

(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2015-527342

(P2015-527342A)

(43) 公表日 平成27年9月17日 (2015.9.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18 Z N A	4 B 0 2 4
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 B 0 6 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 89 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2015-525618 (P2015-525618)	(71) 出願人	511071555
(86) (22) 出願日	平成25年8月2日 (2013.8.2)		ダナーファーバー キャンサー インステ
(85) 翻訳文提出日	平成27年4月1日 (2015.4.1)		イテュート, インコーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/053392		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
(87) 国際公開番号	W02014/022758		1 1 5 - 5 4 5 O, ボストン, ブルッ
(87) 国際公開日	平成26年2月6日 (2014.2.6)		クライン アヴェニュー 4 5 0
(31) 優先権主張番号	61/679, 190	(74) 代理人	100136630
(32) 優先日	平成24年8月3日 (2012.8.3)		弁理士 水野 祐啓
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	フリーマン, ゴードン, ジェイ.
			アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
			2 4 4 5 ブルックライン ウォルナット
			ストリート 3 0 5
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 単一抗原抗PD-L1およびPD-L2二重結合抗体およびその使用方法

(57) 【要約】

本発明は、一部において、PD-L1およびPD-L2の両方に結合親和性を有する新規な抗体の同定およびそれを使用する方法に基づく。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

P D - L 1 および P D - L 2 の両方に特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 2】

P D - L 1 および P D - L 2 の両方は、ヒト P D - L 1 およびヒト P D - L 2 である、請求項 1 に記載の単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 3】

ヒト P D - L 1 は、配列番号 4 または 6 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、ヒト P D - L 2 は、配列番号 6 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 2 に記載の単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメント。

10

【請求項 4】

前記単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントは、(a) P D - 1 に結合する P D - L 1 ; (b) B 7 - 1 に結合する P D - L 1 ; (c) P D - 1 に結合する P D - L 2 ; (d) R G M b に結合する P D - L 2 ; (e) P D - 1 に結合する P D - L 1 によって媒介される免疫共抑制性シグナル ; (f) B 7 - 1 に結合する P D - L 1 によって媒介される免疫共抑制性シグナル ; (g) P D - 1 に結合する P D - L 2 によって媒介される免疫共抑制性シグナル ; および (h) R G M b に結合する P D - L 2 によって媒介される免疫共抑制性シグナルからなる群から選択される、1 以上の相互作用を抑制する、請求項 1 に記載の単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメント。

20

【請求項 5】

前記単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントは、(e)、(f)、(g)、または (h) の 1 以上の免疫共抑制性シグナルを抑制する、請求項 4 に記載の単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 6】

前記単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントは、(a) P D - 1 に結合する P D - L 1 ; (b) B 7 - 1 に結合する P D - L 1 ; (c) P D - 1 に結合する P D - L 2 ; (d) R G M b に結合する P D - L 2 ; (e) P D - 1 に結合する P D - L 1 によって媒介される免疫共抑制性シグナル ; (f) B 7 - 1 に結合する P D - L 1 によって媒介される免疫共抑制性シグナル ; (g) P D - 1 に結合する P D - L 2 によって媒介される免疫共抑制性シグナル ; および (h) R G M b に結合する P D - L 2 によって媒介される免疫共抑制性シグナルからなる群から選択される、1 以上の相互作用を高める、請求項 1 に記載の単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメント。

30

【請求項 7】

前記免疫共抑制性シグナルは、(e)、(f)、(g)、または (h) である、請求項 6 に記載の単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 8】

P D - 1、B 7 - 1、または R G M b は融合タンパク質である、請求項 1 に記載の単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメント。

40

【請求項 9】

前記単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントは、ペプチド配列 CFTVTVPKDLVVEYGSN または CYRSMISYGGADYKRITV に結合する、請求項 1 に記載の単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 10】

前記単離されたモノクローナル抗体は、ハイブリドーマクローンとして寄託され、受託番号が付与されている、請求項 1 に記載の単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 11】

50

前記単離されたモノクローナル抗体は、

a) 表 1 に挙げられた配列からなる群から選択される重鎖配列と少なくとも約 95% の同一性を有する重鎖配列、または、

b) 表 1 に挙げられた配列からなる群から選択される軽鎖配列と少なくとも約 95% の同一性を有する軽鎖配列、

を含む、請求項 1 に記載の単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 12】

前記単離されたモノクローナル抗体は、

a) 表 1 に挙げられた配列からなる群から選択される重鎖 CDR 配列と少なくとも約 95% の同一性を有する重鎖 CDR 配列、または、 10

b) 表 1 に挙げられた配列からなる群から選択される軽鎖配列 CDR 配列 (light chain sequence CDR sequence) と少なくとも約 95% の同一性を有する軽鎖 CDR 配列、を含む、請求項 1 に記載の単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 13】

単離されたモノクローナル抗体は、

a) 表 1 に挙げられた配列からなる群から選択される重鎖配列、または、

b) 表 1 に挙げられた配列からなる群から選択される軽鎖配列、

を含む、請求項 1 に記載の単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメント。 20

【請求項 14】

単離されたモノクローナル抗体は、

a) 表 1 に挙げられた配列からなる群から選択される重鎖 CDR 配列、または、

b) 表 1 に挙げられた配列からなる群から選択される軽鎖 CDR 配列、

を含む、請求項 1 に記載の単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 15】

単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントは、キメラ、ヒト化、複合体、齧歯動物、またはヒトである、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメント。 30

【請求項 16】

単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントは、F(ab')₂ フラグメント、Fab フラグメント、scFv、二重特異性 scFv、三重特異性 scFv、ジアボディ、単ドメイン抗体 (dAb)、ミニボディ、または分子認識単位 (MRU) である、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 17】

単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントは、商業用抗体の PD-L1 または PD-L2 への結合を抑制する、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメント。 40

【請求項 18】

単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントが存在することで、モノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントの不存在の場合に比べて、少なくとも 1 つの PD-L1 または PD-L2 活性を減少させるか、または抑制する、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 19】

請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメント、および医薬的に許容される担体を含む、医薬組成物。 50

【請求項 20】

請求項 1 ～ 18 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体のポリペプチドをコードする核酸の補体または請求項 1 ～ 18 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体のポリペプチドをコードする核酸と少なくとも約 95 % の相同性を有する配列にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする単離された核酸分子。

【請求項 21】

請求項 20 に記載の単離された核酸を含むベクター。

【請求項 22】

請求項 1 ～ 14 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントを発現する宿主細胞。

【請求項 23】

請求項 20 に記載の核酸を含むトランスジェニック動物。

【請求項 24】

請求項 1 ～ 14 のいずれか 1 項に記載の少なくとも 1 つのモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントを作製する方法であって、前記少なくとも 1 つのモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントを産生する細胞を細胞培養から培養するステップを含む、方法。

【請求項 25】

請求項 1 ～ 14 のいずれか 1 項に記載の少なくとも 1 つのモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントを含むデバイスまたはキットであって、任意に少なくとも 1 つのモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメント、またはモノクローナル抗体もしくはその抗原結合フラグメントを含む複合体を検出するための標識を含む、デバイスまたはキット。

【請求項 26】

前記装置は、サンドイッチアッセイまたは競合アッセイを用いて、サンプル中の PD - L1 および / または PD - L2 ポリペプチドの存在を検出する、請求項 25 に記載の装置。

【請求項 27】

PD - L1 および / または PD - L2 ポリペプチドの存在またはレベルを検出する方法であって、サンプルを取得するステップと、請求項 1 ～ 14 のいずれか 1 項に記載の少なくとも 1 つのモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントを用いてサンプル中の前記ポリペプチドを検出するステップとを含む方法。

【請求項 28】

前記少なくとも 1 つのモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントは、PD - L1 および / または PD - L2 ポリペプチドとともに複合体を形成し、前記複合体は、酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA)、放射線免疫検定法 (RIA) の形式で、または免疫化学的に検出される、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記サンプルは、被検体から取得する、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 30】

被検体における疾患の経過または再発をモニターする方法であって、請求項 1 ～ 14 のいずれか 1 項に記載の少なくとも 1 つのモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントならびに前記 PD - L1 および / または PD - L2 ポリペプチドを含む複合体の形成に基づいて、前記被検体からのサンプル中の PD - L1 および / または PD - L2 ポリペプチドのレベルを決定するステップを含み、前記 PD - L1 および / または PD - L2 のレベルは、前記疾患の前記経過または再発を示す、方法。

【請求項 31】

前記決定するステップは、酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA)、放射線免疫検定法 (RIA) の形式で、または免疫化学的によって、または細胞内フローアッセイを用いて行われる、請求項 30 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 3 2】

前記疾患は、癌、メタボリックシンドローム、および脂質異常症からなる群から選択される、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

P D - L 1 および / または P D - L 2 阻害剤を被検体に投与するか否かを決定する方法であって、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の少なくとも 1 つのモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメント、ならびに前記 P D - L 1 および / または P D - L 2 ポリペプチドを含む複合体の形成に基づいて、前記被検体からのサンプル中の P D - L 1 および / または P D - L 2 ポリペプチドのレベルを決定するステップ、および検出された P D - L 1 および / または P D - L 2 ポリペプチドのレベルに基づいて、P D - L 1 および / または P D - L 2 阻害剤を投与するステップを含む、方法。

10

【請求項 3 4】

前記決定するステップは、酵素結合免疫吸着検定法 (E L I S A)、放射線免疫検定法 (R I A) の形式で、または免疫化学的によって、または細胞内フローアッセイを用いて行われる、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

疲弊 T 細胞を再活性化する方法であって、少なくともいくつかの細胞が P D - L 1 および / または P D - L 2 を発現する細胞集団を、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の少なくとも 1 つのモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントを含む有効量の組成物と接触させるステップを含む、方法。

20

【請求項 3 6】

免疫応答の調節の恩恵を受けるであろう状態をもつ被検体を治療する方法であって、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の少なくとも 1 つのモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントを含む有効量の組成物を前記被検体に投与するステップを含む方法。

【請求項 3 7】

前記状態は感染である、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記感染は、ウイルス感染、細菌による感染、原生動物感染、または寄生虫感染である、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記状態は癌である、請求項 3 6 に記載の方法。

30

【請求項 4 0】

前記癌は、固形腫瘍、血液の癌、膀胱癌、脳腫瘍、乳癌、結腸癌、胃癌、神経膠腫、頭部癌、白血病、肝臓癌、肺癌、リンパ腫、骨髄腫、頸部癌、卵巣癌、メラノーマ、膵臓癌、腎臓癌、唾液腺の癌、胃癌、胸腺上皮癌、および甲状腺癌からなる群から選択される、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記状態は、炎症性疾患である、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記炎症性疾患は、急性播種性脳脊髄炎、アジソン病、強直性脊椎炎、抗リン脂質抗体症候群、抗リン脂質抗体症候群、自己免疫肝炎、関節炎、ベーチェット病、類天疱瘡、小児脂肪便症、シャーガス病、クローン病、皮膚筋炎、1 型糖尿病、グッドパスチャー症候群、移植片対宿主病、グレーブス病、ギラン - バレー症候群、橋本病、高 I g E 症候群、特発性血小板減少性紫斑病、エリテマトーデス、多発性硬化症、重症筋無力症、天疱瘡、悪性貧血、多発性筋炎、原発性多発性筋炎、乾癬、関節リウマチ、シェーグレン症候群、一過性動脈炎、脈管炎、またはヴェグナー肉芽腫症からなる群から選択される、請求項 4 1 に記載の方法。

40

【請求項 4 3】

前記状態は、移植拒絶反応である、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 4】

50

前記移植拒絶反応は、臓器拒絶反応、骨髓移植拒絶反応、および骨髓非破壊的骨髓移植拒絶反応からなる群から選択される、請求項43に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2012年8月3日出願の米国仮特許出願第61/679,190号に基づく優先権を主張するものであり、その全体が引用により本明細書中に組み込まれる。

【0002】

連邦支援研究に関する陳述

本発明は、国立衛生研究所により授与された助成金P01 AI056299号の下に合衆国政府の支援を受けてなされた。合衆国政府は本発明における特定の権利を有する。この陳述は、連邦規則法典37巻§401.14(a)(f)(4)を満たすためだけに記載したものであり、出願が1つの発明だけを開示および/または請求していると解すべきでない。

【背景技術】

【0003】

T細胞などの免疫細胞が外来タンパク質に応答するためには、抗原提示細胞(APCs)によって、2つのシグナルが休止Tリンパ球に提示されなければならない(Jenkins, M. and Schwartz, R. (1987) J. Exp. Med. 165:302-319; Mueller, D. L.ら(1990) J. Immunol. 144:3701-3709)。免疫応答に対して特異性を授与する第1のシグナルは、T細胞受容体(TCR)を介して変換され、その後、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)に関連して提示される外来抗原性ペプチドを認識する。共刺激と呼ばれる第2のシグナルは、T細胞の増殖を惹起し、機能を果たす(Lenschowら(1996) Annu. Rev. Immunol. 14:233)。共刺激は、抗原特異的でも、MHC制限的でもなく、APCsと表現される1以上の異なる細胞表面ポリペプチドによってもたらされると考えられている(Jenkins, M. K.ら(1988) J. Immunol. 140:3324-3330; Linsley, P. S.ら(1991) J. Exp. Med. 173:721-730; Gimmi, C. D., ら 1991 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:6575-6579; Young, J. W. ら(1992) J. Clin. Invest. 90:229-237; Koulouva, L. ら(1991) J. Exp. Med. 173:759-762; Reiser, H.ら(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:271-275; van-Seventer, G. A.ら(1990) J. Immunol. 144:4579-4586; LaSalle, J. M. ら(1991) J. Immunol. 147:774-80; Dustin, M. I.ら(1989) J. Exp. Med. 169:503; Armitage, R. J.ら(1992) Nature 357:80-82; Liu, Y.ら(1992) J. Exp. Med. 175:437-445)。

【0004】

公知の共刺激経路に加えて、共抑制経路が存在して、T細胞の活性化および免疫応答をダウンレギュレートする。そしてそのような共抑制経路を調節することで免疫応答を効果的に調節することができる。例えば、共抑制経路の遮断は、負のシグナルを遮断することによって免疫応答を刺激するアプローチを提供し、それによって癌等の疾患、ならびにヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染、C型肝炎ウイルス(HCV)感染、マラリア、および結核(TB)等の慢性感染症を治療する治療可能性を有することになる。しかしながら、少なくとも、(a)PD-1と相互作用するPD-L1およびPD-L2;(b)B7-1と相互作用するPD-L1;および(c)PD-L1および/またはPD-L2と相互作用する他の受容体から構成されるネットワークは、標的への共抑制経路の複合体セットを提示する。現在の作用物質は、これらの相互作用のサブセットを遮断するだけである。実際、これら共抑制経路を調節する作用物質を生成する努力は、相互作用のサブセットを特異的に調節する単一の作用物質に対して向けられている。例えば、存在するPD-1モノクローナル抗体(mAb)は、PD-1とPD-1リガンド、PD-L1とPD-L2の相互作用を遮断するかもしれないが、PD-L1とB7-1またはPD-1リガンドと他の受容体(例えば、PD-L2やRGMb)の相互作用を遮断しないかもしれない。したがって、そのような抗PD-1 mAbは、相互作用のサブセットのみを遮断するだ

10

20

30

40

50

ろう。さらにそのような作用物質を生成する方法、例えば、動物モデルのPD-L1またはPD-L2ポリペプチドによる免疫化は、宿主PD-L1およびPD-L2がそのような作用物質を産生するであろうB細胞の耐性や欠失を導かないため、PD-L1、PD-L2二重結合物質を産出しない。また、免疫化の目的での大きなPD-L1およびPD-L2ポリペプチドの使用は、両標的との結合を可能にする抗体をもたらす共通エピトープを機能的に不明瞭ににする。例えば、野生型マウスは、マウスPD-L1およびPD-L2と反応する抗体を欠失させ、そのためにヒトおよびマウスPD-L1またはPD-L2の間で保存される構造と結合する多くの抗体を除去することになる。

【0005】

したがって、共抑制経路を同時に調節する能力を高めた組成物、およびそのような組成物の使用方法であって、そのような共抑制経路を調節する能力を高めることが有益である用途において効果的に診断、予後診断、および治療の提供を行う方法を開発することは、当該技術において必要である。

【発明の概要】

【0006】

本発明は、部分的に、PD-L1およびPD-L2の両方に対して結合親和性を有する新規な抗体の同定、およびその使用方法に基づいている。

【0007】

ある局面において、PD-L1およびPD-L2の両方に特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体、またはその抗原結合フラグメントが提供される。ある実施態様では、PD-L1およびPD-L2の両方は、ヒトPD-L1およびヒトPD-L2である。別の実施態様では、ヒトPD-L1は、配列番号4または6のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、ヒトPD-L2は、配列番号6のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。さらに別の実施態様では、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントは、(a) PD-1に結合するPD-L1；(b) B7-1に結合するPD-L1；(c) PD-1に結合するPD-L2；(d) RGMbに結合するPD-L2；(e) PD-1に結合するPD-L1によって媒介される免疫共抑制性シグナル；(f) B7-1に結合するPD-L1によって媒介される免疫共抑制性シグナル；(g) PD-1に結合するPD-L2によって媒介される免疫共抑制性シグナル；および(h) RGMbに結合するPD-L2によって媒介される免疫共抑制性シグナルからなる群から選択される、1以上の相互作用を抑制する(例えば、前記単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントは、(e)、(f)、(g)、または(h)の1以上の免疫共抑制性シグナルを抑制する)。さらにまた別の実施態様では、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントは、(a) PD-1に結合するPD-L1；(b) B7-1に結合するPD-L1；(c) PD-1に結合するPD-L2；(d) RGMbに結合するPD-L2；(e) PD-1に結合するPD-L1によって媒介される免疫共抑制性シグナル；(f) B7-1に結合するPD-L1によって媒介される免疫共抑制性シグナル；(g) PD-1に結合するPD-L2によって媒介される免疫共抑制性シグナル；および(h) RGMbに結合するPD-L2によって媒介される免疫共抑制性シグナルからなる群から選択される、1以上の相互作用を高める(例えば、免疫共抑制性シグナルは、(e)、(f)、(g)、または(h)である)。別の実施態様では、PD-1、B7-1、またはRGMbは、融合タンパク質である。さらに別の実施態様では、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントは、ペプチド配列CFTVTVPKDLYVVEYGSNまたはCYRSMISYGGADYKRITVに結合する。さらにまた別の実施態様では、単離されたモノクローナル抗体は、ハイブリドーマクローンとして寄託され、受託番号が付与されている。別の実施態様では、単離されたモノクローナル抗体は、a)表1に挙げられた配列からなる群から選択される重鎖配列と少なくとも約95%の同一性を有する重鎖配列、または、b)表1に挙げられた配列からなる群から選択される軽鎖配列と少なくとも約95%の同一性を有する軽鎖配列を含む。さらに別の実施態様では、単離されたモノクローナル抗体は、a)表1

10

20

30

40

50

に挙げられた配列からなる群から選択される重鎖 C D R 配列と少なくとも約 95 % の同一性を有する重鎖 C D R 配列、または、b) 表 1 に挙げられた配列からなる群から選択される軽鎖配列 C D R 配列 (light chain sequence CDR sequence) と少なくとも約 95 % の同一性を有する軽鎖 C D R 配列を含む。さらにまた別の実施態様では、単離されたモノクローナル抗体は、a) 表 1 に挙げられた配列からなる群から選択される重鎖配列、または、b) 表 1 に挙げられた配列からなる群から選択される軽鎖配列を含む。別の実施態様では、単離されたモノクローナル抗体は、a) 表 1 に挙げられた配列からなる群から選択される重鎖 C D R 配列、または、b) 表 1 に挙げられた配列からなる群から選択される軽鎖 C D R 配列を含む。さらに別の実施態様では、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントは、キメラ、ヒト化、複合体、齧歯動物、またはヒトである。さらにまた別の実施態様では、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントは、F (a b ') 2 フラグメント、F a b フラグメント、s c F v、二重特異性 s c F v、三重特異性 s c F v、ジアボディ、単ドメイン抗体 (d A b)、ミニボディ、または分子認識単位 (M R U) である。別の実施態様では、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントは、商業用抗体の P D - L 1 または P D - L 2 への結合を抑制する。さらに別の実施態様では、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントが存在することで、モノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントの不存在の場合に比べて、P D - L 1 または P D - L 2 活性の少なくとも 1 つを減少させるか、または抑制する。

10

20

30

40

50

【0008】

別の局面において、本明細書に記載する単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントおよび医薬的に許容される担体を含む、医薬組成物が提供される。

【0009】

さらに別の局面において、本明細書に記載するモノクローナル抗体のポリペプチドをコードする核酸の補体または本明細書に記載するモノクローナル抗体のポリペプチドをコードする核酸に少なくとも約 95 % の相同性を有する配列にストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズする単離された核酸分子が提供される。

【0010】

またさらに別の局面において、本明細書に記載する単離された核酸を含むベクターが提供される。

【0011】

別の局面において、本明細書に記載する単離された核酸を含む、および / または本明細書に記載する抗体もしくはその抗原結合フラグメントを発現する、宿主細胞が提供される。

【0012】

さらに別の局面において、本明細書に記載する単離された核酸を含む、および / または本明細書に記載する抗体もしくはその抗原結合フラグメントを発現する、トランスジェニック動物が提供される。

【0013】

またさらに別の局面において、本明細書に記載する少なくとも 1 つのモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントを作製する方法であって、前記少なくとも 1 つのモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントを産生する細胞を細胞培養から培養するステップを含む方法が提供される。

【0014】

別の局面において、本明細書に記載する、少なくとも 1 つのモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントを含むデバイスまたはキットであって、任意に少なくとも 1 つのモノクローナル抗体もしくはその抗原結合フラグメント、またはモノクローナル抗体もしくはその抗原結合フラグメントを含む複合体を検出するための標識を含む、デバイスまたはキットが提供される。ある実施態様では、該装置は、サンドイッチアッセイまたは競合アッセイを用いて、サンプル中の P D - L 1 および / または P D - L 2 ポリペプチドの

存在を検出する。

【0015】

さらに別の局面において、PD-L1および/またはPD-L2ポリペプチドの存在またはレベルを検出する方法であって、サンプルを取得するステップと、本明細書に記載の少なくとも1つのモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントを用いてサンプル中の前記ポリペプチドを検出するステップとを含む方法が提供される。ある実施態様では、前記少なくとも1つのモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントは、PD-L1および/またはPD-L2ポリペプチドと前記複合体を形成し、前記複合体は、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、放射線免疫検定法(RIA)の形式で、または免疫化学的に検出される。別の実施態様では、サンプルは、被検体から取得される。

10

【0016】

またさらに別の局面において、被検体における疾患の経過または再発をモニターする方法であって、本明細書に記載の少なくとも1つのモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメント、ならびに前記PD-L1および/またはPD-L2ポリペプチドを含む複合体の形成に基づいて、前記被検体からのサンプル中のPD-L1および/またはPD-L2ポリペプチドのレベルを決定するステップを含み、前記PD-L1および/またはPD-L2のレベルは、疾患の経過または再発を示す方法が提供される。ある実施態様では、決定するステップは、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、放射線免疫検定法(RIA)の形式で、または免疫化学的によって、または細胞内フローアッセイを用いて行われる。別の実施態様では、疾患は、癌、メタボリックシンドローム、および脂質異常症からなる群から選択される。

20

【0017】

別の局面において、PD-L1および/またはPD-L2阻害剤を被検体に投与するか否かを検出する方法であって、本明細書に記載の少なくとも1つのモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメント、ならびに前記PD-L1および/またはPD-L2ポリペプチドを含む複合体の形成に基づいて、前記被検体からのサンプル中のPD-L1および/またはPD-L2ポリペプチドのレベルを決定するステップ、および検出されたPD-L1および/またはPD-L2ポリペプチドのレベルに基づいて、PD-L1および/またはPD-L2阻害剤を投与するか否かを決定するステップを含む方法が提供される。ある実施態様では、検出するステップは、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、もしくは放射線免疫検定法(RIA)の形式で、または免疫化学的によって、または細胞内フローアッセイを用いて行われる。

30

【0018】

さらに別の局面において、疲弊T細胞を再活性化する方法であって、少なくともいくつかの細胞がPD-L1および/またはPD-L2を発現する細胞集団を、本明細書に記載の少なくとも1つのモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントを含む有効量の組成物と接触させるステップを含む方法が提供される。

【0019】

またさらに別の局面において、免疫応答の調節の恩恵を受けるであろう状態をもつ被検体を治療する方法であって、本明細書に記載(described)の少なくとも1つのモノクローナル抗体またはその抗原結合フラグメントを含む有効量の組成物を被検体に投与するステップを含む方法が提供される。ある実施態様では、状態は、感染(例えば、ウイルス感染、細菌による感染、原生動物感染、または寄生虫感染)である。さらに別の実施態様では、状態は、癌(例えば、固形腫瘍、血液の癌、膀胱癌、脳腫瘍、乳癌、結腸癌、胃癌、神経膠腫、頭部癌、白血病、肝臓癌、肺癌、リンパ腫、骨髄腫、頸部癌、卵巣癌、メラノーマ、膵臓癌、腎臓癌、唾液腺の癌、胃癌、胸腺上皮癌、または甲状腺癌)である。さらにまた別の実施態様では、状態は、炎症性疾患(例えば、急性播種性脳脊髄炎、アジソン病、強直性脊椎炎、抗リン脂質抗体症候群、自己免疫溶血性貧血、自己免疫肝炎、関節炎、ベーチェット病、類天疱瘡、小児脂肪便症、シャーガス病、クローン病、皮膚筋炎、1型糖尿病、グッドパスチャー症候群、移植片対宿主病、グレーブス病、ギラン-バレー症

40

50

候群、橋本病、高IgE症候群、特発性血小板減少性紫斑病、エリテマトーデス、多発性硬化症、重症筋無力症、天疱瘡、悪性貧血、多発性筋炎、原発性多発性筋炎、乾癬、関節リウマチ、シェーグレン症候群、一過性動脈炎、脈管炎、またはヴェグナー肉芽腫症)である。別の実施態様では、状態は、移植拒絶反応(例えば、臓器拒絶反応、骨髄移植拒絶反応、または骨髄非破壊的骨髄移植拒絶反応)。

【0020】

発明の詳細な説明

現在の作用物質は、単一の標的(例えば、CTLA4、B7-1、RGMb、PD-1、PD-L1、またはPD-L2)との結合およびその活性の調節しかできないので、共抑制経路のサブセットの調節が非効率的である。このため、他の共抑制経路(例えば、抗CTLA4抗体、抗B7-1抗体、抗RGMb抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、および/または抗PD-L2抗体)を効果的に調節するための作用物質の追加は、診断計画および治療計画を著しく複雑にし、臨床の通常の要件の負担を増加させるため、有用な診断薬および治療薬の開発が課題となっている。したがって、本発明は、少なくとも部分的に、PD-L1およびPD-L2の両方に結合する新規な抗体組成物に基づくものである。さらに、そのような所望の組成物を産生する宿主B細胞の寛容化や欠失の問題は、PD-L1およびPD-L2のロックアウト突然変異を持つ宿主動物を免疫化することによって克服した。これらのマウスは、これらのタンパク質を欠き、そのためPD-L1またはPD-L2に結合する抗体を産生するあらゆるB細胞が寛容化や欠失がされなかったためである。生成した抗体中、多数の阻害経路を遮断することができるモノクローナル二重遮断抗体である好ましい二重結合抗体を単離した。記載した二重結合抗体の生成の達成は、PD-L1およびPD-L2の構造が、非常に類似した領域を、特にPD-1に結合に関与するIgVドメイン中の領域に有するという発見に基づく。さらに、PD-L1とPD-L2の間の構造および配列構成の分析ならびにPD-1とそのリガンド、PD-L1およびPD-L2との間の結合関係に基づいて所望の二重結合抗体を生成するための免疫原性エピトープを表すペプチドCF TV T V P K D L Y V V E Y G S NおよびC Y R S M I S Y G G A D Y K R I T Vが発見された。

【0021】

本発明を容易に理解するために、まず初めにいくつかの用語を定義する。さらなる定義は、明細書を通して記載する。

【0022】

本明細書で使用する冠詞「a」および「an」は、その冠詞の文法的な目的語の1もしくは1以上(すなわち、少なくとも1)を意味するものとする。例えば、「an element」は、1つの要素もしくは1以上の要素を意味する。

【0023】

本明細書で用いられる場合、用語「活性」は、ポリペプチドに関して用いられるとき、例えば、ヒトPD-L1および/またはPD-L2ポリペプチドは、上記したようにタンパク質の構造に本来そなわる活性を含む。

【0024】

本明細書で用いられる場合、用語「抗体」は、全抗体およびあらゆる抗原結合フラグメント(すなわち、「抗原結合部分」)またはその単鎖を包含する。「抗体」は、ジスルフィド結合によって内部結合している少なくとも2つの重(h)鎖と2つの軽(L)鎖を含むグリコプロテイン、またはその抗原結合部分を意味する。各重鎖は、重鎖可変領域(本明細書においてV_Hと略す)および重鎖定常領域からなる。重鎖定常領域は、3つのドメインCH1、CH2およびCH3からなる。各軽鎖は、軽鎖可変領域(本明細書においてV_Lと略す)および軽鎖定常領域からなる。軽鎖定常領域は1つのドメインCLからなる。V_HおよびV_L領域は、さらにより保存され、フレームワーク領域(FR)と称する領域に点在する相補性決定領域(CDR)と称する超可変部の領域に分割することができる。各V_HおよびV_Lは、3つのCDRおよび4つのFRを含み、アミノ末端からカルボキシ末端までの間に、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順

序で配列されている。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有する。「相互作用する抗体」は、補体系を惹起しない抗体を意味する。抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナル；異種、同種、または同系抗体；またはその修飾系（例えば、ヒト化、キメラなど）でもよい。抗体は、完全ヒト抗体でもよい。いくつかの好ましい実施態様では、本発明の抗体は、特異的また実質的に特異的にヒトPD-L1およびヒトPD-L2と結合する。

【0025】

本明細書で用いられる場合、抗体の「抗原結合部分」または「抗原結合フラグメント」という用語は、抗原と特異的に結合する能力を保持する抗体の1つ以上のフラグメントを意味する（例えば、ヒトPD-1および/またはPD-2）。抗体の抗原結合機能は完全長抗体により実施され得ることが証明されている。抗体の「抗原結合タンパク質」という用語に含まれる結合フラグメントの例は、(i) Fabフラグメント、 V_H 、 V_L 、H、CLおよびCH1ドメインからなる一価フラグメント；(ii) $F(ab')_2$ フラグメント、ヒンジ領域でジスルフィドブリッジにより結合された2のFabフラグメントからなる二価フラグメント；(iii) V_H およびCH1ドメインからなるFdフラグメント；(iv) 抗体の1つの腕の V_H および V_L ドメインからなるFvフラグメント；(v) V_H ドメインからなるdAbフラグメント（Wardら（1989）Nature341：544-546）；および(vi) 単離された相補性決定領域（CDR）、または(vii) 合成リンカーに任意に結合されてもよい単離された2以上のCDRの組み合わせを包含する。さらに、Fvフラグメントの2つの領域、 V_H および V_L は別々の遺伝子によりコードされるが、これらは組み換え法を用いて、 V_H および V_L 領域対が一価ポリペプチド（一本鎖Fv（scFv））として知られている、例えば、Birdら（1988）Science242：423-426；およびHustonら（1988）Proc. Natl. Acad. Sci. USA85：5879-5883）を形成する1つのタンパク質鎖として調製することができる合成リンカーにより結合できる。このような一本鎖抗体はさらに抗体の「抗体結合部分」という用語に含まれることを意図される。これらの抗体フラグメントは、当業者に公知の従来の方法によって取得することができ、フラグメントは、インタクト抗体と同様の方法で使用するためのスクリーニングがなされる。

【0026】

用語「抗原提示細胞」は、プロフェッショナル抗原提示細胞（例えば、Bリンパ球、単球、樹状細胞、ランゲルハンス細胞）ならびに他の抗原提示細胞（例えば、ケラチン生成細胞、内皮細胞、星状細胞、繊維芽細胞、乏突起膠細胞）を包含する。用語「T細胞」は、CD4+T細胞およびCD8+T細胞を包含する。用語「T細胞」はさらに、ヘルパーT細胞1タイプおよびヘルパーT細胞2タイプの両方を包含する。

【0027】

本明細書で用いられる場合、用語「結合親和性」は、作用物質が標的分子に結合する大きさを表す。結合親和性は、所定の抗原に結合するのに十分な強さであるとき、「特異的」であるとする。典型的に抗体は、約 10^{-7} M未満、例えば、約 10^{-8} M、 10^{-9} Mまたは 10^{-10} M未満の親和力（ K_D ）で、あるいは、例えば、分析物およびリガンドとしての抗体として組み換え標的タンパク質（例えば、ヒトPD-L1および/またはヒトPD-L2）を用いたBIAcore3000装置による表面プラズモン共鳴（SPR）によって判定された場合、さらに低い力で結合し、所定の抗原または非常に関連する抗原以外の非特異的抗原（例えば、BSA）と結合する場合の親和性よりも、少なくとも $1.1\times$ 、 $1.2\times$ 、 $1.3\times$ 、 $1.4\times$ 、 $1.5\times$ 、 $1.6\times$ 、 $1.7\times$ 、 $1.8\times$ 、 $1.9\times$ 、 $2.0\times$ 、 $2.5\times$ 、 $3.0\times$ 、 $3.5\times$ 、 $4.0\times$ 、 $4.5\times$ 、 $5.0\times$ 、 $6.0\times$ 、 $7.0\times$ 、 $8.0\times$ 、 $9.0\times$ 、または10倍大きな親和性で所定の抗原に結合する。「抗原を認識する抗体」や「抗原に特異的な抗体」なるフレーズは、本明細書においては、用語「抗原に特異的に結合する抗体」と互換的に用いられる。

【0028】

本明細書で用いられる場合、用語「体液」は、体から排泄または分泌される液体、ならびに通常は存在しない液体（例えば、羊水、眼房水、肝汁、血液、血漿、髄液、耳垢水、

10

20

30

40

50

耳垢、カウパー腺液または尿道球腺液、乳糜、乳糜粥、糞便、女性射精液、間質液、細胞内液、リンパ液、月経分泌物、母乳、粘液、胸膜液、腹水、膿、唾液、皮脂、精液、血清、汗、滑液、涙、尿、膣分泌物、硝子体液、および嘔吐物）を言うものとする。

【 0 0 2 9 】

本明細書で用いられる場合、用語「癌」または「腫瘍」は、制御されない増殖、不死、転移能、急速な成長や増殖などの癌誘因性の細胞に典型的な特徴および特定の形態学的特徴を有する細胞を意味する。癌細胞は腫瘍の形態をとることも多く、そのような細胞は単独で動物内に存在することもある。または、白血病細胞などの非腫瘍化癌細胞であることもある。本明細書で用いられる場合、用語「癌」は、前癌細胞ならびに悪性腫瘍細胞を含む。癌は、限定されないが、グレーゾーンのリンパ腫、ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫（T細胞およびB細胞非ホジキンリンパ腫の両方を含む。例えば、マントルゾーンリンパ腫、縦隔大細胞型B細胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫、濾胞性リンパ腫、粘膜関連組織（MAL Tリンパ腫）の節外性辺縁帯リンパ腫、パーキットリンパ腫、リンパ節性辺縁帯リンパ腫、小リンパ球性リンパ腫（SLL）、リンパ形質細胞性リンパ腫（ワルデンストレームマクログロブリン血症とも称される））を含むリンパ腫、扁平上皮癌腫、B細胞腫瘍、例えば、多発性骨髄腫、例えば、 α 鎖病、 γ 鎖病、および μ 鎖病などの重鎖病、良性モノクローナル免疫グロブリン異常症、免疫細胞性アミロイドーシス、メラノーマ（例えば、転移性メラノーマ）、乳癌、肺癌（例えば、小細胞肺癌および非小細胞肺癌）、気管支癌、結直腸癌、前立腺癌（例えば、転移性のホルモン難治性の前立腺癌）、膵臓癌、胃癌、卵巣癌、膀胱癌、脳もしくは中枢神経系の癌、末梢神経系の癌、食道癌、子宮頸癌、子宮癌もしくは子宮内膜癌、口腔もしくは咽頭の癌、肝臓癌、腎臓癌（例えば、腎細胞癌腫）、精巣癌、胆道癌、小腸もしくは虫垂の癌、唾液腺癌、甲状腺癌、副腎癌、骨肉腫、軟骨肉腫、血液組織の癌などを含む。

10

20

【 0 0 3 0 】

用語「CDR」およびその複数形「CDRs」は、相補性決定領域（CDR）を意味し、そのうち3つは軽鎖可変領域（CDRL1、CDRL2およびCDRL3）の結合特性を形成し、および3つは重鎖可変領域（CDRH1、CDRH2およびCDRH3）の結合特性を形成する。CDRは、抗体分子の機能的活性に寄与し、足場領域もしくはフレームワーク領域からなるアミノ酸配列によって分離される。CDRの正確な境界や長さは、分類および番号系に従って、異なって定義されてきた。したがって、CDRは、Kabat, C 30
hothia、共同研究者または他の境界についての定義を参照することができる。異なる境界があるものの、これらの系のそれぞれは、いわゆる「高頻度可変領域」を構成する、ある程度重複する部分を可変配列内に有している。したがって、これらの系によるCDRの定義は、隣接するフレームワーク領域についての長さおよび境界部分がにおいて異なっているかもしれない。例えば、Kabat、Chothiaおよび/またはMacCallumら（Kabatら、“Sequences of Proteins of Immunological Interest”第5版、アメリカ合衆国保健福祉省、1992；Chothiaら（1987）J. Mol. Biol. 196, 901；およびMacCallumら、J. Mol. Biol. Biol. （1996）262, 732を参照することができる。そのそれぞれの全体が引用により組み込まれる）。

30

【 0 0 3 1 】

本明細書で用いられる場合、用語「分類する」は、サンプルを状態によって「関連づける」または「カテゴライズする」ことを含む。いくつかの特定の例においては、「分類する」は、統計的証拠、実験的証拠、またはその両方に基づいている。いくつかの特定の実施態様では、分類する方法および系は、いわゆる公知の状態のサンプルのトレーニングセットを用いる。いったん確立すれば、トレーニング用データセットは基準、モデルまたはテンプレートの役割を果たし、それらと不知のサンプルの特徴が比較され、不知の状態のサンプルが分類される。いくつかの特定の例においては、サンプルの分類は、サンプルの状態の診断に類似する。他のいくつかの例においては、サンプルの分類は、サンプルの状態と他の状態との識別に類似する。

40

【 0 0 3 2 】

50

本明細書で用いられる場合、用語「複合体抗体」は、2以上の関連しない可変領域からの生殖細胞系列または非生殖細胞系列の免疫グロブリン配列を含む可変領域を持つ抗体を意味する。さらに用語「複合体ヒト抗体」は、ヒト生殖細胞系列または非生殖細胞系列の免疫グロブリン配列に由来する定常領域および2以上の関連しないヒト可変領域からのヒト生殖細胞系列またはヒト非生殖細胞系列の免疫グロブリン配列を含む可変領域を持つ抗体をもつ抗体を意味する。複合体ヒト抗体は、人体中で複合体ヒト抗体の抗原性は低下するので、本発明に係る治療薬中の有効な部分として有用である。

【0033】

本発明はまた、ヌクレオチド配列にコードされる抗体またはアミノ酸配列を含有する抗体の結合特性に有意な影響や変化を与えないヌクレオチドおよびアミノ酸配列修飾を含む「保存配列修飾」を包含する。そのような保存配列修飾は、ヌクレオチドおよびアミノ酸の置換、付加および欠失を含む。修飾は、例えば部位指定突然変異導入法やランダムPCRによる変異導入のような、当該技術分野で知られる標準的な手法により導入することができる。保存的なアミノ酸置換には、例えば、アミノ酸残基を類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置換するものがある。似た側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーが当該技術分野で定義されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、電荷を持たない極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極性の側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、 β -分岐側鎖を有するアミノ酸（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）がある。したがって、本発明の抗体中の予想される非必須アミノ酸残基は、同じ側鎖ファミリーの他のアミノ酸残基に好ましく置換される。あるいは、別の実施態様では、PD-L1および/またはPD-L2と、例えば、飽和突然変異誘発によって結合する抗体をコードする核酸配列の全部または一部にそってランダムに突然変異を導入することができ、得られた修飾抗体は、結合活性に関してスクリーニングすることができる。

【0034】

さらに、遺伝子コード（下に表示）によって定義づけられているように、特定のタンパク質のアミノ酸配列とそのタンパク質をコードすることができるヌクレオチド配列の間には公知かつ確定的な対応性がある。同様に、遺伝子コードによって定義づけられているように、特定の核酸のヌクレオチド配列とその核酸によってコードされるアミノ酸配列の間には公知かつ確定的な対応性がある。

【0035】

10

20

30

遺伝子コード

アラニン (Ala, A)	GCA, GCC, GCG, GCT
アルギニン (Arg, R)	AGA, ACG, CGA, CGC, CGG, CGT
アスパラギン (Asn, N)	AAC, AAT
アスパラギン酸 (Asp, D)	GAC, GAT
システイン (Cys, C)	TGC, TGT
グルタミン酸 (Glu, E)	GAA, GAG
グルタミン (Gln, Q)	CAA, CAG
グリシン (Gly, G)	GGA, GGC, GGG, GGT
ヒスチジン (His, H)	CAC, CAT
イソロイシン (Ile, I)	ATA, ATC, ATT
ロイシン (Leu, L)	CTA, CTC, CTG, CTT, TTA, TTG
リジン (Lys, K)	AAA, AAG
メチオニン (Met, M)	ATG
フェニルアラニン (Phe, F)	TTC, TTT
プロリン (Pro, P)	CCA, CCC, CCG, CCT
セリン (Ser, S)	AGC, AGT, TCA, TCC, TCG, TCT
トレオニン (Thr, T)	ACA, ACC, ACG, ACT
トリプトファン (Trp, W)	TGG
チロシン (Tyr, Y)	TAC, TAT
バリン (Val, V)	GTA, GTC, GTG, GTT
末端シグナル (終端)	TAA, TAG, TGA

10

20

30

【 0 0 3 6 】

遺伝子コードの重要かつ公知の特徴はその重複性であり、それによって、タンパク質を作製するため用いられるアミノ酸の大半においては、複数の、コードするヌクレオチドのトリプレットを用いてもよい（上記図示）。したがって、異なるヌクレオチド配列が所与のアミノ酸配列をコードし得る。そのようなヌクレオチド配列は、（特定の生物では、いくつかの配列を他より効率的に翻訳するかもしれないが）全ての生物において同じアミノ酸配列を産生することになるので、機能的に同等であると考えられる。さらに、場合によっては、所与のヌクレオチド配列においてプリンまたはピリミジンの変異体が認められることもある。そのようなメチル化は、トリヌクレオチドコドンと対応するアミノ酸の間のコード関係に影響を与えない。

40

【 0 0 3 7 】

核酸の場合、用語「実質的な相同性」は、最適にアライメントして比較した場合の2つの核酸またはそのうちの指示した配列が、適当なヌクレオチド挿入または欠失がありながらも、ヌクレオチドの少なくとも約80%、通常はヌクレオチドの少なくとも約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%以上、そしてより好ましくは、ヌクレオチドの少なくとも約97%、98%、99%以上、同一であることを指すものである。あるいは、数セグメントが選択的ハイブリダイゼーション条件下で鎖の補体にハイブリダイズする

50

ときに、実質的な相同性を有するものとする。

【0038】

二つの配列間のパーセント同一性は、これら二つの配列を最適にアライメントするのに導入する必要があるギャップの数、および各ギャップの長さを考慮に入れたときの、これら配列に共通の同一位置の数の関数である（即ち、%相同性 = 同一位置の数 # / 位置の総数 # × 100）。二つの配列間の配列の比較およびパーセント同一性の決定は、以下の非限定的な例に解説するように、数学的アルゴリズムを用いて行うことができる。

【0039】

二つのヌクレオチド間のパーセント同一性は、GCGソフトウェア・パッケージ（<http://www.gcg.com>で入手できる）のGAPプログラムを用い、NWSgapdna.CMP 行列を用いて、ギャップ・ウェイトを40、50、60、70、または80にし、そしてレングス・ウェイトを1、2、3、4、5、または6にして決定することができる。二つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列間のパーセント同一性はまた、ALIGNプログラム（バージョン2.0）に組み込まれたE.マイヤースおよびW.ミラーのアルゴリズム（Comput. Appl. Biosci., 4:11-17（1988））を用い、PAM120ウェイト残基表を用いて、ギャップ・レングス・ペナルティを12、そしてギャップ・ペナルティを4にして、決定することもできる。さらに、二つのアミノ酸配列間のパーセント同一性は、GCGソフトウェア・パッケージ（<http://www.gcg.com>で入手できる）のGAPプログラムに組み込まれたニードルマンおよびワンシュ（J.Mol. Biol. (48):444-453（1970））のアルゴリズムを用い、Blossum 62行列またはPAM250行列のいずれかを用いて、ギャップ・ウェイトを16、14、12、10、8、6、または4にし、レングス・ウェイトを1、2、3、4、5、または6にして、決定することができる。

【0040】

さらに本発明の核酸およびタンパク質の配列を「クエリー配列」として利用して、公開データベースの検索を行って、例えば関連する配列を同定することなどができる。このような検索は、Altschulら（1990）J. Mol. Biol. 215:403-10のNBLASTおよびXBLASTプログラム（バージョン2.0）を利用すれば行える。BLASTヌクレオチド検索を、NBLASTプログラムを用い、スコア=100、ワード長=12にして行くと、本発明の核酸分子に相同なヌクレオチド配列を得ることができる。BLASTタンパク質検索を、XBLASTプログラムを用い、スコア=50、ワード長=3にして行くと、本発明のタンパク質分子に相同なアミノ酸配列を得ることができる。比較を目的としてギャップのあるアライメントを行うには、Gapped BLASTをAltschulら（1997）Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402が解説する通りに利用できる。BLASTおよびギャップドBLASTプログラムを利用する場合、各プログラムの（例えば、XBLAST およびNBLAST）のデフォルト・パラメータを利用できる。<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>を参照されたい。

【0041】

当該核酸は全細胞中であっても、細胞ライセート中であっても、または部分的に精製されたもしくは実質的に純粋な形で存在してもよい。核酸は、アルカリ/SDS処理、CsClバンディング、カラム・クロマトグラフィ、アガロースゲル電気泳動法、および当業で公知の他の技術を含む標準的な技術により、例えば他の細胞内核酸またはタンパク質など、他の細胞成分または他の混入物質を取り除いて精製されている場合に、「単離されている」または「実質的に純粋である」ことになる。F. Ausubelら編。Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York（1987）を参照されたい。

【0042】

cDNA、ゲノムまたは混合物由来である本発明の核酸組成物は、しばしば天然配列（修飾された制限部位等を除き）のままであり、遺伝子配列を提供する標準的技術に従って変異させてもよい。コーディング配列の場合、これらの変異は、必要に応じアミノ酸配列を左右するものでもよい。具体的には、ここで解説した天然のV、D、J、定常、スイッチおよび他のこのような配列に実質的に相同または由来とするDNA配列が考えられる（「

由来する」が、ある配列が別の配列と同一か、もしくは別の配列から改変されていることを指す場合)。

【0043】

本明細書で用いられる場合、用語「二重結合抗体」は、1以上の物理的に離れている、異なるポリペプチド配列を持つポリペプチド配列に対して結合親和性をもつ抗体を言う。そのような二重結合抗体は、例えば、結合エピトープ配列以外の領域にある、2つの物理的に離れている、異なるポリペプチド配列を持つポリペプチド配列が共有するエピトープを認識し、結合する。ある好ましい態様では、二重結合抗体は、本明細書において「抗PD-L1抗体および抗PD-L2抗体」、「抗PD-L1抗体/PD-L2二重結合抗体」とも呼ぶ、1つの「抗PD-L1/PD-L2抗体」である。

10

【0044】

本明細書で用いられる場合、用語「Fc領域」は、天然配列Fc領域と変異体Fc領域を含む免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために用いられる。免疫グロブリン重鎖のFc領域の境界は変化するかもしれないが、ヒトIgG重鎖Fc領域は通常Cys226位またはPro230位ののアミノ酸残基からそのカルボキシル末端に延びると定義されている。本発明の抗体に用いられる好適な天然配列Fc領域としては、ヒトIgG1、IgG2(IgG2A、IgG2B)、IgG3、およびIgG4がある。

【0045】

本明細書で用いられる場合、基質を液体(例えば、標準食塩クエン酸塩(saline citrate)、pH7.4)で、基質から解離する分子の実質的な画分なしに、すぐことができるように基質に共有または非共有結合している場合、分子は基質に「固定されている」または「固着されている」。

20

【0046】

本明細書で用いられる場合、「フレームワーク」または「FR」残基は、本明細書で定義するHVR残基以外の可変ドメイン残基である。

【0047】

本明細書で用いられる場合、「Fc受容体」または「FcR」という用語は、抗体のFc領域に結合するレセプターを記述するために使用される。好ましいFcRは、天然配列ヒトFcRである。さらに好ましいFcRは、IgG抗体(γレセプター)に結合し、FcγRI、FcγRIIおよびFcγRIIIサブクラスのレセプターを含むものであり、これらのレセプターの対立遺伝子変異体および選択的スプライシング型を含む。FcγRIIIレセプターは、FcγRIIIA(「活性化レセプター」)およびFcγRIIIB(「抑制受容体」)を含み、それらは、主としてその細胞質ドメインにおいて異なる類似のアミノ酸配列を有する。活性化FcγRIIIAは、その細胞質ドメインに、免疫レセプターチロシン-ベース活性化モチーフ(ITAM)を有する。抑制受容体FcγRIIIBは、その細胞質ドメインに、免疫レセプターチロシン-ベース活性化モチーフ(ITIM)を有する(Daeron, Annu. Rev. Immunol., 15: 203-234 (1997)に概説されている)。FcRはRavetchおよびKinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991); Capelら, Immuno methods 4: 25-34 (1994); およびde Hasら, J. Lab. Clin. Med. 126: 330-41 (1995)において概説されている。将来同定されるものも含む他のFcRが、ここにおける「FcR」という用語に包含される。

30

40

【0048】

「機能保存的変異体」とは、1つのタンパク質または酵素内の所与のアミノ酸残基が、限定されないが、類似の特性(例えば極性、水素結合ポテンシャル、酸性、塩基性、疎水性、芳香族性など)を有するものによるアミノ酸の置換を含めたポリペプチドの全体的立体構造および機能を改変することなく変更されている変異体のことである。保存されたものとして示されたもの以外のアミノ酸は、1つのタンパク質内で異なっていてよく、そのため、類似の機能をもつ任意の2つのタンパク質の間のタンパク質またはアミノ酸配列類似性百分率は、変動してよく、例えばクラスタ方法(Cluster Method)などによるアラインメントスキームに従って決定された場合70%~99%であり得る。ここで類似性はM

50

E G A L I G N アルゴリズムに基づいている。「機能保存的変異体」も、B L A S T または F A S T A アルゴリズムによって決定された場合に、少なくとも 60 % のアミノ酸同一性、好ましくは少なくとも 75 %、より好ましくは少なくとも 85 %、さらに好ましくは少なくとも 90 %、そしてさらに一層好ましくは少なくとも 95 % のアミノ酸同一性を有し、かつ比較対象の天然のタンパク質または親タンパク質と同じかまたは実質的に類似の特性または機能を有するポリペプチドを含む。

【0049】

ここで使用される場合、「グリコシル化パターン」という用語は、タンパク質、より具体的には免疫グロブリンタンパク質に共有的に付着している炭水化物単位のパターンとして定義される。異種抗体のグリコシル化パターンは、当業者が異種抗体のグリコシル化パターンを、導入遺伝子の C_H 遺伝子が由来する種に対してよりも非ヒトトランスジェニック動物の種における上記グリコシル化パターンにより類似しているものと認識する場合、非ヒトトランスジェニック動物の種によって産生される抗体に天然に生じるグリコシル化パターンと実質的に同様であると特徴付けることができる。

10

【0050】

本明細書で用いられる場合、用語「異種抗体」は、そのような抗体を産生するトランスジェニック非ヒト生物との関連で定義される。この用語は、トランスジェニック非ヒト動物からなるものでない生物に見出され、一般にトランスジェニック非ヒト動物のもの以外の種由来のものに対応するアミノ酸配列またはコード核酸配列を有する抗体を意味する。

20

【0051】

本明細書で用いられる場合、用語「ヒト化抗体」は、ヒト以外の哺乳動物から誘導された抗体の C D R と、ヒト抗体の F R 領域および定常領域からなる抗体を意味する。ヒト化抗体は、人体中におけるヒト化抗体の抗原性が低下させられるので、本発明に係る治療剤中の有効成分として有用である。

【0052】

本明細書で用いられる場合、用語「高頻度可変領域」、「H V R」または「H V」という用語は、配列において高頻度可変であり、および/または構造的に定まったループを形成する抗体可変ドメインの領域を意味する。一般に、抗体は 6 つの H V R を含む；つまり、V H に 3 つ (H 1、H 2、H 3)、V L に 3 つ (L 1、L 2、L 3) である。天然の抗体では、H 3 および L 3 は 6 つの H V R の殆どの多様性を示し、特に H 3 は抗体に微細な特異性を付与するのに独特の役割を果たすと考えられている。例えば Xu ら、Immunity 13 : 37-45 (2000) ; Johnson および Wu, Methods in Molecular Biology 248 : 1-25 (Lo 編, Human Press, Totowa, NJ, 2003) を参照されたい。確かに、重鎖のみからなる天然に生じるラクダ抗体は軽鎖の不存在下で機能的で安定である。例えば、Hamers-Casterman ら、Nature 363 : 446-448 (1993) ; Sheriff ら、Nature Struct. Biol. 3 : 733-736 (1996) を参照されたい。

30

【0053】

用語「免疫応答」は、T 細胞共刺激の調節によって影響を受ける T 細胞媒介および/または B 細胞媒介免疫応答を含む。例示的な免疫応答は T 細胞応答、例えばサイトカイン産生、および細胞傷害性を含む。また、免疫応答という用語は、T 細胞活性化によって間接的に影響を受ける免疫応答、例えば抗体産生 (体液性応答) およびサイトカイン応答性細胞、例えばマクロファージの活性化を含む。

40

【0054】

本明細書で用いられる場合、「抑制する」という用語は、例えば特定の作用、機能または相互作用の減少、制限または遮断を含む。本明細書で用いられる場合、用語「抑制性シグナル」は、免疫細胞上のポリペプチドに対する抑制受容体 (例えば、C T L A 4、P D - 1 または R G M b) を介して伝達されるシグナルを意味する。そのようなシグナルは、活性化レセプターを介して (例えば、T C R または C D 3 ポリペプチドを介して) シグナルをアンタゴナイズし、その結果、例えば、二次メッセンジャー生成の抑制 ; 増殖の抑制 ; 免疫細胞におけるエフェクター機能の抑制、例えば、減少したファージサイトーシス、

50

減少した抗体生産、減少した細胞性細胞傷害性、免疫細胞のメディエータ（例えばサイトカイン（例えばIL-2）および/またはアレルギー性反応のメディエータ）の産生の失敗；またはアレルギーの発生などを生じさせることができる。

【0055】

ここで使用される場合、二分子間の相互作用に言及する場合の「相互作用」という用語は、分子の互いの物理的接触（例えば、結合）を意味する。一般に、そのような相互作用は、上記分子の一方または両方の（生物学的効果を生じる）活性を生じる。活性は分子の一方または両方の直接の活性（例えば、シグナル伝達）でありうる。あるいは、相互作用において一方または両方の分子はリガンドへの結合が防止されることもあり、よってリガンド結合活性（例えばそのリガンドに結合し、共刺激を惹起または抑制する）について不活性とされることもある。そのような相互作用を抑制すると、相互作用に関与する1以上の分子の活性の破壊を生じる。そのような相互作用を亢進することは、上記物理的接触の可能性を延長または増大させ、上記活性の可能性を延長または増大させる。

10

【0056】

本明細書で用いられる場合、「単離された抗体」という用語は、異なった抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体（例えば、ヒトPD-L1および/またはPD-L2に特異的に結合し、ヒトPD-L1および/またはPD-L2に結合しない抗体を実質的に含まない抗体）を言うものとする。しかしながら、ヒトPD-L1および/またはPD-L2のエピトープに特異的に結合する単離された抗体はそれぞれ、異なった種由来の他のヒトPD-L1および/またはPD-L2タンパク質と交差反応性を有している場合がある。しかしながら、いくつかの好ましい実施態様では、抗体は、ヒトPD-L1および/またはPD-L2に対して高い親和性および選択性を維持している。さらに、単離された抗体は、典型的には他の細胞性物質および/または化学物質を実質的に含まない。本発明のある態様では、ヒトPD-L1および/またはPD-L2に対して異なった特異性を有する「単離された」モノクローナル抗体の組合せが良好に定まった組成物において組み合わせられる。

20

【0057】

本明細書で用いられる場合、用語「アイソタイプ」は、重鎖定常領域遺伝子によってコードされる抗体クラス（例えば、IgMまたはIgG1）を意味する。

【0058】

本明細書で用いられる場合、用語「 K_D 」は、特定の抗体抗原相互作用の解離平衡定数を意味するものである。ここに開示される発明の抗体の結合親和性は、標準的な抗体-抗原アッセイ、例えば、競合アッセイ、飽和アッセイ、またはELISAもしくはRIAなどの標準的なイムノアッセイによって測定または判定すればよい。

30

【0059】

本明細書で用いられる場合、「キット」は、少なくとも1つの試薬、例えば、本発明のマーカーの発現を特異的に検出または調節するためのプローブを含む、あらゆる製造物（例えば、パッケージまたは容器）である。キットは、本発明の方法を行うためのユニットとして、売り込まれ、流通され、または販売され得る。

【0060】

本明細書で用いられる場合、「調節する」という用語は、アップレギュレーションおよびダウンレギュレーション、例えば、応答または生物学的活性の亢進または抑制を含む。

40

【0061】

本明細書で用いられる場合、用語「モノクローナル抗体」は、特定のエピトープに対して単一の結合特異性および親和性を示す抗体を意味する。したがって、「ヒトモノクローナル抗体」という用語は、単一の結合特異性を示し、ヒト生殖系列または非生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変および定常領域を有する抗体を意味する。ある実施態様では、ヒトモノクローナル抗体は、不死化細胞に融合させたヒト重鎖導入遺伝子および軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有する非ヒト動物、例えばトランスジェニックマウスから得られるB細胞を含むハイブリドーマによって産生される。

50

【0062】

本明細書で用いられる場合、物について「天然に存在する」という用語は、物を天然に見出すことができるという事実を意味する。例えば、天然源から単離することができる（ウイルスを含む）生物に存在し、研究室において人間によって意図的に改変されていないポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列は天然に存在している。

【0063】

本明細書で用いられる場合、用語「核酸分子」は、DNA分子およびRNA分子を含むものとする。核酸分子は一本鎖または二本鎖でありうるが、好ましくは二本鎖DNAである。本明細書で用いられる場合、PD-L1および/またはPD-L2に結合する抗体または抗体部分（例えば、V_H、V_L、CDR3）をコードする核酸に関連して、本明細書

10

【0064】

核酸は、それが他の核酸配列と機能的な関係に配置される場合、「作用可能に連結」されている。例えば、プロモーターまたはエンハンサーは、それが配列の転写に影響する場合、コード配列に作用可能に連結されている。転写調節配列に関しては、作用可能に連結するとは、連結されているDNA配列が近接し、二つのタンパク質コード領域を接合するのに必要な場合には、近接し、かつ読み枠にあることを意味する。スイッチ配列では、作用可能に連結するとは配列がスイッチ組み換えを実施できることを示す。

20

【0065】

マーカーの「過剰発現」または「有意に高レベルの発現」とは、発現を評価するために使用されるアッセイの標準誤差よりも大きい、そして好ましくは、対照サンプル（例えば、疾患に関連するマーカーを有さない健常被験体由来のサンプル）中のマーカーの発現レベルの少なくとも2倍、より好ましくは2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20倍以上高い試験サンプル中での発現レベル、そして好ましくはいくつかの対照サンプルにおけるマーカーの平均発現レベルをいう。マーカーの「有意に低いレベルの発現」とは、対照サンプル（例えば、疾患に関連するマーカーを有さない健常被験体由来のサンプル）中のマーカーの発現レベルの少なくとも2倍、より好ましくは2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20倍小さい試験サンプルの発現レベル、そして好ましくはいくつかの対照サンプルにおけるマーカーの平均発現レベルをいう。

30

【0066】

本明細書で用いられる場合、用語「患者」は、特定の症状または1以上の診断を示唆する症状を臨床的に発症していることを示したヒト被検体を含む。患者は、当該技術分野の医師に公知の臨床的な処置によって更なる分類が必要かもしれない（または、さらなる疾患の指示は必要ないかもしれない、あらゆるすべての点で正常であるらしいこともある）。患者の診断は、さらなる疾患の症状の発症、または自然な、または、治療計画もしくは治療の経過中の該疾患の寛解といった疾患の進行の経過中に変わるかもしれない。用語「診断」は、特定の患者または被検体の早期または後期における診断が異なることを排除するものではない。用語「予後」は、生物学的サンプル中の1以上の酵素の存在に関連する、さもなければ、それにより示される状態を被検体または患者が発生する蓋然性の評価を意味する。

40

【0067】

用語「PD-1」は、リガンドとして知られているPD-L1およびPD-L2を有す

50

る共抑制受容体として機能する免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーのメンバーを言う。PD-1は、アポトーシス細胞死に関連するタンパク質を選択するためのサブトラクションクロニングベースの方法を用いて既に同定されている。PD-1は、PD-L1に結合するその能力に基づく分子のCD28/CTLA-4ファミリーのメンバーである。CTLA4と同様に、PD-1は抗CD3に应答してT細胞の表面上で迅速に誘発される(Agataら、25 (1996) Int. Immunol. 8:765)。しかしながら、CTLA4とは対照的に、PD-1はB細胞の表面上でも誘発される(抗IgMに应答して)。PD-1はさらに、胸腺細胞および骨髄細胞のサブセット上でも発現される(Agataら (1996) 前掲; Nishimuraら (1996) Int. Immunol. 8:773)。

【0068】

代表的なヒトPD-1バイオマーカーの核酸およびアミノ酸配列は、GenBankデータベースにアクセッション番号NM_005018.2およびNP_005009.2にて公開されており、入手可能である。それを表1に示している(Ishidaら (1992) 20 EMBO J 11:3887; Shinoharaら (1994) Genomics 23:704; 米国特許第5,698,520号も参照されたい)。PD-1は、免疫グロブリンスーパーファミリードメイン、膜貫通ドメインを含有する細胞外領域、および免疫受容体チロシンベースの抑制モチーフ(ITIM)を含む細胞内領域を有する(Ishidaら (1992) EMBO J. 11:3887; Shinoharaら (1994) Genomics 23:704; 米国特許第5,698,520号)。これらの特徴も、免疫抑制性受容体と呼ばれるポリペプチドの大きなファミリーを画定するものであり、それはまたgp49B、PIR-B、およびキラー抑制性受容体(KIR)を含む(Vivier and Daeron (1997) Immunol. Today 18:286)。これらの受容体のチロシルリン酸化ITIMモチーフは、抑制シグナルを導くホスファターゼを含有するSH2ドメインと相互作用することが推定されることが多い。これらの免疫抑制性受容体のサブセットは、MHCポリペプチド、例えば、KIRと結合し、CTLA4はB7-1およびB7-2と結合する。MHCとB7遺伝子の間に系統発生的関係があることが提唱されている(Henryら (1999) Immunol. Today 20(6):285-8)。ヒト以外の生物のPD-1オルソログの核酸およびポリペプチド配列は公知であり、それらには、例えば、マウスPD-1(NM_008798.2およびNP_032824.1)、ラットPD-1(NM_001106927.1およびNP_001100397.1)、イヌPD-1(XM_543338.3およびXP_543338.3)、ウシPD-1(NM_001083506.1およびNP_001076975.1)、ならびにニワトリPD-1(XM_422723.3およびXP_422723.2)が含まれる。

【0069】

PD-1ポリペプチドは、可溶性、単量体の形態で存在するとき、抑制シグナルを免疫細胞に送り、それによって免疫細胞の免疫細胞エフェクター機能を抑制することができ、または共刺激(例えば、競合的抑制によって)を促進することができる抑制性受容体である。好ましいPD-1ファミリーメンバーは、PD-1と配列同一性を共有し、1以上のB7ファミリーメンバー、例えば、B7-1、B7-2、PD-1リガンド、および/または他のポリペプチドに、抗原提示細胞上で結合する。

【0070】

「PD-1活性」という用語は、抗原提示細胞上に天然PD-1リガンドを関与させることにより、免疫細胞において抑制シグナルを調節する、PD-1ポリペプチドの能力を含む。PD-1は、CTLA4と同様な方法で免疫細胞に抑制シグナルを送信する。免疫細胞における抑制性シグナルの調節の結果、免疫細胞の増殖、および/または免疫細胞によるサイトカイン分泌の調節が生じる。よって、「PD-1活性」という用語は、PD-1ポリペプチドのその天然リガンドに結合する能力、免疫細胞共刺激または抑制性シグナルを調節する能力、および免疫応答を調節する能力を含む。

【0071】

用語「PD-1リガンド」は、PD-1受容体の結合パートナーを言い、PD-L1(Freemanら (2000) J. Exp. Med. 192:1027)とPD-L2(Latchmanら (2001) Nat. Immunol. 2:261)の両方を含む。少なくとも2つのタイプのヒトPD-1リガンドポリペプチドが存在する。PD-1リガンドタンパク質は、シグナル配列、およびIgVド

10

20

30

40

50

メイン、IgCドメイン、膜貫通ドメインならびに短い細胞質尾部を含む。PD-L1（配列データについては、Freemanら（2000）J. Exp. Med. 192:1027を参照）およびPD-L2（配列データについては、Latchmanら（2001）Nat. Immunol. 2:261を参照）の両方は、B7ファミリーのポリペプチドのメンバーである。PD-L1およびPD-L2の両方が、胎盤、脾臓、リンパ節、胸腺および心臓で発現する。PD-L2のみが、脾臓、肺および肝臓で発現し、一方、PD-L1のみが胎児肝臓で発現する。両方のPD-L1リガンドが、活性化された単球および樹状細胞においてアップレギュレートされる。

【0072】

PD-L1リガンドは、特定の保存された構造的および機能的特徴を有するポリペプチドのファミリーを含む。用語「ファミリー」は、タンパク質または核酸分子についていう場合、共通の構造的ドメインまたはモチーフを有し、本明細書において定義するような十分なアミノ酸またはヌクレオチド配列相同性を有する2以上のタンパク質または核酸分子を意味するものとする。このようなファミリーメンバーは、天然に存在するかまたは天然に存在せず、同じまたは異なる種のいずれかから得ることができる。例えば、ファミリーはヒト起源の第一のタンパク質、ならびに他のヒト起源の異なるタンパク質を含むことができるか、あるいは別に、ヒト以外の起源の相同物を含むことができる。ファミリーのメンバーはさらに共通の機能的特徴を有し得る。PD-L1リガンドポリペプチドはポリペプチドのB7ファミリーのメンバーである。本明細書で用いる用語「B7ファミリー」または「B7ポリペプチド」は、B7ポリペプチド、例えば、B7-1、B7-2、B7h（Swallowら（1999）Immunity11:423）、および/またはPD-L1リガンド（例えば、PD-L1またはPD-L2）と配列相同性を共有する共刺激ポリペプチドを含む。例えば、デフォルトのパラメータを用いてNCBIのBLASTプログラム（ギャップペナルティーが存在11および拡張1に設定されたBlosurm6 2マトリックス（NCBIウェブサイト参照））を用いて比較した場合に、ヒトB7-1およびB7-2は約26%のアミノ酸配列同一性を共有する。用語B7ファミリーもまた、免疫細胞機能を改変し得る、これらポリペプチドの変異体を含む。分子のB7ファミリーは、シグナルドメイン、IgVドメインおよびIgCドメインを含むいくつかの保存された領域を共有する。IgVドメインおよびIgCドメインは、技術的に認識されたIgスーパーファミリーメンバードメインである。これらのドメインは、Igフォールドと呼ばれるフォールディングパターンが異なる構造的ユニットに対応する。Igフォールドは、2つのβシートに挟まれており、それぞれが5～10のアミノ酸のアンチパラレルβ鎖からなり、2つのシート間のジスルフィド結合は、すべてではないが、大半が保存されている。Ig、TCR、およびMHC分子のIgCドメインは同じタイプの配列パターンを共有し、Igスーパーファミリー内のC1セットと呼ばれる。他のIgCドメインは、他のセット中にある。IgVドメインもまた、配列パターンを共有し、Vセットドメインと呼ばれる。IgVドメインはIgCドメインよりも長く、さらなるβ鎖対を含有する。

【0073】

好ましいB7ポリペプチドは、免疫細胞に共刺激または抑制性シグナルを送り、それによって免疫細胞応答を促進または抑制することができる。例えば、共刺激受容体と結合するB7ファミリーメンバーは、T細胞活性化を増加させるが、抑制受容体と結合するB7ファミリーメンバーは、共刺激を減少させる。さらに、同じB7ファミリーメンバーは、T細胞共刺激を増加または減少させる。例えば、共刺激受容体に結合する場合、PD-L1リガンドは、免疫細胞の共刺激を誘発するか、または例えば、溶解型において存在する場合に免疫細胞共刺激を抑制することができる。抑制受容体と結合する場合、PD-L1リガンドポリペプチドは抑制シグナルを免疫細胞に伝達することができる。好ましいB7ファミリーのメンバーには、B7-1、B7-2、B7h、PD-L1、またはPD-L2およびその可溶性フラグメントもしくは誘導体が含まれる。ある実施態様では、B7ファミリーメンバーは、例えば、CTLA4、CD28、ICOS、PD-1および/または他の受容体などの免疫細胞上の1つ以上の受容体に結合し、受容体に応じて、免疫細胞、好ましくはT細胞に抑制シグナルまたは共刺激シグナルを伝達する能力を有する。

【 0 0 7 4 】

いくつかの実施態様では、B 7 ファミリーの B 7 - 1 および / または B 7 - 2 メンバーが好ましい。B 7 - 1 (C D 8 0) および B 7 - 2 (C D 8 6) タンパク質は、重要な共刺激分子である (Freeman ら (1991) J. Exp. Med. 174 : 625 ; Freeman ら (1989) J. Immunol. 143 : 2714 ; Azuma ら (1993) Nature 366 : 76 ; Freeman ら (1993) Science 262 : 909) 。 B 7 - 2 は、一次免疫応答において主な役割を果たし、B 7 - 1 は、免疫応答の後期にアップレギュレーションされるものであり、一次 T 細胞応答の延長あるいは二次 T 細胞応答の共刺激に重要であるかもしれない (Bluestone (1995) Immunity 2 : 555) 。 P D - L 1 は P D - 1 および B 7 - 1 の両方に結合する。P D - L 1 による T 細胞発現 B 7 - 1 の結合および B 7 - 1 による T 細胞発現 P D - L 1 の結合の両方により、T 細胞が抑制される (Butte ら (2007) Immunity 27 : 111) 。代表的なヒト B 7 - 1 バイオマーカの核酸およびアミノ酸配列は、GenBank データベースにアクセッション番号 NM_005191.3 および NP_005182.1 として公開されており、入手可能である (表 1 において、配列番号 1 1 および 1 2 として示している) 。さらに、ヒト以外の生物の B 7 - 1 オルソログの核酸およびポリペプチド配列は既知であり、例えば、チンパンジー B 7 - 1 (XM_001163234.2 および XP_001163234.1) 、イヌ B 7 - 1 (NM_001003147.1 および NP_001003147.1) 、ウシ B 7 - 1 (NM_001206439.1 および NP_001193368.1) 、マウス B 7 - 1 (NM_009855.2 および NP_033985.3) 、およびラット B 7 - 1 (NM_012926.1 および NP_037058.1) がある。

10

【 0 0 7 5 】

共刺激シグナルを調節すると、免疫細胞のエフェクター機能が調節される。したがって、「P D - 1 リガンド活性」という用語は、P D - 1 リガンドポリペプチドがその天然の受容体 (例えば、P D - 1 または B 7 - 1 など) と結合する能力、免疫細胞共刺激または抑制シグナルを調節する能力および免疫細胞応答を調節する能力を包含する。

20

【 0 0 7 6 】

用語「P D - L 1」は、特異的な P D - 1 リガンドを意味する。2つの型のヒト P D - L 1 分子が同定されている。1の型は天然に存在する P D - L 1 可溶性ポリペプチド、すなわち、C O O H - 末端に短い親水性ドメインを持つが膜貫通ドメインをもたないものであり、本明細書において P D - L 1 S と称する (表 1 において、配列番号 4 に示す) 。第 2 の型は、細胞関連 (cell-associated) ポリペプチド、すなわち、膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインを有するものであり、本明細書においては P D - L 1 M として (配列番号 6 に示す) 。P D - L 1 M に関する代表的なヒト P D - L 1 バイオマーカの核酸およびアミノ酸配列もまた、GenBank データベースにてアクセッション番号 NM_014143.3 および NP_054862.1 として公開されており、入手可能である。P D - L 1 タンパク質は、シグナル配列、および I g V ドメイン、I g C ドメインを含む。配列番号 4 のシグナル配列は、アミノ酸約 1 ~ アミノ酸約 1 8 に示されている。配列番号 6 のシグナル配列は、アミノ酸約 1 ~ アミノ酸約 1 8 に示されている。配列番号 4 の I g V ドメインは、アミノ酸約 1 9 ~ アミノ酸約 1 3 4 に示され、配列番号 6 の I g V ドメインは、アミノ酸約 1 9 ~ アミノ酸約 1 3 4 に示されている。配列番号 4 の I g C ドメインは、アミノ酸約 1 3 5 ~ アミノ酸約 2 2 7 に示され、配列番号 6 の I g C ドメインは、アミノ酸約 1 3 5 ~ アミノ酸約 2 2 7 に示されている。配列番号 4 に例示される P D - L 1 は、アミノ酸約 2 2 8 ~ アミノ酸約 2 4 5 に示される親水性尾部を含む。配列番号 6 に例示される P D - L 1 ポリペプチドは、配列番号 6 のアミノ酸約 2 3 9 ~ アミノ酸約 2 5 9 に示される膜貫通ドメイン、および配列番号 6 のアミノ酸約 2 6 0 ~ アミノ酸約 2 9 0 の約 3 0 のアミノ酸で示される細胞質ドメインを含む。さらに、ヒト以外の生物の P D - L 1 オルソログの核酸およびポリペプチド配列は既知であり、例えば、マウス P D - L 1 (NM_021893.3 および NP_068693.1) 、ラット P D - L 1 (NM_001191954.1 および NP_001178883.1) 、イヌ P D - L 1 (XM_541302.3 および XP_541302.3) 、ウシ P D - L 1 (NM_001163412.1 および NP_001156884.1) 、およびニワトリ P D - L 1 (XM_424811.3 および XP_424811.3) を含む。

30

40

【 0 0 7 7 】

用語「P D - L 2」は、他の特異的 P D - 1 リガンドを意味する。P D - L 2 は、樹状

50

細胞、マクロファージおよび骨髄由来マスト細胞を含む様々なAPCsで発現されるB7ファミリーメンバーである(Zhongら(2007) Eur. J. Immunol. 37:2405)。APC発現PD-L2は、PD-1のライゲーションによるT細胞活性化を抑制しかつPD-1非依存性メカニズムによるT細胞活性化を共刺激することができる(Shinら(2005) J. Exp. Med. 201:1531)。さらに、樹状細胞発現PD-L2のライゲーションは、樹状細胞サイトカインの発現および生存の亢進を生じる(Radhakrishnanら(2003) J. Immunol. 37:1827; Nguyenら(2002) J. Exp. Med. 196:1393)。代表的なヒトPD-L2バイオマーカーの核酸およびアミノ酸配列(例えば、配列番号7および8)は当該技術において既知であり、GenBankデータベースにアクセッション番号NM_025239.3およびNP_079515.2として公開されており、入手可能である。PD-L2タンパク質は、共通の構造的要素によって特徴づけられる。いくつかの実施態様では、PD-L2タンパク質は、少なくとも1以上の以下のドメインを持つ:シグナルペプチドドメイン、膜貫通ドメイン、IgVドメイン、IgCドメイン、細胞外ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞質ドメイン。例えば、配列番号8のアミノ酸1~19はシグナル配列を含む。本明細書で用いられる場合、「シグナル配列」または「シグナルペプチド」は、そのような配列を含むポリペプチドを脂質二重層に指向させるのに役立ち、分泌および膜結合ポリペプチド中において開裂され、分泌および膜結合ポリペプチドのN末端に存在し、多くの疎水性アミノ酸残基を含む、約15以上のアミノ酸を含有するペプチドを含む。例えば、シグナル配列は少なくとも約10~30個のアミノ酸残基、好ましくは約15~25個のアミノ酸残基、より好ましくは約18~20個のアミノ酸残基、さらにより好ましくは約19個のアミノ酸残基を含み、少なくとも約35~65%、好ましくは約38~50%、より好ましくは約40~45%の疎水性アミノ酸残基(例えば、バリン、ロイシン、イソロイシンまたはフェニルアラニン)を有する。別の実施態様では、天然ヒトPD-L2ポリペプチドのアミノ酸残基220~243および成熟ポリペプチドのアミノ酸残基201~243は、膜貫通ドメインを含む。本明細書における用語「膜貫通ドメイン」は、細胞質膜を貫通する長さ約15アミノ酸残基のアミノ酸配列を包む。より詳細には、膜貫通ドメインは少なくとも約20、25、30、35、40または45個のアミノ酸を含み、細胞質膜を貫通する。膜貫通ドメインは疎水性残基に富み、典型的には、 α -ヘリックス構造を有する。ある好ましい態様では、膜貫通ドメインの少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%またはそれ以上のアミノ酸が疎水性、例えば、ロイシン、イソロイシン、チロシンまたはトリプトファンである。膜貫通ドメインは、例えば、Zagotta, W. N.ら(1996) Annu. Rev. Neurosci. 19:235-263に記載されている。さらに別の実施態様では、天然のヒトPD-L2ポリペプチドのアミノ酸残基20~120および成熟ポリペプチドのアミノ酸残基1~101は、IgVドメインを含む。天然のヒトPD-L2ポリペプチドのアミノ酸残基1~101および成熟ポリペプチドのアミノ酸残基102~200は、IgCドメインを含む。本明細書で用いられる場合、IgVドメインおよびIgCドメインは、当該技術においてIgスーパーファミリーメンバードメインとして認識されている。これらのドメインは、Igフォールドと呼ばれる特徴的なフォールディングパターンを有する構造ユニットに対応する。Igフォールドは2つの β シートのサンドイッチから構成されており、各々は5~10個のアミノ酸の逆平行 β 鎖からなり、すべてではないが大部分のドメインにおいて2つの β シート間に保存されたジスルフィド結合がある。Ig、TCRおよびMHC分子のIgCドメインは同じタイプの配列パターンを共有し、Igスーパーファミリー中のC1セットと呼ばれている。他のIgCドメインは他のセットに属する。IgVドメインも配列パターンを共有しており、Vセットドメインと呼ばれている。IgVドメインは、Cドメインよりも長く、さらなる鎖対を有している。さらにまた別の実施態様では、未変性のヒトPD-L2ポリペプチドのアミノ酸残基1~219および成熟ポリペプチドのアミノ酸残基1~200は、細胞外ドメインを含む。本明細書で用いられる場合、用語「細胞外ドメイン」は、細胞表面から尾部として伸長しているN末端アミノ酸を示す。本発明の細胞外ドメインはIgVドメインおよびIgCドメインを含み、シグナルペプチドドメインを含んでいてもよい。さらに別の実施態様では、未変性のヒトPD-L2ポ

10

20

30

40

50

リペプチドのアミノ酸残基 244 ~ 273、ならびに成熟ポリペプチドのアミノ酸残基 225 ~ 273 は細胞質ドメインを含む。本明細書の用語「細胞質ドメイン」は、細胞の細胞質中に尾部として伸長している C 末端アミノ酸を示す。さらに、ヒト以外の生物の PD-L2 オルソログの核酸およびポリペプチド配列は既知であり、例えば、マウス PD-L2 (NM_021396.2 および NP_067371.1)、ラット PD-L2 (NM_001107582.2 および NP_001101052.2)、イヌ PD-L2 (XM_847012.2 および XP_852105.2)、ウシ PD-L2 (XM_586846.5 および XP_586846.3)、およびチンパンジー PD-L2 (XM_001140776.2 および XP_001140776.1) がある。

【0078】

本明細書の用語「PD-L2 活性」、「PD-L2 の生物学的活性」または「PD-L2 の機能的活性」は、PD-L2 応答性細胞または組織に対し、あるいは PD-L2 ポリペプチド結合パートナーに対し、PD-L2 タンパク質、ポリペプチドまたは核酸分子により発揮される活性であって、標準的方法によりインビボまたはインビトロにおいて決定される活性をいう。ある実施態様では、PD-L2 活性は、PD-L2 結合パートナーとの結合のような直接的活性である。本明細書の用語「標的分子」または「結合パートナー」は、本来的に PD-L2 ポリペプチドが結合または相互作用して PD-L2 により媒介される機能が発揮される分子である。ある例示的な態様ににおいて、PD-L2 標的分子は、受容体 RGMb である。あるいはまた、PD-L2 活性は、PD-L2 ポリペプチドとその本来の結合パートナー、例えば RGMb との相互作用により媒介される細胞シグナリング活性のような間接的活性である。PD-L2 の生物学的活性は本明細書に記載されている。例えば、本発明の PD-L2 ポリペプチドは 1 またはそれ以上の下記活性を有する：1) 受容体 RGMb、PD-1 または他の PD-L2 の本来の結合パートナーに結合し、および / またはその活性を調節する、2) 細胞内または細胞間シグナリングを調節する、3) 免疫細胞、例えば、T リンパ球の活性化を調節する、4) 生物、例えばマウスまたはヒト生物の免疫応答を調節する。

【0079】

用語「末梢血細胞サブタイプ」は、通常、限定されないが、好酸球、好中球、T 細胞、単球、NK 細胞、顆粒球、および B 細胞を含む末梢血に認められる細胞タイプを言うものとする。

【0080】

本明細書で用いられる場合、用語「再配列」は、本質的に完全な V_H および V_L ドメインをそれぞれコードするコンホメーションにおいて、V セグメントが D - J または J セグメントのすぐ近く配置されている、重鎖または軽鎖免疫グロブリン座の構成を意味する。再配列免疫グロブリン遺伝子座は、生殖細胞系列 DNA と比較することによって同定することができ；再配列座は、少なくとも 1 つの組み換え七量体 / 九量体相同性エレメントを持つことになる。

【0081】

本明細書で用いられる場合、用語「組み換え体宿主細胞」（もしくは単に「宿主細胞」）は、組み換え発現ベクターが導入された細胞を言うものとする。このような用語は特定の対象細胞のみならず、このような細胞の子孫もしくは潜在的子孫もいうことを理解すべきである。特定の修飾は突然変異または環境の影響のいずれによっても連続した世代を生じる可能性があり、実際には、このような子孫は親細胞と同一ではないが、それでもなお本明細書の「宿主細胞」の範囲内に含まれる。

【0082】

本明細書で用いられる場合、用語「組み換えヒト抗体」は、組み換え手法により調製され、発現され、作製され、または、単離された全てのヒト抗体を含み、例えば、(a) ヒト免疫グロブリン遺伝子に遺伝子導入または染色体導入した動物（例えば、マウス）から単離された抗体、またはそれにより調製されたハイブリドーマ（さらに以下に示す）、(b) その抗体を発現するように形質転換された宿主細胞、例えば、トランスフェクトーマから単離された抗体、(c) 組み換えられたヒト抗体の組合せライブラリーから単離され

10

20

30

40

50

た抗体、および (d) ヒト免疫グロブリン遺伝子導入動物から単離された抗体、または、他の DNA 配列に対するヒト免疫グロブリン遺伝子配列のスプライシングを含む任意の他の手段により調製され、発現され、作製され、または、単離された抗体を含む。そのような組み換え体ヒト抗体は、ヒト生殖細胞系列および / または非生殖細胞系列免疫グロブリン配列から派生する可変および定常領域を含む。しかしながら、いくつかの特定の実施態様では、そのような組み換え体ヒト抗体では、インビトロ突然変異誘発 (または、ヒト Ig 配列に遺伝子変異された動物を用いる場合は、インビボ体細胞性突然変異誘発) が起こり得る。こうして、組み換え抗体の V_H および V_L 領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖細胞系列 V_H および V_L 配列から派生し、それに関連しながら、インビボでヒト抗体生殖細胞系列レパートリー内に天然に存在しないかもしれない配列となる。

10

【0083】

用語「RGMb」は、反発性ガイダンス分子ファミリーのグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) - アンカーメンバーを意味する。Samadらは、JBC Papers 2005, Vol. 280, 14122-14129において、RGMbと、骨形態形成タンパク質 (BMP) の I 型および II 型受容体との間の相互作用を記載している。しかしながら、RGMbと PD-L2 の相互作用は以前には知られていなかった。代表的なヒト RGMb バイオマーカーの核酸およびアミノ酸配列 (例えば、配列番号 9 および 10) が当該技術分野において公知であり、アクセッション番号 NM_025239.3 および NP_079515.2 にて GenBank データベースに公開されており、入手することもできる。RGMb タンパク質は、共通の構造要素によって特徴づけられる。いくつかの実施態様では、RGMb タンパク質は、全て軸索誘導、神経突起伸長、および他のニューロン発育機能に影響を及ぼすことが知られているノッチ-3 (notch-3)、ホスファチジルイノシトール - 4 - リン酸 - 5 - キナーゼ、タイプ II β 、インスリン様成長因子結合タンパク質 - 2、トロネンボスポンジン、エフリンタイプ B 受容体 3 前駆体、およびスリット - 2 (Slit-2) と相同性を有する保存されたドメインを含む。RGMb の C 末端もまた、21 のアミノ酸細胞外 GPI 固着を指示する疎水性ドメインを含有する。さらにヒト以外の生物の RGMb オルソログの核酸およびポリペプチド配列が公知であり、それらには、例えば、マウス RGMb (NM_178615.3 および NP_848730.2)、チンパンジー RGMb (XM_517848.3 および XP_517848.2)、ウシ RGMb (XM_002689413.1 および XP_002689459.1)、ニワトリ RGMb (XM_42860.3 および XP_424860.3)、ならびにゼブラフィッシュ RGMb (NM_001001727.1 および NP_001001727.1) が含まれる。

20

30

【0084】

少なくとも 1 つのバイオマーカーの存在またはレベルを検出または判定するために用いられる用語「サンプル」は、典型的には、血漿、血清、唾液、尿、糞便 (例えば、排泄物)、涙、およびその他の体液 (例えば、「体液」の記載に上で説明したもの)、または組織サンプル (例えば、生検材料)、例えば、小腸、結腸、サンプル、もしくは外科的切除した組織が挙げられる。いくつかの特定の例においては、本発明の方法は、サンプル中の少なくとも 1 つのバイオマーカーの存在またはレベルを検出または判定する前に個体からサンプルを取得するステップをさらに含む。

【0085】

本明細書で用いられる場合、「特異的結合」とは、所定の抗原への抗体の結合を言う。典型的には、抗体は、約 10^{-7} M 未満、例えば、約 10^{-8} M、 10^{-9} M または 10^{-10} M 未満、または、例えば、分析物として、ヒト PD-L1 および / またはヒト PD-L2) を用い、リガンドとして抗体を用いた B I A C O R E (登録商標) アッセイ装置による表面プラズモン共鳴 (SPR) 技術によって判定された場合、さらに低い親和力 (K_D) で結合し、所定の抗原または非常に関連する抗原以外の非特異的抗原 (例えば、BSA、カゼイン) と結合する場合の親和性の少なくとも 1.1 倍、1.2 倍、1.3 倍、1.4 倍、1.5 倍、1.6 倍、1.7 倍、1.8 倍、1.9 倍、2.0 倍、2.5 倍、3.0 倍、3.5 倍、4.0 倍、4.5 倍、5.0 倍、6.0 倍、7.0 倍、8.0 倍、9.0 倍、または 10.0 倍大きい親和力で所定の抗原に結合する。「抗原を認識する抗体」や「抗原に特異的な抗体」なるフレーズは、本明細書においては、用語「抗原に特異

40

50

的に結合する抗体」と互換的に用いられる。

【0086】

本明細書で用いられる場合、用語「被検体」は、状態、特に、下記に述べるようなPD-L1および/またはPD-L2によって媒介される状態に罹りやすく、診断または予後診断を必要とするあらゆる生物またはヒトを含む。用語「非ヒト動物」は、すべての脊椎動物、例えば、哺乳動物および非哺乳動物、例えば、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ニワトリ、両生類、爬虫類等を含む。被検体または非ヒト動物は、望ましい臨床結果を含め、1以上の有益または望ましい結果が得られる場合は治療される。この発明の目的にとって有益または望ましい臨床結果としては、限定されないが、該疾患から生じる1以上の症状の減少、疾患を患う患者の生活の質(QOL)の向上、該疾患の治療に必要とされる他の医薬の用量の減少、疾患の進行を遅らせること、および/または個体の延命が含まれる。

10

【0087】

Vセグメントとの関連で本明細書において用いられる場合、用語「未再編成」または「生殖細胞系列構成」とは、Vセグメントを、組み換えによりDまたはJセグメントにすぐ近接させた構成を言うものとする。

【0088】

本明細書で用いられる場合、用語「ベクター」とは、連結された先の別の核酸を輸送できる核酸分子を言うものと意図されている。ベクターの一種が、付加的なDNAセグメントを連結できる環状の二本鎖DNAループを意味する「プラスミド」である。ベクターのもう一つの種類はウイルスベクターであり、この場合、付加的なDNAセグメントは、ウイルスゲノム内に連結させることができる。いくつかのベクターは導入された先の宿主細胞内で自律的複製が可能である(例えば細菌由来の複製開始点を有する細菌ベクターや、エピソード哺乳動物ベクターなど)。他のベクター(例えば、非エピソード哺乳動物ベクターなど)は、宿主細胞に導入されるとすぐに、宿主細胞のゲノムに組み込まれるため、宿主ゲノムと一緒に複製される。さらに、いくつかのベクターは、作動的に連結された先の遺伝子の発現を命令することができる。このようなベクターをここでは「組み換え発現ベクター」(または単に「発現ベクター」と呼ぶ。一般的に、組み換えDNA技術で実用性のある発現ベクターは、しばしばプラスミドの形である。本明細書では、プラスミドが最も普通に用いられている形のベクターであるため、「プラスミド」および「ベクター」を交換可能に用いている場合がある。しかしながら、本発明には、例えばウイルスベクター(例えば複製欠陥レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス)など、同等の機能を果たす他の形のこのような発現ベクターも包含されることが、意図されている。

20

30

【0089】

上記に鑑み、本発明の融合タンパク質またはポリペプチドをコードするDNAまたはRNAのヌクレオチド配列(またはその一部)を使用し、DNAまたはRNAをアミノ酸配列に翻訳するための遺伝子コードを用いて、融合タンパク質またはポリペプチドのアミノ酸配列を導くことができる。同様に、融合タンパク質またはポリペプチドのアミノ酸配列として、対応する融合タンパク質またはポリペプチドをコードすることができるヌクレオチド配列を、遺伝子コードから導き出すことができる(その重複性ゆえ、所与のアミノ酸配列に対して多数の核酸配列が作製されるであろう)。したがって、ここに記載および/または開示した、融合タンパク質またはポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、ヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列の記載および/または開示も含むものと考えるべきである。同様に、ここに記載および/または開示した融合タンパク質またはポリペプチドのアミノ酸配列は、該アミノ酸配列をコードする考えられるすべてのヌクレオチド配列の記載および/または開示を含むものと考えるべきである。

40

【0090】

最後に、本発明に有用な核酸およびポリペプチド分子のための核酸およびアミノ酸配列情報も当該技術分野において公知であり、国立生物工学情報センター(National Center

50

for Biotechnology Information (N C B I) などから公開されているデータベースから容易に入手することができる。例えば、公に入手可能な配列から導き出す核酸およびアミノ酸配列の例を以下の表 1 に記す。表 1 はまた、新たに記載する抗体可変領域および本明細書に言及したものと関連する C D R 配列も提示している。

【 0 0 9 1 】

【表 1】

【表1】

配列番号1 ヒトPD-1 cDNA配列

cactctggtg	gggctgctcc	aggc	atg	cag	atc	cca	cag	gcg	ccc	tgg	cca	51					
			Met	Gln	Ile	Pro	Gln	Ala	Pro	Trp	Pro						
			1				5										
gtc	gtc	tgg	gcg	gtg	cta	caa	ctg	ggc	tgg	cgg	cca	gga	tgg	ttc	tta	99	
Val	Val	Trp	Ala	Val	Leu	Gln	Leu	Gly	Trp	Arg	Pro	Gly	Trp	Phe	Leu		10
10					15				20					25			
gac	tcc	cca	gac	agg	ccc	tgg	aac	ccc	ccc	acc	ttc	tcc	cca	gcc	ctg	147	
Asp	Ser	Pro	Asp	Arg	Pro	Trp	Asn	Pro	Pro	Thr	Phe	Ser	Pro	Ala	Leu		
				30					35					40			
ctc	gtg	gtg	acc	gaa	ggg	gac	aac	gcc	acc	ttc	acc	tgc	agc	ttc	tcc	195	
Leu	Val	Val	Thr	Glu	Gly	Asp	Asn	Ala	Thr	Phe	Thr	Cys	Ser	Phe	Ser		
			45				50						55				
aac	aca	tcg	gag	agc	ttc	gtg	cta	aac	tgg	tac	cgc	atg	agc	ccc	agc	243	
Asn	Thr	Ser	Glu	Ser	Phe	Val	Leu	Asn	Trp	Tyr	Arg	Met	Ser	Pro	Ser		
		60					65					70					
aac	cag	acg	gac	aag	ctg	gcc	gcc	ttc	ccc	gag	gac	cgc	agc	cag	ccc	291	
Asn	Gln	Thr	Asp	Lys	Leu	Ala	Ala	Phe	Pro	Glu	Asp	Arg	Ser	Gln	Pro		20
	75					80					85						
ggc	cag	gac	tgc	cgc	ttc	cgt	gtc	aca	caa	ctg	ccc	aac	ggg	cgt	gac	339	
Gly	Gln	Asp	Cys	Arg	Phe	Arg	Val	Thr	Gln	Leu	Pro	Asn	Gly	Arg	Asp		
90					95					100				105			
ttc	cac	atg	agc	gtg	gtc	agg	gcc	cgg	cgc	aat	gac	agc	ggc	acc	tac	387	
Phe	His	Met	Ser	Val	Val	Arg	Ala	Arg	Arg	Asn	Asp	Ser	Gly	Thr	Tyr		
				110					115					120			
ctc	tgt	ggg	gcc	atc	tcc	ctg	gcc	ccc	aag	gcg	cag	atc	aaa	gag	agc	435	
Leu	Cys	Gly	Ala	Ile	Ser	Leu	Ala	Pro	Lys	Ala	Gln	Ile	Lys	Glu	Ser		
			125					130					135				
ctg	cgg	gca	gag	ctc	agg	gtg	aca	gag	aga	agg	gca	gaa	gtg	ccc	aca	483	
Leu	Arg	Ala	Glu	Leu	Arg	Val	Thr	Glu	Arg	Arg	Ala	Glu	Val	Pro	Thr		30
		140					145					150					
gcc	cac	ccc	agc	ccc	tca	ccc	agg	tca	gcc	ggc	cag	ttc	caa	acc	ctg	531	
Ala	His	Pro	Ser	Pro	Ser	Pro	Arg	Ser	Ala	Gly	Gln	Phe	Gln	Thr	Leu		
	155					160					165						
gtg	gtt	ggt	gtc	gtg	ggc	ggc	ctg	ctg	ggc	agc	ctg	gtg	ctg	cta	gtc	579	
Val	Val	Gly	Val	Val	Gly	Gly	Leu	Leu	Gly	Ser	Leu	Val	Leu	Leu	Val		
170					175					180				185			
tgg	gtc	ctg	gcc	gtc	atc	tgc	tcc	cgg	gcc	gca	cga	ggg	aca	ata	gga	627	
Trp	Val	Leu	Ala	Val	Ile	Cys	Ser	Arg	Ala	Ala	Arg	Gly	Thr	Ile	Gly		
				190					195					200			
gcc	agg	cgc	acc	ggc	cag	ccc	ctg	aag	gag	gac	ccc	tca	gcc	gtg	cct	675	
Ala	Arg	Arg	Thr	Gly	Gln	Pro	Leu	Lys	Glu	Asp	Pro	Ser	Ala	Val	Pro		40
			205					210					215				
gtg	ttc	tct	gtg	gac	tat	ggg	gag	ctg	gat	ttc	cag	tgg	cga	gag	aag	723	
Val	Phe	Ser	Val	Asp	Tyr	Gly	Glu	Leu	Asp	Phe	Gln	Trp	Arg	Glu	Lys		
		220				225						230					
acc	cgg	gag	ccc	ccc	gtg	ccc	tgt	gtc	cct	gag	cag	acg	gag	tat	gcc	771	
Thr	Pro	Glu	Pro	Pro	Val	Pro	Cys	Val	Pro	Glu	Gln	Thr	Glu	Tyr	Ala		
	235					240					245						
acc	att	gtc	ttt	cct	agc	gga	atg	ggc	acc	tca	tcc	ccc	gcc	cgc	agg	819	

```

Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg
250          255          260          265
ggc tca gct gac ggc cct cgg agt gcc cag cca ctg agg cct gag gat 867
Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp
          270          275          280
gga cac tgc tct tgg ccc ctc tgaccggcctt ccttgggccac cagtgttctg cag 921
Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
          285

```

配列番号2 ヒトPD-1アミノ酸配列

```

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
 1          5          10          15
Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp
          20          25          30
Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp
          35          40          45
Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val
          50          55          60
Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala
          65          70          75          80
Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg
          85          90          95
Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg
          100          105          110
Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
          115          120          125
Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val
          130          135          140
Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro
          145          150          155          160
Arg Ser Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly
          165          170          175
Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys
          180          185          190
Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro
          195          200          205
Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly
          210          215          220
Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro
          225          230          235          240
Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly
          245          250          255
Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg
          260          265          270
Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
          275          280          285

```

配列番号3 ヒトPD-L1S cDNA酸(cDNA Acid)配列

```

gcttcccgag gctccgcacc agccgcgctt ctgtccgcct gcagggcatt ccagaaag 58
atg agg ata ttt gct gtc ttt ata ttc atg acc tac tgg cat ttg ctg 106
Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
 1          5          10          15
aac gca ttt act gtc acg gtt ccc aag gac cta tat gtg gta gag tat 154
Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
          20          25          30
ggc agc aat atg aca att gaa tgc aaa ttc cca gta gaa aaa caa tta 202
Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu
          35          40          45
gac ctg gct gca cta att gtc tat tgg gaa atg gag gat aag aac att 250
Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile

```

```

      50              55              60
att  caa  ttt  gtg  cat  gga  gag  gaa  gac  ctg  aag  gtt  cag  cat  agt  agc  298
Ile  Gln  Phe  Val  His  Gly  Glu  Glu  Asp  Leu  Lys  Val  Gln  His  Ser  Ser
      65              70              75              80
tac  aga  cag  agg  gcc  cgg  ctg  ttg  aag  gac  cag  ctc  tcc  ctg  gga  aat  346
Tyr  Arg  Gln  Arg  Ala  Arg  Leu  Leu  Lys  Asp  Gln  Leu  Ser  Leu  Gly  Asn
      85              90              95
gct  gca  ctt  cag  atc  aca  gat  gtg  aaa  ttg  cag  gat  gca  ggg  gtg  tac  394
Ala  Ala  Leu  Gln  Ile  Thr  Asp  Val  Lys  Leu  Gln  Asp  Ala  Gly  Val  Tyr
      100             105             110
cgc  tgc  atg  atc  agc  tat  ggt  ggt  gcc  gac  tac  aag  cga  att  act  gtg  442
Arg  Cys  Met  Ile  Ser  Tyr  Gly  Gly  Ala  Asp  Tyr  Lys  Arg  Ile  Thr  Val
      115             120             125
aaa  gtc  aat  gcc  cca  tac  aac  aaa  atc  aac  caa  aga  att  ttg  gtt  gtg  490
Lys  Val  Asn  Ala  Pro  Tyr  Asn  Lys  Ile  Asn  Gln  Arg  Ile  Leu  Val  Val
      130             135             140
gat  cca  gtc  acc  tct  gaa  cat  gaa  ctg  aca  tgt  cag  gct  gag  ggc  tac  538
Asp  Pro  Val  Thr  Ser  Glu  His  Glu  Leu  Thr  Cys  Gln  Ala  Glu  Gly  Tyr
      145             150             155             160
ccc  aag  gcc  gaa  gtc  atc  tgg  aca  agc  agt  gac  cat  caa  gtc  ctg  agt  586
Pro  Lys  Ala  Glu  Val  Ile  Trp  Thr  Ser  Ser  Asp  His  Gln  Val  Leu  Ser
      165             170             175
ggt  aag  acc  acc  acc  acc  aat  tcc  aag  aga  gag  gag  aag  ctt  ttc  aat  634
Gly  Lys  Thr  Thr  Thr  Thr  Asn  Ser  Lys  Arg  Glu  Glu  Lys  Leu  Phe  Asn
      180             185             190
gtg  acc  agc  aca  ctg  aga  atc  aac  aca  aca  act  aat  gag  att  ttc  tac  682
Val  Thr  Ser  Thr  Leu  Arg  Ile  Asn  Thr  Thr  Thr  Asn  Glu  Ile  Phe  Tyr
      195             200             205
tgc  act  ttt  agg  aga  tta  gat  cct  gag  gaa  aac  cat  aca  gct  gaa  ttg  730
Cys  Thr  Phe  Arg  Arg  Leu  Asp  Pro  Glu  Glu  Asn  His  Thr  Ala  Glu  Leu
      210             215             220
gtc  atc  cca  ggt  aat  att  ctg  aat  gtg  tcc  att  aaa  ata  tgt  cta  aca  778
Val  Ile  Pro  Gly  Asn  Ile  Leu  Asn  Val  Ser  Ile  Lys  Ile  Cys  Leu  Thr
      225             230             235             240
ctg  tcc  cct  agc  acc  tagcatgatg  tctgcctatc  atagtcattc  agtgattgtt  833
Leu  Ser  Pro  Ser  Thr
      245
gaataaatga  atgaatgaat  aacactatgt  ttacaaaata  tatcctaatt  cctcacctcc  893
attcatccaa  accatattgt  tacttaataa  acattcagca  gatatttatg  gaataaaaaa  953
aaaaaaaaaa  aaaaaa  968

```

10

20

30

配列番号4 ヒトPD-L1Sアミノ酸配列

```

Met  Arg  Ile  Phe  Ala  Val  Phe  Ile  Phe  Met  Thr  Tyr  Trp  His  Leu  Leu
 1              5              10              15
Asn  Ala  Phe  Thr  Val  Thr  Val  Pro  Lys  Asp  Leu  Tyr  Val  Val  Glu  Tyr
      20              25              30
Gly  Ser  Asn  Met  Thr  Ile  Glu  Cys  Lys  Phe  Pro  Val  Glu  Lys  Gln  Leu
      35              40              45
Asp  Leu  Ala  Ala  Leu  Ile  Val  Tyr  Trp  Glu  Met  Glu  Asp  Lys  Asn  Ile
      50              55              60
Ile  Gln  Phe  Val  His  Gly  Glu  Glu  Asp  Leu  Lys  Val  Gln  His  Ser  Ser
      65              70              75              80
Tyr  Arg  Gln  Arg  Ala  Arg  Leu  Leu  Lys  Asp  Gln  Leu  Ser  Leu  Gly  Asn
      85              90              95
Ala  Ala  Leu  Gln  Ile  Thr  Asp  Val  Lys  Leu  Gln  Asp  Ala  Gly  Val  Tyr
      100             105             110
Arg  Cys  Met  Ile  Ser  Tyr  Gly  Gly  Ala  Asp  Tyr  Lys  Arg  Ile  Thr  Val
      115             120             125
Lys  Val  Asn  Ala  Pro  Tyr  Asn  Lys  Ile  Asn  Gln  Arg  Ile  Leu  Val  Val
      130             135             140

```

40

Asp	Pro	Val	Thr	Ser	Glu	His	Glu	Leu	Thr	Cys	Gln	Ala	Glu	Gly	Tyr
145					150					155					160
Pro	Lys	Ala	Glu	Val	Ile	Trp	Thr	Ser	Ser	Asp	His	Gln	Val	Leu	Ser
				165					170						175
Gly	Lys	Thr	Thr	Thr	Thr	Asn	Ser	Lys	Arg	Glu	Glu	Lys	Leu	Phe	Asn
			180					185					190		
Val	Thr	Ser	Thr	Leu	Arg	Ile	Asn	Thr	Thr	Thr	Asn	Glu	Ile	Phe	Tyr
		195					200					205			
Cys	Thr	Phe	Arg	Arg	Leu	Asp	Pro	Glu	Glu	Asn	His	Thr	Ala	Glu	Leu
	210					215					220				
Val	Ile	Pro	Gly	Asn	Ile	Leu	Asn	Val	Ser	Ile	Lys	Ile	Cys	Leu	Thr
225					230					235					240
Leu	Ser	Pro	Ser	Thr											
				245											

10

配列番号5 ヒトPD-L1M cDNA酸(cDNA Acid)配列

cgaggctccg	caccagccgc	gcttctgtcc	gcctgcaggg	cattccagaa	agatgagg	58
					Met Arg	
					1	
ata ttt gct gtc ttt ata ttc atg acc tac tgg cat ttg ctg aac gca	106					
Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu Asn Ala						
5 10 15						
ttt act gtc acg gtt ccc aag gac cta tat gtg gta gag tat ggt agc	154					
Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser						
20 25 30						
aat atg aca att gaa tgc aaa ttc cca gta gaa aaa caa tta gac ctg	202					
Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu Asp Leu						
35 40 45 50						
gct gca cta att gtc tat tgg gaa atg gag gat aag aac att att caa	250					
Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile Ile Gln						
55 60 65						
ttt gtg cat gga gag gaa gac ctg aag gtt cag cat agt agc tac aga	298					
Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser Tyr Arg						
70 75 80						
cag agg gcc cgg ctg ttg aag gac cag ctc tcc ctg gga aat gct gca	346					
Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn Ala Ala						
85 90 95						
ctt cag atc aca gat gtg aaa ttg cag gat gca ggg gtg tac cgc tgc	394					
Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr Arg Cys						
100 105 110						
atg atc agc tat ggt ggt gcc gac tac aag cga att act gtg aaa gtc	442					
Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val Lys Val						
115 120 125 130						
aat gcc cca tac aac aaa atc aac caa aga att ttg gtt gtg gat cca	490					
Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp Pro						
135 140 145						
gtc acc tct gaa cat gaa ctg aca tgt cag gct gag ggc tac ccc aag	538					
Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys						
150 155 160						
gcc gaa gtc atc tgg aca agc agt gac cat caa gtc ctg agt ggt aag	586					
Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys						
165 170 175						
acc acc acc acc aat tcc aag aga gag gag aag ctt ttc aat gtg acc	634					
Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn Val Thr						
180 185 190						
agc aca ctg aga atc aac aca act aat gag att ttc tac tgc act	682					
Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Thr						
195 200 205 210						
ttt agg aga tta gat cct gag gaa aac cat aca gct gaa ttg gtc atc	730					
Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val Ile						

20

30

40

```

                215                220                225
cca gaa cta cct ctg gca cat cct cca aat gaa agg act cac ttg gta 778
Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His Leu Val
                230                235                240
att ctg gga gcc atc tta tta tgc ctt ggt gta gca ctg aca ttc atc 826
Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr Phe Ile
                245                250                255
ttc cgt tta aga aaa ggg aga atg atg gat gtg aaa aaa tgt ggc atc 874
Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys Gly Ile
                260                265                270
caa gat aca aac tca aag aag caa agt gat aca cat ttg gag gag acg 922
Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu Glu Thr
                275                280                285                290
taatccagca ttggaacttc tgatcttcaa gcagggattc tcaacctgtg gtttaggggt 982
tcacgggggc tgagcgtgac aagaggaagg aatgggcccg tgggatgcag gcaatgtggg 1042
acttaaaagg cccaagcact gaaaatggaa cctggcgaaa gcagaggagg agaatgaaga 1102
aagatggagt caaacaggga gcctggaggg agaccttgat actttcaaat gcctgagggg 1162
ctcatcgacg cctgtgacag ggagaaaagga tacttctgaa caaggagcct ccaagcaaat 1222
catccattgc tcatcctagg aagacgggtt gagaatccct aatttgaggg tcagttcctg 1282
cagaagtgcc ctttgccctcc actcaatgcc tcaatttggt ttctgcatga ctgagagtct 1342
cagtgttgga acgggacagt atttatgtat gagtttttcc tatttatattt gagtctgtga 1402
ggtcttcttg tcatgtgagt gtggttggtga atgatttctt ttgaagatat attgtagtag 1462
atgttacaat tttgtcgcca aactaaactt gctgcttaat gatttgctca catctagtaa 1522
aacatggagt atttgtaaaaa aaaaaaaaaa a 1553

```

10

20

配列番号6 ヒトPD-L1Mアミノ酸配列

```

Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
 1          5          10          15
Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
          20          25          30
Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu
          35          40          45
Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile
          50          55          60
Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser
          65          70          75          80
Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn
          85          90          95
Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
          100          105          110
Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val
          115          120          125
Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val
          130          135          140
Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr
          145          150          155          160
Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser
          165          170          175
Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn
          180          185          190
Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr
          195          200          205
Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu
          210          215          220
Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His
          225          230          235          240
Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr
          245          250          255
Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys
          260          265          270

```

30

40

Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu
 275 280 285
 Glu Thr
 290

配列番号7 ヒトPD-L2cDNA酸(cDNA Acid)配列

atg atc ttc ctc ctg cta atg ttg agc ctg gaa ttg cag ctt cac cag	48	
Met Ile Phe Leu Leu Leu Met Leu Ser Leu Glu Leu Gln Leu His Gln		
1 5 10 15		
ata gca gct tta ttc aca gtg aca gtc cct aag gaa ctg tac ata ata	96	10
Ile Ala Ala Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile		
20 25 30		
gag cat ggc agc aat gtg acc ctg gaa tgc aac ttt gac act gga agt	144	
Glu His Gly Ser Asn Val Thr Leu Glu Cys Asn Phe Asp Thr Gly Ser		
35 40 45		
cat gtg aac ctt gga gca ata aca gcc agt ttg caa aag gtg gaa aat	192	
His Val Asn Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn		
50 55 60		
gat aca tcc cca cac cgt gaa aga gcc act ttg ctg gag gag cag ctg	240	
Asp Thr Ser Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu		
65 70 75 80		
ccc cta ggg aag gcc tcg ttc cac ata cct caa gtc caa gtg agg gac	288	20
Pro Leu Gly Lys Ala Ser Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp		
85 90 95		
gaa gga cag tac caa tgc ata atc atc tat ggg gtc gcc tgg gac tac	336	
Glu Gly Gln Tyr Gln Cys Ile Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr		
100 105 110		
aag tac ctg act ctg aaa gtc aaa gct tcc tac agg aaa ata aac act	384	
Lys Tyr Leu Thr Leu Lys Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr		
115 120 125		
cac atc cta aag gtt cca gaa aca gat gag gta gag ctc acc tgc cag	432	
His Ile Leu Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln		
130 135 140		
gct aca ggt tat cct ctg gca gaa gta tcc tgg cca aac gtc agc gtt	480	30
Ala Thr Gly Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Val		
145 150 155 160		
cct gcc aac acc agc cac tcc agg acc cct gaa ggc ctc tac cag gtc	528	
Pro Ala Asn Thr Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val		
165 170 175		
acc agt gtt ctg cgc cta aag cca ccc cct ggc aga aac ttc agc tgt	576	
Thr Ser Val Leu Arg Leu Lys Pro Pro Gly Arg Asn Phe Ser Cys		
180 185 190		
gtg ttc tgg aat act cac gtg agg gaa ctt act ttg gcc agc att gac	624	
Val Phe Trp Asn Thr His Val Arg Glu Leu Thr Leu Ala Ser Ile Asp		
195 200 205		
ctt caa agt cag atg gaa ccc agg acc cat cca act tgg ctg ctt cac	672	40
Leu Gln Ser Gln Met Glu Pro Arg Thr His Pro Thr Trp Leu Leu His		
210 215 220		
att ttc atc ccc tcc tgc atc att gct ttc att ttc ata gcc aca gtg	720	
Ile Phe Ile Pro Ser Cys Ile Ile Ala Phe Ile Phe Ile Ala Thr Val		
225 230 235 240		
ata gcc cta aga aaa caa ctc tgt caa aag ctg tat tct tca aaa gac	768	
Ile Ala Leu Arg Lys Gln Leu Cys Gln Lys Leu Tyr Ser Ser Lys Asp		
245 250 255		
aca aca aaa aga cct gtc acc aca aca aag agg gaa gtg aac agt gct	816	
Thr Thr Lys Arg Pro Val Thr Thr Thr Lys Arg Glu Val Asn Ser Ala		

atc
Ile

260 265 270 819

配列番号8 ヒトPD-L2アミノ酸配列

Met	Ile	Phe	Leu	Leu	Leu	Met	Leu	Ser	Leu	Glu	Leu	Gln	Leu	His	Gln
1				5					10					15	
Ile	Ala	Ala	Leu	Phe	Thr	Val	Thr	Val	Pro	Lys	Glu	Leu	Tyr	Ile	Ile
			20					25					30		
Glu	His	Gly	Ser	Asn	Val	Thr	Leu	Glu	Cys	Asn	Phe	Asp	Thr	Gly	Ser
		35					40					45			
His	Val	Asn	Leu	Gly	Ala	Ile	Thr	Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Val	Glu	Asn
	50					55				60					
Asp	Thr	Ser	Pro	His	Arg	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Leu	Glu	Glu	Gln	Leu
65					70					75					80
Pro	Leu	Gly	Lys	Ala	Ser	Phe	His	Ile	Pro	Gln	Val	Gln	Val	Arg	Asp
			85						90					95	
Glu	Gly	Gln	Tyr	Gln	Cys	Ile	Ile	Ile	Tyr	Gly	Val	Ala	Trp	Asp	Tyr
		100						105					110		
Lys	Tyr	Leu	Thr	Leu	Lys	Val	Lys	Ala	Ser	Tyr	Arg	Lys	Ile	Asn	Thr
	115						120					125			
His	Ile	Leu	Lys	Val	Pro	Glu	Thr	Asp	Glu	Val	Glu	Leu	Thr	Cys	Gln
	130					135				140					
Ala	Thr	Gly	Tyr	Pro	Leu	Ala	Glu	Val	Ser	Trp	Pro	Asn	Val	Ser	Val
145					150					155					160
Pro	Ala	Asn	Thr	Ser	His	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Gly	Leu	Tyr	Gln	Val
			165						170					175	
Thr	Ser	Val	Leu	Arg	Leu	Lys	Pro	Pro	Pro	Gly	Arg	Asn	Phe	Ser	Cys
		180					185						190		
Val	Phe	Trp	Asn	Thr	His	Val	Arg	Glu	Leu	Thr	Leu	Ala	Ser	Ile	Asp
	195					200						205			
Leu	Gln	Ser	Gln	Met	Glu	Pro	Arg	Thr	His	Pro	Thr	Trp	Leu	Leu	His
	210				215					220					
Ile	Phe	Ile	Pro	Ser	Cys	Ile	Ile	Ala	Phe	Ile	Phe	Ile	Ala	Thr	Val
225					230					235					240
Ile	Ala	Leu	Arg	Lys	Gln	Leu	Cys	Gln	Lys	Leu	Tyr	Ser	Ser	Lys	Asp
			245						250					255	
Thr	Thr	Lys	Arg	Pro	Val	Thr	Thr	Thr	Lys	Arg	Glu	Val	Asn	Ser	Ala
		260					265					270			

Ile

配列番号9 ヒトRGMB cDNA配列

1	atgataagga	agaagaggaa	gcgaagcgcg	ccccccggcc	catgccgcag	ccacggggccc
61	agaccgcgca	cggcgcccgc	gccgcgcgcc	tcgccggagc	ccacgagacc	tgcattggacg
121	ggcatgggct	tgagagcagc	accttcagc	gccgcgcgtg	ccgcgcgcga	ggttgagcag
181	cgccgcagcc	cggggtctctg	ccccccgcgc	ctggagctgc	tgtctgtctg	gctgttcagc
241	ctcgggctgc	tccacgcagg	tgactgcaa	cagccagccc	aatgtcgaat	ccagaaatgc
301	accacggact	tctgtgccct	gacttctcac	ctgaactctg	ccgttgacgg	ctttgactct
361	gagttttgca	aggccttgcg	tgccatgct	ggctgcaccc	agcgaacttc	aaaagcctgc
421	cgtggcaacc	tggtatacca	ttctgcgctg	ttgggtatca	gtgacctcat	gagccagagg
481	aattgttcca	aggatggacc	cacatcctct	accaaccccg	aagtgaacca	tgatccttgc
541	aactatcaca	gccacgctgg	agccagggaa	cacaggagag	gggaccagaa	ccctcccagt
601	tacctttttt	gtggcttgtt	tggagatcct	cacctcagaa	ctttcaagga	taacttccaa
661	acatgcaaag	tagaaggggc	ctggccactc	atagataata	attatctttc	agttcaagtg
721	acaaacgtac	ctgtgggtccc	tggatccagt	gctactgcta	caaataagat	cactattatc
781	ttcaaagccc	accatgagtg	tacagatcag	aaagtctacc	aagctgtgac	agatgacctg
841	cgggcgcgct	ttgtggatgg	caccaccagt	ggtggggaca	gcgatgcaa	gagcctgcgt
901	atcgtgga	gggagagtgg	ccactatgtg	gagatgcacg	cccgtatat	agggaccaca

```

961 gtgtttgtgc ggcaggtggg tcgctacctg acccttgcca tccgtatgcc tgaagacctg
1021 gccatgtcct acgaggagag ccaggacctg cagctgtgcg tgaacggctg cccctgagtg
1081 gaacgcatcg atgacgggca gggccaggtg tctgccatcc tgggacacag cctgcctcgc
1141 acctccttgg tgcaggcctg gcctggctac acactggaga ctgccaacac tcaatgccat
1201 gagaagatgc cagtgaagga catctatttc cagtcctgtg tottcgacct gctcaccact
1261 ggtgatgcca actttactgc cgcagccccc agtgcccttg aggatgtgga ggccctgcac
1321 ccaaggaagg aacgctggca cattttcccc agcagtgcca atgggaactcc ccgtggaggc
1381 agtgatttgt ctgtcagttc aggaactcacc tgcttgatcc ttatcgtgtt tttgttag

```

配列番号10 ヒトRGMbアミノ酸配列

```

1 mirkkrkrsa ppgpcrshgp rpatapappp speptrpawt gmglraapss aaaaaaeveg
61 rrspglcpvp lellllllfs lgllhagdcq qpaqcriqkc ttdfvsltsh lnsavdgfdd
121 efckalraya gctqrtskac rgnlvysav lgisdmsqr ncskdqptss tnpevthdpc
181 nyhshagare hrrgdqnpss ylfcgflgdp hlrtfkdnfq tckvegawpl idnnylsvqv
241 tnvpvpgss atatnkitii fkahhctdq kvvqavtddl paafvdgtts ggdsdaksrl
301 iveresghyv emharyigt vfvrvqgryl tlaairmpedl amsyeesqdl qlcvngcpls
361 eriddgggqv sailghslpr tslvqawpgy tletantqch ekmpvkdiyf qscvfdlltt
421 gdanftaaah saledvealh prkerwhifp ssgngtprgg sdlsvslglt clilivfl

```

10

配列番号11 ヒトB7-1 cDNA配列

```

1 atggggcaca cacggaggca gggaacatca ccatccaagt gtccatacct caattttcttt
61 cagctccttg tgctggctgg tctttctcac ttctgttcag gtgttatcca cgtgaccaag
121 gaagtgaagg aagtggcaac gctgtcctgt ggccacaatg tttctgttga agagctggca
181 caaactcgca tctactggca aaaggagaag aaaatgggtg tgactatgat gtctggggac
241 atgaatatat ggcccagagta caagaaccgg accatctttg atatcactaa taacctctcc
301 attgtgatcc tggtctctgc cccatctgac gagggcacat acgagtgtgt tgttctgaag
361 tatgaaaaag acgctttcaa gcgggaacac ctggctgaag tgacgttatc agtcaaagct
421 gacttcccta cacctagtat atctgacttt gaaattccaa cttctaatat tagaaggata
481 atttgctcaa cctctggagg ttttccagag cctcacctct cctgggttga aaatggagaa
541 gaattaaatg ccatcaaac aacagtttcc caagatcctg aaactgagct ctatgctgtt
601 agcagcaaac tggatttcaa tatgacaacc aaccacagct tcatgtgtct catcaagtat
661 ggacatttaa gactgaatca gaccttcaac tggaatacaa ccaagcaaga gcattttcct
721 gataacctgc tccatcctg ggccattacc ttaattctcag taaatggaat ttttgtgata
781 tgctgcctga cctactgctt tgccccaaga tgcagagaga gaaggaggaa tgagagattg
841 agaagggaaa gtgtacgcc tgtataa

```

20

配列番号12 ヒトB7-1アミノ酸配列

```

1 mghtrrqgts pskcpylnff qllvlaglsh fcsgvihvth evkevatlsc ghnvsveela
61 qtriywqkek kmvltmmsgd mniwpeyknr tifditnnls ivilalrpsd egtyecvvlk
121 yekdafkreh laevtlsvka dfptpsisdf eiptsnirri icstsggfpe phlswleng
181 elnainttvs qdpetelyav sskldfnmtt nhsfmcliky ghrlvnqtfh wnttkqehfp
241 dnllpswait lisvngifvi ccltycfapr crerrrnerl rresvrpv

```

30

1B9軽鎖可変領域(vK)DNAおよびアミノ酸配列

```

LOCUS      1B9_VK      321 bp      DNA      linear
DEFINITION 1B9, DNA 321 bases.
FEATURES             Location/Qualifiers
     J_segment       292..321
                     /label=JK
     V_segment       265..291
                     /label=CDR3
     V_region        169..264
                     /label=FWR3
     V_segment       148..168
                     /label=CDR2
     V_region        103..147
                     /label=FWR2
     V_segment       70..102
                     /label=CDR1

```

40

V_region 1..69
/label=FWR1
CDS 1..321
/label=1B9\VK

/translation="DIVMTQSHKFMSTSLGDRVITITCKASQDVGISVVWYQQKPG
QSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTINNVSQSEDLADYFCQQYSSYPL
TVGAGTKLELK"

BASE COUNT 85 a 81 c 77 g 78 t
ORIGIN

1 gacattgtga tgaccagtc tcacaaattc atgtccacat cactaggaga cagggtcacc
61 atcacctgca aggccagtc ggatgtgggt atttctgtag tttggtatca acagaaacca
121 gggcaatctc ctaaaactact gatttactgg gcatccaccc ggcacactgg agtccctgat
181 cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctga ccattaacaa tgtgcagtct
241 gaagacttgg cagattattt ctgtcagcaa tatagcagct atccgctcac ggtcgggtgct
301 gggaccaagc tggagctgaa a

10

1B9重鎖可変DNAおよびアミノ酸配列

LOCUS 1B9_VH 363 bp DNA linear
DEFINITION 1B9, DNA 363 bases.
FEATURES Location/Qualifiers
J_segment 331..363
/label=JH
V_segment 295..330
/label=CDR3
V_region 199..294
/label=FWR3
V_segment 151..198
/label=CDR2
V_region 109..150
/label=FWR2
V_segment 91..108
/label=CDR1
V_region 1..90
/label=FWR1
CDS 1..363
/label=1B9\VK

20

30

/translation="DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDHAWNWIRQ
VPGNKLEWMGYITYRGSTTYSPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATY
YCARSMITTGYYVMDYWGQTSVTVSS"

BASE COUNT 92 a 99 c 82 g 90 t
ORIGIN

1 gatgtgcagc ttcaggagtc gggacctggc ctggtgaaac cttctcagtc tctgtccctc
61 acctgcaactg tcaactggcta ctcaatcacc agtgatcatg cctggaactg gatccggcag
121 gttccaggaa acaaaactgga gtggatgggc tacataacct accgtggtag cactacctat
181 agcccatctc tcaaaagtcg aatttctatc actcgagaca catccaagaa ccagttcttc
241 ctgcagttga attctgtgac tactgaggac acagccacat attactgtgc aagatctatg
301 attacgacgg ggtactatgt tatggactac tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc
361 tca

40

4H1軽鎖可変(vK)DNAおよびアミノ酸配列

LOCUS 4H1_VK 321 bp DNA linear
DEFINITION 4H1, DNA 321 bases.

```

FEATURES             Location/Qualifiers
     J_segment        292..321
                        /label=JK
     V_segment        265..291
                        /label=CDR3
     V_region         169..264
                        /label=FWR3
     V_segment        148..168
                        /label=CDR2
     V_region         103..147
                        /label=FWR2
     V_segment        70..102
                        /label=CDR1
     V_region         1..69
                        /label=FWR1
     CDS               1..321
                        /label=4H1\VK

```

10

```

/translation="DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSISCKASQDVGISVAWYQQKP
GQSPKLLIYWASTRHTGVPVRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYSSY
PPTFGAGTKLELK"

```

```

BASE COUNT      82 a      81 c      79 g      79 t

```

20

ORIGIN

```

1  gacattgtga tgacccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc
61 atctcctgca aggccagtc ggaatgtgggt atttctgtag cctgggtatca acagaaacca
121 gggcaatctc cttaaactact gatttactgg gcatccaccc ggcacactgg agtccctggt
181 cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccataagcaa tgtgcagttc
241 gaagacttgg cagattatct ttgtcagcag tatagcagtt atccgcccac gttcggtgct
301 gggaccaagc tggagctgaa a

```

4H1重鎖可変DNAおよびアミノ酸配列

```

LOCUS      4H1_VH      363 bp      DNA      linear

```

```

DEFINITION 4H1, DNA 363 bases.

```

30

```

FEATURES             Location/Qualifiers
     J_segment        331..363
                        /label=JH
     V_segment        295..330
                        /label=CDR3
     V_region         199..294
                        /label=FWR3
     V_segment        151..198
                        /label=CDR2
     V_region         109..150
                        /label=FWR2
     V_segment        91..108
                        /label=CDR1
     V_region         1..90
                        /label=FWR1
     CDS               1..363
                        /label=4H1\XH

```

40

```

/translation="DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTDYSITSDYAWTWIRQ
FPGNKLEWMGYITYRGTTTRYNPSTLSRISFTRDTSKNQLFLQLNSVTTEDTGTY
CCARSMITTGYIAMDYWGQTSVTVSS"

```

```

BASE COUNT      90 a      103 c      82 g      88 t

```

ORIGIN

```
1 gatgtgcagc ttcaggagtc gggacctggc ctggtgaaac cttctcagtc tctgtccctc
61 acctgcactg tcactgacta ctcaatcacc agtgattatg cctggacctg gatccggcag
121 tttccgggaa acaaactgga gtggatgggc tacataacct acagaggtag cactcgctac
181 aacccatctc tcacaagtcg aatctctttc actcgagaca catccaagaa ccagctcttc
241 ctgcagttga attctgtgac tactgaggac acaggcacat attgctgtgc aagatctatg
301 attacgacgg ggtactatgc tatggactac tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc
361 tca
```

【 0 0 9 2 】

10

本発明の種々の局面を以下のサブセクションにおいてさらに詳細に説明する。

【 0 0 9 3 】

I. 単離された核酸分子

本発明のある局面は、本発明の一態様は、本発明のポリペプチド（例えば、表 1 の配列を含む）またはその生物学的に活性な部分をコードする単離された核酸分子、並びにこれらポリペプチドをコードする核酸分子を同定するためのハイブリダイゼーションプローブとしての使用に十分な核酸断片および核酸分子の増幅または変異のための P C R プライマーとして使用するための断片に関する。本明細書で用いられる場合、「核酸分子」という用語は、DNA 分子（例えば c DNA またはゲノム DNA）および RNA 分子（例えば m RNA）およびヌクレオチドアナログを使用して生産される DNA または RNA のアナログを含むものである。核酸分子は一本鎖または二本鎖でありうるが、好ましくは二本鎖 DNA である。

20

【 0 0 9 4 】

用語「単離された核酸分子」は、核酸の天然源に存在する他の核酸分子から分離される核酸分子を含む。例えば、ゲノム DNA に関して、用語「単離された」は、ゲノム DNA が天然に隣接している染色体から分離される核酸分子を含む。いくつかの実施態様では、「単離された」核酸分子は、核酸が誘導される生物のゲノム DNA 中において核酸に天然に隣接する配列（つまり、核酸分子の 5' および 3' 末端に位置する配列）を含まない。例えば、「単離された」核酸分子、例えば c DNA 分子は、組み換え技術によって作製される場合は他の細胞性物質または培養培地を実質的に含まず、または化学的に合成される場合は化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含まないものでありうる。

30

【 0 0 9 5 】

本発明の核酸分子（例えば、表 1 の配列を含む）またはその一部は、標準的な分子生物学技術およびここで提供される配列情報を使用して単離することができる。例えば、表 1 に示される配列の全てまたは一部を包含する核酸分子は、表 1 に示される配列に基づいて設計される合成オリゴヌクレオチドプライマーを使用してポリメラーゼ連鎖反応（P C R）によって単離することができる。

【 0 0 9 6 】

本発明の核酸分子は、標準的な P C R 増幅技術に従って鋳型および適切なオリゴヌクレオチドプライマーとして c DNA、m RNA または別法ではゲノム DNA を使用して増幅させることができる。このようにして増幅された核酸分子は適切なベクター中にクローニングし、DNA 配列解析によって特徴付けすることができる。更に、本発明の核酸配列に対応するオリゴヌクレオチドは、例えば自動化 DNA 合成機を使用して、標準的な合成技術によって調製することができる。

40

【 0 0 9 7 】

他の実施態様では、本発明の単離された核酸分子は、本発明の核酸分子（例えば、表 1 の配列を含む）の相補鎖である核酸分子、またはその部分を含む。本発明の核酸分子（例えば、表 1 の配列を含む）に相補的である核酸分子、またはその部分は、表 1 に示される各ヌクレオチド配列にハイブリダイズすることができ、よって安定な二本鎖を形成するように表 1 に示されるヌクレオチド配列に十分に相補的であるものである。

50

【 0 0 9 8 】

さらに別の実施態様では、本発明の単離された核酸分子は、表 1 に示されたヌクレオチド配列の全長に対して少なくとも約 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % またはそれ以上の同一性を有するヌクレオチド配列、またはこれらのヌクレオチド配列の何れかの一部を含む。

【 0 0 9 9 】

更に、本発明の核酸分子は、本発明の核酸分子の一部（例えば、表 1 の配列を含む）、またはその一部、例えばプローブまたはプライマーとして使用されうる断片または本発明のポリペプチド、例えば、表 1 のものの一部をコードする断片のみを含み得る。プローブ / プライマーは、典型的には実質的に精製されたオリゴヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチドは、典型的には、本発明の核酸分子（例えば、表 1 の配列を含む）；本発明の核酸分子（例えば、表 1 の配列を含む）のアンチセンス配列；または本発明の核酸分子（例えば、表 1 の配列を含む）の変異体の少なくとも約 1 2 または 1 5、好ましくは約 2 0 または 2 5、より好ましくは約 3 0、3 5、4 0、4 5、5 0、5 5、6 0、6 5、または 7 5 の連続ヌクレオチドにストリンジेंटな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列の領域を含む。

【 0 1 0 0 】

本発明の核酸分子（例えば、表 1 の配列を含む）に基づくプローブは、同じまたは相同のポリペプチドをコードする転写物またはゲノム配列を検出するために使用することができる。ある実施態様では、プローブは、それに結合される標識基を更に含み、例えば標識基は放射性同位体、蛍光化合物、酵素、または酵素コファクターであり得る。

【 0 1 0 1 】

「本発明のポリペプチドの生物学的に活性な部分」をコードする核酸フラグメントは、本発明のポリペプチドの生物学的活性（例えば、その抗原標的に結合する能力）を有するポリペプチドをコードする本発明の核酸分子（例えば、表 1 の配列を含む）の一部を単離し、本発明のポリペプチドのコード化部分を（例えば、インビトロ組み換え発現により）発現させ、本発明のポリペプチドのコード化部分の活性を評価することにより、調製され得る。

【 0 1 0 2 】

他のいくつかの実施態様では、「本発明のペプチドエピトープ」をコードする核酸フラグメントは、該ポリペプチドに対して生成された抗体が特異的となるであろうポリペプチドをコードする、本発明の核酸分子のヌクレオチド配列の一部分（例えば、表 1 の配列を含む）を単離することによって調製することができる（例えば、表 1 に示すヒト P D - L 1 および P D - L 2 ペプチドエピトープ）。

【 0 1 0 3 】

本発明はさらに、遺伝コードの縮重のために表 1 に示されるヌクレオチド配列とは異なる核酸分子を含み、よって表 1 に示される各ヌクレオチド配列によってコードされるものと同じポリペプチドをコードする。別の実施態様では、本発明の単離された核酸分子は、本発明のポリペプチド（例えば、表 1 の配列を含む）をコードするヌクレオチド配列を有する。

【 0 1 0 4 】

本発明の核酸分子（例えば、表 1 の配列を含む）のホモログに対応する核酸分子は、ストリンジेंटなハイブリダイゼーション条件下での標準的なハイブリダイゼーションによるハイブリダイゼーションプローブとして、ここに開示された c D N A s またはその部分を使用して、ここに開示された核酸とのその相同性に基づいて単離されうる。

【 0 1 0 5 】

したがって、別の実施態様では、本発明の単離された核酸分子は、少なくとも 1 5、2 0、2 5、3 0 またはそれ以上のヌクレオチド長であり、本発明の核酸分子（例えば、表 1 の配列を含む）を含む核酸分子にストリンジेंटな条件下でハイブリダイズする。

【 0 1 0 6 】

本明細書で用いられる場合、ここで使用される場合、「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」という用語は、互いに有意に同一であるか相同であるヌクレオチド配列が互いにハイブリダイズされたまま残るハイブリダイゼーションおよび洗浄の条件を記述するものである。好ましくは、該条件は、互いに少なくとも約 70 %、より好ましくは少なくとも約 80 %、更により好ましくは少なくとも約 85 % または 90 % 同一な配列が互いにハイブリダイズされたまま残るようなものである。そのようなストリンジェントな条件は当業者に知られており、Current Protocols in Molecular Biology, Ausubelら編, John Wiley & Sons, Inc. (1995)、第 2、4 および 6 章に見出すことができる。更なるストリンジェントな条件は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrookら, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)、第 7、9 および 11 章に見出すことができる。限定されないが、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の例は、約 65 ~ 70 °C での 4 × または 6 × 塩化ナトリウム / クエン酸ナトリウム (SSC) 中のハイブリダイゼーション (または約 42 ~ 50 °C での 4 × SSC + 50 % ホルムアミド中のハイブリダイゼーション) と続く 65 ~ 70 °C での 1 × SSC 中の一または複数回の洗浄を含む。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の更なる非限定的な例は、45 °C での 6 × SSC でのハイブリダイゼーションと続く 65 °C での 0.2 × SSC、0.1 % SDS 中の一または複数回の洗浄を含む。高度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の非限定的な例は、約 65 ~ 70 °C での 1 × SSC 中でのハイブリダイゼーション (または約 42 ~ 50 °C での 1 × SSC + 50 % ホルムアミド中のハイブリダイゼーション) と続く約 65 ~ 70 °C での 0.3 × SSC 中の一または複数回の洗浄を含む。低いストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の非限定的な例は、約 50 ~ 60 °C での 4 × または 6 × SSC 中のハイブリダイゼーション (またはあるいは約 40 ~ 45 °C での 6 × SSC + 50 % ホルムアミド中のハイブリダイゼーション) と続く約 50 ~ 60 °C での 2 × 中の一または複数回の洗浄を含む。上に記載の値に対して中間の範囲、例えば、65 ~ 70 °C または 42 ~ 50 °C もまた本発明によって包含されることが意図される。ハイブリダイゼーションおよび洗浄バッファーにおいて SSPE (1 × SSPE は 0.15 M の NaCl、10 mM の NaH_2PO_4 、および 1.25 mM の EDTA、pH 7.4) を SSC (1 × SSC は 0.15 M の NaCl および 15 mM のクエン酸ナトリウム) に置換することができる; 洗浄は各ハイブリダイゼーションの完了後に 15 分間実施される。50 塩基対長より少ないことが予想されるハイブリッドのハイブリダイゼーション温度は、ハイブリッドの融解温度 (T_m) よりも 5 - 10 °C 低くなるはずであり、ここで、 T_m は、以下の式に従って決定される。18 塩基対長より少ないハイブリッドでは、 $T_m (^\circ\text{C}) = 2 (A + T \text{ 塩基の } \#) + 4 (G + C \text{ 塩基の } \#)$ 。18 から 49 塩基対長のハイブリッドでは、 $T_m (^\circ\text{C}) = 81.5 + 16.6 (\log_{10} [\text{Na}^+]) + 0.41 (\% G + C) - (600 / N)$ であり、式中、N はハイブリッド中の塩基数、 $[\text{Na}^+]$ はハイブリダイゼーションバッファー中のナトリウムイオンの濃度である (1 × SSC に対する $[\text{Na}^+] = 0.165 \text{ M}$)。限定しないが遮断薬 (例えば、BSA またはサケまたはニシン精子キャリア DNA)、界面活性剤 (例えば、SDS)、キレート剤 (例えば、EDTA)、Ficoll、PVP 等を含む更なる試薬を、ハイブリダイゼーションおよび / または洗浄バッファーに添加し、例えばニトロセルロースまたはナイロン膜のような膜への核酸分子の非特異的なハイブリダイゼーションを減少させることができることを当業者はまた認識するであろう。特にナイロン膜を使用する場合、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の更なる非限定的な例は、約 65 °C での 0.25 - 0.5 M の NaH_2PO_4 、7 % の SDS 中のハイブリダイゼーションと続く 65 °C での 0.02 M の NaH_2PO_4 、1 % の SDS 中の一または複数回の洗浄である。例えば、Church および Gilbert (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1991-1995 (または別法では 0.2 × SSC, 1 % SDS) を参照されたい。

【 0 1 0 7 】

本発明の核酸分子 (例えば、表 1 の配列を含む) に変異によって変化を導入することが

でき、ポリペプチドの機能的能力を変更しないで、本発明のコードされたポリペプチドのアミノ酸配列に変化を生じさせることができることを当業者は更に理解するであろう。例えば、「非必須」アミノ酸残基におけるアミノ酸置換を生じるヌクレオチド置換を本発明の核酸分子（例えば、表 1 の配列を含む）において行うことができる。「非必須」アミノ酸残基は、生物学的活性を変更することなく本発明の核酸分子（例えば、表 1 の配列を含む）から変更させられうる残基である一方、「必須」アミノ酸残基は生物学的活性に必要とされる。例えば、本発明のポリペプチドの間で保存されるアミノ酸残基、例えばポリペプチドのその標的抗原への結合に必要とされるものは特に改変されにくいことが予想される。

【 0 1 0 8 】

したがって、本発明の他の態様は、活性のために必須ではないアミノ酸残基に変化を含む本発明のポリペプチドをコードする核酸分子（例えば、表 1 の配列を含む）に関する。このようなポリペプチドは、表 1 の配列とはアミノ酸配列が異なるが、尚も生物学的活性を保持している。ある実施態様では、単離された核酸分子は、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、ここで、ポリペプチドは、表 1 の配列と少なくとも約 7 1 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % またはそれ以上同一のアミノ酸配列を含む。

【 0 1 0 9 】

表 1 の配列のポリペプチドと同一のポリペプチドをコードする単離された核酸分子は、一または複数のアミノ酸置換、付加または欠失がコードされたポリペプチド中に導入されるように表 1 の配列のヌクレオチド配列に一または複数のヌクレオチド置換、付加または欠失を導入することにより作製されうる。変異は、標準的な技術、例えば部位特異的突然変異誘発および PCR 媒介突然変異誘発によって、本発明の核酸分子（例えば、表 1 の配列を含む）中に導入することができる。ある実施態様では、保存的アミノ酸置換は、1 または複数の予想された非必須アミノ酸残基においてなされる。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基と置換されるものである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該分野で定義されている。これらのファミリーは、塩基性側鎖を持つアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を持つアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖を持つアミノ酸（例えば、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を持つアミノ酸（例えば、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、β 分岐側鎖を持つアミノ酸（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖を持つアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を含む。よって、本発明のポリペプチド（例えば、表 1 の配列を含む）中の予想される非必須アミノ酸残基は同じ側鎖ファミリーからの他のアミノ酸残基と置換されうる。別法では、他の実施態様では、変異を、例えば飽和変異誘発により、本発明の核酸分子（例えば、表 1 の配列を含む）の全てまたは一部に沿って無作為に導入することができ、得られた変異体を、活性を保持している変異体を同定するために生物学的活性についてスクリーニングできる。本発明の核酸分子（例えば、表 1 の配列を含む）の変異誘発後に、コードされたポリペプチドを組み換え的に発現させることができ、ポリペプチドの活性を決定することができる。

【 0 1 1 0 】

ある実施態様では、本発明の変異体ポリペプチドを、PD - L 1 および / または PD - L 2 に結合するおよび / または調節する能力について分析評価することができる。

【 0 1 1 1 】

本発明のさらに別の局面は、融合タンパク質をコードする単離された核酸分子に関する。そのような核酸分子は、本発明のポリペプチド（例えば、表 1 の配列を含む）をコードする第二のヌクレオチド配列に作用可能に連結された本発明のポリペプチド（例えば、表 1 の配列を含む）をコードする少なくとも第一のヌクレオチド配列を含むものであり、標準

10

20

30

40

50

的な組み換えDNA技術によって調製することができる。

【0112】

細胞株または微生物内における本発明の核酸分子（例えば、表1の配列を含む）の発現特性は、挿入された調節エレメントが本発明の核酸分子（例えば、表1の配列を含む）に作用可能に連結されるように安定細胞株またはクローン化微生物のゲノム中に異種DNA調節エレメントを挿入することにより修飾してもよい。例えば、異種調節エレメントは、当業者によく知られ、例えば、Chappelの米国特許第5272071号；1991年5月16日公開のPCT公報国際公開第91/06667号に記載されているような、標的化相同組み換えのような技術を使用して、本発明の核酸分子（例えば、表1の配列）に作用可能に連結されるように安定細胞株またはクローン化微生物中に挿入されうる。

10

【0113】

II. 単離されたポリペプチド分子

本発明の一態様は、本発明の単離されたポリペプチド（例えば、表1の配列を含む）、およびその生物学的に活性な部分に関する。ある実施態様では、本発明のポリペプチド（例えば、表1の配列を含む）、およびその生物学的に活性な部分は、標準的なタンパク質精製技術によって細胞または組織源から単離することができる。他の実施態様では、本発明のポリペプチド（例えば、表1の配列を含む）、およびその生物学的に活性な部分は組み換えDNA技術によって生産される。別法として、本発明のポリペプチド（例えば、表1の配列を含む）、およびその生物学的に活性な部分は標準的なペプチド合成技術を使用して化学的に合成することができる。

20

【0114】

「単離された」または「精製された」ポリペプチドまたはその生物学的に活性な部分は、本発明のポリペプチド（例えば、表1の配列を含む）が誘導される細胞または組織源からの細胞性物質または他の混入タンパク質を実質的に含まないか、または化学的に合成される場合は化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含まない。「細胞性物質を実質的に含まない」という語句は、ポリペプチドがそれが単離されまたは組み換え的に生産される細胞の細胞性成分から分離される本発明のポリペプチド（例えば、表1の配列を含む）、およびその生物学的に活性な部分の調製を含む。ある実施態様では、「細胞性物質を実質的に含まない」という語句は、約30%（乾燥重量）未満の本発明のものではないタンパク質（ここでは「混入タンパク質」ともまた称される）、より好ましくは約20%未満の本発明のものではないタンパク質、更により好ましくは約10%未満の本発明のものではないタンパク質、および最も好ましくは約5%未満の本発明のものではないタンパク質を有する本発明のポリペプチド（例えば、表1の配列を含む）、およびその生物学的に活性な部分の調製を含む。本発明のポリペプチド（例えば、表1の配列を含む）またはその生物学的に活性な部分が組み換え的に製造される場合、それはまた好ましくは培養培地を実質的に含まず、つまり、培養培地がタンパク質調製物の約20%未満、より好ましくは約10%未満、最も好ましくは約5%未満の体積である。

30

【0115】

「化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含まない」という語句は、ポリペプチドが、ポリペプチドの合成に関与する化学的前駆体または他の化学物質から分離されている本発明のポリペプチド（例えば、表1の配列を含む）またはその生物学的に活性な部分の調製を含む。ある実施態様では、「化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含まない」なる語句は、約30%（乾燥重量）未満の化学的前駆体または発明のものではないタンパク質、より好ましくは約20%未満の化学的前駆体または本発明のものではないタンパク質、更により好ましくは約10%未満の化学的前駆体または本発明のものではないタンパク質、および最も好ましくは約5%未満の化学的前駆体または本発明のものではないタンパク質を有する本発明のポリペプチド（例えば、表1の配列を含む）またはその生物学的に活性な部分の調製を含む。

40

【0116】

本明細書で用いられる場合、本発明のポリペプチド（例えば、表1の配列を含む）の「

50

生物学的に活性な部分」は、PD-L1とその受容体、並びにPD-L2とその受容体間の相互作用に關与するポリペプチドを含む。いくつかの実施態様では、PD-L1および/またはPD-L2は、ヒトオルソログである。本発明のポリペプチド（例えば、表1の配列を含む）の生物学的に活性な部分は、本発明の各完全長ポリペプチド（例えば、表1の配列を含む）よりもアミノ酸が少なく、本発明の各ポリペプチド（例えば、表1の配列を含む）の少なくとも一つの活性を示す、本発明のポリペプチド（例えば、表1の配列を含む）のアミノ酸配列と十分に同一であるかまたはそれから誘導されたアミノ酸配列を含むペプチドを含む。ある実施態様では、生物学的に活性な部分は、それが生成せしめられまたは結合するように設計された抗原にそれぞれ応じてPD-L1および/またはPD-L2に特異的に結合する能力を有するドメインまたはモチーフを含む。

10

【0117】

別の実施態様では、本発明のポリペプチド（例えば、表1の配列を含む）は、表1に示されるアミノ酸配列を有している。他のいくつかの実施態様では、ポリペプチドは表1に示されるポリペプチドと実質的に同一であり、表1に示される各ポリペプチドの機能的活性を保持しているが、上記のサブセクションIに詳細に記載されるように突然変異誘発によってアミノ酸配列が異なる。したがって、別の実施態様では、本発明のポリペプチドは表1に示されたポリペプチドと少なくとも約71%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、または99.9%またはそれ以上同一のアミノ酸配列を含むポリペプチドである。

20

【0118】

二つのアミノ酸配列または二つの核酸配列の同一性パーセントを決定するために、配列を最適な比較目的のためにアラインさせる（例えば、最適なアラインメントのために第一および第二アミノ酸または核酸配列の一方または両方にギャップを導入することができる。また、非同一致配列を比較目的に対して無視することができる）。ある実施態様では、比較目的に対してアラインされた参照配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも30%、好ましくは少なくとも40%、より好ましくは少なくとも50%、更により好ましくは少なくとも60%、および更により好ましくは少なくとも70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、または99.9%である。対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置におけるアミノ酸残基またはヌクレオチドが次に比較される。第一の配列中の位置が第二配列中の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドによって占められている場合、分子はその位置で同一である（本明細書で用いられる場合、アミノ酸または核酸「同一性」はアミノ酸または核酸「相同性」と等しい）。二つの配列間の同一性パーセントは、二つの配列の最適なアラインメントのために導入される必要があるギャップの数および各ギャップの長さを考慮して、配列によって共有される同一の位置の数の関数である。

30

【0119】

本発明はまたキメラまたは融合タンパク質を提供する。本明細書で使用される場合、「キメラタンパク質」または「融合タンパク質」は、本発明のものではないポリペプチドに作用可能に連結した本発明のポリペプチド（例えば、表1の配列を含む）を含む。「本発明のポリペプチド」は、表1に示されたポリペプチドに対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドを意味する一方、「本発明のものではないポリペプチド」は、表1に示されたポリペプチドとは異なり、同じかまたは異なった生物から誘導される表1に示されたポリペプチドに対応するアミノ酸配列を有していないポリペプチドを意味する。融合タンパク質内において、「作用可能に連結される」という用語は、本発明のポリペプチドと本発明のものではないポリペプチドが互いにインフレームで融合していることを示すことが意図される。本発明のものではないポリペプチドは、本発明のポリペプチドのN末端またはC末端に融合させることができ、本発明のポリペプチドの溶解性、結合親和性、安定性、または価数を変更する部分に対応する。

40

【0120】

例えば、ある実施態様では、融合タンパク質は、本発明のポリペプチドとのタンパク質

50

のGST融合タンパク質である。このような融合タンパク質は本発明の組み換えポリペプチドの精製を容易化することができる。別の実施態様では、融合タンパク質はそのN末端に異種シグナル配列を含む。さらにまた別の実施態様では、融合タンパク質は、細胞傷害性の部分（例えば、毒素）を含有する。いくつかの宿主細胞（例えば、哺乳動物宿主細胞）では、本発明のポリペプチドの発現および/または分泌を異種シグナル配列の使用によって増大させることができる。

【0121】

本発明のキメラまたは融合ポリペプチド（例えば、表1の配列を含む）は、標準的な組み換えDNA技術によって作製することができる。例えば、異なるポリペプチド配列をコードするDNAフラグメントをインフレームで、従来の手法に従い、例えばライゲーションのための平滑末端またはねじれ末端、適切な終端を付与する制限酵素による消化、適切な付着末端の充填、望ましくない接合を避けるためのアルカリホスファターゼ処理、および酵素ライゲーションを用いて、ライゲートさせる。別の実施態様では、融合遺伝子は自動化DNA合成機を含む従来の手法によって合成することができる。別法では、二つの連続遺伝子フラグメント間に相補的オーバーハングを生じさせ、続いてアニールされ再増幅されてキメラ遺伝子配列を生成することができるアンカープライマーを用いて遺伝子フラグメントのPCR増幅を行うことができる（例えば、Current Protocols in Molecular Biology, Ausubelら編, John Wiley & Sons:1992を参照）。さらに、融合部分（例えばGSTポリペプチド）を既にコードしている多くの発現ベクターが市販されている。

【0122】

ここで同定される本発明のポリペプチド（例えば、表1の配列を含む）のアミノ酸配列により、当業者は、本発明のポリペプチド（例えば、表1の配列を含む）に対応するポリペプチドを作製することができる。そのようなポリペプチドは、本発明のポリペプチド（例えば、表1の配列を含む）をコードするポリヌクレオチドの発現により、原核生物または真核生物宿主細胞において産生させることができる。別法では、そのようなペプチドは、化学的方法によって合成することができる。組み換え宿主における異種ポリペプチドの発現方法、ポリペプチドの化学合成法、およびインビトロ翻訳は当該技術分野においてよく知られており、更にManiatisら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1989), 2版, Cold Spring Harbor, N. Y.; Berger およびKimmel, Methods in Enzymology, Volume 152, Guide to Molecular Cloning Techniques (1987), Academic Press, Inc., San Diego, Calif.; Merrifield, J. (1969) J. Am. Chem. Soc. 91: 501; Chaiken I. M. (1981) CRC Crit. Rev. Biochem. 11: 255; Kaiserら (1989) Science 243: 187; Merrifield, B. (1986) Science 232: 342; Kent, S. B. H. (1988) Annu. Rev. Biochem. 57: 957; およびOfford, R. E. (1980) Semisynthetic Proteins, Wiley Publishingに記載されている。これらを引用により本明細書において援用する。

【0123】

III. PD-L1およびPD-L2の両方に結合する抗体

理論に拘束されるわけではなく、開示された発明の理解を高めるために提供されるものであるが、本発明の抗体は、PD-L1およびPD-L2ポリペプチドの結合に關与する少なくとも1つのCDR（相補性決定領域）内において、既知のPD-L1またはPD-L2結合抗体と比べて独創的であると考えられる。少なくともなぜなら、存在するPD-L1またはPD-L2結合抗体がPD-L1およびPD-L2の双方に対して結合親和性を有しないからである。この考えは、高頻度可変領域を含有するCDRを含む抗体の構成要素の公知の構造的配列に一部基づくものである。本発明の抗体はまた、既知のPD-L1および/またはPD-L2結合抗体と、1より多くのCDRおよび/または1以上のCDR内の1より多くのアミノ酸位置において相違していてもよい。これらの相違は、PD-L1および/またはPD-L2に対する従前の抗体と比べて、PD-L1およびPD-L2の両方の保存されたエピトープに結合するという特徴を、開示された発明の抗体に提供する。ある実施態様では、本発明の抗体は、PD-L1およびPD-L2間の構造的および配列保存分析、ならびにPD-L1とそのリガンド、PD-L1およびPD-L2結合関

係に基づいて、所望の二重結合抗体を作製するための免疫原性エピトープを表す、保存されたPD-L1およびPD-L2ペプチド配列、CFTVTVPKDLVVEYGSNおよびCYRSMISYGGADYKRITVと特異的に結合する。したがって、本発明の抗体は、既知のPD-L1またはPD-L2抗体と比べてより高い特異性および/または感受性を備えたPD-L1およびPD-L2の両方を認識する。そのような抗体は、その他の使用、ウェスタンブロッティング(もしくはイムノブロッティング)、免疫組織化学(IHC)、変性されたもしくは固定された形態のPD-L1および/またはPD-L2、ELISAアッセイ、およびRIAアッセイの検出の使用にとって好適である。

【0124】

いくつかの好ましい実施態様では、本発明の抗体およびその抗原結合フラグメントは、PD-L1および/またはPD-L2活性を阻害(遮断)して、それによってPD-L1および/またはPD-L2阻害剤として機能することもある。そのような抗体およびフラグメントは、追加的なPD-L1および/またはPD-L2阻害剤を導入する必要なく、PD-L1および/またはPD-L2の存在を検出するため、およびPD-L1および/またはPD-L2活性を抑制するための両方に用いてもよい。別法として、PD-L1および/またはPD-L2活性を抑制する方法の一環として、別個にまたは組み合わせで被検体に投与されるように、PD-L1および/またはPD-L2抑制性抗体またはその抗原結合フラグメントを、PD-L1および/またはPD-L2活性を抑制するための組成物などの他のPD-L1および/またはPD-L2阻害剤と組み合わせ用いてもよい。

【0125】

本発明のモノクローナル抗体は、Kohler and Milstein, Nature 256:495(1975)に記載されている標準的な体細胞ハイブリダイゼーション技術などの種々の公知の方法を用いて作成することができる。体細胞ハイブリダイゼーション処置は原理として好ましいが、例えば、Bリンパ球のウイルス性もしくは癌遺伝子形質転換、ヒト抗体遺伝子のライブラリーを用いるファージディスプレイ法などの他のモノクローナル抗体作製技術を採用することもできる。

【0126】

本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを生成する1つの方法は、ネズミ系である。マウスにおけるハイブリドーマ産生は当該技術において公知であり、それには免疫化された脾臓細胞を単離し、融合するための免疫化プロトコルおよび技術が含まれる。

【0127】

ポリクローナル抗体は、好適な被検体をポリペプチド免疫原(例えば、表1に記載のもの)で免疫化することによって調製することができる。しかしながら、これまでに当該技術において用いられてきたもののような、従来の免疫化プロトコルは、あらゆる合理的な発現に成功する望ましい抗PD-L1/PD-L2抗体を生成しないであろう。特に、正常な野生型宿主動物の免疫化は、宿主PD-L1および/またはPD-L2に対して反応する抗体を削除し、それによって宿主PD-L1および/またはPD-L2と免疫化PD-L1および/またはPD-L2配列との間の保存された構造と結合する多数のB細胞およびそれにより産生される抗体を削除するであろう。そのような中、PD-L1およびPD-L2ポリペプチドが発現しないようにする、PD-L1およびPD-L2の両方に対して遺伝子ノックアウトを有する宿主動物の免疫化(すなわち、二重遺伝子ノックアウト)は、免疫化するPD-L1およびPD-L2配列に結合する交差反応性抗体を作製するB細胞の寛容化および欠失を抑制または阻害することがここに発見された。

【0128】

所望のPD-L1/PD-L2抗体を含有する免疫応答を生成するために、クローニングおよび抗体の単離のために細胞を回収する3~4日前に最終ブーストを行う古典的免疫化計画(典型的には、最初の4~5週間に2回免疫化を行い、所望の力価に達成しない場合は、続けて追加免疫を行う)を含めた種々の免疫化およびブースト法を用いることができる。さらに別のアプローチとしては、多部位急速免疫化またはRIMMS免疫化プロト

コルがある (Kilpatrickら (1997) (1997) Hybridoma 16(4) : 381-9 and Bynumら (1999) Hybridoma 19(5) : 407-11参照)。さらに、PD - L 1 および / または PD - L 2 の可溶性細胞外ドメインフラグメント、表面に高レベルの PD - L 1 および / または PD - L 2 を発現するように工学処理され、精製、溶解された細胞、および PD - L 1 および / または PD - L 2 から派生したペプチドを含む免疫原を組み合わせる免疫化 / ブーストアプローチを適応してもよい (例えば、表 1 参照)。

【 0 1 2 9 】

免疫化対象におけるポリペプチド抗体力価は、標準的技術、例えば固定化ポリペプチドを用いた酵素結合免疫吸着検定法 (E L I S A) により経時的にモニターされ得る。所望ならば、抗原に対する抗体を、哺乳動物から (例えば、血液から) 単離し、さらに公知技術、例えば、タンパク質 A クロマトグラフィーにより精製すると、I g G フラクシオンが得られる。免疫後適当な時点で、例えば、抗体力価が最も高いとき、抗体産生細胞は、被検体から入手され、標準的技術、例えば、Kohler および Milstein (1975) Nature 256:495-497 により最初に報告されたハイブリドーマ技術 (Brownら (1981) J. Immunol. 127:539-46; Brownら (1980) J. Biol. Chem. 255:4980-83; Yehら (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. 76:2927-31; および Yehら (1982) Int. J. Cancer 29:269-75 も参照されたい)、さらに最近のヒト B 細胞ハイブリドーマ技術 (Kozborら 1983) Immunol. Today 4:72)、E B V - ハイブリドーマ技術 (Coleら (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96)、またはトリオーマ技術によるモノクローナル抗体の製造に使用され得る。モノクローナル抗体ハイブリドーマ製造技術は公知である (一般的には、Kenneth, R. H. in Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses, Plenum Publishing Corp., New York, New York (1980); Lerner, E. A. (1981) Yale J. Biol. Med. 54:387 - 402; Gefter, M. L. ら (1977) Somatic Cell Genet. 3:231 - 36 を参照されたい)。簡単に述べると、不死細胞系 (代表的には骨髓種) を、上記のように免疫原により免疫化した哺乳動物からのリンパ球 (典型的には、脾臓細胞) に融合させ、生成したハイブリドーマ細胞の培養上清をスクリーニングすると、ポリペプチド抗原と好ましくは特異的に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが同定される。

【 0 1 3 0 】

リンパ球および不死化細胞系の融合に用いられる多くの公知プロトコルのいずれかが、抗 PD - L 1 抗体および / または PD - L 2 モノクローナル抗体を産生する目的で適用され得る (例えば、Galfre, G. ら (1977) Nature 266 : 55052 ; Gefterら (1977)、前掲 ; Lerner (1981) 前掲 ; Kenneth (1980) 前掲)。さらに、当業者にとって、同様に有用である上記方法の多くの変形があることは明らかである。典型的には、不死細胞系 (例えば、骨髓種細胞系) は、リンパ球と同じ種の哺乳動物に由来する。例えば、ネズミハイブリドーマは、本発明免疫原性製品により免疫化したマウスからのリンパ球を不死化マウス細胞系と融合させることにより製造され得る。好ましい不死細胞系は、ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養培地 (「H A T 培地」) に感受性を示すマウス骨髓種細胞系である。骨髓種細胞系のいくつかは、標準的技術による融合相手として使用され得、例えば P 3 - N S 1 / 1 - A g 4 - 1、P 3 - x 6 3 - A g 8 . 6 5 3 または S p 2 / O - A g 1 4 骨髓種系がある。これらの骨髓種系は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (A T C C)、Rockville, Md. から入手可能である。典型的には、H A T 感受性マウス骨髓種細胞は、ポリエチレングリコール (「P E G」) を用いてマウス脾臓細胞に融合される。次いで、融合から生成したハイブリドーマ細胞は H A T 培地を用いて選択され、これによって非融合および非生産的融合骨髓種細胞は殺傷される (非融合脾臓細胞は、形質転換されていないため数日後に死ぬ)。本発明モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞は、例えば、標準 E L I S A アッセイを用いて、所与のポリペプチドと結合する抗体についてハイブリドーマ培養上清をスクリーニングすることにより検出される。

【 0 1 3 1 】

モノクローナル抗体分泌ハイブリドーマを調製するための代替法として、上述のポリペプチドの一つに対して特異的なモノクローナルを、適切なポリペプチドで組み換えコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリー（例えば、抗体ファージディスプレイライブラリー）をスクリーニングすることにより同定し、単離し、ポリペプチドに結合する免疫グロブリンライブラリーメンバーを単離することができる。ファージディスプレイライブラリーを作製しスクリーニングするためのキットは市販されている（例えば、Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, カタログ番号27-9400-01；およびStratagene SurfZAPTM Phage Display Kit, カタログ番号240612）。さらに、抗体ディスプレイライブラリーの作製とスクリーニングに使用されるのに特に適切な方法および試薬の例は、例えばLadnerらの米国特許第5223409号；Kangらの国際公開第92/18619号；Dowerらの国際公開第91/17271号；Winterらの国際公開第92/20791号；Marklandらの国際公開第92/15679号；Breitlingらの国際公開第93/01288号；McCaffertyらの国際公開第92/01047号；Garrardらの国際公開第92/09690号；Ladnerらの国際公開第90/02809号；Fuchsら（1991）Biotechnology（NY）9：1369-1372；Hayら（1992）Hum. Antibod. Hybridomas 3：81-85；Huseら（1989）Science 246：1275-1281；Griffithsら（1993）EMBO J. 12：725-734；Hawkinsら（1992）J. Mol. Biol. 226：889-896；Clarksonら（1991）Nature 352：624-628；Gramら（1992）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89：3576-3580；Garrardら（1991）Biotechnology（NY）9：1373-1377；Hoogenboomら（1991）Nucleic Acids Res. 19：4133-4137；Barbasら（1991）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88：7978-7982；およびMcCaffertyら（1990）Nature 348：552-554に見出すことができる。

10

20

【0132】

さらに、標準的な組み換えDNA技術を使用して作製することができる組み換え抗PD-L1抗体／PD-L2二重結合抗体、例えばキメラ、複合、およびヒト化モノクローナル抗体を生成させることができる。そのようなキメラ、複合、およびヒト化モノクローナル抗体は、当該技術分野で知られている組み換えDNA技術によって、例えばRobinsonらの国際特許公開公報第PCT/US86/02269号；Akiraらの欧州特許出願第184,187号；Taniguchiの欧州特許出願第171,496号；Morrisonらの欧州特許出願第173494号；Neubergerらの国際公開第86/01533号；Cabillyらの米国特許第4816567号；Cabillyらの欧州特許出願第125,023号；Betterら（1988）Science 240：1041-1043；Liuら（1987）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84：3439-3443；Liuら（1987）J. Immunol. 139：3521-3526；Sunら（1987）Proc. Natl. Acad. Sci. 84：214-218；Nishimuraら（1987）Cancer Res. 47：999-1005；Woodら（1985）Nature 314：446-449；およびShawら（1988）J. Natl. Cancer Inst. 80：1553-1559；Morrison, S. L.（1985）Science 229：1202-1207；Oiら（1986）Biotechniques 4：214；Winterの米国特許第5,225,539号；Jonesら（1986）Nature 321：552-525；Verhoeyanら（1988）Science 239：1534；およびBeidlerら（1988）J. Immunol. 141：4053-4060に記載された方法を使用して生産されうる。

30

【0133】

さらに、ヒト化抗体は、米国特許第5565332号に開示されたもののような標準的なプロトコルに従って作製することができる。別の実施態様では、抗体鎖または特異的結合対メンバーは、例えば、米国特許第5565332号、同第5871907号、または同第5733743号に記載されているように、当該分野で知られている技術を使用して、特異的結合対メンバーのポリペプチド鎖と複製可能なジェネリックディスプレイパッケージの成分の融合体をコードする核酸分子を含むベクターと単一の結合対メンバーの第二ポリペプチド鎖をコードする核酸分子を含むベクターとの間の組み換えによって製造されうる。細胞におけるタンパク質機能を抑制するための細胞内抗体の使用は、また当該分野で知られている（例えば、Carlson, J. R.（1988）Mol. Cell. Biol. 8：2638-2646；Biocca, S.ら（1990）EMBO J. 9：101-108；Werge, T. M.ら（1990）FEBS Lett. 274：193-198；Carlson, J. R.（1993）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90：7427-7428；Marasco, W. A.ら（1993）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90：7889-7893；Biocca, S.ら（1994）Biotechnology（NY）12：396-399；Chen, S-Y.ら（1994）Hum. Gene Ther. 5：595

40

50

-601 ; Duan, L.ら (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 : 5075-5079 ; Chen, S-Y.ら (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 : 5932-5936 ; Beerli, R. R.ら (1994) J. Biol. Chem. 269 : 23931-23936 ; Beerli, R. R.ら (1994) Biochem. Biophys. Res. Commun. 204 : 666-672 ; Mhashilkar, A. M.ら (1995) EMBO J. 14 : 1542-1551 ; Richardson, J. H.ら (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 : 3137-3141 ; Marascoらの国際公開第94/02610号 ; およびDuanらの国際公開第95/03832号を参照)。

【 0 1 3 4 】

別の実施態様では、P D - L 1 および P D - L 2 に対するヒトモノクローナル抗体は、マウス系よりもヒト免疫系の部分を担持するトランスジェニックまたは導入染色体マウスを使用して産生させることができる。ある実施態様では「H u M A b マウス」とここでは称されるトランスジェニックマウスは、未再編成のヒト重鎖 (μ および γ) および κ 軽鎖免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子ミニ遺伝子座を、内在性 μ および κ 鎖遺伝子座を不活性化する標的変異と共に含む (Lonberg, N.ら (1994) Nature 368 (6474) : 856 859)。したがって、マウスはマウス I g M または κ の減少した発現を示し、免疫化に应答して、導入されたヒト重鎖および軽鎖導入遺伝子がクラススイッチおよび体細胞変異を受け、高親和性ヒト I g G κ モノクローナル抗体を生じる (上掲のLonberg, N.ら (1994) ; Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113 : 49 101に概説 ; Lonberg, N. およびHuszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol. 13 : 65 93, およびHarding, F. およびLonberg, N. (1995) Ann. N. Y Acad. Sci 764 : 536 546)。H u M a b マウスの調製は、Taylor, L.ら (1992) Nucleic Acids Research 20 : 6287 6295 ; Chen, J.ら (1993) International Immunology 5 : 647 656 ; Tuailonら (1993) Proc. Natl. Acad. Sci USA 90 : 3720 3724 ; Choiら (1993) Nature Genetics 4 : 117 123 ; Chen, J.ら (1993) EMBO J. 12 : 821 830 ; Tuailonら (1994) J. Immunol. 152 : 2912 2920 ; Lonbergら, (1994) Nature 368 (6474) : 856 859 ; Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113 : 49 101 ; Taylor, L.ら (1994) International Immunology 6 : 579 591 ; Lonberg, N. およびHuszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol. 13 : 65 93 ; Harding, F. およびLonberg, N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci 764 : 536 546 ; Fishwild, D.ら (1996) Nature Biotechnology 14 : 845 851に記載されている。さらにLonberg およびKay、およびGenPharm Internationalに付与された米国特許第5,545,806号 ; 同第5,569,825号 ; 同第5,625,126号 ; 同第5,633,425号 ; 同第5,789,650号 ; 同第5,877,397号 ; 同第5,661,016号 ; 同第5,814,318号 ; 同第5,874,299号 ; および同第5,770,429号 ; Suraniらの米国特許第5,545,807号 ; 1998年6月11日公開の国際公開第98/24884 ; 1994年11月10日公開の国際公開第94/25585号 ; 1993年6月24日公開の国際公開第93/1227号 ; 1992年12月23日公開の国際公開第92/22645号 ; 1992年3月19日公開の国際公開第92/03918号を参照されたい。

【 0 1 3 5 】

別の実施態様では、本発明で使用する抗体は二重特異性抗体である。二重特異性抗体は、単一の抗体ポリペプチド内に二つの異なった抗原に対する結合部位を有している。抗原結合性は、同時または逐次的でありうる。トリオーマおよびハイブリッドハイブリドーマは二重特異性抗体を分泌することができる細胞株の二つの例である。ハイブリッドハイブリドーマまたはトリオーマによって産生される二重特異性抗体の例は、米国特許第4474893号に記載されている。二重特異性抗体は、化学的手段 (Staerzら (1985) Nature 314 : 628、およびPerezら (1985) Nature 316 : 354) およびハイブリドーマ技術 (StaerzおよびBevan (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83 : 1453、およびStaerz およびBevan (1986) Immunol. Today 7 : 241) によって構築されている。二重特異性抗体はまた米国特許第5,959,084号に記載されている。二重特異性抗体のフラグメントは米国特許第5798229号に記載されている。

【 0 1 3 6 】

二重特異性薬剤は、ハイブリドーマまたは異なった抗体を作製する他の細胞を融合させることによりヘテロハイブリドーマを作製し、次いで両方の抗体を生産し同時にアセンブ

りするクローンを同定することにより産生させることもできる。それらはまた完全な免疫グロブリン鎖または例えばF a bおよびF v配列のようなその部分の化学的または遺伝子接合によって産生させることができる。抗体成分は、P D - L 1およびP D - L 2に結合することができる。ある実施態様では、二重特異性抗体は、P D - L 1およびP D - L 2の両方、さらに他の免疫共抑制性ポリペプチド（例えば、C T L A 4、B 7 - 1、P D - 1など）の他の望ましい標的に特異的に結合できる。

【0137】

本発明のさらに別の局面は、それぞれ免疫原性P D - L 1およびP D - L 2ポリペプチド、またはその免疫原性部分で動物を免疫化し、ついでポリペプチドに特異的に結合する抗体を動物から単離することを含む方法によって得ることができる抗P D - L 1抗体 / P D - L 2ポリペプチド抗体に関する。

10

【0138】

さらに別の局面において、部分的または既知の抗体配列を使用して新規抗体を産生し、および / または発現させることができる。抗体は、6つの重鎖および軽鎖相補性決定領域（C D R s）に位置するアミノ酸残基を主として通じて標的抗原と相互作用する。このため、C D R s内のアミノ酸配列は、C D R sの外側の配列よりも個々の抗体間でより多様性がある。C D R配列が殆どの抗体抗原相互作用の原因であるため、異なった性質を有する異なった抗体からのフレームワーク配列に特異的な天然に生じる抗体からのC D R配列がグラフトした発現ベクターを構築することによって、特異的な天然に生じる抗体の性質を模倣する組み換え抗体を発現させることができる（例えば、Riechmann, L.ら, 1998, Nature 332 : 323 327 ; Jones, P.ら, 1986, Nature 321 : 522 525 ; およびQueen, C.ら, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86 : 10029 10033を参照）。そのようなフレームワーク配列は、生殖系列または非生殖系列抗体遺伝子配列を含む公的D N Aデータベースから得ることができる。これらの生殖系列配列は、それらがB細胞成熟中にV（D）J接合によって形成される完全にアセンブルされた可変遺伝子を含んでいないので、成熟抗体遺伝子配列とは異なる。生殖系列遺伝子配列はまた可変領域全体にわたって均等に、個々の高親和性二次レパートリー抗体の配列とは異なるであろう。例えば、体細胞変異は、フレームワーク領域のアミノ末端部分においては相対的に希である。例えば、体細胞変異は、フレームワーク領域1のアミノ末端部分およびフレームワーク領域4のカルボキシ末端部分において相対的に希である。更に、多くの体細胞変異は抗体の結合特性を有意には改変しない。このため、元の抗体のものに類似した結合特性を有するインタクトな組み換え抗体を再形成するために特定の抗体の全D N A配列を得ることは必要ではない。C D R領域をスパンする部分的な重鎖および軽鎖配列が典型的にはこの目的に十分である。部分的配列が、どの生殖系列および / または非生殖系列可変および接合遺伝子セグメントが組み換え抗体可変遺伝子に寄与したかを決定するために使用される。ついで、生殖系列および / または非生殖系列配列が使用されて可変領域の失われた部分が満たされる。重鎖および軽鎖リーダー配列はタンパク質成熟中に切断され、最終の抗体の性質には寄与しない。失われた配列を付加するために、クローン化されたc D N A配列が、ライゲーションまたはP C R増幅によって合成オリゴヌクレオチドと組み合わせられうる。別法では、全可変領域は、短いオーバーラップオリゴヌクレオチドのセットとして合成され、完全に合成の可変領域クローンをつくり出すためにP C R増幅によって組み合わせられうる。このプロセスをまた使用して、特定の制限部位の削除または包含、または特定のコドンの最適化のような所定の利点を有する。該プロセスはまた他の種（例えばマウス）中の既知の抗体配列由来の同族免疫グロブリンコード配列を設計するためにある種（例えばヒト）中の特定の免疫グロブリンコード配列のライブラリーをスクリーニングすることができる。

20

30

40

【0139】

ハイブリドーマからの重鎖および軽鎖転写物のヌクレオチド配列を使用して、天然配列と同一のアミノ酸コード化能を有する合成V配列をつくり出すために合成オリゴヌクレオチドのオーバーラップセットを設計する。合成重鎖およびκ鎖配列は3つの点で天然配列とは異なりうる： 反復ヌクレオチド塩基のストリングを妨害してオリゴヌクレオチド合

50

成および P C R 増幅を容易にする；最適な翻訳開始部位は K o z a k の規則（Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266L19867019870）に従って導入され；また H i n d I I I 部位が翻訳開始部位の上流に遺伝子操作される。

【 0 1 4 0 】

重鎖および軽鎖可変領域の両方に対して、最適なされたコード化および対応する非コード化ストランド配列が対応する非コードオリゴヌクレオチドのおよそ中間点で 3 0 - 5 0 のヌクレオチドに分解される。よって、各鎖に対して、オリゴヌクレオチドを、1 5 0 - 4 0 0 ヌクレオチドのセグメントをスパンするオーバーラップ二本鎖セットに組み立てることができる。ついで、プールを鋳型として使用して、1 5 0 - 4 0 0 ヌクレオチドの P C R 増幅産物をつくり出す。典型的には、単一の可変領域オリゴヌクレオチドセットを、二つのオーバーラップする P C R 産物を生成するために別個に増幅される二つのプールに分ける。ついで、これらのオーバーラップ産物を P C R 増幅によって組み合わせて完全な可変領域を形成する。発現ベクターコンストラクト中に簡単にクローニングされうるフラグメントを産生するために、P C R 増幅に重鎖または軽鎖定常領域のオーバーラップフラグメントを含むことが望ましいこともある。

10

【 0 1 4 1 】

再構築された重鎖および軽鎖可変領域についてクローン化プロモーター、リーダー配列、翻訳開始、リーダー配列、定常領域、3' 未翻訳、ポリアデニル化、および転写終結配列と組み合わせて、発現ベクターコンストラクトを形成する。重鎖および軽鎖発現コンストラクトを単一ベクターに組合せ、宿主細胞中に同時転写させ、連続的に転写させ、または別個に転写させて、これをついで融合させて、両方の鎖を発現する宿主細胞を形成することができる。

20

【 0 1 4 2 】

この使用のためのプラスミドは、当該技術分野において公知である。本発明の完全なヒトおよびキメラ抗体はまた I g G 2、I g G 3、I g E、I g A、I g M、および I g D 抗体を含む。同様のプラスミドが、他の重鎖アイソタイプの発現のため、または λ 軽鎖を含む抗体の発現のために構築され得る。

【 0 1 4 3 】

したがって、本発明の別の局面において、既知の非ヒトまたはヒト抗体（例えば、マウス抗ヒト P D - L 1 / P D - L 2 抗体）の構造的特徴を用いて、例えば P D - L 1 および P D - L 2 への結合といった、本発明の抗体の少なくとも一つの機能的性質を保持する構造的に関連したヒト抗ヒト P D - L 1 / P D - L 2 抗体が作製することができる。他の機能的な性質は、競合 E L I S A アッセイでの、もともと公知の非ヒトまたはヒト抗体の結合の抑制を含む。さらに、1 以上の C D R または可変領域（例えば、表 1 の配列、またはその一部を含む）は、本発明の更なる組み換え的に操作されたヒト抗 P D - L 1 / P D - L 2 抗体をつくり出すために既知のヒトフレームワーク領域および C D R s と組み換え的に組み合わせることができる。

30

【 0 1 4 4 】

抗体の重鎖および軽鎖 C D R 3 ドメインが抗原に対する抗体の結合特異性 / 親和性における特に重要な役割を果たしていることがよく知られているので、上に記載されたようにして調製された本発明の組み換え抗体は、本発明の可変領域の重鎖および軽鎖 C D R 3 s（例えば、表 1 の配列、またはその一部を含む）を含むことが好ましい。抗体は本発明の可変領域の C D R 2 s（例えば、表 1 の配列、またはその一部を含む）を含むことができる。抗体は更に本発明の可変領域の C D R 1 s（例えば、表 1 の配列、またはその一部を含む）を含むことができる。他のいくつかの実施態様では、抗体は更に C D R s の任意の組合せを含むことができる。

40

【 0 1 4 5 】

上述の遺伝子操作された抗体の C D R 1、2、および / または 3 領域は、ここに開示された本発明の可変領域（例えば、表 1 の配列、またはその一部を含む）のものとして正確なアミノ酸配列を含み得る。しかしながら、当業者は、P D - L 1 および / または P D -

50

L2に効果的に結合する抗体の能力を依然として保持しつつ、正確なCDR配列からの幾らかの逸脱（例えば、保存的配列修飾）が可能な場合があることを理解するであろう。したがって、別の実施態様では、操作された抗体は、本発明の一または複数のCDRs（例えば、表1の配列、またはその一部を含む）と例えば50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または99.5%同一である一または複数のCDRsからなりうる。

【0146】

本明細書に記載の非ヒトまたはヒト抗体の構造的特徴を用いて、例えば、ヒトPD-L1およびPD-L2の両方との結合のような、本発明の抗体の少なくとも一つの機能的性質を保持する構造的に関連したヒト抗体を創作することができる。別の機能的性質としては、もともと知られている組成物中の非ヒトまたはヒトPD-L1および/またはPD-L2抗体のELISAアッセイでの結合の抑制がある。表1は、組み換え抗体またはその抗原結合フラグメントがPD-L1およびPD-L2と結合する能力を維持する限り、いかなる組合せにおいても、混合、調和させることができる非常に多くのCDRを含有する非常に多くのvKおよびvH配列を示す。

10

【0147】

いくつかの実施態様では、ヒトPD-L1とPD-L2を結合することが可能なモノクローナル抗体であって、可変ドメインが、表1に記載の重鎖可変ドメインCDRの群と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%または100%同一の配列を有する、少なくともC

20

【0148】

同様に、ヒトPD-L1とPD-L2を結合することが可能なモノクローナル抗体であって、可変ドメインが、表1に記載の軽鎖可変ドメインCDRの群と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%または100%同一の配列を有する、少なくとも1つのCDRを含む軽鎖を含む、モノクローナル抗体が提供される。

【0149】

ヒトPD-L1とPD-L2を結合することが可能なモノクローナル抗体であって、可変ドメインが、表1に記載の重鎖可変ドメインCDRの群と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%または100%同一の配列を有する、少なくともCDRを含む重鎖、およびヒトPD-L1とPD-L2を結合することが可能なモノクローナル抗体であって、可変ドメインが、表1に記載の軽鎖可変ドメインCDRの群と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%または100%同一の配列を有する、少なくとも1つのCDRを含む軽鎖を含む、モノクローナル抗体を含む、モノクローナル抗体もまた提供される。

30

【0150】

所与のCDRにおいて、そのようなパーセンテージの相同性が均等であり、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上の保存的アミノ酸置換を導入することによって達成することができることを、当業者は理解するであろう。

40

【0151】

本発明のモノクローナル抗体は、可変ドメインが、表1に記載の重鎖可変ドメインCDRを含む重鎖可変ドメインCDRからなる群から選択される配列を有する少なくとも1つのCDRを含む重鎖、および可変ドメインが、表1に記載の軽鎖可変ドメインCDRを含む軽鎖可変ドメインCDRからなる群から選択される配列を有する少なくとも1つのCDRを含むことができる。

【0152】

そのようなモノクローナル抗体は、可変ドメインが、本明細書に記載のCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3からなる群から選択される配列を有する少なくとも1

50

つのCDRを含む、軽鎖を含み；および/または可変ドメインが、本明細書に記載のCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3からなる群から選択される配列を有する少なくとも1つのCDRを含む、重鎖を含むことができる。いくつかの実施態様では、ヒトPD-L1とPD-L2を結合することが可能なモノクローナル抗体は、本明細書に記載のCDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含む、またはそれらからなる。

【0153】

本発明のモノクローナル抗体の重鎖可変ドメインは、表1に記載のvHアミノ酸配列を含むか、またはそれらからなり、および/または、本発明のモノクローナル抗体の軽鎖可変ドメインは、表1に記載のvKアミノ酸配列を含むか、またはそれらからなる。

10

【0154】

本発明はさらに、前記モノクローナル抗体のフラグメントを含み、それは、限定されないが、Fv、Fab、F(ab')₂、Fab'、dsFv、scFv、sc(Fv)₂およびジアボディ；抗体フラグメントから構成される多重特異性抗体を含む。例えば、CTLA-4などの免疫抑制性分子は、二重特異的または多重特異的方法によって結合可能である。

【0155】

本発明のモノクローナル抗体の他のフラグメントも検討する。例えば、その可変ドメインが、少なくとも、表1に提示したCDRを含む個別の免疫グロブリン重鎖および/または軽鎖が提供される。ある実施態様では、免疫グロブリン重鎖は、表1に提示した重鎖または軽鎖可変ドメインCDRの群と、少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%または100%同一の配列を有する少なくとも1つのCDRを含む。別の実施態様では、本明細書に記載した（例えば、表1に提示された）軽鎖または重鎖可変ドメインCDRと少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%または100%同一の配列を有するCDRを少なくとも含む免疫グロブリン軽鎖が提供される。

20

【0156】

いくつかの実施態様では、免疫グロブリン重鎖および/または軽鎖は、本明細書に記載のCDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2、またはCDR-H3の少なくとも1つを含む可変ドメインを含む。そのような免疫グロブリン重鎖は、CDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3の少なくとも1つを含むことができる、またはそれらからなり得る。免疫グロブリン軽鎖は、CDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3の少なくとも1つを含むことができる、またはそれらからなり得る。

30

【0157】

他のいくつかの実施態様では、本発明の免疫グロブリン重鎖および/または軽鎖は、表1にそれぞれ提示されているvHまたはvK可変ドメイン配列を含む、またはそれらからなる。

【0158】

本発明はさらに、本明細書に記載の、vH可変ドメイン、vK可変ドメイン、CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3配列からなる群から選択される配列を有するポリペプチドを提供する。

40

【0159】

本発明の抗体、免疫グロブリン、およびポリペプチドは、単離された（例えば、精製された）形態、または膜もしくは脂質小胞（例えば、リボソーム）などのベクターに含有された形態で 사용할ことができる。

【0160】

本明細書に記載の抗体のアミノ酸配列の修飾について検討する。例えば、結合親和性および/または抗体の他の生物学的性質を向上させることが望ましい。非ヒト動物由来の抗

50

体のVHおよびVL中のCDRのみをヒト抗体VHおよびVLのFRに単に移植することによってヒト化抗体が作成される場合、抗原結合活性が非ヒト動物由来の元の抗体と比較して減少することは公知である。いくつかのアミノ酸残基では、CDRs中のみならずFRs中の、非ヒト抗体のVHおよびVLは、直接的または間接的に抗原結合活性と関連すると考えられる。したがって、これらアミノ酸残基の、ヒト抗体のVHおよびVLのFRに由来する異なるアミノ酸残基への置換は、結合活性を減少させるであろうが、非ヒト動物由来の元の抗体のアミノ酸残基とのアミノ酸の置換によって修正することができる。

【0161】

修飾および変更は、本発明の抗体の構造、およびそれらをコードするDNA配列において行ってもよく、そうした場合もなお望ましい特徴をもつ抗体およびポリペプチドをコードする機能性分子が取得される。例えば、いくつかの特定のアミノ酸を、感知され得る活性の損失もなく、タンパク質構造において他のアミノ酸と置換し得る。タンパク質の相互作用の能力および性質が、タンパク質の生物学的機能性を規定するので、特定のアミノ酸置換は、タンパク質配列中、そしてもちろんその配列をコードするDNA中で行うことができ、それでもなお好ましい性質をもつタンパク質が得られる。したがって、種々の変更を、感知され得る活性の損失もなく、本発明の抗体配列中、または、前記ポリペプチドをコードする対応するDNA配列中に行い得る。

10

【0162】

ポリペプチドのアミノ配列において変更を行う際、アミノ酸の疎水性親水性指標を検討してもよい。タンパク質に相互作用的な生物学的機能を授与する際の疎水性親水性アミノ酸指標の重要性は、当該技術において一般的に理解されている。アミノ酸の相対的な疎水性親水性は、得られるタンパク質の2次構造に寄与し、ひいては、タンパク質と他の分子、例えば、酵素、基質、受容体、DNA、抗体、抗原などとの相互作用に寄与するとされている。各アミノ酸は、その疎水性および電荷特性に基づいて疎水性親水性指標を割り当てられている：イソロイシン(+4.5)；バリン(+4.2)；ロイシン(+3.8)；フェニルアラニン(+2.8)；システイン/シスチン(+2.5)；メチオニン(+1.9)；アラニン(+1.8)；グリシン(-0.4)；トレオニン(-0.7)；セリン(-0.8)；トリプトファン(-0.9)；チロシン(-1.3)；プロリン(-1.6)；ヒスチジン(-3.2)；グルタミン酸(-3.5)；グルタミン(-3.5)；アスパラギン酸(<RTI3.5)；アスパラギン(-3.5)；リジン(-3.9)；およびアルギニン(-4.5)。

20

30

【0163】

当該技術においては、いくつかの特定のアミノ酸が類似の疎水性親水性指標またはスコアをもつその他のアミノ酸により置換され、なおも類似の生物学的活性をもつタンパク質を結果としてもたらず、すなわちなおも生物学的機能が等価であるタンパク質を得ることができる、ということは公知である。

【0164】

したがって、上で概略的に記した通り、アミノ酸置換は一般に、例えばその疎水性、親水性、電荷、サイズなどといったアミノ酸側鎖置換基の相対的な類似性に基づいている。上述の特性のうちの様々な特性を考慮する例示的置換は、当業者にとっては公知であり、アルギニンとリジン；グルタミン酸塩とアスパラギン酸塩；セリンとトレオニン；グルタミンとアスパラギン；およびバリン、ロイシンとイソロイシンが含まれる。

40

【0165】

本発明の抗体のアミノ酸修飾のもう1つのタイプは、抗体の原初のグリコシル化パターンを改変する、例えば、安定性を増加させるために有用であり得る。「改変する」という用語は、抗体の中に見出される1つ以上の炭水化物部分を削除することおよび/または抗体内に存在しない1つ以上のグリコシル化部位を添加することを意味する。抗体のグリコシル化は、典型的にはN連結である。「N連結」というのは、アスパラギン残基の側鎖に対する炭水化物部分の付着を意味する。Xがプロリンを除く任意のアミノ酸であるトリペプチド配列アスパラギン-X-セリンおよびアスパラギン-X-トレオニンは、アスパラ

50

ギン側鎖に対する炭水化物部分の酵素付着のための認識配列である。このようにして、ポリペプチド内のこれらのトリペプチド配列のいずれかの存在は、潜在的なグリコシル化部位を作り出す。抗体に対するグリコシル化部位の添加は、それが（N連結グリコシル化部位のために）上述のトリペプチド配列のうちの1つ以上のもを含んでいるような形でアミノ酸配列を改変させることによってうまく達成される。別のタイプの共有結合修飾には、抗体に対して化学的にまたは酵素によりグリコシドをカップリングすることが関与する。これらの手順は、NまたはO連結のグリコシル化についてのグリコシル化能力をもつ宿主細胞内での抗体の産生を必要としないという点において有利である。使用されるカップリング様式に応じて、糖（単複）を（a）アルギニンおよびヒスチジン、（b）遊離カルボキシル基、（c）システインのものといったような遊離スルフヒドリル基、（d）セリン、トレオニン、オルヒドロキシプロリンのものといったような遊離ヒドロキシル基、（e）フェニルアラニン、チロシンまたはトリプトファンのものといったような芳香族残基、または（f）グルタミンのアミド基に対し付着させてよい。例えば、このような方法は国際公開第87/05330号に記載されている。

【0166】

同様に、抗体上に存在するあらゆる炭水化物部分の除去は、化学的かまたは酵素的に達成可能である。化学的脱グリコシル化には、化合物トリフルオロメタンスルホン酸または等価の化合物に対する抗体の曝露が必要である。この処理の結果、抗体を無傷のままに残しながら、連結する糖以外の大部分または全ての糖が分割されることになる（N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミン）。化学的脱グリコシル化については、Sojahnら(1987)およびEdgeら(1981)。抗体上の炭水化物部分の酵素分割は、Thotakura, NR.ら(1987年)により記述されているように、さまざまなエンドおよびエキソグリコシダーゼを使用することによって達成可能である。

【0167】

抗体のもう1つのタイプの共有結合修飾には、米国特許第4,640,835号；第4,496,689号；第4,301,144号；第4,670,417号；第4,791,192号、または第4,179,337号で示されているやり方での、例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールまたはポリオキシアルキレンといったようなさまざまな非タンパク性重合体の1つに抗体を連結させることが含まれる。

【0168】

細胞毒性剤または成長阻害剤と本発明の抗体のコンジュゲーションは、限定されないが、N-スクシンイミジル（2-ピリジルジチオ）プロピオネート（SPDP）、スクシンイミジル（N-マレイミドメチル）シクロヘキサン-1-カルボキシレート、イミノチオラン（IT）、イミドエステルの二官能性誘導体（例えばジメチルアジビデートHCL）、活性エステル（例えばジスクシンイミジルスベレート）、アルデヒド（例えば、グルタルアルデヒド）、bis-アジド化合物（例えば、bis（p-アジドベンゾイル）ヘキサジアミン）、bis-ジアゾニウム誘導体（例えば、bis-（p-ジアゾニウムベンゾイル）-エチレンジアミン）、ジイソシアネート（例えば、トリエン2,6ジイソシアネート）、およびbis-活性フッ素化合物（例えば1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼンを含むさまざまな2機能性タンパク質カップリング剤を用いて行なうことができる。例えば、炭素標識された1-イソチオシアナトベンジルメチルジエチレントリアミンペンタ酢酸（MX-DTPA）は、抗体に対する放射性ヌクレオチドのコンジュゲーションのための例示的キレート剤である（国際公開第94/11026号）。

【0169】

別の局面において、本発明は、細胞毒素、薬剤および/または放射性同位体等の治療用部分とコンジュゲートされた抗体を特徴とする。細胞毒素にコンジュゲートされると、これらの抗体コンジュゲートは、「免疫毒素」と称される。細胞毒素または細胞傷害剤には、細胞に有害な（例えば、細胞を死滅させる）あらゆる作用物質が含まれる。例えば、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンB、エチジウムブロミド、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ド

10

20

30

40

50

キソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびビューロマイシン、並びにそのアナログまたはホモログが挙げられる。治療薬としては、限定されないが、代謝拮抗剤（例えば、メトトレキセート、6-メルカプトブリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシル、デカルバジン）、アルキル化剤（例えばメクロレタミン、チオエパ（thioepa）、クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（BSNU）およびロムスチン（CCNU）、シクロトスファミド（cyclophosphamide）、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、およびシス-ジクロロジアミン白金（II）（DDP）、シスプラチン）、アントラサイクリン（例えば、ダウノルピシン（旧称ダウノマイシン）およびドキシソルピシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（旧称アクチノマイシン）、プレオマイシン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン（AMC））、および有糸分裂阻害剤（例えば、ビンクリスチンおよびビンブラスチン）が含まれる。本発明の抗体を、放射性同位体、例えば放射性ヨウ素にコンジュゲートして、関連疾患、例えば癌の治療のための細胞傷害性放射性薬剤を生成することも可能である。

【0170】

コンジュゲートされた抗体は、例えば所定の治療計画の効果を決定するために、臨床試験手順の一部として組織中のポリペプチドレベルをモニターするために診断的にまたは予防的に使用することができる。検出は、検出可能な基質に抗体をカップリング（すなわち、物理的に連結）させることによって容易になされ得る。検出可能な物質の例は、様々な酵素、補欠分子団、蛍光材料、発光材料、生物発光材料、および放射性材料を含む。好適な酵素の例は、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、P-ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼを含み；好適な補欠分子団複合体の例はストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンを含み；好適な蛍光材料の例はウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシルまたはフィコエリトリン（PE）を含み；発光材料の例はルミノールを含み；生物発光材料の例はルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンを含み、および好適な放射性材料の例は¹²⁵I、¹³¹I、³⁵Sまたは³Hを含む。本明細書で用いられる場合、抗体に関する「標識された」という用語は、抗体に対して放射性作用物質または蛍光プローブ（例えばフルオロセインイソチオシアネート（FITC）またはフィコエリスリン（PE）またはインドシアニン（Cy5））といったような検出可能な物質をカップリング（すなわち物理的連結）することによる抗体の直接的標識、ならびに検出可能な物質との反応性による抗体の間接的標識を包含するように意図されている。

【0171】

本発明の抗体コンジュゲートを用いて、所定の生物学的反応を修飾することも可能である。治療用部分は、古典的な化学療法剤に限定されると解釈されてはならない。例えば、薬剤部分は、所望の生物学的活性を有するタンパク質またはポリペプチドであり得る。このようなタンパク質は、例えば、酵素的に活性な毒素、またはその活性フラグメント、例えばアブリン、リシンA、シュードモナス外毒素、またはジフテリア毒素；腫瘍壊死因子またはインターフェロン-γなどのタンパク質；または生物学的反応修飾剤、例えばリンホカイン、インターロイキン-1（「IL-1」）、インターロイキン-2（「IL-2」）、インターロイキン-6（「IL-6」）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（「GM-CSF」）、顆粒球コロニー刺激因子（「G-CSF」）、または他のサイトカインまたは増殖因子であってもよい。

【0172】

このような治療用部分を抗体にコンジュゲートさせるための技術は公知であり、例えば、Arnonら、"Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeldら編, pp. 243-56 (Ala

10

20

30

40

50

n R. Liss, Inc. 1985) ; Hellstromら, "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (第2版), Robinsonら編, pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987) ; Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pincheiraら編, pp. 475-506 (1985) ; "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwinら編, pp. 303-16 (Academic Press 1985), およびThorpeら, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62: 119-58 (1982) を参照されたい。

【0173】

いくつかの実施態様では、コンジュゲートは、細胞内の細胞毒性剤または成長阻害剤の放出を容易にする「分割可能なリンカー」を用いて行うことができる。例えば、酸に不安定なリンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、光解離性リンカー、ジメチルリンカーまたはジスルフィド含有リンカー（例えば、米国特許第5,208,020号参照）を使用してよい。別法として、組み換え型技術またはペプチド合成により、抗体および細胞毒性剤または成長阻害剤を含む融合タンパク質を作ることができる。DNAの長さは、コンジュゲートの所望の物性を破壊しないリンカーペプチドをコードする領域により分離されているかまたは互いに隣接しているコンジュゲートの2つの部分をコードするそれぞれの領域を含んでよい。

【0174】

単にPD-L1とPD-L2を結合することに加えて、抗体、例えば、本明細書に記載の抗体を、それらがPD-L1およびPD-L2機能、例えば、FoxP3発現の改変、ERK1またはERK2のリン酸化の改変、PKC- θ のリン酸化の改変、SHP-2のリン酸化の改変、サイトカイン産生の改変、および細胞増殖および/または転移の改変に対する作用に関連付けて選択してもよい。が決定される。

【0175】

いくつかの実施態様では、試験化合物は、(a) PD-L2/RGMbシグナリングをアップレギュレートし、それによってERK1またはERK2のリン酸化をダウンレギュレートする作用；(b) PD-L2/RGMbシグナリングをダウンレギュレートし、それによってERK1またはERK2のリン酸化をアップレギュレートする作用；(c) PD-L2/RGMbシグナリングをアップレギュレートし、それによってPKC- θ のリン酸化ダウンレギュレートする作用；(d) PD-L2/RGMbシグナリングをダウンレギュレートし、それによってPKC- θ のリン酸化アップレギュレートする作用；(e) PD-L2/RGMbシグナリングをアップレギュレートし、それによってSHSP-2のリン酸化をアップレギュレートする作用；そして(f) PD-L2/RGMbシグナリングをダウンレギュレートし、それによってSHP-2のリン酸化をダウンレギュレートする作用からなる群から選択される作用を持つ。。

【0176】

FoxP3、ERK1/ERK2、PKC- θ 、およびSHP-2は当該技術分野において公知である。例えば、FOX P3は、B細胞、T細胞およびCD25+/CD4+調節T細胞の発達を調節する役割を持つ。それは、成人T細胞性白血病/リンパ腫において発現し、免疫寛容をコントロールする調節T細胞(Treg)の集団のマーカーとして広く使用され、腫瘍細胞の宿主反応回避を可能にしている(Bignone and Banham (2008) EOBT 8: 1897-1920)。SHP-2(Syp、SHPTP2、PTP2C、PTPN11、PTP1D、およびBPTP3としても知られる)は、非膜チロシンホスファターゼのファミリーのメンバーである(米国特許第5,589,375号および米国特許第5,831,009号)。SHPタンパク質は、ホスホチロシル残基結合によるタンパク質-タンパク質相互作用を促進する、Srcタンパク質チロシンキナーゼにおいて本来的に同定される約100個のアミノ酸の保存された領域である2つのsrcホモロジー2(SH2)ドメインを含む(Neel, Semin. Cell. Bioi. 4: 419-432 (1993))。これら2つの

10

20

30

40

50

ドメインは、SHP-2ホスファターゼの調節において異なる機能を示し、その結果異なるシグナリング経路に影響を及ぼすことが示されている。N末端SHドメインは、内部触媒ホスファターゼドメインとの分子間相互作用により自己抑制効果を生じる調節および補充ドメインとして作用する。一方、C末端SH2ドメインは、シグナル伝達に必要な分子間相互作用のための他のタンパク質を補充すべく作用するにすぎない (Peiら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:1141-1145 (1996))。SHP-2分子のリン酸化状態により、そのリン酸化活性が調節される。SH2含有ホスファターゼを含むタンパク質-チロシンホスファターゼは、ヒトを含む哺乳動物などの多様な種から酵母およびツメガエル属に至る真核生物間で高度に保存されている。タンパク質-チロシンホスファターゼの変異および変化した発現が、腫瘍疾患および発生異常などの多くの病理学的症状に関連している (Tonks, N.Kら、Cell 87:365-368 (1996); Neel, B. G. ら、Curr. Opin. Cell Biol. 9:193-204 (1997); Li, J. ら、Science 275:1943-1947 (1997))。SHP-2は、異常な免疫反応において重要な役割を果たすことが示されている (例えば、アレルギー反応において (Pazdrakら、J. Exp. Med. 186:561-568 (1997))。SHP-2分子のリン酸化は、PD-1を経るシグナリングの指標である。SHP-2のリン酸化は、制限するものでなく、PAGEゲル上でのSHP-2分子の変化した移動の検出、リン酸化アッセイ、およびSHP-2分子の活性を測定するアッセイを含む当該分野で公知の方法により容易に検出され得る。SHP-2のリン酸化の検出は直接的であってよく、または別法として、例えば、下流の活性または現象の検出など、間接的であってよい。

【0177】

ERK1およびERK2 (MAPK1およびMAPKとしても知られる) はそれ自身がキナーゼである (Boultonら、Cell 65:663-675 (1991))。ERK分子の活性化は、セリン/トレオニンリン酸化またはチロシンリン酸化による。ERK1および2の活性化の抑制は、ERK1および2分子の上流のリン酸化の抑制の結果生じ、またはERK1および2を脱リン酸化して活性を減じるホスファターゼの活性化から生じることもある。ERKタンパク質は、二重特異性キナーゼであるMEK分子によるリン酸化により活性化されることが公知である。活性化に際して、ERK1およびERK2は核へと移動し、そこで、c-Myc、C/EBP β 、p62、TCF/ELK-1、ATF-2およびc-Junを含む種々の転写因子を直接リン酸化および活性化することができる。T細胞の活性化に際してのERK1および2分子のリン酸化状態/活性化状態は、PD-1を経るシグナリングの指標である。ERK1および2のリン酸化状態/活性化状態は、当該分野で容易に利用できるアッセイを用いて当業者により容易に決定され得る。例えば、ERK1および2分子のリン酸化状態は、p42/44 ERK1/2タンパク質のリン酸化形態に特異的な (ホスホ-Thr202/Tyr204特異的) 抗体、そのいくつかは市場で入手可能である、を用いて決定することができる。別法として、ERK1および2分子のリン酸化状態は、ゲルにおけるその移動により、リン酸化状態に関わらずERK1および2を認識する抗体を同定のために用いて決定することができる。別法として、ERK1および2の活性化状態は、ERK1および2分子のキナーゼ活性をアッセイすることにより決定することができる。ERK1および2のリン酸化/活性化状態の決定は、例えば、下流の活性または現象の検出など、間接的な方法によってもよい。

【0178】

PKCイソ酵素は、多くの細胞シグナリング現象において重要な役割を果たす。PKC- θ (PKC- θ 、PKCT、PRKCT、nPKC- θ 、およびPRKCQとしても知られる) は、セリン-トレオニンキナーゼのPKCファミリーのカルシウム非依存性イソ形態である。ネズミの胸腺細胞におけるPKC- θ タンパク質の一過性の過剰発現の結果、インターロイキン-2-プロモーター駆動性コンストラクトの転写の活性化が生じ (Baierら、Eur. J. Biochem. 225:195-203 (1994))、T細胞シグナリング経路におけるPKC- θ の役割が示される。PKC- θ もまた、T細胞レセプター媒介性のT細胞の活性の過程において活性化されることが示されており、この活性化はPKC- θ 分子の血漿膜へのAPC接触部位における移動と相関する (米国特許第6,040,152号)。PKC- θ

は、アポトーシス (Dattaら、J. Biol. Chem. 272 : 20317-20320 (1997))、細胞骨格の編成 (Pietromonacoら、J. Biol. Chem. 273 : 7594-7603 (1998) ; Simonsら、Biochem. Biophys. Res. Commun. 253 : 561-565 (1998))、増殖 (Passalacquaら、Biochem. J. 337 : 113-118 (1999))、および血管形成ならびに創傷治癒 (Tangら、J. Biol. Chem. 272 : 28704-28711 (1997))を含む他の細胞プロセスにも関与している。リン酸化状態は、PKC-θ分子の活性化状態を反映し、リン酸化は活性化を示す。PKC-θのリン酸化状態/活性化状態は、当該分野で容易に利用できるアッセイを用いて当業者により容易に決定され得る。例えば、PKC-θ分子のリン酸化状態は、市場で入手可能な、PKC-θタンパク質のリン酸化形態に特異的な抗体 (例えば、抗-ホスホT538) を用いて決定することができる。別法として、PKC-θ分子のリン酸化状態は、ゲルにおけるその移動により、PKC-θを (リン酸化状態に関わらず) 認識する抗体を検出のために用いて、決定することができる。別法として、PKC-θの活性化状態は、PKC-θ分子のキナーゼ活性をアッセイすることにより (Kupferら、米国特許No. 6,040,152号)、またはAPC接触点における膜への移動をアッセイすることにより (Kupferら、米国特許No. 6,040,152号) 決定することができる。PKC-θリン酸化/活性化状態の決定は、下流の活性または現象の検出など、間接的な方法によってもよい。

10

【0179】

I V . 組み換え発現ベクターおよび宿主細胞

本発明の他の態様は、本発明のポリペプチド (例えば、表1記載の配列またはその一部を含む) をコードする核酸分子を含有するベクター、好ましくは発現ベクターに関する。ここで使用される場合、「ベクター」という用語は、それが結合した他の核酸を輸送することができる核酸分子を意味する。ベクターの一つのタイプは、更なるDNAセグメントがライゲートされ得る円形の二本鎖DNAストランドDNAループを意味する「プラスミド」である。ベクターの他のタイプは、更なるDNAセグメントがウイルスゲノム中にライゲートされ得るウイルスベクターである。ある種のベクターはそれらが導入される宿主細胞中において自律増殖可能である (例えば、細菌の複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソード哺乳動物ベクター)。他のベクター (例えば、非エピソード哺乳動物ベクター) が宿主細胞中への導入時に宿主細胞のゲノム中に組み込まれ、それによって宿主ゲノムとともに複製される。更に、ある種のベクターは、それらが作用可能に結合した遺伝子の発現を指向し得る。そのようなベクターをここでは、「発現ベクター」と称する。一般に、組み換えDNA技術において利用できる発現ベクターはしばしばプラスミドの形態である。本明細書において、「プラスミド」と「ベクター」は、プラスミドがベクターの最も一般的に使用される形態であるので、交換可能に使用され得る。しかしながら、本発明は、均等な機能を発揮する、例えばウイルスベクター (例えば複製欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス) のような、発現ベクターの他の形態も含むものとする。

20

30

【0180】

本発明の組み換え発現ベクターは、宿主細胞における核酸の発現に適した形態の発明の核酸を含み、これは、組み換え発現ベクターが、発現される核酸に作用可能に連結され、発現に使用される宿主細胞に基づいて選択される一または複数の調節配列を含んでいることを意味する。組み換え発現ベクターにおいて、「作用可能に連結する」とは、対象とするヌクレオチド配列がヌクレオチド配列の発現を (例えば、インビトロ転写/翻訳系においてまたはベクターが宿主細胞に導入されるときに宿主細胞において) 可能にする形で調節配列に連結されていることを意味する。用語「調節配列」は、プロモーター、エンハンサーおよび他の発現コントロールエレメント (例えば、ポリアデニル化シグナル) を含む。そのような調節配列については、例えばGoeddel (1990) Methods Enzymol. 185 : 3-7に記載がある。調節配列は、多くのタイプの宿主細胞におけるヌクレオチド配列の構成的発現を指示するもの、およびある種の宿主細胞においてのみヌクレオチド配列の発現を指示するもの (例えば、組織特異的調節配列) を含む。発現ベクターの設計は、形質転換される宿主細胞の選択、所望されるタンパク質の発現量等のような因子に依存し得ることが当

40

50

業者には理解されるであろう。本発明の発現ベクターを宿主細胞中に導入し、それによって、ここに記載された核酸によってコードされる融合タンパク質またはペプチドを含むタンパク質またはペプチドを作製することができる。

【0181】

本発明の組み換え発現ベクターは、原核生物または真核生物細胞において本発明のポリペプチド（例えば、表1記載の配列またはその一部を含む）を発現させるために設計され得る。例えば、ポリペプチドは、細菌細胞、例えば、エシェリヒア・コリ、昆虫細胞（バキュロウイルス発現ベクターを使用）、酵母細胞、または哺乳動物細胞において発現させることができる。適切な宿主細胞は上掲Goeddel（1990）においてさらに検討されている。別法として、例えば、T7プロモーター調節配列およびT7ポリメラーゼを使用して、

10

【0182】

原核生物中のポリペプチドの発現は、融合または非融合タンパク質の何れかの発現をせしめる構成的または誘導性プロモーターを含むベクターを用いてエシェリヒア・コリ中で最もしばしば実施される。融合ベクターは、通常は組み換えポリペプチドのアミノ末端に、そこにコードされたポリペプチドに多くのアミノ酸を付加する。そのような融合ベクターは、典型的には3つの目的を果たす：1）組み換えポリペプチドの発現を増大させること；2）組み換えポリペプチドの溶解性を増大させること；および3）アフィニティ精製におけるリガンドとして作用することによって組み換えポリペプチドの精製を助けること。しばしば、融合発現ベクターにおいては、タンパク質切断部位を、融合部分と組み換え

20

【0183】

適切な誘導性非融合エシェリヒア・コリ発現ベクターの例は、pTrc（Amannら（1988）Gene 69：301-315）およびpET11d（Studierら（1990）Methods Enzymol. 185：60-89）を含む。pTrcベクターからの標的遺伝子発現は、ハイブリッドtrp-lac融合プロモーターからの宿主RNAポリメラーゼ転写に依存する。pET11dベクターからの標的遺伝子発現は、同時発現されるウイルスRNAポリメラーゼ（T7gn1）によって媒介されるT7gn10-lac融合プロモーターからの転写に依存する。このウイルスポリメラーゼは、lacUV5プロモーターの転写制御下で常在プロファージを有するT7gn1遺伝子からの宿主株BL21（DE3）またはHMS174（DE3）によって供給される。

30

【0184】

エシェリヒア・コリにおける組み換えポリペプチド発現を最大にするための一つの方法は、組み換えポリペプチドをタンパク分解的に切断する能力が損なわれた宿主細菌においてポリペプチドを発現させることである（Gottesman, S.（1990）Methods Enzymol. 185：119-128）。他の方法は、発現ベクター中に挿入される核酸の核酸配列を、各アミノ酸に対する個々のコドンがエシェリヒア・コリにおいて優先的に利用されるものであるように改変することである（Wadaら（1992）Nucleic Acids Res. 20：2111-2118）。本発明の核酸配列のそのような改変は、標準的なDNA合成技術によって実施することができる。

40

【0185】

別の実施態様では、発現ベクターは酵母発現ベクターである。酵母出芽酵母（*S. cerevisiae*）中での発現のためのベクターの例は、pYepSec1（Baldariら（1987）EMB

50

O J. 6 : 229-234)、p M F a (Kurjan および Herskowitz (1982) Cell 30 : 933-943)、p J R Y 8 8 (Schultz ら (1987) Gene 54 : 113-123)、p Y E S 2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.)、および p i c Z (Invitrogen Corp Corp, San Diego, Calif.) を含む。

【 0 1 8 6 】

別法として、本発明のポリペプチド (例えば、表 1 記載の配列またはその一部を含む) は、バキュロウイルス発現ベクターを使用して昆虫細胞において発現され得る。培養された昆虫細胞 (例えば、S f 9 細胞) におけるポリペプチドの発現に利用可能なバキュロウイルスベクターは、p A c シリーズ (Smith ら (1983) Mol. Cell Biol. 3 : 2156-2165)、および p V L シリーズ (Lucklow および Summers (1989) Virology 170 : 31-39) を含む。

10

【 0 1 8 7 】

さらにまた別の実施態様では、本発明の核酸 (例えば、表 1 記載の配列またはその一部を含む) は、哺乳動物発現ベクターを使用して哺乳動物細胞において発現される。哺乳動物発現ベクターの例は、p C D M 8 (Seed, B. (1987) Nature 329 : 840) および p M T 2 P C (Kaufman ら (1987) EMBO J. 6 : 187-195) を含む。哺乳動物細胞において使用される場合、発現ベクターの制御機能はウイルス調節エレメントによってしばしばもたらされる。例えば、一般的に使用されるプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス 2、サイトメガロウイルスおよびサルウイルス 4 0 から誘導される。原核生物および真核生物細胞双方のための他の適切な発現系に対しては、Sambrook, J. ら, Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 第 2 版、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989 の 1 6 および 1 7 章を参照されたい。

20

【 0 1 8 8 】

別の実施態様では、組み換え哺乳動物発現ベクターは、特定の細胞型において優先的に核酸の発現を指示することができる (例えば、組織特異的調節エレメントを使用して核酸を発現させる)。組織特異的調節エレメントは当該分野で知られている。適切な組織特異的プロモーターの非限定的な例は、アルブミンプロモーター (肝臓特異的 ; Pinkert ら (1987) Genes Dev. 1 : 268-277)、リンパ系特異的プロモーター (Calame および Eaton (1988) Adv. Immunol. 43 : 235-275)、T 細胞レセプターの特定のプロモーター (Winoto および Baltimore (1989) EMBO J. 8 : 729-733) および免疫グロブリン (Banerji ら (1983) Cell 33 : 729-740 ; Queen および Baltimore (1983) Cell 33 : 741-748)、神経細胞特異的プロモーター (例えば、神経フィラメントプロモーター ; Byrne および Ruddle (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 5473-5477)、膵臓特異的プロモーター (Edlund ら (1985) Science 230 : 912-916)、および乳腺特異的プロモーター (例えば、乳清プロモーター ; 米国特許第 4,873,316 号、および欧州特許出願公開第 264,166 号) を含む。発生的に調節されるプロモーターもまた包含され、例えば、マウス hox プロモーター (Kessel および Gruss (1990) Science 249 : 374-379) および α - フェトプロテインプロモーター (Campes および Tilghman (1989) Genes Dev. 3 : 537-546) によるものである。

30

【 0 1 8 9 】

本発明の別の局面は、本発明の核酸分子 (例えば、表 1) が組み換え発現ベクターまたは宿主細胞のゲノムの特異的部位に相同的に組み込まれることを可能にする配列を含む核酸分子に導入される宿主細胞に関する。「宿主細胞」および「組み換え宿主細胞」という用語は、ここでは互換可能に使用される。そのような用語は、特定の対象細胞だけでなく、そのような細胞の子孫または潜在的な子孫をも意味することが理解される。ある種の修飾は、突然変異または環境的影響のために続く世代で生じ得るので、そのような子孫は、実際は親細胞と同一ではない場合があるが、本明細書で用いられる用語の範囲内に尚も含まれる。

40

【 0 1 9 0 】

宿主細胞は任意の原核生物または真核生物細胞であり得る。例えば、本発明のポリペプ

50

チド（例えば、表 1 記載の配列またはその一部を含む）は、細菌細胞、例えば、エシェリヒア・コリ、昆虫細胞、酵母または哺乳動物細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）またはCOS細胞）において発現され得る。他の適切な宿主細胞は当業者に知られている。

【0191】

ベクターDNAは一般的な形質転換またはトランスフェクト技術によって原核生物または真核生物細胞中に導入することができる。ここで使用される場合、「形質転換」および「トランスフェクト」という用語は、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウム共沈、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクト、リポフェクション、または電気穿孔法を含む、外来性核酸（例えば、DNA）を宿主細胞に導入するための様々な当該分野で認められている技術を意味するものである。宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトするための適切な方法は、Sambrookら（Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989）、および他の実験室マニュアルに見出すことができる。

【0192】

哺乳動物細胞の安定なトランスフェクトのためには、使用される発現ベクターおよびトランスフェクト技術に応じて、ほんの僅かの量の細胞が外来性DNAをそのゲノム中に組み込むことができることが知られている。これらの組み込み体を同定し選択するためには、選択可能マーカー（例えば、抗生物質に耐性のあるマーカー）をコードする遺伝子が一般に対象の遺伝子とともに宿主細胞中に導入される。好ましい選択可能マーカーは、薬剤に耐性を付与するもの、例えば、G418、ハイグロマイシンおよびメトトレキサートを含む。選択可能マーカーをコードする核酸は、PD-L1および/もしくはPD-L2ポリペプチドまたは抗PD-L1抗体および/もしくはPD-L2抗体ポリペプチドをコードするものと同じベクター上の宿主細胞中に導入することができ、または別個のベクターに導入することができる。導入された核酸で安定にトランスフェクトされた細胞を、薬剤選択によって同定することができる（例えば、選択可能マーカー遺伝子を導入した細胞は残存するが、他の細胞は死滅する）。

【0193】

本発明の宿主細胞、例えば培養中の原核生物または真核生物宿主細胞を、本発明のポリペプチド（例えば、表 1 記載の配列またはその一部を含む）の作製（すなわち、発現）のために使用することができる。したがって、本発明は、本発明の宿主細胞を使用して本発明のポリペプチド（例えば、表 1 記載の配列またはその一部を含む）を作製する方法を更に提供する。ある実施態様では、該方法は、（本発明のポリペプチド（例えば、表 1 記載の配列またはその一部を含む）をコードする組み換え発現ベクターが導入された）本発明の宿主細胞を適切な培地中で本発明のポリペプチド（例えば、表 1 記載の配列またはその一部を含む）が作製されるように培養することを含む。別の実施態様では、本発明は培地または宿主細胞から本発明のポリペプチド（例えば、表 1 記載の配列またはその一部を含む）を単離することを更に含む。

【0194】

本発明の宿主細胞をまた以下に記載のように使用して非ヒトトランスジェニック動物を生産することができる。

【0195】

V. 抗体コンジュゲート / 免疫毒素

別の局面において、本発明は、例えば細胞毒素、薬剤（例えば、免疫抑制剤）または放射性同位体などの療法用部分にコンジュゲートされた抗PD-L1 / PD-L2抗体を特徴とする。細胞毒素にコンジュゲートされると、これらの抗体コンジュゲートは、「免疫毒素」と称される。細胞毒素または細胞傷害剤には、細胞に有害な（例えば、細胞を死滅させる）あらゆる薬剤が含まれる。例としては、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンB、エチジウムブロミド、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒ

ドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシン D、1 - デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピューロマイシン、並びにそのアナログまたはホモログがある。治療剤には、限定されるものではないが、代謝拮抗剤（例えば、メトトレキサート、6 - メルカプトプリン、6 - チオグアニン、シタラビン、5 - フルオロウラシル、デカルバジン）、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオエパ（thioepa）、クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（BSNU）およびロムスチン（CCNU）、シクロトスファミド（cyclophosphamide）、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシン C、およびシス - ジクロロジアミン白金（II）（DDP）、シスプラチン）、アントラサイクリン（例えば、ダウノルビシン（旧称ダウノマイシン）およびドキシソルビシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（旧称アクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン（AMC））、および有糸分裂阻害剤（例えば、ビンクリスチンおよびビンブラスチン）が含まれる。本発明の抗体を、放射性同位体、例えば放射性ヨウ素にコンジュゲートして、関連疾患、例えば癌の治療のための細胞傷害性放射性薬剤を生成することも可能である。

【0196】

コンジュゲートされた抗 PD - L1 / PD - L2 抗体は、例えば所定の治療レジメンの効果を決定するために、臨床試験手順の一部として組織中のポリペプチドレベルをモニターするために診断的にまたは予後的に使用することができる。検出は、検出可能な基質に抗体をカップリング（すなわち、物理的に連結）させることによって容易になされ得る。検出可能な物質の例は、様々な酵素、補欠分子団、蛍光材料、発光材料、生物発光材料、および放射性材料を含む。適切な酵素の例は、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、P - ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼを含み；適切な補欠分子団複合体の例はストレプトアビジン / ビオチンおよびアビジン / ビオチンを含み；適切な蛍光材料の例はウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシルまたはフィコエリトリンを含み；発光材料の例はルミノールを含み；生物発光材料の例はルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンを含み、および適切な放射性材料の例は ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S および ^3H を含む。

【0197】

本発明の抗体コンジュゲートを用いて、所定の生物学的反応を修飾することも可能である。治療用部分は、古典的な化学療法剤に限定されると解釈されてはならない。例えば、薬剤部分は、所望の生物学的活性を有するタンパク質またはポリペプチドであり得る。このようなタンパク質は、例えば、酵素的に活性な毒素、またはその活性フラグメント、例えばアブリン、リシン A、シュードモナス外毒素、またはジフテリア毒素；腫瘍壊死因子またはインターフェロン - γ などのタンパク質；または生物学的反応修飾剤、例えばリンホカイン、インターロイキン - 1（「IL - 1」）、インターロイキン - 2（「IL - 2」）、インターロイキン - 6（「IL - 6」）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（「GM - CSF」）、顆粒球コロニー刺激因子（「G - CSF」）、または他のサイトカインまたは増殖因子であってもよい。

【0198】

このような治療用部分を抗体にコンジュゲートさせるための技術は公知であり、例えば、Arnon ら、"Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld ら編, pp. 243 56 (Alan R. Liss, Inc. 1985) ; Hellstrom ら、"Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (第2版), Robinson ら編, pp. 623 53 (Marcel Dekker, Inc. 1987) ; Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pincheira ら編, pp. 475 506 (1985) ; "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Ant

10

20

30

40

50

bodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwinら編, pp. 303 16 (Academic Press 1985), およびThorpeら, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62: 119 58 (1982)を参照されたい。

【0199】

V I . 本発明の使用および方法

本明細書に記載の組成物(二重結合抗体、ならびにその誘導体およびコンジュゲートを含む)は、種々の治療的および予後的用途に使用することができる。例えば、多くのヒト疾患は、修飾された免疫応答(例えば、免疫応答のアップレギュレーションまたはダウンレギュレーション)から恩恵を受けるであろう。そしてこれは、単一の作用物質を用いるPD-L1およびPD-L2によって媒介される、免疫共抑制性シグナリング経路のネットワークを同時に修飾することによって効率的に達成することができる。したがって、本発明の組成物を用いた、PD-L1およびPD-L2によって媒介される免疫共抑制経路の結合および/またはシグナリングを修飾するための方法(例えば、以下から選択される1以上の相互作用の修飾:(a)PD-1に結合するPD-L1;(b)B7-1に結合するPD-L1;(c)PD-1に結合するPD-L2;(d)RGMbに結合するPD-L2;(e)PD-1に結合するPD-L1によって媒介される免疫共抑制性シグナル;(f)B7-1に結合するPD-L1によって媒介される免疫共抑制性シグナル;(g)PD-1に結合するPD-L2によって媒介される免疫共抑制性シグナル;および(h)RGMbに結合するPD-L2によって媒介される免疫共抑制性シグナル)を検討する。さらに、本発明の組成物を用いたPD-L1およびPD-L2の生物学的活性を修飾する方法を検討する。特に、ここに記載の本発明の組成物(例えば、抗PD-L1/PD-L2抗体)は、PD-L1およびPD-L2によって媒介される特定の状態に関連する治療的および予後的用途に有用である。

【0200】

いくつかの実施態様では、抗体は、ELISAまたはRIAにおいて抗体を使用するための部品またはデバイスに関連する。限定されない例としては、アッセイに用いる固体表面に固定された抗体(例えば、上述した発光または放射に基づき検出可能な標識に結合された、および/またはコンジュゲートされたもの)が挙げられる。他のいくつかの実施態様では、抗体は、例えば、「サンドイッチ」もしくは競合アッセイなどの免疫クロマトグラフ分析または免疫化学アッセイを用いてPD-L1および/またはPD-L2を検出するためのデバイスまたは細片に関連する。そのようなデバイスまたは細片のさらに別の例としては、自宅での検査や、迅速ポイント・オブ・ケア検査のためにデザインされたものがある。更なる例としては、単一のサンプル中の多数の分析物の同時分析のためにデザインされたものがある。例えば、標識されていない本発明の抗体を生物学的サンプル中の「捕捉」PD-L1および/またはPD-L2ポリペプチドに適用してもよいし、捕捉(もしくは固定)されたPD-L1および/またはPD-L2ポリペプチドを、標識された形態の、検出すべき本発明の抗体に結合させてもよい。他の標準的なイムノアッセイの態様が当業者において公知であり、それらには、例えば、免疫拡散、免疫電気泳動、免疫組織病理学、免疫組織化学、および組織病理学に基づくアッセイが含まれる。

【0201】

1 . スクリーニング方法

本発明の一面は、非細胞ベースのアッセイを含むスクリーニングアッセイに関する。ある実施態様では、アッセイは、PD-L1/PD-L1受容体および/またはPD-L2/PD-L2受容体(PD-L1およびPD-L2(例えば、(a)PD-1に結合するPD-L1;(b)B7-1に結合するPD-L1;(c)PD-1に結合するPD-L2;(d)RGMbに結合するPD-L2)の相互作用を調節する抗体を同定するための方法を提供する。別の実施態様では、アッセイは、PD-L1および/またはPD-L2の生物学的活性を調節する抗体を同定するための方法を提供する。

【0202】

ある実施態様では、本発明は、PD-L1および/またはPD-L2に結合し、または

その生物学的活性を調節する、例えば、ポリペプチドがその同族結合対と相互作用（例えば結合）する能力を調節する、候補または試験抗体をスクリーニングするためのアッセイに関する。ある実施態様では、免疫応答を調節する抗体を同定するための方法は、PD-L1 / PD-L1 受容体および / または PD-L2 / PD-L2 受容体（PD-L1 および PD-L2（例えば、（a）PD-L1 に結合する PD-L1；（b）B7-1 に結合する PD-L1；（c）PD-L1 に結合する PD-L2；（d）RGMb に結合する PD-L2）の相互作用を調節する、例えば、高めるまたは抑制する能力を決定するステップを伴う。

【0203】

ある実施態様では、アッセイは、無細胞アッセイであり、それは、PD-L1 または PD-L2 を試験抗体に接触させるステップと、試験抗体が、PD-L1 / PD-L1 受容体および / または PD-L2 / PD-L2 受容体（PD-L1 および PD-L2（例えば、（a）PD-L1 に結合する PD-L1；（b）B7-1 に結合する PD-L1；（c）PD-L1 に結合する PD-L2；（d）RGMb に結合する PD-L2）の間の相互作用を調節する（例えば、刺激する、または抑制する）能力を決定するステップを含む。PD-L1 / PD-L1 受容体および / または PD-L2 / PD-L2 受容体（PD-L1 および PD-L2（例えば、（a）PD-L1 に結合する PD-L1；（b）B7-1 に結合する PD-L1；（c）PD-L1 に結合する PD-L2；（d）RGMb に結合する PD-L2）の間の相互作用の調節の決定は、例えば、直接結合の測定、または、下記の間接パラメータの測定により、達成することができる。

【0204】

例えば、直接の結合アッセイでは、PD-L1 または PD-L2 タンパク質（またはその各標的ポリペプチドまたは分子）に放射性同位体または酵素標識をカップリングさせ、複合体中の標識されたタンパク質または分子を測定することによって決定することができる。例えば、標的は、PD-L1 または PD-L1 を ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、または ^3H で直接的または間接的に標識することができ、放射性同位体が放出放射能の直接の計数またはシンチレーションカウントにより検出される。別法では、標的は、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはルシフェラーゼで酵素的に標識され得、酵素標識が適切な基質の製造物への転化を決定することによって検出される。

【0205】

PD-L1 / PD-L1 受容体および / または PD-L2 / PD-L2 受容体（PD-L1 および PD-L2（例えば、（a）PD-L1 に結合する PD-L1；（b）B7-1 に結合する PD-L1；（c）PD-L1 に結合する PD-L2；（d）RGMb に結合する PD-L2）の間の相互作用の決定は、リアルタイム生体分子間相互作用解析（BIA）（Sjolander, S. および Urbaniczky, C. (1991) Anal. Chem. 63: 2338-2345 および Szabo (1995) Curr. Opin. Struct. Biol. 5: 699-705) のような技術を使用して達成することもできる。本明細書で用いられる場合、「BIA」は何れの相互作用体の標識もしないでリアルタイムで生体分子特異的相互作用を研究するための技術である（例えば、ピアコア）。表面プラズモン共鳴（SPR）の光学的現象の変化を、生物学的ポリペプチド間のリアルタイム反応の指標として使用することができる。PD-L1、PD-L1 リガンド、および B7 ポリペプチドをピアコアチップに固定させることができ、抗体を PD-L1、PD-L1 リガンド、および B7 ポリペプチドへの結合について試験することができる。BIA 技術を使用する例は、Fitz (1997) Oncogene 15: 613 に記載されている。

【0206】

上述のアッセイ方法の一または複数の態様では、ポリペプチドまたは分子を固定化して、タンパク質の一方または両方の未複合化形態からの複合化形態の分離を容易にし、ならびにアッセイの自動化に適応させることが望ましい場合がある。試験抗体の標的（例えば、PD-L1 または PD-L2）への結合は、反応体を含めるのに適した任意の容器において達成することができる。そのような容器の例としては、限定されないが、マイクロタイタプレート、試験管、および微量遠心管が挙げられる。本発明の固定化された形態の

抗体はまた、多孔性、微孔性の材料（平均孔径が約 1 ミクロン未満の材料）、または大孔材料（平均孔径が約 10 ミクロンより大きい材料）、例えば、メンブレン、セルロース、ニトロセルロース、もしくはガラス繊維；アガロースもしくはポリアクリルアミドもしくはラテックスのビーズ；または、例えばポリスチレン製のシャーレ、プレートもしくはウェルの表面といった固相に結合する抗体を含み得る。ある実施態様では、基質にタンパク質の一方または両方を結合させることを可能にするドメインを付加する融合タンパク質を提供することができる。例えば、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ / PD - L1 または PD - L2 融合タンパク質、またはグルタチオン - S - トランスフェラーゼ / 標的融合タンパク質を、グルタチオンセファロースビーズ（Sigma Chemical, St. Louis, MO）またはグルタチオン誘導体化マイクロタイタープレートに吸着させることができ、次にこれを試験化合物と組み合わせ、混合物を、複合体形成を助ける条件下（例えば、塩および pH について生理学的条件）でインキュベートすることができる。インキュベート後、ビーズまたはマイクロタイタープレートウェルを洗浄し、未結合成分、ビーズの場合は固定化された基質、直接的または間接的に定量された複合体を、例えば上述のように、除去する。別法として、複合体を基質から解離させることができ、PD - L1 および / または PD - L2 の結合性または活性のレベルを標準的な技術を使用して決定する。

10

20

30

40

50

【0207】

別の態様では、本発明の抗体が PD - L1 / PD - L1 受容体と PD - L2 / PD - L2 受容体（例えば、PD - L1 と PD - L2（例えば、（a）PD - L1 に結合する PD - L1；（b）B7 - 1 に結合する PD - L1；（c）PD - L1 に結合する PD - L2；（d）RGMb に結合する PD - L2）の間の相互作用を調節する能力を決定することは、PD - L1 および / または PD - L2 の下流で機能する、例えば、免疫共抑制に関連するシグナリングを行う、ポリペプチドまたは生成物の活性を調整する試験抗体の能力を決定することによって達成され得る。

【0208】

別の態様では、本発明の抗体が PD - L1 / PD - L1 受容体と PD - L2 / PD - L2 受容体（例えば、PD - L1 と PD - L2（例えば、（a）PD - L1 に結合する PD - L1；（b）B7 - 1 に結合する PD - L1；（c）PD - L1 に結合する PD - L2；（d）RGMb に結合する PD - L2）の間の相互作用を調節する能力を決定することは、PD - L1 -、B7 - 1 -、または RGMb - Ig 融合タンパク質の PD - L1 または PD - L2 トランスフェクト細胞への結合を調整する試験抗体の能力を決定することによって達成され得る。

【0209】

本発明はさらに、上述のスクリーニングアッセイによって同定される新規抗体に関する。したがって、適切な動物モデルにおいて本明細書に記載されたようにして同定された抗体を更に使用することも本発明の範囲に入る。例えば、本明細書に記載されたようにして同定された抗体を動物モデルで使用して、有効性、毒性、またはそのような抗体での治療の副作用を決定することができる。別法では、本明細書に記載されたようにして同定された抗体を動物モデルで使用して、そのような抗体の作用機序を決定することができる。更に、本発明は、本明細書において上述したスクリーニングアッセイによって同定される新規抗体の本明細書に記載の治療のための使用に関する。

【0210】

2. 予測医薬

本発明はまた、診断アッセイ、予後アッセイ、および臨床試験をモニターすることを診断（予測）目的のために用いて個体を予防的に治療する予測医薬の分野に関する。したがって、本発明の一面は、生物学的サンプル（例えば、血液、血清、細胞、組織）の内容物中での PD - L1 および / または PD - L2 もしくはそのフラグメントの発現および / または活性レベルを測定して、それにより個人が異常もしくは望ましくないバイオマーカーの発現または活性に関連する病気または疾患に罹患しているまたはそれに伴う疾患を進行させる危険にあるかどうかを決定するための診断アッセイに関する。発明によりさらに

、個体が、バイオマーカーポリペプチド、核酸発現、または活性に関連する疾患を進行させる危険にあるかどうかを決定するための診断（または予測）アッセイも提供される。例えば、バイオマーカー遺伝子における変異を生物学的サンプルにおいてアッセイすることができる。

【0211】

そのようなアッセイを診断または予測目的のために用いて、それによりバイオマーカーポリペプチド、核酸発現、または活性により特徴づけられる、または、それらに関連する疾患の発症前または再発後に、個体を予防的に治療することができる。

【0212】

本発明の別の局面は、臨床試験におけるPD-L1および/またはPD-L2、またはそのフラグメントの発現または活性における試薬（例えば、薬剤、化合物、および核酸ベースの小分子）の影響をモニターすることを含む。これらおよび他の試薬を以下のセクションにさらに詳細に記載する。

10

【0213】

3. 診断アッセイ

本発明は部分的に、生物学的サンプルがPD-L1および/またはPD-L2の異常な発現または活性に関連するか否かを正確に分類するための方法、システム、およびコードを提供する。いくつかの実施態様では、本発明は、PD-L1および/またはPD-L2により媒介される疾患または異常（PD-L1サンプルおよび/またはPD-L2サンプルとして知られる）を伴うまたは危険性のあるサンプル（例えば、被検体からのサンプル）の統計的アルゴリズムおよび/または実験データ（例えば、PD-L1および/またはPD-L2の有無またはレベル）を用いた分類に有用である。

20

【0214】

PD-L1および/またはPD-L2またはそのフラグメントの発現または活性のレベルを検出する、したがって、PD-L1および/またはPD-L2またはその臨床的サブタイプによって媒介される疾患または障害に関連するか否かを分類するのに有用な例示的方法は、試験対象から生物学的サンプルを取得し、その生物学的サンプルをPD-L1および/またはPD-L2を検出することができる本発明の抗体またはその抗原結合フラグメントと接触させることを含み、それによって生物学的サンプルにおいてPD-L1および/またはPD-L2の発現のレベルまたは活性が検出される。いくつかの実施態様では、少なくとも1つの抗体またはその抗原結合フラグメントが使用され、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上の抗体または抗体フラグメントを組み合わせる（例えば、サンドイッチELISAにおいて）、または連続して、使用することができる。いくつかの特定の例においては、統計的アルゴリズムは、単一の学習統計的分類システムである。例えば、単一の学習統計的分類システムは、サンプルをPD-L1サンプルおよび/またはPD-L2サンプルとして、予測または蓋然性値およびPD-L1および/またはPD-L2の有無またはレベルに基づいて、分類するために用いることができる。単一の学習統計的分類システムの使用は、典型的に、サンプルを、少なくとも約75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の、感受性、特異性、陰性的中率、陽性的中率、および/または総体的的確性を有するPD-L1サンプルおよび/またはPD-L2サンプル（例えば、慢性感染）サンプルとして分類する。

30

40

【0215】

他の好適な統計的アルゴリズムは、当該技術分野において公知である。例えば、学習統計的分類システムは、本明細書中で用いる場合、複合データの集合（例えば、着目したマーカーのパネル）に適用し、そしてこのようなデータの集合に基づいて判断を行なうことができる機械学習アルゴリズム技術を含む。いくつかの実施態様では、単一の学習統計的分類システム、例えば、分類木（例えば、ランダムフォレスト）を用いる。他の実施態様では、2種、3種、4種、5種、6種、7種、8種、9種、10種、またはそれ以

50

上の学習統計的分類子システムの組み合わせを、好ましくは直列に用いる。学習統計的分類子システムの例として、限定されないが、帰納学習（例えば、決定／分類木、例えば、ランダムフォレスト、分類および回帰木（C & R T）、ブースト型の木等）、Probably Approximately Correct（P A C）学習、コネクショニスト学習（例えば、ニューラルネットワーク（N N）、人工ニューラルネットワーク（A N N）、ニューロファジーネットワーク（N F N）、ネットワーク構造、パーセプトロン、例えば、多層パーセプトロン、多層フィードフォワードネットワーク、ニューラルネットワークのアプリケーション、信念ネットワーク（belief network）におけるベイジアン学習等）、強化学習（例えば、既知環境における受動的学習、例えば、純粋な学習（naive learning）、適応型動的学習、および時間差学習、未知環境における受動的学習、未知環境における能動的学習、行動 - 価値関数学習、強化学習のアプリケーション等）、および遺伝的アルゴリズムおよび進化的プログラミングを用いた学習統計的分類子システムを挙げることができる。他の学習統計的分類子システムとして、サポート・ベクター・マシーン（例えば、カーネル法）、多変量適応回帰スプライン（M A R S）、レーベンバーグ・マルカートアルゴリズム、ガウス・ニュートンアルゴリズム、ガウスの混合（mixtures of Gaussians）、勾配降下アルゴリズム、および学習ベクトル量子化（L V Q）を挙げることができる。いくつかの特定の実施態様では、本発明の方法はさらに、P D - L 1 サンプルおよび／または P D - L 2 サンプル分類結果を臨床医、例えば、胃腸病専門医や一般開業医に送信することを含む。

10

【0216】

別の実施態様では、本発明の方法はさらに、個体が P D - L 1 および／または P D - L 2 の異常な発現または活性に関連する状態または異常を持つ可能性の形式での診断を提供する。例えば、個体は、約 0 %、5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、またはそれ以上の蓋然性で当該状態または異常を持ち得る。さらにまた別の実施態様では、本発明の方法はさらに、個体における状態または異常の予後診断を提供する。いくつかの例では、サンプルを、P D - L 1 サンプルおよび／または P D - L 2 サンプルとして分類する方法は、さらにサンプルを取得した個体の症状（例えば、臨床的因子）に基づいている。症状または症状群には、例えば、下痢、腹痛、痙攣、発熱、貧血、体重減少、不安、鬱、およびこれらの組み合わせがある。いくつかの実施態様では、状態または異常（例えば、化学療法薬）に関連する 1 以上の症状を治療するのに有用な薬剤の治療的に有効な量を個体に投与した後に、個体が P D - L 1 および／または P D - L 2 の異常な発現または活性に伴う状態または異常を有すると診断する。

20

30

【0217】

ある実施態様では、方法は、対照生物学的サンプル（例えば、P D - L 1 および／または P D - L 2 によって媒介される状態または異常を持たない被検体からの生物学的サンプル）、P D - L 1 および／または P D - L 2 によって媒介される状態または異常の寛解中または発症前の被検体からの生物学的サンプル、または、P D - L 1 および／または P D - L 2 によって媒介される状態または異常の発症の治療中の被検体からの生物学的サンプルを取得するステップを含む。

40

【0218】

4. 予後アッセイ

本明細書に記載の診断法はさらに、P D - L 1 および／または P D - L 2 またはそのフラグメントの異常な発現または活性に関連する疾患や障害に罹患している、または発症する危険性のある被検体を確認するために利用することができる。本明細書で用いられる場合、「異常な」という語は、対照の正常な発現または活性から逸脱したバイオマーカー発現または活性のレベルを含む。

【0219】

先行診断アッセイまたは事後アッセイなどの、本明細書に記載のアッセイを用いて、例えば癌における P D - L 1 および／または P D - L 2 活性または発現の誤調節と関連する障害を有するか、または生じる危険性がある被検体を同定することができる。別法として

50

、予後アッセイを用いて、例えば癌におけるPD-L1および/またはPD-L2活性または発現の誤調節と関連する障害を有するか、または生じる危険性がある被検体を同定することができる。こうして、本発明は、PD-L1および/またはPD-L2またはそのフラグメントの異常な発現または活性と関連する疾患を同定および/または分類する方法を提供する。さらに、本明細書に記載の予後アッセイを用いて、異常なバイオマーカー発現または活性と関連する疾患または障害を処置するための作用物質（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド模倣体、ポリペプチド、ペプチド、核酸、小分子、または他の薬剤候補）を被検体に投与することができるかどうかを決定することができる。こうして本発明は、被検体を、異常なPD-L1および/またはPD-L2発現または活性と関連する疾患のための薬剤を用いて効率的に処置することができるかどうかを決定する方法であって、試験サンプルを取得し、PD-L1および/またはPD-L2発現または活性を検出する（例えば、バイオマーカーポリペプチドまたは核酸発現または活性の、対照に対する有意な増減が認められれば、被検体に異常なPD-L1および/またはPD-L2の異常な発現または活性に関連する障害を治療するための薬剤を投与できると診断する）方法を提供する。いくつかの実施態様では、バイオマーカー発現または活性の有意な増減は、対照サンプル中のマーカーの発現活性またはレベルより、それぞれ少なくとも2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20倍以上高いまたは低い場合を含む。

10

20

【0220】

5. 臨床試験中の効果のモニタリング

作用物質（例えば、薬剤）のPD-L1および/またはPD-L2またはそのフラグメント発現または活性に対する影響（例えば、癌の調節）のモニタリングを、基礎的な薬剤スクリーニングのみならず、臨床試験においても適用することができる。例えば、作用物質の有効性は、本発明の抗体を用いて、対照との比較におけるPD-L1および/またはPD-L2発現および/または活性の調節（すなわち、増加または減少）を検出することによって決定することができる。そのような臨床試験において、PD-L1および/またはPD-L2の発現および/または活性を、特定の細胞または状態の表現型の「読み出し」またはマーカーとして使用することができる。

30

【0221】

いくつかの実施態様では、本発明は、作用物質（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド模倣体、ポリペプチド、ペプチド、核酸、小分子、または他の薬剤）による被検体の治療の効果をモニタリングする方法であって、(i)作用物質を投与する前の被検体から投与前サンプルを取得するステップ；(ii)投与前サンプルのPD-L1および/またはPD-L2の発現および/または活性またはそのフラグメントのレベルを検出するステップ；(iii)被検体から1以上の投与後サンプルを取得するステップ；(iv)投与後サンプルにおけるPD-L1および/またはPD-L2またはそのフラグメントの発現または活性のレベルを検出するステップ；(v)投与前サンプル中のPD-L1および/またはPD-L2またはそのフラグメントの発現または活性のレベルと、投与後サンプルのバイオマーカーまたはサンプルのそれとを比較するステップ；および(vi)それにしたがって、被検体への該作用物質の投与を変更するステップを含む方法を提供する。例えば、PD-L1および/またはPD-L2の発現または活性を減少させ、検出されたものよりレベルを下げるためには、作用物質の投与を増加させることが望ましいかもしれない。そのような態様によれば、PD-L1および/またはPD-L2の発現または活性は、観察し得る表現型反応がない場合であっても、作用物質の有効性の指標として用いてもよい。

40

【0222】

6. 治療方法

本明細書に記載の組成物（二重結合抗体、ならびにその誘導体およびコンジュゲートを

50

含む)は、種々のインビトロおよびインビボでの治療的用途(例えば、免疫応答のアップレギュレーションまたはダウンレギュレーション)に使用され得る。ある実施態様では、PD-L1/PD-L1受容体および/またはPD-L2/PD-L2受容体(PD-L1およびPD-L2(例えば、(a)PD-L1に結合するPD-L1;(b)B7-1に結合するPD-L1;(c)PD-L1に結合するPD-L2;(d)RGMbに結合するPD-L2)の間の相互作用を遮断する抗体は、抑制シグナリングを妨げることができる。ある実施態様では、PD-L1リガンドの共刺激シグナルを遮断する抗体は、免疫細胞に対する共刺激シグナルを遮断する。さらに、PD-L2のライゲーションはサイトカイン分泌および樹状細胞の生存を誘導し得る。よって、PD-L2ライゲーションを遮断する抗体は樹状細胞の生存を抑制し、樹状細胞によるサイトカイン発現を低減させ、これらのメカニズムを通じて免疫応答を抑制し得る。特に、ここに記載された抗体は、例えばKeirら(2008)Annu. Rev. Immunol. 26:677; Sharpeら、(2007)Nat. Immunol. 8:239; Freemanら(2007)J. Exp. Med. 10:2223において検討されているように、PD-L1およびPD-L2により媒介される特定の症状に関連した治療への応用に有用である。

【0223】

ある実施態様では、本発明の抗体および抗原結合フラグメントは、限定されないが、老年期痴呆、アルツハイマー病、ダウン症、パーキンソン病、クロイツフェルトヤコブ病、糖尿病性ニューロパシー、パーキンソン症候群、ハンチントン病、マシャドジェセフ病、筋萎縮性側索硬化症、および糖尿病性ニューロパシーを含む、神経変性疾患に関する診断、予後、予防への応用に加えて、治療への応用に有用である。

【0224】

別の実施態様では、本発明の抗体および抗原結合フラグメントは、診断、予後、予防への応用(例えば、疾患の発症または進行を治療し、遅らせる)に加えて、免疫反応が亢進する疾患、例えば、喘息、自己免疫疾患(糸球体腎炎、関節炎、拡張性心筋症様疾患、潰瘍性大腸炎、シェーグレン症候群、クローン病、全身性エリテマトーデス、慢性関節リウマチ、多発性硬化症、乾癬、アレルギー性接触性皮膚炎、多発性筋炎、強皮症、結節性動脈周囲炎、リウマチ熱、尋常性白斑、インスリン依存性糖尿病、ベーチェット病、橋本病、アジソン病、皮膚筋炎、重症筋無力症、ライター症候群、グレーブス病、悪性貧血、グッドパスチャー症候群、不妊症、慢性活動性肝炎、天疱瘡、自己免疫性血小板減少性紫斑病、および自己免疫性溶血性貧血、活動性慢性肝炎、アジソン病、抗リン脂質症候群、アトピー性アレルギー、自己免疫萎縮性胃炎、無酸症自己免疫、セリアック病、クッシング症候群、皮膚筋炎、円板状狼瘡、斑性狼瘡、グッドパスチャー症候群、橋本甲状腺炎、突発性副腎萎縮症、突発性血小板減少症、インスリン依存性糖尿病、ランバート・イートン症候群、ルポイド肝炎、リンパ球減少症のいくつかの症例、混合性結合組織病、類天疱瘡、天疱瘡尋常性、悪性貧血、水晶体起因性ブドウ膜炎、結節性多発動脈炎、多腺性自己免疫症候群、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、レイノー症候群、再発性多発性軟骨炎、シュミット症候群、限局型全身性強皮症(またはクレスト症候群)、交感性眼炎、全身性エリテマトーデス、高安動脈炎、側頭動脈炎、甲状腺中毒症、b型インスリン耐性、潰瘍性大腸炎およびウェゲナー肉芽腫症)を抑制するための治療への応用に有用である。

【0225】

さらに別の実施態様では、本発明の抗体および抗原結合フラグメントは、持続性感染疾患(例えば、ウイルス感染疾患、例えばHPV、HBV、C型肝炎ウイルス(HCV)、レトロウイルス、例えばヒト免疫不全ウイルス(HIV-1およびHIV-2)、ヘルペスウイルス、例えばエプスタイン・バーウイルス(EBV)、サイトメガロウイルス(CMV)、HSV-1およびHSV-2、およびインフルエンザウイルス)の診断、予後、予防に加えてさらに治療応用(例えば、治療し、疾患の発症または進行を遅延させる)に有用である。ここに記載されたようにして利用することができる病原菌に付随する他の抗原は様々な寄生虫の抗原であり、マラリア、好ましくはNANPの反復に基づくマラリアペプチドを含む。さらに、細菌、真菌および他の病原体の疾患が含まれ、例えば、アスペ

ルギルス (*Aspergillus*)、ブルギア (*Brugia*)、カンジダ (*Candida*)、クラミジア (*Chlamydia*)、コッチジア (*Coccidia*)、クリプトコッカス (*Cryptococcus*)、ジロフィラリア (*Dirofilaria*)、ゴノコッカス (*Gonococcus*)、ヒストプラズマ (*Histoplasma*)、レイシュマニア (*Leishmania*)、マイコバクテリウム (*Mycobacterium*)、マイコプラズマ (*Mycoplasma*)、パラメチウム (*Paramecium*) ペルツシス (*Pertussis*)、プラスモジウム (*Plasmodium*)、ニューモコッカス (*Pneumococcus*)、ニューモキスティス (*Pneumocystis*)、リケットシア (*Rickettsia*)、サルモネラ (*Salmonella*)、シゲラ (*Shigella*)、スタフィロコッカス (*Staphylococcus*)、ストレプトコッカス (*Streptococcus*)、トクソプラズマ (*Toxoplasma*)、ビブリオコレラ (*Vibrio* コレラ) が挙げられる。例示的な種としては、淋菌 (*Neisseria gonorrhea*)、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*)、カンジダ・トロピカリス (*Candida tropicalis*)、膣トリコモナス (*Trichomonas vaginalis*)、ヘモフィルス・バジナリス (*Haemophilus vaginalis*)、B 群連鎖球菌種 (Group B *Streptococcus* sp.)、マイコプラズマ・ホミニス (*Mycoplasma hominis*)、軟性下疳菌 (*Hemophilus ducreyi*)、グラヌローマ・イングイネル (*Granuloma inguinale*)、リンホパチア・ベネレウム (*Lymphopathia venereum*)、梅毒トレポネ - マ (*Treponema pallidum*)、ブルセラ・アボルタス (*Brucella abortus*)、ブルセラ・メリテンシス (*Brucella melitensis*)、ブルセラ・スイス (*Brucella suis*)、ブルセラ・カニス (*Brucella canis*)、カンピロバクター・フィタス (*Campylobacter fetus*)、カンピロバクター・フィタス・インテスチナリス (*Campylobacter fetus intestinalis*)、レプトスピラ・ポモナ (*Leptospira pomona*)、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*)、ブルセラ・オビス (*Brucella ovis*)、オウム病クラミジア (*Chlamydia psittaci*)、トリコモナス・フィータス (*Trichomonas foetus*)、トキソプラズマ・ゴンディ (*Toxoplasma gondii*)、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*)、アクチノバチルス・エクーリ (*Actinobacillus equuli*)、ヒツジ流産菌 (*Salmonella abortus ovis*)、ウマ流産菌 (*Salmonella abortus equi*)、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、コリネバクテリウム・エクイ (*Corynebacterium equi*)、コリネバクテリウム・ピオゲネス (*Corynebacterium pyogenes*)、アクチノバチルス・セミニス (*Actinobacillus seminis*)、マイコプラズマ・ボビゲニタリウム (*Mycoplasma bovis genitalium*)、アスペルギルス・フミガーツス (*Aspergillus fumigatus*)、アブシジア・ラモーザ (*Absidia ramosa*)、トリパノソーマ・エクイペルダム (*Trypanosoma equiperdum*)、パベシア・カバリ (*Babesia caballi*)、破傷風菌 (*Clostridium tetani*)、ボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*) が含まれる；または例えば、パラコクシジオイデス - ブラジリエンシス (*Paracoccidioides brasiliensis*) などの菌類が含まれる；または、他の病原菌、例えば、プラスモジウムファルシパルム (*Plasmodium falciparum*) が含まれる。米国立アレルギー感染症研究所 (Allergy and Infectious Diseases (NIAID)) の優先的病原菌も含まれる。これらは、大痘瘡 (*variola major*) (天然痘)、バチルス・アンスラシス (*Bacillus anthracis*) (炭疽菌)、エルシニア・ペステリス (*Yersinia pestis*) (ペスト)、ボツリヌス菌毒素 (ボツリヌス中毒)、フランシセラ・ツラレンシス (*Francisella tularensis*) (野兔病)、フィロウイルス (*filovirus*) (エボラ出血熱、マールブルグ出血熱)、アレナウイルス (*arenavirus*) (ラッサ (Lassa) (ラッサ熱)、フニン (Junin) (アルゼンチン出血熱) および関連ウイルス) などのカテゴリー A 物質；コクシエラ・パーネッティ (*Coxiella burnetii*) (Q 熱)、ブルセラ (*Brucella*) 種 (ブルセラ症)、パークホルデリア・マレイ (*Burkholderia mallei*) (鼻疽)、アルファウイルス (ベネズエラ脳脊髄炎、東部および西部ウマ脳脊髄炎)、リシナス・コミュニス (*Ricinus communis*) (トウゴマ) 由来のリシン毒、ウェルチ菌 (*Clostridium perfringens*) のイブシロン毒素；ブドウ球菌 (*Staphylococcus*) エンテロトキシン B、サルモネラ (*Salmonella*) 種、志賀赤痢菌 (*Shigella dysenteriae*)、エシェリヒア・コリ株 O 157 : H 7、コレラ菌 (*Vibrio cholerae*)、クリプトスポリジウム・パルブム (*Cryptosporidium parvum*) などのカテゴリー B 物質；ニパ (nipah) ウイルス、ハンタウイルス (*hantavirus*)、ダニ媒介性出血熱ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルス

10

20

30

40

50

ス、黄熱病、および多剤耐性結核などのカテゴリーC物質；蠕虫、例えば住血吸虫および条虫類；および原虫、例えばリーシュマニア（*Leishmania*）（例えば、メキシコリーシュマニア（*L. mexicana*））およびプラスモジウム（*Plasmodium*）を含む。

【0226】

さらに別の実施態様では、本発明の抗体および抗原結合フラグメントは、臓器移植片拒絶、移植片対宿主病（GVHD）、アレルギー性疾患、およびPD-L1およびPD-L2によって媒介される免疫反応の減衰により引き起こされる疾患の診断、予後、予防に加えてさらに治療応用に有用である。

【0227】

いくつかの実施態様では、免疫応答のダウンレギュレーションが望ましい。例えば、免疫応答は、PD-L1などのPD-1リガンドによって共刺激をブロックする、または、PD-L1および/またはPD-L2とPD-1との結合を促進する（一方でPD-1リガンドによる共刺激に影響を与えない、または抑制しない）抗PD-L1/PD-L2抗体を用いて下方調節することができる。

【0228】

本発明のある実施態様では、抗原に、B7媒介性および/またはPD-1リガンド媒介性の共刺激を抑制する抗体を共投与することによって、特異的な抗原に対する忍容性が誘発される。例えば、忍容性は、特異的タンパク質に誘発することができる。ある実施態様では、免疫応答が望ましくないアレルゲンまたは外来タンパク質に対する免疫応答を抑制することができる。例えば、第V I I I因子が投与される患者は、この血液凝固因子に対する抗体を産生することが多い。B7媒介性および/またはPD-1リガンド媒介性の共刺激シグナルをブロックする抗体、またはCTL A4、PD-1-および/またはRGMb媒介性抑制シグナルを刺激する抗体の組み換え第V I I I因子との併用投与により（または例えば架橋により、物理的に第V I I I因子に結合させることにより）、免疫応答のダウンレギュレーションが生じ得る。

【0229】

別の実施態様では、治療方法は、例えば、B7-1、B7-2、またはB7-3のような他のBリンパ球抗原の共刺激経路の活性を抑制する作用物質をさらに用いて、免疫応答をさらに下方調節してもよい。免疫応答を下方調節する2つの別個の薬剤を、被検体における免疫細胞媒介性免疫応答をより効果的にダウンレギュレートするために単一組成物として組み合わせるかまたは別個に（同時または逐次）投与され得る。更に、治療的有効量の1以上の対象抗体を、他の下方調節試薬と併せて用いて、免疫応答に影響を及ぼすことができる。他の免疫調節試薬の例は、限定されるものではないが、共刺激シグナルをブロックする抗体（例えば、CD28またはICOSに対するもの）、CTL A4のアゴニストとして作用する抗体、および/または他の免疫細胞マーカーに対する抗体（例えば、CD40、CD4リガンドまたはサイトカインに対するもの）、融合タンパク質（例えば、CTL A4-Fc）、および免疫抑制剤（例えば、ラパマイシン、シクロスポリンAまたはFK506）を含む。いくつかの実施態様では、本発明のPD-L1/PD-L2二重ブロッキング抗体を、と併用することができる。放射線治療および/またはヒストンデアセチラーゼ阻害剤（例えば、ポリノスタット、ロミデプシン、パノビノスタット、バルプロ酸、ベリノスタット、モセチノスタット、アベキシノスタット、エンチノスタット、SB-939、レスミノスタット、ギビノスタット（givinostat）、キシノスタット（quisinostat）等）を用いて治療的有効性を高めることができる。

【0230】

PD-1リガンド共刺激のダウンレギュレーションまたは妨害、あるいはPD-1リガンドとPD-1の相互作用の促進は、例えば、組織、皮膚および臓器移植の状況、移植片対宿主病（GVHD）、または炎症性疾患、例えば全身性エリテマトーデス、および多発性硬化症における免疫応答をダウンレギュレートするのに有用である。例えば、免疫細胞機能の遮断は、組織移植における組織破壊の減少を生じる。典型的には、組織移植片において、移植片の拒絶は、免疫細胞によるその外来性との認識によって開始され、続いて移

10

20

30

40

50

植片を破壊する免疫反応が起こる。移植前または移植時での、PD-1リガンド共刺激を抑制する抗体単独のまたは別の下方調節剤との併用での投与は、阻害性シグナルの生成を促進し得る。さらに、PD-1リガンド共刺激シグナルの阻害、またはPD-1リガンドもしくはPD-1阻害性シグナルの促進は、免疫細胞をアネルギー化して、被検体に忍容性を誘導するのに十分であり得る。PD-1リガンド媒介性共刺激シグナルをブロックすることによる長期間の忍容性の誘導により、これらの遮断薬の繰返し投与の必要性を回避し得る。

【0231】

被検体において十分な免疫抑制または忍容性を達成するために、他のポリペプチドの共刺激機能をブロックすることが望ましい場合もある。例えば、移植前または移植時に、B7-1、B7-2、またはB7-1およびB7-2の機能を、これらの抗原の各々の活性を有するペプチドの組み合わせの可溶型、これらの抗原に対する遮断抗体または遮断小分子を（別個にまたは単一の組成物において一緒にして）投与することによってブロックすることが望ましい場合がある。別法として、PD-1リガンドまたはPD-1の抑制活性を促進し、B7-1および/またはB7-2の共刺激活性を抑制するのが望ましい場合がある。本発明の下方調節法との関連で使用され得る他の下方調節剤は、例えば、CTLA4を介して抑制シグナルを伝達する薬剤、CTLA4を介して抑制シグナルを活性化する抗体、他の免疫細胞マーカーまたは他のレセプター・リガンド対の可溶型に対する遮断抗体（例えば、CD40とCD40リガンドの相互作用を妨害する薬剤（例えば、抗CD40リガンド抗体））、サイトカインに対する抗体、または免疫抑制剤を含む。

10

20

【0232】

免疫応答のダウンレギュレートは、いくつかの状態、例えば、組織、皮膚および臓器移植の状況、移植片対宿主病（GVHD）、または炎症性疾患、例えば全身性エリテマトーデス、および多発性硬化症、アレルギー、移植、過敏反応症、CD4+T細胞の産生または機能の亢進が必要な障害、ワクチン接種の有効性の改善が必要な障害、調整T細胞の産生または機能の増加が必要な障害、およびワクチン接種の有効性の改善が必要な障害の治療に有用である。例えば、免疫細胞機能の遮断によって、組織移植の破壊が減少することになる。典型的には、組織移植において、移植片の拒絶は、免疫細胞によるその外来性との認識によって開始され、続いて移植片を破壊する免疫反応が起こる。移植前または移植時での本明細書に記載の薬剤の投与は、抑制シグナルの発生を促進することができる。また、抑制は、免疫細胞を免疫不応性にするのに十分であり、それによって被検体に忍容性を誘発しうる。長期間の忍容性の誘導により、これらの遮断薬の繰返し投与の必要性を回避し得る。

30

【0233】

免疫応答のダウンレギュレーションは、自己免疫疾患の治療にも有用である。多くの自己免疫疾患は、自己組織に対して反応性であり、疾患の病理に関与するサイトカインおよび自己抗体の産生を促進する免疫細胞の不適切な活性化の結果である。自己反応性免疫細胞の活性化を防止することにより、疾患の症状を低減または排除し得る。本明細書に記載の作用物質の投与は、疾患過程に関与し得る自己抗体またはサイトカインの産生を妨害するのに有用である。加えて、RGMbとPD-L2の相互作用によって媒介される抑制機能を促進する作用物質は、自己反応性免疫細胞の抗原特異的忍容性を誘導することができ、これが疾患からの長期の救済を導くことができる。自己免疫疾患を予防または緩和する試薬の効力は、ヒト自己免疫疾患の十分に特徴付けられた多くの動物モデルを使用して決定することができる。例として、マウス実験的自己免疫脳炎、MRL/lpr/lprマウスまたはNZB雑種マウスにおける全身性エリテマトーデス、マウス自己免疫コラーゲン関節炎、NODマウスおよびBBラットにおける糖尿病、およびマウス実験的重症筋無力症が挙げられる（例えば、Paul編、Fundamental Immunology, Raven Press, New York, Third Edition 1993, 30章を参照）。

40

【0234】

免疫細胞活性化の抑制は、例えば、IgE産生の抑制によるアレルギーおよびアレルギー

50

ー反応の治療において治療的に有用である。アレルギー反応は、アレルギーの侵入経路およびマスト細胞または好塩基球上のIgEの沈着のパターンに応じて、実際は全身性または局所性である。よって、本明細書に記載の作用物質の全身性または局所性投与による、免疫細胞媒介性アレルギー反応の抑制は、RGMbおよびPD-L2媒介の抑制機能を促進する。

【0235】

免疫細胞活性化の抑制が、免疫細胞の寄生虫感染およびウイルス感染において治療的に重要である場合もある。例えば、後天性免疫不全症候群(AIDS)において、ウイルス複製は免疫細胞活性化により刺激される。これらの相互作用の調節は、ウイルス複製の抑制が生じ、それによってAIDSの経過が寛解する。これらの相互作用の調節は、妊娠の持続を促進するのにも有用である。胚または胎児の免疫拒絶のために自然流産の危険のある女性(例えば、以前に自然流産したことがある女性または妊娠が困難である者)は、これらの相互作用を調節する薬剤で治療することができる。

10

【0236】

RGMbとPD-L2の間の相互作用の調節による免疫応答のダウンレギュレーションも、自家組織の自己免疫攻撃を治療するのににおいても有用であり得る。したがって、自己免疫疾患などの自己免疫攻撃によって悪化する症状、並びに心臓病、心筋梗塞、およびアテローム性動脈硬化症のような症状を調節することは本発明の範囲内である。

【0237】

免疫応答をアップレギュレートする手段としての、PD-L1およびPD-L2と免疫共抑制受容体との相互作用の同時遮断も治療的にまた有用である。免疫応答のアップレギュレーションは、存在する免疫応答の亢進または最初の免疫応答の誘発の形態をとり得る。例えば、対象の組成物および方法を使用する免疫応答の増強は、微生物(例えば、細菌、ウイルス、または寄生虫)の感染の場合に有用である。ある実施態様では、PD-L1およびPD-L2と免疫共抑制受容体との相互作用を遮断する抗体が免疫応答を亢進させるために使用される。そのような抗体(例えば、PD-L1およびPD-L1に結合するPD-L2を、ブロッキングRGMbに結合するPD-L2とともに、あるいはそれなしで、遮断するブロッキング(非ブロッキング)抗体)は、抗体のアップレギュレーションおよび細胞媒介性応答が有益である状況において治療的に(例えば、癌、感染症(例えば、細菌、ウイルス、または寄生虫)、寄生虫感染、気道の忍容性の結果に関連する喘息、神経学的疾患、および免疫抑制性の疾患の治療において)有用である。障害の例としては、疱疹または帯状疱疹などのウイルス性皮膚疾患を含み、その場合、そのような薬剤が皮膚に局所的に送達され得る。また、インフルエンザ、感冒および脳炎のような全身性ウイルス性疾患は、このような薬剤の全身投与によって軽減されるかもしれない。

20

30

【0238】

別法として、免疫応答は、エキソピボのアプローチ法、例えば、免疫細胞を患者から取り出し、免疫細胞をインビトロで、PD-1とのPD-1リガンドの相互作用をブロックする抗体と接触させ、インビトロで刺激された免疫細胞を患者へ再導入することにより、感染した患者において高めることができる。

【0239】

いくつかの特定の例においては、免疫応答を更に増強するために、免疫応答をアップレギュレートする他の作用物質、例えば、共刺激受容体を介してシグナルを伝達する他のB7ファミリーメンバーの形態をさらに投与することが望ましい場合がある。

40

【0240】

免疫応答をアップレギュレートする作用物質を、様々なポリペプチド(例えば病原体から派生するポリペプチド)に対するワクチンで予防的に使用することができる。病原体(例えば、ウイルス)に対する免疫性は、適当なアジュバント中、免疫応答をアップレギュレートする抗原とともにウイルスタンパク質でワクチン予防接種することにより誘導することができる。

【0241】

50

別の実施態様では、本明細書に記載の免疫応答機能のアップレギュレーションまたは亢進は、腫瘍免疫の誘導に有用である。別の実施態様では、先在している忍容性、クローン欠失、および/または枯渇（例えば、T細胞枯渇）に打ち勝つことができるように、免疫応答を、ここに記載の方法によって刺激することができる。例えば、被検体が有意な免疫応答を開始することができない抗原、例えば、腫瘍特異的抗原などの自己抗原に対する免疫応答は、免疫応答をアップレギュレートする、本明細書に記載の適切な作用物質をを投与することにより、誘導することができる。ある実施態様では、腫瘍特異的抗原のような自己抗原を併用投与することができる。別の実施態様では、他の実施態様では、免疫応答を抗原（例えば、自己抗原）に対して刺激して、神経性疾患を治療することができる。別の実施態様では、対象薬剤をアジュバントとして使用して、活性な免疫化のプロセスにおいて外来性抗原への応答をブーストすることができる。

10

【0242】

ある実施態様では、免疫細胞を被検体から得て、エキソピボで、ここに記載の抗体の存在下で培養し、免疫細胞集団を増殖させるか、および/または免疫細胞活性化を亢進する。更なる態様では、免疫細胞をその後被検体へ投与する。免疫細胞は、例えば、免疫細胞へ一次活性化シグナルおよび共刺激シグナルを、当該分野で知られているようにして、提供することにより、インビトロで刺激され得る。様々な薬剤をまた使用して免疫細胞の増殖を共刺激することもできる。ある実施態様では、免疫細胞はPCT出願国際公開第94/29436号に記載の方法に従い、エキソピボで培養される。共刺激ポリペプチドは可溶性であり、細胞膜へ結合され、またはビーズのような固体表面へ結合され得る。

20

【0243】

さらに別の実施態様では、免疫応答のアップレギュレーションに有用な本明細書に記載の作用物質は、さらに、当該技術分野において公知の技術、例えば、架橋または組み換えDNA技術を用いて毒素に、連結または作用可能に接着することができる。そのような作用物質は、望ましい細胞の細胞破壊をもたらし得る。ある実施態様では、毒素は、二重特異性抗体などの抗体にコンジュゲートすることができる。そのような抗体は、例えば、特定のタイプの細胞、例えば、RGMb-および/またはPD-L2-発現細胞のみに認められるマーカーを用いて、特定の細胞集団を標的化するために有用である。免疫毒素の調製は、一般に、当該技術において公知である（例えば、米国特許第4,340,535号および欧州特許第44167号参照）。非常に多くのタイプの、ジスルフィド結合を含有するリンカーが知られており、それらは毒素部分とポリペプチドをコンジュゲートや結合するためにうまく採用されている。ある実施態様では、インピボで安定性が高く、作用部位での結合の前に毒素部分の放出を防ぐことから、立体「障害型」のジスルフィド結合を含有するリンカーが好ましい。本発明のポリペプチドまたは抗体抗体と結合するかもしれない多様な毒素が知られている：種々のA鎖毒素、特にリシンA鎖、サポリンまたはゼロニンなどのリボソーム不活化タンパク質、 α -サルシン、アスペルギリン、レスチリクトシン、胎盤リボヌクレアーゼ等のリボヌクレアーゼ、アンジオゲニン（angiogenic）、ジフテリア毒素、またはシュードモナス属菌体外毒素などの非常に多くの有用な植物、菌類またはさらには細菌類由来の毒素を含む。本発明の関連で使用される好ましい毒素部分は、毒素A鎖であり、それは、炭水化物残基、脱グリコシル化A鎖を調節または除去するように処理されてきた（米国特許第5,776,427号）。細胞傷害性作用物質（例えば、リシン融合）の組み合わせの1以上の融合物を患者に導入することにより、免疫細胞は死滅するかもしれない。

30

40

【0244】

7. キット

本発明はまた、PD-L1および/またはPD-L2ポリペプチドを検出するためのキットを包含する。例えば、キットは、少なくとも1つの本発明の抗PD-L1/PD-L2抗体および/または対照試薬（例えば、標準的PD-L1および/またはPD-L2タンパク質）を好適な容器中に含むことができる。

【0245】

本発明のキットはまた、キットの使用を開示または説明する指示書、あるいは本明細書

50

において提供される開示発明の方法中の開示された発明の抗体を含んでもよい。キットはまた、キットがデザインされるための特定の用途を容易にするために、さらなる構成要素を含んでもよい。例えば、キットは、標識（例えば、蛍光標識や、ヒツジ抗マウスHRP等のような適切な二次標識を検出するための、酵素標識のための酵素基質、フィルターセット）を検出するための手段および対照に必要な試薬（例えば、対照生物学的サンプルまたは標準的なPD-L1および/またはPD-L2タンパク質）をさらに含んでもよい。キットは、開示された発明の方法での使用のために認識される緩衝剤および他の試薬を含んでもよい。限定されないが、例としては、非特異的結合を減少させる作用物質、例えば、キャリアタンパク質または界面活性剤がある。

【0246】

VII. 作用物質の投与

本発明の免疫調節剤は、免疫細胞による免疫反応を向上させるかまたは抑制するかのいずれかのために、インビボの医薬的投与に適した生物学的に適合性の形態において患者に投与される。「インビボ投与に適した生物学的に適合性の形態」とは、任意の有毒な影響よりもタンパク質の治療効果の方が重要な、投与されるタンパク質の形態を意味する。用語「被検体」は、免疫反応を惹起できる生きている生物、例えば、哺乳動物を含むことが意図される。被検体の例は、ヒト、イヌ、ネコ、マウス、ラット、およびそのトランスジェニック種を含む。本明細書に記載される作用物質の投与は、治療的に活性な量の作用物質単独または医薬的に許容される担体との組み合わせを含めた、あらゆる薬理学的形態であり得る。

【0247】

治療的に活性な量の本発明の治療組成物の投与は、所望の結果を達成するために必要な用量および時間で有効な量として定義される。例えば、作用物質の治療的に活性な量は、個体の疾患状態、年齢、性別、および体重ならびにペプチドが個体において所望の反応を惹起する能力によって変わり得る。投薬計画は、最適の治療反応を提供するために調節できる。例えば、いくつかに分割された用量を毎日投与できるか、または治療状況の緊急性からの指示に比例して減少させることができる。

【0248】

本明細書に記載の作用物質を都合の良い方法、例えば、注射（皮下、静脈内など）、経口投与、吸入、経皮適用、または直腸投与により投与できる。投与経路に応じて、活性化化合物は、化合物を酵素、酸、および化合物を不活化し得る他の自然条件の作用から化合物を保護するために物質中でコーティングできる。例えば、非経口投与以外によって作用物質を投与するためには、作用物質をその不活化を防止する物質でコーティングするか、または作用物質を該物質と共に同時投与するのが望ましい。

【0249】

作用物質は、個体に、適当な担体、希釈剤またはアジュバント中で投与でき、酵素阻害剤と同時投与でき、またはリポソームなどの適当な担体中で投与できる。医薬的に許容される希釈剤は、塩溶液および水性緩衝溶液を含む。アジュバントはその最も広い意味で用いられ、あらゆる免疫刺激化合物、例えばインターフェロンを包含する。本発明において意図されるアジュバントは、レゾルシノール、非イオン性界面活性剤、例えば、ポリオキシエチレンオレイルエーテルおよびn-ヘキサデシルポリエチレンエーテルを包含する。酵素阻害剤は、腓トリプシン阻害剤、ジイソプロピルフルオロホスフェート（DEEP）およびトラシロールを包含する。リポソームは、水中油中水エマルジョンならびに慣用のリポソームを包含する（Sternaら（1984）J. Neuroimmunol. 7:27）。

【0250】

活性化化合物は、非経口または腹腔内投与できる。分散液は、グリセロール、液状ポリエチレングリコール、およびその混合物および油中でも調製できる。通常の貯蔵および使用条件下で、これらの製剤は、微生物の成長を防止するための保存料を含んでもよい。

【0251】

注射可能な用途に適した医薬組成物は、滅菌水性溶液（水溶性の場合）または分散液お

10

20

30

40

50

よび滅菌注射溶液または分散液の即席調製用滅菌粉末を包含する。全ての場合において、組成物は無菌でなければならず、容易に注射針通過する程度まで流動性でなければならない。製造および貯蔵条件下で安定でなければならず、細菌および真菌などの微生物の汚染作用に対して保護されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、ポリエチレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、およびその適当な混合物を含む溶媒または分散媒体であり得る。適当な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用、分散液の場合には必要な粒子サイズの意地、および界面活性剤の使用により維持できる。微生物の作用の防止は、さまざまな抗菌剤および抗進近在、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどにより達成できる。多くの場合において、等張剤、例えば、糖、ポリ

10

【0252】

滅菌注射溶液は、必要に応じて、前記の成分の一つまたは組み合わせと共に必要な量の活性化化合物（例えば、抗体、ペプチド、融合タンパク質、または小分子）を適当な溶媒中に組み入れることにより調製でき、続いて濾過滅菌される。一般に、活性化化合物を、塩基性分散媒体および前記のものから必要とされる他の成分を含む滅菌賦形剤中に組み入れることにより、分散液を調製する。滅菌注射溶液を調製するための滅菌粉末の場合において

20

【0253】

上記のように、活性化化合物が適当に保護される場合、タンパク質を、例えば不活性希釈剤または消化吸収される可食担体と共に経口投与できる。本明細書において使用する場合、「医薬的に許容される担体」とは、ありとあらゆる溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などを包含する。医薬的活性な物質についてのこのような媒体および薬剤の使用は、当該技術分野において公知である。慣用の媒体または薬剤が活性化化合物と不適合性である場合を除いては、治療組成物におけるその使用

30

【0254】

投与の簡便性および投与量の均一性のために、単位投与形態の非経口組成物を処方するのが特に有利である。本明細書で用いられる場合、「単位投与形態」とは、治療される哺乳動物被検体の単位投与量として適した物理的に独立した単位を意味し；各単位は所望の治療効果を生じるために計算された所定の量の活性化化合物を、必要とされる医薬担体と組み合わせ含有している。本発明の単位投与形態の明細は、（a）活性化化合物の独自の特性および達成されるべき特定の治療効果、および（b）個体において感受性を治療するためのこのような活性化化合物を配合する分野に固有の制限、により決定され、直接依存する

40

【0255】

ある実施態様では、本発明の作用物質は抗体である。本明細書において定義するとおり、抗体の治療的に有効な量（すなわち、有効量）は、約0.001～30mg/kg体重、好ましくは約0.01～25mg/kg体重、さらに好ましくは約0.1～20mg/kg体重、なおいっそう好ましくは約1～10mg/kg、2～9mg/kg、3～8mg/kg、4～7mg/kg、または5～6mg/kg体重の範囲である。当業者は、限定されないが、疾患または障害の重さ、治療歴、被検体の全身の健康状態および/または年齢、および存在する他の疾患を含む因子が、被検体を有効に治療するために必要な用量に影響を及ぼし得ることを理解するであろう。さらに、治療的に活性な量の抗体での被検体の治療は、単回の治療とすることもでき、または好ましくは一連の治療とすることもでき

50

る。好ましい例において、被検体は約 0.1 ~ 20 mg / kg 体重の範囲の抗体で、1 週間に 1 回で約 1 ~ 10 週間、好ましくは 2 ~ 8 週間、さらに好ましくは約 3 ~ 7 週間、なおいっそう好ましくは約 4、5、または 6 週間投与される。治療に使用される抗体の有効量は、特定の治療の過程にわたって増減可能である。診断アッセイの結果によって投与量を変えてもよい。

【0256】

本発明を以下の実施例によってさらに説明する。実施例は、限定として解釈すべきでない。この出願を通して引用されている全ての引用、特許、公開されている出願の内容、ならびに図面を引用によって援用する。本発明の他の実施態様を次の実施例に記載する。本発明は、更なる限定として解釈すべきではない次の実施例によって更に例証される。

10

【実施例】

【0257】

実施例 1 : PD - L 1 および PD - L 2 と PD - 1 との相互作用を遮断する抗体の発見と特徴付け

それぞれがマウス IgG2a 定常領域 (それぞれ PD - L 1 - mIgG2a および PD - L 2 - mIgG2a) に融合しているヒト PD - L 1 または PD - L 2 の細胞外ドメインを免疫原として使用した。雌 BALB / c または C57BL / 6 の PD - L 1 / PD - L 2 二重ノックアウトマウス (Buら (2011) Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 31 (5) : 1100-7) を、古典的な多部位急速免疫化 (RIMMS) プロトコルを用いて免疫化した。

20

【0258】

古典的免疫化

古典的免疫化プロトコルでは、BALB / c 二重ノックアウトマウスを使用し、1 日目に完全フロインドアジュバント (CFA) 中 PD - L 2 - mIgG2a による免疫化、その後、15 日目と 29 日目に不完全フロインドアジュバント (IFA) 中 PD - L 2 - mIgG2a による免疫化、その後 43 日目と 57 日目に IFA 中 PD - L 1 - mIgG2a による免疫化を行った。67 日目に力価を評価し、74 日目に動物をオリゴヒスチジン標識 PD - L 1 および PD - L 2 細胞外ドメインタンパク質でブーストした。78 日目に脾臓細胞を回収し、融合を行った。

【0259】

融合パートナーとしての SP2 / 0 マウスミエローマ細胞との PEG 媒介性融合によってハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマをマルチウェルプレート中で、クローン密度にて、MRC - 5 ヒト二倍体肺線維芽細胞供給層上で平板培養し、HAT 培地 (ヒポキサンチン / アミノプテリン / チミジン、ATCC 69x) で成長させ、徐々に HT 培地から引き離れた (ATCC 71x)。FACS ベース染色アッセイを用いて、ハイブリドーマを、PD - L 1、PD - L 2、および無関係の抗原に対する結合についてスクリーニングした。

30

【0260】

単離されたモノクローナル抗体、例えば、1B9 および 4H1 モノクローナル抗体の配列は表 1 に示している。要約すると、mAbs の軽鎖および重鎖の可変ドメインの配列を示している。相補性決定領域 (CDR) ドメインの配列を提供している。核酸およびその対応するアミノ酸残基の位置にしたがって番号を付けている。それは、例えば、CDR に対応しており、提供された翻訳に基づいて容易に同定することができる。

40

【0261】

サブクローニング後、古典的免疫化方法 (それぞれ、現在指定されている 1B9、2E11、3 および 4H1、G10、15) からのハイブリドーマ 1B9 および 4H1 を、追加の FACS ベースの染色アッセイにおいてさらに特徴づけた。ハイブリドーマ上清を、ヒト PD - L 1 もしくは PD - L 2 のいずれかを発現する 300、19 細胞、または非トランスフェクト 300、19 のいずれかと混合し、4 で 30 分間攪拌しながらインキュベートした。細胞を遠心分離により回収し、2% ウシ胎児血清 (FBS) を含んだ PBS

50

ですすぎ、次いでフィコエリトリン（PE）標識ヤギ抗マウスIgG抗体とともに4で30分間攪拌しながらインキュベートした。細胞を再度、遠心分離により回収し、洗浄し、次いで、FACS分析前、2%ホルムアルデヒドを含んだPBS中で保存した。対照は、アイソタイプ対照抗体（MOPC31C）および無抗体（「ブランク」）とした。結果（平均蛍光強度、すなわちMFI）を表2にまとめた。本アッセイでは、MFIが抗体結合に比例していることがわかる。

【0262】

【表2】

【表2】

10

抗体	PD-L1発現 300.19細胞	PD-L2発現 300.19細胞	非トランスフェクト 300.19細胞
アイソタイプ対照	45	19	21
ブランク	21	37	
1B9.2E11.3	26957	1289	79
4H1.G10.15	27893	93	20

【0263】

20

種々のモノクローナル抗体力価および更に別の陰性対照を用いて、表2に示した実験結果について説明したように、同様の結合アッセイを行った。その結果を表3に示す。これらの結果は表2で示した結果を確認するものである。

【0264】

【表 3】

【表3】

ヒトPD-L1発現300細胞

ウェル名	使用mAb ／細胞	サンプル	特異性	mAb濃度			
				未希釈即ち 10ug.mL	1:10即ち 1ug.mL	1:100即ち 0.1ug.mL	
A8	1B9.2E11.7	上清	二重	242571	236986	236865	PEシグナル の平均 値
A11	4H1.F9.19	上清	二重	241489	238240	223289	
E6	WASH	N/A	陰性対照	396	183	171	
E7	MOPC31C	抗体	陰性対照	263	183	250	
E8	29E.2A3	抗体	PD-L1のみ	234726	234336	109412	
E9	3.2	抗体	PD-L2のみ	819	1333	588	

10

ヒトPD-L2発現300細胞

ウェル名	使用mAb	サンプル	特異性	mAb濃度			
				未希釈即ち 10ug.mL	1:10即ち 1ug.mL	1:100即ち 0.1ug.mL	
A8	1B9.2E11.7	上清	二重	9786	2719	1253	PEシグナル の平均 値
A11	4H1.F9.19	上清	二重	840	757	672	
E6	WASH	N/A	陰性対照	586	370	209	
E7	MOPC31C	抗体	陰性対照	173	164	149	
E8	29E.2A3	抗体	PD-L1のみ	251	150	150	
E9	3.2	抗体	PD-L2のみ	218582	205735	80064	

20

陰性対照300.19細胞

ウェル名	使用mAb	サンプル	特異性	mAb濃度			
				未希釈即ち 10ug.mL	1:10即ち 1ug.mL	1:100即ち 0.1ug.mL	
A8	1B9.2E11.7	上清	二重	1019	706	669	PEシグナル の平均 値
A11	4H1.F9.19	上清	二重	827	630	624	
E6	WASH	N/A	陰性対照	254	229	320	
E7	MOPC31C	抗体	陰性対照	208	210	194	
E8	29E.2A3	抗体	PD-L1のみ	206	214	183	
E9	3.2	抗体	PD-L2のみ	410	213	252	

30

【 0 2 6 5 】

1 B 9 . 2 E 1 1 . 3 および 4 H 1 . G 1 0 . 1 5 も、 P D - L 1 / P D - 1 または P D - L 2 / P D - 1 結合の遮断を測定するアッセイを用いて特徴付けを行い、 F A C S ベースのアッセイによって評価した。抗体をヒト P D - L 1 または P D - L 2 のいずれかを発現する 3 0 0 . 1 9 細胞と混合し、 4 で 3 0 分間攪拌しながらインキュベートした。次いで、細胞を、ヒト P D - 1 エクトドメイン / ヒト I g G 1 融合タンパク質とともに 4 で 3 0 分間攪拌しながらインキュベートした。細胞を遠心分離により回収し、 2 % ウシ胎児血清 (F B S) を含んだ P B S ですすいだ。 P D - 1 / P D - L 1 または P D - 1 / P D - L 2 結合を、 P E 標識ヤギ抗マウス I g G 抗体 (マウス I g との反応性を除去するために吸収されたもの) とともに 4 で 3 0 分間攪拌しながらインキュベートすることによって検出した。細胞を再度、遠心分離により回収し、洗浄し、次いで、 F A C S 分析前、 2 % ホルムアルデヒドを含んだ P B S 中で保存した。対照は、アイソタイプ対照抗体 (

40

50

MOPC31C)およびPD-1(-)対照(PD-1エクトドメイン/ヒトIgG1融合タンパク質なし)とした。結果(MFI)を表4にまとめている。本アッセイでは、MFIがPD-1/PD-L結合の遮断に反比例していることがわかる。

【0266】

【表4】

【表4】

抗体	PD-L1発現 300.19細胞	PD-L2発現 300.19細胞
アイソタイプ ^o 対照	26671	19203
PD-1(-)対照	47	19
1B9.2E11.3	51	20248
4H1.G10.15	44	21100

10

20

【0267】

種々のモノクローナル抗体力価および更に付加的陰性対照を用いて、表4に示した実験結果について説明したように、同様の競合結合アッセイを行った。その結果を表5に示す。これらの結果は表4で示した結果を確認するものである。

【0268】

【表5】

【表5】

ヒトPD-L1発現300細胞

ウェル名	使用mAb	mAb特異性	mAb濃度								PEシグナルの平均値
			90 ug/mL	30 ug/mL	10 ug/mL	3.3 ug/mL	1.1 ug/mL	0.37 ug/mL	0.12 ug/mL	0.04 ug/mL	
A1	1B9	二重	62	52	57	46	66	50	188	5801	
A2	4H1	二重	49	80	48	57	92	55	61	4623	
A3	29E.2A3	ヒトPD-L1のみ	54	53	52	50	51	65	523	6105	
A4	9E5	ヒトPD-L2のみ	9390	13126	14549	12800	14701	14318	13382	12101	
A5	MOPC31C	陰性対照	11767	14889	12572	11943	13578	13454	15209	13302	
A6	細胞のみ	陰性対照	49								

30

ヒトPD-L2発現300細胞

ウェル名	使用mAb	mAb特異性	mAb濃度								PEシグナルの平均値
			90 ug/mL	30 ug/mL	10 ug/mL	3.3 ug/mL	1.1 ug/mL	0.37 ug/mL	0.12 ug/mL	0.04 ug/mL	
A8	1B9	二重	43979	52595	58371	54304	58865	55826	52061	58006	
A9	4H1	二重	52174	56129	56772	55980	54643	52394	52477	54704	
A10	29E.2A3	ヒトPD-L1のみ	55075	53919	53834	56665	56121	52881	53928	58825	
A11	9E5	ヒトPD-L2のみ	6105	24250	42020	46722	51993	51071	53939	57482	
A12	MOPC31C	陰性対照	53544	54188	52462	52618	58440	60567	59108	60825	
A7	細胞のみ	陰性対照	37								

40

【0269】

さらに、二重結合およびPD-L1のみの結合モノクローナル抗体がヒトB7-1とヒトPD-L1との結合を遮断する能力を、表4および5に示した実験結果について説明したFACS分析にしたがって評価した。簡単に述べると、300-hPD-L1細胞をmAbsとともに30分間プレインキュベートした。ヒトB7-1-ヒトIgG融合タンパク質(R&Dシステム)を1ug/mLで添加し、30分間インキュベートし、1回洗浄した。マウスIgG吸収Fab2ヤギ抗ヒトIgG-PE(Southern Biotech 2043-09)を、2.5ug/mLで30分間添加し、その後2回洗浄した。表6に示した結果は、抗体

50

1 B 9 および 4 H 1 が B 7 - 1 と P D - L 1 の結合を遮断したことを示している。

【 0 2 7 0 】

【 表 6 】

【表6】

ウェル名	mAb濃度 (ug/ml)	使用mAb							PEシグナル の平均 値
		mAb特異性	ヒトPD-L1のみ	ヒトPD-L2のみ	ヒトPD-L3のみ	二重	二重	陰性対象	
			29E.2A3	339.4C10	298.3D12	368A.1.1B9	368A.1.4H1	C1.18 mIgG2a 対照	
A1	20		811	1768	1399	917	895	4541	3590
A2	10		797	1702	879	936	914	3912	3547
A3	5		853	1620	791	933	903	3857	3579
A4	2.5		823	1715	864	933	873	3879	3879
A5	1.25		788	1793	865	910	926	3724	3493
A6	0.625		850	1760	842	804	938	3843	3707
A7	0.313		770	1754	869	944	862	3758	3962
A8	0.156		853	2267	863	944	928	4032	3722
A9	0.078		807	3087	983	1035	1141	3937	4317
A10	0.039		1227	3502	1326	1469	1707	4281	3986
A11	0.0195		1707	3467	1633	2124	2231	3505	4763
A12	0.0098		2540	4196	2240	2804	3037	4058	4406

10

【 0 2 7 1 】

20

R I M M S 免疫化

R I M M S プロトコルにしたがって、B 1 6 マウスを免疫化した。マウスの免疫化は、ヒトPD-L1-mIgG2aおよび/またはPD-L2-mIgG2aを含んだアジュバントを、表7に記載のように、皮下/腹腔内(SC/IP)または足蹠注射することによって行った。18日目に力価を評価し、脾臓細胞を回収し21日目に融合した。

【 0 2 7 2 】

【 表 7 】

【表7】

日	PD-L1	PD-L2	アジュバント	注射のタイプ
1	—	100 µg	CFA	SC/IP
1	—	5 µg	Alum	足蹠
4	25 µg	100 µg	PBS	SC/IP
4	5 µg	5 µg	Alum	足蹠
6	25 µg	50 µg	IFA	SC/IP
6	5 µg	5 µg	Alum	足蹠
8	50 µg	50 µg	PBS	SC/IP
8	5 µg	5 µg	Alum	足蹠
11	50 µg	50 µg	IFA	SC/IP
11	5 µg	5 µg	Alum	足蹠
13	50 µg	25 µg	PBS	SC/IP
13	5 µg	5 µg	Alum	足蹠
15	100 µg	25 µg	IFA	SC/IP
15	5 µg	5 µg	Alum	足蹠
18	100 µg	—	PBS	SC/IP
18	5 µg	—	Alum	足蹠

30

40

50

【 0 2 7 3 】

融合は、古典的免疫化法について説明されているように行い、ハイブリドーマ上清をヒトPD-L1およびPD-L2との結合に関してスクリーニングした。

【 0 2 7 4 】

スクリーニングアッセイは、ハイブリドーマ上清の、非トランスフェクト300.19ネズミB細胞、300.19細胞発現ヒトPD-L1、および300.19細胞発現ヒトPD-L2の混合物（比率はそれぞれ、約20%、40%、40%）への結合を試験した。抗体（ハイブリドーマ上清または対照抗体）を細胞混合物とともに、4℃で30分間攪拌しながらインキュベートし、次いで、細胞を遠心分離により回収し、2%ウシ胎児血清（FBS）を含んだPBSですすぎ、フィコエリトリン（PE）標識されたヤギ抗マウスIgG抗体とともに、4℃で30分間攪拌しながらインキュベートした。細胞を再び遠心分離により回収し、洗浄し、その後FACS分析前、2%ホルムアルデヒドを含んだPBS中で保存した。対照は、（a）ヒトPD-L1に特異的な抗体、（b）ヒトPD-L2に特異的な抗体、（c）抗PD-L1抗体とPD-L2抗体の混合物、およびアイソタイプ対照（MOPC31C）とした。

10

【 0 2 7 5 】

FACSデータは、生細胞の周りのゲート（「細胞」）を用いて解析した。ここでは、「細胞、全平均蛍光強度」は細胞の染色強度を示す。ゲート（「P1」）はアイソタイプ対照MFI上の細胞のMFIを解析するために設定した。%P1は、P1中の細胞のパーセントを示すもので、陽性染色細胞のパーセンテージを示し；P1中央蛍光強度は、P1ゲート中の細胞のMFIを示す。P1が70%より大きいハイブリドーマおよび5000より大きいP1蛍光シグナルをサブクローニングの対象と考え、さらなる特徴付けを行った。RIMMSプロトコルから29のハイブリドーマのFACSデータを表8に示す。

20

【 0 2 7 6 】

【表 8】

【表8】

ウェル名	細胞、全平均蛍光強度	P1中央蛍光強度	% P1
1A8	116863	105657	91.3
1E4.	102070	102939	91.6
8G2	35225	38667	85.8
1D11	42647	19719	90.2
3A2	38540	17065	85
3B11	6379	7605	73.7
3F4	10722	10532	86
3H6	85640	12883	89.4
4C1	88622	21998	90.7
4E1.	12184	11595	86.7
5A6	9395	9587	81.3
9C12	9069	8981	86.1
1B4	6716	5889	83.1
1B11	7445	5974	84.4
1F6	94441	119771	81.1
1H8	5201	6268	70.9
1H12	6357	6072	85.6
2D5	96521	115477	84
2H11	51086	47720	84.4
3D12	5534	5690	84.2
4C8	88961	109423	78.2
4C9	51501	15177	87.4
5E10.	11634	7170	80.4
5H4	5281	5642	80
5H5	5172	5537	80.6
8A1	7224	6657	79.2
9G9	11365	11400	73.6
10A7	30658	41786	54.9
10H6	17860	26851	46.4
抗PD-L1対照	99315	205842	48.2
抗PD-L2対照	82131	170077	48.2
抗PD-L1/L2対照	156820	179733	87.2
アイソタイプ対照	1620	151802	0.9

【0277】

実施例2：インビトロ抗体ライブラリー技術を用いた、PD-L1およびPD-L2とPD-1との相互作用を遮断する抗体の発見と特徴付け

PD-L1およびPD-L2可溶性細胞外ドメインタンパク質およびPD-L1またはPD-L2タンパク質によりトランスフェクトされた細胞を用いて、PD-L1およびPD-L2の両方と結合し、それらとPD-1との相互作用を遮断する抗体を発見するためにインビトロ抗体ライブラリーを選択する。ライブラリー選択に用いられる可溶性PD-L1およびPD-L2標的タンパク質は、全エクソドメインコンストラクトまたはIgVドメインのみを含むコンストラクトである。

【0278】

PD-L1およびPD-L2とPD-1との相互作用を遮断する抗体を発見するために

複数のライブラリーが用いられる。そのライブラリーは、57名の非免疫化ヒトボランティアの末梢血から単離した遺伝子の重鎖および軽鎖のランダム対で構築される、 1.2×10^{10} メンバーライブラリーであるメタ (Metha) 1 ライブラリー、57名の非免疫化ヒトボランティアの末梢血から捕捉した重鎖および軽鎖のランダム対で構築される 1.5×10^{10} メンバーライブラリーであるメタ (Metha) 2 ライブラリー、および lox ライブラリーに基づく 1.2×10^9 メンバー半合成ライブラリーであるグリフィン (Griffin) 1 ライブラリーを含む (Herschorn ら (2010) J. Immunol. 185 (12) : 7623-32)。固定化された標的タンパク質でパニングを行って、あるいはタグを付けた標的タンパク質とともにインキュベーションおよびその後のタグを用いた回収 (例えば、ビオチニル化標的タンパク質を回収するために、ストレプトアビジンでコーティングされた磁性ビーズを用いる) によってライブラリーを選択する。多数回の選択、および回収、およびファージのレスキューを行って所望の抗体は強化される。

10

【0279】

所望の抗体の発見は複数選択法を用いて行われる。それは、1以上の標的タンパク質により選択するステップ、その後、他の標的タンパク質に結合するための選択された抗体をスクリーニングするステップ、標的タンパク質を変更して選択を繰り返すステップを含む。さらに、すべての標的タンパク質を発現する細胞についての選択が、をいくつかの方法に組み込まれる。

【0280】

ヒト PD-L1 およびヒト PD-L2 の両方に特異的に結合する抗体をコードする DNA を選択されたファージから単離し、全ての IgG 型抗体を構築するために使用する。該抗体を、標的タンパク質 (ヒト PD-L1 およびヒト PD-L2) ならびにマウスおよびカニクイザルホモログに対する結合に関して特徴付ける。さらに、該抗体を PD-L1 / PD-1 と PD-L2 / PD-1 との相互作用の遮断アッセイにおいて試験する (例えば、実施例 1 参照)。

20

【0281】

参照による援用

ここに述べた全ての刊行物、特許、および特許出願は、あたかも各個々の刊行物、特許または特許出願が参照により特にかつ個々に援用されるべきことが示されるように、参照によりその全体がここに援用される。相反する場合、ここでの定義を含む本出願が優先する。

30

【0282】

例えば、ワールドワイドウェブにゲノム科学研究所 (The Institute for Genomic Research (TIGR)) および / またはワールドワイドウェブに国立生物工学情報センター (National Center for Biotechnology Information (NCBI)) によって維持されているもののような公的データベースにおけるエントリーに相関する受託番号を引用する任意のポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列もまた、その全体が参照によりまた援用される。

【0283】

均等物

当業者であれば、ここに記載された発明の特定の実施態様に対する多くの均等物を認識し、またはルーチンの実験に過ぎない実験を使用して確認できるであろう。そのような均等物は以下の特許請求の範囲に包含されることが意図される。

40

【配列表】

2015527342000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2013/053392

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - C07K 16/28 (2013.01)

USPC - 530/388.15

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)

IPC(8) - A61K 39/395; A61P 33/00, 33/10, 35/00, 37/02; C07K 16/18, 16/28, 16/30; C12N 5/10, 5/12, 5/18, 5/24; G01N 33/50 (2013.01)
USPC - 424/142.1, 143.1, 144.1; 435/326, 328, 330, 331, 334, 343.1; 514/3.8, 3.9, 6.9, 18.9, 19.3, 885; 530/388.15, 388.22, 388.75, 388.8; 536/23.53Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
CPC - A61K 31/69, 38/00, 2039/505; C07K 2317/21, 2319/00 (2013.01)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Orbit, Google Patents, Google Scholar

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2011/0033884 A1 (WOOD et al) 10 February 2011 (10.02.2011) entire document	1-10, 15-19, 22, 24-44
Y		11, 12, 14
Y	US 2012/0135003 A1 (KAMOGAWA) 31 May 2012 (31.05.2012) entire document	11, 12, 14
A	US 2009/0055944 A1 (KORMAN et al) 26 February 2009 (26.02.2009) entire document	1-19, 22, 24-44
A	ANSARI et al. "The Programmed Death-1 (PD-1) Pathway Regulates Autoimmune Diabetes in Nonobese Diabetic (NOD) Mice" J. Exp. Med Volume 198, Number 1, July 7, 2003, Pages 63-69. entire document	1-19, 22, 24-44

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

* 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

13 December 2013

Date of mailing of the international search report

24 DEC 2013

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Blaine R. Copenheaver

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2013/053392

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

a. (means)

☐

on paper

☒

in electronic form

b. (time)

☒

in the international application as filed

☐

together with the international application in electronic form

☐

subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

Specifically, SEQ ID NOs 1, 3-10, and 14-22 were searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2013/053392

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 20, 21, and 23
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード(参考)

C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 1
A 0 1 K	67/027	(2006.01)	A 0 1 K	67/027	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	31/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/00	
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P	31/12	
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 P	33/00	(2006.01)	A 6 1 P	33/00	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	5/38	(2006.01)	A 6 1 P	5/38	
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	21/00	(2006.01)	A 6 1 P	21/00	
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	5/14	(2006.01)	A 6 1 P	5/14	
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	21/04	(2006.01)	A 6 1 P	21/04	
A 6 1 P	7/06	(2006.01)	A 6 1 P	7/06	
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	17/06	
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	
G 0 1 N	33/543	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
			G 0 1 N	33/543	5 4 5 A

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

(72)発明者 シャープ, アーリーン, エイチ.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 4 4 5 ブルックライン ウォルナット ストリート
3 0 5

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA13 BA43 BA61 CA01 DA01 DA02 DA05 DA11 EA04

GA01 GA11 HA08

4B064 AG26 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01 DA13

4B065 AA01X AA57X AA87X AA90X AA90Y AB01 AB02 BA02 CA24 CA25

CA44 CA46
4C085 AA14 CC23 DD21 EE01 GG02 GG04 GG08
4H045 AA11 AA30

专利名称(译)	单抗原抗PD-1和PD-1双键抗体及其使用方法		
公开(公告)号	JP2015527342A	公开(公告)日	2015-09-17
申请号	JP2015525618	申请日	2013-08-02
[标]申请(专利权)人(译)	达那-法伯癌症研究所		
申请(专利权)人(译)	达纳 - 法伯癌症研究所有限公司		
[标]发明人	フリーマンゴードンジェイ シャープアーリーンエイチ		
发明人	フリーマン, ゴードン, ジェイ. シャープ, アーリーン, エイチ.		
IPC分类号	C07K16/18 C12P21/08 C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A01K67/027 A61K39/395 A61P43/00 A61P37/02 A61P31/00 A61P31/12 A61P31/04 A61P33/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P29/00 A61P5/38 A61P1/16 A61P37/06 A61P19/02 A61P17/00 A61P1/04 A61P21/00 A61P3/10 A61P13/12 A61P5/14 A61P25/00 A61P21/04 A61P7/06 A61P17/06 A61P9/00 G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	A61P1/04 A61P1/16 A61P3/10 A61P5/14 A61P5/38 A61P7/06 A61P9/00 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P33/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/04 A61P37/06 A61P43/00 C07K16/2827 C07K2317/33 C07K2317/34 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/76 A01K67/0278 A01K2227/105 A01K2267/01 C07K16/2803 C07K2317/31 G01N33/57492 G01N33/6872 G01N2333/70503 G01N2800/56		
FI分类号	C07K16/18.ZNA C12P21/08 C12N15/00.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 A01K67/027 A61K39/395.N A61P43/00.105 A61P37/02 A61P31/00 A61P31/12 A61P31/04 A61P33/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P29/00 A61P5/38 A61P1/16 A61P37/06 A61P19/02 A61P17/00 A61P1/04 A61P21/00 A61P3/10 A61P13/12 A61P5/14 A61P25/00 A61P21/04 A61P7/06 A61P17/06 A61P29/00.101 A61P9/00 G01N33/53.D G01N33/543.545.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA13 4B024/BA43 4B024/BA61 4B024/CA01 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA04 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA08 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/CC23 4C085/DD21 4C085/EE01 4C085/GG02 4C085/GG04 4C085/GG08 4H045/AA11 4H045/AA30		
优先权	61/679190 2012-08-03 US		
其他公开文献	JP6403166B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明部分基于鉴定对PD-L1和PD-L2均具有结合亲和力的新型抗体及其使用方法。

(21) 出願番号	特願2015-525618 (P2015-525618)	(71) 出願人	511071555
(86) (22) 出願日	平成25年8月2日 (2013.8.2)		ダナーファーバー キャンサー インステ イテュート, インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成27年4月1日 (2015.4.1)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02 115-5450, ボストン, ブルッ クライン アヴェニュー 450
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/053392		
(87) 国際公開番号	W02014/022758		
(87) 国際公開日	平成26年2月6日 (2014.2.6)		
(31) 優先権主張番号	61/679,190	(74) 代理人	100136630
(32) 優先日	平成24年8月3日 (2012.8.3)		弁理士 水野 祐啓
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	フリーマン, ゴードン, ジェイ. アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2445 ブルックライン ウォルナット ストリート 305
最終頁に続く			