

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7003036号

(P7003036)

(45)発行日 令和4年2月4日(2022.2.4)

(24)登録日 令和4年1月5日(2022.1.5)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13

Z N A

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

C 1 2 Q 1/02

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

T

A 6 1 K 51/10 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

L

A 6 1 K 45/00 (2006.01)

A 6 1 K 51/10

2 0 0

請求項の数 18 (全79頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-528648(P2018-528648)

(86)(22)出願日 平成28年12月1日(2016.12.1)

(65)公表番号 特表2019-509976(P2019-509976  
A)

(43)公表日 平成31年4月11日(2019.4.11)

(86)国際出願番号 PCT/US2016/064394

(87)国際公開番号 WO2017/096026

(87)国際公開日 平成29年6月8日(2017.6.8)

審査請求日 令和1年11月29日(2019.11.29)

(31)優先権主張番号 62/262,303

(32)優先日 平成27年12月2日(2015.12.2)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

前置審査

(73)特許権者 517343508

エスティーキューブ、インコーポレイテ  
ッド大韓民国 0 6 1 6 4 ソウル、ガンナム  
- グ、ヨンドン - デロ、5 1 1、トレー  
ド センター トレード タワー、2 2 0 1

(73)特許権者 500039463

ボード オブ リージェンツ、ザ ユニバ  
ーシティ オブ テキサス システム  
BOARD OF REGENTS, TH  
E UNIVERSITY OF TEX  
AS SYSTEMアメリカ合衆国 7 8 7 0 1 テキサス州  
、オースティン、ウェスト 7 番 ストリ  
ート 2 1 0

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 グリコシル化PD-1に対して特異的な抗体およびその使用方法

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

配列番号6のアミノ酸配列を有するCDR H1と、配列番号7のアミノ酸配列を有する  
CDR H2と、配列番号8のアミノ酸配列を有するCDR H3とを含むVHドメイン；  
または

配列番号9のアミノ酸配列を有するCDR H1と、配列番号10のアミノ酸配列を有す  
るCDR H2と、配列番号8のアミノ酸配列を有するCDR H3とを含むVHドメイン  
；または

配列番号11のアミノ酸配列を有するCDR H1と、配列番号12のアミノ酸配列を有  
するCDR H2と、配列番号8のアミノ酸配列を有するCDR H3とを含むVHドメ  
イン；または

配列番号13のアミノ酸配列を有するCDR H1と、配列番号14のアミノ酸配列を有  
するCDR H2と、配列番号15のアミノ酸配列を有するCDR H3とを含むVHドメ  
イン；および

配列番号16のアミノ酸配列を有するCDR L1と、配列番号17のアミノ酸配列を有  
するCDR L2と、配列番号18のアミノ酸配列を有するCDR L3とを含むVLドメ  
イン；または

配列番号19のアミノ酸配列を有するCDR L1と、配列番号20のアミノ酸配列を有  
するCDR L2と、配列番号21のアミノ酸配列を有するCDR L3とを含むVLドメ  
イン

を有する、P D - 1に結合する単離された抗体。

【請求項 2】

V<sub>H</sub>ドメインが、配列番号 3 のアミノ酸配列を有し、V<sub>L</sub>が、配列番号 5 のアミノ酸配列を有する、単離された抗体。

【請求項 3】

V<sub>H</sub>ドメインが、配列番号 23 のアミノ酸配列を有し、V<sub>L</sub>ドメインが、配列番号 25 のアミノ酸配列を有する、単離された抗体。

【請求項 4】

V<sub>H</sub>ドメインが、配列番号 3 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を有し、V<sub>L</sub>ドメインが、配列番号 5 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の単離された抗体。

10

【請求項 5】

配列番号 26 のアミノ酸配列を有する C D R<sub>H1</sub> と、配列番号 27 のアミノ酸配列を有する C D R<sub>H2</sub> と、配列番号 28 のアミノ酸配列を有する C D R<sub>H3</sub> とを含む V<sub>H</sub>ドメイン；または

配列番号 29 のアミノ酸配列を有する C D R<sub>H1</sub> と、配列番号 30 のアミノ酸配列を有する C D R<sub>H2</sub> と、配列番号 28 のアミノ酸配列を有する C D R<sub>H3</sub> とを含む V<sub>H</sub>ドメイン；または

配列番号 31 のアミノ酸配列を有する C D R<sub>H1</sub> と、配列番号 32 のアミノ酸配列を有する C D R<sub>H2</sub> と、配列番号 28 のアミノ酸配列を有する C D R<sub>H3</sub> とを含む V<sub>H</sub>ドメイン；または

20

配列番号 33 のアミノ酸配列を有する C D R<sub>H1</sub> と、配列番号 34 のアミノ酸配列を有する C D R<sub>H2</sub> と、配列番号 35 のアミノ酸配列を有する C D R<sub>H3</sub> とを含む V<sub>H</sub>ドメイン；および

配列番号 36 のアミノ酸配列を有する C D R<sub>L1</sub> と、配列番号 37 のアミノ酸配列を有する C D R<sub>L2</sub> と、配列番号 38 のアミノ酸配列を有する C D R<sub>L3</sub> とを含む V<sub>L</sub>ドメイン；または

配列番号 39 のアミノ酸配列を有する C D R<sub>L1</sub> と、配列番号 40 のアミノ酸配列を有する C D R<sub>L2</sub> と、配列番号 41 のアミノ酸配列を有する C D R<sub>L3</sub> とを含む V<sub>L</sub>ドメイン

30

を有する、P D - 1に結合する単離された抗体。

【請求項 6】

V<sub>H</sub>ドメインが、配列番号 23 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を有し、V<sub>L</sub>ドメインが、配列番号 25 のアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を有する、請求項 5 に記載の単離された抗体。

【請求項 7】

ヒトフレームワーク領域を有する、請求項 1 または 5 に記載の単離された抗体。

【請求項 8】

ヒト定常ドメインを含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の単離された抗体。

【請求項 9】

40

ヒト化抗体である、請求項 1 または 5 に記載の単離された抗体。

【請求項 10】

イメージング剤、化学療法剤、毒素または放射性核種とコンジュゲートされている、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の単離された抗体。

【請求項 11】

薬学的に許容される担体中に請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の単離された抗体を含む組成物。

【請求項 12】

がんを有する対象を処置するための組成物であって、薬学的に許容される組成物中に有効量の請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の単離された抗体を含む、組成物。

50

## 【請求項 1 3】

前記がんが、乳がん、肺がん、頭頸部がん、前立腺がん、食道がん、気管がん、皮膚がん、脳がん、肝臓がん、膀胱がん、胃がん、膵臓がん、卵巣がん、子宮がん、子宮頸がん、精巣がん、結腸がん、直腸がんまたは皮膚がんである、請求項 1 2 に記載の組成物。

## 【請求項 1 4】

前記組成物が、静脈内、皮内、腫瘍内、筋肉内、腹腔内、皮下または局所投与するためのものである、請求項 1 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 1 5】

抗 P D - 1 抗体、抗 P D - L 1 抗体、または抗 C T L A - 4 抗体を含む第 2 の抗がん剤をさらに含む、請求項 1 2 に記載の組成物。

10

## 【請求項 1 6】

前記第 2 の抗がん剤が、ペムブロリズマブ、ニボルマブ、ピディリズマブ、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、アベルマブまたはイピリムマブである、請求項 1 5 に記載の組成物。

## 【請求項 1 7】

P D - 1 グリコシル化を評価する方法であって、P D - 1 含有試料を請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の抗体と接触させることを含む方法。

## 【請求項 1 8】

*in vitro* の方法としてさらに定義されるか、または前記試料が細胞試料である、請求項 1 7 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

20

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

## 配列表

本出願は、A S C I I 形式で電子出願した配列表を含み、該配列表は、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。2 0 1 6 年 1 1 月 3 0 日に作成した前記 A S C I I コピーは、2 4 2 5 8 \_ 1 0 5 0 0 5 P C T \_ S L . t x t という名であり、サイズは 1 9 , 8 1 9 バイトである。

## 【0 0 0 2】

本発明は、一般に、医学、分子生物学および腫瘍学の分野に関する。より詳細には、本発明は、がんを処置するための抗体に関する。

30

## 【背景技術】

## 【0 0 0 3】

T 細胞活性化の永続化は、広範囲の悪性がんの処置を劇的に変化させる。例えば、T 細胞応答を標的にする F D A により初めて認可されたチェックポイント遮断薬である、イピリムマブの開発により、転移性黒色腫の処置が見込めるようになった (Hodi et al., The New England Journal of Medicine 363, 711-723 (2010))。抗細胞傷害性 T リンパ球抗原 - 4 (C T L A - 4) モノクローナル抗体は、黒色腫患者の処置において有望な結果を示したが、P D - 1 と P D - L 1 の両方を標的にする第二世代チェックポイント阻害剤は、第 I I I 相試験においてより良好な臨床的活性および安全性を明示した (Topalian et al., The New England Journal of Medicine 366, 2443-2454 (2012); Brahmer et al., The New England Journal of Medicine 366, 2455-2465 (2012))。P D - L 1 は、その免疫抑制活性に加えて、がん細胞の進行を誘導する発がん能も有する (Topalian et al., The New England Journal of Medicine 366, 2443-2454 (2012); Page et al., Annual Review of Medicine 65, 185-202 (2014)) ため、P D - 1 / P D - L 1 を標的にすることは、P D - 1 による免疫抑制を遮断する上に P D - L 1 による細胞進行を低減させることにより二重の効力をもたらす (Okazaki et al., Nature Immunology 14, 1212-1218 (2013))、より感度の高い結果となると予想される (Topalian et al., The New England Journal of Medicine 366, 2443-2454 (2012); Brahmer et al., The New England Journal of Medicine 366, 2455-2465 (2012); Hamid et al., The New England Journal of Medicine, 369, 134-144 (2013))。

40

50

2014年に米国では抗PD-L1および/または抗PD-1抗体の効力を単一薬剤としてまたは組み合わせて試験する10件を超える治験が進行中であった (Page et al., Annual Review of Medicine 65, 185-202 (2014))。有望な結果を有する成功した治験は幾つかあるが、PD-L1およびPD-1の病態生理学的機能および調節メカニズムは、不完全にしか解明されていない。

#### 【0004】

沈黙した免疫応答を再び目覚めさせることが、最近では、外科的切除、化学療法、放射線治療および標的療法後の処置の選択肢のレパートリーに加えられている。抗CTLA-4モノクローナル抗体の使用 (Dunn et al., Nature Immunology 3, 991-998(2002); Leach et al., Science 271, 1734-1736 (1996)) の使用は、転移性黒色腫の処置において成功を最初は明示したが、自己免疫応答も誘導することが明らかになってきた。免疫細胞のみに影響を及ぼす抗CTLA-4とは異なり、抗PD-L1および抗PD-1は、がん細胞とT細胞の両方からの二重の影響を生じさせる腫瘍部位に対して主として作用するため、有害作用を制限し、より良好な治療効力をもたらす (Okazaki et al., Nature Immunology 14, 1212-1218 (2013))。しかし、がん細胞におけるPD-1/PD-L1経路をうまく標的化するための新たな治療法および方法論が依然として必要とされている。

#### 【発明の概要】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0005】

本明細書で提供されるのは、非グリコシル化PD-1と比較してグリコシル化PD-1と選択的に結合する単離されたモノクローナル抗体 (本明細書では抗glycPD-1抗体) である。一部の態様では、これらの抗体は、非グリコシル化PD-1と比較して、N49、N58、N74および/またはN116位でグリコシル化されたPD-1と選択的に結合する。

#### 【0006】

一部の実施形態では、単離された抗体は、N49グリコシル化を有するヒトPD-1と選択的に結合する。一部の実施形態では、単離された抗体は、N58グリコシル化を有するヒトPD-1と選択的に結合する。一部の実施形態では、単離された抗体は、N74グリコシル化を有するヒトPD-1と選択的に結合する。一部の実施形態では、単離された抗体は、N116グリコシル化を有するヒトPD-1と選択的に結合する。一部の実施形態では、単離された抗体は、N49およびN58グリコシル化を有するヒトPD-1と選択的に結合する。一部の実施形態では、単離された抗体は、N49およびN74グリコシル化を有するヒトPD-1と選択的に結合する。一部の実施形態では、単離された抗体は、N49およびN116グリコシル化を有するヒトPD-1と選択的に結合する。一部の実施形態では、単離された抗体は、N58およびN74グリコシル化を有するヒトPD-1と選択的に結合する。一部の実施形態では、単離された抗体は、N58およびN116グリコシル化を有するヒトPD-1と選択的に結合する。一部の実施形態では、単離された抗体は、N49、N58およびN74グリコシル化を有するヒトPD-1と選択的に結合する。一部の実施形態では、単離された抗体は、N49、N74およびN116グリコシル化を有するヒトPD-1と選択的に結合する。一部の実施形態では、単離された抗体は、N58、N74およびN116グリコシル化を有するヒトPD-1と選択的に結合する。一部の実施形態では、単離された抗体は、N49、N58、N74およびN116グリコシル化を有するヒトPD-1と選択的に結合する。

#### 【0007】

一部の態様では、抗体は、1つまたは複数のグリコシル化モチーフと選択的に結合する。一部の態様では、抗体は、グリコシル化モチーフを含む糖ペプチドおよびその隣接ペプチ

10

20

30

40

50

ドと結合する。一部の態様では、抗体は、三次元でグリコシル化モチーフの1つまたは複数の付近に位置するペプチド配列と結合する。ある特定の態様では、抗体は、非グリコシル化PD-1に対して示される $K_d$ の半分未満の $K_d$ でグリコシル化PD-1と結合する。さらなる態様では、抗体は、非グリコシル化PD-1に対して示される $K_d$ の少なくとも10倍少ない $K_d$ でグリコシル化PD-1と結合する。

#### 【0008】

ある特定の態様では、抗glycPD-1抗体は、PD-1と結合し、1つまたは複数のグリコシル化モチーフを遮蔽(mask)または隠蔽(screen)してそのモチーフと分子の結合または他の相互作用を遮断し、PD-1のそのグリコシル化部位でのグリコシル化を阻止することができる。特定の実施形態では、抗glycPD-1抗体は、N49、N58、N74およびN116のうちの1つまたは複数のグリコシル化部位を遮蔽する。

10

#### 【0009】

特定の態様で提供されるのは、配列番号3および5のアミノ酸配列をそれぞれ有する重鎖および軽鎖可変ドメイン(シグナル配列を一切有さない成熟V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>領域アミノ酸)有する抗glycPD-1モノクローナル抗体STM418、およびその抗原結合部分、ならびにそのヒト化およびキメラ形態である。本明細書で提供されるのは、グリコシル化PD-1との結合についてSTM418 MA bと競合する、および/またはSTM418と同じエピトープと結合する、抗glycPD-1抗体である。STM418のエピトープは下記の通りであり、PD-1アミノ酸配列内の接触残基に下線が引かれている：  
34 P P I F S P A L L V V 44 ... 49 N A I F I C S F S N T 59 ... 104 R D F H M  
S V V R A R R N D S G T Y L C G 124

20

(配列番号1のアミノ酸34~44、49~59および104~124)。提供されるのは、配列番号1のグリコシル化PD-1配列のアミノ酸34~44、49~59および104~124の領域を有し、特に、配列番号1のT36、S38、T51、T53、S55、S109、R115、S118およびY121位のうちの1つまたは複数に接触点がある、エピトープに結合する抗体である。特定の実施形態では、提供されるのは、グリコシル化PD-1に選択的に結合し、配列番号1の36、38、51、53、55、109、115、118および121位のすべてとの結合接触点を有する、抗体である。

#### 【0010】

提供されるのは、核酸(DNA)であり、STM418 MA bの重鎖および軽鎖可変(V)ドメインの対応するアミノ酸配列は、下記の表3に示されている。配列番号2および3は、STM418 V<sub>H</sub>ドメインの核酸配列およびアミノ酸配列であり、配列番号4および5は、STM418 カッパ軽鎖可変ドメインの成熟形態の核酸配列およびアミノ酸配列である。表4は、STM418のコチア、AbM、カバットおよびコンタクト(Contact)重鎖および軽鎖VドメインCDRを提供するものである。

30

#### 【0011】

ある実施形態では、グリコシル化PD-1に特異的かつ優先的に結合する抗glycPD-1抗体は、配列番号3のアミノ酸配列を有するV<sub>H</sub>ドメイン、および/または配列番号5のアミノ酸配列を有するV<sub>L</sub>ドメインを含む。ある実施形態では、抗glycPD-1抗体は、グリコシル化PD-1との特異的結合について、配列番号3のV<sub>H</sub>ドメインおよび配列番号5のV<sub>L</sub>ドメインを含む抗体と競合する。他の実施形態では、抗glycPD-1抗体は、配列番号3のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一であるV<sub>H</sub>ドメイン、および/または配列番号5のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一であるV<sub>L</sub>ドメインを含む。これらの抗glycPD-1抗体は、キメラ抗体であってもよく、例えばヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4からのヒト定常ドメインを含んでいてもよい。

40

#### 【0012】

ある実施形態では、グリコシル化PD-1に特異的かつ優先的に結合する抗glycPD-1抗体は、配列番号6、配列番号7および配列番号8のアミノ酸配列をそれぞれ有する

50

コチア C D R 1 ~ 3 を含む V<sub>H</sub> ドメインを含むか、配列番号 9、配列番号 10 および配列番号 8 のアミノ酸配列をそれぞれ有する A b M C D R 1 ~ 3 を含む V<sub>H</sub> ドメインを含むか、配列番号 11、配列番号 12 および配列番号 8 のアミノ酸配列をそれぞれ有するカバット C D R 1 ~ 3 を含む V<sub>H</sub> ドメインを含むか、もしくは配列番号 13、配列番号 14 および配列番号 15 のアミノ酸配列をそれぞれ有するコンタクト C D R 1 ~ 3 を含む V<sub>H</sub> ドメインを含むか、またはそれらの組み合わせを含む。ある実施形態では、抗 g l y c P D - 1 抗体は、配列番号 6、配列番号 7 および配列番号 8 のアミノ酸配列をそれぞれ有するコチア C D R 1 ~ 3 を含む V<sub>H</sub> ドメインを含むか、配列番号 9、配列番号 10 および配列番号 8 のアミノ酸配列をそれぞれ有する A b M C D R 1 ~ 3 を含む V<sub>H</sub> ドメインを含むか、配列番号 11、配列番号 12 および配列番号 8 のアミノ酸配列をそれぞれ有するカバット C D R 1 ~ 3 を含む V<sub>H</sub> ドメインを含むか、もしくは配列番号 13、配列番号 14 および配列番号 15 のアミノ酸配列をそれぞれ有するコンタクト C D R 1 ~ 3 を含む V<sub>H</sub> ドメインを含むか、またはそれらの組み合わせを含む抗体と、グリコシル化 P D - 1 との特異的結合について競合する。ある実施形態では、グリコシル化 P D - 1 に特異的かつ優先的に結合する抗 g l y c P D - 1 抗体は、配列番号 16、配列番号 17 および配列番号 18 のアミノ酸配列をそれぞれ有するコチア、A b M もしくはカバット C D R 1 ~ 3 を含む C D R 1 ~ 3 を含む V<sub>L</sub> ドメインを含むか、または配列番号 19、配列番号 20 および配列番号 21 のアミノ酸配列をそれぞれ有するコンタクト C D R 1 ~ 3 を含む V<sub>L</sub> ドメインを含むか、あるいはそれらの組み合わせを含む。ある実施形態では、抗 g l y c P D - 1 抗体は、配列番号 16、配列番号 17 および配列番号 18 のアミノ酸配列をそれぞれ有するコチア、A b M もしくはカバット C D R 1 ~ 3 を含む V<sub>L</sub> ドメインを含むか、または配列番号 19、配列番号 20 および配列番号 21 のアミノ酸配列をそれぞれ有するコンタクト C D R 1 ~ 3 を含む V<sub>L</sub> ドメインを含むか、あるいはそれらの組み合わせを含む抗体と、グリコシル化 P D - 1 との特異的結合について競合する。ある実施形態では、抗 g l y c P D - 1 抗体は、配列番号 6、配列番号 7 および配列番号 8 のアミノ酸配列をそれぞれ有するコチア C D R 1 ~ 3 を含む V<sub>H</sub> ドメインを含むか、配列番号 9、配列番号 10 および配列番号 8 のアミノ酸配列をそれぞれ有する A b M C D R 1 ~ 3 を含む V<sub>H</sub> ドメインを含むか、配列番号 11、配列番号 12 および配列番号 8 のアミノ酸配列をそれぞれ有するカバット C D R 1 ~ 3 を含む V<sub>H</sub> ドメインを含むか、または配列番号 13、配列番号 14 および配列番号 15 のアミノ酸配列をそれぞれ有するコンタクト C D R 1 ~ 3 を含む V<sub>H</sub> ドメインを含み、かつ配列番号 16、配列番号 17 および配列番号 18 のアミノ酸配列をそれぞれ有するコチア、A b M もしくはカバット C D R 1 ~ 3 を含む V<sub>L</sub> ドメインを含むか、または配列番号 19、配列番号 20 および配列番号 21 のアミノ酸配列をそれぞれ有するコンタクト C D R 1 ~ 3 を含む V<sub>L</sub> ドメインを含む、抗体を含むか、あるいはその抗体と結合について競合する。好ましくは、V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> ドメインは、C D R の同じクラスを有する、すなわち、両方とも、コチア、A b M、カバットまたはコンタクト C D R を有する

### 【 0 0 1 3 】

他の実施形態では、抗 g l y c P D - 1 抗体は、配列番号 6、配列番号 7 および配列番号 8 のアミノ酸配列をそれぞれ有する C D R のうちの、または配列番号 9、配列番号 10 および配列番号 8 のアミノ酸配列をそれぞれ有する C D R のうちの、または配列番号 11、配列番号 12 および配列番号 8 のアミノ酸配列をそれぞれ有する C D R のうちの、または配列番号 13、配列番号 14 および配列番号 15 のアミノ酸配列をそれぞれ有する C D R のうちの 1、2 または 3 つの C D R に 1、2、3、4 または 5 つのアミノ酸置換があるアミノ酸配列を有する C D R H 1、H 2 および H 3 を含む、V<sub>H</sub> ドメインを有する。抗 g l y c P D - 1 抗体は、配列番号 16、配列番号 17 および配列番号 18 のアミノ酸配列をそれぞれ有する 1、2 もしくは 3 つの C D R または配列番号 19、配列番号 20 および配列番号 21 のアミノ酸配列をそれぞれ有する 1、2 もしくは 3 つの C D R に 1、2、3、4 または 5 つのアミノ酸置換があるアミノ酸配列を有する、C D R L 1、L 2 および L 3 を含む V<sub>L</sub> ドメインを有しうる。抗 g l y c P D - 1 抗体は、V<sub>H</sub> ドメインと V<sub>L</sub> ド

10

20

30

40

50

メインの両方の C D R にアミノ酸置換があってもよい。一部の実施形態では、アミノ酸置換は、保存的置換である。

#### 【 0 0 1 4 】

好ましくは、上述の抗体は、ヒトフレームワーク領域を有し、すなわち、S T M 4 1 8 のヒト化形態、および任意選択的に、例えばヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3 または I g G 4 からのヒト定常ドメインを含む。

#### 【 0 0 1 5 】

結合親和性または他のパラメーターを向上させるためにヒト化抗体の C D R および / またはフレームワーク領域において 1 つまたは複数のアミノ酸置換を行ってもよいことは、当業者には理解されるであろう。実施形態では、抗 g l y c P D - 1 抗体は、グリコシル化 P D - 1 との特異的結合について、上記 V H および V L ドメインならびに C D R を内部に含む抗体と競合する。実施形態では、抗 g l y c P D - 1 抗体は、非グリコシル化 P D - 1 との該抗体の結合により示される K<sub>d</sub> の半分未満の K<sub>d</sub> でグリコシル化 P D - 1 と結合する。ある実施形態では、抗 g l y c P D - 1 抗体は、非グリコシル化 P D - 1 に対して示される K<sub>d</sub> の少なくとも 5 倍少ない K<sub>d</sub> でグリコシル化 P D - 1 タンパク質と結合する。ある実施形態では、抗 g l y c P D - 1 抗体は、非グリコシル化 P D - 1 タンパク質との該抗体の結合により示される K<sub>d</sub> の少なくとも 1 0 倍少ない K<sub>d</sub> でグリコシル化 P D - 1 タンパク質と結合する。

#### 【 0 0 1 6 】

ある実施形態では、実施例 2 に記載の細胞フローサイトメトリー結合アッセイにおいて、抗体は、野生型 P D - 1 を発現する細胞との結合であって、非グリコシル化 P D - 1 を発現する細胞との結合についての M F I より 3 倍、5 倍、1 0 倍、2 0 倍、5 0 倍、または 1 0 0 倍大きい M F I として表される結合を示す。ある実施形態では、抗体は、蛍光標識またはマーカーにより直接または間接的に検出可能である。ある実施形態では、抗体は、蛍光標識もしくはマーカー、例えば、F I T C で直接標識されるか、または蛍光標識二次抗体により検出される。ある実施形態では、グリコシル化 P D - 1 に対する S T M 4 1 8 M A b またはそのキメラもしくはヒト化形態の結合親和性は、5 ~ 2 0 n M または 5 ~ 1 0 n M ( 下限値と上限値を含む ) である。ある実施形態では、抗体は、P D - 1 と P D - L 1 の相互作用を阻害し、特に、エフェクター T 細胞により発現されるグリコシル化 P D - 1 と腫瘍細胞により発現される P D - L 1 の相互作用を阻害する。

#### 【 0 0 1 7 】

別の特定の態様で提供されるのは、グリコシル化 P D - 1 に特異的に結合する、配列番号 2 3 および 2 5 のアミノ酸配列をそれぞれ有する重鎖および軽鎖可変ドメイン ( 成熟 V H および V L 領域アミノ酸配列 ) を有する抗 g l y c P D - 1 モノクローナル抗体 S T M 4 3 2、およびその抗原結合部分、ならびにそのヒト化およびキメラ形態である。配列番号 2 2 および 2 4 である S T M 4 3 2 M A b の重鎖および軽鎖可変ドメインをそれぞれコードする核酸配列は、下記の表 3 に示されている。また、表 5 に示されているのは、S T M 4 3 2 のコチア、A b M、カバットおよびコンタクト重鎖および軽鎖 V ドメイン C D R である。S T M 4 3 2 M A b は、接触残基、R 9 5、R 1 0 3、S 1 2 7 および K 1 3 1 に下線が引かれている、配列 9 1 D C R F R V T Q L P N G R D F H M 1 0 7 ... 1 2 3 C G A I S L A P K A Q I 1 3 4 ( 配列番号 1 のアミノ酸 D 9 1 ~ M 1 0 7 および C 1 2 3 ~ I 1 3 4 ) を有する、グリコシル化 P D - 1 上のエピトープと結合する。したがって、提供されるのは、上記の S T M 4 3 2 エピトープと結合する抗 g l y c P D - 1 抗体である。また、提供されるのは、グリコシル化 P D - 1 との結合について S T M 4 3 2 M A b と競合する抗 g l y c - P D - 1 抗体である。

#### 【 0 0 1 8 】

ある実施形態では、グリコシル化 P D - 1 に特異的かつ優先的に結合する抗 g l y c P D - 1 抗体は、配列番号 2 3 のアミノ酸配列を有する V H ドメイン、および / または配列番号 2 5 のアミノ酸配列を有する V L ドメインを含む。ある実施形態では、抗 g l y c P D - 1 抗体は、グリコシル化 P D - 1 との特異的結合について、配列番号 2 3 の V H ドメ

10

20

30

40

50

インおよび配列番号 25 の V<sub>L</sub> ドメインを含む抗体と競合する。他の実施形態では、グリコシル化 PD-1 に特異的かつ優先的に結合する抗 g l y c PD-1 抗体は、配列番号 23 のアミノ酸配列と少なくとも 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% または 99% 同一である V<sub>H</sub> ドメイン、および / または配列番号 25 のアミノ酸配列と少なくとも 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% または 99% 同一である V<sub>L</sub> ドメインを含む。これらの抗 g l y c PD-1 抗体は、キメラ抗体であってもよく、例えばヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3 または I g G 4 からのヒト定常ドメインを含んでいてもよい。

#### 【0019】

ある実施形態では、グリコシル化 PD-1 に特異的かつ優先的に結合する抗 g l y c PD-1 抗体は、配列番号 26、配列番号 27 および配列番号 28 のアミノ酸配列をそれぞれ有するコチア CDR 1~3、配列番号 29、配列番号 30 および配列番号 28 のアミノ酸配列をそれぞれ有する A b M CDR 1~3、配列番号 31、配列番号 32 および配列番号 28 のアミノ酸配列をそれぞれ有するカバット CDR 1~3、もしくは配列番号 33、配列番号 34 および配列番号 35 のアミノ酸配列をそれぞれ有するコンタクト CDR 1~3、またはそれらの組み合わせを含む、V<sub>H</sub> ドメインを含む。ある実施形態では、抗 g l y c PD-1 抗体は、配列番号 26、配列番号 27 および配列番号 28 のアミノ酸配列をそれぞれ有するコチア CDR 1~3、配列番号 29、配列番号 30 および配列番号 28 のアミノ酸配列をそれぞれ有する A b M CDR 1~3、配列番号 31、配列番号 32 および配列番号 28 のアミノ酸配列をそれぞれ有するカバット CDR 1~3、もしくは配列番号 33、配列番号 34 および配列番号 35 のアミノ酸配列をそれぞれ有するコンタクト CDR 1~3、またはそれらの組み合わせを含む V<sub>H</sub> ドメインを含む抗体と、グリコシル化 PD-1 との特異的結合について競合する。ある実施形態では、グリコシル化 PD-1 に特異的かつ優先的に結合する抗 g l y c PD-1 抗体は、配列番号 36、配列番号 37 および配列番号 38 のアミノ酸配列をそれぞれ有するコチア、A b M もしくはカバット CDR 1~3 を含む CDR 1~3、または配列番号 39、配列番号 40 および配列番号 41 のアミノ酸配列を有するコンタクト CDR 1~3、あるいはそれらの組み合わせを含む、V<sub>L</sub> ドメインを含む。ある実施形態では、抗 g l y c PD-1 抗体は、配列番号 36、配列番号 37 および配列番号 38 のアミノ酸配列をそれぞれ有するコチア、A b M もしくはカバット CDR 1~3、または配列番号 39、配列番号 40 および配列番号 41 のアミノ酸配列を有するコンタクト CDR 1~3、あるいはそれらの組み合わせを含む V<sub>L</sub> ドメインを含む抗体と、グリコシル化 PD-1 との特異的結合について競合する。ある実施形態では、グリコシル化 PD-1 に特異的かつ優先的に結合する抗 g l y c PD-1 抗体は、配列番号 26、配列番号 27 および配列番号 28 のアミノ酸配列をそれぞれ有するコチア CDR 1~3、配列番号 29、配列番号 30 および配列番号 28 のアミノ酸配列をそれぞれ有する A b M CDR 1~3、配列番号 31、配列番号 32 および配列番号 28 のアミノ酸配列をそれぞれ有するカバット CDR 1~3 を、または配列番号 33、配列番号 34 および配列番号 35 のアミノ酸配列をそれぞれ有するコンタクト CDR 1~3 を含む V<sub>H</sub> ドメインを含み、かつ配列番号 36、配列番号 7 および配列番号 38 のアミノ酸配列をそれぞれ有するコチア、A b M もしくはカバット CDR 1~3、または配列番号 39、配列番号 40 および配列番号 41 のアミノ酸配列を有するコンタクト CDR 1~3 を含む V<sub>L</sub> ドメインを含む、抗体を含むか、あるいはその抗体と結合について競合する。

#### 【0020】

ある特定の実施形態で提供されるのは、配列番号 26、配列番号 27 および配列番号 28 のアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号 29、配列番号 30 および配列番号 28 のアミノ酸配列をそれぞれ、または配列番号 31、配列番号 32 および配列番号 28 のアミノ酸配列をそれぞれ、または配列番号 33、配列番号 34 および配列番号 35 のアミノ酸配列をそれぞれ有する 1、2 または 3 つの CDR に 1、2、3、4 または 5 つのアミノ酸置換があるアミノ酸配列を有する CDR H 1、H 2 および H 3 を含む V<sub>H</sub> ドメインをする抗 g l y c PD-1 抗体である。抗 g l y c PD-1 抗体は、配列番号 36、配列番号 37 およ

10

20

30

40

50



び配列番号38のアミノ酸配列をそれぞれまたは配列番号39、配列番号40および配列番号41のアミノ酸配列をそれぞれ有する1、2または3つのCDRに1、2、3、4または5つのアミノ酸置換があるアミノ酸配列を有する、CDRL1、L2およびL3を含むVLドメインも有しうる。抗glycPD-1抗体は、VHドメインとVLドメインの両方のCDRにアミノ酸置換があってもよい。一部の実施形態では、アミノ酸置換は、保存的置換である。

#### 【0021】

実施形態では、抗glycPD-1抗体は、グリコシル化PD-1との特異的結合について、上記VHおよびVLドメインならびにCDRを内部に含む抗体と競合する。好ましくは、これらの抗体は、ヒトフレームワーク領域を有し、すなわち、STM432のヒト化形態、および任意選択的に、例えばヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4からのヒト定常ドメインを含む。結合親和性または他のパラメーターを向上させるためにヒト化抗体のCDRまたはフレームワーク領域において1つまたは複数のアミノ酸置換を行ってもよいことは、当業者には理解されるであろう。実施形態では、抗glycPD-1抗体は、非グリコシル化PD-1に対して示されるK<sub>d</sub>の半分未満のK<sub>d</sub>でグリコシル化PD-1と結合する。実施形態では、抗glycPD-1抗体は、非グリコシル化PD-1に対して示されるK<sub>d</sub>の半分未満のK<sub>d</sub>でグリコシル化PD-1と結合する。ある実施形態では、抗glycPD-1抗体は、非グリコシル化PD-1との該抗体の結合により示されるK<sub>d</sub>の少なくとも5倍少ないK<sub>d</sub>でグリコシル化PD-1タンパク質と結合する。ある実施形態では、抗glycPD-1抗体は、非グリコシル化PD-1タンパク質との該抗体の結合により示されるK<sub>d</sub>の少なくとも10倍少ないK<sub>d</sub>でグリコシル化PD-1タンパク質と結合する。ある実施形態では、実施例5に記載の細胞フローサイトメトリ結合アッセイにおいて、抗体は、WT PD-1を発現する細胞との結合であって、非グリコシル化PD-1を発現する細胞との結合についてのMFIより3倍、5倍、10倍、20倍、30倍、または50倍大きいMFIとして表される結合を示す。ある実施形態では、抗体は、蛍光標識またはマーカーにより直接または間接的に検出可能である。ある実施形態では、抗体は、蛍光標識またはマーカー、例えば、FITCで直接標識されている。ある実施形態では、グリコシル化PD-1に対するSTM432 MA bあるいはその結合ドメインまたはヒト化もしくはキメラ形態の結合親和性は、5~20 nMまたは5~10 nM（下限値と上限値を含む）である。ある実施形態では、抗体は、PD-1とPD-1の相互作用を阻害し、特に、エフェクターT細胞により発現されるグリコシル化PD-1と腫瘍細胞により発現されるPD-L1の相互作用を阻害する。

#### 【0022】

一部の態様では、抗体は、組換え型である。ある特定の態様では、抗体は、IgG、IgM、IgA、またはその抗原結合断片である。他の態様では、抗体は、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、F(ab')<sub>3</sub>、一価scFv、二価scFv、二重特異性抗体、二重特異性scFv、または単ドメイン抗体である。一部の態様では、抗体は、ヒト抗体またはヒト化抗体である。さらなる態様では、抗体は、イメージング剤、化学療法剤、毒素または放射性核種にコンジュゲートされている。

#### 【0023】

さらなる実施形態では、本明細書で提供されるのは、薬学的に許容される担体中に本実施形態の抗体（例えば、非グリコシル化PD-1と比較してグリコシル化PD-1と選択的に結合する抗体）を含む組成物である。

#### 【0024】

なおさらなる実施形態では、ヒトPD-1のN49、N58、N74またはN116位に対応する少なくとも1個のアミノ酸を含む、ヒトPD-1の少なくとも7個（例えば、少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個以上）の連続するアミノ酸の断片を含む、単離されたポリペプチドが提供される。さらなる態様では、実施形態の単離されたポリペプチドは、ヒトPD-1のN49、N58、N74またはN116位に対応する少なくとも1個のアミノ酸を含む、ヒトPD-1の少

なくとも7個（例えば、少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個以上）の連続するアミノ酸の断片であって、ヒトPD-1のN49、N58、N74またはN116位に対応する前記アミノ酸の少なくとも1個がグリコシル化されている、断片を含む。一部の態様では、実施形態のポリペプチドは、免疫原性ポリペプチド（例えば、キーホールリンペットヘモシアニン、KLH）に融合またはコンジュゲートされている。ある特定の態様では、ポリペプチドは、CまたはN末端にCys残基をさらに含む。例えば、一部の態様では、ポリペプチドは、Cys残基においてジスルフィド結合により免疫原性ポリペプチドにコンジュゲートされている。

#### 【0025】

またさらなる実施形態では、ヒトPD-1のN49、N58、N74またはN116位に対応する少なくとも1個のアミノ酸を含むヒトPD-1の連続する少なくとも7個（例えば、少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20個以上）の連続するアミノ酸の断片を含むポリペプチドを含む組成物であって、ヒトPD-1のN49、N58、N74またはN116位に対応する前記アミノ酸の少なくとも1個がグリコシル化されており、ポリペプチドが、薬学的に許容される担体に配合されている、組成物が提供される。

#### 【0026】

またさらなる実施形態では、ヒトPD-1のN49、N58、N74またはN116位に対応する少なくとも1個のアミノ酸を含むヒトPD-1の少なくとも7個の連続するアミノ酸の断片を含むポリペプチドを含む免疫原性組成物であって、ヒトPD-1のN49、N58、N74またはN116位に対応する前記アミノ酸の少なくとも1個がグリコシル化されており、ポリペプチドが、薬学的に許容される担体に配合されている、免疫原性組成物が提供される。一部の態様では、免疫原性組成物は、アジュバント、例えば、ミョウバンまたはフロイントアジュバントをさらに含む。

#### 【0027】

なおさらなる実施形態では、本明細書で提供されるのは、がんを有する対象を処置する方法であって、有効量の実施形態の抗体または単離されたポリペプチドを対象に投与することを含む方法である。ある特定の態様では、がんを処置する方法は、有効量のポリペプチド（例えば、グリコシル化PD-1ポリペプチド）を対象に投与することを含む。さらなる態様では、がんを処置する方法は、有効量の実施形態の抗体（例えば、非グリコシル化PD-1と比較してグリコシル化PD-1と選択的に結合する抗体）、例えば、これらに限定されないが、STM418もしくはSTM432のヒト化もしくはキメラ形態、またはグリコシル化PD-1との結合についてSTM418もしくはSTM432と競合する抗体を対象に投与することを含む。一部の態様では、がんは、乳がん、肺がん、頭頸部がん、前立腺がん、食道がん、気管がん、皮膚がん、脳がん、肝臓がん、膀胱がん、胃がん、膵臓がん、卵巣がん、子宮がん、子宮頸がん、精巣がん、結腸がん、直腸がんまたは皮膚がんである。ある特定の態様では、がんは、副腎がん、肛門がん、胆管がん、膀胱がん、骨がん、成人の脳/CNS腫瘍、小児の脳/CNS腫瘍、乳がん、男性乳がん、青年のがん、小児のがん、若年成人のがん、原因不明のがん、キャスルマン病、子宮頸がん、結腸/直腸がん、子宮内膜がん、食道のがん、ユーイングファミリー腫瘍、眼がん、胆嚢がん、消化管カルチノイド腫瘍、消化管間質腫瘍（GIST）、妊娠性絨毛性疾患、ホジキン病、カボジ肉腫、腎がん、咽頭もしくは下咽頭がん、白血病（例えば、成人急性リンパ球性（ALL）、急性骨髄性（AML）、慢性リンパ球性（CLL）、慢性骨髄性（CML）、慢性骨髄単球性（CMML）、小児白血病）、肝がん、肺がん（例えば、非小細胞、小細胞）、肺カルチノイド腫瘍、リンパ腫、皮膚のリンパ腫、悪性中皮腫、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、鼻腔がん、副鼻腔がん、上咽頭がん、神経芽腫、非ホジキンリンパ腫、小児の非ホジキンリンパ腫、口腔がん、中咽頭がん、骨肉腫、卵巣がん、膵臓がん、陰茎がん、下垂体腫瘍、前立腺がん、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、唾液腺がん、肉腫（例えば、成人軟部組織がん）、皮膚がん（例えば、基底および扁平細胞、黒色腫、メルケル細胞）、小腸がん、胃がん、精巣がん、胸腺がん、甲状腺がん、子宮肉腫、膣がん、

10

20

30

40

50

外陰がん、ワルデンストレーム高ガンマグロブリン血症、またはウィルムス腫瘍である。ある特定の態様では、抗体は、薬学的に許容される組成物中にある。さらなる態様では、抗体は、全身投与される。特定の態様では、抗体は、静脈内、皮内、腫瘍内、筋肉内、腹腔内、皮下または局所投与される。

#### 【0028】

一部の態様では、方法は、少なくとも第2の抗がん療法を対象に施すこと (administering) をさらに含む。ある特定の態様では、その場合の第2の抗がん療法は、外科手術療法、化学療法、放射線療法、凍結療法、ホルモン療法、免疫療法またはサイトカイン療法である。

#### 【0029】

さらになおさらなる実施形態では、本明細書で提供されるのは、PD-1グリコシル化、N結合型グリコシル化またはN-グリコシル化を評価する方法であって、PD-1含有試料と実施形態の抗体 (例えば、非グリコシル化PD-1と比較してグリコシル化PD-1と選択的に結合する抗体) を接触させるステップを含む方法である。一部の態様では、方法は、in vitro方法である。ある特定の態様では、試料は、細胞試料である。

#### 【0030】

さらになおさらなる態様では、抗体を作製する方法であって、実施形態によるポリペプチド (例えば、ヒトPD-1のN49、N58、N74またはN116位に対応する少なくとも1個のアミノ酸を含むヒトPD-1の少なくとも7個の連続するアミノ酸の断片を含むポリペプチドであって、ヒトPD-1のN49、N58、N74またはN116位に対応する前記アミノ酸の少なくとも1個がグリコシル化されている、ポリペプチド) を動物に投与するステップ、および動物から抗体を単離するステップを含む方法が、提供される。例えば、動物は、マウス、ラット、ウサギまたはヒトでありうる。ある特定の態様では、方法は、抗体のCDRを同定するステップ、およびCDRを包囲する配列をヒト化して、ヒト化抗体を産生するステップをさらに含む。なおさらなる実施形態では、方法は、ヒト化抗体を組換え発現させるステップを含む。したがって、さらなる実施形態では、本明細書で提供されるのは、上述の方法によって産生された、単離された抗体である。したがって、一部の実施形態では、本明細書で提供されるのは、非グリコシル化PD-1と比較して実施形態のポリペプチド (例えば、ヒトPD-1のN49、N58、N74またはN116位に対応する少なくとも1個のアミノ酸を含むヒトPD-1の少なくとも7個の連続するアミノ酸の断片を含むポリペプチドであって、ヒトPD-1のN49、N58、N74またはN116位に対応する前記アミノ酸の少なくとも1個がグリコシル化されている、ポリペプチド) と選択的に結合する、単離された抗体である。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0031】

【図1】 PD-1とのPD-L1結合はグリコシル化特異的であることを示す図である。(AおよびB) 最終時点でのPD-L1と野生型PD-1およびPD-1 4NQ変異型 (すなわち、非グリコシル化PD-1) 発現293T細胞との動的相互作用を示す、(24時間の時点での) タイムラプス顕微鏡画像。PD-1 WT (A) または4NQ PD-1変異型 (B) 発現細胞の緑色蛍光 (緑色蛍光標識PD-1 / Fcタンパク質) マージ画像 (20倍) を示す。(C) グラフは、PD-1 WTまたはPD-1 4NQ発現HEK293T細胞へのPD-L1 / Fcタンパク質の定量的結合を時間点ごとに示すものである。(D) 野生型PD-1または4NQ変異型PD-1を発現する293T細胞へのPD-L1 / Fcタンパク質の結合を共免疫沈降およびウェスタンブロット分析によりアッセイした。WB: 抗hIgG-HRPは、ウェスタンブロット分析において抗hIgG-HRP抗体により認識される、結合したPD-L1 / Fcを示し; WB: 抗FLAGは、ウェスタンブロット分析によるPD-1の検出を示し; IP: FLAGにおける抗FLAGは、免疫沈降によるPD-L1 / Fc投入量の検出および抗FLAG抗体での検出を示す。

【図2】 PD-1-Fcタンパク質への抗glycPD-1抗体結合のウェスタンブロット分析の図である。野生型 (WT)、変異型 (N49、N58およびN74)、およびP

10

20

30

40

50

N G a s eで処置された野生型に対するS T M 4 1 8およびS T M 4 3 2 M A bの結合を、ウェスタンブロットで示されている。

【図3 A】野生型および変異型P D - 1タンパク質 - P D - 1（配列番号1）の49位のNがQで置換されているN 4 9、58位のNがQで置換されているN 5 8、74位のNがQで置換されているN 7 4、116位のNがQで置換されているN 1 1 6、ならびに49、58、74および116位の各々のNがQで置換されている4 N Q - を発現する293 T細胞、または対象293 T細胞への、標識抗g l y c P D - 1および対照抗体の結合を、フローサイトメトリーを使用して測定する図である。A．野生型および変異型P D - 1タンパク質を発現する293 T細胞ならびに対照293 T細胞への抗g l y c P D - 1抗体S T M 4 1 8の結合。

10

【図3 B】野生型および変異型P D - 1タンパク質 - P D - 1（配列番号1）の49位のNがQで置換されているN 4 9、58位のNがQで置換されているN 5 8、74位のNがQで置換されているN 7 4、116位のNがQで置換されているN 1 1 6、ならびに49、58、74および116位の各々のNがQで置換されている4 N Q - を発現する293 T細胞、または対象293 T細胞への、標識抗g l y c P D - 1および対照抗体の結合を、フローサイトメトリーを使用して測定する図である。B．野生型および変異型P D - 1タンパク質を発現する293 T細胞ならびに対照293 T細胞への抗g l y c P D - 1抗体S T M 4 3 2の結合。

【図3 C】野生型および変異型P D - 1タンパク質 - P D - 1（配列番号1）の49位のNがQで置換されているN 4 9、58位のNがQで置換されているN 5 8、74位のNがQで置換されているN 7 4、116位のNがQで置換されているN 1 1 6、ならびに49、58、74および116位の各々のNがQで置換されている4 N Q - を発現する293 T細胞、または対象293 T細胞への、標識抗g l y c P D - 1および対照抗体の結合を、フローサイトメトリーを使用して測定する図である。C．野生型および変異型P D - 1タンパク質を発現する293 T細胞ならびに対照293 T細胞への対照マウスI g Gの結合。

20

【図4】抗g l y c P D - 1抗体S T M 4 1 8の中和活性およびE C 5 0の図である。A．抗体濃度別の、P D - 1を発現する細胞へのP D - L 1 - F cタンパク質の結合を遮断するS T M 4 1 8の活性。B．S T M 4 1 8濃度の関数としての、P D - 1 - P D - L 1結合の阻害。E C 5 0は、0.132  $\mu$ g / mlである。

30

【図5】抗G l y c P D - 1抗体S T M 4 3 2の中和活性およびE C 5 0の図である。A．抗体濃度別の、P D - 1を発現する細胞へのP D - L 1 - F cタンパク質の結合を遮断するS T M 4 3 2の活性。B．S T M 4 3 2濃度の関数としての、P D - 1 - P D - L 1結合の阻害。E C 5 0は、0.110  $\mu$ g / mlである。

【図6】がん細胞のT細胞殺滅に対するS T M 4 1 8およびS T M 4 3 2の効果の図である。グラフは、S T M 4 1 8およびS T M 4 3 2抗体および対照マウスI g Gの存在下でのがん細胞増殖を赤色画像検出がん細胞レベルとして示す。

【発明を実施するための形態】

【0032】

N - グリコシル化は、小胞体（E R）で開始され、そしてその後、ゴルジでプロセッシングされる、翻訳後修飾である（Schwarz & Aeibi, Current Opinion in Structural Biology 21, 576-582(2011)）。このタイプの修飾は、オリゴ糖で構成されている前もって形成されたグリカン（N X Tモチーフ（- A s n - X - S e r / T h r - ）内に位置するアスパラギン（A s n）側鎖アクセプターに転移させる膜結合型オリゴサッカリルトランスフェラーゼ（O S T）複合体により先ず触媒される（Cheung and Reithmeier, Methods 41(4): 451-59 (2007) ; Helenius and Aeibi, Science 291 (5512): 2364-69 (2001)）。前もって形成されたグリカンからの糖類の付加または除去は、細胞依存的かつ位置依存的にN - グリコシル化カスケードを厳密に調節する、グリコトランスフェラーゼおよびグリコシダーゼの一群により、それぞれ媒介される。

40

【0033】

50

プログラム死リガンド - 1 (PD - L1) とプログラム死 (PD - 1) との細胞外相互作用は、腫瘍関連免疫回避に対して顕著な影響を与える。抗PD - 1またはPD - L1抗体を使用する免疫チェックポイント遮断薬の臨床的成功にもかかわらず、PD - L1とPD - 1の相互作用の根底にある調節メカニズムは、大部分が依然として不明である。PD - 1のN結合型グリコシル化は、PD - L1へのその結合を増進することができ、その結果、T細胞媒介免疫応答が抑制される。したがって、抗glycPD - 1抗体は、より一般的なPD - 1抗体と比較して増強された阻害効果を示す。

#### 【0034】

本明細書で使用される場合、別段の指定がない限り、用語「プログラム死 - 1」または「PD - 1」は、霊長類（例えば、ヒト、カニクイザル(cyno)）、イヌおよび齧歯類（例えば、マウスおよびラット）などの哺乳動物を含む、任意の脊椎動物からのPD - 1を意味する。別段の指定がない限り、PD - 1は、様々なPD - 1アイソフォーム、関連PD - 1ポリペプチド（そのSNPバリエーションを含む）、ならびにPD - 1の種々の修飾形態（リン酸化PD - 1、グリコシル化PD - 1、およびユビキチン化PD - 1を含むが、これらに限定されない）も含む。

#### 【0035】

ヒトPD - 1の例示的なアミノ酸配列は、下に提供されるものであり、この配列中、N結合型グリコシル化の部位は、太字かつ下線付きである(N49、N58、N74またはN116)。

MQIPQAPWPV VWAVLQLGWR PGWFLDSPDR PWNPPPTFS  
PA LLLVVTEGDNA TFTCSFSNTS ESFVLNWYRM SPSNQ  
TDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRVTQL PNGRDFHMSV VR  
ARRND SGT YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE  
VPTAHPSPSP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS LVLLVWVL  
AV ICSRAARGTI GARRTGQPLK EDPSPVPVFS VDYGE  
LDFQW REKTPEPPVP CVPEQTEYAT IVFPSGMGTS SP  
ARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL (配列番号1)

#### 【0036】

##### 【表1】

特徴キー	位置	長さ	説明
トポロジカルドメイン	21~170	150	細胞外
膜貫通型	171~191	21	ヘリックス
トポロジカルドメイン	192~288	97	細胞質

#### 【0037】

下記の表1に示されているように、4つのN - グリコシル化部位すべてが、PD1の細胞外ドメイン内に位置する。

#### 【0038】

特定のPD - 1アイソフォームまたはバリエーションの具体的なグリコシル化部位が、その特定のPD - 1アイソフォームまたはバリエーションの49、58、74または116位のアミノ酸と異なることもある。

#### 【0039】

そのような場合には、当業者は、配列アライメントおよび当技術分野における他の一般的知識に基づいて、上に例示したヒトPD - 1のN49、N58、N74およびN116に対応する任意の特定のPD - 1アイソフォームまたはバリエーションのグリコシル化部位を決定することができるだろう。したがって、本明細書で提供されるのは、非グリコシル化PD - 1アイソフォームまたはバリエーションと比較してPD - 1アイソフォームまたはバリエーションのグリコシル化形態と選択的に結合する抗体でもある。PD - 1アイソフォームまたはバリエーションのグリコシル化部位は、上記提供のヒトPD - 1配列のN49、N58、N

74 および N116 の対応する部位であることもある。本明細書で提供されるのは、上記提供の例示的なヒト PD-1 配列の N49、N58、N74 または N116 位に対応する少なくとも 1 個のアミノ酸を含む、PD-1 アイソフォームまたはバリエーションの少なくとも 7 個（例えば、少なくとも 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 個以上）の連続するアミノ酸の断片を含む、ポリペプチドでもある。

【0040】

本明細書で使用される場合、別段の指定がない限り、冠詞「1つ(a)」、「1つ(an)」および「その(the)」は、その冠詞の文法上の目的語の 1 つまたは 1 つより多くを指す。例として、「1つの抗体(an antibody)」は、1つの抗体または 1 つより多くの抗体を意味する。

10

【0041】

本明細書で使用される場合、別段の指定がない限り、用語「または」は、選択肢のみを意味すると明確に示されている場合または選択肢が相互排他的である場合を除き、「および/または」と同義で使用される。本明細書で使用される場合、別段の指定がない限り、「別の」は、少なくとも第 2 以上のを意味する。

【0042】

本明細書で使用される場合、別段の指定がない限り、用語「約」は、ある値が、その値を決定するために用いられるデバイス、方法の誤差の固有変動、または研究対象間に存在する変動を含む値を示す。

【0043】

本明細書で使用される場合、別段の指定がない限り、用語「抗体」は、特異的分子抗原と結合することができるポリペプチドの免疫グロブリン（または「Ig」）クラス、例えば IgG、IgM、IgA、IgD、IgE、内の B 細胞のポリペプチド産物、ならびにその抗原結合断片を有する他の分子を意味する。抗体は、ポリペプチド鎖の 2 つの同一の対であって、各々の対が、1 本の重鎖（約 50 ~ 70 kDa）および 1 本の軽鎖（約 25 kDa）を有し、各鎖の各アミノ末端部分が約 100 ~ 約 130 個以上のアミノ酸の可変領域を含み、各鎖の各カルボキシ末端部分が定常領域を含む、対からなりうる（Borrebaeck (ed.) (1995) Antibody Engineering, Second Edition, Oxford University Press. ; Kuby (1997) Immunology, Third Edition, W. H. Freeman and Company, New York を参照されたい）。ここで、特異的分子抗原は、グリコシル化ヒト PD-1 を含む。本明細書で提供される抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、合成抗体、組換えで産生された抗体、二重特異性抗体、多重特異性抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、ラクダ化抗体、キメラ抗体、イントラボディ、抗イディオタイプ（抗 Id）抗体を含むが、これらに限定されない。

20

30

【0044】

本明細書で使用される場合、別段の指定がない限り、用語「単離された」は、抗体、抗原結合断片、またはポリヌクレオチドに関して使用される場合、自然界では見られるような少なくとも 1 つの成分が、言及される分子にないことを意味する。この用語は、その天然の環境では見られるような一部またはすべての他の成分から取り出されている、抗体、抗原結合断片またはポリヌクレオチドを含む。抗体の天然環境の成分としては、例えば、赤血球、白血球、血小板、血漿、タンパク質、核酸、塩および栄養素が挙げられる。交点結合断片のまたはポリペプチドの天然環境の成分としては、例えば、脂質膜、細胞小器官、タンパク質、核酸、塩および栄養素が挙げられる。本発明の抗体、抗原結合断片またはポリヌクレオチドには、それが単離されるもしくは組換えで産生される細胞のこれらの成分または任意の他の成分のすべてが、実質的にないこともあり、または幅広く実質的にないこともある。

40

【0045】

本明細書で使用される場合、別段の指定がない限り、用語「モノクローナル抗体」は、単一細胞クローンの産物である、または単一細胞に由来する細胞のハイブリドーマもしくは集団の産物である、抗体を意味する。モノクローナル抗体は、免疫グロブリン遺伝子をコ

50

ードする重鎖および軽鎖から組換え方法により単一分子免疫グロブリン種を産生するように産生された抗体を意味することを意図したものである。モノクローナル抗体調製物中の抗体のアミノ酸配列は、実質的に均一であり、そのような調製物中の抗体の結合活性は、実質的に同じ抗原結合活性を示す。対照的に、ポリクローナル抗体は、特異的抗原に結合する免疫グロブリン分子の組み合わせである集団内の異なるB細胞から得られる。ポリクローナル抗体の各免疫グロブリンは、同じ抗原の異なるエピトープに結合することができる。モノクローナル抗体とポリクローナル抗体の両方を産生する方法は、当技術分野において周知である (Harlow and Lane., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)およびBorrebæck (ed.), *Antibody Engineering: A Practical Guide*, W. H. Freeman and Co., Publishers, New York, pp. 103-120 (1991))。

10

**【0046】**

本明細書で使用される場合、別段の指定がない限り、用語「ヒト抗体」は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に対応する、ヒト可変領域および/もしくはヒト定常領域またはその一部分を有する抗体を意味する。そのようなヒト生殖系列免疫グロブリン配列は、Kabat et al.(1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242に記載されている。ここで、ヒト抗体は、グリコシル化ヒトPD-1と結合し、ヒト生殖系列免疫グロブリン核酸配列の天然起源の体細胞バリエーションである核酸配列によってコードされる抗体を含むことができる。

20

**【0047】**

本明細書で使用される場合、別段の指定がない限り、用語「キメラ抗体」は、重鎖および/または軽鎖の一部分が、特定の種に由来するまたは特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一または相同であるが、鎖の残部が、別の種に由来するまたは別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一または相同である抗体はもちろん、所望の生物活性を示すのであればそのような抗体の断片も意味する (米国特許第4,816,567号明細書; およびMorrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)を参照されたい)。

**【0048】**

本明細書で使用される場合、別段の指定がない限り、用語「ヒト化抗体」は、ヒト免疫グロブリン (例えば、レシピエント抗体) を含むキメラ抗体であって、天然相補鎖決定領域 (「CDR」) 残基が、所望の特異性、親和性および能力を有するマウス、ラット、ウサギまたは非ヒト霊長類などの非ヒト種 (例えば、ドナー抗体) の対応するCDRからの残基によって置換されている、キメラ抗体を意味する。一部の事例では、ヒト免疫グロブリンの1つまたは複数のFR領域残基が、対応する非ヒト残基によって置換されている。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にもドナー抗体にも見つけられない残基を有することがある。これらの修飾は、抗体の性能をさらに洗練するために行われる。ヒト化抗体重鎖および軽鎖は、少なくとも1つまたは複数の可変領域であって、CDRのすべてまたは実質的にすべてが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、FRのすべてまたは実質的にすべてがヒト免疫グロブリン配列のものに対応する可変領域の、実質的にすべてを有することもある。ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域 (Fc) の少なくとも一部分、典型的にはヒト免疫グロブリンの少なくとも一部分を有することもある。さらさらなる詳細については、Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-329 (1988); and Presta, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992); Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285-4289 (1992); ならびに米国特許第6,800,738号、同第6,719,971号、同第6,639,055号、同第6,407,213号および同第6,054,297号明細書を参照されたい。

30

40

**【0049】**

本明細書で使用される場合、別段の指定がない限り、用語「組換え抗体」は、組換え手段により調製、発現、作出または単離される抗体を意味する。組換え抗体は、宿主細胞にト

50

ランスフェクトされる組換え発現ベクターを使用して発現される抗体であってもよく、組換え、コンビナトリアル抗体ライブラリーから単離された抗体であってもよく、ヒト免疫グロブリン遺伝子の遺伝子導入および/もしくは染色体導入動物（例えば、マウスもしくはウシ）から単離された抗体（例えば、Taylor, L. D. et al., Nucl. Acids Res. 20:6287-6295(1992)を参照されたい）であってもよく、または免疫グロブリン遺伝子配列の他のDNA配列へのスプライシングを含む任意の他の手段により調製、発現、作出もしくは単離された抗体であってもよい。そのような組換え抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来するものを含む、可変および定常領域を有しうる（Kabat, E. A. et al.(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242を参照されたい）。組換え抗体は、*in vitro*変異誘発（または、ヒトIg配列の遺伝子導入動物を使用する場合には*in vivo*体細胞変異）を受けることもあり、それ故、組換え抗体のV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖細胞系V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>配列に由来し、ヒト生殖細胞系V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>配列と類縁の配列であるが、*in vivo*でヒト抗体生殖系列レパートリー内に天然に存在しない配列でありうる。

#### 【0050】

本明細書で使用される場合、別段の指定がない限り、用語「抗原結合断片」および類似の用語は、抗原と免疫特異的に結合し、抗原に対するその特異性および親和性を抗体に付与するアミノ酸配列を含む、抗体の一部を意味する。抗原結合断片は、抗体の機能性断片と呼ばれることもある。抗原結合断片は、一価であってもよく、二価であってもよく、または多価であってもよい。

#### 【0051】

抗原結合断片を有する分子としては、例えば、F<sub>d</sub>、F<sub>v</sub>、F<sub>ab</sub>、F<sub>(ab')</sub>、F<sub>(ab)<sub>2</sub></sub>、F<sub>(ab')</sub><sub>2</sub>、F<sub>(ab)<sub>3</sub></sub>、F<sub>(ab')</sub><sub>3</sub>、一本鎖F<sub>v</sub>(scF<sub>v</sub>)、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ミニボディ、または単一ドメイン抗体が挙げられる。scF<sub>v</sub>は、一価scF<sub>v</sub>であってもよく、または二価scF<sub>v</sub>であってもよい。抗原結合断片を有する他の分子としては、例えば、重鎖もしくは軽鎖ポリペプチド、可変領域ポリペプチドまたはCDRポリペプチドあるいはその一部分を挙げることができるが、ただしそのような抗原結合断片が結合活性を保持することを条件とする。そのような抗原結合断片は、例えば、Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989); Myers (ed.), Molec. Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference, New York: VCH Publisher, Inc.; Huston et al., Cell Biophysics, 22:189-224 (1993); Pluckthun and Skerrra, Meth. Enzymol., 178:497-515 (1989)、およびDay, E.D., Advanced Immunoch emistry, Second Ed., Wiley-Liss, Inc., New York, NY (1990)において見つけることができ、それらに記載されている。抗原結合断片は、少なくとも5個の連続するアミノ酸残基、少なくとも10個の連続するアミノ酸残基、少なくとも15個の連続するアミノ酸残基、少なくとも20個の連続するアミノ酸残基、少なくとも25個の連続するアミノ酸残基、少なくとも40個の連続するアミノ酸残基、少なくとも50個の連続するアミノ酸残基、少なくとも60個の連続するアミノ酸残基、少なくとも70個の連続するアミノ酸残基、少なくとも80個の連続するアミノ酸残基、少なくとも90個の連続するアミノ酸残基、少なくとも100個の連続するアミノ酸残基、少なくとも125個の連続するアミノ酸残基、少なくとも150個の連続するアミノ酸残基、少なくとも175個の連続するアミノ酸残基、少なくとも200個の連続するアミノ酸残基、または少なくとも250個の連続するアミノ酸残基のアミノ酸配列を有するポリペプチドでありうる。

#### 【0052】

抗体の重鎖は、アミノ末端部分が約120～130個以上のアミノ酸の可変領域を含み、カルボキシ末端部分が定常領域を含む、約50～70kDaのポリペプチド鎖を意味する。定常領域は、重鎖定常領域のアミノ酸配列に基づき、アルファ(α)、デルタ(δ)、イプシロン(ε)、ガンマ(γ)およびミュー(μ)と呼ばれる、5つの別個のタイプの



うちの1つでありうる。これらの別個の重鎖はサイズが異なり、 $\kappa$  および  $\lambda$  は、およそ450のアミノ酸を含有するが、 $\mu$  および  $\delta$  は、およそ550のアミノ酸を含有する。軽鎖と組み合わせられた場合、これらの別個の重鎖タイプは、抗体の公知の5クラス、IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMをそれぞれ生じ、これには、IgGの4つのサブクラス、すなわちIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4が含まれる。重鎖は、ヒト重鎖でありうる。

#### 【0053】

抗体の軽鎖は、アミノ末端部分が100～110個以上のアミノ酸の可変領域を含み、カルボキシ末端部分が定常領域を含む、約25kDaのポリペプチド鎖を意味する。近似的軽鎖長は、211～217アミノ酸である。定常領域のアミノ酸配列に基づいてカッパ( ) またはラムダ( ) と呼ばれる2つの別個のタイプがある。軽鎖アミノ酸配列は、当技術分野において周知である。軽鎖は、ヒト軽鎖でありうる。

10

#### 【0054】

抗体の可変ドメインまたは可変領域は、抗体の軽鎖または重鎖の部分であって、軽鎖または重鎖のアミノ末端に一般に位置し、重鎖では約120～130アミノ酸および軽鎖では約100～110アミノ酸の長さを有し、その特定の抗原に対する各々の特定の抗体の結合および特異性に使用される部分を意味する。可変ドメインは、異なる抗体間で配列が広範に異なる。配列の可変性は、CDR内に集中しており、さらに、可変ドメイン内のより小さい可変部分は、フレームワーク領域(FR)と呼ばれる。軽鎖および重鎖のCDRは、抗体と抗原の相互作用に主として関与する。本明細書で使用されるアミノ酸部分のナンバリングは、Kabat et al.(1991) Sequences of proteins of immunological interest. (U.S. Department of Health and Human Services, Washington, D.C.) 5<sup>th</sup> ed.におけるような、EUIンデックスに準ずる。可変領域は、ヒト可変領域でありうる。

20

#### 【0055】

CDRは、免疫グロブリン(Igもしくは抗体)V<sub>H</sub> シートフレームワークの非フレームワーク領域内の3つの高頻度可変領域(H1、H2もしくはH3)のうちの1つ、または抗体V<sub>L</sub> シートフレームワークの非フレームワーク領域内の3つの高頻度可変領域(L1、L2もしくはL3)のうちの1つを意味する。したがって、CDRは、フレームワーク領域配列内に散在する可変領域配列である。CDR領域は、当業者に周知であり、例えば、カバットによって抗体可変ドメイン内の最高頻度可変性領域と定義されている(Kabat et al., J. Biol. Chem. 252: 6609-6616 (1977); Kabat, Adv. Prot. Chem. 32:1-75 (1978))。CDR領域配列はまた、コチアによって保存シートフレームワーク部分がなく、したがって異なる立体構造に適応することができる残基と構造的に定義されている(Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。両方の用語法は、当技術分野において十分に認知されている。基準抗体可変ドメイン内のCDRの位置は、非常に多数の構造の比較により決定されている(Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); Morea et al., Methods 20:267-279 (2000))。高頻度可変領域内の残基番号は、抗体によって異なるため、基準位置と比較して追加の残基は、基準可変ドメインナンバリングスキームで残基番号の次にa、b、cなどと従来通りにナンバリングされる(Al-Lazikani et al., supra (1997))。そのような命名法は、当業者に周知である。

30

40

#### 【0056】

ImMunoGeneTics(IMG T) Information System(登録商標)という汎用ナンバリングシステムが開発され、広く適用されている(Lafranc et al., 2003, Dev. Comp. Immunol., 27(1):55-77)。IMG Tは、ヒトおよび他の脊椎動物の免疫グロブリン(Ig)、T細胞受容体(TR)および主要組織適合複合体(MHC)を専門に扱う統合情報システムである。本明細書では、CDRは、軽鎖または重鎖内のアミノ酸配列と位置の両方の点から言及される。免疫グロブリンVドメインの構造内のCDRの「位置」は、種間で保存され、ループと呼ばれる構造の中に存在するので、構造的特徴に従って可変ドメイン配列をアラインするナンバリングシステムを使用することに

50

より、C D Rおよびフレームワーク残基が容易に同定される。この情報は、ある種の免疫グロブリンからのC D R残基を、典型的にはヒト抗体からの、アクセプターフレームワークにグラフトすることおよび置き換えることに使用されうる。さらなるナンバリングシステム (A H o n) が、Honegger et al., 2001, J. Mol. Biol., 309: 657-670により開発された。例えばカバットナンバリングおよびI M G T固有ナンバリングシステムを含む、ナンバリングシステム間の対応は、当業者に周知である (例えば、Kabat, Id ; Chothia et al., Id ; Martin, 2010, Antibody Engineering, Vol. 2, Chapter 3, Springer Verlag ; およびLefranc et al., 1999, Nuc. Acids Res., 27:209-212を参照されたい)。

#### 【 0 0 5 7 】

C D R領域配列は、A b Mおよびコンタクト方法論によっても定義されている。A b M高頻度可変領域は、カバットC D Rとコチア構造ループの折衷案であり、O x f o r d M o l e c u l a rのA b M抗体モデリングソフトウェアにより使用される (例えば、Martin, 2010, Antibody Engineering, Vol. 2, Chapter 3, Springer Verlagを参照されたい)。「コンタクト」高頻度可変領域は、入手可能な複合体結晶構造の分析に基づく。これらの高頻度可変領域またはC D Rの各々からの残基は、下段にて述べられる。

#### 【 0 0 5 8 】

C D R領域配列の例示的な概要説明は、下記の表 2 に示されている。基準抗体可変領域内のC D Rの位置は、非常に多数の構造の比較により決定されている (Al-Lazikani et al., 1997, J. Mol. Biol., 273:927-948) ; Morea et al., 2000, Methods, 20:267-279)。高頻度可変領域内の残基番号は、抗体によって異なるため、基準位置と比較して追加の残基は、基準可変領域ナンバリングスキームで残基番号の次にa、b、cなどと従来通りにナンバリングされる (Al-Lazikani et al., Id)。そのような命名法は、当業者に周知である。

#### 【 0 0 5 9 】

#### 【表 2】

表 2.CDR 領域配列の例示的な概要説明

	IMGT	カバット	AbM	コチア	コンタクト
V <sub>H</sub> CDR1	27~38	31~35	26~35	26~32	30~35
V <sub>H</sub> CDR2	56~65	50~65	50~58	53~55	47~58
V <sub>H</sub> CDR3	105~117	95~102	95~102	96~101	93~101
V <sub>L</sub> CDR1	27~38	24~34	24~34	26~32	30~36
V <sub>L</sub> CDR2	56~65	50~56	50~56	50~52	46~55
V <sub>L</sub> CDR3	105~117	89~97	89~97	91~96	89~96

#### 【 0 0 6 0 】

1個または複数のC D Rを分子に共有結合的にまたは非共有結合的に分子に組み込んで、それをイムノアドヘシンにすることもできる。イムノアドヘシンは、C D Rをより大きいポリペプチド鎖の一部として組み込むことができ、C D Rを別のポリペプチド鎖と共有結合させることができ、またはC D Rを非共有結合的に組み込むことができる。C D Rは、目的の特定の抗原とのイムノアドヘシンの結合を可能にする。

#### 【 0 0 6 1 】

本明細書で使用される場合、別段の指定がない限り、用語「結合する」または「結合すること」は、分子間の相互作用を意味する。相互作用は、例えば、水素結合、イオン結合、疎水性相互作用および/またはファンデルワールス相互作用をはじめとする、非共有結合性相互作用であってもよい。抗体とグリコシル化ヒトP D - 1などの標的分子の単一のエピトープとの全非共有結合性相互作用の強度が、そのエピトープに対する抗体の親和性である。「結合親和性」は、一般に、分子 (例えば、抗体などの結合タンパク質) の単一の結合部位とその結合パートナー (例えば、抗原) との非共有結合性相互作用の合計の強度を意味する。

## 【 0 0 6 2 】

結合分子 X (例えば、抗体) のその結合パートナー Y (例えば、抗体の同種抗原) に対する親和性は、一般に、解離定数 ( $K_d$ ) または平衡解離定数 ( $K_D$ ) によって一般に表すことができる。低親和性抗体は、一般に、抗原にゆっくりと結合し、容易に解離する傾向があるが、高親和性抗体は、一般に、より迅速に抗原に結合し、より長く結合したままである傾向がある。結合親和性の様々な測定方法が当技術分野において公知であり、それらのうちのいずれを本開示のために使用してもよい。「 $K_D$ 」または「 $K_D$  値」は、当技術分野において公知のアッセイにより、例えば結合アッセイにより、測定することができる。 $K_D$  は、例えば、目的の抗体の Fab パージョンおよびその抗原を用いて行われる、放射標識抗原結合アッセイ (RIA) で測定することができる (Chen, et al., (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881)。 $K_D$  または  $K_D$  値は、例えば、BIAcore (商標) 2000 もしくは BIAcore (商標) 3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) を使用する、Biacore による表面プラズモン共鳴アッセイを使用することにより、または例えば、Octet QK384 システム (FortéBio, Menlo Park, CA) を使用するバイオレイヤー干渉法により、測定することもできる。本明細書で使用される場合、別段の指定がない限り、抗体は、第 2 の分子抗原より高い親和性で第 1 の分子抗原と結合する場合、第 2 の分子抗原と比較して第 1 の分子抗原に「選択的に結合する」ことができると言われる。抗体は、一般に、全く関係の無い抗原とは結合しない。

## 【 0 0 6 3 】

本明細書で使用される場合、別段の指定がない限り、用語「ポリペプチド」は、本明細書で使用される場合、2 ~ 30 個の間のアミノ酸 (例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、25 または 30 個のアミノ酸) を有するオリゴペプチド、およびより長いアミノ酸鎖、例えば、30 個より多くのアミノ酸、50 個より多くのアミノ酸、100 個より多くのアミノ酸、150 個より多くのアミノ酸、200 個より多くのアミノ酸、300 個より多くのアミノ酸、400 個より多くのアミノ酸、500 個より多くのアミノ酸、または 600 個より多くのアミノ酸を含む。例えば、組換え発現によりまたは化学合成により、ポリペプチドを産生することができる。本開示のポリペプチドを翻訳後にまたは化学的に修飾 (例えば、グリコシル化、カルバミル化、リン酸化、ビオチン化、蛍光色素の結合など) することができる。ポリペプチドを特異的部位でグリコシル化することができる。ポリペプチドは、天然遺伝コードによってコードされない非天然アミノ酸を含むこともある。例えば、ポリペプチドは、メチル化された主鎖構造、ペプトイド主鎖構造 (ポリ N 置換グリシン)、L - アミノ酸、D - アミノ酸などを含むこともある。ポリペプチドは、野生型配列、天然起源のバリエーション配列、変異型配列 (例えば、点変異、欠失変異) などを含むこともある。

## 【 0 0 6 4 】

抗 glycoPD - 1 抗体

本明細書で提供されるのは、非グリコシル化 PD - 1 と比較してグリコシル化 PD - 1 と選択的に結合する単離された抗体である。PD - 1 は、ヒト PD - 1 でありうる。グリコシル化 PD - 1 は、PD - 1 の特異的 N - グリカン構造であってもよく、または PD - 1 の糖ペプチドであってもよい。一部の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、非グリコシル化 PD - 1 と比較してグリコシル化 PD - 1 と選択的に結合する抗原結合断片である。

## 【 0 0 6 5 】

一部の実施形態では、本明細書で提供される単離された抗体は、非グリコシル化 PD - 1 と比較して、N49、N58、N74、N116 またはそれらの任意の組み合わせにおいてグリコシル化されたヒト PD - 1 と選択的に結合する。一部の実施形態では、単離された抗体は、N49 グリコシル化を有するヒト PD - 1 と選択的に結合する。一部の実施形態では、単離された抗体は、N58 グリコシル化を有するヒト PD - 1 と選択的に結合する。一部の実施形態では、単離された抗体は、N74 グリコシル化を有するヒト PD - 1

と選択的に結合する。一部の実施形態では、単離された抗体は、N 1 1 6 グリコシル化を有するヒト P D - 1 と選択的に結合する。一部の実施形態では、単離された抗体は、N 4 9 および N 5 8 グリコシル化を有するヒト P D - 1 と選択的に結合する。一部の実施形態では、単離された抗体は、N 4 9 および N 7 4 グリコシル化を有するヒト P D - 1 と選択的に結合する。一部の実施形態では、単離された抗体は、N 4 9 および N 1 1 6 グリコシル化を有するヒト P D - 1 と選択的に結合する。一部の実施形態では、単離された抗体は、N 5 8 および N 7 4 グリコシル化を有するヒト P D - 1 と選択的に結合する。一部の実施形態では、単離された抗体は、N 5 8 および N 1 1 6 グリコシル化を有するヒト P D - 1 と選択的に結合する。一部の実施形態では、単離された抗体は、N 7 4 および N 1 1 6 グリコシル化を有するヒト P D - 1 と選択的に結合する。一部の実施形態では、単離された抗体は、N 4 9、N 5 8 および N 7 4 グリコシル化を有するヒト P D - 1 と選択的に結合する。一部の実施形態では、単離された抗体は、N 4 9、N 5 8 および N 1 1 6 グリコシル化を有するヒト P D - 1 と選択的に結合する。一部の実施形態では、単離された抗体は、N 4 9、N 7 4 および N 1 1 6 グリコシル化を有するヒト P D - 1 と選択的に結合する。一部の実施形態では、単離された抗体は、N 5 8、N 7 4 および N 1 1 6 グリコシル化を有するヒト P D - 1 と選択的に結合する。一部の実施形態では、単離された抗体は、N 4 9、N 5 8、N 7 4 および N 1 1 6 グリコシル化を有するヒト P D - 1 と選択的に結合する。

10

#### 【 0 0 6 6 】

ある特定の態様では、抗 g l y c P D - 1 抗体は、P D - 1 と結合し、1 つまたは複数のグリコシル化モチーフを遮蔽または隠蔽してそのモチーフと分子の結合または他の相互作用を遮断し、P D - 1 のそのグリコシル化部位でのグリコシル化を阻止することができる。特定の態様では、抗 g l y c P D - 1 抗体は、N 4 9、N 5 8、N 7 4 および N 1 1 6 のうちの 1 つまたは複数のグリコシル化部位を遮蔽する。

20

#### 【 0 0 6 7 】

一部の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、P D - 1 の 1 つまたは複数のグリコシル化モチーフと選択的に結合する。一部の実施形態では、抗体は、グリコシル化モチーフを含む糖ペプチドおよびその隣接ペプチドと選択的に結合する。一部の実施形態では、抗体は、非グリコシル化 P D - 1 に対して示される  $K_d$  の少なくとも 3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 % または 9 0 % 未満の  $K_d$  でグリコシル化 P D - 1 と選択的に結合する。ある特定の態様では、抗原結合断片は、非グリコシル化 P D - 1 に対して示される  $K_d$  の 5 0 % 未満の  $K_d$  でグリコシル化 P D - 1 と結合する。一部の実施形態では、抗体は、非グリコシル化 P D - 1 に対して示される  $K_d$  の少なくとも 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、1 0 %、1 5 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 % 未満の  $K_d$  でグリコシル化 P D - 1 と結合する。さらなる態様では、抗体は、非グリコシル化 P D - 1 に対して示される  $K_d$  の少なくとも 1 0 倍少ない  $K_d$  でグリコシル化 P D - 1 と結合する。

30

#### 【 0 0 6 8 】

提供されるのは、グリコシル化 P D - 1 に優先的に結合するモノクローナル抗体、特に、本明細書に記載の S T M 4 1 8 および S T M 4 3 2 である。また、提供されるのは、S T M 4 1 8 および S T M 4 3 2 のヒト化およびキメラ形態、ならびに S T M 4 1 8 および S T M 4 3 2 と結合について競合する抗体である。S T M 4 1 8 および S T M 4 3 2 の重鎖および軽鎖可変ドメインは、下記の表 3 に提供されている。

40

#### 【 0 0 6 9 】

特定の態様で提供されるのは、配列番号 3 および 5 のアミノ酸配列をそれぞれ有する重鎖および軽鎖可変ドメイン（シグナル配列を一切有さない成熟  $V_H$  および  $V_L$  領域アミノ酸配列）有する抗 g l y c P D - 1 モノクローナル抗体 S T M 4 1 8、およびその抗原結合部分、ならびにそのヒト化およびキメラ形態である。本明細書で提供されるのは、P D - 1 との結合について S T M 4 1 8 M A b と競合する、および / または S T M 4 1 8 と同じエピトープと結合する、抗 g l y c P D - 1 抗体である。

50

## 【 0 0 7 0 】

提供されるのは、モノクローナル核酸（DNA）であり、STM418の重鎖および軽鎖可変（V）ドメインの対応するアミノ酸配列は、下記の表3に示されている。配列番号2および3は、STM418 VHドメインの核酸配列およびアミノ酸配列であり、配列番号4および5は、STM418カッパVLドメインの成熟形態の核酸配列およびアミノ酸配列である。表4は、STM418のコチア、AbM、カバットおよびコンタクト重鎖および軽鎖VドメインCDRを提供するものである。

## 【 0 0 7 1 】

グリコシル化PD-1上のSTM418のエピトープは、下記の通りであると決定されており、PD-1位置は配列番号1の場合と同様であり、抗原-抗体架橋実験により決定された接触残基が下線を引くことにより示されている：

34 P P T F S P A L L V V 4 4 ... 4 9 N A T F T C S F S N T 5 9 ... 1 0 4 R D F H M  
S V V R A R R N D S G T Y L C G 1 2 4

（配列番号1のアミノ酸34～44、49～59および104～124）。したがって、提供されるのは、配列番号1のグリコシル化PD-1配列のアミノ酸34～44、49～59および104～124の領域を有し、特に、配列番号1のT36、S38、T51、T53、S55、S109、R115、S118およびY121位のうちの1つまたは複数に接触点がある、エピトープに結合する抗体である。特定の実施形態において、提供されるのは、グリコシル化PD-1に選択的に結合し、配列番号1の36、38、51、53、55、109、115、118および121位のすべてとの結合接触点を有する、抗体である。

## 【 0 0 7 2 】

ある実施形態では、グリコシル化PD-1に特異的かつ優先的に結合する抗glycPD-1抗体は、配列番号3のアミノ酸配列を有するVHドメイン、および/または配列番号5のアミノ酸配列を有するVLドメインを含む。ある実施形態では、抗glycPD-1抗体は、グリコシル化PD-1との特異的結合について、配列番号3のVHドメインおよび配列番号5のVLドメインを含む抗体と競合する。他の実施形態では、抗glycPD-1抗体は、配列番号3のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一であるVHドメイン、および/または配列番号5のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一であるVLドメインを含む。これらの抗glycPD-1抗体は、キメラ抗体であってもよく、例えばヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4からのヒト定常ドメインを含んでいてもよい。

## 【 0 0 7 3 】

ある実施形態では、グリコシル化PD-1に特異的かつ優先的に結合する抗glycPD-1抗体は、配列番号6、配列番号7および配列番号8のアミノ酸配列をそれぞれ有するコチアCDR1～3を含むVHドメインを含むか、配列番号9、配列番号10および配列番号8のアミノ酸配列をそれぞれ有するAbM CDR1～3を含むVHドメインを含むか、配列番号11、配列番号12および配列番号8のアミノ酸配列をそれぞれ有するカバットCDR1～3を含むVHドメインを含むか、もしくは配列番号13、配列番号14および配列番号15のアミノ酸配列をそれぞれ有するコンタクトCDR1～3を含むVHドメインを含むか、またはそれらの組み合わせを含む。ある実施形態では、抗glycPD-1抗体は、配列番号6、配列番号7および配列番号8のアミノ酸配列をそれぞれ有するコチアCDR1～3を含むVHドメインを含むか、配列番号9、配列番号10および配列番号8のアミノ酸配列をそれぞれ有するAbM CDR1～3を含むVHドメインを含むか、配列番号11、配列番号12および配列番号8のアミノ酸配列をそれぞれ有するカバットCDR1～3を含むVHドメインを含むか、もしくは配列番号13、配列番号14および配列番号15のアミノ酸配列をそれぞれ有するコンタクトCDR1～3を含むVHドメインを含むか、またはそれらの組み合わせを含む抗体と、グリコシル化PD-1との特異的結合について競合する。ある実施形態では、グリコシル化PD-1に特異的かつ優先

10

20

30

40

50

的に結合する抗 g l y c P D - 1 抗体は、配列番号 1 6、配列番号 1 7 および配列番号 1 8 のアミノ酸配列をそれぞれ有するコチア、A b M もしくはカバット C D R 1 ~ 3 を含む C D R 1 ~ 3 を含む V L ドメインを含むか、または配列番号 1 9、配列番号 2 0 および配列番号 2 1 のアミノ酸配列をそれぞれ有するコンタクト C D R 1 ~ 3 を含む V L ドメインを含むか、あるいはそれらの組み合わせを含む。ある実施形態では、抗 g l y c P D - 1 抗体は、配列番号 1 6、配列番号 1 7 および配列番号 1 8 のアミノ酸配列をそれぞれ有するコチア、A b M もしくはカバット C D R 1 ~ 3 を含む V L ドメインを含むか、または配列番号 1 9、配列番号 2 0 および配列番号 2 1 のアミノ酸配列をそれぞれ有するコンタクト C D R 1 ~ 3 を含む V L ドメインを含むか、あるいはそれらの組み合わせを含む抗体と、グリコシル化 P D - 1 との特異的結合について競合する。ある実施形態では、抗 g l y c P D - 1 抗体は、配列番号 6、配列番号 7 および配列番号 8 のアミノ酸配列をそれぞれ有するコチア C D R 1 ~ 3 を含む V H ドメインを含むか、配列番号 9、配列番号 1 0 および配列番号 8 のアミノ酸配列をそれぞれ有する A b M C D R 1 ~ 3 を含む V H ドメインを含むか、配列番号 1 1、配列番号 1 2 および配列番号 8 のアミノ酸配列をそれぞれ有するカバット C D R 1 ~ 3 を含む V H ドメインを含むか、または配列番号 1 3、配列番号 1 4 および配列番号 1 5 のアミノ酸配列をそれぞれ有するコンタクト C D R 1 ~ 3 を含む V H ドメインを含み、かつ配列番号 1 6、配列番号 1 7 および配列番号 1 8 のアミノ酸配列をそれぞれ有するコチア、A b M もしくはカバット C D R 1 ~ 3 を含む V L ドメインを含むか、または配列番号 1 9、配列番号 2 0 および配列番号 2 1 のアミノ酸配列をそれぞれ有するコンタクト C D R 1 ~ 3 を含む V L ドメインを含む、抗体を含むか、あるいはその抗体と結合について競合する。好ましくは、V H および V L ドメインは、C D R の同じクラスを有する、すなわち、両方とも、コチア、A b M、カバットまたはコンタクト C D R を有する

#### 【 0 0 7 4 】

他の実施形態では、抗 g l y c P D - 1 抗体は、配列番号 6、配列番号 7 および配列番号 8 のアミノ酸配列をそれぞれ有する C D R のうちの、または配列番号 9、配列番号 1 0 および配列番号 8 のアミノ酸配列をそれぞれ有する C D R のうちの、または配列番号 1 1、配列番号 1 2 および配列番号 8 のアミノ酸配列をそれぞれ有する C D R のうちの、または配列番号 1 3、配列番号 1 4 および配列番号 1 5 のアミノ酸配列をそれぞれ有する C D R のうちの 1、2 または 3 つの C D R に 1、2、3、4 または 5 つのアミノ酸置換があるアミノ酸配列を有する C D R H 1、H 2 および H 3 を含む、V H ドメインを有する。抗 g l y c P D - 1 抗体は、配列番号 1 6、配列番号 1 7 および配列番号 1 8 のアミノ酸配列をそれぞれ有する 1、2 もしくは 3 つの C D R または配列番号 1 9、配列番号 2 0 および配列番号 2 1 のアミノ酸配列をそれぞれ有する 1、2 もしくは 3 つの C D R に 1、2、3、4 または 5 つのアミノ酸置換があるアミノ酸配列を有する、C D R L 1、L 2 および L 3 を含む V L ドメインを有しうる。抗 g l y c P D - 1 抗体は、V H ドメインと V L ドメインの両方の C D R にアミノ酸置換があってもよい。一部の実施形態では、アミノ酸置換は、保存的置換である。

#### 【 0 0 7 5 】

好ましくは、上述の抗体は、ヒトフレームワーク領域を有し、すなわち、S T M 4 1 8 のヒト化形態、および任意選択的に、例えばヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3 または I g G 4 からのヒト定常ドメインを含む。

#### 【 0 0 7 6 】

結合親和性または他のパラメーターを向上させるためにヒト化抗体の C D R および / またはフレームワーク領域において 1 つまたは複数のアミノ酸置換を行ってもよいことは、当業者には理解されるであろう。実施形態では、抗 g l y c P D - 1 抗体は、グリコシル化 P D - 1 との特異的結合について、上記 V H および V L ドメインならびに C D R を内部に含む抗体と競合する。実施形態では、抗 g l y c P D - 1 抗体は、非グリコシル化 P D - 1 との該抗体の結合により示される K<sub>d</sub> の半分未満の K<sub>d</sub> でグリコシル化 P D - 1 と結合する。ある実施形態では、抗 g l y c P D - 1 抗体は、非グリコシル化 P D - 1 に対して

10

20

30

40

50

示される $K_d$ の少なくとも5倍少ない $K_d$ でグリコシル化PD-1タンパク質と結合する。ある実施形態では、抗glycPD-1抗体は、非グリコシル化PD-1タンパク質との該抗体の結合により示される $K_d$ の少なくとも10倍少ない $K_d$ でグリコシル化PD-1タンパク質と結合する。ある実施形態では、実施例2に記載の細胞フローサイトメトリー結合アッセイにおいて、抗体は、WT PD-1を発現する細胞との結合であって、非グリコシル化PD-1を発現する細胞との結合についてのMFIより5倍、10倍、20倍、30倍、50倍、70倍、または100倍大きいMFIとして表される結合を示す。ある実施形態では、抗体は、蛍光標識またはマーカーにより直接または間接的に検出可能である。ある実施形態では、抗体は、蛍光標識またはマーカー、例えば、FITCで直接標識されている。ある実施形態では、グリコシル化PD-1に対するSTM418 MA 10  
bまたはそのキメラもしくはヒト化形態の結合親和性は、5~20 nMまたは5~10 nM（下限値と上限値を含む）である。ある実施形態では、抗体は、PD-1とPD-L1の相互作用を阻害し、特に、エフェクターT細胞により発現されるグリコシル化PD-1と腫瘍細胞により発現されるPD-L1の相互作用を阻害する。

#### 【0077】

別の態様で提供されるのは、グリコシル化PD-1に特異的に結合する、配列番号23および25のアミノ酸配列をそれぞれ有する重鎖および軽鎖可変ドメイン（成熟 $V_H$ および $V_L$ 領域アミノ酸配列）を有する抗glycPD-1モノクローナル抗体STM432、およびその抗原結合部分、ならびにそのヒト化およびキメラ形態である。配列番号22および24であるSTM432 MA 20  
bの重鎖および軽鎖可変（V）ドメインをそれぞれコードする核酸配列は、下記の表3に示されている。また、表5に示されているのは、STM432のコチア、AbM、カバットおよびコンタクト重鎖および軽鎖VドメインCDRである。

#### 【0078】

STM432は、配列91DCRFRVTQLPNGRDFHM107...123CGAISLAPKAQI134（配列番号1のPD-1アミノ酸配列のアミノ酸D91~M107およびC123~I134）に対応する、グリコシル化PD-1上のエピトープに結合すると決定されている。MAB STM432により認識されるエピトープを含む、すなわち、PD-1に結合したmAbによる接触を受ける、本明細書で示されるアミノ酸残基R95、R103、S127およびK131には、下線が引かれている。したがって、提供されるのは、本明細書で定義される通りのSTM432エピトープに結合する抗glycPD-1抗体である。また、本明細書で提供されるのは、グリコシル化PD-1との結合についてSTM432 MA 30  
bと競合する、および/またはSTM432と同じエピトープと結合する、抗glycPD-1抗体である。

#### 【0079】

ある実施形態では、グリコシル化PD-1に特異的かつ優先的に結合する抗抗glycPD-1抗体は、配列番号23のアミノ酸配列を有する $V_H$ ドメイン、および/または配列番号25のアミノ酸配列を有する $V_L$ ドメインを含む。ある実施形態では、抗glycPD-1抗体は、グリコシル化PD-1との特異的結合について、配列番号23の $V_H$ ドメインおよび配列番号25の $V_L$ ドメインを含む抗体と競合する。ある実施形態では、グリコシル化PD-1に特異的かつ優先的に結合する抗glycPD-1抗体は、配列番号23のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一である $V_H$ ドメイン、および/または配列番号25のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一である $V_L$ ドメインを含む。これらの抗glycPD-1抗体は、キメラ抗体であってもよく、例えばヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4からのヒト定常ドメインを含んでいてもよい。 40

#### 【0080】

ある実施形態では、グリコシル化PD-1に特異的かつ優先的に結合する抗glycPD-1抗体は、配列番号26、配列番号27および配列番号28のアミノ酸配列をそれぞれ 50

有するコチア C D R 1 ~ 3、配列番号 2 9、配列番号 3 0 および配列番号 2 8 のアミノ酸配列をそれぞれ有する A b M C D R 1 ~ 3、配列番号 3 1、配列番号 3 2 および配列番号 2 8 のアミノ酸配列をそれぞれ有するカバット C D R 1 ~ 3、もしくは配列番号 3 3、配列番号 3 4 および配列番号 3 5 のアミノ酸配列をそれぞれ有するコンタクト C D R 1 ~ 3、またはそれらの組み合わせを含む、V H ドメインを含む。ある実施形態では、抗 g l y c P D - 1 抗体は、配列番号 2 6、配列番号 2 7 および配列番号 2 8 のアミノ酸配列をそれぞれ有するコチア C D R 1 ~ 3、配列番号 2 9、配列番号 3 0 および配列番号 2 8 のアミノ酸配列をそれぞれ有する A b M C D R 1 ~ 3、配列番号 3 1、配列番号 3 2 および配列番号 2 8 のアミノ酸配列をそれぞれ有するカバット C D R 1 ~ 3、もしくは配列番号 3 3、配列番号 3 4 および配列番号 3 5 のアミノ酸配列をそれぞれ有するコンタクト C D R 1 ~ 3、またはそれらの組み合わせを含む V H ドメインを含む抗体と、グリコシル化 P D - 1 との特異的結合について競合する。ある実施形態では、グリコシル化 P D - 1 に特異的かつ優先的に結合する抗 g l y c P D - 1 抗体は、配列番号 3 6、配列番号 3 7 および配列番号 3 8 のアミノ酸配列をそれぞれ有するコチア、A b M およびカバット C D R 1 ~ 3 を含む C D R 1 ~ 3、もしくは配列番号 3 9、配列番号 4 0 および配列番号 4 1 のアミノ酸配列を有するコンタクト C D R 1 ~ 3、またはそれらの組み合わせを含む、V L ドメインを含む。ある実施形態では、抗 g l y c P D - 1 抗体は、配列番号 3 6、配列番号 3 7 および配列番号 3 8 のアミノ酸配列をそれぞれ有するコチア、A b M もしくはカバット C D R 1 ~ 3、または配列番号 3 9、配列番号 4 0 および配列番号 4 1 のアミノ酸配列を有するコンタクト C D R 1 ~ 3、あるいはそれらの組み合わせを含む V L ドメインを含む抗体と、グリコシル化 P D - 1 との特異的結合について競合する。ある実施形態では、グリコシル化 P D - 1 に特異的かつ優先的に結合する抗 g l y c P D - 1 抗体は、配列番号 2 6、配列番号 2 7 および配列番号 2 8 のアミノ酸配列をそれぞれ有するコチア C D R 1 ~ 3、配列番号 2 9、配列番号 3 0 および配列番号 2 8 のアミノ酸配列をそれぞれ有する A b M C D R 1 ~ 3、配列番号 3 1、配列番号 3 2 および配列番号 2 8 のアミノ酸配列をそれぞれ有するカバット C D R 1 ~ 3、または配列番号 3 3、配列番号 3 4 および配列番号 3 5 のアミノ酸配列をそれぞれ有するコンタクト C D R 1 ~ 3 を含む V H ドメインを含み、かつ配列番号 3 6、配列番号 7 および配列番号 3 8 のアミノ酸配列をそれぞれ有するコチア、A b M もしくはカバット C D R 1 ~ 3、または配列番号 3 9、配列番号 4 0 および配列番号 4 1 のアミノ酸配列を有するコンタクト C D R 1 ~ 3 を含む V L ドメインを含む、抗体を含むか、あるいはその抗体と結合について競合する。好ましくは、V H および V L ドメインは、C D R の同じクラスを有する、すなわち、両方とも、コチア、A b M、カバットまたはコンタクト C D R を有する。

#### 【 0 0 8 1 】

ある特定の実施形態で提供されるのは、配列番号 2 6、配列番号 2 7 および配列番号 2 8 のアミノ酸配列をそれぞれ、配列番号 2 9、配列番号 3 0 および配列番号 2 8 のアミノ酸配列をそれぞれ、または配列番号 3 1、配列番号 3 2 および配列番号 2 8 のアミノ酸配列をそれぞれ、または配列番号 3 3、配列番号 3 4 および配列番号 3 5 のアミノ酸配列をそれぞれ有する 1、2 または 3 つの C D R に 1、2、3、4 または 5 つのアミノ酸置換があるアミノ酸配列を有する C D R H 1、H 2 および H 3 を含む V H ドメインをする抗 g l y c P D - 1 抗体である。抗 g l y c P D - 1 抗体は、配列番号 3 6、配列番号 3 7 および配列番号 3 8 のアミノ酸配列をそれぞれまたは配列番号 3 9、配列番号 4 0 および配列番号 4 1 のアミノ酸配列をそれぞれ有する 1、2 または 3 つの C D R に 1、2、3、4 または 5 つのアミノ酸置換があるアミノ酸配列を有する、C D R L 1、L 2 および L 3 を含む V L ドメインも有しうる。抗 g l y c P D - 1 抗体は、V H ドメインと V L ドメインの両方の C D R にアミノ酸置換があってもよい。一部の実施形態では、アミノ酸置換は、保存的置換である。

#### 【 0 0 8 2 】

実施形態では、抗 g l y c P D - 1 抗体は、グリコシル化 P D - 1 との特異的結合について、上記 V H および V L ドメインならびに C D R を内部に含む抗体と競合する。好ましく

10

20

30

40

50



は、これらの抗体は、ヒトフレームワーク領域を有し、すなわち、STM432のヒト化形態、および任意選択的に、例えばヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4からのヒト定常ドメインを含む。結合親和性または他のパラメーターを向上させるためにヒト化抗体のCDRまたはフレームワーク領域において1つまたは複数のアミノ酸置換を行ってもよいことは、当業者には理解されるであろう。実施形態では、抗glycPD-1抗体は、非グリコシル化PD-1に対して示される $K_d$ の半分未満の $K_d$ でグリコシル化PD-1と結合する。実施形態では、抗glycPD-1抗体は、非グリコシル化PD-1に対して示される $K_d$ の半分未満の $K_d$ でグリコシル化PD-1と結合する。ある実施形態では、抗glycPD-1抗体は、非グリコシル化PD-1との該抗体の結合により示される $K_d$ の少なくとも5倍少ない $K_d$ でグリコシル化PD-1タンパク質と結合する。ある実施形態では、抗glycPD-1抗体は、非グリコシル化PD-1タンパク質との該抗体の結合により示される $K_d$ の少なくとも10倍少ない $K_d$ でグリコシル化PD-1タンパク質と結合する。ある実施形態では、実施例2に記載の細胞フローサイトメリー結合アッセイにおいて、抗体は、WT PD-1を発現する細胞との結合であって、非グリコシル化PD-1を発現する細胞との結合についてのMFIより5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、または50倍大きいMFIとして表される結合を示す。ある実施形態では、抗体は、蛍光標識またはマーカーにより直接または間接的に検出可能である。ある実施形態では、抗体は、蛍光標識またはマーカー、例えば、FITCで直接標識されている。ある実施形態では、グリコシル化PD-1に対するSTM432 MA bあるいはその結合ドメインまたはヒト化もしくはキメラ形態の結合親和性は、5~20 nMまたは5~10 nM（下限値と上限値を含む）である。ある実施形態では、抗体は、PD-1とPD-1の相互作用を阻害し、特に、エフェクターT細胞により発現されるグリコシル化PD-1と腫瘍細胞により発現されるPD-1、特にグリコシル化PD-1、の相互作用を阻害する。

10

20

#### 【0083】

ある実施形態では、抗体は、PD-1とPD-1の相互作用を阻害し、特に、エフェクターT細胞により発現されるグリコシル化PD-1と腫瘍細胞により発現されるPD-L1の相互作用を阻害する。

#### 【0084】

さらに別の実施形態は、配列番号2もしくは22と少なくとも90~98%同一であるヌクレオチド配列を含む抗glycPD-1 V<sub>H</sub>ドメインをコードする、および/または配列番号4もしくは24とそれぞれ少なくとも90~98%同一であるヌクレオチド配列を含む抗glycPD-1抗体V<sub>L</sub>ドメインをコードする、単離された核酸分子を提供する。実施形態では、V<sub>H</sub>および/またはV<sub>L</sub>ドメインをコードするヌクレオチド配列は、配列番号2もしくは22または配列番号4もしくは24とそれぞれ90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一である。

30

#### 【0085】

下記の表3は、STM418およびSTM432の重鎖および軽鎖可変ドメインのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を提供するものである。

#### 【0086】

40

## 【表 3】

表 3. STM418 および STM432 の重鎖および軽鎖可変ドメインヌクレオチドおよびアミノ酸配列

記述	配列
MAb STM418 成熟重鎖 V ドメインヌクレオチド配列	gaagtgatgctggtggagctctgggggaggccttagtgaagcctggagggtccctgaaactctcctgtgcagcctctggattcactttcagtagctatggcatgtcttgggttcgtcagactccggagaagaggctggagtgggtcgcaaccattagtggtggtggtgtaaacacctactatccagacactgtgaagggccgattcaccatctccagagacaatgccaagaacacctgtactgcaaagtgcagctctgaggtctgaggacacggccttgattattgtacaagctattactacgggattgactactggggccaaggcaccactctcacagtctcctca (配列番号 2)
MAb STM418 成熟重鎖 V ドメインアミノ酸配列	EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSSYGMSWVRQTPEKRLEWVATISGGGGNTYYPDTVKGRTISRDNANTLYLQMSLSRSEDALYYCTSYYYGIDYWGQGTTLTVSS (配列番号 3)
MAb STM418 成熟軽鎖 V ドメインヌクレオチド配列	gacattgtgatgaccagctctcacaattcatgtccacatcagtaggaagcaggggtcagcatcacctgcaaggccagtcaggatgtgagtactgctgtagcctggatcaacaaaaaccagggaatctcctaaattactgattactgggcatccaccggcaaaactggagtccctgatcgcttcacaggcagtggatctgggacagagtatactctcaccatcagcagtggtgcaggctgaagacctggcactttattactgtcagcaacattatagcattccgtggacgttcgggtggaggccaccaagctggaaatcaaacgg (配列番号 4)
MAb STM418 成熟軽鎖 V ドメインアミノ酸配列	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRQTGVPDRFTGSGSGTEYTLTISSVQAEDLALYYCQQHYSIPWTFGGGTKLEIKR (配列番号 5)
MAb STM432 成熟重鎖 V ドメインヌクレオチド配列	gaagtgatgctggtggagcctgggggaggccttagtgaagcctggagggtccctgaaactctcctgtgcagcctctggattcactttcagtagctatggcatgtcttgggttcgccagactccggagaagaggctggagtgggtcgcaaccattagtggtggtggtgctaacacctactatccagacactgtgaagggccgattcacca tctccagagacaatgccaagaacacctgtacctgcaaataaacagctctgaggtctgaggacacggccttgattactgtgcaagatatggttacgacacggctcttgcctactggggccaaggactctggtcactgtctctgca (配列番号 22)
MAb STM418 成熟重鎖 V ドメインアミノ酸配列	EVMLVEPGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSSYGMSWVRQTPEKRLEWVATISGGGANTYYPDTVKGRTISRDNANTLYLQMSLSRSEDALYYCARYGYDTVFAIWGQGTTLTVSA (配列番号 23)
MAb STM418 成熟軽鎖 V ドメインヌクレオチド配列	gacattgtgctgacccaatctccagcttcttggctgtgtcttagggcagaaggccaccatctcctgcagagccagcgaaagtgttgatgattatggcattggttttatgaactggtccaacagaaaccagggtcagccacccaaactcctcatctatactacatccaaccaaggatccgggtccctgccagggttagtggcagtggtctgggacagacttcagcctcaacatccatcctatggtggaggatgatactgcaatgtatttctgtcagcaagtaaggaggtccgtggacgttcgggtggcggcaccaagctggaaatcaaa (配列番号 24)
MAb STM418 成熟重鎖 V ドメインヌクレオチド(DNA)配列	DIVLTQSPASLAVSLGQKATISCRASESVDDYGI GFMNWFQQKPGQPPLLIYTTSNQSGVPARFSGSGGTDFSLNIHPMVEDDTAMYFCQQSKEVPWTFGGGTKLEIK (配列番号 25)

## 【0087】

下記の表 4 および 5 で提供されるのは、コチア、A b M、カバットおよびコンタクト C D R による、S T M 4 1 8 および S T M 4 3 2 抗体の C D R 配列である。したがって、提供されるのは、ヒトフレームワーク領域に付け足された下記表 4 および 5 の C D R を含む非グリコシル化 P D - 1 と比較してグリコシル化 P D - 1 に優先的に結合する、S T M 4 1 8 および S T M 4 3 2 のヒト化形態である。

## 【0088】

10

20

30

40

50

## 【表 4】

表 4.STM418 の CDR 配列

	領域定義	CDRI	CDR2	CDR3
STM418 重鎖	コチア	GFTFSSY (配列番号 6)	SGGGGN (配列番号 7)	YYYGIDY (配列番号 8)
	AbM	GFTFSSYGMS (配列番号 9)	TISGGGGNTY (配列番号 10)	YYYGIDY (配列番号 8)
	カバット	SYGMS (配列番号 11)	TISGGGGNTYYPDTVKG (配列番号 12)	YYYGIDY (配列番号 8)
	コンタクト	SSYGMS (配列番号 13)	WVATISGGGGNTY (配列番号 14)	TSYYYGID (配列番号 15)
STM418 カップ軽鎖	コチア	KASQDYSTAVA (配列番号 16)	WASTRQT (配列番号 17)	QQHYSIPWT (配列番号 18)
	AbM	KASQDYSTAVA (配列番号 16)	WASTRQT (配列番号 17)	QQHYSIPWT (配列番号 18)
	カバット	KASQDYSTAVA (配列番号 16)	WASTRQT (配列番号 17)	QQHYSIPWT (配列番号 18)
	コンタクト	STAVAWY (配列番号 19)	LLIYWASTRQ (配列番号 20)	QQHYSIPW (配列番号 21)

10

20

## 【 0 0 8 9 】

## 【表 5】

表 5.STM432 の CDR 配列

	領域定義	CDRI	CDR2	CDR3
STM432 重鎖	コチア	GFTFSSAY (配列番号 26)	SGGGAN (配列番号 27)	YGYDTVFAY (配列番号 28)
	AbM	GFTFSSAYGMS (配列番号 29)	TISGGGANTY (配列番号 30)	YGYDTVFAY (配列番号 28)
	カバット	SYGMS (配列番号 31)	TISGGGANTYYPDTVKG (配列番号 32)	YGYDTVFAY (配列番号 28)
	コンタクト	SSYGMS (配列番号 33)	WVATISGGGANTY (配列番号 34)	ARYGYDTVFA (配列番号 35)
STM432 カップ軽鎖	コチア	RASESVDDYGIGFMN (配列番号 36)	TTSNQGS (配列番号 37)	QQSKEVPWT (配列番号 38)
	AbM	RASESVDDYGIGFMN (配列番号 36)	TTSNQGS (配列番号 37)	QQSKEVPWT (配列番号 38)
	カバット	RASESVDDYGIGFMN (配列番号 36)	TTSNQGS (配列番号 37)	QQSKEVPWT (配列番号 38)
	コンタクト	DDYGIGFMNWF (配列番号 39)	LLIYTTSNQG (配列番号 40)	QQSKEVPW (配列番号 41)

30

40

## 【 0 0 9 0 】

一部の実施形態では、本明細書で提供される抗 g l y c P D - 1 抗体は、I g G、I g M、I g A、I g D または I g E であってもよい。抗 g l y c P D - 1 抗体はまた、キメラ抗体、親和成熟抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体であってもよい。抗 g l y c P D - 1 抗体はまた、ラクダ化抗体、イントラボディ、抗イディオタイプ (抗 I d) 抗体であってもよい。一部の実施形態では、抗 g l y c P D - 1 抗体は、ポリクローナル抗体であって

50

もよく、またはモノクローナル抗体であってもよい。

【0091】

一部の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、非グリコシル化PD-1と比較してグリコシル化PD-1と選択的に結合する抗原結合断片である。抗原結合断片は、Fd、Fv、Fab、F(ab')、F(ab)<sub>2</sub>、F(ab')<sub>2</sub>、F(ab)<sub>3</sub>、F(ab')<sub>3</sub>、一本鎖Fv(scFv)、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ミニボディ、または単ドメイン抗体であってもよい。scFvは、一価scFvであってもよく、または二価scFvであってもよい。

【0092】

公知の手段により、および本明細書に記載の通り、グリコシル化PD-1、そのそれぞれのエピトープのうちの1つもしくは複数、または前述のもののいずれかのコンジュゲートに特異的である、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体、抗原結合断片、ならびに結合ドメインおよびCDR（上述のもののいずれかについての操作形態を含む）を、そのような抗原またはエピトープが天然源から単離されたものであるか、または天然化合物の合成誘導体もしくはバリエーションであるかを問わず、作出することができる。

【0093】

鳥類および哺乳動物を含む、任意の動物源から、抗体を産生することができる。一部の実施形態では、抗体は、ヒツジ、ネズミ（マウスおよびラット）、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ウマまたはニワトリである。加えて、より新しい技術により、ヒトコンビナトリアル抗体ライブラリーからのヒト抗体の開発およびスクリーニングが可能である。例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれている米国特許第6,946,546号に記載されているように、バクテリオファージ抗体発現技術により動物の免疫処置の非存在下で特異的抗体を産生することが可能である。これらの技術は、Marks et al., Bio/Technol., 10:779-783(1992); Stemmer, Nature, 370:389-391(1994); Gram et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:3576-3580 (1992); Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:3809-3813(1994); およびSchier et al., Gene, 169(2):147-155(1996)にさらに記載されており、これらの参考文献は、それら全体が参照により本明細書に組み込まれている。

【0094】

様々な動物種においてポリクローナル抗体を産生する方法、ならびにヒト化、キメラおよび完全ヒトをはじめとする様々なタイプのモノクローナル抗体を産生する方法も、当技術分野において周知である。例えば、次の米国特許は、そのような方法の実施可能な記述を提供しており、参照により本明細書に組み込まれている：米国特許第3,817,837号、同第3,850,752号、同第3,939,350号、同第3,996,345号、同第4,196,265号、同第4,275,149号、同第4,277,437号、同第4,366,241号、同第4,469,797号、同第4,472,509号、同第4,606,855号、同第4,703,003号、同第4,742,159号、同第4,767,720号、同第4,816,567号、同第4,867,973号、同第4,938,948号、同第4,946,778号、同第5,021,236号、同第5,164,296号、同第5,196,066号、同第5,223,409号、同第5,403,484号、同第5,420,253号、同第5,565,332号、同第5,571,698号、同第5,627,052号、同第5,656,434号、同第5,770,376号、同第5,789,208号、同第5,821,337号、同第5,844,091号、同第5,858,657号、同第5,861,155号、同第5,871,907号、同第5,969,108号、同第6,054,297号、同第6,165,464号、同第6,365,157号、同第6,406,867号、同第6,709,659号、同第6,709,873号、同第6,753,407号、同第6,814,965号、同第6,849,259号、同第6,861,572号、同第6,875,434号、同第6,891,024号、同第7,407,659号、および同第8,178,098号明細書（これらの米国特許は、それら全体が参照により本明細書に組み込まれている）。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 9 5 】

一部の実施形態では、抗 g l y c P D - 1 抗体は、モノクローナル抗体でありうる。一部の実施形態では、抗 g l y c P D - 1 抗体は、ポリクローナル抗体でありうる。動物にグリコシル化 P D - 1 ポリペプチドなどの抗原を接種して、グリコシル化 P D - 1 ポリペプチドに特異的な抗体を産生することができる。多くの場合、抗体は、免疫応答を増強するために別の分子に結合またはコンジュゲートされる。コンジュゲートは、動物において免疫応答を惹起するために使用される抗原に結合された、いずれのペプチド、ポリペプチド、タンパク質または非タンパク質性物質であってもよい。抗原接種に応答して動物において産生される抗体は、様々な個々の抗体産生 B リンパ球から作製される様々な同一でない分子（ポリクローナル抗体）を有する。動物におけるポリクローナル抗体産生のための妥当な条件を考えれば、動物の血清中の抗体の大部分は、その動物に免疫を付与した抗原性化合物上の集団エпитープを認識する。

10

## 【 0 0 9 6 】

この特異性をアフィニティー精製によって目的の抗原またはエпитープを認識する抗体のみを選択するように増強することができる。モノクローナル抗体（M A b）を生成する方法は、ポリクローナル抗体を調製する方法と同じように開始することができる。一部の実施形態では、マウスおよびラットなどの齧歯類がモノクローナル抗体の生成に使用される。一部の実施形態では、ウサギ、ヒツジまたはカエル細胞がモノクローナル抗体の生成に使用される。ラットの使用は周知であり、ある特定の利点をもたらすことができる。マウス（例えば、B A L B / c マウス）は、日常的に使用されており、一般に、高いパーセンテージの安定した融合体をもたらす。

20

## 【 0 0 9 7 】

ハイブリドーマ技術は、グリコシル化 P D - 1 ポリペプチドで前もって免疫を付与したマウスからの単一 B リンパ球と不死メラノーマ細胞（通常はマウスメラノーマ）の融合を含む。この技術は、不特定の世代数にわたって単一抗体産生細胞を増殖させる方法をもたらす。したがって、同じ抗原またはエпитープ特異性を有する構造的に同じ抗体（モノクローナル抗体）の無限の量を産生することができる。

## 【 0 0 9 8 】

抗 g l y c P D - 1 抗体は、ポリペプチドの産生に有用な当技術分野において公知の任意の方法、例えば、i n v i t r o 合成、組換え D N A 産生などによって産生することができる。ヒト化抗体を組換え D N A 技術によって産生することができる。本明細書に記載の抗体は、組換え免疫グロブリン発現技術を使用して産生することもできる。ヒト化抗体をはじめとする免疫グロブリン分子の組換え産生は、米国特許第 4 , 8 1 6 , 3 9 7 号明細書（B o s s ら）、米国特許第 6 , 3 3 1 , 4 1 5 号および同第 4 , 8 1 6 , 5 6 7 号明細書（両方とも C a b i l l y ら）、英国特許出願公開第 2 , 1 8 8 , 6 3 8 号明細書（W i n t e r ら）、英国特許出願公開第 2 , 2 0 9 , 7 5 7 号明細書に記載されており、これらの参考文献は、それら全体が参照により本明細書に組み込まれている。ヒト化免疫グロブリンをはじめとする免疫グロブリンの組換え発現のための技術もまた、Goeddel et al., Gene Expression Technology Methods in Enzymology Vol. 185 Academic Press (1991)、および Borreback, Antibody Engineering, W. H. Freeman (1992) において見つけることができ、これらの参考文献は、それら全体が参照により本明細書に組み込まれている。組換え抗体の生成、設計および発現に関する追加情報は、Mayforth, Designing Antibodies, Academic Press, San Diego (1993) において見つけることができる。

30

40

## 【 0 0 9 9 】

外来抗体の可変領域をそのまま残してモノクローナル抗体の軽鎖および重鎖定常ドメインをヒト由来の類似ドメインで置換する方法が開発された。あるいは、完全ヒトモノクローナル抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子の遺伝子導入マウスまたはラットにおいて産生される。齧歯動物アミノ酸配列とヒトアミノ酸配列の両方を有する抗体可変ドメインを組換えで構築することにより、モノクローナル抗体の可変ドメインをよりヒトの形態に変換す

50

る方法も開発された。ヒト化モノクローナル抗体の場合、高頻度可変CDRのみが非ヒト（例えば、マウス、ラット、ニワトリ、ラマ）モノクローナル抗体に由来し、フレームワーク領域はヒトアミノ酸配列に由来する。齧歯動物に特有である抗体のアミノ酸配列を、ヒト抗体の対応する位置に見られるアミノ酸配列で置換することにより治療目的使用中的有害免疫反応の尤度が低下されることになると考えられる。抗体を産生するハイブリドーマまたは他の細胞もまた、ハイブリドーマにより産生される抗体の結合特異性を変えることもまたは変えないこともある遺伝子変異または他の変化を受けることがある。

#### 【0100】

モノクローナル抗体および他の抗体ならびに組換えDNA技術を使用して、元の抗体の抗原またはエпитープ特異性を保持する、すなわち分子が結合ドメインを有する、他の抗体またはキメラ分子を産生することにより、操作抗体を作出することができる。そのような技術は、抗体の免疫グロブリン可変領域またはCDRをコードするDNAを、異なる抗体のフレームワーク領域、定常領域、または定量領域+フレームワーク領域の遺伝物質に導入することを含む。例えば、参照により本明細書に組み込まれている米国特許第5,091,513号および同第6,881,557号明細書を参照されたい。

#### 【0101】

ある特定の実施形態では、抗glycPD-1抗体は、ヒト抗体である。ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン配列に由来する抗体ライブラリーを使用する上記のファージディスプレイ方法をはじめとする当技術分野において公知の様々な方法によって作製することができる（例えば、米国特許第4,444,887号および同第4,716,111号明細書、ならびに国際公開第98/46645号、同第98/50433号、同第98/24893号、同第98/16654号、同第96/34096号、同第96/33735号および同第91/10741号パンフレットを参照されたい）。ヒト抗体は、機能性内因性免疫グロブリンを発現する能力がないがヒト免疫グロブリン遺伝子を発現することができる遺伝子導入マウスを使用して、産生することができる。例えば、ヒト重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子複合体を、マウス胚性幹細胞に、ランダムにまたは相同組換えにより導入することができる。あるいは、ヒト可変領域、定常領域および多様性領域を、ヒト重鎖および軽鎖遺伝子に加えてマウス胚性幹細胞に導入することができる。マウス重鎖および軽鎖免疫グロブリン遺伝子は、相同組換えによるヒト免疫グロブリン座位の導入で、別々にまたは同時に非機能性にするすることができる。特に、JH領域のホモ接合型欠失は、内因性抗体産生を防止する。修飾された胚性幹細胞は、キメラマウスを産生するために増殖され、胚盤胞にマイクロインジェクトされる。その後、それらのキメラマウスは、ヒト抗体を発現するホモ接合子孫を産生するために飼育される。それらの遺伝子導入マウスに、選択された抗原、例えば、グリコシル化PD-1ポリペプチドのすべてまたは一部分を用いて、従来の方法論を使用して免疫が付与される。抗原に対するモノクローナル抗体は、従来のハイブリドーマ技術を使用して、免疫付与された遺伝子導入マウスから得ることができる（例えば、米国特許第5,916,771号明細書を参照されたい）。遺伝子導入マウスにより保有されるヒト免疫グロブリン導入遺伝子は、B細胞分化中に再編成し、その後、クラススイッチおよび体細胞変異を受ける。したがって、そのような技術を使用して、治療に有用なIgG、IgA、IgMおよびIgE抗体を産生することができる。このヒト抗体産生技術の概要については、Lonberg and Huszar (1995, Int. Rev. Immunol. 13:65-93; これは、その全体が参照により本明細書に組み込まれている)を参照されたい。ヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体のこの産生技術ならびにそのような抗体を産生するためのプロトコールの詳細な論述については、例えば、国際公開第98/24893号、同第96/34096号および同第96/33735号パンフレット、ならびに米国特許第5,413,923号、同第5,625,126号、同第5,633,425号、同第5,569,825号、同第5,661,016号、同第5,545,806号、同第5,814,318号および同第5,939,598号明細書を参照されたく、これらの参照文献は、それら全体が参照により本明細書に組み込まれている。加えて、Abgenix, Inc. (Freemont, Calif.) および Medarex (Pri

10

20

30

40

50

nceton、N. J. )などの会社は、上記の技術に類似した技術を使用して、選択された抗原に対するヒト抗体を提供する業務に従事することができる。

#### 【0102】

一実施形態では、抗体は、キメラ抗体、例えば、異種非ヒト、ヒトまたはヒト化配列（例えば、フレームワークおよび/または定常ドメイン配列）にグラフトされた非ヒトドナーからの抗原結合配列を含む抗体である。一実施形態では、非ヒトドナーは、ラットである。一実施形態では、抗原結合配列は、合成のものであり、例えば、変異誘発（例えば、ヒトファージライブラリーのファージディスプレイスクリーニングなど）によって得られる。一実施形態では、本明細書で提供されるキメラ抗体は、マウスV領域およびヒトC領域を有する。一実施形態では、マウス軽鎖V領域は、ヒトカッパ軽鎖に融合されている。一実施形態では、マウス重鎖V領域は、ヒトIgG1 C領域に融合されている。

10

#### 【0103】

キメラ抗体の産生方法は、当技術分野において公知である。例えば、Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi et al., BioTechniques 4:214 (1986); Gillies et al., J. Immunol. Methods 125:191-202(1989); ならびに米国特許第6,311,415号、同第5,807,715号、同第4,816,567号および同第4,816,397号明細書を参照されたく、これらの参照文献のすべては、それら全体が参照により本明細書に組み込まれている。非ヒト種からの1つまたは複数のCDRとヒト免疫グロブリン分子からのフレームワーク領域とを含むキメラ抗体は、当技術分野において公知の様々な技術を使用して産生することができ、そのような技術には、例えば、CDRグラフトイング（欧州特許第239,400号明細書、国際公開第91/09967号パンフレット、ならびに米国特許第5,225,539号、同第5,530,101号および同第5,585,089号明細書）、ペニアリングまたはリサーフェーシング（欧州特許第592,106号、同第519,596明細書; Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7:805 (1994); およびRoguska et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:969 (1994))、および鎖シャフリング（米国特許第5,565,332号明細書）が含まれ、参照文献は、それら全体が参照により本明細書に組み込まれている。

20

#### 【0104】

組換えキメラ抗glycPD-1抗体の例示的な産生方法は、a) マウス抗glycPD-1モノクローナル抗体のCDRおよび可変領域が、ヒト免疫グロブリンに由来するFc領域に融合されている、抗体重鎖をコードし、発現する発現ベクターを従来の分子生物学方法により構築し、それによってキメラ抗体重鎖発現用のベクターを産生するステップ、b) マウス抗glycPD-1モノクローナル抗体の抗体軽鎖をコードし、発現する発現ベクターを従来の分子生物学方法により構築し、それによってキメラ抗体軽鎖発現用のベクターを産生するステップ、c) 従来の分子生物学方法により発現ベクターを宿主細胞に移入して、キメラ抗体発現用のトランスフェクトされた細胞を産生するステップ、およびd) トランスフェクトされた細胞を従来の細胞培養技術により培養して、キメラ抗体を産生するステップを含む。

30

#### 【0105】

組換えヒト化抗glycPD-1抗体の例示的な産生方法は、a) CDRとドナー抗体結合特異性を保持するために必要とされる可変領域フレームワークの最小部分がマウス抗glycPD-1モノクローナル抗体などの非ヒト免疫グロブリンに由来し、抗体の残部がヒト免疫グロブリンに由来する、抗体重鎖をコードし、発現する発現ベクターを従来の分子生物学方法により構築し、それによってヒト化抗体重鎖発現用のベクターを産生するステップ、b) CDRとドナー抗体結合特異性を保持するために必要とされる可変領域フレームワークの最小部分がマウス抗glycPD-1モノクローナル抗体などの非ヒト免疫グロブリンに由来し、抗体の残部がヒト免疫グロブリンに由来する、抗体重鎖をコードし、発現する発現ベクターを従来の分子生物学方法により構築し、それによってヒト化抗体軽鎖発現用のベクターを産生するステップ、c) 従来の分子生物学方法により発現

40

50

ベクターを宿主細胞に移入して、ヒト化抗体発現用のトランスフェクトされた細胞を産生するステップ、およびd)トランスフェクトされた細胞を従来の細胞培養技術により培養して、ヒト化抗体を産生するステップを含みうる。

#### 【0106】

どちらかの例示的方法に関しても、重鎖および軽鎖 - コード配列を除いてだが、異なる選択マーカ含有することができ、そのような発現ベクターをコトランスフェクトすることができる宿主細胞は、好ましくは同じものである。この手順は、重鎖および軽鎖ポリペプチドの同等の発現をもたらす。あるいは、重鎖ポリペプチドと軽鎖ポリペプチドの両方をコードする単一のベクターを使用してもよい。重鎖および軽鎖のコード配列は、cDNAもしくはゲノムDNAまたは両方を含むことができる。組換え抗体を発現するために使用される宿主細胞は、細菌細胞、例えば大腸菌 (*Escherichia coli*)、またはより好ましくは真核細胞 (例えば、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞もしくはHEK-293細胞) の、どちらであってもよい。発現ベクターの選択は、宿主細胞の選択に依存し、選択された宿主細胞において所望の発現および調節特性を有するように選択することができる。使用することができる他の細胞株には、CHO-K1、NSO、およびPER.C6 (Crucell, Leiden, Netherlands) が含まれるが、これらに限定されない。さらに、宿主細胞を選択するとき、種特異的なコドン使用頻度の偏りを考慮に入れ、タンパク質発現を増進するように、コドン使用頻度を最適化することができる。例えば、CHO細胞発現のために、抗体をコードするDNAは、モンゴルキヌゲネズミ (*Cricetulus griseus*) (チャイニーズハムスター卵巣細胞が由来する) により優先的に使用されるコドンを組み入れることができる。コドン最適化方法を用いて、所望の宿主細胞による発現向上を助長することができる (例えば、Wohlgemuth et al., *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 366(1580):2979-2986 (2011); Jestin et al., *J. Mol. Evol.* 69(5):452-457 (2009); Bollenbach et al., *Genome Res.* 17(4):401-404(2007); Kurland et al., *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 31:191-219 (1984); Grosjean et al., *Gene* 18(3): 199-209(1982)を参照されたい)。

#### 【0107】

一実施形態では、抗体は、V<sub>H</sub>Hドメイン配列またはナノボディ (商標) として公知である、軽鎖を欠くラクダ化抗体、好ましくは重鎖ラクダ化抗体、に由来する免疫グロブリン単一可変ドメインである。ナノボディ (商標) (Nb) は、天然起源の一本鎖抗体の最小機能断片または単一可変ドメイン (V<sub>H</sub>H) であり、当業者には公知である。それらは、ラクダ科動物に見られる重鎖のみ抗体に由来する (Hamers-Casterman et al., *Nature* 363: 446-448 (1993); Desmyter et al., *Nat. Struct. Biol.*, 803-811 (1996))。「ラクダ科動物」の科では、軽鎖ポリペプチド鎖を欠く免疫グロブリンが見いだされる。「ラクダ科動物」は、旧世界ラクダ科動物 (フタコブラクダ (*Camelus bactrianus*) およびヒトコブラクダ (*Camelus dromedarius*)) および新世界ラクダ科動物 (例えば、アルパカ (*Lama paccos*)、ラマ (*Lama glama*)、グアナコ (*Lama guanicoe*) およびビクーニャ (*Lama vicugna*) を含む。単一可変ドメイン重鎖抗体は、本明細書ではナノボディ (商標) またはV<sub>H</sub>H抗体と表記される。Nbの小さいサイズおよび特有の生物物理学的特性は、まれなまたは隠れたエピトープの認識について、およびタンパク質標的の空洞または活性部位への結合について、従来の抗体断片より優れている。さらに、Nbを多重特異性および多価抗体として設計することができ、レポーター分子に結合させることができ、またはヒト化することができる。Nbは、安定しており、胃腸系を生き延び、またNbを容易に製造することができる。

#### 【0108】

異なる特異性の2つの抗原結合部位を一体化して単一の構築物にするので、二重特異性抗体には、優れた特異性を有する2つの個別の抗原と一緒にする能力があり、したがって、治療剤として大きな可能性がある。二重特異性抗体は、そもそも、各々が異なる免疫グロブリンを産生する能力がある2つのハイブリドーマを融合させることによって作製することができる。完全免疫グロブリン中に存在するFc部分を含めずに2つのscFv抗体断



片を連結させることによって、二重特異性抗体を産生することもできる。そのような構築物中の各 s c F v ユニットは、合成ポリペプチドリinker によって互いに連結された重鎖 (V<sub>H</sub>) および軽鎖 (V<sub>L</sub>) 抗体鎖の各々からの 1 つの可変ドメインから構成されるものであり、合成ポリペプチドリinker は、耐タンパク質分解性を最大に維持しながら最小に免疫原性であるように遺伝子操作されていることが多い。2 つの s c F v ユニットを架橋する短い (通常は 10 アミノ酸未満) ポリペプチドSpacer の導入をはじめとするいくつかの技術によりそれぞれの s c F v ユニットを連結することによって二重特異性一本鎖抗体を作出することができる。したがって、結果として得られる二重特異性一本鎖抗体は、それぞれの s c F v ユニット内の V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> ドメインが、これら 2 つのドメイン間の分子内会合を可能にするのに十分な長さのポリペプチドリinker によって離隔されており、そのようにして形成された s c F v ユニットが、例えば一方の s c F v ユニットの V<sub>H</sub> ドメインと他方の s c F v ユニットの V<sub>L</sub> 間の望ましくない会合を防止するのに十分な短さで保たれたポリペプチドSpacer によって互いに近接して繋留されている、単一ポリペプチド鎖上に異なる特異性の 2 つの V<sub>H</sub> / V<sub>L</sub> 対を含有する種である。

#### 【0109】

抗原結合断片の例としては、限定ではないが、(i) V<sub>L</sub>、V<sub>H</sub>、C<sub>L</sub> および C<sub>H</sub>1 ドメインからなる F a b 断片、(ii) V<sub>H</sub> および C<sub>H</sub>1 ドメインからなる「F d」断片、(iii) 単一抗体の V<sub>L</sub> および V<sub>H</sub> ドメインからなる「F v」断片、(iv) V<sub>H</sub> ドメインからなる「d A b」断片、(v) 単離された C D R 領域、(vi) 2 つの連結された F b 断片を含む二価断片である、F (a b') 2 断片、(vii) V<sub>H</sub> ドメインおよび V<sub>L</sub> ドメインが、これら 2 つのドメインが会合して結合ドメインを形成することを可能にするペプチドリinker によって連結されている、一本鎖 F v 分子 (「s c F v」)、(viii) 二重特異性一本鎖 F v 二量体 (米国特許第 5, 091, 513 号明細書)、および (ix) 遺伝子融合により構築されたダイアボディ、多価または多重特異性断片 (米国特許出願公開第 2005/0214860 号明細書) が挙げられる。F v、s c F v、またはダイアボディ分子は、V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> ドメインを連結するジスルフィド架橋の組み込みによって安定させることができる。C<sub>H</sub>3 ドメインに連結された s c F v を有するミニボディも作製することができる (Hu et al., Cancer Res., 56:3055-3061 (1996))。

#### 【0110】

実施形態では抗体様結合ペプチド模倣物も企図されている。Liu et al., Cell Mol. Biol., 49:209-216 (2003) には、切り詰められた抗体 (pared-down antibodies) として作用するペプチドであり、より長い血清半減期および扱いやすい合成方法といったある特定の利点を有する、「抗体様結合ペプチド模倣物」(A B i P) が記載されている。

#### 【0111】

グリコシル化 P D - 1 ポリペプチド

またさらなる実施形態では、ヒト P D - 1 の N 49、N 58、N 74 または N 116 位に対応する少なくとも 1 個のアミノ酸を含むヒト P D - 1 の少なくとも 7 個 (例えば、少なくとも 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 個以上) の連続するアミノ酸の断片を含むポリペプチドを含む組成物であって、ヒト P D - 1 の N 49、N 58、N 74 または N 116 位に対応する前記アミノ酸の少なくとも 1 個がグリコシル化されており、ポリペプチドが、薬学的に許容される担体に配合されている、組成物が提供される。

#### 【0112】

一部の実施形態では、本明細書で提供されるのは、ヒト P D - 1 の N 49、N 58、N 74 または N 116 位に対応する少なくとも 1 個のアミノ酸を有するヒト P D - 1 の少なくとも 7 個の連続するアミノ酸のポリペプチドであって、ヒト P D - 1 の N 49、N 58、N 74 または N 116 位に対応する前記アミノ酸の少なくとも 1 個がグリコシル化されている、ポリペプチドである。一部の実施形態では、ポリペプチドは、グリコシル化されている N 49 位に対応するアミノ酸を有するヒト P D - 1 の少なくとも 7 個の連続するアミノ酸を有する。一部の実施形態では、ポリペプチドは、グリコシル化されている N 58 位

に対応するアミノ酸を有するヒトPD-1の少なくとも7個の連続するアミノ酸を有する。一部の実施形態では、ポリペプチドは、グリコシル化されているN74位に対応するアミノ酸を有するヒトPD-1の少なくとも7個の連続するアミノ酸を有する。一部の実施形態では、ポリペプチドは、グリコシル化されているN116位に対応するアミノ酸を有するヒトPD-1の少なくとも7個の連続するアミノ酸を有する。

【0113】

例えば、ポリペプチドは、N49がグリコシル化されている、ヒトPD-1のアミノ酸44～50個の断片でありうる。別の例では、ポリペプチドは、N74がグリコシル化されている、ヒトPD-1のアミノ酸70～80個の断片でありうる。さらに別の例では、ポリペプチドは、N58およびN74がグリコシル化されている、ヒトPD-1のアミノ酸50～80個の断片でありうる。本明細書で企図されるポリペプチドが、ヒトPD-1のN49、N58、N74またはN116位に対応する少なくとも1個のアミノ酸を含むヒトPD-1の少なくとも7個の連続するアミノ酸を有する任意のおよびすべてのポリペプチドであって、ヒトPD-1のN49、N58、N74またはN116位に対応する前記アミノ酸の少なくとも1個がグリコシル化されている、ポリペプチドであることは、当業者には理解されるであろう。

【0114】

一部の実施形態では、ポリペプチドは、ヒトPD-1の少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20個の連続するアミノ酸を有する。一部の実施形態では、ポリペプチドは、ヒトPD-1の少なくとも25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、または270、280個の連続するアミノ酸を有する。一部の実施形態では、本明細書で提供されるのは、本明細書で提供される少なくとも2個のポリペプチドを有する組成物である。少なくとも2個のポリペプチドは、別々の分子であることもあり、または1個の分子として連結されていることもある。一部の実施形態では、組成物は、少なくとも3個のポリペプチド、少なくとも4個のポリペプチド、または少なくとも5個のポリペプチドを有する。一部の実施形態では、組成物は、2個のポリペプチド、3個のポリペプチド、4個のポリペプチド、または5個のポリペプチドを有する。

【0115】

一部の実施形態では、本明細書で提供されるポリペプチドは、非天然アミノ酸を含む。一部の実施形態では、非天然アミノ酸は、メチル化された主鎖を有するペプチドを産生するために - アミノ基がメチル化される。一部の実施形態では、非天然アミノ酸は、R-アミノ酸である。一部の実施形態では、非天然アミノ酸は、色素（例えば、蛍光色素）またはアフィニティタグを含むことができる。一部の実施形態では、本明細書で提供されるポリペプチドは、化学修飾を含む。化学修飾は、例えば、ビオチン、蛍光色素での化学修飾を含む。非天然アミノ酸をポリペプチドに導入する方法およびポリペプチドを化学的に修飾する方法が当技術分野において周知であることは、当業者には分かるであろう。

【0116】

一部の実施形態では、実施形態のポリペプチドは、免疫原性ポリペプチド（例えば、キーホールリンペットヘモシアニン、KLH）に融合またはコンジュゲートされている。ある特定の態様では、ポリペプチドは、CまたはN末端にCys残基をさらに含む。例えば、一部の態様では、ポリペプチドは、Cys残基においてジスルフィド結合により免疫原性ポリペプチドにコンジュゲートされている。

【0117】

またさらなる実施形態では、ヒトPD-1のN49、N58、N74またはN116位に対応する少なくとも1個のアミノ酸を含むヒトPD-1の少なくとも7個の連続するアミノ酸の断片を含むポリペプチドを有する免疫原性組成物であって、ヒトPD-1のN49、N58、N74またはN116位に対応する前記アミノ酸の少なくとも1個がグリコシ

10

20

30

40

50

ル化されており、ポリペプチドが、薬学的に許容される担体に配合されている、免疫原性組成物が本明細書で提供される。一部の態様では、免疫原性組成物は、アジュバント、例えば、ミョウバンまたはフロイントアジュバントをさらに含む。

#### 【0118】

一部の実施形態では、抗体を作製する方法であって、動物にポリペプチドを投与するステップおよび動物から抗体を単離するステップを含み、ポリペプチドが、ヒトPD-1のN49、N58、N74またはN116位に対応する少なくとも1個のアミノ酸を有するヒトPD-1の少なくとも7個の連続するアミノ酸の断片を有し、ヒトPD-1のN49、N58、N74またはN116位に対応する前記アミノ酸の少なくとも1個がグリコシル化されている、方法が、提供される。動物は、マウス、ラット、ウサギまたはヒトでありうる。ある特定の態様では、方法は、抗体のCDRを同定するステップ、およびCDRを包囲する配列をヒト化して、ヒト化抗体を産生するステップをさらに含む。なおさらなる実施形態では、方法は、ヒト化抗体を組換え発現させるステップを含む。したがって、さらなる実施形態では、上述の方法によって産生された、単離された抗体が提供される。したがって、一部の実施形態では、本明細書で提供されるのは、非グリコシル化PD-1と比較して実施形態のポリペプチド（例えば、ヒトPD-1のN49、N58、N74またはN116位に対応する少なくとも1個のアミノ酸を含むヒトPD-1の少なくとも7個の連続するアミノ酸の断片を含むポリペプチドであって、ヒトPD-1のN49、N58、N74またはN116位に対応する前記アミノ酸の少なくとも1個がグリコシル化されている、ポリペプチド）と選択的に結合する、単離された抗体である。

#### 【0119】

本明細書で提供されるポリペプチドは、当技術分野において公知の任意の方法によって調製することができる。例えば、ポリペプチドは、化学合成または組換え産生により調製することができる。組換えポリペプチドの例示的な発現および精製方法は、例えば、Scopes R. K., Protein Purification - Principles and Practice, Springer Advanced Texts in Chemistry, 3<sup>rd</sup> Edition (1994); Simpson R.J. et al., Basic Methods in Protein Purification and Analysis: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1<sup>st</sup> Edition (2008); Green M. R. and Sambrook J., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 4<sup>th</sup> Edition (2012); Jensen K. J. et al., Peptide Synthesis and Applications (Methods in Molecular Biology), Humana Press, 2<sup>nd</sup> Edition (2013)において見つけることができる。ポリペプチドの化学合成は、当技術分野において周知の方法論を使用することにより果たすことができる (Kelley and Winkler, 1990, In: Genetic Engineering Principles and Methods, Setlow J. K, ed., Plenum Press, N.Y., Vol. 12, pp 1-19; Stewart et al., 1984, J. M. Young, J. D., Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Co., Rockford, Ill; Marglin and Merrifield, Ann. Rev. Biochem, 39:841-866, at 862 (1970). Merrifield, R. B., 1963, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154; Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins, Williams et al., Eds., 1997, CRC Press, Boca Raton Fla.; Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, Atherton & Sheppard, Eds., 1989, IRL Press, Oxford, Englandを参照されたく、また米国特許第4,105,603号、同第3,972,859号、同第3,842,067号および同第3,862,925号明細書も参照されたい)。

#### 【0120】

修飾および誘導体

グリコシル化PD-1に対する抗体は、動物種、モノクローナル細胞株または他の抗体源を問わず、グリコシル化PD-1の効果を中和または相殺する能力を有することができる。ある特定の動物種は、治療用抗体の生成にあまり好ましくないこともある。なぜなら、それらは、抗体のFc部分による補体系の活性化に起因してアレルギー反応を引き起こす可能性がより高くなることがあるからである。しかし、全抗体を酵素的に消化して、Fc（補体結合）断片に、および結合ドメインまたはCDRを有する抗体断片にすることがで

きる。Fc部分の除去は、抗体断片が望ましくない免疫応答を惹起することになる尤度を低下させ、それ故、Fcのない抗体を予防的または治療的処置に使用することができる。上記の通り、抗体をキメラ抗体、部分的または完全ヒト抗体になるように構築して、他の種において産生されたまたは他の種からの配列を有する抗体を動物に投与した結果として生じる有害な免疫学的帰結を低減または排除することもできる。

#### 【0121】

所望の特性を示すバリエーションについてスクリーニングすることにより、抗glycPD-1抗体の結合特性をさらに改善することができる。例えば、そのような改善は、当技術分野において公知のファージディスプレイ方法を使用して行うことができる。ファージディスプレイ方法では、機能性抗体ドメインが、それらをコードするポリヌクレオチド配列を担持するファージ粒子の表面に提示される。特定の実施形態では、そのようなファージを用いて、レパートリーまたはコンビナトリアル抗体ライブラリー（例えば、ヒトまたはマウス）から発現される抗原結合断片、例えば、FabおよびFvまたはジスルフィド結合により安定化されたFvを提示することができる。目的の抗原に結合する抗原結合断片を発現するファージは、抗原を用いて、例えば、標識された抗原、または固体表面もしくはビーズに結合もしくは捕捉された抗原を使用して、選択または同定することができる。これらの方法に使用されるファージは、典型的に、fdおよびM13をはじめとする繊維状ファージである。抗原結合断片は、ファージ遺伝子IIITタンパク質またはファージ遺伝子VIIITタンパク質のどちらかとの組換え融合タンパク質として発現される。本明細書に記載の抗体またはポリペプチドを作製するために使用することができるファージディスプレイ方法の例としては、Brinkman et al., J Immunol Methods, 182:41-50 (1995); Ames et al., J. Immunol. Methods, 184:177-186 (1995); Kettleborough et al., Eur. J. Immunol., 24:952-958(1994); Persic et al., Gene, 187:9-18 (1997); Burton et al., Adv. Immunol. 57:191-280 (1994); PCT公開公報国際公開第92/001047号、同第90/02809号、同第91/10737号、同第92/01047号、同第92/18619号、同第93/11236号、同第95/15982号、同第95/20401号パンフレット；ならびに米国特許第5,698,426号、同第5,223,409号、同第5,403,484号、同第5,580,717号、同第5,427,908号、同第5,750,753号、同第5,821,047号、同第5,571,698号、同第5,427,908号、同第5,516,637号、同第5,780,225号、同第5,658,727号、同第5,733,743号および同第5,969,108号明細書において開示されているものが挙げられ、これらの参考文献のすべては、それら全体が参照により本明細書に組み込まれている。

#### 【0122】

上記参考文献に記載されているように、ファージ選択後、ファージから抗体コード領域を単離し、例えば下段にて詳細に説明されるように、それらを使用して、全抗体（ヒト化抗体を含む）または任意の他の所望の断片を生成すること、および哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母および細菌をはじめとする任意の所望の宿主において発現させることができる。例えば、Fab、Fab'およびF(ab')<sub>2</sub>断片を組換えで産生する技術も、PCT公開公報国際公開第92/22324号パンフレット；Mullinax, R. L. et al., BioTechniques, 12(6):864-869 (1992)；およびSawai et al., Am. J. Reprod. Immunol. 34:26-34 (1995)；およびBetter, M. et al. Science 240:1041-1043(1988)に記載されているものなどの、当技術分野において公知の方法を使用して用いることができ、参考文献のすべては、それら全体が参照により本明細書に組み込まれている。一本鎖Fvおよび抗体を産生するために使用することができる技術の例としては、米国特許第4,946,778号および同第5,258,498号明細書；Huston, J. S. et al., Methods in Enzymology 203:46-88(1991)；Shu, L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 90:7995-7999；ならびにSkerra, A. et al., Science 240:1038-1040 (1988)に記載されているものなどが挙げられ、参考文献のすべては、それら全体が参照により本明細書に組み込まれている。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 2 3 】

ファージディスプレイ技術を使用して、本明細書に記載の抗 g l y c P D - 1 抗体の親和性を増加させることができる。この技術は、本明細書に記載のコンビナトリアル方法に使用することができるだろう高親和性抗体を得るのに使用することができる。親和性成熟と呼ばれるこの技術は、そのような受容体もしくはリガンド（もしくはそれらの細胞外ドメイン）またはそれらの抗原結合断片を使用して変異誘発または C D R ウォーキングおよび再選択を用いて、最初の抗体または親抗体と比較したときにより高い親和性で抗原と結合する抗体を同定する（例えば、Glaser, S. M. et al., J. Immunol. 149:3903-3913(1992)を参照されたい）。単一ヌクレオチドではなくコドン全体の変異誘発は、アミノ酸変異のセミランダム化レパートリーをもたらす。バリエーションクロンのプールからなるライブラリーであって、クロンの各々が、単一 C D R の単一アミノ酸変化の点で異なり、各 C D R 残基について可能な各アミノ酸置換を示すバリエーションを含有する、ライブラリーを構築することができる。抗原に対する結合親和性が増した変異体を、固定化された変異体を標識された抗原と接触させることによりスクリーニングすることができる。当技術分野において公知の任意のスクリーニング方法を使用して、抗原に対する親和力が増した変異抗体を同定することができる（例えば、E L I S A）（例えば、Wu, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci.(USA) 95(11):6037-6042(1998); Yelton, D. E. et al., J. Immunol. 155:1994-2004 (1995)を参照されたい）。軽鎖をランダム化する C D R ウォーキングを使用することもできる。（Schier et al., J. Mol. Biol. 263:551-567(1996)を参照されたい）。

10

20

## 【 0 1 2 4 】

ランダム変異誘発をファージディスプレイ方法と協調して使用して、改善された C D R および/または可変領域を同定することができる。あるいは、ファージディスプレイ技術を使用して、定方向変異誘発（例えば、親和性成熟または「C D R ウォーキング」）により C D R 親和性を増加させる（または減少させる）ことができる。この技術は、標的抗原またはその抗原性断片を使用して、最初の抗体または親抗体と比較したときにより高い（またはより低い）親和性で抗原と結合する C D R を有する抗体を同定する（例えば、Glaser, S. M. et al., J. Immunol. 149:3903-3913(1992)を参照されたい）。

## 【 0 1 2 5 】

そのような親和性成熟を果たす方法は、例えば、Krause, J. C. et al., MBio.2(1) pii: e00345-10. doi: 10.1128/mBio. 00345-10(2011); Kuan, C. T. et al., Int. J. Cancer 10.1002/ijc.25645; Hackel, B. J. et al., J. Mol. Biol. 401(1):84-96(2010); Montgomery, D. L. et al., MAbs 1(5):462-474(2009); Gustchina, E. et al., Virology 393(1):112-119 (2009); Finlay, W. J. et al., J. Mol. Biol. 388(3):541-558 (2009); Bostrom, J. et al., Methods Mol. Biol. 525:353-376 (2009); Steidl, S. et al., Mol. Immunol. 46(1):135-144 (2008); および Barderas, R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 105(26):9029-9034 (2008)に記載されており、参考文献のすべては、それら全体が参照により本明細書に組み込まれている。

30

## 【 0 1 2 6 】

本明細書で提供されるのは、「親」（または野生型）分子と比較して1、2、3、4、5つ以上のアミノ酸置換、付加、欠失または修飾を有する、抗 g l y c P D - 1 抗体またはグリコシル化 P D - 1 ポリペプチドの誘導体でもある。そのようなアミノ酸置換または付加は、天然起源の（すなわち、DNAによりコードされている）アミノ酸残基または非天然起源のアミノ酸残基を導入することができる。そのようなアミノ酸を、グリコシル化すること（例えば、そのようなアミノ酸は、変化したマンノース、2 - N - アセチルグルコサミン、ガラクトース、フコース、グルコース、シアル酸、5 - N - アセチルノイラミン酸、5 - グリコールノイラミン酸などの含有量を有すること）、アセチル化すること、P E G 化すること、リン酸化すること、アミド化すること、公知の保護/ブロッキング基、タンパク質分解性切断により誘導体化すること、細胞リガンドまたは他のタンパク質に連結させることなどができる。一部の実施形態では、炭水化物修飾変化により、次のうちの

40

50

1つまたは複数が調節される：抗体の可溶化、抗体の細胞内輸送および分泌の助長、抗体構築の促進、立体構造の完全性、ならびに抗体媒介エフェクター機能。一部の実施形態では、炭水化物修飾変化により、炭水化物修飾を欠く抗体と比較して抗体媒介エフェクター機能が增強される。抗体媒介エフェクター機能を変化させることになる炭水化物修飾は、当技術分野において周知である（例えば、Shields, R. L. et al., J. Biol. Chem. 277(30): 26733-26740 (2002) ; Davies J. et al. Biotechnology & Bioengineering 74 (4): 288-294(2001)を参照されたく、参照文献のすべては、それら全体が参照により本明細書に組み込まれている）。炭水化物含有量を変化させる方法は、当業者に公知であり、例えば、Wallick, S. C. et al., J. Exp. Med.168(3): 1099-1109(1988) ; Tao, M. H. et al., J. Immunol. 143(8): 2595-2601 (1989) ; Routledge, E. G. et al., Transplantation 60(8):847-53 (1995) ; Elliott, S. et al., Nature Biotechnol. 21:414-21(2003) ; Shields, R. L. et al., J. Biol. Chem. 277(30): 26733-26740(2002)を参照されたく、参照文献のすべては、それら全体が参照により本明細書に組み込まれている。

10

#### 【0127】

置換バリエーションは、あるアミノ酸の別のアミノ酸との交換を、本明細書で提供される抗体またはポリペプチド内の1つまたは複数の部位に含むことができ、抗体またはポリペプチドの1つまたは複数の特性を、他の機能または特性の喪失のあるまたはない状態で調節するように置換バリエーションを設計することができる。置換は、保存的であってもよく、すなわち、あるアミノ酸を同様の形状および電荷の別のアミノ酸で置き換える。保存的置換は、当技術分野において周知であり、例えば、アラニンのセリンへの、アルギニンのリジンへの、アスパラギンのグルタミンまたはヒスチジンへの、アスパルテートのグルタミンへの、システインのセリンへの、グルタミンのアスパラギンへの、グルタメートのアスパルテートへの、グリシンのプロリンへの、ヒスチジンのアスパラギンまたはグルタミンへの、イソロイシンのロイシンまたはバリンへの、ロイシンのバリンまたはイソロイシンへの、リジンのアルギニンへの、メチオニンのロイシンまたはイソロイシンへの、フェニルアラニンのチロシン、ロイシンまたはメチオニンへの、セリンのトレオニンへの、トレオニンのセリンへの、トリプトファンのチロシンへの、チロシンのトリプトファンまたはフェニルアラニンへの、およびバリンのイソロイシンまたはロイシンへの変化を含む。あるいは、置換は、非保存的であってもよく、したがって、ポリペプチドの機能または活性に影響を与える。非保存的变化は、残基の化学的に類似していないものの置換、例えば、極性または荷電アミノ酸での非極性または非荷電アミノ酸での置換、また逆に非極性または非荷電アミノ酸の極性または荷電アミノ酸での置換を、典型的に含む。

20

30

#### 【0128】

一部の実施形態では、ヒト化抗体は、誘導体抗体である。そのようなヒト化抗体は、1つまたは複数の非ヒトCDRにアミノ酸残基置換、欠失または付加を含む。ヒト化抗体誘導体は、非誘導体ヒト化抗体と比較したとき、実質的に同じ結合を有することもあり、より良好な結合を有することもあり、またはより不良な結合を有することもある。一部の実施形態では、CDRの1、2、3、4または5個のアミノ酸残基は、変異、例えば、置換、欠失または付加されている。

40

#### 【0129】

一部の実施形態では、ポリペプチドは、誘導体ポリペプチドである。そのようなポリペプチドは、野生型ヒトPD-1と比較してアミノ酸残基置換、欠失または付加を含む。誘導体ポリペプチドは、非誘導体ポリペプチドと比較して抗glycPD-1抗体との実質的に同じ結合を有することもあり、より良好な結合を有することもあり、またはより不良な結合を有することもある。一部の実施形態では、ヒトPD-1の1、2、3、4または5個のアミノ酸残基は、変異、例えば、置換、欠失または付加されている。

#### 【0130】

本明細書に記載の抗体またはポリペプチドは、当業者に公知の技術を使用して化学修飾により修飾することができ、そのような技術としては、特異的な化学的切断、アセチル化、

50

製剤化、ツニカマイシンの代謝合成などが挙げられるが、これらに限定されない。一実施形態では、誘導体ポリペプチドまたは誘導体抗体は、親ポリペプチドまたは抗体と同様または同一の機能を有する。別の実施形態では、誘導体ポリペプチドまたは誘導体抗体は、親ポリペプチドまたは親抗体と比較して活性変化を示す。例えば、誘導体抗体（またはその断片）は、親抗体より強くそのエピトープと結合することができ、または親抗体より耐タンパク質分解性が大きいこともある。

#### 【0131】

誘導体抗体における置換、付加または欠失は、該抗体のFc領域におけるものであることがあり、その結果、1つまたは複数のFc Rに対する該抗体の結合親和性を修飾するのに役立つことがある。1つまたは複数のFc Rとの結合修飾を伴う抗体の修飾方法は、当技術分野において公知であり、例えば、PCT公開番号国際公開第04/029207号、同第04/029092号、同第04/028564号、同第99/58572号、同第99/51642号、同第98/23289号、同第89/07142号、同第88/07089号、パンフレット、ならびに米国特許第5,843,597号および同第5,642,821号を参照されたく、これらの参照文献のすべては、それら全体が参照により本明細書に組み込まれている。一部の実施形態では、抗体または他の分子は、活性化Fc R、例えば、Fc RIIIAに対する親和性の変化を示すことができる。好ましくは、そのような修飾は、Fc媒介エフェクター機能の変化も有する。Fc媒介エフェクター機能を変化させる修飾は当技術分野において公知である（例えば、米国特許第6,194,551号明細書および国際公開第00/42072号パンフレットを参照されたい）。一部の実施形態では、Fc領域の修飾は、抗体媒介エフェクター機能の変化、他のFc受容体（例えば、Fc活性化受容体）との結合の変化、抗体依存性細胞介在性細胞傷害（ADCC）活性の変化、C1q結合活性の変化、補体依存性細胞傷害活性（CDC）の変化、食細胞活性、またはこれらの任意の組み合わせを有する抗体をもたらす。

#### 【0132】

誘導体抗体またはポリペプチドは、哺乳動物、好ましくは、ヒトにおける親分子または親抗体の半減期（例えば、血清半減期）の変化を有することもできる。一部の実施形態では、そのような変化は、15日より長い、好ましくは、20日より長い、25日より長い、30日より長い、35日より長い、40日より長い、45日より長い、2カ月より長い、3カ月より長い、4カ月より長い、または5カ月より長い半減期をもたらす。哺乳動物、好ましくは、ヒトにおけるヒト化抗体またはポリペプチドの半減期増加は、哺乳動物における同抗体またはポリペプチドのより高い血清力価をもたらす、したがって、前記抗体もしくはポリペプチドの投与頻度を低減させ、および/または投与される前記抗体もしくはポリペプチドの濃度を低下させる。in vivo半減期が増加した抗体またはポリペプチドは、当業者に公知の技術によって生成することができる。例えば、in vivo半減期が増加した抗体またはポリペプチドは、FcドメインとFcRn受容体間の相互作用に関与すると同定されたアミノ酸残基を修飾する（例えば、置換する、欠失させる、または付加させる）ことにより生成することができる。本明細書に記載のヒト化抗体を、生物学的半減期を増加させるように操作することができる（例えば、米国特許第6,277,375号明細書を参照されたい）。例えば、本明細書に記載のヒト化抗体のFcヒンジドメインを、in vivoまたは血清半減期増加を有するように操作することができる。

#### 【0133】

in vivo半減期が増加された本明細書に記載の抗体またはポリペプチドは、前記抗体またはポリペプチドポリマー分子、例えば高分子量ポリエチレングリコール（PEG）への結合により生成することができる。PEGを抗体またはポリペプチドに、多官能性リンカーを用いて、または用いずに、前記分子もしくは抗体のN末端もしくはC末端へのPEGの部位特異的コンジュゲーションによって、またはリジン残基上に存在するイプシロンアミノ基を介して、結合させることができる。生物学的活性の損失をほとんどもたらない直鎖状または分岐ポリマー誘導体化を使用することができる。コンジュゲーションの程度をSDS-PAGEおよび質量分析によって厳密にモニターして、PEG分子と抗体

10

20

30

40

50

の適切なコンジュゲーションを保証することができる。未反応 P E G は、例えばサイズ排除またはイオン交換クロマトグラフィーによって、抗体 - P E G コンジュゲートから分離することができる。

#### 【 0 1 3 4 】

本明細書に記載の抗体またはポリペプチドを D a v i s らによって記載された方法およびカップリング剤（例えば、米国特許第 4 , 1 7 9 , 3 3 7 号明細書を参照されたい）によって修飾して、実質的に免疫原性応答なしに哺乳動物循環系に注射することができる組成物を得ることもできる。F c 部分の除去は、抗体断片が望ましくない免疫応答を惹起することになる尤度を低下させることができ、それ故、F c のない抗体を予防的または治療的処置に使用することができる。上記の通り、抗体をキメラ抗体、部分的または完全ヒト抗体になるように構築して、他の種において産生されたまたは他の種からの配列を有する抗体を動物に投与した結果として生じる有害な免疫学的帰結を低減または排除することもできる。

10

#### 【 0 1 3 5 】

融合体およびコンジュゲート

本明細書で提供される抗 g l y c P D - 1 抗体またはグリコシル化 P D - 1 ポリペプチドを、他のタンパク質との融合タンパク質として発現させることもでき、または別の部分に化学的にコンジュゲートすることもできる。

#### 【 0 1 3 6 】

一部の実施形態では、本明細書で提供されるのは、F c 部分を有する抗体またはポリペプチドであって、F c 部分が、アイソタイプもしくはサブクラスによって様々でありえ、キメラもしくはハイブリッドであってもよく、ならびに / または例えば、エフェクター機能、半減期の制御、組織到達性を向上させるように、安定性などの生物物理学的特性を増大させるように、および産生効率を向上させる（およびより安価にする）ように、修飾することができる、抗体またはポリペプチドである。開示される融合タンパク質の構築に有用な多くの修飾およびそれらを行う方法は当技術分野において公知であり、例えば、Mueller, J. P. et al., Mol. Immun. 34(6):441-452 (1997)、Swann, P. G., Curr. Opin. Immun. 20:493-499 (2008)、および Presta, L. G., Curr. Opin. Immun. 20:460-470 (2008) を参照されたい。一部の実施形態では、F c 領域は、天然 I g G 1、I g G 2 または I g G 4 F c 領域である。一部の実施形態では、F c 領域は、ハイブリッドであり、例えば、I g G 2 / I g G 4 F c 定常領域を有するキメラ F c 領域である。F c 領域の修飾体は、F c ガンマ受容体および補体への結合を防止するように修飾された I g G 4、1 つまたは複数の F c ガンマ受容体への結合を改善するように修飾された I g G 1、エフェクター機能（アミノ酸変化）を最小にするように修飾された I g G 1、グリカンが（典型的には発現宿主を変えることにより）変化した / ない I g G 1、および F c R n への pH 依存性結合が変化した I g G 1 を含むが、これらに限定されない。F c 領域は、ヒンジ領域全体を含むこともあり、またはヒンジ領域全体未満を含むこともある。

20

30

#### 【 0 1 3 7 】

別の実施形態は、I g G 2 ~ 4 ハイブリッドおよび I g G 4 変異体であって、それらの半減期を増加させる F c R への結合が低減されたハイブリッドおよび変異体を含む。代表的な I G 2 ~ 4 ハイブリッドおよび I g G 4 変異体は、Angal et al., Molec. Immunol. 30(1):105-108 (1993) ; Mueller et al., Mol. Immun. 34(6):441-452 (1997) ; および米国特許第 6 , 9 8 2 , 3 2 3 号明細書に記載されており、これらの参考文献は、それら全体が参照により本明細書に組み込まれている。一部の実施形態では、I g G 1 および / または I g G 2 ドメインが欠失されており、例えば、A n g a l らは、セリン 2 4 1 がプロリンで置換された I g G 1 および I g G 2 を記載している。

40

#### 【 0 1 3 8 】

一部の実施形態では、本明細書で提供されるのは、少なくとも 1 0、少なくとも 2 0、少なくとも 3 0、少なくとも 4 0、少なくとも 5 0、少なくとも 6 0、少なくとも 7 0、少なくとも 8 0、少なくとも 9 0 または少なくとも 1 0 0 個のアミノ酸を有する融合タンパ

50



ク質またはポリペプチドである。

【0139】

一部の実施形態では、本明細書で提供されるのは、連結している、または共有結合している、または少なくとも1つの部分との複合体になっている、抗g l y c P D - 1抗体またはグリコシル化P D - 1ポリペプチドである。そのような部分は、これらに限定されないが、診断または治療剤としての分子の効力を増加させるものでありうる。一部の実施形態では、部分は、イメージ剤、毒素、治療用酵素、抗生物質、放射標識ヌクレオチドなどでありうる。

【0140】

一部の実施形態では、部分は、酵素、ホルモン、細胞表面受容体、毒素（例えば、アブリン、リシンA、緑膿菌外毒素（すなわち、P E - 40）、ジフテリア毒素、リシン、ゲロニン、もしくはヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質）、タンパク質（例えば、腫瘍壊死因子、インターフェロン（例えば、インターフェロン、インターフェロン）、神経成長因子、血小板由来増殖因子、組織プラスミノゲンアクチベーター、もしくはアポトーシス剤（例えば、腫瘍壊死因子、腫瘍壊死因子））、生物学的応答修飾物質（例えば、リンホカイン（例えば、インターロイキン1'「I L - 1」）、インターロイキン2（「I L - 2」）、インターロイキン6（「I L - 6」）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（「G M - C S F」）、顆粒球コロニー刺激因子（「G - C S F」）、もしくはマクロファージコロニー刺激因子（「M - C S F」））、もしくは成長因子（例えば、成長ホルモン（「G H」））など）、細胞毒（例えば、細胞傷害性薬剤もしくは細胞破壊剤、例えば、パクリタキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、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、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、モノメチルオーリスタチンF（M M A F）、モノメチルオーリスタチンE（M M A E、例えばベドチン）およびピューロマイシンならびにそれらの類似体もしくは同族体）、代謝拮抗薬（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、ダカルバジン）、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオテパ、クロラムブシル、メルファラン、B i C N U（登録商標）（カルムスチン；B S N U）およびロムスチン（C C N U）、シクロホスファミド、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾシン、マイトマイシンC、および037薬剤（例えば、ダウノルビシン（旧名ダウノマイシン）およびドキソルビシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（旧名アクチノマイシン）、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（A M C））、または抗有糸分裂剤（例えば、ピンクリスチンおよびビンブラスチン）でありうる。

【0141】

そのような治療用部分を抗体にコンジュゲートする技術は周知である。例えば、Amon et al., " Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy ", in MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Reisfeld et al.(eds.), 1985, pp. 243-56, Alan R. Liss, Inc.); Hellstrom et al., " Antibodies For Drug Delivery ", in CONTROLLED DRUG DELIVERY (2nd Ed.), Robinson et al.(eds.), 1987, pp. 623-53, Marcel Dekker, Inc.); Thorpe, " Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review ", in MONOCLONAL ANTIBODIES '84: BIOLOGICAL AND CLINICAL APPLICATIONS, Pinchera et al.(eds.), 1985, pp. 475-506); " Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy ", in MONOCLONAL ANTIBODIES FOR CANCER DETECTION AND THERAPY, Baldwin et al.(eds.), 1985, pp. 303-16, Academic Press; Thorpe et al., Immunol. Rev. 62:119-158 (1982); Carter et al., Cancer J. 14(3):154-169 (2008); Alley et al., Curr. Opin. Chem. Biol. 1

10

20

30

40

50

4(4):529-537 (2010); Carter et al., Amer. Assoc. Cancer Res. Educ. Book. 2005(1):147-154 (2005); Carter et al., Cancer J. 14(3):154-169(2008); Chari, Acc. Chem Res. 41(1):98-107 (2008); Doronina et al., Nat. Biotechnol. 21(7):778-784(2003); Ducry et al., Bioconjug Chem.21(1):5-13(2010); Senter, Curr. Opin. Chem. Biol. 13(3):235-244 (2009); およびTeicher, Curr Cancer Drug Targets. 9(8):982-1004 (2009)を参照されたい。オーリスタチンE)(MMAE)、例えばベドチン;またはそれらの組み合わせ。

#### 【0142】

好ましい実施形態では、抗体は、エチオピアの低木メイテヌス・オバツス(Maytenus ovatus)の樹皮から最初に単離されたベンゾアンサマクロライドであるメイタンシンにコン  
 ジュゲートされている。この細胞傷害性薬剤およびその誘導体(例えば、メイタンシノイド)は、ピンカルカロイド部位付近のチューブリンと結合する。それらは、微小管の末端に位置するチューブリンに対して高い親和性を有し、微小管全体にわたって分布している部位に対してより低い親和性を有すると考えられている。微小管動態の抑制は、細胞を細胞周期のG2/M期で停止させ、最終的にはアポトーシスにより細胞死をもたらす。(Oroudjev et al., Mol. Cancer Ther., 10L2700-2713 (2010))。2つのメイタンシン誘導体(チオール含有メイタンシノイド)として、不可逆的リンカーおよび可逆的リンカーと組み合わせで広範に使用されているDM1およびDM4(ImmunoGen, Inc., Waltherham, MA)が挙げられる。詳細には、チオエーテルリンカーで抗体に結合されたDM1は、「エムタンシン」と呼ばれ、SPPLリンカーで抗体に結合されたDM1は、「メルタンシン」と呼ばれる。SPDBリンカーで結合されたDM4は、「ラブタンシン」と呼ばれ、sSPDBリンカーで結合されたDM4は、「ソラブタンシン」と呼ばれる。(ImmunoGen, Inc., Waltherham, MA)。ある実施形態では、抗glycPD-1抗体-ADCは、チューブリン作用メイタンシノイドペイロードDM1を含む。ある実施形態では、抗glycPD-1抗体-ADCは、チューブリン作用メイタンシノイドペイロードDM4を含む。ある実施形態では、抗glycPD-1抗体-ADCは、DNA作用ペイロード、例えば、DGN462(ImmunoGen, Inc., Waltherham, MA)を含む。ある実施形態では、抗glycPD-1抗体-ADCの抗glycPD-1抗体成分は、STM418のキメラもしくはヒト化形態、またはその結合部分である。ある実施形態では、抗glycPD-1抗体-ADCの抗glycPD-1抗体成分は、STM432のキメラもしくはヒト化形態、またはその結合部分である。

#### 【0143】

特定の実施形態では、抗glycPD-1抗体にコンジュゲートされる細胞傷害性薬剤は、MMAE(モノメチルオーリスタチンE(またはデスメチル-オーリスタチンE))であり、該MMAEは、その抗有糸分裂活性が、チューブリンの重合を阻止することにより細胞分裂を阻害することを含む、高毒性の抗腫瘍剤である。国際一般名ベドチンは、MMAE-抗体コンジュゲートにおける抗体へのその結合構造を加えたMMAEを意味する。より特定の実施形態では、ADCは、STM418(キメラもしくはヒト化形態)-MMAE、またはSTM432(キメラもしくはヒト化形態)-MMAEである。

#### 【0144】

いくつかの化学的リンカーが公知であり、細胞傷害性薬物またはDNA作用薬ペイロードを抗体にコンジュゲートしてADCを産生するために使用される。抗glycPD-1抗体、特に、本明細書に記載されているようなそれらの標的に結合後にそれらの標的を内在化する抗glycPD-1抗体を含むADCを産生するための単独でのまたは組み合わせでの使用に採用される、ある特定のリンカーとしては、SMCC(4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキササンカルボン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル);SPDB(3-(2-ピリジルジチオ)酪酸N-スクシンイミジル);SPP(4-(2-ピリジルジチオ)ペンタン酸N-スクシンイミジル);スルホ-SPDBまたはsSPDB(4-(2-(ピリジルチオ)-2-スルホブタン酸N-スクシンイミジル);チオエーテル

リンカー 4 - ( N - マレイミドメチル ) シクロヘキサン - 1 - カルボン酸スクシンイミジル ( M C C ) ; および v c ( バリン - シトルリンジペプチドリナー ) が挙げられる。例として、操作リンカー ( 例えば、S M C C、S P D B、S - S P D B )、( I m m u n o g e n , I n c . ) は、A D C の腫瘍への結合前には安定しているように、そしてその後、A D C ががん細胞に内在化された時点でペイロードの効力を最適化するように、設計されている。カテプリン切断性リンカーである、ジペプチド v c リンカーなどの他のリンカーを使用して、ドラスタチン 10 に由来する有糸分裂阻害剤であるオーリスタチン、例えば、モノメチルオーリスタチン E ( M M A E )、例えばベドチンなどの、細胞傷害性薬剤に、抗体をコンジュゲートしてもよい。細胞毒を抗体に、1 個より多くの毒素分子が各抗体分子に結合されるように、例えば 1 抗体当たり平均で 2、3、4、5、6、7 または 8 個の毒素分子が存在するように、コンジュゲートしてもよい。

10

#### 【 0 1 4 5 】

特定の実施形態では、M M A E は、バリン - シトルリン - p - アミノベンジルオキシカルボニル - M M A E に結合されているマレイミドカプロイル ( M C ) 結合基 ( M c - v c - P A B - M M A E ) によって、抗体システインに間接的に連結される。「M C - v c - P A B - M M A E」直鎖状構造では、「M C」は、マレイミドおよびカプロン酸からなり、抗体に通常は H 鎖上のシステイン基を介して結合する部分である。順番に、「M C」は、「v c」リンカーに結合しており、この「v c」リンカーは、バリン ( V a l ) およびシトルリン ( C i t ) からなり、腫瘍またはがん細胞内部のカテプシンにより切断されるカテプリン切断性リンカーである。「v c」は、スペーサー「P A B」、すなわち、パラアミノ安息香酸に結合しており、その P A B に M M A E 細胞毒が連結されている。M C - v c - P A B - M M A C A D C は、カテプシン B などのプロテアーゼにより切断されると膜透過性の遊離 M M A E を放出する。ある実施形態では、抗体へのリンカーは、細胞外液中では安定しているが、A D C が腫瘍またはがん細胞に入り、かくて M M A E または他の毒薬の抗有糸分裂メカニズムを活性化した時点で、カテプシンにより切断される。別の実施形態では、モノメチルオーリスタチン F、( M M A F ) は、マレイミドカプロイル ( M C - M M A F ) により抗体システインに連結される。M C - v c - P A B - M M A E A D C とは対照的に、M C - M M A F A D C は、M C C - D M 1 A D C と同様に切断不能であり、細胞に内在化され、細胞内で分解されて、細胞内で活性薬物としてのシステイン - M C - M M A F を放出しなければならない。

20

30

#### 【 0 1 4 6 】

ある実施形態では、細胞傷害性ペイロードは、細胞への A D C の内在化後にリソソーム内に放出される。リソソーム内で、リソソーム酵素が、A D C の抗体成分を消化する。リソソーム分解後、薬物 ( および薬物 - リンカー ) ペイロードは、細胞質に放出され、そこで薬物は細胞内の標的に結合し、最終的には細胞死を引き起こす。最適には、放出されるペイロードは、十分に活性であり、リンカーがまだ付いている。A D C に結合された標的がリソソームへの輸送不良をもたらす他の実施形態では、標的細胞の外部では安定しているが、細胞の内部に入ると抗体成分からペイロードを切断するリンカーが、細胞内で、しかしリソソームの外部でペイロードを放出するための代替法になる。他の実施形態では、リンカーは、細胞外液中では安定しているが、A D C が腫瘍またはがん細胞に入り、かくて毒薬の抗有糸分裂または他の細胞傷害メカニズムを活性化した時点で、カテプシンにより切断される。他の実施形態では、切断性リンカーの作用により放出されたペイロードは、隣接がん細胞に入り、バースタンダー効果によりそれらを殺滅し、かくて A D C の標的化および腫瘍殺滅活性を増大させることができる。

40

#### 【 0 1 4 7 】

一部の実施形態では、本明細書に記載の抗体およびポリペプチドを、精製を助長するためにペプチドなどのマーカーにコンジュゲートすることができる。一部の実施形態では、マーカーは、ヘキサヒスチジンペプチド ( 配列番号 4 2 )、インフルエンザヘマグルチニンタンパク質に由来するエピトープに対応するヘマグルチニン「H A」タグ ( Wilson, I. A. et al., Cell, 37:767-778 (1984))、または「f l a g」タグ ( Knappik, A. et al., B

50

biotechniques 17(4):754-761 (1994)) である。

#### 【 0 1 4 8 】

一部の実施形態では、部分は、アッセイで検出することができるイメージ剤でありうる。そのようなイメージ剤は、酵素、補欠分子族、放射標識、非放射性常磁性金属イオン、ハプテン、蛍光標識、リン光分子、化学発光分子、クロモフォア、発光分子、生物発光分子、光親和性分子、着色粒子またはリガンド、例えばビオチンでありうる。

#### 【 0 1 4 9 】

一部の実施形態では、酵素には、これらに限定されないが、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが含まれ；補欠分子族複合体には、これらに限定されないが、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが含まれ；蛍光物質には、これらに限定されないが、ウンベリフェロン、フルオレセイン、イソチオシアン酸フルオレセイン、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、ダンシルクロリドまたはフィコエリトリンが含まれ；発光物質は、例えば、これに限定されないが、ルミノールであり；生物発光物質には、これらに限定されないが、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンが含まれ；放射性物質には、これらに限定されないが、ビスマス ( $^{213}\text{Bi}$ )、炭素 ( $^{14}\text{C}$ )、クロム ( $^{51}\text{Cr}$ )、コバルト ( $^{57}\text{Co}$ )、フッ素 ( $^{18}\text{F}$ )、ガドリニウム ( $^{153}\text{Gd}$ 、 $^{159}\text{Gd}$ )、ガリウム ( $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ )、ゲルマニウム ( $^{68}\text{Ge}$ )、ホルミウム ( $^{166}\text{Ho}$ )、インジウム ( $^{115}\text{In}$ 、 $^{113}\text{In}$ 、 $^{112}\text{In}$ 、 $^{111}\text{In}$ )、ヨウ素 ( $^{131}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{121}\text{I}$ )、ランタン ( $^{140}\text{La}$ )、ルテニウム ( $^{177}\text{Lu}$ )、マンガン ( $^{54}\text{Mn}$ )、モリブデン ( $^{99}\text{Mo}$ )、パラジウム ( $^{103}\text{Pd}$ )、リン ( $^{32}\text{P}$ )、プラセオジウム ( $^{142}\text{Pr}$ )、プロメチウム ( $^{149}\text{Pm}$ )、レニウム ( $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ )、ロジウム ( $^{105}\text{Rh}$ )、ルテニウム ( $^{97}\text{Ru}$ )、サマリウム ( $^{153}\text{Sm}$ )、スカンジウム ( $^{47}\text{Sc}$ )、セレン ( $^{75}\text{Se}$ )、ストロンチウム ( $^{85}\text{Sr}$ )、硫黄 ( $^{35}\text{S}$ )、テクネチウム ( $^{99}\text{Tc}$ )、タリウム ( $^{201}\text{Tl}$ )、スズ ( $^{113}\text{Sn}$ 、 $^{117}\text{Sn}$ )、トリチウム ( $^3\text{H}$ )、キセノン ( $^{133}\text{Xe}$ )、イッテルビウム ( $^{169}\text{Yb}$ 、 $^{175}\text{Yb}$ )、イットリウム ( $^{90}\text{Y}$ )、亜鉛 ( $^{65}\text{Zn}$ )；様々なポジトロン放出断層撮影を使用するポジトロン放出物質、および常磁性金属イオンが含まれる。

#### 【 0 1 5 0 】

当技術分野において公知の技術を使用して、イメージ剤を本明細書で提供される抗体またはポリペプチドに直接、または介在物（例えば、当技術分野において公知のリンカーなど）によって間接的に、コンジュゲートすることができる。例えば、診断剤として使用するために本明細書に記載の抗体および他の分子にコンジュゲートすることができる金属イオンについては米国特許第 4,741,900 号明細書を参照されたい。一部のコンジュゲーション方法は、例えば、抗体に結合されたジエチレントリアミン四酢酸無水物 (DTPA)、エチレントリアミン四酢酸、N-クロロ-p-トルエンスルホンアミドおよび/またはテトラクロロ-3-6-ジフェニルグリコウリル-3などの有機キレート剤を用いる、金属キレート錯体の使用を含む。モノクローナル抗体をグルタルアルデヒドまたは過ヨウ素酸塩などのカップリング剤の存在下で酵素と反応させることもできる。フルオレセインマーカーを有するコンジュゲートは、これらのカップリング剤の存在下で、またはイソチオシアン塩との反応により、調製することができる。

#### 【 0 1 5 1 】

一部の実施形態では、本明細書に記載の抗体またはポリペプチドは、Segalにより米国特許第 4,676,980 号明細書に記載されたように二次抗体にコンジュゲートして抗体ヘテロコンジュゲートを形成することができる。そのようなヘテロコンジュゲート抗体を、さらにハプテン（例えば、フルオレセイン）に、または細胞マーカー（例えば、4-1-BB、B7-H4、CD4、CD8、CD14、CD25、CD27、CD40、CD68、CD163、CTLA4、GITR、LAG-3、OX40、TIM3、TIM4、TLR2、LIGHT、ICOS、B7-H3、B7-H7、B7-H7CR、C

10

20

30

40

50

D70、CD47)に、またはサイトカイン(例えば、IL-7、IL-15、IL-12、IL-4、TGF- $\beta$ 、IL-10、IL-17、IFN、Flt3、Bly)に、またはケモカイン(例えば、CCL21)に結合させることができる。

#### 【0152】

一部の実施形態では、本明細書に記載の抗glycPD-1抗体またはグリコシル化PD-1ポリペプチドを固体支持体に結合させることもでき、これは、標的抗原のイムノアッセイもしくは精製に、または支持体に固定化された標的抗原に本明細書に記載の抗体または抗原結合断片への結合によって結合することができる他の分子のイムノアッセイもしくは精製に、有用でありうる。そのような固体支持体としては、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニルまたはポリプロピレンが挙げられるが、これらに限定されない。

10

#### 【0153】

##### タンパク質精製

タンパク質精製技術は、当業者に周知である。これらの技術は、あるレベルでの、細胞、組織または器官の均質化およびペプチド画分と非ペプチド画分への粗分画を含む。目的タンパク質またはポリペプチドは、別段の指定がない限り、クロマトグラフィー技術および電気泳動技術を使用してさらに精製して部分または完全精製(または均一になるまでの精製)を果たすことができる。純粋なペプチドの調製に特に適した分析方法は、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、アフィニティークロマトグラフィー、イムノアフィニティークロマトグラフィー、および等電点電気泳動である。特に効率的なペプチド精製方法は、高速液体クロマトグラフィー(fast-performance liquid chromatography)(FPLC)またはさらには高速液体クロマトグラフィー(high-performance liquid chromatography)(HPLC)である。当技術分野において一般に公知であるように、様々な精製ステップを行う順序を変えることができる、またはある特定のステップを省いてもよく、結果的に、それでもなお、実質的に精製されたポリペプチドの調製に好適な方法となると考えられる。

20

#### 【0154】

精製されたポリペプチドは、他の成分から単離可能な組成物であって、ポリペプチドがその天然に得ることができる状態と比較して任意の程度に精製されている組成物への言及を意図したものである。したがって、単離されたまたは精製されたポリペプチドは、それが天然に存在する環境から分離されたポリペプチドも意味する。一般に、「精製された」は、分画に付されて様々な他の成分が除去されたポリペプチド組成物であって、述べられているその生物活性を実質的に保持する組成物を意味することになる。用語「実質的に精製された」が使用される場合、この表記は、ポリペプチドが、組成物の主要成分を形成する、例えば、組成物のタンパク質の約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%以上を構成する、組成物を意味することになる。

30

#### 【0155】

ポリペプチドの精製度を定量するための様々な方法は、本開示に鑑みて、当業者には公知である。これらは、例えば、活性画分の比活性度を決定すること、またはSDS/PAGE分析により画分中のポリペプチドの量を評価することを含む。画分の純度の好ましい評価方法は、画分の比活性度を計算すること、それを初期抽出物の比活性度と比較すること、そしてそのようにして、「精製倍率の数値」により評価されるそれらに関する純度を計算することである。活性の量を表すために使用される実際の単位は、精製を追跡するために選択される特定のアッセイ技術、および発現されるポリペプチドが検出可能な活性を示すか否かに、もちろん、依存することになる。

40

#### 【0156】

ポリペプチドが常にその最も精製された状態で提供されるという一般要件はない。実際、ある特定の実施形態では実質的精製度の低い生成物に有用性がありうると考えられる。部分精製は、より少ない精製ステップを組み合わせる使用することにより、または異なる形

50

の同じ一般精製スキームを利用することにより、果たすことができる。例えば、HPLC装置を用いて行われる陽イオン交換カラムクロマトグラフィーが、低圧クロマトグラフィーシステムを用いる同じ技術より高い精製「倍率」を一般にもたらすことになることは、理解される。より低い相対精製度を示す方法は、タンパク質産物の総回収率の点で、または発現されるタンパク質の活性を意味する点で有利でありうる。

【0157】

アフィニティークロマトグラフィーは、単離される物質と、それが特異的に結合することができる分子との間の特異的親和性に依存するクロマトグラフィー手順である。これは、受容体-リガンド型の相互作用である。カラム材料は、結合パートナーの一方の不溶性マトリックスへの共有結合的カップリングにより合成される。それ故、カラム材料は、溶液から物質を特異的に吸着することができる。溶離は、条件を、結合が起こらない条件（例えば、変化したpH、イオン強度、温度など）に変えることによって起こる。マトリックスは、分子をいかなる有意な程度にも吸着しない物質であって、広範な化学的、物理学的および温度安定性を有する物質であるべきである。リガンドを、その結合特性に影響を与えないような方法でカップリングすべきである。リガンドはまた、比較的強い結合を提供すべきである。試料またはリガンドを破壊することなく物質を溶出することが可能であるべきである。

【0158】

サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）は、溶液中の分子がそれらのサイズ、より専門的な用語では、それらの流体力学的体積に基づいて分離される、クロマトグラフィーの方法である。これは、通常、大分子または高分子複合体、例えばタンパク質および工業用ポリマーに適用される。典型的には、カラムを通して試料を輸送するために水溶液が使用される場合、この技術は、有機溶媒が移動相として使用される場合に使用されるゲル浸透クロマトグラフィーという名に対して、ゲル濾過クロマトグラフィーと称される。SECの基礎をなす原理は、異なるサイズの粒子が異なる速度で固定相を通して溶出（濾過）することになるということである。この結果、サイズに基づいて粒子の溶液が分離されることになる。粒子すべてが同時にまたはほぼ同時に負荷される限り、同じサイズの粒子は、一緒に溶出するはずである。

【0159】

高速液体クロマトグラフィー（または高圧液体クロマトグラフィー、HPLC）は、化合物を分離、同定および定量するために生化学および分析化学で頻繁に使用されるカラムクロマトグラフィーの一形態である。HPLCは、クロマトグラフィー充填材料（固定相）を保持するカラム、そのカラムを通して移動相を移動させるポンプ、および分子の滞留時間を示す検出器を用いる。滞留時間は、固定相と分析すべき分子と使用される溶媒との間の相互作用によって変わる。

【0160】

本明細書で提供されるのは、PD-1グリコシル化、N結合型グリコシル化またはN-グリコシル化を評価する方法であって、PD-1含有試料と実施形態の抗体（例えば、非グリコシル化PD-1と比較してグリコシル化PD-1と選択的に結合する抗体）を接触させるステップを含む方法である。一部の態様では、この方法は、*in vitro*方法である。ある特定の態様では、試料は、細胞試料である。

【0161】

核酸

本開示は、本明細書に記載の任意の抗glycPD-1抗体またはグリコシル化PD-1ポリペプチドをコードする核酸分子（DNAまたはRNA）も企図している。本明細書で提供されるのは、そのような核酸分子を伝達または複製することができるベクター分子（例えば、プラスミド）でもある。核酸は、一本鎖であってもよく、二本鎖であってもよく、一本鎖部分と二本鎖部分の両方を含有してもよい。

【0162】

医薬調製物

10

20

30

40

50

抗体を含有する医薬組成物の臨床応用に着手する場合、所期の用途に適した医薬組成物または治療用組成物を調製するのが一般に有利である。一般に、医薬組成物は、本明細書に記載の抗 g l y c P D - 1 抗体またはグリコシル化 P D - 1 ポリペプチドの有効量を有することができ、またはそれを薬学的に許容される担体に溶解もしくは分散されたさらなる薬剤と共に有することができる。

#### 【 0 1 6 3 】

本明細書で提供されるのは、本明細書に記載の抗 g l y c P D - 1 抗体またはグリコシル化 P D - 1 ポリペプチドを有する組成物でもある。一部の実施形態では、組成物は、抗体またはポリペプチドを少なくとも 0 . 1 重量% 有することができる。一部の実施形態では、組成物は、少なくとも 0 . 5 重量%、1 重量%、2 重量%、3 重量%、4 重量%、5 重量%、6 重量%、7 重量%、8 重量%、9 重量%、1 0 重量%、1 5 重量%、2 0 重量%、2 5 重量%、3 0 重量%、3 5 重量%、4 0 重量%、4 5 重量%、5 0 重量%、5 5 重量%、6 0 重量%、6 5 重量%、7 0 重量%、7 5 重量%、8 0 重量%、8 5 重量%、9 0 重量% 以上の抗 g l y c P D - 1 抗体またはグリコシル化 P D - 1 ポリペプチドを有することができる。他の実施形態では、例えば、抗 g l y c P D - 1 またはグリコシル化 P D - 1 ポリペプチドは、組成物の重量の約 2 % ~ 約 7 5 % の間、約 2 5 % ~ 約 6 0 % の間、約 3 0 % ~ 約 5 0 % の間、またはその中の任意の範囲を構成することができる。好適な投薬量が、投与される任意の化合物単位用量で得られるように、各治療有用組成物中の活性化合物の量を調製することができる。溶解度、バイオアベイラビリティ、生物学的半減期、投与経路、製品の有効期間、および他の薬理学的考慮事項などの因子が、そのような医薬製剤を調製する技術分野の当業者によって熟考され、しかるが故に、様々な投薬量および処置レジメンが望ましいものでありうる。

#### 【 0 1 6 4 】

組成物は、抗 g l y c P D - 1 抗体またはグリコシル化 P D - 1 ポリペプチドを活性成分として有し、薬学的に許容される担体も有する、医薬組成物でありうる。医薬組成物は、1 つまたは複数のさらなる活性成分をさらに含むことができる。薬学的に許容される担体は、動物での使用、さらに特にヒトでの使用が、連邦もしくは州政府の監督官庁によって承認された担体、または米国薬局方、欧州薬局方もしくは他の一般に認知されている薬局方に記載されている担体でありうる。

#### 【 0 1 6 5 】

本明細書で使用される場合、別段の指定がない限り、用語「担体」は、治療剤と共に投与される、希釈剤、アジュバント（例えば、フロイントアジュバント（完全もしくは不完全））、賦形剤、安定剤またはビヒクルを意味する。「薬学的に許容される担体」は、用いられる投薬量および濃度でそれに曝露される細胞または哺乳動物にとって非毒性である担体であり、該担体は、滅菌液、例えば、水、油（石油、動物、植物または合成起源のもの、例えば、ピーナッツ油、ダイズ油、鉱油、ゴマ油などを含む）でありうる。薬学的に許容される分子実体または組成物は、ヒトなどの動物に必要な応じて投与されたとき、有害反応、アレルギー反応または他の望ましくない反応を生じさせない。抗体またはさらなる活性成分を有する医薬組成物の調製は、参照により本明細書に組み込まれている Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., 1990 によって例示されているので、本明細書に鑑みて、当業者には公知である。さらに、動物（例えば、ヒト）への投与のために、調製物が、F D A O f f i c e o f B i o l o g i c a l S t a n d a r d s により要求されるような無菌性、発熱性、一般安全性および純度基準を満たすべきであることは理解されるであろう。

#### 【 0 1 6 6 】

組成物は、1 m l 当たり約 0 . 0 0 1 m g および約 1 0 m g の抗体またはポリペプチド総量を含むと考えられる。したがって、組成物中の抗体またはポリペプチドの濃度は、約 0 . 0 0 1、0 . 0 1 0、0 . 0 5 0、0 . 1、0 . 2、0 . 3、0 . 4、0 . 5、0 . 6、0 . 7、0 . 8、0 . 9、1 . 0、1 . 5、2 . 0、2 . 5、3 . 0、3 . 5、4 . 0、4 . 5、5 . 0、5 . 5、6 . 0、6 . 5、7 . 0、7 . 5、8 . 0、8 . 5、9 . 0、

9.5、10.0 mg/ml 以上（またはこれらの中から導き出すことができる任意の範囲）でありうる。このうち、約、少なくとも約、または最大で約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 または 100% が、抗 gly c P D - 1 抗体またはグリコシル化 P D - 1 ポリペプチドでありうる。

10

#### 【0167】

本明細書に記載の抗体または他のポリペプチドを活性成分として有する医薬組成物の調製は、参照により本明細書に組み込まれている Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., 1990 によって例示されているので、本明細書に鑑みて、当業者には公知である。さらに、動物（ヒトを含む）への投与のために、調製物が、F D A O f f i c e o f B i o l o g i c a l S t a n d a r d s により要求されるような無菌性、発熱性、一般安全性および純度基準を満たすべきであることは理解される。

#### 【0168】

薬学的に許容される担体は、液体、半固体、すなわちペースト、または固体担体を含む。担体または希釈剤の例としては、脂肪、油、水、生理食塩水、脂質、リボソーム、樹脂、結合剤、充填剤など、またはそれらの組み合わせが挙げられる。薬学的に許容される担体は、水性溶媒（例えば、水、アルコール溶液／水溶液、エタノール、生理食塩水、非経口ビヒクル、例えば塩化ナトリウム、リンゲルデキストロースなど）、非水性溶媒（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、および注射用有機エステル、例えばオレイン酸エチル）、分散媒、コーティング剤（例えば、レシチン）、界面活性剤、抗酸化剤、保存剤（例えば、抗菌または抗真菌剤、抗酸化剤、キレート剤、不活性ガス、パラベン（例えば、メチルパラベン、プロピルパラベン）、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサル）、等張剤（例えば、糖、塩化ナトリウム）、吸収遅延剤（例えば、モノステアリン酸アルミニウム、ゼラチン）、塩、薬物、薬物安定剤（例えば、緩衝剤、アミノ酸、例えばグリシンおよびリシン、炭水化物、例えばデキストロース、マンノース、ガラクトース、フルクトース、ラクトース、スクロース、マルトース、ソルビトール、マンニトールなど）、ゲル、結合剤、賦形剤、崩壊剤、滑沢剤、甘味剤、着香剤、色素、補充液および栄養補給剤、当業者に公知であろう同様の物質およびそれらの組み合わせを含みうる。任意の従来の媒体、薬剤、希釈剤または担体が、レシipient に対してまたはその中に含まれている組成物の治療有効性に対して有害である場合を除き、本方法を実施する際に使用するための投与可能な組成物におけるその使用は、適切である。医薬組成物中の様々な成分の pH および正確な濃度は、周知のパラメーターに従って調整される。本開示のある特定の態様に従って、任意の適便かつ実用的な方法で、すなわち、溶解、懸濁、乳化、混合、カプセル化、吸収、粉碎などによって、組成物を担体と併せることができる。そのような手順は、当業者にとって日常的なものである。

20

30

40

#### 【0169】

一部の実施形態では、薬学的に許容される担体は、pH 緩衝水溶液でありうる。例としては、緩衝液、例えば、リン酸、クエン酸および他の有機酸；アスコルビン酸をはじめとする抗酸化剤；低分子量（例えば、約 10 個未満のアミノ酸残基）のポリペプチド；タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチンもしくは免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンもしくはリジン；グルコース、マンノースもしくはデキストリンをはじめとする、単糖類、二糖類および他の炭水化物；キレート剤、例えば、E D T A；糖アルコール、例えば、マンニトールもしくはソルビトール；塩形成性対イオン、例えば、ナトリウム；ならびに／または非イオン性界面活性剤、例えば、T W E E N（商標）、ポリエチレ

50



ングリコール ( P E G ) および P L U R O N I C S ( 商 標 ) が挙げられる。

【 0 1 7 0 】

一部の実施形態では、薬学的に許容される担体は、滅菌液、例えば、水および油（石油、動物、植物または合成起源のもの、例えば、ピーナッツ油、ダイズ油、鉱油などを含む）でありうる。水は、特に医薬組成物が静脈内投与されるとき、担体でありうる。生理食塩水、ならびにデキストロースおよびグリセロール水溶液も、特に注射用溶液に、液体担体として用いることができる。適する医薬賦形剤としては、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、白亜、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレングリコール、水、エタノール、ポリソルベート - 8 0 などが挙げられる。組成物は、少量の湿潤もしくは乳化剤、または pH 緩衝剤も含有しうる。これらの組成物は、溶液、懸濁液、エマルジョン、錠剤、ピル、カプセル、粉末、徐放性製剤などの形態をとることができる。

10

【 0 1 7 1 】

本開示のある特定の実施形態は、それが、固体形態で投与されることになるのか、液体形態で投与されることになるのか、またはエアロゾル形態で投与されることになるのか、およびそれが、注射などの投与経路のために無菌である必要があるのかに依存して、異なるタイプの担体を有しうる。組成物を静脈内、皮内、経皮、髄腔内、動脈内、腹腔内、鼻腔内、膈内、直腸内、筋肉内、皮下、粘膜、経口、局部、局所、吸入（例えば、エアロゾル吸入）による、注射による、注入による、持続注入による、標的細胞を直接浸す局所的な灌流による、カテーテルによる、洗浄による、脂質組成物（例えば、リポソーム）での、または当業者に公知であろう他の方法または前述のものの任意の組み合わせによる投与用に製剤化することができる（例えば、参照により本明細書に組み込まれている Remington ' s Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., 1990 を参照されたい）。典型的に、そのような組成物を溶液または懸濁液のどちらかとして調製することができ、注射前に液体を添加することにより溶液または懸濁液を調製するための使用に好適な固体形態を調製することもでき、調製物を乳化させることもできる。

20

【 0 1 7 2 】

抗 g l y c P D - 1 抗体またはグリコシル化 P D - 1 ポリペプチドを遊離塩基、中性または塩形態の組成物に製剤化することができる。薬学的に許容される塩には、酸付加塩、例えば、タンパク質性組成物の遊離アミノ基とで形成される酸付加塩、あるいは例えば塩酸もしくはリン酸などの無機酸とで、または酢酸、シュウ酸、酒石酸もしくはマンデル酸のような有機酸とで形成される酸付加塩が含まれる。遊離カルボキシル基とで形成される塩を、例えばナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウムもしくは水酸化第二鉄などの無機塩基から誘導することもでき、またはイソプロピルアミン、トリメチルアミン、2 - エチルアミノエタノール、ヒスチジンもしくはプロカインのような有機塩基から誘導することもできる。

30

【 0 1 7 3 】

さらなる実施形態では、本明細書で提供されるのは、脂質を有する医薬組成物である。脂質は、特徴として水に不溶性であり、有機溶媒で抽出可能である、物質の一類である。例としては、長鎖脂肪族炭化水素およびそれらの誘導体を含有する化合物が挙げられる。脂質は、天然起源であることもあり、または合成である（すなわち、人間により設計もしくは製造される）こともある。脂質は、生物学的物質である。生物学的脂質は当技術分野において周知であり、例えば、中性脂肪、リン脂質、ホスホグリセリド、ステロイド、テルペン、リゾ脂質、スフィンゴ糖脂質、糖脂質、スルファチド、エーテル結合およびエステル結合脂肪酸を有する脂質、重合性脂質、ならびにそれらの組み合わせを含む。当業者に脂質として理解される、本明細書に具体的に記載のもの以外の化合物も、使用することができる。

40

【 0 1 7 4 】

当業者は、脂質ビヒクル中に組成物を分散させるために用いることができる技術範囲を熟

50

知しているであろう。例えば、抗体またはポリペプチドを、脂質を含有する溶液に分散させることができ、脂質と共に溶解させることができ、脂質を用いて乳化させることができ、脂質と混合させることができ、脂質と併せることができ、脂質と共有結合させることができ、脂質に懸濁物として含めることができ、ミセルもしくはリポソームに含めるもしくはそれらと複合体化させることができ、または当業者に公知の任意の手段により脂質もしくは脂質構造と別様に会合させることができる。分散の結果として、リポソームが形成されることもあり、またはされないこともある。

#### 【 0 1 7 5 】

一般に、組成物の成分は、別々にまたは混合して単位剤形で、例えば、活性薬剤の量を示すアンプルまたはサッシェなどの密封容器内の凍結乾燥ドライパウダーまたは無水濃縮物として供給される。組成物が吸入によって投与されることになる場合、医薬品グレードの滅菌水または食塩水が入っている吸入ボトルで組成物を投薬することができる。組成物が注射によって投与される場合、投与前に成分を混合することができるように注射用滅菌水または食塩水用のアンプルを提供することができる。

10

#### 【 0 1 7 6 】

好適な投薬量が、投与される任意の化合物単位用量で得られるように、各治療有用組成物中の活性成分の量を調製することができる。溶解度、バイオアベイラビリティ、生物学的半減期、投与経路、製品の有効期間、および他の薬理学的考慮事項などの因子は、そのような医薬製剤を調製する技術分野の当業者によって熟考されうるものであり、しかるが故に、様々な投薬量および処置レジメンが望ましいものでありうる。

20

#### 【 0 1 7 7 】

単位用量または投薬量は、その投与、すなわち、適切な経路および処置レジメン、に関連して上で論じた望ましい応答を生じさせるように計算された医薬組成物の所定量を各単位が含有する、対象における使用に好適な物理的に個別の単位を意味する。投与される量は、処置の数と単位用量の両方によるが、所望される効果に依存する。患者または対象に投与される本実施形態の組成物の実際の投薬量は、身体的および生理学的要因、例えば、対象の体重、年齢、健康状態および性別、処置される疾患の型、疾患浸透度、過去のまたは同時に行われる治療的介入、患者の特発性疾患、投与経路、ならびに特定の治療用物質の作用強度、安定性および毒性によって決定されうる。他の非限定的例では、用量は、1投与につき約1マイクログラム/kg/体重から、約5マイクログラム/kg/体重から、約10マイクログラム/kg/体重から、約50マイクログラム/kg/体重から、約100マイクログラム/kg/体重から、約200マイクログラム/kg/体重から、約350マイクログラム/kg/体重から、約500マイクログラム/kg/体重から、約1ミリグラム/kg/体重から、約5ミリグラム/kg/体重から、約10ミリグラム/kg/体重から、約50ミリグラム/kg/体重から、約100ミリグラム/kg/体重から、約200ミリグラム/kg/体重から、約350ミリグラム/kg/体重から、約500ミリグラム/kg/体重から、約1000ミリグラム/kg/体重以上まで、およびこれらの中から導き出すことができる任意の範囲を有しうる。ここに列挙した数値から導き出すことができる範囲の非限定的例では、上記の数値に基づいて約5ミリグラム/kg/体重から約100ミリグラム/kg/体重、約5マイクログラム/kg/体重から約500ミリグラム/kg/体重などの範囲を投与することができる。いずれにせよ、投与を担当する実施者が、個々の対象のための組成物中の活性成分の濃度および適切な用量を決定する。

30

40

#### 【 0 1 7 8 】

当業者には理解されるであろうが、本明細書に記載の組成物は、治療用調製物の特定性質により限定されない。例えば、そのような組成物を、生理学的に許容される液体、ゲルまたは固体担体、希釈剤および賦形剤を伴う製剤で提供することができる。これらの治療用調製物を、家畜に関するものなどの獣医学的使用のために、および他の治療剤と同様のヒトにおける臨床使用のために、哺乳動物に投与することができる。一般に、治療効力に必要な投薬量は、投与の使用および方法のタイプ、ならびに個々の対象についての特化され

50

た要件によって変わる。ヒト患者をはじめとする動物患者に投与される組成物の実際の投薬量は、身体的および生理学的要因、例えば、体重、状態の重症度、処置される疾患の型、過去のまたは同時に行われる治療的介入、患者の特発性疾患により、および投与経路に基づいて決定される。投薬量および投与経路に依存して、好ましい投薬量および/または有効量の投与の数は、対象の応答によって変わりうる。いずれにせよ、投与を担当する実施者が、個々の対象のための組成物中の活性成分の濃度および適切な用量を決定する。

#### 【0179】

##### 疾患の処置

本明細書で使用される場合、別段の指定がない限り、用語「対象」は、処置、観察および/または実験の対象である動物を意味する。「動物」は、脊椎動物および非脊椎動物、例えば、魚類、甲殻類、鳥類、および特に哺乳動物を含む。「哺乳動物」は、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、イヌ、ネコ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ウマ、霊長目、例えばサル、チンパンジー、類人猿およびヒトを含むが、これらに限定されない。一部の実施形態では、対象はヒトである。

#### 【0180】

本明細書で使用される場合、別段の指定がない限り、用語「がん」または「がん性(の)」は、無秩序な細胞増殖を概して特徴とする哺乳動物における生理学的状態を意味する。がんの例としては、血液がんおよび固形腫瘍が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0181】

本明細書で使用される場合、別段の指定がない限り、用語「処置する」、「処置すること」または「処置」は、対象に治療剤を投与もしくは適用すること、または疾患もしくは健康に関する状態に対する治療的恩恵を得ることを目的とした手技もしくはモダリティを対象に対して行うことを意味する。例えば、処置は、治療有効量の抗 *g l y c P D - 1* 抗体を対象に投与することを含みうる。がん患者に関して使用される場合、用語「処置する」、「処置すること」または「処置」は、がんの重症度を低下させる可能性がある、またはがんの悪化を遅延させるもしくは緩徐化する可能性がある行為であって、(a) がんの増殖を阻害する、がんの増殖速度を低下させる、発生を阻止する、がん浸潤性を低下させる、またはがんの転移を予防する行為、および(b) がんの退縮を生じさせる、がんの存在に関連する1つもしくは複数の症状を遅らせるもしくは最小にする、またはがん患者の生存期間を延長する行為を意味する。

#### 【0182】

本明細書で使用される場合、別段の指定がない限り、用語「治療有効量」は、所与の疾患、障害もしくは状態および/またはそれらに関連する症状の重症度および/または継続期間を低減および/または改善するのに十分である、薬剤(例えば、本明細書に記載の抗体もしくはポリペプチドまたは本明細書に記載の任意の他の薬剤)の量を意味する。治療剤をはじめとする薬剤の治療有効量は、(i) 所与の疾患、障害もしくは状態の進行もしくは悪化の低減もしくは改善、(ii) 所与の疾患、障害もしくは状態の再発、発生もしくは発病の低減もしくは改善、および/または(iii) 別の療法(例えば、本明細書に記載の抗体の投与以外の療法)の予防もしくは治療効果の改善もしくは増強に必要な量でありうる。本開示の物質/分子/薬剤(例えば、抗 *g l y c P D - 1* 抗体またはグリコシル化 *P D - 1* ポリペプチド)の治療有効量は、個体の病状、年齢、性別および体重、ならびに個体において所望の応答を惹起するその物質/分子/薬剤の能力などの因子によって変わりうる。治療有効量は、物質/分子/薬剤のいかなる毒性または有害効果よりも治療有益効果のほうが上回る量を包含する。

#### 【0183】

本明細書で使用される場合、別段の指定がない限り、用語「投与する」または「投与」は、粘膜、皮内、静脈内、筋肉内送達および/または本明細書に記載のもしくは当技術分野において公知の任意の他の物理的送達方法などによって、体外に存在する物質を患者に注射または別様に物理的に送達する行為を意味する。疾患、障害もしくは状態またはその症状が処置されることになる場合、物質の投与は、概して疾患、障害もしくは状態の発病ま

10

20

30

40

50

たはその症状の発症後に行われる。疾病、障害もしくは状態またはその症状が予防されることになる場合、物質の投与は、概して疾患、障害もしくは状態の発病またはその症状の発症前に行われる。

#### 【0184】

本明細書で提供されるのは、抗 g l y c P D - 1 抗体およびグリコシル化 P D - 1 ポリペプチドの治療目的使用でもある。これらの抗体またはポリペプチドを使用して、P D - 1 / P D - L 1 シグナル伝達の活性を調節することができる。これらの抗体またはポリペプチドを使用して、T 細胞活性化または増殖における P D - 1 の抑制活性を阻害することにより疾患を処置することもできる。したがって、本明細書で提供されるのは、P D - 1 シグナル伝達を阻害または遮断することによる対象の免疫系の上方調節におけるそのような抗体またはポリペプチドの使用である。一部の実施形態では、本明細書で提供されるのは、P D - 1 が P D - L 1 に結合するのを阻止するための抗体またはポリペプチドの使用である。

10

#### 【0185】

一部の実施形態では、本明細書で提供されるのは、がんの処置における抗 g l y c P D - 1 抗体およびグリコシル化 P D - 1 ポリペプチドの治療目的使用でもある。免疫系の上方調節は、がんの処置に特に望ましく、それ故、本明細書で提供されるのは、がん処置方法でもある。がんは、細胞の異常な無制御増殖の結果として生じる新生物または腫瘍を意味する。がんは、原発がんであることもあり、または転移がんであることもある。特定の実施形態では、がん細胞は、P D - L 1 に対して陽性である。

20

#### 【0186】

ある特定の態様では、本実施形態のポリペプチドまたは抗体（例えば、グリコシル化 P D - 1 ポリペプチド、またはグリコシル化 P D - 1 と結合する抗体）を、がんを処置するために投与することができる。特定の実施形態では、抗 g l y c P D - 1 抗体は、S T M 4 1 8 または S T M 4 3 2 のキメラまたはヒト化形態である。本処置方法が有用であるがんには任意の悪性細胞型、例えば、固形腫瘍または血液腫瘍において見いだされるものが含まれる。例示的な固形腫瘍としては、脾臓、結腸、盲腸、胃、脳、頭部、頸部、卵巣、腎臓、喉頭、肉腫、肺、膀胱、メラノーマ、前立腺および乳房からなる群から選択される器官の腫瘍を挙げることができるが、これらに限定されない。例示的な血液腫瘍としては、骨髄の腫瘍、T または B 細胞悪性腫瘍、白血病、リンパ腫、芽細胞腫、骨髄腫などが挙げられる。本明細書で提供される方法を使用して処置することができるがんのさらなる例としては、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、白血病、扁平上皮がん、肺がん（小細胞肺がん、非小細胞肺がん、肺腺癌、および肺扁平上皮癌を含む）、腹膜がん、肝細胞がん、胃がん（gastricまたはstomach cancer）（胃腸がんおよび胃腸間質がんを含む）、脾臓がん、膠芽腫、子宮頸がん、卵巣がん、肝臓がん、膀胱がん、乳がん、結腸がん、結腸直腸がん、子宮内膜または子宮癌、唾液腺癌、腎臓または腎がん、前立腺がん、外陰がん、甲状腺がん、様々な型の頭頸部がん、メラノーマ、表在拡大型メラノーマ、悪性黒子由来メラノーマ、末端黒子型メラノーマ、結節性メラノーマ、ならびに B 細胞リンパ腫（低悪性度 / 濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）；小リンパ球性（SL）NHL；中悪性度 / 濾胞性 NHL；中悪性度びまん性 NHL；高悪性度免疫芽球性 NHL；高悪性度リンパ芽球性 NHL；高悪性度小型非切れ込み核細胞性 NHL；巨大腫瘍病変性 NHL；マントル細胞リンパ腫；A I D S 関連リンパ腫；およびワルデンストレーム高ガンマグロブリン血症を含む）、急性リンパ芽球性白血病（CLL）、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、ヘアリー細胞白血病、多発性骨髄腫、急性骨髄性白血病（AML）および骨髄芽球性白血病が挙げられるが、これらに限定されない。

30

40

#### 【0187】

がんは、具体的には以下の組織学的型のものであるが、これらに限定されない：悪性新生物；癌腫；未分化癌；巨大紡錘細胞癌；小細胞癌；乳頭癌；扁平上皮癌；リンパ上皮癌；基底細胞癌；石灰化上皮癌；移行上皮癌；乳頭移行上皮癌；腺癌；悪性ガストリノーマ；胆管細胞癌；肝細胞癌；肝細胞癌と胆管細胞癌の混合型；索状腺癌；腺様嚢胞癌；腺腫性

50

ポリープ内腺癌；腺腫、家族性大腸腺腫症；固形癌；悪性カルチノイド腫瘍；細気管支・肺胞性腺癌；乳頭状腺癌；嫌色素性癌；好酸性癌；好酸性腺癌；好塩基性癌；明細胞腺癌；顆粒細胞癌；濾胞状腺癌；乳頭状・濾胞状腺癌；非被包性硬化性癌；副腎皮質癌；類内膜癌；皮膚付属器癌；アポクリン腺癌；皮脂腺癌；耳道腺癌；粘表皮癌；嚢胞腺癌；乳頭状嚢腺癌；乳頭状漿液嚢胞腺癌；粘液性嚢胞腺癌；粘液性腺癌；印環細胞癌；浸潤性乳管癌；髓様癌；小葉癌；炎症性癌；乳房パジェット病；腺房細胞癌；腺扁平上皮癌；扁平上皮化生を伴う腺癌；悪性胸腺腫；悪性卵巣間質性腫瘍；悪性莢膜細胞腫；悪性顆粒膜細胞腫；悪性アンドロblastoma；セルトリ細胞癌；悪性ライディッヒ細胞腫；悪性脂質細胞腫；悪性傍神経節腫；悪性乳房外傍神経節腫；褐色細胞腫；血管球血管肉腫；悪性メラノーマ；無色素性メラノーマ；表在拡大型メラノーマ；巨大色素性母斑における悪性メラノーマ；類上皮細胞メラノーマ；悪性青色母斑；肉腫；線維肉腫；悪性線維性組織球腫；粘液肉腫；脂肪肉腫；平滑筋肉腫；横紋筋肉腫；胎児性横紋筋肉腫；胞巣状横紋筋肉腫；間質肉腫；悪性混合腫瘍；ミューラ管混合腫瘍；腎芽腫；肝芽腫；癌肉腫；悪性間葉腫；悪性プレナー腫瘍；悪性葉状腫瘍；滑膜肉腫；悪性中皮腫；未分化胚細胞腫；胎児性癌；悪性奇形腫；悪性卵巣甲状腺腫；絨毛癌；悪性中腎腫；血管肉腫；悪性血管内皮腫；カポジ肉腫；悪性血管周皮腫；リンパ管肉腫；骨肉腫；傍骨性骨肉腫；軟骨肉腫；悪性軟骨芽細胞腫；間葉性軟骨肉腫；骨巨細胞腫；ユーイング肉腫；悪性歯源性腫瘍；エナメル上皮歯牙肉腫；悪性エナメル上皮腫；エナメル上皮線維肉腫；悪性松果体腫；脊索腫；悪性神経膠腫；上衣腫；星細胞腫；原形質性星細胞腫；原線維性星細胞腫；星状芽細胞腫；膠芽腫；乏突起神経膠腫；乏突起神経膠芽細胞腫；原始神経外胚葉性（primitive neuroectodermal）；小脳肉腫；神経節芽細胞腫；神経芽腫；網膜芽細胞腫；嗅神経原性腫瘍；悪性髄膜腫；神経線維肉腫；悪性神経鞘腫；悪性顆粒細胞腫瘍；悪性リンパ腫；ホジキン病；ホジキン側肉芽腫；小リンパ球性悪性リンパ腫；大細胞びまん性悪性リンパ腫；濾胞性悪性リンパ腫；菌状息肉症；他の特定される非ホジキンリンパ腫；悪性組織球増殖症；多発性骨髄腫；マスト細胞肉腫；免疫増殖性小腸疾患；白血病；リンパ性白血病；形質細胞白血病；赤白血病；リンパ肉腫細胞白血病；骨髓性白血病；好塩基球性白血病；好酸球性白血病；単球性白血病；マスト細胞白血病；巨核芽球性白血病；骨髓肉腫；およびヘアリー細胞白血病。

10

20

#### 【0188】

一部の実施形態では、本明細書で提供される抗体またはポリペプチドは、乳がん、肺がん、頭頸部がん、前立腺がん、食道がん、気管がん、皮膚がん、脳がん、肝臓がん、膀胱がん、胃がん、膵臓がん、卵巣がん、子宮がん、子宮頸がん、精巣がん、結腸がん、直腸がんまたは皮膚がんであるがんを処置するために使用することができる。

30

#### 【0189】

ポリペプチドおよび抗体は、本明細書では、様々なモダリティで抗腫瘍剤として使用することができる。特定の実施形態では、本明細書で提供されるのは、ポリペプチドまたは抗体を抗腫瘍剤として使用する方法であり、したがって、腫瘍細胞の集団を治療有効量のポリペプチドまたは抗体と、腫瘍細胞増殖を阻害するのに十分な期間にわたって接触させることを含む。

#### 【0190】

リポソーム、微粒子、マイクロカプセルへの封入、抗体または融合タンパク質を発現することができる組換え細胞、受容体媒介エンドサイトーシス（例えば、Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432を参照されたい）、レトロウイルスまたは他のベクターの一部としての核酸の構築などのような、様々な送達系も公知であり、抗glycPD-1抗体、もしくはグリコシル化PD-1ポリペプチドの関連分子、または関連医薬組成物を投与するためにそれらを使用することができる。

40

#### 【0191】

本明細書で提供の投与方法は、非経口投与（例えば、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内および皮下）、硬膜外、および粘膜（例えば、鼻腔内および経口経路）によるような注射を含むが、これらに限定されない。一部の実施形態では、本明細書で提供される抗体、他の分

50

子、または医薬組成物は、筋肉内、静脈内、皮下、静脈内、腹腔内、経口、筋肉内、皮下、腔内、経皮、または皮膚投与される。組成物を、任意の適便な経路によって、例えば、注入またはボーラス注射によって、上皮内層または粘膜皮膚内層（例えば、経口粘膜、直腸および腸粘膜など）による吸収によって投与することができ、または他の生物活性薬剤と一緒に投与することができる。投与は、全身的であることもあり、または局所的であることもある。加えて、肺内投与も、例えば、吸入器またはネブライザー、およびエアロゾル化剤を含有する製剤を使用することにより用いることができる。例えば、米国特許第 6,019,968 号、同第 5,985,20 号、同第 5,985,309 号、同第 5,934,272 号、同第 5,874,064 号、同第 5,855,913 号、同第 5,290,540 号および同第 4,880,078 号明細書、ならびに PCT 公開番号国際公開第 92/19244 号、同第 97/32572 号、同第 97/44013 号、同第 98/31346 号および同第 99/66903 号パンフレットを参照されたく、これらの参考文献のすべては、それら全体が参照により本明細書に組み込まれている。一部の実施形態では、本明細書で提供される抗体、他の分子、または医薬組成物は、処置を必要とする領域に局所投与され、これは、例えば、局所注入により、注射により、または埋込物によって果たすことができ、前記埋込物は、サイラスティック膜などの膜、または繊維を含む、多孔質、無孔質またはゼラチン質材料のものである。一部の実施形態では、本明細書に記載のように抗体または他の分子を投与する場合、抗体または他の分子が吸着しない材料を使用するように注意が払われる。

10

#### 【0192】

20

一部の実施形態では、本明細書で提供される抗体またはポリペプチドは、標的化送達のためにリポソームに入っている形で製剤化される。リポソームは、水性相を封入する、同心円状に整列したリン脂質二重層で構成されている小胞である。リポソームは、様々なタイプの脂質、リン脂質および/または界面活性剤を概して有する。リポソームの成分は、生体膜の脂質配列に類似した、二重層立体配置で配列されている。リポソームは、一部はそれらの生体適合性、低い免疫原性および低い毒性のため、有用な送達ビヒクルでありうる。リポソームの調製方法は、当技術分野において公知であり、本明細書で提供される。例えば、Epstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688; Hwang et al., 1980 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030-4; 米国特許第 4,485,045 号および同第 4,544,545 号を参照されたく、これらの参考文献のすべては、それら全体が参照により本明細書に組み込まれている。

30

#### 【0193】

本明細書で提供されるのは、米国特許第 5,013,556 号明細書において開示されているものなどの、血清半減期が延長された、すなわち循環時間が向上した、リポソームの調製方法でもある。一部の実施形態では、本明細書で提供される方法において使用されるリポソームは、循環から急速に排除されない、すなわち、単核食細胞系 (MPS) に取り込まれない。本明細書で提供されるのは、当業者に公知の一般的な方法を使用して調製される、立体的に安定化されたリポソームでもある。立体的に安定化されたリポソームは、リポソームと血清タンパク質の望ましくない反応を低減させ、血清成分によるオプソニン作用を低減させ、MPS による認識を低減させる、嵩高く非常に柔軟な親水性部分を有する脂質成分を含有することができる。立体的に安定化されたリポソームは、ポリエチレングリコールを使用して調製することができる。リポソームの調製および立体的に安定化されたリポソームについては、例えば、Bendas et al., 2001 BioDrugs, 15(4): 215-224; Allen et al., 1987 FEBS Lett. 223: 42-6; Klivanov et al., 1990 FEBS Lett., 268: 235-7; Blum et al., 1990, Biochim.Biophys.Acta., 1029: 91-7; Torchilin et al., 1996, J. Liposome Res.6: 99-116; Litzinger et al., 1994, Biochim. Biophys. Acta, 1190: 99-107; Maruyama et al., 1991, Chem. Pharm. Bull., 39: 1620-2; Klivanov et al., 1991, Biochim Biophys Acta, 1062: 142-8; Allen et al., 1994, Adv. Drug Deliv. Rev, 13: 285-309 を参照されたく、これらの参考文献は、それら全体が参照により本明細書に組み込まれている。

40

50

## 【 0 1 9 4 】

本明細書で提供されるのは、特定器官標的化に適応するリポソームでもあり、例えば米国特許第 4, 5 4 4, 5 4 5 明細書を参照されたく、または特異的細胞標的化に適応するリポソームでもあり、例えば米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 0 7 4 4 0 3 号明細書を参照されたく、これらの参照文献は、それら全体が参照により本明細書に組み込まれている。本明細書で提供される組成物および方法における使用に特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロールおよび P E G 誘導体化ホスファチジルエタノールアミン ( P E G - P E ) を含む脂質組成物を用いて逆相蒸発方法により生成することができる。リポソームを被定義孔径のフィルターに通して押し出して、所望の直径を有するリポソームを生じさせることができる。一部の実施形態では、以前に記載された方法を使用して、抗原結合断片、例えば F ( a b ' )、を有する分子をリポソームにコンジュゲートすることができる。例えば、Martin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257: 286-288 を参照されたく、この参照文献は、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。

10

## 【 0 1 9 5 】

本明細書に記載のヒト化またはキメラ抗体をイムノリポソームとして製剤化することもできる。イムノリポソームは、抗体またはその断片がリポソーム表面に共有結合的にまたは非共有結合的に連結されている、リポソーム組成物を意味する。抗体をリポソーム表面に連結させる化学は当技術分野において公知であり、例えば、米国特許第 6, 7 8 7, 1 5 3 号明細書 ; Allen et al., 1995, Stealth Liposomes, Boca Rotan: CRC Press, 233-44 ; Hansen et al., 1995, Biochim. Biophys. Acta, 1239: 133-144 を参照されたく、これらの参照文献は、それら全体が参照により本明細書に組み込まれている。一部の実施形態では、本明細書で提供される方法および組成物において使用するためのイムノリポソームは、さらに立体的に安定化される。一部の実施形態では、本明細書に記載のヒト化抗体は、リポソームの脂質二重層内に安定的に定着する疎水性アンカーに共有結合的にまたは非共有結合的に連結される。疎水性アンカーの例としては、リン脂質、例えば、ホスファチジルエタノールアミン ( P E )、ホスファチジルイノシトール ( P I ) が挙げられるが、これらに限定されない。抗体と疎水性アンカー間の共有結合性連結を達成するために、当技術分野における公知生化学的戦略のいずれを使用してもよく、例えば、J. Thomas August ed., 1997, Gene Therapy: Advances in Pharmacology, Volume 40, Academic Press, San Diego, Calif., p. 399-435 を参照されたく、この参照文献は、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。例えば、抗体分子上の官能基は、リポソーム会合疎水性アンカー上の活性基と反応することができ、例えば、抗体のリジン側鎖のアミノ基を、水溶性カルボジイミドで活性化されたりポソーム会合 N - グルタリル - ホスファチジルエタノールアミンにカップリングさせてもよく、または還元抗体のチオール基を、ピリジルチオプロピオニルホスファチジルエタノールアミンなどのチオール反応性アンカーによってリポソームにカップリングさせることができる。例えば、Dietrich et al., 1996, Biochemistry, 35: 1100-1105 ; Loughrey et al., 1987, Biochim. Biophys. Acta, 901: 157-160 ; Martin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257: 286-288 ; Martin et al., 1981, Biochemistry, 20: 4429-38 を参照されたく、これらの参照文献は、それら全体が参照により本明細書に組み込まれている。抗グリコシル化 P D - 1 抗体を有するイムノリポソーム製剤は、標的細胞、すなわち抗体が結合する受容体を含む細胞、の細胞質に活性成分を送達するので、治療剤として特に有用である。一部の実施形態では、イムノリポソームは、血中半減期増加を有することができ、特に、標的細胞を該標的細胞の細胞質に内在化することによって治療剤の損失またはリソソーム内経路による分解を回避することができる。

20

30

40

## 【 0 1 9 6 】

本明細書で提供されるイムノリポソーム組成物は、1 つもしくは複数の小胞形成脂質と、本発明の抗体もしくは他の分子またはその断片もしくは誘導体と、任意選択的に親水性ポリマーとを有することができる。小胞形成脂質は、アシル基および極性ヘッド基などの、2 本の炭化水素鎖を有する脂質でありうる。小胞形成脂質の例としては、リン脂質、例え

50

ば、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジン酸、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴミエリン、および糖脂質、例えばセレブロシド、ガングリオシドが挙げられる。本明細書で提供される製剤において有用なさらなる脂質は当業者に公知であり、本明細書に包含される。一部の実施形態では、イムノリポソーム組成物は、該リポソームの血清半減期を増加させる親水性ポリマー、例えば、ポリエチレングリコール、およびガングリオシドGM1をさらに含む。親水性ポリマーをリポソームにコンジュゲートする方法は当技術分野において周知であり、本明細書に包含される。さらなる例示的イムノリポソームおよびそれらの調製方法は、例えば、米国特許出願公開第2003/0044407号明細書；PCT公開番号国際公開第97/38731号パンフレット；Vingerhoads et al., 1994, Immunomethods, 4: 259-72；Maruyama, 2000, Biol.Pharm.Bull.23(7): 791-799；Abra et al., 2002, Journal of Liposome Research, 12(1&2): 1-3；Park, 2002, Bioscience Reports, 22(2): 267-281；Bendas et al., 2001 BioDrugs, 14(4): 215-224, J. Thomas August ed., 1997, Gene Therapy: Advances in Pharmacology, Volume 40, Academic Press, San Diego, Calif., p. 399-435を参照されたく、これらの参考文献のすべては、それら全体が参照により本明細書に組み込まれている。

#### 【0197】

本明細書で提供されるのは、がん患者を処置する方法であって、抗glycPD-1抗体の単位用量を患者に投与することによる方法でもある。本明細書で提供されるのは、がん患者を処置する方法であって、グリコシル化PD-1ポリペプチドの単位用量を患者に投与することによる方法でもある。単位用量は、各々の単位が、必要希釈剤、すなわち担体またはビヒクルと共同して望ましい治療効果を生じさせるように計算された活性物質の所定量を含有する、対象への単位投薬量として好適な物理的に個別の単位を意味する。

#### 【0198】

抗体、ポリペプチドまたは組成物は、投与製剤に適合する様式で、かつ治療有効量で投与される。投与される量は、処置されることになる対象、活性成分を利用する対象の系の能力、および所望される治療効果の程度に依存する。投与する必要がある活性成分の正確な量は、実施者の判断に依存し、個々の対象各々に特有である。しかし、全身適用に好適な投薬量範囲が本明細書で開示され、そのような範囲は投与経路に依存する。初回投与および追加投与に好適なレジメンも企図され、典型的には、初回投与、続いての1時間またはそれ超の間隔での後続注射または他の投与による反復投与によるレジメンを含む。例示的な複数回投与が本明細書に記載され、そのような投与は、ポリペプチドまたは抗体の高い血清および組織中レベルを継続的に維持するのに有用である。あるいは、in vivo治療用に指定された範囲で血中濃度を維持するのに十分な持続静注が企図される。

#### 【0199】

治療有効量は、所望の効果を達成するように計算された所定量である。一般に、投薬量は、患者の年齢、患者の状態、患者の性別および患者の疾患の程度によって変わることになり、当業者は投薬量を決定することができる。何らかの合併症が生じた場合、個々の医師が投薬量を調整することができる。

#### 【0200】

一部の実施形態では、本明細書で提供される抗体、ポリペプチドまたは医薬組成物は、アンプルまたはサッシュなどの密封容器に包装される。一実施形態では、本明細書で提供される抗体、ポリペプチドまたは医薬組成物は、密封容器内の滅菌凍結乾燥ドライパウダーまたは無水濃縮物として供給され、例えば、対象への投与のために水または食塩水で適切な濃度に再構成されうる。一部の実施形態では、本明細書で提供される抗体、ポリペプチドまたは医薬組成物は、密封容器内の無菌凍結乾燥粉末として少なくとも5mg、より好ましくは少なくとも10mg、少なくとも15mg、少なくとも25mg、少なくとも35mg、少なくとも45mg、少なくとも50mg、または少なくとも75mgの単位投薬量で供給される。本明細書で提供される凍結乾燥抗体、ポリペプチドまたは医薬組成物を元の容器内で2～8の間で保管すべきであり、再構成したら12時間以内に、好まし



くは6時間以内、5時間以内、3時間以内または1時間以内に投与すべきである。代替実施形態では、本明細書で提供される抗体、ポリペプチドまたは医薬組成物は、該抗体、ポリペプチドまたは医薬組成物の量および濃度を示す密封容器内の液体形態で供給される。一部の実施形態では、本明細書で提供される抗体、ポリペプチドまたは医薬組成物の液体形態は、密封容器内に少なくとも1 mg / ml、より好ましくは少なくとも2.5 mg / ml、少なくとも5 mg / ml、少なくとも8 mg / ml、少なくとも10 mg / ml、少なくとも15 mg / ml、少なくとも25 mg / ml、少なくとも50 mg / ml、少なくとも100 mg / ml、少なくとも150 mg / ml、少なくとも200 mg / mlで供給される。

#### 【0201】

製剤に用いられることになる正確な用量もまた投与経路および状態の重症度に依存することになり、実施者の判断および各患者の状況に応じてそのような用量を決定すべきである。有効用量は、*in vitro*または動物モデル試験系から得られる用量反応曲線から推定することができる。抗glycPD-1抗体またはグリコシル化PD-1ポリペプチドについて、患者に投与される投薬量は、典型的には、患者の体重当りで0.01 mg / kg ~ 100 mg / kgである。一部の実施形態では、患者に投与される投薬量は、患者の体重当りで0.01 mg / kg ~ 20 mg / kgの間、0.01 mg / kg ~ 10 mg / kgの間、0.01 mg / kg ~ 5 mg / kgの間、0.01 ~ 2 mg / kgの間、0.01 ~ 1 mg / kgの間、0.01 mg / kg ~ 0.75 mg / kgの間、0.01 mg / kg ~ 0.5 mg / kgの間、0.01 mg / kg ~ 0.25 mg / kg、0.01 ~ 0.15 mg / kg、0.01 ~ 0.10 mg / kg、0.01 ~ 0.05 mg / kg、または0.01 ~ 0.025 mg / kgである。特に、患者に投与される投薬量は、0.2 mg / kg、0.3 mg / kg、1 mg / kg、3 mg / kg、6 mg / kgまたは10 mg / kgでありうる。0.01 mg / kgほども低い用量が適切な薬力学的効果を示すと予測される。0.10 ~ 1 mg / kgの用量レベルが最も適切であると予測される。より高い用量（例えば、1 ~ 30 mg / kg）も有効であると予想されうる。一般に、ヒト抗体は、異種ポリペプチドに対する免疫応答のため他の種からの抗体より長い体内での半減期を有する。したがって、ヒト抗体のより低い投薬量およびより少ない投薬頻度を実施することができる。さらに、本明細書で提供される抗体またはポリペプチドの投薬量および投与頻度を、例えば脂質修飾などの修飾により抗体の取り込みおよび組織透過性を増進することによって低減させることができる。

#### 【0202】

さらに別の実施形態では、組成物を制御放出または徐放系で送達することができる。当業者に公知の任意の技術を使用して、本明細書で提供される1つまたは複数の抗体、分子または医薬組成物を有する徐放性製剤を生成することができる。例えば、米国特許第4,526,938号明細書；PCT公開公報国際公開第91/05548号パンフレット；PCT公開公報国際公開第96/20698号パンフレット；Ning et al., *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189 (1996)；Song et al., *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397 (1995)；Cleek et al., *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854 (1997)；およびLam et al., *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759-760(1997)を参照されたく、参照文献のすべては、それら全体が参照により本明細書に組み込まれている。一実施形態では、制御放出系でポンプを使用することもある（Langer, *supra*；Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:20；Buchwald et al., 1980, *Surgery* 88:507；およびSaudek et al., 1989, *N. Engl. J. Med.* 321:574を参照されたい）。別の実施形態では、高分子材料を使用して、抗体またはポリペプチドの制御放出を達成することができる（例えば、*Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla.(1974)；*Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984)；Ranger and Peppas, 1983, *J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61を参照されたい；Lev

10

20

30

40

50

y et al., 1985, Science 228:190 ; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351 ; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71:105) ; 米国特許第 5,679,377 号明細書 ; 米国特許第 5,916,597 号明細書 ; 米国特許第 5,912,015 号明細書 ; 米国特許第 5,989,463 号明細書 ; 米国特許第 5,128,326 号明細書 ; PCT 公開番号国際公開第 99/15154 号パンフレット ; および PCT 公開番号国際公開第 99/20253 号パンフレットも参照されたい)。参照文献のすべては、それら全体が参照により本明細書に組み込まれている。

#### 【0203】

徐放性製剤において使用することができるポリマーの例としては、ポリ(メタクリル酸ヒドロキシエチル)、ポリ(メタクリル酸メチル)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(エチレン - c o - 酢酸ビニル)、ポリ(メタクリル酸)、ポリグリコリド(PLG)、ポリ無水物、ポリ(N-ビニルピロリドン)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリアクリルアミド、ポリ(エチレングリコール)、ポリラクチド(PLA)、ポリ(ラクチド - c o - グリコリド)(PLGA)、およびポリオルトエステルが挙げられるが、これらに限定されない。さらに別の実施形態では、制御放出系を治療標的(例えば、肺)に近接して配置することができ、したがって全身用量のほんの一部しか必要としない(例えば、Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)を参照されたい)。別の実施形態では、制御放出埋込物として有用なポリマー組成物が、その全体が参照により本明細書に組み込まれているDunn et al.(例えば、米国特許 5,945,155 号明細書を参照されたい)に従って使用される。ポリマー系からの生物活性材料の生体内原位置での制御放出の治療効果に基づいて、一般に、埋め込みは、治療的処置を必要とする患者の体内のどこで行ってもよい。

#### 【0204】

別の実施形態では、非ポリマー性持続送達系が使用され、それによって対象の体内の非ポリマー性埋込物が薬物送達系として使用される。体内に埋め込むと、埋込物の有機溶媒が、組成物から周囲の組織液に消散、分散または浸出することになり、非ポリマー性材料は、徐々に凝固または沈殿して固体、ミクロ多孔質マトリックスになる(例えば、米国特許第 5,888,533 号明細書を参照されたい)。制御放出系は、Langer による総説(1990, Science 249:1527-1533)でも論じされている。当業者に公知の任意の技術を使用して、本明細書で提供される 1 つまたは複数の治療剤を含む徐放性製剤を生成することができる。例えば、米国特許第 4,526,938 号明細書 ; 国際公開第 91/05548 号および同第 96/20698 号パンフレット ; Ning et al., 1996, Radiotherapy & Oncology 39:179-189 ; Song et al., 1995, PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397 ; Cleek et al., 1997, Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854 ; および Lam et al., 1997, Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760 を参照されたい、参照文献のすべては、それら全体が参照により本明細書に組み込まれている。

#### 【0205】

本明細書で提供されるのは、組成物が、本明細書で提供される抗体またはポリペプチドをコードする核酸を有する実施形態であって、適切な核酸発現ベクターの一部としてその組成物を構築し、その組成物が細胞内に存在することになるようにすることによって(米国特許第 4,980,286 号を参照されたい)、または直接注射によって、またはマクロパーティクルボンバードメント(例えば、遺伝子銃 ; 微粒子銃、Dupont)の使用によって、または脂質もしくは細胞表面受容体もしくはトランスフェクト剤でコーティングして、または核に侵入することが公知であるホメオボックス様ペプチドに結合している状態のその組成物を投与すること(例えば、Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868 を参照されたい)によって、核酸を *in vivo* で投与してそのコードされた抗体またはポリペプチドの発現を促進することができる、実施形態でもある。あるいは、核酸を細胞内に導入し、例えば相同組換えにより宿主細胞 DNA 内に組み込むことができる。

10

20

30

40

50

## 【 0 2 0 6 】

治療有効量の本明細書で提供される抗体、ポリペプチドまたは医薬組成物での対象の処置は、単一処置を含むこともあり、または一連の処置を含むこともある。本明細書で提供される抗体、ポリペプチドまたは医薬組成物を全身投与または局所投与して、疾患を処置することができ、例えば、局所進行または転移がんを有するがん患者において腫瘍細胞の増殖を阻害するまたはがん細胞を殺滅することができると考えられる。それらを静脈内、髄腔内および/または腹腔内投与してもよい。それらを単独で投与してもよく、または抗増殖薬と組み合わせて投与してもよい。一実施形態では、それらは、外科手術または他の手技の前に患者のがんの負荷を低減させるために投与される。あるいは、任意の残存するがん（例えば、外科手術により除去することができなかったがん）が確実に生存しないようにするために、それらを外科手術後に投与してもよい。一部の実施形態では、それらを原発癌の退縮後に投与して転移を予防することができる。

10

## 【 0 2 0 7 】

## 併用処置

ある特定の実施形態では、実施形態の組成物および方法は、グリコシル化PD-1ポリペプチドのまたはグリコシル化PD-1と選択的に結合する抗体の投与を、第2のまたはさらなる療法との組み合わせで含む。そのような療法をPD-1またはグリコシル化PD-1に関連する任意の疾患の処置の際に適用することができる。例えば、疾患は、がんでありえ、第2の療法は、抗がんまたは過剰増殖抑制療法である。

## 【 0 2 0 8 】

併用療法を含む方法および組成物は、治療もしくは保護効果を増強し、および/または別の抗がんもしくは過剰増殖抑制療法の治療効果を増大させる。治療および予防方法ならびに治療用および予防用組成物を、がん細胞の殺滅および/または細胞の過剰増殖の阻害などの、所望の効果を達成するのに有効な総計量で、提供することができる。これらの方法は、ポリペプチドまたは抗体および第2の療法の投与を含みうる。第2の療法は、直接的な細胞障害効果を有することもあり、または有さないこともある。例えば、第2の療法は、直接的な細胞障害効果を有せずに免疫系を上方調節する薬剤でありうる。組織、腫瘍または細胞を、1つもしくは複数の薬剤（例えば、抗体もしくは抗がん剤）を含む1つもしくは複数の組成物もしくは薬理的製剤に曝露してもよく、または組織、腫瘍および/もしくは細胞を曝露することに関しては、1つの組成物が1)ポリペプチドもしくは抗体、

20

30

## 【 0 2 0 9 】

細胞に適用される場合の用語「接触した」および「曝露された」は、治療用ポリペプチドまたは抗体および化学療法剤または放射線治療剤が標的細胞に送達されるかまたはそれらと標的細胞とがすぐ近位に配置されるプロセスを記述するために本明細書では使用される。例えば、細胞殺滅を達成するために、両方の薬剤は、細胞を殺滅するのに有効なまたは細胞が分裂するのを防止するのに有効な総計量で細胞に送達される。

40

## 【 0 2 1 0 】

抗glycPD-1抗体またはグリコシル化PD-1ポリペプチドを、第2のまたはさらなる抗がん処置の前に、その間に、その後に、またはそれに対して様々な組み合わせで投与することができる。投与は、同時に～数分～数日～数週間にわたる間隔でありうる。抗体またはポリペプチドが患者に抗がん剤とは別に提供される実施形態では、一般に、2つの化合物が患者に対して有利な複合効果をなお発揮することができるような有意な期間が各送達時と送達時の間に確実に終了しないようにすることになる。そのような場合、抗glycPD-1抗体またはグリコシル化PD-1ポリペプチドおよび第2の療法を互いに約12～24または72時間以内に、より詳細には互いに約6～12時間以内に患者に施すことができると考えられる。一部の状況では、それぞれの投与間に数日（2、3、4、

50

5、6または7)～数週間(1、2、3、4、5、6、7または8)が経過する、処置の期間を、有意に延長することができる。

#### 【0211】

特定の実施形態では、抗glycPD-1抗体は、がんの処置のために1つまたは複数の他の抗PD-1抗体と組み合わせて患者に投与され、これは、ペムブロリズマブ、ニボルマブまたはピディリズマブと組み合わせての投与を含む。他の実施形態では、抗glycPD-1抗体は、がんの処置のために1つまたは複数の抗PD-L1抗体と組み合わせて患者に投与される。特定の実施形態では、抗glycPD-1抗体は、アテゾリズマブ、デュルバルマブまたはアベルマブと組み合わせて投与される。他の実施形態では、抗glycPD-1抗体は、1つまたは複数の抗CTLA-4抗体と組み合わせて投与され、特定の実施形態では、抗CTLA-4抗体は、イピリムマブである。他の実施形態では、抗glycPD-1抗体は、PD-1、PD-L1またはCTLA-4の活性を阻害する薬剤、例えば、Fcドメインに融合したPD-1、PD-L1またはCTLA-4タンパク質の細胞外受容体またはリガンド結合部分を有するイムノアドヘンシと共に投与される。

10

#### 【0212】

特定の実施形態では、抗glycPD-1抗体は、非グリコシル化PD-L1と比較してグリコシル化PD-L1に優先的に結合する抗体と組み合わせて投与される。特に、抗glycPD-1抗体を、非グリコシル化PD-L1と比較してグリコシル化PD-L1に優先的に結合する抗PD-L1抗体STM004またはSTM115のキメラまたはヒト化形態と組み合わせて投与してもよく、それらの重鎖および軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列(およびコードヌクレオチド配列)は、2016年10月6日に発行された、発明の名称が「Antibodies Specific To Glycosylated PD-L1 And Methods Of Use Thereof」であるPCT公開公報国際公開第2016/160792号パンフレットにおいて開示されており、参考文献は、参照により本明細書に組み込まれている。抗glycPD-1抗体を、非グリコシル化PD-L1と比較してグリコシル化PD-L1に優先的に結合する抗PD-L1抗体STM073またはSTM108のキメラまたはヒト化形態と組み合わせて投与してもよく、それらの重鎖および軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列(およびコードヌクレオチド配列)は、2016年3月29日に発行された、発明の名称が「Dual Function Antibodies Specific To Glycosylated PD-L1 And Methods Of Use Thereof」である米国特許仮出願第62/314,652号明細書において開示されており、参考文献は、参照により本明細書に組み込まれている。

20

30

#### 【0213】

ある特定の実施形態では、処置過程は、1～90日以上(このそのような範囲は、介在する日を含む)続きうる。ある薬剤を1日目～90日目(このそのような範囲は、介在する日を含む)の任意の日またはそれらの任意の組み合わせに与えることができ、別の薬剤は、1日目～90日目(このそのような範囲は、介在する日を含む)の任意の日またはそれらの任意の組み合わせに与えられると考えられる。1日(24時間の期間)のうちに、患者に1回または複数回の薬剤投与を施すことができる。さらに、処置過程後、抗がん処置が投与されない期間があると考えられる。この期間は、患者の状態、例えば彼らの予後、強さ、健康状態などに依存して、1～7日、および/または1～5週間、および/または1～12カ月以上(このそのような範囲は、介在する日を含む)続きうる。これらの処置サイクルを必要に応じて反復することができる。

40

#### 【0214】

様々な組み合わせを用いることができる。下に列挙するのは、抗glycPD-1抗体またはグリコシル化PD-1ポリペプチドを「A」とし、第2の抗がん療法を「B」とした、処置に関する一部の例である：

A / B / A    B / A / B    B / B / A    A / A / B    A / B / B    B / A / A    A  
/ B / B / B    B / A / B / B    B / B / B / A    B / B / A / B    A / A / B / B

50

A / B / A / B    A / B / B / A    B / B / A / A    B / A / B / A    B / A / A / B  
 B    A / A / A / B    B / A / A / A    A / B / A / A    A / A / B / A

【 0 2 1 5 】

第 2 の療法との組み合わせでの、本明細書で提供される任意の抗体、ポリペプチドまたは医薬組成物の患者への投与は、もしあれば第 2 の療法の毒性を考慮に入れて、そのような第 2 の療法の投与についての一般的プロトコールに従うことになる。したがって、一部の実施形態には、併用療法に起因する毒性をモニターするステップがある。

【 0 2 1 6 】

化学療法

広範な化学療法剤を本実施形態に従って第 2 の療法として使用することができる。化学療法薬は、がんの処置の際に投与される化合物または組成物でありうる。これらの薬剤または薬物は、細胞内でのそれらの活性モードによって、例えば、それらが細胞周期に影響を与えるかどうか、およびそれらが細胞周期にどの期で影響を与えるのかによって、カテゴリー分けすることができる。あるいは、薬剤を、DNA を直接架橋させるその能力、DNA に挿入するその能力、または核酸合成に影響を与えることにより染色体および有糸分裂異常を誘導するその能力に基づいて特性解析することができる。

【 0 2 1 7 】

化学療法剤の例としては、アルキル化剤、例えば、チオテパおよびシクロホスファミド；アルキルスルホン酸系、例えば、プスルファン、インプロスルファンおよびピボスルファン；アジリジン系、例えば、ベンゾデパ、カルボコン、メツレドパおよびウレドパ；エチレンイミン系およびメチロールメラミン系（アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミドおよびトリメチロールメラミンを含む）；アセトゲニン系（特に、プラタシンおよびプラタシノン）；カンプトテシン（合成類似体トポテカンを含む）；プリオスタチン；カリスタチン；CC - 1065（そのアドゼレシン、カルゼレシンおよびビゼレシン合成類似体を含む）；クリプトフィシン系（特に、クリプトフィシン 1 およびクリプトフィシン 8）；ドラスタチン；デュオカルマイシン（合成類似体 KW - 2189 および CB1 - TM1 を含む）；エリテロピン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スポンギスタチン；ナイトロジェンマスタード系、例えば、クロラムブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベムピチン、フェネスチリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、およびウラシルマスタード；ニトロソウレア系、例えば、カルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、およびラニムスチン；抗生物質、例えば、エンジイン抗生物質（例えば、カリケアマイシン、特に、カリケアマイシガンマ 1 I およびカリケアマイシンオメガ I 1）；ダイネマイシン（ダイネマイシン A を含む）；ビスホスホネート系、例えば、クロンドロネート；エスペラミシン；ならびにネオカルジノスタチンクロモフォアおよび関連色素タンパク質エンジイン抗生物質クロモフォア、アクラシノマイシン類、アクチノマイシン、アントラマイシン、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン、カラピシン（carabycin）、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン類、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6 - ジアゾ - 5 - オキソ - L - ノルロイシン、ドキシソルピシン（モルホリノードキシソルピシン、シアノモルホリノ - ドキシソルピシン、2 - ピロリノ - ドキシソルピシンおよびデオキシドキシソルピシンを含む）、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシン類、例えばマイトマイシン C、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン（potfiromycin）、ピューロマイシン、クエラマイシン、ロドルピシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、およびゾルピシン；代謝拮抗薬、例えば、メトトレキサートおよび 5 - フルオロウラシル（5 - FU）；葉酸類似体、例えば、デノブテリン、プテロプテリンおよびトリメトレキサート；プリン類似体、例えば、フルダラビン、6 - メルカプトプリン、チアミプリン、およびチオグアニン；ピリミジン類似体、例えば、アンシタピン、アザシチジン、

10

20

30

40

50

6 - アザウリジン、カルモフル、シタラピン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン、およびフロクスウリジン；アンドロゲン系、例えば、カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、およびテストラクトン；副腎皮質ホルモン合成阻害薬（anti-adrenals）、例えば、ミトタンおよびトリロスタン；葉酸補充薬、例えば、フォリン酸；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレプリン酸；エニルウラシル；アムサクリン；ベストラブシル；ビスアントレン；エダトレキサート；デフォファミン（defofamine）；デメコルシン；ジアジクオン；エフロニチン；酢酸エリブチニウム；エポチロン；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダミン；メイタンシノイド系、例えば、メイタンシンおよびアンサマイトシン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モビダモール；ニトラクリン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルピシン；ロソキサントロン；ポドフィリン酸；2 - エチルヒドラジン；プロカルバジン；P S K 多糖類複合体；ラゾキサン；リゾキシン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジコン；2, 2', 2'' - トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン類（特に、T - 2 トキシン、ベルカリンA、ロリジンAおよびアングイジン）；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピボプロマン；ガシトシン（gacytosine）；アラビノシド（「Ara - C」）；シクロホスファミド；タキソイド系、例えば、パクリタキセルおよびドセタキセル；ゲムシタピン；6 - チオグアニン；メルカプトプリン；白金配位錯体、例えば、シスプラチン、オキサリプラチン、およびカルボプラチン；ビンブラスチン；白金；エトポシド（VP - 16）；イホスファミド；ミトキサントロン；ピンクリスチン；ピノレルピン；ノバントロン；テニポシド；エダトレキサート；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼローダ；イバンドロネート；イリノテカン（例えば、CPT - 11）；トポイソメラーゼ阻害剤RFS 2000；ジフルオロメチルオルニチン（DMFO）；レチノイド系、例えば、レチノイン酸；カペシタピン；カルボプラチン、プロカルバジン、プリカマイシン、ゲムシタピン、ナベルピン、ファルネシルプロテイントランスフェラーゼ阻害剤、トランス白金、ならびに上記のもののいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体が挙げられる。

#### 【0218】

##### 放射線治療

本明細書に記載の方法および組成物と組み合わせて使用することができるもう1つの従来の抗がん療法は、放射線治療、すなわち放射線療法である。放射線治療は、線、X線、および/または腫瘍細胞への放射性同位元素の直接送達の使用を含む。DNA損傷因子の他の形態、例えば、マイクロ波、プロトンビーム照射（米国特許第5,760,395号および同第4,870,287号明細書；これらの参考文献のすべては、それら全体が参照により本明細書に組み込まれている）、およびUV照射も考えられる。これらの因子のすべてが、DNAに対して、DNAの前駆体に対して、DNAの複製および修復に対して、ならびに染色体の構築および維持に対して広範な障害をもたらすことは、ほぼ確実である。

#### 【0219】

腫瘍微小環境は、腫瘍に浸潤し、免疫応答を抑制する骨髄系由来サプレッサー細胞および調節性T細胞の存在のため、本質的に阻害性である。加えて、ある特定の阻害性分子のT細胞および抗原提示細胞（APC）上で発現は、有効な免疫応答を制限しうる。放射線は、腫瘍細胞アポトーシス、老化、オートファジーの誘導により抗腫瘍効果を媒介し、状況によっては、より有効な免疫応答を刺激することができる。

#### 【0220】

アブスコパル効果は、原発性腫瘍に対する標的化照射が、照射領域内にない遠位部位で腫瘍応答を誘導する、生理学的プロセスである。アブスコパル効果の原因となるメカニズムは、免疫介在性であり、T細胞に対する腫瘍抗原の提示増進、ならびに局所性および全身性免疫応答を刺激するサイトカインおよび炎症誘発因子の放出を含むと考えられる。アブスコパル効果は、放射線処置を受ける原発性腫瘍か遠位に位置する腫瘍に影響を与える

10

20

30

40

50

ので、アブスコパル効果を誘発することができる薬剤は、体内の二次的部位に広がってしまうと処置がより困難になることが多い転移性腫瘍の処置に特に有利であろう。

#### 【0221】

本明細書に記載の抗 g l y c P D - 1 抗体またはグリコシル化 P D - 1 ポリペプチドは、局所性および全身性免疫応答を刺激することができる。一部の実施形態では、治療有効量の本明細書に記載の抗体、ポリペプチドまたは医薬組成物は、放射線治療の前に、それと同時に、またはその後に投与されて、相乗的アブスコパル効果を達成する。

#### 【0222】

一部の実施形態では、宿主における腫瘍を照射に対して有効に増感させる、治療有効量の本明細書に記載の抗体、ポリペプチドまたは医薬組成物が、投与される。照射は、電離放射線、特に、ガンマ線照射でありうる。一部の実施形態では、ガンマ線は、線型加速器によって、または放射性核種によって放射される。放射性核種による腫瘍の照射は、外部照射であることもあり、または内部照射であることもある。

10

#### 【0223】

一部の実施形態では、本明細書に記載の抗体、ポリペプチドまたは医薬組成物の投与は、腫瘍に対する照射前1カ月までに、特に、10日または1週間までに開始する。加えて、腫瘍の照射は分割され、本明細書に記載の抗体、ポリペプチドまたは医薬組成物の投与は、最初の照射セッションから最後の照射セッションまでの間、維持される。

#### 【0224】

照射は、X線照射であってもよい。X線の線量範囲は、長期間(3~4週間)にわたって50~200レントゲンの1日線量から、2000~6000レントゲンの単一線量まで、多岐にわたる。放射性同位元素についての投与量範囲は、広範囲変動し、同位元素の半減期、放射される放射線の強度およびタイプ、ならびに新生物細胞による取り込み量に依存する。

20

#### 【0225】

##### 免疫療法

免疫療法を本実施形態の方法と組み合わせるまたは共に使用することができることは、当業者には理解されるであろう。がん処置に関して、免疫療法薬は、一般に、がん細胞を標的にして破壊するための免疫エフェクター細胞および分子の使用に一般に依存する。リツキシマブ(RITUXAN(登録商標))は、そのような一例である。例えばイピリウムマブ、ペムブロリズマブ、ニボルマブおよびアテゾリズマブなどの、チェックポイント阻害剤が、他の例である。免疫エフェクターは、例えば、腫瘍細胞の表面の何らかのマーカに対して特異的な抗体でありうる。抗体は、単独で治療のエフェクターとして働くこともあり、または細胞殺滅を実際にもたすために他の細胞を動員することもある。抗体は、薬物または毒素(例えば、化学療法薬、放射性核種、リシンA鎖、コレラ毒素、百日咳毒素)にコンジュゲートされ、単に標的化剤として働くこともある。あるいは、エフェクターは、腫瘍細胞標的と直接的にかまたは間接的に相互作用する表面分子を保有するリンパ球でありうる。様々なエフェクター細胞が、細胞傷害性T細胞およびNK細胞を含む。

30

#### 【0226】

免疫療法の一態様では、腫瘍細胞は、標的化に適している、すなわち、大多数の他の細胞上に存在しない、何らかのマーカを有する。多くの腫瘍マーカが存在し、これらのいずれもが本実施形態との関連での標的化に好適でありうる。一般的な腫瘍マーカとしては、CD20、癌胎児抗原、チロシナーゼ(p97)、gp68、TAG-72、HMGF、シアリルルイス抗原、MucA、MucB、PLAP、ラミニン受容体、erbB、およびp155が挙げられる。免疫療法の代替態様は、抗がん効果を免疫刺激効果と組み合わせることである。免疫刺激分子も存在し、それらには、サイトカイン、例えばIL-2、IL-4、IL-12、GM-CSF、ガンマIFN、ケモカイン、例えばMIP-1、MCP-1、IL-8、および増殖因子、例えばFLT3リガンドが含まれる。

40

#### 【0227】

現在研究中であるかまたは使用されている免疫治療薬の例は、免疫アジュバント、例えば

50

、ウシ型結核菌 (Mycobacterium bovis)、熱帯熱マラリア原虫 (Plasmodium falciparum)、ジニトロクロロベンゼン、および芳香族化合物 (米国特許第 5, 801, 005 号および同第 5, 739, 169 号明細書; Hui and Hashimoto, Infect Immun., 66(11):5329-36(1998); Christodoulides et al., Microbiology, 66(11):5329-36(1998)); サイトカイン療法、例えば、インターフェロン、および、IL-1、GM-CSF、ならびに TNF (Bukowski et al., Clin Cancer Res., 4(10):2337-47 (1998); Davidson et al., J Immunother., 21(5):389-98(1998); Hellstrand et al., Acta Oncol. 37(4):347-53(1998)); 遺伝子療法、例えば、TNF、IL-1、IL-2、および p-53 (Qin et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 95(24):14411-6(1998); Austin-Ward and Villaseca, Rev Med Chil, 126(7):838-45 (1998); 米国特許第 5, 830, 880 号および同第 5, 846, 945 号明細書); ならびにモノクローナル抗体、例えば、抗 PD-1、抗 PDL-1、抗 CD20、抗ガングリオシド GM2、および抗 p185 (Topalian et al., The New England journal of medicine, 366:2443-2454 (2012); Brahmer et al., The New England journal of medicine 366:2455-2465 (2012); Hollander, Front Immunol (2012): 3:3. doi: 10.3389/fimmu.2012.00003; Hanibuchi et al., Int J Cancer, 78(4):480-5(1998); 米国特許第 5, 824, 311 号明細書) であり、参考文献のすべては、それら全体が参照により本明細書に組み込まれている。抗 gl yc PD-1 抗体またはグリコシル化 PD-1 ポリペプチドの使用を含む本明細書に記載の療法と共に 1 つまたは複数の抗がん療法を用いることができると考えられる。

10

20

#### 【0228】

##### 外科手術

がんを有する人物のおおよそ 60% は、予防的、診断的または病期診断、根治的、および姑息手術を含む、何らかのタイプの外科手術を受けることになる。根治手術は、がん組織のすべてまたは一部が物理的に除去、切除および/または破壊される摘除を含み、本実施形態の処置、化学療法、放射線治療、ホルモン療法、遺伝子療法、免疫療法および/または代替療法などの、他の療法と共に使用されることもある。腫瘍摘除は、腫瘍の少なくとも一部の物理的除去を意味する。腫瘍摘除に加えて、外科手術による処置は、レーザー手術、凍結手術、電気手術、および顕微鏡下手術 (モース術) を含む。

#### 【0229】

がん細胞、組織または腫瘍の一部またはすべてを切除すると、体内に空洞が形成されうる。処置は、その領域に対する灌流、直接注射または局所適用とさらなる抗がん療法によって果たすことができる。そのような処置を、例えば、1、2、3、4、5、6 もしくは 7 日ごとに、または 1、2、3、4 および 5 週間ごとに、または 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 もしくは 12 カ月ごとに繰り返すことができる。これらの処置も様々な投薬量のものでありうる。

30

#### 【0230】

##### 他の薬剤

処置の治療効力を向上させるために他の薬剤を本実施形態のある特定の態様と組み合わせて使用することができることが考えられる。これらのさらなる薬剤には、細胞表面受容体およびギャップ結合の上方調節をもたらす薬剤、細胞分裂阻害剤および分化剤、細胞接着阻害剤、アポトーシス誘導物質に対する過剰増殖性細胞の感受性を増大させる薬剤、または他の生物学的薬剤が含まれる。ギャップ結合の数を増加させることによる細胞内シグナル伝達の増加は、隣接する過剰増殖性細胞集団に対する過剰増殖抑制効果を増大させることができる。他の実施形態では、処置の過剰増殖抑制効力を向上させるために細胞分裂阻害剤および分化剤を本実施形態のある特定の態様と組み合わせて使用することができる。細胞接着阻害剤は、本実施形態の効力を向上させると考えられる。細胞接着阻害剤の例は、接着斑キナーゼ (FAK) 阻害剤およびロバスタチンである。治療効力を向上させるために、抗体 c225 などの、アポトーシスに対する過剰増殖性細胞の感受性を増大させる他の薬剤を、本実施形態のある特定の態様と組み合わせて使用することができる。

40

50



## 【 0 2 3 1 】

## キットおよび診断薬

本明細書における様々な態様で提供されるのは、治療剤を含有するキットならびに / または他の治療および送達剤である。一部の実施形態では、本明細書で提供される治療を準備および / または投与するためのキットが企図される。キットは、本明細書で提供される医薬組成物のいずれかを含有する 1 つまたは複数の密封バイアルを含むことができる。キットは、例えば、少なくとも抗 g l y c P D - 1 抗体またはグリコシル化 P D - 1 ポリペプチド、ならびに本明細書で提供される成分を調製、製剤化および / もしくは投与するためのまたは本明細書で提供される方法の 1 つもしくは複数のステップを行うための試薬を含むことができる。

10

## 【 0 2 3 2 】

一部の実施形態では、キットは、抗 g l y c P D - 1 抗体および少なくとも 1 つの補助的試薬を含むことができる。一部の実施形態では、キットは、グリコシル化 P D - 1 ポリペプチドおよび少なくとも 1 つの補助的試薬を含むことができる。

## 【 0 2 3 3 】

一部の実施形態では、キットは、第 2 の抗がん剤をさらに含む。第 2 の抗がん剤は、化学療法剤、免疫療法剤、ホルモン療法剤、またはサイトカインでありうる。

## 【 0 2 3 4 】

一部の実施形態では、キットは、キットの成分と反応しない容器である好適な容器手段、例えば、エッペンドルフチューブ、アッセイプレート、注射器、ピンまたはチューブも含むことができる。容器は、プラスチックまたはガラスなどの滅菌可能な材料から製造されたものでありうる。

20

## 【 0 2 3 5 】

キットは、本明細書に記載の方法の手順ステップの概要を示す指示シートであって、本明細書に記載の手順と実質的に同じ手順または当業者に公知の手順に準拠するものとなる指示シートをさらに含むことができる。指示情報は、コンピューターを使用して実行すると、治療有効量の本明細書で提供される抗体またはポリペプチドを送達する現実のまたは仮想の手順を表示させる、機械可読の指示を収録しているコンピューター可読媒体でのものであってもよい。キットは、医薬品または生物学的製剤の製造、使用または販売を監督する政府機関によって指示された形式での注意書きであって、ヒトへの投与のための製造、使用または販売についての機関による承認を表す注意書きも含むことができる。

30

## 【 0 2 3 6 】

## [ 実施例 ]

当然のことながら、本明細書に記載の様々な実施形態の性質および主旨を実質的に変えない変更形態も企図されることが理解される。したがって、以下の実施例は、説明のためのものであり、決して限定的でない。

## 【 0 2 3 7 】

## 材料および方法

細胞培養、安定発現株、およびトランスフェクション細胞は、アメリカ合衆国細胞培養系統保存機関 ( A T C C ) から入手した。10 % ウシ胎仔血清 ( F B S ) を補充した D M E M / F 1 2 または R P M I 1 6 4 0 培地でこれらの細胞を増殖させた。ピューロマイシン ( I n v i v o G e n , S a n D i e g o , C A , U S A ) を使用して、H E K 2 9 3 T 細胞における P D - I 安定発現株を選択した。一過性トランスフェクションのために、S N リボソーム ( H u , M . C . e t a l . , 2 0 0 4 , C e l l , 1 1 7 : 2 2 5 - 2 3 7 ) 、リポフェクタミン ( 商標 ) 2 0 0 0 およびリポフェクタミン L T X ( L i f e T e c h n o l o g i e s , C a r l s b a d , C A , U S A ) を使用して、P D - I をコードする D N A などの D N A を細胞に一過性にトランスフェクトした。

40

## 【 0 2 3 8 】

レンチウイルス感染を使用する安定細胞の生成。P D - 1 遺伝子を O r i g e n e ( r o c k v i l l e , M D , U S A ) から購入し、公知の分子生物学技術を使用して、p C D

50

Hレンチウイルス発現ベクターにクローニングしてPD-1-Flag発現細胞株を樹立した。pCDHI PD-1-Flag発現ベクターを鋳型として使用して、部位特異的変異誘発によりPD-1-Flag NQ変異体N49Q、N58Q、N74Q、N116Qおよび4NQ(N49Q/N58Q/N79Q/N116Q)を生じさせた。酵素消化およびDNAシーケンシングを使用して、すべての構築物を確認した。PD-1を発現する安定細胞を生成するために、リポフェクタミンLTXトランスフェクション試薬を用いてプラスミドを293T細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションの24時間後、培地を交換し、その後、24時間間隔で培地を採取した。レンチウイルスを含有する採取した培地を遠心分離して細胞残屑を除去し、0.45 µmフィルターに通して濾過した。感染の12時間前に細胞を集密度50%で播種し、培地を、レンチウイルスを含有する培地と交換した。24時間感染させた後、培地を新鮮培地と交換し、1 µg/mlのピューロマイシン(InvivoGen)を用いて感染細胞を選択した。

10

## 【0239】

免疫プロット分析、免疫細胞化学的検査および免疫沈降。免疫プロット分析は、以前に記載されたように行った(Lim et al., 2008, Gastroenterology, 135:2128-40; および Lee et al., 2007, Cell, 130:440-455)。画像取得およびバンド強度の定量は、Bio-Rad ChemiDocイメージングシステム(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)を使用して行った。免疫細胞化学的検査のために、細胞を室温で15分間、4%パラホルムアルデヒドで固定し、5分間、5%Triton X-100中で透過処理し、その後、一次抗体を使用して染色した。使用した二次抗体は、抗マウスAlexa Fluor 488もしくは594色素コンジュゲートおよび/または抗ウサギAlexa Fluor 488もしくは594色素コンジュゲート(Life Technologies)であった。核を4', 6-ジアミノ-2-フェニルインドール(DAPIブルー)(Life Technologies)で染色した。マウント後、マルチフォトン共焦点レーザー走査顕微鏡(Nikon A1+, Melville, NY, USA)を使用して細胞を可視化した。

20

## 【0240】

フローサイトメトリー。PD-1野生型および変異型タンパク質または対照ベクターを過剰発現する細胞をトリプシン処理により単離し、Cell Staining Buffer(CBS)(BioLegend, San Diego, CA, US)中に細胞 $2 \times 10^6$ 個/mLで収集した。50 µLの細胞を96ウェル丸底プレートに小分けし、それに50 µLの一次抗体20 µg/mLを添加し、その後、穏やかに混合し、4℃で、暗所で、1時間インキュベートした。細胞をCSBで洗浄し、抗マウスIgG-PEコンジュゲート(10 µg/mL)とDAPI(1:100)と共に30分間、21℃暗所でインキュベートした。細胞を洗浄し、Guava EasyCyte HT(Millipore Darmstadt, DE)またはFACS Celesta(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, US)フローサイトメーターを使用してデータを取った。

30

## 【0241】

PD-L1とPD-1(PD-L1/PD-1)の相互作用アッセイ。PD-1タンパク質とPD-L1タンパク質の相互作用を測定するために、PD-1発現細胞を4%パラホルムアルデヒド中、室温で15分間固定し、その後、組換えヒトPD-L1-Fcキメラタンパク質(R&D Systems)と共に1時間インキュベートした。使用した二次抗体は、抗ヒトAlexa Fluor 488色素コンジュゲート(Life Technologies)であった。その後、Alexa Fluor 488色素の蛍光強度をリアルタイム顕微鏡Incucyte(Essen BioScience, Ann Arbor, Michigan, USA)を使用してモニターした。

40

## 【0242】

K<sub>D</sub>決定およびOctetによるピニング。ハイスループットK<sub>D</sub>スクリーニングのために、抗体リガンドを20 nM溶液によりセンサーに投入した。1 mg/mLのウシ血清ア

50

ルブミンを含有するPBS（アッセイ緩衝液）でベースラインを確立し、アッセイ緩衝液中の単一濃度の分析物にセンサーを沈めることにより会合ステップを行った。新たなアッセイ緩衝液中で解離を行い、モニターした。すべての実験は、1,000rpmで振盪しながらセンサーを用いて行った。ForteBioのデータ分析ソフトウェアを使用して、1:1結合モデルにデータをフィッシングして、会合速度および解離速度を抽出した。 $k_d/k_a$ 比を使用して $K_D$ を計算した。典型的エピトープビニングアッセイでは、抗原PD-1-His(10nM)を二次抗体(10nM)と共に1時間、室温でブレインキュベートした。対照抗体(20nM)をAMCセンサー(ForteBio)に投入し、センサー上の残りのFc結合部位を全マウスIgG抗体(Jackson Immuno Research)でブロックした。ブレインキュベートした抗原-二次抗体混合物にセンサーを曝露した。ForteBio's Data Analysis Software 7.0を使用して生データを処理し、抗体対を競合結合について評価した。二次抗体によるさらなる結合は、占有されていないエピトープ(非競合物)を示し、その一方で結合なしは、エピトープブロッキング(競合物)を示す。

#### 【0243】

PD-1のグリコシル化分析。PD-1タンパク質のグリコシル化を確認するために、酵素PNGase F、Endo H、O-グリコシダーゼ(New England Biolabs、Ipswich、MA、USA)を製造業者による説明通りに用いて細胞溶解物を処置した。

#### 【0244】

統計解析。棒グラフのデータは、未処置または対照群に対する平均倍率変化と3回の独立した実験の標準偏差を表す。SPSS(バージョン20、SPSS、Chicago、IL)を使用して統計解析を行った。スピアマンの相関およびマン・ホイットニー検定を使用して、タンパク質発現とBLBCサブセットとの相関関係を解析した。実験データについてはスチューデントt検定を行った。AP値<0.05を統計的に有意と見なした。

#### 【実施例1】

#### 【0245】

グリコシル化PD-1はPD-L1と結合する。

N49、N58、N79およびN116にグリコシル化を有する野生型PD-1を発現する293T細胞を用いて、およびグリコシル化を阻止するためにこれらの位置のすべてにおけるアスパラギンがグルタミンで置換されている変異型PD-1を発現する293T細胞を用いて、PD-1/PD-L1結合アッセイで、PD-L1への結合におけるPD-1のグリコシル化の役割を試験した。したがって、変異型4NQは、N49Q/N58Q/N79Q/N116Qである。細胞を蛍光標識PD-L1-Fc融合タンパク質と共にインキュベートした。Incucyte(商標)Zoomを製造業者の指示に従って用いて、リガンドおよび受容体結合を1時間ごとに定量した。図1Aは、野生型、すなわちグリコシル化されている、PD-1を発現する細胞がPD-L1-Fc融合タンパク質により緑色に染色されることを示す。その一方で、図1Bは、標識PD-L1-Fc融合体が、グリコシル化されていない4NQ変異型PD-1を発現する細胞と結合しないことを示す。図1Cは、野生型、グリコシル化PD-1発現細胞および4NQ変異型、非グリコシル化PD-1発現細胞に関する緑色染色レベルを24時間にわたって示すグラフである。野生型、グリコシル化PD-1発現細胞へのPD-L1-Fcの結合は、24時間にわたって増加するが、4NQ、非グリコシル化変異型PD-1発現細胞へのPD-L1-Fc結合は、ほとんどない。この実験は、PD-L1が、非グリコシル化PD-1と結合するよりはるかに大きい親和性でグリコシル化PD-1と結合することを実証する。

#### 【0246】

グリコシル化がPD-1-PD-L1会合に必要なかどうかを判定するために、共免疫沈降およびウェスタンブロット分析を行って、PD-1WTまたは4NQ発現293T細胞におけるPD-1とPD-L1の相互作用を評価した。PD-1WTおよび4NQ発現293T細胞の溶解物をPD-L1/Fc癒合タンパク質と共にまたはなしでイン

キュベートし、その後、PD-1タンパク質を抗Flag樹脂で免疫沈降し、PD-L1/Fcを検出するために抗ヒトIgG-HRP、およびPD-1タンパク質を検出するために抗Flag抗体を用いてウェスタンブロットにより分析した。図1Dに示されているように、PD-L1/Fcを野生型と共にインキュベートするとPD-LへのPD-L1結合が(最上列に抗hIgG-HRP抗体により検出された通り)観察されるが、PD-L1/Fcを非グリコシル化4NQ PD-1変異体と共にインキュベートすると観察されない。抗FLAG抗体は、野生型および4NQ PD-1タンパク質と対照としてのPD-L1/Fcの両方を検出した。結果は、グリコシル化がPD-L1とPD-1の会合に必要であることを裏付ける。

#### 【実施例2】

#### 【0247】

抗PD-1抗体の産生

標準的プロトコールによる、ヒトPD-1で免疫されたBALB/cマウス((n=6)(Antibody Solutions, Inc., Sunnyvale, CA, USA)から単離された脾細胞とSP2/0マウス骨髓腫細胞の融合により、グリコシル化ヒトPD-1に対して生成されたモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得た。融合前に、FACS分析を使用してヒト化マウスからの血清をPD-1免疫原への結合について検証した。モノクローナル抗体(MAb)産生ハイブリドーマを生成した。抗体を産生するハイブリドーマを再び特異性について試験した。

#### 【0248】

このために、100を超える候補MAB産生ハイブリドーマを選択し、ADCF培地で増殖させ、それらのモノクローナル抗体含有上清を濃縮および精製した。非グリコシル化PD-1と比較してグリコシル化PD-1への優先的結合についてそれらの候補モノクローナル抗体をスクリーニングした。PD-1 WT(完全にグリコシル化されたもの)を過剰発現するT293細胞にビオチンタグを付け、その後、それらの細胞を、完全非グリコシル化PD-1を過剰発現するT293細胞と混合した。混合された細胞をPD-1に対する一次抗体と共にインキュベートし、FITCとコンジュゲートした二次抗体でさらに洗浄した。洗浄後、蛍光強度(MFI)を測定して、膜に結合したグリコシル化または非グリコシル化PD-1への抗体の相対結合を評価した。グリコシル化PD-1に関して非グリコシル化PD-1より有意に高いMFIを示す抗体を抗glycPD-1抗体として同定した。

#### 【0249】

生細胞イメージングアッセイ、Incucyte(商標)(Essen Bioscience)を使用して、精製MABを、PD-L1とPD-1間の相互作用(PD-L1/PD-1結合相互作用)を中和または阻害するそれらの能力について試験した。このアッセイのために、PD-1を発現する293T細胞を抗ヒトPD-1抗体と共に、および蛍光標識PD-L1-Fc融合タンパク質と共にインキュベートした。Incucyte(商標)Zoomを製造業者の指示に従って用いて、リガンドおよび受容体結合を1時間ごとに定量した。

#### 【0250】

非グリコシル化PD-1と比較してグリコシル化PD-1と優先的に結合する2つの抗glycPD-1抗体、STM413およびSTM432を同定した。これらのモノクローナル抗体の重鎖および軽鎖可変ドメインの配列を表3に提供する。BIACORE(登録商標)アッセイを使用して、これらの抗体をグリコシル化PD-1に対する結合動態について特性解析した。結果を下の表6に提供する。

#### 【0251】

10

20

30

40

50

## 【表 6】

表 6.PD-1 への抗 glyco-PD-1 抗体結合の BIACORE アッセイ。

抗体	抗原	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)
STM418	PD-1-His	$8.44 \times 10^4$	$7.78 \times 10^{-6}$	$9.22 \times 10^{-11}$
STM432	PD-1-His	$1.79 \times 10^4$	$5.30 \times 10^{-3}$	$2.96 \times 10^{-7}$

## 【0252】

抗体 - 抗原架橋とグリコシル化 PD - 1 ペプチド断片に関する高質量 MALDI 分析を使用して、グリコシル化 PD - 1 上の STM418 エピトープを決定した。抗体のエピトープは、配列番号 1 の 36、38、51、53、55、109、115、118 および 121 位の抗体 - 抗原架橋実験により同定された結合接触点に下線が引かれている、下記の配列番号 1 のアミノ酸 34 ~ 44、49 ~ 59 および 104 ~ 124 のグリコシル化 PD - 1 の領域であると決定した：

34 P P T E S P A L L V V 44 ... 49 N A T F T C S F S N T 59 ... 104 R D F H M  
S V V R A R R N D S G T Y L C G 124

(配列番号 1 のアミノ酸 34 ~ 44、49 ~ 59 および 104 ~ 124)。

## 【0253】

抗体 - 抗原架橋と高質量 MALDI 分析を使用して、グリコシル化 PD - 1 上の STM432 エピトープを決定した。ヒト PD - 1 配列におけるエピトープを以下の通り決定した。  
91 D C R E R V T Q L P N G R D F H M 107 - - - - - 123 C  
G A I S L A P K A Q I 134

(配列番号 1 のアミノ酸 91 ~ 107 および 123 ~ 134)。エピトープは、配列番号 1 における PD - 1 のアミノ酸配列の D91 位から M107 位そしてその後 C123 から I134 に広がる。下線を引かれている位置 R95、R103、S127 および K131 は、PD - 1 抗体への架橋を示した位置である。

## 【0254】

モノクローナル抗体 STM418 および STM432 を、グリコシル化野生型および変異型 PD - 1 - Fc (変異型 PD - 1 タンパク質は、アスパラギン (N) のグルタミン (Q) の変異によって 1 つまたは複数のグリコシル化部位が除去されている)、ならびに PNGase F で処置してグリコシル化を酵素的に除去した野生型 PD - 1 への結合について、ウェスタンブロット分析により試験した。各々 0.5 μg の PD - 1 - Fc タンパク質 (野生型おならびに変異型 N49Q、N58Q および N74Q) および PNGase F 処置野生型 PD - 1 をウェスタンブロット分析により分析し、STM418 および STM432 でプロービングし、ヤギ抗マウス二次抗体で検出した。図 2 は、STM418 が、グリコシル化野生型 PD - 1、ならびに 49 および 58 位のグリコシル化部位が変異型である (すなわち、74 および 116 位でグリコシル化されている) PD - 1 と結合するが、74 位に変異型グリコシル化部位を有する PD - 1 とも、PNGase F での処置により脱グリコシル化された野生型 PD - 1 とも結合しないことを示す。STM432 は、野生型グリコシル化 PD - 1、および 58 位に変異型グリコシル化部位を有する PD - 1 と結合するが、49 または 74 位のいずれかに変異型グリコシル化部位を有する PD - 1 とも、PNGase F での処置により脱グリコシル化された野生型 PD - 1 とも結合しない。

## 【0255】

フローサイトメトリーを使用して、野生型 PD - 1、変異型 PD - 1 タンパク質を発現する 293T 細胞または対照 293T 細胞への抗 glyco PD - 1 抗体の結合をアッセイした。野生型 PD - 1、N49Q PD - 1、N58Q PD - 1、N74Q PD - 1、N116Q PD - 1、および 4NQ PD - 1 (49、58、74 および 116 位における

10

20

30

40

50

置換であるNからQへの変異)を発現する293T細胞、ならびにPD-1を発現しない対照293T細胞への、STM418およびSTM432の結合をアッセイした。図3Aおよび3Bは、抗glycPD-1抗体または対照および蛍光標識二次抗体とのインキュベーション後の細胞のフローサイトメトリーの結果であって、MFI、すなわち測定蛍光強度、として測定された結果を表す。図3Cは、対照マウスIgGのインキュベーションからの結果を示す。野生型および変異型PD-1タンパク質を発現する細胞ならびに対照細胞への抗glycPD-1抗体および対照抗体の結合についてのMFIを下の表7に提示する。データは、STM418が、非グリコシル化4NQ変異型PD-1との結合についてのMFIより約128倍大きいMFIで野生型、グリコシル化PD-1と結合すること、およびSTM432が、非グリコシル化4NQ変異型PD-1との結合についてのMFIより約43倍大きいMFIで野生型、グリコシル化PD-1と結合することを示す。

【0256】

【表7】

表7.PD-1発現細胞への抗glycPD-1抗体結合についてのMFI値。

MAb	293T WTPD-1 MFI	293T N49PD-1 MFI	293T N58PD-1 MFI	293T N74PD-1 MFI	293T N116PD-1 MFI	293T 4NQPD-1 MFI	293T ブ ランク MFI
STM418	3610	607	880	971	108	28	27
STM432	1136	32	413	29	31	26	29
マウス IgG	52	31	106	26	28	26	27

【実施例3】

【0257】

抗glycPD-1抗体中和活性

PD-1タンパク質とPD-L1タンパク質の相互作用の抗体による阻害を測定するために、

PD-1を発現する293T細胞を96ウェルプレートに播種し、STM418またはSTM432抗体、組換えヒトPD-L1-Fcタンパク質および抗ヒト-Fc Alexa Fluor 488色素コンジュゲート(Life Technologies、Carlsbad、CA、US)と共にインキュベートした。緑色蛍光をIncucyte(商標)Zoomデバイスにより2時間ごとに測定し、Incucyte(商標)Zoomソフトウェア(Essen BioScience、Ann Arbor、MI、USA)により定量した。図4Aは、0.03μg/ml~4.0μg/mlの抗glycPD-1抗体濃度の存在下でのPD-L1-FcのPD-1発現細胞への結合を18時間にわたって示す。STM418は、PD-1発現細胞へのPD-L1-Fc結合を濃度依存的に阻害する。図4Bは、0.132μg/mlのEC50を計算するための、PD-1-PD-L1結合の活性パーセントに対するSTM418の濃度のプロットである。図5Aは、0.03μg/ml~4.0μg/mlの抗glycPD-1抗体STM432濃度の存在下でのPD-L1-FcのPD-1発現細胞への結合を18時間にわたって示す。STM432は、PD-1発現細胞へのPD-L1-Fc結合を濃度依存的に阻害する。図5Bは、0.110μg/mlのEC50を計算するための、PD-1-PD-L1結合の活性パーセントに対するSTM432の濃度のプロットである。

【実施例4】

【0258】

T細胞殺滅に対する抗glycPD-1抗体の効果

T細胞の存在下でのがん細胞に対する抗glycPD-1抗体の効果のアッセイするために、磁気CD3単離抗体キットによりヒトPBMCからT細胞を単離し、その後、CD3抗体100ng/mlおよびIL-210ng/mlとの72時間のインキュベーションにより活性化した。10μg/ml SMT418、STM432抗体または対照

としてのm I g G 1アイソタイプと共にR P M I 1 6 4 0培地が入っている9 6 ウェルプレートに前もって播種した、Nuc L i g h t Red L e n t i v i r u s 試薬 ( E s s e n B i o S c i e n c e , A n n A r b o r , M I , U S A ) で標識されたB T 5 4 9 がん細胞に、それらの活性化したT細胞を添加した。I n c u c y t e Z o o m ( E s s e n B i o s c i e n c e s ) を使用して、I n c u c y t e Z o o m 2 0 1 6 ソフトウェアにより計算される赤色核画像数 ( 増殖 ) によって、経時的にがん細胞のT細胞殺滅を検出した。図6は、対照マウスI g G アイソタイプと共にインキュベートした活性化T細胞の存在下でのがん細胞と比較して、活性化T細胞およびS T M 4 1 8 またはS T M 4 3 2 抗体のどちらかの存在下でのがん細胞についての増殖の低減を、9 0 時間にわたって示す。

10

#### 【実施例5】

#### 【0259】

#### 抗体ヒト化

上に示したように、例えばヒト疾患のi n v i v o 処置における使用を含む、ある特定の目的のためには、マウスモノクローナル抗体のヒト化誘導体を用いるほうが好ましい。そのようなヒト化抗体を形成するために、マウスモノクローナル抗体のフレームワーク配列 ( 「親」配列 ) を、まず、一連の「アクセプター」ヒト抗体のフレームワーク配列とアラインして、フレームワーク配列の差を同定する。親とアクセプター間で適合しないフレームワーク残基を置換することにより、ヒト化を果たす。パーニアゾーン、V H / V L 鎖間界面、またはC D R 基準クラス決定位置におけるものなどの、潜在的に重要な位置での置換を、予想される逆変異について分析した ( Foote, J. et al., J. Molec. Biol. 224: 487-499 (1992) を参照されたい ) 。

20

#### 【0260】

保存ドメインデータベース ( C O D ) ( Marchler-Bauer, et al.(2011) Nucleic Acids Res. 39:D225-D229 ) を使用して、各アミノ酸鎖のドメインの内容および各ドメインの近似的境界を決定することができる。可変ドメイン境界は、いくつかの一般に使用されている定義 ( Kabat, E. A. et al.(1991) “ Sequences of Proteins of Immunological Interest, ” Fifth Edition.NIH Publication No. 91-3242 ; Chothia, C. et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) ; Honegger, A. et al., J. Molec. Biol. 309(3):657-670 (2001) ) に従って、C D R の境界と共に正確に決定することができる。

30

#### 【0261】

M A F F T ( Katoh, K. et al., Nucleic Acids Res. 30: 3059-3066 (2002) ) を使用してマウスおよびヒト生殖系列配列への親配列の複数のアライメントを生成し、各アライメントのエントリーを、親配列との配列同一性に従って順序づける。1 0 0 % 配列同一性をクラスタリングし、冗長エントリーを排除することにより、参照セットを縮小して一意的な配列セットにする。

#### 【0262】

最適なアクセプターフレームワーク選択は、両方の鎖のフレームワークにわたってのアクセプターに対する総合親抗体配列同一性に基づくが、V H / V L 鎖間界面を構成する位置は特に興味深い。加えて、C D R のうちの5 個について定義された基準構造 ( Chothia, C. et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) ; Martin, A. C. et al., J. Molec. Biol. 263:800-815 (1996) ; Al-Laziniki, B. et al., J. Molec. Biol. 273:927-948(1997) ) の個別のセットに関係するC D R ループ長およびC D R 位置を生殖系列と比較して、両方が同じ界面残基を有し、かつ類似のC D R ループ立体構造を支持することが分かっている生殖系列フレームワークがどれであるのかを決定する。

40

#### 【0263】

ヒト生殖系列への親抗体の配列アライメントに基づいて、最も厳密に適合するエントリーを同定する。好ましいヒト生殖系列の選択は、要求される基準に基づく：( 1 ) フレームワークにわたっての配列同一性、( 2 ) 同一のまたは匹敵する鎖間界面残基、( 3 ) 親C D R の基準立体構造を有する支持ループ、( 4 ) 重鎖生殖系列と軽鎖生殖系列の組み合わせ

50

せが、発現される抗体において見いだされる、および(5)除去されなければならないN-グリコシル化部位の存在。

#### 【0264】

ヒト化抗体のFv領域の構造モデルを生成する。FRおよびCDRの候補構造鋳型断片、ならびに完全Fvを、標的とのそれらの配列同一性、およびオングストローム( )での、分解能などの、鋳型構造の定性的結晶学的基準に基づいて、スコアづけし、ランクづけし、抗体データベースから選択する。

#### 【0265】

構造的にFR鋳型にCDRをアラインするために、CDRの両側の5個の残基をCDR鋳型に含める。重複セグメントに基づいて断片のアライメントを生成し、構造配列アライメントを生成する。テンプレート断片をそのアライメントと共にMODELLER(Sall, A. et al.; J. Molec. Biol. 234:779-815(1993))によって処理した。このプロトコールは、アラインされた構造鋳型のセットに由来する立体構造の制約を生じる。この制約を充足する構造のアンサンブルを共役勾配および模擬アニーリング最適手順によって作出する。タンパク質構造スコアおよび立体構造制約充足から導出されるエネルギースコアに基づいて、このアンサンブルからモデル構造を選択するそのモデルを点検し、側鎖最適化アルゴリズムを使用して標的と鋳型間で異なった位置の側鎖を最適化し、エネルギーを最小にする。一式の可視化および計算ツールを使用して、CDR立体構造多様性、局所充填および表面分析を評価して、1つまたは複数の好ましいモデルを選択する。

#### 【0266】

親抗体の構造モデルを構築し、不良な原子充填、結合長、結合角または二面角の歪みなどの欠陥について点検する。これらの欠陥は、抗体の構造安定性に関する潜在的問題点を示しうる。このモデリングプロトコールは、そのような欠陥を最小にしようとするものである。ヒト化Fvの初期構造モデルは、安全な置換(すなわち、結合親和性または安定性に影響を与えるはずがない置換)および注意を要する置換(すなわち、位置置換が行われるが、その位置が結合親和性にとって重要であることもある)すべてを含んでいる。結合親和性低下または安定性低下のリスクに関連すると考えられる位置での置換が変更されない。鋳型の検索および選択を親鋳型検索とは別に行って、厳密に適合する親のバリエーションモデルではなく良好な独立型モデルを作出する。可能性のある置換の評価を行うときに、モデルがアップデートされて、好ましい置換および逆変異の効果を反映する。

#### 【0267】

本出願を通して様々な刊行物を参照してきた。これらの刊行物の開示、それら全体が、本開示が関係する技術分野の現状をより十分に説明するために参照によって本明細書により本出願に組み入れられている。ある特定の実施形態の例を本明細書で提供するが、様々な変更および修飾を加えることができることは当業者には理解されるであろう。そのような修飾形態も添付の特許請求の範囲内に入ることを意図している。

本発明は次の実施態様を含む。

#### [1]

非グリコシル化PD-1と比較してグリコシル化PD-1と選択的に結合する単離されたモノクローナル抗体。

#### [2]

非グリコシル化PD-1と比較して、N49、N58、N74、N116位またはその任意の組み合わせでグリコシル化されたPD-1と選択的に結合する、上記[1]に記載の単離された抗体。

#### [3]

非グリコシル化PD-1に対して示される $K_d$ の10倍少ない $K_d$ でグリコシル化PD-1と結合する、上記[1]または[2]に記載の単離された抗体。

#### [4]

蛍光標識により直接または間接的に検出可能であり、細胞フローサイトメトリーアッセイで非グリコシル化PD-1を発現する細胞への抗体結合により示されるMFIより10



倍～50倍高い測定蛍光強度(MFI)でグリコシル化PD-1を発現する細胞と優先的に結合する、上記[1]～[3]のいずれかに記載の単離された抗体。

[5]

PD-1のN49、N58、N74およびN116のうちの1カ所または複数カ所でのグリコシル化を遮蔽する、上記[1]～[4]のいずれかに記載の単離された抗体。

[6]

配列番号1のアミノ酸34～44、49～59、および104～124を含みかつ配列番号1の36、38、51、53、55、109、115、118および121位のアミノ酸で接触するグリコシル化PD-1のエピトープと、または配列番号1のアミノ酸91～107および123～134を含みかつ配列番号1の95、103、127および131位のアミノ酸で接触するグリコシル化PD-L1のエピトープと特異的に結合する、上記[1]～[5]のいずれかに記載の単離された抗体。

10

[7]

グリコシル化PD-1との特異的結合についてMAb STM418またはMAb STM432と競合または交差競合する、上記[1]～[6]のいずれかに記載の単離された抗体。

[8]

V<sub>H</sub>ドメインが、配列番号3のアミノ酸配列を有し、V<sub>L</sub>が、配列番号5のアミノ酸配列を有する、上記[1]～[5]のいずれかに記載の単離された抗体。

[9]

20

V<sub>H</sub>ドメインが、配列番号23のアミノ酸配列を有し、V<sub>L</sub>ドメインが、配列番号25のアミノ酸配列を有する、上記[1]～[5]のいずれかに記載の単離された抗体。

[10]

V<sub>H</sub>ドメインが、配列番号3または配列番号23のアミノ酸配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を有する、上記[1]～[5]のいずれかに記載の単離された抗体。

[11]

V<sub>L</sub>ドメインが、配列番号5または配列番号25のアミノ酸配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を有する、上記[1]～[5]または[10]のいずれかに記載の単離された抗体。

[12]

30

配列番号6のアミノ酸配列を有するCDR<sub>H1</sub>と、配列番号7のアミノ酸配列を有するCDR<sub>H2</sub>と、配列番号8のアミノ酸配列を有するCDR<sub>H3</sub>とを含むV<sub>H</sub>ドメイン；または配列番号9のアミノ酸配列を有するCDR<sub>H1</sub>と、配列番号10のアミノ酸配列を有するCDR<sub>H2</sub>と、配列番号8のアミノ酸配列を有するCDR<sub>H3</sub>とを含むV<sub>H</sub>ドメイン；または配列番号11のアミノ酸配列を有するCDR<sub>H1</sub>と、配列番号12のアミノ酸配列を有するCDR<sub>H2</sub>と、配列番号8のアミノ酸配列を有するCDR<sub>H3</sub>とを含むV<sub>H</sub>ドメイン；または配列番号13のアミノ酸配列を有するCDR<sub>H1</sub>と、配列番号14のアミノ酸配列を有するCDR<sub>H2</sub>と、配列番号15のアミノ酸配列を有するCDR<sub>H3</sub>とを含むV<sub>H</sub>ドメインを有する、上記[1]～[5]のいずれかに記載の単離された抗体。

40

[13]

配列番号16のアミノ酸配列を有するCDR<sub>L1</sub>と、配列番号17のアミノ酸配列を有するCDR<sub>L2</sub>と、配列番号18のアミノ酸配列を有するCDR<sub>L3</sub>とを含むV<sub>L</sub>ドメイン；または配列番号19のアミノ酸配列を有するCDR<sub>L1</sub>と、配列番号20のアミノ酸配列を有するCDR<sub>L2</sub>と、配列番号21のアミノ酸配列を有するCDR<sub>L3</sub>とを含むV<sub>L</sub>ドメインを有する、上記[1]～[5]または[12]のいずれかに記載の単離された抗体。

[14]

配列番号26のアミノ酸配列を有するCDR<sub>H1</sub>と、配列番号27のアミノ酸配列を有するCDR<sub>H2</sub>と、配列番号28のアミノ酸配列を有するCDR<sub>H3</sub>とを含むV<sub>H</sub>ドメ

50

イン；または配列番号 29 のアミノ酸配列を有する C D R H 1 と、配列番号 30 のアミノ酸配列を有する C D R H 2 と、配列番号 28 のアミノ酸配列を有する C D R H 3 とを含む V<sub>H</sub> ドメイン；または配列番号 31 のアミノ酸配列を有する C D R H 1 と、配列番号 32 のアミノ酸配列を有する C D R H 2 と、配列番号 28 のアミノ酸配列を有する C D R H 3 とを含む V<sub>H</sub> ドメイン；または配列番号 33 のアミノ酸配列を有する C D R H 1 と、配列番号 34 のアミノ酸配列を有する C D R H 2 と、配列番号 55 のアミノ酸配列を有する C D R H 3 とを含む V<sub>H</sub> ドメインを有する、上記 [ 1 ] ~ [ 5 ] または [ 1 3 ] のいずれかに記載の単離された抗体。

[ 1 5 ]

配列番号 36 のアミノ酸配列を有する C D R L 1 と、配列番号 37 のアミノ酸配列を有する C D R L 2 と、配列番号 38 のアミノ酸配列を有する C D R L 3 とを含む V<sub>L</sub> ドメイン；または配列番号 39 のアミノ酸配列を有する C D R L 1 と、配列番号 40 のアミノ酸配列を有する C D R L 2 と、配列番号 41 のアミノ酸配列を有する C D R L 3 とを含む V<sub>L</sub> ドメインを有する、上記 [ 1 ] ~ [ 5 ] または [ 1 4 ] のいずれかに記載の単離された抗体。

[ 1 6 ]

配列番号 6、配列番号 7 および配列番号 8 のアミノ酸配列をそれぞれ有する、または配列番号 9、配列番号 10 および配列番号 8 のアミノ酸配列をそれぞれ有する、または配列番号 11、配列番号 12 および配列番号 8 のアミノ酸配列をそれぞれ有する、または配列番号 13、配列番号 14 および配列番号 15 のアミノ酸配列をそれぞれ有する、1、2 または 3 つの C D R に 1、2、3、4 または 5 つのアミノ酸置換があるアミノ酸配列を有する、C D R H 1、H 2 および H 3 を含む V<sub>H</sub> ドメインを有する、上記 [ 1 ] ~ [ 5 ] のいずれかに記載の単離された抗体。

[ 1 7 ]

配列番号 16、配列番号 17 および配列番号 18 のアミノ酸配列をそれぞれ有する、または配列番号 19、配列番号 20 および配列番号 21 のアミノ酸配列をそれぞれ有する、1、2 または 3 つの C D R に 1、2、3、4 または 5 つのアミノ酸置換があるアミノ酸配列を有する、C D R L 1、L 2 および L 3 を含む V<sub>L</sub> ドメインを有する、上記 [ 1 ] ~ [ 5 ] または [ 1 6 ] のいずれかに記載の単離された抗体。

[ 1 8 ]

配列番号 26、配列番号 27 および配列番号 28 のアミノ酸配列をそれぞれ有する、または配列番号 29、配列番号 30 および配列番号 28 のアミノ酸配列をそれぞれ有する、または配列番号 31、配列番号 32 および配列番号 28 のアミノ酸配列をそれぞれ有する、または配列番号 33、配列番号 34 および配列番号 35 のアミノ酸配列をそれぞれ有する、1、2 または 3 つの C D R に 1、2、3、4 または 5 つのアミノ酸置換があるアミノ酸配列を有する、C D R H 1、H 2 および H 3 を含む V<sub>H</sub> ドメインを有する、上記 [ 1 ] ~ [ 5 ] または [ 1 7 ] のいずれかに記載の単離された抗体。

[ 1 9 ]

配列番号 36、配列番号 37 および配列番号 38 のアミノ酸配列をそれぞれ有する、または配列番号 39、配列番号 40 および配列番号 41 のアミノ酸配列をそれぞれ有する、1、2 または 3 つの C D R に 1、2、3、4 または 5 つのアミノ酸置換があるアミノ酸配列を有する、C D R L 1、L 2 および L 3 を含む V<sub>L</sub> ドメインを有する、上記 [ 1 ] ~ [ 5 ] または [ 1 8 ] のいずれかに記載の単離された抗体。

[ 2 0 ]

ヒトフレームワーク領域を有する、上記 [ 1 2 ] ~ [ 1 9 ] のいずれかに記載の単離された抗体。

[ 2 1 ]

1、2、3、4、5 または 6 つのアミノ酸置換がある重鎖または軽鎖ヒトフレームワーク領域を有する、上記 [ 2 0 ] に記載の単離された抗体。

[ 2 2 ]

10

20

30

40

50

ヒト定常ドメインを含む、上記 [ 1 ] ~ [ 2 1 ] のいずれかに記載の単離された抗体。  
[ 2 3 ]

I g G、I g M、I g Aまたはそれらの抗原結合断片である、上記 [ 1 ] ~ [ 2 2 ] の  
いずれかに記載の単離された抗体。

[ 2 4 ]

F a b'、F ( a b' )<sub>2</sub>、F ( a b' )<sub>3</sub>、一価 s c F v、二価 s c F v、または単一ド  
メイン抗体である、上記 [ 1 ] ~ [ 2 2 ] のいずれかに記載の単離された抗体。

[ 2 5 ]

ヒト抗体またはヒト化抗体である、上記 [ 1 ] ~ [ 5 ] のいずれかに記載の単離された  
抗体。

[ 2 6 ]

イメージング剤、化学療法剤、毒素または放射性核種とコンジュゲートされている、上  
記 [ 1 ] ~ [ 2 5 ] のいずれかに記載の単離された抗体。

[ 2 7 ]

薬学的に許容される担体中に上記 [ 1 ] ~ [ 2 6 ] のいずれかに記載の単離された抗体  
を含む組成物。

[ 2 8 ]

がんを有する対象を処置する方法であって、薬学的に許容される組成物中の有効量の上  
記 [ 1 ] ~ [ 2 6 ] のいずれかに記載の単離された抗体を前記対象に投与することを含む  
方法。

[ 2 9 ]

前記がんが、乳がん、肺がん、頭頸部がん、前立腺がん、食道がん、気管がん、皮膚が  
ん、脳がん、肝臓がん、膀胱がん、胃がん、膵臓がん、卵巣がん、子宮がん、子宮頸がん  
、精巣がん、結腸がん、直腸がんまたは皮膚がんである、上記 [ 2 8 ] に記載の方法。

[ 3 0 ]

前記単離された抗体が、静脈内、皮内、腫瘍内、筋肉内、腹腔内、皮下または局所投与  
される、上記 [ 2 9 ] に記載の方法。

[ 3 1 ]

少なくとも第 2 の抗がん療法を前記対象に施すことをさらに含む、上記 [ 2 8 ] ~ [ 3  
0 ] のいずれかに記載の方法。

[ 3 2 ]

前記第 2 の抗がん療法が、外科手術療法、化学療法、放射線療法、凍結療法、ホルモン  
療法、免疫療法またはサイトカイン療法である、上記 [ 3 1 ] に記載の方法。

[ 3 3 ]

前記第 2 の抗がん療法が、抗 P D - 1 抗体、抗 P D - L 1 抗体、または抗 C T L A - 4  
抗体である、上記 [ 3 1 ] に記載の方法。

[ 3 4 ]

前記第 2 の抗がん療法が、ペムブロリズマブ、ニボルマブ、ピディリズマブ、アテゾリ  
ズマブ、デュルバルマブ、アベルマブまたはイピリムマブである、上記 [ 3 3 ] に記載の  
方法。

[ 3 5 ]

前記第 2 の抗がん療法が、非グリコシル化 P D - L 1 と比較してグリコシル化 P D - L  
1 と優先的に結合する抗 P D - L 1 抗体である、上記 [ 3 3 ] に記載の方法。

[ 3 6 ]

前記第 2 の抗がん療法が、抗グリコシル化 P D - L 1 モノクローナル抗体、S T M 0 0  
4、S T M 0 7 3、S T M 1 0 8 または S T M 1 1 5 のヒト化またはキメラ化抗体である  
、上記 [ 3 5 ] に記載の方法。

[ 3 7 ]

P D - 1 グリコシル化を評価する方法であって、P D - 1 含有試料を上記 [ 1 ] に記載  
の抗体と接触させることを含む方法。

10

20

30

40

50

[ 3 8 ]

*in vitro*方法としてさらに定義される、上記[ 3 7 ]に記載の方法。

[ 3 9 ]

前記試料が、細胞試料である、上記[ 3 9 ]に記載の方法。

【図面】

【図 1】

【図 2】

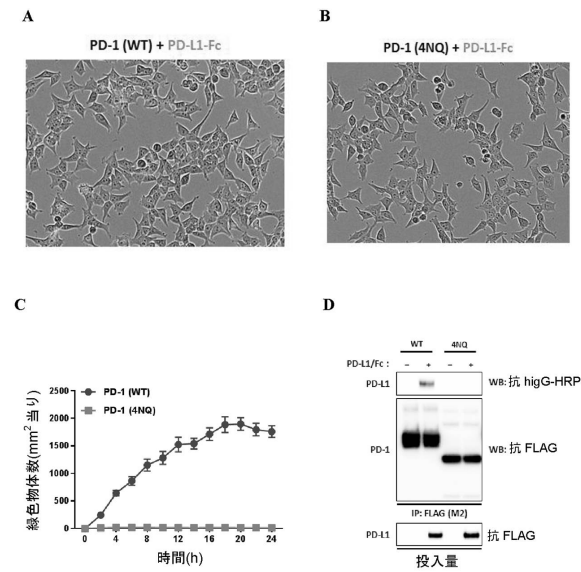


図 1A~D

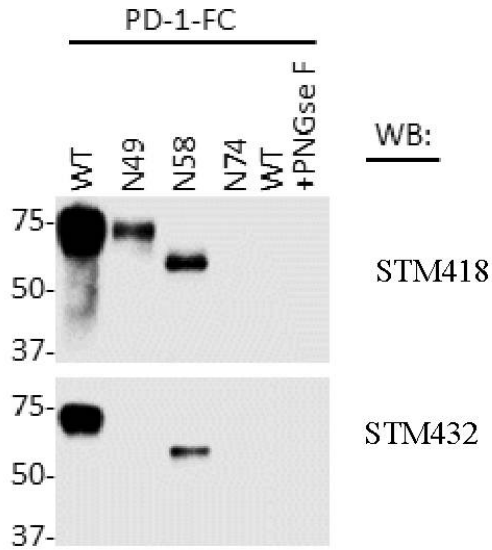


図 2

【図 3 A】

【図 3 B】

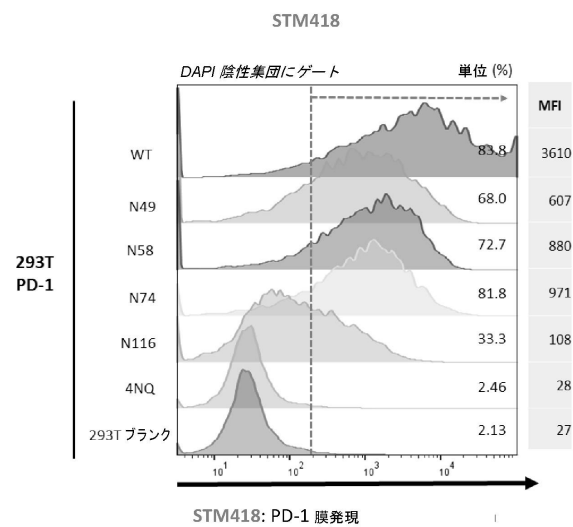


図 3A

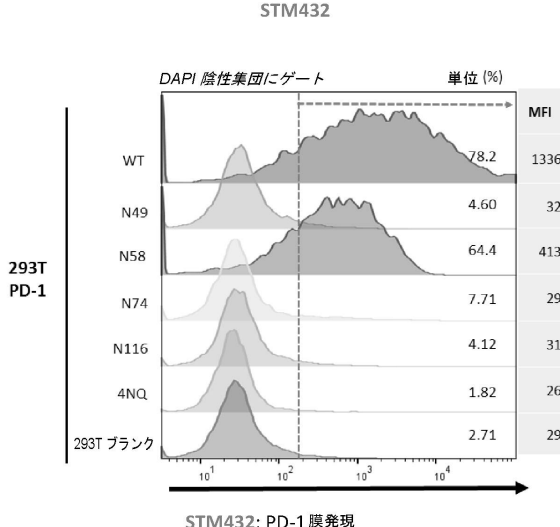


図 3B

10

20

30

40

50

【図 3 C】

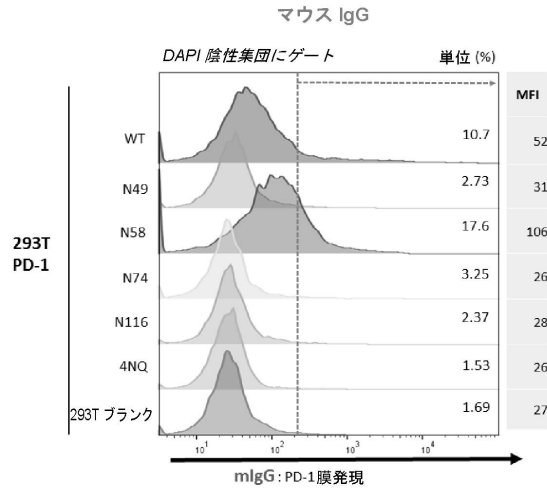


図 3C

【図 4】

図 4A

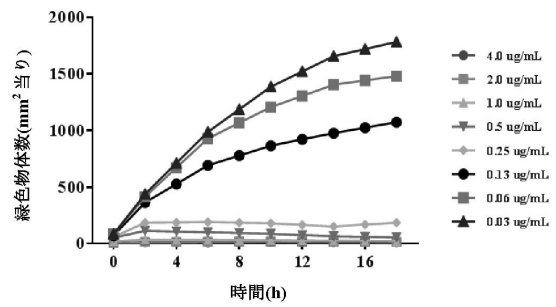
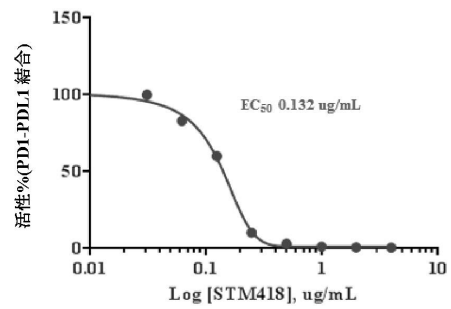


図 4B



【図 5】

図 5A

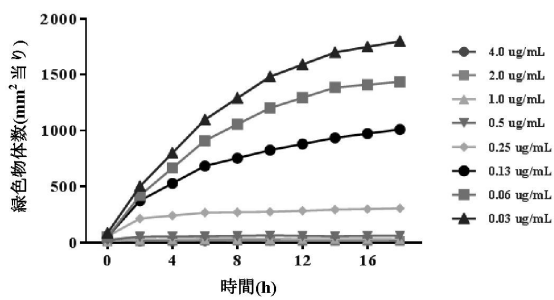
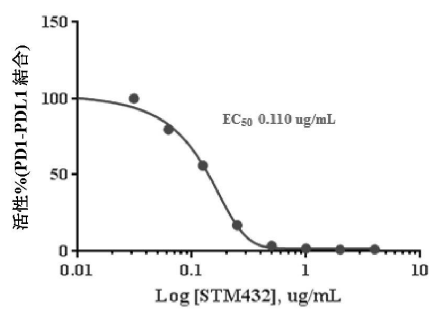
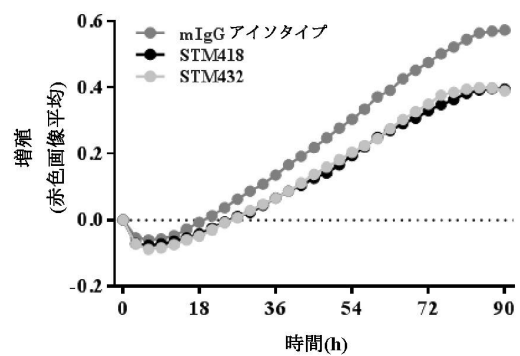


図 5B



【図 6】

図 6



10

20

30

40

50

【配列表】  
0007003036000001.app

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

F I

<b>A 6 1 K</b>	<b>47/68</b>	<b>(2017.01)</b>	<b>A 6 1 K</b>	<b>51/10</b>	<b>1 0 0</b>
<b>G 0 1 N</b>	<b>33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 K</b>	<b>45/00</b>	
<b>C 0 7 K</b>	<b>16/28</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 K</b>	<b>47/68</b>	
<b>A 6 1 P</b>	<b>35/00</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>G 0 1 N</b>	<b>33/53</b>	<b>D</b>
<b>C 1 2 P</b>	<b>21/08</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 0 7 K</b>	<b>16/28</b>	
			<b>A 6 1 P</b>	<b>35/00</b>	
			<b>C 1 2 P</b>	<b>21/08</b>	

2 1 0 West 7 th Street Austin , Texas 7 8 7 0 1 U . S . A .

(74)代理人 100092783

弁理士 小林 浩

(74)代理人 100120134

弁理士 大森 規雄

(74)代理人 100103182

弁理士 日野 真美

(74)代理人 100181168

弁理士 丸山 智裕

(72)発明者 ユ, ステファン エス .

アメリカ合衆国 バージニア州 2 0 1 2 0 , センタービル, ジュール スター ドライブ 5 2 3 3

(72)発明者 チュン, エズラ エム .

アメリカ合衆国 メリーランド州 2 0 8 7 8 , ノース ポトマック, チザム ランディング ウェイ  
1 4 7 4 0

(72)発明者 キム, ヨン - ス

アメリカ合衆国 メリーランド州 2 0 8 5 2 , ロックビル, ローリンズ アベニュー 2 6 7

(72)発明者 リム, スン - ウェ

アメリカ合衆国 テキサス州 7 7 0 3 0 , ハウストン, アンダーウッド ストリート 2 4 2 5 ,  
アパートメント 2 5 6

(72)発明者 リ, チア - ウェイ

アメリカ合衆国 テキサス州 7 7 0 3 0 , ハウストン, ケンブリッジ ストリート 7 9 0 1 , ア  
パートメント 2

(72)発明者 フン, ミン - チエ

アメリカ合衆国 テキサス州 7 7 0 9 6 , ハウストン, バードウッド ロード 5 7 6 2

審査官 玉井 真人

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 7 / 0 5 5 4 4 3 ( W O , A 1 )

国際公開第 2 0 0 8 / 1 5 6 7 1 2 ( W O , A 1 )

特表 2 0 1 0 - 5 3 0 7 5 3 ( J P , A )

国際公開第 2 0 0 6 / 1 2 1 1 6 8 ( W O , A 1 )

特開 2 0 0 6 - 3 4 0 7 1 4 ( J P , A )

国際公開第 2 0 1 5 / 0 3 5 6 0 6 ( W O , A 1 )

"PHARMACOLOGY REVIEW(S), APPLICATION NUMBER:125554Orig1s000, Opdivo (nivolu  
mab)", 2014.12.4, retrieved on 2020.10.27, retired from the Intetrnet, URL:https://ww  
w.accessdata.fda.gov/drugsatfda\_docs/nda/2014/125554Orig1s000PharmR.pdf

Cancer Immunol Res, 2014, Vol.2, pp.846-856 and Supplementary Information

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 0 7 K 1 6 / 0 0 - 1 6 / 4 6

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T  
N )