

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-518068
(P2019-518068A)

(43) 公表日 令和1年6月27日(2019.6.27)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/30 (2006.01)	C07K 16/30 ZNA	4B064
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28	4C085
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/46	4H045
C12N 15/13 (2006.01)	C12N 15/13	
C12P 21/08 (2006.01)	C12P 21/08	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 86 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-503385 (P2019-503385)
 (86) (22) 出願日 平成29年3月24日 (2017. 3. 24)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年11月28日 (2018. 11. 28)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2017/024024
 (87) 国際公開番号 W02017/172517
 (87) 国際公開日 平成29年10月5日 (2017. 10. 5)
 (31) 優先権主張番号 62/314, 940
 (32) 優先日 平成28年3月29日 (2016. 3. 29)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/361, 298
 (32) 優先日 平成28年7月12日 (2016. 7. 12)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

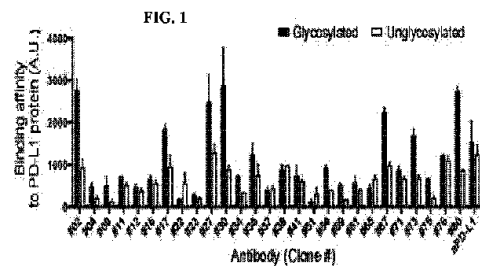
(71) 出願人 518345837
 エスティーキューブ アンド カンパニー
 , インコーポレイテッド
 大韓民国 ソウル 135-729, ガン
 ナム-グ, ヨンドン-デロ, 511, トレ
 ード センター トレード タワー, # 3
 014
 (71) 出願人 500039463
 ボード・オブ・リージェンツ, ザ・ユニバ
 ーシテイ・オブ・テキサス・システム
 アメリカ合衆国 テキサス 78701,
 オースティン, ウェスト 7ティーエイチ
 ストリート 210
 (74) 代理人 100092783
 弁理士 小林 浩

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 グリコシル化免疫チェックポイントタンパク質に特異的に結合する抗体を選択する方法

(57) 【要約】

非グリコシル化免疫チェックポイントタンパク質 (ICP) と比較してグリコシル化 ICP に特異的に結合する抗体を産生およびスクリーニングする方法を提供する。そのような抗体は、グリコシル化 ICP の特異的のエピトープを認識し、グリコシル化 ICP とそのリガンド、例えば別の ICP との結合を防止または遮断することができ、ヒト PD-L1 / PD-1 相互作用によって例証される、免疫抑制を引き起こしうる 2 つのタンパク質の間の相互作用を阻害することができる。特定の例として、PD-L1 または PD-1 にそれぞれ特異的に結合して、PD-L1 / PD-1 相互作用を阻害する抗グリコシル化 PD-L1 または抗グリコシル化 PD-1 抗体を生成するために、その細胞外ドメイン内にグリコシル化アミノ酸残基を含むヒト PD-L1 および PD-1 ポリペプチドを提供する。本方法によって産生および選択した抗体は、ICP 系およびその特異的 ICP 相互作用を妨害、遮断、または中和するためのがん治療薬として特に有用である。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

グリコシル化免疫チェックポイントタンパク質（ICP）抗原に優先的に結合する抗体を同定および単離する方法であって、

a) グリコシル化 ICP 抗原への特異的結合について抗体集団をスクリーニングするステップと、

b) 前記グリコシル化 ICP 抗原より前記 ICP 抗原の非グリコシル化形態への結合が弱いことについて、前記グリコシル化 ICP に特異的に結合する抗体をスクリーニングするステップと、

c) 前記 ICP の非グリコシル化形態より高い親和性で前記グリコシル化 ICP に結合する抗体を単離するステップとを含む方法。

10

【請求項 2】

前記抗体集団が、グリカン部分への結合によって改変された少なくとも 1 つのグリコシル化アスパラギン（N）アミノ酸を含む ICP の少なくとも 7 連続アミノ酸の断片を含むグリコシル化 ICP 抗原またはそのペプチドによって免疫した動物から得たモノクローナル抗体である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記スクリーニングステップの前に、

a) 動物において抗グリコシル化 ICP 特異的抗体の免疫応答を誘発するために有効な量で、グリカン部分への結合によって改変された少なくとも 1 つのグリコシル化アスパラギン（N）アミノ酸を含む ICP の少なくとも 7 連続アミノ酸の断片を含むグリコシル化 ICP 抗原またはそのペプチドを、レシピエント動物に投与するステップと、

b) 抗体集団を分泌するハイブリドーマ集団を前記動物から産生するステップとをさらに含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

20

【請求項 4】

前記動物がマウスまたはラットである、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記動物が、ヒト免疫グロブリンを発現する遺伝子についてトランスジェニックである、請求項 2 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 6】

前記抗体集団が、ファージディスプレイ抗体ライブラリである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記ファージ抗体ライブラリが、ヒト抗体レパトリーライブラリである、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記抗体を、ICP 抗原の非グリコシル化形態への抗体の結合によって示される K_d の半分より小さい K_d でのグリコシル化 ICP 抗原への結合について試験する、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 9】

前記抗体を、ICP 抗原の非グリコシル化形態への抗体の結合によって示される K_d の少なくとも 5 倍小さい K_d でのグリコシル化 ICP 抗原への結合について試験する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記抗体を、ICP 抗原の非グリコシル化形態への抗体の結合によって示される K_d の半分より小さい K_d でのグリコシル化 ICP 抗原への結合について試験する、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

蛍光標識によって直接または間接的に標識された前記抗体を、ICP 抗原の非グリコシ

50

ル化形態を発現する細胞への抗体の結合によって示される平均蛍光強度（MFI）値より少なくとも2倍から少なくとも20倍大きい、グリコシル化ICP抗原を発現する細胞への結合についてのMFI値で、グリコシル化ICP抗原への結合について試験する、請求項1から7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

前記抗体を、ICP抗原の非グリコシル化形態への前記抗体の結合によって示されるMFI値より少なくとも3倍から少なくとも5倍大きい、グリコシル化ICP抗原への結合についてのMFI値で、グリコシル化ICP抗原への結合について試験する、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

グリコシル化ICP抗原またはそのペプチドが腫瘍細胞またはがん細胞上に発現し、ICPリガンドが免疫細胞上に発現する、請求項1から12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

グリコシル化ICP抗原またはそのペプチドが免疫細胞上に発現し、ICPリガンドが腫瘍細胞またはがん細胞上に発現する、請求項1から12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

前記免疫細胞がエフェクターT細胞またはナチュラルキラー細胞（NK細胞）である、請求項13または14に記載の方法。

【請求項16】

前記ICPがヒトICPである、請求項1から15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

グリコシル化ICP抗原が、CD47、CD96、TIM-3、LAG-3、CEACAM1、BTN1A1、セマフォリン4D、プチロフィリン様2（BTNL2）、BTLA、PD-1およびPD-L1からなる群から選択される、請求項1から16のいずれか一項に記載の方法。

【請求項18】

前記グリコシル化ICPがPD-L1である、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

前記グリコシル化ICPがPD-1である、請求項17に記載の方法。

【請求項20】

前記グリコシル化ICPがCD47である、請求項17に記載の方法。

【請求項21】

前記グリコシル化ICPがCD96である、請求項17に記載の方法。

【請求項22】

前記グリコシル化ICPがTIM-3である、請求項17に記載の方法。

【請求項23】

前記グリコシル化ICPがLAG-3である、請求項17に記載の方法。

【請求項24】

前記グリコシル化ICPがCEACAM1である、請求項17に記載の方法。

【請求項25】

前記グリコシル化ICPがBTN1A1である、請求項17に記載の方法。

【請求項26】

前記グリコシル化ICPがセマフォリン4Dである、請求項17に記載の方法。

【請求項27】

前記グリコシル化ICPがBTNL2である、請求項17に記載の方法。

【請求項28】

前記グリコシル化ICPがBTLAである、請求項17に記載の方法。

【請求項29】

ステップ（a）および/またはステップ（b）でのスクリーニングがフローサイトメトリ分析によって行われる、請求項1から28のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 30】

前記 I C P の、その同起源の I C P 結合パートナーへの結合の阻害について前記抗体を試験するステップをさらに含む、請求項 1 から 29 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

前記抗体の相補性決定領域 (C D R) を含むアミノ酸を同定するステップ、およびヒト化抗体を産生するために C D R 周囲のアミノ酸配列をヒト化するステップをさらに含む、請求項 1 から 30 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 32】

ヒト化抗体を組み換え発現するステップをさらに含む、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記ヒトグリコシル化 I C P 抗原が、ヒト P D - L 1 の少なくとも 7 連続アミノ酸の断片を含む単離ポリペプチドであり、前記ポリペプチドが、ヒト P D - L 1 の N 3 5、N 1 9 2、N 2 0 0、または N 2 1 9 位に対応する少なくとも 1 つのアミノ酸を含み、P D - L 1 の N 3 5、N 1 9 2、N 2 0 0、または N 2 1 9 位に対応するアミノ酸の少なくとも 1 つがグリコシル化されている、請求項 2 から 32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

前記単離ポリペプチドが、ヒト P D - L 1 の少なくとも 8 ~ 2 0 連続アミノ酸を含む、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 35】

前記単離ポリペプチドが、そのアミノまたはカルボキシ末端で免疫原性ポリペプチドに融合またはコンジュゲートされる、請求項 3 3 または 3 4 に記載の方法。

【請求項 36】

前記ヒトグリコシル化 I C P 抗原が、ヒト P D - 1 の少なくとも 7 連続アミノ酸の断片を含む単離ポリペプチドであり、前記ポリペプチドが、ヒト P D - 1 の N 4 9、N 5 8、N 7 4、および / または N 1 1 6 位に対応する少なくとも 1 つのアミノ酸を含み、P D - 1 の N 4 9、N 5 8、N 7 4、および / または N 1 1 6 位に対応するアミノ酸の少なくとも 1 つがグリコシル化されている、請求項 2 から 32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 37】

前記単離ポリペプチドがヒト P D - 1 の少なくとも 8 ~ 2 0 連続アミノ酸を含む、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 38】

前記単離ポリペプチドが、そのアミノまたはカルボキシ末端で免疫原性ポリペプチドに融合またはコンジュゲートされる、請求項 3 6 または 3 7 に記載の方法。

【請求項 39】

前記抗体のエピトープと重複しないヒトグリコシル化 I C P のエピトープに結合する二次抗体の抗原結合ドメインを含む s c F v を、前記抗体の重鎖および / または軽鎖の N - 末端に連結するステップをさらに含む、請求項 1 から 3 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 40】

請求項 1 から 3 9 のいずれか一項に記載の方法に従って単離された単離抗体。

【請求項 41】

抗グリコシル化 P D - L 1 抗体である、請求項 4 0 に記載の単離抗体。

【請求項 42】

抗グリコシル化 P D - 1 抗体である、請求項 4 0 に記載の単離抗体。

【請求項 43】

ヒト化またはヒト抗体である、請求項 4 0 から 4 2 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 44】

組み換え抗体である、請求項 4 0 から 4 3 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 45】

I g M、I g G 1、I g G 2、I g G 2 a、I g G 2 b、I g G 3、I g G 4 からなる群から選択されるアイソタイプである、請求項 4 0 から 4 4 のいずれか一項に記載の単離

10

20

30

40

50

抗体。

【請求項 46】

F a b '、F (a b ')₂、F (a b ')₃、一価 s c F v、二価 s c F v、二重パラトープ性またはシングルドメイン抗体である、請求項 39 から 45 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 47】

二重特異性または二重パラトープ性抗体である、請求項 40 から 46 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 48】

造影剤、化学療法剤、毒素、抗新生物剤、または放射性核種にコンジュゲートされる、請求項 40 から 47 のいずれか一項に記載の抗体。 10

【請求項 49】

抗新生物剤とコンジュゲートして抗体 - 薬物コンジュゲート (A D C) を産生する、請求項 48 に記載の単離抗体。

【請求項 50】

前記抗新生物剤が、チューブリン重合化を阻害する薬剤である、請求項 49 に記載の単離抗体。

【請求項 51】

前記薬剤がメイタンシノイドまたはアウリスタチンである、請求項 50 に記載の単離抗体。 20

【請求項 52】

前記メイタンシノイドが、D M 1 (N 2 ' - デアセチル - N 2 ' - (3 - メルカプト - 1 - オキシプロピル) - メイタンシン)、または D M 4 (N 2 ' - デアセチル - n 2 ' - (4 - メルカプト - 4 - メチル - 1 - オキシペンチル) - 6 - メチルメイタンシンである、請求項 51 に記載の単離抗体。

【請求項 53】

前記アウリスタチンがモノメチルアウリスタチン E (M M A E) またはモノメチルアウリスタチン F (M M A F) である、請求項 50 に記載の単離抗体。

【請求項 54】

前記アウリスタチンが M M A E である、請求項 53 に記載の単離抗体。 30

【請求項 55】

前記抗体が、マレイミドおよびカプロン酸 (M C) 結合基に化学的にコンジュゲートされ、これがカテプシン切断可能リンカーに化学的にコンジュゲートされ、これがパラアミノ安息香酸 (P A B) スペーサーに化学的にコンジュゲートされ、これが M M A E に化学的にコンジュゲートされ、それによって A D C が形成された、請求項 54 に記載の単離抗体。

【請求項 56】

前記カテプシン切断可能リンカーがバリン - シトルリン (v c) である、請求項 55 に記載の単離抗体。

【請求項 57】

細胞に内在化される抗 g l y c I C P 抗体を含む A D C であって、前記抗体は細胞傷害薬に化学的にカップリングされたものである、A D C。 40

【請求項 58】

前記細胞傷害薬が、チューブリン重合化を阻害する薬剤である、請求項 57 に記載の A D C。

【請求項 59】

前記薬剤がメイタンシノイドまたはアウリスタチンである、請求項 58 に記載の A D C。

【請求項 60】

前記メイタンシノイドが D M 1 または D M 4 である、請求項 59 に記載の A D C。 50

【請求項 6 1】

前記アウリスタチンが M M A E または M M A F である、請求項 5 9 に記載の A D C。

【請求項 6 2】

前記アウリスタチンが M M A E である、請求項 6 1 に記載の A D C。

【請求項 6 3】

前記抗体が、M C 結合基に化学的にコンジュゲートされ、これがカテプシン切断可能リンカーに化学的にコンジュゲートされ、これが P A B スペーサーに化学的にコンジュゲートされ、これが M M A E に化学的にコンジュゲートされ、それによって A D C が形成された、請求項 5 7 に記載の A D C。

【請求項 6 4】

前記カテプシン切断可能リンカーがパリン - シトルリン (v c) である、請求項 6 3 に記載の A D C。

【請求項 6 5】

切断可能リンカーを介して M M A E に化学的にカップリングされた抗 g l y c I C P 抗体を含む A D C。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

配列表

本出願は、A S C I I フォーマットで電子提出され、参照により全体が本明細書に組み込まれる配列表を含む。2017年3月23日に作製された前記 A S C I I のコピーは、名称が 2 4 2 5 8 _ 1 0 5 0 0 6 P C T _ S L . t x t であり、大きさは 3 1 , 6 5 2 バイトである。

【0002】

本明細書に示す方法は、一般的に分子生物学、医学、および腫瘍学の分野に関する。より詳しくは、グリコシル化免疫チェックポイントタンパク質に特異的かつ優先的に結合する抗体を作製、選択、およびスクリーニングする方法を提供する。

【背景技術】

【0003】

免疫チェックポイント経路は、免疫チェックポイント分子（ポリペプチドおよびペプチド）を有する免疫細胞間の相互作用を伴い、正常な条件下では自己寛容を維持し、抗菌免疫応答の際の側副組織損傷を制限する。がんおよび腫瘍細胞は、免疫による破壊を逃れるためにこれらの経路を利用することができる。腫瘍細胞と免疫 T 細胞との相互作用を遮断するため、抗腫瘍免疫を提供するため、および持続的ながん縮小治療を媒介するために、抗 C T L A - 4、抗 P D - 1、抗 P D - L 1 抗体などの免疫チェックポイントを中断するための薬物が開発および試験中である。免疫チェックポイント経路の生物学は複雑であり、単独または併用で使用されるチェックポイント遮断薬の完全な活性スペクトルは、現在、集中的な研究の対象である (S. Topalian et al., 2015, Cancer Cell, 27(4): 450-461)。

【0004】

がん疾患の病因における交絡事象は、腫瘍が、特に腫瘍抗原に対して特異的である T 細胞に対する免疫耐性の主要なメカニズムとして、ある特定の免疫チェックポイント経路を組み込むことができるという点である。免疫チェックポイントの多くは、リガンド - 受容体相互作用によって開始されることから、それらは、抗体によって容易に遮断することができるか、またはリガンドもしくは受容体の組み換え形態によって調節することができる。例えば、細胞傷害性 T リンパ球関連抗原 4 (C T L A 4) 抗体は、米国食品医薬品局 (F D A) によって承認された最初の免疫治療剤であった。プログラム細胞死タンパク質 1 (P D - 1) などの追加の免疫チェックポイントタンパク質の遮断剤に関する知見から、永続的な臨床応答を生じる可能性を有する抗腫瘍免疫を増強する広く多様な機会があることが示される (D. Pardoll, 2012, Nature Reviews Cancer, 12:252-264)。P D - 1 に

10

20

30

40

50

対する治療抗体であるKEYTRUDA（登録商標）ペンブロリズマブおよびOPDIVO（登録商標）ニボルマブが、米国FDAによって承認されている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

医学界において、免疫チェックポイント分子、特に腫瘍細胞上で安定に発現して免疫T細胞上のリガンドに結合する免疫チェックポイント分子を特異的に認識して結合し、このようにして腫瘍細胞に対するT細胞活性の免疫抑制を促進する抗体を生成して選択する方法が必要である。同様に、腫瘍細胞を破壊して、最終的にがんを処置するために必要であるT細胞応答の免疫抑制を防止または阻害するために、エフェクターT細胞上の同起源の

10

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、腫瘍細胞上に発現する、例えばPD-L1などの、本明細書において「ICP」と省略する免疫チェックポイントタンパク質のグリコシル化が、免疫エフェクター細胞上の同起源のリガンド、例えばPD-1への結合を促進または増強し、それによって腫瘍細胞に対するT細胞活性の抑制を増加させること、およびPD-L1などのICPのグリコシル化が同様に、細胞表面上のそのような免疫チェックポイントタンパク質の発現も安定化させることができることを発見した。本発明者らは、非グリコシル化ヒトICPと比較してPD-L1ポリペプチド（CD274、PDCD1L1、またはB7-H1としても知られる）またはPD-1ポリペプチド（CD279としても知られる）などのグリコシル化ヒトICPに優先的に結合し（すなわち、非グリコシル化形態よりICPのグリコシル化形態に高い親和性で結合し）、そのような特異的結合によって、例えば腫瘍細胞上のICPと、例えばT細胞またはナチュラルキラー細胞（NK細胞）などの免疫エフェクター細胞上のその同起源のリガンドとの相互作用、またはその逆を防止または阻害する抗体を産生および同定する方法を開発した。本明細書における方法は、グリコシル化ICPに選択的であり、かつ優先的に結合し、ICP相互作用経路を通してのそのような腫瘍細胞とT細胞の相互作用に起因する免疫抑制作用を防止、低減、遮断、または阻害するための有効なICP阻害剤として役立つ抗体を提供する。用語「免疫チェックポイント

20

30

【0007】

本明細書において、免疫系の細胞および/または腫瘍細胞に存在しうる、ICP標的抗原（本明細書における抗glycICP抗体）の非グリコシル化形態またはグリコシル化変種形態と比較して、グリコシル化ICP標的抗原を選択的に認識し、かつ優先的に結合する単離抗体を産生およびスクリーニング、または選択する方法が提供される。いくつかの例において、グリコシル化ICPは、ICPの野生型または天然に存在する形態（すなわち、ICP_{WT}）でありえて、このためICP_{WT}は、抗体産生およびスクリー

40

【0008】

特定の実施形態において、グリコシル化ICP抗原は、ヒトグリコシル化PD-L1ポリペプチド（CD274、PDCD1L1、またはB7-H1としても知られる）である。別の特定の実施形態において、グリコシル化タンパク質抗原は、ヒトグリコシル化PD-1ポリペプチド（CD279としても知られる）である。別の特定の実施形態において

50

、グリコシル化 I C P 抗原は、ヒトグリコシル化 P D - L 2 ポリペプチドである。本明細書において使用される限り、「P D - L 1」は、P D - L 1 タンパク質、ポリペプチド、またはペプチド、特にヒト P D - L 1 (そのアミノ酸配列は配列番号 1 である) であり、「P D - 1」は、P D - 1 タンパク質、ポリペプチド、またはペプチド、特にヒト P D - 1 (そのアミノ酸配列は配列番号 2 である) である。

【0009】

別の特定の実施形態において、グリコシル化 I C P 抗原は、C D 3 6 6、F L J 1 4 4 2 8、T I M D 3、および H A V C R 2 (アミノ酸配列は配列番号 4 である) としても知られるヒトグリコシル化「T 細胞免疫グロブリンおよびムチンドメイン 3」(T I M - 3) である。別の特定の実施形態において、グリコシル化 I C P 抗原は、C D 2 2 3 (アミノ酸配列は配列番号 5 である) としても知られるヒトグリコシル化「リンパ球活性化遺伝子 3」(L A G - 3) である。別の特定の実施形態において、グリコシル化 I C P 抗原は、C D 2 7 2 (アミノ酸配列は配列番号 3 である) としても知られるヒトグリコシル化「B および T リンパ球アテニューエーター」(B T L A) である。別の特定の実施形態において、グリコシル化 I C P 抗原は、I A P、M E K 6、および O A 3 としても知られるヒトグリコシル化 C D 4 7 である。別の特定の実施形態において、グリコシル化 I C P 抗原は、C D 9 6 分子または C D 9 6 抗原としても知られるヒトグリコシル化 C D 9 6 である。別の特定の実施形態において、グリコシル化 I C P 抗原は、B G P または B G P 1 (アミノ酸配列は配列番号 7 である) としても知られるヒトグリコシル化「癌胎児性抗原関連細胞接着分子 1 (胆管糖タンパク質)」(C E A C A M 1) である。別の特定の実施形態において、グリコシル化 I C P 抗原は、B T N または B T N 1 (アミノ酸配列は配列番号 6 である) としても知られるヒトグリコシル化「ブチロフィリンサブファミリー 1 メンバー A 1」(B T N 1 A 1) である。別の特定の実施形態において、グリコシル化 I C P 抗原は、S E M A J、C D 1 0 0、c o l l - 4、および F L J 3 9 7 3 7 (アミノ酸配列は配列番号 8 である) としても知られるヒトグリコシル化セマフォリン 4 D である。別の特定の実施形態において、グリコシル化 I C P 抗原は、B T L - I I、B T N 7、H S B L M H C I および S S 2 としても知られるヒトグリコシル化「ブチロフィリン様 2」(B T N L 2) である。本明細書において使用される限り、実施形態の I C P 抗原は、タンパク質、ポリペプチド、またはペプチド、特にヒト I C P タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドを指す。一態様において、本明細書において記述される方法の実践によって、以下の表 1 に記載のグリコシル化アミノ酸を含む、前述の I C P のいずれかへの優先的結合について、抗体を産生およびスクリーニングする。簡単に説明すると、グリコシル化 I C P ポリペプチドまたはそのグリコシル化部分を、免疫原として使用して、それぞれのグリコシル化 I C P タンパク質またはその一部に優先的に結合する抗 g l y c I C P 抗体を生成してもよい。

【0010】

非グリコシル化 I C P 抗原と比較してグリコシル化 I C P に結合するその特異性について産生および選択された抗体を、グリコシル化 I C P 抗原に特異的に結合して、I C P と、通常は別の細胞、例えば免疫細胞または腫瘍細胞上に発現するタンパク質受容体であるその同起源のリガンドとの相互作用を遮断する I C P 阻害剤として使用してもよい。例えば、抗体は、I C P 抗原の非グリコシル化形態と比較して 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、8 倍、または 10 倍大きい、ある特定の実施形態において、I C P 抗原の非グリコシル化形態より 20 倍、50 倍、100 倍、1000 倍、または 10000 倍以下大きい結合親和性で I C P 抗原のグリコシル化形態に結合しうる。

【0011】

あるいは、抗体は、対応する非グリコシル化 I C P への抗体の結合によって示される K_d の半分より小さい K_d でグリコシル化 I C P に結合しうる。別の実施形態において、抗体は、非グリコシル化 I C P と比較して示される K_d の 85% より小さい、80% より小さい、75% より小さい、70% より小さい、65% より小さい、60% より小さい、55% より小さい、50% より小さい、45% より小さい、30% より小さい、20% より

10

20

30

40

50

小さい、または10%より小さい K_d でグリコシル化ICPに結合する。さらなる実施形態において、抗体は、非グリコシル化ICPと比較して示される K_d のわずか10分の1、100分の1、または1000分の1の K_d でグリコシル化ICPに結合する。

【0012】

グリコシル化ICP抗原に特異的かつ優先的に結合する抗体をスクリーニングおよび同定する方法が提供され、方法は、グリコシル化ICP抗原を特異的に認識して結合する1つまたは複数の抗体についてクローン化抗体集団（例えばハイブリドーマ集団、抗体のレパートリーを発現するファージディスプレイライブラリ等）をスクリーニングするステップ、次に抗体がグリコシル化形態に結合する親和性より低い親和性でのICP抗原の非グリコシル化形態への結合について、グリコシル化ICP抗原に特異的に結合する抗体をさらにスクリーニングするステップを含む。あるいは、抗体集団を、非グリコシル化ICPと比較してグリコシル化ICPへの特異的結合およびグリコシル化ICPへの抗体の優先的に結合について1回のステップでスクリーニングする。

10

【0013】

スクリーニングは、当技術分野で公知の任意の方法、例えば標識グリコシル化ICP抗原のパンニング、またはグリコシル化ICP抗原もしくは固相支持体上に抗原を有するグリコシル化ICPを発現する培養細胞への結合に関するハイブリドーマ培地もしくはライブラリメンバーの試験、ウェスタンブロッティング、もしくはFACS、または抗原に対する抗体の特異的結合を検出するために公知の任意の他の方法を使用して実施することができる。ICPの非グリコシル化形態と比較してICPのグリコシル化形態への優先的結合についてのアッセイは、固相表面にそれぞれコーティングしたグリコシル化ICP抗原および非グリコシル化ICP抗原への抗体の結合を、FACSまたはフローサイトメトリーを介して比較することによって実施することができる。

20

【0014】

好ましい実施形態において、優先的結合についてのスクリーニングは、フローサイトメトリーを使用してICPのグリコシル化および非グリコシル化形態を発現する細胞において実施する。例えば、WT ICP（グリコシル化されている）を組み換えにより発現する細胞を、グリコシル化されていない（グリコシル化部位内のアスパラギンがグルタミンに置換されている）変異体ICPを組み換えにより発現する同じ宿主細胞と共に、細胞の1つまたは両方の組を検出可能または選択可能に標識して、培養において混合することができる。例えば、細胞の1つの組をビオチンで標識し、これを検出可能なまたは選択可能なマーカーに連結したストレプトアビジンへの結合を通して検出および/または選別することができる。細胞混合物に、試験される抗体（直接、または検出可能なもしくは選択可能なマーカーによって標識された、試験される抗体を認識する二次抗体などによって間接的でありうる）を接触させることができ、次に例えばFACSまたは例えば実施例2に記述される他の抗体結合アッセイを通して、アッセイされる細胞の両方のタイプに結合させることができる。ある特定の実施形態において、本明細書において記述されるフローサイトメトリーアッセイにおいて、非グリコシル化ICPを発現する細胞より少なくとも1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、または10倍大きい頻度でグリコシル化ICPを発現する細胞に優先的に結合する抗体が同定され、結合は、例えば抗体を蛍光マーカーによって直接または間接的に（例えば、標識二次抗体によって）標識した場合の、2つの細胞集団で測定された蛍光強度（MFI）によって測定される。

30

40

【0015】

グリコシル化形態は、一般的に野生型ICPまたはそのペプチドである。ICPの非グリコシル化形態は、例えば、PNGアゼFによる消化、しかしこれに限定されない、タンパク質からグリコシル化、特にN-連結グリコシル化を除去する酵素によってICPを処置することによって生成することができる。あるいは、ICPを変異させて、タンパク質内のグリコシル化部位または複数の部位を除去することができる。N-連結グリコシル化は一般的に、コンセンサス配列Asn-X-Ser/Thr（式中、Xはプロリン以外の任意のアミノ酸である）のアスパラギンで起こり、アスパラギンを別のアミノ酸、好ま

50

しくはグルタミンに置換することによって、その部位でグリコシル化されないタンパク質が得られる。

【0016】

一実施形態において、方法はさらに、グリコシル化ICP抗原とその同起源のICP結合パートナー（リガンドまたは受容体、例えばPD-1は、PD-L1の同起源のICP結合パートナーである等）の間の相互作用または結合を特異的に遮断する抗glycICP抗体を同定するために、抗glycICP抗体をスクリーニングすることを伴う。一実施形態において、グリコシル化ICP抗原またはそのペプチドは、腫瘍細胞またはがん細胞上に発現し、ICPリガンドは免疫細胞上に発現する。一実施形態において、グリコシル化ICP抗原またはそのペプチドは、免疫細胞上に発現し、ICPリガンドは腫瘍細胞またはがん細胞上に発現する。一実施形態において、免疫細胞はエフェクターT細胞またはナチュラルキラー細胞（NK細胞）である。抗体を、ICPへの結合についての、ICP結合パートナーの細胞外ドメインとのFc融合体などの結合パートナーの改変された可溶性形態を含む、標識されたICP結合パートナーと抗体との競合をアッセイすることによって、そのICP結合パートナーへのICPの結合の阻害または遮断についてスクリーニングすることができる。あるいは、抗体を、ICP-ICP結合パートナー結合の生物学的結末を検出する細胞アッセイ（例えば、免疫抑制、ある特定のサイトカイン産生レベルの変化等）において、ICP-ICP結合パートナー結合を遮断するその能力についてアッセイすることができる。

10

【0017】

抗体、好ましくはグリコシル化ICPに対する抗体を発現するクローン集団を生成する方法が提供され、方法は、動物において抗グリコシル化ICP免疫応答を誘発するために有効な量の、グリカン部分への結合によって改変された少なくとも1つのグリコシル化アスパラギン（N）アミノ酸を含むヒトICPの少なくとも7連続アミノ酸の断片を含むヒトグリコシル化ICPまたはそのペプチドをレシピエント動物に投与すること、および次にスクリーニングのために動物からハイブリドーマを調製することを含む。一実施形態において、動物は、マウス、ラット、またはウサギ、ヤギ、ロバ、または非ヒト霊長類である。あるいは、抗体のライブラリ、例えば抗体のファージライブラリを、免疫した動物から生成することができるか、または抗体のナイーブライブラリを使用してもよい。ある特定の実施形態において、動物は、ヒト免疫グロブリンについてトランスジェニックである。他の実施形態において、ライブラリは、ヒト抗体レパートリーを代表する合成ライブラリである。抗体ライブラリは、四量体免疫グロブリン、F(ab)断片、scFv、またはシングルドメイン抗体を含む任意の形態の抗体を発現するクローンでありうる。

20

30

【0018】

一実施形態において、抗体を作製および選択する方法において使用するためのグリコシル化ICP抗原は、PD-L1、PD-L2、PD-1、TIM-3、LAG-3、BTLA、CEACAM1、BTN1A1、BTNL2、SEMA4D、CD47、CD96、B7-H3、B7-H4、CTLA-4、VISTA、またはKIRから選択される。好ましくは、ICPはヒトICPである。他の実施形態において、グリコシル化ICP抗原は、以下の1つである：AGER、ALCAM、AMIGO1、AMIGO2、AMIGO3、AXL、B2M、BCAM、BCAN、BOC、BSG、BTN2A1、BTN2A2、BTN3A3、BTNL1、BTNL6、BTNL7、BTNL9、CADM1、CADM2、CADM3、CADM4、CD101、CD160、CD19、CD1D2、CD2、CD200、CD22、CD226、CD244、CD274、CD276、CD28、CD300A、CD300E、CD300LB、CD300LD、CD300LF、CD300LG、CD33、CD3E、CD3G、CD4、CD48、CD7、CD79A、CD79B、CD80、CD83、CD84、CD86、CD8A、CD8B、CD8B1、CDON、CEACAM3、CEACAM5、CHL1、CILP、CNTFR、CNTN1、CNTN2、CNTN6、CRL、CRTAM、CSF1R、CSF3R、CXADR、EMBF、ERMAPP、ESAM、F11R、FAIM3、FC

40

50

ER1A、FCGR2B、FCGRT、FCRL1、FCRL5、FCRLA、FCRLB、FGFR1、FGFR2、FGFR4、FLT1、FLT3、GP6、GPA33、HAPLN1、HAPLN2、HAPLN3、HAVCR1、HEPACAM、HEPACAM2、ICAM1、ICAM2、ICAM4、ICAM5、ICOS、IFNGR1、KIT、L1CAM、LAIR1、LEPR、LILRA5、LILRB4、LINGO1、LINGO2、LINGO4、LRFN1、LRFN2、LRFN3、LRFN4、LRFN5、LRIG1、LRIG2、LRIG3、LRIT1、LRRC4、LRRN1、LRRN2、LRRN3、LSAMP、LSR、LY6G6F、LY9、MADCAM1、MAG、MALT1、MCAM、MERTK、MFAP3、MOG、MPZ、MPZL1、MPZL2、MPZL3、MR1、MUSK、MXRA8、NCAM1、NCAM2、NCR1、NEGR1、NEO1、NFAM1、NPTN、NRCAM、NRG1、NTM、NTRK1、NTRK2、NTRK3、OPCML、OSCAR、PAPLN、PDCD1、PDCD1LG2、PDGFRA、PDGFRB、PECAM1、PIGR、PRTG、PTGFRN、PTK7、PTPRD、PTPRK、PTPRS、PTPRT、PTPRU、PVR、PVRL1、PVRL2、PVRL3、PVRL4、PXDN、ROBO1、ROBO2、ROBO3、ROBO4、ROR1、ROR2、SCN1B、SCN2B、SCN3B、SEMA3A、SEMA3B、SEMA3C、SEMA3F、SEMA4A、SEMA4B、SEMA4C、SEMA4F、SEMA4G、SEMA7A、SIGGIR、SIGLEC1、SIGLEC5、SIRPA、SIRPB1、SLAMF1、SLAMF6、SLAMF7、SLAMF8、SLAMF9、TAPBP、TAPBPL、TEK、THY1、TIE1、TIGIT、TIMD4、TMEM25、TMEM81、TMIGD1、TREM1、TREM2、TREM1L1、TREM1L2、TREM1L4、TYRO3、UNC5A、UNC5B、UNC5C、VCAM1、VPREB1、VPREB3、VSIG1、VSIG2、VSIG4、VSIG8、VTCN1、WFIKKN2。

【0019】

一実施形態において、ヒトグリコシル化ICP抗原は、ヒトPD-L1の少なくとも7連続アミノ酸の断片を含む単離ポリペプチドであり、ポリペプチドは、ヒトPD-L1のN35、N192、N200、またはN219位（配列番号1における付番）に対応する少なくとも1つのアミノ酸を含み、PD-L1のN35、N192、N200、またはN219位に対応するアミノ酸の少なくとも1つがグリコシル化されている。一実施形態において、単離ポリペプチドは、ヒトPD-L1の少なくとも8～20連続アミノ酸を含む。一実施形態において、単離ポリペプチドは、ヒトPD-L1のN35、N192、N200、および/またはN219位に対応するグリコシル化アミノ酸を含む。別の実施形態において、ヒトグリコシル化ICP抗原は、ヒトPD-1の少なくとも7連続アミノ酸の断片を含む単離ポリペプチドであり、前記ポリペプチドは、ヒトPD-1のN49、N58、N74、および/またはN116位（配列番号2における付番）に対応する少なくとも1つのアミノ酸を含み、PD-1のN49、N58、N74、および/またはN116位に対応するアミノ酸の少なくとも1つがグリコシル化されている。一実施形態において、単離ポリペプチドは、ヒトPD-1の少なくとも8～20連続アミノ酸を含む。一実施形態において、単離ポリペプチドは、ヒトPD-1のN49、N58、N74、および/またはN116位に対応するグリコシル化アミノ酸を含む。一実施形態において、単離ポリペプチドは、そのアミノまたはカルボキシ末端でICPポリペプチドではない免疫原性ポリペプチドに融合またはコンジュゲートされる。

【0020】

単離された抗体がヒト抗体ではない（例えば、マウスモノクローナル抗体である）他の実施形態では、方法は、抗体の相補性決定領域（CDR）を含むアミノ酸を同定すること、およびヒト化抗体を産生するためにCDR周囲のアミノ酸配列をヒト化して、これを組み換えにより発現させることをさらに伴う。一実施形態において、方法は、ヒト化抗体を組み換えにより発現させることを伴う。あるいは、抗体の非ヒト定常ドメインを、ヒト定

10

20

30

40

50

常ドメインと置換して、キメラ抗体を産生してもよい。

【0021】

別の態様において、非グリコシル化ICPと比較してグリコシル化ICP抗原に選択的かつ優先的に結合する、上記の方法によって産生された単離抗体が提供される。一実施形態において、単離抗体は、抗グリコシル化PD-L1抗体である。実施形態において、単離抗体は、抗グリコシル化PD-1抗体である。一実施形態において、抗体は、モノクローナル、ヒト化、キメラ、またはヒト抗体である。別の実施形態において、抗体は、アイソタイプIgM、IgG1、IgG2、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgG4の抗体、またはその抗原結合断片である。一実施形態において、抗体は、Fab'、F(ab')₂、F(ab')₃、一価scFv、二価scFv、またはシングルドメイン抗体から選択される。別の実施形態において、抗体は、造影剤、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る。

10

【0022】

特定の態様において、本明細書において記述される方法は、非グリコシル化PD-L1タンパク質と比較してグリコシル化PD-L1タンパク質に特異的かつ優先的に結合する抗グリコシル化PD-L1抗体（本明細書において抗glycPD-L1抗体と呼ばれる）をスクリーニングおよび選択するために適している。一実施形態において、抗glycPD-L1抗体は、非グリコシル化PD-L1タンパク質と比較して、例えば配列番号1に記載のPD-L1タンパク質、特にPD-L1タンパク質の細胞外ドメイン（ECD）におけるアミノ酸N35、N192、N200、および/またはN219位でグリコシル化されるPD-L1タンパク質に特異的に結合する。いくつかの実施形態において、抗glycPD-L1抗体は、PD-L1グリコポリペプチドまたはそのペプチドにおける1つまたは複数のグリコシル化モチーフに特異的に結合する。いくつかの実施形態において、抗glycPD-L1抗体は、グリコシル化モチーフおよび隣接ペプチドを含むPD-L1グリコペプチドに結合する。いくつかの実施形態において、抗glycPD-L1抗体は、三次元で1つまたは複数のグリコシル化モチーフの近傍に位置するペプチド配列に結合する。したがって、実施形態において、抗glycPD-L1抗体は、グリコシル化PD-L1のコンフォメーションエピトープを認識して、これに選択的に結合する。例として、ある特定の実施形態において、抗glycPD-L1抗体は、非グリコシル化PD-L1への抗体の結合によって示されるK_dの半分より小さいK_dでグリコシル化PD-L1に結合する。一実施形態において、抗glycPD-L1抗体は、非グリコシル化PD-L1への抗体の結合によって示されるK_dの少なくとも5倍小さいK_dでグリコシル化PD-L1に結合する。一実施形態において、抗glycPD-L1抗体は、非グリコシル化PD-L1タンパク質と比較して示されるK_dの少なくとも10倍小さいK_dでグリコシル化PD-L1に結合する。一実施形態において、実施例2において記述される細胞フローサイトメトリー結合アッセイにおいて、抗glycPD-L1抗体は、非グリコシル化PD-L1を発現する細胞への結合についてのMFIより1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、または10倍大きいMFIとして表される、WT PD-L1を発現する細胞への結合を示す。一実施形態において、抗glycPD-L1抗体は、5~20nM、5~10nM、または10~20nMの親和性でグリコシル化PD-L1タンパク質に選択的に結合する。実施形態において、抗体はヒト、ヒト化、または組み換え抗体である。

20

30

40

【0023】

別の具体的態様において、非グリコシル化PD-1タンパク質と比較してグリコシル化PD-1タンパク質に特異的かつ優先的に結合する抗グリコシル化PD-1抗体（本明細書において抗glycPD-1抗体と呼ばれる）またはその結合断片をスクリーニングおよび選択する方法が提供される。一実施形態において、抗glycPD-1抗体は、非グリコシル化PD-1タンパク質と比較して、例えば配列番号2に記載されるヒトPD-1タンパク質、特にPD-1タンパク質の細胞外ドメイン（ECD）におけるアミノ酸N49、N58、N74、および/またはN116位でグリコシル化されるPD-1タンパク

50

質に特異的に結合する。いくつかの実施形態において、抗glycPD-1抗体は、PD-1グリコポリペプチドまたはそのペプチドにおける1つまたは複数のグリコシル化モチーフに特異的に結合する。いくつかの実施形態において、抗glycPD-1抗体は、グリコシル化モチーフおよび隣接するペプチドを含むPD-1グリコペプチドに結合する。いくつかの実施形態において、抗glycPD-1抗体は、三次元において、グリコシル化モチーフの1つまたは複数の近位に存在するペプチド配列に結合する、したがって、実施形態において、抗glycPD-1抗体は、グリコシル化PD-1の非線形のコンフォメーションエピトープを認識して選択的に結合する。例として、ある特定の実施形態において、抗glycPD-1抗体は、非グリコシル化PD-1への抗体の結合によって示される K_d の半分より小さい K_d でグリコシル化PD-1に結合する。一実施形態において、抗glycPD-L1抗体は、非グリコシル化PD-1への抗体の結合によって示される K_d の少なくとも5倍小さい K_d でグリコシル化PD-1に結合する。一実施形態において、抗glycPD-L1抗体は、非グリコシル化PD-1タンパク質と比較して示される K_d の少なくとも10倍小さい K_d でグリコシル化PD-1に結合する。一実施形態において、実施例2において記述される細胞フローサイトメトリー結合アッセイにおいて、抗glycPD-L1抗体は、非グリコシル化PD-L1を発現する細胞への結合についてのMFIより1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、または10倍大きいMFIとして表される、WT PD-L1を発現する細胞への結合を示す。一実施形態において、抗glycPD-1抗体は、5~20nM、5~10nM、または10~20nMの親和性でグリコシル化PD-1タンパク質に選択的に結合する。一実施形態において、抗体はモノクローナル抗体である。実施形態において、抗体はヒト、ヒト化、または組み換え抗体である。

10

20

30

40

50

【0024】

なお別の態様において、生物試料中のICPのグリコシル化、N-連結グリコシル化、またはN-グリコシル化を評価する方法が提供され、方法は、ICP含有試料に、本明細書において記述される方法によって産生される抗体（例えば、非グリコシル化ICPと比較してグリコシル化ICPに選択的に結合する抗体）を接触させることを含む。いくつかの態様において、方法は、*in vitro*の方法またはアッセイである。ある特定の態様において、生物試料は、細胞試料、組織試料、体液（例えば、血漿、血清、血液、尿、喀痰、リンパ、腹水、腹腔内液、脳脊髄液、およびその他）である。特定の実施形態において、試料は、細胞試料、またはがんもしくは腫瘍を有する対象から得た腫瘍もしくはがんからの細胞試料である。そのようながんまたは腫瘍細胞試料を、抗グリコシル化タンパク質抗体を使用してがんまたは腫瘍細胞表面上のグリコシル化ICPについてアッセイして、特にグリコシル化ICPが対象のがんまたは腫瘍細胞に存在すれば、細胞が1つまたは複数の抗グリコシル化ICP抗体による処置の適切な標的である可能性があることを決定してもよい。例として、そのようなグリコシル化タンパク質に特異的に結合してその同起源の結合パートナーとのその相互作用を防止または遮断する単離抗体によって検出可能であるグリコシル化ICPには、PD-L1、PD-L2、PD-1、TIM-3、LAG-3、BTLA、CEACAM1、BTN1A1、BTNL2、SEMA4D、CD47、CD96、B7-H3、B7-H4、CTLA-4、VISTA、またはKIR等が挙げられる。

【0025】

他の実施形態において、抗体は、以下と其の同起源の結合パートナーとの相互作用を遮断する：AGER、ALCAM、AMIGO1、AMIGO2、AMIGO3、AXL、B2M、BCAM、BCAN、BOC、BSG、BTN2A1、BTN2A2、BTN3A3、BTNL1、BTNL6、BTNL7、BTNL9、CADM1、CADM2、CADM3、CADM4、CD101、CD160、CD19、CD1D2、CD2、CD200、CD22、CD226、CD244、CD274、CD276、CD28、CD300A、CD300E、CD300LB、CD300LD、CD300LF、CD300LG、CD33、CD3E、CD3G、CD4、CD48、CD7、CD79A、CD

79B、CD80、CD83、CD84、CD86、CD8A、CD8B、CD8B1、
 CDON、CEACAM3、CEACAM5、CHL1、CILP、CNTFR、CNT
 N1、CNTN2、CNTN6、CRL、CRTAM、CSF1R、CSF3R、CXA
 DR、EMBF、ERMAP、ESAM、F11R、FAIM3、FCER1A、FCG
 R2B、FCGRT、FCRL1、FCRL5、FCRLA、FCRLB、FGFR1、
 FGFR2、FGFR4、FLT1、FLT3、GP6、GPA33、HAPLN1、H
 APLN2、HAPLN3、HAVCR1、HEPACAM、HEPACAM2、ICA
 M1、ICAM2、ICAM4、ICAM5、ICOS、IFNGR1、KIT、LIC
 AM、LAIR1、LEPR、LILRA5、LILRB4、LINGO1、LINGO
 2、LINGO4、LRFN1、LRFN2、LRFN3、LRFN4、LRFN5、L
 RIG1、LRIG2、LRIG3、LRIT1、LRRC4、LRRN1、LRRN2
 、LRRN3、LSAMP、LSR、LY6G6F、LY9、MADCAM1、MAG、
 MALT1、MCAM、MERTK、MFAP3、MOG、MPZ、MPZL1、MPZ
 L2、MPZL3、MR1、MUSK、MXRA8、NCAM1、NCAM2、NCR1
 、NEGR1、NEO1、NFAM1、NPTN、NRCAM、NRG1、NTM、NT
 RK1、NTRK2、NTRK3、OPCML、OSCAR、PAPLN、PDCD1、
 PDCD1LG2、PDGFRA、PDGFRB、PECAM1、PIGR、PRTG、
 PTGFRN、PTK7、PTPRD、PTPRK、PTPRS、PTPRT、PTPR
 U、PVR、PVRL1、PVRL2、PVRL3、PVRL4、PXDN、ROBO1
 、ROBO2、ROBO3、ROBO4、ROR1、ROR2、SCN1B、SCN2B
 、SCN3B、SEMA3A、SEMA3B、SEMA3C、SEMA3F、SEMA4
 A、SEMA4B、SEMA4C、SEMA4F、SEMA4G、SEMA7A、SIG
 GIR、SIGLEC1、SIGLEC5、SIRPA、SIRPB1、SLAMF1、
 SLAMF6、SLAMF7、SLAMF8、SLAMF9、TAPBP、TAPBPL
 、TEK、THY1、TIE1、TIGIT、TIMD4、TMEM25、TMEM81
 、TMIGD1、TREM1、TREM2、TREM1L1、TREM1L2、TREM1L4
 、TYRO3、UNC5A、UNC5B、UNC5C、VCAM1、VPREB1、VP
 REB3、VSI1G1、VSI1G2、VSI1G4、VSI1G8、VTCN1、またはWF
 IKKN2。

10

20

30

40

50

【0026】

一態様において、本明細書に開示の方法の実践によって、ポリペプチドの非グリコシル
 化形態と比較して少なくとも1つのグリコシル化アミノ酸（例えば、グリカン部分への結
 合によって改変されたアミノ酸（Nまたはアスパラギン））を有する少なくとも7連続ア
 ミノ酸の断片を含むグリコシル化ICPのコンフォメーションエピトープなどのエピト
 ープに選択的に結合する単離抗体が提供される。特定の実施形態において、ヒトPD-L1
 のN35、N192、N200、またはN219位に対応する少なくとも1つのアミノ酸
 を含むPD-L1のコンフォメーションエピトープなどのエピトープに選択的に結合する
 単離抗体が提供され、PD-L1のN35、N192、N200、またはN219位に対
 応するアミノ酸の少なくとも1つがグリコシル化されている。特定の実施形態において、
 ヒトPD-1のN49、N58、N74、またはN116位に対応する少なくとも1つの
 アミノ酸を含むPD-1のコンフォメーションエピトープなどのエピトープに選択的に結
 合する単離抗体が提供され、PD-1のN49、N58、N74、またはN116位に対
 応するアミノ酸の少なくとも1つがグリコシル化されている。

【0027】

特定の実施形態において、本発明は、それぞれが、グリコシル化ICPの他の抗原結合
 ドメインのエピトープと重複しないエピトープに結合する2つの異なる抗原結合ドメイン
 を有し、少なくとも1つの結合ドメイン（およびある特定の実施形態において、両方の結
 合ドメイン）が、例えば本明細書において記載されるグリコシル化部位の1つまたは複数
 を含むエピトープに結合することによって、ICPのグリコシル化形態に優先的に結合す
 る、二重パラトープ性抗体を作製する方法を提供する。これらの抗体は、細胞表面タンバ

ク質に架橋して、内在化、リソソーム輸送、および分解を促進することができる。そのような二重パラトープ性抗体は、本明細書において記載されるスクリーニング方法を使用して、ICPの非グリコシル化形態と比較してグリコシル化ICPに優先的に結合する抗体についてスクリーニングすること、好ましくは1つまたは両方が非グリコシル化形態と比較してICPのグリコシル化形態に優先的に結合する、グリコシル化ICPの重複しないエピトープに結合する2つの抗体を同定することによって作製することができる。グリコシル化含有エピトープ、または抗体がグリコシル化ICPに優先的に結合する本明細書において記述されるエピトープのいずれかに対する抗体を使用することができる。2つの抗原結合ドメインを、抗体分子において、例えばDimasi et al., J. Mol. Biol., 393:672-692 (2009)に記述されるように整列させることができる。特定の実施形態において、抗原結合ドメインの1つを、一本鎖Fvのフォーマットとなるように操作し、次にこれを、例えばペプチドリンカーを介して、他の抗原結合ドメインまたはCH3ドメインのC末端を有する抗体の重鎖および/または軽鎖のN末端に連結する。

10

【0028】

特定の態様において、抗glycICP抗体は、細胞表面上の標的抗原に結合後のその標的glycICP抗原の内在化および分解を促進する。標的glycICP抗原が腫瘍細胞上で発現するまたは高度に発現する場合、本明細書において提供される抗glycICP抗体による結合後に腫瘍細胞上で発現するグリコシル化標的抗原の内在化によって、例えばT細胞などの免疫細胞上で同起源の結合分子との相互作用によって腫瘍細胞上で利用できるグリコシル化ICPが減少し、それによって腫瘍細胞に対するT細胞の細胞傷害性エフェクター機能が増加し、glycICP/同起源の結合分子相互作用に起因するT細胞アネルギーを低減させる。特定の実施形態において、抗体は、PD-1とPD-L1との相互作用を阻害する、特にエフェクターT細胞によって発現するPD-1と腫瘍細胞によって発現するPD-L1、特にグリコシル化PD-L1との相互作用を阻害し、同様に特にPD-L1の内在化および細胞内分解を増加させることによって、腫瘍細胞の表面上のPD-L1、特にグリコシル化PD-L1のレベルを低減する。本明細書において提供される抗グリコシル化PD-L1抗体による結合後に腫瘍細胞上で発現したPD-L1の内在化は、T細胞上でのPD-1との相互作用のために腫瘍細胞上で利用可能であり、それによって腫瘍細胞に対するT細胞の細胞傷害性エフェクター機能を増加させ、PD-L1/PD-1相互作用に起因するT細胞アネルギーを低減させるため、抗glycPD-L1抗体の有益な特徴である。

20

30

【0029】

別の態様において、本明細書において記述される抗glycICP抗体、特にグリコシル化標的抗原への結合後に有効な内在化活性を示す抗体を、抗新生物薬および薬剤に化学的に連結し、本明細書において記述および例示される抗glycICP抗体-薬物コンジュゲート(抗glycICP抗体またはMAbADC)を産生する、抗体-薬物コンジュゲート(ADC)が提供される。ある特定の実施形態において、抗glycICP抗体-ADCは、腫瘍細胞またはがん細胞の殺滅において、および癌を有する対象を処置するための抗新生物治療において非常に有効である。実施形態において、ADCの抗glycICP抗体成分は、二重特異性、多重特異性、二重パラトープ性、もしくは多重パラトープ性抗体、またはその抗原結合部分である。他の実施形態において、抗glycICP抗体は、本明細書においてさらに記述されるように、抗分裂剤、例えばメイタンシン誘導体、例えばDM1もしくはDM4などのメイタンシノイド、またはチューブリン重合化アウリスタチン、例えばモノメチルアウリスタチンE(MMAE)、もしくはモノメチルアウリスタチンF(MMAF)に化学的に連結される。一実施形態において、抗glycICP抗体に対するリンカーは、細胞外液で安定であるが、ADCが腫瘍細胞またはがん細胞の中に入るとカテプシンによって切断され、このようにしてMMAEまたは他の毒素薬物の抗分裂メカニズムを活性化する。特異的な実施形態において、ADCの抗体成分は、本明細書において記述されるSTM073MAbまたはSTM108MAbである。一実施形態において、抗glycICP抗体含有ADC(抗glycICP抗体-ADC)

40

50

、例えばSTM108 Mab含有ADC (STM108 - ADC)は、切断可能なリンカーを介してMMAEに化学的に連結される。特定の実施形態において、抗glycICP抗体 - ADC (例えば、STM108 - ADC)は、抗glycICP抗体 (例えば、STM108 MA b)がそのC領域におけるシステイン残基を介してマレイミドおよびカブロン酸 (MC) 結合基に化学的に連結され、これにバリン (Val) およびシトルリン (Cit) からなる「vc」などのカテプシン切断可能なリンカーが化学的に連結され、これにスパーサー「PAB」、すなわちパラアミノ安息香酸が化学的に結合され、これにMMAE細胞毒素が化学的に連結される構造を含み、このようにして、その成分構造抗glycICP抗体 - MC - vc - PAB - MMAE、例えばSTM108 - MC - vc - PAB - MMAEによって示されるADCを産生する。

10

【0030】

以下の図面は、本明細書の一部を形成し、本明細書において記述される方法および抗体の特定の態様をさらに証明するために含める。それらは、限定的であると意図されない、本明細書において示される実施形態の詳細な説明と共にこれらの図面の1つまたは複数を参照することによってよりよく理解することができる。本特許または本出願のファイルは、カラー表示の少なくとも1つの図面を含む。カラーの図面を含むこの特許または特許出願公報のコピーは、要請に応じ、必要な料金を支払うことによって、当局によって提供される。

【図面の簡単な説明】

【0031】

20

【図1】PNGアーゼF処置の存在下または非存在下での*in vitro*のヒトPD-L1と抗ヒトPD-L1抗体の結合。HisタグPD-L1を、本来の条件でPNGアーゼFの存在下または非存在下で処置した後、Ni-NTAコーティングプレートに固定した。蛍光標識抗PD-L1抗体を、固定したリガンドと共にインキュベートし、リガンドについての抗体の結合親和性を定量した。

【図2】PD-L1とPD-1の結合についての抗ヒトPD-L1抗体の遮断。PD-L1発現BT549細胞を、抗ヒトPD-L1抗体および蛍光標識PD-1-Fc融合タンパク質と共にインキュベートした。リガンドと受容体との結合を、Incucyte (商標) Zoomによって毎時間定量した。赤色で示したものは、抗体が、PD-L1/PD-1結合の完全な遮断を示したことを示している。

30

【図3】抗グリコシル化PD-L1モノクローナル抗体の特徴付け。A. PD-L1 WTと、PD-L1アミノ酸配列内のグリコシル化部位を変異させることによって生成した非グリコシル化PD-L1 (PD-L1 4NQは、4箇所のアスパラギン (N) のグルタミン (Q) への置換を表す) の概略図。B. 5個の抗glycPD-L1抗体のウェスタンブロット分析。左のパネルは、抗Flag抗体を使用してPD-L1 WTおよび4NQ発現が等量であることを示す。C. 5個の抗glycPD-L1抗体のフローサイトメトリー分析。

【図4】抗グリコシル化PD-L1抗体の特徴付け。A. PD-L1 WTおよび非グリコシル化PD-L1変種の概略図。B. WT、N35/3NQ、N192/3NQ、N200/3NQ、およびN219/3NQ PD-L1を発現するBT549の安定なクローンのウェスタンブロット分析。C. 6個の抗glycPD-L1抗体のウェスタンブロット分析。D. 肝臓がん細胞株における5個の抗glycPD-L1抗体のウェスタンブロット分析。

40

【図5】免疫組織化学 (IHC) による抗グリコシル化PD-L1モノクローナル抗体の特徴付け。サイトスピン分析に関して、PD-L1 WTまたはPD-L1 4NQタンパク質のいずれかを発現するBT-549細胞を塗抹し、5個の抗glycPD-L1抗体によって染色した。IHC染色に関して、乳がん患者試料を抗glycPD-L1抗体によって染色した。

【図6-1】結合アッセイ。図6A及び6Bは、実施例5に記述した結合アッセイの結果を示す。抗glycPD-L1抗体は、アッセイ対照であるPD-1/Fcなし、Abなし

50

し、m I g G A b (図 6 D) と比較して、W T P D - L 1 を発現する B T 5 4 9 標的細胞への P D - 1 の結合を用量依存的に遮断する (図 6 A は、S T M 0 0 4 結合を示し、図 6 B は S T M 0 7 3 結合を示す) 。

【図 6 - 2】結合アッセイ。図 6 C は、実施例 5 に記述した結合アッセイの結果を示す。抗 g l y c P D - L 1 抗体は、アッセイ対照である P D - 1 / F c なし、A b なし、m I g G A b (図 6 D) と比較して、W T P D - L 1 を発現する B T 5 4 9 標的細胞への P D - 1 の結合を用量依存的に遮断する (図 6 C は、S T M 1 0 8 結合を示す) 。

【図 7】抗 g l y c P D - L 1 抗体は、T 細胞による腫瘍細胞殺滅を増強する。本明細書において記述される方法を使用して生成した 2 つの異なる抗グリコシル化 P D - L 1 抗体を、実施例 6 に記述される細胞傷害アッセイにおいて試験し、腫瘍細胞 (B T 5 4 9) に対する P B M C 由来 T 細胞の細胞傷害性を評価した。図 7 A (S T M 0 0 4) および 7 B (S T M 0 7 3) はそれぞれ、2 つの異なる抗体によって処置した P D - L 1 W T 発現 B T 5 4 9 細胞の死滅 (アポトーシス) をリアルタイムで示す。図 7 A および 7 B において、下のグラフ (塗りつぶした青色の四角) は、対照 (P B M C からの T 細胞なし) を表し、塗りつぶした赤色の丸は抗体なし対照を表し、塗りつぶした黒色の四角は、アッセイに使用した抗グリコシル化 P D - L 1 抗体の 2 0 μ g / m l を表し、および塗りつぶした茶色の丸は、アッセイに使用した抗グリコシル化 P D - L 1 抗体の 4 0 μ g / m l を表す。図 7 A および 7 B に示すように、P D - L 1 を有する腫瘍細胞の経時的な殺滅は用量依存的である。

【図 8】抗 g l y c P D - L 1 抗体による結合後の P D - L 1 の内在化および分解。図 8 A ~ 8 C は、二重機能抗 g l y c P D - L 1 抗体と共にインキュベートした P D - L 1 発現細胞の生細胞イメージングの結果を示す。図 8 A ~ 8 C において、抗 P D - L 1 抗体は、赤色の蛍光色素である p H r o d o (商標) レッド (スクシンイミジルエステル (p H r o d o (商標) レッド、S E) (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c , W a l t h a m , M A) にコンジュゲートした S T M 1 0 8 M A b である。p H r o d o (商標) レッド色素コンジュゲートは、細胞外では非蛍光であるが、ファゴソームにおいて明るい赤色の蛍光を発し、このため生体粒子の食作用から受容体の内在化に及び研究の有用な試薬となっている。緑色の染色は、L y s o T r a c k e r (登録商標) グリーン D N D - 2 6 によって染色された細胞を反映し、この色素は生細胞イメージングを介して撮像される生細胞における酸性区画 (リソソーム) を染色する細胞透過性の緑色色素である。図 8 A は、第 1 の時点 (時間 0) で、矢印によって示される細胞の強い赤色の細胞内染色によって表されるように、S T M 1 0 8 が細胞に内在化されることを示している。図 8 B は、図 8 A で表した同じ細胞において、図 8 A の時点の 2 分後の時点で細胞内赤色染色が弱くなったことを示す。図 8 C は、図 8 A における時点の 4 分後での赤色の細胞内染色がないことを示し、このことは、細胞内部での S T M 1 0 8 抗体および / または抗体 - 抗原複合体の分解を反映している。

【図 9 - 1】総 T 細胞と比較した腫瘍細胞における抗 P D - L 1 抗体が結合した P D - L 1 の内在化。図 9 A 及び 9 B は、二重機能抗 g l y c P D - L 1 抗体が P D - L 1 陽性腫瘍細胞に内在化することができるが、活性化または非活性化 T 細胞のいずれにも内在化しないことを示す細胞の画像を表す。図 9 A 及び 9 B は、以下の抗体と共にインキュベーション後の末梢血からの非活性化総 T 細胞の画像を示す：マウス I g G 抗体対照 (図 9 A) ; 非内在化抗 g l y c P D - L 1 M A b S T M 0 0 4 (図 9 B) 。図 9 A 及び 9 B は、試験した抗体のいずれも、非活性化総 T 細胞に内在化しなかったことを示している。

【図 9 - 2】総 T 細胞と比較した腫瘍細胞における抗 P D - L 1 抗体が結合した P D - L 1 の内在化。図 9 C および 9 D は、二重機能抗 g l y c P D - L 1 抗体が P D - L 1 陽性腫瘍細胞に内在化することができるが、活性化または非活性化 T 細胞のいずれにも内在化しないことを示す細胞の画像を表す。図 9 C および 9 D は、以下の抗体と共にインキュベーション後の末梢血からの非活性化総 T 細胞の画像を示す：二重機能抗 g l y c P D - L 1 M A b S T M 0 7 3 (図 9 C) ; および二重機能抗 g l y c P D - L 1 抗体 S T M 1 0 8 (図 9 D) 。図 9 C および 9 D は、試験した抗体のいずれも、非活性化総 T 細胞に

10

20

30

40

50

内在化しなかったことを示している。

【図9-3】総T細胞と比較した腫瘍細胞における抗PD-L1抗体が結合したPD-L1の内在化。図9Eおよび9Fは、二重機能抗glycPD-L1抗体がPD-L1陽性腫瘍細胞に内在化することができるが、活性化または非活性化T細胞のいずれにも内在化しないことを示す細胞の画像を表す。図9Eおよび9Fは、以下の抗体と共にインキュベーション後の末梢血由来の活性化総T細胞の画像を示す：マウスIgG抗体対照（図9E）；非内在化STM004（図9F）。T細胞活性化に関して、総T細胞を抗CD3および抗CD28抗体（例えば、ThermoFisher Scientific, Rochester, NY）と1：1の比率で共有結合によりカップリングさせたビーズ、例えば不活性な超常磁性ビーズと混合した。図9Eおよび9Fは、試験した抗体のいずれについても、活性化総T細胞への内在化が実質的に観察されなかったことを示している。

10

【図9-4】総T細胞と比較した腫瘍細胞における抗PD-L1抗体が結合したPD-L1の内在化。図9A～9Lは、二重機能抗glycPD-L1抗体がPD-L1陽性腫瘍細胞に内在化することができるが、活性化または非活性化T細胞のいずれにも内在化しないことを示す細胞の画像を表す。図9Gおよび9Hは、以下の抗体と共にインキュベーション後の末梢血由来の活性化総T細胞の画像を示す：二重機能STM073（図9G）；および二重機能STM108（図9H）。T細胞活性化に関して、総T細胞を抗CD3および抗CD28抗体（例えば、ThermoFisher Scientific, Rochester, NY）と1：1の比率で共有結合によりカップリングさせたビーズ、例えば不活性な超常磁性ビーズと混合した。図9Gおよび9Hは、試験した抗体のいずれについても、活性化総T細胞への内在化が実質的に観察されなかったことを示している。

20

【図9-5】総T細胞と比較した腫瘍細胞における抗PD-L1抗体が結合したPD-L1の内在化。図9A～9Lは、二重機能抗glycPD-L1抗体がPD-L1陽性腫瘍細胞に内在化することができるが、活性化または非活性化T細胞のいずれにも内在化しないことを示す細胞の画像を表す。図9Iおよび9Jは、以下の抗体と共にインキュベーション後のNCI-H226細胞（ヒト肺がん細胞株、扁平上皮中皮腫）の画像を示す：マウスIgG抗体対照（図9I）；非内在化抗glycPD-L1抗体STM004（図9J）。図9Iおよび9Jは、赤色の細胞内染色によって証明されるように、二重機能の内在化STM073およびSTM108 MAbsが、対照抗体であるmIgG（図9I）および非内在化STM004 MAbsと比較して、これらの細胞とのインキュベーション後にNCI-H226細胞に内在化されたことを示している。

30

【図9-6】総T細胞と比較した腫瘍細胞における抗PD-L1抗体が結合したPD-L1の内在化。図9A～9Lは、二重機能抗glycPD-L1抗体がPD-L1陽性腫瘍細胞に内在化することができるが、活性化または非活性化T細胞のいずれにも内在化しないことを示す細胞の画像を表す。図9Kおよび9Lは、以下の抗体と共にインキュベーション後のNCI-H226細胞（ヒト肺がん細胞株、扁平上皮中皮腫）の画像を示す：二重機能抗glycPD-L1 MAbs STM073（図9K）；および二重機能抗glycPD-L1 MAbs STM108（図9L）。図9Kおよび9Lは、赤色の細胞内染色によって証明されるように、二重機能の内在化STM073およびSTM108 MAbsが、対照抗体であるmIgG（図9I）および非内在化STM004 MAbsと比較して、これらの細胞とのインキュベーション後にNCI-H226細胞に内在化されたことを示している。

40

【図10-1】抗glycPD-L1抗体-ADCの抗腫瘍有効性。図10A～10Dは、本明細書において記述される抗体-薬物コンジュゲート（STM108-ADC）を産生するためにMMAEにカップリングさせた二重機能抗glycPD-L1 MAbs STM108を含むADCの有効性を、PD-L1発現および非PD-L1発現腫瘍細胞の殺滅について評価する、ならびに対照（IgGおよびSTM108 MAbs単独）を注射した腫瘍を有する動物と比較して、STM108-ADCを、腫瘍を有する動物に注射後の腫瘍移植マウスにおける腫瘍体積の低減について評価する実験の結果を表す。図10Aは、異なる濃度のSTM108-ADC、すなわち「ADC108」（塗りつぶした黒四

50

角)への曝露後のPD-L1のその発現をノックアウトするように改変されているMB231細胞(「MB231 PDL1 KO」)の%生存率と比較した、異なる濃度(nM)のSTM108-ADC(塗りつぶした黒丸)への曝露後のPD-L1発現MDA-MB231(ヒト乳癌細胞株)腫瘍細胞(「MB231」)の%生存率を示す。図10Bでは、MDA-MB231マウス乳がんモデルを使用し、MB231細胞に由来する腫瘍を移植した動物を、図10Bのグラフに示すように、IgG-MMAE対照(100µg);またはSTM108ADC(「ADC」)の50µg、100µg、もしくは150µg;またはSTM108MAbの100µgのいずれかによって処置した。STM108-ADC100µgを投与したマウス5匹中3匹、およびSTM108-ADCの150µgを投与したマウス5匹中4匹において、完全奏効(「CR」)が観察された。

10

【図10-2】抗glycPD-L1抗体-ADCの抗腫瘍有効性。図10A~10Dは、本明細書において記述される抗体-薬物コンジュゲート(STM108-ADC)を産生するためにMMAEにカップリングさせた二重機能抗glycPD-L1MAbSTM108を含むADCの有効性を、PD-L1発現および非PD-L1発現腫瘍細胞の殺滅について評価する、ならびに対照(IgGおよびSTM108MAb単独)を注射した腫瘍を有する動物と比較して、STM108-ADCを、腫瘍を有する動物に注射後の腫瘍移植マウスにおける腫瘍体積の低減について評価する実験の結果を表す。図10Cは、異なる濃度(nM)のSTM108-ADC、すなわち「ADC108」(白抜きの赤い四角)への曝露後の、PD-L1を天然に発現しない4T1細胞(「4T1」)の%生存率と比較して、異なる濃度(nM)のSTM108-ADC(白抜きの赤い丸)への曝露後の細胞表面上にヒトPD-L1を発現するように改変されている4T1乳癌細胞(「4T1hPDL1」)の%生存率を示す。図10Dでは、4T1同系マウス乳がんモデルを使用し、動物(Balb/cマウス)に、細胞表面上にPD-L1を発現するように改変されている4T1乳癌細胞(「4T1hPD-L1」)に由来する腫瘍を移植したか、またはBalb/cマウスに、細胞表面上にPD-L1を天然に発現しない非トランスフェクト4T1乳癌細胞(「4T1」)に由来する腫瘍を移植した。2つのタイプの4T1細胞に由来する腫瘍を有する動物を、図10Dのグラフに示すように、IgG-MMAE対照(100µg);またはSTM108MAb(100µg)またはSTM108ADC(100µg)のいずれかによって処置した。実施例8を参照されたい。

20

【発明を実施するための形態】

30

【0032】

記載の実施形態の他の態様、特徴、および利点は、以下の詳細な説明および例としての実施例から明らかになると予想される。

【0033】

本明細書において、非グリコシル化ICPまたはその非グリコシル化ペプチドと比較して、グリコシル化免疫チェックポイントタンパク質(ICP)またはそのグリコシル化ペプチドを特異的かつ優先的に認識して結合するモノクローナル抗体(MAb)などの抗体を産生、スクリーニング、および選択するための方法を提供する。ICPの非制限的な例には、PD-L1、PD-L2、PD-1、TIM-3、LAG-3、BTLA、CEACAM1、BTN1A1、BTN2L2、SEMA4D、CD47、CD96、B7-H3、B7-H4、CTLA-4、VISTA、またはKIR等が挙げられ、そのいくつかまたは全てが1つまたは複数のグリカン構造を含む糖タンパク質である。略語「MAb」は、本明細書において「モノクローナル抗体」を指すために使用される。

40

【0034】

当業者に認識されるように、腫瘍細胞上に発現するICP、例えばプログラム細胞死リガンド1タンパク質(PD-L1)と、免疫エフェクター細胞、例えばT細胞上に発現するプログラム細胞死1タンパク質(PD-1)との間の細胞外相互作用は、腫瘍関連免疫逃避に対して顕著な影響を有する(例えば、Pardoll, D. M., 2012, Nature Reviews, 12:252-264を参照されたい)。抗PD-1または抗PD-L1抗体を使用する免疫チェックポイント遮断の臨床での成功にもかかわらず、PD-L1とPD-1との相互作用の基礎

50

となる調節メカニズムおよび構造特徴は依然として不明のままである。PD-L1のN-連結グリコシル化は、PD-L1タンパク質リガンドを安定化させ、同様にPD-1へのその結合を容易にして増強し、T細胞媒介免疫応答の抑制を促進することが見出された。本明細書において記述される方法によって生成された抗glycPD-L1抗体は、PD-L1/PD-1相互作用を防止、遮断、または阻害するために役立ち、このため、がんの処置のために有効なICP阻害剤として有用である。

【0035】

特定の実施形態において、グリコシル化ICP抗原は、ヒトグリコシル化PD-L1ポリペプチド(CD274、PDCD1L1、またはB7-H1としても知られる)である。別の特定の実施形態において、グリコシル化ICP抗原は、ヒトグリコシル化PD-1ポリペプチド(CD279としても知られる)である。別の特定の実施形態において、グリコシル化ICP抗原は、ヒトグリコシル化PD-L2ポリペプチドである。本明細書において使用する限り、「PD-L1」は、PD-L1タンパク質、ポリペプチド、またはペプチド、特にヒトPD-L1(そのアミノ酸配列は配列番号1である)を指し、「PD-1」は、PD-1タンパク質、ポリペプチド、またはペプチド、特にヒトPD-1(そのアミノ酸配列は配列番号2である)を指す。

10

【0036】

特定の実施形態において、本明細書において記述される方法に使用されるグリコシル化ICP抗原は、例えば配列番号1に記載されるPD-L1タンパク質のN35、N192、N200、および/またはN219位でグリコシル化部位の1つまたは複数を含む、PD-L1タンパク質の少なくとも7アミノ酸のポリペプチドである。別の実施形態において、本明細書において記述される方法に使用されるグリコシル化ICP抗原は、例えば配列番号2に記載されるヒトPD-1タンパク質のアミノ酸N49、N58、N74、および/またはN116位でグリコシル化部位の1つまたは複数を含むPD-1タンパク質の少なくとも7アミノ酸のポリペプチドである。

20

【0037】

別の特定の実施形態において、グリコシル化ICP抗原は、CD366、FLJ14428、TIMD3およびHAVCR2(配列番号4)としても知られるヒトグリコシル化「T細胞免疫グロブリンおよびムチンドメイン3(TIM-3)」である。別の特定の実施形態において、グリコシル化ICP抗原は、CD223(配列番号5)としても知られるヒトグリコシル化「リンパ球活性化遺伝子-3(LAG-3)」である。別の特定の実施形態において、グリコシル化ICP抗原は、CD272(配列番号3)としても知られるヒトグリコシル化「BおよびTリンパ球アテニューエーター(BTLA)」である。別の特定の実施形態において、グリコシル化ICP抗原は、IAP、MER6、およびOA3としても知られるヒトグリコシル化CD47である。別の特定の実施形態において、グリコシル化ICP抗原は、CD96分子またはCD96抗原としても知られるヒトグリコシル化CD96である。別の特定の実施形態において、グリコシル化ICP抗原は、BGPまたはBGP1(配列番号7)としても知られるヒトグリコシル化「癌胎児性抗原関連細胞接着分子1(胆管糖タンパク質)」である。別の特定の実施形態において、グリコシル化ICP抗原は、BTNまたはBTN1(配列番号6)としても知られるヒトグリコシル化「ブチロフィリンサブファミリー1メンバーA1(BTN1A1)」である。別の特定の実施形態において、グリコシル化ICP抗原は、SEMAJ、CD100、col1-4、およびFLJ39737(配列番号8)としても知られるヒトグリコシル化セマフォリン4Dである。別の特定の実施形態において、グリコシル化ICP抗原は、BTL-I、BTN7、HSBLMHC I、およびSS2としても知られるヒトグリコシル化「ブチロフィリン様2(BTNL2)」である。本明細書において使用される限り、本実施形態のICP抗原は、タンパク質、ポリペプチド、またはペプチド、特にヒトICPタンパク質、ポリペプチド、またはペプチドを指す。

30

40

【0038】

【表 1 - 1】

表 1. ICP アミノ酸配列のグリコシル化部位

ICP	N-連結グリコシル化部位を示すアミノ酸配列
BTLA	MKTLP AMLGT GKLFW VFFLI PYLDI WNIHG KESCD VQLYI KRQSE HSILA GDPFE LECPV KYCAN RPHVT WCKLN GTTCV KYLER QTSWK EEKNI SFFIL HFEPV LPNDN GSYRC SANFQ SNLIE SHSTT LYVTD VKSAS ERPSK DEMAS RPWLL YRLLP LGGLP LLITT CFCLF CCLRR HQGKQ NELSD TAGRE INLVDAHLKS EQTEA STRQN SQVLL SETGI YDNDP DLCFR MQEGS EVYSN PCLEE NKPGI VYASL NHSVI GPNSR LARNV KEAPT EYASICVRS (配列番号 3)
TIM-3	SEVEY RAEVG QNAYL PCFYT PAAPG NLVPV CWGKG ACPVF ECGNV VLRTD ERDVN YWTSR YWLNG DFRKG DVSLT IENV T LADSG IYCCR IQIPG IMNDE KFNLK LVIKP AKVTP APTLQ RDFTA AFPRM LTTRG HGPAE TQTLG SLPDI NLTQI STLAN ELRDS RLAND LRDSG ATIRV DHHHH HH (配列番号 4)
LAG-3	LQPGA EVPVV WAQEG APAQL PCSPT IPLQD LSLLR RAGVT WQHQP DSGPP AAAPG HPLAP GPHPA APSSW GPRPR RYTVL SVGPG GLRSG RLPLQ PRVQL DERGR QRGDF SLWLR PARRA DAGEY RAAVH LRDRA LSCRL RLRLG QASMT ASPPG SLRAS DWVIL NCSFS RPDRP ASVHW FRNRG QGRVP VRESP HHHLA ESFLF LPQVS PMDSG PWGCI LTYRD GFNV S IMYNL TVLGL EPPTP LTVYA GAGSR VGLPC RLPAG VGTRS FLTAK WTPPG GGPDL LVTGD NGDFT LRLED VSQAQ AGTYT CHIHL QEQQL NATVT LAIIT VTPKS FGSPG SLGKL LCEVT PVSGQ ERFVW SSLDT PSQRS FSGPW LEAQE AQLLS QPWQC QLYQG ERLLG AAVYF TELSS PG (配列番号 5)
BTN1A1	MAVFP SGLP RCLLT LILLQ LPKLD SAPFD VIGPP EPILA VVGED AKLPC RLSPN ASAEH LELRW FRKKV SPAVL VHRDG REQEA EQMPE YRGRA TLVQD GIAKG RVALR IRGVR VSDDG EYTFC FREDG SYEEA LVHLK VAALG SDPHI SMQVQ ENGEI CLECT SVGWY PEPQV QWRTS KGEKF PSTSE SRNPD EEGLF TVAAS VIIRD TSAKN VSCYI QNLLL GQEKK VEISI PASSL PRLTP WIVAV AVILM VLGLL TIGSI FFTWR LYNER PRERR NEFSS KERLL EELKW KKATL HAVDV TLDPD TAHPH LFLYE DSKSV RLED S RQKLP EKTER FDSWP CVLGR ETFTS GRHYW EVEVG DRTDW AIGVC RENV M KKGFD PMTPE NGFWA VELYG NGYWA LTPLR TPLPL AGPPR RVGIF LDYES GDISF YNMND GS DIY TFSNV TFSGP LRPFF CLWSS GKKPL TICPI ADGPE RVTVI ANAQD LSKEI PLSPM GEDSA PRDAD TLHSK LIPTQ PSQGA P (配 列番号 6)

10

20

30

40

【 0 0 3 9 】

【表 1 - 2】

ICP	N-連結グリコシル化部位を示すアミノ酸配列
CEACAM1	MGHLS APLHR VRVPW QGLLL TASLL TFWNP PTTAQ LTTES MPFNV AEGKE VLLLV HNL PQ QLFY SWYKG ERVDG NRQIV GYAIG TQQAT PGPAN SGRET IYP <u>N</u> A SLLIQ <u>N</u> V <u>TQ</u> N DTGFY TLQVI KSDLV NEEAT GQFHV YPELP KPSIS SNNSN PVEDK DAVAF TCEPE TQDTT YLWWI NNQSL PVSPR LQLSN GNRTL TLLSV TRNDT GPYEC EIQNP VSANR SDPVT LNVTY GPDTP TISPS DTYR PGANL SLSCY AASNP PAQYS WLING TFQQS TQELF IPNIT VNNSG SYTCH ANNSV TGCNR TTVKT IIVTE LSPVV AKPQI KASKT TVTGD KDSVN LTCST NDTGI SIRWF FKNQS LPSSE RMKLS QGNTT LSINP VKRED AGTYW CEVFN PISKV QSDPI MLNVN YNALP QENGL SPGAI AGIVI GVVAL VALIA VALAC FLHFG KTGRT TPMTH LTR (配列番号 7)
セマフォリン 4D	MRMCT PIRGL LMALA VMFGT AMAFA PIPRI TWEHR EVHLV QFHEP DIYNY SALLL SEDKD TLYIG AREAV FAVNA LNISE KQHEV YWKVS EDKKA KCAEK GKSKQ TECLN YIRVL QPLSA TSLYV CGTNA FQPAC <u>DHLN</u> L TSFKF LGKNE DGKGR CPFDP AHSYT SVMVD GELYS GTSYN FLGSE PIISR <u>N</u> SSHS PLRTE RA <u>A</u> NY TSSLN LPDKT LQFVK DHPLM SHTKW VRYNG PVPKP RPGAC IDSEA CAY <u>N</u> L STAEV VFSHG KYMQS TTVEQ SPGLK VPFY ALFTP QLNNV GLSAV KARLI CSRPD SGLVF NVLRD VVLR PRIAR VCKGD QGGLR TLQKK WTSFL GEDDR VYFFF TEVSV EYEFV FRVLI YAI PW LNEPS FVFAD VIRKS PDSPD DDSVT PIDNR PRLIK KDVNY TQIVV DRTQA LDGTV YDVMF VSTD R GALHK AISLE HAVHI IETQ LFQDF EPVQT LLLSS KKG NR FVYAG SNSGV VQAPL AFCGK HGTCE DCVLA RDPYC AWSPP TATCV ALHQT ESPSR GLIQE MSGDA SVCPD KSKGS YRQHF FKHGG TAEK CSQKS NLARV FWKFQ NDVLK AESPK YGLMG RKNLL <u>I</u> F <u>N</u> LS EGD SG VYQCL SEERV <u>K</u> NKT V FQVVA KHVLE VKVVP KPVVA PTL SV VQTEG SRIAT KVLVA STQGS SPPTP AVQAT SSGAI TLPPK PAPTG TSCEP KIVIN TVPQL HSEKT MYLKS SDNRL LMSLF LFFFV LFLCL FFYNC YKGYL PRQCL KFRSA LLIK KKP KS DFCDR EQSLK ETLVE PGSFS QQNGE HPKPA LDTGY ETEQD TITSK VPTDR EDSQR IDDL S ARDKP FDVKC ELKFA DSDAD GD (配列番号 8)

【0040】

表 1 において、グリコシル化アミノ酸 (N) を太字および下線で示す。具体的には、BT LA に関して、3つのグリコシル化部位は、配列番号 3 の BT LA ICP タンパク質配列のアミノ酸 N 75、N 94、および N 110 位に示される。TIM - 3 に関して、2つのグリコシル化部位は、配列番号 4 の TIM - 3 ICP タンパク質配列のアミノ酸 N 78 および N 151 位に示される。LAG - 3 に関して、4つのグリコシル化部位は、配列番号 5 の LAG - 3 ICP タンパク質配列のアミノ酸 N 166、N 228、N 234、および N 321 位に示される。BTN 1 A 1 に関して、3つのグリコシル化部位は、配

列番号6のBTN1A1 ICPタンパク質配列のアミノ酸N55、N215、およびN449位に示される。CEACAM1に関して、3つのグリコシル化部位は、配列番号7のBTLA ICPタンパク質配列のアミノ酸N104、N111、およびN115位に示される。セマフォリン4Dに関して、6つのグリコシル化部位は、配列番号8のセマフォリン4Dアミノ酸配列のアミノ酸N139、N191、N204、N254、N613、およびN632位に示される。

【0041】

ある特定の実施形態において、記述される方法に使用されるグリコシル化ICP抗原は、配列番号3のBTLA ICPタンパク質配列のアミノ酸N75、N94、およびN110位でグリコシル化部位の1つまたは複数を含むヒトBTLAの少なくとも7アミノ酸のポリペプチドでありうる。ある特定の実施形態において、グリコシル化ICP抗原は、配列番号4のTIM-3 ICPタンパク質配列のアミノ酸N78およびN151位で1つまたは両方のグリコシル化部位を含むヒトTIM-3の少なくとも7アミノ酸のポリペプチドである。ある特定の実施形態において、グリコシル化ICP抗原は、配列番号5のLAG-3 ICPタンパク質配列のアミノ酸N166、N228、N234、およびN321位でグリコシル化部位の1つまたは複数を含むヒトLAG-3の少なくとも7アミノ酸のポリペプチドである。ある特定の実施形態において、グリコシル化ICP抗原は、配列番号6のBTN1A1 ICPタンパク質配列のアミノ酸N55、N215、およびN449位でグリコシル化部位の1つまたは複数を含むヒトBTN1A1の少なくとも7アミノ酸のポリペプチドである。ある特定の実施形態において、グリコシル化ICP抗原は、配列番号7のBTLA ICPタンパク質配列のアミノ酸N104、N111、およびN115位でグリコシル化部位の1つまたは複数を含むヒトCEACAM1の少なくとも7アミノ酸のポリペプチドである。ある特定の実施形態において、グリコシル化ICP抗原は、配列番号8のセマフォリン4Dアミノ酸配列のアミノ酸N139、N191、N204、N254、N613、およびN632位で6つのグリコシル化部位の1つまたは複数を含むヒトセマフォリン4Dの少なくとも7アミノ酸のポリペプチドである。抗glyc ICP抗体は、これらのグリコシル化部位の1つまたは複数を含むエピトープに結合しうる。

【0042】

他の実施形態において、抗体を作製および選択する方法において使用するためのグリコシル化ヒトICP抗原は、PD-L2、BTNL2、B7-H3、B7-H4、CTLA-4、VISTA、またはKIRから選択される。好ましくは、ICPはヒトICPである。他の実施形態において、グリコシル化ICP抗原（好ましくはヒト）は、以下の1つである：AGER、ALCAM、AMIGO1、AMIGO2、AMIGO3、AXL、B2M、BCAM、BCAN、BOC、BSG、BTN2A1、BTN2A2、BTN3A3、BTNL1、BTNL6、BTNL7、BTNL9、CADM1、CADM2、CADM3、CADM4、CD101、CD160、CD19、CD1D2、CD2、CD200、CD22、CD226、CD244、CD274、CD276、CD28、CD300A、CD300E、CD300LB、CD300LD、CD300LF、CD300LG、CD33、CD3E、CD3G、CD4、CD48、CD7、CD79A、CD79B、CD80、CD83、CD84、CD86、CD8A、CD8B、CD8B1、CDON、CEACAM3、CEACAM5、CHL1、CILP、CNTFR、CNTN1、CNTN2、CNTN6、CRL、CRTAM、CSF1R、CSF3R、CXADR、EMBF、ERMAP、ESAM、F11R、FAIM3、FCER1A、FCGR2B、FCGRT、FCRL1、FCRL5、FCRLA、FCRLB、FGFR1、FGFR2、FGFR4、FLT1、FLT3、GP6、GPA33、HAPLN1、HAPLN2、HAPLN3、HAVCR1、HEPACAM、HEPACAM2、ICAM1、ICAM2、ICAM4、ICAM5、ICOS、IFNGR1、KIT、L1CAM、LAIR1、LEPR、LILRA5、LILRB4、LINGO1、LINGO2、LINGO4、LRFN1、LRFN2、LRFN3、LRFN4、LRFN5、L

R I G 1、L R I G 2、L R I G 3、L R I T 1、L R R C 4、L R R N 1、L R R N 2、L R R N 3、L S A M P、L S R、L Y 6 G 6 F、L Y 9、M A D C A M 1、M A G、M A L T 1、M C A M、M E R T K、M F A P 3、M O G、M P Z、M P Z L 1、M P Z L 2、M P Z L 3、M R 1、M U S K、M X R A 8、N C A M 1、N C A M 2、N C R 1、N E G R 1、N E O 1、N F A M 1、N P T N、N R C A M、N R G 1、N T M、N T R K 1、N T R K 2、N T R K 3、O P C M L、O S C A R、P A P L N、P D C D 1、P D C D 1 L G 2、P D G F R A、P D G F R B、P E C A M 1、P I G R、P R T G、P T G F R N、P T K 7、P T P R D、P T P R K、P T P R S、P T P R T、P T P R U、P V R、P V R L 1、P V R L 2、P V R L 3、P V R L 4、P X D N、R O B O 1、R O B O 2、R O B O 3、R O B O 4、R O R 1、R O R 2、S C N 1 B、S C N 2 B、S C N 3 B、S E M A 3 A、S E M A 3 B、S E M A 3 C、S E M A 3 F、S E M A 4 A、S E M A 4 B、S E M A 4 C、S E M A 4 F、S E M A 4 G、S E M A 7 A、S I G G I R、S I G L E C 1、S I G L E C 5、S I R P A、S I R P B 1、S L A M F 1、S L A M F 6、S L A M F 7、S L A M F 8、S L A M F 9、T A P B P、T A P B P L、T E K、T H Y 1、T I E 1、T I G I T、T I M D 4、T M E M 2 5、T M E M 8 1、T M I G D 1、T R E M 1、T R E M 2、T R E M L 1、T R E M L 2、T R E M L 4、T Y R O 3、U N C 5 A、U N C 5 B、U N C 5 C、V C A M 1、V P R E B 1、V P R E B 3、V S I G 1、V S I G 2、V S I G 4、V S I G 8、V T C N 1、またはW F I K K N 2。

10

【0043】

20

非グリコシル化ICPと比較してグリコシル化ICPへの選択的かつ優先的結合についてスクリーニングされる抗glycICP抗体を産生する方法は、限定的であると意図されない。特定の実施形態において、グリコシル化ICP抗原に対するモノクローナル抗体(MAb)を産生するために、ハイブリドーマ技術を使用し、抗体をグリコシル化ICPまたはそのグリコシル化ペプチドへの特異的結合についてスクリーニングする。本発明の方法によれば、グリコシル化ICPまたはそのグリコシル化ペプチドは、免疫応答を誘発するため、およびグリコシル化ICPに対する抗体を産生するB細胞を生成するために、非ヒト動物を免疫するための抗原または免疫原として使用される。次に、抗体を、ICPの非グリコシル化形態と比較してグリコシル化ICPへの特異的結合およびグリコシル化ICPへの優先的結合についてスクリーニングする。抗体はまた、そのICP結合パートナーへのグリコシル化ICPの結合の遮断または阻害についてスクリーニングしてもよい。一例において、抗体は、グリコシル化PD-L1に選択的かつ優先的に結合し、PD-L1へのPD-L1の結合を遮断または阻害する。あるいは、抗体は、グリコシル化PD-L1に選択的かつ優先的に結合し、PD-L1またはPD-L2を含むPD-L1の結合パートナーへのPD-L1の結合を遮断または阻害する。本明細書において提供される方法によって選択および同定された抗体は、ICPによって媒介される免疫抑制活性を調節することができる治療剤として、または生物試料中のグリコシル化ICPを検出および特徴付けるために有用な試薬としての用途を有する。

30

【0044】

モノクローナル抗体は、所定の標的抗原に対して単特異的である抗体である。MAbは、標的抗原を対象とするが様々なB細胞によって産生されるポリクローナル抗体とは対照的に、独自の親B細胞の全てのクローンである同一の免疫B細胞によって合成および産生される。モノクローナル抗体は、一価の親和性を有し、同じエピトープに結合する。一般的に、抗体を生成するための免疫原として使用される標的抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体を産生することができる。そのようなMAbは、標的抗原を検出もしくは精製するために、または標的抗原の生物活性を調節するために役立つ。加えて、所定の標的抗原に対して特異性を有するMAb、特に単離および精製されたMAbを、がん、腫瘍などの疾患および病的状態の処置に使用してもよい。実施形態において、標的抗原はグリコシル化ICPまたはそのグリコシル化ペプチド部分である。実施形態において、グリコシル化ICPまたはそのグリコシル化ペプチド部分に対して生成されたMAbは、非グ

40

50

リコシル化 I C P と比較してグリコシル化 I C P を特異的かつ選択的に認識して結合する。

【 0 0 4 5 】

定義

本明細書において使用される用語「1つの(a)」または「1つの(an)」は、1つまたは複数を意味しうる。

【 0 0 4 6 】

本明細書において使用される用語「または」は、代替物のみを指すことが明白に示されている場合、または代替物が相互に排他的である場合を除き「および/または」を意味するが、本開示は、代替物のみと「および/または」を指す定義を支持する。

10

【 0 0 4 7 】

本明細書において使用される用語「別の」は、少なくとも2番目以上を意味する。

【 0 0 4 8 】

本明細書において使用される用語「約」は、方法が、値または試験対象間に存在する変動を決定するために使用される、値が装置の固有の誤差の変動を含むことを示すために使用される。

【 0 0 4 9 】

本明細書において使用される用語「プログラム死リガンド-1」または「PD-L1」は、特に示していなければ、哺乳動物、例えば霊長類(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)を含む任意の脊椎動物源由来のポリペプチド(用語「ポリペプチド」および「タンパク質」は本明細書において互換的に使用される)または任意のネイティブPD-L1を指し、ある特定の実施形態において、様々なPD-L1アイソフォーム、そのSNP変種を含む関連するPD-L1ポリペプチドを含む。同様に、用語「プログラム細胞死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起源のPD-1を指す。特に示していなければ、PD-1はまた、様々なPD-1アイソフォーム、そのSNP変種を含む関連するPD-1ポリペプチド、ならびにリン酸化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PD-1の異なる改変形態も含む。

20

30

【 0 0 5 0 】

ヒトPD-L1の例示的なアミノ酸配列(UniProtKB/Swiss-Prot: Q9NZQ7.1; GI: 83287884)を以下に提供する:

M R I F A V F I F M T Y W H L L N A F T V T V P K D L Y V V E Y G S N M T
I E C K F P V E K Q L D L A A L I V Y W E M E D K N I I Q F V H G E E D
L K V Q H S S Y R Q R A R L L K D Q L S L G N A A L Q I T D V K L Q D A G
V Y R C M I S Y G G A D Y K R I T V K V N A P Y N K I N Q R I L V V D P
V T S E H E L T C Q A E G Y P K A E V I W T S S D H Q V L S G K T T T T
N S K R E E K L F N V T S T L R I N T T T N E I F Y C T F R R L D P E E N
H T A E L V I P E L P L A H P P N E R T H L V I L G A I L L C L G V A L
T F I F R L R K G R M M D V K K C G I Q D T N S K K Q S D T H L E E T (配
列番号1)。配列番号1において、アミノ末端のアミノ酸1~18は、ヒトPD-L1タンパク質のシグナル配列を構成する。したがって、成熟ヒトPD-L1タンパク質は、配列番号1のアミノ酸19~290からなる。

40

【 0 0 5 1 】

ヒトPD-1の例示的なアミノ酸配列(UniProtKB: Q15116.3 GI: 145559515)を以下に提供する:

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

50

V R A R R N D S G T Y L C G A I S L A P K A Q I K E S L R A E L R V T E
 R R A E V P T A H P S P S P R P A G Q F Q T L V V G V V G G L L G S L V
 L L V W V L A V I C S R A A R G T I G A R R T G Q P L K E D P S A V P V F
 S V D Y G E L D F Q W R E K T P E P P V P C V P E Q T E Y A T I V F P S
 G M G T S S P A R R G S A D G P R S A Q P L R P E D G H C S W P L (配列番
 号 2)。配列番号 2 において、グリコシル化アミノ酸残基を下線および太字で示す。同様
 に配列番号 2 において、アミノ末端アミノ酸 1 ~ 20 位は、ヒト PD - 1 タンパク質のシ
 グナル配列を構成する。したがって、成熟ヒト PD - 1 タンパク質は、配列番号 2 のアミ
 ノ酸 21 ~ 288 位からなる。

【0052】

本明細書において記述されるポリペプチドおよびペプチドを構成するアミノ酸残基の略
 語、ならびにこれらのアミノ酸残基に対する保存的置換を、以下の表 2 に示す。1 つまたは
 複数の保存的アミノ酸置換を含むポリペプチド、または本明細書において記述されるポリ
 ペプチドの保存的に改変された変種は、当初のまたは天然に存在するアミノ酸が、類似の
 特徴、例えば類似の電荷、疎水性 / 親水性、側鎖の大きさ、骨格のコンフォメーション、
 構造、および剛性を有する他のアミノ酸に置換されているポリペプチドを指す。この
 ため、これらのアミノ酸変化は、典型的に、ポリペプチドの生物活性、機能、または他の
 所望の特性、例えば抗原に対するその親和性またはその特異性を変更することなく行われ
 うる。一般的に、ポリペプチドの非必須領域における 1 つのアミノ酸置換は、生物活性を
 実質的に変更しない。さらに、構造または機能が類似であるアミノ酸の置換は、ポリペプ
 チドの生物活性を妨害する可能性がより低い。

【0053】

10

20

【表 2】

表 2.アミノ酸残基および保存的アミノ酸置換の例

当初の残基 3文字表記と 1文字表記	保存的置換
アラニン(Ala) (A)	Gly; Ser
アルギニン(Arg) (R)	Lys; His
アスパラギン(Asn) (N)	Gln; His
アスパラギン酸(Asp) (D)	Glu; Asn
システイン(Cys) (C)	Ser; Ala
グルタミン(Gln) (Q)	Asn
グルタミン酸(Glu) (E)	Asp; Gln
グリシン(Gly) (G)	Ala
ヒスチジン(His) (H)	Asn; Gln
イソロイシン(Ile) (I)	Leu; Val
ロイシン(Leu) (L)	Ile; Val
リジン(Lys) (K)	Arg; His
メチオニン(Met) (M)	Leu; Ile; Tyr
フェニルアラニン(Phe) (F)	Tyr; Met; Leu
プロリン(Pro) (P)	Ala
セリン(Ser) (S)	Thr
トレオニン(Thr) (T)	Ser
トリプトファン(Trp) (W)	Tyr; Phe
チロシン(Tyr) (Y)	Trp; Phe
バリン(Val) (V)	Ile; Leu

10

20

【 0 0 5 4 】

30

用語「抗体」、「免疫グロブリン」、および「Ig」は、本明細書において広い意味で互換的に使用され、具体的に、以下に記述されるように、例えば個々の抗グリコシル化ICP抗体、例えば本明細書において記述されるモノクローナル抗体（アゴニスト、アンタゴニスト、中和抗体、完全長またはインタクトモノクローナル抗体、抗原結合活性を維持している抗体のペプチド断片を含む）、抗非グリコシル化ICP抗体、および抗グリコシル化ICP抗体、ポリエピトープまたはモノエピトープ特異性を有する抗ICP抗体組成物、ポリクローナル抗体または一価抗体、多価抗体、少なくとも2つのインタクト抗体またはその抗原結合断片から形成される多重特異性抗体（例えば、それらが所望の生物活性を示す限り二重特異性抗体または二重パラトープ性抗体）、一本鎖抗ICP抗体、および抗ICP抗体の断片が範囲に含まれる。抗体は、ヒト、ヒト化、キメラ、および/または親和性成熟抗体でありうる。抗体は、他の種、例えばマウス、ラット、ウサギなど由来であってもよい。用語「抗体」は、特異的分子抗原に結合することができるポリペプチドの免疫グロブリンクラス内のB細胞のポリペプチド産物を含むと意図される。抗体は典型的に、ポリペプチド鎖の2つの同一の対で構成され、それぞれの対は、1つの重鎖（約50～70kDa）と1つの軽鎖（約25kDa）を有し、重鎖および軽鎖のアミノ末端部分は、約100～約130またはそれ超のアミノ酸の可変領域を含み、それぞれの鎖のカルボキシ末端部分は定常領域を含む（Borrebæck (ed.), 1995, Antibody Engineering, Second Ed., Oxford University Press.; Kuby, 1997, Immunology, Third Ed., W.H. Freeman and Company, New Yorkを参照されたい）。特異的実施形態において、本明細書において提供される抗体が結合する特異的分子抗原は、ICP抗原ポリペプチド、ICPペプ

40

50

チド断片、またはICPエプトープを含む。ICPポリペプチド、ICPペプチド断片、またはICPエプトープは、非グリコシル化またはグリコシル化されうる。特定の実施形態において、ICPポリペプチド、ICPペプチド断片、またはICPエプトープはグリコシル化される。ICP抗原に結合する抗体またはそのペプチド断片は、例えば、イムノアッセイ、BIAcore、または当業者に公知のおよび本明細書における実施例において記述される他の技術によって同定することができる。抗体またはその断片は、ラジオイムノアッセイ(RIA)および酵素結合イムノソルベントアッセイ(ELISA)などの実験技術を使用して決定した場合に、いかなる交叉反応抗原よりも高い親和性でICP抗原に結合するとき、ICP抗原に特異的に結合する。典型的に、特異的または選択的結合反応は、バックグラウンドシグナルまたはノイズの少なくとも2倍、より典型的に、バックグラウンドシグナルまたはノイズの5~10倍超である。例えば、抗体特異性に関する考察に関しては、Paul, ed., 1989, Fundamental Immunology Second Edition, Raven Press, New York at pages 332-336を参照されたい。

10

【0055】

本明細書において提供される抗体には、合成抗体、モノクローナル抗体、組み換え産生された抗体、多重特異性抗体(二重特異性抗体を含む)、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、抗イデオタイプ抗体(抗Id)、および上記のいずれか1つの機能的断片(例えば、グリコシル化ICP結合断片などの抗原結合断片)が挙げられるがこれらに限定されるわけではない。結合断片は、抗体重鎖または軽鎖ポリペプチドの一部、例えば断片が由来する抗体の結合活性のいくつがまたは全てを保持するペプチド部分を指す。機能的断片(例えば、ICP結合断片などの抗原結合断片)の非限定的な例には、一本鎖Fv(scFv)(例えば、単特異性、二重特異性、二重パラトープ性、一価(例えば単一のV_HまたはV_Lドメインを有する)、または二価等)、Fab断片、F(ab')断片、F(ab)₂断片、F(ab')₂断片、ジスルフィド結合Fv(sdFv)、Fd断片、Fv断片、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、およびミニボディが挙げられる。特に、本明細書において提供される抗体は、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、例えばICP抗原、特にグリコシル化ICP抗原に結合する抗原結合部位(例えば、抗グリコシル化ICP抗体の1つまたは複数の相補性決定領域(CDR))を含む抗原結合ドメインまたは分子を含む。そのような抗体断片の説明は、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 Skerra, Meth. Enzymol., 178:497-515(1989) and in Day, E.D., Advanced Immunochimistry, Second Ed., Wiley-Liss, Inc., New York, NY(1990)に見出されうる。本明細書において提供される抗体は、免疫グロブリン分子の任意のタイプ(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、およびIgY)、任意のクラス(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、およびIgA2)、または任意のサブクラス(例えば、IgG2aおよびIgG2b)の抗体でありうる。抗PD-L1抗体は、アゴニスト抗体またはアンタゴニスト抗体でありうる。ある特定の実施形態において、抗ICP抗体は、完全ヒト、例えば完全ヒトモノクローナル抗ICP抗体である。ある特定の実施形態において、抗ICP抗体は、ヒト化されており、例えば、ヒト化モノクローナル抗ICP抗体である。ある特定の実施形態において、本明細書において提供される抗体は、IgG抗体、またはそのクラス(例えば、ヒトIgG1またはIgG4)もしくはサブクラス、特にIgG1サブクラスの抗体である。

20

30

40

【0056】

4本鎖抗体単位は、2つの同一の軽(L)鎖と2つの同一の重(H)鎖で構成されるヘテロ4量体糖タンパク質である。IgGの場合、4本鎖(非還元)抗体単位の分子量は、一般的に約150,000ダルトンである。それぞれのL鎖は、1つの共有ジスルフィド結合によってH鎖に連結され、H鎖のアイソタイプに応じて、2つのH鎖が1つまたは複

50

数のジスルフィド結合によって互いに連結される。それぞれのHおよびL鎖はまた、規則正しい間隔の鎖内ジスルフィド架橋を有する。N末端において、それぞれのH鎖は、可変ドメイン(V_H)の後に、および鎖のそれぞれにつき3つの定常ドメイン(C_H)を有し、 μ およびアイソタイプにつき4つの C_H ドメインを有する。それぞれのL鎖は、N末端において可変ドメイン(V_L)を有し、その後そのカルボキシ末端において定常ドメイン(C_L)を有する。 V_L ドメインは、 V_H ドメインと整列し、 C_L ドメインは、重鎖の第1の定常ドメイン(C_{H1})と整列する。特定のアミノ酸残基が、軽鎖と重鎖可変ドメインの間の界面を形成すると考えられている。 V_H および V_L が共に対形成すると、単一の抗原結合部位を形成する。免疫グロブリン分子の基本構造は、当業者によって理解される。例えば、抗体の異なるクラスの構造および特性は、Basic and Clinical Immunology, 8th edition, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, page 71 and Chapter 6において見出される。

10

【0057】

本明細書において使用される用語「抗原」または「標的抗原」は、抗体が選択的に結合することができる既定の分子である。標的抗原は、ポリペプチド、ペプチド、炭水化物、核酸、脂質、ハプテン、または他の天然に存在するもしくは合成の化合物でありうる。実施形態において、標的抗原は低分子である。ある特定の実施形態において、標的抗原は、ポリペプチドまたはペプチドであり、好ましくはグリコシル化ICPである。

【0058】

本明細書において使用される用語「抗原結合断片」、「抗原結合ドメイン」、「抗原結合領域」、および類似の用語は、抗原と相互作用して、結合剤としての抗体に、抗原に対するその特異性および親和性を付与するアミノ酸残基を含む抗体の部分を目指す(例えば、抗体のCDRは、抗原結合領域である)。抗原結合領域は、任意の動物種、例えば齧歯類(例えば、ウサギ、ラット、またはハムスター)およびヒトに由来しうる。特異的实施形態において、抗原結合領域は、ヒト起源の領域でありうる。

20

【0059】

「単離」抗体は、細胞材料または細胞もしくは組織起源の他の混入タンパク質、および/または抗体が由来する他の混入成分を実質的に含まず、または化学合成されるときに化学前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まない。語句「細胞材料を実質的に含まない」には、単離されたまたは組み換え産生された細胞の細胞成分から分離されている抗体の調製物を含む。このため、細胞材料を実質的に含まない抗体は、異種タンパク質(本明細書において「混入タンパク質」とも呼ばれる)の約30%、25%、20%、15%、10%、5%、または1%未満(乾燥重量で)を有する抗体の調製物を含む。ある特定の实施形態において、抗体が組み換え産生されるとき、抗体は培養培地を実質的に含まず、例えば、培養培地はタンパク質調製物の体積の約20%、15%、10%、5%、または1%未満を表す。ある特定の实施形態において、抗体が化学合成によって産生されるとき、抗体は、化学前駆体または他の化学物質を実質的に含まず、例えば抗体は、タンパク質の合成に関する化学前駆体または他の化学物質から分離されている。したがって、抗体のそのような調製物は、目的の抗体以外の化学前駆体または化合物の約30%、25%、20%、15%、10%、5%、または1%未満(乾燥重量で)を有する。混入成分はまた、抗体に対する治療的使用を妨げる材料を含みうるがこれらに限定されるわけではなく、酵素、ホルモン、および他のタンパク質様または非タンパク質様溶質を含みうる。ある特定の实施形態において、抗体は、(1)ローリー法(Lowry et al., J. Bio. Chem., 193: 265-275, 1951)によって決定した場合に、抗体の95重量%より大きいもしくはそれに等しい、例えば95重量%、96重量%、97重量%、98重量%、もしくは99重量%まで、(2)スピニングカップシーケネーターを使用することによって、N-末端もしくは内部のアミノ酸配列の少なくとも15残基を得るために十分な程度まで、または(3)クーマシーブルーもしくは銀染色を使用して還元もしくは非還元条件下でSDS-PAGEによって均一となるまで、精製される。単離抗体はまた、抗体の天然の環境の少なく

30

40

50

とも1つの成分が存在しないことから、組み換え細胞内のその場の抗体を含む。単離抗体は、典型的に少なくとも1つの精製ステップによって調製される。いくつかの実施形態において、本明細書において提供される抗体は単離されている。

【0060】

本明細書において使用される用語「結合する」または「結合している」は、例えば複合体の形成を含む分子間の相互作用を指す。実例として、そのような相互作用は、水素結合、イオン結合、疎水性相互作用、およびファンデルワールス相互作用を含む非共有結合的相互作用を包含する。複合体はまた、共有もしくは非共有結合、相互作用、または力によって共に保持される2つまたはそれ超の分子の結合を含みうる。抗体の1つの抗原結合部位と、PD-L1またはPD-1などの標的(抗原)分子上のそのエピトープの間の全体的な非共有結合的相互作用の強度は、そのエピトープについての抗体または機能的断片の親和性である。一価の抗原への抗体の結合(k_{on})と解離(k_{off})との比率(k_{on}/k_{off})は、結合定数Kであり、これは親和性の測定値である。Kの値は、抗体および抗原の異なる複合体ごとに異なり、 k_{on} および k_{off} の両方に依存する。本明細書において提供される抗体に対する結合定数Kは、本明細書において提供される任意の方法、または当業者に公知の他の任意の方法を使用して決定されうる。1つの結合部位での親和性は、抗体と抗原の間の相互作用の真の強度を必ずしも反映しない。多数の反復抗原性決定基を含む複合抗原が、多数の結合部位を含む抗体と接触するとき、1つの部位で抗体と抗原とが相互作用すると、第2の結合部位での相互作用の確率が増加する。多価抗体と抗原の間のそのような多数の相互作用の強度は、アビディティと呼ばれる。抗体のアビディティは、その個々の結合部位の親和性よりもその結合能のよりよい尺度でありうる。例えば、高いアビディティは、時に、IgGより低い親和性を有しうる5量体のIgM抗体において見出されるように低い親和性を補うことができるが、IgMのアビディティがその多価性に起因して高い場合、IgMは抗原に有効に結合することができる。

【0061】

「結合親和性」は、一般的に、ある分子(例えば、抗体などの結合タンパク質)の1つの結合部位とその結合パートナー(例えば、抗原)の間の非共有結合的相互作用の合計の強度を指す。特に示していなければ、本明細書において使用される「結合親和性」は、結合対のメンバー(例えば、抗体と抗原)間の1:1相互作用を反映する内因性の結合親和性を指す。結合分子Xのその結合パートナーYに対する親和性は、一般的に解離定数(K_d)によって表されうる。親和性は、本明細書において記述される方法を含む、当技術分野で公知の一般的な方法によって測定することができる。低親和性抗体は一般的に、抗原への結合が遅く、容易に解離する傾向があるが、高親和性抗体は一般的に、抗原への結合が速く、抗原により長い時間結合したままである傾向がある。結合親和性を測定する多様な方法が当技術分野で公知であり、そのいずれも、本開示の目的のために使用されうる。特異的な例示の実施形態は、以下を含む:一実施形態において、「 K_d 」または「 K_d 値」は、当技術分野で公知のアッセイ、例えば結合アッセイによって測定される。 K_d は、例えば目的の抗体のFab部分とその抗原について実施される放射標識抗原結合アッセイ(RIA)において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 値はまた、例えばBIAcore(商標)-2000またはBIAcore(商標)-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)を使用する表面プラズモン共鳴アッセイ(BIAcoreによる)を使用することによって、または例えばOctet QK384システム(ForteBio, Menlo Park, CA)を使用するバイオレイヤー干渉法によっても測定することができる。「オンレート」または「結合の速度」または「結合速度」または「 k_{on} 」はまた、例えばBIAcore(商標)-2000もしくはBIAcore(商標)-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)、またはOctet QK384システム(ForteBio, Menlo Park, CA)を使用する、上記の同じ表面プラズモン共鳴またはバイオレイヤー干渉法によって決定することもできる。

【0062】

10

20

30

40

50

用語「抗glyICP抗体」、「グリコシル化ICPに特異的に結合する抗体」、または「グリコシル化ICPに対して特異的である抗体」、「グリコシル化ICPエピトープに特異的に結合する抗体」、「グリコシル化ICPに選択的に結合する抗体」、「グリコシル化ICPエピトープに選択的に結合する抗体」、「グリコシル化ICPエピトープに優先的に結合する抗体」および類似の用語は、本明細書において互換的に使用され、十分な親和性および特異性で、ICP、すなわちグリコシル化またはWT ICPに結合することができる抗体を指す。抗グリコシル化ICP抗体は、グリコシル化ICP抗原、ペプチド断片、またはエピトープ（例えば、ヒトPD-L1ポリペプチド、抗原、またはエピトープなどのヒトPD-L1）などのグリコシル化ICPポリペプチドに特異的に結合する。本明細書において提供される抗glycICP抗体の「優先的結合」は、例えばグリコシル化PD-L1に優先的に結合する抗体について本明細書の実施例2において記述したように、ICPの非グリコシル化形態を発現する細胞への結合などの適切な対照と比較した、細胞上に発現するグリコシル化ICPへの抗体の結合の蛍光強度の定量に基づいて決定される。記述の抗ICP抗体のグリコシル化ICPポリペプチドまたはグリコシル化ICP発現細胞への優先的結合は、実施例2に記述されるアッセイを使用して、非グリコシル化ICPポリペプチドまたは非グリコシル化ICP発現細胞への抗体の結合と比較して、少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも6.7倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも14倍、少なくとも20倍またはそれ超高い、測定される蛍光結合強度(MFI)値によって示される。実施形態において、グリコシル化ICPに優先的または選択的に結合する抗glycICP抗体は、例えば実施例2におけるフローサイトメトリーアッセイに従って決定した場合に、ICPの非グリコシル化形態または完全にはグリコシル化されていないICPグリコシル化変種を発現する細胞の結合についての同じ抗体のMFI値より、ICPのグリコシル化形態を発現する細胞の結合について、1.5倍から25倍、または2倍から20倍、または3倍から15倍、または4倍から8倍、または2倍から10倍、または2倍から5倍大きいMFIを示す。前述の全ての間のおよび全てに等しい蛍光強度の倍率値が含まれると意図される。

10

20

30

40

50

【0063】

実施形態において、ヒトグリコシル化ICP（例えば、ヒトPD-L1）に特異的に結合する抗体は、少なくとも1つのN連結グリコシル化アミノ酸を含む細胞外ドメイン(ECD)またはグリコシル化ICPのECDに由来するペプチドに結合することができる。ヒトグリコシル化ICP抗原（例えば、ヒトPD-L1）に特異的に結合する抗体は、近縁の抗原（例えば、カニクイザル(cyno)ICP抗原）と交差反応することができる。好ましい実施形態において、ヒトグリコシル化ICP抗原に特異的に結合する抗体は、他のICP抗原と交差反応しない。ヒトグリコシル化ICP抗原に特異的に結合する抗体は、例えばイムノアッセイ法、Biacore、または当業者に公知の他の技術によって同定することができる。ある特定の実施形態において、本明細書において記述されるヒトグリコシル化ICPに結合する抗体は、20nM、19nM、18nM、17nM、16nM、15nM、14nM、13nM、12nM、11nM、10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、0.9nM、0.8nM、0.7nM、0.6nM、0.5nM、0.4nM、0.3nM、0.2nM、または0.1nM未満であるかまたはそれに等しい、および/または0.1nM超であるかまたはそれに等しい解離定数(K_d)を有する。ある特定の実施形態において、グリコシル化ICPに結合する抗体は、異なる種（例えば、ヒトとcyno PD-L1の間）のICPにおいて保存されているそのタンパク質のエピトープに結合する。抗体は、ラジオイムノアッセイ(RIA)、および酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)などの実験技術を使用して決定した場合に、任意の交差反応抗原より高い親和性でグリコシル化ICPに結合する場合、グリコシル化ICP抗原に特異的に結合する。典型的に、特異的または選択的反応は、バックグラウンドシグナルまたはノイズの少なくとも2倍であり、バックグラウンドの10倍超でありうる。例えば、抗体の特異性に関する考察に関しては、Paul, ed., 1989, Fundamental I

mmunology Second Edition, Raven Press, New York at pages 332 336を参照されたい。そのような実施形態において、「非標的」タンパク質への抗体の結合の程度は、例えば蛍光活性化細胞ソーティング (FACS) 分析または放射免疫沈殿 (RIA) によって決定した場合に、その特定の標的タンパク質への抗体の結合の約 10% 未満と予想される。

【0064】

実施形態において、抗グリコシル化 I C P 抗体は、グリコシル化 I C P に対して特異的である抗体、例えば抗グリコシル化 I C P 抗体または抗野生型 I C P (I C P W T) 抗体を含み、野生型 I C P タンパク質はグリコシル化されており、グリコシル化 I C P に対して特異的である抗体を含む。好ましい実施形態において、抗グリコシル化 I C P 抗体は、非グリコシル化 I C P と比較してグリコシル化 I C P に特異的かつ優先的に結合する。いくつかの実施形態において、抗グリコシル化 I C P 抗体は、I C P の線形のグリコシル化モチーフに結合する。いくつかの実施形態において、抗グリコシル化 I C P 抗体は、三次元においてグリコシル化モチーフの 1 つまたは複数の近位に位置するペプチド配列に結合する。いくつかの実施形態において、抗グリコシル化 I C P 抗体は、非グリコシル化 I C P と比較してグリコシル化モチーフを有する I C P またはそのペプチドの 1 つまたは複数のグリコシル化モチーフに選択的に結合する。他の実施形態において、抗グリコシル化 I C P 抗体は、I C P アミノ酸配列の連続アミノ酸を含む線形のエピトープに結合する。なお他の実施形態において、抗グリコシル化 I C P 抗体は、グリコシル化 I C P の不連続アミノ酸を含むコンフォメーション (非線形) エピトープに結合する。いくつかの実施形態において、抗グリコシル化 I C P 抗体またはその結合部分は、非グリコシル化 I C P と比較して示される K_d の少なくとも 30%、40%、50%、60%、70%、80%、または 90% より小さい K_d でグリコシル化 I C P に結合する。ある特定の実施形態において、抗 g l y c I C P 抗体またはその結合部分は、非グリコシル化 I C P と比較して示される K_d より 50% より小さい K_d でグリコシル化 I C P に結合する。いくつかの実施形態において、抗 g l y c I C P 抗体またはその結合部分は、非グリコシル化 I C P と比較して示される K_d の 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、30%、40%、50% より小さい K_d でグリコシル化 I C P に結合する。さらなる態様において、抗 g l y c I C P 抗体またはその結合部分は、非グリコシル化 I C P と比較して示される K_d より少なくとも 5 ~ 10 倍小さい K_d でグリコシル化 I C P に結合する。一実施形態において、抗 g l y c I C P 抗体またはその結合部分は、非グリコシル化 I C P と比較して示される K_d より少なくとも 10 倍小さい K_d でグリコシル化 I C P に結合する。ある特定の実施形態において、抗体は、I C P の非グリコシル化形態への結合によって示される K_d の 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、または 20% 以下である K_d でグリコシル化 I C P に結合する。一実施形態において、抗 I C P 抗体またはその結合部分は、ナノモル濃度の親和性で、例えば下限および上限の値を含む 5 ~ 20 n M または 10 ~ 20 n M の親和性で、グリコシル化 I C P に結合する。

【0065】

本明細書において抗体を参照して使用される用語「重 (H) 鎖」は、アミノ末端部分が約 115 ~ 130 またはそれ超のアミノ酸の可変 (V) 領域 (V ドメインとも呼ばれる) を含み、カルボキシ末端部分が定常 (C) 領域を含む、約 50 ~ 70 k D a のポリペプチド鎖を指す。定常領域 (または定常ドメイン) は、重鎖定常領域のアミノ酸配列に基づき、アルファ ()、デルタ ()、イプシロン ()、ガンマ ()、およびミュー (μ) と呼ばれる異なる 5 つのタイプ (例えば、アイソタイプ) の 1 つでありうる。異なる重鎖は、大きさが異なる： 、 、 および は、およそ 450 アミノ酸を含むが、 μ および は、およそ 550 アミノ酸を含む。軽鎖と併せると、これらの異なるタイプの重鎖はそれぞれ、5 つの周知のクラス (例えば、アイソタイプ) の抗体、すなわち、I g A、I g D、I g E、I g G、および I g M を生じ、I g G の 4 つのサブクラス、すなわち I g G 1、I g G 2、I g G 3、および I g G 4 を含む。抗体重鎖は、ヒト抗体重鎖でありうる。

10

20

30

40

50

【0066】

本明細書において抗体を参照して使用される用語「軽(L)鎖」は、約25kDaのポリペプチド鎖を指し、アミノ末端部分は、約100～約110またはそれ超のアミノ酸の可変ドメインを含み、カルボキシ末端部分は、定常領域を含む。軽鎖(VおよびCドメインの両方)のおおよその長さは、211～217アミノ酸である。軽鎖には2つの異なるタイプが存在し、定常ドメインのアミノ酸配列に基づいてカッパ()およびラムダ()と呼ばれる。軽鎖アミノ酸配列は、当技術分野で周知である。抗体軽鎖は、ヒト抗体軽鎖でありうる。

【0067】

本明細書において使用される用語「可変(V)領域」または「可変(V)ドメイン」は、軽(L)または重(H)鎖のアミノ末端に一般的に位置する抗体ポリペプチドのL鎖またはH鎖の部分指す。H鎖Vドメインは、約115～130アミノ酸長を有するが、L鎖Vドメインは、約100～110アミノ酸長である。HおよびL鎖Vドメインは、その特定の抗原に対するそれぞれの特定の抗体の結合および特異性において使用される。H鎖のVドメインは、「V_H」と呼ばれうる。L鎖のV領域は、「V_L」と呼ばれうる。用語「可変」は、Vドメインのある特定の区分が、異なる抗体の間で配列が大きく異なるという事実を指す。Vドメインは、抗原の結合を媒介して、その特定の抗原に対する特定の抗体の特異性を定義するが、可変性は抗体Vドメインの110アミノ酸の全長にわたって均一に分布しているわけではない。その代わりに、Vドメインは、それぞれが約9～12アミノ酸長である「超可変領域」または「相補性決定領域」(CDR)と呼ばれるより大きい可変性(例えば、極度の可変性)のより短い領域によって隔てられた約15～30アミノ酸のフレームワーク領域(FR)と呼ばれるより可変性の低い(例えば、比較的不变である)鎖からなる。抗体HおよびL鎖のVドメインはそれぞれ、4つのFRを含み、これらは大部分がシート立体配座を採用し、3つの超可変領域で接続され、シート構造を接続するループを形成し、いくつかの例ではシート構造の一部を形成する。それぞれの鎖における超可変領域は、FRによって共に近位に保持され、他の鎖からの超可変領域と共に、抗体の抗原結合部位の形成に参与する(例えば、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991を参照されたい)。Cドメインは、抗原への抗体の結合に直接関与しないが、抗体依存性細胞傷害性(ADCC)および補体依存性細胞傷害性(CDC)などの様々なエフェクター機能を示す。Vドメインは、異なる抗体クラスまたはタイプでは配列が大きく異なる。配列の多様性は、CDRに集中し、これは主に抗体と抗原との相互作用の原因である。特異的实施形態において、抗体の可変ドメインはヒトまたはヒト化可変ドメインである。

【0068】

本明細書において使用される用語「相補性決定領域」、「CDR」、「超可変領域」、「HVR」、および「HV」は、互換的に使用される。「CDR」は、抗体V_Hシートフレームワークの非フレームワーク領域内の3つの超可変領域(H1、H2、もしくはH3)の1つ、または抗体V_Lシートフレームワークの非フレームワーク領域内の3つの超可変領域(L1、L2、もしくはL3)の1つを指す。この用語は、本明細書において使用されるとき、配列が高度に可変でありおよび/または構造的に定義されたループを形成する抗体Vドメインの領域を指す。一般的に、抗体は、6つの超可変領域：V_Hドメインにおける3つ(H1、H2、H3)およびV_Lドメインにおける3つ(L1、L2、L3)を含む。したがって、CDRは、典型的に、Vドメインのフレームワーク領域配列内に介在する高度に可変の配列である。「フレームワーク」または「FR」残基は、CDRに隣接するそれらの可変領域残基である。FR残基は、例えばキメラ、ヒト化、ヒト、ドメイン抗体、ダイアボディ、線形抗体、二重特異性抗体または二重パラトープ性抗体に存在する。

【0069】

多数の高度可変領域の描写が使用されており、本明細書において包含される。CDR領

10

20

30

40

50

域は当業者に周知であり、例えば、抗体Vドメイン内の最も超可変性の領域としてKabatによって定義されている(Kabat et al., J. Biol. Chem. 252:6609-6616(1977); Kabat, Adv. Prot. Chem. 32:1-75(1978))。Kabat CDRは、配列多様性に基づいており、最も一般的に使用される(例えば、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)を参照されたい)。CDR領域配列はまた、保存されたシートフレームワークの一部ではなく、このため異なる立体構造を採用することができる残基としてChothiaによって構造的に定義されている(Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917(1987))。Chothiaは、その代わりに構造ループの位置を指す。Kabat付番の慣例を使用して付番したときのChothiaのCDR-H1ループの末端は、ループの長さに応じてH32からH34の間で変化する(これは、Kabatの付番スキームがH35AおよびH35Bで挿入を配置するために起こり; 35Aも35Bのいずれも存在しなければ、ループは32で終了し、35Aのみが存在する場合ループは33で終了し、35Aと35Bの両方が存在する場合、ループは34で終了する)。いずれの付番システムおよび専門用語も当技術分野で十分に認識されている。

10

【0070】

最近、普遍的な付番システム、Immunogenetics (IMGT) 情報システム(登録商標)(Lafranc et al., Dev. Comp. Immunol. 27(1):55-77(2003))が開発されて、広く使用されている。IMGTは、免疫グロブリン(Ig)、T細胞受容体(TR)、ならびにヒトおよび他の脊椎動物の主要組織適合複合体(MHC)を専門とする総合情報システムである。本明細書において、CDRは、アミノ酸配列と、軽鎖または重鎖内の位置の両方に関して参照される。免疫グロブリンVドメインの構造内のCDRの「位置」は、構造特徴に従って可変ドメイン配列を整列させる付番システムを使用することによって、種の間で保存されており、ループと呼ばれる構造で存在することから、CDRおよびフレームワーク残基は容易に同定される。この情報は、1つの種の免疫グロブリンからのCDR残基を典型的にヒト抗体からのアクセプターフレームワークに移植および置換するために使用することができる。追加の付番システム(AHon)が、Honegger and Pluckthun, J. Mol. Biol. 309: 657-670 (2001)によって開発されている。例えば、Kabatの付番とIMGTの独自の付番システムを含む付番システム間の対応は、当業者に周知である(例えば、Kabat、上記; Chothia and Lesk、上記; Martin、上記; およびLafranc et al., 1999, Nuc. Acids Res., 27:209-212を参照されたい)。

20

30

【0071】

CDR領域配列はまた、AbM、Contact、およびIMGTによっても定義されている。AbM超可変領域は、Kabat CDRとChothia構造ループの間の妥協点を表し、Oxford MolecularのAbM抗体モデリングソフトウェア(例えば、Martin, in Antibody Engineering, Vol. 2, Chapter 3, Springer Verlagを参照されたい)によって使用される。「contact」超可変領域は、利用可能な複合体の結晶構造の解析に基づく。これらの超可変領域またはCDRのそれぞれからの残基を以下に記す。

【0072】

CDR領域配列の例示的な描写を、以下の表3に例示する。標準的な抗体可変領域内のCDRの位置は、多数の構造との比較によって決定されている(Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); Morea et al., Methods 20:267-279 (2000))。超可変領域内の残基数は、異なる抗体において変化することから、標準的な可変領域付番スキーム(Al-Lazikani et al., 上記(1997))では、標準的な位置と比較した追加の残基を、慣例によって残基番号の次にa、b、cなどと付番する。そのような命名法は同様に当業者に周知である。

40

【0073】

【表 3】

表 3.CDR 領域配列の例示的な説明

	IMGT	Kabat	AbM	Chothia	Contact
V _H CDR1	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35
V _H CDR2	56-65	50-65	50-58	53-55	47-58
V _H CDR3	105-117	95-102	95-102	96-101	93-101
V _L CDR1	27-38	24-34	24-34	26-32	30-36
V _L CDR2	56-65	50-56	50-56	50-52	46-55
V _L CDR3	105-117	89-97	89-97	91-96	89-96

10

【 0 0 7 4 】

「親和性成熟」抗体は、それらの変更を有しない親抗体と比較して、抗原に対する抗体の親和性の改善が起こる、1つまたは複数のそのHVRにおける1つまたは複数の変更（例えば、変化、付加、および/または欠失を含むアミノ酸配列の変動）を有する抗体である。ある特定の形態において、親和性成熟抗体は、標的抗原、例えばグリコシル化PD-L1に対してナノモル濃度またはピコモル濃度の親和性さえ有すると予想される。親和性成熟抗体は、当技術分野で公知の技法によって産生される。総説に関しては、Hudson and Souriau, *Nature Medicine* 9:129-134(2003); Hoogenboom, *Nature Biotechnol.* 23:1105-1116(2005); Quiroz and Sinclair, *Revista Ingeneria Biomedica* 4:39-51(2010)を参照されたい。

20

【 0 0 7 5 】

「キメラ」抗体は、所望の生物活性を示す限り、Hおよび/またはL鎖の一部、例えばVドメインが、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における対応するアミノ酸配列と同一または相同であるが、鎖の残り、例えばCドメインは、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における対応する配列と同一または相同である抗体、ならびにそのような抗体の断片である（例えば、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）。

30

【 0 0 7 6 】

「ヒト化」された非ヒト（例えば、マウス）抗体は、本来のCDR残基が、所望の特異性、親和性、ならびに抗原結合および相互作用能を有する非ヒト種（例えば、ドナー抗体）、例えばマウス、ラット、ウサギ、または非ヒト霊長類の対応するCDRの残基で置き換えられているヒト免疫グロブリン配列を指す抗体（例えば、レシピエント抗体）のキメラ形態である。いくつかの例において、ヒト免疫グロブリンの1つまたは複数のFR領域残基を同様に、対応する非ヒト残基で置き換えてもよい。加えて、ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体において見出されない残基を含みうる。これらの改変は、ヒト化抗体の性能をさらに精密化するために行われる。ヒト化抗体のHまたはL鎖は、CDRの全てまたは実質的に全てが、非ヒト免疫グロブリンのCDRに対応し、FRの全てまたは実質的に全てがヒト免疫グロブリン配列のFRである、少なくとも1つまたは複数の可変領域の実質的に全てを含みうる。ある特定の形態において、ヒト化抗体は、典型的に、ヒト免疫グロブリンの、免疫グロブリン定常領域の少なくとも一部（Fc）を含む。当業者に公知であるが、さらなる詳細は、望ましければ、例えばJones et al., *Nature*, 321:522-525(1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-329(1988); およびPresta, *Curr. Op. 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号明細書（2004年10月5日発行）、同第6,719,971号明細書（2005年9月27日発行）、同第6,639,055号明細書（2003年10月28日発行）、同第6,407,213号明細書（2002年6月18日発行）、および同第6,054,297号明細書（2000年4月25日発行）において見出されうる。

40

50

【0077】

用語「ヒト抗体」および「完全ヒト抗体」は、本明細書において互換的に使用され、ヒトによって産生された、および/または当業者によって実践されるようにヒト抗体を作製する技術のいずれかを使用して作製されている抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有する抗体を指す。ヒト抗体のこの定義は、具体的には、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を除外する。ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリ (Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381(1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581(1991))、および酵母ディスプレイライブラリ (Chao et al., Nature Protocols 1:755-768(2006)) を含む、当技術分野で公知の様々な技術を使用して産生することができる。Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77(1985); Boerner et al., J. Immunol., 147(1):86-95(1991)に記述される方法も同様に、ヒトモノクローナル抗体の調製に利用可能である。同様にvan Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol., 5: 368-74(2001)も参照されたい。ヒト抗体は、その内因性のIg座が無能力化されていて、抗原チャレンジに应答してヒト抗体が生成されるように、ヒト抗体をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子を有するように遺伝子改変されているトランスジェニック動物、例えばマウスに抗原を投与することによって調製することができる(例えば、Jakobovits, A., Curr. Opin. Biotechnol. 1995, 6(5):561-6; Bruggemann and Taussing, Curr. Opin. Biotechnol. 1997, 8(4):455-8; ならびにXENOMOUSE(商標)技術に関して米国特許第6,075,181号明細書および同第6,150,584号明細書を参照されたい)。同様に、例えばヒトB細胞ハイブリドーマ技術によって生成されるヒト抗体に関して、Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562(2006)も参照されたい。特異的实施形態において、ヒト抗体は、ヒト起源の可変領域と定常領域とを含む。「完全なヒト」抗グリコシル化ICP抗体はまた、ある特定の实施形態において、免疫チェックポイントポリペプチドに結合し、ヒト生殖系列免疫グロブリン核酸配列の天然に存在する体細胞変種である核酸配列によってコードされる抗体も包含することができる。特異的实施形態において、本明細書において提供される抗グリコシル化ICP抗体は、完全なヒト抗体である。用語「完全ヒト抗体」は、Kabataら(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を参照されたい)によって記述されるヒト生殖系列免疫グロブリン配列に対応する可変および定常領域を有する抗体を含む。語句「組み換えヒト抗体」は、組み換え手段によって調製、発現、作製、または単離されたヒト抗体、例えば宿主細胞にトランスフェクトされた組み換え発現ベクターを使用して発現された抗体;組み換えコンビナトリアルヒト抗体ライブラリから単離された抗体;ヒト免疫グロブリン遺伝子についてトランスジェニックおよび/またはトランスクロモソームである動物(例えば、マウスまたはウシ)から単離された抗体(例えば、Taylor, L. D., et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295を参照されたい);またはヒト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伴う他の任意の手段によって調製、発現、作製、もしくは単離された抗体を含む。そのような組み換えヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変および定常領域を有する(Kabat, E. A., et al., 1991、同上を参照されたい)。しかし、ある特定の实施形態において、そのような組み換えヒト抗体は、*in vitro*変異誘発(またはヒトIg配列についてトランスジェニックである動物を使用するときは、*in vivo*体細胞変異誘発)を受け、このため、組み換え抗体のV_HおよびV_L領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列V_HおよびV_L配列に由来して関連するが、*in vivo*でヒト抗体生殖系列レパートリー内に天然には存在しない配列である。

【0078】

本明細書において使用される用語「エピトープ」は、1つの抗体分子が結合する抗原分子の表面上の部位または領域、例えば抗原、例えば抗ICPまたは抗glycICP抗体の1つまたは複数の抗原結合領域が結合することができるICPポリペプチドまたはグリコシル化ICPポリペプチドの表面上の局所領域である。エピトープは、免疫原性であり

10

20

30

40

50

えて、動物において免疫応答を誘発することができる。エピトープは、必ずしも免疫原性である必要はない。エピトープはしばしば、アミノ酸または糖側鎖などの分子の化学活性表面基からなり、特異的三次元構造特徴および特異的電荷特徴を有する。エピトープは、線形エピトープおよびコンフォメーションエピトープでありうる。エピトープに關与するポリペプチドの領域は、線形エピトープを形成するポリペプチドの連続するアミノ酸でありうるか、またはエピトープは、典型的にコンフォメーションエピトープと呼ばれるポリペプチドの2つもしくはそれ超の不連続なアミノ酸もしくは領域から形成されうる。エピトープは、抗原の三次元表面特徴であってもなくてもよい。ある特定の実施形態において、グリコシル化免疫チェックポイントポリペプチドエピトープは、グリコシル化免疫チェックポイントポリペプチドの三次元表面特徴である。他の実施形態において、グリコシル化免疫チェックポイントポリペプチドエピトープは、グリコシル化免疫チェックポイントポリペプチドの線形の表面特徴である。いくつかの実施形態において、免疫チェックポイントポリペプチドエピトープは、非グリコシル化免疫チェックポイントポリペプチドである。いくつかの実施形態において、グリコシル化免疫チェックポイントポリペプチドエピトープは、1つまたは複数の部位でグリコシル化されている。一般的に、抗原はいくつかのまたは多くの異なるエピトープを有し、多くの異なる抗体と反応することができる。特定の実施形態において、抗グリコシル化免疫チェックポイントポリペプチド抗体は、コンフォメーションエピトープであるグリコシル化免疫チェックポイントポリペプチド、例えばグリコシル化PD-L1のエピトープに結合する。

10

20

【0079】

抗体は、2つの抗体が、三次元空間において、同一の、重なり合う、または隣接するエピトープを認識するとき、「1つのエピトープ」、または参照抗体と「本質的に同じエピトープ」もしくは「同じエピトープ」に結合する。2つの抗体が、三次元空間において、同一、重なり合う、または隣接するエピトープに結合するか否かを決定するために最も広く使用される迅速な方法は、競合アッセイであり、これは例えば標識抗原または標識抗体のいずれかを使用する多数の異なるフォーマットで構成することができる。いくつかのアッセイにおいて、抗原を96ウェルプレートに固定するか、または細胞表面上で発現させて、非標識抗体が、標識抗体の抗原への結合を遮断する能力を、検出可能なシグナル、例えば放射活性、蛍光、または酵素標識を使用して測定する。

30

【0080】

グリコシル化免疫チェックポイントポリペプチド標的タンパク質またはそのペプチド上の同じエピトープまたは結合部位について競合する抗グリコシル化免疫チェックポイントポリペプチド抗体の文脈において使用する時の用語「競合する」は、試験中の抗体またはその結合断片が、共通の抗原（例えば、ICPまたはその断片）への参照分子（例えば、参照リガンド、または参照抗原結合タンパク質、例えば参照抗体）の特異的結合を防止、遮断、または阻害するアッセイにおいて決定した場合の競合を意味する。多数のタイプの競合結合アッセイを使用して、試験抗体が、グリコシル化免疫チェックポイントポリペプチドまたはそのエピトープ（例えば、ヒトPD-L1またはヒトグリコシル化PD-L1）への結合について参照抗体と競合するか否かを決定することができる。使用することができるアッセイの例には、固相の直接または間接的ラジオイムノアッセイ（RIA）；固相の直接または間接的酵素イムノアッセイ（EIA）、サンドイッチ競合アッセイ（例えば、Stahli et al., (1983) *Methods in Enzymology* 9:242-253を参照されたい）；固相の直接のピオチン-アビジンEIA（例えば、Kirkland et al., (1986) *J. Immunol.* 137:3614-3619を参照されたい）；固相の直接標識アッセイ；固相の直接標識サンドイッチアッセイ（例えば、Harlow and Lane, (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Pressを参照されたい）；標識ヨウ素（ I^{125} 標識）を使用する固相の直接標識RIA（例えば、Morel et al., (1988) *Molec. Immunol.* 25:7-15を参照されたい）；固相の直接ピオチン-アビジンEIA（例えば、Cheung, et al., (1990) *Virology* 176:546-552を参照されたい）；および直接標識RIA（Moldenhauer et al., (1990) *Scand. J. Immunol.* 32:77-82）が挙げられる。典型的に、そのようなアッセイは、固

40

50

体表面に結合した精製グリコシル化 I C P 抗原（例えば、ヒト P D - L 1 またはグリコシル化 P D - L 1）、または非標識試験抗原結合タンパク質（例えば、試験抗 P D - L 1 抗体）もしくは標識参照抗原結合タンパク質（例えば、参照抗 P D - L 1 抗体）のいずれかを有する細胞の使用を伴う。競合的阻害は、試験抗原結合タンパク質の公知の量の存在下で固体表面または細胞に結合した標識の量を決定することによって測定することができる。通常、試験抗原結合タンパク質は過剰に存在する。競合アッセイによって同定される抗体（競合抗体）は、立体妨害を引き起こすために、参照抗体と同じエピトープに結合する抗体、および/または参照抗体が結合するエピトープに十分に近位の隣接するエピトープに結合してする抗体を含む。競合的結合を決定する方法に関するさらなる詳細を本明細書に記述する。通常、競合抗体タンパク質が過剰に存在するとき、競合抗体は、共通の抗原への参照抗体の特異的結合を少なくとも 15%、または少なくとも 23%、例えば 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、または 75% またはそれ超、および記載の量の間のパーセント量で阻害するが、これらに限定されない。いくつかの例において、結合は、少なくとも 80%、85%、90%、95%、96%、または 97%、98%、99%、またはそれ超阻害される。

10

【0081】

本明細書において使用される用語「遮断」抗体または「アンタゴニスト」抗体は、それが結合する抗原の生物活性または機能的活性を防止、阻害、遮断、または低減させる抗体を指す。遮断抗体またはアンタゴニスト抗体は、抗原の生物活性または機能を、実質的または完全に防止、阻害、遮断、または低減させることができる。例えば、ブロッキング抗グリコシル化免疫チェックポイントポリペプチド抗体は、相互作用する 2 つの I C P、例えば P D - L 1 と P D - 1 との間の結合相互作用を防止、阻害、遮断、または低減することができ、このように相互作用に関連する免疫抑制機能を防止、遮断、阻害、または低減する。用語遮断、阻害、および中和は、本明細書において互換的に使用され、抗グリコシル化免疫チェックポイントポリペプチド抗体が、I C P - I C P 相互作用を防止するかまたはそうでなければ妨害する能力を指す。

20

【0082】

本明細書において使用される用語「ポリペプチド」または「ペプチド」は、ペプチド結合によって連結された一続きの 3 またはそれ超のアミノ酸のアミノ酸のポリマーを指す。「ポリペプチド」は、タンパク質、タンパク質断片、タンパク質アナログ、オリゴペプチドなどでありうる。ポリペプチドを構成するアミノ酸は、天然由来または合成でありうる。ポリペプチドは、生物試料から精製してもよい。例えば、I C P ポリペプチドまたはペプチドは、I C P のアミノ酸配列の少なくとも 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または 25 連続アミノ酸で構成されうる。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、ヒト免疫チェックポイントポリペプチドまたはグリコシル化免疫チェックポイントポリペプチドの少なくとも 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、270、280、または 285 連続アミノ酸を有する。ある特定の実施形態において、グリコシル化または非グリコシル化免疫チェックポイントポリペプチドは、免疫チェックポイントポリペプチドまたはグリコシル化免疫チェックポイントのアミノ酸配列の少なくとも 5 連続アミノ酸残基、少なくとも 10 連続アミノ酸残基、少なくとも 15 連続アミノ酸残基、少なくとも 20 連続アミノ酸残基、少なくとも 25 連続アミノ酸残基、少なくとも 40 連続アミノ酸残基、少なくとも 50 連続アミノ酸残基、少なくとも 60 連続アミノ酸残基、少なくとも 70 連続アミノ酸残基、少なくとも 80 連続アミノ酸残基、少なくとも 90 連続アミノ酸残基、少なくとも 100 連続アミノ酸残基、少なくとも 125 連続アミノ酸残基、少なくとも 150 連続アミノ酸残基、少なくとも 175 連続アミノ酸残基、少なくとも 200 連続アミノ酸残基、少なくとも 250 連続アミノ酸残基を含む。

30

40

50

【0083】

本明細書において使用される用語「アナログ」は、参照ポリペプチドと類似もしくは同一の機能を保有するが、必ずしも参照ポリペプチドと類似もしくは同一のアミノ酸配列を含まないか、または参照ポリペプチドと類似もしくは同一の構造を保有しないポリペプチドを指す。参照ポリペプチドは、ICP、例えばPD-L1ポリペプチド、ICPの断片、抗ICP抗体、または抗グリコシル化ICP抗体でありうる。参照ポリペプチドと類似のアミノ酸配列を有するポリペプチドは、本明細書において記述されるICPまたは抗グリコシル化ICP抗体でありうる参照ポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドを指す。参照ポリペプチドと類似の構造を有するポリペプチドは、ICPまたは抗グリコシル化ICP抗体でありうる参照ポリペプチドの構造と類似の二次、三次、または四次構造を有するポリペプチドを指す。ポリペプチドの構造は、X線結晶学、核磁気共鳴法(NMR)、および結晶電子顕微鏡を含むがこれらに限定されるわけではない、当業者に公知の方法によって決定することができる。

10

【0084】

本明細書において使用される用語「変種」は、ICPまたは抗グリコシル化ICP抗体に関連して使用するとき、ネイティブまたは非改変のICP配列または抗ICP抗体配列と比較して1つまたは複数(例えば、約1~約25、約1~約20、約1~約15、約1~約10、または約1~約5個など)のアミノ酸配列の置換、欠失、および/または付加を有するポリペプチドまたは抗グリコシル化ICP抗体を指す。例えば、ICP変種は、ネイティブICPのアミノ酸配列に対する1つまたは複数(例えば、約1~約25、約1~約20、約1~約15、約1~約10、または約1~約5個など)の変化に起因しうる。同様に、例として、抗ICP抗体の変種は、ネイティブまたはこれまで未改変の抗ICP抗体のアミノ酸配列に対する1つまたは複数(例えば、約1~約25、約1~約20、約1~約15、約1~約10、または約1~約5個など)の変化に起因しうる。変種は、対立遺伝子変種もしくはスプライス変種などの天然に存在しうるか、または人為的に構築することができる。ポリペプチド変種は、変種をコードする対応する核酸分子から調製することができる。

20

30

【0085】

本明細書において使用される用語「誘導体」は、アミノ酸残基の置換、欠失、または付加の導入によって変更されている参照ポリペプチドのアミノ酸配列を含むポリペプチドを指す。参照ポリペプチドは、ICPまたは抗グリコシル化ICP抗体でありうる。本明細書において使用される用語「誘導体」はまた、例えば任意のタイプの分子をポリペプチドに共有結合により付着させることによって化学的に改変されているICPまたは抗グリコシル化ICP抗体を指す。例えば、ICPまたは抗グリコシル化ICP抗体は、例えばグリコシル化、アセチル化、peg化、リン酸化、アミド化、公知の保護基/ブロック基による誘導体化、タンパク質分解、細胞リガンドへの連結、ペプチドもしくはタンパク質タグ分子への連結、または他のタンパク質などによって化学改変することができる。誘導体は、付着した分子のタイプまたは位置のいずれかで、天然に存在するまたは開始ペプチドもしくはポリペプチドとは異なるように改変される。誘導体はさらに、ペプチドまたはポリペプチド上に本来存在する1つまたは複数の化学基の欠失を含みうる。ICPまたは抗グリコシル化ICP抗体の誘導体は、特異的化学的切断、アセチル化、製剤化、ツニカマイシンによる代謝合成などを含むがこれらに限定されるわけではない当業者に公知の技術を使用する化学的改変によって化学的に改変されうる。さらに、ICPまたは抗グリコシル化ICP抗体の誘導体は、1つまたは複数の非古典的アミノ酸を含みうる。ポリペプチド誘導体は、本明細書において記述されるICPまたは抗グリコシル化ICP抗体でありうる、参照ポリペプチドと類似または同一の機能を保有する。

40

50

【0086】

本明細書において使用される用語「組成物」は、明記された構成成分（例えば、本明細書において提供されるポリペプチドまたは抗体）を、任意選択で明記された量または有効量で含む産物、および任意選択で明記された量または有効量の、特異的構成成分の併用または相互作用に直接または間接的に起因する任意の所望の産物を指す。

【0087】

本明細書において使用される用語「処置する」、「処置」、「または「処置している」は、少なくとも1つの陽性の治療効果または利益を得る目的、例えば疾患または健康関連状態を処置する目的で、それを必要とする対象に治療剤を投与もしくは適用すること、または対象に技法もしくはモダリティを行うことを指す。例えば、処置は、様々なタイプのがんを処置する目的での、グリコシル化ICPに特異的に結合する抗体またはその組成物もしくは製剤の薬学的有効量の投与を含みうる。用語「処置レジメン」、「投与レジメン」、または「投与プロトコール」は、互換的に使用され、治療剤、例えば本明細書において記述される方法によって産生された抗グリコシル化ICP抗体の投与時期および用量を指す。本明細書において使用される用語「対象」は、がんを有するまたはがんを有すると診断されたヒトまたは非ヒト動物、例えば霊長類、哺乳動物および脊椎動物のいずれかを指す。好ましい実施形態において、対象はヒトである。いくつかの実施形態において、対象はがん患者である。一実施形態において、必要とする対象は、抗グリコシル化ICP抗体、例えば抗glycPD-L1抗体処置から利益を得るまたは得ると予測される。

10

【0088】

本明細書において使用される用語「治療上有益な」または「治療上有効な」は、必要とする対象（例えば、がんを有する、またはがんを有すると診断された対象）の、特に抗グリコシル化ICP抗体の使用およびこれらの抗体を使用する方法の実施の結果としての、状態の医学的処置、治療、用量の投与に関する幸福度の促進または増強を指す。これには、疾患の兆候または症状の頻度または重症度の低減が挙げられるがこれらに限定されるわけではない。例えば、がんの処置は、例えば腫瘍の大きさの低減、腫瘍の浸潤性もしくは重症度の低減、末梢組織もしくは臓器へのがん細胞の浸潤の低減、腫瘍もしくはがんの増殖速度の低減、または転移の予防もしくは低減を伴いうる。がんの処置はまた、対象において持続的な応答を達成すること、またはがんを有する対象の生存を延長させることも指しうる。

20

30

【0089】

グリコシル化免疫チェックポイントタンパク質に優先的に結合する抗体を産生する方法
抗体産生に関して、レシピエント動物に、グリコシル化ICPまたはペプチドなどの抗原を接種して、免疫応答を生成し、グリコシル化ICPまたはペプチド、例えばPD-L1に対して特異的な抗体を産生する。免疫応答を増強するために、しばしば、抗原を別の分子に結合またはコンジュゲートさせる。本明細書において使用されるように、コンジュゲートは、動物において免疫応答を誘発するために使用される、抗原に結合する任意のペプチド、ポリペプチド、タンパク質、または非タンパク質様物質である。抗原の接種に反応して動物において産生される抗体は、多様な個々の抗体産生Bリンパ球によって作製される多様な非同一の分子（ポリクローナル抗体）を含む。ポリクローナル抗体は、それぞれが、同じ抗原上の異なるエピトープを認識しうる抗体種の混合集団である。動物におけるポリクローナル抗体産生に対する正確な条件を考慮すると、動物の血清中の抗体のほとんどは、動物が免疫されている抗原性化合物上の集合的エピトープを認識する。この特異性を親和性精製によってさらに増強して、目的の抗原またはエピトープを認識するこれらの抗体のみを選択する。

40

【0090】

モノクローナル抗体（MAb）を作製する方法は、ポリクローナル抗体を調製する方法と同じ方向に沿って始まる。いくつかの実施形態において、マウスおよびラットなどの齧歯類を、モノクローナル抗体の生成に使用する。いくつかの実施形態において、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

50

知であり、特定の利点を提供しうる。マウス（例えば、BALB/cマウス）は日常的に使用され、一般的に、安定な融合体を高い割合で生じる。モノクローナル抗体産生に使用されるハイブリドーマ技術は、グリコシル化ICP抗原によって予め免疫したマウスから単離した1つの抗体産生Bリンパ球と、不死化骨髄腫細胞、例えばマウス骨髄腫細胞株との融合を伴う。この技術は、1つの抗体産生細胞を、無限の世代にわたって繁殖させる方法を提供し、それによって同じ抗原またはエピトープ特異性を有する構造的に同一の抗体、すなわちモノクローナル抗体の無限の量が産生されうる。免疫した動物に由来するモノクローナル抗体の集団を発現するハイブリドーマまたは他の細胞の集団を、本明細書において記述される抗グリコシル化ICP抗体についてスクリーニングしてもよい。

【0091】

特定の実施形態において、グリコシル化ICP、または本明細書において記述されるそのグリコシル化ペプチド部分、例えばグリコシル化PD-L1またはそのペプチドは、投与スキームに従う注射経路によって、レシピエント動物、例えばマウスまたはラットに投与される。典型的に、初回免疫を与え、動物を一定期間、例えば限定されないが7~15日間休息させ、追加免疫を既定の期間、例えば2~3週間または1ヶ月間与える。追加免疫期間の間に、動物を、当技術分野で通常使用される方法によって血漿または血清中の抗体力価について試験してもよい。この目的に関して、数週間の免疫後に血清中抗体を測定するために、動物から血液試料を得る。マウスから少量の血液を採取するために、*Clinical Chemistry of Laboratory Animals*, Eds. W.F. Loeb and F.W. Quimby, Taylor & Francis, 1999に記載されるような、いくつかの人的技術が開発されている。血清中抗体力価を、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)およびフローサイトメトリーなどの様々な技術によって決定する。抗体力価が高い場合、細胞融合を行うことができる。力価が低すぎる場合には、繰り返し採血によって決定して適切な応答が達成されるまでマウスに追加免疫を行うことができる。抗体力価が十分に高い場合、マウスにアジュバントなしで抗原を、例えば融合の3日前であるが、前回の免疫の2週間後に、腹腔内または静脈内(尾静脈を介して)に注射することによって一般的に追加免疫する。

【0092】

抗体力価が当技術分野の医師によって決定した場合に十分である場合、マウスを安楽死させてその脾臓を摘出する。脾細胞を単細胞浮遊液に分散させて、細胞融合および*in vitro*でのハイブリドーマの産生にとって適切な条件下で、不死化骨髄腫細胞株(例えば、限定されないが、Sp/02)と混合する。有限の寿命を有する抗体産生脾細胞を、不死化骨髄腫細胞に由来する細胞と融合することによって、無限に成長することができるハイブリドーマが得られる。骨髄腫細胞は、細胞融合後に使用するヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン(HAT)選択培地に対するその感受性を確保するために、8-アザグアニンと共に培養した不死化細胞である。細胞融合の約1週間前に、骨髄腫細胞を8-アザグアニン中で成長させ、細胞は高い生存率および急速な成長を有しなければならない。HAT選択培地は、融合した細胞のみを培養中で生存させる。HAT選択技術において、選択増殖培地は、ヌクレオチドを作製する合成経路を遮断する阻害剤であるアミノプテリンを含む。したがって、細胞は、核酸を合成するために迂回経路を使用しなければならない。この経路は、通常の抗体産生細胞を融合する骨髄腫細胞株において欠損している。骨髄腫も抗体産生細胞もいずれも単独で成長することができないことから、ハイブリッド細胞である「ハイブリドーマ」のみが、細胞分裂を経て、培養中で持続して増殖する。(Monoclonal Antibody Production, 1999, Inst. For Laboratory Animal Research and National Research Council, National Academy Press)。

【0093】

細胞融合は、新しく採取した脾細胞と骨髄腫細胞とを、細胞膜融合増強剤であるポリエチレングリコール中で同時に遠心沈降させることによって実施する。次に、細胞を、マウス腹腔の食塩水洗浄液に由来しうるフィーダー細胞の存在下または非存在下でマルチウェルプレートに分配する。フィーダー細胞は、ハイブリドーマ細胞の成長を促進する増殖因子を供給すると考えられているが、培養細胞の成長を支持し、増殖因子を含む培地のコレ

10

20

30

40

50

クションに起因する市販の調製物を、マウス由来フィーダー細胞の代わりに使用することができる。マウスの骨髄由来マクロファージもフィーダー細胞として使用することができる。マルチウェルプレートからのハイブリドーマ細胞の小さいクラスターを組織培養において成長させた後、本明細書において記述される方法によって抗原結合について選択することができる。ハイブリドーマはまた、マウス腹水中で成長することができ、これを後にクローニングすることができる。ハイブリドーマ細胞の限界希釈「クローニング」により、多数のウェルがそれぞれ多くて単一のクローンを確実に含む。当業者は、増大およびさらに成長することができるハイブリドーマを選択することができる。ハイブリドーマを、適した結合特異性を有するモノクローナル抗体の産生についてスクリーニングする。

【0094】

モノクローナル抗体のスクリーニングは、当技術分野で公知の様々な技法を通して、例えば抗体がバクテリオファージの表面上に提示される細菌系（「ファージディスプレイ」技法）において達成してもよいが、他のスクリーニング技術も同様に想定される。ヒトコンピナトリアル抗体ライブラリから、ヒト抗体を同定および単離してもよい。例えば、参照により全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第6,946,546号明細書に記述されるように、動物の免疫を行うことなく、バクテリオファージ抗体発現技術によって、特異的抗体を産生することができる。これらの技術は、Marks et al., 1992, Bio/Technol., 10:779-783; Stemmer, 1994, Nature, 370:389-391; Gram et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:3576-3580; Barbas et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:3809-3813; および Schier et al., 1996, Gene, 169(2):147-155に詳しく記述されている。

【0095】

例えば、グリコシル化ICPまたはそのペプチドに特異的かつ優先的に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を選択および同定する、ハイブリドーマライブラリ技術を使用してもよい。ハイブリドーマライブラリを、クローニングの前に抗体結合活性について試験することができる。そのようなプロセスは、真のクローンの分析を可能にし、複数ラウンドのサブクローニングを必要としない、フローサイトメトリーによる単細胞のクローニングを含む（例えば、Antibody Solutions, Sunnyvale, CAを参照されたい）。FACSソーティングを繰り返し使用して、特に多数の抗グリコシル化ICP抗体をその表面上に表示するそれらのハイブリドーマ細胞変種を選択することができる。ハイブリドーマライブラリは、多数の種におけるin vivo親和性成熟；自己抗原結合に関する負の選択；重鎖および軽鎖の天然の対形成；ハイブリドーマによる直接抗体分泌；発現に関するクローニングなし；および抗体の哺乳動物翻訳後修飾と共に利用することができる非常に感度が高くかつ特異的である誘導系を有しうる。（Antibody Solutions, Sunnyvale, CA）。所望の抗グリコシル化ICP抗体を産生するハイブリドーマを、本明細書において記述される方法を使用してスクリーニングおよび同定した後、クローンを増大させて、さらに使用するために抗体を単離することができる。

【0096】

ハイブリドーマ技術によって産生されたモノクローナル抗体、またはファージディスプレイライブラリなどの抗体発現細胞の他の集団を、特定の抗原に特異的に結合する抗体の選択および同定に関して公知のプロトコルおよび技術を使用して結合特異性について選択してもよい。当業者に公知であるように、多様な直接、間接、および競合結合アッセイを使用して、標的抗原に特異的に結合する抗体についてアッセイしてもよい。実例として、限定ではないが、グリコシル化ICP抗原を、固相基質に結合させて、適切な検出可能に標識されたレポーター分子、例えば標識二次抗体を使用して、固相基質上のグリコシル化ICP抗原に結合している抗glycICP抗体の特異的結合を決定してもよい。加えて、抗体が細胞表面上に表示される抗体のライブラリ、例えばファージディスプレイライブラリをスクリーニングする場合、ライブラリを、グリコシル化ICP抗原に結合する抗体について「パニング」してもよい。抗体が選択される抗原またはリガンドを、検出可能

10

20

30

40

50

または選択可能標識によって標識してもよく、抗体発現細胞集団を、検出可能または選択可能な標識に接触させた後、標識した抗原に結合する抗体を発現する細胞を選択する。例えば、標識がビオチンである場合、ビオチン標識抗原に結合する抗体を発現する細胞を、固相支持体、ビーズ等に存在しうるストレプトアビジンへのビオチンの結合を使用して分離することができる。

【0097】

特定の実施形態において、スクリーニングされる抗体集団は、ICPの非グリコシル化形態と比較してICPのグリコシル化形態に優先的に結合する抗体についてアッセイすることができる。例えば、グリコシル化ICPを発現する、優先的に組み換えにより発現する細胞を、例えばビオチンによって標識し、ICPの非グリコシル化形態を発現するが、標識されていないか、または異なる標識を有する細胞と混合する。例えば、ICP上のグリコシル化部位または複数の部位を、ICPがグリコシル化されないように変異（例えば、グリコシル化コンセンサス部位におけるアスパラギンのグルタミンへの置換）させてもよい。細胞混合物を、試験される抗体、ならびに標識細胞（グリコシル化形態を発現する細胞）に結合するが非標識細胞には結合しない分子と共にインキュベートする。例えば、標識がビオチンである場合、細胞混合物を、試験される抗体および標識されたストレプトアビジンと共にインキュベートする。次に細胞を、細胞に結合したいかなる抗体も検出するために、標識された二次抗体と共にインキュベートする。当技術分野で公知の任意の方法を使用して、グリコシル化ICPを発現する細胞および非グリコシル化ICPを発現する細胞への抗体の結合を比較することができる。例えば、グリコシル化ICPを発現する細胞と非グリコシル化ICPを発現する細胞とを分離して、二次抗体結合レベルを、FACS/フローサイトメトリー分析によって測定し、グリコシル化ICPおよび非グリコシル化ICPへの抗体の相対的結合を評価することができる。例示的な方法を、実施例2に記述し、非グリコシル化ICPと比較してグリコシル化ICPへの2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍または10倍大きい結合を有する抗体を、優先的に結合するグリコシル化ICPとして選択してもよい。

10

20

【0098】

グリコシル化ICPに特異的に結合する抗体を最初に同定した後、それらの抗体を、非グリコシル化形態への結合を比較するために、当技術分野で公知の他の任意の方法によってさらにスクリーニングおよび分析することができる。例えば、抗体は、抗原結合に関する、任意の結合アッセイ、例えばELISA、ラジオイムノアッセイ、BIACORE等に存在しうる。特定の実施形態において、グリコシル化ICPおよび非グリコシル化ICPは、固相表面（例えば、アッセイプレートのウェル）上にコーティングされる。非グリコシル化ICPは、グリコシル化を除去する酵素、例えばN-連結グリコシル化を除去するPNGアーゼによってグリコシル化ICPを処置することによって、または発現細胞によってグリコシル化されないように変異体グリコシル化部位を有するICPを組み換えにより発現させることによって生成してもよい。次に、抗体を、抗体の多様な濃度でグリコシル化および非グリコシル化形態の結合についてアッセイし、非グリコシル化ICPと比較してグリコシル化ICPについての結合親和性の差を検出する。

30

【0099】

加えて、優先的結合も同様に、ウェスタンブロットまたはFACSフローサイトメトリー分析によって試験することができる。当業者に周知であるように、ウェスタンブロットは、抗体が特異的に結合するエピトープを含むタンパク質を分離および同定するために使用される実験研究技術である、一般的に、技術は、ゲル電気泳動を介してサイズ/分子量によってタンパク質抗原（しばしば細胞溶解物中）を分離することを伴う。ゲル上で分離されたタンパク質を、ナイロン、ポリフッ化ビニリデン（PVDF）、またはニトロセルロースなどの固相のメンブレン支持体に転写し、検出可能に標識された抗体を、抗体が、抗体によって特異的に認識されるエピトープを含む固相支持体上のタンパク質に結合することができる条件でインキュベートする。結合したタンパク質を可視化して、定量することができる。同様に、結合を検出するために、第一の抗原特異的抗体に結合する標識され

40

50

た二次抗体を使用することも可能である。非制限的な例として、Mahmood and Yang, 2012, NAM J Med Sci, 4(9):429-434を参照されたい。同様に、当業者に公知であるように、フローサイトメトリーは、単細胞の多数の特徴および特性を迅速に定量するために、一度に1つの細胞がレーザービームを通り過ぎて流れる自動フローサイトメーター機器（FCまたはFCM）を使用して行われる。FCは、細胞のサイズ、細胞の充実度、特異的表面受容体タンパク質の量、細胞内タンパク質の量、総DNAなどの細胞成分の量、新たに合成されたDNA、特定の遺伝子のメッセンジャーRNAの量としての遺伝子発現、または生きている細胞における一過性のシグナリング事象を測定することができる。量は通常、相対的であるが、絶対値が必要である場合には、細胞あたりの分子数でありうる。典型的に、3～6個の特性または成分が、単一の試料において細胞毎に約 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 個の細胞について1分未満で定量されうる。（Brown, M. and Wittwer, C., 2000, Clin. Chem., 46(8):1221-1229; and Martz, E., 2003, Microbiology 542, U. Massachusetts, Amherst, MA）。

10

【0100】

加えて、抗体が対象とするグリコシル化標的リガンド、例えばグリコシル化PD-L1とその同起源の（ICP）結合分子、例えばPD-1との間の相互作用を特異的に遮断する能力について、抗体をアッセイしてもよい。例えば、グリコシル化ICPを細胞表面上に発現させるか、または固相支持体に接着させ、試験される抗体および検出可能な標識を有する同起源のICP結合パートナーと共にインキュベートする。標識されたICP結合パートナーのICPへの結合レベルを、試験される抗体の非存在下の対照と比較して定量する。ICP結合パートナーの結合が低減すれば、抗体が、ICPおよびICP結合パートナーの相互作用を阻害または遮断することができることを示している。ICP結合分子の結合が存在しなければ、抗体が、ICP結合パートナーへのICPの結合を遮断したことを示している。例示的な方法を実施例2および5に記述する。

20

【0101】

ICP阻害剤として使用するために適した抗体の形態

グリコシル化ICPに優先的かつ特異的に結合する抗体を同定および単離した後、それらを、例えば治療としてより適切にするためにさらに操作してもよい。非ヒトモノクローナル抗体の場合、抗体を「キメラ」または「ヒト化」にすべきである。モノクローナル抗体の軽鎖および重鎖定常ドメインを、外来抗体の可変領域をインタクトにしたままで、ヒト起源の類似のドメインで置き換える方法が開発されている。齧歯類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み換えにより構築することによって、モノクローナル抗体の可変ドメインをよりヒト形態に変換する方法も同様に開発されている。「ヒト化」モノクローナル抗体では、超可変CDRのみが非ヒト（例えば、マウス、ラット、ニワトリ、ラマ等）モノクローナル抗体に由来して、フレームワーク領域は、ヒト抗体アミノ酸配列に由来する。齧歯類の特徴である抗体中のアミノ酸配列を、ヒト抗体の対応する位置に見出されるアミノ酸配列に置き換えると、ヒトにおいて治療的に使用する際の外来タンパク質に対する有害な免疫反応の可能性を低減させる。ハイブリドーマまたは他の抗体産生細胞を同様に、ハイブリドーマによって産生される抗体の結合特異性を変更しうるまたは変更しない遺伝子変異または他の変化に供してもよい。

30

40

【0102】

モノクローナル抗体および他の抗体および組み換えDNA技術を使用して改変抗体を製作して、当初の抗体の抗原またはエピトープ結合特異性を保持する他の抗体またはキメラ抗体を産生してもよく、すなわち分子は、特異的結合ドメインを有する。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、または定常領域プラスフレームワーク領域に対する遺伝子材料に導入することを伴いうる。例えば、参照により全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第5,091,513号明細書および同第6,881,557号明細書を参照されたい。

【0103】

50

本明細書において記述される公知の手段によって、そのような抗原またはエピトープが天然起源から単離されたか、または天然化合物の合成誘導体もしくは変種であるか否かによらず、グリコシル化ICP、1つもしくは複数のそのそれぞれのエピトープに特異的に結合し、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体、結合活性、結合ドメイン、およびCDRを有する抗体断片（前述の任意の1つの改変形態を含む）を作製してもよく、または前述の任意の1つをコンジュゲートしてよい。

【0104】

ある特定の動物種は、それらが、抗体の「Fc」部分を通して補体系の活性化により免疫応答またはアレルギー応答を引き起こす可能性がありうることから、治療抗体を作製するためにはあまり好ましくない。しかし、抗体全体を、「Fc」（補体結合）断片および結合ドメインまたはCDRを有するペプチド断片へと酵素的に消化してもよい。Fc部分の除去は、この抗体断片が望ましくない免疫応答を誘発する可能性を低減させ、このように、Fc部分を有しない抗体は、予防的または治療的処置にとって好ましくなりうる。上記のように、抗体はまた、キメラ、ヒト化、または部分的もしくは完全なヒトとなるように、別の種において産生されているまたは別の種からのアミノ酸配列を有する抗体を動物に投与することに起因する、潜在的に有害な免疫学的効果を低減または消失させるように構築されうる。

【0105】

置換変種は典型的に、タンパク質内の1つまたは複数の部位で1つのアミノ酸の別のアミノ酸への交換を含み、他の機能または特性の喪失を伴うまたは伴うことなく、ポリペプチドの1つまたは複数の特性を調節するように設計されうる。置換は保存的、すなわち1つのアミノ酸が類似の形状および電荷のアミノ酸に置き換えられる置換でありうる。保存的置換は、上記の表1に記述する通りである。あるいは、置換は、ポリペプチドの機能または活性が影響を受ける非保存的であってもよい。非保存的变化は典型的に、ある残基を化学的に異なる残基に置換すること、極性または荷電アミノ酸を非極性または非荷電アミノ酸に置換することおよびその逆を伴う。

【0106】

抗体タンパク質は、組み換えであってもよく、または*in vitro*で合成されてもよい。あるいは、非組み換えまたは組み換え抗体タンパク質を細菌から単離してもよい。同様に、改善された結合または他のパラメータを有する抗体を単離するために、抗体タンパク質変種を含む細菌を、本明細書における組成物および方法において利用してもよいと企図される。本明細書において記述される組成物において、全抗体ポリペプチドが1mlあたり約0.001mgから10mgの間で存在すると企図される。このため、組成物中の抗体タンパク質の濃度は、約、少なくとも約、または多くて約0.001、0.010、0.050、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、10.0mg/mlまたはそれ超（またはそれらから誘導可能な任意の範囲）でありうるかまたはそれらに等しい。この中で、グリコシル化ICPに結合する抗体は、約、少なくとも約、多くて約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%でありうるか、またはそれらに等しい。

【0107】

抗体またはICPに対する結合活性を保持する抗体の免疫学的部分を、他のタンパク質に化学的にコンジュゲートさせることができ、または他のタンパク質との融合タンパク質

10

20

30

40

50

として組み換え発現させることができる。そのような全ての融合タンパク質が、抗体または抗体の免疫学的部分の定義に含まれる。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの薬剤に連結されて、抗体コンジュゲートまたはペイロードを形成する、グリコシル化免疫チェックポイントポリペプチドまたはそのペプチドに対して生成された抗体および抗体様分子が包含される。診断または治療剤としての抗体分子の有効性を増加させるために、通常、少なくとも1つの所望の分子または部分を抗体に連結させる、または共有結合させる、または複合体形成させる。そのような連結された分子または部分は、少なくとも1つのエフェクターまたはレポーター分子でありうるがこれらに限定されるわけではない。エフェクター分子は、所望の活性、例えば細胞傷害活性を有する分子を含む。抗体に付着されうるエフェクター分子の非限定的な例には、毒素、治療的酵素、抗体、放射標識ヌクレオチドなどが挙げられる。これに対し、レポーター分子は、アッセイを使用して検出されうる任意の部分として定義される。抗体にコンジュゲートされうるレポーター分子の非限定的な例には、酵素、放射標識、ハプテン、蛍光標識、リン光分子、化学発光分子、発色団、発光分子、光親和性分子、着色粒子またはリガンド、例えばビオチンなどが挙げられる。抗体をコンジュゲート分子または部分に付着またはコンジュゲートさせるいくつかの方法が当技術分野で公知である。いくつかの付着方法は、非限定的な例として有機キレート剤、例えばジエチレントリアミン五酢酸無水物(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/または抗体に付着させたテトラクロロ-3-6-ジフェニルグリクリル-3を使用する、金属キレート錯体を使用することを伴う。抗体はまた、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しうる。フルオレセインマーカ-とのコンジュゲートは、慣例的に、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ネートとの反応によって調製される。別の実施形態において、抗グリコシル化ICP抗体を、投与後の血漿、血清、または血液中のそのin vivo半減期を増加させるために、化合物または物質、例えばポリエチレングリコール(PEG)にカップリングまたは連結させてもよい。

【0108】

一実施形態において、抗体はキメラ抗体、例えば異種の非ヒト、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)に移植された非ヒトドナー由来の抗原結合配列(例えば、Vドメインおよび/またはCDR)を含む抗体である。一実施形態において、非ヒトドナー配列は、マウスまたはラットに由来する。一実施形態において、抗原結合配列は、合成、例えば変異誘発(例えば、ヒトファージライブラリ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。一実施形態において、キメラ抗体はマウスV領域とヒトV領域とを有する。一実施形態において、マウス軽鎖V領域はヒト軽鎖C領域に融合される。一実施形態において、マウス重鎖V領域は、ヒトIgG1 C領域に融合される。

【0109】

一実施形態において、抗体は、ラクダ抗体に由来し、好ましくはV_HHドメイン配列またはNanobodies(商標)として知られる、軽鎖を欠如する重鎖ラクダ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。Nanobody(商標)(Nb)は、天然に存在する一本鎖抗体の最小の機能的断片または単一可変ドメイン(V_HH)であり、当業者に公知である。それらは、ラクダに見られる重鎖のみの抗体に由来する(Hamers-Casterman et al., 1993, Nature, 363, p. 446-448; およびDesmyter et al., 1996, Nat. Struct. Biol., pp. 803-811)。「ラクダ」科では、軽鎖ポリペプチドを欠如する免疫グロブリンが見出される。「ラクダ」は、旧大陸ラクダ(フタコブラクダ(Camelus bactrianus)およびヒトコブラクダ(Camelus dromedarius))、ならびに新大陸ラクダ(例えば、アルパカ(Lama paccos)、リヤマ(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、本明細書において、Nanobody(商標)またはV_HH抗体として示される。Nbの大きさが小さいことおよび独自の生物物理学的特性は、一般的でないまたは隠れたエピト-プの認識について、およびタンパク質標的の腔または活性部位への結合について通常の抗体断片

10

20

30

40

50

より優れている。さらに、Nbは、レポーター分子に付着したまたはヒト化された、多重特異性および多価抗体として設計することができる。Nbは、安定で、消化管系で分解されることなく、容易に製造することができる。

【0110】

別の実施形態において、抗体は二重特異性抗体である。異なる特異性の2つの抗原結合部位を1つの構築物に統合すると、二重特異性抗体は、優れた特異性を有する2つの異なる抗原を一つにする能力を有し、したがって、治療剤として非常に有望である。二重特異性抗体は、それぞれが異なる免疫グロブリンを産生することができる、2つのハイブリドマを融合することによって当初作製された。二重特異性抗体はまた、完全な免疫グロブリンに存在するFc部分を除外しながら2つのscFv抗体断片を接続させることによっても産生される。そのような構築物におけるそれぞれのscFv単位は、合成ペプチドリンカーによって互いに接続した、重鎖(V_H)および軽鎖(V_L)抗体鎖のそれぞれからの1つの可変ドメインを含み、後者はしばしば、タンパク質分解に対して最大限の抵抗性を残しながら最小の免疫原性となるように遺伝子改変されている。それぞれのscFv単位を、2つのscFv単位を架橋する短い(通常、10アミノ酸未満)ポリペプチドスペーサーを組み込むことを含む、多数の公知の技術によって接続して、それによって二重特異性一本鎖抗体を作製してもよい。したがって、得られた二重特異性一本鎖抗体は、それぞれのscFv単位におけるV_HおよびV_Lドメインが、これらの2つのドメイン間の分子内会合を可能にするために十分に長いポリペプチドリンカーによって隔てられており、そのように形成されたscFv単位が、例えば1つのscFv単位のV_Hドメインと他のscFv単位のV_Lドメインとの間での望ましくない会合を防止するために十分に短く維持されるポリペプチドスペーサーを通して互いに連続してつながれている、1つのポリペプチド鎖上で異なる特異性の2つのV_H/V_L対を含む種である。

10

20

【0111】

別の実施形態において、抗体は二重パラトープ性抗体である。本明細書において使用される用語「二重パラトープ性抗体」は、同じタンパク質標的、例えば腫瘍関連ICP標的抗原または本明細書において記述されるグリコシル化ICP標的抗原上の2つの異なる重複しないエピトープ、抗原性決定基、またはドメインを認識して結合する2つの抗原結合ドメインを含む二重特異性結合分子を指す。一実施形態において、本明細書において記述されるglycICPまたはその1つもしくは複数のペプチド部分に対する二重パラトープ性抗体は、第1の免疫グロブリン可変ドメインと第2の免疫グロブリン可変ドメインとを含み、2つの結合ドメインは、同じ標的glycICPタンパク質の2つの異なる重複しないエピトープに結合する。第1および第2の免疫グロブリン結合ドメインによって認識されるエピトープの1つまたは両方はグリコシル化されていてもよく、またはグリコシル化残基を含んでもよい。好ましくは、免疫グロブリンの少なくとも1つは、非グリコシル化形態と比較してglycICPタンパク質のグリコシル化形態に優先的に結合する。

30

【0112】

別の実施形態において、二重パラトープ性抗体は、glycICP標的分子上のエピトープに結合する免疫グロブリン(好ましくは四価IgG)と、同じglycICP標的分子上の異なる重複しないエピトープに結合するscFvとを含み、免疫グロブリンとscFvは、免疫グロブリンおよびscFvが、glycICP標的分子上の異なる重複しないエピトープに結合できるようにリンカーによって連結される。したがって、バイパラトピック抗体は、結合親和性/アビディティを増強するために、抗体依存性細胞傷害性(ADCC)および/もしくは補体依存性細胞傷害性(CDC)などの増強されたエフェクター機能のために腫瘍細胞上の抗体量を増加させるために、ならびに/または腫瘍の保持時間を改善または増加させるために、同じglycICP標的上の異なるエピトープ(またはドメイン)に結合する(すなわち、バイパラトピック結合)、本明細書において記述される方法によって同定された2つの抗glycICP抗体から作製される。加えて、腫瘍関連glycICP抗原上の2つの重複しないエピトープを標的とする二価の二重パラトープ性抗体は、細胞膜においてglycICP標的分子のクラスターを誘導す

40

50

る可能性を有し、次に、内在化、リソソーム輸送、および分解の増加を促進しうる。標的タンパク質 / 抗原上の2つの異なる重複しないエピトープに対する二重パラトープ性抗体は、当技術分野で公知の技術を使用して作製されうる。例えば、B. Roberts et al., 1999, *Int. J. Cancer*, Vol. 81:285-291 (carcinoembryonic antigen, CEA); D. Lu et al., 1999, *J. Immunol. Methods*, Vol. 230:159-71 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGF2); 2009年6月4日に公開された国際公開第2009/068627号パンフレット、Ablynx NV; 2010年12月16日に公開された国際公開第2010/142534号パンフレット、およびAblynx NVを参照されたい。

【0113】

一実施形態において、二価の二重パラトープ性抗体は、所定のglycICP標的タンパク質上の異なる重複しないエピトープを認識して結合する、本明細書において記述されるように同定された2つの異なる抗glycICP抗体からの可変ドメイン配列を使用することによって産生してもよく、抗体は、glycICP上の異なる重複しないエピトープを認識する第2の抗ICP抗体のH鎖および/もしくはL鎖のN末端、またはあるいはC_H3ドメインのC末端に結合した抗glycICP抗体の1つの一本鎖可変断片(scfv)を含む。scfvを、ペプチドリンカー、例えばscfvにおける結合ドメインを連結するために使用されるリンカーなどを介して、第2の抗ICP抗体に連結してもよい。例えば、Dimasi et al., *J. Mol. Biol.*, 393:672-692 (2009)を参照されたい。得られた結合分子産物または二重パラトープ性抗体は、glycICP上の2つの異なるエピトープと相互作用して結合することができる4つの抗glycICP結合単位または2つの結合単位を、分子のそれぞれのアームに含む。本実施形態によれば、腫瘍細胞の表面上に発現したglycICP上の2つの重複しないエピトープを標的とする二価の二重パラトープ性抗体は、エピトープ結合を通してglycICPと有効に架橋して、細胞表面上のglycICPのクラスター形成を誘導し、増強された内在化およびリソソーム分解を誘発および促進する大きい複合体を形成することができる。一実施形態において、二重パラトープ性抗体を、本明細書においてさらに記述されるように、毒素または抗がん剤に連結して抗体-薬物コンジュゲート(ADC)を産生する。そのような抗ICP二重パラトープ性抗体の増強された内在化およびエンドサイトーシスならびにリソソーム輸送によって、最終的に標的細胞への毒素の大量の送達およびより大きい腫瘍細胞の殺滅または縮小が起こる。そのような効果は、二重パラトープ性抗HER2 ADCに関して記述されているように(J.Y. Li et al., 2016, *Cancer Cell*, Vol. 29:117-129) *in vitro*および*in vivo*の両方で観察された。実例として、その同起源の結合パートナーとのその相互作用を防止または遮断するため、その内在化および分解を促進するため、ならびに抗glycICP ADCを使用する場合には腫瘍細胞の殺滅を促進するために、以下のグリコシル化ICP: PD-L1、PD-L2、PD-1、TIM-3、LAG-3、BTLA、CEACAM1、BTN1A1、BTNL2、SEMA4D、CD47、CD96、B7-H3、B7-H4、CTLA-4、VISTA、またはKIRの1つの、2つの重複しないエピトープに特異的に結合するバイパラトピック抗glycICP抗体または抗glycICP ADCを産生してもよい。

【0114】

他の実施形態において、本発明によって包含される抗glycICP結合分子または抗体は、多重パラトープ性であってもよく、すなわち同じglycICP標的分子上に3つ、4つ、またはそれ超の異なる、好ましくは重複しないエピトープまたは抗原性決定基を認識して結合する抗原結合ドメインを含んでもよい。なお他の実施形態において、抗glycICP抗体は、二重パラトープ性または多重パラトープ性で多価の両方であり、すなわち異なる標的glycICP分子上の1つまたは複数の異なるエピトープまたは抗原性決定基を認識して結合する抗原結合部位または「パラトープ」を同様に含む。

【0115】

抗体断片の例には、(i) V_L、V_H、C_L、およびC_{H1}ドメインからなるFab断

10

20

30

40

50

片；(i i) V_H および C_{H1} ドメインからなる「F d」断片；(i i i) 1つの抗体の V_L および V_H ドメインからなる「F v断片」；(i v) V_H ドメインからなる「d A b」断片；(v) 単離 C D R 領域；(v i) F (a b') 2断片、2つの連結した F a b断片を含む二価の断片；(v i i) V_H ドメインと V_L ドメインが、2つのドメインを会合させて結合ドメインを形成するペプチドリンカーによって連結されている一本鎖 F v分子（「s c F v」）；(v i i i) 二重特異性一本鎖 F v二量体（米国特許第 5, 091, 513号明細書を参照されたい）；および (i x) ダイアボディ、遺伝子融合によって構築された多価または多重特異性断片（米国特許出願公開第 20050214860号明細書）が挙げられるがこれらに限定されるわけではない。F v、s c F v、またはダイアボディ分子は、V_H および V_L ドメインを連結するジスルフィド架橋を取り込むことによって安定化されうる。C_{H3} ドメインに接続した s c F v を含むミニボディ（Hu et al., 1996, Cancer Res., 56:3055-3061）も同様に、有用でありうる。加えて、抗体様結合ペプチド模倣体も同様に、実施形態において企図される。「抗体様結合ペプチド模倣体」（A B i P）は、小さい抗体として作用し、より長い血清中半減期およびより面倒でない合成方法という特定の利点を有するペプチドであり、Liu et al., 2003, Cell Mol. Biol., 49:209-216によって報告されている。

10

【0116】

抗グリコシル化 P D - L 1 抗体（抗 g l y c P D - L 1 抗体）

特定の実施形態において、非グリコシル化 P D - L 1 と比較してグリコシル化 I C P タンパク質、P D - L 1（例えば、特異的 N - グリカン構造を有する P D - L 1 タンパク質；P D - L 1 の特異的グリコペプチド）またはグリコシル化 P D - L 1 ペプチドに特異的に結合し、グリコシル化 P D - L 1 / P D - 1 相互作用（抗 g l y c P D - L 1 抗体）の免疫抑制機能を阻害する抗体を単離および同定する方法が提供される。そのような抗 g l y c P D - L 1 抗体は、疾患、特にがんの処置において有用である。抗 g l y c P D - L 1 抗体は、I g G、I g M、I g A、I g D、および I g E I g クラスの抗体、ならびに抗原結合活性を保持する抗体 C D R ドメインを含むポリペプチドでありうる。実例として、抗 g l y c P D - L 1 抗体は、キメラ、親和性成熟、ヒト化、またはヒト抗体でありうる。好ましい実施形態において、抗 g l y c P D - L 1 抗体は、モノクローナル抗体である。別の好ましい実施形態において、モノクローナル抗 g l y c P D - L 1 抗体は、ヒト化またはヒト抗体である。公知の手段によって、および本明細書において記述されるように、そのような抗原またはエピトープが、天然起源から単離されるか、または天然の化合物の合成誘導体もしくは変種であるかによらず、グリコシル化 P D - L 1 抗原、そのそれぞれのエピトープの1つもしくは複数、または前述のいずれか1つのコンジュゲートに対して特異的な、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体、抗体断片、結合ドメイン、および C D R（前述のいずれかの改変形態を含む）を作製してもよい。抗体は二重特異性またはバイパラトピックでありうる。

20

30

【0117】

方法によって得た抗 g l y c I C P 特異的抗体による疾患の処置

ある特定の態様において、記述される方法によって得た抗体またはその抗原結合断片（例えば、P D - L 1 などのグリコシル化 I C P に特異的に結合する抗体）を、がんを処置するために処置方法に使用して投与してもよい。したがって、本明細書において、がんを処置するために、少なくとも1つの抗グリコシル化 I C P 抗体またはその結合断片、例えば抗 g l y c P D - L 1 抗体の治療有効量を、必要とする対象に投与することによって、がんを処置する方法が提供される。本明細書において記載されるように、処置または治療的処置は、がん細胞の成長、増殖、遊走等を低減、防止、阻害、または遮断することを伴う。方法は、T細胞、特にキラーまたは細胞傷害性T細胞などの免疫エフェクター細胞の細胞表面上に発現する同起源の I C R リガンドと結合/相互作用することができる I C P 細胞表面タンパク質を発現する対象の腫瘍細胞について、処置を受けている対象、例えばヒト患者に利益をもたらす。これらの対象を、抗グリコシル化 I C P 抗体の少なくとも1つの有効量で処置することによって、腫瘍細胞上のグリコシル化 I C P への抗体の結合、な

40

50

らびにICP発現腫瘍細胞と、同起源のIDPリガンドを発現するT細胞との相互作用の防止、遮断、または阻害が起こり、それによってT細胞活性の免疫抑制を防止または回避して、PD-L1などのICPを発現する腫瘍細胞を殺滅するようにT細胞を活性化することができる。したがって、記述の方法によって産生されて得られた抗グリコシル化ICP抗体を使用する方法は、本発明の方法の実践によって達成される抗がん結果の利益を必要とする、利益を受けることができる、または利益を受けることが望ましい対象にとって有利である。対象が、少なくとも1つの抗グリコシル化ICP抗体またはその結合断片、例えば抗glycPD-L1抗体またはその結合断片の治療有効量の投与を伴う方法の治療上の利益を求めることは、当技術分野に対して利点を提供する。加えて、本発明の方法は、他の処置および処置モダリティと比較して、副作用、有害な転帰、禁忌等をなくすもしくは回避する、またはそのような問題が起こるリスクまたは可能性を低減させるさらなる利点を提供する。

10

【0118】

本発明の処置方法が有用であるがんは、任意の悪性細胞タイプ、例えば固形腫瘍または血液腫瘍、特にその表面にグリコシル化PD-L1などのグリコシル化ICPを発現する細胞を有する腫瘍において見出されるがんを含む。一般的に、腫瘍は、任意の大きさの悪性または潜在的に悪性の新生物または組織塊を指し、原発腫瘍および二次腫瘍を含む。固形腫瘍は、通常、嚢胞または液体を含まない異常な組織塊または成長である。例示的な固形腫瘍には、膵臓、胆嚢、結腸、盲腸、胃、脳、頭部、頸部、卵巣、精巣、腎臓、咽頭、肉腫、肺、膀胱、黒色腫、前立腺、および乳房からなる群より選択される臓器の腫瘍が挙げられるがこれらに限定されるわけではない。例示的な血液腫瘍には、骨髄の腫瘍、TまたはB細胞悪性腫瘍、白血病、リンパ腫、芽腫、骨髄腫などが挙げられる。本明細書において提供される方法を使用して処置されうるがんのさらなる例には、癌腫、リンパ腫、芽腫、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）、腹膜のがん、肝細胞がん、胃がん（gastric cancer）または胃がん（stomach cancer）（消化管がん、および消化管間質がんを含む）、膵臓がん、神経膠芽腫、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、子宮内膜癌または子宮癌、唾液腺癌、腎臓がん（kidney cancer）または腎臓がん（renal cancer）、前立腺がん、外陰がん、甲状腺がん、様々なタイプの頭頸部がん、黒色腫、表在拡大型黒色腫、悪性黒子型黒色腫、肢端黒子型黒色腫、結節性黒色腫、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、中間悪性度/濾胞性NHL、中間悪性度びまん性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型細胞NHL、巨大病変NHL、マントル細胞リンパ腫、AIDS関連リンパ腫、およびワルデンストレームマクログロブリン血症）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、ヘアリーセル白血病、多発性骨髄腫、急性骨髄性白血病（AML）、および慢性骨髄芽球性白血病が挙げられるがこれらに限定されるわけではない

20

30

【0119】

がんは、具体的に以下の組織学タイプのがんでありうるが、これらに限定される必要はない：悪性新生物；癌腫；未分化癌；巨細胞および紡錘細胞癌；小細胞癌；乳頭癌；扁平上皮癌；リンパ上皮癌；基底細胞癌；毛母癌；移行上皮癌；乳頭状移行上皮癌；腺癌；悪性ガストリノーマ；胆管癌；肝細胞癌；混合型肝細胞癌および胆管癌；索状腺癌；腺様嚢胞癌；腺癌、腺腫様ポリープ；腺癌、家族性大腸ポリポーシス；固形癌；悪性カルチノイド腫瘍；気管支肺胞腺癌；乳頭状腺癌；色素嫌性癌；好酸性癌；好酸性腺癌；好塩基性癌；明細胞腺癌；顆粒細胞癌；濾胞腺癌；乳頭状濾胞腺癌；非被包性硬化性癌；副腎皮質癌；子宮内膜癌；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；乳頭状嚢胞腺癌；乳頭状漿液性嚢胞腺癌；粘液性嚢胞腺癌；膠様腺癌；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；扁平上皮化生を有する腺癌；悪性胸腺腫；悪性卵巣間質腫瘍；悪性莢膜細胞腫；悪性顆粒膜細胞腫瘍；悪性男性胚細胞腫；セルトリ細胞癌；悪性ライディッヒ細胞腫瘍；悪性

40

50

脂質細胞腫瘍；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；悪性黒色腫；メラニン欠乏性黒色腫；表在拡大型黒色腫；巨大色素性母斑の悪性黒色腫；類上皮細胞黒色腫；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；胎児型横紋筋肉腫；胞巣型横紋筋肉腫；間質性肉腫；悪性混合腫瘍；ミューラー管混合腫瘍；腎芽腫；肝芽腫；癌肉腫；悪性間葉腫；ブレンナー腫瘍；悪性葉状腫瘍；滑膜肉腫；悪性中皮腫；未分化胚細胞腫；胎生期癌；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；カボジ肉腫；悪性血管外皮腫；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；骨の巨細胞腫瘍；ユーイング肉腫；悪性歯原性腫瘍；エナメル上皮歯牙腫；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；星芽細胞腫；神経膠芽腫；乏突起神経膠腫；乏突起神経芽細胞腫；原始神経外胚葉腫瘍；小脳肉腫；神経節芽細胞腫；神経芽腫；網膜芽腫；嗅神経腫瘍；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；側肉芽腫；小リンパ球性悪性リンパ腫；びまん性大細胞型悪性リンパ腫；濾胞性悪性リンパ腫；菌状息肉腫；他の明記された非ホジキンリンパ腫；悪性組織球腫；多発性骨髄腫；肥満細胞肉腫；免疫増殖性小腸疾患；白血病；リンパ球性白血病；形質細胞白血病；赤白血病；リンパ肉腫細胞性白血病；骨髄性白血病；好塩基球性白血病；好酸球性白血病；単球性白血病；肥満細胞性白血病；巨核球性白血病；骨髄肉腫；およびヘアリーセル白血病。

10

20

30

40

50

【0120】

記述の方法によって得た抗g l y c I C P抗体によって処置されるがんは、好ましくは腫瘍細胞またはがん細胞上に発現するI C P、例えばP D - L 1、特にグリコシル化P D - L 1について陽性である。具体的には、処置されるがんは、抗g l y c I C P抗体が結合するI C Pについて陽性である。ある特定の実施形態において、腫瘍細胞はまた、例えば乳がん細胞において発現するE G F RまたはH E R 2 / n e u発現などの腫瘍細胞マーカーについて陽性である。これらのマーカーの存在または非存在は、E G F R陽性がんに対する標的化治療薬、例えばゲフィチニブなどのチロシンキナーゼ阻害剤、またはH E R 2 / n e u陽性がんに対するハーセプチンと、抗g l y c I C P抗体との併用治療が、それを必要とする対象に治療上の恩典を提供するか否かを示しうる。ある特定の実施形態において、がんはB L B Cである。

【0121】

治療の選択を誘導するためにがんを特徴付けするためまたは抗g l y c I C P抗体を用いる治療をモニターするために使用されうる他のマーカーには、非小細胞肺がんおよび異型性大細胞リンパ腫におけるA L K遺伝子の再配列および過剰発現；肝臓がんおよび胚細胞腫瘍に関する - フェトプロテイン (A F P) ；多発性骨髄腫、慢性リンパ球性白血病、およびいくつかのリンパ腫に関する - 2ミクログロブリン (B 2 M) ；絨毛がんおよび胚細胞腫瘍に関する - ヒト絨毛性ゴナドトロピン (- h C G) ；卵巣がんおよび乳がんに関するB R C A 1およびB R C A 2遺伝子変異；慢性骨髄性白血病、急性リンパ芽球性白血病および急性骨髄性白血病に関するB C R - A B L融合遺伝子 (フィラデルフィア染色体) ；皮膚黒色腫および結腸直腸がんに関するB R A F V 6 0 0変異；消化管間質腫瘍および粘膜黒色腫に関するC - k i t / C D 1 1 7 ；乳がんに関するC A 1 5 - 3 / C A 2 7 . 2 9 ；膵臓がん、胆嚢がん、胆管がん、および胃がんに関するC A 1 9 - 9 ；卵巣がんに関するC A - 1 2 5 ；甲状腺髄様がんに関するカルシトニン；結腸直腸がんおよびいくつかの他のがんに関する癌胎児性抗原 (C E A) ；非ホジキンリンパ腫に関するC D 2 0 ；神経内分泌腫瘍に関するクロモグラニンA (C g A) ；膀胱がんに関する第3、7、17および9 p 2 1染色体；肺がんに関するサイトケラチン断片2 1 - 1 ；非小細胞肺がんに関するE G F R遺伝子変異分析；乳がんに関するエストロゲン受容体 (E R) / プロゲステロン受容体 (P R) ；膀胱がんに関するフィブリン/フィブリノーゲン；卵巣がんに関するH E 4 ；乳がん、胃がん、および胃食道接合部腺癌に関するH E R 2 / n e u遺伝子増幅またはタンパク質過剰発現；多発性骨髄腫およびワルデンストレームマ

クログロブリン血症に関する免疫グロブリン；結腸直腸癌および非小細胞肺癌に関する K R A S 遺伝子変異分析；胚細胞腫瘍、リンパ腫、白血病、黒色腫、および神経芽細胞腫に関する乳酸デヒドロゲナーゼ；小細胞肺癌および神経芽腫に関するニューロン特異的エノラーゼ（NSE）；膀胱がんに関する核マトリクスタンパク質 22；前立腺がんに関する前立腺特異的抗原（PSA）；甲状腺がんに関するサイログロブリン；ならびに乳がんに関するウロキナーゼプラスミノゲン活性化因子（uPA）およびプラスミノゲン活性化因子阻害剤（PAI-1）が挙げられる。

【0122】

抗グリコシル化 I C P 抗体、例えば抗 g l y c P D - L 1 抗体は、多様なモダリティにおいて抗腫瘍剤として使用されうる。特定の実施形態において、抗腫瘍剤として抗体を使用する方法が企図され、したがって方法は、腫瘍細胞集団に、抗体、または抗体を含む組成物の治療有効量を、腫瘍細胞の成長を遮断または阻害するために十分な期間、接触させることを含む。一実施形態において、腫瘍細胞に *i n v i v o* で接触させることは、抗グリコシル化 I C P 抗体またはその結合断片、例えば記述の抗 g l y c P D - L 1 抗体またはその結合断片を含む生理的に忍容される組成物の治療有効量を、必要とする患者に、例えば静脈内、皮下、腹腔内、または腫瘍内注射によって投与することによって達成される。抗体は、注射または経時的な徐々の注入によって非経口投与されてもよい。有用な投与および送達レジメンには、静脈内、腹腔内、経口、筋肉内、皮下、腔内、経皮、皮内、蠕動ポンプ手段、または腫瘍細胞を含む組織への直接注射が挙げられる。

10

【0123】

抗体を含む治療組成物は、慣例的に静脈内に、例えば単位用量の注射によって投与される。治療組成物を参照して使用される用語「単位用量」は、それぞれの単位が、必要な希釈剤、すなわち担体またはビヒクルに関連して所望の治療効果を生じるように計算された活性材料の既定量を含む、対象の単位投与量として適した物理的に個別の単位を指す。例えば抗 g l y c P D - L 1 抗体などの抗グリコシル化 I C P 抗体を含む組成物は、投与製剤と適合性である方法で、治療有効量で投与される。投与される量は、処置される対象、対象の系が活性成分を利用する能力、所望の治療効果の程度に依存する。投与するために必要な活性成分の正確な量は、医師の判断に依存して、個々の個体に特異的である。しかし、全身適用について適した投与量範囲が本明細書において開示され、投与経路に依存する。初回および追加投与にとって適したレジメンも同様に企図され、典型的に初回投与後に1つまたは複数の間隔（時間）で皮下注射または他の投与による繰り返し投与を伴いうる。例示的な複数回投与は、抗体の高い血清中および組織レベルを持続的に維持するために適している。あるいは、*i n v i v o* 治療について明記された範囲で血液中の濃度を維持するために十分な持続的な静脈内注入が企図される。

20

30

【0124】

記述の方法によって産生された抗 g l y c I C P 抗体は、疾患を処置するために、例えば局所進行または転移がんを有するがん患者における腫瘍細胞成長を阻害するためまたはがん細胞を殺滅するために全身または局所投与されてもよいと企図される。抗体は、単独で、または抗増殖薬もしくは抗がん薬と併用して投与されうる。一実施形態において、抗グリコシル化 I C P 抗体は、手術または他の技法前に患者におけるがんの負荷を低減させるために投与される。あるいは、残っているいかなるがん（例えば、手術によって除去できなかったがん）も大きさまたは成長能が確実に低減されるように、および/または確実に生存しないように、抗 g l y c P D - L 1 抗体を、術後、定期的な間隔で投与することができる。上記で注目したように、抗体の治療有効量は、所望の効果を達成するように計算された既定量である。このため、抗 g l y c I C P 抗体の投与のための投与量範囲は、腫瘍細胞分裂および細胞周期進行の兆候が低減される所望の効果を生じるために十分に大きい範囲である。最適には、投与量は、有害な副作用、例えば過粘稠度症候群、肺浮腫、うっ血性心不全、神経学的効果などを引き起こすほど多量であってはならない。一般的に、投与量は、患者の年齢、状態、体格、および性別、ならびに疾患の程度によって変化し、内科医または臨床医などの当業者が決定することができる。当然、いずれかの合併症が

40

50

起こった場合には、個々の医師が投与量を調節することができる。

【0125】

処置方法

ある特定の実施形態において、組成物および方法は、グリコシル化ICPタンパク質、例えばPD-L1に特異的かつ優先的に結合する抗グリコシル化ICP抗体またはその結合部分、例えば抗glycPD-L1抗体の単独投与、または第2のもしくは追加の薬物もしくは治療との併用投与を伴う。そのような薬物または治療は、そのリガンドと相互作用するヒトグリコシル化ICPに関連する、例えばヒトPD-L1もしくはグリコシル化ヒトPD-L1とヒトPD-1との相互作用に関連する任意の疾患の処置に適用されうる。例えば、疾患はがんでありうる。特定のおよび例示的な実施形態において、グリコシル化PD-L1タンパク質またはその結合部分に結合する少なくとも1つの抗PD-L1抗体を含む組成物および方法は、がんまたは他の疾患の処置において、特にPD-1/PD-L1相互作用を防止、低減、遮断、または阻害して、それによって治療効果および処置を提供することによって、治療効果または保護効果を有する。

10

【0126】

併用治療を含む組成物および方法は、治療効果もしくは保護効果を有し、治療効果もしくは保護効果を増強し、および/または別の抗がん治療もしくは抗増殖剤治療の治療効果を増加させうる。治療および予防の方法ならびに組成物は、所望の効果、例えばがん細胞の殺滅および/または細胞の過増殖の阻害を達成するために有効な併用量で提供されうる。このプロセスは、抗グリコシル化ICP抗体またはその結合断片と、第2の治療とを投与することを伴いうる。第2の治療は、直接の細胞傷害効果を有しても有しなくてもよい。例えば、第2の治療は、直接の細胞傷害作用を有することなく免疫系をアップレギュレートする薬剤でありうる。組織、腫瘍および/または細胞に、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を曝露するか、または組織、腫瘍、および/もしくは細胞に、2つもしくはそれ超の異なる組成物もしくは製剤を曝露することができ、1つの組成物は、例えば、1)抗体、2)抗がん剤、3)抗体と抗がん剤の両方、または4)2つもしくはそれ超の抗体を提供する。同様に、そのような併用治療は、化学療法、放射線療法、外科療法、または免疫療法と共に使用されうると企図される。

20

【0127】

例として、用語「接触した」および「曝露した」は、細胞に適用されるとき、特に腫瘍細胞またはがん細胞の表面で標的抗原、例えばPD-L1、特にグリコシル化PD-L1に特異的に結合するように、治療ポリペプチド、好ましくは本明細書において記述される抗glycPD-L1抗体を標的細胞に送達するかまたは標的細胞の直接近位に配置するプロセスを記述するために使用される。治療的抗glycPD-L1抗体によるそのような結合は、腫瘍細胞またはがん細胞が発現するPD-L1とエフェクターT細胞上のPD-1との相互作用を防止、遮断、阻害、または低減させて、それによって、PD-L1/PD-1相互作用に関連する免疫抑制を防止する。実施形態において、化学療法剤または放射線療法剤はまた、抗glycPD-L1抗体またはその結合断片と共に対象に投与または送達される。細胞の殺滅を達成するために、例えば1つまたは複数の薬剤は、細胞を殺滅させるためにまたは細胞が分裂するのを防止するために有効な併用量で細胞に送達される。

30

40

【0128】

本明細書において記述される抗グリコシル化ICP抗体、例えば抗glycPD-L1抗体は、別の抗がん処置に対してその前に、間に、後に、または様々な組み合わせで投与されうる。投与は、互いを前後として、同時から数分まで、数日まで、数週間までの範囲の間隔でありうる。抗体が抗がん剤とは別に患者に提供される実施形態において、投与された化合物が患者に対して有利な併用効果をなおも発揮することができるように、一般的に、それぞれの送達時間の間に有意な時間が経過しないように確保される。実例として、そのような例において、患者に抗体と抗がん治療とを互いに約12~24時間または72

50

時間以内に、より詳しくは互いに約 6 ~ 12 時間以内に提供してもよいと企図される。いくつかの状況では、それぞれの投与の間に数日 (2、3、4、5、6、または 7 日) から数週間 (1、2、3、4、5、6、7、または 8 週間) が経過する、処置期間の有意な延長が望ましいと予想される。

【 0 1 2 9 】

ある特定の実施形態において、一連の処置または処置サイクルは、1 ~ 90 日またはそれ超持続すると予想される (この範囲はその間の日および最後の日を含む)。1 つの薬剤を、1 日 ~ 90 日のいずれかの日 (このような範囲はその間の日および最後の日を含む) にまたはその任意の組み合わせで投与してもよく、別の薬剤が 1 日 ~ 90 日 (このそのような範囲は、その間の日および最後の日を含む) またはその任意の組み合わせのいずれかの日に投与されると企図される。1 日の間 (24 時間の期間) に、患者に、薬剤を 1 回または複数回投与してもよい。その上、一連の処置の後、抗がん処置が投与されない期間が存在してもよいと企図される。この期間は、患者の状態、例えば予後、体力、健康などに応じて、例えば 1 ~ 7 日間、および / または 1 ~ 5 週間、および / または 1 ~ 12 ヶ月またはそれ以上持続してもよい (このそのような範囲は、その間の日および上限の時点を含む)。処置のサイクルは必要に応じて繰り返される。様々な処置の組み合わせを使用してもよい。以下に示す併用処置レジメンの代表的な例において、抗体、例えば抗グリコシル化 I C P 抗体、例えば抗 g l y c P D - L 1 抗体またはその結合断片を「 A 」で表し、抗がん治療を「 B 」で表す。

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

【 0 1 3 0 】

本実施形態の任意の抗体または治療の患者への投与は、もしあるとすれば、薬剤の毒性を考慮に入れて、そのような化合物を投与するための一般的プロトコールに従う。したがって、いくつかの実施形態において、有害事象および毒性、特に併用治療に帰することができる有害事象および毒性をモニターするステップが存在する。

【 0 1 3 1 】

一実施形態において、治療または処置方法は、抗グリコシル化 I C P 抗体を単独または別の抗がん剤と併用して、それを必要とする患者、すなわちがんまたは腫瘍を有する患者に投与することを伴う。抗グリコシル化 I C P 抗体の投与前に、患者の腫瘍またはがんの試料を I C P の存在について評価してもよい。そのような評価の結果によって、患者の腫瘍またはがんがグリコシル化 I C P について陽性であることが判明すれば、患者のグリコシル化 I C P + 腫瘍またはがんが抗グリコシル化 I C P 抗体による処置により感受性がある可能性、および処置を進めて有益な転帰が得られる可能性がより高いことに基づいて、患者を処置について選択する。医療の専門家または医師は、抗グリコシル化 I C P 抗体処置方法を進めるように患者に助言を与えてもよく、患者は医療の専門家または医師の助言に基づいて処置を進めることを決定してもよい。加えて、一連の処置において、患者の腫瘍細胞またはがん細胞を、処置の進行または有効性をモニターする方法として、グリコシル化 I C P の存在についてアッセイしてもよい。アッセイによって、例えば、患者の腫瘍細胞またはがん細胞上のグリコシル化 I C P の変化、喪失、または減少が示される場合、医療の専門家は患者と共に、処置を継続すべきか否か、または何らかの方法で変更すべきか、例えばより高い投薬量に、別の抗がん剤もしくは治療を追加するか否かなどを決定してもよい。

【 0 1 3 2 】

免疫療法

方法のいくつかの実施形態において、抗 g l y c I C P 抗体の投与と併用して、または

投与と共に、免疫療法を使用してもよい。がんの処置の文脈において、免疫療法は一般的に、がん細胞を標的として破壊するために、免疫エフェクター細胞および分子の使用に依存する。リツキシマブ（RITUXAN（登録商標））は、そのような一例である。チェックポイント阻害剤、例えばイピリムマブは、別のそのような例である。免疫エフェクターは、例えば、腫瘍細胞の表面上のマーカー（細胞表面タンパク質または受容体）に対して特異的な抗体でありうる。抗体単独は、治療のエフェクターとしての役割を果たしてもよく、または細胞殺滅を実際に行うために他の細胞を動員してもよい。抗体はまた、薬物または毒素（化学療法剤、放射性核種、リシンA鎖、コレラ毒素、百日咳毒素など）にコンジュゲートしてもよく、単に標的化剤としての役割を果たしてもよい。あるいは、エフェクターは、腫瘍細胞標的と直接または間接的に相互作用する表面分子、例えばT細胞上のPD-1/腫瘍細胞上のPD-L1相互作用を有するリンパ球でありうる。様々なエフェクター細胞には、細胞傷害性T細胞およびNK細胞が挙げられる。

10

【0133】

免疫療法の一態様において、腫瘍細胞は、標的化に感受性があるいくつかのマーカー（タンパク質/受容体）を有しなければならない。最適には、腫瘍マーカータンパク質/受容体は、大部分の他の細胞、例えば非がん細胞または正常細胞には存在しない。多くの腫瘍マーカーが存在し、これらのいずれも本実施形態の文脈において、抗glycICP抗体と共に投与される別の薬物または治療による標的化にとって適しうる。一般的な腫瘍マーカーには、例えばCD20、がん胎児性抗原（CEA）、チロシナーゼ（p97）、gp68、TAG-72、HMFG、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。免疫療法の代替の態様は、抗がん作用と免疫刺激作用とを組み合わせることである。免疫刺激分子も同様に存在し、これにはサイトカイン、例えばIL-2、IL-4、IL-12、GM-CSF、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リガンドが挙げられる。

20

【0134】

現在治験中または使用されている免疫療法の例は、免疫アジュバント、例えば、ウシ型結核菌（*Mycobacterium bovis*）、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号明細書および同第5,739,169号明細書；Hui and Hashimoto, 1998, *Infection Immun.*, 66(11):5329-5336；Christodoulides et al., 1998, *Microbiology*, 144(Pt 11):3027-3037）；サイトカイン療法、例えば、およびインターフェロン；IL-1、GM-CSF、およびTNF（Bukowski et al., 1998, *Clinical Cancer Res.*, 4(10):2337-2347；Davidson et al., 1998, *J. Immunother.*, 21(5):389-398；Hellstrand et al., 1998, *Acta Oncologica*, 37(4):347-353）；遺伝子治療、例えばTNF、IL-1、IL-2、およびp53（Qin et al., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(24):14411-14416；Austin-Ward et al., 1998, *Revista Medica de Chile*, 126(7):838-845；米国特許第5,830,880号明細書および同第5,846,945号明細書）；ならびにモノクローナル抗体、例えば抗CD20、抗ガングリオシドGM2、および抗p185（Hollander, 2012, *Front. Immun.*, 3:3；Hanibuchi et al., 1998, *Int. J. Cancer*, 78(4):480-485；米国特許第5,824,311号明細書）である。1つまたは複数の抗がん治療を、本明細書において記述される抗体治療と共に使用してもよいと企図される。

30

40

【0135】

タンパク質の精製

抗グリコシル化ICP抗体を含むタンパク質の精製技術は、当業者に周知である。これらの技術は、1つのレベルで細胞、組織、または臓器のホモジナイゼーション、ならびにポリペプチドおよび非ポリペプチド分画への簡易分画を伴う。目的のタンパク質またはポリペプチドを、特に示していなければ部分精製または十分な精製（または均一になるまで精製）を達成するためにクロマトグラフィーおよび電気泳動技術を使用してさらに精製してもよい。純粋なタンパク質またはペプチドの調製に特に適した分析方法は、イオン交換

50

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。ペプチドの特に効率的な精製方法は、中圧液体クロマトグラフィー（FPLC）または高速液体クロマトグラフィー（HPLC）である。一般的に当技術分野で公知であるように、様々な精製ステップを実施する順序を変化させてもよく、および/またはある特定のステップを省略してもよく、それでもなお実質的に精製されたポリペプチドの適した調製方法が得られうる。

【0136】

精製ポリペプチド、例えば抗glycPD-L1抗体などの抗グリコシル化ICPは、他の成分から単離可能なまたは単離されて、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るポリペプチドを指す。したがって、単離または精製ポリペプチドはまた、それが天然に存在しうる環境、例えば、細胞、組織、臓器、生物試料などを含まないポリペプチドを指す。一般的に、「精製」は、様々な他の成分を除去するために分画に供されているが、組成物がその発現された生物活性を実質的に保持しているポリペプチド組成物を指す。「実質的に精製された」組成物は、ポリペプチドが組成物の主成分を形成し、そのため、ポリペプチドが、組成物のタンパク質成分の約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、またはそれ超を構成する組成物を指す。

10

【0137】

ポリペプチド、例えば抗体タンパク質の精製の程度を定量する様々な方法が、本開示に照らして当業者に公知である。これらは、例えば、活性分画の特異的活性を決定すること、またはSDS/PAGE分析によって分画内のポリペプチドの量を評価することを含む。分画の純度を評価する好ましい方法は、分画の特異的活性を計算すること、それを最初の抽出物の特異的活性と比較すること、およびこのようにして「精製倍率」によって評価したその純度の程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、精製後に行うように選択される特定のアッセイ技術、および発現されたポリペプチドが検出可能な活性を示すか否かに依存する。

20

【0138】

一般的に、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必要はない。実際に、実質的にあまり精製されていない産物は、ある特定の実施形態において有用性を有しうると企図される。部分精製は、より少ない精製ステップを組み合わせて使用することによって、または同じ一般的精製スキームの異なる形態を利用することによって達成されうる。例えば、HPLC装置を利用して実施する陽イオン交換カラムクロマトグラフィーでは、一般的に、低圧のクロマトグラフィーシステムを利用する同じ技術より大きい精製「倍率」が得られると認識される。低い程度の相対的精製を示す方法は、タンパク質産物の全体的な回収において、または発現されたタンパク質の活性の維持において利点を有しうる。

30

【0139】

アフィニティークロマトグラフィーは、単離される物質（タンパク質）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、すなわち、受容体-リガンド型相互作用に依存するクロマトグラフィー技法である。結合パートナーの1つを不溶性マトリクスに共有結合的にカップリングさせることによって、カラム材料（樹脂）を合成する。次いで、カラム材料は、カラム樹脂の上を通過する溶液から物質を特異的に吸着することができる。条件を、結合が妨害される/起こらない条件（例えば、pH、イオン強度、温度の変更など）に変化させることによって、溶出が起こる。マトリクスは、いかなる有意な程度にも分子を吸着せず、広範囲の化学的、物理的、および温度安定性を有する物質であるべきである。リガンドは、その結合特性に影響を及ぼさないようにカップリングすべきである。リガンドはまた、比較的堅固な結合を提供すべきであるが、結合した物質の溶出は、望ましい試料タンパク質またはリガンドを破壊することなく起こるべきである。

40

【0140】

50

サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）は、溶液中の分子がその大きさに基づいて、またはより技術的な用語ではそ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方法である。これは通常、大きい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、水溶液を使用して試料をカラムの中に通過させるとき、この技術は、ゲル濾過クロマトグラフィーとして知られるが、これに対し、ゲル透過性クロマトグラフィーという名称は、移動相として有機溶媒を使用するときに使用される。SECの基礎となる原理は、異なる大きさの粒子が、異なる速度で静止相の中を溶出（濾過）して、それによって、大きさに基づいて粒子の溶液が分離されることである。粒子の全てが同時またはほぼ同時にロードされると仮定すれば、同じ大きさの粒子は共に溶出するはずである。

10

【0141】

高速（すなわち、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において頻繁に使用されるカラムクロマトグラフィーの1つの形態である。HPLCは、クロマトグラフィー充填材料（静止相）、移動相をカラムの中に移動させるポンプ、および分子の保持時間を示す検出器を利用する。保持時間は、静止相、分析される分子、および使用する溶媒の間の相互作用に応じて変化する。

【0142】

患者のバイオマーカーとしてのグリコシル化ICPは、抗グリコシル化ICP抗体処置によって利益を得る

20

一実施形態において、記述の少なくとも1つの抗グリコシル化ICP抗体の使用を伴う方法が提供される。そのような方法は、がんまたは腫瘍を有する対象から得た腫瘍細胞またはがん細胞のバイオマーカー評価において有用でありうる。がんを有する対象が、ICPを有する腫瘍細胞またはがん細胞のバイオマーカーとしてグリコシル化ICP、特にそのような細胞の細胞表面上にグリコシル化PD-L1の検出可能なレベルを発現するがんまたは腫瘍を有するか否かを決定する方法が提供される。例えば、対象のがんまたは腫瘍細胞を試験して、細胞表面上にグリコシル化ICP、例えばPD-L1を発現すると決定されれば、対象を、記述の抗グリコシル化ICP抗体、例えば抗glycPD-L1抗体の単独、または例えば別の抗がん剤との併用によって処置すると、処置によって利益が得られる可能性が高くなる。そのような方法は、がんまたは腫瘍を有する対象から試料を得ること、当技術分野において公知で使用される、または上記の結合方法を使用して、対象のがんまたは腫瘍に由来する細胞上のグリコシル化ICP、例えばPD-L1の存在について試料を試験すること、ならびに対象のがんまたは腫瘍がグリコシル化ICP、例えばPD-L1タンパク質の細胞表面発現について陽性であることが見出されれば、対象に、抗グリコシル化ICP抗体、例えば抗glycPD-L1抗体の有効量を単独でまたは別の抗がん剤と併用して投与することを含む。処置前に対象が、グリコシル化ICP、例えばPD-L1を発現するがんまたは腫瘍を有すると診断されれば、投与された抗グリコシル化ICP抗体、例えば抗glycPD-L1抗体が、対象のグリコシル化ICP、例えばglycPD-L1発現がんまたは腫瘍細胞と、対象のICP発現T細胞、例えばPD-L1発現T細胞との相互作用を遮断または阻害する可能性がより高く、それによってT細胞活性の免疫抑制を防止して、活性化T細胞殺滅により腫瘍細胞またはがん細胞の殺滅を促進することから、より有効な処置が得られ、対象にとって利益が得られる。一実施形態において、方法は、そのがんまたは腫瘍が、発現されたグリコシル化ICP、例えばPD-L1タンパク質の存在に対する試験に感受性がありうる対象を最初に選択することを伴いうる。

30

40

【0143】

類似の方法を使用して、抗グリコシル化ICP抗体、例えば抗glycPD-L1抗体と別の抗がん薬または処置との併用処置を含む、一連のがんの処置または治療の間に、ならびに処置の終了後に、患者の腫瘍細胞上のグリコシル化ICP、例えばPD-L1の存在を経時的にモニターしてもよい。そのような方法はまた、処置前に、および一連の処置

50

の間に、抗がん処置レジメンまたは併用処置が、グリコシル化 I C P 発現腫瘍細胞またはがん細胞、例えばグリコシル化 P D - L 1 発現腫瘍細胞またはがん細胞について患者の腫瘍またはがん試料を試験またはアッセイすること、例えば成功の転帰またはその可能性を決定するためにモニターすることを伴うコンパニオン診断法において使用されうる。

【 0 1 4 4 】

他の薬剤

他の薬剤を、処置の治療有効性を改善するために、本実施形態のある特定の態様と共に使用してもよいと企図される。これらの追加の薬剤は、細胞表面受容体および G A P 接合部のアップレギュレーションに影響を及ぼす薬剤、細胞抑制および分化剤、細胞接着阻害剤、アポトーシス誘発剤に対する過増殖細胞の感受性を増加させる薬剤、または他の生物薬剤を含む。G A P 接合部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、隣接する過増殖細胞集団に対して抗過増殖作用を増加させうる。他の実施形態において、細胞抑制または分化剤は、処置の抗過増殖有効性を改善するために、本実施形態のある特定の態様と共に併用して使用されうる。細胞接着阻害剤は、本実施形態の有効性を改善すると企図される。細胞接着阻害剤の例は、接着斑キナーゼ (F A K) 阻害剤およびロバスタチンである。さらに、処置の有効性を改善するために、アポトーシスに対する過増殖細胞の感受性を増加させる他の薬剤、例えば抗体 c 2 2 5 を、本実施形態のある特定の態様において併用して使用することができると企図される。

【 0 1 4 5 】

融合体およびコンジュゲート

本明細書において提供される抗グリコシル化 I C P 抗体はまた、他のタンパク質との融合タンパク質として発現させるか、または別の部分と化学的にコンジュゲートさせることができる。いくつかの実施形態において、抗体またはポリペプチドは、アイソタイプまたはサブクラスによって変化する F c 部分を有し、キメラもしくはハイブリッドであってよく、および / または例えばエフェクター機能を改善するために、半減期もしくは組織アクセシビリティを制御するために、生物物理学的特徴、例えば安定性を強化するために、および産物の有効性を改善するために、改変することができ、これらはコスト低減に関連しうる。融合タンパク質の構築において有用な多くの改変、およびそれらを作製するための方法は、当技術分野で公知であり、例えば、Mueller, J.P. et al., 1997, Mol. Immunol. 34(6):441-452 ; Swann, P.G., 2008, Curr. Opin. Immunol., 20:493-499 ; および Presta, L.G., 2008, Curr. Opin. Immunol., 20:460-470 に記述されている。いくつかの実施形態において、F c 領域は、抗体のネイティブ I g G 1、I g G 2、または I g G 4 F c 領域である。いくつかの実施形態において、F c 領域はハイブリッド、例えば I g G 2 / I g G 4 F c 定常領域を含むキメラである。F c 領域の改変には、F c 受容体および補体への結合を防止するために改変される I g G 4 ; 1 つまたは複数の F c 受容体への結合を改善するために改変される I g G 1 ; エフェクター機能を最小限にするように改変される I g G 1 (アミノ酸の変化) ; 変更されたグリカンを含む / グリカンを有しない (典型的に、発現宿主を変化させることによって) I g G 1 ; ならびに F c R n への p H 依存的結合が変更された I g G 1 が挙げられるがこれらに限定されるわけではない。F c 領域は、全ヒンジ領域、または抗体の全ヒンジ領域より少ない部分を含みうる。

【 0 1 4 6 】

別の実施形態は、その半減期を増加させる F c R への結合が低減した I G 2 - 4 ハイブリッドおよび I g G 4 変異体を含む。代表的な I g G 2 - 4 ハイブリッドおよび I g G 4 変異体は、例えば、Angal et al., 1993, Molec. Immunol., 30(1):105-108 ; Mueller et al., 1997, Mol. Immunol., 34(6):441-452 ; および米国特許第 6 , 9 8 2 , 3 2 3 号明細書に記載され、その参照により全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態において、I g G 1 および / または I g G 2 ドメインは欠失している。例えば、Angal ら、同上は、I g G 1 および I g G 2 ドメインのセリン 2 4 1 位がプロリンで置換されているタンパク質を記述している。いくつかの実施形態において、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

10

20

30

40

50

も70、少なくとも80、少なくとも90、または少なくとも100個のアミノ酸を有する融合タンパク質またはポリペプチドが企図される。

【0147】

いくつかの実施形態において、抗グリコシル化ICP抗体を、連結または共有結合させる、または少なくとも1つの部分と複合体を形成させる。そのような部分は、診断剤または治療剤として抗体の有効性を増加させる部分でありうるが、これらに限定されるわけではない。いくつかの実施形態において、部分は、造影剤、毒素、治療酵素、抗生物質、放射標識ヌクレオチド、化学療法剤などでありうる。

【0148】

いくつかの実施形態において、抗glycICP抗体にコンジュゲートまたは融合される部分は、酵素、ホルモン、細胞表面受容体、毒素、例えば、限定されないが、アブリン、リシンA、シュードモナスエンテロトキシン（すなわちPE-40）、ジフテリア毒素、リシン、ゲロニン、またはヨウシュヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、タンパク質（腫瘍壊死因子、インターフェロン（例えば、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン）、神経生長因子（NGF）、血小板由来増殖因子（PDGF）、組織プラスミノゲン活性化因子（TPA）、またはアポトーシス剤（例えば、腫瘍壊死因子 α 、腫瘍壊死因子 β ）、生物応答修飾剤（例えば、リンフォカイン（例えば、インターロイキン-1（「IL-1」）、インターロイキン-2（「IL-2」）、インターロイキン-6（「IL-6」）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（「GM-CSF」）、顆粒球コロニー刺激因子（「G-CSF」）、またはマクロファージコロニー刺激因子（「M-CSF」）、または増殖因子（例えば、成長ホルモン（「GH」）、細胞毒素（例えば、細胞抑制または細胞障害剤、例えばパクリタキセル、サイトカラシンB、グラミシジンD、エチジウムプロミド、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テニポシド、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、ツブリシンベースの微小管障害剤、例えばメイタンシノイド、例えばメイタンシノイドDM1（N2'-デアセチル-N2'-(3-メルカプト-1-オキソプロピル)-メイタンシン、使用するリンカーに応じてメルタンシンまたはエムタンシン、ならびにメイタンシノイドDM4（N2'-デアセチル-n2'-(4-メルカプト-4-メチル-1-オキソペンチル)-6-メチルメイタンシン；ラブタンシン、ImmunoGen, Inc、Walsham, MA）、ならびにピューロマイシンおよびそのアナログまたはホモログ）、抗代謝薬（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、BiCNU（登録商標）（カルムスチン、BSNU）およびロムスチン（CCNU））、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、およびシスジクロロジアミン白金（II）（DDP）、シスプラチン）、アントラサイクリン（例えば、ダウノルピシン（これまでのダウノマイシン）、およびドキシソルピシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（これまでのアクチノマイシン）、プレオマイシン、ミトラマイシン、アントラマイシン（AMC））、抗分裂剤ならびに/またはチューブリン障害剤、例えば、ピンクリスチンおよびピンブラスチン、モノメチルアウリスタチンF（MMAF）、モノメチルアウリスタチンE（またはデスメチルアウリスタチンE）（MMAE）、例えばベドチン、またはその組み合わせであってもよい。

【0149】

抗体-薬物コンジュゲート（ADC）

抗体-薬物コンジュゲート（ADC）は、強力な細胞傷害薬が、化学リンカー、またはカップリング剤を介して特異的標的抗原、特に腫瘍細胞またはがん細胞の表面上に発現するまたは過剰発現する標的抗原に対する抗体、典型的にモノクローナル抗体に共有結合により連結されている生物学的治療剤である。そのような「ロード」された抗体は、腫瘍細胞

10

20

30

40

50

胞またはがん細胞に対して致死性の細胞傷害性の積み荷を送達するように設計される。ADCは、副作用を低減させ、全身毒性を最小限にしながら、新生物細胞にペイロード薬物を標的化する手段を提供する。ADCは、ADCの抗体成分とその標的抗原との特異的相互作用により、細胞表面発現標的抗原に結合する。標的抗原に結合後、ADCは、特に抗体が高い内在化活性を有する場合には細胞に内在化される。内在化機能を有する抗glycICP抗体の例は、本明細書において記述される実施形態の抗glycPD-L1抗体、例えばSTM108およびSTM073である。したがって、そのようなADCが細胞に内在化される場合、それらは細胞を殺滅するかまたは細胞内の分子を標的とするように直接作用し、それによってアポトーシスまたは細胞死が起こる。本明細書において記述される抗glycICP抗体、例えば抗glycPD-L1抗体（例えば、STM108およびSTM073）、特にモノクローナル、ヒト化、キメラ、またはヒト抗体を含むそのようなADCは、腫瘍およびがん細胞上のグリコシル化ICPへの抗体の特異的標的化を、細胞傷害薬または化合物のがん殺滅能と組み合わせ、それによって抗glycICP抗体による処置および治療のさらなる利点を提供する。ADCを調製および使用する技術は当技術分野で公知であり、本明細書において記述される抗glycPD-L1抗体に限定されないと意図される。（例えば、Valliere Douglass, J.F., et al., 2015, Mol. Pharm., 12(6):1774-1783; Leal, M. et al., 2014, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1321:41-54; Panowski, S. et al., 2014, mAbs, 6(1):34-45; Beck, A. 2014, mAbs, 6(1):30-33; Behrens, C.R. et al., 2014, mAbs, 6(1):46-53; およびFlygare, J.A. et al., 2013, Chem. Biol. Drug Des., 81(1):113-121を参照されたい）。実施形態において、上記の部分のいくつかまたは全て、特に毒素および細胞毒素を、抗glycPD-L1抗体にコンジュゲートさせて、がんを処置するために有効なADCを産生してもよい。実施形態において、ADCの抗glycICP抗体成分は、二重特異性、多重特異性、二重パラトープ性または多重パラトープ性抗体でありうる。

【0150】

治療的または細胞傷害性部分を抗体にコンジュゲートさせる方法は周知である。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. 14(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。ADCおよびADC腫瘍学産物の総説は、Lambert, British J. Clin. Pharmacol., 76(2):248-262 (2013) and in Bouchard et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 24:5357-5363 (2014)において見出される。

【0151】

特異的実施形態において、glycICP、例えばPD-L1の腫瘍細胞への内在化を容易にする抗glycICP抗体、例えば抗glycPD-L1抗体を、典型的に本明細書において抗glycICP抗体 - ADCと呼ばれる抗glycICP抗体 - 薬物コンジ

ュゲート (ADC) を産生するために、不安定な結合を有する化学リンカーによって、上記のように細胞傷害剤および/または化学療法剤、毒素、または細胞毒素、または放射性核種などの非常に強力な生物活性薬または薬剤にコンジュゲートする。生物活性薬または細胞傷害剤は、例えば細胞、特に抗 *glycICP* 抗体 - ADC が結合する細胞表面標的受容体または分子を発現する腫瘍細胞またはがん細胞に送達される「細胞障害性ペイロード」として役立つ。その標的分子に結合したそのような抗 *glycICP* 抗体 - ADC は、細胞に内在化され、そこで細胞傷害薬ペイロードが放出される。非常に強力な細胞傷害性ペイロードとのコンジュゲーションを通しての本明細書において記述される抗 *glycPD-L1* 抗体などの内在化抗 *glycICP* 抗体のがん細胞殺滅活性の増強により、高い抗腫瘍活性を有する抗がん ADC 生物学が得られ、副作用は一般的に軽度で良好に忍容される。

10

【0152】

本実施形態において記述される抗 *glycICP* 抗体は、当技術分野において公知で使用される、またはまだ商品化されていない様々なタイプの細胞傷害性または DNA 作用ペイロードに連結してもよい。例えば、メイタンシンは、エチオピアの低木であるメイテヌス・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 (*benzoansamacrolide*) である。この細胞傷害剤およびその誘導体 (例えば、メイタンシノイド) は、ピンカルカロイド結合部位の近くでチューブリンに結合する。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および微小管全体に分布する部位に対してより低い親和性を有すると考えられる。微小管動態の抑制により、細胞は細胞周期の G2/M 期で停止し、最終的にアポトーシスによる細胞死が起こる (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) は、DM1 および DM4 (*ImmunoGen, Inc, Waltham, MA*) を含み、これらは非可逆的および可逆的リンカーと組み合わせて広く使用されている。特に、チオエーテルリンカーによって抗体に結合した DM1 は、「エムタンシン」と呼ばれる。SPリンカーによって抗体に結合した DM1 は、「メルタンシン」と呼ばれる。SPDBリンカーによって結合した DM4 は、「ラプタンシン」と呼ばれ、sSPDBリンカーによって結合した DN4 は、「ソラプタンシン」 (*ImmunoGen, Inc, Waltham, MA*) と呼ばれる。一実施形態において、抗 *glycICP* 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。特定の実施形態において、抗 *glycICP* 抗体 - ADC は、抗 *glycPD-L1* 抗体 - DM1 である。一実施形態において、抗 *glycICP* 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。特定の実施形態において、抗 *glycICP* 抗体 - ADC は、抗 *glycPD-L1* 抗体 DM4 である。一実施形態において、抗 *glycICP* 抗体 - ADC は、DNA 作用ペイロード、例えば DGN462 (*ImmunoGen, Inc., Waltham, MA*) を含む。特定の実施形態において、抗 *glycICP* 抗体 - ADC は、抗 *glycPD-L1* 抗体 - DGN462 である。一実施形態において、抗 *glycPD-L1* 抗体 - ADC の抗 *glycPD-L1* 抗体成分は、STM073 またはその結合部分である。一実施形態において、抗 *glycPD-L1* 抗体 - ADC の抗 *glycPD-L1* 抗体成分は、STM108 またはその結合部分である。

20

30

40

【0153】

特定の実施形態において、抗 *glycICP* 抗体にコンジュゲートされる細胞傷害剤は、その抗分裂活性がチューブリンの重合化を遮断することによって細胞分裂を阻害することを伴う毒性の高い抗新生物剤である、MMAE (モノメチルアウリスタチン E (またはデスメチル - アウリスタチン E)) である。国際一般的名称であるペドチンは、MMAE プラス MMAE - 抗体コンジュゲートにおける抗体とのその連結構造を指す。より特定の実施形態において、ADC は、抗 *glycPD-L1* 抗体 - MMAE、例えば STM073 - MMAE または STM108 - MMAE である。

【0154】

50

多数の化学リンカーが公知であり、細胞傷害剤またはDNA作用薬ペイロードをコンジュゲートするために使用される。抗g1y c I C P抗体を含むADC、特に本明細書において記述されるその標的の結合後に内在化されるADCを産生するために単独でまたは併用して使用することが想像されるある特定のリンカーには、SMCC(4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサンカルボン酸 N-ヒドロキシスクシンイミドエステル); SPDB(N-スクシンイミジル 3-(2-ピリジルジチオ)ブチレート); SPP(N-スクシンイミジル 4-(2-ピリジルジチオ)ペンタノエート); スルホ-SPDBまたはsSPDB(N-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルジチオ)-2-スルホブタノエート); チオエーテルリンカー スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸(MCC); およびvc(バリン-シトルリンジペプチドリンカー)が挙げられる。例として、操作されたリンカー(例えば、SMCC、SPDB、S-SPDB)(Immunogen, Inc.)は、ADCの腫瘍への結合の前に安定であるように設計されており、次に、ADCががん細胞内に内在化されるとペイロードの有効性を最適化するように設計されている。カテプシン切断可能リンカーであるジペプチドvcリンカーなどの他のリンカーを使用して、抗体を、ドラスタチン10に由来する分裂阻害剤であるアウリスタチン、例えばモノメチルアウリスタチンE(MMAE)、例えばベドチンなどの細胞傷害剤にコンジュゲートしてもよい。細胞毒素を、1つ超の毒素分子がそれぞれの抗体分子に結合するように抗体にコンジュゲートさせてもよく、例えば抗体あたり平均で2、3、4、5、6、7、または8個の毒素分子が存在してもよい。

10

20

【0155】

特定の実施形態において、MMAEを、マレイミドカプロイル(MC)結合基によって抗体システインに間接的に連結させ、これを、バリン-シトルリン-p-アミノベンジルオキシカルボニル-MMAE(MC-vc-PAB-MMAE)にカップリングさせる。

「MC-vc-PAB-MMAE」の線形構造において、「MC」は、マレイミドおよびカプロン酸からなり、典型的にH鎖上のシステイン基を介して抗体に結合する部分である。次に「MC」を、腫瘍細胞またはがん細胞内部のカテプシンによって切断されるカテプシン切断可能リンカーである、バリン(Val)およびシトルリン(Cit)からなる「vc」リンカーに結合させる。「vc」を、スペーサー「PAB」、すなわちパラアミノ安息香酸に結合し、これにMMAE細胞毒素を連結する。MC-vc-PAB-MMAE

30

ADCは、カテプシンBなどのプロテアーゼによって切断されると遊離の膜透過性のMMAEを放出する。一実施形態において、抗体に対するリンカーは、細胞外液において安定であるが、ADCが腫瘍細胞またはがん細胞に入るとカテプシンによって切断され、このように、MMAEまたは他の毒素薬物の抗分裂メカニズムを活性化する。別の実施形態において、モノメチルアウリスタチンF(MMAF)を、マレイミドカプロイル(MC-MMAF)によって抗体システインに連結する。MC-vc-PAB-MMAE ADCとは対照的に、MC-MMAF ADCは、MMC-DMI ADCと同様に切断不能であり、細胞内で内在化して分解されなければならない、細胞内の活性薬としてシステイン-MC-MMAFを放出する。

40

【0156】

一実施形態において、細胞傷害性ペイロードは、ADCの細胞内への内在化後にリソソームにおいて放出される。リソソームにおいて、リソソーム酵素は、ADC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)ペイロードが細胞質に放出され、ここで薬物が細胞内標的と結合し、最終的に細胞死を引き起こす。任意選択で、放出されたペイロードは、リンカーがなおも結合しているが完全に活性である。ADCに標的が結合することによってリソソームへの輸送の不良が起こる他の実施形態において、標的細胞の外部で安定であるが、細胞内に入ると抗体成分からペイロードを切断するリンカーは、細胞内であるがリソソームの外部でペイロードを放出する代替の様式を提供する。他の実施形態において、リンカーは、細胞外液で安定であるが、ADCが腫瘍細胞またはがん細胞に入るとカテプシンによって切断され、このように毒素薬物の抗分裂または他の

50

細胞傷害メカニズムを活性化する。他の実施形態において、切断可能リンカーの作用によって放出されるペイロードは、隣接するがん細胞に入り、バイスタンダー作用を介してそれらを殺滅することができ、このようにしてADCの標的化および腫瘍殺滅活性を増強する。

【0157】

特定の例として、細胞表面PD-L1の内在化を促進する抗PD-L1 MAbs STM073またはSTM108によって表される抗glycICP抗体は、リンカーSMCC(スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサ-1-カルボキシレート)を介してDM1にカップリングされる。別の特定の実施例において、STM073またはSTM108によって表される抗glycICP抗体は、リンカーSPDB(N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)ブチレート)またはsSPDB(N-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルジチオ)-2-スルホブタノエート)を介してDM4にカップリングされる。別の特定の実施例において、アウリスタチンモノメチルアウリスタチンEは、マレイミドカプロイル-バリン-シトルリン-p-アミノベンジルオキシカルボニル(MC-vc-PAB-MMAE)によって、抗glycICP抗体、例えばSTM073またはSTM108のシステイン残基に連結される。特定の実施形態において、ADCは、STM108-MC-vc-PAB-MMAEまたはSTM073-MC-vc-PAB-MMAEである。

10

【0158】

一実施形態において、抗glycICP抗体-ADCは、1分子あたり、MMAEなどの薬物の多数の単位、例えば分子あたり1~10、1~5、2~5、3~5、または2、3、4、5、6、7、8、9、10単位のMMAEなどの薬物、ならびにその間の値を含む。他の実施形態において、抗体-薬物比は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ超、ならびに2~10の間の範囲およびその間の値でありうる。実施形態において、抗glycICP抗体、例えばSTM108またはSTM073は、二重特異性、多重特異性、二重パラトープ性もしくは多重パラトープ性抗体であるか、またはその抗原結合部分である。本明細書において記述される内在化機能を有する抗glycICP抗体を含むそのようなADC、例えば上記のSTM108-MC-vc-PAB-MMAEは、がんの処置のために腫瘍およびがん細胞の殺滅において強化された多面的な抗新生物効果を提供する。ほんの数例の実例の利点として、抗ヒトglycICPMAb-ADC、例えばSTM108-ADCは、PD-1/PD-L1相互作用を遮断して、それによって腫瘍細胞に対するT細胞免疫およびエフェクター機能を増強することができ、腫瘍およびがん細胞上で発現したグリコシル化PD-L1を選択的に標的とすることができ、結合後に腫瘍細胞またはがん細胞上のPD-L1を内在化して、それによって腫瘍細胞またはがん細胞上の表面発現PD-L1を低減させ、PD-L1の腫瘍形成能をさらに低減させることができ、抗体が内在化されて毒性薬物が放出される腫瘍細胞またはがん細胞のアポトーシスを引き起こし、細胞に損傷を与え、最終的に殺滅することができ、ならびにアポトーシスを受けた腫瘍または細胞からの毒性薬物の放出を通して、付近または近隣の腫瘍細胞またはがん細胞を殺滅することによって、バイスタンダー作用を容易にすることができる。

20

30

40

【0159】

いくつかの実施形態において、本明細書において記述される抗体は、精製を容易にするために、マーカー、例えばペプチドにコンジュゲートさせてもよい。いくつかの実施形態において、マーカーは、ヘキサヒスチジンペプチド、すなわちインフルエンザ血液凝集素タンパク質に由来するエピトープに対応する血液凝集素「HA」タグ(Wilson, I. A. et al., Cell, 37:767-778 (1984))、または「fla g」タグ(Knappik, A. et al., Bio techniques 17(4):754-761 (1994))である。

【0160】

他の実施形態において、本明細書において記述される抗glycICP抗体にコンジュゲートされる部分は、アッセイにおいて検出することができる造影剤でありうる。そのよ

50

うな造影剤は、酵素、補欠分子団、放射標識、非放射活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、発色団、発光分子、生物発光分子、光親和性分子、または色素粒子もしくはリガンド、例えばビオチンでありうる。実施形態において、適した酵素には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -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挙げられるがこれらに限定されるわけではない；補欠分子団には、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが挙げられるがこれらに限定されるわけではない；蛍光材料には、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシル、またはフィコエリスリンが挙げられるがこれらに限定されるわけではない；発光材料には、ルミノールが挙げられるがこれらに限定されるわけではない；生物発光材料には、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンが挙げられるがこれらに限定されるわけではない；放射活性材料には、ビスマス (^{213}Bi)、炭素 (^{14}C)、クロム (^{51}Cr)、コバルト (^{57}Co)、フッ素 (^{18}F)、ガドリニウム (^{153}Gd 、 ^{159}Gd)、ガリウム (^{68}Ga 、 ^{67}Ga)、ゲルマニウム (^{68}Ge)、ホルミウム (^{166}Ho)、インジウム (^{115}In 、 ^{113}In 、 ^{112}In 、 ^{111}In)、ヨウ素 (^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{121}I)、ランタン (^{140}La)、ルテチウム (^{177}Lu)、マンガン (^{54}Mn)、モリブデン (^{99}Mo)、パラジウム (^{103}Pd)、リン (^{32}P)、プラセオジウム (^{142}Pr)、プロメチウム (^{149}Pm)、レニウム (^{186}Re 、 ^{188}Re)、ロジウム (^{105}Rh)、ルテニウム (^{97}Ru)、サマリウム (^{153}Sm)、スカンジウム (^{47}Sc)、セレン (^{75}Se)、ストロンチウム (^{85}Sr)、イオウ (^{35}S)、テクネチウム (^{99}Tc)、タリウム (^{201}Tl)、スズ (^{113}Sn 、 ^{117}Sn)、トリチウム (^3H)、キセノン (^{133}Xe)、イッテルビウム (^{169}Yb 、 ^{175}Yb)、イットリウム (^90Y)、亜鉛 (^{65}Zn)；様々な陽電子射出トモグラフィーを使用して陽子を放出する金属；および非放射活性常磁性金属イオンが挙げられるがこれらに限定されるわけではない。

【0161】

造影剤は、当技術分野で公知の技術を使用して、本明細書において記述される抗体またはポリペプチドに、直接、または中間体（例えば、当技術分野で公知のリンカー）を通して間接的にコンジュゲートさせてもよい。例えば、診断薬として使用するために、本明細書において記述される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関して報告する米国特許第4,741,900号明細書を参照されたい。いくつかのコンジュゲーション方法は、例えば抗体に付着した有機キレート剤、例えばジエチレントリアミン五酢酸無水物 (DTPA)、エチレンジアミン四酢酸、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-ジフェニルグリクリル-3を使用する金属キレート錯体の使用を伴う。モノクローナル抗体はまた、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することができる。フルオレセインマーカ-とのコンジュゲートは、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ネートとの反応によって調製することができる。

【0162】

いくつかの実施形態において、本明細書において記述される抗glycICP抗体を、例えば米国特許第4,676,980号明細書に記述されるように、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してもよい。そのようなヘテロコンジュゲート抗体は、ハプテン（例えば、フルオレセイン）、または細胞マーカ-、サイトカイン、またはケモカインにさらに結合することができる。

【0163】

いくつかの実施形態において、本明細書において記述される抗グリコシル化ICP抗体は、固相支持体に付着させることができ、これは、本明細書において記述される抗体もしくは抗原結合断片との結合を通して支持体に固定されている標的抗原もしくは標的抗原に結合することができる他の分子のイムノアッセイまたは精製を行うために有用でありうる

10

20

30

40

50

。そのような固相支持体には、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るわけではない。

【実施例】

【0164】

本明細書における実施例は、腫瘍およびがん細胞においてグリコシル化形態で本発明者らによって安定に発現することが見出された具体的かつ代表的なICP、すなわちPD-L1、ならびにPD-L1およびそのペプチドのグリコシル化形態に対して生成された抗体に関する。記述の方法によって単離され、本明細書において例証される代表的な抗glycPD-L1抗体には、STM004、STM115、STM073、およびSTM108が挙げられる。抗体STM004およびSTM115は、2016年10月6日に公開されたPCT出願国際公開第2016/160792号パンフレットに開示され、抗体STM073およびSTM108は、2016年7月12日に提出された米国仮特許出願第62/361,312号明細書に開示されている。当業者は、実施例が、エフェクターT細胞などの免疫細胞上で発現するPD-L1およびそのリガンドICPに加えて、腫瘍細胞上で発現する他のグリコシル化ICPを包含しうることを認識するであろう。

10

【0165】

[実施例1]

材料および方法

細胞培養、安定なトランスフェクタント、およびトランスフェクション。細胞は全て、American Type Culture Collection (ATCC) から得た。これらの細胞は、10%ウシ胎仔血清(FBS)を補充したDMEM/F12またはRPMI 1640培地で成長させた。MDA-MB-468、BT549、および293T細胞におけるPD-L1安定トランスフェクタントを、ピューロマイシン(In vivo Gen, San Diego, CA, USA)を使用して選択した。一過性のトランスフェクションに関して、細胞に、SNリボソーム(Hu, M. C. et al., 2004, Cell, 117:225-237)およびlipofectamine(商標)2000(Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)を使用して、DNA、例えばPD-L1をコードするDNAを一過性にトランスフェクトした。

20

【0166】

レンチウイルス感染を使用する安定な細胞の生成。細胞におけるPD-L1の発現をノックダウンするために使用されるレンチウイルスに基づくshRNA(pGIPZプラスミド)(Shen, J. et al., 2013, Nature, 497:383-387)を、shRNA/ORFコア施設(UT MD Anderson Cancer Center)から購入した。MDA-MB-231またはA431細胞におけるPD-L1タンパク質発現のノックダウン効率に基づいて、本発明者らは、この試験について2つのPD-L1クローンを選択した。成熟アンチセンス配列は以下の通りである: TCAATTGTCATATTGCTAC (shPD-L1 #1、配列番号9)、TTGACTCCATCTTTCTTCA (shPD-L1 #5、配列番号10)。内因性のPD-L1をノックダウンして同時にFlag-PD-L1を再構成するために、pGIPZ-shPD-L1/Flag-PD-L1二重発現構築物を使用して、本発明者らは、内因性のPD-L1ノックダウンおよびFlag-PD-L1 WTまたは4NQ変異体発現細胞株を確立した。PD-L1およびFlag-PD-L1に関するレンチウイルス発現shRNAを生成するために、本発明者らは、FuGENE6トランスフェクション試薬によって、293T細胞にpGIPZ非サイレンス(ベクター対照ウイルスについて)、pGIPZ-shPD-L1、またはpGIPZ-shPD-L1/PD-L1 WT、またはpGIPZ-shPD-L1/PD-L1 4NQ変異体を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、培地を交換した後、培地を24時間間隔で収集した。収集したレンチウイルスを含む培地を遠心分離して、細胞破片を除去し、0.45 μmフィルターを通して濾過した。細胞を、注射の12時間前に50%コンフルエンスで播種して、培地を、レンチウイルス

30

40

50

を含む培地に交換した。24時間感染後、培地を新しい培地に交換して、感染した細胞を1 µg/ml ビューロマイシン (InvivoGen) によって選択した。

【0167】

プラスミド。ヒトPD-L1クローンをshRNA/ORFコア施設 (UT MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA) から得て、pCDHレンチウイルス発現ベクターにクローニングして、公知の分子生物学技術を使用してPD-L1-FlagまたはPD-L1-Myc発現細胞株を確立した。加えてヒトPD-L1核酸を、一過性のトランスフェクションのためにpEGFP-N1およびpCMV-HA哺乳動物細胞発現ベクターにクローニングした。pCDH/PD-L1-Flag発現ベクターを鋳型として使用して、以下の表4に示されるプライマーを使用して部位特異的変異誘発を実施することによって、PD-L1-Flag NQ変異体N35Q、N192Q、N200Q、N219Q、および4NQ (N35Q/N192Q/N200Q/N219Q) を生成した。内因性のPD-L1をノックダウンして同時にFlag-PD-L1を再構成するために、pGIPZ-shPD-L1/Flag-PD-L1二重発現構築物を作製するために、PD-L1 mRNAの3'-UTR領域を標的とするshPD-L1構築物 (shPD-L1 #5) を選択した。Flag-PD-L1野生型 (WT) または4NQ変異体DNAを、内因性のPD-L1に対して特異的なshRNAを発現するpGIPZ-shPD-L1 (Thermo Scientific, Pittsburgh, PA, USA) にクローニングした。全ての構築物を酵素消化およびDNAシーケンシングを使用して確認した。

10

20

【0168】

【表4】

表4.部位特異的変異誘発のプライマー

プライマー		配列(5'から3')
N35Q	フォワード(配列番号11)	gtggtagagtatggtagccaaatgacaattgaatgcaaa
	リバース(配列番号12)	tttgcattcaattgtcatttgctaccatactctaccac
N192Q	フォワード(配列番号13)	gagagagagaagctttccaggtgaccagcacactgag
	リバース(配列番号14)	ctcagtgtgctggtcacctggaaaagcttctctctc
N200Q	フォワード(配列番号15)	gaccagcacactgagaatccagacaacaactaatgagat
	リバース(配列番号16)	atctcattagtgtgtctggtgattctcagtgctgctgctc
N219Q	フォワード(配列番号17)	gagagaggagaagctttccaagtgaccagcacactgaga
	リバース(配列番号18)	tctcagtgtgctggtcacttgaaaagcttctctctctc

30

【0169】

抗体および化学物質。以下の抗体を、実施例において記述される実験に使用した: Flag (F3165; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); PD-L1 (13684; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA); PD-L1 (329702; BioLegend, San Diego, CA, USA,); PD-L1 (GTX117446; GeneTex, Irvine, CA, USA); PD-L1 (AF156; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA); PD-1 (ab52587; Abcam, Cambridge, MA, USA)。

40

【0170】

イムノプロット分析および免疫組織化学。イムノプロット分析は既に記述されるように実施した (Lim et al., 2008, Gastroenterology, 135:2128-2140; およびLee et al., 2007, Cell, 130:440-455)。画像獲得およびバンド強度の定量を、Odyssey (登録商標) 赤外線イメージングシステム (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) を使用して実施した。免疫細胞化学について、細胞を4%パラホ

50

ルムアルデヒド中、室温で15分間固定して5% Triton X-100中で5分間透過性にした後、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または594色素コンジュゲートおよび/または抗ウサギAlexa Fluor 488または594色素コンジュゲート(Life Technologies)であった。核を4', 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI blue)(Life Technologies)によって染色した。封入後、多光子共焦点レーザー走査型顕微鏡(Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA)を使用して、細胞を可視化した。

【0171】

PD-L1およびPD-1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、細胞を4%パラホルムアルデヒド中、室温で15分間固定した後、組み換えヒト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。核を4', 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI blue)(Life Technologies)によって染色した。Alexa Fluor 488色素の蛍光強度を、マイクロプレートリーダーSynergy Neo(BioTek, Winooski, VT, USA)を使用して測定して、総タンパク質の量によって強度に対して標準化した。封入後、画像を得るために、共焦点レーザー走査型顕微鏡(Carl Zeiss)を使用して、細胞を可視化した。

10

20

【0172】

統計分析。棒グラフのデータは、3回の独立した実験の標準偏差と共に無処置または対照群と比較した倍率変化を意味する。統計分析は、SPSS(バージョン、20 SPSS, Chicago, IL)を使用して実施した。タンパク質発現と、BLBCサブセットの間の相関を、Spearman相関およびMann-Whitney検定を使用して分析した。実験データに関して学生t検定を実施した。P値<0.05は統計学的に有意であると考えられた。

【0173】

[実施例2]

グリコシル化PD-L1結合抗体の産生およびスクリーニング

30

この代表的な実施例は、グリコシル化ICP、すなわちグリコシル化PD-L1に特異的に結合するモノクローナル抗体を得る説明を提供する。しかし、本明細書において記述される方法は、グリコシル化ICPとその相互作用リガンドとの会合を防止することによって、免疫抑制を阻害するために、他のグリコシル化免疫チェックポイント分子に特異的に結合する抗体を生成することに応用可能である。

【0174】

グリコシル化ヒトPD-L1に対して作製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、標準化プロトコールに従って、SP2/0マウス黒色腫細胞と、ヒトPD-L1免疫BALB/cマウス(n=6)から単離した脾細胞との融合によって得た(Antibody Solution, Inc)。融合前に、免疫したマウスの血清を、FACS分析を使用してPD-L1免疫原への結合について確認した。モノクローナル抗体(MAb)産生ハイブリドーマを作製した。全てのMAbのアイソタイプがIgG1であった。抗体を産生するハイブリドーマを、グリコシル化PD-L1に対する特異性について再度試験した。この目的のため、42個の候補MAb産生ハイブリドーマを選択し、ADC F培地において成長させ、そのモノクローナル抗体含有上清を濃縮して精製した。

40

【0175】

非グリコシル化PD-L1と比較してグリコシル化PD-L1抗原に対して特異的であり、優先的に結合する抗glycPD-L1 MAbを同定するために、異なるタイプのアッセイを実施した。MAbのグリコシル化PD-L1への優先的結合を検出するスクリーニングアッセイにおいて、抗体結合は、FACS分析を通して試験される抗体を認識す

50

る二次抗体の蛍光強度の測定に基づいて決定した（膜結合タンパク質を使用して）。例として、BT549ヒト乳がん細胞株を使用して、アッセイを実施した。実例として、PD-L1 WT（完全にグリコシル化された）を過剰発現するBT549細胞を、従来の技法に従ってビオチンによって標識した後、ビオチンによって標識していないPD-L1 4NQ（完全な非グリコシル化PD-L1変種）を過剰発現するBT549細胞と混合した。混合した細胞を、試験される抗体およびPEにコンジュゲートした組み換えストレプトアビジン（rSA-PE）と共にインキュベートした。細胞を、FITCにコンジュゲートした二次抗体（SA-FITC）と共にさらにインキュベートした。洗浄後、ビオチン-rSA-PE標識細胞（グリコシル化PD-L1）とビオチン-rSA-PEで標識されなかった細胞（非グリコシル化PD-L1 4NQ細胞）とを分離するように、細胞のゲートを設定した。FITCにコンジュゲートした二次抗体（SA-FITC）を介して、膜結合WTまたは4NQ PD-L1への抗PD-L1抗体の相対的結合を評価するために、平均蛍光強度（MFI）を測定した。4NQ PD-L1と比較してWT PD-L1において有意により高いMFIを示した抗体を、さらなる評価のために選択した。STM004、STM073、STM108およびSTM115抗glycPD-L1 MA bの蛍光結合分析の結果を、以下の表5に示し、これは、野生型（グリコシル化）PD-L1を発現するBT549細胞（BT549PD-L1WT細胞）への抗体結合に対するMFI値を、変種（非グリコシル化4NQ）PD-L1を発現するBT549細胞（BT549PD-L1 4NQ細胞）への抗体結合に対するMFI値と比較して示す。

10

20

【0176】

【表5】

表5.抗glycPD-L1 MA bに関する測定された平均蛍光強度値

MAb	MFI (BT549PD-L1WT 細胞)	MFI (BT549PD-L1 4NQ 細胞)
STM004	42.53	8.70
STM073	63.90	12.21
STM108	117.42	27.57
STM115	51.14	21.31

30

【0177】

別のアッセイにおいて、グリコシル化ヒトPD-L1タンパク質および非グリコシル化PD-L1、すなわちPNGアゼFによって処置したPD-L1タンパク質の両方を、固相表面にコーティングして、PD-L1抗原に対するMA bの結合親和性について試験した。「PD-L1抗原」は、「PD-L1タンパク質」と同義であると理解される。12個のMA bが、非グリコシル化PD-L1タンパク質（PNGアゼF処置タンパク質）と比較してグリコシル化PD-L1タンパク質と高親和性の相互作用を示した。さらなる特異性分析について、選択されたMA bをウェスタンブロットおよびFACSフローサイトメトリー分析によって分析した。様々な分析から、STM004、STM073、STM108およびSTM115などのMA bが、PD-L1の非グリコシル化形態と比較してPD-L1のグリコシル化形態に特異的に結合することが見出され、このことは、グリコシル化PD-L1抗原に対するこれらのMA bの特異性をさらに確認した。図1を参照されたい。

40

【0178】

いくつかの例において、精製MA bをさらに、生細胞イメージングアッセイIncucyte（商標）（Essen Bioscience）を使用して、そのPD-L1とPD-1との間の相互作用（PD-L1/PD-1相互作用）の中和または阻害能について試験した。このアッセイについて、PD-L1を発現するBT-549細胞を、抗ヒトP

50

D - L 1 抗体および蛍光標識 P D - 1 - F c 融合タンパク質と共にインキュベートした。リガンドおよび受容体結合を、製造元の説明書に従って I n c u C y t e (商標) Z o o m によって毎時間定量した。試験した 4 2 個の M A b についてこのアッセイに基づき、および図 2 に示すように、1 5 個の M A b が P D - 1 への P D - L 1 の結合を完全に遮断した。

【 0 1 7 9 】

グリコシル化 P D - L 1 への優先的結合をウェスタンブロットおよびフローサイトメトリー分析によって確認した。図 3 B は、本明細書において記述されるスクリーニング方法によって同定された抗 g l y c P D - L 1 抗体の 5 個がグリコシル化 P D - L 1 (「 W T 」) に結合するが、非グリコシル化 P D - L 1 4 N Q には結合しないことを証明する。図 3 C は、フローサイトメトリーによって、非グリコシル化 P D - L 1 4 N Q 変異体と比較して、グリコシル化または W T P D - L 1 に対するこれらの 5 つの抗体の優先的結合を確認する。

10

【 0 1 8 0 】

[実施例 3]

特異的グリコシル化 P D - L 1 結合抗体の結合領域の同定

グリコシル化 P D - L 1 に結合するモノクローナル抗 g l y c P D - L 1 抗体の領域を同定するために、野生型 (グリコシル化) P D - L 1 (P D - L 1 W T) およびグリコシル化変種タンパク質 N 3 5 / 3 N Q 、 N 1 9 2 / 3 N Q 、 N 2 0 0 / 3 N Q 、 および N 2 1 9 / 3 N Q (図 4 A ~ 4 C) を、P D - L 1 ノックダウン B T 5 4 9 細胞において過剰発現させた。図 4 C におけるウェスタンブロットによって決定した場合に、いくつかの M A b は、他の P D - L 1 変異体と比較して高い結合レベルで特定の P D - L 1 変異体を認識し、そのような M A b が認識されるグリコシル化に対して部位特異的であることを証明した。さらに、肝臓がん細胞溶解物を使用するウェスタンブロット分析はまた、異なる抗 g l y c P D - L 1 抗体が、異なるパターンの P D - L 1 グリコシル化を認識することも明らかにした (図 4 D) 。

20

【 0 1 8 1 】

[実施例 4]

抗 g l y c P D - L 1 抗体を使用する免疫組織化学染色

これらの M A b の組織病理学的重要性を、図 5 に示すように免疫組織化学 (I H C) 染色によってさらに証明した。サイトスピン染色分析において、抗 g l y c P D - L 1 モノクローナル抗体は、一貫して P D - L 1 タンパク質のグリコシル化タンパク質を認識して結合したが、非グリコシル化 P D - L 1 タンパク質には結合しなかった。ヒトトリプルネガティブ乳がん患者の試料において、抗 g l y c P D - L 1 モノクローナル抗体はまた、膜および細胞質染色を 1 : 3 0 の比率で示した。これらのデータは、抗 g l y c P D - L 1 モノクローナル抗体が、バイオマーカー分析において、バイオマーカーとしてグリコシル化 P D - L 1 の検出のために使用することができることを証明した。

30

【 0 1 8 2 】

[実施例 5]

結合アッセイ

本明細書において記述される抗 g l y c P D - L 1 モノクローナル抗体が P D - 1 と P D - L 1 との相互作用を特異的に阻害するか否かを決定するために、以下の結合アッセイを実施した。アッセイの 0 日目に、血清含有培地を P D - L 1 発現 B T 5 4 9 標的細胞培養物から採取して、D - P B S によって丁寧に 2 回すすいだ。細胞を採取して計数した。細胞浮遊液を遠心分離 (1 0 0 0 R P M 、 5 分間) して、細胞沈降物を細胞 5 0 , 0 0 0 個 / m l で培養培地に浮遊させた。手動でのマルチチャンネルピペットを使用して、細胞 (1 0 0 μ L / ウェル、すなわち、細胞 5 0 0 0 個 / ウェル) を平底マイクロプレートのあらゆるウェルに播種した。プレートを室温で 3 0 分間放置した。その後、細胞を含むプレートを、5 % C O ₂ インキュベータにおいて終夜インキュベートした。

40

【 0 1 8 3 】

50

アッセイの1日目に(すなわち翌朝)、 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ PD-1/Fcおよび1:400倍希釈のAlexa Fluor 488ヤギ抗ヒトIgGを含む培養培地を調製して、インキュベータ内で 37°C に加熱した。細胞プレートをインキュベータから取り出して、細胞層を傷つけないように注意して培地を吸引した。試験抗体 $50\mu\text{L}$ を、用量依存的に各ウェルに添加した。PD-1/FcおよびAlexa Fluor 488ヤギ抗ヒトIgGを含む培養培地 $50\mu\text{L}$ をあらゆるウェルに添加した。細胞プレートをIncucyte ZOOM(登録商標)機器の中に入れて、20分間平衡にして、初回スキャンを行った。24時間の自動繰り返しスキャンを1~2時間毎に24時間まで計画した。対物レンズ10倍;容器のタイプ:Corning 3596;スキャンモード:標準;スキャンパターン:ウェルあたり画像4個;チャンネル:フェーズ+「緑色」。異なる濃度の代表的なモノクローナル抗glycPD-L1抗体の結合を、対照(図6D)と比較して図6A~6Cに示す。図6Aは、STM004の結果を示し、図6Bは、STM073の結果を示し、図6Cは、STM108の結果を示す。PD-1への結合は、抗glycPD-L1抗体の濃度が増加すると減少し、抗glycPD-L1抗体が、PD-1へのPD-L1の結合を阻害することを証明した。

【0184】

[実施例6]

T細胞殺滅アッセイ

T細胞殺滅活性を利用して、抗glycPD-L1モノクローナル抗体が腫瘍細胞に及ぼす細胞傷害活性を決定した。従ったプロトコールは以下のとおりである;0日目、グリコシル化野生型PD-L1(PD-L1 WT)発現BT549 RFP標的細胞培養物から血清含有培地を除去して、PBSで丁寧に2回すすいだ。細胞を回収して計数した。細胞浮遊液を遠心分離(1000RPM 、4分間)して、細胞沈降物を培養培地に細胞 $50,000$ 個/ mL で浮遊させた。手動のマルチチャンネルピペットを使用して、細胞を平底マイクロプレートのあらゆるウェルに播種した($100\mu\text{L}$ /ウェル、すなわち、細胞 5000 個/ウェル)。プレートを室温で30分間放置した後、Incucyte ZOOM(登録商標)生細胞イメージング装置の中に入れて、20分間平衡にした後、初回スキャンを計画した。初回スキャンの開始直後から3時間ごとに、24時間の繰り返しスキャン(10倍対物レンズ)を計画した。細胞のコンフルエンスを、所望のコンフルエンス(例えば20%)が達成されるまで、続く18時間で(終夜)モニターした。

【0185】

翌朝、アッセイの日(すなわち、1日目)、Incucyte(商標)Caspase 3/7アポトーシス緑色蛍光検出試薬(Essen Bioscience 4440)の $10\mu\text{M}$ 溶液を、アッセイ培地(4x最終アッセイ濃度 $2.5\mu\text{M}$)中で調製して、インキュベータにおいて 37°C に加熱した。抗CD3抗体($100\text{ng}/\text{mL}$)+IL-2($10\text{ng}/\text{mL}$)T細胞活性化剤処置を、アッセイ培地中で4x最終アッセイ濃度で調製して、 37°C に加熱した。試験Mabも同様に調製した。標的細胞プレートをインキュベータから取り出して、細胞層を傷つけないように注意して培地を吸引した。マルチチャンネルピペットを使用して、加熱したカスパーゼ3/7溶液 $25\mu\text{L}$ を各ウェルに移した。その後、加熱した抗CD3抗体+IL-2 $25\mu\text{L}$ および抗体を、細胞プレートの適切なウェルの中に入れた。エフェクター細胞(PBMCまたは総T細胞)を含む追加の培地 $50\mu\text{L}$ を添加して、総アッセイ容積を $100\mu\text{L}$ にした。脱気した細胞プレートをIncucyte ZOOM(登録商標)機器の中に入れて、20分間平衡にして、初回スキャンを行った。24時間の繰り返しスキャンを2~3時間毎に5日まで計画した。(対物レンズ10倍;容器のタイプ:Corning 3596;スキャンモード:標準;スキャンパターン:ウェルあたり画像2個;チャンネル:フェーズ+「緑色」(+NucLight(商標)赤色標的細胞を使用する場合は+「赤色」)。

【0186】

分析に関して、標的細胞アポトーシスを、視野における「大きい」緑色蛍光オブジェクト(核)の総数を経時的に計数することによってIncucyte(商標)ソフトウェア

10

20

30

40

50

において定量した。標的細胞の増殖は、赤色細胞核の数に対応する、赤色オブジェクトの数から測定した。データは 1 mm^2 あたりの蛍光オブジェクト数として表記した。データは、試験した抗体の添加を通して腫瘍細胞殺滅が増強されたことを示した。図 7 A は、STM 0 0 4 の結果を示し、図 7 B は STM 0 7 3 の結果を示す。

【 0 1 8 7 】

[実施例 7]

抗 g l y c P D - L 1 抗体による P D - L 1 の結合は、P D - L 1 内在化および分解を促進する

抗 g l y I C P 抗体が、その同起源の I C P 結合分子への結合後に内在化および分解を促進するか否かを決定するために、細胞染色アッセイを実施した。本実施例において、使用した抗 g l y c I C P 抗体は、抗 P D - L 1 M A b S T M 1 0 8 であった。アッセイに関して、A 4 3 1 細胞を、無血清培地中で一晩インキュベートした後、抗 g l y c P D - L 1 抗体 $10 \mu\text{g}$ と共に 2 日間インキュベートした。次に、細胞を回収し、細胞中の P D - L 1 をウェスタンブロットによって評価した。細胞を抗 g l y c P D - L 1 M A b と共にインキュベートすると、対照 (I g G) と比較して細胞における P D - L 1 レベルの低減を示した。

【 0 1 8 8 】

S T M 1 0 8 M A b の細胞内在化を、p H r o d o (商標) レッド M i c r o s c a l e L a b e l i n g キット (T h e r m o F i s c h e r S c i e n t i f i c , R o c h e s t e r , N Y) を使用して、製造元の説明書に従って、p H r o d o (商標) レッド色素による抗体の標識によって可視化した。簡単に説明すると、細胞を 0 時間で播種し、播種後 2 4 時間で、細胞を標識 S T M 1 0 8 M A b s ($5 \mu\text{g} / \text{mL}$) と共にインキュベートした。1 時間後、細胞のイメージスキャンを、I n c u C y t e Z O O M (登録商標) 機器を使用して、予定される 2 4 時間で 1 時間ごとにスキャンを繰り返した ($10\times$)。対物レンズ：10 倍；容器タイプ：C o r n i n g 3 5 6 4 0 7；スキャンモード：標準；スキャンパターン；ウェルあたり 3 画像；チャンネル：フェーズ + 「レッド」。

【 0 1 8 9 】

図 8 A ~ 8 C は、B T 5 4 9 - P D - L 1 細胞上で発現する P D - L 1 への抗 g l y c P D - L 1 M A b S T M 1 0 8 の結合後の生細胞イメージング分析を介した P D - L 1 内在化および分解の例を提供する。図 8 A ~ 8 C において、S T M 1 0 8 は、上述のとおり、p H r o d o (商標) レッド M i c r o s c a l e L a b e l i n g キット (T h e r m o F i s c h e r S c i e n t i f i c , R o c h e s t e r , N Y) を使用して、赤色蛍光色素 p H r o d o (商標) レッド (スクシンイミジルエステル (p H r o d o (商標) レッド、S E) にコンジュゲートされる。緑色染色は、生細胞イメージングを介して撮像した生細胞において酸性区画 (リソソーム) を染色する細胞透過性緑色色素である L y s o T r a c k e r (登録商標) グリーン D N D - 2 6 によって染色された細胞を反映する。図 8 A は、最初の時点 (時間 0) で、矢印で示される細胞の強い赤色の細胞内染色によって観察されるように、S T M 1 0 8 抗体が細胞に内在化されることを示している。図 8 B は、図 8 A における時間 0 の 2 分後の時点での、図 8 A に示した同じ細胞における弱められた細胞内赤色染色を示す。図 8 C は、図 8 A における時間 0 の 4 分後の赤色細胞内染色の欠如を示し、細胞内の S T M 1 0 8 抗体および / または抗体 - 抗原複合体が分解したことを反映する。これらの画像は、抗 g l y c I C P 抗体、すなわち S T M 1 0 8 M A b などの抗 g l y c P D - L 1 抗体が細胞表面上に発現する P D - L 1 への結合後に P D - L 1 の内在化および分解を行うことを反映している。

【 0 1 9 0 】

[実施例 8]

総 T 細胞と比較した腫瘍細胞における抗 g l y c P D - L 1 抗体が結合した P D - L 1 の内在化

抗 g l y c P D - L 1 抗体を、活性化または非活性化 T 細胞と比較して細胞表面発現 P

10

20

30

40

50

D - L 1 の結合後に P D - L 1 陽性腫瘍細胞に内在化する能力について試験した。抗 g l y c P D - L 1 抗体 S T M 0 0 4、S T M 0 7 3、および S T M 1 0 8 および対照としてのマウス I g G を、末梢血からの非活性化総 T 細胞、末梢血からの活性化総 T 細胞、および P D - L 1 を発現する N C I - H 2 2 6 細胞と共にインキュベートした。T 細胞の活性化に関して、総 T 細胞をビーズ、例えば抗 C D 3 および抗 C D 2 8 抗体（例えば、T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c , R o c h e s t e r , N Y）に 1 : 1 で共有結合によりカップリングさせた不活性化超常磁性ビーズと混合して、抗原提示細胞による刺激を模倣するように T 細胞を刺激した（例えば、A. Trickett et al., 2003, J. Immunol. Methods, 275, Issues 1-2:251-255 を参照されたい）。全ての抗体を、p H r o d o（商標）レッドによって標識し、内在化を上記のように可視化した。図 9 A ~ 9 D および図 9 E ~ 9 H は、試験したいずれの抗体も非活性化総 T 細胞または活性化総 T 細胞に内在化されなかったことを示す。図 9 I ~ 9 L は、S T M 0 7 3 および S T M 1 0 8 M A b が、赤色の細胞内染色を示さなかった標識対照抗体 m I g G（図 9 I）および標識非内在化 S T M 0 0 4 M A b（図 9 J）と比較して、赤色の細胞内染色によって証明されるように、これらの細胞とのインキュベーション後に N C I - H 2 2 6 細胞に内在化されたことを示している。本実施例は、抗 g l y c P D - L 1 抗体 S T M 0 7 3 および S T M 1 0 8 が、P D - L 1 発現腫瘍細胞に選択的に内在化されるが、活性化または非活性化 T 細胞のいずれにも内在化されない抗 g l y c I C P 抗体の例であることを証明している。

10

【 0 1 9 1 】

[実施例 9]

20

腫瘍細胞殺滅および腫瘍体積の低減における P D - L 1 A D C の有効性

腫瘍の殺滅および腫瘍体積の低減における細胞毒素 M M A E にカップリングさせた抗ヒト I C P 抗体、特に抗ヒト g l y c P D - L 1 M A b、すなわち S T M 1 0 8 M A b を含む A D C の有効性を評価するために、in vitro および in vivo 実験の両方を実施した。S T M 1 0 8 - A D C は、M M A E 細胞毒素ペイロードを P D - L 1 発現腫瘍細胞またはがん細胞に特異的に送達するために、本明細書において上記のようにシステインを介して M C - v c - P A B - M M A E に化学的に連結した S T M 1 0 8 M A b を含む。S T M 1 0 8 - A D C（S T M 1 0 8 - M C - v c - P A B - M M A E）の測定された物理特性は、以下の通りである。

30

【 0 1 9 2 】

【 表 6 】

ADC の A_{248nm}	2.548
ADC の A_{280nm}	3.635
比 A_{248nm}/A_{280nm}	0.70
薬物抗体比	4.13

40

【 0 1 9 3 】

本実施例に関連して、図 1 0 A ~ 1 0 D は、対照（I g G および S T M 1 0 8 M A b 単独）と比較して、腫瘍移植マウスにおける P D - L 1 発現および非 P D - L 1 発現腫瘍細胞の殺滅ならびに腫瘍体積の低減における、S T M 1 0 8 - A D C の有効性を評価するために実施した実験の結果を表す。図 1 0 A は、異なる濃度の S T M 1 0 8 - A D C、すなわち「A D C 1 0 8」（塗りつぶした黒四角）に曝露後の P D - L 1 のその発現をノックアウトするように改変された M B 2 3 1 細胞（「M B 2 3 1 P D L 1 K O」）の % 生存率と比較した、異なる濃度（n M）の S T M 1 0 8 - A D C（塗りつぶした黒丸）に曝露後の P D - L 1 発現 M D A - M B 2 3 1（ヒト乳癌細胞株）腫瘍細胞（「M B 2 3 1」）の % 生存率を示す。観察されるように、その表面に P D - L 1 を発現しない M B 2 3 1 細胞の生存率は、最高濃度においても S T M 1 0 8 - A D C によって有意に影響を受け

50

なかったが、PD-L1発現MB231細胞の生存率は、特に1nM~100nMまでのSTM108-ADC濃度で有意に低減された。図10Bでは、MDA-MB231マウス乳がんモデルを使用し、このモデルでは、MB231細胞に由来する腫瘍を移植した動物を、IgG-MMAE対照(100 μ g)、STM108-ADCの50 μ g、100 μ g、もしくは150 μ g、またはSTM108 MA b単独(100 μ g)のいずれかによって処置した。結果は、IgG-MMAE対照によって処置した動物と比較して、腫瘍体積が、全ての用量レベルのSTM108-ADC、ならびにある程度、STM108 MA b(100 μ g)によって処置した腫瘍を有する動物において有効に減少されることを証明した。加えて、約18日までに、STM108-ADC(100 μ g)によって処置した動物5匹中3匹(3/5)およびSTM108-ADC(150 μ g)によって処置した動物5匹中4匹(4/5)において、完全寛解(「CR」)が意外にも見出された。

10

【0194】

図10Cは、異なる濃度のSTM108-ADC、すなわち「ADC108」(白抜きの赤い四角)に曝露後のPD-L1を本来発現しない4T1細胞(「4T1」)の%生存率と比較して、異なる濃度(nM)のSTM108-ADC(白抜きの赤い丸)に曝露後の細胞表面上にPD-L1を発現するように改変された4T1乳癌細胞(「4T1 hPD L1」)の%生存率を示す。観察されるように、その表面上にPD-L1を発現しない4T1細胞の生存率は、最高濃度であってもSTM108-ADCによって有意に影響を受けなかったが、PD-L1発現4T1細胞の生存率は、10nM超~100nMのSTM108-ADC濃度で低減された。

20

【0195】

4T1同系マウス乳がんモデルを使用し、このモデルにおいて、動物(Balb/cマウス)に、細胞表面上にPD-L1を発現するように改変されている4T1乳癌細胞に由来する腫瘍を移植したか、または細胞表面上にPD-L1を本来発現しない非トランスフェクト4T1乳癌細胞(「4T1」)に由来する腫瘍を移植した。BALB/cマウス(6~8週齢、雌性; Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine, USA)を使用する手順は全て、MD Andersonの施設内動物飼育および使用に関する委員会(Institutional Animal Care and Use Committee)によって承認された指針に従って実施した。マウスを各群における平均腫瘍体積に従って群分けした。4T1細胞(Matrix gel 基底膜基質[BD Biosciences, San Jose, CA, USA]25 μ Lと混合した培地25 μ L中に細胞 1×10^5 個)を乳房脂肪体に注射した。IgG-MMAE対照(100 μ g)、STM108 MA b(100 μ g)、またはSTM108-ADC(150 μ g)を、マウスの腫瘍細胞接種後3、5、7、9、11、および13日目に腹腔内注射した。腫瘍をキャリパーによって3日毎に測定し、腫瘍体積を以下の式： $\frac{1}{6} \times \text{長さ} \times \text{幅}^2$ を使用して計算した。

30

【0196】

図10Dに観察されるように、細胞表面PD-L1発現をほとんどまたは全く有しない4T1由来腫瘍を有する動物(白抜きの丸/破線)において、結果は、腫瘍体積が全ての処置タイプ、すなわちIgG-MMAE対照、STM108 MA b、またはSTM108-ADCについて時間と共に増加することを示した。PD-L1発現4T1細胞に由来する腫瘍を有し、IgG-MMAE対照によって処置した動物では、処置動物における腫瘍体積も同様に時間と共に増加した(塗りつぶした黒丸)。これに対し、PD-L1発現4T1細胞に由来する腫瘍を有し、STM108 MA b(塗りつぶした青色の丸)またはSTM108-ADC(塗りつぶした赤色の丸)のいずれかによって処置した動物では、腫瘍体積は有効に減少した。加えて、約21日までに、STM108-ADCによって処置した動物7匹中5匹(5/7)では完全寛解(「CR」)が起こることが意外にも見出された。

40

【0197】

50

がん、例えば2つのタイプの乳房腫瘍を処置するための、抗glycICP抗体、例えばSTM108などの、本明細書において上記の抗glycPD-L1 Mabを含むADCの使用に関連する有益で有効な抗新生物および治療態様は、抗glycPD-L1 Mab ADCによって処置されている動物における処置後25日以内、例えば約15~23日での腫瘍体積の有意な低減および腫瘍の完全寛解を示すin vivo結果によって強調されている。

【0198】

本明細書において開示され特許請求される方法の全ては、本開示に照らして不当な実験を行うことなく、作製および実行することができる。組成物および方法は、好ましい実施形態に関して記述してきたが、その概念、精神および範囲から逸脱することなく、本明細書において記述される方法およびステップに、または方法のステップの順序に変更を適用してもよいことは、当業者に明白である。より具体的に、化学的および物理的に関連する特定の薬剤を、本明細書において記述される薬剤の代わりに置換してもよく、それでも同じまたは類似の結果が得られることは明白である。当業者に明白であるそのような全ての類似の置換および改変は、添付の特許請求の範囲によって定義される記述の実施形態の精神、範囲、および概念に含まれると考えられる。

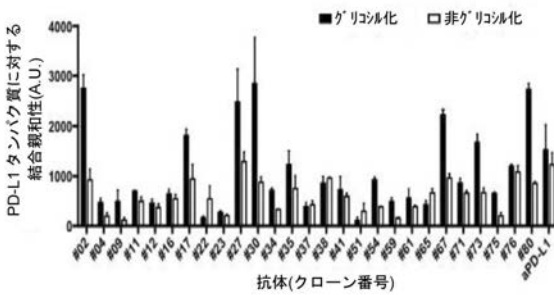
【0199】

本明細書において引用した全ての特許、刊行された特許出願、およびその他の刊行物は、参照により全体が本出願に組み込まれる。

10

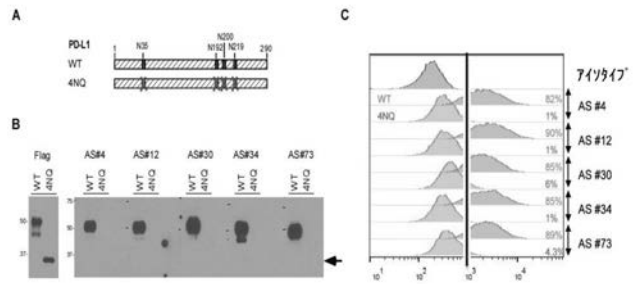
【図1】

図1



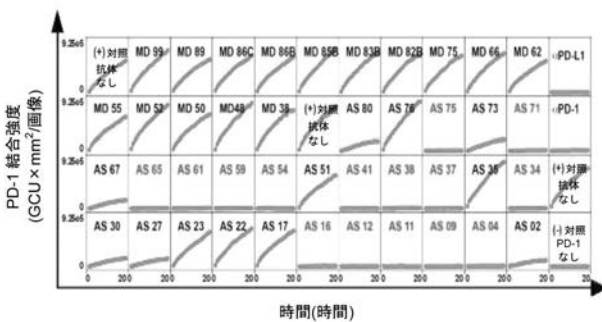
【図3】

図3A~3C



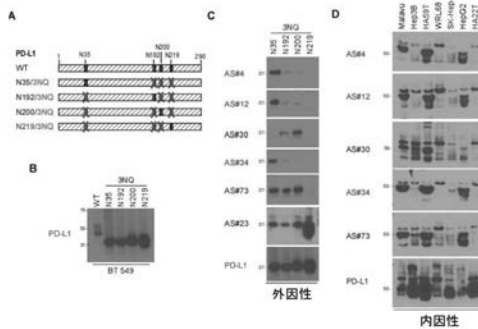
【図2】

図2



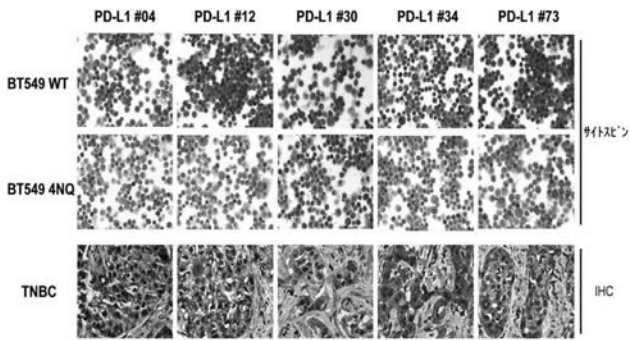
【図4】

図4A~4D



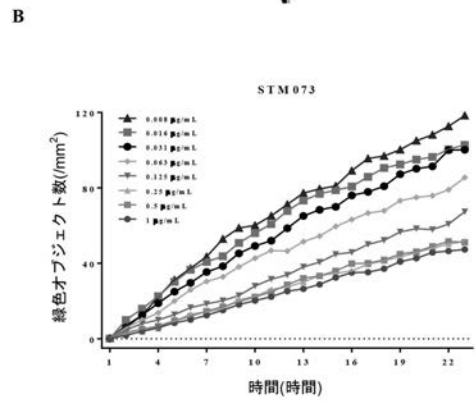
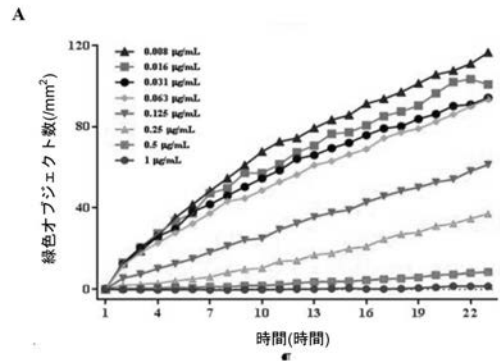
【 図 5 】

図 5



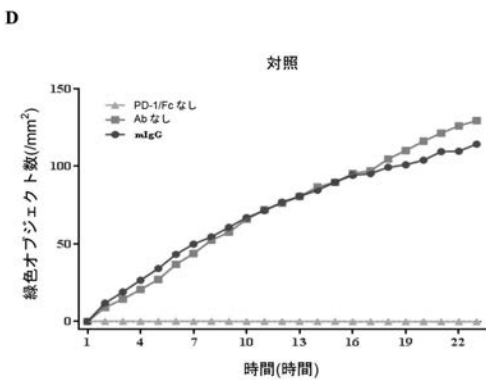
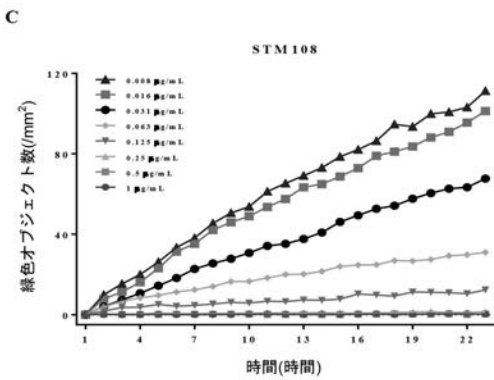
【 図 6 - 1 】

図 6A~6D



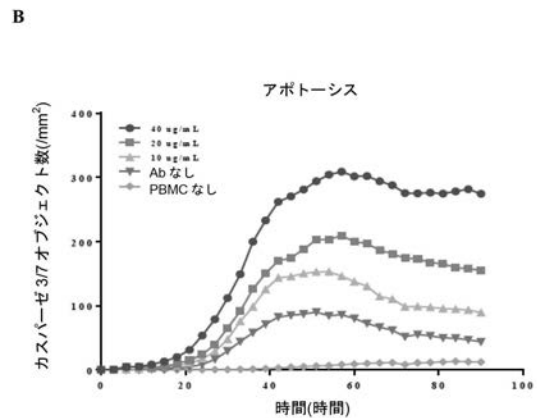
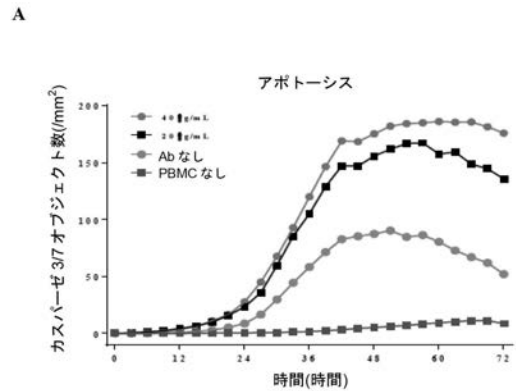
【 図 6 - 2 】

図 6A~6D (続き)



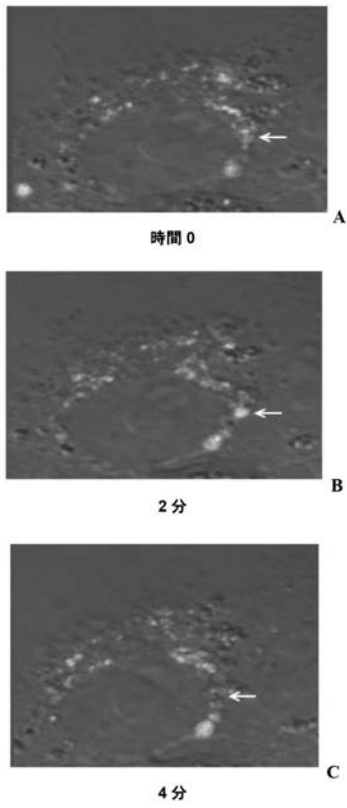
【 図 7 】

図 7A および 7B



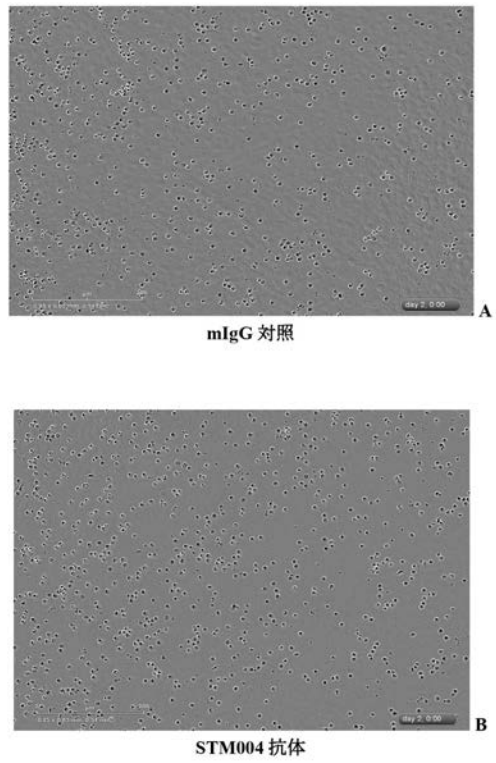
【 図 8 】

図 8A~8C



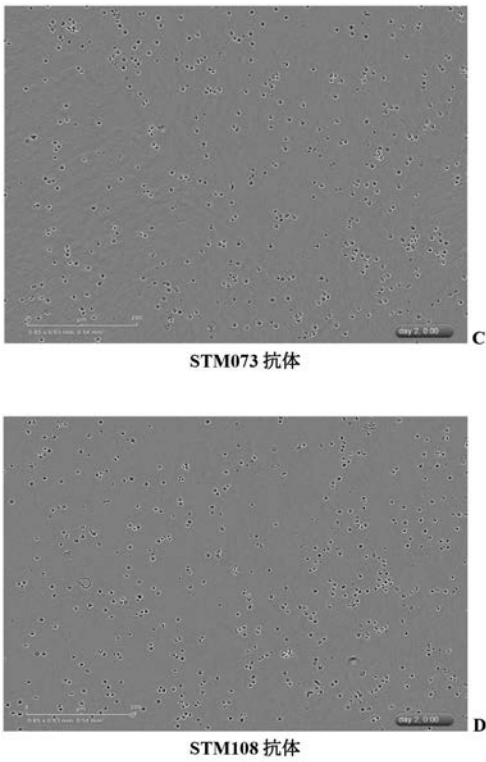
【 図 9 - 1 】

図 9A~9L



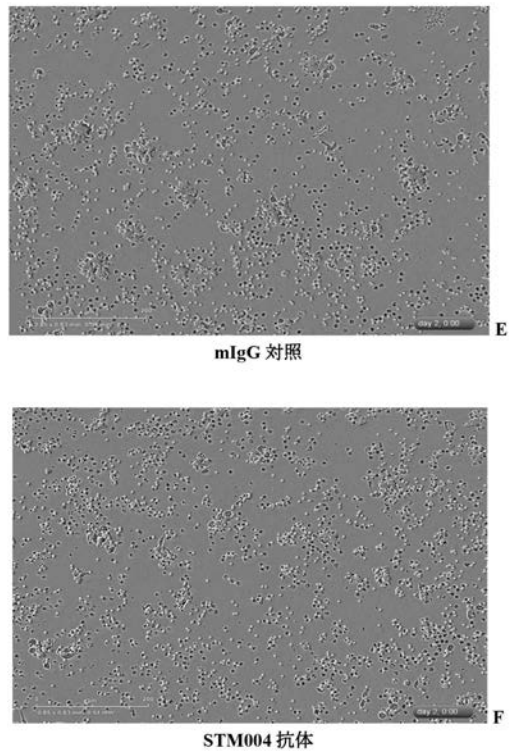
【 図 9 - 2 】

図 9A~9L (続き)



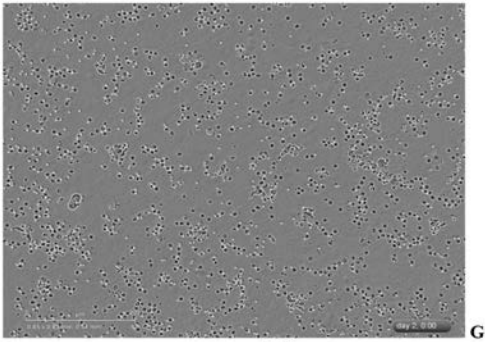
【 図 9 - 3 】

図 9A~9L (続き)

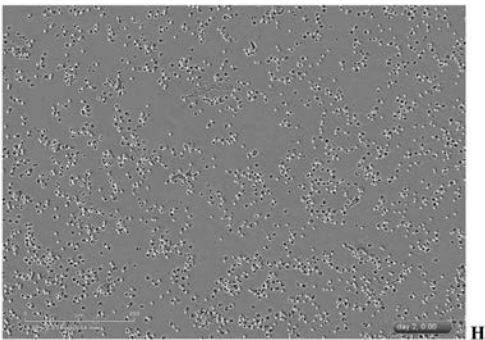


【 図 9 - 4 】

図 9A~9L (続き)



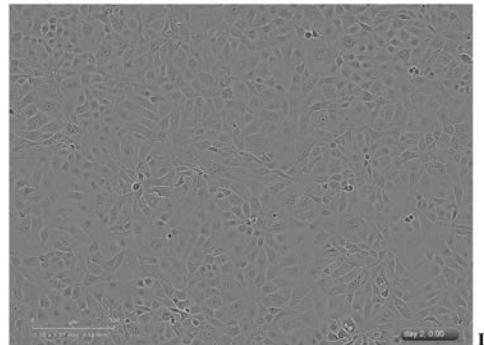
STM073 抗体



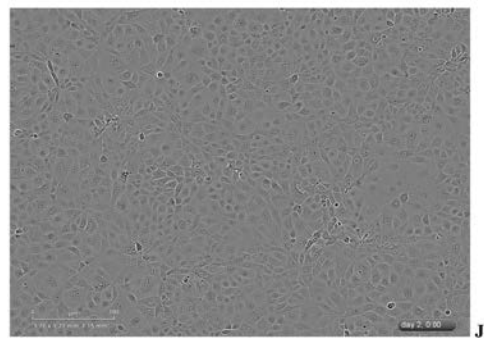
STM108 抗体

【 図 9 - 5 】

図 9A~9L (続き)



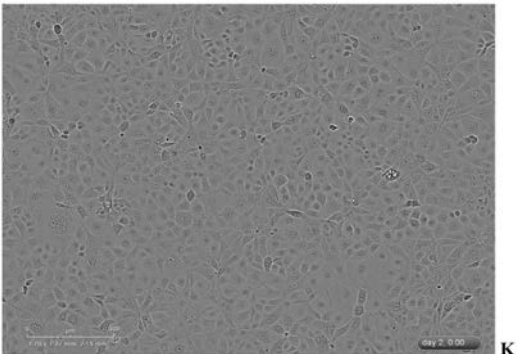
mIgG 対照



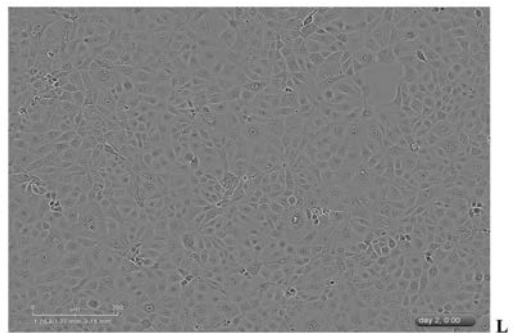
STM004 抗体

【 図 9 - 6 】

図 9A~9L (続き)



STM073 抗体



STM108 抗体

【 図 10 - 1 】

図 10A

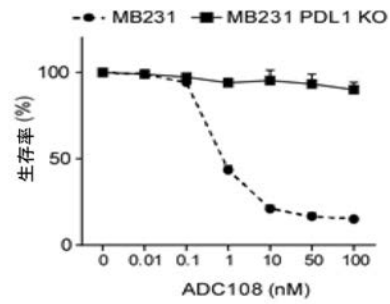
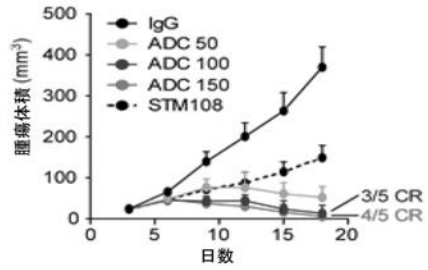
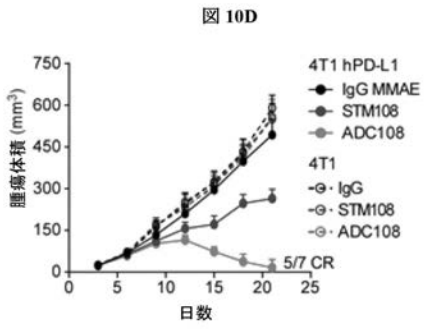
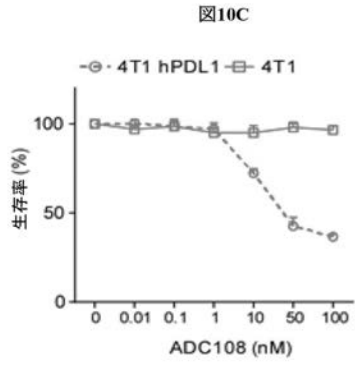


図 10B



【 図 10 - 2 】



【 配列表 】

2019518068000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2017/024024**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

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

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

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

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

see additional sheet

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

1-39

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2017/024024

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/00 C07K16/28 C07K16/30 G01N33/563 A61K47/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2006/004988 A2 (MAYO FOUNDATION [US]; PEASE LARRY R [US]; RADHAKRISHNAN SURESH [US]; V) 12 January 2006 (2006-01-12) examples 5, 7, 14 -----	1-39
A	WARRINGTON ARTHUR E ET AL: "Neuron-binding human monoclonal antibodies support central nervous system neurite extension", JOURNAL OF NEUROPATHOLOGY AND EXPERIMENTAL NEUROL, LIPPINCOTT WILLIAMS AND WILKINS, NEW YORK, NY, vol. 63, no. 5, 1 May 2004 (2004-05-01), pages 461-473, XP009165099, ISSN: 0022-3069, DOI: 10.1093/JNEN/63.5.461 page 467, right-hand column, paragraph 2-3 figure 5I ----- -/-	1-39
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 29 May 2017		Date of mailing of the international search report 10/08/2017
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Brouns, Gaby

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2017/024024

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	A J HAMILTON ET AL: "A 34-to 38-Kilodalton Cryptococcus neoformans Glycoprotein Produced as an Exoantigen Bearing a Glycosylated Species-Specific Epitope", INFECTION AND IMMUNITY, vol. 60, no. 1, 1 January 1992 (1992-01-01), pages 143-149, XP055375853, page 146, right-hand column figure 4 -----	1-39
X	ANTJE DANIELCZYK ET AL: "PankoMab: a potent new generation anti-tumour MUC1 antibody", CANCER IMMUNOLOGY, IMMUNOTHERAPY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 55, no. 11, 17 February 2006 (2006-02-17), pages 1337-1347, XP019422497, ISSN: 1432-0851, DOI: 10.1007/S00262-006-0135-9 page 1338, right-hand column, paragraph 2 -----	1-39
X	HERTZOG P J ET AL: "Oncofetal expression of the human intestinal mucin glycoprotein antigens in gastrointestinal epithelium defined by monoclonal antibodies.", INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER 30 MAY 1991, vol. 48, no. 3, 30 May 1991 (1991-05-30), pages 355-363, XP002770552, ISSN: 0020-7136 page 359, left-hand column, paragraph 2 -----	1-39
X	DATABASE MEDLINE [Online] US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; November 2011 (2011-11), ZHOU YING ET AL: "[Preparation and characterization of three novel monoclonal antibodies against human PD-L1].", XP002770553, Database accession no. NLM22078450 abstract & ZHOU YING ET AL: "[Preparation and characterization of three novel monoclonal antibodies against human PD-L1].", XI BAO YU FEN ZI MIAN YI XUE ZA ZHI = CHINESE JOURNAL OF CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY NOV 2011, vol. 27, no. 11, November 2011 (2011-11), pages 1208-1211, ISSN: 1007-8738 ----- -/--	1-39

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2017/024024

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DEL RIO MARIA-LUISA ET AL: "Antibody-mediated signaling through PD-1 costimulates T cells and enhances CD28-dependent proliferation", EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY,, vol. 35, no. 12, 1 December 2005 (2005-12-01), pages 3545-3560, XP002497526, ISSN: 0014-2980, DOI: 10.1002/EJI.200535232 page 3557, last paragraph - page 3558, paragraph 2 figure 1b	1-39
A	WO 2015/061668 A1 (DANA FARBER CANCER INST INC [US]) 30 April 2015 (2015-04-30) example 1 figures 1, 4, 5	1-18, 29-35,39
A	K. M. MAHONEY ET AL: "PD-L1 Antibodies to Its Cytoplasmic Domain Most Clearly Delineate Cell Membranes in Immunohistochemical Staining of Tumor Cells", CANCER IMMUNOLOGY RESEARCH, vol. 3, no. 12, 1 December 2015 (2015-12-01), pages 1308-1315, XP055367211, US ISSN: 2326-6066, DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0116 page 1309, right-hand column, paragraphs 2, 3 figures 1, 2	1-18, 29-35,39
A	KIM J W ET AL: "Prospects for Targeting PD-1 and PD-L1 in Various Tumor Types", ONCOLOGY (NORWALK), vol. 28, no. Suppl. 3, 10 November 2014 (2014-11-10), pages 15-28, XP055199598, us ISSN: 0890-9091	1-39
X,P	WO 2016/160792 A1 (STCUBE & CO INC [KR]; BOARD OF REGENTS THE UNIV OF TEXAS SYSTEM [US]) 6 October 2016 (2016-10-06) examples 5, 9	1-4,11, 12, 16-18, 30,33,34
	----- -/--	

2

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2017/024024

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	CHIA-WEI LI ET AL: "Glycosylation and stabilization of programmed death ligand-1 suppresses T-cell activity", NATURE COMMUNICATIONS, vol. 7, 30 August 2016 (2016-08-30), page 12632, XP055371693, DOI: 10.1038/ncomms12632 -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2017/024024

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 2006004988	A2	12-01-2006	CA 2572098 A1	12-01-2006
			EP 1768999 A2	04-04-2007
			EP 2481750 A1	01-08-2012
			ES 2427147 T3	29-10-2013
			JP 5902367 B2	13-04-2016
			JP 2008505639 A	28-02-2008
			JP 2012080887 A	26-04-2012
			JP 2016128429 A	14-07-2016
			WO 2006004988 A2	12-01-2006
			WO 2015061668	A1
CA 2926856 A1	30-04-2015			
EP 3060581 A1	31-08-2016			
US 2016272712 A1	22-09-2016			
WO 2015061668 A1	30-04-2015			
WO 2016160792	A1	06-10-2016	NONE	

International Application No. PCT/ US2017/ 024024

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-39

Subject-matter relating to a method of identifying and isolating an antibody that preferentially binds a glycosylated ICP.

2. claims: 41(completely); 40, 43-65(partially)

Subject-matter relating to an anti-glycosylated PD-L1 antibody.

3. claims: 42(completely); 40, 43-65(partially)

Subject-matter relating to an anti-glycosylated PD-1 antibody.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 5/062 (2006.01)	C 0 7 K 5/062	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 49/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
C 4 0 B 40/10 (2006.01)	C 4 0 B 40/10	

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

(特許庁注: 以下のものは登録商標)

1 . T R I T O N

(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

(74)代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

(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 フン , ミン - チェ

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

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA20 CC24 DA01 DA05

4C085 AA14 AA16 AA19 BB11 BB33 BB34 BB35 BB36 BB37 BB41

BB43 CC03 CC05 CC22 CC23 DD62 DD63 DD88 EE01 GG02

GG03 GG04 GG05 GG06 HH11 KA04 KA05 KA27 LL18

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 CA50 DA76 DA83 EA22 EA28

FA74

专利名称(译)	选择特异性结合糖基化免疫检查点蛋白的抗体的方法		
公开(公告)号	JP2019518068A	公开(公告)日	2019-06-27
申请号	JP2019503385	申请日	2017-03-24
申请(专利权)人(译)	Rijientsu董事会, 德州系统的通用名称		
[标]发明人	ユステファン エス フンミンチエ		
发明人	ユ,ステファン エス. フン,ミン-チエ		
IPC分类号	C07K16/30 C07K16/28 C07K16/46 C12N15/13 C12P21/08 C07K19/00 C07K5/062 A61P35/00 A61K39/395 A61K49/00 G01N33/53 C40B40/10		
CPC分类号	A61K47/6849 A01K67/0278 A01K2217/206 A01K2227/105 A01K2267/0331 A61K47/6803 A61K47/6855 C07K16/00 C07K16/2827 C07K16/3015 C07K2317/30 C07K2317/73 C07K2317/76 C07K2317/77 C07K2317/92 C12N15/1037 G01N33/563		
FI分类号	C07K16/30.ZNA C07K16/28 C07K16/46 C12N15/13 C12P21/08 C07K19/00 C07K5/062 A61P35/00 A61K39/395.N A61K49/00 G01N33/53.D C40B40/10		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA05 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/AA19 4C085/BB11 4C085/BB33 4C085/BB34 4C085/BB35 4C085/BB36 4C085/BB37 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/CC03 4C085/CC05 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/DD88 4C085/EE01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG05 4C085/GG06 4C085/HH11 4C085/KA04 4C085/KA05 4C085/KA27 4C085/LL18 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/CA50 4H045/DA76 4H045/DA83 4H045/EA22 4H045/EA28 4H045/FA74		
代理人(译)	小林 浩 日野麻美 丸山智 铃木康仁		
优先权	62/314940 2016-03-29 US 62/361298 2016-07-12 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了产生和筛选与非糖基化免疫检查点蛋白 (ICP) 相比特异性结合糖基化ICP的抗体的方法。 此类抗体可以识别糖基化ICP上的特定表位, 并防止或阻止糖基化ICP与其配体的结合, 例如另一种ICP, 即人PD-L1 / PD-1相互作用。 例如, 可以抑制两种蛋白质之间的相互作用, 这可能导致免疫抑制。 作为一个具体实例, 生成分别与PD-L1或PD-1特异性结合并抑制PD-L1 / PD-1相互作用的抗糖基化PD-L1或抗糖基化PD-1抗体。 为了提供人PD-L1和PD-1多肽, 在其细胞外结构域中包含糖基化的氨基酸残基。 通过这种方法产生和选择的抗体特别可用作癌症治疗剂, 以干扰, 阻断或中和ICP系统及其特异性ICP相互作用。

