

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6949009号
(P6949009)

(45) 発行日 令和3年10月13日(2021.10.13)

(24) 登録日 令和3年9月24日(2021.9.24)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N 15/13	(2006.01)	C 1 2 N 15/13	Z N A
C O 7 K 16/28	(2006.01)	C O 7 K 16/28	
C 1 2 N 1/15	(2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	(2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/21	

請求項の数 17 (全 48 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-514829 (P2018-514829)
 (86) (22) 出願日 平成28年9月20日 (2016.9.20)
 (65) 公表番号 特表2018-533914 (P2018-533914A)
 (43) 公表日 平成30年11月22日 (2018.11.22)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/052569
 (87) 国際公開番号 W02017/053250
 (87) 国際公開日 平成29年3月30日 (2017.3.30)
 審査請求日 令和1年9月19日 (2019.9.19)
 (31) 優先権主張番号 62/221,472
 (32) 優先日 平成27年9月21日 (2015.9.21)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)

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

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトプログラム死リガンド2 (PD-L2) に結合する抗体およびその用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

CDRL1、CDRL2およびCDRL3の、3個の軽鎖CDR、ならびにCDRH1、CDRH2およびCDRH3の、3個の重鎖CDRを含む、ヒトPD-L2に特異的に結合する単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントであって、ここで、

- (a) CDRL1は配列番号2であり、
- (b) CDRL2は配列番号4であり、
- (c) CDRL3は配列番号6であり、
- (d) CDRH1は配列番号10であり、
- (e) CDRH2は配列番号12であり、
- (f) CDRH3は配列番号14である、単離された抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【請求項2】

軽鎖可変領域が配列番号8であり、重鎖可変領域が配列番号16である、軽鎖可変領域および重鎖可変領域を含む、請求項1記載の単離された抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【請求項3】

マウスIgG1定常領域を含む、請求項1または2に記載の単離された抗体。

【請求項4】

各重鎖がマウスIgG1定常領域を含み、各軽鎖がマウスカッパ定常領域を含む、2つ

の同一重鎖および2つの同一軽鎖を含む、請求項1～3のいずれか1項記載の単離された抗体。

【請求項5】

抗体軽鎖可変領域および抗体重鎖可変領域の両方をコードする単離された核酸であって、抗体軽鎖可変領域が配列番号8を含み、抗体重鎖可変領域が配列番号16を含む、単離された核酸。

【請求項6】

配列番号17および配列番号18の両方を含む、請求項5記載の単離された核酸。

【請求項7】

請求項5または6記載の単離された核酸を含む発現ベクター。

10

【請求項8】

請求項7記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項9】

ヒトから抽出された組織サンプルをPD-L2発現に関してアッセイする方法であって、

(a) ヒトPD-L2へのPD-L2結合性試薬の特異的結合を可能にする条件下、該組織サンプルをPD-L2結合性試薬と接触させ、ここで、該結合性試薬は、請求項1～4のいずれか1項記載の抗体または抗原結合性フラグメントを含み、

(b) 未結合のPD-L2結合性試薬を除去し、

(c) 結合したPD-L2結合性物質の存在または非存在を検出することを含む、方法

20

【請求項10】

結合した結合性試薬の量を定量することを更に含む、請求項9記載の方法。

【請求項11】

結合性試薬が2つの同一重鎖および2つの同一軽鎖を含み、各重鎖が配列番号16およびマウスIgG1定常領域を含み、各軽鎖が配列番号8およびマウスカッパ定常領域を含む、請求項9または請求項10記載の方法。

【請求項12】

組織サンプルが腫瘍由来である、請求項9～11のいずれか1項記載の方法。

【請求項13】

組織サンプルが腫瘍由来であり、患者が膀胱癌、胃癌、頭頸部扁平上皮癌、メラノーマ、非小細胞肺癌、腎細胞癌または三種陰性乳癌と診断されている、請求項9～12のいずれか1項記載の方法。

30

【請求項14】

請求項1～4のいずれか1項記載の単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントと、ヒトPD-L2に結合した該抗体または抗原結合性フラグメントの複合体を検出するための試薬のセットとを含むキット。

【請求項15】

該抗体が2つの同一重鎖および2つの同一軽鎖を含み、各重鎖が配列番号16およびマウスIgG1定常領域を含み、各軽鎖が配列番号8およびマウスカッパ定常領域を含む、請求項14記載のキット。

40

【請求項16】

(1) 腫瘍由来のサンプルがPD-L2発現に関して陽性であるか陰性であるかを判定し、

(2) 腫瘍がPD-L2に関して陽性である場合には、PD-1アンタゴニストの治療的有効量を対象に投与することを含む、腫瘍を有する患者の治療方法に用いるための、請求項14または15に記載のキット。

【請求項17】

前記(1)の方法において、腫瘍組織サンプルがPD-L1発現に関して陽性であるかどうかを判定する工程を更に含む、

50

そして、サンプルがPD-L1およびPD-L2の両方に関して陽性であると判定された場合には、患者にPD-1アンタゴニストを投与することを含む、請求項16記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、ヒトプログラム死リガンド2 (PD-L2) に結合し、免疫組織化学的 (IHC) 分析によるヒト組織サンプルにおけるPD-L2発現の検出に有用である抗体およびその抗原結合性フラグメントに関する。本発明はまた、この抗ヒトPD-L2抗体を使用する免疫組織化学的 (IHC) アッセイに関する。

10

【0002】

関連出願に対する相互参照

本出願は2015年9月21日付け出願の米国仮特許出願第62/221,472号(その内容の全体を参照により本明細書に組み入れることとする)の利益を主張するものである。

【0003】

電子的に提出された配列表に対する言及

本出願の配列表は、ファイル名「24188WOPCT-SEQLIST-14SEPT2016.TXT」、2016年9月14日の作成日および13.7KBのサイズを有するASCII形式の配列表としてEFS-Webを介して電子的に提出されている。EFS-Webを介して提出されたこの配列表は本明細書の一部であり、その全体を参照により本明細書に組み入れることとする。

20

【背景技術】

【0004】

プログラム細胞死タンパク質1 (PD-1) 系を標的とする免疫チェックポイント療法は複数のヒト癌における臨床応答の画期的な改善をもたらしている (Brahmerら, N Engl J Med 2012, 366:2455-65; Garonら, N Engl J Med 2015, 372:2018-28; Hamidら, N Engl J Med 2013, 369:134-44; Robertら, Lancet 2014, 384:1109-17; Robertら, N Engl J Med 2015, 372:2521-32; Robertら, N Engl J Med 2015, 372:320-30; Topalianら, N Engl J Med 2012, 366:2443-54; Topalianら, J Clin Oncol 2014, 32:1020-30; Wolchokら, N Engl J Med 2013, 369:122-33)。T細胞上のPD-1受容体と腫瘍および免疫浸潤細胞上のそのリガンド(すなわち、PD-L1およびPD-L2)との相互作用はT細胞媒介性免疫応答を調節し、ヒト腫瘍による免疫逃避において何らかの役割を果たしている可能性がある (Pardoll DM. Nat Rev Cancer 2012, 12:252-64)。PD-1の、そのリガンドのいずれかへの結合は、T細胞への抑制性刺激の運搬をもたらす。PD-1系を標的とする免疫療法には、PD-1受容体に対するモノクローナル抗体 [OPDIVO (ニボルマブ (nivolumab)), Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ および KEYTRUDA (ペンブロリズマブ (pembrolizumab)), Merck and Co., Inc. Kenilworth, NJ]、そしてまた、PD-L1リガンドに結合するもの [MPDL3280A; TECENTRIQ (アテゾリズマブ (atezolizumab)), Genentech, San Francisco, CA] が含まれる。どちらの治療アプローチも幾つかの癌型において抗腫瘍効果を示している。

30

40

【0005】

PD-L2タンパク質発現は或る条件下の抗原提示細胞上および腫瘍微小環境中で検出

50

されている。また、種々の組織のノーザンブロット分析は、PD-L2 RNAが心臓、胎盤、肝臓、膵臓、脾臓、リンパ節、肺、平滑筋および胸腺において発現されることを示している。したがって、ヒト組織において（例えば、IHCアッセイにより）インサイチュ（*in situ*）でPD-L2タンパク質を検出することが、PD-L2タンパク質の生物学的活性を調べるのに、およびPD-1系を標的とする薬物の抗腫瘍効力を評価するのに重要である。

【0006】

IHCアッセイは、ヒト組織サンプルにおける目的のタンパク質を検出するための最も一般的な技術の1つである。ヒト患者から摘出された腫瘍組織サンプルは、典型的には、個々の組織切片を凍結させることにより、またはホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織切片を調製することにより、後続分析のために保存される。類似した特異性および感度を有する凍結組織切片およびFFPE組織切片の両方について染色パターンを生成し、および再現可能な状態でそれを行いうる抗ヒトPD-L2抗体が必要とされている。

10

【発明の概要】

【0007】

発明の概括

本発明は、非常に特異的で高感度で再現性のある状態で凍結組織切片およびFFPEヒト組織切片の両方におけるPD-L2タンパク質に結合しうる新規抗ヒトPD-L2モノクローナル抗体（mAb）に関する。本発明者らは、この新規抗ヒトPD-L2 mAbが、以下の基準、すなわち、特異性、感度および再現性の1以上に基づいて、IHCアッセイで使用される幾つかの商業的に入手可能な抗ヒトPD-L2抗体より優れていると考えている。これらの3つの基準の3つ全てを満たしているわけではない市販抗ヒトPD-L2抗体としては、R&D Systems（Minneapolis, MN, USA）からカタログ番号MAB1224として入手可能なマウスIgG2b mAbであるクローン#176611、ポリクローナルヤギIgGであるR&D Systemsカタログ番号AF1224として入手可能なもの、およびBioLegend（登録商標）（サンディエゴ, CA USA）からカタログ番号345501として入手可能なマウスIgG1 mAbであるクローンMIH18が挙げられる。したがって、本発明はまた、FFPE組織切片におけるPD-L2を検出するためのIHCアッセイを含む、ヒト細胞の表面上のPD-L2発現の検出における本発明の抗PD-L2 mAbの使用に関する。

20

30

【0008】

1つの態様においては、本発明は、ヒトPD-L2に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体（mAb）またはその抗原結合性フラグメントを提供する。該単離mAbまたはその抗原結合性フラグメントは、CDRL1、CDRL2およびCDRL3の、3個の軽鎖CDR、ならびにCDRH1、CDRH2およびCDRH3の、3個の重鎖CDRを含む。

【0009】

本発明の1つの実施形態においては、CDRL1は配列番号2または配列番号2の変異体であり、CDRL2は配列番号4または配列番号4の変異体であり、CDRL3は配列番号6または配列番号6の変異体である。

40

【0010】

1つの実施形態においては、CDRH1は配列番号10または配列番号10の変異体であり、CDRH2は配列番号12または配列番号12の変異体であり、CDRH3は配列番号14または配列番号14の変異体である。

【0011】

1つの実施形態においては、前記の3個の軽鎖CDRは配列番号2、配列番号4、および配列番号6であり、前記の3個の重鎖CDRは配列番号10、配列番号12および配列番号14である。

【0012】

50

本発明の幾つかの抗体および抗原結合フラグメントは軽鎖可変領域および重鎖可変領域を含む。幾つかの実施形態においては、軽鎖可変領域は配列番号 8 または配列番号 8 の変異体を含み、重鎖可変領域は配列番号 16 または配列番号 16 の変異体を含む。そのような実施形態においては、変異体軽鎖または重鎖可変領域配列は、フレームワーク（すなわち、CDR の外部）に 1、2、3、4 または 5 個のアミノ酸置換を有すること以外は参照配列と同一である。幾つかの実施形態においては、アミノ酸置換の 1、2、3、4 または 5 個は保存的置換である。

【0013】

本発明の 1 つの抗体または抗原結合性フラグメントにおいては、軽鎖可変領域は配列番号 8 であり、重鎖可変領域は配列番号 16 である。

10

【0014】

前記抗体の実施形態の全てにおいては、単離された抗体は、IgM、IgG、IgD、IgA および IgE を含む免疫グロブリンの任意のクラスの完全長抗体でありうる。好ましくは、抗体は IgG 抗体、例えば IgG₁、IgG₂、IgG₃ または IgG₄ である。1 つの実施形態においては、抗体は 2 個の同一重鎖および 2 個の同一軽鎖を含み、ここで、各重鎖はマウス IgG₁ 定常領域を含み、各軽鎖はマウスカッパ定常領域を含む。

【0015】

本発明はまた、製剤中に前記抗体または抗体フラグメントのいずれかを含む抗体組成物を提供する。1 つの適切な製剤は 20 mM 酢酸ナトリウムおよび 9% スクロースを pH 5.0 で含む。

20

【0016】

前記実施形態のいずれかにおいては、抗原結合性フラグメントは Fab フラグメント、Fab' フラグメント、(Fab')₂ フラグメント、Fv フラグメントまたは scFv フラグメントでありうる。

【0017】

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

【0018】

本発明はまた、前記で開示されている抗体可変領域のいずれかをコードする単離された核酸分子を提供する。本発明はまた、本発明の抗体または抗原結合性フラグメントのいずれかをコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクターを提供する。1 つの実施形態においては、核酸分子は、配列番号 17 または配列番号 18 に記載されているヌクレオチド配列を含む。もう 1 つの実施形態においては、核酸分子は、配列番号 17 および配列番号 18 に記載されているヌクレオチド配列を含む。

30

【0019】

本発明はまた、前記で開示されている抗体、抗原結合性フラグメントまたは抗体可変領域のいずれかをコードする発現ベクターを含む宿主細胞に関する。1 つの実施形態においては、発現ベクターは重鎖および軽鎖の両方をコードする。1 つの実施形態においては、発現ベクターは配列番号 17 および配列番号 18 の一方または両方を含む。

【0020】

本発明はまた、ヒトから抽出されたヒト組織サンプルを PD-L2 発現に関してアッセイする方法を提供する。該方法は、ヒト PD-L2 への PD-L2 結合性試薬の特異的結合を可能にする条件下、該組織サンプルを PD-L2 結合性試薬と接触させ、未結合の PD-L2 結合性試薬を除去し、結合した PD-L2 結合性物質の存在または非存在を検出することを含む。1 つの好ましい実施形態においては、該方法は、結合した結合性試薬の量を定量することを更に含む。PD-L2 結合性試薬は前記のモノクローナル抗体または抗原結合性フラグメントのいずれかである。1 つの実施形態においては、PD-L2 結合性試薬は、配列番号 8 および配列番号 16 を含む抗体である。1 つの実施形態においては、組織サンプルは腫瘍由来である。1 つの実施形態においては、組織サンプルは、膀胱癌、胃癌、頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC)、ホジキンリンパ腫、メラノーマ、非小細胞肺

40

50

癌（NSCLC）、腎細胞癌（RCC）または三種陰性乳癌（TNBC）と診断された患者から摘出された腫瘍組織を含む。1つの実施形態においては、該方法は、PD-L1発現に関して組織サンプルを試験することを更に含む。1つの実施形態においては、患者から摘出された別の組織サンプルはPD-L2発現に関して陰性の試験結果を過去に示している。

【0021】

もう1つの態様においては、該方法は、癌と診断された患者を治療することを含む。該方法は、前記の抗PD-L2モノクローナル抗体または抗原結合性フラグメントのいずれかを使用するIHCアッセイによりPD-L2発現に関して患者が陽性の試験結果を示すかどうかを判定し、患者が陽性試験結果を示した場合には、患者をPD-1アンタゴニストで治療し、該IHCアッセイによりPD-L2発現に関して患者が陰性の試験結果を示した場合には、患者をPD-1アンタゴニストで治療しないことを含む。1つの実施形態においては、PD-1アンタゴニストはペンブロリズマブ（pembrolizumab）である。

10

【0022】

更にもう1つの態様においては、本発明は、PD-L2発現に関してヒト組織サンプルをアッセイするためのキットを提供する。該キットは、PD-L2結合性物質と、ヒトPD-L2に結合した結合性物質を含む複合体を検出するための試薬のセットとを含む。PD-L2結合性物質は、ヒトPD-L2に特異的に結合する前記の任意のモノクローナル抗体または抗原結合性フラグメントである。1つの実施形態においては、PD-L2結合性試薬は配列番号8および配列番号16を含む。

20

【0023】

発明の詳細な説明

腫瘍関連PD-L1発現は抗PD-1療法に対する臨床的応答に関連している。しかし、PD-L1陰性患者も抗PD-1療法に応答しうる。このことは、他のPD-1相互作用が応答性に関連している可能性があることを示唆している。PD-1のもう一方の公知リガンドであるPD-L2の保有率および分布は十分には研究されていない。商業的に入手可能な抗ヒトPD-L2抗体は、FFPE組織切片のIHCアッセイにおいてヒトPD-L2を検出するのに満足しうるものではない。この目的を達成するために、本発明は、単離された抗PD-L2抗原結合性タンパク質、およびヒト組織サンプルにおけるPD-L2発現の検出方法における該抗原結合性タンパク質の使用法を提供する。本発明は更に、抗PD-1治療を要する患者における抗PD-1治療に対する臨床応答性を予測するための、本発明のPD-L2抗体またはその抗原結合性フラグメントの使用法を提供する。幾つかの実施形態においては、患者は頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）を有する。

30

【0024】

抗PD-1標的化療法に対する臨床応答は腫瘍型によって異なる可能性があり、これらの療法から最大の利益を受ける患者を特定するのに役立つ予測バイオマーカーを見出すことに多大な努力が払われている。PD-1系標的化治療に適した患者のスクリーニングは、主として、免疫組織化学法（IHC）により検出される、腫瘍におけるPD-L1発現の評価に焦点が合わされている。PD-L1発現に関する試験は幾つかの腫瘍型における応答者集団を絞り込むことを可能にしているが、PD-L1陽性患者の一部は抗PD-1系療法に対して低い応答性しか示しておらず、一部のPD-L1陰性患者は良好な応答を示している（Garonら，2015，前掲；Robertら，2015，前掲；Herbstら，Nature 2014，515：563-7；Tumehら，Nature 2014，515：568-71）。このことは、PD-L2を含むPD-L1以外のPD-1との分子的相互作用がこれらの治療に対する臨床応答性の予測に関連している可能性があることを示唆している。

40

【0025】

腫瘍組織におけるPD-L2の発現およびPD-1系標的化療法に対する応答とのその相関性は十分には研究されていない。PD-L1と同様に、PD-L2とのPD-1相互

50

作用はT細胞増殖、サイトカイン産生およびT細胞細胞溶解を抑制する(Latchmanら, Nat Immunol 2001, 2:261-8; Rodigら, Eur J Immunol 2003, 33:3117-26)。これまでの研究は、PD-L1がT細胞、B細胞、樹状細胞およびマクロファージならびに非免疫細胞において発現されることを見出しており、一方、PD-L2発現は抗原提示細胞に、より限局される(尤も、種々の微小環境刺激により他の免疫細胞および非免疫細胞において誘導可能である)ことが確認されている(Latchmanら, 2001, 前掲; Lesterhuisら, Mol Immunol 2011, 49:1-3; Lesterhuisら, J Clin Invest 2011, 121:3100-8; Messalら, Mol Immunol 2011, 48:2214-9)。これらの相違はPD-1系におけるこれらの2つのリガンドに関する異なる機能を反映している可能性があり、この場合、PD-L1はより一般的な抗炎症作用を媒介し、PD-L2はT細胞プライミングにおいて何らかの役割を果たしている可能性がある(Cheahら, Curr Opin Oncol 2015, 27:384-91)。限られた研究において、調べられた幾つかの適応症からのヒト腫瘍においてPD-L2発現が示されており、幾つかのサンプルにおいてはPD-L1の非存在下で発現が検出され、臨床応答とのその関係に関して種々の結果が示された(Herbstら, 2014, 前掲; Taubeら, Clin Cancer Res 2014, 20:5064-74; Schimdら, Journal of Clinical Oncology 2016, 34 Suppl 15, 11506)。

【0026】

PD-L2の発現が、単独で又はPD-L1と組合されて、PD-1系を標的とする療法の有効性に影響を及ぼしうることを考慮して、本発明者らは、本発明のPD-L2抗体を使用する新規PD-L2 IHCアッセイを用いて、7つの癌適応症にわたる400個を超える保存ヒト腫瘍サンプルにおいて、PD-L2の保有率および分布を本発明で評価した。PD-L2発現は全ての腫瘍型において観察され、間質、腫瘍および内皮細胞において発現された。本発明者らは更に、PD-L2の保有率および分布がPD-L1と有意に相関する($P = 0.0012 - < 0.0001$)ことを本明細書に示す。しかし、幾つかの腫瘍型においてはPD-L2はPD-L1の非存在下で検出された。PD-L1およびPD-L2の両方の陽性がペンブロリズマブに対する臨床応答を有意に予測したことも示されており、この場合、PD-L1の状態には無関係にPD-L2の状態の影響が有意であった。全体的な応答は、PD-L1およびPD-L2に両方に関して陽性の患者においては(27.5%)、PD-L1のみに関して陽性の患者の場合(11.4%)より大きかった。PD-L2の状態は、PD-L1の状態には無関係に、ペンブロリズマブ療法での無増悪生存(PFS)の有意な予測因子であった。PD-L2陽性患者においては、PD-L2陰性患者の場合より長いPFS生存期間中央値および全生存が認められた。

【0027】

定義および略語

本発明の詳細な説明および実施例の全体にわたって、以下の略語を用いる。

【0028】

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

CHO：チャイニーズハムスター卵巣

EC50：50%の効力または結合をもたらす濃度

ELISA：酵素結合免疫ソルベントアッセイ

FFPE：ホルマリン固定パラフィン包埋

FR：フレームワーク領域

HRP：ホースラディッシュペルオキシダーゼ

HNSCC：頭頸部扁平上皮細胞癌

IC50：50%の抑制をもたらす濃度

IgG：免疫グロブリンG

I H C : 免疫組織化学または免疫組織化学的
 m A b または M a b : モノクローナル抗体
 M E S : 2 - (N - モルホリノ) エタンスルホン酸
 N C B I : N a t i o n a l C e n t e r f o r B i o t e c h n o l o g y
 I n f o r m a t i o n
 N S C L C : 非小細胞肺癌
 P C R : ポリメラーゼ連鎖反応
 P D - 1 : プログラム死 1
 P D - L 1 : プログラム細胞死 1 リガンド 1
 P D - L 2 : プログラム細胞死 1 リガンド 2
 T N B C : 三種陰性乳癌
 V _H : 免疫グロブリン重鎖可変領域
 V _K : 免疫グロブリンカッパ軽鎖可変領域
 V _L : 免疫グロブリン重鎖可変領域

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

【 0 0 2 9 】

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

【 0 0 3 0 】

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

【 0 0 3 1 】

典型的には、本発明の抗体または抗原結合性フラグメントは（親抗体と比較された場合、すなわち、抗体 3 G 2 の軽鎖および重鎖可変領域を含む四量体抗体と比較された場合）そのヒト P D - L 2 結合活性の少なくとも 1 0 %（その活性がモル基準で表された場合）を保有する。好ましくは、本発明の抗体または抗原結合性フラグメントは、親抗体としてのヒト P D - L 2 結合アフィニティの少なくとも 2 0 %、5 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 % または 1 0 0 % またはそれ以上を保有する。本発明の抗体または抗原結合性フラグメントは、その生物活性を実質的に改変しない保存的または非保存的アミノ酸置換（該抗体の「保存的変異体」または「機能保存変異体」と称される）を含みうることも意図される。

【 0 0 3 2 】

「投与」および「治療（処理、処置）」は、それが動物、ヒト、実験対象、細胞、組織、器官または生物学的流体に適用される場合には、該動物、ヒト、対象、細胞、組織、器官または生物学的流体との外因性医薬、治療用物質、診断剤または組成物の接触を意味する。細胞の処理は、該細胞との試薬の接触、および該細胞に接触している流体との試薬の接触を含む。「投与」および「処理（治療、処置）」は、試薬、診断剤、結合性化合物または別の細胞による、例えば細胞の、インビトロおよびエクスピボ（*ex vivo*）処理をも意味する。「対象」なる語は、任意の生物、好ましくは動物、より好ましくは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、イヌ、ネコ、ウサギ）、最も好ましくはヒトを含む。

【 0 0 3 3 】

10

20

30

40

50

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

【0034】

幾つかの実施形態においては、抗体は四量体を含む。各四量体は、ポリペプチド鎖の、2つの同一ペアを含み、各ペアは1つの「軽」鎖（約25 kDa）および1つの「重」鎖（約50～70 kDa）を有する。各鎖のアミノ末端部分は、主に抗原認識をもたらす約100～110個またはそれ以上のアミノ酸の可変領域を含む。各軽/重鎖ペアの可変領域は抗体結合部位を形成する。したがって、一般に、完全抗体（無傷抗体）は2つの結合部位を有する。二官能性または二重特異性抗体の場合を除き、それらの2つの結合部位は一般に同一である。

10

【0035】

典型的には、重鎖および軽鎖のそれぞれの可変領域は、比較的保存されたフレームワーク領域（FR）により包囲された、相補性決定領域（CDR）とも称される3つの超可変領域を含む。一般に、N末端からC末端へと、軽鎖および重鎖可変領域はFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3およびFR4を含む。特に示されていない限り、本発明の抗体の種々の領域へのアミノ酸の帰属はKabatの定義に従っている（例えば、Kabatら（1991）*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md; Kabat（1978）*Adv. Prot. Chem.* 32: 1-75; Kabatら,（1977）*J. Biol. Chem.* 252: 6609-6616を参照されたい）。CDRの帰属のための代替的アプローチはChothiaの定義を用いる（例えば、ChothiaおよびLesk（1987）, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917; Chothiaら,（1989）*Nature* 342: 878-883を参照されたい）。

20

30

【0036】

特定された標的タンパク質に「特異的に結合する」抗体は、他のタンパク質と比較して該標的タンパク質への優先的な結合を示す抗体であるが、この特異性は絶対的な結合特異性を要しない。したがって、抗PD-L2抗体が、与えられたアミノ酸配列（例えば、成熟ヒトPD-L2分子のアミノ酸配列または成熟ヒトPD-L2タンパク質の細胞外ドメインのアミノ酸配列）を含むヒトPD-L2ポリペプチドに対して特異的であると言えるのは、それが、その配列を含むポリペプチドには結合するが、その配列を欠くタンパク質には結合しない場合である。また、抗hPD-L2抗体またはその抗原結合性フラグメントがヒトPD-L2に「特異的」とみなされるのは、例えば、IHC診断アッセイにおける偽陽性のような望ましくない結果をもたらすことなく、その結合がサンプル中のヒトPD-L2の存在の決定因子である場合である。抗hPD-L2抗体または抗原結合性フラグメントに必要な特異性の度合は該抗体またはフラグメントの意図される用途に左右されるが、いずれにせよ、意図される目的の用途のためのその適合性により定められる。本発明において有用な抗体またはその結合性フラグメントは、非標的タンパク質に対するアフィニティより少なくとも2倍大きな、好ましくは少なくとも10倍大きな、より好ましくは少なくとも20倍大きな、最も好ましくは少なくとも100倍大きなアフィニティでヒトPD-L2に結合する。

40

【0037】

特に示されていない限り、本明細書中で用いる「抗体フラグメント」または「抗原結合性フラグメント」は、抗体の抗原結合性フラグメントを、すなわち、完全長抗体に結合す

50

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

【0038】

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

【0039】

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

【0040】

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

【0041】

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

【0042】

「Fv領域」は重鎖および軽鎖の両方からの可変領域を含むが、定常領域を欠く。

【0043】

「一本鎖Fv」または「scFv」抗体なる語は、抗体のV_HおよびV_Lドメインを含む抗体フラグメントを意味し、ここで、これらのドメインは単一ポリペプチド鎖内に存在する。一般に、Fvポリペプチドは更に、抗原結合のための所望の構造をscFvが形成するのを可能にする、V_HおよびV_Lドメイン間のポリペプチドリンカーを含む。scFvの概説としては、Pluckthun(1994)THE PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES, vol. 113, RosenbergおよびMoore編, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315を参照されたい。また、国際特許出願公開番号WO 88/01649ならびに米国特許第4,946,778号および第5,260,203号も参照されたい。

【0044】

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

【0045】

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

【0046】

本明細書中で用いる「ジアボディ」なる語は、2個の抗原結合部位を有する小型抗体フラグメントを意味し、該フラグメントは、同一ポリペプチド鎖内で軽鎖可変ドメイン(V_L)に連結された重鎖可変ドメイン(V_H)を含む(V_H-V_LまたはV_L-V_H)。同

10

20

30

40

50

一鎖上の2個のドメイン間のペア形成を可能にするには短すぎるリンカーを用いることにより、それらのドメインは別の鎖の相補的ドメインとのペア形成を強要され、2つの抗原結合部位を形成する。ジアボディは、例えばEP 404,097; WO 93/11161; およびHolligerら(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448に更に詳しく記載されている。操作された抗体変異体の概説としては、一般的には、HolligerおよびHudson(2005) Nat. Biotechnol., 23:1126-1136を参照されたい。

【0047】

本明細書中で用いる「フレームワーク」または「FR」なる語は、CDRアミノ酸配列と重複しない抗体可変領域におけるアミノ酸配列を意味する。

【0048】

抗体3G2は、以下の表1に示す構造的特徴を含む、ハイブリドマクローンMEB123.3G2.038から産生されるマウス抗ヒトPD-L2 mAbである。

【表1】

表 1. 抗ヒト PD-L2 mAb 3G2 の構造的特徴		
抗体の特徴	アミノ酸配列	配列番号
軽鎖		
フレームワーク領域 1	DIVMTQSPSSLATSVGQRVTMSC	1
CDRL1	KSSQNLLYSTDQKNYLA	2
フレームワーク領域 2	WFQKPGQSPKLLLY	3
CDRL2	FASIRES	4
フレームワーク領域 3	GVPDRFIGSGSGTDFLTITSSVQAEDLADYFC	5
CDRL3	QQHYNPPT	6
フレームワーク領域 4	FGGGTRLEIK	7
可変領域	DIVMTQSPSSLATSVGQRVTMCKSSQNLLYSTDQKNYLAWFQKPGQSPKLLLYFASIRESGVPDRFIGSGSGTDFLTITSSVQAEDLADYFCQQHYNPPTFGGGTRLEIK	8
重鎖		
フレームワーク領域 1	EVQLVESGGDLVKSGLKLSCAASGFIF	9
CDRH1	SFGMS	10
フレームワーク領域 2	WVRQTPDKRLEWVA	11
CDRH2	TISSGGRNIYYLDSVK	12
フレームワーク領域 3	RFTISRDNVKNILYLQMSGLKSEDSAMYVCAR	13
CDRH3	EGHYALDY	14
フレームワーク領域 4	CGQGTSVTVSS	15
可変領域	MNFGLSLIFLALILKGVQCEVQLVESGGDLVKSGLKLSCAASGFIFSSFGMSWVRQTPDKRLEWVATISSGGRNIYYLDSVKGRFTISRDNVKNILYLQMSGLKSEDSAMYVCAREGHYALDYCGQGTSVTVSS	16

【0049】

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

【0050】

「含む」、または「含み」、「含んでいて」もしくは「含まれる」のような派生語は、明確な言語または必然的暗示によって文脈に矛盾している場合を除き、本明細書および特許請求の範囲の全体において包括的な意味で用いられ、すなわち、本発明の実施形態のいずれかの実施または有用性を実質的に促進しうる更なる特徴の存在または付加を排除することなく、示されている特徴の存在を特定するために用いられる。

【0051】

「保存的に修飾された変異体」または「保存的置換」は、タンパク質中のアミノ酸が、類似特性（例えば、電荷、側鎖サイズ、疎水性/親水性、バックボーンコンホメーションおよび剛性など）を有する他のアミノ酸により置換されることを意味し、この場合、該変化は、しばしば、該タンパク質の生物活性を変化させずに施されうる。一般に、ポリペプチドの非必須領域における単一アミノ酸置換は生物活性を実質的に変化させない、と当業者は認識している（例えば、Watsonら（1987）Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224（4th Ed.）を参照されたい）。また、構造的または機能的に類似したアミノ酸の置換は、生物活性を損なう可能性が低い。典型的な保存的置換を表2に記載する。

【表 2】

表 2: 典型的な保存的アミノ酸置換	
元の残基	保存的置換
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys; His
Asn (N)	Gln; His
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; His
Met (M)	Leu; Ile; Tyr
Phe (F)	Tyr; Met; Leu
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

10

20

30

【 0 0 5 2 】

本明細書および特許請求の範囲の全体において用いられる「から実質的になる」およびその派生語、例えば「から実質的になり」または「から実質的になっており」は、任意の列挙されている要素または要素群の包含、および特定されている投与レジメン、方法または組成物の基本的または新規特性を実質的に変化させない、列挙要素と類似した又は異なる性質の他の要素の随意的（すなわち、所望により含んでいてもよい）包含を示す。非限定的な一例としては、列挙されているアミノ酸配列から実質的になる抗 PD-L2 抗体は、結合特異性または活性に実質的な影響を及ぼさない、1 以上のアミノ酸残基の置換を含む 1 以上のアミノ酸をも含んでいてもよい。

40

【 0 0 5 3 】

「制御配列」なる語は、特定の宿主生物における機能的に連結されたコード配列の発現に必要な DNA 配列を意味する。原核生物に適した制御配列には、例えば、プロモーター

50

、所望により、オペレーター配列、およびリボソーム結合部位が含まれる。真核細胞はプロモーター、ポリアデニル化シグナルおよびエンハンサーを用いることが公知である。

【0054】

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

10

【0055】

「診断用抗PD-Lモノクローナル抗体」は、ある哺乳類細胞の表面上で発現される示されているPD-L (PD-L1またはPD-L2)の成熟形態に特異的に結合するmAbを意味する。

【0056】

本明細書中で用いる診断用抗ヒトPD-L1 mAbまたは抗hPD-L1 mAbは、成熟ヒトPD-L1に特異的に結合するmAbを意味する。成熟ヒトPD-L1分子は以下の配列のアミノ酸19~290からなる。

20

【0057】

M R I F A V F I F M T Y W H L L N A F T V T V P K D L Y V V E Y G S N M T I E C
K F P V E K Q L D L A A L I V Y W E M E D K N I I Q F V H G E E D L K V Q H S S
Y R Q R A R L L K D Q L S L G N A A L Q I T D V K L Q D A G V Y R C M I S Y G G
A D Y K R I T V K V N A P Y N K I N Q R I L V V D P V T S E H E L T C Q A E G Y
P K A E V I W T S S D H Q V L S G K T T T T N S K R E E K L F N V T S T L R I N
T T T N E I F Y C T F R R L D P E E N H T A E L V I P E L P L A H P P N E R T H
L V I L G A I L L C L G V A L T F I F R L R K G R M M D V K K C G I Q D T N S K
K Q S D T H L E E T (配列番号21)。

30

【0058】

ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 腫瘍組織切片におけるPD-L1発現の免疫組織化学的 (IHC) 検出のための診断用mAbとして有用な診断用抗ヒトPD-L1 mAbの具体例としては、抗体20C3および抗体22C3が挙げられ、これらは、2013年12月18日に出願され2014年6月26日にWO2014/100079として公開された同時係属国際特許出願PCT/US13/075932に記載されている。FFPE組織切片におけるPD-L1発現のIHC検出に有用であると報告されているもう1つの抗ヒトPD-L1 mAb (Chen, B. J. ら, Clin Cancer Res 19:3462-3473 (2013)) は、Sino Biological, Inc. (Beijing, P. R. China; Catalog number 10084-R015) から公的に入手可能なウサギ抗ヒトPD-L1 mAbである。

40

【0059】

「相同性」は、2つのポリヌクレオチド配列間または2つのポリペプチド配列間の、それらが最適に整列 (アライメント) された場合の配列類似性を意味する。それらの2つの比較される配列の両方における位置が同一塩基またはアミノ酸単量体サブユニットにより占拠されている場合、例えば、2つのDNA分子のそれぞれにおける位置がアデニンにより占拠されている場合、該分子はその位置において相同である。相同性の百分率 (%) は、それらの2つの配列により共有される相同位置の数を、比較される位置の総数で割り算

50

し、100を掛け算したものである。例えば、2つの配列における10個中8個の位置が、それらの配列が最適に整列された場合に一致(マッチ)している又は相同であれば、それらの2つの配列は80%相同である。一般に、該比較は、最大の相同性(%)を与えるように2つの配列が整列された場合に行われる。例えば、該比較はBLASTアルゴリズムにより行われることが可能であり、この場合、該アルゴリズムのパラメータは、それぞれの参照配列の全長にわたってそれぞれの配列の間で最大マッチを与えるように選択される。

【0060】

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

【0061】

「ヒトPD-L2」、「hPD-L2」および「ヒト成熟PD-L2」なる語は本明細書において互換的に用いられ、特に示されていない限り又はそうでないと文脈から容易に理解されない限り、同じ分子を意味すると理解されるべきである。成熟PD-L2分子は、リーダーペプチドとも称される分泌前リーダー配列を欠いている。PD-L2の別名または同義語にはPDCD1L2、PDL2、B7-DC、BtdcおよびCD273が含まれる。成熟ヒトPD-L2アミノ酸配列はNCBI Locus 番号：NP_079515に記載されており、以下に示すアミノ酸配列からなる。

【0062】

F T V T V P K E L Y I I E H G S N V T L E C N F D T G S H V N L G A I T A S L Q 50

K V E N D T S P H R E R A T L L E E Q L P L G K A S F H I P Q V Q V R D E G Q Y
 Q C I I I Y G V A W D Y K Y L T L K V K A S Y R K I N T H I L K V P E T D E V E
 L T C Q A T G Y P L A E V S W P N V S V P A N T S H S R T P E G L Y Q V T S V L
 R L K P P P G R N F S C V F W N T H V R E L T L A S I D L Q S Q M E P R T H P T
 W L L H I F I P F C I I A F I F I A T V I A L R K Q L C Q K L Y S S K D T T K R
 P V T T T K R E V N S A I (配列番号 2 2) 。成熟ヒト P D - L 2 の細胞外ドメインは
 配列番号 2 2 のアミノ酸 1 ~ 2 2 0 からなる。

【 0 0 6 3 】

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

10

【 0 0 6 4 】

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

20

【 0 0 6 5 】

本明細書中で用いる「モノクローナル抗体」なる語は実質的に均一な抗体の集団を意味
 する。すなわち、該集団を構成する抗体分子は、少量で存在しうる可能な天然に生じる突
 然変異以外はアミノ酸配列において同一である。これとは対照的に、通常の(ポリクロー
 ナル)抗体調製物は、典型的には、可変ドメイン、特にCDR内に種々のアミノ酸配列を
 有する多数の種々の抗体を含み、これらは種々のエピトープに特異的であることが多い。
 「モノクローナル」なる修飾語は、実質的に均一な抗体集団から得られたという、抗体の
 特性を示し、いずれかの特定の方法による該抗体の産生を要すると解釈されるべきではな
 い。例えば、本発明に従い使用されるモノクローナル抗体は、Kohlerら(1975)
) Nature 256:495に最初に記載されたハイブリドーマ法により製造される
 ことが可能であり、あるいは組換えDNA法により製造されることが可能である(例えば
 、米国特許第4,816,567号を参照されたい)。「モノクローナル抗体」は、例え
 ばClacksonら(1991)Nature 352:624-628およびMar
 ksら(1991)J.Mol.Biol.222:581-597に記載されている技
 術を用いるファージ抗体ライブラリーからも単離されうる。また、Presta(200
 5)J.Allergy Clin.Immunol.116:731も参照されたい。

30

40

【 0 0 6 6 】

本明細書中で用いる「ポリメラーゼ連鎖反応」または「PCR」は、例えば米国特許第
 4,683,195号に記載されているとおり、特定の核酸配列、RNAおよび/または
 DNAを増幅する方法または技術を意味する。一般に、オリゴヌクレオチドプライマーを
 設計するために、関心領域の末端またはその向こうからの配列情報が用いられる。これら
 のプライマーは、増幅すべき鋳型の逆鎖と配列において同一または類似である。それらの
 2つのプライマーの5'末端ヌクレオチドは、増幅される物質の末端と一致しうる。PC
 Rは、特異的RNA配列、全ゲノムDNAからの特異的DNA配列、および全細胞RNA

50

から転写されたcDNA、バクテリオファージまたはプラスミド配列などを増幅するために用いられうる。全般的には、Mullisら, (1987) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263; Erlich編, (1989) PCR TECHNOLOGY (Stockton Press, N.Y.)を参照されたい。本明細書中で用いるPCRは、核酸の特異的断片を増幅し又は生成させるための核酸ポリメラーゼとプライマーとしての既知核酸との使用を含む、核酸試験サンプルを増幅するための核酸ポリメラーゼ反応法の一例(しかし唯一の例ではない)とみなされる。

【0067】

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

【0068】

本明細書中で用いる「PD-L1」または「PD-L2」発現は、細胞表面における示されているPD-Lタンパク質の、または細胞もしくは組織内の示されているPD-L mRNAの任意の検出可能なレベルの発現を意味する。PD-Lタンパク質発現は、腫瘍組織切片のIHCアッセイにおいて診断用PD-L抗体で、またはフローサイトメトリーにより検出されうる。あるいは、腫瘍細胞によるPD-Lタンパク質発現は、所望のPD-L標的、例えばPD-L1またはPD-L2に特異的に結合する結合性物質(例えば、抗体フラグメント、アフィボディなど)を使用して、PETイメージングにより検出されうる。PD-L mRNA発現を検出し測定するための技術にはRT-PCRおよびリアルタイム定量RT-PCRが含まれる。

【0069】

「組織切片」は、組織サンプルの単一の部分または断片、例えば、正常組織または腫瘍のサンプルから切断された組織の薄片を意味する。

【0070】

「腫瘍」は、癌を有すると診断された又は癌を有する疑いのある対象に適用される場合には、任意のサイズの悪性または潜在的に悪性の新生物または組織塊を意味し、原発腫瘍および続発性新生物を含む。固形(充実性)腫瘍は、嚢胞または液体領域を通常は含有しない、組織の異常成長または塊を意味する。種々のタイプの固形腫瘍が、それらを形成する細胞の型にちなんで命名されている。固形腫瘍の例としては、肉腫、癌腫およびリンパ腫が挙げられる。白血病(血液の癌)は、一般に、固形腫瘍を形成しない(National Cancer Institute, Dictionary of Cancer Terms)。

【0071】

抗PD-L2抗体

本発明は、ヒトPD-L2に特異的に結合する単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントを提供する。該単離抗体またはその抗原結合性フラグメントは3個の軽鎖CDR(CDR L1、CDR L2およびCDR L3)および3個の重鎖CDR(CDR H1、CDR H2およびCDR H3)を含む。該単離抗PD-L2抗体またはその結合性フラグメントは細胞表面上のヒトPD-L2発現の検出に有用である。本発明の抗PD-L2抗体の例には、抗体3G2の軽鎖および重鎖アミノ酸配列を含む抗体(表1を参照されたい; V_Lは配列番号8を含み、またはそれからなり、またはそれから実質的になり、V_Hは配列番号16を含み、またはそれからなり、またはそれから実質的になる)が含まれるが

10

20

30

40

50

、これに限定されるものではない。

【0072】

本発明の幾つかの実施形態においては、PD-L2に結合する組換え抗原結合性タンパク質は、本明細書に開示されている抗原結合性タンパク質のCDRの3、4、5または6個を含む(表1)。1つの実施形態においては、本発明は、抗体3G2のCDRの6個全てを含む、単離された抗体またはその抗原結合性フラグメントを提供する。

【0073】

本発明の1つの実施形態においては、CDRL1は配列番号2または配列番号2の変異体であり、CDRL2は配列番号4または配列番号4の変異体であり、CDRL3は配列番号6または配列番号6の変異体である。

10

【0074】

本発明の抗体および抗原結合性フラグメントにおいては、変異体CDR配列(軽鎖または重鎖)は、参照配列と比較した場合の1個または2個のアミノ酸置換以外は、参照配列と同一である。幾つかの実施形態においては、アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換である。本発明の1つの実施形態においては、変異体CDRは参照CDR配列におけるただ1つのアミノ酸置換を有する。1つの実施形態においては、変異体CDRにおける前記の1つのアミノ酸置換は保存的置換である。好ましい実施形態においては、3個の軽鎖CDRの多くとも2個が変異体配列であり、3個の重鎖CDRの多くとも2個が変異体配列である。より好ましい実施形態においては、変異体配列は6個のCDRのうちの3個、2個または1個のみにおいて存在する。

20

【0075】

本発明の1つの実施形態においては、抗原結合性タンパク質は、配列番号2のCDRL1、配列番号4のCDRL2および配列番号6のCDRL3を含むV_Lドメインを含む。

【0076】

もう1つの実施形態においては、抗原結合性タンパク質は、配列番号8に記載されているアミノ酸配列を含むV_Hドメインを含む。1つの実施形態においては、V_Hドメインは配列番号8からなる。

【0077】

PD-L2に結合する単離された抗原結合性タンパク質は、本発明の抗原結合性タンパク質(例えば、抗体3G2)のCDRH1、CDRH2およびCDRH3の1以上を含む少なくとも1つの重鎖可変(V_H)ドメインを含みうる。特定の実施形態においては、抗原結合性タンパク質は、本発明の抗原結合性タンパク質の、3個のCDRを含むV_Hドメインを含む。

30

【0078】

1つの実施形態においては、CDRH1は配列番号10または配列番号10の変異体であり、CDRH2は配列番号12または配列番号12の変異体であり、CDRH3は配列番号14または配列番号14の変異体である。

【0079】

1つの実施形態においては、抗原結合性タンパク質は、配列番号10に記載されているCDRH1、配列番号12に記載されているCDRH2および配列番号14に記載されているCDRH3を含むV_Hドメインを含む。

40

【0080】

もう1つの実施形態においては、抗原結合性タンパク質は、配列番号16に記載されているアミノ酸配列を含むV_Hドメインを含む。1つの実施形態においては、V_Hドメインは配列番号16からなる。

【0081】

本発明の1つの実施形態においては、抗原結合性タンパク質は、配列番号8に記載されているアミノ酸配列を含むV_Lドメイン、および配列番号16に記載されているアミノ酸配列を含むV_Hドメインを含む。本発明のもう1つの実施形態においては、抗原結合性タンパク質は、配列番号8に記載されているアミノ酸配列からなるV_Lドメイン、および配

50

列番号16に記載されているアミノ酸配列からなるV_Hドメインを含む。

【0082】

他の実施形態においては、本発明は、本明細書に開示されている抗原結合性タンパク質の誘導体である抗原結合性タンパク質を提供する。本発明の抗原結合性タンパク質誘導体はPD-L2に特異的に結合し、本明細書に開示されている抗体（例えば、表1におけるもの）のV_LドメインおよびV_Hドメインに対して少なくとも50%、75%、80%、85%、90%、95%、98%または99%の配列同一性を有するV_LドメインおよびV_Hドメインを有する一方で、所望の結合および機能的特性（例えば、PD-L2結合）を尚も示す。もう1つの実施形態においては、本発明の抗原結合性タンパク質誘導体は、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個まで又はそれ以上の保存的または非保存的アミノ酸置換を有するV_LおよびV_Hドメインを含む一方で、所望の結合および機能的特性を尚も示す。

10

【0083】

本発明の抗原結合性タンパク質誘導体はまた、PD-L2に特異的に結合し、本発明の抗原結合性タンパク質（例えば、表1におけるもの）のV_LドメインおよびV_Hドメインに関して本明細書に開示されているCDRに対して少なくとも50%、75%、80%、85%、90%、95%、98%または99%の配列同一性を有するV_LドメインのCDR（すなわち、CDRL1、CDRL2およびCDRL3）およびV_HドメインのCDRを有する一方で所望の結合および機能的特性（例えば、PD-L2結合）を尚も示す誘導体を含む。もう1つの実施形態においては、本発明の抗原結合性タンパク質誘導体は、0、1、2、3個まで又はそれ以上の保存的または非保存的アミノ酸置換を有する開示されているV_LおよびV_HドメインのCDRを含む一方で、所望の結合および機能的特性を尚も示す。

20

【0084】

配列同一性は、2つのポリペプチドのアミノ酸が、それらの2つの配列が最適に整列された場合に同等位置において同一である度合を意味する。配列同一性は、BLASTアルゴリズムを使用して決定されることが可能であり、この場合、該アルゴリズムのパラメータは、それぞれの参照配列の全長にわたってそれぞれの配列の間で最大マッチを与えるように選択される。以下の参考文献は、配列分析にしばしば使用されるBLASTアルゴリズムに関するものである：BLASTアルゴリズム：Altschul, S.F.ら, (1990) J. Mol. Biol. 215: 403 - 410; Gish, W.ら, (1993) Nature Genet. 3: 266 - 272; Madden, T.L.ら, (1996) Meth. Enzymol. 266: 131 - 141; Altschul, S.F.ら, (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389 - 3402; Zhang, J.ら, (1997) Genome Res. 7: 649 - 656; Wootton, J.C.ら, (1993) Comput. Chem. 17: 149 - 163; Hancock, J.M.ら, (1994) Comput. Appl. Biosci. 10: 67 - 70; アライメント・スコアリング・システム：Dayhoff, M.O.ら, "A model of evolutionary change in proteins" in Atlas of Protein Sequence and Structure, (1978) vol. 5, suppl. 3. M.O. Dayhoff (編), pp. 345 - 352, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, DC; Schwartz, R.M.ら, "Matrices for detecting distant relationships" in Atlas of Protein Sequence and Structure, (1978) vol. 5, suppl. 3. M.O. Dayhoff (編), pp. 353 - 358, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, DC; Altschul, S.F., (1991) J. Mol. Biol. 219: 555 - 565; States, D.J.ら, (1991) Methods 3: 66 - 70; Henikoff, S.ら, (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA

30

40

50

89:10915-10919; Altschul, S. F. ら, (1993) J. Mol. Evol. 36:290-300; アライメント統計学: Karlin, S. ら, (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268; Karlin, S. ら, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877; Dembo, A. ら, (1994) Ann. Prob. 22:2022-2039; および Altschul, S. F. "Evaluating the statistical significance of multiple distinct local alignments" in Theoretical and Computational Methods in Genome Research (S. Suhai 編), (1997) pp. 1-14, Plenum, New York.

10

【0085】

典型的には、本発明の抗原結合性タンパク質誘導体は、(親抗原結合性タンパク質と比較された場合)そのヒトPD-L2結合活性の少なくとも10%(その活性がモル基準で表された場合)を保有する。好ましくは、本発明の抗原結合性タンパク質誘導体は、親抗原結合性タンパク質としてのPD-L2結合アフィニティの少なくとも20%、50%、70%、80%、90%、95%または100%を保有する。

【0086】

該抗体のV_HまたはV_L鎖は重鎖または軽鎖定常領域の全部または一部を更に含む。1つの実施形態においては、該抗体は2個の免疫グロブリン重鎖および2個の免疫グロブリン軽鎖の四量体であり、ここで、免疫グロブリン重鎖および軽鎖は例えばジスルフィド結合により互いに連結されている。重鎖定常領域は3個のドメイン、すなわち、CH1、CH2およびCH3を含む。軽鎖定常領域は1個のドメインCLを含む。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は、典型的には、免疫系の種々の細胞(例えば、エフェクター細胞)および古典的補体系の第1成分(C1q)を含む宿主組織または因子への抗体の結合をもたらす。「抗体」なる語はタイプIgA、IgG、IgE、IgD、IgM(およびそれらのサブタイプ)の無傷免疫グロブリンを含み、ここで、免疫グロブリンの軽鎖はカッパまたはラムダのタイプのものでありうる。

20

【0087】

軽鎖および重鎖においては、可変領域および定常領域は約12個以上のアミノ酸の「J」領域により連結されており、重鎖は約10個以上のアミノ酸の「D」領域をも含む。一般的には、Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W. 編, 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989))を参照されたい。

30

【0088】

本明細書中で用いる「超可変領域」なる語は、抗原結合をもたらす、抗体のアミノ酸残基を意味する。超可変領域は軽鎖可変領域CDRおよび重鎖可変領域CDRからのアミノ酸残基を含む。

【0089】

本発明の抗原結合性タンパク質の機能保存的誘導体も本発明により想定される。本明細書中で用いる「機能保存的誘導体」なる語は、抗原アフィニティおよび/または特異性および/または中和活性のような所望の特性を変化させることなく1以上のアミノ酸残基が変化している抗原結合性タンパク質を意味する。そのような変異体は、類似特性を有するアミノ酸によるアミノ酸の置換、例えば、表2の保存的アミノ酸置換を含むが、これらに限定されるものではない。

40

【0090】

また、高いアフィニティおよび特異性でPD-L2に結合する能力を尚も示す一方で、1、2、3、4または5個まで又はそれ以上のアミノ酸置換を有する本発明の抗PD-L2抗原結合性タンパク質のV_Hドメインを含む組換えポリペプチド、および本発明の抗PD-L2抗原結合性タンパク質のV_Lドメインを含む組換えポリペプチドを提供する。

50

【 0 0 9 1 】

もう1つの実施形態においては、本明細書に記載されている V_L ドメインまたは V_H ドメインに対して少なくとも95%、90%、85%、80%、75%または50%の配列相同性を有する V_L ドメインおよび/または V_H ドメインを有し、PD-L2への特異的結合を示す抗原結合性タンパク質を提供する。もう1つの実施形態においては、本発明の抗原結合性タンパク質は、1、2、3、4または5個まで又はそれ以上のアミノ酸置換を有する V_L ドメインおよび V_H ドメイン（シグナル配列を伴う又は伴わない）を含み、PD-L2への特異的結合を示す。

【 0 0 9 2 】

もう1つの実施形態においては、本発明は、ヒトPD-L2に特異的に結合し、 V_L ドメインおよび V_H ドメインを有し、表1の軽鎖および重鎖CDRに対して100%の配列相同性ならびに表1の軽鎖および重鎖成熟可変領域に対して少なくとも90%、92%、94%、96%、98%または99%の配列相同性を有する抗体またはその抗原結合性フラグメントを含む。

10

【 0 0 9 3 】

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

20

【 0 0 9 4 】

核酸

本発明はまた、本明細書に開示される抗PD-L1抗体および抗原結合性フラグメントの免疫グロブリン鎖をコードする組換え核酸を提供する。例えば、本発明は、表1に記載されているアミノ酸配列をコードする核酸、およびそれにハイブリダイズする核酸を含む。

【 0 0 9 5 】

1つの実施形態においては、該組換え核酸は、本明細書に開示されている抗原結合性タンパク質のCDRL1、CDRL2およびCDRL3（配列番号2、4および6）を含む軽鎖可変（ V_L ）ドメインを含む抗原結合性タンパク質をコードする。

30

【 0 0 9 6 】

1つの実施形態においては、該組換え核酸は、本明細書に開示されている抗原結合性タンパク質のCDRH1、CDRH2およびCDRH3（配列番号10、12および14）を含む重鎖可変（ V_H ）ドメインを含む抗原結合性タンパク質をコードする。

【 0 0 9 7 】

1つの実施形態においては、該組換え核酸は、少なくとも1つの軽鎖（ V_L ）ドメインと少なくとも1つの重鎖可変（ V_H ）ドメインとを含む抗原結合性タンパク質をコードし、ここで、 V_L ドメインは、配列番号2、4および6に記載されているアミノ酸配列を有する3個のCDRを含み、 V_H ドメインは、配列番号10、12および14に記載されているアミノ酸配列を有する3個のCDRを含む。1つの実施形態においては、単離された核酸は、配列番号8に記載されている軽鎖可変領域、および配列番号16に記載されている重鎖可変領域をコードする。幾つかの実施形態においては、単離された核酸は単一核酸分子上で軽鎖および重鎖の両方をコードし、他の実施形態においては、軽鎖および重鎖は別個の核酸分子上でコードされる。もう1つの実施形態においては、該核酸は更にシグナル配列をコードする。

40

【 0 0 9 8 】

本発明はまた、ハイブリドーマMEB123.3G2から単離された全RNAから調製された抗体可変軽鎖および重鎖cDNA（それぞれ配列番号17および配列番号18）のヌクレオチド配列を提供する。

50

【0099】

本発明は更に、本明細書に開示されている抗PD-L2抗原結合性タンパク質をコードする核酸にハイブリダイズする核酸を含む。一般に、該核酸は、中等度または高度なストリンジェンシーの条件下、本明細書に開示されている抗原結合性タンパク質をコードする、そしてまた、PD-L2に特異的に結合する能力を維持する抗原結合性タンパク質をコードする核酸にハイブリダイズする。第1核酸分子が第2核酸分子に「ハイブリダイズ可能」と言えるのは、温度および溶液イオン強度の適当な条件下（Sambrookら、前掲を参照されたい）、第1核酸分子の一本鎖形態が第2核酸分子にアニーリングしうる場合である。温度およびイオン強度の条件はハイブリダイゼーションの「ストリンジェンシー」を決定する。典型的な低ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件は55、5×SSC、0.1% SDSおよびホルムアミド非含有；または30% ホルムアミド、5×SSC、0.5% SDS、42である。典型的な中等度ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件は40% ホルムアミド、ならびに5×または6×SSCおよび0.1% SDS、42である。高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件は50% ホルムアミド、5×または6×SSC、42、または所望により、より高い温度（例えば、57、59、60、62、63、65または68）である。一般に、SSCは0.15M NaClおよび0.015M クエン酸Naである。ハイブリダイゼーションは、それらの2つの核酸が相補的配列を含有することを要する。ただし、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに応じて、塩基間のミスマッチが可能である。核酸のハイブリダイゼーションのための適当なストリンジェンシーは核酸の長さ、および相補性の度合、当技術分野でよく知られた変数に左右される。2つのヌクレオチド配列間の類似性または相同性の度合が大きければ大きいほど、それらの核酸がハイブリダイズしうるストリンジェンシーは高くなる。100ヌクレオチドを超える長さのハイブリッドの場合、融解温度を計算するための式が導き出されている（Sambrookら、前掲、9.50-9.51を参照されたい）。より短い核酸、例えばオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションの場合、ミスマッチの位置がより重要となり、オリゴヌクレオチドの長さがその特異性を決定する（Sambrookら、前掲、11.7-11.8を参照されたい）。

【0100】

もう1つの実施形態においては、本発明は、本明細書に記載されている単離された抗PD-L2抗体または抗原結合性フラグメントのポリペプチド鎖の少なくとも1つをコードする単離された核酸（単数または複数）、例えばDNAを提供する。幾つかの実施形態においては、単離された核酸は単一核酸分子上で軽鎖および重鎖の両方をコードし、他の実施形態においては、軽鎖および重鎖は別個の核酸分子上でコードされる。もう1つの実施形態においては、該核酸は更にシグナル配列をコードする。

【0101】

また、本明細書に記載されている抗PD-L2抗原結合性タンパク質誘導体をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子も本発明に含まれる。

【0102】

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

【0103】

エピトープ結合

本発明は更に、抗体3G2（「参照抗体」）の軽鎖および重鎖アミノ酸配列を含む四量体抗体の、ヒトPD-L2への結合を、参照抗体と同じエピトープへの結合により遮断す

10

20

30

40

50

る抗体またはその抗原結合性フラグメントを提供する。そのような抗体および結合性フラグメントは、当技術分野で公知の任意の交差遮断または競合分析を用いて特定されうる。第1抗体が第2抗体の結合を交差遮断するとみなされるのは、飽和状態までの第1抗体への標的の予備結合が、標的の最大半量結合を達成するのに必要な第2抗体の濃度を2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍、200倍以上増加させる場合である。交差遮断抗体の結合性エピトープは、当技術分野でよく知られた技術を用いて特定されうる。

【0104】

1つのそのようなエピトープマッピング技術は、タンパク質分解および質量分析と組合された水素/重水素交換(HDX-MS)である。この方法は、重水(D₂O)単体中、およびその抗体の存在下、種々の時間間隔でインキュベートされた際の抗原による重水素取り込みの度合の正確な測定および比較に基づいている。重水素は露出領域内のタンパク質のアミド主鎖上の水素と交換され、一方、抗体に結合した抗原の領域は保護され、タンパク質分解断片の液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法(LC-MS/MS)による分析の後、交換をより少量しか又は全く示さない。

【0105】

抗体およびその抗原結合性フラグメントの製造方法

本発明の抗体は、所望の抗体を発現するハイブリドーマクローンを培養することにより製造されうる。例えば、約1グラムの3G2抗体は、以下の方法を用いて、マウスハイブリドーマ細胞株MEB123.3G2.038から製造され、精製されうる。凍結MEB123.3G2.038細胞を、0.18% Pluronic F-68の存在下または非存在下で2mMの追加的L-グルタミンを含有するハイブリドーマ血清非含有培地を含む振とうフラスコ内に解凍する。Pluronic F-68の存在は振とうフラスコ培養の生存性を改善しうる。細胞が振盪フラスコ内に完全に馴化したら、10% CHO CD高効率フィードB(Invitrogen, カタログ番号A10240-01)を加えながら、WAVEバイオリアクター(GE Healthcare Life Sciences)内の無血清培地において20リットルの生産培養を行う。細胞増殖のために、1リットルの培養を小さなWAVEバッグ内で開始させ、ついでその1LのWAVE培養物をWAVEバイオリアクターにおいて20Lの培養へと拡大させる。その20リットルの培養を0.5×10⁶ 生存細胞/mLの細胞密度で開始させ、第1日に10% CHO CD高効率フィードBを供給し、1N Na₂CO₃でpHを毎日調節する。4日後に細胞を集める。NOVA分析のために、少量のサンプルを毎日採取することが可能である。

【0106】

本発明の抗hPD-L2抗体は以下の方法によりハイブリドーマ培養から精製されうる。1.2マイクロメートルガラス繊維および0.2マイクロメートル酢酸セルロースフィルターを使用するデプス濾過により、該ハイブリドーマ培養を清澄化する。等体積の2×ProSepAバッファー(100mM ホウ酸, 5M NaCl, pH8.5)を該清澄化回収物に加え、該希釈回収物を170mL床体積プロテインAカラム上にローディングする。該カラムを5カラム体積(CV)の1×ProSepAバッファー(50mM ホウ酸, 2.5M NaCl, pH8.5)で洗浄し、ついで2CVの1×PBSで洗浄し、該抗hPD-L2抗体を5CVの溶出バッファー(0.1M グリシン, pH3.0)で溶出する。IgGを含有する溶出画分を一緒にし、1.0M Tris, pHバッファーの1/10の体積を加えることによりpHを中和する。ついで該中和抗体組成物を、10kDa 使い捨てTFFカセットを使用して滅菌濾過する。該抗体は、10リットルの製剤化バッファー(20mM 酢酸ナトリウム, 9% スクロース, pH5.0)に対するダイアフィルトレーションおよび20体積の交換により、保存のために製剤化されうる。

【0107】

本明細書に開示されている抗PD-L2抗体は組換え法(例えば、大腸菌(E. coli

10

20

30

40

50

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

【0108】

抗体PD-L2抗体は、米国特許第6,331,415号に記載されている方法のいずれかによっても製造されうる。

【0109】

本明細書に開示されている抗体またはフラグメントの発現のための宿主として利用可能な哺乳類細胞系は当技術分野でよく知られており、American Type Culture Collection(ATCC)から入手可能な多数の不死化細胞系を包含する。これらには、とりわけ、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、NSO、SP2細胞、HeLa細胞、乳児ハムスター腎(BHK)細胞、サル腎細胞(COS)、ヒト肝細胞癌細胞(例えば、Hep G2)、A549細胞、3T3細胞、HEK-293細胞および多数の他の細胞系が含まれる。哺乳類宿主細胞には、ヒト、マウス、ラット、イヌ、サル、ブタ、ヤギ、ウシ、ウマおよびハムスター細胞が含まれる。特に好ましい細胞系は、どの細胞系が高い発現レベルを有するかを判断することにより選択される。使用されうる他の細胞系としては、昆虫細胞系、例えばSf9細胞、両生類細胞、細菌細胞、植物細胞および真菌細胞が挙げられる。重鎖またはその抗原結合性部分もしくはフラグメント、軽鎖および/またはその抗原結合性フラグメントをコードする組換え発現ベクターを哺乳類宿主細胞内に導入する場合には、該宿主細胞における該抗体の発現、またはより好ましくは、該宿主細胞が増殖する培地内への該抗体の分泌を可能にするのに十分な時間にわたり、該宿主細胞を培養することにより、該抗体を産生させる。

【0110】

抗体は、標準的なタンパク質精製方法を用いて培地から回収されうる。更に、生産細胞系からの本発明の抗体(またはそれからの他の部分)の発現は、幾つかの公知技術を用いて増強されうる。例えば、グルタミンシンターゼ遺伝子発現系(GS系)は、ある条件下の発現を増強するための一般的なアプローチである。GS系は全体的または部分的に欧州特許第0216846号、第0256055および第0323997号ならびに欧州特許出願第89303964.4号に記載されている。

【0111】

本発明は更に、本明細書に開示されている抗PD-L2抗体の抗体フラグメントを含む。該抗体フラグメントには、 $F(ab)_2$ フラグメントが含まれ、これは例えばペプシンによるIgGの酵素的切断により産生されうる。

【0112】

1つの実施形態においては、該抗体または抗原結合性フラグメントは重鎖定常領域、例えばヒト定常領域、例えば1、2、3または4ヒト重鎖定常領域またはそれらの変異体を含む。もう1つの実施形態においては、該抗体または抗原結合性フラグメントは軽鎖定常領域、例えばヒト軽鎖定常領域、例えばラムダまたはカッパヒト軽鎖領域またはそれらの変異体を含む。限定的ではない例示に過ぎないが、ヒト重鎖定常領域は1であ

10

20

30

40

50

ることが可能であり、ヒト軽鎖定常領域はカップパであることが可能である。もう1つの実施形態においては、該抗体のFc領域は、Ser 228 Pro突然変異を有する4である (Schuurman, Jら, Mol. Immunol. 38: 1-8, 2001)。

【0113】

抗体の改変

親抗原結合性タンパク質の可変ドメイン内のフレームワーク残基に対する修飾を含むように、例えば、抗原結合性タンパク質の特性を改善するために、抗PD-L2抗原結合性タンパク質が改変(操作)される実施形態が更に含まれる。典型的には、そのようなフレームワーク修飾は、抗原結合性タンパク質の免疫原性を低下させるために行われる。これは通常、親抗原結合性タンパク質における可変ドメイン内の非CDR残基(すなわち、フレームワーク残基)を、該抗原結合性タンパク質が使用されることになる種の免疫レパトワからの類似残基(例えば、ヒト用治療剤の場合にはヒト残基)で置換することにより達成される。そのような抗体は「ヒト化」抗原結合性タンパク質と称される。幾つかの場合には、改変(例えば、ヒト化)抗原結合性タンパク質の特異性を変化させ、またはアフィニティを増強することが望ましい。1つのアプローチは1以上のフレームワーク残基を対応生殖系列配列へと「復帰突然変異(back mutate)」させることである。より詳しくは、体細胞突然変異を受けた抗原結合性タンパク質は、該抗原結合性タンパク質が由来する生殖系列配列とは異なるフレームワーク残基を含有しうる。そのような残基は、該抗原結合性タンパク質が由来する生殖系列配列と該フレームワーク配列を比較することにより特定されうる。もう1つのアプローチは、該改変(例えば、ヒト化)抗原結合性タンパク質の位置の1以上において元の親残基へと復帰突然変異させること、例えば、フレームワーク残基の置換の過程において喪失した可能性がある結合アフィニティを回復させることである(例えば、米国特許第5,693,762号、米国特許第5,585,089号および米国特許第5,530,101号を参照されたい)。

【0114】

特定の実施形態においては、以下のとおりに、最終的な抗原結合性タンパク質の、より高い化学的安定性を得るために、露出側鎖を含有する或るアミノ酸を別のアミノ酸残基へと変化させることが望ましいであろう。アスパラギンの脱アミド化はN-GまたはD-G配列上で生じ、イソアスパラギン酸残基の生成をもたらすことが可能であり、該残基はポリペプチド鎖内にねじれ(キック)を導入し、その安定性を低下させる(イソアスパラギン酸効果)。ある実施形態においては、本開示の抗原結合性タンパク質はアスパラギン異性部位を含有しない。

【0115】

例えば、特にCDR内の、いずれかのAsn-Gly配列におけるイソアスパルターートの形成の可能性を低減するために、アスパラギン(Asn)残基はGlnまたはAlaへと改変されうる。同様の問題はAsp-Gly配列においても生じうる。ReissnerおよびAswad(2003)Cell.Mol.Life.Sci.60:1281。イソアスパルターート形成は抗体のその標的抗原への結合を減弱し、または完全に阻止しうる。Presta(2005)J.Allergy.Clin.Immunol.116:731,p.734を参照されたい。1つの実施形態においては、該アスパラギンはグルタミン(Gln)へと改変される。小さなアミノ酸がアスパラギンまたはグルタミンに隣接して存在する場合にはより高い率で生じる脱アミド化の可能性を低減するために、アスパラギン(Asn)またはグルタミン(Gln)残基に隣接したアミノ酸を改変することも望ましいかもしれない。Bischoff & Kolbe(1994)J.Chromatog.662:261を参照されたい。また、抗原結合アフィニティを低減しうる、そしてまた、最終抗体調製物における分子不均一性に寄与しうるメチオニン硫黄の酸化の可能性を低減するために、CDR内のいずれかのメチオニン残基(典型的には溶媒露出Met)がLys、Leu、AlaまたはPheへと改変されうる(同誌)。1つの実施形態においては、メチオニンはアラニン(Ala)へと改変される。また、Asn-Proペプチド結合の潜在的な切断を妨げ又は最小にするために、CDRにおいて見出さ

10

20

30

40

50

れるいずれかのAsn-Proの組合せをGln-Pro、Ala-ProまたはAsn-Alaへと改変することが望ましいかもしれない。ついで、そのような置換を有する抗体をスクリーニングして、該置換がヒトPD-L2に対する抗体のアフィニティまたは特異性を、許容し得ないレベルに低減しないことを確認する。

【表3】

表3. CDRの典型的な安定化変異体

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

10

20

【0116】

V_Hおよび/またはV_L CDRの変異は、独立して、任意の組合せで選択されうる。また、所望の活性または結合能が維持される限り、本明細書に記載されている任意の変異は、独立して、任意の組合せで選択されうる。

【0117】

Fc領域の改変

本明細書に開示されている抗原結合性タンパク質はまた、Fc領域内の修飾を含むように、典型的には、抗原結合性タンパク質の機能特性、例えば血清半減期、補体固定、Fc受容体結合および/またはエフェクター機能（例えば、抗原依存性細胞傷害性）の1以上を変化させるために改変されうる。更に、本明細書に開示されている抗原結合性タンパク質は化学的に修飾可能であり（例えば、1以上の化学的部分が該抗原結合性タンパク質に結合可能である）、あるいは、再び抗原結合性タンパク質の機能特性の1以上を改変するために、そのグリコシル化を改変するように修飾されうる。これらの実施形態のそれぞれは後記に更に詳細に記載されている。Fc領域内の残基の番号付けはKababatのEUIンデックスのものである。

30

【0118】

本明細書に開示されている抗原結合性タンパク質は、改変されたエフェクター機能をもたらすための、修飾（または遮断）されたFc領域を有する抗原結合性タンパク質をも含む。例えば、米国特許第5,624,821号；WO2003/086310；WO2005/120571；WO2006/0057702を参照されたい。そのような修飾は、診断および療法における可能な有益な効果を伴って、免疫系の種々の反応を増強または抑制するために用いられうる。Fc領域の改変には、アミノ酸変化（置換、欠失および挿入）、グリコシル化または脱グリコシル化および複数のFcの付加が含まれる。Fcに対する変化はまた、治療用抗原結合性タンパク質における抗体の半減期を改変することが可能であり、それほど頻繁でない投与ならびにそれによる便利さの向上および物質の使用の減少を可能にする。Presta(2005) J. Allergy Clin. Immu

40

50

no1.116:731, p.734-35を参照されたい。

【0119】

1つの実施形態においては、該抗原結合性タンパク質は、重鎖定常領域のヒンジ領域内の228位に対応する位置におけるセリンからプロリンへの突然変異(S228P; EUIンデックス)を含むIgG4アイソタイプ抗体の抗体またはそのフラグメントである。この突然変異はヒンジ領域内の重鎖間ジスルフィド架橋の不均一性を排除することが報告されている(Angalら, 前掲; 241位はKabata番号付け系に基づく)。

【0120】

1つの実施形態においては、CH1のヒンジ領域は、該ヒンジ領域内のシステイン残基の数が増加または減少するように修飾される。このアプローチは米国特許第5,677,425号に更に詳細に記載されている。CH1のヒンジ領域内のシステイン残基の数は、例えば、軽鎖および重鎖の集合を促進させるために、または抗体の安定性を増強もしくは低減するために改変される。

10

【0121】

もう1つの実施形態においては、該抗原結合性タンパク質は、その生物学的半減期を増加させるために修飾される。種々のアプローチが可能である。例えば、米国特許6,277,375号に記載されているとおり、以下の突然変異の1以上が導入されうる:T252L、T254S、T256F。あるいは、米国特許第5,869,046号および第6,121,022号に記載されているとおり、生物学的半減期を増加させるために、該抗原結合性タンパク質は、IgGのFc領域のCH2ドメインの2つのループから取られたサルベージ(salvage)受容体結合性エピトープを含有するようにCH1またはCL領域内で改変されうる。

20

【0122】

更に他の実施形態においては、該抗原結合性タンパク質のエフェクター機能を改変するために、少なくとも1つのアミノ酸残基を異なるアミノ酸残基で置換することにより、Fc領域を改変する。例えば、抗原結合性タンパク質がエフェクターリガンドに対する改変されたアフィニティを有するが、親抗原結合性タンパク質の抗原結合能を保有するように、アミノ酸残基234、235、236、237、297、318、320および322から選択される1以上のアミノ酸が異なるアミノ酸残基で置換されうる。アフィニティが改変されるエフェクターリガンドは、例えば、Fc受容体または補体のC1成分でありうる。このアプローチは米国特許第5,624,821号および第5,648,260号に更に詳細に記載されている。

30

【0123】

もう1つの例においては、アミノ酸231位および239位における1以上のアミノ酸残基を改変して、それにより、補体を固定する該抗原結合性タンパク質の能力を改変する。このアプローチはPCT公開WO94/29351に更に詳細に記載されている。

【0124】

更にもう1つの例においては、抗体依存性細胞傷害性(ADCC)をもたらす該抗原結合性タンパク質の能力を増強もしくは低減するために、および/またはFc受容体に対する該抗原結合性タンパク質のアフィニティを増強もしくは低減するために、以下の位置: 238、239、243、248、249、252、254、255、256、258、264、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、329、330、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438または439位における1以上のアミノ酸を修飾することにより、Fc領域を修飾する。このアプローチはPCT公開WO 00/42072に更に詳細に記載されている。更に、FcRI、FcRII、FcRIIIおよびFcRnに対するヒトIgG1上の結合部位が位置決

40

50

定されており、改善された結合を示す変異体が記載されている (Shields ら (2001) J . Biol . Chem . 276 : 6591 - 6604 を参照されたい) 。 256、290、298、333、334 および 339 位における特定の突然変異は Fc RII への結合を改善することが示された。また、以下の組合せ突然変異体は Fc RII 結合を改善することが示された : T256A / S298A、S298A / E333A、S298A / K224A および S298A / E333A / K334A。

【 0125 】

更にもう 1 つの実施形態においては、該抗原結合性タンパク質は特定のグリコシル化パターンを含む。例えば、非グリコシル化抗原結合性タンパク質 (すなわち、該抗原結合性タンパク質はグリコシル化を欠く) が製造されうる。抗原結合性タンパク質のグリコシル化パターンは、例えば、抗原に対する該抗原結合性タンパク質のアフィニティまたはアビディティを増強するように改変されうる。そのような修飾は、例えば、該抗原結合性タンパク質配列内のグリコシル化部位の 1 以上を改変することにより達成されうる。例えば、可変領域フレームワークグリコシル化部位の 1 以上の除去をもたらし、それによりその部位におけるグリコシル化を排除する 1 以上のアミノ酸置換が施されうる。そのような非グリコシル化は抗原に対する該抗体のアフィニティまたはアビディティを増強しうる。例えば、米国特許第 5,714,350 号および第 6,350,861 号を参照されたい。

【 0126 】

抗体コンジュゲート

本明細書に開示されている抗 PD - L2 抗体および抗体フラグメントはまた、放射性核種または他の検出可能な標識のような化学的部分にコンジュゲート化されうる。放射性核種には、⁹⁹Tc、⁹⁰Y、¹¹¹In、³²P、¹⁴C、¹²⁵I、³H、¹³¹I、¹¹C、¹⁵O、¹³N、¹⁸F、³⁵S、⁵¹Cr、⁵⁷Co、²²⁶Ra、⁶⁰Co、⁵⁹Fe、⁵⁷Se、¹⁵²Eu、⁶⁷Cu、²¹⁷Pb、²¹¹At、²¹²Pb、⁴⁷Sc、¹⁰⁹Pd、²³⁴Th および ⁴⁰K、¹⁵⁷Gd、⁵⁵Mn、⁵²Tr、および ⁵⁶Fe が含まれる。蛍光または化学発光標識には、発蛍光団、例えば希土類キレート、フルオレセインおよびその誘導体、ローダミンおよびその誘導体、イソチオシアナート、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o - フタルアルデヒド、フルオレスカミン、¹⁵²Eu、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシフェリン、ルミナール標識、イソルミナール標識、芳香族アクリジニウムエステル標識、イミダゾール標識、アクリジミウム塩標識、シュウ酸エステル標識、エクオリン標識、2,3 - ジヒドロフタラジンジオン、ピオチン / アビジン、スピン標識および安定なフリーラジカルが含まれる。

【 0127 】

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

【 0128 】

実験的および診断的用途

本明細書に開示されている抗 PD - L2 抗体および抗体フラグメントは、細胞の表面上で発現されたヒト PD - L2 を特異的に検出するために使用されうる。該細胞は、ヒト個体から得られた組織または血清サンプル中に存在することが可能であり、PD - L2 発現の検出は、当技術分野で公知の種々のインビトロアッセイ方法のいずれかを用いて行われる。

【 0129 】

例えば、特定の実施形態は ELISA アッセイ (酵素結合イムノソルベントアッセイ)

を含み、これは典型的には以下の工程を含む：

- (a) 基体 (例えば、マイクロタイタープレートウェル、例えばプラスチックプレートの表面) を抗 P D - L 1 抗体またはその抗原結合性フラグメントで被覆 (コート) し、
- (b) ヒト P D - L 1 の存在に関して試験されるべきサンプルを該基体に適用し、
- (c) 該サンプル中の未結合物質が除去されるように、該プレートを洗浄し、
- (d) 同様にヒト P D - L 1 に特異的である、検出可能な様態で標識された抗体 (例えば、酵素結合抗体) を適用し、
- (e) 未結合標識抗体が除去されるように、該基体を洗浄し、
- (f) 該標識抗体が、結合した酵素である場合には、該酵素により蛍光シグナルへと変換される化学物質を適用し、
- (g) 該標識抗体の存在を検出する。

10

【 0 1 3 0 】

もう1つの実施形態においては、A B T S (例えば、2 , 2 ' - アジノ - ビス (3 - エチルベンゾチアゾリン - 6 - スルホン酸)) または 3 , 3 ' , 5 , 5 ' - テトラメチルベンジジンと反応して、検出可能な変色を引き起こすペルオキシダーゼで、標識抗体を標識する。あるいは、シンチラント (*scintillant*) の存在下でシンチレーションカウンターにより検出されうる検出可能な放射性同位体 (例えば、³H) で標識抗体を標識する。

【 0 1 3 1 】

本発明の抗 P D - L 2 抗体およびその抗原結合性フラグメントはウエスタンブロットまたは免疫タンパク質ブロット法において使用されうる。そのような方法は本発明の一部を構成し、例えば以下を含む：

20

(1) ヒト P D - L 2 の存在に関して試験されるべき膜または他の固体基体を本発明の抗体またはその抗原結合性フラグメントと接触させる。そのような膜は、非変性 P A G E (ポリアクリルアミドゲル電気泳動) ゲルまたは S D S - P A G E (ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動) ゲルにおいて P D - L 2 の存在に関して試験されるべきタンパク質が (例えば、該ゲルにおける電気泳動分離の後で) 移されたニトロセルロースまたはビニル系 (例えば、ポリビニリデンフルオリド (P V D F)) 膜の形態をとりうる。抗 P D - L 2 抗体またはフラグメントとの膜の接触の前に、膜を、所望により、例えば乾燥脱脂乳などでブロッキングして、該膜上の非特異的タンパク質結合部位に結合するようにする。

30

【 0 1 3 2 】

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

【 0 1 3 3 】

(3) 結合抗 P D - L 2 抗体またはフラグメントを検出する。該結合抗体またはフラグメントは、検出可能な様態で標識された二次抗体 (抗免疫グロブリン抗体) と共に該結合抗体またはフラグメントをインキュベートし、ついで該二次抗体の存在を検出することにより検出されうる。

【 0 1 3 4 】

40

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

50

結合されうる。

【 0 1 3 5 】

好ましい IHC アッセイは、商業的に入手可能な Dako EnVision (商標) FLEX 検出系を使用し、これは Dako Autostainer 装置 (Dako, an Agilent Technologies Company, Glostrup, Denmark) と併用されることが意図される。本発明の抗体 (すなわち、3G2 抗体、3G2 の 6 個の CDR を含む抗体またはその抗原結合性フラグメント、あるいは 3G2 の重鎖および軽鎖可変領域を含む抗体またはその抗原結合性フラグメント) と共にこの系を使用する場合、IHC アッセイは以下のとおりに行われうる。

【表 4】

アッセイ試薬

試薬	企業	カタログ 番号	調製
抗 PD-L2 mAb	N/A	N/A	mAb のストック溶液を抗体希釈剤で 0.8 マイクログラム/ml に希釈する
EnVision FLEX キット、高 pH (プラス) (マウスリンカーを伴う)	Dako	K8012	<p>該キットの全試薬は、以下を除き、そのまま使用可能:</p> <p>EnVision FLEX 標的回収溶液, 高 pH</p> <ul style="list-style-type: none"> 脱イオン水を使用して 50×キット溶液を 1:50 希釈することにより調製する。希釈した溶液は調製後 1 ヶ月間だけ良好であり、溶液が濁ったら廃棄しなければならない。 <p>EnVision FLEX 洗浄バッファー (TBST)</p> <ul style="list-style-type: none"> キット 20X 溶液を脱イオン水で 1:20 希釈することにより調製する。 <p>EnVision FLEX DAB 基質</p> <ul style="list-style-type: none"> 1mL の DAB 基質バッファーに 1 滴の DAB 色素原を加えることにより調製する。
抗体希釈剤	Dako	S0809	そのまま使用可能
マイヤー(Mayer)改変ヘマトキシリン	Poly Scientific R&D Corp. Bay Shore, NY USA	S216-1GL	そのまま使用可能; 毎日濾過
マイクロマウント (Micromount)	Leica Biosystems Inc. Buffalo Grove, IL USA	3801731	そのまま使用可能

【 0 1 3 6 】

アッセイプロトコル

1) FFPE 組織を 4 μm に薄片化し、一晚風乾させる。

【 0 1 3 7 】

2) 使用前にスライドを60 で45分間焼く。

【0138】

3) 使用当日に、以下のとおりに設定されたLeica Stainer XL(プログラム1)を使用してスライドを脱パラフィン化する：

- 1) キシレン 5分×3
- 2) キシレン 3分×1
- 3) 100% アルコール 3分×2
- 4) 95% アルコール 3分×1
- 5) 95% アルコール 2分×1
- 6) 70% アルコール 2分×1
- 7) 脱イオン水 1分×1。

10

【0139】

4) 脱パラフィン化後、大気圧で97 で20分間、EnVision(商標)FLEX高pH標的回収溶液を使用して、FFPEスライドを熱誘発性エピトープ回収(HIER)に付す。

【0140】

5) ついでスライドを脱イオン水中に浸漬し、ついでTBST中に2回浸漬する(乾燥アーチファクトを避けるために、切片を常に湿潤状態で維持しなければならない)。

【0141】

6) ついで、以下のとおりに設定(プログラム)されたオートステイナー内にスライドをロードする。

20

【表5】

工程	インキュベーション時間	洗浄
EnVision Flex ペルオキシダーゼブロック	5分	1×TBST
抗PD-L2 mAb, 0.8ug/mL	60分	1×TBST
EnVision Flex+ MS リンカー	15分	1×TBST
EnVision Flex/HRP	20分	1×TBST
EnVision Flex DAB	10分	3×脱イオン水

30

【0142】

7) オートステイナープログラムが完了した後、スライドを装置から取り出し、脱イオン水に浸漬し、対比染色/脱水する。これは、以下のとおりに設定されたLeica Stainer XL(プログラム3)を使用して行う。

40

【0143】

- 1) マイヤー(Mayer's)ヘマトキシリン 30秒×1
- 2) 脱イオン水 2分×1
- 3) リチャード・アレン(Richard Allen's)ブルーイング試薬 20秒×1
- 4) 脱イオン水 2分×1
- 5) 95% アルコール 1分×1
- 6) 100% アルコール 1分×2

50

7) キシレン 1分×3

8) キシレン 終了。

【0144】

8) スライドをマイクロマウント (Micro mount) 媒体でカバーガラス化し、十分に乾燥させてから顕微鏡で観察する。

【0145】

本明細書に開示されている抗PD-L2抗体およびその抗原結合性フラグメントはインビボ腫瘍イメージングにも使用されうる。そのような方法は、放射能標識抗PD-L2抗体またはその抗原結合性フラグメントを、PD-L2発現を伴う腫瘍の存在に関して試験されるべきヒト患者の体内に注射し、ついで、例えば、該腫瘍に結合した高濃度の該抗体またはフラグメントを含む部位における、該標識抗体またはフラグメントの存在を検出するために、患者の身体の核イメージングを行うことを含む。1つの実施形態においては、抗PD-L2抗体は、表1に挙げられている6個のCDRを含むヒト化抗体である。イメージング技術には、SPECTイメージング(単一光子放出型コンピュータ断層撮影)またはPETイメージング(陽電子放射断層撮影)が含まれる。標識には、例えば、SPECTイメージングと組合されるヨウ素-123 (^{123}I) およびテクネチウム-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)、または例えばPETイメージングと組合される ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O もしくは ^{18}F 、またはインジウム-111が含まれる(例えば、Gordonら(2005) International Rev. Neurobiol. 67:385-440を参照されたい)。

10

20

【0146】

治療方法

本発明はまた、PD-1アンタゴニストに対する臨床応答を予測するための方法を提供する。1つの実施形態においては、該方法は、ヒト患者から摘出された腫瘍組織サンプルにおけるPD-L2の発現レベルを測定し、腫瘍組織サンプルがPD-L2に関して陽性であるか陰性であるかを判定し、サンプルがPD-L2陽性であると判定された場合にはPD-1アンタゴニストを患者に投与することを含む。

【0147】

本発明はまた、腫瘍を有する患者の治療方法に関する。該方法は、(1)腫瘍がPD-L2発現に関して陽性であるか陰性であるかを判定し、(2)腫瘍がPD-L2に関して陽性である場合には、PD-1アンタゴニストの治療的有効量を対象に投与し、または腫瘍がPD-L2に関して陰性である場合には、PD-1アンタゴニストを含まない癌治療を対象に投与することを含む。

30

【0148】

前記方法の実施形態においては、該方法は更に、腫瘍組織サンプルがPD-L1陽性であるかどうかを判定することを含む。該方法の特定の実施形態においては、サンプルがPD-L1およびPD-L2の両方に関して陽性であると判定された場合に、PD-1アンタゴニストを患者に投与する。

【0149】

前記方法の1つの実施形態においては、IHCアッセイにおいて、抗PD-L2抗体またはその抗原-タンパク質フラグメントを使用して、PD-L2の発現レベルを決定する。本発明の実施形態においては、IHCアッセイにおけるPD-L2発現のレベルが、染色の強度に基づく0~5の尺度において1以上である場合に、サンプルを「PD-L2陽性」と評価する。この場合、染色を分類するために以下の尺度を用いる: 0 = 陰性、1 = 稀少、2 = 低い、3 = 中等度、4 = 高い、5 = 非常に高い。他の実施形態においては、IHCアッセイにおけるPD-L2発現スコアが2以上、3以上、4以上または5である場合に、サンプルをPD-L2陽性と評価する。

40

【0150】

前記方法の1つの実施形態においては、患者は、非小細胞肺癌、頭頸部扁平上皮癌、胃癌、三種陰性乳癌および膀胱癌からなる群から選択される癌を有する。特定の実施形態に

50

おいては、患者は頭頸部扁平上皮癌を有する。

【0151】

前記方法のいずれかの1つの実施形態においては、判定(決定)工程は、患者の腫瘍からサンプルを得、PD-L2の存在または非存在に関してサンプルを試験するよう依頼すると共に腫瘍サンプルを検査所へ送り、腫瘍サンプルがPD-L2に関して陽性であるか陰性であるかを示す、検査所からの報告を受け取ることを含む。

【0152】

前記方法の特定の実施形態において、PD-1アンタゴニストはペンブロリズマブまたはニボルマブである。1つの実施形態においては、PD-1アンタゴニストはペンブロリズマブである。

10

【0153】

前記方法のいずれかの実施形態においては、PD-L2発現は、PD-L2に結合する組換え抗原結合性タンパク質(ここで、抗体は3G2またはその変異体である)を使用するIHCアッセイにおいて決定される。

【0154】

本発明の方法の1つの実施形態においては、CDRL1は配列番号2または配列番号2の変異体であり、CDRL2は配列番号4または配列番号4の変異体であり、CDRL3は配列番号6または配列番号6の変異体である。

【0155】

本発明の方法の1つの実施形態においては、抗原結合性タンパク質は、配列番号2のCDRL1、配列番号4のCDRL2および配列番号6のCDRL3を含むV_Lドメインを含む。

20

【0156】

他の実施形態においては、IHCアッセイにおいて使用される抗原結合性タンパク質は、配列番号8に記載されているアミノ酸配列を含むV_Hドメインを含む。1つの実施形態においては、V_Hドメインは配列番号8からなる。

【0157】

1つの実施形態においては、CDRH1は配列番号10または配列番号10の変異体であり、CDRH2は配列番号12または配列番号12の変異体であり、CDRH3は配列番号14または配列番号14の変異体である。

30

【0158】

1つの実施形態においては、抗原結合性タンパク質は、配列番号10に記載されているCDRH1、配列番号12に記載されているCDRH2および配列番号14に記載されているCDRH3を含むV_Hドメインを含む。

【0159】

本発明の方法のもう1つの実施形態においては、抗原結合性タンパク質は、配列番号16に記載されているアミノ酸配列を含むV_Hドメインを含む。1つの実施形態においては、V_Hドメインは配列番号16からなる。

【0160】

前記方法の1つの実施形態においては、抗原結合性タンパク質は、配列番号8に記載されているアミノ酸配列を含むV_Lドメインと、配列番号16に記載されているアミノ酸配列を含むV_Hドメインとを含む。本発明のもう1つの実施形態においては、抗原結合性タンパク質は、配列番号8に記載されているアミノ酸配列からなるV_Lドメインと、配列番号16に記載されているアミノ酸配列からなるV_Hドメインとを含む。

40

【0161】

本発明はまた、医薬組成物と処方情報とを含む医薬品を提供し、ここで、該医薬組成物はPD-1アンタゴニストおよび少なくとも1つの医薬上許容される賦形剤を含み、該処方情報は、該医薬組成物が、PD-L2に関して陽性の試験結果を示す腫瘍を有する対象における使用に適応することを記載している。

【0162】

50

本発明のこの態様の実施形態においては、PD-1アンタゴニストはペンブロリズマブである。

【0163】

検出キットおよび治療用キット

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

10

【0164】

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

20

【0165】

本明細書に開示されている検出キットはまた、本明細書に開示されている抗体または抗原結合性フラグメントの少なくとも1つと、検出試薬として該組成物を使用するための説明とを含むものとして製造されうる。そのようなキットにおいて使用する容器は、典型的には、少なくとも1つのバイアル、試験管、フラスコ、ボトル、シリンジ、または該検出組成物の1以上が配置され、好ましくは適切にアリコート化されうる他の適当な容器を含みうる。本明細書に開示されているキットは、典型的には、商業的販売のために密封された、バイアルを含有するための手段、例えば、所望のバイアルが収容される射出成型またはブロー成型プラスチック容器をも含むであろう。放射能標識、色素原、発蛍光または他のタイプの検出可能な標識または検出手段が該キット内に含まれる場合には、該標識剤は検出組成物自体と同じ容器内で提供されることが可能であり、あるいはこの第2の組成物が配置され適切にアリコート化されうる第2の別個の収容手段内に配置されることが可能である。あるいは、該検出試薬は単一容器手段において調製されることが可能であり、ほとんどの場合、該キットは、典型的には、商業的販売および/または簡便なパッケージングおよび運搬のために密封された、該バイアルを収容するための手段をも含むであろう。

30

40

【0166】

本明細書に記載されている検出またはモニタリング方法を行うための装置または器具も提供する。そのような装置は、サンプルが投入されうるチャンバ（室）またはチューブ、流体処理系（これは、所望により、サンプル流を装置へ導くための弁またはポンプを含みうる）、血液から血漿または血清を分離するための所望により含まれうるフィルター、捕捉剤または検出試薬の添加のための混合チャンバ、および捕捉剤免疫複合体に結合した検

50

出可能な標識の量を検出するための所望により含まれうる検出装置を含みうる。サンプル流は受動的なもの（例えば、毛管力、静水力、またはサンプルが一旦適用されると装置の更なる操作を要しない他の力によるもの）または能動的なもの（例えば、機械式ポンプ、電気浸透ポンプにより生じる力、遠心力、増加した空気圧の適用によるもの）または能動的な力および受動的な力の組合せによるものでありうる。

【0167】

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

10

【0168】

一般的方法

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

20

30

【0169】

免疫沈降、クロマトグラフィー、電気泳動、遠心分離および結晶化を含むタンパク質精製方法が記載されている (Coligan (2000) Current Protocols in Protein Science, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York)。化学的分析、化学的修飾、翻訳後修飾、融合タンパク質の製造、タンパク質のグリコシル化が記載されている (例えば、Coligan (2000) Current Protocols in Protein Science, Vol. 2, John Wiley and Sons, Inc., New York; Ausubel (2001) Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 3, John Wiley and Sons, Inc., NY, NY, pp. 16.0.5 - 16.22.17; Sigma-Aldrich, Co. (2001) Products for Life Science Research, St. Louis, MO; pp. 45 - 89; Amersham Pharmacia Biotech (2001) BioDirectory, Piscataway, N.J., pp. 384 - 391) を参照されたい)。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の製造、精製およびフラグメント化が記載されている (Coligan (2001) Current Protocols in Immunology, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc.,

40

50

New York; HarlowおよびLane (1999) Using Antibodies, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; HarlowおよびLane, 前掲)。リガンド/受容体相互作用を特徴づけるための標準的な技術が利用可能である(例えば、Coliganら(2001) Current Protocols in Immunology, Vol. 4, John Wiley, Inc., New Yorkを参照されたい)。

【0170】

モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体およびヒト化抗体は製造可能である(例えば、SheperdおよびDean(編)(2000) Monoclonal Antibodies, Oxford Univ. Press, New York, NY; KontermannおよびDubel(編)(2001) Antibody Engineering, Springer-Verlag, New York; HarlowおよびLane(1988) Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 139-243; Carpenterら(2000) J. Immunol. 165: 6205; Heら(1998) J. Immunol. 160: 1029; Tangら(1999) J. Biol. Chem. 274: 27371-27378; Bacaら(1997) J. Biol. Chem. 272: 10678-10684; Chothiaら(1989) Nature 342: 877-883; FooteおよびWinter(1992) J. Mol. Biol. 224: 487-499; 米国特許第6,329,511号を参照されたい)。

10

20

【0171】

抗体は例えば小薬物分子、酵素、リポソーム、ポリエチレングリコール(PEG)、色素、放射性同位体、酵素または金属、例えばコロイド金にコンジュゲート化またはカップリング(結合)されうる。(例えば、Le Doussalら(1991) J. Immunol. 146: 169-175; Gibelliniら(1998) J. Immunol. 160: 3891-3898; HsingおよびBishop(1999) J. Immunol. 162: 2804-2811; Evertsら(2002) J. Immunol. 168: 883-889を参照されたい)。

30

【0172】

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

40

【0173】

免疫系の標準的な組織学的方法が記載されている(例えば、Muller-Harmelink(編)(1986) Human Thymus: Histopathology and Pathology, Springer Verlag, New York, NY; Hiattら(2000) Color Atlas of Histology, Lippincott, Williams, and Wilkins, Phila, PA; Louisら(2002) Basic Histology: Text and At

50

las, McGraw-Hill, New York, NYを参照されたい)。

【0174】

本明細書中に引用されている全ての参考文献を、各個の刊行物、データベースエントリー（例えば、NCBI配列またはGeneIDエントリー）、特許出願または特許が参照により本明細書に組み入れられると具体的かつ個別に示されているのと同様に、参照により本明細書に組み入れることとする。参照により組み入れるというこの陳述は、そのような引用が、参照により組み入れるという特別な陳述に直に隣接して存在しない場合であっても、37 C.F.R. § 1.57(b)(1)に従い、各個の刊行物、データベースエントリー（例えば、Genbank配列またはGeneIDエントリー）、特許出願または特許〔それらのそれぞれは37 C.F.R. § 1.57(b)(2)に従い明らかに特定されるものである〕に関するものであることが出願人により意図される。参照により組み入れるという特別な陳述が明細書中に含まれている場合、それは、参照により組み入れるというこの一般的(general)陳述を何ら弱めるものではない。本明細書における参考文献の引用は、該参考文献が関連先行技術であると自認するものではなく、また、それは、これらの刊行物または文書の内容または日付に関して何ら自認するものでもない。

10

【0175】

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

20

【0176】

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

【図面の簡単な説明】

【0177】

【図1】図1は、ハイブリドーマMEB123.3G2から単離された全RNAから調製された抗体可変軽鎖および重鎖cDNAのヌクレオチド配列（それぞれ配列番号17および配列番号18）、ならびにそれによりコードされる推定アミノ酸配列（それぞれ配列番号19および配列番号20）を示し、括弧はリーダーペプチドのヌクレオチドおよびアミノ酸配列を示し、下線はCDRのヌクレオチドおよびアミノ酸配列を示す。

30

【図2】図2は、3つの抗ヒトPD-L2抗体、すなわち、本発明のモノクローナル抗体（クローン3G2、左パネル）、市販のポリクローナル抗体（AF1224、中央パネル）およびモノクローナル抗体（クローンMIH18、右パネル）の1つで染色された正常ヒト扁桃組織のFFPE組織切片を示す。

【図3】図3は、本明細書に記載されている3G2抗PD-L2抗体およびIHCアッセイを用いて検出された7つの異なる癌型からの保存組織切片におけるPD-L2発現を示す。

【図4】図4は、本明細書に記載されている3G2抗PD-L2抗体およびIHCアッセイを用いて検出された7つの異なる腫瘍における細胞型によるPD-L2発現を示す。

40

【図5】図5は腫瘍型におけるPD-L1およびPD-L2の関係を示す。両方のアナライトについて同じ0~5のスコア系を使用した場合の、全てのサンプルにわたるPD-L1とPD-L2との間の全体的発現の相関プロット。スコアは全ての適応症において有意に相関していた($P = 0.0012 \sim P < 0.0001$)。円形は、PD-L1とPD-L2とのスコアが大幅に異なるサンプルを強調表示している。

【図6】図6はHNSCCコホートにおける患者のベースライン特性を示す（処置全患者集団；実施例5を参照されたい）。

【図7】図7はPDL-1およびPDL-2の状態ならびに全体的な臨床応答を示す（実施例5を参照されたい）。

50

【図8】図8Aおよび8BはPD-L2状態ごとの無増悪生存および全生存(OS)を示す。KEYNOTE-12における172名の処置全患者集団からのPD-L2陽性およびPD-L2陰性腫瘍サンプル(腫瘍および免疫細胞)についてのPFS(図8A)およびOS(図8B)を示す Kaplan-Meier 曲線。

【0178】

実施例1

抗PD-L2ハイブリドーマの作製およびスクリーニング

幾つかの市販抗ヒトPD-L2抗体の試験が、FFPE組織切片のIHCアッセイにおいてヒトPD-L2を検出するのにそれらが満足しうるものではないことを示した後、本発明者らは、高品質抗ヒトPD-L2 IHC試薬を作製することを試みるために一連のげっ歯類免疫化実験を本実施例で行った。最初の2つの実験で用いた免疫原はヒトPD-L2-Fc融合タンパク質(R&D Systems:カタログ番号:1224-PL、ロット番号:FCI051302A)およびヒトPD-L2-HisTag融合タンパク質(Sino Biologicals:カタログ番号:10292-H08H、ロット番号:MB05OC0910)であった。該PD-L2 Fc融合タンパク質は、ヒトIgG1フラグメントに融合したヒトPD-L2(Leu20-Pro219, NCBIアクセッション番号Q9BQ51.2)の細胞外ドメインを含有する。該PD-L2-HisTag融合体は、ポリヒスチジンタグに融合したヒトPD-L2の細胞外ドメインを含有する。第3の実験においては、同じ2つの融合タンパク質を、それらを5分間煮沸して変性させた後、免疫原として使用した。

【0179】

各実験において5匹のマウスを免疫化した。ここで、最初の2回の注射には該PD-L2-Fc融合体を使用し、残りの注射(実験に応じて10~17回)には該PD-L2-HisTagを使用した。第3の実験においては、13回および15回の免疫化のそれぞれの後でハイブリドーマを作製した。

【0180】

得られたハイブリドーマの上清をスクリーニングして、ヒトPD-L2に対する抗体を産生するハイブリドーマを特定した。用いたスクリーニングの1つは、タンパク質に基づくELISAであり、これは、該PD-L2-Fc、変性PD-L2-Fc、変性PD-L2-HisTag融合体、または無関係なIg陰性対照(47ADY)への結合を測定した。細胞に基づくELISAである2次スクリーニングを行い、これは、陰性対照としての親CHO細胞またはヒトPD-L2を発現するように操作されたCHO細胞への結合を測定した。

【0181】

免疫スケジュールおよびスクリーニング結果を以下の表に要約する。

【表6】

実験	免疫化の数	融合体	1次スクリーニング	2次スクリーニング	PD-L2 陽性上清の数
1	19	MEB120	cho-PD-L2	Cho PD-L2/Fc	29
2	12	MEB121	cho-PD-L2	cho PD-L2-His-Tagd*	28
3a	13	MEB122	PD-L2-His-Tagd*	Cho cho-PD-L2 PD-L2-Fcd* 47ADY	310
3b	15	MEB123	PD-L2-His-Tagd*	Cho cho-PD-L2 PD-L2-Fcd* 47ADY	110

d* = 変性

10

20

30

40

50

【 0 1 8 2 】

ついで、1次スクリーニングおよび2次スクリーニングの両方においてヒトPD-L2への結合に関して陽性の試験結果を示したハイブリドーマ上清をIHCアッセイにおいてホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)ヒト正常扁桃組織の標識に関してスクリーニングした。染色、核染色、上皮細胞もしくは他の非特異的染色を示さない、または低いシグナル対ノイズ比を有するハイブリドーマを、更なる考慮から完全に除外した。最初の2回の免疫化実験からのPD-L2結合上清はいずれも、満足しうるIHC染色結果を示さなかった。このことに促されて、本発明者らは、第3の実験における免疫原として変性PD-L2融合タンパク質を使用した。PD-L2結合上清を与えた実験からの420個のハイブリドーマのうち、本発明者らは、IHCにおけるPD-L2検出試薬として使用される候補とみなされるのに十分な標識強度、低いバックグラウンドレベルおよびシグナル鮮明度を有する5個だけを特定した。ついで、これらのハイブリドーマを更なる評価のためにサブクローニングし、精製し、抗体クローン3G2が評価基準において最良の特性を有していた。

10

【 0 1 8 3 】

実施例 2

材料および方法

染色

FFPE組織切片を常法により脱パラフィン化し、PD-L2およびPD-L1 IHCのために再水和させた。全てのスライドを熱誘発性エピトープ回収に付し、内因性ペルオキシダーゼブロッキングを行った後、一次抗体(抗PD-L2クローン3G2または抗PD-L1クローン22C3, Merck Research Laboratories, Palo Alto CA)の存在下でインキュベーションを行った。抗原-抗体結合を3,3'-ジアミノベンジジン(DAB)色素原(K4368, Dako, Carpinteria CA)で可視化した。

20

【 0 1 8 4 】

保存腫瘍検体のスコア化

保存FFPE腫瘍検体をMerck Palo Alto組織バンクから入手した。スコア化は病理学者により行われた。スコアは腫瘍細胞および非腫瘍細胞の両方の標識の保有率を含む。半定量的な0~5のスコア化系(0=陰性、1=稀少、2=低い、3=中等度、4=高い、5=非常に高い)を用いた。内皮細胞発現の存在または非存在を、特に、別個の値として評価した。

30

【 0 1 8 5 】

インシトゥハイブリダイゼーション(IISH)

RNA Scopeプラットフォーム(RNA scope 2.0高精細度キット, Advanced Cell Diagnostics [ACD], Hayward CA)を製造業者の説明に従い使用するIISHにより、PD-L2 mRNAの細胞分布を評価した。ヒトPD-L2用のアンチセンスおよびセンスDNAプローブ(それぞれ試験プローブおよび陰性対照)ならびにPPIB用のアンチセンスプローブ(陽性対照)[全て、ACDにより設計されたもの(それぞれカタログ番号316291、519891および313901)]を使用して、ハイブリダイゼーションを行った。

40

【 0 1 8 6 】

遺伝子発現解析

定量的RT-PCR

リアルタイム定量的PCR分析のために、QuantiTect Reverse Transcription(Qiagen, Valencia, CA)を製造者の説明に従い使用して、DNアーゼ処理された全RNAを逆転写した。PDCD1LG2(PD-L2、CD273)に特異的なプライマーをApplied Biosystems(Foster City, CA)から商業的に入手した。ウラシル-DNAグリコシラーゼ

50

の存在下で Taqman Universal PCR Master Mix と共に特異的プローブ/プライマー混合物を使用して、Fluidigm Biomark 上でリアルタイム定量的 PCR を行った。ユビキチンレベルを別の反応において測定し、それを用いて Ct 方法によりデータを正規化した。

【0187】

NanoString 法

製造業者のプロトコール (NanoString, Seattle WA) に従って切片化 FFPE 組織から組織ライセートを得た。細胞ライセート (サンプル当たり 50 ng) をバーコード化 3' ピオチン化捕捉プローブおよび蛍光タグ化 5' レポータープローブ (所望の遺伝子発現コードセットからのもの) と混合した。プローブおよび標的転写産物を、製造業者の推奨に従い、一晩ハイブリダイズさせた。ハイブリダイズしたサンプルを NanoString nCounter (商標) 装置において使用し、ついで、nCounter (商標) Digital Analyzer を使用して、最大スキャン解像度でサンプルをスキャンした。

10

【0188】

分位 (quantile) 正規化を用いてデータ分析を行った。この場合、各サンプルにおける (NanoString コードセット上のすべての遺伝子にわたる) 遺伝子の相対的ランクを、(該データセットにおける全てのサンプルおよび遺伝子からの) プールされた分布からの同じ相対ランクを有する値により置換した。ついで全ての分位正規化データを \log_{10} 変換に付した。

20

【0189】

実施例 3

3G2 抗 PD-L2 mAb の品質評価

ヒト PD-L2 タンパク質の検出のための IHC 試薬としての 3G2 抗体の品質を試験した。該試験は、 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で適用された場合の FFPE ヒト正常扁桃組織の標識に関する初期スクリーニング、高分解能、低いバックグラウンドノイズをもたらすアッセイの最適化 (抗体の力価測定、複数の検出系の評価) を含む一連の工程、およびそれに続く一連の妥当性確認工程により行った。妥当性確認工程においては、以下の処理を行った: 1) 各組織に関する対応アイソタイプ対照を伴う 37 個の正常ヒト組織のパネル上 (この場合、PD-L2 の豊富な発現が胎盤および複数のリンパ組織において検出された) および複数のヒト腫瘍のコホートにおいてアッセイを行った; 2) IHC アッセイにおいて陽性シグナルを示していたサンプル上で PD-L2 mRNA に関して *in situ* ハイブリダイゼーション (RNAscope, Advanced Cellular Diagnostics, Hayward CA) を行うことにより、IHC による組織におけるシグナルの分布の妥当性をクロスチェックした; 3) プロッキング研究の実施により (この場合、IHC アッセイにおいて標識を示していた組織を共に常法で使用した)、および抗体の相補性決定領域 (CDR) の結合に対する標識の依存性を判定するために、免疫原での該抗体の予備吸着の後でのみ、該組織への該抗体の適用により、IHC により生成されたシグナルの特異性をクロスチェックした; 4) 通常の RNA 分析方法により検出された mRNA の量と、IHC により生成されたシグナルの度合を比較するために、PD-L2 mRNA 発現のレベル差を示すことが知られている一連の細胞系 (CHO-K1、PD-L2 トランスフェクト化 CHO-K1、NCIH-226、NCIH-23、HOP-62、HOP-92、SKBR3、MCF7、M14、SR、RPMI 8226) から得られた FFPE 細胞ペレット上でアッセイを行った; ならびに 5) IHC シグナルの再現性を評価するために、出力の比較可能性の病理学者による評価により、3つの正常扁桃上で 3 日間にわたってアッセイを行った。PD-L2 IHC シグナルは、ヒト腫瘍サンプルにおいて NanoString 法により定量された PD-L2 mRNA レベルとも有意に相関した ($p < 0.0001 \sim p = 0.0037$; データ非表示)。

30

40

【0190】

本発明者らはまた、正常ヒト扁桃腺組織の染色において、3G2 抗体および 2 つの商業

50

的に入手可能な抗ヒトPD-L2抗体を比較した。使用した市販抗体は前記のAF1224ポリクローナル抗体およびMIH18モノクローナル抗体であった。隣接FFPE組織切片を、同じIHCアッセイ条件を用いて染色し、各抗体に関する最良の染色結果を図4に示し、染色結果の、病理学者の評価を以下に示す。

【0191】

3G2：胚中心における樹状形態および円形細胞の両方を伴う、強力な鮮明なシグナル。胚中心の外側にそれほど多くはない数の散在性個別化陽性細胞。非常に綺麗なバックグラウンド。

【0192】

AF1224：胚中心における強力な円形細胞標識を示し、他の胚中心標識を伴い、それはおそらく樹状であるが、バックグラウンドからの最終的な区別が困難である。胚中心の外側に、軽度のバックグラウンドが認められ、バックグラウンドより明らかな陽性細胞標識は存在しない。

【0193】

MIH18：胚中心における形態学的に円形の細胞の集団の非常に綺麗な標識。胚中心の外側には標識細胞は存在しない。非常に綺麗なバックグラウンド。

【0194】

実施例4

腫瘍および免疫細胞におけるPD-L2発現

腫瘍組織におけるPD-L2発現を検出するための3G2 mAbの有用性を評価するために、7つの異なる腫瘍型の保存サンプルを、3G2抗体を使用する本明細書に記載されているIHCアッセイに付した。腎細胞癌(n=71)、膀胱癌(n=34)、メラノーマ(n=83)、非小細胞肺癌(NSCLC)(n=94)、HNSCC(n=40)、三種陰性乳癌(TNBC)(n=22)および胃癌(n=73)を含む幾つかの腫瘍型のコホートにおいて、3G2抗PD-L2抗体でのIHC染色により、PD-L2タンパク質の発現を評価した(図3を参照されたい)。PD-L2発現のレベルは、染色の強度に基づいて0(陰性)、1(稀少)、2(低い)、3(中等度)、4(高い)または5(非常に高い)として、病理学者によりスコア化された。本発明者らはまた、種々の腫瘍型にわたる或る範囲のPD-L2発現を示す結果を分析した。また、本発明者らは、腫瘍組織切片における3つの異なる細胞型、すなわち、間質細胞、腫瘍細胞および内皮細胞において、PD-L2発現のレベルを評価し、その結果を図4に示す。簡潔に説明すると、該結果は、PD-L2タンパク質が間質細胞(免疫細胞浸潤物を含む)、腫瘍細胞および内皮細胞上で種々の度合で発現されたことを示している(後記)。

【0195】

各コホートをPD-L2発現の全体的分布率に関して評価した。ここでは、間質細胞、腫瘍細胞および内皮細胞を一緒に評価した。評価した全ての腫瘍型においてPD-L2発現が観察されたが、PD-L2発現の全体的分布率は適応症によって異なっていた(図3)。腎細胞癌に関しては、PD-L2発現は、特に低い全体レベルに偏向していることが注目されたが、胃およびTNBCは中程度ないし高発現に強く偏向していた。他の腫瘍型における発現は、評価サンプルにわたって低から高へ、より均一に分布していた。

【0196】

各腫瘍型に関して間質、腫瘍および内皮細胞の3つの範疇においてIHC染色によりPD-L2タンパク質発現の存在または非存在(0~5の尺度でそれぞれ1以上および1未満のスコア)を評価したところ、幾つかのパターンが現れた(図4)。免疫細胞浸潤物を含む間質細胞におけるPD-L2発現の存在は概ね最も一般的であり、比較的最小の変動を伴って全ての腫瘍型にわたって観察された。これとは対照的に、腫瘍細胞におけるPD-L2発現は腫瘍型にわたって非常に大きく変動し、腎細胞癌は腫瘍細胞発現を全く示さず、メラノーマはほとんど示さなかったが、HNSCCの半分以上がPD-L2を発現した。最後に、内皮細胞発現は、評価された腫瘍型のほとんどに関して、少数のサンプルにおいて認められたが、内皮発現を示すサンプルの分布は腎細胞癌および胃癌において、顕

10

20

30

40

50

著に、より高かった。

【0197】

これらのコホートにおける腫瘍組織におけるPD-L2タンパク質の相対的な保有率および分布を、Merckの22C3抗PD-L1 IHC抗体(WO2014/100079)を使用して、同じサンプルの追加的な区分におけるPD-L1の場合と比較した。一般に、PD-L2の分布パターンおよび保有率はPD-L1の場合と厳密に一致した(データ非表示)。しかし、他のサンプルはPD-L2とPD-L1との間の不一致を示し、幾つかはPD-L2の非存在下でPD-L1シグナルを示し、他のサンプルはPD-L1の非存在下でPD-L2発現を示した。

【0198】

PD-L1およびPD-L2の全体的な発現を全てのサンプルにわたって比較したところ(両方のバイオマーカーに関して0~5のスコア化系)、調べた全ての適応症に関して、スコアは有意に相関することが判明した($P = 0.0012 \sim P < 0.0001$)(図5)。PD-L1とPD-L2との間の最も強い関連性($R^2 = 0.6238$)は三重陰性乳癌(TNBC)において認められ、それらのサンプルのいずれに関してもPD-L2発現とPD-L1発現との間に有意な不一致は認められなかった。全ての他の適応症に関して、PD-L2およびPD-L1の発現スコアは有意に相関していたが、幾つかのサンプルでは発現の不一致が認められた。メラノーマおよび腎細胞癌では双方向性の不一致発現が認められ、PD-L2を大きく上回るPD-L1発現を示したサンプルもあれば、PD-L1を大きく上回るPD-L2発現を示したサンプルもあった。調べた他の適応症では、主に一方向性の不一致が認められ、NSCLCおよび膀胱腫瘍サンプルの一部においては、PD-L1がPD-L2を上回る発現を示したが、HNSCCおよび胃腫瘍サンプルの一部においては、PD-L2がPD-L1を上回る発現を示した。

【0199】

本発明者らの分析において評価した全ての腫瘍型において、PD-L1およびPD-L2の発現は強く相関していたが、幾つかの腫瘍内ではPD-L2はPD-L1の非存在下で発現し、腫瘍細胞と免疫細胞との組合せにおいて評価された場合、ペンブロリズマブで治療されたHNSCC患者のコホートにおける臨床応答と、独立して関連していた。

【0200】

実施例5

3G2抗PD-L2 mAbを使用するIHCアッセイの臨床的有用性

KEYNOTE-12治験(Seiwertら, 2016年提出; Chowら, 2016年提出)からの172名のHNSCC患者からの腫瘍組織サンプルにおいて、PD-L1およびPD-L2発現ならびに抗PD-L1療法に対する臨床応答の間の関係を調べた。RECIST1.1に従い測定可能な再発性または転移性疾患を有し、0または1のECOG性能状態を有し、200mgのペンブロリズマブで3週間ごとに又は10mg/kgで2週間ごとに治療された、PD-L1およびPD-L2 IHCスコア化データが入手可能なHNSCC患者からの前治療サンプルを含めた。腫瘍および免疫浸潤細胞の両方の評価を含む1%陽性カットオフ(陽性 $\geq 1\%$; 陰性 $< 1\%$)を用いて、両方のアナライトに関する発現をスコア化した。1用量以上の治験薬の投与を受け、ベースライン疾患測定値および1以上のベースライン後スキャンを有する者、または薬物関連有害事象もしくは臨床進行性疾患ゆえに服薬を中断した者として定義される完全分析セット集団におけるこれらの患者の146名において、全体的な応答率(ORR)を評価した。1用量以上の治験薬の投与を受けた者として定義される172名の処置全患者集団において、無増悪生存(PFS)および全生存(OS)を評価した。片側検定、PD-L1発現に関する補正を伴う又は伴わないロジスティック(ORR)またはCox(PFS, OS)回帰分析により、PD-L2発現との関係を調べた。PD-L2陽性および陰性患者におけるPFSおよびOSに関する生存期間中央値を推定するために、カプラン-マイヤー統計を用いた。

【0201】

結果

入手可能なPD-L2およびPD-L1 IHCスコア化データを有する、KEYNOTE-12治験における再発性または転移性疾患を有する172名のペンブロリズマブ処置HNSCC患者に由来する腫瘍組織サンプルにおいて、PD-L2発現の臨床的関連性を評価した。サンプリングされた患者の年齢中央値は60歳（範囲は37～84歳）で、ほとんどが男性であり（83.1%）、大部分はHPV陰性（65.7%）であった（図6）。患者の大半はECOG状態1であり（71.5%）、M1の転移病期を有し（84.9%）、多数（60.4%）は再発性または転移性疾患に対する2以上の過去の療法を受けていた。

【0202】

腫瘍細胞および免疫浸潤細胞の組合せにおけるIHC染色により、完全分析セット集団における146名の患者において、PD-L1およびPD-L2状態（陽性カットオフ $\geq 1\%$ ）の関数として、全体的な応答率を評価した。これらのうち、126名（86.3%）の患者は、PD-L1陽性と評価された腫瘍を有し、94名（64.3%）は、PD-L2陽性と評価された腫瘍を有し、20名（13.6%）は、PD-L1陰性と評価された腫瘍を有し、52名（35.6%）は、PD-L2陰性と評価された腫瘍を有していた（図7）。PD-L1（23.0%；95% CI 16.0, 31.4）およびPD-L2（26.6%；95% CI 18.0, 36.7）陽性患者の応答率は、 $p < 0.05$ のレベルで、PD-L1およびPD-L2陰性患者における応答率より有意に高かった（図7）。PD-L1状態に関して補正されたロジスティック回帰モデルにおけるPD-L2状態の更なる評価は、PD-L2陽性が、応答を決定するための追加的な予測値を与えることを示唆しており（ $p = 0.038$ ）、PD-L2陽性率は、PD-L1陽性（72.2% [95% CI 63.5, 79.8]）腫瘍においては、PD-L1陰性（15.0% [95% CI 3.2, 37.9]）腫瘍より、統計的に有意（ $p < 0.001$ ）に高かった。ORRは、PD-L1およびPD-L2の両方に関して陽性である患者において最大であり、PD-L1のみに関して陽性である腫瘍を有する患者（11.4% [95% CI 3.2, 26.7]）より2倍高かった（27.5% [95% CI 18.6, 37.8]）。

【0203】

全172名の患者（処置全患者集団）のコホート全体において、PFSとPD-L1およびPD-L2状態との関係をそれぞれ個別に評価した。PD-L1陽性状態はPFSと有意には関連していなかった（ $p = 0.080$ ）。しかし、PD-L2陽性状態はPFSの有意な予測因子であり（ $p = 0.003$ ）、PD-L1状態に関する補正の後でも尚もPFSと有意に関連していた（ $p = 0.013$ ）。OSとPD-L1およびPD-L2との関係も同様に評価した。PD-L2陰性患者およびPD-L2陽性患者の無増悪生存期間中央値はそれぞれ59日および65日であり、全生存期間中央値はそれぞれ199日および303日であった（図8）。

【0204】

これらのデータは、PD-L2発現が、PD-L1発現に関する補正の後、より高い客観的応答率（ORR）と関連していること、およびPD-L2が、PD-L1状態の影響に関する補正の後、より長い無増悪生存（PFS）と正に関連していることを示唆している。これは、PD-L2発現が存在する幾つかの状況においては、PD-L1およびPD-L2の両方を標的とする抗PD1療法が、抗PD-L1標的化剤と比較して大きな利益を有しうることを示唆している。

10

20

30

40

【 図 1 】

軽鎖：DNA配列(399 bp)

```
[ATGGAATCACAGACCAGGTCCTCATGTTCTTCTGCTCTGGGTACTCTGGTGCCTGTGCA]GA
CATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGGCTACGTAGTGGACAGAGGGTCACTATGAGC
TGCAGTCCAGTCAGAACCTTTTATATAGTACCGATCAAAAGAACATTTGGCTGGTCCAGC
AGAAACCAGGACAGTCTCTAACTTCTACTATACTTTGCATCCATTAGGGAATCTGGGGTCCC
TGATCGCTTCATAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTTACCATCAGCAGTGTGACAGG
GAAGACCTGGCAGATTACTTCTGTGAGCAGCATTTATAACACTCCTCCGACGTTTCGGTGGAGGCA
CCAGACTGGAATCAAA (配列番号17)
```

重鎖：アミノ酸配列(133 AA)

```
[MESQTVLMLLLLVWSGACA]DIVMTQSPSSLATSVGRVMTSKSSQHLLYSTDQKNYLAWF
OQKPGOSP KLLL YFASIRESGVPRDFIGSGSDTFLTTISSVQAEIDLADYFCQHYNTPIPFGG
GTRLEIK (配列番号19)
```

重鎖：DNA配列(408 bp)

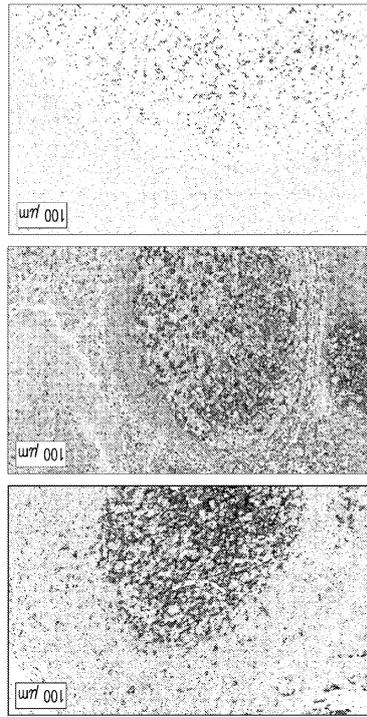
```
[ATGAACTTCGGGCTCAGTGTGATTTTCCTGCGCTCATTTAAAAGGTGCCAGTGT]GAGGT
GCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGACTTAGTGAAGTCTGGAGGGTCCCTGAACTCCTCTGTGCC
GCCTCTGGATTCAATTTTCAGTAGCTTTGGCATGCTTTGGGTCGCCAGACTCCAGACAAGAGGC
TGAAGTGGGTCGCAACCATTAGTAGTGGTGGGAAGGAATATCTACTATTAGACAGTGTGAAGGG
GCATTACCATCTCCAGAGACAATGTCAAGAATCCTGTACTCTGCAAAATGAGCGGTTCTGAA
TCTGAGGACTCAGCCATGTACTACTGTGCAAGAGAGGGGCATATGCTTTGGACTACTGTGGTC
AAGGAACCTCAGTCACCGTCTCTCA (配列番号18)
```

重鎖：アミノ酸配列(136 AA)

```
[MNFGLSLIFLALILKGVQC]EVQLVESGGDLVKSQGLSLKLSAASGIFSSFGMSWVRQTPDK
RLIEWATISSGGRTIYYLDSVKGRFTISRDNVKNILYLMQSLKSEDSAMYCYAREGHYALDYC
GGGTSVTVSS (配列番号20)
```

FIG.1

【 図 2 】



MH18 クロローン
R&D AF1224 ポリクローナル
3G2 クロローン

FIG.2

【 図 3 】

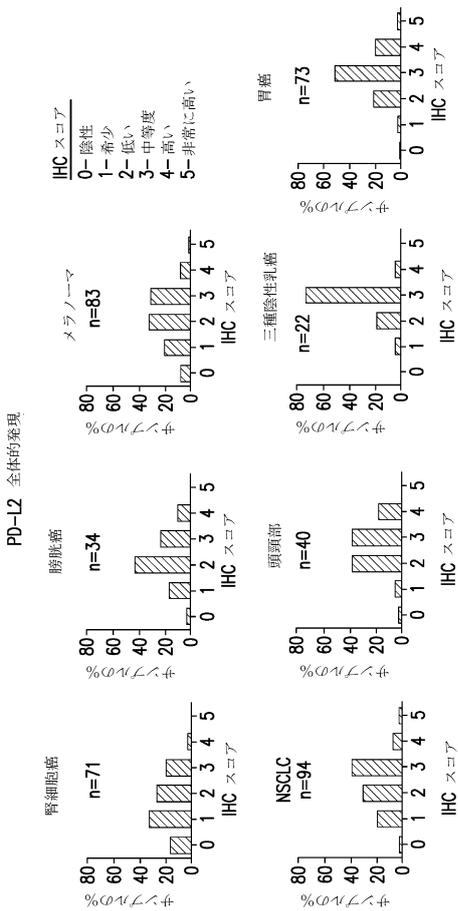
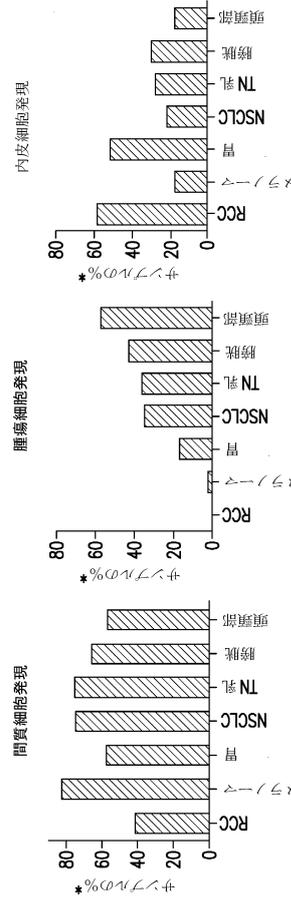


FIG.3

【 図 4 】



* 0~5の尺度で1以上のPD-L2発現スコアを有するサンプルの%

FIG.4

【 図 5 】

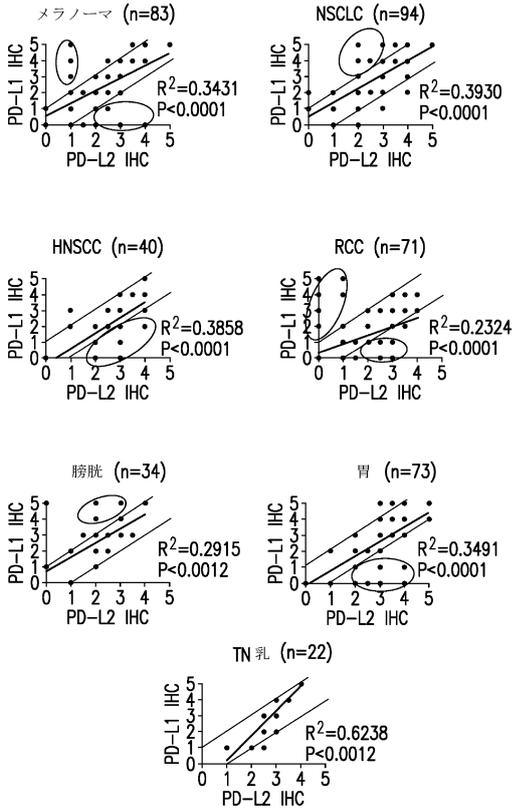


FIG.5

【 図 6 】

特徴	合計 N=172
年齢中央値 (範囲)	60 (37-84)
男性	143 (83.1)
人種	
白人	129 (75.0)
アジア人	27 (15.7)
その他	16 (9.3)
ECOG 性能状態	
0	49 (28.5)
1	123 (71.5)
転移病期	
MX	1 (0.6)
M0	25 (14.5)
M1	146 (84.9)
HPV 状態	
陽性	57 (33.1)
陰性	113 (65.7)
不明	2 (1.2)
ベースラインにおける標的病変の総和 mm中央値 (範囲) ^a	99.2 (10-664)
過去の補助及び/又は術前補助療法	
有り	81 (47.1)
再発性または転移性疾患に対する過去の療法の数	
0	32 (18.6)
1	36 (20.9)
2	40 (23.3)
3	30 (17.4)
4	19 (11.0)
≥5	15 (8.7)
^a n=157	

FIG.6

【 図 7 】

状態	合計	非応答者	応答者	応答 ^a , % (CI)
PD-L1 ⁻	20	19	1	5.0 (0.1, 24.9)
PD-L1 ⁺	126	97	29	23.0 (16.0, 31.4)
PD-L2 ⁻	52	47	5	9.6 (3.2, 21.0)
PD-L2 ⁺	94	69	25	26.6 (18.0, 36.7)
PD-L1 ⁻ /PDL-2 ⁻	17	16	1	5.9 (0.1, 28.7)
PD-L1 ⁺ /PDL-2 ⁻	35	31	4	11.4 (3.2, 26.7)
PD-L1 ⁻ /PDL-2 ⁺	3	3	0	0.0 (0.0, 70.8)
PD-L1 ⁺ /PDL-2 ⁺	91	66	25	27.5 (18.6, 37.8)

^a完全分析セット集団
陽性 (+) = ≥1% 染色;
陰性 (-) = <1% 染色

FIG.7

【 図 8 】

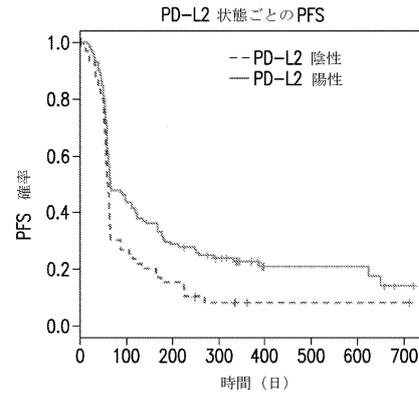


FIG.8A

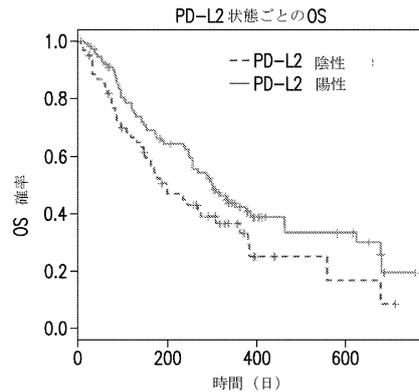


FIG.8B

【配列表】

0006949009000001.app

フロントページの続き

(51) Int. Cl.		F I			
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
G 0 1 N	33/574	(2006.01)	G 0 1 N	33/574	A

- (74)代理人 100119253
弁理士 金山 賢教
- (74)代理人 100124855
弁理士 坪倉 道明
- (74)代理人 100129713
弁理士 重森 一輝
- (74)代理人 100137213
弁理士 安藤 健司
- (74)代理人 100143823
弁理士 市川 英彦
- (74)代理人 100151448
弁理士 青木 孝博
- (74)代理人 100196483
弁理士 川崎 洋祐
- (74)代理人 100203035
弁理士 五味淵 琢也
- (74)代理人 100185959
弁理士 今藤 敏和
- (74)代理人 100160749
弁理士 飯野 陽一
- (74)代理人 100160255
弁理士 市川 祐輔
- (74)代理人 100202267
弁理士 森山 正浩
- (74)代理人 100146318
弁理士 岩瀬 吉和
- (74)代理人 100127812
弁理士 城山 康文
- (72)発明者 ヤーリー, ジェニファー・エイチ
アメリカ合衆国、9 4 3 0 4 ・カリフォルニア、パロ・アルト、サウス・カリフォルニア・アベニ
ュー・9 0 1
- (72)発明者 リアン, リンダ
アメリカ合衆国、9 4 0 4 3 ・カリフォルニア、マウンテン・ビュー、エイダ・アベニュー・1 2
8、アパートメント・8
- (72)発明者 ビグラー, マイケル・エリック
アメリカ合衆国、9 4 3 0 4 ・カリフォルニア、パロ・アルト、サウス・カリフォルニア・アベ
ニュー・9 0 1
- (72)発明者 ギブソン, クリストファー・ジョン
アメリカ合衆国、1 9 3 4 8 ・ペンシルベニア、ケネット・スクエア、ハルダン・ドライブ・7 0
7

審査官 玉井 真人

(56)参考文献 Clin. Cancer Res., 2014, Vol.20, pp.5064-5074
Am J Surg Pathol., 2014, Vol.38, pp.1715-1723

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12N 15/00 - 15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/REGISTRY(STN)