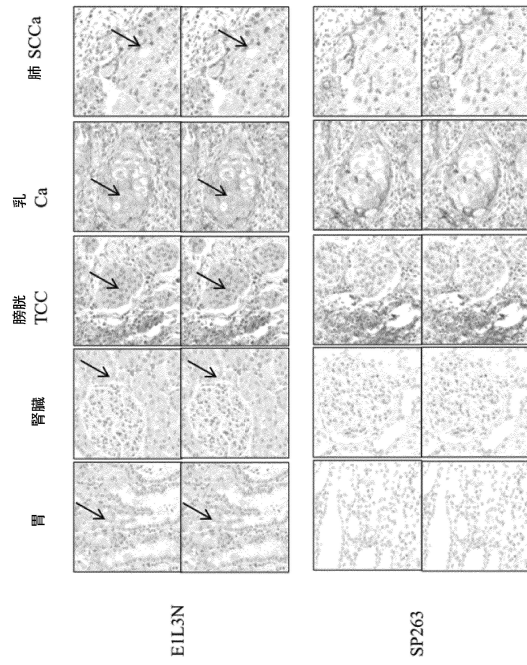
【図 5】



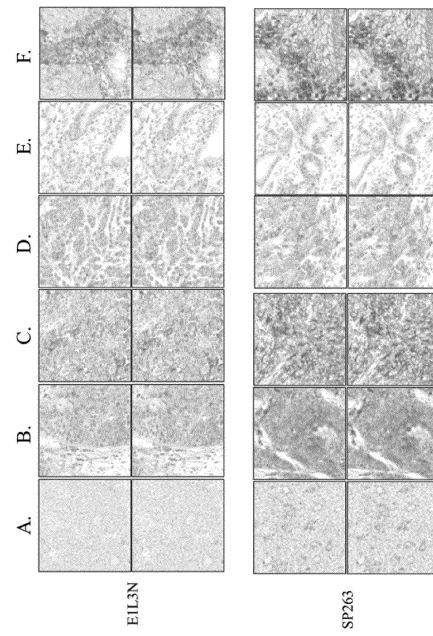
【図 6】



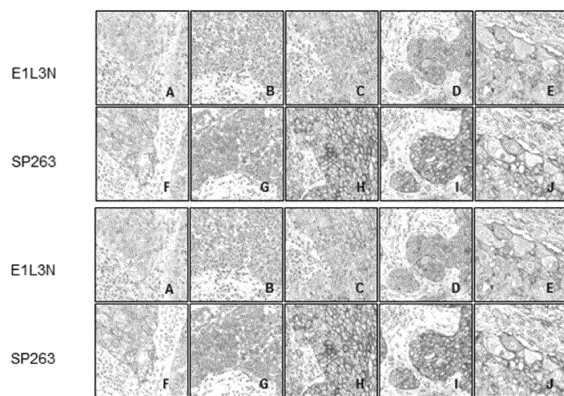
【図 7】



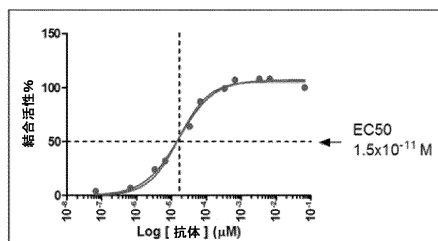
【図 8】



【図 9 A - J】



【図 10】



【配列表】

0006666905000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 15/13 (2006.01) C 1 2 N 15/13 Z N A
C 1 2 P 21/08 (2006.01) C 1 2 P 21/08

(72)発明者 リャオ, チミン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 5 0, リバモア, メディナ ストリート 1 7 5

(72)発明者 コウト, フェルナンド
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 8 8, プレザントン, オーク クリーク ドライブ
7 8 1 4

審査官 松田 芳子

(56)参考文献 DATASHEET: AHP2128 PRODUCT DETAILS, [ONLINE], 2 0 1 5 年 7 月 2 2 日, PAGE.1-3, URL
, <https://static.abdserotec.com/datasheets/ahp21/human-cd274-antibody-ahp2128.pdf>
ASCO MEETING ABSTRACTS, 2 0 1 4 年 5 月 2 0 日, ABSTRACT: 8064, URL, [http://meeting
library.asco.org/record/92530/abstract](http://meeting.library.asco.org/record/92530/abstract)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 0 7 K 1 6 / 0 0
C 1 2 N 1 5 / 0 9
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C a p l u s / R E G I S T R Y / W P I D S / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S
(STN)