(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2020-515238
(P2020-515238A)
(43)公表日　令和2年5月28日(2020.5.28)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/13	(2006.01)	C12N	15/13		4B064
C07K 16/42	(2006.01)	C07K	16/42	ZNA	4B065
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/10		4H045
C12N 5/071	(2010.01)	C12N	5/071		
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 63 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2019-538318 (P2019-538318)
(86)(22)出願日　平成30年1月17日 (2018.1.17)
(85)翻訳文提出日　令和1年9月11日 (2019.9.11)
(86)国際出願番号　PCT/US2018/014099
(87)国際公開番号　WO2018/136553
(87)国際公開日　平成30年7月26日 (2018.7.26)
(31)優先権主張番号　62/447,886
(32)優先日　平成29年1月18日 (2017.1.18)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)
(31)優先権主張番号　62/452,934
(32)優先日　平成29年1月31日 (2017.1.31)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)

(71)出願人　509012625
ジェネンテック，　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　カリフォルニア州　サウス　サンフランシスコ　ディーエヌエー　ウェイ　1
(74)代理人　110002077
園田・小林特許業務法人
(72)発明者　ホンゴ，　ジョ－アン
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４０８０，　サウス　サンフランシスコ，　ディーエヌエー　ウェイ　１，　シー／オー　ジェネンテック，　インコーポレイテッド

最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗ＰＤ－Ｌ１抗体に対するイディオタイプ抗体及びそれらの使用

(57)【要約】
本発明は、抗ＰＤ－Ｌ１抗体に対する抗イディオタイプ抗体及びその使用方法を提供する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
抗ＰＤ－Ｌ１抗体に特異的に結合する単離された抗イディオタイプ抗体であって、前記抗ＰＤ－Ｌ１抗体が、
（ａ）
（ｉ）アミノ酸配列ＲＡＳＱＤＶＳＴＡＶＡ（配列番号１）を含むＨＶＲ－Ｌ１、
（ｉｉ）アミノ酸配列ＳＡＳＦＬＹＳ（配列番号２）を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び
（ｉｉｉ）アミノ酸配列ＱＱＹＬＹＨＰＡＴ（配列番号３）を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、軽鎖可変領域と、
（ｂ）
（ｉ）アミノ酸配列ＧＦＴＦＳＤＳＷＩＨ（配列番号４）を含むＨＶＲ－Ｈ１、
（ｉｉ）アミノ酸配列ＡＷＩＳＰＹＧＧＳＴＹＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号５）を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び
（ｉｉｉ）アミノ酸配列ＲＨＷＰＧＧＦＤＹ（配列番号６）を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む、重鎖可変領域と、を含む、前記単離された抗イディオタイプ抗体。
【請求項２】
前記抗ＰＤ－Ｌ１抗体が、配列番号７のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域及び／または配列番号８のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、請求項１に記載の単離された抗イディオタイプ抗体。
【請求項３】
前記抗ＰＤ－Ｌ１抗体が、配列番号９のアミノ酸配列を含む軽鎖及び／または配列番号１０のアミノ酸配列を含む重鎖を含む、請求項２に記載の単離された抗イディオタイプ抗体。
【請求項４】
前記単離された抗イディオタイプ抗体が、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、及びＨＶＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域と、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、及びＨＶＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域と、を含み、
（ａ）ＨＶＲ－Ｈ１が、アミノ酸配列ＳＹＤＭＳ（配列番号３５）を含み、
（ｂ）ＨＶＲ－Ｈ２が、アミノ酸配列ＹＩＳＳＧＧＧＳＴＹＹＰＤＴＶＫＧ（配列番号３６）を含み、
（ｃ）ＨＶＲ－Ｈ３が、アミノ酸配列ＬＶＹＹＤＹＤＤＡＭＤＹ（配列番号３４）を含み、
（ｄ）ＨＶＲ－Ｌ１が、アミノ酸配列ＳＡＳＳＳＶＳＹＭＨ（配列番号１４）を含み、
（ｅ）ＨＶＲ－Ｌ２が、アミノ酸配列ＳＴＳＮＬＡＳ（配列番号１５）を含み、
（ｆ）ＨＶＲ－Ｌ３が、アミノ酸配列ＱＱＲＳＳＹＰＰＴＦ（配列番号１６）を含む、請求項１～３のいずれか１項に記載の単離された抗イディオタイプ抗体。
【請求項５】
前記単離された抗イディオタイプ抗体が、配列番号５４の配列を含む重鎖可変領域及び／または配列番号５３の配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項１～４のいずれか１項に記載の単離された抗イディオタイプ抗体。
【請求項６】
前記単離された抗イディオタイプ抗体が、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、及びＨＶＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域と、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、及びＨＶＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域と、を含み、
（ａ）ＨＶＲ－Ｈ１が、アミノ酸配列ＤＹＩＭＬ（配列番号４３）を含み、
（ｂ）ＨＶＲ－Ｈ２が、アミノ酸配列ＮＩＮＰＹＹＧＳＴＳＹＮＬＫＦＫＧ（配列番号４４）を含み、
（ｃ）ＨＶＲ－Ｈ３が、アミノ酸配列ＷＧＧＮＹＥＧＷＦＡＹ（配列番号４２）を含み、
（ｄ）ＨＶＲ－Ｌ１が、アミノ酸配列ＨＡＳＱＧＩＳＳＮＩＧ（配列番号２０）を含み

、
（ｅ）ＨＶＲ－Ｌ２が、アミノ酸配列ＨＧＴＮＬＥＤ（配列番号２１）を含み、
（ｆ）ＨＶＲ－Ｌ３が、アミノ酸配列ＶＱＹＡＱＦＰＬＴＦ（配列番号２２）を含む、請求項１～３のいずれか１項に記載の単離された抗イディオタイプ抗体。
【請求項７】
前記単離された抗イディオタイプ抗体が、配列番号５６の配列を含む重鎖可変領域及び／または配列番号５５の配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項１～３及び６のいずれか１項に記載の単離された抗イディオタイプ抗体。
【請求項８】
前記単離された抗イディオタイプ抗体が、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、及びＨＶＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域と、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、及びＨＶＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域と、を含み、
（ａ）ＨＶＲ－Ｈ１が、アミノ酸配列ＳＹＤＭＳ（配列番号５１）を含み、
（ｂ）ＨＶＲ－Ｈ２が、アミノ酸配列ＹＩＳＳＧＧＧＳＴＹＹＰＤＴＶＫＧ（配列番号５２）を含み、
（ｃ）ＨＶＲ－Ｈ３が、アミノ酸配列ＴＩＹＹＧＹＤＤＶＭＤＹ（配列番号５０）を含み、
（ｄ）ＨＶＲ－Ｌ１が、アミノ酸配列ＳＡＳＳＳＶＳＹＭＨ（配列番号２６）を含み、
（ｅ）ＨＶＲ－Ｌ２が、アミノ酸配列ＳＴＳＮＬＡＳ（配列番号２７）を含み、
（ｆ）ＨＶＲ－Ｌ３が、アミノ酸配列ＱＱＲＳＧＹＰＰＴＦ（配列番号２８）を含む、請求項１～３のいずれか１項に記載の単離された抗イディオタイプ抗体。
【請求項９】
前記単離された抗イディオタイプ抗体が、配列番号５８の配列を含む重鎖可変領域及び／または配列番号５７の配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項１～３及び８のいずれか１項に記載の単離された抗イディオタイプ抗体。
【請求項１０】
前記単離された抗イディオタイプ抗体が、前記抗ＰＤ－Ｌ１抗体の少なくとも１つのＨＶＲに特異的に結合する、請求項１～９のいずれか１項に記載の単離された抗イディオタイプ抗体。
【請求項１１】
前記単離された抗イディオタイプ抗体が、異種部分または検出可能な部分にコンジュゲートされる、請求項１～１０のいずれか１項に記載の単離された抗イディオタイプ抗体。
【請求項１２】
前記検出可能な部分が、標識またはビオチンである、請求項１１に記載の単離された抗イディオタイプ抗体。
【請求項１３】
請求項１～１２のいずれか１項に記載の抗イディオタイプ抗体を含む、組成物。
【請求項１４】
請求項１３に記載の組成物を含む、キット。
【請求項１５】
抗ＰＤ－Ｌ１抗体に特異的に結合する抗イディオタイプ抗体をコードする単離された核酸であって、前記抗イディオタイプ抗体が、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、及びＨＶＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域と、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、及びＨＶＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域と、を含み、
（ａ）ＨＶＲ－Ｈ１が、アミノ酸配列ＳＹＤＭＳ（配列番号３５）を含み、
（ｂ）ＨＶＲ－Ｈ２が、アミノ酸配列ＹＩＳＳＧＧＧＳＴＹＹＰＤＴＶＫＧ（配列番号３６）を含み、
（ｃ）ＨＶＲ－Ｈ３が、アミノ酸配列ＬＶＹＹＤＹＤＤＡＭＤＹ（配列番号３４）を含み、
（ｄ）ＨＶＲ－Ｌ１が、アミノ酸配列ＳＡＳＳＳＶＳＹＭＨ（配列番号１４）を含み、

（ｅ）ＨＶＲ－Ｌ２が、アミノ酸配列ＳＴＳＮＬＡＳ（配列番号１５）を含み、
（ｆ）ＨＶＲ－Ｌ３が、アミノ酸配列ＱＱＲＳＳＹＰＰＴＦ（配列番号１６）を含む、前記単離された核酸。
【請求項１６】
抗ＰＤ－Ｌ１抗体に特異的に結合する抗イディオタイプ抗体をコードする単離された核酸であって、前記抗イディオタイプ抗体が、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、及びＨＶＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域と、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、及びＨＶＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域と、を含み、
（ａ）ＨＶＲ－Ｈ１が、アミノ酸配列ＤＹＩＭＬ（配列番号４３）を含み、
（ｂ）ＨＶＲ－Ｈ２が、アミノ酸配列ＮＩＮＰＹＹＧＳＴＳＹＮＬＫＦＫＧ（配列番号４４）を含み、
（ｃ）ＨＶＲ－Ｈ３が、アミノ酸配列ＷＧＧＮＹＥＧＷＦＡＹ（配列番号４２）を含み、
（ｄ）ＨＶＲ－Ｌ１が、アミノ酸配列ＨＡＳＱＧＩＳＳＮＩＧ（配列番号２０）を含み、
（ｅ）ＨＶＲ－Ｌ２が、アミノ酸配列ＨＧＴＮＬＥＤ（配列番号２１）を含み、
（ｆ）ＨＶＲ－Ｌ３が、アミノ酸配列ＶＱＹＡＱＦＰＬＴＦ（配列番号２２）を含む、前記単離された核酸。
【請求項１７】
抗ＰＤ－Ｌ１抗体に特異的に結合する抗イディオタイプ抗体をコードする単離された核酸であって、前記抗イディオタイプ抗体が、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、及びＨＶＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域と、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、及びＨＶＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域と、を含み、
（ａ）ＨＶＲ－Ｈ１が、アミノ酸配列ＳＹＤＭＳ（配列番号５１）を含み、
（ｂ）ＨＶＲ－Ｈ２が、アミノ酸配列ＹＩＳＳＧＧＧＳＴＹＹＰＤＴＶＫＧ（配列番号５２）を含み、
（ｃ）ＨＶＲ－Ｈ３が、アミノ酸配列ＴＩＹＹＧＹＤＤＶＭＤＹ（配列番号５０）を含み、
（ｄ）ＨＶＲ－Ｌ１が、アミノ酸配列ＳＡＳＳＳＶＳＹＭＨ（配列番号２６）を含み、
（ｅ）ＨＶＲ－Ｌ２が、アミノ酸配列ＳＴＳＮＬＡＳ（配列番号２７）を含み、
（ｆ）ＨＶＲ－Ｌ３が、アミノ酸配列ＱＱＲＳＧＹＰＰＴＦ（配列番号２８）を含む、前記単離された核酸。
【請求項１８】
請求項１～１０のいずれか１項に記載の抗イディオタイプ抗体をコードする、単離された核酸。
【請求項１９】
請求項１５～１８のいずれか１項に記載の核酸を含む、ベクター。
【請求項２０】
請求項１９に記載のベクターを含む、宿主細胞。
【請求項２１】
真核生物である、請求項２０に記載の宿主細胞。
【請求項２２】
哺乳動物である、請求項２１に記載の宿主細胞。
【請求項２３】
チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞である、請求項２２に記載の宿主細胞。
【請求項２４】
原核生物である、請求項２０に記載の宿主細胞。
【請求項２５】
Ｅ．ｃｏｌｉである、請求項２４に記載の宿主細胞。
【請求項２６】

抗イディオタイプ抗体を作製するためのプロセスであって、前記抗イディオタイプ抗体をコードする前記ベクターの発現に適している条件下で、請求項２０～２５のいずれか１項に記載の宿主細胞を培養することと、前記抗イディオタイプ抗体を回収することと、を含む、前記プロセス。

【請求項２７】

生体試料中の抗ＰＤ－Ｌ１抗体を検出するための方法であって、

（ａ）前記生体試料を、請求項１３に記載の組成物である捕捉剤と接触させ、それによって、免疫複合体を形成することと、

（ｂ）（ａ）からの前記免疫複合体を、前記抗ＰＤ－Ｌ１抗体に結合する検出可能な抗体と接触させることと、

（ｃ）前記検出可能な抗体を検出することによって前記組成物に結合した前記抗ＰＤ－Ｌ１抗体のレベルを測定することと、を含む、前記方法。

【請求項２８】

生体試料中の抗ＰＤ－Ｌ１抗体を検出するための方法であって、

（ａ）前記生体試料を、前記試料中に存在する前記抗ＰＤ－Ｌ１抗体に結合する請求項１～１２のいずれか１項に記載の抗イディオタイプ抗体である捕捉剤と接触させ、それによって、免疫複合体を形成することと、

（ｂ）（ａ）からの前記免疫複合体を、前記抗ＰＤ－Ｌ１抗体に結合する検出可能な抗体と接触させることと、

（ｃ）前記検出可能な抗体を検出することによって、前記抗イディオタイプ抗体に結合した前記抗ＰＤ－Ｌ１抗体のレベルを測定することと、を含む、前記方法。

【請求項２９】

前記抗イディオタイプ抗体が、固体支持体に固定化され、前記方法が、前記生体試料を、前記抗ＰＤ－Ｌ１抗体に結合した前記固定化した抗イディオタイプ抗体から分離させるステップをさらに含む、請求項２８に記載の方法。

【請求項３０】

前記固定化した抗イディオタイプ抗体が、ビオチンにコンジュゲートされ、ストレプトアビジンでコーティングされたマイクロタイタープレートに結合している、請求項２９に記載の方法。

【請求項３１】

前記検出可能な抗体が、ヒトまたはヒト化抗体に結合する非ヒト種からの抗体である、請求項２８に記載の方法。

【請求項３２】

前記検出可能な抗体が、直接検出可能であるか、または西洋ワサビペルオキシダーゼにコンジュゲートされるか、または蛍光測定もしくは熱量測定試薬によって検出される、請求項２８に記載の方法。

【請求項３３】

前記生体試料が、ヒト対象から単離される、請求項２７～３２のいずれか１項に記載の方法。

【請求項３４】

前記ヒト対象が、

（ａ）

（ｉ）アミノ酸配列ＲＡＳＱＤＶＳＴＡＶＡ（配列番号１）を含むＨＶＲ－Ｌ１、

（ｉｉ）アミノ酸配列ＳＡＳＦＬＹＳ（配列番号２）を含むＨＶＲ－Ｌ２、

（ｉｉｉ）アミノ酸配列ＱＱＹＬＹＨＰＡＴ（配列番号３）を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、軽鎖可変領域と、

（ｂ）

（ｉ）アミノ酸配列ＧＦＴＦＳＤＳＷＩＨ（配列番号４）を含むＨＶＲ－Ｈ１、

（ｉｉ）アミノ酸配列ＡＷＩＳＰＹＧＧＳＴＹＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号５）を含むＨＶＲ－Ｈ２、

（ｉｉｉ）アミノ酸配列ＲＨＷＰＧＧＦＤＹ（配列番号６）を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む、重鎖可変領域と、を含む、抗ＰＤ－Ｌ１抗体で治療されたことがある、請求項３３に記載の方法。

【請求項３５】

前記方法が、前記抗ＰＤ－Ｌ１抗体の既知のレベルと比較して、前記抗ＰＤ－Ｌ１抗体のレベルを判定するために標準曲線を使用することをさらに含む、請求項２８に記載の方法。

【請求項３６】

前記生体試料が、血液、血漿、または血清である、請求項２７～３５のいずれか１項に記載の方法。

【請求項３７】

生体試料中の抗ＰＤ－Ｌ１抗体を特異的に検出するための免疫学的測定キットであって、

（ａ）請求項１～１２のいずれか１項に記載の抗イディオタイプ抗体または請求項１３に記載の組成物と、

（ｂ）前記抗ＰＤ－Ｌ１抗体に結合する検出可能な抗体と、

（ｃ）前記抗ＰＤ－Ｌ１抗体を検出するための取扱説明書と、を含む、生体試料中の抗ＰＤ－Ｌ１抗体を特異的に検出するための免疫学的測定キット。

【請求項３８】

前記キットが、前記抗ＰＤ－Ｌ１抗体を検出するための免疫学的測定において有用である、請求項３７に記載のキット。

【請求項３９】

生体試料中の抗ＰＤ－Ｌ１抗体を検出するための方法であって、

（ａ）前記生体試料を、前記抗イディオタイプ抗体を前記抗ＰＤ－Ｌ１抗体に結合し、複合体を形成することを可能にする条件下で、請求項１～１２のいずれか１項に記載の抗イディオタイプ抗体または請求項１３に記載の組成物と接触させることと、

（ｂ）前記抗イディオタイプ抗体と接触させた試料を、前記抗イディオタイプ抗体と接触させたことがない試料と比較するために、免疫固定電気泳動によって前記試料を分析することと、

（ｃ）前記生体試料中の前記抗ＰＤ－Ｌ１抗体の存在を検出することであって、前記抗イディオタイプ抗体と接触させた試料と、前記抗イディオタイプ抗体と接触させたことがない試料との間の泳動の違いが、前記生体試料中の前記抗ＰＤ－Ｌ１抗体の存在を示す、前記検出することと、を含む、前記方法。

【請求項４０】

生体試料中のＭ－タンパク質を検出するための方法であって、

（ａ）前記生体試料を、前記抗イディオタイプ抗体を前記抗ＰＤＬ１抗体に結合し、複合体を形成することを可能にする条件下で、請求項１～１２のいずれか１項に記載の抗イディオタイプ抗体または請求項１３に記載の組成物と接触させることと、

（ｂ）前記抗イディオタイプ抗体と接触させた試料を、前記抗イディオタイプ抗体と接触させたことがない試料と比較するために、免疫固定電気泳動によって前記試料を分析することと、

（ｃ）前記生体試料中の前記Ｍ－タンパク質の存在を検出することと、を含む、前記方法。

【請求項４１】

ステップ（ｂ）が、前記Ｍ－タンパク質からの前記抗ＰＤ－Ｌ１抗体及び前記抗イディオタイプ抗体の複合体の分離をもたらす、請求項４０に記載の方法。

【請求項４２】

ステップ（ｃ）の前に、前記方法が、バンドの泳動が、前記抗イディオタイプ抗体の添加によって影響を受けるかどうかを判定することによって、バンドがＭ－タンパク質であるかどうかを判定するステップをさらに含む、請求項４０または４１に記載の方法。

【請求項４３】
前記生体試料が、血液、尿、または血清である、請求項３９～４２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４４】
対象における抗ＰＤ－Ｌ１抗体治療の有効性をモニタリングするための方法であって、
（ａ）生体試料を、前記抗イディオタイプ抗体を前記抗ＰＤ－Ｌ１抗体に結合し、複合体を形成することを可能にする条件下で、請求項１～１２のいずれか１項に記載の抗イディオタイプ抗体または請求項１３に記載の組成物と接触させることであって、前記生体試料が前記対象からの生体試料であり、前記対象が、多発性骨髄腫に罹患しており、前記抗ＰＤ－Ｌ１抗体で治療されたことがある、前記接触させることと、
（ｂ）前記抗イディオタイプ抗体と接触させた前記試料を、前記抗イディオタイプ抗体と接触させたことがない前記試料と比較するために、免疫固定電気泳動によって前記試料を分析することと、
（ｃ）前記生体試料中の前記抗ＰＤ－Ｌ１抗体の存在を検出することであって、前記抗イディオタイプ抗体と接触させた前記試料と、前記抗イディオタイプ抗体と接触させたことがない前記試料との間の泳動の違いが、前記生体試料中の前記抗ＰＤ－Ｌ１抗体の存在を示す、前記検出することと、
（ｄ）前記生体試料中のＭ－タンパク質のレベルを検出することであって、前記生体試料中の前記Ｍ－タンパク質のレベルが、前記抗ＰＤ－Ｌ１抗体治療の有効性を示す、前記検出することと、を含む、前記方法。
【請求項４５】
ステップ（ｂ）が、前記Ｍ－タンパク質からの前記抗ＰＤ－Ｌ１抗体及び前記抗イディオタイプ抗体の複合体の分離をもたらす、請求項４４に記載の方法。
【請求項４６】
ステップ（ｄ）の前に、前記方法が、バンドの泳動が、前記抗イディオタイプ抗体の添加によって影響を受けるかどうかを判定することによって、バンドがＭ－タンパク質であるかどうかを判定するステップをさらに含む、請求項４４または４５に記載の方法。
【請求項４７】
前記生体試料が、血液、尿、または血清である、請求項４４～４６のいずれか１項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願
本出願は、２０１７年１月１８日に出願された米国特許出願第６２／４４７，８８６号及び２０１７年１月３１日に出願された米国特許出願第６２／４５２，９３４号の優先利益を主張するものであり、この各々の開示は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【０００２】
ＡＳＣＩＩテキストファイルでの配列表の提出
ＡＳＣＩＩテキストファイルでの以下の提出内容が、その全体が参照により本明細書に組み込まれる：コンピュータ可読形態（ＣＲＦ）の配列表（ファイル名：１４６３９２０３８５４０ＳＥＱＬＩＳＴ．ｔｘｔ、記録日：２０１８年１月１６日、サイズ：４０ＫＢ）。
【０００３】
本発明は、抗ＰＤ－Ｌ１イディオタイプ抗体及びその使用方法に関する。
【背景技術】
【０００４】
Ｔ細胞機能障害またはアネルギーが、阻害性受容体であるプログラム死１ポリペプチド（ＰＤ－１）の発現の持続及び誘導と同時に生じることが発見された。結果として、ＰＤ

－１、ならびにＰＤ－１との相互作用によりシグナル伝達する他の分子、例えば、プログラム死リガンド１（ＰＤ－Ｌｌ）の治療標的は、極めて興味深い分野である。ＰＤ－Ｌ１シグナル伝達の阻害は、がん（例えば、腫瘍免疫）の治療のためにＴ細胞免疫を増強する手段として実証されている。抗ＰＤ－１または抗ＰＤ－Ｌ１抗体を使用する治療法が、開発されており、異なるタイプのがんを治療するために使用されている。例えば、米国特許第８，２１７，１４９号を参照のこと。

【０００５】

ＰＤ－Ｌ１（例えば、内因性免疫グロブリン）を対象とするまたは対象としない他の抗体をまた検出することなく、生体試料及び／または臨床試料中のＰＤ－Ｌ１に治療的モノクローナル抗体を検出することが当該技術分野で必要である。本発明は、ある特定の抗ＰＤ－Ｌ１抗体を特異的に検出する抗イディオタイプ抗体を提供する。これらの抗体は、例えば、薬物動態（ＰＫ）及び薬力学的研究において、患者における治療的抗ＰＤ－Ｌ１抗体の定量化及びモニタリングのために有用である。

【発明の概要】

【０００６】

一態様では、本発明は、抗ＰＤ－Ｌ１抗体に特異的に結合する単離された抗イディオタイプ抗体を提供する。いくつかの実施形態において、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、

（ａ）

（ｉ）アミノ酸配列ＲＡＳＱＤＶＳＴＡＶＡ（配列番号１）を含むＨＶＲ－Ｌ１、

（ｉｉ）アミノ酸配列ＳＡＳＦＬＹＳ（配列番号２）を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び

（ｉｉｉ）アミノ酸配列ＱＱＹＬＹＨＰＡＴ（配列番号３）を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、軽鎖可変領域と、

（ｂ）

（ｉ）アミノ酸配列ＧＦＴＦＳＤＳＷＩＨ（配列番号４）を含むＨＶＲ－Ｈ１、

（ｉｉ）アミノ酸配列ＡＷＩＳＰＹＧＧＳＴＹＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号５）を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び

（ｉｉｉ）アミノ酸配列ＲＨＷＰＧＧＦＤＹ（配列番号６）を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む、重鎖可変領域と、を含む。

【０００７】

いくつかの実施形態において、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、配列番号７のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域及び／または配列番号８のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。

【０００８】

いくつかの実施形態において、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、配列番号９のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域及び／または配列番号１０のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。

【０００９】

いくつかの実施形態において、単離された抗イディオタイプ抗体は、配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号３１のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（ＶＨ）、及び／または配列番号１１のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号１２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号１３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。

【００１０】

いくつかの実施形態において、単離された抗イディオタイプ抗体は、配列番号３２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号３４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含むＶＨ、及び／または配列番号１４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号１５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号１６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含むＶＬを含む。

【００１１】

いくつかの実施形態において、単離された抗イディオタイプ抗体は、配列番号３５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び

配列番号３４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含むＶＨ、及び／または配列番号１４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号１５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号１６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含むＶＬを含む。

【００１２】

いくつかの実施形態において、単離された抗イディオタイプ抗体は、配列番号５４の配列を含む重鎖可変領域及び／または配列番号５３の配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【００１３】

いくつかの実施形態において、単離された抗イディオティック抗体は、配列番号６０の配列を含む重鎖及び／または配列番号５９の配列を含む軽鎖を含む。

【００１４】

いくつかの実施形態において、単離された抗イディオタイプ抗体は、配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含むＶＨ、及び／または配列番号１７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号１８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号１９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含むＶＬを含む。

【００１５】

いくつかの実施形態において、単離された抗イディオタイプ抗体は、配列番号４０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号４１のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含むＶＨ、及び／または配列番号２０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号２１のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号２２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含むＶＬを含む。

【００１６】

いくつかの実施形態において、単離された抗イディオタイプ抗体は、配列番号４３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号４４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含むＶＨ、及び／または配列番号２０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号２１のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号２２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含むＶＬを含む。

【００１７】

いくつかの実施形態において、単離された抗イディオタイプ抗体は、配列番号５６の配列を含む重鎖可変領域、及び／または配列番号５５の配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【００１８】

いくつかの実施形態において、単離された抗イディオティック抗体は、配列番号６２の配列を含む重鎖及び／または配列番号６１の配列を含む軽鎖を含む。

【００１９】

いくつかの実施形態において、単離された抗イディオタイプ抗体は、配列番号４５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号４６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号４７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含むＶＨ、及び／または配列番号２３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号２４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号２５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含むＶＬを含む。

【００２０】

いくつかの実施形態において、単離された抗イディオタイプ抗体は、配列番号４８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号４９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号５０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含むＶＨ、及び／または配列番号２６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号２７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号２８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含むＶＬを含む。

【００２１】

いくつかの実施形態において、単離された抗イディオタイプ抗体は、配列番号５１のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号５２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号５０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含むＶＨ、及び／または配列番号２６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号２７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、

及び配列番号２８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含むＶＬを含む。
【００２２】
いくつかの実施形態において、単離された抗イディオタイプ抗体は、配列番号５８の配列を含む重鎖可変領域、及び／または配列番号５７の配列を含む軽鎖可変領域を含む。
【００２３】
いくつかの実施形態において、単離された抗イディオティック抗体は、配列番号６４の配列を含む重鎖、及び／または配列番号６３の配列を含む軽鎖を含む。
【００２４】
いくつかの実施形態において、単離された抗イディオタイプ抗体は、抗ＰＤ－Ｌ１抗体の少なくとも１つのＨＶＲに特異的に結合する。
【００２５】
いくつかの実施形態において、単離された抗イディオタイプ抗体は、異種部分または検出可能な部分にコンジュゲートされる。いくつかの実施形態において、検出可能な部分は、標識またはビオチンである。
【００２６】
別の態様では、本発明は、本明細書に提供される、抗イディオタイプ抗体を含む組成物を提供する。
【００２７】
別の態様では、本発明は、本明細書に提供される組成物を含むキットを提供する。
【００２８】
別の態様では、本発明は、抗ＰＤ－Ｌ１抗体に特異的に結合する抗イディオタイプ抗体をコードする単離された核酸を提供し、抗イディオタイプ抗体は、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、及びＨＶＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域と、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、及びＨＶＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域と、を含み、
（ａ）ＨＶＲ－Ｈ１が、アミノ酸配列ＳＹＤＭＳ（配列番号３５）を含み、
（ｂ）ＨＶＲ－Ｈ２が、アミノ酸配列ＹＩＳＳＧＧＧＳＴＹＹＰＤＴＶＫＧ（配列番号３６）を含み、
（ｃ）ＨＶＲ－Ｈ３が、アミノ酸配列ＬＶＹＹＤＹＤＤＡＭＤＹ（配列番号３４）を含み、
（ｄ）ＨＶＲ－Ｌ１が、アミノ酸配列ＳＡＳＳＳＶＳＹＭＨ（配列番号１４）を含み、
（ｅ）ＨＶＲ－Ｌ２が、アミノ酸配列ＳＴＳＮＬＡＳ（配列番号１５）を含み、
（ｆ）ＨＶＲ－Ｌ３が、アミノ酸配列ＱＱＲＳＳＹＰＰＴＦ（配列番号１６）を含む。
【００２９】
別の態様では、本発明は、抗ＰＤ－Ｌ１抗体に特異的に結合する抗イディオタイプ抗体をコードする単離された核酸を提供し、抗イディオタイプ抗体は、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、及びＨＶＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域と、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、及びＨＶＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域と、を含み、
（ａ）ＨＶＲ－Ｈ１が、アミノ酸配列ＤＹＩＭＬ（配列番号４３）を含み、
（ｂ）ＨＶＲ－Ｈ２が、アミノ酸配列ＮＩＮＰＹＹＧＳＴＳＹＮＬＫＦＫＧ（配列番号４４）を含み、
（ｃ）ＨＶＲ－Ｈ３が、アミノ酸配列ＷＧＧＮＹＥＧＷＦＡＹ（配列番号４２）を含み、
（ｄ）ＨＶＲ－Ｌ１が、アミノ酸配列ＨＡＳＱＧＩＳＳＮＩＧ（配列番号２０）を含み、
（ｅ）ＨＶＲ－Ｌ２が、アミノ酸配列ＨＧＴＮＬＥＤ（配列番号２１）を含み、
（ｆ）ＨＶＲ－Ｌ３が、アミノ酸配列ＶＱＹＡＱＦＰＬＴＦ（配列番号２２）を含む。
【００３０】
別の態様では、本発明は、抗ＰＤ－Ｌ１抗体に特異的に結合する抗イディオタイプ抗体をコードする単離された核酸を提供し、抗イディオタイプ抗体は、ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、及びＨＶＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域と、ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、及びＨ

ＶＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域と、を含み、
（ａ）ＨＶＲ－Ｈ１が、アミノ酸配列ＳＹＤＭＳ（配列番号５１）を含み、
（ｂ）ＨＶＲ－Ｈ２が、アミノ酸配列ＹＩＳＳＧＧＧＳＴＹＹＰＤＴＶＫＧ（配列番号５２）を含み、
（ｃ）ＨＶＲ－Ｈ３が、アミノ酸配列ＴＩＹＹＧＹＤＤＶＭＤＹ（配列番号５０）を含み、
（ｄ）ＨＶＲ－Ｌ１が、アミノ酸配列ＳＡＳＳＳＶＳＹＭＨ（配列番号２６）を含み、
（ｅ）ＨＶＲ－Ｌ２が、アミノ酸配列ＳＴＳＮＬＡＳ（配列番号２７）を含み、
（ｆ）ＨＶＲ－Ｌ３が、アミノ酸配列ＱＱＲＳＧＹＰＰＴＦ（配列番号２８）を含む。

【００３１】
別の態様では、本発明は、本明細書に提供される、抗イディオタイプ抗体をコードする単離された核酸を提供する。

【００３２】
別の態様では、本発明は、本明細書に提供される、核酸を含むベクターを提供する。

【００３３】
別の態様では、本発明は、本明細書に提供される、ベクターを含む宿主細胞を提供する。

【００３４】
いくつかの実施形態において、宿主細胞は、真核生物である。いくつかの実施形態において、宿主細胞は、哺乳類細胞である。いくつかの実施形態において、宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞である。

【００３５】
いくつかの実施形態において、宿主細胞は、原核生物である。いくつかの実施形態において、宿主細胞は、Ｅ．ｃｏｌｉである。

【００３６】
別の態様では、本発明は、抗イディオタイプ抗体をコードするベクターの発現に適している条件下で、本明細書に提供される宿主細胞を培養することと、抗イディオタイプ抗体を回収することと、を含む、抗イディオタイプ抗体を作製するためのプロセスを提供する。

【００３７】
別の態様では、本発明は、
（ａ）生体試料を、本明細書に提供される抗イディオタイプ抗体を含む組成物である捕捉剤と接触させ、それによって、免疫複合体を形成することと、
（ｂ）（ａ）からの免疫複合体を、抗ＰＤ－Ｌ１抗体に結合する検出可能な抗体と接触させることと、
（ｃ）検出可能な抗体を検出することによって組成物に結合した抗ＰＤ－Ｌ１抗体のレベルを測定することと、を含む、生体試料中の抗ＰＤ－Ｌ１抗体を検出するための方法を提供する。

【００３８】
別の態様では、本発明は、
（ａ）生体試料を、試料中に存在する抗ＰＤ－Ｌ１抗体と結合する本明細書に提供される抗イディオタイプ抗体である捕捉剤と接触させ、それによって、免疫複合体を形成することと、
（ｂ）（ａ）からの免疫複合体を、抗ＰＤ－Ｌ１抗体に結合する検出可能な抗体と接触させることと、
（ｃ）検出可能な抗体を検出することによって、抗イディオタイプ抗体に結合した抗ＰＤ－Ｌ１抗体のレベルを測定することと、を含む、生体試料中の抗ＰＤ－Ｌ１抗体を検出するための方法を提供する。

【００３９】
いくつかの実施形態において、抗イディオタイプ抗体は、固体支持体に固定化され、本

方法は、生体試料を、抗ＰＤ－Ｌ１抗体に結合した固定化した抗イディオタイプ抗体から分離させるステップをさらに含む。

【００４０】

いくつかの実施形態において、固定化した抗イディオタイプ抗体は、ビオチンにコンジュゲートされ、ストレプトアビジンでコーティングされたマイクロタイタープレートに結合している。

【００４１】

いくつかの実施形態において、検出可能な抗体は、ヒトまたはヒト化抗体に結合する非ヒト種からの抗体である。

【００４２】

いくつかの実施形態において、検出可能な抗体は、直接検出可能であるか、または西洋ワサビペルオキシダーゼにコンジュゲートされるか、または蛍光もしくは熱量測定試薬によって検出される。

【００４３】

いくつかの実施形態において、生体試料は、ヒト対象から単離される。

【００４４】

いくつかの実施形態において、ヒト対象は、

（ａ）

（ｉ）アミノ酸配列ＲＡＳＱＤＶＳＴＡＶＡ（配列番号１）を含むＨＶＲ－Ｌ１、

（ｉｉ）アミノ酸配列ＳＡＳＦＬＹＳ（配列番号２）を含むＨＶＲ－Ｌ２、

（ｉｉｉ）アミノ酸配列ＱＱＹＬＹＨＰＡＴ（配列番号３）を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、軽鎖可変領域と、

（ｂ）

（ｉ）アミノ酸配列ＧＦＴＦＳＤＳＷＩＨ（配列番号４）を含むＨＶＲ－Ｈ１、

（ｉｉ）アミノ酸配列ＡＷＩＳＰＹＧＧＳＴＹＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号５）を含むＨＶＲ－Ｈ２、

（ｉｉｉ）アミノ酸配列ＲＨＷＰＧＧＦＤＹ（配列番号６）を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む、重鎖可変領域と、を含む、抗ＰＤ－Ｌ１抗体で治療されたことがある。

【００４５】

いくつかの実施形態において、本方法は、抗ＰＤ－Ｌ１抗体の既知のレベルと比較して、抗ＰＤ－Ｌ１抗体のレベルを判定するために標準曲線を使用することをさらに含む。

【００４６】

いくつかの実施形態において、生体試料は、血液、血漿、または血清である。

【００４７】

別の態様では、本発明は、

（ａ）本明細書に提供される抗イディオタイプ抗体または本明細書に提供される組成物と、

（ｂ）抗ＰＤ－Ｌ１抗体に結合する検出可能な抗体と、

（ｃ）抗ＰＤ－Ｌ１抗体を検出するための取扱説明書と、を含む、生体試料中の抗ＰＤ－Ｌ１抗体を特異的に検出するための免疫学的測定キットを提供する。いくつかの実施形態において、このキットは、抗ＰＤ－Ｌ１抗体を検出するための免疫学的測定において有用である。

【００４８】

別の態様では、本発明は、

（ａ）生体試料を、抗イディオタイプ抗体を抗ＰＤ－Ｌ１抗体に結合し、複合体を形成することを可能にする条件下で、本明細書に提供される抗イディオタイプ抗体または本明細書に提供される組成物と接触させることと、

（ｂ）抗イディオタイプ抗体と接触させた試料を、抗イディオタイプ抗体と接触させたことがない試料と比較するために、免疫固定電気泳動によって試料を分析することと、

（ｃ）生体試料中の抗ＰＤ－Ｌ１抗体の存在を検出することであって、抗イディオタイ

プ抗体と接触させた試料と、抗イディオタイプ抗体と接触させたことがない試料との間の泳動の違いが、生体試料中の抗ＰＤ－Ｌ１抗体の存在を示す、検出することと、を含む、生体試料中の抗ＰＤ－Ｌ１抗体を検出するための方法を提供する。

【００４９】

別の態様では、本発明は、

（ａ）生体試料を、抗イディオタイプ抗体を抗ＰＤＬ１抗体に結合し、複合体を形成することを可能にする条件下で、本明細書に提供される抗イディオタイプ抗体または本明細書に提供される組成物と接触させることと、

（ｂ）抗イディオタイプ抗体と接触させた試料を、抗イディオタイプ抗体と接触させたことがない試料と比較するために、免疫固定電気泳動によって試料を分析することと、

（ｃ）生体試料中のＭ－タンパク質の存在を検出することと、を含む、生体試料中のＭ－タンパク質を検出するための方法を提供する。いくつかの実施形態において、ステップ（ｂ）は、Ｍ－タンパク質からの抗ＰＤ－Ｌ１抗体及び抗イディオタイプ抗体の複合体の分離をもたらす。いくつかの実施形態において、ステップ（ｃ）の前に、本方法は、バンドの泳動が、抗イディオタイプ抗体の添加によって影響を受けるかどうかを判定することによって、バンドがＭ－タンパク質であるかどうかを判定するステップをさらに含む。いくつかの実施形態において、生体試料は、血液、尿、または血清である。

【００５０】

別の態様では、本発明は、対象における抗ＰＤ－Ｌ１抗体治療の有効性をモニタリングするための方法であって、

（ａ）生体試料を、抗イディオタイプ抗体を抗ＰＤ－Ｌ１抗体に結合し、複合体を形成することを可能にする条件下で、本明細書に提供される抗イディオタイプ抗体をまたは本明細書に提供される組成物と接触させることであって、生体試料が対象からの生体試料であり、対象が、多発性骨髄腫に罹患しており、抗ＰＤ－Ｌ１抗体で治療されたことがある、接触させることと、

（ｂ）抗イディオタイプ抗体と接触させた試料を、抗イディオタイプ抗体と接触させたことがない試料と比較するために、免疫固定電気泳動によって試料を分析することと、

（ｃ）生体試料中の抗ＰＤ－Ｌ１抗体の存在を検出することであって、抗イディオタイプ抗体と接触させた試料と、抗イディオタイプ抗体と接触させたことがない試料との間の泳動の違いが、生体試料中の抗ＰＤ－Ｌ１抗体の存在を示す、検出することと、

（ｄ）生体試料中のＭ－タンパク質のレベルを検出することであって、生体試料中のＭ－タンパク質のレベルが、抗ＰＤ－Ｌ１抗体治療の有効性を示す、検出することと、を含む、方法を提供する。いくつかの実施形態において、ステップ（ｂ）は、Ｍ－タンパク質からの抗ＰＤ－Ｌ１抗体及び抗イディオタイプ抗体の複合体の分離をもたらす。いくつかの実施形態において、ステップ（ｄ）の前に、本方法は、バンドの泳動が、抗イディオタイプ抗体の添加によって影響を受けるかどうかを判定することによって、バンドがＭ－タンパク質であるかどうかを判定するステップをさらに含む。いくつかの実施形態において、生体試料は、血液、尿、または血清である。

【００５１】

本明細書に記載される様々な実施形態の特性のうちの１つ、いくつか、または全てが組み合わされて、本発明の他の実施形態を形成することができることを理解されたい。

【図面の簡単な説明】

【００５２】

【図１】抗イディオタイプ抗体１０５Ｄ１１（配列番号５４）、４３Ｂ５（配列番号５６）、及び４８Ｃ１（配列番号５８）の重鎖可変領域（ＶＨ）のアミノ酸配列整列を示す。重鎖接触ＣＤＲ、Ｃｈｏｔｈｉａ　ＣＤＲ、及びＫａｂａｔ　ＣＤＲ配列を示す。

【図２】抗イディオタイプ抗体１０５Ｄ１１（配列番号５３）、４３Ｂ５（配列番号５５）、及び４８Ｃ１（配列番号５７）の軽鎖可変領域（ＶＬ）のアミノ酸配列整列を示す。軽鎖接触ＣＤＲ、Ｃｈｏｔｈｉａ　ＣＤＲ、及びＫａｂａｔ　ＣＤＲ配列を示す。

【図３】抗ＰＤＬ１抗体Ｆａｂ及び抗体ＹＷ１６７Ｂ．４３（フレームワーク対照Ｆａｂ

）への抗体１０５Ｄ１１の結合におけるＳＰＲを生成した結合動態（k_a、k_d、及びK_D）を示す。
【図４】抗ＰＤＬ１抗体Ｆａｂ及び抗体ＹＷ１６７Ｂ．４３（フレームワーク対照Ｆａｂ）への抗体４３Ｂ５の結合におけるＳＰＲを生成した結合動態（k_a、k_d、及びK_D）を示す。
【図５】抗ＰＤＬ１抗体Ｆａｂ及び抗体ＹＷ１６７Ｂ．４３（フレームワーク対照Ｆａｂ）への抗体４８Ｃ１の結合におけるＳＰＲを生成した結合動態（k_a、k_d、及びK_D）を示す。
【図６】Ｓｅｂｉａ免疫固定電気泳動（ＩＦＥ）アッセイにおける抗イディオタイプ抗体のスクリーニングを示す。
【図７】ＩＦＥアッセイにおける高解像度で検出された多発性骨髄腫患者の血清におけるＩｇＡ／ＩｇカッパＭタンパク質のスパイクを示す（パネル１、レーンＡ及びレーンＫ）。患者「ＭＭ５」血清は、１５００μｇ／ｍｌでスパイクしたアテゾリズマブ抗イディオタイプマウスｍＡＢクローン４８Ｃ１のみ（パネル２）、１５００μｇ／ｍｌ中でスパイクされたアテゾリズマブのみ（パネル３、レーンＧ及びレーンＫ）、及びそれぞれ、１５００μｇ／ｍｌで一緒に添加されたアテゾリズマブ＋アテゾリズマブ抗イディオタイプクローン４８Ｃ１（パネル４）の条件下で２時間予めインキュベートされた。
【図８】ＩＦＥアッセイにおけるアテゾリズマブの移動性を変化させる抗イディオタイプ抗体の能力におけるアテゾリズマブ血清濃度の効果を示す。
【発明を実施するための形態】
【００５３】
Ｉ．定義
別途の定義がない限り、本明細書で使用される技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されている意味と同じ意味を有する。Ｓｉｎｇｌｅｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ２ｎｄ ｅｄ．，Ｊ．Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ（Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．１９９４）、及びＭａｒｃｈ，Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ Ｒｅａｃｔｉｏｎｓ，Ｍｅｃｈａｎｉｓｍｓ ａｎｄ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ４ｔｈ ｅｄ．，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ（Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎ．Ｙ．１９９２）は、本出願で使用される用語の多くに関する一般的指針を当業者に提供する。特許出願及び刊行物を含む、本明細書に引用される全ての参考文献は、参照によりそれらの全体が組み込まれる。
【００５４】
本明細書を解釈する目的において、以下の定義が適用され、適当な場合はいつでも、単数形で使用される用語は複数形も含み、その逆も同様である。本明細書において使用される用語は、特定の実施形態のみを説明する目的のためのものであり、制限することを意図しないことを理解されたい。以下に記載されるいずれかの定義が、参照により本明細書に組み込まれるいずれかの文献と矛盾する場合には、以下に記載される定義が優先する。
【００５５】
「親和性」とは、分子（例えば、抗体）とその結合パートナー（例えば、抗原）との単一結合部位の間の非共有結合相互作用の合計の強度を指す。別途指示されない限り、本明細書で使用される場合、「結合親和性」とは、結合対のメンバー（例えば、抗体及び抗原）間の１：１の相互作用を反映する固有の結合親和性を指す。分子Ｘの、そのパートナーＹに対する親和性は一般に、解離定数（K_D）によって表すことができる。親和性は、本明細書に記載の方法を含む当技術分野で既知の一般的な方法によって測定され得る。結合親和性を測定するための具体的な例証的かつ例示的な実施形態は本明細書に記載される。
【００５６】
本明細書における「抗体」という用語は、最も広義に使用され、それらが所望の抗原結合活性を呈する限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、及び抗体フラグメントを含むが、これらに限定されない様々な抗体

構造を包含する。

【００５７】

「抗体断片」は、無傷抗体が結合する抗原に結合する無傷抗体の一部分を含む、無傷抗体以外の分子を指す。抗体断片の例としては、Ｆｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆａｂ’－ＳＨ、Ｆ（ａｂ’）$_2$と、ダイアボディと、線状抗体と、単鎖抗体分子（たとえば、ｓｃＦｖ）と、抗体断片から形成される多特異性抗体が挙げられるが、これらに限定されない。抗体のパパイン消化は、各々、単一の抗原結合部位を持つ、「Ｆａｂ」断片と呼ばれる２つの同一の抗原結合断片、及び容易に結晶化する能力を反映する名称を持つ、残った「Ｆｃ」断片を産生する。ペプシン処理は、Ｆ（ａｂ’）$_2$断片をもたらし、これは、２つの抗原結合部位を有し、依然として抗原を架橋することができる。

【００５８】

本明細書で使用される場合、「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に同種の抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、その集団を構成する個々の抗体は、同一である、及び／または同じエピトープに結合するが、例えば、天然に存在する変異を含有するか、またはモノクローナル抗体調製物の産生中に生じる可能なバリアント抗体を除いて、かかるバリアントは一般に、少量で存在する。異なる決定基（エピトープ）に対して指向された異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対して指向される。したがって、「モノクローナル」という修飾語は、実質的に同種の抗体集団から得られるという抗体の特徴を示し、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とするものと解釈されるべきではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法、組み換えＤＮＡ法、ファージディスプレイ法、及びヒト免疫グロブリン遺伝子座の全てまたは一部を含有するトランスジェニック動物を利用する方法を含むがこれらに限定されない、様々な技法により作製され得、モノクローナル抗体を作製するためのかかる方法及び他の例示的な方法が、本明細書に記載される。

【００５９】

「ネイキッド抗体」は、異種部分（例えば、細胞傷害性部分）または放射標識にコンジュゲートされていない抗体を指す。ネイキッド抗体は、薬学的製剤中に存在し得る。

【００６０】

「天然抗体」は、異なる構造を有する天然に存在する免疫グロブリン分子を指す。例えば、天然ＩｇＧ抗体は、ジスルフィド結合されている２つの同一の軽鎖及び２つの同一の重鎖から構成される、約１５０，０００ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。Ｎ末端からＣ末端まで、各重鎖は、可変重ドメインまたは重鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（ＶＨ）を有し、その後に３つの定常ドメイン（ＣＨ１、ＣＨ２、及びＣＨ３）が続く。同様に、Ｎ末端からＣ末端まで、各軽鎖は、可変軽ドメインまたは軽鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（ＶＬ）を有し、その後に定常軽（ＣＬ）ドメインが続く。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（κ）及びラムダ（λ）と呼ばれる２つのタイプのうちの１つに割り当てられ得る。

【００６１】

抗体の「クラス」は、その重鎖が所有する定常ドメインまたは定常領域のタイプを指す。５つの主要なクラスの抗体、つまり、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、及びＩｇＭが存在し、これらのうちのいくつかは、サブクラス（アイソタイプ）、例えば、ＩｇＧ$_1$、ＩｇＧ$_2$、ＩｇＧ$_3$、ＩｇＧ$_4$、ＩｇＡ$_1$、及びＩｇＡ$_2$にさらに分類され得る。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインはそれぞれ、α、δ、ε、γ、及びμと呼ばれる。

【００６２】

「抗ＰＤ－Ｌ１抗体」、「抗ＰＤ－Ｌ１」、「ＰＤ－Ｌ１抗体」、または「ＰＤ－Ｌ１に結合する抗体」という用語は、抗体がＰＤ－Ｌ１を標的とする上で診断剤及び／または治療剤として有用になるように、十分な親和性を有するＰＤ－Ｌ１に結合することができる抗体を指す。一実施形態において、無関係の非ＰＤ－Ｌ１タンパク質への抗ＰＤ－Ｌ１

抗体の結合の程度は、例えば放射免疫アッセイ（ＲＩＡ）により測定されたときに、ＰＤ－Ｌ１への結合の約抗体の約１０％未満である。ある特定の実施形態において、ＰＤ－Ｌ１に結合する抗体は、１μＭ以下、１００ｎＭ以下、１０ｎＭ以下、１ｎＭ以下、０．１ｎＭ以下、０．０１ｎＭ以下、または０．００１ｎＭ以下（例えば、10^{-8}Ｍ以下、例えば、10^{-8}Ｍ～10^{-13}Ｍ、例えば、10^{-9}Ｍ～10^{-13}Ｍ）の解離定数（K_D）を有する。ある特定の実施形態において、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、異なる種由来のＰＤ－Ｌ１の間で保存されているＰＤ－Ｌ１のエピトープに結合する。

【００６３】

「ヒト抗体」は、ヒトもしくはヒト細胞により産生された抗体、またはヒト抗体レパートリーもしくは他のヒト抗体コード配列を利用する非ヒト源に由来する抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を保有するものである。ヒト抗体のこの定義は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を具体的に排除する。

【００６４】

「キメラ」抗体という用語は、重鎖及び／または軽鎖の一部が特定の源または種に由来し、一方で重鎖及び／または軽鎖の残りが異なる源または種に由来する抗体を指す。

【００６５】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンＶＬまたはＶＨフレームワーク配列の選択において最も一般的に生じるアミノ酸残基を表すフレームワークである。一般に、ヒト免疫グロブリンＶＬまたはＶＨ配列の選択は、可変ドメイン配列のサブグループに由来する。一般に、配列の下位集団は、Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，Ｆｉｆｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ，ＮＩＨ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ ９１－３２４２，Ｂｅｔｈｅｓｄａ ＭＤ（１９９１），ｖｏｌｓ．１－３にあるような下位集団である。一実施形態において、ＶＬについては、下位群は、Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，（上記参照）における下位群カッパＩである。一実施形態において、ＶＨについては、下位群は、Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，（上記参照）における下位群ＩＩＩである。

【００６６】

「ヒト化」抗体は、非ヒトＨＶＲからのアミノ酸残基及びヒトＦＲからのアミノ酸残基を含むキメラ抗体を指す。ある特定の実施形態において、ヒト化抗体は、少なくとも１つ、及び典型的には２つの可変ドメインの実質的に全てを含み、そのＨＶＲ（例えば、ＣＤＲ）の全てまたは実質的に全てが非ヒト抗体のものに対応し、ＦＲの全てまたは実質的に全てがヒト抗体のものに対応する。ヒト化抗体は、任意に、ヒト抗体に由来する抗体定常領域の少なくとも一部分を含み得る。抗体、例えば、非ヒト抗体の「ヒト化型」は、ヒト化を受けた抗体を指す。

【００６７】

「可変領域」または「可変ドメイン」という用語は、抗体の抗原への結合に関与する抗体の重鎖または軽鎖のドメインを指す。天然抗体の重鎖及び軽鎖の可変ドメイン（それぞれ、ＶＨ及びＶＬ）は一般に、類似の構造を有し、各ドメインが４つの保存フレームワーク領域（ＦＲ）及び３つの超可変領域（ＨＶＲ）を含む。（例えば、Ｋｉｎｄｔ ｅｔ ａｌ．Ｋｕｂｙ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，6^{th} ｅｄ．，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏ．，ｐａｇｅ ９１（２００７）を参照されたい）。単一のＶＨドメインまたはＶＬドメインは、抗原結合特異性を付与するのに十分であり得る。さらに、特定の抗原に結合する抗体は、ＶＨドメインまたはＶＬドメインを使用して抗原に結合する抗体から単離されて、それぞれ相補的ＶＬドメインまたはＶＨドメインのライブラリをスクリーニングすることができる。例えば、Ｐｏｒｔｏｌａｎｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５０：８８０－８８７（１９９３）、Ｃｌａｒｋｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３５２：６２４－６２８（１９９１）を参照されたい。

【００６８】

本明細書で使用される「超可変領域」または「ＨＶＲ」という用語は、配列が高度に変化する、及び／または構造的に規定されたループ（「超可変ループ」）を形成する、抗体

可変ドメインの領域の各々を指す。一般に、天然４本鎖抗体は、６つのＨＶＲを含み、このうち３つがＶＨ（Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３）にあり、３つがＶＬ（Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３）にある。ＨＶＲは一般に、超可変ループ及び／または「相補性決定領域」（ＣＤＲ）からのアミノ酸残基を含み、後者は、最も高い配列可変性を有する、及び／または抗原認識に関与する。例示的な超可変ループは、アミノ酸残基２６～３２（Ｌ１）、５０～５２（Ｌ２）、９１～９６（Ｌ３）、２６～３２（Ｈ１）、５３～５５（Ｈ２）、及び９６～１０１（Ｈ３）において生じる。（Ｃｈｏｔｈｉａ ａｎｄ Ｌｅｓｋ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１－９１７（１９８７））。例示的なＣＤＲ（ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２、ＣＤＲ－Ｌ３、ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、及びＣＤＲ－Ｈ３）は、アミノ酸残基２４～３４（Ｌ１）、５０～５６（Ｌ２）、８９～９７（Ｌ３）、３１～３５Ｂ（Ｈ１）、５０～６５（Ｈ２）、及び９５～１０２（Ｈ３）に生じる。（Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ Ｅｄ．Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ（１９９１）。）ＶＨ内のＣＤＲ１を除いて、ＣＤＲは一般に、超可変ループを形成するアミノ酸残基を含む。ＣＤＲはまた、抗原と接触する残基である「特異性決定残基」または「ＳＤＲ」も含む。ＳＤＲは、短縮－ＣＤＲ、またはａ－ＣＤＲと呼ばれるＣＤＲの領域内に収容される。例示的なａ－ＣＤＲ（ａ－ＣＤＲ－Ｌ１、ａ－ＣＤＲ－Ｌ２、ａ－ＣＤＲ－Ｌ３、ａ－ＣＤＲ－Ｈ１、ａ－ＣＤＲ－Ｈ２、及びａ－ＣＤＲ－Ｈ３）は、アミノ酸残基３１～３４（Ｌ１）、５０～５５（Ｌ２）、８９～９６（Ｌ３）、３１～３５Ｂ（Ｈ１）、５０～５８（Ｈ２）、及び９５～１０２（Ｈ３）に生じる。（Ａｌｍａｇｒｏ ａｎｄ Ｆｒａｎｓｓｏｎ，Ｆｒｏｎｔ．Ｂｉｏｓｃｉ．１３：１６１９－１６３３（２００８）を参照のこと。）本明細書で別途示されない限り、可変ドメイン中のＨＶＲ残基及び他の残基（例えば、ＦＲ残基）は、Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，（上記参照）に従って本明細書において番号付けされる。

【００６９】

「検出」という用語は、標的分子の質的測定及び量的測定の両方を含むために本明細書で最も広義に使用される。一態様では、本明細書に記載の検出する方法は、生体試料中の目的とする抗体の単なる存在を特定するのに使用される。別の態様では、本方法は、試料中の目的とする抗体が検出可能なレベルで存在するかどうかを試験するために使用される。さらに別の態様では、本方法は、試料中の目的とする抗体の量を定量化するために使用される。

【００７０】

「生体試料」という用語は、目的とする抗体を含有し得る任意の生物学的物質を指す。試料は、全血または全血成分、例えば、赤血球、白血球、血小板、血清、及び血漿など、腹水、硝子体液（ｉｔｒｅｏｕｓ ｆｌｕｉｄ）、リンパ液、滑液、卵胞液、精液、羊水、乳、唾液、痰、涙液、汗、粘液、脳脊髄液、及び目的とする抗体を含有し得る人体の他の構成要素などの生物学的液体であり得る。様々な実施形態において、試料は、任意の動物からの身体試料である。いくつかの実施形態において、試料は、哺乳動物からの試料である。いくつかの実施形態において、試料は、ヒト対象からの試料である。いくつかの実施形態において、生体試料は、臨床患者または治療的抗ＰＤ－Ｌ１抗体（複数可）で治療された患者からの生体試料である。ある特定の実施形態において、生体試料は、血清または血漿である。ある特定の実施形態において、生体試料は、臨床患者からの血清である。

【００７１】

「捕捉剤」という用語は、好適な条件下で、捕捉試薬及び目的とする標的物（例えば、抗体）の複合体が試料の残りから分離され得るように、目的とする標的物（例えば、抗体）に結合し、かつ生体試料中の目的とする標的物（例えば、抗体）に結合し、捕捉することができる、試薬（例えば、抗体）またはかかる試薬の混合物を指す。例えば、捕捉試薬は、好適な条件下で、捕捉試薬及び目的とする抗体の複合体が試料の残りから分離され得るように、目的とするイディオタイプの抗体に結合し、かつ生体試料中の目的とする抗体

に結合し、捕捉することができる、抗イディオタイプ抗体またはかかる抗体の混合物であり得る。ある特定の実施形態において、捕捉試薬は、固定化されるか、または固定化可能である。

【００７２】

本明細書に使用される、「抗イディオタイプ抗体」は、同種抗体、この場合は、目的とする抗体のＶＨ及び／またはＶＬドメインに結合する抗体である。典型的には、かかる抗イディオタイプ抗体は、目的とする抗体を有するマウスなどの哺乳動物に免疫付与し、ハイブリドーマライブラリーを産生し、ハイブリドーマに由来する抗体のパネルから選択することによって、捕捉試薬または検出可能な抗体に対して、アッセイにおけるクリーンなシグナルを得るような抗体に調製される。ある特定の実施形態において、抗イディオタイプ抗体は、固定化されるか、または固定化可能である。いくつかの実施形態において、抗イディオタイプ抗体は、モノクローナル抗体であり、例えば、マウスまたはラット抗体などの齧歯動物抗体であり得る。

【００７３】

本明細書で使用される、「抗ＰＤ－Ｌ１イディオタイプ抗体」は、抗ＰＤ－Ｌ１抗体の検出に有用であるのに十分な特異性及び親和性を有する抗ＰＤ－Ｌ１モノクローナル抗体に特異的に結合するものである。

【００７４】

「検出可能な抗体」という用語は、目的とする抗体に結合し、検出手段によって増幅される標識を通して直接的に、または例えば、標識される別の抗体を通して間接的にかのいずれかで検出することができる、抗体を指す。いくつかの実施形態において、検出可能な抗体は、ヒト抗体に結合する非ヒト種からの抗体である。いくつかの実施形態において、検出可能な抗体は、抗イディオタイプ抗体または目的とするイディオタイプの抗体に結合するような抗体の混合物である。直接標識の場合、抗体は、典型的には、いくつかの手段によって検出可能な部分にコンジュゲートされる。いくつかの実施形態において、検出可能な抗体は、西洋ワサビペルオキシダーゼにコンジュゲートされる。

【００７５】

「検出手段」という用語は、本明細書におけるアッセイで後に読み取られるシグナル報告により検出可能な抗体の存在を検出するために使用される部分または技法を指す。それは、マイクロタイタープレート上で捕捉される標識などの固定化標識を増幅する試薬を含む。

【００７６】

「Ｆａｂ」断片は、重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含有し、軽鎖の定常ドメイン及び重鎖の第１の定常ドメイン（ＣＨ１）もまた含有する。Ｆａｂ’断片は、抗体ヒンジ領域からの１つ以上のシステインを含む重鎖ＣＨ１ドメインのカルボキシ末端への数個の残基の付加によって、Ｆａｂ断片とは異なる。Ｆａｂ’－ＳＨは、定常ドメインのシステイン残基（複数可）が遊離チオール基を持つＦａｂ’の本明細書における表記である。Ｆ（ａｂ’）$_2$抗体断片は、元来、それらの間にヒンジシステインを有するＦａｂ’断片の対として産生されたものであった。抗体断片の他の化学的結合もまた知られている。

【００７７】

本明細書の「Ｆｃ領域」という用語は、定常領域の少なくとも一部を含有する免疫グロブリン重鎖のＣ末端領域を定義するために使用される。この用語は、天然配列Ｆｃ領域及び変異型Ｆｃ領域を含む。ある特定の実施形態において、ヒトＩｇＧ重鎖Ｆｃ領域は、Ｃｙｓ２２６またはＰｒｏ２３０から、重鎖のカルボキシル末端に及ぶ。しかしながら、Ｆｃ領域のＣ末端リジン（Ｌｙｓ４４７）は、存在することもあれば、しないこともある。本明細書において別途明記されない限り、Ｆｃ領域または定常領域内のアミノ酸残基の番号付けは、Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ Ｅｄ．Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ，１９９１に記載される、ＥＵインデックスとも呼ば

れるＥＵ番号付けシステムに従う。

【００７８】

「フレームワーク」または「ＦＲ」は、超可変領域（ＨＶＲ）残基以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインのＦＲは、一般に、４つのＦＲドメイン：ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、及びＦＲ４からなる。したがって、ＨＶＲ及びＦＲ配列は一般に、ＶＨ（またはＶＬ）において以下の配列、ＦＲ１－Ｈ１（Ｌ１）－ＦＲ２－Ｈ２（Ｌ２）－ＦＲ３－Ｈ３（Ｌ３）－ＦＲ４で出現する。

【００７９】

「完全長抗体」、「無傷抗体」、及び「全抗体」という用語は、本明細書で、天然抗体構造と実質的に同様の構造を有するか、または本明細書に定義されるＦｃ領域を含有する重鎖を有する抗体を指すように同義に使用される。

【００８０】

「宿主細胞」、「宿主細胞株」、及び「宿主細胞培養物」という用語は、同義に使用され、外因性核酸が中に導入されている細胞を指し、かかる細胞の子孫を含む。宿主細胞には、「形質転換体」及び「形質転換細胞」が含まれ、これらには、初代形質転換細胞及び継代の数に関わらずそれに由来する子孫が含まれる。子孫は、核酸含有量が親細胞と完全に同一ではない場合があるが、変異を含み得る。最初に形質転換された細胞についてスクリーニングまたは選択されたものと同じ機能または生物活性を有する変異子孫が、本明細書に含まれる。

【００８１】

「免疫コンジュゲート」は、細胞傷害性剤を含むが、これに限定されない１つ以上の異種分子（複数可）にコンジュゲートされる抗体である。

【００８２】

「個体」または「対象」は、哺乳動物である。哺乳動物には、家畜（例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、及びウマ）、霊長類（例えば、ヒト、及びサルなどの非ヒト霊長類）、ウサギ、ならびに齧歯類（例えば、マウス及びラット）が含まれるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態において、個体または対象は、ヒトである。

【００８３】

「単離された」抗体は、その天然環境の構成成分から分離された抗体である。いくつかの実施形態において、抗体は、例えば、電気泳動（例えば、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、等電点電気泳動法（ＩＥＦ）、キャピラリー電気泳動法）またはクロマトグラフ（例えば、イオン交換もしくは逆相ＨＰＬＣ）によって決定される、９５％または９９％を超える純度に精製される。抗体の純度を評定するための方法の概説については、例えば、Ｆｌａｔｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒ．Ｂ　８４８：７９－８７（２００７）を参照されたい。

【００８４】

「単離された」核酸は、その天然環境の成分から分離された核酸分子を指す。単離された核酸は、通常核酸分子を含有する細胞内に含有される核酸分子を含むが、その核酸分子が染色体外に、またはその天然染色体位置とは異なる染色体位置に存在する。

【００８５】

「抗イディオタイプ抗体をコードする単離された核酸」とは、抗イディオタイプ抗体の重鎖及び軽鎖（またはそれらの断片）をコードする１つ以上の核酸分子を指し、単一のベクターまたは別個のベクター内のかかる核酸分子（複数可）を含み、かかる核酸分子（複数可）は、宿主細胞内の１つ以上の場所に存在する。

【００８６】

「添付文書」という用語は、かかる治療製品の適応症、使用法、投薬量、投与、併用療法、禁忌症、及び／またはその使用に関する警告についての情報を含有する、治療製品の商業用パッケージに通例含まれる指示書を指すために使用される。

【００８７】

基準ポリペプチド配列に関する「アミノ酸配列同一性パーセント（％）」は、最大の配

列同一性パーセントを達成するように、配列を整列させ、必要に応じてギャップを導入した後に、かついかなる保存的置換も配列同一性の一部とは見なさずに、候補配列内のアミノ酸残基が、基準ポリペプチド配列内のアミノ酸残基と同一であるパーセンテージとして定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定するための整列は、当業者が備えている技能の範囲内の様々な方法で、例えば、ＢＬＡＳＴ、ＢＬＡＳＴ－２、ＡＬＩＧＮ、またはＭｅｇａｌｉｇｎ（ＤＮＡＳＴＡＲ）ソフトウェアなどの公的に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用して達成され得る。当業者であれば、比較されている配列の完全長にわたって最大の整列を達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、配列を整列させるための適切なパラメータを決定することができる。しかしながら、本明細書における目的のために、アミノ酸配列同一性％値は、配列比較コンピュータプログラムＡＬＩＧＮ－２を使用して生成される。ＡＬＩＧＮ－２配列比較コンピュータプログラムは、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．によって記述され、ソースコードは、ユーザ文書とともに米国著作権庁（Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ　Ｄ．Ｃ．，２０５５９）に提出されており、米国著作権番号ＴＸＵ５１００８７の下に登録されている。ＡＬＩＧＮ－２プログラムは、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．，Ｓｏｕｔｈ　Ｓａｎ　Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａから公的に入手可能であるか、またはソースコードからコンパイルされ得る。ＡＬＩＧＮ－２プログラムは、デジタルＵＮＩＸ　Ｖ４．０Ｄを含むＵＮＩＸオペレーティングシステムで使用する場合はコンパイルされるべきである。全ての配列比較パラメータは、ＡＬＩＧＮ－２プログラムにより設定されており、変動しない。

【００８８】

ＡＬＩＧＮ－２がアミノ酸配列比較に用いられる状況において、所与のアミノ酸配列Ｂへの、それとの、またはそれに対する、所与のアミノ酸配列Ａのアミノ酸配列同一性％（あるいは、所与のアミノ酸配列Ｂへの、それとの、またはそれに対するある特定のアミノ酸配列同一性％を有するか、または含む所与のアミノ酸配列Ａと表現され得る）は、以下、

１００×分数Ｘ／Ｙ

のように計算され、式中、Ｘは、配列整列プログラムＡＬＩＧＮ－２によって、そのプログラムのＡとＢとの整列において完全な一致としてスコア化されたアミノ酸残基の数であり、Ｙは、Ｂにおけるアミノ酸残基の総数である。アミノ酸配列Ａの長さがアミノ酸配列Ｂの長さと等しくない場合、ＡのＢへのアミノ酸配列同一性％は、ＢのＡへのアミノ酸配列同一性％とは等しくないことが理解されるだろう。別途具体的に述べられない限り、本明細書で使用される全てのアミノ酸配列同一性％値は、直前の段落に記載されるようにＡＬＩＧＮ－２コンピュータプログラムを使用して得られる。

【００８９】

「治療有効量」は、少なくとも特定の障害の測定可能な改善または予防をもたらすために必要な最小限の濃度である。治療有効量は、本明細書において、患者の病状、年齢、性別、及び体重、ならびに個体において所望の応答を引き起こすための抗体の能力などの因子によって変動し得る。治療有効量は、抗体の任意の毒性または有害な作用よりも治療的に有益な作用が上回ることでもある。

【００９０】

抗ＰＤ－Ｌ１抗体の「シグネチャーペプチド」は、１つの抗体アイソタイプ中のみに存在するタンパク質分解ペプチド（例えば、トリプシンペプチド）を指す。

【００９１】

「薬学的製剤」または「薬学的組成物」という用語は、内部に含まれる活性成分の生物学的活性が有効になるような形態であり、かつ製剤が投与され得る対象が受け入れられない程度に毒性のいかなる成分も含まない調製物を指す。

【００９２】

「薬学的に許容される担体」または「有効量」は、対象にとって無毒である、活性成分以外の薬学的製剤中の成分を指す。薬学的に許容される担体には、緩衝液、賦形剤、安定剤、または保存剤が含まれるが、これらに限定されない。

【００９３】
本明細書で使用される場合、「治療」（及び「治療する」または「治療すること」などのその文法上の変形）とは、治療されている個体の自然経過を変更することを目的とした臨床介入を指し、予防のために、または臨床病理過程中のいずれかで行われ得る。治療の望ましい効果には、疾患の発生または再発の予防、症状の緩和、疾患の任意の直接的または間接的病理学的帰結の縮小、疾患進行速度の減少、病状の回復または寛解、及び緩解または予後の改善が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、本発明の抗体を使用して、疾患の発達を遅延させるか、または疾患の進行を減速させる。
【００９４】
本明細書で使用される場合、「ベクター」という用語は、それが結合している別の核酸を運搬することができる核酸分子を指す。この用語は、自己複製核酸構造としてのベクター、及びそれが導入される宿主細胞のゲノム内に組み込まれたベクターを含む。ある特定のベクターは、それらが作動可能に結合している核酸の発現を誘導することができる。かかるベクターは、本明細書で「発現ベクター」と称される。
【００９５】
本明細書で使用する場合、単数形「ａ」、「ａｎ」、及び「ｔｈｅ」は、別途指示されない限り、複数の対象を含む。
【００９６】
本明細書で使用される「約」という用語は、当業者に容易に知られているそれぞれの値の通常の誤差範囲を指す。本明細書における「約」値またはパラメータへの言及は、その値またはパラメータ自体を対象とする実施形態を含む（かつ説明する）。
【００９７】
本明細書に記載される本発明の態様及び実施形態は、態様及び実施形態「を含む」、「からなる」、及び「から本質的になる」を含むことが理解される。
【００９８】
ＩＩ．組成物及び方法
一態様では、本発明は、抗ＰＤ－Ｌ１モノクローナル抗体に特異的に結合する抗イディオタイプ抗体を提供する。本発明の抗体は、例えば、生体試料、例えば、臨床試料中の抗ＰＤ－Ｌ１の検出及び／または定量化に有用である。いくつかの実施形態において、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、モノクローナル、キメラ、ヒト化、またはヒトである。
【００９９】
Ａ．抗ＰＤ－Ｌ１抗体
ｉ．例示的な抗ＰＤ－Ｌ１抗体
ある特定の実施形態において、抗イディオタイプ抗体は、（ａ）アミノ酸配列ＲＡＳＱＤＶＳＴＡＶＡ（配列番号１）を含むＨＶＲ－Ｌ１、アミノ酸配列ＳＡＳＦＬＹＳ（配列番号２）を含むＨＶＲ－Ｌ２、及びアミノ酸配列ＱＱＹＬＹＨＰＡＴ（配列番号３）を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、軽鎖可変領域と、（ｂ）アミノ酸配列ＧＦＴＦＳＤＳＷＩＨ（配列番号４）を含むＨＶＲ－Ｈ１、アミノ酸配列ＡＷＩＳＰＹＧＧＳＴＹＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号５）を含むＨＶＲ－Ｈ２、及びアミノ酸配列ＲＨＷＰＧＧＦＤＹ（配列番号６）を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む、重鎖可変領域と、を含む、抗ＰＤ－Ｌ１抗体に結合する。
【０１００】
いくつかの実施形態において、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、配列番号７のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、配列番号８のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、を含む。いくつかの実施形態において、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、配列番号７のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域に対して少なくとも８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、もしくは９９％の配列同一性を有する軽鎖可変領域、及び／または配列番号８のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域に対して少なくとも８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、もしくは９９％の同一性を有する重鎖可変領域を含む。

【０１０１】
いくつかの実施形態において、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、配列番号９のアミノ酸配列を含む軽鎖と、配列番号１０のアミノ酸配列を含む重鎖と、を含む。いくつかの実施形態において、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、配列番号９のアミノ酸配列を有する軽鎖に対して少なくとも８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、もしくは９９％の配列同一性を有する軽鎖と、配列番号１０のアミノ酸配列を有する重鎖に対して少なくとも８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、もしくは９９％の同一性を有する重鎖と、を含む。

【０１０２】
いくつかの実施形態において、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、アテゾリズマブ（ＴＥＣＥＮＴＲＩＱ（登録商標））である。

【０１０３】
いくつかの実施形態において、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、アテゾリズマブのＨＶＲを含む。いくつかの実施形態において、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、アテゾリズマブの重鎖可変領域及び／または軽鎖可変領域を含む。

【０１０４】
いくつかの実施形態において、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、モノクローナル、キメラ、またはヒト化される。

抗ＰＤ－Ｌ１抗体軽鎖可変領域のアミノ酸配列：
ＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＡＳＱＤＶＳＴＡＶＡＷＹＱＱＫＰ
ＧＫＡＰＫＬＬＩＹＳＡＳＦＬＹＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰ
ＥＤＦＡＴＹＹＣＱＱＹＬＹＨＰＡＴＦＧＱＧＴＫＶＥＩＫＲ（配列番号７）
抗ＰＤ－Ｌ１抗体重鎖可変領域のアミノ酸配列：
ＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＦＴＦＳＤＳＷＩＨＷＶＲＱＡ
ＰＧＫＧＬＥＷＶＡＷＩＳＰＹＧＧＳＴＹＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＡＤＴＳＫＮＴＡＹ
ＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＲＨＷＰＧＧＦＤＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳＡＳ
ＴＫ（配列番号８）
抗ＰＤ－Ｌ１抗体軽鎖のアミノ酸配列：
ＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＡＳＱＤＶＳＴＡＶＡＷＹＱＱＫＰ
ＧＫＡＰＫＬＬＩＹＳＡＳＦＬＹＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰ
ＥＤＦＡＴＹＹＣＱＱＹＬＹＨＰＡＴＦＧＱＧＴＫＶＥＩＫＲＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰＰ
ＳＤＥＱＬＫＳＧＴＡＳＶＶＣＬＬＮＮＦＹＰＲＥＡＫＶＱＷＫＶＤＮＡＬＱＳＧＮＳＱ
ＥＳＶＴＥＱＤＳＫＤＳＴＹＳＬＳＳＴＬＴＬＳＫＡＤＹＥＫＨＫＶＹＡＣＥＶＴＨＱＧ
ＬＳＳＰＶＴＫＳＦＮＲＧＥＣ（配列番号９）
抗ＰＤ－Ｌ１抗体重鎖のアミノ酸配列：
ＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧＦＴＦＳＤＳＷＩＨＷＶＲＱＡ
ＰＧＫＧＬＥＷＶＡＷＩＳＰＹＧＧＳＴＹＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＡＤＴＳＫＮＴＡＹ
ＬＱＭＮＳＬＲＡＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＲＨＷＰＧＧＦＤＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳＡＳ
ＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷＮ
ＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＱＴＹＩ
ＣＮＶＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＫＶＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳ
ＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶ
ＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＡＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹ
ＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＥＥＭＴ
ＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤ
ＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫ
ＳＬＳＬＳＰＧ（配列番号１０）

【０１０５】
Ｂ．抗イディオタイプ抗体

ｉ．例示的な抗イディオタイプ抗体

一態様では、本発明は、本明細書に記載される抗ＰＤ－Ｌ１抗体に特異的に結合する抗イディオタイプ抗体を提供する。いくつかの実施形態において、抗イディオタイプ抗体は、抗ＰＤ－Ｌ１抗体を含み、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、（ａ）アミノ酸配列ＲＡＳＱＤＶＳＴＡＶＡ（配列番号１）を含むＨＶＲ－Ｌ１、アミノ酸配列ＳＡＳＦＬＹＳ（配列番号２）を含むＨＶＲ－Ｌ２、及びアミノ酸配列ＱＱＹＬＹＨＰＡＴ（配列番号３）を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、軽鎖可変領域と、（ｂ）アミノ酸配列ＧＦＴＦＳＤＳＷＩＨ（配列番号４）を含むＨＶＲ－Ｈ１、アミノ酸配列ＡＷＩＳＰＹＧＧＳＴＹＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号５）を含むＨＶＲ－Ｈ２、及びアミノ酸配列ＲＨＷＰＧＧＦＤＹ（配列番号６）を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む、重鎖可変領域と、を含む。いくつかの実施形態において、抗イディオタイプ抗体は、抗ＰＤ－Ｌ１抗体の少なくとも１つ、少なくとも２つ、少なくとも３つ、少なくとも４つ、少なくとも５つ、または６つのＨＶＲに特異的に結合する。

【０１０６】

いくつかの実施形態において、抗イディオタイプ抗体は、図１及び２に示される、抗体１０５Ｄ１１の１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つのＨＶＲ（Ｋａｂａｔ）を含む。いくつかの実施形態において、抗イディオタイプ抗体は、図１及び２に示される、抗体１０５Ｄ１１のＶＨ及び／またはＶＬを含む。

【０１０７】

いくつかの実施形態において、抗イディオタイプ抗体は、配列番号５４のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン（ＶＨ）配列を含む。ある特定の実施形態において、配列番号５４のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するＶＨ配列は、参照配列と比較して、置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含有するが、そのＶＨ配列を含む抗ＰＤ－Ｌ１イディオタイプ抗体は、参照配列を含む抗イディオタイプ抗体と同じ抗ＰＤ－Ｌ１抗体に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態において、配列番号５４において合計で１～１０個のアミノ酸が置換、挿入、及び／または欠失している。ある特定の実施形態において、置換、挿入、または欠失は、ＨＶＲの外側の領域内で（すなわち、ＦＲ内で）生じる。任意に、抗ＰＤ－Ｌ１イディオタイプ抗体は、配列番号５４のＶＨ配列を、その配列の翻訳後修飾を含めて、含む。特定の実施形態において、ＶＨは、（ａ）配列番号３５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号３６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｃ）配列番号３４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３から選択される１つ、２つ、または３つのＨＶＲを含む。

【０１０８】

別の態様では、抗ＰＤ－Ｌ１イディオタイプ抗体が提供され、この抗体は、配列番号５３のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含む。ある特定の実施形態において、配列番号５３のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するＶＬ配列は、参照配列と比較して、置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含有するが、そのＶＬ配列を含む抗ＰＤ－Ｌ１イディオタイプ抗体は、参照配列を含む抗イディオタイプ抗体と同じ抗ＰＤ－Ｌ１抗体に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態では、配列番号５３において合計で１～１０個のアミノ酸が置換、挿入、及び／または欠失している。ある特定の実施形態において、置換、挿入、または欠失は、ＨＶＲの外側の領域で（すなわち、ＦＲ内で）生じる。任意に、抗ＰＤ－Ｌ１イディオタイプ抗体は、配列番号５３のＶＬ配列を、その配列の翻訳後修飾を含めて、含む。特定の実施形態において、ＶＬは、（ａ）配列番号１４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｂ）配列番号１５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｃ）配列番号１６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３から選択される１つ、２

つ、または３つのＨＶＲを含む。

【０１０９】

別の態様では、抗ＰＤ－Ｌ１イディオタイプ抗体が提供され、この抗体は、上記に提供される実施形態のいずれかにあるようなＶＨ、及び上記に提供される実施形態のいずれかにあるようなＶＬを含む。一実施形態において、抗体は、配列番号５４のＶＨ配列及び配列番号５３のＶＬ配列を含み、これにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。

【０１１０】

いくつかの実施形態において、抗ＰＤ－Ｌ１イディオタイプ抗体が提供され、この抗体は、配列番号２９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号３１のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含むＶＨと、配列番号１１のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号１２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号１３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含むＶＬと、を含む。いくつかの実施形態において、抗体は、配列番号３２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号３４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含むＶＨと、配列番号１４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号１５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号１６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含むＶＬと、を含む。いくつかの実施形態において、抗体は、配列番号３５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号３４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含むＶＨと、配列番号１４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号１５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号１６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含むＶＬと、を含む。

【０１１１】

別の態様では、抗イディオタイプ抗体は、図１及び２に示される、抗体４３Ｂ５の１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つのＨＶＲ（Ｋａｂａｔ）を含む。いくつかの実施形態において、抗イディオタイプ抗体は、図１及び２に示される、抗体４３Ｂ５のＶＨ及び／またはＶＬを含む。

【０１１２】

別の態様では、抗ＰＤ－Ｌ１イディオタイプ抗体は、配列番号５６のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）配列を含む。ある特定の実施形態において、配列番号５６のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するＶＨ配列は、参照配列と比較して、置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含有するが、そのＶＨ配列を含む抗ＰＤ－Ｌ１イディオタイプ抗体は、参照配列を含む抗イディオタイプ抗体と同じ抗ＰＤ－Ｌ１抗体に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態では、配列番号５６において合計で１～１０個のアミノ酸が置換、挿入、及び／または欠失している。ある特定の実施形態において、置換、挿入、または欠失は、ＨＶＲの外側の領域内で（すなわち、ＦＲ内で）生じる。任意に、抗ＰＤ－Ｌ１イディオタイプ抗体は、配列番号５６のＶＨ配列を、その配列の翻訳後修飾を含めて、含む。特定の実施形態において、ＶＨは、（ａ）配列番号４３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号４４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｃ）配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３から選択される１つ、２つ、または３つのＨＶＲを含む。

【０１１３】

別の態様では、抗ＰＤ－Ｌ１イディオタイプ抗体が提供され、この抗体は、配列番号５５のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含む。ある特定の実施形態において、配列番号５５のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するＶＬ配列は、参照配列と比較して、置

換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含有するが、そのＶＬ配列を含む抗ＰＤ－Ｌ１イディオタイプ抗体は、参照配列を含む抗イディオタイプ抗体と同じ抗ＰＤ－Ｌ１抗体に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態では、配列番号５５において合計で１～１０個のアミノ酸が置換、挿入、及び／または欠失している。ある特定の実施形態において、置換、挿入、または欠失は、ＨＶＲの外側の領域で（すなわち、ＦＲ内で）生じる。任意に、抗ＰＤ－Ｌ１イディオタイプ抗体は、配列番号５５のＶＬ配列を、その配列の翻訳後修飾を含めて、含む。特定の実施形態において、ＶＬは、（ａ）配列番号２０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｂ）配列番号２１のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｃ）配列番号２２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３から選択される１つ、２つ、または３つのＨＶＲを含む。

【０１１４】

別の態様では、抗ＰＤ－Ｌ１イディオタイプ抗体が提供され、この抗体は、上記に提供される実施形態のいずれかにあるようなＶＨ、及び上記に提供される実施形態のいずれかにあるようなＶＬを含む。一実施形態において、抗体は、それぞれ、配列番号５６及び配列番号５５のＶＨ配列及びＶＬ配列を含み、これにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。

【０１１５】

いくつかの実施形態において、抗ＰＤ－Ｌ１イディオタイプ抗体が提供され、この抗体は、配列番号３７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号３８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号３９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含む、ＶＨと、配列番号１７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号１８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号１９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含む、ＶＬと、を含む。いくつかの実施形態において、抗体は、配列番号４０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号４１のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含むＶＨと、配列番号２０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号２１のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号２２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含むＶＬと、を含む。いくつかの実施形態において、抗体は、配列番号４３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号４４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含むＶＨと、配列番号２０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号２１のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号２２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含むＶＬと、を含む。

【０１１６】

いくつかの実施形態において、抗イディオタイプ抗体は、図１及び２に示される、抗体４８Ｃ１の１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つのＨＶＲ（例えば、Ｋａｂａｔ）を含む。いくつかの実施形態において、抗イディオタイプ抗体は、図１及び２に示される、抗体４８Ｃ１のＶＨ及び／またはＶＬを含む。

【０１１７】

別の態様では、抗ＰＤ－Ｌ１イディオタイプ抗体は、配列番号５８のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）配列を含む。ある特定の実施形態において、配列番号５８のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するＶＨ配列は、参照配列と比較して、置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含有するが、そのＶＨ配列を含む抗ＰＤ－Ｌ１イディオタイプ抗体は、参照配列を含む抗イディオタイプ抗体と同じ抗ＰＤ－Ｌ１抗体に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態では、配列番号５８において合計で１～１０個のアミノ酸が置換、挿入、及び／または欠失している。ある特定の実施形態において、置換、挿入、または欠失は、ＨＶＲの外側の領域内で（すなわち、ＦＲ内で）生じる。任意に、抗ＰＤ－Ｌ１イディオタイプ抗体は、配列番号５８のＶＨ配列を、その配列の翻訳後修飾を含めて、含む。特定の実施形態において、ＶＨは、（ａ）配列番号５１のアミノ酸配列

を含むＨＶＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号５２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び（ｃ）配列番号５０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３から選択される１つ、２つ、または３つのＨＶＲを含む。

【０１１８】

別の態様では、抗ＰＤ－Ｌ１イディオタイプ抗体が提供され、この抗体は、配列番号５７のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含む。ある特定の実施形態において、配列番号５７のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するＶＬ配列は、参照配列と比較して、置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含有するが、そのＶＬ配列を含む抗ＰＤ－Ｌ１イディオタイプ抗体は、参照配列を含む抗イディオタイプ抗体と同じ抗ＰＤ－Ｌ１抗体に結合する能力を保持する。ある特定の実施形態では、配列番号５７において合計で１～１０個のアミノ酸が置換、挿入、及び／または欠失している。ある特定の実施形態において、置換、挿入、または欠失は、ＨＶＲの外側の領域で（すなわち、ＦＲ内で）生じる。任意に、抗ＰＤ－Ｌ１イディオタイプ抗体は、配列番号５７のＶＬ配列を、その配列の翻訳後修飾を含めて、含む。特定の実施形態において、ＶＬは、（ａ）配列番号２６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、（ｂ）配列番号２７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び（ｃ）配列番号２８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３から選択される１つ、２つ、または３つのＨＶＲを含む。

【０１１９】

別の態様では、抗ＰＤ－Ｌ１イディオタイプ抗体が提供され、この抗体は、上記に提供される実施形態のいずれかにあるようなＶＨ、及び上記に提供される実施形態のいずれかにあるようなＶＬを含む。一実施形態において、抗体は、それぞれ配列番号５８及び配列番号５７のＶＨ配列及びＶＬ配列を含み、これにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。

【０１２０】

いくつかの実施形態において、抗ＰＤ－Ｌ１イディオタイプ抗体が提供され、この抗体は、配列番号４５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号４６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号４７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含むＶＨと、配列番号２３のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号２４のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号２５のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含むＶＬと、を含む。いくつかの実施形態において、抗体は、配列番号４８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号４９のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号５０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含むＶＨと、配列番号２６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号２７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号２８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含むＶＬと、を含む。いくつかの実施形態において、抗体は、配列番号５１のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ１、配列番号５２のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ２、及び配列番号５０のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｈ３を含むＶＨと、配列番号２６のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ１、配列番号２７のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ２、及び配列番号２８のアミノ酸配列を含むＨＶＲ－Ｌ３を含むＶＬと、を含む。

【０１２１】

本発明のさらなる態様において、上記の実施形態のいずれかによる抗ＰＤ－Ｌ１イディオタイプ抗体は、キメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体を含む、モノクローナル抗体である。一実施形態において、抗ＰＤ－Ｌ１イディオタイプ抗体は、抗体断片、例えば、Ｆｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、ｓｃＦｖ、ダイアボディ、またはＦ（ａｂ’）$_2$断片である。別の実施形態において、抗ＰＤ－Ｌ１イディオタイプ抗体は、完全長抗体、例えば、本明細書において定義される無傷のＩｇＧ１抗体または他の抗体クラスもしくはアイソタイプである。

【０１２２】

本発明のさらなる態様において、上記の実施形態のいずれかに従ってまたは本明細書に記載される抗ＰＤ－Ｌ１イディオタイプ抗体は、異種部分または薬剤にコンジュゲートされる。

【０１２３】

別の態様では、上記の実施形態のいずれかに従ってまたは本明細書に記載される抗ＰＤ－Ｌ１イディオタイプ抗体のうちの１つ以上を含む組成物が、本明細書に提供される。本明細書に記載される抗イディオタイプ抗体をコードする核酸、核酸を含むベクター、及びベクターを含む宿主細胞もまた、本明細書に提供される。いくつかの実施形態において、宿主細胞は、単離されるか、または精製される。いくつかの実施形態において、宿主細胞は、細胞培養培地である。

【０１２４】

ｉｉ．産生方法

以下は、本発明に従って使用される抗イディオタイプ抗体の産生について例示的な技術として記載する。

【０１２５】

１．ポリクローナル抗体

本発明の抗体は、ポリクローナル抗体を含み得る。ポリクローナル抗体の調製方法は、当業者に既知である。ポリクローナル抗体は、哺乳動物において、例えば、免疫付与剤及び必要に応じてアジュバントの１回以上の注射によって産生され得る。典型的には、免疫付与剤及び／またはアジュバントは、複数の皮下または腹腔内注射によって哺乳動物に注射される。免疫付与剤は、抗ＰＤ－Ｌ１、その抗原結合断片、またはその融合タンパク質を含み得る。免疫付与される哺乳動物において免疫原性であることが知られているタンパク質に免疫付与剤を共役させることが有用であり得る。かかる免疫原性タンパク質の例としては、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、及び大豆トリプシン阻害剤が挙げられるが、それらに限定されない。用いられ得るアジュバントの例としては、フロイント完全アジュバント、及びＭＰＬ－ＴＤＭアジュバント（モノホスホリル脂質Ａ、合成トレハロースジコリノミコール酸塩）が挙げられる。免疫化プロトコルは、過度な実験なしに当業者によって選択され得る。次いで、哺乳動物が、採血され、血清が抗イディオタイプ抗体力価についてアッセイされ得る。必要に応じて、哺乳動物は、抗体力価が増加するか、または頭打ちになるまで促進され得る。

【０１２６】

２．モノクローナル抗体

本発明の抗体は、あるいは、モノクローナル抗体であり得る。モノクローナル抗体は、Ｋｏｈｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，２５６：４９５（１９７５）によって最初に記載されるハイブリドーマ法により作製されてもよいし、組換えＤＮＡ法によって作製されてもよい（例えば、米国特許第４，８１６，５６７号を参照のこと）。

【０１２７】

ハイブリドーマ法では、マウスまたは他の適切な宿主動物、例えばハムスターなどが、上述のように免疫化されて、免疫化に使用されるタンパク質に特異的に結合する抗体を産生するか、または産生することのできるリンパ球が誘発される。あるいは、リンパ球は、インビトロで免疫化され得る。免疫化の後、リンパ球が単離され、次いでポリエチレングリコールなどの好適な融合剤を使用して骨髄腫細胞株と融合されて、ハイブリドーマ細胞が形成される（Ｇｏｄｉｎｇ，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ　ａｎｄ　Ｐｒａｃｔｉｃｅ，ｐｐ．５９－１０３（Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，１９８６））。

【０１２８】

このように調製されたハイブリドーマ細胞は、好適な培地に播種され増殖し、この培地は、非融合の親骨髄腫細胞（融合パートナーとも称される）の増殖または生存を阻害する１つ以上の物質を含有する。例えば、親骨髄腫細胞が酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（ＨＧＰＲＴまたはＨＰＲＴ）を欠く場合、ハイブリドーマ

の選択培地は、典型的には、ヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジンを含むことになり（ＨＡＴ培地）、これらの物質は、ＨＧＰＲＴ欠損細胞の増殖を防止する。

【０１２９】

融合パートナー骨髄腫細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定した高レベルの産生を支持し、かつ非融合の親細胞に対して選択する選択培地に対して感受性を示すものである。骨髄腫細胞株は、Ｓａｌｋ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ Ｃｅｌｌ Ｄｉｓｔｒｉｂｕｔｉｏｎ Ｃｅｎｔｅｒ（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ ＵＳＡ）から入手可能なＭＯＰＣ－２１及びＭＰＣ－１１マウス腫瘍、ならびにＡｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ，ＵＳＡ）から入手可能なＳＰ－２及び誘導体、例えば、Ｘ６３－Ａｇ８－６５３細胞に由来するものなどのマウス骨髄腫株である。ヒト骨髄腫及びマウス－ヒトヘテロ骨髄腫細胞株も、ヒトモノクローナル抗体の産生に関して記載されている（Ｋｏｚｂｏｒ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１３３：３００１（１９８４）、及びＢｒｏｄｅｕｒ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，ｐｐ．５１－６３（Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８７））。

【０１３０】

ハイブリドーマ細胞が成長する培養培地は、抗原に対して指向されたモノクローナル抗体の産生に関してアッセイされる。ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降またはインビトロ結合アッセイ、例えば、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）または酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）によって決定され得る。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、Ｍｕｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，１０７：２２０（１９８０）に記載されるＳｃａｔｃｈａｒｄ分析によって判定され得る。

【０１３１】

所望の特異性、親和性、及び／または活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞が特定されたら、クローンを、限界希釈手技によってサブクローニングし、標準的方法によって増殖させることができる（Ｇｏｄｉｎｇ，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ，ｐｐ．５９－１０３（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，１９８６））。この目的に適切な培養培地としては、例えば、Ｄ－ＭＥＭまたはＲＰＭＩ－１６４０培地が挙げられる。加えて、ハイブリドーマ細胞は、例えば、マウスにこの細胞を腹腔内注射することによって、動物において腹水癌としてインビボで増殖させることができる。

【０１３２】

サブクローンにより分泌されるモノクローナル抗体は、例えば、親和性クロマトグラフィー（例えば、タンパク質Ａまたはタンパク質Ｇ－セファロースを使用する）またはイオン交換クロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析などの従来の抗体精製手技によって、培地、腹水、または血清から好適に分離される。

【０１３３】

モノクローナル抗体をコードするＤＮＡは、従来の手順を使用して（例えば、マウス抗体の重及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合し得るオリゴヌクレオチドプローブを使用することにより）容易に単離及び配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、かかるＤＮＡの源として機能する。単離されると、ＤＮＡが発現ベクター内に入れられてよく、これは次いで、宿主細胞、例えばＥ．ｃｏｌｉ細胞、サルＣＯＳ細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、またはさもなければ抗体タンパク質を産生しない骨髄腫などにトランスフェクトされて、組換え宿主細胞内のモノクローナル抗体の合成体が得られる。抗体をコードするＤＮＡの細菌における組換え発現に関する概説論文としては、Ｓｋｅｒｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎｉｏｎ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌ．，５：２５６－２６２（１９９３）及びＰｌｉｉｃｋｔｈｕｎ，Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｖｓ．１３０：

１５１－１８８（１９９２）が挙げられる。

【０１３４】

さらなる一実施形態において、モノクローナル抗体または抗体断片は、ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３４８：５５２－５５４（１９９０）に記載される技術を使用して作製された抗体ファージライブラリから単離されてもよい。Ｃｌａｃｋｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３５２：６２４－６２８（１９９１）、及びＭａｒｋｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２２２：５８１－５９７（１９９１）は、それぞれ、ファージライブラリを使用したマウス及びヒト抗体の単離を記載する。その後の刊行物は、非常に大きなファージライブラリを構築するための戦略として、鎖シャッフリング（Ｍａｒｋｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１０：７７９－７８３（１９９２））、ならびに組み合わせ感染及びインビボ組換えによる高い親和性（ｎＭ範囲）のヒト抗体の産生を記載する（Ｗａｔｅｒｈｏｕｓｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ．Ｒｅｓ．２１：２２６５－２２６６（１９９３））。したがって、これらの技術は、モノクローナル抗体を単離するための伝統的なモノクローナル抗体ハイブリドーマ技術の実行可能な代替案である。

【０１３５】

原則として、合成抗体クローンは、ファージコートタンパク質に融合した抗体可変領域（Ｆｖ）の様々な断片をディスプレイするファージを含むファージライブラリをスクリーニングすることによって選択される。かかるファージライブラリは、所望の抗原に対してスクリーニングされる。所望の抗原に結合することができるＦｖ断片を発現するクローンは、抗原に吸着し、それ故に、ライブラリ内の非結合クローンから分離される。その後、結合クローンは、抗原から溶出し、追加の抗原吸着／溶出サイクルによってさらに富化され得る。

【０１３６】

可変ドメインは、Ｗｉｎｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１２：４３３－４５５（１９９４）に記載されるように、ＶＨ及びＶＬが短い柔軟性ペプチドを介して共有結合される一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）断片として、またはそれらが各々定常ドメインに融合して非共有結合的に相互作用するＦａｂ断片としてのいずれかで、ファージ上に機能的にディスプレイされ得る。

【０１３７】

ＶＨ及びＶＬ遺伝子のレパートリーは、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によって別個にクローニングされ、ファージライブラリ内でランダムに組換えられ得、その後、これは、Ｗｉｎｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１２：４３３－４５５（１９９４）に記載されるように、抗原結合クローンについて検索され得る。免疫化源由来のライブラリは、ハイブリドーマの構築を必要とすることなく、高親和性抗体を免疫原に提供する。あるいは、ナイーブレパートリーは、Ｇｒｉｆｆｉｔｈｓ　ｅｔ　ａｌ．，ＥＭＢＯ　Ｊ，１２：７２５－７３４（１９９３）に記載されるように、クローニングされて、いずれの免疫化も伴うことなく、単一のヒト抗体源を広範囲の非自己抗原及び自己抗原に提供することができる。最後に、Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍ　ａｎｄ　Ｗｉｎｔｅｒ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２２７：３８１－３８８（１９９２）に記載されるように、幹細胞からの再編成されていないＶ遺伝子セグメントをクローニングし、ランダム配列を含有するＰＣＲプライマーを使用して高度に可変的なＣＤＲ３領域をコードし、インビトロでの再編成を達成することによってナイーブライブラリを合成的に作製することもできる。

【０１３８】

ライブラリのスクリーニングは、当該技術分野で既知の様々な技術によって達成され得る。例えば、抗ＰＤ－Ｌ１は、吸着プレートに付着した宿主細胞で発現された吸着プレートのウェルを被覆するために使用され得るか、または細胞選別で使用され得るか、またはストレプトアビジンでコーティングしたビーズで捕捉するためにビオチンにコンジュゲートされ得るか、またはディスプレイライブラリをパニングするための任意の他の方法で使

用され得る。

【０１３９】

遅い解離速度（及び良好な結合親和性）を有する抗体の選択は、Ｂａｓｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎｓ，８：３０９－３１４（１９９０）及びＷＯ９２／０９６９０に記載されるように、長時間の洗浄及び一価ファージディスプレイの使用、ならびにＭａｒｋｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，１０：７７９－７８３（１９９２）に記載されるように、抗原の低被覆密度の使用によって促進され得る。

【０１４０】

本発明の抗イディオタイプ抗体のうちのいずれも、目的とするファージクローンを選択するのに好適な抗原スクリーニング手順を設計し、続いて、目的とするファージクローンからのＦｖ配列、及びＫａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　ｌｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，Ｆｉｆｔｈ　Ｅｄｉｔｉｏｎ，ＮＩＨ　Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ　９１－３２４２，Ｂｅｔｈｅｓｄａ　ＭＤ（１９９１），ｖｏｌｓ．１－３に記載される好適な定常領域（Ｆｅ）配列を用いて完全長抗イディオタイプ抗体クローンを構築することによって得ることができる。

【０１４１】

３．抗体バリアント

ある特定の実施形態において、本明細書に提供される抗体のアミノ酸配列バリアントが企図される。例えば、抗体の結合親和性及び／または他の生物学的特性を改善することが望ましい場合がある。抗体のアミノ酸配列バリアントは、抗体をコードするヌクレオチド配列中に適切な修飾を導入することによって、またはペプチド合成によって調製され得る。かかる修飾には、例えば、抗体のアミノ酸配列内における、残基からの欠失、及び／または残基への挿入、及び／または残基の置換が含まれる。最終構築物に到達するために欠失、挿入、及び置換の任意の組み合わせを行うことができるが、最終構築物が所望の特性、例えば、抗原結合を保有することを条件とする。

ａ．置換、挿入、及び欠失バリアント

【０１４２】

ある特定の実施形態において、１つ以上のアミノ酸置換を有する抗体バリアントを提供する。置換変異誘発のために対象となる部位は、ＨＶＲ及びＦＲを含む。保存的置換を表１の「保存的置換」という見出しの下に示す。より実質的な変化が表１の「例示的な置換」という見出しの下に提供され、アミノ酸側鎖クラスに関連して、以下でさらに記載される。アミノ酸置換は、目的とする抗体に導入され、生成物は、所望の活性、例えば、保持／改善された抗原結合、低下された免疫原性、または改善されたＡＤＣＣもしくはＣＤＣに関してスクリーニングされ得る。

表１

元の残基	例示的な置換	好ましい置換
Ａｌａ（Ａ）	Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ	Ｖａｌ
Ａｒｇ（Ｒ）	Ｌｙｓ、Ｇｌｎ、Ａｓｎ	Ｌｙｓ
Ａｓｎ（Ｎ）	Ｇｌｎ、Ｈｉｓ、Ａｓｐ、Ｌｙｓ、Ａｒｇ	Ｇｌｎ
Ａｓｐ（Ｄ）	Ｇｌｕ、Ａｓｎ	Ｇｌｕ
Ｃｙｓ（Ｃ）	Ｓｅｒ、Ａｌａ	Ｓｅｒ
Ｇｌｎ（Ｑ）	Ａｓｎ、Ｇｌｕ	Ａｓｎ
Ｇｌｕ（Ｅ）	Ａｓｐ、Ｇｌｎ	Ａｓｐ
Ｇｌｙ（Ｇ）	Ａｌａ	Ａｌａ
Ｈｉｓ（Ｈ）	Ａｓｎ、Ｇｌｎ、Ｌｙｓ、Ａｒｇ	Ａｒｇ
Ｉｌｅ（Ｉ）	Ｌｅｕ、Ｖａｌ、Ｍｅｔ、Ａｌａ、Ｐｈｅ、ノルロイシン	Ｌｅｕ
Ｌｅｕ（Ｌ）	ノルロイシン、Ｉｌｅ、Ｖａｌ、Ｍｅｔ、Ａｌａ、Ｐｈｅ	Ｉｌｅ
Ｌｙｓ（Ｋ）	Ａｒｇ、Ｇｌｎ、Ａｓｎ	Ａｒｇ
Ｍｅｔ（Ｍ）	Ｌｅｕ、Ｐｈｅ、Ｉｌｅ	Ｌｅｕ
Ｐｈｅ（Ｆ）	Ｔｒｐ、Ｌｅｕ、Ｖａｌ、Ｉｌｅ、Ａｌａ、Ｔｙｒ	Ｔｙｒ
Ｐｒｏ（Ｐ）	Ａｌａ	Ａｌａ
Ｓｅｒ（Ｓ）	Ｔｈｒ	Ｔｈｒ
Ｔｈｒ（Ｔ）	Ｖａｌ、Ｓｅｒ	Ｓｅｒ
Ｔｒｐ（Ｗ）	Ｔｙｒ、Ｐｈｅ	Ｔｙｒ
Ｔｙｒ（Ｙ）	Ｔｒｐ、Ｐｈｅ、Ｔｈｒ、Ｓｅｒ	Ｐｈｅ
Ｖａｌ（Ｖ）	Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｍｅｔ、Ｐｈｅ、Ａｌａ、ノルロイシン	Ｌｅｕ

【０１４３】

アミノ酸は、一般的な側鎖特性に従って群分けされ得る：

－疎水性：ノルロイシン、Ｍｅｔ、Ａｌａ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、

－中性親水性：Ｃｙｓ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、

－酸性：Ａｓｐ、Ｇｌｕ、

－塩基性：Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｒｇ、

－鎖の配向に影響を及ぼす残基：Ｇｌｙ、Ｐｒｏ、

－芳香族：Ｔｒｐ、Ｔｙｒ、Ｐｈｅ。

【０１４４】

非保存的置換は、これらのクラスのうちの１つのメンバーを別のクラスと交換することを伴うであろう。

【０１４５】

１つのタイプの置換バリアントは、親抗体（例えば、ヒト化抗体またはヒト抗体）の１つ以上の超可変領域残基を置換することを伴う。概して、さらなる研究のために選択される結果として生じる変異体（複数可）は、親抗体に対してある特定の生物学的特性（例えば、親和性の増加、免疫原性の低減）における修飾（例えば、改善）を有し、かつ／または親抗体のある特定の生物学的特性を実質的に保持するであろう。例示的な置換バリアントは、例えば、本明細書に記載の技術等のファージディスプレイに基づく親和性成熟技術を使用して好都合に生成され得る親和性成熟抗体である。簡潔には、１つ以上のＨＶＲ残基が変異され、バリアント抗体がファージ上にディスプレイされ、特定の生物学的活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングされる。

【０１４６】

改変（例えば、置換）は、ＨＶＲにおいて、例えば抗体親和性を改善するために行われ得る。かかる改変は、ＨＶＲ「ホットスポット」、すなわち、体細胞成熟プロセス中に高頻度で変異を経るコドンによってコードされる残基（例えば、Ｃｈｏｗｄｈｕｒｙ，Ｍｅ

ｔｈｏｄｓ Ａｆｏｌ．Ｂｉｏｌ．２０７：１７９－１９６（２００８）を参照されたい）、及び／またはＳＤＲ（ａ－ＣＤＲ）で行われてもよく、得られたバリアントＶＨまたはＶＬが結合親和性に関して試験される。二次ライブラリからの構築及び再選択による親和性成熟は、例えば、Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍ ｅｔ ａｌ．ｉｎ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ １７８：１－３７（Ｏ’Ｂｒｉｅｎ ｅｔ ａｌ．，ｅｄ．，Ｈｕｍａｎ Ｐｒｅｓｓ，Ｔｏｔｏｗａ，ＮＪ，（２００１））に記載されている。親和性成熟のいくつかの実施形態において、多様性は、種々の方法（例えば、エラープローンＰＣＲ、鎖シャフリング、またはオリゴヌクレオチド指向性変異誘発）のうちのいずれかによって、成熟のために選択される可変遺伝子に導入される。次いで、二次ライブラリが創出される。次いで、ライブラリは、所望の親和性を有する任意の抗体バリアントを特定するためにスクリーニングされる。多様性を導入するための別の方法は、ＨＶＲ指向アプローチを伴い、その方法では、いくつかのＨＶＲ残基（例えば、一度に４～６個の残基）がランダム化される。抗原結合で伴われるＨＶＲ残基は、例えば、アラニンスキャニング変異誘発またはモデリングを使用して、特異的に特定され得る。特に、ＣＤＲ－Ｈ３及びＣＤＲ－Ｌ３が標的化されることが多い。

【０１４７】

ある特定の実施形態において、置換、挿入、または欠失は、かかる改変が抗原に結合する抗体の能力を実質的に低減させない限り、１つ以上のＨＶＲ内で生じ得る。例えば、結合親和性を実質的に低減しない保存的改変（例えば、本明細書に提供される保存的置換）は、ＨＶＲ内で行われ得る。かかる改変は、ＨＶＲ「ホットスポット」またはＳＤＲの外側であり得る。上で提供されるバリアントＶＨ及びＶＬ配列のある特定の実施形態において、各ＨＶＲは、改変されていないか、または１つ、２つ、もしくは３つ以下のアミノ酸置換を含有するかのいずれかである。

【０１４８】

変異誘発の標的とされ得る抗体の残基または領域の特定のための有用な方法は、Ｃｕｎｎｉｎｇｈａｍ ａｎｄ Ｗｅｌｌｓ（１９８９）Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４４：１０８１－１０８５に記載される「アラニンスキャニング変異誘発」と称される。この方法において、標的残基の残基または基（例えば、Ａｒｇ、Ａｓｐ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、及びＧｌｕなどの荷電残基）は、特定され、かつ中性または負に荷電されたアミノ酸（例えば、アラニンまたはポリアラニン）により置き換えられ、抗体と抗原との相互作用が影響を受けたかどうかを決定する。さらなる置換は、最初の置換に対する機能感受性を示すアミノ酸位置に導入され得る。

【０１４９】

あるいは、または加えて、抗原－抗体複合体の結晶構造は、抗体と抗原との間の接触点を特定する。かかる接触残基及び隣接する残基が置換の候補として標的とされてもよく、または排除されてもよい。変異体は、スクリーニングされて、それらが所望の特性を有するかどうかが決定され得る。

【０１５０】

アミノ酸配列挿入には、長さが１残基から１００以上の残基を含有するポリペプチドの範囲であるアミノ末端及び／またはカルボキシル末端の融合、及び単一または複数のアミノ酸残基の配列内挿入が含まれる。末端挿入の例には、Ｎ末端メチオニル残基を有する抗体が含まれる。抗体分子の他の挿入バリアントは、抗体の血清半減期を増加させる酵素（例えば、ＡＤＥＰＴのための）またはポリペプチドへの、抗体のＮ末端またはＣ末端の融合を含む。

【０１５１】

４．組換え方法及び組成物

抗体は、例えば、米国特許第４，８１６，５６７号に記載される組換え方法及び組成物を使用して産生され得る。一実施形態において、本明細書に記載される抗イディオタイプ抗体をコードする単離された核酸が提供される。かかる核酸は、抗体のＶＬを含むアミノ酸配列及び／またはＶＨを含むアミノ酸配列（例えば、抗体の軽鎖及び／または重鎖）を

コードし得る。さらなる一実施形態において、かかる核酸を含む１つ以上のベクター（例えば、発現ベクター）が提供される。さらなる実施形態において、かかる核酸を含む宿主細胞が提供される。１つのかかる実施形態において、宿主細胞は、（１）抗体のＶＬを含むアミノ酸配列及び抗体のＶＨを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含むベクター、または（２）抗体のＶＬを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第１のベクター、及び抗体のＶＨを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第２のベクターを含む（例えば、これらで形質転換されている）。一実施形態において、宿主細胞は、真核生物、例えばチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞またはリンパ球細胞（例えば、ＹＯ、ＮＳＯ、Ｓｐ２０細胞）である。一実施形態において、抗ＰＤ－Ｌ１イディオタイプ抗体の作製方法が提供され、本方法は、抗体の発現にとって好適な条件下で、上記で提供されるように、抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を培養すること、及び任意に、宿主細胞（または宿主細胞培養培地）から抗体を回復することを含む。

【０１５２】

抗ＰＤ－Ｌ１イディオタイプ抗体の組換え産生のために、例えば、上述のものなどの抗体をコードする核酸が単離され、宿主細胞内でのさらなるクローニング及び／または発現のために、１つ以上のベクター中に挿入される。かかる核酸は、従来の手順を使用して（例えば、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）、容易に単離され、配列決定され得る。

【０１５３】

抗体をコードするベクターのクローニングまたは発現に好適な宿主細胞には、本明細書に記載される原核生物細胞または真核生物細胞が含まれる。例えば、抗体は、特にグリコシル化及びＦｃエフェクター機能が必要ではないときに細菌中で産生され得る。細菌中の抗体断片及びポリペプチドの発現については、例えば、米国特許第５，６４８，２３７号、同第５，７８９，１９９号、及び同第５，８４０，５２３号を参照されたい。（Ｅ．ｃｏｌｉにおける抗体断片の発現について説明している、Ｃｈａｒｌｔｏｎ，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ａｆｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．２４８（Ｂ．Ｋ．Ｃ．Ｌｏ，ｅｄ．，Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ，Ｔｏｔｏｗａ，ＮＪ，２００３），ｐｐ．２４５－２５４も参照されたい。）発現後、抗体は、可溶性画分中の細菌細胞ペーストから単離され得、さらに精製され得る。

【０１５４】

原核生物に加えて、グリコシル化経路が「ヒト化」されている菌類及び酵母株を含む糸状菌類または酵母などの真核微生物は、抗体をコードするベクターにとって好適なクローニングまたは発現宿主であり、それらは、部分的または完全なヒトグリコシル化パターンを有する抗体の産生をもたらす。Ｇｅｒｎｇｒｏｓｓ，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．２２：１４０９－１４１４（２００４）、及びＬｉ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．２４：２１０－２１５（２００６）を参照されたい。

【０１５５】

グリコシル化抗体の発現に好適な宿主細胞はまた、多細胞生物（無脊椎動物及び脊椎動物）にも由来する。無脊椎動物細胞の例としては、植物細胞及び昆虫細胞が挙げられる。特にＳｐｏｄｏｐｔｅｒａ ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ細胞のトランスフェクションのために昆虫細胞と組み合わせて使用され得る、多数のバキュロウイルス株が特定されている。植物細胞培養物もまた、宿主として利用することができる。例えば、米国特許第５，９５９，１７７号、同第６，０４０，４９８号、同第６，４２０，５４８号、同第７，１２５，９７８号、及び同第６，４１７，４２９号（トランスジェニック植物で抗体を産生するための、ＰＬＡＮＴＩＢＯＤＩＥＳ（商標）技術について記載する）を参照されたい。

【０１５６】

脊椎動物細胞もまた、宿主として使用することができる。例えば、懸濁液中で成長するように適合される哺乳動物細胞株が、有用であり得る。有用な哺乳動物宿主細胞株の他の例は、ＳＶ４０により形質転換されたサル腎臓ＣＶ１株（ＣＯＳ－７）、ヒト胚性腎臓株（例えば、Ｇｒａｈａｍ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｇｅｎ Ｖｉｒａｌ．３６：５９（１９７

７）に記載される２９３または２９３細胞、ベビーハムスター腎臓細胞（ＢＨＫ）、マウスセルトリ細胞（例えば、Ｍａｔｈｅｒ，Ｂｉｏｌ．Ｒｅｐｒｏｄ．２３：２４３－２５１（１９８０）に記載されるＴＭ４細胞、サル腎臓細胞（ＣＶ１）、アフリカミドリザル腎臓細胞（ＶＥＲ０－７６）、ヒト子宮頸癌腫細胞（ＨＥＬＡ）、イヌ腎臓細胞（ＭＯＣＫ、バッファローラット肝臓細胞（ＢＲＬ３Ａ）、ヒト肺細胞（Ｗ１３８）、ヒト肝臓細胞（Ｈｅｐ０２）、マウス乳房腫瘍（ＭＭＴ０６０５６２）、例えばＭａｔｈｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｎａｌｓ Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．３８３：４４－６８（１９８２）に記載される、ＴＲＩ細胞、ＭＲＣ ５細胞、及びＦＳ４細胞である。他の有用な哺乳動物宿主細胞株には、ＤＨＦＲ－ＣＨＯ細胞を含むチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞（Ｕｒｌａｕｂ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７７：４２１６（１９８０））、ならびにＹＯ、ＮＳＯ、及びＳｐ２／０などの骨髄腫細胞株が含まれる。抗体産生に好適なある特定の哺乳動物宿主細胞株の概説については、例えば、Ｙａｚａｋｉ ａｎｄ Ｗｕ，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．２４８（Ｂ．Ｋ．Ｃ．Ｌｏ，ｅｄ．，Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ，Ｔｏｔｏｗａ，ＮＪ），ｐｐ．２５５－２６８（２００３）を参照されたい。

【０１５７】

Ｃ．アッセイ

本明細書で提供される抗ＰＤ－Ｌ１イディオタイプ抗体は、当該技術分野で既知の様々なアッセイにより、それらの物理的／化学特性及び／または生物学的活性に関して特定されるか、スクリーニングされるか、またはそれらを特徴としてよい。

【０１５８】

ｉ．結合アッセイ及び他のアッセイ

一態様では、本発明の抗体は、例えば、ＥＬＩＳＡ、ウェスタンブロットなどの既知の方法によってその抗原結合活性に関して試験される。結合親和性は、当該技術分野で既知の一般的な方法によって測定され得る。一実施形態において、抗体のK_Dが、非標識抗原の一連の滴定の存在下でＦａｂを最小濃度の（^{125}Ｉ）標識抗原と平衡化し、その後、抗Ｆａｂ抗体でコーティングしたプレートに結合している抗原を捕捉することによってＦａｂの抗原に対する溶液結合親和性を測定する以下のアッセイによって説明される、抗体のＦａｂバージョン及び抗原分子によって実行される、放射標識抗原結合アッセイ（ＲＩＡ）によって測定される（Ｃｈｅｎ，ｅｔ ａｌ．，（１９９９）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ ２９３：８６５－８８１）。アッセイの条件を確立するために、マイクロタイタープレート（Ｄｙｎｅｘ）を５０ｍＭの炭酸ナトリウム（ｐＨ９．６）中５μｇ／ｍｌの捕捉抗Ｆａｂ抗体（Ｃａｐｐｅｌ Ｌａｂｓ）で一晩コーティングし、その後、ＰＢＳ中２（ｗ／ｖ）％のウシ血清アルブミンで、室温（約２３℃）で２～５時間遮断する。非吸着性プレート（Ｎｕｎｃ番号２６９６２０）中、１００ｐＭまたは２６ｐＭの［^{125}Ｉ］抗原を、目的とするＦａｂの段階希釈液と混合する（Ｐｒｅｓｔａ ｅｔ ａｌ．，（１９９７）Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５７：４５９３－４５９９における抗ＶＥＧＦ抗体、Ｆａｂ－１２の評価と一貫している）。次いで、目的とするＦａｂを一晩インキュベートするが、このインキュベーションは、平衡が達成されることを確実にするために、より長い期間（例えば、約６５時間）継続し得る。その後、室温での１時間のインキュベーションのために混合物を捕捉プレートに移動する。その後、溶液を除去し、ＰＢＳ中０．１％のＴｗｅｅｎ－２０でプレートを８回洗浄する。プレートが乾燥したら、１５０μｌ／ウェルのシンチラント（ｓｃｉｎｔｉｌｌａｎｔ）（ＭｉｃｒｏＳｃｉｎｔ－２０；Ｐａｃｋａｒｄ）を付加し、プレートをＴｏｐｃｏｕｎｔガンマ計数器（Ｐａｃｋａｒｄ）上で１０分間計数する。２０％以下の最大結合を付与する各Ｆａｂの濃度を競合結合アッセイにおける使用のために選択する。

【０１５９】

別の実施形態に従って、K_Dは、２５℃で、１０の応答単位（ＲＵ）で固定化抗原ＣＭ５チップを用いて、ＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）－２０００またはＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）－３０００装置（ＢＩＡｃｏｒｅ，Ｉｎｃ．，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，Ｎ．Ｊ．）

を使用した表面プラズモン共鳴アッセイを使用して測定される。簡潔に述べると、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサチップ（ＣＭ５、ＢＩＡｃｏｒｅ　Ｉｎｃ．）を、供給業者の指示書に従って、Ｎ－エチル－Ｎ’－（３－ジメチルアミノプロピル）－カルボジイミド塩酸塩（ＥＤＣ）及びＮ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）を用いて活性化させる。抗原をｐＨ４．８の１０ｍＭの酢酸ナトリウムによって５μｇ／ｍｌ（０．２μＭ）に希釈した後、５μｌ／分の流量で注射し、カップリングされたタンパク質の約１０の応答単位（ＲＵ）を達成する。抗原の注射に続いて、１Ｍのエタノールアミンを注射して、未反応基を遮断する。動態測定のために、Ｆａｂの２倍段階希釈液（０．７８ｎＭ～５００ｎＭ）を、０．０５％のＴＷＥＥＮ２０（商標）界面活性剤を含むＰＢＳ（ＰＢＳＴ）中、２５℃で、約２５μＬ／分の流速で注射する。会合速度（k_{on}）及び解離速度（k_{off}）は、会合及び解離のセンサグラムを同時に適合することによって、単純な１対１Ｌａｎｇｍｕｉｒ結合モデル（ＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）評価ソフトウェアバージョン３．２）を使用して算出される。平衡解離定数（K_D）は、比率k_{off}／k_{on}として算出される。例えば、Ｃｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２９３：８６５－８８１（１９９９）を参照されたい。上記の表面プラズモン共鳴アッセイによるオンレートが$10^6 M^{-1} s^{-1}$を超える場合、オンレートは、ストップトフローを備えた分光光度計（Ａｖｉｖ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ）、または撹拌キュベットを備えた８０００シリーズＳＬＭ－ＡＭＩＮＣＯ（商標）分光光度計（ＴｈｅｒｍｏＳｐｅｃｔｒｏｎｉｃ）などの分光計で測定される場合に、増加する抗原濃度の存在下で、２５℃で、ＰＢＳ中２０ｎＭの抗－抗原抗体（Ｆａｂ型）（ｐＨ７．２）の蛍光発光強度（励起＝２９５ｎｍ、発光＝３４０ｎｍ、１６ｎｍ帯域通過）の増加または減少を測定する蛍光消光技法を使用することによって決定することができる。

【０１６０】

別の態様では、競合アッセイは、抗ＰＤ－Ｌ１抗体の結合について本明細書に記載される抗ＰＤ－Ｌ１イディオタイプ抗体のうちのいずれかと競合する別の抗イディオタイプ抗体を特定するために使用されてよい。ある特定の実施形態において、かかる競合抗体は、抗ＰＤ－Ｌ１抗体の同じエピトープ（例えば、直鎖または立体構造のエピトープ）に結合する。抗体が結合するエピトープをマッピングするための詳細な例示の方法が、Ｍｏｒｒｉｓ（１９９６）“Ｅｐｉｔｏｐｅ　Ｍａｐｐｉｎｇ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，”ｉｎ　Ａｆｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ａｆｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　ｖｏｌ．Ｈｕｍａｎａ　Ｐｒｅｓｓ，Ｔｏｔｏｗａ，ＮＪ）に提供されている。

【０１６１】

例示的な競合アッセイにおいて、固定化ＰＤ－Ｌ１抗体は、それぞれ、抗ＰＤ－Ｌ１抗体に結合する第１の標識化抗体（例えば、第１の標識化抗ＰＤ－Ｌ１イディオタイプ抗体）、及び抗ＰＤ－Ｌ１抗体に結合することに関して第１の抗体と競合するその能力に関して試験されている第２の非標識化抗体（例えば、第２の非標識化抗ＰＤ－Ｌ１イディオタイプ抗体）を含む溶液中にインキュベートされる。第２の抗体は、ハイブリドーマ上清中に存在し得る。対照として、固定化抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、第２の非標識化抗体ではなく第１の標識化抗体を含む溶液中にインキュベートされる。第１の抗体を抗ＰＤ－Ｌ１抗体に結合するのに許容的な条件下でインキュベーション後、過剰非結合抗体は除去され、固定化抗ＰＤ－Ｌ１抗体に関連する標識の量が測定される。固定化抗ＰＤ－Ｌ１抗体に関連する標識の量は、対照試料に対して試験試料中で実質的に低減される場合、次いでそれは、第２の抗体が、抗ＰＤ－Ｌ１抗体に結合するために第１の抗体と競合していることを示す。Ｈａｒｌｏｗ　ａｎｄ　Ｌａｎｅ（１９８８）Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ａ１ａｎｕａｌ　ｃｈ．１４（Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ）を参照されたい。競合アッセイはまた、抗ＰＤ－Ｌ１抗体でトランスフェクトされ、細胞表面上に発現した細胞を用いて、上述の様式で、ＦＡＣＳで行われ得る。さらに、抗ＰＤ－Ｌ１抗体を用いたＥＬＩＳＡはまた、競合アッセイにおいて使用され得る。

【０１６２】

別の態様では、ゲルシフトアッセイを用いて、本発明の抗イディオタイプ抗体と、抗ＰＤ－Ｌ１抗体などの標的抗体との相互作用を特定し得る。

【０１６３】

例示的なゲルシフトアッセイにおいて、抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、抗イディオタイプ抗体で予めインキュベートされる。予めインキュベートされた抗ＰＤ－Ｌ１抗体及び抗イディオタイプ抗体で予めインキュベートされていない対照抗ＰＤ－Ｌ１抗体を、ゲル電気泳動に供し、二次抗体（例えば、ＩｇＧ／Ｉｇカッパ抗ＰＤ－Ｌ１抗体に対してＩｇＧ及びＩｇカッパ二次抗体）でプローブ化する。予めインキュベートされた抗ＰＤ－Ｌ１抗体及び対照抗ＰＤ－Ｌ１抗体の移動性を比較し、予めインキュベートされた抗ＰＤ－Ｌ１抗体及び対照抗ＰＤ－Ｌ１抗体の移動性の違いは、抗ＰＤ－Ｌ１抗体と抗イディオタイプ抗体との相互作用を示す。

【０１６４】

Ｄ．抗イディオタイプ抗体を使用方法

ｉ．使用方法

ある特定の実施形態において、抗イディオタイプ抗体のうちのいずれか、または本明細書に提供されるかかる抗体を含む組成物は、生体試料中の抗ＰＤ－Ｌ１抗体の存在の検出に有用である。ある特定の実施形態において、抗ＰＤ－Ｌ１イディオタイプ抗体のうちのいずれか、または本明細書に提供されるかかる抗体を含む組成物は、試料中の抗ＰＤ－Ｌ１抗体を定量化するのに有用である。ある特定の実施形態において、生体試料は、全血または全血成分、例えば、赤血球、白血球、血小板、血清、及び血漿など、腹水、硝子体液、リンパ液、滑液、卵胞液、精液、羊水、乳、唾液、痰、涙液、汗、粘液、脳脊髄液、尿、及び目的とする抗体を含有し得る人体の他の構成要素などの生物学的液体である。様々な実施形態において、試料は、任意の動物からの身体試料である。様々な実施形態において、試料は、ヒトからの試料である。

【０１６５】

ある特定の実施形態において、抗イディオタイプ抗体のうちのいずれか、または本明細書に提供されるかかる抗体を含む組成物は、別の分子（例えば、抗ＰＤ－Ｌ１抗体のＦｃ領域に結合する抗体）に結合するその能力に影響することなく免疫アッセイにおいて抗ＰＤ－Ｌ１の存在の検出に有用である。

【０１６６】

抗ＰＤ－Ｌ１イディオタイプ抗体、またはかかる抗体を含む組成物は、ＥＬＩＳＡ、ビーズベースの免疫アッセイ、及び質量分析が挙げられるが、これらに限定されない、様々な異なるアッセイにおいて使用することができる。

【０１６７】

いくつかの実施形態において、抗ＰＤ－Ｌ１抗体に結合する抗イディオタイプ抗体のうちのいずれか、またはかかる抗体を含む組成物は、アッセイにおいてその干渉を低減するために、患者試料から抗ＰＤ－Ｌ１抗体を欠失し、検出するか、または分化させるために有用である。

【０１６８】

いくつかの実施形態において、試料は、哺乳動物からの試料である。いくつかの実施形態において、試料は、例えば、臨床試料中のヒト化抗体などの抗体を測定するとき、ヒト対象からの試料である。いくつかの実施形態において、生体試料は、臨床患者または治療的抗ＰＤ－Ｌ１抗体（例えば、アテゾリズマブ）で治療された患者からの生体試料である。ある特定の実施形態において、生体試料は、血清または血漿である。ある特定の実施形態において、生体試料は、臨床患者からの血清である。ある特定の実施形態において、生体試料は、尿である。ある特定の実施形態において、生体試料は、臨床患者からの尿である。

【０１６９】

ある特定の実施形態において、標識された抗ＰＤ－Ｌ１イディオタイプ抗体を含む組成物が提供される。標識としては、直接検出される標識または部分（蛍光標識、発色団標識

、電子密度の高い標識、化学発光標識、及び放射性標識等）、ならびに間接的に、例えば、酵素反応または分子相互作用により検出される酵素またはリガンド等の部分が挙げられるが、これらに限定されない。例示的な標識としては、放射性同位体^{32}Ｐ、^{14}Ｃ、^{125}Ｉ、^{3}Ｈ、及び^{131}Ｉ、希土類キレートまたはフルオレセイン及びその誘導体などのフルオロフォア、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルセリフェラーゼ（ｌｕｃｅｒｉｆｅｒａｓｅｓ）、例えば、ホタルルシフェラーゼ及び細菌ルシフェラーゼ（米国特許第４，７３７，４５６号）、ルシフェリン、２，３－ジヒドロフタラジンジオン、西洋ワサビペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）、アルカリホスファターゼ、Ｊ３－ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、糖質オキシダーゼ、例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、及びグルコース－６－リン酸塩デヒドロゲナーゼ、過酸化水素を用いて色素前駆体を酸化させる酵素、例えばＨＲＰ、ラクトペルオキシダーゼ、またはマイクロペルオキシダーゼとカップリングされた、ウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼなどの複素環式オキシダーゼ、ビオチン／アビジン、スピン標識、バクテリオファージ標識、安定した遊離ラジカルなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１７０】

ｉｉ．抗ＰＤ－Ｌ１抗体の検出のための方法及び組成物

１．ＥＬＩＳＡ

いくつかの実施形態において、抗ＰＤ－Ｌ１イディオタイプ抗体は、ＥＬＩＳＡアッセイにおいて使用される。本明細書に記載されるアッセイは、目的とする抗体のための捕捉試薬として抗ＰＤ－Ｌ１イディオタイプ抗体を利用するＥＬＩＳＡである。アッセイの第１のステップにおいて、目的とする抗体を含有する疑いがあるかまたはそれを含有する生体試料は、捕捉抗体が検出ステップにおいて検出され得るように、目的とする抗体を捕捉するか、または結合するように、捕捉（もしくはコーティング）抗体で接触され、インキュベートされる。検出ステップは、目的とする結合抗体のうちのいずれかで接触されるとき、存在する場合、目的とする抗体に結合する検出可能な抗体の使用を伴う。検出手段は、抗体における標識を検出するために使用され、したがって、目的とする抗体の存在または量が存在する。

【０１７１】

ある特定の実施形態において、アッセイは、以下のステップを利用する。

【０１７２】

第１のステップ

本明細書にアッセイの第１のステップにおいて、本明細書に定義される目的とする抗体を含有する疑いがあるかまたはそれを含有する生体試料は、目的とする抗体に対する抗イディオタイプ抗体である、固定化した捕捉（またはコーティング）試薬で接触され、インキュベートされる。いくつかの実施形態において、これらの抗イディオタイプ抗体は、モノクローナル抗体であり、任意の種からの抗体であり得る。いくつかの実施形態において、これらの抗イディオタイプ抗体は、齧歯動物抗体であり、さらなる実施形態において、マウスまたはラット抗体であり、さらなる実施形態において、マウス抗体である。

【０１７３】

様々な実施形態において、抗イディオタイプは、本明細書に開示される任意の抗イディオタイプ抗体である。ある特定の実施形態において、抗イディオタイプ抗体は、３つの重鎖超可変領域（ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、及びＨＶＲ－Ｈ３）ならびに３つの軽鎖超可変領域（ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、及びＨＶＲ－Ｌ３）を含む抗体であり、（ａ）ＨＶＲ－Ｈ１は、配列番号３５のアミノ酸配列を含み、（ｂ）ＨＶＲ－Ｈ２は、配列番号３６のアミノ酸配列を含み、（ｃ）ＨＶＲ－Ｈ３は、配列番号３４のアミノ酸配列を含み、（ｄ）ＨＶＲ－Ｌ１は、配列番号１４のアミノ酸配列を含み、（ｅ）ＨＶＲ－Ｌ２は、配列番号１５のアミノ酸配列を含み、（ｆ）ＨＶＲ－Ｌ３は、配列番号１６のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、抗イディオタイプ抗体は、配列番号５４の重鎖可変領域配列及び配列番号５３の軽鎖可変領域配列を含む。

【０１７４】
別の実施形態に従って、抗イディオタイプ抗体は、３つの重鎖超可変領域（ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、及びＨＶＲ－Ｈ３）ならびに３つの軽鎖超可変領域（ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、及びＨＶＲ－Ｌ３）を含む抗体であり、（ａ）ＨＶＲ－Ｈ１は、配列番号４３のアミノ酸配列を含み、（ｂ）ＨＶＲ－Ｈ２は、配列番号４４のアミノ酸配列を含み、（ｃ）ＨＶＲ－Ｈ３は、配列番号４２のアミノ酸配列を含み、（ｄ）ＨＶＲ－Ｌ１は、配列番号２０のアミノ酸配列を含み、（ｅ）ＨＶＲ－Ｌ２は、配列番号２１のアミノ酸配列を含み、（ｆ）ＨＶＲ－Ｌ３は、配列番号２２のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、抗イディオタイプ抗体は、配列番号５６の重鎖可変領域配列及び配列番号５５の軽鎖可変領域配列を含む。

【０１７５】
別の実施形態に従って、抗イディオタイプ抗体は、３つの重鎖超可変領域（ＨＶＲ－Ｈ１、ＨＶＲ－Ｈ２、及びＨＶＲ－Ｈ３）ならびに３つの軽鎖超可変領域（ＨＶＲ－Ｌ１、ＨＶＲ－Ｌ２、及びＨＶＲ－Ｌ３）を含む抗体であり、（ａ）ＨＶＲ－Ｈ１は、配列番号５１のアミノ酸配列を含み、（ｂ）ＨＶＲ－Ｈ２は、配列番号５２のアミノ酸配列を含み、（ｃ）ＨＶＲ－Ｈ３は、配列番号５０のアミノ酸配列を含み、（ｄ）ＨＶＲ－Ｌ１は、配列番号２６のアミノ酸配列を含み、（ｅ）ＨＶＲ－Ｌ２は、配列番号２７のアミノ酸配列を含み、（ｆ）ＨＶＲ－Ｌ３は、配列番号２８のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、抗イディオタイプ抗体は、配列番号５８の重鎖可変領域配列及び配列番号５７の軽鎖可変領域配列を含む。

【０１７６】
通常、固定化は、アッセイ手順前に、水に不溶なマトリクスもしくは表面への吸着（米国特許第３，７２０，７６０号）または非共有結合性もしくは共有結合性のカップリングにより（例えば、米国特許第３，６４５，８５２号またはＲｏｔｍａｎｓら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ，５７：８７－９８（１９８３）中に記載されるように、例えば、硝酸及び還元剤による支持体の事前の活性化を伴うまたは伴わない、グルタルアルデヒドまたはカルボジイミドの架橋結合を用いて）、あるいはその後、例えば、免疫沈降法などの方法により、捕捉試薬を不溶化することによって達成される。いくつかの実施形態において、捕捉抗体は、ビオチンにコンジュゲートされ、ストレプトアビジンでコーティングされたマイクロタイタープレートに結合している。他の実施形態において、捕捉抗体は、ＨｉｓタグまたはＧＳＴなどのタンパク質タグにコンジュゲートされ、好適な表面、例えば、ニッケルもしくは銅でコーティングされた表面またはグルタチオンでコーティングされた表面に結合している。

【０１７７】
固定化のために使用される固相は、例えば、表面、粒子、多孔質マトリックスなどの形態の支持体を含む、本質的に水不溶性であり、かつ免疫測定アッセイに有用な任意の不活性支持体または担体であり得る。一般に使用されている支持体の例としては、小シート、ＳＥＰＨＡＤＥＸ（登録商標）ゲル、ポリ塩化ビニル、プラスチックビーズ、及びポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレンなどから製造されたアッセイプレートまたは試験管、例えば、９６ウェルマイクロタイタープレート、ならびに濾紙などの粒子材料、アガロース、架橋デキストラン、及び他の多糖が挙げられる。あるいは、米国特許第３，９６９，２８７号、同第３，６９１，０１６号、同第４，１９５，１２８号、同第４，２４７，６４２号、同第４，２２９，５３７号、及び同第４，３３０，４４０号に記載される反応性水不溶性マトリックス、例えば、臭化シアン活性化炭水化物、及び反応性基質が、捕捉－試薬固定化に好適に用いられる。いくつかの実施形態において、固定化捕捉試薬は、マイクロタイタープレート上にコーティングされる。いくつかの実施形態において、使用される固相は、一度にいくつかの試料を分析するために使用され得るマルチウェルマイクロタイタープレート、例えば、ＮＵＮＣ　ＭＡＸＩＳＯＲＢ（商標）またはＩＭＭＵＬＯＮＴ（商標）として販売されるものなどのＭＩＣＲＯＴＥＳＴ（商標）またはＭＡＸＩＳＯＲＰ（商標）９６ウェルＥＬＩＳＡプレートである。

【０１７８】
固相は、非共有結合もしくは共有結合相互作用、または所望の場合、物理的結合によって結合し得る、上で定義された捕捉試薬でコーティングされる。結合技術には、米国特許第４，３７６，１１０号に記載されるもの及びそこに引用される参考文献が含まれる。共有結合の場合、プレートまたは他の固相が、室温で１時間等の当該技術分野で周知の条件下で、捕捉試薬と一緒に架橋剤とインキュベートされる。
【０１７９】
捕捉試薬を固相物質に結合させるために一般に使用された架橋結合剤には、例えば、１，１－ビス（ジアゾアセチル）－２－フェニルエタン、グルタルアルデヒド、Ｎ－ヒドロキシコハク酸イミドエステル、例えば、４－アジドサリチル酸とのエステル、３，３’－ジチオビス（スクシンイミジル－プロピオン酸塩）などのジスクシンイミジルエステルを含むホモ二官能性イミドエステル、及びビス－Ｎ－マレイミド－１，８－オクタンなどの二官能性マレイミドが含まれる。メチル－３－（（ｐ－アジドフェニル）－ジチオ）プロピオイミデート（ｐｒｏｐｉｏｉｍｉｄａｔｅ）などの誘導体化剤は、光の存在下で架橋を形成することが可能である、光励起性中間体を産出する。
【０１８０】
９６－ウェルプレートが利用される場合、それらは、典型的には、０．０５Ｍの炭酸ナトリウムなどの緩衝液中で、少なくとも約１０時間、インキュベーションにより希釈される、捕捉試薬の混合物でコーティングされ得る。いくつかの実施形態において、インキュベーションは、少なくとも一晩、約４～２０℃、または約４～８℃の温度で、約８～１２、約９～１０、または約９．６のｐＨである。さらに短いコーティング時間（１～２時間）が望ましい場合、ニトロセルロースフィルターの底面を有する９６ウェルプレート（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　ＭＵＬＴＩＳＣＲＥＥＮ（商標））を使用するか、または３７℃でコーティングすることができる。プレートは、アッセイ自体に先んじて長期間積み重ねてコーティングされ、次いで、アッセイが、手動で、半自動で、または自動で、例えば、ロボット工学を使用して、いくつかの試料で同時に行われ得る。
【０１８１】
次いで、コーティングされたプレートは、典型的には、結合部位に非特異的に結合して、それを飽和させる遮断剤で処理されて、遊離リガンドのプレートのウェル上の過剰部位への望ましくない結合を阻止する。この目的に適切な遮断剤の例としては、例えば、ゼラチン、ウシ血清アルブミン、卵アルブミン、カゼイン、及び脱脂乳が挙げられる。遮断処理は、典型的には、周囲温度の条件下で、約１～４時間または約１．５～３時間行われる。
【０１８２】
コーティング及び遮断後、適切に希釈された標準物質（目的とする精製した抗体）または分析される生物学的試料が固定化相に添加される。ある特定の実施形態において、希釈率は、約５～１５重量％、または約１０重量％である。この目的のために希釈に使用され得る緩衝液としては、（ａ）０．５％のＢＳＡ、０．０５％のＴＷＥＥＮ２０（商標）洗剤（Ｐ２０）、０．０５％のＰＲＯＣＬＩＮ（商標）３００抗生物質、５ｍＭのＥＤＴＡ、０．２５％の３－（（３－コールアミドプロピル）ジメチルアンモニオ）－１－プロパンスルホネート（ＣＨＡＰＳ）界面活性剤、０．２％のベーターガンマグロブリン、及び０．３５ＭのＮａＣｌを含有するリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）、（ｂ）０．５％のウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）、０．０５％のＰ２０、及び０．０５％のＰＲＯＣＬＩＮ（商標）３００を含有するＰＢＳ（ｐＨ７）、（ｃ）０．５％のＢＳＡ、０．０５％のＰ２０、０．０５％のＰＲＯＣＬＩＮ（商標）３００、５ｍＭのＥＤＴＡ、及び０．３５ＭのＮａＣｌを含有するＰＢＳ（ｐＨ６．３５）、（ｄ）０．５％のＢＳＡ、０．０５％のＰ２０、０．０５％のＰＲＯＣＬＩＮ（商標）３００、５ｍＭのＥＤＴＡ、０．２％のベーターガンマグロブリン、及び０．３５ＭのＮａＣｌを含有するＰＢＳ、ならびに（ｅ）０．５％のＢＳＡ、０．０５％のＰ２０、０．０５％のＰＲＯＣＬＩＮ（商標）３００、５ｍＭのＥＤＴＡ、０．２５％のＣＨＡＰＳ、及び０．３５ＭのＮａＣｌを含有するＰＢＳ

が挙げられる。ＰＲＯＣＬＩＮ（商標）３００は、保存剤として作用し、ＴＷＥＥＮ２０（商標）は、非特異的な結合を除去するために界面活性剤として作用する。

【０１８３】

用いられる捕捉試薬の量は、標準物と比較して良好なシグナルを与えるのには十分大きいが、試料中の最大の予測されたレベルの目的とする抗体と比較して過剰なモル濃度ではない。ある特定の実施形態において、添加される生体試料の量は、固定化された捕捉試薬が、試料の適切な希釈後の生体試料中に予測される目的とする遊離抗体の最大モル濃度の過剰なモル濃度である。この予測されたレベルは、主として、分析される特定の生体試料中の目的とする遊離抗体の濃度レベルと患者の臨床症状との間におけるいずれかの既知の相関に依存する。したがって、例えば、成人患者は、血清中にかなり高い最大の予想された濃度の目的とする遊離抗体を有し得るのに対し、子供は、与えられた用量に基づいて血清中により低いレベルの目的とする遊離抗体を有することが予想されるであろう。

【０１８４】

捕捉試薬の濃度は、生体試料の必要な希釈を考慮にいれた、目的とする抗体の目的とする濃度範囲によって決定され得る。捕捉試薬の最終濃度はまた、目的とする範囲にわたってアッセイ感度を最大にするために経験的に決定され得る。概して、モル過剰は、試料の適当な希釈の後、生体試料中の目的とする抗体の最大の予測されたモル濃度の適切に約１０倍未満である。

【０１８５】

試料及び固定化捕捉試薬のインキュベーションの条件は、アッセイ感度を最大にし、解離を最小限に抑えるように、かつ試料中に存在する目的とする任意の抗体が固定化捕捉試薬に結合することを確実にするように選択される。インキュベーションは、約０℃～約４０℃の範囲内にあり、例えば、室温でまたはほぼ室温で、完全に一定の温度で達成される。インキュベーションの時間は、概して、約１０時間を超えない。様々な実施形態において、インキュベーション時間は、捕捉試薬への目的とする抗体の結合を最大にするために、室温でまたはほぼ室温で、約０．５～３時間、または約１．５～３時間である。生物学的体液中のプロテアーゼが目的とする抗体を分解することを妨げるために、プロテアーゼ阻害剤が添加される場合、インキュベーションの持続時間は、さらに長くなり得る。

【０１８６】

この段階で、インキュベーション混合物のｐＨは、通常、約４～９．５の範囲内であるか、または約６～９、または約７～８の範囲内であるであろう。インキュベーション緩衝液のｐＨは、捕捉されるべき目的とする抗体への捕捉試薬の特異的な結合の有意なレベルを維持するために選択される。様々な緩衝液は、ホウ酸塩、リン酸塩、炭酸塩、ＴＲＩＳ－ＨＣｌ、またはＴＲＩＳ－リン酸塩、酢酸塩、バルビタールなどを含む、このステップ間、所望のｐＨを達成及び維持するために使用され得る。用いられた特定の緩衝液は、本発明にとって重要というわけではないが、個々のアッセイにおいてある緩衝液がその他の緩衝液より好ましくあり得る。

【０１８７】

任意の第２のステップ

アッセイ方法の任意の第２のステップにおいて、生体試料は、目的とする捕捉されなかった抗体を除去するために、固定化した捕捉試薬から分離される（例えば、洗浄することによって）。洗浄のために用いられる溶液は、概して、考慮すべき事項により決定されるｐＨを持つ緩衝液（「洗浄緩衝液」）であり、約６～９のｐＨ範囲を持つインキュベーションのステップのための上述の緩衝液である。洗浄は、３回以上行われ得る。洗浄の温度は、概して、冷蔵庫の温度から中程度の温度であり、アッセイの期間中維持される一定温度を有し、典型的には、約０～４０℃、または約４～３０℃である。例えば、洗浄緩衝液は、洗浄前に貯蔵庫内で４℃の氷中に置かれ得、プレート洗浄機がこのステップで利用され得る。架橋結合剤または他の好適な薬剤はまた、目的とする捕捉抗体が後のステップにおいてある程度解離することに懸念がある場合、結合したばかりの目的とする抗体が捕捉試薬に共有結合的に接着されることを可能にするために、この段階で添加されてもよい。

【０１８８】
第３のステップ
次のステップにおいて、存在する目的とする任意の結合抗体と固定化した捕捉試薬を、約２０～４０℃または約３６～３８℃の温度で、検出可能な抗体と接触させ、２つを接触するための正確な温度及び時間は、主に用いられる検出手段に応じて異なる。例えば、４－メチルウンベリフェリル－β－ガラクトシド（ＭＵＧ）、ストレプトアビジン－ＨＲＰ、またはストレプトアビジン－β－ガラクトシダーゼを、検出のための手段として使用するとき、接触は、シグナルを最大限に増幅するために、一晩（例えば、約１５～１７時間またはそれ以上）を行われ得る。検出可能な抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体であり得るが、好ましくは、検出可能な抗体は、バックグラウンドノイズを低減させるために、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態において、同じ抗イディオタイプ抗体は、アッセイにおいてコーティングまたは検出のために使用される。他の実施形態において、異なる抗イディオタイプ抗体は、コーティングまたは検出のために使用され得、これらは、バックグラウンドノイズを最小限にするために選択される。
【０１８９】
いくつかの実施形態において、検出可能な抗体は、ヒト抗体に結合する非ヒト種からの抗体である。いくつかの実施形態において、検出可能な抗体は、抗ｈｕＩｇＧ　Ｆｃ抗体である。いくつかの実施形態において、検出可能な抗体は、マウス抗ｈｕＩｇＧ　Ｆｃγ抗体である。いくつかの実施形態において、検出可能な抗体は、直接検出可能である。ある特定の実施形態において、検出可能な抗体は、ビオチン化される。このような場合、ビオチン化標識のための検出手段は、アビジンまたはストレプトアビジン－ＨＲＰであり得、検出手段の読み出しは、蛍光測定または比色測定であり得る。いくつかの実施形態において、抗体は、ＨＲＰにコンジュゲートされ、検出手段は、比色測定である。
【０１９０】
（上記のように）期待された遊離抗体の最大濃度に関して検出可能な抗体のモル過剰は、それを洗浄した後に、プレートに添加される。この抗体（直接的または間接的に検出可能である）は、あらゆる抗体を用いることができるが、モノクローナル抗体である。検出可能な抗体の親和性は、少量の目的とする遊離抗体を検出することができるのに十分高くなくてはならないが、目的とする抗体を捕捉試薬から引き出すほど高くない。
【０１９１】
第４のステップ
アッセイ方法の最終ステップにおいて、現在、捕捉試薬に結合している試料からの目的とするあらゆる遊離抗体のレベルは、検出可能な抗体のための検出手段を用いて測定される。生体試料が臨床患者からの生体試料である場合、測定ステップは、既知の量と比較した目的とする抗体のレベルを決定するために、上の３つのステップの結果として生じる反応物を標準曲線と比較することを含む。
【０１９２】
固定化捕捉試薬に添加される抗体は、直接標識されるか、または過剰な第１の抗体を洗い流した後に第１の抗体の動物種のＩｇＧに対して指向されたモル過剰の第２の標識抗体を添加することによって間接的に検出されるかのいずれかである。後者の間接アッセイでは、第１の抗体に対する標識された抗血清が試料に添加されて、標識抗体をインサイチュで産生する。
【０１９３】
第１の抗体または第２の抗体のいずれかに用いられる標識は、抗イディオタイプ抗体への目的とする遊離抗体の結合に干渉しない任意の検出可能な官能性である。
【０１９４】
好適な標識の例は、蛍光色素、化学発光及び放射性標識などの直接検出され得る部分、ならびに検出されるように反応されるかまたは誘導体化されなければならない酵素などの部分を含む、免疫アッセイで用いるために知られている多数の標識である。かかる標識の例としては、放射性同位体^{32}Ｐ、^{14}Ｃ、^{125}Ｉ、^{3}Ｈ、及び^{131}Ｉ、希土類キレ

ートまたはフルオレセイン及びその誘導体などのフルオロフォア、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルセリフェラーゼ（ｌｕｃｅｒｉｆｅｒａｓｅｓ）、例えば、ホタルルシフェラーゼ及び細菌ルシフェラーゼ（米国特許第４，７３７，４５６号）、ルシフェリン、２，３－ジヒドロフタラジンジオン、ＨＲＰ、アルカリホスファターゼ、β－ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、糖質オキシダーゼ、例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、及びグルコース－６－リン酸塩デヒドロゲナーゼ、過酸化水素を用いて色素前駆体を酸化させる酵素、例えばＨＲＰ、ラクトペルオキシダーゼ、またはマイクロペルオキシダーゼとカップリングされた、ウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼなどの複素環式オキシダーゼ、ビオチン（例えば、アビジン、ストレプトアビジン、ストレプトアビジン－ＨＲＰ、及びストレプトアビジン－β－ガラクトシダーゼによってＭＵＧで検出可能）、スピン標識、バクテリオファージ標識、安定した遊離ラジカルなどが挙げられる。

【０１９５】

これらの標識をタンパク質またはポリペプチドに共有結合させる従来の方法が利用可能である。例えば、カップリング剤、例えば、ジアルデヒド、カルボジイミド、ジマレイミド、ビス－イミデート、ビス－ジアゾ化ベンジジンなどを使用して、抗体を、上述の蛍光標識、化学発光標識、及び酵素標識でタグすることができる。例えば、米国特許第３，９４０，４７５号（蛍光定量法）及び米国特許第３，６４５，０９０号（酵素）、Ｈｕｎｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，１４４：９４５（１９６２）、Ｄａｖｉｄ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，１３：１０１４－１０２１（１９７４）、Ｐａｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ，４０：２１９－２３０（１９８１）、及びＮｙｇｒｅｎ，Ｊ．Ｈｉｓｔｏｃｈｅｍ．ａｎｄ Ｃｙｔｏｃｈｅｍ．，３０：４０７－４１２（１９８２）を参照されたい。

【０１９６】

酵素などのかかる標識の抗体へのコンジュゲーションは、免疫アッセイ技法の当業者にとって標準の操作手技である。例えば、Ｏ’Ｓｕｌｌｉｖａｎ ｅｔ ａｌ．“Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ ｏｆ Ｅｎｚｙｍｅ－ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ ｆｏｒ Ｕｓｅ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｅ Ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ，”ｉｎ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，ｅｄ．Ｊ．Ｊ．Ｌａｎｇｏｎｅ ａｎｄ Ｈ．Ｖａｎ Ｖｕｎａｋｉｓ，Ｖｏｌ．７３（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８１），ｐｐ．１４７－１６６を参照されたい。好適な市販の標識抗体もまた、使用され得る。

【０１９７】

最後に標識された抗体を添加した後、結合している抗体の量は、過剰な結合していない標識抗体を洗浄により除去し、その後、標識に適切な検出方法を用いて結合した標識の量を測定し、測定された量を生体試料中の目的とする抗体の量と相関させることによって決定される。例えば、酵素の場合、発現及び測定された色の量は、存在する目的とする抗体の量の直接測定値となるであろう。具体的には、ＨＲＰが標識である場合、色は、４５０ｎｍの読み出し波長及び６２０または６３０ｎｍの参照波長を用いて、基質ＴＭＤを用いて検出され得る。

【０１９８】

一例では、第１の標識されていない抗体に対して指向された酵素標識された第２の抗体が固定化相から洗浄された後、色または化学発光が、固定化捕捉試薬を酵素基質とインキュベートすることによって発現及び測定される。次いで、目的とする抗体の濃度は、並行して目的とする標準抗体によって生成された色または化学発光と比較することによって計算される。

【０１９９】

２．質量分析

いくつかの実施形態において、抗ＰＤ－Ｌ１イディオタイプ抗体は、抗ＰＤ－Ｌ１抗体のための質量分析アッセイにおいて使用される。本明細書に記載されるアッセイは、生体

試料からの抗ＰＤ－Ｌ１抗体の免疫親和性捕捉のための抗ＰＤ－Ｌ１イディオタイプ抗体を利用する。試料は、質量分光法によって抗ＰＤ－Ｌ１抗体の定量化の前に、クロマトグラフィーなどの分離技術を用いてさらに処理され得る。いくつかの実施形態において、特徴のあるペプチド断片は、タンパク質分解によって産生され、選択されるシグネチャーペプチドは、抗ＰＤ－Ｌ１抗体のための代理分析物として測定される。ある特定の実施形態において、代理ペプチドは、タンデム質量分光法（ＭＳ／ＭＳ）による検出によるＨＰＬＣを用いて定量化される。

【０２００】

ａ．生体試料の処理

抗ＰＤ－Ｌ１抗体は、ヒトなどの哺乳動物に投与されるか、または組織、細胞培養、血漿、もしくは血清から選択される生物学的起源と接触させる。血清及び血漿試料からの分析は、それらの高いプロテオームバックグラウンド、すなわち、多くのタンパク質及び他の分析物のため、問題があることが知られている。ある特定の期間後、投与から数分、数時間、数日後の範囲にわたって、抗ＰＤ－Ｌ１抗体またはその断片を含む生体試料が、回収される。生体試料は、シリンジまたはカニューレによって液体を抽出することを含む、任意の手段によって回収され得る。生体試料は、血清、血漿などの血液もしくは血液生成物、または目的とする抗体を含有する他の体液であり得る。

【０２０１】

生体試料は、製剤化すること、固定化すること、遠心分離、単離すること、消化すること、血液細胞凝固を誘発もしくは防止すること、加水分解すること、または精製することを含む、従来の手順によって分析試料を形成するために処理される。生体試料の処理は、不純物を除去し、試料の不均一性を低減させるのに役立ち、試料成分の分離、またはあいまいなデータ収集もしくは分析を妨げ得る。あるいは、または加えて、処理は、試料の取扱いを単純化し、分解から保護し、試料体積を最小限にするか、または質量分光分析において目的とする試料成分（分析物）について選択する。あるいは、または加えて、処理は、生体試料を、薬物代謝物または薬物動態効果を決定する際に目的とする、代謝産物、断片、または誘導体に変化させる。

【０２０２】

ｂ．処理した分析試料の捕捉

抗体は、投与した抗ＰＤ－Ｌ１抗体に対して特異的な固定した抗イディオタイプ抗体を有する免疫親和性ビーズに捕捉される。様々な実施形態において、抗イディオタイプは、本明細書に開示される任意の抗イディオタイプ抗体である。投与した抗ＰＤ－Ｌ１抗体に対して特異的な抗イディオタイプ抗体は、当該技術分野で知られている任意の好適な方法を用いて免疫親和性ビーズにコンジュゲートされ得る。いくつかの実施形態において、投与した抗ＰＤ－Ｌ１抗体に対して特異的な抗イディオタイプ抗体は、ビオチン化され、強力なビオチン－ストレプトアビジンの相互作用（$K_D = 10^{-15}$Ｍ）を通してストレプトアビジンでコーティングした常磁性ビーズに結合している。ストレプトアビジンでコーティングした常磁性ビーズを使用する理由には、（ｉ）強力なストレプトアビジン－ビオチンの相互作用（$K_D = 10^{-15}$Ｍ）、（ｉｉ）固定化したストレプトアビジン／ビオチン化した分析物は、証明された方法である、（ｉｉｉ）高い結合能力（無傷のタンパク質に対して十分な材料）、（ｉｖ）低い非特異的結合、（ｖ）質量分析に適合する溶媒による試料の溶出、（ｖｉ）ビーズからの良好な試料回収、ならびに（ｖｉｉ）使いやすさ及び自動化に適していることが含まれる。

【０２０３】

免疫親和性ビーズは、多孔質ポリマーモノリスを含み得、捕集リザーバと流体が流れるように連通しているフロースルーチャネルに設けられ得る。ビーズは、生物学的起源からの試料が、一端またはオリフィスに導入され、試料が他端またはオリフィスから溶出されるカラムまたは漏斗のようなフロースルー容器に収容され得る。免疫親和性ビーズは、それぞれが別個の捕集リザーバに連通している複数のフロースルー容器に分布され得る。容器及びリザーバは、１２×８の行列の９６マイクロタイターウェル形式、または自動化及

び結果の再現性のために２４×１６の行列の３８４マイクロタイターウェル形式に構成され得る。

【０２０４】

抗ＰＤ－Ｌ１抗体を受容した哺乳動物（生物学的起源）からの血漿または血清試料は、手作業のピペット操作または自動化されたロボット分配によってビーズに塗布する。

【０２０５】

ビーズは、ウェルまたは他の容器に設けられ、または試料が一端またはオリフィスに導入され、洗浄溶出物または溶出試料が他端またはオリフィスから溶出されるカラムまたは他のフロースルー装置に収容され得る。ビーズ結合抗イディオタイプ抗体に対して特異的な試料成分が結合可能である。ビーズを洗浄して非特異的タンパク質及び他の非特異的試料成分をすすぐ。結合抗体は、ビーズ上で、例えば、ＰＮＧａｓｅＦで脱グリコシル化され得る。結合した試料成分は、試料プレート中に溶出され得、分離されたものは容器またはウェルに収容される。次いで、溶出した試料は、手作業のピペット操作によりまたはロボット移送によって対処され、逆相クロマトグラフィーによって分離され得、分離された試料成分が質量分析計によって分析される。

【０２０６】

いくつかの実施形態において、生体試料は、プロテアーゼで消化され得る。特徴のあるペプチド断片は、タンパク質分解によって産生され、選択されるシグネチャーペプチドは、抗ＰＤ－Ｌ１抗体のための代理分析物として測定される。例示的な実施形態において、生体試料は、トリプシン消化で消化され得る。トリプシン消化では、試料は、ＤＴＴで還元され、ヨード酢酸ナトリウムでＳ－カルボキシメチル化され、次いで、トリプシンで消化され得る。消化された試料は、分離方法、例えば、逆相ＨＰＬＣ、例えば、Ｎｕｃｌｅｏｓｉｌ　Ｃ１８カラム、サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）、例えば、ＴＳＫ３０００ＳＷｘＬカラム、またはＴＳＫボロン酸カラムを使用するボロン酸アフィニティクロマトグラフィーによって分析され得る。

【０２０７】

ｃ．試料成分の分離

分析試料を形成するために、生体試料は、１つを超える試料成分の分離に影響を及ぼすように適用され得る。分離方法は、親和性、クロマトグラフィー、及び電気泳動方法を含む。親和性方法は、親和性クロマトグラフィー、吸着、及び固定化親和性マトリックスを含む。クロマトグラフィー法は、ＨＰＬＣ、疎水性相互作用（ＨＩＣ）、アニオン交換、カチオン交換、逆相、順相、イオン対逆相、薄層、キャピラリーフロー、及びサイズ排除を含む。電気泳動方法は、単一次元、スラブゲル、キャピラリー、ポリアクリルアミド、変性、天然、自由溶液、紙、２次元、等電点電気泳動、及び勾配電位を含む。他の分離方法は、透析、遠心分離、遠心沈降、浮選、沈降、免疫沈降、及びゲル濾過を含む。

【０２０８】

分離方法は、溶出時間、疎水性、親水性、泳動時間、割合、速度、クロマトグラフィー保持時間、溶解度、分子容積またはサイズ、正味荷電、荷電状態、イオン電荷、等電点、解離定数（ｐＫａ）、抗体親和性、電気泳動移動度、イオン化ポテンシャル、双極子モーメント、水素結合能、及び気相中におけるイオン移動度が含まれるが、これらに限定されない、１つ以上の物理化学的性質による生体試料の成分の分離をもたらし得る。

【０２０９】

質量分析計入口装置中へのキャピラリーフロー注入による低い流量により、質量検出の感度を高め、例えば、無傷なタンパク質及び抗体のような低濃度分析物及び高分子量種を検出し、特徴付けることができる。

【０２１０】

ｄ．分離した試料成分の質量分析

質量分光分析のための試料の調製は、概して、既知の技術に従って行われ得る。“Ｍｏｄｅｍ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ：Ｐｒａｃｔｉｃａｌ　Ａｓｐｅｃｔｓ”，Ｈｏｗａｒｄ，Ｇ．Ｃ．ａｎｄ　Ｂｒｏｗｎ，Ｗ．Ｅ．，Ｅｄｓ．（２００２）ＣＲＣ

Ｐｒｅｓｓ，Ｂｏｃａ　Ｒａｔｏｎ，Ｆｌｏｒｉｄａを参照されたい。

【０２１１】

本発明の方法は、生体試料から由来する抗体混合物の分析に適しており、成分を連続的にまたはバッチ形式で溶出し、または質量分析計によって直接検出される親和性またはクロマトグラフィーを含む１つ以上のプロセスにより、混合物の異なった化学成分が、最初に単離され、分離され、または部分的に分離される。断片化、脱アミド、糖化、酸化、部分的配列情報、例えばＮ末端及びＣ末端、二量体及び凝集状態を含む、抗体の様々な構造的特徴及び特性を、質量分光分析から解明することができる。生体試料中の１つ以上の化学成分は、投与された抗ＰＤ－Ｌ１抗体が既知の配列、構造、及び分子量のものであるため、その正確な質量の測定によって高度に特異的な形で特徴付けることができる。

【０２１２】

高質量精度、高感度、及び高解像度を可能にする様々な質量分光システムが当該技術分野で知られており、本発明の方法において用いることができる。かかる質量分光計の質量分析器としては、四重極型（Ｑ）、飛行時間型（ＴＯＦ）、イオントラップ、磁場型またはＦＴ－ＩＣＲまたはその組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。質量分析計のイオン源は、主として試料分子イオン、または疑似分子イオン、及びある特定の特徴付け可能な断片イオンを生じなければならない。かかるイオン源の例は、大気圧イオン化源、例えば、エレクトロスプレーイオン化（ＥＳＩ）及び大気圧化学イオン化（ＡＰＣＩ）及びマトリックス支援レーザー脱離イオン化（ＭＡＬＤＩ）を含む。ＥＳＩ及びＭＡＬＤＩは、質量分光分析に対してタンパク質をイオン化するための二種の最も一般的に用いられている方法である。ＥＳＩ及びＡＰＣＩは、ＬＣ／ＭＳによる小分子の分析のために最も一般的に使用されるイオン源技術である（Ｌｅｅ，Ｍ．“ＬＣ／ＭＳ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ　ｉｎ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ”（２００２）Ｊ．Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ）。

【０２１３】

表面増強レーザー脱離イオン化（ＳＥＬＤＩ）は、高スループットの質量分析を可能にする表面ベースのイオン化技術の一例である（米国特許第６，０２０，２０８号）。典型的には、ＳＥＬＤＩは、タンパク質及び他の生体分子の複雑な混合物を分析するために使用される。ＳＥＬＤＩは、溶液中の例えばタンパク質のような分析物と相互作用する「タンパク質チップ」などの化学的に反応性の表面を用いる。かかる表面は、分析物と選択的に相互作用し、それらをその上に固定化する。したがって、本発明の分析物は、チップ上で部分的に精製され、次いで、質量分析計で迅速に分析され得る。基質表面上の異なった部位に複数の反応性部分を提供することによって、スループットが増大され得る。

【０２１４】

機能的システムでは、質量分析計は、目的とする化学種の質量を、その正確なまたは計算された質量の２０ｐｐｍ以内まで、典型的にはその正確なまたは計算された質量の５ｐｐｍ以下まで精確に測定するであろう。市販の質量分析計は、質量スペクトルシグナル強度またはピーク面積が定量的に代表することを確実にするために混合物中の複数の成分について十分なスペクトルを獲得することを可能にする頻度で同時に全質量スペクトルをサンプリングし、記録することができる。これはまた、全ての質量に対して観察される溶出時間が質量分析計によって変更または歪められないことを確実にし、定量的測定値が大量の一過性シグナルを測定する必要性によって損なわれないことを確実にするのに役立つであろう。

【０２１５】

分析的変動は、標的分析物の物理化学的特性と類似の物理化学的特性を有する内部標準（ＩＳ）の使用によって修正され得る。（Ｍｅｓｍｉｎ　ｅｔ　ａｌ．（２０１１）Ｂｉｏａｎａｌｙｓｉｓ　３：４７７－４８０）。いくつかの実施形態において、シグネチャーペプチドは、抗ＰＤ－Ｌ１抗体のための代理分析物として測定される場合、シグネチャーペプチドに対応する安定同位体標識化（ＳＩＬ）ペプチドは、内部標準として使用され得る。（Ｈａｇｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．（２００８）　Ａｎａｌ．Ｃｈｅｍ．８０：１２９

０－１２９６、Ｍｅｓｍｉｎ ｅｔ ａｌ．（２０１０）Ｒａｐｉｄ Ｃｏｍｍｕｎ．Ｍａｓｓ Ｓｐｅｃｔｒｏｍ．２４：２８７５－２８８４）。

【０２１６】

３．エレクトロスプレーイオン化質量分析（ＥＳＩ）

高感度が、増加した分析物イオン化効率のために低流量で達成される（Ｇａｌｅ ｅｔ ａｌ（１９９３）Ｒａｐｉｄ Ｃｏｍｍｕｎ．Ｍａｓｓ Ｓｐｅｃｔｒｏｍ．７：１０１７）。したがって、分範囲当たりナノリットルの流量で試料含有液体のエレクトロスプレー注入を実施することによって、適切な検量後に正確な定量がもたらされ、質量分光分析と併用される場合、液中に含まれる分析物に対して高感度がもたらされる。高選択性及び感度をもたらし、ＭＳに対する前工程としての正確な定量分析をもたらす小型化され、統合されたマイクロカラム及び親和性クロマトグラフィー吸着剤を有するマイクロカラムアレイを含むシステム及び装置が報告されている（米国特許第６，８１１，６８９号、米国特許第６，０２０，２０８号、米国特許第６，５７９，７１９号）。

【０２１７】

抗体などの比較的高分子量の化合物の質量は、ほとんどの質量分析計によって容易に決定される質量電荷比（ｍ／ｚ）（２０００～３０００の典型的なｍ／ｚ範囲）で検出され得る。エレクトロスプレーイオン化質量分析ＥＳＩ－ＭＳは、具体的には、荷電、極性、または塩基性化合物に、また多重に荷電した化合物を優れた検出限界で分析するために適している。したがって、ＥＳＩは、大きな生体分子、例えば、１５０，０００以上の分子量（ＭＷ）の抗体及び抗体－薬物コンジュゲートの検出及び特徴付けを可能にする。高分子量イオンを用いると、一連の多重に荷電した分子イオンが典型的には観察される。陽イオンの分子量は、測定されたｍ／ｚ比に電荷数（ｎ）を掛け、カチオン質量（Ｃ＋）にイオン上の電荷数（ｎ）を掛けたものを引くことによって決定される。

【０２１８】

ＥＳＩ法は、インターフェースレンズ電位を制御することによって断片化の有無を制御することを可能にする。エレクトロスプレーイオン化（ＥＳＩ）は、液体分離方法（前工程）ならびに質量分光検出法（後工程）と適合性がある（“Ｅｌｅｃｔｒｏｓｐｒａｙ Ｉｏｎｉｚａｔｉｏｎ Ｍａｓｓ Ｓｐｅｃｔｒｏｍｅｔｒｙ：Ｆｕｎｄａｍｅｎｔａｌｓ，Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔａｔｉｏｎ，ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ”，Ｃｏｌｅ，Ｒ．Ｂ．，Ｅｄ．（１９９７）Ｗｉｌｅｙ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ。

【０２１９】

ＥＳＩ－ＭＳデータは、多数のスキャンを併せて平均化し、データを平滑化して良好なピーク強度及び形状をもたらすことによって獲得され得る。低分子量化合物では、観察される最も多いピークは、しばしば、陽イオンモードでは［Ｍ＋Ｈ］＋イオン、陰イオンモードでは［Ｍ－Ｈ］－である。二重及び三重に荷電したイオンならびに二量体もまた、観察され得る。二重に荷電した陽イオンは、質量（ＭＷ＋２Ｃ＋）／２に観察され、ＭＷは分子量であり、Ｃ＋は、$Ｈ^{+}$、$Ｎａ^{+}$、または$ＮＨ４^{+}$などのイオン化陽イオンである。非常に低分子量の化合物を除いて、検出されるイオンは、多重に荷電されるであろう。ＥＳＩのソフトな（低イオン化電位）条件のため、典型的には分子イオンのみが観察される。ＥＳＩスペクトルは、イオンが有する様々な電荷数のため、質量対電荷比が異なるいくつかの分子イオンピークを有し得る。

【０２２０】

試料、例えばＡＤＣまたは他の生体分子の希釈溶液は、ＥＳＩ－ＭＳ分析のための皮下注射針を通してゆっくりとポンプ移送され得る。試料は、フロー注入またはＬＣ／ＭＳを介して導入され得る。典型的な流量は、毎分１マイクロリットル（μｌ）未満から毎分約１ミリリットル（ｍｌ）までの範囲である。ＥＳＩは、さもないと蒸発またはイオン化が困難な大きな生体分子に特に適している。針は、高電圧に保たれ、針端部の強電場が噴霧された溶液を荷電し、荷電した液滴を生じる。荷電した液滴は、水を蒸発させ、小オリフィスを通じて真空チャンバー中に移動する分子イオンを最終的に生じる。溶媒蒸発の過程中に、非共有的に結合した複合体が溶液から気相に移動される。（Ｈｕら（１９９４））

。

【０２２１】

穏やかな脱溶媒和条件は、概して、無傷な気相複合体を維持するために必要とされる。イオンが完全に脱溶媒和されることを確実にするためにオリフィスを加熱してもよい。あるＭＳシステムは、向流の加熱ガスを用い得る。荷電した液滴は、皮下注射針から放出され、真空チャンバーに入る前に溶媒を蒸発させるにつれて収縮する。熱及びガス流は、脱溶媒和を促進するために使用され得る。ＥＳＩ測定に対して必要とされる試料の量は、小さなキャピラリーエレクトロスプレーエミッター、チップの使用により液の流れを減少させることによって低減させることができ、ナノエレクトロスプレーとして知られているプロセスである。ナノエレクトロスプレー法は、１μｌの試料に対して約１０～３０分間、一定のシグナルを産生し得る低い流量は、イオン効率を増加させ、イオン抑制を低減させることが示されている。ナノエレクトロスプレー法は、しばしばＭＳ／ＭＳタンパク質研究に使用される（Ｋｏｍｅｒ ｅｔ ａｌ（１９９６）Ｊ．Ａｍ．Ｓｏｃ．Ｍａｓｓ Ｓｐｅｃｔｒｏｍ．７：１５０－１５６、Ｍａｎｎ，Ｍ．ａｎｄ Ｗｉｌｍ，Ｍ．（１９９６）Ａｎａｌ．Ｃｈｅｍ．６８：１－８。

【０２２２】

タンパク質のＥＳＩは、分子量が増加するにつれて増加する傾向にある電荷数を有する多重に荷電したイオンを産生する。与えられたイオン種上の電荷数は、例えば、（ｉ）一電荷が異なる２つの荷電状態を比較し、連立方程式を解くこと、（ｉｉ）同じ電荷を有するが異なる付加質量を有する種を探すこと、及び（ｉｉｉ）分離された同位体クラスターに対して質量対電荷比を調べることのような方法によって決定することができる。ＥＳＩ及びＥＳＩ－ＭＳの方法ならびにこれらの方法を実施するために必要とされるパラメータは、当該技術分野でよく知られている。エレクトロスプレーイオン化法の穏やかさは、無傷な抗体コンジュゲートを質量分析法によって直接検出することを可能にする。

【０２２３】

一実施形態において、タンパク質、抗体、抗体断片、または抗体コンジュゲート（大きな分子）のＱ１質量スペクトルが、方法の一部として実施される。大きな分子の適切な質のＱ１質量スペクトルを得ることができる。タンパク質エンベロープがシフトする可能性があるので、クロマトグラフィーに使用される全ての溶媒が新鮮にされ、スペクトルエンベロープを観察された範囲に位置付けるために溶出溶媒に酸が加えられる。１００，０００超の質量単位のタンパク質には、ギ酸のような酸を、溶出溶媒、例えば溶媒Ａ（水）とＢ（アセトニトリル）の両方の溶媒に対して、約０．１％（体積）で使用することができる。より強い酸、例えば、トリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）は、１００，０００未満の質量単位を有するタンパク質に対してＡ及びＢの溶媒に対して０．０５％（体積）のＴＦＡで使用することができる。ギ酸の量が減少すると、無傷なグリコシル化抗体、トラスツズマブがより多くの電荷を拾い上げ、エンベロープをさらに左に、観察された範囲のｍ／ｚ（１８００～３０００ｍ／ｚ）にシフトさせる。クラスター分離（ＤＰ）電位が約３０～１２０Ｖから約７０～１９０Ｖまで増加すると、抗体上の電荷がさらになお増加する。したがって、印加される電圧、溶媒組成、及びイオン対形成剤は、考慮し、調節すべき因子である。クラスター分離（ＤＰ）を増加（勾配付け）させて、最良の電荷イオン範囲を選択するのに十分な分解能を獲得することができる。線形性を、広範囲のｍ／ｚにわたって得ることができる。抗体の脱グリコシル化は、無傷な抗体または重鎖、断片またはＡＤＣの定量を支援する。グリコシル化は、イオン化効率を低下させるのに貢献し、よって感度を減少させる。抗体または抗体断片コンジュゲートを定量化するとき、抗体の脱グリコシル化が質量スペクトルの不均一性を低減させ、感度を増大させ、よって分析を単純化し得る。

【０２２４】

逆重畳積分表を使用して、定量される各種に対して正確な質量対電荷比（ｍ／ｚ）を決定する。逆重畳積分ソフトウェアアプリケーション、例えば、Ａｎａｌｙｓｔ．ＴＭ．ＱＳ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ，Ｆｏｓｔｅｒ Ｃｉｔｙ，Ｃａｌｉｆ．）は市販されており、及び／または質量分析器とともに提供される。逆重畳積分ソフトウェ

アは、概してユーザに逆重畳積分質量の表ならびにこれらの質量を計算するために使用されるｍ／ｚイオンの副表を提供する。

【０２２５】

ｉｉｉ．Ｍ－タンパク質検出

多発性骨髄腫（ＭＭ）は、骨髄中の形質細胞のがんである。多発性骨髄腫は、Ｍ－タンパク質及び他の免疫グロブリン（抗体）及びβ－２－ミクログロブリンが挙げられるが、これらに限定されない、血液、尿、及び臓器において高レベルのタンパク質を引き起こす。パラタンパク質としても知られている、モノクローナルタンパク質に対して短い、Ｍ－タンパク質は、骨髄腫細胞によって産生され、多発性骨髄腫に罹患しているほとんど全ての患者の血液または尿中に見出され得る。

【０２２６】

レナリドマイド（Ｒｅｖｌｉｍｉｄ（登録商標））などの免疫調節薬物は、新たに診断された患者、化学療法または移植に効果がなかった進行性疾患患者及び再発または難治性多発性骨髄腫患者の骨髄腫を治療するための重要な選択肢として知られるようになっている。別の強力な免疫調節薬は、４－（アミノ）－２－（２，６－ジオキソ（３－ピペリジル））－イソインドリン－１，３－ジオン（ポマリドマイド、Ａｃｔｉｍｉｄ（登録商標））である。場合によっては、かかる薬剤は、標準的な化学療法剤と組み合わせて使用される。例えば、レナリドミドとデキサメタゾンの併用は、前治療を少なくとも１回受けた多発性骨髄腫患者の治療に対して最近認められている。ポマリドミドも、デキサメタゾンと併せて投与することができる。他の治療と併せて、アテゾリズマブ（Ｔｅｃｅｎｔｒｉｑ（登録商標））は、多発性骨髄腫の療法として複数の臨床試験において試験されている。

【０２２７】

国際骨髄腫ワーキンググループ（ＩＭＷＧ）は、血清タンパク質電気泳動（ＳＰＥ）、及び免疫固定電気泳動（ＩＦＥ）、骨髄形質細胞の割合、ならびに遊離軽鎖（ＦＬＣ）に比率による血清／尿Ｍ－タンパク質レベルの変化を含む、ＭＭにおける治療に対する臨床反応に対する基準を構築している。ＩＭＷＧ基準による完全奏功（ＣＲ）を有すると分類される患者のために、血清及び尿は、ＩＦＥ及びＳＰＥによって判定されるように、Ｍ－タンパク質に対して陰性でなければならず、骨髄形質細胞は、５％未満でなければならない。ＭＭの治療は、治療的モノクローナル抗体の導入とともに進化している。ＳＰＥ及びＩＦＥは、それぞれ、定量化し、免疫グロブリンのクローナル性質を特徴付けるために使用されるため、これらのアッセイは、治療中に使用されるモノクローナル抗体による干渉に供される。本発明の抗イディオタイプ抗体は、Ｍタンパク質を検出するために臨床アッセイ中、生体試料中の抗ＰＤ－Ｌ１抗体をシフトするために使用することができる。

【０２２８】

免疫固定電気泳動（ＩＦＥ）

免疫固定電気泳動（ＩＦＥ）は、当該技術分野で知らされており、第１の段階においてアガロースゲルタンパク質電気泳動、及び第２の段階において免疫沈降を用いた２つの段階手順である。分析物は、任意の生体試料であり得る。好ましい実施形態において、分析物は、血清、尿、または脳脊髄液である。一実施形態において、ＩＦＥは、（ａ）アガロースゲル上の電気泳動によってタンパク質を分離するステップと、（ｂ）電気泳動したタンパク質の免疫固定（免疫沈降）を行うステップであって、適切な電気泳動の泳動トラックは、個々の抗血清とオーバーレイであり、抗血清はゲルに拡散し、存在するとき、対応する抗原を沈殿させ、参照トラックのタンパク質は、固定剤で固定させる、免疫固定（免疫沈降）を行うステップと、（ｃ）ブロッティング及び洗浄によって沈殿されていない可溶性タンパク質をゲルから除去するステップであって、抗原－抗体複合体の沈降素は、ゲルマトリックス内に閉じ込められる、除去するステップと、（ｄ）染料によって沈殿したタンパク質を可視化するステップと、を含む。いくつかの実施形態において、免疫固定電気泳動プロセスは、（ａ）電気泳動ゲル上の少なくとも２つの適用領域に試料を適用することと、（ｂ）ゲルを電気泳動させることと、（ｃ）電気泳動したゲル上にテンプレート

を整列させることであってテンプレートは、各電気泳動した領域に対応するテンプレートスロットを有する、整列させることと、（ｄ）原位置でタンパク質を固定することができる組成物を少なくとも１つのテンプレートスロットに適用し、少なくとも１つの残りのテンプレートスロットに一方のタンパク質と反応させることができる抗血清を適用することと、（ｅ）ステップ（ｄ）の結果として得られた生成物をインキュベートすることと、（ｆ）テンプレートを、インキュベートした電気泳動ゲルから除去することと、（ｇ）ステップ（ｆ）のインキュベートした電気泳動ゲルを洗浄することと、（ｈ）ステップ（ｇ）の洗浄したゲルを乾燥させることと、（ｉ）ステップ（ｈ）の乾燥させたゲルを染色させることと、（ｊ）ステップ（ｉ）の染色したゲルを脱色することと、（ｋ）ステップ（ｊ）の脱色したゲルを乾燥させることと、（ｌ）ステップ（ｋ）の乾燥させたゲルを分析することと、を含む。

【０２２９】

いくつかの実施形態において、方法は、生体試料中の抗ＰＤ－Ｌ１抗体を検出するために使用される。いくつかの実施形態において、本方法は、（ａ）生体試料を、抗イディオタイプ抗体を抗ＰＤ－Ｌ１抗体に結合し、複合体を形成することを可能にする条件下で、本明細書に記載される抗イディオタイプ抗体または組成物と接触させることと、（ｂ）電気泳動ゲルを充填し、免疫固定電気泳動によって、抗イディオタイプ抗体と接触している生体試料中のタンパク質の泳動を抗イディオタイプ抗体と接触していない生体試料と比較することと、を含み、抗イディオタイプ抗体と接触させる試料と、抗イディオタイプ抗体と接触していない試料との間のバンドの泳動の違いは、生体試料中の抗ＰＤ－Ｌ１抗体の存在を示す。

【０２３０】

いくつかの実施形態において、本方法は、生体試料中のＭ－タンパク質を検出するために使用される。いくつかの実施形態において、本方法は、（ａ）生体試料を、抗イディオタイプ抗体を抗ＰＤ－Ｌ１抗体に結合し、複合体を形成することを可能にする条件下で、本明細書に記載される抗イディオタイプ抗体または組成物と接触させることと、（ｂ）電気泳動ゲルを充填し、免疫固定電気泳動によって、抗イディオタイプ抗体と接触している生体試料中のタンパク質の泳動を抗イディオタイプ抗体と接触していない生体試料と比較することを含む。いくつかの実施形態において、抗イディオタイプ抗体と接触している試料及び抗イディオタイプ抗体と接触していない試料中のバンドの泳動間の違いがない場合、Ｍ－タンパク質が検出される。いくつかの実施形態において、抗イディオタイプ抗体と接触している試料及び抗イディオタイプ抗体と接触していない試料中のバンドの泳動において部分的シフトがある場合、Ｍ－タンパク質が検出される。いくつかの実施形態において、抗イディオタイプ抗体と接触している試料及び抗イディオタイプ抗体と接触していない試料中のバンドの泳動間の違いがある場合、Ｍ－タンパク質が検出されない。

【０２３１】

会社の中には、これらのステップのうちの１つ以上を確立する自動化選択を提供するものがある。アッセイは、免疫固定電気泳動アッセイを商品化する会社によって提供される説明書に従って行われ得る。例えば、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｉｌｅｘｍｅｄｉｃａｌ．ｃｏｍ／ｆｉｌｅｓ／Ｓｅｂｉａ％２０ｉｎｓｅｒｔｓ／ＩＦ＿Ｓｔａｎｄａｒｄ＿ｍａｓｋ＿Ｈｙｄｒａｓｉｓ．ｐｄｆに記載されるように、アッセイが行われ得る。

【０２３２】

ＩＩＩ．キット

本発明のアッセイ方法は、キットの形態で提供され得る。一実施形態において、このようなキットは、抗イディオタイプ抗体または本明細書に記載される抗イディオタイプ抗体を含む組成物を含む。いくつかの実施形態において、このようなキットは、目的とする抗体に対する抗イディオタイプ抗体、目的とする抗体に結合する検出可能な（標識もしくは非標識）抗体からなる捕捉試薬、及びこれらの試薬を用いたアッセイ方法をいかに実行するかについての指示書の基本的要素を含むパッケージ化された組み合わせである。これらの基本要素は、上文に定義される。

【０２３３】
キットは、捕捉試薬のための固体支持体をさらに含み得、これは、別個の要素として提供され得るか、または捕捉試薬は、既に固定化される。
【０２３４】
したがって、キット中の捕捉抗体は、固体支持体上に固定化され得るか、またはそれらはキットに含まれるか、またはキットとは別個に提供されるような支持体上に固定化され得る。いくつかの実施形態において、捕捉試薬は、固体材料（例えば、マイクロタイタープレート、ビーズ、またはコーム）上にコーティングされるか、またはそれに接着されている。検出可能な抗体は、直接検出される標識抗体または異なる種で育てられる非標識抗体に対する標識抗体によって検出される非標識抗体であり得る。標識が酵素である場合、キットは、通常、酵素によって必要とされる基質及び補因子を含み、標識がフルオロフォアである場合、検出可能な発色団を提供する染料前駆体であり、標識がビオチンである場合、アビジン、例えば、アビジン、ストレプトアビジン、またはＭＵＧを用いてＨＲＰもしくはβ－ガラクトシダーゼにコンジュゲートされたストレプトアビジン。
【０２３５】
様々な実施形態において、抗イディオタイプ抗体は、本明細書に開示される抗イディオタイプ抗体のうちのいずれかの１つ以上である。いくつかの実施形態において、抗イディオタイプ抗体は、（ａ）配列番号５４の重鎖可変領域配列及び配列番号５３の軽鎖可変領域配列を含む抗イディオタイプ抗体、（ｂ）配列番号５６の重鎖可変領域配列及び配列番号５５の軽鎖可変領域配列を含む抗イディオタイプ抗体、（ｃ）配列番号５８の重鎖可変領域配列及び配列番号５７の軽鎖可変領域配列を含む抗イディオタイプ抗体、ならびに（ｄ）これらの組み合わせから選択される。
【０２３６】
キットはまた、典型的には、標準物として目的とする抗体、ならびに安定剤、洗浄及びインキュベーション緩衝液などの他の添加剤を含有する。
【０２３７】
キットの成分は、所定の比率で提供され、様々な試薬の相対量を適切に変化させて、アッセイの感受性を実質的に最大限にする試薬の溶液中の濃度を提供するであろう。特に、試薬は、試験される試料と組み合わせるために、溶解時に適切な濃度を有する試薬溶液を提供する賦形剤を含む、乾燥粉末、通常、凍結乾燥された乾燥粉末として提供され得る。
【０２３８】
様々な実施形態において、本明細書に記載される抗イディオタイプ抗体を含むキットは、本明細書に記載される方法において（例えば、Ｍ－タンパク質を検出する方法において）用いられる。いくつかの実施形態において、キットは、Ｍ－タンパク質を検出する方法において用いられるコームにコーティングされたまたは結合された抗イディオタイプ抗体をさらに含む。
【実施例】
【０２３９】
本発明は、以下の実施例を参照することによってより完全に理解されるだろう。しかしながら、それらは、本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。本明細書に記載される実施例及び実施形態が例証のみを目的とするものであり、それを考慮した様々な修正または変更が当業者に示唆され、本出願の趣旨及び範囲ならびに添付の特許請求の範囲内に含まれるべきであることが理解される。
【０２４０】
実施例１．抗ＰＤ－Ｌ１抗体アテゾリズマブに対する抗イディオタイプ抗体の生成及び特徴付け
ハイブリドーマの生成。
５つのＢａｌｂ／ｃマウス（Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ，Ｉｎｃ．，Ｗｉｌｍｉｎｇｔｏｎ，ＭＡ，ＵＳＡ）に、代謝可能なスクアレン、Ｔｗｅｅｎ　８０、トレハロース６，６－ジミコレート、及びモ

ノホスホリル脂質Ａ（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ，ＵＳＡから得られた全ての成分）を含有するアジュバントにおいて抗ＰＤＬ１抗体アテゾリズマブで、各後足蹠に、３～４日の間隔で、腹腔内に過免疫した。１１回追加免疫した後、血清力価を、抗ＰＤＬ１抗体に対して陽性血清力価を有するマウスを特定するために、標準酵素結合免疫吸着法（ＥＬＩＳＡ）によって評価した。脾臓及び膝窩リンパ節からのＢ細胞を、電気融合（Ｈｙｂｒｉｍｕｎｅ－Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ　Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍ；Ｈａｒｖａｒｄ　Ａｐｐａｒａｔｕｓ，Ｉｎｃ．，Ｈｏｌｌｉｓｔｏｎ，ＭＡ，ＵＳＡ）によって、マウス骨髄腫細胞（Ｘ６３．Ａｇ８．６５３またはＰ３Ｘ６３Ａｇ．Ｕｌ；Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ，ＵＳＡ）で融合させた。１０～１４日後、ハイブリドーマ上清を収集し、ＥＬＩＳＡによってＣＤＲ特異的抗体産生に関してスクリーニングした。

抗体クローニング及び配列。

【０２４１】

組換え抗体産生のためのハイブリドーマ細胞の抗体配列をクローンアウトするために、培養したハイブリドーマ細胞から単離されたＲＮＡ全体は、抗体可変領域増幅のためにＰＣＲテンプレートであるｃＤＮＡを生成するために使用された。ＰＣＲのために使用されたオリゴは、マウスＶ－遺伝子及びＪ－遺伝子生殖細胞系列配列に基づいている。哺乳動物発現ベクターにＰＣＲ生成物を直接サブクローニングするために、隣接ベクター配列は、それぞれ、順方向プライマー及び逆方向プライマーの５’－及び３’－末端に添付された。重鎖及び軽鎖の可変領域は、プールした生殖細胞系列オリゴで別個に増幅され、ＰＣＲ生成物を、ＤＮＡゲル上に可視化して、予想されたサイズ（重鎖においては４００ｂｐｓ及び軽鎖においては３５０ｂｐｓ）で単一バンドを確認した。

【０２４２】

精製した重鎖及び軽鎖ＰＣＲ生成物を、それぞれ、Ｉｎ－Ｆｕｓｉｏｎ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）キットを用いてｐＲＫ５Ｐ－マウスＩｇＧ２ａ及びｐＲＫ５Ｐ－マウスカッパベクターにサブクローニングした。ライゲーション生成物の形質転換後、いくつかの単一コロニーを、ＤＮＡ配列シークエンシングのために選択した。ＤＮＡ配列を、ＩＭＧＴ生殖細胞系列データベースに整列させ、コンセンサス配列を有するクローンを選択し、タンパク質発現のために拡大した。

【０２４３】

組換え抗体配列を確認するために、重鎖及び軽鎖プラスミドを、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞に一過的にコトランスフェクトした。精製した組換えＩｇＧを、特徴付け、ハイブリドーマ培養物から単離されたＩｇＧと結合活性及び親和性を比較した。

【０２４４】

モノクローナル抗体１０５Ｄ１１、４３Ｂ５、及び４８Ｃ１における重鎖及び軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を、図１及び２に示されるように決定した。

【０２４５】

ＢＩＡｃｏｒｅによるアテゾリズマブへの抗イディオタイプ抗体の結合の特徴付け

抗ＰＤＬ１　抗ＩＤ抗体の結合親和性は、ＢＩＡｃｏｒｅ（商標）－Ｔ２０００装置を用いて表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）によって測定された。抗イディオタイプ抗体は、約２００の反応単位（ＲＵ）を達成するために、ＣＭ５バイオセンサチップ上にコーティングされた抗マウスＦｃ抗体によって捕捉された。動態測定のために、５００ｎＭの抗ＰＤＬ１　Ｆａｂまたはフレームワーク対照Ｆａｂ（ＹＷ１６７Ｂ．４３）（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｓｏｕｔｈ　Ｓａｎ　Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，ＣＡ）は、２５℃、３０μｌ／分の流速で、ＨＢＳ－Ｐ＋緩衝液（０．１ＭのＨＥＰＥＳ、１．５ＭのＮａＣｌ、０．５％の界面活性剤Ｐ２０－ＧＥ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅ）中に注射された。会合速度（k_a）及び解離速度（k_d）は、単純な１対１Ｌａｎｇｍｕｉｒ結合モデル（ＢＩＡｃｏｒｅ評価ソフトウェアバージョン３．２）を使用して算出された。平衡解離定数（K_D）を、比率k_{off}/k_{on}として計算した。表２を参照されたい。図３～５も参照されたい。

表２．アテゾリズマブへの抗イディオタイプ抗体の結合動態

抗体	k_a　１／（１／Ｍｓ）	k_d　１／（１／ｓ）	K_D（Ｍ）
１０５Ｄ１１	２．７９Ｅ＋０５	４．５０Ｅ－０３	１．６５Ｅ－０８
４３Ｂ５	９．５０Ｅ＋０４	８．６２Ｅ－０３	９．０７Ｅ－０８
４８Ｃ１	４．２１Ｅ＋０５	９．７７Ｅ－０４	２．３１Ｅ－０９

【０２４６】

実施例２．免疫固定電気泳動アッセイで用いるための抗イディオタイプ抗体のスクリーニング

アテゾリズマブに対する抗イディオタイプ（抗ＩＤ）抗体のスクリーニングを、Ｓｅｂｉａ　ＩＦＥプラットフォームにおいて実行して、アテゾリズマブに結合し、Ｓｅｂｉａ　ＩＦＥプラットフォーム上にきれいな「ゲルシフト」をもたらす抗ＩＤ抗体を特定した。図６を参照されたい。

【０２４７】

簡潔には、試料は、ゲル電気泳動で用いるための血清の取り扱い、保存、及び調製のための標準的な実験手順に従って設定した。ＨＹＤＲＡＳＹＳ装置を、製造業者のガイドラインに従って設定した。泳動プロトコル及びゲル処理の設定を、製造業者によって特定されたプロトコルに従って行った。

【０２４８】

アテゾリズマブ（１５００μｇ／ｍＬ）を、ＰＢＳ中に再懸濁し、それぞれの抗ＩＤ抗体または偽対照（ＰＢＳのみ）で、振動プラットフォーム上で室温で２時間予めインキュベートした。Ｍａｘｉｋｉｔ　Ｈｙｄｒａｇｅｌ　４１ＦまたはＨｙｄｒａｓｙｓ　２において行われた電気泳動を用いて、試料を、分離した。次いで、ゲルの免疫固定（ＩＦＥ）を、Ｓｅｂｉａ　ＩＦＥプロトコルのように、ＩｇＧ、Ｉｇカッパ、Ｉｇラムダ、ＩｇＡ、及び／またはＩｇＭなどの二次抗体を用いた製造業者の仕様書に従って行った。結果は、アテゾリズマブが臨床アッセイプラットフォーム上で検出可能であり、アテゾリズマブと抗ＩＤの特定の複合体がアテゾリズマブのみから分離され得る子を示す。したがって、抗アテゾリズマブ（抗ＩＤ）抗体の添加後、ＩｇＧ／Ｉｇカッパ抗体の電気泳動移動度の変化は、抗体の識別、すなわち、アテゾリズマブの証拠を提供する。図６を参照されたい。図６に示されるデータに基づいて、抗体４８Ｃ１、１０５Ｄ１１、及び４３Ｂ５は、アテゾリズマブの、これらの抗体のうちの１つとの複合体がＳｅｂｉａ　ＩＦＥプラットフォームにおいてきれいなゲルシフトを示したため、選択された。

【０２４９】

血清中のアテゾリズマブの濃度が増加されるとき、アテゾリズマブの電気泳動移動度を変化させるための抗ＩＤ抗体の能力は、抗ＩＤ抗体の濃度及びインキュベーション時間に応じて異なる。図８を参照されたい。アテゾリズマブの完全ゲルシフトは、血清中のアテゾリズマブの濃度が５００μｇ／ｍｌであり、インキュベーション時間が２時間であったとき、アテゾリズマブ：抗ＩＤ抗体が１：１の比で観察された。しかしながら、血清中のアテゾリズマブの濃度が１０００μｇ／ｍｌまでにお増加したとき、アテゾリズマブ：抗ＩＤ抗体が１：４の比が、アテゾリズマブの完全ゲルシフトをもたらすために必要とされた。図８を参照されたい。

【０２５０】

実施例３．多発性骨髄腫患者からの血清試料中のＭタンパク質のスパイクの存在下でアテゾリズマブの検出

多発性骨髄腫患者からのヒト血清試料を使用した。患者の試料は、ＩＦＥ後の血清中の検出可能なＩｇＡ／Ｉｇカッパ Ｍタンパク質のスパイクを示した（図７、パネル１のレーンＡ及びレーンＫ）。患者の血清を、１５００μｇ／ｍｌでアテゾリズマブ抗ＩＤ抗体４

８Ｃ１のみ（図７、パネル２）、１５００μｇ／ｍｌでスパイクしたアテゾリズマブのみ（図７、パネル３）、及びそれぞれ１５００μｇ／ｍｌでアテゾリズマブ＋アテゾリズマブ抗ＩＤ抗体４８Ｃ１（図７、パネル４）の条件下で３０分～２時間予めインキュベートした。免疫固定（ＩＦＥ）アッセイは、Ｍａｘｉｋｉｔ　Ｈｙｄｒａｇｅｌ　４１Ｆまたは９１Ｆ（Ｓｅｂｉａ，Ｎｏｒｃｒｏｓｓ，ＧＡ，ＵＳＡ）を用いた半自動Ｈｙｄｒａｓｙｓ　２において行われた。製造業者の仕様書に従って、ＩＦＥアッセイが行われた。データを分析して、多発性骨髄腫患者における臨床反応評価のために日常的に使用されたＩＦＥアッセイにおいてアテゾリズマブのバンドをシフトするために、アテゾリズマブ抗ＩＤ抗体の有効性を決定した。

【０２５１】

図７のパネル２において、患者血清試料を、アテゾリズマブ抗ＩＤ抗体で予めインキュベートした。パネル１とパネル２の比較は、血清の、アテゾリズマブ抗ＩＤ抗体による予めのインキュベーションが、患者の検出可能なＭ－タンパク質の結果を妨げないことを示す。

【０２５２】

図７のパネル３において、患者血清試料を、１５００μｇ／ｍｌのアテゾリズマブで予めインキュベートした。パネル１とパネル３の比較は、パネル３における検出可能な小さいバンドの添加を示す（矢印レーンＧ及びＫ）。これは、ＩｇＧ／Ｉｇカッパヒトｍ ＡＢであるアテゾリズマブなどの大きな生物学的薬物が、検出可能であり、多発性骨髄腫患者における臨床反応評価のために日常的に使用されたＩＦＥアッセイの結果を妨げ得ることを確認する。

【０２５３】

図７のパネル４において、患者血清試料を、アテゾリズマブ及びアテゾリズマブ抗イディオタイプマウスｍＡＢクローン＃４８Ｃ１の両方で予めインキュベートした。パネル３とパネル４の比較（図７）は、アテゾリズマブでスパイクした血清試料へのアテゾリズマブ抗イディオタイプマウスモノクローナル抗体の添加が、抗イディオタイプモノクローナル抗体とアテゾリズマブの結合複合体をもたらし、それによって、Ｍタンパク質の泳動を妨げることなく、ＩＦＥゲル上で低分子量から高分子量へのアテゾリズマブのＩｇＧ及びＩｇカッパの検出可能なＩｇＧ及びＩｇカッパシフトをもたらすことを示す（図７、パネル４、レーンＧ及びＫ）。

【０２５４】

前述の発明は、明確な理解のために例証及び例によっていくらか詳細に記載されているが、説明及び例は、本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。本明細書で引用される全ての特許及び科学文献の開示は、参照によりそれらの全体が明示的に組み込まれる。

抗ＰＤ－Ｌ１イディオタイプ抗体のアミノ酸配列

	ＨＶＲタイプ	配列番号	ＨＶＲ　Ｌ１	配　列番号	ＨＶＲ　Ｌ２	配　列番号	ＨＶＲ　Ｌ３
	接触	１１	ＶＳＹＭＨＷＦ	１２	ＬＷＩＹＳＴＳＮＬＡ	１３	ＱＱＲＳＳＹＰＰＴ
	Ｃｈｏｔｈｉａ	１４	ＳＡＳＳＳＶＳＹＭＨ	１５	ＳＴＳＮＬＡＳ	１６	ＱＱＲＳＳＹＰＰＴＦ
１０５Ｄ１１	Ｋａｂａｔ	１４	ＳＡＳＳＳＶＳＹＭＨ	１５	ＳＴＳＮＬＡＳ	１６	ＱＱＲＳＳＹＰＰＴＦ
	接触	１７	ＳＳＮＩＧＷＬ	１８	ＧＬＩＹＨＧＴＮＬＥ	１９	ＶＱＹＡＱＦＰＬＴ
	Ｃｈｏｔｈｉａ	２０	ＨＡＳＱＧＩＳＳＮＩＧ	２１	ＨＧＴＮＬＥＤ	２２	ＶＱＹＡＱＦＰＬＴＦ
４３Ｂ５	Ｋａｂａｔ	２０	ＨＡＳＱＧＩＳＳＮＩＧ	２１	ＨＧＴＮＬＥＤ	２２	ＶＱＹＡＱＦＰＬＴＦ
	接触	２３	ＶＳＹＭＨＷＦ	２４	ＬＷＩＹＳＴＳＮＬＡ	２５	ＱＱＲＳＧＹＰＰＴ
	Ｃｈｏｔｈｉａ	２６	ＳＡＳＳＳＶＳＹＭＨ	２７	ＳＴＳＮＬＡＳ	２８	ＱＱＲＳＧＹＰＰＴＦ
４８Ｃ１	Ｋａｂａｔ	２６	ＳＡＳＳＳＶＳＹＭＨ	２７	ＳＴＳＮＬＡＳ	２８	ＱＱＲＳＧＹＰＰＴＦ
		配列番号	ＨＶＲ　Ｈ１	配　列番号	ＨＶＲ　Ｈ２	配　列番号	ＨＶＲ　Ｈ３
	接触	２９	ＳＳＹＤＭＳ	３０	ＷＶＡＹＩＳＳＧＧＧＳＴＹ	３１	ＡＲＬＶＹＹＤＹＤＤＡ
	Ｃｈｏｔｈｉａ	３２	ＧＦＡＦＳＳＹ	３３	ＳＳＧＧＧＳ	３４	ＬＶＹＹＤＹＤＤＡＭＤＹ
１０５Ｄ１１	Ｋａｂａｔ	３５	ＳＹＤＭＳ	３６	ＹＩＳＳＧＧＧＳＴＹＹＰＤＴＶＫＧ	３４	ＬＶＹＹＤＹＤＤＡＭＤＹ
	接触	３７	ＴＤＹＩＭＬ	３８	ＷＩＧＮＩＮＰＹＹＧＳＴＳ	３９	ＡＲＷＧＧＮＹＥＧＷＦ
	Ｃｈｏｔｈｉａ	４０	ＧＹＳＦＴＤＹ	４１	ＮＰＹＹＧＳ	４２	ＷＧＧＮＹＥＧＷＦＡＹ
４３Ｂ５	Ｋａｂａｔ	４３	ＤＹＩＭＬ	４４	ＮＩＮＰＹＹＧＳＴＳＹＮＬＫＦＫＧ	４２	ＷＧＧＮＹＥＧＷＦＡＹ
	接触	４５	ＳＳＹＤＭＳ	４６	ＷＶＡＹＩＳＳＧＧＧＳＴＹ	４７	ＡＲＴＩＹＹＧＹＤＤＶ
	Ｃｈｏｔｈｉａ	４８	ＧＦＡＦＳＳＹ	４９	ＳＳＧＧＧＳ	５０	ＴＩＹＹＧＹＤＤＶＭＤＹ
４８Ｃ１	Ｋａｂａｔ	５１	ＳＹＤＭＳ	５２	ＹＩＳＳＧＧＧＳＴＹＹＰＤＴＶＫＧ	５０	ＴＩＹＹＧＹＤＤＶＭＤＹ

	軽鎖可変領域	重鎖可変領域
１０５Ｄ１１	配列番号５３	配列番号５４
４３Ｂ５	配列番号５５	配列番号５６
４８Ｃ１	配列番号５７	配列番号５８

	軽鎖	重鎖
１０５Ｄ１１	配列番号５９	配列番号６０
４３Ｂ５	配列番号６１	配列番号６２
４８Ｃ１	配列番号６３	配列番号６４

抗イディオタイプ抗ＰＤ－Ｌ１抗体１０５Ｄ１１軽鎖可変領域のアミノ酸配列：
ＤＩＶＬＴＱＳＰＡＩＭＳＡＳＰＧＥＫＶＴＩＴＣＳＡＳＳＳＶＳＹＭＨＷＦＱＱＫＰＧ
ＴＳＰＫＬＷＩＹＳＴＳＮＬＡＳＧＶＰＡＲＦＳＧＳＧＳＧＴＳＹＳＬＴＩＳＲＭＥＡＥ
ＤＡＡＴＹＹＣＱＱＲＳＳＹＰＰＴＦＧＧＧＴＲＬＥＩＫ（配列番号５３）
抗イディオタイプ抗ＰＤ－Ｌ１抗体１０５Ｄ１１重鎖可変領域のアミノ酸配列：
ＥＶＱＬＶＥＴＧＧＧＬＶＫＰＧＧＳＬＫＬＳＣＡＡＳＧＦＡＦＳＳＹＤＭＳＷＶＲＱＴ
ＰＥＫＲＬＥＷＶＡＹＩＳＳＧＧＧＳＴＹＹＰＤＴＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＡＫＮＴＬＹ
ＬＱＭＳＳＬＫＳＥＤＴＡＭＹＹＣＡＲＬＶＹＹＤＹＤＤＡＭＤＹＷＧＱＧＴＳＶＴＶＳ
Ｓ（配列番号５４）
抗イディオタイプ抗ＰＤ－Ｌ１抗体４３Ｂ５軽鎖可変領域のアミノ酸配列：
ＤＩＫＭＴＱＳＰＳＳＭＳＶＳＬＧＤＴＶＳＩＴＣＨＡＳＱＧＩＳＳＮＩＧＷＬＱＱＫＰ
ＧＫＳＦＫＧＬＩＹＨＧＴＮＬＥＤＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＡＤＹＳＬＴＩＳＳＬＥＳ
ＥＤＦＡＤＹＹＣＶＱＹＡＱＦＰＬＴＦＧＡＧＴＫＬＥＬＫ（配列番号５５）
抗イディオタイプ抗ＰＤ－Ｌ１抗体４３Ｂ５重鎖可変領域のアミノ酸配列：
ＥＶＱＬＱＱＳＧＰＥＬＶＫＰＧＡＳＶＫＩＳＣＫＡＳＧＹＳＦＴＤＹＩＭＬＷＶＫＱＳ
ＨＧＫＳＬＥＷＩＧＮＩＮＰＹＹＧＳＴＳＹＮＬＫＦＫＧＫＡＴＬＴＶＤＫＳＳＳＴＡＹ
ＭＱＬＮＳＬＴＳＥＤＳＡＶＹＹＣＡＲＷＧＧＮＹＥＧＷＦＡＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＡ
（配列番号５６）
抗イディオタイプ抗ＰＤ－Ｌ１抗体４８Ｃ１軽鎖可変領域のアミノ酸配列：
ＱＩＶＬＴＱＳＰＡＩＭＳＡＳＰＧＥＫＶＴＩＴＣＳＡＳＳＳＶＳＹＭＨＷＦＱＱＫＰＧ
ＴＳＰＫＬＷＩＹＳＴＳＮＬＡＳＧＶＰＡＲＦＳＧＳＧＳＧＴＳＹＳＬＴＩＳＲＭＥＡＥ
ＤＡＡＴＹＹＣＱＱＲＳＧＹＰＰＴＦＧＧＧＴＫＬＥＩＫ（配列番号５７）
抗イディオタイプ抗ＰＤ－Ｌ１抗体４８Ｃ１重鎖可変領域のアミノ酸配列：
ＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＫＰＧＧＳＬＫＬＳＣＡＡＳＧＦＡＦＳＳＹＤＭＳＷＶＲＱＴ
ＰＥＫＲＬＥＷＶＡＹＩＳＳＧＧＧＳＴＹＹＰＤＴＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＡＫＮＴＬＹ
ＬＱＭＳＳＬＫＳＥＤＴＡＭＹＹＣＡＲＴＩＹＹＧＹＤＤＶＭＤＹＷＧＱＧＴＳＶＴＶＳ
Ｓ（配列番号５８）
抗イディオタイプ抗ＰＤ－Ｌ１抗体１０５Ｄ１１軽鎖のアミノ酸配列：
ＤＩＶＬＴＱＳＰＡＩＭＳＡＳＰＧＥＫＶＴＩＴＣＳＡＳＳＳＶＳＹＭＨＷＦＱＱＫＰＧ
ＴＳＰＫＬＷＩＹＳＴＳＮＬＡＳＧＶＰＡＲＦＳＧＳＧＳＧＴＳＹＳＬＴＩＳＲＭＥＡＥ
ＤＡＡＴＹＹＣＱＱＲＳＳＹＰＰＴＦＧＧＧＴＲＬＥＩＫＲＡＤＡＡＰＴＶＳＩＦＰＰＳ
ＳＥＱＬＴＳＧＧＡＳＶＶＣＦＬＮＮＦＹＰＫＤＩＮＶＫＷＫＩＤＧＳＥＲＱＮＧＶＬＮ
ＳＷＴＤＱＤＳＫＤＳＴＹＳＭＳＳＴＬＴＬＴＫＤＥＹＥＲＨＮＳＹＴＣＥＡＴＨＫＴＳ
ＴＳＰＩＶＫＳＦＮＲＮＥＣ（配列番号５９）
抗イディオタイプ抗ＰＤ－Ｌ１抗体１０５Ｄ１１重鎖のアミノ酸配列：
ＥＶＱＬＶＥＴＧＧＧＬＶＫＰＧＧＳＬＫＬＳＣＡＡＳＧＦＡＦＳＳＹＤＭＳＷＶＲＱＴ
ＰＥＫＲＬＥＷＶＡＹＩＳＳＧＧＧＳＴＹＹＰＤＴＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＡＫＮＴＬＹ
ＬＱＭＳＳＬＫＳＥＤＴＡＭＹＹＣＡＲＬＶＹＹＤＹＤＤＡＭＤＹＷＧＱＧＴＳＶＴＶＳ

ＳＡＳＴＫＧＰＳＶＹＰＬＡＰＶＣＧＤＴＴＧＳＳＶＴＬＧＣＬＶＫＧＹＦＰＥＰＶＴＬ
ＴＷＮＳＧＳＬＳＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＤＬＹＴＬＳＳＳＶＴＶＴＳＳＴＷＰＳＱＳ
ＩＴＣＮＶＡＨＰＡＳＳＴＫＶＤＫＫＩＥＰＲＧＰＴＩＫＰＣＰＰＣＫＣＰＡＰＮＬＬＧ
ＧＰＳＶＦＩＦＰＰＫＩＫＤＶＬＭＩＳＬＳＰＩＶＴＣＶＶＶＤＶＳＥＤＤＰＤＶＱＩＳ
ＷＦＶＮＮＶＥＶＨＴＡＱＴＱＴＨＲＥＤＹＮＳＴＬＲＶＶＳＡＬＰＩＱＨＱＤＷＭＳＧ
ＫＥＦＫＣＫＶＮＮＫＤＬＰＡＰＩＥＲＴＩＳＫＰＫＧＳＶＲＡＰＱＶＹＶＬＰＰＰＥＥ
ＥＭＴＫＫＱＶＴＬＴＣＭＶＴＤＦＭＰＥＤＩＹＶＥＷＴＮＮＧＫＴＥＬＮＹＫＮＴＥＰ
ＶＬＤＳＤＧＳＹＦＭＹＳＫＬＲＶＥＫＫＮＷＶＥＲＮＳＹＳＣＳＶＶＨＥＧＬＨＮＨＨ
ＴＴＫＳＦＳＲＴＰＧＫ（配列番号６０）

抗イディオタイプ抗ＰＤ－Ｌ１抗体４３Ｂ５軽鎖のアミノ酸配列：

ＤＩＫＭＴＱＳＰＳＳＭＳＶＳＬＧＤＴＶＳＩＴＣＨＡＳＱＧＩＳＳＮＩＧＷＬＱＱＫＰ
ＧＫＳＦＫＧＬＩＹＨＧＴＮＬＥＤＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＡＤＹＳＬＴＩＳＳＬＥＳ
ＥＤＦＡＤＹＹＣＶＱＹＡＱＦＰＬＴＦＧＡＧＴＫＬＥＬＫＲＡＤＡＡＰＴＶＳＩＦＰＰ
ＳＳＥＱＬＴＳＧＧＡＳＶＶＣＦＬＮＮＦＹＰＫＤＩＮＶＫＷＫＩＤＧＳＥＲＱＮＧＶＬ
ＮＳＷＴＤＱＤＳＫＤＳＴＹＳＭＳＳＴＬＴＬＴＫＤＥＹＥＲＨＮＳＹＴＣＥＡＴＨＫＴ
ＳＴＳＰＩＶＫＳＦＮＲＮＥＣ（配列番号６１）

抗イディオタイプ抗ＰＤ－Ｌ１抗体４３Ｂ５重鎖のアミノ酸配列：

ＥＶＱＬＱＱＳＧＰＥＬＶＫＰＧＡＳＶＫＩＳＣＫＡＳＧＹＳＦＴＤＹＩＭＬＷＶＫＱＳ
ＨＧＫＳＬＥＷＩＧＮＩＮＰＹＹＧＳＴＳＹＮＬＫＦＫＧＫＡＴＬＴＶＤＫＳＳＳＴＡＹ
ＭＱＬＮＳＬＴＳＥＤＳＡＶＹＹＣＡＲＷＧＧＮＹＥＧＷＦＡＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＡ
ＡＳＴＫＧＰＳＶＹＰＬＡＰＶＣＧＤＴＴＧＳＳＶＴＬＧＣＬＶＫＧＹＦＰＥＰＶＴＬＴ
ＷＮＳＧＳＬＳＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＤＬＹＴＬＳＳＳＶＴＶＴＳＳＴＷＰＳＱＳＩ
ＴＣＮＶＡＨＰＡＳＳＴＫＶＤＫＫＩＥＰＲＧＰＴＩＫＰＣＰＰＣＫＣＰＡＰＮＬＬＧＧ
ＰＳＶＦＩＦＰＰＫＩＫＤＶＬＭＩＳＬＳＰＩＶＴＣＶＶＶＤＶＳＥＤＤＰＤＶＱＩＳＷ
ＦＶＮＮＶＥＶＨＴＡＱＴＱＴＨＲＥＤＹＮＳＴＬＲＶＶＳＡＬＰＩＱＨＱＤＷＭＳＧＫ
ＥＦＫＣＫＶＮＮＫＤＬＰＡＰＩＥＲＴＩＳＫＰＫＧＳＶＲＡＰＱＶＹＶＬＰＰＰＥＥＥ
ＭＴＫＫＱＶＴＬＴＣＭＶＴＤＦＭＰＥＤＩＹＶＥＷＴＮＮＧＫＴＥＬＮＹＫＮＴＥＰＶ
ＬＤＳＤＧＳＹＦＭＹＳＫＬＲＶＥＫＫＮＷＶＥＲＮＳＹＳＣＳＶＶＨＥＧＬＨＮＨＨＴ
ＴＫＳＦＳＲＴＰＧＫ（配列番号６２）

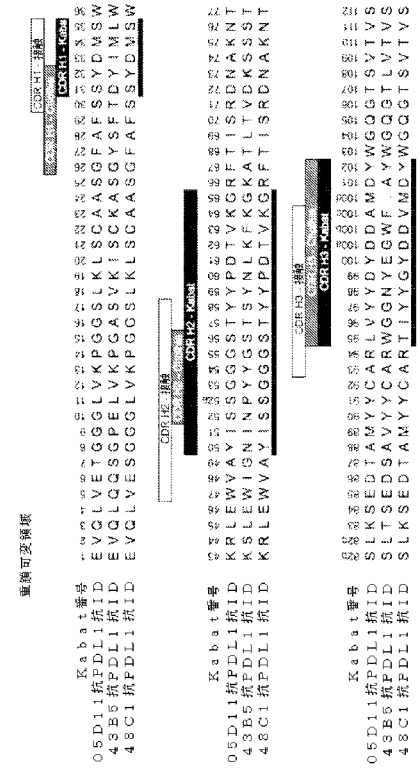
抗イディオタイプ抗ＰＤ－Ｌ１抗体４８Ｃ１軽鎖のアミノ酸配列：

ＱＩＶＬＴＱＳＰＡＩＭＳＡＳＰＧＥＫＶＴＩＴＣＳＡＳＳＳＶＳＹＭＨＷＦＱＱＫＰＧ
ＴＳＰＫＬＷＩＹＳＴＳＮＬＡＳＧＶＰＡＲＦＳＧＳＧＳＧＴＳＹＳＬＴＩＳＲＭＥＡＥ
ＤＡＡＴＹＹＣＱＱＲＳＧＹＰＰＴＦＧＧＧＴＫＬＥＩＫＲＡＤＡＡＰＴＶＳＩＦＰＰＳ
ＳＥＱＬＴＳＧＧＡＳＶＶＣＦＬＮＮＦＹＰＫＤＩＮＶＫＷＫＩＤＧＳＥＲＱＮＧＶＬＮ
ＳＷＴＤＱＤＳＫＤＳＴＹＳＭＳＳＴＬＴＬＴＫＤＥＹＥＲＨＮＳＹＴＣＥＡＴＨＫＴＳ
ＴＳＰＩＶＫＳＦＮＲＮＥＣ（配列番号６３）

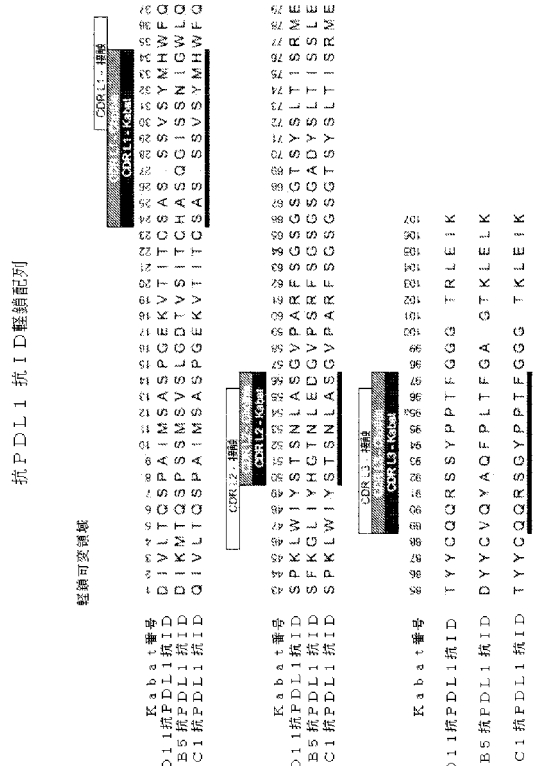
抗イディオタイプ抗ＰＤ－Ｌ１抗体４８Ｃ１重鎖のアミノ酸配列：

ＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＫＰＧＧＳＬＫＬＳＣＡＡＳＧＦＡＦＳＳＹＤＭＳＷＶＲＱＴ
ＰＥＫＲＬＥＷＶＡＹＩＳＳＧＧＧＳＴＹＹＰＤＴＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＡＫＮＴＬＹ
ＬＱＭＳＳＬＫＳＥＤＴＡＭＹＹＣＡＲＴＩＹＹＧＹＤＤＶＭＤＹＷＧＱＧＴＳＶＴＶＳ
ＳＡＳＴＫＧＰＳＶＹＰＬＡＰＶＣＧＤＴＴＧＳＳＶＴＬＧＣＬＶＫＧＹＦＰＥＰＶＴＬ
ＴＷＮＳＧＳＬＳＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＤＬＹＴＬＳＳＳＶＴＶＴＳＳＴＷＰＳＱＳ
ＩＴＣＮＶＡＨＰＡＳＳＴＫＶＤＫＫＩＥＰＲＧＰＴＩＫＰＣＰＰＣＫＣＰＡＰＮＬＬＧ
ＧＰＳＶＦＩＦＰＰＫＩＫＤＶＬＭＩＳＬＳＰＩＶＴＣＶＶＶＤＶＳＥＤＤＰＤＶＱＩＳ
ＷＦＶＮＮＶＥＶＨＴＡＱＴＱＴＨＲＥＤＹＮＳＴＬＲＶＶＳＡＬＰＩＱＨＱＤＷＭＳＧ
ＫＥＦＫＣＫＶＮＮＫＤＬＰＡＰＩＥＲＴＩＳＫＰＫＧＳＶＲＡＰＱＶＹＶＬＰＰＰＥＥ
ＥＭＴＫＫＱＶＴＬＴＣＭＶＴＤＦＭＰＥＤＩＹＶＥＷＴＮＮＧＫＴＥＬＮＹＫＮＴＥＰ
ＶＬＤＳＤＧＳＹＦＭＹＳＫＬＲＶＥＫＫＮＷＶＥＲＮＳＹＳＣＳＶＶＨＥＧＬＨＮＨＨ
ＴＴＫＳＦＳＲＴＰＧＫ（配列番号６４）

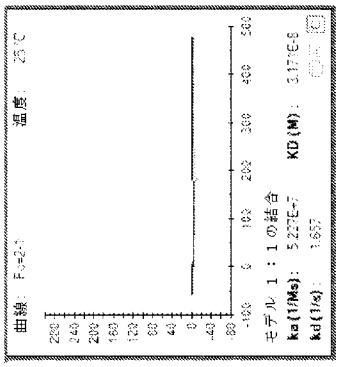
【図１】


抗ＰＤＬ１抗ＩＤ重鎖配列
重鎖可変領域
Ｋａｂａｔ番号
105D11抗PDL1抗ID
43B5抗PDL1抗ID
48C1抗PDL1抗ID
CDR H1 : 掲載
CDR H2 : 掲載
CDR H3 : 掲載
CDR H1 - Kabat
CDR H2 - Kabat
CDR H3 - Kabat

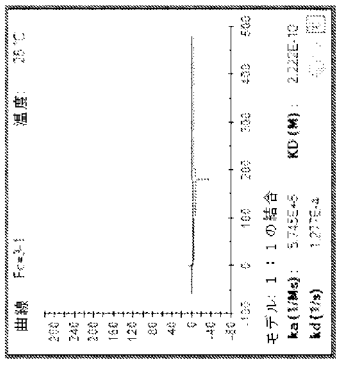
【図２】


抗ＰＤＬ１抗ＩＤ軽鎖配列
軽鎖可変領域
Ｋａｂａｔ番号
105D11抗PDL1抗ID
43B5抗PDL1抗ID
48C1抗PDL1抗ID
CDR L1 : 掲載
CDR L2 : 掲載
CDR L3 : 掲載
CDR L1 - Kabat
CDR L2 - Kabat
CDR L3 - Kabat

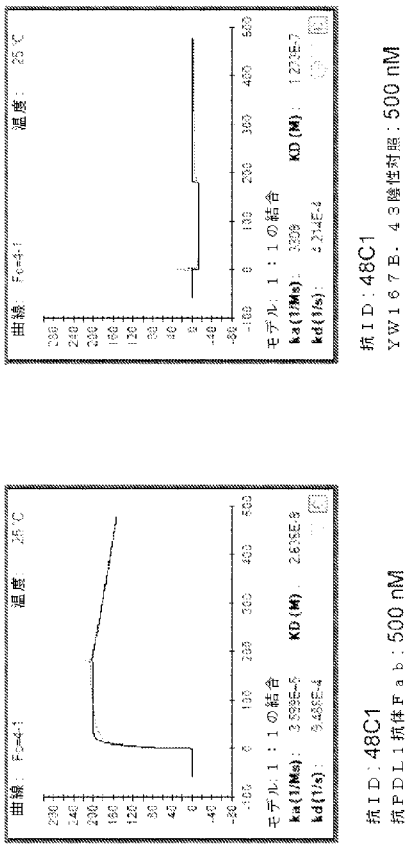
【図３】


曲線：
温度：
モデル：1：1の結合
抗ＩＤ：105D11
抗ＰＤＬ１抗体Ｆａｂ：500 nM
抗ＩＤ：105D11
ＹＷ１６７Ｅ．４３陰性対照：500 nM

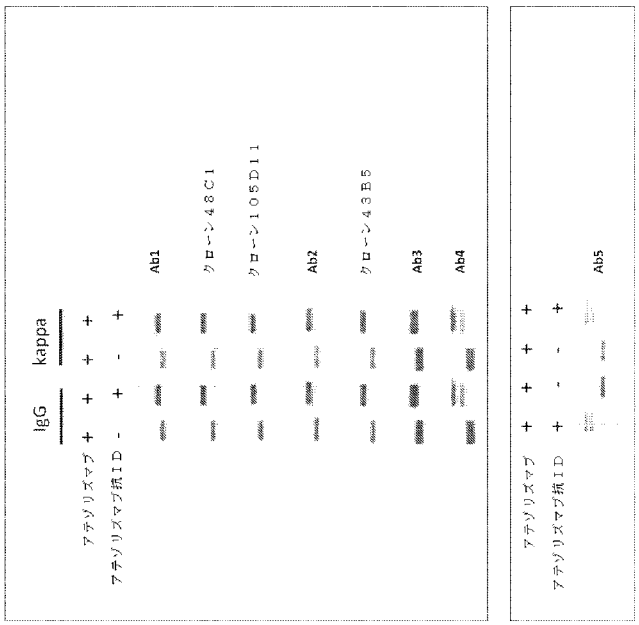
【図４】


曲線：
温度：
モデル：1：1の結合
抗ＩＤ：43B5
抗ＰＤＬ１抗体Ｆａｂ：500 nM
抗ＩＤ：43B5
ＹＷ１６７Ｂ．４３陰性対照：500 nM

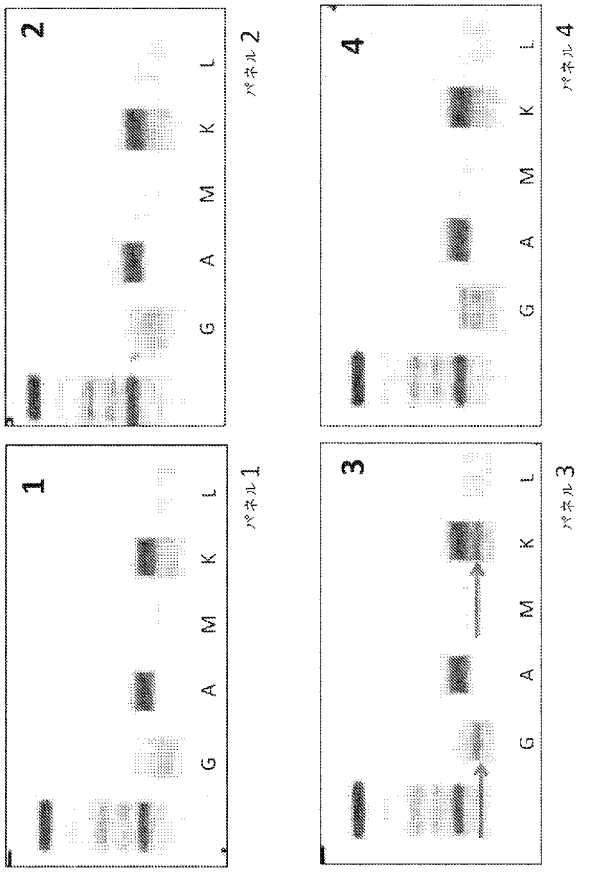
【図５】


曲線：
温度：
モデル：1：1の結合
KD (M)：
抗ID：48C1
抗PDL1抗体Fab：500 nM
抗ID：48C1
YW167B．43陰性対照：500 nM

【図６】


IgG
kappa
アテゾリズマブ
アテゾリズマブ抗ID
Ab1
クローン48C1
クローン105D11
Ab2
クローン43B5
Ab3
Ab4
Ab5

【図７】


パネル1
パネル2
パネル3
パネル4
G
A
M
K
L

【図８】

30分
60分
120分
IgG
アテゾ(μg/mL)
抗アテゾ(μg/mL)

【配列表】
2020515238000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2018/014099

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/28 C07K16/42 G01N33/68
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, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	THOMAS POWLES ET AL: "MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer", NATURE, vol. 515, no. 7528, 26 November 2014 (2014-11-26), pages 558-562, XP055207741, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature13904 the whole document -----	1-47
Y	WO 2016/183326 A1 (GENENTECH INC [US]; F HOFFMANN-LA ROCHE AG [CH]) 17 November 2016 (2016-11-17) the whole document -----	1-47
	-/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
7 March 2018	20/03/2018

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Irion, Andrea

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2018/014099

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2013/148373 A1 (GENENTECH INC [US]; HOFFMANN LA ROCHE [CH]) 3 October 2013 (2013-10-03) page 3, line 9 - page 9, line 12	1-47
Y	WO 2016/205551 A2 (UNIV CALIFORNIA [US]) 22 December 2016 (2016-12-22) paragraph [0035] - paragraph [0036] paragraph [0186] claims 46-48	1-47
Y	NIELS W.C.J. VAN DE DONK ET AL: "Interference of daratumumab in monitoring multiple myeloma patients using serum immunofixation electrophoresis can be abrogated using the daratumumab IFE reflex assay (DIRA)", CLINICAL CHEMISTRY AND LABORATORY MEDICINE, vol. 54, no. 6, 1 January 2016 (2016-01-01), XP055457218, DE ISSN: 1434-6621, DOI: 10.1515/cclm-2015-0888 the whole document	1-47

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2018/014099

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2016183326 A1	17-11-2016	AU 2016262074 A1	09-11-2017
		CA 2983282 A1	17-11-2016
		CN 107667119 A	06-02-2018
		EP 3294770 A1	21-03-2018
		KR 20180008449 A	24-01-2018
		US 2018030138 A1	01-02-2018
		WO 2016183326 A1	17-11-2016
WO 2013148373 A1	03-10-2013	AR 090510 A1	19-11-2014
		CA 2868161 A1	03-10-2013
		CN 104334583 A	04-02-2015
		EP 2831119 A1	04-02-2015
		HK 1206759 A1	15-01-2016
		JP 2015518471 A	02-07-2015
		KR 20140138971 A	04-12-2014
		RU 2014143251 A	20-05-2016
		US 2013266973 A1	10-10-2013
		US 2016002355 A1	07-01-2016
		WO 2013148373 A1	03-10-2013
WO 2016205551 A2	22-12-2016	NONE	

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

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｐ 21/08	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｐ	21/08		
Ｇ０１Ｎ 33/53	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/53	Ｎ	
Ｇ０１Ｎ 33/543	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/543	５０１Ｈ	
Ｇ０１Ｎ 33/561	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/543	５０１Ａ	
		Ｇ０１Ｎ	33/561		
		Ｇ０１Ｎ	33/53	Ｕ	

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

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．ＵＮＩＸ

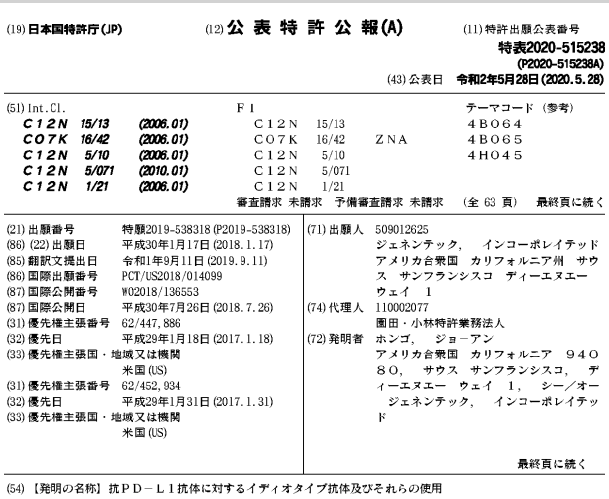
(72)発明者 イー， アンジー
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４０８０， サウス サンフランシスコ， ディーエヌエー ウェイ １， シー／オー ジェネンテック， インコーポレイテッド
(72)発明者 タン， クリスティーン
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４０８０， サウス サンフランシスコ， ディーエヌエー ウェイ １， シー／オー ジェネンテック， インコーポレイテッド
(72)発明者 ライ， ジョイス
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４０８０， サウス サンフランシスコ， ディーエヌエー ウェイ １， シー／オー ジェネンテック， インコーポレイテッド
(72)発明者 アダムケービッチ， ジョアン
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４０８０， サウス サンフランシスコ， ディーエヌエー ウェイ １， シー／オー ジェネンテック， インコーポレイテッド
(72)発明者 バイオン， ジョン
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４０８０， サウス サンフランシスコ， ディーエヌエー ウェイ １， シー／オー ジェネンテック， インコーポレイテッド

Ｆターム(参考) 4B064 AG27 CA19 CC24 DA13 DA14
4B065 AA01X AA90X AB01 AC14 BA02 CA25 CA46
4H045 AA11 AA20 AA30 BA51 DA76 EA50 FA74

专利名称(译)	抗pd-1抗体的独特型抗体及其用途		
公开(公告)号	JP2020515238A	公开(公告)日	2020-05-28
申请号	JP2019538318	申请日	2018-01-17
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	ホンゴジョアン タンクリスティーン		
发明人	ホンゴ, ジョ-アン イー, アンジー タン, クリスティーン ライ, ジョイス アダムケービッチ, ジョアン バイオン, ジョン		
IPC分类号	C12N15/13 C07K16/42 C12N5/10 C12N5/071 C12N1/21 C12P21/08 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/561		
CPC分类号	C07K16/2827 C07K16/4208 C07K2317/565 G01N33/686 G01N2800/52 C07K2317/14 C07K2317/24 C07K2317/56 C07K2317/76 C07K2317/92 C12P21/005 G01N33/68 G01N2800/26		
FI分类号	C12N15/13 C07K16/42.ZNA C12N5/10 C12N5/071 C12N1/21 C12P21/08 G01N33/53.N G01N33/543.501.H G01N33/543.501.A G01N33/561 G01N33/53.U		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA13 4B064/DA14 4B065/AA01X 4B065/AA90X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA51 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	62/447886 2017-01-18 US 62/452934 2017-01-31 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了针对抗PD-L1抗体的抗独特型抗体及其使用方法。 [选择图]无



(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2020-515238
(P2020-515238A)
(43)公表日　令和2年5月28日(2020.5.28)

(51)Int.Cl.　F I　テーマコード（参考）
C12N 15/13 (2006.01)　C12N 15/13　4B064
C07K 16/42 (2006.01)　C07K 16/42 ZNA　4B065
C12N 5/10 (2006.01)　C12N 5/10　4H045
C12N 5/071 (2010.01)　C12N 5/071
C12N 1/21 (2006.01)　C12N 1/21
審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 63 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2019-538318 (P2019-538318)
(86)(22)出願日　平成30年1月17日(2018.1.17)
(85)翻訳文提出日　令和1年9月11日(2019.9.11)
(86)国際出願番号　PCT/US2018/014099
(87)国際公開番号　WO2018/136553
(87)国際公開日　平成30年7月26日(2018.7.26)
(31)優先権主張番号　62/447,886
(32)優先日　平成29年1月18日(2017.1.18)
(33)優先権主張国・地域又は機関　米国(US)
(31)優先権主張番号　62/452,934
(32)優先日　平成29年1月31日(2017.1.31)
(33)優先権主張国・地域又は機関　米国(US)

(71)出願人　509012625
ジェネンテック，　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　カリフォルニア州　サウス　サンフランシスコ　ディーエヌエー　ウェイ　1
(74)代理人　110002077
園田・小林特許業務法人
(72)発明者　ホンゴ，　ジョ－アン
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４０８０，　サウス　サンフランシスコ，　ディーエヌエー　ウェイ　１，　シー／オー　ジェネンテック，　インコーポレイテッド

最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗ＰＤ－Ｌ１抗体に対するイディオタイプ抗体及びそれらの使用